

毛细管区带电泳检测糖尿病肾病变患者 血液内红细胞中的谷胱甘肽

孔 宇¹, 郑 凝², 张智超¹, 高如瑜¹

(1. 南开大学元素有机化学国家重点实验室 元素有机化学研究所, 天津 300071;
2. 天津代谢病医院, 天津 300071)

摘要 采用高效毛细管区带电泳法对糖尿病肾病变患者血液内红细胞中参与氧化应激的氧化型谷胱甘肽(GSSG)和还原型谷胱甘肽(GSH)进行了测定。对影响分离的条件(缓冲液 pH、缓冲液浓度、分离电压和毛细管温度)进行了优化,使用非涂层的毛细管(21 cm×75 μm i. d.)和 20 mmol/L pH 6.86 的磷酸缓冲液,在 25 kV, 30 ℃ 和 200 nm 条件下,可在 3 min 内同时对血红细胞中 GSSG 和 GSH 定量分析。方法具有良好的重现性(迁移时间和峰面积的相对标准偏差均小于 2.0%)、较高的灵敏度(GSH 3.0 μmol/L, GSSG 1.5 μmol/L)和较宽的线性范围(GSH 3.0~750.0 μmol/L, GSSG 1.5~600.0 μmol/L),完全可用于临床上对患者体内氧化应激状况的监测。

关键词 毛细管区带电泳; 谷胱甘肽; 氧化应激; 血红细胞; 糖尿病肾病变

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-8713(2003)02-0135-03

Determination of Glutathione in Red Blood Cells of Diabetic Nephropathy Patient with Capillary Zone Electrophoresis

KONG Yu¹, ZHENG Ning², ZHANG Zhichao¹, GAO Ruyun¹

(1. State Key Laboratory of Elemento-Organic Chemistry, Institute of Elemento-Organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. Tianjin Metabolic Disease Hospital, Tianjin 300071, China)

Abstract: A new capillary zone electrophoretic method for the determination of both the reduced (GSH) and oxidized (GSSG) forms of glutathione was optimized in terms of buffer pH, buffer concentration, separation voltage and capillary temperature. GSH and GSSG, which are related to oxidative stress and several diseases, in red blood cells of diabetic nephropathy (DN) patients could be baseline separated within 3 min using a fused-silica capillary (21 cm×75 μm i. d.) and a 20 mmol/L phosphate buffer (pH 6.86) with a separation voltage of 25 kV at 30 ℃, and a detection wavelength of 200 nm. The red blood cells were obtained by centrifugation of the DN plasma samples at 3 000 r/min for 5 min and deproteinized with trichloroacetic acid. After centrifugation at 10 000 r/min for 10 min, the supernatant fluid was injected into the capillary directly. The method was applied to detect the clinical samples without derivatization. The linear ranges were 3.0–750.0 μmol/L and 1.5–600.0 μmol/L and the limits of detection were 3.0 and 1.5 μmol/L for GSH and GSSG, respectively. The proposed method also has a high reproducibility (RSDs of both migration times and peak areas were lower than 2%) and has been successfully applied to the determination of GSH and GSSG in the clinical samples and monitoring of the status of the oxidized stress in patients' plasma.

Key words: capillary zone electrophoresis; glutathione; oxidative stress; red blood cell; diabetic nephropathy

糖尿病肾病变已成为糖尿病病人死亡的主要因素之一。其主要原因在于血液中的持续高血糖致使体内氧化应激过剩,最终导致对肾脏的损害。谷胱

甘肽参与了体内血液中的氧化应激(氧化型谷胱甘肽(GSSG)和还原型谷胱甘肽(GSH)的比例标志着体内氧化应激的程度)并起着防止血液中含巯基的

蛋白质氧化、维持血红蛋白中铁离子状态等作用。此外,医学临床上还发现,谷胱甘肽与人免疫缺陷性病毒感染、急性呼吸压迫综合征等疾病也密切相关。因此,建立快速、高效地分析临床血液中谷胱甘肽的方法变得十分重要。

用于临床测定血液中谷胱甘肽的经典方法为酶法^[1]。此法虽然对谷胱甘肽的特异性较好,但样品需衍生化,测定步骤较繁琐,耗时长,消耗试剂量大,并且 GSH 的含量不能被直接测定(需从总量中扣除 GSSG 的含量)。高效液相色谱法(HPLC)也被用于测定谷胱甘肽^[2,3],但由于谷胱甘肽自身的紫外吸收很小,一般在低波长(200 nm 以下)下检测才能获得满意的检测限,而 HPLC 使用的有些添加剂在低紫外区有吸收会导致背景变大,使得谷胱甘肽的直接测定变得困难,因此文献多为 HPLC 与电化学检测^[2]或激光诱导荧光检测^[3]联用的报道(样品需要衍生化)。毛细管电泳法(CE)测定血液或体液中谷胱甘肽时也面临着与 HPLC 相同的问题,一般也需要与电化学检测^[4]或激光诱导荧光检测^[5,6]联用(分离时间一般在 20 min 左右)。而这些检测设备相对于广泛应用的紫外(UV)检测器来说,造价昂贵,另外样品的衍生化增加了处理的步骤,延长了分析时间(一般样品衍生化的时间在 10 h 以上^[6])。直接采用 CE-UV 来检测谷胱甘肽的也有报道,Havel 等^[7]采用毛细管胶束电泳(MEKC)模式,使用带有“Z”型增强吸收光路的毛细管柱,采用内标法定量,在 15 min 内实现了 $\mu\text{mol/L}$ 级谷胱甘肽的检测,但文中未报道实际样品的测定情况。

本文采用毛细管区带电泳(CZE)模式,在 pH 6.86 的磷酸盐缓冲体系中,对人血液中红细胞内的 GSH 和 GSSG 进行了毛细管电泳分离研究。在优化的条件下,可在 3 min 内对 GSSG 和 GSH 进行快速的测定。方法快速、高效,重现性和线性好,样品无需衍生化,无需使用内标即可进行定量,已运用于临床上谷胱甘肽的检测。

1 仪器和方法

1.1 仪器和试剂

Beckman MDQ™ 2000 毛细管电泳仪(Beckman, Fullerton, CA, USA),多波长的紫外检测器和 MDQ P/AGE 操作软件(V 2.3);Biofuge Status 超高速离心机(Heraeus, Germany);pH 计(pHs-25 型,上海);GSH 和 GSSG 均为 Sigma 分装试剂;磷酸、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、磷酸钾、氢氧化钠、盐酸和三氯乙酸(TCA)均为分析纯;实验用水为二次重蒸水;所有的溶液以及样品均过 $0.22 \mu\text{m}$ 的水相

膜后再用于电泳分析。

1.2 电泳条件

非涂层石英毛细管总长度 32.1 cm,有效长度为 21 cm,内径 $75 \mu\text{m}$ (河北永年光导纤维厂);电泳缓冲液为 20 mmol/L pH 6.86 的磷酸盐缓冲液;检测波长 200 nm;电压 25 kV;压力进样为 2.1 kPa,4 s;毛细管温度 $30 \text{ }^\circ\text{C}$;每次运行之间用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液冲洗 3 min,再用 0.1 mol/L 盐酸和重蒸水各冲洗 1 min,最后用缓冲液平衡 3 min。

1.3 血样的处理

取新鲜的糖尿病肾病变患者(临床诊断为尿毒症患者)血样(不含抗凝剂),立即在 3000 r/min 下离心 5 min,弃去上清液,沉淀部分即为红细胞(RBC)。将所得 RBC 放置到 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 下,10 min 后取出,升温至室温($25 \text{ }^\circ\text{C}$),此时红细胞被冻融。取冻融液 1 mL,向其中加入 1 g/L TCA 溶液 0.1 mL。再在 10000 r/min 下离心 10 min,上清液直接用于 CE 测定。

2 结果与讨论

2.1 分离条件的优化

2.1.1 pH 对分离的影响

在毛细管区带电泳中影响带电物质分离的关键因素是 pH 值。在对 pH 值进行选择时发现,GSH 和 GSSG 可以在一个比较宽的 pH 范围内得到分离;当 pH 小于 3 时,GSH 和 GSSG 只能部分的分离;pH 4 时,GSH 和 GSSG 能得到分离,但迁移时间过长(此时,两者近似为中性,随电渗流流出,迁移时间大于 10 min);pH 5~12 时,GSH 和 GSSG 均可得到分离,但当 pH 大于 10 时,GSH 和 GSSG 的峰形变差,不利于定量,故不选用;而在 pH 5~10 之间选择时,出于对所选缓冲液在该 pH 时的缓冲能力考虑,选定 pH 值为 6.86。

2.1.2 缓冲液浓度对分离的影响

缓冲液浓度会影响到毛细管电泳内管壁上的双电层的厚度。一般随着缓冲液浓度的增加,双电层的厚度减小,因而电渗流会变小,最终导致分离时间变长,各物质间的分离度变大;但与此同时,电流变强,由此产生的焦耳热也随之变大。因此在选择缓冲液浓度时,应尽可能地选择低浓度。我们在实验中发现,缓冲液浓度为 5~50 mmol/L 时,GSH 和 GSSG 均可达到基线分离。但在较低浓度(10 mmol/L)下,二者的峰形会变宽,再从缓冲能力角度考虑,最终选择 20 mmol/L 为最佳的缓冲液浓度。

2.1.3 温度对分离的影响

在理论上,毛细管温度的增加会导致毛细管内

电泳缓冲液粘度降低,从而使得各物质的迁移时间变短,分离效率变高,但同时会减小物质间的分离度。实验中我们观察了 20~50 ℃ 间 GSH 和 GSSG 迁移时间的变化情况,结果发现两种物质可在很宽的范围得到分离,但当温度大于 30 ℃ 时,GSH 不能与背景的杂质分开,因此选择 30 ℃ 为最佳的分离温度。

2.1.4 电压对分离的影响

电压的增加会缩短分离时间,提高分离效率,但同时会导致电流变大,焦耳热变大,并降低物质间的分离度。因此应在不影响分离度的情况下,尽可能地选择高的分离电压。从实验中我们发现,GSH 和 GSSG 在分离电压为 5~25 kV 时均可得到分离;但当分离电压为 25 kV 时,分析时间最短,峰形较好,并且 GSH 和 GSSG 之间的分离度仍达 1.5,因此选用 25 kV 为最佳的分离电压。

2.2 分离结果

在上述优化的分离条件下,我们在 3 min 内成功地氧化型和还原型的谷胱甘肽进行了分离分析。其标样在优化条件下的 CE 分离结果见图 1。

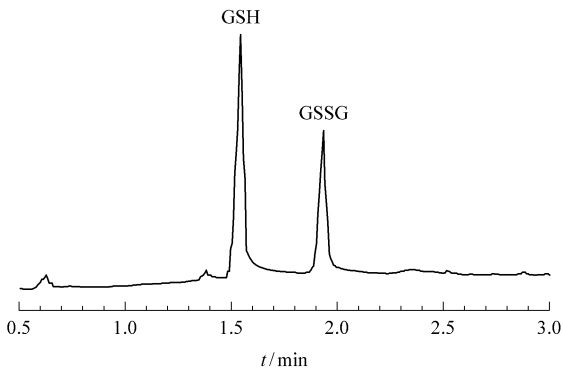


图 1 GSH 和 GSSG 标样的 CE 图

Fig. 1 Electropherogram of GSH and GSSG standards under the optimum conditions

Column: fused silica capillary (21 cm × 75 μm i. d.); separation voltage: 25 kV; capillary temperature: 30 ℃; buffer: pH 6.86, 20 mmol/L phosphate; detection wavelength: 200 nm.

2.3 重现性测定

在相同的电泳条件下,连续 5 次测定了同一样品,对 GSH 和 GSSG 的迁移时间、峰面积和峰高的重现性进行了考察。结果表明,GSH 和 GSSG 的迁移时间变化很小,其相对标准偏差(RSD)分别为 1.3% 和 1.9%;定量时,峰面积的 RSD(GSH: 0.2%, GSSG: 1.2%)略好于峰高的 RSD(GSH: 0.2%, GSSG: 2.2%),故选用峰面积进行定量研究。

2.4 标准曲线、回收率以及最低检测限的测定

配制一系列浓度的标准溶液,以其峰面积对其浓度作回归分析,以信噪比为 3 来测定检测限,向血样中添加已知量的标样,以(测定值 - 本底值)与添

加值的比计算回收率,结果如表 1 所示。

表 1 GSH 和 GSSG 的线性范围、检测限和回收率
Table 1 Linear ranges, detection limits, and recoveries of oxidized and reduced glutathione

Glutathione	Detection limit/ (μmol/L)	Linear range/ (μmol/L)	Recovery/ %	r ²
GSH	3.0	3.0 - 750.0	98	0.998 9
GSSG	1.5	1.5 - 600.0	95	0.999 9

2.5 实际样品的测定

在优化的分析条件下,对糖尿病肾病变患者血样中红细胞内的谷胱甘肽进行了测定,结果如图 2 所示。测定结果(n = 3)为 GSH: 80.8 ± 3.0 μmol/L; GSSG: 3.0 ± 1.0 μmol/L。GSH 与 GSSG 之间的比例(27)小于正常值(约为 54),这正说明了糖尿病肾病变患者体内氧化应激的水平高于正常人,最终导致对肾脏的损害。

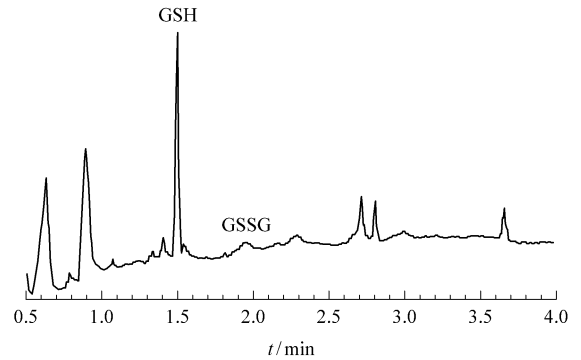


图 2 血红细胞样品的 CE 图

Fig. 2 Electropherogram of RBC under the optimum conditions

For conditions, see Fig. 1.

3 结论

通过对实验条件的优化以及实际样品的测定,我们得到了一个在 3 min 内同时测定病人血液中红细胞内氧化和还原型谷胱甘肽的 CZE 新方法。此方法无需对样品进行衍生化即可进行检测,并具有快速、样品量小、重现性和灵敏度好的特点,完全可运用于临床测定和病理研究。

参考文献:

[1] Tietze F. Anal Biochem, 1969, 27: 502
 [2] Eramo J D, Finkelstein A, Boccazi F, Fridman O. J Chromatogr B, 1998, 720(1): 205
 [3] Ivanov A R, Nazimov I V, Baratova L. J Chromatogr A, 2000, 895(1): 157
 [4] Lin B L, Colon L A, Zare R N. J Chromatogr A, 1994, 680(1): 263
 [5] Ivanov A R, Nazimov I V, Baratova L. J Chromatogr A, 2000, 895(1): 167
 [6] Chassaing C, Gonin J. J Chromatogr B, 1999, 735(1): 219
 [7] Havel K, Pritts K, Wielgos T. J Chromatogr A, 1999, 853(1): 215