

桩蛋白调控肝肺综合征大鼠血清诱导PASMCs的增殖和迁移

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6月24日; 录用日期: 2025年7月18日; 发布日期: 2025年7月28日

摘 要

目的: 评价桩蛋白(Paxillin)在肝肺综合征(HPS)大鼠血清诱导肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)增殖和迁移中的作用。方法: 选取20只雄性Sprague-Dawley大鼠, 运用慢性胆总管结扎法构建HPS大鼠模型, 并采集腹主动脉血样制备血清。将培养的大鼠PASMCs分别接种于6孔板、24孔板和96孔板, 通过随机数字表法均分为2组: 对照组(C组)和HPS组。C组添加正常大鼠血清, HPS组加入HPS大鼠血清, 使两组血清终浓度均为5%。于细胞孵育24 h (T1)、48 h (T2)和72 h (T3), 采用RT-PCR法和Western blot法测定PASMCs内paxillin mRNA及其蛋白的表达水平; 运用³H-TdR法检测PASMCs的增殖水平, 借助Transwell小室(T1)及划痕实验(T1~T3)测定PASMCs的迁移水平。结果: 与C组相比, HPS组PASMCs的增殖和迁移能力显著增强($P < 0.05$); 且HPS组随着刺激时间的延长, paxillin mRNA及其蛋白表达呈现逐渐上调趋势($P < 0.05$)。结论: 在HPS大鼠血清刺激下, PASMCs中paxillin表达逐渐上调, 这可能在HPS相关的PASMCs异常增殖和迁移过程中发挥重要的调节作用。

关键词

肝肺综合征, 肺动脉平滑肌细胞, 桩蛋白

The Regulation of Paxillin on the Proliferation and Migration of PASMCs Induced by the Serum of Rats with HPS

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, The First Affiliated Hospital of 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. 桩蛋白调控肝肺综合征大鼠血清诱导 PASMCs 的增殖和迁移[J]. 临床医学进展, 2025, 15(7): 1678-1683. DOI: 10.12677/acm.2025.1572173

Abstract

Objective: To explore the mechanism of action of paxillin in the proliferation and migration of pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs) induced by the serum of rats with hepatopulmonary syndrome (HPS). **Methods:** Twenty male Sprague-Dawley rats were selected. The HPS rat model was established by chronic common bile duct ligation, and abdominal aortic blood was collected to prepare serum. The cultured rat PASMCs were seeded into 6-well, 24-well, and 96-well plates respectively, and randomly divided into a control group (Group C) and an HPS group using the random number table method. Group C was supplemented with normal rat serum, while the HPS group was added with HPS rat serum, with the final serum concentration adjusted to 5% in both groups. At the time points of 24 h (T1), 48 h (T2), and 72 h (T3) of cell incubation, RT-PCR and Western blot were used to determine the expression levels of paxillin mRNA and protein in PASMCs. The ³H-TdR method was employed to detect the proliferation level of PASMCs, and the Transwell chamber (T1) and scratch assay (T1~T3) were used to measure the migration level of PASMCs. **Results:** Compared with Group C, the proliferation and migration abilities of PASMCs in the HPS group were significantly enhanced ($P < 0.05$). In the HPS group, the expression of paxillin mRNA and protein showed a gradually increasing trend with the extension of the stimulation time ($P < 0.05$). **Conclusion:** Stimulation by the serum of HPS rats can gradually upregulate the expression of paxillin in PASMCs, which may play a crucial regulatory role in the abnormal proliferation and migration of PASMCs associated with HPS.

Keywords

Hepatopulmonary Syndrome, Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells, Paxillin

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)是以慢性肝病、肺内微血管扩张和低氧血症为主要特征的临床综合征[1]。低氧血症引发的肺内低氧环境促使肺动脉平滑肌细胞发生表型转换,从血管中膜迁移至内膜并大量增殖和迁移;同时,病肝释放的多种循环细胞因子经血液作用于 PASMCs,进一步加重其病理改变,这种肝源性肺血管重建是肝肺综合征的基本病理变化之一[2]。桩蛋白(Paxillin)是一种定位于黏着斑的磷酸蛋白,在多种细胞内的信号转导以及骨架蛋白与细胞外基质的联系中发挥“枢纽”作用[3]。本研究通过观察 HPS 大鼠血清诱导 PASMCs 增殖和迁移时 paxillin 的表达变化,深入探讨其在 HPS 相关肝源性肺血管重建中的作用机制。

2. 材料与方法

2.1. 主要实验材料和仪器

选用 20 只清洁级成年雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠,体重 220~250 g,由第三军医大学实验动物中心提供。实验材料包括:美国 PAA 公司的低糖 DMEM 培养基、美国 Hyclone 公司的 D.Hanks 液、英国

Abcam 公司的小鼠抗 F-actin 单克隆抗体、小鼠抗 α -tubulin 单克隆抗体、兔抗 Dextrin 单克隆抗体, 北京康为世纪生物科技有限公司的兔抗大鼠 GAPDH 一抗、HRP 标记羊抗兔二抗、HRP 标记大鼠抗小鼠二抗, 美国康宁公司的 Transwell 小室, 其余试剂均为国产分析纯。实验仪器有德国 Herseus 公司的二氧化碳恒温培养箱、美国 Alpha Innotech 公司的 Imager 凝胶成像分析系统等。

2.2. HPS 大鼠模型建立

取 30 只健康 SD 大鼠(雌雄不拘, 3~4 月龄, 体重 220~250 g, 购自第三军医大学实验动物中心), 参考文献[4], 采用慢性胆总管结扎法构建 HPS 模型。经腹腔注射 3%戊巴比妥钠(0.1 ml/100g)实施全身麻醉, 于剑突下沿腹白线作约 3 cm 切口进腹, 沿十二指肠暴露上段胆总管, 在近肝门处及近十二指肠处分别结扎胆总管, 随后剪断胆总管, 分层缝合关腹。术后 5 周, 采集 1 ml 腹主动脉血样进行动脉血气分析, 其余血样离心后收集血清, 处死大鼠并取肺组织, 经多聚甲醛固定后制作病理切片, 通过 HE 染色观察肺组织病理变化。以 $\text{PaO}_2 < 85 \text{ mmHg}$ 且肺泡-动脉血氧分压差 $> 18 \text{ mmHg}$, 同时伴有相应肺部病理改变作为 HPS 模型成功的判断标准。

2.3. 大鼠 PSMCs 培养及分组

依据文献[5]的组织块法对大鼠 PSMCs 进行原代培养, 并完成纯化鉴定。选取第 4~9 代 PSMCs 用于实验, 将细胞浓度调整为 5×10^5 个/mL 后, 接种于 6 孔板和 96 孔板。采用随机数字表法将其分为对照组(C 组)和 HPS 组, 每组 6 孔板含 18 孔、96 孔板含 30 孔。C 组添加正常大鼠血清, HPS 组加入 HPS 大鼠血清, 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, 分别在 24 h (T1)、48 h (T2)和 72 h (T3)三个时间点进行孵育。

2.4. RT-PCR 法检测 Paxillin mRNA 的表达

在 T1~T3 各时间点, 每组随机选取 6 孔板中的 3 孔, 使用 TRIzol Reagent 法提取总 RNA, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测确认无降解, 利用紫外分光光度计测定纯度并定量, 确保吸光度值(A_{260}/A_{280})比值在 1.85 左右。取 2 μg 总 RNA 进行逆转录, 随后各取 5 μl 逆转录产物进行 PCR。以 GAPDH 作为内参照, paxillin 上游引物: 5'-CCAAACGGCCAGTGTCTTG-3', 下游引物: 5'-GGAACCACTAGGCTGCCATT-3', 扩增片段长度为 167 bp; GAPDH 上游引物: 5'-TACGACAGTCCATGCCATCAC-3', 下游引物: 5'-TCCAC-CACCTGTGGCTGTA-3', 扩增片段长度为 493 bp。反应条件设定为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火 30 s (paxillin 退火温度 58 $^{\circ}\text{C}$, GAPDH 退火温度 56 $^{\circ}\text{C}$), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 共进行 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 结束后, 取 10 μl 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 借助 Imager 凝胶成像分析系统进行灰度扫描, 以 paxillin 吸光度值与 GAPDH 吸光度值的比值反映其表达水平。

2.5. Western-Blot 法检测 Paxillin 蛋白的表达

在 T1~T3 各时间点, 每组随机选取 6 孔板中的 3 孔, 加入蛋白裂解液(RIPA 裂解液), 在冰上裂解细胞。随后以 10,000 $\times g$ 离心 20 min, 取上清, 用紫外分光光度计(美国 PE 公司)进行蛋白定量。取 40 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 然后将蛋白以恒流 180 mA、电压上限 70 V、转膜时间 45 min 的条件电转印至 PVDF 膜。将 PVDF 膜浸入含 5%脱脂奶粉的溶液中封闭 2 h, 分别加入 1:1000 稀释的兔抗 paxillin 多克隆一抗(英国 Abcam 公司)、1:2000 稀释的兔抗大鼠 GAPDH 一抗(北京康为世纪生物科技有限公司), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。经 TBS 洗膜 3 次后, 加入 1:2000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔二抗(北京康为世纪生物科技有限公司), 室温孵育 2 h, 再次用 TBS 洗膜 3 次, 进行 DAB 显色。利用 Imager 凝胶成像分析系统进行灰度扫描, 以 paxillin 灰度值与 GAPDH 灰度值的比值反映其表达水平。

2.6. PSMCs 增殖水平的检测

采用氘-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)渗入法: 在 T1-T3 各时间点, 每组随机选取 96 孔板中的 5 孔(每孔 200 μl), 每孔加入 1μCi³H-TdR (北京原子能研究所), 培养 6 h 后, 弃去培养液, 用冷 PBS 液终止掺入。加入 0.25%胰酶消化细胞使其脱离孔壁, 使用多头细胞样品收集器将细胞收集至玻璃纤维膜上, 经生理盐水冲洗、10%三氯乙酸固定、无水乙醇脱色后, 于 80℃干烤 30 min, 放入闪烁液中, 通过液体闪烁计数仪测定放射性, 以 counts/min 表示 ³H-TdR 掺入率, 以此反映 PSMCs 的增殖水平。

2.7. PSMCs 迁移水平的检测

Transwell 小室[6]: 将孔径 8.0 μm 的 Transwell 小室插入 24 孔板, 上室部分不涂基底胶。将大鼠 PSMCs 接种于上室, 随机分为 C 组和 HPS 组, 分别用正常和 HPS 大鼠血清孵育细胞 24 小时。孵育结束后, 用棉签去除未穿过膜迁移至下室的细胞, 对下室表面细胞进行结晶紫染色, 在显微镜(ECLIPSETi-E)下以 200 倍放大倍数计数迁移到下室的细胞数量。划痕实验[7]: 将大鼠 PSMCs 接种于 6 孔板(每孔 1.50 × 10⁵ 个细胞)的玻璃盖玻片上, 待细胞生长至汇合状态。随机分为 C 组和 HPS 组, 血清剥夺 24 小时后, 通过可重复使用的模板去除每组盖玻片中间部分细胞以制造标准伤口, 分别用正常和 HPS 大鼠血清孵育两组细胞。在 24 h (T1)、48 h (T2)和 72 h (T3), 借助显微镜配备的十字线测量每组细胞迁移距离占初始距离(T0)的百分比(%)。

2.8. 统计学处理

运用 SPSS13.0 软件进行数据分析, 符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用成组 t 检验, 组内比较采用单因素方差分析, P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3. 结果

3.1. HPS 大鼠模型制备及肺组织病理改变

HPS 组 11 只大鼠符合模型制备成功标准; C 组 1 只大鼠因麻醉因素死亡。HPS 组形态学改变: 肺体积增大, 呈现充血、水肿状态。HPS 组肺组织病理学改变: 肺泡腔减小, 肺间隔增宽且细胞数增多, 以巨噬细胞为主; 与 C 组大鼠肺组织比较, HPS 组大鼠肺组织可见毛细血管显著扩张, 肺间质纤维组织增生明显。

Table 1. Comparison of the transcription and expression levels of paxillin, as well as the proliferation and migration of PSMCs (n = 4, $\bar{x} \pm s$)
表 1. Paxillin 转录及表达水平, 以及 PSMCs 增殖和迁移情况比较(n = 4, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	paxillin mRNA (%)	Paxillin 蛋白 (%)	PASMCs 增殖情况	PASMCs 迁移情况	
				³ H-TdR 渗入法 (cpm)	Transwell 小室 (个数)	划痕实验(%)
C 组	T1	35.3 ± 1.7	23.3 ± 1.2	6503.8 ± 319.0	23 ± 3	93.4 ± 4.2
	T2	37.6 ± 1.9	23.4 ± 0.9	7927.1 ± 150.1		69.0 ± 3.4
	T3	38.2 ± 0.8	25.5 ± 1.0	9223.9 ± 459.1		34.8 ± 4.6
HPS 组	T1	39.2 ± 0.6 ^a	38.6 ± 1.5 ^a	8739.7 ± 181.9 ^a	49 ± 8 [*]	60.9 ± 0.9 ^a
	T2	63.2 ± 1.4 ^{ab}	49.0 ± 1.4 ^{ab}	11096.6 ± 292.3 ^{ab}		30.9 ± 3.3 ^{ab}
	T3	75.2 ± 1.0 ^{abc}	65.6 ± 0.6 ^{abc}	13253.7 ± 1178.1 ^{abc}		4.9 ± 1.6 ^{abc}

与 C 组同时相点比较, ^aP < 0.05; 与 HPS 组 T1 比较, ^bP < 0.05; 与 HPS 组 T2 比较, ^cP < 0.05。

3.2. Paxillin 转录及表达水平, 以及 PSMCs 增殖和迁移情况

与 C 组相比, HPS 组 paxillin mRNA 及其蛋白表达水平显著上调($P < 0.05$); 且 HPS 组 paxillin mRNA 及其蛋白表达水平随着刺激时间的延长呈现逐渐上调趋势($P < 0.05$), 具体结果见表 1。与 C 组相比, HPS 组 PSMCs 的增殖和迁移能力显著增强($P < 0.05$); HPS 组 PSMCs 的增殖和迁移能力随着刺激时间的延长逐渐增强($P < 0.05$), 详见表 1。

4. 讨论

肝肺综合征是终末期肝病患者常见的临床综合征, 具有高死亡率和难治性特点, 深入研究其分子机制意义重大, 其中 PSMCs 异常增殖和迁移是 HPS 重要的病理改变。既往研究表明, 低氧等刺激因子可激活多条信号转导通路, 最终导致 PSMCs 异常增殖和迁移, 但信号转导通路复杂, 阻断单一通路难以有效遏制 HPS 的发展。我们前期研究发现, 低氧刺激下 PSMCs 中表型相关蛋白表达发生显著变化, 推测该变化可能由细胞骨架重组引发, 是 PSMCs 异常增殖和迁移的上游环节[8]。

本研究结果显示, HPS 大鼠血清可诱导 PSMCs 增殖和迁移水平显著增强, 同时 paxillin mRNA 及蛋白表达水平上调; 并且随着刺激时间的延长, PSMCs 迁移水平和 paxillin mRNA 及蛋白表达水平持续上升, 提示 HPS 大鼠血清可能通过上调桩蛋白的表达, 进一步诱导 PSMCs 的异常增殖和迁移。

桩蛋白是细胞骨架上的磷酸蛋白, 分子量 68~70 kD, 定位于黏着斑。其结构包含 LD、LIM、SH3 及 SH2 等多种结构域, 广泛存在于肝脏、肺脏等多种器官组织中, 在多种细胞生物学功能调节中发挥重要作用, 包括介导蛋白间相互作用、促进黏着斑激酶(FAK)磷酸化、作为接头蛋白促使骨架蛋白与适配器蛋白形成黏着斑复合物等[9]。有研究报道[10], 食管癌组织中 paxillin 的表达明显上调; Veith C.等[11]的研究表明, paxillin 可促使 FAK 磷酸化激活, 进而调节 PSMCs 的黏附、增殖和迁移。Paxillin 作为黏着斑复合物的关键成分, 对骨架蛋白和细胞外基质的连接起重要调节作用, 与细胞骨架重组密切相关[12]。因此, paxillin 可能通过调节细胞骨架蛋白的表达, 促使细胞骨架重组, 使细胞转变为合成表型, 最终导致 PSMCs 异常增殖和迁移。

综上所述, HPS 大鼠血清诱导 PSMCs 增殖和迁移时, 桩蛋白表达上调, 这一变化可能是 HPS 相关肝源性肺血管重建的重要机制之一。

基金项目

重庆市自然科学基金项目(CSTB2022NSCQ-MSX0218); 重庆市科卫联合面上项目(2025MSXM012)。

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] Dubrovskiy, O., Tian, X., Poroyko, V., Yakubov, B., Birukova, A.A. and Birukov, K.G. (2012) Identification of Paxillin Domains Interacting with β -Catenin. *FEBS Letters*, **586**, 2294-2299. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.06.016>
- [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] Luo, C., Yi, B., Bai, L., Xia, Y., Wang, G., Qian, G., *et al.* (2010) Suppression of Akt1 Phosphorylation by Adenoviral Transfer of the PTEN Gene Inhibits Hypoxia-Induced Proliferation of Rat Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **397**, 486-492. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.05.140>
- [6] Hertzog, J. and Rehwinkel, J. (2023) A Simple Transwell-Based Infection System for Obtaining Pure Populations of

- VZV-Infected Cells. *Journal of Virological Methods*, **312**, Article ID: 114661. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2022.114661>
- [7] 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.
- [8] Yi, B., Cui, J., Ning, J., Wang, G., Qian, G. and Lu, K. (2012) Over-Expression of PKGI α Inhibits Hypoxia-Induced Proliferation, Akt Activation, and Phenotype Modulation of Human PASMCs: The Role of Phenotype Modulation of PASMCs in Pulmonary Vascular Remodeling. *Gene*, **492**, 354-360. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.11.010>
- [9] Schaller, M.D. (2001) Paxillin: A Focal Adhesion-Associated Adaptor Protein. *Oncogene*, **20**, 6459-6472. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204786>
- [10] Chen, D., Wang, D., Wu, W., Zeng, Z., Luo, H., Qiu, M., *et al.* (2012) Overexpression of Paxillin Induced by miR-137 Suppression Promotes Tumor Progression and Metastasis in Colorectal Cancer. *Carcinogenesis*, **34**, 803-811. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs400>
- [11] Veith, C., Marsh, L.M., Wygrecka, M., Rutschmann, K., Seeger, W., Weissmann, N., *et al.* (2012) Paxillin Regulates Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cell Function in Pulmonary Hypertension. *The American Journal of Pathology*, **181**, 1621-1633. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.07.026>
- [12] Kim, M.S., Yoo, N.J. and Lee, S.H. (2011) Absence of Paxillin Gene Mutation in Lung Cancer and Other Common Solid Cancers. *Tumori Journal*, **97**, 211-213. <https://doi.org/10.1177/030089161109700213>