

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.02.018 [http://www.crter.org]
李慧娟, 陈敢, 傅君舟, 周姗姗. 尿酸钠结晶影响肾小管上皮细胞的紧密连接[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(2): 286-290.

尿酸钠结晶影响肾小管上皮细胞的紧密连接★

李慧娟, 陈敢, 傅君舟, 周姗姗

广州医学院附属广州市第一人民医院, 广东省广州市 510182

文章亮点:

1 本文创新性: 尿酸结晶引起肾损害机制复杂, 除了尿酸结晶导致的梗阻外, 尿酸结晶还能启动炎症反应, 如细胞吞噬晶体后可导致溶酶体破坏, 引起炎症递质及其它细胞因子如白细胞介素 8、肿瘤坏死因子、及一氧化氮等释放。尿酸结晶还可刺激肾小管上皮细胞合成前列腺素 E2、单核细胞趋化蛋白 1, 进而使局部炎症反应放大导致肾损伤。然而, 尿酸结晶导致肾小管上皮细胞损伤的确切机制未明。且近年来, 随着人们生活水平的提高及饮食结构的改变, 高尿酸血症的发病率越来越高, 使得高尿酸血症及尿酸结石得以重新审视。尿酸性结石可使有关细胞生长及损伤的基因激活和上调, 可能是造成小管间质纤维化致慢性肾功能衰竭的原因, 但有关研究甚少, 确切机制未明。

2 实验提出假设: 尿酸结晶通过破坏紧密连接导致肾小管上皮细胞损伤。紧密连接的破坏可作为肾小管上皮细胞的始动环节, 从而能进一步阐述尿酸钠结晶在肾小管上皮细胞转分化中的作用。

3 实验通过免疫荧光、荧光定量 PCR 证实尿酸结晶可使紧密连接蛋白的表达下降及 mRNA 的表达下调, 从而有助于进一步探讨紧密连接在尿酸结晶对肾小管上皮细胞转分化中的作用。

关键词:

组织构建; 组织构建细胞学实验; 尿酸钠结晶; 紧密连接; 紧密连接蛋白; 肾小管上皮细胞; NRK-52E 细胞; 肾间质纤维化; 高尿酸血症; 跨膜蛋白; 膜周蛋白; 大鼠; 组织构建图片文章

摘要

背景: 目前研究来看, 尿酸性结石与紧密连接蛋白及肾间质纤维化的关系仍未明确。

目的: 观察尿酸钠结晶对肾小管上皮细胞紧密连接的影响。

方法: 配制单钠尿酸钠晶体。将正常大鼠肾小管上皮细胞随机分为对照组和尿酸钠结晶组, 分别用无血清培养基和尿酸钠结晶进行培养。免疫荧光和 RT-PCR 方法检测 24, 48, 72 h 紧密连接蛋白的表达。

结果与结论: 与对照组比较, 尿酸钠结晶于不同时相刺激 NRK-52E 细胞后, 紧密连接蛋白和 mRNA 表达下降($P < 0.05$), 72 h 时下降显著($P < 0.01$), 蛋白表达出现重新分布现象。说明尿酸钠结晶可破坏肾小管上皮细胞紧密连接蛋白的结构、功能及导致分布异常。

Monosodium urate monohydrate crystals affect the tight junctions among renal tubular epithelial cells

Li Hui-juan, Chen Gan, Fu Jun-zhou, Zhou Shan-shan

First People's Hospital of Guangzhou City, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China

Abstract

BACKGROUND: Up to now, the relationship of uric acid stones with tight junction proteins and renal interstitial fibrosis is yet unclear.

OBJECTIVE: To observe the effect of monosodium urate (MSU) monohydrate crystals on the tight junction among NRK-52E cells.

METHODS: The NRK-52E cells were divided into two groups: control group and MSU group cultured in

李慧娟★, 女, 1986 年生, 江西省九江市人, 汉族, 2012 年广州医学院毕业, 硕士, 医师, 主要从事尿酸性肾病方面的研究。

hjlj0968@163.com;
huijuanli515@126.com

通讯作者: 傅君舟, 硕士, 教授, 主任医师, 广州市第一人民医院, 广东省广州市 510182
fjzh@163.com

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2013)02-00286-05

收稿日期: 2012-06-25

修回日期: 2012-08-13

(20140424025/D · W)

Li Hui-juan★, Master,
Physician, First People's
Hospital of Guangzhou City,
Guangzhou Medical University,
Guangzhou 510182,
Guangdong Province, China
hjli0968@163.com,
huijuanli515@126.com

Corresponding author: Fu
Jun-zhou, Master, Professor,
Chief physician, First People's
Hospital of Guangzhou City,
Guangzhou Medical University,
Guangzhou 510182,
Guangdong Province, China
fjzh@163.com

Received: 2012-06-25
Accepted: 2012-08-13

serum-free medium and MSU crystals, respectively. The protein and mRNA expressions of ZO-1 were investigated by immunofluorescence and reverse transcription-PCR, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, the protein and mRNA expressions of ZO-1 were down-regulated after the stimulation of MSU at 24, 48, 72 hours ($P < 0.05$), especially at 72 hours ($P < 0.01$). Protein expression appeared with redistribution phenomenon. These findings indicate that MSU can damage the structure, function and distribution of tight junction proteins of renal tubular epithelial cells.

Key Words: tissue construction; cytological experiments of tissue construction; monosodium urate monohydrate crystals; tight junctions; claudin; tubular epithelial cells; NRK-52E cells; renal interstitial fibrosis; hyperuricemia; transmembrane protein; membranous protein; rats; tissue construction photographs-containing paper

Li HJ, Chen G, Fu JZ, Zhou SS. Monosodium urate monohydrate crystals affect the tight junctions among renal tubular epithelial cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(2): 286-290.

0 引言

紧密连接是指上皮细胞顶端侧面质膜中的封闭蛋白和密封蛋白在细胞间构成的密封连接, 对于维持表皮和内皮细胞的选择渗透性屏障功能起关键作用^[1-2]。紧密连接由跨膜蛋白和膜周蛋白组成, 跨膜蛋白包括咬合蛋白、闭合蛋白、连接黏附分子; 膜周蛋白包括紧密连接蛋白1, 2, 3等^[3]。氧化应激, 病原体、促炎症因子均可破坏紧密连接结构及功能。Paleerath等^[4]提出草酸钙结晶可破坏紧密连接屏障功能及篱笆功能, 一定程度上提出了紧密连接在肾结石引起肾间质纤维化中的作用。但目前研究来看, 尿酸性结石与紧密连接蛋白及肾间质纤维化的关系仍未明确, 本实验着重探讨尿酸钠结晶对紧密连接蛋白的影响。

1 材料和方法

设计: 组织构建细胞学观察。

时间及地点: 于2011年6月至2012年3月在广州市第一人民医院中心实验室完成。

材料:

细胞来源: 正常大鼠肾小管上皮细胞株(NRK-52E细胞)由中山大学第一附属医院肾内科惠赠。

尿酸钠结晶对肾小管上皮细胞紧密连接影响的实验试剂:

Experimental reagents used to detect monosodium urate monohydrate crystals effects on the tight junctions of renal tubular epithelial cells:

试剂	来源
胎牛血清、DMEM/F12 培养基	Gibco, 美国
0.25%胰蛋白酶、青霉素/硫酸链霉素	Solarbio, 北京
兔抗鼠紧密连接蛋白多克隆抗体、FITC 标记山羊抗兔 IgG、TRIZOL 试剂	Bioworld, 美国
DAPI	武汉博士德公司
反转录试剂盒	TAKARA, 中国
荧光定量试剂盒	Agilent 美国
尿酸钠	sigma 美国
主要引物合成	TAKARA 生物技术服务有限公司

方法:

单钠尿酸钠晶体的配制: 无菌条件下将5 mL 1 mol/L的NaOH和800 mg尿酸钠加入155 mL去热源的灭菌注射用水中并煮沸, 使尿酸钠完全溶解, 自然降温并搅拌, 滴入1 mol/L

的HCl至pH值7.0溶液呈乳白色后立即3 000 r/min离心2 min, 离心半径12.5 cm。将上清液反复离心至晶体不再析出, 最后于4 °C冷却1 h后离心, 收集晶体于无菌EP管, 4 °C保存^[5]。

NRK-52E细胞培养及分组: 正常大鼠肾小管上皮细胞NRK-52E细胞用含体积分数10%FBS的DMEM/F12培养基, 37 °C, 体积分数5%CO₂的细胞培养箱培养, 每两三天换液1次。细胞融合80%–90%时用0.25% Trypsin/0.02%EDTA 溶液消化传代。细胞分为两组: 对照组, 无血清培养基; 尿酸钠结晶组, 终浓度为500 mg/L的尿酸钠结晶。取1×10⁶ NRK-52E细胞于预置玻片的六孔板中, 细胞贴壁12 h时用无血清DMEM/F12培养基同步化24 h, 弃上清液, 根据实验分组情况更换为含或不含干预因素的无血清培养基, 干预时间为24, 48, 72 h。

免疫荧光: NRK-52E细胞用兔抗鼠紧密连接蛋白多克隆抗体(1:100)进行免疫染色, 放置4 °C冰箱过夜, FITC标记的山羊抗兔IgG(1:100)作为荧光二抗孵育45 min后PBS洗涤。DAPI染核3 min。滴抗荧光淬灭剂封固与载玻片上, 盖上贴有细胞的盖玻片, 片干后与激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

RT-PCR: NRK-52E细胞总RNA的提取和cDNA的合成按试剂盒说明进行。引物设计采用PRIMER5.0软件按照引物设计要求完成, 引物均由TAKARA生物技术服务有限公司合成。

用于扩增的引物紧密连接蛋白、内参照GAPDH序列和碱基:

Primers for tight junction proteins, GAPDH sequence

and base:

目的基因	引物序列	产物碱基数
ZO-1	Sense 5'- CCA TCT TTG GAC CGA TTG CTG -3' Antisense 5'- TAA TGC CCG AGC TCC GAT G-3'	123
GAPDH	Sense 5'-GGT GCT GAG TAT GTC GTG-3' Antisense 5' - TTC AGC TCT GGG ATG ACC-3'	404

实时荧光定量PCR按照说明书进行, PCR总反应体积为25 μL, 2×SYBR mix 12.5 μL, 10 μmol/L引物2 μL, cDNA 1 μL, Rnase Free dH₂O 9.5 μL, 在MJ research上设置程序, 反应条件为95 °C 10 min, 95 °C 30 s, 53 °C 1 min, 72 °C 30 s, 40个循环。结果用opticon monitor 2.0软件分析, 观察融解曲线。荧光定量PCR的结果以Ct值表示, Ct值为每个反应管内的荧光信号达到设定区阈值时所经历的循环数, RT-PCR每个样本重复3次, 取平均值为Ct值, 用SPSS软件计算出各段各基因

表达的平均Ct值, 采用相对定量2^{-ΔΔCt}法比较各基因的表达差异。以对照组表达量为1, 2^{-ΔΔCt}值即为目的段较正常段基因表达的倍数。

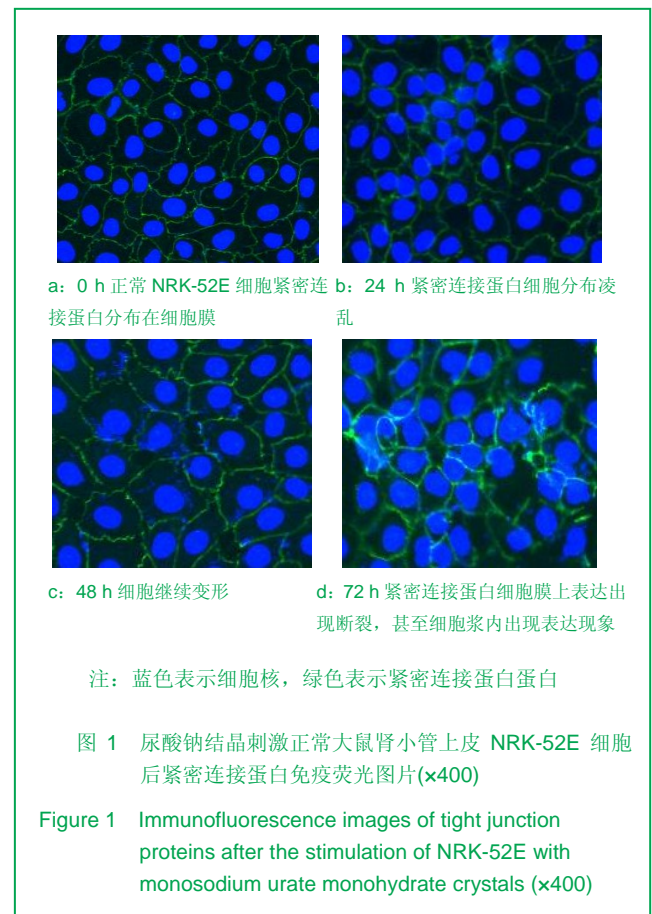
主要观察指标: ①免疫荧光法观察尿酸钠结晶刺激NRK-52E细胞24, 48, 72 h时, 紧密连接蛋白1的蛋白表达变化。②RT-PCR法观察尿酸钠结晶刺激NRK-52E细胞24, 48, 72 h时, 紧密连接蛋白1 mRNA表达变化。

统计学分析: 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 数据用SPSS 17.0统计软件分析, 组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA); $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 尿酸钠结晶刺激后细胞形态的变化 正常NRK-52E细胞为圆形或卵圆形, 具有上皮细胞铺路石样外观, 尿酸钠结晶刺激后细胞逐渐变为梭形, 似成纤维细胞, 以尿酸钠结晶刺激72 h后明显。

2.2 尿酸钠结晶刺激后紧密连接蛋白的表达 见图1。



细胞免疫荧光显示, 正常NRK-52E细胞紧密连接蛋白分布在细胞膜, 尿酸钠结晶刺激细胞后, 随着作用时间延长, 紧密连接蛋白细胞膜上表达出现断裂, 甚至细

胞浆内出现表达现象,

2.3 尿酸钠结晶刺激后紧密连接蛋白 mRNA 的表达
实时荧光定量 PCR 显示, 随着尿酸钠结晶刺激时间延长, 紧密连接蛋白 mRNA 表达下降 ($P < 0.05$), 并在 72 h 后较对照组下降显著 ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 尿酸钠结晶刺激正常大鼠肾小管上皮 NRK-52E 后紧密连接蛋白 mRNA 的表达情况(相对定量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法, $n=6$)

Table 1 mRNA expression of ZO-1 after the stimulation of NRK-52E with monosodium urate monohydrate crystals ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

时间	紧密连接蛋白 1 CT 值	GAPDH	ΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$
对照组	19.53±0.43	15.80±0.22	3.72±0.13	0.80±0.20 ^a
24 h	17.91±0.53	13.31±0.15	4.09±0.12	0.62±0.31 ^a
48 h	17.80±0.53	13.46±0.20	4.46±0.17	0.47±0.27 ^b
72 h	21.97±0.49	17.02±0.16	4.95±0.15	0.34±0.16 ^b

注: 随着尿酸钠结晶刺激时间延长, 紧密连接蛋白 mRNA 表达下降, 并在 72 h 后较对照组下降显著。与其他时间点比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

3 讨论

近年来, 随着国内经济发展和人民饮食结构的改变, 特别是富含蛋白质和嘌呤的食物摄入增加, 高尿酸血症和尿酸结石的发病率逐年上升。既往高尿酸血症仅仅被认为是代谢异常的一种标志, 但近期越来越多的证据表明, 高尿酸血症本身对肾脏和心血管系统有着直接的损伤作用, 是肾脏疾病和心血管疾病独立危险因素^[6-7], 尿酸或尿酸盐导致肾脏损伤不仅仅是由于尿酸盐结晶导致的梗阻, 尿酸结晶还可以激活补体系统, 启动炎症反应^[8-9]。细胞吞噬带有阴离子的晶体可以激活补体系统和炎症细胞, 并伴有细胞因子和其他炎症递质的释放。这些研究重新评估了高尿酸血症与肾脏病的关系, 使高尿酸血症在肾脏疾病中的作用得到新的重视^[10]。Paleerath 等^[1]提出草酸钙结晶可破坏紧密连接屏障功能及篱笆功能, 一定程度上提出了紧密连接在肾结石引起肾间质纤维化中的作用。

紧密连接是上皮细胞顶端侧面质膜中的封闭蛋白和密闭蛋白在细胞间构成的密封连接, 对于维持表皮和内皮细胞的选择通透性屏障功能非常重要^[11]。紧密连接有两个主要功能: ①“篱笆(fence)”功能^[12]: 上皮细胞的细胞膜分为基底侧膜和管腔侧膜, 具有典型极性细胞

特征。紧密连接是基底侧膜与管腔侧膜的分界线^[13]。紧密连接具有维持上皮细胞极性的功能, 同时参与细胞增殖与分化^[14]、肿瘤的形成^[15]、上皮细胞间充质转分化等^[16-17]。②“门”功能^[18]: 调节细胞旁路的物质转运, 控制水、电解质及其他分子经细胞旁路进入组织间隙, 维持上皮细胞的完整性及作为机体外环境与内环境的屏障, 如小肠上皮可隔绝肠液和机体内环境, 肾小管上皮细胞则隔绝尿液和机体内环境^[19]。同时紧密连接还可形成某些局部独立的内环境, 如血脑屏障^[20]、血脑屏障, 对这些器官起保护作用^[21]。同时, 紧密连接是信号传导的平台, 作为某些细菌及毒素的靶目标^[22], 或是某些病毒的受体, 参与多种感染过程^[23-24]。

紧密连接由跨膜蛋白如咬合蛋白、闭合蛋白和膜周蛋白如紧密连接蛋白 1, 2, 3 等组成。咬合蛋白是重要的紧密连接蛋白之一, 在相邻细胞间与另外一个咬合蛋白分子相互作用, 在相同细胞间与另外一个亚细胞结构蛋白相连^[25]; 紧密连接蛋白在咬合蛋白和细胞骨架肌动蛋白间起重要连接作用^[26]。紧密连接蛋白的缺失可导致上皮细胞形态学改变^[27], 表达水平与上皮细胞的完整性直接相关^[28-30]。因此在本实验着重探讨尿酸钠结晶对紧密连接蛋白的影响。

实验研究发现, 紧密连接蛋白主要分布在细胞膜。尿酸钠结晶在不同时间刺激 NRK-52E 细胞后, 免疫荧光显示, 随着尿酸钠结晶作用时间延长, 紧密连接蛋白荧光逐渐减弱, 结构分布异常, 出现重新分布现象。RT-PCR 结果显示, 紧密连接蛋白 mRNA 水平呈时间依赖方式降低。以上结果表明, 单钠尿酸钠晶体(尿酸钠结晶)作用于肾小管上皮细胞, 可导致紧密连接蛋白表达降低、分布异常及细胞与细胞间连接功能破坏。紧密连接蛋白的破坏涉及多种疾病, 包括胃肠道、肺及肾脏疾病等, 本实验通过探讨尿酸钠结晶与紧密连接关系, 进一步为尿酸钠结晶如何导致肾损伤提供依据。

作者贡献: 李慧娟进行收集资料、实验设计、细胞培养、免疫荧光、荧光定量 PCR、论文撰写、论文评估; 陈敢进行收集资料和论文评估; 傅君舟参与了实验设计、论文审核和实验评估; 梁鸣参与实验设计和实验评估; 周姗姗参与实验评估和论文审核。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 未涉及伦理要求。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Raj M. Essential hypertension in adolescents and children: Recent advances in causative mechanisms. *Indian J Endocrinol Metab.* 2011;15 Suppl 4:S367-373.
- [2] Serpa Neto A, Rossi FM, Valle LG, et al. Relation of uric acid with components of metabolic syndrome before and after Roux-en-Y gastric bypass in morbidly obese subjects. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2011;55(1):38-45.
- [3] Steed E, Rodrigues NT, Balda MS, et al. Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC Cell Bid.* 2009; 10:95.
- [4] Peerapen P, Thongboonkerd V. Effects of calcium oxalate monohydrate crystals on expression and function of tight junction of renal tubular epithelial cells. *Lab Invest.* 2011; 91(1):97-105.
- [5] DeBoer MD, Gurka MJ. Low sensitivity for the metabolic syndrome to detect uric acid elevations in females and non-Hispanic-black male adolescents: an analysis of NHANES 1999-2006. *Atherosclerosis.* 2012;220(2):575-580.
- [6] Short RA, Tuttle KR. Clinical evidence for the influence of uric acid on hypertension, cardiovascular disease, and kidney disease: a statistical modeling perspective. *Semin Nephrol.* 2005;25(1):25-31.
- [7] Loeffler LF, Navas-Acien A, Brady TM, et al. Uric acid level and elevated blood pressure in US adolescents: National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2006. *Hypertension.* 2012;59(4):811-817.
- [8] Gibson T. Hyperuricemia, gout and the kidney. *Curr Opin Rheumatol.* 2012;24(2):127-131.
- [9] Ea HK. Mechanisms of gout inflammation. *Presse Med.* 2011;40(9 Pt 1):836-843.
- [10] McArdle PF, Parsa A, Chang YP, et al. Association of a common nonsynonymous variant in GLUT9 with serum uric acid levels in old order amish. *Arthritis Rheum.* 2008;58(9):2874-2481.
- [11] Nuki G. Colchicine: its mechanism of action and efficacy in crystal-induced inflammation. *Curr Rheumatol Rep.* 2008; 10(3):218-227.
- [12] Balkovetz DF. Opening Pandora's box in the tight junction. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(6):1624-1645.
- [13] Achilleos A, Wehman AM, Nance J. PAR-3 mediates the initial clustering and apical localization of junction and polarity proteins during *C. elegans* intestinal epithelial cell polarization. *Development.* 2010;137(11):1833-1842.
- [14] Bilder D. Epithelial polarity and proliferation control: links from the *Drosophila* neoplastic tumor suppressors. *Genes Dev.* 2004;18(16):1909-1925.
- [15] Wang Z, Wade P, Mandell KJ, et al. Raf 1 represses expression of the tight junction protein occludin via activation of the zinc-finger transcription factor slug. *Oncogene.* 2007;26(8):1222-1230.
- [16] Grände M, Franzen A, Karlsson JO, et al. anstroming growth factor-beta and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 22):4227-4236.
- [17] Reichert M, Müller T, Hunziker W. The PDZ domains of zonula occludens-1 induce an epithelial to mesenchymal transition of Madin-Darby canine kidney I cells. Evidence for a role of beta-catenin/Tcf/Lef signaling. *J Biol Chem.* 2000; 275(13):9492-9500.
- [18] Balkovetz DF. Opening Pandora's box in the tight junction. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(6):1624-1625.
- [19] Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(4):285-293.
- [20] Cheng CY, Mruk DD. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev.* 2002;82(4):825-874.
- [21] McCaffrey G, Willis CL, Staats WD, et al. Occludin oligomeric assemblies at tight junctions of the blood-brain barrier are altered by hypoxia and reoxygenation stress. *J Neurochem.* 2009;110(1):58-71.
- [22] Sears CL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions V. assault of the tight junction by enteric pathogens. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;279(6): G1129-1134.
- [23] Zhang B, Lim TS, Vedula SR, et al. Investigation of the binding preference of reovirus sigma1 for junctional adhesion molecule A by classical and steered molecular dynamics. *Biochemistry.* 2010;49(8):1776-1786.
- [24] Walters RW, Freimuth P, Moninger TO, et al. Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell.* 2002;110(6):789-799.
- [25] Dörfel MJ, Huber O. Modulation of tight junction structure and function by kinases and phosphatases targeting occludin. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:807356.
- [26] Pulimeno P, Paschoud S, Citi S. A role for ZO-1 and PLEKHA7 in recruiting paracingulin to tight and adherens junctions of epithelial cells. *J Biol Chem.* 2011;286(19): 16743-16750.
- [27] Yu AS, McCarthy KM, Francis SA, et al. Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;288(6): C1231-1241.
- [28] O'Driscoll MC, Daly SB, Urquhart JE, et al. Recessive mutations in the gene encoding the tight junction protein occludin cause band-like calcification with simplified gyration and polymicrogyria. *Am J Hum Genet.* 2010;87(3):354-364.
- [29] Benedicto I, Molina-Jiménez F, Bartosch B, et al. The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *J Virol.* 2009;83(16):8012-8120.
- [30] Imamura M, Kojima T, Lan M, et al. Oncostatin M induces upregulation of claudin-2 in rodent hepatocytes coinciding with changes in morphology and function of tight junctions. *Exp Cell Res.* 2007;313(9):1951-1962.