

吉兰-巴雷综合征患者血巨噬细胞移动抑制因子、尿酸、一氧化氮检测的临床意义*

卜宁, 吴海琴, 张桂莲, 展淑琴, 张茹, 王虎清, 范清雨, 翟跃芬

西安交通大学医学院第二附属医院 神经内科 (西安 710004)

【摘要】 目的 探讨吉兰-巴雷综合征(GBS)患者血巨噬细胞移动抑制因子(MIF)与一氧化氮(NO)、尿酸检测的临床意义。**方法** 46例GBS患者按照Hughes功能评分分成4个亚组,A组10例,B组17例,C组12例,D组7例,分别采用ELISA法和定量尿酸酶法,检测46例GBS患者及40例健康对照组血MIF、尿酸水平。通过测定白细胞亚硝酸盐浓度反映NO水平。**结果** 无论是男性、女性还是全体入组者GBS患者较健康对照组MIF浓度及白细胞亚硝酸盐浓度均升高($P<0.05$);GBS患者较健康对照组血尿酸浓度低,但差异无统计学意义;在GBS不同的疾病程度的分组中,各组间血尿酸浓度及白细胞亚硝酸盐浓度差异无统计学意义,各组间MIF浓度差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** GBS患者并非发病初期就缺乏尿酸,其血MIF及外周血白细胞NO浓度高,血MIF浓度随疾病程度加重而升高。

【关键词】 吉兰-巴雷综合征 巨噬细胞移动抑制因子 一氧化氮 尿酸

吉兰-巴雷综合征(GBS),又称急性炎症性脱髓鞘性多发性神经病,是以周围神经组织中小血管周围淋巴细胞浸润与巨噬细胞浸润,以及周围神经髓鞘脱失,严重病例可出现以继发轴突变性为病理特点的自身免疫疾病。GBS与多发性硬化(MS)都是脱髓鞘性疾病。近年来,有研究发现氧化应激与MS的病理损害之间存在某种联系^[1],而目前国内外均无有关GBS是否与氧化应激有关的报道。本研究目的通过检测GBS患者中的巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)与一氧化氮(nitrogen monoxidum, NO)、尿酸水平,从氧化应激方面揭示GBS的发病机制,为GBS临床转归提供较好的判断指标。

1 对象与方法

1.1 研究对象

46例GBS患者(2007年10月至2012年6月我科收治),签署知情同意书。排除发热或感染患者。病例组需排除服用可能影响血尿酸浓度药物(如阿司匹林和噻嗪类利尿剂)者。疾病严重性判定通过住院第1d Hughes功能评分^[2]:A,不用帮助可以行走10 m以上;B,需要帮助可以行走10 m以上;C,卧床,或坐轮椅;D,至少部分时间需要辅助呼吸。18例患者接受静注丙种球蛋白,24例接受地塞米松治疗,2例接受血浆置换,2例因为轻度神经病损,未接受上述治疗。

4周内无感染史的年龄和性别与GBS病例组相匹配的40例健康者作为健康对照组。患者在接受任何治疗(静注丙种球蛋白、地塞米松或血浆置换)前住院第1d,清晨空腹抽取肝素抗凝血5 mL, D-Hank液倍比稀释后经淋巴细胞分离液密度梯度离心(1 500 r/min),收集第一层血浆层及

第二层白细胞层,-70℃低温冰箱冻存。

1.2 实验方法

1.2.1 血浆MIF检测 血浆MIF浓度测定:采用ELISA方法(MIF ELISA试剂盒购自R&D公司)按试剂盒说明书进行。在空白对照孔中加入稀释液10 μL,其他每孔加入不同浓度标准品和待测血浆10 μL,均设复孔。在每孔中加入90 μL 1:10稀释的MIF-HRP抗体,室温孵育2 h后,弃去每个孔内液体,洗涤液洗涤5次后,每孔加底物液200 μL,避光室温孵育30 min后,在每孔加终止液100 μL终止反应,在酶标仪上450 nm处读取吸光度(A)值,根据标准曲线计算出各血浆样品MIF浓度。

1.2.2 白细胞NO测定 NO是不稳定分子,在体内很快转变成其代谢产物亚硝酸盐及硝酸盐。亚硝酸盐浓度可以作为NO产物的指标。按照NO检测试剂盒(南京建成)硝酸还原酶法测定NO含量,取上清显色,分光光度计上550 nm处测各管A值。

1.2.3 血尿酸检测 尿酸浓度通过尿酸酶法经日立7170型全自动生化分析仪测定,试剂为上海科华生物工程股份有限公司产品。

1.3 统计学方法

Kruskal-Wallis 检验用于多组间数据比较。Mann-Whitney U 检验用于两组间数据比较, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 血浆MIF检测

健康对照组及GBS组中,MIF浓度在男性与女性中差异均无统计学意义($P>0.05$)。男性、女性及全体入组者中,GBS患者较健康对照组MIF浓度升高($P<0.05$)。见表1。

2.2 白细胞亚硝酸盐检测

健康对照组及GBS组中,白细胞亚硝酸盐浓度在男性

* 西安交通大学医学院第二附属医院院基金项目(QN) 200901资助

与女性中差异均无统计学意义($P>0.05$)。白细胞中的亚硝酸盐浓度反映 NO 的产量,男性、女性及全体入组者中,GBS 患者较健康对照组白细胞亚硝酸盐浓度高($P<0.05$)。见表 1。

2.3 血尿酸检测

健康对照组中血尿酸水平男性高于女性($P<0.05$),GBS 组中血尿酸水平男性也高于女性($P<0.05$)。男性、女性及全体入组者中,GBS 患者较健康对照组血尿酸浓度低,但差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

2.4 不同疾病程度分组中各种指标的比较

在 GBS 不同的疾病程度的分组中,各组间血尿酸浓度或白细胞亚硝酸盐浓度差异无统计学意义($P>0.05$),各组间 MIF 浓度差异有统计学意义($P<0.05$),随疾病程度加重,MIF 浓度逐渐升高,各组间两两两比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 1 两组血尿酸水平、白细胞亚硝酸盐浓度、MIF 浓度比较

	健康对照组	GBS 组	P
性别(男/女)	20/20	24/22	
年龄($\bar{x}\pm s$)	46.00 $\pm$ 1.00	41.00 $\pm$ 2.00	0.06
MIF 浓度(pg/mL)			
全体	343.01 $\pm$ 125.99	2 724.52 $\pm$ 943.32	<0.05
男性	356.50 $\pm$ 118.06	2 764.51 $\pm$ 1 025.99	<0.05
女性	329.53 $\pm$ 135.14	2 680.89 $\pm$ 886.07	<0.05
白细胞亚硝酸盐浓度(nmol/mg)			
全体	5.50 $\pm$ 0.55	13.81 $\pm$ 0.47	<0.05
男性	5.05 $\pm$ 0.32	14.10 $\pm$ 0.38	<0.05
女性	5.96 $\pm$ 0.30	13.49 $\pm$ 0.34	<0.05
血尿酸水平(mmol/L)			
全体	0.31 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.02	0.789
男性	0.35 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.03	0.776
女性	0.26 $\pm$ 0.01	0.24 $\pm$ 0.02	0.556

表 2 不同病情程度的 GBS 组中血尿酸、白细胞亚硝酸盐、MIF 浓度比较

	Hughes 功能评分				P
	A (n=10)	B (n=17)	C (n=12)	D (n=7)	
MIF 浓度(pg/mL)	1 702.19 $\pm$ 335.58	2 459.89 $\pm$ 667.16*	3 352.86 $\pm$ 734.58*·#	3 750.49 $\pm$ 608.89*·#·△	0.000
白细胞亚硝酸盐浓度(nmol/mg)	13.70 $\pm$ 0.53	13.81 $\pm$ 0.55	13.88 $\pm$ 0.32	13.85 $\pm$ 0.48	0.902
血尿酸水平(mmol/L)	0.27 $\pm$ 0.06	0.27 $\pm$ 0.06	0.28 $\pm$ 0.06	0.28 $\pm$ 0.05	0.854

* $P<0.05$, vs. A; # $P<0.05$, vs. B; △ $P<0.05$, vs. C

3 讨论

MIF 是由活化的 T 细胞、巨噬细胞、一些非免疫细胞在免疫反应中产生的多效性细胞因子,因其能抑制巨噬细胞在体液中的移动而得名。MIF 刺激合成促炎细胞因子及在 GBS 及实验性变态反应性神经病(experimental allergic neuritis, EAN)中起作用的可溶介质肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、NO^[3,4]。本实验结果发现 GBS 患者中 MIF 浓度较健康对照组升高,并且 GBS 病情越重,MIF 浓度越高。MIF 可以作为 GBS 病情严重程度预测指标。我们分析 MIF 可以反映病情是因为:巨噬细胞是 GBS 脱髓鞘的效应细胞,分泌促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-12、IL-18、干扰素- γ (IFN- γ)、金属蛋白酶-9 (MMP-9)^[5]及化学增活素(MCP-1)聚集于神经组织,致神经损害,改变施万细胞的活力、免疫原性及功能。另外,巨噬细胞介导的原发脱髓鞘机制,使神经严重水肿,导致轴索变性^[6]。而 MIF 通过抑制巨噬细胞移动,增加炎症局部巨噬细胞数量,从而发挥致病作用。

在细胞因子的作用下,单核-巨噬细胞释放出蛋白酶、NO 和氧自由基,破坏周围神经系统的髓鞘素蛋白,从而引起脱髓鞘改变。脱髓鞘中的磷脂类蛋白发生炎性免疫损伤并产生大量的 NO 和过氧亚硝酸盐阴离子(ONOO⁻)^[7]。NO 是不稳定分子,在体内很快转变成其代谢产物亚硝酸盐及硝酸盐。亚硝酸盐浓度可以作为 NO 产物的指标。我们的实验结果发现 GBS 患者较健康对照组白细胞亚硝酸盐浓度升高,间接说明 GBS 患者 NO 水平较健康对照组升高,可能系 MIF 抑制巨噬细胞移动,促进其释放出 NO,破坏周围神经系统的髓鞘素蛋白,从而加重脱髓鞘改变。

正如上文所述脱髓鞘中产生的另一有害物质是 ONOO⁻。ONOO⁻ 具有极强的氧化性可直接损害神经组织,使得髓鞘肿胀、髓鞘中的磷脂氧化丢失、酪氨酸和半胱氨酸残基硝化作用增强,DNA 断裂,破坏核酸、蛋白等体内的重要生物活性物质,促使细胞死亡。最终导致髓鞘变性、脱髓鞘斑块的形成,对轴突、髓鞘等造成严重损害^[7]。尿酸是体内核酸嘌呤的代谢产物,正常机体尿酸水平处于一种稳定状态。尿酸也是体内天然抗氧化物质,ONOO⁻ 的清除主要依赖于尿酸。尿酸能降低硝基酪氨酸硝化作用,减少脂质氧化和细胞的凋亡,从而阻止炎症因子的毒性产物对神经系统的损害。近年来,有研究发现尿酸与中枢神经系统炎症性脱髓鞘病的病理损害之间存在某种联系,临床可以通过调节尿酸水平对 MS 患者进行治疗以缓解病情。同时低尿酸血症也可能是 MS 发病的一个危险因素,有实验提示为预防和阻止 MS 的发生,选择口服尿酸可能会降低 MS 的发生。对 MS 患者进行血尿酸的连续检测,也有助于对疾病的治疗缓解或复发起起到一定的监控作用^[8]。因此我们感兴趣的是 GBS 患者体内尿酸水平是否较健康对照组降低,其尿酸水平是否可以作为临床病情的一个判断指标。我们的实验结果提示:健康对照组及 GBS 组尿酸水平男性均较女性升高,GBS 组较健康对照组尿酸水平低,但差异无统计学意义。我们推测 GBS 患者并非发病初始阶段尿酸水平较健康组低,而是在病程进展中尿酸参与过氧化亚硝酸盐清除,而使尿酸水平有所降低。

通过本实验结果发现,GBS 患者血浆 MIF 浓度随疾病程度加重而升高。MIF 可以通过氧化应激途径增加 NO 的生成,加重神经脱髓鞘损害。GBS 患者尿酸水平较健康对照组有所下降,但差异无统计学意义,提示并非 GBS 患者病

初即尿酸水平下降,有可能是因为尿酸参与氧化应激产物的清除才导致其水平下降。在今后的工作中,我们将对入选的 GBS 患者随访观察不同病程阶段 MIF、尿酸、NO 三者的变化,进一步揭示氧化应激在 GBS 发病机制中的作用。

参 考 文 献

1 Peng F, Zhang B, Zhong X, *et al.* Serum uric acid levels of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. *Mult Scler*,2008;14(2):188-196.

2 Hughes RA, Newsom-Davis JM, Perkins JD. Controlled trial of prednisolone in acute polyneuropathy. *Lancet*,1978;2(8093):750-753.

3 Lu MO, Zhu J. The role of cytokines in Guillain-Barré syndrome. *J Neurol*,2011;258(4):533-548.

4 De La Hoz CL, Castro FR, Santos LM, *et al.* Distribution of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α in the peripheral nervous system of Lewis rats during ascending

paresis and spontaneous recovery from experimental autoimmune neuritis. *Neuroimmunomodulation*,2010;17(1):56-66.

5 Nyati KK, Prasad KN, Verma A, *et al.* Correlation of matrix metalloproteinases-2 and -9 with proinflammatory cytokines in Guillain-Barré syndrome. *J Neurosci Res*,2010;88(16):3540-3546.

6 Griffin JW, Li CY, Ho TW, *et al.* Pathology of the motor-sensory axonal Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol*,1996;39(1):17-28.

7 Drechsel DA, Estévez AG, Barbeito L. Nitric oxide-mediated oxidative damage and the progressive demise of motor neurons in ALS. *Neurotox Res*,2012;22(4):251-264.

8 Guerrero AL, Gutiérrez F, Iglesias F, *et al.* Serum uric acid levels in multiple sclerosis patients inversely correlate with disability. *Neurol Sci*,2011;32(2):347-350.

(2013-03-11 收稿,2013-07-25 修回)

编辑 吕 熙

(上接第 1020 页)

11 Kumpulainen S, Kuoppala T, Leminen A, *et al.* Surgical staging, treatment, and follow-up of borderline tumors in different hospital categories;a prospective nationwide survey in Finland. *Acta Obstet Gynecol Scand*,2007;86(5):610-614.

12 Sevcik L, Klat J, Koliba P, *et al.* Radical surgical therapy and role of adjuvant chemotherapy in ovarian tumors of borderline malignancy. *Cesk Gynek*,2004;69(9):488-492.

13 Fauvet R, Boccara J, Dufournet C, *et al.* Restaging surgery for women with borderline ovarian tumors;results of a French multicenter study. *Cancer*,2004;100(6):1145-1151.

14 Zanetta G, Rota S, Chiari S, *et al.* Behavior of borderline tumors with particular interest to persistence, recurrence, and progression to invasive carcinoma;a prospective study. *J Clin*

Oncol,2001;19(10):2658-2664.

15 Zapardiel I, Rosenberg P, Peiretti M, *et al.* The role of restaging borderline ovarian tumors: single institution experience and review of the literature. *Gynecol Oncol*,2010;119(2):274-277.

16 Lalwani N, Shanbhogue AK, Vikram R, *et al.* Current update on borderline ovarian neoplasms. *AJR Am J Roentgenol*,2010;194(2):330-336.

17 Silva EG, Gershenson DM, Malpica A, *et al.* The recurrence and the overall survival rates of ovarian serous borderline neoplasms with noninvasive implants is time dependent. *Am J Surg Pathol*,2006;30(11):1367-1371.

(2013-04-03 收稿,2013-07-15 修回)

编辑 余 琳