

论著·临床研究

## 左向右分流先天性心脏病儿童红细胞 氧化应激状态相关研究

乐高钟 董湘玉 沈阳 陈永前 芦金萍

(兰州大学第二医院儿科,甘肃 兰州 730030)

**[摘要]** **目的** 研究左向右分流型先天性心脏病(先心病)患儿红细胞氧化应激状态,探讨其相互关系及临床意义。**方法** 左向右分流先心病患儿31例为实验组,再根据解剖特点分为亚组,其中房间隔缺损(ASD)7例、室间隔缺损(VSD)12例、动脉导管未闭(PDA)4例、卵圆孔未闭(PFO)6例、完全性心内膜垫缺损(复杂组)2例;门诊健康体检儿童20例为对照组,两组年龄均为1月至3岁。用酶联免疫法(ELISA法)测定红细胞内超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)含量;魏氏法检测ESR,血气分析仪(GEM Premier 3000)测定PaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>。**结果** 先心病组与对照组比较红细胞内MDA含量升高,SOD含量降低,两组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );合并心力衰竭时SOD较对照组下降更为明显,MDA含量明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。各解剖分型组中,SOD含量以PFO组最高,复杂组最低,PFO组与ASD组、VSD组、复杂组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );MDA含量以VSD组最高,PFO、ASD及PDA组有所降低,复杂组最低,组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。相关分析显示先心病组ESR及MDA含量与SOD含量的改变呈负相关( $r = -0.191, r = -0.312; P < 0.05$ ),而ESR与PaO<sub>2</sub>的变化呈正相关( $r = 0.216, P < 0.05$ )。**结论** 左向右分流先心病患儿体内存在氧化应激,测定红细胞SOD、MDA含量可较好反映疾病严重程度。

[中国当代儿科杂志,2010,12(6):440-443]

**[关键词]** 先天性心脏病;红细胞;氧化应激;儿童

[中图分类号] R725.4 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2010)06-0440-04

### Erythrocyte oxidative stress in children with left to right shunt congenital heart disease

LE Gao-Zhong, DONG Xiang-Yu, SHEN Yang, CHEN Yong-Qian, LU Jin-Ping. Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China (Email: Dong X-Y, Email: dxy0223@163.com)

**Abstract: Objective** To study erythrocyte oxidative stress status and its association with left to right shunt congenital heart disease (CHD) in children. **Methods** A total of 31 children with left to right shunt CHD were enrolled, including 7 cases of atrial septal defect (ASD), 12 ventricular septal defect (VSD), 4 patent ductus arteriosus (PDA), 6 patent foramen ovale (PFO), and 2 complete endocardial cushion defect. Twenty healthy age-matched (1 month to 3 years old) children served as the control group. The contents of superoxide dismutase (SOD) and malonaldehyde (MDA) in erythrocytes were determined using ELISA. ESR was measured by Westergen. PaO<sub>2</sub> and PaCO<sub>2</sub> were measured by Blood Gas Analyzer (GEM Premier 3000). **Results** The MDA content in erythrocytes in the CHD group was significantly higher, in contrast, SOD content was significantly lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The CHD children with heart failure had more decreased SOD and more increased MDA contents compared with the control group ( $P < 0.01$ ). The SOD level was the highest in the PFO group and was the lowest in the complete endocardial cushion defect group. The SOD level in the PFO group was significantly higher than that in the ASD, VSD and complete endocardial cushion defect groups ( $P < 0.05$ ). The MDA level was the highest in the VSD group and was the lowest in the complete endocardial cushion defect group. There were significant differences in the MDA level among CHD subgroups ( $P < 0.05$ ). The ESR was negatively correlated to the SOD level ( $r = -0.191, P < 0.05$ ), while positively correlated to PaO<sub>2</sub> level in CHD children ( $r = 0.216, P < 0.05$ ). There was a negative correlation between SOD and MDA levels ( $r = -0.312, P < 0.05$ ). **Conclusions** Oxidative stress exists in children with left to right shunt CHD. The SOD and MDA contents in erythrocytes can be used as markers for the assessment of severity of the disease.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (6):440-443]

**Key words:** Congenital heart disease; Erythrocyte; Oxidative stress; Child

[收稿日期]2009-08-20; [修回日期]2010-03-10  
[基金项目]兰州大学2008年度医学科研部资助项目(项目代码:820821)。  
[作者简介]乐高钟,男,硕士研究生。  
[通信作者]董湘玉,主任医师。

先天性心脏病(先心病)是胎儿期心脏及大血管发育异常的一种先天畸形,是小儿最常见的心脏病。由于解剖结构的异常,导致血液动力学的改变,部分患儿出现心功能异常,甚至心力衰竭(心衰)。缺氧是重要作用之一,亦是氧化应激重要诱因之一。缺氧引起的氧自由基(oxygen free radical, OFR)急剧升高是氧化应激损伤的主要病理基础<sup>[1]</sup>。红细胞是血液中重要细胞之一,亦是血液中主要的抗氧化成分。本研究旨在以红细胞为研究对象,从自由基生物学角度,测定红细胞内超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的含量,作为体内氧化应激的生物指标,观察先心病(左向右分流型)患儿体内氧化应激状态。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

先心病组经彩色超声心动图确诊为左向右分流先心病患儿31例(系2008年10月至2009年6月兰州大学第二医院住院治疗患儿,并心衰组4例,非心衰组27例),其中男17例,女14例,年龄1月至3岁,平均年龄 $12.4 \pm 6.7$ 月;再根据解剖特点将先心病患儿分成室间隔缺损(VSD)、房间隔缺损(ASD)、动脉导管未闭(PDA)、卵圆孔未闭(PFO)及完全性心内膜垫缺损(复杂畸形)各亚组。对照组为本院门诊健康体检儿童20例,其中男11例,女9例,年龄1月至3岁,平均年龄 $13.8 \pm 7.6$ 月。先心病组(部分存在肺功能异常)与对照组年龄和性别差异无统计学意义。

### 1.2 方法

1.2.1 标本采集 先心病组患儿于入院后在不吸氧状态下取股静脉血3 mL,注入EDTA-K3抗凝管中,混匀,4℃,3 000 r/min离心10 min,分离弃血浆、血小板等,留置底层红细胞约1 mL,经80%甘油与PBS缓冲溶液处理后,使红细胞的最终浓度为40%<sup>[2]</sup>,混匀,静置5 min,分别编号,置于-70℃冰箱中保存待测。对照组于体检日取静脉血3 mL作同样处理。另采桡动脉血各1 mL,用于血气分析。

1.2.2 主要试剂 80%甘油、PBS缓冲液购自兰州百源基因技术有限公司,羟乙基淀粉200/0.5氯化钠溶液(6% HSE200/0.5)购自北京费森尤斯卡比医药有限公司,SOD、MDA ELISA试剂盒购自上海沪尚生物科技有限公司。

1.2.3 主要仪器 冷冻离心机,酶标仪,-70℃冰箱,电热恒温水浴箱,血气分析仪(GEM Premier 3000)。

1.2.4 ELISA检测SOD、MDA含量 采用梯度洗涤法<sup>[3]</sup>洗涤甘油化的红细胞,红细胞去甘油化后加4倍体积的蒸馏水充分溶血,采用美国ADL公司生产SOD、MDA ELISA试剂盒测定溶血后红细胞内SOD、MDA含量,严格按照试剂说明书操作。血沉(ESR)测定采用魏氏法。

### 1.3 统计学方法

所得数据用SPSS 11.0统计软件分析处理,计量资料用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示;组间比较采用单因素方差分析,先心病各亚组间比较采用单因素方差分析,相关分析采用直线相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 先心病患儿与对照组红细胞内SOD及MDA含量比较

与对照组比较,先心病组SOD明显下降,差异有统计学意义( $t = 2.306, P < 0.05$ ),先心病合并心衰组SOD下降更为明显,差异有统计学意义( $t = 3.731, P < 0.01$ )。与对照组比较,先心病非心衰组MDA有所升高,但差异无统计学意义( $t = 1.675, P > 0.05$ ),先心病合并心衰组MDA明显升高,差异有统计学意义( $t = 3.740, P < 0.01$ )。先心病组与对照组比较MDA升高明显,差异有统计学意义( $t = 2.514, P < 0.05$ )。先心病心衰组与非心衰组比较SOD、MDA含量差异有统计学意义( $t = 2.113, P < 0.05; t = 2.927, P < 0.05$ )。见表1。

### 2.2 先心病患儿与对照组ESR、PaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>水平比较

与对照组比较,先心病组及先心病合并心衰组,PaO<sub>2</sub>呈下降趋势,差异有统计学意义(分别为 $t = 14.098, P < 0.01; t = 13.097, P < 0.01$ )。与对照组比较,先心病组ESR、PaCO<sub>2</sub>呈上升趋势,差异有统计学意义(分别为 $t = 2.277, P < 0.05; t = 2.158, P < 0.05$ );先心病合并心衰组ESR、PaCO<sub>2</sub>明显升高,差异有统计学意义(分别为 $t = 3.395, P < 0.01; t = 6.537, P < 0.01$ )。先心病心衰组与非心衰组比较ESR、PaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>水平差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 先心病组与对照组红细胞 SOD MDA ESR PaO<sub>2</sub> 及 PaCO<sub>2</sub> 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例	SOD(μg/mL)	MDA(ng/mL)	ESR(mm/h)	PaO <sub>2</sub> (mmHg)	PaCO <sub>2</sub> (mmHg)
对照组	20	4.13 ± 1.03	0.50 ± 0.20	3.3 ± 1.7	81.8 ± 3.7	35.5 ± 2.1
先心病组	31	3.12 ± 1.47 <sup>a</sup>	0.72 ± 0.33 <sup>a</sup>	6.0 ± 2.5 <sup>b</sup>	60.0 ± 4.7 <sup>b</sup>	38.5 ± 4.6 <sup>a</sup>
非心衰组	27	3.36 ± 1.52 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.25	5.7 ± 2.0 <sup>a</sup>	63.1 ± 4.3 <sup>b</sup>	38.0 ± 4.0
并心衰组	4	2.15 ± 0.27 <sup>b,c</sup>	0.89 ± 0.40 <sup>b,c</sup>	7.0 ± 1.8 <sup>b,c</sup>	52.8 ± 3.3 <sup>b,c</sup>	44.5 ± 3.4 <sup>b,c</sup>
F 值		4.913	6.567	3.798	9.031	3.641
P 值		0.040	0.017	0.039	0.008	0.043

与对照组比较, a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ ; c: 与非心衰组比较,  $P < 0.05$

### 2.3 先心病各亚组 SOD MDA ESR PaO<sub>2</sub> 及 PaCO<sub>2</sub> 比较

PFO 组 SOD 含量与其他各亚组 (ASD、VSD 和复杂组) 比较, PFO 组含量最高, 复杂组明显降低, 差异有统计学意义 ( $F = 1.797, P < 0.05$ ), 而 ASD、VSD、PDA 和复杂组间比较差异无统计学意义 ( $F = 0.537, P > 0.05$ ); 与 VSD 组比较, 复杂组 MDA 含量明显降低, 差异有统计学意义 ( $F = 5.169, P < 0.01$ ); 与 ASD、PFO 及 PDA 组间

比较, 复杂组 MDA 含量有所下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。ESR 检测复杂组最快, 与 PFO 组比较, 差异有统计学意义 ( $F = 2.798, P < 0.05$ ), 而 ASD、VSD、PFO、PDA 组间比较 ESR 差异无统计学意义 ( $F = 0.429, P > 0.05$ ); PaO<sub>2</sub> 在 PDA 组较高, 复杂组最低, 下降较明显, PDA 组与复杂组及 ASD 组比较差异有统计学意义 ( $F = 2.031, P < 0.05$ )。见表 2。

表2 先心病各亚组红细胞 SOD MDA ESR PaO<sub>2</sub> 及 PaCO<sub>2</sub> 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例	SOD(μg/mL)	MDA(ng/mL)	ESR(mm/h)	PaO <sub>2</sub> (mmHg)	PaCO <sub>2</sub> (mmHg)
ASD 组	7	2.89 ± 1.06	0.72 ± 0.29	5.75 ± 2.50	56.5 ± 5.1	38.8 ± 3.9
VSD 组	12	2.54 ± 0.56	1.19 ± 0.85 <sup>a</sup>	6.00 ± 2.83	60.8 ± 4.4	36.4 ± 3.5
PDA 组	4	3.15 ± 0.90	0.57 ± 0.13	5.50 ± 0.71	62.8 ± 4.8 <sup>a</sup>	40.8 ± 5.7
PFO 组	6	5.29 ± 4.30 <sup>a</sup>	0.62 ± 0.29	2.50 ± 0.71	61.4 ± 2.9	38.8 ± 6.5
复杂组	2	2.39 ± 0.10	0.39 ± 0.98 <sup>b</sup>	10.00 ± 2.83 <sup>a</sup>	56.0 ± 1.4	40.0 ± 1.4
F 值		1.797	5.169	2.798	2.031	0.358
P 值		0.044	0.006	0.013	0.035	0.921

指标组间(标注组与其他组)比较: a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$

### 2.4 相关分析

Pearson 相关分析显示, 先心病组 ESR 与 SOD 含量呈显著负相关 ( $r = -0.191, P < 0.05$ ), 与 PaO<sub>2</sub> 呈显著正相关 ( $r = 0.216, P < 0.05$ ); SOD 含量与 MDA 含量的改变呈负相关 ( $r = -0.312, P < 0.05$ )。

## 3 讨论

氧化应激(oxidative stress, OS) 机制在许多疾病发生与转归中具有重要作用, 成为研究的热点。随着自由基学说理论的研究深入, 大量研究证实细胞的脂质过氧化与其功能的异常有很大的关系<sup>[4]</sup>。脂质过氧化发生在需氧细胞中, 是分子态的氧与不饱和脂肪酸作用的过程, 自由基被证实广泛地参与脂质过氧化过程<sup>[5]</sup>, 缺氧是重要诱因之一。红细胞是氧化应激研究对象之一。细胞内 SOD 和脂质过氧化物 MDA 的含量及活性的改变在疾病发生过程中

有重要作用, 从自由基生物学角度, 在小儿先心病中的相关研究报道较少。

本研究结果显示先心病组 PaO<sub>2</sub> 明显低于对照组, 合并心衰时, PaO<sub>2</sub> 下降更为显著, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  及  $P < 0.01$ ), 说明先心病患儿存在低氧状态。本研究同时发现先心病组 ESR 明显快于对照组, 合并心衰时, 缺氧更显著, 血 ESR 更快, 说明先心病患儿在低氧状态下, 红细胞功能受到影响, 缺氧越严重, ESR 越快。

SOD 是体内一种重要的氧自由基清除剂, 具有重要的生物学功能。本研究结果显示, 先心病组红细胞内 SOD 浓度明显低于对照组, 合并心衰时, 由于 PaO<sub>2</sub> 降低, 红细胞内 SOD 含量下降更为显著, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  及  $P < 0.01$ )。SOD 是机体主要抗氧化剂之一, 普遍存在于有氧代谢的细胞中。先心病患者在缺氧状态下产生过多的自由基, 消耗了内源性 SOD, SOD 发生糖基化后活性下降,

抗氧化能力下降,氧自由基通过与细胞膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,破坏细胞结构和功能。红细胞对氧化应激比较敏感,它对体外氧化应激的敏感性反映了其他组织和器官同样的趋势<sup>[6]</sup>。MDA是自由基与生物膜多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化的产物,其含量反映氧自由基的水平及脂质过氧化的程度<sup>[7]</sup>。因此,MDA不仅是细胞损伤的代谢产物,而且是细胞、组织及机体氧化程度较为可靠的检测指标。本研究显示先心病组红细胞内MDA浓度在没有合并心衰的情况下,与对照组比较差异无统计学意义,合并心衰时含量明显升高,与对照组比较差异有统计学意义。原因可能是红细胞早期缺氧外膜较内膜敏感,诱发氧化应激时内膜较外膜程度略低;另外,红细胞膜内与膜外理化因素的不同,膜外环境更容易受影响,MDA首先在细胞外液中发生变化,细胞内MDA改变不明显,只有在严重低氧(先心病合并心衰)状态下,细胞内MDA才出现升高。本研究未测红细胞外液MDA含量,具体变化有待进一步研究。

在先心病解剖分型亚组中,PFO组SOD含量最高,其次为PDA组,复杂组最低,PFO组与复杂组比较差异有统计学意义;复杂组MDA含量较低,与各亚组间比较差异有统计学意义;复杂组ESR较PFO组明显增快,差异有统计学意义;PaO<sub>2</sub>复杂组最低,与各亚组比较差异有统计学意义。复杂组先心病患儿处于低氧环境中,缺氧越严重,氧化应激程度越严重,但本研究未发现SOD与MDA之间存在直线相关性,可能为大量活性氧形成,而不是抗氧化系统破坏。

SOD具有催化超氧化物自由基O<sub>2</sub><sup>-</sup>(超氧阴离子)发生歧化反应的能力,及时清除体内O<sub>2</sub><sup>-</sup>,防止产生过多有害的氧自由基<sup>[8]</sup>。合成SOD的多少常受O<sub>2</sub><sup>-</sup>浓度的影响,当O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生增加时,合成SOD相应增加。氧自由基与不饱和脂肪酸作用引起脂质过氧化反应而产生脂质过氧化物,由于MDA的产生与脂质过氧化平行,测定MDA可代表脂质过氧化物浓度。当机体内氧自由基的产生与清除之间的平衡遭到破坏,表现为SOD及MDA含量改变<sup>[9]</sup>。本研究中红细胞内MDA含量先心病组与对照组比较差异无统计学意义,但在相关分析显示MDA与SOD存在着一定的负相关,提示在先心病患儿体内虽然未发现有氧自由基产生与清除失衡的直接证

据,但是ESR、PaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>及氧自由基之间的相互关系仍值得关注。

综上所述,氧化应激参与了先心病(左向右分流型)的病理过程,体内SOD失衡可能在先心病心肺功能异常中发挥了重要作用,当合并肺功能异常(如肺炎、肺动脉高压等)时,病变虽在心血管,损害的却是肺循环<sup>[10]</sup>。本研究发现部分患儿存在不同程度心肺功能异常,在先心病后期阶段,缺氧或缺血可加重各脏器(心、肺等)氧化应激,应考虑予以抗氧化剂以保护患儿免受氧化应激损害。检测红细胞内MDA、SOD含量,对进一步的了解先心病的病情,指导临床实践具有重要的临床价值。由于本研究只限于左向右分流先心病小样本探讨,相关研究需扩大样本、对其他分流型先心病进一步研究。

#### [参 考 文 献]

- [1] 孙存普,张建中,段绍瑾. 自由基生物学导论[M]. 第3版. 北京:中国科学技术出版社,1999:112-148.
- [2] 何晖,刘宝林,华泽钊,沈敏,陈颖. 甘油保护剂对冷冻干燥保存红细胞作用的实验研究[J]. 上海理工大学学报,2006,28(5):413-417.
- [3] 吴艳丽,陆典瑞,胡继红,赵玉验. 影响冷冻红细胞质量的若干因素研究[J]. 中华煤炭医学杂志,2007,10(12):1412-1413.
- [4] Fenari G, Agnoletti L, Comini L, Gaia G, Bachetti T, Cargoni A, et al. Oxidative stress during myocardial ischemia and heart failure curpharm[J], 2004,10(14):1699-1711.
- [5] 方允中,李文杰. 自由基和酶基础理论及其在生物学和医学中的应用[M]. 第2版. 北京:科学出版社,1994:126-127.
- [6] Yedgar S, Hovav T, Barshtein G. Red blood cell intercellular interactions in oxidative stress states[J]. Clin Hemorheol Microcirc, 1999, 21(3-4):189-193.
- [7] Serdar Z, Serdar A, Altin A, Eryilmaz U, Albayrak S. The relation between oxidant and antioxidant parameters and severity of acute coronary syndromes [J]. Acta cardiologica, 2007, 62(4): 373-380.
- [8] Lee YS, Sindhu RK, Lin CY, Ehdaie A, Lin VW, Vaziri ND. Effects of nerve graft on nitric oxide synthase, NADPH oxidase, and antioxidant enzymes in chronic spinal cord injury [J]. Free Radic Biol Med, 2004, 36(3):330-339.
- [9] 张庆荣,周坚,黄绮玲,尹碧容,陈伦能,曾玫玫,等. 铅暴露对一氧化氮及氧自由基代谢的影响[J]. 中国儿童保健杂志, 2005,13(4):293-295.
- [10] Chowdhury UK, Bishnoi AK, Ray R, Mishra AK, Gonvindappa RM. Central pulmonary artery histopathology in patients with cyanotic congenital heart diseases [J]. Ann Thorac Surg, 2009, 87(2):596-598.

(本文编辑:黄 榕)