生率增加。

总之，在大当量装药的武器发生爆炸时，由于致伤因素多，伤情复杂，伤死率高。由于冲击伤伤情隐蔽，多表现为外轻内重且并发症多[7]，发展迅速，在救治过程中应引起高度重视。能够存活的伤员应该及时开展全面救治，从而减轻伤后伤员的伤死率和并发症的发生。

参考文献：

[1] 杨志焕，黄建钊，王正国，等. 冲击伤复合高速破片致伤损伤特点和冲击伤防护研究[J]. 爆炸与冲击，1998，18(2)：162－166.

[2] 安 波，李兵仓，赖西南，等. 某型榴弹静爆对生物杀伤效应的实验研究[J]. 创伤外科杂志，1999，1(3)：161－163.

[3] 李兵仓，杨志焕，王正国. 爆炸性武器在现代战争中的应用及其致伤机制[J]. 解放军医学情报，1996，10(5)：251－253.

[4] 刘荫秋，王正国，马玉媛. 创伤弹道学[M]. 北京：人民军医出版社，1991. 128－165.

[5] Ho A M. A simple conceptual model of primary pulmonary blast injury[J]. Med Hypotheses, 2002, 59(5): 611－613.

[6] Cohen J T, Ziv G, Bloom J, *et al*. Blast injury of the ear in a confined space explosion: auditory and vestibular evaluation[J]. Isr Med Assoc J, 2002, 4(7): 559－562.

[7] Guy R J, Glover M A, Cripps N P, *et al*. Primary blast injury: pathophysiology and implications for treatment. Part Ⅲ: Injury to the central nervous system and the limbs[J]. J R Nav Med Serv, 2000, 86(1): 27－31.

（编辑 刘洪城）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)01-0004-01

罗丹明123和碘化丙锭测定线粒体跨膜电位反应条件优化的研究

Study of optimized reaction condition for detection of mitochondrial transmembrane staining with rhodamine 123 and propidium iodide

毛咏秋[1]，孟文彤[2]，刘志刚[2]（四川大学华西医院：[1]人类疾病生物治疗教育部重点实验室，[2]血液科，成都 610041）

在正常情况下，质子可自由通过线粒体通透性转运孔（mitochondrial permeability transition pore, MPTP），形成线粒体跨膜电位（mitochondrial transmembrane potential, $\Delta\Psi m$）。在一些因素作用下，MPTP异常开放，$\Delta\Psi m$下降或丧失，因此检测$\Delta\Psi m$是观察线粒体变化的敏感指标[1]。罗丹明123（rhodamine123, Rh123，碱性蕊香红）和碘化丙啶（propidium iodide, PI）双染色是检测$\Delta\Psi m$的方法之一[2]，目前尚少见两种染料组合染色的最佳浓度报道。本研究采用不同浓度PI和Rh123组合染色检测阿糖胞苷（Ara-c）和三氧化二砷（As_2O_3）分别作用NB4和HL60细胞后的$\Delta\Psi m$，寻找双染色测定$\Delta\Psi m$的最佳方案。

1 材料与方法

1.1 实验材料

NB4细胞：急性早幼粒细胞白血病细胞株；HL60细胞：急性粒细胞白血病细胞株；As_2O_3：哈尔滨伊达药业；Ara-c：上海华联制药有限公司。

1.2 药物对细胞的作用

取对数生长期NB4和HL60细胞，以2×10^5/ml浓度，分别接种于含1.0 μmol/L As_2O_3和10 μmol/L Ara-c的培养基[3,4]，用未加药物的培养液为阴性对照。培养于含10% 小牛血清的1640培养液中，置于5% CO_2，饱和湿度，37 ℃孵箱中培养。

1.3 细胞$\Delta\Psi m$检测[3]

按交叉试验设计原理对检测反应的条件进行优化。取未经处理的两种细胞、As_2O_3处理72 h的NB4细胞和Ara-c作用6 h的HL60细胞，PBS洗涤2次，再将这些细胞按照Rh123和PI不同的浓度组合分别分成A～H组，见表1。先用Rh123在37 ℃染色30 min，PBS洗涤2次，PI染色5 min，PBS洗涤1次后，流式细胞仪检测。

表1 $\Delta\Psi m$检测反应条件的交叉试验结果

染料	A	B	C	D	E	F	G	H
Rh123 (ρ_B/μg·ml^{-1})	5.0	5.0	2.5	2.5	1.25	1.25	0.625	0.625
PI (ρ_B/μg·ml^{-1})	4.0	2.0	4.0	2.0	4.0	2.0	4.0	2.0

1.4 统计学方法

采用χ^2检验。

2 结果

按照交叉试验设计，用Rh123和PI对细胞进行$\Delta\Psi m$检测。分析时细胞可分为3群：$\Delta\Psi m$正常（$Rh123^+$）和胞膜完整（PI^-）的$Rh123^+$ PI^-的细胞；$\Delta\Psi m$消失（$Rh123^-$）和胞膜完整的$Rh123^-$ PI^-的细胞；$\Delta\Psi m$消失和胞膜破损（PI^+）的$Rh123^-$ PI^+的细胞，结果见表2。未经药物处理和经药物处理后的HL60和NB4细胞的A～F组中的各组之间$Rh123^+$ PI^-细胞百分比差异不显著（$P>0.05$）；G和H组分别与A～F组中的各组有差异（$P<0.05$）；但G和H组之间差异不显著（$P>0.05$）。这些均提示染未经处理和经药物处理的细胞取1.25 μg/ml Rh123和2.0 μg/ml PI为测定$\Delta\Psi m$的最佳组合。

（下转8页）

作者简介：毛咏秋（1955－），女，重庆市人，主管技师，主要从事血液科方面的研究。电话：(028)85423175

收稿日期：2004-07-08；修回日期：2004-10-18

结果表明，布放在驾驶员位的动物的全身和眼部伤情均最重，可能与弹着点为驾驶员正前方（坦左前方）的钢板有关。

3.3 临床意义

眼部伤情复杂、严重，全身复合伤多，提示在抢救中应兼顾全身，突出重点。眼部伤情是冲击波、有害气体和破片等多种致伤因素综合作用的结果。因此，建议对作战密闭舱室内的乘员采取相应的防护措施，如佩带护目镜、护耳器具及防爆背心等，并提高通风设备的效率，使有害气体尽快消减。另外，舱室内设施应采用阻燃低毒的环保材料。

闭合性眼外伤有外轻内重、葡萄膜和视网膜血管反应明显的特点。故，应重视对眼后节的检查，并及时应用糖皮质激素以减轻血管反应，改善微循环。

参考文献：

[1] 李兵仓. 对坦克内乘员的受伤特点和早期救治进行研究的意义途径[J]. 解放军医学杂志, 2003, 28(1): 1-3.

[2] Muramatsu T, Weber A, Muramatsu S, *et al*. An experimental study on irritation and annoyance due to passive smoking[J]. Int Arch Occup Environ Health, 1983, 51(4): 305-317.

[3] Schwartzman M L, Balazy M, Masferrer J, *et al*. 12(R)-hydroxyicosatetraenoic acid: a cytochrome-P450-dependent arachidonate metabolite that inhibits Na^+, K^+-ATPase in the cornea[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, 84(22): 8125-8129.

[4] Luksch A, Polska E, Imhof A, *et al*. Role of NO in choroidal blood flow regulation during isometric exercise in healthy humans[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(2): 734-739.

[5] Schmetterer L, Polak K. Role of nitric oxide in the control of ocular blood flow[J]. Prog Retin Eye Res, 2001, 20(6): 823-847.

[6] Chiou G C. Review: effects of nitric oxide on eye diseases and their treatment[J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2001, 17(2): 189-190.

[7] Das M, Bhargava S K, Kumar A, *et al*. An investigation of environmental impact on health of workers at retail petrol pumps[J]. Ann Occup Hyg, 1991, 35(3): 347-352.

[8] Higgins B G, Francis H C, Yates C J. Effects of air pollution on symptoms and peak expiratory flow measurements in subjects with obstructive airways disease[J]. Thorax, 1995, 50(2): 149-155.

[9] 刘 江, 孙忠良, 梁之安, 等. 常规兵器发射或爆炸时脉冲噪声和冲击波对人员听觉损伤的安全限值(GJB2A-91)[M]. 北京: 国防科工委军标出版发行部, 1996. 2-4.

[10] 姚德胜, 杨志焕, 刘正邦, 等. 炮口冲击波对人员非听觉器官损伤的安全限值(GJB1158-91)[M]. 北京: 国防科工委军标出版发行部, 1992. 2-3.

[11] 刘 江, 李兵仓, 谷春广, 等. 大口径反坦克武器侵彻坦克后绵羊的致伤特点[J]. 解放军医学杂志, 2003, 28(1): 7-8.

[12] 刘 江, 李兵仓, 谷春广, 等. 中口径穿甲爆破燃烧弹对坦克内绵羊致伤的试验研究[J]. 解放军医学杂志, 2003, 28(1): 9-10.

[13] 刘 江, 李兵仓, 谷春广, 等. 小口径穿甲武器致伤坦克内绵羊致伤的现场试验[J]. 解放军医学杂志, 2003, 28(1): 11-12.

（编辑 薛国文）

（上接4页）

表2 交叉试验的结果（%，$\bar{x} \pm s$）

组别	n	$Rh123^+ PI^-$ 细胞的百分比			
		NB4 细胞	HL60 细胞	用 As_2O_3 处理的 NB4 细胞	用 Ara-c 处理的 HL60 细胞
A	3	97.2±2.6	97.5±1.8	34.7±3.5	48.7±5.5
B	3	96.8±2.5	97.0±2.5	35.9±3.8	45.9±5.8
C	3	94.8±2.3	95.3±3.5	32.5±3.8	42.5±4.8
D	3	94.4±2.5	95.9±4.4	33.7±3.4	43.7±4.4
E	3	92.6±3.5	93.8±5.5	36.9±2.6	46.9±4.6
F	3	92.5±3.5	93.9±4.5	35.4±2.5	45.4±3.5
G	3	72.7±9.1*	51.7±8.7**	28.9±3.3*	24.9±4.3**
H	3	71.7±9.9*	51.9±8.8**	25.6±4.4*	28.6±4.8**

与 A 组比较，*：$P<0.05$，**：$P<0.01$

3 讨论

使用 Rh123 和 PI 双染色测定 $\Delta\Psi m$，多使用的浓度为 10.0 μg/ml[3]，但有 $\Delta\Psi m$ 正常和胞膜破损的细胞存在，这是异常分布，因为 PI 阳性显示细胞膜已破裂，而未加线粒体保护剂，$\Delta\Psi m$ 不可能正常。同时 Rh123 染料对线粒体有极高的亲和力，2.5 μg/ml Rh123 染色细胞也可获得较高的荧光强度[2]。因此认为是两种染料浓度较高，不能除去染料的残留所致。

而使用 10.0 μg/ml Rh123 和 10.0 μg/ml PI 时，在两次染色时均增加了洗涤各两次，虽可取得较好的效果，但试验的结果仍不稳定；由于洗涤次数增加损失细胞过多，给工作造成诸多不便。有报道 As_2O_3 和 Ara-c 处理后的 NB4 和 HL60 细胞 $\Delta\Psi m$ 消失[3,4]。我们采用了不同浓度的 Rh123 和 PI 交叉优化方案，洗涤的次数不增加，甚至 PI 染色后，只洗涤 1 次，即上机检测。检测的结果显示经或未经药物处理的细胞，Rh123 和 PI 双染色检测 $\Delta\Psi m$ 的浓度分别为 1.25 和 2.0 μg/ml 时，检测获得的 $Rh123^+ PI^-$ 细胞百分率与其相应较高的浓度组合相比无差异，但都比其相应较低的浓度组合相比则有增加，同时结果与文献[3,4]报道的使用高浓度 Rh123 和 PI 染色结果一致。证实 Rh123 和 PI 分别为 1.25 和 2.0 μg/ml 双染色检测 $\Delta\Psi m$ 为最佳浓度组合。同时可以减少洗涤次数，增加试验结果的稳定性和重复性。

关键词：线粒体跨膜电位；罗丹明 123；碘化丙啶

中图法分类号：R329-33 **文献标识码**：B

参考文献：

[1] Halestrap A P, Doran E, Gillespie J P, *et al*. Mitochondria and cell death [J]. Biochem Soc Trans, 2000, 28(2): 170-177.

[2] Salvioli S, Ardizzoni A, Franceschi C, *et al*. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis[J]. FEBS Lett, 1997, 411(1): 77-82.

[3] 沈玉雷, 陈国强, 蔡 循, 等. 谷胱甘肽合成酶抑制剂加强三氧化二砷的凋亡诱导效应[J]. 中华肿瘤杂志, 1999, 21(4): 259-261.

[4] Takemura H, Urasaki Y, Yoshida A, *et al*. Simultaneous treatment with 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and daunorubicin induces cross-resistance to both drugs due to a combination-specific mechanism in HL60 cells[J]. Cancer Res, 2001, 61(1): 172-177.

（编辑 陈聪连）