

隐球菌脑膜炎患者外周血 CD200 表达水平及其临床意义*

刘挺挺¹, 谷明莉¹, 张 蕾¹, 邓安梅¹, 陈孙孝² (1. 第二军医大学长海医院实验诊断科, 上海 200433;
2. 第二军医大学长征医院皮肤科, 上海 200003)

摘要:目的 分析隐球菌脑膜炎患者外周血 CD200 的表达水平及其与其他炎症因子水平的关系。方法 选取 2009 年 6 月~2013 年 11 月期间上海长海医院和长征医院收治的 25 例隐球菌脑膜炎患者为研究对象, 归为观察组, 同时选取同期来体检的 30 名健康成人作为对照组。收集受试者的外周抗凝血, 分离外周单个核细胞(PBMC), 采用反转录酶-聚合酶链锁反应(RT-PCR)方法检测 PBMC 中 CD200 的 mRNA 水平, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)方法检测其血浆 CD200 蛋白水平以及 TNF- α , IFN- γ 和 IL-17 的水平, 并采用 Pearson 相关分析探讨 CD200 与这些炎症因子的相关性。**结果** 观察组和对照组 PBMC 的 CD200mRNA 水平分别为 1.73 ± 0.51 和 1.69 ± 0.47 , 两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。观察组血浆 CD200 蛋白水平为 212.3 ± 70.5 pg/ml, 显著高于对照组的 90.5 ± 32.2 pg/ml, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。观察组血浆 TNF- α , IFN- γ 水平显著低于对照组, IL-17 水平显著高于对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。Pearson 相关分析结果提示血浆 CD200 水平与 IFN- γ 呈负相关($r = -0.635$, $P < 0.001$), 与 IL-17 水平呈正相关($r = 0.668$, $P < 0.001$)。**结论** 隐球菌脑膜炎患者血浆 CD200 水平显著升高, 其可能通过调节 IFN- γ 和 IL-17 等炎症因子水平来影响患者的免疫功能, 参与其发病, 提示 CD200 有望成为隐球菌脑病免疫治疗的一个新的靶点。

关键词: 隐球菌脑膜炎; CD200; 免疫调节

中图分类号: R519.4; R392.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2016)02-035-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.02.011

Expression Level and Clinical Significance of CD200 in Peripheral Blood for Patients with Cryptococcal Meningitis

LIU Ting-ting¹, GU Meng-li¹, ZHANG Lei¹, DENG An-mei¹, CHEN Sun-xiao²

(1. Laboratory Diagnostics Division, Changhai Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Dermatology, Changzheng Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

Abstract: **Objective** To analyze the expression of CD200 in peripheral blood for patients with cryptococcal meningitis, and the relationship between it and other inflammatory factor levels. **Methods** 25 patients with cryptococcal meningitis treating in Changhai Hospital and Changzheng Hospital from June 2009 to November 2013 were enrolled for the study as observation group. 57 healthy adults who received check-up in the same time were randomly selected as control group. Their peripheral blood were collected and separated for peripheral blood mononuclear cell (PBMC). Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the mRNA level of CD200 in PBMC. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to detect the protein level of CD200, IL-17, TNF- α and IFN- γ in plasma. Pearson correlation analysis was used to investigate the relationship between CD200 and these inflammatory factors. **Results** The mRNA level of CD200 in PBMC of observation group and control group were 1.73 ± 0.51 , 1.69 ± 0.47 respectively, and there was no significant difference between them ($P > 0.05$). The protein level of CD200 in plasma of observation group was 212.3 ± 70.5 pg/ml, which was significantly higher than 90.5 ± 32.2 pg/ml of control group ($P < 0.05$). The levels of TNF- α and IFN- γ in plasma of observation group were significantly lower than that of control group while the level of IL-17 was significantly higher than that of control group ($P < 0.05$). Result of Pearson correlation analysis showed that the protein level of CD200 in plasma negatively correlated with level of IFN- γ ($r = -0.635$, $P < 0.001$), and it positively correlated with level of IL-17 ($r =$

* 基金项目: 973 计划(2013CB531606), 国家自然科学基金(81471605, 81302579, 81300748, 81273282, 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: 刘挺挺(1989-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事感染免疫和自身免疫研究, Tel: 021-31162061, E-mail: ltt2109@163.com。

谷明莉(1983-), 女, 检验技师, 主要从事临床检验诊断工作, 共同第一作者。

通讯作者: 陈孙孝, 男, E-mail: csx614@163.com。

0.668, $P < 0.001$). **Conclusion** Patients with cryptococcal meningitis had a significant rise in the protein level of CD200 in plasma, which may influence patients' immune function and participate its onset by adjusting inflammatory factor levels such as IFN- γ and IL-17. So CD200 may become a new target of immunotherapy for cryptococcus meningitis.

Keywords: cryptococcal meningitis; CD200; immunoregulation

新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*, CN)是一种广泛存在于环境中的有荚膜的条件致病性真菌,容易感染免疫力低下人群,如特别是获得性免疫缺陷综合征(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)、长期应用免疫抑制剂或化疗药物的患者等,但也可累及免疫功能正常的人群^[1]。CN感染可引起致命性脑膜炎,治疗较为棘手,致死、致残率较高,现有的抗真菌药物如两性霉素B等副作用较大,且耐药性日趋严峻。T细胞介导的宿主的免疫反应在隐球菌感染中发挥关键作用^[2]。

CD200是一个高度保守的I型膜糖蛋白,在多种细胞中表达,如造血细胞中的髓细胞(中性粒细胞、巨噬细胞、树突细胞)、淋巴细胞(T、B细胞)和非造血系统细胞(神经细胞,心肌细胞,滋养层细胞)等^[3]。CD200蛋白的结构包括胞内段、跨膜段和胞外段,由于其细胞内段较短,缺乏细胞之间信号motif,故CD200主要通过受体CD200R结合来发挥其传递免疫调节信号作用^[4,5]。既往多个研究^[6,7]表明CD200在自身免疫性疾病、肿瘤以及病毒感染等多个相关疾病中表达异常,但目前CD200在隐球菌感染中的作用不清楚。本研究旨在探讨CD200在隐球菌脑膜炎外周血中的表达情况,初步分析CD200与IFN- γ , TNF- α , IL-17等炎症因子之间的关系,报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择自2009年6月~2013年11月在上海长海医院和上海长征医院治疗的21例隐球菌脑膜炎患者,纳入观察组,其中男性15例,女性6例,年龄22~54岁,平均年龄 40.8 ± 6.9 岁。所有患者的脑脊液墨汁涂片发现隐球菌或培养阳性,符合隐球菌脑膜炎的诊断标准。然后随机选取同期来上海长海医院体检的30例健康成人作为对照组,其中男性21例,女性9例,年龄20~53岁,平均年龄 38.9 ± 7.3 岁。两组的性别、年龄比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究通过上海长海医院和长征医院伦理委员会批准,所有患者均已签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器 Trizol试剂, Ficoll分离液,反转录试剂盒,实时荧光定量PCR,罗氏荧光定量PCR Lightcycler 480仪器。

1.3 方法

1.3.1 标本采集和PBMC分离:对上述21例隐

球菌脑膜炎患者和25例健康对照无菌采集2.5 ml EDTA-K₂抗凝血,进一步采用Ficoll分离液(Sigma-Aldrich公司)分离PBMC,同时收集血浆,保存于-70℃。

1.3.2 总RNA提取以及cDNA合成:利用Trizol试剂提取PBMC中的总RNA,紫外分光光度计检测 A_{260nm} 和 A_{280nm} ,计算RNA的浓度。进一步根据反转试剂盒(TakaRa公司)说明书合成cDNA。

1.3.3 实时荧光定量PCR:以cDNA为模板,设计CD200引物,以beta-actin为内参,利用SYBR green 荧光燃料,进行荧光定量聚合酶链反应(PCR),利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算CD200相对定量。

1.3.4 酶联免疫吸附试验(ELISA):利用ELISA方法检测隐球菌脑病患者以及健康对照血浆中CD200以及IFN- γ , TNF- α , IL-17的水平。

1.4 统计学分析 采用SPSS 19.0统计软件进行处理,定量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用t检验,采用Pearson相关分析外周血CD200水平与相关细胞因子之间的关系,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组PBMC中CD200 mRNA水平 见表1。结果表明,两组PBMC中CD200 mRNA水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 两组血浆CD200蛋白水平 见表1。结果表明,观察组患者血浆CD200水平显著高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 两组血浆各炎症因子水平比较 见表1。结果表明,观察组血浆TNF- α , IFN- γ 水平显著低于对照组,IL-17水平显著高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 血浆CD200蛋白水平与各炎症因子水平的相关性 Pearson分析结果表明,血浆CD200蛋白水平与IFN- γ 水平呈负相关($r = -0.635$, $P < 0.001$),与IL-17水平呈正相关($r = 0.668$, $P < 0.001$),与TNF- α 无明显相关性($r = -0.254$, $P = 0.072 > 0.05$)。

3 讨论 隐球菌脑膜炎好发于青壮年,预后差,死亡率较高,在免疫低下的患者中极易引起隐球菌脑膜炎,且在感染后三个月内平均死亡率很高,甚至高达65.2%^[8]。由于隐球菌病主要发生在免疫低

下人群,故深入了解隐球菌免疫感染机制,对于寻找新的治疗靶标、降低隐球菌病的发病率及死亡率

表1 两组 PBMC 中 CD200 mRNA 水平及血浆 CD200 蛋白及各炎性因子水平比较

项 目	观察组(<i>n</i> =21)	对照组(<i>n</i> =30)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
PBMC 中 CD200 mRNA	1.73±0.51	1.69±0.47	0.289	0.774
血浆中 CD200 蛋白(pg/ml)	212.3±70.5	90.5±32.2	8.328	<0.001
血浆 TNF-α(pg/ml)	1.40±0.13	1.62±0.45	2.172	0.035
血浆 IFN-γ(pg/ml)	36.20±15.31	60.23±19.56	4.706	<0.001
血浆 IL-17(pg/ml)	16.35±6.47	2.11±0.64	12.023	<0.001

具有重要意义。Voelz 等^[9]发现 Th1 激活状态在隐球菌感染中起关键作用,IL-2,IFN-γ 和 TNF-α 主要由 Th1 细胞分泌,能协助机体清除感染,其研究表明,隐球菌脑病患者的脑脊液以及外周血中 IFN-γ, TNF-α 水平降低,本研究结果与其类似,可能是由于在隐球菌感染急性期机体不能有效清除隐球菌,使得隐球菌被吞噬后难以得到有效清除,从而诱发隐球菌脑膜炎。Muller 等^[10]在对隐球菌感染的小鼠模型的研究中发现,Th-17 免疫应答以及其表达的 IL-17 这个促炎因子在隐球菌感染中起重要的作用。

CD200 属于免疫球蛋白超家族,是一种糖蛋白,广泛表达于人体各器官,参与调节免疫系统,维持免疫稳态。目前 CD200 相关的大量研究主要集中在肿瘤免疫、移植免疫、自身免疫性疾病、中枢神经性疾病以及病毒感染等,对这些疾病的发生、发展具有一定的作用^[6,7],在隐球菌病免疫机制中的研究甚少。本研究结果表明与健康成人相比,隐球菌脑膜炎患者 PBMC 中 CD200mRNA 水平无显著升高,而血浆 CD200 蛋白水平显著升高,其可能与 CD200 在免疫调节中的作用相关。有研究^[11]表明在病毒感染时 CD200 可以调节免疫的强度,保护宿主组织以防止过度的破坏,在 CD200-/-老鼠接种流感病毒会引起过度的炎症反应且肺实质严重损伤。Mukhopadhyay 等^[12]在对细菌性脑膜炎患者的研究结果显示,病原菌通过 TLRs 及 NLRs 来下调 CD200 表达,以进一步限制巨噬细胞的激活从而防止机体患上脑膜炎性败血症。Zhang 等^[13]研究结果表明隐球菌脑膜炎患者中外周血 TLR2 下调,故本研究 CD200 表达升高可能与 TLR2 调节有关。同时本研究结果表明隐球菌脑膜炎患者血浆 IL-17 水平升高、IFN-γ 水平降低,且血浆 CD200 水平与 IFN-γ 呈负相关,与 IL-17 呈正相关。由于 Th-1, Th-17 细胞因子的表达水平与吞噬隐球菌的强度以及抑制隐球菌增殖相关,故 CD200 可能通过影响 Th-1 与 Th-17 两条免

疫途径来发挥其免疫应答能力,影响隐球菌对宿主的致病程度^[14,15]。但隐球菌脑膜炎患者的标本较少,故需要进一步的研究来探讨 CD200 的具体作用机制。

综上所述,隐球菌脑膜炎患者血浆 CD200 水平显著升高,其可能通过调节 IL-17, IFN-γ 等细胞因子水平来影响患者的免疫功能,参与其发病,提示 CD200 有望成为隐球菌脑病免疫治疗的一个新靶点。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Zhang L, Chen MK, Shi L, et al. Increased expression of Micro RNA-31 in peripheral blood mononuclear cells from patients with cryptococcal meningitis[J]. J Mod Lab Med, 2014, 29(3): 16-17, 21.
- [3] Vecchiarelli A. Fungal capsular polysaccharide and T-cell suppression: the hidden nature of poor immunogenicity[J]. Crit Rev Immunol, 2007, 27(6): 547-557.
- [4] Wright GJ, Jones M, Puklavec MJ, et al. The unusual distribution of the neuronal/lymphoid cell-surface CD200 (OX2) glycoprotein is conserved in humans[J]. Immunology, 2001, 102(2): 173-179.
- [5] Dick AD, Broderick C, Forrester JV, et al. Distribution of OX2 antigen and OX2 receptor within retina[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(1): 170-176.
- [6] Wright GJ, Holly C, Mrlred FC, et al. Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200 [J]. J Immunol, 2003, 171(6): 3034-3046.
- [7] Li Y, Zhao LD, Tong LS, et al. Aberrant CD200/CD200R1 expression and function in systemic lupus erythematosus contributes to abnormal T-cell respon-

- siveness and dendritic cell activity[J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(3):R123.
- [7] Koning N, Swaab DF, Hoek RM, et al. Distribution of the immune inhibitory molecules CD200 and CD200R in the normal central nervous system and multiple sclerosis lesions suggests neuron-glia and glia-glia interactions[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2009, 68(2):159-167.
- [8] Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS[J]. *AIDS*, 2009, 23(4):525-530.
- [9] Voelz K, Lammas DA, May RC. Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by *Cryptococcus neoformans* [J]. *Infect Immun*, 2009, 77(8):3450-3457.
- [10] Uwe M, Werner S, Gabriele K, et al. IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans* [J]. *J Immunol*, 2007, 179(8):5367-5377.
- [11] Snelgrove RJ, Goulding J, Didierlaurent AM, et al. A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection[J]. *Nature Immunology*, 2008, 9(9):1074-1083.
- [12] Mukhopadhyay S, Plüddemann A, Hoe JC, et al. Immune inhibitory ligand cD200 induction by TLRs and NLRs limits macrophage activation to protect the host from meningococcal septicemia [J]. *Cell Host Microbe*, 2010, 8(3):236-247.
- [13] Zhang L, Liu T, Kong W, et al. Decreased TLR2 signal expression in peripheral blood mononuclear cell from patients with *Cryptococcal meningitis* [J]. *Microbiol Immunol*, 2015, 59(6):357-364.
- [14] Milam JE, Herring-Palmer AC, Pandrangi R, et al. Modulation of the pulmonary type 2 T-cell response to *Cryptococcus neoformans* by intratracheal delivery of a tumor necrosis factor alpha-expressing adenoviral vector [J]. *Infect Immun*, 2007, 75(10):4951-4958.
- [15] Kleinschek MA, Muller U, Brodie SJ, et al. IL-23 enhances the inflammatory cell response in *Cryptococcus neoformans* infection and induces a cytokine pattern distinct from IL-12 [J]. *J Immunol*, 2006, 176(2):1098-1106.

收稿日期:2015-10-25

修回日期:2015-11-05

(上接 34 页)

- Hu LT, He FL, Wang W, et al. Application of biological variation in the evaluation of patients' series results[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2011, 26(6):153-155.
- [3] 胡丽涛, 廖经忠, 王治国. 分析变异和个体内生物学变异与检验结果的关系[J]. *检验医学与临床*, 2015, 12(19):2887-2889.
- Hu LT, Liao JZ, Wang ZG. Relationship between analytical variation and individual biological variation with testing results [J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2015, 12(19):2887-2889.
- [4] Ockene IS, Chiriboga DE, Stanek EJ, et al. Seasonal variation in serum cholesterol levels; treatment implications and possible mechanisms [J]. *Arch Intern Med*, 2004, 164(8):863-870.
- [5] 曾洁, 赵海舰, 张传宝, 等. 19项临床生化检验项目的分析前变异和个体内生物学变异[J]. *中华检验医学杂志*, 2010, 33(8):776-781.
- Zeng J, Zhao HJ, Zhang CB, et al. Preanalytical and intraindividual biological variations of 19 biochemistry analytes[J]. *Chin J Lab Med*, 2010, 33(8):776-781.
- [6] 陈政君, 张晨, 宋斌斌, 等. 常规生化检验项目生物学变异的研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2012, 35(10):926-931.
- Chen ZJ, Zhang C, Song BB, et al. Biological variation in 32 clinical laboratory routine tests[J]. *Chin J Lab Med*, 2012, 35(10):926-931.
- [7] Shine B. Use of routine clinical laboratory data to define reference intervals[J]. *Ann Clin Biochem*, 2008, 45(Pt 5):467-475.
- [8] Mu R, Chen W, Pan B, et al. First definition of reference intervals of liver function tests in china: a large-population-based multi-center study about healthy adults[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9):e72916.
- [9] Letellier G, Desjarlais F. Study of seasonal variations for eighteen biochemical parameters over a four-year period[J]. *Clin Biochem*, 1982, 15(4):206-211.
- [10] Donahoo WT, Jensen DR, Shepard TY, et al. Seasonal variation in lipoprotein lipase and plasma lipids in physically active, normal weight humans[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(9):3065-3068.

收稿日期:2015-09-05

修回日期:2015-12-01