



·综述·

## 肌萎缩侧索硬化症脑脊液中生物标记物研究进展

王虹杨, 翁超, 卢祖能

武汉大学人民医院神经内科, 湖北 武汉 430060

**摘要:** 肌萎缩侧索硬化症是一种慢性进展性疾病, 目前病因及发病机制不明, 尚无有效的生物标志物协助疾病诊断、判断疾病进展及预后。生物标记物研究通过对病理生理机制的探索可以加深对疾病的理解, 有助于疾病诊断、分类、药效学检测, 及识别新的药物靶点, 为新疗法实施提供方向。

[国际神经病学神经外科学杂志, 2021, 48(4): 392-395.]

**关键词:** 肌萎缩侧索硬化症; 脑脊液; 生物标记物

中图分类号: R744.8

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2021.04.015

### Research advances in cerebrospinal fluid biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis

WANG Hong-Yang, WENG Chao, LU Zu-Neng

Department of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China

Corresponding author: LU Zu-Neng, Email: lzn196480@126.com; WENG Chao

**Abstract:** Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a chronic progressive disease with unknown etiology and pathogenesis, and there are still no effective biomarkers to assist in the diagnosis, progression judgment, and prognostic evaluation of the disease. The research on biomarkers can deepen the understanding of disease by exploring pathophysiological mechanisms and help with disease diagnosis, classification, pharmacodynamic detection, and identification of new drug targets, thereby providing a direction for the implementation of new therapies.

[Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2021, 48(4): 392-395.]

**Keywords:** amyotrophic lateral sclerosis; cerebrospinal fluid; biomarker

肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一组累及上运动神经元, 下运动神经元, 或两者都受到影响的神经变性疾病。发病率为2/10万~3/10万, 男性多于女性, 预后较差, 从发病至死亡平均约20个月, 最常见的死亡原因为呼吸衰竭<sup>[1]</sup>。目前, ALS病因不明, 缺乏有效治疗方法, 急需敏感且特异的生物标志物以助临床医生和研究人员早期诊断ALS、评估疾病进展、评价预后及用药效果。由于脑脊液直接靠近大脑和脊髓, 因此脑脊液是一种对于判断神经病变很有价值的生物流体成分, 从脑脊液中获取到的生物标志物对于研究ALS价值重大。既往已有大量研究, 提供部分生物标记物, 虽尚未

用于临床实践, 但对于之后研究及临床应用具有指导作用。本文将对不同研究发现的脑脊液中生物标志物在ALS诊断、疾病进展及预后中的应用进行阐述。

#### 1 基因研究

MicroRNA (miRNA) 是一类内源性非编码单链RNA, 参与转录后基因调控。不仅能与靶基因结合, 抑制转录后翻译, 还能补充靶基因, 直接降解具有负调控作用的靶基因。此外, 特定的miRNA与神经系统的发育密切相关, 可以影响ALS的神经细胞特性、突触功能、神经胶质调节以及神经炎症过程。另一方面, miRNA与TDP-43有关。因此, miRNA可通过多种病理机制影响ALS的发生和发

收稿日期: 2020-12-29; 修回日期: 2021-04-21

**作者简介:** 王虹杨(1994—), 女, 住院医师, 研究生在读, 主要从事神经肌肉病和周围神经病的研究。

**通信作者:** 卢祖能(1964—), 男, 主任医师, 硕士, 博士生导师, 主要从事周围神经病和肌肉疾病及其肌电图应用、急性脑血管疾病等的研究。

Email: lzn196480@126.com。

翁超(1984—), 男, 副主任医师, 医学博士, 主要从事神经免疫疾病的临床与基础研究。

展,被认为是ALS发病的关键因素。

miRNA-206的缺失可诱导rtn4a1的过度表达,并促进斑马鱼中ALS样表型的发育<sup>[2]</sup>。miRNA-218富含于运动神经元中,可在ALS大鼠细胞外释放。释放的miRNA-218下调兴奋性氨基酸转运体2(EAAT2)的表达,而EAAT2被确定为星形胶质细胞中的谷氨酸转运体,也是星形胶质细胞功能障碍的原因<sup>[3]</sup>。此外,既往研究已证实,miRNA-29b-3p与细胞凋亡,神经变性相关,miRNA-193B-3p可促进细胞死亡,miRNA-124影响星形胶质细胞分化,miRNA-125b干扰ALS小胶质细胞激活<sup>[4]</sup>。

miRNA已被证明是潜在的ALS诊断生物标志物,还可用于监测ALS患者的病情进展。然而,诊断的敏感性及特异性还需要进一步研究。目前研究表明,通过调节病理性基因和干预其发病机制有望带来治疗效果,这为开发有效的ALS的潜在治疗方案带来了希望。

## 2 结构、功能蛋白研究

### 2.1 神经丝蛋白

脑脊液中化学成分最可能成为ALS诊断生物标记物的是神经丝蛋白。神经丝蛋白是神经元的一种细胞骨架成分,在轴突生长中起着重要作用,同时,已被证明在轴突损伤和变性后会在机体内发生积聚现象<sup>[5]</sup>,这可能与ALS发病有关。神经丝蛋白由三个亚基组成,其中两个亚基分别是磷酸化神经丝重链(pNFH)和神经丝轻链(NFL)。

Oeckl等<sup>[6]</sup>在一项涉及欧洲/美国15个多中心研究中认为,pNFH和NFL可作为ALS诊断生物标志物。这些研究均使用标准操作程序收集和处理样本,并对被检患者样本内和各中心之间神经丝水平的一致性进行标准化处理,这增加了研究的可靠性和可重复性。

此外,神经丝蛋白可能与ALS预后有关。在ALS患者与健康对照组间,可发现ALS患者的NFL水平较高,且较高的水平与较差预后相关<sup>[7]</sup>。在一项大型队列研究中也有类似的结果,但当分析纵向数据时,仅67%的ALS患者在随访中存在NFL升高,另外,部分患者随着时间的推移NFL浓度下降。同时,后者的基线值较高,这表明一旦神经元死亡达到顶峰,脑脊液中神经丝水平就会进入平台期<sup>[8]</sup>。另一项研究认为,NFL不会随着病程进展而改变,进一步支持NFL作为患者分层的预后标记物<sup>[9]</sup>。

脑脊液中NFL与疾病亚型相关,进行性上运动神经元症状加重的患者或疾病进展更快的患者(与年龄无关)脑脊液中检出更高水平的NFL<sup>[10]</sup>。另一方面,血清和脑脊液的NFL之间有很高的相关性,由于抽血较腰椎穿刺抽取脑脊液更为简便,所以之后可考虑使用血清替代脑脊液进行NFL检测。

### 2.2 tau蛋白

tau蛋白是一种微管相关蛋白,主要分布于神经元轴

突、少突胶质细胞和星形胶质细胞中,主要作用是维持微管结构稳定,维持神经细胞正常形态和功能。过度磷酸化的tau蛋白发生堆积是神经纤维缠结构成过程中最早的细胞骨架改变之一,微管结构被破坏后,影响轴索的运输功能,会导致神经元和皮质轴突的病理性改变,进而神经元可发生退行性改变。以tau蛋白为主要成分的磷酸化缠结可见于阿尔茨海默病和ALS,这可能是神经细胞退行性变的共同机制。tau蛋白是细胞内蛋白,正常情况下不会在细胞外出现,当在脑脊液中检测到增多的tau蛋白时,提示神经元细胞的坏死和皮质轴的退变。

有报道,ALS和额颞叶痴呆患者的脑脊液中tau蛋白升高<sup>[11]</sup>,高浓度的tau蛋白裂解片段tau45-230可在ALS患者的腰椎脊髓标本中聚集。但在一项纳入57例ALS患者和110例对照组研究中,ALS与对照组脑脊液tau蛋白无显著差异,同时未发现脑脊液tau蛋白浓度与疾病进展速度间存在相关性<sup>[12]</sup>。未来需要更多的多中心研究,来验证脑脊液tau含量是否可作为ALS诊断及评估病情严重程度的生物标记物。

### 2.3 TAR DNA结合蛋白43

正常TAR DNA结合蛋白43(TDP-43)是一种多功能的DNA和RNA结合蛋白,在细胞内RNA转录、选择性剪接及维持mRNA稳定等过程中具有重要作用。病理性TDP-43蛋白是蛋白过磷酸化、泛素化后形成的蛋白片段。

Neumann等<sup>[13]</sup>在2006年首次报道,包含病理性TDP-43的神经元和胶质包涵体与ALS和相关的额颞叶痴呆(frontotemporal dementia, FTD)的发病机制有关。ALS患者脑脊液中TDP-43水平升高,且ALS患者脑脊液中TDP-43水平高于FTD<sup>[14]</sup>。将人体神经细胞中的TDP-43分离后注入鸡胚的脊髓中,可出现神经细胞的凋亡及运动系统发育迟滞<sup>[15]</sup>。Feneberg等<sup>[16]</sup>发现,血清TDP-43浓度是脑脊液浓度的200倍以上,其作为一种诊断工具价值不大,但对于监测TDP-43修饰药物的治疗效果可能更为重要。几乎没有研究证实TDP-43可用于疾病进展或预后的标志。

## 3 病理生理研究

### 3.1 氧化应激生物标志物

氧化应激与ALS发病机制有关<sup>[17]</sup>。超氧化物歧化酶(superoxidedismutase, SOD)是生物体内的自由基清除剂,按照结合的离子不同,分为3种:SOD1、SOD2、SOD3。SOD1是其主要形式,主要作用是催化氧自由基( $O_2^-$ )发生反应,形成 $H_2O_2$ ,之后被过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化氢酶还原,变为 $H_2O$ ,氧自由基被清除。异常SOD1蛋白会干扰抗氧化过程,产生毒性作用,加重细胞氧化和应激损伤反应,导致神经细胞变性坏死。个体的SOD1水平随着时间的推移是稳定的,因此,脑脊液中SOD1蛋白水平可作为一种药效学生物标志物。而反义寡核苷酸(anti-

sense oligonucleotide, ASO)可以降低SOD1浓度,在ALS大鼠模型中被证明有治疗效果<sup>[18]</sup>。

另一方面,有研究报道ALS患者抗氧化能力降低,高级氧化蛋白产物增加,ALS患者的脑脊液氧化还原电位(oxidation-reduction potential, ORP)较高,脑脊液ORP与ALS功能评定量表R(ALS Function Rating Scale R, ALS-FRS-R)呈负相关,可能是疾病进展的标志之一<sup>[19]</sup>。

### 3.2 神经炎症的生物标志物

除了氧化应激外,免疫和细胞因子在ALS的发生发展中也起着复杂的作用。小胶质细胞是中枢系统主要的免疫和吞噬细胞。在被激活的开始阶段,小胶质细胞可以清理神经毒素、分泌神经营养因子、炎症因子,起着保护中枢的作用。然而,随着炎症反应进展,细胞因子可导致炎症反应范围扩大,产生毒性分子,造成神经元及组织损伤。

有研究报道,ALS和健康对照组间差异最大的5种细胞因子是IL-10、IL-6、GM-CSF、IL-2和IL-15。其他具有差异性的因子包括IL-17、碱性成纤维细胞生长因子、血管内皮细胞生长因子、巨噬细胞炎症蛋白(MIP)、单核细胞趋化蛋白-1 $\beta$ 和干扰素- $\gamma$ ,以及卵白抑素、IL-1 $\alpha$ 和激肽释放酶-5等<sup>[20]</sup>。

此外,细胞因子与患者病程具有相关性。干扰素- $\gamma$ 与疾病进展相关,碱性成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子和巨噬细胞趋化蛋白-1 $\alpha$ 与较长的病程相关<sup>[21]</sup>。因此,细胞因子有助于ALS的分类及治疗靶点的研究。

## 4 组学研究

### 4.1 蛋白质组学

蛋白质组学以一组蛋白质为研究对象,从整体水平上研究蛋白质表达、翻译后修饰及蛋白质相互作用等,从而研究疾病病理机制、病程进展、药物治疗靶点等方面。

Collins等<sup>[22]</sup>对ALS、其他神经退行性疾病患者和健康对照的脑脊液进行蛋白质组学分析。发现与另外两组相比,神经丝蛋白、补体C3和分泌颗粒素I以及半胱氨酸蛋白酶抑制剂C是ALS患者脑脊液中主要的差异蛋白,这些蛋白与炎症、神经元活性和细胞外基质调节有关。此外,通过联合使用4种分类蛋白:WD重复蛋白63、淀粉样蛋白1、SPARC样蛋白1和细胞黏附分子3,区分ALS、健康对照组和其他神经退行性疾病的敏感性为83%,特异性为100%。

通过蛋白质组学方法可发现,ALS患者脑脊液中壳三糖苷酶(chitotriosidase 1, CHIT1)水平显著高于对照组<sup>[23]</sup>。与其他神经退行性疾病相比,ALS患者CHIT1的高表达与病程呈负相关<sup>[24]</sup>。因此,CHIT可能成为诊断和预后标志物。

此外,ALS患者脑脊液中谷氨酸受体4的表达水平升高,且与疾病严重程度呈负相关。这与谷氨酸兴奋毒性

损伤神经元的机制表现出一致性,并表明抗谷氨酸疗法,如利鲁唑,在病程早期可能更有效<sup>[23]</sup>。

### 4.2 代谢组学

与蛋白质组学一样,代谢组学可以通过组群指标分析,进行高通量检测 and 数据处理,从而实现对小分子代谢物质的定性定量分析。

一项代谢组学研究显示,与对照组相比,ALS脑脊液中醋酸盐水平较低,丙酮酸和抗坏血酸水平较高<sup>[25]</sup>。随后有研究表明,在病程较长的患者中通过代谢组学识别ALS脑脊液中代谢产物特征效率更高,同时,脑脊液内源性乙醇可能是ALS神经元组织损伤的一种新标记物<sup>[26]</sup>。

此外,由于神经的发育、稳态维持、功能依赖于脂类,所以在脑中含有丰富的脂类。ALS脑脊液具有特有的脂质质谱,其中,磷脂酰胆碱在ALS中是最具鉴别意义的分子,神经酰胺和葡萄糖基神经酰胺也与ALS高度相关。神经鞘磷脂和甘油三酯与长链脂肪酸可能预示疾病进展<sup>[27]</sup>。

## 5 小结

目前已有很多研究报道,脑脊液中存在生物标记物,可用于ALS诊断、判断病情进展、评估预后及用药治疗效果,但仍缺乏经过验证试验可用于临床实践的生物标志物。一方面,需要认识到目前分析技术的局限性,为了减少差异,分析须使用标准化操作程序,最好是跨不同中心,以确保验证试验可重复性。另一方面,将生物标记物结合使用是提高诊断敏感性和特异性的有效方法。尽管这将增加假阳性的风险,而且使用的生物标记物越多,所需的样本量及产生的数据就越多。但是利用机器学习可以不断完善生物标记物组合方式,最大程度提高诊断效率。相信随着研究进展,对于ALS认识的深入,未来将有更多诊断、治疗、监测疾病的生物标记物可供选择。

## 参 考 文 献

- [1] DEMETRIOU CA, HADJIVASILIOU PM, KLEOPA KA, et al. Retrospective longitudinal study of ALS in Cyprus: clinical characteristics, management and survival[J]. PLoS One, 2019, 14(9): e0220246.
- [2] LIN CY, ZHANG PH, CHEN YJ, et al. Conditional overexpression of rtn4al in muscle of adult zebrafish displays defects similar to human amyotrophic lateral sclerosis[J]. Mar Biotechnol (NY), 2019, 21(1): 52-64.
- [3] FERRAIUOLO L, SHAW PJ. Lost in translation: microRNAs mediate pathological cross-talk between motor neurons and astrocytes[J]. Brain, 2018, 141(9): 2534-2536.
- [4] WANG L, ZHANG LJ. MicroRNAs in amyotrophic lateral sclerosis: from pathogenetic involvement to diagnostic biomarker and therapeutic agent development[J]. Neurol Sci, 2020, 41(12): 3569-3577.
- [5] SAKKA L, COLL G, CHAZAL J. Anatomy and physiology of ce-

- rebrospinal fluid[J]. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*, 2011, 128(6): 309-316.
- [6] OECKL P, JARDEL C, SALACHAS F, et al. Multicenter validation of CSF neurofilaments as diagnostic biomarkers for ALS[J]. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 2016, 17(5-6): 404-413.
- [7] GAIANI A, MARTINELLI I, BELLO L, et al. Diagnostic and prognostic biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis: neurofilament light chain levels in definite subtypes of disease[J]. *JAMA Neurol*, 2017, 74(5): 525-532.
- [8] SKILLBÄCK T, MATSSON N, BLENNOW K, et al. Cerebrospinal fluid neurofilament light concentration in motor neuron disease and frontotemporal dementia predicts survival[J]. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 2017, 18(5-6): 397-403.
- [9] LU CH, MACDONALD-WALLIS C, GRAY E, et al. Neurofilament light chain: a prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Neurology*, 2015, 84(22): 2247-2257.
- [10] TORTELLI R, RUGGIERI M, CORTESE R, et al. Elevated cerebrospinal fluid neurofilament light levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a possible marker of disease severity and progression[J]. *Eur J Neurol*, 2012, 19(12): 1561-1567.
- [11] BOURBOULI M, RENTZOS M, BOUGEA A, et al. Cerebrospinal fluid TAR DNA-binding protein 43 combined with Tau proteins as a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia spectrum disorders[J]. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2017, 44(3-4): 144-152.
- [12] PALADINO P, VALENTINO F, PICCOLI T, et al. Cerebrospinal fluid tau protein is not a biological marker in amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Eur J Neurol*, 2009, 16(2): 257-261.
- [13] NEUMANN M, SAMPATHU DM, KWONG LK, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Science*, 2006, 314(5796): 130-133.
- [14] JUNTILA A, KUVAJA M, HARTIKAINEN P, et al. Cerebrospinal fluid TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis patients with and without the C9orf72 hexanucleotide expansion[J]. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*, 2016, 6(1): 142-149.
- [15] LULÉ DE, LUDOLPH AC. In vivo tracking of TDP43 in ALS: cognition as a new biomarker for brain pathology[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2020, 91(2): 125.
- [16] FENEBERG E, STEINACKER P, LEHNERT S, et al. Limited role of free TDP-43 as a diagnostic tool in neurodegenerative diseases[J]. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 2014, 15(5-6): 351-356.
- [17] D'AMICO E, FACTOR-LITVAK P, SANTELLA RM, et al. Clinical perspective on oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65: 509-527.
- [18] WINER L, SRINIVASAN D, CHUN S, et al. SOD1 in cerebral spinal fluid as a pharmacodynamic marker for antisense oligonucleotide therapy[J]. *JAMA Neurol*, 2013, 70(2): 201-207.
- [19] OPAČIĆ M, STEVIĆ Z, BAŠČAREVIĆ V, et al. Can oxidation-reduction potential of cerebrospinal fluid be a monitoring biomarker in amyotrophic lateral sclerosis? [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 28(17): 1570-1575.
- [20] LIND AL, WU D, FREYHULT E, et al. A multiplex protein panel applied to cerebrospinal fluid reveals three new biomarker candidates in ALS but none in neuropathic pain patients[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0149821.
- [21] GUO J, YANG X, GAO LN, et al. Evaluating the levels of CSF and serum factors in ALS[J]. *Brain Behav*, 2017, 7(3): e00637.
- [22] COLLINS MA, AN JY, HOOD BL, et al. Label-free LC-MS/MS proteomic analysis of cerebrospinal fluid identifies protein/pathway alterations and candidate biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis[J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(11): 4486-4501.
- [23] CHEN Y, LIU XH, WU JJ, et al. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(6): 2095-2106.
- [24] STEINACKER P, VERDE F, FANG LB, et al. Chitotriosidase (CHIT1) is increased in microglia and macrophages in spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis and cerebrospinal fluid levels correlate with disease severity and progression[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2018, 89(3): 239-247.
- [25] BLASCO H, CORCIA P, MOREAU C, et al. 1H-NMR-based metabolomic profiling of CSF in early amyotrophic lateral sclerosis [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13223.
- [26] GRAY E, LARKIN JR, CLARIDGE TDW, et al. The longitudinal cerebrospinal fluid metabolomic profile of amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 2015, 16(7-8): 456-463.
- [27] BLASCO H, VEYRAT-DUREBEX C, BOCCA C, et al. Lipidomics reveals cerebrospinal-fluid signatures of ALS[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 17652.

责任编辑: 龚学民