

• 论著 •

氧化应激诱导肺泡 II 型上皮细胞凋亡及 Bax 和 p53 的表达变化

符跃强 卢仲毅 方芳 谭利平 匡凤梧 王兴勇 许峰

【摘要】 目的 探讨氧化应激状态下肺泡 II 型上皮细胞(AT II)凋亡的变化规律及 Bax 和 p53 表达的变化。方法 用过氧化氢(H₂O₂, 500 μmol/L)处理不同时间模拟机体活性氧攻击损伤 AT II 细胞的体内情况,建立氧化损伤性细胞模型,用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测细胞存活率,流式细胞仪检测细胞凋亡率,荧光显微镜及流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位,蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 Bax 和 p53 的蛋白表达变化。结果 与对照组比较,随 H₂O₂ 刺激时间延长,AT II 细胞存活率明显下降($F=85.211, P<0.05$),线粒体膜电位也明显下降($F=72.453, P<0.05$),凋亡率却明显增加($F=54.002, P<0.05$);同时发现 Bax 蛋白和 p53 蛋白表达均明显增加($F_1=38.534, F_2=52.145, P$ 均 <0.05)。结论 氧化应激能损伤 AT II 细胞,使细胞线粒体膜电位下降,细胞凋亡率增加、存活率下降,Bax 和 p53 可能参与了 AT II 细胞的凋亡。

【关键词】 肺泡 II 型上皮细胞; 凋亡; 氧化应激; 线粒体膜电位

Oxidative stress induced the expression of Bax and p53 during the apoptosis of alveolar type II epithelial cell

FU Yue-qiang, LU Zhong-yi, FANG Fang, TAN Li-ping, KUANG Feng-wu, WANG Xing-yong, XU Feng. Pediatric Intensive Care Unit, Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China

Corresponding author: XU Feng (Email: xufeng9899@yahoo.com.cn)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of oxidative stress on the survival and apoptosis of alveolar epithelial type II (AT II) cells, as well as the mechanisms of apoptosis. Methods 500 μmol/L H₂O₂ was added into primary AT II cells at different times and cell viability, apoptotic ratio and the expression of Bax and p53 were measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, flow cytometry (FCM) and Western blotting analysis, respectively. The change in mitochondrial membrane potential (MMP) was detected by fluorescence microscopy and FCM. Results The cell viability and MMP were decreased by H₂O₂ compared with the controls ($F_1=85.211, F_2=72.453$, respectively, both $P<0.05$). The cell apoptotic ratios were increased with the time of the stimulation prolonged compared with the controls ($F=54.002, P<0.05$). H₂O₂ increased Bax and p53 protein levels ($F_1=28.118, F_2=43.456$, both $P<0.05$). Conclusion High level of oxidative stress can inhibit AT II cells proliferation, and induce cells apoptosis and decrease the MMP. Up-regulation of the expression of Bax and p53 may contribute to its apoptosis effects.

【Key words】 alveolar epithelial type II cell; apoptosis; oxidative stress; mitochondrial membrane potential

氧疗是临床上治疗急性呼吸衰竭常用且有效的措施,但长期高浓度给氧亦可引起氧化应激性肺损伤等不良反应,目前广泛认为在此过程中产生的活性氧(ROS)是其主要致病因素^[1-3]。ROS 除引起膜脂质过氧化、促进炎症因子的释放外,是否还可启动凋亡相关基因、促进细胞的凋亡少有研究。Bax 和 p53 是调节细胞凋亡的关键因子,其是否参与了氧化应激状态下肺泡 II 型上皮细胞(AT II)的凋亡机制目前尚不清楚。本研究以体外培养的原代大鼠

AT II 细胞为研究对象,用过氧化氢(H₂O₂)处理不同时间模拟机体 ROS 攻击损伤 AT II 细胞的体内情况,建立氧化损伤性细胞模型,并探讨 Bax 和 p53 在 AT II 细胞氧化损伤时的表达变化及其与 AT II 细胞存活凋亡的关系。

1 材料与方法

1.1 主要材料:清洁级雄性 SD 大鼠,体重 180~200 g,由第三军医大学大坪三院实验动物中心提供。Dulbecco 改良 Eagle 培养基/F12(DMEM/F12)培养基(美国 Gibco 公司),胰蛋白酶(美国 BBI 公司),脱氧核糖核酶 I (DNase I,北京鼎国生物技术有限责任公司),大鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司),特级胎牛血清(天津 TBD 公司),钙结合蛋白 V-异硫氰酸荧光素 (Annexin V-FITC) 凋亡

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370618);教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(教外司留[2006]311)

作者单位:400014 重庆医科大学附属儿童医院 PICU

通讯作者:许峰,Email: xufeng9899@yahoo.com.cn

作者简介:符跃强(1979-),男(汉族),浙江省人,博士研究生,主要从事高氧肺损伤方面的研究,Email: fuyueqiang@sina.com.cn.

检测试剂盒(美国 BD Biosciences Pharmingen 公司),四甲基偶氮唑盐(MTT,美国 Amresco 公司),Bax 抗体(美国 eBioscience 公司),p53 抗体(美国 Santa 公司),辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司),二辛可宁酸(BCA)蛋白定量检测试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司),化学发光试剂盒(美国 Pierce 化学品公司),JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒(南京凯基生物公司);荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司,TE2000U),流式细胞仪(FACS Calibur,美国 BD 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 AT II 细胞的原代培养:用水合氯醛麻醉大鼠,打开胸腔行肺动脉插管,以生理盐水冲净肺血。整体取出心、肺和气管,气管插管,以缓冲液(NaCl 140 mmol/L, KCl 5 mmol/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8 mmol/L, 乙二醇四乙酸酯(EGTA)0.2 mmol/L, 羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)10 mmol/L, 葡萄糖 6 mmol/L, pH 7.4)灌洗肺泡腔 10 次。将质量分数为 0.08% 的胰蛋白酶消化液从气管注入肺泡,置于 37 °C、体积分数为 5% 的二氧化碳(CO_2)培养箱,隔 5 min 添加适量消化液,20 min 后去除气管及肺门周围结缔组织置于 250 mg/L 的 DNase I 和终止血清混合液中,快速将肺组织剪至 1 mm³ 小块,筛网过滤,离心收集细胞,用 DMEM/F12 培养基重悬细胞并转移至大鼠 IgG 包被的培养皿中,吸附纯化 2 h,用含体积分数为 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基重悬细胞,以 $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 密度接种至 6 孔板或以 $1 \times 10^9/\text{L}$ 浓度接种于 96 孔培养板,细胞接种后 24 h 换液,继续培养 12 h 备用。用改良巴氏染色法和电镜鉴定 AT II 细胞(纯度 > 90%),苔盼蓝拒染法测定细胞存活率 > 90%。

1.2.2 氧化损伤性细胞模型制备及实验分组:实验组每孔加入含终浓度为 500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 的无血清培养基,分别作用 AT II 细胞 1 h 和 3 h。对照组仅加无血清培养基。

1.2.3 细胞存活率:采用 MTT 比色法检测。细胞以 $1 \times 10^5/\text{L}$ 浓度接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μl ,对照组和实验组各 3 个复孔,培养 36 h。 H_2O_2 处理后吸去孔内液体,每孔中加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μl 和培养基 180 μl ,反应 4 h 后快速去除培养液,再加入二甲亚砜(DMSO)150 μl ,振荡器作用 10 min 混匀。由多功能酶标仪检测波长为 492 nm 处吸光度(A_{492})值,空白孔调零, A_{492} 值越高表示存活细胞越多,细胞存活率按公式计算。

细胞存活率(%) = 处理孔 A_{492} / 对照孔 $A_{492} \times 100\%$

1.2.4 Annexin V / 碘化丙啶(PI)双标记法检测细胞凋亡:消化并收集各组贴壁细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,重悬于结合液(10 mmol/L HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L CaCl_2)中,吹打成单细胞悬液。取 Annexin V - FITC 及 PI 与细胞悬液于室温下暗处孵育 15 min, FACS 检测, CellQuest 分析软件进行分析。

1.2.5 线粒体膜电位检测:荧光染料 JC-1 有两种不同的物理存在形式——单体和多聚体,单体发射光 527 nm,呈绿色荧光;多聚体发射光 590 nm,呈红色荧光。消化和收集各组细胞悬液,分别与 JC-1 在 37 °C 孵育 20 min 后,以无血清培养基洗涤 3 次后, FACS 测定(绿色荧光通过 FL1 通道来检测,红色荧光通过 FL2 通道来检测), CellQuest 分析软件进行定量分析。另外,采用荧光显微镜观察各组细胞单体和多聚体荧光情况,进行定性分析,以红色/绿色荧光强度比值表示。

1.2.6 Bax 和 p53 的蛋白表达:用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)。放射性免疫沉淀(RIPA)裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法定量蛋白。取 45 μg 蛋白质上样,用质量分数为 12% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电转移至聚偏二氯乙烯(PVDF)膜,质量分数为 5% 的脱脂奶粉封闭后,分别与 Bax(1 : 1 000)、p53 抗体(1 : 500) 4 °C 孵育过夜,二抗(1 : 2 000) 37 °C 孵育 1 h,增强化学发光法(ECL)检测, Quantity One 4.5.0 软件分析各蛋白条带的校对积分吸光度(A)值。将对照组蛋白/内参照比值设定为 1,各蛋白/内参照比值以此为对照得到相对值,进行统计学分析。

1.3 统计学方法:实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,多样本均数比较用单因素方差分析,组间两两比较用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H_2O_2 对 AT II 细胞存活和凋亡的影响:光镜下体外培养的 AT II 细胞生长良好,体积较大,细胞间连接紧密,胞质中有板层小体颗粒围绕细胞核。 H_2O_2 作用 1 h 后,多数细胞与对照组比较无明显变化,少数细胞核固缩深染; H_2O_2 作用 3 h 后,细胞间隙增宽,细胞体积缩小,核固缩深染。表 1 结果显示,与对照组比较, H_2O_2 刺激 1 h 和 3 h 后可见 AT II 细胞存活率明显下降(P 均 < 0.05),细胞凋亡率显著增加(P 均 < 0.05)。

表 1 H₂O₂ 处理不同时间 AT I 细胞存活率、凋亡率和线粒体膜电位的变化($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	细胞存活率(%)	细胞凋亡率(%)	线粒体膜电位
对照组	100.03±3.44	3.19±1.09	1.31±0.15
H ₂ O ₂ 1 h 组	76.92±4.88 ^a	9.06±1.75 ^a	0.81±0.10 ^a
H ₂ O ₂ 3 h 组	68.33±4.47 ^a	15.05±2.73 ^a	0.54±0.09 ^a
F 值	85.211	54.002	72.453
P 值	<0.05	<0.05	<0.05

注:与对照组比较,^aP<0.05

2.2 H₂O₂ 对 AT I 细胞线粒体膜电位的影响(表 1, 彩色插页图 1):在荧光显微镜下观察 JC-1 多聚体时发现,对照组细胞发出明亮的鲜红色荧光,H₂O₂ 刺激后,随作用时间的延长,鲜红色荧光逐渐变暗淡;各组相同视野下观察单体时发现对照组细胞发出橙色荧光,而受 H₂O₂ 刺激后随作用时间的延长,细胞逐渐发出绿色荧光;H₂O₂ 作用 3 h 后视野下绝大多数细胞发出绿色荧光。另外,FACS 检测发现,AT I 细胞的红色荧光平均强度值随 H₂O₂ 作用时间的延长而降低,绿色荧光平均强度值随 H₂O₂ 作用时间的延长而增加,AT I 细胞红色/绿色荧光平均强度比值随 H₂O₂ 作用时间的延长而明显下降(P 均<0.05),提示 H₂O₂ 刺激后细胞线粒体膜电位明显下降。

2.3 H₂O₂ 刺激后 Bax 和 p53 的蛋白表达(图 2, 表 2):与对照组比较,受 H₂O₂ 刺激 1 h 和 3 h 后,Bax 表达明显升高,3 h 时表达升高水平较 1 h 时增加更为明显(P 均<0.05)。另外,H₂O₂ 刺激 3 h 后 p53 蛋白的表达较对照组明显升高(P<0.05)。

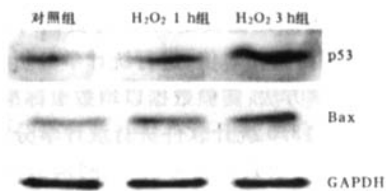


图 2 Western blotting 检测 Bax 和 p53 的蛋白表达

表 2 H₂O₂ 处理后不同时间点 Bax 和 p53 的蛋白表达($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Bax/GAPDH	p53/GAPDH
对照组	1.04±0.14	1.01±0.20
H ₂ O ₂ 1 h 组	1.56±0.18 ^a	1.09±0.22
H ₂ O ₂ 3 h 组	2.10±0.29 ^{ab}	2.44±0.30 ^a
F 值	38.534	52.145
P 值	<0.05	<0.05

注:与对照组比较,^aP<0.05;与 H₂O₂ 1 h 组比较,^bP<0.05; GAPDH 为三磷酸甘油脱氢酶(内参照)

3 讨论

肺泡上皮是氧化应激性肺损伤时 ROS 攻击的重要目标,我们早期的研究已表明,H₂O₂ 可以浓度和时间依赖的方式诱导 AT I 细胞凋亡^[4]。AT I 细胞除了能分泌肺泡表面活性物质稳定肺泡张力外,还能在肺泡受到损伤时转化为肺泡 I 型上皮细胞,主动修复受损的肺泡上皮^[5-6],其过度凋亡可以导致肺组织异常重塑——纤维化。至今有关氧化应激下 AT I 细胞的凋亡机制尚不很明确。本研究发现,500 μmol/L H₂O₂ 刺激可诱导 AT I 细胞凋亡,随 H₂O₂ 作用时间延长,细胞存活率下降、凋亡率上升。

线粒体是调节细胞内氧化还原能力的中枢,也是调控细胞凋亡的重要细胞器。损伤性刺激积累可导致线粒体内外膜交界处的线粒体通透性转换孔(permeability transition pore,PTP)持续开放,线粒体膜通透性增加,促使线粒体内促凋亡因子释放,引起细胞凋亡。线粒体膜电位下降是 PTP 持续开放和线粒体通透性增加的结果,预示着细胞进入了不可逆的凋亡进程。

JC-1 是一种碳氰化合物类荧光染料,在细胞内可以多聚体和单体两种不同的物理形式存在,分别处于不同的最大荧光吸收峰。JC-1 进入正常细胞后在线粒体中以多聚体形式存在,发出红色荧光;而细胞损伤后线粒体膜电位降低或崩溃,只能以单体形式存在于细胞质内,发绿色荧光。红色/绿色荧光强度比值的下降可以代表线粒体膜电位的降低。本研究发现 H₂O₂ 刺激 AT I 细胞后,随 H₂O₂ 刺激时间的延长 AT I 细胞线粒体膜电位明显降低,说明氧化应激能损伤 AT I 细胞的线粒体,触发凋亡反应。

Husari 等^[7]发现,新生鼠高氧暴露 3 d 后肺组织细胞凋亡增加,同时伴有 Bax 表达增多。Das 等^[8]报导在高氧诱导早产狒狒支气管肺发育不良模型中发现肺组织细胞凋亡增加及 p53 蛋白表达增多。另外在体外其他细胞研究中,周静等^[9]发现 H₂O₂ 诱导肠上皮细胞凋亡时可上调 Bax 的表达。因此氧化应激下 AT I 细胞的凋亡可能与促凋亡蛋白 Bax 和 p53 的表达增加有关。Bax 是 Bcl-2 家族中促凋亡成员之一,在凋亡早期阶段 Bax 表达增加,并在 Bid 的作用下改变构象插入线粒体外膜,使线粒体膜通透性增加,导致线粒体内促凋亡因子的释放^[10-12]。p53 作为一种肿瘤抑制蛋白,在细胞损伤时可以诱导细胞周期停滞在 G1 期而修复受损 DNA,但如果 DNA 损伤过多无法修复时,则诱导细胞发生凋亡。本实验发现 H₂O₂ 刺激后,AT I 细胞 Bax 和 p53 的

蛋白表达明显高于对照组,并随刺激时间的延长而增加,说明氧化应激能诱导 Bax 和 p53 的蛋白表达, Bax 和 p53 参与了 AT I 细胞的凋亡。

Bcl-2 家族、p53 以及线粒体膜电位存在着相互作用的关系。国外研究发现,肺上皮细胞株 A549 细胞凋亡时有 p53 和 Bax 的参与,抑制 p53 的转录后能阻遏线粒体膜电位的下降及凋亡的发生^[13-14]。另有报道, p53 可激活 Bax 而增加线粒体外膜通透性,触发凋亡^[15]。本研究提示氧化应激性损伤可破坏 AT I 细胞的线粒体膜电位,并诱导 Bax 及 p53 的表达增加,从而导致细胞凋亡,但线粒体膜电位、Bax 和 p53 之间的关系如何, p53 是否在凋亡中起主要调控作用,尚有待于进一步研究。

参考文献

[1] Selman M, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis; an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder [J]. Respir Res, 2002, 3; 3.

[2] Mantell L L, Lee P J. Signal transduction pathway in hyperoxia-induced lung cell death [J]. Mol Genet Metab, 2000, 71(7-2); 359-370.

[3] Barazzone C, White C W. Mechanisms of cell injury and death in hyperoxia role of cytokines and Bcl-2 family proteins [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 22(5); 517-519.

[4] 陈娟, 许峰, 蒋静. 氧化应激状态下肺泡 I 型上皮细胞凋亡及细胞外信号调节激酶信号转导机制的研究 [J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(4); 193-196.

[5] Sugahara K, Tokumine J, Teruya K, et al. Alveolar epithelial cells; differentiation and lung injury [J]. Respirology, 2006, 11 Suppl; S28-31.

[6] 黎檀实, 尹明, 冯丽洁. 急性肺损伤中肺泡 I 型细胞凋亡机制的研究现状 [J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(3); 58-60.

[7] Husari A W, Dbaibo G S, Bitar H, et al. Apoptosis and the activity of ceramide, Bax and Bcl-2 in the lungs of neonatal rats exposed to limited and prolonged hyperoxia [J]. Respir Res, 2006, 7; 100.

[8] Das K C, Ravi D, Holland W. Increased apoptosis and expression of p21 and p53 in premature infant baboon model of bronchopulmonary dysplasia [J]. Antioxid Redox Signal, 2004, 6(1); 109-116.

[9] 周静, 王杉, 叶颖江, 等. 应激状态下肠上皮细胞凋亡水平的变化及其机制 [J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(5); 268-272.

[10] Er E, Oliver L, Cartron P F, et al. Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax [J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1757(9-10); 1301-1311.

[11] Wang X, Ryter W S, Dai C, et al. Necrotic cell death in response to oxidant stress involves the action of the apoptogenic caspase-8/bid pathway [J]. J Biol Chem, 2003, 278(31); 29184-29191.

[12] von Ahnse O, Renkin C, Perkins G, et al. Preservation of mitochondrial structure and function after Bid or Bax mediated cytochrome c release [J]. J Cell Biol, 2001, 150(5); 1027-1036.

[13] Soberanes S, Panduri V, Mutlu G M, et al. p53 mediates particulate matter-induced alveolar epithelial cell mitochondria regulated apoptosis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 174(11); 1229-1238.

[14] Panduri V, Surapureddi S, Soberanes S, et al. p53 mediates amosite asbestos-induced alveolar epithelial cell mitochondria regulated apoptosis [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006, 34(4); 443-452.

[15] Chipuk J E, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis [J]. Science, 2004, 303(5660); 1010-1014.

(收稿日期: 2007-09-06 修回日期: 2008-01-15)

(本文编辑: 李银平)

• 启事 •

中华医学会全国重症医学研讨会征文通知

为促进我国重症医学发展,提高重症患者诊治水平,中华医学会重症医学分会定于 2008 年 5 月 22—25 日在杭州第一世界大酒店召开“中华医学会全国重症医学研讨会”。此次会议是重症医学分会 2008 年年会,大会将介绍重症医学最新进展,讨论学科前沿问题,重点突出国内近年来在重症医学领域中临床和科研方面的工作。届时将邀请国内外著名重症医学专家进行专题报告并重点研讨重症患者治疗方法实施和过程的管理问题。欢迎全国从事重症医学、呼吸、麻醉、急诊及相关学科的同道踊跃投稿并出席会议。

1 交流内容包括:①重症医学现状与规范化建设;②严重感染、休克与多器官功能障碍综合征;③ COPD 与机械通气;④ ARDS 与机械通气;⑤呼吸机相关肺炎;⑥侵袭性真菌感染;⑦肾脏替代治疗;⑧重症胰腺炎;⑨营养与代谢支持;⑩镇静与镇痛;⑪心、肺、脑复苏;⑫血流动力学监测与容量治疗;⑬其他与重症医学有关的学术内容。

2 征文要求:①未在国内公开刊物上发表的论文(勿投综述类文章);②全文 1 份,4 000 字以内,编排顺序为:题目、单位、邮编、姓名、正文;③摘要 1 份,1 000 字以内,编排顺序为:题目、单位、邮编、姓名、正文。摘要正文格式必须包括:目的、方法、结果和结论 4 部分(对因时间紧来不及写出全文者,本次会议允许仅投摘要);④请务必附通讯地址、联系电话(单位、住宅)、手机、Email, 以便及时联系。

3 本次大会采用网上投稿收集论文,请登录中华医学会网站: www.cma.org.cn, 学术活动→学术会议→全国重症医学研讨会。投稿截止时间为 3 月 30 日。

4 联系人: 李佳, 联系地址: 北京市东四西大街 42 号中华医学会学术会务部, 联系电话: 010-85158128(办), Email: lijia@cma.org.cn, 邮编: 100710。

5 请作者自留底稿, 文责自负, 恕不退稿。

6 学术论文证书和学分: 被会议录用的论文将收入大会论文集, 并可获得大会论文证书。全体参会代表可获得国家级 I 类继续教育学分。

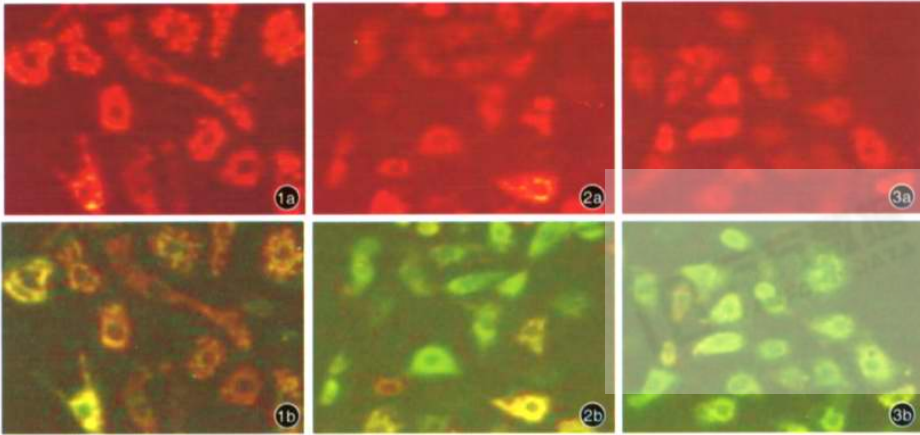
7 论文评奖: 我们将组织专家对投稿论文进行评审, 评选出一、二、三等奖, 并颁发获奖证书及奖金。

8 壁报评奖: 参加壁报交流的论文, 内容和制作优秀者, 可获得优秀壁报证书和奖励。

9 青年论坛: 我们将在会议中组织“青年论坛”专题, 欢迎 35 岁以下医生投稿, 对评选出的优秀青年医生论文将大会发言并颁发优秀青年论文奖。

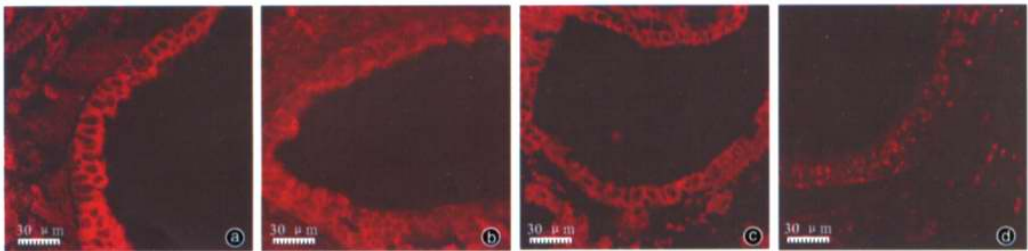
(中华医学会学术会务部 中华医学会重症医学分会)

氧化应激诱导肺泡 II 型上皮细胞凋亡及Bax和p53的表达变化 (正文见76页)

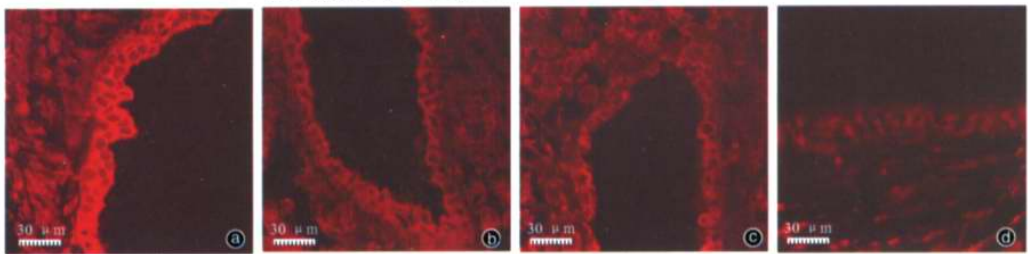


1: 对照组, 2: H₂O₂ 1 h组, 3: H₂O₂ 3 h组, (a): 多聚体, (b): 单体
图1 荧光显微镜下观察各组相同视野A2细胞线粒体膜电位的变化情况(JC-1染色, ×200)

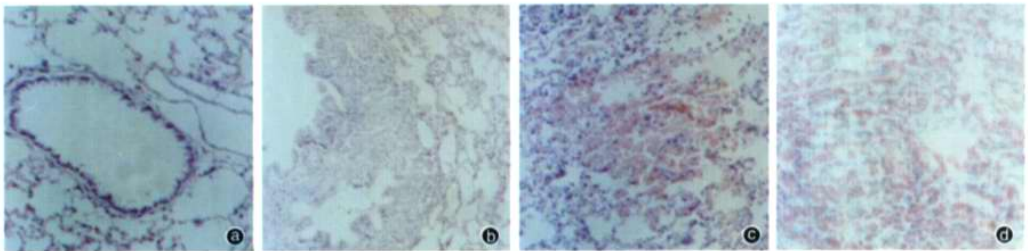
慢性乙醇摄取对急性肺损伤大鼠气道上皮细胞间连接蛋白 occludin和E-cadherin及屏障功能的影响 (正文见95页)



(a): 对照组, (b): 乙醇组, (c): LPS组, (d): 乙醇+LPS组
图2 各组大鼠肺组织气道上皮细胞occludin蛋白的表达及分布(免疫组化)



(a): 对照组, (b): 乙醇组, (c): LPS组, (d): 乙醇+LPS组
图3 各组大鼠肺组织气道上皮细胞E-cadherin蛋白的表达及分布(免疫组化)



(a): 对照组(×200), (b): 乙醇组(×100), (c): LPS组(×200), (d): 乙醇+LPS组(×200)
图7 光镜下观察各组大鼠肺组织病理学改变(HE)