

正常人皮肤 I 型 III 型胶原定量测定

王成 张国安 荣艳华

目前已有几种较常用的胶原蛋白测定方法,但仅为定性或半定量分析,结果有失精确,操作较复杂,对实验设备要求较高。笔者将羟脯氨酸法和免疫组织化学法相结合(以下简称结合法)测定正常人皮肤 I、III 型胶原蛋白的含量,并校正相对粗略的盐析法结果,以期建立一种操作简便、精确度高、重复性好的 I、III 型胶原蛋白测定法。

1 对象与方法

1.1 主要试剂及仪器

标准羟脯氨酸(法国 Fluka 公司)、胃蛋白酶(美国 Sigma 公司)。3K30 型离心机(美国 Sigma 公司)、UV2401-PC 型紫外分光光度计(澳大利亚 Shimadzu 公司)、DP70 型显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 检测方法

1.2.1 羟脯氨酸法测定胶原蛋白的总量 取手术剩余皮肤(患者知情同意),将部分皮肤酸解,加入柠檬酸、氯胺 T 氧化,高氯酸终止氧化,对二甲氨基甲醛溶液显色,波长 560 nm 下测定胶原蛋白总量。

1.2.2 I、III 型胶原蛋白的测定 将剩余皮肤分成 15 份,每份又分成 2 小份,分别进行如下检测:(1)免疫组织化学法及结合法:标本处理采用 I、III 型胶原多克隆抗体和链霉亲和素-生物素复合物法试剂盒,用阳性染色面积占测量总面积的百分比表示 I、III 型胶原百分比。以此为基础并根据羟脯氨酸法测定结果,换算出 I、III 型胶原蛋白含量(结合法)。(2)盐析法:将皮肤标本匀浆、胃蛋白酶消化,所得混合物先后用 4.4、2.4、1.7 mol/L 的 NaCl 抽提,上清液即为 I 型

胶原蛋白;沉淀再用 1.0 mol/L 的 NaCl 抽提,上清液为 III 型胶原蛋白。将 2 种上清液用 0.001 mol/L 乙酸透析后,测定其吸光度值,根据校正曲线测出 2 种胶原蛋白的浓度,并换算为含量。

1.3 统计学处理

以结合法结果作为因变量 Y,盐析法结果作为自变量 X,采用回归分析确定盐析法与结合法之间的定量关系,用 SAS 8.2 统计软件进行数据处理。

2 结果

2.1 胶原蛋白测定结果

皮肤胶原蛋白总量为(808 ± 46) mg/g。I、III 型胶原蛋白百分比及含量见图 1、2 及表 1。

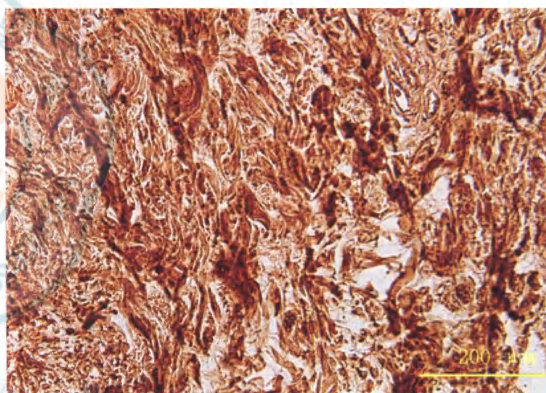


图 1 I 型胶原蛋白着棕黄色、分布较广,胶原束较粗大 链霉亲和素-生物素复合物法 ×200

表 1 3 种方法测定 I、III 型胶原蛋白结果的比较

标本 编号	I 型胶原蛋白			III 型胶原蛋白		
	免疫组织化学法 (%)	结合法 (mg/g)	盐析法 (mg/g)	免疫组织化学法 (%)	结合法 (mg/g)	盐析法 (mg/g)
1	71.99	546.32	6.80	14.65	109.70	3.25
2	81.24	632.98	13.03	16.78	124.25	4.61
3	77.48	562.40	8.70	14.41	117.46	3.70
4	78.30	621.09	10.47	15.17	132.98	6.30
5	69.73	570.16	8.90	15.35	127.32	5.84
6	71.18	575.42	9.50	18.27	120.78	4.30
7	77.30	656.74	13.20	15.60	147.69	6.80
8	68.47	605.17	10.23	19.06	124.09	4.60
9	74.86	607.76	10.30	14.66	154.08	7.33
10	79.28	563.70	8.70	14.94	126.11	5.80
11	76.83	624.89	11.18	16.45	122.63	4.32
12	67.58	626.35	12.40	13.57	116.49	3.62
13	75.18	553.51	7.80	15.75	135.65	6.63
14	70.53	640.90	13.12	14.53	118.43	3.87
15	69.57	581.97	10.14	15.37	118.51	4.06

作者单位:100035 北京,积水潭医院烧伤科

通讯作者:张国安,Email:zhangga777@163.com,电话:010-58516361

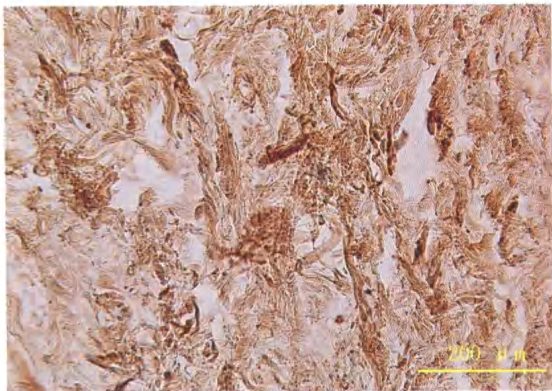


图 2 III型胶原蛋白着浅棕黄色、散在分布,胶原束较细小 链霉素和素-生物素复合物法 $\times 200$

2.2 回归分析

回归分析求得 I 型胶原蛋白含量回归方程为 $Y = 423.40 + 16.95X$ ($r = 0.91, P < 0.01$); III 型胶原蛋白含量回归方程为 $Y = 84.21 + 8.44X$ ($r = 0.87, P < 0.01$)。

3 重复性试验

取另一成人正常皮肤(供者知情同意),分别用盐析法和结合法测定 I、III 型胶原蛋白含量。将盐析法测定结果代入上述回归方程中得出结合法的预测值,与结合法的实测结果进行比较,可见两者差别均较小,每一测定结果的学氏残差的绝对值均 < 2 ,表明方程拟合效果较好,预测精度较高。

4 讨论

胶原蛋白的异常合成与沉积是许多纤维化反应疾病的病理基础, I、III 型胶原蛋白在创面修复和瘢痕形成过程中起关键作用。皮肤胶原蛋白的分析和提取多见报道^[1-3],但均不能进行定量检测。我们用羟脯氨酸法测定皮肤中胶原蛋白的总量,免疫组织化学法测定 I、III 型胶原蛋白的百分比,盐析法粗略测定皮肤 I、III 型胶原蛋白的含量,并将 3 种方法结合起来进行定量分析。羟脯氨酸法和免疫组织化学法精确度比较高,但操作较复杂、耗时,对实验设备要求较高,费用不菲。盐析法操作简单,对实验设备要求相对较低,但结果欠精确。我们把前 2 种方法相结合测定的结果与盐析法结果进行比较,确定相关系数并建立回归方程,用较简单的盐析法就可以推算出 I、III 型胶原蛋白含量。重复性试验显示,此简化方法所测结果与结合法实测结果符合性好,表明此法具有较高的精确性、稳定性及应用价值。

参考文献

- [1] 李玉瑞. 细胞外间质的生物化学及研究方法. 北京:人民卫生出版社,1988:174-192.
- [2] 永井裕,藤本大三郎. 胶原蛋白实验方法. 刘平,译. 2 版. 上海:上海中医学院出版社,1992:1-49.
- [3] Christopher AM, Trevor JS, Nancy PC, et al. The role of the $\alpha 2$ chain in the stabilization of the collagen type I heterotrimer; a study of the type I homotrimer in oim mouse tissue. J Mol Biol, 2002, 321(5):803.

(收稿日期:2006-12-29)

(本文编辑:罗勤)

喷吸组合盘在创面清洗中的应用

王年云 郭光华 史南玫

1 对象与方法

1.1 一般资料

选择笔者单位收治的胸、背部开水烫伤患者男 6 例、女 3 例,年龄 20~55 岁,烫伤总面积 $(24 \pm 16)\%$ TBSA,深 II 度。LH080Y 型氧化电位水生成设备购自江西林河实业有限公司。用无菌等渗盐水与氧化电位水作为清洗液,均选用传统的徒手清洗及喷吸组合盘清洗患者创面。以喷吸组合盘盘口面积 (16 cm^2) 为每次清洗的样本面积。

1.2 自制喷吸组合盘及使用方法

清洗盘采用塑料和硅胶压模组合制成,形似倒置的茶杯。盘口装有一圈硅胶吸引孔和软边,紧贴创面即能把清洗后的污水迅速吸走。打开手柄上的喷吸开关,盘内立即产生负压,选择开关挡数以控制清洗的速度和深度,只需十几秒即可洗净与清洗盘口大小相同的创面。关闭开关,盘内排气孔自动打开,使盘内负压消失,便于快速移动。采用一次性输液器作进水管,选用耐压容器作盛水装置,并可适当对

盛水装置施加 50 kPa 内的正压,加强喷射力。采用内径 4 mm 的耐压塑料管作吸引管路,负压控制在 0.03 MPa 内为宜,可将喷吸盘内的污水迅速吸引到收集瓶中。病房墙壁上的供氧设备和吸引器分别作为正压和负压给予装置连接在组合盘的相应部件上。该组合盘使用前须将所有部件拆开,用甲醛溶液熏蒸 12 h 灭菌。本装置已获国家发明专利(专利号:ZL200510024494.8),见图 1。



图 1 喷吸组合盘外观

作者单位:330006 南昌大学第一附属医院烧伤科