

## COPD 患者线粒体功能及代谢水平变化检测与骨骼肌功能障碍的相关性研究

陈元菁, 艾红军, 王湘云, 吴琼, 常雁, 刘锦铭 (上海市杨浦区控江医院呼吸科, 上海 200090)

**摘要:** **目的** 探讨慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 线粒体功能、代谢水平变化与骨骼肌功能障碍 (SMD) 的相关性。**方法** 将2018年12月~2019年12月上海市杨浦区控江医院呼吸内科门诊就诊的60例COPD患者, 根据是否并发SMD分为COPD-SMD组 ( $n=21$ ) 和COPD组 ( $n=39$ ), 另选择同期健康体检者30例作为对照组。比较各组外周血单核细胞 (PBMCs) mtDNA 拷贝数、线粒体膜电位和细胞内活性氧 (ROS)、血清胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、瘦素 (LP) 和空腹胰岛素 (FINS) 等指标, 分析线粒体功能、代谢水平与股神经动作电位时间和股神经传导速度的相关性。**结果** 与对照组比较, COPD组和COPD-SMD组PBMCs中mtDNA拷贝数和膜电位显著下降, ROS则显著升高 ( $t=4.03\sim 9.97$ ,  $2.92\sim 6.75$  和  $2.73\sim 3.92$ , 均  $P<0.05$ ), 上述指标在COPD-SMD组与COPD组比较, 差异有统计学意义 ( $t=10.26$ ,  $5.28$  和  $9.24$ , 均  $P<0.05$ )。COPD-SMD组、COPD组LP和FINS显著高于对照组, IGF-1较对照组显著降低 ( $t=5.57\sim 8.50$ ,  $5.27\sim 6.64$  和  $3.27\sim 11.57$ , 均  $P<0.05$ )。COPD-SMD组LP和FINS显著高于COPD组, IGF-1较COPD组显著降低 ( $t=10.25$ ,  $14.26$  和  $8.01$ , 均  $P<0.05$ )。股神经传导时间与mtDNA, 膜电位和LP均呈显著负相关 ( $r=-0.475$ ,  $-0.440$  和  $-0.416$ , 均  $P<0.05$ ), 与ROS和IGF-1呈显著正相关性 ( $r=0.421$  和  $0.471$ ,  $P<0.05$ ); 股神经动作电位幅度与mtDNA, 膜电位、LP和FINS均呈显著正相关 ( $r=0.451$ ,  $0.464$ ,  $0.435$  和  $0.375$ , 均  $P<0.05$ ), 与ROS和IGF-1呈显著负相关 ( $r=-0.447$  和  $-0.391$ , 均  $P<0.05$ )。**结论** COPD患者存在线粒体功能减退, 代谢水平异常, 且与SMD的发生密切相关。

**关键词:** 慢性阻塞性肺疾病; 线粒体; 代谢; 骨骼肌功能障碍

**中图分类号:** R563;R446.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 06-025-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.007

### Study on the Correlation between Changes Detection in Mitochondrial Function, Metabolic Level and Skeletal Muscle Dysfunction Inpatients with COPD

CHEN Yuan-jing, AI Hong-jun, WANG Xiang-yun, WU Qiong, CHANG Yan, LIU Jin-ming

(Department of Respiratory Medicine, Kongjiang Hospital of Yangpu District in Shanghai, Shanghai 200090, China)

**Abstract: Objective** To explore the correlation between changes in mitochondrial function, metabolic level and skeletal muscle dysfunction (SMD) in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** From December 2018 to December 2019, 60 COPD patients of outpatient from the Department of Respiratory Medicine of Kongjiang Hospital of Yangpu District in Shanghai were divided into the COPD-SMD group ( $n=21$ ) and the COPD group ( $n=39$ ) according to the combination of SMD or not. Healthy control of 30 cases was chosen at the same period as control group. The copy number of mt DNA, mitochondrial membrane potential, intracellular reactive oxygen species (ROS) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), serum insulin-like growth factor (IGF-1), leptin (LP), fasting insulin (FINS) in each group were compared, and the correlation between mitochondrial function and metabolic level with the action potential time of femoral nerve and conduction velocity of femoral nerve was analyzed. **Results** Compared with the control group, mtDNA copy number and membrane potential in PBMCs in COPD group and COPD-SMD group significantly decreased, while ROS significantly was increased ( $t=4.03\sim 9.97$ ,  $2.92\sim 6.75$  and  $2.73\sim 3.92$ , all  $P<0.05$ ). The indexes above were statistically significant between the COPD group and the COPD group ( $t=10.26$ ,  $5.28$  and  $9.24$ , all  $P<0.05$ ). LP and FINS in the COPD-SMD group, COPD group were significantly higher than the control group, and IGF-1 was significantly lower than the control group ( $t=5.57\sim 8.50$ ,  $5.27\sim 6.64$  and  $3.27\sim 11.57$ , all  $P<0.05$ ). LP and FINS in the COPD-SMD group were significantly higher than that in the COPD group, and IGF-1 was significantly lower than that in the COPD group ( $t=10.25$ ,  $14.26$  and  $8.01$ , all  $P<0.05$ ). The action potential time of femoral nerve was negatively correlated with mtDNA, membrane potential and L ( $r=-0.475$ ,  $-0.440$  and  $-0.416$ , all  $P<0.05$ ), and positively correlated with ROS and IGF-1 ( $r=0.421$  and  $0.471$ , all  $P<0.05$ ). The conduction amplitude of the femoral nerve was positively correlated with

**基金项目:** 上海市杨浦区医学重点学科专项基金 (基金编号: YP19ZB06)。

**作者简介:** 陈元菁 (1972-), 女, 学士, 副主任医师, 研究方向: 慢性气道疾病的临床研究, E-mail: ccyyqq\_1990@126.com。

**通讯作者:** 刘锦铭 (1959-), 男, 博士, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 肺循环疾病, E-mail: jinming2007@163.com。

mtDNA, membrane potential, LP and FINS ( $r=0.451, 0.464, 0.435$  and  $0.375$ , all  $P<0.05$ ), and negatively correlated with ROS and IGF-1 ( $r=-0.447$  and  $-0.391$ , all  $P<0.05$ ). **Conclusion** COPD had decreased mitochondrial function and abnormal metabolic levels, which were closely related to the occurrence of SMD, mitochondrial function and metabolic level are expected to be the evaluation indexes of skeletal muscle function in COPD patients.

**Keywords:** chronic obstructive pulmonary disease; mitochondria; metabolism; skeletal muscle dysfunction

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种多因素参与、多机制介导的全身性慢性炎症性疾病, 具有明显的肺外效应, 其中骨骼肌功能障碍 (skeletal muscle dysfunction, SMD) 因其对预后的严重影响而愈发引起重视<sup>[1-2]</sup>。COPD 并发 SMD 的机制尚不十分清楚, 普遍认为与全身系统性炎症、营养不良、运动量不足、缺氧、激素使用等所致患者肌肉损失有关, 从而造成患者运动强度、耐力下降, 甚至诱发 COPD 急性发作<sup>[3-4]</sup>。近年来, 研究发现线粒体作为机体代谢与活动所需能量及自由氧重要提供者, 其功能变化可能与 COPD 并发 SMD 存在联系<sup>[5]</sup>, 但相关研究较少且缺乏足够循证学依据。本研究通过检测 COPD 患者外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PMBCs) 线粒体功能、代谢水平变化, 分析其与骨骼肌功能的相关性, 现报告如下。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 回顾性分析 2018 年 12 月~2019 年 12 月杨浦区控江医院呼吸内科门诊就诊的 60 例 COPD 患者的临床资料。入组标准: ①均符合中华医学会发布的《慢性阻塞性肺疾病诊治指南 (2013 年修订版)》的诊断标准<sup>[6]</sup>; ②年龄 18~70 岁; ③排除支气管扩张、哮喘、肺癌等严重肺部疾病, 或并发重要器官功能障碍者。其中男性 37 例, 女性 33 例; 年龄 48~70 ( $52.8 \pm 4.6$ ) 岁; COPD 病程 2~15 ( $9.3 \pm 2.5$ ) 年。根据患者是否并发 SMD, 分为 COPD-SMD 组 ( $n=21$ ) 和 COPD 组 ( $n=39$ )。另选择本院同期健康体检者 30 例作为对照组, 排除心脑血管等严重疾病。其中男性 15 例, 女性 15 例; 年龄 45~70 ( $51.6 \pm 4.3$ ) 岁。各组年龄、性别构成比等基本资料比较, 差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。本研究获所有患者或家属知情同意。

**1.2 仪器与试剂** 人外周血淋巴细胞分离液 (Solarbio), TGL-16B 台式离心机 (上海安亭), QIAamp DNA 提取试剂盒 (德国 QIAGEN), BriCyte E6 流式细胞仪 (迈瑞) 及 JC-1 (美国 sig-

ma)、荧光探针 DCFH-DA (美国 Thermo) 试剂盒, 科斯迈 SMART 300 全自动化学发光测定仪, 试剂盒由福州迈新生物技术开发有限公司提供。

## 1.3 方法

**1.3.1 线粒体功能检测:** 抽取患者空腹外周静脉血 3 ml, 肝素抗凝, 按密度梯度离心法用淋巴细胞分离液分离出 PMBCs, 分装后于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。采用 QIAamp DNA 提取试剂盒提取线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA), 采用实时荧光定量 RT-PCR 检测 mtDNA 拷贝数。采用流式细胞术检测线粒体膜电位和细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 试剂盒分别为 JC-1、荧光探针 DCFH-DA。二者均以平均荧光强度 (MFI) 表示, 激发波长、发射波长分别为 488nm, 520 nm。

**1.3.2 代谢指标检测:** 取 2ml 外周静脉血, 分离血清, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血清胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 及瘦素 (LP) 水平, 采用化学发光免疫法检测空腹胰岛素 (fasting insulin, FINS) 水平, 试剂盒均由福州迈新生物技术开发有限公司提供, 所有操作严格按照说明书进行。

**1.3.3 骨骼肌功能检测:** 采用 Nicolet Viking Quest 型肌电诱发电位仪, 阳极置于髌骨上缘与髌前上棘连线的中点, 刺激电极沿肌肉纤维走行 2 cm 处, 刺激肌肉收缩后观察股神经传导时间及动作电位幅度。

**1.4 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 软件包对研究数据进行统计学分析, 计量资料采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD- $t$  检验; 计数资料采用  $\chi^2$  检验,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组 PMBCs 线粒体功能比较** 见表 1。与对照组比较, COPD 组、COPD-SMD 组 PMBCs 中 mtDNA 拷贝数、膜电位显著下降, ROS 则显著升高, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。上述指标在 COPD-SMD 组与 COPD 组比较, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

表 1 各组 PMBCs 线粒体功能比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	对照组 ( $n=30$ )	COPD 组 ( $n=39$ )	COPD-SMD 组 ( $n=21$ )	$t_1$	$t_2$	$t_3$	$P$
mtDNA (copies)	$2.38 \pm 0.23$	$2.07 \pm 0.37$	$1.36 \pm 0.49$	4.03	10.26	9.97	<0.05
ROS	$36.33 \pm 9.25$	$40.45 \pm 10.18$	$48.14 \pm 12.27$	2.73	5.28	3.92	<0.05
膜电位	$2\ 386.88 \pm 651.90$	$1\ 980.67 \pm 505.47$	$1\ 352.63 \pm 306.61$	2.92	9.24	6.75	<0.05

注:  $t_1$ : COPD 组 vs 对照组;  $t_2$ : 对照组 vs COPD-SMD 组;  $t_3$ : COPD 组 vs COPD-SMD 组。

2.2 各组机体代谢水平比较 见表2。COPD-SMD组、COPD组LP, FINS显著高于对照组, IGF-1较对照组显著降低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

COPD-SMD组LP, FINS显著高于COPD组, IGF-1较COPD组显著降低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

表2 各组机体代谢水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

项目	对照组( $n=30$ )	COPD组( $n=39$ )	COPD-SMD组( $n=21$ )	$t_1$	$t_2$	$t_3$	$P$
LP( $\mu\text{g/L}$ )	13.37 $\pm$ 2.38	21.06 $\pm$ 7.25	40.39 $\pm$ 10.23	5.57	10.25	8.50	<0.05
IGF-1( $\mu\text{g/L}$ )	45.33 $\pm$ 9.15	38.45 $\pm$ 8.26	16.14 $\pm$ 4.18	3.27	14.26	11.57	<0.05
FINS(mIU/L)	12.83 $\pm$ 3.93	18.34 $\pm$ 4.57	24.93 $\pm$ 6.34	5.27	8.01	6.64	<0.05

注:  $t_1$ : COPD组 vs 对照组;  $t_2$ : 对照组 vs COPD-SMD组;  $t_3$ : COPD组 vs COPD-SMD组。

2.3 线粒体功能、代谢水平与股神经功能相关性 见表3。Pearson线性相关分析显示, 股神经传导时间与mtDNA、膜电位、LP均呈显著负相关, 与

ROS, IGF-1呈显著正相关性( $P<0.05$ )。股神经动作电位幅度与mtDNA, 膜电位、LP, FINS均呈显著正相关, 与ROS, IGF-1呈显著负相关( $P<0.05$ )。

表3 线粒体功能、代谢水平与股神经功能相关性

项目	指标	股神经传导时间(ms)		股神经动作电位幅度(mV)	
		$r$	$P$	$r$	$P$
线粒体功能	mtDNA	-0.475	0.017	0.451	0.019
	ROS	0.421	0.333	-0.447	0.024
	膜电位	-0.440	0.031	0.464	0.017
代谢水平	LP	-0.416	0.035	0.435	0.027
	IGF-1	0.471	0.028	-0.391	0.038
	FINS	-0.317	0.147	0.375	0.047

### 3 讨论

SMD作为COPD患者最重要的肺外表现之一, 因其在发病早期缺乏典型症状易被忽略, 随着病情进展可出现肌肉体积减小、运动强度减弱、运动耐力下降, 严重影响患者生存质量与预后<sup>[7]</sup>。最新指南强调, 稳定期COPD患者的综合评估中应纳入SMD, 代谢综合征等并发症的评估。目前, COPD患者并发SMD尚无特殊有效治疗方法, 多局限于运动锻炼、营养支持方面, 但效果并不明显。现研究已证实, 氧化应激、细胞凋亡增加是导致肌肉丢失、萎缩进而诱发SMD的主要机制之一, 线粒体结构与功能障碍在COPD并发SMD中发挥着重要作用<sup>[8-9]</sup>。

线粒体作为骨骼肌运动所需能量的主要合成场所, 可通过其通透性转换孔调节细胞凋亡, 且线粒体呼吸链在氧化磷酸化反应产生ATP的同时产生大量ROS, 可能导致DNA损伤, 进而引起呼吸链相关蛋白质合成障碍, 形成缺陷呼吸链<sup>[10]</sup>。mtDNA是真核细胞除核DNA外唯一的遗传物质, 每个线粒体中约有2~10拷贝mtDNA, 近年来在肺部疾病的诊治及预后评估中的应用愈发广泛, 被视为线粒体功能的敏感指标。本研究中, COPD患者PBMCs中mtDNA拷贝数、膜电位显著下降, ROS则显著升高( $P<0.05$ ), 而COPD并发SMD患者线粒体功能损伤更为突出, 从而加剧对线粒体呼吸功能及

细胞内氧化磷酸化过程的抑制, 导致细胞产能持续下降<sup>[11]</sup>。KONOKHOVA等<sup>[12]</sup>研究发现, 与健康对照组相比, COPD患者肌肉组织中DNA氧化损伤产物羟脱氧鸟苷(8-OHdG)水平显著高于健康人群, 且mtDNA分布密度下降, 缺失率升高。户元元等<sup>[13]</sup>报道称, ROS的大量释放可通过影响肌质网功能、肌球蛋白ATP酶功能及肌细胞线粒体呼吸功能等途径引起肌组织萎缩、肌纤维类型转换导致骨骼肌消耗增加。

骨骼肌是胰岛素介导的葡萄糖摄取、代谢的重要靶器官, COPD患者在长期反复炎症、氧化应激状态刺激下, 下丘脑-垂体-肾上腺皮质系统激活后促进糖皮质激素、儿茶酚胺等升血糖激素释放, 易导致骨骼肌出现胰岛素抵抗(IR)<sup>[2]</sup>。研究认为, 骨骼肌IR与ROS含量密切相关, 生理水平ROS有助于维持骨骼肌强度, 而过量ROS通过损害线粒体功能、葡萄糖摄取导致骨骼肌IR<sup>[14]</sup>。本研究结果显示, 随着SMD的发生, COPD患者血清LP, FINS显著升高, IGF-1显著降低( $P<0.05$ ), 与朱木林等<sup>[15]</sup>研究结果相似, 表明COPD并发SMD患者机体代谢水平升高, 对脂肪合成抑制作用增强, 能量消耗增加, 促进骨骼肌蛋白质的分解。相关性分析发现, 股神经传导时间及动作电位幅度与mtDNA, 膜电位、LP存在显著相关性( $P<0.05$ ), 进一步证实了SMD严重程度与线粒体(下转第32页)