

肺移植术后 T 淋巴细胞亚群动态变化及意义*

(附 2 例报告)

李海滨 孙煦勇[△] 秦科 邓添薪[†] 黄晓诞 覃音红 黄晨 黄莹 曹嵩 蔡文娥 郭海鸽

(中国人民解放军第三〇三医院移植医学研究院,广西移植医学重点实验室,广州军区器官移植中心 南宁 530021)

摘要 目的:探讨肺移植术后 T 淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 比值水平的表达及意义。方法:采用流式细胞术检测 2 例肺移植患者术前、术后 3 个月内与术后 3 个月外周血 T 淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺ 与 CD8⁺ 的连续变化情况。结果:2 例肺移植患者术前 T 淋巴细胞绝对计数接近正常水平,术后 3 个月内 T 淋巴细胞绝对计数低于正常值,3 个月以后绝对计数趋向于正常范围,而 CD4⁺/CD8⁺ 在术前、手术 3 个月均较术后 3 个月内低。结论:肺移植患者术后 T 淋巴细胞亚群的动态检测,可及时了解患者的免疫状态,为及时调整治疗方案提供参考。

关键词 肺移植;T 淋巴细胞亚群

中图分类号:R392.4

文献标志码:A

文章编号:1005-930X(2015)03-0391-04

DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2015.03.013

THE DYNAMIC CHANGE AND SIGNIFICANCE OF T LYMPHOCYTE SUBPOPULATION AFTER LUNG TRANSPLANTATION (TWO CASES REPORT)

Li Haibin, Sun Xuyong, Qin Ke, Deng Tianxin, Huang Xiaodan, Qin Yinhong, Huang Chen, Huang Ying, Cao Song, Cai Wen'e, Guo Haige. (Institute of Transplant Medicine, 303 Hospital of PLA; Guangxi Key Laboratory for Transplantation Medicine Guangxi, Department of Organ Transplantation in Guangzhou Military Region, Nanning 530021, China)

Abstract Objective: To investigate the expression of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ in T lymphocyte subpopulation from receptor's blood after curing with lung transplantation. **Methods:** Flow cytometry was used to detect the continuous change of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T lymphocyte subpopulation of two patients subjected lung transplantation before and after 3 months and within operation 3 months. **Results:** For two patients who were subjected lung transplantation, the amount of T lymphocyte was close to normal level before treatment while lower than normal's during operation 3 months, but the sum of T lymphocyte was tend to be normal after surgery 3 months later. For the ratio of CD4⁺/CD8⁺, it was lower than within operation 3 months's no matter operation before or surgery 3 months later. **Conclusion:** The dynamic detection of T lymphocyte subsets in patients with lung transplantation can timely reflect the immune status of patients, so that providing a reference for the adjustment of treatment program.

Key words lung transplantation; T lymphocyte subpopulation

肺移植是目前治疗终末期肺病的唯一方法。同其它器官移植一样,预防急、慢性排斥反应是肺移植术后治疗的重点,但由于肺脏是一个开放的系统,感染随时可能发生,而感染与排斥反应的治疗方案却完全相悖,因此术后的患者管理和免疫抑制治疗具有很大难度。免疫抑制治疗与患者的免疫状况密切相关,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,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,有很好的临床应用价值。本文观察 2012 年我院收治的 2 例双肺移植受体外周血 CD3⁺、CD4⁺ T 淋巴细胞亚群的动态变化情况,旨在及时了解患者的免疫状态,为及时调整治疗方案提供参考。

1 材料和方法

1.1 案例资料:病例 1,女性,23 岁,2010 年发现在咳嗽时伴右下胸部疼痛,随后到多家医院进行检查治疗,诊断为 I 型呼吸衰竭;双肺重度肺气肿,肺间质纤维化、双肺局限性肺气肿并肺大泡形成。双侧胸膜增厚,双肺结构及功能已严重受损,进行内科治疗已无法恢复,病情继续进展,需终日持续吸氧,

* 基金项目:广西自然科学基金资助项目(Nn 2013gxnsfaa019253)

[△]通信作者,E-mail:sxywn@sohu.com

[†] 广西医科大学第一附属医院病案信息科 南宁 530021

收稿日期:2014-10-15

近乎丧失劳动力,生存质量极差,于2012年7月成功实施肺移植手术,成为广西首例肺移植手术。术后诊疗计划:绝对卧床,持续呼吸机辅助呼吸,维持循环稳定,控制体温,行抗排斥、预防感染、适当补液、利尿等治疗。监测呼吸参数、胸腔引流量等指标,抗排斥治疗方案为(他克莫司+吗替麦考酚+甲泼尼龙琥珀酸钠)。严密观察病情变化,及时处理。早晚分别进行纤维支气管镜下吸痰,防止分泌物堵塞段支气管或细支气管等。同时加强雾化及体位引流,维持电解质、酸碱平衡。术后第3天、第7天群体反应抗体阳性,群体反应抗体较前明显升高,第5天出现肺部感染,第8天感染加重,予停服抗排斥药吗替麦考酚,减少他克莫司剂量;并调整抗感染方案,此时群体反应性抗体较前两次升高,T淋巴细胞亚群检测, $CD3^+$ 增加, $CD4^+/CD8^+$ 比值明显增大。综合考虑患者存在急性排斥反应的可能,加大了甲泼尼龙琥珀酸钠大剂量抗排斥治疗,第2天恢复小剂量激素,常规免疫抑制治疗。经细心治疗与护理,患者病情平稳,移植肺功能逐渐恢复正常,无吸氧情况下能生活自理,于8月康复出院,此后定期返院复查。

病例2,男性,71岁,反复咳嗽气喘20年余,曾到多家医院诊疗,给予“抗炎,平喘,中医药,吸氧”等治疗,能暂缓症状,出院在家间断吸氧,随时间推移症状反复并加重,活动后明显,已严重影响生活质量。2012年,患者为行同种异体肺移植来我院就诊,入院后诊断为慢性阻塞性肺病急性期(COPD),Ⅱ型呼吸功能衰竭,慢性肺源性心脏病,心功能3级,颈椎病,脑萎缩。于2012年12月,成功实施同种异体双侧序贯性肺移植手术。术后诊疗计划参考首例肺移植患者,围手术期内病情平稳,恢复良好。经细心治疗与护理,患者

病情平稳,移植肺功能逐渐恢复正常,无吸氧情况下能生活自理,于2014年1月康复出院,此后定期返院复查及随访。截止2014年9月,2例肺移植患者身体状况均良好。

1.2 材料:空腹采集患者外周静脉血2 mL,EDTA抗凝。患者及家属均知情同意,器官供者为脑死亡患者。EB、HIV、CMV、HSV病毒及乙肝病毒均为阴性。术前供、受者的ABO血型均相符。与相关样本的使用均符合医学伦理学标准。流式细胞仪型号为FACSCalibur(#E97501437),及苹果电脑均由购自BD公司, $CD4/CD3/CD8$ 抗体和绝对计数管均购自南宁康臣生物科技有限公司。

1.3 方法:取绝对计数管(避光复温),加入 $10\ \mu\text{L}$ $CD3/4/8$ 抗体,加入 $50\ \mu\text{L}$ EDTA- K_2 抗凝全血(反向加样法加到网上),之后轻轻震荡混匀,室温避光孵育15 min;加入 $450\ \mu\text{L}$ 10倍稀释后的溶血素,震荡混匀,室温避光孵育15 min,然后用流式细胞仪按照Multi SET操作流程对标本进行细胞获取、分析。

1.4 主要观察指标:观察肺移植患者术前(入院时及术前3 d)、术后前10 d(术后1,2,3,4,5,6,8,10 d)及术后1,3,6和12个月的T淋巴细胞亚群的 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 细胞的变化,确定患者的免疫情况,及时调整治疗方案。细胞获取结束后Multi SET自动分析结果,通过计算微球数得出血中T淋巴细胞的绝对计数与相对计数。

2 结果

2.1 两例患者在不同时间的T淋巴细胞亚群绝对计数,见表1。

表1 2例患者在不同时间的T淋巴细胞亚群绝对计数

检测次数	$CD3^+$		$CD3^+CD4^+$		$CD3^+CD8^+$		$CD4^+/CD8^+$	
	病例1	病例2	病例1	病例2	病例1	病例2	病例1	病例2
术前3个月	860	772	516	483	313	275	1.65	1.76
3 d	720	412	401	244	256	161	1.57	1.52
术后1 d	158	126	87	83	60	38	1.44	2.22
2 d	102	96	64	60	35	30	1.84	1.99
3 d	148	366	94	265	52	99	1.82	2.67
4 d	95	138	58	93	33	43	1.74	2.14
5 d	63	123	40	77	22	46	1.82	1.68
6 d	176	79	112	51	61	28	1.85	1.81
8 d	548	386	362	278	175	106	2.07	2.62
10 d	171	297	89	205	75	89	1.19	2.3
30 d	345	416	207	254	130	159	1.59	1.59
3个月	1 175	455	605	267	473	182	1.28	1.47
6个月	1 080	612	568	401	415	204	1.37	1.96
9个月	973	953	534	525	359	414	1.49	1.27
12个月	1 626	967	906	525	582	423	1.56	1.24

2.2 T细胞绝对计数的变化,见图1、图2。

肺移植术前、术后呈规律性变化,术前T淋巴细胞绝对计数接近正常水平,术后3个月内T淋巴细胞绝对计数低于正常值(其中3~11为围手术期内的检测数据),而肺移植术3个月以后,T淋巴细胞计数趋向于正常范围内,而 $CD4^+/CD8^+$ 在术前、手术3个月均较术后3个月内低。

病例1在围手术期内第8天的T淋巴细胞亚群检测中 $CD3^+$ 增加, $CD4^+/CD8^+$ 比值明显增大,病例2的T淋巴细胞亚群在围手术期末出现较大波动。

患者的 $CD4^+/CD8^+$ 比值在术前维持在1.60水平,术后3个月内维持在1.80左右,而术后3个月以上则维持均值在1.50。

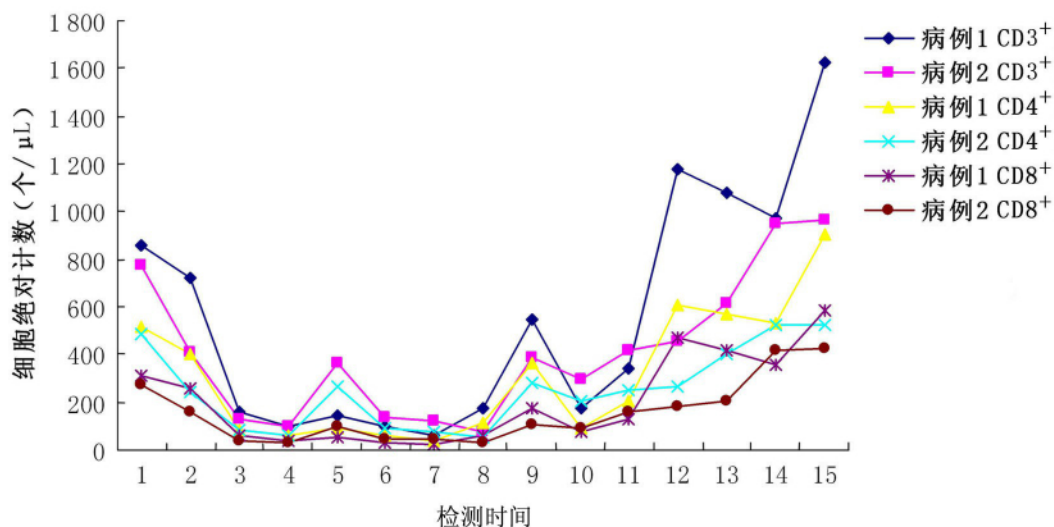
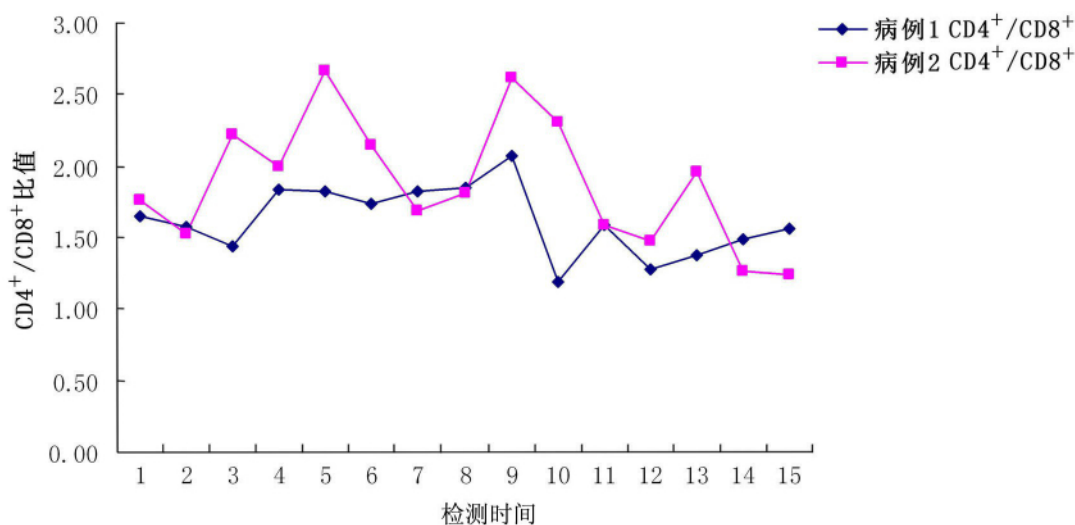


图1 T淋巴细胞亚群绝对计数的变化

注:1~15 分别表示术前3个月,术前3 d,术后1,2,3,4,5,6,8,10 d,术后1,3,6,9,12个月

图2 T淋巴细胞亚群 CD4⁺/CD8⁺ 比值的变化

注:1~15 分别表示术前3个月,术前3 d,术后1,2,3,4,5,6,8,10 d,术后1,3,6,9,12个月

3 讨论

肺移植目前已成为公认的治疗终末期肺疾患的一种有效方法^[1,2]。本中心的首例肺移植患者为Ⅰ型呼吸衰竭,双肺重度肺气肿,肺间质纤维化、双肺局限性肺气肿并肺大泡形成,双侧胸膜增厚,双肺结构及功能已严重受损,内科治疗已无法恢复,进行肺移植后一年多,患者恢复良好。而71岁高龄患者为COPD,Ⅱ型呼吸功能衰竭,反复咳嗽气喘20年余,在家间断吸氧,随时间推移症状反复并加重,活动后明显,已严重影响生活质量,肺移植术后一年多也恢复良好。

肺是开放的器官同时又是重要的免疫器官,同其他实质性器官移植一样,排异反应和感染一直是肺移植两大难点,及时识别和控制排异反应对提高肺移植成功率具有重要的意义。随着供肺保存技术、移植技术、围手术期处理的改进,术后并发症的发生率明显减少,但肺移植术后并发症仍是制

约肺移植发展的重要因素。多中心的数据统计显示,肺移植术后气道并发症的发生率9%~22%^[3,4]。而肺作为一个开放的器官,直接与外界相通,因此其感染和排斥反应的发生情况较其它脏器更为复杂,这也是导致肺移植生存率不如其它器官移植的原因^[5]。相对于其他器官(如肝肾、心等)的移植,肺移植进展比较缓慢,主要原因是术后除发生排斥反应外,发生感染的概率也比较高,所以肺移植术后机体的免疫状况与患者的预后密切相关。

本研究中的2个案例均采用术前免疫诱导(吗替麦考酚酯+醋酸泼尼松+他克莫司),术中注射巴利昔单抗,术后采用三联免疫抑制方案(他克莫司+吗替麦考酚+甲泼尼龙琥珀酸钠),在出现排斥反应时,用甲泼尼龙琥珀酸钠大剂量加强冲击。病例1在第8天出现CD4⁺与CD4⁺/CD8⁺突然增大,同时结合血常规检测结果与临床表现,预示患者表现出排斥反应,依此,临床医生加大了免疫抑制剂的剂量,并采用

甲泼尼龙琥珀酸钠冲击治疗后, T 淋巴细胞数量明显减少。抗排斥治疗后 $CD8^+$ T 淋巴细胞维持在排斥时水平, 而 $CD4^+$ T 淋巴细胞则明显下降, $CD4^+/CD8^+$ 同 $CD4^+$ T 淋巴细胞有相似变化。甲泼尼龙琥珀酸钠冲击治疗后, T 淋巴细胞亚群的绝对数量逐渐平稳增加, 显示免疫抑制剂的剂量合适, 患者当前免疫抑制状态处于平稳状态, 提示临床免疫抑制剂的剂量可维持在目前水平; 病例 2 在围手术期内的 T 淋巴细胞检测未出现较大波动, 虽然在第 9 天也出现减少, 但变化不大, 没有出现急性排斥反应。T 淋巴细胞在移植急性排斥反应中是主要的效应细胞, 外周血 T 淋巴细胞亚群是反映机体免疫功能状态极为重要的指标, T 淋巴细胞是参与移植排斥反应和诱导免疫耐受的免疫细胞之一, 在机体内发挥着极其重要的调节和效应作用。T 细胞主要的 CD 抗原为 CD3, 是 T 细胞共同的表面标志物, 根据细胞表面是否表达 CD4 和 CD8 将 T 淋巴细胞分为 $CD3^+ CD4^+$ 和 $CD3^+ CD8^+$ 两个 T 淋巴细胞亚群^[6]; CD4 抗原存在抑制 T 淋巴细胞 (Ti)/辅助 T 淋巴细胞 (Th) 细胞上, 主要是辅助性 T 细胞, 可增强对人类主要组织相容性复合体 (MHC) I 类抗原的结合。CD4 和 CD8 分子也是信号传导的辅助分子。辅助性 T 细胞和细胞毒性 T 细胞比例可由测 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞数来决定, $CD3^+ CD4^+$ T 细胞可增强机体的免疫应答, 能促进 B 细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞 (Tc) 和其他免疫细胞的增殖及分化, 调节体液免疫和细胞免疫; $CD3^+ CD8^+$ T 细胞则主要由 Tc 组成, 是抗病毒感染的主要效应细胞, 抑制机体免疫应答^[7], 因此, $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞基本代表了 Th 和 Ti, 如果这些细胞的功能和数量发生变化, 则可视为免疫功能紊乱, 这些均与疾病的发生发展有关^[8]。目前认为, 人类外周血 $CD3^+$ T 淋巴细胞中, $CD4^+$ 细胞占 60%~65%, $CD8^+$ 细胞占 30%~35%, 而 $CD4^- CD8^-$ 细胞仅占 1~5%。 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞在正常人外周血和周围组织的比值约为 2, 其比值 < 1.0 或 > 2.0 时视为调节细胞比例异常。目前, $CD4^+/CD8^+$ 比值已作为临床诊断排斥反应的有效指标, 通过流式分析 $CD3^+ CD4^+/CD3^+ CD8^+$ 比值变化来分析机体的免疫功能状态, 以辅助临床医师诊断和治疗疾病。研究结果表明, 免疫抑制剂对 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞有明显抑制作用, 而在排斥反应时两者均明显增加。

免疫抑制剂 FK506、CAS 等的使用, 抑制免疫应答过程中 T 淋巴细胞的活化和增殖、成熟, 最终促进效应 T 细胞减少而发挥抗排斥反应, $CD4^+$ T 淋巴细胞被认为是启动移植排斥反应最重要的细胞, 它识别由抗原呈递细胞 (APC) 递呈的移植抗原, 被激活后分泌启动免疫反应所需要的细胞因子, 启动移植排斥免疫应答。而 $CD8^+$ T 淋巴细胞在移植中则是直接攻击供者细胞的细胞毒性细胞^[9], 因此免疫抑制剂可通过对细胞免疫功能的影响而使机体的免疫力下降, 更容易引起病毒、细菌等的感染。如何确定其用量达到最小 FK506 浓度窗即不引起排斥反应, 也能增强机体免疫系统对病毒的抗感染力也是目前临床研究的重点^[8]。

对于 $CD4^+/CD8^+$ 比值与排斥反应之间的关系, 有学者认为器官移植后 $CD4^+/CD8^+$ 比值低下的患者发生排斥反应反而较多。本研究案例肺移植患者的 $CD4^+/CD8^+$ 比值在术前维持在 1.60 水平, 术后 3 个月内维持在 1.80 左右, 而术后 3 个月以上则维持均值在 1.50。可能是因为免疫抑制剂在术后早期对 $CD3^+ CD4^+$ 抑制作用最明显, 免疫抑制剂导致 $CD3^+ CD4^+$ 的分化成熟受到明显抑制, 随着移植肾功能的恢复, 机体 T 淋巴各亚群细胞的免疫功能趋于稳定, 辅助性 T 细胞亚群与抑制性 T 淋巴细胞亚群的免疫平衡也逐渐形成。肺移植患者 T 细胞亚群的监测不但可以了解患者的免疫状态, 而且对预测患者早期排斥反应及判断患者预后及为临床调整免疫抑制治疗方案提供参考都有重要意义^[10]。

本研究中通过检测 T 淋巴细胞亚群在肺移植术后患者血清中的变化, 从而检测患者的免疫状况, 对肺移植术后的临床用药有着重要的指导意义, 为监控肺移植术后产生免疫耐受患者提供了可能的检测指标, 并对今后针对不同基因状态的预防免疫排斥反应的个体化治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] 张皓, 齐海. 肺移植动物模型: 损伤、保护及免疫反应[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(5): 797-802.
- [2] 刘跃进, 郭璐. 肺移植国内外研究近况与展望[J]. 实用医院临床杂志, 2013, 10(4): 33-37.
- [3] 李慧星, 毛文君, 陈静瑜, 等. 肺叶切除术治疗双肺移植术后肺不张疗效分析[J]. 器官移植, 2014, 5(1): 24-27, 31.
- [4] Fitzsullivan E, Gries CJ, Phelan P, et al. Reduction in airway complications after lung transplantation with novel anastomotic technique[J]. The Annals of Thoracic Surgery, 2011, 92(1): 309-315.
- [5] 强光亮, 刘德若. 肺移植的现状与展望[J]. 器官移植, 2011, 2(4): 181-183.
- [6] 曹林林, 刘颖男, 郑德明, 等. 乳腺癌患者手术前后 T 淋巴细胞亚群变化的实验研究[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(1): 113-114.
- [7] 童明宏, 邵俊, 陈燕红, 等. $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞水平在胃癌患者外周血中的变化[J]. 检验医学, 2012, 27(6): 445-447.
- [8] 谢炜, 杨占宇, 刘翔德. T 淋巴细胞亚群在肝移植术后长期生存患者外周血中的变化[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(22): 2306-2310.
- [9] 孙煦勇, 秦科, 农江, 等. 肝肾联合移植术后 T 细胞亚群变化及其共刺激分子的表达[J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29(10): 1934-1937.
- [10] 俞小卫, 林亚媛, 韦国桢. 肺移植术后受者 T 细胞亚群和 IL-6 水平的动态变化 1 例并文献分析[J]. 中国临床医学, 2006, 13(5): 745-746.