

Fas/FasL信号传导途径在启动尘肺中的作用机制

张喜英¹, 姚三巧^{1*}, 陈志远², 白玉萍¹, 沈福海¹, 陈刚², 袁扬², 徐应军¹, 李君¹

(1 华北煤炭医学院预防医学系/河北省煤矿卫生与安全实验室, 河北 唐山 063000 2 中国煤矿工人北戴河疗养院尘肺科, 河北 秦皇岛 066000)

摘要: 目的 探讨 Fas/FasL 信号传导途径在尘肺发生发展中的作用机制。方法 以中国煤炭工人北戴河疗养院无其他肺部疾病的 0⁺ 接尘工人及 期、II 期尘肺患者为研究对象, 将支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中的肺泡巨噬细胞 (AMs) 分 5 组培养 (分别在信号传导途径的不同环节进行抑制), 即对照组 (未抑制任何途径介导的细胞凋亡过程)、SOD 组 (在 AMs 凋亡过程上游保护 AMs 抑制 AMs 细胞膜脂质过氧化过程从而抑制凋亡过程, 观察 SOD 对凋亡细胞的保护作用)、Fas/FasL 组 (抑制三条传导途径中的另两条即 TNFR/TNF- α 、TRAILR/TRAIL 途径, 观察 Fas/FasL 信号传导途径介导的细胞凋亡情况)、FasL 抑制组 (同时抑制 TNFR/TNF- α 、TRAILR/TRAIL 和 Fas/FasL 三条途径, 观察 Fas/FasL 信号传导途径上游抑制后的细胞凋亡情况)、caspase-8 抑制组 (同时抑制 TNFR/TNF- α 、TRAILR/TRAIL 途径和 Fas/FasL 途径的下游蛋白 caspase-8 的活性, 观察 Fas/FasL 信号传导途径下游抑制后的细胞凋亡情况)。分别采用 Western blot (WB)、琼脂糖凝胶电泳 (AGE) 和 TDT 介导的 dUTP 缺口末端标记技术 (TUNEL) 方法检测肺泡巨噬细胞 (AMs) 的凋亡情况、DNA 片段的改变、信号蛋白 Fas/FasL、caspase-8、caspase-3 的表达水平。结果 SOD 组、FasL 抑制组、caspase-8 抑制剂的凋亡指数均低于对照组, 差异均有统计学意义。对照组的 AMs 出现凋亡细胞特征性“梯状带”, SOD 组未出现, FasL 抑制组、caspase-8 抑制剂的 DNA 条带明显弱于对照组。SOD 组的 Fas/FasL、caspase-8、caspase-3 蛋白的表达均低于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); FasL 抑制组的 caspase-8、caspase-3 的表达低于 Fas/FasL 组与对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); caspase-8 抑制组的 caspase-3 表达低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 尘肺的发生发展可能与 Fas/FasL 信号传导途径介导的 AMs 凋亡有关。

关键词: Fas/FasL 信号传导途径; 肺泡巨噬细胞; 尘肺; Fas/FasL; caspase-8; caspase-3

中图分类号: R135.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2008)03-0139-05

Mechanism of Fas/FasL signal transduction pathway on initiating pneumoconiosis

ZHANG Xiying, YAO Sanqiao*, CHEN Zhiyuan, BAI Yuping, SHEN Fuhai, CHEN Gang, YUAN Yang, XU Yingjun, LI Jun

(1. Department of Preventative Medicine of North China Coal Medical College Tangshan 063000 China 2. Department of Pneumoconiosis of China Coal Miner Beidaihe Sanitarium Qinhuangdao 066000 China)

Abstract: Objective The purpose of this was to study the mechanism of Fas/FasL signal transduction on triggering and promoting pneumoconiosis. Methods Phase 0⁺, I and II pneumoconiosis cases without other lung diseases admitted in Beidaihe Coal Workers' Sanatorium were selected as subjects collecting their BALF. The alveolar macrophages (AMs) in BALF were separately cultivated in 5 groups: A control group, B Fas/FasL group, C SOD group, D FasL inhibitor group and E caspase-8 inhibitor group. The apoptosis was measured by TUNEL, agarose gel electrophoresis was used to evaluate the alteration of DNA fragment, the expressions of Fas/FasL, caspase-8, caspase-3 were detected by Western blot (WB). Results The results showed that the apoptosis indices in SOD group, FasL inhibitor group and caspase-8 inhibitor group were all lower than that of control group, the expressions of Fas/FasL, caspase-8, caspase-3 in SOD group were decreased compared with control group ($P < 0.05$); the levels of caspase-8, caspase-3 in FasL inhibitor group were decreased compared with control group and Fas/FasL group ($P < 0.05$); and the caspase-3 level in caspase-8 inhibitor group was also decreased compared with control group ($P < 0.05$). The AMs' DNA electrophoresis strips of control group characterized by distinctive ladder pattern were well observed but wasn't observed in SOD group, the other groups were also illegible. Conclusion It is suggested that Fas/FasL signal transduction pathway might be essential in triggering and promoting pneumoconiosis triggered by AMs apoptosis.

Key words: Fas/FasL; Signal transduction pathway; Alveolar macrophage; Pneumoconiosis; Caspase-8; Caspase-3

收稿日期: 2007-12-28 修回日期: 2008-03-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (项目编号: 30671741)

作者简介: 张喜英 (1974-), 女, 讲师, 硕士, 主要从事尘肺发病机制研究。现工作单位河南省焦作卫生学校预防教研室。

* 通讯作者, sanqiaoyao137@sohu.com

尘肺 (Pneumoconiosis) 是生产过程中长期吸入粉尘而发生的以肺组织纤维化为主的疾病, 是当前我国由粉尘引起的职业性肺部疾患中危害最严重的一类

疾病。目前我国每年约有1万名尘肺新发病例，尘肺的防治工作任重而道远。尽管多年来临床和基础学科专家在不断努力，但尘肺的发病机制仍然不完全清楚，给尘肺的防治带来了很大的困难。

探讨尘肺的发生机制尤其是认识发病的早期事件，对尘肺的防治具有重要的意义。近年来关于石英引起的肺泡巨噬细胞 (alveolar macrophages, AMs) 功能改变、崩解死亡和肺泡结构及其他细胞受损破坏，进而导致肺组织纤维化病变机制的研究不断深入并取得许多重要的进展。有证据表明，在 SiO_2 引起的肺纤维化过程中，AMs 凋亡被认为是形成肺泡炎导致肺纤维化的病理学基础^[1]。大量研究表明，细胞凋亡主要通过两条信号传导途径：一条是线粒体途径；另一条是膜死亡受体途径，即细胞表面的死亡受体通过 AM 细胞表面的受体与其配体结合启动细胞凋亡。主要通过三条基本信号传导通路诱导细胞凋亡：Fas/FasL 途径、TNFR/TNF- α 途径、肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体 (TRAILR/TRAIL) 途径 (见图 1)。国内外学者认为 Fas/FasL 信号传导途径在尘肺的发生发展中可能起到关键的作用。本研究在对尘肺患者肺灌洗液中 AMs 的离体培养基础上，通过抑制肿瘤坏死因子受体 (TNFR)/TNF 及肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体 (TRAILR)/TRAIL 两条信号传导途径，研究 Fas/FasL 信号传导途径以及对该信号通路的不同环节分别进行上、下游抑制后，AMs 的凋亡情况以及各种凋亡蛋白的表达水平，探讨 Fas/FasL 信号传导途径介导的 AMs 凋亡在尘肺启动中的作用机制，为尘肺的早期防治提供依据。

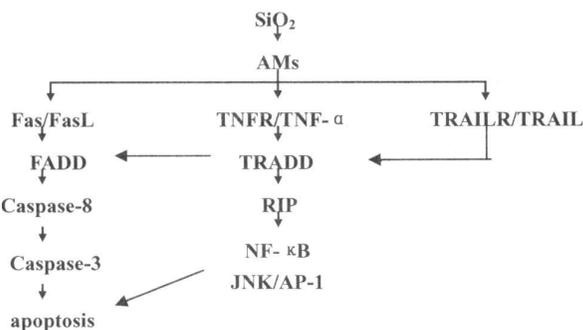


图 1 膜死亡受体介导的细胞凋亡的信号传导途径

1 对象与方法

1.1 对象

以中国煤炭工人北戴河疗养院无其他肺部疾病且行双肺大容量灌洗术的 0⁺ 的接尘工人和 I 期、II 期尘肺患者共 50 例为研究对象，其中 0⁺ 5 例，I 期尘肺 34 例，II 期尘肺 11 例。以尘肺诊断组的诊断为依

据，研究对象均为汉族男性，年龄 40 岁以上，接尘工龄 17~34 年。

1.2 内容与方法

1.2.1 实验分组 将尘肺患者的支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中的 AMs 分 5 组培养，分别在凋亡信号传导途径的不同环节进行抑制，即对照组 (未抑制任何途径介导的细胞凋亡过程)、SOD 组 (SOD 200 U/ml 在 AMs 凋亡过程上游保护 AMs 抑制 AM 细胞膜脂质过氧化过程从而抑制凋亡过程，观察 SOD 对凋亡细胞的保护作用)、Fas/FasL 组 (anti-TNF- α 抗体 50 ng/ml, anti-TRAIL 抗体 200 ng/ml 抑制三条传导途径中的另两条即 TNFR/TNF- α 、TRAILR/TRAIL 途径，观察 Fas/FasL 信号传导途径介导的细胞凋亡情况)、FasL 抑制组 (anti-FasL 抗体、anti-TRAIL 抗体各 200 ng/ml 和 anti-TNF- α 抗体 50 ng/ml 同时抑制 TNFR/TNF- α 、TRAILR/TRAIL 和 Fas/FasL 三条途径，观察 Fas/FasL 信号传导途径上游抑制后的细胞凋亡情况)、caspase8 抑制组 (anti-TNF- α 抗体 50 ng/ml, anti-TRAIL 抗体 200 ng/ml 和 caspase8 抑制剂 200 ng/ml 同时抑制 TNFR/TNF- α 、TRAILR/TRAIL 途径和 Fas/FasL 途径的下游蛋白 caspase8 的活性，观察 Fas/FasL 信号传导途径下游抑制后的细胞凋亡情况)。

1.2.2 细胞的纯化、培养、收集 将 BALF 经无菌纱布过滤后，离心半径 16.7 cm, 1000 r/min 离心 10 min 弃上清，用含 10% FCS (56°C 灭活) 的 DMEM 培养液吹打细胞团，混匀，离心半径 16.7 cm, 1000 r/min 离心 10 min 洗 3 次。调整细胞浓度为 10^6 / ml 分 5 组，置 37°C CO₂ 培养箱 (100% 湿度, 5% CO₂) 中培养 2 h 贴壁细胞即为纯化 AMs (台盼蓝染色证明，细胞活性 > 95%)，弃去培养液，分别加等体积的培养液及相应试剂，继续培养 24 h 后，弃上清，刮取细胞，PBS 洗涤 3 次，制成细胞悬液并进行细胞计数。

1.2.3 TUNEL 技术检测 AMs 凋亡指数 按照原位细胞凋亡检测试剂盒 TUNEL (POD) 说明书进行免疫细胞化学实验。取细胞爬片，4% 多聚甲醛室温下固定 30~60 min 置穿透液 (含 1 g/L TritonX-100 的 1 g/L 枸橼酸钠) 中，4°C, 2 min PBS 或 TBS 冲洗 2 min 洗涤 3 次。弃 PBS 滴加 TUNEL 反应混合液试剂 1，试剂 2 37°C 孵育 60 min PBS 冲洗 2 min 洗涤 3 次。滴加转化剂酶标记抗荧光素抗体 (POD)，37°C 孵育 60 min PBS 冲洗 2 min 洗涤 3 次。DAB 显色剂显色，室温 5~20 min 在显微镜下观察显色

情况, 显色充分后将标本及时脱水封固。滴加 Mayer 氏苏木素复染 5 min 自来水冲洗, 盐酸乙醇分化数秒, 自来水冲洗。中性树胶封片, 镜下观察并照相。结果判定: 细胞核固缩有的呈碎片状, 不规则, 大小不一致, 呈棕黄色颗粒为阳性细胞, 即凋亡的细胞。高倍镜下计数至少 200 个细胞并计算细胞凋亡指数 (凋亡细胞占总细胞的百分比)。

1.2.4 琼脂糖凝胶电泳检测 AMs 的 DNA 片段 采用盐析法^[2]提取 AMs 内的 DNA 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 观察 DNA 样本是否出现特征性梯状带。具体步骤: 各组细胞按前述方法培养 24 h 后, 分别取 5×10^6 个 AMs, 离心半径 16.7 cm 1 000 r/min 离心 10 min PBS 漂洗 3 次, 弃上清。向细胞团中加 0.25 ml 核悬浮液, 轻轻吹散, 然后依次加入 10 μ l 蛋白酶 K (20 mg/ml)、24 μ l SDS (10%), 充分混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴至溶液澄清 (约 6 h 或过夜), 其间振荡 2~3 次。加入 0.15 ml 饱和 NaCl 溶液, 混匀, 4 $^{\circ}$ C 盐析 15~20 min 离心半径 16.7 cm 2 800 r/min 离心 25 min 将上清液转移至 1.5 ml EP 管中。加入 2.5 倍体积 (大约 1 ml) 预冷无水乙醇, 轻轻摇动, 至絮状 DNA 析出为止, 离心半径 5.9 cm 8 000 r/min 离心 10 min 弃上清 (或小心将絮状 DNA 吸出)。95% 乙醇洗 1 遍, 离心半径 5.9 cm 8 000 r/min 离心 10 min 弃上清; 70% 乙醇洗 2 遍, 离心半径 5.9 cm 8 000 r/min 离心 10 min 弃上清后用滤纸将剩余的水分吸净。室温下自然干燥至糊状, 加 100 μ l TE 溶解 DNA -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.5 Western blot 法检测 Fas FasL caspase8 caspase3 表达的相对含量 细胞培养 24 h 后, PBS 洗涤 3 次, 制成细胞悬液, 取 10^6 个细胞, 离心半径 16.7 cm 1 000 r/min 离心 10 min 弃上清, 加 100 μ l 的细胞裂解液, 充分振荡混匀, 煮沸 3~5 min 冰上冷却, 离心半径 5.9 cm 8 000 r/min 离心 5 min 取上清 -20 $^{\circ}$ C 储存备用。裂解液于 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离蛋白, 每条泳道加入 20 μ l 蛋白样品, 将分离后的蛋白转移到硝酸纤维素滤膜上。滤膜于封闭液中室温封闭 1 h TBS/T 漂洗 3 次, 5 min 次, 一抗 (1:1000 稀释) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBS/T 洗涤 3 次, 碱性磷酸酶标记的二抗 (1:2000) 室温孵育 1 h TBS/T 洗涤 3 次, 加入化学发光试剂显色曝光, 采用 Mxroték Scan Wizard 5 扫描软件进行电脑扫描, Quantity One 7.0 软件定量分析 Fas FasL caspase8 caspase3 的表达水平。

1.3 统计处理方法

用 Excel 建库, SAS 9.0 进行统计分析, 均数用 \bar{x} 表示, 各组间均数比较采用方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 TUNEL 法检测各组 AMs 凋亡指数

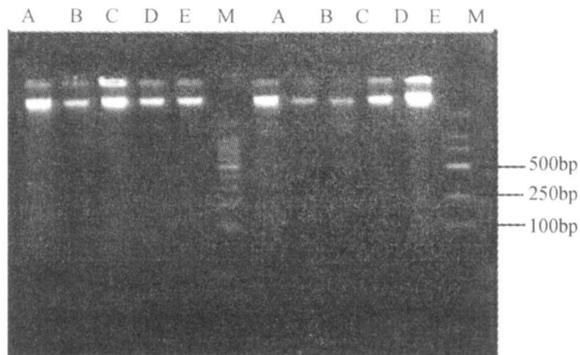
由表 1 可见, SOD 组、FasL 抑制组、caspase8 抑制剂组的凋亡指数均低于对照组, 差异均有统计学意义。

表 1 各组 AMs 凋亡指数的比较

| 组别 | 样本例数 | 凋亡指数 (%) | F 值 | P 值 |
|---------------|------|-------------------|------|--------|
| 对照组 | 5 | 19.18 \pm 2.83 | | |
| SOD 组 | 5 | 9.50 \pm 2.76* | | |
| Fas/FasL 组 | 5 | 14.01 \pm 2.56* | 8.86 | 0.0003 |
| FasL 抑制组 | 5 | 12.81 \pm 3.04* | | |
| Caspase8 抑制剂组 | 5 | 11.15 \pm 2.63* | | |

2.2 琼脂糖凝胶电泳检测 AM 的 DNA 片段化

对照组的 AM 出现了凋亡细胞特征性的阶梯状 (ladder pattern) 的 DNA 电泳条带, 电泳条带的间距在 200 bp 左右, 这与细胞凋亡后核内 DNA 受核酸内切酶裂解成 180~200 bp 的核苷酸小段的理论相一致, Fas/FasL 组、FasL 抑制组与 caspase8 抑制组的 DNA 泳道甚至电泳条带隐约可见, 而 SOD 组未出现。见图 2。



A: 对照组; B: SOD 组; C: FasL 对照组; D: FasL 抑制组; E: caspase-8 抑制组; M: Marker

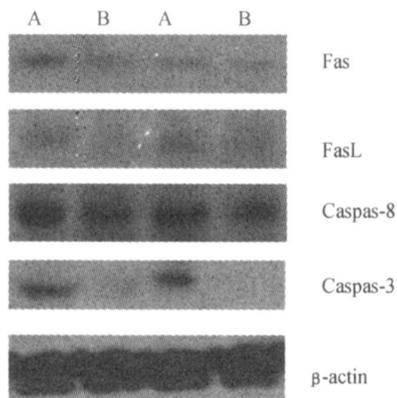
图 2 AM 的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

2.3 各组 AMs Fas FasL caspase8 caspase3 水平变化

各组 AMs 培养 24 h 后, Fas FasL caspase8 caspase3 的表达水平见图 3、4 表 2。由图 3、4 可见, β -actin 的蛋白条带比较均一, 表明细胞的含量相对一致, 而 Fas FasL caspase8 caspase3 的蛋白条带图则不一致, 其定量分析结果见表 2。

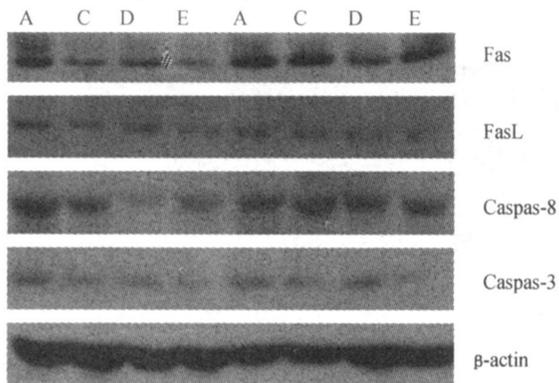
由表 2 可见, SOD 组的 Fas FasL caspase8 caspase3 蛋白表达水平均低于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), Fas/FasL 抑制组的 Fas FasL

表达水平低于对照组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 而 caspase-8、caspase-3 的表达水平均低于 Fas/FasL 组与对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); caspase-8 抑制组的 Fas、FasL、caspase-8 的表达水平均低于 Fas/FasL 组和对照组, 但差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), caspase-3 的表达水平明显低于 Fas/FasL 组及对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。



A: 对照组; B: SOD 组

图 3 Western blot 方法分析 SOD 组 AMs 的 Fas、FasL、caspase-8、caspase-3 蛋白条带图



A: 对照组; C: FasL 对照组; D: FasL 抑制组; E: caspase-8 抑制组

图 4 Western blot 方法分析 4 组 AMs 的 Fas、FasL、caspase-8、caspase-3 蛋白条带图

表 2 5 组 AMs 的 Fas、FasL、caspase-8、caspase-3 表达情况 (n=50)

| 组别 | Fas | FasL | caspase-8 | caspase-3 |
|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 对照组 | 0.215 2±0.094 0 | 0.203 6±0.093 9 | 0.365 3±0.086 2 | 0.419 8±0.091 8 |
| SOD 组 | 0.106 0±0.086 6 * | 0.117 3±0.065 0 * | 0.193 6±0.071 2 * | 0.197 5±0.075 9 * |
| Fas/FasL 组 | 0.187 3±0.076 2 | 0.185 7±0.073 4 | 0.318 6±0.092 3 * | 0.374 8±0.088 4 * |
| Fas 抑制组 | 0.185 6±0.064 8 | 0.170 8±0.078 5 | 0.194 3±0.080 0 * | 0.286 4±0.075 7 * |
| Caspase-8 抑制组 | 0.174 1±0.069 9 | 0.168 1±0.078 6 | 0.301 9±0.072 9 * | 0.211 3±0.085 8 * |

与对照组比较, * $P < 0.05$ 与 Fas/FasL 组比较, # $P < 0.05$

3 讨论

致肺纤维化损伤发生的始动因素目前还不清楚, 有人认为可能与遗传易感性、病毒感染、免疫功能异

常等有关^[3]。目前比较公认的理论涉及细胞、细胞因子和信号转导机制以及脂质过氧化作用等方面^[4]。近几年国内外研究资料表明, 细胞凋亡是尘肺发生发展过程的免疫病理学基础^[1], Fas/FasL 介导的细胞凋亡在肺纤维化过程中起到关键的作用^[5]。通过调控参与肺纤维化的效应细胞、细胞因子, 特别是干预介导肺纤维化的重要信号传导分子将给肺纤维化治疗带来新的希望。AMs 是矽尘作用的主要靶细胞, 矽尘进入肺泡后, AMs 吞噬矽尘颗粒, 细胞被活化并上调凋亡基因 (Fas、FasL 等) 的表达, 使 AMs 表面的 FasL 表达增高, 从而诱导表达 Fas 的 AMs 凋亡。近年来的研究表明, AMs 凋亡在肺部炎症/纤维化发生发展中具有重要的意义^[6]。Borges VM 等通过对鼠尘肺模型的研究显示, FasL 缺陷型鼠由于 AMs 凋亡失败而完全抵抗了尘肺的发生, 也不能募集中性粒细胞进入肺泡, 而重新导入表达 FasL 的 AMs 则又发生尘肺; 另外通过抗 FasL 抗体的治疗可以阻止野生型鼠尘肺的发展^[7]。在 FasL 缺陷小鼠气管内灌注矽尘很少发展为肺纤维化, 其可能机制是 AMs 凋亡减少, 导致中性粒细胞浸润以及 TNF- α 的产生相应减少, 从而抑制了炎症反应^[8]。上述结果进一步表明 Fas/FasL 信号传导途径介导的细胞凋亡在尘肺的发生发展中起着关键的作用。从本次实验中发现, 尘肺的发生发展可能与 Fas/FasL 信号传导途径有关。

在该信号传导途径中 Fas 与 FasL 的表达水平、两者的相互交连、以及 caspase 酶联反应均起着至关重要的作用。SO₂ 颗粒本身可刺激 AM 表面 FasL 的表达^[8], 除此之外还有多种原因可导致 FasL 的表达增高, 例如肺癌、结节病、肺炎、免疫性疾病、特发性肺纤维化等均有报道。Fas 和 anti-FasL 抗体均能模拟 Fas 与 FasL 相结合, 从而抑制 Fas/FasL 信号传导途径的信号传递^[5, 8], FasL 和 anti-Fas 抗体能模拟 FasL 与 Fas 相结合, 从而导致表达死亡受体 Fas 的细胞凋亡^[9~11]。研究表明, 矽尘对肺泡巨噬细胞凋亡的诱导作用受 ROS 和 caspases 介导^[12]。用 caspases 抑制剂能降低 caspase-1 和 caspase-3 的活性, 减少凋亡细胞数, 减轻肺炎症、肺纤维化病变程度^[13]。本实验研究发现, 抑制剂作用于 Fas/FasL 信号传导途径的不同环节后, Fas、FasL、caspase-8、caspase-3 的表达均发生相应的变化。结果提示, 通过下调 Fas/FasL 的表达、加入 anti-FasL 抗体来抑制 Fas/FasL 的结合或通过抑制 caspase 酶的活性等三条途径均可在不同部位抑制 Fas/FasL 信号传导途径。

矽尘与 AMs 共育, 引起细胞 DNA 断裂增加, 细

胞凋亡增多, 而且凋亡细胞数与矽尘呈剂量依赖性增加^[14]。凋亡的主要生化过程是核酸内切酶活化, 将核内 DNA降解成寡聚核小体 (180~200 bp的核苷酸小段) 而出现规则的“梯状带”。目前已经公认, 活性氧可以直接参与 DNA链断裂, 导致细胞损伤。本实验结果显示, 对照组出现明显的特征性“梯状带”, 而且电泳条带的间距在 200 bp左右, 与上述理论基本一致; SOD可以阻断活性氧对细胞核的损伤而未出现“梯状带”, FasL对照组、FasL抑制组、caspase8抑制组均未出现特征性梯状带或隐约可见。结果提示, antiFasL抗体、caspase8抑制剂、SOD对 SO₂介导的细胞凋亡均有一定的抑制作用, 且 SOD的抑制作用强于 antiFasL抗体、caspase8抑制剂, 可能与 SOD能有效地抑制 ROS对 AM的脂质过氧化损伤作用, 下调 Fas/FasL的表达水平有关。

信号传导与疾病是当今生命科学研究的热点, 肺纤维化机制的研究已涉及到相关的信号传导通路的改变, 在更深层次上研究其发病的分子机制, 探索通过干预信号传导通路治疗肺纤维化的可能性^[15]。尽管该实验中所加抑制剂对各处理组的凋亡指数影响不大, 其原因有待进一步研究, 但 Fas/FasL信号传导途径中所涉及到的主要蛋白信号分子均发生了变化, 其 DNA损伤也发生很大程度的改变, 而且该信号途径是介导 AM凋亡的三条信号传导途径之一, 因此, Fas/FasL信号传导途径介导的 AMs凋亡在尘肺的发生发展中可能起着重要的作用。

参考文献:

[1] Borges VM, Lopes MF, Falcao H et al. Apoptosis underlies immunopathogenic mechanisms in acute silicosis [J]. Am J Respir Cell Mol Biol 2002 27 (1): 78-84
 [2] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF et al. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells [J]. Nucleic Acids Res 1988 16 (3): 1215.
 [3] Marshall RP, McAnulty R J, Laurent G J. The pathogenesis of pulmonary fibrosis: is there a fibrosis gene? [J]. Int J Biochem Cell

Biol 1997 29 (1): 107-120.
 [4] 陈海峰. 肺纤维化发病机制研究进展 [J]. 预防医学情报杂志, 2004 20 (4): 386-388
 [5] Kuwano K, Hagimoto N, Kawasaki M et al. Essential roles of the Fas/Fas ligand pathway in the development of pulmonary fibrosis [J]. J Clin Invest 1999 104 (1): 13-19
 [6] Gozal E, Ortiz LA, Zou X et al. Silica-induced apoptosis in murine macrophage: involvement of tumor necrosis factor- α and nuclear factor- κ B activation [J]. Am J Respir Cell Mol Biol 2002 27 (1): 91-98
 [7] Dosreis GA, Borges VM. Role of Fas ligand induced apoptosis in pulmonary inflammation and injury [J]. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 2003 2 (2): 161-167.
 [8] Borges VM, Falcao H, Leite-Junior JH et al. Fas ligand triggers pulmonary silicosis [J]. J Exp Med 2001 194 (2): 155-164.
 [9] Hagimoto N, Kuwano K, Miyazaki H et al. Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen [J]. Am J Respir Cell Mol Biol 1997 17 (3): 272-278.
 [10] Maute-Bell G, Liles WC, Fiervert CW et al. Recombinant human Fas ligand induces alveolar epithelial cell apoptosis and lung injury in rabbits [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001 281 (2): 1328-335
 [11] Tanaka T, Yoshim M, Maeyama T et al. Resistance to Fas-mediated apoptosis in human lung fibroblast [J]. Eur Respir J 2002 20 (2): 359-368
 [12] Shen HM, Zhang Z, Zhang QF et al. Reactive oxygen species and caspase activation mediate silica-induced apoptosis in alveolar macrophages [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001 280 (1): 140-147
 [13] Kuwano K, Kunjaker R, Maeyama T et al. Attenuation of bleomycin-induced pneumopathy in mice by a caspase inhibitor [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001 280 (2): 1316-325
 [14] Gao N, Keane M J, Ong T et al. Effects of phospholipid surfactant on apoptosis induction by respirable quartz and kaolin in NR8383 rat pulmonary macrophages [J]. Toxicol Appl Pharmacol 2001 175 (3): 217-225
 [15] Kang JL, Paek IS, Hong SM et al. Silica induces nuclear factor- κ B activation through tyrosine phosphorylation of κ B- α in RAW 264.7 macrophages [J]. Toxicol Appl Pharmacol 2000 169 (1): 59-65

作者须知

正文中参考文献的标注: 采用顺序编码制, 即按文献出现的先后顺序用阿拉伯数字连续编码, 并将序号置于方括号中。可根据具体情况分别按下述 3种格式之一标注。

- a 薛社普等^[1]指出棉酚从体内排泄缓慢。
- b 麦胶敏感性肠病的发病有 3种机制参与^[2,4-6]。
- c 间质细胞 cAMP含量测定方法见文献[7]。

正文指明原始文献作者姓名时, 序号标注于作者姓名右上角 (如例 a); 正文未指明作者或非原始文献作者时, 序号标注于句末 (如例 b); 正文直接述及文献序号将之作为语句的组成部分时, 不用角码标注 (如例 c)。