·论　　著·

尿液 8-oxo-Gsn 与丙型肝炎病毒感染引起肝损害的关系研究

杨丽霞[1]，张厚亮[1]，吴洪章[2]
（1. 天津医科大学静海临床学院免疫科，天津 301600；2. 天津市第二人民医院，天津 300192）

摘　要：目的　探讨尿液中 RNA 氧化产物 8-氧化鸟苷（8-oxo-Gsn）与丙型肝炎病毒（HCV）感染引起肝损害的关系及临床意义。**方法**　选取 45 例慢性丙型肝炎（CHC）患者肝穿刺活检前的空腹中段晨尿，HCV 携带者 50 例及 50 例体检健康者（对照组）的空腹中段晨尿，采用同位素稀释高效液相-串联质谱（ID-LC-MS/MS）检测尿 RNA 氧化产物 8-oxo-Gsn，并用肌酐值（creatinine）校正。分析尿 8-oxo-Gsn 与 CHC 炎症程度和纤维化程度之间的相关性。**结果**　CHC 组尿 8-oxo-Gsn 水平显著高于 HCV 携带组（$P<0.01$）；HCV 携带组患者尿 8-oxo-Gsn 水平显著高于对照组（$P<0.01$）；肝脏炎症程度高的患者（A2～A3）尿 8-oxo-Gsn 水平显著高于肝脏炎症程度低的患者（A0～A1），差异有统计学意义（$P<0.01$）；纤维化程度高的患者（F3～F4）尿 8-oxo-Gsn 水平与纤维化程度低（F0～F2）的比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。**结论**　尿中 RNA 氧化损伤标志物 8-oxo-Gsn 对评估丙型肝炎肝脏损害程度有较高的参考价值。

关键词：8-氧化鸟苷；　丙型肝炎病毒；　慢性丙型肝炎；　肝脏损害程度
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2020.05.022　　**中图法分类号：**R446.1
文章编号：1673-4130(2020)05-0607-04　　**文献标识码：**A

The relationship between urine 8-oxo-Gsn and hepatic damage caused by hepatitis C virus infection

YANG Lixia[1], *ZHANG Houliang*[1], *WU Hongzhang*[2]
(1. *Department of Immunology, Jinghai Clinical College, Tianjin Medical University, Tianjin* 301600, *China*; 2. *Tianjin Second People's Hospital, Tianjin* 300192, *China*)

Abstract: Objective　To investigate the relationship between urinary RNA oxidation product 8-oxo-Gsn and hepatic damage caused by hepatitis C virus (HCV) infection and its clinical significance. **Methods**　The urine samples of 45 patients with chronic hepatitis C (CHC), 50 hepatitis C carriers and 50 healthy controls were collected before liver biopsy. The urine RNA oxidized product 8-oxo-Gsn was detected by isotope dilution high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (ID-LC-MS/MS) and corrected by creatinine value. To analyze the correlation between urinary 8-oxo-Gsn and the degree of inflammation and fibrosis of CHC. **Results**　Urine 8-oxo-Gsn in CHC group was higher than that in hepatitis C carrier group ($P<0.01$); urine 8-oxo-Gsn in hepatitis C carrier group was significantly higher than that in healthy control group ($P<0.01$); urine 8-oxo-Gsn in patients with high degree of hepatitis (A2－A3) was significantly higher than that in patients with low degree of hepatitis (A0－A1), with significant difference ($P<0.01$); meanwhile, compared between patients with high degree of fibrosis (F3－F4) and patients with low fibrosis (F0－F2), there was no significant difference in urine 8-oxo-Gsn concentration ($P>0.05$). **Conclusion**　Urinary RNA oxidative damage marker 8-oxo-Gsn has a good significance in evaluating the degree of liver damage in hepatitis C.

Key words: 8-oxo-Gsn;　HCV infection;　chronic hepatitis C patients;　degree of liver damage

丙型肝炎病毒（HCV）为单股正链 RNA 病毒，感染后可引起肝脏炎性反应，约 85% 的感染会转为慢性[1]。丙型肝炎是全球性的公共卫生健康问题，患者人数众多。据 WHO 统计，全世界约 1.7 亿到 2.0 亿人患丙型肝炎，每年约有 39.9 万人因长期 HCV 感染导致肝硬化或肝癌死亡[2]，我国是 HCV 感染人数较多的国家之一，并且丙型肝炎已经继乙型肝炎之后成为我国肝细胞癌的另一个重要致病因素[3]。随着临床研究的深入，发现活性氧自由基（ROS）可引起核酸损伤，而其所引发的氧化应激是肝细胞损伤的重要环节，ROS 增多可引起核酸中碱基修饰、错配、蛋白变异。RNA 中鸟嘌呤核苷常在 ROS 的作用下形成 8-氧化鸟苷（8-oxo-Gsn），受损的核酸氧化产物进入血液循环，从尿液排出。RNA 的氧化损伤可能参与多

作者简介：杨丽霞，女，主管技师，主要从事免疫检测项目研究。

本文引用格式：杨丽霞，张厚亮，吴洪章. 尿液 8-oxo-Gsn 与丙型肝炎病毒感染引起肝损害的关系研究[J]. 国际检验医学杂志，2020，41(5)：607-610.

种疾病的发生、发展[4]。8-oxo-Gsn 是 RNA 鸟苷的氧化产物，可作为体内 RNA 氧化标志物，在发生氧化损伤后尿液中的 8-oxo-Gsn 水平较其他体液指标变化更明显，其检测手段具有无创性，容易操作，是极具临床推广价值的 RNA 氧化损伤标志物。本研究旨探讨尿液中 RNA 氧化产物 8-oxo-Gsn 与丙型肝炎肝损害的关系。

1　资料与方法

1.1　一般资料　选取 2015 年 5 月至 2018 年 8 月在天津医科大学静海临床学院和天津市第二人民医院进行肝穿刺活检的慢性丙型肝炎(CHC)患者 45 例作为 CHC 组，其中男 25 例、女 20 例，年龄 29～65 岁，平均(48.8±11.1)岁；选取同期的 HCV 携带者 50 例作为 HCV 携带组，其中男 28 例、女 22 例，年龄 31～63 岁，平均(49.3±10.8)岁；选取同期体检健康者 50 例作为对照组，其中男 25 例、女 25 例，年龄 30～63 岁，平均(47.9±12.7)岁。各组年龄差别无统计学意义($P>0.05$)。

1.2　纳入及排除标准

1.2.1　CHC 组患者　纳入标准：CHC 患者符合《丙型肝炎防治指南》(2015 更新版)[5] CHC 诊断标准，即 HCV 感染 6 个月以上，或有 6 个月以前的流行病学史；血清 HCV 抗体阳性及 HCV 核糖核酸(HCV RNA)阳性；肝脏组织病理学检查符合慢性肝炎；或根据临床症状、体征、实验室及影像学检查结果综合分析诊断。排除标准：酒精性肝炎、脂肪肝；有甲、乙、丁、戊、庚型等其他肝炎病毒的混合感染；人类免疫缺陷病毒(HIV)、梅毒等感染性疾病；有严重心、脑疾病及各种严重全身性疾病；接受过干扰素或抗病毒治疗；有穿刺禁忌证。

1.2.2　HCV 携带组　纳入标准：HCV 抗体阳性，HCV RNA 阴性；1 年内连续随访 2 次以上，每次间隔 6 个月，肝功能均正常。排除标准：酒精性肝炎、脂肪肝；有其他肝炎病毒的混合感染；HIV、梅毒等感染性疾病；严重心、脑疾病及各种严重全身性疾病。

1.2.3　对照组　纳入标准：体检身体健康。无酒精性肝炎、脂肪肝、自身免疫性肝病；无甲、乙、丁、戊、庚型等其他肝炎病毒的混合感染；无 HIV、梅毒等感染性疾病；体检肝、肾功能等各项常规检测项目均无异常。

1.3　仪器与试剂　Agilent UPLC 1290 超高效液相系统(Agilent 公司，美国)；Agilent 6490 Triple Quad MS/MS 三重串联四极杆液质连用系统(Agilent 公司，美国)。液相条件如下。A 液：10 mmol/L 醋酸铵水溶液，调节 pH 值 3.7；B 液：色谱级纯甲醇；色谱柱：SB-Aq，3.0 mm×100.0 mm，1.8 μm，600 Bar(Agilent 公司，美国)，柱温 35 ℃。罗氏 Cobas c701 全自动生化分析仪及其配套试剂。

1.4　方法

1.4.1　检测方法　留取纳入研究者空腹新鲜中段晨尿，装入 15 mL 无菌尿管，立即于－80 ℃冰箱冻存。应用同位素稀释高效液相-串联质谱(ID-LC-MS/MS)定量测定所有患者晨尿中 8-oxo-Gsn 水平，酶法测定尿肌酐值(creatinine)。尿液的前处理：冻存的尿液于 37 ℃水浴 10 min 解冻，7 500×g，离心 5 min(4 ℃)；取上清 200 μL，200 μL 工作液(70%纯甲醇，30%醋酸铵水溶液，水平 10 mmol/L，pH 值为 3.7)，再加入 10 μL 浓度为 480 pg/μL 的 8-oxo-Gsn(^{13}C，$^{15}N_2$)同位素内标，震荡混匀 2 min，置于 37 ℃温育箱孵育 10 min，然后 12 000×g 低温离心 15 min(4 ℃)，上清液用作 LC-MS/MS 检测分析，试验严格按照产品说明和仪器操作规程进行。用尿 creatinine 校正测得的 8-oxo-Gsn 值以减少肾小球功能和尿液体积对测定的影响，校正方法参考文献[6]。$C_{校正}=C_{测定}/C_{尿creatinine}$，合格 creatinine 水平范围 0.5～3.0 g/L。

1.4.2　肝脏组织学检查　通过超声检查定位，取右腋中线第 8～9 肋间隙、肝实音处为穿刺点，嘱患者深吸气屏气，采用美国 Bard 公司生产的弹射式肝穿刺枪和配套的 16 G 一次性活检穿刺针，1 s 负压吸取肝组织，要求穿刺取出的肝组织长度≥1.5 cm，包含至少 3 个可供评价汇管区。常规用 10%甲醛溶液固定肝组织，及时送检。使用国际上最常用的肝纤维化 METAVIR 评分系统[7]，将肝组织纤维化程度分为 0～4 五个等级：F0 为无纤维化；F1 为汇管区星芒状扩大但无纤维间隔形成；F2 为汇管区星芒状扩大，极少数纤维间隔形成；F3 为众多纤维间隔，但无硬化；F4 为硬化。将肝组织炎症活动度分为 0～3 四个等级：A0 为无活动，A1 为轻度活动，A2 为中度活动，A3 为重度活动。

1.5　统计学处理　采用 SPSS22.0 统计软件进行数据结果统计分析，成正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间比较采用 t 检验，采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析诊断价值，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　尿液 8-oxo-Gsn 水平的比较　CHC 组尿 8-oxo-Gsn 水平显著高于 HCV 携带组，差异有统计学意义($t=3.319$，$P=0.002$)；HCV 携带组尿 8-oxo-Gsn 水平显著高于对照组，差异有统计学意义($t=17.867$，$P=0.000$)，见表 1。

表 1　各组间尿 8-oxo-Gsn 水平比较($\bar{x}\pm s$)

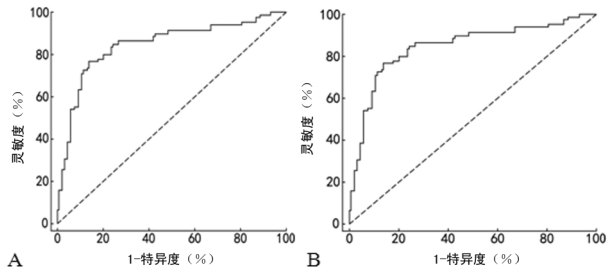
组别	n	8-oxo-Gsn (μmol/mol creatinine)
CHC 组	45	4.490±0.678
HCV 携带组	50	4.123±0.414
对照组	50	2.498±0.531

2.2　CHC 患者各组间尿 8-oxo-Gsn、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)水平比较　肝脏炎症程度高(A2～A3)的患者尿液 8-oxo-Gsn、血清 ALT、AST 水平均显著高于肝脏炎症程度低(A0～A1)的患者，差异均有统计学意义($P<0.01$)。纤维化程度高(F3～F4)的患者尿 8-oxo-Gsn 水平与纤维化程度低(F0～F2)的患者比较，差异无统计学意义($P>0.05$)。尿 8-oxo-Gsn 水平与血清 ALT 和 AST 并未发现相关性(P 分别为 0.212、0.470)。不同炎症分期及纤维化分期的 CHC 患者间检测指标的比较见表 2。

表 2　CHC 各组间尿 8-oxo-Gsn、血清 ALT、AST 水平比较($\overline{x}\pm s$)

项目	n	8-oxo-Gsn (μmol/mol creatinine)	ALT (U/L)	AST (U/L)
炎症分期				
A0～A1	22	4.051±0.651	65.86±19.35	46.67±18.41
A2～A3	11	5.135±0.912	108.76±43.62	72.50±19.97
t		3.203	3.215	3.542
P		0.009	0.009	0.005
纤维化分期				
F0～F2	20	4.025±0.292	56.54±17.98	46.38±11.97
F3～F4	13	4.228±0.466	48.20±12.59	48.65±15.39
t		2.089	1.388	0.502
P		0.059	0.190	0.625

2.3　ROC 分析 8-oxo-Gsn 对 CHC 炎症活动度和纤维化程度的诊断价值　8-oxo-Gsn 对 CHC 炎症活动度的诊断灵敏度为 82.2%，特异度为 75.3%，曲线下面积(AUC)为 0.812；8-oxo-Gsn 对 CHC 纤维化程度的诊断灵敏度为 83.2%，特异度为 77.3%，AUC 为 0.822。见图 1。



注：A 为 8-oxo-Gsn 对 CHC 炎症活动度诊断的 ROC 曲线；B 为 8-oxo-Gsn 对 CHC 纤维化程度诊断的 ROC 曲线。

图 1　8-oxo-Gsn 用于诊断的 ROC 曲线

3　讨　论

HCV 感染是急性丙型肝炎或 CHC、肝硬化和肝癌的病因之一。在感染早期，大部分患者没有任何症状，HCV 也是导致肝脏损伤的直接原因之一，病毒感染可引起核酸损伤，而其所引发的氧化应激是肝细胞损伤的重要环节，造成 ROS 释放增多，使吞噬细胞活化并释放前氧化性细胞因子，ROS 由其羟基自由基进一步损伤核酸，引发蛋白质变异造成肝脏病变[8]。目前丙型肝炎肝损害程度的评估及是否进行抗病毒治疗主要依靠一般血液生化检测、影像学和病理学检查。然而有证据显示，有部分 ALT 正常的 CHC 患者肝穿刺组织病理学呈明显肝损伤表现，如不早期临床干预会增加肝硬化甚至肝癌的发生风险。由于肝穿刺检测周期长、成本高，给患者造成有创伤害，不易推广应用，影响了隐匿性 HCV 感染患者肝组织损害状态的评估，影像学检查有一定的漏诊率和灰区[9]。根据丙型肝炎防治指南，即便是对肝纤维化评估较为理想的 FibroScand 对肝损伤判定也存在一定的灰区[10]。无创性检测方法对于医生判断患者肝脏炎症分期是非常重要的检测手段之一，并对提高患者治疗依从性有一定帮助。研究表明，晨尿中 RNA 氧化产物 8-oxo-Gsn 用 creatinine 校正后，与 24 h 尿中 RNA 氧化产物浓度意义相近，能反映一定时间内人体氧化应激水平[11]。

氧化应激是人体正常细胞中氧化和抗氧化失去平衡的一种状态，在引起肝脏发生病理损伤中发挥了关键作用[12]。当前许多研究证明 RNA 在细胞质中分布广泛，相对于 DNA 来说，RNA 大部分为单链，缺乏组蛋白保护和 RNA 聚合酶的校正功能，容易受到 ROS 攻击发生氧化损伤，氧化修饰的 RNA 可引起转录翻译的异常，从而导致蛋白质合成的障碍，诱发细胞变异[13]，RNA 中鸟嘌呤核苷常在 ROS 的作用下形成氧化代谢产物 8-oxo-Gsn。分泌至血液、尿液、脑脊液等体液中的氧化代谢产物 8-oxo-Gsn 可作为一种新的生物学标志物，提示体内 RNA 氧化损伤的水平，对人们了解疾病状态、致病因素、治疗选择等有一定的参考价值。WANG 等[14]在糖尿病的大鼠模型中发现也证实了这一点，高血糖状态下相较于 DNA，RNA 更易受到损伤。有研究表明，RNA 氧化损伤是一种潜在的发病机制，氧化损伤在一些疾病及并发症的发生和进展中扮演了重要角色[15]。RNA 氧化参与多种疾病的发生、发展，如氧化应激相关疾病、糖尿病、肿瘤等。LIU 等[6]运用 ID-LC-MS/MS 法检测对比糖尿病患者及健康人尿 8-oxo-Gsn 后发现，尿 8-oxo-Gsn 的升高可能是一种糖尿病进展的危险因素，尤其在糖尿病合并大血管病变中 RNA 氧化损伤与许多疾病相关，是许多疾病的潜在发病机制，尤其是神经退行性病变、糖尿病等疾病。SONG 等[16]研究证明在胃癌患者尿 8-oxo-Gsn 显著增高，与胃癌分期严重程度有明显相关性。RNA 氧化产物 8-oxo-Gsn 已经成为公认的 RNA 氧化最重要的标志物，前期研究表明，在大鼠和猕猴等动物组织和体液中，如白细胞、血液和尿液中，RNA 氧化产物 8-oxo-Gsn 水平随年龄逐渐升高，且尿液中的 8-oxo-Gsn 水平最高[17-20]。因此，无创性尿液 8-oxo-Gsn 是一种评估机体氧化应激损伤非常重要的生物学标志物。

RNA 氧化标志物的检测目前主要采用免疫组化法、反转录酶-聚合酶链式反应法(RT-PCR)、高效液

相色谱-电化学探测器联用法(HPLC-ECD)及 ID-LC-MS/MS,有研究认为 ID-LC-MS/MS 是最具有灵敏度和特异度的检测尿液 8-oxo-Gsn 的方法,推荐使用 ID-LC-MS/MS 检测尿液 8-oxo-Gsn 评估患者氧化应激损伤情况[7]。本研究采用无创的 ID-LC-MS/MS 检测尿液中 RNA 氧化标志物 8-oxo-Gsn,结果显示 CHC 组尿液中 RNA 氧化标志物 8-oxo-Gsn 显著高于 HCV 携带组,HCV 携带组患者尿 8-oxo-Gsn 显著高于对照组,尿液 8-oxo-Gsn 水平对快速判断丙型肝炎患者所处感染的不同临床时期有重要参考价值,可用于区分丙型肝炎携带者和 CHC 患者。肝脏炎性损伤程度越高尿 8-oxo-Gsn 水平越高,说明尿液 8-oxo-Gsn 对评估丙型肝炎炎症程度有较高的参考价值。血清 ALT 和 AST 与丙型肝炎炎症程度显著相关。纤维化程度高的患者尿 8-oxo-Gsn 水平也高于纤维化程度低的患者,但差异无统计学意义,是否受标本例数的影响,下一步本课题组还将深入研究。

4　结　　论

8-oxo-Gsn 作为一种极具潜力的新型氧化损伤标志物,对评估丙型肝炎肝脏损害程度有较高的价值,对临床选择治疗方案提供一定的依据。尿液 8-oxo-Gsn 有可能对于患者抗病毒疗效观察起到一定辅助作用,由于本研究样本量少,数据分析受多种因素干扰可能存在偏移,后续本课题组将进一步深入研究以减少这类偏移。

参考文献

[1] KAUR H, SINGH P, PANNU H S, et al. To study the prevalence of impaired glucose tolerance in patients with hepatitis C virus related chronic liver disease[J]. J Clin Diagn Res, 2015, 9(3): 16-20.

[2] 高荣,王嘉琪,任浩. SOCS3 参与丙型肝炎病毒感染和治疗的研究进展[J]. 微生物与感染, 2019, 14(1): 46-51.

[3] CHEN J C, ZHANG S W. Liver cancer epidemic in China past present and future[J]. Semin Cancer Biol, 2011, 21(1): 59-69.

[4] POULSEN H E, SPECHT E, BROEDBAEK K, et al. RNA modifications by oxidation: a novel disease mechanism[J]. Free Radiiol Med, 2012, 52(8): 1353-1361.

[5] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会. 丙型肝炎防治指南(2015 更新版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2015, 23(12): 906-923.

[6] LIU X, GAN W, ZOU Y, et al. Elevated levels of urinary markers of oxidative DNA and RNA damage in type 2 diabetes with complications[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 4323198.

[7] The French METAVIR Cooperative Study Group. Intraobserver and interobserver varia-tions in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C[J]. Hepatology, 1994, 20(1): 15-20.

[8] BARCELOS R P, ROYES L F F, GONZALE-GALLEGO J, et al. Oxidative stress and inflammation: liver responses and adaptations to acute and regular exercise[J]. Free Radic Res, 2017, 51(2): 222-236.

[9] HUANG R, JIANG N, YANG R, et al. Fibroscan improves the diagnosis sensitivity of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B[J]. Exp Ther Med, 2016, 11(5): 1673-1677.

[10] 刘京,刘映霞,董常峰,等. ARFI、Forns 指数、FIB-4 和 APRI 无创诊断慢性乙型病毒性肝炎肝硬化的研究[J/CD]. 中国肝脏病学杂志(电子版), 2014, 6(11): 18-21.

[11] MAO Y H, WENG Q H, XU L N, et al. Levels of 8-oxo-dGsn and 8-oxo-Gsn in random urine are consistent with 24 h urine in healthy subjects and patients with renal disease[J]. Free Radic Res, 2017, 51(6): 616-621.

[12] HA H L, SHINE H J, FEITELSON M A, et al. Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenrsis[J]. World J Gastrornterol, 2010, 16(48): 6035-6043.

[13] SHIMODE R, NAGASHIMA M, SAKAMOTO M, et al. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-Hydroxyguanosine in human livers with chronic hepatitis[J]. Cancers Res, 1994, 54(12): 3171-3172.

[14] WANG W X, LUO S B, XIA M M, et al. Analysis of the oxidative damage of DNA, RNA, and their metabolites induced by hyperglycemia and related nephropathy in Sprague Dawley rats[J]. Free Radic Res, 2015, 49(10): 1199-1209.

[15] 赵聪,何青. RNA 氧化损伤:一种潜在的新的致病机制[J]. 中华保健医学杂志, 2016, 5(18): 434-436.

[16] SONG W J, JIANG P, CAI J P, et al. Expression of cytoplasmic 8-oxo-Gsn and MTHl correlates With pathological grading in human gastric cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prey, 2015, 16(15): 6335-6338.

[17] GAN W, NIE B, SHI F, et al. Age-dependent increases in the oxidative damage of DNA, RNA, and their metabolites in normal and senescence-accelerated mice analyzed by LC-MS/MS: urinary 8-oxoguanosine as a novel biomarker of aging[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 52(9): 1700-1707.

[18] SHI F, NIE B, GAN W, et al. Oxidative damage of DNA, RNA and their metabolites in leukocytes. plasma and urine of Macaca mulatta: 8-oxoguanosine in urine is a useful maker for aging[J]. Free Radic Res, 2012, 46(9): 1093-1098.

[19] NIE B, GAN W, SHI F, et al. Age-dependent accumulation of 8-oxoguanine in the DNA and RNA in various rat tissues[J]. Oxid Med Cell Longev, 2013, 2013: 303181.

[20] ANDREOLI R, MUTTI A, GOLDONI M, et al. Reference ranges of urinary biomarkers of oxidized guanine in (2′-deoxy) ribonucleotides and nucleic acids[J]. Free Radic Biol Med, 2011, 50(2): 254-261.

(收稿日期:2019-07-25　修回日期:2019-12-18)