

• 论 著 •

五色流式细胞术分类计数检测接尘工人外周血白细胞结果分析

王玉寒,袁宝军[△],李超,佟艳艳

(华北理工大学附属开滦总医院检验科,河北唐山 063000)

摘要:目的 探讨五色流式细胞术分类计数在接尘工人外周血白细胞中的检测价值,为粉尘导致肺损伤的机制研究提供新思路。方法 采用五色流式细胞术检测 45 例井下健康接尘矿工(接尘组)及 40 例井上健康人员(对照组)外周血白细胞亚群水平。结果 与对照组比较,接尘组总单核细胞、CD16⁻单核细胞、CD16⁺单核细胞、细胞毒性的 T/NK 细胞水平均增高,差异有统计学意义($P < 0.05$);其他指标间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 煤矿接尘工人外周血总单核细胞、CD16⁻单核细胞、CD16⁺单核细胞、细胞毒性的 T/NK 细胞表达增加,可能与肺损伤早期炎症有关。

关键词:五色流式细胞术; 接尘工人; 白细胞; 分类计数

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.15.022 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)15-2228-03

Analysis of peripheral leukocyte differential count in underground pit miners by five-color flow cytometry

WANG Yuhan, YUAN Baojun[△], LI Chao, TONG Yanyan

(Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Kailuan General Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To explore the value of five-color flow cytometry leukocyte in detecting peripheral blood of underground pit miners, and to provide a new way to research the mechanism of lung injury caused by dust. **Methods** The levels of peripheral blood leukocytes subgroup were determined by a flow cytometer in 45 cases of healthy underground pit miners (dust-exposed group) and 40 cases healthy ground workers (control group). **Results** Compared with the control group, the levels of total monocytes, CD16⁻ monocytes, CD16⁺ monocytes and cytotoxic T/NK cells were significantly higher in dust-exposed group ($P < 0.05$), while the levels of other parameters were not significantly different ($P > 0.05$). **Conclusion** The levels of total monocytes, CD16⁻ monocytes, CD16⁺ monocytes and cytotoxic T/NK cells are higher in pit miners, which may be related to the early inflammatory of lung injury.

Key words: five-color flow cytometry; pit miners; leukocyte; differential count

粉尘颗粒进入机体导致巨噬细胞活化或损伤,释放细胞毒性氧化剂、蛋白酶、细胞因子,促使炎症细胞到达肺泡上皮细胞表面引起肺炎炎症和损伤,而炎症细胞所释放的毒性氧衍生物和蛋白水解酶可进一步引起细胞 DNA 损伤、细胞凋亡和相关的细胞外基质沉积^[1]。以往对粉尘致肺损伤的机制研究主要涉及 CD4⁺T、CD8⁺T、CD16⁺CD56⁺NK、Treg、Th17 等淋巴细胞亚型^[2],单核细胞及其亚型、细胞毒性的 T/NK 细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞等细胞群体是否参与粉尘致肺损伤的发生发展,国内外鲜有报道。五色流式细胞术是 CytoDiff 组合试剂结合流式细胞术对外周血白细胞进行分类计数的一项新型检测技术,可使用 6 种荧光标记抗体对外周血白细胞进行分类达 16 种。本试验采用五色流式细胞术检测煤矿接尘工人外周血包括 CD16⁺单核细胞、CD16⁻单核细胞、细胞毒性的 T/NK 等在外的 10 余种细胞,探讨其水平变化在粉尘至肺损伤中的价值,为粉尘至肺损伤的机制研究提供新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 3—5 月在开滦职业病防治所进行体格检查的同一矿区在职和退休井下健康煤矿接尘工人 45 例为接尘组;年龄 51~79 岁,平均(58.0±6.4)岁;接尘工龄 11~37 年,平均(30.0±6.8)年;所暴露的粉尘性质、浓度一致。对照组为开滦非接尘井上健康人员 40 例,年龄 51~74 岁,平均(59.0±6.5)岁。所选对象均为男性,无心脑血管疾

病、肾脏疾病、肝脏疾病、糖尿病,无肺部并发症、近期肺部感染史及免疫系统疾病。经统计学分析,两组年龄差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 仪器与试剂 美国贝克曼库尔特公司生产的 FC500 流式细胞仪和配套稀释液及清洗液、CytoDiff 组合试剂包含 CD36-FITC、CD2-PE、CD294-PE、CD19-ECD、CD16-PC5 和 CD45-PC7 共 6 种单抗、溶血素、校准微球和质控微球。

1.3 标本采集 所有研究对象均采集清晨空腹静脉血 2 mL,保存于乙二胺四乙酸二钾抗凝管中,采集后 4 h 内处理分析。

1.4 方法 FC500 流式细胞仪检测:开机后先使用荧光微球完成仪器校准和补偿设定,如符合要求可检测标本。试管内加入 10 μ L CytoDiff 组合试剂与 100 μ L 标本混匀,室温避光孵育 15 min,加入溶血素 1 mL 混匀,室温避光孵育 10 min 后将标本按顺序置于进样架,打开 CXP 自动分析软件进行标本检测,每管收集 20 000 个细胞后软件计算出各细胞百分比。流式细胞术设门策略:利用外周血中各种白细胞表面抗原表达类型不同或者荧光强度的差异,结合不同细胞光散射特点采用多重逻辑设门的方法将其分开。具体为:(1)首先用 CD45 和侧向角散射光(SS)参数作图,选出所有白细胞;(2)用 CD19 和 SS 作图,选出各阶段 B 淋巴细胞(CD19⁺、SS 弱阳性);(3)用 CD16 和 SS 作图,选出中性粒细胞(CD16⁺、SS⁺);(4)用 CD36 和 CD2⁺ CD294 作图,选出单核细胞(CD36⁺、CD2⁻、

CD294⁻);(5)用 CD16 和 SS 作图,选出嗜酸粒细胞和不成成熟粒细胞(SS⁺);(6)用 CD45 和 SS 作图,选出 T 淋巴细胞和 NK 细胞(CD45 强阳性);(7)用 CD45 和 CD2⁺CD294 作图,选出髓系原始细胞(CD2⁻、CD294⁻);(8)用 CD45 和 SS 作图,分开嗜碱粒细胞和原始 T 淋巴细胞;(9)用 CD45 和 SS 作图,分开成熟 B 淋巴细胞和原始 B 淋巴细胞;(10)用 CD45 和 CD2⁺CD294 作图,选出嗜酸粒细胞(CD294⁺、CD45⁺)。

1.5 统计学处理 使用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,对于偏态分布的计量资料以中位数和四分位数间距[M(P₂₅,

P₇₅)]表示,两组间比较采用非参数检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

与对照组比较,接尘组总单核细胞、CD16⁻ 单核细胞、CD16⁺ 单核细胞、细胞毒性的 T/NK 细胞水平均升高,差异有统计学意义(P<0.05);未成熟粒细胞、总原始细胞、原始 T 细胞、原始非 T 非 B 细胞水平均降低,差异有统计学意义(P<0.05);其他指标间比较,差异无统计学意义(P>0.05)。见表 1。

表 1 两组研究对象外周血白细胞水平比较[M(P₂₅, P₇₅)]

组别	n	总淋巴细胞	B 淋巴细胞	非细胞毒性的 T	细胞毒性 T/NK	NK ⁺ T 淋巴细胞	总单核细胞
对照组	40	36.045(31.723,39.603)	3.761(2.967,4.939)	23.750(21.083,27.198)	6.380(3.805,10.013)	30.910(27.150,35.268)	6.115(5.138,7.205)
接尘组	45	36.730(31.195,48.255)	3.990(3.255,5.075)	23.550(19.905,30.050)	7.850(6.025,11.565)	32.540(28.120,44.630)	7.020(6.005,8.940)
P		0.146	0.316	0.663	0.011	0.087	0.003

组别	n	原始 B 细胞	原始非 T 非 B 细胞	CD16 ⁻ 单核	CD16 ⁺ 单核	成熟中性粒细胞
对照组	40	0.040(0.020,0.050)	0.045(0.030,0.068)	5.625(4.690,6.625)	0.385(0.285,0.608)	55.380(50.575,58.918)
接尘组	45	0.020(0.020,0.040)	0.010(0.005,0.020)	6.560(5.525,8.140)	0.510(0.375,0.785)	52.150(41.175,59.605)
P		0.122	<0.05	0.004	0.025	0.091

组别	n	嗜酸性粒细胞	嗜碱性粒细胞	未成熟粒细胞	总原始细胞	原始 T 细胞
对照组	40	2.070(1.283,3.030)	0.790(0.580,0.975)	0.050(0.025,0.090)	0.325(0.233,0.515)	0.225(0.140,0.420)
接尘组	45	2.120(1.205,3.170)	0.820(0.630,1.370)	0.030(0.012,0.060)	0.110(0.070,0.185)	0.030(0.020,0.075)
P		0.850	0.144	0.033	<0.05	<0.05

3 讨 论

CytoDiff 为一种包含 5 色 6 种单克隆抗体的组合试剂,通过加样、孵育、溶血、上机后运用 CXP 软件系统自动分析,多重逻辑门将全血中白细胞分为成熟中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、CD16⁺ 单核细胞、CD16⁻ 单核细胞、细胞毒性 T/自然杀伤(NK)细胞、B 淋巴细胞、未成熟细胞等 16 种,具有高通量、高精密度特点,已在多种疾病研究中广泛应用^[3]。

粉尘暴露是导致接尘工人肺部疾病的直接原因,其诱导肺损伤的主要机制为:(1)直接细胞毒性作用;(2)活性组分的产生;(3)细胞因子和趋化因子的产生;(4)纤维化;(5)细胞死亡及凋亡^[4]。单核细胞是应对微生物炎症反应的天然效应器,通过吞噬作用,产生活性氧(ROS)、一氧化氮(NO)、髓过氧化物酶、炎症细胞因子杀死病原体^[5]。循环中单核细胞亚群的划分主要基于流式细胞术 CD14 和 CD16 的分析。CD16⁻ 单核细胞具有很强的吞噬功能,CD16⁺ 单核细胞具有更强的分泌促炎性因子的能力,与某些感染和炎症性疾病密切相关^[6]。细胞毒 T 细胞(CTL)是执行细胞免疫、排斥同种异体移植体、杀伤病毒感染细胞和肿瘤细胞的效应细胞。研究证实,CTL 主要通过 3 种途径发挥其独特功能:(1)穿孔素、颗粒酶介导的细胞毒途径;(2)Fas、FasL 诱导的细胞凋亡途径;(3)细胞因子介导途径^[7]。NK 细胞是自然杀伤细胞的高效生产者,也是对抗肿瘤和病毒的固有免疫反应的重要组成部分。研究表明,NK 细胞不仅可调节早期天然免疫应答,而且参与调节获得性免疫应答,是连接天然免疫和获得性免疫的桥梁^[8]。

不同病理生理阶段,博莱霉素诱导小鼠外周血 Ly6Chi、Ly6Clo 单核细胞亚群比例改变,与肺组织炎性细胞渗出、浸润等病理进程相关,Ly6Chi 单核细胞亚群应对肺组织损伤、炎性

反应迅速,早期 Ly6Chi 单核细胞亚群比例的升高可能与肺组织炎性反应及后期纤维化程度密切相关^[9]。在对煤矿接尘工人外周血白细胞进行分类计数时发现,接尘组总单核细胞、CD16⁺ 单核细胞、CD16⁻ 单核细胞及细胞毒性的 T/NK 细胞均显著高于对照组,可能因粉尘颗粒刺激 II 型肺泡上皮细胞产生磷脂,这些磷脂刺激机体后引起循环单核细胞增殖;也可因巨噬细胞吞噬粉尘颗粒后以一种抗原特异性方式刺激机体,导致细胞毒性的 T/NK 细胞增殖,并释放穿孔素和颗粒酶至细胞间隙诱导靶细胞凋亡^[10]。最近研究表明,小鼠体内,Ly6Chi 单核细胞可直接活化为纤维化巨噬细胞参与肺部炎症及纤维化调节过程^[11]。研究证实,人体内 CD16⁺、CD16⁻ 单核细胞可依据所暴露的环境状况不同而分化为巨噬细胞或者树突状细胞^[12]。应对粉尘刺激,CD16⁻ 单核细胞诱导分化的巨噬细胞可能作为抗原提呈细胞参与适应性的免疫反应,它们诱导更多细胞增殖并刺激同种异体 CD4⁺ T 细胞活化产生 IFN-γ;CD16⁺ 单核细胞在边缘池蓄积,可快速释放至炎症部位,在粉尘刺激下,CD16⁺ 单核细胞诱导分化的巨噬细胞分泌 TNF-α、IL-1 等细胞因子,可能参与速发的固有免疫反应^[13]。粉尘刺激引发的单核细胞类别改变可能与炎症及损伤的发生发展有关,可能是接尘工人外周血白细胞亚群失衡的主要原因。本研究结果还显示,接尘工人外周血未成熟粒细胞、总原始细胞、原始 T 细胞、原始非 T 非 B 细胞数量均下降,可能因机体受粉尘刺激后大量炎性细胞招募至肺组织、骨髓造血功能促进未成熟细胞向成熟细胞转换所致。也可能因数量少出现的统计学误差所致。由于未成熟细胞在外周血中含量甚微,需达到或超过一定量后才具有实际临床意义,其临床价值有待进一步探讨^[14]。

综上所述,煤矿接尘工人外周血细胞毒性的 T/NK 细胞、

CD16⁻单核细胞、CD16⁺单核细胞、总单核细胞比例的升高可能与肺损伤早期炎症有关。由于本次试验例数相对较少且未能涵盖煤工尘肺患者,今后会继续扩大样本量,作进一步研究。

参考文献

[1] Huaux F. New developments in the understanding of immunology in silicosis[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2007, 7(2):168-173.
[2] 李超,袁宝军,邹吉敏,等. 煤工尘肺壹期患者周围血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞与 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞表达及意义[J]. *中国职业医学*, 2012, 39(5):380-383.
[3] Park SH, Park BG, Park CJ, et al. An extended leukocyte differential count(16 types of circulating leukocytes)using the CytoDiff flow cytometric system can provide information for the discrimination of sepsis severity and prediction of outcome in sepsis patients[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2014, 86(4):244-256.
[4] Lopes-Pacheco M, Bandeira E, Morales MM. Cell-Based therapy for silicosis[J]. *Stem Cells Int*, 2016(5):1-9.
[5] Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(11):762-774.
[6] Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, et al. The three human monocyte subsets: implications for health and disease[J]. *Immunologic Research*, 2012, 53(1):41-57.
[7] 郭春艳,韩波. 细胞毒性 T 淋巴细胞抗病毒感染作用机制的研究进展[J]. *中华儿科杂志*, 2007, 45(2):155-157.

[8] Campbell KS, Hasegawa J. Natural killer cell biology: an update and future directions[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 132(3):536-544.
[9] 马永强,姬文婕,郑春秀,等. 实验性肺纤维化小鼠循环单核细胞亚群的动态变化及意义[J]. *医学研究生学报*, 2014, 27(9):909-914.
[10] Nishimura Y, Kumagai-Takei N, Matsuzaki H, et al. Functional alteration of natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes upon asbestos exposure and in malignant mesothelioma patients[J]. *Bio Med Res Int*, 2015, 2015:1-9.
[11] Gibbons MA, Mackinnon AC, Ramachandran P, et al. Ly6Chi monocytes direct alternatively activated profibrotic macrophage regulation of lung fibrosis[J]. *Am J Respir Criti Care Med*, 2012, 184(5):569-581.
[12] Landsman L, Varol C, Jung S. Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung[J]. *J Immunol*, 2007, 178(4):2000-2007.
[13] Aguilar-Ruiz SR, Torres-Aguilar HA, Narvaez J, et al. Human CD16(+) and CD16(-) monocyte subsets display unique effector properties in inflammatory conditions in vivo[J]. *J Leukoc Biol*, 2011, 90(6):1119-1131.
[14] 屈晨雪,普程伟,尚柯,等. 快速流式细胞术分类计数外周血白细胞生物参考区间的建立及验证[J]. *中华医学杂志*, 2015, 95(26):2079-2083.

(收稿日期:2017-03-05 修回日期:2017-05-13)

(上接第 2227 页)

医学杂志, 2012, 22(5):62-65.

[5] Norouzpour A, Zarei-Ghanavati S. Hydrophilic acrylic intraocular lens opacification after descemet stripping automated endothelial keratoplasty[J]. *J Ophthalmic Vis Res*, 2016, 11(2):225-227.
[6] Hasan Luay RT, 陈伟蓉, 林振德, 等. 超声乳化联合囊袋内可调节人工晶状体植入术对白内障患者对比敏感度视觉影响研究[J]. *中国全科医学*, 2013, 16(1):1007-9572.
[7] Garg J, Mathur U, Acharya C, et al. Outcomes of descemetopexy with isoexpansile perfluoropropane after cataract surgery[J]. *J Ophthalmic Vis Res*, 2016, 11(2):168-173.
[8] 李佳佳,陈彬川,帖红艳,等. 白内障超声乳化吸出联合人工晶状体植入术高危因素临床分析[J]. *眼科新进展*, 2014, 34(5):448-450.
[9] 王芳,封霄,汪建涛. 白内障超声乳化人工晶状体植入联合经内窥镜睫状体光凝治疗青光眼合并白内障[J]. *眼科新进展*, 2014, 34(5):458-461.
[10] Mohammad-Rabei H, Mohammad-Rabei E, Espandar G, et al. Three methods for correction of astigmatism during

phacoemulsification[J]. *J Ophthalmic Vis Res*, 2016, 11(2):162-167.

[11] Ferreira B, Berendschot T, Ribeiro J. Clinical outcomes after cataract surgery with a new transitional toric intraocular lens[J]. *J Refract Surg*, 2016, 32(7):452-459.
[12] 赵恩. 白内障超声乳化人工晶状体植入术对糖尿病患者角膜内皮细胞形态与功能的影响[J]. *眼科新进展*, 2013, 33(4):373-376.
[13] 刘文龙,贾焯,邓勇,等. 不同切口超声乳化人工晶状体植入术治疗高度近视合并白内障的疗效比较[J]. *眼科新进展*, 2013, 33(5):457-459.
[14] Marques F, Ferreira B, Simoes P. Visual performance and rotational stability of a multifocal toric intraocular lens [J]. *J Refract Surg*, 2016, 32(7):444-450.
[15] 黄晓燕,叶亲颖,黄玉银. 超声乳化联合人工晶状体植入术治疗原发性房角关闭或原发性闭角型青光眼合并白内障的疗效观察[J]. *眼科新进展*, 2014, 34(6):572-574.

(收稿日期:2017-01-24 修回日期:2017-04-02)