

论著·临床研究

826例0岁至学龄前健康儿童外周血 淋巴细胞亚群分布的调查分析

詹文丽¹ 杨笑涵¹ 郭浩¹ 钟志成¹ 杜倩怡¹ 张畅斌¹ 黄滨梅¹ 刘鸿² 骆明勇¹

(1. 广东省妇幼保健院医学遗传中心, 广东 广州 511442;
2. 广东省妇幼保健院儿科, 广东 广州 511442)

[摘要] **目的** 调查分析0岁至学龄前健康儿童外周血淋巴细胞亚群的分布。**方法** 826例0岁至学龄前汉族儿童分为新生儿组、婴儿组、幼儿组、学龄前组, 使用流式细胞术检测各组外周血淋巴细胞亚群。**结果** CD3⁺细胞、CD3⁺CD4⁺细胞、CD3⁻CD19⁺细胞和CD4⁺/CD8⁺在0岁至学龄前儿童不同性别之间的差异具有统计学意义 ($P<0.05$), CD3⁻CD19⁺细胞以女童较低, 其他3个指标以女童较高; CD3⁺、CD3⁺CD4⁺及CD4⁺/CD8⁺均以新生儿组最高, 其中CD3⁺CD4⁺及CD4⁺/CD8⁺含量随年龄增长逐渐降低, 至学龄前最低 ($P<0.05$); CD3⁻CD19⁺和CD3⁻CD16⁺CD56⁺细胞含量以新生儿组最低, 随年龄增长而增高, CD3⁻CD16⁺CD56⁺细胞以学龄前组最高, 而CD3⁻CD19⁺细胞含量在幼儿期达峰值后降低 ($P<0.05$); CD3⁺CD8⁺细胞含量以学龄前组最高 ($P<0.05$)。不同年龄组男童的淋巴细胞亚群分布的变化趋势与不同年龄组儿童的规律一致; 在女童中, CD3⁺CD4⁺及CD4⁺/CD8⁺含量也是以新生儿组最高 ($P<0.05$)。**结论** 淋巴细胞亚群在不同年龄、性别健康儿童之间的分布不同, 建议按年龄、性别分别建立参考值。 **[中国当代儿科杂志, 2019, 21(2): 180-183]**

[关键词] 淋巴细胞亚群; 流式细胞术; 儿童

Distribution of peripheral blood lymphocyte subsets in 826 healthy children aged 0-6 years

ZHAN Wen-Li, YANG Xiao-Han, GUO Hao, ZHONG Zhi-Cheng, DU Qian-Yi, ZHANG Chang-Bin, HUANG Bin-Mei, LIU Hong, LUO Ming-Yong. Medical Genetics Center, Guangdong Women and Children's Hospital, Guangzhou 511442, China (Luo M-Y, Email: luo-my@163.com)

Abstract: Objective To study the distribution of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy children aged 0-6 years. **Methods** A total of 826 healthy Han children aged 0-6 years were recruited. According to their age, the children were divided into four groups: newborn, infant, toddler and preschool. Their peripheral blood samples were collected to measure the percentages of lymphocyte subsets by flow cytometry. **Results** There were significant differences in the percentages of CD3⁺ T cells, CD3⁺CD4⁺ T cells and CD3⁻CD19⁺ B cells and the CD4⁺/CD8⁺ ratio between boys and girls ($P<0.05$). The girls had a lower percentage of CD3⁻CD19⁺ B cells, higher percentages of CD3⁺ T cells and CD3⁺CD4⁺ T cells and a higher CD4⁺/CD8⁺ ratio than the boys. The newborn group had the highest percentages of CD3⁺ T cells and CD3⁺CD4⁺ T cells and the highest CD4⁺/CD8⁺ ratio ($P<0.05$). The percentage of CD3⁺CD4⁺ T cells and the CD4⁺/CD8⁺ ratio gradually decreased with age and the preschool group had the lowest values ($P<0.05$). The newborn group had the lowest percentages of CD3⁻CD19⁺ B cells and CD3⁻CD16⁺CD56⁺ NK cells ($P<0.05$). The percentage of CD3⁻CD16⁺CD56⁺ NK cells gradually increased with age and the preschool group had the highest percentage ($P<0.05$). The percentage of CD3⁻CD19⁺ B cells reached the peak in the toddler period and then decreased with age ($P<0.05$). The preschool group had the highest percentage of CD3⁺CD8⁺ T cells ($P<0.05$). The variation trend of distribution of lymphocyte subsets in boys from different age groups was consistent with that in children from different age groups. For girls, the newborn group had the highest percentage of CD3⁺CD4⁺ T cells and CD4⁺/CD8⁺ ratio ($P<0.05$). **Conclusions** The distribution of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy children is significantly different across ages and sexes. Therefore, the reference values should be established according to age and sex. **[Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(2): 180-183]**

Key words: Lymphocyte subset; Flow cytometry; Child

[收稿日期] 2018-08-24; [接受日期] 2018-12-17

[基金项目] 广东省省级科技计划项目(2014A020212246、2016A020218011)。

[作者简介] 詹文丽, 女, 硕士, 技师。

[通信作者] 骆明勇, 男, 主任技师。Email: luo-my@163.com。

儿童的许多疾病都与免疫功能异常有关，通过淋巴细胞亚群评估儿童的免疫状态已得到较为广泛的应用^[1]。因而客观可靠的正常参考值对于淋巴细胞亚群结果的准确判读具有重要作用。而不同性别、不同年龄、不同地区以及不同种族人群的淋巴细胞亚群分布均有不同^[2-4]，目前对广州地区健康儿童淋巴细胞亚群分布特点的了解较少，因此本研究对826例来自广东省妇幼保健院的0岁到学龄前健康儿童的淋巴细胞亚群分布进行分析，为建立广州地区健康儿童外周血淋巴细胞亚群的参考范围提供初步依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

以广东省妇幼保健院行体检或者因鞘膜积液、疝气等术前检查的826例0~6岁汉族儿童为研究对象。排除标准：具有心脑血管疾病、先天性免疫缺陷性疾病、获得性免疫缺陷性疾病、自身免疫性疾病等，以及糖皮质激素或免疫调节剂服用史，近期有感染性疾病以及急性时相反应、外周血细胞计数、肝肾功能和肺部、骨骼X线检查异常者。研究对象按照年龄分为4组：新生儿组295例、婴儿组306例、幼儿组138例、学龄前组87例，其中男529例，女297例。

1.2 淋巴细胞亚群检测

使用BD FACSCanto II流式细胞仪检测淋巴细胞亚群。试剂（美国BD公司生产）主要包括：BD 6色淋巴细胞亚群检测试剂CD3-FITC/CD16+CD56-

PE/CD45-PerCP-Cy5.5/CD4-PE-Cy7/CD19-APC/CD8-APC-Cy7；红细胞裂解液：BD FACS Lysing Solution（蒸馏水1:10稀释）；荧光标准微球：BD FACS 7-Color Setup Beads。

采集研究对象外周静脉血3 mL（EDTA抗凝），24 h内进行检测。取全血标本50 μL加入已加有20 μL 6色淋巴细胞亚群抗体的流式细胞上样管中，充分混匀后室温避光孵育20 min，然后加入1:10蒸馏水稀释的溶血素500 μL，充分混匀，室温避光孵育15 min后上机检测淋巴细胞亚群。使用FACSCanto软件，操作按照说明书进行，结果均由同一技术人员进行读取。

1.3 统计学分析

采用SPSS 20.0软件进行数据处理。符合正态分布的计量资料用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，多组间的比较采用方差分析，多个样本均数两两比较采用SNK-*q*检验。*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同性别儿童淋巴细胞亚群分布的比较

0岁至学龄前儿童不同性别之间CD3⁺、CD3⁺CD4⁺细胞、CD3⁺CD19⁺细胞和CD4⁺/CD8⁺的差异具有统计学意义(*P*<0.05)，女童的CD3⁺CD19⁺细胞含量低于男童，其他三个指标以女性较高。CD3⁺CD8⁺和CD3⁺CD16⁺CD56⁺细胞含量在不同性别儿童之间的差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表1。

表1 不同性别儿童淋巴细胞亚群分布的比较 ($\bar{x} \pm s$)

性别	<i>n</i>	CD3 ⁺ 细胞 (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ 细胞 (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞 (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD19 ⁺ 细胞 (%)	CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ 细胞 (%)
男	529	68 ± 12	44 ± 14	21 ± 7	2.39 ± 1.51	22 ± 10	9 ± 6
女	297	70 ± 11	48 ± 14	20 ± 7	2.63 ± 1.27	19 ± 10	8 ± 6
<i>t</i> 值		-3.200	-3.748	1.662	-2.344	3.444	0.812
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	0.097	<0.019	0.001	0.417

2.2 不同年龄组儿童淋巴细胞亚群分布的比较

CD3⁺、CD3⁺CD4⁺细胞及CD4⁺/CD8⁺均以新生儿组最高，其中CD3⁺CD4⁺及CD4⁺/CD8⁺含量随年龄增长逐渐降低，至学龄前最低，但婴儿组、幼儿组、学龄前组的CD3⁺细胞含量的差异无统计学意义(*P*>0.05)；CD3⁺CD19⁺和CD3⁺CD16⁺CD56⁺

细胞含量以新生儿组最低，随着年龄的变化，CD3⁺CD16⁺CD56⁺细胞含量逐渐增长、以学龄前组最高，而CD3⁺CD19⁺细胞含量在幼儿期达峰值后降低；CD3⁺CD8⁺细胞含量以学龄前组最高，新生儿组、婴儿组、幼儿组之间的差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表2、图1。

表 2 不同年龄组之间淋巴细胞亚群的比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	CD3 ⁺ 细胞 (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ 细胞 (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞 (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD3 ⁻ CD19 ⁺ 细胞 (%)	CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ 细胞 (%)
新生儿组	295	78 ± 11	58 ± 12	20 ± 6	3.2 ± 1.5	15 ± 9	6 ± 5
婴儿组	306	64 ± 10 ^a	41 ± 10 ^a	20 ± 7	2.4 ± 1.4 ^a	25 ± 9 ^a	10 ± 6 ^a
幼儿组	138	63 ± 9 ^a	37 ± 8 ^{a,b}	21 ± 6	1.9 ± 0.8 ^{a,b}	25 ± 8 ^a	10 ± 5 ^a
学龄前组	87	66 ± 8 ^a	33 ± 7 ^{a,b,c}	26 ± 7 ^{a,b,c}	1.4 ± 0.5 ^{a,b,c}	20 ± 7 ^{a,b,c}	13 ± 7 ^{a,b,c}
F 值		118.018	225.950	17.804	54.804	75.870	54.490
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: a 示与新生儿组比较, $P < 0.05$; b 示与婴儿组比较, $P < 0.05$; c 示与幼儿组比较, $P < 0.05$ 。

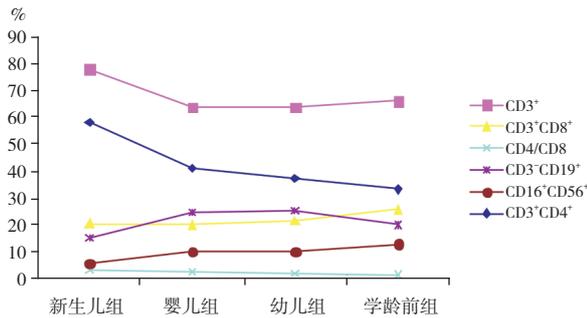


图 1 淋巴细胞亚群随年龄变化的趋势

2.3 不同年龄不同性别儿童的淋巴细胞亚群分布

新生儿组和婴儿组男童的 CD3⁻CD19⁺ 细胞含

量高于女童 ($P < 0.05$), 新生儿组女童 CD3⁺CD4⁺ 细胞含量和婴儿组女童 CD3⁺ 细胞含量都高于同年龄男童 ($P < 0.05$)。不同年龄组男童的淋巴细胞亚群分布的变化趋势与不同年龄组儿童的规律一致; 在女童中, CD3⁺CD4⁺ 含量以新生儿组最高, 随年龄增长逐渐降低, 但婴儿组与幼儿组 CD3⁺CD4⁺ 细胞含量的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 婴儿组与学龄前组 CD3⁺CD4⁺ 细胞含量的差异有统计学意义 ($P < 0.05$); CD4⁺/CD8⁺ 也是以新生儿组最高, 学龄前组降至最低 ($P < 0.05$), 其他指标的比较情况与不同年龄组儿童的规律一致。见表 3。

表 3 不同年龄组、不同性别儿童的淋巴细胞亚群分布 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD3 ⁺ 细胞 (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ 细胞 (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞 (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD3 ⁻ CD19 ⁺ 细胞 (%)	CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ 细胞 (%)
新生儿组							
男	184	77 ± 11	56 ± 12	21 ± 6	3.0 ± 1.6	16 ± 9	6 ± 5
女	111	79 ± 10	60 ± 12 ^d	20 ± 6	3.4 ± 1.3	14 ± 8 ^d	6 ± 5
t 值		-1.751	-3.214	1.245	-1.916	2.149	0.539
P 值		0.081	0.001	0.214	0.056	0.032	0.590
婴儿组							
男	194	63 ± 10 ^a	40 ± 10 ^a	20 ± 7	2.4 ± 1.6 ^a	26 ± 9 ^a	10 ± 6 ^a
女	112	65 ± 10 ^{a,d}	42 ± 10 ^a	19 ± 7	2.4 ± 1.0 ^a	23 ± 9 ^{a,d}	10 ± 5 ^a
t 值		-2.031	-1.737	0.962	-0.501	2.642	-0.913
P 值		0.043	0.083	0.337	0.616	0.009	0.362
幼儿组							
男	93	62 ± 9 ^a	36 ± 8 ^{a,b}	22 ± 6	1.8 ± 0.8 ^{a,b}	26 ± 9 ^a	10 ± 6 ^a
女	45	65 ± 9 ^a	39 ± 7 ^a	21 ± 8	2.1 ± 0.9 ^a	24 ± 8 ^a	9 ± 4 ^a
t 值		-1.732	-1.673	0.318	-1.301	0.979	1.344
P 值		0.086	0.097	0.751	0.196	0.329	0.181
学龄前组							
男	58	65 ± 9 ^a	32 ± 6 ^{a,b,c}	26 ± 8 ^{a,b,c}	1.4 ± 0.5 ^{a,b,c}	20 ± 8 ^{a,b,c}	13 ± 7 ^{a,b,c}
女	29	67 ± 8 ^a	35 ± 7 ^{a,b}	25 ± 6 ^{a,b,c}	1.5 ± 0.5 ^{a,b,c}	19 ± 5 ^{a,b,c}	12 ± 6 ^{a,c}
t 值		-1.235	-1.937	0.257	-0.901	0.678	0.782
P 值		0.220	0.056	0.798	0.370	0.500	0.436

注: a 示与新生儿组比较, $P < 0.05$; b 示与婴儿组比较, $P < 0.05$; c 示与幼儿组比较, $P < 0.05$; d 示与同年龄组男童比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

淋巴细胞亚群分布能较好反映机体的免疫状态^[5-6]。地区、种族等因素对淋巴细胞亚群的分布有影响^[7-9]。本研究发现广州地区0岁至学龄前儿童不同性别之间的CD3⁺、CD3⁺CD4⁺或CD3⁻CD19⁺细胞和CD4⁺/CD8⁺差异具有统计学意义,与福建地区林珊等^[10]研究结果类似。但本研究CD3⁺CD4⁺细胞含量以女童较高、CD3⁻CD19⁺细胞含量则相反,与研究对象同样来自于广州地区的李蓓等^[11]研究结果略有不同,但该研究对象仅纳入了80例。

不同年龄段儿童免疫系统发育成熟程度不同,因而淋巴细胞亚群的分布也不同。本研究发现,CD3⁺、CD3⁺CD4⁺细胞及CD4⁺/CD8⁺均以新生儿组最高,并随年龄增长逐渐降低,至学龄前最低,婴儿组、幼儿组、学龄前组的CD3⁺细胞含量差异无统计学意义;CD3⁻CD19⁺和CD3⁻CD16⁺CD56⁺细胞含量以新生儿组最低,CD3⁻CD16⁺CD56⁺细胞含量随年龄变化逐渐增长、以学龄前组最高,而CD3⁻CD19⁺细胞含量在幼儿期达峰值后降低;CD3⁺CD8⁺细胞含量以学龄前组最高,新生儿组、婴儿组、幼儿组之间的差异无统计学意义。我国Kam等^[12]和肖婧等^[13]的研究也表明婴儿期以后各年龄段的CD3⁺细胞含量相对稳定。欧美、非洲地区研究^[7,14-15]表明,CD3⁺细胞含量随年龄而变化趋势的不同可能与种族差异有关。欧美^[7,14]、非洲地区^[15]及我国香港^[12]、北京地区^[13]除CD3⁺细胞外的其他淋巴细胞亚群随年龄变化的趋势与本研究结果基本一致,提示淋巴细胞亚群分化及抗原表达与年龄密切相关,且这种相关性受地区和种族的影响较小。本研究还发现,男童淋巴细胞亚群随年龄变化的趋势与不同年龄组儿童的规律一致;女童CD3⁺CD4⁺及CD4⁺/CD8⁺含量也是新生儿组最高,但CD3⁺CD4⁺含量在婴儿组和幼儿组、幼儿组和学龄前组之间的差异均无统计学意义。

综上,本研究通过调查分析广州地区826例0岁至学龄前健康儿童外周血淋巴细胞亚群的分布,证实了淋巴细胞亚群在不同年龄、性别健康儿童之间的分布不同,为建立广州地区健康儿童外周血淋巴细胞亚群的参考范围提供了初步依据。

[参考文献]

- [1] 中国医师协会儿科医师分会风湿免疫专业委员会, 中国医师协会儿科医师分会过敏专业委员会, 中华医学会儿科分会免疫学组. 流式细胞术分析外周血淋巴细胞亚群在儿科的临床应用共识[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(5): 344-349.
- [2] 朱立华, 王建中. 中国人血液淋巴细胞免疫表型参考值调查[J]. 中华医学检验杂志, 1998(4): 223-226.
- [3] Kone B, Maiga M, Baya B, et al. Establishing reference ranges of hematological parameters from malian healthy adults[J]. J Blood Lymph, 2017, 7(1): 154.
- [4] Chng WJ, Tan GB, Kuperan P. Establishment of adult peripheral blood lymphocyte subset reference range for an Asian population by single-platform flow cytometry: influence of age, sex, and race and comparison with other published studies[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2004, 11(1): 168-173.
- [5] Castilho JL, Shepherd BE, Koethe J, et al. CD4/CD8 ratio, age, and risk of serious noncommunicable diseases in HIV-infected adults on antiretroviral therapy[J]. AIDS, 2016, 30(6): 899-908.
- [6] 赵宏, 焦顺昌, 张国庆, 等. 不同年龄、性别的健康成年人21项淋巴细胞亚群分析[J]. 标记免疫分析和临床, 2011, 18(2): 99-102.
- [7] Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, et al. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: The pediatric AIDS clinical trials Group P1009 study[J]. J Allergy Clin Immunol, 2003, 112(5): 973-980.
- [8] 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.
- [9] 郭志宏, 姚亚萍, 李西婷, 等. 浙江地区健康青少年和成人外周血T淋巴细胞免疫表型调查及正常参考值范围的建立[J]. 中国预防医学杂志, 2008, 9(1): 32-35.
- [10] 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.
- [11] 李蓓, 陆军, 李志敏. 80例健康儿童淋巴细胞亚群参考范围的调查分析[J]. 广州医药, 2010, 41(2): 22-25.
- [12] Kam KM, Leung WL, Wong KH, et al. Maturation changes in peripheral lymphocytes subsets pertinent to monitoring human immuno-deficiency virus-infected Chinese pediatric patients[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2001, 8(5): 926-931.
- [13] 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.
- [14] Tollerud DJ, Ildstad ST, Brown LM, et al. T-cell subsets in healthy teenagers: transition to the adult phenotype[J]. Clin Immunol Immunopathol, 1990, 56(1): 88-96.
- [15] Tsegaye A, Wolday D, Otto S, et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes at birth, during childhood, and during adulthood in HIV-1-uninfected Ethiopians[J]. Clin Immunol, 2003, 109(3): 338-446.

(本文编辑: 俞燕)