

· 论 著 ·

不同尿标本视黄醇结合蛋白质和甲状腺功能相关激素的比较*

蔡佳, 张曼[△]

(北京大学第九临床医学院/首都医科大学附属北京世纪坛医院临床检验中心 100038)

摘要:目的 比较分析晨尿和随机尿中视黄醇结合蛋白质(RBP)、促甲状腺激素(TSH)及游离甲状腺激素的水平,拓展以随机尿替代晨尿的应用领域。方法 随机选取 12 名门诊志愿者,采集其晨尿和随机尿,离心、留上清液。测定尿液的 TSH、游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)、游离甲状腺素(FT4)及尿肌酐(Cr);提取尿蛋白、裂解、离心、测定提取的总蛋白水平,行 Western blot 并对其条带进行光密度扫描。结果 经 Cr 校正后,晨尿和随机尿 TSH、FT3 和 RBP 水平的差异无统计学意义($t=0.903, P>0.05$; $t=1.217, P>0.05$; $t=1.880, P>0.05$);晨尿和随机尿 FT4 水平的差异具有统计学意义($t=2.436, P<0.05$)。结论 晨尿和随机尿 RBP、TSH 及 FT3 水平没有明显差异,可以用随机尿替代晨尿来进行这些项目的检测和研究,方便尿液标本的留取,提高尿液标本的实用性。

关键词:尿分析;视黄醇结合蛋白质类;促甲状腺激素;游离三碘甲状腺原氨酸;游离甲状腺素

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.12.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)12-1327-03

Comparison of retinol-binding protein and thyroid function related hormones of different urine specimens*

Cai Jia, Zhang Man[△]

(The Center of Clinical Laboratory, the Ninth Clinical Medical College of Peking University/Beijing Shijitan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100038, China)

Abstract: Objective To comparative analyze the contents of the retinal-binding protein(RBP), thyrotropin(TSH) and free thyroid hormone in the urine sanguinis and the random urine, and to explore the alternative of urine sanguinis with random urine. **Methods** Urine sanguinis and random urine were collected from 12 outpatient volunteers. After centrifugation, supernatant of urine was tested for TSH, free triiodothyronine(FT3), free tetraiodothyronine(FT4) and urine creatinine(Cr). Urine proteins were extracted and dissociated. After centrifugation, levels of extracted proteins were determined. Then Western blot was employed and the optical density of bands was scanned. **Results** After correction with Cr, there were no statistical significances between urine sanguinis and random urine for TSH, FT3 and RBP($t=0.903, P>0.05$; $t=1.217, P>0.05$; $t=1.880, P>0.05$). There were significant differences of FT4 between urine sanguinis and random urine($t=2.436, P<0.05$). **Conclusion** There are no statistical significances between urine sanguinis and random urine for RBP, TSH and FT3. Random urine could be an alternative of urine sanguinis for convenient availability and applicability for these tests.

Key words: urinalysis; retinol-binding proteins; thyrotropin; free triiodothyronine; free tetraiodothyronine

尿液是重要的体液成分之一,其组成成分及水平的变化能反映多个系统的功能状态,在诊断疾病方面有很大优势。目前通常研究晨尿、8 h 或 24 h 尿,以排除饮食、饮水等影响因素,但留取不方便、不规范、患者依从性差,特别是门诊患者,晨尿留取时间过长而影响检验结果。随机尿的总蛋白/肌酐比(TPCR)和清蛋白/肌酐比(ACR)与 24 h 尿的总蛋白和清蛋白水平有较好相关性^[1-2],可作为排除非显著性蛋白尿的初筛试验^[3],替代 24 h 尿蛋白监测肾病患者尿蛋白排泄情况^[4]。本研究比较分析晨尿和随机尿的视黄醇结合蛋白质(retinal-binding protein, RBP)、TSH/Cr、FT3/Cr、FT4/Cr,充分发挥随机尿检测及研究在临床检验诊断中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2011 年 10 月至 2011 年 11 月北京世纪坛医院的 12 名女性门诊志愿者,年龄 20~35 岁,平均(28.4±2.2)岁。纳入标准:(1)空腹血清化验检查肝、肾功能正常;(2)

无泌尿系炎症、感染或肿瘤;(3)非月经期。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂材料及仪器 无水乙醇分析纯由国药集团化学试剂有限公司提供;尿素、3-[(3-胆固醇氨丙基)二甲氨基基]-1-丙磺酸(CHAPS)、二硫苏糖醇(DTT)、过硫酸铵、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)、甲叉聚丙烯酰胺由北京鼎国生物技术有限公司提供;三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基磺酸钠(SDS)从美国进口,中生华美(北京)科技有限公司分装;0.2 μm 聚偏二氟乙烯(PVDF)膜由美国 Millipore 公司提供;兔抗人 RBP 多克隆抗体由美国 Abcam 公司提供(ab48624);HRP-羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)由美国 Jackson Immuno Research 公司提供;增强型辣根过氧化物酶-二氨基联苯胺(HRP-DAB)底物显色试剂由北京天根生化科技有限公司提供。日立 7080-ISE 生化分析仪由日本日立公司提供;Roche cobs e601 全自动电化学发光免疫分析仪及配套试剂、

耗材由瑞士罗氏公司提供;立式离心机 Avanti J-30I 由美国 Beckman-Coulter 公司提供;半干电转仪由美国 Bio-rad 公司提供;垂直电泳槽 DY CZ-24EN 型由北京市六一仪器厂提供。

1.2.2 标本采集 不限制饮食和活动量,常规饮水,在非月经期,分别采集 12 名志愿者清晨首次和同日 9:00~12:00 时随机尿的清洁中段尿标本各 100 mL 于无菌瓶中,1 500 r/min 离心 5 min,收集上清液,各自混匀后分装(每管 10 mL),-80 °C 冰箱冻存备用。

1.2.3 尿蛋白的提取 24 份尿标本,各取 40 mL 于离心瓶中;从 24 份尿标本中随机抽取 6 份,各取 10 mL,混匀后取 40 mL 于离心瓶中;25 份标本分别加入 120 mL 4 °C 预冷的无水乙醇,混匀后置于 4 °C 冰箱 30 min。12 000 r/min 离心 10 min 后收集沉淀,将沉淀溶于样品裂解液[8 mol/L 尿素,4% CHAPS,65 mmol/L DTT,2% 质量体积比(w/v)两性电解质]中,-20 °C 过夜。超声裂解 5 min,14 000 r/min 离心 20 min 后取上清液,测定总蛋白水平(日立 7080-ISE 生化分析仪,连苯三酚红-钼酸终点法)。

1.2.4 蛋白免疫印迹(Western bolt) 经 12% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE,上样量均为 30 μg)后,半干转印至 PVDF 膜上,分别经兔抗人 RBP(一抗)和 HRP-羊抗兔 IgG(二抗)孵育后,二氨基联苯胺(DAB)显色至条带清晰时终止显色反应。

1.2.5 尿液 TSH、FT3、FT4 及 Cr 水平测定 24 份尿标本各取 1 mL,在 Roche cobs e601 全自动电化学发光免疫分析仪上以配套试剂,测定每份标本的 TSH、FT3、FT4 水平。吸取 800 μL 去离子水于 1.5 mL EP 管中,再吸取 200 μL 尿标本,拭去枪头外壁的液体,加到 800 μL 去离子水中,充分混匀,即制备成 10 倍稀释的尿标本,日立 7080-ISE 生化分析仪检测尿肌酐水平(SOD 酶法)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,晨尿和随机尿两组间各项指标的比较均采用配对 *t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

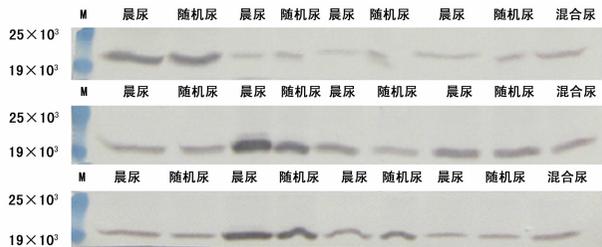
2 结 果

2.1 晨尿和随机尿中 RBP 的 Western blot 条带的比较分析 行 Western blot,DAB 显色至条带清晰时终止显色反应,在相对分子质量 25×10^3 与 19×10^3 间可见明显条带(图 1,RBP 相对分子质量为 21×10^3)。用 1D-LANE 凝胶分析软件对图 1 中的各条带进行光密度扫描,得到各条带的积分光密度(IOD),计算晨尿 IOD 比混合尿 IOD 及随机尿 IOD 比混合尿 IOD,得到各自的相对积分光密度(RIOD)值;其平均 RIOD 水平见图 2;晨尿和随机尿中 RBP 的 Western blot 条带的 RIOD 值分别为 1.371 ± 1.087 和 1.201 ± 0.951 ,进行配对 *t* 检验,差异无统计学意义($t = 1.880, P > 0.05$)。

2.2 晨尿和随机尿中 TSH/Cr 的比较分析 测得晨尿和随机尿 TSH(μIU/mL)和 Cr(μmol/L)水平,计算 $TSH/Cr = (TSH \times 10^6) / Cr$ (mIU/mol),平均水平(图 3)。晨尿和随机尿的 TSH/Cr 值进行配对 *t* 检验,差异无统计学意义($t = 0.903, P > 0.05$),见表 1。

2.3 晨尿和随机尿中 FT3/Cr 的比较分析 测得晨尿和随机尿 FT3(pg/mL)和 Cr 水平,计算 $FT3/Cr = [(FT3 \times 10^6) / (Cr \times 113.1)]$ (ng/g),平均水平见图 4。晨尿和随机尿的

FT3/Cr 值比较,差异无统计学意义($t = 1.217, P > 0.05$),见表 1。



M: 预染 Marker。

图 1 12 对晨尿和随机尿及混合尿的 Western blot 条带结果

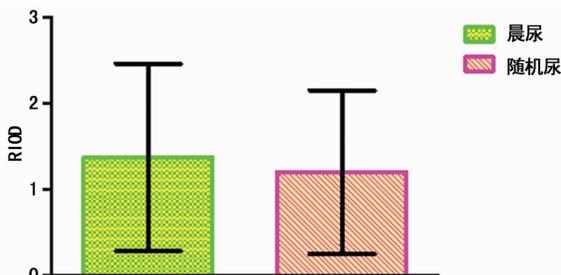


图 2 晨尿和随机尿中 RBP 的 Western blot 条带 RIOD 的平均水平

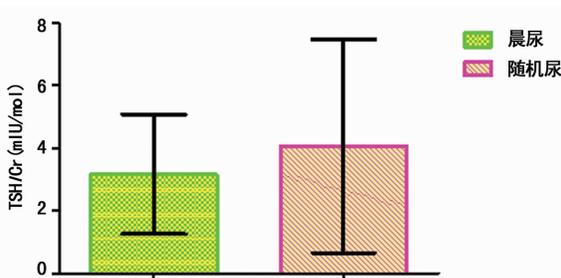


图 3 晨尿和随机尿中 TSH/Cr 的平均水平

表 1 晨尿和随机尿中甲状腺功能相关激素水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	TSH/Cr(mIU/mol)	FT3/Cr(ng/g)	FT4/Cr(ng/g)
晨尿	3.165 ± 1.911	6.524 ± 2.221	3.394 ± 1.848
随机尿	4.067 ± 3.410	7.408 ± 2.632	4.725 ± 2.516

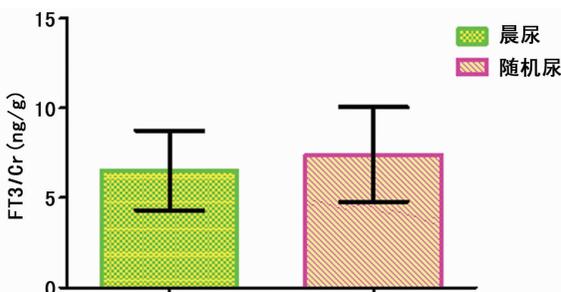


图 4 晨尿和随机尿中 FT3/Cr 的平均水平

2.4 晨尿和随机尿中 FT4/Cr 的比较分析 测定晨尿和随机尿中 FT4(10^{-2} ng/mL)和 Cr 水平,计算 $FT4/Cr = [(FT4 \times 10^7) / (Cr \times 113.1)]$ (ng/g),平均水平见图 5。晨尿和随机尿

的 FT4/Cr 值进行配对 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t=2.436$, $P<0.05$), 见表 1。

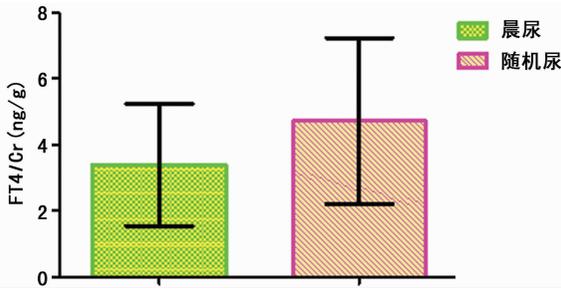


图 5 晨尿和随机尿中 FT4/Cr 的平均水平

3 讨论

除尿常规检查外, 临床应用最广泛的是尿清蛋白检测^[5-6], 其次包括尿液中 Cr、尿酸、电解质、Ig 及几种肿瘤标记物^[7] 的检测, 与血液的检测项目相比仅是冰山一角。与其他留取方式相比, 随机尿标本最容易留取, 如能用随机尿代替晨尿(或 8、24 h 尿)进行检测和研究, 则可使尿液检测和研究更加简便易行。

多种疾病后期均可发展成肾脏疾病, 而 RBP 是评判肾小管损伤的理想指标, 并可估计损伤范围^[8-9], 本研究参照本实验室醇类沉淀法提取尿液蛋白的最优策略^[10], 提取尿蛋白并行 Western blot 验证, 可以用随机尿代替晨尿来检测和研究 RBP, 这使 RBP 在肾脏疾病诊断及预后判断方面的应用和研究更加方便可行。

甲状腺是机体重要的内分泌器官, 甲状腺功能紊乱影响人体的生长发育和新陈代谢, 特别是对孕妇及胎儿影响极大^[11-13]。有研究表明, 妊娠期合并亚临床甲状腺功能减退、亚临床甲状腺功能亢进、甲状腺功能减退和甲状腺功能亢进的发生率分别为 3.53%、2.57%、1.12% 和 0.32%^[14], 其中妊娠合并甲减对孕妇和胎儿的健康造成不可逆影响, 及早诊断及干预治疗可大大降低对孕妇和胎儿健康的损害^[15]。本研究尝试开拓尿液检测的新领域, 探索甲状腺功能检测的新途径。结果表明, 经 Cr 校正后, 晨尿和随机尿中 TSH、FT3 水平的差异无统计学意义 ($P>0.05$), 可以尝试用随机尿研究这些项目与相关疾病的关系; 晨尿和随机尿中 FT4 水平的差异有统计学意义, 需要进一步探讨和研究。

参考文献:

[1] Methven S, Macgregor MS, Traynor JP, et al. Assessing proteinuria in chronic kidney disease; protein-creatinine ratio versus albumin-creatinine ratio [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25(9): 2991-2996.
 [2] Shahbazian N, Hosseini-Asl F. A comparison of spot urine

protein-creatinine ratio with 24-hour urine protein excretion in women with preeclampsia [J]. *Iran J Kidney Dis*, 2008, 2(3): 127-131.

[3] 陈晓婷, 李云飞, 张炳峰, 等. 随机尿标本蛋白与肌酐比值在显著性蛋白尿预测中的应用 [J]. *实用医学杂志*, 2006, 22(19): 2305-2307.
 [4] 成守金, 罗云杰, 赵丽萍. 随机尿蛋白/肌酐比值与 24 h 尿蛋白定量的关系及其临床应用的研究 [J]. *中外健康文摘*, 2011, 8(12): 419-420.
 [5] Poudel B, Yadav BK, Nepal AK, et al. Prevalence and association of microalbuminuria in essential hypertensive patients [J]. *N Am J Med Sci*, 2012, 4(8): 331-335.
 [6] Viana LV, Gross JL, Camargo JL, et al. Prediction of cardiovascular events, diabetic nephropathy, and mortality by albumin concentration in a spot urine sample in patients with type 2 diabetes [J]. *J Diabetes Complications*, 2012, 26(5): 407-412.
 [7] Ganti S, Weiss RH. Urine metabolomics for kidney Cancer detection and biomarker discovery [J]. *Urol Oncol*, 2011, 29(5): 551-557.
 [8] Chinen R, Câmara NO, Nishida S, et al. Determination of renal function in long-term heart transplant patients by measurement of urinary retinol-binding protein levels [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2006, 39(10): 1305-1313.
 [9] 夏运成, 彭灿辉, 屈申, 等. 尿视黄醇结合蛋白与肾小管间质受损的相关性研究 [J]. *中南大学学报: 医学版*, 2011, 36(10): 1008-1011.
 [10] 周慧, 雷婷, 张曼. 醇类沉淀法提取尿液蛋白的优化策略 [J]. *广东医学*, 2012, 33(11): 1534-1536.
 [11] Zimmermann MB. The effects of Iodine deficiency in pregnancy and infancy [J]. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 2012, 26 Suppl 1: S108-117.
 [12] El Baba KA, Azar ST. Thyroid dysfunction in pregnancy [J]. *Int J Gen Med*, 2012, 5: 227-230.
 [13] 赵艳晖, 吴富菊, 张炜旸, 等. 妊娠合并甲状腺功能减退症对孕妇及胎儿的影响 [J]. *中国妇幼保健*, 2009, 24(35): 4982-4984.
 [14] 苏会璇, 韦慈, 连冬梅. 妊娠各期孕妇甲状腺激素变化的探讨 [J]. *中国医师杂志*, 2010, 12(6): 725-727.
 [15] Sahay RK, Nagesh VS. Hypothyroidism in pregnancy [J]. *Indian J Endocrinol Metab*, 2012, 16(3): 364-370.

(收稿日期: 2012-11-08 修回日期: 2013-01-22)

(上接第 1326 页)

Eur J Cell Biol, 1994, 65(1): 14-25.
 [14] Caro LH, Plomp PJ, Wolvetang EJ, et al. 3-Methyladenine, an inhibitor of autophagy, has multiple effects on metabolism [J]. *Eur J Biochem*, 1988, 175(2): 325-329.
 [15] Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, et al. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including

primary CML stem cells [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(5): 1109-1123.

[16] Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreros C, Menendez JA. Autophagy facilitates the development of breast cancer resistance to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab [J]. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6251.

(收稿日期: 2012-11-08 修回日期: 2013-01-22)