

· 论著 ·

缺氧人肠上皮细胞 Slingshot 蛋白表达变化及其与屏障功能的关系

张健 王裴 何雯 王凤君



【摘要】 目的 研究缺氧对人肠上皮细胞 Slingshot 蛋白表达的影响及其与屏障功能变化的关系。方法 建立人肠上皮细胞株 Caco-2 单层细胞培养模型。取细胞按照随机数字表法分为 6 部分, 分别行缺氧处理 0 h(即刻)及 1、2、6、12、24 h, 采用生物电阻测定仪测定细胞的跨上皮电阻(TER)。另取细胞同前行缺氧处理, 采用蛋白质印迹法检测带状闭合蛋白 1(ZO-1)、咬合蛋白、闭合蛋白 1 及 Slingshot-1、Slingshot-2、Slingshot-3 的蛋白表达。另取细胞同前行缺氧处理, 采用荧光法检测纤维状肌动蛋白及球状肌动蛋白含量。3 项检测中, 各时相点样本数分别为 10、10、18。对数据进行单因素方差分析、Dunnett 检验。结果 (1) 与缺氧 0 h 比较, 缺氧 1~24 h 细胞的 TER 值均明显降低(P 值均小于 0.01)。(2) 与缺氧 0 h(均为 1.00)比较, 缺氧 1~24 h 细胞的 ZO-1、咬合蛋白及闭合蛋白 1 表达量普遍降低, 于缺氧 12 h 或 24 h 达到最低值(分别为 0.69 ± 0.20 、 0.47 ± 0.15 、 0.47 ± 0.22 , $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与缺氧 0 h 比较, 缺氧 1~24 h 细胞的 Slingshot-1、Slingshot-3 蛋白表达量无明显变化(P 值均大于 0.05); 缺氧 1~24 h, 细胞的 Slingshot-2 蛋白表达量呈先降低后上升的趋势, 其中缺氧 24 h(1.54 ± 0.57)明显高于缺氧 0 h(1.00, $P < 0.05$)。(3) 与缺氧 0 h 比较, 缺氧 1、6、12、24 h 细胞的纤维状肌动蛋白含量明显减少, 缺氧 6~24 h 细胞的球状肌动蛋白含量明显增加, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 其余时相点 2 项指标无明显变化(P 值均大于 0.05)。结论 缺氧通过诱导人肠上皮细胞 Slingshot-2 表达, 引起丝切蛋白去磷酸化而活化以及纤维状肌动蛋白解聚, 从而影响细胞间紧密连接, 导致细胞屏障功能受损。

【关键词】 缺氧; 肌动蛋白类; 肠上皮细胞; Slingshot; 带状闭合蛋白 1; 咬合蛋白; 闭合蛋白 1

基金项目: 国家自然科学基金(81272087); 教育部创新团队项目(13050)

Changes in expression of Slingshot protein in hypoxic human intestinal epithelial cell and its relation with barrier function of the cells Zhang Jian, Wang Pei, He Wen, Wang Fengjun. Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: Wang Fengjun, Email: wangfj@tmmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the effect of hypoxia on Slingshot protein expression in human intestinal epithelial cell and its relation with changes in barrier function of the cells. **Methods** The human intestinal epithelial cell line Caco-2 was used to reproduce monolayer-cells. One portion of the monolayer-cell specimens were divided into six parts according to the random number table, and they were respectively exposed to hypoxia for 0 (without hypoxia), 1, 2, 6, 12, and 24 h. Transepithelial electrical resistance (TER) was determined with an ohmmeter. Another portion of the monolayer-cell specimens were exposed to hypoxia as above. Western blotting was used to detect the protein expressions of zonula occludens 1 (ZO-1), occludin, claudin-1, Slingshot-1, Slingshot-2, and Slingshot-3. The remaining portion of the monolayer-cell specimens were also exposed to hypoxia as above. The content of fibrous actin (F-actin) and globular actin (G-actin) was determined by fluorescence method. The sample number of above-mentioned 3 experiments was respectively 10, 10, and 18 at each time point. Data were processed with one-way analysis of variance and Dunnett test. **Results** (1) Compared with that of cells exposed to hypoxia for 0 h, TER of cells exposed to hypoxia for 1 to 24 h was significantly reduced (P values below 0.01). (2) Compared with those of cells exposed to hypoxia for 0 h (all were 1.00), the protein expressions of ZO-1, occludin, and claudin-1 of cells exposed to hypoxia for 1 to 24 h were generally lower, especially those of cells exposed to hypoxia

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.04.014

作者单位: 400038 重庆, 第三军医大学西南医院全军烧伤研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通信作者: 王凤君, Email: wangfj@tmmu.edu.cn

for 12 h or 24 h (respectively 0.69 ± 0.20 , 0.47 ± 0.15 , and 0.47 ± 0.22 , $P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with those of cells exposed to hypoxia for 0 h, the protein expressions of Slingshot-1 and Slingshot-3 of cells exposed to hypoxia for 1 to 24 h were not obviously changed (P values above 0.05). The protein expression of Slingshot-2 of cells was decreased at first and then gradually increased from hypoxia hour 1 to 24. The protein expression of Slingshot-2 of cells exposed to hypoxia for 24 h (1.54 ± 0.57) was significantly higher than that of cells exposed to hypoxia for 0 h (1.00 , $P < 0.05$). (3) Compared with those of cells exposed to hypoxia for 0 h, the content of F-actin of cells exposed to hypoxia for 1, 6, 12, and 24 h was significantly decreased, whereas the content of G-actin of cells exposed to hypoxia for 6–24 h was significantly increased, $P < 0.05$ or $P < 0.01$; the content of F-actin and G-actin of cells exposed to hypoxia for the other time points was not obviously changed (P values above 0.05). **Conclusions** Hypoxia may cause cofilin activation after dephosphorylation and the depolymerization of F-actin by inducing Slingshot-2 protein expression, which in turn affects the tight junction of human intestinal epithelial cells, thus leading to deterioration of barrier function of these cells.

【Key words】 Anoxia; Actins; Intestinal epithelial cells; Slingshot; Zonula occludens 1; Occludin; Claudin-1

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81272087); Program for Innovative Research Team of Ministry of Education of China (13050)

肠道一直被认为是严重烧/创伤等外科应激的中心器官,其屏障功能损害在严重烧伤后机体病理生理紊乱中的作用已得到广大学者的一致认可。但是,已有研究表明,严重烧伤后肠道屏障功能损害发生所涉及的因素众多,分子机制极其复杂,至今仍未完全明了^[1-2]。因此,探索烧伤后肠道屏障功能损害的分子机制以及相应的针对性防治措施,仍然是烧伤学者关注的重要内容^[3-4]。笔者课题组已有的体内及体外实验表明,严重烧伤或单纯缺氧后肠上皮细胞骨架纤维状肌动蛋白及细胞间紧密连接蛋白的变化,可能参与了肠上皮细胞屏障功能损害的发生^[5-7];缺氧可通过诱导肠上皮细胞丝切蛋白活化而影响纤维状肌动蛋白,导致紧密连接蛋白带状闭合蛋白 1(ZO-1)发生改变^[8],但具体的分子机制尚不清楚。有研究表明,丝切蛋白活性受到上游分子 Slingshot 的调控^[9]。因此,本文旨在了解缺氧状态下肠上皮细胞 Slingshot 表达变化与紧密连接蛋白及屏障功能变化的关系,以期进一步完善缺氧肠上皮细胞屏障功能损害的机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料来源

人肠上皮细胞株 Caco-2 购自中国科学院上海细胞研究所。胰蛋白酶、乙二胺四乙酸购自美国 BBI 公司,Transwell 细胞培养小室购自美国 Corning 公司,鼠尾胶原及鼠抗人 β 肌动蛋白一抗购自美国 Sigma 公司,兔抗人 ZO-1 一抗、594-鬼笔环肽、488-脱氧核糖核酸酶 I、兔抗人咬合蛋白一抗、兔抗人闭合蛋白 1 一抗购自美国 Invitrogen 公司,兔抗人 Slingshot-1 一抗、兔抗人 Slingshot-2 一抗购自美国

Abcam 公司,鼠抗人 Slingshot-3 一抗购自美国 Abnova 公司,辣根过氧化物酶(HRP)-抗兔 IgG 二抗、HRP-抗鼠 IgG 二抗购自美国 Calbiochem 公司,氮气购自重庆朝阳气体厂,超敏化学发光试剂购自美国 Advansta 公司。Milicell ERS 型生物电阻测定仪购自美国 Millipore 公司,ChemiDoc XRS 型凝胶图像分析系统购自美国 Bio-Rad 公司,多功能读板仪购自美国 Thermo 公司。

1.2 细胞培养与单层肠上皮细胞模型的建立

取 Caco-2 细胞株参照文献[10-11]常规培养,待细胞生长至约 80% 融合时,采用 2.5 g/L 胰蛋白酶、0.53 mmol/L 乙二胺四乙酸消化,以 1:3 的比例传代培养。将细胞以 5×10^4 个/cm² 的密度接种至 96 孔板、预先用 1 g/L 鼠尾胶原包被的 24 孔板 Transwell 聚碳酸酯膜,以 5×10^5 个/cm² 的密度接种至 6 孔板。隔日更换 1 次培养液,每日在倒置相差显微镜下观察 6 孔板及 96 孔板的单层细胞形成情况;采用生物电阻测定仪测定 24 孔板 Transwell 聚碳酸酯膜跨上皮电阻(TER)以监测单层细胞形成情况,电阻趋于稳定时表明单层肠上皮细胞形成。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 单层肠上皮细胞的 TER 变化 将培养于 24 孔板 Transwell 聚碳酸酯膜的细胞按照随机数字表法分为 6 部分,参照文献[12]的缺氧操作分别行缺氧处理 0 h(即刻)及 1、2、6、12、24 h。参照文献[7]采用生物电阻测定仪测定细胞的 TER,各时相点样本数为 2,实验重复 5 次。

1.3.2 单层肠上皮细胞 3 种紧密连接蛋白及 3 种 Slingshot 蛋白表达 将培养于 6 孔板的细胞按照随机数字表法分为 6 部分,同前分别行缺氧处理 0 h

(即刻)及 1、2、6、12、24 h,提取细胞总蛋白,而后进行蛋白质印迹法检测。加入兔抗人 ZO-1 一抗、兔抗人咬合蛋白一抗、兔抗人闭合蛋白 1 一抗、兔抗人 Slingshot-1 一抗、兔抗人 Slingshot-2 一抗、鼠抗人 Slingshot-3 一抗(稀释比均为 1:1 000)及鼠抗人 β 肌动蛋白一抗(稀释比为 1:5 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。加入 HRP-抗兔 IgG 二抗及 HRP-抗鼠 IgG 二抗,稀释比均为 1:5 000。超敏化学发光试剂发光,并经凝胶图像分析系统采集发光信号,配套软件进行定量分析,结果以目的蛋白与内参照 β 肌动蛋白灰度值比值表示。各时相点样本数为 1,实验重复 10 次。

1.3.3 单层肠上皮细胞纤维状肌动蛋白及球状肌动蛋白含量的测定 将培养于 96 孔板的细胞按照随机数字表法分为 6 部分,同前分别行缺氧处理 0 h(即刻)及 1、2、6、12、24 h,参照文献[13]进行荧光染色。先用 PBS 漂洗、多聚甲醛室温固定、Triton X-100 细胞打孔、牛血清白蛋白室温封闭,之后加入 0.165 mol/L 594-鬼笔环肽(红色荧光)和 0.3 mol/L 488-脱氧核糖核酸酶 I(绿色荧光)孵育 15 min,分别对纤维状肌动蛋白与球状肌动蛋白进行荧光标记。采用多功能读板仪分别在激发光波长 578 nm、发射光波长 600 nm 及激发光波长 495 nm、发射光波长 519 nm 的条件下测定红色与绿色荧光强度,以它们分别表示纤维状肌动蛋白与球状肌动蛋白含量。各时相点样本数为 3,实验重复 6 次。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,总体比较行单因素方差分析,两两比较行 Dunnett 检验(软件自动略去该统计量值)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

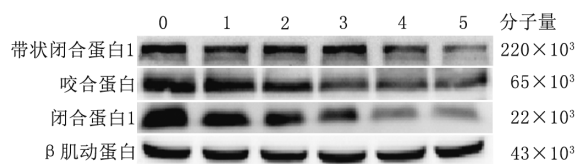
2.1 缺氧对单层肠上皮细胞 TER 的影响

缺氧 0、1、2、6、12、24 h,细胞的 TER 分别为

1.00、0.64 \pm 0.19、0.59 \pm 0.13、0.58 \pm 0.13、0.56 \pm 0.15、0.61 \pm 0.07,总体比较差异明显($F = 6.704$, $P = 0.001$)。与缺氧 0 h 比较,缺氧 1~24 h 细胞的 TER 均明显降低(P 值均小于 0.01)。

2.2 缺氧后单层肠上皮细胞 3 种紧密连接蛋白及 3 种 Slingshot 蛋白表达的变化

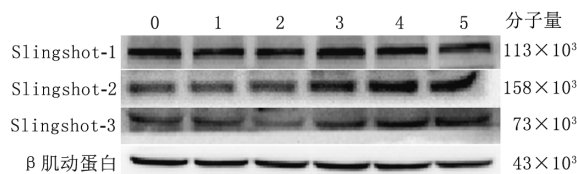
与缺氧 0 h 比较,缺氧 1~24 h 细胞的 ZO-1、咬合蛋白及闭合蛋白 1 表达量普遍降低,于缺氧 12 h 或 24 h 达到最低值($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 1、表 1。



注:0~5.依次为缺氧 0、1、2、6、12、24 h

图 1 蛋白质印迹法检测单层肠上皮细胞缺氧各时相点的 3 种紧密连接蛋白表达

与缺氧 0 h 比较,缺氧 1~24 h 细胞的 Slingshot-1、Slingshot-3 蛋白表达无明显变化(P 值均大于 0.05);缺氧 1~24 h,细胞的 Slingshot-2 蛋白表达呈先降低后上升的趋势,其中缺氧 24 h 明显高于缺氧 0 h($P < 0.05$)。见图 2、表 1。



注:0~5.依次为缺氧 0、1、2、6、12、24 h

图 2 蛋白质印迹法检测单层肠上皮细胞缺氧各时相点的 3 种 Slingshot 蛋白表达

2.3 缺氧对单层肠上皮细胞纤维状肌动蛋白及球状肌动蛋白含量的影响

缺氧 0、1、2、6、12、24 h,细胞的纤维状肌动蛋白含量分别为 242 \pm 48、162 \pm 61、179 \pm 50、126 \pm 22、

表 1 缺氧各时相点单层肠上皮细胞 3 种紧密连接蛋白及 3 种 Slingshot 蛋白的相对含量($\bar{x} \pm s$)

检测时相点	带状闭合蛋白 1	咬合蛋白	闭合蛋白 1	Slingshot-1	Slingshot-2	Slingshot-3
缺氧 1 h	0.98 \pm 0.05	0.90 \pm 0.07	0.79 \pm 0.21	1.02 \pm 0.22	1.03 \pm 0.03	1.06 \pm 0.28
缺氧 2 h	1.07 \pm 0.20 ^a	0.82 \pm 0.20	0.77 \pm 0.31 ^a	1.19 \pm 0.38	0.94 \pm 0.04	1.00 \pm 0.17
缺氧 6 h	0.87 \pm 0.25	0.65 \pm 0.23	0.64 \pm 0.15 ^a	1.14 \pm 0.30	0.95 \pm 0.12	1.03 \pm 0.26
缺氧 12 h	0.69 \pm 0.20 ^b	0.47 \pm 0.15 ^a	0.61 \pm 0.23 ^a	1.31 \pm 0.38	1.31 \pm 0.07	1.03 \pm 0.14
缺氧 24 h	0.70 \pm 0.12 ^b	0.54 \pm 0.16 ^a	0.47 \pm 0.22 ^a	1.04 \pm 0.23	1.54 \pm 0.57 ^b	0.99 \pm 0.17
<i>F</i> 值	8.742	7.033	9.750	1.523	3.528	0.079
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	0.202	0.048	0.995

注:缺氧 0 h,3 种紧密连接蛋白及 3 种 Slingshot 蛋白的相对含量均为 1.00; F 值、 P 值为缺氧各时相点各指标总体比较所得;与缺氧 0 h 比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$

143 ± 50、148 ± 25, 总体比较差异明显 ($F = 3.322$, $P = 0.027$)。与缺氧 0 h 比较, 缺氧 1、6、12、24 h 时细胞的纤维状肌动蛋白含量明显减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 缺氧 2 h 细胞的纤维状肌动蛋白含量则无明显变化 ($P > 0.05$)。

缺氧 0、1、2、6、12、24 h, 细胞的球状肌动蛋白含量分别为 22 ± 3、31 ± 8、29 ± 10、39 ± 12、40 ± 11、48 ± 12, 总体比较差异明显 ($F = 4.702$, $P = 0.005$)。与缺氧 0 h 比较, 缺氧 6 ~ 24 h 细胞的球状肌动蛋白含量明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 缺氧 1、2 h 细胞的球状肌动蛋白含量则无明显变化 (P 值均大于 0.05)。

3 讨论

肠道屏障功能损害至今仍被认为是严重烧伤后肠道细菌移位、炎症反应、脓毒症、多器官功能障碍、高代谢反应及死亡的重要原因^[14], 但其发生机制仍不清楚。众所周知, 严重烧伤早期损害的实质是机体全身的缺血缺氧性损害。因此, 本研究首先观察了缺氧对体外培养的单层肠上皮细胞屏障功能的影响。结果表明, 缺氧 1 ~ 24 h, 反映肠上皮细胞屏障功能完整性的指标 TER 均明显降低, 表明缺氧导致了肠上皮细胞屏障功能损害, 这与既往的研究结果^[7]相符。研究表明, 肠上皮细胞屏障功能的完整性主要取决于上皮细胞间连接, 尤其是紧密连接结构, 而紧密连接的分子解剖学基础是一系列紧密连接相关蛋白, 包括 ZO 家族成员、咬合蛋白、闭合蛋白家族成员以及连接黏附分子等, 这些紧密连接相关蛋白无论是表达量的改变还是胞内分布的改变均可影响细胞紧密连接, 从而参与屏障功能障碍的发生^[15-16]。因此, 在观察到缺氧能引起肠上皮细胞屏障功能损害的基础上, 笔者又观察了缺氧对单层肠上皮细胞紧密连接蛋白 ZO-1、咬合蛋白及闭合蛋白 1 表达的影响。结果表明, 3 种紧密连接蛋白表达随着缺氧时间的延长普遍降低。这些紧密连接蛋白表达的降低势必影响肠上皮细胞间紧密连接的结构与功能, 导致肠上皮细胞屏障功能损害, 表现为 TER 降低。

研究表明, 肠上皮细胞的紧密连接与细胞骨架是密切关联的。紧密连接的组成成员 ZO-1 通过其肌动蛋白结合区域与细胞骨架的主要成分肌动蛋白相连接, 从而形成紧密连接蛋白与细胞骨架蛋白的连接网络, 并相互影响^[15-16]。有鉴于此, 笔者又进一步观察了缺氧对单层肠上皮细胞纤维状肌动蛋白及

球状肌动蛋白含量的影响。结果表明, 缺氧后肠上皮细胞纤维状肌动蛋白含量降低, 而球状肌动蛋白含量升高。这与本课题组已有研究观察到缺氧后肠上皮细胞纤维状肌动蛋白与球状肌动蛋白比值降低, 纤维状肌动蛋白形态分布发生改变的结果^[8]相符。因此, 笔者认为缺氧引起了肠上皮细胞纤维状肌动蛋白的解聚增加, 导致纤维状肌动蛋白与球状肌动蛋白的动态平衡受到破坏, 从而影响细胞紧密连接。

既往研究认为, 胞内肌动蛋白聚合与解聚的动态平衡主要受丝切蛋白活性的调控, 丝切蛋白是一种肌动蛋白解聚因子, 在纤维状肌动蛋白与球状肌动蛋白的相互转换中起着开关作用^[9]。丝切蛋白活性由其肽链中第 3 位丝氨酸残基的磷酸化状态所决定, 磷酸化时失去活性, 去磷酸化时被激活。本课题组前期研究表明, 缺氧能引起肠上皮细胞丝切蛋白去磷酸化, 从而激活丝切蛋白活性, 但机制尚不清楚^[8]。由于丝切蛋白的去磷酸化直接受上游分子 Slingshot 的调控, 因此, 笔者还观察了缺氧对单层肠上皮细胞 Slingshot 蛋白表达的影响。结果表明, 缺氧后肠上皮细胞 Slingshot-1 及 Slingshot-3 蛋白表达量无明显变化, Slingshot-2 蛋白表达量呈先降低后上升的趋势, 尤其在缺氧 24 h 明显升高, 提示 Slingshot-2 表达增加可能是缺氧引起肠上皮细胞丝切蛋白活化的重要分子基础。

综上所述, 笔者认为缺氧通过诱导肠上皮细胞 Slingshot-2 表达, 引起丝切蛋白去磷酸化而活化以及纤维状肌动蛋白解聚, 从而影响细胞间紧密连接, 导致肠上皮细胞屏障功能受损。

参考文献

- [1] 王凤君. 重视烧伤后肠道紧密连接屏障功能障碍的研究[J]. 中华烧伤杂志, 2010, 26(5): 331-333. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2010.05.002.
- [2] 刘行, 王凤君. 紧密连接蛋白与烧伤后肠道屏障功能障碍研究进展[J]. 中华烧伤杂志, 2010, 26(5): 351-353. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2010.05.008.
- [3] Zhou CX, Bai W, Chen QH, et al. Protective effect of crocetin against burn-induced intestinal injury[J]. J Surg Res, 2015, 198(1): 99-107. DOI: 10.1016/j.jss.2015.05.052.
- [4] Earley ZM, Akhtar S, Green SJ, et al. Burn injury alters the intestinal microbiome and increases gut permeability and bacterial translocation[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0129996. DOI: 10.1371/journal.pone.0129996.
- [5] 陈传莉, 刘依凌, 王裴, 等. 严重烧伤后肠黏膜肌球蛋白轻链磷酸化表达改变及其意义[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(15): 1434-1437. DOI: 10.3321/j.issn:1000-5404.2008.15.013.
- [6] Chen C, Wang P, Su Q, et al. Myosin light chain kinase mediates intestinal barrier disruption following burn injury[J]. PLoS

- One, 2012, 7 (4): e34946. DOI: 10.1371/journal.pone.0034946.
- [7] 王裴, 陈传莉, 李牧, 等. 肌球蛋白轻链激酶介导缺氧后肠上皮屏障功能紊乱的研究[J]. 中华烧伤杂志, 2009, 25(1): 57-60. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2009.01.021.
- [8] 何雯, 王裴, 张健, 等. 缺氧条件下人肠上皮细胞丝切蛋白活化及其与带状闭合蛋白 1 分布的关系[J]. 中华烧伤杂志, 2015, 31(2): 116-121. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2015.02.010.
- [9] Pfaendtner J, De La Cruz EM, Voth GA. Actin filament remodeling by actin depolymerization factor/cofilin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(16): 7299-7304. DOI: 10.1073/pnas.0911675107.
- [10] 刘行, 王裴, 王凤君. γ 干扰素与肿瘤坏死因子 α 对肠上皮屏障功能影响的实验研究[J]. 中华烧伤杂志, 2011, 27(2): 145-149. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2011.02.019.
- [11] Cao M, Wang P, Sun C, et al. Amelioration of IFN- γ and TNF- α -induced intestinal epithelial barrier dysfunction by berberine via suppression of MLCK-MLC phosphorylation signaling pathway[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e61944. DOI: 10.1371/journal.pone.0061944.
- [12] Wang P, Qi H, Sun C, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 α exacerbates endothelial barrier dysfunction induced by hypoxia[J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 32(4): 859-870. DOI: 10.1159/000354488.
- [13] Nakashima S, Matsuda H, Kurume A, et al. Cucurbitacin E as a new inhibitor of cofilin phosphorylation in human leukemia U937 cells[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20(9): 2994-2997. DOI: 10.1016/j.bmcl.2010.02.062.
- [14] Carter SR, Zahs A, Palmer JL, et al. Intestinal barrier disruption as a cause of mortality in combined radiation and burn injury[J]. Shock, 2013, 40(4): 281-289. DOI: 10.1097/SHK.0b013e3182a2c5b5.
- [15] Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(11): 799-809. DOI: 10.1038/nri2653.
- [16] Shen L, Weber CR, Raleigh DR, et al. Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo[J]. Annu Rev Physiol, 2011, 73: 283-309. DOI: 10.1146/annurev-physiol-012110-142150.

(收稿日期: 2015-11-20)

(本文编辑: 莫愚)

本文引用格式

张健, 王裴, 何雯, 等. 缺氧人肠上皮细胞 Slingshot 蛋白表达变化及其与屏障功能的关系[J]. 中华烧伤杂志, 2016, 32(4): 249-253. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.04.014.

Zhang Jian, Wang Pei, He Wen, et al. Changes in expression of Slingshot protein in hypoxic human intestinal epithelial cell and its relation with barrier function of the cells[J]. Chin J Burns, 2016, 32(4): 249-253. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.04.014.

· 消息 ·**本刊“疑难病例析评”栏目征稿**

《中华烧伤杂志》“疑难病例析评”栏目文章结构分“病历摘要”和“分析与讨论”两部分。(1)作者在文题下署名,而非仅在文末注明由何人整理,作者拥有论文的著作权。(2)“分析与讨论”部分不采用依次发言的形式,而由作者系统归纳,形成思路清晰、条理清楚、分析得当、科学性强的原创性临床论文。论文性质等同于本刊“论著”。(3)所分析的病例不一定都具备病理检查结果,但必须经科学手段确诊。

病例选择:(1)疑难病例,特别是涉及多学科、多领域的疑难病例。(2)误诊且有经验教训的病例。(3)诊断已经明确,但病情危重或有诸多并发症,治疗上甚为棘手的病例。(4)罕见病例。(5)其他对临床实践有指导或提示意义的病例。以上病例须最终获得明确诊断或成功治疗,临床资料应齐全,能提供实验室、影像学 and/或病理确诊证据。

写作格式:文题可用主要症状、体征或诊断命题,各短语之间用一字线连接。正文分“病历摘要”和“分析与讨论”两部分。“病历摘要”部分需交代清楚患者主诉、病史(包括既往史)、作者接诊后的诊治经过等。应提供必要的实证图片。字数以不超过 1 000 字为宜(不包括图片)。“分析与讨论”部分要求逻辑性强,条理清楚,能较好地体现正确的临床思维,对读者的临床工作有实际借鉴意义。重点部分可采用序号标示法,以突出层次。

写作上应满足以下要求:(1)开门见山,首先说明本病例需要从哪几个方面讨论。(2)阐述诊断和治疗思路,如何发现并优先处理疾病的关键问题。(3)将疑点、鉴别诊断要点另行列出,指出通过什么手段排除相关疾病。(4)给出病例的最后诊断和诊断依据。(5)若为误诊,则需总结经验教训。(6)若为罕见病,则需介绍目前国内外的最新进展。(7)列出相关的国内外主要参考文献。字数以控制在 2 000 ~ 2 500 字为宜。

欢迎根据本刊文末文献著录格式引用文章

临床医师、科研人员工作繁忙,而国内外期刊对参考文献的引用格式都有严格要求。本刊特别从 2016 年第 1 期开始,在每篇文章参考文献下方刊载该文作为参考文献的著录格式,对有英文题名信息的文章同时附注英文版著录格式。既方便读者作者朋友更加快捷地引用本刊文章,使您的投稿论文更加规范工整,也方便作者本人整理记录研究成果,欢迎关注使用。

本刊编辑部