·论著·

蛋白激酶 C 抑制剂对脂多糖所致大鼠肾微血管内皮细胞损伤的保护作用

林兰　何兵　程衍杨　陈卫萍　徐之良
武汉大学人民医院儿科，湖北武汉 430060
通信作者：徐之良，Email：930856284@qq.com

【摘要】 目的 探讨蛋白激酶 C（PKC）抑制剂 Rottlerin 对脂多糖（LPS）引起的大鼠肾微血管内皮细胞损伤的保护作用。**方法** 体外培养大鼠肾微血管内皮细胞至 3～6 代后，按随机数字表法分为 3 组：空白对照组不给予任何处理；LPS 组给予 LPS 10 mg/L 刺激 24 h；PKC 抑制剂组在 LPS 刺激前 30 min 给予 PKC 抑制剂 Rottlerin 2 μmol/L。采用酶联免疫吸附试验（ELISA）检测细胞肿瘤坏死因子-α（TNF-α）和白细胞介素（IL-1β、IL-8）等炎性因子水平；采用 Transwell 小室法检测肾单层内皮细胞通透性；采用蛋白质免疫印迹试验（Western Blot）检测细胞 PKC、RhoA 和血管内皮-钙黏蛋白（VE-cadherin）的表达；激光共聚焦荧光显微镜下观察血管内皮细胞纤维型肌动蛋白（F-actin）的形态及分布。**结果** 与空白对照组相比，LPS 组细胞经 10 mg/L LPS 刺激 24 h 后，炎性因子水平显著升高〔TNF-α（ng/L）：397.3±25.4 比 46.8±8.9，IL-1β（ng/L）：76.7±11.2 比 12.6±3.2，IL-8（ng/L）：574.5±31.4 比 73.2±9.6，均 $P<0.05$〕，单层内皮细胞通透性显著增高（A 值：1.32±0.03 比 0.36±0.02，$P<0.05$），PKC 和 RhoA 表达水平明显上调（PKC/β-actin：0.88±0.02 比 0.61±0.03，RhoA/β-actin：0.96±0.01 比 0.49±0.03，均 $P<0.05$），VE-cadherin 的表达水平明显下调（VE-cadherin/β-actin：0.51±0.01 比 0.72±0.04，$P<0.05$），且 F-actin 分布紊乱，有明显的应力纤维形成。与 LPS 组相比，PKC 抑制剂组细胞炎性因子水平显著降低〔TNF-α（ng/L）：127.4±14.6 比 397.3±25.4，IL-1β（ng/L）：43.2±7.8 比 76.7±11.2，IL-8（ng/L）：212.7±18.2 比 574.5±31.4，均 $P<0.05$〕，单层内皮细胞通透性显著下降（A 值：0.81±0.02 比 1.32±0.03，$P<0.05$），PKC 和 RhoA 的表达水平明显下调（PKC/β-actin：0.44±0.03 比 0.88±0.02，RhoA/β-actin：0.63±0.05 比 0.96±0.01，均 $P<0.05$），VE-cadherin 表达水平明显上调（VE-cadherin/β-actin：0.69±0.03 比 0.51±0.01，$P<0.05$），且 F-actin 重构及应力纤维形成明显减轻。**结论** PKC 抑制剂可以显著减轻 LPS 诱导的大鼠肾微血管内皮细胞损伤，对血管内皮细胞起保护作用。

【关键词】 蛋白激酶 C 抑制剂；　脂多糖；　血管内皮屏障
基金项目：湖北省武汉市应用基础研究计划项目（2015061701011643）
DOI：10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.03.017

Protective effect of protein kinase C inhibitor on rat renal vascular endothelial injury induced by lipopolysaccharide

Lin Lan, He Bing, Cheng Yanyang, Chen Weiping, Xu Zhiliang
Department of Pediatrics, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China
Corresponding author: Xu Zhiliang, Email: 930856284@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of protein kinase C (PKC) inhibitor rottlerin on rat renal vascular endothelial injury induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Rat renal microvascular endothelial cells cultured for 3–6 generations were divided into three groups according to random number table: blank control group in which cells were not challenged, LPS group in which cells were only stimulated by LPS 10 mg/L for 24 hours, and PKC inhibitor group in which cells were treated with PKC inhibitor rottlerin 2 μmol/L 30 minutes before LPS stimulation. The levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukins (IL-1β, IL-8) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Monolayer permeability was determined by Transwell assay. The expressions of PKC, RhoA and vascular endothelial-cadherin (VE-cadherin) were detected by Western Blot. The morphological characteristic and distribution of F-actin was measured by laser confocal fluorescence microscope. **Results** Compared with blank control group, the levels of inflammatory cytokines at 24 hours after 10 mg/L LPS stimulation were significantly increased in LPS group [TNF-α (ng/L): 397.3±25.4 vs. 46.8±8.9, IL-1β (ng/L): 76.7±11.2 vs. 12.6±3.2, IL-8 (ng/L): 574.5±31.4 vs. 73.2±9.6, all $P<0.05$], the permeability of endothelial cells was significantly increased (A value: 1.32±0.03 vs. 0.36±0.02, $P<0.05$), while the expressions of PKC and RhoA were significantly up-regulated (PKC/β-actin: 0.88±0.02 vs. 0.61±0.03, RhoA/β-actin: 0.96±0.01 vs. 0.49±0.03, both $P<0.05$), VE-cadherin expression was significantly down-regulated (VE-cadherin/β-actin: 0.51±0.01 vs. 0.72±0.04, $P<0.05$), and the F-actin distribution disorder had obvious stress fiber formation. Compared with LPS group, the levels of inflammatory cytokines were significantly lowered in PKC inhibitor group [TNF-α (ng/L): 127.4±14.6 vs. 397.3±25.4, IL-1β (ng/L): 43.2±7.8 vs. 76.7±11.2, IL-8 (ng/L): 212.7±18.2 vs. 574.5±31.4, all $P<0.05$], the permeability of endothelial cells was significantly

decreased (*A* value: 0.81±0.02 vs. 1.32±0.03, $P < 0.05$), the expressions of PKC and RhoA were significantly down-regulated (PKC/β-actin: 0.44±0.03 vs. 0.88±0.02, RhoA/β-actin: 0.63±0.05 vs. 0.96±0.01, both $P < 0.05$), the VE-cadherin expression was significantly up-regulated (VE-cadherin/β-actin: 0.69±0.03 vs. 0.51±0.01, $P < 0.05$), and the F-actin remodeling and stress fiber formation were significantly reduced. **Conclusion** PKC inhibitor could significantly attenuate the damage of vascular endothelial barrier induced by LPS, and plays an important role in endothelial cell barrier.

【Key words】 Protein kinase C inhibitor; Lipopolysaccharide; Vascular endothelial barrier
Fund program: Wuhan City Applied Basic Research Project of Hubei Province (2015061701011643)
DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.03.017

脓毒症是指机体对炎症反应失控而导致危及生命的器官功能障碍[1],具有较高的发病率和病死率。全球每年脓毒症发病人数约以 1%～5% 的速度增加,病死率可达到或超过 25%[2]。目前研究表明,炎症反应和血管内皮细胞屏障功能破坏是脓毒症发生发展过程中的关键环节[3-4]。临床上脓毒症患者发病过程中常伴有体腔和组织水肿,从而导致组织氧供不足以及有效循环血量不足,严重者可导致多器官功能障碍甚至死亡[5]。目前有观点认为肾脏是脓毒症病变过程中易受损靶器官之一,往往在病变早期出现急性肾损伤(AKI)[6-7]。Shum 等[8]研究显示,约有 47.5% 的脓毒症患者并发 AKI,当脓毒症患者合并 AKI 时病死率显著高于未合并 AKI 的脓毒症患者。脂多糖(LPS)是革兰阴性菌细胞壁的重要组成成分,是目前公认的发生脓毒症的关键分子[9]。有研究表明,蛋白激酶 C(PKC)可能参与炎症反应和血管内皮通透性的调控[10-11]。PKC 是体内重要的细胞内信号转导分子,是 Ca^{2+} 磷脂依赖性的丝氨酸 / 苏氨酸酶家族成员之一,可以催化各种蛋白质底物上的丝氨酸或苏氨酸磷酸化[12]。因此,本实验探讨 PKC 抑制剂 Rottlerin 对 LPS 所致血管内皮细胞损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料:大鼠肾微血管细胞株购于北京北纳创联生物技术研究院;培养基及胎牛血清均购于美国 Gibco 公司;PKC、RhoA、血管内皮-钙黏蛋白(VE-cadherin)抗体、LPS 及辣根过氧化物酶(HRP)均购于美国 Sigma 公司;Transwell 小室购于美国 Corning 公司;PKC 抑制剂 Rottlerin、酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒、异硫氰酸荧光素(FITC)-鬼笔环肽染色剂、抗荧光淬灭封片剂均购自武汉谷歌生物科技有限公司。

1.2 细胞培养与实验分组:大鼠肾微血管内皮细胞加入含 10% 血清的 RMPI1640 培养基,置于 37 ℃、含 5% CO_2 的细胞培养箱中培养。用 0.25% 胰酶 + 乙二胺四乙酸(EDTA)消化传代,当细胞传至 3～6 代且待细胞生长融合至 80% 左右时进行后续实验。按随机数字表法将 6 孔板内的细胞分为 3 组:空白对照组不给予任何处理,只加入等量培养基;LPS 组给予 LPS 10 mg/L 刺激 24 h;PKC 抑制剂组在接受 LPS 刺激前 30 min 给予 Rottlerin 2 μmol/L。

1.3 炎性因子水平检测:收集各组细胞,4 ℃离心 10 min 取上清液,采用 ELISA 检测肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白细胞介素(IL-1β、IL-8)水平,严格按照试剂盒说明书步骤操作。

1.4 Transwell 小室法检测肾单层内皮细胞通透性:将细胞接种于 Transwell 小室中,每孔细胞密度约为 5×10^4 个,培养 2～4 d 后血管内皮细胞融合成单层,用 Hank 液洗 3 次,分别在 Transwell 上室、下室加入 600 μL 和 1 500 μL 细胞培养基。在上室按每 500 μL 加入终浓度为 0.6 mg/L 的 HRP 后,根据实验分组,在 Transwell 上室中分别加入 10 mg/L LPS 刺激 6、12、24 h,从下室取 50 μL 培养基置于 96 孔板。待所有样本收集完毕后,每孔分别加入 100 μL 柠檬酸钠缓冲液显色 15 min,然后加入 2 mol/L H_2SO_4 50 μL 终止反应,通过酶标仪检测 HRP 吸光度(*A*)值,间接判断肾微血管内皮细胞通透性的变化。

1.5 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肾微血管内皮细胞 PKC、RhoA 和 VE-cadherin 的表达:吸取细胞培养基,提取细胞蛋白质,BCA 法测定蛋白浓度,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰氨凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,转移至硝酸纤维素(PVDF)膜上,用含吐温 20 的磷酸盐缓冲液(TBST)洗涤,5% 脱脂奶粉封闭 1 h。TBST 洗膜 3 次后,分别加入抗 PKC、RhoA 和 VE-cadherin 一抗,4 ℃摇床过夜,TBST 洗涤;加入荧光二抗室温避光孵育 1 h,TBST 洗涤;以 β-肌动蛋白(β-actin)为内参。采用双色红外激光扫描成像系统扫描并分析蛋白条带,以目的蛋白与内参条带的灰度值比值作为目的蛋白表达量。

1.6 肾微血管内皮细胞纤维型肌动蛋白(F-actin)免疫荧光染色:将细胞种植于载玻片上,待细胞融合至 50% 左右,给予磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,

用 4% 多聚甲醛固定 15 min，PBS 冲洗后，1% 曲通 PBS 破膜 5 min，PBS 冲洗后加入 FITC-鬼笔环肽染色剂（与 PBS 1∶300 稀释），室温避光染色 1 h，PBS 冲洗后，用抗荧光淬灭封片剂封片，激光共聚焦荧光显微镜下观察 F-actin 分布。

1.7 统计学分析：应用 SPSS 20.0 软件分析数据，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-t 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 PKC 抑制剂对 LPS 所致内皮细胞炎性因子水平的影响（表 1）：与空白对照组比较，LPS 组细胞 TNF-α、IL-1β 和 IL-8 水平显著升高（均 $P<0.05$）；与 LPS 组比较，PKC 抑制剂组上述炎性因子水平明显下降（均 $P<0.05$）。

表 1　各组大鼠肾微血管内皮细胞炎性因子释放水平比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	样本数（孔）	TNF-α（ng/L）	IL-1β（ng/L）	IL-8（ng/L）
空白对照组	3	46.8± 8.9	12.6± 3.2	73.2± 9.6
LPS 组	3	397.3±25.4 [a]	76.7±11.2 [a]	574.5±31.4 [a]
PKC 抑制剂组	3	127.4±14.6 [ab]	43.2± 7.8 [ab]	212.7±18.2 [ab]

注：LPS 为脂多糖，PKC 为蛋白激酶 C，TNF-α 为肿瘤坏死因子-α，IL-1β 为白细胞介素-1β，IL-8 为白细胞介素-8；与空白对照组比较，[a]$P<0.05$；与 LPS 组比较，[b]$P<0.05$

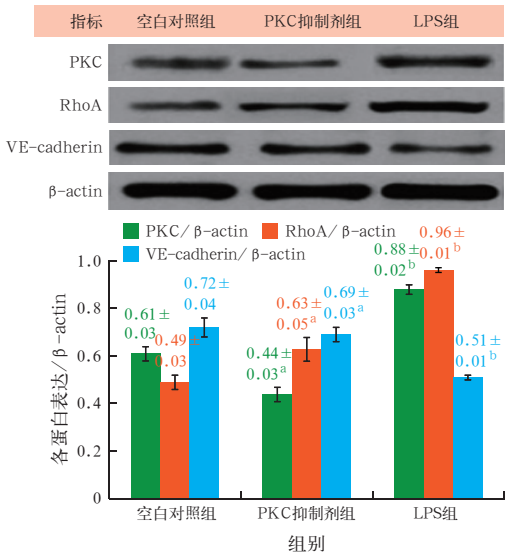
2.2 PKC 抑制剂对 LPS 所致内皮细胞通透性的影响（表 2）：与空白对照组相比，LPS 组经 LPS 刺激 6 h 后内皮细胞通透性即显著升高（$P<0.05$），并随时间延长呈升高趋势；与 LPS 组比较，PKC 抑制剂组 LPS 刺激各时间点内皮细胞通透性均明显降低（均 $P<0.05$）。

表 2　各组大鼠肾微血管内皮细胞通透性比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	样本数（孔）	通透性（A 值）		
		6 h	12 h	24 h
空白对照组	6	0.31±0.02	0.34±0.01	0.36±0.02
LPS 组	6	0.75±0.01 [a]	0.98±0.02 [a]	1.32±0.03 [a]
PKC 抑制剂组	6	0.42±0.01 [ab]	0.64±0.01 [ab]	0.81±0.02 [ab]

注：LPS 为脂多糖，PKC 为蛋白激酶 C；与空白对照组比较，[a]$P<0.05$；与 LPS 组比较，[b]$P<0.05$

2.3 PKC 抑制剂对 LPS 所致内皮细胞 PKC、RhoA、VE-cadherin 蛋白表达的影响（图 1）：与空白对照组相比，LPS 组 PKC 和 RhoA 表达水平明显上调，VE-cadherin 表达水平显著下调（均 $P<0.05$）；与 LPS 组相比，PKC 抑制剂组 PKC 和 RhoA 表达水平显著下调，VE-cadherin 表达水平明显上调（均 $P<0.05$）。



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验，PKC 为蛋白激酶 C，VE-cadherin 为血管内皮-钙黏蛋白，LPS 为脂多糖，β-actin 为 β-肌动蛋白；与 LPS 组比较，[a]$P<0.05$；与空白对照组比较，[b]$P<0.05$

图 1　Western Blot 检测各组大鼠肾微血管内皮细胞 PKC、RhoA、VE-cadherin 的蛋白表达

2.4 PKC 抑制剂对 LPS 所致内皮细胞 F-actin 分布的影响（图 2）：空白对照组肾微血管内皮细胞内的 F-actin 主要分布于细胞周边，微丝分布较有序，可见少量应力纤维形成；LPS 组可见 F-actin 排列紊乱、断裂、纤维重构、有应力纤维形成；与 LPS 组相比，PKC 抑制剂组 F-actin 的破坏程度显著改善。

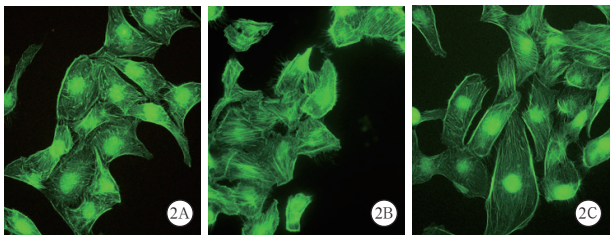


图 2　激光共聚焦荧光显微镜下观察各组大鼠肾微血管内皮细胞纤维型肌动蛋白（F-actin）分布　空白对照组（A）F-actin 呈“花环状”分布于细胞周边，应力纤维形成较少；脂多糖（LPS）组（B）F-actin 形成粗大、排列无序的应力纤维；蛋白激酶 C（PKC）抑制剂组（C）F-actin 形成较细的应力纤维，排列较有序，无明显断裂　FITC-鬼笔环肽染色　高倍放大

3 讨　论

正常情况下，微血管内皮细胞具有调节血管张力，维持血管屏障，防止炎性细胞、血细胞渗出及微血栓形成的作用，是维持器官功能的要素之一[13]。因此，探讨脓毒症时内皮细胞屏障的保护因素对脓毒症治疗起着关键作用。目前随着对 PKC 研究的深入，发现其在细胞增殖、分化、凋亡、炎症反应、细胞分泌以及细胞骨架重构等方面发挥着关键的调控作用[12]。有研究表明，应用 PKC 激动剂乙酸佛波

脂（PMA）可导致紧密连接相关蛋白降解，从而引起内皮细胞屏障功能的破坏[14]。相关研究表明，PKC 可通过增加基质金属蛋白酶 9（MMP-9）的活性，从而降低紧密连接蛋白的表达水平，导致血脑屏障功能破坏；此外，PKC 也可能通过 RhoA 信号通路导致血管内皮细胞屏障破坏[15]。

RhoA 属于三磷酸鸟苷（GTP）酶家族成员之一，该家族成员在细胞炎性因子所致的血管内皮屏障通透性增高中发挥着关键的调控作用[16]。该家族中 RhoA、Rac1 和 Cdc42 是目前研究的热点，Rac1、Cdc42 失活可促进微血管内皮屏障功能破坏[17-18]；相反，激活 RhoA 激酶信号通路可降低血管内皮细胞 VE-cadherin 和 β-连环蛋白（β-catenin）的表达水平，破坏 F-actin 网络，从而引起血管内皮高渗透。

TNF-α 是一种多功能细胞因子，其生物学功能包括炎症反应、肿瘤细胞坏死及细胞的分化、增殖、凋亡等[19]。有研究表明，在肺血管内皮细胞中，TNF-α 通过活化 Rho 激酶导致 F-actin 重组，内皮屏障功能破坏，引起肺水肿[20]。还有研究证明，TNF-α 可使 RhoA 活化并诱导其蛋白表达上调[21]。

本实验表明，PKC 抑制剂 Rottlerin 可显著降低 LPS 刺激所致的炎性因子 TNF-α、IL-1β 和 IL-8 水平，显著减轻 LPS 引起的内皮屏障通透性增高，明显改善 LPS 导致细胞 F-actin 骨架的破坏，表明 PKC 抑制剂 Rottlerin 对 LPS 所致肾微血管内皮细胞损伤有一定保护作用。因此推测 PKC 抑制剂 Rottlerin 的保护作用可能与 TNF-α、RhoA 的活性受到抑制以及 VE-cadherin 等内皮细胞间连接相关蛋白表达增加有关，但其具体作用机制仍需进一步研究证明。

综上，本研究表明，PKC 抑制剂 Rottlerin 可以抑制 LPS 诱导的大鼠肾微血管内皮细胞炎性因子水平升高、内皮屏障通透性增加及细胞骨架的破坏，从而发挥一定的保护效应，但其具体作用机制、临床疗效及其安全性仍需要进一步深入探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315 (8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.

[2] Hodgin KE, Moss M. The epidemiology of sepsis [J]. Curr Pharm Des, 2008, 14 (19): 1833-1839. DOI: 10.2174/138161208784980590.

[3] Khakpour S, Wilhelmsen K, Hellman J. Vascular endothelial cell Toll-like receptor pathways in sepsis [J]. Innate Immun, 2015, 21 (8): 827-846. DOI: 10.1177/1753425915606525.

[4] 李鑫，梁英健，张晓娟，等. 肝素通过下调脂多糖诱导的 NO 和活性氧表达保护肾脏微血管内皮细胞 [J]. 中华危重病急救医学，2018, 30 (5): 405-408. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.05.003.
Li X, Liang YJ, Zhang XJ, et al. Unfractionated heparin ameliorates lipopolysaccharide induced expressions of nitric oxide and reactive oxygen species in renal microvascular endothelial cells [J]. Chin Crit Care Med, 2018, 30 (5): 405-408. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.05.003.

[5] Di A, Mehta D, Malik AB. ROS-activated calcium signaling mechanisms regulating endothelial barrier function [J]. Cell Calcium, 2016, 60 (3): 163-171. DOI: 10.1016/j.ceca.2016.02.002.

[6] Chertow GM, Burdick E, Honour M, et al. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients [J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16 (11): 3365-3370. DOI: 10.1681/ASN.2004090740.

[7] 赵娜，田焕焕，李志，等. 脓毒症并发急性肾损伤的危险因素分析与早期诊断 [J]. 中华危重病急救医学，2013, 25 (9): 542-545. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.09.009.
Zhao N, Tian HH, Li Z, et al. Risk factors and early diagnosis of acute kidney injury in patients with sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2013, 25 (9): 542-545. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.09.009.

[8] Shum HP, Kong HHY, Chan KC, et al. Septic acute kidney injury in critically ill patients: clinical characteristics and outcomes [J]. Hong Kong J Nephrology, 2015, 17 (2): S99. DOI: 10.1016/j.hkjn.2015.09.072.

[9] Venancio TM, Machado RM, Castoldi A, et al. CETP lowers TLR4 expression which attenuates the inflammatory response induced by LPS and polymicrobial sepsis [J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016: 1784014. DOI: 10.1155/2016/1784014.

[10] 杨霞，李香琴，马晓媛，等. 脓毒症血管内皮损伤及调节策略的研究进展 [J]. 中国中西医结合急救杂志，2016, 23 (1): 108-110. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.01.028.
Yang X, Li XQ, Ma XY, et al. Research progress of vascular endothelial injury and its regulatory measures in sepsis [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2016, 23 (1): 108-110. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.01.028.

[11] Ren J, Wang Q, Morgan S, et al. Protein kinase C-δ (PKCδ) regulates proinflammatory chemokine expression through cytosolic interaction with the NF-κB subunit p65 in vascular smooth muscle cells [J]. J Biol Chem, 2014, 289 (13): 9013-9026. DOI: 10.1074/jbc.M113.515957.

[12] Zeng L, Webster SV, Newton PM. The biology of protein kinase C [J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 740: 639-661. DOI: 10.1007/978-94-007-2888-2_28.

[13] Gill SE, Taneja R, Rohan M, et al. Pulmonary microvascular albumin leak is associated with endothelial cell death in murine sepsis-induced lung injury *in vivo* [J]. PLoS One, 2014, 9 (2): e88501. DOI: 10.1371/journal.pone.0088501.

[14] Yasui Y, Yamada K, Takahashi S, et al. PMA induces GCMa phosphorylation and alters its stability via the PKC- and ERK-dependent pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 417 (4): 1127-1132. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.12.059.

[15] Deng Y, Feng W, Wu J, et al. The concentration of erlotinib in the cerebrospinal fluid of patients with brain metastasis from non-small-cell lung cancer [J]. Mol Clin Oncol, 2014, 2 (1): 116-120. DOI: 10.3892/mco.2013.190.

[16] Nair S, Arora S, Lim JY, et al. The regulation of TNFα production after heat and endotoxin stimulation is dependent on Annexin-A1 and HSP70 [J]. Cell Stress Chaperones, 2015, 20 (4): 583-593. DOI: 10.1007/s12192-015-0580-5.

[17] Cristante E, McArthur S, Mauro C, et al. Identification of an essential endogenous regulator of blood-brain barrier integrity, and its pathological and therapeutic implications [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110 (3): 832-841. DOI: 10.1073/pnas.1209362110.

[18] Spindler V, Schlegel N, Waschke J. Role of GTPases in control of microvascular permeability [J]. Cardiovasc Res, 2010, 87 (2): 243-253. DOI: 10.1093/cvr/cvq086.

[19] Wang XX, Yang JX, Pan YY, et al. Protective effects of tanshinone ⅡA on endothelial progenitor cells injured by tumor necrosis factor-α [J]. Mol Med Rep, 2015, 12 (3): 4055-4062. DOI: 10.3892/mmr.2015.3969.

[20] Xing J, Birukova AA. ANP attenuates inflammatory signaling and Rho pathway of lung endothelial permeability induced by LPS and TNFalpha [J]. Microvasc Res, 2010, 79 (1): 56-62. DOI: 10.1016/j.mvr.2009.11.006.

[21] 邓小鹿，彭镜，何芳，等. TNF-α 对小鼠脑微血管内皮细胞 RhoA 活性的影响 [J]. 中国病理生理杂志，2011, 27 (6): 1210-1212, 1217. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2011.06.030.
Deng XL, Peng J, He F, et al. A novel mechanism of RhoA activation induced by tumor necrosis factor-α in mouse cerebral microvascular endothelial cells [J]. Chin J Pathophysiology, 2011, 27 (6): 1210-1212, 1217. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2011.06.030.

（收稿日期：2018-12-17）