

血浆 L-瓜氨酸和 L-精氨酸浓度分析方法建立及应用*

魏 玮¹, 茅惠明^{2a}, 陈炳官^{2a}, 熊伍军^{2b}, 徐增光^{2a} (1. 上海市浦南医院肿瘤科, 上海 200125;
2. 同济大学附属东方医院 a. 中心实验室; b. 消化内科, 上海 200120)

摘要:目的 建立反相高效液相色谱(RP-HPLC)-紫外检测法同时测定血浆 L-瓜氨酸和 L-精氨酸浓度的方法并应用于临床。**方法** 采用三氯乙酸结合加热法除血浆蛋白, 用异硫氰酸苯酯(PITC)进行柱前衍生化反应, 梯度洗脱, 柱温 46℃, 波长 254 nm, 进样 20 μ l, 流速 1.0 ml/min; 通过分析 21 例消化道晚期恶性肿瘤病人、21 例非恶性肿瘤病人和 39 例健康人的空腹血浆 L-瓜氨酸和 L-精氨酸浓度, 验证方法的可行性。**结果** 两种氨基酸的峰面积和浓度之间呈线性关系, 线性范围从 0~1 000 μ mol/L, 两者 $r=0.999\ 95$ 。L-瓜氨酸和 L-精氨酸的定量下限分别为 0.240 μ mol/L 和 0.448 μ mol/L。日内和日间变异系数(CVs)分别小于 3.4% 和 7.2%, 平均回收率在 95.2%~104.1%。血浆 L-瓜氨酸/L-精氨酸的比值均值, 消化系统肿瘤病人组高于年龄性别相匹配的健康对照组, 差异有统计学意义(t 检验, $P=0.009$); 两种氨基酸比值诊断消化系统恶性肿瘤的敏感度和特异度分别为 81% 和 71.4%。**结论** 这一新方法可用于临床测定血浆 L-瓜氨酸/和 L-精氨酸浓度; 与浓度相比, 血浆两种氨基酸浓度比值也许是评估消化系统恶性肿瘤更加敏感的指标。

关键词: 血浆; L-瓜氨酸; L-精氨酸; 反相高效液相色谱; 异硫氰酸苯酯; 三氯乙酸

中图分类号: R446.112 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2016)01-028-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.01.008

Establishment and Clinical Application of the Analytical Method for Plasma L-citrulline and L-arginine Concentration

WEI Wei¹, MAO Hui-ming^{2a}, CHEN Bing-guan^{2a}, XIONG Wu-jun^{2b}, XU Zeng-guang^{2a}

(1. Department of Medical Oncology, Shanghai Punan Hospital, Shanghai 200125, China;

2a. Department of Central Laboratory; 2b. Department of Digestion,

Affiliated Shanghai East Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200120, China)

Abstract: **Objective** To establish a method for simultaneously measuring L-citrulline and L-arginine concentration in plasma using reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with ultraviolet detection, and the novel method is applied to the patients with digestive system tumor. **Methods** Plasma samples were deproteinized by trichloroacetic acid with heating method. Phenylisothiocyanate (PITC) was used as derivatization reagent and a gradient elution was adopted. The feasibility verification of method was carried out by detecting plasma L-citrulline and L-arginine acid concentration in 21 cases of advanced digestive tract malignant tumor patients, 21 cases of non malignant tumor patients and 39 cases of healthy people. **Results** The linearity for L-citrulline and L-arginine ranged from 0 to at least 1 000 μ mol/L. $r=0.999\ 95$ for both. The lower limits of quantification for L-citrulline and L-arginine were 0.240 μ mol/L and 0.448 μ mol/L respectively. The intraday and interday coefficients of variation (CVs) were less than 3.4% and 7.2%, respectively. The average recovery rate was from 95.2% to 104.1%. The ratio of plasma L-citrulline /L-arginine in patients with digestive cancer was significantly higher than that in the healthy control group, t -test, $P=0.009$. The sensitivity and specificity of plasma L-citrulline/L-arginine ratio in the malignant tumor of digestive system were 81% and 71.4% respectively. **Conclusion** This method can provide a reliable and efficient method for the clinical determination of the L-citrulline and L-arginine concentration in plasma. The ratio of plasma citrulline/arginine increased obviously in patients with digestive cancer, suggesting that this ratio is a more sensitive index than single concentration of L-citrulline or L-arginine when evaluating patients with digestive tumor.

Keywords: plasma; L-citrulline; L-arginine; RP-HPLC; PITC; trichloroacetic acid

精氨酸是一种半必需氨基酸, 内源性的合成满足不了人体的需要, 因此, 人类所需的精氨酸通常由食物提供。在人体内, 内源性的精氨酸合成是一个涉及到多个器官的过程, 主要在小肠内皮细胞合成瓜氨酸, 并从循环中提取, 然后在肾脏的近曲小

管细胞内转化成精氨酸, 最后返回循环; 少量的精氨酸也能够肝脏合成。目前的研究表明精氨酸及其主要代谢产物瓜氨酸水平变化与许多疾病有关, 包括恶性肿瘤^[1~6]。有关氨基酸的分析, 比较多的采用氨基酸分析仪等方法^[7], 但是氨基酸分析

* 基金项目: 上海市浦东新区卫生系统领先人才培养计划项目(PWRL2014-01); 上海市浦东新区卫生系统学科带头人培养项目(PWRd2014-03)。

作者简介: 魏 玮(1973—), 女, 硕士, 副主任医师, 从事临床肿瘤学。

通讯作者: 茅惠明, 男, 主任技师; 徐增光, 男, 教授, E-mail: mhuim@163.com。

仪价格较昂贵。因此,有必要建立一种简单及准确地测定血浆精氨酸和瓜氨酸浓度的方法。由于精氨酸及瓜氨酸缺少芳香环或其它生色基团,因此在用 HPLC 法测定以前通常需要作衍生化处理。常用的柱前衍生化试剂有丹酰氯(Dansyl-Cl)、异硫氰酸苯酯(PITC)、9-芴甲基氯甲酸酯(FMOC)、4,4-二甲氨基偶氮苯-4'-磺酰氯(DABS-Cl)和邻苯二甲醛(OPA)等。Dansyl-Cl, DABS-Cl 及 FMOC 存在一些缺点,例如,衍生副产品干扰氨基酸的测定,OPA 试剂本身不稳定,容易降解,而且它的衍生产物也不够稳定^[8~12],而 PITC 试剂没有这些缺点,并且衍生化反应敏感,衍生产物稳定;对于血浆除蛋白,大部分的文献报道采用单一的方法。为此,我们用 PITC 作衍生化试剂,同时首次采用三氯乙酸结合加热法除血浆蛋白,建立了反相高效液相色谱(RP-HPLC)-紫外检测法同时测定血浆 L-精氨酸和 L-瓜氨酸的新方法,并应用于消化系统肿瘤患者。

1 材料与方法

1.1 研究对象 病人组为 21 例消化道晚期恶性肿瘤患者,来自上海市浦南医院肿瘤科以及东方医院肿瘤和消化医学部住院病人,年龄 48~83 岁,平均年龄 63 岁,男性 14 例,女性 7 例。其中,肝癌 5 例,胃癌 7 例,食道癌 4 例,结肠癌 3 例和直肠癌 2 例;21 例非恶性肿瘤患者,年龄和性别与消化道恶性肿瘤病人相匹配,为东方医院消化医学部住院和门诊部病人,其中,慢性胃炎 3 例,胃溃疡 2 例,胆结石 3 例,慢性肾炎 1 例,子宫肌瘤 2 例,脂肪肝 2 例,小叶增生 3 例,良性前列腺增生 3 例,强直性脊柱炎 2 例。健康对照组 39 例,男性 21 例,女性 18 例,年龄 23~73 岁,平均年龄 46 岁,经东方医院健康体检部检查均无明显器质性疾病。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 主要试剂:L-瓜氨酸和 L-精氨酸标准品以及异硫氰酸苯酯(PITC)由 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)公司提供。HPLC 级甲醇和乙腈由上海国药集团化学试剂有限公司提供。HPLC 级超纯水由 Merck (Darmstadt, Germany)公司提供。其余所用分析纯试剂均由上海国药集团化学试剂有限公司提供。衍生化试剂:甲醇:乙醇:三乙胺:超纯水:PITC 为 6:1:1:1:1,现配现用。流动相 A:500 ml 水溶液含 4.77 g NaAc,12.5 ml 乙腈,125 μ l 10 mmol/L EDTA,过滤、超声脱气;流动相 B:由 75 ml 甲醇,225 ml 乙腈及 200 ml 超纯水混合组成,过滤、超声脱气。准确称重 L-瓜氨酸和 L-精氨酸标准品,用 HPLC 级超纯水溶解后,分别配成浓度为 1.0 mmol/L 的储

存液,4℃保存。使用时用 HPLC 级超纯水稀释至所需浓度。

1.2.2 主要仪器:LC-10A 型高效液相色谱仪(包括两个 LC-10AT 输液泵、SIL-10AD 自动进样器、SCL-10A 控制器、CTO-10A 柱温箱、SPD-10A 紫外可见分光光度检测器,梯度混合器及 CLASS-VP 色谱工作站),日本 SHIMADZU 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 血浆样品和标准品的预处理:空腹抽取静脉血,采用 EDTA 或肝素抗凝,离心分离血浆。取血浆 200 μ l,加 80 μ l 浓度为 0.1 g/ml 三氯乙酸,旋涡混匀,于 75~80℃孵育 15 min,然后室温离心,10 000×g,15 min。吸上清液 50 μ l 于另一试管中,加入 100 μ l 衍生化试剂,混匀,室温反应 20 min。冰冻干燥后,用流动相 A 定容至 150 μ l,0.2 μ m 针形滤器过滤,待测。用超纯水将每种标准储存液分别稀释为 0,7.81,15.62,31.25,62.5,125,250,500 以及 1 000 μ mol/L 浓度系列。标准品的处理和分析条件同血浆样本。

1.3.2 色谱条件:采用 PICO-TAG(300×3.9 mm i.d., 5 μ m partical size, Waters, Milford, MA, USA)梯度洗脱,0~13.5 min,0%~97% A;13.5~20 min,97%~96% A;20~20.5 min,96%~20% A;20.5~22.5 min,20%~0% A;22.5~30.01 min,0% A。柱温 46℃,波长 254 nm,进样 20 μ l,流速 1.0 ml/min。

1.3.3 方法的特异度、除蛋白方法的选择、衍生化产物的稳定性试验、检测限、定量下限、日内、日间变异系数及回收试验:将一份血浆样本一分为二,其中一份加入标准品,一份不加,观察色谱峰的变化,同时与 L-瓜氨酸和 L-精氨酸标准品色谱图比较,进行方法的特异度试验。采用乙腈、甲醇、超滤以及三氯乙酸结合加热除蛋白方法,观察色谱峰的变化,选择最佳的除蛋白方法。将衍生化产物放置 4℃,采用作图法,分别观察标准品和血浆样本的衍生化产物的稳定性。定义检测限为 HPLC 分析时组分所产生的信号等于基线噪声 3 倍时的量;定义定量下限为 HPLC 定量分析时信噪比等于 10 时的组分浓度。取一份正常人混合血浆,一天内连续分析十次以及每天分析两次连续分析十个工作日,分别计算日内和日间变异系数。在已知 L-瓜氨酸和 L-精氨酸浓度的三份血浆样本中,分别加入 17.5,35 和 70 μ mol/L 浓度的标准品,每份样品平行测定三次,计算平均回收率。

1.4 统计学分析 所有统计学分析采用 SPSS14.0 版软件。用最小二乘法计算峰面积和浓度之间的线性关系。血浆 L-瓜氨酸和 L-精氨酸浓

度以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所有指标经 Kolmogorov- Smirnov 正态性检验呈正态分布,两组均值之间的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。诊断的敏感度和特异度分别用公式 $[TP/TP + FN] \times 100$ 和 $[TN/TN + FP] \times 100$ 计算,以百分比表示(TP:真阳性,FN:假阴性,TN:真阴性,FP:假阳性)。根据 receiver operating characteristic curve(ROC)曲线分析两种氨基酸比值对消化系统肿瘤的诊断价值。

2 结果

2.1 分析方法的特异度 方法的特异性色谱图如图 1 所示。由图可见,不同的保留时间能将这两种物质的色谱峰特异地鉴别开来。图中有一些来自于血浆的未知峰,但是,这些未知峰不干扰这两种氨基酸的测定。

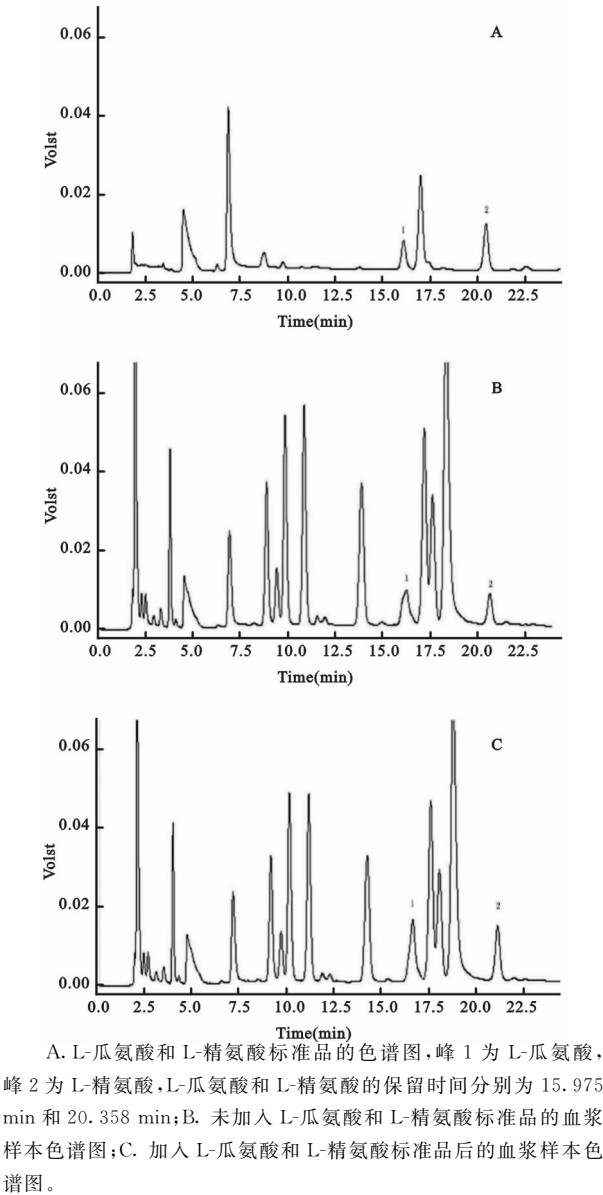


图 1 分析方法的特异度试验

2.2 血浆除蛋白方法对色谱峰的影响 比较乙

腈、甲醇、超滤以及三氯乙酸结合加热除蛋白方法,发现用乙腈除蛋白有杂质峰干扰,甲醇除蛋白分析的敏感度较低,超滤法除蛋白,增加背景峰面积。如果单纯用三氯乙酸除蛋白,能除去 95% 的血浆蛋白,而采用三氯乙酸结合加热法,除去的血浆蛋白达 98%。经比较,三氯乙酸结合加热法除蛋白效果最好,血浆样本 L-瓜氨酸和 L-精氨酸的分离度分别可以达到 3.03 和 4.70,高于其它三种方法(图 2)。

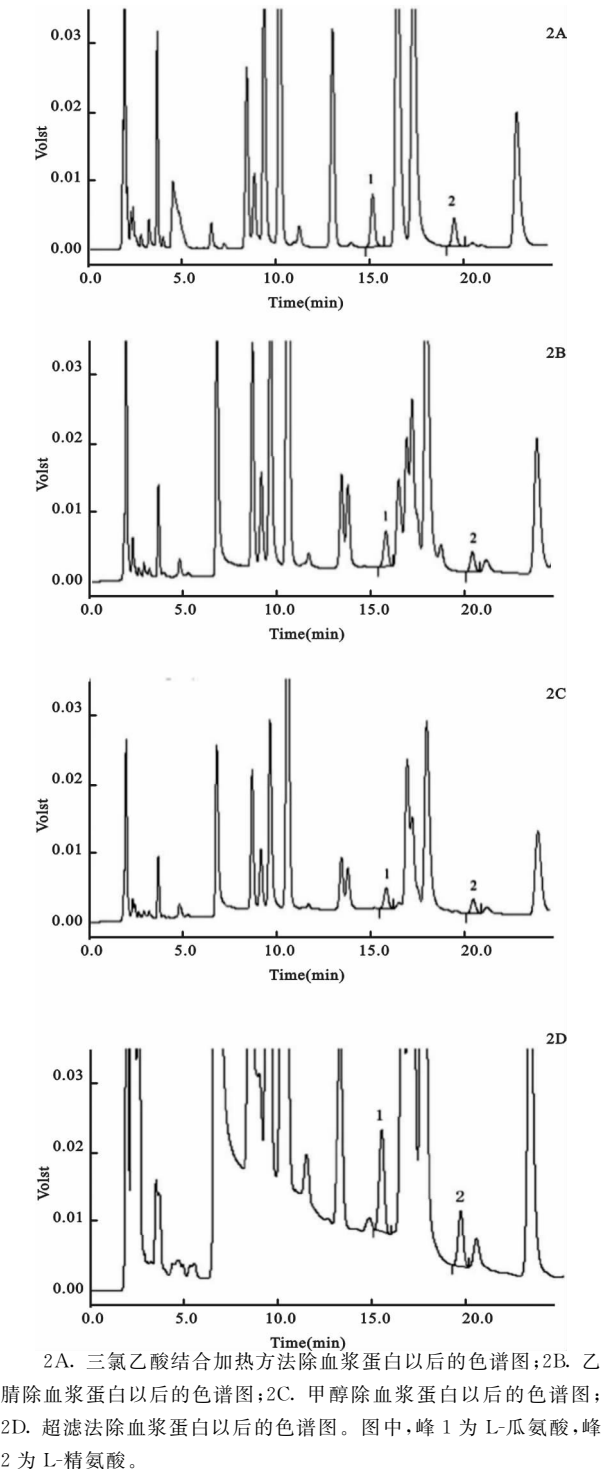


图 2 不同的血浆除蛋白方法对色谱峰的影响

2.3 衍生化产物的稳定性 衍生化产物的稳定性通过作图来观察^[13]。L-瓜氨酸和L-精氨酸标准品的衍生化产物在4℃条件下至少稳定两周;血浆样本的衍生化产物在4℃条件下最多稳定两天。

2.4 工作曲线 以L-瓜氨酸和L-精氨酸标准品峰面积为纵坐标,浓度为横坐标绘制工作曲线。计算曲线的斜率、截距、斜率和截距的标准差,以及回归线的标准差。两种氨基酸的峰面积和浓度之间呈线性关系,两者 $r=0.999\ 95$;线性范围从0~1 000 μmol/L。L-瓜氨酸的线性回归方程为 $Y=15\ 531.02+4\ 272.13X(s_{yx}=30\ 160,s_a=13\ 345,s_b=33.99;s_{yx},s_a,s_b$ 分别代表残余标准偏差,斜率标准偏差和截距标准偏差);L-精氨酸的线性回归方程为 $Y=892.17+4\ 278.03X(s_{yx}=6\ 767.05,s_a=2\ 757.27,s_b=7.167)$ 。血浆L-瓜氨酸和L-精氨酸浓度由工作曲线或回归方程得到的结果并乘以稀

表 2 血浆 L-瓜氨酸和 L-精氨酸加入标准回收试验												
分析物	加入(μmol/L 血浆)			实测(μmol/L 血浆)			平均回收率(%)			相对标准偏差(%)		
	L	M	H	L	M	H	L	M	H	L	M	H
L-瓜氨酸	17.5	35	70	18.2	34	66.6	104.1	97.2	95.2	0.6	0.8	0.4
L-精氨酸	17.5	35	70	17.6	33.5	68.5	103.5	95.8	97.8	0.1	0.4	0.4

注:每一值为三次独立测定的均值。

2.7 临床应用 用本方法测定了39例健康对照样本的血浆两种氨基酸浓度,L-瓜氨酸浓度为 $60.77\pm9.18\ \mu\text{mol/L}$,L-精氨酸浓度为 $58.19\pm16.43\ \mu\text{mol/L}$,L-瓜氨酸/L-精氨酸比值为 $1.11\pm0.28\ \mu\text{mol/L}$,两种氨基酸浓度和比值均无性别差异。21例消化系统肿瘤患者血浆两种氨基酸浓度与年龄匹配的14例健康对照样本(年龄50~73岁,平均年龄59岁)比较(见表3)结果显示,在肿瘤病人中血浆L-瓜氨酸浓度较正常人稍微增加,血浆L-精氨酸浓度较正常人稍微降低,但差异无统计学意义,然而,血浆L-瓜氨酸/L-精氨酸的比值,肿瘤病人组显著高于对照组,图3是一正常人和一食道癌患者血浆样本色谱图比较;21例非肿瘤患者血浆L-瓜氨酸、L-精氨酸浓度和两者的比值与健康对照组比较差异均无统计学意义;与21例消化系统肿瘤患者比较,血浆两种氨基酸浓度差异均无统计学意义,但L-瓜氨酸/L-精氨酸的比值,肿瘤组高于非肿瘤组,差异有统计学意义。

表 3 消化道恶性肿瘤组血浆 L-瓜氨酸、L-精氨酸水平及比值与健康对照及非肿瘤组的比较($\bar{x}\pm s,\mu\text{mol/L}$)			
分析物	健康对照(n=14)	肿瘤患者(n=21)	非肿瘤患者(n=21)
L-瓜氨酸	65.00±10.97	71.85±29.64	69.23±20.91
L-精氨酸	66.73±12.50	53.00±23.05	67.82±24.31
L-瓜氨酸/L-精氨酸	0.98±0.13	1.54±0.73 [*]	1.05±0.34 [#]

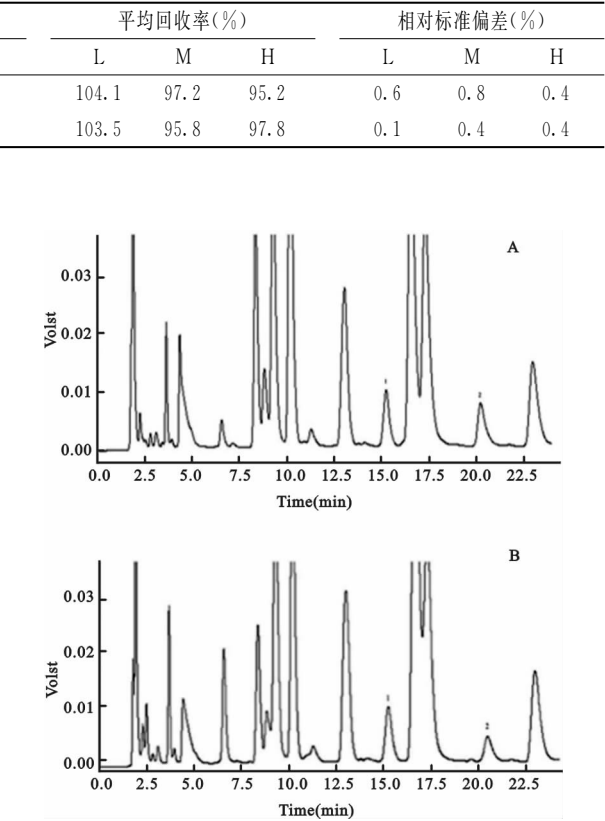
注: * 与健康对照比较, $t=2.984,P=0.009$;# 与肿瘤患者组比较, $t=2.490,P=0.022$ 。

释倍数1.4后获得。

2.5 检测限和定量下限 L-瓜氨酸和L-精氨酸的检测限分别为 $0.020\ 1\ \mu\text{mol/L}$ 和 $0.047\ 6\ \mu\text{mol/L}$;L-瓜氨酸和L-精氨酸的定量下限分别为 $0.240\ \mu\text{mol/L}$ 和 $0.448\ \mu\text{mol/L}$ 。

2.6 精密度及回收试验 L-瓜氨酸和L-精氨酸的日内和日间变异系数(CVs)分别 $<3.4\%$ 和 7.2% (见表1)。在已知L-瓜氨酸和L-精氨酸浓度的血浆中,加入低、中、高标准品后,两种氨基酸的平均回收率在 $95.2\%\sim104.1\%$ 范围之内,见表2。

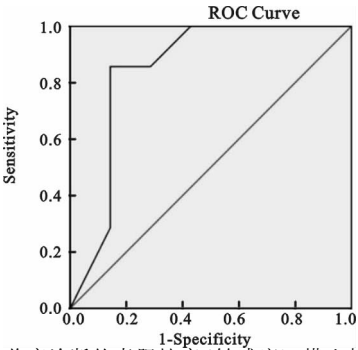
表 1 混合血浆样本的精密度试验(μmol/L 血浆)						
分析物	日内(n=10)		CV(%)	日间(n=20)		CV(%)
	\bar{x}	s		\bar{x}	s	
L-瓜氨酸	64.58	2.16	3.34	56.99	2.78	4.89
L-精氨酸	23.23	0.72	3.11	37.58	2.70	7.19



A. 一正常人血浆色谱图;B. 一食道癌患者血浆色谱图。图中,峰1为L-瓜氨酸,峰2为L-精氨酸。

图 3 正常人血浆和消化系统恶性肿瘤患者的色谱图比较

2.8 ROC 曲线分析 ROC 曲线分析血浆L-瓜氨酸/L-精氨酸比值对消化系统恶性肿瘤的诊断价值。ROC曲线下面积(AUC)为0.847。当cutoff值为2.83时,血浆L-瓜氨酸/L-精氨酸比值诊断消化系统恶性肿瘤的敏感度为81%;特异度为71.4%,见图4。



纵坐标为临床诊断的真阳性率(敏感度),横坐标为诊断的假阳性率(1-特异度)。

图 4 ROC 曲线

3 讨论 有关采用 HPLC 法同时测定血液和其它体液中瓜氨酸和精氨酸浓度的方法已有报道,可是大部分采用荧光检测器,或者采用其它的衍生化试剂,各种除蛋白方法也与本法不同^[8,9]。本实验,我们采用紫外检测器;用 PITC 作衍生化试剂,衍生产物比较稳定;采用三氯乙酸沉淀结合加热的方法,由于同时可以除去部分热变性蛋白,提高了除血浆蛋白的效率。

基体效应可以影响 L-瓜氨酸和 L-精氨酸浓度的测定。实验表明血浆样本衍生化产物的稳定性不如标准品,同时,加入标准品的浓度不同,回收率也明显不同,这些差别可能由基体效应引起。

健康人血浆 L-精氨酸浓度,各文献报道不完全一致,有的文献报道采用 HPLC 法,平均浓度为 49.80 $\mu\text{mol/L}$,也有报道平均浓度为 117.75 $\mu\text{mol/L}$ 以及 236 $\mu\text{mol/L}$ ^[8];采用氨基酸分析法,依据仪器不同平均浓度在 70.76 ~ 93.54 $\mu\text{mol/L}$ 之间^[7]。我们的结果介于 49.80 ~ 70.76 $\mu\text{mol/L}$ 的平均浓度。可是,血浆 L-瓜氨酸平均浓度高于以前的有关报道^[14]。为此,我们测定了氨基酸标准品混合物(sigma product no A6407, physiological),将 L-瓜氨酸标准品的浓度分别稀释为 25 及 50 $\mu\text{mol/L}$,实际分析结果显示,L-瓜氨酸标准品的浓度分别为 $22.99 \pm 2.79 \mu\text{mol/L}$ 和 $50.10 \pm 0.16 \mu\text{mol/L}$ (每一浓度测定两次的均值),十分接近理论值。由此推测,血浆 L-瓜氨酸平均浓度与有关报道的差别,可能与样本例数、种族、饮食习惯等因素有关。

消化系统肿瘤患者的血浆 L-瓜氨酸/L-精氨酸比值显著高于健康对照和非肿瘤患者组,提示与两种氨基酸浓度相比,两者的比值应该是评估消化系统肿瘤更加敏感的指标。同时,根据血浆两种氨基酸浓度的比值诊断消化系统肿瘤的敏感度和特异度结果,进一步提示这一新方法用于临床的可行性。

肿瘤的发生、浸润和转移是复杂而有序的多阶

段生物学过程,受到多种酶的调控,是在一系列酶诱导下原癌基因的激活以及抑癌基因失活,继而引发细胞的过度增殖和异常的程序性死亡所致^[15]。在细胞形态发生明显变化之前,已经在分子及代谢水平发生了异常的改变^[16]。因此明确肿瘤的代谢调节改变对进一步预防肿瘤的发生及指导临床治疗具有重要意义。

在细胞内,一氧化氮合酶(NOS)催化精氨酸生成一氧化氮(NO),伴随的代谢产物还有瓜氨酸,瓜氨酸通过两种尿素循环酶精氨基琥珀酸合成酶(ASS)和精氨基琥珀酸裂解酶(ASL)经过瓜氨酸-NO 通路或精氨酸-瓜氨酸通路再循环合成精氨酸^[8]。通过一氧化氮(NO)-瓜氨酸通路和尿素循环,精氨酸能够产生 NO、瓜氨酸、鸟氨酸、尿素、肌酐、多胺、脯氨酸等代谢物。体外研究表明,精氨酸是肿瘤细胞生存必需的氨基酸,肿瘤细胞的生长依赖于精氨酸^[5]。在尿素循环和瓜氨酸-NO 通路中,精氨酸是 NOS 及精氨酸酶的共同底物。本实验发现,在消化系统恶性肿瘤患者中血浆 L-瓜氨酸/L-精氨酸比值明显增加,可能由于 NOS 活性增强所致。然而,L-瓜氨酸不仅是 L-精氨酸代谢的产物,而且也是鸟氨酸氨甲酰基转移酶与鸟氨酸作用的产物;有意思的是包括胰腺、肝脏、前列腺和恶性胸膜间皮瘤在内的肿瘤细胞中不表达 ASS,不能从 L-瓜氨酸合成 L-精氨酸^[17,18],从而导致 L-瓜氨酸和 L-精氨酸之间的不平衡;同时,鸟氨酸通过精氨酸酶催化,由精氨酸合成,一旦精氨酸酶活性变化,也能够导致这种不平衡。总之,血浆 L-瓜氨酸/L-精氨酸比值的改变反映了精氨酸代谢通路中一系列酶的反应。所以,开发同时测定相关的酶、氨基酸及其代谢产物的分析方法,应该具有重要的临床应用价值。

参考文献:

[1] Marini JC,Didelija IC. Arginine depletion by arginine deiminase does not affect whole protein metabolism or muscle fractional protein synthesis rate in mice[J]. PLoS One,2015,10(3):e0119801.

[2] Rodriguez PC,Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspective[J]. Immunol Rev,2008,222(1):180-191.

[3] Oliverius M,Kudla M,Baláz P,et al. Plasma citrulline concentration-a reliable noninvasive marker of functional enterocyte mass[J]. Cas Lek Cesk,2010,149(4):160-162.

[4] Lam TL, Wong GK, Chong HC,et al. Recombinant human arginase inhibits proliferation of human hepatocellular carcinoma by inducing cell cycle arrest[J]. Cancer Lett,2009,277(1):91-100.

- plasminogen activator inhibitor-1 level in Chinese patients with and without hypertension[J]. *Am J Hypertens*, 2005, 18(4 Pt 1): 517-522.
 - [14] 付海霞, 李艳, 李庚山, 等. 白细胞介素-6 基因多态性与原发性高血压的关系[J]. *临床心血管病杂志*, 2003, 19(12): 714-716.
Fu HX, Li Y, Li GS, et al. Association between interleukin-6 gene polymorphisms and primary hypertension in Hubei Han population[J]. *J Clin Cardiol (China)*, 2003, 19(12): 714-716.
 - [15] Pola R, Flex A, Gaetani E, et al. The -174 G/C polymorphism of the interleukin-6 gene promoter and essential hypertension in an elderly Italian population[J]. *J Hum Hypertens*, 2002, 16(9): 637-640.
 - [16] Jenny NS, Tracy RP, Ogg MS, et al. In the elderly, interleukin-6 plasma levels and the -174G>C polymorphism are associated with the development of cardiovascular disease[J]. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2002, 22(12): 2066-2071.
 - [17] Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, et al. The interleukin-6-174 G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men[J]. *European Heart Journal*, 2001, 22(24): 2243-2252.
 - [18] Tonet AC, Karnikowski M, Moraes CF, et al. Association between the -174 G/C promoter polymorphism of the interleukin-6 gene and cardiovascular disease risk factors in Brazilian older women[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2008, 41(1): 47-53.
 - [19] Rivera-Chavez FA, Peters-Hybki DL, Barber RC, et al. Interleukin-6 promoter haplotypes and interleukin-6 cytokine responses[J]. *Shock (Augusta, Ga)*, 2003, 20(3): 218-223.
- 收稿日期: 2015-10-17
修回日期: 2015-12-23
-
- (上接 32 页)
- [5] Schrader H, Menge BA, Belyaev O, et al. Amino acid malnutrition in patients with chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma[J]. *Pancreas*, 2009, 38(4): 416-421.
 - [6] Geng D, Sun D, Zhang L, et al. The therapy of gefitinib towards breast cancer partially through reversing breast cancer biomarker arginine[J]. *Afr Health Sci*, 2015, 15(2): 594-597.
 - [7] 何桂珍, 陶智兵, 张文辉, 等. 生理体液法测定 40 例健康志愿者血浆游离氨基酸正常值[J]. *现代检验医学杂志*, 2015, 30(1): 46-51, 54.
He GZ, Tao ZB, Zhang WH, et al. Establishing physiological body fluid method to evaluate the normal value of plasmic free amino acid in normal healthy volunteers[J]. *J Mod Lab Med*, 2015, 30(1): 46-51, 54.
 - [8] Zhang W, Kaye DM. Simultaneous determination of arginine and seven metabolites in plasma by reversed-phase liquid chromatography with a time-controlled ortho-phthaldehyde precolumn derivatization[J]. *Anal Biochem*, 2004, 326(1): 87-92.
 - [9] Perez-Neri I, Castro E, Montes S, et al. Arginine, citrulline and nitrate concentrations in the cerebrospinal fluid from patients with acute hydrocephalus[J]. *J Chromatogr B*, 2007, 851(1/2): 250-256.
 - [10] 丁永胜, 牟世芬. 氨基酸的分析方法及其应用进展[J]. *色谱杂志*, 2004, 22(3): 210-215.
Ding YS, Mou SF. Development of analytical methods for amino acids and their applications[J]. *Chin J Chromatogr*, 2004, 22(3): 210-215.
 - [11] Wu G, Meininger CJ. Analysis of citrulline, arginine, and methylarginines using high-performance liquid chromatography[J]. *Meth Enzymol*, 2008(440): 177-189.
 - [12] Wuyts B, Stove V, Goossens L. Critical sample pretreatment in monitoring dried blood spot citrulline[J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 386(1/2): 105-109.
 - [13] 蒋子刚, 顾雪梅. 分析检验的质量保证和计量认证[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 1998: 497.
Jiang ZG, Gu XM. Qualitative Guarantee and Measure Demonstration of Analysis & Test[M]. Shanghai: Publishing House of East China University of Science and Technology, 1998: 497.
 - [14] Crenn P, Messing B, Cynober L. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction[J]. *Clin Nutr*, 2008, 27(3): 328-329.
 - [15] Jiang ZM, Cui YZ, Wang L, et al. Investigating citrullinated proteins in tumour cell lines[J]. *World Journal of Surgical Oncology*, 2013, 11(1): 260.
 - [16] Stadler SC1, Vincent CT, Fedorov VD, et al. Dysregulation of PAD4-mediated citrullination of nuclear GSK3 β activates TGF- β signaling and induces epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(29): 11851-11856.
 - [17] Feun L, You M, Wu CJ, et al. Arginine deprivation as a targeted therapy for cancer[J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(11): 1049-1057.
 - [18] Wangpaichitr M, Wu C, Bigford G, et al. Combination of arginine deprivation with TRAIL treatment as a targeted-therapy for mesothelioma[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(12): 6991-6999.
- 收稿日期: 2014-06-25
修回日期: 2015-08-18