

## 烯醇化酶的水平变化在肝豆状核变性的临床意义

周香雪<sup>1</sup>, 李润桦<sup>2\*</sup>, 梁秀龄<sup>2</sup>, 蒲小勇<sup>3</sup>, 梁颖茵<sup>1</sup>, 刘冰<sup>1</sup>, 朱荣兰<sup>1</sup>, 黄海威<sup>1</sup>

(1. 中山大学附属第一医院黄埔院区 神经内科, 广东 广州 510700;

2. 中山大学附属第一医院神经内科, 广东 广州 510080; 3. 广东省人民医院泌尿外科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】研究脑脊液和血清中烯醇化酶(NSE)在肝豆状核变性(WD)中的临床意义。【方法】选取WD初诊患者40例、正常对照20例,进行神经症状评分,测定脑脊液和血清NSE、脑脊液及血清铜,计算血脑屏障指数(AR值)。青霉胺治疗3个月后再次进行神经症状评分和上述指标的测定。【结果】WD患者脑脊液NSE含量低于对照组,脑脊液NSE含量低于血清。肝、脑型WD患者NSE无明显差异。脑脊液NSE含量与神经症状评分无相关性。脑脊液NSE与AR值呈负相关。青霉胺治疗后神经症状加重的患者脑脊液NSE量升高。脑脊液NSE是青霉胺治疗后是否出现神经症状加重的相关因素。【结论】WD患者脑脊液NSE水平可反映WD患者神经功能的缺失,可以作为预测青霉胺治疗后是否出现神经症状加重的指标,但不能作为评价神经症状严重程度的指标。神经系统损伤加重可能是WD患者青霉胺治疗后神经症状加重的机制之一。

**关键词:** 肝豆状核变性; 烯醇化酶; 脑脊液; 血脑屏障指数

中图分类号:R73 文献标识码:A 文章编号:1672-3554(2009)01-0088-04

## Clinical Significance of Neuron Specific Enolase Level in Patients with Wilson Disease

ZHOU Xiang-xue<sup>1</sup>, LI Xun-hua<sup>2\*</sup>, LIANG Xiu-ling<sup>2</sup>, PU Xiao-yong<sup>3</sup>, LIANG Ying-yin<sup>1</sup>,  
LIU Bing<sup>1</sup>, ZHU Rong-lan<sup>1</sup>, HUANG Hai-wei<sup>1</sup>

(1. Department of Neurology, Huangpu District, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510700, China;

2. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

3. Department of Urology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the clinical significance of the neuron specific enolase (NSE) in cerebrospinal fluid (CSF) and serum of Wilson disease (WD). 【Methods】 Forty primary WD patients and 20 healthy volunteers were enrolled to this study. The neural symptom scores were determined. NSE in CSF and serum, CSF and serum copper, and the albumin CSF/serum ratios (AR) were also evaluated. The neural symptom scores and these evaluations were conducted in the WD patients 3 months after penicillamine treatment. 【Results】 NSE concentration in the CSF of WD patients was lower than that of control and was lower than that in serum from WD patients. There was no significant difference of the NSE in CSF and serum between hepatic and encephalic type WD patients. There was no correlation between NSE concentration in CSF and the neural symptom scores. Significant negative correlation was found between NSE concentration in CSF and AR ratio. The NSE concentration of CSF increased in the patients who were developed secondary deterioration in neurological symptoms after penicillamine treatment. The NSE concentration in CSF was related with whether the disease was deteriorated or not after penicillamine treatment. 【Conclusions】 NSE concentration level in CSF of WD can reflect the defect of neural system, and can be used as an indicator to forecast whether the neurological symptoms aggravate or not after penicillamine treatment, but not as an index of neurological evaluation of the severity. The deteriorated nervous system damage may be one of the mechanisms that neurological symptoms aggravate in WD patients after penicillamine treatment.

**Key words:** Wilson disease; neuron specific enolase; cerebrospinal fluid; albumin CSF/serum ratio

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2009, 30(1): 88-91; 99]

肝豆状核变性 (hepatolenticular degeneration) 亦称 Wilson 病 (Wilson disease, WD), 是常染色体隐性遗传的铜代谢障碍疾病, 主要表现为神经系统和肝脏损害症状<sup>[1-3]</sup>。目前尚无统一指标对 WD 患者的神经系统损害程度进行评价。在使用青霉胺治疗过程中, 有部分患者会出现神经症状加重, 机制尚不明确, 这是在 WD 患者治疗过程中遇到的棘手问题。症状加重过程中是否出现神经系统损伤加重, 目前尚无文献报道。神经元特异性烯醇化酶 (neuron specific enolase, NSE) 是判断神经元损伤程度的重要标志。本文研究了 NSE 对 WD 患者症状及预后评价的意义, 同时用 NSE 对青霉胺治疗过程中症状加重机制进行了初步探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 一般资料

收集 2005 年 3 月 ~ 2006 年 10 月我院 WD 初诊患者 40 例。男 23 例, 女 17 例。年龄 9 ~ 51 岁, 平均 23 岁。其中肝型患者 8 例, 脑型患者 32 例。均符合 WD 诊断标准<sup>[4]</sup>。选取正常对照 20 例。

### 1.2 方法

对所有 WD 患者均进行神经系统检查, 采用改良的 Young 量表<sup>[5]</sup>进行神经症状评分。腰穿采集脑脊液, 同时采血 2 mL, 提取血清。脑脊液及血清标本在 -20 °C 低温存放, 3 个月内进行 NSE 测定。NSE 测定采用固相酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 双抗体夹心法, 使用 NSE-EIA 试剂盒 (上海轩昊公司提供)。同时测定脑脊液及血清铜、血及脑脊液白蛋白含量。

按照 15 ~ 25 mg/kg 剂量使用青霉胺治疗。患者接受青霉胺治疗 3 个月后, 再次进行神经症状评分, 根据使用青霉胺后是否出现神经症状的加重, 将患者分为加重组和改善组。再次测定上述指标。用血脑屏障指数 (albumin CSF/serum ratio, AR 值) 评价血脑屏障通透性。AR 值计算方法为: 脑脊液白蛋白/血清白蛋白。脑脊液铜、血清铜、24 h 尿铜通过原子吸收分光光度计火焰法测定。测定仪器为日立 Z-5000 原子吸收分光光度计。铜元素空心阴极灯波长为: 324.9 nm, 电流为: 10 mA。

### 1.3 统计学方法

用  $\bar{x} \pm s$  记录脑脊液 NSE 测定值。统计方法采用相关性回归分析和 *t* 检验, 显著性水平定为 0.05。用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 NSE-EIA 试剂盒的可靠性分析

利用 NSE-EIA 试剂盒内的系列标准 (0、5、15、40、100、200 ng/L), 进行该方法的线性评估。结果在标准范围内 NSE 浓度的线性关系良好 ( $r = 0.985$ ,  $A = -12.106$ ,  $B = 83.168$ ), 表明该试剂盒结果可靠。

### 2.2 初诊 WD 患者 NSE 水平及其影响因素

初诊肝型、脑型 WD 患者及正常对照组脑脊液及血清 NSE、脑脊液及血清铜、AR 值结果见表 1。肝型、脑型 WD 患者脑脊液中 NSE 均低于正常对照组 ( $t$  值分别为 2.66 和 3.311,  $P < 0.05$ )。肝型、脑型 WD 患者脑脊液中 NSE 比较, 差异无统计学意义 ( $t = 1.17$ ,  $P > 0.05$ )。WD 患者血清 NSE 与略高于正常对照。

表 1 三组患者血、尿、脑脊液中铜、NSE 等检测结果

Table 1 Detection results of copper, NSE in serum, urine and CSF in the three different groups

Group	<i>n</i>	CSF copper (mg/L)	Serum copper (mg/L)	CSF NSE (μg/L)	Serum NSE (μg/L)	AR value ( $\times 10^{-3}$ )	24h urine copper (μg/24h)
Hepatic type	8	0.061 ± 0.026 <sup>1)</sup>	0.36 ± 0.12 <sup>1)</sup>	1.82 ± 0.92 <sup>1)</sup>	4.1 ± 2.1 <sup>1)</sup>	8.3 ± 1.4 <sup>1)</sup>	605 ± 213 <sup>1)</sup>
Encephalic type	32	0.072 ± 0.036 <sup>1),2)</sup>	0.35 ± 0.13 <sup>1)</sup>	1.77 ± 0.93 <sup>1)</sup>	4.0 ± 2.4 <sup>1)</sup>	10.1 ± 2.9 <sup>1),2)</sup>	435 ± 51 <sup>1),2)</sup>
Control	20	0.016 ± 0.009	0.91 ± 0.10	5.22 ± 1.41	3.7 ± 1.0	6.1 ± 0.3	60 ± 32

NSE: neuron specific enolase; CSF: cerebrospinal fluid; AR: albumin CSF/serum ratio; 1) compared with control,  $P < 0.05$ ; 2) compared with hepatic WD,  $P < 0.05$

脑型 WD 患者脑脊液 NSE 值与神经症状评分无明显相关性 ( $P > 0.05$ )。脑脊液和血清 NSE 含

量呈正相关,  $r = 0.533$  ( $P < 0.05$ )。脑脊液 NSE 和 AR 值呈负相关,  $r = -0.341$  ( $P < 0.05$ )。脑脊液

NSE与脑脊液铜、血清铜、24 h尿铜无相关性( $P > 0.05$ )。

### 2.3 青霉胺治疗前后 NSE 动态变化结果

在使用青霉胺的治疗过程中,有 15 例患者出现神经症状加重。症状加重组治疗前后脑脊液 NSE 分别为:  $(1.32 \pm 0.85) \mu\text{g/L}$  和  $(3.00 \pm 1.17) \mu\text{g/L}$ ; 血清 NSE 分别为:  $(3.45 \pm 2.09) \mu\text{g/L}$  和  $(6.79 \pm 2.20) \mu\text{g/L}$ 。治疗后脑脊液及血清中 NSE 较治疗前升高( $t$  值分别为: 2.53, 2.71,  $P < 0.05$ )。

症状未加重组治疗后脑脊液及血清中 NSE 较治疗前无明显差异( $t$  值分别为: 1.31, 0.14,  $P > 0.05$ )。症状加重组治疗前后 AR 值变化无统计学意义( $P > 0.05$ )。

对症状加重与脑脊液 NSE、血清 NSE 分别进行多因素 Logistic 回归分析(表 2), 脑脊液 NSE 值与是否出现神经症状加重的关系有统计学意义( $P < 0.05$ )。初诊患者脑脊液 NSE 值越低, 出现神经症状加重的可能性越大。

表 2 青霉胺治疗后出现神经症状加重多因素 Logistic 回归分析结果

Table 2 Results of logistic regression analysis of the deterioration of nervous symptom after penicillamine treatment

Item	OR	P	Item	OR	P
Neural symptom score	0.890	0.045 <sup>1)</sup>	Time	0.958	0.54
CSF NSE	2.910	0.039 <sup>1)</sup>	Age	0.578	0.59
AR value	1.465	0.26	Dysphagia	2.011	0.25
Serum copper	0.349	0.83	Dribbling	0.846	0.75
Urine copper	0.451	0.25	Trembling	1.184	0.56
CSF copper	1.359	0.16	Gait irregularity	1.114	0.77
CSF NSE	2.91	0.15	Language	0.648	0.046 <sup>1)</sup>
Serum NSE	1.528	0.25	Muscular tension	0.441	0.038 <sup>1)</sup>

1)  $P < 0.05$

## 3 讨论

### 3.1 NSE 对 WD 患者症状评价的意义

NSE 在糖酵解中与 ATP 合成有关。其中 rr 型特异性存在于神经元和神经内分泌细胞中, 称为神经元特异性烯醇化酶。rr 型 NSE 占脑内可溶性蛋白的 1.5% ~ 30%<sup>[6]</sup>。正常情况下, 体液中含量微小, 若神经元破坏、变性坏死时, NSE 可以从损伤的神经元中漏出, NSE 不与细胞内肌动蛋白及肌膜结合, 直接释放入脑脊液。若同时伴有血脑屏障的损坏, NSE 可跨过血脑屏障进入体循环。可在血液中检测到 NSE 的升高。故 NSE 可作为神经系统损伤的有效标志。且脑脊液中 NSE 比血清 NSE 更敏感。

本研究结果显示, WD 患者脑脊液中 NSE 含量低于正常对照。Parnetti<sup>[7]</sup>曾报道血管性痴呆(VD)患者脑脊液中 NSE 低于正常对照。高东等<sup>[8]</sup>报道多梗死性痴呆(MID)稳定期患者脑脊液中 NSE 含量低于正常对照, 在正常生理情况下, NSE 会由神经元和神经内分泌细胞不断释放入脑脊液, 故脑脊液中 NSE 可反映脑组织正常功能状态,

慢性患者神经元细胞缺失和功能异常会导致脑脊液 NSE 低。本研究提示, 肝豆状核变性患者由于血清铜蓝蛋白水平低下, 铜不能由胆道排出, 铜异常沉积在脑部, 可能导致神经元细胞缺失和功能异常, NSE 的正常分泌受影响, 导致脑脊液 NSE 含量低。同时, 我们发现, WD 患者 AR 值高于正常对照, 提示 WD 患者存在血脑屏障的损伤。脑脊液 NSE 与 AR 值呈负相关, 提示 WD 患者脑脊液中的 NSE 通过损伤的血脑屏障排入血中, 且脑脊液 NSE 的排出量与血脑屏障的损伤程度相关。脑脊液 NSE 通过损伤的血脑屏障大量排到血液中, 可能也是 WD 患者脑脊液中 NSE 含量低于正常对照, 血清 NSE 稍高于正常对照的原因之一。

本研究可见, WD 患者脑脊液 NSE 含量低于血清。国内外报道普遍认为在脑血管病急性期、脑外伤急性期等脑脊液中 NSE 高于血清含量。但 Egan 等<sup>[9-10]</sup>认为 NSE 将快速从脑脊液清除到血液中。乔健等<sup>[11]</sup>曾报道运动神经元病患者脑脊液 NSE 含量低于血清。徐建洋等<sup>[12]</sup>也报道过癫痫患者脑脊液 NSE 含量低于血清, 考虑与脑脊液中 NSE 稳定性低于血清有关。本研究认为, 脑脊液中

NSE含量与测定时间有关,在神经系统损伤的急性期,脑脊液中NSE尚未完全进入血液,所以脑脊液中NSE高于血清含量。在慢性神经系统损伤疾病如WD、运动神经元病中,脑脊液中NSE稳定性差,已大量排除到血液中,可能是出现脑脊液NSE含量低于血清的原因。同时,本研究可见,脑脊液与血清中NSE含量呈正相关,同样提示了血清NSE可能来源于脑脊液。临床上,血清NSE测定方法简单,可用于脑脊液NSE的估计。

目前普遍认为,肝型WD患者以肝功损害为主。本研究发现,肝型、脑型WD患者脑脊液中NSE水平无明显差异。提示在肝型WD患者中,也存在神经系统的功能异常。NSE值不能作为提示WD患者分型的指标。

本研究发现,脑型WD患者脑脊液NSE值与脑脊液铜含量、神经症状严重程度无相关性。脑脊液NSE值与神经症状严重程度相关性国内外无一致报道。关景霞等<sup>[13]</sup>发现在脑出血1周内,脑脊液NSE含量与病情严重程度正相关。而Missler等<sup>[14]</sup>认为,脑卒中患者NSE水平与近期及远期临床表现均无相关性。Nooijen等<sup>[15-16]</sup>报道了除CJD外的痴呆患者和帕金森患者脑脊液中NSE不能代表神经症状程度。本研究认为,慢性神经损伤如WD患者中,脑脊液NSE除了反映神经元损伤程度,还受如病程长短、血脑屏障损伤程度、脑脊液NSE的清除等多种因素的影响,与脑脊液铜含量的变化可能并不平行,故也不与神经症状严重程度平行。脑脊液NSE不能作为评价神经症状严重程度的指标。

### 3.2 青霉胺治疗WD过程症状加重的机制分析

肝豆状核变性病人在使用青霉胺治疗早期,10%~50%有神经症状的患者出现症状加重<sup>[17]</sup>。目前症状加重的机制主要有铜的重新分布、血脑屏障损伤等假说。在研究是否出现神经症状加重的相关因素时,我们发现,初诊患者脑脊液NSE值越低,出现神经症状加重的可能性越大。前文已讨论,初诊患者脑脊液NSE值低,提示神经元细胞缺失和功能异常严重。神经系统基础病变严重的患者,可能对青霉胺的耐受力低,出现神经症状加重的可能性越大。NSE对初诊WD患者使用青霉胺治疗后是否出现神经症状加重可能有预测作用。

本研究显示,出现神经症状加重的患者中,青霉胺治疗后脑脊液、血清的NSE高于治疗前。我们同时发现,神经症状加重患者治疗后AR值

无明显变化,说明症状加重时血脑屏障损伤无明显加重。在患者病程长短、血脑屏障损伤程度、脑脊液NSE的清除等因素不变的情况下,NSE水平的升高反映了神经细胞的损伤加重。提示在青霉胺导致症状加重过程中,存在神经元新近的损伤和坏死。神经系统损伤的加重,可能是青霉胺导致症状加重的机制之一。脑脊液中NSE的动态变化可能可以作为判断有无症状加重的一个指标。

综上所述,WD患者的脑脊液NSE水平反映了患者神经功能的缺失,其动态变化可以评价青霉胺治疗效果。NSE在WD有一定的临床意义,但是本研究病例数较少,NSE与WD患者症状及疗效的关系尚需大样本多中心随机化研究。

### 参考文献:

- [1] Banci L, Bertini I, Cantini F, et al. Metal binding domains 3 and 4 of the Wilson disease protein: solution structure and interaction with the copper (I) chaperone HAH1 [J]. *Biochemistry*, 2008,47(28): 7423-7429.
- [2] 梅咏予,张晓红,赵志新. 儿童肝豆状核变性临床研究 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*,2006,27(4S): 122-123.
- [3] 丘小汕,黄婷婷,沈振宇. 以神经系统表现为首发症状的青少年肝豆状核变性的诊断 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*,2005,26(4S): 173-174.
- [4] Mak CM, Lam CW, Tam S. Diagnostic accuracy of serum ceruloplasmin in Wilson disease: determination of sensitivity and specificity by ROC curve analysis among ATP7B-genotyped subjects [J]. *Clin Chem*, 2008,54(8): 1356-1362.
- [5] Young AB, Shoulson I, Penney JB, et al. Huntington's disease in Venezuela: neurologic features and functional decline [J]. *Neurology*, 1986,36(2): 244-249.
- [6] Hein Née Maier K, Köhler A, Diem R, et al. Biological markers for axonal degeneration in CSF and blood of patients with the first event indicative for multiple sclerosis [J]. *Neurosci Lett*, 2008,436(1): 72-76.
- [7] Parnetti L, Palumbo B, Cardinali L, et al. Cerebrospinal fluid neuron-specific enolase in Alzheimer's disease and vascular dementia [J]. *Neurosci Lett*, 1995,183(1-2): 43-45.
- [8] 高东,王景周,张莉莉,等. 多梗塞性痴呆患者脑脊液神经元特异性烯醇化酶含量的测定 [J]. *中国行为医学杂志*,2001,10(6): 532-532.