中 国 科 学 (B 辑)
第 29 卷 第 2 期 SCIENCE IN CHINA (Series B) 1999 年 4 月

细胞中鸟苷二磷酸糖的毛细管电泳研究*

许国旺① R. Lehmann② 路 鑫① H. M. Liebich②
张玉奎① 卢佩章①
(①中国科学院大连化学物理研究所, 国家色谱研究分析中心, 大连 116011; ②Medizinische Universitaetsklinik Tuebingen, Tuebingen 72076, Germany)

摘要 葡萄糖是细胞生长和代谢的一种重要的调节剂. 鸟苷二磷酸糖(UDP-Sugars)作为其代谢的中间产物, 在碳水化合物、糖类酯等的合成中起着重要作用. 研究其在细胞中的代谢在临床生物化学中具有重要意义. 建立了一个毛细管电泳方法, 采用 70 cm × 50 μm 的未涂毛细管, 20 mmol/L 硼酸盐(pH9)作缓冲液, 在 22 kV 下, 可在 15 min 左右全分离 4 个关键 UDP-Sugars, 精度和检测限满足细胞分析要求. 经实际分析淋巴细胞、成纤维细胞和肾小球细胞, 表明此方法不仅比 HPLC 具有明显优点, 而且还可用于测量细胞能荷.

关键词 细胞 葡萄糖 毛细管电泳 鸟苷二磷酸糖 葡糖胺

葡萄糖是细胞生长和代谢的一种重要调节剂. 鸟苷二磷酸糖(UDP-Sugars)是葡萄糖代谢的中间产物, 主要有 4 个化合物: 鸟苷二磷酸葡萄糖(UDP-Glu)、鸟苷二磷酸半乳糖(UDP-Gal)、鸟苷二磷酸乙酰葡糖胺(UDP-GluNac)及鸟苷二磷酸乙酰半乳糖胺(UDP-GalNac). 这些己糖胺在生物合成过程中, 对慢性高血糖病人来讲, 如代谢通量(flux)增加, 则会引起糖尿病血管综合症及胰岛素阻[1], 并进一步导致高血糖病的加重. 所以, UDP-Sugars 的研究在临床生物学中具有重要的意义.

一般来说, 高效液相色谱法(HPLC)是细胞中 UDP-Sugars 和核苷酸分析的最常用的方法[2]. Borzi 等人[3]建立了一个强阴离子交换 HPLC 方法用于分析淋巴细胞和粒性白血球细胞内核苷酸, 可分离出其中的 UDP-Glu 和 UDP-Gal. Palmieri 等人[4]建立了一个测定红血细胞中的 UDP-Glu, UDP-Gal 的 HPLC 方法, 并将此进一步用于测定经典(classic)半乳糖血症及其他代谢失调病人的血细胞中尿苷糖核苷酸的浓度[5]. Hull 等人[6]用阴离子交换 HPLC 电导检测方法测定 UDP-Sugars、核苷和糖磷酸酯, 并测定了红细胞中各代谢物的浓度. Sweeney 等人[7]用阴离子交换 HPLC 测量了 Swarm 鼠软骨细胞中 UDP-Sugars 的代谢. Wehrli 等人[8]用 ^{31}P NMR 分析红细胞中的 UDP-Glu 和 UDP-Gal. Wice 等人[9]测量了人结肠癌细胞中 UDP-N-乙酰己胺(UDP-HexNac)的浓度. 上述方法不是时间太长、需要特殊的仪器(如 ^{31}P NMR), 就是 4 个关键的 UDP-Sugars 不能完全分离. 为此, 迫切需要建立一个分析新方法以快速测定细胞中 UDP-

1998-07-02 收稿, 1998-11-24 收修改稿
* 德国马普(Max-Planck-Institut)研究基金资助项目

Sugars 浓度.

高效毛细管电泳(CE)由于使用细内径的毛细管柱,因此具备高效、快速及溶剂消耗和样品需要量少等特点,特别适合于细胞这样的小体积生化样品的分析. 本文的目的在于建立一个快速、高效的毛细管电泳方法,用于研究细胞中的 UDP-Sugars.

1 实验

1.1 细胞来源及培养

淋巴细胞采用 Sigma Diagnostics 专用试剂 Histopaque-1119 和 Histopaque-1077[10, 11],根据比重不同从 Buffy Coats 中分离. 2 体积 Histopaque-1077 轻轻加到 1 体积 Histopaque-1119 上,然后在其上轻轻加入 2 体积 Buffy Coats,在 1 000 u/min 下离心 20 min,用吸管吸出淋巴细胞层(黄色环),再在 2 000 r/min 下离心 5 min,倒掉上层清液,沉淀(细胞)用磷酸缓冲的生理盐水(PBS, Sigma)洗涤(2~3 次)和悬浮,并测定细胞个数.

成纤维细胞和肾小球细胞均来自本医院的细胞实验室[12],肾小球细胞在 7 mL 含 2% 胚胎牛血清(FCS)的 Dulbecco's Modified Eagle 介质(DMEM)中于 37 ℃下,在 10 mmol/L 葡萄糖、30 mmol/L 葡萄糖或 10 mmol/L 葡萄糖+ 1 mmol/L 葡糖胺中培养 2~47 h. 收获时用 PBS 和胰蛋白酶洗涤,所得的肾小球作 CE 分析用.

1.2 UDP-Sugars 的 CE 分析

在毛细管电泳分析前,细胞用含内标 8-溴鸟苷(Br^8G)的 60% 乙腈水溶液或乙腈与 5% Trixton X-100 (2∶1)的混合液脱除细胞小球中的蛋白. 将细胞小球与上述试剂混匀后,于 4 ℃,13 000 r/m下离心 10 min,上层清液直接用 CE 分析. 如浓度太低,则清液可以用真空蒸发器在 50 ℃下蒸干,再用 50 μL 60% 乙腈溶解其中的提取物,即可用 CE 分析.

毛细管电泳在 Dionex 的毛细管电泳系统 CESI 上进行. 该仪器装备有自动恒体积进样系统、高灵敏度的 UV 检测器及 AI 450 数据处理软件. 所用毛细管柱为未涂的 50 μm 内径的石英毛细管(Grom, Herrenberg-Kayh, 德国),检测窗离柱末端的距离为 6.5 cm. 分离电压为 22 kV. 样品由重力法引入,并由 UV 检测(262 nm),内标法定量.

2 结果与讨论

2.1 操作条件对 UDP-Sugars CE 分离的影响

从 UDP-Sugars 的结构来看,它们属于小的生物活性分子. 因此,毛细管区带电泳(CZE)和胶束电动力学色谱(MECC)均属可选用的方法. 相比之下[13],CZE 法比 MECC 法分析时间更短,操作更简单,对 4 个 UDP-Sugars 可在 5~10 min 内实现一次分离. 最佳的缓冲液为 pH 9 的 20 mmol/L的硼酸钠溶液. 增加缓冲液浓度对分离没有改善作用.

上述方法采用 50 cm 长的毛细管,不足之处是实际的细胞样品中共存的蛋白、盐及离子强度等基体以及迁移稍慢的核苷酸常常影响到 UDP-Sugars 的测定. 因此,有必要增加毛细管柱的长度以拉开各 UDP-Sugars 峰之间的间隔及与其他核苷酸的距离. 图 1 表明,采用 70 cm 长的毛细管柱已足以适合实际样品分析的需要,分离时间也只为 15 min 左右.

表 1 给出了采用所建立的方法获得的迁移时间和相对峰面积的再现性,以及线性范围和检测限(LOD). 由表 1 可知,此方法不仅能全分离 4 个峰,分析时间比 HPLC 短得多,而且再现

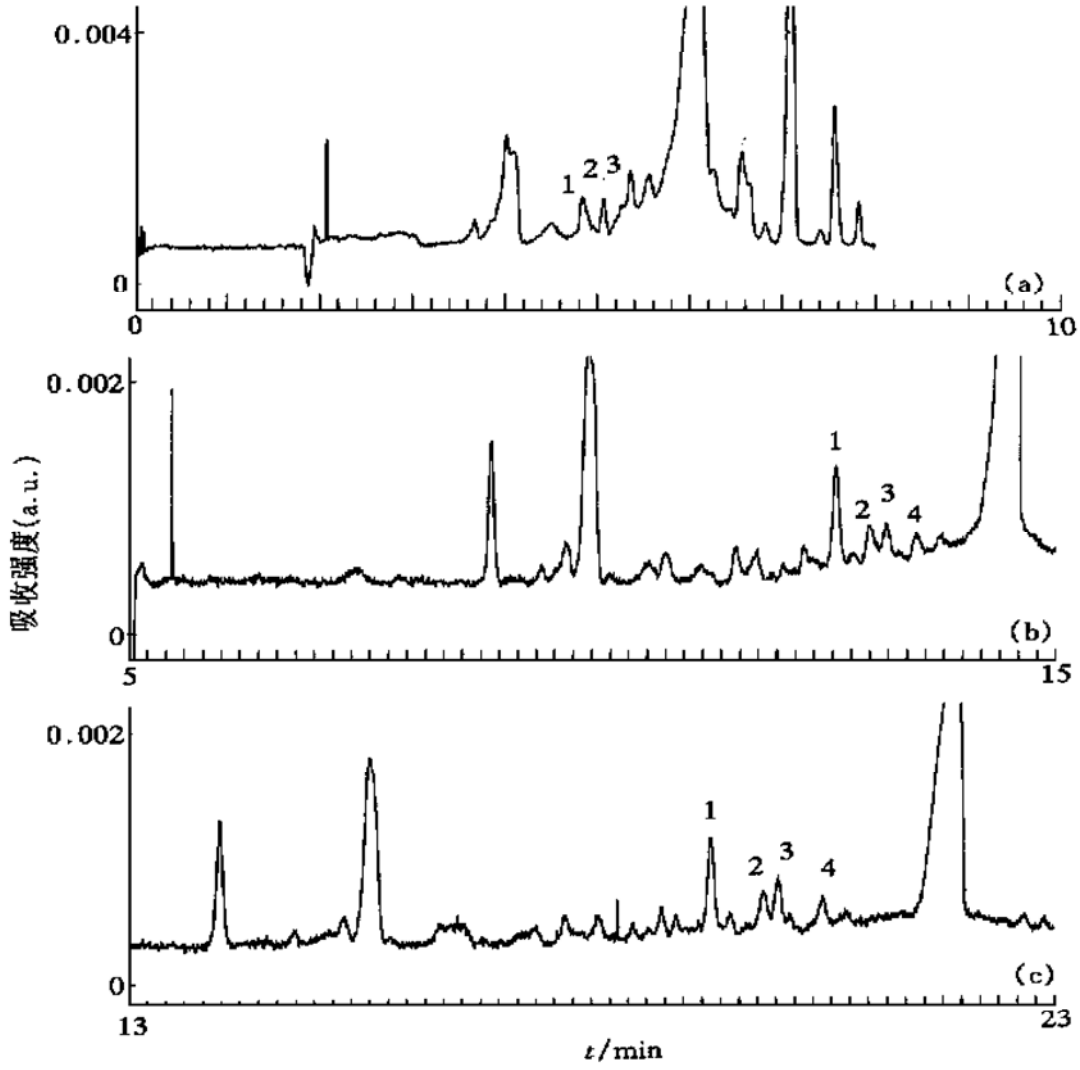


图 1　柱长对细胞中 UDP-Sugars CE 分离的影响

电泳条件: 缓冲液 20 mmol/L 硼酸钠, pH= 9; 检测器波长 262 nm; 重力进样(150 mm 进样头高度, 60 s); 毛细管柱(a) 50 cm × 50 μm, 22 kV, 48 μA; (b) 70 cm × 50 μm, 22 kV, 24 μA 及(c) 90 cm × 50 μm, 25 kV, 22 μA. 样品: buffy coat 中的淋巴细胞. 峰 1 ——UDP-GluNac, 2 ——UDP-GalNac, 3 ——UDP-Glu, 4 ——UDP-Gal

性良好, 最小检测浓度也在 1 μM 左右, 可望满足细胞中 UDP-Sugars 分析的需要.

表 1　UDP-Sugars 用 CE 分析的重复性、线性及其检测限(LOD) [a)]

化合物	时间/min	SD_1	CV_1/%	R_{area}	SD_2	CV_2/%	线性 ($R_{area}= a+ b\times C$)			LOD/μM
							a	b	r^2	
Br^8G	8.27	0.065	0.79	1						
UDP-GluNac	11.65	0.13	1.07	0.73	0.016	2.16	0.13	0.75	0.9996	0.9
UDP-GalNac	12.00	0.13	1.08	0.90	0.024	2.69	0.14	0.88	0.9992	1.2
UDP-Glu	12.15	0.13	1.10	0.87	0.024	2.79	0.14	0.88	0.9994	1.0
UDP-Gal	12.43	0.14	1.12	0.96	0.028	1.91	0.23	0.96	0.9992	1.2

a) 电泳条件: 重力进样(150 mm 进样头高度, 60 s); 262 nm 检测; 电压 22 kV; 22 μA; R_{area}= UDP-Sugars 的面积/内标的面积. 表中数据是浓度为 16 μM 的标样平行分析 9 次的结果. SD 为标准偏差, CV 为变动系数, 下标 1, 2 分别指迁移时间和相对面积 R_{area}. CE 分析的线性及其检测限数据为 5 个不同浓度(2~ 50 μM) 样品的测定结果, 其他同图 1

2.2　细胞中 UDP-Sugars 的分离分析

在细胞中, 有很多蛋白, 在实际样品分析时, 要先除去它们. 常见的方法有全氯酸法[14] 、

三氯乙酸法[15]、乙腈法[15]等. 经试验, 在本文建立的 CE 缓冲液系统中, 应用氯乙酸法时基体对分离的影响太大, 很难获得一个好的谱图. 乙腈法不仅可用于蛋白的消除, 而且有利于提高检测灵敏度[16], 当用 Trixton X-100 与乙腈混合液(1∶2)时, 效果更佳. 两种方法均是在细胞中直接加入脱蛋白试剂(乙腈/Trixton X-100), 混匀后所得上层清液用 CE 分析, 非常简单. 图 2 给出了淋巴细胞中 UDP-Sugars 的分离谱图. 从图中可知 4 个 UDP-Sugars 分得非常好. 由于样品用了 6×10^7 个细胞, 相当于通常样品的 5~ 10 倍, 核苷酸浓度太大, 重叠在一起了.

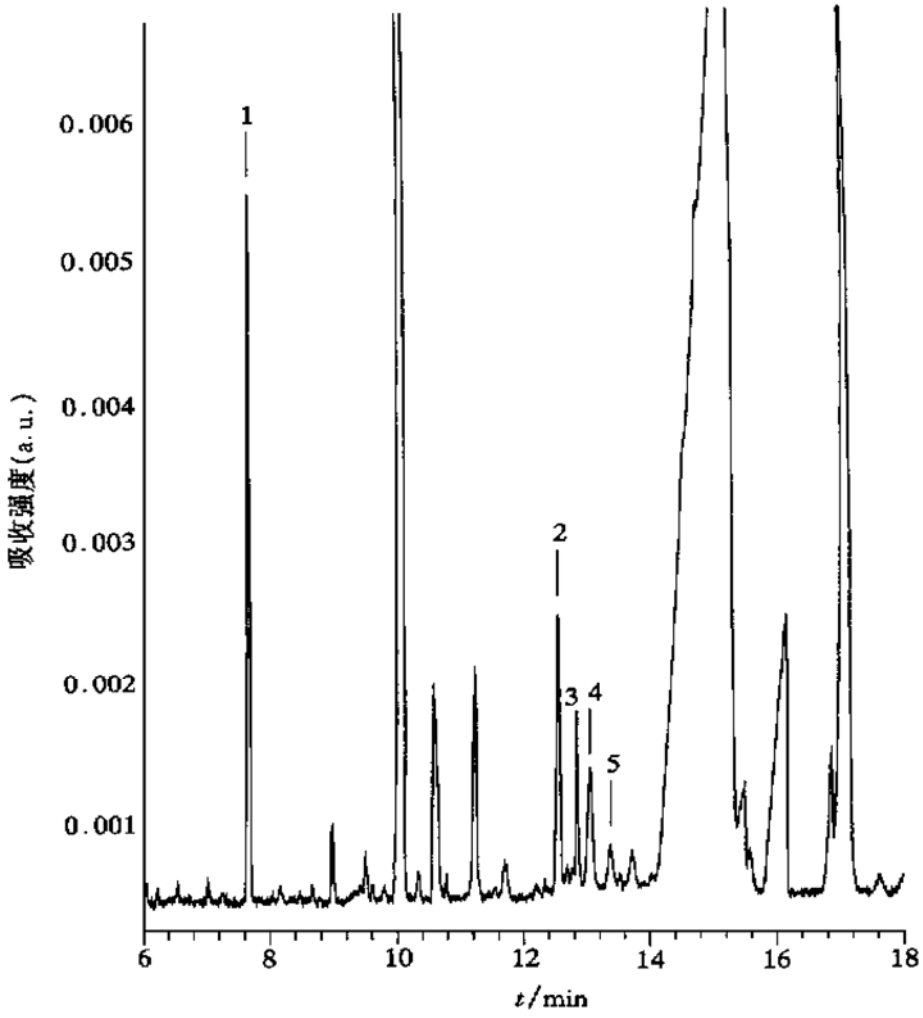


图 2 淋巴细胞中 UDP-Sugars 经 trixton X-100 和乙腈脱蛋白后直接用 CE 分离的谱图

样品预处理条件: 60×10^6 细胞用 100 μL 0.5% Trixton X-100 和 200 μL 100% 乙腈脱蛋白离心后的上层清液直接用 CE 分析. 电泳条件: 毛细管柱 70 cm × 50 μm; 峰 1 ——Br^8G(IS), 2 ——UDP-GluNac, 3 ——UDP-GalNac, 4 ——UDP-Glu, 5 ——UDP-Gal, 其他同图 1

表 2 给出了上述预处理及后续的 CE 分析的重复性. 平行处理 9 份成纤维细胞样品, 迁移时间精度在 6% 以内, 定量精度在 25% 以内. 在淋巴细胞萃取物中加入 10~ 40 μmol/L 的标准 UDP-Sugars, 回收率在 92%~ 108% 之间, 可满足实际分析的需要.

如前所述, 葡萄糖是一种细胞生长和代谢的重要调节剂, 有证据表明, 己糖胺生物合成通道对葡萄糖的摄入、糖原的合成、糖原酵解及生长因子等方面的调节起重要作用, 过量的己糖胺通量(flux)会引起胰岛素阻. 因此, 通过测定中间产物 UDP-Sugars 的变化, 对阐明糖尿病的发病机理有重要作用.

表 2　成纤维细胞中 UDP-Sugars 用 CE 分析的再现性[a)]

化合物	时间/ min	SD_1	CV_1/ %	R_{area}	SD_2	CV_2/ %
Br^8G	8. 93	0. 29	3. 23	1		
UDP-GluNac	12. 90	0. 66	5. 13	1. 48	0. 238	16. 09
UDP-GalNac	13. 32	0. 71	5. 36	0. 58	0. 085	14. 77
UDP-Glu	13. 42	0. 74	5. 51	0. 29	0. 033	11. 37
UDP-Gal	13. 88	0. 78	5. 59	0. 14	0. 035	25. 42

a) 9 个相同的样品, 每个含 10^6 个细胞, 用乙腈和 Trixton X-100 脱蛋白, 清液用 CE 分析. 其他同表 1

图 3 给出了肾小球细胞中 UDP-Sugars 和其他核苷酸采用本方法分离的典型谱图. 由图 3 可知, 不但此方法可用于分离 UDP-Sugars, 而且可将其他核苷酸较好地分离. 对后者的最小检测浓度为 0. 1~ 0. 5 μmol/ L. 满足细胞代谢产物分析的需要.

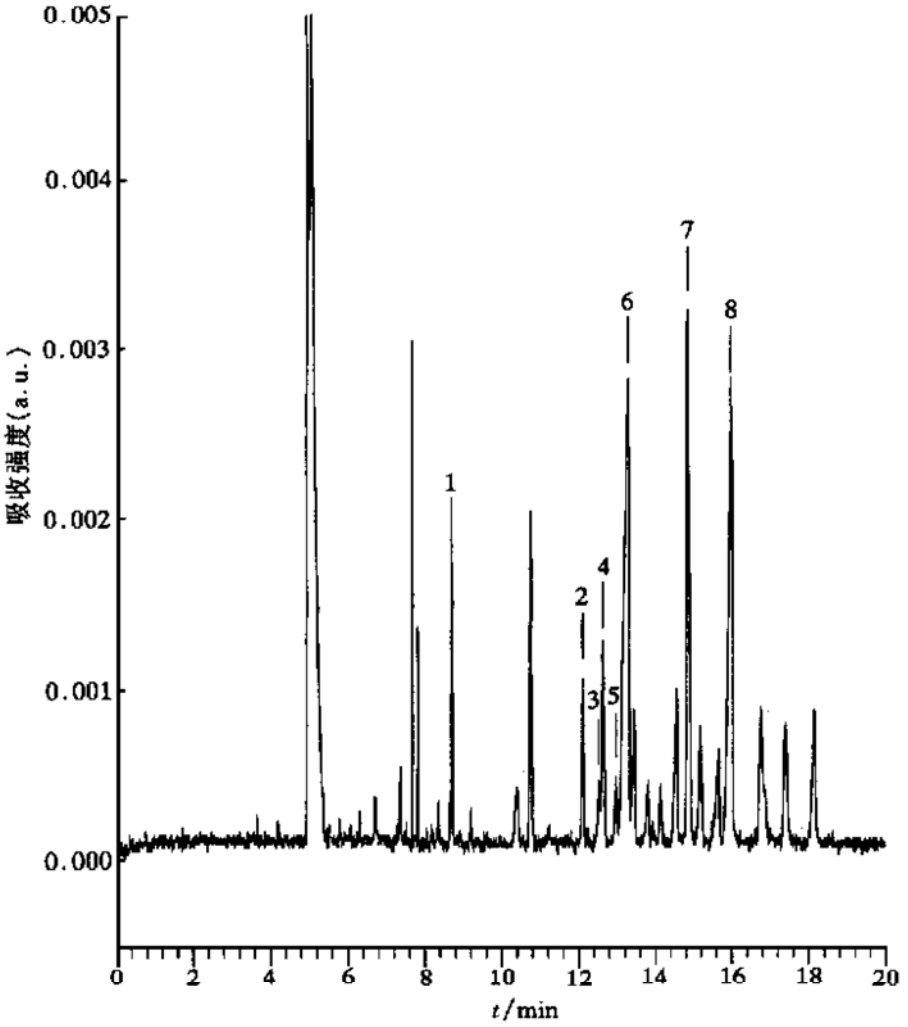


图 3　肾小球细胞中 UDP-Sugars 和重要的核苷酸的 CE 分离

2×10^6 个细胞用乙腈和 Trixton x-100 脱蛋白, 然后直接用 CZE 分析, 进样方式: 重力进样(150mm 进样头高度, 25s) ; 峰: 6 ——ATP, 7 ——AMP, 8 ——ADP. 其他见图 2

将 2×10^6 个肾小球细胞在 10 mmol/ L 葡萄糖、30 mmol/ L 葡萄糖或 10 mmol/ L 葡萄糖+ 1 mmol/ L 葡糖胺中培养 2~ 47 h, 收获的细胞再用 CE 分析. 用 10 mmol/ L 葡萄糖和 30 mmol/ L 葡萄糖培养细胞时, UDP_Sugars 的浓度基本类似. 当在培养液中加入葡糖胺时(图 4) , 在不同的培养时间, UDP_GalNac 和 UDP_Glu 的浓度均增加 5~ 10 倍. 与此相反, UDP_Glu 和 UDP_Gal 的浓度则下降. Krug 等人[2] 在研究结肠癌细胞时, 使用 2. 5 mmol/ L D_葡糖胺来培养细胞, 取

得的结果也类似. UDP_HexNac 的积累与 UTP, CTP, UDP-Gal, UDP_Glu 的浓度的下降有关.

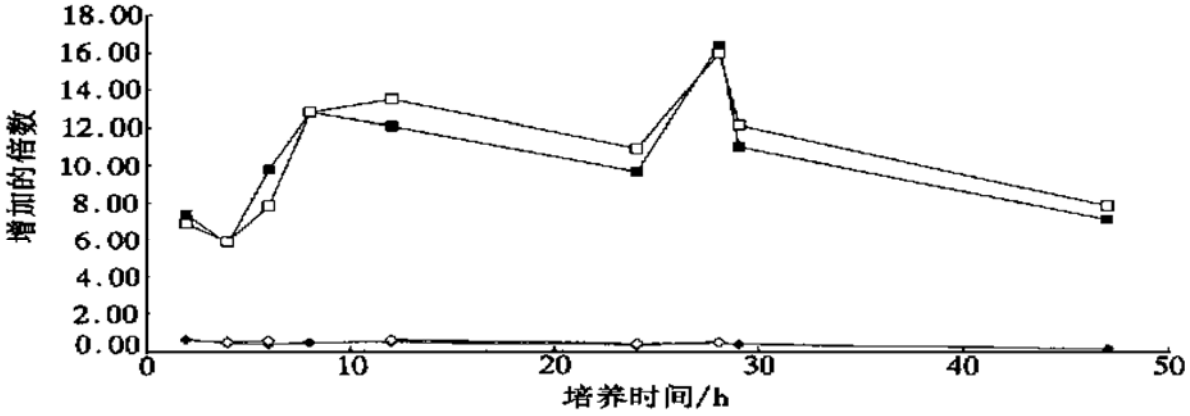


图 4 肾小球细胞在不同培养条件下, UDP_Sugars 浓度的变化

增加的倍数为培养液 C 中某一 UDP_Sugars 浓度/ 培养液 A 中某一 UDP_Sugars 浓度. ■——UDP_GluNac, □——UDP_GalNac, ◆——UDP_Glu, ◇——UDP_Gal

腺苷能量存储系统可由下面几式表达[17]:

$$AMP + 2Pi \Leftrightarrow ATP + 2H_2O \quad (1)$$

$$2ADP + 2Pi \Leftrightarrow 2ATP + 2H_2O \quad (2)$$

$$ATP + AMP \Leftrightarrow 2ADP \quad (3)$$

(3) 式描述了由腺苷酸激酶催化的反应, (2) 式则表达了 ATP 由电子转移磷腺化的再生或 ATP 在代谢中的利用. (1) 式代表了(2) 和(3) 式的总和. 腺苷系统的能荷(EC) 可由下式给出:

$$EC = \frac{ATP + 0.5ADP}{ATP + ADP + AMP}. \quad (4)$$

不难明白, 知道 ATP, ADP 和 AMP 的浓度, 即可知道细胞的能荷. 图 5 比较了 3 种培养液中肾小球细胞在不同培养时间下的能荷变化. 由此可知, 10 mmol/ L 葡萄糖与 30 mmol/ L 葡萄糖培养液相比, 后者的能荷略小于前者. 在培养液中加入葡糖胺对能荷影响不大. 从总的趋势来看, 随培养时间的增加, 细胞能量在下降, 可能与细胞的不断代谢和老化有关.

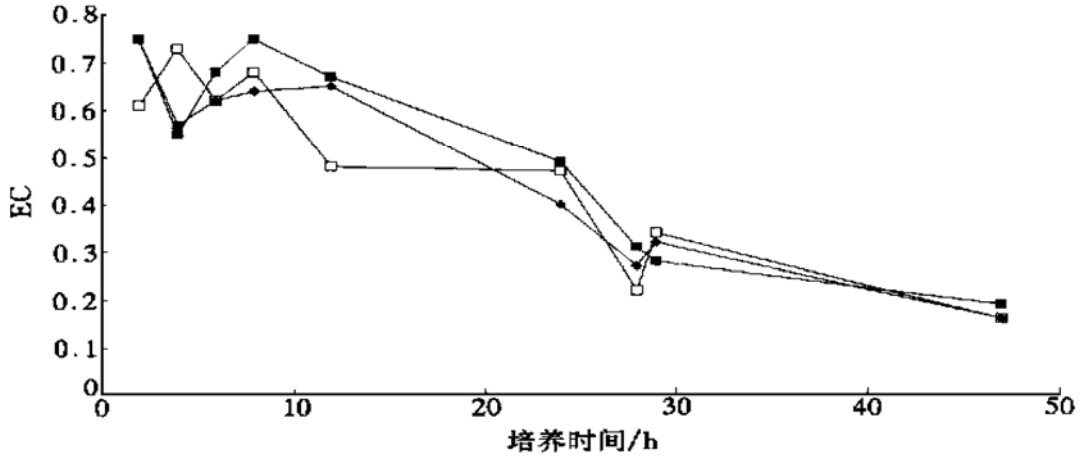


图 5 肾小球细胞在 3 种不同培养液中于不同的时间下能荷(EC) 的变化

■——10 mmol/ L 葡萄糖, □——30 mmol/ L 葡萄糖, ◆——10 mmol/ L 葡萄糖+ 1 mmol/ L 葡糖胺

3　结论

本文建立了一个用于细胞代谢产物 UDP-Sugars 分析的高效毛细管区带电泳方法，不仅在 15 min 内全分离 4 个关键的 UDP-Sugars，而且可用于测量细胞的能荷；样品的预处理采用乙腈或乙腈与 Trixton X-100 (2∶1) 的混合液一步完成，回收率在 92% ~ 108%，简单方便. 分析淋巴细胞、成纤维细胞及肾小球细胞，表明本方法适合于临床、小体积的细胞样品代谢物中 UDP-Sugars 的分析.

参　考　文　献

1　McClain D A, Crook E D. Hexosamines and insulin resistance. Diabetes, 1996, 45: 1003

2　Krug E, Zweibaum A, Schulz-holstege C, et al. D-Glucosamine-induced changes in nucleotide metabolism and growth of coloncarcinoma cells in culture. Biochem J, 1984, 217: 701

3　Borzi R M, Dal Monte P, Uguccioni M, et al. Intracellular nucleotides of lymphocytes and granulocytes from normal ageing subjects. Mech Ageing Dev, 1992, 64: 1

4　Palmieri M J, Berry G T, Player D A, et al. The concentration of red blood cell UDPGlucose and UDPGalactose determined by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem, 1991, 194: 388

5　Berry G T, Palmieri M J, Heales S, et al. Red blood cell uridine sugar nucleotide levels in patients with classic galactosemia and other metabolic disorders. Metabolism, 1992, 41: 783

6　Hull S R, Montgomery R. Separation and analysis of 4′-epimeric UDP-sugars, nucleotides, and sugar phosphates by anion-exchange high-performance liquid chromatography with conductimetric detection. Anal Biochem, 1994, 222: 49

7　Sweeney C, Mackintosh D, Mason R M. UDP-sugar metabolism in Swarm rat chondrosarcoma chondrocytes. Biochem J, 1993, 290: 563

8　Wehrli S L, Palmieri M J, Berry G T, et al. 31P NMR analysis of red blood cell UDPGlucose and UDPGalactose: Comparison with HPLC and enzymatic methods. Anal Biochem, 1992, 202: 105

9　Wice B M, Trugnan G, Pinto M, et al. The intracellular accumulation of UPD-N-acetylhexosamines is concomitant with the inability of human colon cancer cells to differentiate. J Biol Chem, 1985, 260: 139

10　Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest, 1969, 21: 77

11　English D, Andersen B R. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradient of ficoll-hypaque. J Immunol Methods, 1974, 5: 249

12　Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, et al. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. J Clin Invest, 1998, 101: 160

13　Xu Guowang, Lehmann R, Schleicher E, et al. Advantages in the analysis of UDP-Sugars by capillary electrophoresis-comparison of the conventional HPLC method with two new capillary electrophoretic micro-procedures. Biomed Chromatogr, 1998, 12: 113

14　Dike de K, Willem A H, Albert H van G, et al, Nucleotide profiles of normal human blood cells determined by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem, 1985, 147: 197

15　John H, Anna H J K, Gustav G. Comparison of sample preparation methods for the high-performance liquid chromatographic analysis of cell culture extracts for triphosphate ribonucleosides and deoxyribonucleosides. Anal Biochem, 1987, 161: 26

16　Shihabi Z K. Sample stacking by acetonitrile-salt mixtures. J Cap Elec, 1995, 2: 267

17　Diniel E A. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. Biochem, 1968, 7: 4 030