中华危重病急救医学 2017 年 7 月第 29 卷第 7 期 Chin Crit Care Med, July 2017, Vol.29, No.7

· 论著 ·

多药耐药相关蛋白 4 过表达对脂多糖诱导血管内皮高渗透性的影响及其机制

夏文芳 张桓铭 郑颜磊 周青山 苏镔

430060 湖北武汉,武汉大学人民医院重症医学科

通讯作者:夏文芳,Email:xiawenfang2004@sina.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.07.007

【摘要】 **目的** 探讨多药耐药相关蛋白 4(MRP4)基因过表达对脂多糖(LPS)诱导大鼠肺微血管内皮细胞(PMVECs)渗透性的影响及其分子机制。**方法** 体外培养 PMVECs 细胞,待细胞传至 3~6 代后分为 3 组:LPS 组无血清培养基培养 24 h 后,用 10 μg/mL LPS 刺激细胞;Ad-shRNA 组用腺病毒空白载体转染细胞 2 h,无血清培养基培养 24 h 后,用 10 μg/mL LPS 刺激细胞;Ad-MRP4 组用携带 MRP4 的重组腺病毒载体转染细胞 2 h,无血清培养基培养 24 h 后,用 10 μg/mL LPS 刺激细胞。于 LPS 刺激 2、6、12、24 h 采用 Transwell 小室法检测单层细胞渗透性;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞内环磷酸腺苷(cAMP)水平;激光共聚焦荧光显微镜下观察细胞内纤维型肌动蛋白(F-actin)形态及分布情况。于 LPS 刺激 12 h 收集细胞,采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测 PMVECs 中 MRP4、β-连环蛋白(β-catenin)、血管内皮-钙黏蛋白(VE-cad)和紧密连接蛋白(ZO-1)的表达水平。**结果** ① LPS 刺激后 PMVECs 细胞渗透性及细胞内 cAMP 水平逐渐增加,12 h 达到高峰,24 h 开始下降。用携带 MRP4 的重组腺病毒载体转染 PMVECs 后,细胞渗透性较 LPS 组及 Ad-shRNA 组显著增加〔12 h 渗透性(*A* 值):1.88±0.06 比 1.12±0.17、1.10±0.18〕,细胞内 cAMP 水平显著降低〔12 h cAMP(μg/L):2.39±0.02 比 2.97±0.01、3.00±0.02,均 $P<0.05$〕;而 LPS 组与 Ad-shRNA 组各时间点各指标差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。② 激光共聚焦荧光显微镜下显示,3 组细胞均出现 F-actin 重构、应力纤维形成,但 Ad-MRP4 组细胞破坏程度较 LPS 组和 Ad-shRNA 组更加严重。③ 与 LPS 组和 Ad-shRNA 组比较,Ad-MRP4 组 PMVECs 中 MRP4 蛋白表达显著上调(灰度值:0.76±0.03 比 0.44±0.02、0.43±0.02,均 $P<0.05$),β-catenin、VE-cad 和 ZO-1 蛋白表达显著下调〔β-catenin(灰度值):0.14±0.03 比 0.23±0.04、0.23±0.03;VE-cad(灰度值):0.21±0.01 比 0.34±0.02、0.35±0.04;ZO-1(灰度值):0.14±0.02 比 0.37±0.06、0.33±0.07,均 $P<0.05$〕;而 LPS 组与 Ad-shRNA 组间各蛋白表达差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。**结论** MRP4 基因过表达可降低细胞内 cAMP 水平,下调细胞间连接蛋白表达,从而增加 LPS 诱导的血管内皮渗透性。

【关键词】 脂多糖; 多药耐药性关蛋白 4; 内皮通透性; 环磷酸腺苷

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(81301620);国家自然科学基金面上项目(81671941)

Effect of multidrug resistant associated protein 4 overexpression on lipopolysaccharide-induced vascular endothelial hyperpermeability and its mechanism *Xia Wenfang, Zhang Huanming, Zheng Yanlei, Zhou Qingshan, Su Bin*

Department of Critical Care Medicine, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China

Corresponding author: Xia Wenfang, Email: xiawenfang2004@sina.com

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effect of multidrug resistance protein 4 (MRP4) overexpression on lipopolysaccharide (LPS)-induced vascular endothelial hyperpermeability of rat pulmonary micro-vascular endothelial cells (PMVECs) and its molecule mechanism. **Methods** Three to six passages of PMVECs were cultured *in vitro*, and they were divided into three groups: the cells in LPS group were only challenged by LPS 10 μg/mL after being cultured in serum-free medium for 24 hours; the cells in Ad-shRNA and Ad-MRP4 groups were infected with the empty virus control or recombinant adenovirus expressing MRP4 for 2 hours, and then were cultured in serum-free medium for 24 hours followed by stimulation of LPS 10 μg/mL. Endothelial permeability was assayed by the Transwell chamber models at 2, 6, 12, and 24 hours after LPS stimulation. Intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The morphological characteristics and distribution of F-actin was determined by laser confocal fluorescence microscope. The protein expressions of MRP4, β-catenin, vascular endothelium-cadherin (VE-cad) and ZO-1 were measured by Western Blot. **Results** ① After LPS stimulation, endothelium permeability and intracellular cAMP levels in PMVECs were significantly increased, peaked at 12 hours, and then decreased after 24 hours. Compared with LPS group and Ad-shRNA group, PMVECs of Ad-MRP4 group were exhibited a significant increase in endothelial permeability [12-hour permeability (*A* value): 1.88±0.06 vs. 1.12±0.17, 1.10±0.18] and a significant decrease in intracellular cAMP level [12-hour cAMP (μg/L): 2.39±0.02 vs. 2.97±0.01, 3.00±0.02, all $P<0.05$]. There was no significant difference in endothelium permeability and intracellular cAMP levels at all time points between the LPS group and the Ad-shRNA group (all $P>0.05$).

万方数据

② Under laser confocal fluorescence microscope, after LPS stimulation, the stress fiber formation was induced in three groups. But there were pronounced irregular aggregation of fiber in PMVECs of Ad-MRP4 group. ③ Furthermore, compared with LPS group and Ad-shRNA group, protein expression of MRP4 in Ad-MRP4 group was dramatically increased (gray value: 0.76±0.03 vs. 0.44±0.02, 0.43±0.02, both $P<0.05$), and the protein expressions of β-catenin, VE-cad, and ZO-1 were significantly decreased [β-catenin (gray value): 0.14±0.03 vs. 0.23±0.04, 0.23±0.03); VE-cad (gray value): 0.21±0.01 vs. 0.34±0.02, 0.35±0.04; ZO-1 (gray value): 0.14±0.02 vs. 0.37±0.06, 0.33±0.07, all $P<0.05$]. There was no significant difference in all protein expressions between the LPS group and Ad-shRNA group (all $P>0.05$). **Conclusion** MRP4 overexpression can decrease intracellular cAMP levels, reduce intercellular junction protein expression, and then exaggerate LPS-induced vascular endothelial hyperpermeability.

【Key words】 Lipopolysaccharide; Multidrug resistance protein 4; Endothelial permeability; Cyclic adenosine monophosphate

Fund program: National Natural Science Youth Foundation of China (81301620); National Natural Science Foundation of China (General Program) (81671941)

脓毒症是由于机体对感染和非感染的反应失控引起的危及生命的多器官功能衰竭，是重症加强治疗病房（ICU）的常见病症，病死率高[1]。肺脏是脓毒症时最容易受累的器官，肺微血管内皮细胞（PMVECs）是肺损伤过程的靶细胞和效应细胞。脂多糖（LPS）是革兰阴性菌细胞壁的主要构成成分，在脓毒症早期发生发展过程中起到重要作用，可破坏PMVECs，导致肺微血管内皮渗透性增高，诱发急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征（ALI/ARDS）[2-3]。

多药耐药相关蛋白4（MRP4）主要参与转运环磷酸腺苷（cAMP），调控细胞内的环核苷酸水平。既往对MRP4的研究主要集中在肿瘤发生发展和耐药领域，2008年有研究表明，MRP4可以调控下游分子前列腺素，而细胞内前列腺素可以增加内皮细胞的渗透性[4]。本课题组前期研究也显示，MRP4抑制剂MK571可减轻脓毒症大鼠的肺损伤[5-6]，但MRP4对PMVECs内皮渗透性的影响及其机制尚未完全阐明。因此，本研究中通过重组腺病毒载体介导的大鼠MRP4基因（Ad-MRP4）转染大鼠PMVECs，观察MRP4基因过表达对LPS诱导的细胞渗透性、细胞骨架和细胞连接蛋白表达的影响，探讨MRP4在脓毒症致肺损伤中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂：大鼠PMVECs细胞株购于北京北纳创联生物技术研究院；实验用重组腺病毒Ad-MRP4的构建、包装、扩增、鉴定和纯化，及滴度为1×10^{10} pfu/mL的Ad-MRP4和腺病毒空白载体Ad-shRNA由上海汉恒生物科技有限公司完成；RPMI 1640培养基、胎牛血清（FBS）和胰酶购于美国Gibco公司；LPS、辣根过氧化物酶（HRP）、一抗〔MRP4、紧密连接蛋白（ZO-1）、β-连环蛋白（β-catenin）、血管内皮-钙黏蛋白（VE-cad）〕购于美国Sigma公司；Transwell小室购于美国Corning公司；β-肌动蛋白（β-actin）抗体、异硫氰酸荧光素（FITC）-鬼笔环肽染色剂、抗荧光淬灭封片剂购自武汉谷歌生物科技有限公司。

1.2 PMVECs传代培养：用含乙二胺四乙酸（EDTA）的0.25%胰酶消化PMVECs，种植于含10% FBS的RMPI 1640培养基6孔板中，细胞密度1×10^5/孔，置于37 ℃、含5% CO_2的细胞培养箱，待细胞生长至80%～90%进行消化传代，取3～6代细胞用于实验。

1.3 细胞分组及处理：将6孔板细胞分为LPS组、Ad-shRNA组、Ad-MRP4组3组。按感染复数值（MOI）为50计算感染病毒量，Ad-MRP4组用带有绿色荧光蛋白及大鼠MRP4基因的重组腺病毒载体转染细胞2 h，用不含FBS的培养基饥饿24 h后加入10 μg/mL LPS刺激；Ad-shRNA组用带有绿色荧光蛋白的空基因腺病毒载体转染细胞2 h，饥饿24 h后加入10 μg/mL LPS刺激；LPS组细胞仅饥饿24 h后加入10 μg/mL LPS刺激。

1.4 Transwell小室法检测内皮细胞渗透性：取胰酶消化培养瓶中的细胞，离心后加1 mL含10% FBS的RMPI 1640培养基，取10 μL进行细胞计数，按5×10^4/孔的细胞密度接种于Transwell上室，下室加入1 mL含10% FBS的培养基；待细胞长满后，上室加入10 μg/mL LPS和1 μg/mL HRP共200 μL，下室加入1 mL完全培养基。分别于2、6、12、24 h从下室取100 μL（用完全培养基补充）置于96孔板中，每孔加入3,3',5,5'-四甲基联苯胺（TMB）显色液100 μL，室温避光30 min后通过酶标仪在450 nm波长处检测HRP吸光度（A）值，反映内皮细胞渗透性。

1.5 细胞内cAMP水平的检测：各组分别于加入LPS 2、6、12、24 h收集细胞，4 ℃离心10 min，取上清，-20 ℃保存。采用酶联免疫吸附试验（ELISA）检测cAMP水平，按照试剂盒说明书操作。

1.6 细胞骨架蛋白的观察：将细胞种植于含载玻片

万方数据

的 6 孔板上，待细胞融合至 50% 左右，用磷酸盐缓冲液（PBS）冲洗，4% 多聚甲醛固定 15 min，PBS 冲洗后，用含 1% 曲通 X-100 的 PBS 破膜 5 min，PBS 冲洗后加入 FITC-鬼笔环肽染色剂 PBS 1∶400 稀释，室温避光染色 1 h 后，PBS 冲洗 3 次，用抗荧光淬灭封片剂封片，激光共聚焦荧光显微镜下观察纤维型肌动蛋白（F-actin）分布。

1.7 蛋白质免疫印迹试验（Western Blot）检测细胞 MRP4、β-catenin、VE-cad 和 ZO-1 蛋白表达：各组细胞于 LPS 刺激 12 h 后加入适量 RIPA 细胞裂解液，冰上混匀 30 min 后收集液体，4 ℃离心取上清液，取 20 μL 进行 BCA 蛋白定量，剩余按 1∶4 加入蛋白缓冲液，100 ℃恒温加热 10 min 后，-20 ℃冷藏。取等量蛋白上样，十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-DAGE）分离，电转至聚偏氟乙烯（PVDF）膜上，用含吐温的 Tris-HCl 缓冲盐溶液（TBS-T）洗涤，加含 50 g/L 脱脂奶粉的三羟甲基氨基甲烷-吐温缓冲盐溶液（TBST）室温封闭 1 h，加一抗，4 ℃过夜，TBS-T 洗涤 3 次，加入相应二抗（1∶1 000 稀释），室温孵育 1 h，TBS-T 洗涤 3 次。采用 Odyssey 双色红外激光成像系统扫描 PVDF 膜并成像，以目的蛋白与内参照 β-actin 条带的灰度值比值作为目的蛋白表达量。

1.8 统计学分析：采用 SPSS 20.0 软件分析数据。先对计量资料进行正态性检验，正态分布的计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-t 检验；非正态分布的计量资料以中位数（四分位数）〔$M(Q_L, Q_U)$〕表示，多组间比较采用非参数 Kruskal-Wallis H 检验，两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 细胞渗透性改变（表 1）：LPS 刺激后 PMVECs 细胞渗透性逐渐增加，12 h 达高峰，24 h 开始下降。与 LPS 组和 Ad-shRNA 组比较，Ad-MRP4 组细胞渗透性显著增加（均 $P<0.05$）；LPS 组与 Ad-shRNA 组差异无统计学意义（均 $P>0.05$）。

2.2 细胞内 cAMP 水平的变化（表 2）：LPS 刺激后 PMVECs 细胞内 cAMP 水平逐渐升高，12 h 达峰值后下降。与 LPS 组和 Ad-shRNA 组比较，Ad-MRP4 组各时间点 PMVECs 细胞内 cAMP 水平均显著降低（均 $P<0.05$）；而 LPS 组与 Ad-shRNA 组差异无统计学意义（均 $P>0.05$）。

表 1　脂多糖（LPS）刺激大鼠肺微血管内皮细胞（PMVECs）不同时间点细胞渗透性的变化（$\bar{x}\pm s$）

组别	孔数（孔）	细胞渗透性（A 值）			
		2 h	6 h	12 h	24 h
LPS 组	10	0.41±0.04	0.56±0.04	1.12±0.17	0.79±0.02
Ad-shRNA 组	10	0.41±0.03	0.52±0.03	1.10±0.18	0.80±0.04
Ad-MRP4 组	10	0.63±0.02[a]	0.81±0.03[a]	1.88±0.06[a]	1.26±0.08[a]

注：LPS 组用 10 μg/mL LPS 刺激细胞，Ad-shRNA 组用腺病毒空白载体转染细胞 2 h 后用 10 μg/mL LPS 刺激，Ad-MRP4 组用携带多药耐药相关蛋白 4（MRP4）的重组腺病毒载体转染细胞 2 h 后用 10 μg/mL LPS 刺激；与 LPS 组和 Ad-shRNA 组比较，[a]$P<0.05$

表 2　脂多糖（LPS）刺激大鼠肺微血管内皮细胞（PMVECs）不同时间点细胞内 cAMP 水平变化（$\bar{x}\pm s$）

组别	孔数（孔）	cAMP（μg/L）			
		2 h	6 h	12 h	24 h
LPS 组	10	2.53±0.05	2.85±0.02	2.97±0.01	2.70±0.02
Ad-shRNA 组	10	2.60±0.02	2.81±0.03	3.00±0.02	2.69±0.02
Ad-MRP4 组	10	2.21±0.04[a]	2.32±0.02[a]	2.39±0.02[a]	2.32±0.02[a]

注：cAMP 为环磷酸腺苷；LPS 组用 10 μg/mL LPS 刺激细胞，Ad-shRNA 组用腺病毒空白载体转染细胞 2 h 后用 10 μg/mL LPS 刺激，Ad-MRP4 组用携带多药耐药相关蛋白 4（MRP4）的重组腺病毒载体转染细胞 2 h 后用 10 μg/mL LPS 刺激；与 LPS 组和 Ad-shRNA 组比较，[a]$P<0.05$

2.3 细胞骨架 F-actin 的变化（图 1）：3 组细胞均出现 F-actin 重构、应力纤维形成，但 Ad-MRP4 组细胞破坏程度较 LPS 组和 Ad-shRNA 组更严重。LPS 刺激 2 h，LPS 组和 Ad-shRNA 组 F-actin 分布较规则；Ad-MRP4 组有无序粗大的应力纤维形成。LPS 刺激 6 h，3 组膜周边缘均出现 F-actin 致密带；Ad-MRP4 组膜周边缘 F-actin 致密带更薄，应力纤维明显。LPS 刺激 12 h，与 LPS 组和 Ad-shRNA 组比较，Ad-MRP4 组有明显极性的应力纤维，膜周核周 F-actin 毛糙、细胞间隙增大。LPS 刺激 24 h，Ad-MRP4 组 F-actin 分布较 LPS 组和 Ad-shRNA 组明显改变，胞质内有粗大极性的应力纤维，膜周 F-actin 稀疏甚至消失。

2.4 细胞 MRP4、β-catenin、VE-cad 和 ZO-1 蛋白表达的变化（图 2）：与 LPS 组和 Ad-shRNA 组比较，Ad-MRP4 组细胞 MRP4 蛋白的表达水平显著升高，β-catenin、VE-cad 和 ZO-1 蛋白的表达水平显著下降（均 $P<0.05$）；LPS 组与 Ad-shRNA 组间各蛋白表达差异无统计学意义（均 $P>0.05$）。

3 讨　论

正常情况下微血管内皮细胞参与体内多种生理过程，维持血液正常流动状态，调节血管内外物质交换，发挥屏障作用[7]。目前认为微血管内皮细胞渗透性增高可导致肺水肿等肺损伤，微血管内皮细胞

万方数据

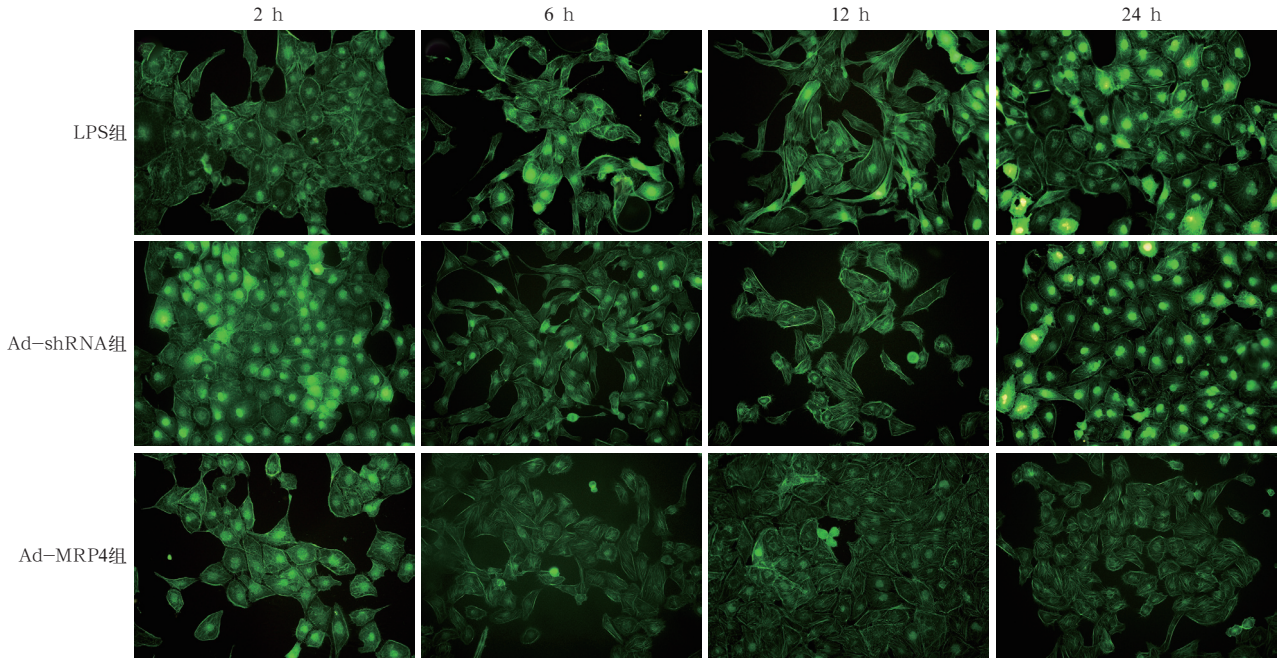
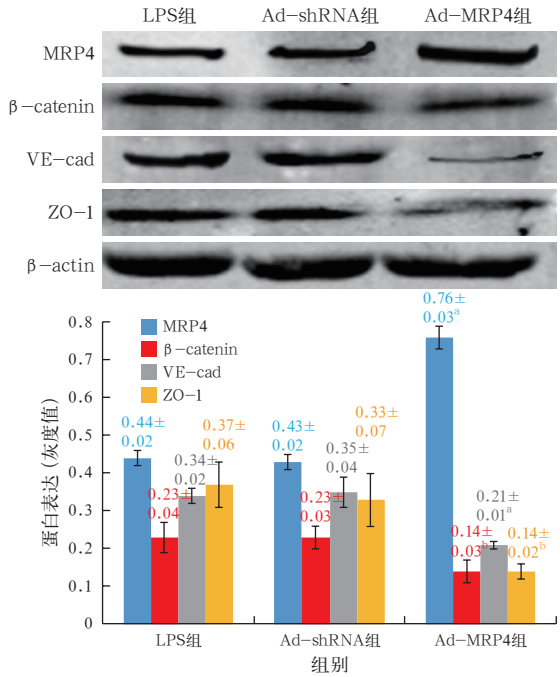


图 1 激光共聚焦荧光纤维镜下观察各组大鼠肺微血管内皮细胞(PMVECs)中纤维型肌动蛋白(F-actin)的形态变化 LPS 刺激 2 h,脂多糖(LPS)组和腺病毒空白载体组(Ad-shRNA 组)出现少量应力纤维,F-actin 分布较为有序,呈“花环状”分布;而携带多药耐药相关蛋白 4(MRP4)的重组腺病毒载体组(Ad-MRP4 组)有无序粗大的应力纤维形成。LPS 刺激 6 h,各组均出现无序应力纤维;Ad-MRP4 组膜周应力纤维分布紊乱更加明显。LPS 刺激 12 h,3 组膜周边缘 F-actin 致密带变薄,“花环状”分布破坏;Ad-MRP4 组膜周核周 F-actin 毛糙细胞间隙增大。LPS 刺激 24 h,3 组 F-actin 膜周核周分布紊乱;Ad-MRP4 组较其他两组极性粗大的应力纤维更多,膜周 F-actin 稀疏消失 FITC- 鬼笔环肽染色 中倍放大



脂多糖(LPS)组用 10 μg/mL LPS 刺激细胞,Ad-shRNA 组用腺病毒空白载体转染细胞 2 h 后用 10 μg/mL LPS 刺激,Ad-MRP4 组用携带多药耐药相关蛋白 4(MRP4)的重组腺病毒载体转染细胞 2 h 后用 10 μg/mL LPS 刺激;β-catenin 为 β-连环蛋白,VE-cad 为血管内皮-钙黏蛋白,ZO-1 为紧密连接蛋白,β-actin 为 β-肌动蛋白;与 LPS 组和 Ad-shRNA 组比较,$^aP<0.01$,$^bP<0.05$

图 2 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组大鼠肺微血管内皮细胞(PMVECs)MRP4、β-catenin、VE-cad 和 ZO-1 蛋白表达

屏障功能的维持在脓毒症治疗中起重要作用[8]。

调控血管内皮细胞渗透性变化主要涉及两方面调节因素,即血管内皮细胞形态破坏(细胞骨架重构)和血管内皮屏障功能破坏。细胞骨架由微管、微丝和中间纤维构成,微管主要参与细胞内物质运输与胞质分裂,而微丝则稳定细胞形态,并参与调控细胞紧密连接和黏附链接[9]。微丝由肌动蛋白(actin)、肌球蛋白和肌动蛋白结合蛋白组成,而 actin 是真核细胞最丰富的蛋白之一,由单聚体 G-actin 和多聚体 F-actin 两种动态转换构成。当炎性因子 LPS、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)刺激时,F-actin 发生重组,两者平衡动态紊乱,导致细胞形态改变且影响细胞内紧密链接和黏附链接,从而引起内皮细胞渗透性改变[10]。正常内皮细胞呈典型的“鹅卵石”样形态,F-actin 均匀分布在胞质内接近细胞膜处,胞质内有明显的密集 F-actin,细胞内极少的应力纤维。本实验显示,LPS 刺激细胞 12 h F-actin 形态发生改变,24 h 胞质内 F-actin 形成明显应力纤维,而细胞边缘 F-actin 致密带变薄;MRP4 过表达组在 LPS 刺激 6 h F-actin 形态开始改变,12 h 形成明显应力纤维,膜周边缘 F-actin 变细甚至消失,细胞形态显著改变。因此,MRP4 过表达加剧了炎性因子对细胞

万方数据

骨架的重构。细胞间屏障功能主要由细胞间黏附连接和紧密连接调控。紧密连接通过密封蛋白和闭合蛋白在膜周与 F-actin 相连，维持细胞的极性，防止分子、离子穿过细胞间隙。黏附链接主要由钙依赖性黏附素构成，相邻细胞间的 VE-cad 通过“Z”字形连接形成抛锚状态，并在细胞内通过 β-catenin、p120-catenin 等连接 F-actin[11]。本研究结果显示，Ad-MRP4 组紧密连接蛋白 ZO-1 和黏附链接蛋白 VE-cad、β-catenin 表达较 LPS 组和 Ad-shRNA 组显著下调，提示 MRP4 过表达通过降低细胞间连接蛋白表达加剧 LPS 诱导的细胞屏障功能破坏。

LPS 为脓毒症早期炎症反应的主要分子。有研究结果显示，LPS 可降低细胞内 cAMP 水平，进而调节下游的效应蛋白分子，影响微血管内皮细胞渗透性[12]。细胞内 cAMP 水平降低是导致内皮细胞形态改变和屏障功能紊乱的关键。cAMP 及其主要靶蛋白 cAMP 依赖的蛋白激酶 A（PKA）参与细胞骨架 F-actin 的重构。Bogatcheva 等[13-14]研究发现，LPS 可降低细胞内 cAMP/PKA 水平，进而通过肌球蛋白轻链激酶（MLCK）和蛋白激酶 2（ROCK2）上调肌球蛋白轻链（MLC）磷酸化，调控 F-actin 重构，增加内皮细胞渗透性。cAMP 还可通过 cAMP 直接激活的相关蛋白 1（Epac1）和小分子 G 蛋白 Ras 超家族成员 Rap1 途径调控 Rac1 和细胞分裂周期蛋白 42（Cdc42）的活化水平。活化的 Rac1 和 Cdc42 可以直接调控细胞间连接蛋白的表达水平，引起内皮细胞的渗透性增高[15]。本实验结果显示，MRP4 过表达组细胞内 cAMP 水平较 LPS 组明显降低，细胞骨架重构更加显著，细胞间连接蛋白 ZO-1、VE-cad 和 β-catenin 蛋白表达明显下调，说明 MRP4 通过调控细胞内 cAMP 水平影响细胞间屏障功能。

综上所述，MRP4 过表达可以通过降低细胞内 cAMP 水平，下调细胞间连接蛋白 ZO-1、VE-cad 和 β-catenin 表达，促进细胞骨架重构，破坏细胞间屏障功能，增加内皮细胞渗透性，进一步明确了 MRP4 调控肺血管内皮细胞渗透性的分子机制，为临床治疗脓毒症致肺损伤提供了新的靶点和理论依据。

参考文献

[1] 代晓明，黄伟. 2016 重症医学回顾与展望 [J]. 中华危重病急救医学，2017, 29 (1): 1-5. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.01.001.
Dai XM, Huang W. Critical care medicine breakthroughs in 2016 [J]. Chin Crit Care Med, 2017, 29 (1): 1-5. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.01.001.

[2] 秦科，邝晓聪，孙煦勇，等. 免疫抑制小鼠急性重症肺部感染中巨噬细胞亚型变化与乌司他丁调控效应 [J/CD]. 实用器官移植电子杂志，2016, 4 (1): 46-51. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2016.01.009.
Qin K, Kuang XC, Sun XY, et al. Alterations of macrophage subsets and the regulation of ulinastatin in the immunosuppressed mouse with severe pulmonary infection [J/CD]. Pract J Organ Transplant (Electron Version), 2016, 4 (1): 46-51. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2016.01.009.

[3] 宋麦芬，张羽，郭玉红，等. Sepsis 3.0 对 ICU 脓毒症患者诊断及预后评估的验证 [J]. 中国中西医结合急救杂志，2017, 24 (1): 6-9. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.01.003.
Song MF, Zhang Y, Guo YH, et al. Test of Sepsis 3.0 for diagnosis and prognosis of the septic patients in the intensive care unit [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2017, 24 (1): 6-9. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.01.003.

[4] Sassi Y, Lipskaia L, Vandecasteele G, et al. Multidrug resistance-associated protein 4 regulates cAMP-dependent signaling pathways and controls human and rat SMC proliferation [J]. J Clin Invest, 2008, 118 (8): 2747-2757. DOI: 10.1172/JCI35067.

[5] 苏镔，夏文芳，周青山，等. MK571 对脓毒症大鼠急性肺损伤的影响 [J]. 现代中西医结合杂志，2016, 25 (1): 1-3. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8849.2016.01.001.
Su B, Xia WF, Zhou QS, et al. Effect of MK571 on sepsis-induced acute lung injury in rats [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2016, 25 (1): 1-3. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8849.2016.01.001.

[6] 郑颜磊，夏文芳，周青山，等. 多药耐药相关蛋白 4 抑制剂对脓毒症急性肺损伤大鼠的保护作用 [J]. 中华危重病急救医学，2016, 28 (6): 504-507. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.06.006.
Zheng YL, Xia WF, Zhou QS, et al. Protective effect of multidrug resistant associated protein 4 inhibitor on rats with sepsis-induced acute lung injury [J]. Chin Crit Care Med, 2016, 28 (6): 504-507. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.06.006.

[7] 张艺森，徐晓涵，孙炳伟. 脓毒症时血管内皮细胞与血管平滑肌细胞相互作用的研究进展 [J]. 中华危重病急救医学，2016, 28 (2): 180-183. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.02.019.
Zhang YS, Xu XH, Sun BW. Interactions between endothelial cells and smooth muscle cells of blood vessels in sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2016, 28 (2): 180-183. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.02.019.

[8] Herold S, Gabrielli NM, Vadász I. Novel concepts of acute lung injury and alveolar-capillary barrier dysfunction [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013, 305 (10): L665-681. DOI: 10.1152/ajplung.00232.2013.

[9] Dominguez R, Holmes KC. Actin structure and function [J]. Annu Rev Biophys, 2011, 40 : 169-186. DOI: 10.1146/annurev-biophys-042910-155359.

[10] 陶广华，潘灵辉，荆忍，等. Rac1/MAPK/ERK 通路在大鼠呼吸机相关性肺损伤中的作用及机制 [J]. 中华危重病急救医学，2017, 29 (3): 249-254. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.03.011.
Tao GH, Pan LH, Jing R, et al. Study on Rac1/MAPK/ERK pathway mediated mechanism and role in rats with ventilator induced lung injury [J]. Chin Crit Care Med, 2017, 29 (3): 249-254. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.03.011.

[11] Dejana E, Orsenigo F. Endothelial adherens junctions at a glance [J]. J Cell Sci, 2013, 126 (Pt 12): 2545-2549. DOI: 10.1242/jcs.124529.

[12] Schlegel N, Waschke J. cAMP with other signaling cues converges on Rac1 to stabilize the endothelial barrier—a signaling pathway compromised in inflammation [J]. Cell Tissue Res, 2014, 355 (3): 587-596. DOI: 10.1007/s00441-013-1755-y.

[13] Bogatcheva NV, Zemskova MA, Poirier C, et al. The suppression of myosin light chain (MLC) phosphorylation during the response to lipopolysaccharide (LPS): beneficial or detrimental to endothelial barrier? [J]. J Cell Physiol, 2011, 226 (12): 3132-3146. DOI: 10.1002/jcp.22669.

[14] Bogatcheva NV, Zemskova MA, Kovalenkov Y, et al. Molecular mechanisms mediating protective effect of cAMP on lipopolysaccharide (LPS)-induced human lung microvascular endothelial cells (HLMVEC) hyperpermeability [J]. J Cell Physiol, 2009, 221 (3): 750-759. DOI: 10.1002/jcp.21913.

[15] Spindler V, Peter D, Harms GS, et al. Ultrastructural analysis reveals cAMP-dependent enhancement of microvascular endothelial barrier functions via Rac1-mediated reorganization of intercellular junctions [J]. Am J Pathol, 2011, 178 (5): 2424-2436. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.01.014.

（收稿日期：2017-04-17）

万方数据