

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.07.19

青海玉树地区藏族与汉族儿童外周血淋巴细胞亚群参考区间的建立及对比分析*

范亚莉,洪军,殷青宁,周林平,巨巧云,马绍青,王积川(青海省妇女儿童医院急诊科,西宁 810007)

摘要:目的 建立青海玉树地区藏族和汉族健康儿童的外周血淋巴细胞亚群参考区间。方法 收集 755 例藏族和 174 例汉族健康儿童静脉血标本,采用四色免疫荧光抗体标记后通过流式细胞术进行淋巴细胞亚群检测,采用百分位数法建立各指标的参考区间,并与同区域成年人及其他地区人群的参考区间进行比较。结果 藏族儿童淋巴细胞亚群的参考区间分别为 CD3⁺T:55~83,CD4⁺T:22~45,CD8⁺T:20~46,CD4⁺/CD8⁺:0.53~1.92,B:6~23,NK:4~29;汉族儿童淋巴细胞亚群的参考区间分别为 CD3⁺T:51~84,CD4⁺T:19~54,CD8⁺T:12~40,CD4⁺/CD8⁺:0.67~2.53,B:6~27,NK:4~28。不同年龄之间比较结果表明,藏族学龄前组和少年组之间 B 和 NK 细胞差异有统计学意义(Z 分别为-9.692 和-5.475, P 均 <0.01),汉族学龄前组和少年组 CD8⁺T、B 细胞和 CD4⁺/CD8⁺ 间差异亦有统计学意义(Z 分别为-3.547、-3.092 和-4.918, P 均 <0.01);不同民族之间比较结果表明,藏、汉族儿童 CD4⁺T、CD8⁺T 和 CD4⁺/CD8⁺ 之间差异均有统计学意义(Z 分别为-3.114、-4.840 和-4.582, P 均 <0.01);不同性别之间比较结果表明,藏族儿童男、女之间各指标差异均有统计学意义(P 均 <0.05);本研究中各指标参考区间与同区域藏族成年人及其他区域健康儿童各指标间的差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。结论 淋巴细胞亚群在青海玉树地区不同性别、不同年龄和不同民族儿童间的分布存在差异,建立高海拔地区健康儿童淋巴细胞亚群的参考区间十分必要。

关键词:青海;高海拔;淋巴细胞亚群;参考区间

中图分类号:R446.6

文献标志码:A

外周血淋巴细胞亚群已成为评价人类免疫系统状态的重要指标^[1],许多疾病如感染、自身免疫性疾病和血液系统肿瘤的发生均与淋巴细胞亚群有关,因此,建立健康人群外周血淋巴细胞亚群的参考区间尤其重要。研究表明,淋巴细胞亚群的参考区间受年龄、性别、民族和区域等因素影响^[2];另有学者发现,高原低氧环境可影响机体的免疫调节功能^[3]。然而,国内文献报道的研究对象多集中于成年人,其年龄范围相对狭窄。目前针对我国高海拔地区(>3 000 m)藏族健康儿童的免疫状态评估尚未见报道。因此,本研究拟检测青海玉树地区 755 例藏族和 174 例汉族健康儿童淋巴细胞亚群的分布情况,并比较不同民族、不同性别和不同年龄之间的差异,以期为临床诊疗提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象 收集 2018 年 12 月至 2019 年 12 月青海省妇女儿童医院体检中心进行健康体检且世居在海拔>3 000 m 的青海玉树地区的藏族儿童 755 例及汉族儿童 174 例,其中,藏族儿童中男 458 例,女 297 例,年龄(8.0±3.4)岁,学龄前组(3~6 岁)439 例,少年组(7~14 岁)316 例;汉族儿童中男 81 例,女 93 例,年龄(8.6±3.0)岁,学龄前组(3~6 岁)

76 例,少年组(7~14 岁)98 例,两组性别和年龄差异无统计学意义。纳入及排除标准:(1)外周血细胞计数、肝肾功能、X 线检查无异常;(2)无心、脑血管疾病;(3)无先天性免疫缺陷性疾病和自身免疫性疾病;(4)无 3 周内发生感染性疾病及急性时相反应;(5)无 HBV、HCB、HIV 和梅毒等慢性感染性疾病;(6)近期末使用过影响免疫系统的药物。选取同期于青海省妇女儿童医院体检中心就诊且世居玉树地区的 50 例藏族健康成年人(19~60 岁),男 25 例,女 25 例,年龄(38±2.5)岁。本研究经青海省妇女儿童医院医学伦理学委员会批准(批准文号:2017 院伦审研第 1 号),健康成年人及患儿家属均知情同意。

1.2 主要仪器与试剂 FACS canto II 型流式细胞仪、淋巴细胞亚群检测试剂盒(MultiTest™ IMK Kit,货号 340503)、相同荧光素标记的鼠抗同型对照 IgG2a 和溶血素(货号 349202)、四色荧光校准微球均购自美国 BD 公司。

1.3 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群 无菌采集各研究对象清晨空腹静脉血 2 mL,EDTA-K₂ 抗凝,室温静置 30 min。充分混匀后取 50 μL 抗凝血分别加入 3 个流式管(2 管样品管,1 管同型对照)中,其中样品管 1 中加入 CD4FITC/CD8PE/

* 基金项目:青海省科技计划项目(2017-ZJ-759)。

作者简介:范亚莉,1963 年生,女,主任医师,大学本科,主要从事小儿免疫机制研究。

通信作者:周林平,主管技师,E-mail:sfeyfy1678@163.com。

CD45percp/CD3APC 组合抗体 20 μL, 管 2 中加入 CD3FITC/CD16⁺ 56PE/CD45percp/CD19APC 组合抗体 20 μL, 同型对照管中加入相同荧光素标记的鼠抗同型对照 IgG₂a 20 μL, 充分混匀, 室温避光温育 20 min, 每管中加入 1 000 μL 溶血素, 混匀后室温避光静置 20 min; 加入 2 000 μL PBS, 377×g 离心 5 min; 弃上清, 加入 500 μL PBS 重悬混匀后, 2 h 内上机使用 MuhiSET 自动分析软件自动获取淋巴细胞亚群相对计数结果, 结果符合公式: T%+B%+NK%±5% 和 Th%+Ts%=T%±5% 即为可信。每次样品检测前使用专用四色荧光校准微球进行仪器校准, 以保证检测结果的可靠性。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 23.0 软件进行分析, 计量资料不符合正态分布, 以中位数(四分位数) [M(P₂₅, P₇₅)] 表示, 以 (P_{2.5}, P_{97.5}) 计算 95% 参考值区间。两组间比较采用 Wilxon 秩和检验, 以 P <

0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同年龄儿童之间淋巴细胞亚群检测结果比较 藏族健康儿童学龄前组和少年组之间比较, CD3⁺T、CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值差异无统计学意义 (P>0.05), 而 B 和 NK 细胞差异有统计学意义 (P<0.05); 汉族健康儿童学龄前组和少年组之间比较, CD3⁺T、CD4⁺T 和 NK 细胞差异无统计学意义 (P>0.05), 但 CD8⁺T、B 细胞和 CD4⁺/CD8⁺ 之间差异有统计学意义 (P<0.05)。藏族和汉族健康儿童总计之间比较结果表明, CD4⁺T、CD8⁺T 细胞和 CD4⁺/CD8⁺ 差异有统计学意义 (Z 分别为 -3.114、-4.840 和 -4.582, P 均 < 0.01), 但 CD3⁺T、B 和 NK 细胞之间差异无统计学意义 (Z 分别为 -0.198、-0.996 和 -4.453, P 均 > 0.05)。见表 1。

表 1 不同民族儿童外周血淋巴细胞亚群检测结果 [M(P₂₅, P₇₅)]

指标	藏族			Z	P	汉族			Z	P
	学龄前	少年组	总计			学龄前	少年组	总计		
CD3 ⁺ T	70(54, 81)	70(55, 85)	70(55, 83)	-0.382	0.702	66(52, 84)	71(54, 83)	70(51, 84)	-2.272	0.023
CD4 ⁺ T	32(22, 43)	32(22, 46)	32(22, 45)	-0.442	0.659	70(18, 54)	36(19, 47)	33(19, 54) ^c	-1.520	0.129
CD8 ⁺ T	30(19, 43)	31(21, 49)	30(20, 46)	-0.415	0.678	23(17, 38)	29(19, 40) ^b	28(12, 40) ^c	-3.547	0.000
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.06(0.53, 1.94)	1.07(0.52, 1.92)	1.06(0.53, 1.92)	-0.107	0.915	1.51(0.73, 2.53)	1.14(0.67, 2.01) ^b	1.16(0.67, 2.53) ^c	-3.092	0.002
B	13(6, 24)	11(5, 18) ^a	12(6, 23)	-9.692	0.000	17(7, 27)	11(7, 22) ^b	11(6, 27)	-4.918	0.000
NK	11(4, 27)	14(4, 30) ^a	12(4, 29)	-5.475	0.000	12(5, 28)	13(5, 28)	13(4, 28)	-1.317	0.188

注: 藏族少年组与学龄前组比较, a, P<0.05; 汉族少年组与学龄前组比较, b, P<0.05; 汉族总计和藏族总计比较, c, P<0.05。

2.2 同民族不同性别儿童之间淋巴细胞亚群检测结果比较 藏族健康儿童男性和女性之间比较, 各检测项目差异均有统计学意义 (P<0.05), 而汉族健

康儿童男性和女性之间比较, 各检测项目差异均无统计学意义 (P>0.05)。见表 2。

表 2 同民族不同性别儿童之间外周血淋巴细胞亚群结果 [M(P₂₅, P₇₅)]

指标	藏族		Z	P	汉族		Z	P
	男性	女性			男性	女性		
CD3 ⁺ T	70(53, 83)	70(52, 82)	-2.233	0.026	71(56, 85)	70(51, 83)	-0.370	0.712
CD4 ⁺ T	31(21, 44)	33(23, 45)	-5.306	0.000	33(22, 66)	34(18, 48)	-0.416	0.678
CD8 ⁺ T	30(20, 47)	30(18, 42)	-2.106	0.035	28(10, 43)	28(16, 40)	-0.279	0.780
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.04(0.51, 1.92)	1.11(0.61, 2.01)	-4.828	0.000	1.14(0.67, 2.80)	1.22(0.67, 2.52)	-0.728	0.467
B	11(5, 22)	13(6, 24)	-3.043	0.002	11(6, 23)	11(6, 29)	-0.252	0.801
NK	14(4, 31)	12(5, 29)	3.388	0.001	12(5, 27)	12(5, 29)	-1.195	0.232

2.3 本研究建立的参考区间与其他地区比较结果 与国内已发表的相关文献比较, 本研究建立的健

康儿童淋巴细胞亚群参考区间存在较大的差异。见表 3。

表 3 本研究与其他文献报道的外周血淋巴细胞亚群参考区间的对比

分组/文献	年龄(岁)	地区	CD3 ⁺ T	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	B	NK
藏族儿童	3~14	青海	55~83	22~45	20~46	0.53~1.92	6~23	4~29
汉族儿童	3~14	青海	51~84	19~54	12~40	0.67~2.53	6~27	4~28
藏族成人	18~60	青海	53~79	29~41	15~37	0.81~2.01	8~26	5~27
孟祥颖 ^[4]	3~7	河南	50~76	22~45	16~39	0.68~2.4	10~31	5~26
王文第 ^[5]	3~7	甘肃	53~82	22~51	18~40	0.82~2.57	9~26	3~28
林珊 ^[6]	0~18	福州	54~82	23~59	14~40	0.73~3.56	8~32	2~25
肖婧 ^[7]	3~7	北京	60~76	28~44	19~33	0.90~2.18	11~23	6~21

3 讨论

T 淋巴细胞亚群分析是评估免疫功能的重要指标,一项调查结果表明,外周血淋巴细胞亚群分布受地域、种族、年龄和性别影响^[8]。本研究中不同年龄之间比较结果表明,藏族学龄前组和少年组之间 B 和 NK 细胞差异有统计学意义;汉族学龄前组和少年组之间 CD8⁺T、B 细胞和 CD4⁺/CD8⁺ 差异有统计学意义,表明年龄是造成部分淋巴细胞亚群指标差异的重要因素,这与王文第等^[5]和林珊等^[6]报道的结果相似,分析原因可能与发育过程中受到更多暴露抗原刺激,免疫系统逐渐成熟而导致分布不同有关。本研究中藏族健康儿童各年龄段的所有淋巴细胞亚群指标均有性别的差异,其中男性 CD3⁺T 和 CD8⁺T 细胞高于女性,B 细胞低于女性,其余指标分布特点和王永顺等^[8]研究结果一致。王文第等^[5]、林珊等^[6]和肖婧等^[7]研究结果表明,汉族健康儿童 T、CD4⁺T、B 和 NK 细胞百分比差异有统计学意义;但张志平等^[9]研究结果表明,汉族健康儿童男女性别间 T、CD4⁺T、CD8⁺T、B 和 NK 细胞的百分率比较差异均无统计学意义。本研究结果中汉族健康儿童各年龄段的所有淋巴细胞亚群指标均无性别差异 ($P>0.05$),与张志平等^[9]的研究结果相一致,而与王文第等^[5]、林珊等^[6]和肖婧等^[7]研究结果明显不同。由此可见,高海拔地区藏族成年人和儿童男女之间淋巴细胞亚群分布特点存在差异,与高海拔地区汉族亦有不同的分布特点,这可能是由于不同民族男女在高海拔环境下机体对免疫功能的调节不同。周晶萍等^[3]对海拔 4 500 m 地区健康成年人 T 细胞亚群进行了对比,发现藏族人群 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞虽然高于汉族人群,但差异无统计学意义,而藏族人群 NK 细胞明显低于汉族人群;B 细胞明显高于汉族人群 ($P<0.05$)。本研究结果表明,藏族和汉族儿童仅 CD4⁺T 和 CD8⁺T 差异有统计学意义 ($P<0.05$),藏族 CD4⁺T 细胞表达水平低于汉族,CD8⁺T 细胞表达水平高于汉族 ($P<0.05$),表明同一海拔下健康成年人和儿童具有不同的民族差异特点,这可能提示不同民族和年龄适应高原低氧环境产生的生理性改变,免疫系统会做出适当的调整。

此外,本研究结果与全国其他地区相比,总体上均存在一定差异,这可能与样本量、地理环境与生活习惯相关,也可能与检测和统计方法的不同相关,临床实验室若直接沿用诊断试剂公司提供的参考区间,也会造成一定误差,所以建立本地的参考区间显得十分必要。

本研究成功建立了青海玉树地区藏族和汉族健康儿童淋巴细胞亚群的参考区间,对相关疾病的诊断分期、治疗评价、和预后判断提供了实验依据,但由于本研究样本只选取了青海玉树地区的健康儿童作为研究对象,且年龄分布相对集中,汉族儿童男女例数小于 100 例,所得到的参考区间还需要在更大样本量及多地区的研究中进一步验证。

4 参考文献

- [1] 吕松琴, 黄山, 李晓非, 等. 昆明地区健康成年人外周血 T 淋巴细胞亚群参考区间调查[J]. 临床检验杂志, 2017, 35(4): 310-313.
- [2] Ding Y, Zhou L, Xia Y, *et al.* Reference values for peripheral blood lymphocyte subsets of healthy children in China[J]. J Allergy Clin Immunol, 2018, 142(3): 970-973.
- [3] 周晶萍, 顾松琴, 彭海, 等. 海拔 4 500m 地区藏、汉人群外周血淋巴细胞亚群检测[J]. 免疫学杂志, 2012, 28(9): 820-822.
- [4] 孟颖颖, 石瑛, 李松磊, 等. 河南地区健康儿童淋巴细胞亚群参考区间的建立[J]. 江苏预防医学, 2020, 31(1): 39-43.
- [5] 王文第, 毛宝宏, 王晶, 等. 流式细胞术建立甘肃地区学龄前汉族儿童外周血淋巴细胞亚群相对计数的正常参考值范围[J]. 循证儿科杂志, 2019, 14(3): 181-183.
- [6] 林珊, 高虹, 李晶, 等. 福州地区健康儿童外周血淋巴细胞亚群及主要活化相关指标正常参考范围的建立[J]. 实验与检验医学, 2016, 34(3): 298-303.
- [7] 肖婧, 申丹, 刘永革, 等. 以流式细胞术建立中国汉族健康儿童外周血淋巴细胞亚群相对计数的正常参考值[J]. 中国循证儿科杂志, 2010, 5(4): 245-250.
- [8] 王永顺, 韩秀敏, 范雯, 等. 青海省藏族健康人群 T 淋巴细胞免疫表型及包虫病患者免疫应答研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(11): 1070-1072.
- [9] 张志平, 郭慧敏, 黄瑞, 等. 365 名太原市学龄前儿童淋巴细胞亚群调查分析[J]. 中国实用儿科杂志, 2013, 28(6): 428-430.

(收稿日期:2020-02-03)

(本文编辑:许晓蒙)