

表面增强拉曼光谱技术检测隐球菌 脑膜炎患者血清中 CD93⁺ 外泌体及其意义*

李腾达¹, 刘 鹏¹, 龙曙萍¹, 刘 云¹, 黄元兰², 张薇薇¹, 郭 杰¹, 谷明莉¹, 邓安梅¹

(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 利用表面增强拉曼光谱技术(SERS)检测隐球菌脑膜炎患者血清中 CD93⁺ 外泌体,以优化该病的监测手段。**方法** 收集 2013 年 12 月~2017 年 3 月在上海长海医院和长征医院确诊的 38 例隐球菌脑膜炎患者的血清作为实验组,同期体检的 38 例健康者血清作为对照组。用 ELISA 法检测血清中的 IFN- γ , TNF- α 的蛋白表达水平;用超高速离心法分离血清外泌体;用磁珠连接抗体法捕获 CD93⁺ 外泌体并进行标记,于拉曼光谱仪下检测样本的 SERS 信号。实验组与对照组计量资料间的比较采用两独立样本的 *t* 检验,用 Origin75 软件对两连续变量进行线性拟合,两变量之间的相关性以 Pearson 系数表示。**结果** SERS 检测隐球菌脑膜炎患者血清中外泌体最低浓度为 5 500 个/ml,最低量为 110 个/ml, log(SERS 信号)与 log(外泌体浓度)进行线性拟合的 R 值为 0.995 96, $P < 0.0001$; SERS 检测实验组与对照组血清外泌体 CD93 的信号值取对数分别为 2.75 ± 0.59 vs 2.47 ± 0.15 , 差异具有统计学意义($t = 2.835$, $P = 0.0059$); SERS 检测实验组血清 CD93⁺ 外泌体得到的数据与 ELISA 法检测实验组血清中 IFN- γ , TNF- α 的结果呈正相关,差异有统计学意义($r = 0.389, 0.478$, $P < 0.05$)。**结论** 该方法可初步提高隐球菌脑膜炎患者血清标本检测的灵敏度,为该病监测提供新的技术思路。

关键词:表面增强拉曼光谱技术;隐球菌脑膜炎;外泌体;CD93

中图分类号:Q503;R519.4 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)04-004-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.04.002

Detection of Serum CD93⁺ Exosomes in Patients with Cryptococcal Meningitis by Surface-Enhanced Raman Scattering Technology and Its Significance

LI Teng-da¹, LIU Peng¹, LONG Shu-ping¹, LIU Yun¹, HUANG Yuan-lan², ZHANG Wei-wei¹,

GUO Jie¹, GU Ming-li¹, DENG An-mei¹ (1. *Changhai Hospital Affiliated to Second Military*

Medical University, Shanghai 200433, China; 2. No. 455 Hospital of PLA, Shanghai 200052, China)

Abstract: Objective To detect the serum CD93⁺ exosomes of patients with cryptococcal meningitis by Surface-enhanced Raman Scattering technology (SERS) in order to optimize the measures to monitor this disease. **Methods** The serum samples of 38 patients with cryptococcal meningitis diagnosed in Changhai Hospital and Changzheng Hospital were collected from December 2013 to March 2017. In the same period, the serum samples of 38 health subjects were collected as control group. The protein expression level of IFN- γ , TNF- α in serums were examined by ELISA method. The exosomes in serum were separated by the ultracentrifuge method. The CD93⁺ exosomes were captured by magnetic bead-connected antibodies. Under the Raman spectroscopy, the SERS signals of samples was acquired. The comparison of measure data between experimental and controlled groups was measured by two independent samples' *t* test, Origin 75 software was used to do the linear fitting for two continuous variables, and the relationship between the two variables was measured by Pearson coefficient. **Results** The lowest concentration of serous exosomes in patients with cryptococcal meningitis that could be tested by SERS was 5 500 particles/ml, the lowest counts were 110 particles/ml. The R value for linear fitting of log (SERS signal) and log (exosomes' concentration) was 0.995 96 ($P < 0.0001$). The log values of SERS signals tested for CD93 on serous exosomes in experimental and controlled groups were 2.75 ± 0.59 vs 2.47 ± 0.15 ($t = 2.835$, $P = 0.0059$), with statistical difference. The results from the CD93⁺ exosomes in serum samples of experiment group were positively related with the ELISA results of IFN- γ and TNF- α in serum samples of experiment group and there was statistical difference ($r = 0.389, 0.478$, $P < 0.05$).

* 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。

Conclusion This method can primarily improve the sensitivity of the detection of serum samples in patients with cryptococcal meningitis and may provide a new technological way to detect this disease.

Keywords: surface-enhanced raman scattering technology; cryptococcal meningitis; exosomes; CD93

新生隐球菌是一种普遍存在的机会性致病真菌,其常侵犯免疫力低下的人群如 HIV 感染者、肝癌患者等造成病人的肺部或脑膜感染^[1]。目前诊断隐球菌脑膜炎的方法中印度墨汁染色法在脑脊液真菌量小于 1 000 CFU/ml 时灵敏度显著下降,易漏诊早期病患;真菌培养至少需 1 周时间才能得到可靠结果,结果的主观影响因素较大;病理学方法是隐球菌脑膜炎的确诊性实验,但其取样困难,易与免疫缺陷造成的假性肉芽肿混淆^[1]。基于现有隐球菌脑膜炎的诊断状况,发展一种高灵敏度和相对特异度的检测手段,对于该病的早期诊断、提高病人术后预后有重要意义。

表面增强拉曼光谱技术(surface-enhanced raman scattering technology, SERS)是一种由于非规则检测表面等离子激活致电磁场变化而产生的增强拉曼信号技术,具有灵敏度高、检测限低等特点^[2]。随着外泌体等液态活检技术的兴起, SERS 亦被用于该领域的检测,研究表明 SERS 技术可动态观察 SKOV3 细胞系来源外泌体在干燥过程中内容物的变化^[3],亦可用于对结肠癌细胞系和健康细胞来源的外泌体进行定性和定量^[4],该类研究证明了 SERS 用于外泌体检测具有灵敏度高等优势。为进一步提高隐球菌脑膜炎检测的特异度,本实验结合前期对 CD93⁺ 外泌体在隐球菌脑膜炎血清中显著增高的研究发现,利用 SERS 技术对其进行高灵敏度检测,以优化隐球菌脑膜炎的疾病检测手段,辅助临床对该病的诊断。

1 材料和方法

1.1 研究对象 以 38 例 2013 年 12 月~2017 年 3 月在上海长海医院和长征医院确诊的隐球菌脑膜炎患者血清作为实验组,诊断标准为脑脊液染色新生隐球菌阳性或培养阳性,患者男性 14 例,女性 24 例,中位年龄为 39.7±6.3 岁。健康对照组为同期体检的 38 例血清标本,男女比例为 8:11,中位年龄为 40.1±6.7 岁,实验组与对照组年龄及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 试剂与仪器 抗体(美国 Abcam 公司), HAuCl₄·3H₂O 及对氨基硫苯酚(PATP)等(美国 Sigma-Aldrich 公司), SM3-P100 磁珠(Alrun Nano Science & Technology 公司), ELISA 试剂盒(Thermo 公司),超速离心机(HITACHI 公司),拉曼光谱仪(法国 Horiba Jobin Yvon 公司),纳米

颗粒追踪分析仪(英国 Malvern Company)。

1.3 方法

1.3.1 受试对象血清收集:将研究对象非抗凝血于采集后 1~2 h 内进行 2 500×g, 10 min 分离,或置于室温自然搁置形成血清,将形成的血清于一 80℃ 保存待用。

1.3.2 血清外泌体的分离:将患者血清经 0.2 μm 过滤器过滤,用 PBS 稀释到适合浓度后于 2 000×g,离心 20 min,收集上清,经 0.2 μm 过滤器过滤,于 120 000×g,离心 3 h,收集沉淀,用 PBS 重悬后重复离心后再次收集沉淀,以 PBS 重悬待测。

1.3.3 纳米追踪分析进行外泌体定量:将待检测的外泌体用 PBS 稀释到适宜浓度,经 0.22 μm 过滤器过滤,取 1 ml 进行外泌体定量,仪器相关参数:激光为 Blue 488,检测阈值为 3,温度为 22.9℃~23.1℃。实验重复五次,取均值计算小于 200 nm 的外泌体的浓度。

1.3.4 SERS 探针的合成及检测前样品制备:用传统的 Fren's 方法合成 16 nm 金纳米颗粒约 600 μl,在该体系中加入 100 μl Tris-HCl(50 mmol/L, pH8.5), 100 μl 50 μmol/L PATP 水溶液, 1 mg/dl BSA 溶液反应 30 min 后进行离心(6 000 r/min, 20 min)分离沉淀,用 PBS 重悬,加入抗体孵育 2 h 将抗体连接到材料上。每个血清标本分离得到的外泌体溶液取 20 μl,利用磁珠连接的抗体进行捕获,捕获得到的外泌体用以上相应抗体标记的材料进行标记及 SERS 信号检测。

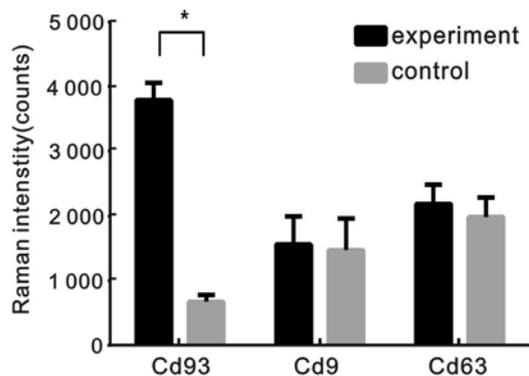
1.3.5 ELISA 试剂盒检测细胞因子:按照 ELISA 试剂盒操作说明检测血清中 TNF-α, IFN-γ 等因子的表达情况。

1.4 统计学分析 本研究中两连续计量资料的比较采用两独立样本 *t* 检验,两变量之间的相关性用 Pearson 系数表示,检验水准 α 为 0.05,线性拟合采用 Origin 软件进行,统计分析软件为 Graph Prism 6.0。

2 结果

2.1 两组间血清外泌体表面蛋白 SERS 检测信号的比较 首先在 10 例实验组与 10 例对照组血清外泌体中检测 CD93, CD9 及 CD63 等外泌体表面蛋白的 SERS 信号,结果显示以 CD93 为靶点的 SERS 信号在实验组与对照组血清外泌体中分别为 3 789.45±267.76 vs 676.98±107.76,差异具有统计学意义($t=34.10, P<0.0001$)。而 CD9 在实验组与对照组 SERS 信号强度分别为 1

563.78 ± 432.98 vs 1 478.09 ± 488.17 ($t=0.4153$, $P=0.6828$), CD63 分别为 2 193.53 ± 298.06 vs 1 987.93 ± 301.87 ($t=1.533$, $P=0.1428$), 差异均无统计学意义。见图 1。



(* $P<0.0001$)

图 1 两组间血清外泌体表面蛋白 SERS 检测信号的比较

2.2 SERS 检测实验组血清 CD93⁺ 外泌体的标准曲线 取三例实验组血清约 2 ml 进行外泌体分离,用 nanosight 对外泌体原始溶液浓度进行定量,调整其浓度均为 5.50×10^8 个/ml。以抗 CD93 抗体标记的纳米材料对实验组不同浓度的外泌体进行标记,并观测其 SERS 信号。将外泌体浓度与 SERS 信号强度分别取对数值后进行相关性分析,结果显示,随着外泌体浓度的增加,SERS 信号亦增加,线性拟合方程为 $Y=(1.3186 \pm 0.0501) + (0.2765 \pm 0.00788)X$,差异具有统计学意义($R=0.99596$, $P<0.0001$)。最低检测的外泌体浓度为 5 500 个/ml,本实验滴加的稀释液为 20 μ l,故其最低检测限的外泌体约为 110 个/ml,见图 2。

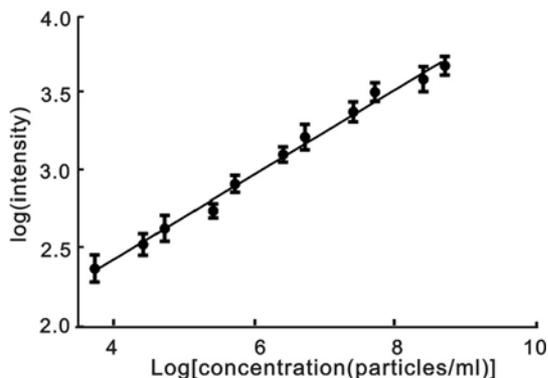


图 2 SERS 检测实验组血清 CD93⁺ 外泌体的标准曲线

2.3 实验组与对照组血清 CD93⁺ 外泌体的 log(SERS 信号) 利用该体系检测 38 例实验组与对照组血清 CD93⁺ 外泌体的 SERS 信号,并取对数值。实验组为 2.75 ± 0.59 ,对照组为 2.47 ± 0.15 ,

差异具有统计学意义($t=2.835$, $P=0.0059$)。

2.4 该检测方法与 ELISA 法的相关性分析 用传统 ELISA 法检测实验组血清中 IFN- γ 与 TNF- α 的结果分别为 209.54 ± 56.90 pg/ml, 468.98 ± 102.76 pg/ml。拉曼光谱仪检测实验组血清中纳米材料标记的 CD93⁺ 外泌体的 log(SERS 信号)值与 ELISA 检测得到的 IFN- γ , TNF- α 结果进行相关性分析,结果表明该检测方法得到的结果与 IFN- γ , TNF- α 的 ELISA 结果呈正相关,差异具有统计学意义($r=0.389$, 0.478 , $P<0.05$)。

3 讨论 新生隐球菌是一种广泛分布于外界环境的哺乳动物机会性致病菌,在人体免疫力低下时,其可侵入人体致病人颅脑感染,形成隐球菌脑膜炎^[5]。目前辅助隐球菌脑膜炎诊断的方法有染色法、影像学、分子诊断技术以及病理组织学检查等,但此类方法亦存在一些不足:如印度墨汁染色法对于真菌负荷小于 1 000 CFU/ml 的情况,其灵敏度会显著下降;CT 及 MRI 等影像学方法较难发现隐球菌脑膜炎颅脑部病变早期病灶;PCR 等分子生物学方法检测时间长(2~3 天),需专业人员操作;脑脊液乳胶凝集实验在类风湿因子存在的情况下会出现假阳性结果,难以区分死亡病菌与活菌;病理组织学方法取样困难,对患者颅脑损伤大,易与免疫缺陷造成的假性肉芽肿混淆;LFA 虽然相比较于传统检测手段其灵敏度和特异度有所提高,但其检测限有待进一步提高^[1]。现有检测方法的不完善使得隐球菌脑膜炎发现时间延后,造成患者预后差,因此发展一种灵敏度高、检测时间短、特异度较高的隐球菌脑膜炎检测方法具有重要意义。外泌体是一种胞外囊泡,高表达 CD9, CD63 等分子,直径 50~180 nm,被视为细胞的“指纹印记”,其可由一种细胞分泌后作用于临近细胞影响其功能的表达,亦可随血液、淋巴液等作用于远端脏器,是一种颇具价值的疾病监测指标^[6,7]。近来有报道称 SERS 技术可检测 SKOV3 细胞系来源的外泌体,并且可以在单个外泌体层面上对其干燥过程中内容物的变化进行监测^[3];亦有研究表明利用金纳米颗粒对红细胞和胶质瘤细胞来源的外泌体进行标记,得到的外泌体溶液具有很好的单分散性、均一性,有利于实现对外泌体良好的观测^[6]。本课题前期对隐球菌脑膜炎外周循环外泌体的研究表明,CD93⁺ 外泌体在患者血清中表达丰富,且与疾病发生发展可能存在相关性,基于此,我们以外泌体 CD93 为标志物并结合 SERS 技术对隐球菌脑膜炎血清中的外泌体进行检测,结果表明 SERS 能够检测到的外泌体的最低量为 110 个/ml,隐球菌脑膜炎患者血清用量为 20 μ l,相比较于传统的 ELISA

检测法显著降低了临床标本用量,进一步对不同浓度的实验组血清 CD93⁺ 外泌体进行检测,结果表明 log(SERS 信号)与 log(外泌体浓度)有较好的线性关系,且该方法检测实验组血清标本的结果与 ELISA 试剂盒检测的 TNF- α , IFN- γ 结果呈正相关,这就为其应用于临床研究奠定了理论基础。但本实验标本量有待进一步扩大, SERS 检测体系有待进一步优化以降低检测限,实现微量检测和无创液态活检,从而减轻病理诊断给患者造成的痛苦。

参考文献:

- [1] Abassi M, Boulware DR, Rhein J. Cryptococcal meningitis: diagnosis and management update[J]. *Current Tropical Medicine Reports*, 2015, 2(2): 90-99.
- [2] Vo-Dinh T, Liu Y, Fales AM, et al. SERS nanosensors and nanoreporters: golden opportunities in biomedical applications[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2015, 7(1): 17-33.
- [3] Lee C, Carney RP, Hazari S, et al. 3D plasmonic nanobowl platform for the study of exosomes in solution[J]. *Nanoscale*, 2015, 7(20): 9290-9297.
- [4] Potara M, Bawaskar M, Simon T, et al. Biosynthesized silver nanoparticles performing as biogenic SERS-nanotags for investigation of C26 colon carcinoma cells[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015, 133(1): 296-303.
- [5] 胡红丽, 杨静文, 谷明莉, 等. 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[J]. *现代检验医学杂志*, 2017, 32(1): 16-18.
Hu HL, Yang JW, Gu ML, et al. Increased expression of MIF in peripheral blood mononuclear cells from patients with cryptococcal meningitis and its clinical significance[J]. *J Mod Lab Med*, 2017, 32(1): 16-18.
- [6] Record M, Carayon K, Poirot M, et al. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1841(1): 108-120.
- [7] Yu DD, Wu Y, Shen HY, et al. Exosomes in development, metastasis and drug resistance of breast cancer [J]. *Cancer Science*, 2015, 106(8): 959-964.
- [8] Stremersch S, Marro M, Pinchasik BE, et al. Identification of individual exosome-like vesicles by surface enhanced raman spectroscopy [J]. *Small*, 2016, 12(24): 3292-3301.
- 收稿日期: 2017-06-16 修回日期: 2018-02-23
-
- (上接 3 页)
- [7] 潘利琴, 张德亭, 连国军, 等. 以 WST-5 为色源脱氢酶法测定血清 1, 5-AG 含量[J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(3): 688-690.
Pan LQ, Zhang DT, Lian GJ, et al. A new enzymatic method for determination of 1,5 anhydro-D-glucitol in serum using WST-5 as a color source[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2013, 23(3): 688-690.
- [8] Malkan UY, Gunes G, Corakci A. Rational diagnoses of diabetes: the comparison of 1, 5-anhydroglucitol with other glycemic markers[J]. *Springer Plus*, 2015, 4(1): 587.
- [9] 王洋一, 胡宏章. 在不同性别及年龄间糖化血红蛋白水平差异分析[J]. *现代检验医学杂志*, 2017, 32(2): 123-125, 130.
Wang YY, Hu HZ. Differential analysis of glycosylated hemoglobin in different sex and age[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2017, 32(2): 123-125, 130.
- [10] Wang Y, Bai Y, Yang R, et al. Serum 1,5-anhydroglucitol concentrations remain valid as a glycemic control marker in diabetes with earlier chronic kidney disease stages[J]. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 2017 doi: 10. 1055/S-0043-122142[Epub ahead of print].
- [11] Wang Y, Yuan Y, Zhang Y, et al. Serum 1,5-anhydroglucitol level as a screening tool for diabetes mellitus in a community-based population at high risk of diabetes[J]. *Acta Diabetologica*, 2017, 54(5): 425-431.
- [12] Su H, Ma X, Yin J, et al. Serum 1,5-anhydroglucitol levels slightly increase rather than decrease after a glucose load in subjects with different glucose tolerance status[J]. *Acta Diabetologica*, 2017, 54(5): 463-470.
- [13] Wright LA, Hirsch IB, Gooley TA, et al. 1, 5-anhydroglucitol and neonatal complications in pregnancy complicated by diabetes[J]. *Endocrine Practice*, 2015, 21(7): 725-733.
- [14] Dworacka M, Winiarska H, Borowska M, et al. Proatherogenic alterations in T-lymphocyte subpopulations related to acute hyperglycaemia in type 2 diabetic patients[J]. *Circ J*, 2007, 71(6): 962-967.
- [15] Yu B, Zheng Y, Nettleton JA, et al. Serum metabolomic profiling and incident CKD among African Americans[J]. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2014, 9(8): 1410-1417.
- [16] Rebholz CM, Grams ME, Chen Y, et al. Serum levels of 1,5-anhydroglucitol and risk of incident end-stage renal disease[J]. *American Journal of Epidemiology*, 2017, 186(8): 952-960.
- [17] Liang M, McEvoy JW, Chen Y, et al. Association of a biomarker of glucose peaks, 1,5-anhydroglucitol, with subclinical cardiovascular disease[J]. *Diabetes Care*, 2016, 39(10): 1752-1759.
- [18] Fujiwara T, Yoshida M, Akashi N, et al. Lower 1,5-anhydroglucitol is associated with adverse clinical events after percutaneous coronary intervention[J]. *Heart and Vessels*, 2016, 31(6): 855-862.
- [19] Takahashi S, Shimada K, Miyauchi K, et al. Low and exacerbated levels of 1,5-anhydroglucitol are associated with cardiovascular events in patients after first-time elective percutaneous coronary intervention[J]. *Cardiovascular Diabetology*, 2016, 15(1): 145.
- [20] Meng X, Tancharoen S, Kawahara KI, et al. 1,5-Anhydroglucitol attenuates cytokine release and protects mice with type 2 diabetes from inflammatory reactions[J]. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2010, 23(1): 105-119.
- 收稿日期: 2018-06-07 修回日期: 2018-06-27