

羟乙基淀粉 130/0.4 急性高容量血液稀释对脓毒症兔肺脏的影响

鲁卫华 金孝岷 鲁美静

【摘要】 目的 研究羟乙基淀粉(HES)130/0.4行中度急性高容量血液稀释(AHH)对脓毒症兔肺脏的影响,并探讨其可能机制。方法 取健康新西兰兔30只,随机分为模型组、假手术组、治疗组,每组10只。采用升结肠持续引流腹膜炎(CASP)方法改良制备脓毒症兔模型,假手术组仅暴露升结肠后关腹。治疗组于术后4h测量基础值后输注HES 130/0.4 20 ml/kg行AHH,输入速率为20 ml/min。3组术中均补充乳酸林格液 $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。于术后4h连续监测平均动脉压(MAP)、心率(HR);术后4h、8h开腹观察腹腔状况,同时抽取颈动脉血液测定血气及血浆肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平,术中监测呼吸频率及尿量。术后8h处死动物,取左肺测定湿/干重比值,观察肺组织病理学改变并行损伤评分,取右肺测支气管肺泡灌洗液总蛋白水平。结果 ①模型组术后4~8h MAP逐渐下降,HR逐渐加快,治疗组和假手术组变化较平稳。②治疗组稀释后血红蛋白(Hb)下降约20%,达到中度血液稀释。术后8h,模型组动脉血氧饱和度(SaO_2)、动脉血氧分压(PaO_2)、动脉血二氧化碳分压(PaCO_2)及pH值均较假手术组下降(P 均 <0.05)。③术后4h,模型组及治疗组TNF- α 高于假手术组(P 均 <0.05);术后8h,与假手术组比较,模型组TNF- α 升高($P<0.05$),而治疗组差异无统计学意义。④治疗组肺损伤病理学评分低于模型组[(6.9 ± 1.4)分比(11.2 ± 1.7)分, $P<0.05$]。结论 对脓毒症兔予HES 130/0.4行中度AHH可减轻肺脏损害,其机制可能与减少炎症介质的释放有关。

【关键词】 羟乙基淀粉; 血液稀释; 脓毒症; 肺脏; 肿瘤坏死因子- α

Effects of acute hypervolemic hemodilution with hydroxyethyl starch 130/0.4 on the lung in a rabbit model of sepsis LU Wei-hua, JIN Xiao-ju, LU Mei-jing. Department of Anesthesiology, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of acute hypervolemic hemodilution (AHH) with hydroxyethyl starch (HES) 130/0.4 on the lung in a rabbit model of sepsis and their possible mechanism. **Methods** Thirty healthy New Zealand rabbits were randomly divided into three groups ($n=10$ each): group sham operation (C), group sepsis model (E) and group AHH. Sepsis model was reproduced with modified colon ascendens stent peritonitis (CASP). In group C laparotomy was done but without puncturing the colon. At 4 hours after CASP, AHH was carried out intravenous infusion of 6% HES 130/0.4 20 ml/kg at 20 ml/min. Lactated Ringer solution was infused at $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ in all three groups during the experiment. The animals breathed spontaneously during the experiment. A catheter was introduced into the right carotid artery for blood sampling, and it was connected to a pressure transducer for continuous mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) monitoring. At 4 hours and 8 hours after CASP, a median abdominal incision was made and photographic documentation of abdominal situs was made. At the same time arterial blood samples were drawn at 4 hours and 8 hours after CASP for blood gas analysis and determination of hemoglobin (Hb) and hematocrit (Hct). The plasma component was separated and tumor necrosis factor- α (TNF- α) was measured. Respiratory rate and urinary output were record. The rabbits were sacrificed at 8 hours after CASP. The right lungs were immediately removed for determination of total protein concentration in broncho-alveolar lavage fluid (BALF). The wet/dry (W/D) lung weight rate were calculated. The sections of lung were stained with hematoxylin and eosin for light microscopic examination and the injury score was recorded. **Results** ①MAP declined gradually and HR tended to accelerate during the course of the experiment in group E, but no significant differences were found in both group C and group AHH. ②After AHH, the Hb and Hct decreased by 20% in group AHH. In group E, arterial oxygen saturation (SaO_2), arterial partial pressure of oxygen (PaO_2), arterial partial pressure of carbon dioxide (PaCO_2) and pH decreased significantly at 8 hours after CASP compared with group C (all $P<0.05$). ③TNF- α concentration in plasma was higher in group E and group AHH than in group C at 4 hours after CASP (both $P<0.05$). At 8 hours TNF- α concentration was increased in group E compared with group C ($P<0.05$), but there was no significant difference between group C and group AHH. ④In group E, score of morphological changes in lung was significantly increased compared with group AHH (6.9 ± 1.4 vs. 11.2 ± 1.7 , $P<0.05$). **Conclusion** AHH with HES 130/0.4 can protect the lungs from sepsis. Inhibition of proinflammatory cytokines may be involved in the mechanism.

【Key words】 hydroxyethyl starch; hemodilution; sepsis; lung; tumor necrosis factor- α

脓毒症致多器官功能障碍综合征(MODS)是外科重症监护病房(SICU)患者死亡和并发症发生的主要原因之一,术中输血是术后发生 MODS 的重要诱因之一^[1]。急性高容量血液稀释(AHH)作为一种血液保护方法,具有预防容量不足及治疗性作用。质量分数为 6% 的中分子羟乙基淀粉(HES 130/0.4)是理想的容量替代和血液稀释胶体。肺脏往往是障碍发生率最高、发生最早的器官,血液稀释后携氧能力下降,且全身炎症介质的释放导致内皮激活和广泛的毛细血管通透性增加,进行容量替代以维持血管内循环血量和心排血量可能会诱发肺水肿,甚至进一步损害组织氧合。因此 AHH 是否影响脓毒症机体肺脏功能及内稳态的稳定,目前尚存在争议。本研究中通过运用模拟脓毒症病理生理过程的动物模型,观察用 HES 130/0.4 进行 AHH 对脓毒症兔肺脏的影响,评价 AHH 用于脓毒症的安全性和可行性,为防治 MODS 提供新的思路和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 动物分组与模型制备:体重 2~3 kg 的健康新西兰兔 30 只,雌雄不限,由南京青龙山动物繁殖中心提供。按照随机数字表法分为模型组、假手术组、治疗组,每组 10 只。参照升结肠持续引流腹膜炎(CASP)方法^[2]改良制备脓毒症兔模型。假手术组仅暴露升结肠后关腹。术后 4 h 耳缘静脉置入 24G 导管针连接输液器。用戊巴比妥(30 mg/kg)麻醉兔,右颈总动脉插管。治疗组静脉输注 HES 130/0.4(德国费森尤斯卡比医药有限公司,批号:TL7319) 20 ml/kg(20 ml/min)行 AHH,3 组术中均补充乳酸林格液 10 ml·kg⁻¹·h⁻¹。于术后 4 h 连续监测平均动脉压(MAP)、心率(HR)、呼吸频率、尿量。术后 4 h 和 8 h 开腹观察腹腔状况。

1.2 标本采集与处理:于术后 4 h、8 h 取颈动脉血 2 ml,先测定血气,将剩余血离心取血浆,-70℃ 保存待测。术后 8 h 后处死动物取左上肺待检,另取左下肺用中性甲醛水溶液固定,常规石蜡包埋、切片,苏木素-伊红染色,光镜下观察肺组织病理学变化。取右肺支气管肺泡灌洗液(BALF)离心取上清液,-70℃ 保存。

1.2.1 血浆肿瘤坏死因子-α(TNF-α)含量检测:采用酶联免疫吸附法(ELISA)。

1.2.2 肺组织含水量的测定:称左上肺湿重(W)和干重(D),以 W/D 比值反映肺组织含水量。

1.2.3 右肺 BALF 总蛋白水平的检测:用考马斯亮蓝法检测 BALF 总蛋白水平。

1.2.4 肺组织病理学观察:观察肺间质水肿、肺泡水肿、炎症细胞浸润、肺泡出血、透明膜形成、肺不张。病变程度按无、轻、中、重分别记为 0、1、2、3 分,计算总分,对兔肺组织的病理形态学行定量分析。

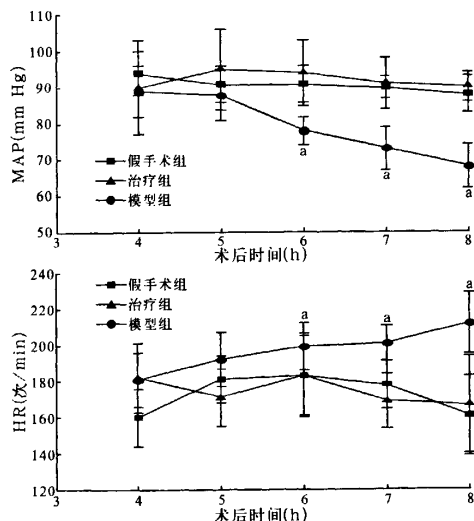
1.2.5 血细胞比容(Hct)及血红蛋白(Hb)检测:AHH 前后及术后 8 h 测定 Hct 及 Hb 含量。

1.3 统计学处理:采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用配对资料 t 检验或重复测量数据的方差分析,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般情况比较:模型组动物术后 4 h 出现轻重不一的呼吸急促、腹式呼吸,活动减少,8 h 时出现不同程度的呼吸困难,部分个体呈叹气样呼吸、HR 加快、血压下降、少尿甚至无尿等表现。治疗组及假手术组动物呼吸、血压平稳,尿量正常。

2.2 血流动力学变化(图 1):术后 4 h 时 3 组动物 MAP、HR 差异无统计学意义;模型组术后 4~8 h MAP 逐渐下降,HR 逐渐加快,6、7、8 h 时 MAP、HR 与 4 h 比较差异均有统计学意义(P 均<0.05);治疗组和假手术组 MAP 变化平稳,各时间点比较差异无统计学意义。



注:与本组 4 h 比较,^aP<0.05
图 1 3 组动物各时间点 MAP 和 HR 变化的比较

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.03.005

基金项目:安徽省教委自然科学基金项目(KJ2008B323)

作者单位:241001 安徽芜湖,皖南医学院附属弋矶山医院麻醉科

Email:lw683@sohu.com

2.3 腹腔情况的比较:模型组术后 8 h 从导管口持续流出大量肠腔内容物,腹腔有较多混浊脓性液体,伴恶臭,出现明显的弥漫性感染性腹膜炎特征,肠管浆膜严重充血水肿,炎性粘连,并可见散在瘀斑和出血点,部分出现肠管扩张麻痹,血管扩张充血,淋巴结明显肿大,并见少量腹水。治疗组动物出现轻度腹膜炎特征,引流管附近肠管充血粘连。假手术组未见明显改变。

2.4 肺功能变化的比较(表 1~2):术后 4 h,3 组血气分析指标差异均无统计学意义。术后 8 h,模型组动脉血氧饱和度(SaO₂)、动脉血氧分压(PaO₂)、动脉血二氧化碳分压(PaCO₂)、pH 值均较假手术组明显下降(*P* 均 < 0.05);治疗组各指标则显著高于模型组(*P* 均 < 0.05),但与假手术组比较差异均无统计学意义。3 组间 BALF 总蛋白含量及肺组织含水量差异无统计学意义。

2.5 Hb、Hct 变化的比较(表 2):Hb、Hct 基础值比较差异无统计学意义。治疗组稀释后 Hb、Hct 均下降约 20%。

2.6 炎症细胞因子的变化(表 2):术后 4 h,模型组和治疗组 TNF-α 均较假手术组升高(*P* 均 < 0.05)。术后 8 h,模型组 TNF-α 继续升高,而治疗组与假手术组比较差异无统计学意义。

2.7 肺组织病理学变化(彩色插页图 2):模型组肺毛细血管充血,肺泡壁破坏严重,肺泡间隔增厚,有大量炎症细胞浸润,肺间质及肺泡腔内可见渗出液,部分肺泡腔萎陷不张,肺泡腔内透明膜形成,小血管中见微血栓形成。治疗组肺泡结构尚可,少数肺泡间质水肿,肺泡隔毛细血管轻度充血,间质中性粒细胞轻度浸润,病理学改变较脓毒症组明显减轻。假手术

组呈现正常肺组织形态,肺组织形态结构完整,肺泡腔无渗出液,肺泡间隔无水肿和炎症。模型组及治疗组肺损伤评分[(11.2±1.7)分,(6.9±1.4)分]均较假手术组[(1.8±1.5)分]增高,且治疗组低于模型组(*P* 均 < 0.05)。

3 讨论

脓毒症发生的重要机制是内毒素启动的微循环衰竭,炎症因子 TNF-α、白细胞介素-6(IL-6)、IL-1 等在 MODS 中可能起促进作用。目前认为腹膜炎模型是动物脓毒症模型的“金标准”,CASP 能很好地模拟弥漫性腹膜炎的临床过程,早期即出现逐渐加剧的全身感染和全身炎症反应综合征(SIRS),而盲肠结扎穿孔术模型仅能模拟腹腔脓肿的形成过程^[3]。按照胡森等^[4]提出动物 SIRS 的一般标准,认为采用直肠温度、PaCO₂ 及白细胞计数和分类的变化进行诊断相对较为准确。肺脏功能发生改变最直接、最可靠的依据是 PaO₂ 的变化,结合 PaCO₂ 变化可较好地判断肺功能障碍或衰竭。因此,本研究中选择 PaCO₂ 及 PaO₂ 来作为 SIRS 的诊断标准,并用来判断肺损伤的严重程度。另外,血清 TNF-α 作为炎症反应过程中最重要的前炎症介质,其含量的变化亦可作为 SIRS 诊断标准的一个指标。

在本实验中,术后动物所出现的肠管血气、炎症因子、肺组织病理学改变以及血压下降、HR 加快、酸中毒等表现,与临床严重感染,特别是以大肠杆菌等革兰阴性菌为主的脓毒症临床特征相一致,符合腹腔感染所致脓毒症表现。术后 8 h 时,治疗组各血气指标均较模型组好转;而肺组织含水量及 BALF 总蛋白含量差异无统计学意义。用 HES 130/0.4 行 AHH 后动物各项指标均有明显改善,说明用 HES

表 1 3 组动物术后血气指标变化的比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	SaO ₂		PaO ₂ (mm Hg)		PaCO ₂ (mm Hg)		pH 值	
	4 h	8 h	4 h	8 h	4 h	8 h	4 h	8 h
假手术组	0.983±0.008	0.978±0.013	89±15	106±14	33.5±1.1	32.6±3.1	7.44±0.08	7.43±0.05
模型组	0.980±0.011	0.862±0.117 ^a	84±21	79±22 ^a	31.6±5.9	25.4±5.7 ^a	7.42±0.09	7.27±0.19 ^a
治疗组	0.983±0.007	0.974±0.016 ^b	89±14	109±7 ^b	29.1±6.3	31.1±5.2 ^b	7.45±0.03	7.43±0.09 ^b

注:与假手术组比较,^a*P*<0.05;与模型组比较,^b*P*<0.05;1 mm Hg=0.133 kPa

表 2 3 组动物肺通透性及各时间点 Hb、Hct 和 TNF-α 变化的比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	BALF 总蛋白(g/L)	肺组织含水量	Hb(g/L)			Hct			TNF-α(ng/L)	
			基础值	稀释后	术毕	基础值	稀释后	术毕	4 h	8 h
假手术组	0.86±0.32	0.78±0.01	115±17		111±19	0.34±0.05		0.33±0.05	12.9±2.6	19.4±3.1
模型组	0.92±0.27	0.79±0.01	109±18		115±22	0.33±0.05		0.34±0.06	18.1±1.9 ^a	26.6±5.7 ^a
治疗组	0.82±0.30	0.76±0.06	118±14	95±13	95±12	0.35±0.04	0.28±0.04	0.29±0.04	20.7±2.5 ^a	21.4±6.5

注:与假手术组比较,^a*P*<0.05;空白代表无此项

130/0.4 进行 AHH 后能明显改善脓毒症兔的肺功能。有文献报道 HES 130/0.4 快速输注后,能迅速达到 100% 的初始容量效力,4~6 h 的平台期,至少 6 h 的容量效应^[5],因此本研究以血液稀释后 4 h 为观察点,在作用时间内评价作用。Habler 等^[6]报道,当 Hct 不低于 0.20 时,组织器官的氧供未见受到明显影响,中度血液稀释使 Hct 达 0.30,约低于正常值 20% 时,可降低血浆黏滞度,并且由于心排血量代偿性的增加可提高 15% 的氧输送能力。本研究结果显示,AHH 后 Hct 下降 20%,达到中度血液稀释,可优化氧输送能力。

麻醉期间对无心脏病的患者(包括老年患者)实施 AHH 时输注胶体液发生肺水肿的几率较低,一般情况下,肺淋巴管可将过多的间质液移出,只有在血浆胶体渗透压与肺动脉压的梯度下降至(0.16±0.17)kPa 时,才有可能发生肺水肿^[7]。葛宁花等^[8]报道,老年患者术前行扩容治疗并不会引起肺水肿,只有超过机体的防御能力,同时伴有左心功能不全时才可能发生。Gallandat Huet 等^[9]研究亦表明,心脏手术患者用 HES 130/0.4 行高容量血液稀释,其血流动力学稳定,胶体渗透压能维持正常,达到与 HES 200/0.5 一致的效果。但脓毒症时肺通透性增高,AHH 未加重肺水肿可能与 HES 具有堵塞和预防毛细血管渗漏的作用有关。其可能的机制为生物物理作用——分子塞堵漏,以及生物化学作用——调节炎症介质,抑制内皮细胞的激活,防止中性粒细胞黏附。脓毒症时在激活产生的细胞因子连锁反应中,TNF- α 可能起核心作用。当细菌或毒素侵入机体后,TNF- α 在循环中出现较早并迅速达到高峰。本实验结果显示,术后 4 h 血浆 TNF- α 即增高,且随着时间的延长增高更加明显;而治疗组术后 8 h TNF- α 降至正常水平。说明 HES 130/0.4 行 AHH 发挥了调节作用,能及时调节炎症因子的释放,纠正机体免疫系统功能紊乱,提高生存率。研究表明:用 HES 130/0.4 进行容量替代,可使促炎因子释放降低,上皮细胞黏附分子表达下降及可溶性黏附分子浓度降低有关^[10]。HES 130/0.4 与等渗盐水对脂多糖(LPS)诱导的小静脉渗漏作用相比差异有统计学意义^[11]。HES 200/0.5 能抑制肺中性粒细胞的聚集及内毒素诱发的核转录因子- κ B(NF- κ B)激活,从而降低 LPS 诱导的大鼠肺水增加及肺毛细血管通透性。但剂量如超过 30 ml/kg 时 HES 堵漏作用下降,

活化蛋白-1(AP-1)反而升高,以剂量依赖方式导致肺前炎症因子下调,NF- κ B 抑制效应反而被 AP-1 中介的激动效应所消除^[12]。因此,脓毒症早期采取中度 AHH 措施进行干预,可改善肺脏功能有助于 MODS 的防治。

综上所述,对脓毒症兔予 HES 130/0.4 行中度 AHH 可改善肺功能而不加重肺脏损害。其机制可能与减少炎症介质的释放有关。

参考文献

- [1] Moore FA, Moore EE, Sauaia A. Blood transfusion, an independent risk factor for postinjury multiple organ failure. Arch Surg, 1997, 132(6): 620-624.
- [2] Zantl N, Uebe A, Neumann B, et al. Essential role of γ interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. Infect Immun, 1998, 66(5): 2300-2309.
- [3] Maier S, Traeger T, Entleutner M, et al. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis, two distinct animal models for polymicrobial sepsis. Shock, 2004, 21(6): 505-511.
- [4] 胡森, 盛志勇, 梁延杰, 等. 细菌复合低容量性休克诱发兔肠源性脓毒症和多脏器功能失常综合症的实验研究. 中国危重病急救医学, 1998, 10(10): 587-591.
- [5] Waitzinger J, Bepperling F, Pabst G, et al. Effect of a new hydroxyethyl starch (HES) specification (6% HES 130/0.4) on blood and plasma volumes after bleeding in 12 healthy male volunteers. Clin Drug Invest, 1999, 17(2): 119-125.
- [6] Habler OP, Kleen MS, Podtschaske AH, et al. The effect of acute normovolemic hemodilution on myocardial contractility in anesthetized dogs. Anesth Analg, 1996, 83(3): 451-458.
- [7] 孙怡, 田玉科. 血液稀释的分类应用及其对重要器官功能的影响. 国外医学麻醉学与复苏分册, 2002, 23(5): 310-312.
- [8] 葛宁花, 丁明, 薛张纲, 等. 扩容治疗对老年患者血液动力学和血管外肺水的影响. 中华麻醉学杂志, 2001, 21(8): 459-462.
- [9] Gallandat Huet RC, Siemons AW, Baus D, et al. A novel hydroxyethyl starch (voluven) for effective perioperative plasma volume substitution in cardiac surgery. Can J Anaesth, 2000, 47(12): 1207-1215.
- [10] Lang K, Suttner S, Boldt J, et al. Volume replacement with HES 130/0.4 may reduce the inflammatory response in patients undergoing major abdominal surgery. Can J Anaesth, 2003, 50(10): 1009-1016.
- [11] Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW, et al. Hydroxyethyl starch (130 kD), but not crystalloid volume support, improves microcirculation during normotensive endotoxemia. Anesthesiology, 2002, 97(2): 460-470.
- [12] Feng X, Ren B, Xie W, et al. Influence of hydroxyethyl starch 130/0.4 in pulmonary neutrophil recruitment and acute lung injury during polymicrobial sepsis in rats. Acta Anaesthesiol Scand, 2006, 50(9): 1081-1088.

(收稿日期: 2008-07-11)

(本文编辑: 李银平)

羟乙基淀粉130/0.4急性大容量血液稀释对脓毒症兔肺脏的影响

(正文见143页)

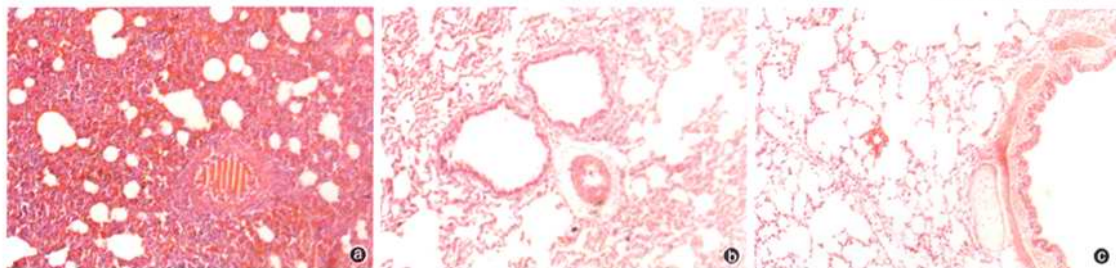


图2 光镜下观察制模后8 h大鼠肺组织病理学变化 模型组(a)肺毛细血管充血,肺泡壁破坏严重,肺泡间隔增厚,有大量炎症细胞浸润,肺间质及肺泡腔内可见渗出液,部分肺泡腔萎陷不张,肺泡腔内透明膜形成,小血管中见微血栓形成 治疗组(b)肺泡结构尚可,少数肺泡间质水肿,肺泡隔毛细血管轻度充血,间质中性粒细胞轻度浸润,组织病理学改变较模型组明显减轻 假手术组(c)呈现正常肺组织形态,结构完整,肺泡腔无渗出液,肺泡间隔无水肿和炎症 HE $\times 100$

对白细胞介素-1 β 激活核转录因子- κ B介导A549细胞分泌细胞间黏附分子-1作用的研究

(正文见151页)

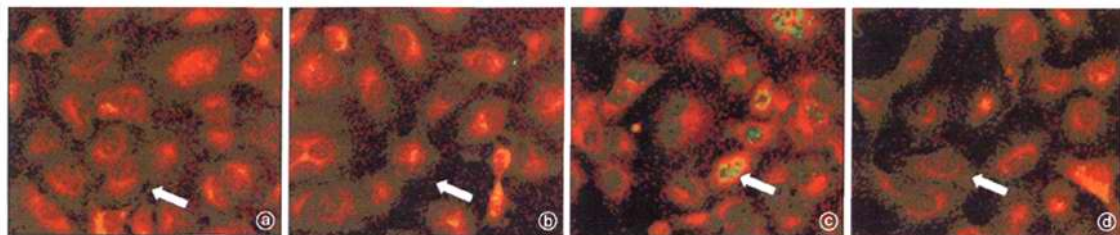


图2 LSCM下观察IL-1 β 和SC-514对p65蛋白核转移的影响 箭头示绿色荧光染色部分为p65蛋白 A549细胞组(a), SC-514组(b)细胞未受刺激时, p65蛋白主要位于胞质内 A549细胞+IL-1 β 组(c)IL-1 β 干预后30 min内激活的p65蛋白由胞质转移至胞核内 A549细胞+SC-514+IL-1 β 组(d)SC-514抑制了p65蛋白的核转移 免疫荧光染色 $\times 200$

肿瘤坏死因子- α 对血管内皮细胞通透性及细胞骨架和紧密连接形态变化的诱导作用

(正文见160页)

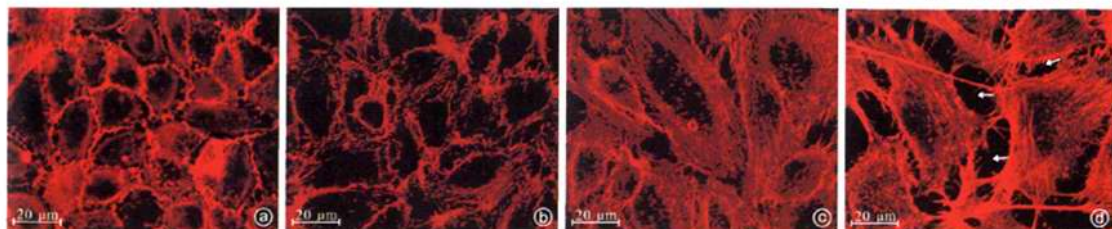


图3 镜下观察TNF- α 对内皮细胞肌动蛋白F-actin的作用 F-actin呈红色黄光染色 空白对照组(a)细胞间连接紧密,圆滑,未见明显缝隙形成 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的TNF- α 作用12 h(b)时细胞边缘粗糙,不规则,纤维致密斑减少 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的TNF- α 作用24 h(c)时胞质内应力纤维明显增多,细胞收缩,变形 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的TNF- α 作用24 h(d)时细胞收缩明显,外周纤维致密斑断裂,细胞间裂隙增大、增多,箭头示细胞间裂隙 免疫荧光染色 $\times 400$

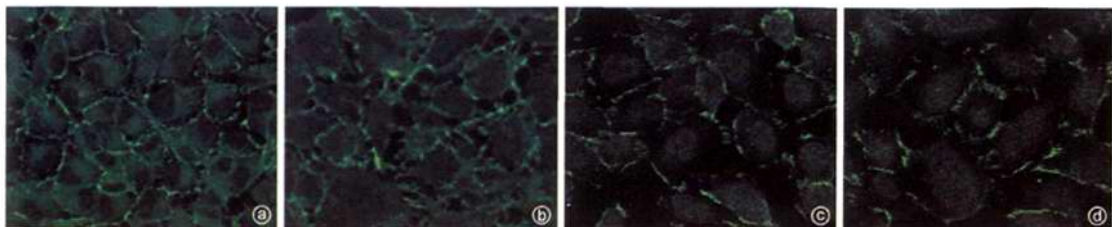


图4 镜下观察TNF- α 对内皮细胞紧密连接蛋白ZO-1的作用 ZO-1呈绿色黄光染色 空白对照组(a)ZO-1呈环状,线条清晰、连续、光滑 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的TNF- α 作用12 h(b)时细胞边缘呈锯齿状,部分ZO-1环打开 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的TNF- α 作用24 h(c)时ZO-1环出现中断、数量减少 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的TNF- α 作用24 h(d)时ZO-1环出现明显中断、数量明显减少 免疫荧光染色 $\times 400$