

· 论 著 ·

肌萎缩侧索硬化患者低密度脂蛋白的氧化敏感性

赵 伟, 胡新国, 王润兰

[摘要] **目的** 测定肌萎缩侧索硬化(ALS)患者血中低密度脂蛋白(LDL)体外氧化延迟时间的变化。**方法** 根据 EL Escorial 诊断标准选取 ALS 19 例,其中男 15 例,女 4 例,并与 19 例年龄、影响因素等相当的健康成人相对照。以铜氧化共轭双烯法测定血中 LDL 体外氧化延迟时间。**结果** ALS 组血中 LDL 体外氧化延迟时间较对照组明显减低,分别为 (59.32 ± 8.65) min 与 (83.16 ± 8.37) min, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 增高的氧化压力与降低的抗氧化能力在 ALS 的发病机制中具有一定的作用,提示有效的抗氧化治疗可能对控制疾病的发展及改善预后具有一定的临床意义。

[关键词] 肌萎缩侧索硬化;脂蛋白类;低密度脂蛋白;

[中图分类号] R746.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2012)06-0523-03

Oxidized sensibility of low-density lipoproteins in patients with amyotrophic lateral sclerosis

ZHAO Wei, HU Xin-guo, WANG Run-lan. Department of Neurology, Lusan Sanatorium of Nanjing Military Command, Jiujiang, Jiangxi 332000, China

[Abstract] **Objective** To measure the changes in oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) lag time in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). **Methods** A case-control study was performed involving 15 male patients and 4 women with ALS diagnosed according to the Escorial criteria. 19 age-matched healthy persons with comparable status of smoking and life style were used as control. For each subject, LDL oxidizability was measured by determining LDL oxidation lag time in conjugated diene product at 234 nm using Cu-stimulated oxidation. **Results** Compared to the levels in the control subjects, the ALS patients showed significantly reduced LDL oxidation lag time [(59.32 ± 8.65) vs (83.16 ± 8.37) min, $P < 0.05$]. **Conclusion** Decreased anti-oxidant ability are implicated in the mechanisms of ALS, suggesting the value of appropriate antioxidant therapy in controlling the progression of ALS.

[Key words] amyotrophic lateral sclerosis; lipoproteins; low-density lipoprotein

肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)是一种选择性侵犯上、下运动神经元的致死性神经系统变性疾病,患者出现进行性加重的肌无力和肌肉萎缩,多在起病 3~10 年内因呼吸功能衰竭而死亡^[1]。ALS 与阿尔茨海默病、帕金森病同为神经系统变性疾病,但发展速度和性质更加严重^[2]。有关 ALS 的发病机制目前有多种理论,但均未完全明确,一般认为与遗传因素、氧化应激损伤、免疫因素及中毒、感染因素等有关^[3]。近年来氧化应激损伤在 ALS 发病中的作用逐渐引起人们的重视,在 ALS 发病的各种学说中都涉及到自由基氧化损伤机制,说明自由基氧化损伤是 ALS 发病的一个重要环节。但自由基是一种极不稳定、高度反应活性的

物质,测定极其困难,这就给其所导致的氧化损伤在神经性病变中作用机制的研究带来了障碍。低密度脂蛋白(LDL)的氧化是体内自由基介导的过程,由亚油酸与花生四烯酸等不饱和脂肪酸过氧化起始反应,经过分子重新排列,形成共轭双烯(conjugated diene, CD),生成氧化低密度脂蛋白(OX-LDL),体外 OX-LDL 的测定多以 Cu^{2+} 诱导氧化形成共轭双烯的延迟时间为标准,共轭双烯产生的延迟时间是反映氧化敏感性的重要指标,可作为评估体内抗氧化能力的指标^[4]。为此本文以部分 ALS 患者与健康人群对照研究 OX-LDL,以期能客观评价 ALS 患者体内的氧化压力及抗氧化能力,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象与分组 ALS 组:根据 EL Escorial 诊断标准^[3]选取 ALS 19 例,男 15 例、女 4 例,年龄 (53.46 ± 10.44) 岁。具体入选标准:①临床、肌电图或

作者简介: 赵 伟(1975-),男,江西南昌人,主治医师,从事神经内科临床工作

作者单位: 332000 江西九江,南京军区庐山疗养院神经内科

通讯作者: 胡新国, E-mail: hxg8605@163.com

神经病理学检查有下运动神经元损害的证据;②临床检查有上运动神经元损害的证据;③症状或体征在一个部位内进行性扩展或扩展到其他部位。排除标准:①有能解释上运动神经元和(或)下运动神经元损害的其他疾病的电生理依据;②有能解释临床体征和电生理特点的其他疾病的神经影像学依据;③排除痴呆、脊髓小脑变性、多系统萎缩及帕金森综合征等神经系统变性疾病;④发病前有抗精神病药物治疗史,或有药物、毒物、脑炎病史,有高脂血症及脑、心、肾等器官病变。对照组:19 例,为经随机数字表法选取的与 ALS 组年龄、用药、吸烟、饮食等生活习惯相似的健康男性。均排除高脂血症及脑、心、肾等器官病变。所有参与者均知情同意。

1.2 LDL 体外氧化延迟时间的测定 采用 Naghi^[4] 的测定方法,采集入选对象早晨空腹血,立即加入备有 EDTA 的试管中,于 -80°C 保存。采用密度梯度超速离心法分离 LDL,于避光并充氮气的磷酸盐缓冲液中透析(透析液体积超过 LDL 的 100 倍),更换透析液重复透析 4 次。以充氮气的磷酸盐缓冲液配制并予 CuSO_4 氧化,使 LDL 最终浓度为 50 mg/L 、 CuSO_4 为 $2.5\text{ }\mu\text{mol/L}$,采用日立 U200 分光光度计测定,于温度 37°C 、波长 234 nm 测定吸光度,每隔 10 min 测定一次,共测定 10 次,以吸光度的最大值确定延迟时间。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件包进行统计学分析,正态分布的计量数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

ALS 组体外氧化延迟时间为 $(59.32 \pm 8.65)\text{ min}$,对照组体外氧化延迟时间为 $(83.16 \pm 8.37)\text{ min}$ 。与对照组相比,ALS 组体外氧化延迟时间明显减低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

ALS 是一组预后极差的神经系统变性疾病,该病呈全球性分布,发病率为 $2/10$ 万,临床患病率 $4 \sim 6/10$ 万,90% 以上为散发病例,成人通常在 $30 \sim 60$ 岁发病,男性多见^[5]。但目前对该病的病因及发病机制了解甚少,近年来有证据表明氧化应激损伤在 ALS 发病机制起着重要作用^[6-7];有报道在 ALS 患者的血液及脑脊液中可监测到氧化应激损伤后的特征性变化,说明监测外周血或脑脊液的氧化应激变化可更方便、更可靠地了解神经系统变性疾病包

括 ALS 的发病机制^[6,8-10]。本实验结果表明,与对照组相比,ALS 组患者的脂质过氧化程度明显增高而体内抗氧化能力明显减低,两者共同作用加重 ALS 患者体内抗自由基系统破坏,引起的恶性循环导致运动皮质的上运动神经元和连接脑干、脊髓到肌肉纤维的下运动神经元变性坏死,引起疾病发生。

机体正常时自由基的产生与清除保持动态平衡,当平衡被破坏,自由基产生过多或机体抗氧化功能下降,会造成自由基在体内大量堆积,对生物体具有高度毒性,导致许多异常反应。3-硝基酪氨酸(Ntyr)是体内由过氧亚硝基(ONOO^-)介导的氧化损伤的标志物。Wong 等^[11]、Tohgi 等^[12]均证实 ALS 患者有大量 Ntyr 存在,Beal 等^[13]用直接生化法和免疫组化法,检测散发性 ALS 和有超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)点突变的家族性 ALS 患者,发现其死后中枢神经系统组织中硝化蛋白质的含量显著升高,提示自由基损伤导致过氧化物的增多,氧化损伤标志物 Ntyr 也相应增多,由此肯定了自由基在 ALS 发病过程中的作用。 ONOO^- 介导的酪氨酸硝化与 ALS 发病密切相关^[14-15];有学者应用转基因鼠来检测脂质过氧化对脊髓的损害作用,发现运动神经元的丙二醛含量异常增高,提示脂质过氧化是疾病进程中的一个重要方面^[16]。

自由基诱导的过氧化反应是许多神经性病发生的重要原因之一^[17]。自由基动态平衡系统被破坏时,造成机体损伤机制之一就是作用于多价不饱和脂肪酸,引发生物膜的脂质过氧化反应,从而破坏生物膜的通透性、完整性、流动性,造成细胞内钙离子超载,同时破坏生物膜酶的功能状态,导致相应的细胞变性、死亡;而脂质过氧化产生的自由基亦可使蛋白变性形成蛋白自由基,进一步引起蛋白分子的聚合、肽键的断裂等变化。机体正常神经细胞代谢高度需氧,抗氧化系统成分少,而运动神经元轴索最长,轴突又含有神经微丝等重要结构,因此最易受到自由基攻击,发生变性坏死。本研究发现 ALS 患者血液中的体外氧化延迟时间明显低于对照组,反应了自由基诱导的氧化损伤程度较差,增高的过氧化物及降低的抗氧化能力共同作用加重了运动神经元的变性坏死,这一点可能是 ALS 发生、发展的重要机制。

本研究显示在 ALS 患者的自由基动态平衡遭到破坏,运动神经元细胞遭受到氧化损伤,抗氧化能力明显降低时,如在临床及时给予抗氧化治疗,以清除自由基,保护或减少运动神经元的损伤,有望治疗 ALS 或延长患者生存期^[6,8]。

更大, LHBs 亦可单独或作为 HBV DNA 的补充指标反映乙肝病毒的复制情况。开展 LHBs 检测, 在乙型肝炎的治疗和预后判断中具有重要临床意义。

【参考文献】

- [1] 成均, 孙长贵, 戴玉柱, 等. 驻浙部队 HBV 感染情况及低浓度 HBsAg 流行病学调查[J]. 东南国防医药, 2009, 17(4): 298-301.
- [2] 时连华, 郑纪山. 乙型肝炎病毒血清亚型的研究进展[J]. 东南国防医药, 2003, 5(5): 398-399.
- [3] Bang G, kim KH, Gnarnieri M, et al. Effect of mutating the two cysteines required for HBe antigenicity on hepatitis B virus DNA replication and virion secretion[J]. Virology, 2005, 332(1): 216-224.
- [4] Chua PK, Wang RY, Lin MH, et al. Reduced secretion of virions and hepatitis B virus (HBV) surface antigen of a naturally occurring HBV variant correlates with the accumulation of the small S envelope protein in the endoplasmic reticulum and golgi apparatus[J]. J Virol, 2005, 79(9): 13483-13496.
- [5] Hamassak K, Nakata K, Nagagama Y, et al. Change in prevalence of HBeAg negative mutant hepatitis B virus during the course chronic hepatitis B[J]. Hepatology, 1994, 20(5): 8-14.
- [6] Lambert C, Mann S, Prange R. Assessment of determinants affecting the dual topology of hepatitis B virus large envelope proteins[J]. J General Virol, 2004, 85(5): 1221-1225.
- [7] Foo NC, Ahn B, Ma X, et al. Cellular vacuolization and apoptosis induced by hepatitis B virus large surface protein[J]. Hepatology,

2002, 6(3): 1400-1407.

- [8] Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid[J]. Virus Res, 2004, 106(2): 199-209.
- [9] Bruss M, Miska S, Chassot S. Enhancement of hepatitis B virus infection by non-infectious subviral particles[J]. J Virol, 1998, 72(2): 1462-1468.
- [10] 毛远丽, 李伯安, 马洪滨, 等. 乙肝患者外膜蛋白血清学检测及对于判定 HBV DNA 复制的意义[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2006, 20(3): 276-278.
- [11] 乐爱平, 鞠北华, 王文, 等. 乙肝病毒大蛋白在乙型肝炎诊治中的临床意义[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(16): 1578-1581.
- [12] 魏红山, 黄玉波, 宋淑静, 等. e 抗原阴性慢性乙型肝炎患者血清表面抗原大蛋白水平与乙型肝炎病毒 DNA 之间的关系[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(7): 543-546.
- [13] 乐爱平, 胡国信. 乙肝病毒大蛋白在血清 HBeAg 阴性与低水平 HBV DNA 乙肝患者中的检测意义[J]. 现代免疫学杂志, 2008, 28(3): 244-247.
- [14] 孙颖, 辛绍波, 雷厉, 等. 乙肝病毒外膜大蛋白检测对于判定 HBV DNA 复制的意义[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(3): 354-357.
- [15] 吴正林, 刘玢, 肖桂初, 等. 乙型肝炎病毒表面大蛋白与 HBV DNA 检测的对比研究[J]. 中华实验诊断学, 2007, 11(4): 479-481.

(收稿日期: 2012-06-26; 修回日期: 2012-08-20)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)

(上接第 524 页)

【参考文献】

- [1] 赖福生, 卢少军, 王一芳, 等. 脐带血有核细胞移植治疗肌萎缩侧索硬化的临床研究[J]. 东南国防医药, 2010, 12(6): 515-518.
- [2] 樊东升, 张俊, 邓敏, 等. 肌萎缩侧索硬化/运动神经元病的基础与临床研究[J]. 北京大学学报(医学版), 2009, 41(3): 279-281.
- [3] 吴江. 神经病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [4] Naghii MR. A suggested method for the prediction of the oxidation resistance of low density lipoprotein by determination of the lag time[J]. Nutr Health, 2002, 16(2): 107-112.
- [5] 陈文霖, 谭峰. 62 例肌萎缩侧索硬化的临床分析[J]. 临床医学工程, 2011, 18(3): 355-357.
- [6] Barber SC, Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 48(5): 629-641.
- [7] 崔芳, 黄旭升. 肌萎缩侧索硬化症的研究进展[J]. 实用临床医药杂志, 2010, 14(6): 104-107.
- [8] Ihara Y, Nobukuni K, Takata H, et al. Oxidative stress and metal content in blood and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients with and without a Cu, Zn-superoxide dismutase mutation[J]. Neurol Res, 2005, 27(1): 105-108.
- [9] Smith RG, Henry YK, Mattson MP, et al. Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis[J]. Ann Neurol, 1998, 44(4): 696-699.

- [10] Simpson EP, Henry YK, Henkel JS, et al. Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden[J]. Neurology, 2004, 62(10): 1758-1765.
- [11] Wong NK, Strong MJ. Nitric oxide synthase expression in cervical spinal cord in sporadic amyotrophic lateral sclerosis[J]. Eur J Cell Biol, 1998, 77(4): 338-343.
- [12] Tohi H, Abe T, Yamazaki K, et al. Remarkable increase in cerebrospinal fluid 3-nitrotyrosine in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis[J]. Ann Neurol, 1999, 46(1): 129-131.
- [13] Beal RS. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis[J]. Neurosci Lett, 2000, 291: 44.
- [14] Aoyama K, Matsubara K, Fujikawa Y, et al. Nitration of manganese superoxide dismutase in cerebrospinal fluids is a marker for peroxynitrite-mediated oxidative stress in neurodegenerative diseases[J]. Ann Neurol, 2000, 47(4): 524-527.
- [15] 张蔷, 孟凤琴, 卜晖. 内质网应激和肌萎缩侧索硬化[J]. 医学研究生学报, 2010, 23(4): 422-425.
- [16] Nicaise C, Mitrecic D, Pochet R. Brain and spinal cord affected by amyotrophic lateral sclerosis induced differential growth factors expression in rat mesenchymal and neural stem cells[J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2011, 37(2): 179-188.
- [17] Tsikas D. Handling of commercially available enzyme immunoassays for 8-iso-prostaglandin F2 α (8-iso-PGF2 α , iPF2 α -III, 15-F2t-IsoP) in clinical research and science: considerations from the analytical and review point of view[J]. Clin Chim Acta, 2004, 344(1-2): 215-217.

(收稿日期: 2012-03-09; 修回日期: 2012-05-06)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)