DOI:10.16016/j.2097-0927.202202013

布雷他汀改善高位胆总管结扎术大鼠肺炎性损伤的研究

赖 静,陈 林,李才溢,王丹丹,鲁开智 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院麻醉科

[摘要] **目的** 探讨非肌肉肌球蛋白Ⅱ(non-muscle myosin Ⅱ, NMⅡ)抑制剂布雷他汀对慢性胆总管结扎术后肺组织炎性损伤的保护作用。**方法** 选用体质量200~220 g的SPF级雄性SD大鼠55只,按照随机数字表法分为对照组(Sham组,$n=11$)、高位胆总管结扎术(common bile duct ligation, CBDL)模型组(CBDL组,$n=22$)和高位胆总管结扎术后布雷他汀治疗组[CBDLB组,$n=22$,腹腔注射布雷他汀5 mg/kg(PEG-300∶生理盐水=1∶1为溶剂)]。通过HE染色观察肺组织的改变;Western blot检测肺组织MPO、IL-6、TNF-α、SOD3表达情况;免疫组化检测炎症相关的MPO、IL-6、IL-1β、TNF-α、LY6B、CD163因子和血管内皮相关因子CD31的表达水平。**结果** 胆总管结扎术后3周肺部损伤表现为大量的炎性细胞浸润为主,伴有局部肺组织肺泡腔和肺间质出血;免疫组化结果显示CBDL组相较于Sham组MPO、LY6B和CD163阳性细胞数量均显著增多($P<0.01$),同时炎症因子IL-1β、TNF-α的表达量也显著升高($P<0.01$);Western blot检测结果也同样证实CBDL组相较于Sham组肺组织炎性因子MPO、IL-6和超氧化物歧化酶SOD3分泌增多($P<0.05$);胆总管结扎术后5周肺组织损伤主要表现为肺微血管扩张,CBDL组相较于Sham组肺微血管扩张明显($P<0.01$)。胆总管结扎的大鼠经过布雷他汀治疗1周后,第3周免疫组化结果显示CBDLB组较CBDL组MPO、LY6B和CD163阳性细胞数量均显著减少($P<0.01$),同时炎症因子IL-1β、IL-6和TNF-α的表达量也显著降低($P<0.01$),Western blot检测结果显示CBDLB组较CBDL组炎性因子IL-6、MPO和TNF-α的分泌减少($P<0.05$);第5周CBDLB组较CBDL组肺微血管扩张程度明显减轻($P<0.01$)。**结论** 布雷他汀能有效抑制胆总管结扎后肺组织炎性细胞的浸润,减轻肺炎症损伤,缓解胆总管结扎后期肺微血管扩张。

[关键词] 布雷他汀;炎症;慢性胆总管结扎;肝肺综合征

[中图法分类号] R563.05; R575; R977.6 [文献标志码] A

Blebbistatin ameliorates pneumonic injury after high common bile duct ligation in rats

LAI Jing, CHEN Lin, LI Caiyi, WANG Dandan, LU Kaizhi Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the protective effect of blebbistatin, a non-muscle myosin Ⅱ (NMⅡ) inhibitor, on inflammatory injury of lung tissue after chronic common bile duct ligation (CBDL) in rats. **Methods** A total of 55 SPF male SD rats (200~220 g) were randomly divided into 3 groups, namely control group (Sham, $n=11$), high CBDL group (model group, $n=22$) and blebbistatin treatment after high CBDL group (treatment group, $n=22$). The treatment group was intraperitoneally injected with blebbistatin at a dose of 5 mg/kg once a day for a week, while the model group was only given the solvent (PEG-300∶saline=1∶1). The changes of lung tissue were observed with HE staining. Western blotting was performed to detect the expression of myeloperoxidase (MPO), IL-6, TNF-α, and superoxide dismutase (SOD3) in the lung tissues. The expression levels of MPO, IL-6, IL-1β, TNF-α, LY6B, CD163, and vascular endothelium related factor CD31 were also determined by immunohistochemical assay. **Results** The lung injury at the 3rd

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81671961)

[通信作者] 鲁开智,E-mail:lukaizhi2010@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 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( )

week after CBDL presented a large number of inflammatory cells infiltration, accompanied by local alveolar space and pulmonary interstitial hemorrhage. Immunohistochemical results demonstrated that the numbers of MPO positive cells, LY6B positive cells and CD163 positive cells were all increased significantly in the model group as compared with the Sham group ($P<0.01$), with enhanced expression of IL-1β and TNF-α ($P<0.01$). Western blotting results confirmed the up-regulated levels of MPO, IL-6 and SOD3 in the model group than the sham group ($P<0.05$). In comparison with the model group, the treatment group showed decreased numbers of MPO positive cells, LY6B positive cells, and CD163 positive cells ($P<0.01$), and declined levels of inflammatory factors IL-1β, IL-6, and TNF-α ($P<0.01$). Western blotting indicated as well that the expression of MPO, IL-6 and TNF-α in the treatment group was reduced greatly ($P<0.05$). Moreover, at the 5th week after surgery, the lung injury mainly manifested as pulmonary microvascular dilation, which was more severe in the model group than the Sham group ($P<0.01$), while the severity of pulmonary microvascular dilatation was remarkably milder after treatment ($P<0.01$). **Conclusion** Blebbistatin can effectively inhibit the infiltration of inflammatory cells in lung tissue, reduce pneumonia injury and alleviate pulmonary microvascular dilatation after CBDL.

[**Key words**] blebbistatin; inflammation; chronic common bile duct ligation; hepatopulmonary syndrome

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81671961). Corresponding author: LU Kaizhi, E-mail: lukaizhi2010@163.com

肝肺综合征(hepatopulmonary syndrome, HPS)是在慢性肝病基础上发生的肺内血管异常扩张、气体交换障碍和动脉血氧合异常导致的低氧血症及一系列病理生理变化和临床表现,其在肝硬化患者中发病率为5%~32%[1],一旦发生HPS,患者往往呈进行性发展。目前除了对症支持治疗以外没有找到比肝移植术更经济有效且能广泛受益的药物治疗方案,患者往往预后差。近年的研究发现,巨噬细胞肺组织浸润以及其分泌的TNF-α在肝肺综合征的发展中发挥了重要的作用[2-3]。众所周知,组织中巨噬细胞来源于循环血液中的单核细胞,其中涉及到单核细胞如何跨越血管内皮从血管中进入到肺组织当中。最近研究发现炎症细胞跨越内皮细胞向组织浸润的过程高度依赖其自身的非肌肉肌球蛋白Ⅱ(non-muscle myosin Ⅱ NMⅡ)的活性,而布雷他汀作为一种选择性的NMⅡ抑制剂能够抑制这一跨越,减少炎症细胞的浸润[4]。因此,本研究使用布雷他汀干预胆总管结扎术(common bile duct ligation, CBDL)构建的HPS模型鼠,观察布雷他汀治疗后大鼠肺组织的炎症浸润以及后期肺微血管扩张情况,明确布雷他汀能否改善HPS模型疾病进展中炎症损伤和缓解后期肺血管扩张。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及分组 雄性健康SD大鼠,6周龄,体质量200~220 g,购于陆军军医大学实验动物中心。大鼠饲养在SPF级动物房,室温维持在23 ℃,昼夜交替,自由摄食和饮水,本实验获得陆军军医大学动物伦理委员会批准,所有操作都遵循《实验动物保护条例》。55只大鼠按照随机数字表法分为3组,分别为对照组(Sham组,$n=11$)、高位胆总管结扎模型组(CBDL组,$n=22$)和高位胆总管结扎术后布雷他汀治疗组(CBDLB组,$n=22$)。

1.1.2 主要试剂 兔多抗MPO购于美国Proteintech公司;兔多抗IL-6、兔多抗SOD3、辣根过氧化物酶(HRP)标记的β-actin均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;兔单抗CD163、兔单抗CD31、兔多抗IL-1β购自英国Abcam公司,兔抗Neutrophil/LY-6B和鼠抗TNF-α购自北京博奥森生物;ECL试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;BCA蛋白定量分析试剂盒购自ThermoFisher科技公司;布雷他汀(Blebbistatin)购于MCE公司(MedChemExpress)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型 大鼠术前禁食8 h,按照大鼠体质量给予5%水合氯醛(0.7~0.8 mL)/100 g腹腔注射。麻醉起效后,给CBDL组和CBDLB组大鼠实施改良型高位胆总管结扎术[5],即在肝门部和十二指肠部结扎大鼠胆总管,从两结扎点之间剪断。Sham组只做胆总管游离,不做胆总管结扎和剪断。用生理盐水冲洗腹腔,然后缝合腹腔及皮肤。手术结束后将大鼠放入温箱,等待自然苏醒。麻醉恢复后按照计划饲养大鼠。

对于 CBDLB 组,从第 3 周第 1 天开始腹腔注射布雷他汀,注药剂量为 5 mg/kg,药品稀释浓度为 2 mg/mL,每天注射 1 次,连续给药 1 周,CBDL 组给予同样体积的溶剂(PEG-300∶生理盐水=1∶1)作对比。

布雷他汀溶解方法如下:布雷他汀用 PEG-300(MCE)部分溶解后,用超声清洗仪超声 5 min,加入等体积的生理盐水,再用超声清洗仪超声 1 min,药物溶解成黄色混悬液后立即使用。

Sham 组和 CBDL 组大鼠分别饲养 1、3、5 周后,CBDLB 组大鼠饲养 3、5 周后取材,腹腔给予 5%水合氯醛 0.8 mL/100 g 麻醉,采腹主动脉血约 10 mL,用预冷的肝素生理盐水从右心灌注大鼠肺循环至液体清亮为止。3 号丝线结扎大鼠右侧肺组织,剪取右肺组织,用冰生理盐水清洗后擦干,剪碎后放入 2 mL 冻存管中,液氮中保存。再用多聚甲醛灌注大鼠循环,取大鼠左侧肺组织,用多聚甲醛 5 mL 从气管灌注左肺,结扎支气管,放入多聚甲醛中继续固定 24 h。

1.2.2 HE 染色观察肺组织形态 肺组织用多聚甲醛固定 24 h 后,进行石蜡包埋切片,切片厚度 4 μm,切片进行 HE 染色,显微镜观察切片,拍照分析。

1.2.3 免疫组织化学检测大鼠肺组织中炎性细胞的浸润和炎性因子的表达 大鼠肺组织石蜡切片经过 60 ℃烘烤、二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化,用 3% H_2O_2 耗竭内源性过氧化酶,高温高压抗原修复,10%山羊血清封闭,一抗孵育、二抗孵育,DAB 显色,苏木精复染,返蓝、脱水、透明、中性树胶封片,晾干后于显微镜下观察拍照。用 Image ProPlus 统计累积光密度值。

1.2.4 Western blot 检测 大鼠取材获得的各组肺组织中加入 RIPA 蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂,经过瓷珠碾磨、超声破碎、低温过夜裂解、低温离心后取得组织总蛋白,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 30 μg(体积 15 μL)蛋白上样,电泳结束后转到 PVDF 膜上,山羊血清封闭后用相应的一抗孵育、二抗孵育、清洗后 ECL 显影拍照。

1.3 统计学分析

Sham 组和 CBDL 组 1、3、5 周以及 CBDLB 组 3、5 周各取材 3 只,各实验均重复 3 次。采用 Graphpad Prism 7.0 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,检验水准 $\alpha=0.05$。

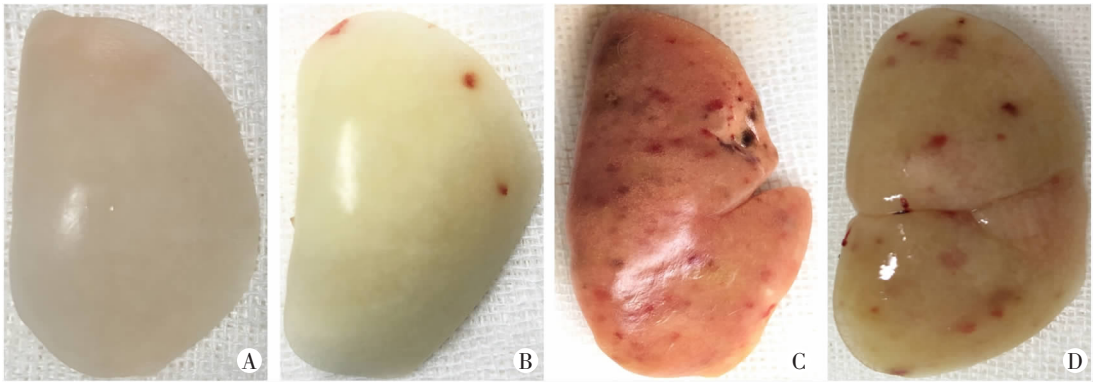
2 结果

2.1 HPS 大鼠模型

采用本研究团队提出的高位胆总管结扎术来建立 CBDL 大鼠模型。Sham 组和 CBDL 组术后 1、3、5 周的肺组织大体观见图 1。HE 染色结果显示,CBDL 组术后 1 周肺微血管中可见少量炎性细胞浸润,术后 3 周大鼠肺组织发生了明显的炎症改变,大量的炎症细胞浸润,以巨噬细胞和淋巴细胞浸润为主,肺泡间质增厚,挤压肺泡腔,部分肺泡腔被压闭,局灶肺组织实变,同时存在散在的肺泡腔和肺间质出血。CBDL 组术后 5 周肺组织中炎症细胞浸润恢复,病变以肺微血管扩张为主,部分扩张血管内可见大量红细胞(图 2)。

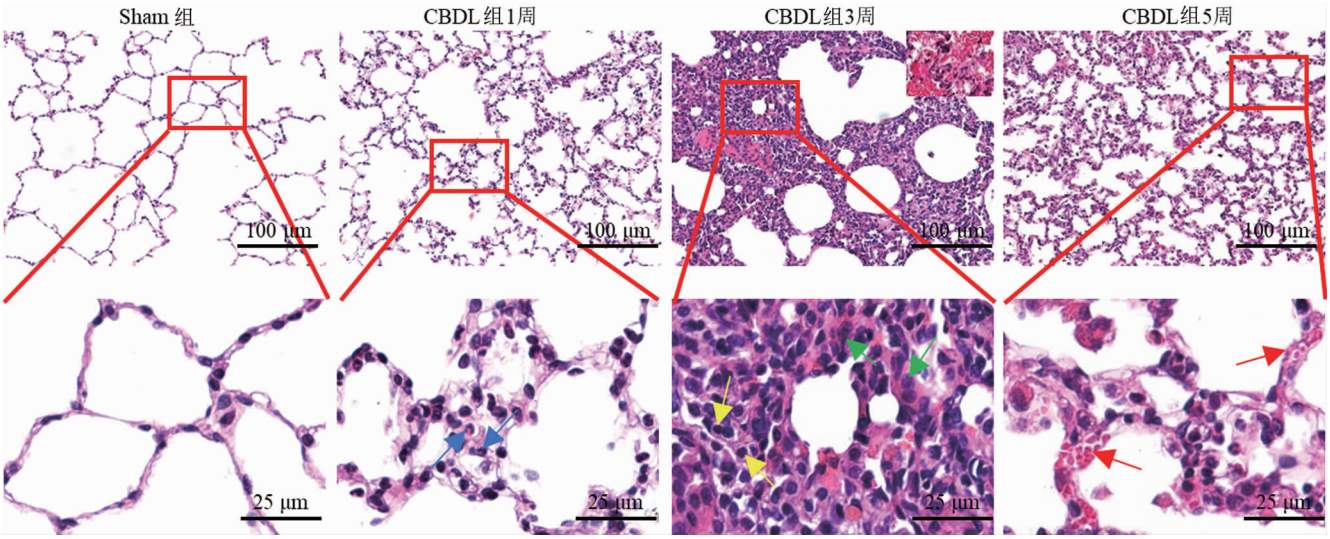
2.2 布雷他汀能改善大鼠肺组织的炎性损伤

CBDLB 组与 CBDL 组肺组织 HE 染色对比可见,给予布雷他汀治疗 1 周,CBDLB 组 3 周较 CBDL 组同时期肺组织巨噬细胞、淋巴细胞浸润明显减少,未见肺泡腔被挤压以及肺组织出血、实变。CBDLB 5 周较 CBDL 组同时期肺微血管血管扩张缓解,未见肺组织炎症以及红细胞渗出(图 3)。



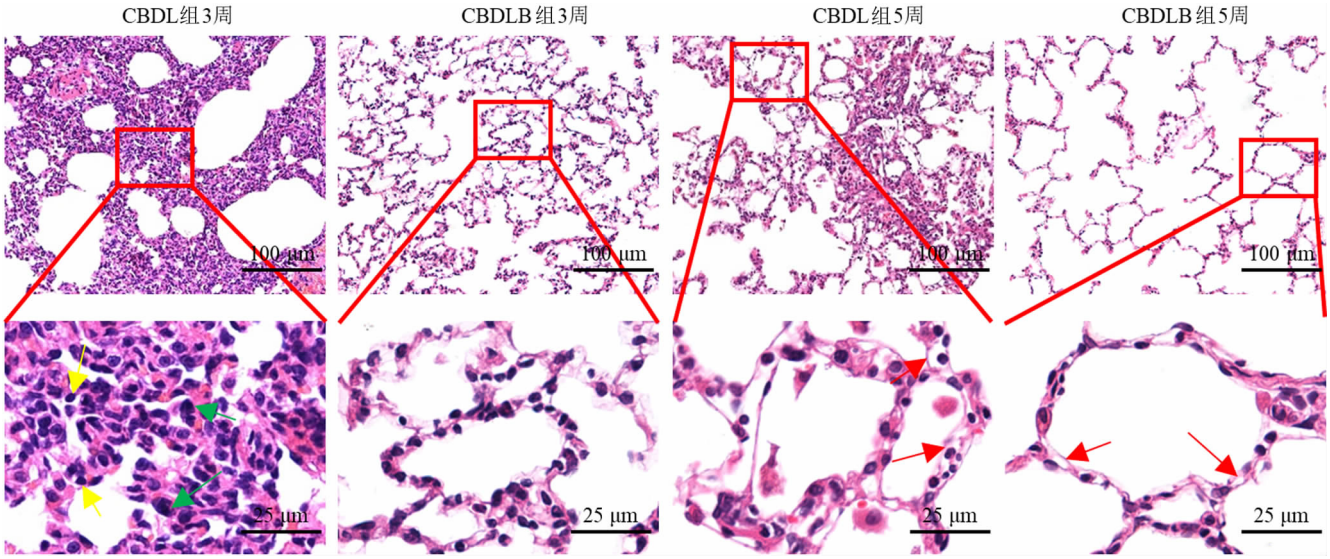
A:Sham 组;B:CBDL 组 1 周;C:CBDL 组 3 周;D:CBDL 组 5 周

图 1 CBDL 大鼠不同时期肺组织大体观



蓝色箭头示中性粒细胞;黄色箭头示淋巴细胞;绿色箭头示巨噬细胞;红色箭头示扩张的肺微血管及血管内红细胞

图 2 HE 染色观察 Sham 组和 CBDL 组不同时期肺组织的改变



黄色箭头示淋巴细胞;绿色箭头示巨噬细胞;红色箭头示扩张的血管

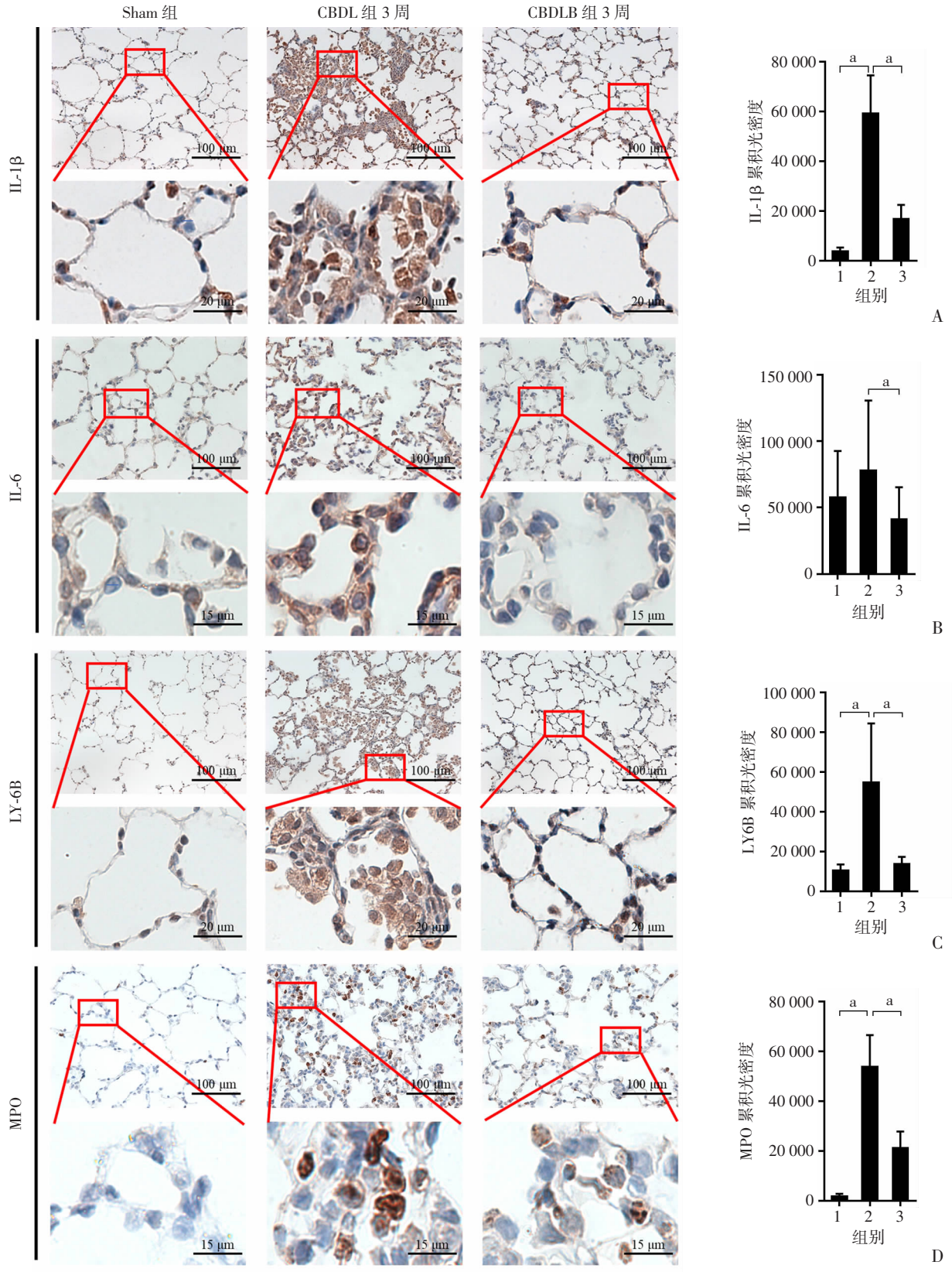
图 3 HE 染色观察 CBDL 组与 CBDLB 组不同时期肺组织的对比

2.3 免疫组化证实布雷他汀治疗后 CBDLB 组 3 周炎性细胞浸润减少

Sham 组、CBDL 组和 CBDLB 组 3 周大鼠肺组织经免疫组化染色,检测肺组织 IL-1β、IL-6、TNF-α、MPO、LY-6B 以及 CD163,通过累积光密度值(IOD)来统计各组的差异。结果显示:CBDL 组较 Sham 组 MPO、LY6B 阳性细胞数量显著增多($P<0.01$),CD163 阳性细胞数量显著增多($P<0.01$),同时炎症因子的表达量也显著升高,差异均有统计学意义($P<0.01$)。布雷他汀干预后,CBDLB 组较肺 CBDL 组 MPO、LY6B、CD163 阳性细胞数量均显著减少($P<0.01$),同时炎症因子的表达量也显著降低,差异均有统计学意义($P<0.01$)。见图 4。

2.4 Western blot 证实布雷他汀干预后肺组织中炎性因子减少

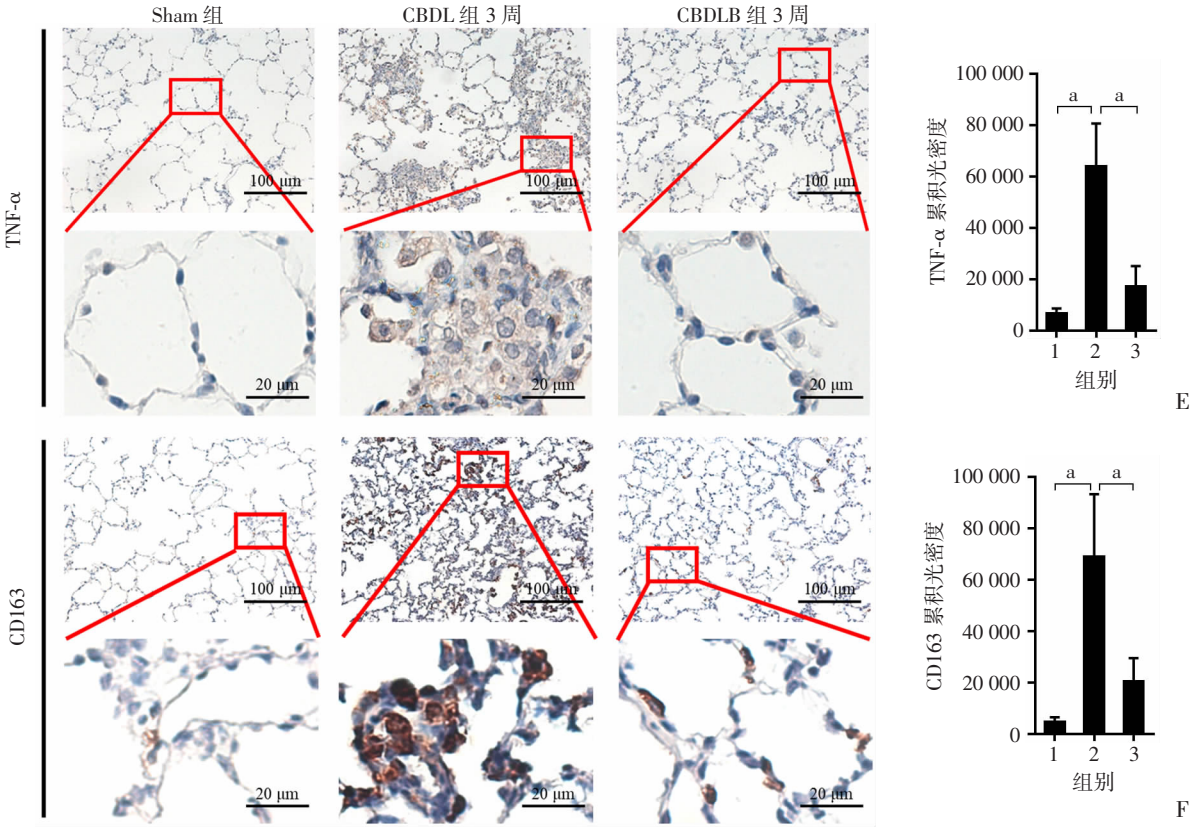
Sham 组、CBDL 组和 CBDLB 组 3 周肺组织采用 Western blot 检测炎性因子 IL-6、MPO、TNF-α 以及氧化应激因子 SOD3 的表达水平,结果显示:CBDL 组较 Sham 组 IL-6、SOD3 和 MPO 表达明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。而布雷他汀治疗的 CBDLB 组较 CBDL 组 IL-6、TNF-α 和 MPO 表达明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$,图 5)。



A：Image J 分析不同实验组 IL-1β 累积光密度值；B：Image J 分析不同实验组 IL-6 累积光密度值 ；C：Image J 分析不同实验组 LY-6B 累积光密度值；D：Image J 分析不同实验组 MPO 累积光密度值； 1：Sham；2：CBDL 3 周；3：CBDLB 3 周；a：$P<0.01$

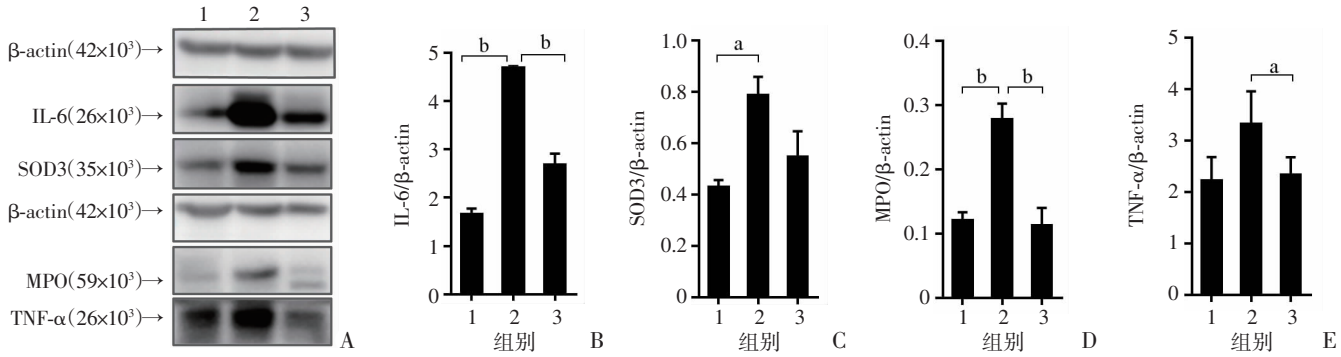
图 4 Sham 组、CBDL 组与 CBDLB 组 3 周大鼠肺组织免疫组化染色结果对比

（图 4E、F 续下页）



E：Image J 分析不同实验组 TNF-α 累积光密度值；F：Image J 分析不同实验组 CD163 累积光密度值　1：Sham；2：CBDL 3 周；3：CBDLB 3 周；a：$P<0.01$

续图 4　Sham 组、CBDL 组与 CBDLB 组 3 周大鼠肺组织免疫组化染色结果对比

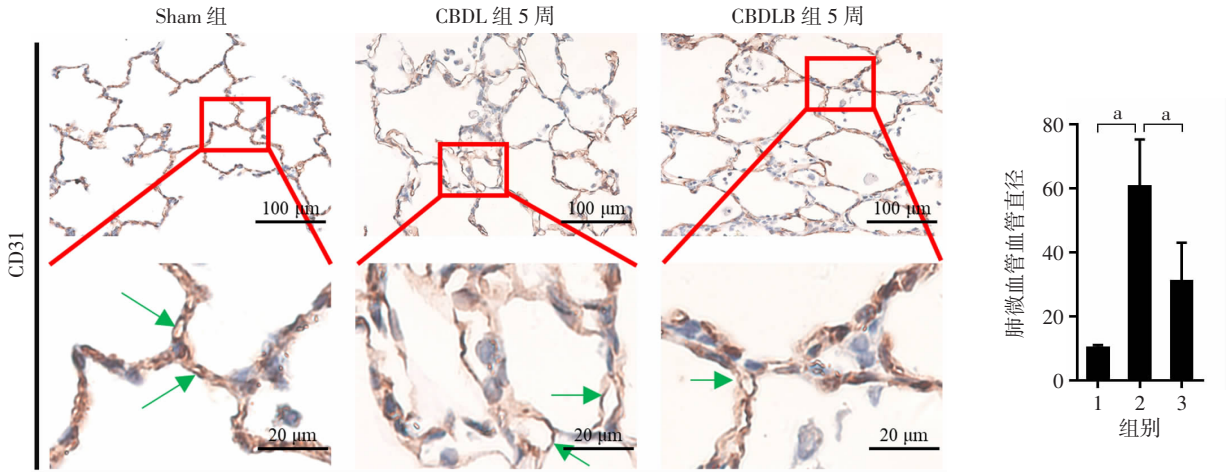


A：蛋白免疫印迹；B：Wstern blot 检测炎性因子 IL-6 的表达水平；C：Western blot 检测抗氧化物细胞外超氧化物歧化酶 SOD3 的表达水平；D：Western blot 检测髓过氧化物酶 MPO 的表达水平；E：Western blot 检测肿瘤坏死因子 TNF-α 的表达水平　1：Sham；2：CBDL 3 周；3：CBDLB 3 周；a：$P<0.05$，b：$P<0.01$

图 5　蛋白免疫印迹检测 Sham 组、CBDL 组与 CBDLB 组 3 周肺组织炎性因子的表达

2.5　布雷他汀治疗可改善 CBDL5 周大鼠肺微血管扩张

Sham 组、CBDL 组和 CBDLB 组 5 周肺组织采用免疫组化方法染 CD31。结果显示：在 5 周，CBDL 组较 Sham 组肺组织出现明显的肺微血管扩张，肺微血管直径差异有统计学意义（$P<0.01$）；布雷他汀治疗后，CBDLB 组的肺血管扩张情况较 CBDL 组有所减轻，肺微血管直径差异有统计学意义（$P<0.01$）。见图 6。



绿色箭头示肺微血管 1：Sham 组；2：CBDL 组 5 周；3：CBDLB 组 5 周；a：$P<0.01$

图 6 免疫组化检测 Sham 组、CBDL 组和 CBDLB 组 5 周肺组织肺微血管直径的变化

3 讨论

肝肺综合征是慢性肝病患者发生呼吸功能不全的最常见因素，其特征是肝脏疾病患者发生的肺内微血管扩张（intrapulmonary vascular dilatation，IPVD）导致的气体交换异常和肺组织氧合异常[6]。本研究使用改良的高位胆总管结扎法成功建立大鼠模型。从 CBDL 组不同时期的肺组织大体照片可以看出整个疾病发展过程中肺组织的变化。在 CBDL 组 3 周，肺组织主要为炎症浸润期，表现为过度的免疫细胞浸润，以巨噬细胞浸润为主，同时伴有中性粒细胞和淋巴细胞浸润，大量炎性细胞在肺间质积聚，挤压边上的肺实质，可见到肺泡腔被挤压变小，有的甚至被压闭，还有散在的肺间质和肺泡腔出血，严重影响了肺组织通气功能。另外，肺间质的炎性细胞增多，整个呼吸膜增厚，肺换气功能也出现障碍。研究发现过度的免疫细胞浸润是大多数进展性疾病的一个重要的共同途径，并最终推动疾病进展至终末期器官衰竭[7]，巨噬细胞通过分泌血管舒张因子 iNOS、血管生长因子 VEGF 和增殖生长因子（platelet-derived growth factor，PDGF）在实验性 HPS 的发病机制中发挥关键作用[8]，同时有研究表明巨噬细胞积聚在肝肺综合征大鼠模型中参与了肺纤维化、肺血管扩张和低氧血症[2]。以上结果说明整个 CBDL 向 HPS 发展过程中，过度的免疫细胞浸润发挥着重要的作用，炎症阶段可能是导致 CBDL 大鼠发生血管扩张和血管新生的重要阶段。炎症被认为是慢性病程中可能改变的危险因素之一[7]，本研究通过控制过度的炎症反应寻找延缓 HPS 进展的方法，这可能成为 HPS 新的防治方向。

布雷他汀是一种应用广泛的 NMⅡ特异性抑制剂，BARZILAI 等[4]在研究白细胞如何实现跨膜运动的过程中发现白细胞通过形成板状足，板状足插入细胞间隙或细胞孔隙，细胞核形成核叶，通过核叶挤压最终实现跨膜运动，阐明了白细胞是如何跨越血管内皮到达靶组织中的，同时发现这一运动过程能被布雷他汀干预。WRÓBEL 等[9]在大鼠出血性膀胱炎和膀胱过度活动模型中发现布雷他汀可以降低膀胱促炎标记物水平，同时改善膀胱水肿和通透性。JANBEN 等[10]研究 NMⅡ在小胶质细胞激活中的作用，发现布雷他汀显著抑制细胞的定向运动，以上研究表明布雷他汀通过抑制 NMⅡ实现抑制细胞的定向迁移，达到抑制炎症的目的。本研究将布雷他汀运用到 HPS 实验动物模型中，目的是想控制 CBDL 术后 3 周时巨噬细胞、淋巴细胞等过度的炎症细胞浸润。从本实验结果可以看出布雷他汀持续治疗 1 周后，CBDLB 组 3 周肺组织中巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞等炎症细胞浸润明显减少，肺实质损伤减轻，未见肺泡腔被挤压，肺组织出血损伤相较 CBDL 组明显减轻，说明布雷他汀抑制或者减缓了炎性细胞从肺循环中进入到肺组织中，缓解了肺组织直接受到炎性细胞或免疫细胞的攻击。通过免疫组化检测 CBDL 组 3 周肺组织中巨噬细胞极化相关标志物 IL-1β 和 IL-6 以及巨噬细胞的标志物 CD163 表达明显增加，同时主要由巨噬细胞分泌的 TNF-α 表达量也增加，证实了 CBDL 术后 3 周时巨噬细胞在肺内积聚。研究证明巨噬细胞在肺部急性、慢性炎症以及肺纤维化中发挥了重要作用[11]，同时它在血管微环境中发挥重要调节作用，是血管生成的主要参与者[12]；研究还表明消耗肺血管内巨噬细胞可预防

和逆转 HPS[8]。TNF-α 被证实可与炎症细胞一起刺激血管内皮生长因子(VEGF)信号通路激活,共同参与血管生成[13],另有研究表明 TNF-α 单抗能抑制 CBDL 大鼠 HPS 特征的发展[3]。本研究通过抑制 NMⅡ实现抑制单核细胞从血管跨越至肺组织,来实现减少肺内巨噬细胞浸润的目的,同时 TNF-α 的分泌也减少,从而阻碍巨噬细胞以及 TNF-α 在肺血管扩张和肺血管新生这两大主要机制中发挥作用,以达到延缓 HPS 的发展进程的目的。从免疫组化结果来看,通过布雷他汀治疗炎症期 1、5 周 CBLDB 组肺微血管扩张明显得以缓解,这也证实了我们的想法,即通过阻碍核心炎症细胞巨噬细胞炎症期的浸润,最终缓解 HPS 最重要的病理变化——肺微血管扩张。同时布雷他汀也减少中性粒细胞和淋巴细胞从肺血管中迁移到肺组织中,协同减轻肺组织炎症损伤。因此本研究得出结论:布雷他汀可减少 CBDL 大鼠肺组织巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞等炎性细胞浸润,缓解 HPS 模型晚期肺微血管扩张。

在实验过程中由于在麻醉后采大鼠动脉血的原因,CBDL 术后各时期大鼠的动脉血饱和度、肺泡-动脉血氧分压差两个指标受麻醉的影响较大,无法得到真实值,所以没有更多的证据证明大鼠的肺组织氧合得到改善。同时布雷他汀是否能进一步减少大鼠死亡率还需要再次实验验证。再者,布雷他汀自身有荧光,溶解困难并且容易降解,这些特性阻碍了它的临床应用[14]。目前也发现一种高度可溶、无光毒性、无荧光的布雷他汀衍生物 para-aminoblebbistatin,同时具有相似的肌球蛋白Ⅱ抑制特性[15], para-aminoblebbistatin 的发现给本实验中使用 NMⅡ抑制剂提供了更好的选择,期待它能应用到更广阔的炎症治疗和慢性病领域。

参考文献:

[1] ZHANG J L, FALLON M B. Hepatopulmonary syndrome: update on pathogenesis and clinical features[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2012, 9(9): 539-549. DOI: 10.1038/nrgastro.2012.123.

[2] CHEN B, YANG Y, YANG C W, *et al*. M2 macrophage accumulation contributes to pulmonary fibrosis, vascular dilatation, and hypoxemia in rat hepatopulmonary syndrome[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(11): 7682-7697. DOI: 10.1002/jcp.30420.

[3] LIU L, LIU N, ZHAO Z, *et al*. TNF-α neutralization improves experimental hepatopulmonary syndrome in rats[J]. Liver Int, 2012, 32(6): 1018-1026. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2012.02821.x.

[4] BARZILAI S, YADAV S K, MORRELL S, *et al*. Leukocytes breach endothelial barriers by insertion of nuclear lobes and disassembly of endothelial actin filaments[J]. Cell Rep, 2017, 18(3): 685-699. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.12.076.

[5] YANG Y, CHEN B, CHEN Y, *et al*. A comparison of two common bile duct ligation methods to establish hepatopulmonary syndrome animal models[J]. Lab Anim, 2015, 49(1): 71-79. DOI: 10.1177/0023677214558701.

[6] FUHRMANN V, KROWKA M. Hepatopulmonary syndrome[J]. J Hepatol, 2018, 69(3): 744-745. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.01.002.

[7] SI J, GE Y, ZHUANG S G, *et al*. Inhibiting nonmuscle myosin Ⅱ impedes inflammatory infiltration and ameliorates progressive renal disease[J]. Lab Invest, 2010, 90(3): 448-458. DOI: 10.1038/labinvest.2009.142.

[8] THENAPPAN T, GOEL A, MARSBOOM G, *et al*. A central role for CD68(+) macrophages in hepatopulmonary syndrome. Reversal by macrophage depletion[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183(8): 1080-1091. DOI: 10.1164/rccm.201008-1303OC.

[9] WRÓBEL A, SEREFKO A, BAŃCZEROWSKA-GÓRSKA M, *et al*. Intravesical administration of blebbistatin prevents cyclophosphamide-induced toxicity of the urinary bladder in female Wistar rats[J]. Neurourol Urodyn, 2019, 38(4): 1044-1052. DOI: 10.1002/nau.23973.

[10] JANBEN S, GUDI V, PRAJEETH C K, *et al*. A pivotal role of nonmuscle myosin Ⅱ during microglial activation[J]. Exp Neurol, 2014, 261: 666-676. DOI: 10.1016/j.expneurol.2014.08.010.

[11] VANNELLA K M, WYNN T A. Mechanisms oforgan injury and repair by macrophages[J]. Annu Rev Physiol, 2017, 79: 593-617. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034356.

[12] MARTIN P, GUREVICH D B. Macrophage regulation of angiogenesis in health anddisease[J]. Semin Cell Dev Biol, 2021, 119: 101-110. DOI: 10.1016/j.semcdb.2021.06.010.

[13] SOULAIDOPOULOS S, CHOLONGITAS E, GIANNAKOULAS G, *et al*. Review article: update on current and emergent data on hepatopulmonary syndrome[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(12): 1285-1298. DOI: 10.3748/wjg.v24.i12.1285.

[14] RAUSCHER AÁ, GYIMESI M, KOVÁCS M, *et al*. Targeting myosin by blebbistatin derivatives: optimization and pharmacological potential[J]. Trends Biochem Sci, 2018, 43(9): 700-713. DOI: 10.1016/j.tibs.2018.06.006.

[15] VÁRKUTI B H, KÉPIRÓ M, HORVÁTH I Á, *et al*. A highly soluble, non-phototoxic, non-fluorescent blebbistatin derivative[J]. Sci Rep, 2016, 6: 26141. DOI: 10.1038/srep26141.

(**收稿**:2022-02-08;**修回**:2022-03-03)

(编辑 王 红)