DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.052

降,究其原因,吸入伤后支气管肺泡灌洗液中溶血性卵磷脂(DPPC)的相对含量下降,伤后24 h仅占总磷脂的50%,肺组织中的DPPC的绝对与相对含量均增高。表明吸入伤后具表面活性的磷脂组分减少,而表面张力活性弱的组分增多[8]。应用5%的乳化猪源性PS(肺舒通,本所研制生产),10 ml气道内注入每2 h 1次,每次应用前用20 ml左右的等渗盐水作气管内灌洗并吸净气道内分泌物。能明显改善低氧血症、肺的通气血流失调,促使PaO_2/FiO_2、RI和$P(A-a)O_2$向好的方向转化;提高肺的顺应性。是一种有前景的治疗方式[9]。通过以上措施的应用,可以看出吸入性损伤的病死率下降是不同程度吸入性损伤死亡率下降,是治疗作用的效果体现,由于吸入性损伤的构成比不同,轻、中度吸入性损伤病死率的下降是吸入性损伤病死率下降的主要因素;以上措施的应用在第2、3阶段的重度吸入性损伤病死率降低中有一定作用,但第2、3阶段的重度吸入性损伤病死率却无明显差别,表明这些措施对重度吸入性损伤的治疗作用效果有限,一方面需要开发更新治疗措施,另一方面需要从临床总结经验,调整这些措施的适应征,才能使重度吸入性损伤的治疗,跃上一个新的台阶。

这些措施对重度吸入性损伤的治疗作用效果有限,需要开发更新治疗措施和从临床总结经验调整已有措施的适应症,才能进一步提高重度吸入性损伤的治愈率。

参考文献:

[1] 黎 鳌,李照洲,雷政宏.48 978例烧伤病人分析[J].解放军医学杂志,1984,9(6):401.

[2] 黎 鳌,杨宗城,李刚荣.48 085例烧伤病人分析[J].解放军医学杂志,1999,24(4):251.

[3] 赵琢道,黎 鳌,杨宗城.抗脂质过氧化综合治疗烟雾吸入伤的实验研究[J].中华整形烧伤外科杂志,1990,6(4):294.

[4] 黎 鳌,杨宗城.吸入性损伤[M].北京:人民军医出版社,1993.292—294.

[5] 杨宗城.吸入性损伤研究进展[J].中华烧伤杂志,2000,16(3),137—140.

[6] Stothert J C Jr, Traber L, Traber D. Does positive end-expiratory pressure significantly reduce airway blood flow[J]? J Trauma, 1993, 35(3): 437—440.

[7] Nieman G F, Cigada M, Paskanik A M, *et al*. Comparison of high-frequency jet to conventional mechanical ventilation in the treatment of severe smoke inhalation injury[J]. Burns, 1994, 20(2): 157—629.

[8] 谢尔凡,杨宗城,黎 鳌.肺灌洗及外源性肺表面活性物质替代治疗减轻烟雾吸入所致肺组织细胞损害[J].解放军医学杂志,1997,22(1):26—29.

[9] 罗奇志,刘志远,杨宗城,等.肺表面活性物质气道内灌注治疗重度吸入性损伤[J].中华烧伤杂志,2000,16(3):145.

(编辑 陈聪连)

经验与短篇

文章编号:1000-5404(2001)03-0360-01

MTT法在测定细胞放射敏感性中的运用

Application of MTT colorimetric assay for measuring radiosensitivity of cells *in vitro*

阮志华,杨和平,曾 勇,庞学利 (第三军医大学附属西南医院肿瘤科,重庆 400038)

本研究用MTT法和细胞克隆计数法检测了人肺腺癌细胞株A549在不同剂量X射线照射后的存活分数,发现在一定照射剂量内两种方法相关性较好。

1 材料和方法

细胞培养:人肺腺癌细胞株A 549由附属新桥医院全军呼吸内科研究所提供。培养在含有10%小牛血清,青-链毒素(各100 U/ml)的RPMI-1640培养液中。

X线照射:在室温下,Varian 2300直线加速器6 MV-X线照射,加3 cm标准等效填充物,平均剂量率2 Gy/min。

细胞存活分数测定:将处于对数生长期的细胞分为4组,分别照射0、2、6、10 Gy后,立即制成单细胞悬液,然后分别运用MTT法和细胞克隆计数法测定细胞存活分数。

MTT法检测:将细胞制成单细胞悬液后,调节细胞浓度至4×10^4/ml,按每孔200 μl接种96孔板,每组设4个复孔,培养5 d(第3天换培养液1次),每孔加入5 mg/ml MTT 20 μl,37 ℃条件下继续孵育4 h,终止培养。小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入150 μl二甲基亚砜(DMSO),振荡10 min,使结晶物充分溶解,选择540 nm波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值(A_{540}),求出细胞存活分数(SF)。重复3次。

SF=实验组吸光值平均值/对照组吸光值平均值×100%

克隆计数法检测:按文献[1]进行。

统计学处理:t检验。

2 结果

MTT法和克隆计数法所测定的细胞存活分数,见表1,在照射剂量低于6 Gy时,两种方法所测结果无显著性差别,在照射剂量高于10 Gy时,MTT法所测值高于克隆形成法。

表1 A549细胞在X射线照射后的存活分数(%,$\bar{x}\pm s$)

	2 Gy	6 Gy	10 Gy
MTT法	63±8.7	20.8±2.5	11.5±2.7
克隆法	67±7.3	21.3±3.1	6.1±2.3*

*:$P<0.01$与MTT法比较

作者简介:阮志华(1971—),男,湖北省枝江市人,硕士,医师,主要从事肿瘤学方面的研究。电话:(023)65318301-73133

收稿日期:2000-01-15;修回日期:2000-10-12

(下转363页)

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

组比Ⅰ组血浆 ET-1 在术前、转流前、术后 1 d 和术后 3 d 显著性增高, CPB 30 min 和停 CPB 期间非常显著性增高, 血浆 TM 已提示Ⅱ组病人 CPB 所致的 VEC 损伤的程度比Ⅰ组大, Ⅱ组血浆 ET-1 一直高于Ⅰ组也反映了这一点。在心血管 CPB 手术中, 伴随着 CPB 的启动, 许多与 CPB 相关的因素如非搏动血流、缺血-再灌注、血凝血酶和内毒素水平增高以及炎症递质的大量表达, 均可导致全身 VEC 急性损伤/活化, 从而上调 VEC 的 ET-1 基因的表达, 使血浆 ET-1 水平增高[6]。EC 表达内皮细胞型 NO 合酶(eNOS), 其合成和释放的 NO 通过激活血管平滑肌细胞 GTP 转变为 cGMP, 发挥强有力的松弛血管效应。VEC 损伤/活化可下调 eNOS 的基因表达, 使 NO 合成减少[1]; 而 CPB 所致的炎症递质和内毒素可引起可诱导型 NO 合酶(iNOS)表达, 使 NO 的释放增加[7]。本实验结果显示: 两组病人 CPB 围术期血浆 NO 水平无明显变化。而Ⅱ组血浆 NO 除转流前和术后 1 d 比Ⅰ组显著性增高($P<0.05$)外, 其余时相点相比无显著性差异。其原因可能与 eNOS 表达下调和 iNOS 的激活程度不平衡相关。动物实验显示: 心肌缺血-再灌注对 VEC 的损伤, 减少 NO 的合成和释放, 并且增加 ET-1 合成和释放, 导致冠状血管的内皮细胞依赖舒缩功能之 ET-1/NO 平衡失调[8], 在再灌注过程中, 用 L-Arg 或 NO 供体能有效地减轻与缺血-再灌注相关的内皮细胞和心肌细胞损伤[9]。Beghetti[10]报道 CPB 导致病人呼出气体中 NO 水平下降, 这可能是继发于肺 VEC 损伤/活化导致 NO 合成下降所致。在心血管 CPB 手术中, 阻断升主动脉将不可避免出现心肌缺血-再灌注损伤, 推测在复跳后早期可能存在 EC 损伤所致的 NO 合成和分泌下降的情况。本实验在复跳后早期时相点也未见血浆 NO 水平下降。这可能表明血浆NO 水平可能不能准确反映心、肺器官NO 水平的变化。两组病人 CPB 围术期血浆 ET-1 和 NO 的变化趋势一致, 均表现为血浆 ET-1 增加而 NO 无明显变化, 这提示 CPB 可致 ET-1/NO 平衡失调。内皮细胞依赖舒缩血管物质和扩血管物质的比例失调可能是导致 CPB 术后早期急性血管痉挛的重要原因[6], 尤其在心脏可引起术后心肌细胞缺血, 导致心功能不全; 在肺可引起肺血管阻力增高, 导致肺动脉高压, 从而增加并发症和死亡率。因此, 在心血管 CPB 手术中, 采取保护内皮细胞的治疗措施具有重要的意义。

参考文献:

[1] Boyle E M Jr, Verrier E D, Spiess B D. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the procoagulant response[J]. Ann Thorac Surg, 1996, 62(5): 1 549—1 557.

[2] Boyle E M Jr, Pohlman T H, Johnon M C, *et al*. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the systemic inflmmatory response[J]. Ann Thorac Surg, 1997, 63(1): 277—284.

[3] Ishii H, Uchiyama H, Kazama M. Soluble Thrombomodulin antigen in conditioned medium is increased by damage of endothelial cells[J]. Thrombo Haemost, 1991, 65(6): 618—623.

[4] Takahashi H, Ito S, Hanano M, *et al*. Circulating thrombomodulin as a novel endothelial cell marker: comparison of its behavior with von Willebrand factor and tissue-type plasminogen activator[J]. Am J Hematol, 1992, 41(1): 32—39.

[5] Cicala C, Cirino G. Lingkage beyween inflammation and coagulation: an update on the molecular basis of the crosstalk[J]. Life Sciences, 1998, 62(20): 1 817—1 824.

[6] Sellke F W, Boyle E M Js, Verrier E D. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the pathophysiology of vasomotor dysfunction[J]. Ann Thorac Surg, 1996, 62(4): 1 222—1 228.

[7] Jansen N J, Van Oeveren W, Gu Y J, *et al*. Endotoxin release and tumor necrosis factor formation during cardopulmanary bypass[J]. Ann Thorac Surg, 1992, 54(4): 744—748.

[8] Argano V, Galinanes M, Edmondson S, *et al*. Effects of cardioplegia on vascular function and the "no reflow" phenomenon after ischemia and reperfusion: studies in the isolated blood perfused rat heart[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1996, 111(2): 432—442.

[9] Zhar U, Schwalb H, Borman J B, *et al*. Cardioprotective effect of L-arginine in myocardial ischemia and reperfusion in an isolated working rat heart model[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1998, 39(3): 321—329.

[10] Beghetti M, Silkoff P E, Caramori M, *et al*. Decreased exhaled nitric oxide may be a marker of cardiopulmonary bypass-induced injury[J]. Ann Thorac Surg, 1998, 66(2): 532—534.

(编辑　冯崇英)

(上接 360 页)

3　讨论

MTT 为线粒体脱氢酶的作用底物, 活细胞能将其还原为不溶于水的结晶体 formazon, 此结晶体在被 DMSO 溶解后呈紫色, 在 540 nm 处有最大吸收峰, 通过 A_{540} 可以定量反应出存活细胞数[2]。本实验显示在 X 射线照射剂量低于 6 Gy 时, MTT 法和克隆计数法所测细胞存活分数无显著性差别, 说明二者在一定范围内可以相互替代; 在 10 Gy 时 MTT 法所测结果偏高, 可能与 MTT 法的敏感程度有关。本实验结果提示, 当受试组吸光值极低时($A_{540}<0.15$), 不易准确测出更低的吸光值, 从而表现出较大误差(结果未示)。由于 2 Gy 照射时的细胞存在分数通常代表细胞的内在放射敏感性[3], 我们认为, MTT 法可用于细胞放射敏感性检测, 而且具有方便、迅速、重复性好等优点, 此外, 我们按文献[1]所推荐方法, 先在 96 孔板中培养数天后进行 X 线照射, 然后再继续培养 5 d 后进 MTT 检测, 不如本实验步骤所得结果准确。

关键词: 放射敏感性; MTT 法; 克隆计数法
中图法分类号: R446; R814.2　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司西安分公司, 1996. 148—149.

[2] 王仁生, 解荷芝, 金一尊. 用 MTT 法研究两种放射增敏剂对细胞的毒性作用[J]. 上海医科大学学报, 1997, 24(2): 135—136.

[3] Lambin P, Malaise E P, Joiner M C. Might intrinsic radioresistance of human tumor cells be induced by radiation[J]? Int J Radiat Biol, 1996, 69(3): 279—290.

(编辑　陈聪连)

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