

· 论 著 ·

# 肌萎缩侧索硬化患者外周血中 IL-8、CXCR1、CXCR2 的表达及意义

苏丹丹<sup>1</sup>, 张勇<sup>1</sup>, 毕方方<sup>2</sup>, 肖波<sup>2</sup>

1. 中国人民解放军联勤保障部队第 928 医院神经内科, 海南 海口 571100;

2. 中南大学湘雅医院神经内科, 湖南 长沙 410008

**摘要:** 目的 检测肌萎缩侧索硬化(ALS)患者外周血中白细胞介素(IL)-8、趋化因子受体(CXCR)1、CXCR2 的水平,并分析其与患者预后的关系。方法 选取 2011 年 8 月至 2013 年 12 月确诊收治的 ALS 患者 40 例为研究组,选取无神经疾病及该类疾病家族遗传史的紧张性头痛患者 38 例为对照组。采用 ELISA 法检测血清 IL-8 水平;qRT-PCR 法检测单个核细胞(PBMC)中 CXCR1、CXCR2 mRNA 表达水平;ALS 功能评定量表(ALSFRS-r)评估患者评分,计算疾病进展速率(DPR)。结果 研究组血清 IL-8 水平[(72.69 ± 16.47) pg/ml vs (36.32 ± 15.81) pg/ml,  $t=9.940, P=0.000$ ]、PBMC 中 CXCR1、CXCR2 mRNA 表达水平显著高于对照组。ALS 患者血清 IL-8 水平、PBMC 中 CXCR1、CXCR2 mRNA 表达水平分别与 DPR 显著正相关( $P$  均  $<0.01$ ),与病程时间显著负相关( $P < 0.05, P < 0.01$ );ALS 患者血清 IL-8 水平与 PBMC 中 CXCR1、CXCR2 mRNA 表达水平显著正相关( $r=0.576, r=0.478, P$  均  $<0.05$ )。Kaplan-Meier 生存分析表明,血清 IL-8 与 PBMC 中 CXCR1、CXCR2 mRNA 高表达水平者生存率明显低于低表达水平者。结论 ALS 患者外周血 IL-8、CXCR1、CXCR2 水平显著升高,可能是 ALS 患者不良预后的生物标志。

**关键词:** 肌萎缩侧索硬化; 白细胞介素-8; 趋化因子受体 1; 趋化因子受体 2; 预后

中图分类号: R 744.8 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2019)10-1327-04

## Expressions and significances of IL-8, CXCR1 and CXCR2 in peripheral blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis

SU Dan-dan\*, ZHANG Yong, BI Fang-fang, XIAO Bo

\* Department of Neurology, 928 Hospital of China People's Liberation Army Joint Logistics Support Force, Haikou, Hainan 571100, China

Corresponding author: BI Fang-fang, E-mail: 1005914500@qq.com

**Abstract: Objective** To detect the levels of interleukin(IL)-8, chemokine receptor(CXCR)1, and CXCR2 in peripheral blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) to analyze their relationships with prognosis. **Methods** Forty ALS patients from August 2011 to December 2013 were selected as study group, and thirty-eight patients with tension headache and without neurological diseases and family hereditary history of neurological diseases were selected as control group at the same time. ELISA was used to detect the level of IL-8 in serum, qRT-PCR method was used to detect the expression levels of CXCR1 and CXCR2 mRNAs in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), ALS functional rating scale (ALSFRS-r) was used to assess patients' scores and disease progression rate (DPR). **Results** The level of serum IL-8 [(72.69 ± 16.47) pg/ml vs (36.32 ± 15.81) pg/ml,  $t=9.94, P=0.000$ ] and the expression levels of CXCR1 and CXCR2 mRNAs in study group were significantly higher than those in control group (all  $P < 0.01$ ). In ALS patients, the level of serum IL-8 and the expression levels of CXCR1 and CXCR2 mRNAs in PBMC were positively correlated with DPR (all  $P < 0.01$ ), respectively, and negatively correlated with duration of disease ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); the serum IL-8 level was significantly positively correlated with the expression levels of CXCR1 and CXCR2 mRNAs ( $r=0.576, r=0.478$ , all  $P < 0.05$ ). Kaplan-Meier survival analysis showed that the survival rates of ALS patients with high levels of serum IL-8, CXCR1 and CXCR2 in PBMC was significantly lower than that of ALS patients with low levels of above indicators. **Conclusion** For patients with ALS, the levels of IL-8, CXCR1 and CXCR2 increase significantly, which may be the

biomarkers of poor prognosis.

**Key words:** Amyotrophic lateral sclerosis; Interleukin-8; Chemokine receptor 1; Chemokine receptor 2; Prognosis

**Fund program:** Projects funded by the National Natural Science Foundation of China (81571256)

肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 又称运动神经元疾病 (MND), 是一种累及上、下运动神经元的神经变性疾病, 临床表现为进行性加重的四肢无力、肌肉萎缩, 最终导致吞咽困难和呼吸肌无力, 80% ~ 90% 的患者发病后 3 ~ 5 年后死亡<sup>[1]</sup>。目前, ALS 发病的具体机制尚未完全清楚。现有研究认为 ALS 发病与线粒体损伤及功能障碍、氧化应激反应、谷氨酸兴奋性毒性、神经胶质细胞异常、免疫炎症反应等有关<sup>[2]</sup>。白细胞介素 (IL)-8 是第一个被发现的 CXC 趋化因子, 在机体应激时通过刺激单核细胞、内皮细胞等分泌, 诱导中性粒细胞、淋巴细胞等聚集、脱颗粒, 发挥生物学效应<sup>[3-4]</sup>。趋化因子受体 (chemokine receptor, CXCR) 1、CXCR2 是趋化因子 CXCR 家族中重要成员, 主要表达于中性粒细胞、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞、CD56<sup>+</sup>NK 细胞、神经血管内皮细胞、肠道上皮细胞、肝转移瘤细胞等, 与共同配体 IL-8 结合后可趋化淋巴单核等炎症细胞, 使其游走至组织损伤部位, 产生免疫应答或炎症反应<sup>[5]</sup>。本研究通过检测 ALS 患者外周血中 IL-8、CXCR1、CXCR2 水平变化, 旨在探讨其与 ALS 发病及病情发展的相关性。

## 1 资料与方法

**1.1 临床资料** 选取 2011 年 8 月至 2013 年 12 月中国人民解放军联勤保障部队第 928 医院和中南大学湘雅医院确诊收治的 ALS 患者 40 例为研究组, 其中男 21 例, 女 19 例; 年龄 39 ~ 79 (53.67 ± 12.89) 岁; 病程 1 ~ 26 (15.19 ± 4.87) 个月。ALS 患者诊断标准<sup>[6]</sup>: (1) 局部或大面积肌肉隐匿性、持续或持续间断性萎缩; (2) 多部位或大面积肌肉持续性、静止性、肉眼可见性跳动 (区别于肢体的静止性颤抖, 如帕金森病); (3) 单侧肢体或多侧肢体、多部位、多器官先发或同时进行性、间断进行性无力伴功能慢性或急性衰竭, 最终导致单个或多个器官或系统功能衰竭。纳入标准: (1) 经诊断符合 El Escorial revised ALS 诊断标准<sup>[6]</sup>, 确诊的 ALS 患者; (2) 近期末接受相关治疗患者; (3) 患者及家属签署知情同意书。排除标准: (1) 家族性 ALS 患者; (2) 其他脏器严重疾病患者; (3) 其他恶性肿瘤伴发 ALS 患者; (4) 其他变性病者。选取无神经疾病及该类疾病家族遗传史的紧张性头痛患者 38 例作为对照组, 其中男 20 例, 女 18 例; 年龄 41 ~ 82 (54.19 ± 11.31) 岁。本研究经两

医院伦理委员会批准。两组年龄、性别比较无统计学差异 ( $P$  均 > 0.05)。

**1.2 样本采集** 均于清晨空腹采取肘静脉血 5 ml, 分别置于含肝素的无菌 EP 管和普通 EP 管内, 肝素抗凝血用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离单个核细胞 (PBMC), 普通管离心取上清, -80 °C 保存待检。

**1.3 血清 IL-8 水平检测** 采用 ELISA 试剂盒检测血清 IL-8 水平, 试剂盒购自上海康朗生物科技, 所有样本均重复检测三次取平均值。检测均由同一人员在同一台仪器上操作完成。

**1.4 PBMC 中 CXCR1、CXCR2 mRNA 水平检测** Trizol 法提取 PBMCs 总 RNA, 检测合格后反转录为 cDNA, 进行实时定量 PCR (qRT-PCR)。以 GAPDH 为内参基因, qRT-PCR 引物由上海生物工程合成, 引物序列见表 1。反应体系为 25  $\mu$ l: H<sub>2</sub>O 11  $\mu$ l, 正向引物 1  $\mu$ l, 反向引物 1  $\mu$ l, 模板 2.0  $\mu$ l, SYBR Master Mix (2 ×) 10  $\mu$ l。反应条件如下: 95 °C 预变性 300 s, 95 °C 变性 50 s, 55 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 35 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算目标基因的相对表达量。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	正向引物 5'→3'	反向引物 5'→3'
CXCR1	CAGATCCACAGATGTGGGAT	AGCAGCCAAGACAACAACAACTT
CXCR2	CTTTTCTACTAGATGCCGC	AGATGCTGAGACATATGAATTT
IL-8	GTGCAGTTTTGCCAAGGAGT	CTCTGCACCCAGTTTTTCCTT

**1.5 其他指标检测** ALS 功能评定量表修定版 (ALSFRS-r) 评分, 该表是最广泛用于评定 ALS 患者机能状态的临床标准。疾病进展速率 (DPR), DPR = (48 - ALSFRS-r) / 病程 (月)。

**1.6 随访** 对本研究纳入对象进行定期随访, 通过住院复查、电话问询等方式获得患者客观生存资料, 随访结束时间为 2017 年 12 月 31 日。生存时间定义为出院后至任意原因导致死亡经历的时间。

**1.7 统计学分析** 使用 SPSS 20.0 软件分析。计数资料采用 “%” 表示, 行四格表  $\chi^2$  检验; 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 行独立样本  $t$  检验; 采用 Pearson 相关进行相关性分析; 采用 Kaplan-Meier 进行生存分析, 行 Log-Rank 检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 研究组 ALSFRS-r 评分和 DPR 结果** 研究组

ALSFRS-r 评分为(33.19 ± 1.87)分, DPR 为(1.47 ± 0.23)%。

2.2 两组血清 IL-8 水平 研究组血清 IL-8 水平显著高于对照组 [(72.69 ± 16.47) pg/ml vs (36.32 ± 15.81) pg/ml, *t* = 9.940, *P* = 0.000]。

2.3 两组 PBMC 中 CXCR1、CXCR2 mRNA 表达水平 研究组 PBMC 中 CXCR1、CXCR2 mRNA 表达水平显著高于对照组 (*P* 均 < 0.01)。见表 2。

2.4 ALS 患者血清和 PBMC 指标水平与 DPR、病程时间、ALSFRS-r 评分的关系 ALS 患者血清 IL-8 水平、PBMC 中 CXCR1、CXCR2 mRNA 表达水平与 DPR 显著正相关 (*P* 均 < 0.01), 与病程时间显著负相关 (*P* < 0.05, *P* < 0.01), 与 ALSFRS-r 评分无关 (*P* 均 > 0.05)。见表 3。

2.5 ALS 患者血清与 PBMC 指标水平的相关性 ALS 患者血清 IL-8 水平与 PBMC 中 CXCR1、CXCR2 mRNA 表达水平显著正相关 (*r* = 0.576, *r* = 0.478, *P* 均 < 0.05)。见图 1。

2.6 ALS 患者血清和 PBMC 指标水平与患者预后的关系 ALS 患者随访至就诊后 48 个月, 以 IL-8 水平、CXCR1、CXCR2 mRNA 表达水平平均值为界, 将其分为 IL-8、CXCR1、CXCR2 三对高表达组、低表达组。随访结果发现 ALS 患者 48 个月总生存率为 17.5% (7/40)。图 2 示, 血清 IL-8、PBMC 中 CXCR1、CXCR2 mRNA 高水平者生存率明显低于低水平者。

### 3 讨论

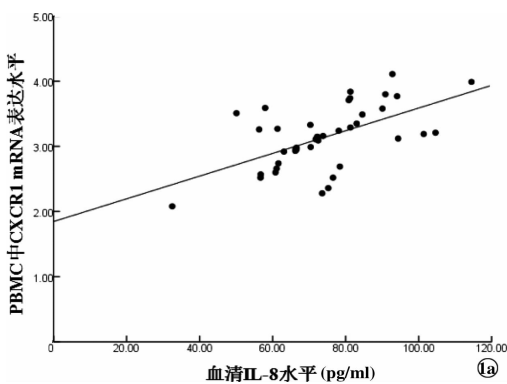
ALS 常于中年后发病, 起病隐匿, 临床表现为肢体无力、肌肉萎缩, 延髓麻痹及锥体束征等<sup>[7]</sup>。无感觉障碍的进行性运动性功能障碍是 ALS 的临床特征, 具有致死率高、预后差等特点, 目前尚无有效治疗措施。目前该病发病机制仍不明确, 各基础医学领域提出了不同假说, 主要有氧化应激、神经兴奋毒性、线粒体异常、免疫炎症反应等。有研究发现, ALS 脊髓侧索中存在神经胶质瘢痕, 而神经胶质瘢痕是由星形胶质细胞增生形成, 是中枢神经系统炎症反应的结

表 2 两组 PBMC 中 CXCR1、CXCR2 mRNA 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	CXCR1	CXCR2
研究组	40	3.06 ± 0.67	2.21 ± 0.41
对照组	38	1.09 ± 0.27	1.03 ± 0.32
<i>t</i> 值		16.866	14.119
<i>P</i> 值		0.000	0.000

表 3 ALS 患者血清 IL-8 水平和 PBMC 中 CXCR1、CXCR2 mRNA 表达水平与 DPR、病程时间、ALSFRS-r 评分的关系

指标	DPR		病程时间		ALSFRS-r	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
IL-8	0.472	0.000	-0.397	0.012	-0.134	0.295
CXCR1	0.441	0.000	-0.463	0.000	-0.126	0.198
CXCR2	0.502	0.000	-0.419	0.027	-0.182	0.248



注: 1a: IL-8 与 CXCR1; 1b: IL-8 水平与 CXCR2。

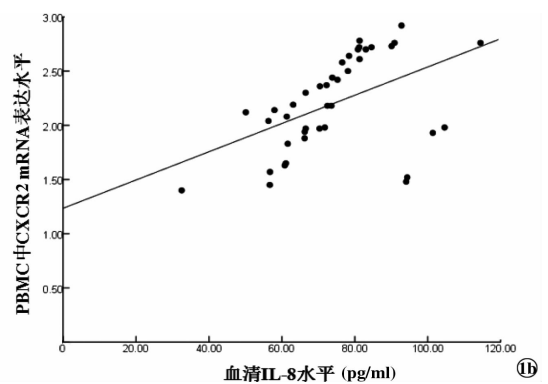
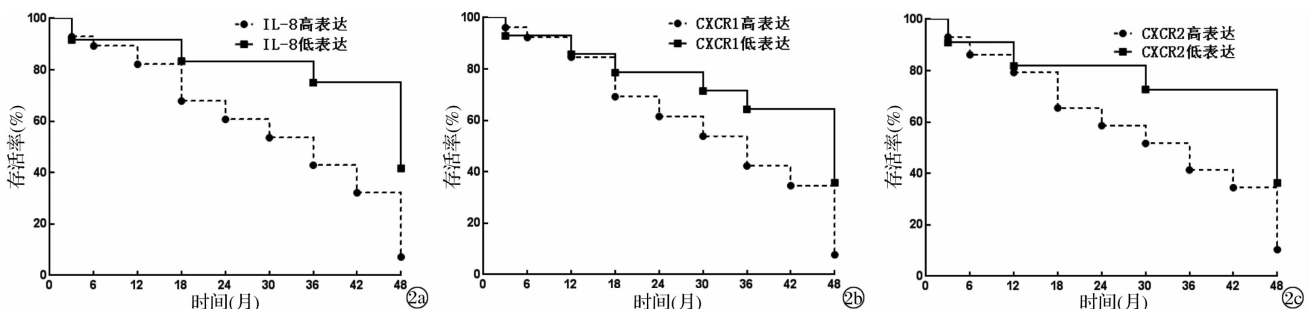


图 1 ALS 患者血清 IL-8 水平与 PBMC 中 CXCR1、CXCR2 mRNA 表达水平的相关性



注: 2a: IL-8 与患者预后; 2b: CXCR1 与患者预后; 2c: CXCR2 与患者预后。

图 2 ALS 患者血清 IL-8 水平、PBMC 中 CXCR1、CXCR2 mRNA 表达水平与患者预后的关系

果<sup>[8]</sup>。另有研究表明,ALS 患者与相同年龄段的正常健康人相比,脑脊液中促炎症因子含量升高,说明 ALS 患者病理变化中存在炎症反应<sup>[9]</sup>。此外,近年有研究发现 ALS 患者脊髓中有 T 淋巴细胞浸润,患者血浆中单克隆免疫球蛋白水平异常,提示免疫反应也参与 ALS 发病<sup>[10]</sup>。

IL-8 具有显著的中性粒细胞趋化作用,在各种急性和慢性炎症中起重要作用,能诱导中性粒细胞和淋巴细胞浸润,增加血管通透性<sup>[11]</sup>。IL-8 能导致细胞质游离钙浓度迅速升高,诱导机体局部的炎症反应,达到杀灭病原体的作用,同时造成血脑屏障的破坏,致中枢神经系统细胞损伤。IL-8 是诱导性细胞因子,具有双向免疫调节作用,激活免疫效应细胞保护神经元及脑胶质细胞的同时,造成局部脑组织免疫损伤<sup>[12]</sup>。本研究结果显示,研究组血清 IL-8 水平显著高于对照组,提示血清 IL-8 水平可能与 ALS 发病相关。

趋化因子激活或调节炎性细胞和神经胶质细胞,发挥促炎和抗炎双重作用,参与多种神经性疾病的发展<sup>[13]</sup>。在急性炎症反应过程中,趋化因子在氨基葡聚糖作用下聚集至内皮细胞表面,通过一系列生理生化反应,促进内皮细胞释放大量促炎细胞因子<sup>[14]</sup>。CXCR 是一类具有 7 次跨膜域结构的 G 蛋白耦联受体,主要分布于中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞等炎症细胞表面,CXCR1、CXCR2 属于 CXCR 家族,是能与 IL-8 特异性结合的受体<sup>[15]</sup>,其中 CXCR1 与 IL-8 亲和力高,CXCR2 亲和力较低。CXCR1、CXCR2 与相应配体 IL-8 结合后,通过 G 蛋白进行级联信号传导,可趋化表达该受体的中性粒细胞、淋巴细胞等炎症细胞游走,在机体抗感染、抗病毒等多种炎症疾病中发挥重要作用。本研究发现,ALS 患者 PBMC 中 CXCR1、CXCR2 mRNA 表达水平显著高于对照组,与 DPR 显著正相关,与病程时间显著负相关;而与 ALSFRS-r 无关;ALS 患者血清 IL-8 水平与 PBMC 中 CXCR1、CXCR2 mRNA 表达水平显著正相关,提示血清 IL-8 水平、PBMC 中 CXCR1、CXCR2 mRNA 表达水平与 ALS 发病及病情发展有关,血清 IL-8 或可作为病情监测的指标。前述研究显示,CXCR1、CXCR2 通过与其配体结合,可导致脑局部组织发生炎症损伤。本研究结果表明,CXCR1、CXCR2 可能通过 ALS 患者体内炎症反应参与 ALS 的发病。ALS 患者血清 IL-8 与 PBMC 中 CXCR1、CXCR2 mRNA 高水平者生存率明显低于低水平者,提示血清 IL-8 高表达、PBMC 中 CXCR1、CXCR2 高表达是 ALS 患者不良预后的生物

标志。

综上所述,ALS 患者外周血 IL-8、CXCR1、CXCR2 水平显著升高,可能是 ALS 患者不良预后的生物标志,免疫炎症反应参与了 ALS 的发病。本研究的不足是所选患者未进行亚类分析,可能导致结果产生一定偏倚,有待在后续研究中完善。

## 参考文献

- [1] 甘卫明,徐仁舫. 帕金森病与肌萎缩侧索硬化发病机制的共性研究[J]. 中国老年学杂志,2017,37(7):1818-1820.
- [2] 郭永强,李森,张海鸥,等. 肌萎缩侧索硬化发病机制的研究进展[J]. 中国康复理论与实践,2017,23(6):685-689.
- [3] 周天,贺用和,张英. 白细胞介素 8 与恶性肿瘤生物学行为的关系[J]. 医学综述,2017,23(8):1515-1519.
- [4] 白建蓉,闵兴明,黄远帅. 冠心病患者血清 IL-8 表达量与血小板 gp II b/III a 活性白细胞血小板聚集率之间的关系[J]. 贵州医药,2016,40(7):686-688.
- [5] 朱锋,王晓兵,刘适,等. CXC 趋化因子受体 2 和白细胞介素-8 在炎症性肠病患者中的表达及其意义[J]. 胃肠病学,2016,21(6):331-335.
- [6] Bresch S, Delmont E, Soriani MH, et al. Electrodiagnostic criteria for early diagnosis of bulbar-onset ALS: a comparison of El escorial, revised El escorial and Awaji algorithm [J]. Rev Neurol (Paris), 2014,170(2):134-139.
- [7] 董高磊,赵宇. 肌萎缩性侧索硬化的研究进展[J]. 医学综述,2018,24(13):2632-2635,2640.
- [8] Song S, Miranda CJ, Braun L, et al. Major histocompatibility complex class I molecules protect motor neurons from astrocyte-induced toxicity in amyotrophic lateral sclerosis [J]. Nat Med, 2016,22(4):397-403.
- [9] 郑勇,臧大维. 肌萎缩性侧索硬化患者脑脊液和血清 IL-6、IL-15 的临床分析[J]. 山西医科大学学报,2017,48(7):702-705.
- [10] Lam L, Chin L, Halder RC, et al. Epigenetic changes in T-cell and monocyte signatures and production of neurotoxic cytokines in ALS patients [J]. FASEB J, 2016,30(10):3461-3473.
- [11] Ha H, Debnath B, Neamati N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 axis in cancer and inflammatory diseases [J]. Theranostics, 2017,7(6):1543-1588.
- [12] Mendieta D, De la Cruz-Aguilera DL, Barrera-Villalpando MI, et al. IL-8 and IL-6 primarily mediate the inflammatory response in fibromyalgia patients [J]. J Neuroimmunol, 2016,290:22-25.
- [13] 罗飘,楚世峰,朱天碧,等. 趋化因子参与阿尔茨海默病的研究进展[J]. 中国药理学通报,2017,33(8):1051-1055.
- [14] 王晓微,张磊,许丽辉,等. 血小板源性 CXC-型趋化因子在动脉粥样硬化中的作用[J]. 生命的化学,2016,36(5):621-624.
- [15] Cianga CM, Cianga P, Dumitrescu GF, et al. IL-8, IL-8RA (CXCR1) and IL-8RB (CXCR2) expression in pilomatricoma [J]. Rom J Morphol Embryol, 2016,57(1):59-64.

收稿日期:2019-02-18 修回日期:2019-03-11 编辑:石嘉莹