DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.04.038

现在以上条件下2 h内呈色稳定。

2.5 重复试验

混合血清进行重复测定($n=20$),$\bar{x}=6.5$、S_O 0.16,OCV 2.5%;$\bar{x}=6.62$、S_R 0.18、RCV 2.8%。

2.6 回收试验

配制42.84、21.42、7.14 mmol/L尿素标准液做回收试验,基础值为4.1 mmol/L,测得值分别为8.1、5.96、4.77 mmol/L,回收率分别为95.8%、97.3%、104.6%,平均回收率为99.2%。

2.7 与脲酶法、二乙酰一肟法对比试验

选用高、中、低三种浓度病员标本46例进行对比试验(见图2、3)。

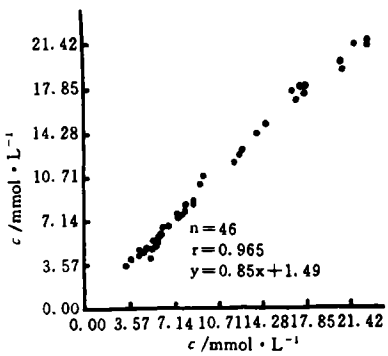


图2 二乙酰一肟与改良法对比曲线

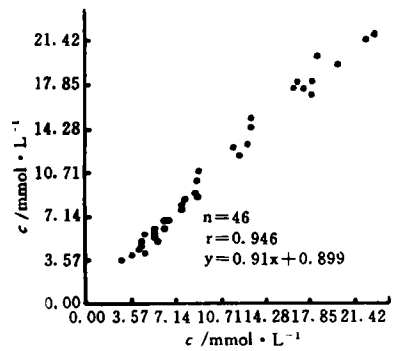


图3 脲酶法与改良法对比曲线

2.8 参考范围

用改良法对40例健康成人检测,男28例、女12例,年龄25~48岁。正常参考范围5.27±1.98 mmol/L。

Gabrie Lopez-Castro法,加用0.5%十六烷基三甲基溴化铵改良后,消除了标本易混浊的干扰,明显提高了方法的灵敏度。在线性范围内的病理情况可灵敏地反应出来。当尿素浓度在20 mmol/L以上需稀释后再测定。改良法与脲酶法,二乙酰一肟之间无明显差异。经系统的方法学评价实验说明:该法具有重复性好,线性范围广,且有快速、简便、试剂稳定、用血量少的优点,克服了酶试剂昂贵,不易久存及二乙酰一肟需煮沸的缺点。为急诊检验的优选方法。适用于各种实验室,有一定推广价值。

关键词 尿素/血液;邻苯二甲醛;偏钒酸铵;表面活性剂

中图法分类号 R446.1

参考文献

1 Gabrie Lopez-Castro. Colorimetric Reagent for Assay of urea. Clin Chem,1991;37(10):804~805

2 叶应妩,王毓三主编.全国临床检验操作常规.南京:东南大学出版社,1991:226~227

(收稿:1995-01-20;修回:1995-05-15)

一种快速、简便测定腺苷酸含量的高效液相色谱法

A rapid, simple assay of adenine nucleotides by high performance liquid chromatography

朱 珠 陈炜伟 (第三军医大学基础部中心实验室)重庆,630038

腺苷酸类(ATP、ADP、AMP)是参与遗传信息贮存、传递与表达的核酸"构件"分子,亦是生物氧化、能量代谢中的能源物质,其中ATP又是临床治疗冠心病及心肌梗塞等的药物,因此这些成分的测定意义十分重大。以往采用电泳法、层析法、酶学方法等分析方法进行测量,方法复杂,测定时间长、灵敏度低。近年来随着高效液相色谱法(HPLC)的广泛应用,已有用HPLC分析腺苷酸的文献报道[1~6]。本文在参照这些方法的基础上,结合国内实际情况加以改进,提出用磷酸钠缓冲液溶剂洗脱分离和测定组织中的腺苷酸,12

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

min即可分析微小样本，取得满意效果。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

美国Waters高效液相色谱仪，配备510泵，U6K进样器，484紫外检测器，810色谱工作站。

ATP、ADP、AMP均购自Sigma公司，Na_2HPO_4，NaH_2PO_4为分析纯，实验用水为重蒸去离子水。ATP、ADP、AMP用水配制成1 mg/ml的标准储备液，4℃保存。

1.2 色谱条件

色谱柱：Waters μBondapak C18柱(15 cm×0.38 cm)，流动相：50 mmol/L磷酸钠缓冲液(pH=6.0)，流速：0.5 ml/min，紫外检测波长：254 nm，样品进样体积：50 μl。

1.3 样本处理

体重250 g左右的大鼠，断头处死，迅速解剖，取出心脏置液氮中冷冻，加0.1 mol/L高氯酸冰浴中磨成匀浆(1 mg组织加20 μl)，在4℃ 30000×g离心20 min，取上清液作色谱分析。

2 结果

2.1 实验色谱图

腺苷酸混合标样及大鼠心肌样本中腺苷酸分离的色谱图见图1和图2。从图中可以看出ATP、ADP、AMP均能达到基线分离，且生物样本中腺苷酸的测定无明显杂质干扰。

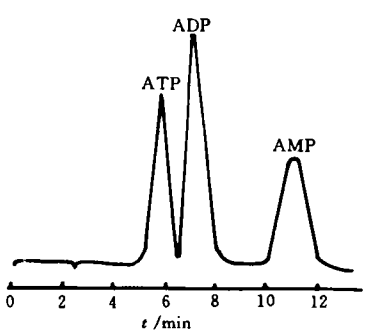


图1 腺苷酸混合标准液分离谱图

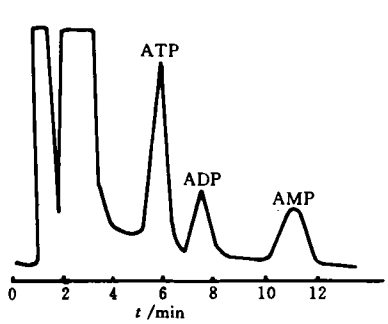
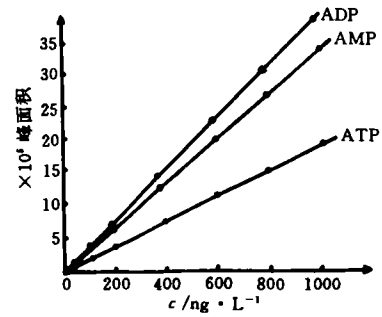


图2 大鼠心肌组织腺苷酸分离谱图

2.2 线性

在本文实验条件下，分别用不同浓度的混合标样进样分析，观察浓度与峰面积之间的关系，结果表明在5.0～1000 ng范围内三种物质线性关系良好(图3)。



ATP：$C=5.88\times10^{-4}\cdot R-1.82$ $r=0.9990$

ADP：$C=2.97\times10^{-4}\cdot R-5.30$ $r=0.9999$

AMP：$C=2.68\times10^{-4}\cdot R-3.79$ $r=0.9990$

图3 ATP、ADP、AMP标准曲线

2.3 精确度及回收率实验

本法无论是精确度还是回收率都是令人满意的(附表)。

附表 ATP、ADP、AMP三种化合物精确度及回收率实验结果($n=5$)

	变异系数CV(%)		回收率($\bar{x}\pm s$)
	日内	日间	
ATP	2.10	3.60	95.12±4.32
ADP	3.37	5.25	97.10±4.98
AMP	3.58	4.93	96.29±5.43

2.4 样本测试

按照本文实验条件，我们测定了30份正常大鼠心肌组织中腺苷酸的含量，结果分别为ATP：165.38±11.21，ADP：89.75±7.42，AMP：43.36±5.34(μg/g组织，$\bar{x}\pm s$)。

3 讨论

采用磷酸钠缓冲液进行洗脱，避免了使用四丁基氢氧化铵和乙腈这两种价格昂贵、毒性较大的试剂，从分离效果(图1、图2)来看，ATP、ADP、AMP均能达到基线分离，样本分析时间也较文献报道[2~6]的40 min左右缩短到12 min。此外，由于采用恒溶剂洗脱，避免了离子交换法梯度洗脱中严重的基线漂移，操作更加简便。

腺苷酸是生物材料中一种不稳定化合物，所以在制备心肌组织样本时应力求迅速，以免ATP发生分解。本文采用将组织液氮冷冻保存，低温匀浆离心，取

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

上清液直接进样分析的前处理方法，容易操作，样本预处理时间短，对防止 ATP 分解及测试结果的准确性起到了好的效果。

关键词　腺苷酸类；色谱法，高效液相

中图法分类号　R446.1

参考文献

1 王洛四. 高效液相色谱法分析腺苷酸. 军事医学科学院院刊，1988；13(2)：203

2 Jones DP. Determination of pyridine dinucleotides in cell extracts by high performance liquid chromatography. J Chromatogr，1981；225：446

3 顾建国，荣　沛，王义明等. 反相 HPLC 法测定大鼠梗塞心肌组织中 ATP、ADP 与 AMP. 中国药科大学学报，1989；20(2)：103

4 Juengling E，Kammermeier H. Rapid assay of adenine nucleotides or creatine compounds in extracts tissue by paired-ion reverse-phase high performance liquid chromatography. Anal Biochem，1980；102：358

5 张新明. 一种简便、灵敏测定腺苷酸的高效液相色谱法. 分析仪器，1991；4：45

6 马丽英，梁殿权，王孝铭等. 高效液相色谱(HPLC)对游离腺苷酸类的测定. 生物化学与生物物理进展，1983；5：64

(收稿：1994-09-15；修回：1995-06-24)

****

(上接 344 页)

EGFR 和 P^{21} ras 在胶质瘤表达率均很高，但可能主要参与胶质瘤恶变的早期阶段；而 P^{53} 过度表达和/或在细胞内积聚则涉及胶质瘤发生、发展的整个过程。

(2)应用细胞内显微注射和流式细胞术等方法研究了 NDGA 对人恶性胶质瘤细胞系 SHG-44生长、分化的影响及其机制。结果显示，SHG-44细胞具有 GFAP-vimentin 共存特性，并发现有 P^{21}ras 和 P^{53}蛋白表达，PCNA 阳性反应强。在含有 100μmol/L 的培养基中瘤细胞生长受抑制，细胞增殖活性降低，细胞周期也有明显改变(G_0G_1期细胞增多，S 和 G_2/M 期细胞显著减少)，但活力细胞百分比无显著变化；细胞异型性变小，甚至呈正常星形细胞表现；胞浆中胶质细丝增多，且其中 GFAP 增加而 vimentin 减少，并伴有线粒体退变；P^{53}蛋白表达也减弱。NDGA 可能是通过抑制 SHG-44细胞 DNA 合成、阻遏细胞增殖周期等环节抑制瘤细胞生长，并诱导其分化，对 P^{53}过度表达或积聚也有一定程度的抑制作用。

本研究建立了胶质瘤细胞内微量注射的方法并首次应用于 NDGA 作用的观察，结果发现，NDGA 直接进入细胞内(约 0.015 pg/细胞)后对细胞的影响与其在细胞外的作用相似，但作用更迅速、持久，表明 NDGA 可能不需要首先对细胞表面或受体的影响而发生上述作用。

(3)制作了人恶性胶质瘤细胞异种移植瘤模型，应用流式细胞术和中间丝蛋白免疫电镜等技术观测了 NDGA 对异种移植瘤生长和分化的影响。本实验所制作的移植瘤在裸鼠体内传代稳定，保持了人恶性胶质瘤特性。NDGA 可降低此移植瘤成瘤率，并具有抑制肿瘤生长、诱导分化作用，与体外实验结果一致。本结果首次证实了 NDGA 对胶质瘤异种移植瘤具有诱导分化治疗作用，并探讨了它对血管生成因子 bFGF 表达的影响。NDGA 这种抗肿瘤作用除了干扰线粒体结构和功能、抑制 DNA 合成和阻遏细胞周期外，可能还与影响 bFGF 表达水平密切相关，并有促进含 GFAP 中间丝合成、组装作用。

(4)合成 N-乙基-N-亚硝基脲(ENU)并经胎盘和皮下给药分别在妊娠晚期孕鼠子代和3 d 龄 Wistar 大鼠经12个月诱发出 CNS 胶质瘤，成瘤率分别为73.2%和68.3%(其中胶质瘤占90.0%和92.9%)；胶质瘤呈小灶性、多灶性、混合性特点并伴有胶质增生存在，后者在胶质瘤组织发生学上有重要意义。先经胎盘给药、仔鼠生后3 d 再经皮下追加给药1次可增加胶质瘤发生率，恶性胶质瘤的比例也增加，并伴有更多的胶质增生病灶出现。NDGA 可降低胶质瘤发生率、间变率及 CNS 外肿瘤的发生，对主要脏器无明显毒性，提示其良好的应用前景。其预防作用可能与其抗突变、在胶质瘤的促发阶段起阻遏作用有关。

关键词　神经胶质瘤；去甲二氢愈创木酸(NDGA)；诱导分化治疗；免疫细胞化学；流式细胞术；N-乙基-N-亚硝基脲(ENU)

中图法分类号　R739.264

(收稿：1995-07-18；修回：1995-07-27)

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