

· 论 著 ·

人胚胎间充质干细胞向平滑肌细胞定向分化标志蛋白的选择

李红华¹, 刘厚奇^{1*}, 刘太华², 汤淑萍¹, 熊俊¹, 惠宁³

(1. 第二军医大学基础医学部组织胚胎学教研室, 上海 200433; 2. 基础医学部人体解剖学教研室; 3. 长海医院妇产科)

[摘要] **目的:**选择平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)特异性标志蛋白, 作为判断人胚胎间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)是否向 SMC 方向分化的指标。**方法:**采用免疫细胞化学、免疫荧光、Western 印迹和 RT-PCR 等方法, 检测 SMC 分化早、中、晚期标志蛋白 smooth muscle (SM)- α -actin、calponin、SM-myosin heavy chain (SM-MHC) 在人胚 MSC 中的表达情况。**结果:**各实验均证明 SM- α -actin 和 calponin 蛋白在人胚 MSC 中表达。各种实验方法在人胚 MSC 中均检测不到 SM-MHC 蛋白及其 mRNA 的表达。**结论:**SM-MHC 是一个有价值的 SMC 特异性标志物, 可以作为判断人胚 MSC 向 SMC 方向分化与否的指标。

[关键词] 间充质干细胞; 胚胎; 平滑肌细胞; 细胞分化**[中图分类号]** Q 254 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)08-0822-05

Selection of specific marker protein for smooth muscle lineage differentiation from human embryonic mesenchymal stem cells

LI Hong-Hua¹, LIU Hou-Qi^{1*}, LIU Tai-Hua², TANG Shu-Ping¹, XIONG Jun¹, HUI Ning³ (1. Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Anatomy, College of Basic Medical Sciences; 3. Department of Gynecology and Obstetrics, Changhai Hospital)

[ABSTRACT] **Objective:** To select specific marker protein for smooth muscle cells (SMC) as an indicator of SMC differentiation from human embryonic mesenchymal stem cells (MSC). **Methods:** The expressions of smooth muscle (SM)- α -actin, calponin, and SM-myosin heavy chain (MHC), the early, middle, and late stage markers of SMC differentiation respectively, were detected in MSC by immunocytochemistry, immunofluorescence, Western blotting and RT-PCR. **Results:** Immunocytochemistry, immunofluorescence, Western blotting and RT-PCR showed that both SM- α -actin and calponin proteins expressed in human embryonic MSC. Neither protein nor mRNA of SM-MHC was found in human embryonic MSC by all 4 experiment methods. **Conclusion:** SM-MHC is a valuable specific marker of SMC, which can be used as an indicator of smooth muscle lineage differentiation from human embryonic MSC.

[KEY WORDS] mesenchymal stem cells; embryo; smooth muscle cells; cell differentiation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(8): 822-826]

阻塞性动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄等疾病均与血管平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)分化状态的改变有关, 然而目前 SMC 的分化机制尚未阐明。近年来, 人们先后建立了小鼠、鸡等动物多能细胞向 SMC 分化的体外模型^[1~5], 用于 SMC 分化机制的研究。但由于种属间差异, 来自动物细胞的研究结果不能直接应用于临床。因此, 本课题拟定向诱导多能人胚胎间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)向 SMC 分化, 建立人 SMC 体外分化模型。在开始该研究之前, 首先要选择一个合适的 SMC 特异性标志蛋白, 作为判断人胚 MSC 是否向 SMC 方向分化的指标。本实验用免疫细胞化学、免疫荧光、Western 印迹和 RT-PCR 等方法, 检测了 SMC 分化早、中、晚期标志蛋白^[6] smooth muscle (SM)- α -actin、calponin、SM-myosin heavy chain (SM-MHC) 在人胚 MSC 中的表达情况。

1 材料和方法

1.1 主要材料 脐带和胚胎取自长海医院妇产科(患者均签署知情同意书, 并报医院伦理委员会批准); 人骨骼肌(截肢患者腓肠肌)取自长海医院骨科; 胰蛋白酶、EDTA₂Na · 2H₂O、L-谷氨酰胺(Amresco); 胎牛血清(FBS, 56 C 30 min 灭活)、DMEM (high glucose) (Gibco); 小鼠抗人 SM- α -actin 单克隆抗体、小鼠抗人 SM-MHC 单克隆抗体(DAKO); 小鼠抗人 calponin 单克隆抗体、FITC 标记山羊抗小鼠 IgG、TRITC 标记山羊抗小鼠 IgG (北京中山生物技术有限公司); 小鼠抗 β -actin 单克隆抗体

[基金项目] 国家自然科学基金(90208026)。**[作者简介]** 李红华(1968-), 女(汉族), 博士生。

*Corresponding author. E-mail: houqiliu@hotmail.com

(Sigma);HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(上海华美生物工程公司);即用型第 2 代免疫组化 EnVision™ plus 广谱试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司);DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);Total RNA Isolation Classic Kit(上海申能博彩生物科技有限公司);RNA PCR Kit (AMV) Ver 2.1(大连宝生物工程有限公司);BioTrace™ PVDF 膜(Pall Gelman);Western blotting luminol reagent (Santa Cruz)。

1.2 人胚 MSC 的培养 原代培养:主要参照鸡胚肢芽 MSC 的原代培养方法^[7],略加改进。以下各步操作均在无菌条件下进行。4~5 周 RU486 引产胚胎,绒毛膜完整饱满,放入装有生理盐水的小瓶中,于 0.5 h 内进行人胚 MSC 原代培养。在超净台中,用眼科镊撕开绒毛膜,取出胚胎。用含 100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 D-Hank's 液洗 3 次。用眼科剪剪取 4 个肢芽(肢芽长约 1~2 mm),放入 1.5 ml Eppendorf 管中。加入 D-Hank's 液,静置 30 min,使细胞间质中 Ca²⁺、Mg²⁺ 游离出来。吸弃液体。加入 1%胰蛋白酶-0.1%EDTA 溶液 0.5 ml,37℃ 静置 20 min,消化去除外胚层源性结构。10 ml 离心管中加 9 ml 含 10%FBS、4 mmol/L L-谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养液,将消化物倒入,静置,待组织块沉淀后,吸弃上面液体,留约 1 ml。吸管反复吹打,使成单细胞悬液,血细胞计数板计数。以每皿 5×10⁵ 个细胞接种至 35 mm 培养皿中,补加上述培养液,在 CO₂ 培养箱(饱和湿度,5%CO₂,37℃)中培养,24 h 后换液,以后每 3 d 换液 1 次。传代培养:待细胞长至 80%~90%汇合,即用含 0.05%胰蛋白酶-0.02% EDTA 的 D-Hank's 溶液常规传代。每 35 mm 培养皿细胞可传至 1 个 25 cm² 培养瓶中,CO₂ 培养箱(饱和湿度,5%CO₂,37℃)中培养,每 3 d 换液 1 次。以后按一传二或一传三的比例传代。

1.3 人胚 MSC 中 SM-α-actin、calponin、SM-MHC 的表达 在 35 mm 培养皿中放置 18 mm×18 mm 无菌盖玻片,每皿种植 5×10⁵ 个传代培养 4~8 代的人胚 MSC,培养条件同前。24 h 后取出盖玻片,进行免疫细胞化学法和(或)免疫荧光检测。间接免疫细胞化学实验所用一抗分别为小鼠抗人 SM-α-actin 单克隆抗体、小鼠抗人 calponin 单克隆抗体和小鼠抗人 SM-MHC 单克隆抗体,均按 1:50 比例稀释;用即用型第 2 代免疫组化 EnVision™ plus 广谱试剂盒(含聚合 HRP 标记抗小鼠/兔 IgG)结合一抗;最后用 DAB 显色试剂盒显色。间接免疫荧光实验

所用一抗同上;分别用 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 显示 SM-α-actin 和 SM-MHC,用 TRITC 标记山羊抗小鼠 IgG 显示 calponin,两种二抗均按 1:100 比例稀释。

1.4 SM-MHC SMC 特异性(及 SM-MHC 抗体特异性)的检测 用免疫组织化学法检测在人脐动、静脉 SMC 和人骨骼肌中 SM-MHC 的表达情况。将新鲜取材的人脐带和人骨骼肌标本投入 4%多聚甲醛中固定 12 h。常规石蜡切片,片厚 5 μm,进行免疫组织化学检测,所用抗体及显色方法与间接免疫细胞化学实验相同。

1.5 Western 印迹检测人胚 MSC 中 calponin 和 SM-MHC 蛋白质表达情况 同时检测人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和人脐静脉平滑肌细胞(HU-VSMC),分别做为阴、阳性对照。用细胞裂解液(50 mmol/L HEPES,150 mmol/L NaCl,100 mmol/L NaF,10 mmol/L 去氧胆酸钠盐,1 mmol/L EGTA,1 mmol/L ZnCl₂,10%甘油,100 μg/ml PMSF,1 μg/ml 抑胰肽酶,1 μg/ml 亮肽素)裂解生长至单层的细胞,获得总蛋白溶液。灌制 3 层 SDS 聚丙烯酰胺凝胶,从下向上依次为:10%分离胶,高约 6 cm,用于分离 β-actin(42 000)和 calponin(28 000~34 000);6%分离胶,高约 2 cm,用于分离 SM-MHC(200 000~205 000);5%积层胶,高约 2 cm(包括梳齿插入部分,使齿梳下缘距分离胶上缘约 1 cm)。每泳道 20 μg 总蛋白行 SDS-PAGE 分离后电泳转移至 PVDF 膜上。免疫学检测所用一抗为小鼠抗人 SM-MHC 单克隆抗体(1:200)、小鼠抗人 calponin 单克隆抗体(1:200)、小鼠抗 β-actin 单克隆抗体(1:5 000);二抗为 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(1:50);最后用 Western blotting luminol reagent 显示抗原-抗体复合物,暗室 X 线胶片曝光、显影、定影。

1.6 RT-PCR 检测人胚 MSC 中 SM-MHC mRNA 表达情况 同时检测 HUVEC 和 HUVSMC,分别做为阴、阳性对照。细胞生长至单层,用 Total RNA Isolation Classic Kit 抽提总 RNA。由上海生工生物工程技术有限公司合成 RT-PCR 引物。SM-MHC 上游引物:5'AAG CCA AGA GCT TGG AAG C 3';下游引物:5'TCC TCC TCA GAA CCA TCT GC 3';预期 RT-PCR 产物长度为 829 bp。β-actin 上游引物:5'GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA 3';下游引物:5' CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT 3';预期 RT-PCR 产物长度为 548 bp。用 RNA PCR Kit (AMV) Ver 2.1,以总 RNA 为模板

进行 RT-PCR 反应。每 50 μ l 反应体系中含 SM-MHC 上、下游引物各 10 pmol; β -actin 上、下游引物各 5 pmol;退火温度为 62 $^{\circ}$ C,其余条件见试剂盒说明书中推荐方法。

2 结果

相差显微镜下,人胚 MSC 的原代培养物中有少量上皮样、巨噬细胞样杂细胞存在;由于 MSC 体外增殖速度快,具优势生长效应,在传代培养 3~4 代后基本上就可以获得成分单一的人胚 MSC。此时,单层汇合的人胚 MSC 均为长梭形,排列有方向性,常呈旋涡状;单层汇合前细胞形状多样,似与其周围的生长空间的大小、形状有关,多为长多角形,有细长突起,胞质较少,胞核呈椭圆形或圆形(图 1)。

用免疫细胞化学法和免疫荧光法检测 MSC 分化早、中、晚期标志蛋白 SM- α -actin、calponin、SM-MHC 在人胚 MSC 中的表达情况,结果表明在人胚 MSC 中,SMC 分化早期标志蛋白 SM- α -actin、中期

标志蛋白 calponin 均有表达,在胞质内呈丝状、细胞骨架样分布;而 SMC 分化晚期标志蛋白 SM-MHC 在人胚 MSC 中检测不到(图 2)。免疫组织化学法实验表明,在相同实验条件下,人骨骼肌不表达 SM-MHC,而人脐动、静脉 SMC 高表达 SM-MHC(图 3)。

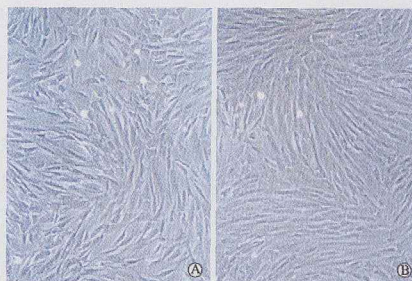


图 1 相差显微镜下 4~8 代人胚 MSC
Fig 1 Phase-contrast microscope of human embryonic MSC(4-8 passage) ($\times 100$)
A: 70%-80% confluent human embryonic MSC;
B: 100% confluent human embryonic MSC

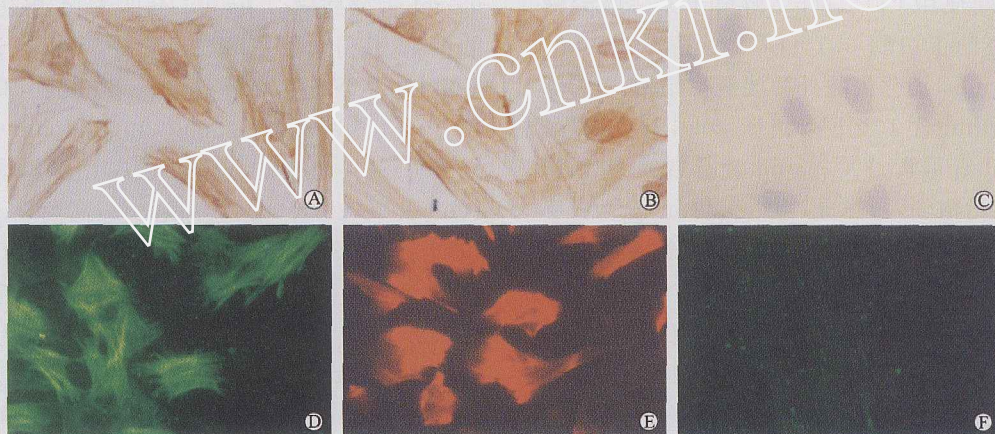


图 2 SMC 分化标志蛋白在人胚 MSC 中的表达情况
Fig 2 Expression of SMC differentiation specific marker proteins in human embryonic MSC($\times 400$)
A-C: Immunocytochemistry detection of SM- α -actin, calponin and SM-MHC in human embryonic MSC, respectively;
D-F: Immunofluorescence detection of SM- α -actin, calponin and SM-MHC in human embryonic MSC, respectively

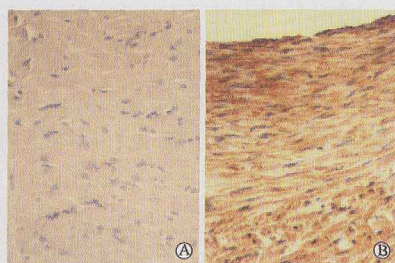


图 3 SM-MHC SMC 特异性(及 SM-MHC 抗体特异性)的检测
Fig 3 Assessment of SM-MHC specificity in SMC($\times 100$)
A: Immunohistochemistry detection of SM-MHC in human skeletal muscle; B: Immunohistochemistry detection of SM-MHC in HUVSMC

Western 印迹实验亦表明,人胚 MSC 中表达 calponin,不表达 SM-MHC 蛋白;阴性对照 HUVEC 中 2 种蛋白均不表达,阳性对照 HUVSMC 中 2 种蛋白均表达;各组间用做内参照的 β -actin 蛋白表达水平无明显差异(图 4)。由于 SMC 分化早期标志蛋白 SM- α -actin 的相对分子质量与用做内参照的 β -actin 蛋白相同(42 000),故没有对其进行 Western 印迹检测。

RT-PCR 实验表明,在人胚 MSC 中检测不到 SM-MHC mRNA 条带;阴性对照 HUVEC 中检测不到 SM-MHC mRNA 条带,阳性对照 HUVSMC 中可

以检测到 SM-MHC mRNA 条带; 各组间用做内参照的 β -actin mRNA 表达水平无明显差异(图 5)。

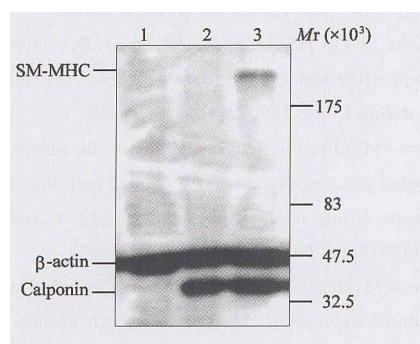


图 4 Western 印迹检测 calponin 和 SM-MHC

Fig 4 Western blotting analysis of calponin and SM-MHC

1: HUVEC in 4 d; 2: Human embryonic MSC; 3: HUVERSC

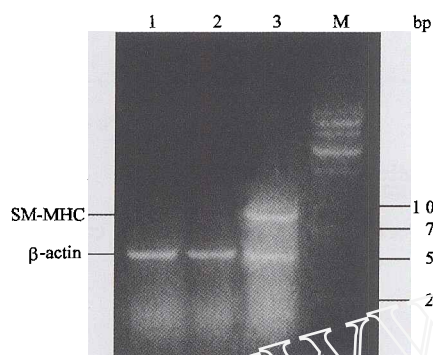


图 5 RT-PCR 检测 SM-MHC

Fig 5 RT-PCR detection of SM-MHC

1: HUVEC; 2: Human embryonic MSC;
3: HUVERSC; M: 1 kb DNA ladder

3 讨论

人胚 MSC 原代培养主要参照鸡胚肢芽 MSC 的原代培养方法^[7], 其主要原理是胚胎肢芽的组成相对较单纯, 在其发生早期(本实验中所用长约 1~2 mm)主要由中胚层 MSC 及体表的外胚层细胞组成; 首先用高浓度酶处理, 消化外胚层细胞; 酶处理后的肢芽在培养液中自然沉降, 进一步除去已离散的外胚层细胞, 得到相对纯净中胚层细胞团。这种方法得到的培养物与去除外胚层后分离的 MSC 培养物具有相同的特征。再加上 MSC 体外增殖速度快, 具优势生长效应, 在传代培养 3~4 代后基本上就可以获得成分单一的人胚 MSC。为提高各组间的可比性, 本实验均采用传代培养 4~8 代的人胚 MSC(我们曾尝试传代培养人胚 MSC 达 20 多代, 细胞的形态、生长速度等生物学性状均无明显变化, 也没有出现衰老或分化迹象)。

实验结果证明 SMC 分化早、中期标志蛋白 SM-

α -actin 和 calponin 在人胚 MSC 中均表达, 该结果与 Perry 等^[8]对骨髓 MSC 的检测结果相同。这一现象可能是因为: 首先, MSC 可以同时表达其各种分化细胞, 如上皮细胞、肌细胞等的多种特征^[9]。事实上, SMC 分化早期标志蛋白 SM- α -actin 亦常被人们当做 MSC 的一个特异性抗原标志物^[9]。其次, 很多证据证明 SM- α -actin 和 calponin 的 SMC 特异性不高, 在多种胚胎细胞, 如成心肌细胞、成骨骼肌细胞中均可表达 SM- α -actin^[10~12], 此外也有在胚胎发育过程中在非平滑肌细胞中检测到 calponin 的报道^[13,14]。在人胚 MSC 中, 各种实验方法均检测不到 SMC 分化晚期标志蛋白 SM-MHC 的表达。SM-MHC 是 SMC 标志蛋白中特异性最高的一个, 是组成 SMC“收缩装置”(contraction devices)的主要成分^[7], 在 SMC 分化晚期才开始表达^[15,16], 在 SMC 分化研究中被用做终末分化标志(the definitive SM-lineage marker or the marker of differentiated state of SMC)^[5]。以上事实均提示 SM-MHC 可以做为入胚 MSC 向 SMC 方向分化的标志物。免疫组织化学检测结果还表明, 人脐动、静脉 SMC 高表达 SM-MHC; 而人骨骼肌不表达 SM-MHC。该结果不但说明 SM-MHC 只存在于 SMC 中, 还证明本实验所用入 SM-MHC 的抗体能特异性地结合入 SM 亚型的 MHC, 与人骨骼肌中的 MHC 无交叉反应。由于标本难以获得, 本研究中没能在人心肌细胞上进行这部分实验。

本研究证明 SM-MHC 可以做为判断人胚 MSC 向 SMC 方向分化与否的指标。该研究为我们体外定向诱导人胚 MSC 向 SMC 分化的研究打下基础。

[参考文献]

- [1] Jain MK, Layne MD, Watanabe M, et al. In vitro system for differentiating pluripotent neural crest cells into smooth muscle cells[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(11):5993-5996.
- [2] Hirschi KK, Rohovsky SA, D'Amore PA. PDGF, TGF- β , and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate[J]. *J Cell Biol*, 1998, 141(3):805-814.
- [3] Landerholm TE, Dong XR, Lu J, et al. A role for serum response factor in coronary smooth muscle differentiation from proepicardial cells[J]. *Development*, 1999, 126:2053-2062.
- [4] Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors[J]. *Nature*, 2000, 408(6808):92-96.
- [5] Manabe I, Owens GK. Recruitment of serum response factor and hyperacetylation of histones at smooth muscle-specific regulatory regions during differentiation of a novel P19-derived in vitro smooth muscle differentiation system[J]. *Circ Res*, 2001, 88:1127-1134.

[6] Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells[J]. *Physiol Rev*, 1995, 75(3): 487-517.

[7] Caplan AI. Effects of the nicotinamide-sensitive teratogen 3-acetylpyridine on chick limb cells in culture[J]. *Exp Cell Res*, 1970, 62(2): 341-355.

[8] Perry TE, Kaushal S, Sutherland FWH, et al. Bone marrow as a cell source for tissue engineering heart valves[J]. *Ann Thorac Surg*, 2003, 75: 761-767.

[9] Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells[J]. *Exp Biol Med*, 2001, 226(6): 507-520.

[10] Ruzicka DL, Schwartz RJ. Sequential activation of α -actin genes during avian cardiogenesis; vascular smooth muscle α -actin gene transcripts mark the onset of cardiomyocyte differentiation[J]. *J Cell Biol*, 1988, 107(6 Pt 2): 2575-2586.

[11] Sawtell NM, Lessard JL. Cellular distribution of smooth muscle actins during mammalian embryogenesis; expression of the α -vascular but not the γ -enteric isoform in differentiating striated myocytes[J]. *J Cell Biol*, 1989, 109(6 Pt 1): 2929-2937.

[12] Sugi Y, Lough J. Onset of expression and regional deposition of alpha-smooth and sarcomeric actin during avian heart development[J]. *Dev Dyn*, 1992, 193(2): 116-124.

[13] Samaha FF, Ip HS, Morrissey EE, et al. Developmental pattern of expression and genomic organization of the calponin-h1 gene[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(1): 395-403.

[14] Miano JM, Olson EN. Expression of the smooth muscle cell calponin gene marks the early cardiac and smooth muscle cell lineages during mouse embryogenesis[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(12): 7095-7103.

[15] Kuro-o M, Nagai R, Tsuchimochi H, et al. Developmentally regulated expression of vascular smooth muscle myosin heavy chain isoforms[J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(31): 18272-18275.

[16] Miano JM, Cserjesi P, Ligon KL, et al. Smooth muscle myosin heavy chain exclusively marks the smooth muscle lineage during mouse embryogenesis[J]. *Circ Res*, 1994, 75: 803-812.

[收稿日期] 2004-06-04 [修回日期] 2004-07-07
[本文编辑] 尹 荼

• 个案报告 •

体外循环双肺移植治疗终末期肺气肿一例报告

Bilateral lung transplantation under extracorporeal circulation for end-stage emphysema: a case report

陈 龙, 陈炜生, 杨胜生, 徐 驰, 林金祥, 盛继红, 张苏迅, 程先进
(南京军区福州总医院胸心外科, 福州 350027)

[关键词] 肺移植; 体外循环; 肺气肿

[中图分类号] R 563.3 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2004)08-0826-01

1 临床资料 患者, 男性, 48岁, 因反复咳嗽、咳痰、气喘20年, 加重3年入院。入院查体: 体温 37.0℃, 呼吸 24次/min, 脉搏 95次/min, 血压 130/80 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa), 嘴唇轻度发绀, 杵状指, 桶状胸, 双侧肺泡呼吸音减弱, 心界不大, 各瓣膜区无明显杂音。动脉血气分析示: 氧分压 55.4 mmHg, 二氧化碳分压 78.9 mmHg, pH 7.32。肺功能检查示: 通气功能呈重度阻塞性减退。超声心动图检查示: 心功能正常。胸部CT检查示: 慢性喘息型支气管炎、阻塞性肺气肿。X线胸片示: 肋间隙明显增宽, 肺透亮度明显增强。肺核素灌注显像(ECT)示双肺灌注明显减少, 肝肾功能基本正常。PRA阴性。

供体为25岁的男性脑死亡者, 血型与受体相同, HLA组织配型有3个位点相同, 相容性较好。前胸正中切口, 剪开心包及两侧纵隔胸膜。主肺动脉荷包式缝合, 置入冷灌注管。从肺动脉总干内注入前列腺素 E₁ 1 000 μg, 肝素 200 mg, 随即用冷 Euro-Collins 液 3 000 ml 加压灌注。剪开左心耳, 分离纵隔胸膜, 在肺充氧膨胀情况下夹住主气管, 双肺及心脏整块取下, 置于保温箱中运送。供肺修剪时仔细结扎止血, 主肺动脉及主气管均尽量保留, 到台上再根据受体情况修剪。

患者胸骨正中劈开进胸, 剪开心包及两侧纵隔胸膜, 注意保护双侧膈神经。全身肝素化后常规升主动脉插管, 上、下腔静脉置管并套束带, 经右上肺静脉置左房引流管, 建立体

外循环。转流时注意保温, 心脏不停跳。分别结扎切断两侧肺静脉, 于肺动脉分叉处切断肺动脉。注意保留动脉导管韧带处肺动脉片, 保护喉返神经, 于隆突上两个软管环处切断总气管, 分别移出左右肺组织, 将供肺于心脏后放入胸腔。先吻合气管, 以4-0聚丙烯线连续缝合膜部, 余部间断缝合。于患者左房后壁开窗与供者左心房吻合, 最后缝合肺动脉, 开放上、下腔静脉, 恢复肺血供, 同时开始肺通气。双肺膨胀良好, 气管吻合处未见漏气, 左心房及肺动脉吻合口未见活动出血。停机后纵膈渗血较多, 未能找到明显出血点, 用纱布填塞止血。两侧胸膜腔放闭式引流管。患者采用普乐可复和吗替麦考酚酯联合抗排斥, 监测普乐可复血药浓度为15~20 ng/L。切除双肺标本的病理检查为: 双肺纤维化, 肺大泡形成, 符合慢性阻塞性肺气肿表现。

术后8h内胸腔引流液较多, 150~200 ml/h, 用自体血回输机回收后回输入患者体内, 同时予以输血小板、纤维蛋白原等止血处理, 12h后循环稳定, 胸腔引流液减少到20 ml/h, 于术后24h再次开胸取出纱布。术后以左氧氟沙星和头孢西丁钠抗感染, 氟康唑预防真菌感染。术后早期患

(下转第845页)

[作者简介] 陈 龙(1963-), 男(汉族), 博士生, 主任医师。
E-mail: chenlongdirector@yahoo.com.cn