

导的。此外,据报道:在缺氧诱导 VEGF 表达的信号传导中也有 Ca^{2+} 离子流的参与[6]。蛋白激酶 C (Protein kinase C, PKC) 参与了体内多种物质的生物合成,是重要的信号传导介质。本实验应用 PKC 激动剂 PMA 及 PKC 抑制剂 Chelerythrine 探讨 PKC 通路在心肌细胞缺氧产生 VEGF 中的作用。结果显示: PMA 刺激组(B、C、D 组),其 VEGF 表达量与缺氧对照组 A 组相比较,均有非常显著差异($P < 0.01$),且呈剂量相关趋势。而 PKC 抑制剂 Chelerythrine 组 VEGF 表达量与缺氧对照组相比降低($P < 0.01$)。说明在缺氧状态下, PMA 促进心肌细胞分泌产生 VEGF,而 PKC 抑制剂则减弱了此作用,但未完全阻断此过程,由此说明:缺氧诱导大鼠心肌细胞分泌产生 VEGF 蛋白,其信号传导部分是通过 PKC 通路完成的。对于其它信号传导通路的存在尚有待进一步证实。

参考文献

- [1] Hahimoto E, Teruhiko O, Takaski N, *et al.* Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart[J]. *Am J Physiol*, 1994, 267

(4): H1 948—H1 954.

- [2] Banai S, Jaklitsch M T, Shou M, *et al.* Angiogenic induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by VEGF in dogs[J]. *Circulation*, 1994, 89 (5): 2 183—2 189.
- [3] Simpson P, Savion S. Differentiation of rat myocytes in single cell culture with and without proliferating nonmyocardial cells[J]. *Circ Res*, 1982, 50(1): 101—116
- [4] Mukhopadhy D, Tsiokas L, Zhou X M, *et al.* Hypoxia induction of human endothelial cell growth factor expression through c-Src activation[J]. *Nature*, 1995, 375(2): 577—581.
- [5] Takagi H, King G L, Robinson G S, *et al.* Adenosine mediated hypoxia induction of vascular endothelial growth factor in retinal microvascular endothelial cells[J]. *Inv Ophthalmol Vis Sci*, 1996, 37(5): 2 165—2 176
- [6] Claffy K, Wilkison W O, Spiegelman B M. Vascular endothelial growth factor regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(16): 16 317—16 322

(编辑 谢义霞)

文章编号: 1000-5404(2000)03-0277-01

经验与短篇

用流式细胞术监测原位心脏移植病人术后的 T 细胞及亚群的变化

Monitoring the changes of T cell and its subgroup after orthotopic cardiac transplantation with flow cytometry

汪志文¹, 马 铮², 李 磊¹, 周元国¹ (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所: ¹ 分子生物学中心; ² 胸心外科; 重庆 400042)

我院于 1998 年 9 月成功地进行了 1 例扩张型心脏病患者的原位心脏移植手术, 我们采用流式细胞术对术前、术后淋巴细胞、T 细胞及其亚群进行了详细的监测。

1 资料与方法

1.1 临床资料

患者, 男, 14 岁, 汉族, 因扩张性心脏病入院, 符合心脏移植条件。供者, 男, 28 岁, 脑死亡者。免疫抑制剂的使用状况: 术前 1 d: 开始给病人服用环孢素 A 和硫唑嘌呤剂量分别为 150 mg/次、2 次/d, 37.5 mg/次、2 次/d; 手术当日晨: 环孢素 A 150 mg、硫唑嘌呤 37.5 mg 静滴; 术后当晚: 同手术当日晨, 另加甲基强的松龙 1 000 mg 分 2 次静滴。以后: 每日均按手术当日用药, 术后第 4 天开始减免疫抑制剂用量。手术采用体外循环方

法进行全心移植。

1.2 样品采集

于术前和术后 2、3、5、7 d 同法采患者静脉血 2 ml(肝素抗凝)送检。术前血为服免疫抑制剂前采集。

1.3 方法

采集的血液标本用法国 IMMUNOTECH 公司生产的荧光抗体直接标记。操作步骤为: ① 20 μl 抗体+100 μl 全血, 混匀, 25 $^{\circ}\text{C}$ 室温放置 15 min。② 加 500 μl 红细胞裂解液, 混匀, 25 $^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min。③ 加 500 μl pH 7.4 磷酸缓冲液, 混匀, 25 $^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min 后上机。④ 检测: 采用美国 Coulter 公司生产的 ELITE ESP 型流式细胞仪观测外周血淋巴细胞、单核细胞、粒细胞、T 淋巴细胞及其亚群 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 、 $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ 的数量变化。每次检测计数 5 万个白细胞, 其中 80% 以上是单个白细胞。通过设定门通道进行分类计数, 少量聚集粘连在一起细胞不能被有效计数, 故不列入检测结果。流式细胞仪的光源为氩离子激光器, 激发波长 488 nm, 发射波长分别为 525 nm (FITC)、575 nm (PE)。

参考文献

- [1] Kuhn F, Morris R, Witherspoon C D, *et al.* A standardized classification of ocular trauma[J]. *Ophthalmology*, 1996, 103 (2): 240—243.
- [2] Mieler W F, Mittra R A. The role and timing of pars plana vitrectomy in penetrating ocular trauma[J]. *Arch Ophthalmol*, 1997, 115(9): 1 191—1 192.
- [3] Cherry P M. Indirect traumatic rupture of the globe[J]. *Arch Ophthalmol*, 1978, 96(2): 252—256.
- [4] De Juan E Jr, Sternberg P Jr, Michels R G. Penetrating oc-

ular injuries Type of injuries and visual results [J]. *Ophthalmology*, 1983, 90(11): 1 318—1 322.

- [5] Coleman D J. Early vitrectomy in the management of the severely traumatized eye[J]. *Am J Ophthalmol*, 1982, 93 (5): 543—547.
- [6] Ryan S J. Guidelines in the management of penetrating ocular trauma with emphasis on the role of timing of pars plana vitrectomy[J]. *Int Ophthalmol*, 1979, 1(2): 105—108.
- [7] 张卯年, 马志中, 何守志, 等. 玻璃体切除手术在眼外伤中的应用[J]. *中华眼科杂志*, 1993, 29(6): 329—330.

(编辑 王 红)

(上接 277 页)

2 结果

原位心脏移植病人术后第 2、3 天血中 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 和 CD_4^+/CD_8^+ 均明显下降, 术后 5~7 d 呈逐渐恢复趋势, 但在术后 7 d 仍低于术前, 见表 1。淋巴细胞在术后也明显减低, 术后 2~7 d 一直在 10% 以下。而单核细胞和粒细胞在术后显升高趋势, 见表 2。

表 1 手术前后 T 淋巴细胞亚群含量百分比变化(%)

	术前	术后(d)				正常值
		2	3	5	7	
CD_3^+	70.2	22.1	31.8	41.0	50.2	61.1~77.0
CD_4^+	70.4	14.0	14.6	24.6	29.9	25.8~41.6
CD_8^+	41.3	14.3	16.1	18.9	21.8	18.1~29.6
CD_4^+/CD_8^+	1.70	0.98	0.91	1.30	1.37	1.45~2.27

正常参考值由第二军医大学长征医院提供

表 2 手术前后淋巴细胞、单核细胞和粒细胞百分含量变化(%)

	术前	术后(d)				正常值
		2	3	5	7	
淋巴细胞	24.8	7.0	7.7	8.1	9.4	30
单核细胞	1.8	5.2	4.0	3.3	1.7	1~3
粒细胞	48.8	71.4	81.9	76.9	67.3	70

3 讨论

在进行异体器官移植后, 移植物均可刺激受者的免疫系统发生免疫应答, 导致排斥反应。排斥反应发生的强弱取决于供者、受者间组织相容性抗原的差异程度, 受者的免疫功能状态、移植物的种类及预防措施等因素。术后控制排斥反应是保证移植物存活和发挥正常功能的关键。目前常用的方法就是术后长期服用免疫抑制类药物, 但过度抑制机体的免疫系统, 又

疫抑制剂, 对患者的康复具有重要意义。

CD_3^+ 为总 T 细胞标记, CD_4^+ 和 CD_8^+ 分别是 T 细胞辅助/诱导亚群、T 抑制/细胞毒细胞亚群的标记, 它们是最重要的免疫调节细胞。流式细胞仪对淋巴、单核、粒细胞数量和 T 淋巴细胞及其亚群的检测, 可用于术前、术后的免疫状态监测, 特别是对急性排斥反应是否出现有较高的阳性预测率^[2,3]。本例用流式细胞仪进行分析, 结果显示, 术前 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 的值在正常范围内或略高于正常值, 粒细胞数量略低于正常值; 术后第 2、3 天淋巴细胞及亚群的阳性率明显降低, 而单核细胞和粒细胞数量呈增多趋势。这与术后环孢素 A、硫唑嘌呤、甲基强的松龙等免疫抑制剂的使用, 抑制了机体免疫系统功能有关^[4]。随着环孢素 A、硫唑嘌呤、甲基强的松龙等免疫抑制剂用量的逐渐减低, 淋巴细胞总数、T 淋巴细胞及亚群的阳性率逐步恢复正常。

本文结果显示随着术后急性排斥期的过去, 免疫抑制剂用量的减少, 患者的免疫系统在逐渐恢复。提示该手术后免疫抑制剂使用适当, 免疫能力恢复平稳。本例患者于术后 14 d 作心内膜活检一次, 取 2 处标本, 结果显示, 一处为 1A 级排斥反应, 另一处为零级。与流式细胞仪检测结果相吻合, 表明用流式细胞术监测器官移植术后受者免疫状态, 对指导临床合理应用免疫抑制剂提供有价值的参考意见。

关键词 流式细胞术; 移植; T 细胞

中图法分类号 R446.113

文献标识码 B

参考文献

- [1] 毕爱华, 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京: 北京人民医学出版社, 1996. 256—263.
- [2] Utzig M J, Blumke M. Flow cytometry cross-match: a method for predicting graft rejection[J]. *Transplantation*, 1997, 63(4): 551—554.
- [3] Shanahan T. Application of flow cytometry in transplantation medicine[J]. *Immunol Invest*, 1997, 26(1~2): 91—101.
- [4] Wang X H, Xie T. Factors affecting therapeutic effect of anti- CD_3 and CD_4 monoclonal antibody in acute renal allograft