DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.03.030

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, Jaklitsh M T, Shou M, *et al*. Angiongenic 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 browth 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 medited hypoxia induction of vascular endothelial growth factor in retinal microvascular endothelial cells[J]. Inv Ophtal Vis Sci, 1996, 37(5): 2 165—2 176.

[6] Claffy K, Wilkison W O, Spiegelman B M. Vascular endothelilal 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例扩张型心肌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，因扩张性心肌病入院，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：①20 μl抗体+100 μl全血，混匀，25°C室温放置15 min。②加500 μl红细胞裂解液，混匀，25°C放置10 min。③加500 μl pH 7.4磷酸缓冲液，混匀，25°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^+、CD_4^+/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)。

(下转286页)

作者简介：汪志文(1963.7)，女，四川省泸州市人，实验师，主要从事生化实验方面的研究，发表论文5篇。电话：(023)68757465

收稿日期：1999-01-21；修回日期：1999-08-06

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

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]. ArchOphthalmol, 1978, 96(2): 252—256.

[4] De Juan E Jr, Sternberg P Jr, Michels R G. Penetrating ocular 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, 又可引起免疫功能缺陷、严重感染和造血功能障碍等并发症[1]。因此, 手术前后, 特别是术后进行免疫功能的监测, 合理使用免疫抑制剂, 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抡高于正常值, 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 antiCD_3 and CD_4 monoclonal antibody in acute renal allograft rejection[J]. Transplant Proc, 1996, 28(3): 1 306—1 308.

(编辑 冷怀明)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net