

Fas 和 FasL 在 Na⁺/H⁺ 交换器-1 抑制诱导缺氧大鼠肺动脉平滑肌细胞凋亡中的作用

陆俊羽 姚伟 钱桂生 吴国明 陈维中 李淑平

【摘要】目的 探讨 Fas、FasL 在 Na⁺/H⁺ 交换器-1(NHE-1)抑制所诱导的缺氧大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)凋亡中的作用。**方法** 将转染 NHE-1 特异性核酶基因的大鼠 PASMCs 置于缺氧条件下(O₂ 的体积分数低于 1%)培养。缺氧培养 2、6、12、24 和 48 h 后用原位末端标记法(TUNEL)检测细胞凋亡情况;半定量逆转录-聚合酶链反应(sqRT-PCR)方法检测细胞内 fas 和 fasL mRNA 表达变化;免疫细胞化学法检测细胞内 Fas 和 FasL 蛋白表达变化。**结果** 转染 NHE-1 特异性核酶基因的大鼠 PASMCs 在缺氧培养时,其细胞凋亡率随缺氧时间的延长而逐渐升高,但细胞内 fas、fasL mRNA 及 Fas、FasL 蛋白表达与对照组细胞比较差异均无显著性。**结论** Fas/FasL 死亡通路可能不参与 NHE-1 抑制而诱导缺氧大鼠 PASMCs 凋亡的调控。

【关键词】 Na⁺/H⁺ 交换器-1; Fas/FasL; 细胞凋亡; 基因表达; 蛋白表达; 平滑肌; 血管

Role of Fas and FasL expression in apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells in hypoxia induced by inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger isoform - 1 in rat LU Jun - yu, YAO Wei, QIAN Gui - sheng, WU Guo - ming, CHEN Wei - zhong, LI Shu - ping. Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China (LU Jun - yu works in Department of Respiratory Disease, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China)

【Abstract】Objective To investigate the role of Fas and FasL expression in apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) in hypoxia induced by inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger isoform - 1 (NHE - 1) in rat. **Methods** The cells were cultured in hypoxia (<1% O₂) for 2, 6, 12, 24 and 48 hours respectively. Then cell apoptosis was observed with terminal deoxynucleotidyl transferase - mediated dUTP - biotin nick end labeling (TUNEL). The changes in fas and fasL mRNA expression in PASMCs were detected by semi - quantitative reverse transcription - polymerase chain reaction (sqRT - PCR) in vitro. The expression of Fas and FasL protein in cells was determined immunohistochemically. **Results** No significant changes in the expression of fas/fasL mRNA and protein between cells transfected with NHE - 1 ribozyme gene and cells transfected with pLXSN, or nontransfected control in hypoxia. **Conclusion** Apoptosis of PASMCs induced by NHE - 1 inhibition may occur independently of Fas/FasL death pathway.

【Key words】 Na⁺/H⁺ exchanger isoform - 1; Fas/FasL; cell apoptosis; gene expression; protein expression; smooth muscle; vascular

研究表明,肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)增殖在低氧肺动脉高压肺血管结构重建中起重要作用。PASMCs的 Na⁺/H⁺ 交换器-1(Na⁺/H⁺ exchanger isoform - 1, NHE - 1)活化所致细胞内碱化在 PASMCs 增殖中起“容许性”作用^[1]。我们在前期实验中,通过构建 NHE - 1 特异性核酶基因逆转录病毒载体,转染入体外培养大鼠 PASMCs 内,发现 NHE - 1 抑制可诱导细胞内酸化而抑制 PASMCs

增殖,并促进其凋亡^[2]。本研究拟观察 NHE - 1 抑制后 Fas、FasL 表达变化,探讨 Fas/FasL 死亡通路是否参与 NHE - 1 抑制从而诱导 PASMCs 凋亡调控。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂:转染表达 NHE - 1 特异性核酶基因的体外培养大鼠 PASMCs(PRZ 细胞);转染逆转录病毒真核表达载体(pLXSN)空载体的大鼠 PASMCs(PX 细胞);正常大鼠 PASMCs(PA 细胞)为我们前期实验制备,并经实验证实能转染表达 NHE - 1 特异性核酶并有效抑制大鼠 PASMCs 内 NHE - 1 表达^[2]。莫洛尼鼠白血病病毒(MMLV)逆转录酶购自美国 Promega 公司, Tripure、原位凋亡试剂盒购自 Roche 公司, Tag 酶购自上海生工生物公司, Fas、FasL 抗体及链霉亲和素过氧化物酶复合

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870352)

作者单位:400037 重庆,第三军医大学附属新桥医院全军呼吸研究所(陆俊羽现在华中科技大学同济医学院附属同济医院呼吸疾病研究室进行博士后工作)

作者简介:陆俊羽(1972 -),女(汉族),云南省人,讲师,医学博士,主治医师,主要从事缺氧肺动脉高压方面的研究,已发表论文 10 篇(E-mail: lujunyu1026@yahoo.com.cn)。

物(SABC)试剂盒购自武汉博士德公司。

1.2 细胞的缺氧培养:细胞接种于 24 孔培养板内的玻片上,长成单层后换含体积分数为 0.4% 小牛血清的 Dulbecco 改良 Eagle 培养液(DMEM)培养基,使其处于静止状态后,在缺氧细胞培养箱进行缺氧培养(体积分数为 5% 的 CO₂ 和体积分数为 95% 的 N₂)。分别在缺氧 2、6、12、24 和 48 h 时取出细胞进行各指标检测。未缺氧细胞为对照组。

1.3 原位细胞凋亡检测:按原位凋亡试剂盒说明书操作,结果在光镜(×400)下观察,至少观察 5 个视野,计数 200 个以上细胞,计算阳性细胞百分率。

1.4 半定量逆转录-聚合酶链反应(sqRT-PCR)法检测 fas、fasL mRNA 的表达:取对数生长期的单层细胞,用 Tripure 提取细胞总 RNA 后进行逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR),以 β-肌动蛋白(β-actin)为内参照。fas 引物:上游:5'-ACG AAC CAG CAA CAC CAA AT-3';下游:5'-AGC GGA AGA CTG AGG AAA TG-3';产物长度为 504 bp。fasL 引物:上游:5'-TCT TAC CGT TGC TGA CCA TT-3';下游:5'-ATC CTT TCT CAC CCT TGT AT-3';产物长度为 739 bp。内参照 β-actin 引物:上游:5'-CC AAG GCC AAC CGC GAG AAG ATG AC-3';下游:5'-AG GGT ACA TGG TGG TGC CGC CAG AC-3';产物长度为 587 bp。PCR 反应条件:94℃ 变性 40 s,58℃ 退火 50 s,72℃ 延伸 90 s,共重复 30 个循环,末次循环后延伸 10 min。将产物进行电泳,紫外灯下观察并照相。扫描照片,测定各条带积分吸光度值(integral optical density, A, 以灰度表示)。以 fas 或 fasL 和

β-actin 产物条带 A 值比(A_{fas}/A_{β-actin} 或 A_{fasL}/A_{β-actin})反映 fas mRNA 和 fasL mRNA 的表达程度。

1.5 Fas、FasL 的免疫细胞化学染色:细胞接种于 24 孔培养板内的玻片上,生长成单层后,按 SABC 试剂盒说明书进行 Fas、FasL 蛋白免疫细胞化学染色,3,3'-二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色。胞浆中或核膜棕黄色颗粒为阳性,不加一抗为阴性对照。用 Tiger 图像分析系统分析,随机取 5 个视野,以其平均 A 值作为 Fas 和 FasL 的相对含量。

1.6 统计学处理:用 SPSS11.5 软件进行数据处理。所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并进行 FLSD 显著性检验,组间差异用 q 检验进行统计学分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原位细胞凋亡率(表 1):缺氧条件下,PA 组和 PX 组细胞凋亡率在各时间点间差异无显著性(P 均 > 0.05),PRZ 组细胞凋亡率在缺氧 6 h 时开始升高,并随缺氧时间延长而逐渐升高。

2.2 PASMCS 中 fas mRNA 表达(表 2):PCR 产物电泳结果经图像分析显示,fas 的 PCR 产物条带 A_{fas}/A_{β-actin} 在同时间点各组细胞间以及同组细胞各时间点间差异均无显著性(P 均 > 0.05)。

2.3 PASMCS 中 fasL mRNA 表达(表 3):PCR 产物电泳结果经图像分析显示,fasL 的 PCR 产物条带 A_{fasL}/A_{β-actin} 除在未缺氧和缺氧 24 h 时显著高于同时间点 PA 组细胞外(P 均 < 0.05),其余同时间点各组细胞间以及同组细胞各时间点间差异均无显著性(P 均 > 0.05)。

2.4 NHE-1 抑制后 PASMCS 中 Fas 蛋白表达

表 1 NHE-1 核酶基因转染对缺氧 PASMCS 原位细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Changes of apoptosis rates of cells transfected with NHE-1 ribozyme gene in hypoxia($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	细胞凋亡率(%)					
	未缺氧	缺氧 2 h	缺氧 6 h	缺氧 12 h	缺氧 24 h	缺氧 48 h
PA 组	5.29 ± 0.88	4.87 ± 0.87	5.28 ± 0.91	5.54 ± 0.84	6.12 ± 1.06	6.50 ± 0.63
PX 组	6.05 ± 1.12	4.89 ± 0.92	5.15 ± 0.71	5.39 ± 0.63	5.86 ± 0.72	6.51 ± 0.65
PRZ 组	32.06 ± 3.06 [*]	32.26 ± 2.99 [*]	41.61 ± 5.56 ^{*#}	53.21 ± 5.27 ^{*#}	55.49 ± 5.33 ^{*#}	66.04 ± 5.34 ^{*#}

注:与同时时间点 PA 组比较: * P < 0.01; # 与同组未缺氧时比较; # P < 0.01

表 2 NHE-1 核酶基因转染对缺氧 PASMCS 内 fas mRNA 表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Changes of fas mRNA expression of cells transfected with NHE-1 ribozyme gene in hypoxia($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	A _{fas} /A _{β-actin}					
	未缺氧	缺氧 2 h	缺氧 6 h	缺氧 12 h	缺氧 24 h	缺氧 48 h
PA 组	0.24 ± 0.13	0.25 ± 0.14	0.28 ± 0.11	0.32 ± 0.16	0.34 ± 0.06	0.26 ± 0.11
PX 组	0.25 ± 0.11	0.27 ± 0.15	0.30 ± 0.09	0.29 ± 0.15	0.33 ± 0.10	0.26 ± 0.14
PRZ 组	0.46 ± 0.14	0.48 ± 0.19	0.44 ± 0.12	0.47 ± 0.08	0.48 ± 0.15	0.39 ± 0.10

表 3 NHE-1 核酶基因转染对缺氧 PSMCs 内 fasL mRNA 表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 Changes of fasL mRNA expression of cells transfected with NHE-1 ribozyme gene in hypoxia($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	$\Delta A_{fasL} / \Delta \beta\text{-actin}$					
	未缺氧	缺氧 2 h	缺氧 6 h	缺氧 12 h	缺氧 24 h	缺氧 48 h
PA 组	0.40 ± 0.10	0.41 ± 0.15	0.45 ± 0.11	0.43 ± 0.14	0.40 ± 0.15	0.41 ± 0.11
PX 组	0.42 ± 0.09	0.43 ± 0.19	0.46 ± 0.12	0.44 ± 0.10	0.45 ± 0.17	0.49 ± 0.13
PRZ 组	0.57 ± 0.11*	0.51 ± 0.15	0.57 ± 0.13	0.60 ± 0.11	0.65 ± 0.12*	0.50 ± 0.14

注:与同时点 PA 组比较: * $P < 0.05$ 表 4 NHE-1 核酶基因转染对缺氧 PSMCs 内 Fas 蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Changes of Fas protein expression of cells transfected with NHE-1 ribozyme gene in hypoxia($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Fas(A 值)					
	未缺氧	缺氧 2 h	缺氧 6 h	缺氧 12 h	缺氧 24 h	缺氧 48 h
PA 组	3.91 ± 0.90	3.76 ± 0.69	3.51 ± 0.12	4.05 ± 0.18	3.98 ± 0.87	4.15 ± 0.34
PX 组	4.10 ± 0.92	3.92 ± 0.70	3.76 ± 0.32	4.13 ± 0.21	4.16 ± 0.59	4.20 ± 0.46
PRZ 组	4.25 ± 0.49	4.05 ± 0.37	3.95 ± 0.57	4.18 ± 0.36	3.85 ± 0.76	4.21 ± 0.54

表 5 NHE-1 核酶基因转染对缺氧 PSMCs 内 FasL 蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 5 Changes of FasL protein expression of cells transfected with NHE-1 ribozyme gene in hypoxia($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	FasL(A 值)					
	未缺氧	缺氧 2 h	缺氧 6 h	缺氧 12 h	缺氧 24 h	缺氧 48 h
PA 组	5.87 ± 1.36	5.74 ± 1.05	5.62 ± 1.13	5.93 ± 1.08	5.58 ± 1.29	5.73 ± 1.09
PX 组	5.74 ± 1.57	5.55 ± 1.08	5.43 ± 1.06	5.86 ± 1.28	5.79 ± 1.29	5.64 ± 1.18
PRZ 组	6.21 ± 1.47	6.45 ± 1.52	7.02 ± 1.57	7.11 ± 1.40	6.29 ± 1.43	6.81 ± 0.72

(彩色插页图 1, 表 4); DAB 染色后, 细胞核膜及胞浆内均可见棕黄色阳性颗粒。经图像分析显示, Fas 蛋白阳性染色 A 值在同时间点各组细胞间及同组细胞各时间点间差异均无显著性(P 均 > 0.05)。

2.5 NHE-1 抑制后 PSMCs 中 FasL 蛋白表达
(彩色插页图 2, 表 5); DAB 染色后, 细胞核膜及胞浆内均可见棕黄色阳性颗粒。图像分析显示, FasL 蛋白阳性染色 A 值在同时间点各组细胞间及同组细胞各时间点间差异均无显著性(P 均 > 0.05)。

3 讨论

NHE-1 是存在于血管平滑肌细胞膜上的一种管家基因蛋白, 可介导 1:1 细胞外 Na^+ 和细胞内 H^+ , 从而调节细胞内 H^+ 、pH 值、 Na^+ 和细胞容积。Quinn 等^[1] 研究发现, 血小板源性生长因子(PDGF) 和表皮生长因子(EGF) 等生长因子可以通过激活 NHE-1, 导致牛 PSMCs 细胞内碱化, 从而诱发细胞增殖; 而二者刺激细胞增殖作用都能被 NHE-1 特异性抑制剂二甲基氨基吡咪(5-N, N-dimethylamiloride, DMA) 抑制。我们在先前的实验中发现, 转染 NHE-1 特异性核酶基因后, 大鼠 PSMCs 内 NHE-1 mRNA 表达量及 pH 显著降低, 细胞凋亡率显著增加, 说明抑制 NHE-1 后, 可通过细胞内酸化诱导 PSMCs 凋亡^[2]。

目前认为, 细胞凋亡有两条主要的信号转导通

路, 即线粒体依赖性途径和死亡受体途径^[3,4]。细胞凋亡的死亡受体途径是指细胞凋亡由死亡受体(TNFR 或 Fas) 介导, 通过死亡受体的死亡功能区来实现。Fas 是由 fas 基因编码的一种细胞表面受体, 存在于许多组织细胞表面, 为糖基化的跨膜蛋白, 由跨膜区和胞浆区组成。Fas 蛋白 N 端在膜外, 具有 3 个富含半胱氨酸的结构域, C 端在胞浆区内, 有一段 80 个氨基酸的序列与细胞凋亡信号的传递有关, 被称为死亡功能区或者死亡结构域(DD)。Fas 的死亡功能区可以与几个蛋白发生多聚化作用从而形成死亡诱导信号复合物(death inducing signaling complex, DISC), 在细胞凋亡信号的传递中起着重要的、几乎是催化剂的作用。Fas 死亡区结合蛋白(Fas associated death domain protein, FADD, 或称 Mort-1)C-末端含有死亡功能区的接头分子, 可与 Fas 细胞内死亡功能区相互结合^[5], 序列分析显示内源性 FADD 是以配体依赖的方式与 Fas 系统相连, 其 N-末端为死亡效应区(DED), 是诱导细胞凋亡所必需的^[6]。Fas 介导的细胞凋亡需要天然配体(FasL/Apo-1L) 参与。Fas 和 FasL 的可溶型可同时在细胞中表达, 参与调节细胞膜 Fas 与 FasL 的结合^[7]。一旦细胞受到凋亡信号刺激, Fas 通过与其特异性配体 FasL 结合而在细胞膜表面发生聚合, 与 FADD 形成的复合物通过 FADD 的 DED 与半胱

氨酸天冬氨酸蛋白酶 8 (caspase 8) 特异结构域结合, caspase 8 自身被降解而激活, 激活的 caspase 8 亚基释放到胞浆中, 进而激活 caspases 的级联反应, 诱导细胞凋亡^[8]。

Boyle 等^[9]研究发现, 来源于巨噬细胞的一氧化氮(NO)通过增强巨噬细胞表达的 FasL, 与血管平滑肌细胞(VSMCs)上的 Fas 相互作用, 从而引起 VSMCs 凋亡。Imanishi 等^[10]发现, 在动脉粥样硬化损伤血管, 表达 FasL 的血管内皮细胞可以通过 Fas/FasL 途径诱导 VSMCs 凋亡, 且这一作用能被 Fas 可溶性受体作用的重组 Fas-Fc 所阻断。但 Sata 等^[11]在基因敲除小鼠上进行的研究发现, 机械损伤后出现的急性或慢性 VSMCs 凋亡均与 Fas 死亡通路无关。Kim 等^[12]的研究也发现, 在新生儿期血管重构、VSMCs 凋亡过程中 Fas/FasL 的表达无明显变化, 认为 Fas/FasL 不参与这一过程的调控。

本实验中通过 sqRT-PCR 法检测细胞内 fas 和 fasL mRNA 表达变化, 免疫组化法检测细胞内 Fas 和 FasL 蛋白表达变化。显示转染 NHE-1 特异性核酶基因后, 大鼠 PSMCs 内 fas mRNA 及蛋白的表达在常氧和缺氧培养时均无显著变化, 而 fasL mRNA 的表达在个别时间点显著增加, 但在常氧和缺氧培养时 FasL 蛋白的表达并无显著变化。而我们同期的其他研究显示, NHE-1 特异性核酶抑制 NHE-1 后, 可能通过引起细胞内 Ca^{2+} 浓度增加、bcl-2 表达降低及 bax 表达增加而诱导 PSMCs 凋亡^[13]。因此推断, Fas/FasL 死亡通路可能不参与 NHE-1 抑制而诱导 PSMCs 凋亡的调控。至于某些时间点 fasL mRNA 或蛋白表达显著增加在缺氧 PSMCs 凋亡中是否有意义, 尚待进一步研究。

参考文献:

1 Quinn D A, Dahlberg C G, Bonventre J P, et al. The role of Na^+

- H^+ exchange and growth factors in pulmonary artery smooth muscle cell proliferation[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996, 14:139-145.
- 2 陆俊羽, 姚伟, 钱桂生, 等. NHE-1 核酶基因转染对大鼠肺动脉平滑肌细胞凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23, 1282-1284.
- 3 Green D R. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors[J]. Cell, 2000, 102:1-4.
- 4 Green D R, Reed J C. Mitochondrion and apoptosis[J]. Science, 1998, 281:1309-1312.
- 5 Muzio M, Chinnaiyan A M, Kischkel F C, et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex[J]. Cell, 1996, 85:817-827.
- 6 Luschen S, Ussat S, Scherer G, et al. Sensitization to death receptor cytotoxicity by inhibition of fas-associated death domain protein (FADD)/caspase signaling: requirement of cell cycle progression[J]. J Biol Chem, 2000, 275:24670-24678.
- 7 Martin S J, Green D R. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts[J]. Cell, 1995, 82:349-352.
- 8 Ashkenazi A, Dixit V M. Death receptors: signaling and modulation[J]. Science, 1998, 281:1305-1308.
- 9 Boyle J J, Weissberg P L, Bennett M R. Human macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis requires NO enhancement of Fas/Fas-L interactions [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002, 22:1624-1630.
- 10 Imanishi T, Hano T, Nishio I, et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells is induced by Fas ligand derived from endothelial cells[J]. Jpn Circ J, 2001, 65:556-560.
- 11 Sata M, Sugiura S, Yoshizumi M, et al. Acute and chronic smooth muscle cell apoptosis after mechanical vascular injury can occur independently of the Fas-death pathway [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21:1733-1737.
- 12 Kim H S, Hwang K K, Seo J W, et al. Apoptosis and regulation of Bax and Bcl-X proteins during human neonatal vascular remodeling[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20:957-963.
- 13 陆俊羽, 姚伟, 钱桂生, 等. bcl-2, bax 在 NHE-1 核酶基因转染所致缺氧大鼠肺动脉平滑肌细胞凋亡中的作用[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16:394-398.

(收稿日期: 2005-04-22 修回日期: 2005-07-16)

(本文编辑: 李银平)

• 启事 •

北京医学会 2005 年危重病医学学术年会征文通知

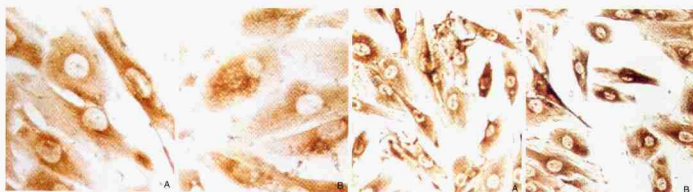
北京医学会 2005 年危重病医学专业委员会第一届年会将于 2005 年 12 月 17—18 日在北京召开。大会将邀请国内外知名危重病医学专家作专题报告。届时, 欧洲危重病协会将委派专家对与会代表进行“危重病人紧急事件处理培训课程”的演示。为进一步推动危重病医学的发展, 鼓励中青年医师积极开展基础和临床研究, 本次年会将举办论文报告会, 会议组委会将进行优秀论文评选。欢迎 ICU 界医师踊跃投稿, 参加会议。

征文内容包括严重全身感染、急性呼吸窘迫综合征、ICU 镇静、休克复苏、出血功能障碍、危重患者营养支持以及组织灌注与氧代谢的监测、连续性肾脏替代治疗(CRRT)、肺复张技术等。征文要求: 2005 年 12 月前未在正式刊物发表的论文。论文全文及中文摘要打印稿及电子版文件(Word 格式)各 1 份。投稿请寄: 北京东单三条甲 7 号, 北京医学会周捷收, 邮编 100005。征文截稿日期: 2005 年 10 月 17 日。

(北京医学会危重病医学专业委员会)

Fas和FasL在Na⁺/H⁺交换器-1抑制诱导缺氧大鼠肺动脉平滑肌细胞凋亡中的作用

(正文见515页)



A: PA细胞, B: PRZ细胞

图1 转基因后细胞Fas蛋白免疫组化染色(DAB, ×400)

Figure 1 Immunohistochemical staining of Fas protein in cells transfected with NHE-1 ribozyme gene (DAB, ×400)

A: PA细胞, B: PRZ细胞

图2 转基因后细胞FasL蛋白免疫组化染色(DAB, ×400)

Figure 2 Immunohistochemical staining of FasL protein in cells transfected with NHE-1 ribozyme gene (DAB, ×200)

创伤性脓毒症过程中外周血中性粒细胞凋亡的实验研究

(正文见561页)



图3 循环血中性粒细胞凋亡TUNEL染色正常组,可见少数中性粒细胞的胞核染成红色,阳性率为6.17%(TUNEL, ×400)

Figure 3 Normal group of PMN apoptosis by TUNEL stain in systemic blood. It was seen that few cell nuclei of neutrophil were stained red colour, the positive rate was 6.17%(TUNEL, ×400)



图4 循环血中性粒细胞凋亡TUNEL染色正常组,可见着色部位为细胞核的一端(TUNEL, ×1 000)

Figure 4 Normal group of neutrophil apoptosis by TUNEL stain in systemic blood. It's seen that the stained site was on one side of cell nuclear (TUNEL, ×1 000)



图5 CLP术后12 h, 循环血中性粒细胞凋亡明显受抑,只有少数中性粒细胞胞核染成红色,阳性率为4.83%(TUNEL, ×400)

Figure 5 neutrophil apoptosis in systemic blood was restrained obviously 12 hours after CLP, the positive rate was 4.83% (TUNEL, ×400)

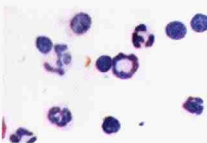


图6 CLP术后48 h, 循环血中性粒细胞凋亡明显加速,多数中性粒细胞胞核染成红色,阳性率为48.33%(TUNEL, ×400)

Figure 6 Neutrophil apoptosis in systemic blood was accelerated obviously 48 hours after CLP, more cell nuclei of neutrophil were stained red colour, the positive rate was 48.33% (TUNEL, ×400)

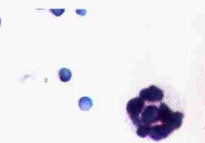


图7 CLP术后48 h, 循环血中性粒细胞凋亡(TUNEL, ×1 000)

Figure 7 Neutrophil apoptosis stain in systemic blood 48 hours after CLP (TUNEL, ×1 000)