

· 论著 ·

高糖培养脂多糖刺激下肺脏微血管内皮细胞通透性改变及 DDAH / NOS / NO 失平衡在其发生机制中的作用

刘秀娟 穆恩 梁英健 章志丹 马晓春

【摘要】 目的 探讨高糖对脂多糖(LPS)刺激下血管内皮细胞损伤的影响及其机制。**方法** 将人肺脏微血管内皮细胞(PMVEC)分为正常糖组(NG 组)、正常糖 + LPS 刺激组(NGL 组)、高糖组(HG 组)、高糖 + LPS 刺激组(HGL 组),分别给予含 10%小牛血清的正常糖(5.5 mmol/L)或高糖(33 mmol/L)培养 5 d,加入 10 mg/L LPS 刺激细胞 24 h。采用免疫荧光染色观察细胞纤维肌动蛋白(F-actin)的分布及变化;扫描电镜观察细胞膜窗孔数量及孔径变化;细胞迁移实验(Transwell)测定单层内皮细胞的辣根过氧化物酶(HRP)通透性;硝酸盐还原法(Griess 法)检测细胞培养上清液中一氧化氮(NO)含量;蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)测定细胞二甲基精氨酸-二甲胺水解酶 2(DDAH2)、诱生型一氧化氮合酶(iNOS)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的蛋白表达。**结果** 与 NGL 组比较,HGL 组 PMVEC 的 F-actin 分布排列紊乱,细胞膜窗孔异常增大、增多,细胞单层对 HRP 通透率增加[(53.62 ± 6.70)%比(23.63 ± 3.92)%, $P < 0.01$],细胞 DDAH2 表达(积分 A 值)减少(0.33 ± 0.08 比 0.77 ± 0.14, $P < 0.01$),iNOS 表达(积分 A 值)增加(1.40 ± 0.29 比 1.04 ± 0.09, $P < 0.01$),eNOS 表达(积分 A 值)减少(0.67 ± 0.09 比 0.91 ± 0.17, $P < 0.05$),上清液 NO 含量(μmol/L)增多(20.36 ± 2.25 比 7.99 ± 0.33, $P < 0.01$)。**结论** 高糖加重 LPS 刺激下体外培养 PMVEC 的 F-actin 分布紊乱、单层细胞通透性增加;NO 调节紊乱可能参与了 PMVEC 损害的发生。

【关键词】 高糖; 内毒素; 二甲基精氨酸-二甲胺水解酶 2; 一氧化氮合酶; 内皮细胞通透性

High glucose enhances permeability of human pulmonary microvascular endothelial cells by lipopolysaccharide stimulation in vitro and effect of DDAH/NOS/NO imbalance on its pathogenesis LIU Xiu-juan, MU En, LIANG Ying-jian, ZHANG Zhi-dan, MA Xiao-chun. Department of Critical Care Medicine, First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China
Corresponding author: MA Xiao-chun, Email: xcma2972@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the damage to endothelial cells incubated in high concentration of glucose challenged by lipopolysaccharide (LPS), and the likely mechanisms of injury. **Methods** Human pulmonary microvascular endothelial cells (PMVECs) were divided into the following groups: normal glucose group (NG), normal glucose + LPS stimulation group (NGL), high glucose stimulation group (HG), and high glucose + LPS stimulation group (HGL). The cells were incubated with normal glucose (5.5 mmol/L, contained 10% calf serum) or high glucose (33 mmol/L) for 5 days to form a monolayer of cells before LPS stimulation (10 mg/L) for 24 hours. The microfilaments (F-actin) were investigated by immuno-fluorescence, and the number and size change in fenestrae were examined by scanning electron microscopy. The permeability of vascular endothelial cell was assessed by trans-PMVEC horseradish peroxidase (HRP) flux. Western blotting was used to determine the expressions of dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 (DDAH2), inducible nitricoxide synthase (iNOS) and endothelial nitricoxide synthase (eNOS). Nitric oxide (NO) was assessed by Griess method. **Results** When stimulated with LPS, cells incubated with high glucose showed obvious microfilament rearrangement, a larger average diameter and increased number of F-actin, as well as higher HRP permeability on the hyperglycemic PMVECs compared with PMVECs cultured with normal glucose [(53.62 ± 6.70)% vs. (23.63 ± 3.92)%, $P < 0.01$]. Furthermore, high glucose down-regulated DDAH2 expression (arbitrary units, AU, 0.33 ± 0.08 vs. 0.77 ± 0.14, $P < 0.01$) and up-regulated LPS-stimulated iNOS production (1.40 ± 0.29 vs. 1.04 ± 0.09, $P < 0.01$), as well as increased LPS-stimulated nitrite/nitrate and stable NO end products (μmol/L) compared with normal (20.36 ± 2.25 vs. 7.99 ± 0.33, $P < 0.01$) and reduction of eNOS levels was observed (0.67 ± 0.09 vs. 0.91 ± 0.17, $P < 0.05$). **Conclusion** It demonstrated that, in vitro high glucose deteriorate LPS-stimulated F-actin rearrangement and hyperpermeability of an endothelial monolayer, and the worsened imbalance of the NO pathway may lead to endothelial damage in microcirculation.

【Key words】 High glucose; Endotoxin; Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2; Nitricoxide synthase; Endothelial cell permeability

高血糖在严重感染患者中十分常见,并可以增加病死率。因此,高糖与内毒素作为损伤因子同时发生作用十分常见。内毒素脂多糖(LPS)可通过直接或间接方式损伤内皮细胞引起内皮细胞功能变化,如黏附分子表达、细胞因子释放或屏障功能损伤,高糖也可以通过多种机制参与内皮细胞功能损害。但高糖如何影响 LPS 刺激下的血管内皮细胞损伤目前还不清楚。既往研究表明,高糖可以影响 LPS 引起全身炎症反应时机体的免疫反应状态,可使 LPS 刺激下的单核细胞株 U937 细胞 CD14 表达增加^[1],基质金属蛋白酶(MMP)^[2]、巨噬细胞炎症蛋白-1(MACP-1)^[3]、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)^[4]产生增加,内皮细胞白细胞介素-8(IL-8)^[5]、腹腔巨噬细胞活性氧(ROS)^[6]表达增加。脓毒症时存在内皮细胞的活化和损伤,突出表现为微血管渗透性增加,进而加重器官功能障碍。一氧化氮(NO)是参与血管内皮细胞功能调节的重要介质,机体 NO 生成调节保持动态平衡对血管内皮细胞功能自稳平衡十分重要。NO 调节失平衡是否参与高糖培养对 LPS 引起的血管内皮细胞损伤是本研究的目的。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂:肺脏微血管内皮细胞(PMVEC)购自上海拜力生物技术公司;DMEM 细胞培养液、胰蛋白酶、新生小牛血清均购自美国 Hyclone 公司;大肠杆菌内毒素 LPS(O55:B5)、D-葡萄糖粉均购自美国 Sigma 公司;诱生型一氧化氮合酶(iNOS)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、二甲基精氨酸-二甲胺水解酶 2 (DDAH2) 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司;异硫氰酸荧光素(FITC)标记鬼笔环肽购自德国 Anexin 公司;NO 试剂盒购自南京建成生物技术有限公司。

1.2 PMVEC 分组及培养:将人 PMVEC 分为正常糖组(NG 组)、正常糖 + LPS 刺激组(NGL 组)、高糖组(HG 组)、高糖 + LPS 刺激组(HGL 组)4 组分别培养。在人 PMVEC 中分别加入含 10% 小牛血清的高糖(33 mmol/L)或正常糖(5.5 mmol/L)DMEM 培养基,接种到培养瓶中,37℃、5% CO₂ 孵箱培养,2 d 换液 1 次,培养 5 d 后加入 LPS 刺激细胞。

1.3 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法测定细胞增殖

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.03.006

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20102104110003)

作者单位:110001 辽宁沈阳,中国医科大学附属第一医院重症医学科(刘秀娟现在秦皇岛市第一医院重症医学科工作)

通信作者:马晓春,Email:xcma2972@sina.com

及活性:将人 PMVEC 按 $(1 \sim 2) \times 10^7/L$ 分别培养 5 d 后,用 0.01、0.1、1、10、100 mg/L LPS 分别培养 8、12、24、36 h,每孔加入 0.5% MTT 溶液 20 μ l 继续培养 4 h 终止培养,吸去孔内培养液,每孔加入 150 μ l 二甲基亚砷,置摇床上低速振荡 10 min 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪波长 490 nm 处测量各孔的吸光度(A)值。同时设置调零孔(培养基、MTT、二甲基亚砷)和对照孔(细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、二甲基亚砷)以绘制细胞生长增殖曲线,选出对细胞活性影响最大的刺激时间及浓度进行下一步实验。

1.4 纤维肌动蛋白(F-actin)特异性荧光染色:将人 PMVEC 以 $(1 \sim 2) \times 10^7/L$ 接种于微孔小皿中,培养 2~3 d,待细胞融合后改用无血清培养基继续培养 24 h,使细胞同步生长并处于静止期。根据实验设计和步骤刺激细胞后,用冷磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 2 min $\times$ 3 次,4%多聚甲醛孵育 10 min;再用冷 PBS 漂洗 2 min $\times$ 3 次,0.5%曲通-100 孵育 5 min;最后冷 PBS 漂洗 2 min $\times$ 3 次。用 5 kU/L FITC 标记的鬼笔环肽染色,荧光显微镜下观察照相采图。

1.5 细胞膜改变:将 4 组细胞分别爬片接种于载玻片上,经过戊二醛固定—PBS 漂洗—钨酸浸泡—PBS 漂洗—叔丁醇梯度脱水—冷冻干燥等过程后,金属金离子镀膜,扫描电镜下观察。

1.6 建立微血管内皮细胞屏障并测定单层细胞对辣根过氧化物酶(HRP)的通透性:采用细胞迁移实验,将 4 组细胞接种至 Transwell 板中,上层加入 100 μ l 培养液,下层加入 600 μ l 培养液,测定跨内皮细胞电阻(TEER),当 TEER 升高大于 $100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 细胞铺满单层,进行后续实验。

4 组细胞分别刺激及培养形成单层,上池加入 HRP,37℃孵育 1 h 后收集基底池液体,测定 HRP 通透率(基底池 HRP 浓度/最初加入的 HRP 浓度 $\times 100\%$)。

1.7 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组内皮细胞 DDAH2、iNOS、eNOS 蛋白表达:提取蛋白,用 Folin-酚试剂法进行蛋白定量。以每孔 80 μ g 上样,加入 12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转印至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉吐温 20-Tris(T-TBS)缓冲液封闭膜封闭,依次加入一抗(1:400)、二抗(HRP 标记羊抗兔 IgG,1:400)室温下孵育,T-TBS 洗 3 次,碱性磷酸酶显色 15~30 min,GDS 800 凝胶自动成像仪扫描成像,V 2.03 分析软件测定积分 A 值。

1.8 NO 测定:采用硝酸盐还原法(Griess 法)测定 NO,操作按试剂盒说明书的要求和步骤进行。

1.9 统计学分析:采用 SPSS 14.0 统计软件处理,实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较用单因素方差分析,随后采用 LSD 法进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS 刺激的最佳浓度和时间选择:细胞增殖曲线的浓度效应图显示,低浓度 LPS 刺激细胞活性,高浓度 LPS 抑制细胞活性,10 mg/L 时有明显的抑制作用;时间效应图显示,早期有轻度刺激细胞活性,24 h 后显示出细胞活性受到明显的抑制。因此选取 10 mg/L LPS 进行 24 h 培养。

2.2 各组细胞中 F-actin 表达(图 1):NG 组 F-actin 在细胞内分布均匀一致;HG 组 F-actin 在细胞内轻度聚集;NGL 组 LPS 刺激后细胞间隙增大,F-actin 纤维集束明显、部分断裂;HGL 组 LPS 刺激后细胞间隙增大明显,F-actin 纤维集束、断裂明显。

2.3 扫描电镜细胞膜窗孔情况(图 2):NG 组细胞膜未见窗孔形成;HG 组细胞可见窗孔,细胞膜表面粗糙;NGL 组 LPS 刺激后细胞窗孔直径增大明显,数目增多,部分融合形成较大漏孔;HGL 组 LPS 刺

激后细胞间隙增大明显,窗孔进一步增多且直径增大明显,融合形成较大漏孔弥漫分布。

2.4 单层细胞 HRP 通透率(表 1):单纯高糖培养可能加重单层细胞对 HRP 的通透率($P < 0.01$);LPS 刺激正常糖及高糖细胞均可使通透率增加,后者较前者更明显(均 $P < 0.01$)。

表 1 各组人肺脏微血管内皮细胞 HRP 通透率和细胞上清液中 NO 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	HRP 通透率(%)	上清液 NO 含量($\mu\text{mol/L}$)
NG 组	$10.37 \pm 1.29(8)$	$0.54 \pm 0.12(6)$
NGL 组	$23.63 \pm 3.92(8)^a$	$7.99 \pm 0.33(6)^a$
HG 组	$16.94 \pm 1.62(8)^a$	$2.91 \pm 0.30(6)^b$
HGL 组	$53.62 \pm 6.70(8)^{acd}$	$20.36 \pm 2.25(6)^{acd}$

注:HRP:辣根过氧化物酶,NO:一氧化氮,NG 组:正常糖组,NGL 组:正常糖 + 脂多糖(LPS)刺激组,HG 组:高糖组,HGL 组:高糖 + LPS 刺激组;与 NG 组比较, $^aP < 0.01$, $^bP < 0.05$;与 HG 组比较, $^cP < 0.01$;与 NGL 组比较, $^dP < 0.01$;括号内为样本数

2.5 细胞上清液中 NO 含量(表 1):HG 组细胞上清液中 NO 含量较 NG 组明显增加($P < 0.05$);LPS 刺激正常糖组及高糖组均可使细胞上清液中 NO 含量增加,后者增高程度高于前者(均 $P < 0.01$)。

2.6 细胞 DDAH2、iNOS、eNOS 蛋白表达(图 3 ~ 4):

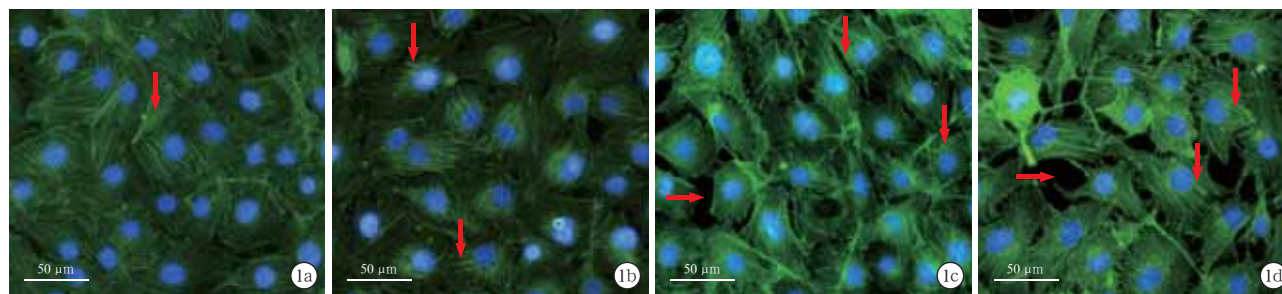


图 1 荧光显微镜下观察各组人肺脏微血管内皮细胞(PMVEC)纤维肌动蛋白(F-actin)的表达 正常糖组(a)F-actin 分布均匀(垂直箭头所示),外周带致密、连续;高糖组(b)F-actin 部分聚集(垂直箭头所示);正常糖 + 脂多糖(LPS)刺激组(c)刺激 24 h 后细胞间隙增大(水平箭头所示),F-actin 纤维集束、部分断裂(垂直箭头所示);高糖 + LPS 刺激组(d)刺激 24 h 后细胞间隙增大明显(水平箭头所示),细胞形态改变明显,F-actin 纤维集束、断裂明显(垂直箭头所示) 免疫荧光染色 低倍放大

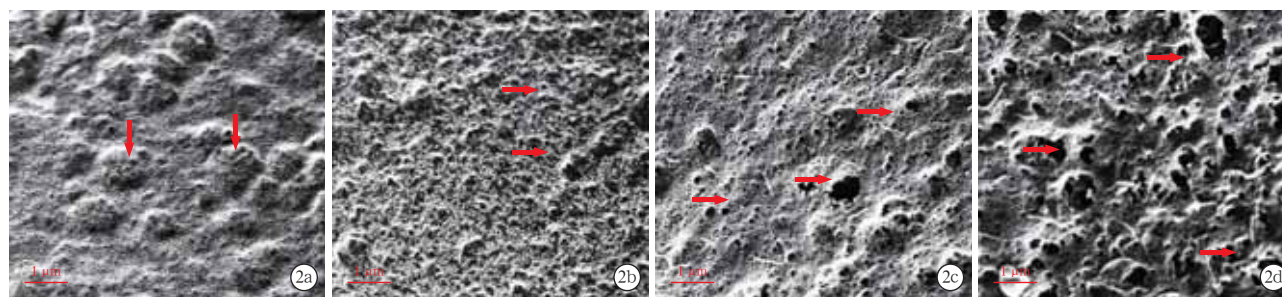
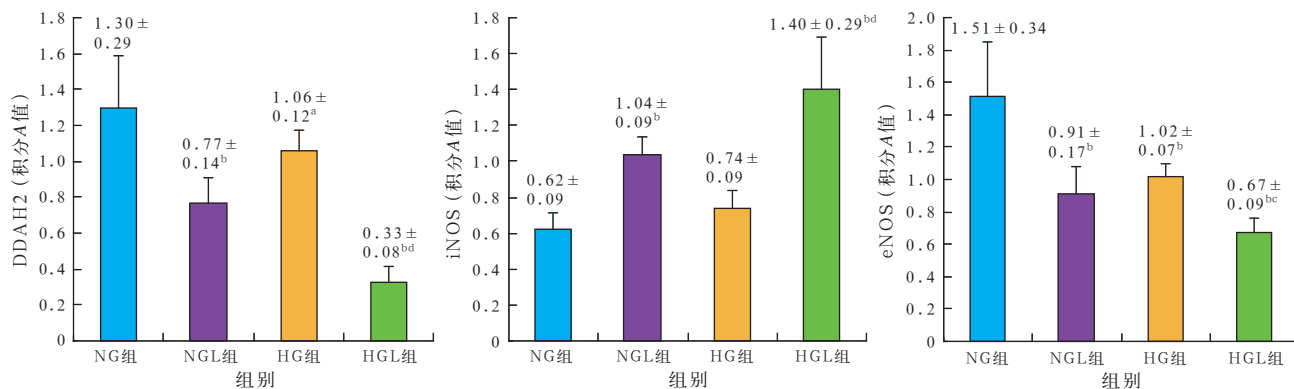


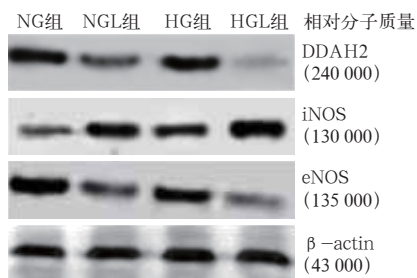
图 2 扫描电镜下观察各组人肺脏微血管内皮细胞(PMVEC)的细胞膜窗孔情况 正常糖组(a)细胞膜未见窗孔形成,但可见小凹样结构(垂直箭头所示);高糖组(b)细胞膜窗孔直径增大(水平箭头所示),细胞膜表面粗糙;正常糖 + 脂多糖(LPS)刺激组(c)刺激 24 h 后细胞膜窗孔直径增大明显,数目增多,部分融合形成较大漏孔(水平箭头所示);高糖 + LPS 刺激组(d)刺激 24 h 后细胞膜窗孔直径增大明显,融合形成较大漏孔弥漫分布(水平箭头所示) 高倍放大



注:DDAH2:二甲基精氨酸-二甲胺水解酶 2,iNOS:诱导型一氧化氮合酶,eNOS:内皮型一氧化氮合酶,NG 组:正常糖组,NGL 组:正常糖+脂多糖(LPS)刺激组,HG 组:高糖组,HGL 组:高糖+LPS 刺激组;与 NG 组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与 NGL 组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$

图 3 各组人肺脏微血管内皮细胞 DDAH2、iNOS、eNOS 蛋白表达

单纯 LPS 及高糖刺激均可使 DDAH2 的表达减少 ($P<0.01$ 和 $P<0.05$);高糖培养后,LPS 刺激可使 DDAH2 表达更为减少(均 $P<0.01$)。二者单纯刺激均可使 iNOS 表达增加,共同刺激可使 iNOS 表达进一步增加(均 $P<0.01$)。二者单纯刺激均可使 eNOS 的表达减少,共同刺激可使 eNOS 表达更为减少 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。



DDAH2:二甲基精氨酸-二甲胺水解酶 2,iNOS:诱导型一氧化氮合酶,eNOS:内皮型一氧化氮合酶,β-actin:β-肌动蛋白,NG 组:正常糖组,NGL 组:正常糖+脂多糖(LPS)刺激组,HG 组:高糖组,HGL 组:高糖+LPS 刺激组

图 4 蛋白质免疫印迹试验检测人肺脏微血管内皮细胞 DDAH2、iNOS、eNOS 的蛋白表达

3 讨论

一般认为,急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(ALI/ARDS)发生的病理生理基础为内皮细胞活化和损伤,突出表现为微血管通透性增加。影响微血管内皮细胞通透性增加有 3 种方式,即细胞间的紧密连接;内皮异常增加改变的细胞窗孔;有特殊受体介导的转运机制^[7]。对于细胞间紧密连接机制,普遍认为与内皮细胞的 F-actin 重排有关^[8]。细菌内毒素及炎症介质等可通过信号转导或直接作用于肌动蛋白,通过肌动蛋白的解聚和聚合的转换导致肌动蛋白纤维的断裂及其再分布,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^[9-12]。对于有特殊受体介导的转运机制,炎症因子与其受体结合后能激发细胞内多个信号转导的级联反应,最终引起内皮细胞收缩和细胞间黏附作用减弱,从而导致内皮细胞通透性增加^[13]。本研究中通过 FITC 标记的鬼笔环肽特异性免疫荧光染色及扫描电镜下直观地反映出,将 PMVEC 在 LPS 刺激下的高糖环境中培养,F-actin 在内皮细胞内重排较正常糖培养更加明显,发生应力纤维形成、集束现象。

内皮细胞窗孔在正常情况下仅允许水及小分子物质通过,而在毒素等刺激下可以出现窗孔数目及直径增加,从而可以通过大分子物质使通透性增加;细胞膜窗孔直径增大,相邻间出现融合数目增多。LPS 刺激下高糖培养可使细胞膜窗孔融合明显,数量进一步增多。HRP 是测定血管内皮通透性的代表性大分子物质,本研究显示,高糖培养会使 LPS 引起的内皮细胞单层对 HRP 通透性增加近 2.3 倍。以上研究表明高糖加重了内毒素引起的内皮细胞通透性增加的损害作用,但对于发生机制目前不明。

NO 是参与血管功能的重要介质。以往研究证明,在危重症患者中内皮细胞产生的 NO 参与其发病机制及器官功能损害作用^[14]。神经型一氧化氮合酶(nNOS)和 iNOS 在生理情况下恒定少量表达,作为信号分子、神经递质调节线粒体功能及宿主防御反应,维持血管稳态,包括减少白细胞黏附、抑制血小板激活、使平滑肌舒张、保持黏膜严密性。而在免疫激活时 iNOS 大量表达,一方面通过与线粒体作用使能量产生减少、ROS 产生增多;另一方面使血管通透性增加^[15-16]。本研究发现,在 LPS 刺激下细胞 eNOS 表达减少,33 mmol/L 的高糖可以使 eNOS 表

达较正常糖更为减少。eNOS 活性受非对称性二甲基精氨酸(ADMA)内源性 NOS 抑制剂的抑制,DDAH2 是其水解酶,也是决定 ADMA 含量的关键酶。高糖培养的内皮细胞在 LPS 刺激下 DDAH2 含量减低,因此 eNOS 表达减少。已有研究证实,DDAH/ADMA 通过 Rac1 信号通路调节肺脏内皮细胞屏障的紧密连接^[17],具体机制可能为:①ADMA 使 eNOS 脱耦联,一方面使 eNOS 产生的 NO 减少,另一方面使 ROS 氧自由基及氮自由基(RNS)产生增多,其产物硝磺脂参与肺脏损害的发生^[18-19]。

本研究显示,LPS 刺激内皮细胞上清液中反映 NO 水平的亚硝酸盐含量升高,iNOS 表达升高;高糖培养可加重这一变化。高表达 iNOS 产生的 NO 参与血管内皮细胞功能不全^[20],表现为三方面:①iNOS 与 eNOS 竞争四氢生物喋呤(BH4)一氧化氮合成的底物。②iNOS 可引起硝磺脂酯升高,使 DDAH2 活性降低,因此,ADMA 水平升高对 eNOS 产生抑制。③iNOS 与高尔基体的距离较 eNOS 更近,故 iNOS 效率高。研究证实,ADMA 对 NOS 抑制的效率存在差别,eNOS 在数秒至数分钟内即可发生皮克到纳克水平的变化,而 iNOS 则需在数小时至数天内仅发生纳克到毫克水平的变化,可见 ADMA 对 NOS 的抑制效率 eNOS 高于 iNOS^[21],因此,总体表现为 LPS 刺激下 iNOS 表达及 NO 水平升高,eNOS 及 DDAH2 表达减少;高糖培养可加重该变化。

综上所述,高糖可使 LPS 刺激下微血管内皮细胞 F-actin 重排及细胞单层窗孔增大,对大分子物质通透性增加,NO 在精细调节系统作用下保持动态平衡^[22];LPS 等可引起该调节系统变化,进而使机体 NO 在不同时相、各系统器官细胞分布部位表达变化;高糖对 LPS 引起的该系统失衡损害加重,内皮细胞功能损害更为严重,表现为细胞骨架肌动蛋白重排,使细胞间连接结构破坏,以及细胞窗孔直径及数量的异常增加,最终表现为微血管内皮细胞单层通透性增加,参与急性炎症反应条件下高血糖损害的发生。对 NO 系统进行调节干预有可能减轻该损害的发生。

参考文献

- [1] Nareika A, Im Y B, Game BA, et al. High glucose enhances lipopolysaccharide-stimulated CD14 expression in U937 mononuclear cells by increasing nuclear factor kappaB and AP-1 activities. *J Endocrinol*, 2008, 196:45-55.
- [2] Maldonado A, He L, Game BA, et al. Pre-exposure to high glucose augments lipopolysaccharide-stimulated matrix metalloproteinase-1 expression by human U937 histiocytes. *J Periodontol Res*, 2004, 39:415-423.
- [3] Nareika A, Maldonado A, He L, et al. High glucose-boosted

- inflammatory responses to lipopolysaccharide are suppressed by statin. *J Periodontol Res*, 2007, 42:31-38.
- [4] Sherry CL, O'Connor JC, Kramer JM, et al. Augmented lipopolysaccharide-induced TNF- α production by peritoneal macrophages in type 2 diabetic mice is dependent on elevated glucose and requires p38 MAPK. *J Immunol*, 2007, 178:663-670.
- [5] Noda A, Kinoshita K, Sakurai A, et al. Hyperglycemia and lipopolysaccharide decrease depression effect of interleukin 8 production by hypothermia: an experimental study with endothelial cells. *Intensive Care Med*, 2008, 34:109-115.
- [6] de Souza LF, Barreto F, da Silva EG, et al. Regulation of LPS stimulated ROS production in peritoneal macrophages from alloxan-induced diabetic rats: involvement of high glucose and PPARgamma. *Life Sci*, 2007, 81:153-159.
- [7] Vu DM, Yokoyama TA, Sawada K, et al. Enhancement of permeability in endothelial cells for the development of an antithrombogenic bioartificial hemofilter. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 101: 634-641.
- [8] 毛怡然, 肇冬梅, 马晓春. 肝素对脂多糖诱导内皮细胞通透性增高的保护作用. *中国危重病急救医学*, 2012, 24:278-282.
- [9] Hirase T, Staddon JM, Saitou M, et al. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci*, 1997, 110:1603-1613.
- [10] Yuan SY. Signal transduction pathways in enhanced microvascular permeability. *Microcirculation*, 2000, 7:395-403.
- [11] Kevil CG, Oshima T, Alexander JS. The role of p38 MAP kinase in hydrogen peroxide mediated endothelial solute permeability. *Endothelium*, 2001, 8:107-116.
- [12] 郑运江, 汤耀卿, 刘伟, 等. 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. *中国危重病急救医学*, 2009, 21:160-163.
- [13] 章志丹, 马晓春. 脓毒症血管内皮细胞损伤与微循环功能障碍. *中国危重病急救医学*, 2011, 23:125-128.
- [14] Bojunga J, Dresar-Mayert B, Usadel KH, et al. Antioxidative treatment reverses imbalances of nitric oxide synthase isoform expression and attenuates tissue-cGMP activation in diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 316: 771-780.
- [15] Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7:803-815.
- [16] Baumgarten G, Knuefermann P, Schuhmacher G, et al. Toll-like receptor 4, nitric oxide, and myocardial depression in endotoxemia. *Shock*, 2006, 25:43-49.
- [17] Wojciak-Stothard B, Torondel B, Zhao L, et al. Modulation of Rac1 activity by ADMA / DDAH regulates pulmonary endothelial barrier function. *Mol Biol Cell*, 2009, 20:33-42.
- [18] Sud N, Wells SM, Sharma S, et al. Asymmetric dimethylarginine inhibits HSP90 activity in pulmonary arterial endothelial cells: role of mitochondrial dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 294: C1407-1418.
- [19] Sharma S, Smith A, Kumar S, et al. Mechanisms of nitric oxide synthase uncoupling in endotoxin-induced acute lung injury: role of asymmetric dimethylarginine. *Vascul Pharmacol*, 2010, 52: 182-190.
- [20] Shelkovnikov S, Gonick HC. Peroxynitrite but not nitric oxide donors destroys epinephrine: HPLC measurement and rat aorta contractility. *Life Sci*, 2004, 75:2765-2773.
- [21] Ulker S, Cinar MG, Can C, et al. Endotoxin-induced vascular hyporesponsiveness in rat aorta: in vitro effect of aminoguanidine. *Pharmacol Res*, 2001, 44: 22-27.
- [22] Wang QH, Liu YJ, Liu J, et al. Plasmodium yoelii: assessment of production and role of nitric oxide during the early stages of infection in susceptible and resistant mice. *Exp Parasitol*, 2009, 121:268-273.

(收稿日期:2012-07-11)

(本文编辑:李银平)