

· 临床研究 ·

8-羟基脱氧鸟苷在结直肠癌患者尿液中的表达

毛玲娜, 宋震亚

浙江大学医学院附属第二医院全科医学科, 浙江 杭州 310009

摘要: **目的** 研究 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)在结直肠癌患者尿液中的表达水平及其对结直肠癌的诊断价值。**方法** 收集 2015 年 9 月至 2016 年 12 月浙江大学医学院附属第二医院 58 例新近确诊且未接受任何治疗的结直肠癌患者以及 26 名健康体检者的晨尿样本,运用高效液相色谱(分离)-串联质谱法(HPLC-MS/MS)测定两组尿液中 8-OHdG 的表达水平。同时,采用化学发光微粒免疫分析法检测受试者的血清癌胚抗原水平。以血清癌胚抗原为对照,利用受试者工作特征(ROC)曲线评价尿液 8-OHdG 对结直肠癌的诊断价值。**结果** 结直肠癌患者的血清癌胚抗原和尿液 8-OHdG 水平分别为 3.1(2.0,8.3)ng/ml 和 (1.5 ± 0.8) nmol/mmol 肌酐,均高于健康人群 [1.8(1.6, 2.4)ng/ml, (1.0 ± 0.5) nmol/mmol 肌酐, $P < 0.01$],且不同病理分期的患者之间血清癌胚抗原和尿液 8-OHdG 水平差异有统计学意义($P < 0.01$)。ROC 曲线分析结果显示,以 1.95 ng/ml 作为诊断临界值,血清癌胚抗原诊断结直肠癌的曲线下面积为 0.756,95% CI 为 0.695 ~ 0.818;以 1.974 nmol/mmol 肌酐为临界值,尿液 8-OHdG 诊断结直肠癌的曲线下面积为 0.843,95% CI 为 0.774 ~ 0.912。**结论** 结直肠癌患者尿液 8-OHdG 表达水平显著增高,且与癌症病情的进展成正相关,提示尿液 8-OHdG 可作为一项新的筛查结直肠癌和监测病情进展的生物学指标。

关键词: 结直肠癌; 8-羟基脱氧鸟苷; 氧化应激; DNA 氧化损伤; ROC 曲线; 筛查

中图分类号: R 735.3 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2019)05-0647-04

Expression and significance of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in urine of patients with colorectal cancer

MAO Ling-na, SONG Zhen-ya

Department of General Practice, The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, Zhejiang 310009, China

Abstract: Objective To study the expression level of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in urine of patients with colorectal cancer and its value for colorectal cancer diagnosis. **Methods** Spot morning urine samples from 58 newly diagnosed patients with colorectal cancer(case group) who were hospitalized in from September 2015 to December 2016 and 26 healthy persons(control group) were collected. The expression level of 8-OHdG in urine was determined by high-performance liquid chromatography (separation)/mass spectrometry in two groups. Meanwhile, the level of serum carcinoembryonic antigen (CEA) was detected by chemiluminescent microparticle immunoassay. The diagnostic value of urine 8-OHdG in colorectal cancer was evaluated by receiver operating characteristic (ROC) curve with serum carcinoembryonic antigen as control. **Results** The levels of serum CEA and urinary 8-OHdG in case group were significantly higher than those in control group [3.1(2.0,8.3)ng/ml vs 1.8(1.6,2.4)ng/ml, (1.5 ± 0.8) nmol/mmol creatinine vs (1.0 ± 0.5) nmol/mmol creatinine, $P < 0.01$]. There were significant differences in them among patients with different pathological stages($P < 0.01$). ROC curve analysis showed that the area under the curve of serum CEA was 0.756(95% CI = 0.695 - 0.718) with 1.95 ng/ml as the diagnostic threshold and 0.843 (95% CI = 0.774 - 0.912) with 1.974 nmol/mmol creatinine as the critical value. **Conclusion** The expression level of 8-OHdG in urine significantly increases and is positively correlated with the progression of disease in patients with colorectal cancer, suggesting that it can be used as a new biological index for screening colorectal cancer and monitoring the progress of cancer.

Key words: Colorectal cancer; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; Oxidative stress; DNA oxidative damage; Receiver operating characteristic; Screening

Fund program: Zhejiang Education Department Project (Y201534681)

结直肠癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,发病率目前居全球男性恶性肿瘤的第三位,女性则居第二位,且有逐年上升的趋势^[1]。研究发现,氧化应激与结直肠癌的发生发展密切相关。机体有氧代谢过程中产生活性氧簇(ROS),正常情况下 ROS 会被抗氧化防御系统清除,但在疾病状态下(如癌症、慢性肾脏疾病、糖尿病等),ROS 产量超过机体抗氧化系统的清除能力或该系统受损,ROS 大量累积导致氧化应激,造成 DNA 氧化损伤,诱导包括结直肠癌在内的多种疾病发生^[2]。在 DNA 氧化损伤产生的大量嘌呤基化、嘧啶基化的碱基修饰产物中,8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG)被认为是 DNA 氧化损伤的标志物^[3],尿液中 8-OHdG 水平反应了机体总体的氧化应激或 DNA 氧化损伤水平^[4]。

目前国内外已经有关于 8-OHdG 水平与人体肿瘤性疾病关系的研究报道。研究发现,非小细胞肺癌患者肿瘤组织中 8-OHdG 水平较低的患者存活时间较长,8-OHdG 水平高的患者死亡风险增加 3 倍以上^[5];乳腺癌患者尿 8-OHdG 水平为正常受试者的 2.5 倍^[6];良性和临界性卵巢肿瘤氧化应激水平相似,但其水平远低于恶性肿瘤^[7];食道上皮细胞癌、胰腺癌患者体液中 8-OHdG 水平显著高于对照组^[8-9]。此外,研究还发现人体血清 8-OHdG 水平与心血管疾病、糖尿病、慢性肾脏疾病等相关^[10-11]。目前,利用液相色谱(分离)-串联质谱法(HPLC-MS/MS)检测 8-OHdG 在结直肠癌患者尿液的表达的研究在国内报道甚少^[12-13]。本研究拟应用高效色谱质谱检测肠癌患者尿液中 8-OHdG 水平,分析不同人群尿液中 8-OHdG 水平的差异,以及尿液 8-OHdG 水平用于早期筛查结直肠癌的临床价值。

1 对象与方法

1.1 研究对象 收集 2015 年 9 月至 2016 年 12 月浙江大学医学院附属第二医院的 58 例新确诊的结直肠癌患者。选取同期在本院健康管理中心体检的健康人群 26 例作为对照组。患者纳入标准:(1)新近病理确诊的结直肠癌患者,确诊之前未接受过腹部手术、未接受放疗或者化疗;(2)所有参加试验的患者既往没有恶性肿瘤、糖尿病、肾功能不全、代谢综合征、痛风、风湿性疾病或其他系统性疾病;(3)合并冠心病的患者病情稳定,近半年未发生过急性冠状动脉综合征或接受支架植入手术;(4)合并脑卒中的患者病情稳定,近半年未有新发梗死灶或接受手术。各期结直肠癌患者和健康人群均为汉族,之间没有血缘关

系。本研究方案通过医学研究伦理委员会的审查,所有研究步骤均在该委员会的指导下进行,所有受试者均签署参加本研究的知情同意书。结直肠癌组共 58 例,男性 28 例,女性 30 例,年龄 25~84(63±12)岁;健康对照组共 26 例,男性 14 例,女性 12 例,年龄 41~73(61±9)岁。结直肠癌组与健康对照组在性别、年龄、体质指数、三酰甘油和血肌酐水平等方面比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

1.2 HPLC-MS/MS 技术检测尿液 8-OHdG 水平 留取所有入组人群的空腹晨尿 15 ml,分管后立即置于 -80℃液氮中备用。结直肠癌患者的尿液必须在新近确诊患者进行放疗或者手术之前收取。检测主要仪器为 ESI-APCI 及 nano ESI 源的串联四级杆线性离子阱质谱仪(AB Sciex 4000 QTRAP)和超高效液相色谱仪(Waters Acquity UPLC)。按照“尿液样本中提取目标化合物处理、液相色谱条件优化、质谱参数优化”等步骤测定尿液 8-OHdG 水平,同时测定尿液中肌酐的含量作为校正^[11],单位为 nmol/mmol 肌酐。

1.3 血三酰甘油、肌酐和癌胚抗原检测 所有受试者禁食 8~12 h 后,于清晨由专人抽取静脉血送实验室进行生化指标测定。血三酰甘油和肌酐的测定通过全自动生化检测仪器(Beckman Coulter AU5831)测定。血三酰甘油测定采用三酰甘油试剂盒(GPO-POD 法),参考范围为 <1.69 mmol/L;血肌酐测定使用肌氨酸氧化酶法,参考范围为男性 40~106 μmol/L,女性 44~88 μmol/L;血清癌胚抗原的测定通过全自动免疫分析仪测定,检测方法为化学发光微粒免疫分析法,参考范围为 <5 ng/ml。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。计量资料行正态性检验及方差齐性检验;不符合正态分布的数据以中位数(上下四分位数)[$M(Q_1, Q_3)$]表示,符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对满足正态分布、方差齐的数据,组间均数比较采用单因素方差分析法,进一步两两比较采用 Scheffe 法;非正态分布数据,采用 Kruskal-wallis 非参数检验法。采用受试者工作特征(ROC)曲线评估尿液 8-OHdG 水平对结直肠癌的诊断价值。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清癌胚抗原和尿液 8-OHdG 水平比较 直肠癌患者的血清癌胚抗原水平为 3.1(2.0, 8.3) ng/ml,高于健康人群的 1.8(1.6, 2.4) ng/ml,差异有统计学意义($P<0.01$),且不同病理分期的患者之间血清癌胚抗原水平差异有统计学意义($P<0.01$)。

见表 1。结直肠癌人群的尿液 8-OHdG 水平为 (1.5 ± 0.8) nmol/mmol 肌酐, 高于健康人群的 (1.0 ± 0.5) nmol/mmol 肌酐, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 且不同病理分期的患者之间尿液 8-OHdG 水平差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 血清癌胚抗原和尿液 8-OHdG 水平对结直肠癌的诊断价值 血清癌胚抗原和尿液 8-OHdG 水平诊断结直肠癌的受试者工作特征曲线见图 1。从图中得出, 1.95 ng/ml 作为临界值, 血清癌胚抗原诊断结直肠癌的灵敏性为 70%, 特异性为 60%, 阳性预测值

为 62%, 阴性预测值为 77%, 曲线下面积为 0.756, 95% CI 为 0.695 ~ 0.818; 以 1.97 nmol/mmol 肌酐为临界值, 尿液 8-OHdG 诊断结直肠癌的灵敏性为 81%, 特异性为 76%, 阳性预测值为 67%, 阴性预测值为 86%, 曲线下面积为 0.843, 95% CI 为 0.774 ~ 0.912。尿液 8-OHdG 诊断结直肠癌的灵敏度高于血清癌胚抗原, 由于尿液的获取较血液更为方便和无创, 因此尿液 8-OHdG 可作为诊断结直肠癌的一个新型体液标志物。

表 1 结直肠癌组和健康对照组一般资料比较

组别	例数	男性 [例(%)]	年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	体质指数 (kg/m^2 , $\bar{x} \pm s$)	三酰甘油 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	血肌酐 ($\mu\text{mol}/\text{L}$, $\bar{x} \pm s$)	癌胚抗原 [ng/ml, $M(Q_1, Q_3)$]	尿 8-OHdG (nmol/mmol 肌酐, $\bar{x} \pm s$)
结直肠癌组	58	28(48.3)	63 ± 12	23 ± 3	1.4 ± 0.6	63 ± 13	3.1(2.0, 8.3) ^a	1.5 ± 0.8 ^a
I 期	12	5(41.7)	66 ± 10	24 ± 3	1.4 ± 0.4	65 ± 17	1.6(0.8, 2.3)	1.1 ± 0.4
II 期	18	6(33.3)	64 ± 12	22 ± 3	1.3 ± 0.6	58 ± 12	4.1(2.7, 6.1) ^b	1.3 ± 0.6 ^b
III 期	18	11(61.1)	62 ± 16	23 ± 3	1.5 ± 0.6	66 ± 11	2.9(2.1, 8.3) ^{bc}	1.5 ± 0.4 ^{bc}
IV 期	10	6(60.0)	62 ± 9	22 ± 4	1.3 ± 0.7	66 ± 10	69.7(22.2, 103.0) ^{bed}	2.6 ± 1.0 ^{bed}
健康对照组	26	14(53.8)	61 ± 9	24 ± 3	1.6 ± 0.6	63 ± 17	1.8(1.6, 2.4)	1.0 ± 0.5

注: 与健康对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与结直肠癌 I 期比较, ^b $P < 0.01$; 与结直肠癌 II 期比较, ^c $P < 0.01$; 与结直肠癌 III 期比较, ^d $P < 0.01$ 。

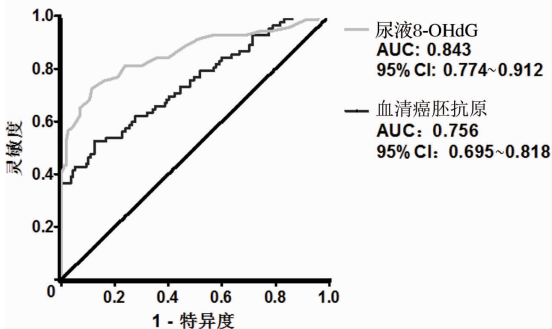


图 1 血清癌胚抗原和尿液 8-OHdG 诊断结直肠癌的 ROC 曲线

3 讨论

8-OHdG 广泛存在于人体体液中, 相比血液和唾液, 尿液中取样简单方便且无创。关于 8-OHdG 的检测, 传统的检测方法主要为酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法, 但该方法的重复性和精确度不佳。HPLC-MS/MS 定量检测 8-OHdG 技术采用多通道扫描模式检测, 能够有效排除其他物质的干扰, 且检测的灵敏度较高, 是目前国际上较 ELISA 法更为先进的 8-OHdG 检测技术^[14-15]。本研究运用 HPLC-MS/MS 定量检测结直肠癌患者尿液中的 8-OHdG 水平, 并与健康对照组进行比较, 结果显示, 与健康人群相比, 结直肠癌患者尿液中 8-OHdG 水平显著增高, 提示 8-OHdG 可用于肠癌筛查^[15]。根据 ROC 曲线分析, 建议选取尿液 8-OHdG > 1.974 nmol/mmol 肌酐作为临床筛查值。虽然与血清癌胚抗原相比, 尿液

8-OHdG 诊断结直肠癌的灵敏度和特异度稍低, 但鉴于尿液的获取较血液更为方便, 因此尿液 8-OHdG 水平作为结直肠癌的筛查指标在临床上仍具有一定的应用价值。

此外, 根据本研究的结果, 我们还发现, 且随着结直肠癌病情的进展, 患者尿液 8-OHdG 水平呈逐渐上升趋势, 提示患者体内 DNA 氧化损伤水平逐渐升高, 一方面证实了氧化应激与结直肠癌的发生发展之间存在联系, 另一方面也提示尿液 8-OHdG 水平可用于判断病情和进行预后的预测。

综上所述, 结直肠癌患者尿液中 8-OHdG 水平显著增高, 且随着癌症病情的进展而升高, 提示尿液 8-OHdG 可作为一项新的筛查结直肠癌和监测结直肠癌病情进展的生物学指标。但是, 由于本试验入选标准比较严苛, 最终入选的受试者数量较少, 可能导致最终结果的不够稳定。因此, 尿液 8-OHdG 筛查结直肠癌的效能还需要进一步扩大样本量来研究证实。

参考文献

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [J]. Int J Cancer, 2010, 136(5): 359-386.
- [2] Klaunig JE, Kamendulis LM, Hoocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis [J]. Toxicol Pathol, 2010, 38(1): 96-109.

(下转第 653 页)

别管腔狭窄程度,从而提高冠心病的诊断率。

综上所述,64 层 DSCT 冠脉成像可有效评估冠心病患者的冠脉斑块性质及管腔狭窄程度,且操作简单、微创。

参考文献

- [1] Angiolillo DJ, Franchi F, Waksman R, et al. Effects of ticagrelor versus clopidogrel in troponin-negative patients with low-risk ACS undergoing ad hoc PCI [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 67 (6): 603 - 613.
- [2] Amsterdam EA, Wenger NK, Brindis RG, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes; a report of the American college of Cardiology/American heart association task force on practice guidelines [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 64(24): e139 - e228.
- [3] 江立生, 邵琴, 卜军, 等. 冠状动脉造影检查疑似冠心病患者 6040 例合并传统心血管病危险因素的临床分析 [J]. *中国介入心脏病学杂志*, 2016, 24(9): 497 - 501.
- [4] 李红. 双源螺旋 CT 诊断冠脉易损斑块的应用价值 [J]. *中国 CT 和 MRI 杂志*, 2016, 14(1): 42 - 45.
- [5] Puchner SB, Liu T, Mayrhofer T, et al. High-risk plaque detected on coronary CT angiography predicts acute coronary syndromes independent of significant stenosis in acute chest pain: results from the ROMICAT- II trial [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 64(7): 684 - 692.
- [6] 刘震, 韩金花, 张佩娟, 等. 64 层螺旋 CT 对急性冠脉综合征患者斑块成分的临床研究 [J]. *中国 CT 和 MRI 杂志*, 2017, 15(10): 84 - 87.
- [7] 杨金霞. 冠脉 CTA 对冠状动脉斑块性质的评估价值及其与血小

板功能、血清生化指标的相关性 [J]. *海南医学院学报*, 2017, 23(1): 26 - 29, 33.

- [8] Vergallo R, Ren XF, Yonetsu T, et al. Pancoronary plaque vulnerability in patients with acute coronary syndrome and ruptured culprit plaque: a 3-vessel optical coherence tomography study [J]. *Am Heart J*, 2014, 167(1): 59 - 67.
- [9] Aldous S, Elliott J, McClean D, et al. Outcomes in patients presenting with symptoms suggestive of acute coronary syndrome with elevated cardiac troponin but non-obstructive coronary disease on angiography [J]. *Heart Lung Circ*, 2015, 24(9): 869 - 878.
- [10] 杨琳. FFR 联合 CAG 对冠心病患者 PCI 术后主要不良心脏事件发生的评估 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2016, 8(12): 1511.
- [11] 刘师节, 杨莉, 何燕, 等. 老年冠心病患者冠脉病变和血浆同型半胱氨酸水平的关系 [J]. *昆明医科大学学报*, 2015, 36(10): 28 - 31.
- [12] 倪健坤, 徐东风, 戴鸿志, 等. DSCT 用于冠状动脉狭窄与斑块定量的临床价值 [J]. *现代医学*, 2016, 44(7): 936 - 939.
- [13] 何燕, 杨莉, 杨文慧, 等. 64 层双源螺旋 CT 结合血清学标志物评价老年 2 型糖尿病合并冠心病患者冠脉斑块的稳定性 [J]. *昆明医科大学学报*, 2014, 35(6): 76 - 80.
- [14] 吴启源, 袁明远, 许建荣, 等. 双源 CTA 对冠状动脉临界狭窄病变斑块判断的价值 [J]. *中国医学计算机成像杂志*, 2017, 23(3): 217 - 221.
- [15] 张锋. 冠心病患者双侧颈总动脉中内膜厚度及斑块与冠状动脉病变的关系 [J]. *中国医师杂志*, 2016, 18(2): 288 - 289.
- [16] 冯长超, 付敏. CT 血管造影术在评估冠脉狭窄程度及其与斑块钙化程度关系中的应用 [J]. *中国临床研究*, 2018, 31(10): 1347 - 1350.

收稿日期: 2018 - 11 - 15 修回日期: 2018 - 12 - 20 编辑: 王宇

(上接第 649 页)

- [3] European Standards Committee on Urinary (DNA) Lesion Analysis, Evans MD, Olinski R, et al. Toward consensus in the analysis of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a noninvasive biomarker of oxidative stress [J]. *FASEB J*, 2010, 24(4): 1249 - 1260.
- [4] Dziaman T, Banaszekiewicz Z, Roszkowski K, et al. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine and uric acid as efficient predictors of survival in colon cancer patients [J]. *Int J Cancer*, 2014, 134(2): 376 - 383.
- [5] Shen J, Deininger P, Hunt JD, et al. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) as a potential survival biomarker in patients with non-small-cell lung cancer [J]. *Cancer*, 2007, 109(3): 574 - 580.
- [6] Kuo HW, Chou SY, Hu TW, et al. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and genetic polymorphisms in breast cancer patients [J]. *Mutat Res*, 2007, 631(1): 62 - 68.
- [7] Pylväs M, Puistola U, Kauppila S, et al. Oxidative stress-induced antioxidant enzyme expression is an early phenomenon in ovarian carcinogenesis [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(9): 1661 - 1667.
- [8] Kubo N, Morita M, Nakashima Y, et al. Oxidative DNA damage in human esophageal cancer: clinicopathological analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine and its repair enzyme [J]. *Dis Esophagus*, 2014, 27(3): 285-293.
- [9] Mohamadkhani A, Pourshams A, Viti J, et al. Pancreatic cancer is associated with peripheral leukocyte oxidative DNA damage [J]. *Asian*

Pac J Cancer Prev, 2017, 18(5): 1349 - 1355.

- [10] Di Minno A, Turmu L, Porro B, et al. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis of the literature [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 24(10): 548 - 555.
- [11] Al-Aubaidy HA, Jelinek HF. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus [J]. *Eur J Endocrinol*, 2011, 164(6): 899.
- [12] 高宇, 王平, 田崇彬, 等. 放射工作人员血清中 8-羟基脱氧鸟苷水平研究 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2018, 38(4): 253 - 257.
- [13] Lin TJ, Guo YL, Hsu JC, et al. 2-Naphthol levels and allergic disorders in children [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2018, 15(7): 1449.
- [14] Gan HJ, Xu H. A novel aptamer-based online magnetic solid phase extraction method for the selective determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine [J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1008: 48 - 56.
- [15] Rossner P Jr, Mistry V, Singh R, et al. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine values determined by a modified ELISA improves agreement with HPLC-MS/MS [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 440(4): 725 - 730.

收稿日期: 2018 - 11 - 18 修回日期: 2018 - 12 - 20 编辑: 王国品