· 临床研究 ·

不同类型脑性瘫痪患儿脑脊液氨基酸变化

袁海斌¹, 成莲英¹, 尹飞², 张国勋¹, 彭镜², 康明秀¹, 许佑明¹, 陈若岚¹, 王利¹

(1. 南华大学附属湘潭市一医院脑瘫中心, 湖南 湘潭 411101; 2. 中南大学湘雅医院儿科, 湖南 长沙 410008)

[摘要] **目的** 目前对于脑瘫与脑内神经递质的关系研究很少, 该研究通过测定不同类型脑瘫患儿脑脊液中谷氨酸、天冬氨酸、 γ -氨基丁酸的含量, 以了解不同类型脑瘫患儿脑脊液中氨基酸变化。**方法** 选取13例痉挛型脑瘫患儿、14例徐动型脑瘫患儿及同期已排除神经系统疾病和感染性疾病的10例手术患儿, 分别设为痉挛组、徐动组和对照组。每1例均于手术麻醉前自腰椎3, 4椎间隙穿刺取无血污脑脊液2 mL, 取上清液用高效液相色谱-荧光法测定谷氨酸、天冬氨酸、 γ -氨基丁酸含量。**结果** ①对照组脑脊液中 γ -氨基丁酸、天冬氨酸、谷氨酸分别为 $13.04 \pm 2.19 \mu\text{mol/L}$, $10.21 \pm 0.45 \mu\text{mol/L}$, $8.41 \pm 2.26 \mu\text{mol/L}$; 与对照组比较, 痉挛型脑瘫患儿脑脊液中 γ -氨基丁酸显著降低为 $8.02 \pm 2.03 \mu\text{mol/L}$, ($P < 0.01$), 谷氨酸、天冬氨酸显著增高为 $20.99 \pm 8.15 \mu\text{mol/L}$, $13.53 \pm 3.93 \mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 徐动型脑瘫脑脊液中 γ -氨基丁酸显著降低为 $10.01 \pm 2.68 \mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$), 谷氨酸、天冬氨酸显著增高为 $28.77 \pm 17.62 \mu\text{mol/L}$, $14.02 \pm 2.88 \mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$)。痉挛型脑瘫与徐动型脑瘫比较, 痉挛型脑瘫患儿脑脊液中 γ -氨基丁酸显著降低, 而谷氨酸、天冬氨酸含量两者差异无显著性 ($P > 0.05$)。②线性相关分析发现痉挛型脑瘫患儿脑脊液中谷氨酸的水平与肌张力呈等级正相关; γ -氨基丁酸和天冬氨酸的水平与肌张力无相关性。**结论** 脑瘫患者脑脊液中兴奋性氨基酸含量较正常儿童增高, 抑制性氨基酸含量较正常儿童降低, 且不同类型脑脊液中氨基酸含量存在差异, 氨基酸水平的改变可能是脑瘫患儿的病理改变的基础之一。

[中国当代儿科杂志, 2008, 10(4): 475-477]

[关键词] 脑性瘫痪; 脑脊液; 兴奋性氨基酸; 抑制性氨基酸; 儿童

[中图分类号] R748 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)04-0475-03

Levels of amino acids in cerebral spinal fluid in children with cerebral palsy

YUAN Hai-Bin, CHENG Lian-Ying, YIN Fei, ZHANG Guo-Xun, PENG Jing, KANG Ming-Xiu, XU You-Ming, CHEN Ruo-Lan, WANG Li. Center of Cerebral Palsy, First Hospital of Xiangtan, Nanhua University, Xiangtan, Hunan 411101, China (Email: yd8026@sina.com)

Abstract: Objective To study the changes of amino acids in cerebral spinal fluid (CSF) in children with spastic or athetotic cerebral palsy (CP) by examining CSF levels of glutamic acid (Glu), gamma-aminobutyric acid (GABA) and aspartate (ASP). **Methods** CSF samples were obtained from 13 children with spastic CP, from 14 children with athetotic CP, and from 10 children without central nervous system and infectious diseases (control group). CSF levels of Glu, GABA and ASP were determined by high-performance liquid chromatography. **Results** CSF levels of GABA, ASP and Glu in the control group were 13.04 ± 2.19 , 10.21 ± 0.45 and $8.41 \pm 2.26 \mu\text{mol/L}$, respectively. Compared with the control group, CSF GABA levels in the spastic and the athetotic CP groups (8.02 ± 2.03 and $10.01 \pm 2.68 \mu\text{mol/L}$ respectively) significantly decreased ($P < 0.01$), whereas CSF levels of Glu (20.99 ± 8.15 and $28.77 \pm 17.62 \mu\text{mol/L}$ respectively) and Asp (13.53 ± 3.93 and $14.02 \pm 2.88 \mu\text{mol/L}$ respectively) in the spastic and the athetotic CP groups significantly increased ($P < 0.01$). There were statistical differences in the GABA level between the spastic and the athetotic CP groups ($P < 0.05$). In children with spastic CP, CSF Glu level was positively correlated to muscle tension. **Conclusions** CSF excitatory amino acid levels increased, while CSF inhibitory amino acid levels decreased in children with CP. There were differences for CSF amino acid levels in different types of CP. The changes of amino acid levels may contribute to the pathogenesis of CP.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10(4): 475-477]

Key words: Cerebral palsy; Cerebrospinal fluid; Excitatory amino acid; Inhibitory amino acid; Child

氨基酸是中枢神经系统的经典神经递质, 根据其中枢作用不同可分为兴奋性氨基酸与抑制性氨基

酸。前者包括谷氨酸 (glutamic acid, Glu) 和天冬氨酸 (aspartic acid, Asp), 后者主要是 γ -氨基丁酸

[收稿日期] 2007-09-21; [修回日期] 2007-12-10

[作者简介] 袁海斌, 男, 大学, 主任医师。主攻方向: 小儿神经系统疾病。

(gamma-aminobutyric, GABA) 和甘氨酸 (glycine Gly)。氨基酸不但能通过相应的受体结合参与中枢神经系统的信息传递,而且近年来的研究表明兴奋性氨基酸还可作为内源性兴奋毒素参与破坏神经细胞、介导钙超载、促进迟发性细胞死亡等^[1-4]。同时在动物模型中也发现兴奋性氨基酸与围生期脑损伤关系密切^[5],但有关不同类型脑性瘫痪(脑瘫)患儿脑脊液中氨基酸的变化研究较少,为此本文对27例脑瘫患儿脑脊液中Glu、Asp和Gly含量进行检测,以了解不同类型脑瘫患者脑脊液中氨基酸神经递质的变化。

1 资料与方法

1.1 研究对象及分组

27例脑瘫病例均符合2004年昆明全国小儿脑性瘫痪座谈会的制定的诊断和分型标准^[6]。其中痉挛型脑性瘫痪(以下简称痉挛组)13例,男8例,女5例,平均年龄4.8岁。肌张力3级6例,4级3例,5级4例;徐动型脑性瘫痪(以下简称徐动组)14例,男9例,女5例;平均年龄4.9岁。另选择本院同期住院手术患儿10名,均排除神经系统疾病和感染性疾病,设为对照组,男7例,女3例;平均年龄4.7岁。

1.2 实验方法

1.2.1 试剂 氨基酸、ADMA和SDMA标准(美国Sigma公司),用0.1mol/L HCL稀释贮备液,使各标准物质的浓度为25μmol/L。OPA和β-巯基乙醇(美国Sigma公司);四氢呋喃(THF)和醋酸钠(分析纯),甲醇(色谱醇)。所有用水均为双蒸水。

1.2.2 仪器 色谱系统为LC-10ADvp四元梯度泵、CTO-10Avp柱温箱、RF-10Axl荧光检测器、7725手动进样器(美国Rheodyne公司)和Echrom98色谱工作站(大连依利特科学仪器有限公司)。分析柱为Nova-Pak C18柱(150×4.6 mm,4μ);保护柱为C18 guard-pak(美国Waters公司)。

1.2.3 色谱条件 流动相为50 mmol/L的醋酸钠(pH 6.8)、甲醇和THF(A:82:17:1;B:22:77:1)。临床前超声脱气。各成分均经过0.45 μm 滤膜过滤,柱温为30℃,流速为1.0 mL/min。荧光检测器的激发波长338 nm,发射波长425 nm。采用峰面积定量。

1.2.4 OPA试剂和衍生反应 OPA(10 mg)溶解在0.5 mL甲醇中,加2.0 mL 0.4 mol/L(pH 9.4)的硼酸缓冲液和30 μL β-巯基乙醇混匀,此溶液只能稳定2 d;取10 μL样品或标准应用液,加100 μL

衍生试剂,混匀,室温下反应3 min后进行分析。

1.2.5 脑脊液收集及处理 每1例均于手术麻醉前腰椎3,4椎间穿刺取无血污脑脊液2 mL,-70℃低温冰箱保存。检测时取1 mL脑脊液,加10 mg 磺基水杨酸,混匀后冰浴10 min,2 000 r/min离心10 min,取上清液用高效液相色谱-荧光法测定谷氨酸、天冬氨酸、γ-氨基丁酸含量。

1.3 统计学处理

所有脑脊液经过检测定量后数据用SPSS11.0软件包进行统计学分析,实验数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较应用单因素方差分析。同时采用线性相关性分析了解脑瘫患儿CSF中谷氨酸、天冬氨酸、γ-氨基丁酸与肌张力等级的关系。

2 结果

2.1 各组患儿脑脊液中谷氨酸、天冬氨酸、γ-氨基丁酸含量

痉挛组和徐动组脑瘫患儿脑脊液中γ-氨基丁酸水平低于对照组,而谷氨酸、天冬氨酸含量高于对照组,统计学处理有显著意义($P < 0.05$)。与痉挛组脑瘫患儿比较,徐动组患儿脑脊液中γ-氨基丁酸含量降低($P < 0.05$),而谷氨酸、天冬氨酸含量两者之间差异无显著性(表1)。

表1 不同类型CP脑脊液氨基酸比较 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)

分组	例数	谷氨酸	天冬氨酸	γ-氨基丁酸
对照组	10	8.41 ± 2.26	10.21 ± 0.45	13.04 ± 2.19
痉挛组	13	20.99 ± 8.15 ^a	13.53 ± 3.93 ^a	8.02 ± 2.03 ^a
徐动组	14	28.77 ± 17.62 ^b	14.02 ± 2.88 ^b	10.01 ± 2.68 ^{b,c}

a:与对照组相比 $P < 0.05$; b: < 0.01 ; c:与痉挛组比 $P < 0.05$

2.2 痉挛型脑瘫患儿肌张力等级与脑脊液氨基酸的关系

将脑脊液中谷氨酸、天冬氨酸、γ-氨基丁酸含量分别与脑瘫患儿肌张力进行线性相关分析,发现谷氨酸、GABA和天冬氨酸的相关系数(r)分别为0.6215,0.3869和0.0378。

3 讨论

谷氨酸、天冬氨酸是哺乳动物中枢神经系统中含量最高的氨基酸,在脑、脊髓内分布很广,但相对来说,大脑半球和脊髓背侧部分含量较高。在生理条件下它们具有兴奋性递质作用;在脑损伤或缺血下,神经胶质细胞摄取谷氨酸功能下降或受损,使细

胞外谷氨酸含量增高,通过与 NMDA 或非 NMDA 受体结合,可启动呈缓慢进展的变性过程如钙超载等直至神经元细胞变性死亡^[7]。而 γ -氨基丁酸作为重要的中枢神经抑制性递质在脑内含量也很高,但在脑内各部位的含量差别很大,其中在黑质和苍白球含量最高,但其无论作用于何处都是抑制性调控,对谷氨酸、天冬氨酸有明显的拮抗作用。兴奋性氨基酸和抑制性氨基酸两者的平衡,是神经系统正常工作的基础之一。

脑性瘫痪是指脑发育早期各种所引起的脑损伤或发育缺陷所致的运动障碍及姿势异常。其发病原因比较复杂,任何病因都可能导致脑萎缩、脑白质发育不良等不同病理类型的损害,而病变部位的不同又导致临床症状的多样:如锥体束损伤常导致痉挛型脑性瘫痪,而锥体外系损伤表现为徐动型脑性瘫痪等。对于痉挛型脑性瘫痪,有许多复杂机制被认为参与了肌痉挛的形成,其中仅突触前抑制下降阐述得较为清楚并为多数学者所接受^[8]。突触前抑制作用下降低时,GABA 分泌减少,后根传入终末释放的兴奋性递质增加。此外,后根传入纤维的侧支出芽、突触重建亦可能引起后根释放的兴奋性递质增加。故正常的传入冲动可释放出更多的兴奋性递质,牵张反射亢进。而对于徐动型脑性瘫痪机制目前尚未见相关报道,但根据神经解剖学理论,我们知道锥体外系发自大脑皮层后,它们在下行途中先与纹状体发生联系,然后经过多次换元后才抵达脊髓前角运动神经元。其受损后下行传导系统对脊髓前角运动神经元调控异常,从而使肌张力呈动摇型,运动稳定性遭到破坏。有可能由此伴随有氨基酸的失平衡,相关疾病如 Huntington 病即已证明存在着兴奋性氨基酸毒性改变^[9]。

本研究采用高效液相色谱分析法测定脑脊液中谷氨酸、天冬氨酸、 γ -氨基丁酸水平。结果显示痉挛型脑瘫和徐动型脑瘫脑脊液中 γ -氨基丁酸均低于对照组,谷氨酸、天冬氨酸高于对照组,痉挛型脑瘫中谷氨酸与增高的肌张力呈直线相关。表明痉挛型脑瘫和徐动型脑瘫患儿神经系统内氨基酸代谢均出现异常,谷氨酸、天冬氨酸含量增加, γ -氨基丁酸含量不足。国内张新^[10]、徐鹏^[11]、朱凤莲^[12]等对痉挛型脑瘫患儿和非神经系统疾病儿童及 SPR 术后脑瘫脑脊液中的氨基酸神经递质的变化的研究发现痉挛型脑瘫患儿脑脊液 γ -氨基丁酸低于对照组,谷氨酸、天冬氨酸高于对照,谷氨酸与患儿增高的肌张力呈等级正相关,阐述了有关痉挛型脑瘫患儿脑脊液中神经递质的变化,结果与本研究痉挛型脑瘫一致。

本实验结果还提示痉挛型脑瘫 GABA 降低较徐动型脑瘫患儿更为显著,经统计学处理,两者差异具有显著性,这可能与作为抑制性递质 GABA 在黑质和苍白球分布较多,而徐动型脑瘫相对选择性损伤该区域有关。痉挛型脑瘫和徐动型脑瘫脑脊液中谷氨酸、天冬氨酸无明显差异考虑可能系这两种氨基酸分布广泛,虽然相对大脑半球和脊髓背侧含量较高,但在这两种类型脑瘫中损伤选择性差异不明显。

综上所述,脑性瘫痪患者脑脊液中兴奋性氨基酸与抑制性氨基酸含量失衡,可能是脑瘫患儿的病理改变之一,因此重建兴奋性氨基酸与抑制性氨基酸动态平衡有可能为脑瘫治疗提供一条新思路。

[参 考 文 献]

- [1] Pilitsis JG, Diaz FG, O'Regan MH, Phillis JW. Inhibition of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange by KB-R7943, a novel selective antagonist, attenuates phosphoethanolamine and free fatty acid efflux in rat cerebral cortex during ischemia-reperfusion injury [J]. Brain Res, 2001, 916(1-2): 192-198.
- [2] Selvatici R, Marino S, Piubello C, Rodi D, Beani L, Gandini E, et al. Protein kinase C activity, translocation, and selective isoform subcellular redistribution in the cerebral cortex after in vitro ischemia[J]. J Neurosci Res, 2003, 71(1): 64-71.
- [3] Ding R, Asada H, Obata K. Changes in extracellular glutamate and GABA levels in the hippocampal CA3 and CA1 areas and the induction of glutamic acid decarboxylase-67 in dentate granule cells of rats treated with kainic acid[J]. Brain Res, 1998, 800(1): 105-113.
- [4] 尹飞,杨于嘉,虞佩兰,陶永光,毛定安. 百日咳菌液诱发大鼠脑水肿时脑组织中兴奋性氨基酸时相的变化[J]. 中华儿科杂志, 2000, 38(1): 9-12.
- [5] Mespès B, Plaisant F, Fontaine RH, Gressens P. Pathophysiology of neonatal brain lesions: lessons from animal models of excitotoxicity[J]. Acta Paediatr, 2005, 94(2): 185-190.
- [6] 林庆. 小儿脑性瘫痪的定义、诊断条件及分型[J]. 中华儿科杂志, 2005, 43(4): 262.
- [7] Pringle AK, Iannotti F, Wilde GJ, Chad JE, Seeley PJ, Sundstrom LE, et al. Neuroprotection by both NMDA and non-NMDA re-ceptor antagonist in vitro ischemia[J]. Brain Res, 1997, 755(1): 36-46.
- [8] Delwaide PJ. Spasticity: from pathophysiology to therapy[J]. Acta Neurochir Suppl (Wien), 1987, 39: 91-95.
- [9] Dure Leon S, Young Anne B, Penney John B. Excitatory amino acid binding sites in the caudate nucleus and frontal cortex of Huntington's disease[J]. Ann Neurol, 1991, 30(6): 785-793.
- [10] 张新,徐鹏,张大光,张吉亭. 痉挛型脑性瘫痪患儿脑脊液中兴奋与抑制性氨基酸及乙酰胆碱脂酶的研究[J]. 中国临床康复, 2002, 6(3): 349-350.
- [11] 徐鹏,赵毅,张新. 脑瘫患儿脑脊液氨基酸类神经递质的变化[J]. 吉林大学学报, 2004, 30(1): 117-119.
- [12] 朱凤莲,李晶,钱惠茵,郭学鹏. 痉挛型脑性瘫痪患儿脑脊液中谷氨酸与 γ -氨基丁酸的变化[J]. 中国临床康复, 2004, 8(36): 8341-8347.

(本文编辑: 吉耕中)