

CD44 在隐球菌性脑膜炎发病机制中的作用研究

张俊勇 樊一斌 徐红 赵瑾 仇芸 温海
(第二军医大学长征医院皮肤科,上海 200003)

【摘要】 目的 测定隐球菌性脑膜炎小鼠脑组织中 CD44 表达,探讨 CD44 在隐球菌性脑膜炎发病机制中的作用。方法 隐球菌性脑膜炎免疫抑制小鼠为实验组,未接种隐球菌的免疫抑制小鼠为对照组,应用免疫组化法检测实验组 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、4 d、7 d 小鼠脑组织 CD44 表达与对照组的分布变化。**结果** 对照组小鼠脑组织 CD44 均匀分布在脑细胞膜上。实验组隐球菌作用小鼠 48 h、72 h 后,CD44 在小鼠脑组织脑膜侧分布增加,而在脑实质侧 CD44 的分布明显减少。病灶周围的脑组织 CD44 分布也一侧增加,另一侧分布减少。**结论** 隐球菌侵入小鼠脑组织后,隐球菌诱导 CD44 向脑组织的一侧移行,向脑膜方向聚集。病灶周围脑组织 CD44 分布也不均匀。说明隐球菌性脑膜炎的发生与 CD44 有密切的关系。

【关键词】 新生隐球菌;CD44;隐球菌性脑膜炎

【中图分类号】 R 379.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-3827(2010)06-0340-04

CD44 expression in murine model of cryptococcal meningitis

ZHANG Jun-yong, FAN Yi-bin, XU Hong, ZHAO Jin, QIU Yun, WEN Hai
(Department of Dermatology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003)

【Abstract】 Objective To determine the CD44 expression in the brain of mice with cryptococcal meningitis and to explore its role in pathogenesis of cryptococcal meningitis. **Methods** CD44 expression in immunocompromised mice with or without cryptococcal meningitis were determined at 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 4 d, 7 d by immunohistochemistry. **Results** CD44 distributed uniformly in the brain cell membrane in the control group. The expression increased in the meningeal side, while decreased significantly in the parenchyma side after 48 h and 72 h in the experimental group. This unbalanced distribution of CD44 expression was also observed around lesions. **Conclusions** *Cryptococcus neoformans* could induce CD44 migration in the brain. The incidence of cryptococcal meningitis has effects on CD44 molecules.

【Key words】 *Cryptococcus neoformans*; cryptococcal meningitis; CD44

[Chin J Mycol, 2010, 5(6):340-343]

新生隐球菌是一种条件致病真菌,隐球菌病发病率逐年增高,其中 90% 侵犯中枢神经系统,引起致命的脑膜炎^[1-2]。

目前,关于隐球菌的嗜中枢性,国内、外学者围

绕隐球菌与脑血管内皮细胞相互作用方面做了大量的研究。最新的研究显示,在隐球菌感染脑血管内皮细胞过程中,菌体荚膜透明质酸 HA 与宿主 CD44 相互作用,使菌体易于穿越脑血管内皮细胞^[3]。CD44 是分布极为广泛的细胞表面跨膜糖蛋白,属于未分类的黏附分子^[4]。与许多疾病的进展和转归都有密切的关系。

本研究经小鼠尾静脉注射隐球菌菌悬液构建

基金项目:国家自然科学基金(30471566,30870106).
作者简介:张俊勇,男(汉族),硕士,主治医师. E-mail: junyongzhang2007@163.com
通讯作者:温海, E-mail: wenhai98@sohu.com

隐球菌性脑膜炎小鼠模型^[5],应用免疫组化技术检测小鼠脑组织 CD44 表达,探索 CD44 在隐球菌性脑膜炎发病机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 菌株与动物

新生隐球菌 H99 标准株(全军真菌病重点实验室、中国医学真菌保藏管理中心隐球菌专业实验室提供)。C₅₇BL/6 小鼠(中科院实验动物中心),雌性,体重(24±3)g,共 48 只,随机分为 8 组。

1.2 试剂和仪器

环磷酰胺(200 mg/支,批号 07040421,江苏恒瑞医药股份有限公司);Rabbit 抗 Endostatin (Ab-1, NeoMarkers 公司);McAb CD44S (HCAM, Santa Cruz 公司);EnVision 试剂(HRP-Rabbit/mouse, 丹麦 Dako 公司)。

37℃ 电热恒温培养温箱(上海精宏实验设备有限公司);切片机 LEICA RM2145 (德国 LEICA 公司);展片机 Leica HI1210 (德国 LEICA 公司);烤片机 Leica HI1220 (德国 LEICA 公司);光学显微镜(OLYMPUS 公司)。

1.3 标本来源

对照组 C₅₇BL/6 小鼠经腹腔注射环磷酰胺进行免疫抑制,剂量为 200 mg/kg,3 d 后处死取出脑组织(共 6 只)。实验组 C₅₇BL/6 小鼠经腹腔注射环磷酰胺进行免疫抑制,剂量为 200 mg/kg,3 d 后于尾静脉接种 1.0×10⁷ CFU/mL 新生隐球菌菌悬液 0.4 mL,于 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、4 d、7 d 7 个时间点处死小鼠(每个时间点 6 只小鼠),制备隐球菌性脑膜炎小鼠脑组织和免疫抑制脑组织,-70℃ 冰箱保存。

1.4 免疫组化染色

用 EnVision 法进行免疫组化染色。取对照组脑组织标本以及实验组各时间点脑组织标本,石蜡切片常规脱蜡脱水,PBS 洗 3 min,重复 3 遍;切片用 pH 6.0 的 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液(CB)热诱导修复,室温自然冷却;PBS 洗 20 min;加入 0.3% H₂O₂ 抑制内源性过氧化物酶,室温置 20 min,PBS 洗 3 min,重复 3 遍;20% 正常羊血清室温孵育 30 min,不洗;滴加适当稀释特异性一抗 37℃ 孵育 2 h;PBS 洗 3 min,重复 3 遍;EnVision 试剂(HRP-R/M)37℃ 条件 30 min;PBS 洗 3 min,重复 3 遍;DAB 液显色,中性树胶封片。免疫组化阳性染色为棕黄

色或棕褐色,定位于细胞膜。

2 结果

实验组造模成功,接种隐球菌菌悬液 6 h 后小鼠脑组织 PAS 染色病理切片示小鼠脑组织可见隐球菌菌体(见图 1)。镜下可见圆形或椭圆形的双层厚壁孢子,外有一层宽阔荚膜。

免疫组化结果显示对照组小鼠 CD44 均匀分布在脑组织细胞膜上(见图 2)。实验组中隐球菌作用小鼠 6 h 和 12 h 后,小鼠脑组织 CD44 的分布没有发生明显变化(见图 3、4),在作用 24 h 后,CD44 的分布出现了变化,CD44 逐渐向脑组织的一侧移行(见图 5)。当作用 48 h 和 72 h 后,CD44 的分布发生了明显变化,在脑膜侧的脑组织分布了大量的 CD44,而在脑实质侧 CD44 的分布明显减少(见图 6)。在病灶周围的脑组织 CD44 分布也发现一侧增加,另一侧分布减少(见图 7)。当作用 4 d 和 7 d 后,CD44 分布逐渐恢复均匀(见图 8、9)。

3 讨论

免疫组化应用抗原与抗体特异性结合的原理,通过化学反应使标记抗体的显色剂(荧光素、酶、金属离子、同位素)显色来确定组织细胞内抗原(多肽和蛋白质),对其进行定位、定性及定量的研究,广泛应用于现代生物学和医学中。王溪涛^[6]等用免疫组化方法检测到隐球菌性脑膜炎小鼠模型大脑皮质 BDNF(脑源性神经营养因子,Brain-derived Neurotrophic Factor)和 bFGF(碱性成纤维细胞生长因子,Basic Fibroblast Growth Factor)表达增高,推测 BDNF 和 bFGF 能促进受伤神经元修复和再生,减轻隐球菌对神经元的损伤。

目前,研究隐球菌病动物模型多选用 C₅₇BL/6 小鼠,小鼠在免疫抑制的状态下,对隐球菌的易感性明显增强,经尾静脉接种隐球菌菌悬液,或经腹腔注射隐球菌菌悬液通过血液循环经血脑屏障到达中枢神经系统,感染脑实质造成隐球菌性脑膜炎或脑膜脑炎。亦有采用脑内直接注射接种隐球菌菌悬液建立隐球菌性脑膜炎动物模型的方法^[7]。本试验结果表明,隐球菌作用小鼠后,诱导脑组织 CD44 的分布发生了明显改变,CD44 向脑膜部位脑组织聚集。在病灶周围的脑组织 CD44 分布也一侧增加,另一侧分布减少。说明隐球菌侵入脑组

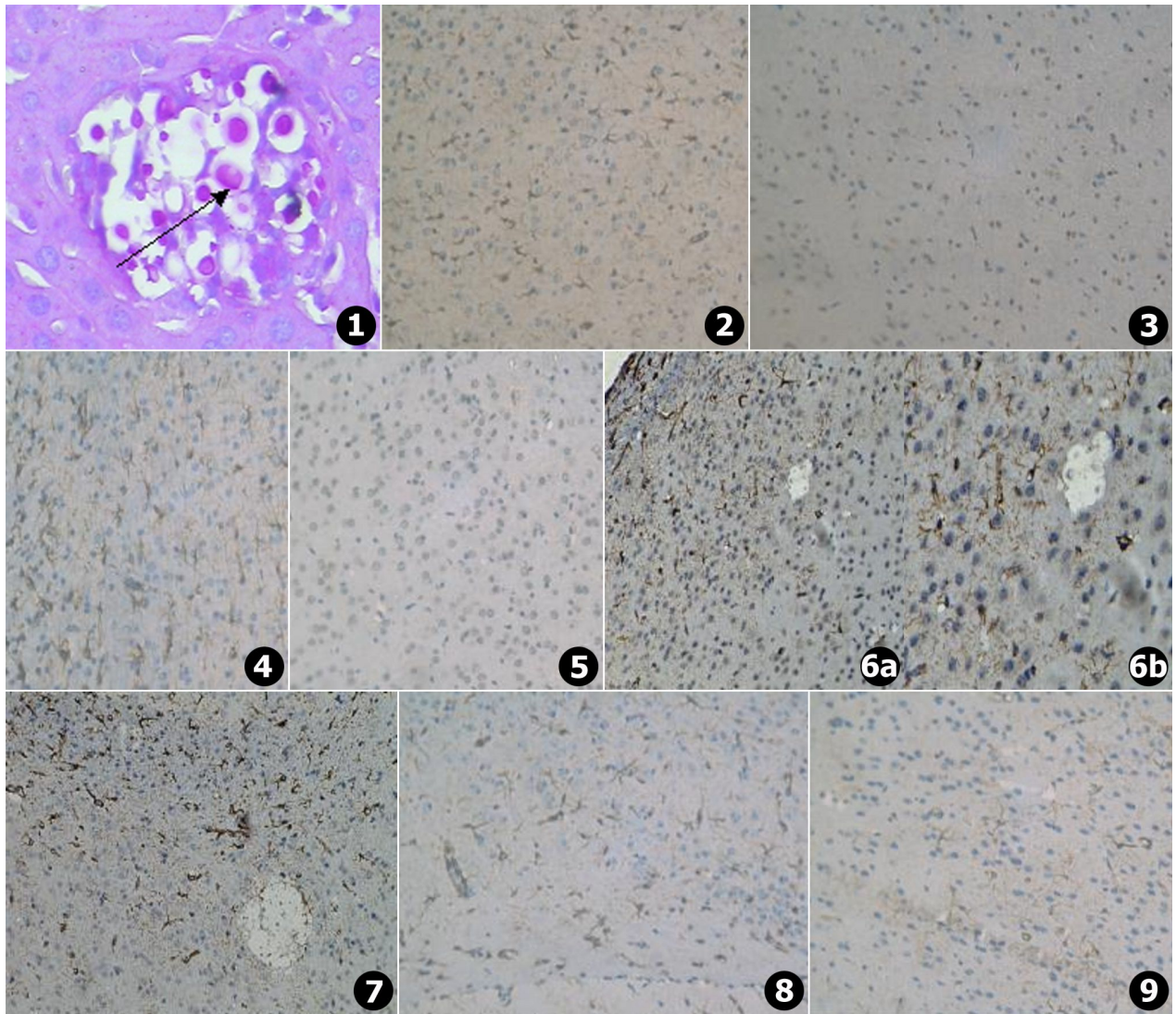


图 1 隐球菌感染 6 h 后 C₅₇BL/6 小鼠脑组织 PAS 染色病理切片 (×400, 箭头所指为隐球菌菌体) 图 2 对照组 CD44 表达, CD44 均匀分布在脑组织细胞膜上 (×400) 图 3 实验组 6 h CD44 表达, CD44 分布未见明显变化 (×400) 图 4 实验组 12 h CD44 表达, CD44 分布未见明显变化 (×400) 图 5 实验组 24 h CD44 表达, CD44 分布逐渐发生变化 (×400) 图 6 实验组 48 h CD44 表达, 脑膜侧的脑组织 CD44 分布增加, 脑实质侧 CD44 的分布明显减少 (a. ×100, b. ×400) 图 7 实验组 72 h CD44 表达, 病灶周围的 CD44 的分布一侧增加, 另一侧减少 (×400) 图 8 实验组 4 d CD44 表达, CD44 分布逐渐恢复均匀 (×400) 图 9 实验组 7 d CD44 表达, CD44 恢复均匀分布 (×400)

Fig. 1 PAS staining of brain tissue 6 h after Cryptococcus infection (×400, arrow for Cryptococcus) Fig. 2 CD44 distributed uniformly in the brain cell membrane in control group (×400) Fig. 3 CD44 expression with no significant changes at 6 h in the test group (×400) Fig. 4 CD44 expression with no significant changes at 12 h in the test group (×400) Fig. 5 CD44 expression with gradual changes at 24 h in the test group (×400) Fig. 6 CD44 expression at 48 h in the test group; increasing in the meningeal side and decreasing significantly in the parenchyma side (a. ×100, b. ×400) Fig. 7 CD44 expression at 72 h in the test group; increasing on one side while decreasing on the other side of the lesion (×400) Fig. 8 CD44 expression on 4 d in the test group with gradual and even distribution (×400) Fig. 9 CD44 expression on 7 d in the test group with gradual and even distribution (×400)

织, CD44 发挥了重要的作用。研究表明, 在隐球菌感染脑血管内皮细胞过程中, 脑血管内皮细胞上的 CD44 与隐球菌荚膜透明质酸 (HA) 结合后, 增加隐球菌菌体黏附力, 促进了细胞骨架重组^[3]。

Wang H^[8]等在阻塞大脑中动脉的大鼠模型上研究了 CD44 在中风后炎症反应和组织重建中的作用, 应用免疫组化技术和共聚焦电镜证实在诱导大鼠大脑局部缺血后, 大脑微血管可见大量的 CD44 表

达,主要分布在巨噬细胞周围,其机制是 CD44 与 HA 相互作用的结果。Johnson^[9]研究也证明,内皮细胞上的 CD44 能够递呈细胞外基质的 HA 与活化淋巴细胞表面的 CD44 相互作用,能够诱导白细胞向宿主炎症区域聚集,使炎症加重。本试验研究表明隐球菌侵入小鼠大脑后,诱导 CD44 的分布发生变化,向隐球菌侵入方向的脑膜部位脑组织聚集。可能的机制是隐球菌侵入小鼠脑组织过程中,隐球菌菌体荚膜 HA 与脑组织表达的 CD44 相互作用后,使 CD44 向脑膜侧聚集。感染病灶周围的 CD44 也发生不均匀分布。另外,隐球菌在侵入过程中,激活了巨噬细胞, T 淋巴细胞,使病灶周围免疫应答活跃。说明 CD44 分布的变化也可能影响了炎症的转归。试验结果说明隐球菌性脑膜炎的发生与 CD44 有密切的关系。所以,进一步研究探索 CD44 在隐球菌性脑膜炎的发生,发展和转归中所起的作用,对于揭示隐球菌性脑膜炎的发病机制具有相当重要的意义。本实验发现隐球菌入侵小鼠脑组织后,脑组织 CD44 分布发生了显著的变化,其机制还需进一步的研究。

参考文献

[1] Chen SHM, Stins MF, Huang SH, et al. *Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells [J]. J Med Microbiol, 2003, 52(7):961-

970.

- [2] Huang SH, Wan ZS, Chen YH, et al. Further characterization of *Escherichia coli* brain microvascular endothelial cell invasion gene *ibeA* by deletion, complementation, and protein expression [J]. J Infect Dis, 2001, 183(7):1071-1078.
- [3] Jong A, Wu CH, Shackelford GM, et al. Involvement of human CD44 during *Cryptococcus neoformans* infection of brain microvascular endothelial cells [J]. Cell Microbiol, 2008, 10(6):1313-1326.
- [4] Ambrose J, Wu CH, Chen HM, et al. Identification and Characterization of CPS1 as a Hyaluronic Acid Synthase Contributing to the Pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* [J]. Infection eukaryotic cell, 2007, 6(8):1486-1496.
- [5] 范娟, 温海, 朱元杰, 等. 隐球菌感染小鼠模型脑组织含水量的变化 [J]. 中国真菌学杂志, 2008, 3(4):201-204.
- [6] 王溪涛, 温海. C₅₇BL/6 小鼠感染新生隐球菌对大脑皮质 bDNF 和 bFGF 表达的影响 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2007, 723(7):579-580.
- [7] 黄欣, 温海, 施伟民, 等. 中枢神经系统隐球菌感染动物模型的研究 [J]. 中国真菌学杂志, 2006, 1(2):85-87.
- [8] Wang H, Zhan Y, Xu L, et al. Use of suppression subtractive hybridization for differential gene expression in stroke: discovery of CD44 gene expression and localization in permanent focal stroke in rats [J]. Stroke, 2001, 32(4):1020-1027.
- [9] Johnson P, Ruffell B. CD44 and its role in inflammation and inflammatory [J]. Diseases, 2009, 8(3):208-220.

[收稿日期] 2010-06-01

[本文编辑] 施慧

· 消息 ·

办班消息

由冉玉平教授负责的国家级医学继续教育项目《皮肤真菌病基础和临床研究新进展》[项目编号:2009-04-12-060(国)]将于2011年3月底在成都举行。

培训对象 皮肤性病科临床医师;综合医院临床医师;在读博士、硕士研究生;综合医院检验科实验技术人员。

主要内容 真菌的分类与命名;酵母菌的鉴定、分型、分子生物学及念珠菌病的临床和实验研究进展;浅部真菌病、念珠菌病、隐球菌病、镰刀菌病、孢子丝菌病、着色真菌病、马尔尼菲青霉菌病、组织胞浆菌病、皮炎芽生菌病、球孢子菌病、曲霉病、结合菌病;马拉色菌的研究进展,包括最新的命名、分类及鉴定方法;与马拉色菌有关疾病的临床表现和治疗;甲真菌病的诊断、鉴别诊断、病理学及治疗;真菌与性传播疾病;皮肤癣菌、马拉色菌取材、镜检、染色、培养及鉴定;念珠菌、孢子丝菌、污染菌的小培养及菌落观察;常规及特殊培养基制作;抗真菌药物研究进展及合理应用,真菌病的临床科研思路、论文撰写及中国真菌学杂志投稿规范等。

报到时间及地点 2011年3月30日(星期三)四川大学继续教育学院(成都市人民南路三段16号)。

学习时间及**证书** 2011年3月31日~4月4日;结业颁发国家I类学分(10分)证书。

培训费用 700元/人(含资料费);食宿统一安排,费用自理。

联系方式 电话:028-85501663 传真:028-85501565 电子邮件:ranyuping@gmail.com 邮寄:610041 四川大学华西医院皮肤性病科杨翰君博士(13568839039)。