

# 乌司他丁抑制 TNF- $\alpha$ 诱导血管内皮细胞高通透性的研究

魏伏 张丹 罗丽 古妮娜 曾燕 陈晓迎 刘景仑

400016 重庆, 重庆医科大学附属第一医院重症医学科

通信作者: 张丹, Email: doctor\_zhangdan@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2016.03.013

**【摘要】目的** 探讨乌司他丁 (UTI) 对肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 诱导的血管内皮细胞高通透性的影响。**方法** 建立人脐静脉内皮细胞系 EA.hy926 细胞 TNF- $\alpha$  诱导炎症模型, 将其分为正常组、TNF- $\alpha$  组、UTI 组及 TNF- $\alpha$  + 不同浓度的 UTI 组 (T + U 组), 分别采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法检测 EA.hy926 细胞活性, EVOM 法测单层细胞电阻, RT-PCR 法、免疫细胞化学法检测血管内皮钙黏蛋白 (VE-cadherin) 的表达。**结果** 与正常组相比, TNF- $\alpha$  作用下 EA.hy926 单层细胞电阻值明显降低 ( $67.200 \pm 8.937$  vs.  $33.600 \pm 8.771$ ,  $P=0.010$ ), 通透性增加, UTI 在 1 ~ 100 U/mL 范围内以剂量依赖性方式改善 TNF- $\alpha$  所致的 EA.hy926 细胞高通透性 ( $40.133 \pm 7.484$  vs.  $33.600 \pm 8.771$ ,  $P=0.382$ ;  $49.232 \pm 3.162$  vs.  $33.600 \pm 8.771$ ,  $P=0.044$ ;  $63.700 \pm 8.515$  vs.  $33.600 \pm 8.771$ ,  $P=0.013$ )。TNF- $\alpha$  作用下 EA.hy926 细胞 VE-cadherin mRNA 的表达较正常组显著降低 ( $1.089 \pm 0.018$  vs.  $0.835 \pm 0.021$ ,  $P=0.000$ ), UTI 可抑制 TNF- $\alpha$  引起的 VE-cadherin 低表达, 其中 UTI 浓度为 10 U/mL 和 100 U/mL 时 VE-cadherin mRNA 的表达较 TNF- $\alpha$  组差异具有统计学意义 ( $0.976 \pm 0.014$  vs.  $0.835 \pm 0.021$ ,  $P=0.001$ ;  $1.115 \pm 0.015$  vs.  $0.835 \pm 0.021$ ,  $P=0.000$ ), UTI 的上述作用在 1 ~ 100 U/mL 浓度范围内呈现出剂量依赖性。免疫细胞化学结果显示, 与正常组相比, TNF- $\alpha$  作用下 VE-cadherin 的表达明显降低 ( $0.061 \pm 0.013$  vs.  $0.093 \pm 0.014$ ,  $P=0.049$ ), 而 UTI 可改善 TNF- $\alpha$  导致的 VE-cadherin 表达降低 ( $0.032 \pm 0.004$  vs.  $0.061 \pm 0.013$ ,  $P=0.016$ )。**结论** UTI 可抑制 TNF- $\alpha$  引起的 EA.hy926 细胞通透性增加, 且在一定范围内呈现出剂量依赖性。

**【关键词】** 脐静脉内皮细胞 EA.hy926; 高通透性; 乌司他丁; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 血管内皮钙黏蛋白

**基金项目:** 国家自然科学基金 (81071531; 81372102); 重庆市自然科学基金 (CSTC 2009BB5066); 天普研究基金项目 (UF201314)

**A study of inhibitory effect of ulinastatin on hyper-permeability of endothelium induced by TNF- $\alpha$**  Wei

Fu, Zhang Dan, Luo Li, Gu Nina, Zeng Yan, Chen Xiaoying, Liu Jinglun

Department of Emergency/Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Corresponding author: Zhang Dan, Email: doctor\_zhangdan@126.com

**【Abstract】Objective** To investigate the influence of Ulinastatin (UTI) on the hyper-permeability of vascular endothelial cells induced by tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ). **Methods** Inflammation model was induced by TNF- $\alpha$  in human umbilical vein endothelial cell line (EA.hy926). The experiment was designed into 4 groups: normal group, TNF- $\alpha$  group, UTI group and TNF- $\alpha$  with UTI (U + T) group. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method and epithelial voltameter (EVOM) method were used to measure cell viability [absorbance (A) value] and transepithelial electrical resistance (TER) of EA.hy926 cells respectively. The expression of VE-cadherin was measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunocytochemistry. **Results** Compared with normal group, the TER of EA.hy926 cells induced by TNF- $\alpha$  was significantly decreased ( $67.200 \pm 8.937$  vs.  $33.600 \pm 8.771$ ,  $P=0.010$ ). The permeability in EA.hy926

cells increased obviously. The hyper-permeability of EA.hy926 cells induced by TNF- $\alpha$  could be alleviated by UTI at the concentrations of 1–100 U/mL in a dose-dependent manner (40.133  $\pm$  7.484 vs. 33.600  $\pm$  8.771,  $P=0.382$ ; 49.232  $\pm$  3.162 vs. 33.600  $\pm$  8.771,  $P=0.044$ ; 63.700  $\pm$  8.515 vs. 33.600  $\pm$  8.771,  $P=0.013$ ). The expression of VE-cadherin mRNA reduced significantly in the TNF- $\alpha$  group (1.089  $\pm$  0.018 vs. 0.835  $\pm$  0.021,  $P=0.000$ ) compared with normal group. This effect of TNF- $\alpha$  could be attenuated by UTI. When EA.hy926 cells exposed to UTI at 10 U/mL and 100 U/mL, a significant increase of the expression of VE-cadherin mRNA was observed (0.976  $\pm$  0.014 vs. 0.835  $\pm$  0.021,  $P=0.001$ ; 1.115  $\pm$  0.015 vs. 0.835  $\pm$  0.021,  $P=0.000$ ). And the inhibition of UTI manifested a dose-dependent manner (1–100 U/mL). The results of the immunocytochemistry showed that the expression of VE-cadherin in TNF- $\alpha$  group was decreased significantly (0.061  $\pm$  0.013 vs. 0.093  $\pm$  0.014,  $P=0.049$ ) compared with normal group. And the low-expression of VE-cadherin could be alleviated by UTI (0.032  $\pm$  0.004 vs. 0.061  $\pm$  0.013,  $P=0.016$ ).

**Conclusion** The high permeability of EA.hy926 cells induced by TNF- $\alpha$  could be inhibited by UTI at the concentrations of 1–100 U/mL in a dose-dependent manner.

**[Key words]** Human umbilical vein endothelial cell line; High permeability; Ulinastatin; Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ); VE-cadherin

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China General Program (81071531; 81372102); Natural Science Foundation of Chongqing General Program (CSTC 2009BB5066); Tianpu Research Fund Program (UF201314)

血管内皮细胞的激活与高通透性的活化状态是脓毒症炎症反应的特征性改变, 可以导致血管屏障完整性的破坏进而引起血容量不足、组织水肿及各器官功能受损<sup>[1-2]</sup>。调节血管内皮细胞的通透性, 避免炎症反应引起的血管内皮细胞损伤, 是维持循环稳态和呼吸功能, 保护脏器功能的关键<sup>[3]</sup>。

乌司他丁 (UTI) 是存在于人尿液与血液中的一种糖蛋白, 属于一种 Kunitz 型蛋白酶抑制剂, 对体内多种酶有抑制作用, 同时也是人体内一种天然的抗炎物质, 可以抑制炎症介质的释放<sup>[4-6]</sup>。近年来 UTI 对脓毒症的临床疗效有多种推测和假说, 有研究表明 UTI 可通过减轻脓毒症患者的免疫反应, 可以缩短脓症患者住院时间, 减少患者病死率, 有望改善其预后<sup>[7-9]</sup>。但目前仍未从细胞水平及分子机制角度来阐明其具体作用。为了探讨 UTI 是否直接通过对炎症状态下血管内皮细胞高通透性的改善而发挥其在脓毒症的抗炎作用, 本实验以 EA.hy926 细胞为研究对象, 分别以 TNF- $\alpha$  和 UTI 作用于 EA.hy926 细胞, 观察细胞通透性的改变以及相关因子的表达, 以期明确 UTI 对血管内皮细胞通透性的影响及相关分子机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料和主要试剂

人脐静脉内皮细胞株 EA.hy926 (上海中国科学院细胞库); 乌司他丁 (UTI) (广东天普生化医

药股份有限公司, 批号 031309034); RPMI-1640 细胞培养基及胎牛血清 (美国 Hyclone 公司); 重组人肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ )、免疫组化试剂盒及 DAB 显影液 (北京中杉金桥生物技术有限公司); TRIzol 试剂、逆转录反应试剂盒及 PCR 扩增试剂盒 (大连 TaKaRa 宝生物工程有限公司); Millicell ERS-2 电阻仪及 Transwell 小室 (美国 Millipore 公司)。

### 1.2 人脐静脉内皮细胞株 (EA.hy926) 培养

将 EA.hy926 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  恒温孵箱中培养, 每 2 d 更换一次培养液, 根据细胞生长情况进行传代。

### 1.3 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法检测细胞活性

将 EA.hy926 细胞以  $10^4$  个/孔接种于 96 孔板内, 充分摇匀, 置于恒温孵箱中培养 48 h, 用不同浓度 UTI (1、10、100、1 000 U/mL) 分别作用 24 h 后, 每孔加入 MTT 20  $\mu\text{L}$ , 培养 4 h, 再加入二甲基亚砷 (DMSO) 150  $\mu\text{L}$ , 避光, 室温摇床上作用 15 min, 酶标仪测定吸光度 (A) 值。

### 1.4 EVOM 法测单层细胞电阻

向 Transwell 小室的上下室均加入 300  $\mu\text{L}$  的 1640 培养液, 将 Millicell ERS-2 电阻仪<sup>[10]</sup> 的两个电极分别置于滤膜表面及滤膜下, 测量每个小室的基础电阻值, 即空白电阻。将 EA.hy926 细胞以

$5 \times 10^4$  个/孔的密度均匀接种在各小室中, 待其生长形成单层, 上室加入不同浓度 UTI (1、10、100、1 000 U/mL) 作用 1 h 后加入 TNF- $\alpha$  作用 24 h。用同样的方法测各小室的电阻值。其单层细胞电阻值 (单位:  $\Omega/\text{cm}^2$ ) = (所测电阻 - 空白电阻)  $\times$  有效膜面积。

### 1.5 RT-PCR 检测 VE-cadherin mRNA 的表达

UTI 预处理 EA. hy926 细胞 1 h 后, 加入 TNF- $\alpha$  再作用 24 h。应用 TRIzol 法提取细胞总 RNA, 严格按照反转录试剂盒说明书进行逆转录, VE-cadherin 引物上游 5' -CCACGCCTCTGTCATGTACC-3', 下游 5' -GGTCAAAGCGTCTCGGTAGTC-3'; GAPDH 上游 5' -GAAGTCCGAGTCAACGGA-3', 下游 5' -TGAGTCCTTCCACGATACCAA-3', PCR 反应体系为: PCR rTaq 酶 12.5  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , cDNA 1  $\mu\text{L}$ , 灭菌蒸馏水 9.5  $\mu\text{L}$ 。反应条件为: 94  $^\circ\text{C}$  预变性 5 min、变性 30 s, 58  $^\circ\text{C}$  退火 30 s 以及 72  $^\circ\text{C}$  延伸 30 s, 共 30 个循环。扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 凝胶电泳成像系统拍照, 用 Quantity One 软件进行分析。

### 1.6 免疫细胞化学检 VE-cadherin 的表达

将 EA. hy926 细胞悬液以  $10^4$  个/孔的密度进行细胞爬片, 孵育 24 h 后 PBS 洗涤细胞 3 次, 4% 多聚甲醛固定, 按照 SP 法免疫组化试剂盒说明进行操作, DAB 染色后, 常规复染、脱水、透明, 中性树胶封片, Olympus 倒置显微镜下观察并采图, 用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析每个视野的平均吸光度值, 以平均吸光度值衡量蛋白表达水平。并做统计学分析。

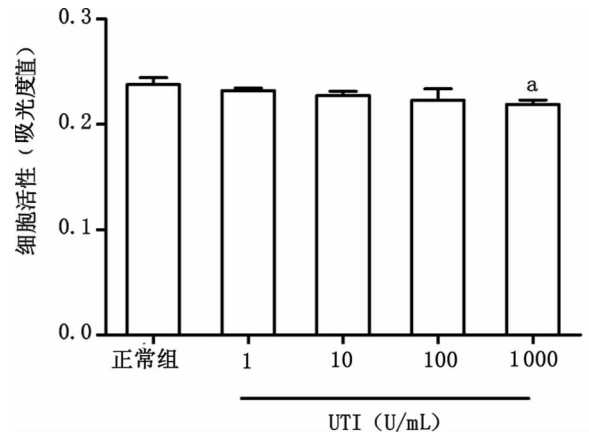
### 1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理, 计量资料用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- $t$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。采用 GraphPad Prism 5 作图。

## 2 结果

### 2.1 EA. hy926 细胞活性的测定

与正常组相比, 1、10 和 100 U/mL 的 UTI 对 EA. hy926 细胞活性无明显影响 (均  $P > 0.05$ ), 而 1 000 U/mL 的 UTI 对 EA. hy926 细胞活性有抑制作用 ( $0.238 \pm 0.007$ ) vs. ( $0.219 \pm 0.043$ ),  $P = 0.014$ , 见图 1。



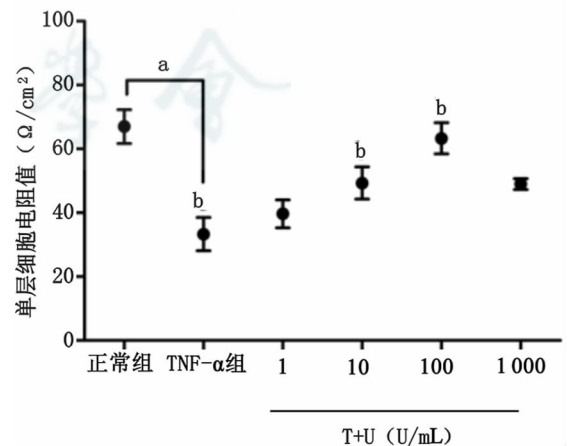
与正常组细胞活性比较, 1 000 U/mL UTI 组差异具有统计学意义,  $^a P = 0.014$

图 1 UTI 对 EA. hy926 细胞活性的影响

Fig 1 The effects of UTI on EA. hy926 cell viability

### 2.2 UTI 可改善 TNF- $\alpha$ 作用下单层 EA. hy926 细胞电阻的降低

与正常组相比, TNF- $\alpha$  组单层细胞电阻明显降低 ( $67.200 \pm 8.937$ ) vs. ( $33.600 \pm 8.771$ ),  $P = 0.010$ ; 1、10、100 和 1 000 U/mL 的 UTI 均可改善 TNF- $\alpha$  所致的单层细胞电阻值降低, 其中 T + U (10 U/mL) 组和 T + U (100 U/mL) 组的细胞电阻值与 TNF- $\alpha$  组比较, 差异具有统计学意义 ( $49.232 \pm 3.162$ ) vs. ( $33.600 \pm 8.771$ ),  $P = 0.044$ ; ( $63.700 \pm 8.515$ ) vs. ( $33.600 \pm 8.771$ ),  $P = 0.013$ , 见图 2。



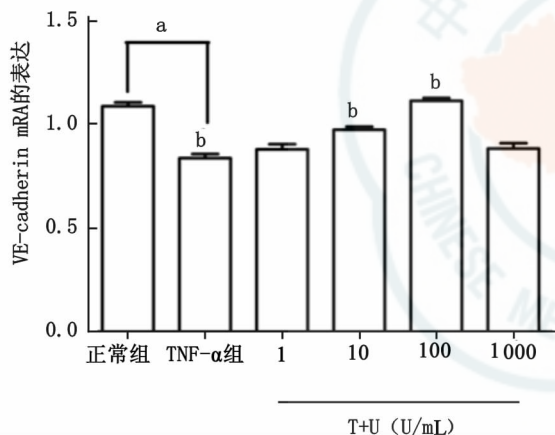
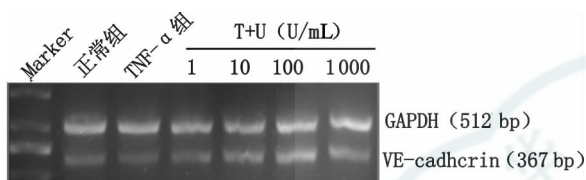
与正常组单层细胞电阻比较, TNF- $\alpha$  组差异具有统计学意义,  $^a P = 0.010$ ; 与 TNF- $\alpha$  组单层细胞比较, T + U (10 U/mL) 和 T + U (100 U/mL) 组差异均有统计学意义,  $^b (P = 0.044, P = 0.013)$

图 2 UTI 对 TNF- $\alpha$  作用下 EA. hy926 细胞电阻值的影响

Fig 2 The effects of UTI on the transepithelial electrical resistance of EA. hy926 cell induced by TNF- $\alpha$

### 2.3 UTI 可抑制 TNF-α 作用下 VE-cadherin mRNA 的低表达

与正常组相比, TNF-α 组 VE-cadherin mRNA 表达明显降低 ( $1.089 \pm 0.018$ ) vs. ( $0.835 \pm 0.021$ ),  $P=0.000$ ; 1、10、100 和 1 000 U/mL 的 UTI 均能抑制 TNF-α 引起 VE-cadherin mRNA 的低表达, 且在 10 U/mL 和 100 U/mL 浓度时较 TNF-α 组差异具有统计学意义 [ ( $0.976 \pm 0.014$ ) vs. ( $0.835 \pm 0.021$ ),  $t=9.777$ ,  $P=0.001$ ; ( $1.115 \pm 0.015$ ) vs. ( $0.835 \pm 0.021$ ),  $P=0.000$ ], 见图 3。



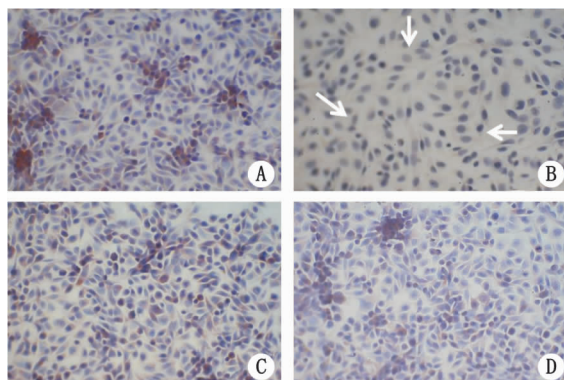
与正常组 VE-cadherin mRNA 的表达比较, TNF-α 组差异具有统计学意义,  $aP=0.000$ ; 与 TNF-α 组 VE-cadherin mRNA 的表达比较, T+U (10 U/mL) 和 T+U (100 U/mL) 组差异均有统计学意义,  $bP=0.001$ ,  $P=0.000$

图 3 各组 VE-cadherin mRNA 表达的比较

Fig 3 The comparison of VE-cadherin mRNA expression between groups

### 2.4 UTI 可改善 TNF-α 作用下 VE-cadherin 蛋白的低表达

免疫细胞化学法检测 VE-cadherin 蛋白表达的结果显示, 正常组中, VE-cadherin 主要分布于细胞膜与细胞质, 呈棕色, 见图 4A; TNF-α 作用下细胞间隙增大, VE-cadherin 的表达明显减少 ( $0.061 \pm 0.013$ ) vs. ( $0.093 \pm 0.014$ ),  $P=0.049$ , 呈浅棕色, 见图 4B; UTI 组、T+U 组细胞间隙缩小, 细胞紧密连接, 见图 4C、D; 与 TNF-α 组比较, T+U 组 VE-cadherin 的表达明显增加 ( $0.032 \pm 0.004$ ) vs. ( $0.061 \pm 0.013$ ),  $P=0.016$ , 见图 4D。



A: 正常组; B: TNF-α 组; C: UTI 组; D: T+U 组。箭头示细胞 VE-cadherin 蛋白的分布

图 4 VE-cadherin 蛋白的细胞化学染色 (×200)

Fig 4 Immunocytochemistry staining of VE-cadherin in EA.hy926 cell (×200)

## 3 讨论

本研究首次在体外细胞水平观察到 UTI 可通过改善炎症状态下细胞高通透性而达到调节血管稳态作用。研究发现 TNF-α 诱导的血管内皮细胞高通透性能够被 UTI 抑制, 且在 1~100 U/mL 浓度范围呈现一定的剂量依赖性。

目前 UTI 对脓毒症的疗效已有较多研究报道, 曾朝涛等<sup>[11]</sup>研究发现 UTI 可通过减轻脑血屏障损伤, 抑制脑细胞凋亡, 对脓毒症大鼠脑组织起保护作用; 同时有研究表明 UTI 在脓毒症早期对肠黏膜屏障有保护性作用<sup>[12]</sup>。但 UTI 是否直接对血管内皮细胞有影响尚未有研究, 其作用于内皮细胞的具体机制仍未有明确阐述。而且在体实验中, 体内微环境复杂, 影响因素较多, 因此本实验采用离体人脐静脉内皮细胞进行对其作用机制进行探索, 避免了众多因素的影响。

本研究首次发现在炎症状态下, UTI 直接作用于血管内皮细胞, 通过影响内皮细胞关键分子的表达, 改善炎症状态时血管内皮的高通透性来达到其抗炎作用。以前的研究均表明 UTI 可能通过多种机制并存方式发挥其抗炎作用, 如 UTI 可抑制机体炎症介质的释放, 抑制白细胞过度激活, 阻断细胞因子间的级联反应, 从而来减轻全身炎症反应<sup>[8, 13-14]</sup>; Nakatani 等<sup>[15]</sup>研究结果也证实 UTI 可以抑制中性粒细胞介导的血管内皮损伤。本研究是对上述研究有益补充, 从另一个角度证实了 UTI 对脓毒症中炎症反应有调节作用。

血管内皮钙黏蛋白 VE-cadherin 是血管内皮细胞

特异性表达的黏附蛋白,是形成血管内皮黏附连接的关键成分。在炎症介质(如 TNF- $\alpha$ )的作用下,细胞间 VE-cadherin 解聚和表达降低,从而使细胞间隙增大,血管内皮通透性增加<sup>[16-17]</sup>,本研究中 VE-cadherin mRNA 的变化与上述细胞通透性改变的结果一致,从而进一步证实了 UTI 通过改善血管内皮细胞高通透性而发挥其调节血管稳态的作用。

本研究证实 1~1 000 U/mL 浓度范围的 UTI 对炎症状态下血管内皮细胞高通透性有改善作用,而脓毒症时,一方面,机体产生多种炎症介质(如 TNF- $\alpha$ 、凝血酶、白细胞介素-1 等),这些炎症介质共同作用于血管内皮细胞,进而引起内皮细胞通透性的改变;另一方面,由于体内 UTI 可能通过多种间接途径影响脓毒症时炎症状态下血管内皮细胞的功能,因此脓毒症血管内皮细胞高通透性治疗作用的 UTI 浓度有待进一步探讨。

本研究还发现在 1 000 U/mL UTI 对 TNF- $\alpha$  所致的血管内皮高通透性改善作用效果不如 100 U/mL 浓度时明显。细胞活性的检测结果表明 1 000 U/mL UTI 对正常细胞活性有抑制作用,因此笔者推测上述现象可能因为高浓度的 UTI 对血管内皮细胞有一定的毒性作用。

综上,本研究探讨 UTI 通过对脓毒症中血管内皮细胞通透性紊乱的调节来发挥其维持微循环稳态作用。从分子生物学机制阐明 UTI 可抑制 TNF- $\alpha$  诱导的血管内皮细胞通透性增加,揭示 UTI 在危重症患者中的抗炎作用的新机制,为临床上治疗脓毒症探索新的可能及理论依据。

### 参 考 文 献

[1] 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.

[2] 刘秀娟,穆恩,梁英健,等.脓毒症糖尿病大鼠肺脏血管内皮细胞损伤及 DDAH2/NOS/NO 系统变化[J].*中华急诊医学杂志*, 2013, 22 (10): 1105-1111. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2013.10.008.

Liu XJ, Mu E, Liang YJ, et al. The role of DDAH2/NOS/NO in lung endothelial cell damages in streptozotocin induced diabetic rats with sepsis [J]. *Chin J Emerg Med*, 2013, 22 (10): 1105-1111.

[3] Bansch P, Nelson A, Ohlsson T, et al. Effect of charge on microvascular permeability in early experimental sepsis in the rat [J]. *Microvasc Res*, 2011, 82 (3): 339-345. DOI: 10.1016/j.mvr.2011.08.008.

[4] Fries E, Blom AM. Bikunin--not just a plasma proteinase inhibitor [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, 32 (2): 125-137. DOI:

10.1016/S1357-2725 (99) 00125-9.

[5] Tsujino T, Kawabe T, Omata M. Antiproteases in preventing post-ERCP acute pancreatitis [J]. *JOP*, 2007, 8 (4 Suppl): 509-517.

[6] Saji T. Clinical utility of ulinastatin, urinary protease inhibitor in acute Kawasaki disease [J]. *Nippon Rinsho*, 2008, 66 (2): 343-348.

[7] Karnad DR, Bhadade R, Verma PK, et al. Intravenous administration of ulinastatin (human urinary trypsin inhibitor) in severe sepsis: a multicenter randomized controlled study [J]. *Intensive Care Med*, 2014, 40 (6): 830-838. DOI: 10.1007/s00134-014-3278-8.

[8] Chen H, He MY, Li YM. Treatment of patients with severe sepsis using ulinastatin and thymosin alpha1: a prospective, randomized, controlled pilot study [J]. *Chin Med J*, 2009, 122 (8): 883-888. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2009.08.001.

[9] 吴铁军,张丽娜,亢翠翠.乌司他丁对严重脓毒症患者炎症免疫失衡的调理作用[J].*中华危重病急救医学*, 2013, 25 (4): 219-223. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.04.010.

Wu TJ, Zhang LN, Kang CC. The effect of ulinastatin on disbalance of inflammation and immune status in patients with severe sepsis [J]. *Chin Crit Care Med*, 2013, 25 (4): 219-223.

[10] Min HJ, Kim TH, Yoon JH, et al. Hypoxia increases epithelial permeability in human nasal epithelia [J]. *Yonsei Med J*, 2015, 56 (3): 825-831. DOI: 10.3349/ymj.2015.56.3.825.

[11] 曾朝涛,张萌,周天恩,等.乌司他丁对脓毒症大鼠脑组织的保护作用[J].*中华急诊医学杂志*, 2014, 23 (8): 885-889. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2014.08.013.

Zeng CT, Zhang M, Zhou TE, et al. Protective effect of ulinastatin on cerebral tissue in septic rats [J]. *Chin J Emerg Med*, 2014, 23 (8): 885-889.

[12] Jiang L, Yang L, Zhang M, et al. Beneficial effects of ulinastatin on gut barrier function in sepsis [J]. *Indian J Med Res*, 2013, 138 (6): 904-911.

[13] Bingyang J, Jinping L, Mingzheng L, et al. Effects of urinary protease inhibitor on inflammatory response during on-pump coronary revascularisation. Effect of ulinastatin on inflammatory response [J]. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 2007, 48 (4): 497-503.

[14] Yu JB, Yao SL. Protective effects of hemin pretreatment combined with ulinastatin on septic shock in rats [J]. *Chin Med J*, 2008, 121 (1): 49-55.

[15] Nakatani K, Takeshita S, Tsujimoto H, et al. Inhibitory effect of serine protease inhibitors on neutrophil-mediated endothelial cell injury [J]. *J Leukoc Biol*, 2001, 69 (2): 241-247.

[16] Monaghan-benson E, Burrige K. VE-cadherin status as an indicator of microvascular permeability [M] // Coutts AS. Adhesion protein protocols. New York: Humana Press. 2013: 335-342.

[17] Belloni D, Scabini S, Foglieni C, et al. The vasostatin-I fragment of chromogranin A inhibits VEGF-induced endothelial cell proliferation and migration [J]. *FASEB J*, 2007, 21 (12): 3052-3062. DOI: 10.1096/fj.06-6829com.

(收稿日期: 2015-08-03)

(本文编辑: 郑辛甜)