

## CD36 在隐球菌脑膜炎患者外周血单个核细胞中表达升高及其临床意义\*

李腾达<sup>1</sup>, 黄元兰<sup>2</sup>, 龙曙萍<sup>1</sup>, 刘云<sup>1</sup>, 刘鹏<sup>1</sup>, 张薇薇<sup>1</sup>, 郭杰<sup>1</sup>, 谷明莉<sup>1</sup>, 邓安梅<sup>1</sup>

(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 CD36 在隐球菌脑膜炎患者外周血单个核细胞(PBMCs)中的表达水平及其临床意义。方法 以 2013 年 9 月~2017 年 2 月于上海长海医院和长征医院确诊的 36 例隐球菌脑膜炎患者外周血为实验组, 以同期体检的 36 例健康者外周血作为对照组, 采用密度梯度离心法进行 PBMCs 的分离, 以 qRT-PCR 法检测 PBMCs 中 CD36, TLR4 的相对 mRNA 表达水平, 以 ELISA 法检测血浆中 TNF- $\alpha$  等细胞因子的表达水平, 实验组与对照组检测值的比较采用两独立样本  $t$  检验, 对实验组 PBMCs 中 CD36 的 mRNA 相对表达水平与 TNF- $\alpha$  等细胞因子进行 Pearson 相关性分析。结果 实验组 PBMCs 中 CD36 的 mRNA 相对表达水平为  $2.01 \pm 0.63$ , 对照组为  $1.49 \pm 0.47$ , 两组比较差异具有统计学意义( $t=3.969$ ,  $P=0.0002$ )。Pearson 分析结果显示实验组 CD36 与血浆中 IFN- $\gamma$  蛋白表达水平呈正相关( $r=0.384$ ,  $P<0.05$ ), 与 TGF- $\beta$  呈负相关( $r=-0.487$ ,  $P<0.005$ )。结论 CD36 可能通过影响 IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  等因子的表达参与隐球菌脑膜炎的免疫病理过程, 是该病监测和治疗潜在的靶点。

**关键词:** 隐球菌脑膜炎; CD36; 干扰素- $\gamma$ ; 转化生长因子- $\beta$

中图分类号: R519.4; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2018)01-056-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.01.014

## High Expression of CD36 in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Cryptococcal Meningitis and Its Clinical Significance

LI Teng-da<sup>1</sup>, HUANG Yuan-lan<sup>2</sup>, LONG Shu-ping<sup>1</sup>, LIU Yun<sup>1</sup>, LIU Peng<sup>1</sup>, ZHANG Wei-wei<sup>1</sup>,

GUO Jie<sup>1</sup>, GU Ming-li<sup>1</sup>, DENG An-mei<sup>1</sup> (1. Changhai Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. No. 455 Hospital of PLA, Shanghai 200052, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the expression level of CD36 in peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) from patients with cryptococcal meningitis and its clinical significance. **Methods** The experimental group was the peripheral blood samples from 36 patients diagnosed as cryptococcal meningitis in Changhai Hospital and Changzheng Hospital in Shanghai from September 2013 to February 2017, while the control group was the peripheral blood samples from 36 health individuals examined at the same time. PBMCs were separated by density gradient centrifugation method, the relative mRNA expression of CD36, TLR4 in PBMCs was tested by qRT-PCR, the expression level of cytokines such as TNF- $\alpha$  in plasma was tested by ELISA, the comparison of the examined values of experimental and control groups performed by two independent samples'  $t$  test, Pearson correlation analysis was performed on the relative mRNA expression of CD36 in PBMCs and cytokines such as TNF- $\alpha$  in experimental group. **Results** The relative mRNA expression of CD36 in PBMCs of experimental group was  $2.01 \pm 0.63$ , the control was  $1.49 \pm 0.47$ , and there was statistical difference( $t=3.969$ ,  $P=0.0002$ ). Pearson analysis results showed that in experimental group CD36 was positively related with the protein expression level of IFN- $\gamma$  in plasma ( $r=0.384$ ,  $P<0.05$ ) and negatively related with TGF- $\beta$  ( $r=-0.487$ ,  $P<0.005$ ). **Conclusion** CD36 might involve in the immunopathology process of cryptococcal meningitis by influencing the expression of cytokines such as IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , and was the potential target for monitoring and treating this disease.

**Keywords:** cryptococcal meningitis; CD36; IFN- $\gamma$ ; TGF- $\beta$

新型隐球菌是一种广泛存在于土壤等外界环境中的机会性致病菌, 常经呼吸道侵入人体致机体肺部感染, 肺巨噬细胞在防止隐球菌进一步扩散,

吞噬消灭病菌方面起到了重要作用<sup>[1]</sup>。研究表明当肺巨噬细胞吞噬隐球菌后其分泌的细胞因子可诱导 CD4+T 细胞向 Th1/Th2 或 Th17 方向分

\* 基金项目: 973 计划(2013CB531606), 国家自然科学基金(81671556, 81601406, 81471605, 81501397, 31500721, 81501398, 81401358, 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, 在读硕士研究生, 主要从事感染免疫与自身免疫研究, E-mail: tengdali@smmu.edu.cn。

黄元兰(1983—), 女, 博士, 主要从事真菌感染与免疫机制研究, E-mail: huang\_yuanlan@163.com, 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。

化,如细菌感染后巨噬细胞分化为 M1 亚型,可诱导 CD4+T 细胞向 Th1 亚群分化及细胞因子 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  的分泌,而 M2 型巨噬细胞可致 Th2 型细胞因子 IL-4 等分泌<sup>[1,2]</sup>。CD36(cluster of differentiation 36)叫做血小板糖蛋白 4,是 B 族清道夫受体成员之一,表达于血小板、单核/巨噬细胞等细胞膜上<sup>[3]</sup>。研究表明表达于巨噬细胞表面的 CD36 抗原可能与 Toll 样受体 4(TLR4)相互作用,提高自身吞噬病菌能力,参与机体抵抗病菌的炎症级联反应;亦有研究表明巨噬细胞 CD36 与凋亡细胞识别后可激活机体抗炎反应,而这种抗炎反应可由 IL-10, TGF- $\beta$  等细胞因子介导,同时能被 TNF- $\alpha$  等免疫分子抑制<sup>[4]</sup>。在金黄色葡萄球菌感染小鼠肺部模型中 CD36 分子可能参与了机体免疫系统识别病原菌的过程<sup>[5]</sup>。然而 CD36 在隐球菌脑膜炎中的作用尚未明确,本课题通过检测隐球菌脑膜炎患者外周血单个核细胞(PBMCs)及血浆中 CD36 的表达情况,初步探究其临床意义,为该病的监测和治疗提供潜在靶点。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 以 2013 年 9 月~2017 年 2 月于上海长海医院和长征医院确诊的 36 例隐球菌脑膜炎患者外周血为实验组,以同期体检的 36 例健康者外周血作为对照组。实验组患者男性 12 例,女性 24 例,平均年龄为  $38.1 \pm 5.9$  岁,诊断标准为脑脊液涂片镜下检测阳性或培养阳性;对照组男性 13 例,女性 23 例,平均年龄为  $38.6 \pm 6.3$  岁,两组间的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(Arigo 公司), Ficoll 400 \* (sigma-aldrich 公司);RNA 抽提试剂盒(ThermoFisher 公司);PCR 试剂盒(Takara 公司);PCR 仪,酶标仪(ThermoFisher 公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 血浆分离及细胞因子的 ELISA 检测:取 2~3 ml 受试对象抗凝血进行 3 000 r/min,离心 10 min 离心,得到血浆。对血浆中 TNF- $\alpha$  等细胞因子进行 ELISA 法蛋白定量,操作过程参见 ELISA 检测试剂盒。

1.3.2 PBMCs 分离:将外周血稀释 1 倍,取体积为稀释后外周血一半的 Ficoll 试剂加入离心管,将血标本沿着离心管管壁缓慢加入到 Ficoll 试剂管中,400 g 离心 30 min 后去除上清,吸取中间白膜至新的离心管中并用 PBS 稀释进行 3 次重复离心,离心条件为 250 g,10 min,得到 PBMCs。

1.3.3 RNA 抽提及实时荧光定量 PCR:RNA 抽

提及 PCR 检测前样本制备按照相应试剂盒操作说明进行,制好的样本于 PCR 仪上进行检测。实验内参基因为  $\beta$ -actin,检测体系为 10  $\mu$ l, mRNA 相对表达量 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.4 统计学分析 实验组与对照组检测值的比较采用两独立样本  $t$  检验,两变量之间的相关性以 Pearson 相关系数表示, $\alpha = 0.05$ 。统计学处理软件为 GraphPad Prism 6.0。

## 2 结果

2.1 实验组与对照组 PBMCs 中 CD36 的 mRNA 相对表达水平 qRT-PCR 结果显示,实验组 PBMCs 中 CD36 的 mRNA 相对表达水平为  $2.01 \pm 0.63$ ,对照组为  $1.49 \pm 0.47$ ,差异具有统计学意义( $t = 3.969$ ,  $P = 0.0002$ )。

2.2 实验组与对照组相关免疫分子的测定 qRT-PCR 检测实验组与对照组 PBMCs 中 TLR4 的相对 mRNAs 水平为  $0.56 \pm 0.14$  vs  $1.05 \pm 0.27$ ,与对照组比较,实验组 TLR4 表达水平降低,差异具有统计学意义( $t = 9.667$ ,  $P < 0.0001$ )。进一步检测血浆中 TNF- $\alpha$  等细胞因子的蛋白表达水平,结果对照组比较,IL-10, TGF- $\beta$  在实验组表达增高,IFN- $\gamma$  在实验组表达降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 实验组与对照组细胞因子表达情况 ( $\bar{x} \pm s$ , pg/ml)

项 目	实验组	对照组	$t$	$P$
TNF- $\alpha$	$1.78 \pm 0.53$	$1.69 \pm 0.49$	0.748 1	0.456 9
IFN- $\gamma$	$35.89 \pm 10.56$	$61.83 \pm 16.23$	8.038	$< 0.0001$
IL-4	$1.96 \pm 0.68$	$1.89 \pm 0.71$	0.427 2	0.670 5
IL-10	$4.87 \pm 1.32$	$1.53 \pm 0.45$	14.37	$< 0.0001$
TGF- $\beta$	$116.78 \pm 34.89$	$40.18 \pm 11.76$	12.48	$< 0.0001$

2.3 实验组 CD36 与 TNF- $\alpha$  等免疫分子的相关性分析 见表 2。将实验组 PBMCs 中 CD36 的 mRNA 表达量与 TNF- $\alpha$  等免疫分子进行相关性分析,结果显示 CD36 与 IFN- $\gamma$  呈正相关,与 TGF- $\beta$  呈负相关,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );与其他分子的表达不具有相关性。

表 2 实验组 CD36 与 TNF- $\alpha$  等免疫分子的相关性分析

相关因子	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	IL-4	IL-10	TGF- $\beta$	TLR4
$r$	0.311	0.384	0.231	-0.323	-0.487	0.309
$P$	$> 0.05$	$< 0.05$	$> 0.05$	$> 0.05$	$< 0.005$	$> 0.05$

注:  $r_{34,0.05/2} = 0.329$ ,  $r_{34,0.01/2} = 0.424$ ,  $r_{34,0.005/2} = 0.458$ 。

3 讨论 新型隐球菌是一种机会致病菌,毒力因子如胞壁黑色素、多糖荚膜等可保护其抵抗外界环境压力<sup>[1]</sup>。隐球菌病好发于艾滋病(AIDS)及淋巴瘤患者、器官移植者等群体,病菌常经肺部侵入人体,当机体免疫功能不全时可经特洛伊木马现象侵

犯中枢神经系统致隐球菌脑膜炎<sup>[6]</sup>。在机体抵抗隐球菌感染的过程中,定居于肺部的巨噬细胞起到了重要作用,其可吞噬隐球菌避免其从肺部扩散形成隐球菌脑膜炎,但当机体由于服用免疫抑制类药物等原因而导致机体免疫力下降或免疫功能不全时,隐球菌会从肺部扩散导致病情恶化<sup>[1,2]</sup>。对隐球菌感染机体的机制研究表明,经 STAT1 途径激活的 M1 型巨噬血细胞能促进机体 Th1 样反应和细胞因子 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  的分泌,有利于机体产生 NO 以杀伤病菌,而 M2 巨噬细胞可诱导 CD4+T 细胞向 Th2 细胞分化及 IL-4 等因子的分泌<sup>[1,2]</sup>。

CD36 是一种细胞膜糖蛋白,表达于血小板、单核/巨噬细胞、内皮细胞、平滑肌等细胞表面<sup>[3]</sup>。研究表明巨噬细胞的 CD36 参与了机体对自身衰老细胞、凋亡细胞等“自我成分”以及病原体等“异己”成分的清除,在血管再生、动脉粥样硬化、恶性疟原虫感染等疾病中起到了重要作用<sup>[3,7]</sup>。在炎症反应中,巨噬细胞 CD36 的作用机制较为复杂,有专家认为其与 TLR 的相互作用可提高巨噬细胞吞噬病原菌的能力,进一步激活机体炎症级联反应,亦有研究表明巨噬细胞 CD36 与凋亡细胞的识别过程不能激活机体的促炎反应,反而能激活抗炎反应过程,而这个过程可以被 IL-10, TGF- $\beta$  等细胞因子介导,同时能被 TNF- $\alpha$  等免疫分子抑制<sup>[4]</sup>。在动脉粥样硬化病理形成过程中,巨噬细胞 CD36 分子可损伤溶酶体,激活 NLRP3 炎症小体,促进疾病进展<sup>[7]</sup>;氧化低密度脂蛋白(oxLDL)可诱导血小板激活因子受体(PAFR)和 CD36 发生相同的磷脂转换,这对于 oxLDL 的摄取及 IL-10 的分泌十分重要<sup>[8]</sup>;而金黄色葡萄球菌感染小鼠肺部模型显示,CD36 参与了机体对病原菌的识别过程<sup>[5]</sup>。本课题发现隐球菌脑膜炎患者 PBMCs 中 CD36 的 mRNA 相对表达水平增高,且与 IFN- $\gamma$  呈正相关,与 TGF- $\beta$  呈负相关,证明其可能通过影响 IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  等因子的表达参与了该病的免疫病理过

程,是该病监测和治疗潜在的靶点。但本实验尚需进一步对 CD36 的免疫机制进行深入研究,并扩大样本量进行反复验证,以明确其具体作用机制,应用于临床检测。

#### 参考文献:

- [1] Williamson PR, Jarvis JN, Panackal AA, et al. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy[J]. *Nature Reviews Neurology*, 2017, 13(1):13-24.
- [2] Rohatgi S, Pirofski LA. Host immunity to *Cryptococcus neoformans* [J]. *Future Microbiology*, 2015, 10(4):565-581.
- [3] Abumrad NA, Goldberg IJ. CD36 actions in the heart: Lipids, calcium, inflammation, repair and more? [J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 2016, 1861(10):1442-1449.
- [4] Ren Y. Peroxisome proliferator-activator receptor gamma: A link between macrophage CD36 and inflammation in malaria infection[J]. *PPAR Research*, 2012, 2012(9):640769.
- [5] Blanchet C, Jouvion G, Fitting C, et al. Protective or deleterious role of scavenger receptors SR-A and CD36 on host resistance to *Staphylococcus aureus* depends on the site of infection[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e87927.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Gowda NM, Wu X, Kumar S, et al. CD36 contributes to malaria parasite-induced pro-inflammatory cytokine production and NK and T cell activation by dendritic cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10):e77604.
- [9] Rios FJ, Ferracini M, Pecenin M, et al. Uptake of ox-LDL and IL-10 production by macrophages requires PAFR and CD36 recruitment into the same lipid rafts [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10):e76893.

收稿日期:2017-06-20

修回日期:2017-11-25

(上接 55 页)2017,13(6):5009-5015.

- [9] Li M, Li BY, Xia H, et al. Expression of microRNA-142-3p in cervical cancer and its correlation with prognosis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(10):2346-2350.
- [10] Zou D, Zhou Q, Wang D, et al. The downregulation of microRNA-10b and its role in cervical cancer[J]. *Oncol Res*, 2016, 24(2):99-108.
- [11] Wang N, Chen P, Huang LP, et al. Prognostic significance of microRNA-10b overexpression in breast cancer: a meta-analysis[J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(2):7350-7359.
- [12] Parrella P, Barbano R, Pasculli B, et al. Evaluation of microRNA-10b prognostic significance in a prospec-

tive cohort of breast cancer patients[J]. *Mol Cancer*, 2014, 13(1):142.

- [13] Saldanha G, Elshaw S, Sachs P, et al. MicroRNA-10b is a prognostic biomarker for melanoma [J]. *Mod Pathol*, 2016, 29(2):112-121.
- [14] Eissa S, Matboli M, Shehata HH, et al. MicroRNA-10b and minichromosome maintenance complex component 5 gene as prognostic biomarkers in breast cancer[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(6):4487-4494.
- [15] Chen WJ, Cai FF, Zhang B, et al. The level of circulating miRNA-10b and miRNA-373 in detecting lymph node metastasis of breast cancer: potential biomarkers[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(1):455-462.

收稿日期:2017-08-31

修回日期:2017-09-29