XXXX DOI:

小鼠爆炸冲击伤后GNAS表达与肺泡上皮细胞骨架改变的相关性研究

周 慈,邹 杰,邓蒙生,郭 玲,杨光明,王建民
(陆军军医大学大坪医院野战外科研究部第六研究室,重庆 400042)

【摘 要】目的:探讨爆炸冲击伤不同损伤程度及不同时间G蛋白α亚基(G-protein alpha-subunit,GNAS)基因表达变化与肺泡上皮细胞骨架改变的时效、量效关系。**方法:**8~10周龄的C57 BL/6雄性小鼠94只,随机分为2组,在距离爆炸物中心5.4 m和5.7 m处布放小鼠,致伤后随机取24只5.7 m冲击小鼠为冲击6、12、24、48 h组;随机取9只5.7 m冲击小鼠和9只5.4 m冲击小鼠,存活24 h后根据肺冲击伤病理严重度分级评分标准分为冲击轻度、中度和重度组,观察剩余小鼠48 h生存情况。采用苏木精-伊红染色观察各组小鼠肺组织损伤,采用酶联免疫吸附测定法检测各组小鼠肺组织中炎性因子含量,通过蛋白免疫印迹法检测各组肺组织中GNAS、细胞骨架与连接蛋白表达。**结果:**光镜下各组冲击伤小鼠肺组织主要表现为肺泡结构破裂、融合,肺泡腔内出血、水肿,炎症细胞浸润。与对照组相比,不同损伤程度和损伤时间组的小鼠肺组织炎性因子白细胞介素-1β、白细胞介素-6和肿瘤坏死因子-α的含量均明显升高(均$P<0.05$)。与对照组相比,不同损伤程度和损伤时间组的GNAS蛋白表达均逐渐降低(均$P<0.05$),同时不同损伤程度组细胞骨架蛋白(β-肌动蛋白、β-微管蛋白)、细胞连接蛋白(上皮-钙黏蛋白、闭锁小带蛋白-1)及黏着斑激酶也呈逐渐降低趋势(均$P<0.05$);不同损伤时间组β-肌动蛋白、β-微管蛋白、闭锁小带蛋白-1及黏着斑激酶于6 h略有升高,随后逐渐降低(均$P<0.05$),上皮-钙黏蛋白则随时间逐渐降低($P<0.05$)。**结论:**小鼠肺冲击伤后引发强烈的炎症风暴,导致GNAS抑制和肺泡上皮细胞骨架-连接复合体的结构性破坏,且两者之间可能存在正相关性。

【关键词】肺冲击伤;急性肺损伤;GNAS基因;细胞骨架
【中图分类号】R826.1;R827 **【文献标志码】**A

Correlation between the expression of G-protein alpha subunit and cytoskeletal alterations in alveolar epithelial cells after blast-induced lung injury in mice

Zhou Ci, Zou Jie, Deng Mengsheng, Guo Ling, Yang Guangming, Wang Jianmin
(*Department 6, Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Army Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the time-effect and dose-effect relationships between the change in the expression of G-protein alpha subunit (GNAS) and cytoskeletal alterations in alveolar epithelial cells after blast-induced lung injury with different severities and durations. ***Methods*:** A total of 94 male C57BL/6 mice, aged 8-10 weeks, were randomly divided into two groups and were placed at 5.4 m and 5.7 m from the blast epicenter, respectively. After injury induction, 24 mice were randomly selected from the 5.7 m group and were divided into 6-hour, 12-hour, 24-hour, and 48-hour post-injury subgroups. Another 9 mice from the 5.7 m group and 9 mice from the 5.4 m group were assessed at 24 hours after injury, and according to the Pathologic Severity Scale of Lung Blast Injury score, they were divided into mild, moderate, and severe injury groups. The remaining mice were observed for 48-hour survival. HE staining was used to observe lung tissue injury; ELISA was used to measure the levels of inflammatory cytokines in lung tissue; Western blotting was used to measure the expression levels of GNAS, cytoskeletal components, and junctional proteins in lung tissue. ***Results*:** Histological examination revealed alveolar structural disruption and fusion, intra-alveolar hemorrhage and edema, and inflammatory cell infiltration in mice with blast-induced injury in each group under a light microscope. Compared with the control group, the groups with different severities and durations of injury had significant increases in the levels of the inflammatory cytokines interleukin-1β, interleukin-6, and tumor necrosis factor-α ($P<0.05$). Compared with the

作者介绍:周 慈,Email:zhouci6524@tmmu.edu.cn,
研究方向:爆炸武器伤的损伤特点及机制研究。
通信作者:王建民,Email:jmwang@tmmu.edu.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:82072164);陆军特色医学中心医学科研重点资助项目(编号:ZXAIZD007)。

control group, the groups with different severities and durations of injury had a gradual reduction in the protein expression level of GNAS ($P<0.05$), and the groups with different severities had gradual reductions in cytoskeletal proteins (β-actin, β-tubulin), junctional proteins (E-cadherin, ZO-1), and focal adhesion kinase (FAK) ($P<0.05$), while the groups with different durations had slight increases in β-actin, β-tubulin, ZO-1, and FAK at 6 hours, followed by gradual reductions ($P<0.05$), as well as a gradual reduction in E-cadherin over time ($P<0.05$). ***Conclusion***: Blast-induced lung injury in mice triggers a robust inflammatory storm, which subsequently suppresses the expression of GNAS and induces structural disruption of the alveolar epithelial cytoskeleton-junction complex, and there might be a potential positive correlation between these two phenomena.

【Key words】blast lung injury; acute lung injury; G-protein alpha subunit gene; cytoskeleton

原发性冲击波肺损伤(primary blast lung injury, PBLI)是由战争、恐怖袭击、工业生产和生活爆炸等产生的高强度压力波直接或间接作用于肺部所导致的急性损伤,其病理特征以肺泡毛细血管屏障破坏为主,表现为出血、水肿及炎症反应,严重时可导致急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS),死亡率高[1]。肺冲击伤作为强力学刺激所致的致命性损伤,其病理机制涉及细胞结构破坏与分子信号异常的复杂交互。G蛋白α亚基(G-protein alpha-subunit, GNAS)作为G蛋白信号通路的关键调控因子,在细胞应激响应中发挥重要作用,而细胞骨架作为维持细胞形态与功能的核心结构,其动态重塑与GNAS介导的信号传导密切相关[2]。GNAS通过调控Rho家族三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)酶(rho family of GTPases, Rho GTPases)活性影响微管、微丝组装,而细胞骨架的损伤又可能反向调控GNAS的表达与定位,形成复杂的互作网络[3]。肺冲击伤中,冲击波产生的机械应力可能直接诱发细胞骨架解聚,导致肺泡上皮和血管内皮屏障功能受损,同时激活GNAS依赖的信号级联反应。GNAS在肺冲击伤中的具体作用机制尚不明确,尤其是其是否通过调控细胞骨架的动态变化影响肺上皮或内皮细胞的屏障功能,仍有待深入探索。本文从GNAS基因出发,探讨其在冲击伤后细胞骨架重塑及肺屏障功能障碍中的作用,以期为靶向GNAS相关的治疗策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

苏木精-伊红染色试剂盒(货号:G1120)、白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-alpha, TNF-α)等酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自上海爱萌优宁生物技术有限公司(货号:LV30300、LV30325);二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白检测试剂盒购自碧云天(货号:P0010);一抗GNAS、β-肌动蛋白(beta-actin, β-actin)、黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)、上皮-钙黏蛋白(epithelial cadherin, E-cadherin)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)均购自武汉三鹰生物技术有限公司(货号:10150-2-AP、20536-1-AP、66258-1-1g、20874-1-AP、60004-1-lg),β-微管蛋白(beta-tubulin, β-tubulin)、闭锁小带蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司(货号:AC021、A25306)。

1.2 实验爆炸物及动物

实验场地位于重庆某开阔地,爆炸物采用8 kg三硝基甲苯(trinitrotoluene, TNT)当量的去壳炸弹,固定于距地面1.2 m高的木凳上。

本实验动物共采用104只8~10周龄的C57 BL/6雄性小鼠,体质量(20±2)g,所有动物运至试验场地,其中10只作为对照组置于非爆炸区域不进行爆炸致伤,另外94只作为冲击组置于爆炸区域进行爆炸致伤。致伤后所有动物运回饲养,饲养室温度维持在(24±2)℃,相对湿度40%~60%,均以标准饲料喂养,自由饮水。实验所采用的小鼠购自陆军特色医学中心实验动物中心,本研究经陆军军医大学动物福利伦理审查委员会批准(批准号:AMUWEC20223572)。

1.3 方法

1.3.1 分组及模型制备 将94只雄性C57 BL/6小鼠随机分为2组,每组47只,分别在距离爆炸物中心5.4 m和5.7 m处布放,致伤后即刻记录小鼠死亡情况,见图1。随机取24只存活5.7 m冲击组小鼠将其分为冲击6、12、24、48 h组(每组6只),并于伤后6、12、24、48 h解剖取材;随机取9只存活5.7 m冲击组小鼠和9只存活5.4 m冲击组小鼠于伤后24 h解剖,根据肺冲击伤病理严重度分级评分标准(patho-logic severity scale of lung blast injury, PSSLBI)将小鼠分为冲击轻度、中度和重度组(每组6只),剩余存活小鼠观察死亡情况。样本量参考文献[4]。所有解剖后肺组织,左肺叶于4%多聚甲醛中固定,其他肺叶液氮速冻保存。

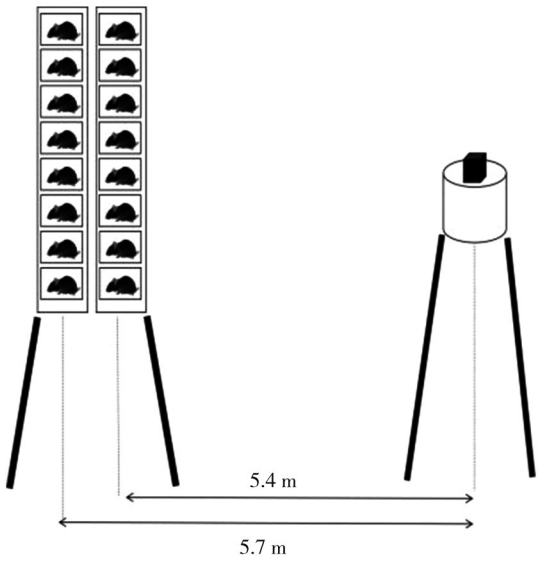


图1 爆炸致伤示意图

1.3.2 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining,HE)染色 将各组小鼠肺叶固定在4%多聚甲醛溶液中24 h经脱水、石蜡包埋、切片。然后进行HE染色,光学显微镜下观察并采集图像。

1.3.3 ELISA检测肺组织炎症因子 取各组小鼠肺叶组织,研磨匀浆后,提取总蛋白,BCA法检测组织蛋白浓度,按ELISA试剂盒说明书操作,测定肺组织中IL-1β、IL-6和TNF-α的含量。

1.3.4 蛋白质免疫印迹法(western blotting,WB)检测肺组织蛋白表达 取各组小鼠肺叶组织,研磨匀浆后,提取总蛋白,BCA法检测组织蛋白浓度。采用10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)后,将分离蛋白转至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride membrane,PVDF)上,5%脱脂牛奶封闭2 h后,磷酸缓冲液(Tris-buffered saline with tween-20,TBST)洗膜3次,加入GNAS(1∶2 500)、β-actin(1∶5 000)、β-tubulin(1∶5 000)、FAK(1∶1 000)、ZO-1(1∶1 000)、E-cadherin(1∶2 500)一抗,4 ℃孵育过夜,TBST洗膜3次,加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的二抗(1∶5 000),室温孵育1 h,TBST洗膜3次,增强化学发光法(enhanced chemiluminescence,ECL)显影液显影。凝胶成像系统成像,ImageJ软件计算灰度值,以GAPDH为内参,计算目的蛋白相对表达量。

1.4 统计学方法

采用GraphPad Prism 10软件进行统计分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间比较符合正态分布且方差齐性者,采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著差异法(least significant difference,LSD)。正态分布但方差不齐性者,组间两两比较采用Welch ANOVA法。偏态分布的计量资料以中位数(四分位间距)[$M_d(P_{25},P_{75})$]表示,采用Kruskal-Wallis法,组间两两比较采用Dunn法。检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 爆炸冲击波伤后致小鼠48 h存活率的变化

距爆源5.7 m的47只冲击伤组小鼠即刻死亡11只,后续48 h内无新增死亡。距爆源5.4 m的47只冲击伤组小鼠即刻死亡16只,24 h内死亡1只,后续48 h内无新增死亡。见图2。

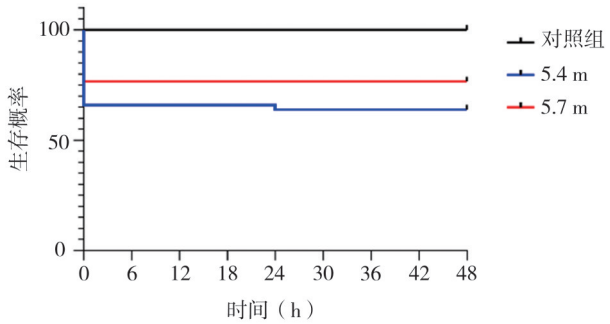


图2 不同距离爆炸后小鼠生存曲线

2.2 小鼠肺冲击伤后肺大体解剖病理学改变

各组肺冲击伤小鼠肺大体解剖未见血胸和气胸,肺表面可见不同程度的肺出血和水肿,切面可见不同程度的粉红色泡沫样液体流出。不同损伤程度肺大体解剖显示冲击轻度组呈散在性点灶状或斑块状出血;冲击中度组表现为散在性斑块状或小片状出血,两叶以上的肺表面较饱满,有少许泡沫样液体;冲击重度组表现为弥漫性大片状出血,有较多的泡沫液,伴有显著的水肿,肺损伤评分差异有统计学意义(H=19.660,P<0.001)(图3A,表1)。不同损伤时间肺大体解剖显示,肺出血和水肿程度随时间加重,至24 h达高峰,肺出血和水肿面积最大,48 h肺出血和水肿开始恢复(图3B)。

表1 不同损伤程度肺组织损伤评分[$M_d(P_{25},P_{75})$;n=6]

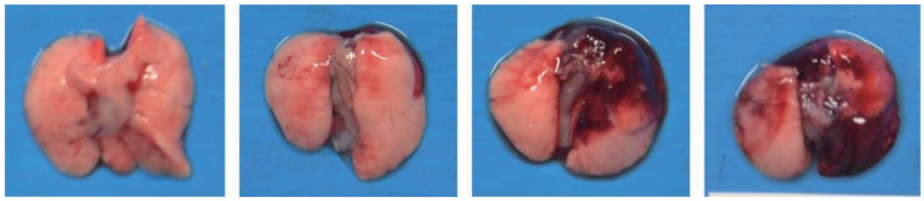
组别	肺组织损伤评分	H值	P值
对照组	0.00(0.00,0.00)	19.660	<0.001
冲击轻度组	1.00(1.00,2.00)		
冲击中度组	2.50(2.00,3.00)[a]		
冲击重度组	3.50(3.00,4.00)[ab]		

注:a,与对照组比较,P<0.05;b,与冲击轻度组比较,P<0.05

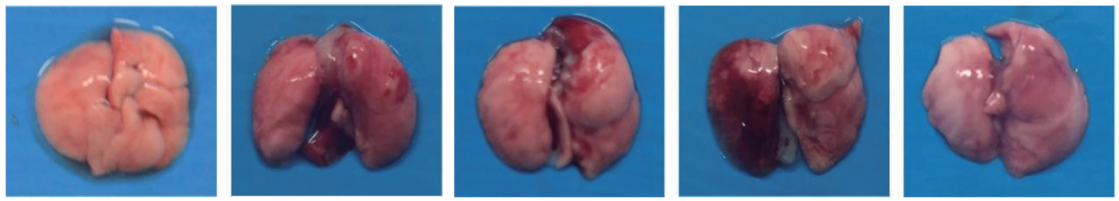
2.3 小鼠冲击伤后肺组织显微病理学改变

光镜下各组冲击伤的小鼠肺组织主要表现为肺泡结构破裂、融合,肺泡腔内出血、水肿,炎症细胞浸润。不同损伤程度肺组织病理显示,随着损伤加重,肺泡壁从局部塌陷发展至大面积塌陷、叠压,冲击中、重度组肺泡腔消失;轻度组少量肺泡腔出血到冲击中度组大面积肺组织间质、肺泡和支气管内的出血,最后重度组出血充满肺泡,肺组织实变;中度

组可见少量渗出液，冲击重度组肺泡腔内可见明显的液体渗出和组织水肿，并伴有不同程度的炎性细胞浸润（图4A）。不同损伤时间肺组织病理显示，随着时间的增加6~24 h肺泡壁塌陷加重，肺间隔逐渐增宽，肺组织间质、肺泡和支气管内的出血、液体渗出、组织水肿也随时间逐渐增加，同时伴有不同程度的炎症浸润，其中24 h可见肺组织实变，但48 h肺组织病理肺间隔宽度，肺组织间质、肺泡和支气管内的出血、液体渗出、组织水肿较24 h均有所改善（图4B）。

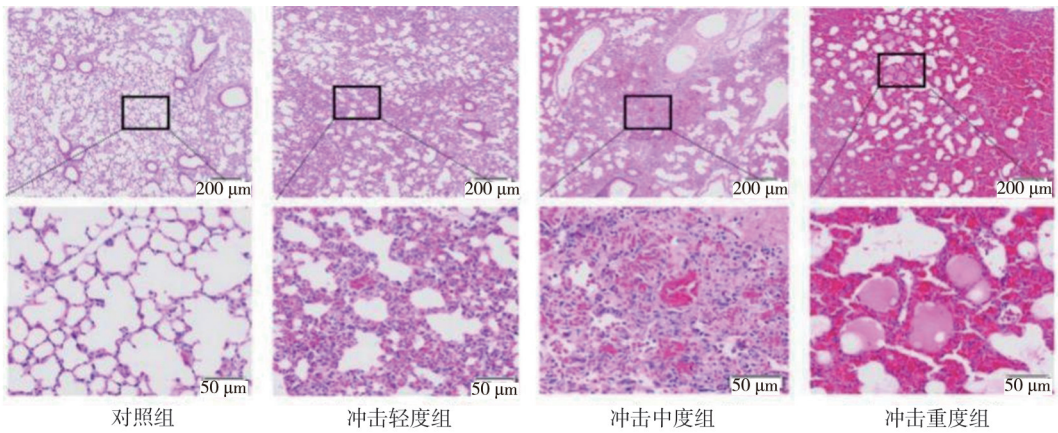


A. 不同损伤程度肺大体解剖

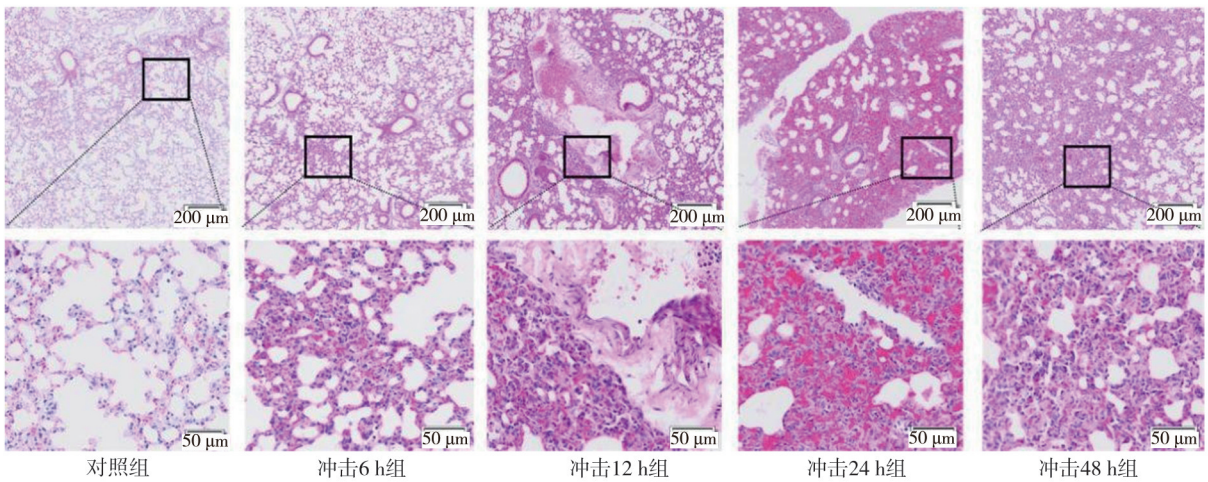


B. 不同损伤时间肺大体解剖

图3 肺冲击伤后肺大体解剖图



A. 不同损伤程度肺组织HE染色



B. 不同损伤时间肺组织HE染色

图4 肺冲击伤后组织HE染色

2.4 小鼠冲击伤后肺组织炎症因子变化

不同损伤程度肺组织炎症因子：与对照组相比，冲击轻、中、重度组小鼠肺组织中IL-1β、IL-6和TNF-α含量均明显升高，差异有统计学意义（F=85.390，F=28.840，F=16.360，均P<0.001）（表2）；不同损伤时间肺冲击伤组织炎症因子：与对照组相比，冲击6 h、12 h、24 h和48 h组小鼠肺组织中IL-1β、IL-6和TNF-α的含量均明显升高，差异有统计学意义（F=73.690，F=68.580，F=112.200，均P<0.001）（表3）。提示不同损伤程度和时间肺组织均大量分泌炎症因子。

2.5 不同程度肺冲击伤后GNAS和细胞骨架-连接蛋白表达变化

不同损伤程度小鼠肺冲击伤组织WB检测结果显示随着损伤加重GNAS蛋白表达逐渐降低（F=14.900，P<0.001），冲击轻、中、重度组GNAS蛋白相对表达量均低于对照组，冲击中、重度组GNAS低于冲击轻度组；与对照组相比伤后β-actin、β-tubulin表达随着损伤程度增加逐渐降低（F=5.792，F=11.510，均P<0.05），冲击中、重度组β-actin低于对照组和冲击轻度组，冲击重度组β-tubulin蛋白相对表达量低于对照组和冲击轻、中度组；FAK表达随着损伤加重逐渐降低（F=29.530，P<0.001），冲击重度组低于对照组和冲击轻、中度组；ZO-1表达随着损伤加重逐渐降低（F=4.855，P=0.003），冲击重度组低于对照组和冲击轻度组；E-cadherin表达随着损伤加重逐渐降低（F=2.958，P=0.037），冲击中、重度组低于对照组。上述结果提示不同程度肺冲击伤G蛋白信号通路改变，同时肺泡上皮细胞骨架及连接的破坏随着损伤加重而加剧（表4，图5）。

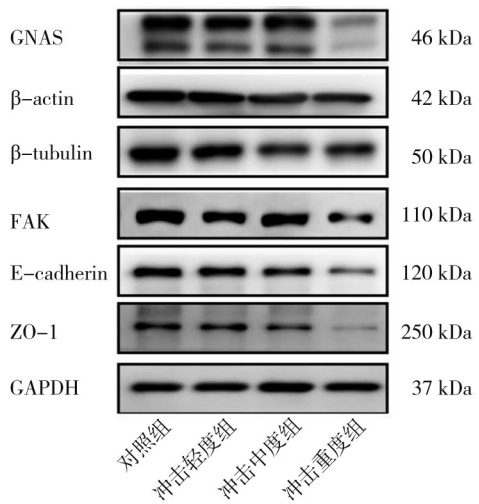


图5 不同损伤程度肺冲击伤GNAS及细胞骨架-连接蛋白水平

表2 不同损伤程度肺冲击伤组织炎症因子含量变化（n=6，$\bar{x}\pm s$）

组别	IL-1β（pg/mL）	IL-6（pg/mL）	TNF-α（pg/mL）
对照组	83.21 ± 8.66	64.07 ± 6.05	111.40 ± 10.83
冲击轻度组	132.00 ± 11.08[a]	97.01 ± 13.79[a]	181.50 ± 35.86[a]
冲击中度组	149.40 ± 12.53[ab]	101.90 ± 8.10[a]	203.70 ± 31.48[a]
冲击重度组	119.40 ± 4.90[abc]	97.67 ± 11.81[a]	169.20 ± 38.54[ac]
F值	85.390	28.840	16.360
P值	<0.001	<0.001	<0.001

注：a，与对照组比较，P<0.05；b，与冲击轻度组比较，P<0.05；c，与冲击中度组比较，P<0.05

表3 不同损伤时间肺冲击伤组织炎症因子含量变化（n=6，$\bar{x}\pm s$）

组别	IL-1β（pg/mL）	IL-6（pg/mL）	TNF-α（pg/mL）
对照组	90.38 ± 7.72	63.37 ± 5.67	115.90 ± 5.95
冲击6 h组	159.30 ± 9.48[a]	93.85 ± 3.00[a]	218.60 ± 13.17[a]
冲击12 h组	166.20 ± 5.34[a]	93.80 ± 7.73[a]	208.50 ± 6.40[a]
冲击24 h组	173.50 ± 11.09[ab]	106.50 ± 5.87[abc]	222.30 ± 6.53[ac]
冲击48 h组	148.20 ± 13.51[abcd]	110.70 ± 5.93[abc]	198.80 ± 15.57[abd]
F值	73.690	68.580	112.200
P值	<0.001	<0.001	<0.001

注：a，与对照组比较，P<0.05；b，与冲击6 h组比较，P<0.05；c，与冲击12 h组比较，P<0.05；d，与冲击24 h组比较，P<0.05

表4 不同损伤程度肺冲击伤GNAS及细胞骨架-连接蛋白相对表达水平（n=6，$\bar{x}\pm s$）

组别	GNAS	β-actin	β-tubulin	FAK	ZO-1	E-cadherin
对照组	1.02 ± 0.23	1.13 ± 0.16	0.97 ± 0.21	0.92 ± 0.17	0.65 ± 0.27	0.99 ± 0.18
冲击轻度组	0.88 ± 0.32[a]	1.09 ± 0.25	0.96 ± 0.15	0.86 ± 0.19	0.61 ± 0.27	0.90 ± 0.18
冲击中度组	0.70 ± 0.17[ab]	0.98 ± 0.19[ab]	0.88 ± 0.15[b]	0.81 ± 0.17	0.52 ± 0.21	0.83 ± 0.24[a]
冲击重度组	0.62 ± 0.34[ab]	0.96 ± 0.24[ab]	0.73 ± 0.21[abc]	0.48 ± 0.22[abc]	0.41 ± 0.25[ab]	0.80 ± 0.30[a]
F值	14.900	5.792	11.510	29.530	4.855	2.958
P值	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	0.003	0.037

注：a，与对照组比较，P<0.05；b，与冲击轻度组比较，P<0.05；c，与冲击中度组比较，P<0.05

2.6 肺冲击伤后不同时间GNAS及细胞骨架-连接蛋白表达变化

不同损伤时间小鼠肺冲击伤组织WB检测结果显示随着时间延长GNAS蛋白表达逐渐降低(F=5.340, P=0.001)，伤后冲击12 h组GNAS蛋白相对表达量低于对照组，冲击24 h和48 h组低于对照组和冲击6 h组；与对照组相比伤后β-actin、β-tubulin蛋白表达在6 h均略有升高，随后逐渐降低(F=7.087, F=7.893, 均 P<0.001)，冲击24 h、48 h组β-actin、β-tubulin蛋白相对表达量低于对照组和冲击6 h、12 h组；与对照组相比伤后FAK蛋白表达在6 h略有升高，随后逐渐降低(F=7.024, P<0.001)，冲击24 h组FAK表达低于对照组和冲击6 h组；与对照组相比伤后ZO-1蛋白表达在6 h均略有升高(F=8.768, P<0.001)，随后逐渐降低，冲击24 h和48 h组ZO-1表达低于对照组和冲击6 h、12 h组；与对照组相比伤后E-cadherin蛋白表达逐渐降低(F=7.536, P=0.001)，伤后冲击24 h组E-cadherin蛋白相对表达量低于对照组和冲击6 h、12 h组，冲击48 h组E-cadherin蛋白相对表达量低于对照组和冲击6 h组。上述结果提示肺冲击伤后G蛋白信号通路随着时间发生改变，同时肺泡上皮细胞骨架及连接的破坏随着时间加重(表5，图6)。

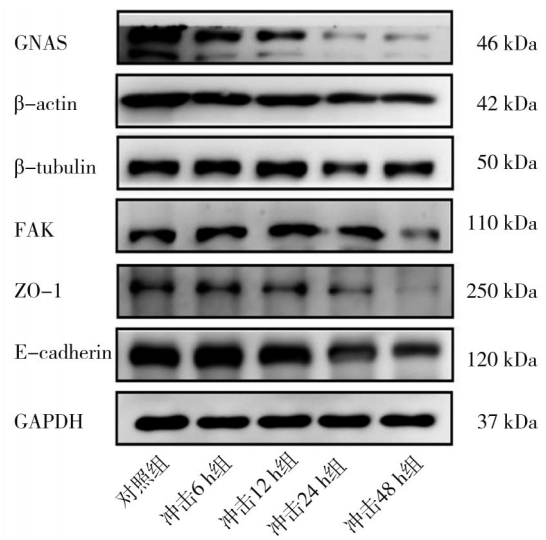


图6 不同损伤时间肺冲击伤GNAS及细胞骨架-连接蛋白水平

3 讨 论

肺冲击伤的致伤机制核心在于冲击波超压-负压序列与机体间的能量传递。超压通过内爆效应、惯性效应及压力差使肺泡内气体急剧压缩与膨胀，导致肺泡-毛细血管屏障机械性撕裂；继而负压进一步加剧组织损伤[5]。组织损伤后即刻引发继发生化级联反应，即强烈的局部炎症反应与氧化应激等病理过程，形成“二次打击”，共同导致肺水肿、出血及呼吸功能障碍。本研究为现场实验，采用实弹爆炸致小鼠肺损伤模型，观察了伤后不同损伤程度和不同损伤时间肺大体组织病理改变，伤后小鼠肺部主要表现为出血、水肿及炎症细胞浸润，且病变程度与损伤程度呈正相关。大体解剖与镜下观察均证实，损伤严重程度及病程进展与肺泡结构破坏、腔隙内渗出及实变形成密切相关。值得注意的是，损伤在24 h达到高峰，48 h可见修复迹象，提示肺部在冲击伤后具有一定自我修复能力。

目前，国内外对肺冲击伤分子机制的研究多集中于炎症风暴、氧化应激及程序性细胞坏死等经典通路[6-8]，其中炎症风暴在肺冲击伤的发生、发展和预后中起核心作用，炎症因子可破坏肺泡毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞的屏障功能，增加血管通透性，导致大量富含蛋白的液体渗入肺泡腔和间质。本研究肺冲击伤后小鼠肺组织中IL-1β、IL-6及TNF-α等关键促炎因子表达均显著升高，且随损伤程度加重和损伤时间延长呈持续上升趋势，至24 h达峰值，48 h仍维持较高水平。这表明炎症反应在肺冲击伤病理进程中发挥重要作用，其剧烈程度与组织损伤严重性及时程密切相关，说明早期过

表5 不同损伤时间肺冲击伤GNAS及细胞骨架-连接蛋白相对表达水平(n=6, $\bar{x}\pm s$)

组别	GNAS	β-actin	β-tubulin	FAK	ZO-1	E-cadherin
对照组	1.25 ± 0.31	1.11 ± 0.25	1.06 ± 0.23	0.78 ± 0.13	0.76 ± 0.22	1.04 ± 0.07
冲击6 h组	1.06 ± 0.33	1.18 ± 0.30	1.22 ± 0.29	0.84 ± 0.11	0.88 ± 0.37	1.00 ± 0.12
冲击12 h组	0.98 ± 0.19^{a}	1.04 ± 0.25	1.03 ± 0.25	0.70 ± 0.23	0.70 ± 0.18	0.90 ± 0.20
冲击24 h组	0.76 ± 0.23^{ab}	0.77 ± 0.22^{abc}	0.68 ± 0.07^{abc}	0.58 ± 0.19^{ab}	0.44 ± 0.18^{abc}	0.72 ± 0.02^{abc}
冲击48 h组	0.74 ± 0.32^{ab}	0.74 ± 0.19^{abc}	0.65 ± 0.23^{abc}	0.52 ± 0.21^{abc}	0.48 ± 0.25^{abc}	0.73 ± 0.17^{ab}
F值	5.340	7.087	7.893	7.024	8.768	7.536
P值	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001

注：a，与对照组比较，P<0.05；b，与冲击轻度组比较，P<0.05；c，与冲击中度组比较，P<0.05

度炎症反应对肺冲击伤发生发展起关键作用。

GNAS作为G蛋白信号通路的核心刺激因子，可编码刺激性G蛋白（stimulatory G protein alpha subunit，Gsα）的α亚基，激活腺苷酸环化酶生成第二信使环磷酸腺苷（cyclic adenosine monophosphate，cAMP），cAMP可激活下游效应因子包括蛋白激酶A（protein kinase A，PKA）、交换蛋白（exchange protein activated by cAMP，EPAC）以及环状核苷酸门控通道。cAMP水平升高可抑制炎症细胞迁移，调节内皮和肺上皮屏障的形成及细胞因子的分泌[9-10]。已有研究发现脂多糖诱导的大鼠急性肺损伤中，激活cAMP/PKA信号可抑制核因子κB（nuclear factor kappa-B，NF-κB）、丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）炎症通路，缓解肺水肿[11]。本研究中GNAS的表达随损伤程度加重和时间延长而持续显著下降，表明G蛋白偶联受体（G-protein coupled receptor，GPCR）介导的信号转导在冲击伤后受到严重抑制。这与观察到的IL-1β、TNF-α等细胞因子水平升高高度吻合；此外cAMP-PKA信号的减弱直接影响其对细胞骨架蛋白和连接蛋白的稳定作用。研究表明，持续激活的PKA可通过磷酸化多个下游关键因子，从而协同调控细胞骨架的动态平衡[12]。PKA直接磷酸化并激活血管扩张剂刺激磷蛋白（vasodilator-stimulated phosphoprotein，VASP），可增强其促肌动蛋白聚合的能力[13]；PKA通过磷酸化并抑制RhoA的鸟苷酸交换因子（p115 Rho-specific guanine nucleotide exchange factor，p115-RhoGEF），同时磷酸化并激活RhoA的GTP酶激活蛋白（Rho GTPase activating protein 22，ARHGAP22），双重下调RhoA-GTP的活性，从而调控肌动蛋白细胞骨架[10]。此外，PKA还可作用于微管及细胞黏附结构，通过磷酸化微管相关蛋白[如微管相关蛋白2（microtubule-associated protein 2，MAP2）、微管相关蛋白Tau（microtubule-associated protein Tau，Tau）]影响微管稳定性[14-15]，同时通过磷酸化FAK、桩蛋白等促进黏附斑的周转[16]，进一步协调细胞骨架的重塑进程。

细胞骨架不仅是维持细胞形态的支架，更是细胞连接蛋白的锚定基础，其解聚和破坏直接导致细胞失去力学稳定性，使细胞在机械力作用下更易受损，并使细胞连接蛋白提供锚定位点的结构消失[17]。细胞连接是肺泡毛细血管屏障结构的关键组成部分，对于维持肺泡上皮屏障的完整性及调控毛细血管通透性起关键作用[18]，紧密连接蛋白ZO-1作为构成细胞旁屏障的关键组分，通过组装紧密连接复合体以有效封闭上皮细胞间的旁细胞途径；与此同时，由E-cadherin介导的黏附连接则为上皮屏障的整体结构与稳定性提供了细胞-细胞必需的锚定作用，FAK是整合素介导的细胞-基质黏附信号的核心[19-21]。本研究显示细胞骨架蛋白及连接蛋白随损伤程度加重和时间延长主要呈现下降趋势，但β-actin、β-tubulin、FAK和ZO-1的蛋白表达在伤后6 h略有升高，可能为急性期的应激代偿反应。在损伤初期，细胞可能试图通过上调细胞骨架蛋白的表达来对抗冲击波所致的机械应力，维持细胞结构的完整性，然而，随着损伤的持续进展，这种代偿机制迅速被更强烈的破坏性过程所压倒。在24 h和48 h，β-actin、β-tubulin、FAK和ZO-1的蛋白表达显著降低，表明细胞骨架大规模解体和降解，细胞连接被破坏。该现象与GNAS的下调密切相关。如前所述，cAMP/PKA信号抑制会导致RhoA激活和肌动蛋白细胞骨架的剧烈重构，伴随着大量的细胞骨架蛋白的解聚和降解。因此，GNAS信号的衰减可能是后续细胞骨架重构和连接破坏的始动因素之一。

本研究观察了爆炸冲击伤不同损伤程度和不同损伤时间GNAS表达变化与肺泡上皮细胞骨架改变的时效、量效关系。但损伤时间仅观察至48 h，未探讨更长时间点的修复过程。针对肺冲击伤后肺泡毛细血管屏障破坏，本研究仅探讨了肺泡上皮细胞骨架及连接蛋白的变化，未探讨损伤后肺泡毛细血管内皮细胞骨架及连接蛋白的变化。后续研究将进一步探讨修复时长及冲击损伤后其他类型细胞开展进一步研究。

综上所述，本研究结果表明，肺冲击伤不仅引发了强烈的炎症风暴，更导致了GPCR信号通路（以GNAS为代表）的抑制和肺泡上皮细胞骨架-连接复合体的结构性破坏。两者间存在潜在的关联：GNAS通路的抑制可能削弱了其对细胞骨架稳定性的调控能力，而机械力的直接破坏又可能反馈性影响GPCR信号。这种“信号-结构”的双重损害共同推动了肺冲击伤的病理进程。这为未来治疗策略提供了新的思路，即不仅需要抗炎，更应着眼于稳

定细胞骨架、增强细胞连接以及调控G蛋白信号，从而多维度促进肺屏障功能的修复。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 周慈：实验设计，研究实施，论文撰写；邹杰：动物实验，数据收集；邓蒙生：实验设计，数据分析；郭玲：动物实验，数据整理；杨光明：实验技术指导、经费与资源支持；王建民：研究方案设计、论文修改与审阅

参 考 文 献

[1] Li JF, Zhang JF, Shi MY, et al. Crosstalk between inflammation and hemorrhage/coagulation disorders in primary blast lung injury[J]. Biomolecules, 2023, 13(2): 351.

[2] Jara-Medina K, Lillo L, Lagunas C, et al. Identification of vascular genes differentially expressed in the brain of patients with Alzheimer's disease[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2024, 22(6): 404-416.

[3] Masubuchi Y, Nakagawa Y, Medina J, et al. T1R3 homomeric sweet taste receptor regulates adipogenesis through Gαs-mediated microtubules disassembly and Rho activation in 3T3-L1 cells[J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0176841.

[4] 蒋建新, Ibolja Cernak, 王正国, 等. 肺冲击伤对大鼠学习、记忆能力的影响及其机制[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(6): 1000-5404.

Jiang JX, Cernak I, Wang ZG, et al. Effects of blast injury of the lungs on learning and memory capacity and their mechanisms in rats[J]. Acta Acad Med Mil Tertiae, 1999, 21(6): 1000-5404.

[5] Li N, Geng CH, Hou SK, et al. Damage-associated molecular patterns and their signaling pathways in primary blast lung injury: new research progress and future directions[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(17): 6303.

[6] Hubbard WB, Lashof-Sullivan MM, Lavik EB, et al. Steroid-loaded hemostatic nanoparticles combat lung injury after blast trauma [J]. ACS Macro Lett, 2015, 4(4): 387-391.

[7] Ning JL, Mo LW, Lu KZ, et al. Lung injury following lower extremity blast trauma in rats[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2012, 73(6): 1537-1544.

[8] Liu MY, Lei BF. Pathogenesis of hypervirulent group a *Streptococcus*[J]. Jpn J Med, 2018, 1(6): 269-275.

[9] Lu CL, Xia J, Zhou YJ, et al. Loss of Gsα impairs liver regeneration through a defect in the crosstalk between cAMP and growth factor signaling[J]. J Hepatol, 2016, 64(2): 342-351.

[10] Zimmerman NP, Kumar SN, Turner JR, et al. Cyclic AMP dysregulates intestinal epithelial cell restitution through PKA and RhoA[J]. Inflamm Bowel Dis, 2012, 18(6): 1081-1091.

[11] Dhar R, Li YJ, Hu ZQ, et al. PDE4B Modulates Phosphorylation of p65 (Ser468) *via* cAMP/PKA in Acute Lung Injury[J]. Lung, 2025, 203(1): 33.

[12] Wang WB, Li JT, Hui Y, et al. Combination of pseudoephedrine and emodin ameliorates LPS-induced acute lung injury by regulating macrophage M1/M2 polarization through the VIP/cAMP/PKA pathway [J]. Chin Med, 2022, 17(1): 19.

[13] Krause M, Dent EW, Bear JE, et al. *Ena*/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2003, 19: 541-564.

[14] Sánchez C, Díaz-Nido J, Avila J. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2(MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function[J]. Prog Neurobiol, 2000, 61(2): 133-168.

[15] Qureshi HY, Paudel HK. Parkinsonian neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine(MPTP) and alpha-synuclein mutations promote Tau protein phosphorylation at Ser262 and destabilize microtubule cytoskeleton *in vitro*[J]. J Biol Chem, 2011, 286(7): 5055-5068.

[16] Zhang HT, Ramsey A, Xiao YT, et al. Dynamic phosphorylation and dephosphorylation of cyclase-associated protein 1 by antagonistic signaling through cyclin-dependent kinase 5 and cAMP are critical for the protein functions in actin filament disassembly and cell adhesion[J]. Mol Cell Biol, 2020, 40(4): e00282-e00219.

[17] Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton [J]. Nature, 2010, 463(7280): 485-492.

[18] Peter A, Fatykhova D, Kershaw O, et al. Localization and pneumococcal alteration of junction proteins in the human alveolar-capillary compartment[J]. Histochem Cell Biol, 2017, 147(6): 707-719.

[19] Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6(8): 622-634.

[20] Zihni C, Mills C, Matter K, et al. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17(9): 564-580.

[21] Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6(1): 56-68.

(收稿：2025-10-09；修回：2026-03-06；录用：2026-03-20)

(责任编辑：曾 玲)

本文引用格式：

周慈，邹杰，邓蒙生，等. 小鼠爆炸冲击伤后GNAS表达与肺泡上皮细胞骨架改变的相关性研究[J]. 重庆医科大学学报，XXXX，XX(XX)：1-8.