临床研究 文章编号:0253-3626(2008)s1-0060-03

病毒性脑炎患者血液和脑脊液NSE含量测定及其与临床的相关性研究

王振海[1],陈建红[1],马斌武[1],谢 鹏[2],孔繁元[1,2]

(1.宁夏医学院附属医院神经内科 宁夏颅脑疾病重点实验室,银川 750004;
2.重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:为了观察病毒性脑炎急性期和恢复期患者血液和脑脊液的NSE含量变化,探讨其与异常脑电图和影像学低密度灶体积等方面的相关性。方法:将42例病毒性脑炎住院患者作为观察组,25例与观察组相匹配的阑尾或胆囊摘除手术病人以及健康体检者作为对照组;采用ELISA法,检测其血液及脑脊液NSE浓度;并应用SPSS13.0统计软件包进行统计学分析。结果:病毒性脑炎急性期患者血液和脑脊液NSE浓度显著高于恢复期患者和对照组($P<0.01$);血液和脑脊液NSE浓度与低密度灶体积均呈显著正相关($r_{csf}=0.736$, $P<0.01$; $r_{血液}=0.685$, $P<0.01$);轻度、中度及重度异常脑电图患者脑脊液NSE浓度均高于血液($P<0.01$);重度、中度异常脑电图患者血液及脑脊液NSE浓度均高于轻度($P<0.01$)。结论:脑脊液或血清中的NSE浓度,反映了神经细胞和神经胶质细胞的损害程度,也是脑组织破坏后较合适的生化标记物。

【关键词】神经元特异性烯醇化酶;病毒性脑炎;酶联免疫吸附法

【中国图书分类法分类号】R512.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-29

Assay of NSE concentration in serum and cerebrospinal fluid of patients with viral encephalitis and its clinical correlation

WANG Zhen-hai, et al

(*Department of Neurology, the Affiliated Hospital, Ningxia Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the changes of neuron-specific enolase(NSE)concentration in serum and cerebrospinal fluid from patients with acute and recovery viral encephalitis and to find out its correlation with anomaly electroencephalogram and low density focus volume in imageology. *Methods*: 42 cases of patients with viral encephalitis were enrolled and 25 cases of health examinater or patients with operation of appendix or cholecyst were enrolled in control group. We measured the NSE concentration in cerebrospinal fluid and serum using enzyme-linked immunosorbent assay. Comparison analysis was performed by using a SPSS13.0 statistical package. *Results*: NSE concentration in serum and cerebrospinal fluid of patients with acute viral encephalitis was significantly higher than that of recoverys and control group($P<0.01$). The release of NSE concentration in serum and cerebrospinal fluid of patients with acute viral encephalitis was associated with the low density focus volume of imageology ($r_{csf}=0.736$, $P<0.01$; $r_{blood}=0.685$, $P<0.01$). NSE concentration in cerebrospinal fluid was significantly higher than that in serum from patients with light, midrange and severe anomaly electroencephalogram($P<0.01$). *Conclusion*: The NSE concentration in serum and cerebrospinal fluid from patients with acute viral encephalitis indicates the damage degree of neuroglial lesion. It is a useful biochemical marker for brain-tissue damage.

【Key words】 Neuron-specific enolase; Viral encephalitis; Enzyme-linked immunosorbent assay

作者介绍:王振海(1968-),男,副教授,博士,
研究方向:从事中枢神经系统感染性疾病研究。

基金项目:2006年国家"863"计划项目(编号:2006AA02Z196);
2007年国家自然科学基金面上项目(编写:30760067);
2007年宁夏自然科学基金项目(编号:NZ0790);
2007年第四十二批中国博士后科学基金项目(编号:20070420721)。

神经元特异性烯醇化酶(Neuron-specific enolase, NSE)特征性地位于神经元和神经内分泌细胞质中。免疫组化研究证实[1],NSE存在于中枢或外周神经元的胞体、轴突和树突的胞质中。国内外研究表明[1],血液和脑脊液NSE含量变化作为敏感的病理学标志蛋白以及中枢神经系统损伤时的定量指标正逐渐被临床所重视。近年来倍受关注的是体液中NSE的含量与中枢神经系统损伤的关系。本课题采用ELISA技术对42例病毒性脑炎患者分别在急性和恢复期测定其血液及脑脊液NSE浓度,探讨其与异常脑电图、影像学低密度灶体积等方面的相关性。

1 资料与方法

1.1 观察对象

42例病毒性脑炎(Viral encephalitis, VE)病例为观察组,均系神经内科住院患者。其中男性32例,女性10例,平均年龄(36.35 ± 11.48)岁,平均住院(25.70 ± 6.97)d。急性期42例(病程≤7d。其中住院10d内死亡1例,住院少于21d3例)、恢复期38例(病程≥21d)。全部病例符合病毒性脑炎的临床诊断标准[2]:(1)急性或亚急性起病,多有发热和其他神经系统症状;(2)临床体征支持脑组织受损改变;(3)脑脊液以淋巴细胞增多(50 ~ 100) × 10^6反应为主、蛋白正常或轻度增高、糖和氯化物正常;(4)脑电图(EEG)背景活动异常;(5)影像学检查CT 或MRI发现低密度灶、也可正常。并除外以下疾病:颅脑外伤、脑肿瘤、颅内出血、其它致病微生物所致颅内感染、脑白质病变、中毒性脑病、代谢性脑病等。对照组为25例与观察组相匹配的骨折、阑尾或胆囊摘除手术病人以及健康体检者,其中男性16例,女性9例。平均年龄(34.76 ± 10.35)岁,与观察组患者年龄经统计学分析无显著性差异(t=0.785, P>0.05)。全部病例在发病2~4d内行脑CT或MRI扫描证实,并按Pullicino公式(长 × 宽 × CT或MRI扫描阳性层数 × π/6)计算低密度灶体积(ml)。低密度灶位于大脑额叶16例、颞叶8例、枕叶3例、基底节区10例。其中EEG异常37例(88.09%)、正常5例(11.91%),同时按照《临床脑电图学》[3]对异常EEG分为轻度、中度及重度异常,分别为19例、11例和7例。

1.2 标本收集

观察组病人于发病后7d内和21d后,分别采空腹肘静脉血1次,第1次42例、第2次38例,每次4 ml采后立即注入EDTA抗凝管内,4℃、3 000r/min离心10min,吸取上清液,每0.2ml分装,在-20℃下冻存待测;于发病后7d内和21d后,各作1次腰脊髓池穿刺(均无穿刺伤),并取脑脊液(Cerebrospinal fluid, CSF)2ml,第1次42例、第2次35例,每0.2ml分装,在-20℃下冻存待测。对照组按上述方法收集血清25例,脑脊液21例。均按上述方法分装冻存待测。

1.3 方法

采用酶联免疫吸附法,根据试剂盒(NSE EIA kit.For96 × 4 determination,瑞典康内格公司)操作步骤如下:①准备NSE标准品:在A0μg, B8.1μg, C24.8μg, D73.1μg, E144μg每个小瓶中加入蒸馏水0.75ml,轻轻混摇,至少15 min。并标记浓度便于计算。②准备洗液:浓洗液40ml加入蒸馏水或去离子水960ml。③准备孵育液:Tracer 600μl加入抗NSE生物素(BAN)12ml。④洗板:用洗液洗链霉亲合素包被的酶标板1次。⑤加标准品或样本25μl/孔。⑥加孵育液100μl/孔;在室温下震荡1h;用洗液洗6次/孔。⑦加TMB-HRP底物100μl/孔;在室温下震荡30min。⑧加HRP终止液100μl/孔;在室温下震荡1min。⑨在酶标仪(Serial公司Rs-232C型)405nm处测各孔吸光度(OD)值(15min内测完)。OD值为纵坐标,NSE浓度为横坐标,绘制标准曲线。在标准曲线上检测待测标本NSE的含量。

1.4 统计方法

使用SPSS13.0统计软件包进行统计分析。所有实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组内比较采用单因素方差分析,组间比较采用成组资料t检验以及皮尔逊(Pearson)相关分析等方法进行比较。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血液和脑脊液NSE浓度的检测结果

VE急性期患者血液和脑脊液NSE浓度均显著高于恢复期患者和对照组(P<0.01);VE急性期患者脑脊液NSE浓度显著高于血液(t=6.16, P<0.01)(表1);轻度、中度及重度异常EEG患者脑脊液NSE浓度均高于血液(P<0.01);重度、中度异常EEG患者血液及脑脊液NSE浓度均高于轻度(P<0.01)(表2)。

2.2 VE急性期患者血液和脑脊液NSE浓度与低密度灶体积的相关性

表1 VE患者血液和脑脊液NSE浓度检测结果($\bar{x} \pm s$) (μg/L)

	病毒性脑炎					
	n	急性期	n	恢复期	n	对照组
$NSE_{血液}$	42	17.14 ± 1.23*	38	11.75 ± 0.86	25	10.96 ± 1.88
NSE_{CSF}	42	18.55 ± 1.85*☆	35	11.57 ± 1.63	21	10.51 ± 2.39

*急性 VE 患者血液和脑脊液显著增高于恢复期患者和对照组(P<0.01);

☆脑脊液 NSE 浓度显著增高于血液(P<0.01)

表3　VE急性期异常脑电图患者血液和脑脊液NSE浓度检测结果($\bar{x} \pm s$)(μg/L)

异常脑电图	n	脑脊液	血液
轻度	19	14.24 ± 0.11*	13.20 ± 0.14
中度	11	18.32 ± 0.17*☆	17.86 ± 0.06☆
重度	7	21.35 ± 0.08*☆	19.30 ± 0.17☆

*脑脊液 NSE 浓度均高于血液(P<0.01)；

☆重度、中度异常 EEG 患者血液及脑脊液 NSE 浓度均高于轻度(P<0.01)

Pearson相关分析发现，VE急性期患者血液和脑脊液NSE浓度呈显著正相关(r=0.772，P<0.01)(图1)；与低密度灶体积均呈显著正相关($r_{灶}$=0.736，P<0.01；$r_{血液}$=0.685，P<0.01)(图2)。

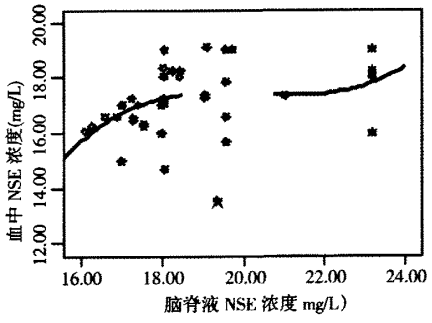


图1　VE急性期患者血液和脑脊液NSE含量

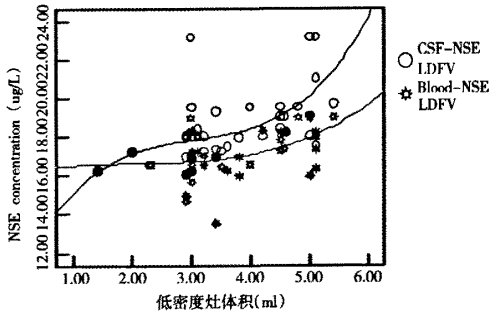


图2　VE急性期患者血液和脑脊液NSE含量与低密度灶体积

3　讨　论

病毒性脑炎是常见的中枢神经系统感染性疾病，病毒经血循环直接或沿神经分布进入中枢神经系统，破坏神经元或神经胶质细胞和/或引起神经细胞的脱髓鞘改变和血管损伤造成供血不足，引起脑组织缺血、缺氧，导致脑细胞的损伤。

在脑组织中有αα、αγ和γγ3种烯醇化酶同工酶。γγ型特异地存在于神经元和神经内分泌细胞的胞浆中故命名为NSE。αα型同工酶位于神经胶质细胞，其结构和免疫学特性与肝脏中的烯醇化酶相同称非神经性烯醇化酶。NSE 占脑内全部可溶性蛋白的1.5%。NSE含量由高到低依次为脑、脊髓和周围神经节。周围神经中NSE水平远低于脑内，相差10～100倍。血液成分血小板和红细胞中也有一定量的αγ型同工酶。因NSE与之有部分交叉反应免疫活性，故在测定血清NSE时应避免溶血。

本实验研究表明：(1)VE急性期患者血液和脑脊液NSE含量均显著高于恢复期患者和对照组；VE急性期患者脑脊液NSE含量显著高于血液；VE急性期患者血液和脑脊液NSE含量呈显著正相关。其可能机制是①神经元受到损伤后，NSE在细胞内的分布会有所变化。在缺血-缺氧状态下神经元存活需要NSE提供大量ATP以满足核酸合成，以及NSE的间接产物丙酮酸能够保护胞核免受过氧化物损害[4]，则NSE会漏至细胞外间隙致使体液中增高。②NSE不与细胞内的肌动蛋白结合，较易释放，这为脑组织损伤后检测脑脊液及血液中NSE的变化提供了依据[5]。③NSE不与胞膜结合，当神经元破坏时，直接释放至脑脊液中，并通过损伤的血-脑屏障(Blood-brain barrier，BBB)漏至血浆中，这些均已被动物实验所证实[6]。④由于不同患者病变部位距蛛网膜下腔远、近不同，不同部位神经元的易损性不同，释放出的NSE被局限或被巨噬细胞吞噬、蛋白酶消耗等各种因素的影响，使脑脊液和血液NSE水平可能有差异[7]。(2)VE患者血液和脑脊液NSE含量与低密度灶体积均呈显著正相关。可能的原因是脑的神经细胞和神经胶质细胞分布与神经功能有关[8]。

本实验研究结果表明，脑脊液或血清中的NSE浓度的高低，虽然对VE的诊断不具有特异性，但其反映了神经细胞和神经胶质细胞的损害程度，是脑组织损伤后的特异性蛋白，也是脑组织破坏后较合适

(下转第 77 页)

[6] de la Torre JC, Carbone KM, Lipkin WI. Molecular characterization of the Borna disease agent[J]. Virology, 1990; 179(2): 853-856.
[7] Fukuda K, Takahashi K, Iwata Y, et al. Immunological and PCR analyses for Borna disease virus in psychiatric patients and blood donors in Japan[J]. J Clin Microbiol, 2001; 39(2): 419-429.
[8] Lipkin WI, Hornig M, Briese T. Borna disease virus and neuro-psychiatric disease--a reappraisal[J]. Trends Microbiol, 2001; 9(7): 295-298.
[9] Miranda HC, Nunes SO, Calvo ES, et al. Detection of Borna disease virus p24 RNA in peripheral blood cells from Brazilian mood and psychotic disorder patients[J]. J Affect Disord, 2006; 90(1): 43-47.
[10] Iwata Y, Takahashi K, Peng X, et al. Detection and sequence analysis of borna disease virus p24 RNA from peripheral blood mononuclear cells of patients with mood disorders or schizophrenia and of blood donors[J]. J Virol, 1998; 72(12): 10044-10049.
[11] Xie P, Xu P, Zou DZ, et al. Detection of Borna disease virus RNA from peripheral blood cells in neuropsychiatric patients in china[J]. Journal of Neurochemistry, 2003; 87(s1): 64-64.
[12] Xu P, Xie P, Zou DZ. Detection of Borna disease Virus p24 Fragment from Peripheral Blood Cells in Patients With Viral Encephalitis[J]. Chin J Neurol Virol, 2005; 38(5): 309-312.
[13] de la Torre JC, Gonzalez-Dunia D, Cubitt B, et al. Detection of Borna disease virus antigen and RNA in human autopsy brain samples from neuropsychiatric patients[J]. Virology, 1996; 223(2): 272-282.
[14] Haga S, Yoshimura M, Motoi Y, et al. Detection of Borna disease virus genome in normal human brain tissue[J]. Brain Res, 1997; 770(1-2): 307-309.
[15] zur Hausen H Proliferation-inducing viruses in non-permissive systems as possible causes of human cancers[J]. Lancet, 2001; 357 (9253): 381-384.
[16] Chung YH, Cho NH, Garcia MI, et al. Activation of Stat3 transcription factor by Herpesvirus saimiri STP-A oncoprotein[J]. J Virol, 2004; 78(12): 6489-6497.
[17] Strickler HD, Goedert JJ, Devesa SS, et al. Trends in U.S. pleural mesothelioma incidence rates following simian virus 40 contamination of early poliovirus vaccines[J]. J Natl Cancer Inst, 2003; 95 (1): 38-45.
[18] White MK, Gordon J, Reiss K, et al. Human polyomaviruses and brain tumors[J]. Brain Res Rev, 2005; 50(1): 69-85.
[19] Mercer A, Fleming S, Robinson A, et al. Molecular genetic analyses of parpoxviruses pathogenic for humans[J]. Arch Virol Suppl, 1997; 13: 25-34.
[20] Orth G, Jablonska S, Favre M, et al. Identification of papillomavirus in butchers' warts[J]. J Invest Dermato, 1981; 176(2): 97-102.
[21] Kamitani W, Shoya Y, Kobayashi T, et al. Borna disease virus phosphoprotein binds a neurite outgrowth factor, amphoterin/HMG-1 [J]. J Virol, 2001; 75(18): 8742-8751.
[22] Zhang G, Kobayashi T, Kamitani W, et al. Borna disease virus phosphoprotein represses p53-mediated transcriptional activity by interference with HMGB1[J]. J Virol, 2003; 77(22): 12243-12251.
[23] Banerjee S, Kundu TK. The acidic C-terminal domain and A-box of HMGB-1 regulates p53-mediated transcription [J]. Nucleic Acids Res, 2003; 31(12): 3236-3247.

(上接第 62 页)

的生化标记物。有助于研究NSE在脑损伤中的作用机制，为判断中枢神经系统的损害程度提供了定量信息以及对预测病人出院后神经症状和体征的恢复程度提供了重要的参数，也可能有效地反映VE患者颅内压的高低，为临床合理使用降颅压药物，提供了新的监测手段。目前的研究多集中在脑损害后它们的动态改变以及与神经功能紊乱的程度和预后的相关性上，是否与脑的修复机制有关以及是否可以通过药物来改变它们的浓度等问题还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Barone FC, Clark RK, Price WJ, et al. Neuron-specific enolase increases in cerebral and systemic circulation following focal ischemia[J]. Brain Res, 1993; 623(1): 77-82.
[2] 周光斗，刘振华，陈俊抛，等.临床神经疾病诊断学[M]. 广州：广东科技出版社，2003.596.
[3] 黄远桂，吴声伶.临床脑电图学[M]. 西安：陕西科学技术出版社，1984.193.
[4] Johnsson P, Lundquist C, Lindgren A, et al. Cerebral complications after cardiac surgery assessed by S-100 and NSE levels in blood[J]. Cardiothorac Vasc Anesth, 1995; 9: 694-699.
[5] Schaar SH, Prange HW, Reiber H. Neuron-specific enolase concentrations in blood as a prognostic parameter in cerebrovasc ular diseases[J]. Stroke, 1994; 25(3): 558-565.
[6] Angelov DN, Neiss WF, Gunkel A, et al. Axotomy induces intran uclear immunolocalization of neuron-specific enolase infacial and hyp oglossal neurons of the rat[J]. Neurocytol, 1994; 23(4): 218-233.
[7] Hardemark HG, Ericsson N, Kotwica E, et al. S-100 protein and neuron-specific enolase in CSF after experimental traumatic or focal ischemic brain damage[J]. Neurosurg, 1989; 71: 727-731.
[8] Missler U, Wiesmann M, Friendich C, et al. S100 protein and neuron specific-enolase oncentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke[J]. Stroke, 1997; 28(10): 1956-1960.