DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.03.039

中图法分类号 R743.35 文献标识码 B

参考文献

[1] Kakarieka A, Braakman R, Schakel E H. Subarachnoid hemorrhage after head injury[J]. Cerebrovasc Dis, 1995, 5(4): 403.

[2] Ram Z, Sahar A, Hadani M. Vasospasm due to massive subarachnoid hemorrhage—a rat model[J]. Acta Neurochir (Wien) 1991, 110(3-4): 181—184.

[3] 刘佰运, 王忠诚, 吴建中, 等. 蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的发生机制研究[J]. 中华神经外科杂志, 1995, 11(4): 226.

[4] Macdonald R L, Wier B A K. A review of hemoglobin and the pathogenesis of cerebral vasospasm[J]. Stroke, 1991, 22(8): 971—982.

[5] Chatte D, Rusch N. Prevention of chronic experimental cerebral vasospasm with iburofen and high-dose methlprednisolone[J]. J Neurosurg, 1983, 59(6): 925—932.

(编 辑 王 红)

文章编号: 1000-5404(2000)03-0297-02

技术方法

尿中Ⅳ型胶原检测在诊断糖尿病肾病中的应用

Detecting urinary type Ⅳcollagen in the diagnosis of diabetic nephropathy

杨 沛, 陈 伟, 梁启中, 霍加勇 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所检验科, 重庆 400042)

提 要 目的: 探讨 PEG-4000 浓缩尿中Ⅳ型胶原(Ⅳ-C)检测对诊断糖尿病肾病的作用。方法: 用 ELISA 法检测 PEG-4000 浓缩尿中Ⅳ-C 浓度。结果: 健康对照组尿液Ⅳ-C 含量为(4.47±1.72) ng/ml; 糖尿病正常白蛋白尿组尿液Ⅳ-C 含量为(6.12±3.02) ng/ml; 糖尿病微量白蛋白尿组为(12.07±4.43) ng/ml; 糖尿病大量白蛋白尿组为(14.53±9.12) ng/ml; 非糖尿病肾病组浓缩尿Ⅳ-C 含量为(4.68±2.01) ng/ml。糖尿病人随着尿白蛋白分泌率(AER)增加, 血清和尿中Ⅳ-C 浓度也逐渐增加。结论: 用 PEG-4000 浓缩尿中Ⅳ-C 的效果显著, 血清和尿中Ⅳ-C 检测在诊断糖尿病肾病方面是有效的指标, 可作为糖尿病肾病(DN)和非糖尿病肾病(NDRD)的鉴别指标。

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)是糖尿病(Diabetic mellitus, DM)的主要并发症, 病理基础是糖尿病性微血管病变, 表现为肾小球硬化, 而肾小球基底膜的主要化学成份是Ⅳ-C(Type Ⅳcollagen), 因此, Ⅳ-C 在 DN 的发生、发展过程中起作非常重要的作用。对 DN 病人血清中Ⅳ-C 变化的研究已见广泛报道[1~3], 但研究 DN 病人尿中Ⅳ-C 变化的报道还很少。本研究采用 ELISA 法检测 PEG-4000 浓缩尿中的Ⅳ-C, 观察尿中Ⅳ-C 在 DN 时的变化及临床意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本院 1997 年 11 月至 1998 年 5 月之间 50 例 NIDDM 住院病人, 其中 16 例为正常白蛋白尿 A 组: 年龄(56±10)岁, 病程(14±5)年, HbA1C 为(7.0±1.2)%, Ccr 为(87±20) ml/min; 22 例为微量白蛋白尿 B 组: 年龄(57±10)岁, 病程(16±6)年, HbA1C 为(6.9±0.8)%, Ccr 为(87±16) ml/min; 12 例为大量白蛋白尿 C 组: 年龄(57±7)岁, 病程(16±4)年, HbA1C 为 7.0±0.7)%, Ccr 为(68±24) ml/min; 本院同期 20 例非糖尿病肾病(Nondiabetic renal disease, NDRD)病人为 D 组(8 例 IgA 肾病, 8 例肾硬化, 4 例膜性肾病); 16 例本科室人员为正常对照组(H 组)。所有各组人员均不伴有结缔组织疾病及肝脏疾病。对 B、C、D 3 组进行肾活组织检查, 以确定糖尿病肾病和非糖尿病肾病。

1.2 方法

将 24 h 尿标本混匀, 取 10 ml 离心(450× g, 5 min)取上清液, 缓慢加入 10 g/L 牛γ-球蛋白液 0.8 ml, 振荡混匀, 缓慢加入 450 g/L 的 PEG-4000 溶液 5 ml, 使γ-球蛋白最终浓度为 0.5 g/L, PEG-4000 最终浓度为 150 g/L, 在 4°C 孵育 5 min, 然后于 TLL-C 台式高速冷冻离心机离心沉淀(18 000× g, 30 min), 弃上清液, 用生理盐水充分溶解沉淀至 1 ml, 即得到浓缩尿标本。然后用 IV-C 酶联免疫测定试剂盒(中国科学院上海细胞生物研究所), 检测浓缩尿和血清中的 IV-C, 于 DG3022 酶联免疫检测仪 450 nm 比色, 根据标准曲线得出结果。

1.3 统计学分析

数据表达均为 $\bar{x}\pm s$, 组间数据比较采用 Student's t 检验和 t' 检验。

2 结果

2.1 PEG-4000, γ-球蛋白最适浓度选择

取不同浓度的 PEG-4000 进行回收试验, 结果发现, 回收率随 PEG-4000 浓度增加而增加, 当达到 150 g/L 时, 回收效果最好, 灵继续增加 PEG-4000 浓度, 回收率缓慢降低。取不同浓度

作者简介: 杨 沛(1964.2), 男, 四川省崇州市人, 硕士研究生, 主管技师, 主要从事临床生化方面的研究。电话: (023)68757272

收稿日期: 1999-09-17; 修回日期: 1999-12-29

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的γ-球蛋白进行回收试验，结果发现，γ-球蛋白浓度达到0.5 g/L时，回收率达到最高，继续增加γ-球蛋白浓度，回收率不再增加。因此，本实验选择PEG-4000的最终浓度为150 g/L。γ-球蛋白为0.5 g/L。

2.2 PEG-4000浓缩效果观察

我们对16例正常人，20例NDRD病人和50例NIDDM病人尿标本在浓缩前进行测定，其中69份（占80%）尿标本由于IV-C浓度在检测限以下，无法测定。17份尿标本可测定，结果为(9.2±4.7) ng/ml。经过PEG-4000浓缩后，前69份标本均可测出IV-C含量，结果为(72.9±40.1) ng/ml，后17份标本IV-C浓度为(90.4±67.2) ng/ml，浓缩效果显著。

2.3 正常人、NIDDM和NDRD病人血清和尿中IV-C浓度比较

NIDDM病人A组和正常健康人H组比较，血清和尿中IV-C均升高（$P<0.01$），尿总蛋白无变化。B组与H组比较，血清和尿IV-C升高非常明显（$P<0.001$），尿总蛋白仍无变化。C组与H组比较，血清、尿IV-C以及尿总蛋白升高均非常明显（$P<0.001$）。D组（NDRD病人）与H组比较，血清和尿中IV-C无明显改变（$P>0.05$），但尿总蛋白升高明显（$P<0.001$），见表1。

表1 正常人和各组病人IV-C浓度比较

组别	AER (μg/min)	例数	血清IV-C (ng/ml)	尿液IV-C (ng/ml)	尿总蛋白 (g/24 h)
H	<20	16	98±22	4.47±1.72	0.05±0.03
A	<20	16	160±42*	6.12±3.02*	0.05±0.03
B	20~200	22	301±84**	12.07±4.43**	0.08±0.06
C	≥200	12	324±90**	14.53±9.12**	1.006±0.88*
D	≥20	20	99±30	4.68±2.01	0.8±0.6**

*：$P<0.01$，**：$P<0.001$ 与H组比较

3 讨论

目前，国内外已有很多文献报道用单克隆抗体ELSIA法检测血清IV-C浓度是非常敏感和特异的，然而由于尿中IV-C浓度大都在检测限以下，故这种方法不能检测尿中IV-C浓度。为了检测尿IV-C浓度，我们在Nazifa等人[4]的基础上，建立了一种用PEG-4000浓缩尿IV-C的方法，这种方法简便，快速，效果良好。

患终末期肾衰的糖尿病人持续增加，说明目前对糖尿病的治疗还不能完全阻止糖尿病肾病的进程。目前认为，持续性微量白蛋白尿（尿AER在20~200 μg/min）可诊断早期糖尿病肾病，而早期的糖尿病肾病是可逆的，可以通过有效控制血糖和使用血管紧张素转化酶（Angiotensin-converting enzyme，ACE）抑制剂减小肾小球高血压来阻止其发生、发展。然而，其它的肾脏疾病，如原发性高血压，尿道感染和NDRD都存在AER升高，因此，只凭AER升高还不能确诊早期糖尿病肾病（特别是NIDDM病人），有时需要作肾活组织检查。

糖尿病肾病的特点是肾小球膜肿胀，小结形成，肾小球和肾小管基底膜增厚，入球和出球小动脉透明变性和间质纤维变性。IV-C是基底膜和肾小球膜的主要成份，糖尿病人血清和尿中IV-C可能会增加，检测血清和尿中IV-C浓度对鉴别糖尿病肾病和NDRD（特别是只存在蛋白尿的肾硬化）可能是有价值的。为此，我们检测了正常人、各种糖尿病人和NDRD病人血清和尿中IV-C浓度。结果显示，糖尿病人，特别是带有微量或大量白蛋白尿的糖尿病人，血清和尿中IV-C水平明显升高。相反，带有微量或大量白蛋白尿的NDRD病人，血清和尿中IV-C水平不升高。所以，通过检测血清和尿中IV-C水平可以鉴别DN和NDRD。

Matsumoto等[2]证实尿白蛋白浓度小于15 mg/L的糖尿病人，其血清IV-C水平也明显升高，并且随着尿白蛋白浓度增加，血清IV-C浓度也成比例增加。我们的研究结果显示，有微量白蛋白尿和大量白蛋白尿的糖尿病人，其血清和尿中IV-C水平比有正常白蛋白尿的糖尿病人和健康对照组明显升高。与此同时，有正常白蛋白尿糖尿病人的血清和尿IV-C水平又比健康对照组明显升高。

在其他器官，特别是在肝脏，能够合成大量的IV-C。在肝脏疾病如肝硬化，慢性肝炎，在结缔组织疾病如类风湿性关节炎时，血清IV-C含量升高，尿中IV-C是否增加也不能确定。所在，在我们的研究中排除了以上疾病。

本实验结果显示，在糖尿病肾病和NDRD都存在微量或大量蛋白尿时，检测血清和尿中IV-C水平可以将它们明确区分开来，而不必进行肾活组织检查。

关键词 糖尿病肾病；Ⅳ型胶原；微量白蛋白尿；非糖尿病肾病
中图法分类号 R692.39 文献标识码 B

参考文献

[1] Inomata S, Itoh M, Sato T. Difference of serum levels of type Ⅳcollagen 7S between early or overt nephropathy and nondia betic renal disease in diabetic patients with micro-or macroalbuminuria[J]. Nephron, 1996, 73(4): 601—605.

[2] Matsumoto E, Matsumoto G, Ooshima A, *et al*. Serum type Ⅳ collagen concentrations in diabetic patients with microangiopathy as determined by enzyme immunoassay with monoclonal antibodies[J]. Diabetes, 1990, 39(8): 885—890.

[3] 王国英，张捷，寇丽筠. 夹层酶标法测定糖尿病人血清Ⅳ型胶原含量的临床意义[J]. 北京医学，1993，15(5)：273—275.

[4] Nazifa B, Hitoshi H, Shinkuro K, *et al*. A novel method for concentrating urinary type Ⅳ collage based on precipitation with polyethylene glycol: application to its measurement by enzyme immunoassay[J]. Ann Clin Biochem, 1994, 31(2): 485—491.

（编 辑 王 红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net