DOI:10.16016/j.2097-0927.202207164

钙库操纵性钙内流参与调节 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞通透性改变

康 越[1],邰苏豫[2],李茂巍[2],于林君[2],王连友[2] 453003 河南 新乡,新乡医学院研究生院[1];450042 郑州,联勤保障部队 988 医院心内科[2]

[摘要] **目的** 利用体外培养的人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVECs),探讨钙库操纵性钙内流(store-operated calcium entry,SOCE)在氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein,ox-LDL)诱导的血管内皮细胞通透性改变中的作用。**方法** 体外培养 HUVECs,传代 3 次后,用于检测跨内皮电阻(transendothelial electrical resistance,TER)的细胞随机分为对照组和不同剂量 ox-LDL(10、25、50、100 μg/mL)干预组($n=3$)。培养于载玻片上的细胞随机分为对照组和 ox-LDL 24 h 组、ox-LDL 48 h 组,免疫荧光检测细胞骨架蛋白 F-actin 及细胞连接蛋白 VE-cadherin 的分布,免疫印迹检测 VE-cadherin 的含量。细胞孵育钙离子探针(Fluo-3/AM)后,激光共聚焦检测细胞内钙含量(对照组、ox-LDL 组、ox-LDL+2APB 组)以及 SOCE(对照组、ox-LDL 24h 组、ox-LDL 48 h 组)。**结果** 低剂量的 ox-LDL(10、25 μg/ mL)对 TER 无明显影响,高剂量 ox-LDL(50、100 μg/ mL)在 6 h 内对 TER 影响不明显,但在 12 h 引起 TER 降低($P<0.05$),此效应在 24 h 和 48 h 更加明显($P<0.05$)。Ox-LDL(100 μg/mL)处理后 24、48 h,VE-cadherin 的表达减少($P<0.05$),并影响 F-actin 的形态和分布;HUVECs 的游离钙浓度显著增加($P<0.05$),此效应被 SOCE 抑制剂 2-APB 阻断,2-APB 能够减弱 ox-LDL 对 TER 的影响。ox-LDL(100 μg/mL)处理 48 h 后,SOCE 的振幅显著降低($P<0.05$)。SOCE 降支速度在 ox-LDL 处理 24 h 后呈现降低趋势,而在 ox-LDL 处理 48 h 后呈显著下降($P<0.05$)。**结论** ox-LDL 通过延长内皮细胞 SOCE 的持续时间上调细胞内游离钙浓度,影响细胞骨架的排列和细胞间连接的完整性,引起细胞通透性的增加。

[关键词] 钙库操纵性钙内流;细胞骨架;氧化-低密度脂蛋白;通透性;血管内皮细胞
[中图法分类号] R322.123; R329.27; R363.21 [文献标志码] A

Store-operated calcium entry involves in regulating the hyperpermeability of endothelial cells induced by ox-LDL

KANG Yue[1], TAI Suyu[2], LI Maowei[2], YU Linjun[2], WANG Lianyou[2] [1]School of Graduate Students, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan Province, 453003; [2]Department of Cardiology, No. 988 Hospital of Joint Logistic Force of PLA, Zhengzhou, Henan Province, 450042, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effects of store-operated calcium entry (SOCE) on oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL)-induced hyperpermeability in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** HUVECs at passage 3 were divided into the control group and the ox-LDL(10, 25, 50 and 100 μg/mL) intervention groups ($n=3$) for the examination of transendothelial electrical resistance (TER). HUVECs cultured in slides were randomly divided into the control group, the ox-LDL 24 h group and the ox-LDL 48 h group. The distribution of F-actin and VE-cadherin were detected by immunofluorescence,

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划(联合共建)项目(LHGJ20190865)
[通信作者] 王连友,E-mail:quantin_wly@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

and the protein content of VE-cadherin was detected by Western blotting. Incubated with calcium fluorescence probe (Fluo-3/AM), intracellular free Ca^{2+} concentration (control group, ox-LDLgroup, ox-LDL+2-APB group) and SOCE (control group, ox-LDL 24 h group, ox-LDL 48 h group) were detected by laser confocal microscopy. **Results** Low dose of ox-LDL(10,25 μg/mL) exerted no effect on TER. High dose of ox-LDL (50, 100 μg/mL) also had no effect on TER within 6 h, but after 6 h showed no effect on TER. However, high dose of ox-LDL(50, 100 μg/mL) reduced the decrease of TER in 12 h ($P<0.05$), and the decrease was more significant in 24 h and 48 h. After the incubation with ox-LDL(100 μg/mL) 24 h and 48 h, the expression level of VE-cadherin decreased($P<0.05$), while the form and distribution of F-action changed; Intracellular free Ca^{2+} concentration increased obviously which was interrupted by 2-APB the SOCE inhibitor ($P<0.05$), and the 2-APB can decrease the effect of ox-LDL on TER. After incubation with ox-LDL (100 μg/mL) 48 h, the amplitude of SOCE decreased ($P<0.05$). The descending artery flow velocity of SOCE showed a slightly decreased trend after incubation with ox-LDL 24 h and a more significant decrease in 48 h ($P<0.05$). **Conclusion** Ox-LDL up-regulate the intracellular free Ca^{2+} concentration of vascular endothelial cells by extending the duration of SOCE to effect the arrangement of cytoskeleton and cell junction, which increases the cell permeability.

[**Key words**] store-operated calcium entry; cytoskeleton; oxidized low-density lipoprotein; permeability; vascular endothelial cells

Supported by the Henan Province-Ministry Co-Construct Key Medical Science and Technology Project (LHGJ20190865). Corresponding author: WANG Lianyou, E-mail: quantin_wly@163.com

动脉粥样硬化是不良心血管事件的重要诱因。既往研究发现,动脉粥样硬化的早期病理改变是血管内皮细胞功能异常[1-2]及其通透性的改变[3-4]。氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)聚积于血管壁,形成典型的脂质斑块。在此过程中,ox-LDL不仅是参与形成泡沫细胞(吞噬了ox-LDL的巨噬细胞),其本身也是一种致病因子,参与调节内皮细胞的功能以及通透性改变[5-7]。但ox-LDL对血管内皮细胞通透性改变的调节机制仍未明确。

既往研究发现,钙离子参与调节血管内皮细胞通透性和细胞骨架排列[8-10]。钙库操纵性钙内流(store-operated calcium entry, SOCE)是大多数非兴奋性细胞钙内流的主要方式[11-12]。前期研究发现,SOCE参与调节血管内皮细胞的增殖和迁移[13],推测SOCE可能参与调节血管内皮细胞的通透性改变。本研究利用体外培养的人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs),初步探讨SOCE在ox-LDL诱导的HUVEC通透性变化中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及处理分组

HUVECs(HUM-CELL-0020,武汉原生原代)用含20%胎牛血清的1640培养基(Hyclon)的培养瓶贴壁培养,培养瓶置于37℃、5% CO_2 培养箱中。每3天传代1次,第3次传代根据目标实验分别接种于Millicell培养皿、激光共聚焦培养皿、6孔培养板中。培养于Millicell培养皿的细胞用于检测跨内皮电阻(transendothelial electrical resistance, TER),随机分为对照组和不同剂量ox-LDL(10、25、50、100 μg/mL)干预组($n=3$)。培养于含载玻片的6孔板的细胞用于细胞骨架的免疫荧光及蛋白印迹检测,随机分为($n=5$):对照组、ox-LDL 24 h组(100 μg/mL)和ox-LDL 48 h组(100 μg/mL,48 h)。培养于激光共聚焦培养皿的细胞用于检测细胞内钙含量以及SOCE ($n=8\sim12$):钙含量检测中利用2-APB为SOCE抑制剂,细胞随机分为对照组、ox-LDL组(100 μg/ml)和ox-LDL+2APB组(ox-LDL 100 μg/ml;2-APB 50 μmol/L),分别于24 h和48 h检测。SOCE检测的细胞随机分为对照组、ox-LDL 24 h组(100 μg/ml)和ox-LDL 48 h组(100 μg/ml)。

1.2 跨内皮电阻(transendothelial electrical resistance, TER)检测

采用Millicell ERS-2电阻仪检测TER。以无细胞的Millicell培养皿为空白对照(TER_0),接种了细胞的Millicell培养皿先置于细胞培养箱24 h,随后添加不同剂量的ox-LDL(10、25、50、100 μg/mL),分别于0、3、6、12、24、48 h检测TER_t,按照公式$TER=TER_t-TER_0$

计算。

在观察抑制 SOCE 对 TER 影响的检测中,将细胞分为对照组、ox-LDL 组(100 μg/ml)和 ox-LDL+2APB 组(ox-LDL 100 μg/ml, 2-APB 50 μmol/L)。

1.3 细胞骨架免疫荧光检测

细胞用4%多聚甲醛室温固定 15 min,0.01 mol/L PBS 洗 3 min×3 次。加入兔血清封闭液封闭 37 ℃孵育 20 min。分别加入 VE-cadherin 抗体(1∶200 稀释,中国碧云天生物技术有限公司),Actin-Tracker Red-Rhodamine (1∶100 稀释,中国碧云天生物技术有限公司)后,置于保湿盒后,于 4℃冰箱孵育过夜。0.01 mol/L PBS 洗 3 min×3 次,再加入 FITC 标记的羊抗兔抗体(1∶100 稀释,美国 Earthox 公司),37 ℃避光孵育 1 h。0.01 mol/L PBS 洗 3 min×3 次,加入 DAPI 染液,室温孵育 5 min。0.01 mol/L PBS 洗 3 min×3 次后,激光共聚焦显微镜观察荧光阳性细胞并拍照。

1.4 VE-cadherin 水平免疫印迹检测

取接种于 6 孔板的细胞,RIPA 裂解液(按 1∶100 添加 PMSF,中国碧云天生物技术有限公司)裂解细胞提取总蛋白,离心后取上清,BCA 法测蛋白浓度。添加 SDS 上样缓冲液(中国碧云天生物技术有限公司)后 95 ℃变性 5 min,取 20 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 胶电泳后转移至 PVDF 膜,5%BSA 室温封闭 1 h,孵育 VE-cadherin 抗体(1∶500,中国碧云天生物技术有限公司)、β-actin(1∶1 000,中国碧云天生物技术有限公司)于 4 ℃过夜,漂洗后与 HRP 标记的 IgG 抗体 37 ℃孵育 1 h,以 ECL 试剂盒显影,Quantity One 软件分析条带灰度值。

1.5 钙离子探针孵育

取接种于激光共聚焦培养皿并培养 1 d 的细胞,加入终浓度为 5 μmol/L 的 Fluo-3/AM 钙离子探针(中国碧云天生物技术有限公司),37℃避光孵育 30 min 后,吸弃培养液并以 PBS 漂洗 3 次,加入新鲜培养液再次避光孵育 60 min 后,即于激光共聚焦下检测细胞内钙含量以及 SOCE。

1.6 细胞内游离钙浓度检测

取孵育钙离子探针的细胞置于显微镜载物台。选取视野后(每个视野含 8~12 个细胞),共聚焦显微镜扫描 1 min(激发波长 488 nm,发射波长 530 nm)。因 Fluo-3/AM 选择性与细胞内游离钙结合后呈荧光性。以细胞边界圈定兴趣窗(region of interest, ROI),计算每个 ROI 区域的平均荧光强度 F,以此代表细胞内游离钙浓度。

1.7 SOCE 检测

SOCE 检测依既往研究实施[14]。其基本原理是在孵育钙离子探针后,细胞首先置于无钙离子的缓冲液中,添加毒胡萝卜素(可特异性抑制内质网上 G^{2+}-ATP 酶,从而引起细胞内钙库的耗竭),此过程将激活介导 SOCE 的钙离子通道,随后再向缓冲液中添加含钙离子的溶液,此时,引起的钙内流被认为是 SOCE。取孵育钙离子探针的细胞,吸弃原培养液,以无钙离子的 HBSS 漂洗 3 次后每个培养皿加入 1 mL 无钙离子的 HBSS 并置于显微镜载物台。选取视野后,共聚焦显微镜行基线扫描 1 min(激发波长 488 nm,发射波长 530 nm,连续扫描模式),基线荧光值计为 F_0。向培养皿中加入终浓度为 2 μmol/L 的毒胡萝卜素(Sigma)并继续扫描直至基线稳定,向培养皿中加入钙离子终浓度为 2 mmol/L 的氯化钙溶液,继续扫描 10 min。加入氯化钙后引起的荧光强度上升,其峰值计为 F_{max},以荧光值变化的绝对值代表细胞内游离钙的改变($\Delta[Ca^{2+}]_i=F_{max}-F_0$),此研究触发的游离钙改变条件为激活 SOCE,因此以 $\Delta[Ca^{2+}]_i$ 代表 SOCE 强度。

1.8 统计学分析

计量结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,Western blot 结果以对照组的倍数表示。采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,均数比较采用 t 检验。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

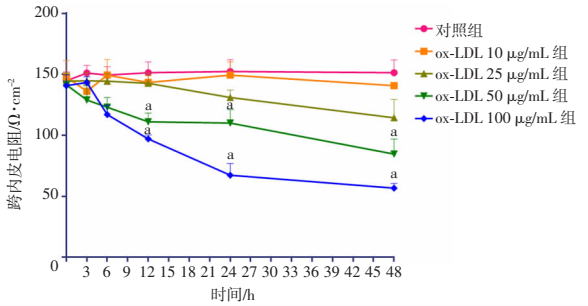
2.1 Ox-LDL 增加 HUVEC 通透性

如图 1 所示,ox-LDL 对 HUVEC 的 TER 影响呈现剂量与时间依赖性。10 μg/mL 的 ox-LDL 对 TER 无明显影响,25 μg/mL 的 ox-LDL 处理 12 h 内,TER 无明显变化,在 24、48 h 引起 TER 降低,但结果无统计学意义。50、100 μg/mL 的 ox-LDL 在 6 h 内对 TER 影响不明显,但在 12 h 引起 TER 降低(与同时相对照组比较,分别降低 26.5%、35.8%,$P<0.05$),此效应在 24 h(与对照组比较,分别降低 27.6%、55.9%,$P<0.05$)、48 h(与对照组比较,分别降低 44.3%、63.0%,$P<0.05$)更加明显。

2.2 Ox-LDL 减少 VE-cadherin 蛋白表达并引起细胞骨架重排

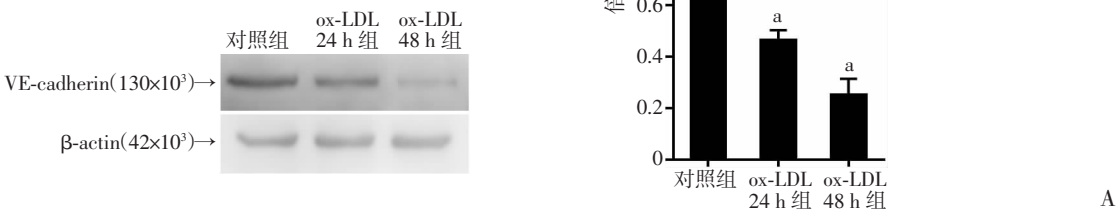
鉴于细胞骨架及细胞间紧密连接与通透性密切相关,本研究观察了 ox-LDL 对 HUVEC 细胞紧密链接关键蛋白 VE-Cadherin 表达的影响以及对细胞骨架蛋白 F-actin 的分布影响。如图 2A 所示,免疫印迹结果显

示,Ox-LDL 处理后 24、48 h, VE-cadherin 的表达减少(与对照组比较分别减少 51%、63%,$P<0.05$)。免疫荧光结果显示,VE-cadherin 主要分布于细胞内,ox-LDL 处理 24、48 h 后,其表达降低(图 2B)。F-actin 主要沿着细胞膜分布,微丝结构在细胞质内规律分布。如图 2B 所示,ox-LDL 处理后,F-actin 的形态和分布均发生改变,应力纤维和板状伪足的数量均减少。这些结果提示,ox-LDL 引起的 HUVECs 通透性的增加,可能与 F-actin 的重新排列以及 VE-cadherin 的表达降低有关。

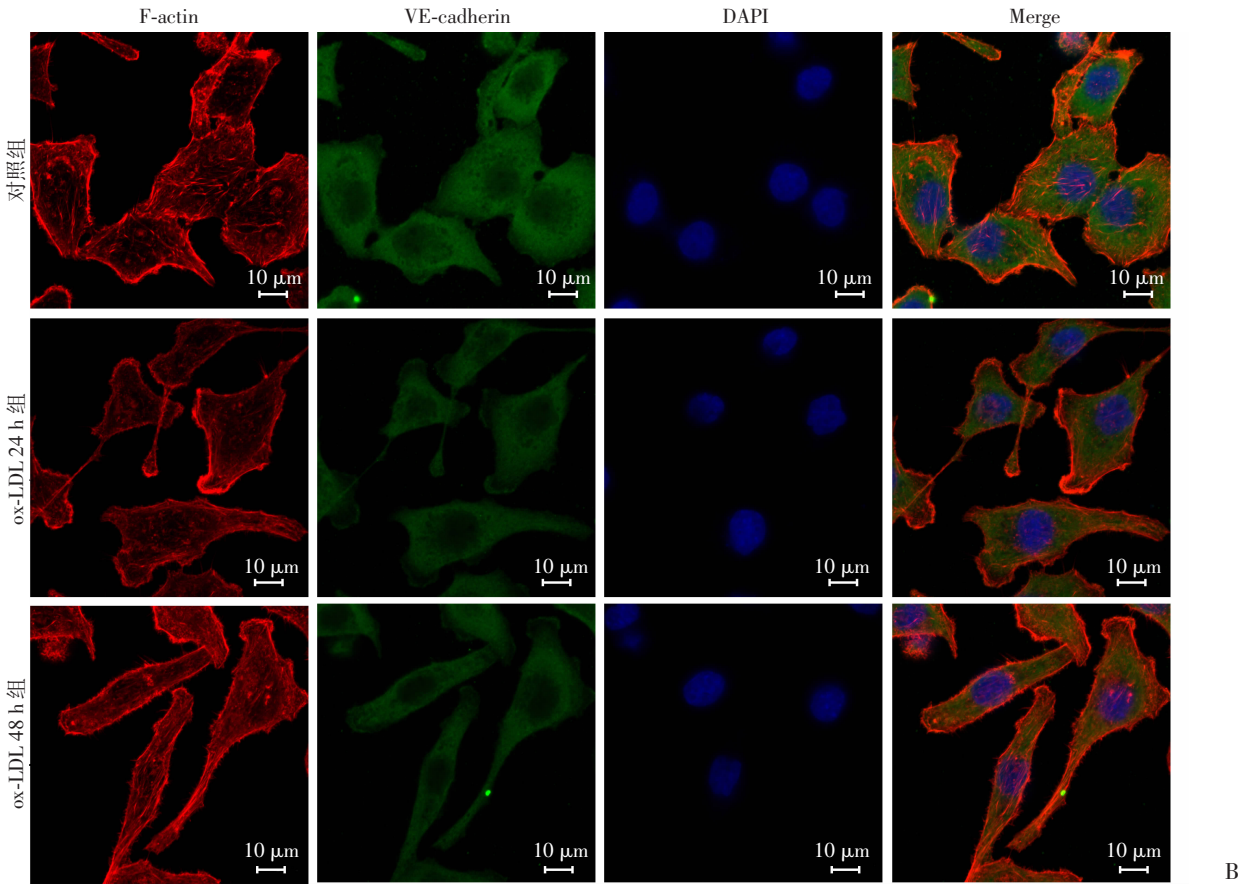


a:$P<0.05$,与对照组比较

图 1　各组 HUVECs 在不同时相点的 TER　($n=3,\bar{x}\pm s$)



A

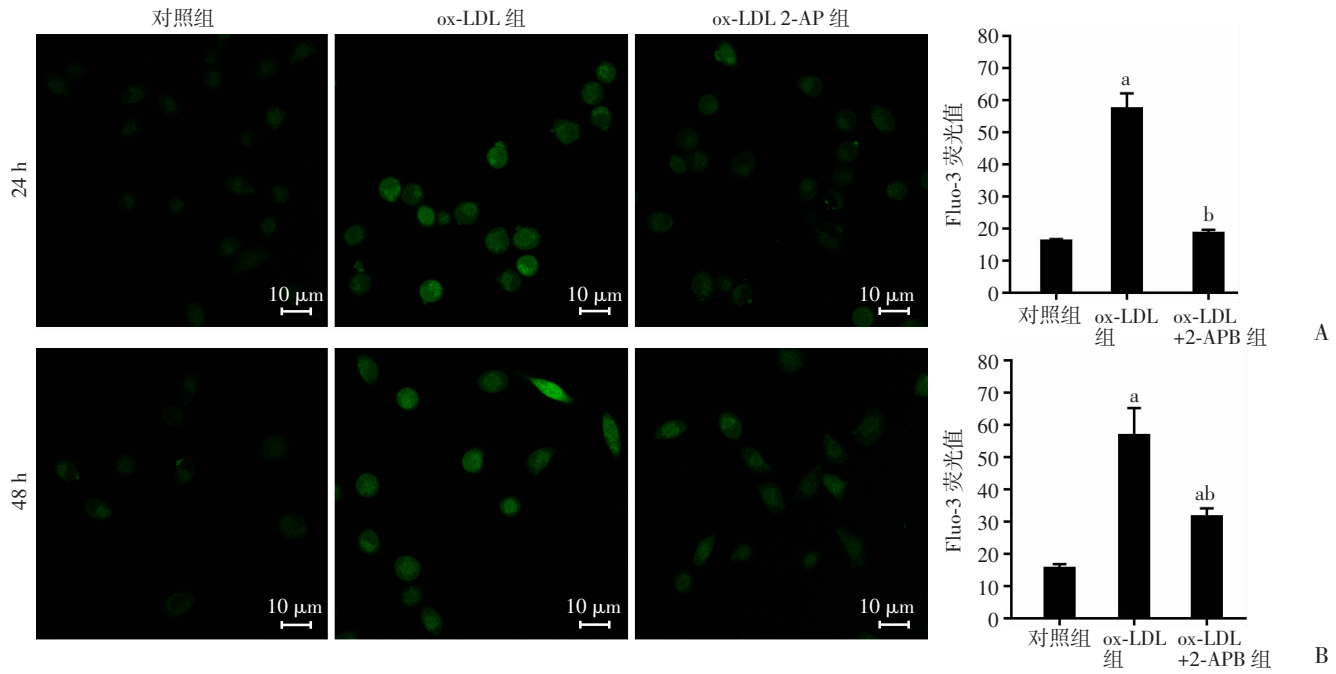


B

A:Western blot 检测 ox-LDL 处理 24、48 h 后 VE-cadherin 表达;B:免疫荧光检测 VE-cadherin 及 F-actin 的表达与分布

a:$P<0.05$,与对照组比较

图 2　Ox-LDL 对 HUVECs VE-cadherin 表达水平及 F-actin 分布的影响　($n=3,\bar{x}\pm s$)



A:各组细胞 24 h 钙离子探针荧光值统计;B:各组细胞 48 h 钙离子探针荧光值统计 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 ox-LDL 组比较

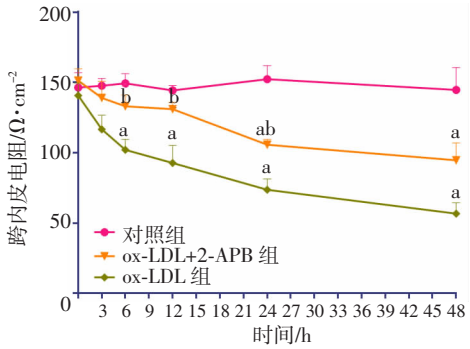
图 3 Ox-LDL 显著降低 HUVEC 细胞内游离钙浓度 ($n=10\sim12$, $\bar{x}\pm s$)

2.3 Ox-LDL 增加 HUVECs 细胞的游离钙浓度

采用钙离子探针(Fluo-3/AM)评估 HUVEC 的游离钙浓度。如图 3A 所示,Ox-LDL(100 μg/mL)处理 24 h 后,HUVECs 的游离钙浓度显著增加(与对照组比较增加 260%,$P<0.05$),此效应被 SOCE 抑制剂 2-APB(50 μmol/L)阻断,即同时给予 ox-LDL 和 2-APB 后,细胞内游离钙浓度与对照组无明显差异,与单独给予 ox-LDL 组相比显著减低(降低 68.4%,$P<0.05$)。在 ox-LDL 处理 48 h 后(图 3B),细胞内游离钙浓度显著增加(与对照组比较增加 273%,$P<0.05$),同时给予 ox-LDL 和 2-APB 后,细胞内游离钙浓度虽较对照组是增加的,但与单独给予 ox-LDL 组相比是显著减低的(降低 44.6%,$P<0.05$)。这部分结果提示 ox-LDL 上调 HUVECs 游离钙浓度是 SOCE 依赖的。

2.4 抑制 SOCE 可减弱 ox-LDL 引起的 HUVECs 通透性增高

前述实验结果提示 ox-LDL 引起的 HUVECs 通透性增加可能是 SOCE 依赖的。为验证此假设,尝试利用 2-APB 阻断 SOCE,并观察对 HUVECs 通透性的影响。结果发现,ox-LDL(100 μg/mL)在 6 h 引起 TER 降低(与同时相对照组相比降低 31.5%,$P<0.05$),TER 在 12、24、48 h(分别降低 35.8%、51.6%、60.8%)降低更加明显($P<0.05$)。此效应能被 SOCE 抑制剂 2-APB(50 μmol/L)减弱(图 4),在 6 h 和 12 h,ox-LDL +2-APB 组细胞的 TER 较对照组无明显下降,在 24、48 h,其 TER 较对照组有显著降低(分别降低 30.7%、34.7,$P<0.05$),但下降幅度低于 ox-LDL 组。提示 ox-LDL 对 HUVECs 通透性的影响虽不完全,但至少部分是通过 SOCE 发生的(图 4)。

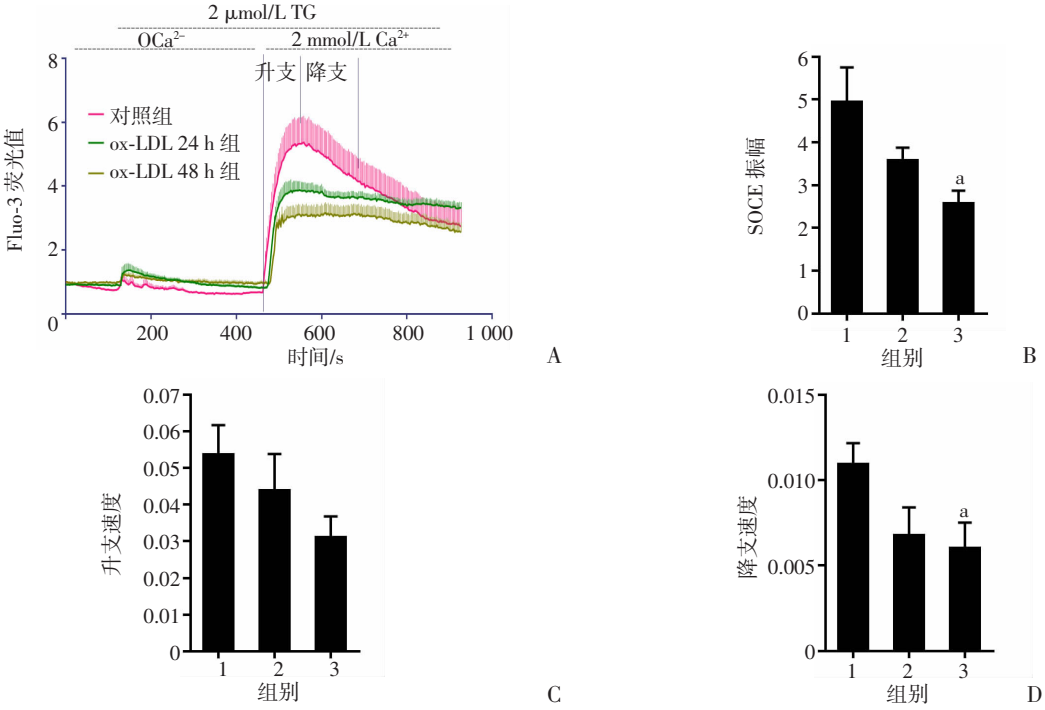


a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 ox-LDL 组比较

图 4 各组 HUVECs 在不同时相点的 TER ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

2.5 Ox-LDL 降低 SOCE 的振幅并增加 SOCE 持续时间

如上所述,在 ox-LDL 作用下,HUVECs 游离钙增加是 SOCE 依赖的。如图 5A 所示,在无钙离子的缓冲液中,给予 TG(2 μmol/L)后引起钙库内钙离子钙释放,表现为图中的第一个波峰。随后给予钙离子(2 mmol/L),



A:各组细胞孵育钙离子探针后的实时荧光曲线;B:SOCE 振幅统计;C:SOCE 升支速度统计;D:SOCE 降支速度统计; 1: 对照组;2: ox-LDL 24 h 组;3: ox-LDL 48 h 组; a:$P<0.05$,与对照组比较

图 5 Ox-LDL 降低 SOCE 的振幅并延长 SOCE 持续时间 ($n=10,\bar{x}\pm s$)

立即出现第二个更为明显的钙内流波峰。统计分析 SOCE 的振幅(由基线到波峰的荧光值差 ΔF)发现,ox-LDL(100 μg/mL)处理 24 h 后,SOCE 的振幅较对照组有降低趋势,但差异无统计学意义(图 5B)。而在 ox-LDL(100 μg/mL)处理 48 h 后,SOCE 的振幅显著降低(降低 48%,$P<0.05$)。进一步分析不同组间 SOCE 波形变化,如图 5A 所示,以钙离子开始回填到 SOCE 波峰的时间区域代表 SOCE 的升支,以波峰到峰后的 120 s 区域代表 SOCE 的降支。分别计算每个细胞的升支速度和降支速度(ΔF/Δs)后再予以统计,结果如图 5C、D 所示。ox-LDL 处理后, HUVECs 的 SOCE 的升支速度呈降低趋势,但无统计学意义。降支速度在 ox-LDL 处理 24 h 后呈现降低趋势,而在 ox-LDL 处理 48 h 后则呈显著下降(降低 45.8%,$P<0.05$)。SOCE 降支速度的降低,说明 SOCE 持续时间/介导 SOCE 离子通道开放时间的延长,这也说明在 SOCE 振幅降低的情况下,ox-LDL 仍能引起细胞内游离钙浓度的增加。

3 讨论

血管内皮细胞功能异常是动脉粥样硬化发生的早期病理改变。Ox-LDL 作为一种致病因子,可通过直接和间接的方式,影响血管内皮细胞的增殖、迁移等功能。但目前对 ox-LDL 是否影响血管内皮细胞的通透性仍未明确。本研究发现,ox-LDL 能够降低 HUVECs 的 TER,TER 与细胞间紧密连接的完整性密切相关,而细胞间紧密连接的完整性是维系内皮细胞通透性的关键,既往研究也多把 TER 作为检测细胞通透性的指标之一[15],因此,TER 的降低间接提示 ox-LDL 可增加 HUVEC 的通透性。

TER 及血管内皮细胞的通透性的维持依赖于完整的细胞骨架以及正常的细胞间连接。其中 F-actin 蛋白[16-17]和 VE-cadherin 蛋白[18-19]在维持正常的细胞骨架和细胞间连接中起关键作用,也参与调节血管内皮细胞的通透性[20]。本研究发现,ox-LDL 降低 HUVECs 的 VE-cadherin 表达,并改变 F-actin 蛋白的在 HUVECs 的分布,这提示 ox-LDL 可能是通过影响细胞骨架的排列和细胞间连接的完整性从而引起 TER 的改变。

细胞内游离钙的浓度改变参与调节诸多细胞功能。既往研究也发现,细胞内游离钙的浓度与细胞骨架的稳定性相关,参与调节 VE-cadherin 蛋白的功能[21]。本研究发现,ox-LDL 引起 HUVECs 游离钙浓度增加,此效应能被 SOCE 的特异阻断剂 2-APB 阻断,

说明 ox-LDL 对细胞游离钙的影响是 SOCE 依赖的。提示 ox-LDL 可通过影响 SOCE 而增加 HUVECs 的游离钙浓度,进而下调 VE-cadherin 蛋白的表达并影响 F-actin 蛋白的分布,从而引起 TER 的改变。随后的研究也证实,2-APB 不仅能阻断细胞内游离钙的增加,还能减轻 ox-LDL 对 HUVECs 的 TER 的影响,说明 SOCE 的改变,是引起 HUVECs 通透性变化的上游调节环节。

本研究观察了 ox-LDL 对 HUVECs 的 SOCE 产生何种影响。结果提示 ox-LDL 虽然降低 SOCE 的振幅,但显著延长了 SOCE 的持续时间,即介导 SOCE 的钙离子通道持续开放的时间延长,进而引起细胞内游离钙浓度的增加。

Ox-LDL 对细胞通透性的影响可能存在多种机制。本研究重点观察 SOCE 在其中的作用。研究结果提示 ox-LDL 通过延长内皮细胞 SOCE 的持续时间上调细胞内游离钙浓度,也观察到 ox-LDL 对 TER、细胞骨架和细胞间连接的影响。虽未提供游离钙与 TER、细胞骨架和细胞间连接相关的直接证据,但根据既往研究结果,游离钙的增加会导致细胞骨架和细胞间连接的改变[21]。因而推测 ox-LDL 对细胞骨架、细胞间连接的影响是通过 SOCE 相关的游离钙改变而实现。

综上所述,本研究结果显示,ox-LDL 通过延长内皮细胞 SOCE 的持续时间上调细胞内游离钙浓度,进而可能影响细胞骨架的排列和细胞间连接的完整性,引起细胞通透性的增加。

参考文献:

[1] GIMBRONE M A Jr, GARCÍA-CARDEÑA G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis[J]. Circ Res, 2016, 118(4): 620-636. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.

[2] PIRCHER A, TREPS L, BODRUG N, *et al*. Endothelial cell metabolism: a novel player in atherosclerosis? Basic principles and therapeutic opportunities[J]. Atherosclerosis, 2016, 253: 247-257. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.08.011.

[3] CALCAGNO C, LAIREZ O, HAWKINS J, *et al*. Combined PET/DCE-MRI in a rabbit model of atherosclerosis: integrated quantification of plaque inflammation, permeability, and burden during treatment with a leukotriene A4 hydrolase inhibitor[J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2018, 11(2 Pt 2): 291-301. DOI: 10.1016/j.jcmg.2017.11.030.

[4] PHINIKARIDOU A, ANDIA M E, PROTTI A, *et al*. Noninvasive magnetic resonance imaging evaluation of endothelial permeability in murine atherosclerosis using an albumin-binding contrast agent[J]. Circulation, 2012, 126(6): 707-719. DOI: 10.1161/circulationaha.112.092098.

[5] CHAVAKIS E, DERNBACH E, HERMANN C, *et al*. Oxidized LDL inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by an inhibitory effect on the Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway[J]. Circulation, 2001, 103(16): 2102-2107. DOI: 10.1161/01.cir.103.16.2102.

[6] GALLE J, HANSEN-HAGGE T, WANNER C, *et al*. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells[J]. Atherosclerosis, 2006, 185(2): 219-226. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.10.005.

[7] HONG D, BAI Y P, GAO H C, *et al*. Ox-LDL induces endothelial cell apoptosis *via* the LOX-1-dependent endoplasmic reticulum stress pathway[J]. Atherosclerosis, 2014, 235(2): 310-317. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.028.

[8] DE BOCK M, CULOT M, WANG N, *et al*. Connexin channels provide a target to manipulate brain endothelial calcium dynamics and blood-brain barrier permeability[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2011, 31(9): 1942-1957. DOI: 10.1038/jcbfm.2011.86.

[9] KOOIMAN K, VAN DER STEEN A F W, DE JONG N. Role of intracellular calcium and reactive oxygen species in microbubble-mediated alterations of endothelial layer permeability[J]. IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control, 2013, 60(9): 1811-1815. DOI: 10.1109/TUFFC.2013.2767.

[10] SANDOVAL R, MALIK A B, MINSHALL R D, *et al*. Ca(2+) signalling and PKC alpha activate increased endothelial permeability by disassembly of VE-cadherin junctions[J]. J Physiol, 2001, 533(Pt 2): 433-445. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2001.0433a.x.

[11] PRAKRIYA M, LEWIS R S. Store-operated calcium channels[J]. Physiol Rev, 2015, 95(4): 1383-1436. DOI: 10.1152/physrev.00020.2014.

[12] ZHANG S L, YU Y, ROOS J, *et al*. STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane[J]. Nature, 2005, 437(7060): 902-905. DOI: 10.1038/nature04147.

[13] 王连友, 杨杰, 黄岚. 钙库操纵性钙内流参与调节血管内皮细胞增殖与迁移[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(5): 424-429. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201809115.
WANG L Y, YANG J, HUANG L. Store-operated calcium entry is involved in proliferation and migration of vascular endothelial cells[J]. J Third Mil Med Univ, 2019, 41(5):

424-429. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201809115.

[14] ZOU J J, GAO Y D, GENG S, YANG J. Role of STIM1/Orai1-mediated store-operated Ca^{2+} entry in airway smooth muscle cell proliferation[J]. J Appl Physiol. 2011, 110(5): 1256-1263. DOI: 10.1152/japplphysiol.01124.2010. Epub 2011 Feb 17.

[15] MEUREN L M, COELHO S V A, ARRUDA L B. Evaluation of DENV-induced endothelial cell permeability by measurements of transendothelial electrical resistance (TEER) and extravasation of proteins and virus[J]. Methods Mol Biol, 2022, 24(9): 207-222. DOI: 10.1007/978-1-0716-1879-0_14.

[16] BARBERA S, RAUCCI L, LUGANO R, *et al*. CD93 signaling via rho proteins drives cytoskeletal remodeling in spreading endothelial cells[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(22): 12417. DOI: 10.3390/ijms222212417.

[17] WU L M, ISLAM M R, LEE J, *et al*. ErbB3 is a critical regulator of cytoskeletal dynamics in brain microvascular endothelial cells: implications for vascular remodeling and blood brain barrier modulation[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2021, 41(9): 2242-2255. DOI: 10.1177/0271678X20984976.

[18] BLECHARZ K G, DRENCKHAHN D, FORSTER C Y. Glucocorticoids increase VE-cadherin expression and cause cytoskeletal rearrangements in murine brain endothelial cEND cells[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(6): 1139-1149. DOI: 10.1038/jcbfm.2008.2.

[19] YANG J J, YAO W, QIAN G S, *et al*. Rab5-mediated VE-cadherin internalization regulates the barrier function of the lung microvascular endothelium[J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(24): 4849-4866. DOI: 10.1007/s00018-015-1973-4.

[20] HARKI O, TAMISIER R, PEPIN J L, *et al*. VE-cadherin cleavage in sleep apnoea: new insights into intermittent hypoxia-related endothelial permeability[J]. Eur Respir J, 2021, 58(4): 2004518. DOI: 10.1183/13993003.04518-2020.

[21] DENG T L, YU L, GE Y K, *et al*. Intracellular-free calcium dynamics and F-actin alteration in the formation of macrophage foam cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 338(2): 748-756. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.10.010.

(**收稿**:2022-07-25;**修回**:2022-09-29)

(编辑 栾 嘉)