



SBi4211 阻断 HIV-1 gp41 促进新生隐球菌对人脑微血管内皮细胞的黏附作用

魏轶¹ 彭亮^{2,3} 李莉^{3,4} 何肖龙¹ 吴学东^{3,5} 曾志节¹ 杨伟军¹ 曹虹^{*1} 黄胜和^{*1,3}

1 南方医科大学公共卫生学院 广东省热带病研究重点实验室 微生物学系 广东 广州 510515

2 广州医科大学附属第五医院检验科 广东 广州 510700

3 Saban Research Institute, Children's Hospital Los Angeles, University of Southern California, Los Angeles 90027, America

4 昆明市儿童医院云南省儿科研究所 昆明市儿童感染与免疫重点实验室 云南 昆明 650228

5 南方医科大学南方医院儿科系 广东 广州 510515

摘要:【背景】目前艾滋病和新型隐球菌性脑膜炎共病因素导致其高发病率和死亡率的机制尚不明确。【目的】探索 S100B 抑制剂 SBi4211 对 HIV-1 gp41 促进新生隐球菌黏附人脑微血管内皮细胞的影响和可能机制。【方法】黏附实验分析 SBi4211 是否能阻断 HIV-1 gp41 诱导下新生隐球菌黏附人脑微血管内皮细胞。使用免疫印迹方法进一步检测在此过程中 SBi4211 对脑微血管内皮细胞上新生隐球菌透明质酸受体 CD44 表达的影响。【结果】SBi4211 可显著抑制 HIV-1 gp41 对新生隐球菌黏附脑微血管内皮细胞的增强作用,且呈时间、剂量效应($P < 0.05$);免疫印迹结果显示 SBi4211 可抑制新生隐球菌和/或 HIV-1 gp41 增加脑微血管内皮细胞上新生隐球菌透明质酸受体 CD44 的表达。【结论】SBi4211 可通过下调受体 CD44 来阻断 HIV-1 gp41 对新生隐球菌黏附人脑微血管内皮细胞的增强效应,这为了解 HIV-1 与新生隐球菌共病机制及其防治策略提供了新思路。

关键词: 新生隐球菌, S100B 抑制剂, HIV-1 gp41, CD44, 人脑微血管内皮细胞

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (81370740); Key Program of Natural Science Foundation of Guangdong Province (2017B030311017); China Postdoctoral Science Foundation (2018M633076)

*Corresponding authors: E-mail: Cao Hong: gzhcao@smu.edu.cn; Huang Sheng-He: shhuang@usc.edu

Received: 15-12-2018; **Accepted:** 25-03-2019; **Published online:** 10-04-2019

基金项目: 国家自然科学基金(81370740); 广东省自然科学基金重点项目(2017B030311017); 中国博士后科学基金(2018M633076)

*通信作者: E-mail: 曹虹: gzhcao@smu.edu.cn; 黄胜和: shhuang@usc.edu

收稿日期: 2018-12-15; 接受日期: 2019-03-25; 网络首发日期: 2019-04-10

HIV-1 gp41-enhanced binding of *Cryptococcus neoformans* to human brain microvascular endothelial cells is blocked by SBi4211

WEI Yi¹ PENG Liang^{2,3} LI Li^{3,4} HE Xiao-Long¹ WU Xue-Dong^{3,5} ZENG Zhi-Jie¹
YANG Wei-Jun¹ CAO Hong^{*1} HUANG Sheng-He^{*1,3}

1 Department of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Tropical Diseases Research, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China

2 Department of Clinical Laboratory, The Fifth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510700, China

3 Saban Research Institute, Children's Hospital Los Angeles, University of Southern California, Los Angeles 90027, America

4 Kunming Key Laboratory of Children Infection and Immunity, Yunnan Institute of Pediatrics, Kunming Children's Hospital, Kunming, Yunnan 650228, China

5 Department of Pediatrics, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China

Abstract: [Background] The prevalence of neuroAIDS and *Cryptococcus neoformans* meningitis has significantly increased and the mechanism remains unclear. [Objective] To study the inhibitory effect of SBi4211 on adhesion of *C. neoformans* to human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) induced by HIV-1 gp41. [Methods] The adhesion experiments were carried out to determine whether SBi4211 could block *C. neoformans* adhesion. Furthermore, the expression of hyaluronic acid CD44 was analyzed by the Western Blot method (WB) during the adhesion process. [Results] SBi4211 could significantly inhibit the HIV-1 gp41-enhanced adhesion of *C. neoformans* to HBMEC in a dose- and time-dependent manner ($P < 0.05$). Meanwhile expression of the *C. neoformans* hyaluronic acid receptor CD44 on HBMEC is down regulated. [Conclusion] Our study suggested SBi4211 could block HIV-1 gp41-enhanced adhesion of *C. neoformans* to HBMEC by reducing expression of receptor CD44, which might provide novel insights into understanding the mechanisms of *C. neoformans* and HIV-1 associated comorbidity besides its prevention and treatment.

Keywords: *C. neoformans*, S100B inhibitor, HIV-1 gp41, CD44, Human brain microvascular endothelial cells

新生隐球菌(*C. neoformans*)感染在侵入性真菌感染案例中占重要部分,在机体免疫力低下的病人如艾滋病、白血病和糖尿病等患者中尤为多见^[1]。隐球菌病是艾滋病最常见的中枢神经系统(Central nervous system, CNS)真菌感染^[2],与人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)共同感染造成神经损伤,其中包括突破血脑屏障(Blood brain barrier, BBB)而感染 CNS 导致高致死率的隐球菌性脑膜炎^[3]。目前治疗隐球菌性脑膜炎的药物主要有两性霉素 B、5-氟胞嘧啶及咪唑类抗真菌药物联合治疗^[4]。上述治疗对约 85%非艾滋病患者有效,但仅对 50%艾滋病患者有效^[5-6],足以说明隐球菌感染在艾滋病阳性病人中用药困难。因此,亟待开发新的艾滋病合并隐球菌性脑膜炎的防治药物。

S100 蛋白家族结合并调节众多蛋白质靶标,具有多种生物学功能。在 Domer 等^[7]的研究中,证明

S100B 在真菌感染的过程中参与炎症发展,并表现出高浓度 S100B 具有神经毒性,而抑制 S100B 的表达可起到神经保护作用。在 Adami 等^[8]的研究中, S100B 在隐球菌性脑膜炎中调节小胶质细胞的吞噬功能。此外,一项回顾性分析指出, S100B 与 CD44 抗原都参与了黑色素瘤的发展进程,且它们的表达量与恶性程度呈正相关^[9]。上述研究提示可通过抑制 S100B 来影响 *C. neoformans* 侵入 CNS,以达到预防或治疗隐球菌感染的作用。本研究使用的 S100B 抑制剂是在戊脒(Pentamidine)基础上通过分子改造得到的庚脒(Heptanmin, SBi4211)^[10],已通过三期临床试验,在治疗黑色素瘤应用方面较为成熟^[11]。

C. neoformans 黏附人脑微血管内皮细胞(Human brain microvascular endothelial cells, HBMEC),是 *C. neoformans* 与 HIV 共同感染中穿过 BBB 导致脑损伤的重要途径,猜测在现有治疗方

法如直接杀死、抑制生长和免疫激化^[12]的基础上,是否存在一种药物阻止 *C. neoformans* 穿越 BBB。

前期研究已证实在艾滋病合并隐球菌感染导致的脑损伤中,跨膜蛋白 gp41 可诱导 *C. neoformans* 黏附 HBMEC^[13-15]。本研究将利用黏附实验分析 S100B 抑制剂 SBi4211 对 gp41 诱导下的 *C. neoformans* 黏附 HBMEC 是否有阻抑作用,并探索该过程是否通过降低宿主细胞 CD44 的表达来实现。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、主要试剂和仪器

C. neoformans 野生株 B4500FO2 培养于 YPD 液体培养基^[16]。收集对数生长期新生隐球菌, PBS 洗 3 次,重悬于含 2% 胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS) 1640 培养基中,光学显微镜下用血球计数板直接计数。

葡萄糖、酵母提取物, Solarbio 公司; 1640 细胞培养基, Gibco 公司; FBS, PAN 公司; SBi4211, 常州康卫生物技术有限公司, 相对分子质量 368.48; 膜蛋白提取试剂盒, 碧云天生物科技有限公司; CD44 抗体、Na/K ATPase 抗体、辣根过氧化物酶标记的二抗, Proteintech Group 公司。

光学显微镜, Nikon 公司; 电转仪, Bio-Rad 公司。

1.1.2 人脑微血管内皮细胞及培养

HBMEC 来自美国南加州大学洛杉矶儿童医院。HBMEC 完全培养基: 1640 细胞培养基, 10% (体积比) FBS, 1% (体积比) 青链霉素, 4 °C 保存备用, 现配现用。37 °C 二氧化碳恒温箱中培养。

1.1.3 SBi4211

将粉末状 SBi4211 溶于 1 mL DMSO 中, 配成终浓度为 10 mmol/L 的储存液, 4 °C 避光保存。临用前取 0.1 mL 储存液加 0.9 mL PBS 稀释, 浓度为 1 mmol/L。

1.2 实验方法

1.2.1 黏附实验

将 HBMEC 浓度调整为 5×10^5 CFU/mL, 1 mL/孔

铺于 24 孔板, 37 °C、5% CO₂ 培养 12 h, 实验共分 5 组(空白对照组、对照组、SBi4211 组、gp41 组、SBi4211+gp41 组), 其中 SBi4211 组经 1 μmol/L SBi4211 预处理 6 h; gp41 组经 25 mg/L gp41 预处理 3 h; SBi4211+gp41 组先经 1 μmol/L SBi4211 预处理 6 h, 再经 25 mg/L gp41 处理 3 h。各组预处理完成后加入 1×10^6 CFU/mL *C. neoformans* 共同孵育 3 h。

培养结束后弃去培养液, 用 PBS 洗 3 次, 加入 100 μL/孔 PBS, 用枪头反复吹打至 *C. neoformans* 基本剥落。按 1:2 的比例用 PBS 进行梯度稀释涂布 YPD 平板, 37 °C 培养 24 h 后进行单菌落计数。选择合适的稀释倍数, 取该稀释度两平行培养皿的平均值, 计算 *C. neoformans* 对 HBMEC 的黏附率。黏附率=(培养皿菌落数均值×稀释倍数/ 5×10^5)×100%。观察 SBi4211 对 gp41 诱导的 *C. neoformans* 黏附 HBMEC 的作用。实验重复至少 3 次。

同上述方法, SBi4211 按处理浓度分为 5 组(0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 μmol/L), 按处理时间分为 4 组(0、2、4 和 6 h), 经 25 mg/L gp41 预处理 3 h 后分别进行黏附实验。计算 *C. neoformans* 对 HBMEC 的黏附率。观察 SBi4211 处理浓度和处理时间对 gp41 诱导的 *C. neoformans* 黏附 HBMEC 的作用。实验重复至少 3 次。

1.2.2 免疫印迹法(Western blot, WB)检测不同处理组受体 CD44 表达的变化

将 HBMEC 浓度调整为 5×10^5 /mL, 10 mL/孔铺于 10 cm 培养皿, 实验分组及处理同上, 探究在上述处理过程中 HBMEC 上受体 CD44 蛋白表达的变化。

培养结束后弃去培养液, 预冷 PBS 洗 3 次, 提取膜蛋白。收集细胞膜蛋白溶液, BCA 法测蛋白浓度, 进行 SDS-PAGE 电泳, 将电泳产物转印到 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 分别加入兔抗 CD44 及 Na/K ATPase 抗体 4 °C 孵育过夜。洗膜后用对应辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h, 再次洗膜后用化学发光法显色, 观察各组蛋白表达量。

1.2.3 统计学处理

所有实验至少重复 3 次, 以均数±标准差表示数据, 以 t 检验来确定对照组和实验组之间的差异。使用软件 SPSS 20.0 进行统计分析, $P < 0.05$ 表明有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 SBi4211 可以抑制 gp41 诱导下的新生隐球菌黏附脑微血管内皮细胞

经 gp41 诱导后, *C. neoformans* 对 HBMEC 的黏附显著增加($P < 0.01$), 与前期实验结果相符; 经 SBi4211 预处理后, *C. neoformans* 对 HBMEC 的黏附率低于对照组($P < 0.01$), 提示 SBi4211 可抑制 gp41 诱导下的新生隐球菌黏附 HBMEC, 结果见图 1。图 1 中空白对照组黏附率为零, 因此未在图中标出。

2.2 gp41 诱导的 *C. neoformans* 对 HBMEC 的黏附率随药物 SBi4211 处理浓度的增加而降低

各组同时经 gp41 诱导, 再经不同浓度的 SBi4211 预处理 6 h 后, 黏附率随药物处理浓度的增加而降低。浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 时, 黏附率有降低趋势($P < 0.01$); 药物浓度为 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 时, 黏附率显著降低($P < 0.0001$); 药物浓度为 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, 黏附率接近零($P < 0.0001$), 见图 2。

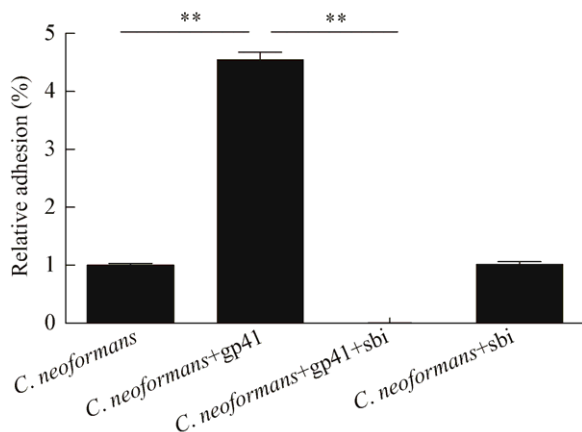


图 1 SBi4211 对 gp41 诱导 *C. neoformans* 黏附 HBMEC 黏附率的影响

Figure 1 Gp41-enhanced binding of *C. neoformans* to HBMEC treated with SBi4211

Note: **: $P < 0.01$.

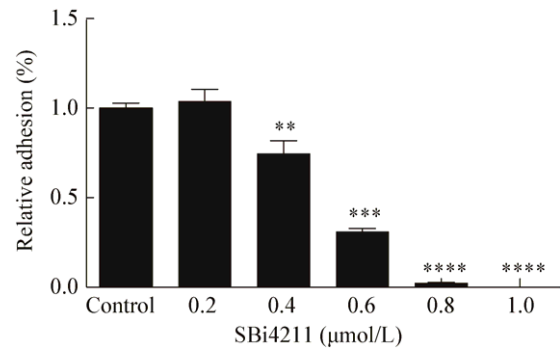


图 2 SBi4211 浓度梯度对 gp41 诱导 *C. neoformans* 黏附 HBMEC 黏附率的影响

Figure 2 Dose-dependent effects of SBi4211 on gp41-induced adhesion of *C. neoformans* to HBMEC

Note: **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$ vs. control.

2.3 gp41 诱导的 *C. neoformans* 对 HBMEC 的黏附率随药物 SBi4211 处理时间的增加而降低

各组同时经 gp41 诱导, 再经 1.0 $\mu\text{mol/L}$ SBi4211 预处理, 黏附率随药物处理时间增加而降低。处理时间为 2 h 时, 黏附率有降低趋势($P < 0.01$); 处理时间为 4 h 时, 黏附率显著降低($P < 0.0001$); 处理时间为 6 h 时, 黏附率接近零($P < 0.0001$), 见图 3。

2.4 SBi4211 下调了 HBMEC 上受体 CD44 的表达

研究表明在 *C. neoformans* 对 HBMEC 的黏附中, CD44 发挥重要作用, 作为 HBMEC 上的独立因子受体可与 *C. neoformans* 上透明质酸结合, 辅助

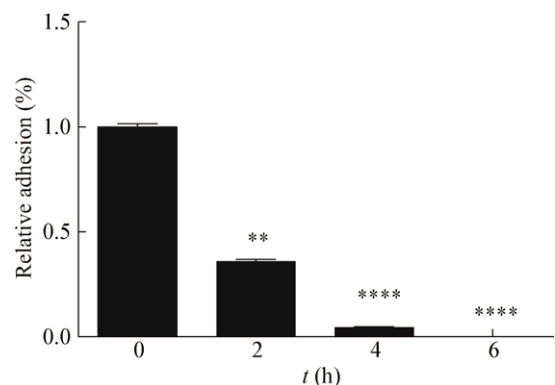


图 3 SBi4211 时间梯度对 gp41 诱导 *C. neoformans* 黏附 HBMEC 黏附率的影响

Figure 3 Time-dependent effects of SBi4211 on gp41-induced adhesion of *C. neoformans* to HBMEC

Note: **: $P < 0.01$; ****: $P < 0.0001$ vs. control.

黏附过程。经 gp41 诱导后, CD44 表达显著增高, 与前期研究一致; 而经 SBI4211 预处理的实验组 CD44 的表达明显减少, 提示 SBI4211 可下调受体 CD44 的表达。3 次 WB 实验结果一致, 选取代表性图片见图 4A。

gp41 诱导的 *C. neoformans* 黏附 HBMEC 过程中, 经 SBI4211 浓度梯度处理, 在 0.2–1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的范围内, 随浓度增加, CD44 表达逐渐减少; 处理浓度为 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, CD44 表达量最低(图 4B)。经 SBI4211 时间梯度处理, 在 0–6 h 的范围内, 随预处理时间增加, CD44 含量降低, 预处理时间达 6 h 时 CD44 表达量最少(图 4C)。

3 讨论与结论

HIV 跨膜蛋白 gp41 是 HIV 包膜蛋白复合物的亚基, 有研究^[13–15]验证了 HIV-1 gp41 的胞外域片段 gp41-I33 和 gp41-I90 可以增强 *C. neoformans* 与 HBMEC 结合, 而 *C. neoformans* 对 HBMEC 的黏附是其穿越 BBB 的一个重要步骤。

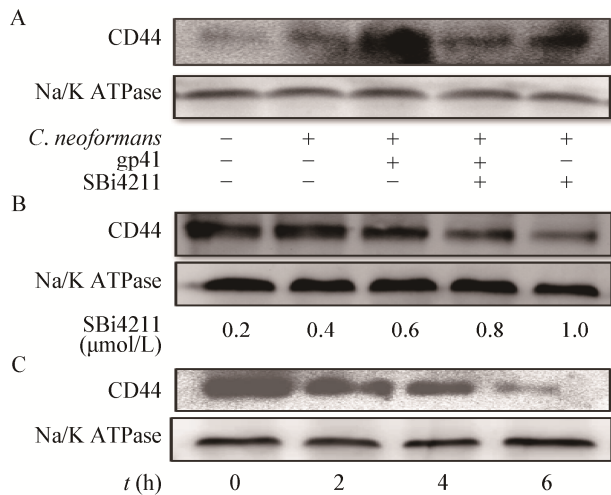


图 4 SBI4211 处理对 HBMEC 上受体蛋白 CD44 表达的影响

Figure 4 Level of CD44 on HBMEC treated with SBI4211

注: A: 空白对照组、对照组、gp41 组、SBI4211+gp41 组、SBI4211 组 CD44 的表达; B: 浓度依赖关系; C: 时间依赖关系。

Note: A: Western blot analysis of CD44 in five groups (control, *C. neoformans*, gp41, SBI4211+gp41, SBI4211); B: Western blot analysis of CD44 in a dose-dependent manner; C: Western blot analysis of CD44 in a time-dependent manner.

HBMEC 表达的 CD44 蛋白是 *C. neoformans* 感染期间的主要受体, 是该菌荚膜的主要毒力因子透明质酸结合部位^[17–18], CD44 对 gp41 诱导的单核细胞黏附内皮细胞和迁移通过 BBB 模型时起重要作用^[19–20]。前期的研究表明 *C. neoformans* 黏附过程中 CD44 表达明显上调^[21], 其中可能有脂筏的参与^[22]。作为结合位点, CD44 在整个过程中的作用不可小觑。

本研究探讨了药物 SBI4211 是否可以阻止 *C. neoformans* 黏附 HBMEC。我们发现 SBI4211 可以抑制 gp41 诱导的 *C. neoformans* 黏附 HBMEC, 在这个过程中下调透明质酸与 HBMEC 结合的毒力因子受体 CD44 的表达, 同时本研究浓度范围内 SBI4211 不直接作用于 *C. neoformans*, 不具有杀菌作用。我们推测 SBI4211 下调了 CD44 的表达, 从而阻断 gp41 诱导 *C. neoformans* 黏附 HBMEC。

SBI4211 同系物喷他脒可跨越 BBB, 用于治疗中枢神经感染阶段 I 期非洲人类锥虫病^[23]。在阿兹海默症小鼠模型中, 喷他脒有效地减轻了小鼠的脑损伤程度^[24]。本研究中的 SBI4211 作为喷他脒的同系物具有相似的化学性质, 且抑制 S100B 能力更强的 SBI4211 跨越 BBB 参与大脑内隐球菌感染的治疗, 减少神经损伤成为可能, 该药物已经通过了三期临床试验, 目前较多应用在治疗黑色素瘤上^[11]。此种“老药新用”的手段可极大地节省试验成本、规避毒副作用、缩短上市时间, 在药物开发研究中愈受重视。

在未来的研究中我们将继续探讨 SBI4211 是否可以减轻细菌性败血症与脑膜炎(Bacterial sepsis and meningitis, BSM)的三联特征, 并且探究其通过何种作用机制来降低 *C. neoformans* 与 HIV-1 共同感染引起的脑损伤。通过以上讨论我们认为, SBI4211 这一药物在未来 HIV 阳性病人感染 *C. neoformans* 的治疗中可能具有重要意义, 这为真菌性脑部感染提供了新思路, 值得进一步研究探索。

REFERENCES

[1] Esher SK, Zaragoza O, Alspaugh JA. Cryptococcal pathogenic

- mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain[J]. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2018, 113(7): e180057
- [2] Drummond RA. Neuro-immune mechanisms of anti-cryptococcal protection[J]. *Journal of Fungi*, 2018, 4(1): 4
- [3] Henao-Martínez AF, Chastain DB, Franco-Paredes C. Treatment of cryptococcosis in non-HIV immunocompromised patients[J]. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2018, 31(4): 278-285
- [4] Liu ZY, Wang GQ, Zhu LP, et al. Expert consensus on the diagnosis and treatment of cryptococcal meningitis[J]. *Chinese Journal of Internal Medicine*, 2018, 57(5): 317-323 (in Chinese)
刘正印, 王贵强, 朱利平, 等. 隐球菌性脑膜炎诊治专家共识[J]. *中华内科杂志*, 2018, 57(5): 317-323
- [5] Li WL, Devied A. Clinical analysis of 31 cases of AIDS complicated with cryptococcal meningitis[J]. *Chinese Journal of Clinical Neurosciences*, 2001, 9(2): 193-194 (in Chinese)
李微浪, Devied A. 31 例艾滋病合并隐球菌脑膜炎临床分析[J]. *中国临床神经科学*, 2001, 9(2): 193-194
- [6] Guan JL, Li YP, Cai WP. Clinical analysis on 100 cases of AIDS combined with cryptococcal meningitis[J]. *International Medicine and Health Guidance News*, 2014, 20(9): 1185-1188 (in Chinese)
关家龙, 李粤平, 蔡卫平. 艾滋病合并新型隐球菌性脑膜炎 100 例临床分析[J]. *国际医药卫生导报*, 2014, 20(9): 1185-1188
- [7] Domer JE, Carrow EW. Immunity to fungal infections[A]/Eisenstein TK, Actor P, Friedman H. *Host Defenses to Intracellular Pathogens[M]*. Boston, MA: Springer, 1983: 383-406
- [8] Adami C, Sorci G, Blasi E, et al. S100B expression in and effects on microglia[J]. *Glia*, 2001, 33(2): 131-142
- [9] Sviatoha V, Tani E, Kleina R, et al. Immunohistochemical analysis of the S100A1, S100B, CD44 and Bcl-2 antigens and the rate of cell proliferation assessed by Ki-67 antibody in benign and malignant melanocytic tumours[J]. *Melanoma Research*, 2010, 20(2): 118-125
- [10] McKnight LE, Raman EP, Bezawada P, et al. Structure-based discovery of a novel pentamidine-related inhibitor of the calcium-binding protein S100B[J]. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2012, 3(12): 975-979
- [11] Alasady MJ, Adipietro KA, Pierce AD, et al. Abstract 315: S100B regulates IL-6 signaling via the p90 ribosomal S6 kinase (RSK) in malignant melanoma[J]. *Cancer Research*, 2017, 77(S13): 315
- [12] Elsegeiny W, Marr KA, Williamson PR. Immunology of cryptococcal infections: developing a rational approach to patient therapy[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 651
- [13] Chang YC, Jong A, Huang S, et al. *CPSI*, a homolog of the *Streptococcus pneumoniae* type 3 polysaccharide synthase gene, is important for the pathobiology of *Cryptococcus neoformans*[J]. *Infection and Immunity*, 2006, 74(7): 3930-3938
- [14] Huang SH, Wu CH, Jiang SB, et al. HIV-1 gp41 ectodomain enhances *Cryptococcus neoformans* binding to human brain microvascular endothelial cells via gp41 core-induced membrane activities[J]. *Biochemical Journal*, 2011, 438(3): 457-466
- [15] Jong A, Wu CH, Prasadarao NV, et al. Invasion of *Cryptococcus neoformans* into human brain microvascular endothelial cells requires protein kinase C- α activation[J]. *Cellular Microbiology*, 2008, 10(9): 1854-1865
- [16] Sabiti W, May RC. Capsule independent uptake of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* into brain microvascular endothelial cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35455
- [17] Jong A, Wu CH, Shackleford GM, et al. Involvement of human CD44 during *Cryptococcus neoformans* infection of brain microvascular endothelial cells[J]. *Cellular Microbiology*, 2008, 10(6): 1313-1326
- [18] Zhang LK, Qiu JW, Liang XL, et al. Role of CD44 in monocyte transmigration across *Cryptococcus neoformans*-infected blood-brain barrier *in vitro*[J]. *Journal of Southern Medical University*, 2015, 35(4): 468-473 (in Chinese)
张立科, 邱嘉文, 梁晓路, 等. CD44 在新生隐球菌体外感染血脑屏障中对单核细胞迁移的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2015, 35(4): 468-473
- [19] Zhang B, Yu JY, Liu LQ, et al. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor is required for blood-brain barrier injury-related CNS disorders caused by *Cryptococcus neoformans* and HIV-1 associated comorbidity factors[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2015, 15: 352
- [20] Jong A, Wu CH, Gonzales-Gomez I, et al. Hyaluronic acid receptor CD44 deficiency is associated with decreased *Cryptococcus neoformans* brain infection[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(19): 15298-15306
- [21] Huang SH, Long M, Wu CH, et al. Invasion of *Cryptococcus neoformans* into human brain microvascular endothelial cells is mediated through the lipid rafts-endocytic pathway via the dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 3 (DYRK3)[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(40): 34761-34769
- [22] Long M, Huang SH, Wu CH, et al. Lipid raft/caveolae signaling is required for *Cryptococcus neoformans* invasion into human brain microvascular endothelial cells[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2012, 19: 19
- [23] Sekhar GN, Georgian AR, Sanderson L, et al. Organic cation transporter 1 (OCT1) is involved in pentamidine transport at the human and mouse blood-brain barrier (BBB)[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173474
- [24] Cirillo C, Capoccia E, Iuvone T, et al. S100B inhibitor pentamidine attenuates reactive gliosis and reduces neuronal loss in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *BioMed Research International*, 2015: 508342