DOI:10.16016/j.2097-0927.202305047

siRNA 沉默 α-TAT1 对肝肺综合征中内皮细胞迁移行为的影响

刘 畅[1,2],朱佳熙[1],刘亚楠[1],徐 木[1],陈璟莉[1] 431600 武汉,华中科技大学同济医学院附属武汉市中心医院麻醉科[1];431600 武汉,湖北省分子诊断重点实验室[2]

[摘要] **目的** 探究 siRNA 沉默微管乙酰化转移酶 1(alpha tubulin acetyltransferase 1,α-TAT1)对肝肺综合征(hepatopulmonary syndrome, HPS)中内皮细胞迁移行为的影响。**方法** 通过在线数据库 Tabula Muris 分析肺组织各细胞亚群 α-TAT1 的表达。24 只雄性 SD 大鼠按照随机数字表法分为对照组(Sham 组,$n=6$)、胆管结扎组(HPS 组,$n=18$)。造模后在第 2、4 周分别取材 HPS 组大鼠,通过免疫荧光共定位检测 2 周和 4 周 HPS 大鼠肺血管内皮细胞中 α-TAT1 表达水平变化。收集 Sham 和 HPS 大鼠血清处理人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVECs) 12 h 和 24 h,之后进行小分子 RNA(small interfering RNA, siRNA)干扰实验,分为 Sham 血清+siRNA NC 组、Sham 血清+siRNA α-TAT1 组、HPS 血清+siRNA NC 组、HPS 血清+siRNA α-TAT1 组。Western blot 检测各组 HUVECs 中 α-TAT1、Ace-α-tubulin 表达水平变化。免疫荧光观察各组诺考达唑(10 μmol/L)预处理后 HUVECs 中 α-Tubulin 微管聚合水平,评估微管的结构稳定性;细胞划痕实验联合细胞免疫荧光观察 HUVECs 的细胞迁移能力和高尔基体的定位。体外成血管实验检测 HUVECs 成血管能力。**结果** 体内及体外实验表明 HPS 中肺血管内皮细胞 α-TAT1 表达显著增加($P<0.01$)。siRNA α-TAT1 干扰组中 α-TAT1 和 Ace-α-tubulin 表达量均显著下调,且微管稳定性减弱($P<0.01$)。另外,siRNA α-TAT1 干扰组中 GM130 标记的高尔基体在核周细胞突出段方向的分布比例降低,且迁移能力下降($P<0.01$)。同时,成血管长度及网络水平显著减弱($P<0.01$)。**结论** 沉默 α-TAT1 可减弱 HPS 中内皮细胞迁移和成血管能力,其机制与减弱微管稳定性有关。

[关键词] 肝肺综合征;内皮细胞;病理性血管新生;α-TAT1;迁移极性
[中图法分类号] R322.12; R394.3; R575 [文献标志码] A

Effect of siRNA-mediated α-TAT1 gene silencing on migration behavior of endothelial cells in rats with hepatopulmonary syndrome

LIU Chang[1,2], ZHU Jiaxi[1], LIU Yanan[1], XU Mu[1], CHEN Jingli[1] [1]Department of Anesthesiology, Wuhan Central Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei Province, 431600; [2]Hubei Provincial Key Laboratory of Molecular Diagnosis, Wuhan, Hubei Province, 431600, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of silencing alpha tubulin acetyltransferase 1 (α-TAT1) on migration behavior of endothelial cells induced by hepatopulmonary syndrome (HPS). **Methods** Online database Tabula Muris was used to analyze the expression of α-TAT1 in various cell subsets in the lungs. Twenty-four male SD rats were randomly divided into control group (Sham group, $n=6$) and common bile duct ligation group (HPS group, $n=18$). The rats in HPS group were euthanasized at 2 and 4 weeks after modelling, and then the expression of α-TAT1 in pulmonary vascular endothelial cells was detected by immunofluorescence colocalization. The sera from the Sham and HPS rats were used to stimulate human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) for 12 and 24 h, respectively. Then the obtained HUVECs were

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(82000584)
[通信作者] 陈璟莉,E-mail: chenjinli2001@sina.com

2097-0927/Copyright © 2024, 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/)

divided into 4 groups: Sham serum + siRNA NC group, Sham serum + siRNA α-TAT1 group, HPS serum+ siRNA NC group, HPS serum + siRNA α-TAT1 group. The expression levels of α-TAT1 and Ace-α-tubulin in HUVECs were detected by Western blotting. Immunofluorescence assay was applied to observe the levels of polymerized microtubules of α-Tubulin in HUVECs after nocodazole (10 μmol/L) pretreatment to evaluate the stability of microtubule structure. Cell scratch assay combined with cell immunofluorescence assay was employed to observe the nuclear localization of Golgi apparatus and cell migration ability of HUVECs. The angiogenesis ability of HUVECs was tested by *in vitro* angiogenesis test. **Results** *In vivo* and *in vitro* experiments showed that the expression of α-TAT1 in endothelial cells was significantly increased after HPS inducement. The expression levels of α-TAT1 and Ace-α-tubulin were significantly down-regulated, and the stability of microtubules was weakened in the siRNA α-TAT1 interference group ($P<0.01$). In addition, the distribution of GM130 labeled Golgi apparatus in the protrusion of HUVECs was down-regulated in the siRNA α-TAT1 interference group, as well as the migration ability ($P<0.01$). And the length of angiogenesis and network level were also significantly declined ($P<0.01$). **Conclusion** Silencing α-TAT1 reduces the migration and angiogenesis of endothelial cells in HPS, which was associated with weakened stabilization of microtubule.

[**Key words**] hepatopulmonary syndrome; endothelial cells; pathological angiogenesis; α-TAT1; polarity of migration

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (82000584). Corresponding author: CHEN Jinli, E-mail: chenjinli2001@sina.com

肝肺综合征(hepatopulmonary syndrome, HPS)是在慢性肝病基础上出现的晚期肺部并发症,主要表现为肺微血管扩张、动静脉分流、病理性肺血管新生(pathological pulmonary angiogenesis, PPA),进而导致肺部血氧困难,造成患者出现严重的低氧血症,临床预后极差[1-2]。其中,慢性肝硬化导致的病理性因子大量释放入血作用于肺脏组织是 PPA 的主要因素,机制不清,亟待研究[3-5]。探讨其血管新生发生机制,探寻有效的干预靶点,采用有效的药物或者干预措施减少 PPA 的进展,可能是减轻 HPS 患者缺氧症状的有效策略。

血管新生过程需要依赖内皮细胞的群体迁移,即内皮细胞群相互协调朝着一致的方向做集体迁移[6-7]。细胞迁移通常始于对细胞外刺激的响应,而细胞极性形成是迁移的结构基础,迁移细胞被高度极化表现为信号分子、细胞骨架、中心体、高尔基体和膜定向运输的不对称分布,随即产生细胞突触端。细胞在突出端引导下沿着迁移方向进行动态伸展,其分子机制尚不清楚。α-TAT1, 又称微管乙酰化转移酶 1 (alpha tubulin acetyltransferase 1, α-TAT1),通过对微管 K40 位点进行乙酰化修饰,增加对生物机械应力的抵抗力,促进聚合微管的稳定性[8]。有研究报道显示,小鼠水平敲除 α-TAT1 后可减弱神经发育过程中皮质神经元的迁移能力,表明 α-TAT1 在迁移过程中发挥重要作用[9]。前期的研究过程中,我们发现 HPS 血清能显著刺激内皮细胞的迁移能力[10],然而,α-TAT1 在 PPA 中的具体作用机制仍不清楚。因此本研究拟采用 siRNA 干扰沉默 α-TAT1, 观察内皮细胞在 HPS 血清刺激下迁移极性和成血管能力的变化,明确 α-TAT1 是 HPS 中 PPA 发生发展的关键分子。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物为雄性健康 SD 大鼠,8 周龄,体质量 200~220 g,购于宜昌三峡大学动物中心,大鼠饲养为 SPF 级,室温维持在 24~26 ℃,可自由摄食和饮水。本实验获得华中科技大学动物伦理委员会批准(2020 年),所有操作都遵循《实验动物保护条例》。

1.2 主要试剂

α-TAT1 兔来源单克隆抗体购于美国 Invitrogen 公司;Ace-α-tubulin 兔来源单克隆抗体购于美国 Abcam 公司;CD31 小鼠来源单克隆抗体购于美国 CST 公司;GM130 兔来源单克隆抗体购于美国 CST 公司;Tubulin 兔来源多克隆抗体、Alexa-Fluor 488 驴抗兔 IgG 和 Alexa-Fluor 555 驴抗小鼠 IgG 购于广州碧云天生物科技有限公司;Matrigengel 购于上海 ABW 公司;HRP 标记辣根过氧化物酶二抗、Western blot 试剂盒购于武汉赛维尔生物公司;诺考达唑购于美国 MedChemexpress 公司;α-TAT1-siRNA、siRNA NC 购于广州锐博生物技

术有限公司。

1.3 大鼠胆总管结扎模型(common bile duct ligation, CBDL)

HPS 动物模型采用 CBDL 法构建,大鼠模型构建前 1 d 晚上进行禁食,次日实验中 2%~3%七氟烷进行吸入麻醉。麻醉起效后,腹部皮肤消毒铺巾,无菌手术器械暴露腹腔,寻找十二指肠,游离胆总管,随后用 3-0 不可吸收线结扎肝门部和十二指肠部胆总管,并剪断两结扎点之间的胆总管,假手术组(Sham 组)大鼠只进行胆总管游离。随后肠道还纳,注入青霉素 80 万单位,进行关腹。手术结束后将大鼠放置电温毯上,等待自然苏醒,按计划继续饲养 2 周或 4 周。

1.4 大鼠血清收集

Sham 和 HPS 大鼠分别采用七氟烷麻醉后,腹部皮肤碘伏消毒,无菌手术器械暴露腹腔,寻找游离腹主动脉,22G 采血针置入动脉管腔,收集血液,即刻进行动脉血气分析,其余血液 4 ℃过夜,直至血清充分析出,离心 10 min(3 000 r/min)后取上清液,-80 ℃保存备用。

1.5 HE 染色观察肺组织形态

肺组织固定 24 h 后石蜡包埋,厚度 10 μm, 进行 HE 染色,光镜下观察拍照,并进行分析。

1.6 公开数据库和在线分析网站

α-TAT1 相关单细胞转录组数据来源于 Tabula Muris 网站。使用在线分析网站(https://tabula-muris.ds.czbiohub.org/)下载肺组织数据集进行基因表达分析。

1.7 细胞培养及转染

复苏 HUVECs 细胞,用 ECM 培养液, 内含 1%内皮细胞生长因子、1%双抗和 10%的胎牛血清,37 ℃、5% CO_2恒温培养。收集对数生长期的 HUVECs 细胞并接种于 6 孔板(Western blot 实验)或者放置有细胞爬片的 12 孔培养板(细胞免疫荧光实验)中,继续培养待贴壁细胞长满底部面积的 50%~60%时进行转染。细胞分为 4 组: Sham 血清+siRNA NC 组、Sham 血清+siRNA α-TAT1 组、HPS 血清+siRNA NC 组、HPS 血清+siRNA α-TAT1 组。siRNA 转染操作严格按试剂盒说明书进行,其中转染效率检测分组为 siRNA 对照组(S-NC)、1 号 α-TAT1 干扰 RNA(S-1#)、2 号 α-TAT1 干扰 RNA(S-2#)、3 号 α-TAT1 干扰 RNA(S-3#)。转染结束后继续恒温培养 6 h,更换培养基并继续培养。细胞转染后 48 h 进行后续实验,包括划痕实验、高尔基体定位分析、体外成血管实验。

1.8 细胞划痕实验

待 HUVECs 融合度达到 100%,取 200 μL TIP 头垂直于细胞平面,在细胞层面上进行划痕,无菌 PBS 洗细胞 3 次,更换新鲜含 1%血清培养基。将细胞放入 37 ℃ 5% CO_2 培养箱培养。24 h 取出细胞,显微镜下观察并拍照。使用 Image J 软件打开图片后,随机划取 6~8 条水平线,计算细胞间距离的均值。迁移率=(初始时间点细胞两侧平均距离-终点细胞两侧平均距离)/初始时间点细胞两侧平均距离。

1.9 免疫荧光染色

组织免疫荧光:Sham 组大鼠和 HPS 组大鼠麻醉后经左心灌流,4 ℃预冷的 PBS 冲净循环血液,之后 4%多聚甲醛进行灌流直至大鼠四肢僵硬,肺脏颜色透明,取出肺脏,继续浸泡在 4%多聚甲醛进行外固定 24 h,蔗糖梯度脱水后进行冰冻切片。切片在室温下使用 0.5% Triton X-100 和 10%山羊血清进行破膜和封闭处理,兔抗大鼠 α-TAT1 (1∶200)和小鼠抗大鼠 CD31(1∶200)一抗 4 ℃孵育过夜。次日切片用 PBS 洗涤 3 次,Alexa-Fluor 488 共轭驴抗兔 IgG 和 Alexa-Fluor 555 共轭驴抗小鼠 IgG 混匀后在 37 ℃下孵育 1 h,再用 DAPI 染色 5 min。使用荧光显微镜采集图像,分析 CD31 阳性细胞中 α-TAT1 的荧光强度。

细胞免疫荧光:取出 12 孔板,吸去培养基,PBS 清洗 3 次,进行破膜和封闭处理,兔抗人 α-Tubulin 或兔抗人 GM130 一抗 4 ℃孵育过夜,次日吸去一抗,PBS 清洗 3 次,Cy3 共轭驴抗兔 IgG 或 Alexa-Fluor 555 共轭驴抗兔 IgG 混匀后在 37 ℃下孵育 1 h 进行荧光二抗染色 1 h,PBS 清洗 3 次, DAPI 复染, 取出细胞爬片进行封片,荧光显微镜下进行观察拍照。

1.10 Western blot 检测

细胞实验中去除各组培养基,每孔加入 150 μL RIPA 蛋白裂解液(含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂),置于冰上裂解 30 min, 高速离心取上清液,取得细胞总蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,调整蛋白浓度后,按照每孔 20 μg 蛋白上样,电泳结束后转到 PVDF 膜上,5%BSA 封闭后用相应的一抗、二抗孵育,PBST 清洗后 ECL 显影拍照。通过 Image J 软件分析各组条带灰度值,并进行统计分析。

1.11 微管稳定性测试

12 孔板中细胞转染 48 h,之后各组条件下继续培养 22 h,加入诺考达唑 10 μmol/L(微管聚合抑制剂)处理, 培养 2 h,收集细胞爬片进行细胞免疫荧光染色(α-Tubulin 一抗,1∶500;Cy3 标记荧光二抗,1∶500),封片后荧光显微镜下观察聚合微管的强度变化。

1.12 高尔基体核周定位分析

细胞划痕后继续在各组条件下培养 24 h, 多聚甲醛固定细胞,之后通过细胞免疫荧光观察高尔基体(GM130 一抗,1∶400;Alexa-Fluor 555 标记荧光二抗,

1∶500)在细胞核周的分布状态,以细胞核为中心,以细胞迁移方向为基准,高尔基体主体在细胞突出端120°范围内视为具备迁移极性,之后统计划痕处第1排细胞中迁移极性阳性细胞的百分比,以此反映细胞迁移极性的水平。阳性细胞百分比越高,细胞迁移极性越强。

1.13　体外成血管实验

将提前解冻的Matrigengel用预冷枪头混匀,冰上操作,EP管提前预冷,12孔板提前预冷,每孔加入200 μL基质胶,在37 ℃孵箱放置30 min进行基质胶固化。将提前进行细胞转染的HUVECs消化,制成悬液,每孔加入5×10^5个细胞,37 ℃孵箱孵育,6 h后镜下观察并拍照。采用Image J中Angiogenesis Analyzer插件对成管长度、成环数量结果进行统计分析。

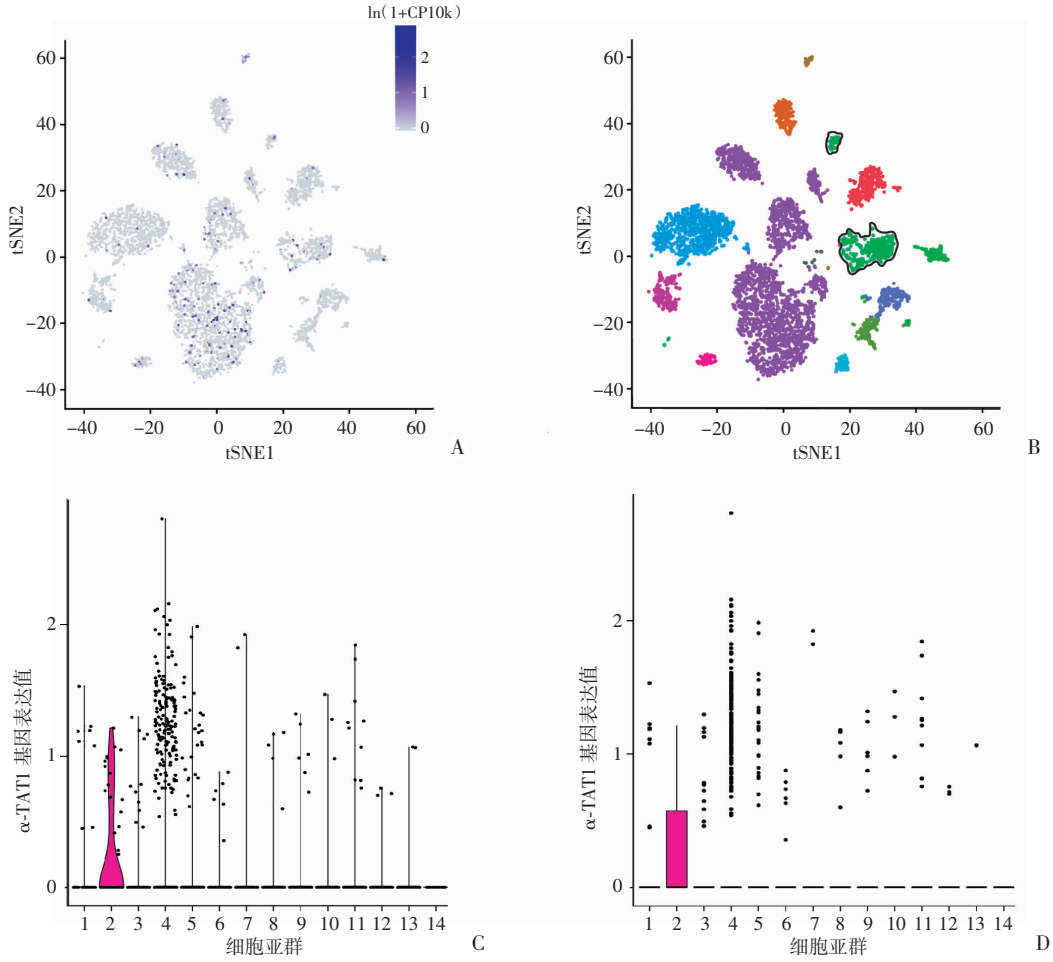
1.14　统计学分析

采用GraphPad Prism 6.0软件进行分析,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,多组间比较用单因素方差分析,$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　α-TAT1在小鼠肺血管内皮细胞中低表达

为了明确在正常肺组织中血管内皮细胞α-TAT1的表达情况,通过Tabula在线数据库分析α-TAT1基因在小鼠肺组织各细胞亚群中的表达水平。如图1所示,α-TAT1表达阳性细胞数在肺组织中各类细胞中整体占比较低,包括支气管纤毛柱状上皮、基质细胞、肺泡上皮细胞、肺血管内皮细胞等,其中α-TAT1表达阳性细胞占内皮细胞总数约5.63%(图1A、B)。分析α-TAT1基因在肺组织各细胞亚群中的相对表达值发现,α-TAT1在支气管纤毛柱状细胞中表达值最高,而肺血管内皮细胞表达值较低(图1C、D)。以上结果在一定程度上提示,在血管静息状态下肺血管内皮细胞中α-TAT1呈低表达状态。



1:NA细胞;2:支气管纤毛柱状细胞;3:2型肺泡细胞;4:基质细胞;5:内皮细胞;6:骨髓细胞;7:白细胞;8:B淋巴细胞;9:肺泡巨噬细胞;10:T淋巴细胞;11:自然杀伤细胞;12:经典单核细胞;13:非经典单核细胞;14:肥大细胞
A:α-TAT1基因在各亚群细胞中的表达;B:α-TAT1在肺组织各亚群细胞中的分类;C:α-TAT1基因在各亚群细胞中的表达小提琴统计;D:α-TAT1基因在各亚群细胞中的表达箱形统计

图1　单细胞测序结果分析α-TAT1基因在小鼠肺组织各细胞亚群中的表达水平和相对表达值

2.2　HPS 模型的构建

本研究采用经典的 CBDL 法构建 HPS 模型。肺 HE 染色结果提示,相比 Sham 组,2 周 HPS 组可见肺泡间隔增厚,肺泡间隔内可见炎症细胞浸润,部分肺泡间隔断裂。4 周 HPS 组肺泡间隔增宽,挤压部分肺泡腔,肺泡间隔断裂,肺泡腔和肺泡间隔均可见大量炎症细胞浸润。动脉血气分析结果提示,2 周 HPS 和 4 周 HPS 后血氧分压(PaO_2)显著下降($P<0.01$),表明大鼠出现低氧血症,以上结果提示 HPS 建模成功(图 2)。

2.3　HPS 大鼠肺血管内皮细胞中 α-TAT1 的表达增高

在体的免疫荧光共定位结果表明,相比 Sham 组,2 周和 4 周 HPS 组中 CD31 阳性内皮细胞中 α-TAT1 的表达量显著增加,呈时间依赖性增高($P<0.01$,图 3A)。采用体外细胞模型,配制含 10% Sham 血清和 10% HPS 血清的 ECM 培养基分别添加到 HUVECs 中培养 0、12、24 h(图 3B)。Western blot 结果显示,相比 Sham 组,HPS 组血清可以促进 HUVECs 中 α-TAT1 表达,且呈时间依赖性增高($P<0.01$,图 3C)。结果提示内皮细胞中 α-TAT1 在 HPS 病理刺激下表达水平增高,可能是 HPS 病理性血管新生中诱导肺内皮细胞迁移的重要因素。

2.4　沉默 α-TAT1 可降低 HPS 血清刺激下 HUVECs 的微管乙酰化水平和微管的稳定性

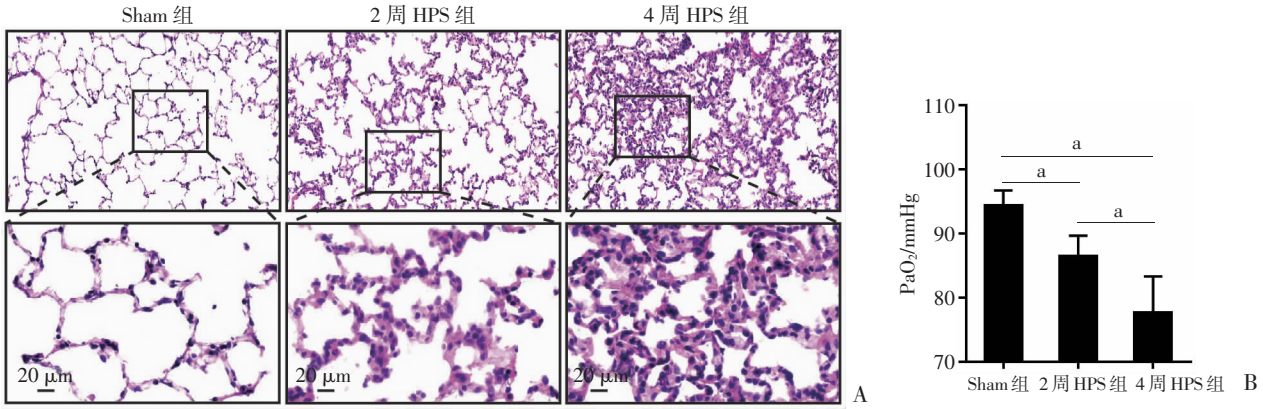
为了验证 α-TAT1 是否能影响 HPS 血清诱导的 HUVECs 迁移增强效应,采用 siRNA 方式敲低 α-TAT1 的表达水平来观察迁移能力变化。siRNA 转染 48 h 后进行 Western blot 实验,结果显示:与 siRNA NC 组相比,siRNA α-TAT1 1#、siRNA α-TAT1 2#组中蛋白下调不明显,siRNA α-TAT1 3#组下调显著($P<0.01$),因此选用 siRNA α-TAT1 3#进行下一步实验(图 4A)。之后采用 Western blot 检测 Ace-α-tubulin 表达变化,结果提示,HPS 血清刺激下,相比 siRNA NC 组,siRNA α-TAT1 组中 Ace-α-tubulin 表达水平显著下降($P<0.01$),表明微管乙酰化水平降低(图 4B)。同时采用诺考达唑预处理,检测各组中微管聚合水平,结果显示,HPS 血清刺激下,相比 siRNA NC 组,siRNA α-TAT1 组中聚合微管水平减弱($P<0.01$),提示稳定性显著下降(图 5)。以上结果表明 α-TAT1 基因的沉默有效性,且能降低 HUVECs 的微管乙酰化水平和微管的稳定性。

2.5　沉默 α-TAT1 可降低 HPS 血清刺激下 HUVECs 的迁移极性和迁移能力

由于细胞划痕可以诱导划痕处的细胞具有迁移的空间和能力,因此采用细胞免疫荧光和细胞划痕的方法分析划痕处细胞的迁移极性等生物学行为。结果提示,在 HPS 刺激下,相比 siRNA NC 组,siRNA α-TAT1 组内皮细胞中高尔基体分布于核周突出端的阳性比例由 70.6% 下降到 32.1%,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 6)。同时采用划痕实验检测迁移能力,结果表明,siRNA α-TAT1 组内皮细胞迁移率下降,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 7)。

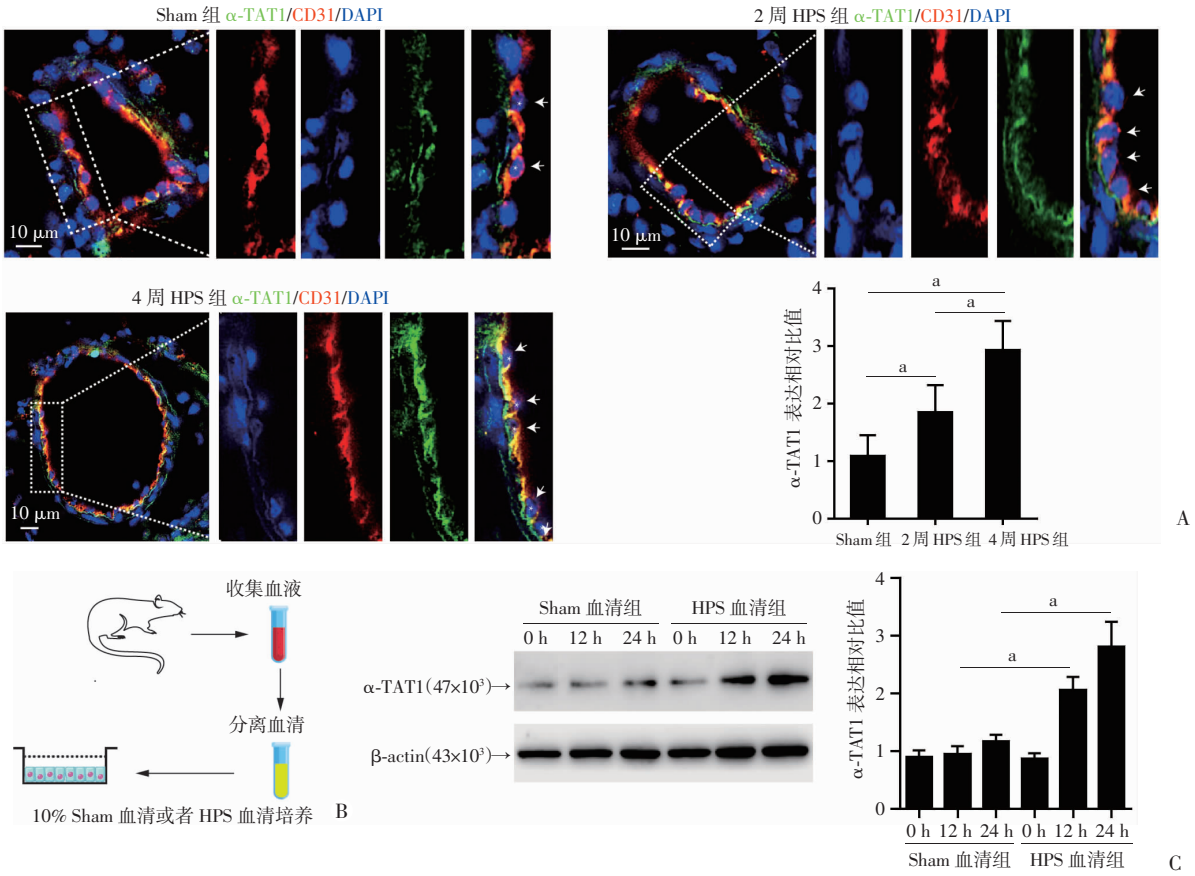
2.6　沉默 α-TAT1 可抑制 HPS 血清刺激下 HUVECs 的成血管能力

采用体外成管实验检测内皮细胞成血管能力变化,结果提示,在 HPS 刺激下,相比 siRNA NC 组,siRNA α-TAT1 组中 HUVECs 成管长度和数量均显著下降,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 8)。



A:各组大鼠肺 HE 染色;B:各组大鼠氧分压情况　a:$P<0.01$

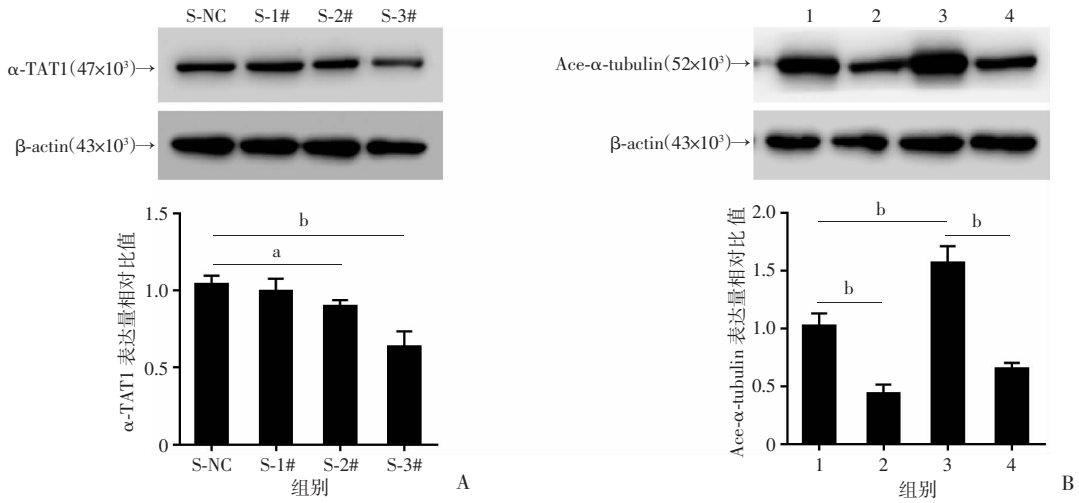
图 2　HPS 大鼠不同时期肺组织的病理变化($\bar{x}\pm s$)



a: $P<0.01$

A:免疫荧光检测 Sham、2 周 HPS 和 4 周 HPS 组大鼠肺血管内皮细胞中 α-TAT1 的表达,箭头示内皮细胞;B:体外模型中大鼠血清刺激实验示意图;C:Western blot 检测 Sham 大鼠血清和 4 周 HPS 大鼠血清刺激对 HUVECs 中 α-TAT1 表达的影响

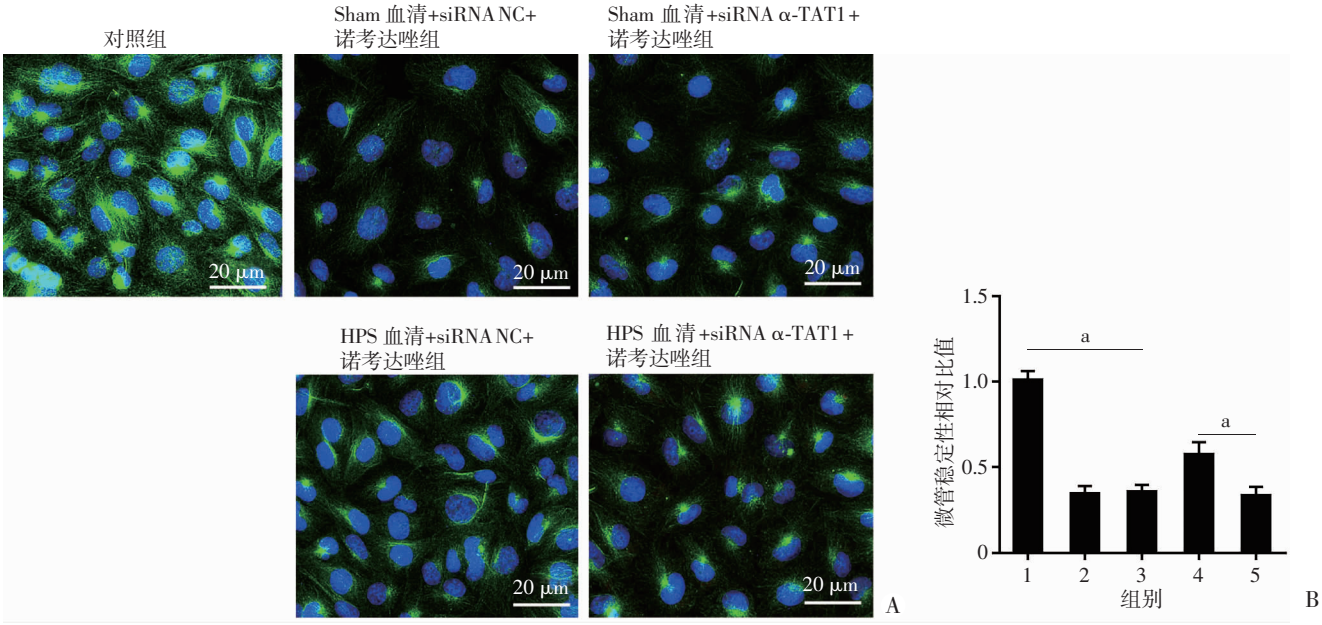
图 3 HPS 大鼠肺血管内皮细胞中 α-TAT1 的表达($n=3,\bar{x}\pm s$)



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$

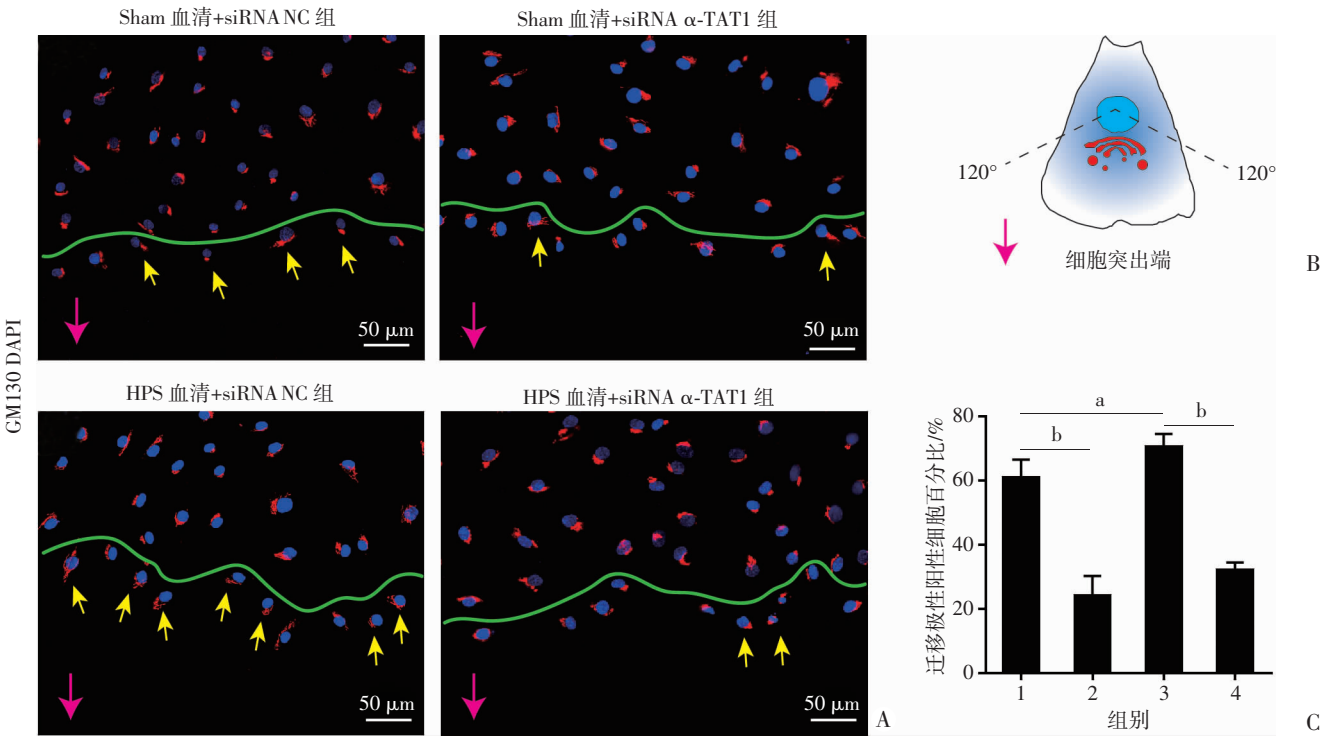
A: Western blot 检测不同 siRNA α-TAT1 在 HUVECs 中的沉默效率 S-NC: si-RNA 对照组;S-1#: 1 号 α-TAT1 干扰 RNA;S-2#: 2 号 α-TAT1 干扰 RNA;S-3#: 3 号 α-TAT1 干扰 RNA;B: Western blot 检测 siRNA α-TAT1 干预后 HUVECs 中微管乙酰化的表达水平 1:Sham 血清+siRNA NC 组;2:Sham 血清+siRNA α-TAT1 组; 3: HPS 血清+siRNA NC 组;4: HPS 血清+siRNA α-TAT1 组

图 4 沉默 α-TAT1 对 HPS 中内皮细胞微管乙酰化的影响($n=3,\bar{x}\pm s$)



A:细胞免疫荧光检测各组中 HUVECs 在诺考达唑处理后微管聚合水平; B:微管稳定性分析 1: 对照组; 2: Sham 血清+siRNA NC+诺考达唑组;3:Sham 血清+siRNA α-TAT1+诺考达唑组; 4: HPS 血清+siRNA NC+诺考达唑组; 5: HPS 血清+siRNA α-TAT1+诺考达唑组; a :$P<0.01$

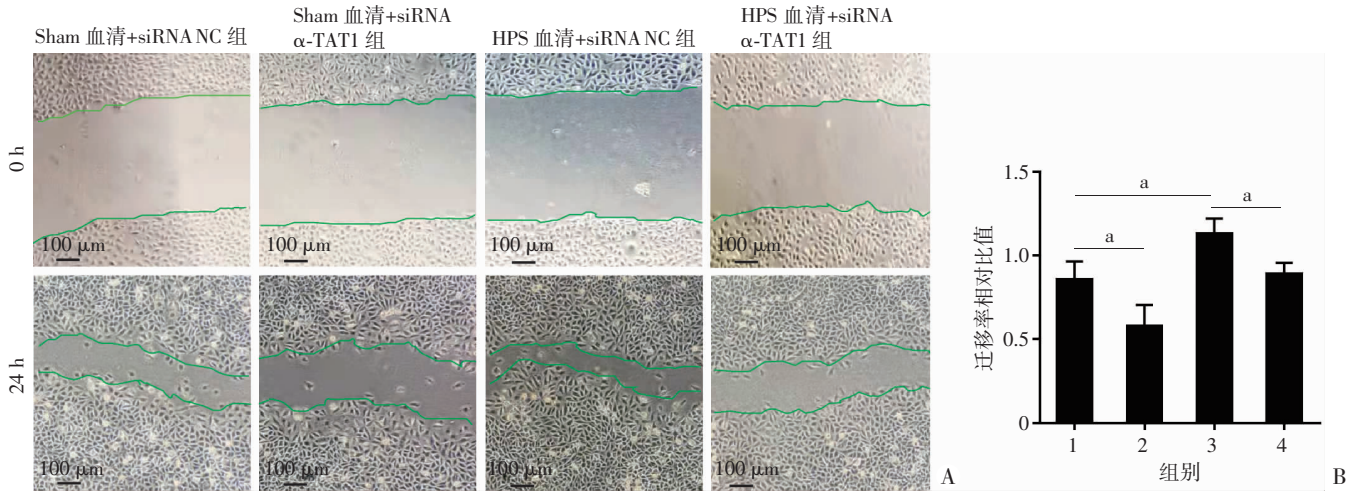
图 5 沉默 α-TAT1 对 HPS 中内皮细胞微管稳定性的影响($n=3,\bar{x}\pm s$)



1:Sham 血清+siRNA NC 组;2:Sham 血清+siRNA α-TAT1 组; 3: HPS 血清+siRNA NC 组; 4: HPS 血清+siRNA α-TAT1 组; 黄色箭头:迁移极性阳性细胞;粉色箭头:细胞迁移方向;绿色分界线:细胞划痕处第一排细胞分界线;a: $P<0.05$, b: $P<0.01$

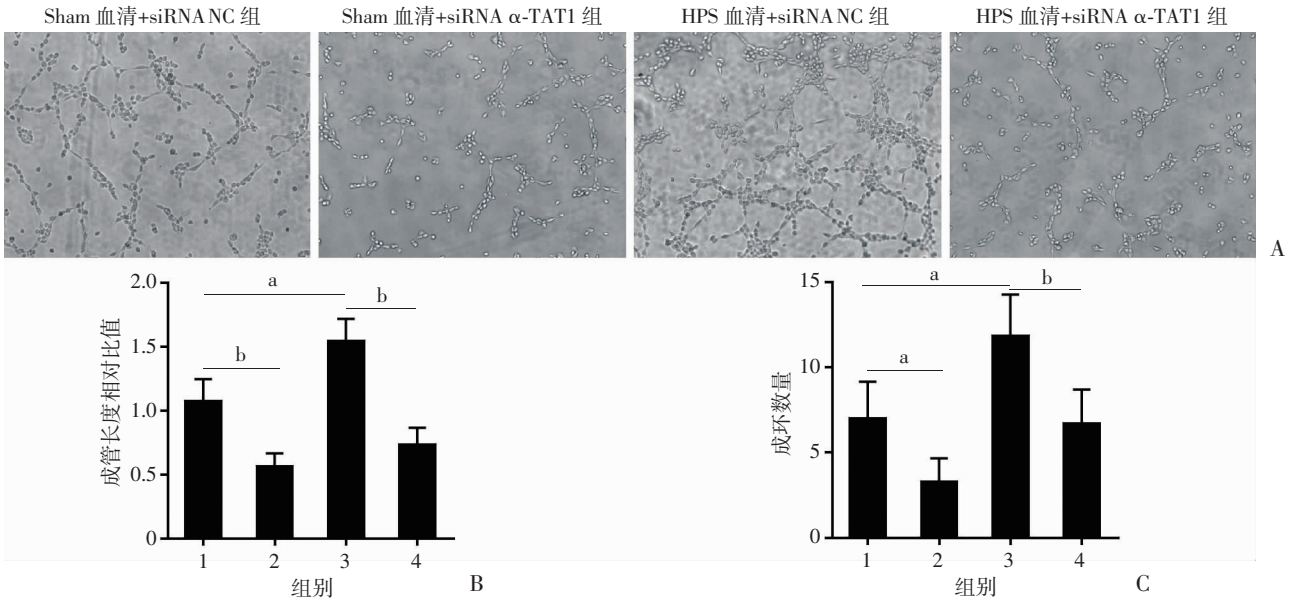
A: 细胞免疫荧光检测各组 HUVECs 中 GM130 在核周分布情况;B: 高尔基体分布示意图,高尔基体主体在细胞突出端 120°范围内视为具备迁移极性;C:细胞划痕处第一排 HUVECs 具有迁移极性的细胞百分比统计

图 6 沉默 α-TAT1 对 HPS 血清刺激下 HUVECs 的迁移极性影响($n=5,\bar{x}\pm s$)



A：细胞划痕实验结果；B：细胞迁移率　1：Sham 血清+siRNA NC 组；2：Sham 血清+siRNA α-TAT1 组；3：HPS 血清+siRNA NC 组；4：HPS 血清+siRNA α-TAT1 组；a：$P<0.01$

图 7　沉默 α-TAT1 对 HPS 血清刺激下 HUVECs 迁移能力的影响（$n=11$，$\bar{x}\pm s$）



1：Sham 血清+siRNA NC 组；2：Sham 血清+siRNA α-TAT1 组；3：HPS 血清+siRNA NC 组；4：HPS 血清+siRNA α-TAT1 组；a：$P<0.05$，b：$P<0.01$

A：各组成管实验结果（×100）；B：各组成管长度相对比值；C：各组成环数量

图 8　沉默 α-TAT1 对 HPS 血清刺激下 HUVECs 成血管能力的影响（$n=7$，$\bar{x}\pm s$）

3　讨论

本课题前期研究发现肺微血管内皮细胞（pulmonary microvascular endothelial cells，PMVECs）在 HPS 血清刺激下迁移能力显著加强，与 COX-2、PTEN、CDC42 的异常表达及激活有关[10-11]。无论是单一或者集体模式的细胞迁移，细胞都会产生移动极性，其特征是蛋白质、细胞器和脂质的不对称分布和形状，以及细胞两端的差异活动，其迁移极性高效而快速形成是迁移能力提升的主要因素，进而可以促进新生血管的延伸和分支形成[12]。在细胞迁移过程中，高尔基体会在细胞突出端产生极化反应，通过分析高尔基体的定位可以判断细胞是否产生迁移极性。另外，骨架动力排列、机械张力、信号分子的胞内扩散参与了迁移极性的形成和维持[13]。这些不同的机制有效结合在一起，促进了细胞在迁移时能够保持稳定的极性。

然而,在 HPS 病理条件刺激下,调控肺血管内皮细胞迁移极性的机制尚不明确,需要进一步探索。

大量文献报道,微管可以通过翻译后修饰来控制微管结构的相关特性,从而进行组装和拆卸等过程,比如乙酰化、甲基化、谷氨酸化、酪氨酸化[14-15]。其中,微管乙酰化修饰在细胞迁移中发挥重要作用,可能与促进高尔基体再定位到细胞突出端和囊泡快速运输等过程有关[16]。α-TAT1 是一种使 α 微管蛋白中的 K40 位点产生乙酰化的酶,有助于维持微管的稳定性,可以促进高尔基体依赖的囊泡运输,加快迁移突出端微丝网状结构和粘着斑复合物的形成。在转移性乳腺癌研究中,α-微管蛋白乙酰化水平升高与预后不良相关[17]。在结肠癌研究中,αTAT1 表达的增加促进了癌细胞的侵袭[18],这些结论表明,α-TAT1 介导的微管稳定性可能促进了细胞迁移。本研究发现 4 周 HPS 大鼠肺血管内皮细胞 α-TAT1 表达显著升高,同时体外实验中采用 HPS 血清刺激内皮细胞进行干预,也验证了这样的结果,以上结果均表明 α-TAT1 可能参与了 PPA 的发生发展。本研究进一步试图探究 HPS 中 α-TAT1 的过表达与病理性血管新生的相关性。在功能实验中,本研究利用 siRNA 技术在 HUVECs 中下调 α-TAT1 的表达,并检测了内皮细胞的迁移极性水平、迁移能力以及成血管能力的改变。结果显示,HUVECs 中沉默 α-TAT1 可有效降低微管乙酰化水平,同时减低了微管的稳定性。近期的一项研究表明,微管发生乙酰化后,由于静电干扰的产生,αK40 环的运动受到限制,减少了微管分子蛋白间的横向接触,这种结构上的横向接触减少增加了微管结构的柔韧性[19]。这一结论与先前研究保持一致,认为 K40 位点乙酰化介导的微管横向相互作用的减弱是对细胞极性形成和维持的一种保护机制,可以防止先前存在破损的微管在重复应力作用下发生大面积的损伤,从而避免微管的完全断裂[8, 20]。同时本研究还表明,通过下调 α-TAT1 可以抑制 HUVECs 的迁移极性以及成血管水平。因此在 HPS 病理条件刺激下,内皮细胞中 α-TAT1 的过表达增加了微管结构乙酰化水平,促进了微管结构的稳定性,提示 α-TAT1 在 HPS 介导的内皮细胞迁移行为中扮演了关键作用。

综上所述,本研究证实了 HPS 中内皮细胞 α-TAT1 处于高表达状态,并与病理性血管新生具有密切关系,其作用可能与通过维持内皮细胞中微管结构的稳定性和增强迁移极性快速形成有关。因此在后续研究中我们将重点关注 α-TAT1 在 HPS 中发挥的复杂作用,为寻找治疗 HPS 更为有效的靶点提供新的理论基础。

参考文献:

[1] GANDHI K D, TAWEESEDT P T, SHARMA M, *et al*. Hepatopulmonary syndrome: an update [J]. World J Hepatol, 2021, 13(11): 1699-1706. DOI: 10.4254/wjh.v13.i11.1699.

[2] 赖静, 陈林, 李才溢, 等. 布雷他汀改善高位胆总管结扎术大鼠肺炎性损伤的研究[J]. 陆军军医大学学报, 2022(8): 757-764.
LAI J, CHEN L, LI C Y, *et al*. Blebbistatin ameliorates pneumonic injury after high common bile duct ligation in rats [J]. J Army Med Univ, 2022(8): 757-764.

[3] KAWUT S M, KROWKA M J, FORDE K A, *et al*. Impact of hepatopulmonary syndrome in liver transplantation candidates and the role of angiogenesis [J]. Eur Respir J, 2022, 60(2): 2102304. DOI: 10.1183/13993003.02304-2021.

[4] LIU H Y, GU H J, GU L L, *et al*. CX3CR1 regulates angiogenesis and activation of pro-angiogenic factors and triggers macrophage accumulation in experimental hepatopulmonary syndrome model[J]. Gastroenterol Hepatol, 2021, 44(2): 115-124. DOI: 10.1016/j.gastrohep.2020.05.021.

[5] CHEN L, HAN Y, LI Y J, *et al*. Hepatocyte-derived exosomal miR-194 activates PMVECs and promotes angiogenesis in hepatopulmonary syndrome [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(11): 853. DOI: 10.1038/s41419-019-2087-y.

[6] MARGADANT C. Positive and negative feedback mechanisms controlling tip/stalk cell identity during sprouting angiogenesis [J]. Angiogenesis, 2020, 23(2): 75-77. DOI: 10.1007/s10456-020-09706-0.

[7] KIM Y H, CHOI J, YANG M J, *et al*. A MST1-FOXO1 cascade establishes endothelial tip cell polarity and facilitates sprouting angiogenesis [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 838. DOI: 10.1038/s41467-019-08773-2.

[8] XU Z J, SCHAEDEL L, PORTRAN D, *et al*. Microtubules acquire resistance from mechanical breakage through intralumenal acetylation [J]. Science, 2017, 356(6335): 328-332. DOI: 10.1126/science.aai8764.

[9] LI L, WEI D, WANG Q, *et al*. MEC-17 deficiency leads to reduced α-tubulin acetylation and impaired migration of cortical neurons [J]. J Neurosci, 2012, 32(37): 12673-12683. DOI: 10.1523/jneurosci.0016-12.2012.

[10] TANG X, LIU C, CHEN L, *et al*. Cyclooxygenase-2 regulates HPS patient serum induced-directional collective HPMVEC migration *via* PKC/Rac signaling pathway [J]. Gene, 2019, 692: 176-184. DOI: 10.1016/j.gene.2019.

01.009.

[11] GAO J, YU H F, BAI X H, *et al*. Loss of cell polarity regulated by PTEN/Cdc42 enrolled in the process of hepatopulmonary syndrome[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(8): 5542-5552. DOI: 10.1111/jcmm.14437.

[12] VAIDŽIULYTE K, MACÉ A S, BATTISTELLA A, *et al*. Persistent cell migration emerges from a coupling between protrusion dynamics and polarized trafficking[J]. Elife, 2022, 11: e69229. DOI: 10.7554/eLife.69229.

[13] SEETHARAMAN S, ETIENNE-MANNEVILLE S. Cytoskeletal crosstalk in cell migration[J]. Trends Cell Biol, 2020, 30(9): 720-735. DOI: 10.1016/j.tcb.2020.06.004.

[14] MAGIERA M M, BODAKUNTLA S, ŽIAK J, *et al*. Excessive tubulin polyglutamylation causes neurodegeneration and perturbs neuronal transport[J]. EMBO J, 2018, 37(23): e100440. DOI: 10.15252/embj.2018100440.

[15] JANKE C, MAGIERA M M. The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(6): 307-326. DOI: 10.1038/s41580-020-0214-3.

[16] CHIU S C, HUANG Y J, WEI T W, *et al*. The PRMT5/HURP axis retards Golgi repositioning by stabilizing acetyltubulin and Golgi apparatus during cell migration[J]. J Cell Physiol, 2022, 237(1): 1033-1043. DOI: 10.1002/jcp.30589.

[17] BOGGS A E, VITOLO M I, WHIPPLE R A, *et al*. α-Tubulin acetylation elevated in metastatic and basal-like breast cancer cells promotes microtentacle formation, adhesion, and invasive migration[J]. Cancer Res, 2015, 75(1): 203-215. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3563.

[18] OH S, YOU E, KO P, *et al*. Genetic disruption of tubulin acetyltransferase, αTAT1, inhibits proliferation and invasion of colon cancer cells through decreases in Wnt1/β-catenin signaling[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 482(1): 8-14. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.11.039.

[19] ESHUN-WILSON L, ZHANG R, PORTRAN D, *et al*. Effects of α-tubulin acetylation on microtubule structure and stability[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(21): 10366-10371. DOI: 10.1073/pnas.1900441116.

[20] PORTRAN D, SCHAEDEL L, XU Z J, *et al*. Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing[J]. Nat Cell Biol, 2017, 19(4): 391-398. DOI: 10.1038/ncb3481.

(收稿:2023-05-15;修回:2023-07-07)

(编辑 张 维)