

高效毛细管电泳分离氨基酸对肝癌肝硬化的诊断价值

王跃国, 王惠民, 鞠少卿, 王忠慧, 宋红伟, 李 丽

王跃国, 王惠民, 鞠少卿, 王忠慧, 宋红伟, 李丽, 江苏省南通大学附属医院检验医学中心 江苏省南通市 226001
项目负责人: 王跃国, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 江苏省南通大学附属医院检验医学中心, jsq814@hotmail.com
电话: 0513-5052103 传真: 0513-5052102
收稿日期: 2004-11-09 接受日期: 2004-12-08

摘要

目的: 建立高效毛细管电泳分离氨基酸的方法探讨肝癌肝硬化患者血清氨基酸变化。

方法: 用毛细管电泳法对17种常见氨基酸的2, 4-二硝基氟苯(DNFB)衍生物进行了分离研究, 优化缓冲液浓度、pH、有机溶剂及表面活性剂对分离影响的条件, 对正常人, 肝癌及肝硬化患者各20例的血浆游离氨基酸进行测定。

结果: 在优化条件下, 17种氨基酸除亮氨酸, 异亮氨酸外均达到基线分离。9 min内分离18种氨基酸, 线性在20-1 000 $\mu\text{mol/L}$ 范围, 回收率为77.5-113.3%, 批内精密度2.6-11.4%, 批间精密度5.8-19.7%。肝硬化组酪氨酸、丝氨酸、色氨酸明显升高, 丙氨酸明显下降; 肝癌组酪氨酸、半胱氨酸、缬氨酸明显升高, 脯氨酸明显下降。

结论: 以浓度为30 mmol/L pH9.9的硼砂溶液含150 g/L 异丙醇为运行缓冲液, 分离氨基酸DNFB衍生物效果最佳, 分离时间30 min, 出峰17个。毛细管电泳测定血浆游离氨基酸对肝癌肝硬化诊断和治疗有一定指导意义。

王跃国, 王惠民, 鞠少卿, 王忠慧, 宋红伟, 李丽. 高效毛细管电泳分离氨基酸对肝癌肝硬化的诊断价值. 世界华人消化杂志 2005;13(3):406-408
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/406.asp>

0 引言

氨基酸测定对代谢性疾病、肾病、肝病的诊断和治疗具有重要的价值^[1-4], 在评价患者营养状况方面亦受到广泛重视^[5]。毛细管电泳(CE)具有高效、快速、灵敏、低耗等优点, 很快被用于氨基酸的分析^[6-7]。组成人体蛋白质的20种氨基酸多数没有紫外吸收峰, 不产生荧光, 一般需要衍生。我们利用毛细管电泳检测2, 4-二硝基氟苯衍生的氨基酸在360 nm波长处的吸收谱, 探讨了缓冲液浓度、pH、有机溶剂及表面活性剂对其分离的影响。在优化条件下, 17种氨基酸除亮氨酸、异亮氨酸外均达到基线分离。对肝癌肝硬化患者的血浆氨基酸进行检测, 并与正常人比较如下。

1 材料和方法

1.1 材料 高效毛细管电泳仪:P/ACE™ MDQ 配置二极管阵

列(PDA)检测器, 美国Beckman-Coulter公司;pH计: PHS-3TC型, 上海天达仪器有限公司;石英毛细管: 内径75 μm , 总长度60 cm, 有效长度50 cm, 河北永年光导纤维厂生产。氨基酸(甘氨酸和其他19种L-型氨基酸)标准物, Sigma公司生产;甲醇和乙腈(色谱纯)、乙二醇(上海国药集团化学试剂公司);硼砂、氢氧化钠、异丙醇、吐温20、吐温80(上海化学试剂厂);十六烷基三甲基溴化铵(天津化学试剂厂);TritonX-100、NP40(进口Fluka公司);Brij35(进口Koch-Light, 批号:ML0553/01);2, 4-二硝基氟苯(江苏省吴江市青云精细化工厂);未特别注明者均为分析纯。50 mmol/L pH 9.5 硼砂缓冲液;20, 30, 50 mmol/L pH 9.8 硼砂缓冲液, 30 mmol/L pH 9.3-10.1 硼砂缓冲液均自配。原发性肝癌患者20例, 肝硬化患者20例, 均为南通大学附属医院住院确诊患者, 其中男24例, 女16例, 平均年龄50岁。正常对照组20例, 均为献血员, 男11例, 女9例, 平均年龄27岁。取空腹血液2 mL, 离心后取血清0.5 mL, 加乙腈0.5 mL, 混匀, 15 000 r/min离心10 min, 取上清液备用。不能及时分析的样品置-20℃冷冻保存。

1.2 方法 取2 mL的Eppendorf管, 加50 mmol/L pH 9.5 硼砂缓冲液0.5 mL, 乙腈0.5 mL, 氨基酸标准液0.5 mL, DNFB10 μL , 振荡混匀, 置50℃水浴40 min^[8]。运行缓冲液冲洗毛细管, 275.6 kPa恒压2 min;3.45 kPa进样5 s;28 kV恒电压分离;采集360 nm波长下吸收谱图。

2 结果

我们把pH 9.8 硼砂缓冲液配成20, 30, 50 mmol/L三个浓度作为运行缓冲液进行分离。研究表明, 在相同的pH条件下, 从分离和峰形综合考虑, 本实验选择30 mmol/L 硼砂作运行缓冲液。缓冲液pH值是控制物质解离程度进而影响其迁移行为的关键因素之一。在pH 9.3-10.1的范围内详细考察分离度和迁移行为的变化, 发现分离效果逐渐改善, pH 9.9时变化较明显, 部分重叠峰有分开的趋势, 因此最佳pH为9.9。用甲醇、乙腈、乙二醇对DNFB-氨基酸衍生物分离选择性进行研究, 发现没有明显作用, 而异丙醇却对DNFB-氨基酸衍生物的分离选择性有一定的影响, 浓度为150 g/L时, 出峰17个, 而且分析窗口也扩大了。我们也试用两种有机溶剂同时加入作为运行缓冲液, 也不能改善其分离选择性。30 mmol/L pH 9.9 硼砂溶液: 异丙醇 = 85:15 (V/V)的分离效果(图1)。采用Brij35, Tween20, Tween80, TritonX-100, NP40, 十六烷基三甲基溴化铵等表面活性剂作为添加剂进行实

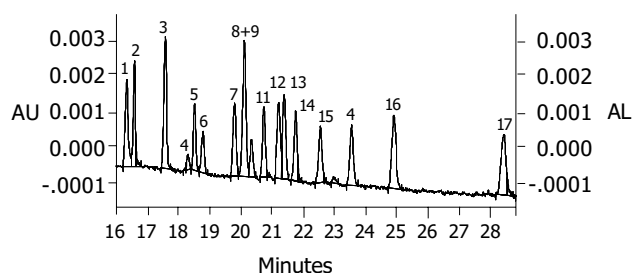


图1 异丙醇对分离的影响。1: 酪氨酸 Tyr; 2: 组氨酸 His; 3: 赖氨酸 Lys; 4: 丝氨酸 Ser; 5: 色氨酸 Trp; 6: 半胱氨酸 Cys; 7: 苯丙氨酸 Phe; 8: 亮氨酸 Leu; 9: 异亮氨酸 Ile; 10: 谷氨酰胺 Gln; 11: 甲硫氨酸 Met; 12: 缬氨酸 Val; 13: 苏氨酸 Thr; 14: 天冬酰胺 Asn; 15: 脯氨酸 Pro; 16: 丙氨酸 Ala; 17: 甘氨酸 Gly.

验. 实验表明, Brij35 和 Tween80 虽能缩短分离时间, 但不能提高分离度, 峰的个数无改善; Tween20 既不能缩短分离时间, 也不能提高分离度, 而且峰形不佳; NP40 和 TritonX-100 虽可缩短分离时间, 但对氨基酸分离起负作用, 峰个数减少, 峰形也不佳; 十六烷基三甲基溴化铵加入后, 无氨基酸吸收峰, 考虑其为阳离子表面活性剂, 可能改变电渗方向, 故用反向电场再试, 仍无氨基酸特异吸收峰. 总之, 表面活性剂对 DNFB-氨基酸衍生物的分离无明显改善作用. 将 20 种氨基酸标准液稀释成 20, 30, 50, 100, 200, 400, 500, 800 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 9 个不同浓度, 以氨基酸浓度 ($\mu\text{mol/L}$) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 根据待测样品的峰面积计算得样品的氨基酸含量. 将 18 种氨基酸标准液, 精氨酸 (Arg)、酪氨酸 (Tyr)、赖氨酸 (Lys)、半胱氨酸 (Cys)、色氨酸 (Trp)、组氨酸 (His)、苯丙氨酸 (Phe)、异亮氨酸 (Ile)、亮氨酸 (Leu) 蛋氨酸 (Met)、缬氨酸 (Val)、丝氨酸 (Ser)、苏氨酸 (Thr)、脯氨酸 (Pro)、丙氨酸 (Ala)、甘氨酸 (Gly)、天冬酰胺 (Asn)、谷氨酰胺 (Gln) 各为 100 $\mu\text{mol/L}$, 进行衍生化反应, 然后电泳分离. 在 9min 内可分离出 15 个峰, 其中 12 种氨基酸可完全分离 (图 2).

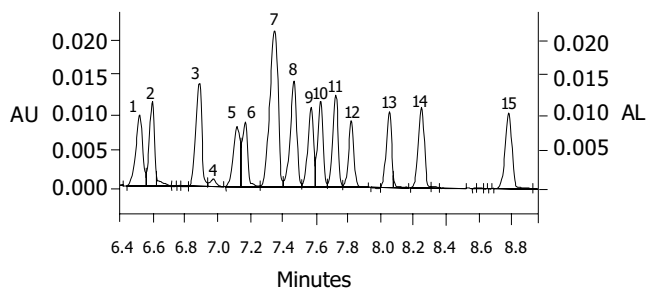


图2 氨基酸标准混合液电泳图谱。1: Tyr; 2: His; 3: Lys; 4: Ser; 5: Cys; 6: Tyr; 7: Phe+Ile+Leu; 8: Met+Gln; 9: Val; 10: Thr; 11: Asn; 12: Pro; 13: Ser; 14: Ala; 15: Gly.

取一份正常人血清标本, 进行批内和批间精密度测定. 批内精密度测定时, 同一份样本同时测 12 次, 作为批内精密度观察指标, 其变异系数为 2.6–11.4%; 批间精密度测

定时, 每天测 1 次, 共 6 d, 作为批间精密度观察指标, 其变异系数为 5.8–19.7%. 将 20 种氨基酸标准液稀释成 20, 30, 50, 100, 200, 400, 500, 800 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 几个不同浓度, 测定后进行线性回归, 其相关系数 $r = 0.938-0.954$. 表明 18 种氨基酸在 20–1 000 $\mu\text{mol/L}$ 范围内线性良好. 人血清标本经乙腈去蛋白衍生化反应后, 直接进样分析. 可知, 血清中其他成分对所测定的氨基酸无明显的干扰. 取一份正常人血清标本, 分别加入 40 $\mu\text{mol/L}$ 和 360 $\mu\text{mol/L}$ 两种浓度的氨基酸标准液, 测得平均回收率为 95.4%. 对 20 名健康人血清中 12 种游离氨基酸进行参考值调查, 其中男性 11 例, 年龄 18–45 岁; 女性 9 例, 年龄 18–42 岁. 血清氨基酸含量见表 1. 结果采用 t 检验进行统计学处理, 发现肝硬化组酪氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、丝氨酸明显升高, 丙氨酸明显下降; 肝癌组酪氨酸、赖氨酸、色氨酸、缬氨酸、苏氨酸、天冬酰胺明显升高, 脯氨酸明显下降 ($P < 0.05$).

表1 肝癌肝硬化患者 12 种血清氨基酸测定结果(mean \pm SD, $\mu\text{mol/L}$, $n = 20$)

氨基酸	正常人	肝硬化	肝癌
酪氨酸	30.8 \pm 8.6	67.4 \pm 40.5 ^a	56.8 \pm 23.0 ^a
组氨酸	48.2 \pm 11.8	54.2 \pm 27.3	49.2 \pm 16.6
赖氨酸	97.6 \pm 30.2	97.8 \pm 28.2	127.0 \pm 40.1 ^a
丝氨酸	111.0 \pm 35.6	130.2 \pm 31.5 ^a	136.2 \pm 39.5
半胱氨酸	161.4 \pm 54.0	149.6 \pm 67.8	208.0 \pm 304.0
色氨酸	17.8 \pm 8.6	33.6 \pm 20.8 ^a	45.8 \pm 14.2 ^a
缬氨酸	137.2 \pm 41.4	138.0 \pm 31.4	187.6 \pm 32.3 ^a
苏氨酸	98.0 \pm 29.2	110.0 \pm 41.6	115.6 \pm 31.7 ^a
天冬酰胺	34.6 \pm 13.5	55.2 \pm 22.2 ^a	51.8 \pm 22.6 ^a
脯氨酸	121.4 \pm 47.1	126.8 \pm 54.8	105.6 \pm 30.8 ^a
丙氨酸	227.4 \pm 67.8	160.4 \pm 57.0 ^a	206.8 \pm 48.9
甘氨酸	216.6 \pm 67.8	228.4 \pm 80.3	212.0 \pm 38.2

^a $P < 0.05$ vs 正常人.

3 讨论

氨基酸传统分析方法为离子交换色谱法和反相高效液相色谱法, 这些方法操作繁琐, 成本高费时. 高效毛细管电泳法是近几年发展起来的新技术, 其分离效能高快速且试剂消耗低. Shen *et al*^[8] 成功分离了 16 种 DNFB 衍生的氨基酸标准品并用此条件定量血清中 16 种氨基酸的含量. 但组成人体蛋白质的氨基酸有 20 种, 仅分离 16 种不能用于血清游离氨基酸定量. 我们用 20 种氨基酸标准品, 衍生物同样为 DNFB. 从缓冲液浓度, pH, 添加剂等几个方面观察其对氨基酸分离的影响, pH>9 的缓冲溶液分离氨基酸较容易, 硼砂是此范围中最常用的缓冲溶液, 我们比较了硼砂缓冲溶液与硼酸钠缓冲液^[8]作为衍生缓冲液发现前者效果好, 不使用添加剂情况下增加一个峰, 但硼砂溶液溶解度低, 可选浓度范围较小, 随着缓冲液浓度增加, 电流的增加, 焦耳热增多, 管内形成温度梯