

血必净注射液通过上调 claudin-5 改善硫化氢诱导的肺血管屏障功能失调

耿平¹ 张洪亮² 熊佳俐² 王颖² 凌冰玉¹ 王晖晖¹ 谈定玉¹ 王大胜¹ 张劲松³

¹江苏省苏北人民医院,扬州大学临床医学院急诊医学科,江苏扬州 225001; ²大连医科大学,辽宁大连 116044; ³南京医科大学第一附属医院急诊医学科,南京 210029

通信作者:张劲松,Email: zhangjso@njmu.edu.cn

【摘要】 目的 从细胞紧密连接蛋白 claudin-5 的角度探讨血必净注射液改善肺血管屏障功能紊乱的新机制。**方法** 采用硫化氢(H₂S)暴露导致急性肺损伤(ALI)模型。①体内实验:按随机数字表法将雄性SD大鼠分为对照组、H₂S暴露组(300×10⁻⁶ H₂S持续暴露3h)、血必净对照组(静脉注射血必净注射液4 mL/kg、每日2次、持续3d)、血必净干预组(血必净注射液预处理后予以H₂S暴露),每组6只。制模成功后不同时间点(0、6、12、24h)分别检测大鼠血浆和支气管肺泡灌洗液(BALF)中总蛋白含量,计算肺通透性指数(PPI; PPI=BALF中总蛋白含量/血浆中总蛋白含量),测定肺湿/干重比值(W/D),用实时定量聚合酶链反应检测肺组织 claudin-5 mRNA 表达。②体外实验:将人肺微血管内皮细胞株(HPMECs)分为空白对照组、H₂S供体(NaHS)处理组(与500 μmol/L NaHS共孵育12h)、血必净对照组(加入2 g/L血必净注射液培养24h)、血必净干预组(2 g/L血必净注射液预处理24h后与500 μmol/L NaHS共孵育12h)。分别于共孵育不同时间点(1、3、6、12和24h),用蛋白质免疫印迹试验检测HPMECs细胞 claudin-5 蛋白表达,以荧光素钠评价单层HPMECs的通透性。**结果** ①体内实验结果:与对照组相比,大鼠H₂S暴露后6h肺W/D比值即显著升高,12h达峰值(4.67±0.11比4.26±0.06, P<0.01);肺组织 claudin-5 mRNA 表达显著降低,暴露后6h时降至对照组的89%(P<0.01)。暴露后12h BALF中总蛋白和PPI均显著高于对照组[总蛋白(mg/L):262.31±14.24比33.30±3.09, PPI:(11.72±0.57)×10⁻³比(1.21±0.08)×10⁻³,均P<0.01];而血必净预处理后BALF中总蛋白和PPI均显著下降[总蛋白(mg/L):153.25±7.32比262.31±14.24, PPI:(5.79±0.23)×10⁻³比(11.72±0.57)×10⁻³,均P<0.01]。②体外实验结果:与空白对照组相比,HPMECs与NaHS共孵育后单层内皮细胞通透性逐渐增加,12h达到最高,约为空白对照组的2倍(P<0.01),而 claudin-5 蛋白表达则于12h时降至最低(claudin-5/β-actin:0.42±0.03比1.03±0.05, P<0.01);经血必净干预后可明显改善内皮细胞通透性(荧光素钠的荧光强度:1.46±0.10比1.89±0.11, P<0.01),减轻 claudin-5 蛋白的下降程度(claudin-5/β-actin:0.68±0.04比0.38±0.03, P<0.01)。**结论** 血必净注射液可能通过上调 claudin-5 的表达改善ALI时受损的肺血管屏障功能。

【关键词】 血必净注射液; Claudin-5; 硫化氢; 内皮屏障; 失调

基金项目:江苏省中医药局科技项目(YB2017076);江苏省医学创新团队培养项目(CXTDA2017007)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200319-00220

Xuebijing injection attenuates hydrogen sulfide-induced endothelial barrier dysfunction by upregulating claudin-5 expression

Geng Ping¹, Zhang Hongliang², Xiong Jiali², Wang Ying², Ling Bingyu¹, Wang Huihui¹, Tan Dingyu¹, Wang Dasheng¹, Zhang Jinsong³

¹Department of Emergency Medicine, Northern Jiangsu People's Hospital, Clinical Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu, China; ²Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning, China; ³Department of Emergency Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu, China

Corresponding author: Zhang Jinsong, Email: zhangjso@njmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the new mechanism of Xuebijing injection improving the function of pulmonary vascular barrier from the perspective of claudin-5 protein. **Methods** Acute lung injury (ALI) model was induced by hydrogen sulfide (H₂S) exposure. ① *In vivo* study: Sprague-Dawley (SD) rats were divided into control group, H₂S exposure group (exposure to 300×10⁻⁶ H₂S for 3 hours), Xuebijing control group (Xuebijing injection 4 mL/kg, twice a day, for 3 days), and Xuebijing intervention group (H₂S exposure after pretreatment of Xuebijing injection) according to random number method, with 6 rats in each group. At different time points (0, 6, 12 and 24 hours) after the model was made successfully, the total protein content in plasma and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of rats were detected respectively, and the pulmonary permeability index (PPI) was calculated (PPI = protein content in BALF/protein content in plasma), lung dry/wet weight ratio (W/D) was detected, and claudin-5 mRNA expression in lung tissue was measured by real time-polymerase chain reaction. ② *In vitro* test: human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMECs) were divided into blank control group, NaHS treatment group (co-incubated with 500 μmol/L NaHS for 12 hours), Xuebijing control group (2 g/L Xuebijing injection for 24 hours), and Xuebijing intervention group (2 g/L Xuebijing injection

pre-treated for 24 hours, then co-incubated with 500 $\mu\text{mol/L}$ NaHS for 12 hours). The HPMECs claudin-5 protein expression and monolayer permeability changes were measured at different co-incubation time (1, 3, 6, 12 and 24 hours) by Western Blot and fluoresceinsodium. **Results** ① *In vivo* study: compared with the control group, the lung W/D ratio increased significantly at 6 hours and peaked at 12 hours after H_2S exposure in rats (4.67 ± 0.11 vs. 4.26 ± 0.06 , $P < 0.01$). The expression of claudin-5 mRNA in lung tissue was significantly decreased, which was 89% of control group 6 hours after exposure ($P < 0.01$). The total protein content in BALF and PPI at 12 hours after exposure were significantly higher than those in the control group [total protein content (mg/L): 262.31 ± 14.24 vs. 33.30 ± 3.09 , PPI: $(11.72 \pm 0.57) \times 10^{-3}$ vs. $(1.21 \pm 0.08) \times 10^{-3}$, both $P < 0.01$], while the results in Xuebijing intervention group were significantly decreased [total protein content (mg/L): 153.25 ± 7.32 vs. 262.31 ± 14.24 , PPI: $(5.79 \pm 0.23) \times 10^{-3}$ vs. $(11.72 \pm 0.57) \times 10^{-3}$, both $P < 0.01$]. ② *In vitro* test: compared with the blank control group, after incubating HPMECs with NaHS, the permeability of monolayer endothelial cells gradually increased, reaching the highest level in 12 hours, about twice of that in the blank control group, while claudin-5 protein expression decreased to the lowest level at 12 hours (claudin-5/ β -actin: 0.42 ± 0.03 vs. 1.03 ± 0.05 , $P < 0.01$). After intervention with Xuebijing, the permeability of endothelial cells was significantly improved (fluorescence intensity of fluorescein sodium: 1.46 ± 0.10 vs. 1.89 ± 0.11 , $P < 0.01$), and the decrease of claudin-5 protein was reduced (claudin-5/ β -actin: 0.68 ± 0.04 vs. 0.38 ± 0.03 , $P < 0.01$). **Conclusion** Xuebijing injection may improve pulmonary vascular barrier function in ALI by upregulating claudin-5 expression.

【Key words】 Xuebijing injection; Claudin-5; Hydrogen sulfide; Endothelial barrier; Dysfunction

Fund program: Science and Technology Project of Jiangsu Traditional Chinese Medicine Bureau of China (YB2017076); Program for Innovative Medical Research Team of Jiangsu Province of China (CXTDA2017007)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200319-00220

($250 \sim 500$) $\times 10^{-6}$ 的硫化氢 (H_2S) 急性暴露可以导致内源性急性肺损伤 (ALI)^[1]。ALI/急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 最重要的本质特征是肺毛细血管内皮细胞受损, 屏障功能失衡, 血管壁通透性增加导致弥漫性肺间质水肿和肺泡水肿^[2]。细胞紧密连接蛋白 claudin-5 可通过控制细胞旁路转运途径发挥内皮细胞的屏障功能^[3]。研究表明, 在 ALI/ARDS 发病过程中, 微血管通透性升高、血气屏障破坏与 claudin-5 下调有关^[4-5]。血必净注射液被广泛用于脓毒症所致的全身炎症反应, 能有效减轻高通透性组织水肿。然而血必净注射液对肺血管内皮屏障功能的保护作用及机制并不明确。本研究中通过建立 H_2S 急性暴露致 ALI 模型, 经体内和体外实验, 观察血必净注射液对 claudin-5 的调节作用及其对肺血管通透性的影响, 探讨血必净注射液对肺血管内皮屏障功能的保护作用及可能机制。

1 材料与方 法

1.1 主要实验材料与试剂: 血必净注射液 (天津红日药业股份有限公司); 1% 标准 H_2S 气体 (南京上元工业气体厂), claudin-5 一抗、 H_2S 供体 (NaHS)、RIPA 蛋白裂解液、TRIzol、蛋白酶抑制剂 Cocktail 均购于美国 Sigma-Aldrich 公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (美国 Thermo Fisher 公司); 反转录试剂盒 (日本 TAKARA 公司)。

1.2 动物模型制备及分组: 清洁级健康雄性 SD 大鼠, 14~16 周龄, 购于扬州大学动物实验中心, 动物许可证号: SCXK(苏)2017-0044。动物处置方法

符合动物伦理学标准, 经扬州大学实验动物伦理委员会批准 (审批号: YZUDWLL-201708-002)。按随机数字表法将大鼠分组。① H_2S 暴露实验: 将大鼠分为对照组和 H_2S 暴露后 0、6、12、24 h 组 ($n=6$)。对照组在室内正常呼吸空气; H_2S 暴露组用 300×10^{-6} 的 H_2S 持续暴露 3 h 制备 H_2S 暴露模型^[1,6], 并分别于暴露后 0、6、12 和 24 h 腹腔注射戊巴比妥钠麻醉动物留取肺组织标本。② 血必净干预实验: 将大鼠分为 4 组 ($n=6$), 即对照组、 H_2S 暴露后 12 h 组、血必净对照组 (静脉注射血必净注射液 4 mL/kg, 每日 2 次, 持续 3 d^[7], 无 H_2S 暴露) 和血必净干预组 (血必净预处理 3 d, 再予以 H_2S 暴露), 制模后 12 h 腹腔注射戊巴比妥钠麻醉动物, 摘除眼球采血, 并予以支气管肺泡灌洗。

1.3 细胞模型制备及分组: 人肺微血管内皮细胞株 (HPMECs) 购于美国模式菌种收集中心, 按 $4 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接种于 25 cm^2 的培养皿中, 用含 5% 胎牛血清 (FBS)、1% 内皮细胞生长因子及 1% 青霉素/链霉素的内皮细胞专用培养基 (ECM) 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养。细胞达到 80%~90% 融合时进行传代, 取第 3~10 代细胞用于实验, 在细胞对数生长期给药。NaHS 作为 H_2S 供体溶解于无菌磷酸盐缓冲液 (PBS) 中配成 100 mmol/L 的母液, 染毒前 12 h 用无血清 ECM 培养基稳定 HPMECs, 将新鲜配置的 NaHS 母液加至无血清培养基中使 NaHS 终浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$, 与 HPMECs 共同孵育 1、3、6、12 和 24 h^[8-9], 并根据以上共孵时

间分组。血必净干预实验中,首先用CCK-8细胞增殖和毒性分析试剂盒确定适宜的血必净干预浓度,将干预浓度的血必净注射液与无血清ECM培养基中的HPMECs预孵育24h(血必净对照组),然后加入NaHS(500 μmol/L)共同孵育12h后(血必净干预组)用于检测。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 大鼠肺湿/干重比值(W/D)测定:断头处死大鼠后开胸,暴露肺叶和心脏,取右肺下叶称湿重(W),再置于50℃烤箱中干燥标本,3d后称干重(D),计算W/D比值^[8-9]。

1.4.2 支气管肺泡灌洗液(BALF)中总蛋白含量和肺通透性指数(PPI)测定:麻醉大鼠后摘除眼球采血,离心取上层血浆保存在-70℃冰箱中待检。采血后即刻开胸暴露肺和主支气管,于环状软骨下方做倒“T”型切口,把连接注射器的硅胶管置入左支气管并固定,分3次缓慢注入4℃PBS 2.5 mL,回收BALF,4℃离心取上清液,于-70℃冰箱中保存待检。用BCA法检测血浆和BALF上清液中总蛋白含量。PPI=BALF中总蛋白含量/血浆中总蛋白含量。

1.4.3 实时定量聚合酶链反应(PCR)检测大鼠肺组织 claudin-5 mRNA 表达:冰上取30 mg肺组织进行匀浆,提取总RNA,进行反转录、实时定量PCR。引物序列由上海捷瑞公司设计合成。根据溶解曲线和扩增曲线得知引物特异性和扩增效率。以β-肌动蛋白(β-actin)作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算mRNA表达量。

1.4.4 CCK-8 检测细胞增殖:HPMECs细胞经消化、计数,配制成 $8 \times 10^7/L$ 的细胞悬液,接种于96孔板培养24h;弃去培养基,PBS清洗,用完全培养基稀释血必净注射液至所需浓度,每孔加入10 μL CCK-8溶液、200 μL相应的含药培养基,继续培养3h后,用多功能酶标仪在波长450 nm处检测吸光度(A)值,计数各组细胞存活率。

1.4.5 Transwell 小室检测单层 HPMECs 通透性:采用荧光素钠评价单层 HPMECs 的通透性。将 HPMECs 接种在 Transwell 上层多聚碳酸酯膜上(2×10^5 个/Transwell小室),培养液培养24h形成细胞单层后给予相应处置:①空白对照组:在上室中只加入100 μL的DMEM培养基;②NaHS暴露组:在上室中加入100 μL NaHS(500 μmol/L)分别培养1、3、6、12和24h;③血必净对照组:在上室中加入100 μL血必净注射液(2 g/L)培养24h;

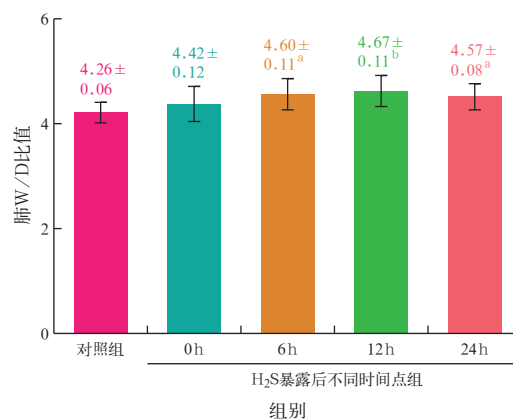
④血必净干预组:在上室中加入100 μL血必净注射液(2 g/L)培养24h后吸除,再加入100 μL的NaHS(500 μmol/L)培养12h。刺激完毕用PBS洗涤,在上室中加入100 μL荧光素钠(2 mg/L)^[10],在下室中加入PBS 600 μL,37℃孵育1h,取100 μL下室液体,用酶标仪在波长520 nm处测量荧光素钠的A值。HPMECs通透性=各实验组A值/空白对照组A值×100%。

1.4.6 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测 HPMECs 细胞 claudin-5 蛋白表达:用RIPA蛋白裂解液及蛋白酶抑制剂Cocktail(100:1)冰上裂解细胞30 min,BCA法测定上清液蛋白浓度后高温变性制备蛋白样品,取20 μg,5%脱脂牛奶常温封闭2h,加入兔源性单克隆 claudin-5 抗体(1:1000)及鼠源性β-actin抗体(1:5000)置于4℃冰箱摇床过夜,漂洗后加辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗兔或抗鼠二抗(1:50000)常温孵育1h,反复漂洗后显影、拍照,用Image J图像分析系统以β-actin为内参照进行灰度扫描分析。

1.5 统计学方法:使用GraphPad Prism软件进行数据分析。结果源于3次以上独立实验,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组定量资料比较采用方差分析,两组间比较采用LSD-t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

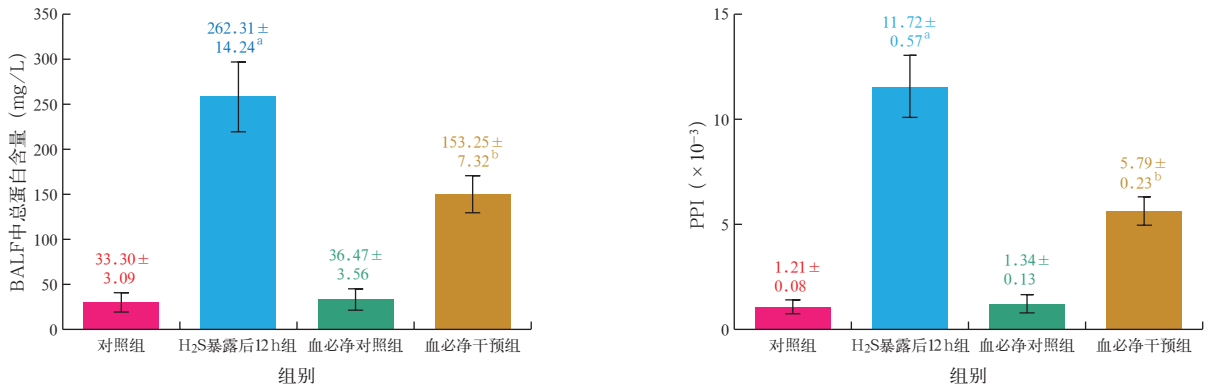
2 结果

2.1 H₂S 暴露后不同时间点大鼠肺 W/D 比值变化(图1):与对照组相比,H₂S暴露后6h肺W/D比值开始出现显著升高($P < 0.05$),12h达到峰值($P < 0.01$)。说明H₂S暴露后肺血管通透性升高,肺水明显增加。



注: H₂S 为硫化氢,肺 W/D 比值为肺湿/干重比值;与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

图1 H₂S暴露后各组大鼠肺W/D比值比较

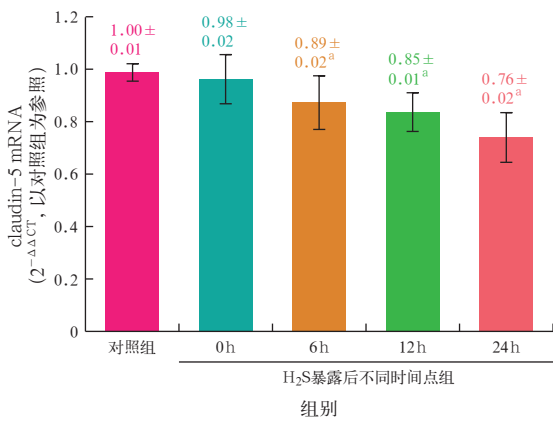


注: BALF 为支气管肺泡灌洗液, PPI 为肺通透性指数; 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与硫化氢(H₂S)暴露后 12 h 组比较, ^b $P < 0.01$

图2 各组大鼠 BALF 中总蛋白含量和 PPI 比较

2.2 各组大鼠 BALF 中总蛋白含量和 PPI 比较 (图 2): 与对照组相比, H₂S 暴露后 12 h 组 BALF 中总蛋白含量显著升高, PPI 升高近 10 倍 (均 $P < 0.01$)。经血必净干预后 BALF 中总蛋白含量、PPI 均较 H₂S 暴露后明显下降 (均 $P < 0.01$)。说明血必净能有效改善 H₂S 暴露后肺血管屏障功能受损的严重程度。

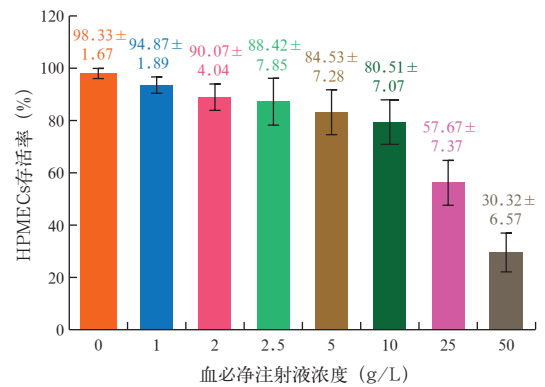
2.3 H₂S 暴露后不同时间点大鼠肺组织 claudin-5 mRNA 表达 (图 3): 与对照组相比, H₂S 暴露后 6 h claudin-5 mRNA 表达即显著下降 ($P < 0.01$), 并持续到 24 h。



注: H₂S 为硫化氢, claudin-5 为细胞紧密连接蛋白; 与对照组比较, ^a $P < 0.01$

图3 实时定量聚合酶链反应(PCR)检测 H₂S 暴露后大鼠肺组织 claudin-5 mRNA 表达

2.4 血必净注射液对 HPMECs 活性的影响 (图 4): 随血必净注射液浓度的增加, 细胞存活率逐渐下降。2 g/L 血必净注射液干预 24 h 后细胞存活率为 90.07%, 2.5 g/L 血必净注射液干预 24 h 后细胞存活率为 88.42%。参照药物干预研究中, 干预药物的最大安全剂量一般会选择细胞存活率在 90% 左右的药物浓度, 据此, 我们选择 2 g/L 作为血必净注射液在细胞实验中适宜的干预浓度。

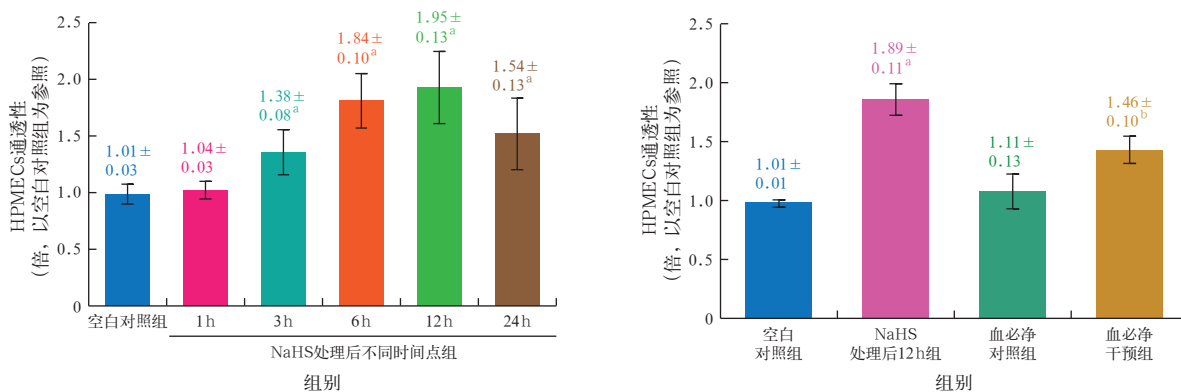


注: HPMECs 为人肺微血管内皮细胞株

图4 不同浓度血必净注射液与 HPMECs 共孵育 24 h 对细胞活性的影响

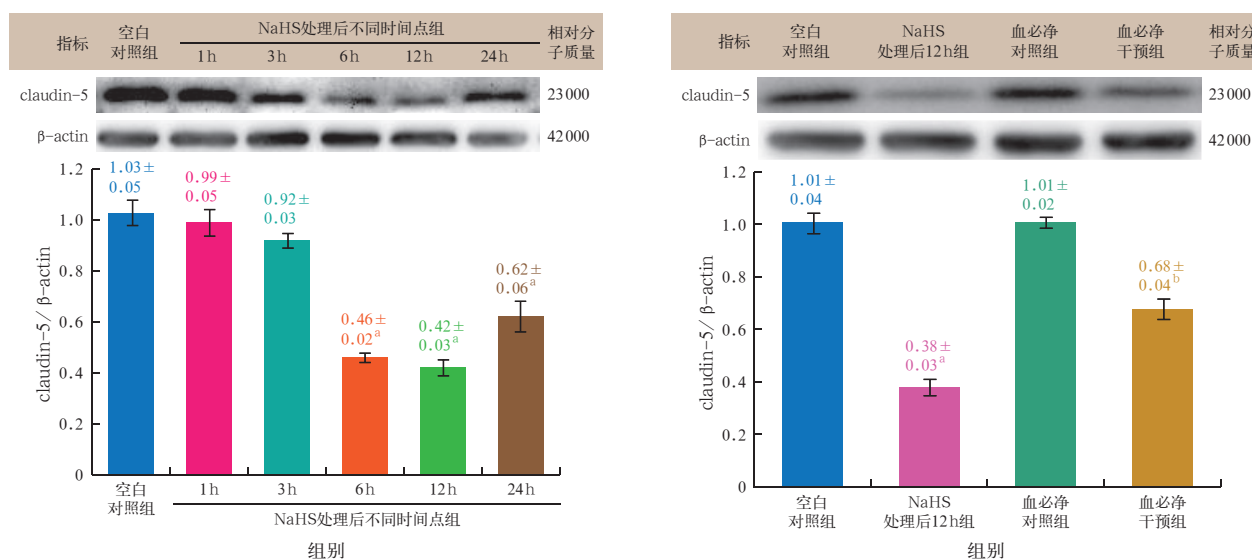
2.5 NaHS 暴露及血必净注射液干预后 HPMECs 的通透性 (图 5): 以荧光素钠为标记检测 HPMECs 的通透性。HPMECs 与 NaHS 共同孵育后, 单层内皮细胞的通透性出现升高趋势, 共同孵育后 3 h 细胞通透性开始出现显著升高, 达到空白对照组的 1.38 倍 ($P < 0.01$), 12 h 达到最高, 约为空白对照组的 2 倍。与 NaHS 处理后 12 h 组比较, 经血必净注射液干预后 HPMECs 通透性显著下降 ($P < 0.01$), 说明血必净注射液能有效改善 ALI 所致肺血管内皮细胞的高通透性。

2.6 NaHS 暴露及血必净注射液干预后 HPMECs 细胞 claudin-5 蛋白表达 (图 6): 与空白对照组相比, NaHS 暴露后血管内皮 claudin-5 蛋白表达水平呈明显下降趋势, 暴露后 6 h 约为空白对照组的 46%, 12 h 时约为空白对照组的 42%。而经血必净注射液干预后 claudin-5 蛋白表达水平降到空白对照组的 68%, 明显高于 NaHS 处理后 12 h 组 ($P < 0.01$), 说明血必净注射液可显著减轻 ALI 状态下 claudin-5 蛋白表达的下程度。



注: NaHS 为硫化氢供体, HPMECs 为人肺微血管内皮细胞株; 与空白对照组比较, ^a*P* < 0.01; 与 NaHS 处理后 12 h 组比较, ^b*P* < 0.01

图5 NaHS暴露和血必净注射液干预后HPMECs的通透性



NaHS 为硫化氢供体, HPMECs 为人肺微血管内皮细胞株, claudin-5 为细胞紧密连接蛋白, β-actin 为 β-肌动蛋白; 与空白对照组比较, ^a*P* < 0.01; 与 NaHS 处理后 12 h 组比较, ^b*P* < 0.01

图6 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测NaHS暴露和血必净注射液干预后HPMECs细胞claudin-5蛋白表达

3 讨论

肺血管内皮屏障功能紊乱是ALI/ARDS最核心的病理改变, 可以导致肺血管通透性增加, 血管内液体渗出, 肺间质水肿, 进而导致ALI/ARDS^[11]。静止状态下, 内皮细胞呈“鹅卵石”样, 均匀而致密地排列成单层, 维持内皮屏障结构完整。生理状态下, 血管内皮细胞作为一种半透膜屏障, 调节大/小分子、白细胞和液体的转运, 在调节组织液稳态和炎症应答中扮演着关键角色。

相邻内皮细胞之间的黏附结构包括紧密连接(TJs)、黏附连接(AJs)和缝隙连接(GJs), 对于保持内皮组织的屏障功能发挥着重要作用。内皮屏障通透性增高有细胞旁路途径和跨细胞途径, 细胞旁路途径开放是通透性增高的主要原因^[12]。现已明确, TJs是由多种蛋白分子组成的复合物, 通过控制细胞

旁路转运途径发挥屏障功能。其中, claudin 家族跨膜蛋白因为能够直接调节TJs通透性, 被认为是TJs中最重要的组成部分^[13]。目前已经发现的 claudin 家族成员至少有 27 种, 在不同组织细胞中的表达相差很大, 而 claudin-5 仅在血管内皮细胞表达^[14]。有研究显示, claudin-5 缺陷小鼠具有选择性的血脑屏障功能障碍, 小分子物质渗入脑脊液导致在围产期死亡, 反映出 claudin-5 特异的血管屏障功能^[15]。相关实验表明, claudin-5 能增加内皮细胞的屏障功能而具有保护内皮作用。例如, 在辛伐他汀减轻ALI的研究中, 内皮细胞中表达的 claudin-5 起到重要的保护作用^[10]。Dalmasso 等^[16]研究表明, 白细胞介素-4(IL-4)可以激活内皮细胞中 claudin-5 表达上调, 从而增强内皮细胞抵抗损伤的作用。故 claudin-5 被认为有可能是ALI/ARDS的潜在治疗靶

点。H₂S 暴露浓度是其毒性作用的关键因素之一，高浓度 [(500 ~ 1000) × 10⁻⁶] H₂S 可直接抑制细胞色素氧化酶引起细胞内窒息导致“闪电样死亡”，(250 ~ 500) × 10⁻⁶ 的 H₂S 暴露可导致肺内源性的 ALI/ARDS^[8-9]。

在本研究的暴露实验中，我们用 SD 大鼠建立 H₂S 吸入性 ALI 动物模型，并以 HPMECs 与 NaHS 共孵育建立相应的细胞模型。在动物实验中通过检测肺 W/D 比值、BALF 中总蛋白含量、PPI，在细胞实验中以荧光素钠为标记检测 HPMECs 通透性，进一步验证 ALI/ARDS 状态下肺血管的高通透性；同时，分别在 mRNA 和蛋白水平检测了 H₂S 暴露后 claudin-5 的表达。结果显示，大鼠肺 W/D 比值、BALF 中总蛋白含量、PPI 及 HPMECs 的通透性均呈升高趋势，尤其在暴露后 6 ~ 24 h 最为明显；伴随通透性指标的升高，claudin-5 的 mRNA 和蛋白表达水平均出现显著下降。

血必净注射液主要由红花、赤芍、川芎、丹参、当归等活血化瘀中药提炼而成^[17]。本课题组前期研究显示，血必净注射液能有效干预血小板活化和微血栓形成，从而改善脓毒症早期就存在的高凝状态，并推测其机制可能与保护血管内皮有关^[18]。在本研究的血必净干预实验中，我们选择暴露（共孵）后内皮细胞屏障功能受损最严重的时间点（12 h）为干预点，重点研究了血必净注射液对血管内皮屏障功能的保护作用。结果显示，血必净注射液能显著降低 ALI 状态下升高的 BALF 中总蛋白含量、PPI 及 HPMECs 通透性，并且能显著改善 claudin-5 蛋白的下降水平。由此说明，claudin-5 可能是血必净注射液发挥屏障保护作用的分子靶点。

虽然已有大量研究证明了血必净注射液保护血管内皮的作用，但目前研究大多集中在功效观察和相关炎症因子表达水平的改善方面，对血必净注射液发挥功效的具体分子靶点和作用机制有待进一步研究。本研究中通过体内和体外实验，聚焦血管内皮的屏障功能，阐述了血必净注射液对内皮屏障功能的保护作用，并就其发挥功效可能的分子靶点进行了有益的探索。下一步我们将就血必净注射液对 claudin-5 的调节通路做进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Wang J, Zhang H, Su C, et al. Dexamethasone ameliorates H₂S-induced acute lung injury by alleviating matrix metalloproteinase-2 and -9 expression [J]. PLoS One, 2014, 9 (4): e94701. DOI:

10.1371/journal.pone.0094701.
 [2] 郝金香, 许俊旭, 梁勇, 等. miR-122 联合 APACHE II 评分对 ARDS 患者预后的评估价值 [J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31 (6): 694-698. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.06.007.
 Hao JX, Xu JX, Liang Y, et al. Prognostic value of microRNA-122 combined with APACHE II score in patient with acute respiratory distress syndrome [J]. Chin Crit Care Med, 2019, 31 (6): 694-698. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.06.007.
 [3] Koval M. Claudin heterogeneity and control of lung tight junctions [J]. Annu Rev Physiol, 2013, 75: 551-567. DOI: 10.1146/annurev-physiol-030212-183809.
 [4] Ward C, Schlingmann B, Stecenko AA, et al. NF-κB inhibitors impair lung epithelial tight junctions in the absence of inflammation [J]. Tissue Barriers, 2015, 3 (1-2): e982424. DOI: 10.4161/21688370.2014.982424.
 [5] Aslam M, Ahmad N, Srivastava R, et al. TNF-α induced NFκB signaling and p65 (RelA) overexpression repress Cldn5 promoter in mouse brain endothelial cells [J]. Cytokine, 2012, 57 (2): 269-275. DOI: 10.1016/j.cyto.2011.10.016.
 [6] Jiang L, Wang J, Su C, et al. α-ENaC, a therapeutic target of dexamethasone on hydrogen sulfide induced acute pulmonary edema [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2014, 38 (2): 616-624. DOI: 10.1016/j.etap.2014.08.012.
 [7] 王文江, 姚咏明, 威力明, 等. 血必净注射液对烧伤延迟复苏大鼠器官功能及死亡率的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2006, 18 (1): 16-18. DOI: 10.3760/j.issn:1003-0603.2006.01.005.
 Wang WJ, Yao YM, Xian LM, et al. Effects of Xuebijing injection (血必净注射液) on multiple organ dysfunction and mortality in rats with delayed resuscitation for scald injury [J]. Chin Crit Care Med, 2006, 18 (1): 16-18. DOI: 10.3760/j.issn:1003-0603.2006.01.005.
 [8] Xu C, Jiang L, Zou Y, et al. Involvement of water channel aquaporin 5 in H₂S-induced pulmonary edema [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2017, 49: 202-211. DOI: 10.1016/j.etap.2016.12.013.
 [9] Geng P, Ma T, Xing J, et al. Dexamethasone ameliorates H₂S-induced acute lung injury by increasing claudin-5 expression via the PI3K pathway [J]. Hum Exp Toxicol, 2018, 37 (6): 626-635. DOI: 10.1177/0960327117721961.
 [10] Chen W, Sharma R, Rizzo AN, et al. Role of claudin-5 in the attenuation of murine acute lung injury by simvastatin [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014, 50 (2): 328-336. DOI: 10.1165/rcmb.2013-00580C.
 [11] 夏文芳, 张恒铭, 潘舟, 等. 雌激素相关受体 α 对脓毒症大鼠肺损伤的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31 (6): 699-703. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.06.008.
 Xia WF, Zhang HM, Pan Z, et al. Influences of estrogen-related receptor α on pulmonary vascular endothelium of rats undergoing sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2019, 31 (6): 699-703. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.06.008.
 [12] Stolwijk JA, Matrougui K, Renken CW, et al. Impedance analysis of GPCR-mediated changes in endothelial barrier function: overview and fundamental considerations for stable and reproducible measurements [J]. Pflugers Arch, 2015, 467 (10): 2193-2218. DOI: 10.1007/s00424-014-1674-0.
 [13] Overgaard CE, Daugherty BL, Mitchell LA, et al. Claudins: control of barrier function and regulation in response to oxidant stress [J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15 (5): 1179-1193. DOI: 10.1089/ars.2011.3893.
 [14] Kaarteenaho R, Merikallio H, Lehtonen S, et al. Divergent expression of claudin -1, -3, -4, -5 and -7 in developing human lung [J]. Respir Res, 2010, 11: 59. DOI: 10.1186/1465-9921-11-59.
 [15] Nitta T, Hata M, Gotoh S, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice [J]. J Cell Biol, 2003, 161 (3): 653-660. DOI: 10.1083/jcb.200302070.
 [16] Dalmaso AP, Goldish D, Benson BA, et al. Interleukin-4 induces up-regulation of endothelial cell claudin-5 through activation of FoxO1: role in protection from complement-mediated injury [J]. J Biol Chem, 2014, 289 (2): 838-847. DOI: 10.1074/jbc.M113.455766.
 [17] 杨俊, 许华, 王兵, 等. 血必净对脓毒症血管内皮保护作用的研究进展 [J]. 医学综述, 2018, 24 (6): 1206-1210. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2018.06.031.
 Yang J, Xu H, Wang B, et al. Research progress of protective effect of Xuebijing injection on vascular endothelium in sepsis [J]. Med Rec, 2018, 24 (6): 1206-1210. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2018.06.031.
 [18] 耿平, 夏仲芳, 顾健, 等. 血必净注射液对严重脓毒症患者早期高凝状态的干预作用 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15 (6): 346-349. DOI: 10.3321/j.issn:1008-9691.2008.06.007.
 Geng P, Xia ZF, Gu J, et al. Intervention of Xuebijing injection (血必净注射液) against early hypercoagulability in patients with severe sepsis [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2008, 15 (6): 346-349. DOI: 10.3321/j.issn:1008-9691.2008.06.007.

(收稿日期: 2020-03-19)