

# ALDH2 通过线粒体融合与裂变减轻脂多糖诱导的脑微血管内皮细胞屏障的损伤

王莎莎<sup>1,2</sup>, 吕恒<sup>2,3</sup>, 王丽娅<sup>1,2</sup>, 田美惠<sup>2,3</sup>, 高洁<sup>1,2</sup>, 刘忠义<sup>2</sup>, 王佳慧<sup>2</sup>, 于影<sup>1,2</sup>

蚌埠医学院<sup>1</sup>生理学教研室,<sup>2</sup>心脑血管疾病基础与临床重点实验室,<sup>3</sup>流行病学与卫生统计学教研室,安徽蚌埠 233000

**摘要:**目的 观察乙醛脱氢酶2(ALDH2)对脂多糖(LPS)诱导的小鼠脑微血管内皮细胞屏障的影响,并探讨线粒体融合与裂变在内皮屏障中的作用。方法 小鼠脑微血管内皮细胞分为3组:对照组:不给予任何处理;LPS损伤组(LPS):1 μg/mL的LPS刺激24 h;LPS+ALDH2激动剂Alda-1组(LPS+Alda-1):在LPS刺激前给予20 μmol/mL的Alda-1预处理1 h。CCK-8实验检测细胞活性;跨内皮细胞电阻和FITC-Dextran葡聚糖实验检测细胞通透性变化;试剂盒丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)测定氧化应激水平;超氧化物阴离子荧光探针检测细胞活性氧(ROS)的表达;Western blot检测细胞ALDH2、紧密连接蛋白ZO-1、Occludin以及线粒体融合蛋白Mfn2、OPA1和分裂蛋白Drp1、Fis1表达。结果 与对照组相比,LPS组跨内皮细胞电阻值降低、FITC-Dextran渗透性增高,MDA含量升高,SOD活性下降,ROS荧光表达增强,ALDH2、紧密连接蛋白ZO-1、Occludin、线粒体融合蛋白Mfn2和OPA1表达降低,而线粒体分裂蛋白Drp1和Fis1表达升高( $P<0.05$ )。应用Alda-1干预后,可显著抑制LPS所致的内皮细胞膜通透性升高,减低ROS荧光表达,ALDH2、ZO-1、Occludin、OPA1和Mfn2蛋白表达增高,而Drp1和Fis1蛋白表达降低( $P<0.05$ )。结论 ALDH2通过抑制线粒体ROS的产生,减轻LPS诱导脑微血管内皮细胞屏障的损伤,其机制可能与促进线粒体融合及抑制线粒体裂变有关。

**关键词:**乙醛脱氢酶2、LPS、线粒体融合和分裂、内皮屏障

## ALDH2 attenuates LPS-induced increase of brain microvascular endothelial cell permeability by promoting fusion and inhibiting fission of the mitochondria

WANG Shasha<sup>1,2</sup>, LÜ Heng<sup>2,3</sup>, WANG Liya<sup>1,2</sup>, TIAN Meihui<sup>2,3</sup>, GAO Jie<sup>1,2</sup>, LIU Zhongyi<sup>2</sup>, WANG Jiahui<sup>2</sup>, YU Ying<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, <sup>2</sup>Key Laboratory of Basic and Clinical Cardiovascular Diseases, <sup>3</sup>Department of Epidemiology and Health Statistics, Bengbu Medical College, Bengbu 233000, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) on lipopolysaccharide (LPS)-induced damage of mouse brain microvascular endothelial barrier and explore the role of mitochondrial fusion and fission in maintaining the integrity of endothelial barrier. **Methods** Mouse brain microvascular endothelial cells were treated with 1 μg/mL LPS for 24 h with or without pretreatment with 20 μmol/mL Alda-1 (a ALDH2 agonist) for 1 h. The changes in cell viability were assessed using cell counting Kit-8 (CCK8) assay, and the cell permeability was evaluated using transendothelial cell resistance (TEER) and FITC-Dextran assay. The level of oxidative stress in the cells was assessed by detecting the levels of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD), and the content of reactive oxygen species (ROS) was detected using a superoxide anion fluorescent probe (DHE). Western blotting was performed to detect the expressions of ALDH2, tight junction proteins ZO-1 and occludin, and mitochondrial fusion- and division-related proteins Mfn2, OPA1, Drp1 and Fis1. **Results** Compared with the untreated cells, the cells treated with LPS showed significantly decreased TEER, increased FITC-dextran leakage, MDA content and ROS production, decreased SOD activity expressions of ALDH2, ZO-1, occludin, Mfn2 and OPA1, and increased expressions of Drp1 and Fis1 ( $P<0.05$ ). Pretreatment with Alda-1 prior to LPS exposure strongly suppressed the increase of endothelial cell membrane permeability, reduced ROS production, increased the expressions of ALDH2, ZO-1, occludin, OPA1 and Mfn2, and lowered the expressions of Drp1 and Fis1 ( $P<0.05$ ). **Conclusion** ALDH2 can alleviate LPS-induced damage of brain microvascular endothelial cell barrier by inhibiting the mitochondrial ROS production and promoting mitochondrial fusion and inhibiting mitochondrial fission.

**Keywords:** ALDH2; LPS; mitochondrial fusion and fission; endothelial barrier

脓毒症相关性脑病(SAE),是脓毒症常见的一种神经系统并发症,其相关重要机制极为复杂,包括内皮屏障受损、线粒体的功能障碍、神经胶质细胞激活以及鞘

磷脂代谢紊乱或异常等<sup>[1]</sup>。血脑屏障(BBB)<sup>[2]</sup>是维持中枢神经系统稳态的关键屏障系统,由周细胞、脑微血管内皮细胞(BMECs)、星形细胞末端足、基底板细胞、神经元和小胶质细胞组成。其中BMECs通过紧密连接蛋白构成内皮细胞屏障,对维持BBB的完整性尤为重要<sup>[3]</sup>。紧密连接蛋白主要由跨膜蛋白,如闭锁带状蛋白ZO、咬合蛋白Occludin、闭合蛋白Claudin以及连接黏附分子JAM等组成<sup>[4]</sup>。研究发现,脂多糖(LPS)诱导SAE产生

收稿日期:2022-05-28

基金项目:安徽省自然科学基金(2108085MH252);蚌埠医学院“512人才培养计划”(by51201307)

作者简介:王莎莎,在读硕士研究生,E-mail: 1183197303@qq.com

通信作者:于影,硕士,副教授,E-mail: yuying2011@126.com

活性氧 ROS<sup>[5]</sup>,引起细胞间紧密连接被破坏,ZO-1、Occludin 蛋白表达下降,内皮细胞通透性增加,造成神经系统功能障碍<sup>[6]</sup>。

乙醛脱氢酶2(ALDH2)是位于线粒体基质内重要的醛类氧化酶,催化乙醛氧化为乙酸。值得注意的是,敲除 ALDH2 小鼠因脑内皮细胞内皮型一氧化氮合酶(eNOS)降低,导致氧化应激增加,引起内皮细胞紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 丢失,内皮屏障通透性增加<sup>[7]</sup>;而在高氧诱导的人微血管内皮细胞采用 ALDH2 激动剂 Alda-1 干预,可通过抑制氧化应激的增加,恢复线粒体膜电位并改善线粒体功能<sup>[8]</sup>。

线粒体在生理状态下,处于不断地融合、分裂动态平衡中<sup>[9]</sup>。线粒体的融合蛋白家族成员包含视神经萎缩蛋白 OPA1、线粒体融合蛋白 Mfn2;线粒体的分裂蛋白包括动力相关蛋白 Drp1、线粒体分裂蛋白 Fis1 等。已有研究表明,线粒体融合和分裂参与了多种细胞活动,如氧化应激<sup>[10-12]</sup>、细胞凋亡<sup>[13-15]</sup>、吞噬有丝分裂<sup>[15-17]</sup>等。抑制 Drp1 可以逆转线粒体形态变化,降低 ROS 水平,明显改善 BBB 破坏和脑水肿<sup>[18]</sup>。而 Mfn2 通过抑制炎症反应,稳定细胞间连接,维持内皮屏障的完整性<sup>[19]</sup>,这表明线粒体融合和分裂与内皮细胞屏障存在一定联系。在心肌细胞中研究显示<sup>[20]</sup>,ALDH2 可以通过调控线粒体分裂蛋白 Drp1,抑制线粒体分裂发挥保护作用。采用线粒体分裂蛋白抑制剂可减弱 LPS 诱导的脓毒症时,肺脏<sup>[21]</sup>、脑组织<sup>[22]</sup>氧化应激的产生,改善线粒体的功能。然而,有关 ALDH2 改善 LPS 导致的脑微血管内皮细胞损伤,相关报道较少。特别是 ALDH2 能否通过调控线粒体融合和分裂,抑制氧化应激的增加,进而减轻内皮细胞通透性? 具体机制还不清楚。故本实验通过给予 ALDH2 激动剂 Alda-1,观察 ALDH2 对 LPS 诱导脑微血管内皮细胞损伤的影响,并探讨线粒体融合和分裂在内皮屏障中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

小鼠脑微血管内皮细胞(Procell);DMEM 高糖培养基(Hyclone);胎牛血清(Hyclone);LPS(Sigma);Alda-1(MCE);Dihydroethidium 和 DAPI(碧云天);CCK8 检测细胞增殖毒性试剂(Biosharp);丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)氧化应激检测试剂盒(南京建成);FITC-Dextran(Sigma);DHE 超氧化物阴离子荧光探针(碧云天);ALDH2 单克隆抗体、ZO-1 多克隆抗体、Occludin 单克隆抗体、OPA1 多克隆抗体和 Drp1 多克隆抗体(Abcam);Mfn2 多克隆抗体和 Fis1 单克隆抗体(武汉三鹰);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(Biosharp)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 脑微血管内皮细胞加入浓度为 25 mmol/L 的 DMEM 培养基,其中包括 10% 的胎牛血清和双抗(即青霉素和链霉素),在实验操作过程中,按照约以  $3 \times 10^4/\text{cm}^2$  的密度,接种到 25  $\text{cm}^2$  的培养瓶中,最后放置于温度为 37  $^\circ\text{C}$ 、含 5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱中进行培养。待细胞的密度长至约 80%~90% 左右时,将细胞进行传代(1 传 2),进行后续的实验。

实验分组:实验分为 3 组,即(1)对照组:将脑微血管内皮细胞培养在 DMEM 完全培养基;(2)LPS 损伤组(LPS):LPS 加入在 DMEM 完全培养基中,24 h 后处理细胞;(3)LPS+ALDH2 激动剂 Alda-1 组(LPS+Alda-1):Alda-1 药物预先处理 1 h,随之将药物 LPS 加入 DMEM 完全培养基中干预 24 h。

1.2.2 CCK-8 检测细胞活性 将 bEnd.3 细胞密度以 6000/孔,接种于 96 孔板,分别加入 LPS(0.1、0.5、1、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和 Alda-1(10、20、40、80、100  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ )药物处理 24 h 后,每个孔加入含有 110  $\mu\text{L}$  的 CCK-8 稀释液,放置摇床上匀速混匀 5 min,在培养箱中避光孵育 1 h,最后测定各组的 A 值(波长 450 nm 处)。

1.2.3 TEER 电阻值的测定 每孔接种细胞  $2 \times 10^5/\text{mL}$ ,细胞贴壁生长 48 h 至单层融合后,利用 ESR-电阻仪测量细胞 TEER 电阻值;在测量时,将电极插入小室中(上短下长),均取每孔细胞不同方向的 3 个点进行检测。TEER=(内皮细胞电阻值-基础电阻值) $\times$  Transwell 上室滤膜的底面积。

1.2.4 FITC-Dextran 细胞通透性检测 将脑微血管内皮细胞按  $2 \times 10^5/\text{cm}^2$  接种于小室的滤膜上,待 bEnd.3 细胞待汇合成单层后,LPS 和 Alda-1 药物干预细胞 24 h 后,弃去小室中的培养基,下室加入无 FITC 标记的葡聚糖的无血清 DMEM 600  $\mu\text{L}$ ,上室中加入无血清 DMEM 配制的 0.5 mg/mL FITC-Dextran 100  $\mu\text{L}$ ,孵育 1 h 后,在暗室下分别吸取各组上室和下室的溶液,各 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,用多功能酶标仪检测其荧光的 A 值(即激发的波长为 485 nm、发射的波长为 520 nm)。FITC-Dextran 通透性的大小,用通透系数(Pa)表示,计算公式为: $\text{Pa}=[A]/t \times 1/A \times V/[L]$ ,其中[A]表示下室的荧光值,t 为 FITC-Dextran 的孵育时间(以秒计算为单位),A 为 FITC-Dextran 滤过的面积(以  $\text{cm}^2$  计算),V 为下室无血清培养基体积,[L]代表上室荧光的 A 值。实验结果均以 Pa% 表示,即  $\text{Pa}\%=(\text{检测组 Pa 值}/\text{对照组 Pa 值}) \times 100\%$ 。

1.2.5 SOD 活性和 MDA 含量的测定 取药物干预后的细胞上清液于新的 1.5 mL 于 EP 管中,接下来进行离心(3000 r/min 10 min),取适量于新的 EP 管中,按照试剂盒的说明书操作步骤,检测脑内皮细胞 MDA 的含量和 SOD 活性。

1.2.6 细胞免疫荧光ROS测定 将细胞接种于6孔板,按以 $1 \times 10^5$ /孔的细胞密度接种培养,细胞生长至合适的密度后,LPS、Alda-1单独或联合药物干预24 h后,弃去原有的培养基并用PBS清洗,随后用4%的多聚甲醛固定细胞(30 min),清洗细胞3遍,5 min/遍;应用DHE(超氧化物阴离子荧光探针)试剂按 $5 \mu\text{mol/L}$ 的浓度在 $37^\circ\text{C}$ 水浴锅中孵育40 min,之后清洗细胞;接下来,DAPI染胞核5 min( $5 \mu\text{g/mL}$ , $37^\circ\text{C}$ )左右并清洗细胞3遍,放置避光的盒子中,利用蔡司荧光倒置显微镜观察细胞内荧光强度的表达变化,并及时拍照保存。

1.2.7 Western blot 实验检测各蛋白表达 细胞药物干预24 h后,使用PBS清洗细胞,随后加入提前配制好的裂解液和蛋白酶抑制剂(比例为100:1)的混合液,上下左右摇晃培养皿,在冰上裂解5 min后,用手持型细胞刮刀刮取脑内皮细胞,然后用1 mL量程的移液枪,收集细胞悬浮液至新的EP管中,振荡离心,结束后吸取各组的蛋白上清液(200  $\mu\text{L}$  EP管)。蛋白浓度检测后,经计算得出各组蛋白的上样体积。取各组适量的蛋白上样、电泳、转膜,最后用牛奶封闭PVDF膜2 h。封闭结束后将条带用TBST洗膜3遍,10 min/遍,随后将PVDF膜分别与ALDH2(1:2000)、ZO-1(1:1000)、Occludin(1:1000)、OPA1(1:1500)、Mfn2(1:8000)、Drp1(1:1000)、Fis1(1:3000)、GAPDH(1:10 000)等一抗, $4^\circ\text{C}$ 冰箱的摇床过夜;隔天上午用配制好的TBST洗膜3遍,10 min/

遍,洗膜结束后,孵育蛋白二抗(1:10 000),在室温条件下,孵育1.5 h,最后洗膜并曝光。将显影液与各条带进行充分的接触,即在盒子中静置1 min后,使用Tanon-5200 Multi化学发光成像系统进行图像采集,并用Image J软件对目的和内参条带,进行灰度值分析。

1.2.8 统计学分析 将所有数据以均数 $\pm$ 标准差表示,利用GraphPad Prism 8.0统计软件,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 时表明差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞活性变化

2.1.1 药物浓度确定 CCK8结果显示,LPS药物干预24 h后,与Con组相比,随着LPS药物浓度的不断增高,各药物浓度的细胞活性逐渐下降( $P < 0.001$ ),其中LPS浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ 时,细胞活性最低( $P < 0.001$ ),细胞损伤较强,故选取LPS药物浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ 进行实验(图1A)。加入Alda-1干预24 h后,与Con组相比,随着Alda-1药物浓度的不断增高,细胞活性均明显升高( $P < 0.001$ );结合我们实验室前期研究基础,选取 $20 \mu\text{mol/mL}$ 的Alda-1进行后续实验(图1B)。

2.1.2 各组内皮细胞活性的变化 CCK-8的结果显示(图1C),与对照组相比,LPS组细胞活性下降( $P < 0.001$ )。与LPS组相比,LPS+Alda-1组细胞活性增高( $P < 0.01$ )。

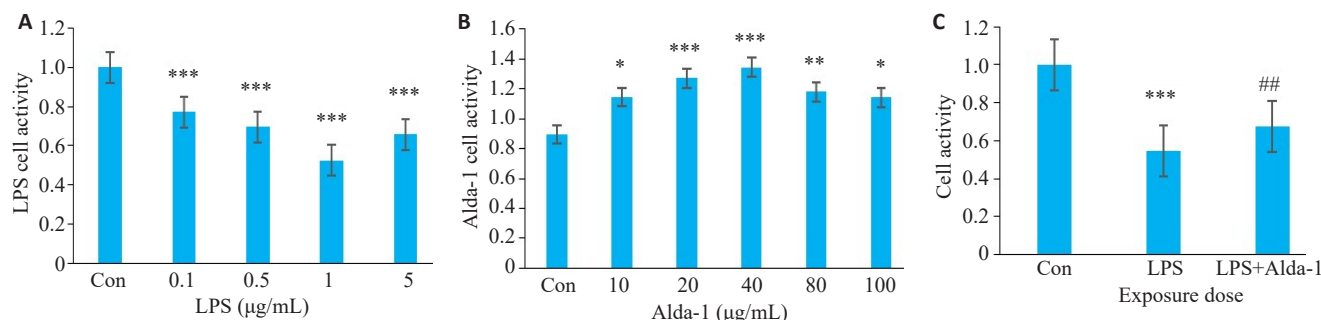


图1 各组脑微血管内皮细胞细胞活性

Fig.1 Viability of brain microvascular endothelial cells treated with different concentrations of LPS (A), Alda-1 (B) and both (C). Data are presented as Mean $\pm$ SD (n=6). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs Con; ## $P < 0.01$  vs LPS.

### 2.2 ALDH2对LPS诱导脑微血管内皮细胞通透性的影响

采用TEER法检测细胞电阻值,结果如图2A所示,与Con组相比,LPS组电阻值显著降低( $P < 0.05$ );而使用ALDH2激动剂Alda-1预处理后,LPS+Alda-1组电阻值升高( $P < 0.001$ )。进一步采用FITC-Dextran法观察荧光渗漏A值变化,结果如图2B所示,与Con组相比,荧光渗漏A值明显增高( $P < 0.05$ );而使用ALDH2激动剂Alda-1预处理后,LPS+Alda-1组荧光值降低

( $P < 0.001$ )。

### 2.3 ALDH2对LPS诱导脑微血管内皮细胞氧化应激的影响

采用MDA和SOD试剂盒检测氧化应激变化,如图3所示,与Con相比,LPS组MDA含量的表达明显升高( $P < 0.01$ ),然而SOD的活性表达降低( $P < 0.001$ );与LPS组相比,LPS+Alda-1组结果反之,即MDA含量的表达明显下降( $P < 0.001$ ),而SOD活性表达显著升高( $P < 0.01$ )。



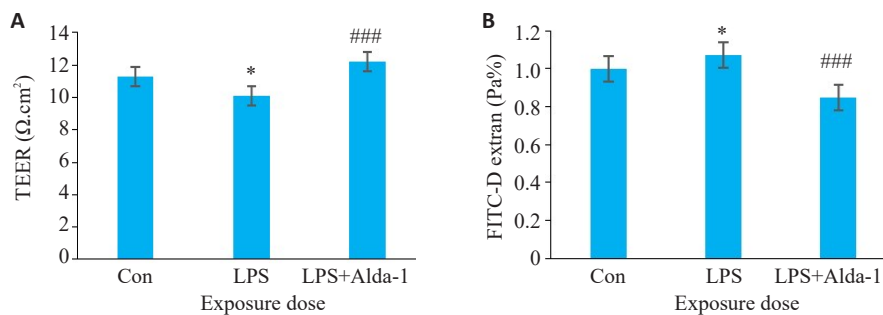


图2 ALDH2对LPS诱导脑微血管内皮细胞通透性的影响

Fig.2 Effects of ALDH2 on LPS-induced increase of permeability of brain microvascular endothelial cells. TEER (A) and FITC-dextran permeability (B) of the cells. Data are presented as *Mean±SD* ( $n=6$ ). \* $P<0.05$  vs Con; ### $P<0.001$  vs LPS.

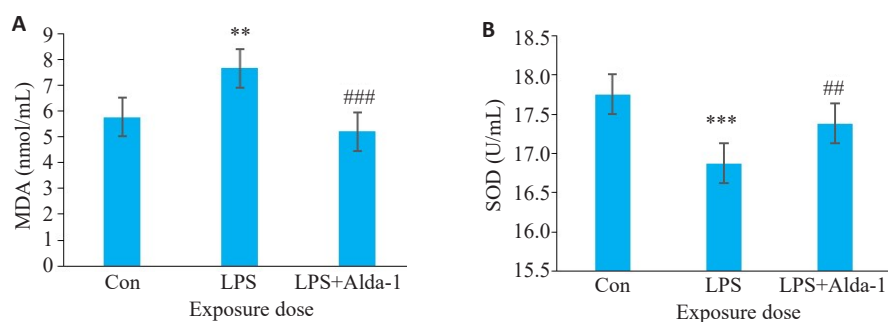


图3 各组细胞MDA、SOD水平比较

Fig.3 Comparison of MDA (A) and SOD (B) levels in the cells. Data are presented as *Mean±SD* ( $n=6$ ). \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs Con, ## $P<0.01$ , ### $P<0.001$  vs LPS.

#### 2.4 ALDH2对LPS诱导脑微血管内皮细胞内活性氧ROS的影响

免疫荧光结果如图4A所示,与Con相比,LPS组胞浆ROS的平均荧光强度增强(红色,图4B)( $P<0.01$ );与LPS组相比,LPS+Alda-1组胞浆ROS的平均荧光强度弱(红色,图4B)( $P<0.05$ )。

#### 2.5 ALDH2对LPS诱导脑微血管内皮细胞中OPA1、Mfn2、Drp1和Fis1蛋白表达的影响

采用免疫印迹实验检测线粒体融合蛋白和线粒体分裂蛋白表达的变化,结果如图5所示:与Con组相比,LPS组OPA1蛋白( $P<0.01$ )和Mfn2蛋白( $P<0.001$ )表达明显降低,Drp1( $P<0.001$ )和Fis1蛋白表达均显著增高( $P<0.01$ );而与LPS组相比,LPS+Alda-1组OPA1蛋白( $P<0.05$ )和Mfn2蛋白( $P<0.001$ )表达升高,Drp1蛋白( $P<0.001$ )和Fis1蛋白( $P<0.05$ )表达降低。

#### 2.6 ALDH2对LPS诱导脑微血管内皮细胞ALDH2和紧密连接蛋白ZO-1、Occludin蛋白表达的影响

免疫印迹实验检测ALDH2、紧密连接蛋白ZO-1和Occludin表达的变化,结果如图6所示:与Con组相比,LPS组ALDH2蛋白表达降低明显( $P<0.001$ ),与此同时,ZO-1蛋白( $P<0.001$ )和Occludin蛋白( $P<0.001$ )表

达均降低显著;使用ALDH2激动剂Alda-1预处理后,LPS+Alda-1组ALDH2( $P<0.01$ )、ZO-1( $P<0.01$ )和Occludin( $P<0.05$ )蛋白表达均明显升高。

### 3 讨论

脑微血管内皮细胞之间的紧密连接是血脑屏障的基本结构,是维持脑微环境内稳态的第一道屏障<sup>[23]</sup>。而紧密连接破坏和内皮损伤是LPS诱导血脑屏障破坏的主要机制<sup>[24,25]</sup>。当ROS分泌和清除之间的平衡被打破时,ROS过度积累就会诱导氧化应激增加<sup>[26]</sup>,进而破坏内皮屏障的完整性。本研究采用LPS诱导脑微血管内皮细胞损伤模型,结果显示:与Con组相比,TEER电阻值降低而FITC-Dextran荧光渗漏值升高;氧化应激因子MDA含量增高而SOD活性下降;ROS荧光强度表达增强;ZO-1和Occludin内皮屏障紧密连接蛋白表达明显降低,提示LPS可引起脑微血管内皮细胞损伤显著,促进氧化应激产生,导致细胞通透性增加。

线粒体是细胞的“动力工厂”,也是真核动物细胞生物氧化、能量转换的主要场所。生理状态下,细胞内线粒体处于不断地融合与分裂平衡中,对维持细胞功能起到重要作用<sup>[27,28]</sup>。已有研究表明线粒体融合和分裂是

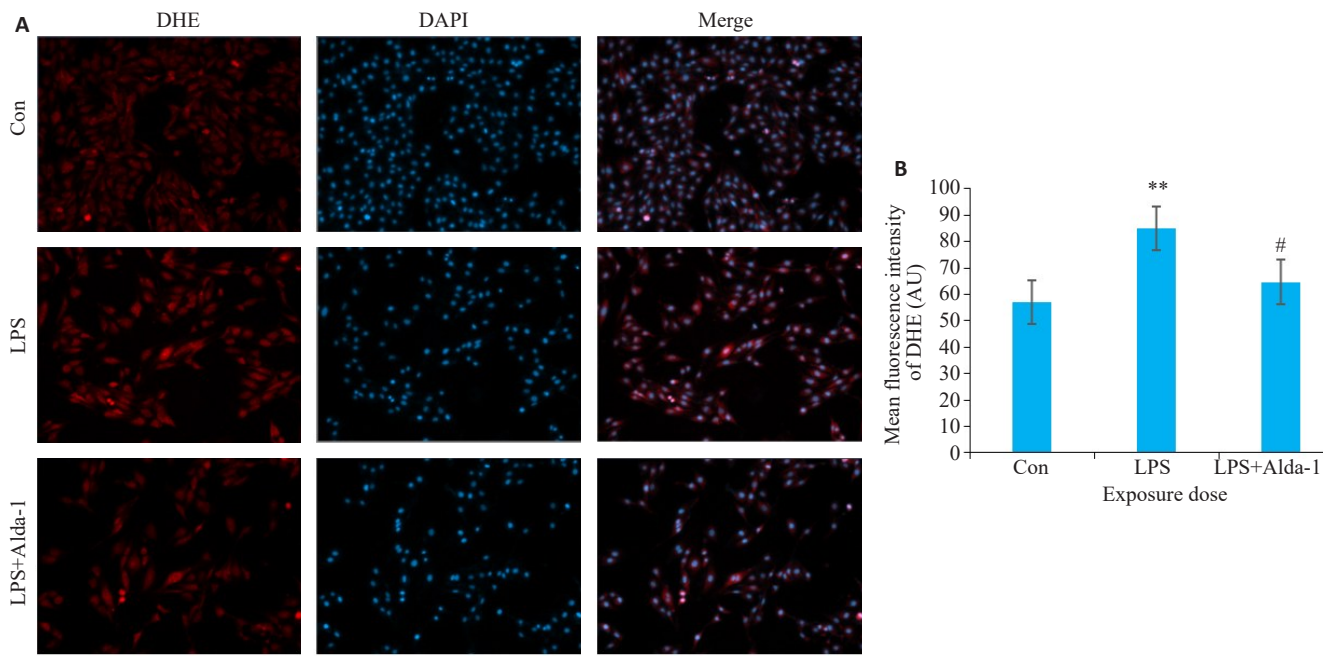


图4 各组脑微血管内皮细胞ROS免疫荧光染色

Fig.4 Immunofluorescence staining of ROS in the cells. A: Immunofluorescence staining of ROS (red) and DAPI (blue). B: Quantitative analysis of ROS fluorescence intensity ( $Mean \pm SD, n=5$ ). \*\* $P < 0.01$  vs Con; # $P < 0.05$  vs LPS.

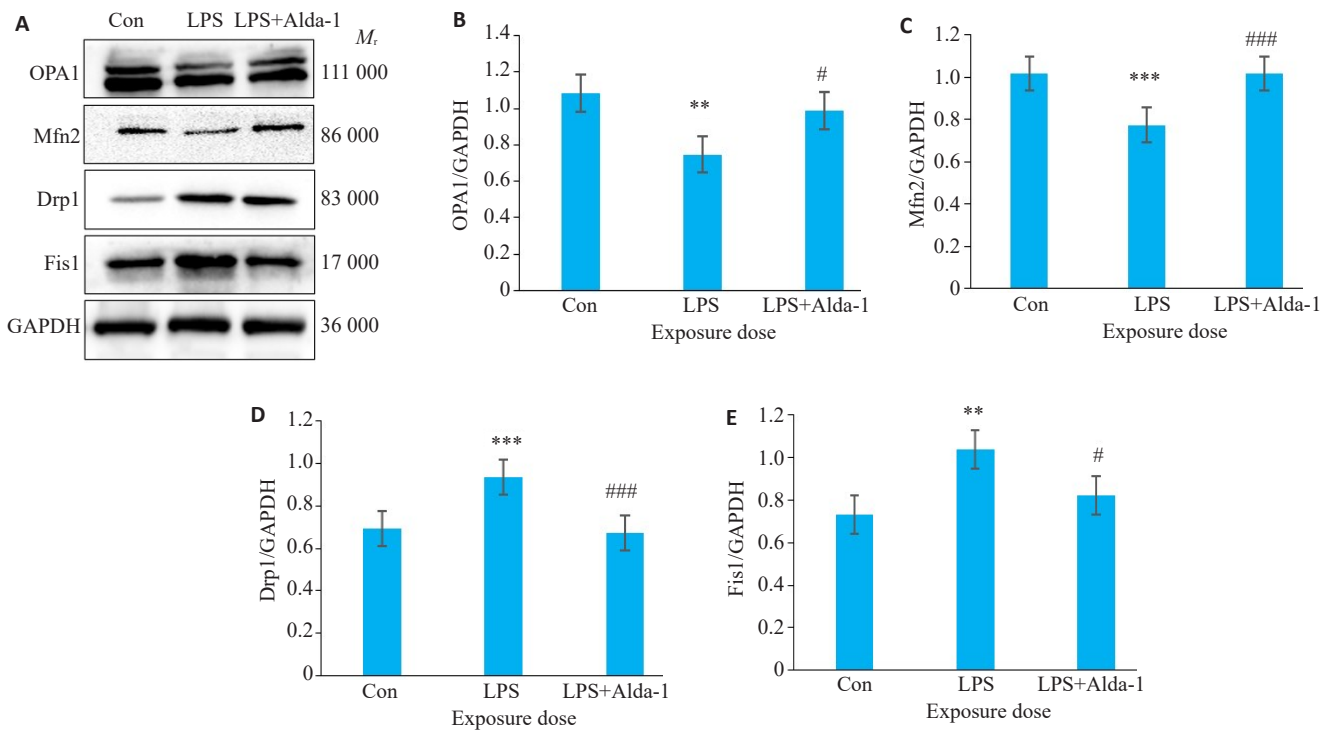


图5 各组bEnd.3脑微血管内皮细胞OPA1、Mfn2、Drp1和Fis1蛋白水平变化

Fig.5 Expression of OPA1, Mfn2, Drp1 and Fis1 proteins in bEnd.3 cells in each group. Western blots of OPA1, Mfn2, Drp1, Fis1 and GAPDH (A). OPA1 (B), Mfn2 (C), Drp1 (D), and Fis1 (E) protein levels are normalized by GAPDH levels ( $Mean \pm SD, n=5$ ). \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs Con; # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$  vs LPS.

影响内皮屏障的关键因素之一<sup>[22]</sup>。抑制线粒体融合或线粒体过度分裂会造成线粒体功能紊乱,导致细胞内ROS产生,破坏线粒体膜电位<sup>[29]</sup>,进一步增加血管内皮

细胞膜通透性,使血管内皮屏障功能遭到损害<sup>[30]</sup>。过表达OPA1能够促进线粒体的融合,抑制氧化应激,减少细胞凋亡,减弱内皮细胞的损伤程度<sup>[31]</sup>。而体内缺失线

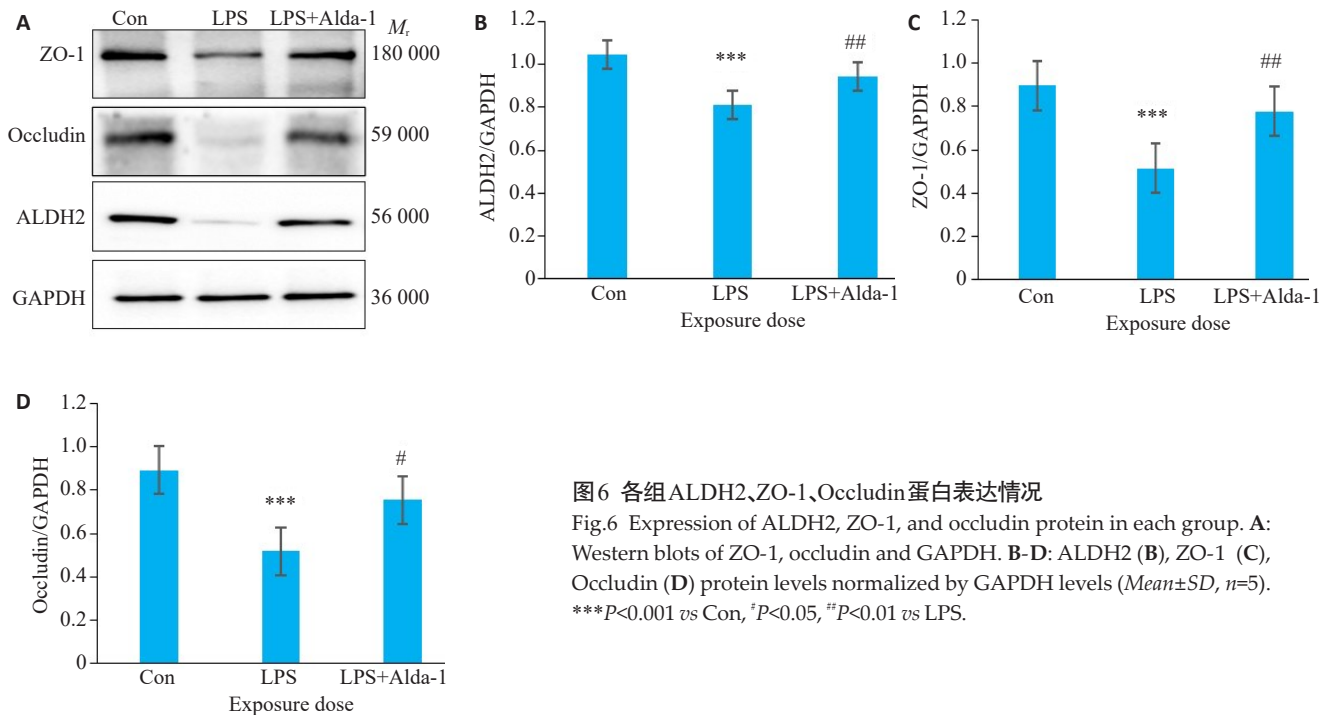


图6 各组ALDH2、ZO-1、Occludin蛋白表达情况

Fig.6 Expression of ALDH2, ZO-1, and occludin protein in each group. A: Western blots of ZO-1, occludin and GAPDH. B-D: ALDH2 (B), ZO-1 (C), Occludin (D) protein levels normalized by GAPDH levels (Mean±SD, n=5). \*\*\*P<0.001 vs Con, #P<0.05, ##P<0.01 vs LPS.

粒体融合蛋白Mfn2,会导致线粒体稳态破坏,血管内皮细胞通透性增加,影响内皮屏障的完整性<sup>[19]</sup>。此外,还有研究发现,在脑微血管内皮细胞和星形胶质细胞共同培养的体外血脑屏障细胞模型中<sup>[22]</sup>,给予线粒体分裂蛋白Drp1抑制剂,可明显降低线粒体ROS水平,改善线粒体的膜电位,降低LPS诱导的细胞通透性;同时体内实验<sup>[22]</sup>也表明分裂蛋白Drp1抑制剂可以上调脑组织中ZO-1和Occludin蛋白的表达。随后Haileslassie等<sup>[22]</sup>研究发现,抑制Drp1-Fis1相互作用,可以减轻LPS诱导的原代脑微血管内皮细胞通透性,促进紧密连接蛋白表达,进而保持血脑屏障的完整性。与此结果相似的是,我们采用LPS刺激脑微血管内皮细胞损伤后,线粒体融合蛋白OPA1、Mfn2表达下降,分裂蛋白Drp1、Fis1表达升高,紧密连接蛋白ZO-1和Occludin表达降低,说明LPS抑制线粒体融合、促进线粒体分裂并且破坏内皮屏障。

已有研究表明,ALDH2可以通过代谢4-羟基壬稀醛(4-HNE)和MDA等毒性醛类物质,发挥间接抗氧化的作用,拮抗ROS生成,减轻乙醛及代谢产物对细胞的损伤<sup>[32]</sup>。作为ALDH2的激动剂Alda-1,可通过上调内皮细胞紧密连接蛋白及粘附连接蛋白的表达,改善内皮屏障损伤<sup>[33]</sup>。Alda-1通过抗氧化作用清除机体内ROS,抑制脂质过氧化物的产生,促进细胞氧化还原平衡<sup>[34]</sup>。此外,线粒体ALDH2在防止4-HNE的积累、氧化应激、细胞凋亡和线粒体膜损伤等方面发挥着重要作用。激动ALDH2可以明显抑制肺微血管内皮细胞免受氧化应激,改善线粒体形态结构与功能,在急性肺损伤中发挥保护作用<sup>[8]</sup>。为进一步分析ALDH2是否通过调控线粒

体融合和分裂减轻LPS诱导脑微血管内皮屏障损伤,本研究使用Alda-1进行干预,结果显示:与LPS组相比,LPS+Alda-1组TEER电阻值升高,FITC-Dextran荧光渗漏值下降,MDA含量降低,SOD活性升高,ROS释放减少,内皮紧密连接蛋白ZO-1和Occludin表达增高,提示激动ALDH2可以减轻脑微血管内皮屏障损伤和氧化应激反应的发生。同时,我们通过Western blot实验还测定线粒体融合和分裂蛋白的表达情况,结果显示:ALDH2蛋白表达增高时,线粒体融合蛋白Mfn2、OPA1升高,分裂蛋白Fis1、Drp1表达减少。说明ALDH2可能通过促进线粒体的融合和抑制线粒体的分裂,减少氧化应激的产生,减轻对脑内皮屏障的破坏。

综上所述,本研究发现ALDH2预处理可以抑制ROS的释放,减轻LPS诱导脑微血管内皮细胞屏障的损伤,其机制可能与维持线粒体融合和分裂平衡有关,二者之间相关机制还有待进一步探讨。

#### 参考文献:

- [1] Gao QZ, Hernandez MS. Sepsis-associated encephalopathy and blood-brain barrier dysfunction[J]. Inflammation, 2021, 44(6): 2143-50.
- [2] 穆蕊,余剑波. 脓毒症相关性脑病与免疫功能障碍的研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2022, 28(1): 132-6.
- [3] Li HL, Wang P, Huang F, et al. Astragaloside IV protects blood-brain barrier integrity from LPS-induced disruption via activating Nrf2 antioxidant signaling pathway in mice[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2018, 340: 58-66.
- [4] Heinemann U, Schuetz A. Structural features of tight-junction proteins[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(23): 6020.
- [5] You LN, Jiang HD. Cabergoline possesses a beneficial effect on

- blood-brain barrier (BBB) integrity against lipopolysaccharide (LPS) [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 8358-69.
- [6] Uddin MA, Akhter MS, Kubra KT, et al. Hsp90 inhibition protects the brain microvascular endothelium against oxidative stress [J]. *Brain Disord*, 2021, 1: 100001.
- [7] Knopp RC, Jastaniah A, Dubrovskiy O, et al. Extending the calpain-cathepsin hypothesis to the neurovasculature: protection of brain endothelial cells and mice from neurotrauma [J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2021, 4(1): 372-85.
- [8] Patil SS, Hernández-Cuervo H, Fukumoto J, et al. Alda-1 attenuates hyperoxia-induced mitochondrial dysfunction in lung vascular endothelial cells [J]. *Aging*, 2019, 11(12): 3909-18.
- [9] 刘刚, 门运政, 童旭辉, 等. 线粒体融合与裂变在右美托咪定减轻小鼠脑缺血再灌注损伤中的作用及其机制 [J]. *南方医科大学学报*, 2020, 40(4): 463-8.
- [10] Yu YC, Wang L, Delguste F, et al. Advanced glycation end products receptor RAGE controls myocardial dysfunction and oxidative stress in high-fat fed mice by sustaining mitochondrial dynamics and autophagy-lysosome pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 112: 397-410.
- [11] Yi XL, Guo WN, Shi Q, et al. SIRT3-dependent mitochondrial dynamics remodeling contributes to oxidative stress-induced melanocyte degeneration in vitiligo [J]. *Theranostics*, 2019, 9(6): 1614-33.
- [12] Zhang TY, Wu P, Zhang JH, et al. Docosahexaenoic acid alleviates oxidative stress- based apoptosis *via* improving mitochondrial dynamics in early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018, 38(7): 1413-23.
- [13] Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis [J]. *FEBS J*, 2018, 285(3): 416-31.
- [14] Morita M, Prudent J, Basu K, et al. mTOR controls mitochondrial dynamics and cell survival *via* MTFP1 [J]. *Mol Cell*, 2017, 67(6): 922-35.e5.
- [15] van der Blik AM, Shen QF, Kawajiri S. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(6): a011072.
- [16] Yoo SM, Jung YK. A molecular approach to mitophagy and mitochondrial dynamics [J]. *Mol Cells*, 2018, 41(1): 18-26.
- [17] Chen M, Chen ZH, Wang YY, et al. Mitophagy receptor FUNDC1 regulates mitochondrial dynamics and mitophagy [J]. *Autophagy*, 2016, 12(4): 689-702.
- [18] Liu YL, Wang LX, Du N, et al. Ramelteon ameliorates LPS-induced hyperpermeability of the blood-brain barrier (BBB) by activating Nrf2 [J]. *Inflammation*, 2021, 44(5): 1750-61.
- [19] Kim YM, Krantz S, Jambusaria A, et al. Mitofusin-2 stabilizes adherens junctions and suppresses endothelial inflammation via modulation of  $\beta$ -catenin signaling [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2736.
- [20] Zhang R, Xue MY, Liu BS, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 preserves mitochondrial morphology and attenuates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury [J]. *World J Emerg Med*, 2020, 11(4): 246-54.
- [21] Deng SY, Zhang LN, Mo YN, et al. Mdivi-1 attenuates lipopolysaccharide- induced acute lung injury by inhibiting MAPKs, oxidative stress and apoptosis [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2020, 62: 101918.
- [22] Haileselassie B, Joshi AU, Minhas PS, et al. Mitochondrial dysfunction mediated through dynamin-related protein 1 (Drp1) propagates impairment in blood brain barrier in septic encephalopathy [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 36.
- [23] Choi YK, Kim KW. Blood-neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication [J]. *BMB Rep*, 2008, 41(5): 345-52.
- [24] Galea I. The blood-brain barrier in systemic infection and inflammation [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(11): 2489-501.
- [25] Elwood E, Lim Z, Naveed H, et al. The effect of systemic inflammation on human brain barrier function [J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 62: 35-40.
- [26] Sonnevile R, Verdonk F, Rauturier C, et al. Understanding brain dysfunction in Sepsis [J]. *Ann Intensive Care*, 2013, 3(1): 15.
- [27] Murata D, Arai K, Iijima M, et al. Mitochondrial division, fusion and degradation [J]. *J Biochem*, 2019, 167(3): 233-41.
- [28] 马红丽, 张占琴, 王强. 线粒体动态网络在脓毒症相关性脑病中的研究进展 [J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2021, 42(2): 215-9.
- [29] Zou GP, Yu CX, Shi SL, et al. Mitochondrial dynamics mediated by DRP1 and MFN2 contributes to cisplatin chemoresistance in human ovarian cancer SKOV3 cells [J]. *J Cancer*, 2021, 12(24): 7358-73.
- [30] Fu PF, Epshtein Y, Ramchandran R, et al. Essential role for paxillin tyrosine phosphorylation in LPS-induced mitochondrial fission, ROS generation and lung endothelial barrier loss [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 17546.
- [31] Zheng J, Lu CZ. Oxidized LDL causes endothelial apoptosis by inhibiting mitochondrial fusion and mitochondria autophagy [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 600950.
- [32] Chen CH, Budas GR, Churchill EN, et al. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart [J]. *Science*, 2008, 321(5895): 1493-5.
- [33] Solito R, Corti F, Chen CH, et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 activation prevents  $\beta$ -amyloid-induced endothelial cell dysfunction and restores angiogenesis [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126 (Pt 9): 1952-61.
- [34] Tsai HY, Hsu YJ, Lu CY, et al. Pharmacological activation of aldehyde dehydrogenase 2 protects against heatstroke-induced acute lung injury by modulating oxidative stress and endothelial dysfunction [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 740562.

(编辑:吴锦雅)