

## 论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.05.015

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201126.2009.056.html\(2020-11-27\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201126.2009.056.html(2020-11-27))

## 抗结核药物超敏反应患者 PBMCs 中 T 淋巴细胞亚群及 CD69、CD40L 的表达意义\*

吴于青,姜国强,刘 俊,周燕红,张梁伟

(江西省胸科医院结核科,南昌 330006)

**[摘要]** **目的** 研究抗结核药物超敏反应患者外周血单个核细胞(PBMCs)中 T 淋巴细胞亚群及表面分子 CD69、CD40L 的表达意义,探讨 T 淋巴细胞亚群及表面分子 CD69、CD40L 与抗结核药物超敏反应的关系。**方法** 筛选该院初治肺结核治疗过程中出现超敏反应的患者 60 例为病例组,匹配同期抗结核治疗过程中未出现超敏反应的 60 例患者为对照组,采集外周静脉血并分离 PBMCs,通过流式细胞仪检测 PBMCs 中 Th1、Th2、CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 亚群及 CD40L 和 CD69 两种蛋白的表达。**结果** 病例组患者 PBMCs 中的 CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th1 细胞比例较对照组明显升高( $P < 0.01$ ),CD4<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup> Th2 细胞比例较对照组升高,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与对照组比较,病例组患者外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 比例降低( $P < 0.05$ ),细胞表面 CD40L 和 CD69 的表达水平明显升高( $P < 0.05$ )。**结论** T 淋巴细胞亚群比例失衡在抗结核药物超敏反应发生过程中可能起着重要作用。

**[关键词]** 结核,肺;超敏反应;T 淋巴细胞亚群;免疫,细胞**[中图法分类号]** R969 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)05-0784-03

## The expression significance of T cell subsets, CD69 and CD40L in PBMCs of patients with hypersensitivity to antituberculosis drugs\*

WU Yuqing, JIANG Guoqiang, LIU Zhou, ZHOU Yanhong, ZHANG Liangwei

(Department of Tuberculosis, Jiangxi Chest Hospital, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the expression significance of T cell subsets and surface molecules CD69, CD40L in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with hypersensitivity to anti-tuberculosis drugs, and to explore the relationship between T cell subsets and surface molecules CD69, CD40L and hypersensitivity to antituberculosis drugs. **Methods** Sixty patients who had hypersensitivity reaction in the course of initial treatment of pulmonary tuberculosis in this hospital were selected as the case group, and 60 patients who did not have hypersensitivity reactions during the same period were selected as the control group. Peripheral venous blood was collected and PBMCs were separated. The expression of Th1, Th2, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs and CD40L<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> were detected by flow cytometry. **Results** The expression of CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th1 cells in the case group was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.01$ ), and the expression of CD4<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup> Th2 cells was lower than that in the control group, but the difference was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). Compared with the control group, the proportion of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells in the peripheral blood of the case group was decreased significantly ( $P < 0.05$ ), and the expressions of CD40L and CD69 on the cell surface were increased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The imbalance of T cell subsets may play an important role in the hypersensitivity of antituberculosis drugs.

**[Key words]** tuberculosis, pulmonary; hypersensitivity; T-lymphocyte subsets; immunity, cellular

超敏反应是结核病患者在药物治疗过程中常见不良反应之一,约占抗结核药物不良反应的 1/5<sup>[1-3]</sup>;患者在治疗过程中出现超敏反应后,轻者中断治疗延

误病情,而对于出现严重的皮肤不良反应患者,如药物反应伴嗜酸性粒细胞增多和系统症状(DRESS)、Sterns-Johnson 综合征(SJS)、中毒性表皮坏死松解症

(TEN)等,则可导致死亡。抗结核药物超敏反应的发生机制尚不清楚,目前观点认为主要以迟发型超敏反应为主,由抗原特异性 T 淋巴细胞介导,在致敏药物刺激后,药物特异性的 T 淋巴细胞活化并在其表面表达多个活化标记物,如 CD25、CD69、CD71、CD40L 等,淋巴细胞活化后分泌相关的细胞因子,产生炎症反应<sup>[4]</sup>。

本研究通过对抗结核药物超敏反应患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中 T 淋巴细胞亚群 Th1 细胞、Th2 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 及 CD69、CD40L 表面分子的表达变化进行检测,探讨抗结核药物超敏反应的细胞免疫特性。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选择本院 2019 年 1 月至 2020 年 1 月符合初治肺结核治疗过程中出现超敏反应诊断的患者 60 例作为病例组,其中男 26 例,女 34 例,平均年龄 37.9 岁(18~65 岁)。本研究经过本院伦理委员会讨论并通过,所有研究对象均签订知情同意书。初治肺结核诊断标准:初治肺结核患者均符合中华人民共和国卫生行业标准-肺结核诊断(WS 288-2017)。抗结核药物超敏反应的判断<sup>[5-6]</sup>:患者临床表现及实验室检查符合 2010 年出版《中国临床皮肤病学》中药物超敏反应的诊断,并由 2 名专科医师共同诊断为药物超敏反应(同时判断出皮疹的类型)。排除标准:(1)合并获得性免疫缺陷病毒(HIV)感染者;(2)合并自身免疫性相关疾病或长期服用激素类药物者;(3)采血前 1 周内输血史或做过 PET-CT 检查者;(4)采血前已行抗过敏治疗并使用了免疫抑制剂者;(5)既往有药物过敏史者。对照组选择同期抗结核治疗过程中未出现超敏反应的患者,根据性别、年龄、来源与病例组 1:1 匹配,所有患者抗结核治疗方案均为 2H(异烟肼)R(利福平)Z(吡嗪酰胺)E(乙胺丁醇)/4HR,患者入组以后,统一于清晨空腹用肝素抗凝管采外周静脉血备检,标本室温保存,4 h 内送检。

### 1.2 方法

采用流式细胞仪检测 PBMCs 中 Th1 细胞比例、Th2 细胞比例、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 比例及 CD69、CD40 表达水平。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行数据统计分析。正态分布的计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用配对 *t* 检验;计数资料用百分率表示,比较采用  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 入组患者的一般特征

病例组患者入组后,根据性别、年龄(相差不超过 3 岁)、患者来源 1:1 匹配对照组,使两组患者具有可

比性,两组患者的一般情况比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。

表 1 病例组和对照组患者社会人口统计学特征

项目	病例组(n=60)	对照组(n=60)	P
年龄( $\bar{x} \pm s$ , 岁)	37.9 ± 14.2	34.2 ± 13.4	>0.05
性别[n(%)]			>0.05
男	26(43.3)	26(43.3)	
女	34(56.7)	34(56.7)	
慢性疾病[n(%)]			>0.05
有	7(11.7)	5(8.3)	
无	53(88.3)	55(91.7)	
来源[n(%)]			>0.05
农村	26(43.3)	26(43.3)	
城市	34(56.7)	34(56.7)	
体重( $\bar{x} \pm s$ , kg)	49.6 ± 9.7	46.8 ± 10.9	>0.05

### 2.2 患者 PBMCs 中 Th1 细胞、Th2 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 表达比较

经流式细胞仪结果分析,病例组患者 PBMCs 中的 CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th1 细胞比例较对照组明显升高( $P < 0.01$ ),CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> Th2 细胞比例较对照组升高,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与对照组比较,病例组患者 PBMCs 中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 比例较对照组降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 病例组和对照组患者外周血 T 淋巴细胞亚群表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ , %)

组别	n	CD4 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th1	CD4 <sup>+</sup> IL-4 <sup>+</sup> Th2	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>
对照组	60	19.43 ± 10.16	0.58 ± 0.21	8.47 ± 2.53
病例组	60	28.37 ± 8.85	0.66 ± 0.38	4.21 ± 1.13
<i>t</i>		5.13	-1.43	11.90
<i>P</i>		<0.001	0.153	0.001

### 2.3 患者 PBMC 中 CD40L 和 CD69 的表达比较

经流式细胞仪结果分析,病例组患者 PBMCs 中的细胞表面 CD40L 和 CD69 的表达水平较对照组均明显升高( $P < 0.05$ ),见表 3。

表 3 病例组和对照组患者 PBMCs 中的细胞表面 CD40L 和 CD69 的表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ , %)

组别	n	CD69	CD40L	CD69 <sup>+</sup> CD40L
对照组	60	3.38 ± 0.97	4.02 ± 0.84	1.43 ± 0.16
病例组	60	6.22 ± 1.79	7.53 ± 1.96	3.37 ± 1.85
<i>t</i>		-10.77	-12.75	-8.09
<i>P</i>		0.001	<0.001	0.001

## 3 讨论

超敏反应是结核病患者在治疗过程中常见的药物不良反应之一,到目前为止,抗结核药物导致的超

敏反应的发生机制尚不清楚。患者出现超敏反应后往往需要中断治疗,从而导致治疗不规则影响我国结核病的防控。临床观察发现抗结核药物超敏反应的临床表现主要以各种皮肤损害为主,部分患者伴有发热、肝肾损害、嗜嗜酸细胞比例升高等<sup>[7-8]</sup>,符合Ⅳ型(迟发型)超敏反应的表现。目前有观点认为,药物作为抗原或半抗原初次接触 T 淋巴细胞后引起 T 淋巴细胞活化,形成药物特异性 T 淋巴细胞克隆长期存留于组织和血液中,当记忆性 T 淋巴细胞再次接触致敏药物后便迅速活化并增殖,产生不同的炎症因子而引起各种临床表现。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞是一组具有免疫抑制功能的 T 淋巴细胞,能抑制自身反应性 T 细胞和 B 淋巴细胞的活化、增殖、免疫球蛋白的分泌及各种炎性细胞因子的产生。

本研究运用流式细胞仪检测抗结核药物超敏反应患者 PBMCs 中 T 淋巴细胞亚群、Treg 及细胞表面分子 CD69、CD40L 的表达,并与同期抗结核治疗过程中未出现超敏反应的初治肺结核患者比较,结果发现,抗结核药物超敏反应患者 PBMCs 中 CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th1 细胞比例和细胞表面 CD69、CD40L 的表达水平明显高于对照组( $P < 0.05$ ),CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞比例低于对照组( $P < 0.05$ ),但 CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>- $\gamma$ <sup>+</sup> Th2 细胞比例两组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。据此笔者认为,在抗结核药物超敏反应发生过程中,患者特异性 T 淋巴细胞表面 CD69、CD40L 等分子表达上调,细胞活化增殖,其中以 Th1 细胞活化增殖为主,成为针对此药物抗原的杀伤性 T 淋巴细胞,而具有免疫抑制功能的 Treg 细胞比例下降,外周血中促炎因子分泌增多,而抗炎因子释放减少,导致组织器官损害,与部分研究结果<sup>[9-13]</sup>类似。

在细胞免疫中,当抗原提呈细胞(APC)将抗原提呈给幼稚 T 细胞形成主要组织相容性复合体-T 淋巴细胞受体(MHC-TCR)复合物时,T 淋巴细胞表面的 CD40L 表达上调,一般在复合物形成之后 4 h 内,T 淋巴细胞表面的 CD40L 与 APC 上的 CD40 结合,并刺激 APC 产生协同刺激分子,在抗原信号及协同信号双重作用下,T 淋巴细胞被激活为针对某种抗原的杀伤 T 淋巴细胞,产生相应的细胞因子而发挥效应功能。由于抗结核药物是联合运用,患者在抗结核药物超敏反应发生后,致敏药物的快速识别一直是工作中的难点,本研究中,抗结核药物超敏反应患者外周血 T 淋巴细胞表面 CD69、CD40L 等分子表达迅速增加聚集,并较好地体现出此类患者机体的免疫应答,提示检测该类分子在迟发型超敏反应患者外周淋巴细胞中的改变可用于迟发型超敏反应的诊断及致敏药物的识别,这也是笔者今后研究的方向。

CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞根据其产生的细胞因子分为不同的亚群:Th1 细胞、Th2 细胞和 Treg 等,其中 Th1 细胞和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 的比率决定了免疫反应的发生和程度,以及疾病的进程<sup>[14-16]</sup>。本研究显示抗结核药物超敏反应发生过程中患者以 Th1 淋巴细胞活化增殖为主,变化符合迟发型超敏反应发生特点,下一步将继续对相关的细胞因子表达水平进行研究,将来基于诱导或增强能够抑制过敏性炎症反应的 Treg 的新型治疗策略也许是可取的。

## 参考文献

- [1] EL HAMDOUNI M, AHID S, BOURKADI J E, et al. Incidence of adverse reactions caused by first-line anti-tuberculosis drugs and treatment outcome of pulmonary tuberculosis patients in Morocco[J]. *Infection*, 2020, 48(1): 43-50.
- [2] JUNG H Y, PARK S, SHIN B, et al. Prevalence and clinical features of drug reactions with eosinophilia and systemic symptoms syndrome caused by antituberculosis drugs: a retrospective cohort study[J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2019, 11(1): 90-103.
- [3] ALLOUCHERY M, LOGEROT S, COTTIN J, et al. Antituberculosis drug-associated DRESS: a case series[J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2018, 6(4): 1373-1380.
- [4] ROMÁN-FERNÁNDEZ I V, GARCÍA-CHAGOL LÁN M, CERPA-CRUZ S, et al. Assessment of CD40 and CD40L expression in rheumatoid arthritis patients, association with clinical features and DAS28[J]. *Clin Exp Med*, 2019, 19(4): 427-437.
- [5] 赵辨. 临床皮肤病学[M]. 南京:江苏科学技术出版社, 2010.
- [6] PICHLER W J. Drug hypersensitivity[M]. Basel: Karger, 2007: 382-393.
- [7] COSTER A, AERTS O, HERMAN A, et al. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) syndrome caused by first-line antituberculosis drugs: two case reports and a review of the literature[J]. *Contact Dermatitis*, 2019, 81(5): 325-331.
- [8] 吴于青, 代亮, 陈雪花, 等. 药物淋巴细胞刺激试验诊断抗结核药物所致超敏反应的临床价值研究[J]. *中国全科医学*, 2018, 21(27): 3339-3342.
- [9] WONG A, SEGER D L, LAI K H, (下转第 790 页)

2006,13(6):329-335.

- [6] CULVER A L, OCKENE I S, BALASUBRAMANIAN R, et al. Statin use and risk of diabetes mellitus in postmenopausal women in the women's health initiative[J]. Arch Intern Med, 2012,172(2):144-152.
- [7] KO M J, JO A J, KIM Y J, et al. Time- and dose-dependent association of statin use with risk of clinically relevant new-onset diabetes mellitus in primary prevention: a nationwide observational cohort study[J]. J Am Heart Assoc, 2019,8(8):e011320.
- [8] GOTOH S, NEGISHI M. Statin-activated nuclear receptor PXR promotes SGK2 dephosphorylation by scaffolding PP2C to induce hepatic gluconeogenesis [J]. Sci Rep, 2015, 5: 14076.
- [9] REAL J, MIRANDA C, OLOFSSON C S, et al. Lipophilicity predicts the ability of non-sulphonylurea drugs to block pancreatic beta-cell KATP channels and stimulate insulin secretion; statins as a test case[J]. Endocrinol Diabetes Metab, 2018,1(2):e00017.
- [10] BANG C N, OKIN P M. Statin treatment, new-

onset diabetes, and other adverse effects: a systematic review[J]. Curr Cardiol Rep, 2014, 16(3):461.

- [11] BARKAS F, ELISAF M, LIBEROPOULOS E, et al. Statin therapy with or without ezetimibe and the progression to diabetes[J]. J Clin Lipidol, 2016,10(2):306-313.
- [12] DEUSHI M, NOMURA M, KAWAKAMI A, et al. Ezetimibe improves liver steatosis and insulin resistance in obese rat model of metabolic syndrome[J]. FEBS Lett, 2007, 81(29):5664-5670.
- [13] ZHONG Y, WANG J, GU P, et al. Effect of ezetimibe on insulin secretion in db/db diabetic mice [J]. Exp Diabetes Res, 2012, 2012: 420854.
- [14] 钟勇, 江时森, 王俊, 等. 依折麦布对 db/db 糖尿病小鼠胰岛自身胰岛素信号通路的影响[J]. 东南大学学报(医学版), 2014, 33(1):54-58.
- [15] 刘书宇, 潘涛, 王俊, 等. 依折麦布干预对 2 型糖尿病小鼠体内脂肪因子和胰岛素抵抗的影响[J]. 华南国防医学杂志, 2016, 30(11):692-695.

(收稿日期:2020-10-20 修回日期:2020-12-19)

(上接第 786 页)

et al. Drug hypersensitivity reactions documented in electronic health records within a large health system [J]. J Allergy Clin Immunol Pract, 7(4):1253-1260.

- [10] DURLANIK S, LOYAL L, STARK R, et al. CD40L expression by CD4<sup>+</sup> but not CD8<sup>+</sup> T cells regulates antiviral immune responses in acute LCMV infection in mice[J]. Eur J Immunol, 2016, 46(11):2566-2573.
- [11] SIRIPASSORN K, RUXRUNGTHAM K, MANOSU THI W. Successful drug desensitization in patients with delayed-type allergic reactions to anti-tuberculosis drugs[J]. Int J Infect Dis, 2018, 68:61-68.
- [12] BÖHM R, PROKSCH E, SCHWARZ T, et al. Drug hypersensitivity [J]. Dtsch Arztebl Int, 2018, 115(29/30):501-512.
- [13] YE Y M, HUR G Y, KIM S H, et al. Drug-specific CD4<sup>+</sup> T-cell immune responses are re-

sponsible for antituberculosis drug-induced maculopapular exanthema and drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms syndrome[J]. Br J Dermatol, 176(2):378-386.

- [14] BOONPIYATHAD T, SÖZENER Z C, AKDIS M, et al. The role of Treg cell subsets in allergic disease[J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2020, 38(3):139-149.
- [15] MURATA A, HAYASHI S I. CD4<sup>+</sup> resident memory T cells mediate long-term local skin immune memory of contact hypersensitivity in BALB/c mice [J]. Front Immunol, 2020, 11: 775.
- [16] MAYER A, ZHANG Y, PERELSON A S, et al. Regulation of T cell expansion by antigen presentation dynamics[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(13):5914-5919.

(收稿日期:2020-10-03 修回日期:2020-12-12)