

· 临床论著 ·

流行性乙型脑炎患者机体氧化还原态初探

陈凤文 韩晓群

【摘要】目的 探讨流行性乙型脑炎患者机体氧化还原态。**方法** 选取40例流行性乙型脑炎患儿为研究对象,分别测定发病极期和恢复期血浆还原型谷胱甘肽(GSH)与氧化型谷胱甘肽(GSSG),还原型辅酶Ⅱ(NADPH)与氧化型辅酶Ⅱ(NADP⁺),计算GSH/GSSG和NADPH/NADP⁺比值,评价HIV/AIDS患者机体氧化还原态。**结果** 流行性乙型脑炎患儿发病极期血浆氧化还原态向氧化方向偏移。**结论** 氧化还原态失衡、氧化还原态向氧化方向偏移与流行性乙型脑炎疾病进展有一定相关性。

【关键词】 流行性乙型脑炎; 氧化还原态

Research on the redox status in patients with epidemic encephalitis B CHEN Suwen, HAN Xiaoqun.

Wuhan Medical Treatment Center, Wuhan 430023, China

Corresponding author: HAN Xiaoqun, Email: 763633126@qq.com

【Abstract】Objective To investigate the redox status in patients with epidemic encephalitis B. **Methods** Plasma glutathione (reduced form GSH and oxidized form GSSG) were measured by fluorescence spectrophotometry, reduced form NADPH and oxidized form NADP⁺ were measured by UV spectrophotometry in very period and recovery time. Redox status was evaluated by GSH/GSSG and NADPH/NADP⁺. **Results** The GSH/GSSG and NADPH/NADP⁺ redox status in plasma of patients deviated to pro-oxidative direction in the critical stage. **Conclusions** The imbalance and deviation to prooxidative direction of redox status closely related with the occurrence and development of epidemic encephalitis B.

【Key words】 Epidemic encephalitis B; Oxidation-reduction

流行性乙型脑炎(epidemic encephalitis B)是由乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)引起的以脑实质炎症为主要病变的中枢神经系统急性传染病。据报道,全球每年发病人数达4.5万,其中死亡人数1.0万,病死率约为25%,同时幸存者中有50%留有永久性神经或精神后遗症,如记忆力减退、认知障碍、行动失调、肌无力或瘫痪、语言或协调能力异常等^[1]。尽管疫苗的使用减少了一些国家的发病率,但流行性乙型脑炎尚无特异的抗病毒疗法。因而,探讨流行性乙型脑炎新的治疗方法成为目前研究的热点。

已有研究证实,活性氧在流行性乙型脑炎感染中发挥了重要作用,但流行性乙型脑炎患者机体氧化还原态如何改变目前尚鲜见报道。本研究分别对40例流行性乙型脑炎患者机体氧化还原态进行检测,以期对流行性脑炎的防治打开新视角。

资料和方法

一、研究对象

研究对象为40例2010至2011年于本院住院的流行性乙型脑炎患儿,其中男23例,女17例,年龄1~10岁,平均年龄3.9岁。其中接种疫苗者28例,未接种者9例,3例不详。全部为农村患儿,其中34例患儿家里养猪。所有病例按照杨绍基主编的《传染病学》(第7版)^[2]中流行性乙型脑炎诊断标准进行诊断和病程分期,每例患儿分别取发病极期和恢复期两份血清用于研究。以某幼儿园入园体检健康儿童血清作为对照,通过回顾性研究,比较健康儿童、流行性乙型脑炎极期患儿以及流行性乙型脑炎恢复期患者机体氧化还原态。本研究使用患者血液已告知患者家属并取得同意,并经本院伦理委员会讨论通过。

二、仪器设备及试剂

1. 主要仪器设备:低温冷冻离心机(20PR-52D, HITACHI),超低温保存箱(MDF-382E, 三洋),离心机(TDL-5-A, 上海安亭),高速冷冻离心机

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.04.014

作者单位: 430023 武汉市,湖北省武汉市医疗救治中心

通讯作者: 韩晓群, Email: 763633126@qq.com

(1-15K, Sigma)。

2. 主要试剂: GSH 和 GSSG、NADP⁺ 和 NADPH 试剂盒均由武汉巴菲尔生物有限公司提供。按照试剂盒说明书要求, 配制各种储备液及工作液。

三、血标本采集和贮存

取研究对象清晨空腹肘静脉3 ml, 抗凝, 低温离心后于-70 °C 冰箱保存, 用于实验数据检测。所有标本测定前置于室温复溶。

四、还原型谷胱甘肽和氧化型谷胱甘肽、NADPH 和 NADP⁺ 的测定

参照文献^[3]报道血清中 GSH 和 GSSG 水平、NADP⁺ 和 NADPH 水平分别采用比色法和酶联免疫吸附试验测定。

五、统计学处理

所有数据采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、患儿血清中谷胱甘肽氧化还原态

与健康对照组相比, 流行性乙型脑炎极期患儿血浆中 GSH 浓度显著降低, GSSG 浓度显著升高, GSH/GSSG 比值显著下降, 血浆中 GSH/GSSG 氧化还原态向氧化方向偏移; 随着疾病的恢复, 恢复期患儿血浆中 GSH 浓度升高, GSSG 浓度下降, GSH/GSSG 比值升高, 且恢复期患儿组与健康对照组相比, 血浆中 GSH、GSSG 浓度及 GSH/GSSG 比值差异无统计学意义, 见表 1。

二、患儿血清中辅酶 II 氧化还原态

与健康对照组相比, 流行性乙型脑炎极期患儿血浆中 NADPH 浓度显著降低, NADP⁺ 浓度显

著升高, NADPH/NADP⁺ 比值显著下降, 血浆中 NADPH/NADP⁺ 氧化还原态向氧化方向偏移; 随着疾病的恢复, 恢复期患儿血浆中 NADPH 浓度升高, NADP⁺ 浓度下降, NADPH/NADP⁺ 比值升高, 且恢复期患儿组与健康对照组相比, 血浆中 NADPH、NADP⁺ 浓度及 NADPH/NADP⁺ 比值差异无统计学意义。

讨 论

氧化还原态是指机体的氧化还原态势, 机体内存在各种氧化和抗氧化物质及相关酶类, 如 GSH 和 NADPH 等, 这些物质和酶类在维持机体氧化-抗氧化相对恒定过程中起着重要作用^[3-4]。有研究报道, 机体的氧化还原态可以通过测定血液的氧化还原态来进行反应^[5]。

GSH 系统是体内重要的抗氧化防御系统, 通过清除 ROS 来发挥其抗氧化作用, 亦可通过调节蛋白质的功能而改变细胞内氧化还原态^[6]。因而血浆中存在许多氧化还原对, 但 GSH/GSSG 氧化还原对被公认为是反映机体氧化还原态的常用指标。已有研究证实, 可以通过直接测定 GSH 和 GSSG 浓度, 运用 Nernst 方程计算氧化还原电位。氧化还原电位越高, 即氧化还原态越向氧化方向偏移, 与细胞的凋亡和分化相关; 氧化还原电位越低, 即向还原方向偏移, 与细胞增殖相关^[7-10]。而 NADPH/NADP⁺ 氧化还原对在维持 GSH/GSSG 平衡中发挥着重要作用^[11], 因而可将 GSH/GSSG 和 NADPH/NADP⁺ 作为评价机体氧化还原态的优选指标。

已有研究表明, 活性氧介导的氧化损伤在乙型肝炎的发生发展起着非常重要的作用^[12-13]。而丙型肝炎病毒感染与宿主的氧化还原态有密切关系, 宿

表1 流行性乙型脑炎患儿血清中谷胱甘肽氧化还原态 ($\bar{x} \pm s$)

研究对象	GSH (μmol/L)	GSSG (μmol/L)	GSH/GSSG
极期	253.84 ± 43.00	49.67 ± 2.50	5.88 ± 1.02
恢复期	354.28 ± 39.10	40.33 ± 1.50	8.78 ± 1.23
健康对照	359.85 ± 49.00	41.14 ± 1.50	8.74 ± 0.70

注: GSH、GSSG和GSH/GSSG分别在各组间两两比较: 极期 vs 恢复期: $t = -1.731, 2.525, -1.225, P = 0.027, 0.040, 0.026$; 极期 vs 健康对照: $t = -1.622, 1.156, -2.758, P = 0.049, 0.006, 0.028$; 恢复期 vs 健康对照: $t = -0.150, -3.357, -2.401, P = 0.105, 0.112, 0.147$

表2 流行性乙型脑炎患儿血清中辅酶 II 氧化还原态 ($\bar{x} \pm s$)

研究对象	NADPH (μmol/L)	NADP ⁺ (μmol/L)	NADPH/NADP ⁺
极期	1.27 ± 0.59	3.49 ± 0.31	0.36 ± 0.27
恢复期	1.96 ± 0.54	2.72 ± 0.43	0.72 ± 0.28
健康对照	2.13 ± 0.56	2.59 ± 0.25	0.82 ± 0.13

注: NADPH、NADP⁺和NADPH/NADP⁺分别在各组间两两比较: 极期 vs 恢复期: $t = -2.281, -4.875, 2.073, P = 0.005, 0.002, 0.047$; 极期 vs 健康对照: $t = -1.738, -19.307, -0.587, P = 0.025, 0.001, 0.036$; 恢复期 vs 健康对照: $t = -1.121, 16.042, -1.356, P = 0.157, 0.100, 0.217$

主肝脏、血液及淋巴细胞中 GSH 明显耗竭。本课题组前期研究已证实 HIV/AIDS 患者机体谷胱甘肽和辅酶 II 氧化还原态向氧化方向偏移^[14]。

Kumar等^[15]通过日本脑炎病毒感染大鼠后测定其脑部不同部位氧化抗氧化物质,结果显示,JEV能够诱导感染大鼠大脑皮质、纹状体、丘脑和中脑中抗氧化剂谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶和还原型谷胱甘肽等活性显著降低,其氧化-抗氧化系统失衡,而这种变化与神经元的定向损害是相对应的。本研究结果显示,无论是以GSH/GSSG氧化还原对计算,还是以NADPH/NADP⁺氧化还原对计算,流行性乙型脑炎患者极期机体氧化还原态均向氧化方向偏移,而患者恢复期机体氧化还原态与健康儿童差异无统计学意义。综上,机体的氧化还原态在流行性乙型脑炎发生、发展中发挥了一定的作用。

因而,在采用传统方法治疗流行性乙型脑炎的同时,可考虑对患者机体氧化还原态加以纠正,进而使得治疗达到更好的效果,从而为流行性乙型脑炎的治疗提供一个新思路。

参考文献

- 1 Unnia SK, Růžek D, Mishra R, et al. Japanese encephalitis virus: from genome to infectome[J]. *Microbes Infect*,2011,13(4):312-321.
- 2 杨绍基,任红主编. 传染病学[M]. 7版. 北京:人民卫生出版社,2008,1:92-98.
- 3 韩晓群,吴建红,伍仕敏,等. HIV/AIDS患者机体氧化还原态与血CD4⁺细胞计数相关性分析. 武汉大学学报(医学版),2012,33(3):81-84.
- 4 Hansen RE, Roth D, Winther JR. Quantifying the global cellular thioldisulfide status[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2009,106(2):422-427.
- 5 Caia GL, Efimova OV, Velayutham M, et al. Organ specific mapping of in vivo redox state in control and cigarette smoke-exposed mice using EPR/NMR co-imaging[J]. *J Magn Reson*,2012,216:21-27.
- 6 Wang QL, Wang SR, Ding Y, et al. Age-related changes of the redox state of glutathione in plasma[J]. *Chin Med J Engl*,2005,118(18):1560-1563.
- 7 Miecyl JJ, Gallogly MM, Qanungo S, et al. Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation[J]. *Antioxid Redox Signal*,2008,10(11):1941-1988.
- 8 Smith J, Ladi E, Mayer-Peuschel M, et al. Redox state is a central modulator of the balance between self-renewal and differentiation in a dividing glial precursor cell[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2000,97(18):10032-10037.
- 9 Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as view through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple[J]. *Free Radic Biol Med*,2001,30(11):1191-1212.
- 10 Jones DP. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance[J]. *Methods Enzymol*,2002,348:93-112.
- 11 Timme-Laragy AR, Jared V, Imhoff BR, et al. Glutathione redox dynamics and expression of glutathione-related genes in the developing embryo[J]. *Free Radic Biol Medicine*,2013,65:89-101.
- 12 Yap LP, Garcia JV, Han D, et al. The energy-redox axis in aging and age-related neurodegeneration[J]. *Adv Drug Deliv Rev*,2009,61(14):1283-1298.
- 13 Diana L, Diesen MD, Paul C, et al. Nitric oxide and redox regulation in the liver: Part I. General considerations and redox biology in hepatitis[J]. *J Surg Res*,2010,162(1):95-109.
- 14 韩晓群,熊悦安,周虹. HIV/AIDS 患者机体氧化还原态研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2012,6(2):144-146.
- 15 Kumar S, Misra UK, kalita J, et al. Imbalance in oxidant/antioxidant system in different brain regions of rat after the infection of Japanese encephalitis virus[J]. *Neurochemistry Int*,2009,55(7):648-654.

(收稿日期: 2013-10-12)

(本文编辑: 孙荣华)

陈凤文, 韩晓群. 流行性乙型脑炎患者机体氧化还原态初探[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2014, 8(4): 507-509.