

LC-MS/MS 测定大鼠脑组织中 7 种内源性炎症相关脂质

LCMSMS-305

摘要：脑卒中是全球范围内发病率、致死率以及致残率最高的疾病之一。如何有效防治脑卒中，是当前医学研究的热点和难点。本课题使用岛津脂质介质方法包进行数据采集，建立了一种运用背景扣除校正曲线的 LC-MS/MS 方法，同时定量 7 种炎症相关内源性脂质介质并将该方法应用于大鼠脑卒中模型。方法精密度和准确度 RSD% < 20%，校正因子合格（范围在 90%~110% 之间）。通过比较脑缺血以及不同药物对靶向脂质的调节作用，证实了缺血性脑卒中使炎症反应 COX 通路的 PG 类代谢物以及神经保护因子 AEA、OEA、DHA 含量显著上调，STV-Na 与阳性对照药 edaravone 能显著降低脑卒中大鼠的 PG 类代谢物水平从而达到抗炎的作用。

关键词：缺血性脑卒中 脂质介质 定量分析 背景扣除校正曲线

缩略词：COX，环氧合酶；PG，前列腺素；AEA，N-花生四烯酰乙醇胺；OEA，油酰乙醇胺；AA，花生四烯酸；DHA，二十二碳六烯酸；STV-Na，异甜菊醇钠（东莞凯法公司开发的未上市新药）；Edaravone，依达拉奉（已上市治疗脑卒中的药物）。

目前，在全世界范围内，脑卒中是患病率、发病率、致死率以及致残率最高的三大疾病（脑卒中、心脏病、癌症）之一。同时，治疗脑卒中中所消耗的人力财力巨大。近年来的研究表明脑卒中发生后，缺血缺氧会诱发一系列损伤级联反应，主要涉及到炎症反应、兴奋性氨基酸中毒、细胞去极化、氧自由基的形成、细胞内钙超载等。作为代谢组学的一个重要分支，脂质组学是对生物体、组织或细胞中脂质类代谢物以及与其相互作用的分子进行全面系统的分析与鉴定，进而揭示脂质代谢与细胞、器官乃至机体的生理、病理过程之间关系的一门学科。脂类中的花生四烯酸是一种在生物体内含量较高，分布最广的多不饱和必需脂肪酸，主要以磷脂的形式存在于细胞膜上，当生物体受到某种刺激如炎症时，在磷脂酶 A2 的作用下水解成游离的花生四烯酸。花生四烯酸主要经过三条代谢途径产生具有生物活性的二十碳衍生物。在环氧酶的作用下生产前列腺素 (PGs) 和血栓素；在脂氧合酶的作用下生产白三烯和部分羟基二十

碳四烯酸。在细胞色素 P450 单氧化酶的作用下产生环氧二十碳三烯酸等。花生四烯酸及其代谢产物在体内发挥着重要的生物学作用，广泛参与免疫与炎症反应，维持血液循环畅通。此外，内源性的多不饱和脂肪酸衍生物如油酰乙醇胺 (OEA)、N-花生四烯酰乙醇胺 (AEA) 以及二十二碳六烯酸 (DHA) 在机体内具有一定的神经保护作用。脑内 OEA 水平提高可减轻大鼠神经功能缺失，减小脑梗死体积，减轻脑水肿程度，对急性脑缺血再灌注损伤具有保护作用。AEA 属于内源性大麻素类长链脂肪酸衍生物，可通过大麻素受体途径发挥神经保护作用，提高神经元活力，对脑缺血引起的损伤有保护作用。DHA 被称为“脑黄金”，能增加血小板细胞膜的流动形从而减少血栓素的形成，对脑梗塞有一定的预防和保护作用。因此，建立一种高效准确的测定缺血性脑卒中内源性脂质（花生四烯酸及其类似物）的方法具有重要意义。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2(输液泵)，DGU-20A5R(在线脱气机)，SIL-30AC(自动进样器)，CTO-30AC(柱温箱)，CBM-20A 系统控制器，LabSolutions Ver. 5.86 色谱工作站。

其他仪器：混合球磨机 (Retsch, MM400)；固相萃取装置 (ASE-12, 天津奥特赛恩斯有限公司)；真空浓缩仪 (Eppendorf)；涡旋振荡器 (IKA VIBAX VXR basic)。

1.2 模型构建及实验分组

采用线栓法建立雄性 SD 大鼠大脑中动脉阻塞 / 再灌注模型 (MCAO/R), 造成右侧大脑局灶性缺血。缺血 2 h / 再灌注 22 h, 于缺血后 2 h 采用尾静脉推注给药 / 溶剂。

动物实验分为 4 组: 假手术组 (sham group)、缺血模型组 (model group)、给药组 (STV-Na group)、阳性对照药组 (edaravone), 每组动物数量不低于 6 只。

1.3 分析条件

液相色谱条件

色谱条件

色谱柱: Phenomenex, Kinetex C8 (2.1×150 mm, 2.6 μm)

流动相: A 相: (0.1% 甲酸) 水 (v/v); B 相: 乙腈

流速: 0.40 mL/min

柱温: 40°C

进样体积: 1 μL

洗脱方式: 梯度程序见表 1。

质谱条件

分析仪器: LCMS-8050

离子源: ESI+/-

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 10.0 L/min

接口温度: 300°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 450°C

干燥气流速: 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测, 见表 2。

表1 梯度洗脱条件

Time(min)	Module	Command	Conc.B(%)
0	Pumps	Pump B Conc.	10
5	Pumps	Pump B Conc.	25
10	Pumps	Pump B Conc.	35
20	Pumps	Pump B Conc.	75
20.1	Pumps	Pump B Conc.	95
28	Pumps	Pump B Conc.	95
28.1	Pumps	Pump B Conc.	10
30	Controller	Stop	

表2 靶向脂质及其内标的MRM参数

Analyte	Polarity	Transition (m/z)	Collision energy (v)	Retention time (min)	IS group
PGF _{2α}	Neg	353.20>193.10	26	10.337	1
PGE ₂	Neg	351.20>271.20	17	10.752	2
PGD ₂	Neg	351.20>271.20	18	11.146	2
AEA	Pos	348.20>62.10	-15	18.259	3
OEA	Pos	326.20>62.10	-18	19.191	4
DHA	Neg	327.20>283.20	11	20.226	5
AA	Neg	303.20>303.20	8	20.379	5
PGF _{2α} -d4	Neg	357.20>197.20	25	10.313	1
PGE ₂ -d4	Neg	355.20>275.20	19	10.722	2
5S-HETE-d8	Neg	327.20>116.10	15	17.356	3
OEA-d4	Pos	330.20>66.10	-19	19.162	4
DHA-d5	Neg	332.20>288.20	11	20.190	5

1.5 样品制备

溶液和试剂配制

混合标准溶液 (甲醇溶液): 含 100.0 ng/mL PGE₂, PGD₂, 500.0 ng/mL AEA, DHA, AA, 1000 ng/mL PGF_{2α}, OEA

混合内标溶液 (甲醇溶液): 含 100.0 ng/mL PGF_{2α}-d₄, PGE₂-d₄, 5S-HETE-d₈, 20.00 ng/mL OEA-d₄, 500.0 ng/mL DHA-d₅

样品前处理

固相萃取法 (Strata-X, 10 mg, Phenomenex): 从 -80°C 冰箱取出脑组织样品, 用预冷的刀片冰上分离出约 10.0 mg 样品; 依次加入 100 μL 内标溶液 (100 ng/mL) 及 800 μL 预冷甲醇 (含 1 mM BHT, 预冷于 -20°C); 离心 3000 rpm, 30 s; 球磨仪研磨 (2 beads, 30 HZ, 5 min), 适配器预冷于 -80°C 冰箱; 4°C, 涡旋 30 min, 1500 rpm; 4°C, 离心 12000 rpm, 5 min; 吸取上相 850 μL 于 5 mL 离心管内, 加入 4 mL Water (含 0.1% 甲酸, 4°C), 轻轻混匀; 以 1 mL 甲醇和 1 mL 超纯水 (含 0.1% 甲酸) 活化固相萃取柱 (Strata-X, 10 mg, Phenomenex); 将稀释上相液分批上样, 可适当调节负压, 控制流速 (以每滴 2~3 s 为宜); 以 1 mL 0.1% FA 及 1 mL 15% 乙醇溶液清洗固相萃取柱; 以 300 μL 甲醇洗脱, 收集洗脱液, 真空浓缩 1 h (V-AL, 45°C), 保存于 -80°C。进样前以 200 μL 甲醇复溶。

■ 结果与讨论

2.1 脂质提取方法的优化

比较了 Folch 法以及 SPE 法对靶向脂质及内标的提取效率, 选取的脂质 (内标) 涵盖整个洗脱范围。其中对两款 SPE 柱也进行了对比。结果显示, SPE 法的提取效率优于 LLE 法, 且两种 SPE 法提取效率近似, 最终采用相对较为经济的 Strata-X SPE cartridge。

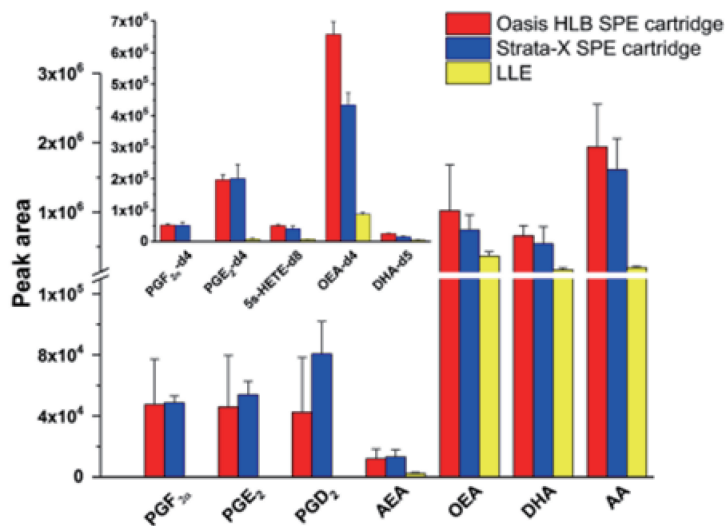


图1 脂质提取前处理方法的比较

2.2 典型色谱图

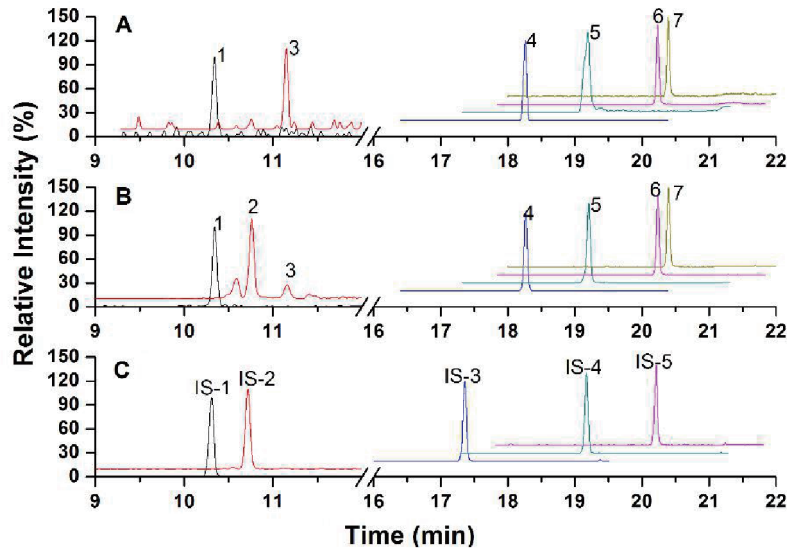


图2 靶向脂质及内标的典型色谱图

A) 基质对照样品靶向脂质色谱图 B) 标曲中间浓度点靶向脂质色谱图 C) 内标色谱图

1: PGF_{2α}, 2: PGE₂, 3: PGD₂, 4: AEA, 5: OEA, 6: DHA, 7: AA, IS-1:PGF_{2α}-d4 (1000 pg/mg), IS-2: PGE₂-d4(1000 pg/mg), IS-3: 5S-HETE-d8(1000 pg/mg), IS-4: OEA-d4 (200.0 pg/mg), IS-5: DHA-d5(5000 pg/mg)

2.3 背景扣除校正曲线 (Background Subtracting Calibration Curves, BSCC) 的建立与验证

首先, 在脑组织匀浆液 (基质对照样品, 匀浆液由不少于 5 只的 Sham 组大鼠脑组织研磨混匀) 中构建分析物的标准曲线, 得到方程 1, 并由截距计算得到 A 值, A 代表了基质中本身包含的内源性脂质浓度。经计算得到 y' (如方程 3), 并由 y' 和 x 拟合得到背景扣除校正曲线 (方程 4)。经验证后, 方程 5 即可应用于内源性脂质测定。

验证过程为: 定义由 BSCC 直接计算得到的基质对照样品中内源性脂质的含量为 M, 定义验证因子 VF, 由方程 6 可计算得到 VF 值, 当 VF 在 85%~115%, 认为 BSCC 通过低浓度点验证, 将 BSCC 对 QC 样品进一步验证, 当 QC 均合格, 表示 BSCC 通过验证。

$$y = ax + b \quad (1)$$

$$A = \left| -\frac{b}{a} \right| \quad (2)$$

$$y' = y - b \quad (3)$$

$$y' = a'x + b' \quad (4)$$

$$\text{Conc}_{\text{Analyte}} = \frac{y' - b'}{a'} \quad (5)$$

$$\text{VF}\% = \frac{A}{M} \times 100 \quad (6)$$

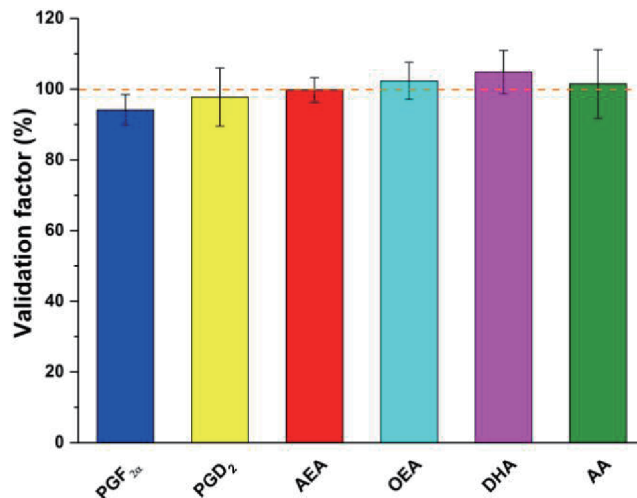


图3 BSCC验证因子(三个分析批)

表 3 为 BSCC 的建立与验证参数, 表 4 为应用 BSCC 的准确度、精密度与回收率。

表3 BSCC的建立与验证参数

Analyte	Batch	Spiked Range (pg/mg)	Y=ax+b		Authentic concentration (A) (pg/mg)		Y'=a'x'+b' (BSCC)			Matrix control (M) (pg/mg)		Validation factor % (VF %)*
			a	b	Linearity (r)	(A)	a'	b'	Linearity (r)	Mean±SD		
PGF _{2α}	01		0.001292	0.067839	0.9972	52.51	0.001263	0.004325	0.9948	53.09 ± 2.301	98.9	
	02	50.00-2000	0.001436	0.075872	0.9989	52.85	0.001438	-0.000439	0.9990	58.47 ± 5.322	90.4	
	03		0.001450	0.078726	0.9975	54.27	0.001477	-0.005095	0.9966	58.28 ± 6.844	93.1	
PGE ₂	01		0.010270	0.012689	0.9982	1.236					-	
	02	2.000-200.0	0.009801	0.020940	0.9977	2.137		Not Modified		ND	-	
	03		0.009423	0.015417	0.9987	1.636					-	
PGD ₂	01		0.002041	0.073018	0.9972	35.78	0.002097	-0.004939	0.9955	33.44 ± 2.852	107.0	
	02	20.00-500.0	0.002129	0.072687	0.9951	34.14	0.002087	0.002810	0.9942	35.99 ± 1.219	94.9	
	03		0.001964	0.063334	0.9988	32.25	0.001974	-0.000820	0.9989	35.34 ± 2.605	91.3	
AEA	01		0.005438	0.054909	0.9941	10.10	0.005261	0.004769	0.9926	9.754 ± 1.214	103.5	
	02	5.000-1000	0.005582	0.051480	0.9983	9.223	0.005533	0.001349	0.9983	9.549 ± 1.504	96.6	
	03		0.006195	0.050837	0.9977	8.205	0.006237	-0.001280	0.9979	8.261 ± 0.442	99.3	
OEA	01		0.012696	1.456569	0.9990	114.7	0.012712	-0.007404	0.9989	105.9 ± 0.603	108.3	
	02	100.0-3500	0.013128	1.858203	0.9992	141.5	0.013306	-0.071443	0.9984	143.5 ± 7.521	98.6	
	03		0.012588	1.784291	0.9958	141.7	0.012902	-0.131840	0.9944	141.4 ± 3.446	100.2	
DHA	01		0.181703	6.188639	0.9970	34.06	0.184777	-0.324382	0.9954	32.50 ± 5.386	104.8	
	02	25.00-1000	0.193996	5.630275	0.9954	29.02	0.195561	-0.159683	0.9956	29.41 ± 3.882	98.7	
	03		0.181452	5.959686	0.9966	32.84	0.183685	-0.218040	0.9967	29.60 ± 5.130	110.9	
AA	01		0.169062	22.305710	0.9990	131.9	0.170700	-0.683377	0.9984	146.1 ± 3.572	90.3	
	02	100.0-2500	0.227489	30.393240	0.9983	133.6	0.233393	-2.55386	0.9975	124.5 ± 8.503	107.3	
	03		0.230999	32.983073	0.9963	142.8	0.235005	-1.772111	0.9952	133.7 ± 4.892	106.8	

表4 应用BSCC的准确度、精密度与回收率

Analyte	Spiked amount (pg/mg)	Background concentration (pg/mg)	Nominal concentration (pg/mg)	Mean measured concentration (pg/mg)	Accuracy and precision		Recovery	
					RE (%)	RSD (%)	Mean(%)	RSD(%)
PGF _{2α}	60.00		112.5	115.1	2.3	12.1	92.3	9.5
	400.0	52.51	452.5	520.0	14.9	11.8	90.2	4.4
	1600		1653	1879	13.7	4.4	93.3	2.6
PGE ₂	6.000		6.000	6.096	1.6	10.9	96.1	12.2
	40.00	ND	40.00	40.69	1.7	7.0	94.5	4.7
	160.0		160.0	153.4	-4.2	2.9	98.2	2.1
PGD ₂	6.000		41.78	40.91	-2.1	3.9	98.3	9.9
	40.00	35.78	75.78	75.84	0.1	8.9	97.0	2.9
	160.0		195.8	190.7	-2.6	3.1	96.3	12.0
AEA	30.00		40.10	37.17	-7.3	8.2	95.5	7.3
	200.0	10.10	210.1	181.2	-13.0	3.1	94.4	5.2
	800.0		810.1	717.7	-11.2	5.7	90.9	5.6
OEA	60.00		174.7	160.5	-8.2	6.9	76.9	0.4
	400.0	114.7	514.7	509.7	-1.0	2.0	74.1	3.1
	1600		1715	1719	0.3	3.8	70.4	3.0
DHA	15.00		49.06	47.49	-3.2	12.8	50.3	2.6
	200.0	34.06	234.1	249.4	6.5	10.1	50.4	1.7
	800.0		834.1	782.1	-6.2	4.2	57.8	3.3
AA	30.00		161.9	149.3	-7.8	11.7	61.8	10.2
	200.0	131.9	331.9	366.9	10.5	10.6	58.1	1.6
	800.0		931.9	988.0	6.0	5.3	54.4	2.3

注：用三个批次对精密度和准确度进行了考察，由于基质匀浆液现配现用，所以 Background concentration 在每批中不一定相同。附表 1 和附表 2 为另两个批次的精密度和准确度考察结果。

表3 在三个不同分析批内对 BSCC 进行了验证, 结果显示绝大多数验证因子 VF 值均在 90%~110% 之间, 表明 BSCC 对低浓度 (基质中本身存在的内源脂质浓度) 定量的准确度与精密度良好, 标准曲线线性良好 ($r>0.99$)。表 4 分别用低中高三个浓度的质控样品对 BSCC 在线性范围内的精密度和准确度进行了验证, 理论浓度 = 基质本身浓度 + 添加浓度, RE% 与 RSD% 均在 15% 以内。各个靶标的回收率在 50.3% 到 98.3% 之间, 在不同浓度保持稳定。

2.4 内标的基质效应与回收率考察

表5 内标的基质效应与回收率

Analyte	Spiked amount (pg/mg)	Recovery		Matrix effect	
		Mean(%)	RSD(%)	Mean(%)	RSD(%)
PGF _{2α} -d4	1000	95.3	2.1	91.1	7.8
PGE ₂ -d4	1000	90.2	7.4	97.8	3.9
5S-HETE-d8	1000	74.1	7.1	111.1	7.2
OEA-d4	200.0	70.6	10.8	94.8	5.1
DHA-d5	5000	51.0	4.8	114.9	2.4

由于不存在绝对空白基质, 所以应用靶标来计算基质效应不可行。因而采用内标来考察基质效应。结果显示, 内标的基质效应和回收率均稳定, RSD% $<$ 11%。

2.5 稳定性考察

表6 方法稳定性考察

Analyte	Spiked amount (pg/mg)	Room temperature for 3 hours		72 hours at -80 °C	
		RSD(%)	RE(%)	RSD(%)	RE(%)
PGF _{2α}	60.00	11.7	-11.4	3.6	-11.5
	1600	0.7	10.2	2.6	-0.4
PGE ₂	6.000	3.0	1.9	6.3	-6.3
	160.0	3.2	0.5	3.2	-1.3
PGD ₂	6.000	7.2	-12.2	4.2	-7.1
	160.0	10.2	0.3	7.6	8.8
AEA	30.00	4.7	-4.9	3.9	-14.4
	800.0	2.5	-4.1	3.4	-11.2
OEA	60.00	3.5	-6.6	3.0	-2.3
	1600	0.6	-1.6	3.5	-1.2
DHA	15.00	10.8	7.5	1.4	-1.5
	800.0	2.4	-9.4	4.2	-3.9
AA	30.00	2.6	2.8	3.0	-6.8
	800.0	3.4	-5.4	4.0	-3.5

在低浓度和高浓度分别考察了室温放置 3 小时和 -80℃下放置 72 小时的稳定性。RSD% 与 RE% 均在 15% 以内。

2.6 应用到脑卒中大鼠的脂质定量分析

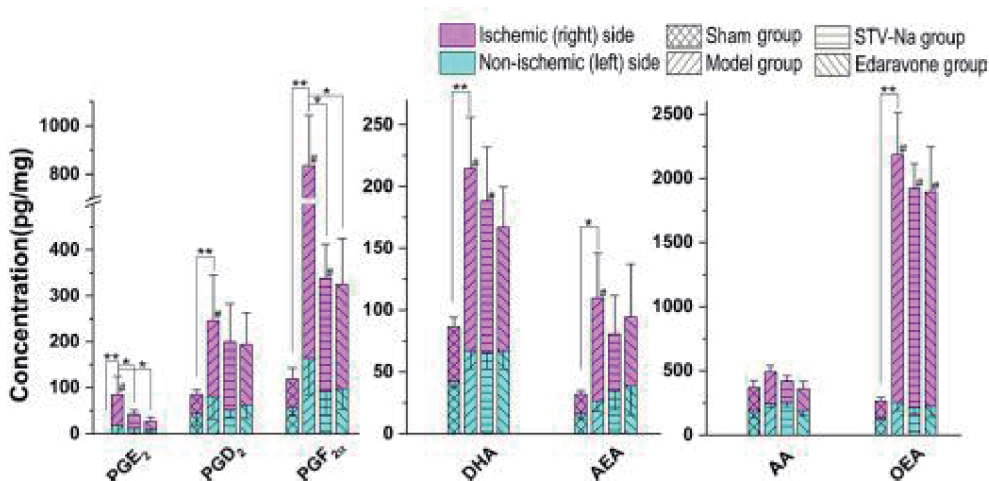


图4 不同实验组靶向脂质含量的比较
堆叠柱状图上部分代表缺血侧(由模型构建造成的右侧大脑缺血), 下部分代表非缺血侧(即对应的左侧脑组织)。自身对照: 脑组织左侧与右侧的差异, #表示 $p < 0.05$; 组间对比: *表示 $p < 0.05$ 以及 **表示 $p < 0.01$ 。PGE₂在假手术组没有被检测到。

结论

本课题使用岛津脂质介质方法包进行数据采集, 建立了一种运用背景扣除校正曲线的 LC-MS/MS 方法, 用于定量 7 种炎症相关内源性脂质介质并将该方法应用于大鼠脑卒中模型, 结果显示: 1、模型组与假手术组相比, 脑卒中能使脑组织的 PG 类化合物及一些神经保护因子 (AEA、OEA、DHA) 水平显著提高, 而 PG 类炎症因子的显著上调说明脑卒中与炎症反应的相关性, AEA、OEA、DHA 的上调说明机体本身内源性神经保护因子的应激性自我保护。2、同模型组相比, STV-Na 与 edaravone 表现有相似的抑制 COX 活性从而降低 PG 水平的抗炎作用。3、非缺血侧脑组织的炎症相关脂质水平同步提高说明炎症的发生具有弥散性, 不仅仅发生在缺血栓塞的右脑, 也会对其对侧 (左侧, 非缺血侧) 造成影响。