

文章编号 1006-8147(2017)05-0475-05

论著

应用高效毛细管电泳法测定2型糖尿病肾病患者尿微量白蛋白的含量

景换利,姚远,高卫平

(天津医科大学生物医学工程与技术学院,天津300070)

摘要 目的:应用毛细管电泳耦合二极管阵列检测器(CE-DAD)技术检测2型糖尿病肾病患者尿微量白蛋白(mALB)的含量。方法:实验过程中,对缓冲液的浓度、pH值、分离电压、最佳波长以及添加剂十二烷基硫酸钠(SDS)的浓度进行系统的研究,得到了最佳分离条件,即运行缓冲溶液为10 mmol/L硼酸盐+70 mmol/L SDS, pH=9.25,检测波长194 nm,分离电压15 kV,分离温度25℃的条件下,通过毛细管电泳压力进样8 s,使空白对照组、糖尿病组和肾病组的mALB在15 min内均被完全分离。结果:糖尿病肾病患者中mALB的含量均高于健康对照组,差异有显著统计学意义,并且随着患者病情的加重,患者体内的mALB的含量明显增高。结论:应用CE-DAD检测方法能够实现mALB良好分离,是一种可靠、高效的分离方法。

关键词 毛细管电泳;2型糖尿病肾病;尿微量白蛋白

中图分类号 R318.6

文献标志码 A

A simple determination of microalbuminuria urine of patients with type 2 diabetic nephropathy by capillary electrophoresis

JING Huan-li, YAO Yuan, GAO Wei-ping

(College of Biomedical Engineering and Technology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To establish a new method for determination of the microalbuminuria (mALB) in urine of patients with type 2 diabetic nephropathy (T2DN) by capillary electrophoresis (CE) coupled with diode array detector (DAD). **Methods:** Experimental parameters such as concentration and pH of buffer solution, the separation voltage, optimal wavelength and SDS concentration were systematically investigated. The optimum separation conditions were determined as: 10 mmol/L borate buffer and 70 mmol/L SDS at pH 9.25 with 8 s hydrodynamic injection at 50 mbar, optimal wavelength 194 nm, applied voltage were set at 15 kV and working temperature at 25℃, and the mALB were completely separated within 15 min. **Results:** There was a significantly difference between the healthy control and the patients, and the concentration of mALB had significantly increased as the disease became worse. **Conclusion:** This CE-DAD method can achieve good accuracy and repetition for analyzing mALB.

Key words capillary electrophoresis; type 2 diabetes nephropathy; microalbuminuria

糖尿病肾病(DN)是糖尿病患者最常见、最严重的并发症之一,可以被看成是一种由代谢紊乱诱发的慢性炎症性疾病^[1]。随着我们生活水平的提高,2型糖尿病的发病率迅速上升,大约10%~40%的2型糖尿病最终导致肾功能衰竭,并成为糖尿病患者的主要死因之一^[2]。目前,肾移植无疑是治疗慢性肾衰竭的最好方法,但因其创伤性大而且术后可能伴有严重的并发症。因此,通过对糖尿病肾病的早期检测,及时有效的进行精准预防和治疗对糖尿病肾病病程的延缓和治愈具有重要的意义^[3]。糖尿病肾病临床以持续的蛋白尿为主要的标志,其中尿微量白蛋白(mALB)是糖尿病肾病的重要预测因素^[4]。如何及早精确的检测出糖尿病肾病患者尿蛋白的含量是问题的关键。目前常用的测量蛋白质含量的方

法有免疫比浊分析法^[5]、化学发光分析法^[6]、放射免疫法^[7]等,但这些方法存在着分辨率低、耗时、有放射性、操作复杂等缺点。毛细管电泳(CE)与传统的蛋白分离方法相比,因其具有灵敏度高、分离速度快、样品用量少、成本低和自动化程度高等优点,是近年来发展最快的分离方法之一^[8-10]。因此,本文采用毛细管电泳技术作为一种新的分离分析方法应用于人体mALB的检测。在最佳试验条件下,通过应用毛细管电泳技术进行试验后,我们得到了正常对照组和不同病程下的2型糖尿病肾病患者mALB的电泳图,进而计算出不同尿液样本中mALB的含量,从而为临床诊断提供参考价值。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 研究对象 试验中用到的所有尿液样本均来自天津医科大学代谢病医院的糖尿病病人和2型

作者简介 景换利(1989-),女,硕士在读,研究方向:分析化学毛细管电泳;通信作者:高卫平, E-mail: weipinggao88@126.com。

糖尿病肾病患者中段尿, 将获得的尿液样本根据尿微量白蛋白排泄率(UAER)分为以下 3 组: DM 组(单纯糖尿病组), 此阶段人体尿液属于正常蛋白尿期, 其 UAER<30 mg/24 h; DN-1 组(早期糖尿病肾病组), 此阶段尿液属于微量白蛋白尿期, UAER 达到 30~300 mg/24 h; DN-2 组(临床糖尿病肾病组), 此时尿液出现大量白蛋白尿, UAER \geq 300 mg/24 h。同时采集 15 例(40~70 岁)健康人的尿液作为试验的空白对照组(control)。

1.1.2 仪器和试剂 安捷伦 7100 型高效毛细管电泳仪, 配备二级管阵列检测器, 检测波长 190~400 nm (美国 Agilent 公司); 75 μ m 内径未涂层熔融石英毛细管 (河北永年锐沅色谱器件有限公司); mALB(99%纯度)(购自武汉艾美捷科技有限公司)。所有试验用水均为 Milli-Q 纯水仪制备的超纯水, 并且所有用到的有机化学试剂均属分析纯及以上。通过加入一定量的超纯水制备 mALB 含量为 2.00×10 g/L 的标准溶液, 然后将 mALB 的标准溶液按比例稀释成 1.00×10^{-1} g/L 到 1.60 g/L。每次试验前, 需要精确称取 3.80×10^{-1} g $\text{Na}_2\text{BO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 和 2.03 g SDS 溶于 1.00×10^{-1} L 的超纯水中, 然后用 0.1 mol/L NaOH 溶液滴定至 pH 值为 9.25。试验中用到的溶液均用 0.45 μ m 的过滤膜过滤之后再放入毛细管中用于样品的分离。

1.1.3 样品制备 尿液样本在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 10 min, 将离心后得到的上清液用移液枪置于 5 mL 的尿液瓶中, 并按比例 1/1 000(v/v) 加入一定含量的 PMSF, 为了有效地抑制尿液蛋白变性。最后将处理后的尿液样本置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中低温保存备用。试验前, 尿液样本按 1:1 比例和当天制备的硼酸盐缓冲液混合后置于毛细管中用于电泳的分离分析。

1.1.4 检测方法 采用毛细管区带电泳模式, 以 10 mmol/L 硼酸盐 + 70 mmol/L SDS + 0.1 mmol/L NaOH (pH=9.25) 为运行缓冲液, 在未涂层熔融石英毛细管(50 cm \times 75 μ m 内径)中进行电泳。在将尿液样本注入毛细管之前, 一根新的毛细管应使用 0.1 mol/L NaOH 冲洗 30 min, 然后依次使用超纯水和运行缓冲液冲洗 10 min。另外, 在两次尿液样本注射之间, 毛细管只需要被 0.1 mol/L NaOH、超纯水和运行缓冲液各冲洗 3 min 即可。本试验采用压力进样(50 mbar)的方式进样 8 s, 整个电泳过程维持在 25 $^{\circ}\text{C}$, 并采用 15 kV 的高压直流电为分离动力对尿液样本中的 mALB 进行高效分离。所有的电泳峰均在 15 min 之内进行完全分离, 试验结束后毛细管电泳将自动生成样本分离的电泳图, 我们将根据不同浓度的

mALB 的含量及其对应的电泳图中的电泳峰的峰高和峰面积绘制工作曲线, 然后根据工作曲线计算出不同尿液样本中所含有的 mALB 的含量, 最后将所有的检测数据采用 SPSS 21.0 进行统计学处理。

1.2 试验方法

1.2.1 毛细管电泳条件

1.2.1.1 运行缓冲液 pH 值和浓度选择: 在本试验的初级阶段, 采用单一变量法来确定缓冲液的类型, 50 mmol/L Tris 和 10 mmol/L 硼酸盐分别在相同的电泳条件下对尿液样本进行电泳分离, 结果显示硼酸盐缓冲液因其较好的灵敏度和分辨率被用于尿液样本的分离(图 1)。

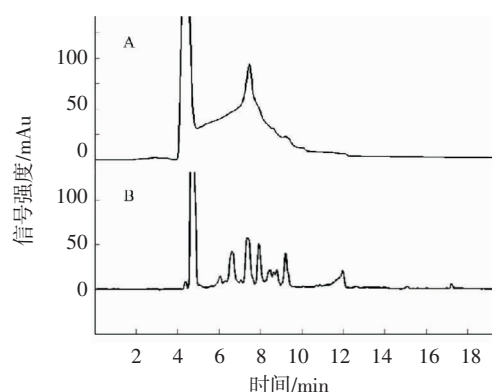


图 1 运行缓冲液 50 mmol/L Tris(A)和 10 mmol/L 硼酸盐(B)对尿微量白蛋白分离的影响

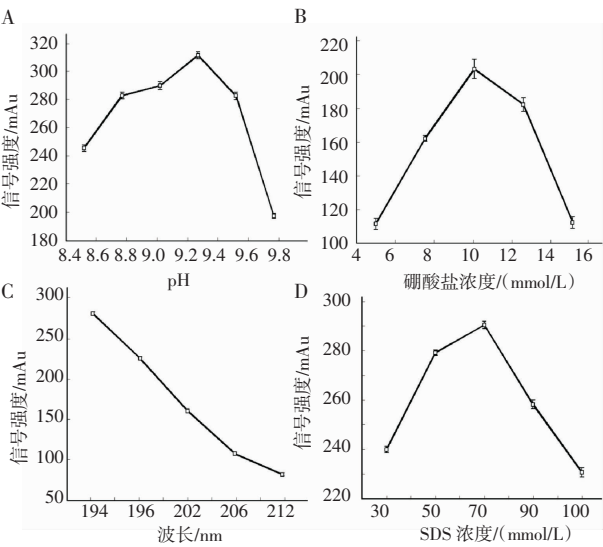
Fig 1 Effect of 50 mmol/L Tris (A) and 10 mmol/L $\text{Na}_2\text{BO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (B) on the separation of mALB

为了进一步优化毛细管电泳的分离条件, 试验中对运行缓冲液的 pH 值及浓度对 mALB 分离结果的影响进行了考察。结果显示, 缓冲液的 pH 值为 9.25 时(图 2A)及浓度为 10 mmol/L(图 2B)时, 尿样本中 mALB 分别达到最佳分离。

1.2.1.2 电泳波长和 SDS 浓度的选择: 为了获得高灵敏度和宽线性范围, 电泳的紫外吸收光谱从 194 nm 到 210 nm 被用于尿液样本的检测。图 2C 表明电泳波长越长, 所得的电泳图的基线越不稳定, 并且 mALB 峰高的信号强度也就越低, 因此在电泳波长 194 nm 处 mALB 具有较强的紫外吸收能力。

为了减少尿液蛋白在毛细管壁的吸附程度, 提高电泳的分离速度, 我们在硼酸盐缓冲液中加入了一定量的 SDS 添加剂。图 2D 显示不同的 SDS 浓度将对尿液中 mALB 的分离产生不同的结果。从图中可以看出, 缓冲液中较高和较低的 SDS 浓度均不会提高 mALB 信号强度和分辨率, 而且随着 SDS 浓度的增加, 电渗逐渐减少导致 mALB 的迁移时间变长。结果表明, SDS 浓度选择 70 mmol/L 可以获得最

佳的分离效果,并且减少了电泳分离所需的迁移时间。



电泳条件:未涂层熔融石英毛细管;50 cm×75 μm;电压:15kV;电泳温度:25 ℃;进样时间:50 mbar×8 s

图 2 缓冲溶液 pH 值(A),浓度(B),电泳波长(C)和 SDS 浓度(D)对尿样中尿微量白蛋白的影响

Fig 2 Effect of (A) pH, (B) borate concentration (mmol/L), (C) wavelength (nm) and (D) SDS concentration (mmol/L) on the separation of mALB

1.2.1.3 分离电压的选择:电泳的外加电压可以对溶质的迁移时间和分离度提供改善,因此,本试验考察了外加电压的范围从 10 到 20 kV 对尿样分离的影响(图 3)。从图 3A 可以看出,随着电压的增加,分离时间呈线性减小,但当电压增至 15 kV 时,电泳分离度减少,基线噪音增加,导致检测出的 mALB 的含量明显减少(图 3B),这可能是由于在高电压下,产生了大量的焦耳热的原因。综合考虑,最终选择最佳分离电压为 15 kV。

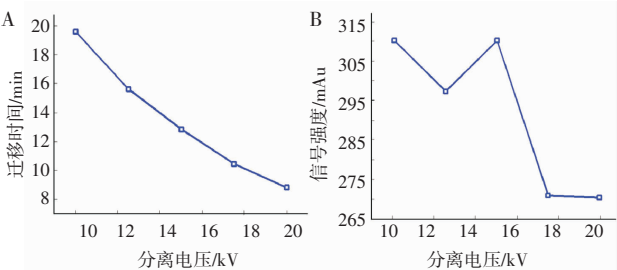


图 3 电泳电压对尿样中尿微量白蛋白迁移时间(A)和峰高(B)的影响
Fig 3 Effect of the applied voltage on migration time (A) and peak height (B) of mALB

1.2.2 分析性能 使用缓冲液将 mALB 的标准液稀释成不同梯度的标准品溶液,然后在电泳的最佳分离条件下直接进行检测,记录其在 194 nm 波长

下的峰面积和峰高值,用于绘制 mALB 的工作曲线。试验考察了尿液中 mALB 的回归方程、线性范围、相关系数以及检出限,结果见表 1。为了测定试验的重复性,在最佳条件下,连续运行 6 次同一浓度的 mALB 的标准试样,结果显示 mALB 的迁移时间、峰面积和峰高的相对标准偏差(RSD)分别是 5.48%、5.01%和 2.63%。

表 1 尿微量白蛋白峰面积和峰高的分析性能
Tab 1 Analytical features of mALB of peak area and mALB of peak height

目标物	mALB (峰面积)	mALB (峰高)
回归方程	$Y=8\ 542.143X-126.884$	$Y=303.177X+1.490$
线性范围/(μg/L)	0.01-1.6	0.02-1.6
相关系数/(r ²)	0.998 2	0.989 1
检测限/(μg/L) ^a	0.007	0.018
迁移时间/(RSD,%)	5.48	5.48
mALB/(RSD,%) ^b	5.01	2.63

^a 检测限(S/N=3);^b n=6

2 结果

在上述选定的最佳试验条件下,使用毛细管电泳技术分别用于正常对照组、糖尿病组和糖尿病肾病组尿液中 mALB 分离和测定,得到 4 组尿样的电泳谱图。通过向尿样中加入 0.4 g/L 的 mALB 标准液来确定电泳峰,结果见图 4,其中实线表示实际糖尿病肾病尿样经电泳分离后所得的电泳图,而虚线则表示加入 0.4 g/L 的 mALB 标准液后的电泳图。通过比较可以看出尿样中的 mALB 约在 12 min 处进行了有效的分离。为了进一步验证方法的可靠性,对各组尿样分别进行了加标回收试验,计算结果见表 2。表中 mALB 峰面积和峰高的回收率分别是 93%~97%和 91%~95%,测定结果的 RSD 均小于 7%。

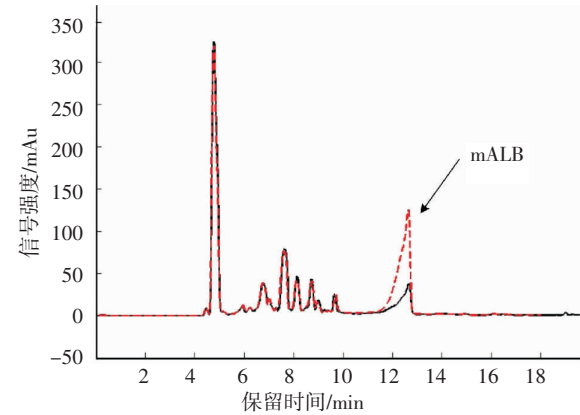


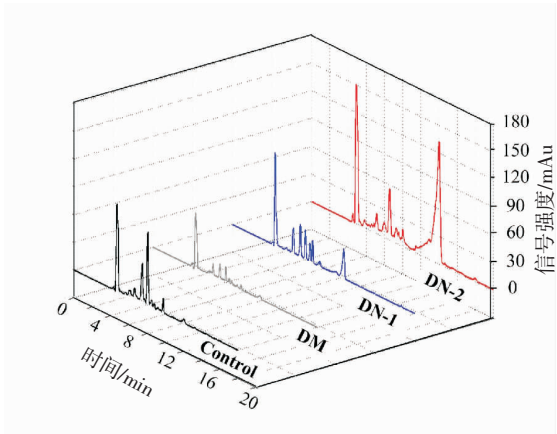
图 4 早期糖尿病肾病患者尿样电泳图(实线)及加标回收图(虚线)
Fig 4 Electropherogram (solid trace) unspiked urine from one of the DN-1 group, (dotted trace) enriched standard mALB solution in the DN-1 group

表 2 人体尿样中尿微量白蛋白的测定结果

Tab 2 Determination results of mALB in human urine samples

	尿液样本	<i>n</i>	含量/(mg/L)	加入量/(g/L)	检出量/(mg/L)	回收率/%	<i>RSD</i> /%
峰面积	Control 组	15	19.90±2.38	0.4	407.17±18.60	96.81	4.5
	DM 组	12	24.74±5.71	0.4	397.86±14.42	93.28	4.1
	DN1 组	8	119.05±49.72	0.4	496.54±45.00	94.37	4.7
	DN2 组	12	471.03±266.89	0.4	844.46±269.60	93.36	6.4
峰高	Control 组	15	9.52±6.46	0.4	386.49±12.23	94.24	3.5
	DM 组	12	15.53±14.58	0.4	384.15±20.22	92.15	5.1
	DN1 组	8	124.54±77.17	0.4	495.24±92.19	92.67	7.3
	DN2 组	12	517.89±298.72	0.4	833.07±292.61	91.30	5.7

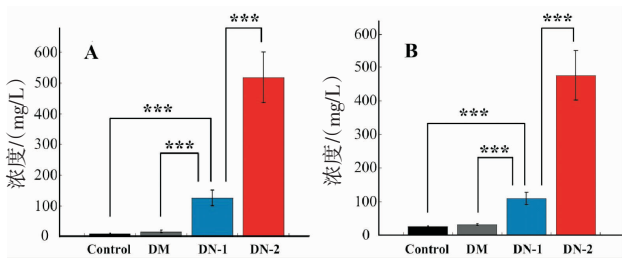
图 5 显示了健康对照组、糖尿病组、早期糖尿病肾病组及临床期糖尿病肾病组的尿样在最佳条件下经电泳分离后的电泳图谱。从图中可以看出,正常人和糖尿病组的尿样中 mALB 的含量是很低的。但是当样本过度到糖尿病肾病组时,可以看到尿样中 mALB 的含量明显增加,并且随着病程的加重,mALB 的含量上升的越快。为进一步分析这 4 组尿样中 mALB 含量的关系,我们绘制了关于电泳峰的峰面积和峰高的直方图(图 6)。结果显示,DM 组和健康对照组之间的变化不明显,无统计学意义($P>0.05$),但 DN-1 与 DM 组、对照组相比明显增高,其差异具有统计学意义($P<0.001$),随着病情的加重,尿样中 mALB 的含量逐渐增加,结果表明 DN-2 组与 DN-1、DM 组、对照组相比均具有统计学差异($P<0.001$)。



电泳条件:未涂层熔融石英毛细管:50 cm×75 μm;电压:15 kV;电泳温度:25 ℃;进样时间:50 mbar×8 s

图 5 正常对照组、糖尿病组、早期糖尿病肾病组和临床糖尿病肾病组电泳图

Fig 5 Electrophoretograms of mALB of human urine samples from the healthy control group, the DM group, the DN-1 group and the DN-2 group



*** $P<0.001$

图 6 正常对照组、糖尿病组、早期糖尿病肾病组和临床糖尿病肾病组的患者尿样中尿微量白蛋白峰高(A)和峰面积(B)的直方图

Fig 6 The histograms obtained by peak height of mALB from the four groups (A). The histograms obtained by peak area of mALB from the four groups(B)

3 讨论

糖尿病肾病已成为糖尿病人主要并发症之一,严重影响着人类的健康和生活质量。糖尿病肾病发病隐匿、病情随时间延长逐渐加重、早期一般不为人所注意,但当发现时,肾脏的病变已经不可逆转。与之相反,如果能够及时的诊断和治疗疾病就可以更加有效地延缓病情的发展,在糖尿病肾病早期的发现甚至可以逆转病情。因此,发现一种糖尿病肾病早期诊断方法具有重要的临床应用价值。

本研究中,我们将毛细管电泳技术作为一种新的分离分析方法应用于人体 mALB 的检测。毛细管电泳技术是在高压直流电的驱动下,以毛细管柱为分离通道,从而实现对样品中各组分的分离和检测。毛细管电泳中,带动毛细管中溶液整体前进的动力是电渗流。电渗越大,毛细管中的物质迁移越快,电渗越小物质迁移越慢。影响电渗流的主要因素是缓冲液的 pH 值、类型和浓度。通过对电渗流的控制,进而可以对尿样在毛细管中的迁移速度和分离效率产生影响。毛细管电泳分离的关键是找到合适的运行缓冲液。试验中发现,硼酸盐缓冲液因其较好的灵敏度和分辨率被用于尿液样本的分离。

运行缓冲液的 pH 值对电渗流和溶质的电泳迁移有重要的影响^[1]。本试验研究了不同的 pH 值在缓冲液浓度相同的情况下对尿液样本分离的影响。结果显示,随着 pH 值的增加,尿样中 mALB 的迁移时间会逐渐增加,这是由于 pH 改变了溶液的离子强度和电渗流。然而,较低的 pH 值在电泳的分辨率、稳定性以及电泳图的波型上却不能得到良好的结果,这意味着较高和较低 pH 值均不能获得良好的试验结果。运行缓冲液的浓度同样能影响电泳分离性和电渗强度,进而导致尿样的电泳现象发生改变。为了得到电泳分离的最佳浓度值,本试验对一系列不同的浓度值在相同的 pH(9.25)下进行尿样分离。结果显示,随着硼酸盐缓冲液浓度的增加,电渗逐渐增加导致 mALB 迁移时间减少。但同时,更高的缓冲液的浓度又将产生大量的焦耳热从而导致较差的分离度、分辨率和试验重复性。很有必要在迁移时间和焦耳热之间做一个折中,因此,选择缓冲液浓度为 10 mmol/L 作为电泳分离条件。为了解决电泳分离过程中出现的蛋白质吸附管壁而造成的电泳峰的拖带和复合峰的问题,通过向运行缓冲液中加入 70 mmol/L SDS,成功地减少了尿液蛋白在毛细管壁的吸附程度。

综上所述,将毛细管电泳技术作为定量检测人体尿液中 mALB 含量的新方法,能够得到令人满意的试验结果。该方法具有灵敏度高、样品用量少、操作简单、自动化程度高等优点,可以作为临床检测 mALB 方法的一种补充。

参考文献:

- [1] Mima A. Diabetic nephropathy: protective factors and a new therapeutic paradigm[J]. Diabetes Complications, 2013,27(5):526
 - [2] Haneda M, Utsunomiya K, Koya D, et al. A new classification of Diabetic Nephropathy 2014: A report from Joint Committee on Diabetic Nephropathy[J]. Clin Exp Nephrol, 2015,19(1):1
 - [3] Hoste E, Damen J, Vanholder R, et al. Assessment of renal function in recently admitted critically ill patients with normal serum creatinine[J]. Nephrol Dial Transplant, 2005,20(4):747
 - [4] Tuttle K R, Bakris G L, Bilous R W, et al. Diabetic kidney disease: a report from an ADA consensus conference[J]. Am J Kidney Dis, 2014, 64(4): 510
 - [5] Worthley D L, Harvey N T, Hill N L, et al. Urinary transferrin and albumin concentrations in patients with type 1 diabetes and normal controls: the search for the first protein lost[J]. Clin Biochem, 2001, 34(1):83
 - [6] Müller R, Hiller K, Schmalz G, et al. Chemiluminescence-based detection and comparison of protein amounts adsorbed on differently modified silica surfaces[J]. Anal Biochem, 2006,359(2):194
 - [7] Prasad P, Chaube S, Panchal M, et al. Molecular dissection of an hCG- β epitope using single-step solid phase radioimmunoassay[J]. Clin Chim Acta, 2007,376(1/2):52
 - [8] Christians S, van Treel N D, Bieniara G, et al. Evaluation of capillary zone electrophoresis for the determination of protein composition in therapeutic immunoglobulins and human albumins[J]. Biologics, 2016, 44(4):234
 - [9] Tian Y, Li Y, Mei J, et al. Simultaneous separation of acidic and basic proteins using gemini pyrrolidinium surfactants and hexafluoroisopropanol as dynamic coating additives in capillary electrophoresis[J]. Chromatogr A, 2015,1412(18):151
 - [10] Desiderio C, Rossetti D, Iavarone F, et al. Capillary electrophoresis-mass spectrometry: recent trends in clinical proteomics[J]. J Pharm Biomed Anal, 2010,53(5):1161
 - [11] Wang W, Zhou L, Wang S, et al. Rapid and simple determination of adenine and guanine in DNA extract by micellar electrokinetic chromatography with indirect laser-induced fluorescence detection[J]. Talanta, 2008, 74(4): 1050
- (2016-12-16 收稿)
- +++++
- (上接第 474 页)
- cular outcomes after acute coronary syndromes [J]. Circulation, 2014, 130(23):2109
 - [3] 刘娱姗,高署,柯学,等.难溶性药物固体分散体研究新进展[J].药学进展,2013,37(4):166
 - [4] 李晗,李继斌,邢正英,等.复方阿托伐他汀依折麦布胶囊的质量控制[J].天津医科大学学报,2016,22(1):76
 - [5] 敖玲玲,张晨芳,徐凯敏,等.几种常用崩解剂的理化性能和应用效果[J].中国医药指南,2015,13(16):20
 - [6] 郭迎新,李非,赵倩倩,等.正交设计法优选银杏黄酮凝胶骨架片处方工艺[J].中国中药杂志,2013, 38(11): 1325
 - [7] 戈文兰,高盼,苗燕飞,等.多条溶出曲线评价氨氯地平阿托伐他汀钙分散片的质量[J].中国生化药物杂志,2012,33(6):811
 - [8] 王洁,孙杨,金刚,等.碱性调节剂对缙沙坦固体分散体外溶出度的影响[J].吉林化工学院学报, 2015, 32(11): 30
 - [9] 李晓君,郭朕,赵勤富,等.高速剪切制粒中吡拉西坦含量均匀性的控制[J].沈阳药科大学学报,2013,30(6): 415
 - [10] 钟益玮,胡翔,陆阳.利伐沙班片的制备及处方优化[J].安徽医药, 2015, 19(2): 225
 - [11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(四部)[S].北京:中国医药科技出版社, 2015:121-122
 - [12] 隋洪飞,王姿婧,刘青,等.星点设计-效应面法优化硝苯地平分散片处方[J].天津医科大学学报,2014,20(4):323
 - [13] Keharom S, Mahachai R, Chanthai S. The optimization study of α -amylase activity based on central composite design-response surface methodology by dinitrosalicylic acid method[J]. Int Food Res J, 2016,23(1):10
 - [14] Ilayaraja N, Likhith K, Babu G, et al. Optimisation of extraction of bioactive compounds from Feronia limonia (wood Apple) fruit using response surface methodology (RSM)[J]. Food Chemistry, 2015,173 :348
- (2016-11-09 收稿)