

蛋白仪;方法为高效液相色谱法。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计,计量资料用 t 检验,计数资料用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同组别间比较 GDM 组与正常妊娠组比较 HbA1c、GCT 差异有统计学意义($P<0.05$),FPG 差异无统计学意义($P>0.05$),IGT 组与正常妊娠组相比,差异无统计学意义($P>0.05$),结果见表 1

表 1 3 组患者 HbA1c、GCT、FPG 检测结果($\bar{x}\pm s$)			
组别	HbA1c(%)	GCT(mmol/L)	FPG(mmol/L)
正常妊娠组	5.1 $\pm$ 0.3	6.6 $\pm$ 0.2	4.9 $\pm$ 0.4
IGT 组	6.0 $\pm$ 0.3	7.2 $\pm$ 0.5	5.2 $\pm$ 0.5
GDM 组	8.2 $\pm$ 0.4	8.4 $\pm$ 1.1	6.8 $\pm$ 0.9

2.2 正常妊娠组与 GDM 组 FBG、HbA1c、OGTT 阳性率比较 GDM 组 FBG、HbA1c、OGTT 阳性率分别为 16.70%、30.30%、46.90%,与正常妊娠组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 2 组 FBG、HbA1c 阳性率比较[n(%)]				
组别	n	FBG	HbA1c	OGTT
正常妊娠组	73	2(2.74)	5(6.85)	3(4.11)
GDM 组	66	11(16.70)	20(30.30)	31(46.90)

3 讨 论

近年来,由于妊娠期糖尿病发病率的不断增加,临床上对于该病关注度越来越高,1979 年世界卫生组织(WHO)将 GDM 列为糖尿病的一个独立类型,主要为妊娠中晚期的孕妇处于一种容易产生糖尿病的临界状态,主要临床表现为葡萄糖耐量的降低,胰岛素的降低血糖作用较妊娠早期明显下降,机体对胰岛素处于不敏感状态等^[3]。虽然孕妇产后血糖水平大多可恢复正常,但将来发生糖尿病的危险性将会明显增加,患有该病的母婴病死率明显大于正常妊娠,还能引起新生儿多种并发症,属于高危妊娠的一种,具有极大的危害性需要早期诊断及治疗,降低该病症母婴并发症^[4],同时 GDM 也易导致孕妇产后出血、巨大儿、畸形胎等。因而早期诊断 GDM 对于产妇和胎儿都有明显的临床价值。目前对于妊娠糖尿病主要采用口服葡萄糖耐量试验进行确诊,这种检测操作比较繁琐耗时且易受外界其他因素的影响^[5],近年来随着对糖尿病的不断

• 经验交流 •

深入研究和检测方法的不断改进,HbA1c 已逐渐应用于临床糖尿病的诊断监测中,HbA1c 是血红蛋白与血糖经过缓慢不可逆的、非酶促反应结合而形成的产物,其形成取决于人体内的血糖浓度和作用时间,生成量与血液中葡萄糖浓度呈正比^[6]可以反映患者 4~8 周内的平均血糖水平,而且具有较强的稳定性,受血糖浓度波动的影响较小。同时,糖化血红蛋白的测定不需要进行空腹可以在一天的任何时候取样,且稳定性好,不容易受到胰岛素的使用而影响,比 GCT、OGTT、FPG 更方便更易被孕妇接受可以作为该病治疗的观察指标^[7]。本研究中 GDM 组与正常妊娠组比较 HbA1c、GCT 差异有统计学意义($P<0.05$),FPG 差异无统计学意义($P>0.05$),IGT 组与正常妊娠组相比差异均无统计学意义($P>0.05$),GDM 组 FBG、HbA1c、OGTT 阳性率与正常妊娠组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),且 HbA1c、OGTT 阳性率成正相关,由此分析,临床中可采用测定空腹血糖结合糖化血红蛋白来初步诊断妊娠糖尿病的患病风险,但不能单独用 HbA1c 作为 GDM 的筛查及诊断指标,以免漏诊,对母婴造成伤害。对于筛查出的有高危因素的孕妇,临床应当以 OGTT 作为妊娠期糖尿病的诊断指标,同时 HbA1c 的测定可作为妊娠糖尿病治疗效果观察的重要指标。

参考文献

[1] Ibrahim H, Ismail AH, Ismail SB, et al. The use of HbA1c in the diagnosis of diabetes mellitus type 2 in high risk subjects[J]. Int J Diabetes Metab, 2010, 18(1): 25-26.

[2] 乐杰. 妇产科学[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 39-41.

[3] 莫军, 李景, 刘刚, 等. 妊娠糖尿病实验室诊断及临床意义[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(6): 498-499.

[4] 祁从辉, 孟祥翠, 李进. 糖化血红蛋白检测在筛查妊娠糖尿病中的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(18): 2154-2155.

[5] 丘春东, 孔晓玲. 糖化血红蛋白在妊娠糖尿病诊断、监测及疗效评价中的应用[J]. 临床合理用药杂志, 2011, 12(5): 566-567.

[6] 刘敏. 糖化血红蛋白测定在妊娠糖尿病诊断中的临床意义[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 9(1): 61.

[7] 易向民, 李庆丰, 郭惠琼. 糖化血红蛋白及糖化血清蛋白在妊娠糖尿病筛选诊断中的价值评估[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(7): 266-267.

(收稿日期: 2014-06-23)

Cys-C、尿 IV-C、尿 NAG 在糖尿病肾病早期诊断中的应用

王 勇, 李东阳
(天津市泰达医院检验科, 天津 300457)

摘 要: 目的 探讨血胱抑素 C(Cys-C)、尿 IV 型胶原(IV-C)、尿 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)检测在糖尿病肾病早期诊断中的应用。方法 利用生化分析仪和酶联免疫分析仪, 分别测定 49 例早期糖尿病患者和 28 例健康人的 Cys-C、尿 IV-C、尿 NAG 和 mALB 数值, 用 SPSS19.0 进行统计分析。结果 Cys-c、尿 IV-C 和尿 NAG 的数值, II 组与 I 组相比, II 组与健康组相比均有显著性增高($P<0.01$), I 组与正常组比较增高均有统计学意义($P<0.05$), II 组 Cys-C、尿 IV-C 和尿 NAG 与 mALB 相关性分别为 0.830、0.849、0.834。结论 Cys-c、尿 IV-C、尿 NAG 可以分别测定肾脏不同部位的损伤, 在早期诊断糖尿病肾病方面灵敏度高, 且与 mALB 有同等诊断价值, 有助于发现早期糖尿病肾病损害。

关键词: 糖尿病肾病; 血胱抑素 C; 尿 IV 型胶原; 尿 N-乙酰-β-D 氨基葡萄糖苷酶
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.24.068 文献标识码: B 文章编号: 1673-4130(2014)24-3441-03

糖尿病是以高血糖为特征的慢性代谢性疾病, 肾脏损害是 糖尿病患者寿命和生活质量的主要威胁, 糖尿病肾病是一种逐

渐进展的肾脏疾病,早期诊断和治疗对阻止和延缓糖尿病肾病的发展有重要意义,但传统实验诊断方法由于其固有的局限性,很难做出早期诊断,近些年血胱抑素 C(Cys-c),尿Ⅳ型胶原(Ⅳ-C)和尿 N-乙酰 β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)等一些新的实验室检测方法被用于肾病的早期诊断,本文探讨这些指标在健康人和早期糖尿病患者之间的差异,探讨其在糖尿病肾病早期诊断中的应用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 糖尿病组 在本院内分泌科检查确诊的糖尿病患者 49 例,其中男 27 例,女 22 例。年龄(54.51±8.14)岁。根据尿微量清蛋白结果,将其分为 2 个组:Ⅰ组(糖尿病尿微量清蛋白正常)24 例,符合 mALB<20 mg/L,即 UAER<30 mg/24 h;Ⅱ组(糖尿病尿微量清蛋白轻度增高)25 例,符合 mALB 在 20~150 mg/L 之间,即 30 mg/24 h<UAER<300 mg/24 h。

1.1.2 健康组 在本院体检健康者 28 例,平均年龄(41.32±15.58)岁,男 12 例,女 15 例。所有人空腹血糖和 mALB 均正常。

1.2 方法

1.2.1 标本的收集处理 留取晨尿,标本离心(1 000 r/min)10 min,留取 3 mL 上清液待测。血清学标本为空腹静脉血,标本离心(3 000 r/min)10 min,分离血清待测。

1.2.2 检测方法 采用日立 7600-020 全自动生化分析仪定量测定 Cys-C、尿 NAG 和 mALB,尿Ⅳ-C 由澳斯邦自动酶联免疫分析仪测定。Cys-C、mALB 和 NAG 试剂盒购自北京九强公司,Ⅳ-C 试剂盒购自上海申索佑福公司。

1.2.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件进行统计分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用 *t* 检验分析,采用 Pearson 分析相关性,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 测得 3 组 Cys-c、尿Ⅳ-C、尿 NAG 数值用 SPSS19.0 统计分析,糖尿病Ⅰ组较健康组增高,差异有统计学意义(*P*<0.05),糖尿病Ⅱ组较健康组显著增高,差异有统计学意义(*P*<0.01),糖尿病Ⅱ组较糖尿病Ⅰ组显著增高,差异有统计学意义(*P*<0.01)(见表 1)。

2.2 糖尿病Ⅱ组 Cys-C、尿Ⅳ-C、尿 NAG 数值与 mALB 数值呈正相关,相关系数分别为 0.830、0.849、0.834。

表 1 各组数据比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	尿 mALB(mg/L)	血 Cys-C(mg/L)	尿Ⅳ-C(μg/L)	尿 NAG(U/L)
Ⅰ组	24	10.10±4.10	0.99±0.21*	93.40±10.90*	16.00±5.20*
Ⅱ组	25	56.20±14.10**#	3.33±0.52**#	144.00±13.40**#	43.80±8.70**#
健康组	28	5.67±3.50	0.77±0.11	77.00±7.40	8.50±1.60

*:*P*<0.05,**:*P*<0.01,与健康组比较;#:*P*<0.05,与Ⅰ组比较。

3 讨论

伴随人们生活水平的提高,糖尿病已不仅仅是发达国家的“富贵病”,在中国发病者数也越来越多,其中 20%~40% 的患者存在糖尿病肾病,且糖尿病肾病是导致终末期肾病的首要因素^[1]。血肌酐和尿素氮是检测肾功能损害的传统实验诊断方法,但由于肾脏有非常大的代偿能力,其灵敏度不高,一旦检测到增高,肾脏损害往往已达到不可逆的损伤程度,错过了最佳的治疗时期。

Cys-C 又称胱抑素 C,是一种含有 122 个氨基酸、低相对分子质量、非糖基化的碱性蛋白质,机体内几乎所有组织的细胞均能持续恒定地产生 Cys-C,并经肾小球滤过,不被肾小管重吸收和分泌。Cys-C 不与其他蛋白形成复合物,血清水平不受炎症、感染、肿瘤及肝功能等影响,与体表面积、肌肉量无关。因此,Cys-C 是一项评估肾小球滤过功能的灵敏而特异的指标^[2]。Ⅳ型胶原是典型的基底膜胶原,是基底膜的支架结构,是基底膜中的主要胶原蛋白,糖尿病肾病早期,肾小球内即可出现Ⅳ型胶原的合成增加,引起肾小球基底膜结构的改变,破坏肾小球的滤过屏障,从而导致滤过膜通透性增加,尿Ⅳ型胶原增高^[3-4]。NAG 是一种溶酶体酶,相对分子质量为 140×10³,广泛分布于各组织中,血液中的 NAG 相对分子质量较大,不能经肾小球滤过。肾小球功能正常时,尿中 NAG 不是来自血浆,尿中 NAG 主要来源于肾小管上皮细胞脱落、破坏、释放,是反映肾小管实质细胞损伤的一个敏感指标^[5]。

本次测得的 Cys-C、尿Ⅳ-C、尿 NAG 的数据分析表明,糖尿病Ⅰ组与健康组相比,数值增高,差异有统计学意义(*P*<0.05),与刘涛等^[6]的研究一致,提示糖尿病患者肾脏损害在尿

mALB 出现前就已经出现,mALB 并不能全面反映早期糖尿病患者肾脏损害,Cys-C、尿Ⅳ-C、尿 NAG 比 mALB 能更早的发现肾脏的早期损害^[7]。糖尿病Ⅱ组与健康组相比、糖尿病Ⅱ组与糖尿病Ⅰ组相比,数值均明显增高,差异有统计学意义(*P*<0.05),提示在肾脏出现损害,mALB 增高时,Cys-C、尿Ⅳ-C、尿 NAG 数值比健康人明显增高。尿微量清蛋白是公认的肾脏早期损伤的重要标志物^[8],在糖尿病Ⅱ组 Cys-C、尿Ⅳ-C、尿 NAG 与 mALB 呈现一致的相关性,表明与 mALB 有同等参考价值。通过对反映肾小球功能损害的 Cys-c、反映肾小管功能损害的 NAG 和同时反映肾脏基底膜代谢与肾小管间质损害情况的Ⅳ-C 3 项指标进行检测,能从不同方面检测肾脏的损害,可以较尿微量清蛋白更早的反映糖尿病肾脏损害的出现,并能与肾小球和肾小管的损害部位区分。

Cys-C、尿Ⅳ-C、尿 NAG 检测能够比 mALB 更早期发现糖尿病患者肾脏损害,早期诊断和治疗对阻止和延缓糖尿病肾病的发展有重要意义,使糖尿病患者的寿命和生活质量能显著提高,Cys-C、尿Ⅳ-C、尿 NAG 的检测在糖尿病肾病的早期诊断中有重要的应用价值。

参考文献

[1] 中华医学会糖尿病学分会.中国 2 型糖尿病防治指南(2010 年版)[J].中国医学前沿杂志,2011,3(1):94-110.
[2] 黄群,杨香玖,等.血清胱抑素 C 在 2 型糖尿病不同肾损害期的变化及其临床意义[J].临床内科杂志,2006,23(4):476-477.
[3] 陈秋,王旭光.2 型糖尿病患者尿Ⅳ型胶原与尿微量清蛋白的关系[J].中华内科杂志,2002,26(2):125-127.
[4] 姚丽,付延红.尿Ⅳ型胶原检测对早期糖尿病肾病临床诊断意义

- 的研究[J]. 中国医科大学学报, 2003, 27(4): 350-352.
- [5] 赵洁, 贾玫. 尿 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶在检测早期肾损害中的应用[J]. 中国实验诊断学, 2012, 30(11): 2066-2068.
- [6] 刘涛, 田少江. 联合尿 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶和血半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 检测在糖尿病肾病早期诊断中的意义[J]. 中国医师进修杂志, 2010, 33(1): 22-24.
- [7] 罗金丽, 郑香花. 血清胱抑素 C 与尿微量清蛋白检测在糖尿病肾

病早期诊断中的应用 [J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(15): 2045-2046.

- [8] 陈燕, 赵敏. 尿微量蛋白检查对糖尿病早期肾损伤的诊断价值[J]. 中华医学检验杂志, 2003, 26(5): 562-564.

(收稿日期: 2014-06-19)

• 经验交流 •

不同月龄婴儿肠道微生态改变的临床研究

贺 锐, 张 翀, 赵翠生, 叶 萍

(甘肃省妇幼保健院检验科, 甘肃兰州 730050)

摘 要:目的 通过应用荧光定量 PCR 技术对不同月龄的正常婴儿、轮状病毒(RV)肠炎患儿肠道微生态进行动态检测, 分析其肠道菌群变化, 为临床提供数据参考。**方法** 采用病例对照研究, 选取不同月龄健康婴儿及 RV 肠炎患儿为研究对象, 运用荧光定量 PCR 技术测定细菌的 16SrRNA, 对不同月龄健康婴儿和 RV 肠炎患儿粪便中双歧杆菌、乳酸杆菌、肠球菌、大肠杆菌进行定量分析。**结果** 不同月龄婴儿肠道中双歧杆菌和肠球菌数量随月龄变化差异有统计学意义($P < 0.05$), 乳酸杆菌和大肠杆菌数量差异无统计学意义($P > 0.05$)。RV 肠炎患儿肠道中双歧杆菌和乳酸杆菌含量在不同月龄阶段均低于健康对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 大肠杆菌和肠球菌含量仅在 3 月龄阶段低于健康对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 在 6 月龄和 10 月龄婴儿与健康对照组婴儿比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 不同月龄婴儿的肠道微生态存在差异, 客观评判婴儿肠道微生态需建立不同月龄的肠道微生态参考区间。RV 对患儿肠道中益生菌的数量影响较大。

关键词: 不同月龄; 婴儿; 肠道微生态

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 24. 069

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2014)24-3443-03

肠道是人体重要的消化器官, 定植于肠道内的大量固有菌群所构成的肠道微生态系统是其重要的组成部分, 婴儿肠道微生态系统对其代谢、免疫系统的发育和成熟等过程起着十分重要的作用^[1]。本研究采取病例对照研究设计, 运用细菌涂片、轮状病毒(RV)检测、16SrRNA 荧光定量 PCR 分析等检测手段, 对不同月龄健康婴儿、RV 肠炎患儿肠道中主要细菌进行定量分析, 并进行比较, 以了解婴儿肠道菌群变化。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 7 月至 2013 年 3 月在甘肃省妇幼保健院就诊的婴儿作为目标研究人群。

1.2 对照组纳入标准 近 4 周内未使用抗菌药物, 未使用微生态制剂且无胃肠道症状的 3 月龄、6 月龄及 10 月龄的健康婴儿各 30 例为研究对象。

1.3 病例组纳入标准 依据《婴幼儿腹泻诊断标准》诊断的 RV 腹泻的 3 月龄、6 月龄及 10 月龄患儿各 30 例为研究对象。

1.4 标本的采集与处理

1.4.1 标本的采集与存储 取新鲜粪便标本置无菌杯内, 立即送检, 进行培养接种, 涂片及 RV 检测, 剩余标本用无菌干燥管储存, -80℃ 冰箱保存备用。

1.4.2 肠道细菌 DNA 的提取 取复融粪便 1 g 加 1 mL 的 PBS(0.05 mol/L, pH 7.4)充分颠倒混匀 5~10 min, 然后低速离心(2 000 r/min)5 min, 取上清液, 上述过程重复 3 次, 收集上清液, 高速离心(13 000 r/min)3 min 后取沉淀, 沉淀的细菌用 PBS 液洗 4 次, 水洗 1 次, 后加 50 μL 蒸馏水悬浮细菌及 50 μL 1% TritonX-100 破碎菌体, 100℃ 煮沸 5 min 立即放入冰水中冷却^[2]。

1.4.3 PCR 引物 引用文献所用引物, 对所选用引物序列分别与 4 种细菌 16SrRNA 的全序列在 BLAST 数据库(www.

ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)进行了比较验证, 4 种细菌上下游引物如下: (1)双歧杆菌^[3]: CTC CTG GAA ACG GGT GG; GGT GTT CTT CCC GAT ATC TAC A, 扩增片段为 550 bp。(2)乳酸杆菌^[4]: AGC AGT AGG GAA TCT TCC A; ATT TCA CCG CTA CAC ATG, 扩增片段为 380 bp。(3)肠球菌^[5]: TCC ACG CCG TAA ACG ATG AG; GAC ACG AGC TGA CGA CAA CC, 扩增片段 274 bp。(4)大肠埃希菌^[6]: GGA GCA AAC AGG ATT AGA TAC CC; CCC AAC ATT TCA CAA CAC G, 扩增片段 317 bp。

1.4.4 荧光定量 PCR 反应体系 采用 25 μL 反应体系, 包括 10×Buffer 2.5 μL, 4×dNTP(0.25 mmol/L)2 μL, MgCl₂(25 mmol/L)2.5 μL, 上下游引物(0.25 μmol/L)各 0.25 μL, Taq 酶(1 u/μL)0.75 μL, DNA 模板 3 μL, 荧光染料 SYBR green 2.5 μL, 水 11.25 μL。应用 Mx3000p 型荧光定量 PCR 仪进行扩增与分析。

1.4.5 PCR 反应条件 95℃ 变性 5 min。95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 72℃ 45 s, 87℃ 5 s 共 40 个循环, 72℃ 10 min 延伸后结束; 60℃~95℃ 作溶解曲线。

1.4.6 标准曲线制作 分别纯化上述 PCR 反应过程中得到的 4 种细菌 PCR 产物, 具体步骤如下: 在 DNA 溶液中加入 1/10 体积 3 mol/L、pH 5.2 的乙酸钠, 在旋涡混合器上稍加振荡或用手指轻弹离心管壁几次使之混匀, 加入 2~2.5 倍体积的无水乙醇, 振荡混匀并置于冰上 30 min, 2 000 r/min 离心 5 min 弃上清液, 加入 1 mL 70% 的乙醇, 颠倒混匀离心弃上清液, 干燥沉淀。将干燥沉淀物溶于适当体积的无菌水或 TE 缓冲液即成。在分光光度仪上测定出 4 种细菌纯化产物的 A 值。参照分子克隆, 1 个 A 双链 DNA 片段(1KB)相当于 4.74 × 10¹³ 分子/mL, 计算出每毫升 PCR 产物中所含的拷贝数, 然