

· 论 著 ·

非痴呆性血管性认知功能障碍患者 ChAT 和 CHE 活性变化及其临床意义*

王 凡¹, 李 毅², 肖 雁², 徐 源¹, 刘 健¹, 官志忠^{2△}

(1. 贵阳医学院附属医院神经外科, 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院分子生物学重点实验室, 贵阳 550004)

摘要:目的 通过检测非痴呆性血管性认知功能障碍(VCIND)患者胆碱乙酰转移酶(ChAT)及胆碱酯酶(CHE)活性的变化,初步探讨 VCIND 的发生机制。方法 选择 61 例 VCIND 患者作为研究组,其检测符合 Rockwood 认知功能障碍诊断标准但未达到 NINDS-ARIEN 血管性痴呆诊断标准。同期相匹配的 75 例健康者作为对照组,两组均清晨空腹抽取静脉血并分离血清。应用分光光度法检测血清 ChAT 及 CHE 活性。结果 血管性认知功能障碍组 ChAT 活性(120.94±23.93) U/mL 较对照组(64.88±12.23) U/mL 明显增高,差异有统计学意义($P<0.01$),CHE 活性两组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 VCIND 患者血清 ChAT 活性增加,促进乙酰胆碱的合成,可能是 VCIND 患者机体维持认知功能的一种代偿作用。

关键词:认知障碍;胆碱乙酰化酶;胆碱酯酶

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.28.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)28-3342-02

Study of the activities of ChAT and CHE in patients with non-dementia vascular cognitive impairment*

Wang Fan¹, Li Yi², Xiao Yan², Xu Yuan¹, Liu Jian¹, Guan Zhizhong^{2△}

(1. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou 550004, China;

2. Molecular Biology Laboratory of Guiyang Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, china)

Abstract: Objective To study of the activities of choline acetyltransferase(ChAT) and cholinesterase(CHE) in non-dementia vascular cognitive impairment (VCIND) patients, and explore its mechanism. **Methods** Sixty-one patients with VCIND were selected as the research group (which accord with Rockwood diagnostic criteria for cognitive dysfunction but not meet the NINDS-ARIEN diagnostic criteria for vascular dementia) and 75 healthy people in the same period as the control group. Venous blood was collected in the early morning and serum was separated in both of the two groups. The activities of ChAT and CHE were detected by spectrophotometric method. **Results** The activity of ChAT in the research group(120.94±23.93) U/mL was increased significantly than the control group(64.88±12.23) U/mL($P<0.01$), while there was no significant difference in CHE activity between the two groups($P>0.05$). **Conclusion** The increased activity of ChAT in VCIND patient and enhance the synthesis of acetylcholine, which may be a compensatory mechanism of VCIND.

Key words: cognition disorders; choline acetyltransferase; cholinesterase

近些年,血管性因素引发的认知障碍的发病率逐年上升。大量具有认知障碍但诊断又未达到血管性痴呆(vascular dementia, VaD)标准的患者没有得到及时的发现与治疗,就诊时往往已发展成中晚期血管性痴呆,丧失了最佳的预防和治疗时机,严重影响了中老年人群的健康和生活质量。血管性认知障碍(vascular cognitive impairment, VCI) 1993年由Hachinski等^[1]提出,目前VCI的概念涵盖非痴呆血管性认知障碍(vascular cognitive impairment no dementia, VCIND)、血管性痴呆(vascular dementia, VD)和混合性痴呆(伴有血管性因素的Alzheimer病)^[2]。乙酰胆碱是与中枢神经系统学习和记忆等认知功能关系十分密切的神经递质。胆碱乙酰转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)是乙酰胆碱的生物合成酶,乙酰胆碱酯酶(cholinesterase, CHE)是催化乙酰胆碱水解的主要生物酶,在乙酰胆碱代谢过程中起十分重要的作用。当ChAT活性下降, CHE活性增强时就会引起乙酰胆碱功能不足,从而影响认知功能。作者既往研究也发现CHE和ChAT活性改变与VaD发生密切相关^[3],可能是引起学习记忆能力下降的主

要因素之一,但在VCIND患者中胆碱能系统是否有类似的改变,在认知功能障碍早期中起何种作用还不清楚。本研究针对VCIND患者血液中这两种酶活性进行了研究,旨在研究VCI患者血液中胆碱能系统酶类的变化情况,以利于进一步探讨VCI的发生机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采集2010年10月至2012年6月贵阳医学院附属医院及附属白云医院就诊的VCIND患者61例(认知功能障碍组),其中男33例,女28例,年龄57~69岁,平均(62.47±2.97)岁。VCIND诊断标准采用Rockwood诊断标准^[4],结合美国国立神经疾病和卒中研究所-加拿大卒中网血管性认知障碍统一标准(2006)中建议的神经心理测评指标。认知损害程度未达到NINDS-ARIEN血管性痴呆诊断标准,但满足下述血管性认知损害标准:(1)患者有获得性认知障碍,据病史推断比以前的认知功能水平有所下降并得到认知检查证实。“蒙特利尔认知评估(MoCA)”(北京版)神经心理学测验标准小于26分。(2)临床特点提示为血管源性病因并至

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81260173),贵州省科技厅基金项目(黔科合J字2012[2055])。 作者简介:王凡(1975~),博士,主要从事血管性痴呆诊疗研究。 △ 通讯作者, Tel:13885169713; E-mail:zhizhongguan@yahoo.com。

少满足下列各项中的 2 项:①急性起病;②阶梯式恶化;③波动性病程;④有自动恢复期;⑤起病或加重与脑卒中或低灌注有关(如心律失常、术中低血压);⑥局灶性神经系统症状;⑦局灶性神经系统体征。(3)存在局灶性神经系统体征或脑缺血的神经影像学证据。

同期采集在贵阳医学院附属医院及附属白云医院体检人群中年龄、性别和受教育程度与病例组匹配者 75 例为对照组,男 35 例,女 30 例,年龄 55~67 岁,平均(61.56±3.25)岁。经询问病史、体格检查和颅脑影像学检查排除中枢神经系统疾病,血压、血糖、血脂、肝功能和心电图检查均正常,MoCA≥26 分,简易精神状态检查(MMSE)正常,日常生活能力量表(IADL)<20 分。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 分光光度计,水浴箱(上海医学仪器厂)。ChAT 及 CHE 活性测定试剂盒购自南京建成生物科技有限公司。

1.2.2 血清标本的采集 在知情同意原则下采集受检者空腹静脉血 2 mL 于含干燥非抗凝管中(购于湖南省浏阳市医用器具厂),全血 4 000 r/min 离心 5 min,分离血清冻存于-80℃保存。

1.2.3 ChAT 活性的测定 ChAT 的测定是以乙酰辅酶 A 和胆碱为底物,在 ChAT 的作用下,反应的生成物和显色剂结合,在 324 nm 处测定吸光度,计算 ChAT 的活力。按试剂盒说明书进行对照组及认知功能障碍组血浆酶活力测定。设定在 pH7.2 条件下,37℃时每毫升血清每分钟转移 1 μmol 乙酰基给胆碱的能力定义为一个酶活力单位。

1.2.4 CHE 活性测定 血液中 CHE 能使乙酰胆碱水解成胆碱和乙酸,未被分解的剩余乙酰胆碱与羟胺作用生成乙酰羟胺,再与铁离子在酸性溶液中形成棕色复合物,在 520 nm 处测定吸光度,按公式计算出酶的活力。实验按试剂盒说明书进行。将每毫升血清在 37℃和底物作用 20 min,分解 1 μmol 乙酰胆碱为 1 个活力单位。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多个样本均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

各组血清 ChAT 及 CHE 活性测定结果显示,认知功能障碍组患者血清 ChAT 活力[(120.94±23.93)U/mL]明显高于对照组[(64.88±12.23)U/mL],差异有统计学意义($P < 0.01$);而认知功能障碍组患者血清 CHE 活性[(61.24±8.17)U/mL]与对照组[(58.35±7.69)U/mL]比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

认知功能障碍已成为影响中老年人健康及生活质量的重要疾病之一,其患病率呈逐年递增趋势,也是脑卒中患者常见的并发症之一^[5]。VCI 的概念包括与脑血管病有关的所有不同程度的认知功能减退。加拿大健康和老年研究中对 10 263 例随机选择的 65 岁以上社区居民和住院患者的纵向随访观察,发现 VCIND 患者 5 年后痴呆发生率为 46%^[6]。如果对临床 VCINC 患者尽早进行识别、干预,将极大改善患者预后,即减缓或阻止其发展成血管性痴呆。因此,探讨血管性认知损害尤其是早期改变并提出更敏感、特异的临床评价指标具有十分重要意义。

乙酰胆碱是脑内广泛分布的一种重要的神经递质,参与注意力、记忆及认知等过程,任何原因导致的痴呆都有可能引起中枢神经系统乙酰胆碱功能障碍,将有可能导致学习、记忆等认知功能下降^[7]。有研究发现,CHE 抑制剂加兰他敏能抑制 CHE 的活性,从而降低其对乙酰胆碱的分解,增加乙酰胆碱的含量,加兰他敏应用在 VaD 患者的临床治疗中取得一定疗效,如能改善患者的学习记忆力,提高 ADAS 评分等^[8-10]。

乙酰胆碱通过胆碱能尼古丁受体发挥生物学效应,它的不足直接影响中枢胆碱能的通路(学习记忆的主要通路)。而 CHE 是胆碱能神经递质乙酰胆碱的水解酶,直接参与神经功能调节、大脑思维、记忆等重要功能,当海马与大脑皮质细胞 CHE 减少时,脑内的乙酰胆碱水平下降,学习记忆能力随之下降^[11]。作者的前期研究也发现对于 VaD 患者,其血清中 CHE 的活性是明显降低的,而此次针对 VCIND 患者的研究表明血清 CHE 的活性无明显变化,ChAT 的活性较对照组明显升高,从而增加血中乙酰胆碱的合成,这可能是 VCIND 患者针对脑中胆碱功能减退的一种代偿机制^[12],同时表明对于 VCI 早期胆碱能神经功能轻微降低时 ChAT 的代偿作用更为灵敏。下一步的研究将继续研究 VCI 患者的认知评分与 ChAT 的关联性,进一步探讨其与 VCI 发生发展的关系,探讨 VCI 的发生机制。

参考文献:

- [1] Hachinski VC, Bowler JV. Vascular dementia[J]. *Neurology*, 1993, 43(20): 2159-2160.
- [2] Lee AY. Vascular dementia[J]. *Chonnam Med*, 2011, 47(2): 66-71.
- [3] Xiao Y, Guan ZZ, Wu CX, et al. Correlations between cholinesterase activity and cognitive scores in post-ischemic rats and patients with vascular dementia[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2012, 32(3): 399-407.
- [4] Rockwood K, Howard K, Macknight C, et al. Spectrum of disease in vascular cognitive impairment[J]. *Neuroepidemiology*, 1999, 18(2): 248-254.
- [5] Black S. Dementia; poststroke dementia—an underestimated burden[J]. *Nat Rev Neurol*, 2010, 6(6): 302-304.
- [6] Ingles JL, Boulton DC, Fisk JD, et al. Preclinical vascular cognitive impairment and Alzheimer disease: neuropsychological test performance 5 years before diagnosis[J]. *Stroke*, 2007, 38(4): 1148-1153.
- [7] Wang J, Zhang HY, Tang XC. Cholinergic deficiency involved in vascular dementia; possible mechanism and strategy of treatment[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30(7): 879-888.
- [8] Senanarong V, Pongvarin N, Phanthumchinda K, et al. Safety and tolerability of galantamine in possible Alzheimer's disease with or without cerebrovascular disease and vascular dementia in Thai patients[J]. *J Med Assoc Thai*, 2009, 9(1): 12-18.
- [9] Pepeu G, Giovannini MG. Cholinesterase inhibitors and memory[J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 187(1/3): 403-408.
- [10] Venneri A, McGeown WJ, Shanks MF. (下转第 3346 页)

素。正常神经管关闭期间,细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(CKIs)作为重要的细胞周期抑制因子,通过抑制细胞从 G₁ 期到 S 期的转化进入 DNA 合成,从而确保蛋白质复合物的准确组装,从而调节正常有序的细胞分化^[2-3]。

本课题组在前期的实验发现正常神经管形成前后及 RA 诱导产生 NTD 后 P57kip2 基因表达有明显差异,P57kip2 在神经管形成前后表达显著上调,而在 RA 诱导产生 NTD 中,P57kip2 表达在 E9.5 d、E10.5 d 两个时相点呈现一致变化,呈现下调趋势^[4]。表明在神经管关闭期间,RA 作用后,P57kip2 的表达水平降低,从而促进细胞从 G₁ 期到 S 期的转化,干扰了神经祖细胞的定向分化,致使细胞周期相关因子的监管功能失控,导致正常细胞不能有序分化,形成发育缺陷的神经管。提示 P57kip2 是一种重要的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子,参与了细胞周期调控、促进凋亡、诱导分化^[5]。可能通过调控转录和翻译过程,调节细胞周期,控制细胞基因和蛋白质的结构^[6]。但在神经胚形成时期,在 RA 的干扰下 P57kip2 的作用途径是否发生了改变,尚需进一步探讨。

通过进一步实验课题组发现正常神经管形成前后及 RA 诱导产生 NTD 后 CDK5 基因表达差异明显,CDK5 在神经管形成前后表达显著上调,而在 RA 诱导产生 NTD 中,CDK5 表达在 E9.5 d、E10.5 d 两个时相点呈现一致变化,呈现下调趋势。CDK5 在细胞分裂中的作用尚不明确。CDK5 是 CDK 的家庭成员,是一种多功能蛋白质,在神经系统的发育和分化过程中发挥独特的作用。研究表明,CDK5/P35 能调节磷酸化的微管相关蛋白,促进神经细胞的迁移、轴突生长与导向,并在神经细胞的发育过程中起支持细胞骨架动力的作用^[7],在神经系统发育成熟过程中扮演了重要角色,其表达随着细胞逃逸出细胞周期而逐渐升高^[8-9]。Trunova 等^[10]通过敲除小鼠的 CDK5 基因获得 NTD 模型,甚至出现胚胎期致使的严重缺陷,提示 CDK5 是 CNS 发育必要的关键基因之一。实验结果提示 RA 作用后 CDK5 表达下调,推测可能通过减少 CDK5 数量,降低 CKIs 抑制因子与 CDK5 的结合力,导致细胞从 G₁ 期到 S 期的转化过程抑制减弱,使 DNA 蛋白的正确组装受到干扰,从而干扰细胞的正常有序的分化,促进了神经管的发育缺陷。目前 RA 和 CDK5 之间具体作用机制的细节尚不明确,须进一步探索研究。

实验结果显示 P57kip2、CDK5 基因参与了 NTD 的发生过程,但对其具体作用机制尚不明确,虽然国内部分学者对其进行了较深入的研究^[11-12],但其作用机制的细节问题还不清楚,需进一步研究。

参考文献:

[1] 肖坤则,张芝燕,高健,等.中国神经管缺陷的流行病学

(上接第 3343 页)

Responders to ChEI treatment of Alzheimer's disease show restitution of normal regional cortical activation [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2009, 6(2): 97-111.

[11] 肖雁,吴昌学,黄勇,等.通复方制剂对血管性痴呆大鼠学习记忆及胆碱酯酶活性的影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2010, 30(8): 627-630.

[J]. *中华医学杂志*, 1989, 69(4): 189.

[2] Klootwijk R, Schijvenaars MM, Mariman EC, et al. Further characterization of the genetic defect of the Bent tail mouse, a mouse model for human neural tube defects [J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2004, 70(11): 880-884.

[3] Joseph B, Hermanson O. Molecular control of brain size: regulators of neural stem cell Life, death and beyond [J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316(8): 1415-1421.

[4] 李新军, 韩杨云, 徐宏, 等. p57kip2 在神经管发育过程中的表达差异 [J]. *中国临床神经外科杂志*, 2012, 17(8): 479-481.

[5] Tury A, Mairet-Coello G, Dicicco-Bloom E. The cyclin-dependent kinase inhibitor p57Kip2 regulates cell cycle exit, differentiation, and migration of embryonic cerebral cortical precursors [J]. *Cereb Cortex*, 2011, 21(8): 1840-1856.

[6] Pateras IS, Apostolopoulou K, Niforou K, et al. p57KIP2: "Kip"ing the cell under control [J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(12): 1902-1919.

[7] Saito T, Onuki R, Fujita Y, et al. Developmental regulation of the proteolysis of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator by phosphorylation. *J Neurosci*. 2003, 23(4): 1189-1197.

[8] Blondel M, Meijer L. Editorial: role of cyclin-dependent kinase-5(Cdk5) in the central nervous system. *Biotechnol J*. 2007, 2(8): 914-915.

[9] Cheung ZH, Ip NY. Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases [J]. *Trends Cell Biol*, 2012, 22(3): 169-175.

[10] Trunova S, Giniger E. Absence of the Cdk5 activator p35 causes adult-onset neurodegeneration in the central brain of *Drosophila* [J]. *Dis Model Mech*, 2012, 5(2): 210-219.

[11] 马向东, 吴小明, 马兴, 等. 胚胎先天性神经管缺陷的表达差异基因及信号传导 [J]. *第四军医大学学报*, 2008, 29(19): 1737-1740.

[12] 李新军, 杨忠, 曾义, 等. 维甲酸诱导神经管发育缺陷相关基因表达验证 [J]. *中华神经外科杂志*, 2012, 28(12): 1279-1283.

(收稿日期: 2013-05-06 修回日期: 2013-07-22)

[12] Park D, Lee HJ, Kim SU, et al. Human neural stem cells over-expressing choline acetyltransferase restore cognition in rat model of cognitive dysfunction [J]. *Exp Neurol*, 2012, 234(2): 521-526.

(收稿日期: 2013-05-27 修回日期: 2013-06-15)