

• 短篇论著 •

LC-MS/MS 定量检测小鼠尿液 RNA 氧化标志物 8-oxoGsn^{*}蔡玉莹^{1,2}, 殷继明^{1,2}, 高玉雪^{1,2}, 杨鹏翔^{1,2}, 关媛月^{1,2}, 陈德喜^{1,2△}

1. 首都医科大学附属北京佑安医院, 北京 100069; 2. 北京肝病研究所, 北京 100069

摘要: 目的 建立快速高效的液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)用于测定小鼠尿液中 RNA 氧化标志物 8-氧化鸟苷(8-oxoGsn)水平。方法 小鼠尿液 37 °C 孵育离心后, 用 70% 甲醇溶液(含 30% 10 mmol/L 醋酸铵)1:10 稀释尿液上清, 加入同位素内标 [¹³C, ¹⁵N₂] 8-oxoGsn, 用 Agilent ZORBOX SB-Aq 色谱柱(100 mm × 3 mm, 1.8 μm)分离, 以含 0.1% 甲酸的 10 mmol/L 醋酸铵水溶液及甲醇溶液为流动相梯度洗脱, 柱温 35 °C, 流速 0.3 mL/min, 进样量 5 μL, 电喷雾离子源正离子模式, 多反应监测。结果 8-oxoGsn 响应和水平的线性关系良好, R^2 为 0.996, 定量检测限为 0.25 ng/mL, 加标回收率 86.21%~112.56%, 基质效应为 -5.01%, 日内和日间变异系数分别为 3.38%~7.17%、2.74%~9.52%, 满足生物样品的分析要求; 小鼠尿液检测结果显示 C57 小鼠对乙酰氨基酚(APAP)处理组 8-oxoGsn 水平明显高于 C57 对照组($P < 0.01$); 乙型肝炎病毒转基因(HBV-Tg)小鼠 APAP 处理组 8-oxoGsn 水平明显高于 HBV-Tg 小鼠对照组($P < 0.001$)。结论 建立的 LC-MS/MS 灵敏度高, 准确可靠, 适用于小鼠尿液中 8-oxoGsn 水平的测定。

关键词: 液相色谱-串联质谱; 8-氧化鸟苷; RNA 氧化损伤; 小鼠尿液

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2024.01.021

文章编号: 1673-4130(2024)01-0109-04

中图法分类号: R446.1

文献标志码: A

活性氧簇(ROS)作为机体各系统和器官中氧化还原反应的中间代谢产物, 其产生和清除处于动态平衡, 但当机体受到有害因素刺激或处于病理状态时, ROS 水平增加, 体内氧化和抗氧化系统失衡^[1-2]。由于 RNA 分子大多是单链, 修复机制不完整, 更易受到氧化应激的影响^[3]。RNA 氧化损伤与多种疾病的发生密切相关^[4-11]。8-氧化鸟苷(8-oxoGsn)是常见的 RNA 氧化碱基, 是公认的定量氧化性 RNA 损伤的生物标志物^[12-15]。目前 8-oxoGsn 常用的检测方法包括酶联免疫吸附试验(ELISA)^[16]、电化学法(ECD)^[17]、气相色谱质谱法(GC-MS)^[18]、高效液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)^[19-20]。本研究建立了一种高灵敏度、高特异度的 LC-MS/MS, 用于定量检测小鼠尿液中的 8-oxoGsn, 以期为人尿液中 RNA 氧化损伤标志物检测方法的建立提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料来源 雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠、乙型肝炎病毒转基因(HBV-Tg)小鼠, 5~9 周龄, 体质量 24~30 g, 由北京维通达生物技术有限公司提供。所有小鼠严格遵守首都医科大学动物伦理和福利相关规定(伦理批件号: AEEI-2021-257)进行动物实验。

1.2 仪器与试剂 Agilent 6495 三重四极杆质谱、Agilent 1290 型超高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Centrifuge 5425R 型高速离心机(德国 Eppendorf 公司); BSA224S 型微量电子天平(德国 Sartori-

us 公司); XMTD-6000 电热恒温水浴锅(中国长风公司); MS3 digital 型涡旋混匀仪(德国 IKA 公司); 实验用水为 Milli-Q Advantage 纯水仪(美国 Millipore 公司)制备的超纯水(18.2 MΩ · cm); PB-10 酸度计(德国 Sartorius 公司); 8-oxoGsn、同位素内标 (IS) [¹³C, ¹⁵N₂] 8-oxoGsn(加拿大 TRC 公司); 甲醇(色谱纯, 美国 Thermo Fisher 公司); 甲酸、醋酸铵(美国 Sigma-Aldrich 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液配制 称取 8-oxoGsn 标准品, 用 50% 甲酸水溶解, 配制成质量浓度均为 1 mg /mL 的单标储备液。用纯水稀释配制成 7 个浓度的标准溶液及低、中、高 3 个浓度的质控溶液, 标准曲线浓度为 0.5、2.5、5.0、12.5、25.0、50.0、100.0 ng/mL。质控浓度为 2.5、12.5、100.0 ng/mL, IS 浓度为 100 ng/mL。

1.3.2 色谱条件 色谱柱: Agilent ZORBOX SB-Aq 色谱柱(100 mm × 3 mm, 1.8 μm), 流动相 A 相为 10 mmol/L 醋酸铵水溶液(含 0.1% 甲酸), B 相为纯甲醇; 梯度洗脱程序(7 min): 起始 10% B, 0~2 min 45% B; 2~5 min 95% B; 5~6 min 95% B 维持; 6~7 min 10% B, 流速为 0.3 mL/min, 柱温 35 °C, 自动进样器温度 4 °C, 进样器体积为 5 μL。

1.3.3 质谱条件 采用 Agilent 6495 三重四极杆质谱, 电喷雾电离(ESI)正离子模式, MRM, Nebulizer

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(82073676); 北京市属医学科研院所公益发展改革试点项目(京医研 2021-10)。

△ 通信作者, E-mail: dexichen@ccmu.edu.cn。

20 psi, Gas Flow 14 L/min, Sheath Gas Temp 250 °C, Sheath Gas Flow 11 L/min, Capillary 3 000 V, Nozzle Voltage 1 500 V。

1.3.4 尿液样本处理 将冻存的尿液在 37 °C 下孵育 5 min, 使其完全解冻, 4 °C 12 000×g 离心 5 min。取 20 μL 尿液上清液加入 180 μL 70% 甲醇溶液[含 70% 甲醇和 30% 10 mmol/L 醋酸铵(pH 3.7)的溶液]以获得(1:10)稀释尿液。混匀后加入 20 μL 浓度为 100 ng/mL 的 IS[¹³C, ¹⁵N]₂8-oxoGsn, 涡旋混匀 2 min, 4 °C 12 000×g 10 min 离心, 取 100 μL 上清液于内衬管中用于 LC-MS/MS 分析。

1.3.5 尿液样本处理 本实验使用 C57BL/6 小鼠、HBV-Tg 小鼠两组小鼠作为研究对象, 共计 20 只小鼠参与实验。其中, C57 小鼠分为两组, 每组 5 只, 1 组为对照组, 另 1 组注射对乙酰氨基酚(APAP); HBV-Tg 小鼠也分为两组, 每组 5 只, 1 组为对照组, 另 1 组注射 APAP。应用建立的方法对小鼠尿液样本中 8-oxoGsn 水平进行测定, 小鼠禁食 12 h 后, 腹腔注射 300 mg/kg 的 APAP, 用于构建 C57 小鼠和 HBV-Tg 小鼠的肝损伤模型, 6 h 后留取尿液。

1.3.6 质谱条件优化 使用 1 μg/mL 的标准品溶液, 流速 0.30 mL/min, 对 8-oxoGsn 的质谱参数进行优化。选择 ESI 源, 在 MRM 模式下对 8-oxoGsn、[¹³C, ¹⁵N]₂8-oxoGsn 的母离子、子离子及碰撞能量逐一优化。

1.3.7 色谱条件优化 本实验选用 Agilent ZOR-BOX SB-Aq 色谱柱(100 mm×3 mm, 1.8 μm), 对梯度和等度不同流动相体系优化。

1.3.8 标准曲线和检出限 连续稀释标准品, 在 0.5~100.0 ng/mL 浓度范围内构建 7 个校准点的标准曲线。以 8-oxoGsn 与 IS 的峰面积比值(即响应)为纵坐标, 以 8-oxoGsn 的浓度为横坐标作标准曲线, 通过调整加权因子 1/X 或 1/X²(X 是分析物的浓度)分析校准。

1.3.9 样品加标回收率 合并 3 个小鼠尿液样本混合均匀并分为两组。在测定该样品的同时, 取另一份加入 2.5、12.5、100.0 ng/mL 的标准品并进行测定, 每一浓度平行操作 6 份。加标回收率计算方法为 P=(加标试样测定值-试样测定值)/加标量×100%。

1.3.10 基质效应 IS 峰面积的相对变化归因于基质效应, 反映了尿液基质导致待测物提取损失和离子抑制。根据 6 份尿液样品中 IS 的平均峰面积与 6 份水样中标准品的平均峰面积之比计算基质效应, 计算公式为 (1-尿液中 IS 峰面积/水中 IS 峰面积)×100%。

1.3.11 精密度 通过重复测定低、中、高浓度的 3 份尿液样本中 8-oxoGsn 水平来确定精密度。每一样本平行操作 6 份, 1 d 内进样 6 次以获得日内检测结果, 3 d 重复进样获得日间检测结果, 并代入线性回归

方程计算浓度。精密度计算方法为变异系数(CV)=标准偏差(SD)/计算结果的算术平均值(X)×100%。

1.3.12 小鼠尿液样本检测 应用建立的方法对小鼠尿液样本中 8-oxoGsn 水平进行测定, 小鼠禁食 12 h 后, 腹腔注射 300 mg/kg 的对 APAP, 用于构建 C57 小鼠和 HBV-Tg 小鼠的肝损伤模型, 6 h 后留取尿液。

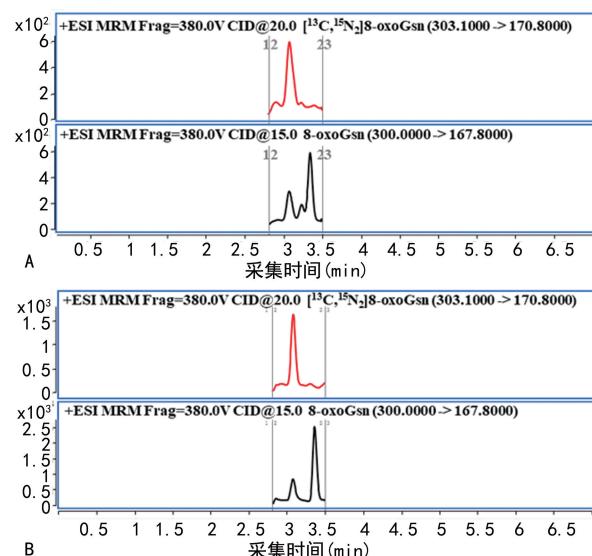
1.4 统计学处理 数据使用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析和制图。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用非配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 方法学的建立与优化

2.1.1 质谱条件优化 在 ESI 正离子模式下, 8-oxoGsn、[¹³C, ¹⁵N]₂8-oxoGsn 都可以获得强度较高的 [M+H]⁺ 准分子离子峰, 在二级质谱高碰撞能量下获得丰度较高的子离子。8-oxoGsn 以 300.0 m/z 为母离子, 以 167.8 m/z 为子离子, 这是核糖部分丢失, 或与 CO 一起丢失所致, 碰撞电压为 15 V; [¹³C, ¹⁵N]₂8-oxoGsn 以 303.0 m/z 为母离子, 以 170.8 m/z 为子离子, 碰撞电压为 20 V。

2.1.2 色谱条件优化 流动相 A 相为 10 mmol/L 醋酸铵水溶液(含 0.1% 甲酸, pH 3.7), B 相为纯甲醇, 采用梯度洗脱时, 检测物的峰形良好, 具有较高灵敏度, 见图 1。醋酸铵的加入极大地提高了离子响应, 本方法分析时间可以缩短到 7 min。



注: A 为甲醇-水溶液, B 为甲醇-10 mmol/L 醋酸铵水溶液(含 0.1% 甲酸, pH=3.7)。

图 1 8-oxoGsn, [¹³C, ¹⁵N]₂8-oxoGsn 的色谱图

2.2 方法学验证

2.2.1 标准曲线和检出限 在 0.5~100.0 ng/mL 浓度范围内 8-oxoGsn 相对响应和浓度的线性关系良好, 线性方程为 $Y = 0.008442X + 0.001668$, $R^2 = 0.9968$, 最佳加权因子为 $1/X^2$ 。以信噪比 S/N =

3:1 时对应的浓度确定本方法的检出限为 0.25 ng/mL。见图 2。

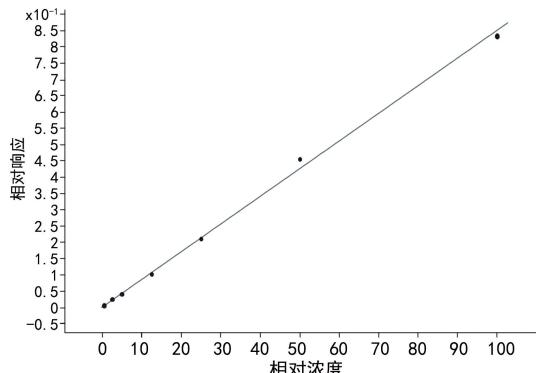


图 2 8-oxoGsn 的标准曲线

2.2.2 样品加标回收率 低、中、高浓度的加标回收率分别为 86.21%、112.56%、94.74%，满足生物样本的分析要求。

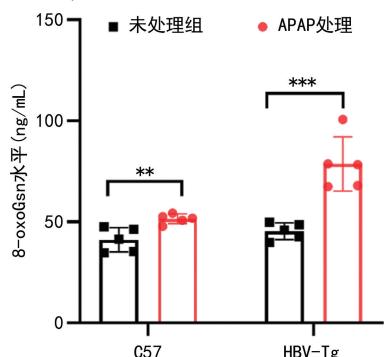
2.2.3 基质效应 尿液基质效应为 -5.01%。基质效应为负值, 说明被 8-oxoGsn 尿液基质中离子增强。

2.2.4 精密度 8-oxoGsn 的日内和日间 CV 分别为 3.38%~7.17%、2.74%~9.52%，见表 1。小鼠尿液样品中 8-oxoGsn 的精密度良好。表 1 结果符合生物样品测定要求, 均在可接受范围内。

表 1 小鼠尿液 8-oxoGsn 日内和日间精密度

样本	日内(n=6)		日间(n=6)	
	$\bar{x} \pm s$ (ng/mL)	CV (%)	$\bar{x} \pm s$ (ng/mL)	CV (%)
1	3.47±0.25	7.17	3.59±0.34	9.52
2	31.36±1.57	5.02	32.89±1.60	4.87
3	85.92±2.90	3.38	81.90±2.24	2.74

2.2.5 小鼠尿液样本检测 用 APAP 处理后, C57 小鼠 APAP 处理组 8-oxoGsn 水平 [(51.44±2.18) ng/mL], 明显高于 C57 小鼠未处理组 [(41.06±5.33) ng/mL] ($P<0.01$); HBV-Tg 小鼠 APAP 处理组 8-oxoGsn 水平 [(78.63±12.05) ng/mL] 明显高于 HBV-Tg 小鼠未处理组 [(45.34±3.70) ng/mL] ($P<0.001$), 见图 3。



注: C57 小鼠未处理组与 APAP 处理组比较, ** $P<0.01$; HBV-Tg 小鼠未处理组与 APAP 处理组比较, *** $P<0.001$ 。

3 讨 论

本研究基于靶向 LC-MS/MS 建立了小鼠尿液 8-oxoGsn 水平的检测方法, 并进行了方法学验证。使用 Agilent ZORBOX SB-Aq 色谱柱, ESI 离子源, 流动相中醋酸铵的加入, 在正离子 MRM 模式下提高了离子化效率, 改善了峰形。而过高的醋酸铵则会抑制目标物的离子化且损伤液相系统, 前期实验表明 10 mmol/L 醋酸铵效果最佳。使用 0.1% 甲酸将液相 pH 调节至 3.7, 以抑制溶质离子化, 获得对称的色谱峰。

已报道的 LC-MS/MS 大多使用固相萃取法^[21], 成本较高, 前处理操作烦琐, 检测时间 17 min。本实验采用稀释法, 检测时间只需 7 min, 简单快速, 基质效应良好。前期实验笔者比对了 5、10、20 倍等不同的稀释倍数, 结果显示, 样本 10 倍稀释时基质影响较低, 且有最好的信噪比。此外, 笔者对于样本处理时甲醇水的比例也进行了验证, 70% 甲醇 30% 10 mmol/L 醋酸铵(pH 3.7)的比例最合适, 提高了分离选择性, 醋酸铵的存在可保持一定的离子强度, 改善了 8-oxoGsn 峰形, 减少了谱带拖尾。图 1 结果显示, 在样本溶液中, 8-oxoGsn 及^{[13]C, ¹⁵N₂}8-oxoGsn 基线较稳定, 信噪比良好。由于尿液是内源性物质可能存在具有相似极性、质量和断裂模式的相关化合物, 经优化后样本中仍有与待测物相同的子母离子对, 但保留时间不同, 且基线完全分离, 不影响定量。

准确定量 8-oxoGsn 对进一步研究 RNA 氧化损伤具有重要意义。本研究采用 LC-MS/MS 检测了小鼠尿液 8-oxoGsn 水平, 结果显示, 正常的 C57 小鼠与 HBV-Tg 小鼠均有一定程度的氧化损伤, 这符合 AMES 等^[22]的研究结果, 即生物体具备完善的氧化修复机制也会有少量的损伤的碱基, 且因为得不到充分的修复而发生损伤的积累。正常的 C57 小鼠与 HBV-Tg 小鼠的 8-oxoGsn 水平无明显差异, 可能是因为 HBV-Tg 小鼠为转基因鼠, 血清中乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)呈阳性但无 HBV DNA 复制, 因此氧化损伤程度相似。而高浓度 APAP 处理后, C57 与 HBV-Tg 小鼠相比于未处理组 8-oxoGsn 水平上升, 这提示尿液中 RNA 氧化损伤的生物标志物 8-oxoGsn 在临幊上将很可能被广泛用于评估各种疾病的风险、诊断和预测治疗效果。

本方法操作简单、分析速度快、灵敏度高, 为进一步研究各种疾病背景下 RNA 氧化损伤创造了条件, 为人的尿液 RNA 损伤标志物的检测提供了方法参考。

参考文献

[1] LI S, TAN H Y, WANG N, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(11):26087-26124.

图 3 LC-MS/MS 检测小鼠尿液中 8-oxoGsn 水平

[2] HE F, ZUO L. Redox roles of reactive oxygen species in cardiovascular diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(11): 27770-27780.

[3] RADAK Z, BOLDOGH I. 8-Oxo-7, 8-dihydroguanine: links to gene expression, aging, and defense against oxidative stress[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(4): 587-596.

[4] YANG K, ZENG L, GE A, et al. A systematic review of the research progress of non-coding RNA in neuroinflammation and immune regulation in cerebral infarction/ischemia-reperfusion injury[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 930171.

[5] GALLENGA C E, LONARDI M, PACETTI S, et al. Molecular mechanisms related to oxidative stress in retinitis pigmentosa[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(6): 848.

[6] CARDIN R, PICIOCCHI M, BORTOLAMI M, et al. Oxidative damage in the progression of chronic liver disease to hepatocellular carcinoma: an intricate pathway [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(12): 3078-3086.

[7] WANG X, ZHOU Y, GAO Q, et al. The role of exosomal microRNAs and oxidative stress in neurodegenerative diseases[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 3232869.

[8] SENONER T, DICHTL W. Oxidative stress in cardiovascular diseases: still a therapeutic target? [J]. *Nutrients*, 2019, 11(9): 2090.

[9] CHEN X, YU H, LI Z, et al. Oxidative RNA damage in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes[J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 725919.

[10] SOSA V, MOLINE T, SOMOZA R, et al. Oxidative stress and cancer: an overview[J]. *Ag Res Rev*, 2013, 12(1): 376-390.

[11] HEMAGIRRI M, SASIDHARAN S. Biology of aging: oxidative stress and RNA oxidation[J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(6): 5089-5105.

[12] ISHII T, SEKIGUCHI M. Two ways of escaping from oxidative RNA damage: selective degradation and cell death[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2019, 81: 102666.

[13] POULSEN H E, NADAL L L, BROEDBAEK K, et al. Detection and interpretation of 8-oxodG and 8-oxoGua in urine, plasma, and cerebrospinal fluid[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(2): 801-808.

[14] TRANFO G, PACI E, CARRIERI M, et al. Levels of urinary biomarkers of oxidatively generated damage to DNA and RNA in different groups of workers compared to general population[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2019, 16(16): 2995.

[15] MALAYAPPAN B, GARRETT T J, SEGAL M, et al. Urinary analysis of 8-oxoguanine, 8-oxoguanosine, fapyguanine and 8-oxo-2'-deoxyguanosine by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry as a measure of oxidative stress[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1167(1): 54-62.

[16] SCHOTTKER B, LARSEN E L, WEIMANN A, et al. Associations of urinary metabolites of oxidized DNA and RNA with the incidence of diabetes mellitus using UPLC-MS/MS and ELISA methods [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 183: 51-59.

[17] CHIORCEA-PAQUIM A M. 8-oxoguanine and 8-oxodeoxyguanosine biomarkers of oxidative DNA damage: a review on HPLC-ECD determination[J]. *Molecules*, 2022, 27(5): 1620.

[18] LIN H S, JENNER A M, ONG C N, et al. A high-throughput and sensitive methodology for the quantification of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: measurement with gas chromatography-mass spectrometry after single solid-phase extraction[J]. *Biochemical J*, 2004, 380(2): 541-548.

[19] CHAO M R, EVANS M D, HU C W, et al. Biomarkers of nucleic acid oxidation-a summary state-of-the-art [J]. *Redox Biol*, 2021, 42: 101872.

[20] WEIMANN A, SIMONSEN A H, POULSEN H E. Measurement of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine and 8-oxo-7, 8-dihydro-guanosine in cerebrospinal fluid by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1073: 110-117.

[21] SHIH Y M, COOKE M S, PAN C H, et al. Clinical relevance of guanine-derived urinary biomarkers of oxidative stress, determined by LC-MS/MS[J]. *Redox Biol*, 2019, 20: 556-65.

[22] AMES B N, SHIGENAGA M K, HAGEN T M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(17): 7915-7922.

(收稿日期:2023-03-10 修回日期:2023-08-11)