

隐球菌性脑膜炎患者中 IFN- γ 和 TGF- β 表达及其临床意义

雷永兰 李靖 牛敏 邱国院 罗茜

四川省攀枝花市中心医院检验科, 四川攀枝花 617067

[摘要] 目的: 测定隐球菌性脑膜炎患者中干扰素- γ (IFN- γ) 和转化生长因子- β (TGF- β) 表达并分析其临床意义。方法: 在本院2016年1月至2018年10月确诊为隐球菌性脑膜炎患者中选取63例纳入观察组, 并选取同期60名健康体检者, 纳入正常对照组。测定两组受试者入组时外周血CD4⁺T细胞中辅助T细胞(Th细胞)相关细胞因子表达水平, 包括IFN- γ 、TGF- β 及白细胞介素-4(IL-4)、IL-6、IL-9、IL-17, 并对比观察组治疗前后上述指标变化, 分析各指标间相关性。结果: 观察组治疗后TGF- β 、IL-6、IL-17表达水平均较治疗前升高, 其治疗前后IFN- γ 表达水平均高于正常对照组, TGF- β 表达水平均低于正常对照组; 观察组治疗前IL-9、IL-17表达水平低于正常对照组, 其治疗后IL-6高于正常对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。观察组63例患者中, 共有42例于治疗3周后完全应答或部分应答, 应答率为66.67%。剔除未应答患者后对比有应答组与正常对照组Th相关细胞因子表达水平, 结果显示, 有应答组治疗前IFN- γ 表达水平高于正常对照组, IL-17表达水平低于正常对照组, 其治疗后IFN- γ 、TGF- β 、IL-6、IL-9、IL-17表达水平均高于正常对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。Pearson相关性分析示, 观察组TGF- β 表达水平与IL-9、IL-17均呈正相关, r 值分别为0.829、0.781, 其IL-6、IL-17表达水平亦呈正相关, r 值为0.880($P < 0.05$)。结论: 隐球菌感染初期TGF- β 抑制可能是导致患者病情加剧的主要原因, 而TGF- β 诱导Th17细胞分化及促进IL-17分泌功能对于控制患者病情进展有积极作用。

[关键词] 隐球菌性脑膜炎; 干扰素- γ ; 转化生长因子- β ; 细胞因子

中图分类号: R446 文献标识码: A 文章编号: 2095-5200(2019)03-023-04

DOI: 10.11876/mimt201903006

Expression and clinical significance of IFN- γ and TGF- β in cryptococcal meningitis patients

LEI Yonglan, LI Jing, NIU Min, QIU Guoyuan, LUO Qian. Department of Clinical Laboratory, Panzhihua Central Hospital, Panzhihua 617067, China

[Abstract] **Objective:** This study objective to determine the expression of interferon- γ (IFN- γ) and transforming growth factor- β (TGF- β) in cryptococcal meningitis patients and analyse their clinical significance. **Methods:** 63 patients diagnosed with cryptococcal meningitis in our hospital from January 2016 to October 2018 were included in the observation group, and 60 healthy subjects were included in the normal control group during the same period. The expression levels of cytokines related to helper T cells (Th cells) in CD4⁺T cells of peripheral blood of subjects in the two groups were measured, including IFN- γ , TGF- β , interleukin-4 (IL-4), IL-6, IL-9, and IL-17, and the changes of the above indicators before and after treatment in the observation group were compared to analyze the correlation between the indicators. **Results:** The expression levels of TGF- β , IL-6 and IL-17 in the observation group were all increased after treatment compared with those before treatment. The expression levels of IFN- γ before and after treatment were all higher than those in the normal control group, and the expression levels of TGF- β were all lower than those in the normal control group. The expression levels of IL-9 and IL-17 before treatment in the

observation group were lower than those in the normal control group, and IL-6 after treatment were higher than those in the normal control group, with statistically significant differences ($P < 0.05$). Among the 63 patients in the observation group, a total of 42 patients responded completely or partially after 3 weeks of treatment, with a response rate of 66.67%. The patients who did not respond were eliminated, the patients of response group and normal control group were compared in Th related cytokines levels, the results showed that the IFN- γ expression level of response group before treatment was higher than that of the normal control group, IL-17 expression level was lower than that of the normal control group, the expression levels of IFN- γ , TGF- β , IL-6, IL-9 and IL-17 of response group after treatment were all higher than those in normal control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed that the expression level of TGF- β in the observation group was positively correlated with IL-9 and IL-17, with an r value of 0.829 and 0.781, respectively, and the expression levels of IL-6 and IL-17 were also positively correlated, with an r value of 0.880 ($P < 0.05$). **Conclusions:** TGF- β inhibition at the early stage of cryptococcus infection may be the main cause of exacerbation of patients' condition, and TGF- β induction of Th17 cell differentiation and promotion of IL-17 secretion function play a positive role in controlling patients' disease progression.

[Key words] cryptococcal meningitis; interferon- γ ; transforming growth factor- β ; cytokines

隐球菌性脑膜炎属中枢神经系统隐球菌感染性疾病,具有起病隐匿、病程长等特点,致残、致死率均处于较高水平^[1]。该病好发于免疫功能低下人群,如人免疫缺陷病毒(HIV)感染者、器官移植者等,故多数研究均认为机体免疫功能在抵御隐球菌感染中发挥了重要的作用^[2]。T淋巴细胞相关免疫状态与机体免疫功能具有密切关联,辅助T细胞(Th细胞)在机体体液免疫、细胞免疫功能调节中均发挥着重要作用,其中,Th1细胞主要产生干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-12(IL-12)等,被证实能够抑制隐球菌的生长与扩散^[3];Th17细胞分泌的IL-17及与Th17分化相关的转化生长因子- β (TGF- β),也可能在隐球菌感染时发挥重要的调控作用^[4]。此次研究就隐球菌性脑膜炎患者外周血IFN- γ 和TGF- β 表达特点进行了分析,旨在了解Th1、Th17细胞在隐球菌性脑膜炎发病机制中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

自我院2016年1月至2018年10月确诊为隐球菌性脑膜炎患者中选取63例,纳入观察组。纳入标准:患者无化疗和放疗史,未合并自身免疫性疾病,HIV感染检测结果呈阴性,无器官移植。63例患者中,男40例,女23例,年龄21~67岁,平均(40.25 \pm 11.73)岁,病程7~42 d,平均(41.59 \pm 6.97) d。按照年龄相近、性别相仿原则,选取同期体格检查、实验室检查及影像学检查均未见异常的健康体检者60名,纳入正常对照

组,其中男38名,女22名,年龄25~63岁,平均(38.87 \pm 12.05)岁。此次研究已获取我院医学伦理委员会批准,受试者均知情同意并签署书面协议。

1.2 检测方法

抽取两组受试者入组次日晨起空腹外周静脉血10 mL,以20 U/mL肝素抗凝,行外周血单个核细胞分离,而后采用磁珠分选细胞分离CD4⁺T细胞^[5]:

(1)使用PBS洗涤细胞悬液,以300 g离心10 min,弃上清;

(2)每10⁷个细胞加入缓冲液80 μ L、磁珠分选细胞(MACS)CD4 20 μ L,吹打混匀;

(3)4 $^{\circ}$ C避光孵育15 min;

(4)加入缓冲液3 mL,洗涤细胞;

(5)于4 $^{\circ}$ C环境下以300 g离心10 min,弃上清,加入缓冲液500 μ L,悬浮细胞;

(6)将MS分离柱置于Midi MACS分选器内,加入缓冲液500 μ L,湿柱;

(7)将细胞悬液缓慢加入分选柱,自然析出非CD4⁺T细胞悬液;

(8)使用500 μ L缓冲液冲洗MS分离柱3次;

(9)将MS分离柱移出磁场,加入缓冲液1 mL,冲出滞留在MS分离柱中的CD4⁺T细胞;

(10)使用PBS洗涤细胞悬液,以300 g离心10 min,弃上清,细胞沉淀保存于-70 $^{\circ}$ C环境中。

参照文献方法^[6-7]抽提标本总RNA,逆转录合成cDNA,使用实时定量PCR法,测定两组受试

者 CD4⁺T 细胞中 IFN- γ 、TGF- β 及 IL-4、IL-6、IL-9、IL-17 表达水平。

1.3 分析方法

对比观察组、正常对照组入组时外周血 CD4⁺T 细胞中 Th 相关细胞因子表达水平差异，并于观察组患者治疗 3 周后再次抽取其外周血，测定 CD4⁺T 细胞中 IFN- γ 、TGF- β 及 IL-4、IL-6、IL-9、IL-17 表达水平并与治疗前检测结果进行对比。此外，根据治疗效果，分析剔除治疗无效病例后观察组患者上述指标变化情况，治疗效果判断标准参照文献^[8]，完全应答：临床症状消失，脑脊液墨汁染色涂片计数正常，脑脊液隐球菌培养转阴，脑脊液乳胶凝集滴度明显下降，生化正常；部分应答：临床症状好转，脑脊液常规及生化改善，真菌培养阴性。无应答为出现以下情况之一：临床症状或脑脊液常规、生化恶化或真菌培养阳性。将完全应答和部分应答患者归为好转组与正常对照组进行比较。分析 Th 相关细胞因子的之间的相关性。

1.4 统计学分析

对本临床研究的所有数据采用 SPSS 18.0 进行分析，IFN- γ 、TGF- β 表达水平等计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，并采用 *t* 检验，相关性分析采用 Pearson 法，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Th 相关细胞因子检测结果

观察组治疗后 TGF- β 、IL-6、IL-17 表达水平均较治疗前升高，其治疗前后 IFN- γ 表达水平均高于正常对照组，TGF- β 表达水平均低于正常对照组；观察组治疗前 IL-9、IL-17 表达水平低于正常对照组，其治疗后 IL-6 高于正常对照组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组受试者 Th 相关细胞因子表达水平比较
($\bar{x} \pm s$)

指标	观察组 (n=63)		正常对照组 (n=50)
	治疗前	治疗后	
IFN- γ	1.22 ± 0.23	1.43 ± 0.25	0.97 ± 0.18 [#]
TGF- β	0.59 ± 0.11	0.96 ± 0.18 [*]	1.05 ± 0.15 [#]
IL-4	1.01 ± 0.21	1.19 ± 0.20	0.82 ± 0.14
IL-6	0.79 ± 0.13	1.06 ± 0.24 [*]	0.79 ± 0.18 [#]
IL-9	0.85 ± 0.22	1.19 ± 0.33	0.99 ± 0.23 [#]
IL-17	0.67 ± 0.21	1.20 ± 0.31 [*]	0.97 ± 0.19 [#]

注：与观察组治疗前比较，^{*} $P < 0.05$ ；与观察组治疗后比较，[#] $P < 0.05$

观察组 63 例患者中，共有 42 例于治疗 3 周后

完全应答或部分应答，应答率为 66.67%。剔除未应答患者后对比观察组与正常对照组 Th 相关细胞因子表达水平，结果显示，观察组治疗前 IFN- γ 表达水平高于正常对照组，IL-17 表达水平低于正常对照组，其治疗后 IFN- γ 、TGF- β 、IL-6、IL-9、IL-17 表达水平均高于正常对照组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 剔除未应答患者后两组受试者 Th 相关细胞因子表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

指标	观察组 (n=42)		正常对照组 (n=50)
	治疗前	治疗后	
IFN- γ	1.26 ± 0.31	1.43 ± 0.28	0.97 ± 0.18 [#]
TGF- β	0.69 ± 0.20	1.45 ± 0.35 [*]	1.05 ± 0.15 [#]
IL-4	1.06 ± 0.21	0.96 ± 0.15	0.82 ± 0.14
IL-6	0.77 ± 0.14	1.26 ± 0.16 [*]	0.79 ± 0.18 [#]
IL-9	0.92 ± 0.23	1.19 ± 0.20 [*]	0.99 ± 0.23 [#]
IL-17	0.65 ± 0.12	1.44 ± 0.32 [*]	0.97 ± 0.19 [#]

注：与观察组治疗前比较，^{*} $P < 0.05$ ；与观察组治疗后比较，[#] $P < 0.05$

2.2 相关性分析

Pearson 相关性分析示，观察组 TGF- β 表达水平与 IL-9、IL-17 均呈正相关，*r* 值分别为 0.829、0.781，其 IL-6、IL-17 表达水平亦呈正相关，*r* 值为 0.880 ($P < 0.05$)。

3 讨论

机体对隐球菌细胞介导的免疫反应以直接细胞毒作用和细胞因子介导的调节作用为主，自然杀伤细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞均可直接产生细胞毒作用，但同时也受到细胞因子的调节^[9]。Th1 细胞主要分泌 IFN- γ ，同时也可分泌 IL-2、IL-18 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)，Th2 则主要分泌 IL-4。多数学者认为，Th1、Th2 表达水平处于相对平衡状态，是机体抵御病原菌感染的重要基础^[10-11]。

动物研究显示，在隐球菌感染模型中，IFN- γ 可通过活化巨噬细胞、刺激巨噬细胞分泌抗菌蛋白、增加两性霉素 B 抗菌活性等机制，发挥保护性免疫效应^[12]。亦有研究指出，将重组 IL-12、IL-18 用于播散性隐球菌感染小鼠的治疗，能够有效促进隐球菌在肺部的清除，改善小鼠生存周期^[13]。然而，本研究结果示，无论是否剔除未好转患者，观察组治疗前后 IFN- γ 表达水平均高于正常对照组，且患者治疗前后 IFN- γ 表达水平未见明显变化，说明在隐球菌性脑膜炎患者中，

IFN- γ 的保护作用并不占主导作用,其原因可能为:机体感染隐球菌后,IFN- γ 在急性期或慢性期抗隐球菌效应中均可发挥积极作用,但仅有IFN- γ 的存在,并不能有效抵御隐球菌感染^[14]。

与IFN- γ 相比,TGF- β 在隐球菌性脑膜炎发生发展中扮演的作用更为重要:一方面,TGF- β 在激活后,能够促进机体抵抗隐球菌效应的上升;另一方面,TGF- β 是幼稚T细胞向Th17细胞分化的必需条件,其积极应答状态也是机体抵御隐球菌感染的关键环节^[15-16]。此外,在IL-6缺乏的前提下,TGF- β 可能诱导幼稚T细胞向调节性T细胞分化,与多种自身免疫性疾病的发生发展亦具有一定关联^[17]。在本次研究中,观察组治疗后TGF- β 表达水平较治疗前升高,且剔除未好转患者后,观察组治疗后TGF- β 表达水平高于正常对照组,与此同时,TGF- β 与IL-17表达水平呈正相关,提示TGF- β 诱导IL-17表达上升,可能是促进机体抵御隐球菌感染的重要机制。伴随着TGF- β 表达水平的上升,患者IL-9表达水平亦呈上升趋势,IL-9也参与了抵抗隐球菌感染的免疫机制。除此之外,隐球菌性脑膜炎患者IL-6、IL-17表达水平亦呈正相关,据此推测,在IL-6存在的条件下,TGF- β 可阻断或破坏Th1、Th2细胞分化,而产生主要分泌IL-17的Th17细胞^[18],再一次印证了上述结论。

综上所述,隐球菌性脑膜炎患者外周血CD4+T细胞中IFN- γ 表达与机体抵御隐球菌感染能力有关,但并不占主导作用,而TGF- β 表达水平的上升伴随着IL-9、IL-17的增加,对于增强机体对隐球菌杀伤作用、改善患者病情有着重要意义,值得进一步关注。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] TANGYE S G, PILLAY B, RANDALL K L, et al. Dedicator of cytokinesis 8-deficient CD4+ T cells are biased to a TH2 effector fate at the expense of TH1 and TH17 cells[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 139(3): 933-949.
- [3] DUTTA O, MASSO-SILVA J A, WANG K, et al. Host Response to Pulmonary Fungal Infections: a Highlight on Cell-Driven Immunity to *Cryptococcus* Species and *Aspergillus fumigatus*[J]. *Curr Pharmacol Rep*, 2017, 3(6): 335-345.
- [4] NAKAMURA Y, SATO K, YAMAMOTO H, et al. Dectin-2 deficiency promotes Th2 response and mucin production in the lungs after pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*[J]. *Infect Immun*, 2015, 83(2): 671-681.
- [5] 刘挺挺,谷明莉,张蕾,等. 隐球菌脑膜炎患者外周血CD200表达水平及其临床意义[J]. *现代检验医学杂志*, 2016, 31(2): 35-38.
- [6] CONTI H R, GAFFEN S L. IL-17-Mediated immunity to the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*[J]. *J Immunol*, 2015, 195(3): 780-788.
- [7] ELLWARDT E, WALSH J T, KIPNIS J, et al. Understanding the role of T cells in CNS homeostasis[J]. *Trends Immunol*, 2016, 37(2): 154-165.
- [8] HOFFMANN O, RUNG O, HELD J, et al. Lymphocytes modulate innate immune responses and neuronal damage in experimental meningitis[J]. *Infect Immun*, 2015, 83(1): 259-267.
- [9] CAMPUZANO A, WORMLEY F. Innate Immunity against *Cryptococcus*, from Recognition to Elimination[J]. *J Fungi*, 2018, 4(1): 33.
- [10] HUNTER C A, JONES S A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease[J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(5): 448.
- [11] GAFFEN S L, HAJISHENGALLIS G. A New Inflammatory Cytokine on the Block: Re-thinking Periodontal Disease and the Th1/Th2 Paradigm in the Context of Th17 Cells and IL-17[J]. *Journal of Dental Research*, 2008, 87(9):817-828.
- [12] SHAWKI S, GAAFAR T, ERFAN H, et al. Immunomodulatory effects of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells[J]. *Microbiol Immunol*, 2015, 59(6): 348-356.
- [13] 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.
- [14] XIE L, CHOUDHURY G R, WINTERS A, et al. Cerebral regulatory T cells restrain microglia/macrophage-mediated inflammatory responses via IL-10[J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(1): 180-191.
- [15] DATTA K, HAMAD M. Immunotherapy of fungal infections[J]. *Immunol Invest*, 2015, 44(8): 738-776.
- [16] NASCIMENTO B B, CARTELE C T, NOVIELLO M L, et al. Influence of indigenous microbiota on experimental toxoplasmosis in conventional and germ-free mice[J]. *Int J Exp Pathol*, 2017, 98(4): 191-202.
- [17] 黄煌,洗莹,潘越峻,等. 新生隐球菌性脑膜炎患者外周血Th1/Th2及相关T淋巴细胞水平变化及意义[J]. *中国真菌学杂志*, 2017, 12(5): 268-273.
- [18] INABA A, OKADA A, YOSHIDA T, et al. Disseminated Cryptococcosis with rapidly growing lung nodules in an end-stage renal disease patient[J]. *Intern Med*, 2017, 56(3): 377-380.