

• 临床检验研究论著 •

药疹患者外周血淋巴细胞亚群的检测及其意义*

谭 飞^{1,2}, 莫小辉², 陈 佳², 章楚光², 胡婷婷², 吴 飞², 宋宁静², 顾 军^{1△}

(1. 第二军医大学附属长海医院皮肤科, 上海 200433; 2. 上海市皮肤病医院中心实验室, 上海 200443)

摘要:目的 分析药疹患者外周血淋巴细胞亚群的变化。方法 将 18 例初诊药疹患者作为药疹组, 根据致敏药物的不同将其分为头孢菌素组($n=9$)、青霉素组($n=5$)及中药组($n=4$), 将 20 例健康体检者作为对照组。应用流式细胞仪检测其外周血 T 淋巴细胞($CD3^+$ 、 $CD3^+CD4^+$ 、 $CD3^+CD8^+$)、B 淋巴细胞、自然杀伤细胞(NK)和自然杀伤 T 淋巴细胞(NKT)所占百分比及其绝对计数。结果 药疹组患者外周血 T 淋巴细胞($CD3^+$ 、 $CD3^+CD4^+$)、B 淋巴细胞和 NKT 细胞所占百分比与对照组的差异有统计学意义($P<0.05$); 药疹组患者 $CD3^+CD8^+$ 淋巴细胞所占百分比与对照组的差异无统计学意义($P>0.05$), 而其 T、B 淋巴细胞亚群的绝对计数与对照组的差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 药疹患者外周血 $CD3^+$ 、 $CD3^+CD4^+$ 淋巴细胞所占百分比降低, NKT 细胞所占百分比增高, 这可能与患者免疫调节有关。

关键词:药疹; 淋巴细胞亚群; 流式细胞术; 外周血

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.10.014

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)10-1266-03

Detection of lymphocyte subsets in peripheral blood of patients with drug eruption and its significance*

Tan Fei^{1,2}, Mo Xiaohui², Chen Jia², Zhang Chuguang², Hu Tingting², Wu Fei², Song Ningjing², Gu Jun^{1△}

(1. Department of Dermatology, Changhai Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Central Laboratory, Shanghai Dermatology Hospital, Shanghai 200443, China)

Abstract: **Objective** To analyze the changes of lymphocyte subsets in peripheral blood of patients with drug eruption. **Methods** 18 newly diagnosed patients were served as the drug eruption group, and were subdivided into cephalosporin group ($n=9$), penicillin group ($n=5$) and Chinese medicine group ($n=4$) according to different sensitizing drugs. 20 healthy people were taken as the control group. Flow cytometry were utilized to detect the percentages and absolute counts of T lymphocytes ($CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ and $CD3^+CD8^+$), B lymphocytes, natural killer cell (NK) and natural killer T lymphocytes (NKT) in their peripheral blood. **Results** Differences of percentages of T lymphocytes ($CD3^+$, $CD3^+CD4^+$), B lymphocytes, NKT cells between the drug eruption group and the control group showed statistical significant ($P<0.05$). Difference of percentages of $CD3^+CD8^+$ lymphocytes of patients between the drug eruption group and the control group demonstrated no statistical significant ($P>0.05$), while that of absolute counts of T and B lymphocytes of patients was statistical significant between the drug eruption group and the control group ($P<0.05$). **Conclusion** The percentages of $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ lymphocytes of patients with drug eruption decrease, while those of NKT cells increase, which may be related to the patients' immune regulation.

Key words: drug eruptions; lymphocytes subsets; flow cytometry; peripheral blood

药疹是药物通过注射、口服、吸入等途径进入人体后导致皮肤黏膜病理改变的不良反应。药疹的发病机制目前尚不完全清楚, 大多数药疹为免疫介导的变态反应, 淋巴细胞在药疹免疫应答中发挥重要作用^[1-2]。淋巴细胞不仅大量存在于患者的皮损部位, 有研究表明, 30%~50% 药疹患者的外周血淋巴细胞可被致敏药物刺激而发生转化^[3]。本研究采用流式细胞术对 18 例药疹患者和 20 名健康成年人外周血淋巴细胞亚群进行检测, 以了解药疹患者淋巴细胞亚群的比例和绝对数量是否存在差异以及淋巴细胞分布特征, 评价药疹患者的免疫状态。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012~2013 年于本院住院治疗的初诊药疹患者 18 例, 并将其作为药疹组, 其中, 男 5 例, 女 13 例; 年龄 22~80 岁; 根据致敏药物的不同将其分为头孢菌素组 (9 例, 平均年龄 51.5 岁)、青霉素组 (5 例, 平均年龄 49.9 岁) 及中药组 (4 例, 平均年龄 65.7 岁); 患者有明确用药史, 潜伏期 1~13 d, 过敏史不详; 皮损以麻疹样或猩红热样发疹型药疹为

主, 住院 3~10 d 后皮损消退, 预后良好。将本院同期 20 例健康体检者作为对照组, 其中, 男 10 例, 女 10 例; 年龄 21~63 岁, 平均 42.8 岁。

1.2 主要仪器与试剂 淋巴细胞亚群检测采用 EPICS XL 分析型流式细胞仪 (美国 Beckman 公司)。T 细胞亚群检测试剂 [单克隆抗体 CD3-藻红蛋白-花青苷 5 (phycoerythrin cyanin 5, PC5)/CD4-藻红蛋白 (phycoerythrin, PE)/CD8-藻红蛋白-德克萨斯红 (phycoerythrin and Texas Red tandem, ECD)/CD45-异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)]、B 细胞亚群 (CD19-PC5)、自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) [CD3-FITC/CD(16+56)-PE] 和自然杀伤 T 淋巴细胞 (natural killer T lymphocytes, NKT) [CD3-FITC/CD(16+56)-PE] 检测试剂以及红细胞溶解液和细胞计数液均为美国 Beckman 公司产品。

1.3 实验方法 患者入院时采集 2 mL 抗凝静脉血, 淋巴细胞亚群检测分为 2 管, 分别加入 100 μ L 抗凝静脉血, 10 μ L 四

* 基金项目: 上海市公共卫生重点学科建设项目 (12GWZX0902)。作者简介: 谭飞, 男, 硕士, 主要从事皮肤病诊治工作。△ 通讯作者, E-mail: tanfeitru@126.com。

色标记单克隆抗体 CD3/CD4/CD8/CD45, 10 μL 双标记单克隆抗 CD3/CD(16+56) 和 10 μL 单标记 CD19, 室温避光温育 15 min, 加 500 μL 红细胞溶解液作用 20 min, 再加入 500 μL 生理盐水和细胞计数液 100 μL, 混匀后上流式细胞仪分析。流式细胞仪每次获取 10 000 个细胞, T 淋巴细胞亚群检测利用 CD45/SSC 设定淋巴细胞门, B 淋巴细胞、NK 细胞和 NKT 细胞检测利用 FSC/SSC 设定淋巴细胞门。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 *t* 检验, 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血淋巴细胞亚群的检测 流式细胞仪检测, 药疹组患者外周血可见 CD3⁺ 淋巴细胞分为 2 群, 其中 CD3 分子表达

较强的一群 T 淋巴细胞主要为 CD4⁻ CD8⁻ 双阴性细胞, 其 CD3 的表达强度与 NKT 细胞一致; 而对照组受检者 CD3⁺ 淋巴细胞中 CD4⁻ CD8⁻ 双阴性细胞极少。

2.2 外周血淋巴细胞亚群百分比的检测 头孢菌素、青霉素组患者外周血 CD19⁺ 淋巴细胞所占百分比低于对照组 ($P<0.05$); 药疹组患者外周血 CD3⁺、CD3⁺/CD4⁺ 淋巴细胞所占百分比低于对照组 ($P<0.05$), 而头孢菌素、青霉素、中药组患者外周血 CD3⁺ CD16⁺ CD56⁺ 淋巴细胞所占百分比高于对照组 ($P<0.05$), 见表 1。

2.3 外周血淋巴细胞亚群绝对计数的检测 药疹组患者外周血淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD3⁺/CD4⁺、CD3⁺/CD8⁺ 和 CD3⁺/CD19⁺ 的绝对计数低于对照组 ($P<0.05$), 而其 CD3⁺/CD16⁺ CD56⁺ 绝对计数高于对照组 ($P<0.05$), 见表 2。

表 1 药疹组与对照组受检者外周血淋巴细胞百分比的比较 (%)

组别	<i>n</i>	CD3 ⁺	CD3 ⁺ /CD4 ⁺	CD3 ⁺ /CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD3 ⁻ /CD19 ⁺	CD3 ⁻ / CD16 ⁺ CD56 ⁺	CD3 ⁺ / CD16 ⁺ CD56 ⁺
对照组	20	72.0±5.0	40.9±3.9	26.7±4.7	1.6±0.3	11.4±1.6	11.6±3.3	0.9±0.6
药疹组								
头孢菌素组	9	66.5±12.1*	30.8±9.38*	24.7±7.3	1.2±0.7*	18.1±8.4*	11.8±8.4	3.3±2.5*
青霉素组	5	67.3±10.1*	33.4±8.9*	28.6±8.3	1.2±0.9*	14.8±7.5*	14.8±11.2*	3.6±2.7*
中药组	4	64.8±10.1*	35.0±8.9*	24.2±8.3	1.5±1.1	8.8±6.3*	19.3±13.2*	1.7±1.0*

*: $P<0.05$, 与对照组比较。

表 2 药疹组与对照组受检者外周血淋巴细胞绝对计数结果的比较 (个/μL)

组别	<i>n</i>	CD3 ⁺	CD3 ⁺ /CD4 ⁺	CD3 ⁺ /CD8 ⁺	CD3 ⁻ /CD19 ⁺	CD3 ⁻ / CD16 ⁺ CD56 ⁺	CD3 ⁺ / CD16 ⁺ CD56 ⁺
对照组	20	1 531.5±356.1	874.8±205.0	570.3±161.5	243.7±71.7	248.3±95.5	18.7±12.8
药疹组							
头孢菌素组	9	836.8±384.2*	267.7±202.5*	207.3±88.2*	170.6±130.1*	238.3±123.0	42.0±14.6*
青霉素组	5	703.2±295.3*	349.6±257.2*	298.6±149.2*	155.5±107.8*	155.6±125.5*	37.8±10.6*
中药组	4	789.5±344.2*	426.3±272.3*	295.1±156.4*	165.8±120.7*	107.1±105.1*	21.1±12.3*

*: $P<0.05$, 与对照组比较。

3 讨论

正常机体中各淋巴细胞亚群相互作用, 维持着机体的正常免疫功能。进入人体内的药物, 或药物代谢的产物通过抗原的处理、提呈及免疫细胞的识别、增殖和反应等机制诱发免疫应答, 从而导致人体免疫紊乱, 并发生皮肤黏膜损害等病理改变^[4-6]。本研究中, 药疹患者外周血淋巴细胞亚群的百分比与健康者存在差异, 且 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞亚群绝对值低于健康者, 表明药疹患者机体处于免疫失衡状态。

外周血 T 淋巴细胞亚群在数量上的比例, 特别是 CD4/CD8 比值有助于反映机体免疫反应的调节能力, 是判断机体免疫状态的客观指标之一^[7]。本研究中, 青霉素和头孢菌素药疹患者的 CD4⁺ T 淋巴细胞百分比和 CD4⁺/CD8⁺ 比值低于健康者, 提示机体处于免疫抑制状态, 可能是机体针对皮肤损害的强烈炎症反应, 为避免机体细胞免疫功能处于“过度活跃”而形成的负反馈调控, 以维持机体的免疫自稳。

药疹的发生主要由免疫反应介导, 参与的免疫类型主要有 IgE 介导的速发型和由 T 淋巴细胞介导的迟发型超敏反应^[8-9]。本研究显示, 药疹组患者外周血 B 淋巴细胞和 NK 细

胞所占百分比均高于健康者, 而其绝对值均低于健康者。由于药疹的皮损组织中, 真皮浅层、中层血管扩张充血, 周围有大量 T 淋巴细胞浸润, 因此, 不能排除由于 T 淋巴细胞向病变皮肤组织迁移而导致的外周血 B 淋巴细胞和 NK 细胞所占百分比相对升高。本研究中, 部分药疹患者 (6 例) 血清存在 IgE 的增高 (数据未列出), 提示药疹患者存在 B 淋巴细胞的激活, 并导致 I 型变态反应的发生。

NKT 细胞是一种重要的调节性 T 淋巴细胞, 参与自身免疫、感染免疫、抗肿瘤免疫和移植免疫等多种免疫反应, 在外周血中含量较少^[10-12]。本研究发现, 药疹组患者 NKT 细胞所占百分比及其绝对计数值均高于健康者, 且 NKT 细胞的 CD3 分子表达稍高于其他 CD3⁺ 淋巴细胞, 该细胞群主要表现为 CD4⁻ CD8⁻ 双阴性 T 淋巴细胞。笔者推测药疹患者外周血 NKT 细胞和 CD4⁻ CD8⁻ 双阴性 T 淋巴细胞参与了药疹患者机体的免疫调节, 在药疹的转归中发挥了一定的作用。由于本研究中的所有患者预后良好, 若判断其与病情是否存在关联, 还需进一步收集病例做深入研究。

综上所述, 药疹患者淋巴细胞数量下降, (下转第 1269 页)

3 讨 论

目前,临床常用的凝血功能筛查项目有 PT、国际标准化比值(international normalized ratio, INR)、APTT、TT 及 Fib。PT 反映外源性凝血功能;APTT 反映内源性凝血功能;TT 反映凝血共同途径是否存在异常抗凝现象;Fib 用于出血、血栓形成性疾病及溶栓治疗的监测;D-二聚体、FDP 则是对纤溶系统的监测,D-二聚体反映继发性纤溶,FDP 反映原发性和继发性纤溶。

本研究显示,巴曲酶可使 PT、TT 延长,Fib 明显降低,FDP 显著增高,但对 APTT、D-二聚体影响不大。这些检测项目在首次治疗 24 h 后发生变化,3 d 内达到变化的最大值。Fib 是机体止血生理中重要的凝血因子,正常人血浆 Fib 浓度为 2.0~4.0 g/L,对维持人体正常凝血和止血功能有重要作用,故若 Fib 浓度过低将严重影响凝血机制,特别是 Fib 降至 0.5 g/L 以下,将明显增加患者的出血风险^[5-6],而临床应用巴曲酶治疗突发性耳聋的机制是通过巴曲酶诱发组织型纤溶酶原激活物(tissue-type plasminogen activator, t-PA)从内皮细胞释出,增强 t-PA 作用,降低血 PA 抑制因子、降低 α_2 纤溶酶抑制因子、降低纤溶酶原、增加纤维蛋白溶酶、活化 C 蛋白,从而发挥降低纤维蛋白,增加血流,改善微循环的作用。因此,应密切关注 Fib 浓度,Fib 浓度过高将难以达到治疗效果^[7-8];而过低,则增大出血风险。TT 延长 3 s 以上则有临床意义,表示可能存在低(无)纤维蛋白原血症、机体发生纤溶或存在抗凝物质。本研究的 TT 延长主要是由于 Fib 浓度过低。FDP 是 Fib、交联纤维蛋白、非交联纤维蛋白在纤溶酶的降解作用下生成的,具有阻止纤维蛋白单体交联和聚合、竞争凝血酶的抗凝以及抑制血小板聚集的作用。临床医师发现 FDP 增高时,多考虑为原发性或继发性纤溶亢进。本研究的 FDP 增多是因巴曲酶使纤溶酶活性增强,降解 Fib 过多所致,因没有交联纤维蛋白、非交联纤维蛋白降解的参与,所以 D-二聚体没有明显的

增高,属药物所致单纯的原发性纤溶亢进,而增高的 FDP 又竞争凝血酶的抗凝及抑制血小板聚集,进一步加剧出血的风险。因此,FDP 也是监测患者纤溶功能的很好指标^[9]。

综上所述,临床应用巴曲酶治疗突发性耳聋时,应严格控制其使用剂量和治疗时间,可通过对患者 PT、Fib、TT、FDP 的监测来掌握患者凝血和纤溶功能情况,一经发现出血现象,应立即停药并及时作出相应处理,以免发生严重后果。

参考文献

- [1] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会,中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会.突发性聋的诊断和治疗指南(2005 年,济南)[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2006,41(8):568-569.
- [2] 于斌.巴曲抗栓酶治疗突发性耳聋临床疗效观察[J].实用临床医学,2005,6(10):108-109.
- [3] 王绍忠.巴曲酶治疗突发性耳聋 30 例疗效观察[J].中国医药指南,2010,8(11):103-104.
- [4] 叶应妩,王毓三.全国临床检验操作规程[M].2 版.南京:东南大学出版社,1997.
- [5] 张国荣,李霞,范秀芳.新生儿低纤维蛋白原血症的相关因素分析[J].中国优生与遗传杂志,2006,14(7):87-88.
- [6] 刘克辛.药理学[M].北京:高等教育出版社,2010.
- [7] Ullrich H, Kleinjung T, Steffens T, et al. Improved treatment of sudden hearing loss by specific fibrinogen aphaeresis[J]. J Clin Apher, 2004, 19(2): 71-78.
- [8] Suckfüll M, Hearing Loss Study Group. Fibrinogen and LDL apheresis in treatment of sudden hearing loss: a randomised multicentre trial[J]. Lancet, 2002, 360(9348): 1811-1817.
- [9] 王学锋,王鸿利.血栓与止血的检测及应用[M].上海:上海世界图书出版公司,2002.

(收稿日期:2013-12-03)

(上接第 1267 页)

各亚群细胞所占百分比发生变化,CD3⁺、CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞所占百分比降低。此外,药疹患者外周血 NKT 细胞增高,可能与药疹患者的免疫调节有关。

参考文献

- [1] Hari Y, Frutig-Schnyder K, Hurni M, et al. T cell involvement in cutaneous drug eruptions[J]. Clin Exp Allergy, 2001, 31(9): 1398-1408.
- [2] 张艳芳,李培茂,张志敏,等.三氯乙烯药疹样皮炎患者外周血常规及 T 淋巴细胞亚群变化的观察[J].国际检验医学杂志,2013,33(21):2565-2566.
- [3] Rozieres A, Hennino A, Rodet K, et al. Detection and quantification of drug-specific T cells in penicillin allergy[J]. Allergy, 2009, 64(4): 534-542.
- [4] Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes[J]. Nature, 1996, 383(6603): 787-793.
- [5] Verneuil L, Leboeuf C, Vidal JS, et al. Endothelial damage in all types of T-lymphocyte-mediated drug-induced eruptions[J]. Arch Dermatol, 2011, 147(5): 579-584.
- [6] Morito H, Ogawa K, Fukumoto T, et al. Increased ratio of FoxP3⁺ regulatory T cells/CD3⁺ T cells in skin lesions in drug-induced hypersensitivity syndrome/drug rash with eosinophilia

and systemic symptoms[J]. Clin Exp Dermatol, 2014, 39(3): 284-291.

- [7] Fernandez TD, Mayorga C, Torres MJ, et al. Cytokine and chemokine expression in the skin from patients with maculopapular exanthema to drugs[J]. Allergy, 2008, 63(6): 712-719.
- [8] Norisugi O, Yoshihisa Y, Shimizu K, et al. In vitro cytokine expression by peripheral mononuclear cells in herbal drug-induced skin eruption[J]. Acta Derm Venereol, 2014, 94(1): 58-62.
- [9] Ives ML, Ma CS, Palendira U, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations underlying autosomal dominant hyper-IgE syndrome impair human CD8(+) T-cell memory formation and function[J]. J Allergy Clin Immunol, 2013, 132(2): 400-411.
- [10] Stuart PB, Mark JS, Alan Gb, et al. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease[J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(2): 131-142.
- [11] Humphries C. Adoptive cell therapy: Honing that killer instinct[J]. Nature, 2013, 504(7480): 13-15.
- [12] Facciotti F, Ramanjaneyulu GS, Lepore M, et al. Peroxisome-derived lipids are self antigens that stimulate invariant natural killer T cells in the thymus[J]. Nat Immunol, 2012, 13(5): 474-480.

(收稿日期:2014-01-03)