

## · 经验交流 ·

## 介绍一种离体皮肤活力测定法

王方明 童成国

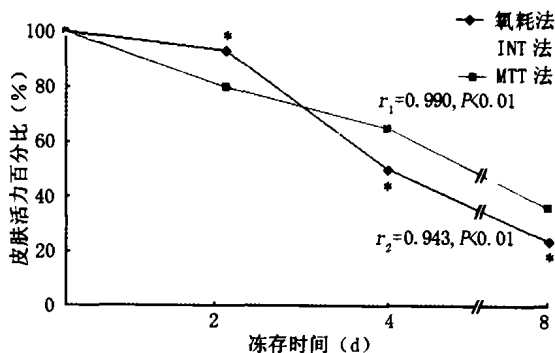
目前测定离体皮肤活力的方法较多,但尚需寻找一种简便、有效的方法。笔者特建立了氯化碘硝基四唑(INT)法。

皮肤来源及处理:本组患者男 6 例、女 4 例,年龄 25~63 岁。经患者同意取其术中剩余的正常皮肤,厚度为 0.2~0.4 mm。用体积分数 20% 二甲基亚砜(DMSO)、Kreb-Ringer 溶液 4℃ 浸泡 30 min,于 -4℃ 冻存。INT 法的反应液用磷酸盐缓冲液配制,含有 1.00 g/L INT(美国 Sigma 公司)、12 g/L Cremophor EL(美国 Sigma 公司)、0.500 mmol/L 乙二胺四乙酸(分析纯,沈阳试剂一厂),pH 7.4。

活力测定:(1)INT 法:设皮肤取后即刻(以下称冻存前)和冻存后 2、4、8 d 共 4 个时相点,每时相点 10 例标本。每例标本用皮肤打孔器取两块直径 6 mm 的圆形皮片,其中一块置等渗盐水中煮沸 10 min,称为对照死皮。将各皮片用万分之一天平称重并记录后,加入 2 ml 反应液,37℃ 恒温水浴 15 min。室温下 300 r/min 匀速振荡 1 h 后,用 721 型紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂)于波长 490 nm 下测量吸光度(A)值,参比溶液不含 INT,其他成分同反应液。随后计算皮肤冻存后 2、4、8 d 的活力百分比:皮肤活力值 = 待测皮片 A 值 ÷ 待测皮片质量(mg) - 对照死皮 A 值 ÷ 对照死皮质量(mg),皮肤活力百分比(%) = 冻存后皮肤活力值 ÷ 冻存前皮肤活力值 × 100%。(2)另采用噻唑蓝(MTT)法<sup>[1]</sup>和氧耗法<sup>[2]</sup>测定上述各冻存时相点的皮肤活力百分比。

统计学处理:采用 SAS 统计软件行方差分析、t 检验,并对 3 种测定法的结果作相关性分析。

结果:用 INT 法测得人体皮肤冻存 2、4、8 d 后活力百分比分别为 74.22%、55.93%、40.52%,此结果与 MTT 法、氧耗法的测定结果均呈正相关,见图 1。



注:与 INT 法比较,\*  $P < 0.01$ ;  $r_1$  为 MTT 法与 INT 法的相关系数,  $r_2$  为氧耗法与 INT 法的相关系数

图 1 3 种方法测定离体皮肤活力百分比

作者单位:444100 当阳,长坂坡医院烧伤科(作者现在解放军第二六三医院烧伤科,110049)

讨论 MTT 法<sup>[1]</sup>、氧耗法<sup>[2]</sup>主要借助活体细胞线粒体内琥珀酸脱氢酶(SDH)的活性来反映皮肤活力。INT 为一种四氮唑化合物,作为电子受体,经线粒体呼吸作用被还原成有色物质,这一变化可以反映活体细胞整个线粒体的呼吸功能,其结果更为客观、准确。该法可应用于肝组织匀浆中 SDH 活力的测定,鲜见用于检测离体皮肤活力。

为寻找最佳实验条件,笔者参考 MTT 法、氧耗法的反应条件,以 SD 大鼠背部皮肤为材料,针对可能影响实验结果的因素进行了大量预实验。例如:在浸出剂的选择上,MTT 法<sup>[1]</sup>采用的是 DMSO,而笔者选用了有机溶剂 Cremophor EL,经预实验得知后者的效果明显优于前者( $P < 0.01$ )。关于使用紫外分光光度计的最大吸收波长,笔者在 450~530 nm 范围内进行筛选,结果表明 490 nm 为最佳条件。为寻找 INT 的最佳反应浓度,笔者在 0.25、0.50、1.00、1.50 g/L 范围内进行了摸索,最终选择 1.00 g/L。EDTA 是一种金属离子配位剂,本方法中笔者特用其来消除重金属对酶催化反应的抑制作用,在 0.250、0.375、0.500、0.625、0.750 mmol/L 5 个预设浓度中,0.500 mmol/L 为 EDTA 的最佳反应浓度。MTT 法<sup>[1]</sup>反应过程与浸出过程分离,操作步骤较多;INT 法将反应与浸出同步进行,耗时短。预实验结果显示,振荡为 1 h 时 A 值升至最大值,故振荡时间(即反应 + 浸出时间)设为此。此外笔者还观察到,在有氧或无氧条件下进行实验,皮肤活力值差异无显著性意义( $P > 0.05$ ),因此为简化步骤选择在有氧条件下操作。本实验中 INT 法与氧耗法相比较,皮肤活力百分比差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ ),其原因可能为 INT 法不受有氧或无氧条件的影响,而氧耗法<sup>[2]</sup>仅测定 SDH 含量且需要在无氧条件下进行。3 种方法测量时皮片直径均为 6 mm,厚度为 0.2~0.4 mm,其活力值在校正质量影响后与皮片大小无关;在皮片大小一样的情况下,皮片越厚其活力值越低。

INT 法与 MTT 法的原理及条件相近,本实验结果显示,此两种方法所测得的皮肤活力百分比差异无显著性意义( $P > 0.05$ );且 INT 法测定结果与其他两法呈正相关,说明用 INT 法较为准确可靠。综上所述,INT 法与传统方法比较操作方便、耗时短、无需隔绝空气、用普通的实验室设备即可进行,不失为一种检测皮肤活力的有效方法。

## 参 考 文 献

- 1 谢卫国,王德运,赵超丽,等.用于离体皮肤活力测定的一种新方法.中华医学杂志,1998,22:190-192.
- 2 吴志谷,朱兆明,孙同柱,等.离体皮肤氧耗测定的实验研究.中华整形烧伤外科杂志,1993,9:138.

(收稿日期:2003-05-01)

(本文编辑:罗勤 莫愚)