

• 论著-研究报告 •

老年心肺慢性疾病中氧化应激指标的变化差异分析

程小欢¹ 袁佳仪² 荣伽玲² 干学东³ 徐献群¹ 陈薇¹ 胡汉宁¹

[摘要] **目的:**分析冠状动脉粥样硬化性心脏病(CAD)和慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者血清中超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)浓度,评估 CAD 和 COPD 患者体内氧化应激状态的变化差异,探讨这 2 个指标在临床的应用价值。**方法:**收集 49 例健康体检者、66 例确诊为 COPD 和 65 例确诊为 CAD 患者的血清标本,测量其 SOD 活性;收集 41 例健康体检者、50 例确诊为 COPD 和 86 例确诊为 CAD 患者的血清标本,测量其 MDA 浓度,进行统计学分析。**结果:**与健康对照相比,CAD 和 COPD 患者血清中 SOD 活性均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与健康对照相比,CAD 患者血清中 MDA 浓度略下降,差异无统计学意义($P = 0.2287$),COPD 患者血清中 MDA 浓度显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**在老年慢性心肺疾病患者血清中均存在氧化应激的异常变化,COPD 患者血清氧化应激紊乱更突出。建议以 SOD 活性作为 CAD 的预警指标,而 SOD 和 MDA 浓度均可以作为 COPD 的预警指标。从 ROC 曲线下面积来看,SOD 作为 COPD 的预警指标更好。

[关键词] 冠状动脉粥样硬化性心脏病;慢性阻塞性肺疾病;氧化应激;超氧化物歧化酶;丙二醛

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2020.06.007

[中图分类号] R541.4 **[文献标志码]** A

Discrepancy of oxidative stress in elderly patients with chronic cardiopulmonary diseases

CHENG Xiaohuan¹ YUAN Jiayi² RONG Jialing² GAN Xuedong³
XU Xianqun¹ CHEN Wei¹ HU Hanning¹

(¹Department of Laboratory Medicine, Central South Hospital of Wuhan University, Wuhan, 430071, China; ²Department of Medical Laboratory, Second Clinical College of Wuhan University School of Medicine; ³Department of Cardiology, Central South Hospital of Wuhan University)
Corresponding author: GAN Xuedong, E-mail: dhgxd319@sohu.com

Abstract Objective: To evaluate the status of oxidative stress in patients with coronary artery heart disease (CAD) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), detect serum superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) concentrations, and explore the clinical values of these two indicators. **Method:** Serum samples were collected from 49 healthy subjects, 66 patients diagnosed with COPD and 65 patients diagnosed with CAD, and their SOD activity was measured. Serum samples were collected from 41 healthy subjects, 50 patients diagnosed with COPD, and 86 patients diagnosed with CAD, and their MDA concentrations were measured. Statistical analysis was performed using SPSS. **Result:** Compared with healthy controls, serum SOD activity was significantly lower in patients with CAD and COPD, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); compared with the control group, serum MDA concentration in patients with CAD decreased slightly, the difference was not statistically significant ($P = 0.2287$). Serum MDA concentration in patients with COPD was significantly increased and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** There is an abnormality of oxidative stress in serum of the patients with chronic cardiopulmonary disease. There is a dominant oxidative stress disorder in serum of the patients with COPD disease. We recommend SOD activity as a prediction index of CAD, while SOD and MDA concentrations both as prediction indexes of COPD. SOD could be used as a valuable prediction marker for COPD based on the ROC curve.

Key words coronary artery heart disease; chronic obstructive pulmonary disease; oxidative stress; superoxide dismutase; malondialdehyde

冠状动脉粥样硬化性心脏病 (coronary athero-

sclerotic heart disease, CAD) 一直是人类非传染性疾病死亡的首要原因^[1-2]。通常认为高脂血症和炎症反应对 CAD 的发生有重要影响,而新近研究发现氧化应激在 CAD 疾病进程中也发挥一定作用。

¹ 武汉大学中南医院检验科 (武汉, 430071)

² 武汉大学医学院第二临床学院医学检验系

³ 武汉大学中南医院心血管内科

通信作者: 干学东, E-mail: dhgxd319@sohu.com

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种以持续气流受限为特征的慢性炎症性肺疾病。目前无法仅靠临床病理特征或胸部 X 线检查结果确诊,需结合病理特征及肺活量测定以辅助诊断^[3-4]。但在老年人中,肺活量测定的方法常导致过度诊断,因此需要一种能够与临床病理特征结合的新型指标来进行辅助预警诊断。

氧化应激是体内氧化剂与抗氧化剂的不平衡,其中氧代谢物通常以活性氧(reactive oxygen species, ROS)表示。导致 CAD 的危险因素,如吸烟,环境污染,辐射等外源性氧化剂会致使体内氧化还原状态失衡,使脂质过氧化,蛋白质羰基化, DNA 损伤,造成炎症反映和血管受损^[5-6]。而炎症反应和血管受损会促进内源性氧化剂生成而造成恶性循环^[7-9]。由于体内 ROS 的半衰期短,直接测量难度大,故可通过测量抗氧化物酶或者氧化产物来间接反应体内 ROS 的含量和氧化损伤程度。

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)在保护细胞免受氧化损伤中起着重要的作用^[8]。SOD 在氧化应激状态下被激活,在相应氧化应激组织如肺部和血管内皮中活性增加,但在血清中活性下降^[9]。

ROS 作用于生物膜中的多不饱和脂肪酸使脂质过氧化生成丙二醛(malondialdehyde, MDA)和 4-羟基-2-壬烯醛(4-hydroxy-2-nonenal, 4-HNE)等产物^[10-11],其中 MDA 能引起细胞代谢及功能障碍,甚至损伤或死亡^[8,12]。测试 MDA 的量常可反映机体内脂质过氧化的程度,间接地反映出细胞损伤的程度。

1 对象与方法

1.1 研究对象

采集我院经冠脉造影术确诊至少有 1 支动脉狭窄 $\geq 50\%$ 的患者资料,收集其在行冠脉造影术之前的血清测量 SOD 活性和 MDA 浓度。我院确诊为 COPD 的患者,收集其在用药前的血清测量 SOD 活性和 MDA 浓度。我院生化与血常规检测均正常且无恶性肿瘤、CAD、COPD 等血管性疾病和呼吸性疾病的健康体检者,测量其血清 SOD 活性和 MDA 浓度。所有对象均抽取静脉血 3 ml,分离血清待测。

1.2 试剂与器材

超氧化物歧化酶测定试剂盒(皖食药监械生产许 20160012 号),丙二醛(MDA)测试盒(南京建成生物工程研究所),BECKMAN 生化分析仪(AU5800)。

1.3 研究方法

1.3.1 SOD 测量方法 邻苯三酚自氧化法:在碱性工作液中邻苯三酚会自氧化显色反应,在其自氧

化过程中不断释放超氧阴离子自由基($\cdot O_2^-$),自氧化反应强度高时释放出的自由基浓度就高,反之释放出的自由基浓度就低。当 SOD 活性降低时,歧化反应被抑制,自由基浓度升高,从而抑制邻苯三酚的自氧化,其反应强度弱,即反应中邻苯三酚自氧化的显色反应强度与 SOD 的活性呈正相关。在 405 nm 的波长下测量其吸收度值,并计算血清中 SOD 浓度。

血清中 SOD 在 2~8℃ 可稳定 7 d,但由于 SOD 会被消耗,故此实验所有 SOD 值均在研究对象抽血后 6 h 内测量。

1.3.2 MDA 测量方法 硫代巴比妥酸法:过氧化脂质降解产物中的 MDA 可与硫代巴比妥酸(TBA)缩合,形成红色产物,在 532 nm 处有最大吸收峰。本实验方法测定的血清样品在 4℃ 放置 3~5 d 测试结果不变,-20℃ 下可保存 3~6 个月。故此实验所有血清在收集后均置于-80℃ 冰箱保存,在 6 个月内测定 MDA 值。

1.4 统计学处理

使用 Graphpad Prism 5 作图并进行统计学处理。所有定量数据采用非配对 *t* 检验进行,以 $\bar{x} \pm s$ 来表示,定义 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 方法学性能验证

对实验方法进行性能验证,得到 SOD 批内 CV: 2.53%,批间 CV: 6.83%,检测线性范围:10~250 U/ml;MDA 批内 CV: 6.60%,批间 CV: 8.57%,检测线性范围:0~10 nmol/ml。

2.2 CAD 患者 SOD 活性及 ROC 曲线

与健康对照相比,CAD 患者血清中 SOD 活性显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。原始数据中 CAD 组的年龄显著高于健康对照组,将 CAD 患者按年龄 55 岁为界分组,定义 > 55 岁为高龄组, ≤ 55 岁为低龄组,发现高龄组血清中 SOD 活性显著低于低龄组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。将健康对照组和 CAD 组样本按年龄进行筛选匹配,并比较 SOD 值,发现与健康对照相比,CAD 患者血清中 SOD 活性还是显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

绘制 ROC 曲线,其曲线下面积(area under curve, AUC)为 0.71,最佳 cut-off 值为 SOD < 158.9 U/ml,此时,灵敏度为 47.69%,特异度为 95.92%,见图 1。

2.3 CAD 患者 MDA 浓度

与健康对照相比,CAD 患者血清中的 MDA 浓度略下降,差异无统计学意义($P = 0.2287$)。

2.4 COPD 患者 SOD 活性及 ROC 曲线

与健康对照相比,COPD 患者血清中 SOD 活

性显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。原始数据中 COPD 组的年龄显著高于健康对照组,故将 2 组按年龄进行筛选匹配,并比较 SOD 值,发现与健康对照相比,COPD 患者血清中 SOD 活性还是显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 5。

表 1 CAD 患者与健康对照血清中 SOD 值比较

组别	例数	年龄/岁	男:女 /例	SOD/ (U · mL ⁻¹)
CAD 组	65	62.75 ± 11.37	56 : 9	160.46 ± 30.43 ¹⁾
健康对 照组	49	55.80 ± 7.58	23 : 26	180.36 ± 14.53

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 2 不同年龄 CAD 患者血清中 SOD 值比较

组别	例数	年龄/岁	SOD/ (U · mL ⁻¹)
高龄组	48	68.10 ± 7.75	153.80 ± 29.86 ¹⁾
低龄组	17	47.65 ± 3.88	179.27 ± 23.31

与低龄组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 3 调整年龄差异后 CAD 患者与健康对照血清中 SOD 值比较

组别	例数	年龄/岁	男:女 /例	SOD/ (U · mL ⁻¹)
CAD 组	57	60.18 ± 9.61	51 : 6	164.31 ± 28.58 ¹⁾
健康对 照组	34	59.44 ± 5.92	18 : 16	177.41 ± 15.14

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

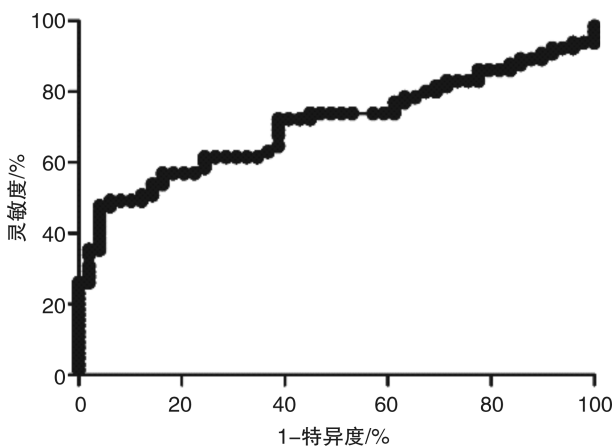


图 1 血清 SOD 预警 CAD 的 ROC 曲线

绘制 ROC 曲线,其 AUC 为 0.92,最佳 cut-off 值为 SOD < 160.4 U/ml,此时,灵敏度为 78.33%,

特异度为 95.92%,见图 2。

表 4 COPD 患者与健康对照血清中 SOD 值比较

组别	例数	年龄/岁	男:女 /例	SOD/ (U · mL ⁻¹)
COPD 组	66	71.36 ± 8.68	60 : 6	141.16 ± 23.66 ¹⁾
健康对 照组	49	55.80 ± 7.58	23 : 26	180.36 ± 14.53

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 5 调整年龄差异后 COPD 患者与健康对照血清中 SOD 值比较

组别	例数	年龄/岁	男:女 /例	SOD/ (U · mL ⁻¹)
COPD 组	37	65.32 ± 5.95	37 : 0	147.64 ± 23.22 ¹⁾
健康对 照组	22	62.73 ± 4.81	9 : 13	176.00 ± 15.84

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

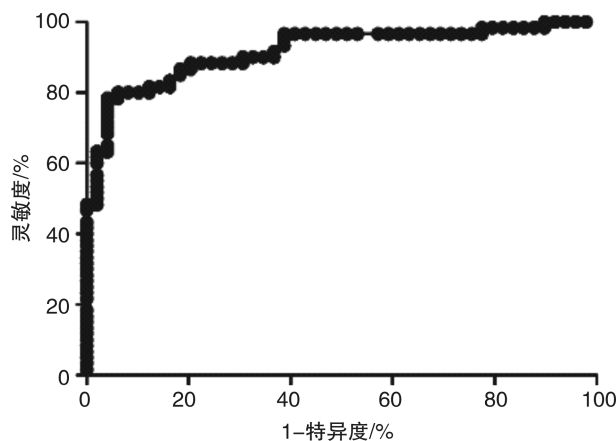


图 2 血清 SOD 预警 COPD 的 ROC 曲线

2.5 COPD 患者 MDA 浓度及 ROC 曲线

与健康对照相比,COPD 患者血清中 MDA 浓度显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 6。原始数据中 COPD 组的年龄显著高于健康对照组,以 COPD 患者和对照的年龄均值 63 岁为界分组,定义 >63 岁为高龄组,≤63 岁为低龄组,发现高龄组血清中 MDA 活性显著高于低龄组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 7。原始数据中 COPD 组的年龄显著高于健康对照组,故将 2 组按年龄进行筛选匹配,并比较 MDA 值,发现与健康对照相比,COPD 患者血清中 MDA 浓度还是显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 8。

绘制 ROC 曲线,其 AUC 为 0.77,最佳 cut-off 值为 MDA > 3.164 nmol/ml,此时,灵敏度为 78.00%,特异度为 68.29%,见图 3。

表 6 COPD 患者与健康对照血清中 MDA 值比较

组别	例数	年龄/岁	男:女 /例	MDA/ (nmol·mL ⁻¹)
COPD 组	50	71.36±8.68	60:6	3.61±0.82 ¹⁾
健康对 照组	41	54.20±9.33	20:21	2.87±0.64

与对照组比较,¹⁾P<0.05。

表 7 不同年龄 COPD 患者与健康对照血清中 MDA 值比较

组别	例数	年龄/岁	MDA/ (nmol·mL ⁻¹)
高龄组	49	73.61±6.89	3.57±0.87 ¹⁾
低龄组	42	52.05±5.84	2.98±0.74

与低龄组比较,¹⁾P<0.05。

表 8 调整年龄差异后 COPD 患者与健康对照血清中 MDA 值比较

组别	例数	年龄/例	男:女 /例	MDA/ (nmol·mL ⁻¹)
COPD 组	22	64.05±6.23	22:0	3.87±1.52 ¹⁾
健康对 照组	19	61.79±8.40	11:8	3.02±0.36

与对照组比较,¹⁾P<0.05。

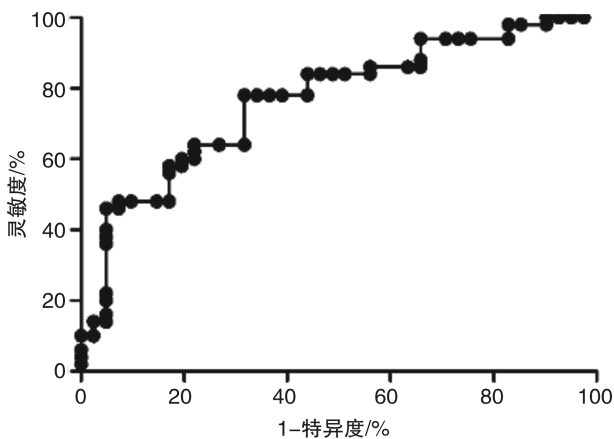


图 3 血清 MDA 预警 COPD 的 ROC 曲线

3 结论

CAD 和 COPD 分别为心血管疾病和呼吸系统疾病,但同为老年心肺慢性疾病,两者在世界范围内的致死率一直居高不下,虽其机制十分复杂,但氧化应激在其中都扮演着较为重要的角色。ROS 主要通过影响内皮保护因子 NO 的浓度^[20]和促进巨噬细胞吞噬 oxLDL 形成泡沫细胞^[13-14]以促进动脉粥样硬化的发展。而在 COPD 中,ROS 主要通过促进机体的炎症反应以及破坏蛋白酶/抗蛋白酶的平衡以加重 COPD 患者的气流受限^[7,9]。

本研究结果表明 CAD 患者血清中的 SOD 活性显著低于健康对照组,差异有统计学意义。将 CAD 患者和对照按照年龄和性别进行分组后,发现高龄组中的 SOD 活性显著低于低龄组,为了判断年龄是否对 SOD 产生影响,将两组样本进行年龄筛选匹配后重新分析,发现 CAD 患者血清中 SOD 活性还是显著降低,差异有统计学意义(P<0.05)。说明 CAD 患者血清中 SOD 活性的下降与疾病的发生有关。

CAD 患者血清中的 MDA 与健康对照组比较差异无统计学意义,与多数研究者的结果不符,分析其可能是由于 CAD 患者服用降脂降糖等药物的干扰作用,但具体原因需要进一步的研究。

与健康对照相比,COPD 患者血清中 SOD 活性显著降低,差异有统计学意义(P<0.05),且 ROC 曲线下面积高达 90% 以上。2 组按年龄进行筛选匹配,并比较 SOD 值,发现与健康对照相比,COPD 患者血清中 SOD 活性还是显著降低,确认 COPD 患者血清中 SOD 活性的下降与疾病的发生有关。

COPD 患者因其接触危险因素如吸烟、空气污染或职业粉尘等原因易使体内外源性 ROS 增多,而其炎症反应易使其内源性 ROS 增多^[7]。在内源性和外源性 ROS 的作用下,COPD 患者体内的氧化应激显著增强,导致 SOD 等抗氧化物酶的消耗,故血清中 SOD 活性下降。

由于 COPD 患者体内受到多种内外源性的 ROS 的攻击,细胞膜和血清 LDL 磷脂上的多不饱和脂肪酸也被 ROS 攻击过氧化生成 MDA 等产物,故血清中的 MDA 含量增高,间接反映体内细胞在氧化应激下受氧化受损的程度。

COPD 患者和健康对照按照年龄分组后发现,高龄组的 MDA 浓度显著高于低龄组。为了判断年龄是否对 MDA 产生影响,将 2 组样本进行年龄筛选匹配后重新分析,发现 COPD 患者血清中 MDA 活性还是显著降低,差异有统计学意义(P<0.05),说明确实与疾病本身的发生相关。

虽然 SOD 活性在 CAD 患者和 COPD 患者中都显著下降,但其在这两种疾病中的诊断价值有所区别。通过 ROC 曲线可知,SOD 活性在这两种疾病诊断中的特异性都高于敏感性,说明其对疾病的误诊率较低,尽管其在诊断 CAD 时的 0.7<AUC<0.9,说明其在作为 CAD 的预警断指标时有一定的价值;在诊断 COPD 时的 AUC>0.9,说明其在作为 COPD 的预警和诊断指标时有很高的价值^[15],但其诊断的灵敏度只有 78.33%,判断其在筛查中的漏诊可能性较大,故还是需要与临床特征相结合。这个结论与 Ambade 等^[16]的研究结果相似,其用 SOD3 作为诊断指标绘制 COPD 患者和

正常对照的 ROC 曲线,得到 AUC 为 0.8,灵敏度为 0.73,特异度为 0.82。

而 MDA 浓度在 COPD 患者中显著升高,尽管通过 ROC 曲线可知其 AUC 为 0.75,说明其在作为 COPD 的预警指标时有一定的准确度。

由于时间原因,本实验还有许多局限性,比如未在试验前匹配患者与健康对照的年龄和性别,之后的实验可将性别和年龄也纳入分析。

体内的氧化应激是一个复杂的程序,涉及的体内物质的变化有 ROS 如超氧阴离子的浓度的升高,抗氧化酶如过氧化氢酶、过氧化物酶、谷胱甘肽氧化酶等活性的变化,想要更精确地衡量机体氧化应激状态,应测量更多氧化应激指标,并进行联合分析。

参考文献

- [1] Sanchis-Gomar F, Perez-Quilis C, Leischik R, et al. Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome[J]. *Ann Transl Med*, 2016, 4:256.
- [2] Zhu KF, Wang YM, Zhu JZ, et al. National prevalence of coronary heart disease and its relationship with human development index: A systematic review[J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2016, 23:530—543.
- [3] Yang IA, Brown JL, George J, et al. COPD-X Australian and New Zealand guidelines for the diagnosis and management of chronic obstructive pulmonary disease; 2017 update[J]. *Med J Aust*, 2017, 207:436—442.
- [4] Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 195:557—582.
- [5] Güder G, Brenner S, Angermann CE, et al. "GOLD or lower limit of normal definition? a comparison with expert-based diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease in a prospective cohort-study"[J]. *Respir Res*, 2012, 13:13.
- [6] Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine[J]. *Redox Biol*, 2015, 4:180—183.
- [7] Boukhenouna S, Wilson MA, Bahmed K, et al. Reactive Oxygen Species in Chronic Obstructive Pulmonary Disease[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018:5730395.
- [8] 俞建, 钱琦. 稳定性心绞痛患者 SIRT1 表达与氧化应激的相关性研究[J]. *南京医科大学学报*, 2017, 37(5):637—8.
- [9] Horváth I, MacNee W, Kelly FJ, et al. "Haemoxygenase-1 induction and exhaled markers of oxidative stress in lung diseases", summary of the ERS Research Seminar in Budapest, Hungary, September, 1999[J]. *Eur Respir J*, 2001, 18:420—430.
- [10] Gheddouchi S, Mokhtari-Soulimane N, Merzouk H, et al. Low SOD activity is associated with overproduction of peroxynitrite and nitric oxide in patients with acute coronary syndrome[J]. *Nitric Oxide*, 2015, 49:40—46.
- [11] Perry JJ, Shin DS, Getzoff ED, et al. The structural biochemistry of the superoxide dismutases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1804:245—262.
- [12] Lewandowski Ł, Kepinska M, Milnerowicz H. The copper-zinc superoxide dismutase activity in selected diseases[J]. *Eur J Clin Invest*, 2019, 49:e13036.
- [13] Binder CJ, Papac-Milicevic N, Witztum JL. Innate sensing of oxidation-specific epitopes in health and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16:485—497.
- [14] Steinberg D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update [J]. *J Lipid Res*, 2009:S376—381.
- [15] Yan L, Tian L, Liu S. Combining large number of weak biomarkers based on AUC[J]. *Stat Med*, 2015, 34:3811—3830.
- [16] Ambade VN, Sontakke AN, Barthwal MS, et al. Diagnostic Utility of Biomarkers in COPD [J]. *Respir Care*, 2015, 60:1729—1742.

(收稿日期:2019-11-12)