

• 临床检验研究 •

2 型糖尿病肾病患者尿 8-羟基脱氧鸟苷水平检测的意义

张哲梅¹, 张兴旺¹, 周淑红^{2△}, 居 军¹

(1. 甘肃省人民医院检验中心, 兰州 730000; 2. 西安交通大学第一附属医院内分泌科, 西安 710061)

摘要:目的 探讨酶联免疫吸附法(ELISA)检测尿 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)水平在糖尿病肾病(DN)中的意义。方法 ELISA 法检测 80 例 2 型糖尿病(T2DM)患者和 30 例健康对照者尿 8-OHdG 水平。结果 DM 组非 DN、早期 DN 及临床 DN 亚组 24 h 尿 8-OHdG 水平分别为(19.4±10.5)、(36.1±24.2)和(83.5±53.7)ng/mgCr, 均高于健康对照组的(12.2±8.3)ng/mgCr, 且与尿清蛋白排泄率(UAER)和糖化血红蛋白(HbA1c)呈正相关。结论 ELISA 检测 DN 患者尿 8-OHdG 具有简便易行的优点; 24 h 尿 8-OHdG 水平检测对于判断 DN 患者病情及预后有一定的意义。

关键词:酶联免疫吸附法; 糖尿病肾病; 尿 8-羟基脱氧鸟苷

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.13.028

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)13-1463-03

Significance of determination of urinary 8-hydroxyguanine levels in patients with diabetic nephropathy using ELISA

Zhang Zhemei¹, Zhang Xingwang¹, Zhou Shuhong^{2△}, Ju Jun¹

(1. Clinical Laboratory Center, People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou Gansu 730000, China;

2. Department of Endocrinology, People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou Gansu 730000, China)

Abstract: Objective To evaluate the significance of the levels of urinary 8-hydroxy-guanine(8-OHdG) measured with enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) in patients with diabetic nephropathy(DN). **Methods** Levels of urinary 8-OHdG in 80 patients with type 2 diabetic nephropathy and 30 healthy controls were measured with ELISA. **Results** The contents of urinary 8-OHdG in non-DN group, early stage DN group and clinical stage DN group was(19.4±10.5), (36.1±24.2) and (83.5±53.7)ng/mgCr, respectively, and all of them were higher than the(12.2±8.3)ng/mgCr in healthy control group($P<0.05$). There was positive correlation between the level of urinary 8-OHdG and the urinary albumin excretion rate and HbA1c in patients with diabetes mellitus. **Conclusion** It could be a easy and simple method to measure the level of urinary 8-OHdG with ELISA. The detection of urinary 8-OHdG might have certain significance to evaluate the severity and prognosis of patients with DN.

Key words: enzyme linked immunosorbent assay; diabetic nephropathies; 8-hydroxy-guanine

氧化应激与糖尿病(diabetes mellitus, DM)及其并发症的发生、发展关系密切, 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者机体的氧化应激水平升高与血管并发症密切相关^[1]。8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-guanine, 8-OHdG)是 DNA 氧化损伤产物, 是评价氧化应激状态的敏感指标, 且与 DM 血管并发症相关^[2]。本研究应用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测尿 8-OHdG 以评价不同时期糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)患者机体的氧化应激状态, 探讨其在 DN 中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院 2009 年 6~10 月住院 T2DM 患者 80 例, 均符合世界卫生组织 1999 年颁布的标准, 即空腹血糖大于或等于 7.0 mmol/L, 和(或)口服葡萄糖耐量试验餐后 2 h 血糖大于或等于 11.1 mmol/L; 男性 44 例、女性 36 例, 平均(64.5±10.5)岁, 排除感染、妊娠、肿瘤、外伤、心肝疾病及应用抗氧化剂者。根据尿微量清蛋白排泄率(urinary albumin excretion rate, UAER)将其分为 3 组: 非 DN 组(UAER≤30 mg/24 h)26 例、早期 DN 组(UAER 30~300 mg/24 h)28 例、临床 DN 组(UAER≥300 mg/24 h)26 例。同期性别和年龄构成相匹配的体检健康组 30 例作健康对照(healthy control, HC)组, 均无吸烟史, 无 DM 家族史, 未服用药物。

1.2 方法 准确留取所有受试者 24 h 尿液, ELISA 法(亿欣, 上海)检测 8-OHdG、肌氨酸氧化酶法检测尿肌酐(creatinine, Cr)(德赛, 上海)和放射免疫法检测 UAER(中国原子能科学研究院, 北京; 批内变异系数 3.9%, 批间变异系数 6.1%, 单位 mg/24 h), 尿样均于-20℃保存, 按说明书操作检测; 患者入院后专人测量静息状态下空腹右上肢血压, 随后采集空腹静脉血 3 mL, 以日立 7170 全自动生化分析仪检测 Cr、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、三酰甘油(triacylglycerol, TG)和总胆固醇(total cholesterol, TC), 试剂均由上海德赛公司提供; 乳胶凝集抑制法检测 T2DM 患者糖化血红蛋白 HbA1c(glycosylated hemoglobin A1c, HbA1c; 西门子, 德国)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.5 分析软件, 计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示, 多组间比较用方差分析, 相关分析用多元线性回归分析; $P<0.05$ 时比较差异有统计学意义。

2 结果

2.1 尿 8-OHdG 和临床生化指标检测水平在各组之间比较 见表 1。

2.2 多元线性回归分析结果 T2DM 组以 8-OHdG 为自变量, 以各种危险因素作为协变量, 自变量与协变量回归分析结果见表 1。进行回归分析, 发现与 HbA1c 与 UAER 呈正相关, 而与收缩压、舒张压、BUN 及 Cr 无统计学意义(表 2)。

△ 通讯作者, E-mail: z4108.150038@stu.xjtu.edu.cn.

表 1 尿 8-OHdG 与临床生化指标各组结果(̄±s)

指标	HC 组	T2DM 组		
		非 DN 组	早期 DN 组	临床 DN 组
例数	30	26	28	26
年龄(岁)	60.2±9.1	61.1±13.2	66.3±10.5	66.4±13.6
病程(年)	—	5.1±7.2	7.3±8.2	12.1±7.2
HbA1c(%)	4.8±0.5	8.2±0.9 [☆]	8.9±1.8 [☆]	8.8±2.2 [☆]
UAER(mg/24 h)	11.4±4.3	15.6±5.6	89.5±41.5	328.1±143.8
Cr(μmol/L)	66.1±9.4	72.1±10.1	82.3±18.5	123.3±26.1 ^{☆△★}
BUN(mmol/L)	5.8±0.9	6.2±0.7	5.5±1.1	9.8±1.2 ^{☆△★}
8-oHdG(ng/mgCr)	12.2±8.3	19.4±10.5 ^{☆*}	36.1±24.2 ^{☆*}	83.5±53.7 ^{☆*}
TG(mmol/L)	1.4±0.8	1.7±1.0	1.5±0.4	1.6±0.9
TC(mmol/L)	4.9±0.7	5.1±1.5	5.0±1.3	5.4±1.6
SBP(mm Hg)	125.8±7.9	116.2±8.7	125.5±11.1	159.8±10.2 ^{☆△★}
DBP(mm Hg)	75.8±10.9	76.2±8.7	75.5±10.1	89.8±14.2 ^{☆△★}

—:无数据;☆: P<0.05,与 HC 组比较;△: P<0.05,与非 DN 组比较;★: P<0.05,与早期 DN 组比较;* : P<0.05,组间两两比较;SBP:收缩压;DBP:舒张压;1 mm Hg=0.133 kPa。

表 2 多元线性回归分析结果

协变量	偏回归系数	95%CI	P
UAER	1.07	1.02~1.08	0.01
HbA1c	1.49	1.1~2.40	0.04
SBP	1.03	0.94~1.02	0.67
DBP	1.10	0.95~1.05	0.10
BUN	0.92	0.48~1.79	0.86
Cr	0.64	0.23~1.72	0.34

95%CI:偏回归系数的 95%置信区间。

3 讨 论

作为 DNA 氧化损伤标志物的 8-OHdG 是鸟苷 8 位碳原子氧化后形成的,其生成原因很多,主要是电离辐射、化学致癌物代谢活化及细胞正常新陈代谢过程中产生大量活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)直接攻击 DNA 中的鸟嘌呤(dG),导致脱氧鸟苷氧化。当机体修复机制正常时,8-OHdG 可被机体的特异性 DNA 修复酶 hOGG1 从 DNA 链上切除并重新渗入正常的鸟嘌呤碱基而经肾脏随尿排泄,因而其含量可以反映机体的 DNA 氧化损伤程度,是目前国际上公认的评价机体 DNA 氧化损伤和机体氧化应激状态的敏感指标和生物标志物,既是个体接触标志物,又是效应标志物^[3]。8-OHdG 不能由细胞内外的脱氧鸟苷通过非 DNA 氧化途径形成,且尿 8-OHdG 水平不受饮食影响,也不是细胞更新的结果,尿液放置一段时间后测定结果不受影响。ELISA 应用单克隆抗体进行靶物质检测,灵敏度高、重复性好,尤其是针对尿中 DNA 和 RNA 的氧化损伤产物,此法不需分解处理 DNA 和较昂贵的仪器,特异性较强,检测耗时短,标本预处理程序简单,而且在一定范围内有非常好的线性关系,具有较大的应用价值^[4]。因此本研究选用 8-OHdG 作为生物标志物,以 ELISA 作为检测方法,从氧化应激的角度评价不同 DN 分期患者的病变程度,并探讨二者之间的相关关系,阐明氧化应激在 T2DM 及 DN 发病机制中的作用。

8-OHdG 水平检测可反映氧化应激参与 T2DM 的发生。郭翼华等^[5]研究显示 1 型 DM 和 T2DM 患者尿 8-OHdG 水平高于健康者(P<0.05),两组患者间 HbA1c 和 24 h 尿 8-OHdG 水平差异无统计学意义,而血糖波动最大的 T2DM 患者尿 8OHdG 水平是血糖波动最者的 4 倍,提示 DM 患者血糖的急性波动与 DM 并发症的发生和进展密切相关。在初诊的 T2DM 前期,包括单纯空腹血糖受损(impaired fasting glucose, IFG)、单纯糖耐量异常(impaired glucose tolerance, IGT)、空腹血糖受损合并糖耐量异常(IFG+IGT)患者,及 OGTT 确诊 T2DM 患者中,血清 8-OHdG 水平依次增高,说明在 T2DM 早期及前期已存在 DNA 氧化损伤,损伤程度随病情进展而增高;而且血清 8-OHdG 水平可以作为评价胰岛素抵抗、胰岛 B 细胞损伤的早期指标和 DM 早期预防的指标^[6]。也有研究显示,DM 患者和包括 DN、糖尿病足、糖尿病视网膜病变、糖尿病神经病变在内的 DM 并发症患者 24 h 尿 8-OHdG 水平均高于健康者(P<0.05),但在 DM 与各并发症患者间差异无统计学意义(P>0.05),提示氧化应激参与了 DM 及其并发症的发生^[7]。氧化应激同样也参与妊娠糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)的发生、发展。妊娠合并 DM 和妊娠合并 IGT 患者 24 h 尿 8-OHdG 水平高于健康者(P<0.05),两组患者间 HbA1c 和尿 8-OHdG 水平差异无统计学意义,且血糖波动最大的患者尿 8-OHdG 水平是血糖波动最小者的 3.5~4.2 倍,表明 GDM 患者血糖的急性波动与 8-OHdG 水平密切相关^[8]。

氧化应激也参与包括脑病在内的 DM 大血管和微血管慢性并发症的发生^[9]。DN 是最重要的 DM 慢性微血管并发症之一,也是影响 DM 患者预后的最主要因素之一。ROS 在 DN 的发生发展中具有重要作用,高血糖诱导产生的 ROS 参与 DM 微血管并发症的发生,因此评价 DM 患者的氧化应激状态对于预测 DN 有重要意义^[10]。DN 患者 8-OHdG 表达明显增高是肾小球细胞蛋白质氧化应激的指标,可作为研究氧化应激在 DN 发病机制中作用的检测指标之一,检测其水平可用于评价抗氧化治疗的效果。谭荣超等^[11]等通过给予中性调宁蛋白过表达转基因大鼠链脲佐菌素以构建 DM 模型,发现建

模后第 30 天大鼠 24 h 尿 8-OHdG 水平下降、尿蛋白水平增高,说明中性调宁蛋白可在 DM 早期抑制 DN 的过氧化损伤^[11]。T2DM 模型大鼠肾脏 8-OHdG 表达高于非模型对照组 ($P < 0.05$),并与 24 h UAER 密切相关,说明 DNA 的氧化损伤和 DN 密切相关;普罗布考治疗组肾脏 8-OHdG 的表达较非治疗组明显下降 ($P < 0.05$),证实普罗布考可改善肾脏 DNA 损伤、减轻肾脏氧化应激损害^[12]。本研究结果表明,T2DM 患者 24 h 尿 8-OHdG 水平高于健康者,临床 DN 患者高于无临床 DN 患者,与张霞等^[13]的报道相符,证实尿 8-OHdG 水平检测可用于评价 T2DM 患者体内 DNA 氧化损伤及氧化应激状态。本研究亦发现 T2DM 患者 24 h 尿 8-OHdG 水平与 UAER 相平行,临床清蛋白尿患者 8-OHdG 水平最高,且 8-OHdG 和 HbA1c 也密切相关,均提示 T2DM 患者尿 8-OHdG 水平与 DN 之间的相关性肾脏局部氧化应激的增强联系密切,也证实了抗氧化治疗和强化血糖控制对防治微血管并发症的重要性。

总之,氧化应激在 DM 及其慢性并发症的发生和发展中起着非常重要的作用;ELISA 法检测尿 8-OHdG 水平可用于动态观察和评价 DN 患者体内的氧化应激状态。

参考文献

[1] Pan HZ, Chang D, Feng LG, et al. Oxidative damage to DNA and its relationship with diabetic complications[J]. Biomed Environ Sci, 2007, 20(2): 160-163.
 [2] 高瑞霄, 姚朱华, 邵红霞. 尿 8-OHdG 与糖尿病性动脉粥样硬化相关性的研究进展[J]. 天津医药, 2009, 37(9): 809-810.
 [3] 周厚地, 刘东方. 8-OH 脱氧鸟苷与糖尿病[J]. 国际内分泌代谢杂

志, 2007, 27(6): 392-394.
 [4] 汪莉君, 邵华. 8-羟基脱氧鸟苷检测方法研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(10): 1915-1916.
 [5] 郭翼华, 项嘉亮, 王小朝. 8-羟基脱氧鸟苷酸检测在预防糖尿病并发症发生的临床价值[J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23(5): 100-102.
 [6] 杨艳. 不同糖代谢人群血清中 8-羟基脱氧鸟苷水平与胰岛素抵抗、胰岛 β 细胞功能的相关性研究[D]. 泰安: 泰山医学院, 2009.
 [7] 郭翼华, 项嘉亮, 黄碧云. 氧化应激与糖尿病并发症发生的相关性研究[J]. 中国基层医药, 2010, 17(17): 2352-2353.
 [8] 赖金玉, 谭忠伟, 黎彩鹏, 等. 妊娠合并糖尿病患者检测 8-羟基脱氧鸟苷酸的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(8): 766-767.
 [9] 徐敏, 杨红英. 氧化应激与糖尿病脑病[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(8): 729-730.
 [10] Josephine MF, Melina TC, Mark EC. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes[J]. Diabetes, 2008, 57(6): 1446-1454.
 [11] 谭荣韶, 刘岩, 陈辉, 等. 中性调宁蛋白对糖尿病早期肾间质炎症的抑制作用[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2010, 19(2): 142-147.
 [12] 徐鑫, 刘东方, 周厚地, 等. 8-羟基脱氧鸟苷在 2 型糖尿病大鼠肾脏的表达及 Probuconol 的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(10): 1358-1361.
 [13] 张霞, 苏本利, 王赞峰. 尿 8-羟基脱氧鸟苷水平与糖尿病肾病的相关性[J]. 中国糖尿病杂志, 2006, 14(1): 41-42.

(收稿日期: 2011-03-11)

(上接第 1460 页)

为进一步加快反应速度,提高反应的稳定性和扩大检测范围,在以 TBHBA 作为色原的基础上,增加样品稀释倍数至 1:200(方案 2),并与原方法降低稀释倍数(方案 1)至 1:50 的结果进行比较,结果证实方案 2 的效果优于方案 1。方案 2 检测限为 0.7 mmol/L(126 mg/L),测定上限达 28 mmol/L,已能充分满足临床检测的需要。增加样品稀释倍数可以降低本底,降低检测限,加快反应速度,也使大部分血糖浓度正常或略高的标本吸光度值落在误差最小的范围内,达到了预期的效果。相较而言,单纯降低稀释倍数虽表面上增加了吸光度值,但反应体系中样品葡萄糖浓度/酶浓度比值增加,将降低反应速度,延长检测时间,从而违背了快速检验的根本目的。本研究对 30 份血清标本用优化的方法进行测定,与生化分析仪结果具有较好的一致性,表明该方法较为准确可靠,具有应用前景。

总之,本研究对可有效检测葡萄糖的干试剂进行了初步探索,建立了相应检测方法,为干试剂微型生化光谱分析仪的研制奠定了基础。

参考文献

[1] 陈刚, 温志渝, 温中泉, 等. 微型生化分析系统实验测试[J]. 光谱学与光谱分析, 2005, 25(3): 439-443.
 [2] Moshides JS. Enzymic determination of cholesterol fraction of high-density lipoprotein in plasma with use of 2,4,6-tribromo-3-hydroxybenzoic acid[J]. Clin Chem, 1988, 34(9): 1799.

[3] Frenchik MD, McFaul SJ. A microplate assay for the determination of hemoglobin concentration[J]. Clinica Chimica Acta, 2004, 339(1): 199.
 [4] 吴斌, 崔云龙. 应用酶标生化仪微量测试血清葡萄糖的评价[J]. 医疗装备, 2002, 12(1): 5-6.
 [5] 刘录春, 遇婷. 丙氨酸氨基转移酶的微量检测法[J]. 预防医学情报杂志, 2005, 21(3): 372-373.
 [6] Izutsu K, Kojima S. Excipient crystallinity and its protein-structure-stabilizing effect during freeze-drying[J]. J Pharm Pharmacol, 2002, 54(12): 1033-1039.
 [7] Andrea H, Wolfgang F. Physico-chemical lyophilization behavior of mannitol, human serum albumin formulations[J]. Eur J Pharm Sci, 2006, 28(3): 224-232.
 [8] Ying H, Guo BQ, Xiu ZL, et al. Improved preservation of human red blood cells by lyophilization[J]. Cryobiology, 2005, 51(1): 152-164.
 [9] 应武林, 顾国耀. 分析化学[M]. 5 版. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2003: 194-195.
 [10] Trinder P, Webster D. Determination of HDL-cholesterol using 2, 4, 6-tribromo-3-hydroxybenzoic acid with a commercial CHOD-PAP reagent[J]. Ann Clin Biochem, 1984, 21: 430-436.
 [11] 刘琳琳, 王华忠, 蒲晓允. 以 TBHBA 为色原的唾液葡萄糖全自动分析法的建立及应用[J]. 重庆医学, 2006, 35(17): 1552-1553.

(收稿日期: 2011-07-21)