

· 实验研究 ·

高原失血性休克大鼠相关急性肺损伤病变及发病机制

高晓华 曹虹 耿智隆

【摘要】 目的 探讨高原失血性休克相关急性肺损伤(acute lung injury, ALI)病变及发病机制。**方法** 雄性 Wistar 大鼠 72 只,体重 280~320 g,随机分为六组:假手术组(Sham 组)、休克 15 min 组(HS15 组)、休克 30 min 组(HS30 组)、休克 45 min 组(HS45 组)、休克 60 min 组(HS60 组)和休克 90 min 组(HS90 组),每组 12 只。建立高原大鼠失血性休克模型后,Sham 组麻醉置管后不予失血,仅观察 90 min 即刻处死,其余五组分别按照 15、30、45、60 和 90 min 观察终止时间窗维持于休克状态。光镜下观察肺组织病理变化,测定肺湿/干重比(W/D)、计算肺通透指数,同时测定肺组织髓过氧化物酶(MPO)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)的活性和丙二醛(MDA)的浓度,采用 ELISA 法检测肺组织中 TNF- α 和 IL-10 的浓度。采用免疫组化法检测肺组织中 claudin-3 和 claudin-4 的表达和分布。**结果** 与 Sham 组比较,休克造成不同程度的肺损伤,且与休克维持时间成正比。在休克 15~30 min,大鼠肺组织 W/D、肺通透指数、MPO、MDA、TNF- α 、T-SOD 和 IL-10 的变化甚微,在此之后,随着时间的延长,肺 W/D、肺通透指数、MPO 活性、MDA 浓度和 TNF- α 浓度明显升高,同时伴随 SOD 活性和 IL-10 浓度的明显下降($P<0.05$)。claudin-3 和 claudin-4 在肺上皮细胞和内皮细胞处的表达明显错位并减少($P<0.05$)。**结论** 高原环境下,遭受失血性休克的大鼠血流动力学在短时间代偿后,病变呈现螺旋式恶化。且随着休克的延续,大鼠体内炎症/抗炎、氧化/抗氧化稳态失衡,导致肺上皮细胞内 claudin-3 和 claudin-4 流失,呈现出急性肺损伤的表现。

【关键词】 失血性休克;高原;急性肺损伤;炎症反应;氧化应激

Evolution and mechanism of acute lung injury following hemorrhagic shock in a rodent model at plateau

GAO Xiaohua, CAO Hong, GENG Zhilong. Department of Anesthesiology, General Hospital of Lanzhou Military Region, Lanzhou 730050, China

Corresponding author: GENG Zhilong, Email: zlgch@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the pathogenesis of acute lung injury in rats suffering hemorrhagic shock at plateau. **Methods** Seventy-two male Wistar rats, weighing 280-320 g, were randomized into 6 groups ($n=12$): sham group (group Sham), hemorrhagic shock for 15 min (group HS15), hemorrhagic shock for 30 min group (group HS30), hemorrhagic shock for 45 min group (group HS45), hemorrhagic shock for 60 min group (group HS60) and 90 min group (group HS90). Hemorrhagic shock model of Wistar rats was reproduced at plateau. The rats were only anesthetized, no shock and were sacrificed after 90 min in group Sham. The other groups were different in bleeding time and then were respectively sacrificed at 15, 30, 45, 60 and 90 min after shock. The pathological changes in the lungs were observed with light microscope. Wet to dry weight ratio (W/D), lung permeability index (LPI), myeloperoxidase (MPO) activity, malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in lung were measured. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the TNF- α and IL-10 in lung tissue, the expression and distribution of claudin-3 and claudin-4 in lung tissue was verified by immunohistochemistry method. **Results** Compared with group Sham, shock causes acute lung injury at different degree, and was positively correlated with the duration of shock, during the period of 15 to 30 min, it merely rendered a slight change in lung W/D, LPI, MPO, MDA, TNF- α , T-SOD and IL-10. Subsequently, along with time prolonged, lung W/D, neutrophils in BALF, LPI, MPO, MDA, TNF- α were significantly elevated, while T-SOD and IL-10 were notably reduced ($P<0.05$). Immunohistochemical results showed that claudin-3 and claudin-4 expression in lung epithelial cells and endothelial cells

基金项目:全军面上基金课题(CLZ14L001);兰州军区面上基金课题(CLZ12JB11)

作者单位:362000 福建省泉州市,福建医科大学附属第二医院麻醉科(高晓华);兰州军区兰州总医院麻醉手术科(曹虹、耿智隆)

通信作者:耿智隆,Email: zlgch@hotmail.com

expressed at low levels and dislocated ($P < 0.05$). **Conclusion** After a short time compensatory lesions, the change of rats' hemodynamic stability suffering severe hemorrhagic shock showed a spiral downward. Along with the extension of the shock, hemorrhagic shock at plateau results into the disturbance of inflammatory response and oxidative stress, the loss of claudin-3 and claudin-4 in lung epithelial cells, which triggers the acute lung injury.

【Key words】 Hemorrhagic shock; Plateau; Acute lung injury; Inflammatory response; Oxidative stress

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的病变特点是中性粒细胞聚集、促炎细胞因子表达增强、上皮和内皮细胞屏障受损、肺泡-动脉血氧梯度增高以及间质肺水肿形成,而且间接性 ALI 的发病占 43%^[1]。有研究表明,多器官衰竭(multi-organ failure, MOF)患者中 74% 伴发肺衰竭,而肺作为首个衰竭器官的患者占 64%^[2]。目前仍缺乏对 ALI 特异性的治疗方案,本研究将上皮和内皮细胞屏障组成中紧密连接结构的关键因子 claudin-3 和 claudin-4 与失血性休克对 ALI 发病的作用相结合,研究休克相关 ALI 的可能机制,以期寻找出能预警 ALI 且特异性和敏感度相对较高的标志物,供临床参考。

材料与方法

实验动物和分组 雄性 Wistar 大鼠 72 只,体重 280~320 g,由兰州大学实验动物中心提供。按照随机数字表法将大鼠分为六组:假手术组(Sham 组)、休克 15 min 组(HS15 组)、休克 30 min 组(HS30 组)、休克 45 min 组(HS45 组)、休克 60 min 组(HS60 组)和休克 90 min 组(HS90 组),每组 12 只。

高原失血性休克大鼠模型制备 大鼠实验前自由进食水,在榆中县马街山(兰州,3780 米)参考文献[3]的方法复制失血性休克模型,面罩吸入 3% 异氟醚-氧气诱导麻醉,0%~1% 异氟醚-空气维持麻醉,1% 利多卡因局部麻醉,分离并暴露双侧股动脉、右侧股静脉和右颈总动脉,分别置入 PE50 管,所有导管均用 100 U/ml 的肝素生理盐水预充,左侧股动脉用于失血,右侧股静脉给药,经右侧股动脉和右颈总动脉导管连接 MPA 心功能检测仪(MPA 2 000),持续监测 HR、MAP、LVSP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 。术毕按 500 U/kg 经静脉全身肝素化处理,稳定 10 min 后,由股动脉放血,在 15 min 内使 MAP 下降至 30~40 mm Hg,Sham 组麻醉置管后不予失血,仅观察 90 min 即刻处死,其余五组失血性休克模型制备成功后,分别按照 15、30、45、60 和 90 min 观察终止时间窗维持于休克状态,实验全程

动物肛温控制在 36.5~37.5℃。

肺组织学检查 右下叶经多聚甲醛 40 g/L 固定,石蜡包埋切片,HE 染色,光镜下进行组织形态学观察。

肺通透指数和 W/D 测定 将大鼠剖腹,腹主动脉取血处死大鼠。留取抗凝血以待测血浆蛋白含量。开胸,暴露气管,通过气管上端的小切口插入灌胃针结扎固定,用丝线结扎右肺,分别用 3 ml 生理盐水灌洗左肺 3 次,合并 3 次收集到的支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF),回收率 80%~90%。BALF 经双层纱布过滤,以 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液-80℃冻存待测蛋白含量。考马斯亮蓝法测定 BALF 中蛋白含量,肺通透指数=BALF 蛋白/血浆蛋白。取右上肺用滤纸吸血,称湿重后,置于烤箱中(80℃,48 h)烤至恒重,称干重,计算肺湿/干重比值(W/D)。

肺组织 MPO、MDA、T-SOD 活性和 TNF- α 、IL-10 浓度的测定 取部分肺叶,以每克肺组织加 10 ml 生理盐水在冰浴中用电动匀浆机制成 10% 的肺组织匀浆,采用分光光度计法测定肺组织髓过氧化物酶(MPO)活性;采用黄嘌呤氧化酶法和硫代巴比妥酸法测定肺组织匀浆液中丙二醛(MDA)和总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性;采用 ELISA 法检测肺组织 TNF- α 和 IL-10 浓度。分别参照说明书进行检测。

肺组织 claudin-3 和 claudin-4 免疫组化染色 将肺组织蜡块切成 4 μ m 薄片,以磷酸盐缓冲液(PBS)代替第 1 抗体作为阴性对照,且每只动物均设阴性对照。免疫组化染色结果通过图像分析,观察并记录 claudin-3 和 claudin-4 在肺内表达部位和平均灰度。

统计分析 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析。正态分布计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析和析因设计方差分析,组间和组内两两比较采用 LSD-t 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

肺通气指标 与休克前比较,休克组大鼠

SaO₂、肺氧合指数、PaO₂ 和 PaCO₂ 明显下降,肺呼吸指数明显升高($P<0.05$),且 HS90 组变化幅度明显大于其它休克组($P<0.05$)(表 1)。

表 1 六组大鼠休克前和休克末 SaO₂、肺氧合指数、肺呼吸指数、PaO₂ 和 PaCO₂ 的比较($\bar{x}\pm s$)

指标	组别	只数	休克前	休克末
SaO ₂ (%)	Sham 组	12	99.25±0.62	—
	HS15 组	12	99.58±0.51	94.92±2.50 ^a
	HS30 组	12	98.69±1.89	95.00±2.31 ^a
	HS45 组	12	98.75±1.54	93.58±2.43 ^a
	HS60 组	12	99.17±1.11	93.83±2.79 ^a
	HS90 组	12	99.42±1.44	88.92±2.35 ^{abcde}
肺氧合 指数	Sham 组	12	505.56±34.86	—
	HS15 组	12	516.27±27.35	384.13±43.23 ^a
	HS30 组	12	513.92±29.45	378.39±59.62 ^a
	HS45 组	12	505.16±44.74	368.65±30.62 ^a
	HS60 组	12	515.08±33.66	390.87±32.26 ^a
	HS90 组	12	528.57±25.44	292.46±22.38 ^{abcde}
肺呼吸 指数	Sham 组	12	0.30±0.12	—
	HS15 组	12	0.29±0.10	1.05±0.28 ^a
	HS30 组	12	0.28±0.10	1.11±0.39 ^a
	HS45 组	12	0.31±0.14	1.10±0.23 ^a
	HS60 组	12	1.05±0.21	1.04±0.23 ^a
	HS90 组	12	1.82±0.26	1.23±0.27 ^{abcde}
PaO ₂ (mm Hg)	Sham 组	12	106.17±7.32	—
	HS15 组	12	108.42±5.74	80.67±9.08 ^a
	HS30 组	12	107.92±6.18	79.46±12.52 ^a
	HS45 组	12	106.08±9.39	77.42±6.43 ^a
	HS60 组	12	108.17±7.07	82.08±6.78 ^a
	HS90 组	12	111.00±5.34	61.42±4.70 ^{abcde}
PaCO ₂ (mm Hg)	Sham 组	12	40.09±4.17	—
	HS15 组	12	38.50±5.65	19.75±4.47 ^a
	HS30 组	12	39.92±4.23	19.23±5.31 ^a
	HS45 组	12	39.67±4.38	20.67±6.34 ^a
	HS60 组	12	39.17±5.42	16.08±6.26 ^a
	HS90 组	12	36.92±5.96	12.08±4.44 ^{abcde}

注:与基础值比较,^a $P<0.05$;与 HS15 组比较,^b $P<0.05$;与 HS30 组比较,^c $P<0.05$;与 HS45 组比较,^d $P<0.05$;与 HS60 组比较,^e $P<0.05$

肺组织病理结构 Sham 组肺泡腔完整,肺泡间隔均匀一致,壁光滑,肺泡腔内无渗液或炎性细胞,HS15 组与 Sham 组无明显差异,HS30 组、HS45 组、HS60 组和 HS90 组肺组织毛细血管明显

扩张,肺泡间隔明显增厚,大量炎性细胞渗出、聚集,肺泡腔中可见明显渗出,部分肺泡萎陷不张,且随时间延长破坏程度加重(图 1)。

肺损伤评分、W/D 和肺通透指数 休克 15~45 min,随着休克时间延长,大鼠肺损伤评分和 W/D 逐渐升高($P<0.05$),肺通透指数差异无统计学意义;休克 60~90 min,随着休克时间延长,大鼠肺损伤评分、W/D、肺通透指数明显升高($P<0.05$)(表 2)。

肺组织 MPO、MDA、T-SOD 活性和 TNF- α 、IL-10 浓度 休克 15~45 min,随着休克时间延长,大鼠肺组织 MPO、MDA 和 T-SOD 活性、TNF- α 浓度逐渐升高($P<0.05$),IL-10 浓度差异无统计学意义;休克 60~90 min,随着休克时间延长,大鼠肺组织、MPO、MDA 活性和 TNF- α 浓度明显升高,T-SOD 活性和 IL-10 浓度代偿性升高($P<0.05$)(表 3)。

肺组织 claudin-3 和 claudin-4 表达 与 Sham 组比较,休克导致肺组织 claudin-3、claudin-4 表达明显减少($P<0.05$)(表 4)。

讨 论

创伤后呼吸衰竭先于其它脏器衰竭的发生,先前研究^[4,5]显示,高原中度失血性休克动物的心血管功能虽与平原中度休克近似,但氧运送量、氧耗量明显减小,减小程度相当于平原重度失血性休克,耐受力明显降低,失代偿出现早。本实验结果显示,高原环境下遭受重度失血性休克大鼠的血流动力学指标在短暂代偿后急剧恶化,呈现出病情重、进展快的特点。随着休克维持时间的延长,肺损伤呈渐进性加重,休克 15~30 min,肺病理改变甚微,这与 TNF- α 和 MDA 变化相呼应,支持“中性粒细胞假说”^[6]。肺损伤在 90 min 达到高峰,此时 TNF- α /IL-10 和 MDA/SOD 表达失衡说明休克在基因水平引发了一系列促死亡细胞信号转导途径的表达。另一方面,与“上皮细胞假说”^[7]相吻合,休克后,肺组织 claudin-3 和 claudin-4 表达量与肺损伤评分变化呈负性相关,值得注意的是,二者变化时间晚于 TNF- α 和 MDA 的改变。因此,休克性肺损伤的发病机制可能是:休克引发一系列与炎性、氧化应激相关的级联反应,促使免疫稳态的失衡,造成 claudin-3、claudin-4 在肺上皮细胞屏障结构的错位,破坏屏障功能,从而加速 ALI 的进展。

肺水肿是 ALI 的主要表现,这一病变可伴随由

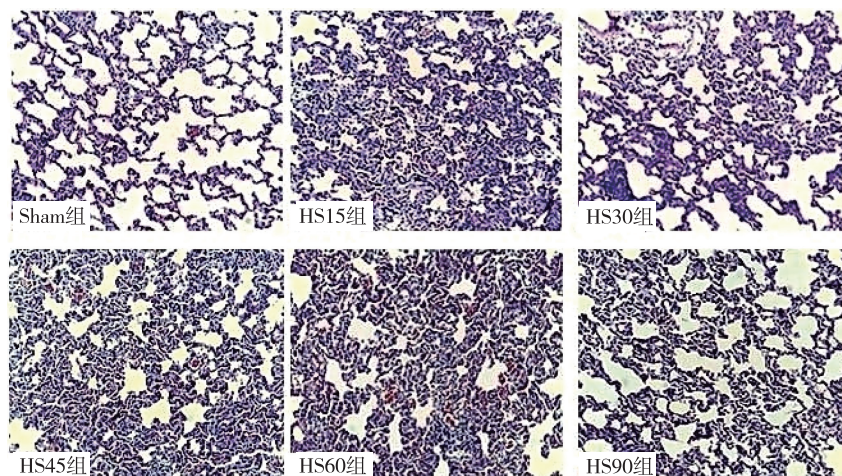


图 1 六组大鼠肺组织病理结构的比较(×200)

表 2 六组大鼠肺损伤评分、W/D 和肺通透指数的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	肺损伤评分(分)	W/D	肺通透指数
Sham 组	12	3.62±0.71	3.43±0.11	3.98±0.07
HS15 组	12	3.76±0.34	3.53±0.13 ^a	4.26±0.04
HS30 组	12	4.87±0.38 ^{ab}	3.65±0.07 ^a	4.30±0.03
HS45 组	12	6.23±0.37 ^{abc}	3.77±0.09 ^{ab}	4.32±0.05
HS60 组	12	7.56±0.37 ^{abcd}	3.96±0.17 ^{abcd}	4.56±0.05 ^a
HS90 组	12	8.95±0.42 ^{abcde}	4.76±0.04 ^{abcde}	5.84±0.90 ^{abcde}

注:与 Sham 组比较,^a $P<0.05$;与 HS15 组比较,^b $P<0.05$;与 HS30 组比较,^c $P<0.05$;与 HS45 组比较,^d $P<0.05$;与 HS60 组比较,^e $P<0.05$

表 3 六组大鼠肺组织 MPO、MDA、T-SOD 活性和 TNF- α 、IL-10 浓度的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	MPO (U/g)	MDA (nmol/mg)	T-SOD (U/mg)	TNF- α (pg/mg)	IL-10 (pg/mg)
Sham 组	12	1.38±0.09	1.75±0.23	51.26±0.87	39.72±2.35	95.53±8.32
HS15 组	12	1.49±0.07 ^a	1.03±0.59 ^a	33.93±2.35 ^a	40.76±3.67	95.24±6.29
HS30 组	12	1.68±0.07 ^{ab}	1.41±0.40	36.59±2.65 ^{ab}	52.55±1.80 ^{ab}	94.12±6.37
HS45 组	12	1.86±0.06 ^{abc}	1.83±0.38 ^{abc}	39.14±2.90 ^{abc}	62.47±6.44 ^{abc}	100.90±4.67
HS60 组	12	2.31±0.07 ^{abcd}	2.49±0.32 ^{abcd}	40.80±2.77 ^{abcd}	67.56±6.97 ^{abcd}	108.11±3.61 ^{abc}
HS90 组	12	3.19±0.13 ^{abcde}	3.60±0.36 ^{abcde}	47.34±1.30 ^{abcde}	77.87±2.51 ^{abcde}	119.98±3.23 ^{abcde}

注:与 Sham 组比较,^a $P<0.05$;与 HS15 组比较,^b $P<0.05$;与 HS30 组比较,^c $P<0.05$;与 HS45 组比较,^d $P<0.05$;与 HS60 组比较,^e $P<0.05$

于相关钠通道抑制造成的肺泡液体清除率下降,同时,内皮高通透性和内皮及上皮细胞屏障受损,最终导致凋亡和坏死的发生^[8]。claudins 是分子量在 18~27 kDa 之间的构成 TJ 骨架结构的跨膜蛋白,其家族有 24 个成员,在人和鼠的不同组织和细胞内

表达具有特异性^[9]。既往研究表明,在鼠和人肺上皮细胞中存在 claudin-1、claudin-3、claudin-4、claudin-5、claudin-7、claudin-8 和 claudin-18 表达,claudin 的表达对上皮细胞表型极具敏感性,其表达与转运通透性相关^[10~12]。与上述理论相吻合。本

表 4 六组大鼠肺组织 claudin-3 和 claudin-4 表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	claudin-3	claudin-4
Sham 组	12	3.70 $\pm$ 0.11	4.81 $\pm$ 0.25
HS15 组	12	3.32 $\pm$ 0.05 ^a	3.57 $\pm$ 0.09 ^a
HS30 组	12	2.91 $\pm$ 0.08 ^{ab}	3.26 $\pm$ 0.14 ^{ab}
HS45 组	12	2.69 $\pm$ 0.10 ^{abc}	2.63 $\pm$ 0.08 ^{abc}
HS60 组	12	2.18 $\pm$ 0.06 ^{abcd}	2.26 $\pm$ 0.07 ^{abcd}
HS90 组	12	1.69 $\pm$ 0.08 ^{abcde}	1.89 $\pm$ 0.07 ^{abcde}

注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 HS15 组比较,^b $P < 0.05$;与 HS30 组比较,^c $P < 0.05$;与 HS45 组比较,^d $P < 0.05$;与 HS60 组比较,^e $P < 0.05$

实验免疫组化结果显示,在正常肺组织中,claudin-3 和 claudin-4 共表达于上皮和内皮细胞,但后者表达量明显高于前者,随着休克时间的延长,二者呈现在上述部位的丢失,最主要的是,其表达与肺损伤分数呈负性相关。

有研究表明,ALI 与肺上皮细胞一些 TJ 蛋白表达水平下降和功能改变有关^[13]。Mazzon 等^[6]研究表明,TNF- α 破坏 ZO-1、claudin-2、claudin-4、claudin-5 和 β -catenin 蛋白表达与连接定位,进而使紧密连接屏障打开。抑制 TNF- α 可降低急性肺炎相关肺组织的紧密连接通透性,从而说明 TNF- α 在影响肺屏障功能方面具有重要作用。TNF- α 和 IFN- γ 共治疗导致胞浆内 TJ 如紧密粘附分子-1 (junctional adhesion molecule-1, JAM-1)、claudin-4 和 claudin-5 错位^[14]。此外,ALI 时转录生长因子(transforming growth factor β , TGF- β)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)、过氧化氢等氧化应激产物大量生成,可潜在影响 claudins 的酪氨酸磷酸化和功能^[8]。与上述理论相一致,本研究结果显示,休克 30 min 后,诱发的炎症级联和氧化应激反应促使免疫稳态的失衡,表现为 MPO、TNF- α 和 MDA 表达增强,而 IL-10 和 SOD 明显降低。肺组织免疫组化结果显示,在休克 60 min 后,claudin-3 和 claudin-4 出现在肺内的流失,MPO、TNF- α 和 MDA 增加达到其峰值,有可能是 claudin-3 和 claudin-4 流失后,肺上皮屏障结构的破坏,加速了炎性和氧化因子向远端脏器的扩散,上述因素的叠加,导致了病变的恶性循环。

综上所述,高原失血性休克造成血流动力学的急剧衰竭,极易发展为急性肺损伤,其与肺上皮屏

障中 claudin-3 和 claudin-4 的流失和错位密切相关,并可最终造成上皮屏障的破坏,进一步促使炎性因子和氧化因子向远端脏器的扩散,诱发多器官功能衰竭。

参 考 文 献

- [1] Costantini TW, Deree J, Martins JO, et al. A novel fluid resuscitation strategy modulates pulmonary transcription factor activation in a murine model of hemorrhagic shock. *Clinics (Sao Paulo)*, 2010, 65(6): 621-628.
- [2] Ciesla DJ, Moore EE, Johnson JL, et al. The role of the lung in postinjury multiple organ failure. *Surgery*, 2005, 138(4): 749-757.
- [3] Wu R, Dong W, Zhou M, et al. A novel approach to maintaining cardiovascular stability after hemorrhagic shock: beneficial effects of adrenomedullin and its binding protein. *Surgery*, 2005, 137(2): 200-208.
- [4] 周其全,高钰琪,王培勇. 高原失血性休克中的若干问题. *中国微循环杂志*, 2004, 8(2): 116-118.
- [5] Zhou Q, Luo Y, Liu F, et al. Resuscitative effect of hyperoxia fluid on high-altitude hemorrhagic shock in rats and antishock mechanisms. *Cell Biochem Biophys*, 2012, 62(2): 343-352.
- [6] Mazzon E, Cuzzocrea S. Role of TNF-alpha in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammation. *Respir Res*, 2007, 8: 75.
- [7] Frank JA. Claudins and alveolar epithelial barrier function in the lung. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1257: 175-183.
- [8] Overgaard CE, Daugherty BL, Mitchell LA, et al. Claudins: control of barrier function and regulation in response to oxidant stress. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(5): 1179-1193.
- [9] Xia XM, Wang FY, Wang ZK, et al. Emodin enhances alveolar epithelial barrier function in rats with experimental acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(24): 2994-3001.
- [10] Soini Y. Claudins in lung diseases. *Respir Res*, 2011, 12: 70.
- [11] Schlingmann B, Molina SA, Koval M. Claudins: gatekeepers of lung epithelial function. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 42: 47-57.
- [12] Rokkam D, Lafemina MJ, Lee JW, et al. Claudin-4 levels are associated with intact alveolar fluid clearance in human lungs. *Am J Pathol*, 2011, 179(3): 1081-1087.
- [13] Frank JA. Claudins and alveolar epithelial barrier function in the lung. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1257: 175-183.
- [14] Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, et al. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol*, 2003, 171(11): 6164-6172.

(收稿日期:2016-06-23)