

研究论著

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2023.07.008

广东省东莞市茶山镇健康人外周血 T 淋巴细胞分布的研究

叶燕华 黄碧彦 钟达均 杨明灿 魏秋静 古洁若 蒋雨彤

【摘要】 目的 分析广东省东莞市茶山镇健康成人外周静脉血 T 淋巴细胞亚群的分布。方法 收集 827 名健康成人静脉全血标本, 使用流式细胞术检测 CD3⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺ T 淋巴细胞、CD8⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、调节性 T 淋巴细胞 (Treg) 的比例和 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞比值。结果 CD3⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺ T 淋巴细胞、CD8⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞比值、双阳性 T 淋巴细胞和 Treg 细胞的比例分别为 40.5%~75.2%、35.4%~68.9%、27.4%~61.8%、0.6~2.4、0.2%~2.7% 和 2.4%~6.0%。各淋巴细胞亚群的分布在不同年龄、性别间分布比较差异有统计学意义 (P 均 < 0.05)。结论 本研究成功分析了广东省东莞市茶山镇健康成人 T 淋巴细胞亚群的分布, 可为本地区临床医师提供有价值的参考依据。

【关键词】 淋巴细胞亚群; 参考值范围; 流式细胞

Study of distribution of peripheral T-lymphocytes in healthy adults from Chashan Town of Dongguan in Guangdong Province Ye Yanhua[△], Huang Biyan, Zhong Dajun, Yang Mingcan, Wei Qiuqing, Gu Jieruo, Jiang Yutong.[△] Department of Otolaryngology, Chashan Hospital of Dongguan, Dongguan, 523000

Corresponding author, Jiang Yutong, E-mail: jiangyt7@mail.sysu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To explore the distribution of T lymphocyte subsets in peripheral blood of healthy adults from Chashan Town of Dongguan in Guangdong Province. **Methods** The venous whole blood samples were collected from 827 healthy adults. The percentage of CD3⁺ T cells, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, CD4⁺CD8⁺ double positive (DP) T cells, and regulatory T (Treg) cells and CD4⁺/CD8⁺ ratio were determined by flow cytometry. **Results** The percentage of CD3⁺ T cells, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, CD4⁺/CD8⁺ ratio, DP T cells and Treg cells were determined as 40.5%-75.2%, 35.4%-68.9%, 27.4%-61.8%, 0.6-2.4, 0.2%-2.7% and 2.4%-6.0%, respectively. Significant differences were observed in the distribution of lymphocyte subsets regarding age and gender (all $P < 0.05$). **Conclusion** The distribution of T lymphocyte subsets in healthy adults from Chashan Town of Dongguan in Guangdong Province was successfully analyzed, providing valuable reference for clinicians in this region.

【Key words】 Lymphocyte subset; Reference range; Flow cytometry

外周血淋巴细胞对于维持免疫稳态至关重要。T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞通过体液和细胞免疫促进适应性免疫反应。淋巴细胞亚群的测定对感染、移植排斥反应、风湿免疫病、恶性肿瘤等疾病的诊断具有重要价值^[1]。分析健康个体中这些免疫细胞的比例可以帮助鉴定患者的免疫状况。既往研究表明, 淋巴细胞亚群的分布与性别、年龄、种族和生活方式等因素相关^[1,2]。我国地大物博, 不

同地域人民的生活环境与习惯有较大差别, 因此有必要分析本地区淋巴细胞亚群的分布。茶山镇位于东莞市中北部, 常住人口 21.97 万人, 男/女构成比约为 1.3 : 1。笔者对广东省东莞市茶山地区常住人口健康成人的淋巴亚群百分比进行了检测, 分析了不同性别和年龄健康成人淋巴细胞亚群之间的差异, 初步探索广东省东莞市茶山镇健康成人 T 淋巴细胞亚群的分布, 现报道如下。

基金项目: 国家自然科学基金 (82201998); 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2021A1515111172)

作者单位: 523000 东莞, 东莞市茶山医院耳鼻喉科 (叶燕华, 钟达均), 体检科 (黄碧彦); 510630 广州, 中山大学附属第三医院风湿免疫科 (杨明灿, 魏秋静, 古洁若, 蒋雨彤)

通信作者: 蒋雨彤, E-mail: jiangyt7@mail.sysu.edu.cn

对象与方法

一、研究对象

本研究的研究时间为2020年10至12月,纳入至东莞市茶山医院的827名健康体检者,均为当地常住居民。研究对象均为汉族,其中男479名(男性组)、女348名(女性组)。年龄22~79岁。根据年龄段将研究对象分为4个年龄组,即22~30岁组、31~40岁组、41~50岁组和51~79岁组。研究对象排除患有系统性疾病、感染、恶性肿瘤和正在服用可能会影响免疫系统的药物(即糖皮质激素、免疫抑制剂等)的受试者。研究得到东莞市茶山医院伦理委员会的批准[批件号:2021(20)],所有参与者已签署知情同意书。

二、方法

1. 主要仪器与试剂

使用以下抗体用于流式细胞术:抗CD3、CD4、CD8、CD127、CD19、CD56和CD25抗体(Biolegend,美国)。荧光染料使用CD3-APC-Cy7、CD4-FITC、CD8-PerCP-Cy5.5、CD127-PE、CD19-AF700、CD56-PE-Cy7和CD25-BV421。使用CytoFLEX流式细胞仪(Beckman,美国)分析样品。

2. 检测方法

采集研究对象外周静脉血3 mL,用依地酸二钾抗凝,并于6 h内检测,严格按试剂盒说明书进行操作:取专用试管内加入荧光素标记抗体10 μ L,抗凝全血50 μ L,振荡混匀并在室温下孵育20 mL。然后加入溶血素2 mL,充分混匀后避光溶血15 min,离心后弃上清,用2 mL磷酸盐缓冲液PBS洗涤,离心后弃上清,加450 mL PBS待测。标本制备后立即上机运行,分析CD3⁺T淋巴细胞、CD4⁺T淋巴细胞、CD8⁺T淋巴细胞、CD4⁺CD8⁺双阳性T淋巴细胞、调节性T淋巴细胞(Treg, CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻)的比例并计算CD4⁺/CD8⁺T淋巴细胞的比值(CD4⁺/CD8⁺)。分析不同性别、不同年龄健康成人淋巴细胞亚群检测结果间的差异。

三、统计学处理

使用SPSS 20.0进行数据分析。本研究数据均不符合正态分布,用 $M(P_{25}, P_{75})$ 或参考值范围(RR)表示。每个淋巴细胞亚群的RR定义为百分位数2.5%~97.5%^[1]。不同年龄和性别的亚组

之间的比较中,2组数据选用Mann-Whitney U 检验,多组数据使用Kruskal-Wallis H 检验,两两比较使用Bonferroni法校正检验水准。使用Spearman秩相关分析确定年龄和免疫细胞百分比的相关性。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

结果

一、不同性别健康成人的淋巴细胞亚群检测结果

男性组年龄为39(33,46)岁,女性组年龄为37(31,44)岁,组间比较差异无统计学意义($Z = -1.892, P = 0.058$)。男性组的CD4⁺T淋巴细胞百分比为47.6(43.0,55.6)%,女性组为49.5(44.0,56.8)%,其中男性组的CD4⁺T淋巴细胞比例更低($Z = 2.838, P = 0.005$)。男性组CD8⁺T淋巴细胞比例为43.3(36.6,50.9)%,女性组为40.0(34.7,46.8)%,其中男性组的CD8⁺T淋巴细胞比例更高($Z = -4.400, P < 0.001$)。健康男性的双阳性T淋巴细胞比例为1.3(1.1,1.5)%,女性组为1.4(1.1,1.7)%,其中男性组的双阳性T淋巴细胞比例更低($Z = 2.705, P = 0.007$)。见表1。

二、不同年龄健康成人的淋巴细胞亚群检测结果

不同年龄组的CD4⁺CD8⁺T淋巴细胞比例比较差异无统计学意义($H = 4.011, P = 0.260$),而其余T淋巴细胞亚群在不同年龄组的分布比较差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。其中CD4⁺T淋巴细胞($H = 47.197, P < 0.001$)及CD4⁺/CD8⁺($H = 50.784, P < 0.001$)随着年龄增长而升高,CD8⁺T淋巴细胞随着年龄增长而下降($H = 42.007, P < 0.001$)。31~40岁以上年龄越大的人群CD3⁺T淋巴细胞比例随着年龄增长有下降趋势,其中51~79岁人群较31~40岁人群的CD3⁺T淋巴细胞下降($P < 0.001$)。CD4⁺CD8⁺双阳性T淋巴细胞比例在40岁以上和40岁以下人群间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。Bonferroni法校正显示,Treg比例在22~30岁和31~40岁年龄组间比较差异无统计学意义($P > 0.008$),Treg比例在50岁以上人群明显下降,在51~79岁和22~30岁年龄组的分布比较差异有统计学意义($P = 0.003$)。见表2。Spearman相关性分析显示,年龄与CD4⁺T淋巴细胞($r_s = 0.269, P < 0.001$)、CD4⁺/CD8⁺比值($r_s = 0.275, P < 0.001$)呈

表1 不同性别健康成人淋巴细胞亚群比例和RR

T淋巴细胞	M (P ₂₅ , P ₇₅)			Z值 ^a	P值 ^a	RR		
	总体 (827名)	男性组 (479名)	女性组 (348名)			总体 (827名)	男性组 (479名)	女性组 (348名)
CD3 ⁺ /%	56.2 (49.8, 63.9)	55.8 (49.9, 64.1)	56.9 (49.8, 63.8)	0.171	0.864	40.5~75.2	40.4~75.5	40.8~74.7
CD4 ⁺ /%	48.3 (43.5, 56.1)	47.6 (43.0, 55.6)	49.5 (44.0, 56.8)	2.838	0.005	35.4~68.9	31.1~69.7	38.4~68.0
CD8 ⁺ /%	41.8 (35.9, 49.0)	43.3 (36.6, 50.9)	40.0 (34.7, 46.8)	-4.400	<0.001	27.4~61.8	27.3~63.0	27.4~57.3
CD4 ⁺ CD8 ⁺ /%	1.3 (1.1, 1.7)	1.3 (1.1, 1.5)	1.4 (1.1, 1.7)	2.705	0.007	0.2~2.7	0.2~2.5	0.2~3.0
Treg/%	5.2 (4.3, 5.6)	5.2 (4.3, 5.6)	5.1 (4.4, 5.5)	-1.574	0.115	2.4~6.0	2.6~6.1	2.2~6.0
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.2 (0.9, 1.6)	1.1 (0.9, 1.6)	1.2 (1.0, 1.6)	4.143	<0.001	0.6~2.4	0.6~2.5	0.7~2.3

注：^a 男性组和女性组的组间比较。

表2 不同年龄组健康成人淋巴细胞亚群比例和RR [中位数 (RR)]

组别	人数	淋巴细胞亚群比例/%					CD4 ⁺ /CD8 ⁺
		CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺	Treg	
22~30岁组	158	55.9 (39.7~74.6)	46.1 (31.1~63.1)	44.2 (30.9~65.4)	1.3 (0.2~2.9)	5.2 (2.6~8.8)	1.0 (0.8~1.4)
31~40岁组	343	58.3 (42.6~76.0)	47.9 (34.2~65.2)	43.0 (29.6~60.8)	1.3 (0.2~2.6)	5.2 (2.4~6.0)	1.1 (0.9~1.5)
41~50岁组	257	55.6 (39.7~76.2)	50.3 (38.3~70.9)	39.5 (26.6~61.0)	1.4 (0.2~2.8)	5.2 (2.8~6.0)	1.3 (1.0~1.7)
51~79岁组	69	51.3 (23.4~79.0)	54.7 (33.0~80.6)	35.6 (15.9~60.9)	1.3 (0.1~6.6)	4.7 (1.8~6.1)	1.4 (1.1~2.0)
H值		19.049	47.193	42.007	4.011	12.571	50.784
P值 ^a		<0.001	<0.001	<0.001	0.260	0.006	<0.001
调整后P值 ^b		0.790	0.093	0.864	—	1.000	0.364
调整后P值 ^c		1.000	<0.001	<0.001	—	1.000	<0.001
调整后P值 ^d		0.038	<0.001	<0.001	—	0.003	<0.001
调整后P值 ^e		0.060	0.002	0.001	—	1.000	<0.001
调整后P值 ^f		<0.001	<0.001	<0.001	—	0.020	<0.001
调整后P值 ^g		0.096	0.190	0.211	—	0.031	0.175

注：^a 比较不同年龄组淋巴细胞亚群比例的差异，已使用 Bonferroni 法校正 P 值；^b 比较 22~30 岁组和 31~40 岁组的淋巴细胞亚群比例的差异；^c 比较 22~30 岁组和 41~50 岁组的淋巴细胞亚群比例的差异；^d 比较 22~30 岁组和 51~79 岁组的淋巴细胞亚群比例的差异；^e 比较 31~40 岁组和 41~50 岁组的淋巴细胞亚群比例的差异；^f 比较 31~40 岁组和 51~79 岁组的淋巴细胞亚群比例的差异；^g 比较 41~50 岁组和 51~79 岁组的淋巴细胞亚群比例的差异。调整后 P < 0.008 为差异有统计学意义。

正相关，而与 CD3⁺ T 淋巴细胞 ($r_s = -0.102$, $P = 0.003$)、CD8⁺ T 淋巴细胞 ($r_s = -0.248$, $P < 0.001$) 和 Treg ($r_s = -0.112$, $P = 0.001$) 呈负相关。

讨 论

T 淋巴细胞是参与机体细胞免疫反应的一组免疫细胞。T 淋巴细胞在胸腺内的分化发育可分别经历双阴性细胞阶段，其主要表型为 CD4⁺CD8⁻；双阳性细胞阶段，其主要表型为 CD4⁺CD8⁺；最后为单阳性细胞阶段，由双阳性细胞经正、负选择过程，分化发育为具有免疫功能的成熟 T 淋巴细胞，其主要表型为只表达 CD4⁺ 或 CD8⁺^[3]。T 淋巴细胞亚群的数量反映个体的免疫功能状态，与免疫性疾病、感染性疾病、肿瘤等许多疾病的发生、发展和转归密切相关^[4]。外周免疫细胞的百分比可能因种族、年龄和性别不同而有所差异，因此需要评估种族、年龄和性别特定人群的 T 淋巴细胞

的分布，作为评估个人免疫功能的依据。本研究首次分析东莞市茶山地区的健康成人 T 淋巴细胞亚群的比例，并提出该人群的 RR，对指导临床诊断和治疗具有重要的意义。

本研究通过对广东省东莞市茶山镇 827 名健康志愿者的 T 淋巴细胞分布进行分析，制定出茶山地区健康人外周血的 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD4⁺CD8⁺ 和 Treg 的 RR 分别为 40.5%~75.2%、35.4%~68.9%、27.4%~61.8%、0.6~2.4、0.2%~2.7% 和 2.4%~6.0%。与国内地区的健康成人 T 淋巴细胞亚群 RR 比较，广东地区的 T 淋巴细胞和 CD4⁺/CD8⁺ 比例与北京、重庆、山西地区的相似，但 CD8⁺ T 淋巴细胞比例均有升高，体现了 T 淋巴细胞亚群的区域差异^[2,5]。Treg 能够抑制效应 T 淋巴细胞的自身免疫反应，促进免疫耐受，对维持机体的稳态发挥重要作用。本研究中，不同性别健康人群的 Treg 的比例无显著性差异，但 51~79 岁健康人的 Treg 百分比小于 30 岁人群的百分比减

低,这与部分研究结果不同,可能是由于不同研究 Treg 标志物的差异^[6]。Treg 通过维持对自身抗原的无反应和抑制过度的免疫反应来促进免疫稳态。随着年龄的增加, Treg 比例下降可能与年龄相关疾病有关^[7]。Treg 参考范围的建立,有助于帮助评估个体的免疫功能及进行相关研究。

T 淋巴细胞亚群的分布受年龄等因素的影响。本研究发现外周 CD4⁺ T 淋巴细胞的比例随着年龄升高, CD8⁺ T 淋巴细胞比例随着年龄下降,这部分与既往研究相一致,但与部分研究结果相反^[56]。研究表明, T 淋巴细胞亚群随着年龄的变化提示可能是由于机体的免疫力随着年龄的增长对各种外界因素的耐受力的降低。CD8⁺ T 淋巴细胞在稳态增殖时保持细胞静止的能力较低,而 CD4⁺ T 细胞更高的抗衰老能力^[8]。同时,部分年龄组的淋巴细胞亚群比例存在显著差异,这可能与研究人群不同的年龄分布及地域、生活方式的不同相关。T 淋巴细胞亚群的分布也与性别密切相关。本研究发现,健康男性的 CD4⁺ T 淋巴细胞比例较女性减少,而 CD8⁺ T 淋巴细胞比例较女性升高,这与既往研究相一致,但与部分研究的发现不同^[5,9]。相关差异有待开展进一步研究证实。

外周血双阳性 T 淋巴细胞在 T 淋巴细胞中的比例很低,但在病理状态下,如自身免疫性疾病(系统性硬化症)及病毒感染(HIV 感染等)等情况下,外周双阳性 T 表达水平上升,其临床意义仍不明确^[1011]。本研究发现不同性别健康人双阳性 T 淋巴细胞比例无明显差异,年龄与双阳性淋巴细胞无显著相关,这与既往的报道相一致^[12]。需要更多研究去发现双阳性 T 淋巴细胞的作用及变化的意义。本研究对健康人双阳性 T 淋巴细胞比例的探究有助于分析及比较疾病状态下双阳性 T 淋巴细胞的变化及意义。

值得指出的,本研究年龄段为 51~79 岁的健康人的数量相对较少,对该年龄段参考范围的建立可能有一定影响。本研究对象为东莞市茶山医院的健康体检者,未能全面反映当地人口的情况;纳入研究对象的时间较短,未考虑到季节气候和季节性流行病等因素对结果的影响。而且,本研究只选取了本地一家医院的健康查体者作为研究对象,所以未来的研究需要进一步扩大研究对象、延长研究时间,从而得到更准确的研究结果。此外,除了不同地区、种族、年龄、性别等因素会对 T 淋巴细胞亚群产生影响,不同实验室采用的

检测方法、仪器试剂和标本保存时间也会导致结果存在差异^[13]。综上所述,分析不同地区 T 淋巴细胞亚群的分布及参考范围的设立,有助于准确了解实验室检测结果,对于医师准确判断本地区患者病情有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Niu H Q, Zhao X C, Li W, et al. Characteristics and reference ranges of CD4⁺T cell subpopulations among healthy adult Han Chinese in Shanxi Province, North China. *BMC Immunol*, 2020, 21 (1): 1-10.
- [2] Xu D, Wu Y, Gao C, et al. Characteristics of and reference ranges for peripheral blood lymphocytes and CD4⁺ T cell subsets in healthy adults in Shanxi Province, North China. *J Int Med Res*, 2020, 48 (7): 030006052091314.
- [3] 刘尧娟, 欧超伟, 钟琼. 健康人外周血 T 细胞亚群参考区间的建立. *检验医学与临床*, 2010, 7 (7): 596-597.
- [4] 曹洁, 朱亦堃, 焦玉睿. CD4⁺T 淋巴细胞亚群与 2 型糖尿病研究进展. *新医学*, 2019, 50 (5): 319-322.
- [5] 韩呈武, 于雪莹, 王丽娜, 等. 北京地区健康成人外周血 T 淋巴细胞亚群的参考范围. *临床检验杂志*, 2009, 27 (5): 390-392.
- [6] 吴士及, 徐丽娟, 黄劲, 等. 健康成年人和儿童外周血淋巴细胞亚群参考区间的建立. *国际检验医学杂志*, 2017, 38 (5): 593-595.
- [7] Rocamora-Reverte L, Melzer F L, Würzner R, et al. The complex role of regulatory T cells in immunity and aging. *Front Immunol*, 2021, 11: 616949.
- [8] Hu B, Jadhav R, Gustafson C, et al. Distinct age-related epigenetic signatures in CD4 and CD8 T cells. *Front Immunol*, 2020, 11: 585168.
- [9] Bisset L R, Lung T L, Kaelin M, et al. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur J Haematol*, 2004, 72 (3): 203-212.
- [10] Gizinski A M, Fox D A. T cell subsets and their role in the pathogenesis of rheumatic disease. *Curr Opin Rheumatol*, 2014, 26 (2): 204-210.
- [11] Frahm M A, Picking R A, Kuruc J D, et al. CD4⁺CD8⁺ T cells represent a significant portion of the anti-HIV T cell response to acute HIV infection. *J Immunol*, 2012, 188 (9): 4289-4296.
- [12] 徐学静, 高硕, 胡伟, 等. 外周血 CD4/CD8 双阳性 T 细胞在类风湿性关节炎中的表达及意义. *临床检验杂志*, 2017, 35 (8): 612-614.
- [13] 阳莉, 陈晓燕, 蔡惠宁, 等. 标本保存时间对健康人外周血淋巴细胞亚群分析的影响. *中国免疫学杂志*, 2021, 37 (14): 1744-1746.

(收稿日期: 2022-06-10)

(本文编辑: 林燕薇)