

· 论著 ·

嗜铬粒蛋白 A 衍生多肽 CGA₄₇₋₆₆ 抑制脓毒症血清所致血管内皮细胞高通透性的研究

古妮娜 张丹 罗丽 陈晓迎 谢明 刘景仑 姜丽萍

【摘要】 目的 观察嗜铬粒蛋白 A 衍生多肽 CGA₄₇₋₆₆(Chromfungin, CHR)对脓症患者血清引起的血管内皮细胞高通透性的影响。**方法** 分别用 CHR、脓毒性休克患者血清、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)作用于人脐静脉内皮细胞株 EA.hy926,采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法、Transwell 小室法测定 EA.hy926 的活性(吸光度(A值))和通透性(A值),免疫荧光法镜下观察细胞纤维肌动蛋白(F-actin)的形态和分布。**结果** 与空白对照组比较,1、10、100 nmol/L CHR 对 EA.hy926 细胞活性无明显影响(A值:1.219 $\pm$ 0.253、1.179 $\pm$ 0.065、1.179 $\pm$ 0.062 比 1.306 $\pm$ 0.162,均 $P>0.05$),而 1 000 nmol/L CHR 对 EA.hy926 细胞活性有显著抑制作用(A值:1.049 $\pm$ 0.256 比 1.306 $\pm$ 0.162, $t=-2.390$, $P=0.031$)。与空白对照组比较,1、10、100 nmol/L CHR 作用下 EA.hy926 细胞通透性明显降低(A值:1.619 $\pm$ 0.324、1.496 $\pm$ 0.356、1.132 $\pm$ 0.280 比 2.315 $\pm$ 0.440, $P<0.05$ 或 $P<0.01$);脓毒性休克患者血清或 TNF- α 单独作用下 EA.hy926 细胞通透性明显升高(血清组 A值:1.204 $\pm$ 0.248 比 0.277 $\pm$ 0.017, $P<0.01$; TNF- α 组 A值:2.485 $\pm$ 0.113 比 1.602 $\pm$ 0.679, $P<0.05$);1、10、100 nmol/L 的 CHR 既可明显降低脓毒性休克患者血清引起的高通透性(A值:0.299 $\pm$ 0.065、0.224 $\pm$ 0.028、0.131 $\pm$ 0.015 比 1.204 $\pm$ 0.248, 均 $P<0.01$),也可明显降低 TNF- α 引起的高通透性(A值:1.995 $\pm$ 0.394、1.920 $\pm$ 0.096、1.744 $\pm$ 0.475 比 2.485 $\pm$ 0.113, $P<0.05$ 或 $P<0.01$),且在 1~100 nmol/L 范围内,CHR 的上述作用呈现一定的剂量依赖性。与空白对照组比较,脓毒性休克患者血清或 TNF- α 单独作用下, F-actin 细胞骨架发生明显重组和再分布,应力纤维形成增多,而 CHR 可以抑制上述变化的发生。**结论** CHR 可以抑制脓毒性休克患者血清引起的血管内皮细胞的高通透性,且呈现一定的剂量依赖性,其机制与抑制 TNF- α 的作用有关。

【关键词】 嗜铬粒蛋白 A; 嗜铬粒蛋白 A 衍生多肽; 血管内皮细胞; 人脐静脉内皮细胞株 EA.hy926; 内皮细胞通透性; 脓毒症

A study of inhibitory effect of chromogranin A derived peptide CGA₄₇₋₆₆ on hyper-permeability of endothelium induced by serum of septic patient GU Ni-na, ZHANG Dan, LUO Li, CHEN Xiao-ying, XIE Ming, LIU Jing-lun, JIANG Li-ping. Department of Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Corresponding author: ZHANG Dan, Email: doctor_zhangdan@126.com

【Abstract】 Objective To explore the role of chromogranin A (CGA) derived peptide CGA₄₇₋₆₆ (Chromfungin, CHR) on septic serum induced high permeability of vascular endothelial cells. **Methods** Human umbilical venous endothelial cell line (EA.hy926 cells) was exposed to CHR, serum of septic shock patient, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) respectively. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method, Transwell assay and immunofluorescence were performed to determine cell viability [absorbance (A) value], permeability of monolayer endothelial cells (A value), and the morphological characteristic and distribution of F-actin respectively. **Results** Compared with the blank control group, when EA.hy926 were exposed to CHR with 1, 10, 100 nmol/L the cell activity was not significantly affected (A value: 1.219 $\pm$ 0.253, 1.179 $\pm$ 0.065, 1.179 $\pm$ 0.062 vs. 1.306 $\pm$ 0.162, all $P>0.05$), while when the cells was exposed to CHR in 1 000 nmol/L the cell activity was significantly inhibited (A value: 1.049 $\pm$ 0.256 vs. 1.306 $\pm$ 0.162, $t=-2.390$, $P=0.031$). Compared with blank control group, when the cells were exposed to CHR of 1, 10, 100 nmol/L a significant decrease in permeability in EA.hy926 cells was observed (A value: 1.619 $\pm$ 0.324, 1.496 $\pm$ 0.356, 1.132 $\pm$ 0.280 vs. 2.315 $\pm$ 0.440, $P<0.05$ or $P<0.01$). Treatment of septic shock patient's serum or TNF- α to EA.hy926 produced an obvious increase in its permeability (septic serum group A value: 1.204 $\pm$ 0.248 vs. 0.277 $\pm$ 0.017, $P<0.01$; TNF- α group A value: 2.485 $\pm$ 0.113 vs. 1.602 $\pm$ 0.679, $P<0.05$). High-permeability induced by TNF- α or septic shock patient's serum was alleviated by CHR in the concentration of 1, 10, 100 nmol/L in a dose-dependent manner (septic serum + CHR group A value: 0.299 $\pm$ 0.065, 0.224 $\pm$ 0.028, 0.131 $\pm$ 0.015 vs. 1.204 $\pm$ 0.248; TNF- α + CHR group A value: 1.995 $\pm$ 0.394, 1.920 $\pm$ 0.096, 1.744 $\pm$ 0.475 vs. 2.485 $\pm$ 0.113, $P<0.05$ or $P<0.01$). Under a

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.12.005

基金项目:国家自然科学基金(81071531);重庆市自然科学基金(CSTC 2009BB5066)

作者单位:400016 重庆医科大学附属第一医院重症医学科

通信作者:张丹, Email: doctor_zhangdan@126.com

laser scanning confocal microscope, it was found that the F-actin cytoskeleton of EA.hy926 cells was redistributed, and more stress fibers were found in the septic shock patient's serum group and TNF- α group, while CHR obviously alleviated the above effects induced by septic shock patient's serum or TNF- α . **Conclusion** In a dose-dependent manner, CHR may inhibit increased permeability of vascular endothelial cells induced by septic shock patient's serum, its underlying mechanism may be related to inhibition of the effect of TNF- α .

【Key words】 Chromogranin A; Chromofungin; Vascular endothelial cell; Human umbilical venous endothelial cell line EA.hy926; Permeability; Sepsis

在脓毒症的病理生理过程中,血管内皮细胞损伤起到了重要作用。脓毒症的发生是由感染引起的全身炎症反应综合征(SIRS)所致,大量炎症介质引起血管内皮细胞损伤,血管通透性增加,进而导致组织水肿、缺氧及有效循环不足等,严重时导致多器官功能衰竭^[1-2]。迄今为止,对于脓毒症对血管内皮细胞通透性增高的病理机制尚未阐明,是脓毒症诊治过程中的“瓶颈”^[3-4]。

在脓毒症患者的应激反应中,肾上腺起着关键作用。嗜铬粒蛋白 A(CGA)是肾上腺髓质中含量最多的激素前蛋白,在应激反应时大量分泌入血,具有多个裂解位点,可生成一系列具有生物活性的多肽,发挥重要的生理作用^[5]。本课题组前期研究和欧洲近期的一项大样本多中心研究显示,包括严重脓毒症在内的重症患者,其血浆 CGA 浓度升高,且与患者的预后密切相关,可作为预测重症患者预后的独立指标^[6-9]。已知 CGA 的 NH₂-端衍生多肽 CGA₁₋₇₆ (Vasostatin-1)对心血管系统有显著的调节作用,如负性肌力作用、抑制结肠平滑肌收缩等。CGA₁₋₇₆ 能抑制炎症介质肿瘤坏死因子- α (TNF- α)引起的人脐静脉内皮细胞高通透性和肝脏血管外渗^[10-12]。

本课题组的前期研究表明,CGA 的衍生多肽 CGA₄₇₋₆₆ 被命名为 Chromofungin (CHR),为细胞穿透性多肽(CPP)家族成员,具有抗真菌活性作用,能诱发中性粒细胞(PMN)的 Ca²⁺ 内流^[13-14]。CHR 可构成两性的 α 螺旋结构,这种结构在体内有重要作用,CHR 的一级结构在多种种属完全保守,是 CGA₁₋₇₆ 的重要基团。本研究将探讨 CHR 是否具有改善脓症患者血清引起的内皮细胞高通透性的作用。本实验以人血管内皮细胞株 EA.hy926 为研究对象,分别用脓毒性休克患者血清、TNF- α 和 CHR 作用于血管内皮细胞,观察细胞通透性以及相关标志物的表达,以期明确 CHR 对血管内皮细胞通透性的影响,报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料: 人工合成多肽 CHR 由上海科肽生物科技有限公司合成;人脐静脉内皮细胞株 EA.hy926 购于上海中国科学院细胞库;RPMI1640 培养液购于

美国 Hyclone 公司;胎牛血清(FBS)、重组人 TNF- α 、罗丹明-鬼笔环肽(Rhodamine-Phalloidin)、辣根过氧化物酶(HRP)、辣根过氧化物酶底物显色液(TMB)等均购于美国 Sigma 公司;Transwell 小室购于美国 Millproe 公司。

1.2 细胞培养: 将 EA.hy926 细胞置于含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基中,于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养,应用 0.25%胰酶-乙二胺四乙酸(EDTA)液消化细胞进行细胞传代。

1.3 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测细胞活性^[15-16]: 选取生长状态良好的 EA.hy926 细胞,以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,置恒温培养箱中培养 24 h,细胞贴壁呈单层生长。采用不同浓度 CHR (1、10、100、1 000 nmol/L)分别作用 24 h 后,每孔加入 MTT (5 g/L)20 μ L 培养 4 h,再加入二甲基亚砷(DMSO)150 μ L 作用 15 min,用酶标仪测定吸光度(A)值。实验重复 5 次,取均值。

1.4 Transwell 小室法检测细胞通透性^[17-18]: 将 400 μ L EA.hy926 细胞以 5×10^4 个/孔的密度接种在 Transwell 小室(直径 6.5 mm,孔径 0.4 μ m)的上室;待其铺满单层,上室加入不同浓度 CHR (1、10、100、1 000 nmol/L) 分别单独作用或与 400 μ L 脓毒性休克患者血清共同作用 1 h,或先用不同浓度 CHR 作用 30 min 后再加入 TNF- α 作用 24 h。待药物作用后,上室加入 50 mg/L 的 HRP、下室加入 500 μ L 的无血清培养液,2 min 后收集下室液体以 10 μ L/孔置于 96 孔板中,加入 200 μ L TMB 显色液,15 min 后用酶标仪测定 A 值,用 A 值反映血管内皮细胞的相对通透性。实验重复 5 次,取均值。

1.5 细胞免疫荧光及激光共聚焦显微镜下观察 EA.hy926 细胞纤维肌动蛋白(F-actin)的形态和分布^[16,19-21]: 将 EA.hy926 细胞种植于铺有 8 mm² 玻片的 24 孔板中,待其铺满 70%~80%时,用脓毒性休克患者血清和/或 100 nmol/L CHR 作用 1 h,或先用 100 nmol/L CHR 作用 30 min 后再加 TNF- α 作用 24 h,用 3.7%多聚甲醛室温下固定细胞 15 min。取出已固定好的细胞爬片,加入 1%牛血清白蛋白(BSA,封闭血清),在 37 °C 恒温箱中封闭 30 min;接

着在避光情况下加入 5 $\mu\text{g/mL}$ 罗丹明 - 鬼笔环肽, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温下染色 1 h; 最后加入 1 $\mu\text{g/mL}$ 4,6-二甲基-2-苯吡啶盐酸核苷酸染料(DAPI)作用 10 min, 以 50% 甘油封片, 激光共聚焦显微镜下观察。

1.6 统计学处理: 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两样本均数比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 SPSS 17.0 软件和 SigmaPlot 10.0 分别进行统计分析和做图。

2 结果

2.1 细胞形态(图 1): EA.hy926 细胞呈梭形或椭圆形, 细胞界限清晰, 并以典型的“铺路石”状排列, 细胞间紧密连接, 间隙致密。

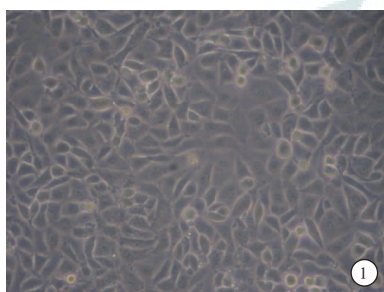
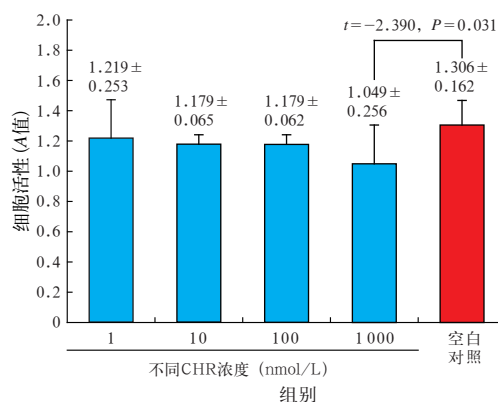


图 1 倒置显微镜下观察人脐静脉内皮细胞株 EA.hy926 的形态 EA.hy926 细胞呈梭形或椭圆形, 以“铺路石”状排列, 细胞紧密连接 低倍放大

2.2 不同浓度 CHR 对 EA.hy926 细胞活性的影响(图 2): 与空白对照组相比, 1、10、100 nmol/L CHR 对 EA.hy926 细胞活性无明显影响(均 $P > 0.05$), 而 1 000 nmol/L 的 CHR 对 EA.hy926 细胞活性有显著抑制作用($t = -2.390$, $P = 0.031$)。

2.3 不同浓度 CHR 对 EA.hy926 细胞通透性的影响: 与空白对照组相比, 在 1、10、100 nmol/L CHR 作

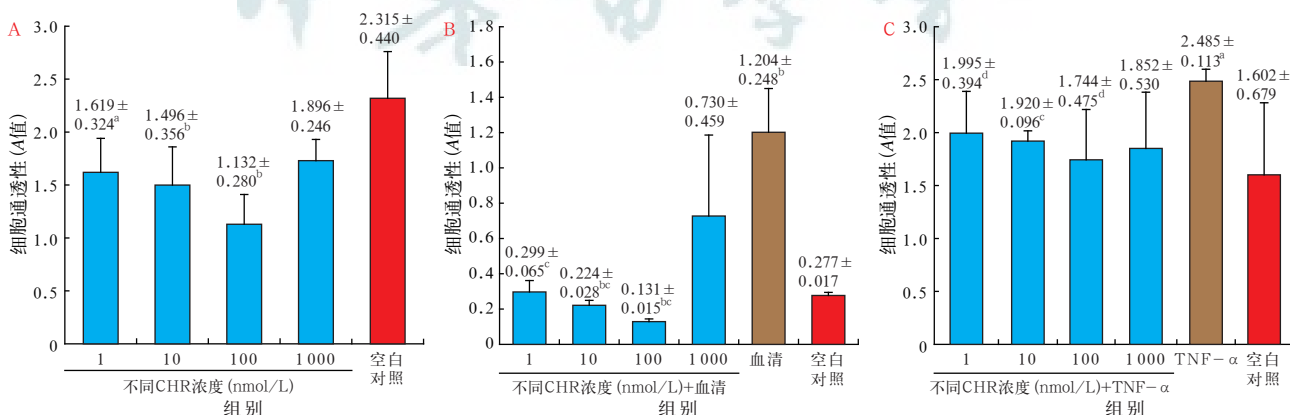


注: CHR 为嗜铬粒蛋白 A 衍生多肽

图 2 不同浓度 CHR 对人脐静脉内皮细胞株 EA.hy926 活性的影响

用下, EA.hy926 细胞的通透性明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 图 3A); 在脓毒性休克患者血清或 TNF- α 单独作用下, EA.hy926 细胞通透性均明显增加($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$; 图 3B ~ 3C)。但是在脓毒性休克患者血清中加入 1、10、100 nmol/L CHR 作用下的 EA.hy926 细胞通透性较脓毒性休克患者血清单独作用时明显降低(均 $P < 0.01$; 图 3B); 在 TNF- α 中加入 1、10、100 nmol/L CHR 作用下的 EA.hy926 细胞通透性较 TNF- α 单独作用时明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 图 3C)。

2.4 CHR 对 EA.hy926 细胞 F-actin 形态和分布的影响(图 4): 免疫荧光显微镜下观察, 空白对照组 F-actin 主要分布于细胞周边和胞膜内侧, 其分布致密带线条完整连续, 细胞边界清晰; 脓毒性休克患者血清组、TNF- α 组细胞外周 F-actin 分布致密带边缘毛糙不规整, 细胞边界不可辨认, 应力纤维形成增多; 而 CHR 组、脓毒性休克患者血清 + CHR 组、



注: CHR 为嗜铬粒蛋白 A 衍生多肽, TNF- α 为肿瘤坏死因子 - α ; 与空白对照组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$;

与相应脓毒性休克患者血清组或 TNF- α 组相比, ^c $P < 0.01$, ^d $P < 0.05$

图 3 不同浓度 CHR 单独或与脓毒性休克患者血清 / 重组人 TNF- α 共同作用对人脐静脉内皮细胞株 EA.hy926 通透性的影响

TNF- α +CHR 组的 F-actin 分布致密带边缘较规整, 细胞边界较清晰, 应力纤维形成较少。

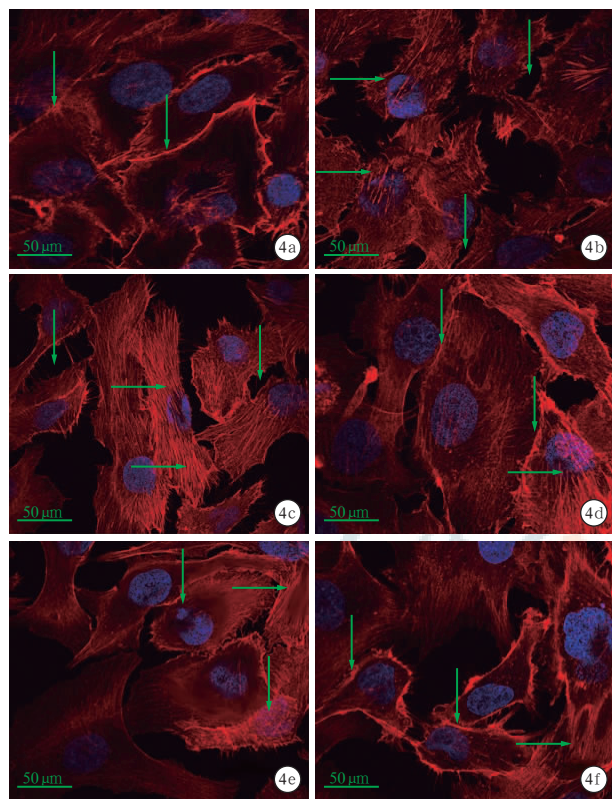


图4 免疫荧光显微镜下观察嗜铬粒蛋白A衍生多肽(CHR)对人脐静脉内皮细胞株 EA.hy926 纤维肌动蛋白(F-actin)形态和分布的影响 红色部分表示 F-actin, 蓝色部分标记细胞核;水平箭头示应力纤维,垂直箭头示细胞边界、细胞间隙;空白对照组 (a)F-actin 分布致密带线条完整连续, 细胞边界清晰;脓毒性休克患者血清组(b)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)组(c)细胞外周 F-actin 分布致密带边缘毛糙不规整, 细胞边界不可辨认, 应力纤维形成增多;CHR 组(d)、脓毒性休克患者血清+100 nmol/L CHR 组(e)、TNF- α +100 nmol/L CHR 组(f) F-actin 分布致密带边缘较规整, 细胞边界较清晰, 应力纤维形成较少 高倍放大

3 讨论

内皮细胞是脓毒症患者炎症反应的重要靶向细胞, 血管内皮细胞通透性异常是严重脓毒症患者发生呼吸、循环及肝肾等重要器官功能衰竭的关键环节^[22-23]。因此, 如何有效地调节血管内皮细胞通透性, 是脓毒症患者治疗的一个突破点^[24-25]。

脓毒症患者发生 SIRS, 引起一系列应激反应, 通过激活下丘脑-垂体-肾上腺皮质(HPA)轴和交感肾上腺髓质系统, 引起肾上腺髓质激素 CGA 表达上调。已知 CGA₁₋₇₆ 具有抑制 TNF- α 引起的血管内皮细胞高渗透性以及肝脏血管外渗等作用^[11-12]。CHR 作为 CGA₁₋₇₆ 的核心功能基团, 比 CGA₁₋₇₆ 更

短, 容易合成及应用于临床, 因此, 本研究关注 CHR 对脓毒性休克患者血清所导致血管内皮细胞高通透性的影响。

本研究结果表明, 脓毒性休克患者的血清和 TNF- α 均能引起血管内皮细胞通透性明显增加。免疫荧光检测结果进一步显示, 脓毒性休克患者血清和 TNF- α 的作用相似, 可引起 F-actin 重新分布、细胞骨架形态改变、细胞应力纤维增加等。现已明确 TNF- α 等炎症介质可通过不同的 Rho 关联含卷曲螺旋蛋白激酶(Rho/ROCK)^[26]和 p38 丝裂素活化蛋白激酶(p38MAPK)^[27]等信号途径, 引起 F-actin 的重排和细胞应力纤维增加, 进而引起细胞收缩, 细胞通透性增加^[28-29]。这提示脓毒性休克患者血清引起的血管内皮细胞通透性改变可能与 TNF- α 等炎症介质对血管内皮细胞的作用有关。

本研究结果还表明, 在体外实验中, 人工合成多肽 CHR 能够改善血管内皮细胞的通透性, 且能有效抑制脓毒性休克患者血清引起的高通透性; 同时免疫荧光结果也显示 CHR 可以抑制患者血清引起血管内皮细胞内应力纤维的形成。并且 CHR 也能抑制 TNF- α 引起的血管内皮细胞通透性和血管内皮细胞应力纤维的形成。

另外, 本研究结果显示, 人工合成多肽 CHR 的上述作用在 1~100 nmol/L 范围内呈现一定的剂量依赖性。本课题组的前期研究显示, 血浆 CGA 的正常范围为 0.5~2.0 nmol/L, 在严重脓毒症患者中, 血浆 CGA 的浓度可以较健康者大幅度增加, 最高达到 20~35 nmol/L, 同时血浆中 CGA₁₋₇₆ 的浓度可以达到 2.6 nmol/L^[7,30-31]。在体外实验中, CHR 对内皮细胞通透性影响的有效浓度范围, 从血浆 CGA 的正常生理浓度到严重脓毒症患者中代偿性增高可以达到甚至更高的浓度, 且呈现剂量依赖性的特征。有趣的是, 在 CHR 浓度高达 1 000 nmol/L 时对血管内皮细胞通透性的改善作用不明显, 具体原因不清楚, 可能与高浓度 CHR 对内皮细胞的细胞毒性作用有关。

值得一提的是, CHR 对脓毒性休克患者血清和 TNF- α 引起的高血管内皮细胞通透性抑制作用表现出相似的剂量依赖性规律, 提示 CHR 缓解脓毒症引起的血管内皮细胞通透性增高的作用可能部分通过抑制 TNF- α 引起的血管内皮细胞高通透性改变来实现, 但其具体机制还需要进一步研究阐明。

肾上腺应激反应分泌大量的 CGA, 对改善脓毒症引起的血管内皮细胞通透性增加起着重要的作用^[32-33]。本研究结果表明, CGA 衍生多肽 CHR 对脓

毒性休克患者血清和 TNF- α 引起的血管内皮细胞高通透性的抑制作用,再次证实肾上腺髓质应激激素对重症患者 SIRS 的调节作用。

脓毒性休克患者血清中含有大量炎症介质,如 TNF- α 、白细胞介素-1(IL-1)、凝血酶等^[34-35],这些炎症介质共同作用于血管内皮细胞,引起通透性改变^[36-38],因此需要在更多的内皮细胞株中,针对更多的其他炎症因子进一步探讨 CHR 对炎症引起血管内皮细胞高通透性的作用和机制。同时,本研究为体外实验,有必要在体内试验中进行验证。

总之,肾上腺重要应激激素 CGA 及其衍生多肽在脓毒症炎症反应中作用的深入探讨,有利于从神经-内分泌免疫网络的角度,为脓毒症病理过程中血管内皮细胞的稳态调节、正常功能维持等提供了新的思路。

参考文献

- [1] 赵聪,马晓春. 脓毒症的抗凝治疗. 中国危重病急救医学, 2011,23:113-116.
- [2] 张晓娟,马晓春. 脓毒症与内皮细胞损伤. 实用医院临床杂志, 2012,9:11-14.
- [3] Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, et al. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol*, 2008, 83: 536-545.
- [4] 赵光举, 卢中秋. 脓毒症内皮细胞损伤与微循环障碍. 临床急诊杂志, 2012, 13: 8-13.
- [5] Helle KB, Corti A, Metz-Boutigue MH, et al. The endocrine role for chromogranin A: a prohormone for peptides with regulatory properties. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64: 2863-2886.
- [6] Zhang D, Lavaux T, Sapin R, et al. Serum concentration of chromogranin A at admission: an early biomarker of severity in critically ill patients. *Ann Med*, 2009, 41: 38-44.
- [7] Zhang D, Lavaux T, Voegeli AC, et al. Prognostic value of chromogranin A at admission in critically ill patients: a cohort study in a medical intensive care unit. *Clin Chem*, 2008, 54: 1497-1503.
- [8] Røsjø H, Nygård S, Kaukonen KM, et al. Prognostic value of chromogranin A in severe sepsis: data from the FINNSEPSIS study. *Intensive Care Med*, 2012, 38: 820-829.
- [9] 谢明,陈晓迎,刘景仑,等. 入院时血清嗜铬粒蛋白 A 浓度和 ICU 患者病情严重程度的相关性研究. 第三军医大学学报, 2013, 35: 157-160.
- [10] Corti A, Ferrero E. Chromogranin A and the endothelial barrier function. *Curr Med Chem*, 2012, 19: 4051-4058.
- [11] Helle KB. Regulatory peptides from chromogranin A and secretogranin II: putative modulators of cells and tissues involved in inflammatory conditions. *Regul Pept*, 2010, 165: 45-51.
- [12] Helle KB. The chromogranin A-derived peptides vasostatin-I and catestatin as regulatory peptides for cardiovascular functions. *Cardiovasc Res*, 2010, 85: 9-16.
- [13] Zhang D, Shooshtarizadeh P, Laventie BJ, et al. Two chromogranin a-derived peptides induce calcium entry in human neutrophils by calmodulin-regulated calcium independent phospholipase A2. *PLoS One*, 2009, 4: e4501.
- [14] Lugardon K, Chasserolet-Golaz S, Kieffer AE, et al. Structural and biological characterization of chromogranin, the antifungal chromogranin A- (47-66)-derived peptide. *J Biol Chem*, 2001, 276: 35875-35882.
- [15] 刘秀娟,穆恩,梁英健,等. 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 失衡在其发生机制中的作用. 中华危重病急救医学, 2013, 25: 140-144.
- [16] 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.
- [17] Veschini L, Crippa L, Dondossola E, et al. The vasostatin-1 fragment of chromogranin A preserves a quiescent phenotype in hypoxia-driven endothelial cells and regulates tumor neovascularization. *FASEB J*, 2011, 25: 3906-3914.
- [18] Li R, Ning Z, Cui J, et al. Diesel exhaust particles modulate vascular endothelial cell permeability: implication of ZO-1 expression. *Toxicol Lett*, 2010, 197: 163-168.
- [19] Blois A, Srebro B, Mandalà M, et al. The chromogranin A peptide vasostatin-I inhibits gap formation and signal transduction mediated by inflammatory agents in cultured bovine pulmonary and coronary arterial endothelial cells. *Regul Pept*, 2006, 135: 78-84.
- [20] Huang W, Liu Y, Li L, et al. HMGB1 increases permeability of the endothelial cell monolayer via RAGE and Src family tyrosine kinase pathways. *Inflammation*, 2012, 35: 350-362.
- [21] 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影响的实验研究. 外科理论与实践, 2009, 14: 323-327.
- [22] 李旭, 马晓春. 脓毒症内皮细胞损伤和凝血功能障碍相关的生物标记物. 中国危重病急救医学, 2011, 23: 117-121.
- [23] 王小红,董晨明,张红松. 毛细血管渗漏综合征的研究进展. 中国中西医结合急救杂志, 2012, 19: 123-125.
- [24] Kumar P, Shen Q, Pivetti CD, et al. Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert Rev Mol Med*, 2009, 11: e19.
- [25] 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.
- [26] 国伟,孟建中,陈宇. Rho/Rho 激酶信号通路与血管内皮通透性的研究. 生物医学工程研究, 2009, 28: 154-158.
- [27] 常江平,朱绪东,刘子娟,等. TNF α 增加血管内皮细胞通透性与其激活 P38 MAPK 和黏附因子重新分布有关. 西安交通大学学报(医学版), 2004, 25: 538-541, 548.
- [28] 高巨,招伟贤,周罗晶,等. 丙泊酚对内毒素诱导内皮细胞通透性和细胞骨架的影响. 中国危重病急救医学, 2007, 19: 717-720.
- [29] 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.
- [30] Chung H, Corti A, Crippa L, et al. Development of an immunoassay for the derived-peptide of chromogranin A, vasostatin-I (1-76): assessment of severity in patients with sepsis. *Biomarkers*, 2012, 17: 430-434.
- [31] Lavaux T, Schneider F, Bach C, et al. Chromogranin A expression in plasma of critically ill patients. *Crit Care*, 2010, 14: P37.
- [32] Cuesta JM, Singer M. The stress response and critical illness: a review. *Crit Care Med*, 2012, 40: 3283-3289.
- [33] Lee WL, Slutsky AS. Sepsis and endothelial permeability. *N Engl J Med*, 2010, 363: 689-691.
- [34] 张彧,任延波,蒋丽. 脓毒症早期大鼠肾脏细胞凋亡及炎症细胞因子的变化. 中国危重病急救医学, 2006, 18: 89-91.
- [35] Knezevic N, Tauseef M, Thennes T, et al. The G protein betagamma subunit mediates reannealing of adherens junctions to reverse endothelial permeability increase by thrombin. *J Exp Med*, 2009, 206: 2761-2777.
- [36] Cugno M. Inflammation, coagulation, vascular permeability and thrombosis. *Curr Vasc Pharmacol*, 2012, 10: 631.
- [37] 原庆,张淑文,罗国燕. 脓毒症引发的微循环障碍及中西药的改善作用. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15: 313-315.
- [38] 薛新,刘志勇. 内毒素诱导急性肺损伤大鼠血清对内皮细胞通透性的影响及乌司他丁的保护作用研究. 东南大学学报(医学版), 2011, 30: 594-597.

(收稿日期:2013-07-23)

(本文编辑:李银平)