

骨架蛋白在肝肺综合征大鼠血清诱导PASMCs迁移中的作用

文 静^{1*}, 鲜俊杰¹, 陈 林², 陈 杨^{1#}

¹重庆市第七人民医院(重庆理工大学附属中心医院)麻醉科, 重庆

²陆军军医大学第一附属医院麻醉科, 重庆

收稿日期: 2025年3月8日; 录用日期: 2025年3月31日; 发布日期: 2025年4月10日

摘 要

目的: 本研究聚焦于探究骨架蛋白在肝肺综合征(HPS)大鼠血清诱导肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)迁移进程中的作用。方法: 实验选用20只雄性Sprague-Dawley大鼠, 通过慢性胆总管结扎的方法构建大鼠HPS模型, 随后采集腹主动脉血用于制备血清。将培养的大鼠PASMCs分别接种至6孔板与24孔板, 借助随机数字表法分为两组, 即对照组(C组)与HPS组。C组和HPS组分别采用正常大鼠和HPS大鼠血清进行孵育, 并使两组血清终浓度均调控至5%。在细胞孵育的24小时(T1)、48小时(T2)以及72小时(T3)这三个时间节点, 运用Western-blot技术对PASMCs内的骨架蛋白, 包括F-actin、 α -tubulin以及Destrin的蛋白表达量进行测定; 同时, 利用Transwell小室(于T1时间点)以及划痕实验(在T1至T3时间点)检测PASMCs的迁移水平。结果: 相较于C组, HPS组的PASMCs迁移能力显著提升, 而骨架蛋白(F-actin, α -tubulin及Destrin)的蛋白表达则呈现出明显的下调趋势($P < 0.05$)。结论: 在HPS大鼠血清的刺激下, PASMCs中骨架蛋白表达逐步降低, 这可能在HPS病理进程的PASMCs异常迁移中发挥重要调节作用。

关键词

肝肺综合征, 肺动脉平滑肌细胞, 骨架蛋白

Role of Cytoskeletal Proteins in Rat PASMCs Migration Induced by HPS Rat Serum

Jing Wen^{1*}, Junjie Xian¹, Lin Chen², Yang Chen^{1#}

¹Department of Anesthesiology, The Seventh People's Hospital of Chongqing (Affiliated Central Hospital of Chongqing University of Technology), Chongqing

²Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital, Army Medical University, Chongqing

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 文静, 鲜俊杰, 陈林, 陈杨. 骨架蛋白在肝肺综合征大鼠血清诱导 PASMCs 迁移中的作用[J]. 临床医学进展, 2025, 15(4): 1154-1159. DOI: 10.12677/acm.2025.1541041

Abstract

Objective: This study focuses on exploring the role of cytoskeletal proteins in the migration process of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) induced by the serum of rats with hepatopulmonary syndrome (HPS). **Methods:** Twenty male Sprague-Dawley rats were selected for the experiment. A rat model of HPS was established by chronic common bile duct ligation, and then the blood from the abdominal aorta was collected for serum preparation. The cultured rat PASMCs were separately seeded into 6-well plates and 24-well plates, and divided into two groups by the random number table method, namely the control group (Group C) and the HPS group. Group C and the HPS group were incubated with the serum of normal rats and HPS rats respectively, and the final concentration of the serum in both groups was adjusted to 5%. At three time points of 24 hours (T1), 48 hours (T2), and 72 hours (T3) of cell incubation, Western-blot technique was used to measure the protein expression levels of cytoskeletal proteins in PASMCs, including F-actin, α -tubulin, and Destrin. Meanwhile, the Transwell chamber (at the T1 time point) and the scratch assay (at the time points from T1 to T3) were used to detect the migration level of PASMCs. **Results:** Compared with Group C, the migration ability of PASMCs in the HPS group was significantly enhanced, while the protein expression of cytoskeletal proteins (F-actin, α -tubulin, and Destrin) showed a significant downward trend ($P < 0.05$). **Conclusion:** Under the stimulation of the serum of HPS rats, the expression of cytoskeletal proteins in PASMCs gradually decreases, which may play an important regulatory role in the abnormal migration of PASMCs related to HPS.

Keywords

Hepatopulmonary Syndrome, Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells, Cytoskeletal Proteins

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肝肺综合征(HPS)作为一类基于慢性肝病发展而来的临床综合征,其典型特征为肺内微血管扩张,进而引发动脉血氧合障碍[1]。在疾病发展过程中,低氧血症会促使血管中膜的肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)发生表型转变,使得这些细胞从中膜到内膜进行迁移,并大量异常增殖。同时,患病肝脏释放的大量循环细胞因子作用于 PASMCs,进一步加剧其病理变化,最终导致肝源性肺血管重塑,这已成为 HPS 的重要病理标志[2]。细胞骨架蛋白在维持细胞结构稳定与弹性方面具有关键作用,并且具备多种生物学功能。本研究通过观察 HPS 大鼠血清刺激下 PASMCs 中骨架蛋白的表达变化情况,深入探究其在 HPS 肝源性肺血管重建进程中的作用机制。

2. 材料与方法

2.1. 主要实验材料和仪器

本实验采用 20 只清洁级成年雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠,体重范围处于 220~250 克之间,购自第三军医大学实验动物中心。实验所使用的低糖 DMEM 培养基由美国 PAA 公司提供, D. Hanks 液购自

美国 Hyclone 公司。小鼠抗 F-actin 单克隆抗体、小鼠抗 α -tubulin 单克隆抗体以及兔抗 Dextrin 单克隆抗体均来自英国 Abcam 公司。兔抗大鼠 GAPDH 一抗、HRP 标记羊抗兔二抗、HRP 标记大鼠抗小鼠二抗由北京康为世纪生物科技有限公司供应。实验用到的 Transwell 小室购自美国康宁公司。实验仪器包含德国 Herseus 公司生产的二氧化碳恒温培养箱, 以及美国 Alpha Innotech 公司的 Imager 凝胶成像分析系统等。

2.2. HPS 大鼠模型制备、PASMCs 培养和分组

采用文献[3]的方法构建 HPS 模型。首先, 经腹腔注射 3%戊巴比妥钠(剂量为 0.1 ml/100g)行全身麻醉。于剑突下沿腹白线切开一个约 3 cm 的切口, 找到十二指肠和上段胆总管, 在靠近肝门处和靠近十二指肠处分别对胆总管进行结扎, 随后剪断胆总管, 最后分层缝合关闭腹腔。术后 5 周时, 采集 1 ml 腹主动脉血样用于动脉血气分析, 4 ml 血样经处理后制备血清。取出肺组织制作病理切片, 观察肺组织的形态学变化。以大鼠的 PaO_2 低于 85 mmHg, 且 A-aDO_2 大于 18 mmHg, 同时伴有相应肺部病理改变时, 判定 HPS 模型构建成功, 采用模型构建成功的血样所制备的血清行后续试验。依照文献[4]所述方法, 对大鼠 PASMCs 进行原代培养。选取第 4~9 代的 PASMCs 用于本次实验。将细胞浓度调整至 5×10^5 个/mL, 分别接种于 6 孔板和 24 孔板。采用随机数字表法分为: C 组(正常大鼠血清进行孵育)和 HPS 组(HPS 大鼠血清进行孵育), 利用低糖 DMEM 培养基将血清终浓度调节为 5%。对两组细胞进行同步化处理后, 分别将各组孵育 24 小时(T1)、48 小时(T2)以及 72 小时(T3)时测定下述指标。

2.3. Western-blot 法检测骨架蛋白的表达

在 T1 至 T3 这三个时间点, 每组随机选取 4 孔(6 孔板), 加入蛋白裂解液, 在冰上进行裂解操作。随后以 $12,000 \times g$ 的转速离心 15 分钟。取 40 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 之后将蛋白电转印 50 分钟至 PVDF 膜上。将 PVDF 膜浸入含有 5%脱脂奶粉的溶液中封闭 2 小时, 分别加入按 1:1000 稀释的小鼠抗 F-actin 单克隆抗体、小鼠抗 α -tubulin 单克隆抗体, 按 1:1500 稀释的兔抗 Dextrin 单克隆抗体, 以及按 1:2000 稀释的兔抗大鼠 GAPDH 一抗, 在 4°C 环境下孵育过夜。用 TBS 洗膜 3 次后, 分别加入按 1:2000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔二抗及 HRP 标记的大鼠抗小鼠二抗, 在室温下孵育 2 小时, 再次用 TBS 洗膜 3 次, 进行 DAB 显色。最后借助 Imager 凝胶成像分析系统进行灰度扫描, 将每个样本中目的蛋白条带的灰度值除以相应样本中 GAPDH 条带的灰度值, 得到目的蛋白的相对表达量, 进行标准化。蛋白表达水平以各组蛋白与内参 GAPDH 灰度值比(%)表示。

2.4. PASMCs 迁移水平的检测 Transwell 小室检测法[5]

将孔径为 $8.0 \mu\text{m}$ 的 Transwell 小室插入 24 孔板中, 插入膜的上室部分不涂抹基底胶。把大鼠 PASMCs 接种在上室中, 孵育 24 h 后, 使用棉签除去未通过膜迁移至下室的细胞, 并用结晶紫染色下室表面细胞。在显微镜下以 200 倍的放大倍数对迁移到下室的细胞进行计数。划痕实验检测法[6]: 将大鼠 PASMCs 接种在 6 孔板(每孔 1.50×10^5 个细胞)的玻璃盖玻片上, 待细胞生长至汇合状态。通过随机数字表法将其分为 C 组和 HPS 组。在血清剥夺 24 小时后, 分别用正常大鼠血清和 HPS 大鼠血清对 C 组及 HPS 组细胞进行孵育。之后利用显微镜中配备的十字线在 T1-3 时测量每组细胞的迁移距离占初始距离(T0)的百分比(%)。

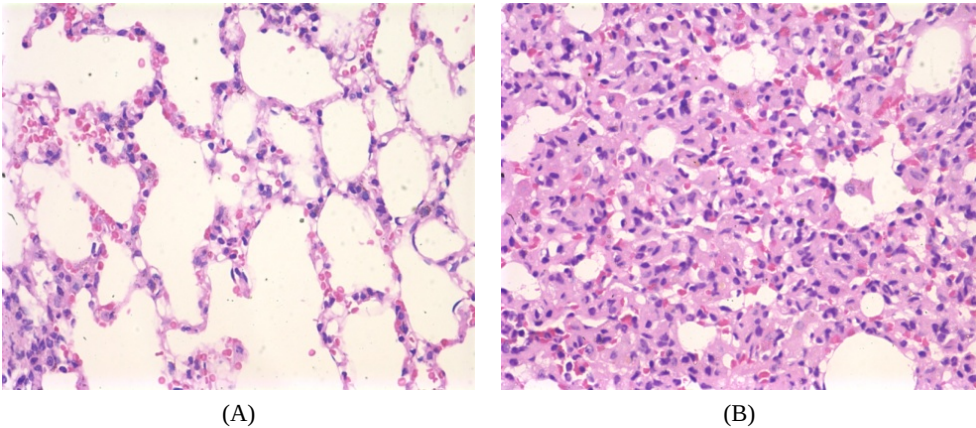
2.5. 统计学处理

运用 SPSS13.0 软件进行数据分析。对于呈正态分布的计量资料, 以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式呈现。组间比较采用成组 t 检验, 组内比较采用单因素方差分析, 当 $P < 0.05$ 时, 认定差异具有统计学意义。

3. 结果

3.1. HPS 大鼠建模一般情况

2 只大鼠因麻醉及手术意外术后 24 h 死亡，其余大鼠术后观察毛色浅黄，大便黄，小便少黄，部分精神萎靡，食欲不振。8 只大鼠在术后 4 周以前死亡，尸检发现肝脏大片坏死出血，胆总管结扎处巨大囊肿形成。术后 5 周大鼠 10 只，成功 HPS 模型 7 只。HPS 大鼠肺组织与正常大鼠肺组织病理切片对比。见图 1。



(A): ×400 正常大鼠肺组织, (B): ×400 HPS 大鼠 5 周肺组织; 与正常大鼠肺组织比较, HPS 大鼠肺组织可见肺间质纤维组织增生, 毛细血管扩张, 小动脉管壁增厚。

Figure 1. Comparison of pathological sections of lung tissues between HPS rats and normal rats
图 1. HPS 大鼠肺组织与正常大鼠肺组织病理切片对比

3.2. 骨架蛋白(F-Actin, α-tubulin 及 Destrin)蛋白表达水平

与 C 组相比, HPS 组的骨架蛋白(F-actin, α-tubulin 及 Destrin)蛋白表达显著下调($P < 0.05$); 并且 HPS 组的骨架蛋白表达随着刺激时间的延长, 呈现出逐渐下调的趋势($P < 0.05$)。见表 1。

Table 1. Comparison of the protein expression levels of cytoskeletal proteins (F-actin, α-tubulin and Destrin) ($n = 4, \bar{x} \pm s$)
表 1. 骨架蛋白(F-actin, α-tubulin 及 Destrin)蛋白表达情况比较($n = 4, \bar{x} \pm s$)

组别	时间	F-actin (%)	Destrin (%)	α-tubulin (%)
C 组	T1	83.14 ± 0.25	73.99 ± 2.28	63.93 ± 0.70
	T2	82.37 ± 0.82	72.99 ± 1.04	62.84 ± 0.47
	T3	82.10 ± 1.21	72.85 ± 0.69	62.10 ± 1.32
HPS 组	T1	63.09 ± 0.37 ^①	53.24 ± 2.05 ^①	45.45 ± 1.23 ^①
	T2	42.84 ± 0.97 ^{①②}	41.59 ± 0.59 ^{①②}	29.31 ± 0.38 ^{①②}
	T3	29.85 ± 0.73 ^{①②③}	28.69 ± 0.51 ^{①②③}	14.98 ± 0.82 ^{①②③}

与 C 组同时相点比较, ① $P < 0.05$ 与 HPS 组 T1 比较, ② $P < 0.05$ 与 HPS 组 T2 比较, ③ $P < 0.05$ 。

3.3. PSMCs 迁移情况

与 C 组相比, HPS 组的 PSMCs 迁移能力明显增强($P < 0.05$); 而且 HPS 组的 PSMCs 迁移能力随着刺激时间的延长逐渐增强($P < 0.05$)。见表 2。

Table 2. Comparison of the migration of PSMCs between the two groups
表 2. 两组 PSMCs 迁移情况的比较

组别	时间	PSMCs 迁移情况	
		Transwell 小室(个数)	划痕实验(%)
C 组	T1	25 ± 4	95.1 ± 3.7
	T2		64.9 ± 5.3
	T3		32.0 ± 3.9
HPS 组	T1	47 ± 7 ^①	63.0 ± 1.4 ^①
	T2		33.2 ± 4.6 ^{①②}
	T3		3.9 ± 1.2 ^{①②③}

与 C 组同时相点比较, ^①P < 0.05 与 HPS 组 T1 比较, ^②P < 0.05 与 HPS 组 T2 比较, ^③P < 0.05。

4. 讨论

肝肺综合征是在慢性肝病和/或门脉高压的基础上,以肺微血管扩张和肺血管重建为主要病理特征的一种综合征[7]。肝脏疾病引发的细胞因子过度释放,是 HPS 发生发展的关键因素。循环细胞因子通过血液循环作用于肺部的肺微血管内皮细胞,以及从中膜内移的 PSMCs,最终导致肝源性的肺血管重建。基于此,本研究制备了 HPS 大鼠血清,通过离体实验深入探究 HPS 发生发展过程中 PSMCs 异常迁移的内在机制。

过往研究[6]表明,在 HPS 大鼠血清的刺激下,膜联蛋白 A2 的表达会显著上调,从而导致 PSMCs 发生异常增殖和迁移。本研究结果显示,在 HPS 大鼠血清的诱导下,PSMCs 迁移能力增强,骨架蛋白(F-actin, α -tubulin 及 Destrin)蛋白表达下调,且这种下调呈现出时间依赖性。这充分表明,HPS 血清诱导的 PSMCs 异常迁移与骨架蛋白的表达水平下调密切相关;骨架蛋白表达的变化,对细胞表型以及细胞信号转导等方面的影响,在 HPS 的发生发展过程中扮演着重要角色。

F-actin 作为肌动蛋白在细胞内的聚合形态,是构成细胞内微丝骨架的关键成分,其表达的变化能够对细胞的形态、黏附以及迁移功能产生调节作用[8]。 α -tubulin 是细胞骨架主要组成部分微管的构成蛋白,它与 β -tubulin 形成异二聚体,共同构成微管。微管在细胞分裂进程中发挥着重要作用,其聚合与解聚过程和细胞的迁移紧密相关[9]。Destrin 又称消去蛋白,属于肌动蛋白纤维去聚合蛋白超家族的一员,广泛存在于平滑肌细胞等多种细胞中。它对肌动蛋白细胞骨架的识别和解聚作用,在细胞增殖、迁移、黏附、形态改变和动力变化等基础活动中起着重要的调节作用[10]。

既往研究[11]发现,膜联蛋白 A2 的下调能够抑制 HPS 大鼠血清诱导的 PSMCs 异常迁移。膜联蛋白可以通过形成异四聚体的形式在膜上聚集,参与调节蛋白的跨膜转运、蛋白的运输以及细胞的增殖和迁移等多种生命活动,并且对 PSMCs 的表型转换具有重要意义。因此,在 HPS 引发的 PSMCs 异常迁移过程中,膜联蛋白 A2 可能通过影响骨架蛋白的表达,进而诱导 PSMCs 的迁移。

综上所述,在 HPS 大鼠血清诱导的 PSMCs 异常迁移过程中,骨架蛋白的表达逐渐下调,这极有可能是多种因素刺激 PSMCs 异常迁移的上游环节,在 HPS 肝源性肺血管重建中发挥着至关重要的作用。

基金项目

重庆市自然科学基金项目(CSTB2022NSCQ-MSX0218);重庆市教委科技研究计划青年项目(KJQN202401137)。

参考文献

- [1] Liu, L., Liu, N., Zhao, Z., Liu, J., Feng, Y., Jiang, H., *et al.* (2012) TNF- α Neutralization Improves Experimental Hepatopulmonary Syndrome in Rats. *Liver International*, **32**, 1018-1026. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2012.02821.x>
- [2] Morrell, N.W., Adnot, S., Archer, S.L., Dupuis, J., Lloyd Jones, P., MacLean, M.R., *et al.* (2009) Cellular and Molecular Basis of Pulmonary Arterial Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, **54**, S20-S31. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.04.018>
- [3] 陈杨, 陈林, 杨勇, 等. 肝肺综合征大鼠血清诱导肺动脉平滑肌细胞增殖时 Talin1 和 F-actin 表达的变化[J]. 中华麻醉学杂志, 2019, 39(4): 471-474.
- [4] 国斌, 易斌, 徐顺贵, 等. 肝肺综合征大鼠血清对肺微血管内皮细胞 Akt 表达的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2010, 30(1): 75-78.
- [5] 王丽平, 李季声, 邓黎, 等. 高迁移率族蛋白 B1 对体外氧糖剥夺/复氧复糖后大鼠脊髓反应性星形胶质细胞不同亚型的作用[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(24): 3831-3837.
- [6] Alishahedani, M.E., Yadav, M., McCann, K.J., Gough, P., Castillo, C.R., Matriz, J., *et al.* (2021) Therapeutic Candidates for Keloid Scars Identified by Qualitative Review of Scratch Assay Research for Wound Healing. *PLOS ONE*, **16**, e0253669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253669>
- [7] Melo-Silva, C.A., Gaio, E., Trevizoli, J.E., Souza, C.S., Gonçalves, A.S., Sousa, G.C.C., *et al.* (2011) Respiratory Mechanics and Lung Tissue Remodeling in a Hepatopulmonary Syndrome Rat Model. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, **179**, 326-333. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2011.10.001>
- [8] Soto, X., Li, J., Lea, R., Dubaissi, E., Papalopulu, N. and Amaya, E. (2013) Inositol Kinase and Its Product Accelerate Wound Healing by Modulating Calcium Levels, Rho Gtpases, and F-Actin Assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**, 11029-11034. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217308110>
- [9] 应荣彪, 冯俊, 李建军, 等. α 、 β -微管蛋白在乳腺癌变不同阶段的表达及意义[J]. 中国癌症杂志, 2011, 21(8): 595-598.
- [10] Kuure, S., Cebrian, C., Machingo, Q., Lu, B.C., Chi, X., Hyink, D., *et al.* (2010) Actin Depolymerizing Factors Cofilin1 and Destrin Are Required for Ureteric Bud Branching Morphogenesis. *PLOS Genetics*, **6**, e1001176. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001176>
- [11] Zeng, J., Yi, B., Wang, Z., Ning, J., Wang, X. and Lu, K. (2013) Effect of Annexin A2 on Hepatopulmonary Syndrome Rat Serum-Induced Proliferation of Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, **185**, 332-338. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.09.009>