

单核白细胞的琥珀酸及琥珀酸脱氢酶作为慢性阻塞性肺疾病患者线粒体快速适应缺氧的标志。

SUCCINATE AND SUCCINATE DEHYDROGENASE OF MONONUCLEAR BLOOD LEUKOCYTES AS MARKERS OF ADAPTATION OF MITOCHONDRIA TO HYPOXIA IN PATIENTS WITH EXACERBATION OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

目的：研究单核白细胞的琥珀酸浓度和琥珀酸脱氢酶 (SDG) 活性作为慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 患者恶化时线粒体快速适应缺氧的标志。

材料与方法。该研究包括58名COPD患者和13名40-75岁的假定健康志愿者。根据 GOLD 2018综合评估原则，患者分为B组 (n=18)、C组 (n=20)、D组 (n=20)。患者的年龄、FEV₁水平、包/年指数都是可以相比较的。D组患者的低氧血症比其他患者更明显。从血液中分离的单核白细胞中来测定SDG活性和琥珀酸盐的浓度。

结果。根据病情恶化的次数及症状的表现程度分为小组的COPD患者，以单核白细胞线粒体紊乱程度不同为特征。C组单核白细胞中琥珀酸浓度最高 (428 [357;545] nmol/10⁶/毫升细胞悬液的总体积 (毫升)，并SDG活性也最高 (64 [56;73] nmol / 分钟*10⁶/毫升细胞悬液的总体积 (毫升)，与B组相比 (琥珀酸浓度下降1.43倍，p=0.002；SDG下降1.88倍，p=0.0015)，而D (琥珀酸浓度下降2.06倍，p<0.0001；SDG下降4.26倍，p<0.0001)。D组患者对缺氧适应的标志物减少最明显。

结论。COPD患者病情恶化期间少数症状与单核白细胞线粒体快速适应缺氧机制的最高指标相关。患者出现严重症状和频繁病症恶化与线粒体对缺氧适应机制的最严重破坏有关。

关键词：COPD；线粒体功能障碍；琥珀酸；单核白细胞

Aim. To study the concentration of succinate and the activity of succinate dehydrogenase (SDH) of mononuclear blood leukocytes as markers of rapid adaptation of mitochondria to hypoxia in patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

Materials and Methods. The study involved 58 patients with COPD and 13 conventionally healthy volunteers of 40-75 years of age. In accordance with GOLD 2018 principles of complex assessment, the patients were divided to groups B (n=18), C (n=20), D (n=20) comparable in age, FEV₁ and in pack-of-cigarettes/year index. Patients of D group were characterized by more pronounced hypoxemia. Activity of SDH and concentration of succinate were determined in mononuclear leukocytes isolated from blood.

Results. Patients with exacerbation of COPD divided to groups on the basis of the frequency of exacerbations and evidence of symptoms, were characterized by different severity of disorders of

mitochondrial functions of mononuclear leukocytes. Patients of C group had the highest succinate concentration (428 [357;545] nmol/10⁶ cells in 1 ml of suspension) and SDH activity (64[56;73] nmol of succinate/min * 10⁶ cells of 1 ml of suspension) in mononuclear leukocytes as compared to groups B (1.43-times reduction of succinate, p<0.002; 1.88-times reduction of SDH, p=0.0015) and D (2.06-times reduction of succinate, p<0.0001; 4.26-times reduction of SDH, p<0.0001). Patients of D group demonstrated the most pronounced reduction of markers of adaptation to hypoxia.

Conclusions. A small amount of symptoms in exacerbation of COPD is associated with the highest parameters of the mechanism of rapid adaptation of mitochondria of mononuclear leukocytes to hypoxia. Existence of evident symptoms and frequent exacerbations in patients is associated with a severe frustration of mechanisms of adaptation of mitochondria to hypoxia.

Keywords: COPD; mitochondrial dysfunction; succinate; mononuclear leukocytes.

发现了慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 合并严重支气管阻塞性疾病的患者能够适应呼吸衰竭, 从而减少呼吸急促的投诉, 进而影响疾病严重程度的评估结果[1,2]。呼吸衰竭与线粒体功能相关的组织呼吸过程中断之间存在直接联系, 提示 COPD 患者适应的潜在标志物之一可能是线粒体功能活动指标的测定[3-5]。积极研究继发性线粒体功能障碍在 COPD 中的作用, 使我们能够建立其系统性, 这使我们不仅可以记录肺组织细胞中线粒体功能的破坏, 还可以记录其他器官如肌肉和血细胞中线粒体功能的破坏[5-8]。因此, 研究外周血细胞线粒体对缺氧适应的指标具有重要的意义, 这些指标在日常的临床实践中最有研究价值[9-11]。

线粒体在缺氧条件下的功能, 是 COPD 恶化的特征, 重要的是与细胞内琥珀酸积累和线粒体呼吸链 II 复合体活性增加相关的线粒体快速适应过程, 是之前为神经元建立的[12]。这些适应性机制的失败与活性氧的过量形成、氧化应激的发展和细胞损伤有关[12]。

在外周血白细胞中可以记录与 COPD 患者呼吸衰竭发生相关的线粒体功能变化。采用 COPD 联合评估分离的各组血细胞线粒体功能指标的研究, 将确定快速适应线粒体缺氧机制对 COPD 临床表现发展的意义。

因此, 本研究的目的是研究单核血白细胞中琥珀酸的浓度和琥珀酸脱氢酶 (SDG) 的活性, 作为急性 COPD 患者线粒体快速适应缺氧机制的标志物。

材料与方法

本研究由俄罗斯卫生部地方伦理委员会高等教育的联邦国家教育机构 Ryazan State Medical University (2016年10月7日第2号议定书) 批准, 符合 Good Clinical Practice (GCP) 和世界医学协会的 Declaration of Helsinki “Ethical principles for medical research involving human subjects” 的要求。

该研究包括 58 名 COPD 患者和 13 名 40-75 岁条件健康志愿者。最小样本量计算是基于以前的研究和使用 Open Epi 计算器统计假设 5% 的 α 错误和 95% 的可信区间 (CI)，考虑到减少白血球琥珀酸的浓度至少 25% 的 COPD 患者的 98% [11]。COPD 患者组包括在梁赞地区国家预算机构 Regional Clinical Hospital (梁赞市) 接受治疗的患者，并向梁赞地区国家预算机构 6 号分院 (梁赞市) 的肺科医生就医疾病恶化的患者。

COPD 患者组纳入标准均签署知情同意书，年龄为 40 至 75 岁，初始支气管扩张指数 FEV1/FIVC \leq 0.7。对照组包括健康志愿者，纳入标准为：签署知情同意书，年龄为 40 至 75 岁，无慢性肺部和心血管疾病病史。

所有组的排除标准为：病史有肺部手术史、酒精和药物滥用，患 COPD 和慢性支气管炎以外的肺部疾病的患者或有明显的炎症性疾病，其他内脏慢性疾病处于失代偿期，在验血结果中检测到的单核细胞增多症。在住院的第二天，使用 MicroLab 肺活量计 (Micro Medical, 英国) 对所有患者进行外部呼吸功能评估，包括一秒内用力呼吸的体积 (FEV1)。使用 Spirotel SpO₂ 进行脉搏血氧测量 (Medical International Research, 意大利)。各研究组的临床、功能和人口学特征见表 1。

作为一项临床调查的一部分，考虑到 COPD 病史恶化的数据，并填写 Modified Medical Research Council Dyspnea Scale (mMRC) 和 The COPD Assessment Test (CAT) 的结果，对 COPD 进行了综合评估[2]。COPD 患者分为 B、C、D 的小组，FEV1 水平、包/年指数以及 SpO₂ 都是可以相比较的 (见表 2)。

住院第二天早晨，通过静脉穿刺在空腹的情况下从肘管中进行血液采样，利用真空系统使用含有肝素钠的试管，分离凝胶和淋巴细胞分离液，以创建一个密度梯度 (BD Vacutainer CPT, 美国)。

在 BD CPT 管中以 1600 G 离心 16 分钟后，以 3000 rpm 离心 10 分钟从血浆中分离出单核白细胞。用 0.9% NaCl 洗涤细胞，并随后的 3000 rpm 离心 3 次，每次 5 分钟。

将分离出的单核白细胞重悬于 1 毫升蒸馏水中以获得悬浮液。在 20 μ l 的悬浮液中，计算了 Goryaev 室中用亚甲基蓝溶液染色的细胞数，然后按悬浮液体积重新计算。细胞计数完成后，洗涤剂 (10 μ l Triton X—100) 加入 1 毫升的悬浮液，并且冻结了。

除霜后，用悬液测定氧化应激、琥珀酸浓度、酶活性等指标，随后重新计算悬液中 10⁶/毫升细胞悬液的指标。

通过亚铁氰化钾 (III) 还原反应测定了 SDG 的光度测定活性[12]。采用一套 Succinate Colorimetric Assay Kit (Sigma-Aldrich, 美国) 测定了琥珀酸的浓度。

数据收集和处理使用 Office Excel 2016 程序 (Microsoft Corporation, 美国) 来完成，而结果统计处理使用 Statistica 10.0 软件 (Stat Soft Inc., 美国)。使用 Shapiro-Wilk 检验来检查样品与

正态分布的一致性。由于样本的分布在性质上与正常值不同，因此采用 Mann-Whitney 准则进行成双比较，使用多重比较时，采用 Kruskal-Wallis H 检验和 Mann-Whitney 检验带有 Bonferroni 校正。当零假设不存在差异的概率为 $p < 0.05$ 时，认为差异具有统计学意义。

结果与讨论

从表 3 的结果可以看出来，COPD 疾病恶化时，SDG 活性明显下降，并外周血单核白细胞悬浮液中琥珀酸浓度也明显下降 (见表 3)。这些变化可能表明，在研究的悬浮液中，受继发性线粒体功能障碍影响的细胞比例有所增加，这进而为氧化应激的发生和外周血单核白细胞功能的破坏创造了先决条件。

在比较 COPD 患者的各项症状的程度和恶化的频率指标时，发现了它们在线粒体适应缺氧的标记物上存在显著差异。同时，症状轻微的 C 组患者在单核白细胞悬浮液中，表现最高 SDG 活性及琥珀酸浓度，这可能反映了大多数细胞对缺氧快速适应机制的保留。

症状较多的 B、D 组患者与 C 组患者相比，SDG 活性明显降低，单核白细胞琥珀酸浓度明显降低。同时，在患者 D 组中观察到 SDG 的最低活性，以最明显的低氧血症为特征。这可能表明，在严重低氧血症背景下，这组患者由于线粒体损伤而导致适应性机制失败 (见表 4)。在此之前，发现了在稳定期 COPD 患者中血浆琥珀酸水平越高，支气管壁增厚越明显，这是通过高分辨率计算机断层扫描确定的。这组患者的特点是在吸入糖皮质激素治疗的背景下，肺参数和 SGRQ 调查表的结果有了很大的改善，与没有支气管壁增厚的肺气肿患者相比，血浆中的琥珀酸水平明显降低 [15]。

对研究指标之间的关系进行分析，发现 COPD 患者线粒体缺氧适应标志物与症状严重程度之间存在很强的负相关 (见表 5)。与此同时，一方面，SDG 活性与琥珀酸浓度之间存在显著的正相关，另一方面，患者的功能参数 (FEV1、SpO₂) 之间也有显著正相关。根据包/年指数确定的吸烟经历，其特征是中等强度的负相关。

因此，琥珀酸是线粒体快速适应缺氧的一种介导机制，可能在 COPD 患者病情恶化期间对呼吸衰竭的适应中发挥重要作用。在这方面，对单核白细胞中 SDG 活性和琥珀酸浓度的研究可以作为评估 COPD 患者对缺氧适应的另一种方法。

结论

1. COPD 患者疾病恶化期间的少量症状与单核白细胞线粒体对缺氧快速适应机制的最高指标相关。
2. 患者出现严重症状和频繁的恶化，同时伴有线粒体对缺氧适应机制的最严重破坏。

表 1

研究小组的临床功能和人口统计特征

指标	COPD, n=58	检查, n=13
年龄, 岁	67 [61;71]	54 [50;63], $p_{1-2}=0,088$
性别:		
男, n	48	5
女, n	9	8
吸烟:		
吸烟者, n	34	0
前吸烟者, n	24	0
以前不抽烟, n	0	13
FEV1, %	48 [38;61]	92 [91;93], $p_{1-2}<0,0001$
SpO ₂ , %	92 [89;93]	97 [97;98], $p_{1-2}<0,0001$

注: FEV1 是测量到的 FEV1 与计算的应当价值的比率, 取为 100%; SpO₂ 是血氧饱和度

表 2

根据症状的严重程度和恶化的频率对 COPD
患者研究组的临床和功能特征进行划分

指标	B 组, n=18	C 组, n=20	D 组, n=20
包/年指数	25 [20;30]	25 [20;30]	22 [20;28]
FEV1, %	48 [38;63]	55 [39;62]	45 [40;58]
SpO ₂ , %	92 [91;93]	92 [91;94]	91 [87;93], $p_{1-3}=0,02, p_{2-3}=0,003$
mMRC, 评分	2 [1;4]	1 [1;1], $p_{1-2}=0,0001$	3 [2;5], $p_{2-3}<0,0001$
CAT, 评分	19 [12;31]	8 [6;9], $p_{1-2}<0,0001$	28 [12;34], $p_{2-3}<0,0001$

注: FEV1 是测量到的 FEV1 与计算的应当价值的比率, 取为 100%; SpO₂ 是血氧饱和度

急性 COPD 患者及对照组单核白细胞线粒体功能指标的研究

所研究的参数	COPD, n=58	检查, n=13
SDG 活性, nmol 琥珀酸/ min * 10 ⁶ /毫升 细胞悬浮液	34 [19;56]	94[88;95], 1-2 减少 2.76 倍, p1-2<0.0001
琥珀酸的浓度, nmol/10 ⁶ /毫升 细 胞悬浮液	319 [215;407]	731[679;768], 1-2 减少 2.29 倍, p1-2<0.0001

COPD 患者单核白细胞线粒体功能的研究,
其分组取决于症状的程度和恶化的频率

所研究的参数	COPD, B (1) n=18	COPD, C (2) n=20	COPD, D (2) n=20
SDG 活性, nmol 琥珀酸/ min * 10 ⁶ /毫升 细胞悬浮液	34 [25;48] 1-2 减少 1.88 倍 p1-2=0.0015; 增长 1-32.26 倍 p1-3=0.0019	64[56;73] 2-3 增长 4.26 倍 p2-3<0.0001	15 [11;20]
琥珀酸的浓度, nmol/10 ⁶ / 毫升 细胞悬浮液	299[216;365] 1-2 减少 1.43 倍 p1-2=0.0002	428[357;545] 2-3 增长 2.06 倍 p2-3<0.0001	208 [157;276]

单核白细胞线粒体耐缺氧指标与
COPD 患者主要临床及功能指标的相关性分析

Spearman 秩相关系数 ($p < 0.05$)	mMRC, 评分	CAT, 评分	FEV1, %	SpO ₂ , %	包/年 指数
SDG 活性, nmol 琥珀酸/ min * 10 ⁶ /毫升 细胞悬浮液	-0,8380	-0,8586	0,7039	0,7433	-0,4277
琥珀酸的浓度, nmol/10 ⁶ /毫升 细胞悬浮液	-0,8129	-0,8062	0,7070	0,7350	-0,510