

酶联荧光法测定失血性休克兔骨骼肌 ATP 含量

侯淦泉 汪志文 黄建明 向春 陈洪
汪江淮 陆松敏 王成英 郭素清 刘光海

(第三军医大学野战研究所, 重庆)

休克时全身血液供应不足, 组织缺氧, 三羧酸循环和线粒体呼吸链的功能受抑制, 往往导致组织 ATP 的合成下降。因此测定休克时组织 ATP 的含量, 可以反映细胞的能量代谢障碍。我们对 G. Paul 介绍的组织 ATP 测定方法^[1]在样品取材和试剂保存方面作了改进, 并且测定了实验性失血性休克模型以及复苏条件下家兔骨骼肌组织 ATP 的含量。现将结果和方法报告如下。

材 料 和 方 法

一、材料 成年家兔 37 只, 性别不拘, 体重 2.0—3.0 kg。分为三组: 假手术组 11 只; 平衡盐液复苏组 13 只; 平衡盐液 + ATP-MgCl₂ 复苏组 13 只。用戊巴比妥钠 (30mg/kg) 静脉麻醉, 行气管切开插管, 股动脉插管监测血压, 颈总动脉插管放血。失血性休克组, 采用 Wigger 氏失血性休克模型, 快速放血使血压下降到 40mmHg, 维持低血压 2 小时后, 回输全部失血, 实验模型完成, 继续观察 2 小时。平衡盐液容量复苏组给予二倍的平衡盐液, ATP-MgCl₂ 复苏组给予 30 μ mol/kg ATP-MgCl₂。分别于放血前、低血压即时、休克后 1 小时、2 小时、复苏后半小时、1 小时、2 小时取上肢肌肉 10—30mg 左右, 置 2ml 0.2N 过氯酸溶液中, 放入前后用万分之一分析天平称重。在冰浴中用玻璃匀浆器匀浆, 再用 2ml 0.2N 过氯酸洗匀浆器, 合并后, 用 1M 的 Na₂CO₃ 调 pH 至 6.8—7.2, 然后置低温离心机或冰水浴中离心, 取上清液用荧光法测定 ATP。假手术组兔

除不放血外, 其它处理同失血性休克组。

二、ATP 的荧光测定

溶液配制

1. 1.0M 的葡萄糖水溶液。溶解 1.8 克无水葡萄糖于蒸馏水中做成 10ml。(冰冻保存)。
2. 0.15M 氯化镁。溶解 305mg MgCl₂ · 6H₂O, 用水稀释至 10ml。(冰冻保存)。
3. 0.1M, pH8.5 三乙醇胺缓冲液。1.857g 三乙醇胺盐酸盐溶解在 80ml 水中, 用 1M Na₂CO₃ 调 pH 至 8.5, 稀释至 100 ml, 用 pH 计校正。
4. 0.02M EDTA。774mg EDTA-Na₂H₂ · 2H₂O 溶于 75ml 蒸馏水中, 用 1M Na₂CO₃ 调 pH 至 7.4, 稀释至 100ml。
5. 辅酶 II 溶液。称取 2mg TPN 溶于 50 ml 水中。(冰冻保存)。
6. ATP 标准溶液。用中性 0.2N 过氯酸配成 100 μ g 1ml 贮存液。用前用中性 0.2N 过氯酸稀释成 10 μ g/ml 的溶液。(冰冻保存)。
7. 6-磷酸葡萄糖脱氢酶/己糖激酶 (G6P-DH/HK)。每 1ml 内含 0.7mg 牛血清白蛋白。称取 1mg 6-磷酸葡萄糖脱氢酶, 2.5mg 己糖激酶, 3.5mg 牛血清白蛋白溶于 50ml 水中, 分裂于 10 个塑料管中加塞保存于 -40℃。用前融化。
8. 0.2N 中性过氯酸。用 1M Na₂CO₃ 调 pH 至 7.0。

操作步骤

用上述 1、2、4、5 四种溶液, 分别取 0.4、0.4、1.2、4ml, 配制成混合反应试剂。

表 1 操作步骤

	空 白	标 准	样 品
混合试剂	1.0ml	1.0ml	1.0ml
ATP 标准 $10\mu\text{g}/\text{ml}$	/	0.1ml	/
样品上清液	/	/	0.1ml
三乙醇胺缓冲液	0.15ml	0.15ml	0.15ml
G6P-DH/HK 溶液	0.1ml	0.1ml	0.1ml
重蒸水	1.75ml	1.65ml	1.65ml

充分混匀后置 37°C 水浴中保温 15 分钟,取出后放置 15 分钟,稳定后用 RF-520 岛津荧光分光光度计,激发波长 365nm , 发射波长 460nm 比色。

计算:

$$\frac{\text{测定读数}}{\text{标准读数}} \times \text{标准液含量} \times \frac{\text{提取液总量}}{\text{实际样品用量}}$$

$$\div \text{肌肉组织重量} \div \text{ATP 分子量}$$

$$= \text{ATP 微克分子/克(湿重)}$$

结 果

一、加 0.1ml 酶试剂时 ATP 标准曲线从 $500\text{--}3000\text{ng}$ 浓度为线性。如 ATP 浓度加大,酶试剂也应相应加大,仍为线性(图 1)。

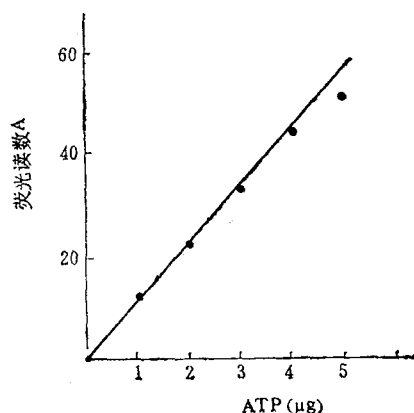


图 1 ATP 标准曲线

激发波长 365nm , 发射波长 460nm

二、标准样品和测定样品的扫描图基本一致,测定样品未见出现杂质峰,(见图 2)。本法回收率 $94.80 \pm 4.87\%$ 。变异系数 7.15% 。

三、失血性休克及其复苏情况下骨骼肌 ATP 含量为图 3 所示。假手术组 $P > 0.05$ 无

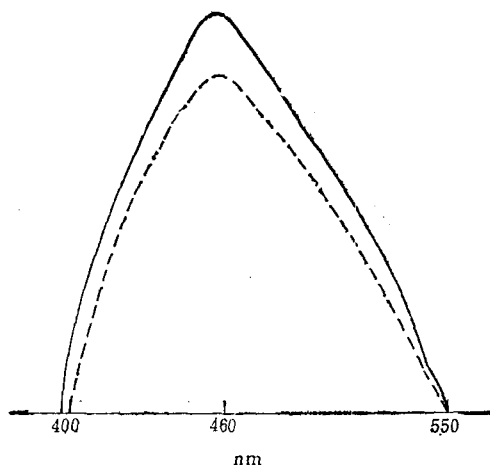


图 2 ATP 标准和肌肉样品扫描图

——ATP 标准 ----肌肉样品
扫描和记录速率 $50\text{nm}/\text{min}$ 激发波长
 360nm 发射波长从 560nm 扫至 400nm 。

差异,平衡盐液组与休克后 1、2 小时比较有显著的下降 $P < 0.05$ 。复苏后 2 小时与休克后 2 小时比较有显著的回升 $P < 0.05$ 。平衡盐液 + ATP-MgCl₂ 复苏组与平衡盐液组的结果基本相同无显著差异。

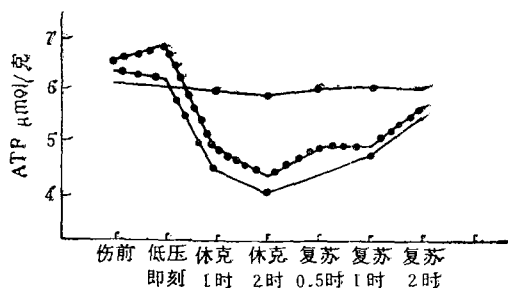


图 3 失血性休克和复苏条件下骨骼肌 ATP 含量的改变

——对照 (上面一条) ----平衡液 + ATP-MgCl₂
·····平衡液组 (下面一条)

讨 论

一、本法标本采集直接放入提取液,未用液氮冰冻。测定了 35 只正常家兔骨骼肌 ATP 为 $6.49 \pm 0.46\mu\text{mol}/\text{g}$ (湿重),与 J. F. Gallagher 测定值 7.95 ± 0.29 相近^[1,3,5]。

二、据 G. Paul 报告^[1],酶试剂要进行冰

男性随意尿 LH、FSH 和睾酮的测定

——一种观察垂体—睾丸功能的简易放免方法

叶尚勉 刘光英

(四川省计划生育科研所,成都)

用放射免疫方法 (RIA) 测定血清或血浆中 LH、FSH 和睾酮的含量已经成为观察男性垂体—睾丸功能变化的一个重要手段。但血样采集有损人体而不易被人接受; 特别是需要连续采样时倍感困难。此外, 由于这些生殖激素本身的生理波动, 仅仅测定一次血样并不能完全反映其变化的真实状况。因此, 寻找一种简单且能替代血清测定的方法对临床诊断和治疗将会大有帮助。

尿液易采集, 而且测定尿液中 LH、FSH 和睾酮的变化有可能得到与测定血清相近的资料。Baghdassarian 等人就曾发现 24 小时尿中 LH 和 FSH 与血清中的这两种激素变化平行^[1]。测定 24 小时尿中葡萄糖醛酸睾酮也可用以观察睾丸功能的变化^[2,3]。然而收集 24 小时尿液仍非简而易行, 并且测定葡萄糖醛酸睾酮需要的特殊药盒不易得。为此, 本研究用放射免疫方法同时测定男性血清和随意尿样品中 LH、FSH

和睾酮的浓度; 然后将尿样品中激素值用尿样品的肌酐含量予以校正; 观察尿激素/肌酐比率是否与血清激素变化相关; 试图建立一种简单易行且能替代血清测定的方法。

材 料 和 方 法

1. 血和尿样品的收集 同时采集 93 名年龄 17—70 岁男性随意血和尿样品各一份。采集时间从上午九点到下午两点不等。采集后立即放在 -20℃ 贮存, 供测定。

2. 试剂和仪器 除活性碳外, LH、FSH 和睾酮的测定均使用 1985 年世界卫生组织提供的放免测定配套药盒, 并使用世界卫生组织按月提供的新鲜 ¹²⁵I-LH 和 ¹²⁵I-FSH。活性碳 (AR)、配制磷酸缓冲液 (PBS) 的试剂, 乙醚 (AR)、配制闪烁液的试剂、聚乙二醇 6000 以及测定尿肌酐的试剂分别购自成都、广东和上海化学试剂厂。肌酐标准品则购自四川医学

冻干燥。现改用水溶液 -40℃ 保存, 可使用三个月, 在 -10℃ 也可用一周, 方法简便易行。

三、ATP 的减少可能是由于削弱了酶底物的利用 Larsson Hultman, 1979 年观察到了人大腿肌肉组织在缺血期间 ATP 有显著下降, 与我们测定的实验性失血性家兔肌肉 ATP 变化结果一致^[4]。

thods of Enzymatic Analysis, (ed. by Bergmeyer, H. U.), P551, Academic Press, New York and London, 1963.

[2] Lowry, O. H. et al.: *J. Biochem.*, **239**, 18, 1964.

[3] Gallagher, J. F.: *Surg. Forum.*, **28**, 19, 1977.

[4] Larsson, I. et al. *Acta Chem. Scand.*, **150**, 511, 1984.

[5] 彭洪福: 《军队卫生研究资料汇编》, 176 页, 军事医学科学院军队卫生研究所情报资料组编印, 1979。

参 考 文 献

[本文于 1985 年 9 月 9 日收到]

[1] Paul, G.: *Determination by Fluorimetry Me-*