

自身免疫性胰腺炎患者 血清外泌体中 CD69 表达升高及意义*

李腾达¹, 龙曙萍¹, 黄元兰², 刘 鹏¹, 张薇薇¹, 郭 杰¹, 刘 云¹, 谷明莉¹, 邓安梅¹

(1. 第二军医大学长海医院, 上海 200433; 2. 解放军 455 医院, 上海 200052)

摘要:目的 探究自身免疫性胰腺炎(AIP)患者血清外泌体中 CD69 的表达情况,初步探讨其对疾病病理过程的影响。

方法 收集 2012 年 10 月~2016 年 12 月来长海医院就诊的 35 例 AIP 患者血清和同期就诊的 35 例健康个体血清,分别作为实验组和对照组。以 ELISA 法检测血清中的细胞因子浓度,以磁珠结合抗体的方法在流式细胞仪中检测血清中外泌体表面分子的表达情况,两组之间计量资料的比较采取两独立样本 *t* 检验,两变量之间的相关性以 Pearson 系数表示。

结果 流式细胞仪分析显示,实验组血清中外泌体 CD69 表达水平高于对照组(85.76 ± 19.45 vs 17.01 ± 5.89)%,差异有统计学意义($t=20.01, P<0.0001$);实验组中 CD69+ 的外泌体所占百分比与血清中 IL-4, IFN- γ , TGF- β 表达量呈正比($r=0.456, 0.678, 0.548$, 均 $P<0.05$), CD69- 的外泌体所占百分比与血清中 IL-4, IFN- γ , IL-10, TGF- β 呈反比($r=-0.589, -0.399, -0.784, -0.657$, 均 $P<0.05$)。结论 CD69 在外泌体的表达可能通过影响 CD4+T 细胞功能参与了 AIP 病程,是该病潜在的监测指标和治疗靶点。

关键词:自身免疫性胰腺炎;外泌体;CD69;IL-4;TGF- β

中图分类号:R576;R392.11 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)02-008-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.02.003

Elevated Expression of CD69 in Serum Exosomes from Patients with Autoimmune Pancreatitis and Its Significance

LI Teng-da¹, LONG Shu-ping¹, HUANG Yuan-lan², LIU Peng¹, ZHANG Wei-wei¹, GUO Jie¹,

LIU Yun¹, GU Ming-li¹, DENG An-mei¹ (1. Changhai Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. No. 455 Hospital of PLA, Shanghai 200052, China)

Abstract: Objective To study the expression of CD69 in exosomes existed in serum from patients with autoimmune pancreatitis (AIP) and primarily discuss its affection on the pathology of disease progression. **Methods** Serum samples from 35 cases diagnosed as AIP and 35 healthy individuals examined at the same time were collected during October 2012 to December 2016 in Changhai Hospital, they were defined as experimental and control groups, separately. The cytokine levels in serum were measured by ELISA. The expression of surfaced molecules in exosomes existed in serum was tested by magnetic bead-conjugant-antibody method in flow cytometry. The comparison between the two groups' measurement data was measured by two independent samples' *t* test, correlation between two variables was showed by Pearson coefficient. **Results** The flow cytometry analysis showed that the expression level of CD69 in serum exosomes in experiment and control groups were (85.76 ± 19.45 vs 17.01 ± 5.89)%, with statistical difference ($t=20.01, P<0.0001$). CD69+ exosomes in experiment group were positively related with serum IL-4, IFN- γ and TGF- β ($r=0.456, 0.678, 0.548$, all $P<0.05$), while CD69- exosomes were negatively related with serum IL-4, IFN- γ , IL-10 and TGF- β ($r=-0.589, -0.399, -0.784, -0.657$, all $P<0.05$). **Conclusion** The expression of CD69 in exosomes might participate in AIP progression through influencing the function of CD4+T cell, and it was the potential examined biomarker and therapeutic target.

Keywords: autoimmune pancreatitis; exosomes; CD69; IL-4; TGF- β

自身免疫性胰腺炎(autoimmune pancreatitis, AIP)是一种新的胰腺疾病类型,被分为 1 型与 2 型,由于其生物学检测的低灵敏性及标志物的非特异性,使 AIP 的早期诊断及鉴别诊断成为难点^[1]。

目前关于 AIP 的病理机制研究发现,CD4+T 细胞是参与病理过程的重要细胞:Th2 型细胞因子 IL-4 和 Treg 分泌的调节性细胞因子 IL-10, TGF- β 在病人病理组织中上调,参与了疾病形成过程^[2];

* 基金项目:973 计划(2013CB531606),国家自然科学基金(81671556,81601406,81471605,81401358,81501397,31500721,81501398,81302579,81273282,81202353),上海申康基金(SHDC22014014),上海教育科学基金(D14017),军队科研基金(BWS14J023,15ZD009,15XD007),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,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。谷明莉,女,检验技师,E-mail:mingligu@126.com,共同通讯作者。

Th1 型细胞及其细胞因子 IFN- γ 在外周血中上升,影响了疾病的发生发展^[3]。

外泌体(exosomes)是一种稳定的细胞外囊泡,大小为 50~150 nm,表面有丰富的蛋白 CD63, CD9 和 CD81,包含了细胞内全面的生物信息,被视为母细胞的“指纹印迹”^[4]。目前有研究报道外泌体可能与急性胰腺炎相关的肺部损伤^[5]、胰腺癌肿瘤转移相关^[6],但外泌体在 AIP 中的研究尚未进行。CD69 是一种 T 细胞激活早期表达的 surface 分子,其在 CD4+T 细胞中表达^[7],与自身免疫性疾病如自免性糖尿病、自免性肝炎等密切相关^[8,9],研究表明在 AIP 的小鼠模型 MRL/MpJ 中,CD4+/CD69+Th 细胞与疾病严重程度相关,CD69 可能通过影响 CD4+T 细胞参与了 AIP 的致病过程^[10]。基于此,本实验拟比较 CD69 在 AIP 病人和健康人血清外泌体中的表达量,并进一步探讨其与 CD4+T 细胞所分泌的细胞因子的相关性,旨在为 AIP 疾病提供新的诊治靶点和思路。

1 材料和方法

1.1 研究对象 收集 2012 年 10 月~2016 年 12 月来第二军医大学长海医院就诊的 35 例 AIP 病人血清作为实验组,收集同期就诊的 35 例健康个体血清作为对照组,所有血清冻存于-80℃待用。AIP 诊断标准参见国际胰腺疾病学会关于自身免疫性胰腺炎的国际统一诊断标准指南,实验组年龄为 66.36±7.78 岁,男女比例为 19:6。健康对照组年龄为 64.24±8.67 岁,男女比例为 3:1。两组年龄、性别差异无统计学意义($P<0.05$)。本研究经第二军医大学长海医院医学科伦理委员会批准,所有受试对象均签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器 ELISA 试剂盒(美国 eBioscience 公司),酶标仪(Thermo Scientific 公司),生物分光光度计(德国 Eppendorf 公司),离心机(美国 Beckman),流式细胞仪(美国 Beckman),透射电镜(日本电子),抗体(美国 Abcam 公司),磁珠(上海秉宏生物科技公司)。

1.3 方法

1.3.1 血清收集:采集无抗凝剂全血后在 1~2 h 内进行分离,离心条件为 2 500 g×10 min,或室温搁置待血清形成直接收集。所有样本装 EP 管,-80℃长期保存。

1.3.2 血清外泌体的分离:将血清于冰上溶解,取 200 μ l,加入 10 ml 左右 PBS 稀释后经 0.2 μ m 过滤器过滤,按照下列程序进行超高速离心:2 000 g,10 min,去除沉渣,140 000 g,4℃,3 h,保留沉淀,PBS 洗涤沉淀并重悬,再次离心 140 000 g,4℃,3 h,得到的沉淀用 200 μ l PBS 重悬。取 10 μ l

外泌体溶液滴入 300 目铜碳网上,干燥后进行电镜下形态学观察。

1.3.2 磁珠结合流式进行外泌体表面抗原的鉴定:取 200 μ l 磁珠用 500 μ l MEST 溶液洗 2 次后,用 200 μ l 5 mg/ml EDC 和 NHS 溶液进行活化,37℃,30 min。加入约 10 μ l 抗体,37℃,摇 3 h。磁性分离移除上清,加 1 ml PBST 重悬,37℃,温育 30 min 后,用 PBST 洗 3 次。加入约 100 μ l 外泌体溶液,37℃摇 1 h,移除上清,PBS 洗 3 次。各管加入 1 ml 30 μ mol/L 的 Dio 染料,37℃,30 min,磁性分离移除上清,用无水乙醇洗 3 次,PBS 重悬,待测。

1.3.3 ELISA 法检测血清中细胞因子的表达水平:按照 ELISA 试剂盒操作说明进行相关因子的检测。

1.4 统计学分析 两组间计量资料的比较采用两独立样本 t 检验,检验水准 α 为 0.05,相关性分析以 Pearson 相关系数表示,统计软件为 SPSS21.0 与 GraphPad Prism 6.0。

2 结果

2.1 实验组与对照组血清中外泌体表面分子的流式分析 见表 1。CD9,CD63,CD81 在实验组与对照组分离出的外泌体中均有表达,实验组高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 CD9,CD63,CD81 等非特异性分子相比,CD69 在实验组外泌体中明显增高,约为对照组的 5 倍,差异有统计学意义($P<0.0001$)。

表 1 实验组与对照组血清外泌体表面分子表达水平($\bar{x}\pm s$ %)

细胞因子	实验组	对照组	t	P
CD69	85.76±19.45	17.01±5.89	20.01	<0.0001
CD9	55.87±12.98	48.89±10.78	2.447	0.0170
CD63	66.98±13.54	54.23±16.23	3.569	0.0007
CD81	57.45±15.76	46.11±16.34	2.955	0.0043

2.2 实验组与对照组血清中细胞因子的表达水平

见表 2。与对照组相比,实验组血清中 IL-4, IFN- γ , TGF- β 增高,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。IL-10 在两组之间的表达无统计学差异。

表 2 实验组与对照组 CD4+T 细胞相关因子的表达情况($\bar{x}\pm s$)

细胞因子	实验组	对照组	t	P
IL-4(ng/ml)	0.84±0.23	0.25±0.06	14.68	<0.0001
IFN- γ (ng/ml)	6.89±1.67	0.84±0.22	21.25	<0.0001
IL-10(pg/ml)	509.78±167.45	456.89±170.34	1.310	0.1946
TGF- β (pg/ml)	365.76±154.98	168.87±43.87	7.232	<0.0001

2.3 实验组外泌体 CD69 的表达情况与血清细胞

因子的相关性分析 见表 3。实验组 CD69+外泌体与 IL-4, IFN- γ , TGF- β 呈正比($P<0.05$),CD69-外泌体与 IL-4, IFN- γ , IL-10, TGF- β 呈反比(P

<0.05), 差异具有统计学意义。

表3 实验组外泌体 CD69 的表达情况与血清细胞因子的相关性分析

细胞因子	CD69+exosome%		D69-exosome%	
	r	P	r	P
IL-4	0.465	<0.005	-0.589	<0.001
IFN- γ	0.678	<0.001	-0.399	<0.05
IL-10	0.102	>0.05	-0.784	<0.001
TGF- β	0.548	<0.001	-0.657	<0.001

注: $r_{0.05/2,33}=0.334$, $r_{0.01/2,33}=0.430$, $r_{0.005/2,33}=0.464$, $r_{0.001/2,33}=0.532$ 。

3 讨论 AIP 是一种新型胰腺疾病, 其免疫病理形成机制目前尚不明晰, 专家认为 CD4+T 细胞, 可从 Th0 细胞分化为 Th1/Th2 及 Treg 细胞等^[11], 是参与 AIP 病理过程的重要细胞; Th2 型免疫反应可能参与了 AIP 疾病的进展, Th1 型反应与疾病早期发展相关, 而 Treg 分泌的 IL-10 与 TGF- β 可调节 IgG4 和纤维化过程, 同时影响了 Th1, Th2 细胞分化^[3]。但值得注意的是对 AIP 疾病机理认识的不完整性以及其生物学标志物的非特异性非灵敏性, 使得该病存在早诊困难等问题。

外泌体是一种稳定的细胞外囊泡, 通过胞内囊泡的内吞途径形成, 包含了细胞内蛋白、mRNA, 非编码 RNA 及 DNA 等生物分子, 在人体外周大量存在, 相当于其来源细胞的“指纹”^[4]。外泌体表面具有鉴定意义的标志物有 CD9, CD63, CD81 等, 不同细胞来源其表面抗原的表达情况有所不同^[4]。研究表明胰腺癌细胞来源的外泌体相比较于正常对照组, 表面有丰富的 GPC-1 等标志物, 能够将早期胰腺癌变与胰腺良性病变区别开来^[12], 但值得注意的是 AIP 来源的外泌体尚未被研究。

CD69 也叫做早期激活抗原(EA-1)和激活诱导分子(AIM), 一旦 T 细胞被激活就会表达于其表面。研究表明, CD69 在 T 细胞的表达与 Th1 型细胞因子 IFN- γ 相关; 在 Treg 细胞中, 仅有表达 CD69 的 Treg 能够分泌高水平的 TGF- β ^[7]。在自身免疫性疾病如自身免疫性糖尿病中 CD69 和疾病严重程度相关^[8], 自身免疫性肝炎中 CD4+CD25-CD69+T 细胞扩增的抑制可改善疾病^[9], 说明 CD69 在自身免疫性疾病中有重要作用, 且可能与 CD4+T 细胞相关。近来有研究表明, 在 AIP 的小鼠模型 MRL/MpJ 中, CD4+/CD69+Th 细胞亦与疾病呈正相关, 说明 CD69 在 AIP 中亦有重要作用, 可能通过 CD4+T 细胞影响疾病进程^[10]。基于 CD69 在自身免疫性疾病中的重要性, 外泌体的疾病特异性, 与 AIP 疾病监测的不完善性, 本课题对 AIP 中 CD69+的外泌体进行了检测以完善 AIP 的诊治手段, 经研究发现 CD69+外泌体在 AIP 病人中明显增高, 并与 IL-4, IFN- γ , TGF- β 呈

正比, 说明 CD69+外泌体可能与 CD4+T 细胞功能相关, 进而参与了疾病的发生发展, 但本文标本较少, 尚需进一步扩大样本量, 并进行更进一步免疫学探究。

参考文献:

- [1] Madhani K, Farrell JJ. Autoimmune pancreatitis: An update on diagnosis and management[J]. Gastroenterology Clinics of North America, 2016, 45(1): 29-43.
- [2] Zen Y. The pathology of IgG4-related disease in the bile duct and pancreas[J]. Seminars in Liver Disease, 2016, 36(3): 242-256.
- [3] Okazaki K, Sumimoto K, Mitsuyama T, et al. Abnormal immunity in IgG4-related autoimmune pancreatitis[J]. Japanese Journal of Clinical Immunology, 2014, 37(1): 11-18.
- [4] Nuzhat Z, Kinhal V, Sharma S, et al. Tumour-derived exosomes as a signature of pancreatic cancer-liquid biopsies as indicators of tumour progression[J]. Onco-target, 2017, 8(10): 17279-17291.
- [5] Bonjoch L, Casas V, Carrascal M, et al. Involvement of exosomes in lung inflammation associated with experimental acute pancreatitis[J]. The Journal of Pathology, 2016, 240(2): 235-245.
- [6] Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver[J]. Nature Cell Biology, 2015, 17(6): 816-826.
- [7] Radulovic K, Rossini V, Manta C, et al. The early activation marker CD69 regulates the expression of chemokines and CD4 T cell accumulation in intestine[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e65413.
- [8] Radenkovic M, Silver C, Arvastsson J, et al. Altered regulatory T cell phenotype in latent autoimmune diabetes of the adults (LADA)[J]. Clinical and Experimental Immunology, 2016, 186(1): 46-56.
- [9] Yang Q, Wang J, Liu R, et al. Amelioration of concanavalin A-induced autoimmune hepatitis by magnesium isoglycyrrhizinate through inhibition of CD4(+)CD25(-)CD69(+) subset proliferation[J]. Drug Design, Development and Therapy, 2016, 10: 443-453.
- [10] Bischof J, Muller S, Borufka L, et al. Quantitative trait locus analysis implicates CD4(+)/CD44high memory T cells in the pathogenesis of murine autoimmune pancreatitis[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0136298.
- [11] 李腾达, 龙曙萍, 徐贵霞, 等. 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[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(5): 38-41.
- [12] Li TD, Long SP, Xu GX, et al. Affection of CD26/DPP4 on CD4+T cells and relative cytokines in patients with cryptococcal meningitis and its clinical significance[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(5): 38-41.
- [12] Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer[J]. Nature, 2015, 523(7559): 177-182.

收稿日期: 2017-02-28

修回日期: 2017-03-07