

徐州及周边地区儿童淋巴细胞亚群正常参考区间调查

方代华 邓罗华 吴宏伟 王文娜 陈娜云

徐州医科大学附属徐州儿童医院输血科, 江苏徐州 221006

通信作者: 方代华, Email: fangdaihua@163.com

【摘要】目的 建立徐州及周边地区不同年龄段儿童淋巴细胞亚群(TBNK)的正常参考区间。**方法** 采集徐州及周边地区 1 378 名受检儿童的外周血样本,采用流式细胞术测定 TBNK 细胞比例和细胞计数,统计并分析不同年龄段儿童的 TBNK(CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD19⁺、CD3⁺CD16/56⁺ 细胞)正常参考区间和变化趋势。**结果** ① CD3⁺ 细胞比例在新生儿期(≤4 周)没有显著变化,婴儿期(5 周~5 个月)与新生儿期比较明显降低[69.70%(56.98%, 79.46%)比 81.12%(69.63%, 89.82%), $P < 0.05$],之后一直持续到青春期无明显变化;CD3⁺ 细胞计数从幼儿期(1~2 岁)至青春期(12~17 岁)结束逐渐降低。② CD3⁺CD4⁺ 细胞比例在新生儿期最高[58.18%(44.01%, 71.44%)],从婴儿期至学龄前期(3~5 岁)逐渐降低,学龄期(6~11 岁)至青春期无明显变化;CD3⁺CD4⁺ 细胞计数在 1 周~12 个月明显高于<1 周[$\times 10^9/L$:2.19(0.98, 3.65)比 1.60(0.77, 2.83), $P < 0.05$],之后则逐渐降低。③ CD3⁺CD8⁺ 细胞比例在 6 个月内没有显著变化,从 6 个月至学龄期逐渐增高,青春期又较学龄期降低;CD3⁺CD8⁺ 细胞计数则呈现先升高后降低的趋势。④ CD3⁺CD19⁺ 细胞比例在新生儿期较低[9.85%(4.11%, 19.80%)],从 6 个月后至青春期呈波动变化;CD3⁺CD19⁺ 细胞计数也呈先升高后降低的趋势,在 6~12 个月最高[1.15(0.53, 2.13) $\times 10^9/L$]。⑤ CD3⁺CD16/56⁺ 细胞比例和细胞计数均呈波动变化。⑥ CD3⁺CD4⁺ 细胞/CD3⁺CD8⁺ 细胞比值(CD4⁺/CD8⁺) 在新生儿期最高[2.76(1.33, 5.72)],之后逐渐降低,至青春期略有上升。⑦ CD3⁺CD4⁺CD8⁺ 细胞比例和计数变化规律不明显。**结论** 通过临床检测 and 数据分析得到了 8 个不同年龄阶段分组样本的 TBNK 细胞比例和计数的正常参考区间。TBNK 变化趋势的规律及影响因素还待进一步探讨研究。

【关键词】 儿童; 淋巴细胞亚群; 正常参考区间; 流式细胞术

基金项目: 江苏省徐州市科技项目(XZZD1368)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2021.01.017

Investigation on normal reference intervals of lymphocyte subsets in children in Xuzhou and surrounding areas Fang Daihua, Deng Luohua, Wu Hongwei, Wang Wenna, Chen Nayun

Department of Blood Transfusion, the Affiliated Xuzhou Children's Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221006, Jiangsu, China

Corresponding author: Fang Daihua, Email: fangdaihua@163.com

【Abstract】Objective To establish the normal reference intervals of lymphocyte subsets (TBNK) in children of different ages in Xuzhou and surrounding areas. **Methods** The peripheral blood samples of 1 378 children were collected from Xuzhou City and its peripheral area and the flow cytometry was used to detect the cell proportion and cell count of TBNK (CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD19⁺ and CD3⁺CD16/56⁺ cells). The normal reference intervals and variation trends of TBNK in children of different ages were statistically analyzed. **Results** ① The proportion of CD3⁺ cells did not change significantly during the neonatal period (≤4 weeks), but the proportion in early infancy period (5 weeks-5 months) was significantly lower than that in neonatal period [69.70% (56.98%, 79.46%) vs. 81.12% (69.63%, 89.82%), $P < 0.05$]. Afterwards, there was no significant change until puberty. The gradual decreasing trend of CD3⁺ cell count from early childhood (1-2 years) to the adolescence (12-17 years) reached the end. ② The proportion of CD3⁺CD4⁺ cells was the highest [58.18% (44.01%, 71.44%)] during the neonatal period, but gradually decreased from infancy to preschool age (3-5 years), while there was no significant change between school age (6-12 years) and adolescence. The CD3⁺CD4⁺ cells count from 1 week-12 months old was significantly higher than that of < 1 week old [$\times 10^9/L$: 2.19 (0.98, 3.65) vs. 1.60 (0.77, 2.83), $P < 0.05$], and then decreased gradually. ③ The proportion of CD3⁺CD8⁺ T cells did not change significantly within 6 months, but increased gradually from 6 months to school age, and then decreased during puberty compared with the proportion in school age. The CD3⁺CD8⁺ cell count presented the trend of firstly increasing and then decreasing. ④ The proportion of CD3⁺CD19⁺ cells was relatively low during the neonatal period [9.85% (4.11%, 19.80%)] and fluctuated from 6 months onward to adolescence; the CD3⁺CD19⁺ cell count also showed a trend of firstly increasing and then decreasing, and reached the highest level during 6-12 months [1.15 (0.53, 2.13) $\times 10^9/L$]. ⑤ The proportion and count of CD3⁺CD16/56⁺ cells all showed a trend of fluctuation change. ⑥ The highest ratio of CD3⁺CD4⁺ cells to CD3⁺CD8⁺ cells (CD4⁺/CD8⁺) was in the neonatal period [2.76 (1.33, 5.72)], then the ratio gradually decreased, and there was a slight increase during adolescence. ⑦ The proportion and count of CD3⁺CD4⁺CD8⁺ cells did not change significantly. **Conclusions** The normal reference intervals of proportion and count of TBNK are obtained by data analysis and clinical detection on blood samples collected from 8 age groups of children. However, the rules of TBNK changing trend and its influencing factors are necessary to be further studied.

【Key words】 Child; Lymphocyte subset; Normal reference interval; Flow cytometry

Fund program: Science and Technology Project of Xuzhou City, Jiangsu Province (XZZD1368)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2021.01.017

在免疫系统中,淋巴细胞亚群(TB NK)扮演着最重要的角色,其失调会导致多种疾病,如肿瘤、自身免疫性疾病、免疫缺陷疾病等^[1-2]。淋巴细胞中的 T 细胞、B 细胞和自然杀伤细胞(NK 细胞)亚群检测被临床广泛应用。其中 CD4⁺ 细胞在外周血中的比例和计数以及 CD3⁺CD4⁺ 细胞与 CD3⁺CD8⁺ 细胞比值(CD4⁺/CD8⁺)可作为获得性免疫缺陷综合征(AIDS)、白血病、淋巴瘤研究和治疗的重要参考依据^[3-4]。有研究显示,CD4⁺、CD8⁺ 细胞亚群与手足口病患儿病情严重程度高度相关^[5]。TB NK 分布受生态环境、社会经济等多种因素影响,不同地域、种族和性别人群间存在差异^[6-8]。目前国内尚无统一的 TB NK 参考区间,大多数临床实验室均使用国外诊断试剂说明书提供的 TB NK 正常参考区间出具检验报告单。部分国内实验室研究出了针对中国人种的成人 TB NK 正常参考区间,但是缺少儿童的 TB NK 参考区间^[8]。因此,为提高临床实验室淋巴细胞检测水平,迫切需要建立适合我国儿童的 TB NK 的正常参考区间。生物检测指标的正常参考区间不但存在不同实验室操作背景、个体和地域差异,也受不同生活方式、自然与社会环境的影响,因此建立有针对性的正常参考区间可为儿童免疫缺陷疾病的诊断、免疫状态的判定与疾病治疗提供确切依据。本研究收集了 1 378 名儿童的淋巴细胞检测结果,旨在探讨徐州及周边地区不同年龄段儿童的 TB NK 正常参考区间,并分析 TB NK 随年龄的变化趋势,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象:选择 2013 年 4 月至 2018 年 1 月幼儿园体检正常儿童、徐州医科大学附属徐州儿童医院门诊体检正常儿童以及在本院治疗的胯关节脱位、包茎患儿(机体免疫功能状态正常)作为研究对象,所有受检儿童均为徐州及周边地区(即淮海经济区相邻苏鲁豫皖四省交界区)汉族儿童。排除患有感染性疾病以及免疫缺陷疾病或其他疾病的儿童。所有儿童接受专业人员的体格检查,包括头围、身高、体重,测量结果健康者可作为试验候选人。共招募 1 378 名受检儿童,其中男生 869 名(占 63.1%),女生 509 名(占 36.9%)。

1.2 仪器与试剂:BD FACSCanto II 流式细胞仪(美国 BD 公司);TB NK 试剂盒、红细胞裂解液、计数管购自北京同生时代生物技术有限公司。TB NK 试剂盒单克隆抗体为胞外抗体,包括 T 淋巴细胞抗体 CD3、CD4、CD8, B 淋巴细胞抗体 CD19, NK 淋

巴细胞抗体 CD16、CD56,白细胞抗体 CD45。本研究检测 6 种 TB NK,包括 T 细胞(CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD4⁺CD8⁺), B 细胞(CD3⁻CD19⁺), NK 细胞(CD3⁻CD16/56⁺)。

1.3 研究方法

1.3.1 样本采集:就诊当天采集受检者空腹静脉血 1 mL,采用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,12 h 内检测。

1.3.2 流式细胞术分析 TB NK:采用反向移液技术吸取 50 μL 混匀的 EDTA-K₂ 抗凝全血,加入计数微球管(TS Count)底部,同时加入 20 μL 抗体。涡旋混匀后室温避光反应 20 min。向管内加入 450 μL 红细胞裂解液,涡旋振荡器上轻轻混匀约 15 s,室温避光反应 15 min。再次于涡旋振荡器上轻轻混匀约 15 s,上机检测。使用 BD FACS Canto 2.4 软件获取 2 500 个淋巴细胞并分析各亚群。

1.4 儿童年龄分组:依据我国现行儿科年龄分段^[9],18 岁以前可分为 6 个阶段,0~4 周龄为新生儿期,4 周龄~1 岁为婴儿期,1~3 岁为幼儿期,3~6 岁为学龄前期,6~12 岁为学龄期,12~17 岁为青春期。结合临床情况,又将新生儿期及婴儿期细分出 0~1 周龄为围产期新生儿,4 周龄~6 个月为前婴儿期。本研究招募的 1 378 名受检儿童按年龄分为 8 组,分组情况及性别构成见表 1。

表 1 徐州及周边地区 1 378 名儿童年龄分组及性别构成

组别	年龄	例数 (例)	性别(例)		组别	年龄	例数 (例)	性别(例)	
			男性	女性				男性	女性
I	<1 周	196	124	72	V	1~2 岁	247	141	106
II	1~4 周	105	75	30	VI	3~5 岁	279	159	120
III	5 周~5 个月	147	97	50	VII	6~11 岁	157	98	59
IV	6~12 个月	118	87	31	VIII	12~17 岁	129	88	41
合计							1 378	869	509

对各年龄组 TB NK 细胞比例和细胞计数结果进行两两比较,若出现差异不显著的相邻组,则进行合并;若连续多组出现相邻差异不显著,而其中不相邻组间差异显著,则优先从两端进行合并。合并后再次统计 TB NK 分布范围。

1.5 伦理学:本研究符合医学伦理学标准,并经本院医学伦理委员会批准(审批号:20210110),受试者监护人均签署知情同意书。

1.6 统计学分析:采用 SPSS 19.0 统计软件分析数据。Kolmogorov-Smirnova 检验显示所有数据呈偏态分布,以中位数(百分位数)[$M(P_{2.5}, P_{97.5})$]表示正常参考区间,多组间比较采用非参数 Kruskal-Wallis 检验,两两比较采用 Dunn-Bonferroni 检验。 $P < 0.05$

为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各年龄组 TBNK 的检测结果:在各年龄组中不同 TBNK 的分布范围不同,且各细胞亚群的变化规律亦不相同。

2.1.1 CD3⁺ 细胞(表 2):CD3⁺ 细胞比例在 4 周前较高,4 周后明显下降($P < 0.05$),在 6 个月后趋于稳定;CD3⁺ 细胞计数在 1 周内上升至 1~4 周最高,随年龄增长呈下降趋势。

表 2 徐州及周边地区不同年龄组儿童 CD3⁺ 细胞比例和细胞计数的正常参考区间 [$M(P_{2.5}, P_{97.5})$]

组别	例数(例)	CD3 ⁺ 细胞比例(%)	
		合并分组前	合并分组后
I	196	81.33 (69.18, 90.25)	81.12 (69.63, 89.82)
II	105	81.05 (69.66, 89.04)	
III	147	69.70 (56.98, 79.46) ^a	69.70 (56.98, 79.46)
IV	118	66.47 (55.20, 77.78)	
V	247	66.53 (53.27, 76.61)	
VI	279	67.99 (55.10, 78.51)	67.27 (55.02, 78.10)
VII	157	67.32 (55.38, 78.45)	
VIII	129	66.86 (57.25, 78.83)	

组别	例数(例)	CD3 ⁺ 细胞计数($\times 10^9/L$)	
		合并分组前	合并分组后
I	196	2.19 (1.12, 4.05) ^a	2.19 (1.12, 4.05)
II	105	3.24 (1.53, 5.28)	3.24 (1.53, 5.28)
III	147	3.24 (1.52, 4.85) ^a	3.24 (1.63, 5.03)
IV	118	3.28 (1.68, 5.15) ^b	
V	247	2.71 (1.44, 4.43)	2.71 (1.44, 4.43)
VI	279	2.27 (1.36, 3.60) ^{bc}	2.27 (1.36, 3.60)
VII	157	1.89 (1.30, 3.03)	1.89 (1.30, 3.03)
VIII	129	1.56 (1.07, 2.84) ^c	1.56 (1.07, 2.84)

注: I 组为 <1 周, II 组为 1~4 周, III 组为 5 周~5 个月, IV 组为 6~12 个月, V 组为 1~2 岁, VI 组为 3~5 岁, VII 组为 6~11 岁, VIII 组为 12~17 岁;与 II 组比较, ^a $P < 0.05$;与 V 组比较, ^b $P < 0.05$;与 VII 组比较, ^c $P < 0.05$

2.1.2 CD3⁺CD4⁺ 细胞(表 3):CD3⁺CD4⁺ 细胞比例在 4 周前较高,4 周后明显下降($P < 0.05$),之后 CD3⁺CD4⁺ 细胞比例逐渐下降,到 6 岁后才趋于稳定;CD3⁺CD4⁺ 细胞计数在 1 周内最高,之后随年龄增长呈下降趋势。

2.1.3 CD3⁺CD8⁺ 细胞(表 4):CD3⁺CD8⁺ 细胞比例在 6 个月后开始随年龄增长呈明显升高趋势($P < 0.05$),直至 12 岁后趋于稳定;CD3⁺CD8⁺ 细胞计数在 1 周内最低,之后逐渐升高,至 6 个月~2 岁最高,而后又呈下降趋势。

2.1.4 CD3⁺CD4⁺CD8⁺ 细胞(表 5):不同年龄组的 CD3⁺CD4⁺CD8⁺ 细胞在血液中含量相对偏低,变化规律不明显,细胞计数结果也较低,且未显示出明显的变化趋势。

表 3 徐州及周边地区不同年龄组儿童 CD3⁺CD4⁺ 细胞比例和细胞计数的正常参考区间 [$M(P_{2.5}, P_{97.5})$]

组别	例数(例)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ 细胞比例(%)	
		合并分组前	合并分组后
I	196	58.15 (43.81, 72.01)	58.18 (44.01, 71.44)
II	105	58.18 (44.81, 70.45) ^a	
III	147	47.14 (37.66, 58.26)	47.14 (37.66, 58.26)
IV	118	41.76 (31.23, 55.75) ^{ab}	41.76 (31.23, 55.75)
V	247	38.71 (27.79, 50.42)	38.71 (27.79, 50.42)
VI	279	36.35 (26.31, 46.25) ^{bc}	36.35 (26.31, 46.25)
VII	157	33.56 (24.32, 46.54)	34.05 (24.57, 44.32)
VIII	129	34.79 (26.01, 42.71)	

组别	例数(例)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ 细胞计数($\times 10^9/L$)	
		合并分组前	合并分组后
I	196	1.60 (0.77, 2.83) ^d	1.60 (0.77, 2.83)
II	105	2.36 (1.00, 4.08)	
III	147	2.25 (0.99, 3.29)	2.19 (0.98, 3.65)
IV	118	2.06 (0.97, 3.46) ^b	
V	247	1.64 (0.79, 2.78)	1.64 (0.79, 2.78)
VI	279	1.19 (0.66, 2.06) ^{bc}	1.19 (0.66, 2.06)
VII	157	0.96 (0.63, 1.66)	0.96 (0.63, 1.66)
VIII	129	0.78 (0.51, 1.48) ^c	0.78 (0.51, 1.48)

注: I 组为 <1 周, II 组为 1~4 周, III 组为 5 周~5 个月, IV 组为 6~12 个月, V 组为 1~2 岁, VI 组为 3~5 岁, VII 组为 6~11 岁, VIII 组为 12~17 岁;与 III 组比较, ^a $P < 0.05$;与 V 组比较, ^b $P < 0.05$;与 VII 组比较, ^c $P < 0.05$;与 II 组比较, ^d $P < 0.05$

表 4 徐州及周边地区不同年龄组儿童 CD3⁺CD8⁺ 细胞比例和细胞计数的正常参考区间 [$M(P_{2.5}, P_{97.5})$]

组别	例数(例)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞比例(%)	
		合并分组前	合并分组后
I	196	20.97 (11.96, 35.33)	20.79 (12.86, 34.36)
II	105	21.13 (12.59, 33.89)	
III	147	20.28 (14.24, 30.76) ^a	23.50 (13.86, 36.74)
IV	118	23.50 (13.86, 36.74)	23.50 (13.86, 36.74)
V	247	25.83 (17.17, 37.01) ^{ab}	25.83 (17.17, 37.01)
VI	279	31.10 (21.14, 40.62)	31.10 (21.14, 40.62)
VII	157	33.28 (21.97, 41.64) ^b	33.28 (21.97, 41.64)
VIII	129	29.63 (20.53, 39.15) ^c	29.63 (20.53, 39.15)

组别	例数(例)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞计数($\times 10^9/L$)	
		合并分组前	合并分组后
I	196	0.57 (0.24, 1.36) ^d	0.57 (0.24, 1.36)
II	105	0.83 (0.35, 1.78)	0.91 (0.38, 1.82)
III	147	0.92 (0.45, 1.91) ^a	
IV	118	1.14 (0.51, 2.07)	1.10 (0.52, 2.05)
V	247	1.07 (0.55, 2.02)	
VI	279	0.99 (0.56, 1.78)	0.97 (0.56, 1.65)
VII	157	0.93 (0.53, 1.54)	
VIII	129	0.67 (0.38, 1.30) ^c	0.67 (0.38, 1.30)

注: I 组为 <1 周, II 组为 1~4 周, III 组为 5 周~5 个月, IV 组为 6~12 个月, V 组为 1~2 岁, VI 组为 3~5 岁, VII 组为 6~11 岁, VIII 组为 12~17 岁;与 IV 组比较, ^a $P < 0.05$;与 VI 组比较, ^b $P < 0.05$,与 VII 组比较, ^c $P < 0.05$;与 II 组比较, ^d $P < 0.05$

2.1.5 CD3⁺CD19⁺ 细胞(表 6):在 4 周后 CD3⁺CD19⁺ 细胞计数开始明显升高,到 6~12 个月达到最高,直到 1 岁开始逐年下降。CD3⁺CD19⁺ 细胞比例在 12 岁后出现升高($P < 0.05$)。

表 5 徐州及周边地区不同年龄组儿童 CD3⁺CD4⁺CD8⁺ 细胞比例和细胞计数的正常参考区间 [M(P_{2.5}, P_{97.5})]

组别	例数 (例)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ 细胞比例 (%)	
		合并分组前	合并分组后
I	196	0.19 (0.02, 0.85)	
II	105	0.23 (0.01, 0.76)	0.19 (0.02, 0.80)
III	147	0.17 (0.00, 0.77) ^a	
IV	118	0.06 (0.00, 0.44)	
V	247	0.08 (0.02, 0.31)	
VI	279	0.08 (0.02, 0.36)	0.08 (0.02, 0.34)
VII	157	0.07 (0.02, 0.26)	
VIII	129	0.24 (0.02, 0.59) ^b	0.24 (0.02, 0.59)

组别	例数 (例)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ 细胞计数 (×10 ⁹ /L)	
		合并分组前	合并分组后
I	196	0.005 (0.000, 0.024)	
II	105	0.008 (0.000, 0.039)	0.006 (0.000, 0.033)
III	147	0.007 (0.000, 0.034) ^a	
IV	118	0.003 (0.000, 0.023)	
V	247	0.003 (0.001, 0.014)	0.003 (0.001, 0.016)
VI	279	0.003 (0.001, 0.013) ^b	
VII	157	0.002 (0.000, 0.008)	0.002 (0.000, 0.008)
VIII	129	0.005 (0.001, 0.014) ^b	0.005 (0.001, 0.014)

注：I 组为 <1 周，II 组为 1~4 周，III 组为 5 周~5 个月，IV 组为 6~12 个月，V 组为 1~2 岁，VI 组为 3~5 岁，VII 组为 6~11 岁，VIII 组为 12~17 岁；与 IV 组比较，^aP<0.05；与 VII 组比较，^bP<0.05

表 6 徐州及周边地区不同年龄组儿童 CD3⁻CD19⁺ 细胞比例和细胞计数的正常参考区间 [M(P_{2.5}, P_{97.5})]

组别	例数 (例)	CD3 ⁻ CD19 ⁺ 细胞比例 (%)	
		合并分组前	合并分组后
I	196	10.19 (4.47, 19.80)	
II	105	8.61 (3.56, 19.75) ^a	9.85 (4.11, 19.80)
III	147	19.88 (12.46, 32.45)	19.88 (12.46, 32.45)
IV	118	24.50 (13.31, 37.06) ^a	
V	247	23.59 (14.81, 34.19) ^b	23.80 (14.19, 35.44)
VI	279	19.44 (10.84, 29.46)	19.44 (10.84, 29.46)
VII	157	15.62 (9.57, 26.59) ^b	15.62 (9.57, 26.59)
VIII	129	17.36 (9.49, 25.52) ^c	17.36 (9.49, 25.52)

组别	例数 (例)	CD3 ⁻ CD19 ⁺ 细胞计数 (×10 ⁹ /L)	
		合并分组前	合并分组后
I	196	0.28 (0.09, 0.65)	
II	105	0.34 (0.09, 0.86) ^a	0.31 (0.09, 0.79)
III	147	0.87 (0.41, 1.88)	0.87 (0.41, 1.88)
IV	118	1.15 (0.53, 2.13) ^{ad}	1.15 (0.53, 2.13)
V	247	0.96 (0.45, 1.84) ^b	0.96 (0.45, 1.84)
VI	279	0.63 (0.32, 1.30)	0.63 (0.32, 1.30)
VII	157	0.42 (0.25, 1.01) ^b	0.41 (0.23, 1.01)
VIII	129	0.38 (0.22, 1.01)	

注：I 组为 <1 周，II 组为 1~4 周，III 组为 5 周~5 个月，IV 组为 6~12 个月，V 组为 1~2 岁，VI 组为 3~5 岁，VII 组为 6~11 岁，VIII 组为 12~17 岁；与 IV 组比较，^aP<0.05；与 VII 组比较，^bP<0.05

2.1.6 NK 细胞(表 7)：CD3⁻CD16/56⁺ 细胞比例和细胞计数随年龄增长并无明显变化趋势，细胞计数在 1 周后升高，6 个月下降，3~6 岁时又出现升高，12 岁后再次下降。

表 7 徐州及周边地区不同年龄组儿童 CD3⁻CD16/56⁺ 细胞比例和细胞计数的正常参考区间 [M(P_{2.5}, P_{97.5})]

组别	例数 (例)	CD3 ⁻ CD16/56 ⁺ 细胞比例 (%)	
		合并分组前	合并分组后
I	196	5.32 (1.53, 14.79) ^a	5.32 (1.53, 14.79)
II	105	7.74 (2.48, 16.37)	
III	147	7.95 (3.49, 15.16)	
IV	118	6.51 (2.46, 17.66)	7.49 (3.04, 18.74)
V	247	7.30 (3.37, 20.63) ^b	
VI	279	10.37 (4.38, 22.21)	10.37 (4.38, 22.21)
VII	157	14.97 (4.93, 29.05) ^b	
VIII	129	11.89 (5.43, 27.94)	13.41 (5.34, 28.52)

组别	例数 (例)	CD3 ⁻ CD16/56 ⁺ 细胞计数 (×10 ⁹ /L)	
		合并分组前	合并分组后
I	196	0.14 (0.03, 0.51) ^a	0.14 (0.03, 0.51)
II	105	0.31 (0.08, 0.77)	
III	147	0.33 (0.13, 0.75)	
IV	118	0.33 (0.11, 0.95)	0.32 (0.11, 0.96)
V	247	0.31 (0.11, 1.07)	
VI	279	0.32 (0.13, 0.95)	
VII	157	0.40 (0.14, 0.94)	0.40 (0.14, 0.94)
VIII	129	0.27 (0.11, 0.92) ^c	0.27 (0.11, 0.92)

注：I 组为 <1 周，II 组为 1~4 周，III 组为 5 周~5 个月，IV 组为 6~12 个月，V 组为 1~2 岁，VI 组为 3~5 岁，VII 组为 6~11 岁，VIII 组为 12~17 岁；与 II 组比较，^aP<0.05；与 VI 组比较，^bP<0.05；与 VII 组比较，^cP<0.05

2.1.7 CD4⁺/CD8⁺ 比值(表 8)：CD4⁺/CD8⁺ 比值随年龄增长呈逐年下降趋势，其分布范围在 1 周以内最为宽泛 [2.80 (1.31, 6.01)]，之后分布范围也逐步收窄，到 12 岁以后才基本稳定在 1.15 (0.75, 1.88)。

表 8 徐州及周边地区不同年龄组儿童 CD4⁺/CD8⁺ 比值的正常参考区间 [M(P_{2.5}, P_{97.5})]

组别	例数 (例)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ 比值	
		合并分组前	合并分组后
I	196	2.80 (1.31, 6.01)	
II	105	2.67 (1.45, 4.95)	2.76 (1.33, 5.72)
III	147	2.34 (1.39, 3.50) ^a	2.34 (1.39, 3.50)
IV	118	1.81 (0.85, 3.44)	1.81 (0.85, 3.44)
V	247	1.51 (0.88, 2.57) ^{ab}	1.51 (0.88, 2.57)
VI	279	1.16 (0.75, 1.97)	1.16 (0.75, 1.97)
VII	157	1.01 (0.66, 1.78) ^b	1.01 (0.66, 1.78)
VIII	129	1.15 (0.75, 1.88) ^c	1.15 (0.75, 1.88)

注：I 组为 <1 周，II 组为 1~4 周，III 组为 5 周~5 个月，IV 组为 6~12 个月，V 组为 1~2 岁，VI 组为 3~5 岁，VII 组为 6~11 岁，VIII 组为 12~17 岁；与 IV 组比较，^aP<0.05；与 VI 组比较，^bP<0.05；与 VII 组比较，^cP<0.05

2.2 不同年龄组合并统计后的 TBNK 结果(表 2~8)：对各年龄组 TBNK 检测结果进行两两比较，合并差异不显著的相邻组，若连续多组相邻差异不显著而不相邻组间差异显著，则优先合并两端组。合并后再次统计 TBNK 的细胞比例和细胞计数，结果显示不同年龄组儿童外周血中 TBNK 细胞比例和细胞计数仍有不同变化趋势。

3 讨论

实验室正常参考区间是临床实施精准医疗的基础,对患者的整体治疗效果有重要影响。尤其在儿童生长发育的不同阶段(从婴儿期到青春期),检查指标的参考范围可能会有很大的变化。性别和种族差异对实验室正常参考区间也存在重要影响^[10]。本研究将受检儿童根据年龄分组来研究 TBNK 细胞比例和细胞计数,重点强调的是 TBNK 细胞计数随年龄增长有相应改变,特别是新生儿期和婴儿期。研究结果清晰地显示了 TBNK 细胞计数随年龄增长呈现出一定的变化趋势,本研究把年龄组细分为 8 组,更能精确地反映整个儿童期的细微变化,正是由于 TBNK 检测结果随年龄变化,所以要求实验室建立年龄相关的 TBNK 正常参考区间,从而避免对不同年龄段儿童免疫状态的误诊。

人体免疫系统在发育的不同阶段呈现不同的特征,同时免疫器官也会随着年龄成熟和衰老,这都导致了 TBNK 呈现出年龄依赖性的动态演变,尤其在儿童阶段,各 TBNK 细胞数量的变化较大^[11-13]。因此,建立年龄相关的 TBNK 正常参考区间,有助于避免在儿童患者中的误诊,如 TBNK 相关缺陷和淋巴细胞水平异常升高等都会造成严重的后果。

本研究中, I、II、III 组年龄均小于 6 个月,可认为属于婴儿早期,IV 组年龄为 6~12 个月,可认为属于婴儿晚期,V 组及以后为幼儿期和儿童期。结果表明,婴儿早期 CD3⁺ 细胞比例较高,但细胞计数不是最高,可能是婴儿早期淋巴细胞总数不高,到了晚期,淋巴细胞总数升高,CD3⁺、CD3⁺CD4⁺ 细胞比例降低。1 岁之后,CD3⁺ 细胞比例基本不变,但细胞计数却随年龄增长而降低,说明淋巴细胞总数随年龄增长而减少,且与 CD3⁺ 减少有一定关系。

CD3⁺CD4⁺ 细胞比例随年龄下降,但 CD3⁺CD8⁺ 细胞比例却随年龄增长有上升趋势;CD4⁺CD8⁺ 细胞在胸腺内经组织相容性复合体(MHC-I 和 MHC-II)的正向选择后,成为只具有 CD4 和 CD8 抗原之一的细胞^[14]。因此外周血中 CD4⁺CD8⁺ 双阳性细胞很少。1 岁以后的儿童体内 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ 细胞计数与 CD3⁺ 细胞有类似趋势,不同的是婴幼儿时期两者的数量均随年龄增长而增加。

CD3⁺CD19⁺ 细胞比例与细胞计数的增减幅度表现出相同的变化趋势。在婴幼儿时期,随年龄增长而增加,而在儿童期,随年龄增长而减少。

CD3⁺CD16/56⁺ 细胞比例大体可认为随年龄增长而增加,局部有波动;CD3⁺CD16/56⁺ 细胞计数在

刚出生时最低,之后整体呈先上升后下降的趋势。

综上所述,本研究统计分析不同年龄段儿童 TBNK 细胞比例和计数的正常参考区间,未统计成人相关数据,因此无法研究儿童与成人的 TBNK 的关系,这也是之后实验需考虑到的。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, et al. B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease [J]. *Immunol Rev*, 2008, 223: 284-299. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00646.x.
- [2] 陈世德,李超乾,秦雪,等.多器官功能障碍综合征患者外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T 淋巴细胞的变化 [J]. *中国危重病急救医学*, 2009, 21 (3): 183-184. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.03.017.
- [3] Chen SD, Li CQ, Qin X, et al. The changes in CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T lymphocyte in peripheral blood of patients with multiple organ dysfunction syndrome [J]. *Chin Crit Care Med*, 2009, 21 (3): 183-184. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.03.017.
- [4] Kayser G, Schulte-Uentrop L, Siemel W, et al. Stromal CD4/CD25 positive T-cells are a strong and independent prognostic factor in non-small cell lung cancer patients, especially with adenocarcinomas [J]. *Lung Cancer*, 2012, 76 (3): 445-451. DOI: 10.1016/j.lungcan.2012.01.004.
- [5] 马新华. 调节性 T 细胞与肿瘤研究进展 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2011, 38 (2): 112-114, 119. DOI: 10.3969/j.issn.1674-1870.2011.02.008.
- [6] Ma XH. Advancement in the research on regulatory T cells and tumor [J]. *J Int Obstet Gynecol*, 2011, 38 (2): 112-114, 119. DOI: 10.3969/j.issn.1674-1870.2011.02.008.
- [7] 刘彦明,曹越,吴勤如,等.手足口病患儿氧化应激指标及外周血淋巴细胞百分比检测结果分析 [J]. *实用检验医师杂志*, 2015, 7 (4): 203-206. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.04.002.
- [8] Liu YM, Cao Y, Wu QR, et al. Oxidative stress and peripheral blood lymphocyte percentage analysis in HFMD children [J]. *Chin J Clin Pathol*, 2015, 7 (4): 203-206. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.04.002.
- [9] 蒋卫民,潘孝彰,康来仪,等.上海地区成人不同年龄组间 CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞计数正常值调查 [J]. *中华传染病杂志*, 2002, 20 (4): 203-205. DOI: 10.3760/j.issn:1000-6680.2002.04.003.
- [10] Jiang WM, Pan XZ, Kang LY, et al. Measurement of the CD4 and CD8 normal value range in adults from Shanghai area [J]. *Chin J Infect Dis*, 2002, 20 (4): 203-205. DOI: 10.3760/j.issn:1000-6680.2002.04.003.
- [11] 林琳,苏生利,傅继华,等.山东省健康成年人 T 淋巴细胞亚群正常参考值范围 [J]. *中华预防医学杂志*, 2009, 43 (11): 1040-1041. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2009.11.025.
- [12] Lin L, Su SL, Fu JH, et al. Normal reference range of T lymphocyte subsets in healthy adults in Shandong Province [J]. *Chin J Prevent Med*, 2009, 43 (11): 1040-1041. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2009.11.025.
- [13] 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, 21 (4): 223-226. DOI: 10.3760/j.issn:1009-9158.1998.04.010.
- [14] Zhu LH, Wang JZ. Reference values on blood lymphocyte immunophenotype in healthy Chinese adult [J]. *Chin J Med Lab Sci*, 1998, 21 (4): 223-226. DOI: 10.3760/j.issn:1009-9158.1998.04.010.
- [9] 王卫平. 儿科学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2013: 3-4.
- [9] Wang WP. Pediatrics [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2013: 3-4.
- [10] Ceriotti F. Establishing pediatric reference intervals: a challenging task [J]. *Clin Chem*, 2012, 58 (5): 808-810. DOI: 10.1373/clinchem.2012.183483.
- [11] Haynes BF, Markert ML, Sempowski GD, et al. The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection [J]. *Annu Rev Immunol*, 2000, 18: 529-560. DOI: 10.1146/annurev.immunol.18.1.529.
- [12] Dunn-Walters DK. The ageing human B cell repertoire: a failure of selection? [J]. *Clin Exp Immunol*, 2016, 183 (1): 50-56. DOI: 10.1111/cei.12700.
- [13] Hayhoe RP, Henson SM, Akbar AN, et al. Variation of human natural killer cell phenotypes with age: identification of a unique KLRG1-negative subset [J]. *Hum Immunol*, 2010, 71 (7): 676-681. DOI: 10.1016/j.humimm.2010.03.014.
- [14] Zerrahn J, Held W, Raulat DH. The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection [J]. *Cell*, 1997, 88 (5): 627-636. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81905-4.

(收稿日期: 2020-08-10)