

# 隐球菌脑膜炎患者外周血单个核细胞 PILR $\alpha$ 升高及意义\*

李腾达<sup>1</sup>, 刘 鹏<sup>1</sup>, 龙曙萍<sup>1</sup>, 刘 云<sup>1</sup>, 黄元兰<sup>2</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Ⅱ型成对免疫球蛋白样受体(paired immunoglobulin-like type 2 receptor  $\alpha$ , PILR $\alpha$ )在隐球菌脑膜炎患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中的表达情况,初步讨论其临床意义。方法 收集2014年5月~2016年11月到长海医院就诊的30例隐球菌脑膜炎患者外周血作为实验组,诊断标准为脑脊液染色新生隐球菌阳性或培养阳性,同期体检的30例健康人外周血作为对照组。以密度梯度离心法获得标本PBMCs,以PCR检测PBMCs中PILR $\alpha$ 的基因表达情况,以ELISA法检测血浆中PILR $\alpha$ 及相关细胞因子的表达情况。以独立样本 $t$ 检验进行两组间变量的比较,以Pearson相关系数表示两变量间的相关性。结果 实验组与对照组PBMCs中PILR $\alpha$ 相对mRNA水平为 $2.49 \pm 0.74$  vs  $1.77 \pm 0.69$  ( $t=3.898$ ,  $P=0.0003$ ),血浆中PILR $\alpha$ 的蛋白表达水平为 $33.81 \pm 10.21$  ng/ml vs  $20.01 \pm 6.74$  ng/ml,差异均具有统计学意义( $t=6.178$ ,  $P<0.0001$ )。实验组血浆中PILR $\alpha$ 的蛋白表达量与IL-1, IL-6和IFN- $\gamma$ 呈正比( $r=0.456, 0.521, 0.467$ ,  $P<0.05$ ),差异具有统计学意义。结论 PILR $\alpha$ 可能参与了隐球菌脑膜炎的免疫炎症过程,是该病潜在的监测标志物和治疗靶点。

**关键词:**隐球菌脑膜炎;Ⅱ型成对免疫球蛋白样受体;白介素-1;白介素-6;干扰素- $\gamma$

**中图分类号:**R519.4;R392.11 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2018)03-011-03

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2018.03.004

## Increasing Expression of PILR $\alpha$ in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Cryptococcal Meningitis and Its Significance

LI Teng-da<sup>1</sup>, LIU Peng<sup>1</sup>, LONG Shu-ping<sup>1</sup>, LIU Yun<sup>1</sup>, HUANG Yuan-lan<sup>2</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 of paired immunoglobulin-like type 2 receptor  $\alpha$  (PILR $\alpha$ ) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with cryptococcal meningitis, primarily discussed its significance. **Methods** Peripheral blood samples from 30 patients receiving a diagnosis of cryptococcal meningitis in Changhai Hospital from May 2014 to November 2016 was regarded as the experimental subjects, and the diagnosis standardization was that the cerebrospinal fluid dyeing was positive or the culturing was positive, while the specimens from 30 health individuals examined at the same time were classified as the control. PBMCs was separated by density gradient centrifugation, PCR was used to test the level of PILR $\alpha$  in PBMCs, the expression of PILR $\alpha$  and the related cytokines in plasma was examined by ELISA. Two independent samples'  $t$  test was used to compare the varies between the two groups. Pearson correlation coefficient was to show the correlation for the two measurement data. **Results** The relative mRNA expression levels of PILR $\alpha$  in PBMCs in experimental and control groups were  $2.49 \pm 0.74$  vs  $1.77 \pm 0.69$  ( $t=3.898$ ,  $P=0.0003$ ), and the protein expression level of PILR $\alpha$  in plasma was  $33.81 \pm 10.21$  ng/ml vs  $20.01 \pm 6.74$  ng/ml ( $t=6.178$ ,  $P<0.0001$ ), both with statistical significance. In experimental group, the protein expression of PILR $\alpha$  in plasma was positively related with IL-1, IL-6 and IFN- $\gamma$ , and there was statistical significance ( $r=0.456, 0.521, 0.467$ ,  $P<0.05$ ). **Conclusion** PILR $\alpha$  may participate in the immune-inflammatory process in cryptococcal meningitis, and can be the potential biomarker for disease surveillance and the therapeutic target.

**Keywords:** cryptococcal meningitis; PILR $\alpha$ ; IL-1; IL-6; IFN- $\gamma$

新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)是一种机会性致病真菌,常经下呼吸道入侵机体,当机体由于肿瘤治疗、移植、人类免疫缺陷病毒感染等而致免疫力低下时,隐球菌可从肺部入侵血液,经

\* 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,主要从事自身免疫研究,E-mail:tengdali@smmu.edu.cn。

刘 鹏(1982-),女,在读博士研究生,主要从事自身免疫研究,E-mail:ppliu23@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。

血脑屏障到达脑部形成隐球菌脑病,威胁患者生命<sup>[1]</sup>。在隐球菌病中固有免疫巨噬细胞 M1 亚型在抵抗真菌感染中起到了重要作用,其主要产生 IL-1, IL-6 和 TNF- $\alpha$  等细胞因子,可促进机体的 Th1 细胞分化及 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  等细胞因子的产生<sup>[1~4]</sup>。NK 细胞作为一种重要的固有免疫淋巴细胞,在隐球菌病中亦发挥了重要作用,可通过穿孔素介导的细胞毒作用杀伤隐球菌,该作用能够被 IL-12 促进<sup>[5,6]</sup>。

II 型成对免疫球蛋白样受体 (paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha, PILR $\alpha$ ) 是一种免疫抑制受体,表达于粒细胞、单核细胞、巨噬细胞等细胞上<sup>[7,8]</sup>。该蛋白包含两种能够激活髓细胞抑制作用的免疫酪氨酸受体抑制性基序 (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM), 可识别单纯疱疹病毒 1 等配体<sup>[7,8]</sup>。研究表明 PILR $\alpha$  与 NK 细胞结合可提高其 IFN- $\gamma$  产量与细胞毒性,有利于实现 NK 细胞功能<sup>[8]</sup>, 亦有 cDNA 微阵列分析显示 PILR $\alpha$  可作为巨噬细胞 I 亚型 (M1) 的新型标志分子<sup>[9]</sup>, 意味着 PILR $\alpha$  可能参与了 M1 细胞相关的免疫炎症作用。而 M1, NK 细胞等固有免疫细胞在隐球菌病中发挥了重要作用。基于此,本文对 PILR $\alpha$  在新型隐球菌脑病中表达情况进行研究,初步探讨其作用机制,进而为隐球菌脑病的诊治提供新的治疗靶点。

## 1 材料和方法

1.1 研究对象 收集 2014 年 5 月~2016 年 11 月于长海医院诊断为隐球菌脑膜炎患者作为实验组,诊断标准为患者脑脊液新型隐球菌染色或培养阳性,患者平均年龄  $37.21 \pm 6.93$  岁,男性 11 例,女性 19 例。30 例同期体检的健康个体为对照组,平均年龄  $38.12 \pm 7.08$  岁,男女比例为 2:3,两组间年龄、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 试剂与仪器 Ficoll (Sigma 公司), ELISA 试剂盒及抗体 (ThermoFisher 公司), PCR 试剂盒 (Taraka 公司), Trizol (Thermo 公司), 酶标仪 (Thermo 公司), PCR 仪 (ThermoFisher 公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 外周血血浆及 PBMCs 分离: 收集 2~3 ml 受试对象外周血装入抗凝管, 3 000 r/min 离心 10 min 分离得到血浆, 用于细胞因子检测, 待测血浆储存于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。将血细胞以 PBS 稀释后加入到 Ficoll 试剂进行密度梯度离心, 收集中间白膜层, 并以约 5 倍体积的 PBS 洗两次, 以 2 490 r/min 离心 10 min, 得到的沉淀即为 PBMCs, 将细胞置于冻

存盒中于  $-80^{\circ}\text{C}$  放置 2~3 天后, 转移到液氮长期保存。

1.3.2 反转录及 PCR 检测 PBMCs 中 PILR $\alpha$  的表达情况: 每  $10^6$  个细胞加入 1 ml Trizol 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, 最后用无 RNA 的双蒸水溶解 RNA, 于  $56^{\circ}\text{C}$ , 水浴 15 min, 浓度及纯度符合检测标准的 RNA 样本可用于 PCR 测定, 测定方法按照 PCR 试剂盒进行。

1.3.3 ELISA 法检测血浆细胞因子: 按照 ELISA 试剂盒操作说明对 PILR $\alpha$ , IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  等细胞因子进行检测定量。

1.4 统计学分析 以独立样本  $t$  检验进行两组间计量资料的比较, 采用 Pearson 相关性系数表示两变量间的关系, 检验水准为 0.05。分析软件为 Graph Prism 6.0。

## 2 结果

2.1 实验组与对照组 PILR $\alpha$  的表达情况 实验组与对照组 PBMCs 中 PILR $\alpha$  的 mRNA 相对表达量为  $2.49 \pm 0.74$  vs  $1.77 \pm 0.69$  ( $t = 3.898$ ,  $P = 0.0003$ ); 实验组与对照组血浆中 PILR $\alpha$  的蛋白表达量分别为  $33.81 \pm 10.21$  ng/ml vs  $20.01 \pm 6.74$  ng/ml ( $t = 6.178$ ,  $P < 0.0001$ ), 差异均具有统计学意义。

2.2 实验组与对照组相关免疫分子的表达 见表 1。与对照组比较, 实验组血浆中 IL-1, IL-6 蛋白表达水平增高, IFN- $\gamma$  表达降低, 差异具有统计学意义 ( $t = 17.74, 10.13, 4.720$ , 均  $P < 0.05$ ), TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-4 的蛋白表达水平在实验组与对照组不具有统计学差异 ( $t = 0.8585, 1.276, 0.2663$ , 均  $P > 0.05$ )。

表 1 实验组与对照组 Th1/Th2 细胞相关免疫分子表达的比较 ( $\bar{x} \pm s$ , pg/ml)

项 目	实验组	对照组	$t$	$P$
IL-1	$59.66 \pm 14.82$	$10.88 \pm 2.67$	17.74	$<0.0001$
IL-6	$269.34 \pm 75.56$	$119.27 \pm 29.64$	10.13	$<0.0001$
TNF- $\alpha$	$1.46 \pm 0.38$	$1.57 \pm 0.59$	0.8585	0.3941
IFN- $\gamma$	$40.05 \pm 16.98$	$61.43 \pm 18.09$	4.720	$<0.0001$
IL-12	$3.19 \pm 1.04$	$2.88 \pm 0.83$	1.276	0.2070
IL-4	$2.26 \pm 0.67$	$2.31 \pm 0.78$	0.2663	0.7909

2.3 实验组 PILR $\alpha$  与细胞因子 Pearson 相关性分析 实验组血浆中 PILR $\alpha$  的蛋白表达水平与相关细胞因子的相关性分析显示, PILR $\alpha$  与 IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$  呈正相关, 差异具有统计学意义 ( $r = 0.456, 0.521, 0.467$ , 均  $P < 0.05$ ), 与其他细胞因子不具有相关性 (TNF- $\alpha$ :  $r = 0.237$ ,  $P > 0.10$ ; IL-

12:  $r = 0.311$ ,  $P > 0.05$ ; IL-4:  $r = 0.256$ ,  $P > 0.10$ 。

3 讨论 新型隐球菌是一种普遍存在于外界环境中的条件致病真菌,其主要依赖于毒力因子多糖荚膜、胞壁黑色素等来抵抗外界射线、温度等压力<sup>[1,10]</sup>。当机体免疫功能缺陷时,其可通过细胞外分泌形式从肺部巨噬细胞逃逸,经特洛伊木马现象扩散到中枢神经形成感染病灶致隐球菌脑病<sup>[1,11]</sup>。目前隐球菌病主要发生于服用免疫抑制药物患者、免疫细胞功能缺陷病人、肿瘤、器官移植及肝病患者等<sup>[11]</sup>。在机体抵抗隐球菌的免疫过程中,人体第一道固有免疫屏障的肺泡巨噬细胞发挥了重要作用,M1型巨噬细胞可分泌IL-1,IL-6等因子,进而诱导机体产生Th1样反应及IFN- $\gamma$ 等细胞因子的分泌,同时M1可通过Th1反应促进真菌杀伤性NO的产生,杀死细胞内吞噬的真菌<sup>[1~4]</sup>。NK细胞亦是机体重要免疫细胞,其在隐球菌感染中亦发挥了重要作用,在试管实验中,NK细胞能抑制新型隐球菌的生长,而在小鼠模型中其可通过一系列细胞活动诱导病菌的免疫清除,在人体中NK细胞可通过穿孔素作用直接杀死新型隐球菌,以防止其进一步扩增及感染<sup>[5,6]</sup>。

PILR $\alpha$ 是一种转膜受体,由303个氨基酸组成,可识别O-糖基化黏蛋白受体例如PILR-相关的神经蛋白(PANP),神经元分化和增殖因子-1(NPDC1)和胶原凝素-12(COLEC-12),表达于髓细胞包括粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞等<sup>[7,8]</sup>。研究表明PILR $\alpha$ -Ig可结合于人类NK细胞自然细胞毒性受体(natural cytotoxicity receptors,NCR)NKp44,NKp46等,可通过促进细胞杀伤作用和提高IFN- $\gamma$ 产量来实现NK细胞功能<sup>[8]</sup>。cDNA微阵列芯片分析显示,PILR $\alpha$ 可作为M1的新型标志分子,意味着其可能参与了M1相关免疫活动<sup>[9]</sup>。在类风湿性关节炎滑膜组织中,PILR $\alpha$ 表达增高且与炎症细胞浸润程度相关<sup>[12]</sup>,证明PILR $\alpha$ 在炎症反应中起到了重要作用。综上所述M1与NK细胞在新型隐球菌病的免疫活动中的重要性,PILR $\alpha$ 与M1,NK细胞之间的关联性及其在炎症反应中的作用,本研究假设PILR $\alpha$ 在隐球菌感染免疫过程中可能亦发挥了重要作用。研究结果表明PILR $\alpha$ 在隐球菌脑膜炎患者外周血单个核细胞中表达升高,且与IL-1,IL-6,IFN- $\gamma$ 呈正相关,表明PILR $\alpha$ 可能参与了隐球菌病的免疫病理及炎症过程,是该病潜在的靶点。但值得注意的是,本研究样本量不足,尚需进一步扩大样本量,并进行深入的PILR $\alpha$ 机制性探索以明确其具体作用

机理。

#### 参考文献:

- [1] Panackal AA, Wuest SC, Lin YC, et al. Paradoxical immune responses in Non-HIV cryptococcal meningitis[J]. PLoS Pathogens, 2015, 11(5): e1004884.
- [2] Coelho C, Souza AC, Derengowski Lda S, et al. Macrophage mitochondrial and stress response to ingestion of *Cryptococcus neoformans*[J]. Journal of Immunology, 2015, 194(5): 2345-2357.
- [3] Ikeda-Dantsuji Y, Ohno H, Tanabe K, et al. Interferon- $\gamma$  promotes phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* but not *Cryptococcus gattii* by murine macrophages[J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2015, 21(12): 831-836.
- [4] 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.
- [5] Ogbomo H, Mody CH. Granule-dependent natural killer cell cytotoxicity to fungal pathogens[J]. Frontiers in Immunology, 2016(7): 692.
- [6] Kyei SK, Ogbomo H, Li S, et al. Mechanisms by which interleukin-12 corrects defective NK cell anticytotoxic activity in HIV-infected patients [J]. mBio, 2016, 237(4): doi10.1128/mBio.00878-16.
- [7] Kohyama M, Matsuoka S, Shida K, et al. Monocyte infiltration into obese and fibrilized tissues is regulated by PILR $\alpha$ [J]. European Journal of Immunology, 2016, 46(5): 1214-1223.
- [8] Ophir Y, Duev-Cohen A, Yamin R, et al. PILR $\alpha$  binds an unknown receptor expressed primarily on CD56 bright and decidual-NK cells and activates NK cell functions[J]. Oncotarget, 2016, 7(27): 40953-40964.
- [9] Bagheri M, Dong Y, Ono M. Molecular diversity of macrophages in allergic reaction: comparison between the allergenic modes; Th1- and -Th2-Derived immune conditions[J]. Iranian Journal of Allergy, Asthma, and Immunology, 2015, 14(3): 261-272.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] McQuiston TJ, Williamson PR. Paradoxical roles of alveolar macrophages in the host response to *Cryptococcus neoformans* [J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2012, 18(1): 1-9.
- [12] Sun Y, Caplazi P, Zhang J, et al. PILR $\alpha$  negatively regulates mouse inflammatory arthritis[J]. Journal of Immunology, 2014, 193(2): 860-870.

收稿日期: 2017-05-30

修回日期: 2017-06-12