

高效液相色谱法测定人血清中 假尿嘧啶核苷的浓度

胡永狮 汤秋华 刘标生*

(解放军第一七五医院 福建漳州 363000)

提 要 应用反相高效液相色谱法测定人血清中假尿苷(PD)的含量,色谱柱为 Nova-Pak C₁₈ 3.9mm × 150mm, 流动相为 0.04mol/L 磷酸二氢钾缓冲液(pH 4.0), 检测波长为 263nm, 线性范围为 0.7~6.8μmol/L, 回收率为 93.50%, 日间误差 CV = 3.11% (n = 6)。同时测定了部队体检正常人血清中 PD 的浓度, 并用于临床观察肝炎、肾病、肺癌等多种疾病以及 He-Ne 激光治疗前后患者血中 PD 含量的变化。正常人血中 PD 的浓度无性别差异, 成年人的正常值与文献一致。肾脏疾病中以尿毒症患者血清中的假尿苷升高最为明显, 3例肺癌患者也都有升高的趋势。而我院开展的 He-Ne 激光治疗前后无明显的变异, 证明激光对细胞修饰没有显著的影响。

关键词 高效液相色谱法, 假尿嘧啶核苷, 人血清

分类号 O658/Q5

1 前言

假尿嘧啶核苷(pseudouridine, PD)为尿嘧啶核苷的异构体, 又称尿核苷, 存在于 RNA 中, 是 t-RNA 降解的最终产物, 不能被机体重新吸收而全部从尿中排出^[1]。Borek 等^[2]提出尿中核苷修饰物的增高是因肿瘤组织中 t-RNA 的高转变率引起, 而不是细胞坏死所致。核苷修饰物中假尿苷主要是从尿中排泄, 因此尿中假尿苷可作为肿瘤诊断的标志物^[3]。文献^[4, 5]测定的尿中假尿苷排出量与尿肌酐的比值, 用于提高肿瘤诊断的准确率和阳性率, 但忽略了尿肌酐值与肾功能有着密切的关系。只有测定血中假尿苷, 才能更准确地反映体内假尿苷值。本文建立了反相高效液相色谱法测定人血中假尿苷的含量, 调查了正常人血清中假尿苷值, 观察了一些病人血清中假尿苷的变化值。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

高效液相色谱仪、510泵、717自动进样器、996二极管阵列检测器、Millennium 2010软件2.0版(美国 Waters 公司), LG-2.4A 离心机(北京医用离心机厂), Milli-Q 纯水器(美国 Millipore)。

假尿苷(Sigma), 其余均为市售分析纯试剂。

2.2 色谱条件

色谱柱: Nova-Pak C₁₈ 3.9mm × 150mm, 流动

相: 0.04mol/L KH₂PO₄缓冲液, 用10% H₃PO₄调 pH 4.0, 流速 0.8mL/min, 检测波长 263nm, 进样 10μL。

2.3 样品处理

取病人血清 0.6mL 置于 2.0mL 加盖离心塑料管中, 加入 6% HClO₄ 0.4mL, 混匀, 离心(3000r/min, 10min)。取上清液 500μL 于 60℃ 空气吹干, 残渣用 300μL 流动相溶解, 进样 10μL。

3 结果与讨论

3.1 血清中假尿苷色谱分离

血中假尿苷浓度低, 干扰多, 在本实验条件下, 血清中假尿苷得到良好的分离, $t_R = 2.087\text{min}$ (见图 1)。为证实峰纯度, 在 $t_R = 1.94, 2.09, 2.24\text{min}$ 处取其光谱图, 3点具有相同的紫外吸收(图 2), 并与标准品重合。

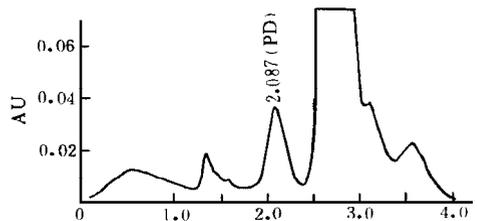


图1 血清中假尿苷分离图(263nm)

Fig. 1 Separation of pseudouridine in serum on Nova-Pak column

Mobile phase: 0.04mol/L KH₂PO₄(pH 4.0); flow rate: 0.8mL/min; detection: 263nm.

* 本文收稿日期: 1996-02-19, 修回日期: 1996-04-20

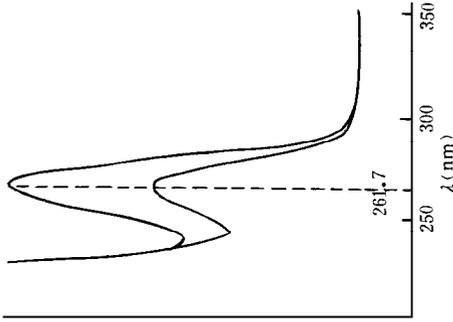


图2 血清中假尿苷光谱吸收图
Fig. 2 Separation of pseudouridine extract
1. 94, 2. 09, 2. 24 min in the chromatography

3. 2 方法学

表1 假尿苷回收率实验

Table 1 Recovery experiment of pseudouridine

	标准品 STD	本底值 Backg round	混合1 M ix 1	混合2 M ix 2	混合3 M ix 3	混合4 M ix 4	混合5 M ix 5
峰高 Peak height(AU)	8591	11278	19409	19560	19170	19238	19178
回收率 Recovery(%)			94.64	96.40	91.86	92.66	91.96
平均值 Average% ± SD(%)			93.50 ± 2.1				

$$\text{Recovery} = (H_{\text{M ix n}} - H_{\text{Background}}) / H_{\text{std}} \times 100\%$$

4 正常人血清中 PD 的测定

本文测定了部队体检正常人血清中假尿苷的浓度,并用于临床观察肝炎、肾病、肺癌等多种疾病以及用 He-Ne 激光治疗神经衰弱症前后患者血中假尿苷含量的变化,结果见表2和表3。正常人血中假尿苷的浓度无性别差异,成年人的正常值与文献一致。肝炎和肾炎患者血中假尿苷未发现显著变化

线性范围 取不同浓度的假尿苷分别置于 0.6mL 血清中,使其浓度范围为 0.7~ 6.8μm ol/L。按样品处理方法测定假尿苷峰高,其值扣除混合血清中假尿苷峰高,得 ΔH 值对加入假尿苷标样浓度 C 作回归曲线,得线性回归方程为: C = 0.3ΔH + 1.19, 相关系数 r = 0.999 7。

重现性实验 取血清(于 - 10℃ 冰箱中保存)做日间重现性试验,与标准品对照,计算结果:平均值为 3.44μm ol/L, 变异系数为 3.11% (n = 6)。

回收率 取血清各 0.6mL 置于 5 支试管中,分别加入 20μL 的工作液(含假尿苷 0.02g/L 的甲酸溶液),按方法学测定,并与血清本底值和标准品对照,结果见表1,平均回收率为 93.50%。

(P > 0.05), 尿毒症患者血清中的假尿苷升高最为明显(P < 0.05),可能是由于肾脏功能失调导致假尿苷排泄的紊乱。3例肺癌患者的假尿苷也都有升高的趋势(P < 0.05),说明假尿苷含量的变化与肺癌疾病有关。我院开展了用 He-Ne 激光治疗神经衰弱症,治疗前后,患者血中假尿苷无显著的变异(P > 0.05),证明激光对细胞修饰没有影响。

表2 几种病例血中假尿苷测定值

Table 2 Value of the pseudouridine in patient's serum

病 例 Category	例 数 Case	假尿苷测定值 PD(X ± SD, μm ol/L)
正常人(> 8岁)Normal(> 8ys)	20	3.03 ± 0.73
肝 炎 Hepatitis	59	3.78 ± 1.17 ^{a)}
肺 癌 Lungcancer	3	5.98 ± 0.79 ^{b)}
肾 炎 Hephritis	6	3.42 ± 1.05 ^{a)}
尿毒症 Uremia	6	26.61 ± 8.76 ^{b)}

^{a)}P > 0.05, ^{b)}P < 0.05.

表3 He-Ne激光治疗前后血中假尿苷含量测定值(μmol/L)*

Table 3 Value of pseudouridine in serum before and after He-Ne laser treatment for patients (μmol/L)*

病人号 Patients	治疗前 Before	治疗后 After	病人号 Patients	治疗前 Before	治疗后 After
1	3.04	2.97	6	2.52	2.87
2	2.93	2.07	7	3.0	2.88
3	2.32	1.99	8	3.06	2.98
4	1.97	1.93	9	2.55	2.87
5	1.67	2.13	10	3.30	3.22

* P > 0.05.

参 考 文 献

- 1 Palm isano F, Rotunno T, Guerrieri A *et al.* J Chromatogr Bio Appl, 1989; 493: 35
- 2 Borek E, Baliga B S, Gesrke D S *et al.* Cancer Res, 1977; 37: 3362
- 3 Tamura S, Fujii J, Nakano T *et al.* Clin Chem Acta, 1986; 154: 125
- 4 何书泉, 韩跃武, 朱 昕等. 色谱, 1995; 13(4): 287
- 5 屠振兴, 许圣献等. 上海医学检验杂志, 1994; 9(3): 129
- 6 Voshiki Amuro, Hiroko Nakanka, Souji Shimomura *et al.* Clinica Acta, 1988; 178: 151
- 7 张 林, 刘延龄. 现代实用临床检验质量控制学. 陕西: 天则出版社, 1990: 137

Determination of Pseudouridine in Serum by High Performance Liquid Chromatography

Hu Yongshi, Tang Qinhua and Liu Biaosheng

(The 175 Hospital of PLA, Zhangzhou, 363000)

Abstract Pseudouridine is a modified nucleoside derived from the degradation of transfer ribonucleic acid. The elevation of modified nucleosides in urine has been suggested to be caused by higher turnover rate of t-RNA in tumor tissue than in healthy tissue, rather than by cell death. A method of pseudouridine determination in serum was developed by high-performance liquid chromatography on a Nova-Pak column (Waters) with 0.04 mol/L KH_2PO_4 (pH 4.0) as mobile phase. The blood samples were collected and 0.6 mL of serum was treated with 0.4 mL 6% HClO_4 . The precipitate was centrifuged for 10 min at 3000 r/min. Five-hundred μL of the liquor was dried by air-stream at 60°C . The residue was dissolved with 300 μL mobile phase and 10 μL was injected. The average recovery was $93.50 \pm 2.1\%$. The calibration curve was linear within the concentration range of 0.7-6.8 $\mu\text{mol/L}$. The serum pseudouridine concentrations for patients with hepatitis, lung cancer, hepatitis and uremia were determined and those of patients with lung cancer and uremia were found significantly higher than those of healthy controls ($p < 0.05$). And for patients treated with He-Ne laser no significant change of the pseudouridine has not been found ($p < 0.05$).

Key words high performance liquid chromatography, pseudouridine, human serum

《高效液相色谱法纯化蛋白质理论与技术》征购

由郭立安编、陕西科学技术出版社出版的《高效液相色谱法纯化蛋白质理论与技术》一书适合于化学、生物化学、免疫学、分子生物学以及从事蛋白质纯化的研究人员使用。定价 15.5 元, 邮费另加 2.5 元。欲购者请与《色谱》编辑部孙树平联系(电话: 3693405)。

《色谱》编辑部电话号码变更启事

从 1996 年 12 月起,《色谱》编辑部电话改为直拨电话(0411)3693405, 望广大读者、作者及广告客户周知。