

IL-33 在隐球菌脑膜炎患者 外周血单个核中的表达及临床意义*

张蕾^{1a}, 刘挺挺^{1a}, 叶辛^{1b}, 陈孙孝², 邓安梅^{1a} (1. 第二军医大学长海医院 a. 实验诊断科;
b. 输血科, 上海 200433; 2. 第二军医大学长征医院皮肤科, 上海 200003)

摘要:目的 探讨 IL-33 在隐球菌脑膜炎患者中的表达。方法 纳入上海长海医院和长征医院 2008 年 5 月~2014 年 9 月隐球菌脑膜炎患者 28 例, 健康对照 30 例。分离外周血单个核细胞, 采用实时荧光定量 PCR 检测 IL-33 mRNA 表达量, ELISA 法检测血清中 IL-33 蛋白浓度; 同时采用流式细胞术检测外周血中 Th1/Th2 细胞亚群的百分比, 并分析其与血清中 IL-33 浓度的相关性。结果 隐球菌脑膜炎患者外周血单个核细胞及血清中 IL-33 水平明显增高 (2.1 ± 0.9 vs 1.0 ± 0.2 , $U=136.0$, $P<0.001$; 121.2 ± 59.2 vs 56.7 ± 19.7 , $U=141.0$, $P<0.001$); 外周血中 Th1 细胞比例降低 (4.1 ± 1.7 vs 5.9 ± 1.6 , $U=191.0$, $P<0.001$), Th2 细胞比例增高 (2.8 ± 0.9 vs 2.2 ± 0.8 , $U=288.0$, $P<0.05$); 进一步分析发现血清中 IL-33 浓度与 Th2 细胞百分比正相关, 差异具有统计学意义 ($R=0.69$, $P<0.001$)。结论 IL-33 可能参与了隐球菌脑膜炎的发病机制。

关键词: 隐球菌脑膜炎; 白细胞介素-33

中图分类号: R519.4; R392.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2016)02-029-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.02.009

Expression of IL-33 in Patients with Cryptococcal Meningitis and Its Clinical Significance

ZHANG Lei^{1a}, LIU Ting-Ting^{1a}, YE Xin^{1b}, CHEN Sun-xiao², DENG An-mei^{1a} (1a. Department of Laboratory Diagnosis; 1b. Department of Transfusion Medicine, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Dermatology, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

Abstract: **Objective** To explore the expression of IL-33 in patients with cryptococcal meningitis. **Methods** 28 patients with cryptococcal meningitis admitted to Shanghai Changhai and Changzheng Hospital and 30 healthy controls from May 2008 to September 2014 were enrolled. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated. IL-33 mRNA expression was determined by quantitative real-time PCR. Serum IL-33 level was determined by ELISA. The percentage of Th1 and Th2 cells was detected by flow cytometry, and their relation with serum IL-33 was analyzed. **Results** IL-33 mRNA and protein level were both increased in patients with cryptococcal meningitis (2.1 ± 0.9 vs 1.0 ± 0.2 , $U=136.0$, $P<0.001$; 121.2 ± 59.2 vs 56.7 ± 19.7 , $U=141.0$, $P<0.001$), compared to healthy controls. The percentage of Th1 cells (4.1 ± 1.7 vs 5.9 ± 1.6 , $U=191.0$, $P<0.001$) was decreased and Th2 cells (2.8 ± 0.9 vs 2.2 ± 0.8 , $U=288.0$, $P<0.05$) was increased, compared to healthy controls. Furthermore, serum IL-33 level was positively correlated with Th2 cells ($R=0.69$, $P<0.001$). **Conclusion** IL-33 may be involved in the pathogenesis of cryptococcal meningitis.

Keywords: cryptococcal meningitis; IL-33

新型隐球菌是一种广泛存在于自然环境中的条件致病性真菌, 主要侵犯免疫功能低下的人群, 如器官移植患者、艾滋病患者等^[1, 2]。当新型隐球菌侵犯中枢神经系统时, 会引起新生隐球菌脑膜炎。目前, 新型隐球菌病病死率较高, 现有的抗真菌药物副作用大, 临床疗效十分局限^[3]。因此, 深入研究新型隐球菌病患者的免疫调节机制, 为临床抗真菌药物的研发提供新的线索。

IL-33 是一类近年来新发现的 IL-1 家族成员,

研究表明, IL-33 在许多自身免疫性疾病和炎症性反应中有重要作用, 包括系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎和糖尿病等^[4~6]。IL-33 通过诱导 Th2 细胞、肥大细胞分泌细胞因子参与了细胞因子介导的免疫反应; 此外, IL-33 也可以作为一种促炎因子, 参与非 Th2 型急性和慢性炎症反应^[7]。但是 IL-33 在隐球菌病中的作用机制尚不明确。本研究旨在初步探索 IL-33 在隐球菌脑膜炎患者外周血单个核细胞及血清中的表达水平, 以期临床免

* 基金项目: 973 计划[2013(B531606)]; 国家自然科学基金(81471605, 81302579, 81300748, 81373282, 81202353, 81401358); 上海申康基金(CHDC22014014), 军队科研基金(BWS14J023), 长海医院 1255 学科建设计划(CH125530300), 南京军区医药卫生科研基金(12MA056)。

作者简介: 张蕾(1990-), 女, 在读研究生, 主要从事感染免疫研究。刘挺挺(1989-), 女, 在读研究生, 主要从事感染免疫研究, 为共同第一作者。

通讯作者: 陈孙孝, 男, E-mail: csx614@163.com。

疫干预治疗隐球菌病提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象 本研究纳入 2008 年 5 月~2014 年 9 月在上海长海医院和长征医院确诊的隐球菌脑膜炎患者 28 例(男性 13 例,女性 15 例),平均年龄 41 岁(41 ± 13.5 岁)。确诊标准为脑脊液墨汁染色或者真菌培养结果。纳入同期健康人群 30 例作为对照组(男性 10 例,女性 20 例),平均年龄 35 岁(35 ± 13 岁)。本研究经过第二军医大学长海医院和长征医院伦理委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 试剂和仪器 Ficoll 淋巴细胞分离液(美国 sigma 公司);RNeasy Mini 试剂盒(Qiagen 公司);反转录试剂盒(Takara 公司);ELISA 试剂盒(ebioscience 公司);Taqman PCR Mix, ABI prism 7500(ABI 公司);流式抗体,FACSCalibur(BD 公司)。

1.3 方法

1.3.1 外周血单个核细胞分离:所有研究对象采集外周静脉血,通过 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离获得外周血单个核细胞(PBMC)。

1.3.2 RNA 抽提和 cDNA 制备:使用 RNeasy Mini 试剂盒,参照说明书提取总 RNA。使用随机引物进行反转录扩增,获得 cDNA 模板。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 反应:所有反应均在 ABI7500 上进行。使用 SYBR Green 法检测 IL-33 mRNA,以 β -actin 为内参,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算相对表达量。

1.3.4 ELISA:参照试剂盒说明书,检测血清中 IL-33 的浓度。

1.3.5 流式细胞术:Th1 细胞标记为 $CD4^+IFN\gamma^+$ 细胞亚群,Th2 细胞标记为 $CD4^+IL4^+$ 细胞亚群。使用 PMA 和离子霉素/莫能霉素刺激 PBMC 后,使用 BD FACSCalibur 检测 Th1/Th2 细胞百分比。

1.4 统计学分析 所有统计分析均使用 Graph-Pad Prism 5.0 软件。差异性分析使用 Mann-Whitney U 检验,相关性分析使用 Spearman 检验,以 α 为 0.05 为检验水准。

2 结果

2.1 隐球菌脑膜炎患者 IL-33 表达水平 与健康对照组相比,隐球菌脑膜炎患者外周血单个核细胞中的 IL-33 mRNA(2.1 ± 0.9 vs 1.0 ± 0.2 , $U=136.0$, $P<0.001$)和血清中的 IL-33(121.2 ± 59.2 vs 56.7 ± 19.7 , $U=141.0$, $P<0.001$)表达水平均显著增高,差异具有统计学意义。

2.2 隐球菌脑膜炎患者外周血 Th1/Th2 细胞比

例变化 与健康对照组相比,隐球菌脑膜炎患者外周血 Th2 细胞比例增高(2.8 ± 0.9 vs 2.2 ± 0.8 , $U=288.0$, $P<0.05$),而 Th1 细胞比例降低(4.1 ± 1.7 vs 5.9 ± 1.6 , $U=191.0$, $P<0.001$),差异具有统计学意义。

2.3 隐球菌脑膜炎患者外周血 IL-33 与 Th2 相关性分析 分析发现,隐球菌脑膜炎患者血清 IL-33 表达水平与 Th2 细胞百分比呈正相关($R=0.69$, $P<0.001$),与 Th1 细胞百分比无相关性($R=0.03$, $P>0.05$)。

3 讨论 新型隐球菌是一种广泛存在的机会感染性真菌,其致病力因子包括包囊结构、黑色素等,主要通过呼吸道以孢子的形式进入人体。在免疫力低下的人群中,机体天然免疫和适应性免疫应答缺陷,不能有效及时地清除隐球菌而使其在体内扩散,最终形成隐球菌病^[8]。因此,深入研究隐球菌患者的免疫调节紊乱病理机制,将为隐球菌病的免疫干预治疗提供新的实验室依据。IL-33 是一种新发现的 IL1 家族细胞因子,可以与其配体 ST2 结合发挥生物学作用,包括诱导 IL-4 和 IL-13 等型细胞因子的表达;通过激活树突状细胞和促进 Th2 细胞分化从而增强 Th2 细胞介导的免疫反应,因此 IL-33 在炎症反应中有重要作用^[9]。在本研究中,我们发现隐球菌脑膜炎患者外周血单个核细胞及血清中 IL-33 的表达显著增高,提示 IL-33 可能参与了隐球菌病的发病机制。研究报道,新型隐球菌病中存在 Th1/Th2 细胞比例紊乱^[10]。在本研究中也证实,隐球菌脑膜炎患者中存在 Th2 细胞极化。进一步分析发现,血清中 IL-33 表达水平与 Th2 细胞比例正相关,这提示 IL-33 可能通过参与 Th1/Th2 介导的炎症反应,调节宿主对隐球菌感染后的免疫应答。

综上,本研究发现隐球菌脑膜炎患者外周血单个核细胞及血清中 IL-33 水平明显增高,并且与 Th2 细胞比例正相关,提示 IL-33 可能通过参与 Th 细胞极化过程,调节机体的抗真菌免疫反应,但是具体机制尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Gibson JF, Johnston SA. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis[J]. Fungal Genetics and Biology, 2015(78):76-86.
- [2] Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box[J]. Nature Reviews Microbiology, 2011,9(3):193-203.
- [3] 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]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(3): 16-17, 21.
- [4] Kuroiwa K, Arai T, Okazaki H, et al. Identification of human ST2 protein in the sera of patients with autoimmune diseases[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 284(5): 1104-1108.
- [5] Xu D, Jiang HR, Kewin P, et al. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2008, 105(31): 10913-10918.
- [6] Zdravkovic N, Shahin A, Arsenijevic N, et al. Regulatory T cells and ST2 signaling control diabetes induction with multiple low doses of streptozotocin[J]. Molecular Immunology, 2009, 47(1): 28-36.
- [7] Oboki K, Ohno T, Kajiwaru N, et al. IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases[J]. Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology, 2010, 59(2): 143-160.
- [8] Coelho C, Bocca AL, Casadevall A. The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*[J]. Annual Review of Pathology, 2014(9): 219-238.
- [9] Molofsky AB, Savage AK, Locksley RM. Interleukin-33 in tissue homeostasis, injury, and inflammation[J]. Immunity, 2015, 42(6): 1005-1019.
- [10] Jiang L, Lin N, Cheng Z, et al. The effect of the expression of virulence-associated DEAD-box RNA helicase mRNA on the imbalance of Th1-Th2 cytokines in the CSF of patients with *Cryptococcus neoformans* meningitis[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2011, 30(12): 1483-1487.

收稿日期: 2015-09-25

修回日期: 2015-11-17

(上接 28 页)

- Wang RH. The relationship between *Helicobacter pylori* infection and stomach cancer[J]. China Health Care & Nutrition, 2013(10): 127.
- [4] 姜静宜, 孙丽萍. 胃黏膜“血清学活检”与胃糜烂溃疡性疾病[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2015, 24(2): 140-142.
- Jiang JY, Sun LP. Serological gastric biopsy and gastric erosion ulcer diseases[J]. Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2015, 24(2): 140-142.
- [5] 赵 枰, 张秀琳, 吴俊渊, 等. 血清胃蛋白酶原检测对老年胃癌诊断价值的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(1): 104-106.
- Zhao P, Zhang XL, Wu JY, et al. Study on diagnostic value of serum pepsinogen levels in elderly patients with Gastric Cancer[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2010, 25(1): 104-106.
- [6] 黄道桂, 任传路, 虞红艳, 等. 血清 PG I, PG II, TK1, TSGF, CEA 与 CA724 联合检测在胃癌诊断中的应用价值[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(1): 101-104.
- Huang DG, Ren CL, Yu HY, et al. Application value of combined detection of PG I, PG II, TK1, TSGF, CEA and CA724 in diagnosis of gastric cancer[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(1): 101-104.
- [7] 张汉园, 蒋玉英, 王 斌. 测定血清胃蛋白酶原在幽门螺杆菌感染的各种胃疾病中的应用价值[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(6): 109-110.
- Zhang HY, Jiang YY, Wang B. Value of serum pepsinogen levels in various gastric diseases infected by *helicibactor pylori*[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2011, 26(6): 109-110.
- [8] Miki K, Ichinose M, Shimizu A, et al. Serum pepsinogens as a screening test of extensive chronic gastritis[J]. Gastroenterologica Japonica, 1987, 22(2): 133-141.
- [9] Oka H, Miki K. Medical application of pepsinogen RI A kit[J]. Rinsho Seijinbyo, 1989, 19(4): 531-537.
- [10] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices; Approved Guideline[S]. Wayne, PA, NCCLS EP5-A, 1999.
- [11] Warren JR, Marshall B, Normrre L, et al. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis[J]. Lancet, 1983(1): 1273-1275.
- [12] 张万岱, 胡伏莲, 萧树东, 等. 中国自然人群幽门螺杆菌感染的流行病学调查[J]. 现代消化及介入诊疗, 2010, 15(5): 265-270.
- Zhang WD, Hu FL, Xiao SD, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in China[J]. Modern Digestion & Intervention, 2010, 15(5): 265-270.
- [13] Choi HS, Lee SY, Kim JH, et al. Combining the serum pepsinogen level and *Helicobacter pylori* antibody test for predicting the histology of gastric neoplasm[J]. Journal of Digestive Diseases, 2014, 15(6): 293-298.
- [14] 赵素萍, 汪 欣, 蔡梅玉, 等. 胃蛋白酶原与幽门螺杆菌检测的相关性研究[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(22): 2868-2869.
- Zhao SP, Wang X, Cai MY, et al. A Study on the Relationship between Pepsinogen and *Helicobacter pylori* detection[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2012, 9(22): 2868-2869.
- [15] 张化涛, 张 磊, 段延安, 等. 幽门螺旋杆菌 IgG 抗体及现症感染条带(CIM)蛋白抗体联合检测在健康体检人群中的临床应用[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(7): 1076-1077.
- Zhang HT, Zhang L, Duan YA, et al. *Helicobacter pylori* IgG antibodies and present infection stripe (CIM) combined detection of antibody populations in the health checkup HP infection in clinical application is now[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2010, 14(7): 1076-1077.

收稿日期: 2015-09-15

修回日期: 2015-12-10