

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.11.023

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200229.1719.004.html\(2020-03-02\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200229.1719.004.html(2020-03-02))

COPD 严重程度和氧化应激与气道中的超细颗粒物的相关性分析

张 瑶¹, 陈丽展¹, 吴 朔², 张 艳², 欧阳海峰^{1△}

(1. 西安国际医学中心医院胸科医院呼吸内科, 西安 710100; 2. 空军军医大学西京医院呼吸内科, 西安 710032)

[摘要] **目的** 评估慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者炎症和氧化应激状态下呼出气冷凝液(EBC)中超细颗粒物(UFP)水平变化。**方法** 选取 2017 年 6 月至 2018 年 12 月空军军医大学西京医院收治的符合 COPD 诊断标准的 58 例患者为研究对象,另选取同期在该院进行健康体检且无系统性疾病的健康志愿者 40 例作为对照组。通过常规方法收集 EBC, NanoSight 纳米颗粒分析仪分析微粒。使用 ELISA 法测量 EBC 中羰基和 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)水平,测定肺活量、肺弥散量。**结果** COPD 组患者血清嗜酸性粒细胞计数(EOS abs)、C 反应蛋白(CRP)及乳酸脱氢酶(LDH)水平均高于对照组($P < 0.05$)。与对照组相比,COPD 组患者 EBC 中 UFP 水平降低($P < 0.05$),血清中 UFP 水平升高($P < 0.05$),EBC 中羰基和 8-OHdG 水平更高($P < 0.05$)。EBC 中 UFP 水平与羰基水平呈负相关($P < 0.05$),与 FEV1 和肺一氧化碳扩散能力(DLCO)呈正相关($P < 0.05$)。EBC 中低 UFP 水平($\leq 0.18 \times 10^8/\text{mL}$)和 $\text{CRP} \geq 5 \text{ mg/L}$ 是频繁加重表型的独立预测因子。**结论** EBC 中 UFP 水平反映了气道的炎症状态,上皮细胞通透性的增加可能是 COPD 患者 EBC 中 UFP 水平低和血清中 UFP 水平高的机制。

[关键词] 呼出气冷凝液;氧化应激;肺疾病,慢性阻塞性**[中图分类号]** R563.9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)11-1817-04

Correlation between severity, oxidative stress of COPD and ultrafine particles in airway

ZHANG Yao¹, CHEN Lizhan¹, WU Shuo², ZHANG Yan², OUYANG Haifeng^{1△}

(1. Department of Respiratory Medicine, Cardiothoracic Hospital of Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an, Shaanxi 710100, China; 2. Xijing Hospital of Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the changes of ultrafine particles (UFP) in exhaled breath condensate (EBC) under inflammatory and oxidative stress in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** A total of 58 patients who met the COPD diagnostic criteria from June 2017 to December 2018 were enrolled in the COPD group. Meanwhile, 40 healthy volunteers with a physical examination without systemic disease were selected as the control group. The EBC was collected by the conventional method, and the particles were analyzed using a NanoSight nanoparticle analyzer. EBC carbonyl and 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) levels were measured by ELISA, lung capacity and lung diffusion were measured. **Results** The serum eosinophil count (EOS abs), levels of C reactive protein (CRP) and lactate dehydrogenase in the COPD group were higher than those in the control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, UFP level in EBC was lower in the COPD group ($P < 0.05$), but it was higher in serum ($P < 0.05$); the levels of EBC carbonyl and 8-OHdG were higher ($P < 0.05$). Additionally, UFP level in EBC was negatively correlated with carbonyl ($P < 0.05$) while positively related to FEV1 and lung carbon monoxide diffusion capacity (DLCO, $P < 0.05$). Low UFP ($\leq 0.18 \times 10^8/\text{mL}$) and CRP level $\geq 5 \text{ mg/L}$ in EBC are independent predictors of frequent exacerbation phenotypes. **Conclusion** The UFP content in EBC reflects the inflammatory state of the airway. Increased permeability of epithelial cells may be the mechanism of low UFP in EBC and high UFP in serum of COPD patients.

[Key words] exhaled breath condensate; oxidative stress; pulmonary disease, chronic obstructive

超细颗粒物 (ultrafine particles, UFP) 在吸入颗粒的发病率中具有关键作用, 主要与其表面积大、尺寸小和渗透率高有关, 与其化学性质无关。研究表明 UFP 使气道上皮发生氧化损伤^[1]。小鼠暴露于炎症性损伤可导致支气管肺泡灌洗液 (BAL) 中独特 UFP 分布模式的形成, 在炎症消退后 UFP 的特殊模式恢复到基准线^[2]。慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 是一种以进行性气流受限为特征的炎症性疾病, 其发病率日益上升^[3]。虽然吸烟是 COPD 的主要危险因素, 但遗传、气道高反应性、早期基线肺功能降低和环境空气污染也与疾病严重程度密切相关^[4-5]。

越来越多的研究将风险分级和 COPD 表型分析的新生物标志物用于早期检测, 呼出气冷凝液 (exhaled breath condensate, EBC) 的收集是一种简单且无创的获得呼吸道标本的方法。EBC 含有来自中小型气道的物质, 这些物质可以作为评估炎症和氧化应激生物标志物。有研究表明, 呼吸道症状和气道炎症与哮喘儿童 EBC 中 UFP 水平相关^[6]。此外, 在 EBC 中探索氧化应激生物标志物支持这一想法: 个性化用药是 COPD 患者的最佳监测和管理的一部分。本研究评估 COPD 患者炎症和氧化应激状态下 EBC 中 UFP 水平变化。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取空军军医大学西京医院 2017 年 6 月至 2018 年 12 月收治的 58 例 COPD 患者为研究对象, 均符合第 8 版《内科学》中的 COPD 诊断标准。同期在该院进行健康体检且无系统性疾病 40 例健康志愿者作为对照组。患者在就诊时病情稳定, 并且在过去 4 周内无 COPD 恶化, 排除因任何传染病或炎症状况住院者。所有受试者均接受肺活量测定, 肺弥散量和 EBC 测试及血液采样, 填写人口统计和临床问卷, COPD 患者还参加了 COPD 评估测试 (CAT)。根据 EBC 指南的建议, 所有受试者在收集 EBC 前避免吸烟和吸入任何类型的药物。

1.2 方法

1.2.1 EBC 样品的收集

使用 EBC 液体收集器收集 EBC。收集器在检查前 20 min 需要预冷, 受试者通过咬口器呼吸 20 min, 气体呼出后通过冷凝装置将呼出气的冷凝物提出, 融化之后以吸管移到收藏管中, 在 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存。

1.2.2 肺功能检查

使用德国 Jaeger 公司生产的 TOENNIES 肺功能仪, 检查时患者取坐位, 由经验丰富的医师专人负责。测定参数为第 1 秒用力呼气容量占预计值的百分比 (FEV1%)。

1.2.3 外周血样品

所有研究对象均于采血前 12 h 禁止饮食, 然后进行静脉采血, 于采血后 1 h 内将血液样品送至实验室进行检查。分析样品的全血细胞计数、C 反应蛋白 (CRP)、胆红素和乳酸脱氢酶 (LDH)。

1.2.4 UFP 的测量和分析

使用 NanoSight 纳米颗粒分析仪评估 EBC 样品中颗粒的大小和浓度, 样品中所含的颗粒在激光光源照射下可以观察到, 目前这种方法适用于直径 $10\sim 1\ 000\text{ nm}$ 的颗粒。

1.2.5 氧化应激标志物

采用 ELISA 试剂盒在 EBC 样品中测定蛋白质氧化。将样品加入到 96 孔蛋白质结合板中, 每孔 $100\ \mu\text{L}$ 。DNPH 工作液加入到样品中并与抗二硝基苯基抗体在室温下孵育 2 h, 洗涤, 然后与 HRP 标记的二抗一起孵化。洗涤, 显色。使用 VersaMax 酶标仪在 450 nm 处测量吸光度, 基于试剂盒所提供的牛白蛋白标准计算蛋白质羰基化, 使用 Bradford 测定法测量样品的总蛋白质浓度, 该方法是建立在 Bradford 试剂和 EBC 样品中蛋白质之间形成复合物的基础上。使用浓度在 $1.2\sim 2\ 500.0\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准曲线来鉴定 EBC 中低蛋白水平, 通过测量在修复受损 DNA 的过程中排泄的 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) 来评估 DNA 氧化程度, 采用双抗夹心法并使用 OxiSelect™ 氧化性 DNA 损伤 ELISA 试剂盒测定 EBC 中 8-OHdG 的水平。将 EBC 样品加到 8-OHdG/BSA 偶联物预吸附的微孔板上。短暂孵化后, 加入抗-8-OHdG 单克隆抗体, 然后加入 HRP-偶联的二抗。EBC 样品中 8-OHdG 的水平表示为 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 统计软件进行分析。通过 *t* 检验和单向 ANOVA 检验比较颗粒特征和其他参数之间的差异, Spearman 系数用于分析颗粒的特性与氧化应激标记物和临床参数的相关程度。使用二元逻辑回归计算患者病情频繁加重时的 OR 值。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺功能和血液检查

研究人群的人口统计学和临床特征见表 1。与对照组相比, COPD 组 FEV1% 和肺部一氧化碳扩散能力 (DLCO) 降低 ($P<0.05$), 白细胞计数 (WBC)、血清嗜酸性粒细胞计数 (EOS abs)、CRP 和 LDH 均升高 ($P<0.05$), 见表 2。

2.2 EBC 和血清中的 UFP 分析

COPD 患者 EBC 中 UFP 水平 $0.24\times 10^8/\text{mL}$ 明显低于对照组 $0.51\times 10^8/\text{mL}$ ($P<0.05$), 血清中 UFP 水平 $9.8\times 10^8/\text{mL}$ 高于对照组 $6.7\times 10^8/\text{mL}$ ($P=0.03$)。与不加重 COPD 患者相比, 频繁加重

COPD 患者(每年住院治疗大于或等于 2 次)EBC 中 UFP 水平降低($0.31 \times 10^8/\text{mL}$ vs. $0.18 \times 10^8/\text{mL}$, $P=0.03$)。二元 Logistic 回归分析显示,EBC 中 UFP 低水平($\leq 0.18 \times 10^8/\text{mL}$)和 $\text{CRP} \geq 5 \text{ mg/L}$ 是频繁加重 COPD 患者表型的独立预测因子($OR=3.6, 95\%CI: 1.06 \sim 7.97, P=0.04$; $OR=4.4, 95\%CI: 1.24 \sim 10.2, P=0.02$)。

表 1 研究人群的人口统计学和临床特征

项目	COPD 组 (n=58)	对照组 (n=40)	统计值	P
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	68.3 \pm 8.6	57.2 \pm 14.4	4.711	0.001
男[n(%)]	46(79)	21(52.5)	7.868	0.050
吸烟[n(%)]			33.19	<0.001
主动的	10(17.2)	13(32.5)		
以前的	46(79.3)	10(25.0)		
从没有	2(3.4)	17(42.5)		
吸烟指数($\bar{x} \pm s$, 包/年)	59.3 \pm 38.2	13.6 \pm 20.5	6.904	<0.001
职业暴露[n(%)]	31(53.4)	17(42.5)	1.136	0.280

表 2 两组肺功能和血液检查($\bar{x} \pm s$)

项目	COPD 组 (n=58)	对照组 (n=40)	统计值	P
FEV1%	54.0 \pm 15.9	93.0 \pm 17.5	11.450	<0.001
DLCO	66.6 \pm 25.6	78.5 \pm 12.4	2.725	0.008
WBC($\times 1000/\text{mm}^3$)	8.3 \pm 1.7	7.3 \pm 2.4	2.416	0.020
EOS abs($/\text{mm}^3$)	224 \pm 163	154 \pm 97	2.433	0.009
CRP(mg/L)	5.0 \pm 6.4	3.0 \pm 3.1	1.832	0.050
LDH(U/L)	391.0 \pm 93.1	330.0 \pm 82.2	3.341	0.004

2.3 EBC 中的氧化应激标志物

与对照组比较,COPD 组 EBC 中羰基水平更高($0.41 \mu\text{g}/\text{mL}$ vs. $5.1 \mu\text{g}/\text{mL}$, $P<0.05$),8-OHdG 水平也较高($0.003 \text{ ng}/\text{mL}$ vs. $0.036 \text{ ng}/\text{mL}$, $P=0.001$)。

2.4 EBC 中 UFP 水平与氧化应激和临床参数的相关性分析

EBC 中 UFP 水平与羰基水平呈负相关($P<0.05$),与 FEV1 和 DLCO 水平呈正相关($P<0.05$)。血清中 UFP 水平与 EOS abs、CRP 和 LDH 呈负相关($P<0.05$)。

3 讨论

当前研究结果表明,与对照组相比,COPD 组患者 EBC 中 UFP 水平降低。这一发现是建立 EBC UFP 水平作为气道炎症标志物的第一步。这种生物标志物的优点在于它能反映肺局部炎症状态。

本研究发现与对照组相比,COPD 组患者 WBC

水平升高,这与其他研究一致^[7-8]。为了验证气道中 UFP 水平可能与这种炎症状态相关,分析了其在 EBC 和血清样本中的水平,结果显示 COPD 患者的 EBC 中 UFP 水平低于对照组,在血清中的结果则相反。有研究表明,小鼠肺泡上皮细胞单层的紧密连接阻力的降低导致纳米颗粒跨上皮屏障的迁移急剧增加^[9]。人体和动物模型中的许多研究表明,吸入的纳米颗粒可以迅速转移到循环中并在肺外器官中积聚^[10]。

本研究显示,与不加重 COPD 患者相比,频繁加重 COPD 患者 EBC 中 UFP 水平降低,EBC 中 UFP 低水平($\leq 0.18 \times 10^8/\text{mL}$)和 $\text{CRP} \geq 5 \text{ mg/L}$ 是频繁加重 COPD 患者表型的独立预测因子。据报道,稳定型 COPD 患者的 CRP 水平与疾病严重程度和恶化风险增加相关^[11],但没有关于可能与疾病活动相关的 EBC 中 UFP 水平截止值的数据。因此,本研究提供 $0.18 \times 10^8/\text{mL}$ 的值可作为这种预测因子的截止值。这些发现可预测患者 EBC 中 UFP $\leq 0.18 \times 10^8/\text{mL}$ 更可能属于频繁加重组。这表明较低的 UFP 水平可能反映 COPD 的气道炎症和疾病严重程度。将健康对照组和 COPD 患者暴露于吸入纳米颗粒的其他人体研究表明,颗粒的沉积随着疾病的严重程度而增加^[12]。

氧化应激在加重肺部炎症和随后的 COPD 恶化中起重要作用。与对照组相比,COPD 患者 EBC 中羰基和 8-OHdG 水平更高。同样,囊性纤维化患者 BAL 中的羰基水平比健康对照组高,并与中性粒细胞炎症水平相关^[13]。此外,研究表明,COPD 患者 EBC 中 H_2O_2 和脂质氧化产物升高,部分生物标志物与疾病严重程度相关^[14]。

本研究发现,EBC 中 UFP 水平与临床参数及炎症标记物之间存在相关性。UFP 水平与羰基水平呈负相关,与 FEV1 和 DLCO 水平呈正相关。EBC 中 UFP 低水平是高炎症状态的反映。EBC 中 UFP 水平与 EOS abs、CRP 和 LDH 水平呈负相关。有研究显示,COPD 患者与健康对照组相比,表面活性蛋白 A(肺部免疫系统的主要成分)的呼出微粒减少,并与疾病严重程度呈负相关^[15]。

综上所述,EBC 中 UFP 水平反映了气道炎症和氧化应激,COPD 患者血清中 UFP 高水平支持上皮细胞通透性增加可能是 EBC 中 UFP 低水平的原因,具体机制还需要进一步研究证明。

参考文献

[1] LI N, GEORAS S, ALEXIS N, et al. A work group report on ultrafine particles (American

- Academy of Allergy, Asthma & Immunology): Why ambient ultrafine and engineered nanoparticles should receive special attention for possible adverse health outcomes in human subjects[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138(2):386-396.
- [2] FIREMAN E, EDELHEIT R, STARK M, et al. Differential pattern of deposition of nanoparticles in the airways of exposed workers[J]. *J Nanopart Res*, 2017, 19(2):30.
- [3] 胡静. COPD 合并肺癌的发病机制与治疗进展[J]. *国际呼吸杂志*, 2016, 36(8):607-611.
- [4] LANGE P, CELLI B, AGUSTI A, et al. Lung-function trajectories leading to chronic obstructive pulmonary disease[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(2):111-122.
- [5] VOGELMEIER C F, CRINER G J, MARTINEZ F J, 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(5):557-582.
- [6] BENOR S, ALCALAY Y, DOMANY K A, et al. Ultrafine particle content in exhaled breath condensate in airways of asthmatic children[J]. *J Breath Res*, 2015, 9(2):026001.
- [7] ZHOU Z, CHEN P, PENG H. Are healthy smokers really healthy[J]. *Tob Induc Dis*, 2016, 14:35.
- [8] BARNES P J. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138(1):16-27.
- [9] FAZLOLLAHI F, KIM Y H, SIPOS A, et al. Nanoparticle translocation across mouse alveolar epithelial cell monolayers: species-specific mechanisms[J]. *Nanomedicine*, 2013, 9(6):786-794.
- [10] MILLER M R, RAFTIS J B, LANGRISH J P, et al. Inhaled nanoparticles accumulate at sites of vascular disease[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(5):4542-4552.
- [11] XIONG W, XU M, ZHAO Y, et al. Can we predict the prognosis of COPD with a routine blood test[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2017, 12:615-625.
- [12] WANG F, NI S S, LIU H. Pollutational haze and COPD: etiology, epidemiology, pathogenesis, pathology, biological markers and therapy[J]. *J Thorac Dis*, 2016, 8(1):E20-30.
- [13] STOLARZ A J, FARRIS R A, WILEY C A, et al. Fenofibrate attenuates neutrophilic inflammation in airway epithelia: potential drug repurposing for cystic fibrosis[J]. *Clin Transl Sci*, 2016, 8(6):696-701.
- [14] MCGUINNESS A J, SAPEY E. Oxidative Stress in COPD: sources, markers, and potential mechanisms[J]. *J Clin Med*, 2017, 6(2):21.
- [15] LARSTAD M, ALMSTRAND A C, LARSSON P, et al. Surfactant protein a in exhaled endogenous particles is decreased in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients: a pilot study[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12):e0144463.

(收稿日期:2020-01-11 修回日期:2020-02-20)

(上接第 1816 页)

- [8] MA Y C, ZUO L, CHEN J H. Modified glomerular filtration rate estimating equation for Chinese patients with chronic kidney disease[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(10):2937-2944.
- [9] NERLICH A, SCHLEICHER E. Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human diabetic glomerular lesions[J]. *Am J Pathol*, 1991, 139(4):889-899.
- [10] ZHUO L, ZOU G, LI W, et al. Prevalence of diabetic nephropathy complicating non-diabetic renal disease among Chinese patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Eur J Med Res*, 2013, 18(1):4.
- [11] WOLF G, MÜLLER N, MANDECKA A, et al. Association of diabetic retinopathy and renal function in patients with types 1 and 2 diabetes mellitus[J]. *Clin Nephrol*, 2007, 68(2):81-86.
- [12] SERRA A, ROMERO R, BAYÉS B, et al. Is there a need for changes in renal biopsy criteria in proteinuria in type 2 diabetes[J]. *Diab Res Clin Pract*, 2002, 58(2):149-153.
- [13] KLESSENS C Q, WOUTMAN T D, VERAAR K A, et al. An autopsy study suggests that diabetic nephropathy is underdiagnosed[J]. *Kidney Int*, 2016, 90(1):149-156.

(收稿日期:2019-12-25 修回日期:2020-02-21)