

论著·临床研究

0~6岁儿童淋巴细胞免疫分型影响因素探讨

陈睿¹ 张修发² 周天祥² 陈滢³ 钟文明⁴ 马丽亚¹

(广东省深圳市宝安区妇幼保健院 1. 新生儿科; 2. 检验科;
3. 儿童保健科; 4. 信息科, 广东 深圳 518133)

[摘要] **目的** 探讨影响0~6岁儿童淋巴细胞免疫分型的因素。**方法** 采集45例健康足月儿脐动脉血及79例健康儿童静脉血,按不同生产方式将45例足月儿分为顺产组($n=22$)和剖宫产组($n=23$);按不同年龄段将健康儿童分为28 d~组($n=25$)、1岁~组($n=26$)和3~6岁组($n=28$),用流式细胞术检测淋巴细胞亚群值,分析生产方式、性别和年龄对淋巴细胞免疫分型的影响。**结果** 顺产和剖宫产两组新生儿在T和Ts细胞计数、B细胞百分比、NK细胞百分比和绝对计数等指标上差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);各淋巴细胞免疫表型绝对计数和百分比在不同性别健康儿童之间比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$);除Ts和NK细胞计数外,其余各亚群在不同年龄组儿童之间差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论** 儿童淋巴细胞亚群的分布受年龄因素的影响较大,新生儿出生时也受生产方式的影响;在建立儿童淋巴细胞免疫分型正常参考范围时应按年龄分段。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(11): 1114-1117]

[关键词] 淋巴细胞免疫分型; 百分比; 绝对计数; 儿童

Influencing factors for lymphocyte subsets in children aged 0-6 years

CHEN Rui, ZHANG Xiu-Fa, ZHOU Tian-Xiang, CHEN Ying, ZHONG Wen-Ming, MA Li-Ya. Department of Neonatology, Shenzhen Bao'an Maternal and Child Health Hospital, Shenzhen, Guangdong 518133, China (Ma L-Y, Email: maliya226@qq.com)

Abstract: Objective To investigate the influencing factors for lymphocyte subsets in children 0 to 6 years of age. **Methods** Umbilical artery blood samples from 45 healthy full-term infants and venous blood samples from 79 healthy children between 0 and 6 years were collected. According to the methods of delivery, the full-term infants were divided into vaginal delivery group ($n=22$) and cesarean section group ($n=23$). Healthy children were divided into different age groups: 28 days to 12 months ($n=25$), 1-3 years ($n=26$), and 3-6 years ($n=28$). Lymphocyte subsets were examined by flow cytometry. The influencing factors including delivery method, sex, and age, which might have an effect on the lymphocyte subsets, were analyzed. **Results** There were significant differences in T and Ts cell counts, percentage of B cells, and percentage and count of natural killer (NK) cells between the full-term infants of vaginal delivery and cesarean section ($P<0.05$). The absolute counts and percentages of different lymphocyte subsets showed no significant differences between males and females in healthy children ($P>0.05$). The counts of all lymphocyte subsets except Ts and NK cells varied significantly between different age groups ($P<0.05$). **Conclusions** Lymphocyte subsets in children under 6 years of age are more profoundly affected by age. Delivery method is also a contributing factor in newborn infants. The reference range of lymphocyte subsets in children should be established for different age groups.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(11): 1114-1117]

Key words: Lymphocyte subsets; Percentage; Absolute count; Child

近年来,随着流式细胞术的推广,淋巴细胞免疫分型已逐渐成为临床医学中的常规检测项目之一。评价不同疾病患儿的淋巴细胞亚群分布变

化,必须以健康儿童的正常结果为参照,而健康儿童淋巴细胞亚群也会受多种因素影响,为此,我们对124例健康儿童进行了淋巴细胞免疫分型

[收稿日期] 2014-04-03; [接受日期] 2014-06-05

[作者简介] 陈睿,女,本科,副主任技师。

[通信作者] 马丽亚,女,主任医师。

影响因素分析,旨在为临床医生正确判断疾病的免疫状态提供可靠的参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取于深圳市宝安区妇幼保健院产科分娩的健康足月儿45例及儿童保健科行正常体检儿童79例为研究对象。45例足月儿中,男27例,女18例,其中顺产22例,剖宫产23例(选择母亲产程未启动择期剖宫产者)。79例体检儿童按年龄分为28 d~组(25例),男13例,女12例;1岁~组(26例),男16例,女10例;3~6岁组(28例),男12例,女16例。

1.2 仪器与试剂

流式细胞分析仪(美国BD公司,型号:Canto II);FACSCanto Software(美国BD公司)。FACS 7-Color Setup Beads(美国BD公司,货号:335775,批号:33417);Multitest 6-Color TBNK with BD TruCount Tubes(CD3FITC/CD16PE+CD56PE/CD45PerCP-Cy5.5/CD4PE-Cy7/CD19APC/CD8APC-Cy7,美国BD公司,货号:337166,批号:40089);FACS™ Lysing Solution(美国BD公司,货号:349202,批号:4043511)。

1.3 方法

采集新生儿脐动脉血1.0 mL及正常体检儿童静脉血0.5~1.0 mL为样本,均以EDTA-K2抗凝。

实验步骤:(1)每日开机后以BD FACS 7-Color Setup Beads检查校准仪器。(2)准确吸取EDTA抗凝全血100 μL及BD Multitest 6-Color TBNK 20 μL,加入BD TruCount Tube,充分混匀,

置室温暗处15 min;再加入1×BD FACS™ Lysing Solution 450 μL,充分混匀,置室温暗处15 min,2 h内上机检测。(3)BD FACSCanto Software分析和记录样本数据,比较各组淋巴细胞免疫表型绝对计数和百分比的差异。为保证数据的准确性,仪器的质量控制、标本的处理和测试、数据分析均由同一人操作。

1.4 统计学分析

应用SPSS 13.0统计软件对数据进行统计学分析,非正态分布计量资料以中位数(四分位间距) $[P_{50}(P_{25}, P_{75})]$ 表示,多组间比较采用非参数Kruskal-Wallis检验,两组比较及组间两两比较采用非参数Mann-Whitney U 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同性别健康儿童淋巴细胞免疫分型比较

各淋巴细胞免疫表型绝对计数和百分比在健康男女儿童之间比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。

2.2 不同生产方式健康新生儿脐血淋巴细胞免疫分型比较

T细胞计数、Ts计数、B细胞百分比、NK细胞百分比和绝对计数在顺产和剖宫产两组新生儿之间差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),见表1。

2.3 不同年龄组健康儿童淋巴细胞免疫分型比较

各年龄组之间T细胞百分比与计数、Th细胞百分比与计数、Ts细胞百分比、B细胞百分比与计数、NK细胞百分比及Th/Ts差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),见表2。

表1 不同生产方式健康新生儿淋巴细胞亚群比较 $[P_{50}(P_{25}, P_{75})]$

指标	顺产 (n=22)	剖宫产 (n=23)	Z 值	P 值
T (%)	66.70(47.14~86.86)	70.50(48.36~84.28)	-1.320	0.188
T (个/μL)	3 075(1 873~4 962)	2 391(1 583~3 614)	-2.566	0.010
Th (%)	43.30(27.37~68.84)	49.80(32.82~64.04)	-1.839	0.066
Th (个/μL)	1 994(1 202~3 252)	1 730(1 046~2 683)	-1.726	0.084
Ts (%)	18.65(13.03~26.23)	18.20(11.38~26.20)	-0.943	0.346
Ts (个/μL)	920(386~1 587)	598(316~1 080)	-3.065	0.002
B (%)	12.75(4.82~24.02)	17.40(8.36~30.26)	-3.020	0.003
B (个/μL)	693(124~1 362)	645(299~1 441)	-0.023	0.982
NK (%)	16.45(2.77~33.59)	7.00(3.38~26.26)	-3.577	<0.001
NK (个/μL)	843(86~2 048)	240(130~1 499)	-3.633	<0.001
Th/Ts	2.10(1.26~4.56)	2.80(1.70~5.58)	-1.907	0.056

表 2 不同年龄组健康儿童淋巴细胞亚群比较 [P_{50} (P_{25} , P_{75})]

项目	28 d~ (n=25)	1 岁~ (n=26)	3~6 岁 (n=28)	Z 值	P 值
T (%)	63.40(55.95~72.20)	68.10(54.86~76.13)	69.35(58.87~81.00) ^a	11.70	0.003
T (个/μL)	4385(2317~5744)	3499(1872~4692) ^a	2268(1719~5496) ^{a,b}	29.32	<0.001
Th (%)	40.90(35.20~54.80)	38.80(26.52~46.86)	36.50(27.50~47.82) ^a	6.99	0.030
Th (个/μL)	2426(1536~3730)	1009(1576~2984) ^a	1245(853~3146) ^{a,b}	32.93	<0.001
Ts (%)	17.50(10.80~23.40)	20.60(13.29~29.10) ^a	22.90(17.68~35.20) ^{a,b}	21.37	<0.001
Ts (个/μL)	1174(511~2035)	967(534~2135)	787(576~1730)	4.85	0.088
B (%)	29.50(19.40~35.29)	21.05(13.24~32.57) ^a	17.05(9.25~24.03) ^{a,b}	25.69	<0.001
B (个/μL)	1921(857~3134)	1010(369~2514) ^a	539(317~1216) ^{a,b}	46.81	<0.001
NK (%)	6.70(3.63~10.60)	7.80(4.17~16.06)	10.40(4.84~26.81) ^a	13.65	0.001
NK (个/μL)	397(258~868)	420(156~1012)	322(185~1017)	2.22	0.330
Th/Ts	2.43(1.64~4.65)	1.89(0.96~3.07) ^a	1.62(0.95~2.60) ^{a,b}	22.45	<0.001

注: a 示与 28 d~ 组比较, $P<0.05$; b 示与 1 岁~ 组比较, $P<0.05$ 。

2.4 0~6 岁儿童淋巴细胞免疫分型百分率变化趋势

出生后 B% 和 Ts% 开始上升, 其它各淋巴细胞免疫分型百分比呈现出下降趋势; 自第 28 天起, B% 开始下降并持续至 6 岁, Ts% 一直呈轻度上升趋势, Th% 一直为下降趋势, 而 T%、NK% 则开始回升, 并持续至 6 岁。见图 1。

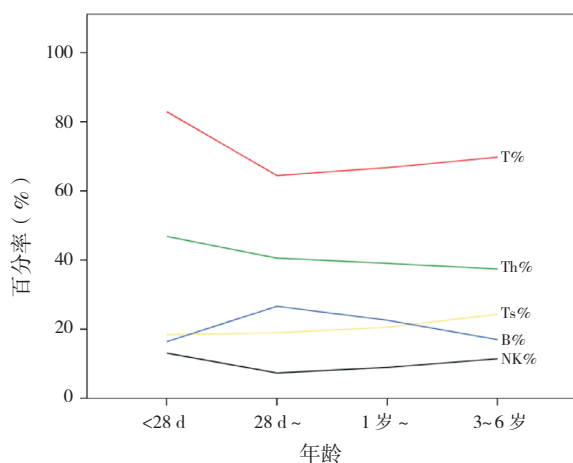


图 1 0~6 岁儿童淋巴细胞表型百分率变化趋势

2.5 0~6 岁儿童淋巴细胞免疫分型绝对计数变化趋势

除 NK 细胞外, 出生后 T 细胞、Ts 细胞、Th 细胞和 B 细胞的绝对计数均呈上升趋势, 第 28 天达到顶峰, 此后随年龄增长而下降并持续至 6 岁, 而 NK 细胞绝对计数则一直呈下降趋势。见图 2。

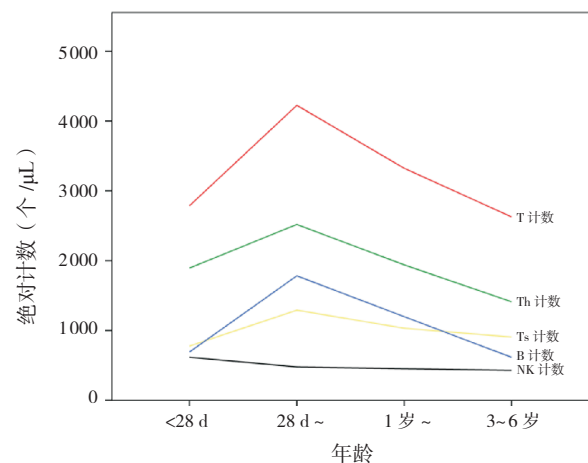


图 2 0~6 岁儿童淋巴细胞表型绝对计数变化趋势

3 讨论

0~6 岁儿童的保健服务是妇幼保健服务的重要内容, 对降低儿童死亡率、促进儿童生长发育和健康成长起着重要作用。0~6 岁也是儿童各种常见病的好发年龄, 是我院门诊和住院病人的主要人群之一。淋巴细胞免疫分型能很好地反映机体当前的免疫功能、状态和平衡水平, 是检测细胞免疫和体液免疫功能的重要指标^[1]。有研究报道毛细支气管炎、重症肺炎支原体感染、脓毒症患儿

都存在着不同程度的细胞免疫功能紊乱, 其程度与疾病的严重程度有明显的关联^[2-4]。由于儿童处于生长发育阶段, 其机体免疫系统将经历逐渐成熟的过程, 不同的生长发育阶段淋巴细胞亚群分布亦不同^[1,5-6], 6 岁之前的儿童体内淋巴细胞亚群处于一个非常活跃的量变过程, 从 6 岁之后, 外周血的淋巴细胞亚群分布逐渐稳定^[7]。因此临床儿科领域需要不同于成年人的淋巴细胞亚群的相对及绝对计数正常参考范围。

本组资料显示, 顺产和择期剖宫产分娩的新

生儿淋巴细胞亚群部分指标差异有统计学意义,与国内班开斌等^[8]、刘克芹等^[9]研究成果相同。生产方式的不同导致淋巴细胞亚群在外周血中的数量有差异,其机制可能是由于择期剖宫产本身没有产生足够的子宫收缩,从而缺少了炎症细胞因子的刺激,进而使淋巴细胞功能的成熟受到影响;而自然分娩过程中胎膜破裂、节律性宫缩、胎儿经产道时受到宫缩和产道挤压等生理过程有利于新生儿的免疫状态的成熟^[5-10]。

在国内外的研究中,性别、年龄因素对淋巴细胞亚群分布的影响报道不相一致。本组资料中不同性别健康儿童之间淋巴细胞亚群结果差异无统计学意义,不同年龄之间差异有统计学意义,与Garcia-Dabrio等^[6]研究结果一致。淋巴细胞亚群百分比只能代表每种细胞在混合细胞群体中所占的比例,并不能体现各种细胞在单位体积血液中的绝对数量,不能真实地反映机体的免疫状况^[11]。且本实验数据显示,各年龄段淋巴细胞亚群的百分比和绝对计数随年龄变化上升或下降的趋势各不相同,所以疾病诊断或评估机体免疫状态时,需同时检测外周血淋巴细胞亚群百分比和绝对计数。因年龄对淋巴细胞亚群影响较大,因此建立儿童淋巴细胞亚群正常参考范围时应按年龄分段。

目前,临床使用流式细胞术检测淋巴细胞亚群灵敏度高、重复性好,是一种快速、准确的评估和检测机体免疫状态的方法^[12]。本组资料采用BD FACSCanto II 双激光六色流式细胞分析仪、六色荧光标记抗体、BD公司的专利技术-TruCount tube和专用的BD FACSCanto软件,再加上精确的全血反向加样技术,最终计算出各细胞亚群相对及绝对计数,其在方法学上具有无可比拟的优越性。操作者在获取细胞时应遵循:

(1) $T\%+B\%+NK\%=100\pm 5\%$; (2) $CD4^+T\%+CD8^+T\%=T\pm 2\%$ ^[13]。但由于所用仪器和试剂、实验方法和条件、甚至同一机型所用软件的不同,都会导致检测的参考值存在差异^[14-15],因此各流式细胞术实验室均应建立自己的参考值。

本研究的不足之处:(1)在年龄分组上不够细化,特别是新生儿有其自身的生理特点,更应对此特殊群体设组统计分析。(2)由于收集正常儿童血标本困难,各组纳入的例数不足,外周血淋巴细胞亚群的分布结果可能存在偏倚。(3)有文献报道,身体质量指数、运动等对外周血淋巴

细胞亚群分布有影响^[6],但本组资料未评估此因素。

[参 考 文 献]

- [1] Schatorje EJ, Gemen EF, Driessen GJ, et al. Paediatric reference values for the peripheral T cell compartment[J]. Scand J Immunol, 2012, 75(4): 436-444.
- [2] 刘义红,熊丽萍,沈红元. 毛细支气管炎患儿红细胞免疫及T细胞亚群变化的研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(3): 202-204.
- [3] 康妍萌,丁明杰,韩玉玲,等. 重症肺炎支原体肺炎患儿肺泡灌洗液中Th1/Th2细胞免疫应答状况的研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(3): 188-190.
- [4] 袁远宏,肖政辉,张慧,等. 小儿脓毒症T细胞亚群变化分析及临床意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2013, 15(3): 216-218.
- [5] Huenecke S, Behl M, Fadler C, et al. Age-matched lymphocyte subpopulation reference values in childhood and adolescence: application of exponential regression analysis[J]. Eur J Haematol, 2008, 80(6): 532-539.
- [6] Garcia-Dabrio MC, Pujol-Moix N, Martinez-Perez A, et al. Influence of age, gender and lifestyle in lymphocyte subsets: report from the Spanish Gait-2 Study[J]. Acta Haematol, 2012, 127(4): 244-249.
- [7] van Gent R, van Tilburg CM, Nibbelke EE, et al. Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B-cell compartments[J]. Clin Immunol, 2009, 133(1): 95-107.
- [8] 班开斌,赵艳丽,黄友敏,等. 不同分娩方式对脐血抵抗素及新生儿免疫功能的影响[J]. 医学检验与临床, 2008, 19(5): 18-20.
- [9] 刘克芹,刘晨,尹卫东,等. 不同分娩方式不同性别新生儿脐血的免疫功能检测[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(27): 5092-5096.
- [10] Perez A, Gurbindo MD, Resino S, et al. NK cell increase in neonates from the preterm to the full-term period of gestation[J]. Neonatology, 2007, 92(3): 158-163.
- [11] Sagnia B, Ateba Ndongo F, Ndiang Moyo Tetang S, et al. Reference values of lymphocyte subsets in healthy, HIV-negative children in Cameroon[J]. Clin Vaccine Immunol, 2011, 18(5): 790-795.
- [12] Fuentes-Arderiu X, Mestre M. Description of flow cytometry examinations related to human cell differentiation molecules in clinical immunology[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2009, 76(4): 291-293.
- [13] Schatorje EJ, Gemen EF, Driessen GJ, et al. Paediatric reference values for the peripheral T cell compartment[J]. Scand J Immunol, 2012, 75(4): 436-444.
- [14] 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.
- [15] Ashman M, Sachdeva N, Davila L, et al. Influence of 4-and 6-color flow cytometers and acquisition/analysis softwares on the determination of lymphocyte subsets in HIV infection[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2007, 72(5): 380-386.

(本文编辑: 万静)