

# 小鼠脑组织中溶血卵磷脂和卵磷脂含量的 简便分析方法

侯威远<sup>1,2</sup>, 龙鼎新<sup>1,2</sup>, 李琴<sup>1,2</sup>, 李薇<sup>1</sup>, 伍一军<sup>1</sup>

1. 中国科学院动物学研究所分子毒理学实验室 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101;
2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**【摘要】** 目的 建立快速准确测定小鼠脑组织中卵磷脂(PC)和溶血卵磷脂(LPC)含量的简便方法。方法 小鼠脑组织经氯仿和甲醇抽提总脂后,以氯仿/甲醇/乙酸/丙酮/水(40/25/7/4/2, v/v)为展层剂,采用单相薄层层析(TLC)并结合钼蓝定磷法测定两种磷脂的含量。结果 该法测定PC和LPC的回收率分别为94.91% ± 6.74%和104.00% ± 5.38%,相对标准偏差分别为5.05%和7.10%,最低检测限为4.80 nmol。用此法测得小鼠脑组织中PC和LPC的含量分别为20257.14 ± 1022.88 nmol/g 脑重、420.91 ± 29.87 nmol/g 脑重。结论 TLC法用于小鼠脑组织中LPC等磷脂的测定,简便易操作、重现性好,不仅能够分离测定PC和LPC,而且能够分离测定小鼠脑组织中的另外其它5种磷脂。

**【关键词】** 薄层层析(TLC);小鼠;脑;卵磷脂(PC);溶血卵磷脂(LPC)

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2008)04-0066-04

## A Simple Method for Quantifying Phosphatidylcholine and Lysophosphatidylcholine in Mouse Brain by Thin-Layer Chromatography

HOU Wei-yuan<sup>1,2</sup>, LONG Ding-xin<sup>1,2</sup>, LI Qin<sup>1,2</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, WU Yi-jun<sup>1</sup>

1. Laboratory of Molecular Toxicology, State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;
2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**【Abstract】** **Objective** To develop a method for determining the contents of phosphatidylcholine (PC) and lysophosphatidylcholine (LPC) in mouse brain. **Methods** The total lipids of mouse brain were extracted with chloroform and methanol. PC and LPC were separated by one-dimensional thin-layer chromatography (TLC) using chloroform/methanol/acetic acid/acetone/water (40:25:7:4:2, v/v/v/v) as solvent and their contents were measured by determination of phosphorus using phosphomolybdenum blue method. **Results** The recovery for PC and LPC was 94.91% ± 6.74% and 104.00% ± 5.38%, respectively, with relative standard deviation of 5.05% and 7.10%, respectively. The limit of quantitation was 4.80 nmoles. The contents of PC and LPC in whole mouse brain assayed by this method were 20257.14 ± 1022.88 nmoles/g wet brain and 420.91 ± 29.87 nmoles/g wet brain, respectively. **Conclusion** The procedure described in the present study is simple, easy to deal with, and reproducible. Not only PC and LPC but also other five phospholipids in mouse brain can be assayed by this method.

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(30470228);科技部 863 项目资助(No. 2006AA06Z423) 资助。

**【作者简介】** 侯威远(1977-),男,硕士研究生,研究方向:神经毒理学。

**【通讯作者】** 伍一军,男,研究员,研究方向:分子毒理学, E-mail: wuyj@ioz.ac.cn.

**【Key words】** Thin-layer chromatography (TLC); Mouse brain; Phosphatidylcholine (PC); Lysophosphatidylcholine (LPC)

卵磷脂 (phosphatidylcholine, PC) 是真核细胞中磷脂的最主要成份, 大约占细胞总磷脂的 50%<sup>[1]</sup>。它对质膜和内膜系统的结构稳定和细胞内信号传导起着非常重要的作用, PC 代谢平衡的紊乱可导致细胞周期阻滞甚至引发细胞凋亡<sup>[2]</sup>。溶血卵磷脂 (lysophosphatidylcholine, LPC) 是 PC 代谢的中间产物, 可进一步脱酰基形成甘油磷脂酰胆碱和游离脂肪酸, 并通过酯化反应生成 PC。因而, LPC 对 PC 代谢的调节起着非常重要的作用。近年来的研究表明, 在小鼠体内, LPC 是神经毒性有机磷化合物的作用靶标-神经靶酯酶 (neuropathy target esterase, NTE) 的生理底物<sup>[3-4]</sup>, 在病理特征为神经病变为主的“有机磷化合物引发的迟发性神经毒性 (organophosphate-induced delayed neuropathy, OPIDN)”的发生过程中起着重要作用<sup>[5]</sup>。此外, 研究还发现 LPC 含量与机体病理变化相关, 如: 在发生动脉粥样硬化时硬化结块的 LPC 含量升高, 在卵巢癌患者的血浆中 LPC 水平升高<sup>[6-7]</sup>。实际上, LPC 是一种重要的信号分子, 它可以作用于 G 蛋白偶连受体引起细胞增殖、钙动员等细胞反应<sup>[8]</sup>。因此, 研究小鼠这种作为医学实验中最常用的实验动物的脑组织中 LPC 水平的变化不仅对于认识 OPIDN 的发生过程, 而且对于了解某些重要疾病的发生机理都具有重要的意义。

以往对于磷脂的分离多用 HPLC 法, 分离时需使用正相柱, 且仪器、试剂昂贵、洗脱条件复杂、技术条件也不易掌握<sup>[9]</sup>。本研究应用并改进薄层层析法 (TLC 法) 分离并测定小鼠脑组织中的 LPC 和 PC 的含量, 效果甚为理想。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器与试剂

分光光度计 (Beckman DU800), 离心机 (Beckman GS-6KR), 消化炉, 氮吹仪, 上行展层层析缸。

PC 和 LPC 标准品为 Sigma 公司产品, 氯仿、甲醇、乙酸、丙酮、钼酸钠、盐酸胍均为国产分析纯试剂。TLC 板 (硅胶 GF254, 20 cm × 20 cm, 0.25 mm 厚) 为 Merck 产品。

### 1.2 实验动物

昆明小鼠 (KM 系) 购自北京大学医学部实验

动物中心, 5~6 周龄, 体重 20~25 g (动物合格证号: SCSK(京)2002-2006)。每 3 只饲于一笼, 自由摄食、饮水, 饲养室温度保持在 (22 ± 2) °C 左右, 自然光照, 适应 3 d 后用于实验。

### 1.3 小鼠脑组织制备及总脂的抽提

参考 Folch 等<sup>[10]</sup>的方法略加改进, 具体步骤如下: 小鼠断颈处死后, 分离脑组织置于盛有冰冷的 TE 缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 0.2 mmol/L EDTA, pH 8.0) 的平皿中, 仔细剥离脑膜和血管, 用吸水纸吸干脑组织表面的缓冲液后称重。将脑组织置于带有四氟乙烯转头的电动玻璃匀浆器中, 加入 10% (w/v) TE 缓冲液匀浆。匀浆液转移到洁净的 10 mL 离心管中 3 000 r/min 离心 10 min, 上清 (S1) 加入 5 倍体积的氯仿/甲醇 (2/1, v/v) 充分混匀后 3 000 r/min 离心 10 min, 上清 (S2) 转移到另一离心管中 1 000 r/min 离心 5 min, 溶液分为上下两层, 下层为富含脂类的抽提液 (T1)。将沉淀 (P2) 与第 1 次离心后的沉淀 (P1) 合并, 然后加入 20 倍体积脑重的氯仿/甲醇 (2/1, v/v) 匀浆后 3 000 r/min 离心 10 min, 沉淀再用 10 倍体积的氯仿/甲醇 (2/1, v/v) 再抽提 1 次, 3 000 r/min 离心 10 min 后, 弃沉淀, 合并两次抽提的上清液, 加入 0.2 倍体积的 0.1 mol/L KCl, 充分混匀后 1 000 r/min 离心 5 min, 吸去上层, 下层即为抽提液 T2, 将 T1、T2 合并, 用氮气流缓慢吹干后 -20 °C 保存备用。

### 1.4 点样、展层、显色

将上述吹干样品用 400 μL 氯仿/甲醇 (1/1, v/v) 溶解后用于点样。点样时距离层析板底缘和两侧边缘各 1.5 cm 点成 3 cm (用于 LPC 测定) 或 1 cm 宽 (用于 PC 测定) 的条带。将展层剂氯仿/甲醇/乙酸/丙酮/水 (40/25/7/4/2, v/v) 预先在层析缸内饱和 1~2 h<sup>[11]</sup>。展层大约需要 2 h, 当溶剂前沿距层析板前端 1.5 cm 时停止展层, 用铅笔标记溶剂前沿的位置。展层后层析板在空气中干燥 30 min, 然后放入碘缸内显色 5 min, 待条带清晰后取出层析板并用铅笔圈出条带的位置。

### 1.5 磷脂消化

用刀片将层析后 LPC 和 PC 对应的条带刮到称量纸上, 然后倒入耐热试管中, 轻轻振荡试管使粘在管壁的硅胶粉末都落入试管底部。加入 200 μL 的 72% 高氯酸使硅胶完全湿润。将试管放在消化炉内

先在 190℃ 消化 20 min, 保证磷脂完全消化, 然后将温度调高到 220℃, 直到高氯酸完全挥发干净。整个消化过程在通风橱内进行。

### 1.6 无机磷定量

1.6.1 钼蓝生成反应的试剂配制<sup>[12]</sup>: 将 60 mL 含 10 g 钼酸钠的 4 mol/L 盐酸溶液与 14 mL 含 400 mg 盐酸胍的 4 mol/L 盐酸溶液混合后沸水浴加热 20 min, 冷却后加入 14 mL 98% 的浓硫酸, 充分混匀后加水至 100 mL, 此即为贮存液。临用时取 4 mL 贮存液加入 1 mol/L 硫酸 48 mL, 加水至 100 mL 即成工作液。

1.6.2 定磷标准曲线制作: 将无水  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  在 120℃ 烘烤至恒重后, 用三蒸水配制成 30 mmol/L 的标准溶液, 等比稀释出不同浓度的标准液 (0 ~ 600  $\mu\text{mol/L}$ ), 取各浓度溶液 0.3 mL 加入钼蓝生成反应工作液 2.7 mL。每个浓度设 3 个平行, 以 0.3 mL 三蒸水加 2.7 mL 钼蓝生成反应工作液为空白。充分混匀后, 在沸水浴加热 5 min, 冷却后在 815 nm 处测定吸光度值。

1.6.3 样品中无机磷含量的测定: 将消化后的样品冷却后, 每管加入 0.3 mL 三蒸水, 然后再加入 2.7 mL 的钼蓝生成反应工作液, 沸水浴 5 min, 1 500 r/min 离心 5 min, 冷却后测上清液在 815 nm 处的吸光度值。无机磷含量根据标准曲线计算。

### 1.7 回收率实验

取 6.5 mmol/L 的 PC 标准溶液和 11.5 mmol/L 的 LPC 标准溶液各 10  $\mu\text{L}$  于硅胶板上分别点成 1 cm 和 3 cm 宽的条带, 展层、消化后测定其回收量, 设 6 个平行, 计算平均回收率。

$$\text{回收率} = \frac{\text{测定值}}{\text{添加量}} \times 100\%$$

### 1.8 数据处理

根据标准曲线计算回归方程及相关系数。样品测定值以平均值  $\pm$  标准差表示。

## 2 结果

### 2.1 磷脂的消化和磷含量测定

用  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  做定量标准曲线的磷含量在所测浓度范围呈现良好的线性关系,  $R^2 = 0.9996$  (图 1)。最小检测限为 4.80 nmol。用 72% 高氯酸在 190℃ 消化 20 min 可使磷脂消化率达到 95% 以上。由于在强酸条件下抑制钼蓝生成, 因此磷脂消化完全后, 要将高氯酸挥发去除。这样既可以促进颜色反应, 又可以防止由于较长时间放置后高氯酸溶液中水分的挥发而带来测定液体积变化引起的误差。该法测

定 PC 和 LPC 的回收率分别为  $94.91\% \pm 6.74\%$  和  $104.00\% \pm 5.38\%$ , 回收率在理想范围。

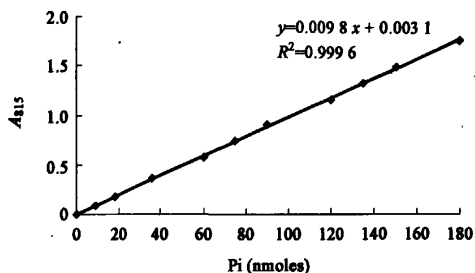
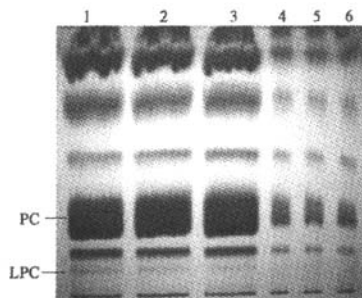


图 1 钼蓝显色法测定磷含量的标准曲线

Fig. 1 Standard curve of absorbance of the chromophore versus equivalent Pi quantity at 815 nm wavelength

### 2.2 TLC 分离小鼠脑组织中的磷脂

采用展层剂氯仿/甲醇/乙酸/丙酮/水 (40/25/7/4/2, v/v) 和上行展层法, 小鼠脑总脂的粗提取物中各磷脂成分可得到较好的分离 (图 2)。LPC 的极性较大, 其 R<sub>f</sub> 值 (0.11) 小于 PC 的 R<sub>f</sub> 值 (0.33)。经此法测得的数据表明, 正常小鼠脑组织中 PC 含量比较丰富, 达到  $20257.14 \pm 1022.88$  nmol/g 脑重, 而 LPC 含量不到 PC 含量的五分之一, 仅为  $420.91 \pm 29.87$  nmol/g 脑重。



1, 2, 3 道上样量为 60  $\mu\text{L}$ , 用于测定 LPC; 4, 5, 6 道上样量为 5  $\mu\text{L}$ , 用于测定 PC。

图 2 TLC 法分离小鼠脑组织中的磷脂

Loading amounts of the samples were 60  $\mu\text{L}$  and 5  $\mu\text{L}$ , respectively, on line 1, 2 and 3 for LPC assay and on line 4, 5 and 6 for PC assay

Fig. 2 Separation of mouse brain phospholipids by TLC

## 3 讨论

TLC 是一种较为经典的用于磷脂分析的方法, 通常有双相和单相之分, 前者耗时长, 且每次只能分析一个样品, 但适合将所有的磷脂类型完全分离。然而, 在很多情况下只要研究样品中一种或几种磷脂含量的变化而并不需要将所有的磷脂类型全部分

离,这时应用单相 TLC 就可以达到快速分离测定的目的。本研究建立单向 TLC 测定 LPC 和 PC 含量,灵敏度和回收均符合要求,尤其适合缺乏大型色谱仪器的实验室使用。

测定中需要注意样品在层析板上的点样量。由于小鼠脑组织中 LPC 含量少,为了能够有效地将样品中的 LPC 分离检测出来,需要增加上样量以增加条带的显色,并使切割下来的条带中的样品经消化后吸光值测定值不至于太低。本研究经反复试验,采用条带点样而不是圆点样方法以增加吸附面积提高上样量,在实际分离 LPC 时,上样量为 60  $\mu\text{L}$ ,并且点成 3 cm 宽的条带(图 2)。另外,由于小鼠脑组织中 PC 含量丰富,若采用同样的上样量,则会使分离得到的 PC 在定磷测定时由于含量过高而其吸光值超出标准曲线线性范围。经过反复摸索,在分离 PC 点样时点成 1 cm 宽的条带,上样量 5  $\mu\text{L}$  效果最佳。

综上所述,虽然小鼠脑中 LPC 的含量很低,但用此单相 TLC 法可对将其进行有效地分离检测,而且,此法不仅可用于小鼠脑中 PC 和 LPC 的分离测定,而且还可以用于小鼠脑组织中的其他 5 种磷脂的分离测定。

#### 参考文献:

[1] Cui Z, Houweling M. Phosphatidylcholine and cell death [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1585 (2-3): 87-96.  
 [2] Anthony ML, Zhao M, Brindle KM. Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis following induction of apoptosis in HL-60 cells [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274 (28):19686-19692.

[3] Lusis AJ. Atherosclerosis [J]. *Nature*, 2000, 407 (6801): 233-241.  
 [4] Quistad GB, Barlow C, Winrow CJ, et al. Evidence that mouse brain neuropathy target esterase is a lysophospholipase [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(13):7983-7987.  
 [5] Zaccheo O, Dinsdale D, Meacock PA, et al. Neuropathy target esterase and its yeast homologue degrade phosphatidylcholine to glycerophosphocholine in living cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (23):24024-24033.  
 [6] Muhlig-Versen M, da Cruz AB, Tschape JA, et al. Loss of Swiss cheese/neuropathy target esterase activity causes disruption of phosphatidylcholine homeostasis and neuronal and glial death in adult *Drosophila* [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(11):2865-2873.  
 [7] Okita M, Gaudette DC, Mills GB, et al. Elevated levels and altered fatty acid composition of plasma lysophosphatidylcholine (lysoPC) in ovarian cancer patients [J]. *Int J Cancer*, 1997, 71 (1): 31-34.  
 [8] Zhu K, Baudhuin LM, Hong GY, et al. Sphingoylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine are ligands for the G protein-coupled receptor GPR4 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (44):41325-41335.  
 [9] Lesnfsky EJ, Stoll MS, Minkler PE, et al. Separation and quantitation of phospholipids and lysophospholipids by high-performance liquid chromatography [J]. *Anal Biochem*, 2000, 285 (2):246-254.  
 [10] Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues [J]. *J Biol Chem*, 1957, 226 (1):497-509.  
 [11] Wang WQ, Gustafson A. One-dimensional thin-layer chromatographic separation of phospholipids and lysophospholipids from tissue lipid extracts [J]. *J Chromatogr*, 1992, 581 (1):139-142.  
 [12] Kostetsky EY, Vasendin IM. A universal reagent for phospholipid analysis [J]. *J Chromatogr*, 1975, 114 (1): 129-141.

[修回日期]2007-11-12

#### 征订启事

## 《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》2008 年广告征订

《中国实验动物学报》、《中国比较医学杂志》是由中国实验动物学会主办并发行的国家级学术刊物。该两本期刊是全国实验动物行业影响最大、学术地位最高的学术刊物,也是我国实验动物科学领域的重要广告媒体。两本期刊可为企事业单位发布产品信息、提供技术服务、宣传企事业单位形象等广告,并提供多方位信息服务。现在开始征订 2008 年广告,请有意向刊登广告单位或个人与我刊联系。电话:010-67779337。

# 小鼠脑组织中溶血卵磷脂和卵磷脂含量的简便分析方法

作者: [侯威远](#), [龙鼎新](#), [李琴](#), [李薇](#), [伍一军](#), [HOU Wei-yuan](#), [LONG Ding-xin](#), [LI Qin](#),  
[LI Wei](#), [WU Yi-jun](#)

作者单位: [侯威远, 龙鼎新, 李琴, HOU Wei-yuan, LONG Ding-xin, LI Qin\(中国科学院动物学研究所分子毒理学实验室, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京, 100101; 中国科学院研究生院, 北京, 100039\)](#), [李薇, 伍一军, LI Wei, WU Yi-jun\(中国科学院动物学研究所分子毒理学实验室, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京, 100101\)](#)

刊名: [中国比较医学杂志](#) **ISTIC**

英文刊名: [CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE](#)

年, 卷(期): 2008, 18(4)

## 参考文献(12条)

1. [Cui Z;Houweling M](#) [Phosphatidylcholine and cell death](#)[外文期刊] 2002(2-3)
2. [Anthony ML;Zhao M;Brindle KM](#) [Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis following induction of apoptosis in HL-60 cells](#)[外文期刊] 1999(28)
3. [Lusis AJ](#) [Atherosclerosis](#)[外文期刊] 2000(6801)
4. [Quistad GB;Barlow C;Winrow CJ](#) [Evidence that mouse brain neuropathy target esterase is a lysophospholipase](#)[外文期刊] 2003(13)
5. [Zaccheo O;Dinsdale D;Meacock PA](#) [Neuropathy target esterase and its yeast homologue degrade phosphatidylcholine to glycerophosphocholine in living cells](#)[外文期刊] 2004(23)
6. [Muhlig-Versen M;da Cruz AB;Tschape JA](#) [Loss of Swiss cheese/neuropathy target esterase activity causes disruption of phosphatidylcholine homeostasis and neuronal and glial death in adult Drosophila](#)[外文期刊] 2005(11)
7. [Okita M;Gaudette DC;Mills GB](#) [Elevated levels and altered fatty acid composition of plasma lysophosphatidylcholine \(lysoPC\) in ovarian cancer patients](#)[外文期刊] 1997(01)
8. [Zhu K;Baudhuin LM;Hong GY](#) [Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine are ligands for the G protein-coupled receptor GPR4](#)[外文期刊] 2001(44)
9. [Lesnefsky EJ;Stoll MS;Minkler PE](#) [Separation and quantitation of phospholipids and lysophospholipids by high-performance liquid chromatography](#)[外文期刊] 2000(02)
10. [Folch J;Lees M;Stanley GHS](#) [A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues](#) 1957(01)
11. [Wang WQ;Gustafson A](#) [One-dimensional thin-layer chromatographic separation of phospholipids and lysophospholipids from tissue lipid extracts](#)[外文期刊] 1992(01)
12. [Kostetsky EY;Vasendin IM](#) [A universal reagent for phospholipid analysis](#)[外文期刊] 1975(01)

## 本文读者也读过(10条)

1. [肖朗](#), [杨洪波](#), [李勇强](#). [XIAO Lang, YANG Hong-bo, LI Yong-qiang 活性污泥法处理高浓度脱臭后碱渣](#)[期刊论文]-[当代化工](#)2009, 38(6)
2. [吴怀英](#), [Wu Huaiying](#) [溶血磷脂酸检测异常者对缺血性脑血管病危险因素的认知及其护理干预](#)[期刊论文]-[护理研究](#)2009, 23(35)
3. [杨丹丹](#), [黄进](#), [王恬](#). [YANG Dan-dan, HUANG Jin, WANG Tian 溶血卵磷脂对肉仔鸡脂类代谢的影响](#)[期刊论文]-[畜牧与兽医](#)2008, 40(5)

4. [王鹤洲 酸性水及碱渣综合处理技术的探讨](#)[会议论文]-2004
5. [何军, 徐新良, 彭卫, 张磊 碱渣处理装置运行不正常原因分析及改造方案](#)[会议论文]-2009
6. [柴小苓, 陈琦, 叶青跃, 方红 血浆溶血磷脂酸在卵巢肿瘤中的表达及临床意义](#)[期刊论文]-[临床检验杂志](#) 2008, 26(2)
7. [杨丹丹, 黄进, 王恬, YANG Dan-dan, HUANG Jin, WANG Tian 日粮中添加溶血卵磷脂对肉仔鸡脂类代谢的影响](#)[期刊论文]-[福建农林大学学报\(自然科学版\)](#) 2008, 37(4)
8. [赵声兰, 赵荣华, 卫华, 张雪松, 赵奕全, ZHAO Sheng-lan, ZHAO Rong-hua, WEI Hua, ZHANG Xue-song, ZHAO Yi-quan 何首乌中总糖和磷脂的测定及其品质的相关分析](#)[期刊论文]-[食品与机械](#)2006, 22(5)
9. [孙进, 程刚, 何仲贵, 王淑君 磷脂膜色谱用于评价药物与有序磷脂膜的相互作用](#)[期刊论文]-[药学学报](#)2003, 38(9)
10. [何爱明, 张静, 李聪敏, 王伟 碱渣处理工艺应用](#)[期刊论文]-[天然气与石油](#)2008, 26(6)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zgsydwzz200804017.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgsydwzz200804017.aspx)