研究报告

大鼠尿中酶类参考值检测

苗玉发,周晓冰,霍　艳,汪巨峰,李　波

(中国食品药品检定研究院,北京　100176)

【摘要】 **目的**　调查正常大鼠尿液样本中酶类参考值范围。**方法**　采集 95 只正常 SD 大鼠的 4 h 尿液,用生化仪检测尿液中的 N-乙酰基-β-D 氨基葡萄糖酶(NAG)、碱性磷酸酶(ALP)、谷氨酰氨基转移酶(γ-GT)和乳酸脱氢酶(LDH)的值,参考范围以 95% 百分位上界表示。**结果**　参考值范围为,雌性:NAG < 5.3 U/L, ALP < 110.8 U/L, γ-GT < 753.0 U/L, LDH < 32.6 U/L;雄性:NAG < 27.3 U/L, ALP < 329.0 U/L, γ-GT < 769.8 U/L, LDH < 40.0 U/L。以/g Cre 为单位的参考值范围,雌性:NAG < 28.9 U/g, ALP < 723.5 U/g, γ-GT < 1763.2 U/g, LDH < 113.1 U/g;雄性:NAG < 84.3 U/g, ALP < 680.2 U/g, γ-GT < 2522.3 U/g, LDH < 121.8 U/g。**结论**　尿中酶类参考值范围为药物肾毒性评价提供了背景数据。

【关键词】 尿酶; 大鼠; 参考范围
【中图分类号】R33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2012)08-0026-03
doi: 10.3969.j.issn.1671.7856.2012.008.006

Investigation of Reference Ranges of Urinary Enzymes in Rats

MIAO Yu-fa, ZHOU Xiao-bing, HUO Yan, WANG Ju-feng, LI Bo
(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China)

【**Abstract**】 **Objective**　To investigate the reference range of enzymes in urine samples of normal rats. **Methods**　Four-hour urine samples were collected from 95 normal rats. Urinary enzymes including NAG, ALP, γ-GT, LDH were analyzed using a biochemical analyzer. Reference ranges were shown with upper 95th percentile. **Results**　The reference ranges for female rats: NAG < 5.3 U/L, ALP < 110.8 U/L, γ-GT < 753.0 U/L, LDH < 32.6 U/L; for male: NAG < 27.3 U/L, ALP < 329.0 U/L, γ-GT < 769.8 U/L, LDH < 40.0 U/L. Reference ranges using the unit/g·Cre for female: NAG < 28.9 U/g, ALP < 723.5 U/g, γ-GT < 1763.2 U/g, LDH < 113.1 U/g; for male rats: NAG < 84.3 U/g, ALP < 680.2 U/g, γ-GT < 2522.3 U/g, LDH < 121.8 U/g. **Conclusion**　The reference ranges of urinary enzymes may provide background values for renal toxicity evaluation in the future.

【**Key words**】 Urinary enzymes; Rat; Reference range

目前大鼠尿液中的酶类已发现有 40 多种,其来源主要有 3 个途径:血浆的尿酶有碱性磷酸酶(ALP)和乳酸脱氢酶(LDH)等;肾小管上皮细胞分泌的酶有谷氨酰氨基转移酶(γ-GT)和丙氨酸氨基肽酶(AAP)等;溶酶体的酶有 N-乙酰基-β-D 氨基葡萄糖酶(NAG),溶菌酶(Lys)和 β-半乳糖苷酶(GAL)等。这些酶类作为肾脏损伤的生物标志物,在人体临床诊断中应用广泛。然而,在临床前药物安全性评价中,肾毒性评价常用的指标为血肌酐、血尿素氮、血尿酸、尿干化学和尿中有形成份等,很

[基金项目]国家"重大新药创制"科技重大专项(2012ZX09302001)。
[作者简介]苗玉发(1980 -),男,助理研究员,硕士,主要从事食品药品安全性研究,E-mail: miaoyufa@ nifdc.org.cn。
[通讯作者]李波,研究员,主要从事食品药品检定. Email: libo@ nifdc.org.cn。

少有关于尿中酶类标志物的测定和评价的报道。随着非临床肾毒性研究的深入,尿酶生物标志物必将纳入评价的指标。本文主要调查大鼠尿中几种常用酶类的参考范围,为将来的非临床肾毒性评价提供背景数据。

1 材料和方法

1.1 材料

5~7 周龄的 SD 大鼠,雌性 47 只,雄性 48 只,来自毒理学实验中对照组动物,购自中国食品药品检定研究院动物实验中心,合格证号:SCXK(京)2009-0017。尿液为 4 h 内新鲜尿液,用自制大鼠代谢笼收集。

1.2 仪器和方法

仪器为 Hitachi 7060,试剂及校准品均购自和光纯药株式会社。高、低值质控品,BioRad,批号:45611 和 45612。肌酐(Cre)测定方法为酶法,NAG、ALP、LDH、γ-GT 为 Wako L-type 速率法 (37℃)。

1.3 统计学方法

用 Kolmogorov-Smirnov 检验数据的正态性。当数据分布呈正态时,计算均值及标准差,参考范围以单侧 95% 可信区间表示。当数据分布不呈正态时,描述四分位数(P25,P50 和 P75),参考范围以第 95 百分位数(P95)作为上限。

2 结果

各酶指标的测定结果见表 1。正常大鼠尿中酶类参考值范围为,雌性:NAG < 5.3 U/L, ALP < 110.8 U/L, γ-GT < 753.0 U/L, LDH < 32.6 U/L;雄性:NAG < 27.3 U/L, ALP < 329.0 U/L, γ-GT < 769.8 U/L, LDH < 40.0 U/L。以/g Cre 为单位的参考值范围,雌性:NAG < 28.9 U/g, ALP < 723.5 U/g, γ-GT < 1763.2 U/g, LDH < 113.1 U/g;雄性:NAG < 84.3 U/g, ALP < 680.2 U/g, γ-GT < 2522.3 U/g, LDH < 121.8 U/g。

3 讨论

尿酶的种类较多,主要来源于肾脏,极少数来自血液,大多数分子量 > 70 kDa。当肾脏损伤时,细胞中的酶类释放增加,尿中酶活性升高,因此尿酶可以作为提示肾细胞损伤的生物标志物。NAG 是一种溶酶体酶,分子量约 130~140 kDa,广泛分布于人体各组织,以前列腺和近端肾小管中含量最多。正常尿液中排出的 NAG 量相对固定,当肾实质性损伤尤其是近曲小管损伤时,NAG 排出增加,可以作为肾小管损伤评价的灵敏标志物[1]。

γ-GT 是广泛分布于人体各组织细胞膜中的一种酶,分子量 90~120 kDa,以肾脏中分布最多。肾组织中又以近端肾小管和 Henle 袢的刷状缘中含量最多。肾脏损伤后,尿中 γ-GT 升高明显,因此 γ-GT 可作为泌尿系统损伤的诊断标准。在一篇临床研究报道中,婴幼儿感染巨细胞病毒后,活动性感染组患儿尿中 γ-GT 和 NAG 水平显著性升高,提示感染患儿的肾小管已经受损,为早期发现肾小管损伤和及时治疗提供了依据[2]。

表 1 正常大鼠尿中酶类的测定结果

Tab. 1 Measurements of urinary enzymes in the normal rats

		N-乙酰基-β-D 氨基葡萄糖酶 NAG (U/L)	N-乙酰基-β-D 氨基葡萄糖酶/肌酐 NAG/Cre (U/g)	碱性磷酸酶 ALP (U/L)	碱性磷酸酶/肌酐 ALP/Cre (U/g)	谷氨酰氨基转移酶 γ-GT (U/L)	谷氨酰氨基转移酶/肌酐 γ-GT/Cre (U/g)	乳酸脱氢酶 LDH (U/L)	乳酸脱氢酶/肌酐 LDH/Cre (U/g)	肌酐 Cre (g/L)
Kolmogorov-Smirnov 检验 P 值(双尾)	F	0.000	0.000	0.004	0.012	0.009	0.041	0.037	0.014	0.009
	M	0.000	0.000	0.000	0.000	0.046	0.013	0.028	0.000	0.037
数据分布	F	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
	M	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
P25	F	1.0	4.3	12.0	59.6	68.1	452.1	5.8	30.4	0.13
	M	1.3	6.1	22.0	64.9	119.2	480.0	7.5	29.1	0.14
P50	F	2.0	8.2	22.5	86.5	136.6	700.8	9.0	40.5	0.23
	M	2.0	11.2	39.0	124.5	255.1	722.6	13.0	35.9	0.39
P75	F	3.0	15.4	57.0	159.0	429.4	1084.1	18.3	51.6	0.43
	M	5.8	19.1	69.5	244.7	416.3	1234.2	21.0	60.9	0.64

注:NN 表示非正态分布

Note: NN represents non-normal distribution

正常动物尿液中 ALP 主要来源于肾小管上皮细胞,当肾小管滤过功能障碍和肾小管上皮细胞损伤时,尿 ALP 升高。此标志物可以作为肾毒性损伤的早期诊断指标。但是 ALP 特异性较低,只能作为近端肾小管损害的补充标志物。LDH 广泛存在于各种器官、组织细胞和体液中。在肾脏中,LDH 主要存在于肾小管上皮细胞。肾脏急性损伤时,肾小管上皮细胞受损,细胞内的 LDH 释放到肾小管腔中,使尿中 LDH 酶活性升高,可以作为肾实质性病变的重要标志物。

在实际应用中,尿酶常和微量白蛋白联合用于肾毒性评价。微量白蛋白分子量较小,当肾小球受到损伤时,可通过肾小球渗透到肾小管中,而肾小管对微量白蛋白几乎无重吸收作用,导致尿液中的微量白蛋白升高,此指标是评价肾小球功能的敏感指标。测定人尿中微量白蛋白有多种方法,比如散射比浊法、透射比浊法、胶体金法、放射免疫法和化学发光免疫法等,然而目前商业化的产品只有酶联免疫吸附(ELISA)一种方法可用于大鼠尿中微量白蛋白的测定[3]。相比于自动生化分析仪采用的比浊法,ELISA 方法具有操作繁琐、耗时、成本高等特点,因此,本研究中未对大鼠尿液中的微量白蛋白背景值进行测定,有待于在以后肾毒性评价时用 ELISA 方法进行检测。

通过分析发现尿酶数据呈非正态分布,数据离散度较大,特别是 ALP 和 γ-GT,即使经 Cre 校正后,其离散度仍然较大,这很可能是个体间差异引起的。尿酶活性的增加,提示肾脏的细胞损伤,这种损伤可能是一过性的、可逆性的,未必造成严重的肾损伤。因此,在肾毒性评价中,要结合尿酶的动态监测数据来综合判断。尽管如此,本研究中获得的尿酶参考范围为将来在大鼠中评价肾脏毒性提供了重要的背景数据。

参考文献:

[1] 吕春,陈江林,聂宇波. 尿蛋白联合尿酶、血磷辅助检查检测对早期肾损伤的临床应用[J]. 赣南医学院学报, 2008, 28(6):820-821.

[2] 郑晓群,乔增培,余坚, 等. 巨细胞病毒感染患儿尿微量蛋白及尿酶检测的意义[J]. 临床检验杂志,2010, 28(4): 289-290.

[3] Liu R, Li G, Cui XF, et al.. Methodological evaluation and comparison of five urinary albumin measurements[J]. J Clin Lab Anal, 2011, 25(5):324-325.

〔修回日期〕2012-05-08

(上接第 5 页)

[7] Pomerantz SH, Ances IG. Tyrosinase activity in human skin, Influence of race and age in newborns[J]. J Clin Invest, 1975, 55: 1127-1131.

[8] Iwata M, Corn T, Iwata S, et al. The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins[J]. J Invest Dermatol, 1990, 95 (1): 9-15.

[9] Aigner B, Besenfelder U, Müller M, et al. Tyrosinase gene variants in different rabbit strains[J]. Mammalian Genome. 2000, 11: 700-702.

[10] The International Albinism Center Web site: http://albinism.reed.uinn.edu 2012/3/25.

[11] Chini V, Foka A, Dimitracopoulus G, et al. Absolute and relative real-time PCR in the quantification of tst gene expression among methicillin-resistant Staphylococcus aureus: evaluation by two mathematical models[J]. Lett Appl Microbiol, 2007, 45(5): 479-484.

[12] Forshew T, Khaliq S, Tee L, et al. Identification of novel TYR and TYRP1 mutations in oculocutaneous albinism[J]. Clin Genet, 2005, 68(2): 182-184.

〔修回日期〕2012-05-31