

肌萎缩侧索硬化患者血浆中趋化因子 FKN 表达降低及其意义

阎俊^{1,2}, 徐运^{1*}, 曹翔¹, 刘斌², 朱骏²

(¹ 南京大学附属鼓楼医院神经内科, 江苏 南京 210008; ² 南京医科大学附属脑科医院老年医学科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)疾病进展过程中, 趋化因子(fractalkine, FKN)对受损的运动神经元可能起保护作用, 但有关 ALS 患者血浆 FKN 表达的研究还未见报道, 本文对 FKN 在 ALS 患者病程中的免疫炎症机制做初步研究, 探索该指标是否可以成为潜在的血浆生物学标志, 尝试寻找治疗 ALS 的新方法。方法: 采用 MILLIPLEX MAP 液相芯片技术, 检测 51 例 ALS 患者与 60 例正常对照的血浆 FKN 水平, 按性别、病程、起病部位、疾病严重程度分组, 研究患者与正常对照组血浆 FKN 水平。结果: 患者的血浆 FKN 水平比正常对照低($P < 0.05$), 分析表明: 各亚组患者血浆 FKN 水平均比正常对照低(P 均 < 0.05); 病程 > 12 个月患者的 FKN 水平比病程 ≤ 12 个月的患者高($P < 0.05$), 其余亚组之间 FKN 水平差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05); 另外, 患者的血浆 FKN 水平与病程无统计相关性($P > 0.05$)。结论: 患者的血浆 FKN 水平比正常对照低, 提示其与 ALS 可能有一定关联, 具体作用机制还有待今后深入探索。

[关键词] 肌萎缩侧索硬化; MILLIPLEX MAP 液相芯片; 趋化因子

[中图分类号] R746

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)11-1441-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20171115

肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一种严重的神经系统变性疾病, 该疾病为选择性中枢神经系统上下运动神经元丢失, 临床表现为进行性加重的肌肉萎缩、无力, 严重时影响呼吸肌, 出现呼吸衰竭, 生存期从数月几十年不等, 病程通常在首次症状出现后的 3 年内^[1]。目前已提出遗传、免疫炎症、神经纤维丝重链基因突变、氨基酸兴奋性中毒等多种病理机制^[2-4], 其中免疫炎症机制引起越来越多的注意^[5]。

FKN (fractalkine) 分子是经 Blast 分析法得到的 CX3C 型趋化因子, 在运动神经元受损早期的 ALS 动物模型中, 激活的小胶质细胞呈 M2 表型, 可释放细胞因子和营养因子修复损伤的运动神经元, 促进再生, 这一过程可能与 CD200 和 FKN 的作用有关^[6]。另有研究表明: 通过与小胶质细胞受体 CX3CR1 结合, FKN 参与了神经元和胶质细胞间的作用^[7]。ALS 病程中, FKN 对受损的运动神经元可能起保护作用, ALS 患者血脑屏障和血脊屏障受损^[8-9], 对外周血 FKN 的研究可间接反映中枢神经系统中有关 FKN 的免疫炎症反应情况, 自 1965 年以来, 来自脑脊液、血清、尿液的 ALS 生物标记已被多方研究^[10],

现阶段尚无 ALS 患者血浆 FKN 表达研究的文献报道, 本研究检测该细胞因子在 ALS 患者不同病程中的血浆水平变化, 通过亚组的分组研究, 试图探讨其在病理机制中可能起到的作用。

1 对象和方法

1.1 对象

ALS 组: 共有 51 例 ALS 患者入组, 为 2010 年 7 月—2014 年 11 月南京医科大学附属脑科医院神经内科、老年医学科收治的住院或门诊患者。患者年龄 45~89 岁, 平均年龄 (54.84±10.04) 岁, 男 26 例, 女 25 例, 男女比例为 1.04:1。入组标准: 国际 Escorial 修订版诊断标准^[11]“临床确诊”或“临床拟诊”的两类。38 例系“临床确诊”患者, 13 例系“临床拟诊”患者。排除标准: 预测用力肺活量 $< 50\%$; 经皮胃造瘘术; 查体或检验(白细胞增高、C 反应蛋白增高及红细胞沉降率异常)提示有系统性感染; 糖尿病患者; 入组前 2 个月服用类固醇、非甾体消炎药及 HMG-CoA 还原酶抑制剂。

对入组患者进行分组研究: 按性别分男性和女性 2 个亚组; 患者的病程为 2 个月~8 年, 平均病程为 19.8 个月, 按病程长短分为病程 ≤ 12 个月 (26 例) 和病程 > 12 个月 (25 例) 2 个亚组^[13]; 按疾病的起病部位分为延髓起病 (13 例) 和肢体起病 (38 例) 2 个亚组; 所有患者在诊断后全部进行 ALSFRS-R 功能评

[基金项目] 国家自然科学基金(81230026, 81171085, 81471157), 南京市医学科技发展项目(YKK10119)

* 通信作者 (Corresponding author), E-mail: xuyun20042001@aliyun.com

分^[12],对疾病的严重程度进行评估,分为重度临床状态(评分 ≤ 24 分)(12例)和轻度临床状态(评分 > 24 分)(39例)2个亚组^[13]。

正常对照组:60例健康体检者,年龄37~74岁,平均年龄(55.52 \pm 8.99)岁。男32例,女28例,在年龄与性别构成上与ALS组匹配。

本研究得到了南京医科大学附属脑科医院伦理委员会的批准,伦理号为伦审第(06)号(2010)。

1.2 方法

血浆的提取:抽取ALS患者和正常对照者肘静脉血1mL,EDTA抗凝,低温离心机1000 r/min离心15 min,提取上清,放入EB管,30 min内把标本放入-80℃冰箱冷冻保存。

标本的检测:采用MILLIPLEX MAP液相芯片试剂盒(HCYTOMAG-60K)检测,由Merck millipore公司上海总部实验室完成血浆FKN水平的检测。

1.3 统计学方法

统计学分析采用SPSS23.0统计软件。计数资料用率或构成比表示;计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。计数资料的两组比较用 χ^2 检验;服从正态分布的相互独立的计量资料的两组比较用 t 检验;不服从正态分布的相互独立的计量资料的两组比较用Mann-Whitney秩和检验;两组计量资料之间的相关性用Spearman秩相关分析。 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

ALS患者血浆FKN水平与正常对照相比下降[(50.01 \pm 42.99)pg/mL vs. (111.04 \pm 49.73)pg/mL, $P < 0.05$,图1A]。对所有亚组与正常对照组,用单因素ANOVA法进行多组比较,提示各亚组与正常对照组血浆FKN水平有差异、部分亚组间血浆FKN水平有差异($P < 0.05$)。

分析发现:病程 ≤ 12 个月、病程 > 12 个月患者血浆FKN水平[(38.91 \pm 42.53)pg/mL,(61.55 \pm 41.16)pg/mL]与正常对照[(111.04 \pm 49.73)pg/mL]相比均下降(P 均 < 0.05),且病程 > 12 个月的患者血浆FKN水平较病程 ≤ 12 个月的患者高($P < 0.05$,图1B、C)。延髓起病、肢体起病患者血浆FKN水平[(49.01 \pm 35.59)pg/mL,(50.35 \pm 45.67)pg/mL]与正常对照[(111.04 \pm 49.73)pg/mL]相比均下降(P 均 < 0.05),延髓起病和肢体起病的患者间无差异($P > 0.05$,图1D、E)。ALSFRS-R评分 ≤ 24 分、ALSFRS-R评分 > 24 分[(46.90 \pm 45.79)pg/mL,(53.23 \pm 40.56)pg/mL]患者血浆FKN水平与正常对

照[(111.04 \pm 49.73)pg/mL]相比均下降(P 均 < 0.05),ALSFRS-R评分 > 24 分和ALSFRS-R评分 ≤ 24 分的患者间无差异($P > 0.05$,图1F、G)。男、女性患者血浆FKN水平[(48.25 \pm 35.37)pg/mL,(51.83 \pm 50.40)pg/mL]与正常对照[(111.04 \pm 49.73)pg/mL]相比均下降(P 均 < 0.05),男性和女性患者之间无差异($P > 0.05$,图1H、I)。患者血浆FKN水平与病程无相关性($P > 0.05$)。

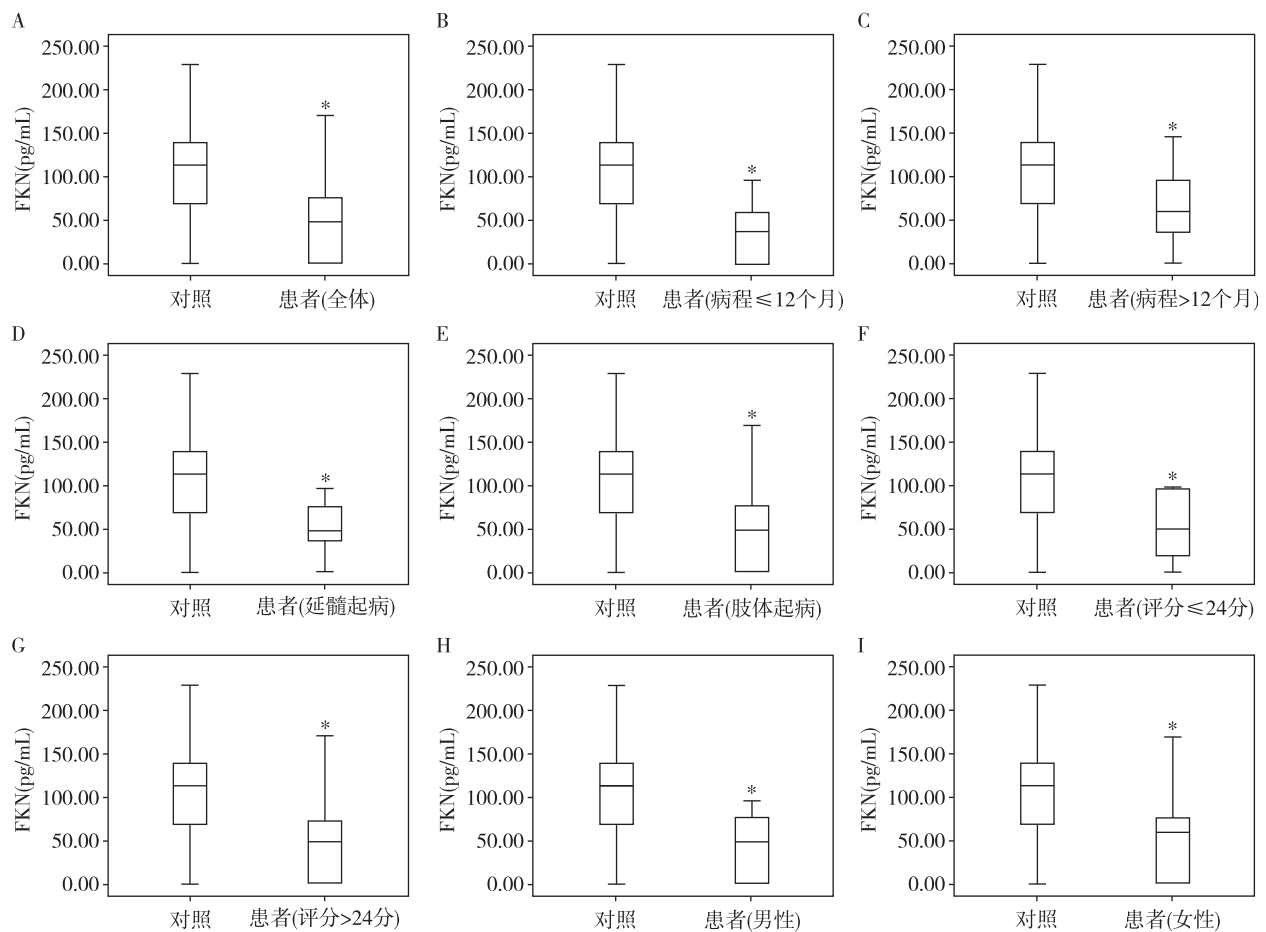
3 讨论

根据半胱氨酸基序和相对位置,趋化因子被分为C、CC、CXC和CX3C4个家族,C为半胱氨酸,X为任何氨基酸。FKN分子属于1997年报道的第4种趋化因子类型,是仅在CX3C亚族发现的一种趋化因子,称为CX3C型趋化因子^[14]。FKN或CX3CL1分为膜结合型、可溶型,其中可溶性FKN对T细胞和单核细胞等具有强大的趋化能力,在炎症反应中扮演重要角色。在风湿性关节炎的研究中也提出把针对趋化因子的靶向治疗作为重要治疗策略^[15]。

在很多神经系统疾病中能发现CX3CL1水平变化,如多发性硬化、脑外伤及HIV中枢神经系统感染患者体内发现血清CX3CL1水平增高,但在细菌或病毒性脑膜炎患者体内并没有发现该指标增高^[16]。CX3CL1和它的同源受体CX3CR1在神经系统变性动物模型的免疫调节中扮演了重要角色。通过敲除CX3CR1基因,导致CX3CL1和受体CX3CR1联系的破坏,可引起帕金森病、ALS、系统性感染模型鼠的神经毒性反应^[16]。

趋化因子作为趋化蛋白,有诱导单核细胞、淋巴细胞等炎性细胞的作用,随着病情进展,ALS患者体内免疫炎症反应不断进展,血脑屏障、血脊屏障受到破坏^[8-9],通透性增加,通过促炎因子、趋化因子、黏附分子与受体的相互作用,外周血中的T淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞等免疫细胞通过血脑屏障和血脊屏障,进入中枢神经系统,引起脑脊液改变与中枢神经系统的免疫炎症反应。不同于腰椎穿刺检查脑脊液,静脉穿刺费用低且操作简便,检测外周血FKN水平可间接反映颅内免疫炎症反应。此外,研究还发现ALS患者体内血IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10及TNF α 表达增加,反映ALS患者体内存在系统性炎症反应及适应性免疫机制^[5]。

之前尚无ALS患者血浆FKN水平变化的报道,本研究排除糖尿病,系统性感染,入组前2个月服用类固醇、非甾体消炎药、HMG-CoA还原酶抑制剂等可能对血浆FKN有影响的药物。研究发现,



A: 患者与正常对照比较; B: 病程 ≤ 12 个月患者与正常对照比较; C: 病程 > 12 个月患者与正常对照比较; D: 延髓起病患者与正常对照比较; E: 肢体起病与正常对照比较; F: ALSFRS-R 评分 ≤ 24 分与正常对照比较; G: ALSFRS-R 评分 > 24 分与正常对照比较; H: 男性患者与正常对照比较; I: 女性患者与正常对照比较。与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 ALS 患者各亚组的血浆 FKN 水平比较

ALS 患者的血浆 FKN 表达水平低于正常对照者, 亚组研究发现, 各亚组患者的血浆 FKN 表达水平均低于正常对照者, 提示入组患者 FKN 的分泌有受到抑制的可能。ALS 动物模型中, 在疾病早期阶段, 表现为有益的 M2 表型的小胶质细胞与 CD200 和 FKN 等保护性信号相互作用, 促进组织修复和再生^[6], 随着疾病进展, 损伤的运动神经元和星型胶质细胞释放错误折叠的蛋白(如 mSOD1), 诱导小胶质细胞表现为有害的 M1 表型, 并增强 NOX2、ROS 和促炎细胞因子的分泌。这些促炎因子进一步刺激小胶质细胞, 使其再释放促炎因子损伤神经细胞^[6]。本研究发现, 无论按照疾病严重程度、起病部位、病程及性别分组, 患者的血浆 FKN 水平均低于正常对照, 可能入组患者已处于疾病进展期, 小胶质细胞已由有益的 M2 表型转变为有害的 M1 表型, 此时 FKN 的分泌已经减少, 具体原因需要今后进行体外实验。研究还发现: 病程 > 12 个月患者的血浆 FKN 水平比病程 ≤ 12 个月的患者高, 但仍低于正常对照者, 今后需要增加入组

患者数量, 设置更多的时间点进行分析, 明确不同病程时血浆 FKN 水平的变化, 同时增加分层分析后各亚组入组数量, 进一步明确趋化因子 FKN 在 ALS 免疫炎症机制中的作用。此外, 虽然 ALS 患者体内血脑、血脊屏障受到破坏, 外周静脉血检查有反映中枢神经系统免疫炎症反应的可能, 但仍需进行脑脊液水平的深入研究, 并进行两者之间的对照研究。

本研究发现血浆趋化因子 FKN 与 ALS 可能有一定程度的关联, 但具体作用机制还有待于今后深入研究, FKN 有可能成为 ALS 的血浆生物学标志。而稳定或上调 M2 小胶质细胞的有益反应, 下调 M1 小胶质细胞的有害反应有望成为延缓 ALS 病情的策略之一, 对该指标的研究有助于寻找治疗 ALS 的新方法。

[参考文献]

- [1] Gordon PH. Amyotrophic lateral sclerosis: an update, for 2013 clinical features, pathophysiology, management and

- therapeutic trials[J]. *Aging Dis*, 2013, 4(5): 295-310
- [2] 孟祥鹏, 陈立杰, 孙宝红. 肌萎缩性侧索硬化发病的分子生物学机制及治疗进展[J]. *临床神经病学杂志*, 2012, 25(5): 395-397
- [3] Bowerman M, Vincent T, Scamps F, et al. Neuroimmunity dynamics and the development of therapeutic strategies for amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Front Cell Neurosci*, 2013, 7: 214
- [4] Fu R, Shen Q, Xu P, et al. Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases[J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 49(3): 1422-1434
- [5] Ehrhart J, Smith AJ, Kuzmin-Nichols N, et al. Humoral factors in ALS patients during disease progression[J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12: 127
- [6] Jia Liu, Fei Wan. Role of neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: cellular mechanisms and therapeutic implications[J]. *Front Immunol*, 2017, 8(1005): 1-12
- [7] Werb Z, Yan Y. A cellular striptease act[J]. *Science*, 1998, 282(5392): 1279-1280
- [8] Garbuzova-Davis S, Sanberg PR. Blood-CNS barrier impairment in ALS patients versus an animal model [J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8(21):21
- [9] Winkler EA, Sengillo JD, Sullivan JS, et al. Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte reductions in amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Acta Neuropathol*, 2013, 125(1): 111-120
- [10] Bowser R, Turner MR, Shefner J. Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis: opportunities and limitations[J]. *Nat Rev Neurol*, 2011, 7(11): 631-638
- [11] Li DW, Liu M, Cui B, et al. Theawaji criteria increases the diagnostic sensitivity of the revised El Escorial criteria for amyotrophic lateral sclerosis diagnosis in a Chinese population[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0171522
- [12] Maier A, Holm T, Wicks P, et al. Online assessment of ALS functional rating scale compares well to in-clinic evaluation: a prospective trial[J]. *Amyotroph Lateral Scler*, 2012, 13(2): 210-216
- [13] Iecka J. Serum caspase-9 levels are increased in patients with amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Neurol Sci*, 2012, 33(4): 825-829
- [14] 张晓鸣, 顾绍庆. 水飞蓟素对急性肺损伤小鼠肺组织 IL-1 β 、IL-6、趋化因子 fractalkine 表达的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2012, 32(8): 1083-1086
- [15] Iwamoto T, Okamoto H, Toyama Y, et al. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients[J]. *FEBS J*, 2008, 275(18): 4448-4455
- [16] Desforgues NM, Hebron ML, Algarzae NK, et al. Fractalkine mediates communication between pathogenic proteins and microglia: implications of anti-inflammatory treatments in different stages of neurodegenerative diseases [J]. *Int J Alzheimers Dis*, 2012, 2012: 345472

[收稿日期] 2017-03-20

(上接第 1432 页)

- 2011, 106(10): 1843-1850
- [8] Cecconi M, De Backer D, Antonelli M, et al. Consensus on circulatory shock and hemodynamic monitoring. Task force of the European Society of Intensive Care Medicine [J]. *Intensive Care Med*, 2014, 40(12): 1795-1815
- [9] Wodack KH, Poppe AM, Tomkotter L, et al. Individualized early goal-directed therapy in systemic inflammation: is full utilization of preload reserve the optimal strategy? [J]. *Crit Care Med*, 2014, 42(12): 741-751
- [10] Sun Y, Lu ZH, Zhang XS, et al. The effects of fluid resuscitation according to PiCCO on the early stage of severe acute pancreatitis[J]. *Pancreatol*, 2015, 15(5):497-502
- [11] Dipti A, Soucy Z, Surana A, et al. Role of inferior vena cava diameter in assessment of volume status: a meta-analysis[J]. *Am J Emerg Med*, 2012, 30(8): 1414
- [12] Airapetian N, Maizel J, Alyamani O, et al. Does inferior vena cava respiratory variability predict fluid responsiveness in spontaneously breathing patients? [J]. *Crit Care*, 2015, 19: 400
- [13] Corl KA, George NR, Romanoff J, et al. Inferior vena cava collapsibility detects fluid responsiveness among spontaneously breathing critically-ill patients[J]. *J Crit Care*, 2017,41: 130-137
- [14] Preau S, Saulnier F, Dewavrin F, et al. Passive leg raising is predictive of fluid responsiveness in spontaneously breathing patients with severe sepsis or acute pancreatitis [J]. *Crit Care Med*, 2010, 38(3):819-825
- [15] Via G, Tavazzi G, Price S. Ten situations where inferior vena cava ultrasound may fail to accurately predict fluid responsiveness: a physiologically based point of view[J]. *Intensive Care Med*, 2016, 42(7): 1164-1167

[收稿日期] 2017-06-19