

# 哮喘患者血浆 ADMA 与 MTP、ATP、SDH 及细胞色素氧化酶活性的相关性

李茂林, 蒋秀园, 顾茜娜

(宜兴市肿瘤医院 检验科, 江苏 宜兴 214200)

**[摘要]** 目的: 分析哮喘急性发作患者血浆二甲基精氨酸(ADMA)水平与线粒体膜电位(MTP)、腺苷三磷酸(ATP)、琥珀酸脱氢酶(SDH)及细胞色素氧化酶(COX)活性的相关性。方法: 选取哮喘急性发作患者 30 例为哮喘组, 同期正常体检者 30 例为对照组, 取两组被检者清晨空腹静脉血, 分离血浆和中间层(含血小板), 采用高效液相法检测两组受检者的血浆 ADMA 水平, 生物发光法测定两组的 ATP 含量; 检测血小板 MTP、ATP 及 SDH, 分析哮喘组患者血浆 ADMA 水平与血小板线粒体 MTP、ATP 含量、SDH 及 COX 活性的相关性。结果: 哮喘组血浆 ADMA 水平较对照组下降, MTP、ATP、COX 及 SDH 较对照组下降( $P < 0.05$ ); 哮喘组一氧化氮合酶(NOS)活性、一氧化氮(NO)含量变化与对照组比较, NO 生成明显减少、NOS 活性明显降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 哮喘组血浆 ADMA 浓度与反映血小板线粒体功能的 4 个指标(MTP、ATP、SDH、COX)均呈负相关。结论: 哮喘急性发作患者线粒体功能障碍与血浆内源性 ADMA 浓度升高, 其机制为 ADMA 导致线粒体功能障碍可能与减少 NO 生成, 增加氧化应激。

**[关键词]** 哮喘持续状态; 二甲基精氨酸; 线粒体膜电位; 腺苷三磷酸; 细胞色素氧化酶

**[中图分类号]** R575.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)01-0110-04

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.01.022

## Association of Plasma ADMA with MTP, ATP and COX Activity in Asthmatic Patients

LI Maolin, JIANG Xiuyuian, GU Xina

(Clinical Laboratory, Yixing Cancer Hospital, Yixing 214200, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze the correlation between plasma dimethylarginine level and mitochondrial transmembrane potential (MTP), adenosine triphosphoric acid (ATP), succinate dehydrogenase (SDH) cytochrome oxidase (COX) activity and in patients with acute asthma attack. **Methods:** 30 asthmatic patients were selected as the asthma group and 30 normal subjects as the control group. The early morning fasting venous blood was collected, the plasma and the middle layer (including platelets) were separated, and the plasma ADMA levels of both groups were detected by high performance liquid chromatography and the ATP levels were measured by bioluminescence method. Platelets were detected and the correlation between ADMA level and platelet mitochondrial MTP, ATP content, SDH and COX activity was analyzed. **Results:** The plasma ADMA level of the asthma group was lower than that of the control group, and the changes of MTP, mitochondrial ATP, mitochondrial COX and mitochondrial SDH in the asthma group were slower than those in the control group ( $P < 0.05$ ). The NO production and NOS activity in the asthma group significantly decreased compared with those in the control group. ( $P < 0.05$ ). There was a negative correlation between plasma ADMA concentration and mitochondrial functions. ADMA / mitochondrial SDH:  $r = 0.61$ ,  $P = 0.001$ . ADMA / cytochrome C oxidase:  $r = -0.69$ ,  $P = 0.000$ . ADMA / MTP:  $r = -0.65$ ,  $P = 0.000$ ; ADMA / ATP content:  $r =$

0.41,  $P = 0.039$ . The correlation coefficients of Pearson were statistically significant ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** There is a correlation between Mitochondrial dysfunction is associated with elevated plasma endogenous ADMA levels in patients with acute asthma attack. The mechanism is that ADMA leads to mitochondrial dysfunction, which may be associated with a reduction in NO production and an increase in oxidative stress.

[ **Key words** ] status asthmaticus; dimethylarginine; mitochondrial transmembrane potential; adenosine triphosphate; cytochrome oxidase

支气管哮喘(简称哮喘)属于一种异质性的疾病,其病理特征是慢性气道炎症。炎性介质会导致炎性细胞聚集以及活化,临床表现为不同程度的气道高反应性、气道阻塞、过量的黏液分泌以及免疫球蛋白 E(immunoglobulin E,IgE)水平升高<sup>[1-2]</sup>,哮喘的发病率以及病死率逐渐上升<sup>[3-5]</sup>。哮喘患者无论是急性发作期还是缓解期,都会出现机体活性氧增加以及氧化或抗氧化失去平衡,氧化应激反应会对哮喘的发生发展起到直接的促进效果<sup>[7-9]</sup>。线粒体功能障碍会诱发活性氧增加、引发哮喘发病或加重<sup>[10-11]</sup>;二甲基精氨酸(dimethylarginine,ADMA)是一种内源性的一氧化氮合酶(nitricoxide synthase,NOS)抑制剂,可以与左旋-精氨酸(L-Arg)及 NOS 结合,从而使一氧化氮(nitric oxide,NO)生成量变少<sup>[12]</sup>,从而干预体内氧化应激水平。本研究分析哮喘急性发作患者血浆 ADMA 水平与线粒体膜电位(mitochondrial transmembrane potential,MTP)、腺苷三磷酸(adenosine triphosphoric acid,ATP)、琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase,SDH)及细胞色素氧化酶(cytochrome oxidase,COX)活性的相关性。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2017年1月~2018年2月哮喘急性发作患者30例作为哮喘组,男17例、女13例,平均(31.52±3.09)岁;其中12例为病情轻度组、18例为病情中度组,病程1周~40年;8例有激素应用史。另选取正常体检人群30例作为对照组,男19例、女11例,平均(31.99±3.23)岁。哮喘急性发作患者入选标准:符合中华医学会呼吸病学分会发布的《支气管哮喘防治指南》中的支气管哮喘急性发作期诊断标准<sup>[3]</sup>。哮喘急性发作患者排除标准:(1)支气管哮喘缓解期患者,(2)支气管哮喘病情严重度Ⅳ级患者,(3)上呼吸道以及气管、支气

管内肿瘤,心源性哮喘或其他能够导致哮喘的器质性疾病患者,(4)已经进行其他有关治疗,可能对本研究的效应指标观测造成影响的患者,(5)合并有心、肝、肾以及造血系统等危及生命的原发性疾病及精神病患者,(6)不能配合系统治疗、对疗效无法判断或者资料不全对疗效和安全性造成影响的患者。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组** 哮喘急性发作患者30例为哮喘组,同期正常体检者30例为对照组,两组患者性别、年龄和体质量比较差异无统计学意义,具有可比性。见表1。

表1 两组受试者一般资料比较( $n=30$ )  
Tab.1 Comparison of general data in the two groups of patients

组别	性别比例 (男/女)	年龄(岁)	体质量(kg)
对照组	14/16	62.08±8.45	66.43±9.36
哮喘组	16/14	61.03±6.62	65.82±8.54
$\chi^2/t$	0.523	1.136	1.209
$P$	0.482	0.437	0.420

**1.2.2 血浆 ADMA 水平** 两组患者入院后次日晨起空腹采集外周血 50 mL。将 1 mL 血浆添加 5-磺基杨酸沉淀蛋白,离心后取出 10  $\mu$ L 血浆样本添加 100  $\mu$ L/min 为流速,通过柱处理后采取 MS-2010 高效液相质谱仪测定 ADMA 含量。

**1.2.3 血小板线粒体 ATP 水平** 两组患者入院后次日晨起空腹采集外周血 50 mL。将 5 mL 血浆在 4  $^{\circ}$ C 的条件下进行 12 000 r/min 离心 5~10 min,取中间层,在避光条件下取闪烁杯将其标记成标准管和测定管,并添加 100  $\mu$ L 荧光素酶 ATP 检测工作液,使用裂解液将 ATP 标准溶液稀释成不同浓度,将其快速混匀,间隔至少 2 s 后,采用液闪仪和酶标仪检测各标准管单位时间转化底物数(CPM)和相对光单位(relative light unit,RLU)值,绘制标准曲线,用考马斯亮兰试剂盒检测蛋白含量。

**1.2.4 血小板 MTP** 取 0.1 μmol/L 罗丹明 123 添加反应介质,反应介质包含 7 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、150 nmol/L蔗糖、30 mmol/L KOH-HE PES、5 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,pH 为 7.0~8.0,在 37 ℃ 条件下用荧光分光光度计测定血小板线粒体荧光值。

**1.2.5 血小板线粒体 COX** 取 10 μL 的线粒体悬液,添加到具有亚铁细胞色素 C 的反应底物中,在 550 nm 处测定亚铁细胞色素 C 吸光度值。

**1.2.6 线粒体 SDH 的活性** 将 100 μL 线粒体悬液放置到清洗完毕的比色皿,添加反应底物以及辅助因子等试剂,5 s 时在 600 nm 处测定吸光度 OD1 值,1 min 后对吸光度 OD2 值进行测定,计算线粒体悬液中琥珀酸脱氢酶(SDH)的活性。

**1.2.7 NO 含量测定** 抽取血浆 5 mL,在在 3 000 r/min 离心 10 min,测定管取血浆的上清 0.5 mL,标准管取 10 μmol/L 的标准应用液 0.1 mL 与双蒸水 0.4 mL 进行混合,充分旋涡混匀 30 s,在室温的条件下静置 40 min 后,3 500~5 000 r/min 离心 10 min,抽取上清 0.8 mL 添加显色剂 0.6 mL,进行混合摇匀,在室温条件下静置 10 min,使用蒸馏水进行调零,采取分光光度计在 550 nm 处对每管的光密度值进行测定。

**1.2.8 NOS 活性测定** 测定管放置 10% 的血浆 5 mL,空白管放置双蒸水 50 μL,每管添加底物 200 μL 缓冲液、10 μL 促进剂及 100 μL 显色剂,混合均匀后放置在 37 ℃ 水浴准确反应 15 min,取出后添加 100 μL 透明剂和 2 mL 终止液,混合均匀后,采用分光光度计在 530 nm 处测定光密度值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件(美国 IBM 公司)进行分析,计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组数据采用 *t* 检验;计数资料用百分率(%)表示,采用  $\chi^2$  分析,相关性分析使用皮尔逊相关分析 *P* < 0.05 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆 ADMA 浓度

哮喘组患者血浆 ADMA 浓度为(1.53 ± 0.61) mmol/L,较对照组(3.27 ± 0.95) mmol/L 降低,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

2.2 线粒体功能

哮喘组患者线粒体 MTP、ATP、COX 及 SDH 变化与对照组比较均降低,差异有统计学意义(*P* <

0.05)。见表 2。

表 2 哮喘组患者与对照组线粒体 MTP、ATP、COX 及 SDH ( $\bar{x} \pm s$ , μmol/L)

Tab.2 MTP, ATP, COX and SDH of asthma group and control group

指标	MTP	ATP	COX	SDH
对照组	29.58 ± 5.37	8.93 ± 4.59	2.99 ± 0.07	3.51 ± 0.09
哮喘组	11.46 ± 2.75	3.26 ± 0.99	1.53 ± 0.05	1.72 ± 0.04
<i>t</i>	9.535	11.305	11.305	13.025
<i>P</i>	0.005	0.002	0.002	0.001

2.3 NOS 活性、NO 含量

哮喘组患者 NOS 活性、NO 含量变化与对照组比较,NO 生成明显减少,NOS 活性明显降低,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 3。

表 3 哮喘组患者与对照组血浆 NOS 活性、NO 含量变化( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.3 Plasma NOS activity and NO levels of asthma group and control group

指标	血浆	
	NOS	NO
对照组	5.81 ± 0.25	17.39 ± 2.94
哮喘组	2.37 ± 0.11	6.05 ± 1.22
<i>t</i>	5.632	15.327
<i>P</i>	0.009	0

2.4 相关性

对哮喘组患者血浆 ADMA 浓度与线粒体 SDH、COX、MTP 及 ATP 含量进行线性相关分析表明,哮喘组血浆 ADMA 浓度与反映线粒体功能的 4 个指标(SDH、COX、MTP、ATP)均呈负相关,ADMA 与线粒体 SDH 的 *r* = -0.61、*P* = 0.001,ADMA 与线粒体 COX 的 *r* = -0.69、*P* = 0.000,ADMA 与线粒体 MTP 的 *r* = -0.65、*P* = 0.000,ADMA 与线粒体 ATP 含量的 *r* = -0.41、*P* = 0.039;皮尔逊相关系数均具有统计学意义(*P* < 0.05)。

3 讨论

支气管哮喘属于一类气道结构上发生的病变,而不仅仅是气道功能出现的紊乱,类气道结构发生的紊乱。哮喘的发病机制为支气管平滑肌痉挛,不同严重程度或者不同病期的哮喘患者多有气道炎症的存在<sup>[13-14]</sup>。哮喘慢性气道炎症学说的成立给支气管哮喘的治疗造成了完全的改变,从对解痉平

喘进行控制从而转变为对气道炎症进行控制的抗炎治疗<sup>[15]</sup>。哮喘急性发作的主要特征是喘息、气急、咳嗽以及胸闷等,其主要特征是患者的呼吸发生困难,呼气流量突然变弱,该症状主要因为长期接触变应原等刺激物或者治疗手段不合适等所引发<sup>[16]</sup>。哮喘患者无论是急性发作期或者是缓解期都具有机体活性氧变多以及氧化/抗氧化失去平衡,氧化应激反应对哮喘的发生发展具有明显的促进效果。细胞代谢和免疫功能在疾病的发生发展的机制中发挥关键作用<sup>[17]</sup>。不对称 ADMA 属于内源性的 NOS 抑制剂,其可与 NOS 结合,从而降低 NO 的生成<sup>[18]</sup>。本研究对哮喘急性发作患者与对照组不对称 ADMA 浓度变化进行比较,哮喘急性发作患者血浆 ADMA 浓度明显降低。本研究推测不对称 ADMA 可引发过氧亚硝基阴离子明显变多,进而引发线粒体功能出现障碍,进而产生的过量的活性氧进而导致氧化应激,从而对哮喘发病造成影响。在哮喘的发病机制中,线粒体功能出现障碍发挥关键作用,在哮喘患者的气道中线粒体功能多出现障碍,且其与小鼠变多的过敏性气道炎症具有相关性<sup>[19]</sup>。哮喘大鼠的气道上皮细胞凋亡上调,气道上皮细胞基质胶原沉积变多,线粒体的数量增多,但线粒体的结构紊乱,多形成板层体和线粒体空泡<sup>[19]</sup>。本研究发现,哮喘急性发作病人气道粘膜的线粒体 SDH 和细胞色素 C 氧化酶的活性变弱;而且线粒体 MTP 变低,ATP 生成明显减少。该结果说明哮喘急性发作病人线粒体功能出现障碍。此外,相关性分析表明不对称 ADMA 浓度与线粒体 SDH、细胞色素 C 氧化酶、线粒体 MTP 以及 ATP 含量均呈负相关。外源性 NOS 抑制剂 L-NAME 能够导致大鼠肝细胞线粒体 MTP 下降,而 NO 供体 SNAP 则能够缓解大鼠肝细胞线粒体 MTP 的变弱。这说明内源性 ADMA 的提升与哮喘急性发作病人线粒体功能障碍可能具有直接关系。不对称 ADMA 能够提升氧化应激的产生。不对称 ADMA 还能够对 NOS 产生抑制从而发生氧化应激,不对称 ADMA 能够使 NOS 解偶联。其使 NO 的合成前体 L-精氨酸与 NOS 之间电子传递脱偶联,使 O<sub>2</sub> 变成唯一的受电子体,从而导致超氧阴离子产生变多,氧化应激明显变强。此外,其降低 NO 的合成<sup>[20]</sup>。本研究发现,哮喘患者气道粘膜 NOS 活性以及 NO 含量都出现明显降低,说明 ADMA 导致细胞中 NOS 解偶联,NO 合成变少,细胞内还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (reduced

form of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 消耗变少。

综上所述,哮喘急性发作病人线粒体功能障碍与血浆内源性 ADMA 浓度升高密切相关。ADMA 导致线粒体功能障碍可能与减少 NO 生成,增加氧化应激,抑制线粒体生物合成有关。

## 4 参考文献

- [1] GALLUZZI L, KEPP O, TROJEL-HANSEN C, et al. Mitochondrial control of cellular life, stress and death [J]. *Circ Res*, 2012, 111: 1198 – 1207.
- [2] CIEBIADA M, GORSKI P, ANTCAZK A. Evaluation of eicosanoids in nasal lavage as biomarkers of inflammation in patients with allergic rhinitis [J]. *Arch Med Sci*, 2014, 10(6): 1123 – 1128.
- [3] AGRAWAL A, MABALIRAJAN U. Rejuvenating Cellular Respiration for Optimizing Respiratory Function-Targeting Mitochondria [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 13310(2): L103 – 113.
- [4] FLAQUER A, HEINZMANN A, ROSPLESZCZ S, et al. Association study of mitochondrial genetic polymorphisms in asthmatic children [J]. *Mitochondrion*, 2014, 14(1): 49 – 53.
- [5] CAABRESE C, CARPAGNANO G E, PATELLA V, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): will be or will not be a new revolutionary biomarker of bronchial asthma [J]. *Minerva Med*, 2015, 19: 1827 – 1829.
- [6] XU W, CARDENES N, COREY C, et al. Platelets from Asthmatic Individuals Show Less Reliance on Glycolysis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132007.
- [7] GARCIA-SOUZA LF, OLIVEIRA MF. Mitochondria: biological roles in platelet physiology and pathology [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 50: 156 – 160.
- [8] KINKER K G, GIBSON A M, BASS S A, et al. Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 attenuates airway inflammation in a mouse model of asthma [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85148.
- [9] AHMAD T, MUKHERJEE S, PATTAIK B, et al. Mitro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy [J]. *EMBO J*, 2014, 33(9): 994 – 1010.
- [10] KIM S R, KIM D I, KIM S H, et al. NLRP3 inflammatory activation by mitochondrial ROS in bronchial epithelial cells is required for allergic inflammation [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1498.

(下转第 118 页)