

## ·综述·

## 内皮细胞间黏附连接调节机制的研究进展

黄焰霞 刘艾然 杨毅

血管内皮在维持血管正常的结构和功能中起着重要作用。当机体因各种因素产生炎症反应时,血管内皮均会有相应的损伤改变,导致血管内皮细胞通透性增加,血管通透性的改变与患者的病死率密切相关<sup>[1-2]</sup>。血管内皮细胞间的连接结构有紧密连接、黏附连接、缝隙连接等,其中黏附连接与血管内皮通透性密切相关,黏附连接结构的损伤会导致细胞间隙增大,通透性增加,引起组织水肿。因此,了解黏附连接结构破坏及稳定的机制对于调节内皮细胞通透性、降低病死率具有重要意义。

## 1 血管内皮细胞间黏附连接结构

黏附连接结构是血管内皮细胞间的重要连接结构之一,是由血管内皮钙黏蛋白(VE-钙黏蛋白)、p120-连环蛋白、 $\beta$ -连环蛋白与 $\gamma$ -连环蛋白、 $\alpha$ -连环蛋白形成的复合体。内皮细胞侧膜上 VE-钙黏蛋白的胞外部分通过聚集反应而相互连接,使得相邻血管内皮细胞紧密连接在一起,形成黏附连接结构,维持血管内皮细胞半透膜的屏障功能,控制液体、大分子物质及血细胞的跨膜运动<sup>[3-5]</sup>。黏附连接结构的各组成成分之间可相互作用、相互影响,在维持血管通透性中起着重要作用。

**1.1 VE-钙黏蛋白:**VE-钙黏蛋白是血管内皮细胞间黏附连接的胞外黏附结构的组成成分,属于钙黏蛋白大家族中的一员。钙黏蛋白是钙依赖性糖蛋白,已知的钙黏蛋白包括表皮钙黏蛋白(E-钙黏蛋白)、神经钙黏蛋白(N-钙黏蛋白)、胎盘钙黏蛋白(P-钙黏蛋白)、视网膜钙黏蛋白(R-钙黏蛋白)、VE-钙黏蛋白,VE-钙黏蛋白仅能特异性地在内皮细胞上表达。VE-钙黏蛋白分成3段,分别是胞外段、跨膜段和胞质段,其中胞外段通过聚集作用相互连接<sup>[4]</sup>,形成内皮细胞间的黏附连接结构,在血管内皮的完整性和通透性中起到重要作用。有研究证实,VE-钙黏蛋白封闭抗体可使体外培养细胞的通透性降低作用减弱<sup>[6]</sup>。Gotsch等<sup>[1]</sup>发现,VE-钙黏蛋白单克隆抗体可使细胞间的聚集作用明显减少,小鼠血管通透性增加。可见,VE-钙黏蛋白是黏附连接结构中决定通透性的重要物质。

**1.2 连环蛋白:**连环蛋白是黏附连接胞内结构的主要组成物质。连环蛋白家族在钙黏蛋白介导的细胞内信号转导与细胞黏附过程中起重要作用。连环蛋白是一组具有相似结构的细胞内糖蛋白家族,分为 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -和p120-连环蛋白四大

类。在细胞内,它们与钙黏蛋白胞内肽段结合形成复合体。 $\beta$ -、 $\gamma$ -连环蛋白可直接与钙黏蛋白结合,但这两种连环蛋白不能同时与钙黏蛋白结合,而呈现互斥结合方式。 $\gamma$ -连环蛋白仅在细胞融合紧密时才会参与细胞间黏附连接结构形成,而 $\beta$ -连环蛋白在细胞稀少或者细胞间融合较松的时候参与黏附连接结构形成<sup>[7]</sup>。它们均能与 $\alpha$ -连环蛋白连接,共同组成复合体,以维持细胞正常的黏附功能。然而,这一复合体的稳定离不开p120-连环蛋白的作用。

p120-连环蛋白可直接与钙黏蛋白胞内段结合,以增强复合体的稳定性。p120-连环蛋白是最迟被鉴定为连环蛋白家族的成员,在p120-连环蛋白下调时,细胞失去细胞间黏附连接,在恢复p120-连环蛋白时,细胞间的黏附连接结构也可以得到恢复<sup>[8]</sup>。当VE-钙黏蛋白从黏附连接结构分离出来后,可继续保留在细胞膜上,亦可通过胞吞作用进入细胞质。当p120-连环蛋白与VE-钙黏蛋白结合时可以阻止这种胞吞作用,使VE-钙黏蛋白保留在细胞膜上;此时即使细胞形态发生改变,但VE-钙黏蛋白仍能保留在细胞膜上<sup>[9]</sup>,可为下一次细胞间黏附连接结构形成做好准备。可见,p120-连环蛋白在维持黏附连接结构的稳定中起着重要作用。

## 2 破坏黏附连接结构的机制

黏附连接结构只有在结构和功能正常的情况下才能发挥其维持血管通透性的作用,在某些情况下其结构会遭到破坏。黏附连接结构的破坏多由炎症因子刺激,激活一系列信号转导通路或者直接使黏附连接结构磷酸化,黏附连接结构破坏,最终导致细胞骨架收缩,细胞间隙增大。

首先,炎症介质可激活调节黏附连接结构的信号转导通路。各种刺激可启动体内免疫系统,调动体内各类炎性细胞,分泌多种炎症介质,作用于内皮细胞表面相应受体,激活以下两条信号转导通路<sup>[10-11]</sup>:①上调激活蛋白激酶C $\alpha$ (PKC $\alpha$ )介导的鸟嘌呤核苷酸解离抑制因子-1(GDI-1)和115-Rho鸟嘌呤核苷酸交换因子(115-RhoGEF)磷酸化,活化小G蛋白(RhoA),从而激活下游的效应器Rho激酶(ROCK)。ROCK可阻止磷酸化的肌球蛋白轻链(MLC-P)向非磷酸化肌球蛋白轻链(MLC)转化。②通过增加胞内Ca<sup>2+</sup>浓度可直接激活肌球蛋白轻链激酶(MLCK),活化的MLCK可使MLC向MLC-P转化。这两条信号转导通路最终导致MLC-P增加。

VE-钙黏蛋白、p120-连环蛋白、 $\beta$ -连环蛋白的酪氨酸磷酸化是导致其复合体发生解离的另一个重要途径。Lampugnani等<sup>[12]</sup>发现,在新近融合的较松散细胞中酪氨酸磷酸化非常明显,而在融合紧密的细胞中酪氨酸磷酸化显著减少。同样Aono等<sup>[13]</sup>的研究证实,恢复钙黏蛋白聚集作用可使p120-连环蛋白的磷酸化残端发生脱磷酸化,提示VE-钙黏蛋白、p120-连环蛋白、 $\beta$ -连环蛋白酪氨酸磷酸化可能会导

DOI: 10.3760/cma. j. issn.2095-4352. 2013. 03.023

基金项目:国家临床重点专科建设项目(2100299);2012年度卫生公益行业科研专项(201202011);江苏省“科教兴卫工程”医学重点学科项目[KJXW11(3)]

作者单位:210009 江苏南京,东南大学附属中大医院重症医学科  
通信作者:杨毅,Email: yiyiyang2004@yahoo.com.cn

致其复合体发生解离,使VE-钙黏蛋白胞外段的聚集作用受影响,细胞间黏附连接结构破坏,内皮细胞通透性增加。可见,黏附连接结构的磷酸化是导致其解离的重要原因。

磷酸化蛋白引起细胞骨架收缩是破坏黏附连接结构的关键步骤。MLC-P 可致肌动蛋白介导的内皮细胞收缩<sup>[10-11]</sup>,破坏内皮细胞间的黏附连接结构。当钙黏蛋白和连环蛋白发生磷酸化后,钙黏蛋白及连环蛋白与肌动蛋白发生解离,此时不但细胞间连接结构瓦解,同时,肌动蛋白及肌球蛋白收缩,产生向心力,导致内皮细胞收缩,内皮细胞间形成空隙,血液中的大分子物质可穿过细胞间隙进入第三间隙,导致组织水肿<sup>[10]</sup>。VE-钙黏蛋白的内化是破坏黏附连接结构的另一项机制。VE-钙黏蛋白是黏附连接结构中重要的黏附分子<sup>[4]</sup>,当 p120-连环蛋白从 VE-钙黏蛋白上解离后,VE-钙黏蛋白胞内段结构域暴露,在有内毒素的条件下,VE-钙黏蛋白快速有效地发生内化<sup>[14]</sup>,最终使内皮细胞间黏附连接结构破坏。Xiao 等<sup>[14]</sup>的研究表明,阻断该通路的任何环节均可阻断 VE-钙黏蛋白内化作用,使得 VE-钙黏蛋白保留在内皮细胞的细胞膜上,以维持黏附结构的稳定。而血管内皮生长因子(VEGF)则可以通过增加 VE-钙黏蛋白内化而明显增加血管内皮通透性<sup>[15]</sup>。可见 VE-钙黏蛋白的内化也是黏附连接结构破坏、增加内皮通透性的重要机制。

### 3 稳定黏附连接结构的机制

机体在炎症介质的作用下,黏附连接结构遭到破坏,细胞间隙增大,引起组织水肿。与此同时,机体亦存在自我保护机制,通过逆转黏附连接结构的破坏,或者稳定黏附连接结构,减轻炎症介质对黏附连接结构的影响。

**3.1 VE-钙黏蛋白增加可稳定黏附连接结构:**VE-钙黏蛋白表达增加可增加黏附连接结构。有研究表明,VEGF 会导致 VE-钙黏蛋白表达减少,强力霉素通过抑制 VEGF 的作用使得 VE-钙黏蛋白表达增加,内皮细胞间连接的 VE-钙黏蛋白增加,从而明显降低通透性<sup>[16]</sup>。可见 VE-钙黏蛋白表达增加是增加黏附连接结构的重要途径。

VE-钙黏蛋白内化通路的抑制可稳定黏附连接结构。Xiao 等<sup>[14]</sup>证实,在 K<sup>+</sup>耗竭或胞质酸化的条件下,通过阻断内毒素介导的内化作用可使内皮细胞膜上的 VE-钙黏蛋白明显增加。强力霉素同样可以通过抑制 VEGF 导致的 VE-钙黏蛋白内化,使得 VE-钙黏蛋白保留在细胞膜上。可见,VE-钙黏蛋白内化作用的抑制可以增加内皮细胞膜上 VE-钙黏蛋白,进而稳定黏附连接结构。

**3.2 神经迁移因子 2/跨膜受体蛋白 4 (Slit2/Robo4) 抑制 p120-连环蛋白与 VE-钙黏蛋白的分离:**Slit 蛋白最初是在研究神经系统发育、轴突伸展、神经元迁移等过程中发现的,Slit 是一种分子质量很大的细胞外分泌糖蛋白,相对分子质量为 170 000 ~ 190 000,Slit 家族有 Slit1、Slit2、Slit3 3 个亚型。Slit1 主要在中枢神经系统表达;Slit2 分布于内皮细胞;Slit3 在线粒体中,主要分布于肺组织。

受体 Roundabout 蛋白简称 Robo,它是一种跨膜蛋白,Robo 分子有 Robo1、Robo2、Robo3、Robo4 4 个亚型。Robo1 和 Robo2 能在多种器官和组织中表达,但在神经系统中表达最

多;Robo3 只在中枢神经系统中有较强的表达,而 Robo4 只在内皮细胞中特异性表达<sup>[17]</sup>。

Slit2/Robo4 可使黏附连接结构更稳定。Slit2 与其受体 Robo4 结合后,可抑制 p120-连环蛋白与 VE-钙黏蛋白的分离,从而使 VE-钙黏蛋白不能通过胞吞作用进入细胞质中,而是保留在细胞膜上,防止因 p120-连环蛋白的解离导致血管内皮细胞 VE-钙黏蛋白发生胞吞作用,破坏内皮细胞间的黏附连接结构所导致的血管通透性增加<sup>[18]</sup>。

**3.3 RhoA 途径抑制剂可直接阻止蛋白磷酸化:**RhoA 途径抑制剂可通过抑制蛋白磷酸化阻止黏附连接的解离。炎症反应时,炎症介质对内皮细胞通透性产生影响,其中一个重要的途径就是 RhoA 途径,炎症反应启动这条信号通路时,首先由 PKC $\alpha$  激活 RhoA,RhoA 作用于效应器 ROCK,ROCK 可阻止 MLC-P 去磷酸化作用,以维持 MLC-P 的量,使内皮细胞收缩<sup>[11]</sup>。阻断这条通路的任何环节都可导致 ROCK 减少,使得阻断 MLC-P 的脱磷酸化作用减弱,MLC-P 减少,从而保护血管内皮通透性。有研究证实,ROCK 抑制剂法舒地尔可有效减轻脓毒症模型小鼠肺水肿<sup>[19]</sup>;强力霉素同样可以通过抑制 VE-钙黏蛋白磷酸化,降低内皮细胞通透性<sup>[16]</sup>。因此,RhoA 抑制剂能够抑制黏附连接结构的解离,改善血管通透性。

综上所述,黏附连接结构是血管内皮细胞间的重要连接结构之一。当机体受到各种打击产生炎症介质时,通过一系列信号转导、黏附连接结构各组成成分磷酸化、细胞骨架收缩、VE-钙黏蛋白内化,导致血管通透性增加。VE-钙黏蛋白表达增加、内化作用的抑制,Slit2 与其受体 Robo4、RhoA 途径抑制剂能够通过不同作用机制阻断炎症反应导致的血管内皮细胞间黏附连接结构破坏,发挥内皮细胞通透性保护功能,维持细胞间的黏附连接结构和血管内皮通透性。但目前尚缺乏黏附连接结构稳定的临床证据,亟待进一步研究。

### 参考文献

- [1] Gotsch U, Borges E, Bosse R, et al. VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci*, 1997, 110: 583-588.
- [2] Xu H, Ye X, Steinberg H, et al. Selective blockade of endothelial NF- $\kappa$ B pathway differentially affects systemic inflammation and multiple organ dysfunction and injury in septic mice. *J Pathol*, 2010, 220: 490-498.
- [3] Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci*, 2008, 121: 2115-2122.
- [4] Vestweber D. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28: 223-232.
- [5] 王丽杰,孙梅.血小板活化因子受体拮抗剂对内毒素血症幼年大鼠肠黏膜上皮细胞间连接蛋白的影响. *中国危重病急救医学*, 2007, 19: 477-480.
- [6] Hordijk PL, Anthony E, Mul FP, et al. Vascular-endothelial-cadherin modulates endothelial monolayer permeability. *J Cell Sci*, 1999, 112: 1915-1923.
- [7] Lampugnani MG, Corada M, Caveda L, et al. The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J Cell Biol*, 1995, 129: 203-217.
- [8] Ireton RC, Davis MA, van Hengel J, et al. A novel role for

- p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol*, 2002, 159: 465-476.
- [9] Sakamoto N, Segawa K, Kanzaki M, et al. Role of p120-catenin in the morphological changes of endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398: 426-432.
- [10] Vandembroucke E, Mehta D, Minshall R, et al. Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1123: 134-145.
- [11] Yoshioka K, Sugimoto N, Takuwa N, et al. Essential role for class II phosphoinositide 3-kinase alpha-isoform in  $Ca^{2+}$ -induced, Rho- and Rho kinase-dependent regulation of myosin phosphatase and contraction in isolated vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, 2007, 71: 912-920.
- [12] Lampugnani MG, Corada M, Andriopoulou P, et al. Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells. *J Cell Sci*, 1997, 110: 2065-2077.
- [13] Aono S, Nakagawa S, Reynolds AB, et al. p120 (ctn) acts as an inhibitory regulator of cadherin function in colon carcinoma cells. *J Cell Biol*, 1999, 145: 551-562.
- [14] Xiao K, Garner J, Buckley KM, et al. p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Mol Biol Cell*, 2005, 16: 5141-5151.
- [15] Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol*, 2006, 8: 1223-1234.
- [16] Fainaru O, Adini I, Benny O, et al. Doxycycline induces membrane expression of VE-cadherin on endothelial cells and prevents vascular hyperpermeability. *FASEB J*, 2008, 22: 3728-3735.
- [17] Andrews WD, Barber M, Parnavelas JG. Slit-Robo interactions during cortical development. *J Anat*, 2007, 211: 188-198.
- [18] London NR, Zhu W, Bozza FA, et al. Targeting Robo4-dependent Slit signaling to survive the cytokine storm in sepsis and influenza. *Sci Transl Med*, 2010, 2: 19-23.
- [19] Stockton RA, Shenkar R, Awad IA, et al. Cerebral cavernous malformations proteins inhibit Rho kinase to stabilize vascular integrity. *J Exp Med*, 2010, 207: 881-896.

(收稿日期: 2012-10-10)

(本文编辑: 李银平)

## · 科研新闻速递 ·

### BRCA1 基因治疗可减轻脓毒症小鼠全身炎症反应并改善器官功能和提高生存率

目前脓毒症引起的相关并发症和死亡仍然是一个突出的临床问题。细胞的修复功能障碍在脓毒症引起的多器官功能障碍和死亡中起了重要作用。为此,加拿大研究人员进行了相关研究,希望通过利用 BRCA1 基因(调控细胞损伤修复和生存的关键基因)治疗,能够减轻脓毒症小鼠的全身炎症反应,从而改善器官功能并提高生存率。研究人员对小鼠进行假手术或者盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症模型,并注射人 BRCA1 腺病毒(AdBRCA1)或者空的腺病毒载体(Adnull)。结果发现,AdBRCA1 和 Adnull 治疗的小鼠 CLP 后 24 h 的死亡率分别为 2.8% 和 17.9% ( $P < 0.001$ ), 中位生存时间分别为 50.5 h 和 33.0 h ( $P < 0.05$ )。AdBRCA1 治疗能改善小鼠 CLP 后的器官功能,同时还能抑制 CLP 引起的肝脏 DNA 双链断裂和细胞凋亡。此外,AdBRCA1 治疗还能抑制体内活性氧的产生,减轻腹腔中性粒细胞的浸润。因此,研究人员认为,这种新颖的 BRCA1 基因治疗能够减轻脓毒症引起的全身炎症反应,改善器官功能并提高生存率。

林志龙, 编译自《Gene Ther》, 2012, 20(1): 51-61; 胡森, 审校

### 重组人可溶性凝血酶调节蛋白能改善脓毒症相关性弥散性血管内凝血患者的预后

目前,有关重组人可溶性凝血酶调节蛋白(rhTM)对脓毒症相关性弥散性血管内凝血(DIC)患者的预后(尤其是病死率指标)影响的相关证据不多。为此,日本研究学者进行了一项多中心的回顾性队列研究,旨在评价 rhTM 治疗脓毒症引起的 DIC 患者的效果。研究对象为日本 3 家三级医院 2006 年 1 月至 2011 年 6 月期间收住的需要机械通气的脓毒症相关性 DIC 患者。主要观察指标为院内病死率;次要评价指标为重症监护病房(ICU)治疗时间、DIC 评分和出血并发症的发生率。结果:共有 162 例患者入选该研究,其中 68 例患者接受了 rhTM 治疗。与未接受 rhTM 治疗的患者相比,rhTM 治疗患者院内病死率明显降低(危险比为 0.45, 95% 可信区间为 0.26 ~ 0.77,  $P = 0.013$ )。rhTM 治疗患者 ICU 治疗时间、机械通气时间和血管加压药使用时间均较未接受 rhTM 治疗患者短,DIC 评分也较低;但两组患者出血并发症的发生率并无显著差异。因此,研究人员认为,rhTM 治疗能够改善脓毒症相关性 DIC 患者的预后。

罗红敏, 编译自《Intensive Care Med》, 2013-01-30(电子版); 胡森, 审校

### 切断迷走神经对蛛网膜下腔出血致多器官功能障碍综合征大鼠 FOS 蛋白表达的影响

目前关于 FOS 蛋白表达和迷走神经与蛛网膜下腔出血(SAH)引起的多器官功能障碍综合征(MODS)的关系尚不清楚。研究人员通过往 Willis 环注射动脉血建立 SAH 引发的 MODS 模型,观察切断和未切断迷走神经情况下,大鼠延髓内脏带 FOS 蛋白表达对 SAH 引起的 MODS 的影响,并进一步研究其调控机制。结果发现,SAH 组和 SAH + 迷走神经切断(SDV)组 FOS 蛋白表达均明显高于正常对照组、假手术组和 SDV 组(均  $P < 0.01$ );SAH + SDV 组 FOS 蛋白表达低于 SAH 组( $P < 0.01$ )。SAH 组和 SAH + SDV 组动物各器官在各时间点均有明显的炎症损伤,并在 24 ~ 36 h 最明显,这与 FOS 蛋白表达的高峰期相一致;同时,SAH + SDV 组的损伤程度更重。研究表明:SAH 后器官周围出现的炎症反应与延髓内脏带 FOS 蛋白表达相关,延髓内脏带参与控制 SAH 后周围器官的炎症反应;切断膈下迷走神经会增加 SAH 引起的周围器官炎症反应,迷走神经对 SAH 引起 MODS 起到了重要保护作用。

林志龙, 编译自《Exp Ther Med》, 2012, 5(1): 223-228; 胡森, 审校