

[文章编号] 1007-3949(2001)-04-0319-03

•临床研究•

急性心肌梗死患者氧化损伤及抗氧化酶活性

刘和俊, 汪太平, 李芹, 史学功

(安徽医科大学附属第一医院心内科, 安徽省合肥市 230022)

[主题词] 心肌梗死, 急性; 氧化损伤; 谷胱甘肽过氧化物酶; 超氧化物歧化酶; 中性粒细胞; 化学发光法

[摘要] 为了评价急性心肌梗死患者氧化损伤程度及与抗氧化酶活性的关系。采用鲁米诺依赖的中性粒细胞化学发光法, 对 60 例急性心肌梗死患者及 62 例年龄和性别匹配的健康对照者, 检测外周血中性粒细胞产生氧自由基的水平; 采用化学定量法测定血脂过氧化终末产物——丙二醛的浓度及超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、肌酸磷酸激酶的活性。结果发现, 急性心肌梗死组中性粒细胞化学发光峰值、积分、吞噬指数、血浆丙二醛浓度较对照组明显升高 (P 均 < 0.001); 血浆超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性较对照组均明显降低 (P 均 < 0.001); 中性粒细胞化学发光峰值与血浆丙二醛浓度及血清肌酸磷酸激酶活性存在明显的正相关, 前者 $r = 0.58$ ($F = 148.9, P < 0.01, n = 122$), 相关方程为 $Y = -4824.9 + 1441.2X$; 后者 $r = 0.47$ ($F = 68.9, P < 0.01, n = 122$), 相关方程为 $Y = 1190.8 + 0.7304X$ 。中性粒细胞化学发光峰值与血浆超氧化物歧化酶活性呈显著的负相关, 其相关系数为 $r = -0.63$ ($F = 193.2, P < 0.01, n = 122$), 相关方程为 $Y = 8230.0 - 78.1X$ 。此结果提示, 急性心肌梗死患者体内存在着明显的氧化损伤, 同时也导致体内抗氧化能力减弱, 氧化损伤的程度可能与心肌梗死的范围有关。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

Status of Free Radicals and Their Scavenging Enzymes in Patients with Acute Myocardial Infarction

LIU He-Jun, WANG Tai-Ping, LI Qin, and SHI Xue-Gong

(Cardiovascular Department of No. 1 Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

MeSH Myocardial Infarction, Acute; Oxidative Stress; Glutathione Peroxidase; Superoxide Dismutase; Neutrophils; Chemiluminescence

ABSTRACT **Aim** We sought to evaluate the markers of polymorphonuclear (PMN) oxygen free radical (OFR) production, the levels of lipid peroxidation (malondialdehyde, MDA) and defenses against oxidative stress in the patients with acute myocardial infarction (AMI). **Methods** and Results A convenient and sensitive method for PMN OFR production was assayed by polymorphonuclear chemiluminescence (PMN-CL). We have measured the parameters of PMN-CL, the plasma MDA concentration, the plasma activities of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPX) in 60 AMI patients and 62 age-matched healthy subjects. Patients with AMI showed significantly increased PMN-CL parameters as peak value, integration and phagocytic index compared to healthy controls ($P < 0.001$, respectively). The plasma MDA concentration increased in AMI patients compared with that in healthy controls ($P < 0.001$). The PMN-CL peak value correlated best with plasma MDA concentration ($r = 0.58, P < 0.01, n = 122$) and negatively correlated with the plasma activity of SOD ($r = -0.63, P < 0.01, n = 122$). **Conclusion** The PMN act as a potential contributor to extension of myocardial necrosis induced by OFR, thereby indicating the involvement of free radicals in AMI.

目前, 冠心病(CHD)的病因和发病机制仍不甚明了, 病因可能与遗传、激素水平和环境等各种因素有关; 发病机制亦十分复杂, 其中, 中性粒细胞(poly-

morphonuclear, PMN)的异常活化, 产生大量氧自由基(oxygen free radical, OFR)与CHD及急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)的发生发展密切相关^[1], PMN产生的OFR损伤血管内皮细胞, 促进动脉硬化及血栓形成, 在AMI心肌缺血——再灌注性损伤等诸环节上发挥着重要作用。动物实验业已表明, 氧化损伤对CHD在引发AMI的过程中起着重要

[作者简介] 刘和俊, 男, 1964年5月出生, 硕士, 副主任医师。汪太平, 女, 1939年12月出生, 主任医师, 教授。李芹, 女, 1968年8月出生, 主治医师。均毕业于安徽医科大学医学系。

作用^[2,3],但在人体 AMI 的研究报道较少。本文采用鲁米诺(luminol, 化学名氨基苯二酰一胍)依赖的中性粒细胞化学发光(polymorphonuclear chemiluminescence, PMN-CL)法^[4],对 AMI 患者外周血 PMN 产生的 OFR 水平进行检测,采用化学定量法^[5]对血浆过氧化脂质终末产物——丙二醛浓度及抗氧化酶肌酸磷酸激酶(CK)活性进行检测,旨在评价氧化损伤及抗氧化酶活性对 AMI 心肌损伤程度的影响。

1 对象和方法

1.1 对象

从 1997 年 7 月至 1999 年 7 月在我院住院的 AMI 患者中连续选取 60 例,均符合 1979 年 WHO 诊断标准(其中男性 44 例,女性 16 例,平均年龄 60.7 ± 9.8 岁),体检身体健康者 62 例(其中男性 45 例,女性 17 例,平均年龄 61.5 ± 9.7 岁)。所有受检对象在 2 周内均未服用抗氧化剂,并除外感染现象。

1.2 采血

抽取静脉血(肝素抗凝)2 mL,取 0.1 mL 用于检测 PMN-CL 各参数,余下血样在 4°C 离心机行 2000 转/min 离心 10 min,取血浆用于测定丙二醛、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)。非抗凝静脉血 1 mL,用于测定 CK。

1.3 中性粒细胞化学发光参数检测

取肝素抗凝的静脉血 0.1 mL,摇匀后 0.7 mL pH 7.8 的 Hank's 液中,在 37°C 孵育 20 min 后,加入浓度为 1×10^{-3} mol/L 的鲁米诺液(Luminol, Sigma 产品) 0.1 mL,再在 37°C 孵育 15 min 后上机检测本底值,加浓度为 2.5 g/L 酵母多糖液(Zymosan A, Sigma 产品) 0.1 mL,每 150 s 测量一次,每次测量时间为 6 s,共测量 20 次,测量仪器为 SHG-1 型生物化学发光仪,自动温控在 $37.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$,最后由微机给出每例的本底、峰值、斜率和积分。由于全血中 PMN 数量个体差异很大,故将每例血样的白细胞进行分类计数,并以峰值除以 PMN 数量,得到每例 PMN 的吞噬指数,借以反映单个 PMN 的吞噬功能。

1.4 血浆丙二醛、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶测定

血浆丙二醛、SOD 和 GPX 均采用化学法测定,试剂盒由南京建成试剂厂提供,按说明书进行操作。

1.5 血清肌酸磷酸激酶测定

血清肌酸磷酸激酶采用国际临床化学学会(IFCC)推荐的速率法测定,试剂盒由上海申能生物技术有限公司提供,按说明书进行操作。

1.6 统计学处理

采用 Epi info 软件,建立数据库,对于符合正态分布且方差齐的计量资料,采用 F 检验;对于非正态分布或方差不齐的计量资料,采用 H 检验。

2 结果

2.1 急性心肌梗死患者与正常人中性粒细胞功能比较

急性心肌梗死患者 PMN 氧化代谢功能异常活跃,表现在 PMN-CL 各参数指标(本底、峰值、斜率、积分及吞噬指数)明显高于正常对照组(表 1, Table 1)。

表 1. 急性心肌梗死患者中性粒细胞化学发光参数及与正常人比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of the PMN-CL parameters between AMI and normal groups

| Parameters | Normal group ($n = 62$) | AMI group ($n = 60$) |
|-------------------|------------------------------|---------------------------|
| Background (mV) | 14.3 ± 13.6 | 136.1 ± 120.3^a |
| Peak value (mV) | 318.1 ± 112.3 | 2279.8 ± 1074.4^a |
| Slope (mV/s) | 0.40 ± 0.23 | 3.01 ± 2.31^a |
| Integration (V·s) | 47.2 ± 17.3 | 334.5 ± 148.7^a |
| Phage index (V/s) | 0.09 ± 0.05 | 0.41 ± 0.26^a |

a: $P < 0.001$, compared with normal group.

2.2 急性心肌梗死患者与正常人血浆丙二醛浓度及抗氧化酶活性比较

急性心肌梗死(AMI)患者血浆丙二醛浓度明显高于正常人,而血浆 SOD、GPX 活性较正常组明显下降(表 2, Table 2)。

表 2. 急性心肌梗死患者与正常人血浆丙二醛浓度及抗氧化酶活性比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Comparison of plasma MDA concentration and activities of SOD, GPx between AMI and normal groups

| Parameters | Normal group ($n = 62$) | AMI group ($n = 60$) |
|---------------------------|---------------------------|------------------------|
| MDA ($\mu\text{mol/L}$) | 3.75 ± 0.38 | 4.54 ± 0.29^a |
| SOD (nU/L) | 98.3 ± 7.0 | 80.4 ± 4.7^a |
| GPX (nU/L) | 101.7 ± 9.7 | 84.7 ± 5.8^a |

a: $P < 0.001$, compared with normal group.

2.3 中性粒细胞化学发光参数与血浆丙二醛浓度、血清肌酸磷酸激酶活性、血浆超氧化物歧化酶活性的相互关系

2.3.1 中性粒细胞化学发光参数峰值与血浆丙二醛浓度的相关关系 将各次实验中测定的 PMN-CL 峰值与血浆丙二醛浓度的实验数据作相关性检验,发现两者存在着明显的正相关($r = 0.58$, $n = 122$, $F = 148.9$, $P < 0.01$, 相关方程为 $Y = -4824.9 + 1441.2X$)。表明 PMN 产生 OFR 的量,可反映体内脂质过氧化反应引起氧化损伤的严重程度。

2.3.2 急性心肌梗死(AMI)患者中性粒细胞化学发光参数峰值与血清肌酸磷酸激酶活性的相关关系

将 AMI 患者各次测得 PMN-CL 峰值和同步检测血清 CK 活性的数据做相关性检验,亦存在着明显正相关($r = 0.67$, $n = 60$, $F = 98.9$, $P < 0.01$, 相关方程为 $Y = 1190.8 + 0.7304X$)。表明 PMN 产生 OFR 的量与心肌坏死的范围有关。

2.3.3 急性心肌梗死(AMI)患者中性粒细胞化学发光参数峰值与血浆超氧化物歧化酶活性的相关关系 急性心肌梗死(AMI)患者 PMN-CL 峰值与血浆 SOD 活性呈显著的负相关($r = -0.63$, $n = 122$, $F = 193.2$, $P < 0.01$, 相关方程为 $Y = 8230.0 - 78.0887X$)。表明 AMI 患者 PMN 产生 OFR 增多,引起氧化损伤的同时,也大量耗竭了体内固有的抗氧化酶。

2.3.4 急性心肌梗死(AMI)患者血浆丙二醛浓度和超氧化物歧化酶活性的相关关系 急性心肌梗死(AMI)患者血浆丙二醛浓度与 SOD 活性两者存在着显著的负相关($r = -0.71$, $n = 122$, $F = 304.75$, $P < 0.01$, 相关方程为 $Y = 7.3845 \pm 0.0354X$)。表明氧化损伤可导致体内抗氧化能力减弱。

3 讨论

Prasad 等^[6]首先应用心肌化学发光法(CL)对兔的缺血再灌注心肌检测了氧自由基、丙二醛含量及超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶(CAT)活性,发现 CL 强度及丙二醛浓度均明显升高,超氧化物歧化酶及过氧化氢酶活性下降,而谷胱甘肽过氧化物酶活性则不受影响,表明缺血再灌注时心肌中氧自由基产生量,超过了保护心肌抗氧化系统的能力,从而出现心肌缺血再灌注性损伤。Disalvo 等^[7]在冠状动脉搭桥术中将除去了中性粒细胞的血液,对 AMI 和不稳定型心绞痛患者再灌注时发现,干预组血清肌钙蛋白 T(Troponin T)及血清 CK-MB 的活性较对照组明显降低,而还原型谷胱甘肽水平则升高,表明中性粒细胞参与了 AMI 时心肌缺血再灌注性损伤的过程,除去活性中性粒细胞的再

灌注治疗能有效地减小心肌损伤的范围和程度。

本研究采用中性粒细胞化学发光法检测中性粒细胞吞噬过程中产生氧自由基的量,来判断中性粒细胞氧化代谢功能。同时应用化学定量法检测血浆脂质过氧化代谢终末产物丙二醛浓度,及血浆超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性,故能准备地反映体内的氧化损伤程度及抗氧化酶系统的活性。在本实验中,我们发现 AMI 患者中性粒细胞化学发光本底、峰值、斜率、积分及单个中性粒细胞吞噬指数明显高于正常人;表明 AMI 患者中性粒细胞氧化代谢功能活跃,产生氧自由基增多;血浆丙二醛浓度明显上升,是 AMI 患者氧化损伤加重的直接后果;AMI 患者血浆超氧化物歧化酶及谷胱甘肽过氧化物酶活性明显显著性低于正常人,一方面可能由于心肌细胞在缺氧时,呼吸链的终末部分的细胞色素氧化酶受到抑制,NADH 得不到氧化而堆积,因而氧自由基呈爆发性增加,耗消了大量内源性超氧化物歧化酶及谷胱甘肽过氧化物酶;另一方面可能由于心肌缺血,使超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶等内源性自由基清除剂活性受抑制,清除氧自由基能力下降;因此,AMI 心肌缺血和再灌注改变了氧自由基生成与清除之间的平衡;提示有效的抗氧化治疗,对于 AMI 患者残存心肌的保护或有裨益。

参考文献

- [1] Curello S, Ceconi C, de-Giuli F, et al. Oxidative stress during reperfusion of human hearts: potential source of oxygen free radicals [J]. *Cardiovasc Res*, 1995, **29** (1): 118-125
- [2] Hoffmeyer MR, Jones SP, Ross CR, et al. Myocardial ischemia reperfusion injury in NADPH oxidase deficient mice [J]. *Circ Res*, 2000, **87** (9): 812-817
- [3] Li G, Chen Y, Saari JT, et al. Catalase overexpressing transgenic mouse heart is resistant to ischemia reperfusion injury [J]. *Am J Physiol*, 1997, **273** (3): 1090-1095
- [4] Van Dyke K. Cellular Chemiluminescence [M]. Vol 1. Boca Raton, CRC Press, 1987, 3-22
- [5] Bardak Y, Ozerturk Y, Ozguner F, et al. Effect of melatonin against oxidative stress in ultraviolet-B exposed rat lens [J]. *Curr Eye Res*, 2000, **20** (3): 225-230
- [6] Prasad K, Lee P, Mantha SV, et al. Detection of ischemia reperfusion cardiac injury by cardiac muscle chemiluminescence [J]. *Mol Cell Biochem*, 1992, **115** (1): 49-58
- [7] Di Salvo C, Louca LL, Pattichis K, et al. Does activated neutrophil depletion on bypass by leukocyte filtration reduce myocardial damage? A preliminary report [J]. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 1996, **37** (6): 93-100

(此文 2000-11-27 收到, 2001-08-19 修回)

(此文编辑 胡必利)