

CD26/DPP4 对隐球菌脑膜炎患者 CD4+T 细胞及相关细胞因子的影响与临床意义*

李腾达¹, 龙曙萍¹, 徐贵霞¹, 刘云¹, 张薇薇¹, 钱琤², 黄元兰³, 秦琴¹, 陈孙孝⁴, 邓安梅¹

(1. 第二军医大学长海医院, 上海 200433; 2. 解放军 100 医院, 江苏苏州 215007;
3. 解放军 455 医院, 上海 200052; 4. 第二军医大学长征医院, 上海 200003)

摘要:目的 分析 CD26/DPP4 对隐球菌脑膜炎患者 CD4+T 细胞及其细胞因子的影响与临床意义。方法 收集 2011 年 8 月~2015 年 12 月在上海长海医院和长征医院确诊的 36 例隐球菌脑膜炎患者及 36 例同期健康者外周血, 以密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(PBMC), 流式细胞术分选 CD26+CD4+T, CD26-CD4+T 细胞群, 反转录酶-聚合酶链锁反应(RT-PCR)检测细胞因子表达水平, 以 Pearson 系数表示 DPP4 活性, CD26+CD4+T(%)与 APACHE II 评分, IL-17, TNF- α , IL-4, IFN- γ 的相关性。结果 实验组与对照组 CD26+CD4+T(%)为 13.35 \pm 3.83 vs 8.39 \pm 2.14, $t=6.78$, $P<0.0001$; DPP4 活性为 50.89 \pm 17.21 mU/ml vs 73.83 \pm 20.24 mU/ml, $t=5.18$, $P<0.0001$, 差异具有统计学意义。实验组 CD26+CD4+T(%)与 APACHE II 评分, IL-17, TNF- α 呈正相关($r=0.431, 0.564, 0.688$, $P=0.0038, 0.001, 0.0046$); DPP4 活性与 APACHE II 评分, IL-17, TNF- α , IFN- γ 呈负相关($r=-0.544, -0.489, -0.678, -0.734$; P 均 <0.001)。结论 CD26/DPP4 可能通过调节 Th 细胞亚群参与隐球菌脑膜炎致病过程, 是潜在疾病治疗靶点和预测指标。

关键词: 隐球菌脑炎; 表面抗原分化簇 26/二肽酶 4; 白介素-17; 白介素-4; 干扰素- γ

中图分类号: R519.4; R392.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2016)05-038-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.05.010

Affection of CD26/DPP4 on CD4+T Cells and Relative Cytokines in Patients with *Cryptococcal Meningitis* and Its Clinical Significance

LI Teng-da¹, LONG Shu-ping¹, XU Gui-xia¹, LIU Yun¹, ZHANG Wei-wei¹, QIAN Cheng²,
HUANG Yuan-lan³, QIN Qin¹, CHEN Sun-xiao⁴, DENG An-mei¹

(1. Changhai Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

2. No. 100 Hospital of PLA, Jiangsu Suzhou 215007, China;

3. No. 455 Hospital of PLA, Shanghai 200052, China; 4. Changzheng

Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

Abstract: Objective To analyze the affection and clinical significance of CD26/DPP4 on CD4+T cells and its cytokines in patients with *Cryptococcal Meningitis*. **Methods** Peripheral blood was collected from 36 patients diagnosed with *Cryptococcal Meningitis* in Changhai Hospital and Changzheng Hospital, Shanghai from August, 2011 to December, 2015, meanwhile 36 health controls' was also acquired. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) was separated by density gradient centrifugation. CD26+CD4+T and CD26-CD4+T cell groups were classified by Flow Cytometry, the expression level of cytokines was tested by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The correlation between DPP4 activity, CD26+CD4+T(%) and APACHE II score, IL-17, TNF- α , IL-4, IFN- γ was measured by Pearson coefficient. **Results** CD26+CD4+T(%) between experimental and control groups was 13.35 \pm 3.83 vs 8.39 \pm 2.14 ($t=6.78$, $P<0.0001$). DPP4 activity was 50.89 \pm 17.21 mU/ml vs 73.83 \pm 20.24 mU/ml ($t=5.18$, $P<0.0001$), with statistically significant differences. In experimental groups, CD26+CD4+T(%) was positively related with APACHE II score, IL-17, TNF- α ($r=0.431, 0.564, 0.688$, $P=0.0038, 0.001, 0.0046$). DPP4 activity was negatively interrelated with APACHE II score, IL-17, TNF- α , IFN- γ

* 基金项目: 973 计划(2013CB531606), 国家自然科学基金(81471605, 81401358, 81501397, 31500721, 81501398, 81302579, 81273282, 81202353), 上海申康基金(SHDC22014014), 上海教育科学基金(D14017), 军队科技项目(BWS14J023, 12MA056, 15ZD009, 15XD007), 美捷登基金(MJR20150019)。

作者简介: 李腾达(1990-), 女, 在读硕士生, 主要从事感染免疫研究, E-mail: tengdali@smmu.edu.cn。

龙曙萍(1994-), 女, 在读硕士生, 主要从事感染免疫研究, 共同第一作者。

通讯作者: 邓安梅, 女, 教授, E-mail: amdeng70@163.com。

陈孙孝, 男, 教授, E-mail: csx614@163.com, 共同通讯作者。

($r = -0.544, -0.489, -0.678, -0.734; P < 0.001$). **Conclusion** CD26/DPP4 may be involved in the pathogenesis of *Cryptococcal Meningitis* through regulation of Th subgroups, and it was the potential therapeutic target and the predicted marker of the disease.

Keywords: *Cryptococcal Meningitis*; CD26/DPP4; interleukin-17; interleukin -4; interferon γ

新型隐球菌是一种机会感染性致病菌,通常以菌体或孢子的形式被人体吸入下呼吸道,当人类CD4+T细胞等免疫缺陷时,该病菌易从肺部进入血液,进而通过血脑屏障引起隐球菌脑膜炎等疾病^[1]。目前由于病菌持留、药物生物相容性差等原因,临床上仍存在感染复发、继发性感染甚至死亡等不良结果^[2]。

表面抗原分化簇26/二肽酶4(cluster of differentiation 26/dipeptidyl peptidase IV, CD26/DPP4)是一种T细胞表面激活抗原,具有DPP4酶活性,它能裂解氨基末端肽倒数第二个L-脯氨酸或L-丙氨酸,通过N-端截断使肠降血糖素、胰高血糖素样肽-1(GLP-1)和胃抑制蛋白(GIP)失活而调节血糖^[3]。研究表明,CD26/DPP4在T细胞激活与增殖、记忆性T细胞形成等方面亦有重要作用^[3]。70%的外周血淋巴细胞表达CD26/DPP4,而Th17细胞高表达高活性的CD26/DPP4^[3]。在肠道炎症性疾病(inflammatory bowel disease, IBD)、原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)等疾病中,CD26与Th17型细胞及细胞因子的表达密切相关^[4];DPP4酶活性与CRP等炎症相关蛋白呈负相关^[5],其可能通过负性调节Th1型细胞因子控制炎症反应^[5,6]。但CD26/DPP4在隐球菌脑膜炎中的作用尚未可知,本文在流式细胞分选的基础上,通过分析CD26/DPP4对患者CD4+T细胞及其细胞因子的影响,初步了解其在隐球菌脑膜炎致病过程中的作用,为进一步病理机制的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 研究对象 实验组为36例于2011年8月~2015年12月在上海长海医院和长征医院确诊的隐球菌脑膜炎患者,男女比例为1:2,平均年龄 36.2 ± 4.7 岁。诊断标准为脑脊液新型隐球菌染色或培养阳性。对照组为36例同期体检的健康个体,男性13例,女性23例,平均年龄 34.8 ± 5.2 岁。所有纳入对象均为HIV阴性。本研究经第二军医大学长海医院医学科研伦理委员会批准,所有受试对象均签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器 淋巴细胞分离液 ficoll 400 * (美国 sigma-aldrich 公司), TRIZOL 试剂(美国 Invitrogen 公司),反转录试剂盒(Takara 公司),实时定量 PCR 引物和试剂(美国 Applied Biosystems

公司),甘氨酸-脯氨酸-对硝基苯胺对甲苯磺酸盐(德国 Sigma Chemie GmbH 公司),酶标仪(Thermo Scientific 公司),Flow Cytometer (Bechman Coulter 公司)。

1.3 方法

1.3.1 血浆收集及PBMC的分离:抽取所有研究对象EDTA-K₂抗凝外周血2~3 ml,3 000 r/min离心10 min,分离血浆,冻存于-80℃待用。血标本稀释1倍后,用ficoll 400 * 分离出PBMC,冻存于液氮。

1.3.2 DPP4酶活性的测定:将溶解后的血浆与2 mmol/L 甘氨酸-脯氨酸-对硝基苯胺对甲苯磺酸盐共同孵育30 min后用醋酸钠缓冲液终止反应,观测波长为405 nm。

1.3.3 流式分选细胞群:将液氮储存的PBMC于37℃溶解后计数,以RPMI 1640+10%FBS调节其为 1×10^6 /ml并于37℃,5 ml/dl CO₂条件下孵育4 h。孵育后,细胞被FITC-抗CD3和PE-Cy5-抗CD8染色,以确定CD4+T细胞。固定和过滤后,细胞被PE-抗CD26标记。标记的细胞用Flow Cytometer进行分选,以CELLQUEST软件(BD BIOSCIENCE)进行分析。分析分选后的细胞群在RPMI 1640+10%FBS条件下培养约2周后,进行RT-PCR。

1.3.4 mRNA抽取、反转录与RT-PCR:在无酶条件下,将分选、培养的CD26+CD4+T与CD26-CD4+T细胞群按TRIZOL试剂盒说明书提取总RNA,用反转录试剂盒将mRNA反转录为cDNA。以 β -actin为内参照基因,cDNA为模板,进行相对定量PCR。

1.4 统计学分析 实验组和对照组计量资料的比较采用两独立样本t检验,相关性分析以Pearson相关系数表示,检验水准 α 为0.05。统计软件为GraphPad Prism 6.0和IBM SPSS Statistics 21.0。

2 结果

2.1 两组间CD26+CD4+T(%),DPP4酶活性,细胞因子表达水平的比较 见表1。实验组与对照组年龄、性别比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与对照组相比,隐球菌脑膜炎患者CD26CD4+T细胞(%)升高,DPP4活性降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 两组间 CD26+CD4+T(%), DPP4 酶活性及细胞因子 mRNA 水平的比较

项目	实验组	对照组	t	P
CD26+CD4+T(%)	13.35±3.83	8.39±2.14	6.78	<0.000 1
DPP4 活性(mU/ml)	50.89±17.21	73.83±20.24	5.18	<0.000 1

2.2 两组间 CD26+CD4+T 与 CD26-CD4+T 细胞中细胞因子相对 mRNA 表达的比较 见表 2, 表 3。与对照组相比, 实验组 CD26+CD4+T 细胞 IL-17, TNF- α , IFN- γ 升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), IL-4 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 实验组 CD26-CD4+T 细胞 TNF- α , IFN- γ 升高, IL-4 降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), IL-17 表达无统计学差异 ($P > 0.05$)。进一步分析发现实验组 CD26+CD4+T 细胞 IL-17, TNF- α 的表达高于 CD26-CD4+T 细胞群 ($t = 20.89, 11.17, P$ 均 $< 0.000 1$), IFN- γ , IL-4 的表达低于 CD26-CD4+T 细胞群 ($t = 14.23, 9.01, P$ 均 $< 0.000 1$), 差异具有统计学意义。

2.3 实验组 CD26+CD4+T(%), DPP4 活性与相关指标的相关性分析 见表 4。实验组 CD26+CD4+T(%) 与 APACHE II 评分, IL-17, TNF- α

呈正相关, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 与 IFN- γ , IL-4 不具有相关性; 实验组血浆 DPP4 酶活性与 APACHE II 评分, IL-17, TNF- α , IFN- γ 呈负相关, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 与 IL-4 不具有相关性。

表2 实验组与对照组 CD26+CD4+T 细胞中细胞因子相对 mRNA 表达的比较

项目	实验组	对照组	t	P
IL-17	3.60±1.01	1.21±0.69	11.72	<0.000 1
TNF- α	2.43±1.24	1.04±0.98	5.28	<0.000 1
IFN- γ	0.32±0.18	0.13±0.09	5.67	<0.000 1
IL-4	0.11±0.06	0.09±0.04	1.66	0.100 6

表3 实验组与对照组 CD26-CD4+T 细胞中细胞因子相对 mRNA 表达的比较

项目	实验组	对照组	t	P
IL-17	0.08±0.05	0.06±0.02	2.23	0.029 1
TNF- α	0.12±0.05	0.07±0.03	5.15	<0.000 1
IFN- γ	4.87±1.91	2.08±0.79	8.10	<0.000 1
IL-4	1.12±0.67	2.15±0.85	5.71	<0.000 1

表4 实验组 CD26+CD4+T(%), DPP4 活性与 APACHE II 评分、细胞因子的关系

指标	CD26+CD4+T(%)					DPP4 活性				
	APACHE II	IL-17	TNF- α	IFN- γ	IL-4	APACHE II	IL-17	TNF- α	IFN- γ	IL-4
r	0.431	0.564	0.688	0.014	0.022	-0.544	-0.489	-0.678	-0.734	0.031
P	0.003 8	0.001	0.004 6	0.188	0.569	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.67

3 讨论 新型隐球菌是一种哺乳动物机会致病菌, 广泛分布于土壤和鸽粪中, 当机体免疫力降低时, 易侵入人体致病^[1,7]。在隐球菌疾病形成过程中 CD4+T 细胞扮演了重要角色, Th1 细胞通过大量分泌 IFN- γ , IL-2 等诱导巨噬细胞上调 NOS₂ 酶, 形成 NO, 从而有利于宿主抵抗真菌^[8], 研究表明真菌清除率与脑脊液中 IFN- γ 的水平, 与生产 IFN- γ /TNF- α 的 CD4+T 相关^[1]; Th2 细胞及 IL-4, IL-13 等可激活巨噬细胞的吞噬作用致隐球菌胞内生长及患者免疫病理损伤^[1], 其损伤作用会被 Treg 及其转录分子、趋化因子等抑制^[9]。Th17 及 IL-17, IL-22, TNF- α 等在疫苗介导的抗隐球菌病中发挥了重要作用^[1], 并能抑制隐球菌的胞内扩增^[8]。

CD26/DPP4 是一种同源二聚体和完整的 II 型糖蛋白, 被认为是人类胸腺成熟的标志与淋巴细胞通过胸腺迁移的中介体^[3]。作为记忆性 T 细胞的特征分子, CD26/DPP4 可通过对募集抗原的反

应而激活细胞; DPP4 酶能抑制有丝分裂原, 控制 DNA 合成, 降低细胞因子生产和 T 细胞活化、增殖^[3]。CD26/DPP4 缺陷的小鼠中, 脾脏 CD4+T 细胞降低, 在被 TCR 抗体刺激后 T 细胞扩增反应相比较于正常组呈现 5 倍下降^[3]。在多发硬化病 (MS) 及其相关脑脊髓炎动物模型中, CD26+T 增高, CD26/DPP4 表达增高, 且与疾病活动性相关^[3]。类风湿性关节炎中, DPP4 抗体的存在与高唾液酸化作用使血清 DPP4 酶活性下降^[3], 下降的 DPP4 活性与特殊 T 细胞亚群的变化相关^[10]。在 IBD 中, T 细胞 CD26/DPP4 表达增高, 循环 CD26/DPP4 下降; 动物试验发现缺乏 CD26/DPP4 能导致疾病炎症阶段巨噬细胞双倍增加而影响 IBD 的发展和消除过程^[3]。另一些研究表明, IBD 中, Th17 细胞的亚群 IL-17+IFN- γ +CD4+T 细胞高表达 CD26 且在炎症性肠膜组织中颇为丰富^[6]。但目前 CD26/DPP4 在隐球菌脑膜炎中的表达状况及作用机制尚不明确。本研究发现隐球

菌脑膜炎患者 CD26+CD4+T(%), Th17, Th1 型细胞因子升高, Th2 型细胞因子降低; Th17 型细胞因子主要表达于 CD26+CD4+T 细胞, Th1, Th2 型细胞因子主要表达于 CD26-CD4+T 细胞; CD26+CD4+T(%), DPP4 活性与疾病 A-PACHE II 评分, IL-17, IFN- γ 等细胞因子的表达相关, 表明 CD26 在隐球菌脑膜炎疾病形成过程中发挥了重要作用, 其可能通过 Th17 型细胞及细胞因子影响 Th1/Th2 细胞及功能, 进而参与隐球菌脑膜炎的病理形成过程, 但其作用机制及免疫调节通路相关分子尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Rohatgi S, Pirofski LA. Host immunity to *Cryptococcus neoformans* [J]. Future Microbiology, 2015, 10(4):565-581.
- [2] Gibson JF, Johnston SA. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis [J]. Fungal Genetics and Biology, 2015(78):76-86.
- [3] Klemann C, Wagner L, Stephan M, et al. Cut to the chase: a review of CD26/dipeptidyl peptidase-4's (DPP4) entanglement in the immune system [J]. Clinical and Experimental Immunology, 2016, 185(1):1-21.
- [4] Bengsch B, Seigel B, Flecken T, et al. Human Th17 cells express high levels of enzymatically active dipeptidyl peptidase IV (CD26) [J]. Journal of Immunology, 2012, 188(11):5438-5447.
- [5] Moran GW, O'Neill C, Padfield P, et al. Dipeptidyl peptidase-4 expression is reduced in Crohn's disease [J]. Regulatory Peptides, 2012, 177(1/3):40-45.
- [6] Globig AM, Hennecke N, Martin B, et al. Comprehensive intestinal T helper cell profiling reveals specific accumulation of IFN- γ +IL-17+coproducing CD4+T cells in active inflammatory bowel disease [J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2014, 20(12):2321-2329.
- [7] 张蕾, 陈明坤, 石磊, 等. 隐球菌脑膜炎患者外周血单个核细胞中 microRNA-31 表达及相关免疫分子水平研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(3):16-17, 21.
- Zhang L, Chen MK, Shi L, et al. Increased expression of microRNA-31 in peripheral blood mononuclear cells from patients with *Cryptococcal meningitis* [J]. J Mod Lab Med, 2014, 29(3):16-17, 21.
- [8] Hole C, Wormley FL. Innate host defenses against *Cryptococcus neoformans* [J]. Journal of Microbiology, 2016, 54(3):202-211.
- [9] Wiesner DL, Smith KD, Kotov DI, et al. Regulatory T cell induction and retention in the lungs drives suppression of detrimental type 2 Th cells during pulmonary *Cryptococcal* infection [J]. Journal of Immunology, 2016, 196(1):365-374.
- [10] Cordero OJ, Varela-Calvino R, Lopez-Gonzalez T, et al. CD26 expression on T helper populations and sCD26 serum levels in patients with rheumatoid arthritis [J]. PloS One, 2015, 10(9):e0139535.
- 收稿日期:2016-07-03 修回日期:2016-07-22
- (上接 37 页)
- [8] 姜波, 王玉明, 段勇. MicroRNA 的研究进展及其与肺癌的关系 [J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(1):5-9.
- Jiang B, Wang YM, Duan Y. Research progress of microRNA and its relationship with Lung Cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2012, 27(1):5-9.
- [9] Shimizu C, Kim J, Stepanowsky P, et al. Differential expression of miR-145 in children with Kawasaki disease [J]. PLoS One, 2013, 8(3):e58159.
- [10] 褚茂平, 周爱华, 胡晨, 等. miR-130a 和 miR-125b 在川崎病外周血细胞中的表达及意义 [J]. 浙江医学, 2015, 37(5):357-362, 388.
- Chu MP, Zhou AH, Hu C, et al. Plasma miR-130a and miR-125b as biomarkers of coronary artery dilatation in Kawasaki disease [J]. Zhejiang Medical Journal, 2015, 37(5):357-362, 388.
- [11] Cordes KR, Sheehy NT, White MP, et al. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity [J]. Nature, 2009, 460(7256):705-710.
- [12] Gatsiou A, Boeckel JN, Randriamboavonjy V, et al. MicroRNAs in platelet biogenesis and function; implications in vascular homeostasis and inflammation [J]. Curr Vasc Pharmacol, 2013, 10(5):524-531.
- [13] Xin M, Small EM, Sutherland LB, et al. MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury [J]. Genes & Development, 2009, 23(18):2166-2178.
- [14] Elia L, Quintavalle M, Zhang J, et al. The knockout of miR-143 and -145 alters smooth muscle cell maintenance and vascular homeostasis in mice; correlates with human disease [J]. Cell Death Differ, 2009, 16(12):1590-1598.
- 收稿日期:2016-06-05 修回日期:2016-08-08