

利鲁唑降低肌萎缩侧索硬化症患者谷氨酸水平

姚晓黎¹, 张成¹, 刘卫彬¹, 卢锡林¹, 张为西¹, 叶俊鹏²

(中山大学附属第一医院, 1. 神经科, 2. 药学部, 广东 广州 510080)

摘要: **目的** 初步探讨利鲁唑对肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 患者血浆谷氨酸的改变, 为临床治疗提供依据。 **方法** 应用毛细管电泳-激光诱导荧光检测器, 测定 ALS 患者和对照组血浆及脑脊液 (CSF) 谷氨酸水平, 以及部分 ALS 患者服用利鲁唑后血浆谷氨酸水平, 并进行统计分析。 **结果** ALS 患者血浆、CSF 谷氨酸水平分别为 (75.65±20.44) 和 (8.1±2.71) $\mu\text{mol/L}$, 与对照组相比差异有显著性 ($P < 0.05$)。 ALS 患者服用利鲁唑后, 血浆谷氨酸的水平为 (66.19±10.27) $\mu\text{mol/L}$, 与服药前比较差异有显著性 ($P < 0.05$), 但仍高于对照组。 **结论** ALS 患者血浆和 CSF 谷氨酸水平较正常为高。 ALS 患者在口服利鲁唑后血浆谷氨酸水平有所下降, 但仍高于正常水平。

关键词: 肌萎缩侧索硬化症; 谷氨酸; 利鲁唑

中图分类号: R744.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-2963 (2004)03-0139-03

A Therapy on Riluzole Reduces the Glutamate Levels in ALS

YAO Xiao-li¹, ZHANG Cheng¹, LIU Wei-bin¹, LU Xi-lin¹, ZHANG Wei-xi¹, YE Jun-peng²

(1. Department of Neurology, 2. Department of pharmacology, The First Affiliated Hospital, Zhongshan University, Guangdong Guangzhou 510080, China)

ABSTRACT Objective To estimate the reducing effect of riluzole on glutamate level in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). **Methods** CE-LIF technique was employed to detect the glutamate levels in CSF and plasma of ALS patients and healthy controls. **Results** The glutamate concentrations in plasma and CSF of ALS patients were (75.65±20.44) and (8.1±2.71) $\mu\text{mol/L}$ respectively, which had significance with control group ($P < 0.05$). After riluzole treatment, the mean value of glutamate concentrations in plasma was (66.19±10.27) $\mu\text{mol/L}$. They were significant with those before treatment ($P < 0.05$), but still was higher than control group. **Conclusions** Our results showed that the glutamate concentrations in plasma and CSF of ALS patients were higher than control. The plasma glutamate concentrations were decreased after riluzole treatment, but were still higher than those of controls.

Key words amyotrophic lateral sclerosis; glutamate; riluzole

肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一种选择性侵犯运动神经元的致命性、进行性神经系统变性疾病, 多于 40~50 岁起病, 男性患者多见, 一般于发病后 3~5 年死亡。其

收稿日期: 2003-04-07; 修订日期: 2003-07-14

基金项目: 卫生部临床学科重点项目 (2001321); 美国 ALS 基金; “211” 工程项目

作者简介: 姚晓黎 (1971-), 女, 福建省人, 讲师, 在读博士。

张成 (1957-), 男, 四川省人, 教授, 博士生导师, 主要从事遗传和神经变性疾病研究。通讯地址: 中山大学附属第一医院神经内科, 广州 510080。联系电话: (020) 87332387 (通讯作者)。

发病机制尚未完全清楚,谷氨酸兴奋毒性引起神经元变性是其主要机制之一。利鲁唑(2-氨基-6-三氟甲氧基苯并噻唑)是一种谷氨酸拮抗剂,目前被认为是惟一可延长 ALS 患者生命的药物。该药在国内应用时间短,目前尚未见有关临床研究报道。作者应用毛细管电泳-激光诱导荧光检测器(capillary electrophoresis with laser induced fluorescein, CE-LIF)测定 ALS 患者和对照组血浆及脑脊液(CSF)谷氨酸水平,以及部分 ALS 患者服用利鲁唑后血浆谷氨酸水平,旨在了解 ALS 患者血浆、CSF 谷氨酸的变化,以及利鲁唑对谷氨酸浓度的影响。

1 资料和方法

1.1 研究对象

1.1.1 病例组:收集 2000-01—2002-01 ALS 患者 45 例(女 11 例、男 34 例),年龄 18~79 岁,平均(44.44±13.38)岁。所有患者按世界神经病学联盟制定的 ALS 诊断标准^[1]确诊,其中 31 例患者行腰穿做 CSF 检查,另 14 例患者拒绝行 CSF 检查。对 23 例 ALS 患者进行了利鲁唑疗效观察研究。

1.1.2 对照组:为同期行腰麻手术的非神经系统变性病患者 46 例(男 31 例、女 15 例),年龄 17~76 岁,平均(41.24±12.50)岁。两组间性别和年龄差异无显著性。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 毛细管电泳仪:购自美国 Beckman 公司。CE-LIF 最常用的激发光源是氩离子激光器的 488 nmol/L 谱线。衍生化试剂:异硫氰酸荧光素异构体 I (fluorescein isothiocyanate isomer I, FITC I) 购自 Sigma 公司。谷氨酸标准品购自 Sigma 公司。

1.2.2 毛细管电泳的分离条件设定:(1) 开口石英毛细管总长度 380 mm,有效长度 300 mm,内径 75 μm; (2) 电压 28 kV,温度 20 °C; (3) 压力进样 8 s; (4) 每次进样之前,毛细管均要经 HCl(0.1 mol/L), NaOH(0.1 mol/L), 三蒸水、四硼酸钠缓冲液(0.03 mol/L, pH9.8)冲洗,冲洗时间各 2 min。

1.3 方法

1.3.1 标本收集:病例组和对照组均抽取空腹外周静脉血 3 mL,取血浆,保存于 -80 °C 冰箱备用。常规腰穿留取 2 mL CSF,保存于 -80 °C 冰箱。其中 23 例 ALS 患者口服利鲁唑(50 mg, 2 次/d) 3 个月,取血浆标本。

1.3.2 衍生化反应过程:取 1.5 mL EP 管,加入 100 μL 谷氨酸标准溶液或待测标本 400 μL NaHCO₃液(20 mmol/L, pH9.6), 10 μL FITC-丙酮溶液(6×10⁻⁴ mol/L),混匀;室温、黑暗中反应 16 h。

1.3.3 建立谷氨酸标准曲线:取 2×10⁸、5×10⁸、1×10⁷、3×10⁷、5×10⁷、7×10⁷、1×10⁶ mol/L 谷氨酸标准溶液各 100 μL,进行衍生化反应。在毛细管电泳仪上进行分离,测定相应的荧光强度(relative fluoresces units, RFU) 以谷氨酸浓度为横坐标,荧光强度为纵坐标绘制标准曲线。

1.3.4 血浆和 CSF 标本的检测:所有血浆标本稀释 100 倍,CSF 标本稀释 10 倍。标本经去蛋白、衍生化反应后,应用 CE-LIF 测定谷氨酸浓度。

1.4 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差别采用 *t* 检验和方差分析进行判断。全部数据均输入 SPSS10.0 统计软件包进行统计分析。

2 结果

2.1 谷氨酸标准曲线:谷氨酸标准溶液与荧光强度的线性相关系数 $r = 0.997$, 直线回归方程 $y = 47.012x - 4.816$

2.2 ALS 患者血浆和 CSF 谷氨酸水平检测 ALS 组血浆和 CSF 谷氨酸浓度 [(75.65±20.44), (8.11±2.71) μmol/L] 与各自对照组 [(57.96±3.40), (3.81±0.86) μmol/L] 比较差异有显著性 ($P < 0.001$)

2.3 服用利鲁唑前后 ALS 患者血浆谷氨酸水平检测 23 例 ALS 患者服用利鲁唑后血浆谷氨酸水平 [(66.19±10.27) μmol/L] 与服药前 [(81.27±21.63) μmol/L] 比较差异有显著性 ($P < 0.001$), 但仍高于对照组 ($P < 0.001$)。

2.4 服用利鲁唑前后 ALS 患者临床症状变化 1 例 45 岁男性患者以言语不清和吞咽困难为首发症状,半年后出现肢体无力。服药 3 个月后,肢体无力加重,但吞咽症状有所改善,如吞咽有力和饮水呛咳减轻。1 例 25 岁男性患者以双上肢无力 1 年就诊。服药 3 个月后,自觉双手活动较前灵活。其余患者临床症状无明显改变。

3 讨论

ALS 患者血浆、CSF 谷氨酸浓度是否升高一直存在争议。Perry 等^[2]研究认为 ALS 患者血浆、CSF 谷氨酸浓度并无升高。Shaw 等^[3]则认为 ALS 患者血浆谷氨酸水平不变而 CSF 谷氨酸浓度升

高。Camu等^[4]发现 ALS患者 CSF谷氨酸浓度未升高,血浆谷氨酸水平与首次发病部位有关,肢体首发型血浆谷氨酸水平升高,而延髓首发型血浆谷氨酸水平降低。Rothstein等^[5]、Niebroj等^[6,7]以及Royberg等^[8]报道 ALS患者血浆、CSF谷氨酸浓度均升高,这与该研究结果相符。体外培养发现谷氨酸浓度大于 $10\mu\text{mol/L}$ 时对神经元有毒性作用。CSF谷氨酸浓度大于 $10\mu\text{mol/L}$ 可能影响脊髓细胞外液,使细胞外液谷氨酸浓度升高。谷氨酸从突触间隙扩散出来被转运到血液中去,结果引起血中谷氨酸水平增高,导致兴奋毒性和神经元变性。该研究也发现 CSF谷氨酸比血浆谷氨酸稳定,对ALS患者而言,检测 CSF谷氨酸浓度更有意义。

利鲁唑是一种抗谷氨酸药物,通过多种途径对抗谷氨酸的兴奋毒性。该组有 23名患者服用利鲁唑 50 mg, 2次/d,共服药 3个月后检测血浆谷氨酸浓度,结果发现服药后血浆谷氨酸水平有所下降,但未能降至正常水平,可能与服药时间较短(3个月)有关。其中 1例曾出现上腹部不适,后改为饭后服药则症状消失。由于利鲁唑价格昂贵,许多患者未能继续服药完成疗程。该研究结果与 Couratier等^[9]的实验研究报告一致。在大鼠皮质神经元培养原液中加入 ALS患者 CSF所产生的兴奋毒性作用,可被利鲁唑减轻。ALS患者 CSF的 50%稀释液可引起神经元死亡,神经元存活率仅为 45%(对照组用健康者 CSF同样处理,神经元存活率约 88%),而加入 $0.5\mu\text{mol/L}$ 利鲁唑后神经元存活率约为 61%^[10]。也有报道停止服用利鲁唑后 ALS患者血浆、CSF谷氨酸水平又会升高。作者未曾观察到这种现象。

ALS患者血浆、CSF谷氨酸浓度升高间接证明了谷氨酸兴奋毒性作用,为 ALS治疗提供了参考依据。此研究证实抗谷氨酸药物利鲁唑可降低 ALS患者的谷氨酸浓度。Dunlop等^[11]也发现利鲁唑可提高脊髓突触摄取谷氨酸的能力。此能力在转基因 ALS鼠的疾病早期明显存在,而在晚期则消失。因此,早期诊断、早期治疗对控制 ALS病情进展、延长 ALS患者生命会有一定帮助。同时,检测 ALS患者血浆、CSF谷氨酸浓度对 ALS患者应用利鲁唑治疗也会有更好的指导作用。

参考文献:

- [1] Brooks BR. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis[J]. J Neurol Sci, 1994, 124(suppl): 96-107.
- [2] Perry TL, Krieger C, Hansen S, *et al*. Amyotrophic lateral sclerosis amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid[J]. Ann Neurol, 1990, 28(1): 12-17.
- [3] Shaw PJ, Forrest V, Ince PG, *et al*. CSF and plasma amino acid level in motor neuron disease elevation of CSF glutamate in a subset of patients [J]. Neurodegeneration, 1995, 4(2): 209-216.
- [4] Camu W, Billiard M, Blady-Loulinier M. Fasting plasma and CSF amino acid level in amyotrophic lateral sclerosis a subtype analysis [J]. Acta Neurol Scand, 1993, 88(1): 51-55.
- [5] Rothstein JD, Kunel R, Chaundhry V, *et al*. Excitatory amino acids in amyotrophic lateral sclerosis an update[J]. Ann Neurol, 1991, 30(1): 224-225.
- [6] Niebroj DI, Janik P. Amino acids acting as transmitters in amyotrophic lateral sclerosis[J]. Acta Neurol Scand, 1999, 100(1): 6-11.
- [7] Niebroj DI, Janik P, Kwiecinski H. Effect of riluzole on serum amino acids in patients with amyotrophic lateral sclerosis [J]. Acta Neurol Scand, 2002, 106(1): 39-43.
- [8] Royberg H, Askmark H, Persson LI. A double-blind randomized clinical trial in amyotrophic lateral sclerosis using lamotrigine effects on CSF glutamate, aspartate, branched-chain amino acid levels and clinical parameters [J]. Acta Neurol Scand, 2003, 108(1): 1-8.
- [9] Couratier PH, Sindou PH, Esclaire F, *et al*. Neuroprotective effects of riluzole in ALS CSF toxicity [J]. Neuroreport, 1994, 5: 1012-1014.
- [10] Couratier PH, Hugon J, Sindou P, *et al*. Cell culture evidence for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis being linked to AMPA/kainate receptors [J]. Lancet, 1993, 341: 264-268.
- [11] Dunlop J, Beal McIlvain H, She Y, *et al*. Impaired spinal cord glutamate transport capacity and reduced sensitivity to riluzole in a transgenic superoxide dismutase mutant rat model of amyotrophic lateral sclerosis [J]. J Neurosci, 2003, 23(5): 1688-1696.