

全血铁和铜与心血管疾病关联的基于队列的病例对照研究

黄 仙¹, 吴寿岭³, 陈朔华⁴, 孙园园², 张 迪², 郭淑霞^{1*}, 王 丽^{2*}

(1. 石河子大学 医学院 预防医学系, 新疆 石河子 832000; 2. 中国医学科学院基础医学研究所 北京协和医学院基础学院 流行病学与卫生统计学系, 北京 100005; 3. 开滦总医院 心内科, 河北 唐山 063000; 4. 开滦(集团)公司 员工健康保障中心, 河北 唐山 063000)

摘要:目的 探究全血铁和全血铜及其交互作用与心血管疾病(CVD)发生的关系。方法 采用基于队列的病例对照研究设计,选择2017年至2018年开滦集团队列人群中在3所定点医院随访的全部93例心血管疾病CVD男性患者为病例组,同期与病例按照年龄、工作类型1:4个体匹配的372名非心血管疾病(non-CVD)男性人群为对照组;采用电感耦合等离子体质谱仪分析方法检测全血中铁和铜的含量。使用条件logistic回归模型分别评估全血铁和铜对心血管疾病CVD的单独效应,采用自适应弹性网络方法构建全血铁与铜的环境风险评分作为共同暴露,并进一步估计该评分与心血管疾病CVD之间的关联。结果 病例组中的全血铁水平明显高于对照组,而全血铜水平低于对照组($P<0.001$)。在校正年龄、吸烟、饮酒、超重、高血压、糖尿病、贫血、高血症和高敏C反应蛋白后,相比于低血铁组,高血铁组发生CVD心血管疾病的风险增加了3.17倍($OR=4.17, 95\% CI: 2.23\sim 7.79, P<0.001$),低血铜组发生CVD心血管疾病的风险比高血铜组增加了3.26倍($OR=4.26, 95\% CI: 1.73\sim 10.45, P<0.01$)。风险评分 >0.232 组发生心血管病的风险是风险评分 ≤ 0.232 组的8.96倍($OR=8.96, 95\% CI: 4.47\sim 17.95, P<0.001$)。结论 高血铁和铜缺乏可能是CVD心血管病的独立危险因素;环境风险评分可作为评价血铁和铜共同暴露的指标,对CVD心血管疾病的风险预测价值更大。

关键词: 全血铁;全血铜;心血管疾病(CVD);病例对照研究

中图分类号:R181.3 文献标志码:A

A cohort-based case control study on the association between the whole blood iron and copper with cardiovascular diseases

HUANG Xian¹, WU Shou-ling³, CHEN Shuo-hua⁴, SUN Yuan-yuan², ZHANG Di², GUO Shu-xia^{1*}, WANG Li^{2*}

(1. Department of Preventive Medicine, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000; 2. Department of Epidemiology and Health Statistics, Institute of Basic Medical Sciences CAMS, School of Basic Medicine PUMC, Beijing 100005; 3. Department of Cardiology, Kailuan General Hospital, Tangshan 063000; 4. Health Care Center, Kailuan Group, Tangshan 063000, China)

Abstract: Objective To investigate the association between whole blood iron, copper and their interaction with cardiovascular diseases (CVD). **Methods** A cohort-based case control study was conducted. Cases were 93 males with CVD in the Kailuan cohort who participated in the follow-up in 3 hospitals in 2017–2018. During the same

收稿日期:2021-02-04 修回日期:2021-03-20

基金项目:中国科学院医学科学创新基金(2016-I2M-3-001)

*通信作者(corresponding author):liwang@ibms.pumc.edu.cn; 2320100252@qq.com

period, 372 males with non-CVD who were 1 : 4 individual matched by age and labor type were selected as controls. The concentration of blood iron and copper was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry. Conditional logistic regression models were used to estimate the association between blood iron and copper and CVD, respectively and elastic-Net regression models to estimates interaction between the two metals and CVD.

Results The whole blood iron concentration in the cases was significantly higher than the controls, while blood copper concentration was lower than the controls (both $P < 0.001$). After adjusting for age, smoking, drinking, overweight, hypertension, diabetes, anemia, hyperlipidemia, and high sensitivity C-reactive protein, the participants with higher iron increase 3.17 times ($OR = 4.17, 95\% CI: 2.23-7.79, P < 0.001$) risk of CVD than those with lower iron, and those with lower copper increase 3.26 times ($OR = 4.26, 95\% CI: 1.73-10.45, P < 0.01$) risk than those with the higher copper. Adaptive Elastic-net regression analysis showed that it under the simultaneous exposure of higher iron and lower copper, the risk of CVD with environment risk score > 0.232 was 8.96 times ($OR = 8.96, 95\% CI: 4.47-17.95, P < 0.001$) than the score ≤ 0.232 . **Conclusions** Higher iron and copper deficiency may be independent risk factors for CVD. Environment risk score could be a good indicator of simultaneous exposure of blood iron and copper, which should have a better predictive value of CVD.

Key words: whole blood iron; whole blood copper; cardiovascular diseases (CVD); case control studies

心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)是导致包括中国在内的全球死亡的首要原因^[1]。控制CVD的危险因素,尤其是可控的危险因素,从而最终实现CVD的预防和控制是中国乃至全球面临的重要公共卫生问题之一。目前已确定的CVD危险因素包括高血压、高血脂、吸烟、肥胖及糖尿病等^[2-3]。近年来,微量元素对心血管健康的影响逐渐被关注。研究显示,人体微量元素的不平衡可能导致CVD的发生风险增加,但结论仍然存在不一致^[4]。因此,本研究拟基于开滦队列人群开展病例-对照研究,探讨全血铁、铜及其交互作用与CVD的发生风险关联。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本研究是以开滦队列人群为基础的病例对照研究(cohort-based case control study)。开滦队列始建于2006年,以河北省开滦集团所辖的11家医院的所有职工体检人群为研究对象,每两年随访一次。本研究病例选自2017-08-01至2018-05-31,在该集团所辖的林西医院、马家沟医院和荆各庄医院3家医院随访,且经诊断为CVD的93例男性;其中CVD的诊断标准分别遵循美国心脏病学院和美国心脏协会(ACC/AHA)2009年修订的心肌梗死治疗指南^[5]和1989年世界卫生组织(WHO)针对卒中提出的标

准诊断^[6]。对照组选自同期相同医院随访的无CVD男性,与病例组按照年龄(± 5 岁)和职业(体力劳动、脑力劳动)进行1:4的个体匹配,共372名对照。本研究排除了受微量元素潜在影响的疾病,如癌和帕金森病。本研究已经通过开滦集团有限公司医院医学伦理委员会批准;此研究经开滦集团和中国医学科学院伦理委员会批准(批准号:2018ZX10715005),并取得所有涉及此项研究对象的知情同意。

1.2 研究方法

1.2.1 资料收集及指标测量:由统一培训的医生和护士按照统一的标准,通过问卷调查、体格检查和实验室检查收集信息。问卷调查包括年龄、性别、职业、吸烟、饮酒史、病史(高血压、糖尿病等)等。体格检查包括身高、体质量、腰围、臀围和血压等的测量,并根据体质量(kg)/身高²(m²)计算体质指数(body mass index, BMI)。常规实验室检查包括血生化(血红蛋白等)和血常规(三酰甘油、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、空腹血糖和高敏C反应蛋白等)。所有受检者收集静脉血标本前均空腹 ≥ 8 h,采用日立7600自动化分析仪测定血常规和血生化指标。同时采用电感耦合等离子质谱仪分析方法检测全血中铁和铜含量,具体的方法为:全血样品经0.5%硝酸稀释、混匀、离心后,取上清液,再次经0.5%硝酸稀释、混匀,作为待测溶液样品。分别取铜和铁标准品,以0.5%硝酸逐级稀释为工作标

准溶液。将工作标准溶液系列样品和待测溶液样品依次上机,同时加入内标混合溶液,建立内标校正标准曲线法以定量分析血铁和血铜浓度。采用混合人全血样品作为质控样品,跟随每个批次进行检测。

1.2.2 相关变量的定义以及诊断标准:吸烟定义为每天至少吸1支烟并且连续吸烟超过1年。饮酒定义为过去一年内至少饮酒12次及以上。高血压定义为收缩压 ≥ 140 mmHg或舒张压 ≥ 90 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),或正在服用高血压降压药物,或自我报告有高血压患病史^[7]。糖尿病定义为空腹血糖 ≥ 7.0 mmol/L,或有降血糖用药史,或自我报告糖尿病患病史^[8]。高血脂症定义为总胆固醇 ≥ 5.2 mmol/L或三酰甘油 ≥ 1.70 mmol/L或高密度脂蛋白胆固醇 < 1.0 mmol/L或低密度脂蛋白胆固醇 ≥ 3.4 mmol/L^[9];BMI ≥ 24 kg/m²定义为超重或肥胖^[10];贫血定义为血红蛋白 < 130 g/L^[11]。

1.3 统计学分析

服从正态分布的连续变量以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)描述,组间比较采用 t 检验;非正态分布的连续变量采用中位数(25%分位数,75%分位数)描述,组间比较采用Mann-Whitney U 检验;分类变量用例数(%)表示,组间比较采用Pearson卡方检验或Fisher确切概率法。

在探讨全血铁、全血铜与CVD的单独效应时,首先基于限制性立方样条函数确定全血铁和血铜与CVD的关系,并将其作为全血铁和血铜的分组依据;之后采用3个条件logistic回归模型分别探讨全血铁和全血铜与CVD之间的风险关联:模型1校正年龄;模型2校正年龄、吸烟、饮酒、超重;模型3进一步校正高血压、糖尿病、高血脂症、贫血和高敏C反应蛋白。

进一步探究全血铁和血铜共暴露与CVD的效应。首先,将所有金属浓度进行 Z 转换,采用自适应弹性网络回归(Adaptive Elastic-net, AENET)模型^[12]对全血铁和血铜的线性项、平方项以及二者的交互项进行筛选,惩罚系数根据5-折交叉验证法得到,选择最小预测误差的参数作为最终纳入的惩罚系数;使用AENET模型中保留的与CVD关系密切的金属项构建环境风险评分(Environmental Risk Score, ERS)代表全血铁和血铜对CVD的综合效

应。ERS计算公式如下:

$$ERS_i = \sum_{j=1}^p \beta_j E_i^j + \sum_{k=1}^{(p-1)} \beta_{kl} E_i^k E_i^l + \sum_{m=1}^p \beta_m (E_i^m)^2$$

其中 E_i^j 表示第 j 种微量元素标准化浓度; β_j 表示第 j 种微量元素的回归系数; β_{kl} 表示微量元素 k 和 l 交互项回归系数; β_m 表示第 m 种微量元素平方项的回归系数。采用条件logistic回归估计ERS与CVD的关系。

所有数据分析均采用SAS9.4版和R3.6.1版软件完成。

2 结果

2.1 研究人群基本特征

研究对象特征如表1所示,病例组的平均年龄为(61.3 \pm 7.9)岁,对照组为(61.0 \pm 7.5)岁。与对照组相比,CVD组人群超重、糖尿病、高血压和贫血的比例以及高敏C反应蛋白水平均偏高($P < 0.05$)。但两组人群在吸烟、饮酒和高血脂症等的分布上无显著差异无统计学意义。

表1 研究人群特征分布

Table 1 Characteristics of the participants

variable	control ($n=372$)	case ($n=93$)
age/years($\bar{x}\pm s$)	601.980 \pm 7.51	61.273 \pm 7.93
labor type		
mental labor	8(2.15)	2(2.15)
manual labor	364(97.85)	91(97.85)
smoking/%	138(38.33)	25(28.09)
drinking/%	67(18.01)	9(9.68)
overweight/%	200(54.05)	67(72.83)**
diabetes/%	52(13.98)	22(23.66)*
hypertension/%	126(33.87)	44(47.31)*
hyperlipemia/%	226(60.75)	57(61.29)
hs-CRP/[(mg/L), P50(P25, P75)]	1.46(0.62, 3.34)	2.04(1.05, 4.50)**
anemia/%	86(23.37)	33(35.48)*
blood iron/[(μ g/mL), ($\bar{x}\pm s$)]	480.60 \pm 100.53	576.06 \pm 103.78***
blood copper/[(μ g/mL), ($\bar{x}\pm s$)]	0.63 \pm 0.12	0.54 \pm 0.10***

hs-CRP: high sensitivity C-reactive protein; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control group.

2.2 病例组和对照组人群全血铁和全血铜浓度的分布

CVD 组全血铁浓度显著高于对照组 [(576.06±103.78) μg/mL vs. (480.60±100.53) μg/mL], 而血铜浓度显著低于对照人群 (0.54±0.10) μg/mL vs. (0.63±0.12) μg/mL ($P<0.001$)。Spearman 相关分析结果显示, 全血铁和血铜存在负相关关系 (相关系数 $r=-0.334, P<0.001$) (图 1, 表 1)。

2.3 全血铁和血铜与 CVD

限制性立方样条 (restricted cubic spline, RCS) 回归分析显示, 全血铁浓度与 CVD 呈现正向线性关系 (线性检验 $P<0.001$); 全血铜浓度与 CVD 之间呈现反向的非线性关系 (非线性检验 $P<0.001$) (图 2)。

根据样条图结果, 全血铁以对照组的中位值 (490.58 μg/mL) 分为低血铁组和高血铁组, 全血铜根据对照人群的 75 分位数 (0.684 μg/mL) 分为低血铜组和高血铜组, 分别构建条件 logistic 回归。结果显示 (表 2): 对于全血铁 3 个模型均表现出高血铁组人群的 CVD 发生风险较低血铁组增加 ($P<0.001$); 而对于全血铜, 低血铜组发生 CVD 的风险较高血铜组增加 ($P<0.01$)。

2.4 全血铁和血铜危险评分与 CVD

全血铁、铜的线性项、平方项及其交互作用均被保留在 AENET 模型中 (表 3)。基于上述模型分别计算每个病例和对照的环境风险评分 ERS, ERS 范围为 -2.683~3.608, 中位值为 0.081。随着铁浓度

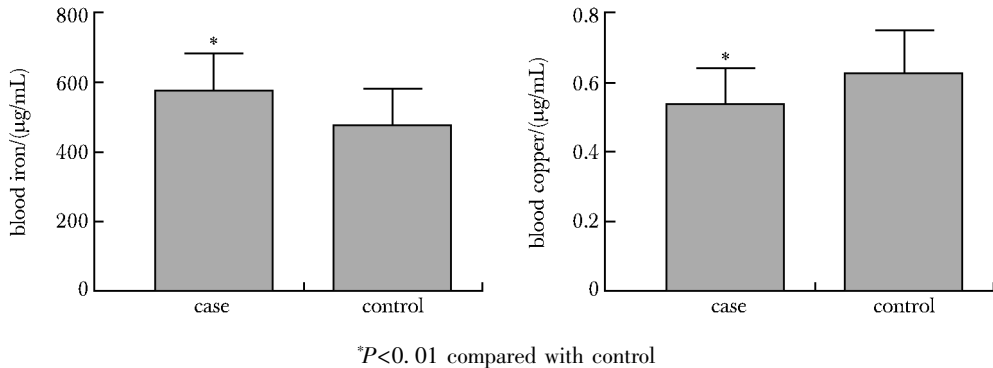
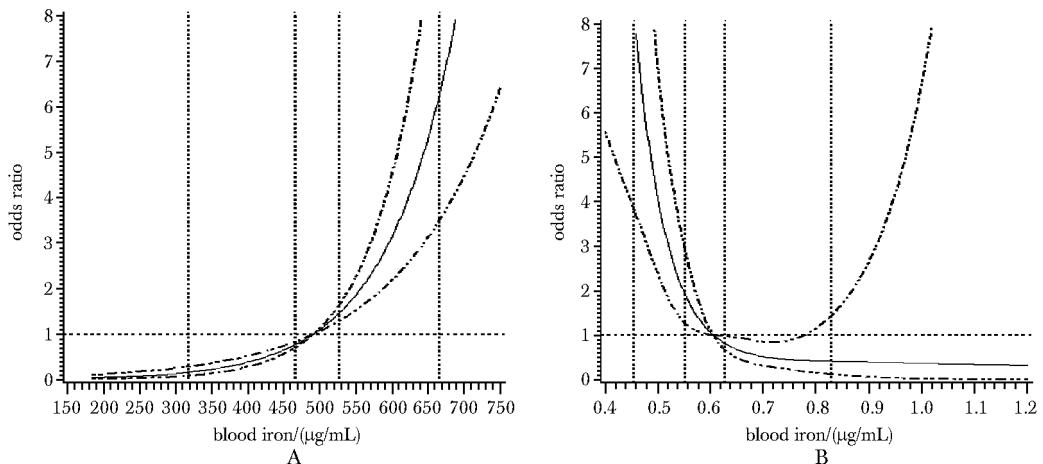


图 1 全血铁和血铜浓度在病例组和对照组人群中的分布

Fig 1 Blood iron and copper concentrations in case and control groups ($\bar{x}\pm s, n=93/372$)



Knots were placed at the 5th, 35th, 65th and 95th percentiles of the blood metal distribution, and the reference values were set at the median of the control group (blood iron: 490.58 μg/mL; copper: 0.605 μg/mL). Models were adjusted for age, smoking, drinking, overweight, hypertension, diabetes, hyperlipidemia, anemia and hs-CRP

图 2 全血铁 (A) 和血铜 (B) 与 CVD 的限制性立方样条曲线

Fig 2 Restricted cubic spline curves for association of blood iron (A), blood copper (B) and cardiovascular diseases

表 2 全血铁、铜与心血管疾病风险关
Table 2 Associations between blood iron, copper and cardiovascular diseases

exposure	lower group	higher group
blood iron[n(%)]	20(9.57)	73(28.52)
model 1	reference	3.63(2.11-6.24) **
model 2	reference	4.07(2.24-7.37) **
model 3	reference	4.17(2.23,7.79) **
blood copper[n(%)]	85(23.35)	8(7.92)
model 1	3.51(1.64-7.52)	reference **
model 2	4.36(1.81-10.47)	reference **
model 3	4.26(1.73-10.45)	reference *

Odds ratios (95% confidence interval); model 1. adjusted for age; model 2. further adjusted for smoking drinking overweight; model 3. further adjusted for hypertension, diabetes, hyperlipidemia, anemia, and hs-CRP; * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ compared with lower group.

表 3 选择在自适应弹性网络回归的血液金属预测因子
Table 3 Selected blood metal predictors in Adaptive Elastic-net regression *

covariate	β for 1-SD increase in metal concentrations	P value
linear term		
blood iron	0.610	0.002
blood copper	-0.803	<0.001
squared term		
blood iron	-0.113	0.020
blood copper	0.114	0.070
pairwise interaction		
blood iron \times blood copper	-0.350	0.039

* age, smoking drinking, overweight, hypertension, diabetes, hyperlipidemia, anemia, and hs-CRP were forced in the model during variable selection.

的增加,ERS 值表现为先升高后降低;而 ERS 值随铜的浓度增加,则先降低后升高。进一步采用 ROC 曲线分析 ERS 与 CVD 的关系,结果提示当临界值为 0.232 时 ERS 对于 CVD 的预测价值更好。因此以 $ERS \leq 0.232$ 为参照组,分别采用单因素及多因

素模型探讨 ERS 评分与 CVD 的关联(表 4),结果均提示随着 ERS 评分的增加,发生 CVD 的风险增加。

3 讨论

本研究通过开展以队列为基础的病例对照研究,发现较高的铁储量和铜缺乏是 CVD 的独立风险因素;同时基于 AENET 模型构建铁和铜的共暴露评分,发现 ERS 值越高,CVD 的发生风险越高。

1981 年,Sullivan 提出“铁假说”,认为随人体铁储量不断蓄积,CVD 的发生风险相应增加^[13]。本研究同样支持这个假说,发现高铁水平会增加 CVD 的发生风险。其发生机制与氧化应激有关,即当人体铁含量较高时,可参与 Fenton 反应生成大量的氧化自由基,进而诱导动脉粥样硬化的发生^[14]。然而部分研究得到相反的结论^[15-16]。中国一项病例对照研究^[15]发现,在校正 BMI、吸烟、饮酒、高血压、糖尿病和高血脂症后,与最低四分位数组比较,最高四分位数组者发生 CVD 的风险减低 41%(95% CI: 0.40~0.89)。

本研究还发现铜缺乏可能与 CVD 的风险增加有关。这与 Karis^[17]等的研究结果一致。研究表明,铜缺乏会降低 SOD 水平,导致 NO 下降及氧化应激的增加^[18]。而一项前瞻性队列研究发现了相反的现象,在校正年龄和性别后,血清铜最高四分位数组 CVD 的死亡风险是最低组的 2.58 倍(95% CI: 2.05-3.25)^[19]。

考虑到金属元素之间可能存在较强的相关性,本研究进一步探讨了铁和铜共暴露时对 CVD 的影响。结果发现二者不仅存在单独效应,也存在负向交互作用。动物实验中也证实了二者之间的竞争作用。有研究显示,高铁饮食喂养大鼠导致其心脏肥大,贫血,血清和组织中铜水平的降低,而通过补充铜能够逆转血清铜和铜蓝蛋白的活^[20]性。

表 4 基于条件 logistic 回归的 ERS 与 CVD 关联分析

Table 4 Conditional logistic regression analysis of the association between ERS and CVD

case/%	control/%	unadjusted model		multivariate model		
		OR(95% CI)	P	OR(95% CI)	P	
ERS						
≤ 0.232	18(7.17)	233(92.83)	reference	-	reference	-
> 0.232	70(36.65)	121(63.35)	8.71(4.60-16.49)	<0.001	8.96(4.47-17.95)	<0.001
ERS score *	-	-	3.96(2.77-5.68)	<0.001	4.11(2.76-6.13)	<0.001

Multivariate model: adjusted for age, smoking, drinking, overweight, hypertension, diabetes, hyperlipidemia, anemia and hs-CRP; * ERS as a continuous variable.

近年来,ERS 作为一种新的检测工具,充分考虑了多种金属暴露的单独作用及潜在的交互作用。本研究利用该方法对铁和铜共暴露进行了量化,结果显示 CVD 的发生风险随 ERS 的增加而增加。

本研究具有一定的局限性。首先,本研究是病

例对照研究,不能对铁和铜与 CVD 之间的关联进行因果推断。其次,本研究的参与者均为 40 岁以上的男性,结论不能外推至女性或年轻男性人群。因此,未来仍需要更多的前瞻性研究探索铁和铜与 CVD 之间的关系。

参考文献:

- [1] Naghavi M, Abajobir AA, Abbafati C, *et al.* Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016; a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016[J]. *Lancet*, 2017, 390: 1151-1210.
- [2] Chandra P, Bhavne R. Assessing the risk factors associated with cardiovascular disease [J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2018, 25: 932-933.
- [3] 刘宁, 张伟华. 糖尿病合并高血压加重血管病变的研究进展[J]. *基础医学与临床*, 2020, 40: 990-994.
- [4] Mohammadifard N, Humphries KH, Gotay C, *et al.* Trace minerals intake: Risks and benefits for cardiovascular health [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59: 1334-1346.
- [5] Zipes DP, Camm J, Borggrefe M, *et al.* ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death) [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 48: e247-346.
- [6] Recommendations on stroke prevention, diagnosis, and therapy. Report of the WHO Task Force on Stroke and Other Cerebrovascular Disorders [J]. *Stroke*, 1989, 20: 1407-1431.
- [7] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南(2018 年修订版) [J]. *中国心血管杂志*, 2019, 24: 24-56.
- [8] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版) [J]. *中华糖尿病杂志*, 2018, 10: 4-67.
- [9] 中国成人血脂异常防治指南修订联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南(2016 年修订版) [J]. *中国循环杂志*, 2016, 31: 937-953.
- [10] 中国肥胖问题工作组数据汇总分析协作组. 我国成人超重和肥胖流行率及其相关危险因素异常的预测价值: 适宜体重指数和腰围切点的研究 [J]. *中华流行病学杂志*, 2002, 23: 5-10.
- [11] Nutritional anaemias. Report of a WHO group of experts [J]. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 1972, 503: 1-29.
- [12] Zou H, Zhang HH. On the adaptive elastic-net with a diverging number of parameters [J]. *Ann Stat*, 2009, 37: 1733-1751.
- [13] Sullivan JL. Iron and the sex difference in heart disease risk [J]. *Lancet*, 1981, 1: 1293-1294.
- [14] Imam MU, Zhang S, Ma J, *et al.* Antioxidants mediate both iron homeostasis and oxidative stress [J]. *Nutrients*, 2017, 9: 671.
- [15] Wen Y, Huang S, Zhang Y, *et al.* Associations of multiple plasma metals with the risk of ischemic stroke: A case-control study [J]. *Environ Int*, 2019, 125: 125-134.
- [16] Suarez-Ortegon MF, McLachlan S, Price AH, *et al.* Decreased iron stores are associated with cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes both cross-sectionally and longitudinally [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 272: 193-199.
- [17] Kariş D, Tarhan D, Boyacıoğlu K, *et al.* The comparison of zinc, copper and iron levels in serum, aorta and left internal mammary artery tissues in coronary by-pass graft surgery patients [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2019, 51: 86-90.
- [18] Al-Bayati MA, Jamil DA, Al-Aubaidy HA. Cardiovascular effects of copper deficiency on activity of superoxide dismutase in diabetic nephropathy [J]. *N Am J Med Sci*, 2015, 7: 41-46.
- [19] Grammer TB, Kleber ME, Silbernagel G, *et al.* Copper, ceruloplasmin, and long-term cardiovascular and total mortality (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study) [J]. *Free Radic Res*, 2014, 48: 706-715.
- [20] Wang T, Xiang P, Ha JH, *et al.* Copper supplementation reverses dietary iron overload-induced pathologies in mice [J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 59: 56-63.