

· 研究原著 ·

文章编号: 1000-2790(2006)01-0027-03

# 体外混合淋巴细胞培养对心脏移植急性排斥反应的监测作用

马 涛, 胡 军, 蔡振杰, 李 彤, 王晓武, 程 亮 (第四军医大学西京医院心血管外科, 陕西 西安 710033)

Mixed lymphocyte culture in vitro in monitoring acute rejection of cardiac transplantation

MA Tao, HU Jun, CAI Zhenjie, LI Tong, WANG Xiaowu, CHENG Liang

Department of Cardiovascular Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

**【Abstract】** AM: To study the use of mixed lymphocyte culture in non-invasive surveillance of acute rejection after cardiac transplantation. **METHODS:** We compared the results of modified mixed lymphocytes culture and endomyocardial biopsy (EMB) and analyzed the relationship of the activity of peripheral lymphocytes and myocardial biopsy grades. **RESULTS:** Modified mixed lymphocyte culture had a very close correlation with the incidence of rejection reaction, which was valuable for the early diagnose of rejection. **CONCLUSION:** Modified mixed lymphocyte culture can be used as a non-invasive method to efficaciously monitor acute rejection.

**【Keywords】** heart transplantation; graft rejection; mixed lymphocyte culture; monitoring

**【摘要】**目的: 研究体外单向混合淋巴细胞培养作为无创的心脏移植排斥反应监测方法的可行性。方法: 通过改良的单向混合淋巴细胞培养与心肌内膜活检(EMB)相对照, 测定淋巴细胞活性与心肌活检病理等级的相关性。结果: 改良的体外单向混合淋巴细胞培养方法与心肌内膜活检病理等级有很好的相似性。结论: 改良的体外单向混合淋巴细胞培养方法可作为无创监测心脏移植排斥反应的有效手段之一。

**【关键词】**心脏移植; 移植排斥; 混合淋巴细胞培养; 监测

**【中图分类号】** R654.2 **【文献标识码】** A

## 0 引言

淋巴细胞是构成机体免疫系统的基本单位, T淋巴细胞是心脏移植受体排斥异体抗原的重要部分。相关研究发现, 供体抗原在一定条件下可诱导淋巴细胞凋亡, 经过对我科心脏移植受体免疫系统跟踪观

察, 并对传统的混合淋巴细胞培养(mixed lymphocyte culture, MLC)技术进行改良, 采取心脏移植受体外周血淋巴细胞在体外混合培养以期监测心脏移植后急性排斥反应。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 同种异体心脏移植患者术后 1 月在每次复查及行心肌内膜活检(endomyocardial biopsy, EMB)时抽取外周静脉抗凝血, 迅速送检, 分离外周淋巴细胞。在获取脑死亡心脏移植供体心脏时, 同时无菌切取部分供体脾脏, 以制备供体淋巴细胞。

### 1.2 方法

**1.2.1 供体淋巴细胞的制备** 在 RPMI1640 培养液中研磨供体脾脏, 将细胞悬液加入大离心管中, 1500 r/min 离心 10 min 使细胞沉淀。轻轻混匀细胞, 加入温热氯化铵溶解红细胞, 37℃水浴 10 min, 1500 r/min 再次离心 10 min 吸除上清, 加入 20 mL 生理盐水混匀, 缓慢加入已装有 25 mL 淋巴细胞分离液中, 2000 r/min 离心 20 min, 全部吸取中层灰色细胞层, 生理盐水离心清洗 2 次, 台盼蓝染色, 计数板计数。调整细胞密度为  $2 \times 10^6 / L$ , 分成 3 管, 各自离心, 留取沉淀。每管中加入 250  $\mu L$  丝裂霉素(终浓度 50 mg/L)和 1.75 mL 生理盐水, 37℃水浴 40 min, 生理盐水离心洗涤 2 次。用含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 液调整细胞密度为  $1 \times 10^6 / L$ , -70℃冰箱冻存备用。在进行混合淋巴细胞培养时, 37℃水浴解冻, 生理盐水洗涤 1 次, 用含 120 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养液调整细胞密度为  $1 \times 10^6 / L$ , 标记为 D。

**1.2.2 受体淋巴细胞的制备** 新鲜外周静脉血按 1:1 比例加在装有比重为 1.077 的淋巴细胞分离液的离心管中, 轻稳加在液面上。2000 r/min 离心 20 min 吸取中间雾状淋巴细胞层。生理盐水洗涤 2 次。用含 120 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养液调整细胞密度为  $1 \times 10^6 / L$ , 标记为 R。

**1.2.3 混合淋巴细胞培养** 将已制备好的 R 和 D 按如下分组加入 96 孔板, 置 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵育

+D50  $\mu$  L+ IL-2 纯化中和 mAb 15  $\mu$  L; C组: R 50  $\mu$  L+ IL-2 纯化中和 mAb 15  $\mu$  L; D组: R 50  $\mu$  L 每组 3 个复孔, 空白对照组为 RPMI1640 培养液 100  $\mu$  L。1.2.4 酶标分析仪检测 培养 24 h 后每孔加入 MTT 试剂 (5 mg/L) 15  $\mu$  L, 继续 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 2~4 h 取出培养板, 2000 r/min 离心 20 min 弃上清, 每孔加入 DMSO 150  $\mu$  L 震荡 10 min 静置 20 min 待结晶完全溶解后, 在酶标分析仪上测定 A<sub>570 nm</sub>。结果判定: ①倒置显微镜下直接观察, 各孔细胞转化黄色可溶性 MTT 为紫蓝色结晶物质的量, 比较试验孔和阴性对照孔的差异。②以刺激指数 (stimulation index SI) 判断细胞活性高低: SI= A<sub>实验孔</sub> / A<sub>空白对照</sub>。

1.2.5 EMB 活检 心脏移植后 3 mo 内做活检 1~2 次, 3 mo 后每隔 6 mo 左右检查一次, 怀疑发生排斥反应时随时做。每次活检均在局麻、X 线引导下取右心室室间隔处标本, 40 g/L 甲醛固定液固定做病理和 2.5 g/L 戊二醛固定液固定做电镜检查。病理切片石蜡包埋, HE 染色, 急性心脏排斥反应等级按照 ISHLT (International Society of Heart and Lung Transplantation) 1990 年分级标准 (0~4 等级) 进行排斥反应分析。

统计学处理: 所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用 SPSS 11.5 软件进行数据分析, 采用单因素方差分析比较组间差别,  $P < 0.05$  为差异有显著统计学意义。

## 2 结果

2.1 EMB 共检测 32 人次心肌样本, 14 人次阴性 (0 等级), 10 人次 1<sup>a</sup> 等级, 1 人次 1<sup>b</sup> 等级, 7 人次 > 1<sup>b</sup> 等级 (1 人次 2 等级, 4 人次 3<sup>a</sup> 等级, 2 人次 3<sup>b</sup> 等级)。病理等级 0 和 1<sup>a</sup> 认为是阴性, 等级  $\geq 1^b$  看作可能的急性排斥反应。

2.2 倒置显微镜观察 各孔细胞转化黄色可溶性 MTT 为紫蓝色结晶物质的量呈现一定的规律。EMB 病理等级  $\geq 1^b$  紫蓝色结晶量多呈现为 D 组 > C 组 > A 组 > B 组, 而病理等级 < 1<sup>b</sup> 紫蓝色结晶量多无明显规律可循。

2.3 EMB 病理等级与 MLC 检测数值比较分析 心肌内膜活检同时 MLC EMB 病理等级 0 1<sup>a</sup> 等级有 24 人次, MLC 时 3 个复孔共获取 72 组数据; EMB 病理等级  $\geq 1^b$  等级有 8 人次, MLC 时 3 个复孔共获取 24 组数据。经检测及统计分析, EMB 病理等级 < 1<sup>b</sup> 时 MLC A B C D 各组差异不明显 ( $P > 0.05$ ), 即淋

C 组与 D 组均有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 在分别受到特异抗原和中和抗体作用时, 淋巴细胞活性减弱, 在两者共同作用下, 淋巴细胞活性减弱更加明显 ( $P < 0.05$ )。由此可见, EMB 病理等级  $\geq 1^b$  MLC 各组 SI 明显呈现 D 组 > C 组 > A 组 > B 组的规律 (表 1)。

表 1 不同 EMB 病理等级 MLC 刺激指数的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	病理分组	
	0 1 <sup>a</sup>	$\geq 1^b$
A	2.72 $\pm$ 0.34	3.07 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>
B	1.98 $\pm$ 0.37	1.64 $\pm$ 0.11
C	2.30 $\pm$ 0.22	3.65 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>
D	2.43 $\pm$ 0.38	4.16 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs B A 组: R 50  $\mu$  L+ D 50  $\mu$  L; B 组: R 50  $\mu$  L+ D 50  $\mu$  L+ IL-2 纯化中和 mAb 15  $\mu$  L; C 组: R 50  $\mu$  L+ IL-2 纯化中和 mAb 15  $\mu$  L; D 组: R 50  $\mu$  L R 受体淋巴细胞; D 供体淋巴细胞。

## 3 讨论

EMB 目前被认为是诊断心脏急性排斥反应的“金标准”, 但却是有创性检查方法, 频繁的右心活检会造成心肌损伤, 反复穿刺对静脉血栓的形成或感染都是潜在的并发症, 患者比较痛苦, 不易为医师和患者所接受。所以, 有必要寻找一种敏感、特异、无创的方法来诊断心脏急性排斥反应。心脏移植后急性排斥反应是以淋巴细胞为主的一系列免疫反应, 其中 T 淋巴细胞起着核心作用。研究发现在特定抗原的诱导下, 成熟 T 淋巴细胞发生凋亡, 即指已活化成熟的淋巴细胞 (T 或 B 淋巴细胞) 再次受到激活信号, 特别是 TCR/CD3 复合体及 CD8 参与, 供体特异性的受体淋巴细胞发生凋亡<sup>[1-9]</sup>, 在我科心脏移植患者长期临床随访观察中, 也发现免疫淋巴细胞活性抑制的现象。由此, 设计了改良体外单向混合淋巴细胞培养方法, 在加入丝裂霉素灭活的供体细胞同时, 引入 IL-2 纯化中和抗体, 通过改变反应条件诱导淋巴细胞的主动及被动性凋亡从而对活化淋巴细胞的增殖产生影响, 而最终通过 MTT 法来测定细胞的增殖活性, 使反应序列细化, 增加了反应的特异性, 检测手段相对简单, 经济可行。

我们采用供体灭活细胞与 IL-2 纯化中和 mAb 联合培养的方法, 在体外证实供体特异受体淋巴细胞在特定供体抗原诱导下, 淋巴细胞活性受到抑制。同时发现, 供体特异的受体淋巴细胞在供体抗原和 IL-2 中和 mAb 联合作用下, 淋巴细胞活性被强烈抑制; 仅单独 IL-2 中和 mAb 对淋巴细胞活性也有抑制, 但抑制

供体细胞抗原是始动因素并起关键作用. 引用特异的供体细胞抗原和 IL<sub>2</sub>中和 mAb多种配组方式监测反应序列化, 监测手段特异性强, 对照直观而敏感, 减少了感染等因素的干扰, 较单个核细胞活性检测有更高的应用价值.

本实验仅在体外诱导出外周淋巴细胞活性受抑制, 其具体机制及体内情况还需要进一步深入研究. 淋巴细胞的凋亡是免疫耐受研究的重点也是热点, 探讨特异抗原诱导淋巴细胞凋亡, 可揭示免疫耐受形成的机制, 进一步为有效应用特异抗原诱导免疫耐受治疗免疫性疾病及器官移植排斥反应提供理论依据.

【参考文献】

[ 1 ] Golbapudi S, Gupta S. Anti-P-Glycoprotein antibody induced apoptosis of activated peripheral blood lymphocytes: A possible role of P-Glycoprotein in lymphocyte survival [ J ]. J Clin Immunol 2001; 21 ( 6 ): 420—430.  
[ 2 ] Kabelitz D, Wesseling S. Life and death of a superantigen-reactive human CD4<sup>+</sup> T cell clone. Staphylococcal enterotoxins induce death by apoptosis but simultaneously trigger a proliferative response in the presence of HLA-DR<sup>+</sup> antigen-presenting cells [ J ]. Int Immunol

1992; 4: 1381—1388.  
[ 3 ] Thomas M, Carver RM, Kasten JJ. Further studies of veto activity in the human bone marrow in relation to allograft tolerance and chimerism [ J ]. Transplantation 1994; 57: 101—115.  
[ 4 ] Thomas M, Verbanck KM, Carver RM. Veto cells in transplantation tolerance [ J ]. Clin Transplant 1994; 8: 195—203.  
[ 5 ] Fourel S, Genestier L, Robinet E. Human T cells require IL<sub>2</sub> but not G1/S transition to acquire susceptibility to Fas-mediated apoptosis [ J ]. J Immunol 1996; 157: 4309—4315.  
[ 6 ] Musci MA, Latnis KM, Koretzky GA. Signaling events in T lymphocytes leading to cellular activation or programmed cell death [ J ]. Clin Immunol Immunopathol 1997; 83: 205—222.  
[ 7 ] Boehme SA, Lenardo MJ. Programmed apoptosis of mature T lymphocytes occurs at S phase of the cell cycle [ J ]. Eur J Immunol 1993; 23: 1552—1560.  
[ 8 ] Wang R, Rogers AM, Rush BJ. Induction of sensitivity to activation-induced death in primary CD4<sup>+</sup> cells: A role for interleukin-2 in the negative regulation of responses by mature CD4<sup>+</sup> T cells [ J ]. Eur J Immunol 1996; 26: 2263—2270.  
[ 9 ] Liss NA, Van Dyk LE. TCR antigen-induced cell death occurs from a late G1 phase cell cycle checkpoint [ J ]. Immunol 1998; 8: 57—65.

编辑 甄志强

· 经验交流 · 文章编号: 1000-2790(2006)01-0029-01

复方氧化锌粉治疗小儿尿布皮炎 50例

赵青华, 袁欣可, 赵朋云

(河南大学第一附属医院, 河南 开封 475001)

【关键词】复方氧化锌粉; 尿布皮炎; 治疗

【中图分类号】R758 【文献标识码】B

1 临床资料 2003-01/2004-10收住尿布皮炎 100(男 56 女 44)例, 年龄 0~28 d 16例, ~1岁 60例, ~2岁 24例, 用掷币法将患儿分为 A组 50例, B组 50例, A组用自制的复方氧化锌粉治疗, B组用京万红软膏治疗, 然后观察两组治疗效果. 根据临床症状将尿布皮炎分为 I° 仅有臀部红斑; II° 臀部红斑、丘疹; III° 臀部红斑、丘疹、糜烂. 两组患儿一般情况比较无显著性差异 ( $P>0.05$ ). 复方氧化锌配方<sup>[1]</sup>: 氧化锌 200 g 呋喃西林粉 2 g 硼酸粉 100 g 滑石粉 498 g 炉甘石 200 g 患儿排便后用温开水 (37℃左右) 清洗臀部, 然后用松软干燥纸巾揩干, 不能用硬的尿布来回搓擦皮肤. A组局部涂撒适量复方氧化锌粉, B组局部涂抹东京万红软膏, 均为每日 3次, 然后观察记录两组患儿臀部红斑、丘疹及糜烂创面的恢复时间, 结果以 A组为优 (表 1).

表 1 患儿尿布皮炎治愈时间比较 (n=50)

组别	2 d	3 d	4~5 d
复方氧化锌粉 <sup>b</sup>	28	21	1
京万红软膏	6	33	11

<sup>b</sup>  $P<0.01$  <sup>v</sup> 京万红软膏.

2 讨论 尿布皮炎为刺激性炎症, 治疗应保持局部清洁干燥, 避免不良刺激, 预防感染. 京万红软膏主要成分为地榆、栀子、大黄、没药、冰片等具有生肌排脓、止痛消肿、活血祛腐、消炎解毒等功能<sup>[2]</sup>. 复方氧化锌粉组方中有氧化锌、呋喃西林、硼酸、炉甘石、滑石粉等, 对局部皮肤有收敛抗菌、干燥、润滑和保护作用, 利于皮肤愈合. 上述研究表明, 两种方法治疗小儿尿布皮炎比较, 用复方氧化锌粉明显优于京万红软膏, 除与本身的药物作用有关外, 可能与剂型有关, 因为会阴、肛周部位易潮湿, 粉剂治疗易于保持局部干燥, 利于局部修复. 复方氧化锌粉与京万红软膏相比, 涂撒更方便, 被污染的衣物易于清洗, 更易被患儿家属接受.

【参考文献】

[ 1 ] 赵青华, 周新明, 高丽英, 等. 复方氧化锌粉治疗婴幼儿尿布皮炎 120例 [ J ]. 第四军医大学学报, 2004; 25(90): 889.  
[ 2 ] 张瑞华, 孟洪霞. 京万红软膏治疗小儿红臀 [ J ]. 护理学杂志, 2001; 16(4): 200.