DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.01.026

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

外硅凝胶膜成品,经过近百次的反复试验,终于研制成功“瘢痕贴”,并对瘢痕贴的抗瘢痕效果进行了临床研究。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

瘢痕贴(CRSS)是采用医用级有机硅凝胶为基本原料,加入适量医用级二甲基硅油等研制成。成品为无色半透明薄膜,质地柔软,随形性好。成品膜为两层薄膜组成。膜的一面光洁无粘性,另一面即粘附面有一定粘着性,能紧密贴附于瘢痕及皮肤表面,膜内有一层织物加强网,扫描电镜观察 CRSS表面光滑,均匀一致,并附有 1~ 5μm的硅油膜。

1.2 临床资料

本研究以 1996年 11月到 1997年 5月在我科住院需多次手术的烧伤后期整形患者为研究对象,共 88例,其中男性 56例,女性 32例,年龄 18~ 45岁,病人选择要求,无心、肺、肝、肾等慢性疾病患者,3个月内未使用过类固醇激素、青霉胺、抗肿瘤药物,并自愿合作者。

1.3 研究方法

以中厚皮片供区形成的增生性瘢痕为研究模型,取皮厚度均为 0.5~ 0.8 cm,根据性别、年龄以达真皮 3/4为准。其中腹部供皮区 24例,背部供皮区 16例,大腿供皮区 48例,采用 64型鼓式取皮机取皮,供皮区创面按常规处理,88例供皮区无一例发生感染,创面 15~ 21 d完全愈合,待创面愈合后 8~ 10 d,将供皮区分为上下两对等部分,一部分为实验组,另一部分为对照组,实验组用 CRSS覆盖,每天使用 22 h以上,并清洁局部一次,对照组不作任何处理,共使用 3个月。

1.4 观察指标

1.4.1 观察在 CRSS使用中有无过敏反应、皮疹、瘙痒等。

1.4.2 瘢痕变化的外形观察 分别在使用 CRSS后 1~ 3个月在同等条件下拍摄彩色照片,对比两组在外观、色素沉着、充血状态等方面的差异。

1.4.3 平均厚度变化的测量 在应用 CRSS 3个月后,用褐藻酸钠印膜胶法测量出两组高出皮肤的体积,然后再根据瘢痕面积求出瘢痕的平均厚度[1]。

2 结果

CRSS的粘附性一面能较好地贴附于瘢痕及周边的皮肤表面,不滑动,使用方便,简单,对活动较多的患者可考虑用绷带或胶布简单固定。在应用 CRSS的最初 3~ 5 d,瘢痕表面较湿润,以后这种现象逐渐消失,除部分患者主诉贴附后有瘙痒现象外,未见有红斑、丘疹等皮肤不良反应,在使用过程中如出现瘢痕瘙痒,经局部清洁后,大多可获缓解。

彩色照相表明,应用后 1个月见 CRSS组表面较光滑、平整、充血状态较轻,对照组瘢痕表面粗糙、充血较明显,并有小结节状突起。3个月时 CRSS组瘢痕平坦光滑,色素沉着少,外观佳,对照组瘢痕明显高出皮肤,表面高低不平,色素沉着明显,呈增生性瘢痕。

采用褐藻酸钠印膜法测定,3个月时 CRSS组平均厚度明显低于对照组,见表 1。

表 1 3个月瘢痕平均厚度(mm)

组别	例数	瘢痕平均厚度($\bar{x}\pm s$)
CRSS组	38	1.350± 0.333*
对照组	38	2.416± 0.837

*:与对照组比较 $P<0.01$

3 讨论

3.1 瘢痕贴抗瘢痕效果评价

创面增生性瘢痕的防治是医学领域内的一个难题。传统的防治方法主要有压力疗法、类固醇激素类药物瘢痕内注射及放射疗法等。压力疗法对高低不平的瘢痕表面压力不均匀及压力套与瘢痕之间摩擦常导致瘢痕表面破溃。另外在四肢应用时由于长时间的加压影响肢体静脉回流,造成肢体末端肿胀,坠胀感等。后两种方法仅适用于局部小面积瘢痕的防治,虽然效果较好,但副作用较大,病人不易接受。瘢痕贴疗法克服以上不足,具有简单、方便、无毒副作用等优点。本研究从瘢痕外观及厚度进行对比研究表明,应用 CRSS后能预防瘢痕增生,疗效确切。瘢痕贴的研制成功,为国内推广这一疗法奠定了基础。

3.2 瘢痕贴作用机理的探讨

国外硅凝胶膜水蒸气透过率(2.0 g/m^2/24 h)不及正常皮肤的一半(8.5 g± 0.5 g/m^2/24 h)[2]。同时也发现在使用 CRSS时,最初 3~ 5 d,膜下瘢痕表面显得较潮湿,随后这种现象逐渐消失,我们推测,在应用 CRSS前,愈合后不久的瘢痕表面呈充血状态,角质层也较薄,水分蒸发量也较大,而应用 CRSS后,由于 CRSS的密闭及蒸气的半通透性,水分蒸发受到抑制,发生了角质层水储留现象,由于每天长时间的应用,促使瘢痕逐渐适应这一环境,使水蒸气透过率降低到与 CRSS一致的水平。Davey[3]认为:瘢痕表面水蒸气透过率的降低,能减少毛细血管的增生。Hosada[4]和激光多普勒仪研究表明:毛细血管活性的增加是增生性瘢痕形成的一个先兆,微血管的改变是促进瘢痕成熟的一个重要因素。对正常皮肤而言,控制水分蒸发取决于角质层,而角质层就是一层富有弹性的生物膜[5]。我们推测,应用 CRSS后,就起到了一种类似皮肤角质层样的作用,减少水分蒸发,从而抑制了毛细血管的增生,达到预防瘢痕增生的目的。

Quinn[2]证明瘢痕贴能释放出低分子硅油,硅油具有许多特性,其氧溶解度 10倍于血浆及盐水[5],在创面应用能促进坏死组织与创面分离,促进上皮细胞再生[6],Hambron认为硅油本身就是一种分裂素。另外,硅油有极强的吸附性,同时又有很强的疏水性能,其与水界面的表面张力高达 50 Dxg/cm^2[7],如此高的疏水

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

性能很可能在阻碍表皮的水分蒸发,导致角质层在水储留过程中起到重要作用。但在 CRSS防治瘢痕的作用机制中,硅油究竟有何作用,尚待进一步研究。

3.3 关于毒副作用

医用硅凝胶制品无毒,无刺激性,无抗原性,无致癌及致畸性。本研究的临床应用观察表明瘢痕贴在使用过程中,除部分患者在开始使用时有瘙痒现象外,尚未发现其它不良反应及不适,使用安全可靠。

关键词 瘢痕贴;增生性瘢痕

中图法分类号 R619.6

参考文献

1 Sawada Y. A method of recording and objective assessment of hypertrophic burn scars. Burns, 1994, 20(1): 76

2 Quinn J K. Silicone gel in scar treatment. Burns, 1987, 13(10): 513

3 Davey R B, Wallia K A, Boweing K. Adhesive contract madiaan update on graft fixating and burn scar management. Burns, 1991, 17(4): 313

4 Hosoda G, Holloway A G, Heimbach D W. Laser Doppler flowmetry for the early detection of hypertropyic burn scar. J Burn Csre Rehabil, 1986, 7(6): 496

5 Helal B, Chapman R, Sllis M, *et al*. The use of siliconeoil for mobilisation of the hand. J of Bone and Joint surg, 1982, 64(1): 67

6 Sawada Y, Ara M, Yotsuyanagi T. Treament of dermal depth burn wound with an antimicrobial agent-releasing silicone gel sheet. Burns, 1990, 16(5): 347

7 吕 林.硅油在视网膜脱离复位术中的用.国外医学:眼科学分册, 1991, 15(5): 273

(收稿: 1998-03-30;修回: 1998-09-10)

(编辑 张大春)

改进 SDS-Phenol法快速提取细胞总 RNA*

Preparation of cellular total RNA by improved SDS-phenol method

吴丽娟** (第三军医大学附属大坪医院检验科) 重庆, 400042

黎 燕 胡美茹 沈倍奋 (军事医学科学院基础医学研究所分子免疫室) 北京, 100850

提 要 目的:比较改进 SDS-Phenol法与常用的 AGPC法提取细胞之总 RNA优缺点。方法:同时采用两种方法对同批稳定培养的一株淋巴瘤细胞系进行总 RNA提取,以收获 RNA的产量和纯度为比较指标,并用甲醛变性电泳验证 SDS-Phenol法提取 RNA的完整性。结果:改进 SDS-Phenol法可从 1× 10^6细胞中提取(1.93± 0.20)μg的总 RNA,是 AGPC法的两倍以上。细胞数在 1× 10^5~ 100× 10^5范围内时其 RNA产量与细胞数量呈线性相关。5× 10^5以上细胞所提取的 RNA, $A_{260/280}$在 1.78~ 1.83之间,无蛋白质,纯度平均在 90%以上,甲醛变性电泳示 RNA完整无降解。5× 10^6细胞可收获 RNA(55.34± 3.02)μg,变异系数 5.45%。结论:改进 SDS-Phenol法优于 AGPC法,有快速、简便和高效的特点,值得推广应用。

RNA提取技术是分子生物学技术的重要基础,也是现代临床医学科研技术的重要组成部分。临床科研的各种 cDNA文库构建、RNA序列分析、Norhtern印迹及 RT-PCR等均需要一定纯度和完整的 RNA。目前,最常使用的 RNA提取方法当推 1987年 Chomczynski等[1]提出的"硫氰酸胍-酚-氯仿抽提法"(简称"一步法"或 AGPC法),其优点是收获的非降解 RNA产量大、纯度高,不需超速离心或多步酚——氯仿抽提。这里,我们将推荐一种改进十二烷基硫酸钠-酸性酚法(简称改进 SDS-Phenol法),经我们验证该法较 AGPC法更为优越。

1 材料与方法

1.1 细胞系及其培养

人 Burkitt淋巴瘤细胞系 Raji由英国帝国肿瘤基金会惠赠。细胞悬浮在含 10%灭活小牛血清(FCS)的 RPIM-1640培养体系中,37℃ 5% CO_2条件下培养,每 2~ 3天换液传代一次。

1.2 AGPC法提取细胞总 RNA

按文献[1]

1.3 改进 SDS-Phenol法提取细胞总 RNA

参照文献[2]并加以改进。细胞用 PBS或生理盐水洗涤 2次,加入 250μl 10 mmol/L EDTA(pH8.0)/0.5% SDS溶液,

* 本课题受军事医学科学院基础医学研究所分子免疫全军重点实验室资助,并在该室完成

** 吴丽娟,女,32岁,主治医师,硕士

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