

# Graves 眼病活动期患者糖皮质激素治疗前后血清 8-羟基脱氧鸟嘌呤水平临床对照研究

叶小珍 刘隽 王扬天 张敏娟 王坚

**【提要】** 探讨氧化应激 DNA 损伤水平在活动性 Graves 眼病(Graves' ophthalmopathy, GO)患者经糖皮质激素治疗后的变化情况。与对照组和 Graves 病(GD)组相比,GO 组的血清 8-羟基脱氧鸟嘌呤(8-hydroxy-deoxyguanosine, 8-OHdG)显著增高( $P < 0.05$ );GO 患者经糖皮质激素治疗后血清 8-OHdG 水平及临床疾病活动分数(clinical activity score)较治疗前显著降低( $P < 0.05$ );治疗后的血清 8-OHdG 水平低于 GD 组( $P < 0.05$ )。氧化应激参与 GO 的发病,GO 患者的血清 8-OHdG 水平经糖皮质激素治疗后明显下降,可作为判断 GO 治疗效果的良好指标。

**【关键词】** 氧化应激;氧化应激 DNA 损伤;血清 8-OHdG 水平;格雷夫斯眼病;糖皮质激素

**Change in serum level of 8-hydroxy-deoxyguanosine during corticosteroid treatment in patients with active Graves' ophthalmopathy** Ye Xiaozhen, Liu Jun, Wang Yangtian, Zhang Minjuan, Wang Jian. Department of Endocrinology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing 210002, China

Corresponding author: Wang Jian, Email: wangjndcrn@aliyun.com

**【Summary】** The change in serum level of 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG), an oxidative stress biomarker, in patients with active Graves' ophthalmopathy (GO) during corticosteroid treatment was observed. The serum level of 8-OHdG was significantly increased in patients with active GO as compared with that of normal controls and patients with Graves' disease ( $P < 0.05$ ). After systemic corticosteroid treatment, patients with GO showed significantly lowered 8-OHdG level as compared with that before treatment and patients with Graves' disease. These changes in serum 8-OHdG level were accompanied by decreases in clinical activity score ( $P < 0.05$ ) during corticosteroid treatment. Oxidative stress may play a role in the pathogenesis of GO. Serum 8-OHdG level may be used as an objective and quantitative parameter in patients with GO during immunosuppressive treatment.

**【Key words】** Oxidative stress; Oxidative DNA damage; 8-hydroxy-deoxyguanosine; Graves' ophthalmopathy; Corticosteroid

(Chin J Endocrinol Metab, 2014, 30; 218-220)

Graves 眼病(GO)是常见的眼眶疾病之一,居成人眼眶疾病发病之首。作为 Graves 甲状腺功能亢进(甲亢)最常见的甲状腺外组织的临床表现,目前被普遍认为是在免疫为背景的炎症性疾病<sup>[1,2]</sup>。有关 GO 发病机制的研究很多,但一直都有争议。最近的研究显示活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)代谢参与许多免疫性疾病包括 Graves 甲亢的发病机制<sup>[3,4]</sup>。越来越多的证据显示甲亢患者的基础代谢亢进,伴随 GO 免疫反应的发展,主要与 ROS 所诱导的氧化应激和抗氧化状态失衡有关<sup>[3,9]</sup>。Graves 甲亢患者以甲状腺激素明显增高为特征,可提高基础代谢率,通过诱导线粒体酶促进细胞氧化代谢,生成过量的 ROS,引起体内抗氧化系统的改变,从而加剧氧化应激反应<sup>[5,6]</sup>。甲亢或不伴浸润性突眼患者体内 ROS 和抗氧化酶均明显升高,Bednarek 等<sup>[4]</sup>研究显示无突眼的甲亢患者血 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、丙二酰硫脲反应物、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶等水平均明显升高,且在甲状腺功能恢复正常后可下降至正

常,而伴有突眼的甲亢患者,即使甲状腺功能恢复正常,ROS 和抗氧化酶仍高于正常。这提示不仅甲状腺代谢状态,而且眼眶局部炎症本身亦可影响 ROS 和抗氧化酶的代谢。然而,有关 ROS 在 GO 发病机制中的作用仍不明确。

糖皮质激素仍是 GO 治疗目前最基本最常用的方案,且对 ROS 的生成和 ROS 清除酶亦有明显作用<sup>[10,11]</sup>。8-羟基脱氧鸟嘌呤(8-OHdG)是 DNA 的氧化核苷,是机体 DNA 氧化应激损伤的敏感生物指标。本研究通过检测糖皮质激素治疗活动性 GO 患者前后的血 8-OHdG 水平,初步探讨其是否可作为 GO 治疗效果的判断指标。

### 一、对象和方法

1. 对象:2008 年 10 月至 2011 年 12 月在南京军区南京总医院内分泌科住院确诊为 GO 活动期的患者 46 例,其中男性 21 例,女性 25 例,所有入选患者的甲状腺功能均恢复正常至少 6 个月。同时收集 30 例初发的单纯 Graves 病而无眼征的患者和 68 名健康体检者作为对照。GO 患者的临床疾病活动分数(CAS)根据王坚等<sup>[12]</sup>修订的 GO 临床积分指数系统进行评定,所有入选患者的 CAS $\geq 4$ 。GO 的确诊依据眼病临床表现及影像学检查发现眼外肌增粗肥大、眶软组织水肿者,并经过相关

检查排除其他内分泌疾病或其他眼病、自身免疫性疾病、感染性疾病及恶性肿瘤。所有患者均无吸烟史,未进行系统的免疫抑制或抗氧化剂治疗。所有患者先用糖皮质激素甲泼尼龙 120 mg 静脉冲击治疗 1 周,再改为强的松口服(40 mg/d×4 周,20 mg/d×4 周,10 mg/d×4 周),疗程 17 周。

2. 方法:入选患者在空腹 12 h 后晨起抽取肘部静脉血,分离单个核细胞,提取 DNA 测定血 8-OHdG 水平,具体方法:(1)检测前准备工作:①DNA 的提取;②DNA 浓度的计算和纯化:DNA 在 TE 中溶解至 20~50 μg/ml,分别于 230、260、280 和 320 nm 检测吸光度,计算 DNA 的浓度(1.0 在波长为 260 nm 对应于 50 μg/ml DNA);DNA 的浓度(μg/ml)=(260 nm 的吸光度)×(50 μg/ml)×溶解度检测 DNA 的纯度;计算(260 nm 的吸光度):(280 nm 的吸光度)的比值,正常在 1.8~1.85 之间;(260 nm 的吸光度):(230 nm 的吸光度)的比值,正常在 2.2~2.25 之间;③DNA 的酶消化:溶解 200 μg DNA 至 135 μl 水中,加入 15 μl 乙酸钠(200 mmol/L, pH 4.8)、6 U 的核酸酶 P1(15 μl, 1 mg/ml)至 DNA 溶解液中,37℃ 下孵育 30 min(氩气环境下),加入 1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(15 μl, pH 7.4)及 2 U 碱性磷酸酶(7 μl, 200 U/0.7 ml, pH 7.4),37℃ 下孵育 30 min(氩气环境下),为去除酶及其它大分子,水解产物过纯化柱(Millipore Microcon YM-10, catalog#42407),14 000 转/min 离心 10 min,收集离心的液体,取 50 μl DNA 消化产物用于 ELISA 试剂盒检测。(2)ELISA 试剂盒检测(IMKOGNW 050915E, Catalog No. KOG200S/E)。所有步骤均严格按照试剂盒说明书操作。

3. 统计学处理:应用 SPSS 13.0 统计学软件,对计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,并进行正态性检验及方差齐性检验,病程用中位数表示。两组间比较采用两独立样本 *t* 检验;组间比较用单因素方差分析;GO 患者治疗前后两组间的比较采用配对 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 二、结果

1. GO 组的年龄、性别与对照组相比无明显差异( $P > 0.05$ )。

2. 与健康对照组和 GD 组相比,GO 组的血清 8-OHdG 水平明显增高( $P < 0.05$ ,表 1);GO 患者经糖皮质激素治疗后血清

表 1 GO 组与对照组的各项指标比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 例数 | 年龄(岁)         | 病程(月)       | 8-OHdG (ng/ml)            | CAS (分)     |
|------|----|---------------|-------------|---------------------------|-------------|
| 对照组  | 68 | 34.12 ± 12.65 | -           | 0.89 ± 0.76               | -           |
| GD 组 | 30 | 34.50 ± 13.45 | 16.21(1-20) | 2.07 ± 1.30 <sup>a</sup>  | -           |
| GO 组 | 46 | 31.24 ± 11.86 | 14.29(1-30) | 3.75 ± 1.32 <sup>ab</sup> | 5.68 ± 2.15 |

注:8-OHdG:8-羟基脱氧鸟嘌呤;CAS:眼病活动分数;GO:甲状腺相关性眼病;与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 GD 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

表 2 活动性 GO 患者糖皮质激素治疗前后血清 8-OHdG 水平的比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 例数 | 8-OHdG (ng/ml)           | CAS (分)                  |
|-----|----|--------------------------|--------------------------|
| 治疗前 | 46 | 3.75 ± 1.32              | 5.68 ± 2.15              |
| 治疗后 | 46 | 0.95 ± 0.76 <sup>a</sup> | 1.84 ± 1.12 <sup>a</sup> |

注:略语同表 1;与治疗前比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$

8-OHdG 水平及临床活动分值较治疗前显著降低( $P < 0.05$ )。治疗后的血清 8-OHdG 水平低于 GD 组( $P < 0.05$ ,表 2)。

## 三、讨论

氧化应激与许多炎症性疾病直接相关<sup>[13]</sup>。研究显示局部炎症部位可同时产生氧化应激反应,局部炎症性过程直接影响周围的氧化应激反应<sup>[13,14]</sup>。当 ROS 的产生超过细胞清除 ROS 和修复细胞损伤的能力时,产生氧化应激反应,最终引起大分子物质包括 DNA、脂肪和蛋白的广泛氧化损伤。8-OHdG 是 DNA 的氧化核苷,只能通过 DNA 氧化损伤途径产生,是 DNA 中鸟嘌呤氧化损伤的特异产物,是公认的内源性及外源性因素对 DNA 氧化损伤的敏感生物标志物,在许多眼部疾病如视网膜静脉周围炎<sup>[15]</sup>、原发性开角型青光眼<sup>[16]</sup>等患者均明显增加。

GO 是以免疫反应为背景的炎症性疾病<sup>[1,2]</sup>。有关 GO 发病机制的研究很多,但尚不明确,目前普遍认为是内源性因素与外界环境因素相互作用的结果。近年来,越来越多的证据显示氧化应激 ROS 参与 GO 的发病<sup>[17,18]</sup>。体外研究显示细胞因子白细胞介素-1β 参与 GO 的自身免疫反应,促进成纤维细胞生长因子(OF)分泌 ROS 增加,且超氧化物歧化酶和过氧化氢酶可部分阻滞其所致的氨基葡聚糖蓄积<sup>[19]</sup>。此外,超氧负离子可刺激 GO 患者 OF 的分化增殖,该反应可被尼克酰胺抑制<sup>[20,21]</sup>。浸润性 GO 患者的 ROS 代谢指标明显增高<sup>[22]</sup>。本组先前的研究显示 GO 患者的血清 8-OHdG 水平明显高于 Graves 甲亢组<sup>[23]</sup>,因此为了排除甲状腺激素异常对氧化应激的影响,只有甲状腺功能已恢复正常至少 6 个月的 GO 患者被纳入该研究。结果显示活动性 GO 患者的血 8-OHdG 水平明显高于对照组和 GD 组,这提示氧化应激 DNA 损伤可能是 GO 炎症反应的一个致病因子。因此,有学者认为 GO 患者眼眶局部自身免疫炎症性反应的发展可使 ROS 水平发生变化,随之促进 ROS 介导的氧化应激反应的发生,从而又加剧 GO 的发展<sup>[17]</sup>。

Bednarek 等<sup>[22]</sup> 研究报道浸润性 GO 患者的外周血 ROS 明显升高,糖皮质激素治疗后续用抗氧化剂治疗可使其 ROS 代谢的各项指标恢复正常。Tsai 等<sup>[24,25]</sup> 研究显示 GO 患者尿 8-OHdG 水平明显增高,是正常对照组的 1.9 倍,CAS>3 的活动性 GO 患者则增高 2.4 倍,8-OHdG 水平与 GO 病情的严重程度和活跃度 CAS 呈正相关。而经过糖皮质激素治疗后,尿 8-OHdG 水平与治疗前相比明显下降,但略高于治疗中的水平。这提示在激素治疗结束后 GO 患者存在 ROS 水平升高与抗氧化能力下降的不平衡。口服抗氧化剂可使轻中度的 GO 患者获得良好效果<sup>[26]</sup>。本研究显示与他们类似的结果,经过糖皮质激素治疗后 GO 患者的氧化应激 DNA 损伤明显减少,且临床活动分值较治疗前亦显著降低。这提示血清 8-OHdG 水平可作为判断 GO 治疗效果的良好指标。

## 参 考 文 献

- [1] Kazim M, Goldberg RA, Smith TJ. Insights into the pathogenesis of thyroid associated orbitopathy: evolving rationale for therapy[J]. Arch Ophthalmol, 2002, 120:380-386.
- [2] Prabhakar BS, Bahn RS, Smith TJ. Current perspective on the pathogenesis of Graves' disease and ophthalmopathy[J]. Endocr Rev, 2003, 24:802-835.

- [3] Ademoglu E, Ozbey N, Erbil Y. Determination of oxidative stress in thyroid tissue and plasma of patients with Graves' disease [J]. *Eur J Intern Med*, 2006,7:545-550.
- [4] Bednarek J, Wysocki H, Sowinski J. Oxidative stress peripheral parameters in Graves' disease; the effect of methimazole treatment in patients with and without infiltrative ophthalmopathy [J]. *Clin Biochem*, 2005,38:13-18.
- [5] Mano T, Sinohara R, Sawai Y, et al. Effects of thyroid hormone on coenzyme Q and other free radical scavengers in rat heart muscle[J]. *J Endocrinol*, 1995,145:131-136.
- [6] Asayama K, Kato K. Oxidative muscular injury and its relevance to hyperthyroidism[J]. *Free Radic Biol Med*, 1990,8:293-303.
- [7] Videla LA, Sir T, Wolff C. Increased lipid peroxidation in hyperthyroid patients: suppression by propylthiouracil treatment[J]. *Free Radic Res Commun*, 1988,5:1-10.
- [8] Venditti P, Balestrini M, Di Meo S, et al. Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defenses, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues[J]. *J Endocrinol*, 1997,155:151-157.
- [9] Abalovich M, Llesuy S, Gutierrez S, et al. Peripheral parameters of oxidative stress in Graves' disease; the effects of methimazole and 131 iodine treatments[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003,59:321-327.
- [10] Whitehouse MW, Cleland LG. Reactive oxygen species and drug therapy for inflammatory diseases [J]. *Agents Actions Suppl*, 1985, 17:177-188.
- [11] Youssef AA, Baron DN. Leucocyte superoxide dismutase in rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 1983,42:558-562.
- [12] 王坚, 王扬天, 邵加庆, 等. Graves 眼病部分免疫抑制剂疗效探讨 [J]. *中华内科杂志*, 2004,43:125-127.
- [13] Koltuksuz U, Uz E, Ozen S, et al. Plasma superoxide dismutase activity and malondialdehyde level correlate with the extent of acute appendicitis [J]. *Pediatr Surg Int*, 2000,16:559-561.
- [14] Oldenburg B, van Kats-Renaud H, Koningsberger JC, et al. Chemiluminescence in inflammatory bowel disease patients; a parameter of inflammatory activity[J]. *Clin Chim Acta*, 2001,310:151-156.
- [15] Rajesh M, Ramesh A, Ravi PE, et al. Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine and its relationship with antioxidant parameters in patients with Eales' disease; implications for antioxidant therapy [J]. *Curr Eye Res*, 2003,27:103-110.
- [16] Zanon-Moreno V, Marco-Ventura P, Lleo-Perez A, et al. Oxidative stress in primary open-angle glaucoma[J]. *J Glaucoma*, 2008,17:263-268.
- [17] Kaur A, Pandey S, Kumar S, et al. Oxidative stress profile in Graves' ophthalmopathy in indian patients[J]. *Orbit*, 2010,29:97-101.
- [18] Bednarek J, Wysocki H, Sowinski J. Oxidative stress peripheral parameters in Graves' disease; the effect of methimazole treatment in patients with and without infiltrative ophthalmopathy [J]. *Clin Biochem*, 2005,38:13-18.
- [19] Lu R, Wang P, Wartofsky L, et al. Oxygen free radicals in interleukin-1-induced glycosaminoglycan production by retro-ocular fibroblasts from normal subjects and Graves' ophthalmopathy patients [J]. *Thyroid*, 1999,9:297-303.
- [20] Burch HB, Lahiri S, Bahn RS, Barnes S. Superoxide radical production stimulates retroocular fibroblast proliferation in Graves' ophthalmopathy[J]. *Exp Eye Res*, 1997,65:311-316.
- [21] Hiromatsu Y, Yang D, Miyake I, et al. Nicotinamide decreases cytokine-induced activation of orbital fibroblasts from patients with thyroid-associated ophthalmopathy [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998,83:121-124.
- [22] Bednarek J, Wysocki H, Sowinski J. Peripheral parameters of oxidative stress in patients with infiltrative Graves' ophthalmopathy treated with corticosteroids[J]. *Immunol Lett*, 2004,93:227-232.
- [23] 仇春健, 叶小珍, 王扬天, 等. 血清 8-羟基脱氧鸟嘌呤水平与 Graves 眼病关系的临床研究 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2013, 29:57-58.
- [24] Tsai CC, Cheng CY, Liu CY, et al. Oxidative stress in patients with Graves' ophthalmopathy: relationship between oxidative DNA damage and clinical evolution[J]. *Eye*, 2009,23:1725-1730.
- [25] Tsai CC, Kao SC, Cheng CY, et al. Oxidative stress change by systemic corticosteroids treatment of patients with active Graves' ophthalmopathy [J]. *Arch Ophthalmol*, 2007,125:1652-1656.
- [26] Bouzas EA, Karadimas P, Mastorakos G, et al. Antioxidant agents in the treatment of Graves' ophthalmopathy[J]. *Am J Ophthalmol*, 2000, 129:618-622.

(收稿日期:2013-06-06)

(本文编辑:陈文辉)