

• 论著 •

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

郑运江 汤耀卿 刘伟 毛恩强 李磊 武均 张如愿 张圣道

【摘要】 目的 观察人肿瘤坏死因子-α(TNF-α)对人血管内皮细胞(EA.hy926)单层通透性的影响,并初步探讨其作用机制。方法 在培养的 EA.hy926 融合成单层细胞后,加入 5、10、20 μg/L TNF-α 培养 24 h,或加入 10 μg/L TNF-α 培养 6、12、24 h,测定异硫氰酸荧光素(FITC)标记的葡聚糖(Dextran)荧光强度以表示血管内皮细胞单层通透性大小;用激光共聚焦显微镜观察内皮细胞肌动蛋白骨架(纤维状肌动蛋白(F-actin))和紧密连接蛋白(ZO-1)的形态分布;用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 ZO-1 的表达。结果 与空白对照组比较,TNF-α 能明显增加内皮细胞的通透性,诱导 F-actin 的重新分布以及应力纤维的形成和 ZO-1 的排列紊乱,数量减少,细胞间裂隙形成增多。Western blotting 表明,TNF-α 呈剂量和时间依赖性方式减少 ZO-1 表达。结论 TNF-α 诱导内皮细胞通透性增高与其破坏内皮细胞屏障功能完整性有关。

【关键词】 肿瘤坏死因子; 血管内皮细胞; 通透性; 肌动蛋白; 紧密连接

A study on increased permeability and morphological changes in actin cytoskeleton and tight junction of vascular endothelial cells induced by tumor necrosis factor-α ZHENG Yun-jiang, TANG Yao-qing, LIU Wei, MAO En-qiang, LI Lei, WU Jun, ZHANG Ru-yuan, ZHANG Sheng-dao. *Surgical Intensive Care Unit, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China*
Corresponding author: TANG Yao-qing, Email: yaoqt@live.cn

【Abstract】 Objective To study the effect of human tumor necrosis factor-α (TNF-α) on permeability of human vascular endothelial cell (EA.hy926) monolayer and its mechanism. **Methods** 5, 10, 20 μg/L TNF-α was respectively added to the cultured endothelial cell monolayer for 24 hours, or 10 μg/L TNF-α for 6, 12, 24 hours. Human vascular endothelial cell (EA.hy926) monolayer permeability was measured by detecting fluorescence intensity of fluorescein isothiocyanate (FITC) labeled dextran. Immunofluorescence and laser confocal microscopy were used to assess vascular endothelial actin cytoskeleton (F-actin) and tight junction protein (ZO-1) distribution. Western blotting was used to assess ZO-1 expression. **Results** Compared with control group, TNF-α significantly increased endothelial permeability and induced F-actin redistribution and stress fiber formation with ZO-1 derangement. Gaps increased obviously between endothelial cells. Furthermore, Western blotting showed that TNF-α reduced ZO-1 expression in a dose- and time-dependent manner. **Conclusion** TNF-α increased endothelial cell permeability by damaging integrity of endothelial barrier function.

【Key words】 tumor necrosis factor; vascular endothelial cell; permeability; actin; tight junction

脓毒症(sepsis)是全身炎症反应综合征(SIRS)的发生发展中,大量炎症细胞因子构成的复杂网路维持和加重了脓毒症的病理过程^[1]。脓毒症早期释放的肿瘤坏死因子(TNF)对脓毒症的发生发展起着十分重要的作用^[2-3]。脓毒症的一个显著特征是毛细血管通透性异常增高造成组织细胞的缺氧和损伤,严重时可导致毛细血管渗漏综合征(CLS)或多器官功能障碍综合征(MODS)^[4]。其中,内皮细胞屏障功能不仅是导致全身 CLS 的重要机制,也是导致 MODS 的重要原因^[5]。内皮细胞的细胞骨架特别是纤维状肌动蛋白(F-actin)的重组和再分布是导致

内皮细胞收缩、通透性增高的病理基础^[6]。紧密连接蛋白(ZO-1)是内皮细胞紧密连接的膜周边蛋白,主要作用为连接跨膜蛋白与肌动蛋白细胞骨架,其功能和结构的改变可引起紧密连接解离,细胞间缝隙加大,从而导致血管通透性升高^[7]。我们以 TNF-α 刺激体外培养的人血管内皮细胞,通过测定异硫氰酸荧光素(FITC)的吸光度(A)值以及进行免疫荧光染色,观察内皮细胞骨架以及紧密连接的形态变化,探讨 TNF-α 对血管内皮细胞通透性的影响。

1 材料与与方法

1.1 内皮细胞培养及鉴定:EA.hy926 内皮细胞系(由美国 Dr. Cora-Jean S. Edgell 教授惠赠)经胰酶消化后种植于培养瓶内,加 DMEM 完全培养液置于 CO₂ 培养箱中培养(37 ℃),至细胞达到 80%~

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.03.009

基金项目:上海市先进学科项目支持(S30204)

作者单位:200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科 ICU

通信作者:汤耀卿,Email:yaoqt@live.cn

90%融合时进行实验,采用Ⅷ因子免疫荧光染色鉴定其阳性率。

1.2 TNF-α 对 EA.hy926 内皮细胞单层通透性的影响:采用 FITC 标记的葡聚糖(FD40)评价单层血管内皮细胞的通透性。将内皮细胞接种在多聚碳酸酯膜滤器小室(美国 Corning Costar 公司)多聚碳酸酯膜上(1×10⁵/孔),加入 100 μl 含胎牛血清(FCS)的 DMEM 培养液于 CO₂ 培养箱中培养 24 h 形成细胞单层,换无血清 DMEM 培养液培养 2 h,再更换含 FCS 的新鲜 DMEM 培养液,分组,在上室中加入 100 μl 浓度为 5、10、20 μg/L 的 TNF-α 培养 24 h,或者加入 10 μg/L 的 TNF-α 培养 6、12、24 h。刺激完毕后,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 遍,上室加入 100 μl 含 FITC 标记的葡聚糖,在下室中加入 600 μl PBS。37 °C 下孵育 1 h 后,波长 490 nm 处检测下室的 A 值。

1.3 TNF-α 对细胞骨架和紧密连接形态的影响:EA.hy926 内皮细胞接种于涂有纤维结合素的载玻片上,待细胞生长至融合后,用无血清培养基继续培养 2 h,使细胞获得同步生长并处于静止期,分别以 5、10、20 μg/L 的 TNF-α 作用 24 h;另以 10 μg/L 的 TNF-α 作用 6、12 和 24 h;以不添加任何刺激物的 DMEM 培养基为空白对照。F-actin 的染色步骤:各组细胞经处理后,用 PBS 漂洗 3 次,多聚甲醛水溶液孵育 10 min,冷 PBS 漂洗 3 次,再用曲拉通 X-100 (Triton X-100)孵育,冷 PBS 漂洗 3 次,牛血清白蛋白室温下封闭 1 h,最后用罗丹明-鬼笔环肽室温下避光孵育 1 h,PBS 漂洗 3 次。最后对肌动蛋白丝进行免疫荧光特异性染色。

ZO-1 的染色步骤:各组细胞经过处理后,用 PBS 漂洗 3 次,用多聚甲醛水溶液孵育,冷 PBS 漂洗 3 次,牛血清白蛋白室温下封闭 1 h,鼠抗 ZO-1 一抗(1:100)孵育过夜,PBS 漂洗 3 次,然后以 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 二抗(1:200)避光孵育 1 h,漂洗干净后用激光共聚焦显微镜观察并记录。

1.4 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测:在生长融合的内皮细胞培养瓶中加入生理盐水或 10 μg/L 的 TNF-α,于 6、12、24 h 后吸去培养液,用含有蛋白酶抑制剂(购自北京普利莱基因公司)的 RIPA 裂解剂溶解细胞。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,再转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,加入抗 ZO-1 鼠单克隆一抗(购自美国 Sigma 公司)过夜,洗涤后加入羊抗鼠耦联辣根过氧化物酶(HRP)的二抗作用 2 h,洗涤

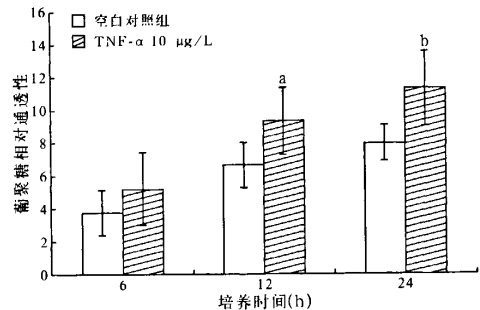
3 次,用荧光多成像仪进行密度测定。

1.5 统计学分析:数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行 ANOVA 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。Western blotting 和免疫荧光显微镜检测实验用双份样本;通透性测定实验的每组样本为 6 份。

2 结果

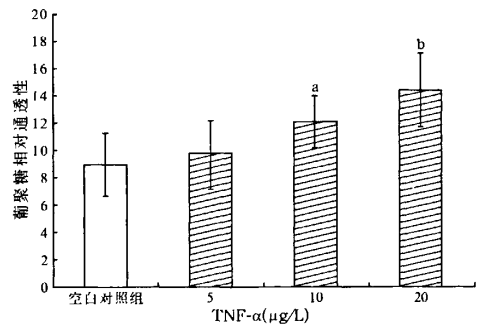
2.1 EA.hy926 内皮细胞系的鉴定:内皮细胞由胰酶消化时的圆形逐渐变为梭形和椭圆形,铺满瓶底时呈鹅卵石镶嵌样排列。Ⅷ因子免疫荧光染色阳性率 > 95%。

2.2 血管内皮单细胞层的通透性:10 μg/L 的 TNF-α 刺激内皮细胞单层 6 h 后下室液体 A 值与空白对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),但 12 h、24 h 则显著高于空白对照组($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$,图 1)。5 μg/L 的 TNF-α 可使内皮细胞单细胞层的通透性增高,随着其剂量增大通透性逐渐增高,且与空白对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图 2)。



注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

图 1 10 μg/L TNF-α 作用于内皮细胞的时-效关系



注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

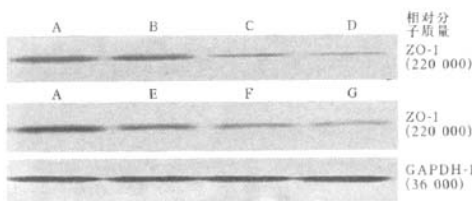
图 2 TNF-α 作用于内皮细胞 12 h 的剂量-效关系

2.3 TNF-α 对单层内皮细胞骨架蛋白 F-actin 分布的影响(彩色插页图 3):空白对照组 F-actin(红色荧光染色)主要分布在细胞周边、胞膜内侧,线条完

整连续,显示出典型的鹅卵石样轮廓,称为外周致密束;细胞间连接紧密、圆滑,未见明显缝隙形成;核周围也有少量分布,形成核骨架。随着 TNF- α 作用浓度的增加,外周致密带边缘变得毛糙不规整,逐渐出现锯齿样断裂,趋于变细崩解消散;10 $\mu\text{g/L}$ 的 TNF- α 作用 12 h 后内皮细胞胞质内出现应力纤维,细胞膜内侧的 F-actin 纤维致密斑减少;作用 24 h 后大部分细胞发生肌动蛋白重组,细胞边缘有纤维状伪足出现,偶有板状伪足形成,细胞间连接有缝隙(gaps)形成;20 $\mu\text{g/L}$ TNF- α 作用 24 h 时细胞边界已不可辨,F-actin 在胞质内弥散分布而核区的染色更致密明显,相邻细胞之间出现大的裂隙。

2.4 TNF- α 对单层内皮细胞 ZO-1 形态学的影响 (彩色插页图 4):空白对照组内皮细胞 ZO-1 存在于细胞周边呈环状(绿色荧光表示),线条清晰连续,边缘光滑流畅,勾勒出内皮细胞典型的铺路石形状,细胞间连接紧密,无明显间隙。随着 TNF- α 作用浓度逐渐增大,10 $\mu\text{g/L}$ TNF- α 作用 12 h 时 ZO-1 环线条逐渐变得模糊,呈断裂状,边缘粗糙有毛刺状突起,细胞间出现了明显的裂隙;作用 24 h 时 ZO-1 环出现明显中断,边缘也变得十分粗糙。20 $\mu\text{g/L}$ 作用 24 h 时 ZO-1 密闭环断开数量明显增多、ZO-1 环数量明显减少。

2.5 TNF- α 对血管内皮细胞 ZO-1 表达的影响 (图 5):Western blotting 结果显示:随着 TNF- α 浓度增大或作用时间延长,与空白对照组比较,ZO-1 的 A 值呈现时间和剂量依赖性逐渐减弱。



A:空白对照组;B~D:5、10 和 20 $\mu\text{g/L}$ 的 TNF- α 作用 24 h;
E~G:10 $\mu\text{g/L}$ 的 TNF- α 作用 6、12、24 h

图 5 Western blotting 检测不同剂量 TNF- α 作用内皮细胞不同时间 ZO-1 的表达

3 讨论

脓毒症是全世界范围内重症监护病房(ICU)的主要疾病,其发病率逐年递增,尽管抗感染措施不断取得进展,且有现代 ICU 的有力支持,但其病死率却居高不下。血管通透性增高是脓毒症的一个标志性事件,是其发生的最初表现和导致其他后续改变的病理基础^[4]。以内皮细胞通透性增高为基础的毛

细血管渗漏,一方面使细胞间隙水肿,增大细胞间隙导致组织和细胞的缺氧;另一方面使炎症细胞因子大量聚集于局部组织,直接造成组织和器官的损伤,严重时导致 MODS 的发生^[5]。TNF- α 是脓毒症早期分泌的主要促炎细胞因子,可引起内毒素休克、多器官功能衰竭(MOF)等严重病理过程外,对血管内皮细胞也有损害作用。除了通过激活白细胞等释放细胞因子间接对内皮发挥作用外,TNF- α 还可通过直接损伤或激活内皮细胞,引起内皮细胞功能发生变化。

血管通透性改变主要取决于内皮细胞屏障功能的改变,即主要取决于内皮细胞骨架肌动蛋白形态学改变引发的细胞收缩性的变化。肌动蛋白是细胞内主要的骨架蛋白,以球状肌动蛋白(G-actin)和 F-actin 两种形式存在于细胞内,二者根据细胞状态相互转化,维持着一种动态平衡。F-actin 以致密外周带和应力纤维等形式存在。F-actin 的重组与细胞旁通路的开放之间存在着结构和功能关系。当内皮细胞受到各种刺激时,F-actin 发生重组和再分布,细胞周边肌动蛋白致密带断裂,细胞中央出现大量平行束状应力纤维,使收缩力超过黏附力,细胞收缩,细胞间隙增大、增多,导致血管通透性升高^[8]。本实验表明,在较高浓度 TNF- α (>10 $\mu\text{g/L}$) 的直接刺激下,不需要其他细胞因子或炎症介质的作用就可以引起内皮细胞骨架蛋白的重组和细胞内的重新分布,具体表现为:肌动蛋白微丝发生重组,可见纤维丝排列紊乱,致密周围束消失,应力纤维形成,有时能见到纤维状伪足和板状伪足,细胞形态也随之改变,导致细胞间缝隙增大、增多,通透性因而升高^[9]。与血管通透性有密切关系的内皮细胞间连接包括紧密连接和黏附连接,其中紧密连接对维持内皮细胞的形态以及屏障功能的完整性起着至关重要的作用^[7]。内皮细胞紧密连接主要由跨膜蛋白(occludin、claudin 等)、膜周边蛋白、胞内及核蛋白组成。ZO-1 是最重要的膜周边蛋白,其功能状态的改变将使血管通透性升高。本实验表明,TNF- α 以时间和剂量依赖的方式引起 ZO-1 的形态结构改变;Western blotting 表明,随着 TNF- α 作用时间的延长或作用浓度的增大,紧密连接蛋白 ZO-1 的表达逐渐减弱,与文献^[10]报道基本一致。

综上所述,本实验表明 TNF- α 呈时间和剂量依赖性地引起内皮细胞通透性增高;TNF- α 主要是通过改变内皮细胞紧密连接结构和细胞骨架 F-actin 的形态分布,而且 ZO-1 还有量的减少,从而使内皮

细胞屏障功能完整性遭到破坏, 内皮细胞通透性显著升高。本实验为临床上干预脓毒症毛细血管渗漏提供了新的理论依据。

参考文献

- [1] 卞建民, 王书奎, 江滨, 等. 多种细胞因子监测对严重感染患者的意义. 中国危重病急救医学, 2002, 14(6): 353-355.
- [2] 李文雄, 陈惠德, 王小文, 等. 脓毒症患者血清 TNF- α 、IL-10 水平、IL-10/TNF- α 比值的变化及其临床意义. 中华普通外科杂志, 2003, 18(4): 229-233.
- [3] 申传安, 柴家科, 姚咏明, 等. 肿瘤坏死因子在烧伤脓毒症大鼠骨骼肌蛋白高分解代谢中的作用及其机制. 中国危重病急救医学, 2002, 14(6): 340-343.
- [4] Bauer PR. Microvascular responses to sepsis: clinical significance. Pathophysiology, 2002, 8(3): 141-148.
- [5] Bannerman DD, Sathyamoorthy M, Goldblum SE. Bacterial lipopolysaccharide disrupts endothelial monolayer integrity and survival signaling events through caspase cleavage of adherens junction proteins. J Biol Chem, 1998, 273(52): 35371-35380.
- [6] Dudek SM, Garcia JG. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. J Appl Physiol, 2001, 91(4): 1487-1500.
- [7] Wang Y, Zhang J, Yi XJ, et al. Activation of ERK1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cells. Exp Eye Res, 2004, 78(1): 125-136.
- [8] Rivero F, Köppel B, Peracino B, et al. The role of the cortical cytoskeleton: F-actin crosslinking proteins protect against osmotic stress, ensure cell size, cell shape and motility, and contribute to phagocytosis and development. J Cell Sci, 1996, 109 (Pt 11): 2679-2691.
- [9] Wright K, Nwariaku F, Halaihel N, et al. Burn-activated neutrophils and tumor necrosis factor- α alter endothelial cell actin cytoskeleton and enhance monolayer permeability. Surgery, 2000, 128(2): 259-265.
- [10] Murphy JT, Duffy S. ZO-1 redistribution and F-actin stress fiber formation in pulmonary endothelial cells after thermal injury. J Trauma, 2003, 54(1): 81-89.

(收稿日期: 2009-02-13)

(本文编辑: 李银平)

• 启事 •

内科临床适宜技术应用交流会暨第十四次全国内科主任诊疗技术高级研修班将举办

内科临床适宜技术应用交流会暨第十四次全国内科主任诊疗技术高级研修班由中国医师协会主办, 中南大学湘雅医院内科协办。订于 2009 年 5 月 9—17 日在湖南省长沙市举办, 学习期满授予国家级 I 类继续教育学分 10 分。

内容: 急性冠脉综合征的正确诊断和治疗; 心绞痛的正确诊断与治疗; 如何选用调脂药; 心律失常的药物治; 慢性心力衰竭的主要进展概述; 高血压药物治疗新趋势; 肺动脉血栓栓塞症诊断与治疗的进展; 呼吸衰竭诊治进展; 支气管哮喘; 糖尿病胰岛素治疗; 糖尿病口服药治疗; 短暂性脑缺血发作; 综合医院对抑郁症的处理; 急性缺血性脑血管病的规范化治疗; 抗感染药物临床应用进展; 反流性食管病新进展; 风湿性疾病的诊治进展; 类风湿关节炎等内容。

教师: 拟邀请长沙中南大学湘雅医院内科杨天伦主任、张赛丹教授、彭道泉教授, 内分泌科雷国湘主任, 神经内科刘运海教授、谷文萍教授, 消化科袁伟建教授、张桂英教授、唐丽安教授, 急诊科邓跃林教授, 呼吸科陈清兰教授、罗百灵教授, 心理咨询中心杨放如教授; 湖南省人民医院郑昭芬教授; 北京阜外心血管病医院袁晋青教授; 北京协和医院唐福林教授等。

学员要求: 心内科、神经科、内科、老年科主任或具有主治医师以上职称者。报名地址: 写清单位、姓名、职务、职称、电话后寄至北京市东城区东四西大街 46 号 中国医师协会事业发展部 曹雪 刘亚杰收, 邮编: 100711; 信封上请注明“内科班”。电话: 010-65286512, 手机: 13391703319, 传真: 010-87835179, Email: cmdapx@sina.com。可电话、短信、传真或邮件索取正式通知。

(中国医师协会)

第十三次全国复苏与中毒学术论文交流会征文通知

为了提高我国复苏与中毒救治水平, 认真总结交流近几年来在这几方面基础与临床的经验和学术研究成果, 经中华医学会批准, 急诊医学分会第十三次全国复苏与中毒学术论文交流会定于 2009 年 6 月在湖北省武汉市召开, 届时有我国复苏、中毒的专家作专题报告介绍这几方面的最新进展, 并聘请相关学科的专家进行专题报告。参会者可获得国家级 I 类继续教育学分 8 分, 为此现展开征文, 内容如下。

征文内容: 心肺复苏的基础和临床研究; 各种中毒(CO、药物、农药、有害气体)的救治基础和临床研究; 猝死、脑死亡、溺水、触电、中暑等理化急诊; 多器官功能不全、心力衰竭、肝、肾、呼吸衰竭救治; 急诊的新技术、新业务及新经验交流; 内、外、妇、儿、皮肤及五官急性疾病的诊断处理及救治原则; 人工气道、呼吸机的应用; 危重病各种监测技术和经验交流; 急危重病救治的新技术、新药物及新方法; 复苏与中毒中的组织管理及救治体会; 复苏、中毒、院前急救、现场救治及转运; 急危重病救治护理经验介绍。

征文要求: 文章请用稿纸书写或打印, 加盖单位公章或介绍信, 来稿一律不退请自留底稿; 文章全文 3 000 字以内, 并附 300~500 字摘要, 同时附电子版。

稿件截止日期: 2009 年 5 月 1 日, 以邮戳为准。

稿件邮寄地址: 北京市朝阳区工人体育场南路 8 号 北京朝阳医院急诊科 邵非收, 邮编: 100020; 电话: 13601332960, Email: yining2000@sina.com。

稿件经审稿会审查录用后将于 2009 年 5 月 31 日前发出参会通知。

(中华医学会急诊医学分会)

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)

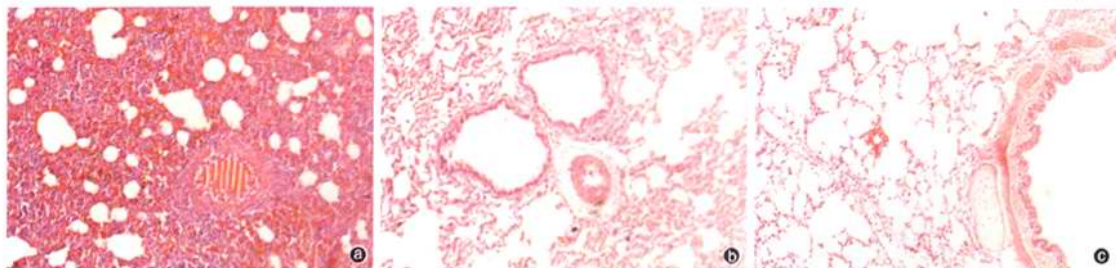


图2 光镜下观察制模后8 h大鼠肺组织病理学变化 模型组(a)肺毛细血管充血,肺泡壁破坏严重,肺泡间隔增厚,有大量炎症细胞浸润,肺间质及肺泡腔内可见渗出液,部分肺泡腔萎陷不张,肺泡腔内透明膜形成,小血管中见微血栓形成 治疗组(b)肺泡结构尚可,少数肺泡间质水肿,肺泡隔毛细血管轻度充血,间质中性粒细胞轻度浸润,组织病理学改变较模型组明显减轻 假手术组(c)呈现正常肺组织形态,结构完整,肺泡腔无渗出液,肺泡间隔无水肿和炎症 HE $\times 100$

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)

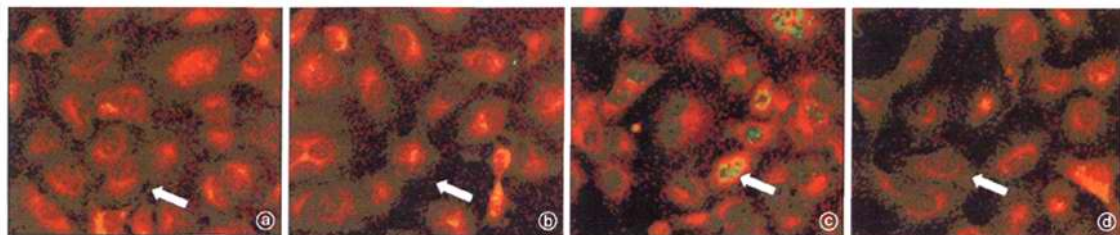


图2 LSCM下观察IL-1 β 和SC-514对p65蛋白核转移的影响 箭头示绿色荧光染色部分为p65蛋白 A549细胞组(a), SC-514组(b)细胞未受刺激时, p65蛋白主要位于胞质内 A549细胞+IL-1 β 组(c)IL-1 β 干预后30 min内激活的p65蛋白由胞质转移至细胞核内 A549细胞+SC-514+IL-1 β 组(d)SC-514抑制了p65蛋白的核转移 免疫荧光染色 $\times 200$

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)

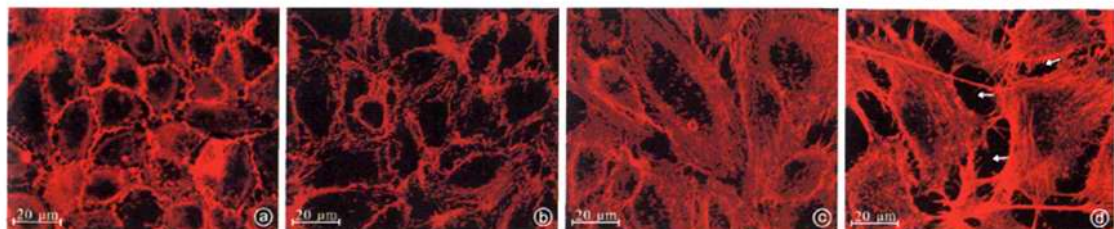


图3 镜下观察TNF- α 对内皮细胞肌动蛋白F-actin的作用 F-actin呈红色黄光染色 空白对照组(a)细胞间连接紧密,圆滑,未见明显缝隙形成 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的TNF- α 作用12 h(b)时细胞边缘粗糙,不规则,纤维致密斑减少 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的TNF- α 作用24 h(c)时胞质内应力纤维明显增多,细胞收缩,变形 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的TNF- α 作用24 h(d)时细胞收缩明显,外周纤维致密斑断裂,细胞间裂隙增大、增多,箭头示细胞间裂隙 免疫荧光染色 $\times 400$

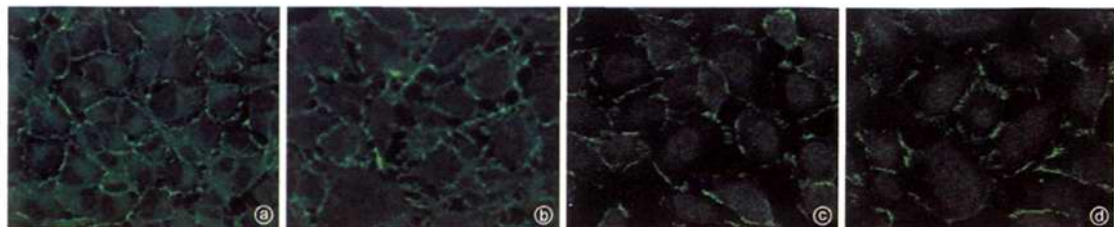


图4 镜下观察TNF- α 对内皮细胞紧密连接蛋白ZO-1的作用 ZO-1呈绿色黄光染色 空白对照组(a)ZO-1呈环状,线条清晰、连续、光滑 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的TNF- α 作用12 h(b)时细胞边缘呈锯齿状,部分ZO-1环打开 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的TNF- α 作用24 h(c)时ZO-1环出现中断、数量减少 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的TNF- α 作用24 h(d)时ZO-1环出现明显中断、数量明显减少 免疫荧光染色 $\times 400$