



• 论 著 •

趋化因子 CXCL10 作为神经病理性疼痛 生物标记物的研究 *

邓雨涛¹ 程祝强² 高永静^{1△} 姜保春^{1△}

(¹ 南通大学疼痛医学研究院, 特种医学研究院, 南通 226019; ² 东部战区总医院疼痛科, 南京 210002)

摘 要 目的: 目前临床上缺乏神经病理性疼痛诊断和预后判断的客观指标, 本研究旨在检测神经病理性疼痛小鼠和人的脑脊液 (cerebrospinal fluid, CSF) 和血清中趋化因子 CXCL10 的表达情况。**方法:** 结扎 ICR 小鼠 L₅ 脊神经 (spinal nerve ligation, SNL) 构建神经病理性疼痛 (neuropathic pain, NP) 模型, 足底注射福尔马林或完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 建立炎症性疼痛模型; 收集捐献者的脑脊液和血液, 采用 Real-time PCR、半定量 PCR、Western Blot、免疫荧光和 ELISA 方法, 分别检测 CXCL10 和 CXCR3 的 mRNA 和蛋白表达、CSF 和血清中 CXCL10 的表达。**结果:** ① *Cxcl10* 在正常 ICR 小鼠的脾脏、淋巴结、背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG)、脊髓和脑中有不同程度的基础表达; ② *Cxcr3* 在正常 ICR 小鼠的脾脏、淋巴结、DRG、脊髓和脑中也有不同程度的基础表达; ③ 与假手术组相比, SNL 模型小鼠 CSF 与血清中 CXCL10 含量显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 急性炎症性疼痛小鼠 CSF 和血清中 CXCL10 与对照组相比无显著变化; 慢性炎症性疼痛小鼠 CSF 中 CXCL10 与对照组相比无显著变化; 血清中 CXCL10 显著增加 ($P < 0.05$); ④ 健康人类受试者的脊髓、DRG 和淋巴结中有 CXCL10 和 CXCR3 表达; ⑤ 疱疹后神经痛病人 CSF 与血清中 CXCL10 与对照组相比显著增加 ($P < 0.05$), 骨性关节炎病人 CSF 和血清中 CXCL10 无显著增加。**结论:** 神经病理性小鼠 CSF 和血清以及疱疹后神经痛病人 CSF 和血清中 CXCL10 表达显著增加, CXCL10 可能作为神经病理性疼痛的生物标志物。

关键词 神经病理性疼痛; 脑脊液; 血清; 趋化因子; CXCL10

A study of chemokine CXCL10 as a biomarker of neuropathic pain *

DENG Yu-Tao¹, CHENG Zhu-Qiang², GAO Yong-Jing^{1△}, JIANG Bao-Chun^{1△}

(¹ Institute of Pain Medicine and Special Environmental Medicine, Nantong University, Nantong 226019, China;

² Department of Pain Medicine, Nanjing Jinling Hospital, Nanjing 210002, China)

Abstract Objective: The objective biomarkers for the diagnosis and prognosis of neuropathic pain are still lacking. The aim of this study was to determine CXCL10 levels in the serum and cerebrospinal fluid (CSF) in mice and human and to evaluate whether CXCL10 can be used as a biomarker in neuropathic pain. **Methods:** The neuropathic pain (NP) was established by L₅ spinal nerve ligation (SNL) of ICR mice. Inflammatory pain was induced by injection of formalin or complete Freund's adjuvant (CFA) in the hind paw. The mRNA expression of CXCL10 and CXCR3 in distinct tissues was assessed by real-time PCR (RT-PCR) and semi-quantitative PCR, and the protein expression was detected by immunofluorescence or western blotting (WB). CXCL10 levels in the serum and CSF were tested by ELISA. **Results:** ① *Cxcl10* is expressed at different levels in spleen, lymph nodes, dorsal root ganglion (DRG), spinal cord, and brain of adult ICR mice; ② *Cxcr3* is expressed at different levels in spleen, lymph nodes, DRG, spinal cord, and brain of adult ICR mice; ③ Compared with the sham group, the CXCL10 content in the CSF and serum of SNL mice was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); CXCL10 in CSF and serum of mice with acute inflammatory pain had no significant change compared with that

* 基金项目: 国家自然科学基金 (31671091, 31871064, 81771197, 81971054); 江苏省自然科学基金 (BK20171255); 江苏省高校青蓝工程; 江苏省六大人才高峰 (SWYY-070)

△ 通讯作者 姜保春 jiangbaochun@ntu.edu.cn; 高永静 gaoyongjing@ntu.edu.cn



of control group; Compared with the control group, the serum CXCL10 of mice with chronic inflammatory pain was significantly increased ($P < 0.05$), but there was no change in CSF; ④ The expression of CXCL10 and CXCR3 was observed in DRG, spinal cord and lymph node of healthy subjects; ⑤ The levels of CXCL10 in CSF and serum were elevated in patients with postherpetic pain ($P < 0.05$), but not in patients with osteoarthritis. **Conclusion:** Our results indicated that the CXCL10 content was significantly increased in serum or CSF of both mouse and human experiencing neuropathic pain. Thus, CXCL10 may serve as a possible objective diagnostic and/or prognostic marker of neuropathic pain.

Key words Neuropathic pain; Cerebrospinal fluid; Serum; Chemokine; CXCL10

疼痛是继体温、呼吸、脉搏和血压之后的第五大生命指征,其特殊之处在于目前没有客观的生物仪器进行检测,疼痛程度的评估主要依赖病人的主观感受,临床上也缺少疼痛诊断、预后和治疗有效性判断的生物标志物。慢性疼痛是指持续或反复发作超过3个月的疼痛,其中由躯体感觉神经系统损伤或疾病引起的神经病理性疼痛(neuropathic pain, NP)是临床常见的慢性疼痛^[1]。长期的慢性疼痛会导致病人无法正常工作、睡眠和饮食等,严重影响病人的身心健康、社会关系和生活质量,给家庭和社会带来沉重的负担^[2]。目前针对慢性疼痛尤其是NP的治疗,临床上缺乏有效的治疗药物和检验指标,因此亟需对慢性疼痛的发病机制和客观反映疼痛情况的生物标志物进行研究。

理想的疼痛诊疗生物标记物应能够准确反应疼痛程度和进展情况,并能预测由急性向慢性转化的风险等级,测量过程中应满足容易、快速、廉价和可重复等条件。血浆和脑脊液被认为是生物标志物研究的理想选择,血浆中的前列腺素E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和白细胞介素2,以及脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)中的胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)、P物质(substance P, SP)等被证明与不同类型疼痛的发生发展相关^[3]。遗传类生物标记物则主要围绕离子通道、G蛋白偶联受体和药物代谢等基因的单核苷酸多态性进行(single nucleotide polymorphisms, SNPs)研究^[3]。遗憾的是,现阶段关于疼痛标记物的研究尚处于起步阶段,虽发现了一些潜在的生物标记物,但其临床有效性和应用范围需作进一步研究,且仍需筛选并确定新的理想标记物。

大量的动物实验证明慢性疼痛常伴随着外周和中枢的组织损伤和炎症。外周组织、背根神经节(DRG)、脊髓和脑中的趋化因子在慢性疼痛的发生和维持中发挥了重要作用^[1]。趋化因子是一类分泌型的细胞因子或信号蛋白,由50多个成员组成。

趋化因子通过形成可溶性或固定的浓度梯度调控免疫细胞由低浓度向高浓度迁移^[1]。神经损伤或组织损伤后,趋化因子不仅从浸润的免疫细胞和胶质细胞中表达上调、释放、导致外周敏化,而且中枢神经系统中的神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞也能够合成并释放趋化因子,通过敏化感觉神经元,进一步增强胶质激活和神经炎症等导致中枢敏化^[4]。趋化因子在导致外周敏化和中枢敏化的同时,还可分泌进入血液和脑脊液,或可作为慢性疼痛的生物标志物^[5,6]。

CXCL10 (C-X-C motif chemokine 10)属于CXC型趋化因子配体,通过与CXCR3受体结合发挥作用。CXCL10和CXCR3能够在外周和中枢神经系统中表达^[7,8],参与脱髓鞘神经病变、神经炎症和多发性硬化症等神经系统功能异常和疾病的调控^[7,9,10]。CXCL10/CXCR3信号在外周和脊髓中参与慢性疼痛和慢性瘙痒的调控^[11,12]。本实验室前期研究发现在脊神经结扎(spinal nerve ligation, SNL)诱导的NP模型中CXCL10在脊髓背角神经元和星形胶质细胞中表达增加,通过与CXCR3结合介导星形胶质细胞和神经元的相互作用促进NP^[11]。而且鞘内注射CXCL10诱导小鼠痛觉过敏^[13],表明CXCL10在脊髓的表达与NP存在密切关系。但在急性和慢性疼痛条件下,CXCL10在小鼠和病人的脑脊液和血液的表达水平变化还未见报道。

本研究采用小鼠L₅脊神经结扎模型及慢性炎症疼痛模型,观察比较了不同疼痛模型小鼠CSF与血清中CXCL10的表达变化,并首次检测了急性带状疱疹、带状疱疹后神经痛和慢性关节炎病人血清和CSF中CXCL10的含量,探讨其作为NP临床诊断指标的可能性。

方 法

1. 材料

动物:健康成年雄性ICR小鼠,由南通大学动物实验中心提供。人的脊髓、DRG和淋巴结组织

由美国 National Disease Research Interchange (NDRI) 和南通大学附属医院病理科提供。脑脊液和血液样品由东部战区总医院疼痛科收集提供。

试剂和药品: CXCL10 抗体 (Goat, R&D Systems, AF-466-NA); CXCR3 抗体 (Rabbit, 博士德生物, PB0038); 荧光二抗, Cy3-donkey anti-goat IgG、Cy3-donkey anti-rabbit IgG 和 Alex-488-donkey anti-mouse (Jackson); 近红外荧光基团标记二抗 IRDye 800CW goat anti-rabbit IgG (美国 LICOR Odyssey); RIPA 组织裂解液 (Beyotime); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Thermal Scientific); 人和小鼠 CXCL10 ELISA 试剂盒, Human CXCL10/IP-10 Quantikine ELISA Kit、Mouse CXCL10/IP-10/CRG-2 DuoSet ELISA (R&D Systems); 逆转录试剂盒 (南京诺唯赞); 其余化学试剂由美国 Sigma 公司提供。

实验所用主要仪器: 荧光定量 PCR 仪 StepOnePlus (Applied Biosystems); 普通 PCR 仪 (Applied Biosystems); 电泳仪 (Bio-Rad Laboratories); 倒置激光共聚焦显微镜 SP8 (Leica); Odyssey 双色红外荧光扫描仪 (美国 LI-COR); 多功能酶标仪 (美国 BioTek); 冰冻切片机 (Thermo Scientific); 高速冷冻离心机 (Eppendorf)。

2. 方法

(1) 疼痛模型建立

神经病理性疼痛模型的建立: 将健康成年 ICR 小鼠随机分为正常组 (Naive), 假手术组 (Sham) 和模型组 (SNL)。SNL 组小鼠禁食禁水 8 h, 使用异氟烷吸入麻醉剃除小鼠背部毛发后用碘伏消毒, 在其背部距髂脊 1 cm 处切开皮肤, 延腰背部正中线下白线处纵向分离肌肉, 钳断 L₆ 腰椎横突使 L₅ 脊

神经暴露并分离, 使用 6-0 丝线结扎。之后缝合肌肉、筋膜和皮肤, 置于温暖环境中苏醒。Sham 组动物的手术过程同 SNL 组, 但不结扎 L₅ 脊神经。

急性疼痛模型建立: 小鼠分为 Naive 组和急性疼痛组 (Formalin)。在清醒状态下, 向小鼠左侧足底皮内注射 5% Formalin 20 μl 制备急性炎症性疼痛模型。

慢性炎症性疼痛模型建立: 动物分为 Naive 组和慢性炎症性疼痛模型组 (CFA)。向小鼠左侧足底皮内注射 50% CFA 20 μl 制备慢性炎症性疼痛模型。

Naive 组小鼠不作任何处理。

(2) RT-PCR 和 semi-quantitative PCR

组织中的总 RNA 提取: 小鼠吸入异氟烷麻醉后, 用生理盐水灌流后取脾脏、淋巴结、脊髓、脑和 DRG。用 Trizol 提取 RNA。用 OD 仪测量 RNA 浓度与纯度, OD_{260/280} 在 1.8-2.0 且 OD_{260/230} 大于 2 为宜。

每个样本取 1 μg 总 RNA 逆转录为 cDNA。引物由生工或 Invitrogen (上海) 合成, 具体引物序列见表 1。

半定量 RT-PCR 及琼脂糖凝胶电泳: 半定量 RT-PCR 实验所采用的样本、反应体系及引物与 Real-time PCR 一致, 但反应循环数不同: 比较小鼠 CXCL10 在脾脏、淋巴结、脊髓、脑和 DRG 中的表达含量采用的 Ct 值为 30; 比较小鼠 CXCR3 在脾脏、淋巴结、脊髓、脑和 DRG 中的表达含量采用的 Ct 值为 35。然后对 PCR 产物进行琼脂糖电泳。

人的脊髓、DRG 和淋巴结组织 RNA 提取和 PCR 方法与小鼠一致, 具体引物序列见表 1。

(3) 免疫荧光

表 1 小鼠 *Cxcl10*、*Cxcr3* 和内参 *β-actin* 引物序列
Table 1 Primer sets for the human and mouse *Cxcl10*, *Cxcr3*, *β-actin* and *Gapdh*

基因 Gene	引物序列 Primer Sequence	长度 Size
Mouse <i>Cxcl10</i>	5'-TGAATCCGGAATCTAAGACCATCAA -3'	171 bp
	5'-AGGACTAGCCATCCACTGGGTAAAG -3'	
Mouse <i>Cxcr3</i>	5'-TACCTTGAGGTTAGTGAACGTCA-3'	100 bp
	5'-CGCTCTCGTTTTCCCCATAATC-3'	
Mouse <i>β-actin</i>	5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3'	171 bp
	5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'	
Human <i>Cxcl10</i>	5'-GTGGCATTCAAGGAGTACCTC-3'	198 bp
	5'-TGATGGCCTTCGATTCTGGATT-3'	
Human <i>Cxcr3</i>	5'-CCACCTAGCTGTAGCAGACAC-3'	141 bp
	5'-AGGGCTCCTGCGTAGAAGTT-3'	
Human <i>Gapdh</i>	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	66 bp
	5'-GCCCAATACGACCAA ATCC-3'	

小鼠经异氟烷吸入麻醉后，经生理盐水和 4% 多聚甲醛灌注固定。取小鼠脾脏和腩窝淋巴结，4% 多聚甲醛后固定过夜，蔗糖脱水后切片，厚度为 14 μm。

免疫荧光染色：PBS (0.01 M, pH 值 7.4) 洗片；加 5% 羊血清室温封闭 2 h 后加一抗 (CXCL10, 1:100; CXCR3, 1:200)，4℃ 过夜后经 PBS 漂洗加入 Cy3 标记的荧光二抗 (1:1000, Jackson ImmunoResearch)；室温孵育 2 h。晾干后封片，激光共聚焦显微镜下拍照观察。

(4) Western Blot 分析

组织蛋白质提取：小鼠经异氟烷麻醉，生理盐水经心脏灌注后取材，用 RIPA 蛋白裂解液提取蛋白。用 BCA 法测定蛋白浓度。每孔加入 30 μg 蛋白进行电泳，湿法转膜将蛋白转移到 PVDF 膜上；5% BSA 室温封闭 2 h，4℃ 一抗过夜孵育 (CXCR3, 1:1000; GAPDH, 1:1 0000)；次日室温复温 1 h 后 TBST 漂洗；用 5% BSA 稀释近红外荧光基团标记的二抗，室温孵育 2 h；Odyssey 双色红外荧光扫描仪成像。

人的脊髓和淋巴结组织 CXCR3 蛋白表达检测方法与小鼠相同。

(5) CSF 样本及血清样本收集与处理

小鼠 CSF 收集与处理：4% 水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠，用脑立体定位仪对小鼠头部进行固定。剃毛后碘伏消毒后划开皮肤与肌肉，暴露环枕膜。用玻璃电极抽取 CSF 25 μl，-80℃ 保存。

小鼠血液样本收集与处理：小鼠尾部采血：小鼠用异氟烷麻醉后将小鼠尾巴用 75% 酒精棉球反

复擦拭，用剪刀剪去尾尖 1~2 mm，用 1.5 ml EP 管收集尾尖血液，采血后用棉球压迫止血每次采血 100 μl。将新鲜血液放入 SST 血清分离管中，室温下放置 30 min，待血细胞凝集后，离心吸取血清，冻于 -80 冰箱存放。

人脑脊液 CSF 和血液样本的收集与处理：收集非疼痛病人 (Control, 无急慢性疼痛病史、无炎症性疾病)、急性带状疱疹神经痛 (herpes zoster neuralgia, HZN)、带状疱疹后神经痛 (postherpetic neuralgia, PHN) 和骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 疼痛病人的血液和脑脊液。本研究经东部战区总医院伦理委员会批准，所有病人均签署知情同意书。用腰椎穿刺法采集各组病人脑脊液 1 ml -80℃ 冰箱冻存。将 5 ml 新鲜血液放入 SST 血清分离管中，室温下放置 30 min，待血细胞凝集后，离心吸取血清 -80℃ 冰箱冻存。提供脑脊液样本和血液样本的病人数、性别、年龄、病程和视觉模拟评分法 (visual analogue scale, VAS) 评分数据见表 2、3。

(6) ELISA

样品制备：用 RIPA 裂解液提取人淋巴结和脊髓组织蛋白，具体方法与 Western Blot 实验一致，提取后的蛋白上清用 Calibrator Diluent RD5K 进行 10 倍稀释：10 μl 蛋白上清 + 90 μl Calibrator Diluent RD5K。血清和 CSF 样本根据说明书要求进行稀释。

根据试剂盒说明进行操作，每孔加入 75 μl Calibrator Diluent RD5K 稀释后的蛋白样品。经加样、富集孵育、洗板、加酶标抗体、再次洗板、底物显色和终止反应步骤后酶标仪读取 450 nm 下样本的 OD 值。

表 2 脑脊液捐献者的基本信息 ($\bar{x} \pm SEM$)
Table 2 The general information of CSF donor ($\bar{x} \pm SEM$)

组别 Group	例数 Number	性别 Gender 女/男 (F/M)	年龄 Age	疼痛持续时间 Pain duration	视觉模拟评分法 VAS
Control	8	1F/7M	55.0 ± 5.1	0	0
HZN (< 1 m)	6	4F/2M	63.0 ± 2.9	21.2 ± 3.5 d	5.3 ± 0.6
PHN (> 1 m)	15	7F/8M	68.9 ± 2.0	28.9 ± 20.4 m	5.1 ± 0.4
OA	6	5F/1M	66.0 ± 2.1	15.9 ± 0.6 m	3.8 ± 0.6

表 3 血清捐献者的基本信息 ($\bar{x} \pm SEM$)
Table 3 The general information of serum donor ($\bar{x} \pm SEM$)

组别 Group	例数 Number	性别 Gender 女/男 (F/M)	年龄 Age	疼痛持续时间 Pain duration	视觉模拟评分法 VAS
Control	8	1F/7M	55.0 ± 5.1	0	0
HZN (< 1 m)	9	5F/4M	60.1 ± 2.5	16.0 ± 3.1 d	5.6 ± 0.6
PHN (> 1 m)	15	8F/7M	68.8 ± 2.2	25.5 ± 20.5 m	5.5 ± 0.4
OA	6	5F/1M	66.0 ± 2.1	15.9 ± 0.6 m	3.8 ± 0.6

拟合标准曲线, 根据 OD 值计算样品浓度: 将不同浓度的标准品 (500 pg/ml、250 pg/ml、125 pg/ml、62.5 pg/ml、31.3 pg/ml、15.6 pg/ml 和 7.8 pg/ml) 和其对应的 OD 值在 Excel 上画出散点图, 为散点图添加趋势线, 回归分析类型选择线性, 即 $Y = A * X + B$, $R^2 \geq 0.98$ 。将每孔样品的 OD 值代入方程, 计算样品浓度。

(7) 图像和统计学处理

图像分析及处理: 处理使用 Image J 软件对 WB 进行图像处理, 统计各条带的灰度值; 用 CXCR3 条带的灰度值与内参 GAPDH 蛋白灰度值 (均扣除背景) 的比值作为最终统计数据, 用以表示相应蛋白的相对表达量。

3. 统计学分析

所有计量资料统计数据均采用均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm SEM$) 表示, 多组之间比较采用单因素方差分

析 (One-way ANOVA), 两组之间比较采用 t 检验 (Student's t -test), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. CXCL10 在正常小鼠的脾脏、淋巴结、DRG、脊髓和脑中均有表达

RT-PCR 扩增曲线显示, *Cxcl10* 在小鼠脾脏、淋巴结、DRG、脊髓和脑中都有基础表达, 表达量从高到低依次为脾脏、淋巴结、脊髓、脑和 DRG (见图 1A)。Semi-quantitative PCR 结果也显示 *Cxcl10* 在上述组织中均有一定量的基础表达, 表达高低顺序与 RT-PCR 结果一致 (见图 1B)。免疫荧光结果显示 CXCL10 蛋白在小鼠脾脏和淋巴结中具有较高的基础表达, 与 PCR 结果相符合 (见图 1C、D)。

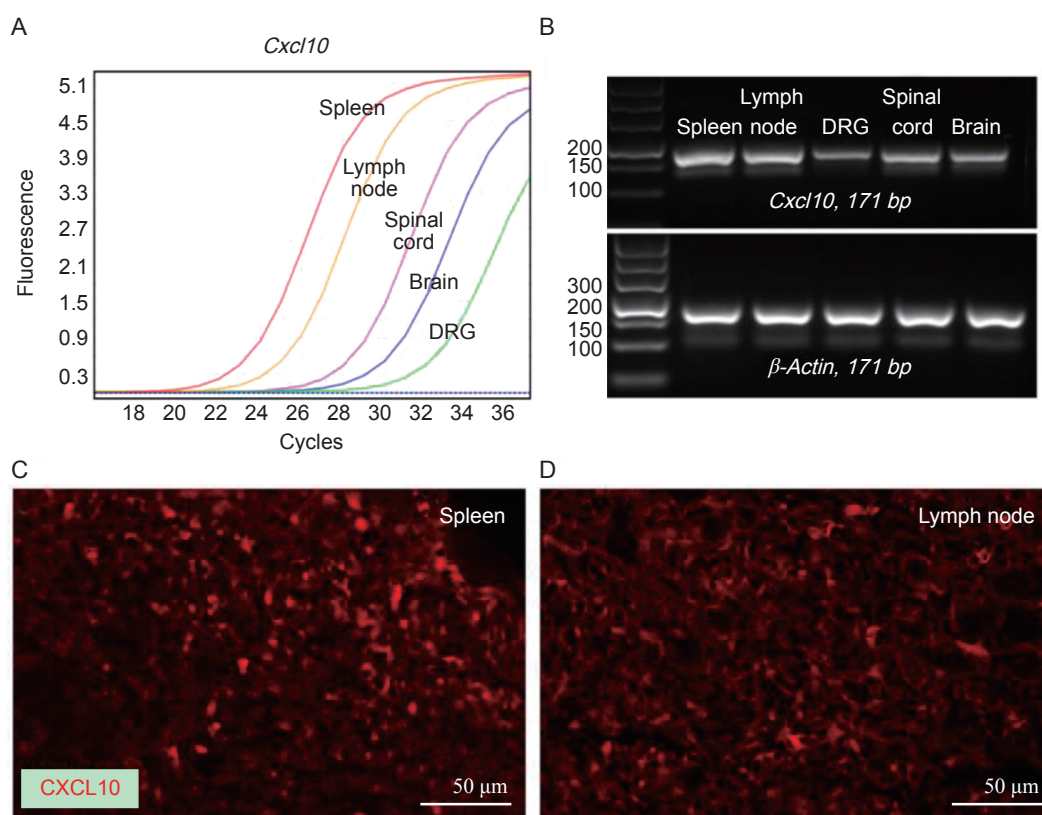


图 1 CXCL10 在免疫器官和神经组织中的基础表达

(A) RT-PCR 扩增曲线展示 *Cxcl10* 基因在小鼠脾脏、淋巴结、DRG、脊髓和脑组织中的基础表达; (B) 琼脂糖凝胶电泳展示 *Cxcl10* 基因在小鼠脾脏、淋巴结、DRG、脊髓和脑组织中的 semi-quantitative PCR 扩增产物; (C) 免疫荧光检测小鼠脾脏中 CXCL10 的表达; (D) 免疫荧光检测小鼠淋巴结中 CXCL10 的表达

Fig. 1 The basal expression of CXCL10 in the immune organs and nervous tissues of adult mice

(A) The amplification curve of real-time PCR shows basal expression of *Cxcl10* in the spleen, lymph nodes, DRG, spinal cord, and brain; (B) Agarose gel electrophoresis display products of *Cxcl10* semi-quantitative PCR from spleen, lymph nodes, DRG, spinal cord, and brain; (C) Immunofluorescence shows CXCL10 expression in the spleen; (D) Immunofluorescence shows CXCL10 expression in the lymph node.

2. CXCR3 在正常小鼠的脾脏、淋巴结、DRG、脊髓和脑组织中均有表达

RT-PCR 扩增曲线显示, *Cxcr3* 在小鼠脾脏、淋巴结、DRG、脊髓和脑中都有基础表达, 表达量从高到低依次为淋巴结、脾脏、脊髓、脑和 DRG (见图 2A)。Semi-quantitative PCR 结果也显示 *Cxcr3* 在上述组织中均有一定量的基础表达, 表达高低顺序与扩增曲线显示结果一致 (见图 2B)。免疫荧光结果显示 CXCR3 蛋白在小鼠淋巴结和脾脏中都具有较高的基础表达, 与 PCR 结果相符合 (见图 2C、D)。

3. 神经病理性疼痛小鼠 CSF 和血清中 CXCL10 含量显著增加

本研究采用 ICR 小鼠构建了 SNL 诱导的神经病理性疼痛模型、福尔马林诱导的急性痛模型以及

CFA 诱导的慢性炎症痛模型, 取 CSF 与血清进行 CXCL10 含量测定。ELISA 结果显示, 与 Naive 和 Sham 组相比, SNL 术后 10 天小鼠 CSF 中 CXCL10 含量显著上升 (见图 3A); 然而, Formalin 诱导的急性炎症性疼痛和 CFA 诱导的慢性炎症性疼痛小鼠 CSF 中 CXCL10 含量与 Naive 组相比无明显变化 (见图 3B、C)。与 Naive 和 Sham 组相比, SNL 术后 1 天和 10 天小鼠血清中 CXCL10 含量均显著上升 (见图 3D); 注射 Formalin 的小鼠血清中 CXCL10 含量与 Naive 组相比无明显变化 (见图 3E); 注射 CFA 的小鼠血清中 CXCL10 含量与 Naive 组相比显著上升 (见图 3F)。

4. CXCL10 及 CXCR3 在正常人淋巴结、DRG 和脊髓中均有表达

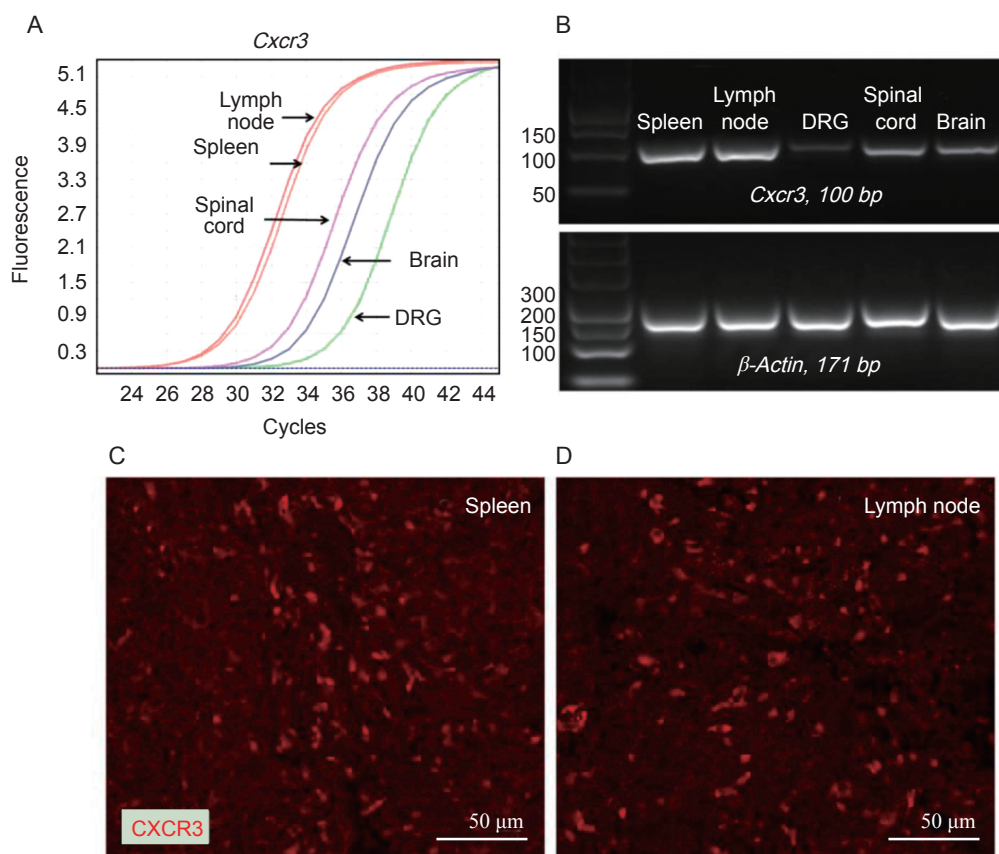


图 2 CXCR3 在免疫器官和神经组织中的基础表达

(A) RT-PCR 扩增曲线展示 *Cxcr3* 基因在小鼠脾脏、淋巴结、DRG、脊髓和脑组织中的基础表达; (B) 琼脂糖凝胶电泳展示 *Cxcr3* 基因在小鼠脾脏、淋巴结、DRG、脊髓和脑组织中的 semi-quantitative PCR 扩增产物; (C) 免疫荧光检测小鼠脾脏中 CXCR3 的表达; (D) 免疫荧光检测小鼠淋巴结中 CXCR3 的表达。

Fig. 2 The basal expression of CXCR3 in the immune organs and nervous tissues of adult mice

(A) The amplification curve of real-time PCR shows basal expression of *Cxcr3* in the spleen, lymph nodes, DRG, spinal cord, and brain; (B) Agarose gel electrophoresis display products of *Cxcr3* semi-quantitative PCR from the spleen, lymph nodes, DRG, spinal cord, and brain; (C) Immunofluorescence shows CXCR3 expression in the spleen; (D) Immunofluorescence shows CXCR3 expression in the lymph node.

为了确定 CXCL10 及 CXCR3 在人免疫器官和神经组织中的表达, 本研究用 RT-PCR 检测了正常人的脊髓、DRG 和淋巴结中 *Cxcl10* 和 *Cxcr3* 的表达。结果显示 *Cxcl10* mRNA 表达从高到低依次为淋巴结、脊髓和 DRG, *Cxcr3* mRNA 表达从高到低依次为淋巴结、DRG 和脊髓 (见图 4A)。Western Blot 结果表明 CXCR3 在脊髓和淋巴结中均有表达, 且淋巴结中表达高于脊髓 (见图 4B), ELISA 结果显示 CXCL10 在人脊髓和淋巴结中均有表达, 同样是淋巴结中的表达高于脊髓 (见图 4C)。

5. CXCL10 在神经病理性疼痛病人以及关节炎

疼痛病人 CSF 和血清中的含量

为了检测 CXCL10 在疼痛病人 CSF 和血清中是否含量增加, 我们用 ELISA 方法检测了非疼痛病人、急性带状疱疹、带状疱疹后神经痛和骨性关节炎疼痛病人 CSF 和血清中 CXCL10 的含量。结果显示, 急性带状疱疹和带状疱疹后神经痛病人 CSF 中 CXCL10 含量显著高于对照组, 而骨性关节炎疼痛病人 CSF 中 CXCL10 未见增加 (见图 5A)。同样检测了他们血清中 CXCL10 的含量, ELISA 结果显示只有带状疱疹后神经痛病人血清中 CXCL10 的含量显著高于对照组 (见图 5B)。

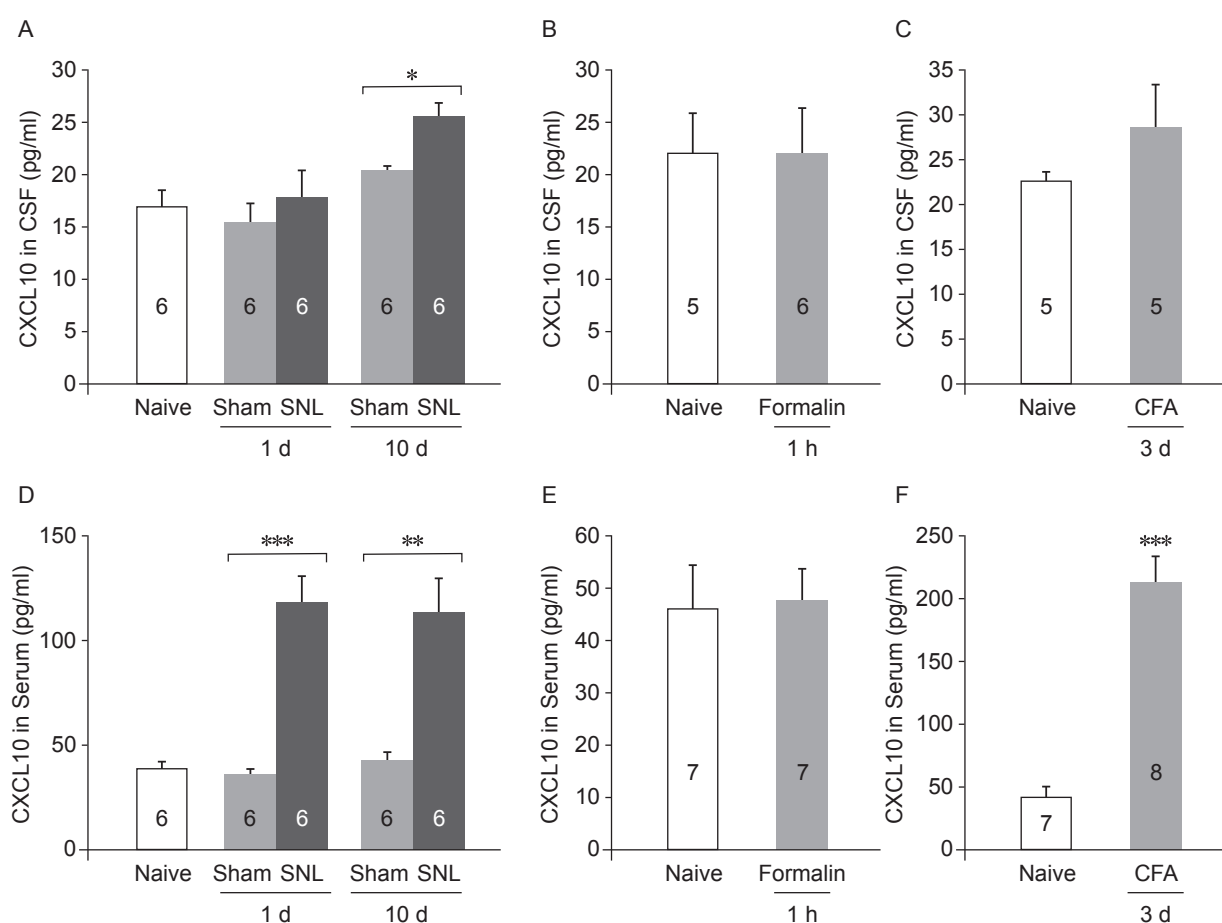


图 3 不同疼痛模型小鼠 CSF 及血清中 CXCL10 蛋白含量 (A-C) CXCL10 在神经病理性疼痛模型、急性和慢性炎症疼痛模型小鼠 CSF 中的含量变化 (A: $*P < 0.05$, 与 Sham 组相比较, Student's *t*-test; B, C: $P > 0.05$, 与 Naive 组相比, Student's *t*-test); (D-F) CXCL10 在神经病理性疼痛模型、急性和慢性炎症疼痛模型小鼠血清中的含量变化 (D: $***P < 0.001$, $**P < 0.01$, 与 Sham 组相比, Student's *t*-test; E: $P > 0.05$, 与 Naive 组相比, Student's *t*-test; F: $***P < 0.001$, 与 Naive 组相比, Student's *t*-test)

Fig. 3 CXCL10 levels in the Serum and CSF of different pain models of mice

(A-C) CXCL10 levels in the CSF of SNL-induced neuropathic pain mice, the formalin-induced acute pain mice, and CFA-induced chronic inflammatory pain mice (A: $*P < 0.05$, compared with group Sham, Student's *t*-test; B, C: $P > 0.05$, compared with group Naive, Student's *t*-test); (D-F) CXCL10 levels in the serum of SNL-induced neuropathic pain mice, the formalin-induced acute pain mice, and CFA-induced inflammatory pain mice (D: $***P < 0.001$, $**P < 0.01$, compared with group Sham, Student's *t*-test; E: $P > 0.05$, compared with group Naive, Student's *t*-test; F: $***P < 0.001$, compared with group Naive, Student's *t*-test).

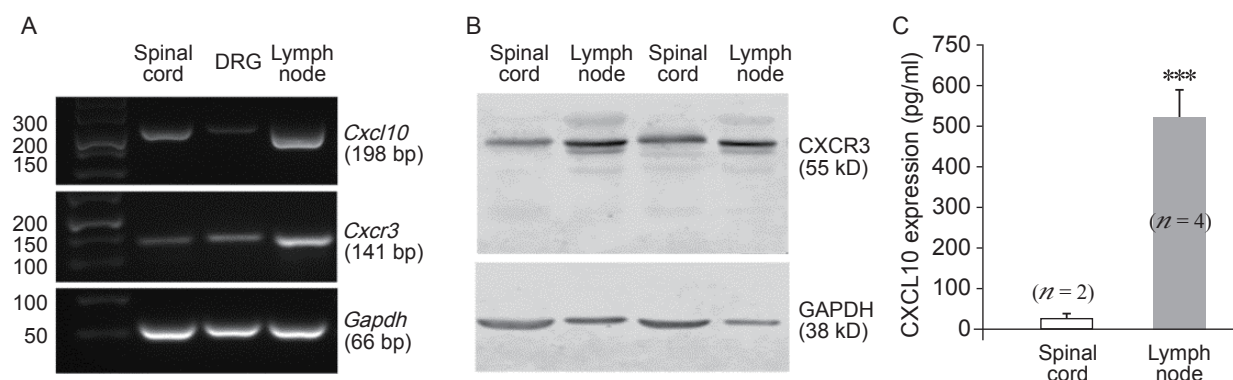


图4 CXCR3 和 CXCL10 在人淋巴结、脊髓和 DRG 中的基础表达

(A) 琼脂糖凝胶电泳展示 *Cxcl10* 与 *Cxcr3* 基因在人脊髓、DRG 和淋巴结中的基础表达情况；(B) 正常人脊髓和淋巴结中 CXCR3 蛋白表达情况，淋巴结中 CXCR3 表达高于脊髓。注：脊髓上样量 30 μ g，淋巴结上样量为 15 μ g；(C) 正常人脊髓和淋巴结中 CXCL10 蛋白表达情况，淋巴结中 CXCL10 表达高于脊髓 (***) P < 0.01, Student's t -test)

Fig. 4 The basal expression of CXCL10 and CXCR3 in the lymph node, spinal cord, and DRG of healthy subjects

(A) Agarose gel electrophoresis show basal expression of *Cxcl10* and *Cxcr3* in human DRG, spinal cord and lymph nodes; (B) Western blot determination of CXCR3 expression in human spinal cord and lymph nodes, the expression of CXCR3 in the lymph node is higher than that in the spinal cord. Please note that 30 μ g spinal cord sample and 15 μ g lymph node sample were loaded; (C) ELISA determination of CXCL10 expression in the spinal cord and lymph node. The expression of CXCL10 in the lymph node is significantly higher than that in the spinal cord (***) P < 0.01, Student's t -test).

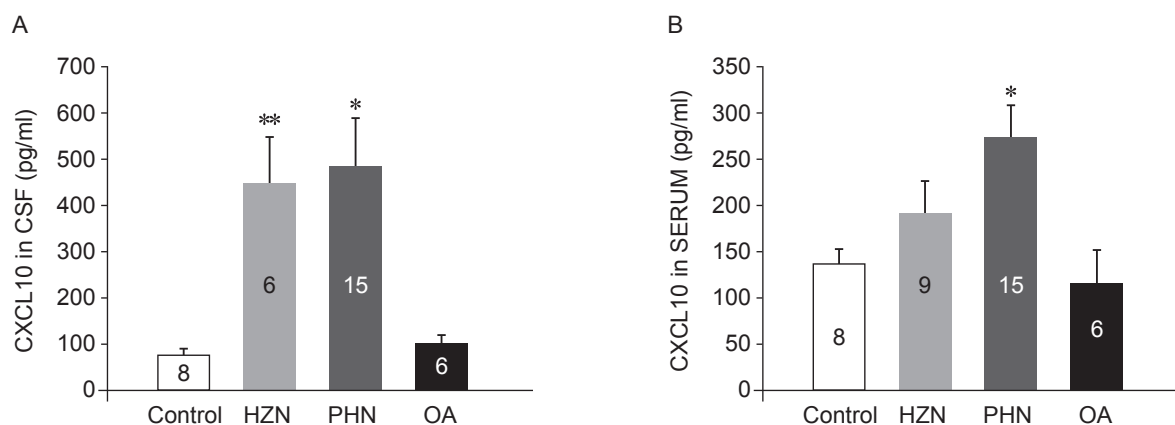


图5 不同疼痛类型病人 CSF 及血清中 CXCL10 蛋白含量

(A) CXCL10 在急性带状疱疹、带状疱疹后神经痛和骨性关节炎疼痛病人 CSF 中的含量变化 (** P < 0.01, * P < 0.05 与 Control 组相比, one-way ANOVA)；(B) CXCL10 在急性带状疱疹、带状疱疹后神经痛和骨性关节炎疼痛病人血清中的含量变化 (* P < 0.05, 与 Control 组相比, one-way ANOVA)

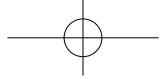
Fig. 5 CXCL10 levels in the serum and CSF of patients with different pain types

(A) CXCL10 levels in the CSF of HZN patients, PHN patients, and OA patients (** P < 0.01, * P < 0.05, compared with group Control, one-way ANOVA); (B) CXCL10 levels in the serum of HZN, PHN, and OA patients (* P < 0.05, compared with group Control, one-way ANOVA).

讨论

本研究采用 RT-PCR、半定量 RT-PCR、Western Blot、免疫荧光等生化手段，结合神经病理性疼痛模型、急性炎症疼痛模型研究了小鼠 CXCL10 与其受体 CXCR3 的组织表达情况，以及正常和模型小鼠的血清和 CSF 中 CXCL10 的含量变化。而且，本研究还检测了 CXCL10 及 CXCR3 在正常人和疼

痛病人不同组织中的基础表达以及在血清和 CSF 中的含量。研究结果显示：CXCL10 和 CXCR3 在小鼠脾脏、淋巴结、DRG、脊髓、脑组织中均有基础表达；在神经病理性疼痛、慢性炎症疼痛等慢性疼痛情况下小鼠 CSF 和血清中 CXCL10 含量有不同程度变化，而急性疼痛时无明显变化；CXCL10 和 CXCR3 在正常人淋巴结、脊髓和 CSF 中均有表达，在带状疱疹后神经痛病人的 CSF 和血清中 CXCL10



含量也显著增加,但骨性关节炎性疼痛病人 CSF 和血清中无显著变化。提示 CXCL10 在 CSF 和血清中的含量变化可能与神经病理性疼痛密切相关。

PCR 结果发现 CXCL10 和 CXCR3 在小鼠脾脏、淋巴结、DRG、脊髓和脑组织中均有表达。由于脾脏和淋巴结是主要的外周免疫器官,大量的 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞定居在其中发育并成熟,且 CXCL10 和 CXCR3 在免疫细胞上高表达^[14],因此 CXCL10 和 CXCR3 在脾脏和淋巴结中的基础表达相对较高。本研究证明 CXCL10 和 CXCR3 在 DRG、脊髓和脑中也有一定的基础表达,提示可能和神经系统的功能调节有关。有文献报道 CXCL10/CXCR3 信号通过介导神经免疫调节参与神经炎症性疾病的发病机制调控^[15]。过敏性接触性皮炎小鼠 DRG 中的 CXCL10 和 CXCR3 表达上调,参与痒觉信息的调控^[8]。本实验室也曾证明正常情况下 CXCL10 与其受体 CXCR3 均在小鼠脊髓背角神经元中有表达;SNL 后脊髓内的 CXCL10 表达大幅增加,且除了在神经元中表达,还能在星形胶质细胞中表达;脊髓中 CXCL10/CXCR3 信号能够介导疼痛条件下脊髓背角神经元兴奋性和突触传递的调节,促进神经病理性疼痛的发生和维持^[11]。CXCL10/CXCR3 信号在脑中还能够介导高血糖症大鼠海马区小胶质细胞激活和星形胶质细胞增生,调控长期的突触形成和行为表现^[16]。

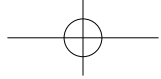
不同疼痛条件下人和小鼠 CSF 和血清中的 CXCL10 在神经病理性疼痛中的含量情况还未见报道。本研究中观察到 CXCL10 的基础表达分布较为广泛。神经病理性疼痛模型小鼠 CSF 和血清中的 CXCL10 含量均显著上升,CFA 引起的炎症痛模型小鼠血清中 CXCL10 含量显著上升、但在 CSF 中上调不显著,表明 CSF 中的 CXCL10 含量变化与神经病理性疼痛相关,和炎症痛没有明显的相关。这种现象的原因可能有:①引起神经病理性疼痛的外周神经损伤和神经病变对中枢神经系统炎症影响更大;②注射 CFA 对外周免疫系统有重要影响、但对中枢神经系统基因表达影响不明显;③ Formalin 引起的组织损伤在短时间内对外周和中枢影响都较小。另外,CXCL10 在不同疼痛病人血清和 CSF 中含量不同,不论是 HZN 还是 PHN 病人,他们的 CSF 中 CXCL10 含量较对照组均显著上升,PHN 病人血清中 CXCL10 含量也显著上升,这与神经病理性疼痛小鼠 CXCL10 在 CSF 和血清中的变化一致。以上结果表明 CSF 和血清中的 CXCL10 含量变化与慢性神经病理性疼痛发生发展相关。以往研究表明 CXCL10 在外周和中枢能够导致神经病理性疼痛的产生和维

持^[11],当降低 CXCL10 表达后能够减轻疼痛行为,由此推测当疼痛治愈后,CXCL10 在外周和中枢的表达有可能降低,血液和 CSF 中的含量也有可能降低。

综上所述,PHN 病人 CSF 和血清中 CXCL10 特异性升高,具有重要的诊断学意义。目前临床上缺乏慢性痛发病前期以及预后的蛋白类诊断标志物。趋化因子由于能够参与神经炎症和疼痛调节,且具备蛋白分子量小、易于扩散进入血液和 CSF、易于免疫学检测等优点,因此很可能成为 NP 诊断和治疗的标志物。本研究证实趋化因子 CXCL10 具备上述特点或可成为检测神经病理疼痛的潜在生物诊断标记物,具有良好的应用开发前景。值得注意的是本研究中临床样本量还较小,需要以后收集更多临床样本分析疼痛程度与血液和 CSF 中 CXCL10 含量的相关性。而且,本研究只检测了 SNL 模型小鼠和 PHN 病人的血清和 CSF 中的 CXCL10 含量,在其它类型的神经病理性疼痛模型或者其它临床类型的 NP 是否有同样变化,仍需进一步研究。另外,由于血清中 CXCL10 可作为系统性红斑狼疮、慢性移植物抗宿主病和川崎病等疾病的生物标志物^[17-19],CSF 中的 CXCL10 含量还与脊髓损伤以及损伤后的运动恢复程度相关^[20],因此在将来的研究和应用中还应考虑 CXCL10 与上述疾病并发时,CXCL10 的诊断意义和含量变化特点。

参 考 文 献

- [1] 吕岩,程建国,樊碧发,等. ICD-11 慢性疼痛分类中文编译版[J]. 中国疼痛医学杂志, 2018, 24(11):801-805.
- [2] Jiang BC, Liu T, Gao YJ. Chemokines in chronic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential[J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 212:107581.
- [3] Sisignano M, Lotsch J, Parnham MJ, *et al*. Potential biomarkers for persistent and neuropathic pain therapy[J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 199:1-29.
- [4] 高永静,张志军,曹德利. 趋化因子介导的神经炎症反应和神经病理性疼痛[J]. 中国细胞生物学学报, 2014, 36(3):297-307.
- [5] 朱翔,戴林,朱鸣镝. 依那西普缓解腰椎间盘突出模型大鼠的痛觉过敏并减少趋化因子 CCL2 和受体的表达[J]. 基础医学与临床, 2015, 35(8):1061-1066.
- [6] 顾军,高永静,姜保春. 趋化因子 CXCL16 及受体 CXCR6 在神经病理性疼痛小鼠背根神经节中的表达变化[J]. 中国疼痛医学杂志, 2017, 23(8):569-574.
- [7] Kieseier BC, Tani M, Mahad D, *et al*. Chemokines and chemokine receptors in inflammatory demyelinating neuropathies: A central role for IP-10[J]. *Brain*, 2002,



- 125(Pt 4):823-834.
- [8] Qu L, Fu K, Yang J, *et al.* CXCR3 chemokine receptor signaling mediates itch in experimental allergic contact dermatitis[J]. *Pain*, 2015, 156(9):1737-1746.
- [9] Sorensen TL, Tani M, Jensen J, *et al.* Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients[J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(6):807-815.
- [10] Krauthausen M, Saxe S, Zimmermann J, *et al.* CXCR3 modulates glial accumulation and activation in cuprizone-induced demyelination of the central nervous system[J]. *J Neuroinflammation*, 2014, 11:109.
- [11] Jiang BC, He LN, Wu XB, *et al.* Promoted interaction of C/EBP α with demethylated Cxcr3 gene promoter contributes to neuropathic pain in mice[J]. *J Neurosci*, 2017, 37(3):685-700.
- [12] Walsh CM, Hill RZ, Schwendinger-Schreck J, *et al.* Neutrophils promote CXCR3-dependent itch in the development of atopic dermatitis[J]. *Elife*, 2019, 8:e48448.
- [13] Wu XB, He LN, Jiang BC, *et al.* Spinal CXCL9 and CXCL11 are not involved in neuropathic pain despite an upregulation in the spinal cord following spinal nerve injury[J]. *Mol Pain*, 2018, 14:1744806918777401.
- [14] Lee EY, Lee ZH, Song YW. CXCL10 and autoimmune diseases[J]. *Autoimmun Rev*, 2009, 8(5):379-383.
- [15] Muller M, Carter S, Hofer MJ, *et al.* Review: The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity-a tale of conflict and conundrum[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2010, 36(5):368-387.
- [16] Satrom KM, Ennis K, Sweis BM, *et al.* Neonatal hyperglycemia induces CXCL10/CXCR3 signaling and microglial activation and impairs long-term synaptogenesis in the hippocampus and alters behavior in rats[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1):82.
- [17] Rose T, Grutzkau A, Hirsland H, *et al.* IFN α and its response proteins, IP-10 and SIGLEC-1, are biomarkers of disease activity in systemic lupus erythematosus[J]. *Ann Rheum Dis*, 2013, 72(10):1639-1645.
- [18] Ko TM, Kuo HC, Chang JS, *et al.* CXCL10/IP-10 is a biomarker and mediator for Kawasaki disease[J]. *Circ Res*, 2015, 116(5):876-883.
- [19] Kariminia A, Holtan SG, Ivison S, *et al.* Heterogeneity of chronic graft-versus-host disease biomarkers: Association with CXCL10 and CXCR3 + NK cells[J]. *Blood*, 2016, 127(24):3082-3091.
- [20] Casha S, Rice T, Stirling DP, *et al.* Cerebrospinal fluid biomarkers in human spinal cord injury from a phase II minocycline trial[J]. *J Neurotrauma*, 2018, 35(16):1918-1928.

· 消 息 ·

2021 年《中国疼痛医学杂志》征稿与征订

《中国疼痛医学杂志》是由中华人民共和国教育部主管，北京大学和中华医学会疼痛学分会共同主办的专业性学术期刊。报道有关疼痛临床、基础研究和临床诊疗的综合性学术刊物。现为中国中文核心期刊（北京大学核心期刊）、中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库 (CSCD) 来源期刊收录。《中国疼痛医学杂志》诚邀您投稿、订阅。

投稿：来稿可直接网上投稿 <http://casp.ijournals.cn>，请署真实姓名、工作单位、职称，附单位介绍信（信中须注明未“一稿两投”、署名无争议、对文章内容的真实性负责、无泄密内容）。投稿时请注明通讯作者及基金资助信息，并提供详细的通讯地址、邮编、联系电话、E-mail 等。衷心希望《中国疼痛医学杂志》成为了您了解疼痛医学发展和发表科研成果的平台之一。

订购：邮发代号：82-832，本刊为月刊，大 16 开本，80 页，每册定价 32.00 元，全年 12 期，共 384.00 元。欢迎在当地邮局订阅或直接汇款至编辑部订阅。

编辑部地址：北京海淀区学院路 38 号，北京大学医学部《中国疼痛医学杂志》编辑部，100083

投稿网址：<http://casp.ijournals.cn>

联系电话：010-82801712；010-82801705

电子邮箱：pain1712@126.com

联系人：赵磊

QQ 群：222950859 微信公众平台：pain1712

