

慢性乙醇摄取对急性肺损伤大鼠气道上皮细胞间连接蛋白 occludin 和 E-cadherin 及屏障功能的影响

张媛莉 李清泉 郭卫 黄毅 杨炯

【摘要】 目的 观察慢性乙醇摄取及内毒素处理对大鼠气道上皮屏障功能及紧密连接(TJ)特征性蛋白 occludin 和黏附连接(AJ)蛋白 E-cadherin 的影响。方法 将 40 只 SD 大鼠随机均分为对照组、慢性乙醇摄取组(乙醇组)、内毒素处理组(LPS 组)、慢性乙醇摄取合并内毒素处理组(乙醇+LPS 组)。利用荧光示踪剂异硫氰酸荧光素标记的右旋糖酐(FD₄)测定支气管肺泡上皮的通透性;免疫荧光共聚焦显微镜下观察大鼠气道上皮 occludin 和 E-cadherin 蛋白分布及表达;蛋白质免疫印迹法(Western blotting)和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定肺组织中 occludin 和 E-cadherin 的蛋白及 mRNA 表达;并观察肺组织病理学改变。结果 乙醇组及 LPS 组支气管肺泡上皮通透性均较对照组明显增高($P < 0.05$);乙醇+LPS 组支气管肺泡上皮的通透性进一步增高($P < 0.01$)。occludin 和 E-cadherin 蛋白在对照组大鼠气道上皮呈连续、均匀的胞膜及胞质中表达;在乙醇组、LPS 组胞膜呈部分断裂、不连续的表达,且胞膜和胞质的表达下降;在乙醇+LPS 组的表达显著下降,且胞膜表达呈明显的断裂甚至消失。Western blotting 和 RT-PCR 显示,乙醇组和 LPS 组肺组织中 occludin 和 E-cadherin 的蛋白及 mRNA 表达均较对照组明显下降($P < 0.05$);乙醇+LPS 组中蛋白及 mRNA 表达下降最为明显,与其余各组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 慢性乙醇摄取通过降低 TJ 蛋白 occludin 和 AJ 蛋白 E-cadherin 的蛋白及 mRNA 表达水平,并干扰各蛋白在胞膜上的定位,最终导致气道上皮屏障功能受损,加重内毒素诱导的急性肺损伤。

【关键词】 肺损伤,急性; 乙醇; 紧密连接蛋白 occludin; 黏附连接蛋白 E-cadherin; 上皮屏障功能

Effects of chronic ethanol ingestion on intercellular junction proteins and barrier function of airway epithelium in the endotoxemic rat ZHANG Yuan-li*, LI Qing-quan, GUO Wei, HUANG Yi, YANG Jiong.
*Division of Intensive Care Unit, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, Guangdong, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of chronic ethanol ingestion and lipopolysaccharide (LPS) on airway epithelium barrier function and the expression of tight junction protein occludin and adherens junction protein E-cadherin. **Methods** Forty Sprague-Dawley (SD) rats were assigned to control, ethanol, LPS and ethanol+LPS groups. The bronchoalveolar epithelial permeability was assessed by the bronchoalveolar lavage fluid (BALF); serum fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran (FD₄) fluorescence ratio. Protein localization and expression of occludin and E-cadherin in airway epithelium of rats lung were examined by immunofluorescence. The protein, messenger RNA expression of occludin and E-cadherin in the lung were examined by Western blotting and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The bronchoalveolar epithelial permeability in the ethanol group and LPS group were approximately 2-fold higher than those in the control group (both $P < 0.05$). The permeability in the ethanol+LPS group was increased further ($P < 0.01$). Occludin and E-cadherin appeared as a continuous and uniform expression in the airway epithelium of control rats. In ethanol group and LPS group partial breakdown of membrane staining and decreased cytoplasm staining of occludin and E-cadherin were seen in the airway epithelium. In ethanol plus LPS group, there was breakdown of epithelial membrane and obvious disappearance of cytoplasm staining pattern of occludin and E-cadherin. Western blotting and RT-PCR showed that both in ethanol and LPS groups protein levels of occludin and E-cadherin were depressed in lung. Treatment with ethanol together with LPS further depressed the protein and mRNA levels of occludin and E-cadherin in lung. RT-PCR showed that messenger RNA levels of occludin and E-cadherin in ethanol group and LPS group were lower than those in the control group (both $P < 0.05$). Treatment with ethanol plus LPS had the greatest depressive effect on these messenger RNA levels (ethanol+LPS group vs. the other groups, all $P < 0.01$). **Conclusion** These data suggest that chronic ethanol ingestion impairs the airway epithelial barrier function through down-regulation the messenger RNA expression and disruption of membrane localization of occludin and E-cadherin. Those deterioration of occludin and E-cadherin predisposes to acute lung injury induced by LPS.

【Key words】 acute lung injury; alcohol; tight junction protein occludin; adherens junction protein E-cadherin; epithelial barrier function

研究证明,慢性乙醇滥用是急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的一个独立危险因子,并提示慢性乙醇滥用可导致肺泡上皮细胞屏障功能损害,而气道及肺泡上皮屏障功能在急性肺损伤(ALI)发病机制中占中心地位,上皮细胞层的完整性是由紧密连接(TJ)、黏附连接(AJ)、桥粒和起细胞间沟通作用的缝隙连接组成,TJ 和 AJ 在调节上皮细胞屏障功能中起重要作用^[1-2]。我们以往的研究表明,慢性乙醇摄取通过改变细胞间 TJ 特征性蛋白 occludin、ZO-1 和 AJ 蛋白 E-cadherin 的表达以及定位,导致肺泡上皮屏障功能受损,并增加了对内毒素诱导 ALI 的易感性^[3],但目前并不清楚慢性乙醇摄取对气道上皮屏障功能的影响如何。本研究通过观察大鼠气道 TJ 蛋白 occludin 和 AJ 蛋白 E-cadherin 的 mRNA 及蛋白表达水平、定位,进一步探讨酗酒对肺部上皮屏障功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料:健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只,体重 170~200 g,由武汉大学实验动物中心提供。内毒素脂多糖(LPS,O127:B8,美国 Sigma 公司),异硫氰酸荧光素(FITC)标记的右旋糖酐(FITC-dextran,FD₄,美国 Sigma 公司)、多克隆兔抗 occludin 和 E-cadherin(美国 Zymed 实验室)、羊抗兔荧光二抗 Cy3(美国 Sigma 公司)、逆转录试剂盒(美国 GIBco BRL),RNA 抽取试剂 TRIzol(美国 GIBco BRL),化学发光试剂盒(ECL,美国 Amersham),壬基酚聚氧乙烯醚(NP-40)裂解液和十二烷基硫酸钠(SDS)裂解液(上海碧云天生物技术研究所)。

1.2 实验方法:按随机数字表法将大鼠分为对照组、乙醇组、LPS 组以及乙醇+LPS 组,每组 10 只。乙醇组大鼠以乙醇代替纯水作为唯一饮料,最初 3 d 给予体积分数为 2.5%的乙醇,然后给予 5%的乙醇,1 周后给予 10%的乙醇连续喂养 5 周(喂养期间所有动物都自由进食标准全价饲料,体重均增加约 2 倍,但乙醇组动物体重较对照组减少约 20%,这是酗酒动物模型的典型表现),平均每日乙醇用量为 8~11 g/kg(相当于人类每日饮用 1.0~1.4 L 苏格兰威士忌),6 周后腹腔注射水合氯醛 500 mg/kg 麻

醉大鼠。LPS 组和乙醇+LPS 组大鼠麻醉后经大隐静脉注射 LPS 2 mg/kg 制备 ALI 模型;其余各组给予生理盐水作为对照。LPS 注射 12 h 后再次麻醉大鼠,以检测支气管肺泡上皮的通透性;然后取左肺组织,用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 occludin 和 E-cadherin 的蛋白及 mRNA 表达;取右中肺组织进行免疫荧光染色,以检测各蛋白的分布及表达;对肺组织进行常规苏木素-伊红(HE)染色,观察肺组织病理学改变。

1.3 支气管肺泡上皮的通透性检测:用荧光示踪剂 FD₄ 方法。麻醉大鼠后经大隐静脉注射 FD₄-磷酸盐缓冲液(PBS)溶液(10 mg/kg),15 min 后切皮暴露气管进行支气管肺泡灌洗,收集支气管肺泡灌洗液(BALF),心脏穿刺采血,离心收集血清。荧光分光光度计测定 FD₄ 在 BALF(取回收量的一半)和血清(0.6 ml)中的强度,FD₄ 激发波长为 492 nm,发射波长为 515 nm。以 BALF 与血清中的荧光比值作为支气管肺泡上皮通透性指标^[4]。

1.4 免疫荧光组化检测蛋白的分布及表达:肺组织经体积分数为 4%的多聚甲醛固定、蔗糖梯度脱水、OCT 包埋剂包埋后冰冻切片(20 μm),切片于室温下干燥后用 PBS 洗涤,加入 0.2%的 Triton X-100 室温下 5 min;洗涤 3 次后用羊血清封闭液 37 °C 温育 30 min,加一抗(兔抗鼠)occludin(1:100)和 E-cadherin(1:200),4 °C 冰箱过夜;阴性对照组加入生理盐水作为对照。洗涤 4 次,然后加入荧光标记的(羊抗兔)二抗(Cy3,1:25),37 °C 温育 45 min;封片后用于激光共聚焦显微镜观察。

1.5 Western blotting 检测蛋白表达

1.5.1 NP-40 可溶性及 NP-40 不可溶性蛋白的提取:分析 TJ 和 AJ 蛋白需将细胞用不同的去污剂来溶解^[5]。用 NP-40 细胞裂解液匀浆肺组织,冰浴、离心,将上清液(即为 NP-40 可溶性蛋白提取液)移至小离心管(EP 管)中,此上清液用冷 SDS 裂解液重悬、超声裂解处理,再加入 NP-40 细胞裂解液反复抽吸以剪切 DNA,冰浴下离心,上清液即为 NP-40 不可溶性蛋白提取液,-70 °C 保存。Occludin 蛋白表达分析用 NP-40 不可溶性蛋白提取液;E-cadherin 蛋白表达分析用 NP-40 可溶性蛋白提取液;蛋白浓度测定用二辛可宁酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒。

1.5.2 Western blotting 分析:将样品用聚丙烯酰胺凝胶电泳,用含质量分数为 5%脱脂奶粉的三羟甲基氨基甲烷碱(TBST)缓冲液封闭,加入多克隆

基金项目:广东省医学科研基金课题(B2005107)
 作者单位:524001 湛江,广东医学院附属医院 ICU(张媛莉);武汉大学人民医院呼吸内科(李清泉,郭卫,黄毅);武汉大学中南医院呼吸内科(杨炯)
 作者简介:张媛莉(1970-),女(汉族),广东省人,博士研究生,副主任医师,主要从事急性性肺损伤的研究。

兔抗 occludin (1 : 500) 和 E-cadherin (1 : 1 000), 37 °C 孵育, TBST 洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (1 : 1 500), 37 °C 孵育。TBST 洗涤, 将 1 : 1 混匀配制的 ECL 显色液 (A 液和 B 液) 加到膜上, 室温放置, 曝光 X 线胶片, 所显示 β-肌动蛋白 (β-actin) 作为内参照。

1.6 半定量 RT-PCR: 采用 Primer 5 和 Oligo 6.5 软件进行引物设计, 并由武汉三博远志公司进行引物合成。Occludin (294 bp) 引物: 上游 5'-CTGTCTA TGCTCGTCATCG-3', 下游 5'-CATTCCCGATC TAATGACGC-3'; E-cadherin (215 bp) 引物: 上游 5'-GTATCGTCCCCGTCCAGC-3', 下游 5'-GGTT GCCCATTCGTTCA-3'; 三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH, 440 bp) 引物: 上游 5'-ACCACAGTCCA TGCCATCAC-3', 下游 5'-TCCACCACCCTGTTG CTGTA-3'。

RT-PCR: 总 RNA 提取严格按 TRIzol 试剂盒说明书进行, 取右上肺组织约 100 mg, 立即在液氮下研磨, 加 RNA 提取试剂 TRIzol 1 ml 抽提 RNA, 调节 RNA 的浓度为 0.5 g/L。取总 RNA (2.5 μg) 作底物, 逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA。PCR 扩增条件为 94 °C 预变性 5 min, 反应 32 个循环, 其中 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环结束后用 72 °C 延伸 10 min。以质量分数为 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳 100 min, Bio-capt 凝胶紫外成像系统中扫描拍照, Bio-1D 凝胶分析软件分析, 以目的基因扩增带灰度与同管 GAPDH 扩增带灰度比值来表示目的基因的 mRNA 表达水平。

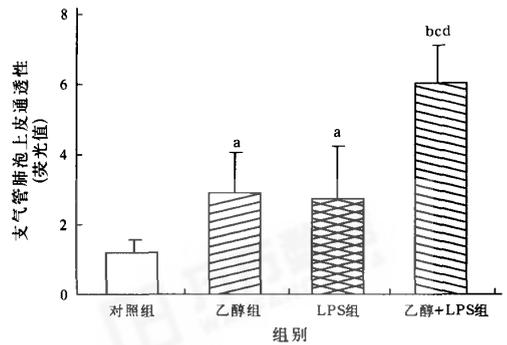
1.7 肺组织病理学改变: 常规甲醛固定, 石蜡包埋、切片, HE 染色, 光镜下观察肺组织的病理学变化。

1.8 统计学分析: 采用 SPSS 11.0 软件对资料进行处理分析, 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组变量比较进行单因素 ANOVA 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乙醇对支气管肺泡上皮通透性的影响 (图 1): 乙醇组支气管肺泡上皮通透性较对照组增高 2 倍左右 (2.89 ± 1.17 比 1.21 ± 0.36 , $P < 0.05$); 在 LPS 组同样观察到支气管肺泡上皮通透性增高 (3.71 ± 1.53 比 1.21 ± 0.36 , $P < 0.05$); 乙醇 + LPS 组支气管肺泡上皮通透性增高最为显著 (6.02 ± 1.09 比 1.21 ± 0.36 , $P < 0.01$)。

2.2 乙醇对气道上皮细胞 occludin 及 E-cadherin 蛋白表达的影响



注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与乙醇组比较, ^c $P < 0.01$; 与 LPS 组比较, ^d $P < 0.01$

图 1 各组大鼠支气管肺泡上皮通透性的比较

2.2.1 免疫组化结果 (彩色插页图 2, 图 3): 对照组 occludin 和 E-cadherin 蛋白在气道上皮胞膜及胞质呈连续的表达。慢性乙醇摄取则导致 occludin 和 E-cadherin 蛋白在气道上皮胞膜呈部分断裂的不连续表达, 而且胞膜、胞质的表达均较对照组下降。在 LPS 组也观察到同样的改变。慢性乙醇摄取合并 LPS 处理导致气道上皮 occludin 和 E-cadherin 蛋白在胞膜呈明显断裂的表达, 且胞膜、胞质的表达较对照组显著下降。

2.2.2 乙醇对肺组织 occludin 和 E-cadherin 蛋白表达的影响 (图 4): 乙醇组和 LPS 组 occludin 和 E-cadherin 的蛋白表达水平较对照组明显下降; 乙醇 + LPS 组 occludin 和 E-cadherin 的蛋白表达变化进一步加剧, 下降最为明显。

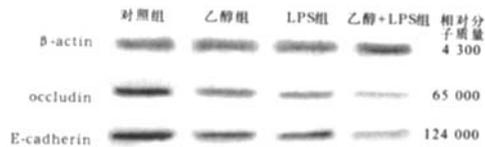
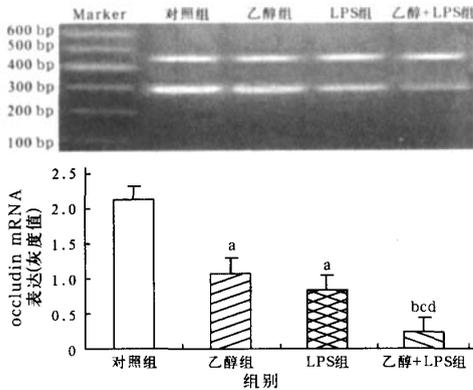


图 4 各组大鼠肺组织 occludin 和 E-cadherin 的蛋白表达

2.3 乙醇对肺组织 occludin 和 E-cadherin mRNA 表达的影响 (图 5, 图 6): 乙醇组和 LPS 组 occludin 和 E-cadherin 的 mRNA 表达均较对照组明显下降; 乙醇 + LPS 组 occludin 和 E-cadherin 的 mRNA 表达下降最为明显, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

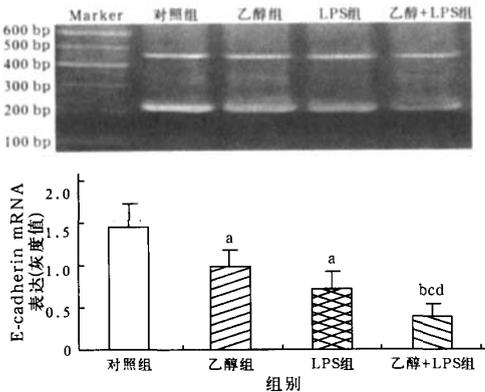
2.4 肺组织病理学改变 (彩色插页图 7): 对照组肺泡结构完整清楚, 肺泡腔和肺间质未见明显的水肿和炎症, 无明显的肺不张、肺大泡和出血; 乙醇组可观察到小支气管周围纤维组织增生等慢性支气管炎

的表现;LPS 组和乙醇+LPS 组可观察到肺组织的炎性出血,尤其是乙醇+LPS 组还伴有肺泡上皮明脱落显。



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与乙醇组比较,^c $P < 0.01$;与LPS组比较,^d $P < 0.01$

图 5 各组大鼠肺组织 occludin mRNA 的表达水平(294 bp)



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与乙醇组比较,^c $P < 0.01$;与LPS组比较,^d $P < 0.01$

图 6 各组大鼠肺组织 E-cadherin mRNA 的表达水平(215 bp)

生的协同效应会导致支气管肺泡上皮渗透性增加约 5 倍,肺组织病理学观察也显示同样结果。

通过免疫组化方法我们可以看到,慢性乙醇摄取和 LPS 两种处理均可降低气道上皮细胞 TJ 蛋白 occludin 和 AJ 蛋白 E-cadherin 在胞膜及胞质中的表达,并使其在胞膜处的连续定位出现断裂;两者联合处理时此变化加剧,这种现象主要出现在小气道肺泡上皮,而我们以往的研究显示,在肺泡上皮亦观察到同样的改变^[3],提示慢性乙醇摄取的作用不局限于气道上皮细胞,亦作用在肺泡上皮细胞。通过 Western blotting 及 RT-PCR 方法检测气道上皮细胞中 occludin 和 E-cadherin 的蛋白和 mRNA 表达水平,其结果与免疫荧光结果相吻合。表明慢性乙醇摄取是在转录水平上降低 occludin 和 E-cadherin 的合成,进而导致气道上皮的通透性增加。

关于影响这些蛋白导致上皮屏障功能受损的具体因子目前还在研究中。最近的研究提示,在全身性炎症后 TJ 蛋白的表达下降及胞膜失定位可能是一氧化氮(NO)依赖性的。Han 等^[4]发现,用 LPS 攻击小鼠后肺上皮屏障功能降低,肺组织 occludin、ZO-1 和 ZO-3 的蛋白及 mRNA 表达也减少,给予特异性诱导型一氧化氮合酶(iNOS)抑制剂后可以减轻 LPS 引起的 TJ 蛋白表达下降,并能保护支气管肺泡的屏障功能,表明全身性炎症是通过增加 iNOS 活性来导致这些 TJ 蛋白减少以及屏障功能降低。在肝脏及肠道的上皮亦观察到 TJ 蛋白 occludin 和 ZO-1 的减少及屏障功能降低与 iNOS 的活性增加有关^[11]。此外,还包括白细胞介素-1(IL-1)、IL-4、IL-10、IL-13、肿瘤坏死因子- α (TNF- α),以及 γ -干扰素(IFN- γ)等在内的许多炎症介质、细胞因子均参与上皮 TJ 功能调节,如 TNF- α 和 IFN- γ 可以在转录水平下调 occludin 与 ZO-1 的表达^[5,12]。

上皮细胞中 occludin 表达水平的下降与上皮通透性的增高相关^[13]。而 LPS 诱导的 ALI 模型中,血清和 BALF 中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 IFN- γ 增高最常见,说明可能通过 iNOS 以及这些炎症因子下调气道上皮细胞 occludin 和 E-cadherin 的蛋白表达来改变这些蛋白胞膜的定位。

有趣的是,慢性乙醇摄取和内毒素诱导在刺激免疫系统等某些方面存在一定程度的相同反应。如乙醇可以上调 iNOS,慢性乙醇滥用引起的细胞毒性是由于过量产生 NO 而导致^[12]。慢性乙醇成瘾患者不但在局部增加 NO 的产生,同时也增加血浆中 NO 的降解产物亚硝酸盐/硝酸盐类水平^[13]。亦有证

3 讨论

健康人的肺泡上皮单层对蛋白通过起主导的屏障作用,并提供大于 90%屏障作用来阻止亲水性溶质通过,同时作为屏障亦阻止吸入性变应原、刺激物和微生物的进入^[6]。TJ 位于上皮细胞侧膜的顶端,形成细胞旁通路的主要选择性屏障^[7]。Occludin 是 TJ 特征性蛋白之一,在 TJ 的屏障功能中起主要作用^[8-9]。AJ 是一种细胞间连接,由跨膜蛋白上皮钙黏蛋白(E-cadherin)依赖性的黏附构成。E-cadherin 丧失在 AJ 上的定位可扰乱 TJ 上皮屏障功能^[10],提示 AJ 的功能对于 TJ 结构的完整性是必需的。

我们的实验显示,慢性乙醇摄取以及 LPS 处理均可导致支气管肺泡上皮的通透性增高,其联合产

据表明,慢性乙醇刺激使炎性细胞、小肠和肝脏中的 iNOS、IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 和 IL-6 的基因表达水平增高^[14-15]。创伤合并慢性乙醇滥用患者血浆中 IL-6、IL-10 和可溶性内皮选择素(sE-selectin)的含量比无慢性乙醇滥用史创伤患者血浆中的含量明显升高,并且多器官功能障碍综合征(MODS)的发生率比无慢性乙醇滥用史创伤患者的发生率显著增加^[16]。此外,有慢性乙醇滥用史的患者血中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 浓度也较正常对照组显著增高^[17]。因此,慢性乙醇摄取可能通过这些高水平的炎症因子下调气道上皮中 occludin 和 E-cadherin 的 mRNA 和蛋白表达水平,从而导致屏障功能受损。

慢性乙醇摄取导致细胞毒性的基本途径是诱导细胞发生氧化应激反应。有研究显示,氧化应激可诱导 occludin、ZO-1 的酪氨酸磷酸化,使 occludin 与 ZO-1 复合物从 TJ 及细胞骨架中离解出来,导致上皮细胞旁的通透性增加,这一过程可被酪氨酸激酶抑制剂所阻断,提示 occludin、ZO-1 的酪氨酸磷酸化在 TJ 的分解中起了重要作用^[18]。因此,慢性乙醇摄取也可能通过改变 TJ 蛋白的酪氨酸磷酸化而破坏肺泡上皮屏障功能。

综上所述,本研究表明,慢性乙醇摄取通过降低 TJ 蛋白 occludin 和 AJ 蛋白 E-cadherin 的 mRNA 及蛋白表达,干扰其在胞膜定位而损伤气道上皮屏障功能,并可加重 LPS 诱导的 ALI。

参考文献

- [1] Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(4): 285-293.
- [2] Matter K, Balda M S. Signalling to and from tight junctions [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(3): 225-236.
- [3] Zhang Y L, Li Q Q, Guo W, et al. Effects of chronic ethanol ingestion on tight junction proteins and barrier function of alveolar epithelium in the rat [J]. Shock, 2007, 28(2): 245-252.
- [4] Han X, Fink M P, Uchiyama T, et al. Increased iNOS activity is essential for intestinal epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 286(2): L259-267.
- [5] Ahdieh M, Vandenbos T, Youakim A. Lung epithelial barrier function and wound healing are decreased by IL-4 and IL-13 and enhanced by IFN-gamma[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 281(6): C2029-2038.
- [6] Matthay M A, Folkesson H G, Clerici C. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema[J]. Physiol, 2002, 82(3): 569-600.
- [7] González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, et al. Tight junction proteins[J]. Prog Biophys Mol Biol, 2003, 81(1): 1-44.
- [8] McCarthy K M, Skare I B, Stankewich M C, et al. Occludin is a functional component of the tight junction [J]. J Cell Biol, 1996, 109(Pt 9): 2287-2298.
- [9] Chen Y, Merzdorf C, Paul D L, et al. COOH terminus of occludin is required for tight junction barrier function in early *Xenopus* embryos[J]. J Cell Biol, 1997, 138(4): 891-899.
- [10] Man Y, Hart V J, Ring C J, et al. Loss of epithelial integrity resulting from E-cadherin dysfunction predisposes airway epithelial cells to adenoviral infection[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 23(5): 610-617.
- [11] Han X, Fink M P, Yang R, et al. Increased iNOS activity is essential for intestinal epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice[J]. Shock, 2004, 21(3): 261-270.
- [12] Banan A, Fields J Z, Decker H, et al. Nitric oxide and its metabolites mediate ethanol induced microtubule disruption and intestinal barrier dysfunction[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 294(3): 997-1008.
- [13] Zima T, Fialová L, Mestek O, et al. Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases [J]. J Biomed Sci, 2001, 8(1): 59-70.
- [14] Fleming S, Toratani S, Shea-Donohue T, et al. Pro- and anti-inflammatory gene expression in the murine small intestine and liver after chronic exposure to alcohol[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2001, 25(4): 579-589.
- [15] Yang S Q, Lin H Z, Yin M, et al. Effects of chronic ethanol consumption on cytokine regulation of liver regeneration[J]. Am J Physiol, 1998, 275(4 Pt 1): G696-704.
- [16] von Heymann C, Langenkamp J, Dubisz N, et al. Posttraumatic immune modulation in chronic alcoholics is associated with multiple organ dysfunction syndrome[J]. J Trauma, 2002, 52(1): 95-103.
- [17] Khoruts A, Stahnke L, McClain C J, et al. Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients [J]. Hepatology, 1991, 13(2): 267-276.
- [18] Rao R K, Basuroy S, Rao V U, et al. Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress [J]. Biochem J, 2002, 368(Pt 2): 471-481.

(收稿日期: 2007-11-11 修回日期: 2008-01-23)

(本文编辑: 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

《中国危重病急救医学》杂志稿约说明

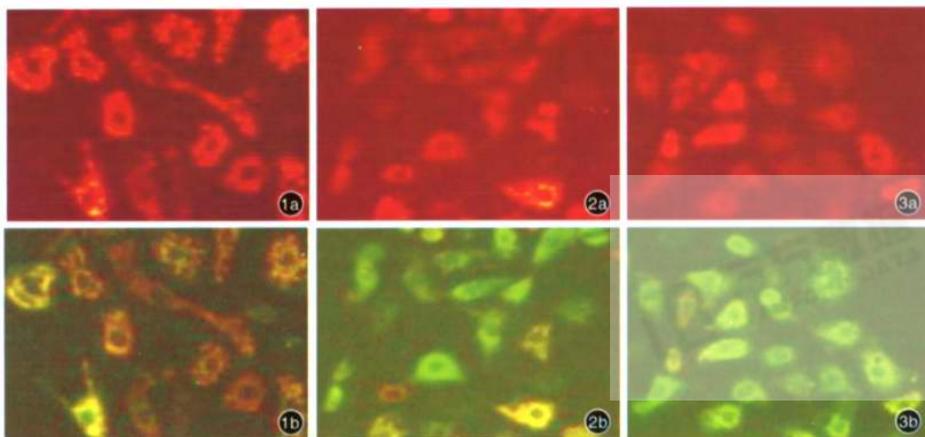
《中国危重病急救医学》杂志每年在杂志上刊登 1 次稿约, 欢迎广大作者踊跃投稿, 投稿请严格按照稿约的要求。同时交付文稿 1 份、单位介绍信或文稿加盖公章、软盘(Word 和纯文本形式排版)、审稿费(每篇 40 元)、课题批件复印件, 以利于稿件审稿过程, 提高稿件刊出速度。

本刊对所有来稿均采用同行审稿的方式进行公平、公正地审定。

(本刊编辑部)

氧化应激诱导肺泡 II 型上皮细胞凋亡及Bax和p53的表达变化

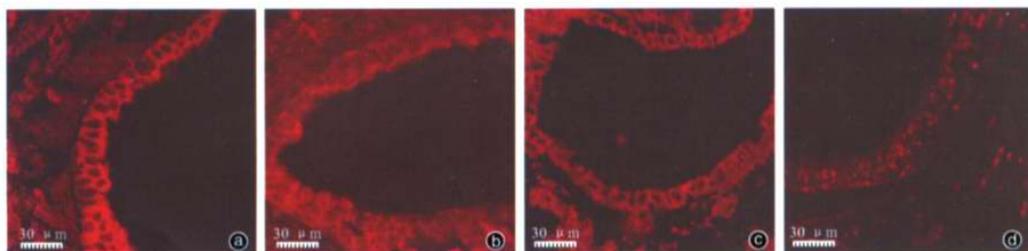
(正文见76页)



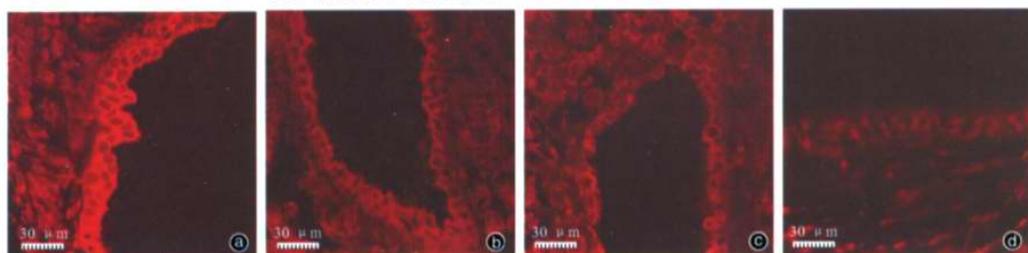
1: 对照组, 2: H₂O₂ 1 h组, 3: H₂O₂ 3 h组, (a): 多聚体, (b): 单体
 图1 荧光显微镜下观察各组相同视野A2细胞线粒体膜电位的变化情况(JC-1染色, ×200)

慢性乙醇摄取对急性肺损伤大鼠气道上皮细胞间连接蛋白 occludin和E-cadherin及屏障功能的影响

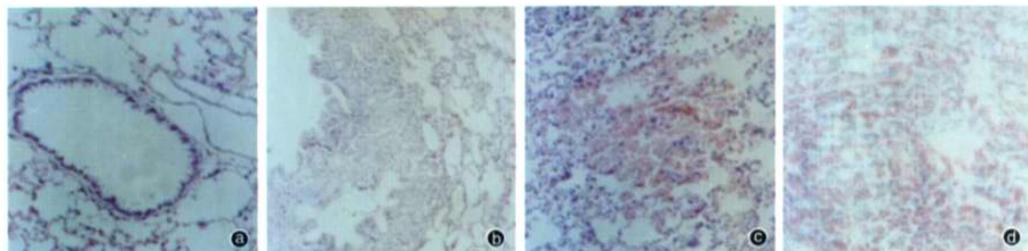
(正文见95页)



(a): 对照组, (b): 乙醇组, (c): LPS组, (d): 乙醇+LPS组
 图2 各组大鼠肺组织气道上皮细胞occludin蛋白的表达及分布(免疫组化)



(a): 对照组, (b): 乙醇组, (c): LPS组, (d): 乙醇+LPS组
 图3 各组大鼠肺组织气道上皮细胞E-cadherin蛋白的表达及分布(免疫组化)



(a): 对照组(×200), (b): 乙醇组(×100), (c): LPS组(×200), (d): 乙醇+LPS组(×200)
 图7 光镜下观察各组大鼠肺组织病理学改变(HE)