

论著

文章编号:1000-5404(2012)06-0508-04

PBMC 中 CD69、CD107a 表达上调在诊断迟发型药物变态反应中的意义

牛 军, 钟 华, 宋志强, 钟白玉, 郝 飞 (400038 重庆, 第三军医大学西南医院皮肤科)

[摘要] **目的** 检测药疹患者外周血单个核细胞中 CD69 和 CD107a 的表达, 评价其与迟发型药物变态反应的相关性。**方法** 2010 年 5 月至 2011 年 4 月采集 20 例药疹患者和 10 例健康对照者的外周血, 用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞, 按 2×10^6 细胞/孔种植于 24 孔板, 给予致敏药物刺激, 培养 72 h 后采用流式细胞术染色并检测外周血单个核细胞中 CD69 和 CD107a 分子的表达。**结果** 健康对照组外周血单个核细胞中 CD107a 阳性、CD69 阳性、CD107a 与 CD69 双阳性细胞刺激前的比例分别为 $(0.41 \pm 0.18)\%$ 、 $(0.33 \pm 0.13)\%$ 、 $(0.12 \pm 0.06)\%$, 经致敏药物刺激后分别为 $(0.38 \pm 0.28)\%$ 、 $(0.35 \pm 0.12)\%$ 、 $(0.14 \pm 0.08)\%$, 刺激前后无明显差异, 药疹患者外周血单个核细胞中 CD107a 阳性、CD69 阳性、CD107a 与 CD69 双阳性细胞刺激前的比例分别为 $(0.45 \pm 0.25)\%$ 、 $(0.31 \pm 0.12)\%$ 、 $(0.15 \pm 0.07)\%$, 与健康对照组无明显差异, 但经致敏药物刺激后外周血单个核细胞中 CD69 阳性、CD107a 阳性、CD107a 与 CD69 双阳性细胞表达比例明显增高[分别为 $(9.01 \pm 2.91)\%$ 、 $(1.78 \pm 0.76)\%$ 、 $(0.74 \pm 0.19)\%$], 和健康对照组、药疹未刺激组比较有统计学差异 ($P < 0.01$), 且随着致敏药物浓度的增加, CD69 和 CD107a 的表达呈剂量依赖性上调。**结论** 药疹患者外周血单个核细胞经致敏药物刺激后 CD69、CD107a 表达增加。

[关键词] CD69; CD107a; 药物变态反应; 外周血单个核细胞

[中图分类号] R392.8; R446.11; R967

[文献标志码] A

Significance of CD69 and CD107 upregulations on PBMC for delayed-type drug hypersensitivity diagnosis

Niu Jun, Zhong Hua, Song Zhiqiang, Zhong Baiyu, Hao Fei (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the expressions of CD69 and CD107a on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in patients with drug rash, and to explore their relationship with delayed-type drug hypersensitivity. **Methods** PBMCs were isolated from the peripheral blood samples that was collected from 20 patients with drug rash and 10 healthy controls from May 2010 to April 2011 by Ficoll density gradient centrifugation. The obtained PBMCs were resuspended and cultured in 24-well plates with 2×10^6 cells/well, and were incubated with the culprit drugs. After 72 h, the expressions of CD69 and CD107a were detected by flow cytometry. **Results** In the healthy control group, there was no significant difference between the ratios of CD107a⁺, CD69⁺ and CD107a⁺CD69⁺ PBMCs before and after the culprit drug incubation [$(0.41 \pm 0.18)\%$, $(0.33 \pm 0.13)\%$ and $(0.12 \pm 0.06)\%$ vs $(0.38 \pm 0.28)\%$, $(0.35 \pm 0.12)\%$ and $(0.14 \pm 0.08)\%$]. In the patients group, the ratios of CD107a⁺, CD69⁺ and CD107a⁺CD69⁺ PBMCs significantly increased in a dose-dependent manner after the culprit drug incubation as compared with those before the incubation [$(9.01 \pm 2.91)\%$, $(1.78 \pm 0.76)\%$ and $(0.74 \pm 0.19)\%$ vs $(0.45 \pm 0.25)\%$, $(0.31 \pm 0.12)\%$ and $(0.15 \pm 0.07)\%$]. The ratios of CD107a⁺, CD69⁺ and CD107a⁺CD69⁺ PBMCs of the patients group were significantly different from those of the healthy control group after the culprit drug incubation ($P < 0.01$), while the differences were not significant between the two groups before the incubation. **Conclusion** Culprit drugs-treated PBMCs of patients with drug rash have upregulations of CD69 and CD107a.

[Key words] CD69; CD107a; drug hypersensitivity; peripheral blood mononuclear cells

Supported by the Clinical Innovative Foundation of Third Military Medical University (2010XLC16). Corresponding author: Hao Fei, E-mail: haofei62@medmail.com.cn

[基金项目] 第三军医大学临床创新基金(2010XLC16)

[通信作者] 郝 飞, E-mail: haofei62@medmail.com.cn

药物过敏十分常见,大约占有所有药物不良反应的15%^[1],皮肤是最易受累也最易观察的靶器官,肝、肾等重要脏器也可受累甚至危及生命。由于各种药物引起的变态反应潜伏期长短不一,且可能同时服用多种药物,还有食物、环境等多种因素干扰,给临床医师确定致敏药物带来一定的困难。临床80%以上的药物过敏为迟发型变态反应,主要由T淋巴细胞介导^[2]。提示T淋巴细胞在迟发型药物变态反应的发病机制中起关键作用,因此以检测药物特异性T淋巴细胞活化为原理的一些体外实验更有应用前景。

表面分子CD69是T淋巴细胞早期活化的标志,当淋巴细胞受到外界抗原如致敏药物等的刺激活化时,该分子在淋巴细胞的表面表达会显著上调,从而可用于评判机体细胞免疫应答的能力以及是否对药物过敏。最新研究表明迟发型药物变态反应患者T淋巴细胞表面表达CD69分子上调^[3],并较好地体现出药疹患者机体的免疫应答,提示该分子在药疹患者外周淋巴细胞的改变可用于迟发型药物变态反应的诊断^[4]。CD107a是目前公认的细胞毒性T细胞(cytotoxic T cell, CTL)脱颗粒的标志,而早期研究已证实CTL参与迟发型药物变态反应,因此,我们推测CD107a很可能参与致敏药物导致的迟发型药物变态反应。Zawodniak等^[5]的研究显示CD107a在药物过敏患者外周血T淋巴细胞的表达上调则进一步证实CD107a可能参与了药物诱导的迟发型变态反应,但是该研究选取的样本量较少,仍需要大样本的研究予以证实。因此,我们选取20例药疹患者,检测其外周血单个核细胞中CD69、CD107a的表达,并评价这2个表面分子在迟发型药物变态反应中的改变,以期找到一种更具有应用前景的体外检测方法确认药疹患者的致敏药物,从而帮助临床更好的治疗药疹患者。

1 资料与方法

1.1 研究对象

20例迟发型药物变态反应患者,根据临床表现及实验室检查符合药疹诊断^[6],并由2名专科医师共同诊断为药疹。药疹治愈距检测时间 ≥ 2 个月。男性13例,女性7例,平均年龄42.3岁,10种致敏药物和8种非致敏药物。对照组为10例健康对照,男性5例,女性5例,平均年龄40.2岁。其中5例最近12个月未服用任何药物,且无药物过敏史;5例最近3个月服用过测试药物,未出现明显的药疹反应。本研究经第三军医大学西南医院伦理委员会批准,所有研究对象均签订知情同意书。

1.2 试剂与仪器

药物(购自Sigma-Aldrich公司):青霉素(penicillins)、阿莫西林(Amoxicillin)、头孢克肟(Cefixime)、甲硝唑(metronidazole)、氧氟沙星(Norfloxacin)、左氧氟沙星(Levofloxacin)、卡马西平(Carbamazepine)、对乙酰氨基酚(Acetaminophen)、磺胺

甲噁唑(Sulfamethylisoxazole)、酒石酸美托洛尔(metoprolol)。CD107a-PE、CD69-FITC、Mouse IgG1 K Isotype Control PE、Mouse IgG1 K Isotype Control FITC抗体均购自美国eBioscience公司。淋巴细胞分离液(中国科学院血液研究所),胎牛血清(GIBICO公司),破伤风类毒素(Tetanus toxoid,成都生物制品研究所),流式细胞仪(BD FACS Calibur)。

1.3 实验方法

1.3.1 PBMC的分离和培养 取药疹患者及健康对照组外周静脉血,肝素抗凝,以等量PBS液稀释, Ficoll梯度离心法分离PBMC, PBS液洗2次,洗涤后用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基调至细胞浓度为 2×10^6 /ml,置入24孔板培养基,每孔1ml,加入致敏药物,调整致敏药物浓度为(1、10、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$),青霉素浓度为(0.1、0.5、1.0 mg/L),阳性对照破伤风类毒素浓度为5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱培养72 h。

1.3.2 双色免疫荧光染色 离心获取细胞沉淀,然后重悬调整细胞浓度为每管 1×10^6 /ml,取细胞悬液100 μl ,各加入2种不同荧光标记抗体各20 μl (PE标记抗人CD107a单抗+FITC标记抗人CD69单抗),混匀,冰上避光孵育30 min; 1 000 r/min离心10 min,获取有核细胞, PBS洗涤2次后弃上清,加入1 ml PBS将细胞悬浮,然后加入0.4 ml 1%多聚甲醛于4 $^{\circ}\text{C}$ 固定30 min。

1.3.3 流式细胞仪分析 每份标本检测 1×10^4 细胞,将光散射及荧光数据存入软盘,测试后分析结果。

1.4 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件,用双尾t检验比较组间差异,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 药疹患者PBMC中CD69和CD107a表达检测

典型斑丘疹型药疹患者PBMC经致敏药物和破伤风类毒素(头孢克肟)孵育刺激,与未经刺激的PBMC比较,表面分子CD69和CD107a表达明显增强(图1)。正常对照组外周血经药物刺激孵育前后CD69、CD107a表达无明显差异;药疹患者PBMC未经致敏药物刺激,CD69、CD107a表达和健康对照比较没有统计学差异,均只有少量细胞表面表达CD69、CD107a;而药疹患者PBMC经致敏药物刺激后,表达CD69、CD107a分子的细胞比例均明显增高($P < 0.01$,表1)。

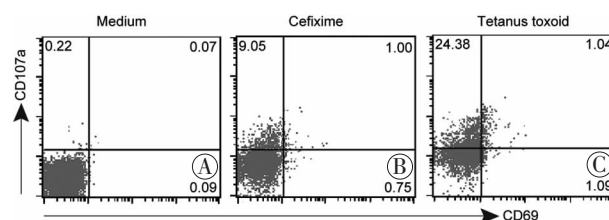


图1 斑丘疹型药疹患者PBMC分别经培养基(A)、头孢克肟(B)及破伤风类毒素(C)作用72 h后CD107a与CD69的表达

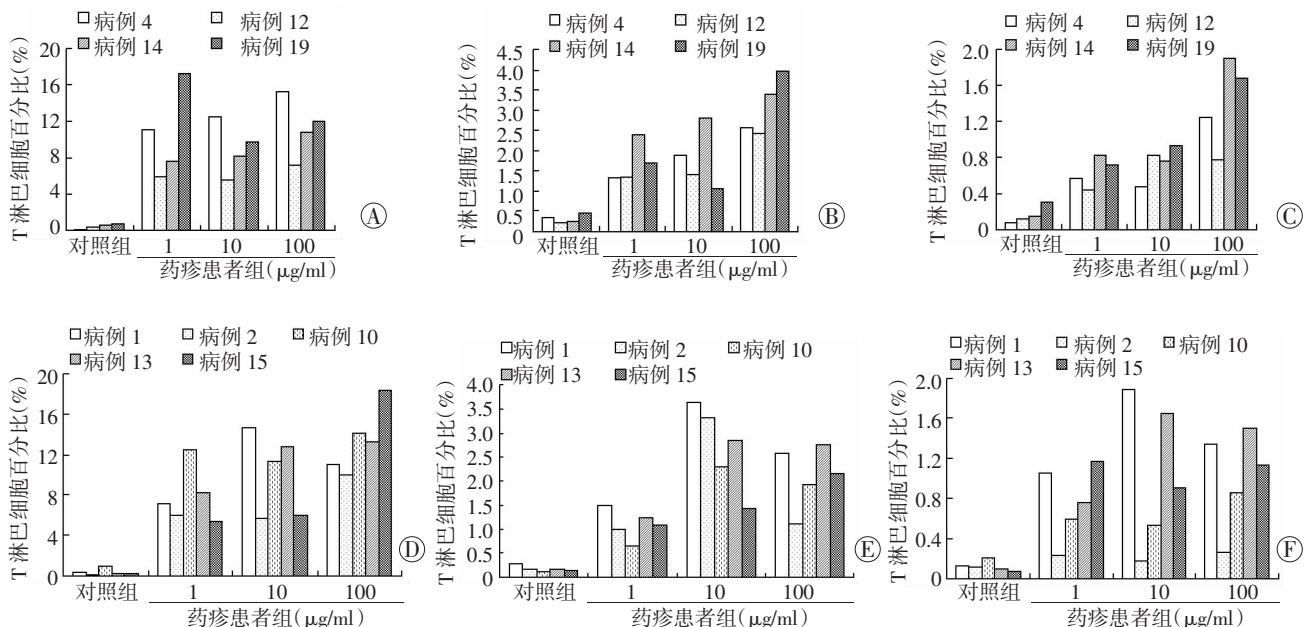
2.2 不同浓度致敏药物对药疹患者PBMC的作用

选取对头孢克肟与磺胺甲异噁唑过敏的药疹患者,以致敏药物刺激其PBMC,72 h后检测CD107a与CD69的表达情况。如图2所示,我们发现药疹患者PBMC经相应的致敏药物刺激后,CD107a与CD69的表达明显上调,CD107a⁺、CD69⁺与CD107a⁺CD69⁺细胞所占的比例显著增加,而且呈剂量依赖性。

表1 正常人和药疹患者PBMC经致敏药物刺激培养72h前后CD107a与CD69表达比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD107a ⁺ PBMC		CD69 ⁺ PBMC		CD107a ⁺ CD69 ⁺ PBMC	
		刺激前	刺激后	刺激前	刺激后	刺激前	刺激后
正常对照组	10	0.41 ± 0.18	0.38 ± 0.28	0.33 ± 0.13	0.35 ± 0.12	0.12 ± 0.06	0.14 ± 0.08
药疹患者组	20	0.45 ± 0.25	9.01 ± 2.91 ^a	0.31 ± 0.12	1.78 ± 0.76 ^a	0.15 ± 0.07	0.74 ± 0.19 ^a

a: P < 0.01, 与正常对照组比较



A: 头孢克肟刺激后 CD107a⁺ 的表达; B: 头孢克肟刺激后 CD69⁺ 的表达; C: 头孢克肟刺激后 CD107a⁺CD69⁺ 的表达; D: 磺胺甲基异噁唑刺激后 CD107a⁺ 的表达; E: 磺胺甲基异噁唑刺激后 CD69⁺ 的表达; F: 磺胺甲基异噁唑刺激后 CD107a⁺CD69⁺ 的表达

图2 药疹患者PBMC经不同浓度致敏药物刺激72h后CD107a和CD69的表达

3 讨论

迟发型药物变态反应主要为T淋巴细胞介导(CD4⁺、CD8⁺)细胞免疫^[7]。药物作为半抗原或前抗原,与机体的大分子蛋白质结合形成全抗原,呈递给主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)分子,进而引起T细胞活化并形成药物特异性T细胞克隆,从而形成记忆性T细胞长期存留于皮肤组织中。当记忆性T细胞再次遇到致敏药物时便会迅速活化,引起药疹的各种临床表现。T细胞在其定型、增殖和功能分化的不同阶段会表达不同的表面分子并分泌不同的细胞因子。因此,检测这些分子便可了解T细胞的活化情况,继而寻找到相应的致敏药物。本实验运用流式细胞术检测外周血PBMC中CD69与CD107a的表达,发现迟发型药疹患者PBMC经致敏药物刺激后,PBMC中表达CD69与CD107a的细胞比例明显增高,而正常人和未经致敏药物刺激的药疹患者PBMC中只有少量细胞表达CD69[分别为(0.38 ± 0.28)%、(0.45 ± 0.25)%],提示正常情况下T淋巴细胞可能处于静止状态,并没有明显的活化。药疹患者外周血经致敏药物刺激后,CD69阳性细胞在PBMC

中的比例明显增加,与对照组、未刺激组、非致敏药物刺激组比较均存在统计学差异(P < 0.05)。同样,流式细胞术检测PBMC中CD107a的表达,发现药疹患者外周血经致敏药物刺激后,PBMC中CD107a阳性细胞显著增加,与对照组、未刺激组、非致敏药物刺激组比较均存在统计学差异(P < 0.01),且这种差异性较CD69的表达更为显著。此外,药疹患者PBMC经致敏药物刺激孵育后,表面分子CD69和CD107a共同表达也显著升高[(0.74 ± 0.19)%]。

目前药疹诊断主要依靠是淋巴细胞转换实验(lymphocyte transformation test, LTT),该实验在体外进行,对受试者无损害,而且能检测多种药物,阳性率可达60%~70%^[8-9],因而备受临床研究人员的关注。但LTT常规应用于药疹诊断仍受到限制,如有的药疹患者外周血淋巴细胞在有丝分裂原的刺激下并未转化成不成熟的淋巴母细胞和有丝分裂,无法适时反映出患者机体的细胞免疫水平^[10-11]。此外,有研究利用酶联免疫吸附实验(ELISA)、流式细胞技术等检测T淋巴细胞活化早期表达的分子CD69、细胞毒效应分子CD107a以及分泌的细胞因子(如IFN-γ、IL-2、IL-5、IL-13),发现这些分子对药疹患者的临床诊断有较高

特异性和敏感性^[3,5,12]。正常情况下,静止的T淋巴细胞不表达CD69,但在PMA、PHA以及某些抗原刺激下,细胞表面就能够合成和表达一些新的糖蛋白,包括CD69、IL-2受体CD25、转铁蛋白受体CD71,这些分子被称为淋巴细胞活化标志,其中最早表达的是CD69,因而认为CD69是淋巴细胞早期活化的标志。研究证明,药疹患者淋巴细胞显著上调表面分子CD69的表达^[3],表明药疹患者机体受抗原(致敏药物)刺激后,特异性淋巴细胞识别抗原,发生活化、增殖、分化即发生免疫应答,形成特异性致敏T淋巴细胞。并且在T淋巴细胞增殖、分化过程中,部分活化的T淋巴细胞分化为记忆性T淋巴细胞。未经抗原刺激的记忆T淋巴细胞处于静息状态,当再次接触致敏药物时,特异性T淋巴细胞TCR(T淋巴细胞抗原受体)与致敏药物结合,释放多种细胞因子(如IL-2、IL-12、IL-4、IL-15),主要为IL-2^[13],激活“旁观者”T淋巴细胞,放大免疫反应,使T淋巴细胞表面表达大量CD69分子。静息的T淋巴细胞表面也不表达CD107a,但是其大量表达在活化的T淋巴细胞表面。研究表明,抗原特异性T淋巴细胞表面的CD107a分子与抗原特异性细胞活化以后的脱颗粒过程密切相关,可能是杀伤性T细胞脱颗粒以后,细胞溶解性颗粒的胞膜与T淋巴细胞膜融合的证据,细胞内包裹穿孔素、颗粒酶的囊泡内膜表达CD107a,在受到TCR刺激后,囊泡膜与细胞膜融合,穿孔素、颗粒酶释放到效应细胞与靶细胞形成的细胞突触间隙,同时CD107a表达达到细胞表面。检测CD107a表达量可以间接反映细胞脱颗粒能力的强弱^[14]。最近研究证实CD107a大量表达于药疹患者CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞表面,指出CD107a是CTL脱颗粒的标志,可用于迟发型药物变态反应的诊断^[5]。

本研究利用流式细胞技术检测药疹患者PBMC中CD69、CD107a在致敏药物刺激前后的改变,发现这2个分子在刺激后明显上调,能够较好的反应药疹患者属于何种药物致敏,显示出较强的特异性。因此,检测CD69、CD107a分子在PBMC中的表达或许成为诊断迟发型药物变态反应的一个重要手段。早期研究分别表明CD69、CD107a在药疹患者的淋巴细胞中表达上调,但他们仅检测了其中的单个表面分子,不能全面反映药疹患者的免疫应答水平,而我们根据Beeler^[3]、Zawodniak^[5]等的研究结论,首次在PBMC中同时检测CD69、CD107a这2个分子的表达,能更加有效的确认致敏药物,提高了诊断的敏感性。此外,该方法不需要应用放射性物质,避免了激发实验的危险性,比LTT实验适合常规开展。但在实验过程中,我们仅分析了CD69、CD107a分子在PBMC中的表达,并没有具体分析这2个表面分子在T淋巴细胞亚群中是否有改变。

因此,我们将在后续的研究中进一步分析CD69、CD107a在T淋巴细胞亚群中的表达。

药疹的发病机制非常复杂,确定致敏药物难度很大,且许多研究存在争议,目前仍没有一种体外研究结果应用于临床诊断。PBMC中CD69、CD107a分子的表达与致敏药物相关性好,特异性与敏感性均较高,可望成为体外检测迟发型药物变态反应的方法。但真正应用于临床还需要大样本患者和对照研究。

参考文献:

- [1] Hunziker T, Bruppacher R, Kuenzi U P, et al. Classification of ADRs: a proposal for harmonization and differentiation based on the experience of the Comprehensive Hospital Drug Monitoring Bern/St. Gallen, 1974-1993 [J]. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2002, 11(2): 159-163.
- [2] Pichler W J. Drug hypersensitivity[M]. Basel: Karger, 2007.
- [3] Beeler A, Zaccaria L, Kawabata T, et al. CD69 upregulation on T cells as an *in vitro* marker for delayed-type drug hypersensitivity [J]. *Allergy*, 2008, 63(2): 181-188.
- [4] Devevre E, Romero P, Mahnke Y D. LiveCount Assay: concomitant measurement of cytolytic activity and phenotypic characterisation of CD8(+) T-cells by flow cytometry [J]. *J Immunol Methods*, 2006, 311(1/2): 31-46.
- [5] Zawodniak A, Lochmatter P, Yerly D, et al. *In vitro* detection of cytotoxic T and NK cells in peripheral blood of patients with various drug-induced skin diseases [J]. *Allergy*, 2010, 65(3): 376-384.
- [6] 赵辩. 中国临床皮肤病学[M]. 4版. 南京:江苏科技出版社, 2010: 752-761.
- [7] Scala E, Giani M, Pastore S, et al. Distinct delayed T-cell response to beta-methasone and penicillin-G in the same patient [J]. *Allergy*, 2003, 58(5): 439-444.
- [8] Naisbitt D J, Farrell J, Wong G, et al. Characterization of drug-specific T cells in lamotrigine hypersensitivity [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 111(6): 1393-1403.
- [9] Pichler W J, Tilch J. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity [J]. *Allergy*, 2004, 59(8): 809-820.
- [10] Martin M, Wurpts G, Ott H, et al. *In vitro* detection and characterization of drug hypersensitivity using flow cytometry [J]. *Allergy*, 2010, 65(1): 32-39.
- [11] Beeler A, Pichler W J. *In vitro* tests of T cell-mediated drug hypersensitivity [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2006, 2(6): 887-900.
- [12] Lochmatter P, Beeler A, Kawabata T T, et al. Drug-specific *in vitro* release of IL-2, IL-5, IL-13 and IFN-gamma in patients with delayed-type drug hypersensitivity [J]. *Allergy*, 2009, 64(9): 1269-1278.
- [13] Cote-Sierra J, Foucras G, Guo L, et al. Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(11): 3880-3885.
- [14] Betts M R, Brenchley J M, Price D A, et al. Sensitive and viable identification of antigen specific CD8 T cells by a flow cytometric assay for degranulation [J]. *J Immunol Methods*, 2003, 281(1/2): 65278.

(收稿:2011-11-09;修回:2011-12-14)

(编辑 邓强庭)