论著

文章编号:1000-5404(2006)12-1290-02

小鼠急性脑损伤后微量脑脊液谷氨酸浓度的测定

李 玮[1],安建宏[1],朱佩芳[2],熊仁平[1],周元国[1] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]第七室研究室,[2]第四室研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 建立急性脑损伤后微量脑脊液谷氨酸浓度测定方法。**方法** 采用邻苯二甲醛柱前衍生,梯度高效液相色谱荧光检测法测定急性脑损伤小鼠脑脊液中谷氨酸(glutamate, GLu)含量。**结果** 谷氨酸的平均加样回收率为84.26%~125.6%($n=3$),日内相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)均小于4.94%($n=3$),日间相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)均小于0.78%($n=3$)。急性脑损伤后6 h小鼠脑脊液谷氨酸含量相对于假手术组有明显升高($P<0.01$)。**结论** 本方法准确、快速,可用于微量脑脊液谷氨酸含量的测定。

关键词: 急性脑损伤;微量;脑脊液;谷氨酸

中图法分类号: R341.7;R446.14;R651.150.4 **文献标识码:** A

Determination of glutamate in microamount cerebrospinal fluid after acute brain injury in mice

LI Wei[1], AN Jian-hong[1], ZHU Pei-fang[2], XIONG Ren-ping[1], ZHOU Yuan-guo[1] (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, [1]Department 7, [2]Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, China)

Abstract: Objective To establish a method for determining glutamate concentration in microamount cerebrospinal fluid after acute cerebral insult. Methods The concentration of glutamate in cerebrospinal fluid was measured in mice after acute cerebral insult by precolumn derivatization with O-phthaldehyde. Results The average recovery of glutamate was 84.26% to 125.6% ($n=3$), the relative standard deviation (RSD) in one day and three days was respectively less than 4.94% ($n=3$), 0.78% ($n=3$). The concentration of glutamate in cerebrospinal fluid of mice 6 h after acute cerebral insult was significantly higher than that of sham operation mice ($P<0.01$). Conclusion This method is accurate and rapid. The glutamate concentation in microamount cerebrospinal fluid can be determined.

Key words: acute cerebral insult; microamount; cerebrospinal fluid; glutamate

谷氨酸是大脑内主要兴奋性神经递质,脑损伤后会大幅度升高,并导致神经元兴奋性毒性损伤[1,2]。在脑脊液和细胞外液之间,谷氨酸等亲水性小的分子物质可自由双向扩散,因此,脑脊液中谷氨酸含量也能间接反应细胞外液中的含量[3]。脑脊液中谷氨酸含量的检测方法有很多,但是如何检测容量不足10 μl的小鼠脑脊液中的谷氨酸含量,还少见报道。根据实验的需要,我们用梯度高效液相色谱结合荧光检测对此进行了探索,取得了较好的效果。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30328015)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30328015)

作者简介: 李 玮(1975-),女,河北省蠡州市人,博士研究生,主要从事腺苷受体在神经损伤中的作用及机制方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68757465,E-mail: lily7510@sohu.com

通讯作者: 周元国,电话:(023)68757475,E-mail:yuanguo.zhou@gmail.com.

收稿日期: 2005-12-16;**修回日期:** 2006-03-25

1 材料与方法

1.1 材料

HPLC-GOLD SYSTEM(美国BECKMAN公司),ODS C18柱(2.5 cm×4.6 mm, 5 μm)(美国SUPELCOSIL)157荧光检测器(美国BECKMAN公司),低温台式离心机(德国,Hearaeus Bio-Stratos),扫描分析软件系统(LabworksTM Analysis Software,美国),谷氨酸(分析纯,上海康达氨基酸厂),邻苯二甲醛(O-phthaldehyde,OPA,fluka公司),甲醇(HPLC级,天津大茂化学试剂厂),四氢呋喃(HPLC级,天津光复精细化工研究所),乙酸钠(分析纯,重庆化学试剂厂)

1.2 实验动物

C57BL/6鼠,两个月龄,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型 自由落体法致伤,重锤20 g,高度50 cm,

撞击深度 1.5 mm,直径 2 mm。

1.3.2　样品收集、处理及衍生　　抽取 C57BL/6 鼠脑脊液 3 ~7 μl,4 ℃,15 000 × *g* 离心 5 min(去除红细胞和其他一些细胞),-20 ℃保存,直至用于分析。脑脊液分析时,从 -20 ℃取出,立刻用 2 倍于脑脊液体积的甲醇充分混合,15 000 × *g* 离心 5 min,以便除去脑脊液中蛋白,上清用于衍生化。

1.3.3　样品的衍生　　衍生试剂:25 mg OPA,1.25 ml 甲醇,25 μl β-巯基乙醇(0.45 μm 膜过虑),4 ℃避光保存,使用不超过 1 周。衍生方法:1CSF:1 衍生试剂:10 硼酸(0.4 mol/L pH 9.25),室温下反应 2 min。

1.3.4　色谱条件　　流动相 A:0.1 mol/L 乙酸钠(9.5% 甲醇,0.5% 四氢呋喃)。流动相 B:甲醇;进样量 20 μl;流速 1 ml/min;梯度条件:0 ~25 min:流动相 B 25% ~35%;5 ~9 min:流动相 B 35% ~95%;9 ~11 min:流动相 B 95%;11 ~15 min:流动相 B 95% ~25%;激发波长 330 nm 发射波长 450 nm。

1.4　统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件行 *t* 检验。

2　结果

2.1　标准曲线

外标法定量。用 0.5 mol/L HCl 配制标准 GLu 液:1、10、20、30、40、60 μmol/L,以其标准液浓度(x)对其相应的峰面积(y)做回归方程,$y = 568.04x + 749.6$ $R^2 = 0.998\ 9$。

2.2　精密度试验

日内精密度:分别取 1、30、60 μmol/L 3 种不同浓度的 GLu 溶液,按上述色谱条件重复进样 3 次,日间精密度:分别在 1、2、3 d 测定 3 个不同浓度的 GLu 溶液。3 个浓度 GLu 日间相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)依次为:4.17%,1.29%,4.94%。日间相对标准偏差依次为:0.78%,0.36%,0.14%。

2.3　加样回收率试验

取已知含量的样品,各加入 3 种不同浓度的谷氨酸溶液,再按上述测定方法测定,每一浓度测定 3 次,据标准曲线计算各样品的加样回收率。结果显示:加入 0.5 ng 谷氨酸对照品时平均回收率为 125.60,RSD 为 32.13%;加入 15 ng 对照品时平均回收率为 85.01,RSD 为 4.63%;加入 30 ng 对照品时平均回收率为 84.26,RSD 为 4.71%。

2.4　样品稳定性实验

将抽取的脑脊液 15 000 × *g* 离心 5 min 后,储存于 -20 ℃中,分别在 0、7、14、21、28 d 测定 GLu 的含量 6 次,结果表明 GLu 含量在 7 d [(4.816 7 ± 0.579 5) μmol/L]、14 d [(4.813 3 ± 0.566 2) μmol/L]、21 d [(4.796 7 ± 0.597 7) μmol/L] 与 0 d [(4.805 7 ± 0.554 9) μmol/L] 无明显差异($P > 0.05$),但 28 d [(3.433 0 ± 0.622 7) μmol/L] 与 0 d 相比,GLu 含量有明显减少($P < 0.05$)。

2.5　样品测定

抽取致伤后 6 h 小鼠脑脊液,按照上述方法测定其 GLu 的含量。结果显示:对照组脑脊液中谷氨酸含量为(5.168 ± 0.226) μmol/L,致伤组脑脊液中谷氨酸含量[(15.302 ± 1.551) μmol/L]明显高于对照组($P < 0.01$)。

3　讨论

目前,脑脊液中 GLu 含量检测方法中,需要脑脊液的量在几十到上百微升之间[4,5],对于不足 10 μl 含量的小鼠脑脊液而言就比较困难。根据本实验的需要,我们建立了用邻苯二甲醛柱前衍生、梯度高效液相色谱并结合荧光检测的方法,来对微量脑脊液中 GLu 含量进行检测。邻苯二甲醛与 β-巯基乙醇连用,在碱性条件(硼酸盐缓冲液,pH 9.3)下能与伯胺类氨基酸反应产生荧光物质,再结合荧光检测仪,可使灵敏度大大提高,达到 pmol 级。因此,即使脑脊液被稀释也可检测到 GLu 的含量。

样品稳定性实验表明,储存在 -20 ℃的脑脊液,在 28 d 时明显降解。因此,脑脊液储存在 -20 ℃时,最好不要超过 21 d。而样品精密度实验表明,日内相对标准偏差均小于 4.94%,日间相对标准偏差均小于 0.78%,说明此方法的有良好的精密度。其回收率在 84.26% ~125.6%,说明此方法的准确度较好。

本实验建立的微量脑脊液中 GLu 含量的检测方法具有快速、结果准确、可靠的优点,不仅可以满足本实验的需要,也可以应用到临床医学上。

GLu 通过受体活化方式激活细胞受体,使细胞膜离子通道开放,引起细胞内 Na^+、Ca^+、Cl^- 蓄积,从而对脑内选择性易损区如海马等部位的神经元和胶质细胞肿胀、坏死,产生继发性脑损伤[1,2]。因此,监测脑介液中谷氨酸含量对研究继发性脑损伤的机制以及为临床预后提供线索都有重要意义。

参考文献:

[1] HABERG A, QU H, SONNEWALD U. Glutamate and GABA metabolism in transient and permanent middle cerebral artery occlusion in rat: Importance of astrocytes for neuronal survival [J]. Neurochem Int, 2006, 48(6-7): 531 -540.

[2] MOVSESYAN V A, FADEN A I. Neuroprotective effects of selective group II mGluR activation in brain trauma and traumatic neuronal injury[J]. J Neurotrauma, 2006, 23(2): 117 -127.

[3] WAGNER A K, BAYIR H, REN D, *et al*. Relationships between cerebrospinal fluid markers of excitotoxicity, ischemia, and oxidative damage after severe TBI: the impact of gender, age, and hypothermia [J]. J Neurotrauma, 2004, 21(2): 125 -136.

[4] MELANI A, PANTONI L, CORSI C, *et al*. Striatal outflow of adenosine, excitatory amino acids, gamma-aminobutyric acid, and taurine in awake freely moving rats after middle cerebral artery occlusion: correlations with neurological deficit and histopathological damage [J]. Stroke, 1999, 30(11): 2448 -2455.

[5] WEN Z H, CHANG Y C, CHERNG C H, *et al*. Increasing of intrathecal CSF excitatory amino acids concentration following morphine challenge in morphine-tolerant rats[J]. Res, 2004, 995(2): 253 -259.

(编辑　张大春)