

# 新型隐球菌性脑膜炎临床特点分析与 脑脊液 Th1-Th2 细胞因子检测

卜暉 王云灿 丁文婷 何俊瑛 赵越 吕文静

**【摘要】** 研究背景 新型隐球菌性脑膜炎是新型隐球菌感染脑膜和(或)脑实质引起的中枢神经系统感染性疾病,其发生、发展和转归在一定程度上取决于患者自身免疫功能,尤其与辅助性T细胞亚群Th1/Th2免疫应答失衡有关。本研究旨在探讨新型隐球菌性脑膜炎患者中枢神经系统局部Th1和Th2免疫应答作用。方法 采用酶联免疫吸附试验定量检测脑脊液Th1细胞因子[干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )]和Th2细胞因子[白细胞介素-10(IL-10)]水平,并动态监测脑脊液细胞学变化。结果 脑膜炎组患者脑脊液Th1细胞因子IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 为(11.17 $\pm$ 1.50)和(18.74 $\pm$ 2.97) pg/ml,低于对照组的(17.69 $\pm$ 2.34)和(28.83 $\pm$ 3.55) pg/ml(均 $P=0.000$ ),Th2细胞因子IL-10为(43.65 $\pm$ 10.12) pg/ml,高于对照组的(7.80 $\pm$ 1.30) pg/ml( $P=0.000$ );急性期IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 为(11.17 $\pm$ 1.50)和(18.74 $\pm$ 2.97) pg/ml,低于稳定期的(17.70 $\pm$ 2.34)和(22.93 $\pm$ 1.53) pg/ml(均 $P=0.000$ ),IL-10为(43.65 $\pm$ 10.12) pg/ml,高于稳定期的(22.93 $\pm$ 7.39) pg/ml( $P=0.000$ )。脑膜炎组患者脑脊液IFN- $\gamma$ /IL-10、TNF- $\alpha$ /IL-10比值低于对照组(均 $P=0.000$ ),急性期亦低于稳定期(均 $P=0.000$ )。结论 Th2免疫应答模式在新型隐球菌性脑膜炎急性期起重要作用,至稳定期转变为以Th1为主的免疫反应。提示Th1/Th2免疫应答失衡与新型隐球菌性脑膜炎发病机制密切相关。

**【关键词】** 脑膜炎,隐球菌性; 脑脊髓液; T淋巴细胞,辅助诱导; 干扰素II型; 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ; 白细胞介素10

## Clinical characteristics and expression of Th1-Th2 cytokines in the cerebrospinal fluid of patients with cryptococcal meningitis

BU Hui<sup>1</sup>, WANG Yun-can<sup>1</sup>, DING Wen-ting<sup>2</sup>, HE Jun-ying<sup>1</sup>, ZHAO Yue<sup>1</sup>, LÜ Wen-jing<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Hebei Key Laboratory of Neurology, Shijiazhuang 050000, Hebei, China

<sup>2</sup>Department of Neurology, Harrison International Peace Hospital, Hengshui 053000, Hebei, China

Corresponding author: HE Jun-ying (Email: hjy\_zn@126.com)

**【Abstract】** **Background** Cryptococcal meningitis (CM) is the most common fungal infection of central nervous system, caused by *Cryptococcus neoformans* infection of the meninges. The development and prognosis of CM depend on the patient's own immune function to some extent, and are relative to the imbalance of helper T lymphocyte (Th1/Th2). This study aims to explore the hidden role of the local Th1/Th2 immune response in the pathophysiological process of CM. **Methods** The levels of Th1 cytokines interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and Th2 cytokine interleukin-10 (IL-10) in the cerebrospinal fluid (CSF) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). CSF cytology changes were monitored dynamically to understand the outcome status of patients with CM. **Results** The levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in CM patients [(11.17 $\pm$ 1.50) and (18.74 $\pm$ 2.97) pg/ml, respectively] were significantly lower than that in control patients [(17.69 $\pm$ 2.34) and (28.83 $\pm$ 3.55) pg/ml;  $P=0.000$ , for all]. However, the levels of IL-10 in CM patients [(43.65 $\pm$ 10.12) pg/ml] were significantly higher than that in control patients [(7.80 $\pm$ 1.30) pg/ml,  $P=0.000$ ]. The CSF IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  levels in acute phase of CM patients [(11.17 $\pm$ 1.50) pg/ml and (18.74 $\pm$ 2.97) pg/ml, respectively] were significantly lower than that in

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2014.08.007

作者单位:050000 石家庄,河北医科大学第二医院神经内科 河北省神经病学重点实验室(卜暉,王云灿,何俊瑛,赵越,吕文静);053000 河北省衡水市,哈励逊国际和平医院神经内科(丁文婷)

通讯作者:何俊瑛(Email:hjy\_zn@126.com)

stable phase of CM patients [(17.70 ± 2.34) and (22.93 ± 1.53) pg/ml;  $P=0.000$ , for all]. On the other hand, the levels of IL-10 were significantly higher in the acute phase than that in stable phase [(43.65 ± 10.12) and (22.93 ± 7.39) pg/ml, respectively;  $P=0.000$ ]. The ratios of Th1/Th2 were used to assess the contribution of Th1/Th2 immunity in acute and stable phase of CM patients. The ratios of IFN- $\gamma$ /IL-10 and TNF- $\alpha$ /IL-10 measured in acute phase of CM patients were significantly lower than that in control patients ( $P=0.000$ , for all). These ratios in acute phase patients were also significantly lower than that in stable phase patients ( $P=0.000$ , for all). **Conclusions** In acute phase, the Th2 response is dominant in patients with CM. However, the immune response shifts towards to Th1 response in the stable phase, providing direct evidence that the imbalance of Th1-Th2 cytokines is related to the pathogenesis of CM.

**【Key words】** Meningitis, cryptococcal; Cerebrospinal fluid; T - lymphocytes, helper - inducer; Interferon type II; Tumor necrosis factor-alpha; Interleukin-10

隐球菌系具有荚膜结构的酵母真菌,广泛存在于自然界。自然环境中的隐球菌包含 30 余个种属,分为 A、B、C、D、AD 共 5 种血清型,通常仅新型隐球菌和格特型隐球菌具有致病性。新型隐球菌首先通过呼吸道侵入肺部,机体免疫力正常时可被清除或潜伏感染;机体免疫力低下时即可凭借其毒性因子如荚膜、黑色素、漆酶、尿素酶、磷脂酶等逃避机体免疫反应(包括固有免疫和适应性免疫),扩散至全身。由于新型隐球菌的嗜中枢性,中枢神经系统为其主要攻击部位,通过跨细胞途径、细胞旁途径和“木马机制”等方式突破血-脑屏障,引起致死性新型隐球菌性脑膜炎。虽然,随着抗真菌药物研制水平的提高,新型隐球菌性脑膜炎得到了有效控制与治疗,但获得性免疫缺陷综合征(AIDS,亦称艾滋病)合并新型隐球菌性脑膜炎的病死率仍达 10%~25%,且至少约有 1/3 的新型隐球菌性脑膜炎患者曾经历抗真菌药物治疗的失败<sup>[1]</sup>。因此,了解新型隐球菌性脑膜炎的发展过程,对治疗与判断预后即显得尤为重要。新型隐球菌性脑膜炎的发病过程包括肺内生长、进入血液循环、逃离免疫杀伤机制、穿越血-脑屏障和感染中枢神经系统等阶段<sup>[2-4]</sup>。在发病的不同环节均存在菌体毒性作用与宿主免疫防御作用之间的抗衡。目前研究发现,机体对新型隐球菌的抵御主要依赖宿主的细胞免疫,特别是激活辅助性 T 细胞(Th)亚群 Th1 免疫应答及其细胞因子,如白细胞介素-12(IL-12)、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等。Wormley 等<sup>[5-6]</sup>的研究显示,易感小鼠接种致病性新型隐球菌后,其 Th1 免疫应答减弱并产生 Th2 细胞因子,进一步证实新型隐球菌逃逸宿主清除是以 Th2 为主的免疫应答反应为基础的。辅助性 T 细胞失衡与新型隐球菌性脑膜炎的发生、发展密切相关,有研究显示,新型隐球菌性脑膜炎发生、发展和转归在一定程度上取决于患者

自身免疫功能,并与 Th1/Th2 失衡有关。在本研究中,我们根据患者临床症状和脑脊液细胞学变化,动态监测疾病转归;对脑脊液 Th1 细胞因子(IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ )和 Th2 细胞因子(IL-10)进行定量分析,以探讨中枢神经系统局部 Th1 和 Th2 免疫应答反应在病理生理学过程中的作用。

## 对象与方法

### 一、研究对象

1. 病例选择 (1)脑脊液细胞学[迈-格-姬(MGG)染色、阿利新蓝染色和(或)墨汁染色]检出新型隐球菌。(2)排除血清人类免疫缺陷病毒(HIV)抗体阳性者。(3)对照组须排除存在中枢神经系统感染患者。

2. 不同疾病阶段的定义 根据临床疗效和脑脊液细胞学动态监测结果,新型隐球菌性脑膜炎共分为两期即急性期和稳定期。急性期:临床症状危急、脑脊液细胞学可见成簇的新型隐球菌生长;稳定期:经严格的抗真菌药物治疗 2 周至 1 个月,病情趋于平稳,临床症状与体征明显改善,脑脊液细胞学检测显示新型隐球菌数目明显减少。

### 二、研究方法

1. 脑脊液检测 经腰椎穿刺术采集脑脊液标本 8 ml,分别行常规、生化和细胞学(MGG 染色和阿利新蓝染色)检查。(1)MGG 染色:采集新鲜脑脊液标本 1 ml 置于 Therm-4 Shandon Cytospin 型玻片离心机(英国赛默飞世尔科技公司),离心半径 10 cm、650 r/min 离心 4 min,玻片沉淀物自然干燥后滴加 MGG 染液至完全覆盖标本,静置 5 min,滴加缓冲液混匀、静置 7~8 min,弃染液;玻片自然干燥。于光学显微镜( $\times 1000$ )下观察细胞形态,并进行细胞分类计数。(2)阿利新蓝染色:玻片沉淀物自然干燥后滴加质量分数为 1%阿利新蓝染液至完全覆盖标

**表 1** 脑膜炎组与对照组患者脑脊液指标的比较

**Table 1.** Comparison of CSF indicators between CM group and control group

Item	Control (N = 25)	CM (N = 25)	Z or t value	P value
TCC [M (P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> ), × 10 <sup>6</sup> /L]	4.00 (1.50, 7.00)	100.00 (24.00, 170.00)	-4.755	0.000
WBC [M (P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> ), × 10 <sup>6</sup> /L]	0.00 (0.00, 1.50)	30.00 ( 0.00, 98.00)	-3.936	0.000
Protein [M (P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> ), g/L]	0.28 (0.21, 0.37)	0.56 ( 0.38, 0.89)	-4.275	0.000
Glucose ( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)	3.28 ± 0.42	2.55 ± 1.06	-3.165	0.003
Cl ( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)	123.63 ± 2.70	118.95 ± 6.15	-3.498	0.001

CM, cryptococcal meningitis, 隐球菌性脑膜炎; TCC, total cell count, 总细胞数; WBC, white blood cell, 白细胞

**表 2** 脑膜炎组患者急性期与稳定期脑脊液指标的比较

**Table 2.** Comparison of CSF indicators between acute phase and stable phase of CM

Item	Acute (N = 25)	Stable (N = 25)	Z or t value	P value
TCC [M (P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> ), × 10 <sup>6</sup> /L]	100.00 (24.00, 170.00)	16.00 ( 2.00, 90.00)	-1.542	0.123
WBC [M (P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> ), × 10 <sup>6</sup> /L]	30.00 ( 0.00, 98.00)	2.00 ( 0.00, 30.00)	-2.556	0.011
Protein [M (P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> ), g/L]	0.56 ( 0.38, 0.89)	0.54 ± 0.24*	-1.587	0.112
Glucose ( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)	2.55 ± 1.06	3.28 ± 1.20	-3.084	0.005
Cl ( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)	118.95 ± 6.15	125.20 (122.00, 129.00)#	-3.118	0.002

\* $\bar{x} \pm s$ , #M (P<sub>25</sub>, P<sub>75</sub>). TCC, total cell count, 总细胞数; WBC, white blood cell, 白细胞

本, 静置 15 min。同时留取脑脊液 3 ml, 为了防止蛋白质降解, 置于 -70 °C 冰箱冻存备用。采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 定量检测 Th1-Th2 细胞因子。IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-10 检测试剂盒由上海巧伊生物科技有限公司提供, 操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

2. 病情分级 根据新型隐球菌性脑膜炎临床症状与体征分为<sup>[7]</sup>: I 级, 神志清楚, 无明显神经系统局灶性定位体征; II 级, 注意力减退、意识下降, 或伴轻度神经系统局灶性定位体征, 如眼球外展受限、动眼神经损伤、病理征阳性等; III 级, 意识明显下降, 出现昏睡、昏迷、抽搐发作、脑神经损伤, 或偏瘫或截瘫等。

3. 统计分析方法 本研究采用 SPSS 13.0 统计软件进行实验数据处理与分析。经正态性检验和方差齐性检验, 呈正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 进行两独立样本的 t 检验; 呈非正态分布的计量资料以中位数和四分位数间距 [M (P<sub>25</sub>, P<sub>75</sub>)] 表示, 采用秩和检验。统计推断的检验水准均为  $\alpha = 0.05$ 。

## 结 果

### 一、一般资料

1. 新型隐球菌性脑膜炎组 (脑膜炎组) 选择 2009 年 6 月-2012 年 5 月在河北医科大学第二医院住院治疗的新型隐球菌性脑膜炎患者共 25 例, 均符合新型隐球菌性脑膜炎诊断标准, 且血清 HIV 抗体呈阴性。男性 16 例, 女性 9 例; 年龄 6~78 岁, 平均 (42.12 ± 2.76) 岁; 均经历急性期和稳定期病程。临

床主要表现为发热、难以忍受的剧烈头痛伴恶心、喷射状呕吐; 中枢神经系统局灶性体征, 如眼球外展受限、动眼神经损伤 (5 例)、抽搐发作 (3 例)、重度意识障碍呈嗜睡、昏迷 (3 例)、严重脑神经损伤以视觉或听觉障碍为主 (3 例)。其中 18 例合并基础疾病, 包括肝炎 (5 例)、糖尿病 (4 例)、系统性红斑狼疮 (2 例)、肾脏移植术后 (2 例)、Evans 综合征 (1 例)、重症肌无力 (1 例)、类风湿性关节炎 (1 例)、经皮冠状动脉腔内成形术后 (1 例) 或家禽接触史 (1 例)。抗真菌药物治疗前 I 级 5 例、II 级 10 例、III 级 10 例, 治疗后 I 级 17 例、II 级 6 例、III 级 2 例。本组有 22 例患者临床症状与体征不同程度好转, 其余 3 例无明显改善。

2. 对照组 选择同期在我院住院治疗并经脑脊液检测排除中枢神经系统感染的患者共 25 例, 男性 12 例, 女性 13 例; 年龄 6~58 岁, 平均 (26.32 ± 13.18) 岁。其中, 支气管炎 1 例、瘰病 2 例、血管性头痛 22 例; 病情分级均为 I 级。

### 二、脑脊液检测

与对照组相比, 脑膜炎组患者在疾病不同阶段脑脊液总细胞数、白细胞计数和蛋白定量升高, 葡萄糖和氯化物降低, 组间差异有统计学意义 (均  $P < 0.05$ , 表 1)。与急性期相比, 经抗真菌药物治疗至稳定期, 新型隐球菌性脑膜炎患者脑脊液白细胞计数下降, 葡萄糖和氯化物升高, 治疗前后差异有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 总细胞数和蛋白定量治疗前后差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 表 2)。

1. 脑脊液细胞学动态监测 与治疗前相比, 脑膜炎组患者治疗后脑脊液新型隐球菌消失 4 例、明



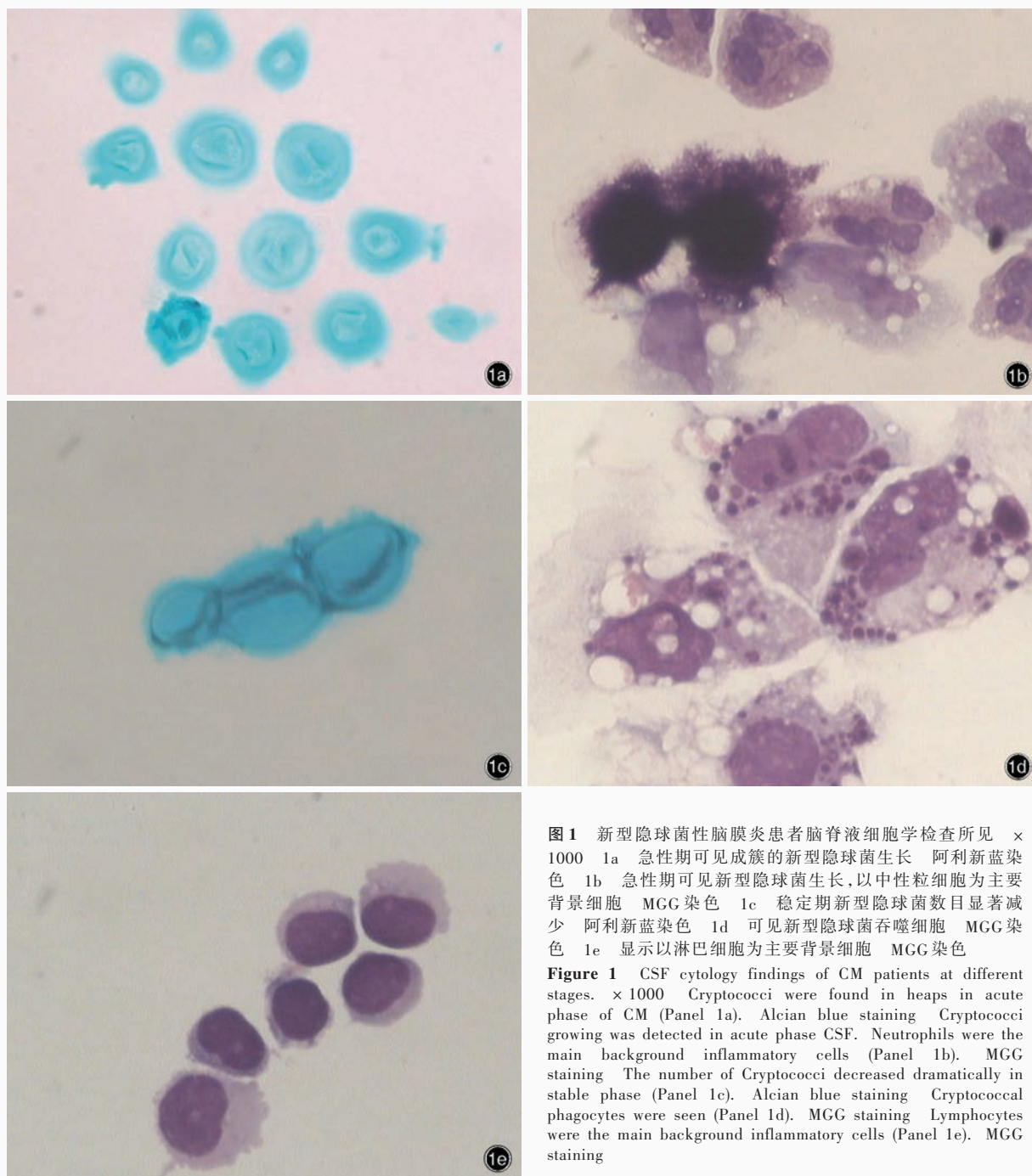


图 1 新型隐球菌性脑膜炎患者脑脊液细胞学检查所见 × 1000 1a 急性期可见成簇的新型隐球菌生长 阿利新蓝染色 1b 急性期可见新型隐球菌生长,以中性粒细胞为主要背景细胞 MGG 染色 1c 稳定期新型隐球菌数目显著减少 阿利新蓝染色 1d 可见新型隐球菌吞噬细胞 MGG 染色 1e 显示以淋巴细胞为主要背景细胞 MGG 染色

**Figure 1** CSF cytology findings of CM patients at different stages. × 1000 Cryptococci were found in heaps in acute phase of CM (Panel 1a). Alcian blue staining Cryptococci growing was detected in acute phase CSF. Neutrophils were the main background inflammatory cells (Panel 1b). MGG staining The number of Cryptococci decreased dramatically in stable phase (Panel 1c). Alcian blue staining Cryptococcal phagocytes were seen (Panel 1d). MGG staining Lymphocytes were the main background inflammatory cells (Panel 1e). MGG staining

显减少 15 例、无变化 6 例。脑脊液新型隐球菌数目变化出现在治疗后 11 ~ 35 d, 平均 21 d, 表明经严格的抗真菌药物治疗后约 20 d 新型隐球菌数目即明显减少。本组有 3 例患者缺乏脑脊液细胞学资料, 其余 22 例治疗前脑脊液中性粒细胞比例 0 ~ 0.90、中位比例为 0.12, 治疗后降至 0 ~ 0.70、中位比例为 0.01, 治疗前后差异有统计学意义 ( $Z = -3.323, P =$

0.001); 淋巴细胞和单核细胞比例趋向正常值范围 (图 1)。

2. 脑脊液 Th1 和 Th2 细胞因子表达变化 与对照组相比, 脑膜炎组患者脑脊液 Th1 细胞因子 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  水平降低、Th2 细胞因子 IL-10 水平升高, 且差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 表 3)。与急性期相比, 经抗真菌药物治疗至稳定期, 脑膜炎组患者脑

**表 3** 脑膜炎组与对照组患者脑脊液细胞因子表达水平的比较( $\bar{x} \pm s$ , pg/ml)

**Table 3.** Comparison of levels of CSF cytokines between CM group and control group ( $\bar{x} \pm s$ , pg/ml)

Group	N	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-10
Control	25	17.69 $\pm$ 2.34	28.83 $\pm$ 3.55	7.80 $\pm$ 1.30
CM	25	11.17 $\pm$ 1.50	18.74 $\pm$ 2.97	43.65 $\pm$ 10.12
<i>t</i> value		-11.246	-10.447	16.847
<i>P</i> value		0.000	0.000	0.000

CM, cryptococcal meningitis, 隐球菌性脑膜炎; IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ , 干扰素- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; IL-10, interleukin-10, 白细胞介素-10

**表 5** 脑膜炎组与对照组患者脑脊液 Th1/Th2 比值的比较( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 5.** Comparison of ratios of Th1 - Th2 cytokines between CM group and control group ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	N	IFN- $\gamma$ /IL-10	TNF- $\alpha$ /IL-10
Control	25	1.81 $\pm$ 0.36	3.84 $\pm$ 1.02
CM	25	0.28 $\pm$ 0.11	0.47 $\pm$ 1.90
<i>t</i> value		-19.655	-15.635
<i>P</i> value		0.000	0.000

CM, cryptococcal meningitis, 隐球菌性脑膜炎; IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ , 干扰素- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; IL-10, interleukin-10, 白细胞介素-10

**表 4** 脑膜炎组患者急性期与稳定期脑脊液细胞因子水平的比较( $\bar{x} \pm s$ , pg/ml)

**Table 4.** Comparison of levels of CSF cytokines between acute phase and stable phase of CM ( $\bar{x} \pm s$ , pg/ml)

Group	N	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-10
Acute	25	11.17 $\pm$ 1.50	18.74 $\pm$ 2.97	43.65 $\pm$ 10.12
Stable	25	17.70 $\pm$ 2.34	22.93 $\pm$ 1.53	22.93 $\pm$ 7.39
<i>t</i> value		-22.182	-2.136	22.069
<i>P</i> value		0.000	0.000	0.000

IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ , 干扰素- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; IL-10, interleukin-10, 白细胞介素-10

**表 6** 脑膜炎组患者急性期与稳定期脑脊液 Th1/Th2 比值的比较( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 6.** Comparison of ratios of Th1 - Th2 cytokines between acute phase and stable phase of CM ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	N	IFN- $\gamma$ /IL-10	TNF- $\alpha$ /IL-10
Acute	25	0.28 $\pm$ 0.11	0.47 $\pm$ 1.90
Stable	25	0.88 $\pm$ 0.38	2.51 $\pm$ 1.15
<i>t</i> value		-10.209	-9.991
<i>P</i> value		0.000	0.000

IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ , 干扰素- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; IL-10, interleukin-10, 白细胞介素-10

脊液 Th1 细胞因子 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  水平升高、Th2 细胞因子 IL-10 水平降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 表 4)。

3. 免疫应答反应 通过 Th1 和 Th2 细胞因子比值反映新型隐球菌性脑膜炎的免疫应答方式, 其结果显示, 脑膜炎组患者脑脊液 IFN- $\gamma$ /IL-10 和 TNF- $\alpha$ /IL-10 均低于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 表 5)。脑膜炎组患者稳定期脑脊液 IFN- $\gamma$ /IL-10 和 TNF- $\alpha$ /IL-10 均高于急性期, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 表 6)。

### 讨 论

近年来, 随着艾滋病的流行、糖皮质激素和免疫抑制剂的滥用, 以及器官移植术的应用, 新型隐球菌性脑膜炎呈现回升态势。一项来自加拿大不列颠哥伦比亚的流行病学调查资料显示, 1999-2007 年该地区共发现 218 例格特型隐球菌感染患者, 平均 24.20 例/年, 且自 1999 年的 6 例增至 2006 年的 38 例<sup>[8]</sup>。新型隐球菌性脑膜炎具有临床表现不典型, 发病隐匿、病程长、病死率高之特点,

故成为中枢神经系统感染性疾病的研究热点。

#### 一、临床表现

新型隐球菌性脑膜炎之临床特点为: (1) 呈亚急性或慢性发病, 因病情轻重而表现多样, 如头痛、恶心、呕吐等颅内高压症状和脑膜刺激征, 或发热、抽搐发作、局灶性神经功能缺损症状和意识障碍等, 难以与其他中枢神经系统感染性疾病相鉴别。(2) 机会性感染易合并基础疾病。新型隐球菌是具有荚膜结构的酵母真菌, 广泛存在于自然界, 为机会性致病菌。格特型隐球菌属主要分布于热带和亚热带, 新型隐球菌可在全球范围内引起感染且主要攻击免疫功能缺陷和受损人群<sup>[1]</sup>, 如艾滋病或器官移植患者。Chuang 等<sup>[9]</sup>发现, 约有 91% 未罹患艾滋病的新隐球菌性脑膜炎患者存在某种程度的免疫功能缺陷, 并合并全身基础疾病如肝硬化 (36%)、糖尿病 (33%)、自身免疫性疾病 (27.30%)。本研究脑膜炎组患者均以头痛、发热为首发症状, 伴或不伴恶心、呕吐; 脑膜刺激征阳性; 多伴基础疾病 (18 例); 并出现脑神经损伤症状, 其中 3 例视力和听力丧失、3 例抽搐发作和意识障碍。

本组有 22 例患者经抗真菌药物治疗后症状与体征不同程度好转,提示免疫功能缺陷和受损人群是新型隐球菌性脑膜炎易感人群,临床症状严重(抽搐发作、脑神经损伤和意识障碍),视神经和前庭蜗神经功能恢复缓慢。存在基础疾病的患者出现难以忍受的剧烈头痛时,应高度警惕新型隐球菌性脑膜炎,及时进行相关检查,早期明确诊断。

## 二、脑脊液检测的诊断价值

脑脊液检测项目包括颅内压、常规和生化等。一般情况下,脑脊液外观清晰透明,新型隐球菌大量存在时呈黏稠状。据文献报道,颅内压明显升高是新型隐球菌性脑膜炎较具特征性的表现,且临床症状与体征严重,如不可耐受的剧烈头痛、视乳头水肿、听觉或视觉损伤和不同程度的精神症状<sup>[10]</sup>。本组有 23 例患者颅内压明显升高( $> 180 \text{ mm H}_2\text{O}$ ,  $1 \text{ mm H}_2\text{O} = 9.81 \times 10^{-3} \text{ kPa}$ ),其中  $> 300 \text{ mm H}_2\text{O}$  者 14 例,经抗真菌药物治疗后明显下降,症状改善。脑脊液总细胞数受多种因素影响,动态观察脑脊液细胞分类可以提供诊断依据。新型隐球菌性脑膜炎脑脊液细胞学变化以白细胞计数增加为典型,本组 25 例患者中 17 例白细胞计数增高 $[(80 \sim 200) \times 10^6/\text{L}]$ 、8 例正常,推测与免疫力低下、机体对入侵的真菌不能产生有效免疫应答反应有关;蛋白定量升高、葡萄糖和氯化物降低符合典型新型隐球菌性脑膜炎诊断标准,尤以葡萄糖降低更为明显,甚至可降至零<sup>[11]</sup>,本组有 3 例葡萄糖水平即低于  $1 \text{ mmol/L}$ ,与文献报道相符。

脑脊液细胞学发现新型隐球菌为诊断金标准。据文献报道,墨汁染色、MGG 染色和阿利新蓝染色的阳性检出率分别为 66.17%、84.10% 和 81.13%;在急性期主要呈混合型细胞反应,可见中性粒细胞和成簇的新型隐球菌,经规范化抗真菌药物治疗至稳定期,新型隐球菌数目显著减少,此时以单核吞噬细胞或淋巴细胞反应为主,可见新型隐球菌吞噬细胞<sup>[12]</sup>。本组 25 例患者发病 11~35 天(平均 21 天)时脑脊液新型隐球菌数目明显减少,提示抗真菌药物治疗后 2 周至 1 个月由急性期进入稳定期,尚需结合患者临床表现确定其疾病转化阶段。由此可见,脑脊液细胞学动态监测具有不可替代的作用。

## 三、新型隐球菌性脑膜炎与机体免疫防御

新型隐球菌性脑膜炎与机体免疫功能密切相关。机体对新型隐球菌的免疫防御机制包括固有

免疫和细胞免疫,前者包括补体系统和吞噬细胞(如中性粒细胞),补体系统主要刺激吞噬细胞趋化和调理病原体以促进其被吞噬<sup>[13]</sup>。细胞免疫是吞噬细胞通过直接识别新型隐球菌的保护性酵母结构[如荚膜多糖、葡萄糖醛酸木糖甘露聚糖(GXM)和半乳糖木糖甘露聚糖(GalXM)]<sup>[14-16]</sup>,或通过补体和抗体发挥免疫调节作用。吞噬细胞还可作为携带新型隐球菌的载体,使其在易感宿主体内存活并在细胞内复制,逃离被感染的吞噬细胞而不被裂解,从而使宿主细胞与新型隐球菌能够共存<sup>[17-18]</sup>,亦称为“木马机制”,急性期脑脊液中可见大量中性粒细胞。

细胞免疫在宿主控制新型隐球菌感染中起最为关键的作用,包括直接的细胞毒性作用和调节细胞因子的产生。直接的细胞毒性作用包括自然杀伤 T 细胞(NKT)、 $\text{CD4}^+$  和  $\text{CD8}^+$  T 细胞,并由分泌蛋白调节<sup>[13,19]</sup>。Th1 细胞因子可增加吞噬活性和抑制新型隐球菌增殖,Th2 细胞因子可使有效控制感染的能力下降<sup>[20]</sup>。扩大 Th1 免疫应答可导致广泛炎症,扩大 Th2 免疫应答则可导致免疫清除能力下降。

在本研究中,新型隐球菌性脑膜炎患者急性期时脑脊液中 Th1 细胞因子  $\text{IFN-}\gamma$  和  $\text{TNF-}\alpha$  明显下降、Th2 细胞因子 IL-10 升高,导致 Th1/Th2 漂移,使得新型隐球菌被吞噬后不能得到有效清除,菌体借助“木马机制”以吞噬细胞为载体进行全身扩散,从而诱发新型隐球菌性脑膜炎。抗真菌药物治疗前病情分级 III 级者 10 例,其脑脊液  $\text{IFN-}\gamma$  约  $10.65 \text{ pg/ml}$ 、 $\text{TNF-}\alpha$  为  $16.76 \text{ pg/ml}$ ,远低于病情较轻者和正常人群;经治疗仍有 3 例患者症状无明显好转且脑脊液  $\text{IFN-}\gamma$  和  $\text{TNF-}\alpha$  水平持续较低、IL-10 水平较高。表明单纯抗真菌药物治疗效果欠佳,患者自身免疫清除能力低下是其持续感染的重要原因。自身免疫功能对新型隐球菌性脑膜炎的发生、发展乃至预后具有重要影响,因此维持机体最佳 Th1/Th2 免疫应答平衡对控制疾病进展至关重要。

## 四、Th1 和 Th2 免疫应答在病理生理学过程中的作用

Voelz 等<sup>[21]</sup>的研究显示,新型隐球菌性脑膜炎患者之预后取决于感染过程中宿主免疫应答反应,以及 Th1/Th2 免疫应答平衡状态。在新型隐球菌感染过程中,Th1 细胞因子( $\text{IFN-}\gamma$ 、 $\text{TNF-}\alpha$  和 IL-12)能够协助宿主清除感染,Th2 细胞因子(IL-4 和 IL-10)则可加重感染<sup>[22]</sup>。一项对感染新型隐球菌后死亡小



鼠的研究显示,其IFN- $\gamma$ 表达水平显著低于存活小鼠<sup>[23]</sup>,提示IFN- $\gamma$ 与新型隐球菌的清除能力密切相关。作为新型隐球菌主要毒性因子的荚膜,其主要成分葡萄糖醛酸木糖甘露聚糖可以激活B细胞,诱导单核细胞产生IL-10,抑制炎症因子分泌<sup>[24]</sup>,表明IL-10与新型隐球菌逃逸宿主免疫清除有关。上述研究表明,辅助性T细胞细胞因子水平可以决定新型隐球菌感染的结局。本研究结果显示,新型隐球菌性脑膜炎患者脑脊液中IL-10水平升高、IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 水平降低,Th1/Th2免疫应答失衡;急性期脑脊液IFN- $\gamma$ /IL-10和TNF- $\alpha$ /IL-10比值显著降低,均低于1,说明Th2免疫应答在新型隐球菌感染急性期发挥主导作用;至稳定期,脑脊液IFN- $\gamma$ /IL-10和TNF- $\alpha$ /IL-10比值明显升高,尤其是TNF- $\alpha$ /IL-10比值高于1,免疫应答模式由急性期的以Th2为主转化为稳定期的以Th1为主。值得注意的是,部分新型隐球菌性脑膜炎患者虽无基础疾病或未长期应用糖皮质激素、抗生素,其脑脊液Th1/Th2比值仍低于1,提示辅助性T细胞免疫应答失衡和Th2细胞因子过表达是新型隐球菌性脑膜炎发生、发展的基础。

#### 参 考 文 献

- [1] Li SS, Mody CH. Cryptococcus. Proc Am Thorac Soc, 2010, 7: 186-196.
- [2] Wilder JA, Olson GK, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Lipscomb MF. Complementation of a capsule deficient Cryptococcus neoformans with CAP64 restores virulence in a murine lung infection. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002, 26:306-314.
- [3] Noverr MC, Williamson PR, Fajardo RS, Huffnagle GB. CNLAC1 is required for extrapulmonary dissemination of Cryptococcus neoformans but not pulmonary persistence. Infect Immun, 2004, 72:1693-1699.
- [4] Olszewski MA, Noverr MC, Chen GH, Toews GB, Cox GM, Perfect JR, Huffnagle GB. Urease expression by Cryptococcus neoformans promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. Am J Pathol, 2004, 164:1761-1771.
- [5] Wormley FL Jr, Perfect JR, Steele C, Cox GM. Protection against cryptococcosis using a murine gamma interferon-producing Cryptococcus neoformans strain. Infect Immun, 2007, 75:1453-1462.
- [6] Wormley FL Jr, Cox GM, Perfect JR. Evaluation of host immune responses to pulmonary Cryptococcosis using a temperature-sensitive Cryptococcus neoformans calcineurin A mutant strain. Microb Pathog, 2005, 38(2/3):113-123.
- [7] Fox A, Jeffries DJ, Hill PC, Hammond AS, Lugos MD, Jackson-Sillah D, Donkor SA, Owiafe PK, McAdam KP, Brookes RH. ESAT-6 and CFP-10 can be combined to reduce the cost of testing for Mycobacterium tuberculosis infection, but CFP-10 responses associate with active disease. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2007, 101:691-698.
- [8] Galanis E, Macdougall L, Kidd S, Morshed M; British Columbia Cryptococcus gattii Working Group. Epidemiology of Cryptococcus gattii, British Columbia, Canada, 1999-2007. Emerg Infect Dis, 2010, 16:251-257.
- [9] Chuang YM, Ho YC, Chang HT, Yu CJ, Yang PC, Hsueh PR. Disseminated cryptococcosis in HIV-uninfected patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2008, 27:307-310.
- [10] Wang XG, Xu QH. Clinical analysis of 65 cases of Cryptococcus neoformans meningitis. Zhongguo Shi Yong Nei Ke Za Zhi, 2004, 24:310. [王晓光, 徐启恒. 新型隐球菌性脑膜炎 65 例临床分析. 中国实用内科杂志, 2004, 24:310.]
- [11] He JY, He HY, Meng ZH, Jin BF. Discussion of early diagnosis and curative effect of cryptococcal meningitis (30 cases report). Zhongguo Shen Jing Jing Shen Ji Bing Za Zhi, 2007, 33:433-435. [何俊琪, 何红彦, 孟兆华, 金便芳. 隐球菌性脑膜炎早期诊断及疗效探讨(附30例报道). 中国神经精神疾病杂志, 2007, 33:433-435.]
- [12] He JY, Kong FY, Guo L. Clinical cerebrospinal fluid cytology diagnosis. Shijiazhuang: Hebei Scientific and Technical Publisher, 2007: 147-149. [何俊琪, 孔繁元, 郭力. 临床脑脊液细胞学诊断. 石家庄: 河北科学技术出版社, 2007: 147-149.]
- [13] Voelz K, May RC. Cryptococcal interactions with the host immune system. Eukaryot Cell, 2010, 9:835-846.
- [14] Shoham S, Huang C, Chen JM, Golenbock DT, Levitz SM. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to Cryptococcus neoformans polysaccharide capsule. J Immunol, 2001, 166:4620-4626.
- [15] Pietrella D, Corbucci C, Perito S, Bistoni G, Vecchiarelli A. Mannoproteins from Cryptococcus neoformans promote dendritic cell maturation and activation. Infect Immun, 2005, 73:820-827.
- [16] Syme RM, Spurrell JC, Amankwah EK, Green FH, Mody CH. Primary dendritic cells phagocytose Cryptococcus neoformans via mannose receptors and Fc gamma receptor II for presentation to T lymphocytes. Infect Immun, 2002, 70:5972-5981.
- [17] Ma H, Croudace JE, Lammas DA, May RC. Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. Curr Biol, 2006, 16:2156-2160.
- [18] Alvarez M, Casadevall A. Phagosome extrusion and host-cell survival after Cryptococcus neoformans phagocytosis by macrophages. Curr Biol, 2006, 16:2161-2165.
- [19] Zheng CF, Ma LL, Jones GJ, Gill MJ, Krensky AM, Kubes P, Mody CH. Cytotoxic CD4+ T cells use granulysin to kill Cryptococcus neoformans, and activation of this pathway is defective in HIV patients. Blood, 2007, 109:2049-2057.
- [20] Milam JE, Herring-Palmer AC, Pandrangi R, McDonald RA, Huffnagle GB, Toews GB. Modulation of the pulmonary type 2 T-cell response to Cryptococcus neoformans by intratracheal delivery of a tumor necrosis factor alpha-expressing adenoviral vector. Infect Immun, 2007, 75:4951-4958.
- [21] Voelz K, Lammas DA, May RC. Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by Cryptococcus neoformans. Infect Immun, 2009, 77:3450-3457.
- [22] Vecchiarelli A. Immunoregulation by capsular components of Cryptococcus neoformans. Med Mycol, 2000, 38:407-417.
- [23] Chiappello LS, Baronetti JL, Aoki MP, Gea S, Rubinstein H, Masih DT. Immunosuppression, interleukin-10 synthesis and apoptosis are induced in rats inoculated with Cryptococcus neoformans glucuronoxylomannan. Immunology, 2004, 113:392-400.
- [24] Siddiqui AA, Brouwer AE, Wuthiekanun V, Jaffar S, Shattock R, Irving D, Sheldon J, Chierakul W, Peacock S, Day N, White NJ, Harrison TS. IFN-gamma at the site of infection determines rate of clearance of infection in cryptococcal meningitis. J Immunol, 2005, 174:1746-1750.

(收稿日期:2014-07-01)