

· 调查报告 ·

尘肺病患者血清 8-羟基脱氧鸟苷酸浓度与肺功能的关系

王建设, 杨尚玉, 杨建锋, 李志达, 庞明珍

(鹤壁职业技术学院医学检验教研室, 河南鹤壁 458030)

摘要:目的 探讨尘肺病患者血清 8-羟基脱氧鸟苷酸(8-OHdG)浓度与肺功能的关系。方法 将调查对象按是否患病分为尘肺组($n=50$)及对照组($n=50$),收集其年龄、性别、工龄、吸烟及饮酒等一般资料;用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测尘肺组与对照组调查对象的血清 8-OHdG 浓度;用肺功能仪检测其用力肺活量(FVC)、1 秒用力呼气容积(FEV1)及 FEV1/FVC。结果 尘肺组患者血清 8-OHdG 浓度高于对照组($P<0.05$),其 FVC、FEV1 及 FEV1/FVC 低于对照组($P<0.05$);多元线性回归分析显示尘肺组患者血清 8-OHdG 浓度与肺功能呈负相关($P<0.05$)。结论 血清 8-OHdG 检测对尘肺病有一定预测价值。

关键词:尘肺;肺活量;酶联免疫吸附测定;8-羟基脱氧鸟苷酸

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.01.017

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)01-0051-03

Relationship between serum 8-hydroxydeoxyguanosine concentration and lung function of patients with pneumoconiosis

Wang Jianshe, Yang Shangyu, Yang Jianfeng, Li Zhida, Pang Mingzhen

(Department of Medical Laboratory Science, Hebi College of Vocation and Technology, Hebi, He'nan 458030, China)

Abstract: Objective To investigate relationship between serum 8-hydroxydeoxyguanosine(8-OHdG) concentration and lung function of patients with pneumoconiosis. **Methods** Respondents were divided into pneumoconiosis group($n=50$) and control group($n=50$) according to whether they had suffered from illness. Their general data such as age, gender, working age, smoking and drinking were collected. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was employed to detect serum 8-OHdG concentration of respondents in pneumoconiosis and control group. Spirometer was used to measure their forced vital capacity(FVC), forced expiratory volume in one second(FEV1) and FEV1/FVC. **Results** Serum 8-OHdG concentration of patients in pneumoconiosis group was higher than that in control group($P<0.05$), while their FVC, FEV1 and FEV1/FVC were lower than those in control group($P<0.05$). Multiple linear regression analysis showed that serum 8-OHdG concentration of patients in pneumoconiosis group had a negative correlation with lung function ($P<0.05$). **Conclusion** Serum 8-OHdG detection has some predictive value for pneumoconiosis.

Key words: pneumoconiosis; vital capacity; enzyme-linked immunosorbent assay; 8-hydroxydeoxyguanosine

尘肺病是由于人体长期吸入生产性粉尘所致的,以肺部弥漫性纤维化为主的全身性疾病^[1]。虽然长期探索已使人类对尘肺的发病机制有了相当的了解,但因其发病机制十分复杂,直至今日,尘肺病仍无早期诊断的特异性标志物,也无特异性的治疗药物和方法。因此,研究尘肺病早期发病机制及寻找一个灵敏度高、特异性好的检测指标成为急需解决的问题。为了深入研究尘肺病的发病机制及早期诊断方法,全面控制尘肺病的发生、发展,本研究从氧化损伤和肺功能角度探讨血清 8-羟基脱氧鸟苷酸(8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG)对尘肺病的预测价值,以寻求行之有效的早期诊断尘肺病的生物学指标。

1 对象与方法

1.1 对象 将调查对象按是否患病分为尘肺组($n=50$)及对照组($n=50$)。

1.1.1 尘肺组 纳入标准:(1)收集 2010 年 10 月至 2011 年 12 月某综合医院住院治疗的尘肺病患者(尘肺病诊断参照《职业病诊断标准》GBZ70-2009)^[2];(2)患者在确诊尘肺病时,无心、肺等脏器的其他相关疾病;(3)自愿参加本研究。排除标准:(1)确诊尘肺病时罹患高血压,糖尿病及心、脑血管疾病;(2)合并抑郁症、精神病及其他躯体疾病引起的认知功能障碍。

1.1.2 对照组 为未患尘肺病的非接尘工人,患者年龄、性别、宗教信仰、生活习惯、文化程度与尘肺组相匹配。

1.2 调查方法和内容 采用病例对照研究,使用统一的调查表,对全部研究对象进行面对面的问卷式调查,收集每位患者的年龄、性别、工龄、吸烟及饮酒等一般资料;用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法分别检测尘肺组及对照组调查对象的血清 8-OHdG 浓度;用肺功能仪检测 2 组调查对象的用力肺活量(forced vital capacity, FVC)、1 秒用力呼气容积(forced expiratory volume in one second, FEV1)及 1 秒率(FEV1/FVC)。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用 t 检验,多因素分析采用 Logistic 回归和多元线性回归分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本资料的比较 尘肺组患者 50 例,年龄 38~62 岁,平均(48.64±5.41)岁。对照组工人 50 例,年龄 40~61 岁,平均(49.31±5.86)岁。两组调查对象均为男性,在年龄和文化程度方面的差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

2.2 两组调查对象的血清 8-OHdG 浓度比较 尘肺组患者血清 8-OHdG 浓度为 0.43(0.31~0.58)ng/mL,对照组工人血清 8-OHdG 浓度为 0.31(0.24~0.42)ng/mL,两者比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。因血清 8-OHdG 浓度呈偏态分布,经对数转换后呈正态分布,两组 Log(8-OHdG)分别为

-0.38±0.21、-0.49±0.17, 差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.3 两组调查对象的肺功能比较 尘肺组与对照组调查对象的 FVC、FEV1 及 FEV1/FVC 的测定结果见表 1。

表 1 两组调查对象的肺功能比较

组别	FVC(%)	FEV1(%)	FEV1/FVC
尘肺组	93.02±7.38	109.11±10.01	81.86±10.37
对照组	105.67±8.58	125.01±10.21	99.13±8.76
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01

2.4 尘肺病患病的多因素分析 以是否有尘肺病为因变量, 以年龄、文化程度、吸烟、饮酒和血清 8-OHdG 浓度为自变量进行多因素 Logistic 回归分析。结果在校正其他影响因素后, 本回归模型中的 8-OHdG 浓度、年龄、文化程度、吸烟、饮酒为尘肺病的独立危险因素。其中 8-OHdG 浓度的比值比(odds ratio, OR)为 1.313[95% 可信区间(confidence interval, CI): 0.834~3.412]($P<0.05$), 表明血清 8-OHdG 浓度每增加 0.1 ng/mL, 发生尘肺病的相对风险增加 31.3%, 见表 2。

表 2 尘肺病患病的多因素分析

变量	OR	95%CI	<i>P</i>
年龄	2.471	0.923~4.265	<0.05
文化程度	1.137	0.766~3.107	<0.05
吸烟	2.201	1.067~5.634	<0.05
饮酒	1.980	0.807~3.808	<0.05
8-OHdG (ng/mL)	1.313	0.834~3.412	<0.05

2.5 尘肺组患者血清 8-OHdG 浓度与肺功能的多元线性回归分析 以尘肺病患者血清 8-OHdG 浓度为因变量, 以 FVC、FEV1、FEV1/FVC 为自变量进行多元线性回归分析, 结果见表 3。

表 3 尘肺组血清 8-OHdG 浓度与肺功能的多元线性回归分析

变量	<i>b</i>	<i>t</i>	<i>P</i>
FVC	-0.37	-3.01	<0.05
FEV1	-0.43	-2.16	<0.05
FEV1/FVC	-0.41	-2.35	<0.05

3 讨论

尘肺病是一种慢性进行性肺纤维化疾病, 长期以来, 国内、外学者对尘肺形成的机制及其治疗药物进行了大量的研究与探索。研究表明尘肺病的发生与自由基及其引发的脂质过氧化损害有密切关系^[3-4]。

由于氧自由基具有不稳定性 and 高度化学反应性, 能够迅速与周围物质发生反应, 半衰期短暂, 因此, 直接检测这些活性氧或自由基的水平非常困难。体内产生的过量活性氧会氧化损伤各种大分子物质, 如蛋白质、脂质和 DNA, 形成相应的氧化产物, 而这些氧化产物的检测却具有可行性^[5-6], 它们在一定程度上反映氧化应激水平, 因此, 这些物质常用作评估机体氧化应激或活性氧水平的生物标志。

DNA 损伤是氧化损伤的重要表现之一, DNA 损伤的形式表现为 DNA 单/双链的断裂、碱基修饰、交联、无碱基位点等。

碱基的氧化修饰是 DNA 氧化损伤常见的形式, DNA 中的 4 种碱基[腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)]均可被氧自由基修饰, 但因鸟嘌呤具有较高的分子轨道能级, 当 DNA 受到氧自由基攻击时, 鸟嘌呤最易被氧化修饰^[7], 形成氧化产物 8-OHdG。8-OHdG 由 Kasai 等^[8-9]最先报道, 它是氧自由基在 DNA 碱基的 C-8 位置上与脱氧鸟嘌呤核苷酸残基结合, 并进一步氧化生成的产物, 体内形成的 8-OHdG 不能被机体进一步代谢而稳定存在, 是氧化代谢的终产物。因此, 通过检测 8-OHdG 浓度可以间接反映氧化应激的程度, 目前 8-OHdG 已成为 DNA 氧化损伤中常用的生物标志物^[10-12]。与蛋白质和脂类的氧化损伤相比, DNA 损伤除了可以反映体内氧化应激损伤程度外, 近年来研究表明, DNA 损伤也是尘肺病的发病机制之一, 且 8-OHdG 本身也可能参与了尘肺病的发病。因此, 对 DNA 氧化损伤产物, 特别是 8-OHdG 的研究具有重要的意义。

作为 DNA 损伤的主要产物之一, 8-OHdG 可以在一定程度上反映 DNA 损伤, 特别是 DNA 氧化损伤的程度。另外, 有研究指出 8-OHdG 本身也是一种很强的致突变剂, 可以引起基因突变, 其作用主要是导致 G-T 和 A-C 转换突变^[13]。根据上述观点, 8-OHdG 本身既然可以导致 DNA 的改变, 它也可能有促进尘肺病发展的作用。与其他氧化产物相比, 8-OHdG 可以反映氧化应激水平, 又可以反映 DNA 损伤程度, 同时其本身也可能与尘肺病有关, 因此, 选择 8-OHdG 为对象进行尘肺病研究能提供更多有价值的信息。

以前 8-OHdG 的检测多采用高效液相色谱-电化学(high performance liquid chromatography with electrochemical detection, HPLC-ECD)检测法, 其检测过程复杂, 费用昂贵, 限制了 8-OHdG 的应用。近年来开展了 ELISA 法检测 8-OHdG 技术, 并且逐渐成熟^[14], ELISA 法可简单、直接地检测血清 8-OHdG 浓度, 并且与 HPLC-ECD 法比较, 两种检测结果间的差异无统计学意义^[15], 因此, 提高了 8-OHdG 作为 DNA 氧化损伤标志物的应用, 本研究采用了此方法进行血清 8-OHdG 浓度检测。肺功能检查也是一种客观反映肺呼吸功能、无创伤的检查方法, 但由于机体肺组织的代偿能力强, 尘肺病患者早期多无呼吸系统的相关症状和体征, 本研究结果显示尘肺组患者血清 8-OHdG 浓度高于对照组, 其 FVC、FEV1 及 FEV1/FVC 低于对照组, 差异均有统计学意义; 多元线性回归分析显示: 尘肺病患者血清 8-OHdG 浓度与肺功能呈负相关, 可能是因为尘肺病患者机体氧化应激增强导致氧化代谢的终产物 8-OHdG 增多, 而肺功能下降。这说明血清 8-OHdG 浓度与尘肺病的发生、发展有关, 可反映尘肺病患者的肺功能, 对尘肺病有一定预测价值。

参考文献:

- [1] 金泰虞. 职业卫生与职业医学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
- [2] 中华人民共和国卫生部. GBZ70-2009 尘肺诊断标准[S]. 北京: 法律出版社, 2009.
- [3] Abú-Shams K, Fanlo P, Lorente MP. Silicosis[J]. An Sist Sanit Navar, 2005, 28 Suppl 1: S83-89.
- [4] 李文桐, 邹俊杰, 刘岩, 等. 通络方剂抗氧化作用及对大血管内皮细胞的保护[J]. 中国临床康复, 2006, 35(10): 54-56.
- [5] Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and

- disease[J]. *Crit Rev Toxicol*, 1993, 23(1): 21-48.
- [6] Thérond P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, et al. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2000, 3(5): 373-384.
- [7] Burney S, Niles JC, Dedon PC, et al. DNA damage in deoxynucleosides and oligonucleotides treated with peroxyxynitrite[J]. *Chem Res Toxicol*, 1999, 12(6): 513-520.
- [8] Kasai H, Hayami H, Yamaizumi Z, et al. Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives[J]. *Nucleic Acids Res*, 1984, 12(4): 2127-2136.
- [9] Kasai H, Nishimura S. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents[J]. *Nucleic Acids Res*, 1984, 12(4): 2137-2145.
- [10] Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis[J]. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2009, 27(2): 120-139.
- [11] Van PY, Hamilton GJ, Kremenevskiy IV, et al. Lyophilized plasma reconstituted with ascorbic acid suppresses inflammation and oxidative DNA damage[J]. *J Trauma*, 2011, 71(1): 20-24.
- [12] Karihtala P, Kauppila S, Puistola U, et al. Divergent behaviour of oxidative stress markers 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in breast carcinogenesis [J]. *Histopathology*, 2011, 58(6): 854-862.
- [13] Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, et al. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G→T and A→C substitutions[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(1): 166-172.
- [14] Toyokuni S, Tanaka T, Hattori Y, et al. Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45. 1; its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model[J]. *Lab Invest*, 1997, 76(3): 365-374.
- [15] Shimoi K, Kasai H, Yokota N, et al. Comparison between high-performance liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002, 11(8): 767-770.

(收稿日期: 2012-09-09 修回日期: 2012-10-15)

(上接第 50 页)

后不会对定量产生影响。提取后样品在室温 24 h 内稳定。上述研究表明含非布司他的血浆样品在普通实验室条件下稳定,并不会出现明显的化合物丢失。

2.5 方法的应用 上述方法对非布司他犬血浆的定量结果良好,并成功用于非布司他片剂经口给药的比格犬药动学研究。10 只比格犬非布司他 A 晶型和 H 晶型片剂给药后的药时曲线见图 3。

3 讨论

在本研究对色谱条件进行了筛选以获得最佳的灵敏度和非布司他色谱峰形。非布司他具有 2 个明显紫外吸收波长,分别为 216 nm 和 314 nm,虽然 216 nm 的响应值较大,但在此波长条件下,处理后血浆样品的内源性物质会有明显干扰,为兼顾本方法的特异性和灵敏度,选择 314 nm 作为目前使用的波长。作者对不同的流动相比例进行了筛选,最后选择甲醇和水(90:10, V/V)作为洗脱系统以获得最佳分离和色谱峰型。

本研究采用不同蛋白沉淀溶剂(如甲醇、乙腈、甲酸和冰醋酸)以确定非布司他血浆样品的前处理过程,结果表明采用乙腈与冰醋酸对非布司他进行蛋白沉淀的效果最佳。

本实验对目标化合物的定量未使用内标内标化合物进行校正,尽管如此,方法学验证的结果表明本研究建立的体内药物分析方法重现性好、准确可靠,这可能得益于简单的样品前处理方法。此外,在待测样品进样前、后,分别采用了标准曲线样品对仪器响应的稳定性进行了考察。本方法可以作为非布司他动物血浆样品测定的参考,具有特异性高、准确和重现性好的优点。此外,在本方法的基础上,如果配备荧光检测器^[8],可建立更为灵敏的、用于人体的药效动力学生物分析方法。

参考文献:

- [1] Ernst ME, Fravel MA. Febuxostat: a selective xanthine-

oxidase/xanthine-dehydrogenase inhibitor for the management of hyperuricemia in adults with gout[J]. *Clin Ther*, 2009, 31(11): 2503-2518.

- [2] 伍小云,胡艾希. 非布索坦(febugostat) [J]. *中国药物化学杂志*, 2009, 19(4): 319-320.
- [3] Pascual E, Sivera F, Yasothan U, et al. Febuxostat[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(3): 191-192.
- [4] 韩莹,朱翊,傅得兴. 非布司他治疗高尿酸血症伴痛风的药理与临床评价[J]. *中国新药与临床杂志*, 2010, 8(29): 635-638.
- [5] Grabowski BA, Khosravan R, Vernillet L, et al. Metabolism and excretion of [¹⁴C] febuxostat, a novel nonpurine selective inhibitor of xanthine oxidase, in healthy male subjects[J]. *J Clin Pharmacol*, 2011, 51(2): 189-201.
- [6] 张聪,王绍杰,麻荣丽,等. HPLC 法测定非布司他的含量及有关物质[J]. *沈阳药科大学学报*, 2010, 27(8): 648-651.
- [7] Khosravan R, Kukulka MJ, Wu JT, et al. The effect of age and gender on pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of febuxostat, a novel nonpurine selective inhibitor of xanthine oxidase[J]. *J Clin Pharmacol*, 2008, 48(9): 1014-1024.
- [8] 张文丽,程航,阳国平. 高效液相-荧光法测定人血浆中非布司他的浓度及其人体药动学研究[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2011, 16(10): 1148-1152.

(收稿日期: 2012-07-08 修回日期: 2012-09-22)