毛细管电泳-激光诱发荧光法检测大鼠 PAG 脑片灌流液中谷氨酸和天门冬氨酸的含量

张娟[1] ,张亚海[2] ,朱波[2] ,周文华[2] ,许鹏程[3] ,杨国栋[1] ,曾因明[3](1 .浙江省中医院麻醉科 ,浙江 杭州 310006 ;2 .宁波微循环与莨菪类药研究所 ,浙江 宁波 315010 ;3 .徐州医学院江苏省麻醉学重点实验室 ,徐州 221002)

摘要 :目的 建立毛细管电泳-激光诱发荧光法(CZE-LIFD) 检测大鼠中脑导水管周围灰质(PAG) 脑片灌流液中谷氨酸(*L*-Glu) 和天门冬氨酸(*L*-Asp) 含量的方法。方法 灌流液中 Glu 和 Asp 用 NDA 衍生标记 ,电泳条件为 :BECKMAN 毛细管 ,长度 67cm ,内径 75μm ,激激发波长 488λ/nm ,发射波长 520λ/nm ,分离电压 25kV ,分离时间 10 min。结果 *L*-Glu 的回归方程为 $Y = 2009 + 4.0e_{-9} X$, $r = 0.9996$,平均回收率为 99.8 % ; L-Asp 的回归方程为 $Y = 33\,846 + 4.4e_{-9} X$, $r = 0.9970$,平均回收率为 99.2 % , Y 为峰面积 , X 为浓度(mol·L^{-1}) 。该方法能够检测大鼠 PAG 脑片灌流液在高钾刺激前后的 *L*-Glu 和 *L*-Asp 含量。结论 毛细管电泳-激光诱发荧光法可用于脑片灌流液内微量 *L*-Glu 和 *L*-Asp 的测定。

关键词 :毛细管电泳-激光诱发荧光法 ;谷氨酸 ;天门冬氨酸 ;中脑导水管周围灰质 ;脑片
中图分类号 : R917.1 ; R927.2 文献标识码 : B 文章编号 :1007-7693(2003)03-0224-03

Determination of Glutamate and Aspartate Concentrations in Brain Slices of Pag by Cze-Lifd

Zhang Juan[1] , Zhang Ya-hai[2] , Zhu Bo[2] , Zhou Wen-hua[2] , Xu Peng-cheng[3] , Yang Guo-dong[1] , Zen Yin-ming[3]
(*Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine , Hangzhou* 310006 , *China*)

ABSTRACT : OBJECTIVE To detect the concentrations of glutamate(*L*-Glu) and aspartate(*L*-Asp) in brain slices of periaqueductal gray (PAG) through developing the method of Capillary zone eletrophoresis with laser-induced fluorescence detection(CZE-LIFD) . **METHOD** Glu and Asp in the infusion fluid were labeled by naphthalene-2 ,3-dicarbox-aldehyde(NDA) . Electrophresis was consisted of BECKMAN capillary(67cm × 75μm) with automated sample injecting system . The laser-excited wavelength was 488λ/nm . The emission intensity was measured at a wavelength of 520λ/nm . The running voltage was 25kV . The separation time was 10 min . **RESULTS** The standard curve was linear . The equation about L-Glu was $Y = 2009 + 4.0e + 9X$ with the correlation coefficient of 0.9996 . The average recovery of *L*-Glu was 99.8 % . The equation about *L*-Asp was $Y = 33846 + 4.4e + 9\ X$ with the correlation coefficient of 0.9970 . The average recovery of *L*-Glu was 99.2 % . This method could measure the concentrations of *L*-Glu and *L*-Asp in brain slices of PAG pre and after high K^+ stimulation . **CONCLUSION** CZE-LIFD can detect the concentrations of *L*-Glu and *L*-Asp in infusion fluid of brain slices .

KEY WORDS : Capillary zone eletrophoresis with laser-induced fluorescence detection ; periaqueductal grey ; glutamate ; aspartate ; brain slice

神经递质含量测定的传统方法是高效液相电化学检测器,该方法要求进样容积大,且有分离时间长、灵敏度低、不稳定等缺点。毛细管电泳-激光诱发荧光法(CZE-LIFD)具有高灵敏、高分辨率、进样少、速度快等特点。CZE-LIFD的基本原理是:荧光物 NDA(naphthalene-2,3-dicarbox-aldehyde)在氰化钠的存在下和递质的氨基结合,在特定波长的激光激发下产生荧光,通过检测器检测后,再根据峰面积的大小决定递质浓度,现已报道了微量测定在体和离体情况下各种氨基酸和单胺类物质的浓度[1]。

谷氨酸(*L*-Glu)和天门冬氨酸(*L*-Asp)神经系统中主要的兴奋性神经递质,研究发现它们参与了脑缺血、阿片依赖的形成和发展[2]。同时研究也发现中脑导水管周围灰质(PAG)是体内参与防御反应和阿片依赖的重要部位[3]。作为神经递质释放量测定的重要方法之一,脑片灌流已广泛用于各种实验研究中[4],其优点是,脑组织释放的递质可通过灌流液很快地除去,减少了释放的递质被再摄取和酶分解的可能性,同时能了解递质释放的时间过程,但由于检测器灵敏度的制约,很少直接对灌流液内递质进行检测,本实验应用 CZE-LIFD 对大鼠 PAG 脑片灌流液内的 *L*-Glu 和 *L*-Asp 进行检测。

1 材料

1.1 试剂和仪器

NDA,L-Asp 和 L-Glu 标准品为 Sigma 公司产品;其余试剂均为分析纯;去离子水为由 MILLI-Q labo 仪器制备。高效毛细管电泳(BECKMAN 公司,P/ACE SYSTEM 5000,带自动进样系统和激光诱发荧光检测器),BECKMAN 毛细管长度 67cm,内径 75μm;恒温水浴箱和恒流泵购自宁波。

1.2 动物

SD大鼠,体重(300±30)g,雌雄不拘,由浙江省实验动物中心提供,食物、饮水不限。

2 方法和结果

2.1 大鼠离体 PAG 脑片体外灌流实验[4]

将 SD 大鼠快速断头取脑,沿矢状缝剪开皮肤,剥去两侧颅骨和硬脑膜,取出脑组织,立即置入预先用 95%O_2 和 5%CO_2 混合气体饱和的 0~4℃ Krebs 液(NaCl 127,KCl 3.73,$CaCl_2$ 1.8,KH_2PO_4 1.18,$MgSO_4$ 1.18,$NaHCO_3$ 20,葡萄糖 10,Na_2EDTA 0.03)内 1 min,然后取出并快速分离出 PAG 组织块,手工切成厚度约为 500μm 的 PAG 脑片,迅速移至灌流小室内,并泵入充有饱和混合气体的 Krebs 液。先以 340μL·min^{-1}的流速泵入 Krebs 液,持续灌流 8 min,再以 170μL·min^{-1}的流速泵入 Krebs 液灌流,在此流速下,每隔 3 min 收集一管,共 4 管,取第 2 管(P_1)和第 4 管(P_2)作为二个时间段来检测,测定其中灌流液内 *L*-Glu、*L*-Asp 的含量。停止脑片灌流后,予以高钾液(30 mmol·L^{-1})刺激,等待 5 min 后,取 Krebs 液用于测定 *L*-Glu 和 *L*-Asp 的含量。实验结束后对脑片进行称重。

2.2 毛细管电泳测定 Glu,Asp 含量[5]

2.2.1 试剂配制:氰化钠溶于 50 mmol·L^{-1}硼酸缓冲液配成溶液 4℃冻存。NDA 先溶于甲醇中,配成 30 mmol·L^{-1},分装后密封 -20℃冻存。Glu、Asp 标准品用 Krebs 液配制成 10^{-2} mmol·L^{-1} -20℃冻存。

2.2.2 电泳条件:BECKMAN 毛细管,长度 67cm,内径 75μm;激发波长 488λ/nm,发射波长 520λ/nm;自动气压进样 5s,分离电压 25kV,分离时间 10 min;使用 30 mmol·L^{-1}硼酸缓冲液(pH 9.5),超声脱气、0.2mm 滤膜过滤;进样前,分别用 0.1 mol·L^{-1} NaOH、去离子水和 30 mmol·L^{-1}硼酸缓冲液(pH9.5)各冲洗毛细管 1.5 min。

2.2.3 衍生化反应:样品 7.5μL,50 mmol·L^{-1}硼酸缓冲液(pH9.5)14.5μL(混有 20 mmol·L^{-1} NaCN),NDA 0.5μL,混合后在水浴箱中 25℃反应 4.5 min 后进样。

2.2.4 标准曲线制备:把 10^{-2} mol·L^{-1}浓度的 *L*-Glu 和 *L*-Asp 分别稀释成 5×10^{-7},1×10^{-6},5×10^{-6},5×10^{-5},1×10^{-5} mol·L^{-1},依照上述电泳分离条件进行检测,分别求得峰面积,用标准品 *L*-Glu、*L*-Asp 浓度与相应的峰面积求得回归方程。

2.2.5 计算方法:由 system Gold 软件对峰面积积分,以标准氨基酸浓度对峰面积作标准曲线,以外标法计算样品中氨基酸的浓度。

2.3 标准曲线

在上述条件下,标准品得到很好的分离,标准品的色谱图见图 1。同时该方法能检测到脑片 Krebs 液内 *L*-Glu 和 *L*-Asp 的含量,并能使脑片 Krebs 液内的干扰峰与氨基酸可完全分离。标准品 *L*-Glu 的回归方程:$Y=2009+4.0e_{+9}X$,$r=0.9996$;*L*-Asp 的回归方程:$Y=33846+4.4e_{+9}X.$,$r=0.9970$,Y 为峰面积,X 为浓度(mol·L^{-1})。

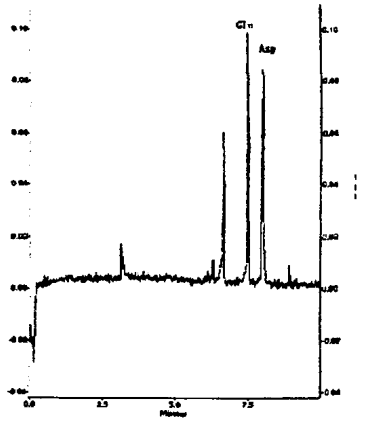

图 1 10^{-4} mol·L^{-1} *L*-Glu 和 *L*-Asp 的电泳图谱

Fig 1 Electropherograms demonstrated the 10^{-4} mol·L^{-1} *L*-Glu and *L*-Asp; sample was prederivated with 4.5 minutes at 25℃, applied voltage of 25kV, injected with 5s.

2.4 回收率试验:

以标准品 L-Glu 配制成浓度 10^{-6} mol·L^{-1},5×10^{-5} mol·L^{-1}为例($n=3$),分别测得 10^{-6} mol·L^{-1}组的回收量为 1.02×10^{-6},1.05×10^{-6},1.01×10^{-6} mol·L^{-1}[($1.03\times10^{-6}\pm0.$

02×10^{-6}) mol·L^{-1}], RSD 为 1.9%。5×10^{-5} mol·L^{-1} 组的回收量为 4.98×10^{-5}, 4.98×10^{-5}, 5.01×10^{-5} mol·L^{-1} [($4.99\times10^{-5}\pm0.17\times10^{-5}$) mol·$L^{-1}$], RSD 为 3.4%, 平均回收率为 99.8%。以标准品 *L*-Asp 配制成浓度 10^{-6}, 5×10^{-5} mol·L^{-1} 为例($n=3$), 分别测得 10^{-6} mol·L^{-1} 组的回收量为 1.14×10^{-6}, 1.03×10^{-6}, 1.15×10^{-6} mol·L^{-1} [($1.11\times10^{-6}\pm0.07\times10^{-6}$) mol·$L^{-1}$], RSD 为 6.3%。$5\times10^{-5}$ mol·L^{-1} 组的回收量为 4.95×10^{-5}, 4.91×10^{-5}, 5.02×10^{-5} mol·L^{-1} [($4.96\times10^{-5}\pm0.06\times10^{-5}$) mol·$L^{-1}$], RSD 为 1.2%, 平均回收率为 99.2%。

2.5 样品测定

本实验测得 PAG 脑片中 Glu 和 Asp 的浓度, 见表 1。

表 1 高钾刺激前后 PAG 脑片中 *L*-Glu 和 *L*-Asp 的浓度 (10^{-7} mL·L^{-1}·mg^{-1}) ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab 1 The concentrations of Glu and Asp in the brain slices of PAG pre and after the high K^+ stimulation. (10^{-7} mol·L^{-1}·mg^{-1}) ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

AA	Pre		after
	P1	P2	
Glu	2.64±0.40	1.94±0.31	4.79±0.80
Asp	1.08±0.15	0.85±0.19	3.66±0.52

3 讨论

脑片灌流是神经递质释放量测定的重要方法之一, 但由于各种检测器灵敏度低等原因, 很少直接测定低浓度的递质, 以前大量实验使用同位素标记脑片后, 对灌流液内的递质进行测定, 但其不足是, 外源性放射标记递质或其前体不一定能均匀地标记内源性递质的贮库, 同时脑片表层和深层的标记也可能不均匀[6]。本实验用 CZE-LIFD 方法直接对灌流液内的递质进行测定, 从而避免了上述不足。

本实验发现, 随着衍生化反应时间的延长, *L*-Glu 和 *L*-Asp 的峰面积增加, NDA 荧光物的峰面积逐渐减少, 但不影响 *L*-Glu 和 *L*-Asp 延迟时间, 提示衍生化反应时间的延长可以增加 *L*-Glu 和 *L*-Asp 峰面积。文献报道[5], 衍生化反应的时间为 3 min, 本实验根据毛细管的冲洗时间, 使用衍生化反应时间为 4.5 min, 以便于控制和保证反应的精确性, 同时在该时间内衍生化反应后, 其检测的灵敏度能够满足对 Krebs 液 *L*-Glu 和 *L*-Asp 含量的检测。

在实验摸索过程中, 我们发现衍生化反应温度对保持 *L*-Glu 和 *L*-Asp 出峰的稳定性很重要。在保持其他实验条件不变的情况下, 由于室温的变化, 使测定结果不稳定, 即随着衍生化反应温度的增加, *L*-Glu 和 *L*-Asp 的峰面积增加, NDA 荧光物的峰面积渐减少, 但不影响 *L*-Glu 和 *L*-Asp 迁移时间。因此, 本实验采用在水浴箱中进行衍生化反应温度(25 ℃)的控制, 在进行温度控制后, *L*-Glu 和 *L*-Asp 出峰变得稳定。

为了测试样品内 HCO_3^- 对衍生化反应的影响, 实验分别使用含有和不含有 HCO_3^- 人工脑脊液配制 *L*-Glu、*L*-Asp 标准品, 在衍生化反应中使用少量 NDA(0.3μL), 后者测得的峰面积明显增加。由于衍生化过程中 HCO_3^- 和氰根离子反应生成氰氢酸, 从而氰化钠不能有效使 NDA 和兴奋性氨基酸的氨基根结合生成衍生物, 这在 NDA 量不足的情况下影响更明显, HCO_3^- 和氰根离子反应生成氰氢酸相对较多, 从而使衍生物的生成减少, 标准品的峰面积也相应减少, 而在 NDA 足量的情况下, HCO_3^- 对衍生化反应的影响相对较小。

综上所述, 使用毛细管电泳-激光诱发荧光法可以对 PAG 脑片内 *L*-Glu、*L*-Asp 进行检测和分离, 能满足实际测定的需要。我们认为本方法稳定性好, 方法简便, 适用于神经系统生物样品中兴奋性氨基酸的分析测定。

参考文献

[1] Dawson LA, Stow JM, Dourish CT *et al*. Analysis of glutamate in striatal microdialysates using capillary eletrophoresis with laser induced fluorescence detection[J]. J Chromatogr A, 1995; 700: 81.

[2] Dravolina OA, Medve I O, Bespalov AY. Behavioral effects of glutamate receptor agonists in morphine-dependent rats[J]. Behav Pharmal, 1999, 10(4): 359.

[3] Maldonado R, Stinus l, Gold LH, *et al*. Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1992, 261(2): 669.

[4] 徐叔云, 卞如廉, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 614.

[5] Dawson LA, Stow JM, Palmer AM *et al*. Improved method for the measurement of glutamate and aspartate using capillary eletrophoresis with laser induced fluorescence detection and its application to brain microdialysis[J]. J Chromatogr B, 1997, 694: 455.

[6] 韩济生. 神经科学原理[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 1999: 36.

收稿日期: 2002-01-21