

HPLC 法测定 2 型糖尿病患者血清中磷脂含量的变化

吴越, 朱敬丽, 姚建, 路赵硕, 王德才

哈尔滨医科大学公共卫生学院营养与食品卫生教研室, 黑龙江 哈尔滨 150086

摘要: **目的** 用高效液相色谱法测定 2 型糖尿病患者血清中五种磷脂含量的变化。 **方法** 取 70 例 2 型糖尿病患者血清, 81 例正常对照组人群血清; 采用正向高效液相色谱法测定血清中的磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、神经鞘磷脂(SM)的含量, 并做对比研究。 **结果** 2 型糖尿病患者体内 PS [(0.139±0.031) mg/L vs. (0.154±0.029) mg/L]、PI [(0.021±0.016) mg/L vs. (0.027±0.017) mg/L]、PC [(0.150±0.039) mg/L vs. (0.385±0.022) mg/L]、PE [(0.070±0.026) mg/L vs. (0.087±0.044) mg/L] 含量均低于正常人, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$), SM 含量 [(0.039±0.026) mg/L vs. (0.044±0.028) mg/L] 与正常人比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。 **结论** 2 型糖尿病患者血清中 PS、PI、PC、PE 含量呈现下降趋势, 提示这四种指标对糖尿病患者在正常人群中的筛查起到了辅助性作用。

关键词: 2 型糖尿病; 高效液相色谱; 磷脂

中图分类号: R331 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2017)05-0533-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.05.006

Changes of serum phosphatide contents in patients with type 2 diabetes mellitus determined by high performance liquid chromatography

WU Yue, ZHU Jing-li, YAO Jian, LU Zhao-shuo, WANG De-cai

Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150086, China

Corresponding author: WANG De-cai, E-mail: decaiwang@live.cn

Abstract: **Objective** To determine the changes of serum contents of five phosphatides in patients with type 2 diabetes mellitus using high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Serum samples were collected from 70 patients with type 2 diabetes mellitus and 81 normal controls for determination of phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) and sphingomyelin (SM) by HPLC, and for comparison between the two groups.

Results The serum contents of PS ((0.139±0.031) mg/L vs. (0.154±0.029) mg/L), PI ((0.021±0.016) mg/L vs. (0.027±0.017) mg/L), PC ((0.150±0.039) mg/L vs. (0.385±0.022) mg/L) and PE ((0.070±0.026) mg/L vs. (0.087±0.044) mg/L) were lower in the patients with type 2 diabetes mellitus than in the normal controls, with statistically significant differences (all $P < 0.05$). No statistically significant difference was discovered in the serum content of SM ((0.039±0.026) mg/L vs. (0.044±0.028) mg/L) between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusions** Serum PS, PI, PC and PE decline in the patients with type 2 diabetes mellitus, and they may play adjuvant roles in the screening of diabetes mellitus among normal population.

Key words: type 2 diabetes mellitus; high performance liquid chromatography; phosphatide

随着人们生活质量的提高, 有许多疾病, 例如: 高血压、高血脂、糖尿病等正威胁到人体的健康。其中关于糖尿病, 国际糖尿病联盟 (IDF) 数据报告, 2014 年全球有糖尿病患者 3.87 亿人, 并预计 20 年后将增长 55%, 达到 6 亿^[1]。糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是胰岛素分泌缺陷及 (或) 其生物效应降低导致作用障碍引起的以高血糖为特征的慢性、全身性代谢性疾病。它被称为三大慢性非传染性疾病之一, 继肿瘤和心血

管疾病后居第三位^[2-3]。其主要分为两种类型: 1 型糖尿病和 2 型糖尿病。1 型糖尿病也称胰岛素依赖型糖尿病, 占糖尿病患者的比例较小, 大约 10%, 其他病例大多数以 2 型糖尿病即非胰岛素依赖型糖尿病存在^[4]。2 型糖尿病的病因并不是十分明确, 通常认为老龄化, 现代的生活方式 (饮食油腻、运动较少) 和肥胖是其中的因素。

众所周知, 人体内磷脂是维持人体生命活动的基本物质, 有降低血脂和胆固醇, 提高机体免疫力的作用, 存在于多种细胞及血液中。并有相关文献提出糖尿病患者会引起红细胞膜中磷脂酰胆碱的代谢紊乱^[5]、糖尿病患者的微血管改变会引起红细胞膜中磷

基金项目: 国家自然科学基金 (81273193)

作者简介: 吴越 (1990-), 女, 黑龙江人, 硕士, 研究方向: 人群体内磷脂变化研究。

通信作者: 王德才, E-mail: decaiwang@live.cn。

脂改变^[6-7]。本文旨在研究 2 型糖尿病患者体内血清中五种磷脂:磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、神经鞘磷脂(SM)含量的变化,根据相关文献^[13-14]对血清中磷脂测定的方法学研究,本实验采用高效液相色谱法进行测定,为临床上早期检测糖尿病提供理论依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

1.1.1 2 型糖尿病组 在哈尔滨市第一、三福利院人群中选具有五年以上糖尿病病史,并排除 1 型糖尿病、妊娠糖尿病和特殊类型糖尿病者,并根据 WHO 鉴定 2 型糖尿病标准之一:空腹血浆葡萄糖(FPG)水平 ≥ 7.0 mmol/L 的 2 型糖尿病患者人群共计 70 人。

1.1.2 正常对照组 在与病例组相同的社区和福利院人群中,选出健康人群:FPG<6.1 mmol/L,且葡萄糖耐量实验正常。人数共计 81 人。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 高效液相色谱(Agilent 1260)(美国 Agilent 公司);XBP-Silica (4.6 mm * 250 mm,5 μ m);-80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱(U410);高速冷冻离心机(TGL16);漩涡混合器(XK96-A);纯水化制备系统(MILLI-Q);超声清洗仪;分析天平(AR1140)。

1.2.2 试剂 磷脂酰丝氨酸(PS 90%)、磷脂酰胆碱(PC 98%)、磷脂酰肌醇(PI 98%)、磷脂酰乙醇胺(PE 98%)和神经鞘磷脂(SM 98%)标准品(宜昌安途商贸

有限公司);乙腈、甲醇、85%磷酸、正己烷、异丙醇和三氯甲烷均为色谱纯;0.95%NaCl 溶液。提取液:氯仿:甲醇=2:1(v/v)。洗液:氯仿:甲醇:水=8:4:3(v/v)。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件 流动相:乙腈:甲醇:85%磷酸=100:10:1.8(v/v);色谱分析柱以 XBP-Silica (4.6 mm * 250 mm,5 μ m);流动相检测波长为 203 nm;进样量 10 μ l;柱温 25 $^{\circ}$ C;流速 1.5 μ l/min。

1.3.2 溶液制备 取 PS、PI、PC、PE、SM 的标准品配置成混标溶液,其浓度分别为:100、6.4、460、200、200 μ g/ml。再加正己烷:异丙醇=3:1(v/v),定容,配制标准系列溶液。

1.3.3 样品的提取 参照改良 Folch 法^[8]提取样品:取血清样品 0.1 ml,加入 0.1 ml 氯仿-甲醇提取液,冰浴匀浆 3 min。再加入提取液 4 ml,于 30 $^{\circ}$ C 保温 30 min,以 3 000 r/min 离心 5 min,取下层液过滤除蛋白。向滤液加 0.9%NaCl 0.4 ml,振摇 1 min,以 3 000 r/min 离心 5 min,弃上层液。加上层洗液(1.2.2 中洗液通过配比,振摇,静止后分层,上层溶液即为上层洗液),0.4 ml 洗管壁,后溶液以 3 000 r/min 离心 5 min,弃上层液,氮气吹干,加提取液 0.5 ml 溶解。

1.3.4 方法评估

1.3.4.1 标准品及样品的峰形图 按照 1.3.1 的色谱条件来测出混合标准溶液和其中一个样品的出峰情况,见图 1、图 2。

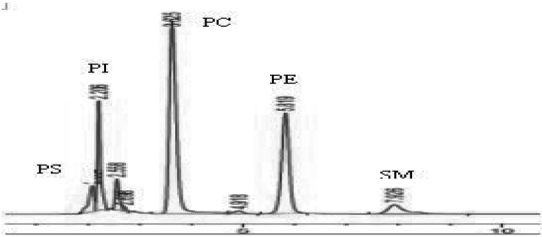


图 1 混合标准溶液的 HPLC 峰形图

横轴表示出峰时间,纵轴表示峰高,由图可见此分离磷脂方法较好。

表 1 五种磷脂的线性回归及检出限和定量

磷脂	线性范围 (mg/ml)	线性回 归方程	相关系数 <i>r</i>	检出限 (mg/ml)	定量限 (mg/ml)
PS	0.02~0.20	$Y=0.32574X-47.449$	0.9992	0.060	0.20
PI	0.01~0.03	$Y=0.03929X-0.0364$	0.9954	0.018	0.06
PC	0.023~0.46	$Y=0.54439X-51.563$	0.9949	0.012	0.04
PE	0.02~0.20	$Y=0.12939X-16.087$	0.9969	0.015	0.05
SM	0.02~0.20	$Y=0.30232X-2.1032$	0.9963	0.015	0.05

1.3.4.2 五种磷脂对应的线性关系 取 1.3.2 中 PS、PI、PC、PE、SM 标准品配置成的混标溶液(其浓度

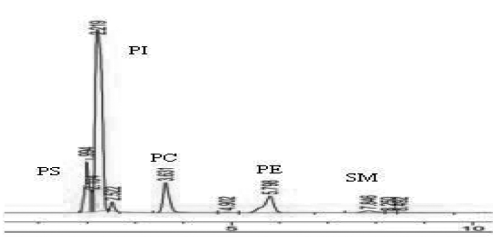


图 2 样品的 HPLC 峰形图

分别为:100、6.4、460、200、200 μ g/ml),分别稀释成不同倍数,获得其他三种混合溶液,用以上 HPLC 的方法测得结果以峰面积(S)对磷脂浓度(mg/ml)绘制标准曲线,见表 1。

表 2 五种磷脂的精密度

磷脂	日内变异 RSD(%)	日间变异 RSD(%)
PS	3.51	3.85
PI	5.19	5.80
PC	4.36	4.82
PE	2.93	3.54
SM	4.26	5.90

1.3.4.3 五种磷脂的精密度 取 1.3.4.2 中五种磷脂(PS、PI、PC、PE、SM)的标准混合溶液配置成三个

浓度梯度(高、中、低)的混合溶液。每个混合溶液根据 HPLC 实验条件进针 5 次,并连续进样 6 d,计算日内变异系数和日间变异系数。见表 2。

表 3 五种磷脂的加标回收率(%)

磷脂	高浓度	中浓度	低浓度	平均
PS	90.05	97.92	88.13	88.71
PI	90.17	86.15	86.57	87.63
PC	89.06	90.12	94.03	91.07
PE	100.02	96.37	97.76	98.05
SM	98.09	86.04	87.43	90.52

1.3.4.4 五种磷脂测定的准确度确定 一般采用加标回收率的计算来确定,精密取得已知磷脂含量的血清样品,并分为三份,每份分别加入不同浓度的混合标准品溶液(高、中、低)三个浓度,按照 1.3.1 的色谱条件进行分析,所得结果进行整理,最后算出五种磷脂的平均回收率均在 100%之间^[9],证明此实验方法准确度

表 4 II 型糖尿病患者与正常人群血清中各磷脂含量比较(mg/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	PS	PI	PC	PE	SM
病例组	70	0.139±0.031	0.021±0.016	0.150±0.039	0.070±0.026	0.039±0.026
正常组	81	0.154±0.029	0.027±0.017	0.385±0.022	0.087±0.044	0.044±0.028
t 值		3.01	2.28	7.51	2.91	1.17
P 值		0.0031	0.0240	0.0001	0.0041	0.5049

3 讨 论

目前糖尿病作为慢性代谢性疾病,正严重的威胁着人们的健康,然而对其机制的研究并不成熟。随着国内外学者对磷脂的探究热度的提升,已把其二者关系的研究作为一个侧重点。有相关文献表明^[8,10]:胰岛素耐受或糖耐受个体中,其血清磷脂的含量具有一定的变化。磷脂的测定有许多方法,如薄层层吸法、分光光度法、气相色谱-质谱联用方法等。这些方法在测定磷脂种类的时候局限性较高,并且有的重复性差,以致于不能更好的说明该实验。近年来,高效液相色谱法对细胞膜磷脂的测定已取代传统方法^[11-12],并且对于原发性高血压^[13]、不稳定型心绞痛患者^[14]等血清中的部分磷脂测定也越加的成熟,因此本实验借鉴以上测定方法,采用正向高效液相色谱法(PP-HPLC)来测定血清中 PS、PI、PC、PE、SM 这五种磷脂的含量,以此来对比 2 型糖尿病患者与正常人群血清中这五种磷脂的含量。本实验准确、精密度好,且具有良好的线性关系,能够较好的分析五种磷脂在血清中的含量变化。

实验中糖尿病患者血清中磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)的含量均呈现下降的趋势,提示这四种磷脂在糖尿病患者发病期间可起到辅助性诊断作用,但是否可以通过提高其四种磷脂在血清中的含量来预防糖尿病的发生仍需要进一步研究。

良好,结果见表 3。

1.4 统计学处理 数据采用软件 SAS 9.4 进行统计分析,满足正态分布的计量资料采用两独立样本 t 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2 型糖尿病组患者人群共计 70 人,其中男 35 人(占 50.0%),女 35 人(占 50.0%),平均年龄(67.83±10.31)岁。正常对照组人数共计 81 人,其中男 38 人(占 46.91%),女 43 人(占 53.09%),平均年龄(68.58±9.05)岁。两组男女构成比、平均年龄差异无统计学意义($P<0.05$)。

由表 4 和图 2 可见,PS、PI、PC、PE 在糖尿病组中血清中的含量均小于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),SM 差异无统计学意义($P>0.05$)。

参考文献

[1] International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas sixth edition poster update 2014[EB/OL]. (2014-11-10) [2016-6-25]. <http://www.idf.org/diabetesatlas/update-2014>.

[2] 王克安,李天麟,向红丁,等. 中国糖尿病流行特点研究-糖尿病和糖耐量低减患病率调查[J]. 中华流行病学杂志,1998,19(5):282-285.

[3] WHO Technical Report Series NO. 844. Preventionwe of diabetes mellitus Report of a WHO Study Group[R]. Geneva:World Health Organization, 2004.

[4] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus[J]. Diabetes care, 2012, 35(Supple 1):S64-S71.

[5] 廖国玲,王玉华,杨凤琴,等. 糖尿病患者红细胞膜磷脂酰胆碱与临床生化指标分析[J]. 检验医学,2010,8(8):592-595.

[6] Setter SM, Campbell RK, Cahoon CJ. Biochemical pathways for microvascular complications of diabetes mellitus[J]. Ann Pharmacother, 2003, 37(12):1858-1866.

[7] 唐霓,唐显玲. 糖尿病血液流变学改变与微血管疾病变关系的研究进展[J]. 微循环学杂志,2007,17(1):60-61.

[8] Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues[J]. J Biol Chem, 1957, 226(1):497-509.

[9] 张文利,杜军文. 正确设计回收率实验,科学判断分析方法的准确度[J]. 光谱仪器与分析,1998,2(1):46-49.

[10] Zhao X, Fritsche J, Wang J, et al. Metabonomic fingerprints of fasting plasma and spot urine reveal human pre-diabetic metabolic traits[J]. Metabolomics, 2010, 6(3):362-374.

[11] 崔莹. 磷脂的高效液相色谱分析[J]. 福建分析测试,2007,16(1):71-74.

[12] Caimi G, Presti RL, Montana M, et al. Membrane fluidity, membrane lipid pattern, and cytosolic Ca²⁺ content in platelets from a group of type II diabetic patients with macrovascular complications[J]. Diabetes care, 1995, 18(1):60-63.

[13] 魏晓真,胡婷婷,吕凤英,等. 原发性高血压病患者血清磷脂变化的临床意义[J]. 中原医刊,2003,30(1):4-5.

[14] 魏晓真,胡婷婷,吕凤英,等. 不稳定型心绞痛急性心肌梗死患者血清磷脂变化的临床意义[J]. 中国急救医学,2003,23(5):304-306.