过程,PLA2在炎症介质产生过程中的作用以及调控机理仍不十分明确,有待进一步深入研究。

(致谢:感谢美国 SmithKline的 Bolognese博士提供cPLA2抗体和标准品及相关资料。)

关键词 内毒素;磷脂酶 A2;大鼠;肾脏

中图法分类号 Q556.1;R392.11

参考文献

1 杜晓燕,周元聪.磷脂酶 A2的生理机能新说.生命的化学,1997,17(1):12

2 Guidet B, Piot O, Masliah J, *et al*. Secretory non-pancreatic phospholipase A2 in severe sepsis: relation to endotoxin, cytokines and thromboxane B2. Infection, 1996; 24(2): 103

3 Ackermann E J, Dennis E A. Mammalian calcium-independent phospholipase A2. Biochim Biophy Acta, 1995, 1259(2): 125

4 蔡文琴,王伯 主编.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.成都:四川科学技术出版社,1994.406~435

5 Borsch-Haubold A G, Kramer R M, Watson S P. Phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A_2 by 38-kDa mitogen-activated protein kinase in collagen stimulated human platelets. Eur J Biochem, 1997, 245(3): 751

6 Stephenson D T, Manetta J V, White D C, *et al*. Calcium-sensitive cytosolic phospholipase A_2 (cPLA2) is expressed in human brain astrocytes. Brain Research, 1994, 637(1-2): 97

7 Skannal D G, Eis A L, Brockman D, *et al*. Immunohistochemical localization of phospholipase A_2 isoforms in human myometrium during pregnancy and parturition. Am J Obstet Gynecol, 1997, 176(4): 878

8 Heasley L E, Thaler S, Nicks M, *et al*. Induction of cytosolic phospholipase A_2 by oncogenic Ras in human non-small cell lung cancer. J Biol Chem, 1997, 272(23): 14501

(收稿:1998-02-09;修回:1998-05-15)

(编辑 王 红)

NADase细菌毒素的非放射性测定法*

Non-radioassay of NADase bacterial toxins

金晓琳** 黎 庶 胡福泉 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室)重庆,430038

提 要 目的:建立一种测定 NADase细菌毒素活性的非放射性测定法。方法:建立一个 NAD(辅酶 I)依赖的显色系统,在该系统中,NAD接受乳酸脱氢酶(LDH)从乳酸脱下来的氢,再通过 PMS(吩嗪二甲酯硫酸盐)传递给 INT(碘化硝基四氮唑蓝),使后者还原而显色。如果 NADase毒素分解 NAD,就会打断递氢链而抑制显色反应。结果:显色系统中,NAD含量与显色有良好线性关系($R=0.9898$)。绿脓杆菌外毒素 A分解 NAD而抑制显色反应。以毒素含量为自变量,以毒素对显色反应的抑制为应变量,建立了对数线性回归方程 $Y=12.5X^{0.26}$,当 $Y=50\%$ 时[即显色系统中的 NAD有半数(250ng)被分解],$X=207$(ng)。定义分解 1ng NAD的毒素活性为一个单位,则 207ng毒素含有 250个毒素活性单位。该方法的测定敏感性达到"ng"水平。结论:本方法是一种敏感的测定 NADase细菌毒素活性的非放射性测定方法。

NADase细菌毒素是一类由细菌产生的能够分解 NAD(辅酶 I)的毒素[1]。这类毒素包括白喉毒素[2]、霍乱毒素及大肠杆菌不耐热肠毒素[3,4],绿脓杆菌外毒素 A等[5,6]及百日咳毒素[7]。过去测定这类毒素的活性采用的是 ADP核糖基化活性分析(ADP-ribosglation assay)[1~5]。该方法是测定毒素分解 ^{14}C-NAD,并将具有放射性标记的 ADPR转移到延长因子 EF-2上去的能力。但是 ^{14}C是长半衰期(5730年)的同位素,许多实验室都限制使用,使得该方法的使用受到极大限制。本研究建立了一种测定 NADase细菌毒素活性的非放射性测定法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

① 菌株与毒素:菌株为本室保存的国际标准产毒株 PA-103株。纯化后的绿脓杆菌外毒素 A,用 pH 8.0, 10 mmol/L

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39770359

** 金晓琳,女,34岁,实验师

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

Tris-HCL, 1 mmol /L EDTA的毒素稀液配制成 0. 1μg /μl浓度的溶液。

② 乳酸脱氢酶 (LDH),用蒸馏水配成 5 mg /ml浓度的溶液。

③ 碘化硝基四氮唑蓝 (INT, Fluka化学试剂公司产品),用蒸馏水配制成 4 mg /ml浓度的溶液。

④ 吩嗪二甲酯硫酸盐 (PMS, Fluka化学试剂公司产品),用蒸馏水配制成 1 mg /ml浓度的溶液。

⑤ NAD(中科院上海生化所产品),用毒素稀释液配制为 0. 25 mg /ml浓度的溶液作为贮存液。需要时用相同缓冲液做进一步稀释。

⑥ 乳酸钠 (上海试剂三厂产品),用 pH 7. 4, 10 mmol /L PBS配制成 0. 5 mol /L的溶液,内含 0. 02% Brij-35

1. 2 NAD依赖的显色系统的建立

具体方法是: 在各测定管中加入 INT溶液 0. 2 ml, PMS溶液 0. 8 ml, LDH 0. 1 ml及乳酸钠溶液 1. 8 ml,置 37℃水浴保温 10 min,再向各测定管中加入 0. 2 ml不同稀释度的 NAD溶液。对照管中不加 NAD溶液 (补充等量稀释液)。混匀后置 37℃保温 5 min。取出后每管加 2 mol/L HCl 0. 1 ml终止反应,于 490 nm波长下比色测定,用对照管调零[8,9]。

1. 3 NADase毒素活性测定

利用上述建立的 NAD依赖的显色系统来测定 NADase细菌毒素分解 NAD的活性。如果显色系统中 NAD被毒素分解,显色系统的显色将受到抑制。具体测定方法是: 根据上述建立的 NAD依赖的显色系统的结果,选择 NAD用量为每反应管中 0. 5μg为理想用量。先将绿脓杆菌外毒素 A用毒素稀液做倍比稀释,使 7个管中的含量分别是 1000, 500, 250, 125, 62. 5, 31. 25, 15. 625(ng),体积为 10μl,然后向每管中加入 NAD溶液 2μl (即 0. 5μg)。混匀后置 25℃水浴 30 min,再向每管中加入 0. 2 ml pH 7. 4的 10 mmol /L PBS,将此毒素处理过的 NAD加入显色系统相应各管中,混匀后 37℃保温 5 min,每管加入 0. 1 ml 2 mol /L HCl终止反应,在 490 nm下比色测定。实验测定设置阴、阳性对照: 阳性对照管中含同样量的 NAD但不含毒素,阴性对照管中不含 NAD,其余条件与测定管相同。D_{490}比色测定时用阴性对照管调零。

2 结果

2. 1 NAD含量与显色反应的线性关系

在测定 NAD含量与显色反应的线性关系中共做了六个不同 NAD浓度,分别是: 100, 150, 200, 300, 450, 600(ng)。每个浓度做三支复管。以 NAD含量为横坐标,以各浓度 D_{490}测定值的均值为纵座标,绘制下列曲线。

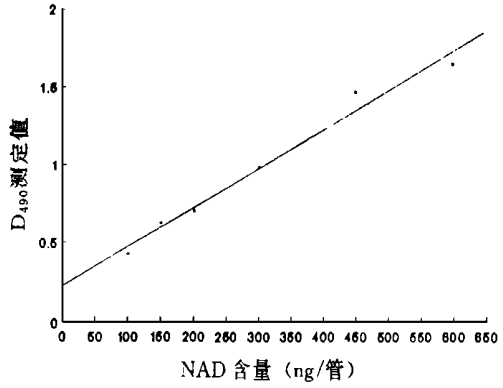


图 1 NAD含量与显色的关系

从曲线中,可以看出 NAD含量与显色反应有良好的线性关系 (R= 0. 9898)。根据此结果,选用 500ng含量的 NAD作为 NADase毒素活性测定中的理想用量。

2. 2 NADase毒素活性测定

在测定中分别用了七个不同浓度的绿脓杆菌外毒素去处理 NAD(500ng)。每个浓度均做三个复管。计算出各浓度下三个复管测得的 D_{490}的均值。以阳性对照管 (NAD未用毒素处理) 的 D_{490}值为 100% 显色看待,计算出各毒素处理管的显色率和显色抑制率:

$$\text{显色率 (RCR)} = \frac{\text{毒素处理管 } D_{490}\text{值}}{\text{阳性参照管 } D_{490}\text{值}} \times 100\%$$

$$\text{抑制率 (RI)} = 100 - \frac{\text{毒素处理管 } D_{490}\text{值}}{\text{阳性参照管 } D_{490}\text{值}} \times 100\%$$

表 1 不同浓度的 NADase毒素对显色反应的影响

Content of toxin(ng)	1000	500	250	125	62. 5	31. 2	15. 6	0(对照)
D_{490}值	0. 265	0. 443	0. 635	0. 786	0. 826	0. 888	0. 933	1. 280
RCR(%)	20. 6	34. 4	49. 4	61. 1	64. 2	69. 1	72. 6	100
RI(%)	79. 4	65. 6	50. 6	38. 9	35. 8	30. 9	27. 4	0. 0

以毒素含量做为自变量,显色抑制率为因变量,做对数线性回归分析, R2= 0. 9723747, SSR= 56. 7801,建立了对数线性回归方程: $Y= 12.5X^{0.26}$。

3 讨论

细菌的 NADase毒素是一类能够分解 NAD为腺嘌呤二磷酸核糖基 (ADPR)及尼克酰胺,并将 ADPR转移到靶分子上去的毒素[1-5],其反应如下:

$$\text{NAD} \xrightarrow{\text{NADase毒素}} \text{ADPR} + \text{尼克酰胺} + \text{H}^+$$

靶分子因核糖基化后失去活性从而引起疾病。本文中建立的测定 NADase细菌毒素活性的非放射性测定法的原理如下:

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

实验建立了一个 NAD依赖的显色系统,显色原理是:乳酸脱氢酶从乳酸上脱下两个氢,通过 NAD及 PMS传递给氧化型 INT,INT还原后发生显色反应而呈红紫色。在 490 nm波长下定量测定成色反应。如果 NADase细菌毒素分解了 NAD,则打断了递氢链的传递。通过毒素对成色反应的抑制率即可反映出毒素的活性。

在建立的对数线性回归方程中,Y为抑制率,当 Y= 50%时,其含意是显色系统中的 NAD有半数已被分解。在本文条件下,显色系统中投入的 NAD量为 500 ng,半数量即为 250 ng 我们规定能够分解 1 ng NAD的毒素量为一个毒素活性单位,则能够使显色系统发生 50%抑制时的毒素活性量即为 250单位。根据对数线性回归方程 $y= 12.5X 0.26$,当 Y= 50时,X= 207 (ng)。这就是说本文中使用的 207 ng毒素具有毒素活性 250单位。

在标本实测中,既不知道毒素活性单位,也不知道毒素含量。但只需将标本做连续倍比稀释,找到发生 50%的抑制时的稀释度,最后用稀释度乘以 250即求得被测样品中的毒素活性单位数。

关键词 细菌毒素;NAD酶;非放射性测定

中图法分类号 R978.19

参考文献

1 Oppenheimer, N J. NAD hydrolysis: Chemical and enzymatic mechnism. Mol Cell Biochem, 1994, 138(1-2): 245

2 Wilson B A, Blanke S R, Reich K A *et al*. Active-site mutation of diphtheria toxin. Tryptophan 50 is a major determinant of NAD affinity. J Biol Chem, 1994, 269(37): 23296

3 Sixma T K, Pronk S E, Kalk K H, *et al*. Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from E. Coli. Nature, 1991, 351(6325): 371

4 Kato M, Imamura S, Kawase H *et al*. Histidinc-44 of the A subunit of Escherichia coli enterotoxin is involved in its enzymatic and biological activities. FEMS Microbiol lett, 1997, 152(2): 219

5 Beattie B K, Prentice G A, Merrill A R. Investigation into the catalytic role for the trytophan residue within domainⅢ of pseudomonas aeruginosa exotoxin A. Biochemisty, 1996, 35(48): 15134

6 Antoine R, Locht C. NAD-glycohydrolase activity of the pertussis toxin S1 subunit involvement of the catalytic His-35 residue. J Biol Chem, 1994, 269(9): 6450

7 胡福泉,周善章.绿脓杆菌外毒素 A靶细胞的实验研究.第三军医大学学报, 1987, 9(1): 1

8 胡福泉,周善章,汪美先.线粒体内 NAD的微量测定法.中华流行病学杂志, 1990, 11(特 6): 131

9 陈鸿书,彭家和,苏礼民等. NAD超微量测定法.第三军医大学学报, 1985, 7(2): 173

(收稿: 1998-04-14;修回: 1998-07-16)

(编辑 冷怀明)

“瘢痕贴”防治创面增生性瘢痕的临床研究

Clinical study of CRSS on prevention and treatment of hypertrophic scar

李世荣* 张 玄 王珍祥 毋巨龙 胡 钧** 云逢芹** (第三军医大学附属西南医院整形外科)重庆, 400038

提 要 目的:为了寻求一种更好的防治增生性瘢痕的方法,对瘢痕贴的抗瘢痕作用进行研究。方法:以 88例患者的中厚皮片供区同增生性瘢痕为研究对象,采用同体对照方法,共观察 3个月。结果:瘢痕贴使用简单方便安全,瘢痕增生厚度明显低于对照组($P < 0.01$)。结论:瘢痕贴有较好的推广应用价值。

烧伤、外伤后形成的创面增生性瘢痕严重影响患者的外观及功能。目前临床上仍缺乏一种简单有效而副作用小的防治方法,80年代初期,国外学者发现硅凝胶膜有防治瘢痕增生的作用后,引起医学界广泛关注。随之便有颇多关于硅凝胶膜防治瘢痕增生的报道,并不断有硅凝胶膜商品问世。结合我科多年来的临床应用硅凝胶膜的经验,1996年,我们同上海东月医疗保健用品有限公司一道,综合了国外 10多年的资料,分析国

* 李世荣,男,45岁,副教授,大学本科

** 上海东月医疗保健用品有限公司

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