DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.02.043

3 讨论

Ab-PABF 组化染色法的染色原理与 Ab-PAS 组化染色法有所不同。Ab-PAS 组化染色法的染色原理是:阿利新兰染料分子中带正电荷的盐基和酸性物质负电荷的酸基结合形成蓝色反应。应用过碘酸这一强的氧化剂把含有糖类物质氧化而产生双醛(CHO-CHO),醛可以与 Schiff 试剂反应,亚硫酸品红与双醛结合便形成了紫红色反应物。而 Ab-PABF 组化染色法的染色原理是:首先应用阿利新兰染料分子中带正电荷的盐基与酸性物质的负电荷的酸基结合形成蓝色反应,与此同时便阻断了酸性粘液的羧酸分子中的乙二醇基,而切片进入 PABF 染液时,只有中性粘液物质中的乙二醇基或氨醇基才能和未经脱色的碱性品红与过碘酸结合形成红色的最终反应物。

小肠粘液可分为中性与酸性两大类。为了使这两种粘液物质能在同一张切片中同时显示出来,我们将5组小鼠小肠组织的连续切片分别应用了 Ab-PABF 组化染色法与 Ab-PAS 组化染色法显示其中不同的粘液类型。并将这两种染色方法所得到的染色结果进行了彩色图像分析与统计处理,证明了 Ab-PABF 组化染色法达到了 Ab-PAS 组化染色法同样的显色效果;Ab-PABF 组化染色法同样可在同一张切片上同时显示不同的粘液类型,且着色对比清晰,反差大,而更重要的是,Ab-PABF 组化染色法克服了 Ab-PAS 组化染色法中诸多的缺陷与不足,而表现出以下几方面的优点:Ab-PABF 组化染色法比 Ab-PAS 组化染色法操作简单。Ab-PAS 组化染色法中涉及了 Schiff 试剂的配制,而 Schiff 试剂的配制必须经过加热煮沸、冷却、过滤、吸附等一系列过程,Ab-PABF 组化染色法中省去了 Schiff 试剂配制的繁琐步骤,只需在临染色前将碱性品红水溶液与过碘酸水溶液按比例混匀即可使用。此外,Ab-PABF 组化染色法与 Ab-PAS 组化染色法容易掌握。Ab-PAS 组化染色法对实验条件要求比较高,如过碘酸氧化作用时的温度,作用时间都对染色结果有很大的影响。如果温度过高,作用时间过长,则可使某些物质成分发生非特异性反应而致染色结果出现假阳性。而 Ab-PABF 组化染色法则避免了上述条件的影响,且要求室温控制在30℃即可,极少发生非特异性染色,背景显得十分干净。另外,Ab-PABF 组化染色法比 Ab-PAS 组化染色法更加经济、实用。Ab-PAS 组化染色法中碱性品红的用量是0.5～1 g/100 ml,而 Ab-PABF 组化染色法中碱性品红的用量只需0.2 g/100 ml 即可,后者比前者节约试剂2～5倍。由于试剂的用量减少,节省经费对于广泛开展 Ab-PABF 组化染色显示小肠粘液物质提供了方便。

关键词 粘液;改良的 Ab-PABF 组化染色;Ab-PAS 组化染色;图像分析

中图法分类号 R329－34

参考文献

1 Perera PAC. Periodic Acid-Basic fuchsin (PABF) technique for the demonstration of carbohydrates and mucosubstances in paraffin sections: an alternative to PAS technique. The Journal of histotechnology,1991;14(3):155

2 易家农.组织学与组织化学技术.湖南医学院,1986:200～201

3 蔡文琴,王伯沄主编.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.成都:四川科学技术出版社,1994:182～183

(收稿:1995-09-26;修回:1996-01-20)

(编辑 冷怀明、汪勤俭)

梯度洗脱高效液相法测定脑组织三磷酸腺苷及其代谢产物

Determination of adenosine triphosphate and its metabolities in brain tissue by gradient elution high-performance liquid chromatography

黄永平 黄林清 徐传福 周世文 张诗平 (第三军医大学附属新桥医院中心实验室)重庆,630037

能量代谢是组织细胞赖以维持其结构和功能正常的物质前提。脑组织能量物质的测定是研究脑组织在生理、病理条件下代谢变化的重要指标,而三磷酸腺苷(ATP)是脑组织中的主要能量物质。为配合我院脑移植的研究,我们建立了测定脑组织 ATP 及其代谢产物的梯度洗脱高效液相色谱技术,以了解胎兔脑组织

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的能量代谢情况。

1 材料和方法

1.1 试剂

5'-腺苷三磷酸(ATP)、5'-腺苷一磷酸(AMP)、肌苷(Inosine,INO)、次黄嘌呤(Hypoxanthine,Hx)、黄嘌呤(Xanthine,X)系上海生物化学研究所制品;5'-腺苷二磷酸(ADP),德国,Fluka,AR;甲醇、磷酸铵等试剂均为国产分析纯级。

1.2 仪器

HPLC色谱仪:System Glod™,美国Beckman公司产品。167紫外检测器,126泵,406转换器均为美国Beckman产品。AST286计算机,香港。EPSON LX-800型打字机,日本。

1.3 色谱条件

5 μm ULTRASPHERE ODSC_{18}柱(4.6×150 mm)。参照文献[1,2]报道的方法加以修改。流动相为0.05 M $(NH_4)_3PO_4$缓冲液(pH6.0)和甲醇,采用线性梯度,其甲醇含量在0~5 min内由0%升至2%,5~12 min内维持在2%水平,12~15 min由2%升至8%,15 min后甲醇为0%。流速:1 ml/min。检测波长:250 nm。进样量:20 μl。压力:1.9 kpsi。

1.4 样品来源及处理

样品来源于23~24 d的兔胚胎。孕兔以3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)静脉注射麻醉,消毒铺巾,剖腹,从子宫中取出兔胎,剪开头皮、颅骨及脑膜,暴露脑组织,以锐利刀片切下,立即置于液氮中保存。检测前取出,在预冷(0℃)的乳钵中研磨,加冷冻的3.6%高氯酸($HClO_4$)3 ml,冰浴中用内切式组织匀浆机制成匀浆,9000×g离心30 min(0℃)。取上清,用3 mol/L KOH,0.50 mol/L K_2CO_3中和,调pH为5.0~6.0,放置12 h后(0℃),再次离心(0℃,10 min,600×g),取上清液,用0.45 μm微孔滤膜过滤。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线的制作

准确称取ATP、ADP、AMP、INO、Hx、X,置于10 ml棕色容量瓶中,加水稀释至刻度,混匀配成含ATP、ADP、AMP、INO、Hx、X的贮备液,其含量分别为:1×10^{-5},3×10^{-5},0.5×10^{-5},0.3×10^{-5},1×10^{-5},6.4×10^{-5} mol/L,并逐次两倍稀释5次,配成6个等比梯度的标准液,通过检测其不同浓度的相应峰面积,计算各直线回归方程和检测结果的相关系数。(ATP:$y=0.74673x-0.04085$;$r=0.99903$;ADP:$y=1.01660x-0.11691$;$r=0.99999$;AMP:$y=0.49146x+0.00358$;$r=0.99544$;INO:$y=0.57567x-0.01632$;$r=0.99903$;Hx:$y=0.62189x-0.04648$;$r=0.99945$;X:$y=7.21083x-0.49461$;$r=0.99906$;检测值均乘以10^{-5} mol/L)。

2.2 标准物质的保留时间

在上述设定条件下,能较好地分离上述6种标准物质,其保留时间分别为(min):INO-3.82;ATP-7.74;ADP-8.24;Hx-8.58;X-9.59;AMP-11.57。

2.3 六种标准物质的重复性和回收率

对6种标准物质进行重复性实验($n=5$),并经统计学处理,其变异系数(CV)在0.34%~3.45%之间(见表1)。兔胎脑组织中分别加入一定量的标准物质,未加入和加入标准物质的脑组织分别上柱检测,计算样品的回收率为96.7%~105.2%(见表2)。

表1 标准物质的重复性(峰面积 $n=5$)

标准物质	$\bar{x}$	s	CV(%)
INO	0.55066	0.00815	1.48
ATP	1.38840	0.03374	2.43
ADP	3.06652	0.10579	3.45
AMP	1.00007	0.02190	2.19
Hx	1.68625	0.03153	1.87
X	0.95477	0.00325	0.34

表2 样品的回收率

物质	INO	ATP	ADP	AMP	Hx	X
加入量(ng)	2.00	12.7	31.9	4.4	3.4	24.3
测得量(ng)	1.97	12.3	32.6	4.63	3.44	24.1
回收率(%)	98.5	96.7	102.3	105.2	101.2	99.3

综上所述,我们应用反相HPLC,采用梯度洗脱技术,可同时测定脑组织中与ATP代谢有关的6种化合物。尽管测定生物样本能量物质的方法较多,如活体核磁共振技术(NMR)[3],但其设备昂贵,难于推广应用;酶学方法、生物发光技术和等速电泳等方法[4],操作繁琐,影响因素多,不能同时检测多种代谢产物。而本文介绍的方法检测精度和准确度均符合方法学要求,具有操作简便,测定时间短,标本用量少等优点,是测定脑组织中能量物质的理想技术。

关键词 三磷酸腺苷;色谱法;高效液相

中图法分类号 R446.1

参考文献

1 Anderson FS, Murphy RC. Isocratic separation of some purine nuleotide, and base metabolities from biological extracts by high-performance liquid chromatography. J Chromatography, 1976;121:251

2 Reimer KA, Hill ML, Jennings RB. Prolonged depletion of ATP and of the adenine nucleotides pool due to delayed resynthesis of adenine nucleotides following reversible my-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

ocardial ischemic injury in dogs. J Mol Cell Cardiol, 1981; 13:229

3 Thulborn KR, Du Boulay GH, Duchen LW *et al*. ^{31}P nuclear magnetic in vivo study of cerebral ischemia in the gerbil. J Cereb Blood Flow Metab, 1982; 2:299

4 Jenning RB, haawkins HK, Lowe JE *et al*. Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in the dog. Am J Pathol, 1978; 92:187

(收稿:1995-08-01;修回:1996-01-20)

(编辑 冷怀明)

离子型与非离子型两种造影剂的比较研究

Comparative study of ionic and nonionic contrast media

刘凤秀 谢 兵 陈 洁 牟 玮 游 箭 (第三军医大学附属西南医院放射科) 重庆,630038

血管造影检查质量保证(QA),是80年代初期产生的,是医学物理学发展的重要成果。随着介入放射学的发展,造影剂引起的不良反应也时有发生,成为介入放射性血管造影并发症发生的重要因素之一[1]。为减少此类并发症,文中就离子型与非离子型造影剂进行对比,结果报道如下。

1 一般资料

我院自1988年4月至1992年4月共进行介入造影940例,980例次。造影剂选用的是国产76%泛影葡胺和德国"先灵公司"的优维显(Ultravist 240—370)。造影剂用量根据各部位不同分别决定,也根据造影全程情况而定。造影剂均为高压注射器推注,"PUCK"大片进行造影。用先灵公司的优维显一般不用镇静剂。用国产76%泛影葡胺时,在造影前用地塞米松5 mg静脉推注或肌注。我们对两种不同造影剂的造影质量及造影反应进行了观察。首先用光密度计(温州自动化设备厂产的MDX—5光密度计)进行造影后的胶片测定,得出各密度区优良差之密度值。各区密度(胶片)标准为:全透明区(未感光区)以0.10～0.20为优,0.21～0.29为良,0.30以上为差。胶片全黑化区:2.0以上为优[2],1.70～1.99为良,低于1.69为差。无血管区:0.50～0.60为优,0.60～0.80为良,0.81以上为差。血管区:1.80～2.50为优,1.60～1.79为良,低于1.59为差,全部造影的投照条件、方式、距离及洗片等均按常规操作不变。将两种造影剂造影后的胶片影像质量进行对比和评价。结果见表1。

表1 两组造影剂胶片影像质量比较

组别	例数				百分比(%)			
	优	良	差	合计	优	良	差	合计
优维显	180	60	0	240	75.0	25.0	0	100.0
76%泛影葡胺	421	274	5	700	60.1	39.1	0.71	100.0

统计处理,得到 $t=7.58$, $P<0.01$,相差显著,说明优维显造影明显优于76%泛影葡胺。

两种造影剂从开始注入体内至1 h观察其不良反应,240例优维显造影中64例次有不适热感(26.7%),700例76%泛影葡胺中624例有轻度反应不适热感(89.1%),见表2。

表2 两种造影剂不适反应发生情况

反应表现	例数		发生率(%)	
	优维显 ($n=240$)	泛影葡胺 ($n=700$)	优维显	泛影葡胺
重热感	4	20	1.66	2.85
轻度热感	64	624	26.67	89.14
全身不适	2	89	0.83	12.71
呼吸困难	0	16	0	2.28
恶心呕吐	3	36	1.25	5.14
抽搐头痛	3	9	1.25	1.28

(病人反应的一过性感觉和症状,经对症处理后未做客观标准记录)

统计处理,得到 $t=2.024$, $P<0.001$,相差显著,优维显造影引起的不适远少于泛影葡胺。

2 讨论

血管造影(包括介入)质量保证,在造影剂的选择上十分重要,为了尽可能的使病人安全和保证造影成功,我们主张在进行血管造影时将优维显(非离子型)作为首选造影剂,个别自费病人在剂量较大的血管造影中也应选择优维显作为首选药。国产泛影葡胺虽然价格低,影像质量也较好,但不良反应不少,在造影过程中或造影后除了病人有一过性热感外,约5%的病人出现不同程度的头痛、头晕、心悸、恶心呕吐、抽搐等过敏反应或重症并发症等,影响摄片质量,增加病人痛苦,而优维显为一种水溶性非离子造影剂,注射后不离

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net