

MIF 在隐球菌脑膜炎患者 外周血单个核细胞中升高及临床意义*

胡红丽^{1a}, 杨静文^{1a}, 谷明莉^{1b}, 黄元兰², 张薇薇^{1b}, 刘云^{1b}, 李腾达^{1a}, 邓安梅^{1a}, 陈孙孝³

(1. 长海医院 a. 临床实验中心; b. 检验科, 上海 200433;

2. 解放军 455 医院, 上海 200052; 3. 长征医院, 上海 200003)

摘要:目的 检测巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)在隐球菌脑膜炎患者外周血单个核细胞(PBMCs)中的表达水平,进一步探讨其临床意义。方法 收集 2012 年 8 月~2015 年 11 月到上海长海医院确诊的 42 例新型隐球菌脑膜炎患者及同期体检的 42 例健康个体外周血,以密度梯度离心法分离 PBMCs,以 PCR 方法检测 PBMCs 中 MIF 的 mRNA 相对表达量,以 ELISA 法检测血浆中 MIF, IL-17, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ 和 IL-4 水平,两组间细胞因子表达的比较采用两独立样本 *t* 检验, MIF 与细胞因子间的关系以 Pearson 相关系数表示。结果 MIF 在实验组与对照组的蛋白表达水平为 34.17 \pm 7.88 ng/ml vs 10.89 \pm 2.76 ng/ml ($t=18.07$, $P<0.0001$); mRNA 相对表达量为 2.87 \pm 0.94 vs 1.95 \pm 0.89 ($t=4.606$, $P<0.0001$), 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。Pearson 相关性分析显示实验组 MIF 与 IL-1 β , IL-17 呈正相关 ($r=0.467$, 0.401 , $P<0.01$), 差异具有统计学意义。结论 MIF 可能通过影响 IL-1 β 和 IL-17 等细胞因子的分泌及功能参与了隐球菌脑膜炎的免疫调节过程,是该病潜在的靶位点和疾病监测指标。

关键词: 隐球菌脑膜炎; 巨噬细胞迁移抑制因子; 白介素-1 β ; 白介素-17

中图分类号: R519.4; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)01-016-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.01.005

Increased Expression of MIF in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Cryptococcal Meningitis and Its Clinical Significance

HU Hong-li^{1a}, YANG Jing-wen^{1a}, GU Ming-li^{1b}, HUANG Yuan-lan², ZHANG Wei-wei^{1b},
LIU Yun^{1b}, LI Teng-da^{1a}, DENG An-mei^{1a}, CHEN Sun-xiao³ (1a. *Clinical Experiment Center*;
1b. *Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital, Shanghai 200433, China*; 2. *No. 455*
Hospital of PLA, Shanghai 200052, China; 3. *Changzheng Hospital, Shanghai 200003, China*)

Abstract: **Objective** To test the expression of MIF in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with Cryptococcal Meningitis and further discuss its clinical significance. **Methods** Peripheral blood from 42 patients with Cryptococcal Meningitis diagnosed in Changhai Hospital, Shanghai and 42 healthy individuals examined at the same time was collected from August, 2012 to November, 2015. PBMCs were separated by density gradient centrifugation method, mRNA relative expression of MIF in PBMCs was measured by PCR, the level of MIF, IL-17, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ and IL-4 in plasma was tested by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The comparison for expression level of cytokines between the two groups was by two-independent samples *t* test. Pearson correlation coefficient was used to measure the relation between MIF and other cytokines. **Results** The protein levels of MIF in experimental and controlled groups were 34.17 \pm 7.88 ng/ml vs 10.89 \pm 2.76 ng/ml ($t=18.07$, $P<0.0001$), while relative expression of RNA was 2.87 \pm 0.94 vs 1.95 \pm 0.89 ($t=4.606$, $P<0.0001$), and there was statistical significance ($P<0.005$). Pearson correlation analysis showed that MIF was positively related with IL-1 β , IL-17 ($r=0.467$, 0.401 , $P<0.01$), with statistical difference. **Conclusion** MIF may involve in the immune regulation for Cryptococcal Meningitis by affecting the secretion and function of cytokines as IL-1 β , IL-17, and it was potential target and monitored biomarker for this disease.

Keywords: cryptococcal meningitis; MIF; IL-1 β ; IL-17

新型隐球菌是一种广泛存在于外界环境中的 机会性致病菌,好发于 HIV/AIDS 患者、器官移植

* 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: 胡红丽(1990-), 女, 硕士研究生, 主要从事感染免疫方面研究, E-mail: 247507238@qq.com。

杨静文(1991-), 女, 硕士研究生, 主要从事感染免疫方面研究, E-mail: 294346526@qq.com, 共同第一作者。

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

李腾达, 女, 硕士研究生, E-mail: tengdali@smmu.edu.cn, 共同通讯作者。

者等群体,全球隐球菌病患者近 950 000 例,年死亡约 625 000 人^[1]。其常以孢子形式进入呼吸道,肺泡巨噬细胞(alveolar macrophages, AMs)吞下隐球菌后可激活宿主免疫反应:固有免疫中,巨噬细胞分泌的细胞因子可激活 NKT 细胞分泌 IFN- γ ,诱导 IL-4 的合成,进而调节 Th1/Th2 免疫活性^[1];适应性免疫中,经典激活的巨噬细胞可促进 CD4+T 细胞向 Th1 分化,诱导其分泌 TNF- α , IFN- γ ,促进真菌胞内杀伤和清除,而旁路激活的巨噬细胞可诱导 Th2 型 IL-4 的分泌,加重真菌扩增和病情恶化^[2]。

巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF),分子量为 12.5kDa,表达于单核细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞等细胞中,具细胞因子、趋化因子等功能^[3]。当机体受到炎症刺激时,巨噬细胞分泌的 MIF 可诱导炎症性因子 TNF- α , IL-1 β , IFN- γ 释放,提高反应性氧(ROS)和一氧化氮(NO)产量,促进 Th1 细胞分化,增强细胞杀菌能力^[4]。研究表明 MIF 有利于宿主抵抗大肠埃希菌、肺炎克雷伯杆菌等细菌感染^[5],且与类风湿性关节炎(RA)^[3]、系统性红斑狼疮(SLE)^[6]、肺炎、囊性纤维化等的病理形成相关^[7]。但 MIF 在新型隐球菌脑膜炎中的作用机制尚不明确,本文基于此对 MIF 在隐球菌脑膜炎中的表达及其对疾病病理形成的影响进行初步研究,为后续深入研究及临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象 42 例实验组患者为 2012 年 8 月~2015 年 11 月于上海长海医院确诊的新型隐球菌脑膜炎患者,男性 14 例,女性 28 例,平均年龄 37.2 \pm 6.8 岁,诊断标准为脑脊液涂片染色可见棒状、圆球状及出芽现象的典型隐球菌形态,或经培养基培养阳性。42 例对照组为同期来长海医院体检的健康个体,男女比例为 1:2,平均年龄 37.9 \pm 7.8 岁。两组间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 试剂和仪器 ELISA 试剂盒(美国 Biolegend 公司),ficoll 400*(美国 sigma-aldrich 公司),一步法 PCR 试剂盒(Takara 公司),Trizol LS(美国 invitrogen 公司),PCR 仪(美国 thermo 公司),NanodropTM3300(美国 Thermo 公司),酶标仪(美国 Thermo 公司)。

1.3 方法

1.3.1 血浆的分离及 ELISA 法检测:将研究对象 2~3 ml 无菌外周血 3 000 r/min 离心 10 min,得

到的血浆进行 ELISA 检测,按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作,于酶标仪上对血浆中 MIF, IL-17, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-4 进行定量。

1.3.2 PBMCs 分离:将外周血用 PBS 稀释一倍,按照 Ficoll 稀释后外周血为 1:2 的比例,将稀释后标本沿管壁加到分离液上,400 \times g 离心 30 min,吸取白膜,加入约 4 倍体积的 PBS,250 \times g 离心 10 min,反复 2 次后即得到 PBMCs。将得到的 PBMCs 进行苔盼蓝染色计数。

1.3.3 反转录及实时荧光定量 PCR:按照每(5~10) \times 10⁶ 个细胞加入 0.75 ml Trizol LS 的比例进行 PBMCs 总 RNA 的抽提,依次加入氯仿、异丙醇、乙醇进行提取纯化,最后用 RNA-free 双蒸水溶解 RNA,56 $^{\circ}$ C 水浴 15 min 后进行 RNA 浓度及纯度测定。将提取到的 RNA 按照一步法 PCR 试剂盒操作说明进行 MIF 基因定量。

1.4 统计学分析 相关分子在两组间表达的比较采用两独立样本 *t* 检验,MIF 与其他分子的相关性以 Pearson 相关系数表示,检验水准 α 为 0.05。统计软件为 GraphPad Prism 6.0。

2 结果

2.1 实验组与对照组 MIF 的表达情况 MIF 在实验组与对照组血浆中的蛋白表达水平为 34.17 \pm 7.88 ng/ml vs 10.89 \pm 2.76 ng/ml,差异有统计学意义($t=18.07, P<0.000 1$);mRNA 相对表达量为 2.87 \pm 0.94 vs 1.95 \pm 0.89,差异有统计学意义($t=4.606, P<0.000 1$)。

2.2 实验组与对照组血浆中相关细胞因子表达的比较 见表 1。相比较于对照组,实验组 IL-1 β , IL-17 表达增高,IFN- γ 表达降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);TNF- α , IL-4 在两组间的表达差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 实验组与对照组相关细胞因子表达的比较($\bar{x}\pm s, \mu\text{g/ml}$)

项目	实验组	对照组	<i>t</i>	<i>P</i>
TNF- α	1.38 \pm 0.25	1.50 \pm 0.44	1.537	0.128 2
IL-1 β	283.96 \pm 47.18	11.38 \pm 3.65	37.33	<0.000 1
IL-17	15.86 \pm 5.48	2.08 \pm 0.59	16.20	<0.000 1
IFN- γ	38.96 \pm 12.97	59.62 \pm 18.49	5.928	<0.000 1
IL-4	2.18 \pm 0.47	2.12 \pm 0.63	0.494 7	0.622 1

2.3 实验组血浆中 MIF 与其他分子的相关性分析 见表 2。实验组 MIF 与 IL-1 β , IL-17 呈正相关,差异有统计学意义($r=0.467, 0.401, P<0.01$);与 TNF- α , IFN- γ , IL-4 不具相关性($P>0.05$)。

3 讨论 新型隐球菌是一种机会致病菌,当机体

表2 实验组 MIF 与其他分子的相关性分析

项 目	TNF- α	IL-1 β	IL-17	IFN- γ	IL-4
<i>r</i>	0.178	0.467	0.401	0.235	-0.127
<i>P</i>	>0.20	<0.002	<0.01	>0.10	>0.20

注: $r_{0.05/2,40} = 0.304$ 。

免疫力下降或 CD4+T 细胞等免疫缺陷时,可通过非溶解性外分泌形式从巨噬细胞逃逸,经单核细胞介导的特洛伊木马效应扩散到中枢神经系统,致隐球菌脑膜炎^[1,8]。针对隐球菌感染的固有免疫中,巨噬细胞扮演了重要角色;IFN- γ /信号传感器和 STAT1 途径激活的巨噬细胞能促进 Th1 分化及 TNF- α , IFN- γ 分泌,致病灶肉芽囊性组织形成和巨噬细胞 NOS2 酶上调,有利于病菌清除;旁路激活的巨噬细胞可致 Th2 型 IL-4 分泌,促进真菌胞内生长^[2]。适应性免疫中 T 细胞在抗隐球菌方面亦具重要性;研究表明隐球菌清除率与脑脊液中的 IFN- γ , TNF- α , CD4+T 数目呈正相关;Th17 型 IL-17 可促进疫苗介导的抗隐球菌免疫活动;CD8+T 细胞可通过 IFN- γ 限制隐球菌在巨噬细胞的增殖^[1]。

MIF 表达于巨噬细胞、T 细胞等免疫细胞,具有细胞因子、趋化因子、血管生成因子等功能,亦具有抗胞内氧化效应,可促进 TNF- α , IL-1 β 和 IFN- γ 分泌,促进白细胞迁移和募集到炎症感染部位^[9]。MIF 前体储存于胞内囊泡中,当有微生物产物、低氧等刺激时其会快速释放,对于调节系统炎症反应有重要作用^[3]。研究表明,RA 病人滑膜组织和滑膜液中增高的 MIF 与疾病活动性相关,且可通过 TNF 等诱导滑膜成纤维细胞增殖,扩大白细胞募集,促进炎症反应^[3];SLE 中,抗 MIF 治疗与病人下降的 TNF- α , IL-1 β 水平相关,与疾病易感性相关^[6];自身免疫性眼色素层炎(EAU)中 MIF 拮抗剂 ISO-1 可减少眼内炎症,抑制 Th1, Th17 的分化^[10];系统性硬化病(SSc)中,MIF 的缺失能导致 IL-6, TNF- α , IL-1 β 下降^[11];AIH 中升高的 MIF 可激活固有免疫和适应性免疫系统,促进 T 细胞向 Th1 分化,与疾病活动性相关^[12]。但值得注意的是 MIF 在隐球菌脑膜炎感染中的作用机制尚不明确,本研究显示 MIF 在隐球菌脑膜炎患者中表达增高,且与 IL-1 β , IL-17 呈正相关,表明其可能通过诱导 IL-1 β , IL-17 等细胞因子的分泌参与了隐球菌脑病的致病过程,但尚需对此作用现象的上游分子及具体免疫调控机制进行研究以明确其信号通路,为临床隐球菌脑膜炎的诊断和检测提供有效的靶位点和研究基础。

参考文献:

- [1] Rohatgi S, Pirofski LA. Host immunity to *Cryptococcus neoformans* [J]. *Future microbiology*, 2015, 10(4):565-581.
- [2] Leopold Wager CM, Hole CR, Wozniak KL, et al. STAT1 signaling within macrophages is required for antifungal activity against *Cryptococcus neoformans* [J]. *Infection and Immunity*, 2015, 83(12): 4513-4527.
- [3] Kim KW, Kim HR. Macrophage migration inhibitory factor: a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis [J]. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 2016, 31(4):634-642.
- [4] Lee JP, Foote A, Fan H, et al. Loss of autophagy enhances MIF/macrophage migration inhibitory factor release by macrophages [J]. *Autophagy*, 2016, 12(6): 907-916.
- [5] Roger T, Delaloye J, Chanson AL, et al. Macrophage migration inhibitory factor deficiency is associated with impaired killing of gram-negative bacteria by macrophages and increased susceptibility to *Klebsiella pneumoniae* sepsis [J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2013, 207(2):331-339.
- [6] Bucala R. MIF, MIF alleles, and prospects for therapeutic intervention in autoimmunity [J]. *Journal of Clinical Immunology*, 2013, 33(Suppl 1):S72-S78.
- [7] Adamali H, Armstrong ME, McLaughlin AM, et al. Macrophage migration inhibitory factor enzymatic activity, lung inflammation, and cystic fibrosis [J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2012, 186(2):162-169.
- [8] 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.
- [9] 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]. *J Mod Lab Med*, 2016, 31(5):38-41.
- [10] Asare Y, Schmitt M, Bernhagen J. The vascular biology of macrophage migration inhibitory factor (MIF). Expression and effects in inflammation, atherogenesis and angiogenesis [J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 2013, 109(3):391-398.
- [11] Yang H, Zheng S, Mao Y, et al. Modulating of ocular inflammation with macrophage migration inhibitory factor is associated with notch signalling in experimental autoimmune uveitis [J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2016, 183(2):280-293.
- [12] Jin J, Chou C, Lima M, et al. Systemic sclerosis is a complex disease associated mainly with immune regulatory and inflammatory genes [J]. *The Open Rheumatology Journal*, 2014, 8(1):29-42.
- [13] Assis DN, Leng L, Du X, et al. The role of macrophage migration inhibitory factor in autoimmune liver disease [J]. *Hepatology*, 2014, 59(2):580-591.

收稿日期:2016-10-02

修回日期:2016-11-19