

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.003423

TNF- α 下调大鼠肺微血管内皮细胞紧密连接蛋白 ZO-1、 Claudin-5 的表达

白吉佳¹, 石国翠², 马申懋¹, 马希刚¹

(1. 宁夏医科大学总医院重症医学科, 银川 750004; 2. 沧州市人民医院呼吸内科, 沧州 061000)

【摘要】目的: 研究肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 对大鼠肺微血管内皮细胞紧密连接蛋白 1 (zonula occludens-1, ZO-1)、Claudin-5 表达的影响, 探讨 TNF- α 对大鼠肺血管屏障的损伤机制。**方法:** 将体外培养的大鼠肺微血管内皮细胞分为对照组、TNF- α 24 h、48 h 和 72 h 组 (TNF- α 10 mg/L)。透射电镜观察大鼠肺微血管内皮细胞超微结构。MTT 法及流式细胞仪分别测定各组细胞的增殖抑制率及凋亡率。免疫荧光法测定 ZO-1 及 Claudin-5 的分布。RT-qPCR 及 Western blot 测定各组细胞 ZO-1 及 Claudin-5 的 mRNA 及蛋白表达。**结果:** 对照组内皮细胞含有大量的线粒体及内质网等结构, 结构正常。TNF- α 各组细胞线粒体数量减少, 线粒体肿胀, 靶溶解, 核固缩, 凋亡细胞增多, 细胞增殖抑制率及凋亡率较对照组增加 (均 $P < 0.05$) , 呈时间依赖性。ZO-1 及 Claudin-5 呈线状荧光分布于内皮细胞间连接部位。与对照组比较, TNF- α 各组细胞 ZO-1 的转录及表达水平降低 (均 $P < 0.05$) 。TNF- α 各组 Claudin-5 的转录水平较对照组明显降低 (均 $P < 0.05$) , TNF- α 48 h、72 h 组 Claudin-5 的蛋白表达水平较对照组降低 (均 $P < 0.05$) , TNF- α 24 h 组与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 。**结论:** TNF- α 下调大鼠微血管内皮细胞 ZO-1 及 Claudin-5 的表达, 诱导细胞损伤及凋亡, 破坏肺屏障, 导致肺损伤。

【关键词】肺血管屏障; 急性肺损伤; 紧密连接蛋白; 凋亡

【中图分类号】R563.8

【文献标志码】A

【收稿日期】2023-05-05

TNF- α downregulates the expression of tight junction proteins ZO-1 and Claudin-5 in rat pulmonary microvascular endothelial cells

Bai Jijia¹, Shi Guocui², Ma Shenmao¹, Ma Xigang¹

(1. Department of Critical Care Medicine, General Hospital of Ningxia Medical University;

2. Department of Respiratory Medicine, Cangzhou People's Hospital)

【Abstract】**Objective:** To investigate the effect of tumor necrosis factor- α (TNF- α) on the expression of tight junction proteins ZO-1 and Claudin-5 in rat pulmonary microvascular endothelial cells and to explore the injury mechanism of TNF- α on pulmonary vascular barrier in rats. **Methods:** Rat pulmonary microvascular endothelial cells cultured *in vitro* were divided into control group, and TNF- α 24 h, 48 h, and 72 h groups (TNF- α 10 mg/L). The ultrastructure of rat pulmonary microvascular endothelial cells was observed by a transmission electron microscope. The proliferation inhibition rate and apoptosis rate of cells in each group were determined by MTT assay and flow cytometry. The distribution of ZO-1 and Claudin-5 was determined by the immunofluorescence method. The mRNA and protein expression levels of ZO-1 and Claudin-5 in cells of each group were determined by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction and Western blot. **Results:** Endothelial cells in the control group contained a large number of mitochondria and endoplasmic reticulum, with a normal structure. Cells in the TNF- α groups showed a decrease in the number of mitochondria, mitochondrial swelling, cristae lysis, karyopyknosis, and an increase in apoptotic cells, with a significant time-dependent increase in the

proliferation inhibition rate and apoptosis rate compared with the control group (all $P < 0.05$). ZO-1 and Claudin-5 were distributed at the junction of endothelial cells, showing linear fluorescence. Compared with the control group, the TNF- α groups showed a significant decrease in the transcription and expression levels of ZO-1 and the transcription level of Claudin-5 ($P < 0.05$); the TNF- α 48 h and 72 h groups showed a significant decrease in the protein expression level of Claudin-5 ($P < 0.05$); the TNF- α 24 h group showed no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion:** TNF- α downregulates the expression of ZO-1 and Claudin-5 in rat pulmonary microvascular endothelial cells, leading to cellular damage and apoptosis, which may be the mechanism of TNF- α on the pulmonary vascular barrier.

作者介绍:白吉佳, Email:15209605572@163.com,

研究方向:重症感染。

通信作者:马希刚, Email:nyfyicu@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81260583);宁夏回族自治区科技厅 2020 年重点研发资助项目(编号:2020BEG03012);宁夏回族自治区科技厅 2022 年度自然科学基金重点资助项目(编号:2022AAC02064);宁夏医科大学校级资助项目(编号:XM2020143)。

优先出版:https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240206.1103.010
(2024-02-09)

lates the expression of ZO-1 and Claudin-5 in rat pulmonary microvascular endothelial cells, induces cell injury and apoptosis, destroys the lung barrier, and leads to lung injury.

【Key words】pulmonary vascular barrier; acute lung injury; tight junction protein; apoptosis

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是由严重感染、创伤、烧伤等非心源性因素诱发的全身炎症反应,以肺屏障功能受损为特征,表现为进行性呼吸窘迫、难治性低氧血症及非心源性肺水肿等症状,为临床常见的急危重症,死亡率高达30%~40%^[1]。目前大多数学者认为ALI的发病机制主要是炎性反应失控及氧化应激损伤导致直接及间接肺损伤^[2]。肺屏障由肺上皮屏障及肺血管内皮屏障共同组成,肺上皮屏障由肺泡上皮细胞组成,为抵御外来病原体侵犯的第一道防线,肺内皮屏障由肺微血管内皮细胞及细胞间紧密连接组成,是急性肺损伤时抵御体内炎症因子攻击,阻止肺水肿的第一道屏障。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)是ALI炎性反应中释放最早最重要的内源性介质,启动炎性级联反应。研究显示TNF- α 可以通过降低血管内皮钙黏蛋白增加人肺微血管内皮屏障的通透性^[3]。本研究采用TNF- α 作为细胞炎症刺激因子,探究其对肺微血管内皮细胞及细胞间机密连接蛋白表达的影响,更接近ALI对机体的病理生理过程。本课题组前期研究表明,TNF- α 下调大鼠肺上皮细胞紧密连接蛋白Claudin-4、紧密连接蛋白1(zonula occludens-1, ZO-1)的表达,损伤肺上皮屏障,导致肺损伤^[4]。并通过在体内实验证实,在油酸诱导的大鼠急性肺损伤中,大鼠肺Claudin-5及ZO-1表达下调^[5]。肺血管内皮屏障及肺泡上皮屏障,在影响肺通透性改变方面的作用同样重要,且肺血管内皮细胞损伤较早且更为严重,因此进一步研究TNF- α 对血管内皮屏障功能的影响,对于进一步明确ALI对TNF- α 损伤肺屏障的机制十分重要。然而,关于TNF- α 对大鼠肺内皮细胞Claudin-5及ZO-1表达的研究,目前主要集中于动物实验,在体内状态下,急性肺损伤炎症风暴发生时,机体常存在多种炎症因子共同作用情况,研究关键促炎因子TNF- α 在离体状态下对大鼠肺微血管内皮细胞Claudin-5、ZO-1的作用,能更准确地反应TNF- α 对肺血管内皮屏障的影响。因此,本研究通过TNF- α 与肺微血管内皮细胞体外共培养,观察肺微血管内皮细胞的损伤及细胞间紧密连接蛋白Claudin-5、ZO-1的表达情

况,进一步探讨TNF- α 对肺血管内皮屏障损伤的机制,为急性肺损伤的治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞系

大鼠肺微血管内皮细胞株购自上海拜力生物有限公司。

1.2 试剂及试剂盒

1640细胞培养基和10%胎牛血清(Gibco公司),TNF- α (Peprotech公司,400-14);MTT试剂盒、Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒和BCA蛋白检测试剂盒(南京凯基生物有限公司);小鼠抗大鼠Claudin-5(Invitrogen公司,352588)和兔抗大鼠ZO-1(Invitrogen公司,61-7300);小鼠抗大鼠 β -actin(北京中山金桥生物有限公司,TA09)、羊抗兔IgG(北京中山金桥生物有限公司,ZF-0511)和羊抗小鼠IgG(北京中山金桥生物有限公司,ZB-2305);反转录试剂盒(Takara公司,RR037A),Claudin-5、ZO-1和 β -actin引物(上海生物工程有限公司,表1)。本研究经宁夏医科大学总医院科研伦理委员会批准(审批号:2012-3-6)。

1.3 方法

1.3.1 细胞分组及处理 细胞分为对照组(1640培养基+10%胎牛血清共培养),TNF- α 24 h组(TNF- α 10 mg/L+1640培养基+10%胎牛血清共培养24 h)、TNF- α 48 h组(TNF- α 10 mg/L+1640培养基+10%胎牛血清共培养48 h)和TNF- α 72 h组(TNF- α 10 mg/L+1640培养基+10%胎牛血清共培养72 h)。TNF- α 10 ng/mL为通过TNF- α 5 ng/mL、TNF- α 10 ng/mL、TNF- α 20 ng/mL、TNF- α 40 ng/mL浓度梯度行预实验筛选后所得的适宜刺激浓度。

1.3.2 透射电镜观察大鼠肺微血管内皮细胞超微结构 肺微血管内皮细胞以适当密度接种于6孔板,细胞培养箱中培养24 h,按照上述分组处理细胞,常规制片,透射电子显微镜观察细胞超微结构,摄片。

1.3.3 MTT法测定细胞的增殖抑制率 肺微血管内皮细胞接种于96孔板,1×10⁵个/L,100 μ L/孔。置于细胞培养箱中孵育24 h,按照实验分组处理细胞,每组设置3个复孔,处理结束后,弃上清液,更换无血清培养基90 μ L/孔,按照试剂盒操作说明进行操作,酶标仪490 nm波长处测定每孔吸光度值(A值)。细胞增殖抑制率=(对照组A值-TNF- α 处理组A值)/对照组A值。

1.3.4 流式细胞双染法测定细胞的凋亡率 肺微血管内皮细胞以1×10⁵个/L接种于6孔板中,培养24 h,按照实验分组处理细胞,每组设2个复孔,处理结束,弃培养液,加入胰酶(不含EDTA)500 μ L/孔,离心收集悬浮细胞。按照Annexin

V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒说明书操作。流式细胞仪检测结果可得出各组细胞早期凋亡率。

1.3.5 免疫荧光法测定 ZO-1、Claudin-5 的表达分布 肺微血管内皮细胞以适当密度均匀接种于置有无菌爬片的 6 孔板内, 细胞培养箱中培养 24 h, 预温的 PBS(1×)洗涤细胞, 4% 的多聚甲醛室温固定 20 min, 再次洗涤细胞, 5% 牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 室温封闭 1 h。6 孔板内加入一抗 (兔抗大鼠 ZO-1 1:50; 小鼠抗大鼠 Claudin-5 1:50) 4 °C 孵育过夜, 洗涤细胞, 加入 FITC 标记的对应二抗 (羊抗大鼠 IgG, 1:100; 羊抗小鼠 IgG, 1:100), 室温避光孵育 1 h。洗涤细胞, DAPI 封片剂染核封片, 共聚焦显微镜观察并拍照。

1.3.6 RT-q-PCR 法测定 ZO-1、Claudin-5 的 mRNA 收集处理后的各组细胞, 用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 用反转录试剂盒 (按说明书操作) 将 RNA 反转录为 cDNA。应用 LightCycler480 System 法进行实时荧光定量 PCR; 反应体系共: 20 μL (SYBR Premix Ex Taq II 10 μL, PCR Forward Primer 0.4 μL, PCR Reverse Primer 0.4 μL, DNA 模板 2 μL, H₂O 7.2 μL)。反应条件为 95 °C 5 s 1 个循环; 95 °C 5 s, 60 °C (ZO-1)/57 °C (Claudin-5) 30 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环。用 PCR 仪器测定各组 CT 值, 按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 Claudin-5 及 ZO-1 的相对转录水平。

表 1 qPCR 引物序列

基因	引物序列 (5'~3')	bp
Claudin-5	R-ACACTTTGCATTGCATGTGCC F-CAGCGTTGAAATTCTGGTC	296
ZO-1	R-TGCTATTACACGGTCCTC F-TGGTGCTCTAAACAATC	642
β-actin	R-TTTAATGTCACGCACGATTC F-CCCATCTATGAGGGTTACGC	150

1.3.7 Western blot 法测定 ZO-1、Claudin-5 的表达 收集处理后各组细胞, 加入预冷的细胞裂解液 100 μL, 混合均匀后, 4 °C 摆床震荡后静置 4 min, 充分裂解 20 min 后离心收集上清即为全蛋白提取物, BCA 法蛋白含量检测, 配置 SDS-PAGE 凝胶, 分别配置 12% 及 8% 的分离胶, 5% 的浓缩胶。将蛋白样品加入上样缓冲液变性处置, 取适量样品加入凝胶孔, 80 V 恒压电泳, 电泳结束后, 使用 Bio-Rad 的标准湿式转膜装置, 按照滤纸-凝胶-PVDF 膜-滤纸顺序组装转印夹, 300 mA 电流冰浴转膜 90 min, 5% 的脱脂牛奶封闭转印有蛋白的 PVDF 膜 2 h, 加入一抗 (兔抗大鼠 ZO-1 1:250, 小鼠抗大鼠 Claudin-5 1:500, 小鼠抗大鼠 β-actin 1:500) 4 °C 过夜孵育, 洗膜 3 次, HRP 标记的相对应的二抗 (羊抗兔 IgG, 1:5 000, 抗小鼠 IgG, 1:5 000) 室温孵育 2 h, 洗膜, 将显色液加到膜上, 置于凝胶成像仪内, 曝光, 成像。用 Image Lab 分析软件进行分析处理, 测定各条带的灰度值, 目的条带/对应内参的灰度值, 计算各组蛋白表达的相对表达量。

1.4 统计学方法

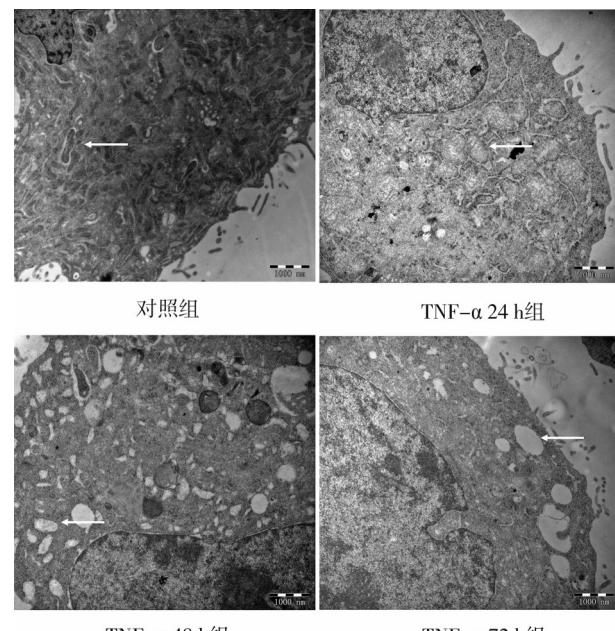
采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析数据分析。计量资料

以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 对数据进行正态性和方差齐性检验, 若满足正态性, 方差齐, 则各组样本间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-q 检验。若不符合正态性, 方差不齐, 则用秩转换的非参数检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 TNF-α 对肺微血管内皮细胞超微结构的影响

对照组大鼠肺微血管内皮细胞胞浆丰富, 含有大量的线粒体 (双层单位膜套叠而成的封闭性膜囊结构)、粗面内质网 (呈管状、扁状, 扩大成囊) 及高尔基复合体 (扁平膜囊), 胞浆内可见少量吞饮泡。TNF-α 24 h 组细胞线粒体即出现肿胀, 峰结构尚完整, 无明显溶解现象。TNF-α 作用至 48 h、72 h 时, 细胞线粒体数量明显减少, 出现溶解, 峰消失, 细胞内出现空泡结构, 粗面内质网及高尔基体肿胀, 结构不清晰, 部分细胞可见核碎裂、溶解, 视野内凋亡细胞增多 (图 1)。



注: 醋酸枸橼酸银染色, 30 000×, 比例尺 = 1 000 nm, 箭头所示为线粒体

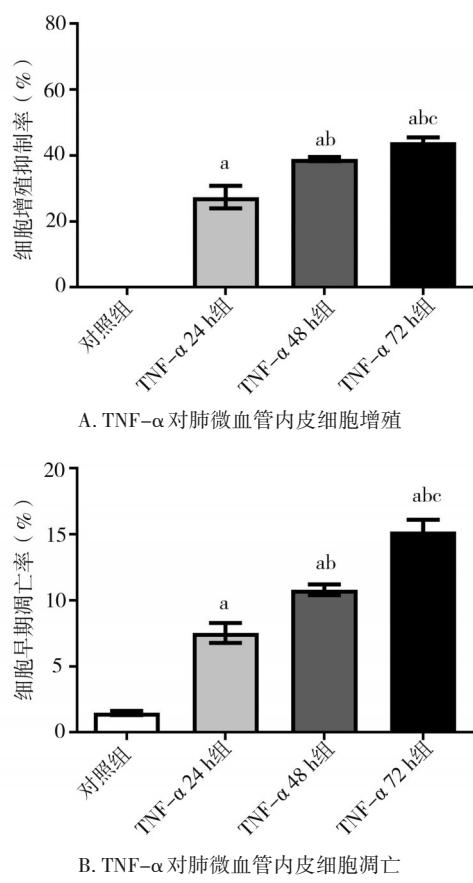
图 1 TNF-α 对肺微血管内皮细胞超微结构的影响

2.2 TNF-α 对肺微血管内皮细胞增殖及凋亡的影响

TNF-α 作用于肺微血管内皮细胞 24 h 后, 细胞的增殖抑制率较对照组明显升高 [(27.39 \pm 3.45)% vs. (0.00 \pm 1.49)%], 呈时间依赖性 [48 h (38.91 \pm 0.63)%; 72 h (43.9 \pm 1.53)%; $P < 0.05$] (图 2A)。与对照组 (1.47 \pm 0.15)% 比较, TNF-α 各组, 细胞的凋亡率均明显增加 [24 h (7.53 \pm 0.76)%; 48 h (10.80 \pm 0.40)%; 72 h (15.20 \pm 0.92)%; $P < 0.05$] (图 2B)。

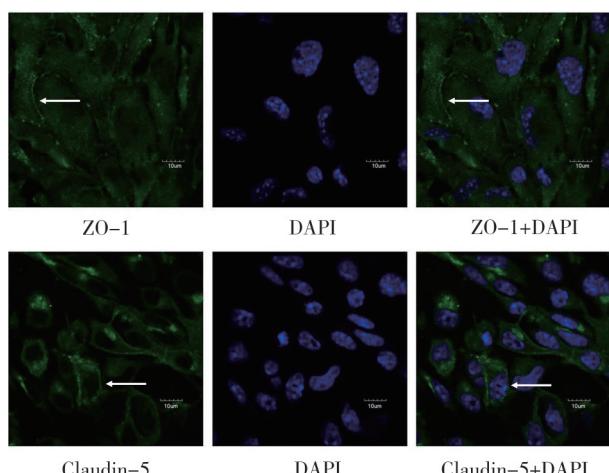
2.3 ZO-1 及 Claudin-5 在肺微血管内皮细胞的表达分布

共聚焦显微镜下可见 ZO-1 及 Claudin-5 均沿细胞膜呈线状荧光分布, 细胞与细胞连接部位, 调控细胞旁通透性 (图 3)。



注: a, 与对照组相比, $P<0.05$; b, 与 TNF- α 24 h 组相比, $P<0.05$; c, 与 TNF- α 48 h 组相比, $P<0.05$

图 2 TNF- α 对肺微血管内皮细胞增殖和凋亡的影响(%, $\bar{x} \pm s$)



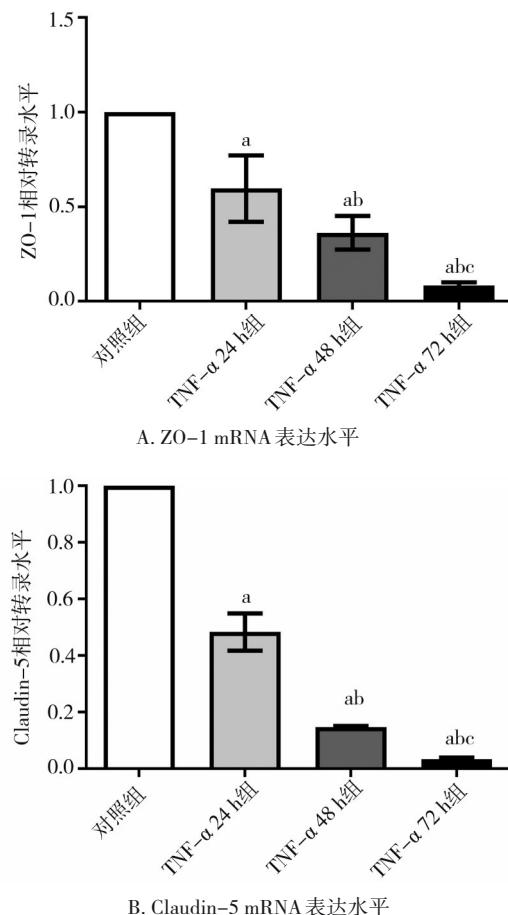
注: ZO-1 和 Claudin-5(绿色线性荧光); DAPI(蓝色荧光)

图 3 肺微血管内皮细胞中 ZO-1 和 Claudin-5 的表达分布
(比例尺=10 μm, 箭头所示为 ZO-1 及 Claudin-5 线性荧光)

2.4 TNF- α 对 ZO-1 及 Claudin-5 的转录水平(mRNA)的作用

TNF- α 各处理组细胞 ZO-1 及 Claudin-5 的相对转录水

平(mRNA)均较对照组明显降低,且随作用时间的延长,相对转录水平呈下降趋势,具有时间依赖性,各组间两两比较差异均有统计学意义(ZO-1: 24 h: 0.60 ± 0.18 , 48 h: 0.36 ± 0.09 , 72 h: 0.08 ± 0.02 vs. 1.00 ± 0.00 , 均 $P<0.05$; Claudin-5: 24 h 0.48 ± 0.07 , 48 h: 0.15 ± 0.00 , 72 h: 0.03 ± 0.00 vs. 1.00 ± 0.00 , 均 $P<0.05$)(图 4)。

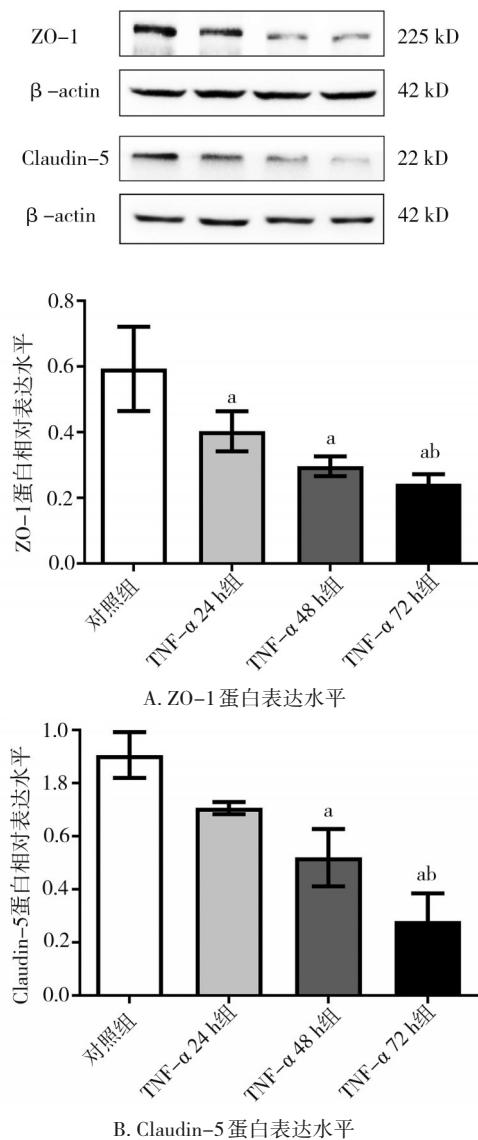


注: a, 与对照组相比, $P<0.05$; b, 与 TNF- α 24 h 组相比, $P<0.05$; c, 与 TNF- α 48 h 组相比, $P<0.05$

图 4 ZO-1 和 Claudin-5 的转录水平

2.5 TNF- α 对紧密连接蛋白 ZO-1 及 Claudin-5 蛋白表达的影响

与对照组比较, TNF- α 各组细胞 ZO-1 蛋白表达水平均低于对照组(24 h: 0.40 ± 0.06 ; 48 h: 0.30 ± 0.03 ; 72 h: 0.24 ± 0.03 vs. 0.59 ± 0.13 ; 均 $P<0.05$), TNF- α 72 h 组较 24 h 组 ZO-1 表达降低($P<0.05$)。TNF- α 48 h 组与 24 h 组比较, ZO-1 蛋白表达降低,但差异无统计学意义。TNF- α 48 h、72 h 组细胞 Claudin-5 的相对表达水平均明显低于对照组(48 h: 0.52 ± 0.11 , 72 h: 0.28 ± 0.10 vs. 0.91 ± 0.09),与 TNF- α 24 h 组(0.71 ± 0.02)比较, TNF- α 72 h 组 Claudin-5 表达降低(均 $P<0.05$), TNF- α 48 h 组 Claudin-5 表达虽继续降低,但差异无统计学意义(图 5)。



注: a, 与对照组相比, $P < 0.05$; b, 与 TNF- α 24 h 组相比, $P < 0.05$

图 5 ZO-1 和 Claudin-5 的表达水平

3 讨 论

急性肺损伤的重要病理特征为弥漫性肺泡损伤及肺屏障功能障碍^[6]。肺内炎症反应失衡为 ALI 的病理基础, 免疫细胞分泌的细胞因子白介素及 TNF- α 引发的细胞因子风暴及瀑布式炎性反应为肺损伤加重的主要因素^[7]。肺微血管内皮细胞为内皮屏障的基本结构及功能单位, 也是急性肺损伤时 TNF- α 作用的重要靶细胞。研究关键促炎因子 TNF- α 对肺血管内皮细胞及屏障功能的影响, 对急性肺损伤的机制及今后治疗有一定价值。

肺微血管内皮屏障由内皮细胞, 细胞-细胞间连接及细胞外基质组成, 具有防止肺泡充血和调控

血管内外液体及营养交换 2 种功能, 物质交换方式包括跨细胞途径及细胞旁途径。在炎症反应时, 一些较大的物质分子主要通过跨细胞途径渗透至肺间质及肺泡内, 而液体分子主要通过细胞旁途径进行渗透。TNF- α 可介导多种炎症反应, 诱导细胞损伤。Zhou P 等^[8]的研究发现 TNF- α 可以诱导内皮细胞线粒体损伤, 上调线粒体死亡因子 Cyt-c 的表达, 触发线粒体凋亡途径, 选择性下调 TNF- α 受体可以减轻呼吸机诱导的肺损伤^[9]。本研究中, TNF- α 10 ng/mL 与大鼠肺微血管内皮细胞共培养 24 h 时, 电镜下观察到内皮细胞内线粒体等细胞器结构肿胀, 培养至 48 h、72 h 时, 细胞内线粒体数量明显减少, 线粒体嵴溶解、断裂, 出现排空现象。内皮细胞炎性损伤是导致跨细胞途径增加的关键因素。此外 TNF- α 参与细胞凋亡、自噬等的发生^[10-11], 内皮细胞的过度凋亡是肺气肿和 ALI 等非肿瘤性肺部疾病发生机制之一。细胞凋亡分为外源性凋亡及内源性凋亡。ALI 通过白细胞活化、氧化应激、神经酰胺上调等多种机制调控内皮细胞过度凋亡。TNF- α 不仅是促炎因子, 同时还是一种细胞凋亡因子, 可以通过外源性凋亡途径, 与相应配体在胞质内的死亡结构域中形成复合物, 激活 caspase 导致细胞凋亡, 同时 TNF- α 诱导内皮细胞线粒体损伤, 释放细胞色素 Cyt-c 于细胞质中, 形成凋亡小体, 引起内源性细胞凋亡。另有研究显示 TNF- α 可以通过激活 JNK 通路诱导小鼠毛囊细胞凋亡, 凋亡细胞又可以表达 TNF- α , 反向诱导细胞凋亡, 形成恶性循环^[12]。Wang L 等^[13]的研究显示应用麻醉剂七氟醚通过调节 caspase-3 活化和 Bcl-xL 和 Bcl-2 表达抑制细胞凋亡减轻脂多糖诱导的大鼠急性肺损伤。而下调 TNF- α 的表达可以减轻内毒素诱导的大鼠急性肺损伤^[14]。本研究中, 与对照组相比, TNF- α 10 ng/mL 作用于肺血管内皮细胞 48 h 及 72 h 时, 电镜下可见细胞核固缩溶解, 凋亡细胞数量增加。且 TNF- α 组细胞的增殖受到抑制, 凋亡率增加, 且其作用具有时间依赖效应, 作用时间越长, 细胞损伤程度及凋亡越重。有研究显示 TNF- α 在 ALI 发生后 1 h 即可出现升高, 呈现动态变化, 贯穿 ALI 的始终^[15]。结合本研究结果, 推测 TNF- α 可持续作用在 ALI 的进展中起到一定作用。完整的内皮屏障结构是维持肺血管内皮屏障稳态, 保障肺泡内外气体交换的必需条件。内皮细胞凋亡所致的肺泡毛细血管屏障完整性受损是急性肺损伤的发生机制之一, 也是急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 发生的关键, 凋亡的细胞因为缺乏细胞间

隙,促使死亡细胞在同一部位累积,增加毛细血管的渗漏,促进 ARDS 的发展^[16]。因此,推测 TNF- α 直接损伤大鼠肺微血管内皮细胞结构,抑制其增殖,诱导其凋亡,增加跨细胞通透性及细胞间隙,破坏内皮屏障结构完整性。

细胞旁途径主要依靠细胞间连接,内皮细胞-细胞间连接包括紧密连接和黏附连接。紧密连接(tight junction, TJ)是黏附在相邻细胞脂质膜上的蛋白复合物,具有栅栏和屏障功能,维持细胞极性,控制细胞旁通透性,为影响肺通透性及肺泡清除能力的主要蛋白。紧密连接由闭合蛋白、Claudins 和 ZO-1 等组成。内皮细胞主要表达 Claudin-5,为内皮特异性紧密连接分子^[17-18]。在急性肺损伤发病过程中,微血管通透性升高、血气屏障破坏与 Claudin-5 下调有关^[19-20],上调内皮细胞中 Claudin-5,可减轻内皮细胞损伤^[21]。有研究显示 TNF- α 通过增强 TNFR1 的表达降低猪肠上皮细胞 Claudin-1、Claudin-3 等表达,导致肠上皮损伤^[22],提示炎症因子 TNF- α 可通过调节 Claudin 蛋白的表达,调控细胞旁通透性。本研究 TNF- α 刺激体外大鼠肺微血管内皮细胞,作用时间 48 h 时 Claudin-5 的转录及表达出现下调,继续作用至 72 h, Claudin-5 的表达水平继续下降,提示 TNF- α 下调 Claudin-5 的表达损伤细胞间紧密连接结构。在一项流感病毒所致 ALI 肺微血管渗漏的研究中显示, Claudin-5 呈剂量依赖性消耗,导致肺水肿^[23]。Huang LY 等^[24]同样研究病毒感染过程中 Claudin-5 及人肺血管内皮细胞屏障之间的关系,发现 Toll 样受体 3 配体多肌苷多胞苷酸通过刺激 IL-6、IL-8、肿瘤坏死因子 α 和干扰素 β 的产生,激活 NF- κ B 和 IRF3,降低跨膜 Claudin-5 的转录及表达,从而增加内皮细胞单层通透性。因此, Claudin-5 的表达与肺血管内皮通透性密切相关。ZO-1 是中间跨膜蛋白和肌动蛋白细胞骨架的组成成分,是内皮连接的中心调节器,与 Claudin-5 共同组成紧密连接复合体,调节细胞-细胞张力、迁移、血管生成和屏障形成。本研究结果显示 ZO-1 及 Claudin-5 蛋白呈线状荧光分布于大鼠肺微血管内皮细胞与细胞间连接部位。Goldblum SE 等^[25]在急性肺损伤的研究中发现,抑制 ZO-1 的表达,改变 ZO-1 的定位,细胞跨膜电阻抗降低,肺通透性增加。本研究 TNF- α 10 ng/mL 作用时间为 24 h、48 h、72 h 时, ZO-1 蛋白表达水平明显下调。吴彦立等^[26]的研究采用 TNF- α 100 ng/mL 作用于人微血管内皮细胞 24 h 后,细胞 claudin-5、ZO-1 表达下调,与本实验结果相比较, TNF- α 的处理浓度及作用时间不

同对紧密连接蛋白表达的影响差异可能与所干预细胞的种属不同有关。任睿芳等^[27]在犀角地黄汤合银翘散对 TNF- α 诱导的大鼠肺微血管内皮细胞通透性的研究中显示, TNF- α 作用 12 h 至 48 h 时, 血管内皮细胞通透性逐渐增加,具有时间依赖效应。这与本研究结果相一致,说明 TNF- α 对细胞及细胞间紧密连接的损伤作用具有持续性,随时间延长呈加重趋势。然而目前关于 TNF- α 影响肺微血管内皮细胞紧密连接蛋白表达的分子机制尚不明确,有研究显示, ALI 时, TNF- α 通过激活 NF- κ B 信号通路,诱导炎症反应,引起多种炎症介质的产生及释放^[28],而 NF- κ B 是肺部 Claudin-5 的主要调控因子,在肠黏膜屏障^[29]及视网膜屏障^[30]中的研究证实,激活 NF- κ B 信号通路可以增加细胞旁通透性,损伤屏障功能。也有研究显示, TNF- α 可以通过激活 Wnt/ β -catenin 通路增加肺微血管内皮屏障通透性^[26]。可见 TNF- α 影响细胞间紧密连接蛋白表达的分子机制,仍需进一步地探索明确。

综上,本研究认为 TNF- α 通过下调离体大鼠肺微血管内皮细胞 ZO-1 及 Claudin-5 的表达,并诱导细胞损伤及凋亡,破坏肺血管屏障结构,导致肺损伤。目前研究显示 TNF- α 抑制剂已应用于炎症性肠病,风湿类疾病等治疗,并取得了较好的疗效^[31],基于本研究结果,推测在急性肺损伤时,应用 TNF- α 拮抗剂有望为急性肺损伤患者带来获益,但仍需要大量的研究进一步进行理论支撑,为急性肺损伤今后的靶向治疗提供指导意义。

参 考 文 献

- [1] ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition[J]. JAMA, 2012, 307(23):2526-2533.
- [2] 何流漾, 郑建洲, 夏 蕾, 等. 炎症反应在 ARDS 中的作用机制研究进展[J]. 中华危重病急救医学, 2017, 29(7):651-655.
- [3] He LY, Zheng JZ, Xia L, et al. Research advances of the role of inflammatory responses in ARDS[J]. Chin Crit Care Med, 2017, 29 (7) : 651-655.
- [4] 穆盛田, 唐 洁, 阎东莉, 等. 乌司他丁通过抑制氧化应激反应改善 TNF- α 引起的人肺微血管内皮细胞屏障功能障碍[J]. 中国医科大学学报, 2020, 49(1):52-57.
- [5] Mu ST, Tang J, Yan DL, et al. Ulinastatin ameliorates TNF- α -induced human pulmonary microvascular endothelial barrier dysfunction by inhibiting oxidative stress[J]. J China Med Univ, 2020, 49(1):52-57.
- [6] 石国翠, 马申懋, 马希刚. 肿瘤坏死因子- α 对大鼠肺泡上皮细胞紧密连接蛋白 ZO-1、Claudin-4 表达的影响[J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28(9):1093-1099.
- [7] Shi GC, Ma SM, Ma XG. Tumor Necrosis Factor- α The effect on the expression of tight junction proteins ZO-1 and Claudin-4 in rat alveolar

- epithelial cells[J]. Chinese Journal of Emergency Medicine, 2019, 28(9): 1093-1099.
- [5] 邵萍. 火把花根对油酸肺损伤肺紧密连接蛋白 Claudin 和 ZO-1 表达的调节及其机制研究[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2015.
- Shao P. The experimental study on *Colquhounia* root adjusting expression of claudin and ZO-1 in lung tight junction protein on rat with acute lung injury by oleic acid[D]. Yinchuan: Ningxia Medical University, 2015.
- [6] Nova Z, Skovierova H, Calkovska A. Alveolar-capillary membrane-related pulmonary cells as a target in endotoxin-induced acute lung injury[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(4):831.
- [7] 耿平, 张洪亮, 熊佳俐, 等. 血必净注射液通过上调 claudin-5 改善硫化氢诱导的肺血管屏障功能失调[J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32(4):443-448.
- Geng P, Zhang HL, Xiong JI, et al. Xuebijing Injection improves hydrogen sulfide induced pulmonary vascular barrier dysfunction by upregulating claudin-5[J]. Chinese Journal of Critical Care Medicine, 2020, 32(4):443-448.
- [8] Zhou P, Lu S, Luo Y, et al. Attenuation of TNF- α -induced inflammatory injury in endothelial cells by ginsenoside Rb1 via inhibiting NF- κ B, JNK and p38 signaling pathways[J]. Front Pharmacol, 2017, 8:464.
- [9] Bertok S, Wilson MR, Morley PJ, et al. Selective inhibition of intra-alveolar p55 TNF receptor attenuates ventilator-induced lung injury[J]. Thorax, 2012, 67(3):244-251.
- [10] Zhang L, Wang FF, Zhang Q, et al. Anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of stybenpropol A on human umbilical vein endothelial cells[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(21):5383.
- [11] Kleinbongard P, Schulz R, Heusch G. TNF α in myocardial ischemia/reperfusion, remodeling and heart failure[J]. Heart Fail Rev, 2011, 16(1):49-69.
- [12] Pérez-Garijo A, Fuchs Y, Steller H. Apoptotic cells can induce non-autonomous apoptosis through the TNF pathway[J]. Elife, 2013, 2: e01004.
- [13] Wang L, Ye Y, Su HB, et al. The anesthetic agent sevoflurane attenuates pulmonary acute lung injury by modulating apoptotic pathways [J]. Braz J Med Biol Res, 2017, 50(3):156-188.
- [14] 罗鹏, 周振兴. 血必净对大鼠急性肺损伤的保护作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2017, 33(2):132-135.
- Luo P, Zhou ZX. Protective effects of xuebijing on the acute lung injury in rats[J]. Chin J Appl Physiol, 2017, 33(2):132-135.
- [15] 李东锦. 急性肺损伤早期肺泡灌洗液表面活性蛋白与 TNF- α 、IL-32 的变化趋势及相关性分析[D]. 广州: 广州医科大学, 2018.
- Li DJ. Study on change trend of content of surfactant protein (SP) A, B, C, D in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and related inflammatory factors TNF- α 、IL-32 during early phase of acute pulmonary contusion [D]. Guangzhou: Guangzhou Medical University, 2018.
- [16] 韩凤. 肺微血管内皮细胞屏障功能损伤与急性呼吸窘迫综合征[J]. 中国急救医学, 2015, 35(11):1048-1053.
- Han F. The damage of pulmonary microvascular endothelial cell barrier and acute respiratory distress syndrome[J]. Chin J Crit Care Med, 2015, 35(11):1048-1053.
- [17] Furuse M, Fujita K, Hiragi T, et al. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin[J]. J Cell Biol, 1998, 141(7):1539-1550.
- [18] Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis[J]. Physiol Rev, 2004, 84(3):869-901.
- [19] Aslam M, Ahmad N, Srivastava R, et al. TNF- α induced NF- κ B signaling and p65 (RelA) overexpression repress Cldn5 promoter in mouse brain endothelial cells[J]. Cytokine, 2012, 57(2):269-275.
- [20] Jang AS, Concel VJ, Bein K, et al. Endothelial dysfunction and claudin 5 regulation during acrolein-induced lung injury[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 44(4):483-490.
- [21] Dalmasso AP, Goldish D, Benson BA, et al. Interleukin-4 induces up-regulation of endothelial cell claudin-5 through activation of FoxO1: role in protection from complement-mediated injury[J]. J Biol Chem, 2014, 289(2):838-847.
- [22] Droessler L, Cornelius V, Markov AG, et al. Tumor necrosis factor alpha effects on the porcine intestinal epithelial barrier include enhanced expression of TNF receptor 1[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(16): 8746.
- [23] 韩凤. 肺微血管内皮细胞屏障功能损伤与急性呼吸窘迫综合征[J]. 中国急救医学, 2015, 35(11):1048-1053.
- Han F. The damage of pulmonary microvascular endothelial cell barrier and acute respiratory distress syndrome[J]. Chin J Crit Care Med, 2015, 35(11):1048-1053.
- [24] Huang LY, Stuart C, Takeda K, et al. Poly(I:C) induces human lung endothelial barrier dysfunction by disrupting tight junction expression of claudin-5[J]. PLoS One, 2016, 11(8):e0160875.
- [25] Goldblum SE, Hennig B, Jay M, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced pulmonary vascular endothelial injury[J]. Infect Immun, 1989, 57(4):1218-1226.
- [26] 吴彦立, 周文杰, 马希刚. 肿瘤坏死因子- α 通过激活 Wnt/ β -catenin 通路增加肺微血管内皮屏障通透性[J]. 宁夏医科大学学报, 2022, 44(3):239-245, 266.
- Wu YL, Zhou WJ, Ma XG. TNF- α increases pulmonary microvascular endothelial barrier permeability by activating Wnt/ β -catenin pathway [J]. J Ningxia Med Univ, 2022, 44(3):239-245, 266.
- [27] 任睿芳, 张舒, 李晓瑞, 等. 犀角地黄汤合银翘散通过 PKC-SSeCKS 通路抑制 TNF- α 诱导的肺微血管内皮细胞通透性增加[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(5):871-876.
- Ren RF, Zhang S, Li XR, et al. Xijiao Dihuang Decoction combined with Yiniao Powder inhibits TNF- α -induced permeability increase in PMVEC via PKC-SSeCKS pathway[J]. Chin J Pathophysiol, 2017, 33(5):871-876.
- [28] Basak C, Pathak SK, Bhattacharyya A, et al. NF- κ B- and C/EBP β -driven interleukin-1 β gene expression and PAK1-mediated caspase-1 activation play essential roles in interleukin-1 β release from *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-stimulated macrophages[J]. J Biol Chem, 2005, 280(6):4279-4288.
- [29] Guthmann F, Wissel H, Schachtrup C, et al. Inhibition of TNF α in vivo prevents hyperoxia-mediated activation of caspase 3 in type II cells[J]. Respir Res, 2005, 6(1):10.
- [30] Al-Sadi R, Guo SH, Ye DM, et al. TNF- α modulation of intestinal tight junction permeability is mediated by NIK/IKK- α axis activation of the canonical NF- κ B pathway[J]. Am J Pathol, 2016, 186(5): 1151-1165.
- [31] Nam J, Emery P. Aspects of TNF inhibitor therapy in rheumatoid arthritis[J]. Mod Rheumatol, 2010, 20(4):325-330.

(责任编辑:周一青)