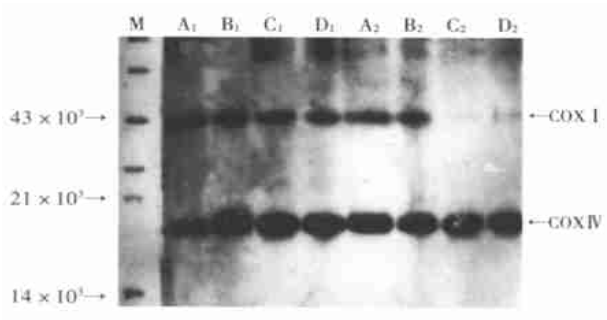
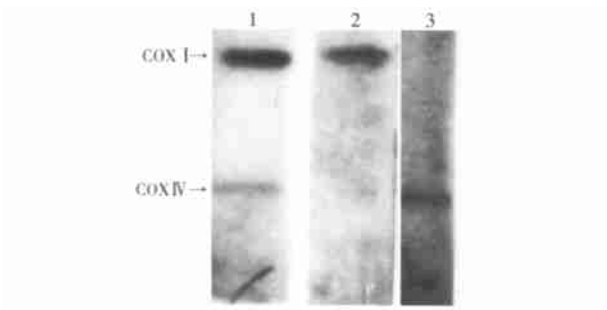
DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.02.032
第25卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 2
2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003



A_1、B_1、C_1、D_1 分别代表 A 液、B 液、C 液和 D 液处理组不补加β-巯基乙醇的免疫印迹结果；A_2、B_2、C_2、D_2 分别代表 A 液、B 液、C 液、D 液处理组补加β-巯基乙醇的免疫印迹结果；M：蛋白质分子量标准物

图 2 尿素-SDS-PAGE 分离 COX 亚基的免疫印迹



a：用小鼠抗人 COX Ⅰ 单克隆抗体液杂交结果，大小约 43×10^3；b：用小鼠抗牛 COX Ⅳ 单克隆抗体液杂交结果，大小约 17×10^3；c：用两种单克隆抗体混合液杂交结果，产生与 A、B 对应的两条带

图 3 尿素-SDS-PAGE 分离 COX 亚基Ⅰ、Ⅳ的效果鉴定

3 讨论

COX Ⅰ 和 Ⅳ 是分别由 mtDNA 和 nDNA 编码的 COX 最大的两个亚基，Ⅰ 是形成酶活性中心的亚基之一，Ⅳ 通过磷酸化以及与 ATP/ADP 的相互作用参与调节酶活性[3]。研究这两个亚基的蛋白量变化，可以反映 mtDNA-nDNA 在蛋白水平上的相互作用，也有助于认识 COX 活性与亚基蛋白量之间的关系。

SDS-PAGE 分离线粒体蛋白的杂交结果说明，A 液效果最好。B 液和 D 液处理不能使 COX 亚基充分解离而产生“鬼带”[2]，见图 1。补加β-巯基乙醇改善了 B 液的处理效果，对 D 液处理结果没有影响，提示分离线粒体蛋白中 COX 亚基必需用尿素和 EDTA。Schagger 等[4] 以提纯的 COX 为样本时，发现亚基充分解离最理想的变性剂是尿素。EDTA 可阻止还原剂的氧化，防止冷却时亚基蛋白重新缔合[3]。我们进一步的研究表明，尿素-SDS-PAGE 分离线粒体蛋白，变性液中加入尿素和/或 EDTA 都可产生理想的结果，而凝胶中加入尿素，杂交结果更清晰。单抗的鉴定证实 A 液处理的线粒体蛋白经尿素-SDS-PAGE，COX 亚基充分解离，杂交条带是亚基蛋白相对含量的反映。

本方法在以往研究的基础上，避免了烦琐的 COX 提取过程和提取中的损失，能真实反映线粒体内 COX 各亚基的蛋白量；由于核基因编码的亚基是在胞浆中合成后运输到线粒体，然后与线粒体基因编码的亚基在线粒体内膜上识别并组装成有功能的 COX 全酶，因此，该方法是考察亚基在线粒体中的总量和分布的有效途径，在深入研究 COX 亚基转运、亚基组装中将有很好的应用价值。

关键词：细胞色素氧化酶；尿素；聚丙烯酰胺凝胶电泳
中图法分类号：R394-33 文献标识码：B

参考文献：

[1] 高文祥，柳君泽，吴利平，等. 急、慢性缺氧对大鼠脑线粒体能量代谢的影响[J]. 中国病理生理杂志，2000，16(10)：879－882
[2] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]，北京：科学技术出版社，1999.76－78.
[3] Lenka N, Vijayasarathy C, Mullick J, *et al*. Structural organization and transcription regulation of nuclear genes encoding the mammalian cytochrome c oxidase complex[J]. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1998, 61: 309－344.
[4] Schagger H, Jagow GV. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the sepatation of proteins from 1 to 100kDa[J]. Anal Biochem, 1987, 166(2): 368－379.

（编辑 薛国文）

文章编号：1000-5404(2003)02-0167-03

技术方法

大鼠同种异体耳廓异位移植模型的可行性探讨

Feasibility of rat model of heterotopic auride allotransplantation

孙志成[1]，李世荣[1]，曹 川[1]，吴 军[2]（第三军医大学附属西南医院：[1]整形美容中心；[2]全军烧伤研究所，重庆 400038）

提 要：目的 建立稳定的大鼠同种异体耳廓移植模型。方法 将动物分为 A、B 两组。每组均以 10 只 SD 大鼠为供体，10 只 Wistar 大鼠为受体进行原位及异位移植。原位移植的静脉选择颈外静脉，动脉选择颈外动脉，动脉吻合平面选

作者简介：孙志成(1970－)，男，黑龙江省双城市人，硕士，主治医师，主要从事移植免疫方面的研究。电话(023)68754192
收稿日期：2001-05-16；修回日期：2002-02-11
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

择甲状腺上动脉分支处;异位移植选择股动静脉。然后观察大鼠及其耳廓的生存情况与组织学变化。结果 两组的耳廓生存时间为5~11 d,异位移植大鼠的生存率最高,耳廓的生存及病理改变与原位移植无差异。结论 大鼠同种异体耳廓异位移植模型对于研究带血管的体表同种异体复合组织移植排斥反应简便易行,稳定可靠。

1986年,Chen等[1]最先报道了大鼠同种异体耳廓原位移植的方法,之后又有作者对该模型进行研究[2]。我们在此基础上通过研究成功地创建了大鼠同种异体耳廓异位移植模型,现将方法报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

试验分为A、B两组进行。每组10只SD大鼠,重量约250 g,作为供体;10只Wistar大鼠,重量约350 g,作为受体,雌雄不限。

1.2 实验方法

1.2.1 供体手术 异戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉(20.0 mg/kg),麻醉后剃除耳廓及周围基底部位毛发,于耳廓基底距颅耳交界线约0.5 cm作椭圆形切口,再沿颈外静脉走行方向作约2 cm的附加切口。分离静脉:在耳周切口的腹侧脂肪组织与腺体之间向深处分离,可见颈外静脉的远端面后静脉的主干,然后向近心及远心端分离,注意保护耳前与耳后静脉。分离剪断浅层神经,剃除静脉周围的脂肪组织,游离静脉蒂至管径合适为止。游离动脉:于颈外静脉背侧,胸锁乳突肌与颅骨壁之间向深处锐性解剖分离,离断胸锁乳突肌及其深处的二腹肌,在贴近外耳道软骨下方可找到颈外动脉末段。紧贴颅骨壁环形切断外耳道软骨,注意结扎颈外动脉终末端,保护好耳前、后动脉,结扎颈外静脉于颅内交通的翼丛、内耳静脉。将耳廓提起沿动脉干向近心端分离。在舌骨大角附着处剪断下颌舌骨肌肉群,并剪掉舌骨大角约1 cm,此时动脉已充分显露。依次双重结扎剪断颌外动脉、腭升动脉、舌动脉、甲状腺上动脉等分支。自颈外静脉注入含肝素的生理盐水,全身肝素化(1 000 U/kg),等待5 min。最后剪断颈外动脉及颈外静脉主干,立刻用灌注液(1%普鲁卡因加肝素50 U/100 ml)从动脉口内灌洗,压力不宜过大,修理血管外膜后置4℃保存。

1.2.2 受体手术 麻醉方法与供体相同。

A组:文献[1,2]报道,动脉吻合平面位于甲状腺上动脉处。紧贴颅骨壁切下耳廓,分离找到面后静脉,然后沿静脉干向近心端游离至颈外静脉。剪断胸锁乳突肌、二腹肌,必要时剪断舌骨大角,即可显露颈总动脉及颈内、外动脉。靠近颈内、外动脉分叉处用血管夹夹住颈外动脉,结扎动脉远端,剪断动脉,修理外膜。以近心断端为吻合口与供体耳动脉蒂间断缝合。用另一血管夹夹住颈外静脉,结扎静脉远端并剪断,同法以近心断端与供体耳静脉蒂行端端吻合。同时放开动静脉血管夹,恢复血供的移植耳廓颜色即由苍白迅速转为红润,透光明显可见大鼠耳廓血管主干及分支网。缝合二腹肌与胸锁乳突肌,固定供体及受体外耳道软骨断端,缝合皮肤切口。

B组:大鼠仰卧位四肢固定于手术台上,沿股动静脉走行方向作纵行切口约3 cm,切开皮肤即可见股动静脉。在腹壁浅动静脉上方游离股动静脉约1.5 cm,结扎远端,近心端上血管夹,离断。吻合方法同A组。

1.2.3 术后处理 术后动物置于室温为25℃的动物房内饲养,术后3 d每日用氨苄西林200 mg/kg腹腔注射,罂粟碱0.5 mg/kg、肝素钠1 mg/kg肌肉注射。术后第1、4、7天取耳廓组织作病理检查。

1.3 统计学处理

结果采用$\bar{x}\pm s$表示,并采用第三军医大学数学教研室统计程序以方差齐性检验,结合t检验和χ^2检验行显著性分析。

2 结果

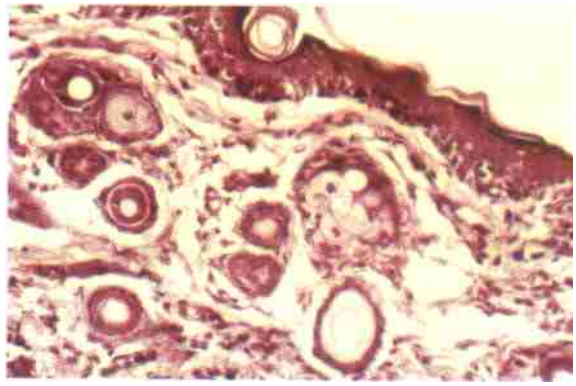
A组血流恢复后耳廓呈现深红色,24 h后转为淡红色。术后2~3 d,颜色又转为深红色;第4天呈黯红色,出现水肿,表面有渗出,质地变硬,耳廓开始变形;5~6 d趋向于深紫色,部分区域发黑,耳廓变形明显,活检时已看不到明显渗血。B组术后即刻为粉红色,然后逐渐出现红色、深红、紫红、褐色乃至坏死。以耳廓部皮肤90%颜色变黑为移植物坏死标准,两组移植耳廓平均存活时间无显著差异($P>0.05$)。最短生存时间为5 d,最长为11 d。C组吻合动静脉所用时间与A、B组对比差异显著($P<0.01$),且动物术后成活率高。见表1。

表1 三组手术方案的结果对比

区别	动物成活率	血管吻合时间(h)	移植耳廓生存时间(d)
A组	0.6#	2.5±0.12#	7.5±0.54
B组	1.0	1.0±0.13	7.5±0.47

#: $P<0.01$ 与B组比较

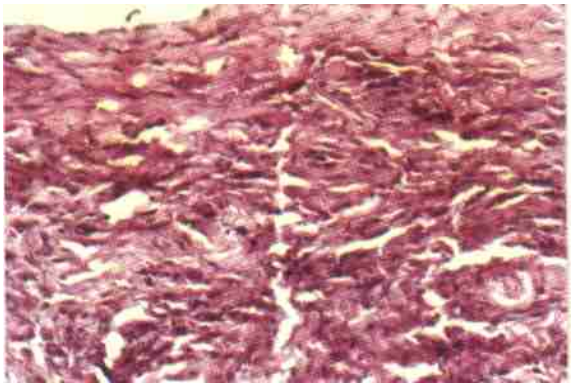
两组的病理学改变没有明显差异,HE染色病理切片镜下可见移植初期少量单核细胞及中性粒细胞浸润,进一步可见淋巴细胞及单核细胞增多,出现血管炎及毛囊周围炎,排斥后期大量炎细胞浸润,以单个核细胞为主,皮肤皮下及软骨层结构已不易区分。微血管壁增厚,内膜部分脱落。见图1,2。



组织中可见少量中性粒细胞、单个核细胞浸润,组织肿胀,组织结构完整

图1 异体耳廓移植术后3 d (HE×200)

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



表皮细胞脱落, 大量单 个核细胞浸润, 组织结构紊乱

图 **2**　异体耳廓移植术后 **7 d**　(HE× 200)

3　讨论

3.1　模型的对比

文献报道的 A 组移植模式是以受体颈外动脉(或颈总动脉)为动脉蒂, 解剖层次较深, 视野狭小, 操作困难, 极不便于吻合; 需要离断二腹肌及剪断舌骨大角, 损伤较大; 同时吻合区距离迷走神经及颈动脉窦较近, 不可避免的有牵拉、压迫等刺激。手术过程中动物经常出现呼吸不规则乃至停止, 动物死亡率较高。B 组是经过我们改进后进行异位移植的探讨。具有明显优于 A 组的特点: ①受体准备时间短, 一般 5 ~ 10 min 即可完成。视野开阔, 手术进针出针不存在困难。全部手术用时较A 组平均节省 1.5 h, 减少了耳廓的热缺血时间。②动物成活率高, 不存在死亡因素。耳廓的存活时间及其组织病理学改变与 A 组无差异。③接近耳廓的生理条件。A 组术后即刻明显出现耳廓颜色深红, 说明颈外动脉的压力较高, 血流量大大超过耳廓的正常血供, 会对移植物造成非生理性影响, 这在动物模型方面有不尽合理之处。B 组吻合血流恢复后颜色粉红, 说明动脉压力接近耳廓的生理条件。④全部 10 只动物在吻合位置离断股动脉后均观察 30 d, 未发现对该侧下肢的血供产生影响。说明有丰富的侧支循环供应下肢的血运。

3.2　供体手术的改进

文献报道供体动脉是从颈外动脉近心端向远心端分离。我们改用离断外耳道壁后由远心端向近心端游离。操作难度下降, 分离过程中利于转换动脉的位置。

3.3　模型的应用

异体复合组织移植是随着器官移植研究的深入而发展起来的, 可用于体表器官缺损的修复与再造, 特别是肢体的形态与功能重建, 临床上已有行全手复合组织异体移植的报道。为此, 寻找一种良好的动物实验模型是进行该项研究的基础。鼠耳廓解剖结构稳定, 手术过程又较肢体移植简捷, 容易观察, 还可随时多次进行活检取材。大鼠耳廓同种异体移植可以作为复合组织移植的动物模型。同时, 我们认为作为动物模型单纯追求原位移植的意义不大, 更重要的是简便可行、接近生理条件、动物死亡率低、模型的可重复性强。腹股沟耳廓异位移植具有上述特点, 不失为带血管的同种异体复合组织移植的良好模型, 也是进行耳廓移植研究的最佳模型。

关键词: 同种异体移植; 耳廓; 大鼠

中图法分类号: R617; R764. 91　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Chen L. A successful replantation of rat ear[J]. J Reconstruc Microsur, 1986, 2(3): 195－197.

[2] David T W, Chiu M D. Rat ear reattachment as an animal model[J]. Plast Reconstruc Surg, 1990, 85(5): 782－788.

(编辑　薛国文)

酶的活性单位

酶活性单位是衡量酶活力大小的尺度, 它反映在规定条件下, 酶促反应在单位时间内生成 一定量的产物或消耗 一定数量的底物所需的酶量。根据国际生化学会酶学委员会规定: 在特定的条件下, 每分钟催化 1 μmol 底物转化为产物所需的量为 1 个国际单位(IU), 即 1 IU＝1 μmol/min。该学会后来又推荐以催量单位 katal 表示酶的活性。1 催量(1 kat)是指在特定条件下, 每秒钟使 1 mol 底物转化为产物所需的酶量。1 IU＝16.67×10^{-9} kat。有的文献业已用 kat 表示酶活性单位, 但国际计量委员会迄今还未同意。根据国家标准对量和单位的规定, 酶活性的法定单位为 mol/s。其换算关系为: 1 IU＝1 μmol/min＝16.67 nmol/s＝1.667×10^{-8} mol/s; 1 kat＝1 mol/s。

(本刊编辑部)

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