

肌萎缩侧索硬化患者血浆和脑脊液谷氨酸改变及利鲁唑对血浆谷氨酸的影响

樊汉青, 蒋雨平^{**}, 朱秋毓^{*}

(复旦大学附属华山医院神经内科, ^{*} 肾病实验室 200040)

关键词 肌萎缩侧索硬化; 谷氨酸; 高效液相色谱法

摘要 目的: 了解肌萎缩侧索硬化(ALS)患者血浆和脑脊液谷氨酸浓度改变, 以及药物干预对谷氨酸水平的影响。方法: 应用 HPLC 方法对 ALS 患者进行血浆和脑脊液谷氨酸测定。结果: ①患者血浆中存在兴奋性谷氨酸显著增高, 谷氨酸浓度与性别、年龄、病程均无关。②力鲁唑(力如太)治疗 1 个月后, 血浆谷氨酸浓度下降, 而环磷酰胺治疗变化不明显。③脑脊液中谷氨酸浓度未见明显变化。结论: ALS 患者存在谷氨酸代谢异常, 但谷氨酸可能不是 ALS 致病的惟一途径。

A Study on Levels of Plasma and CSF Glutamate in ALS Patients and the Effect of Riluzole Treatment on Plasma Glutamate FAN Han-Qing, JIANG Yu-Ping, ZHU Qiu-Yu. Department of Neurology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China

KEY WORDS amyotrophic lateral sclerosis (ALS); glutamate; high performance liquid chromatography(HPLC)

ABSTRACT **Aim** To figure out changes of plasma and CSF glutamate levels in ALS patients and to determine whether Riluzole intervention could make changes on plasma glutamate. **Methods** Levels of plasma and CSF glutamate in ALS patients were measured via high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** It was demonstrated that ①Plasma glutamate levels are higher in ALS patients than in normal controls. No correlation was shown between plasma glutamate levels and age, sex or duration of disease. ②After the initial month of Riluzole therapy, plasma glutamate levels significantly decreased, while no significant change was found in patients treated with cyclophosphamidum. ③No difference in levels of CSF glutamate was shown between ALS patients and normal controls. **Conclusion** The evidence suggests that glutamate plays a significant role in ALS, although it might not be the only significant component in the pathogenetic mechanism of ALS.

肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)是一种病因仍不明确的中枢神经系统上、下运动神经元选择性受累的缓慢进行性的变性病, 其发病机制有多种假说, 其中更以谷氨酸兴奋毒性假说突出。本研究通过测定 ALS 患者血浆和脑脊液的谷氨酸水平, 了解谷氨酸在 ALS 患者是否存在异常增高, 并且通过对患者的随访, 了解作用于兴奋性氨基酸途径的 ALS 治疗药利鲁唑干预是否会对血浆谷氨酸水平产生影响。

资料和方法

研究对象 选取 1999 年—2002 年在我院门诊及住院的 ALS 病例 34 例, 所有病例均符合 World Federation of Neurology (WFN) El Escorial 诊断标准^[1],

即将 3 个区域同时有上、下运动神经元损害证据或 2 个区域有上、下运动神经元损害证据, 病情进行性进展伴有上运动神经元体征向下发展的病例作为入选对象。男 25 例, 女 9 例。平均年龄(50.6±9.6)岁。平均病程(16.5±13.4)个月。所有 ALS 病例均为散发。其中 28 例患者进行了血浆谷氨酸浓度的测定, 28 例患者进行了脑脊液谷氨酸浓度的测定。对照组共 7 人(男 5 名, 女 2 名), 平均年龄(53.7±12.6)岁。为正常人或紧张型头痛患者。两组年龄经 *t* 检验, 无差异; 两组性别构成比经精确四格表检验, 无差异。

谷氨酸浓度测定 谷氨酸标准液配制: 谷氨酸 147 mg, 加 0.1 mol·L⁻¹盐酸至 50 mL 制成谷氨酸储备液。分装, -20℃冷藏待用。工作液用 0.01 mol·L⁻¹

[文章编号] 1008-0678(2004)03-0236-03 [中图分类号] R744.8 [文献标识码] A

[基金项目] 上海市科学技术发展基金(004119005)和安万特公司资助, **申请人。

[作者简介] 樊汉青, 女(1971-), 上海市人, 硕士, 复旦大学附属华山医院, 主治医师, 主要从事运动神经元病的研究。

盐酸稀释至所需浓度。-4℃冷藏待用。邻苯二甲醛衍生化试剂配制:邻苯二甲醛 22 mg,依次加入 500 μL 无水乙醇、9 mL 0.1 mol·L⁻¹硼酸缓冲液(pH 10.4)、500 μL 亚硫酸钠(1 mol·L⁻¹),摇匀,4℃冷藏待用。

色谱条件 不锈钢材质色谱柱,填料为:LiChrosorb C18,250 mm×4.6 mm,粒度 5 μ。流动相 A 为 0.1 mol·L⁻¹醋酸缓冲液,用醋酸调至 pH 6.4。流动相 B 为纯甲醇。用前均经 0.45 μ 膜过滤。无需脱气。柱温设定为 40℃,紫外检测器用于检测谷氨酸-邻苯二甲醛衍生物,检测波长设定为 338 nm。氨基酸分离采用梯度洗脱法进行(见表 1)。所用仪器为 1100 系列 HPLC 色谱仪(Agilent 公司)。

表 1 梯度洗脱参数设置

时间(min)	0	5	15	15.1	19.1	20	21.1
流动相 A	98	95	76	2	2	98	98
流动相 B	2	5	24	98	98	2	2
流速(mL·min ⁻¹)	0.8	0.8	0.8	1	1	1	0.8

数据处理 外标法用于定量分析。所有色谱峰由 Agilent 公司的 ChemStation(A.09.01 版本)按峰面积进行自动积分。

重复性测定 对标准谷氨酸溶液连续重复进样 5 次,隔天再同样重复进样,取其平均值并作统计。结果表明在 0.4~40 μmol·L⁻¹,相关系数为 0.998。天内变异系数为 4.2%,日间变异系数为 9.3%。

血浆、脑脊液标本制备 血浆标本:空腹静脉血 2 mL 置于肝素抗凝管中→4℃ 3 000 r·min⁻¹离心 3 min,取上清液→另取 1.5 mL 离心管,内称量 30 mg 固体磺

基水杨酸→上清液置于离心管内,充分混匀后 4℃ 15 000 r·min⁻¹高速离心→上清液低温-70℃保存。脑脊液标本:空腹脑脊液 1 mL 低温-70℃保存。

作色谱分析时,将上述冷冻标本快速解冻后,吸取 20 μL 上清液,加 300 μL 0.1 mol·L⁻¹硼酸缓冲液(pH 10.4),摇匀后进样测定。脑脊液样品处理同血浆样品,但稀释 5 倍后进行测定。

治疗方法 患者入组后,留取脑脊液、血浆标本后,进行利鲁唑组和免疫治疗组开放性分组治疗。利鲁唑治疗组:利鲁唑 50 mg bid,口服;免疫治疗组:环磷酸胺(cyclophosphamidum)和地塞米松;环磷酸胺 200 mg biw,×5 周,静滴;同时地塞米松 10 mg·d⁻¹×10 d,静滴,改地塞米松 5 mg·d⁻¹×10 d,之后改口服泼尼松递减。治疗 1 个月留取血浆标本。

统计方法 采用 SPSS 10.0 软件统计分析数据,进行均数统计、卡方检验,成组 t 检验,独立样本 t 检验、两个独立样本检验和 Pearson 相关分析(凡进行 t 检验的各组数据均经 One-sample Kormogorov-Smirnov 非参数检验符合正态性分布,当分布不符合正态分布时,进行非参数检验)。

结 果

ALS 组和对照组血浆谷氨酸浓度 与对照组比,28 例 ALS 患者血浆谷氨酸值明显升高(P<0.05)。按起病部位的不同再将利鲁唑组分为两个亚组,首先出现吞咽和构音障碍、舌肌萎缩等症状的患者为延髓组,首先出现单侧或双侧上肢无力,肌萎缩等损害的患者为肢无力组,重新比较结果发现亚组间无差异(表 2)。

表 2 ALS 组、对照组血浆谷氨酸浓度(浓度单位为 μmol·L⁻¹)

	ALS 组			对照组 n=7
	延髓组(n=7)	肢无力组(n=21)	总数(n=28)	
血浆谷氨酸值	237.54±52.61	252.53±58.62	248.78±56.61*	161.27±56.61

*ALS 组和对照组血浆谷氨酸浓度比,P<0.05 有明显差异

血浆谷氨酸浓度和年龄、病程、性别的关系 血浆谷氨酸含量和年龄的相关系数-0.109,和病程的相关系数 0.137,P 值均>0.05。按性别分组:男 23 例,血浆谷氨酸含量为(257.57±48.95)μmol·L⁻¹,女 5 例,为(208.38±77.25)μmol·L⁻¹,P>0.05。上述结果表明,患者血浆谷氨酸水平和年龄、病程、性别无明显相关。

ALS 组和对照组脑脊液谷氨酸浓度 由于患者组脑脊液谷氨酸浓度为(51.03±8.94)μmol·L⁻¹,经检验不呈正态性分布,而对照组谷氨酸浓度为(53.71±

12.65)μmol·L⁻¹,非参数检验结果显示两组无差别,P>0.05。

药物干预对血浆谷氨酸浓度的影响 17 例 ALS 患者随访了血浆谷氨酸浓度,其中 10 例经利鲁唑治疗,7 例经免疫治疗,结果显示利鲁唑组治疗前后血浆谷氨酸浓度呈显著性下降;而免疫治疗组尽管能看到血浆谷氨酸浓度均值下降,但是其差异未达到统计学意义(表 3)。

表3 不同治疗组对血浆谷氨酸浓度的影响(浓度单位为 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

	利鲁唑组(n=10)		免疫治疗组(n=7)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
血浆谷氨酸浓度	251.35±54.37	205.74±55.33*	261.89±50.01	228.07±48.63

*利鲁唑组治疗前后血浆谷氨酸浓度下降, $P < 0.05$

讨 论

Lucas 报道鼠的视网膜在全身注射谷氨酸后, 出现兴奋性毒性反应。谷氨酸是中枢神经系统的—个最主要的神经递质, 谷氨酸聚积在神经突触, 当达到毒性浓度时可造成神经元的死亡, 谷氨酸兴奋毒性学说也是 ALS 三大发病机制之一。Plaitakis 等人^[2]认为在 ALS 患者中存在谷氨酸代谢异常, 其依据是发现 ALS 患者血浆中谷氨酸水平增高, 口服谷氨酸后, 患者血浆谷氨酸浓度仍要比正常人高, 推测造成这些变化的原因是由于氨基酸转运和降解异常。此后又有一些研究^[3,4]支持这一观点, Rothstein^[5]等利用反相高效液相测量了 15 例 ALS 患者脑脊液中谷氨酸浓度为 $(0.80 \pm 0.31) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 较对照组明显增高。然而也有不少学者持否定意见, Perry^[6]认为谷氨酸的增高可能和技术因素及有无禁食有关。对标本处理方法的—不同被认为是导致这些相互矛盾结果的原因。

在本组研究中, 我们采取空腹状态下留取标本, 避免了外源性食物因素的干扰。标本的制备参照 Perry^[6]的方法。结果发现 ALS 患者空腹血浆谷氨酸浓度均值要明显高于对照组, 支持散发型 ALS 中的确存在谷氨酸代谢异常。本研究同时发现, 患者脑脊液谷氨酸浓度和对照组没有差异, 这个结果和一些报道^[3,7,8]相背, 但和 Perry^[6]报道—致。Shaw^[8]报道 ALS 患者只有 30% 出现脑脊液谷氨酸的升高, 其余均在正常范围内。研究^[9,10]发现在 ALS 患者中枢神经系统—些区域谷氨酸有显著的下降, 认为 ALS 患者可能存在谷氨酸代谢、转运和贮存的缺陷。结合我们的研究结果, 认为 ALS 的发病可能是多因素的结果, 兴奋性氨基酸参与了 ALS 的发病, 但中枢神经系统谷氨酸水平可能不是致病的直接原因, 推测谷氨酸可能是一个促发因素, 外周循环的谷氨酸浓度异常增高引起—系列反应致神经元的损伤。而且年龄、病程、性别不是影响谷氨酸浓度的因素。

在所有调节谷氨酸兴奋递质系统的药物中, 利鲁唑(氨基-2-三硫甲氧-6-苯并噻唑)是最突出的—个药物。国外通过两次大规模多中心临床试验, 证实该药物可延缓 ALS 患者机械通气时间, 从而延长患者生存

时间, 提高生活质量。然而, 迄今为止, 其确切的作用部位还不清楚, 它可能在中枢神经系统突触前抑制谷氨酸的释放; 也可能通过阻断电压依赖性的钠通道、影响 G-蛋白信号传递、减少 NMDA (N-甲基-D-天冬氨酸) 受体的过度兴奋、减少钙内流而发挥突触后的作用。本研究显示, 10 例接受利鲁唑治疗的患者, 血浆谷氨酸水平有显著下降, 而在免疫治疗组, 谷氨酸浓度变化不显著。研究再次证实尽管利鲁唑作用环节不明, 它确实作用于谷氨酸代谢途径, 对体内谷氨酸代谢产生影响。

本研究证实 ALS 患者血浆中确实存在兴奋性谷氨酸增高, 认为谷氨酸参与了 ALS 的致病。利鲁唑治疗后血浆谷氨酸浓度下降, 也证实了该药物作用于谷氨酸代谢途径。由于脑脊液中谷氨酸浓度与对照组比, 无显著差异, 故认为中枢神经系统谷氨酸水平可能不是致病的直接原因。

参考文献

- [1] World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Disease Subcommittee on Motor Neuron Disease E1 Escorial World Federation of Neurology Criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis [J]. J Neurol Sci, 1994, 124(Suppl): 96-107
- [2] Plaitakis A, Carosio JJ. Abnormal glutamate metabolism in amyotrophic lateral sclerosis [J]. Ann Neurol, 1987, 22: 575-579
- [3] 姚晓黎, 张为西, 卢锡林, 等. 肌萎缩侧索硬化症患者血浆和脑脊液谷氨酸含量变化的研究 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2003, 29: 252-254
- [4] Plaitakis A. Glutamate dysfunction and selective motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis [J]. Ann Neurol, 1990, 28: 3-8
- [5] Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, et al. Abnormal excitatory amino acid metabolism in myotrophic lateral sclerosis [J]. Ann Neurol, 1990, 28: 18
- [6] Perry TL, Hansen S, Stedman D. ALS: Amino acids in plasma and CSF [J]. Ann Neurol, 1990, 28: 12-17
- [7] Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, et al. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis [J]. Ann Neurol, 1990, 28: 18-25
- [8] Shaw PJ, Forrest V, Ince PG, et al. CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients [J]. Neurodegeneration, 1995, 4: 209-216
- [9] Plaitakis A, Constantakakis E, Smith J. The neuroexcitotoxic amino acids glutamate and aspartate are altered in the spinal cord and brain in amyotrophic lateral sclerosis [J]. Ann Neurol, 1988, 24: 446-449
- [10] Perry TL, Hansen S, Jones L. Brain glutamate deficiency in amyotrophic lateral sclerosis [J]. Neurology, 1987, 37: 1845-1848

(2003-08-22 收稿 2004-01-28 修回)