DOI:10.16016/j.1000-5404.201508151

急性脑梗死患者血浆巯基丙酮酸硫基转移酶及β-淀粉样蛋白42的水平及其临床意义

柯 莉,高 丹,陈秋霞,刘梦洁,赵丰丽,乔沛丰,张 华,晏 勇 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科)

[摘要] **目的** 探讨脑梗死(cerebral infarction,CI)患者急性期血浆巯基丙酮酸硫基转移酶(3-mercaptopyruvate sulfurtransferase,3-MST)及β-淀粉样蛋白42(β-amyloid peptide 42,$A\beta_{42}$)水平及其与脑梗死体积、神经功能缺损程度的关系。**方法** 抽取52例急性期CI患者及35例健康人血浆标本,采用ELISA检测其3-MST及$A\beta_{42}$水平,分析2组人群血浆3-MST及$A\beta_{42}$水平的差异及其与脑梗死的关系。**结果** CI患者组血浆3-MST水平较健康对照组水平明显降低[(3.67±0.29) *vs* (4.98±0.30) ng/mL,$P<0.05$],CI患者组血浆$A\beta_{42}$水平较健康对照组水平显著增高[(44.52±2.92) *vs* (15.77±1.71 pg/mL),$P<0.01$]。急性CI患者中,血浆3-MST水平随脑梗死体积增大和NIHSS评分增加而降低;血浆$A\beta_{42}$水平随脑梗死体积增大及NIHSS评分增加而升高。**结论** 脑梗死患者急性期的血浆3-MST水平明显降低、$A\beta_{42}$水平显著增高,其变化与脑梗死患者神经功能缺损程度及梗死灶体积有关。

[关键词] 急性脑梗死;巯基丙酮酸硫基转移酶;β淀粉样蛋白
[中图法分类号] R362; R446.11; R743.33 [文献标志码] A

Plasma levels and significances of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and beta amyloid protein in acute cerebral infarction patients

Ke li, Gao Dan, Chen Qiuxia, Liu Mengjie, Zhao Fengli, Qiao Peifeng, Zhang Hua, Yan Yong (Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To detect the plasma levels of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST) and beta amyloid protein ($A\beta_{42}$) in acute cerebral infarction patients, and their relationship with infarct volume and severity of neurologic deficits. **Methods** Fifty-two patients with acute cerebral infarction admitted in our hospital from October 2013 to November 2014 were recruited in this study, and another 35 healthy individuals taking physical examination at same period served as normal control. The plasma levels of 3MST and $A\beta_{42}$ were detected in the both groups by ELISA, and the relationship of plasma 3MST and $A\beta_{42}$ contents with cerebral infarction was analyzed. **Results** The plasma content of 3-MST was significantly lower in the acute cerebral infarction patients than the normal control (3.67±0.29 *vs* 4.98±0.30 ng/mL, $P<0.05$), but that of $A\beta_{42}$ was obviously high (44.52±2.92 *vs* 15.77±1.71 pg/mL, $P<0.05$). Among the patients with acute cerebral infarction, the plasma content of 3-MST was decreased with the enlargement of cerebral infarction volume and the increase of National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) score, while that of $A\beta_{42}$ was increased with the changes. **Conclusion** The plasma level of 3-MST is abnormally decreased, while that of $A\beta_{42}$ significantly elevated in acute cerebral infarction patients, and the changes may be related with the severity of neurologic deficits and infarct volume.

[**Key words**] acute cerebral infarction; 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase; beta amyloid protein

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81271222). Corresponding author: Yan Yong, E-mail:yyanpro@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81271222)
[通信作者] 晏 勇,E-mail:yyanpro@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151203.1513.030.html(2015-12-03)

硫化氢(H_2S)是近年来发现的第3种新型内源性气体信号分子,具有重要的脑保护作用,尤其是在脑组织缺血、缺氧(如脑梗死)的时候通过松弛血管平滑肌、抗氧化、抗炎、抗细胞凋亡等改善神经细胞的缺血、缺氧,减轻缺血再灌注对脑组织的损伤[1]。而任彩丽等[2]、郑永强等[3]的研究已表明脑梗死患者血浆H_2S较正常对照组明显降低。生物体内H_2S主要以L-半胱氨酸为底物经胱硫醚β合成酶(cystathionine β-synthase,CBS)和胱硫醚-γ-裂解酶(cystathionine-γ-lyase,CSE)两种酶催化而成;CBS主要表达于脑组织,而CSE则主要分布在肝脏、心肌组织和血管组织等外周组织。近年的研究证明巯基丙酮酸硫基转移酶(3-mercaptopyruvate sulfurtransferase,3-MST)也是神经系统产生H_2S的主要酶之一[4]。β-淀粉样蛋白(β-amyloid peptide,Aβ)是构成老年斑的主要成分,越来越多的研究认为脑组织缺血、缺氧时会影响Aβ的产生。相关临床研究表明急性脑梗死(cerebral infarction, CI)患者血浆中CBS水平较正常对照组明显下降,而Aβ水平较对照组明显升高[3,5]。但急性CI患者血浆3-MST水平的变化及与β-淀粉样蛋白42($A\beta_{42}$)水平变化之间的关系尚不清楚。本研究旨在检测脑梗死患者与健康对照组血浆中3-MST、$A\beta_{42}$水平的差异,以探讨血浆3-MST、Aβ水平与CI梗死体积及神经功能缺损程度的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取2013年10月至2014年11月在我院住院的急性脑梗死患者52例(CI组),男性28例,女性24例,年龄(68.54±14.01)岁。另同期选择35例我院门诊健康体检者(健康对照组),男性16例,女性19例,年龄(66.15±9.24)岁。2组在性别、年龄构成上差异无统计学意义($P>0.05$)。纳入标准:CI组病程均在发病24 h内;所有患者为首次发病,符合全国第四届脑血管病学术会议修订的诊断标准;经头颅CT和/或MRI检查确诊。排除标准:既往有急性脑血管疾病、帕金森病、甲状腺、肝肾功能明显减退及代谢性疾患、认知功能损害或痴呆。

根据Pullicino公式计算CI梗死体积,再分为大体积CI(梗死灶>10 cm^3)组16例,中体积CI(梗死灶5~10 cm^3)组6例,小体积CI(梗死灶<5 cm^3)组30例。应用美国国立卫生研究院卒中量表(NIHSS)评定神经功能缺损程度,以发病24 h以内的神经功能缺损程度评定为准。依据NIHSS评分<5分、5~10分及>10分将急性CI患者分轻度卒中组(36例)、中度卒中组(5例)、重度卒中组(11例)。

本研究经我院伦理委员会批准,所有研究对象获知情同意。

1.2 方法

1.2.1 试剂及仪器 3-MST及$A\beta_{42}$浓度均按ELISA试剂盒(武汉优尔生公司)说明书检测,酶标仪、离心机等设备由重庆医科大学实验室提供。

1.2.2 标本采集 所有患者于入院后第2天清晨空腹用真空采血管采血5 mL(肝素抗凝),在2 h内以3 000 r/min离心10 min,分离上清液,置于-80 ℃冰箱保存,用于测定血浆3-MST及$A\beta_{42}$水平。

1.2.3 血浆3-MST及$A\beta_{42}$水平的测定 加样板分别设标准孔、空白孔、待测样品孔,样品做双份检测;将标准品及处理后的待测样品按每孔各50 μL依次加入包被微孔板,按试剂盒说明书操作步骤加入检测液、孵育、甩干、洗涤、再孵育,避光显色、适时终止反应。使用全自动酶标仪在450 nm波长下测光密度值。以标准品浓度及光密度值为坐标绘制标准曲线,根据标准曲线计算样品浓度。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件,数据以$\bar{x}\pm s$表示,计量资料采用t检验;计数资料采用χ^2检验;多组间比较采用单因素方差分析,2组间两两比较采用两独立样本t检验。

2 结果

2.1 临床一般资料

2组患者在性别、年龄构成上差异无统计学意义($P>0.05$,表1)。

表1 2组研究对象年龄和性别组成的比较

组别	n	年龄(岁)	性别(男/女,例)
CI组	52	68.54±14.01	28/24
健康对照组	35	66.15±9.24	16/19

2.2 2组血浆中3-MST及$A\beta_{42}$的水平

CI组患者血浆3-MST水平显著低于健康对照组($P<0.05$),$A\beta_{42}$水平明显高于健康对照组($P<0.01$,表2)。

表2 2组研究对象患者血浆中3-MST及$A\beta_{42}$的水平($\bar{x}\pm s$)

组别	n	3-MST(ng/mL)	$A\beta_{42}$(pg/mL)
CI组	52	3.67±0.29[a]	44.52±2.92[b]
健康对照组	35	4.98±0.30	15.77±1.71

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与健康对照组比较

2.3 CI 患者血浆 $A\beta_{42}$ 和 3-MST 水平与梗死体积的关系

大体积 CI 组患者血浆 $A\beta_{42}$ 显著高于中、小体积 CI 组($P<0.05$),提示血浆 $A\beta_{42}$ 水平随着脑梗死体积的增大而升高;大体积 CI 组患者 3-MST 水平显著低于中、小体积组 CI($P<0.05$),提示血浆 3-MST 水平随着脑梗死体积的增大而降低(表 3)。

表 3 CI 患者血浆 $A\beta_{42}$ 及 3-MST 水平与梗死体积的关系($\bar{x}\pm s$)

组别	n	$A\beta_{42}$(pg/mL)	3-MST(ng/mL)
小体积 CI 组	30	30.71±1.95	4.35±0.12
中体积 CI 组	6	49.12±0.64	2.57±0.38
大体积 CI 组	16	68.67±4.17[a]	1.54±0.16[a]

a:$P<0.05$,与中、小体积 CI 组比较

2.4 CI 患者血浆 $A\beta_{42}$ 及 3-MST 水平与神经功能缺损程度的关系

将 3 组血浆 $A\beta_{42}$ 及 3-MST 水平分别进行两两比较。重度卒中组 $A\beta_{42}$ 水平明显高于中度卒中组及轻度卒中组($P<0.05$),提示血浆 $A\beta_{42}$ 水平随 NIHSS 评分增加而升高;重度卒中组 3-MST 水平显著低于中度卒中组及轻度卒中组($P<0.05$),提示血浆 3-MST 水平随 NIHSS 评分增加而降低(表 4)。

表 4 CI 患者血浆 $A\beta_{42}$ 和 3-MST 水平与神经功能缺损程度的关系($\bar{x}\pm s$)

组别	n	$A\beta_{42}$(pg/mL)	3-MST(ng/mL)
轻度卒中组	36	33.79±0.38	4.29±0.20
中度卒中组	5	46.44±2.88	2.87±0.35
重度卒中组	11	69.11±2.73[a]	1.49±0.22[a]

a:$P<0.05$,与中、轻度卒中组比较

3 讨论

体内与 H_2S 产生的相关主要酶有 3 种,即 CSE、CBS 及 3-MST,其中 CBS 和 3-MST 主要在中枢神经系统表达[6-7]。研究者在 CBS 基因敲除小鼠脑组织匀浆中检测出的 H_2S 水平与对照组野生型小鼠脑组织匀浆中的 H_2S 水平无明显差异,间接表明 3-MST 是脑内产生 H_2S 的主要酶[4,8]。Zhao 等[9]在小鼠动物实验研究中观察到小鼠永久性大脑中动脉闭塞(pMCAO)后 24 h,皮质和纹状体中 3-MST 表达下调 40%~50%。与 Zhao 等[9]研究结果相似。本研究结果显示 CI 患者急性期血浆中 3-MST 水平明显降低,且均随着 CI 体积的增大和 NIHSS 评分增加而明显降低;表明脑梗死会引起 3-MST 生成减少,其减少的程度与脑梗死的体积及初始 NIHSS 评分密切关联。

淀粉样前体蛋白(APP)有 2 条代谢途径,即非淀粉样物质途径(α 途径)和淀粉样物质途径(β 途径)。在 α 途径中,APP 在 α 分泌酶作用下,产生非毒性可溶性片段;而在 β 途径中,产生不可溶的毒性 β 淀粉样蛋白[10]。正常情况下 α 途径是主要途径,少量 APP 经 β 途径代谢。在某些病理条件下(常见有缺血缺氧性脑损伤,如 CI、TIA),则主要经 β 途径代谢,导致产生的过多 Aβ。本实验结果显示:CI 患者血浆 $A\beta_{42}$ 水平高于健康对照组($P<0.01$),且血浆 $A\beta_{42}$ 水平随着 CI 体积增大及 NIHSS 评分的增加而升高,与 Lee 等[11]研究一致。但与杨轶楠等[5]研究不符,其结果显示急性脑梗死组(72 h 内)血浆 Aβ 水平与脑梗死体积及 NIHSS 评分无明显关系,认为急性脑梗死患者血浆 Aβ 增高可能与外周激活状态的血小板产生过多的 Aβ 有关。实验结果不一可能与杨轶楠等[5]选取的脑梗死组为发病 72 h 内,而本实验中患者血液采集时间均为发病 24 h 内有关,但其具体机制不明,有待进一步研究。

脑梗死的患者血浆中 3-MST 水平降低可能的原因是:①中老年人中 3-MST 水平生理性低于青壮年,而 CI 患者均是年龄偏大的中老年人;CI 患者均有或多或少的血管危险因素,如高血压、糖尿病、动脉粥样硬化等,因此,其血浆 3-MST 水平较健康老人更低,故 $<5\ cm^3$ 的小体积梗死灶患者血浆 3-MST 水平出现显著降低。②急性 CI 患者梗死体积越大,表明脑缺血缺氧状况越重,脑缺血缺氧后触发的一系列氧化应激损伤级联反应,不同水平的氧化应激可产生 H_2O_2 等多种不同的氧化剂。Modis 等[12]通过实验研究表明氧化应激通过产生的 H_2O_2 抑制 3-MST 活性及影响 3-MST/H_2S 通路,同时氧化应激还可影响 3-MST 的内源性辅酶因子来抑制 3-MST 的活性,从而导致 3-MST 和 H_2S 生成减少;而大体积梗死患者 3-MST 表达减少则还认为与脑组织大量坏死,包括神经元和神经胶质细胞破坏;从而可能会使脑组织 H_2S 的生成减少。Gheibi 等[13]用 1 mg/kg 和 5 mg/kg 硫氢化钠(H_2S 供体)干预急性 CI 模型鼠,测得小鼠 CI 体积分别减少 29% 和 51%,说明 H_2S 在 CI 中对脑组织有保护作用。CI 患者由于神经系统中两种生产 H_2S 的主要酶水平降低,H_2S 的生成减少,故不能起到脑保护作用。本课题组早在 2011 年及 2014 年通过对细胞及动物的研究结果提示 H_2S 具有将 APP 的代谢从 β 途径向 α 途径转变的能力[14-15]。故我们可认为脑梗死时通过上述机制使 3-MST 表达减少,从而 H_2S 的生成减少。H_2S 的生成减少使 APP 可能通过 β 途径产生过多的 Aβ。

脑梗死是引起血管性痴呆(VD)的常病因,但同时脑梗死对阿尔茨海默病(AD)的发生、发展起着重要的作用,脑梗死可以缩短 AD 的临床前期,也可以使已有临床症状的 AD 患者的病情进展加速,甚至是作为起始因素导致了 AD 的发生。本实验结果表明脑梗死会导致脑内 Aβ 生成增多,而这些增高的 Aβ 可能与 3-MST 的减少相关;脑缺血后异常增多的 Aβ 可逐渐在脑组织中沉积并最终形成致密斑块[16],为脑梗死引起或加速 AD 的发生、发展提供了理论依据,亦为今后 AD 临床药物研究提供了一个方向。

参考文献:

[1] 陈秋霞, 晏勇. 硫化氢与缺血性卒中关系的研究进展[J]. 重庆医学, 2015, 44(17): 2438 - 2440, 2445.

[2] 任彩丽, 赵红岗, 蔡德亮, 等. 脑梗死患者血浆中内源性硫化氢水平的变化[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2010, 36(1): 43 - 45.

[3] 郑永强, 叶飞, 刘南暖, 等. 脑梗死患者血浆硫化氢、胱硫醚-β-合酶含量变化及意义[J]. 中国老年保健医学, 2013, 11(4): 3 - 5. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4860.2013.04.001

[4] Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, *et al*. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain[J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(4): 703 - 714. DOI: 10.1089/ars.2008.2253

[5] 杨轶楠, 苏玉萍, 刘洪雁. 急性脑梗死患者血浆 β 淀粉样蛋白的水平及意义[J]. 脑与神经疾病杂志, 2013, 21(5): 350 - 352. DOI: 10.3969/j.issn.1006-351X.2013.05.009

[6] Kimura H, Shibuya N, Kimura Y. Hydrogen sulfide is a signaling molecule and a cytoprotectant[J]. Antioxid Redox Signal, 2012, 17(1): 45 - 57. DOI: 10.1089/ars.2011.4345

[7] Kimura H. Hydrogen sulfide and polysulfides as biological mediators[J]. Molecules, 2014, 19(10): 16146 - 16157. DOI: 10.3390/molecules191016146

[8] Yadav P K, Yamada K, Chiku T, *et al*. Structure and kinetic analysis of H2S production by human mercaptopyruvate sulfurtransferase[J]. J Biol Chem, 2013, 288(27): 20002 - 20013. DOI: 10.1074/jbc.M113.466177

[9] Zhao H, Chan S J, Ng Y K, *et al*. Brain 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase (3MST): Cellular Localization and Down-regulation after Acute Stroke[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e67322. DOI: 10.1371/journal.pone.0067322

[10] Zetterberg H, Blennow K, Hanse E. Amyloid beta and APP as biomarkers for Alzheimer's disease[J]. Exp Gerontol, 2010, 45(1): 23 - 29. DOI: 10.1016/j.exger.2009.08.002

[11] Lee P H, Bang O Y, Hwang E M, *et al*. Circulating beta amyloid protein is elevated in patients with acute ischemic stroke[J]. J Neural Transm (Vienna), 2005, 112(10): 1371 - 1379. DOI: 10.1007/s00702-004-0274-0

[12] Modis K, Asimakopoulou A, Coletta C, *et al*. Oxidative stress suppresses the cellular bioenergetic effect of the 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase/hydrogen sulfide pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 433(4): 401 - 407. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.02.131

[13] Gheibi S, Aboutaleb N, Khaksari M, *et al*. Hydrogen sulfide protects the brain against ischemic reperfusion injury in a transient model of focal cerebral ischemia[J]. J Mol Neurosci, 2014, 54(2): 264 - 270. DOI: 10.1007/s12031-014-0284-9

[14] 张华, 谷小云, 孟涛, 等. 硫化氢对淀粉样前体蛋白代谢途径的影响[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2011, 37(2): 271 - 274.

[15] He X L, Yan N, Zhang H, *et al*. Hydrogen sulfide improves spatial memory impairment and decreases production of Aβ in APP/PS1 transgenic mice[J]. Neurochem Int, 2014, 67: 1 - 8. DOI: 10.1016/j.neuint.2014.01.004

[16] van-Groen T, Puurunen K, Maki H M, *et al*. Transformation of diffuse beta-amyloid precursor protein and beta-amyloid deposits to plaques in the thalamus after transient occlusion of the middle cerebral artery in rats[J]. Stroke, 2005, 36(7): 1551 - 1556. DOI: 10.1161/01.STR.0000169933.88903.cf

(**收稿**:2015-08-31;**修回**:2015-09-21)

(编辑 王小寒)