

HPLC法检测细胞培养上清液中前列腺素E₂的含量

高虹,周杨,孙远明,吴青,杨瑞丽*

(广东省食品安全重点实验室,华南农业大学食品学院,广东广州510642)

摘要:建立了检测巨噬细胞培养上清液前列腺素E₂(PGE₂)含量的高效液相色谱法,为检测体外细胞培养液PGE₂提供快速定量的方法。色谱条件为:Ultimate XB-C₁₈反相柱(250mm×4.6mm,5μm);以乙腈和0.02mol/L磷酸二氢钾水溶液(60:40,v/v)作为流动相;流量为1mL/min;检测波长为196nm。结果表明:该方法标准曲线良好,线性范围为0.5625~90μg/mL,相关系数为R²=0.999,出峰时间为3.988min,最低检测限为0.1448μg/mL,平均回收率为100.71%。本方法简单快速,适用于样品数目较多的PGE₂的快速定量检测。

关键词:HPLC,巨噬细胞RAW264.7,前列腺素E₂

Determination of prostaglandin E₂ in RAW264.7 murine macrophages by HPLC

GAO Hong, ZHOU Yang, SUN Yuan-ming, WU Qing, YANG Rui-li*

(Key Laboratory of Food Quality and Safety of Guangdong Province, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A HPLC method was developed for determination of PGE₂ contents in supernatants of RAW264.7 murine macrophages. The samples were separated on Ultimate XB-C₁₈ column (250mm×4.6mm, 5μm), eluted with mixture of acetonitrile and potassium dihydrogen phosphate solution 0.02mol/L (60:40, v/v) at 1mL/min, and detected at 196nm. Results showed that the calibration curves of PGE₂ had good linearity. The developed method exhibited good linearity over the range from 0.5625 to 90μg/mL with a correlation coefficient of 0.999. The minimum detection limit was 0.1448μg/mL and the peak time was 3.988min. The average recovery rate for PGE₂ was 100.71%. This method was simple and fast, which was suitable for determination of PGE₂ with a large sample.

Key words: HPLC; RAW264.7 murine macrophages; PGE₂

中图分类号:TS207.3

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2012)01-0326-03

前列腺素E₂(prostaglandin E₂)是巨噬细胞体外炎症模型的指示物,处于静止状态的巨噬细胞分泌PGE₂的量很少,而在受到某些致炎物质的刺激时,PGE₂的分泌量显著升高^[1-2]。一般认为,在炎症过程中PGE₂具有致炎、致痛作用^[3]。食品科学中常利用巨噬细胞模型研究一些食品的功能因子的抗炎以及免疫调节活性^[4-6]。目前大多采用酶联免疫(ELISA)法和放射免疫(RIA)法检测PGE₂,但是ELISA法的成本较高,RIA法又具有放射污染的缺点。近期高效液相色谱-荧光检测法(HPLC-FD)逐渐用于检测PGE₂,此方法通常需要采用BrMMC作为催化剂进行柱前衍生化,虽然灵敏度高,但是前处理繁琐,出峰时间比

较长,易造成污染,样品较多时无法快速检测^[7-8]。荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)是我国的岭南佳果,有“果王”之称,但“一颗荔枝三把火”,部分人群食用荔枝后出现发热、牙龈肿痛、口舌生疮、咽喉肿痛等炎症症状(俗称“上火”),对消费者健康造成危害。本研究利用巨噬细胞评价平台研究荔枝对小鼠巨噬细胞产生PGE₂炎症介质的影响,以阐明其引发炎症性“上火”反应的机理。本实验建立了一种高效快速的检测巨噬细胞培养液中PGE₂的HPLC定量检测方法,该方法对样品的前处理非常简单,特别适用样品数目较多的PGE₂的快速定量检测。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

荔枝乙酸乙酯提取物 自制;巨噬细胞RAW264.7 购自广州中医药大学免疫学教研室;DMEM培养基干粉 美国GIBCO;胎牛血清FBS 杭州四季青生

收稿日期:2010-10-20 * 通讯联系人

作者简介:高虹(1984-),女,在读硕士研究生,研究方向:食品营养与安全。

基金项目:国家自然科学基金(30900990)。

物工程材料有限公司 前列腺素E₂(PGE₂)标准品 Sigma 公司 磷酸二氢钾 分析纯 乙腈 HPLC级。

2515型高效液相色谱仪、2414型可变波长紫外检测器 美国Waters公司。

1.2 实验方法

1.2.1 待测样品的提取 小鼠巨噬细胞株RAW264.7用DMEM培养液(含10%胎牛血清)培养在6孔培养板(6×10⁵个/mL)中,在37℃,5% CO₂和饱和湿度的条件下培养,细胞生长至单层80%底面积左右时,以提取的不同浓度的荔枝乙酸乙酯提取物刺激细胞产生PGE₂,以不加提取物(无血清DMEM替代)作为空白对照,24h后收集培养液上清,1000r/min离心10min,上清液经0.22μm水系滤膜过滤,备用。

1.2.2 高效液相色谱条件 色谱柱:Ultimate XB-C₁₈反相柱(250mm×4.6mm 5μm) 流动相为乙腈:0.02mol/L磷酸二氢钾溶液(60:40 v/v);流速:1.0mL/min;进样量:10μL;柱温:30℃;检测波长:196nm。

1.2.3 标准溶液的配制与曲线绘制 精密称取PGE₂ 1mg溶解于1mL乙腈,并配制成浓度为100μg/mL的储备液。精密吸取储备液,分别稀释成0.5625、1.125、5.625、22.5、45、90μg/mL,用孔径0.22μm滤膜过滤后,置于样品瓶中,-20℃冰箱保存待用。按照上述色谱条件进行HPLC测定,作峰面积对浓度的标准曲线,求出直线回归方程。

1.2.4 样品分析 在相同的液相色谱条件下,分别将标准溶液和样品溶液注入液相色谱仪中,以保留时间定性,以试样峰面积与标准比较定量。

2 结果与分析

2.1 样品前处理条件的选择

经过不同浓度荔枝乙酸乙酯提取物刺激的细胞培养液1000r/min离心10min 水系滤膜过滤即可 操作简单 这使得在样品量较多的情况下检测更及时。

2.2 色谱条件的选择

本研究发现PGE₂在196nm处有最大吸收峰,流动相为乙腈和0.02mol/L磷酸二氢钾水溶液,流速为1mL/min时能够快速有效地分离PGE₂,其保留时间为3.988min,具体分析图谱见图1。在细胞样品中,目标峰也与细胞培养液中其他杂峰分离良好。

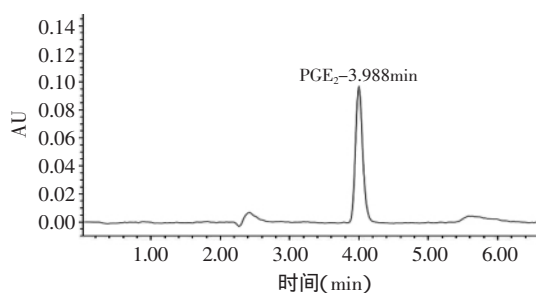


图1 PGE₂标准品液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of PGE₂ standards

2.3 PGE₂标准曲线

在规定的色谱条件下,将标准溶液系列进样10μL进行测定,结果表明,PGE₂的线性范围是0.5625~90μg/mL,作PGE₂浓度Y-相应峰面积X的线性回归方

程,其回归方程为:Y=17000X+14200,R²=0.999066。

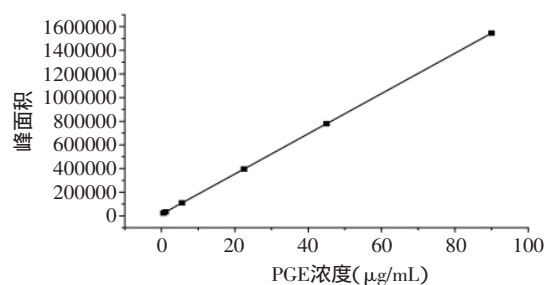


图2 PGE₂标准曲线

Fig.2 Standard curve of PGE₂

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度实验 取浓度为500μg/mL的荔枝乙酸乙酯提取物刺激巨噬细胞24h,获得巨噬细胞培养液的样品,连续6次测定的实验结果显示,精密度实验相对标准偏差(RSD)为2.87%,表明该方法具有良好的精确度。

表1 精密度实验

Table 1 Precision of the measured results

组分 名称	测定值(μg/mL)						平均值 (μg/mL)	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6		
PGE ₂	1.405	1.455	1.438	1.505	1.405	1.398	1.434	2.87

2.4.2 重现性实验 取同一批6份经过荔枝乙酸乙酯提取物700μg/mL刺激细胞培养液样本,进行样本处理作重复性考察。结果显示,重复性实验相对标准偏差(RSD)为7.39%,表明此检测PGE₂方法有较好的重复性。

表2 重现性实验

Table 2 Reproducibility of the measured results

组分 名称	测定值(μg/mL)						平均值 (μg/mL)	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6		
PGE ₂	1.659	1.612	1.401	1.402	1.601	1.605	1.547	7.39

2.4.3 回收率实验 准备已知PGE₂含量的细胞液样品各6份,分别加入不同浓度的PGE₂标准品,按上述HPLC方法作加样回收率考察。结果显示,回收率在90.03%~116.80%之间,表明HPLC检测PGE₂方法具有良好的准确性。

表3 回收率实验

Table 3 Recoveries of the measured results

本底值 (μg/mL)	加标浓度 (μg/mL)	测得浓度 (μg/mL)	回收率 (%)	RSD (%)	平均回收率 (%)
0.605	1	1.515	91.03	0.94	100.71
0.605	2	2.406	90.03	1.10	
0.901	1	1.892	99.13	0.61	
0.901	2	2.983	104.10	0.95	
1.181	1	2.349	116.80	3.52	
1.181	2	3.245	103.18	2.12	

2.5 巨噬细胞培养液中PGE₂的检测

用不同浓度荔枝乙酸乙酯提取物处理巨噬细胞,24h后按实验建立的方法对巨噬细胞培养液PGE₂进行检测,与空白对照组相比,100~700μg/mL浓度的荔枝乙酸乙酯提取物组的细胞上清PGE₂显著升高(P<0.05)。随着荔枝乙酸乙酯提取物剂量增加,细胞

上清PGE₂含量呈上升趋势。

表4 细胞培养上清液中PGE₂的检测

Table 4 Results of PGE₂ in RAW264.7 murine macrophages stimulated by ethyl acetate extracts of litchi fruit

组别	浓度(μg/mL)	PGE ₂ (μg/mL)
对照组	0	-
荔枝乙酸乙酯提取物	100	0.617±0.0015
	300	1.119±0.0072
	500	1.405±0.0236
	700	1.601±0.0345

3 结论

本研究所得的HPLC检测PGE₂色谱条件为:以Ultimate XB-C₁₈反相柱为色谱柱,以乙腈和0.02mol/L磷酸二氢钾水溶液(60:40, v/v)作为流动相,流量为1mL/min,用紫外检测器在196nm波长处检测。PGE₂保留时间为3.988min,检出线性范围为0.5625~90μg/mL。本方法对样品的前处理只需离心过滤,简单快速,出峰时间短,特别适合样品量较多的实验。

参考文献

- [1] 陆志城. 环氧化酶及其研究进展[J]. 广东药学, 2004, (14)3: 65-69.
- [2] 张娟, 王昊, 张玉彬. 环氧化酶-2抑制剂体外筛选模型在药

物抗炎机制研究中的应用[J]. 中南药学, 2005(3):144-146.

- [3] 李沧海, 周军, 霍海如, 等. 前列腺素EP3受体激动剂诱导发热及其机制初探[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(4):664-672.
- [4] Lii CK, Chen HW, Yun WT, et al. Suppressive effects of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* ser.) fruit extracts on inflammatory responses in RAW 264.7 macrophages [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 122(2):227-233.
- [5] Wu WH, Lin BY, Kuo YH, et al. Triglycerides constituted of short and medium chain fatty acids and dicarboxylic acids in *Momordica charantia*, as well as capric acid, inhibit PGE₂ production in RAW264.7 macrophages [J]. *Food Chemistry*, 2009, 117(2):306-311.
- [6] Huang CJ, Wu MC. Differential effects of foods traditionally regarded as "Heating" and "Cooling" on prostaglandin E₂ production by a macrophage cell Line [J]. *Journal of Biomedical Science*, 2002(9):596-606.
- [7] DM Desiderio, MD Cunningham, JA Trimble. High performance (pressure) liquid chromatography separation and quantification of picomole amounts of prostaglandins utilizing a novel triethylamine formate buffer [J]. *Liquid Chromatography & Related Technologies*, 1981, 7(4):1981, 1261-1268.
- [8] 吴涛, 叶笃筠, 张力, 等. 柱前衍生化高效液相色谱法测定细胞培养液中前列腺素E₂ [J]. 色谱, 2006, 24(1):104.

(上接第307页)

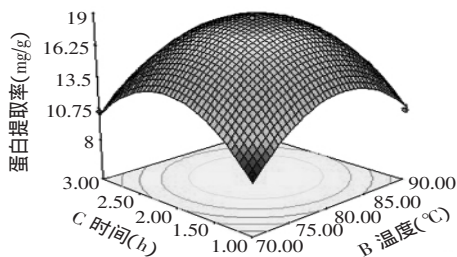


图7 提取时间和提取温度对蛋白提取率影响的响应面图

Fig.7 Response surface of extraction time and extraction temperature on the extraction rate of protein

在模型浓度范围内选择出发点,使用快速上升法进行优化得到的菊芋蛋白提取的最佳方案为:pH14.00,提取温度81.79°C,提取时间:2.11h,菊芋渣蛋白得率23.3187mg/g。为检验响应曲面法所得结果的可靠性采用上述优化提取条件提取南瓜多糖,考虑到实际操作的便利,将提取工艺参数修正为pH14.0,提取温度82°C,提取时间2h。以上述条件进行实验结果的验证,重复3次实际测得的蛋白得率分别为22.6252、23.1173、22.5890mg/g,平均蛋白得率为22.7747mg/g。与理论预测值相比,其相对误差约为2.33%。说明通过响应面优化后得出的回归方程具有一定的实践指导意义。

3 结论

采用碱提的方法对菊芋渣中蛋白质进行提取,通过单因素实验和Box-Behnken中心组合设计原理以及响应面分析法对提取工艺进行优化,拟合了pH、提取温度、提取时间这3个因素对蛋白的原料提取率的回归模型,经检验证明该模型合理可靠,能较好地

预测菊芋渣中碱溶性蛋白的原料提取率。由该模型确定的最优工艺条件为pH14.0,提取温度82°C,提取时间2h。在此条件下,得到菊芋渣平均蛋白得率为22.7747mg/g。通过模型系数显著性检验,得到因素的主效应关系为:pH>提取温度>提取时间。

同时,在单因素实验时与菊芋干粉做了对照实验。结果表明虽然菊芋干粉中碱溶性蛋白的提取率比菊芋渣的高,但从资源充分利用的角度来看,菊芋渣还是具有很大的开发潜力。目前,国内外对菊芋渣的研究未见报道,因此,为了充分开发利用菊芋渣蛋白这一植物蛋白资源,仍需加大科研力度,完善菊芋蛋白提取分离基本理论和方法,满足工业产业化生产的要求。

参考文献

- [1] 秦亚兵, 徐长警, 王华, 等. 宁夏兴建菊芋系列产品加工业的构想与建议[J]. 宁夏农林科技, 2004(1):31-35.
- [2] 矫丽媛, 吕敬军, 陆丰升, 等. 花生分离蛋白提取工艺优化研究[J]. 食品科学, 2010, 20(31):196-201.
- [3] 李明妹, 姚开, 贾冬英. 碱提酸沉法制备花生分离蛋白的优化条件[J]. 中国油脂, 2004, 29(11):21-23.
- [4] 陈学玲, 罗金国, 何建军, 等. 大豆11S球蛋白提取分离方法研究[J]. 中国粮油学报, 2007, 22(1):160-163.
- [5] 赵英永, 戴云, 崔秀明, 等. 考马斯亮蓝G-250染色法测定草乌中可溶性蛋白质含量[J]. 云南民族大学学报:自然科学版, 2006, 15(3):235-237.
- [6] BOXG E P, BEHNKEN D W. Some new three level designs for the study of quantitative variables [J]. *Technometrics*, 1960(2):455-475.