DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.055
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

程中任何过大的机械挤压及揉搓作用均可造成皮肤与皮下组织分离过度，导致术后皮瓣移植失败[2]。因此，以下方法是避免造成以上情况发生的重要注意事项。用长丝线将血管神经束缝合固定于皮瓣之上，同时在切开皮瓣周围时定点将皮下组织与皮肤缝合固定，整个操作过程中以提拉丝线进行皮瓣游离；隐神经与隐血管束的关系紧密，在手术时不要刻意将隐神经游离，以免造成血管蒂周围分支的破坏，有时虽然不进行神经吻合，将隐神经保留在皮瓣内对皮瓣的愈合不会造成影响。

关键词：犬；游离皮瓣；大腿内侧
中图法分类号：R615 文献标识码：B

参考文献：

[1] 江振声 主编. 狗的解剖[M]. 北京：科学出版社，1960. 215.
[2] 李慧增，孙 远. 口腔颌面部火器性软组织缺损早期修复的实验研究[J]. 第三军医大学学报，1992，14(3)：213.

（编辑 谢义霞）

文章编号：1000-5404(2002)05-0621-02

技术方法

大鼠脑组织中兴奋性氨基酸的快速检测

Rapid detection on contents of excitatory amino acids in rat brain

孙 玮，潘 峰，张正治 （第三军医大学高原军事医学系中心实验室，重庆 400038）

提 要：目的 建立一种快速、准确的脑内兴奋性氨基酸定量检测方法。方法 采用6300黄金系统氨基酸分析仪，在锂柱130 min程序生理体液分析方法基础上，根据兴奋性氨基酸(EAAs)的特性，建立了EAAs的快速测定方法。结果 此方法完成兴奋性氨基酸分析的时间是20 min，比原方法缩短了110 min；且有较好的重现性(Glu *CV*：日内1.86%，日间2.32%；Asp *CV*：日内1.42%，日间2.48%)和回收率(Glu 97.7%；Asp 97.3%)。并用此方法观察了高原低氧大鼠下丘脑EAAs的含量变化。结论 本方法定量检测兴奋性氨基酸快速、准确，并利于大批量样品的快速测定。

目前，体液中神经兴奋性氨基酸(EAAs)的测定主要采用氨基酸自动分析仪法[1]和高效液相色谱法[2]。本研究应用6300黄金系统氨基酸分析仪，改良建立了氨基酸分析仪快速检测EAAs的方法，结果准确稳定。并应用此方法测定了谷氨酸(Glutamate，Glu)、天门冬氨酸(Aspartate，Asp)的变化。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

标准混合氨基酸(光谱纯，美国Beckman公司)；柠檬酸锂缓冲液-A(Li-A)，柠檬酸锂稀释液-S(Li-S)，LiOH为主要成分的再生液LiOH-R(Li-R)，均为美国Beckman公司生产；茚三酮，分析纯，上海生物制品研究所；二甲亚砜，分析纯，江苏正兴化工研究所；检测仪器为Beckman6300黄金系统高效氨基酸分析仪和601黄金系统色谱工作站。

1.2 实验材料及前处理

1.2.1 动物模型及分组 实验用Wistar大鼠24只，体重为150～200 g，雌雄不拘。随机分为正常对照组(室温常氧)及低氧1，7，15 d组(每组6只)，将大鼠置于模拟海拔6 000 m的低压舱内(舱内温度为4 ℃)，每天6 h。

1.2.2 EAAs的提取 大鼠断头，迅速取出下丘脑，精确称重。置样品于冰镇玻璃管中，加入10%磺基水杨酸(1 ml)，冰浴下以玻璃匀浆器手动匀浆并离心(4 ℃，15 000 r/min，20 min)，取上清液，－40 ℃冰箱冻存。

1.3 色谱条件

色谱柱，Beckman公司氨基酸分析专用柱(锂柱，10 cm×4.0mm)；流动相，Li-A(用于分析Glu和Asp)；Li-R(再生液)，流速20 ml/h；茚三酮显色剂，将二甲亚砜与茚三酮配制成茚三酮显色剂，流速10 ml/h；柱温，33.5 ℃；进样量，50 μl/次；比色波长，570 nm，440 nm。

1.4 数据处理

各组数据采用$\bar{x} \pm s$表示，各组间数据比较采用t检验和相关分析。

1.5 程序改进

见表1

表1 原程序与短程序的对照

步骤	原程序	短程序
缓冲液Li-A	122.0min	24.0min
缓冲液Li-B	44.0min	————
缓冲液Li-C	74.0min	————
再生液Li-R	120.0min	20.0min
切换T1℃	120.0min	24.0min
T1℃	33.5℃	33.5℃
切换T2℃	14.0min	————
T2℃	60℃	————
切换T3℃	59.0min	————
T3℃	77℃	————
茚三酮试剂	126.0min	28.0min
水	119.0min	19.0min
进样时间	129.0min	32.0min
总分析时间	130.0min	33.0min
缓冲液流速	20.0ml/h	20.0ml/h

作者简介：孙 玮(1966－)，女，云南省陆良县人，实验师，主要从事分析测试方面的研究。电话：(023)68752352

收稿日期：2001-12-24；修回日期：2002-04-01

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果

2.1 脑组织中 Glu 和 Asp 的色谱分离，见图 1

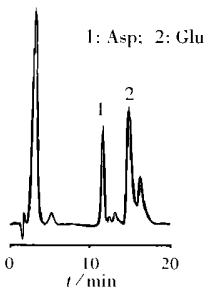


图 1 快速测定测定 **Glu** 和 **Asp** 色谱图

在上述色谱条件下，经 33 min 梯度洗脱将 Asp 和 Glu 分离，其保留时间依次为 11.95 min 和 15.23 min，见图 1。完成分析全过程的时间为 33 min，比常规方法缩短了 97 min，分析效率大大提高，见表 1。

2.2 线性范围

取 2.5 mmol/L Glu 和 Asp 标准溶液，用 Li-S 将储备液分别稀释成 5、10、20、50、100、200、400 μmol/L 7 个浓度，各取 50 μl，按前述方法进行测定。Glu 和 Asp 在 5～400 μmol/L 内线性关系良好，其相关系数分别为 0.996、0.998。

2.3 精密度

取同一份标本，进行色谱分析，日内和日间各进样 10 次，求得批内变异系数 Glu 为 1.86%，Asp 为 1.42%；批间变异系数 Glu 为 2.32%，Asp 为 2.48%

2.4 回收率

取一份脑组织提取液（Glu 为 149.2 μmol/L，Asp 为 45.6 μmol/L），分别加入 25、50、100、200 μmol/L 的 Glu 和 Asp 的标准溶液，测得 Glu 回收率为 92.6%、98.2%、97.8%、102.2%，平均 97.7%；Asp 回收率为 89.7%、99.3%、96.5%、103.8%，平均 97.3%

2.5 高原低氧大鼠下丘脑内 Glu、Asp 含量的变化

下丘脑 Glu、Asp 浓度测定值，见表 2[4]。

表 2 高原低氧对大鼠下丘脑 **Glu**、**Asp** 含量的影响（μ**mol**/**g**，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

分组	Glu	Asp
正常对照	9.08±0.57	4.07±0.76
高原低氧 1 d	10.45±0.49 *	5.63±0.34 *
高原低氧 7 d	11.90±0.73 **	6.84±0.25 **
高原低氧 15 d	12.44±0.84 **	6.94±0.38 **

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，与对照组比较

实验观察到大鼠下丘脑 Glu、Asp 的含量在低氧第 1 d 即开始增加，7 d 组明显多于对照组（$P<0.01$），15 d 仍维持在较高水平。

3 讨论

氨基酸分析法成熟、稳定，并以其操作简单、重现性好而得到了广泛的应用。但就检测单一氨基酸而言，所有氨基酸色谱分析存在着分离费时，浪费试剂的缺点，本研究依据离子交换柱分离氨基酸的原理，在色谱柱填料、柱床高度以及柱温等对色谱峰的保留值和分辨率有一定影响的参数不变的条件下，根据 Asp 和 Glu 为酸性氨基酸，与树脂结合力较弱，较易洗脱这一特点，采用了较低柱温 33.5 ℃和较低 pH 即离子强度的洗脱剂，在上述条件下 Asp 和 Glu 能得较好的分辨率和较快的分析速度，尽可能地缩短了分析时间。本方法具有操作简便、重现性好、变异系数小、回收率高等优点，有利于大批量样品的快速分析。已多次用于组织及体液中的 Asp 和 Glu 检测，效果满意，值得推广应用。

兴奋性氨基酸是脑内主要的兴奋性递质之一，低氧可引起兴奋性氨基酸大量释放，兴奋性氨基酸释放的增加是 Ca^{2+} 内流的重要原因之一，而细胞内 Ca^{2+} 的超载则可导致神经细胞裂解、死亡。阮怀珍等[3]应用本方法对高原低氧条件下大鼠下丘脑内谷氨酸、天门冬氨酸含量变化进行了研究，结果显示：在高原低氧条件下大鼠下丘脑内谷氨酸、天门冬氨酸含量明显高于正常对照组，且这一趋势能维持较长时间。

关键词：大脑组织；兴奋性氨基酸；快速检测
中图法分类号：R446.139 文献标识码：B

参考文献：

[1] Chuang C K, Lin Y T, Huang F Y. Effects of Anticoagulants in Amino Acid Analysis: Comparisons of Heparin, EDTA, and Sodium Citrate in Vacutainer Tubes for Plasma Preparation[J]. Cin Chem, 1998, 44(5): 1 052—1 056.

[2] Jimenez F J, Molina J A, Gomez P, *et al*. Neurotransmitter amino acids in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease[J]. J Neurol Transm, 1998, 105(2): 269—277.

[3] 阮怀珍，范晓棠，张金海，等. 高原低氧对大鼠下丘脑谷氨酸、天门冬氨酸和 NOS 的影响[J]. 中国病理生理杂志，2000, 16(11): 1 198—1 201.

（编辑 郭建秀）

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是：凡是可以使用阿拉伯数字，而且又很得体的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字：

1 公历世纪、年代、年、月、日和时刻 例如：公元前 5 世纪、20 世纪 90 年代、1995 年 6 月 8 日 14 时 30 分。

表示年份要写全称，1995 年不能写成 95 年或 95 年；1953～1958 年不能写成 1953～58 年。年月日可以写成 1995-06-08。时刻用“：”分隔的形式。如：13 时 45 分 8 秒可以写成 13：45：08。

2 计数和计量（整数、小数、分数、百分数、约数）包括序数、编号 4 位和 4 位以上的数字采用三位分节法，不用“千分撇”，节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节，也不加千分撇。5 位数以上，尾数 0 多的数，可以用“万”“亿”作单位，但不得以十、百、千、百万、十亿等作单位，例如 3 579 000 可写成 357.9 万但不能写成 3 百 57 万千或 357 万 9 千。

（本刊编辑部）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net