维普资讯 http://www.cqvip.com

多发性硬化患者脑脊液髓鞘碱性蛋白含量的临床意义*

神经疾病研究室 向 勇 董为伟 傅雅各

提 要 用放免法（RIA）测定106例神经系统疾病患者的CSF髓鞘碱性蛋白（MBP），发现多发性硬化患者的CSF MBP含量明显高于散发性脑炎（$P<0.05$）、神经系统其他疾病和功能性头痛病人（$P<0.01$）。多发性硬化病人的CSF MBP含量高低与病情轻重和近期预后相关

关键词 脑脊液；髓鞘碱性蛋白；多发性硬化；放射免疫分析法

多发性硬化（MS）的发病率在我国有增高趋势，但对MS的诊断目前尚无特异的生化指标。多年来国内外学者对MS的发病机理作了大量研究，一致认为MS时的脱髓鞘机制是一种自身免疫反应，髓鞘碱性蛋白（MBP）则为其重要的免疫原之一。MBP是中枢神经系统（CNS）髓鞘的主要组成蛋白，占髓鞘蛋白的30%[1]。在CNS破坏性病变累及髓鞘和脱髓鞘病变时，MBP可进入CSF，且CSF MBP含量的增高与CNS髓鞘破坏的程度平行，测定CSF MBP含量可有助于对MS的诊断及预后判断[2-5]。为此，我们参考Cohen（1975）方法，建立了CSF MBP的放免测定技术，并对33例MS病人CSF MBP含量进行测定，探讨其临床意义。

材料和方法

一、对象

测定1987—1988年2月间106例我科住院及门诊的神经系统不同疾病患者的CSF，全部待测标本均采自腰穿。CSF标本即置−20℃保存，直到测定。按不同疾病分为以下四组。

1. MS组 33例均符合MS的临床确诊标准[2]。11例为起病二周内，13例的症状超过二周，慢性进展型MS9例。采用Miller（1985）计分评价病情及近期预后[4]。

2. 散发性脑炎组（下称散脑） 36例均符合散脑临床诊断诊断标准[6]。

3. 其他神经疾病组（下称“其他”） 包括格林－巴利综合征11例、周围神经炎2例、单颅神经炎2例、遗传性共济失调及急性脊髓炎各1例，共17例。

4. 功能性头痛组（下称头痛） 20例头痛患者经各项检查均未发现神经系统异常，CSF常规、生化检查均正常。

二、方法

1 MBP的提纯 按Deibler（1972）[1]的操作步骤略加修改，用新鲜牛脊髓200g，经反复脱脂、提取得MBP粗提液820ml，含3.21g蛋白质。MBP粗提液先用CM-23进行离子交换层析，得初步纯化的MBP337.4mg，然后将该液经Sephadex G-125柱层析（2.5×90cm）进一步纯化，分步收集层析液，获纯化Ⅱ峰MBP 69.6mg。纯化Ⅱ峰MBP与标准牛脑MBP（Sigma公司）在pH4连续缓冲系统聚丙烯酰胺凝胶电泳上的迁移率一致（图1）。

* 中国科学院科学基金资助课题

维普资讯 http://www.cqvip.com

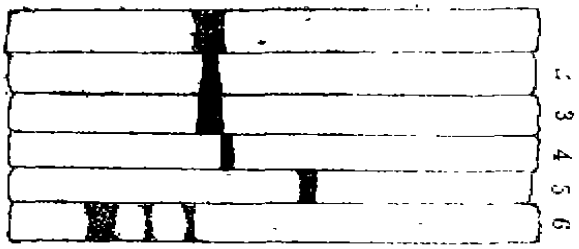


图1 Sephadex G-125层析纯化MBP电泳图每柱加蛋白25μg。1.标准牛脑MBP（Sigma化学公司）2.Ⅲ峰蛋白 3. 0.1NHCl提取液 4. Ⅱ峰蛋白 5. Ⅰ峰蛋白 6.粗提MBP液 Ⅲ峰蛋白显示为单一色带，与标准MBP的迁移率一致

2 抗血清制备 取2ml MBP溶液(5mg/ml)，加0.5ml卡介苗及1.5ml不完全福氏佐剂，混匀、乳化。首先于大白兔（日本大耳白兔，雄性，二月龄，2.6—3kg）双后足跖注入0.5ml抗原-完全福氏佐剂。二周后于双后肢肿大的腘淋巴结内各注入0.5ml同样制剂。第三周用不加佐剂的MBP（5mg/ml）通过耳缘静脉加强免疫，一周内注射三次，剂量分别为0.1、0.3、0.5ml。8周后试测抗体效价。

3 MBP的^{125}I标记 MBP用0.2M Tris-HCl缓冲液（pH7.3）稀释成1mg/ml，取5μlMBP，加^{125}I溶液1mCi，氯氨T 100μg，振荡均匀，室温下反应1分钟，加入偏重亚硫酸钠200μg，充分混合后，加到1×20cm Sephadex G-25层析柱上，用0.1NHCl溶液（含1mg/ml牛血清白蛋白）洗脱，并分步收集，每管1ml。得^{125}I-MBP溶液3ml。标记率15.92%，比放射性31.84μCi/μg（较Cohen方法[5]的比放射性（4.4μCi/μg）高，因本法的标碘量较高，以提高比放射性及RIA的灵敏度）。取1μl ^{125}I-MBP溶液与标准MBP25μg在聚丙烯酰胺凝胶上平行电泳，染色后均匀分为25段，分别计数放射性强度（图2）。

4 抗血清滴度测定 ^{125}I-MBP用磷酸缓冲液（pH7.3，含1mg/ml牛血清白蛋白）稀释成1ng/100μl。取100μl^{125}I-MBP，100μl不同稀释度的抗MBP血清，与300μl上述缓冲液混匀，加至1×7塑料反应管中，4℃下反应24h后，加30%聚乙二醇（PEG MW6000）600μl，0℃放置10分钟，而后于4000rpm离心20分钟。弃去上清液，在γ-计数仪

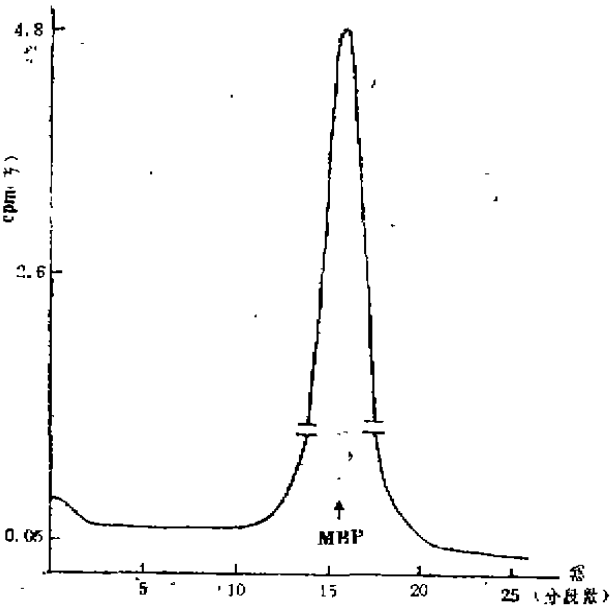


图2 ^{125}I-MBP放射化学纯度测定在标准MBP色带处放射性计数得一单峰

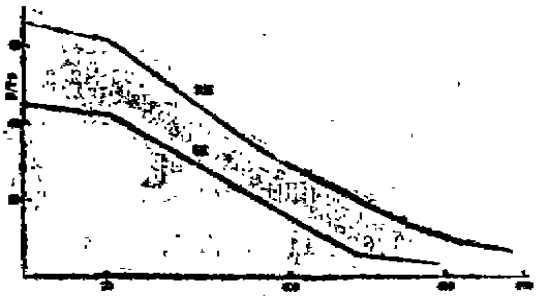


图3 抗体滴度测定曲线

R_1：Ⅰ号兔血清 R_{II}：Ⅱ号兔血清。R_{II}的最大结合率为67%，滴度1:40时结合率为49%。以1:40为工作稀释度，用Scatchard作图法求得该血清的亲合常数为4.6×10^{10} L/M。

（FT-63型自动计算^{125}I放射免疫测定仪）上计数沉淀的放射性强度（图3）。

5 MBP RIA测定 取100μl^{125}I-MBP（1ng/100μl），100μl抗血清（1:40），100μl标准MBP或200μl CSF、依次加至反应管中，再加缓冲液使最终体积为700μl，4℃下反应24小时后，加入30%PEG 600μl，于4000rpm离心20分钟，吸弃上清，计数沉淀的放射性强度。为了消除IgG对MBP的非特异性吸附，在每一管中加入30%正常兔血清，非特异性结合率16.35%。以logit[7]作图法得标准曲线（图

维普资讯 http://www.cqvip.com

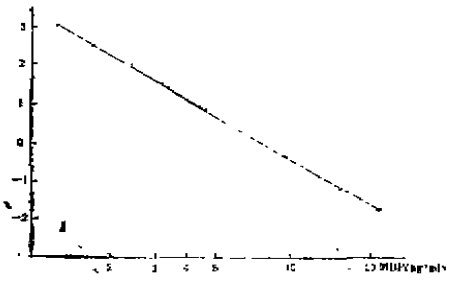


图 4

4)，其最小检出值为2ng/ml；回收率87.5—125%，平均99.5%；平均批内变异系数7.09%，批间变异系数17.33%。后者较大可能与测定时电压不稳、温度差异等随机因素所造成的影响有关。

6 **统计学方法** 多组数据的处理用方差分析。两组均数间的比较用 t 检验。

结 果

1、各组患者CSF MBP含量（表）

以20例功能性头痛患者为对照，其CSF MBP 平均含量为 3.0±2.24ng/ml，对照上限为 7.48ng/ml（$\bar{x}$+2SD）。CSF MBP含量超过此值者为阳性。

33例MS 患者的 CSF 平均 MBP 含量为 21.98±11.82ng/ml，其中31例阳性。36例散脑患者CSF平均MBP含量为14.82±9.53 ng/ml，其中29例阳性。“其他”组CSF平均MBP含量为3.62±1.70ng/ml，无一例阳性。

表1 各组患者CSF MBP平均含量与阳性率

组别	例数	MBP含量±SD(ng/ml)	范围(ng/ml)	阳性例数	阳性率
MS	33	21.98±11.82	2～52.5***	31	93.94
散脑	36	14.82±9.53	0～52.5*	29	80.58
其他	17	3.62±1.70	0～7.48	0	—
头痛	20	3.00±2.24	0～7.40	0	—

* MS组与其他、头痛组比较（方差分析P<0.01）
*** 散脑组与其他、头痛组比较（P<0.01）
** MS组与散脑组比较（P<0.05）

2、MS 患者 CSF MBP 含量与临床病情及近期预后的关系

33例MS患者中急性发作期（二周内）11例，其CSF MBP平均含量为28.73±8.8 ng/ml，较症状超过二周的13例的CSF MBP平均含量（14±9.47ng/ml）明显增高（p<0.01）。9例为慢性进展型MS，其CSFMBP平均含量17.61±5.14ng/ml，亦低于急性发作期患者（p<0.05）。

用 Millar 评分法对33例MS患者入院时及出院时病情进行评分，发现入院时病情轻重与CSF MBP含量高低呈正相关（r=0.80，p<0.01）。33例MS在出院时（住院30—72天，平均51天）的病情积分亦与CSF MBP含量呈正相关（r=0.79，p<0.01）（图5），说明CSF MBP 含量高低与患者的临床神经功能的近期预后有关，即CSF MBP含量越高，病情恢复越差；含量越低，病情恢复越佳。

讨 论

本组研究结果表明，MS患者CSF MBP平均含量较散脑（p<0.05）、“其他”及头痛组患者的明显增高（p<0.01）。急性发作期MS的 CSF MBP 平均含量明显高于症状超过二周及慢性进展型 MS 的 CSF MBP平均含量。通过对病情评分与 CSF MBP含量高低的比较，发现两者之间呈正相关关系，表明CSF MBP 含量高低可反映病情轻重及近期预后的好坏。上述结果与国外文献报道一致[3,4,5,8]。Thomsom（1985）报道221例

维普资讯 http://www.cqvip.com

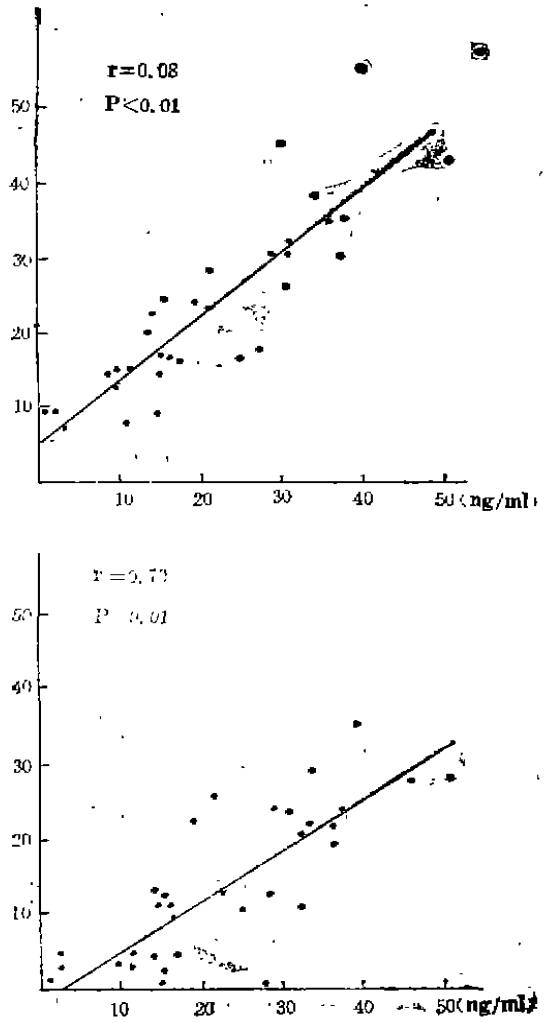


图5 MS患者CSF MBP含量与临床病情的相关关系

MS及85例其他神经疾病（OND）病人的CSF MBP含量，MS患者的CSF MBP阳性数较OND高84%；复发的MS患者中88%阳性，且CSF MBP含量高低与病情轻重相关。缓解期患者中27%阳性，其中58%随访期内复发；而CSF MBP不增高者中仅9%复发（$p<0.01$）[4]。Warren（1983）指出多灶发作型MS患者的CSF MBP含量较单灶发作型MS及慢性进展型MS的明显为高[3]。Witaker（1980）发现发病二周内的MS病例的CSF MBP含量明显高于发作二周后病例的CSF MBP含量[8]。Cohen（1980）也发现病程超过6周的发作型MS无一例CSF MBP阳性[5]。综上所述，CSF MBP含量增高是反映CNS脱髓鞘病变的一项客观的生化改变，其含量增高程度提示髓鞘破坏程度和范围，并与病情轻重相关，有助于MS的临床诊断及预后判断。然而，CSF MBP含量变化还不能视为一项特异的诊断指标。本组研究的散脑病人CSF MBP含量亦较对照组高。此外，脑瘤、卒中、脑外伤等其他神经系统疾病患者的CSF MBP也可有增高[10-12]。Warren（1987）指出MBP一次释放到CSF及血清，如见于颅脑损伤时，并不会导致CSF中抗MBP抗体（MBPA）水平的升高；而MS、亚急性硬化性全脑炎、感染后脑脊髓炎以及散发性脑炎[13,14]时则可伴以CSF MBPA水平的不同程度增高，因而同时测定患者的CSF MBP和MBPA将有助于MS等疾病的鉴别。CSF MBP含量升高表明CNS有脱髓鞘改变，而脑灰质损害时则不会升高[14]。有人报导，肌酸磷酸激酶脑同功酶（CK-BB）是起源于神经元和星形胶质细胞的一种同功酶，脱髓鞘过程不会有CK-BB释放到CSF中，而病变累及神经元及星形胶质细胞时则在CSF中可测出CK-BB，从而据CSF MBP/CK-BB比值可有助于推测病变性质[15]；亦可有助于对MS的鉴别诊断，都值得今后进一步研究。

参考文献

[1] Deibler GE. Preparative Biochemistry 1072; 2(2):139

[2] Tourtellotte WW. Handbook of Neurology, Vol 47:Demyelinating Disease ed. by Vin Ken PS, et al. 1985, pp: 115—118. Elsevier Sci. Pub. Amsterdam

[3] Warren KG. Cana J.Neurol Sci 1983; 10:235

[4] Thomson AJ. Acta Neurol Scand 1985; 72:577

[5] Cohen SR. Ann Neurol 1980; 7:58

维普资讯 http://www.cqvip.com

[6] 中华神经精神科杂志编委会，中华神经精神科杂志，1983；16:315
[7] 李振甲主编，激素的放射免疫分析，科学技术文献出版社，1986，pp:12-36
[8] Hemachudha T. N Engl J Med 1987; 316:369
[9] Witaker JN. Ann Neurol 1989; 7:58
[10] Noseworthy TW. Critical Care Med 1985; 13:743
[11] Matias-Guiu J. Acta Neurol Scand 1986; 73:461
[12] Sutton LN. J Neurosurg 1983; 59; 487
[13] Warren KG. Ann Neurol 1987; 21:183
[14] 董为伟，等 中华医学杂志 987.67(2):82
[15] Matias-Guiu J. Acta Neurol Scand 1986; 73:203

CLINICAL SIGNIFICANCE OF MBP IN THE CSF OF PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

Xiang Yung, Dong·Weiwei, Fu Yage

(Neurological Disease Research Laboratory)

MBP was isolated and purified from bovin spinal cord as described by Deibler. A sensitive and specific RIA was used for quantitating the level of MBP in the CSF samples which was collected from 106 patients with various neurological diseases. In the functional headache group, the mean level of MBP in CSF was 3.0±2.94ug/ml, so the upper control level of CSF MBP was 7.48 ng/ml ($\bar{x}$+2SD). The mean level of MBP in CSF of 33 patients with MS was 21.98±11.82 ng/ml. Thirty-one cases had elevated level of CSF MBP (93.94%). The CSF MBP level of MS patients was significantly higher than the level of patients with sporadic encephalitis, other neurological diseases, and headache ($p<0.05$, $p<0.01$). It suggested that MBP was released into CSF while acute demyelination occurred. The level of CSF MBP in MS patients was correlated with the severity of the clinical condition, and the short-term prognosis ($r=0.80$, $r=0.78$, $p<0.01$). The elevated level of CSF MBP is an objective biochemical marker of the CNS demyelinating diseases

KEY WORD Cerebrospinal fluid; Myelin basic protein; Multiple Sclerosis; Radioimmunoassay