文章编号:1000-5404(2006)24-2481-02

技术方法

高效液相色谱法检测大鼠脑线粒体的腺苷酸

潘 峰[1],孙 玮[1],路 菊[1],张正治[1],柳君泽[2],李 兵[2] (第三军医大学高原军事医学系:[1]中心实验室,[2]病理生理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 建立大鼠脑线粒体腺苷酸简便、快速、有效的高效液相色谱法。**方法** 采用 Hypersil BDS C_{18}(5 μm,250 mm×4.6 mm)色谱柱对标准品和样品进行色谱分析。**结果** 腺苷酸(AMP、ADP、ATP)在 0.25~40.0 μg/ml 的范围内,线性关系良好,加标平均回收率大于(97.59±2.47)%,相对标准差(RSD)小于 3.84%。**结论** 本法操作简便,线性关系好,回收率高、准确可靠,适于线粒体内腺苷酸的检测分析。

线粒体是真核细胞内重要的细胞器。检测脑线粒体腺苷酸池的含量,对研究缺氧尤其是高原缺氧引起的中枢神经系统功能紊乱、缺血再灌注损伤、细胞凋亡、心肌病等发生的细胞机制有重要意义。高效液相色谱法(HPLC)测定大鼠心、骨骼肌及脑等组织的腺苷酸均有报道[1,2],而对大鼠脑组织线粒体腺苷酸少见报道。现对大鼠脑组织线粒体腺苷酸的 HPLC 分析报告如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

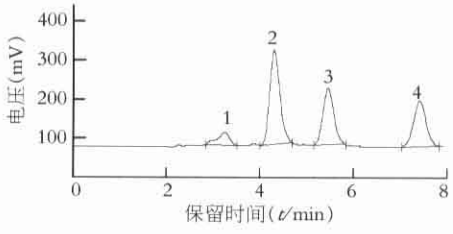
Waters 公司高效液相色谱仪,510 泵, 484 紫外检测器,Rheodyne7725i 进样阀。EC 2000 色谱工作站(大连依利特)。J2-21M 高速离心机(美国贝克曼)。

标准品 ATP、ADP、AMP (Sigma 公司);四丁基氢氧化铵(TBA)、K_2HPO_4、KH_2PO_4等试剂为分析纯;实验用水为超纯水。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱:Hypersil BDS C_{18}(5 μm,250 mm×4.6 mm,大连化物所)。流动相:0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液(含 3 mmol/L TBA,pH=5.85):甲醇=88:12(体积分数)。紫外检测波长 254 nm,柱温 20 ℃。

1.2.2 标准液的配制 精确称取标准品各 10.0 mg,加纯水 10 ml,配成 1.0 mg/ml 的标准储液。依次稀释 40.0、20.0、5.0、2.5、1.0、0.25 μg/ml 的标准液,各进样 20 μl,作色谱分析,其色谱图见图 1。

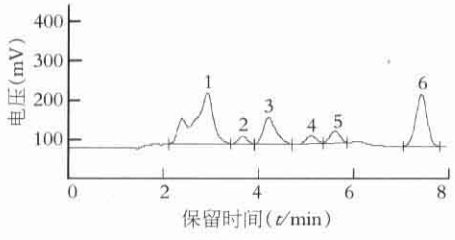


1:未知峰;2:AMP;3:ADP;4:ATP

图1 标准品色谱图

1.2.3 实验动物取材及线粒体的提取 雄性 Wistar 大鼠 6 只,体质量 150~250 g(由本校实验动物中心提供)。断头处死,迅速分离脑组织,置于 0~4 ℃生理盐水洗 2 次,立即埋入冰碴的线粒体分离介质中,按文献[3]的方法提取线粒体。按 Lowry 法测定线粒体蛋白质浓度,以牛血清白蛋白作标准。

1.2.4 样品处理及分析 线粒体悬液按文献[4]处理后,20 μl 进样,作色谱分析。色谱图见图 2。



1,2,4:未知峰;3:AMP;5:ADP;6:ATP

图2 样品色谱图

2 结果

2.1 标准曲线

峰面积 A 与浓度 C 进行线性回归,其方程为:

$C_{AMP}=3.77\times10^{-1}\cdot A-2.21$ $r=0.999\ 97$

$C_{ADP}=5.88\times10^{-1}\cdot A-1.46$ $r=0.999\ 98$

$C_{ATP}=5.91\times10^{-1}\cdot A-7.20$ $r=0.999\ 96$

结果表明,在 0.25~40.0 μg/ml 范围内线性关系良好。

2.2 回收率及精密度实验

取正常大鼠脑组织线粒体悬液 4 份,各 500 μl,1 份作本底值,另外 3 份分别加入标准液,使其浓度为 2.0、10.0、30.0 μg/ml,按样品处理方法操作。按公式:回收率=(加标测定量-本底含量)/加标量×100%,计算加标回收率,求得平均回收率分别是 AMP:(97.59±2.47)%、ADP:(102.28±3.85)%、ATP:(98.59±2.83)%。本底样品在 8 h 内,不定时 5 次进样,求得 RSD 分别是 AMP:1.02%、ADP:2.43%、ATP:3.84%。

2.3 样品测定

对 6 只正常大鼠脑线粒体进行测定,其结果如下(单位 nmol/mg):AMP:(7.194 3±0.684);ADP:(4.649 33±0.633);ATP:(11.09±0.857)。

作者简介:潘 峰(1964-),男,重庆市开县人,高级实验师,主要从事高效液相色谱在生物医药应用方面的研究。电话:(023)68752349

收稿日期:2006-05-12;修回日期:2006-08-31

3 讨论

对腺苷酸的检测，HPLC是目前最简便、快速、有效、应用广泛的分析方法。常用磷酸盐-甲醇体系作流动相，由于ATP、ADP在pH>3.0的溶液中呈负性，极性强，所以在C_{18}色谱柱的保留时间短，且不能有效分离。即使ATP、ADP标准分离好，对于样品或者在分析一定数量样品后，ATP、ADP往往不能完全分离，还有杂峰干扰，影响定量分析。在流动相中加入的TBA能起离子对试剂的作用，增加了ADP、ATP在C_{18}色谱柱上的保留，在磷酸盐-甲醇体系中，ADP、ATP能完全分离，且不受杂峰干扰。

采用密度梯度离心法分离线粒体，纯度高、形态完好、活性强[5]。HPLC测定腺苷酸需要样品量少，结果准确、可靠，回收率高，其结果更能准确地反应线粒体的能量代谢。在研究高原急、慢性缺氧，ATP生成率，腺苷酸库能荷的实验研究中，HPLC是必不可少的检测方法。

关键词：线粒体；腺苷酸；高效液相色谱法；检测
中图法分类号：R446.8 **文献标识码**：B

参考文献：

[1] 张燕婉，龙 村，史世勇. 反相离子对高效液相色谱法测定心肌组织中的三磷酸腺苷[J]. 色谱，2000，18(4)：322－324.
[2] 潘 峰，孙 玮，王一健，等. 反相高效液相色谱分析大鼠脑组织腺苷酸[J]. 解放军预防医学杂志，2001，19(5)：343－345.
[3] CLARK J B，NICKLAS W J. The metabolism of rat brain mitochondria. Preparation and characterization[J]. J Biol Chem，1970，245(18)：4724－4731.
[4] 柳君泽，高文祥，曹利飞，等. 低压缺氧大鼠脑线粒体内腺苷酸含量及能荷的变化[J]. 第三军医大学学报，2003，25(24)：2165－2168.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2006)24-2482-01

食道癌胃转移1例

彭志红[1]，唐 波[2]，彭贵勇[1]，汪荣泉[1]，房殿春[1]（第三军医大学西南医院：[1]全军消化内科中心，[2]普通外科，重庆 400038）

患者，女性，33岁，因胸骨后不适伴腹胀来我院就诊。平素体健，查体无异常。胃镜提示：食管距门齿22 cm见黏膜不平，贲门口合良好。胃底少量清亮胃液，胃体脑回状，桔红色，胃体下部大弯侧见黏膜增厚，蠕动差，表面尚光滑。余未见异常。分别于胃体下部大弯侧及食道取病理活检，病理诊断：食道鳞状细胞癌，未见明显浸润，胃体黏膜内见癌浸润，考虑为食道鳞状细胞癌伴胃体转移。超声胃镜检查提示：食管20～24 cm黏膜粗糙不平，部分小结节样增生。超声小探头显示病灶管壁低回声增厚，部分侵犯黏膜下层，血管纹理清晰，无静脉曲张。贲门口合良好。胃底少量清亮胃液，胃体中下部黏膜增厚，僵硬，超声小探头显示胃壁明显低回声增厚，层次不清。诊断考虑：食道鳞状细胞癌伴胃体转移。因经济原因放弃治疗。

讨论

食管癌发生胃转移较罕见，国外报道其发生率为0.1%[1]，本例符合Saito等提出食管癌胃转移组织学诊断标准。食管癌胃转移途径仍有争议，部分认为是血行或腔内种植转移；大多数学者认为是淋巴转移[2]。

食管癌胃转移常在术中或术后病理学检查证实，术前很少有能确诊者。本例是在初诊时确诊。我们认为提高诊断率的关键，一是要对本病有足够的认识，二是要进行术前详细的各项检查。术前应常规行胃镜及X线检查，若食管无完全堵塞，胃镜检查时要尽可能通过，以观察胃内情况，另外，胃内怀疑有病变处，因深挖，同时取多块组织，提高诊断率。此外应重视腹部B超检查，当腹部B超发现胃部病变而内镜检查黏膜正常时，应高度怀疑食管癌胃转移可能。必要时行超声内镜检查观察胃壁及周围脏器、淋巴结情况。

食管癌伴胃转移患者累积生存率明显低于无胃转移者，可能与大部分患者肿瘤进展或转移严重，肿瘤穿透管壁（T3或T4）、区域淋巴结转移有关。手术切除患者术后近期生活质量较非手术患者为佳，可解除进食梗阻，减少胃病灶出血机会。因此，我们认为食管癌伴胃转移患者应早期详细检查，及时发现病灶，提高手术根治性；术后积极放化疗及免疫治疗可改善预后。

关键词：食道癌；胃转移
中图法分类号：R735.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] ERIHARA Y，HOSOKAWA M，KONDOU S，*et al*. Thirteen cases with intramural metastasis to the stomach in 1259 patients with oesophageal squamous cell carcinoma[J]. Eur J Cardiothorac Surg，2004，26(6)：1223－1225.
[2] GOTOHDA N，NISHIMURA M，YOSHIDA J，*et al*. The pattern of lymphatic metastases in superficial squamous cell carcinoma of the esophagus[J]. Hepatogastroenterology，2005，52(61)：105－107.

（编辑 江勃俭）

作者简介：彭志红（1975－），女，四川省雅安人，硕士，主治医师，主要从事消化道肿瘤基础及临床方面的研究，发表论文7篇。电话：(023)66595207，E-mail：pengzhihong@yahoo.com.cn

收稿日期：2006-08-29；修回日期：2006-09-15