

• 论 著 •

隐球菌性脑膜炎患者中 Th17 细胞相关细胞因子的高表达及其临床意义*

黄元兰¹, 康敏荣¹, 胡志德², 闫伟¹, 邓安梅^{3△}

(1. 解放军第四五五医院检验科, 上海 200052; 2. 济南军区总医院实验诊断科, 山东济南 250031; 3. 第二军医大学长海医院实验诊断科, 上海 200433)

摘要:目的 研究 Th17 细胞相关细胞因子 IL-17A、IL-17F、IL-22 在隐球菌性脑膜炎患者发病机制中的作用。方法 收集了 2011 年 2 月至 2013 年 2 月期间来院就诊的免疫功能正常的隐球菌患者 22 例以及同期来院体检的健康个体 20 例, 收集外周抗凝血, 分离了外周血单个核细胞, 采用 RT-PCR 以及 ELISA 检测了隐球菌性脑膜炎患者和健康对照者外周血单个核细胞(PBMC)中 Th17 相关细胞因子 IL-17A、IL-17F 以及 IL-22 的 mRNA 表达以及血浆中各蛋白水平的表达。并分析其与脑脊液蛋白浓度、颅内压、脑脊液隐球菌抗原滴度、脑脊液葡萄糖浓度的关系。结果 隐球菌性脑膜炎患者外周血单个核细胞中 IL-17A、IL-22 的 mRNA 水平以及血浆中 IL-17A、IL-22 水平较健康对照组显著增高($P < 0.01$), 且与隐球菌性脑膜炎患者的预后因子脑脊液蛋白浓度、颅内压、脑脊液隐球菌抗原滴度、脑脊液葡萄糖浓度相关。结论 Th17 细胞相关细胞因子 IL-17A、IL-22 可能参与了隐球菌性脑膜炎的发病机制, 可能是潜在的评价隐球菌性脑膜炎病情的指标。

关键词: 隐球菌性脑膜炎; Th17; 细胞因子

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.15.006

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)15-2139-03

The increased serum Th17 related cytokine concentration in patients with cryptococcal meningitis and its clinical significance*

Huang Yuanlan¹, Kang Minrong¹, Hu Zhide², Yan Wei¹, Deng Anmei^{3△}

(1. Department of Clinical Laboratory, No. 455 Hospital of People's Liberation Army, Shanghai 200052, China; 2. Department of Clinical Laboratory, General Hospital of Ji'nan Military Region of People's Liberation of Army, Ji'nan, Shangdong 250031, China; 3. Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Objective To investigate the IL-17A/F and IL-22, the Th17 related cytokine, in the serum of cryptococcal meningitis patients and its clinical implications. Methods We collected peripheral blood from 22 cryptococcal meningitis patients and 20 matched healthy controls from February 2011 to February 2013. Then the peripheral blood mononuclear cells(PBMC) were separated with isodensity centrifugation. The RT-PCR and ELISA were used to detect the mRNA and protein level of Th17 related cytokine such as IL-17A, IL-17F and IL-22. In addition, the relationship between these cytokines and cerebrospinal fluid characteristics were analyzed. Results The serum concentration of IL-17A and IL-22 were much higher than that of healthy controls($P < 0.01$). Their concentration were even higher in patients with poor prognosis factors, including higher cerebrospinal fluid protein level and cryptococcal antigen titer, lower cerebrospinal fluid glucose concentration and increased cerebrospinal fluid open pressure. Conclusion IL-17A and IL-22 were involved in the pathogenesis of cryptococcal meningitis and may be a potential prognosis biomarker for cryptococcal meningitis.

Key words: cryptococcal meningitis; Th17; cytokine

隐球菌性脑膜炎(以下简称隐脑)是一种严重危害人类健康的中枢神经系统隐球菌感染性疾病, 其起病隐匿, 病程较长, 致死、致残率较高^[1]。其发病的显著特点是发生于免疫力低下的人群, 如 HIV 感染者和器官移植患者, 提示正常的免疫功能对于抵御隐球菌感染具有十分重要的作用。CD4⁺ 的 Th 细胞是一群与隐球菌感染免疫反应密切相关的细胞, 在隐脑小鼠模型中开展的研究表明, 去除 CD4⁺ 的 Th 细胞或者中和干扰素- γ 将加速隐脑病情的发展, 提示 CD4⁺ 的 Th 细胞对隐脑具有保护作用^[2]。此外, 研究还表明, CD8⁺ 的 T 细胞可以通过颗粒溶素发挥抗隐球菌作用, 但该作用的发挥依赖于 CD4⁺ 的 Th 细胞的存在^[3]。由此可见, CD4⁺ 的 Th 细胞是机体清除隐球菌感染的必要手段^[4]。目前比较公认的 Th 细胞亚群包括 Th1、Th2、Treg 和新近发现的 Th17 细胞^[5]。Th17 细胞以分

泌白细胞介素(IL)-17A、IL-17F 和 IL-22 为显著特征, 在多种自身免疫性疾病和感染性疾病中发挥重要作用^[6]。到目前为止, Th17 细胞在隐球菌感染与免疫中发挥的作用还不是很明确^[7]。但尚缺乏在临床水平证实 Th17 细胞参与隐球菌感染免疫反应的证据。本研究旨在通过 ELISA 检测隐球菌性脑膜炎患者外周血 IL-17A、IL-17F 和 IL-22 的表达, 初步分析 Th17 细胞在隐球菌性脑膜炎发病机制中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 22 例隐脑患者来自长海医院 2008 年 2 月至 2010 年 2 月期间长海医院收治的患者, 并排除自身免疫性疾病、HIV 感染者和器官移植患者。所有患者均为首诊患者, 未接受过抗真菌治疗。其中男女之比为 14 : 8, 平均年龄(40.7 ± 18.5)岁。隐脑的诊断标准为为脑脊液真菌涂片、培养

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81273282)。 作者简介: 黄元兰, 女, 主管技师, 主要从事感染与免疫以及自身免疫相关疾病研究。

△ 通讯作者, E-mail: asdzsq2@163.com。

和隐球菌乳胶凝集试验结果中的任一个阳性^[8]。从解放军第四五五医院健康查体的患者中挑选 20 例健康个体作为健康对照组,并按照年龄相近、性别相同的原则与隐脑组进行 1:1 配对研究。健康对照个体健康查体个体实验室和影像学常规检查未见明显异常。

1.2 仪器与试剂 KUBOTA-5420 台式高速离心机(日本 Kubota 公司);721 型紫外分光光度仪(美国 Beckman 公司);ABI PRISM 7700 Sequence Detection System(美国 Applied biosystems 公司);高速冷冻离心机 centrifuge, 5417R (EPPENDORF, germany);低温冰箱 MDF-292(SANYO);淋巴细胞分离液 LymphoprepTM(挪威 AXIS-SHIELD 公司);TaqMan 逆转录试剂盒(美国 Applied biosystems 公司),ELISA 试剂盒(美国 R&D Systems 公司);RNA 抽提试剂盒为 Rneasy Mini Kits (德国 Qiagen 公司);引物(由上海生工有限公司);DEPC(博彩生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本的采集 对上述 22 例隐脑患者和 20 例健康对照者分别采清晨空腹静脉血 5 mL,以 1:9 枸橼酸钠抗凝,离心后取上清,置 EP 管中-20 °C 保存,同批检测;另剩全血用密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(PBMC)。

1.3.2 细胞总 RNA 的抽提 以 RNA 提取试剂盒 RNeasy Mini Kits(Qiagen)抽提 PBMCs 中的总 RNA,以每管 10 μL 分装抽提的总 RNA,冻存于-80 °C 冰箱中;紫外分光光度仪检测 A260 和 A280,计算 RNA 的浓度。

1.3.3 引物和探针的设计与合成 根据基因库中人 IL-17F、IL-17A、IL-22 和选作内参的人 GAPDH 的 mRNA 序列,所有引物和探针均订购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.3.4 RNA 的逆转录 采用美国 Applied Biosystems 公司的 TaqMan 逆转录试剂盒,以随机引物,分别将从 SS 患者,健康体检者外周血单个核细胞中抽提的总 RNA 逆转录为 cDNA。将逆转录后的 cDNA 分装,冻存于-20 °C 冰箱备用。

1.3.5 荧光定量 PCR 技术检测 IL-17A、IL-17F 以及 IL-22 的 mRNA 水平表达 以逆转录的 cDNA 为模板,利用美国 Applied Biosystems 公司的 PCR 反应试剂盒进行荧光定量 PCR,PCR 扩增条件为 93 °C 4 min,94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 55 s,共计 40 个循环。检测 IL-17A、IL-17F 以及 IL-22mRNA 的表达水平。PCR 检测结果以 2^{-ΔΔCt} 表示设定健康对照组的相对表达量为 1。

1.3.6 ELISA 检测血浆中 Th17 细胞因子的水平以及脑脊液分析 将收集的血浆复溶,采用 ELISA 法检测外周血 IL-17A、IL-17F 和 IL-22 浓度。检测试剂盒购自 eBioscience 公司,按照试剂盒说明进行检测。脑脊液的采集在患者入院 2 d 内完成,并进行脑脊液蛋白和葡萄糖浓度分析,脑脊液内隐球菌抗原滴度的检测采用美国 immuno-Mycologics 有限公司生产的隐球菌抗原乳胶检测系统。

1.4 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 的方式表示,由于数据不服从正态分布。因此,健康对照与隐球菌性脑膜炎患者血浆 IL-17A、IL-17F 和 IL-22 浓度之间的比较采用配对 Wilcoxon 检验,不同脑脊液特征组患者外周血上述细胞因子的比较采用 Wilcoxon 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。所有统计均在 SPSS17.0 统计软件中完成,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者和健康对照组 PBMC 中 Th17 细胞效应因子的 mRNA 水平 隐球菌性脑膜炎患者外周血单个核细胞中 IL-17A、IL-22mRNA 水平较健康对照组显著增高($P < 0.01$),而两组

中 IL-17F 的水平则差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 两组外周血 Th17 细胞效应因子浓度比较 隐球菌患者血浆 IL-17A、IL-17F 和 IL-22 水平较健康对照组显著增高,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”),其中以 IL-17A、IL-22 在两组差异最大,隐脑组患者外周血 IL-17A、IL-22 水平约为健康对照组 2 倍。

2.3 患者血浆 IL-17A、IL-17F、IL-22 与脑脊液特征的关系 为进一步研究 Th17 细胞相关细胞因子在隐球菌性脑膜炎发病机制中的作用,分析了 IL-17A、IL-17F、IL-22 与上述脑膜炎预后因子之间的关系。结果发现,脑脊液蛋白浓度较高(≥ 1 mg/mL)的隐球菌患者,外周血 IL-17A、IL-22 水平也较高(P 值分别为 0.009 和 0.036);脑脊液葡萄糖浓度较低(< 2 mol/L)的隐球菌患者,外周血 IL-17A 和 IL-17F 水平也较高(P 值分别为 0.013 和 0.047);脑脊液隐球菌抗原滴度较高者($\geq 1 024$)的隐球菌患者,外周血 IL-22 水平明显增高($P = 0.000$);颅内压增高(≥ 250 mm Hg)的隐球菌患者,外周血 IL-17A 和 IL-22 水平也显著增高(P 值分别为 0.013 和 0.028)。见表 1。

表 1 比较不同隐脑患者外周血相关细胞因子水平 (pg/mL)

项目	n	IL-17A	IL-17F	IL-22
脑脊液蛋白				
<1 mg/mL	10	35.30±10.41	97.70±40.93	114.10±45.46
≥1 mg/mL	12	54.75±18.49	144.25±60.08	152.92±41.93
P		0.009	0.069	0.036
脑脊液葡萄糖				
<2 mol/L	11	55.00±18.95	145.82±60.94	146.54±48.93
≥2 mol/L	11	36.82±11.79	100.36±42.55	124.00±44.06
P		0.013	0.047	0.217
脑脊液隐球菌抗原滴度				
<1 024	13	41.00±17.49	108.31±45.03	108.77±40.34
≥1 024	9	53.00±17.19	144.44±66.46	173.56±23.19
P		0.096	0.209	0.000
颅内压				
<250 mm Hg	11	36.00±10.21	107.00±50.46	111.91±49.04
≥250 mm Hg	11	55.82±18.97	139.18±59.54	158.64±31.77
P		0.013	0.332	0.028

3 讨 论

天然免疫和获得性免疫是机体清除真菌如新型隐球菌感染的主要手段,一方面可以通过炎症因子非特异性清除隐球菌,另一方面则通过合成相应的细胞因子促进 Th 细胞的分化。Th 细胞可分为 Th1、Th2、Treg 以及 Th17 细胞,传统的观念认为 Th17 细胞可以分泌 IL-17A、IL-17F 和 IL-22,虽然都是 Th17 细胞的效应因子,但其生物学功能不尽相同,其中 IL-17A 和 IL-17F 的主要作用在于募集中性粒细胞至感染部位,促进病原体的消灭^[9]。IL-22 则是参与黏膜反应的重要的细胞因子,可以诱导上皮细胞合成各种抗菌肽,促进病原体的消灭^[10]。隐脑患者上述三个细胞因子在外周血的浓度较健康个体显著增高,提示在隐球菌感染的过程中,可能伴随 Th17 细

胞功能的亢进,其通过分泌 IL-17A、IL-17F 和 IL-22 而促进隐球菌的清除。由此可见,在人体内,Th17 细胞可能是参与隐球菌感染与免疫的积极因素。

本研究发现,隐球菌性脑膜炎患者血浆 IL-17A 和 IL-22 水平较健康对照组显著增高,提示其参与了隐球菌性脑膜炎的发病机制。而两组 IL-17F 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$),同时,IL-17A 和 IL-22 与隐脑已知的预后因子颅内压、脑脊液隐球菌抗原滴度、脑脊液葡萄糖以及蛋白浓度相关,表明其还可能是隐脑潜在的病情分级指标。

以往的研究表明,隐脑患者就诊时颅内压增高、脑脊液中隐球菌抗原滴度增高、脑脊液葡萄糖浓度降低、脑脊液蛋白浓度增高预示脑膜炎患者预后较差^[11-12]。因此上述指标在一定程度上可以作为疾病严重程度划分的依据。此外,最新的研究指出,IL-17A 在新型隐球菌感染后机体的免疫反应中起着重要的作用,它可能通过调节白细胞的聚集、活化以及干扰素的分泌来参与机体的防御反应^[13-14]。而有研究指出 IL-22 主要由 CD4⁺ Th17 细胞分泌而表达于各种活化的 T 细胞亚型、NK 细胞以及 DC 细胞^[15],且在隐球菌感染的小鼠模型中发现 IL-22 对机体的抗隐球菌免疫反应起着重要的作用^[16]。基于上述研究,分别按照颅内压、脑脊液隐球菌抗原滴度、脑脊液葡萄糖以及蛋白浓度对隐脑患者进行了分组,并比较各组血浆 IL-17A、IL-17F 和 IL-22 浓度。结果发现,这些细胞因子特别 IL-17A 和 IL-22 在不同的组别间都或多或少存在差异。说明隐脑患者外周血 IL-17A 和 IL-22 水平与隐脑病情密切相关,可能是潜在的病情分级指标甚至是疾病预后因子。当然,该结论还需要大样本、前瞻性的临床试验进一步予以证实。

综上所述,本研究在临床水平证实了 Th17 细胞效应因子尤其是 IL-17A 和 IL-22 参与了隐脑的发病机制,且患者血浆 IL-17A 和 IL-22 可能是潜在的病情分级指标。

参考文献

[1] Bicanic T, Harrison TS. Cryptococcal meningitis[J]. Br Med Bull, 2004,72(1):99-118.
 [2] Buchanan KL, Doyle HA. Requirement for CD4(+) T lymphocytes in host resistance against cryptococcus neoformans in the central nervous system of immunized mice [J]. Infect Immun, 2000,68(2):456-462.
 [3] Ma LL, Spurrell JC, Wang JF, et al. CD8 T cell-mediated killing of Cryptococcus neoformans requires granulysin and is dependent on CD4 T cells and IL-15[J]. J Immunol, 2002,169(10):5787-5795.
 [4] Romani L. Immunity to fungal infections[J]. Nat Rev Immunol, 2004,4(1):1-23.

[5] Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults[J]. Blood, 2008,112(5):1557-1569.
 [6] Fouser LA, Wright JF, Dunussi-Joannopoulos, K, et al. Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity [J]. Immunol Rev, 2008,226(1):87-102.
 [7] Zhang Y, Wang F, Tompkins KC, et al. Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent Cryptococcus neoformans H99 [J]. Am J Pathol, 2009,175(6):2489-2500.
 [8] 《中国真菌学杂志》编辑委员会. 隐球菌感染诊治专家共识[J]. 中国真菌学杂志, 2010,5(2):65-68.
 [9] Chang SH, Dong CA. Novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses[J]. Cell Res, 2007,17(5):435-440.
 [10] De Luca A, Zelante T, D'Angelo C, et al. IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance [J]. Mucosal Immunol, 2010,3(4):361-373.
 [11] Satishchandra P, Mathew T, Gadre G, et al. Cryptococcal meningitis: clinical, diagnostic and therapeutic overviews[J]. Neurol India, 2007,55(3):226-232.
 [12] Diamond RD, Bennett JE. Prognostic factors in cryptococcal meningitis. A study in 111 cases[J]. Ann Intern Med, 1974,80(2):176-181.
 [13] Murdock BJ, Huffnagle GB, Olszewski MA, et al. Interleukin-17A enhances host defense against cryptococcal lung infection through effects mediated by leukocyte recruitment, activation, and gamma interferon production[J]. Infection and immunity, 2014,82(3):937-948.
 [14] Wozniak KL, Hardison SE, Kolls JK, et al. Role of IL-17A on resolution of pulmonary C. neoformans infection [J]. PLoS One, 2011,6(2):17204.
 [15] Colonna M. Interleukin-22-producing natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells in mucosal immunity[J]. Immunity, 2009,31(1):15-23.
 [16] Wozniak KL, Hole CR, Yano J, et al. Characterization of IL-22 and antimicrobial peptide production in mice protected against pulmonary Cryptococcus neoformans infection[J]. Microbiology, 2014,160(7):1440-1452.

(收稿日期:2015-04-08)



(上接第 2138 页)

and analysis of the clinical laboratory improvement amendment of 1988: compliance plans and enforcement policy[J]. Health Care Manage Rev, 2005,30(2):93-102.
 [6] 辛若雷,孙伟东,李佳,等.北京市 HIV 抗体检测室间比对发现问题分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2013,32(12):2693-2701.
 [7] 陈雅芬,林兆丰,姚海云,等. 2013 年全国辐射环境监测系统累积剂量(TLD 元件)盲样考核结果分析[J]. 中国辐射卫生, 2014,20

(2):134-136.
 [8] 张甜. 微生物实验室质控盲样考核鉴定分析[J]. 中国城乡企业卫生, 2013,20(5):94-96.
 [9] Shahangian S. Proficiency testing in laboratory medicine: uses and limitations[J]. Arch Pathol Lab Med, 1998,122(1):15-30.

(收稿日期:2015-05-10)