

# 流式细胞仪监测肺移植后急性排斥反应

杨波 陈胜喜 罗万俊 蒋海河 施家琦<sup>①</sup>

(附属湘雅医院心胸外科 长沙 410008)

关键词 肺移植; 急性排斥反应; 流式细胞术; T 淋巴细胞亚群

中国图书分类号 R655.3

由于流式细胞分析术能精确地计算出外周血或分泌物中各淋巴细胞亚群所占比例及绝对值数目的增减, 反映受体的免疫状态, 国外有少数学者将流式细胞分析术应用于肺、肾等脏器移植后急性排斥反应监测, 发现此法所能检测的标本众多, 有很好的临床应用价值<sup>[1,2]</sup>。但目前国内仍无这方面的研究。本文观察了国内首例体外循环下单肺移植受体外周血  $CD_3^+$ ,  $CD_4^+$  T 细胞亚群的连续变化情况, 旨在了解流式细胞仪在肺移植后急性排斥反应中的应用价值。

## 1 资料与方法

1.1 一般临床资料 患者罗某, 男, 28 岁, 因进行性呼吸困难加重 16 月入院。术前病肺病理诊断为脂质肺炎, 肺广泛纤维化。查 EBV-Ab, CMV-Ab 阴性。患者于 1997 年 9 月在体外循环支持下移植了同性别、同血型及混合淋巴毒试验阴性的单侧供肺。术后采用 CsA  $8\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 硫唑嘌呤  $1.25\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 强的松  $0.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 三联免疫抑制。CsA 浓度为  $160\sim 249\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  (HPLC 法)。患者于术后第 3d, 第 7d 出现两次急性排斥反应, 第 8d 死亡。供肺病理检查为重度急性排斥反应 (4 级)。

### 1.2 材料

1.2.1 样品 肝素抗凝全血 0.1ml。

1.2.2 试剂和仪器  $CD_3^+$  FITC/ $CD_4^+$  RPE McAb 系丹麦 DAKO 公司产品, 红细胞溶解液由  $\text{KHCO}_3$  1.0g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  8.3g, EDTA 37 mg 加蒸馏水至 1000ml 配成, 细胞洗液含 PBS 缓冲液及 0.1%  $\text{NaN}_3$ , 固定液由 25% 戊二醛 3.2ml, 葡萄糖 2.0g 加细胞洗液至 100ml 配成。FACS Vantage 型号流式细胞仪系美国 Becton Dickinson 公司产品。

### 1.3 方法

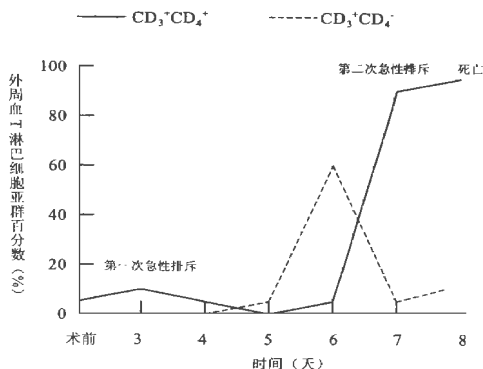
1.3.1 样本的制备 在 1.5ml 离心管中加入 0.1ml 肝素抗凝全血,  $10^4$   $CD_3^+$  FITC/ $CD_4^+$  RPE, 置  $4^\circ\text{C}$  30min 后, 加红细胞溶解液 1ml, 室温静置 3min; 待红细胞完全裂解后立即  $3000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5min (台式微量离心机); 弃上清液, 用细胞洗液离心洗涤细胞两次, 恢复体积至 0.5ml, 加入固定液  $20\mu\text{l}$ ,  $4^\circ\text{C}$  存放并于 2h 内上机

分析。

1.3.2 流式细胞分析术测定法 样品经 400 目尼龙膜过滤入样品管。选用氩离子激光, 波长 488nm, 功率 300 mW。测定前用荧光小球 (beads) 校正仪器 FL1, FL2 的 CV% 均  $< 3\%$ 。冲洗样品管道, 上样后收集 20 000 个细胞的信号, CELLQUEST 软件分析处理所获数据。

## 2 结果

2.1 外周血  $CD_3^+$   $CD_4^+$  T 淋巴细胞占白细胞比例 术后第 3d 发生第一次排斥反应时, 由 2.8% 增至 11.39%, 冲击疗法后, 降至 0.69% (术后第 5d)。第二次排斥反应时, 又猛增至 88.56%, 89.95%, 患者死亡 (附图)。



附图 移植后受体外周血 T 淋巴细胞亚群变化情况

Fig Changes in the subset of T cell in the peripheral blood of the receptor after transplantation

2.2 外周血  $CD_3^+$   $CD_4^+$  T 淋巴细胞占白细胞的比例 第一次排斥反应中所占比例为 0.16%, 而在第二次排斥反应的前一天猛增至 57.77%, 第二次排斥反应时又降至 1.48% (附图)。

## 3 讨论

目前对于肺移植早期急性排斥反应的监测多根据

患者的症状、胸片、动脉血气分析或经支气管肺活检等<sup>[2]</sup>。患者临床表现无特异性。而肺活检,病人不愿接受,且增加感染机会和死亡风险。Crim 等<sup>[2]</sup>通过测定肺泡灌洗液中  $CD_4^+$  和  $CD_8^+$  T 淋巴细胞来监测排斥反应,多次肺泡灌洗亦增加病人的痛苦而易被病人拒绝。Yuichi Yoshido 等<sup>[3]</sup>提出受体血清中的 IL-6 的测定可预测急性排斥反应,但亦缺乏特异性。故一种简单、迅捷、准确、易于为病人接受的监测急性排斥反应的方法系临床之所需。

在移植排斥反应中,  $CD_4^+$  亚群 T 细胞及其淋巴因子产物是排斥的重要介导因子<sup>[4]</sup>。  $T_H$  细胞能分泌 IL-2 激活 NK 细胞,使  $T_C$  细胞成熟,释放巨噬细胞活化因子、B 细胞生长因子和分化因子,活化 B 细胞,增殖和分化为浆细胞,分泌免疫球蛋白<sup>[5]</sup>。因此检测血液中的  $CD_4^+$  细胞有助于了解患者的免疫状态。

以往检测血液中的  $CD_4^+$  细胞多采用荧光显微镜下人工计数,其最大的不足是计数数目少,误差大,花费时间大,不能准确地反映实际情况。流式细胞分析术综合了免疫荧光技术、激光、流动细胞分析术及计数机技术等,具有快速、可靠、灵敏、多参数分析、高度选择性等优点<sup>[6]</sup>。笔者正是利用带荧光的  $CD_3^+$  和  $CD_4^+$  的单克隆抗体分别与淋巴细胞表面的  $CD_3^+$  和  $CD_4^+$  抗原结合,使这些细胞带上不同的荧光,通过检测荧光信号的强度、波长等特性,将检测细胞分为不同的亚群,精确地计数 20 000 个外周血白细胞,从中计算出  $CD_3^+$  或  $CD_4^+$  的淋巴细胞比例。这种计数精确,能真正准确地反映外周血中淋巴细胞亚群的分布,大大优于传统的人工计数。目前国外已趋于用流式细胞仪代替荧光显微镜,而我国在近几年才开始应用。尤其是将流式细胞仪应用于移植排斥反应的监测,目前国内尚无这方面的报道。

$CD_3^+$  和  $CD_4^+$  细胞为成熟的辅助诱导 T 淋巴细胞。移植后受体外周血  $CD_3^+$  和  $CD_4^+$  细胞的增加意味着机体免疫应答增强,与排斥反应有直接关系。本实验结果显示:第一次急性排斥反应中(术后第 3d),  $CD_3^+$  和  $CD_4^+$  细胞较术前明显增加,但增幅不大,患者临床表现轻。甲基强的松龙 0.5g 冲击疗法后,病人症状迅速、明显好转,排斥反应得到控制,  $CD_3^+$  和  $CD_4^+$  细胞则降至

术前水平以下(术后第 5d)。在第二次重度急性排斥反应中,  $CD_3^+$  和  $CD_4^+$  细胞猛增至 88.56%,而  $CD_3^+$  和  $CD_4^+$  细胞仅占 1.48%(术后第 7d),表明免疫反应十分强烈。而患者的临床症状有严重的改变。加用甲基强的松龙 1.5g 冲击治疗无效,病情发展,呈不可逆改变,直至受体死亡。可见,流式细胞术测得外周血  $CD_3^+$  和  $CD_4^+$  细胞比例的改变与临床急性排斥反应发生情况十分吻合。故作者认为流式细胞术分析外周血  $CD_3^+$  和  $CD_4^+$  细胞亚群比例能提示急性排斥反应的发生。从笔者的观察来看,若在肺移植术后早期  $CD_3^+$  和  $CD_4^+$  细胞占外周血白细胞比例 > 10%,则应警惕急性排斥反应,积极处理。

另外,其他脏器的移植,如心脏、心肺联合、肾移植等,亦可采用流式细胞术检测外周血 T 淋巴细胞亚群(国外已有一些相关报道),且可进行多重抗原测定,包括  $CD_3^+$ ,  $CD_4^+$ ,  $CD_8^+$ , IL-2R 及 HLA-DR 等。这样不仅更有利于了解受体的免疫状态,及时发现、预防和治疗排斥反应,还有利于进行有关排斥反应的基础研究。此外,作者通过对  $CD_3^+$  和  $CD_4^+$  细胞荧光强度的分析,发现在严重排斥反应中,二者表面的  $CD_3^+$  和  $CD_4^+$  抗原表达明显增加(资料未显示)。这种增加是否与 T 细胞活性有内在关系有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- 1 Whitehead BF, Stoeckl C, Finkle C, *et al.* Analysis of bronchoalveolar lavage from human lung transplant recipients by flow cytometry. *Respir Med*, 1995; 89: 27
- 2 Crim C, Keller CA, Dunphy CH, *et al.* Flow cytometric analysis of lung lymphocytes in lung transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996; 153: 1041
- 3 Yuichi Yoshida, Yuichi Iwakaki, Si Pham, *et al.* Benefits of post-transplantation monitoring of interleukin 6 in lung transplantation. *Ann Thorac Surg*, 1993; 55: 89
- 4 刘建欣, 蒋志振. 特异性 T 细胞亚群在排斥过程中的作用. 见: 何长民, 石炳毅主编. 器官移植免疫学. 北京: 人民军医出版社, 1995; 18~21
- 5 毕爱华. 移植排斥反应. 见: 郑武飞主编. 医学免疫学. 北京: 人民卫生出版社, 1989; 253~256

(本文编辑 陈丽文)