

淋巴细胞转化实验 (LTT) 在药疹诊断中的意义

刘雁秋 段昕所*

(承德医学院附属医院 河北 承德 067000)

【摘要】药疹的诊断主要依赖于详细的临床病史和临床表现。其发生与 T 细胞密切相关, T 细胞类型、细胞因子释放途径均有可能影响免疫应答的类型。且多数发疹型药疹属于迟发型变态反应。此外, 可以进行体外或体内测试以证明对某种药物的敏化。体外测试之一是淋巴细胞转化实验 (LTT), 它可以通过增强外周血单核细胞对某种药物的增殖反应来揭示 T 细胞的致敏反应。本文通过国内外学者对淋巴细胞转化试验在药疹诊断中的研究, 对淋巴细胞在药疹发生中的作用机制及该试验在药疹诊断中的应用范围、灵敏性及特异性、优点及缺点进行了简要阐述。

【关键词】药疹; 体外实验; 淋巴细胞转化测试

The significance of lymphocyte transformation test (LTT) in the diagnosis of drug eruption

Yanqiu Liu Xinsuo Duan*

(Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde, Hebei, 067000)

【Abstract】The diagnosis of drug eruption mainly depends on the detailed clinical history and clinical manifestations. Its occurrence is closely related to T cells, and both T cell type and cytokine release pathway may affect the type of immune response. And most of the eruption type drug eruption belongs to delayed allergic reaction. In addition, in vitro or in vivo tests may be performed to demonstrate sensitization to a certain drug. One of the in vitro tests is the lymphocyte Transformation test (LTT), which can reveal the sensitization of T cells by enhancing the proliferative response of peripheral blood monocytes to a certain drug. Based on the study of lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug eruption, the mechanism of lymphocyte in the occurrence of drug eruption and the application scope, sensitivity and specificity, advantages and disadvantages of this test in the diagnosis of drug eruption were briefly described.

【Key words】Drug eruption; In vitro experiment; lymphocyte Transformation test

1 引言

药疹^[1] (drug eruptions) 也称药物性皮炎, 是指药物通过各种途径, 包括注射、内服、吸入等进入人体后引起的皮肤、粘膜或其附属器的反应, 是皮肤科的常见病。常见的致敏药物有以下几类: ①抗生素类, 其中以青霉素最多见; ②磺胺类, 其中以长效磺胺最多见; ③解热镇痛药; ④镇静催眠药, 以苯妥英、苯巴比妥、卡马西平及甲丙氨酯等最多见; ⑤某些中药制剂, 以祛风止痛类、清热解毒类、和营祛瘀类、补益类和抗肿瘤类常见。药疹的临床表现多样, 可以仅累及皮肤, 表现为程度不等的皮肤斑疹、丘疹、风团等损害, 也可出现全身各系统损害甚至危及生命, 如药物超敏综合征 (drug-induced hypersensitivity syndrome, DIHS)、中毒性表皮坏死松解症 (toxic epidermal necrolysis, TEN)、Stevens-Johnson 综合征 (Stevens Johnson syndrome, SJS) 和剥脱性皮炎 (exfoliative dermatitis, ED) 等。药疹的诊断包括患者的药物暴露史 (剂量、摄入时间、开始和结束摄入间隔、皮肤开始或任何其他临床表现), 目前已有许多技术用来诊断药

物过敏反应, 用于体外检测药物过敏的诊断工具之一是淋巴细胞转化试验 (LTT), 它基于患者外周单核细胞 (PMBC) 与可疑药物在体外共同孵育后药物特异性记忆 T 细胞的活化和扩增。经典 LTT 中的读出参数是 T 细胞增殖, 可以在向细胞培养物中添加放射性标记的胸苷后每分钟计数进行测量。近年来, 药物特异性 T 细胞系和 T 细胞克隆的成功分离为研究 T 细胞对抗原的特异性识别、T 细胞抗原识别受体对药物识别的分子机制提供了一个有用的工具。

2 淋巴细胞转化试验的原理简介

淋巴细胞转化试验 (LTT) 常用于药物超敏反应的诊断, 使用 LTT 进行体外检测致敏可以追溯到 1960 年代^[2,3]。它的名字很可能来源于通过显微镜观察到的抗原特异性^[4] (或最初由丝裂原诱导的) 激活后活化的 T 细胞转化为原始细胞^[5]。早在 1970 年代就有报道称, 增加了放射性标记的 DNA 碱基 (胸苷), 以通过掺入放射性来测量增殖^[6]。1976 年, 国际免疫学会联合会 (IUIS) 建议测量 3H-胸苷用于 LTT^[7]。鉴于观察到淋巴细胞在药物特异性刺激后开始增殖, LTT

有时被视为淋巴细胞增殖试验，或较少称为淋巴细胞刺激或活化试验。然而，在药物过敏病例中报告阳性结果的频率差异很大，从 30% 到 100% 不等^[8,9,10]。

LTT 是用特异性抗原，如药物，在体外培养环境下刺激患者的 T 淋巴细胞，使之转化成淋巴母细胞而发生增殖分裂的一种方法，有实验研究 LTT 在发疹型药疹中的价值。药物进入人体后，可直接通过主要组织相容抗原复合物 (MHC) 依赖途径与 T 细胞受体非共价结合从而激活 T 细胞，少数可由其代谢产物完成上述途径，被激活的 T 细胞发生增殖分化，并可释放多种细胞因子（如 IL-5, IL-6, TNF- α , 干扰素- γ ）及趋化因子（如嗜酸粒细胞活化趋化因子等），从而导致药疹的发生。其依赖于药物特异性记忆 T 细胞在用标称抗原刺激时增殖的能力。这种增殖测定最初被命名为 LTT，因为抗原刺激的 T 细胞在细胞刺激时经历胚芽生成，并且该测定的旧技术读数依赖于显微镜下的细胞观察。T 细胞参与了各型药疹的发生，因此可用于速发型及迟发型变态反应引起的各型皮疹，主要适用于非即时过敏反应，特别是 IV T 型细胞介导的反应。

3 LTT 的实验方法

LTT 目前主要有形态学法和 3H-TdR 掺入法两种。形态学法是对转化的淋巴细胞用显微镜观察计数，然后计算培养前后淋巴细胞的转化率，该方法由于需要用肉眼计数，主观性较大，易引起结果偏差。3H-TdR 掺入法是以细胞增殖时摄取 3H-TdR 的量来判定结果，较为客观，其又有分离淋巴细胞培养法和微量全血培养法。形态学法需血量多，操作复杂，污染机会多，敏感易变，因此在临床上很难推广。3H-TdR 掺入法相对操作简便，减少了污染机会，用血量少，方法较稳定，近年来已得到广泛应用，经典的 LTT 基于对药物特异性记忆 T 细胞的间接检测，这些 T 细胞在致敏患者的外周血中循环。出于这个原因，LTT 是从假定的致敏患者身上采集血液样本开始。第一步，通过密度梯度离心分离 PBMC（外周血单核细胞），从而去除红细胞、血小板和粒细胞等其他血细胞。然后将这些 PBMC 在补充有热灭活自体血浆或 AB 血清的特殊细胞培养基中培养，然后接种不同的细胞数在 96 孔圆底板中。然后，将可疑的致病药物加入培养基中，并将细胞培养物在 5 $^{\circ}$ C 和 37% CO₂ 下在孵化器中孵育 5 天。随后，将 3H-胸苷加入细胞培养物中并孵育 10-16 小时。在此期间，3H-胸苷被掺入增殖细胞的 DNA 中。最后，通过检测每分钟计数 (cpm) 的辐射来测量每个细胞培养样品中 3H-胸苷的量，然而，免疫细胞的细胞增殖可能受到实质性的生物学变异性的影响，个体间甚至个体内的细胞的有不同 3H-胸苷

摄取，即使在不同时间点服用的同一个体的非刺激样品中也是如此。因此，通常很难根据绝对 cpm 值来定义一个简单的阈值水平，该值可以解释为确认药物特异性淋巴细胞反应性的阳性结果。该方法需进一步计算刺激指数 (stimulation index, SI)，根据指数的大小来判定结果是否阳性。然而免疫细胞的细胞增殖可能受到实质性的生物学变异性的影响，个体间甚至个体内暗示细胞的不同 3H-胸苷摄取即使在不同时间点服用的同一个体的非刺激样品中也是如此，因此一般 SI>3 时被认为结果阳性，在 2-3 之间认为是弱阳性，对有些药物如放射对比造影剂需 >4 才能评为阳性。

LTT 的应用时机应选择在疾病的缓解期而不是急性期，强调在感染消退后至少 2 个月进行 LTT 的重要性，推荐时间为 6-12 个月；否则，如前所述，假阳性结果的风险会增加。事实上，已有一例 COVID-19 相关皮肤表现的报道，其中在感染后 21 日进行增殖试验，并报告了对所有测试药物的致敏。这可能是病毒感染引起的高反应性体征，因此可能是假阳性 LTT 结果。

4 用于药物过敏的 LTT 的敏感性和特异性

LTT 的敏感性和特异性取决于临床表型和使用的药物^[10]。轻度和中度过敏反应的敏感性范围为 58% 至 89%，严重大疱反应的敏感性范围为 25% 至 75%。对于轻度和中度过敏反应，相应的特异性在 93% 至 100% 以内，对于严重大疱反应的特异性在 63% 至 100% 之间在 Luqué 等人对 50 例有充分记录的延迟或立即 β -内酰胺超敏反应患者的类似研究中，发现 LTT 的总体敏感性为 62%，并且在非立即反应方面优于皮肤试验，只有 37% 为阳性，而有即刻反应的患者在 68% 的即刻皮肤试验呈阳性。

有青霉素过敏史者 LTT 检出的阳性率为 41.4%~89.3%，特异性为 60%~100%。BrugnoIo 等应用青霉素 G、阿莫西林和氨苄西林对 29 名青霉素过敏患者作 LTT，结果 12 名至少对其中一种药物呈阳性反应，且随着过敏反应程度加重，LTT 阳性率增高。对照组 17 名无过敏史患者 LTT 检测均为阴性，特异性为 100%。

LTT 应被视为一种有用的体外诊断工具，用于识别对青霉素过敏的受试者，尤其是有非即刻反应的患者，其中 LTT 比皮肤试验具有更好的诊断价值。有趣的是，在反应发生 10 年或更长长时间后，可以在没有进一步暴露于药物的情况下观察到阳性 T 细胞增殖反应。淋巴细胞转化试验可用于检测对青霉素的超敏反应（尽管在 IgE 介导的反应中皮肤试验显然更可取）和异烟肼，对于其他药物，如乙酰水杨酸、美法仑和甲氧苄啶-磺胺甲恶唑，这种药物似乎不适合诱导淋巴细胞增殖反应，由于这些药物引起不良反应的患者有明确或可能的反

应,但他们的淋巴细胞在体外对这些药物没有反应。

Spengler, De Weck 和 Geczy 发现他们的青霉素过敏患者中 79% 的外周血淋巴细胞在试验中被青霉素刺激。在链霉素、异烟肼或对氨基水杨酸引起皮疹或发热或两者同时发生的患者中, Mathews, Pan 和 Well 发现 33% 的淋巴细胞在淋巴细胞转化试验中出现刺激。Dobozy, Hunyadi 和 Simon 发现, 在 229 名因 44 种药物制剂而出现超敏反应的患者中, 该检测结果仅为 29%。总之, LTT 灵敏度大约 60%~80% 之间, 特异性 90% 以上, 无适用条件限制, 可用于多种药物过敏。在一项冠状病毒 (COVID-19) 疫苗接种后疑似严重迟发性超敏反应的实验中发现 LTT 不仅可以检测对 COVID-19 疫苗和 / 或其成分的迟发性超敏反应, 还可以检测 T 细胞对疫苗本身中刺突蛋白成分的反应。

尽管 LTT 已被用于研究非即时反应中的药物致敏性已有三十多年, 但其在 SJS/TEN 中的有用性仍然存在争议。虽然 LTT 传统上是在临床症状消退后进行的, 因为它可以识别急性免疫应答后产生的药物特异性记忆 T 细胞, 但一些作者报道 SJS/TEN 的 LTT 敏感性较低, 并提出如果在 SJS/TEN 的急性期进行检测, LTT 敏感性可能会增加。然而, 这些研究仅纳入了小型病例系列研究, 具有既往明确检测条件的高度疑似药物的代表性较低, 且考虑的阳性阈值较低 ($SI > 1.8$)。

5 LTT 的优点和缺点

作为一种体外方法 LTT 的优点包括它不会再次暴露于潜在的过敏原 (药物), 对患者是安全的。因此, 在过敏测试期间没有引发有害过敏反应或诱导患者对测试药物的潜在致敏的风险。另一个优点是 LTT 能够检测具有不同免疫介导的病理机制的药物过敏反应 (I 型至 IV 型反应), 并同时研究有限数量的药物。此外, 据报道, 对于某些研究药物, LTT 对药物过敏的诊断比皮肤试验更敏感。

缺点包括如上所述, 根据临床表型和药物的不同, 敏感性和特异性不同。此外, 尽管这种方法本身可以标准化, 但结果可能因人而异。值得注意的是, 与其他体外测试一样, 抗原特异性致敏的检测不等于过敏, 因为致敏可以在临床上无任何表现。因此, LTT 中致敏的检测应结合临床症状, 病史以及其他过敏测试进行解释。而且体外实验受机体免疫状态的影响, 对于免疫缺陷者或免疫抑制剂及糖皮质激素应用者, 淋巴细胞不能分化增殖或因低增殖而无法检测相应的反应^[11]。LTT 试验过程复杂、耗时, 并需要放射性物质及昂贵的试验仪器, 从而限制了该试验在临床中的应用。

6 结语

T 淋巴细胞介导的迟发型变态反应在药疹发病过

程中起着重要作用。目前, T 淋巴细胞相关的体外试验得到了越来越多的关注, 相较于皮肤试验, 其敏感性高, 对患者无潜在的危险, 继续研究药物过敏中药物诱导的淋巴细胞增殖反应可能是值得的, 因为只有这样才有可能获得足够的经验, 从而得出关于淋巴细胞转化试验在某种药物超敏反应中的有效性的有效结论。随着时间的推移, 已经提出了对经典 LTT 的不同修改, 以提高敏感性, 特异性和实用性。

参考文献:

- [1] 赵辨. 临床皮肤病学 [M]. 第 3 版. 南京: 江苏科学技术出版社, 2001.620-626.
- [2] Lymphocyte transformation in drug hypersensitivity Lancet, 1 (1967), pp. 743-745.
- [3] B. Summer, S. Ständer, F. Kapp, P. Thomas Role of the lymphocyte transformation test in the evaluation of metal sensitization Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete, 67 (2016), pp. 380-384.
- [4] Hirschhorn, F. Bach, R.L. Kolodny, I. L. Firschein, N. Hashem Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro Science, 142 (1963), pp. 1185-1187.
- [5] B. Summer, S. Ständer, F. Kapp, P. Thomas Role of the lymphocyte transformation test in the evaluation of metal sensitization Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete, 67 (2016), pp. 380.
- [6] I. Sarkany Lymphocyte transformation in drug hypersensitivity Lancet, 1 (1967), pp. 743-745.
- [7] Report of the committee on clinical immunology of the international union of immunological societies (IUIS). Vox Sang. 1976;31(5):386-393.
- [8] Halpern B, Amache N. Diagnosis of drug allergy in vitro with the lymphocyte transformation test. J Allergy. 1967 Sep;40(3):168-181.
- [9] Dobozy A, Hunyadi J, Simon N. Lymphocyte transformation test in detection of drug hypersensitivity. Lancet. 1972 Dec 16;2(7790):1319-1319.
- [10] 徐艳萍, 方洪元, 纪岩文. 淋巴细胞转化试验在药疹诊断中的应用 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2008, 24 (11):892-894.
- [11] 王婷婷, 王学民, 刘彦群, 董亚琦, 刘小萍, 张泮祯. 淋巴细胞相关体外实验在药疹诊断中的应用 [J]. 国际皮肤性病杂志, 2014, 40(5):306-309.