



安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: RACK1 调控 LPS 致大鼠肺微血管内皮细胞损伤的机制研究
作者: 李琪琪, 吴翔晖, 尤青海
网络首发日期: 2025-08-20
引用格式: 李琪琪, 吴翔晖, 尤青海. RACK1 调控 LPS 致大鼠肺微血管内皮细胞损伤的机制研究[J/OL]. 安徽医科大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250820.1057.005>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

RACK1 调控 LPS 致大鼠肺微血管内皮细胞损伤的机制研究

李琪琪, 吴翔晖, 尤青海

(安徽医科大学第一附属医院呼吸与危重症医学科, 合肥 230022)

摘要 目的 探讨活化的蛋白激酶C受体 1 (RACK1) 对脂多糖 (LPS) 诱导大鼠肺微血管内皮细胞 (RPMVEC) 屏障功能调控及其与音猬因子 (SHH) 信号通路的相互作用。方法 体外培养RPMVEC, 将RPMVEC随机分为: si-NC组、si-NC+LPS组、si-RACK1 组、si-RACK1+LPS组、si-RACK1+LPS+Vismodegib组和Vismodegib+SAG组; 小干扰RNA (siRNA) 技术沉默RPMVEC的RACK1, 并给予LPS (10 mg/L)、SHH信号通路抑制剂 (Vismodegib) (20 μ mol/L) 和SHH信号通路激动剂 (SAG) (1 μ mol/L) 处理细胞。干预结束后, 免疫荧光法检测RPMVEC中RACK1 及小窝蛋白 (caveolin-1) 表达; Transwell 法检测跨内皮细胞电阻 (TEER); 免疫印迹试验检测各组RACK1、胶质瘤相关癌基因同源蛋白 1 (Gli-1) 和caveolin-1 蛋白表达水平。结果 沉默RACK1 可使LPS诱导RPMVEC的TEER值升高 ($P<0.05$), caveolin-1 表达降低 ($P<0.05$), Gli-1 表达升高 ($P<0.05$); 抑制SHH信号通路可逆转沉默RACK1 所致LPS诱导RPMVEC增高的TEER值 ($P<0.05$), 且RACK1、caveolin-1 表达升高 ($P<0.05$); 激活SHH信号通路则使沉默RACK1 所致LPS诱导RPMVEC的TEER值升高 ($P<0.05$), 且RACK1、caveolin-1 表达降低 ($P<0.05$)。结论 RACK1 参与LPS致RPMVEC通透性升高, 其作用可能通过调控SHH信号通路和caveolin-1 实现。

关键词 活化的蛋白激酶 C 受体 1; 音猬因子信号通路; 肺微血管内皮细胞; 通透性; caveolin-1

中图分类号 R 563.8

文献标识码 A

The mechanism of RACK1 regulating LPS-induced functional damage of rat pulmonary microvascular endothelial cells

Li Qiqi, Wu Xianghui, You Qinghai

(Dept of Respiratory and Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (编号: 2208085MH195)

作者简介: 李琪琪, 女, 硕士研究生;

尤青海, 男, 副教授, 主任医师, 博士生导师, 通信作者, E-mail: amormor@126.com

Abstract Objective To investigate the effect of receptor of activated protein kinase C 1 (RACK1) on lipopolysaccharide (LPS)-induced barrier function in rat pulmonary microvascular endothelial cells (RPMVEC) and its interplay with the Sonic hedgehog (SHH) signaling pathway. **Methods** RPMVEC were cultured *in vitro* and randomly divided into si-NC, si-NC+LPS, si-RACK1, si-RACK1+LPS, si-RACK1+LPS+Vismodegib and Vismodegib+SAG groups. The RACK1 of RPMVEC was silenced by small interfering RNA (siRNA) technology and the cells were treated with LPS(10 mg/L), SHH signaling pathway inhibitor (Vismodegib) (20 μ mol/L) and SHH signaling pathway agonist (SAG) (1 μ mol/L). Following the intervention, the expressions of RACK1 and caveolin-1 in RPMVEC were detected by immunofluorescence, while the transendothelial electrical resistance (TEER) was evaluated using the method of Transwell, and the expression levels of RACK1, glioma-associated oncogene homolog 1 (Gli-1) and caveolin-1 were detected by Western blot. **Results** Silencing RACK1 significantly increased the TEER value of RPMVEC induced by LPS ($P<0.05$). The expression of caveolin-1 decreased ($P<0.05$), and the expression of Gli-1 increased ($P<0.05$). Inhibiting the SHH signaling pathway could reverse the increased TEER value of LPS-induced RPMVEC caused by silencing RACK1 ($P<0.05$), and the expressions of RACK1 and caveolin-1 increased ($P<0.05$). Activation of the SHH signaling pathway increased the TEER value of LPS-induced RPMVEC caused by silencing RACK1 ($P<0.05$), and the expressions of RACK1 and caveolin-1 decreased ($P<0.05$). **Conclusion** RACK1 plays a role in LPS-induced hyperpermeability of RPMVEC, and its effect may be achieved by modulating the SHH signaling pathway and caveolin-1.

Key words receptor of activated protein kinase C 1; sonic hedgehog signaling pathway; pulmonary microvascular endothelial cells; permeability; caveolin-1

Fund program Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2208085MH195)

Corresponding author You Qinghai, E-mail: amormor@126.com

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是一种严重的肺部疾病, 主要特征是急性弥漫性炎性肺损伤, 目前病死率近 40%^[1]。肺微血管内皮细胞是肺泡—毛细血管屏障的重要组成部分^[2], 通过细胞间连接形成稳定屏障从而控制物质交换^[3]。ARDS时, 肺微血管内皮细胞屏障受损, 液体和中性粒细胞等渗入肺泡腔, 严重影响屏障

功能, 最终导致低氧血症和呼吸窘迫等临床症状^[4-5]。活化的蛋白激酶C受体 1 (receptor of activated C kinase 1, RACK1) 是不同激酶和膜受体的支架蛋白, 将蛋白运送到相应作用位点, 协助不同信号通路之间的调控^[6]。音猬因子 (sonic hedgehog, SHH) 信号通路是一种高度保守的细胞信号传导机制^[7], 参与细胞增殖、分化和组织修复等过程, 与多种疾病的发生发展密切相关^[8]。前期研究^[9]显示, RACK1 可能参与脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 损伤大鼠肺微血管内皮细胞 (rat pulmonary microvascular endothelial cells, RPMVEC) 过程, 且SHH信号通路通过下调RACK1 表达量减轻LPS刺激RPMVEC反应, 其他研究^[10]显示在ARDS发病过程中, SHH信号通路发挥着关键作用。因此, 该研究拟探讨RACK1 是否调控LPS损伤RPMVEC屏障功能及其与SHH信号通路之间的关系, 为ARDS的治疗策略提供新视角。

1 材料与方法

1.1 材料 SPF级SD雄性大鼠, 6~8 周龄, 体质量约 120 g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司[合格证号: SCXK (辽) 2020-0001], 在 22℃~26℃, 50%~60%湿度环境下饲养, 饮水清洁, 自由摄食。DMEM培养基 (美国Gibco公司, 货号: C11995500BT)。胎牛血清 (天津康源生物技术有限公司, 货号: KY-01004)。抗荧光淬灭封片剂 (含DAPI) (北京Biosharp科技有限公司, 货号: BL739A)。RACK1 单克隆抗体 (英国Abcam公司, 货号: ab62735)。caveolin-1 及胶质瘤相关癌基因同源蛋白 1 (glioma-associated oncogene homolog 1, Gli-1) 单克隆抗体 (上海Abmart生物医药有限公司, 货号: PA5382S、PC23173S)。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司, 货号: ZB-2301)。SHH信号通路特异性抑制剂Vismodegib及SHH信号通路特异性激动剂 (smoothened agonist, SAG) (山东SparkJade生物技术有限公司, 货号: SJ-MX0136、SJ-MX0162)。Starvio^{PM}siRNA原代细胞转染试剂 (上海星启百代生物科技有限公司, 货号: T11008)。siRNA序列设计及合成 (上海GenePharma制药技术有限公司, 货号: A01001)。其余实验试剂均为国产分析纯。Millicell ERS-2 电阻仪 (型号: MERS00002) 及 24 孔悬挂式Transwell培养皿 (孔径 0.4 μm, 有效膜面积 0.33 cm², 货号: PIHT12R48) 购自美国Millipore公司。激光扫描共聚焦显微镜 (德国Carl Zeiss公司, 型号: LSM-880)。

1.2 方法

1.2.1 RPMVEC分组及处理 参照本实验室建立的方法及参考文献进行^[11]。取SPF级SD大鼠的肺脏, 体外培养RPMVEC, 传代培养至第 3 代进行实验。将RPMVEC随机分为: MOCK组 (空白对照组)、si-NC组 (阴性干扰对照组)、si-NC+LPS组 (转染si-NC后加入

10 mg/L LPS培养 12 h)、si-RACK1 组(转染si-RACK1)、si-RACK1+LPS组(转染si-RACK1后加入 10 mg/L LPS培养 12 h)、si-RACK1+ LPS + Vismodegib组(转染si-RACK1后加入 10 mg/L LPS培养 6 h, 再加入 20 μ mol/L Vismodegib 培养 6 h)、si-RACK1+ LPS + SAG组(转染si-RACK1后加入 10 mg/L LPS培养 6 h, 再加入 1 μ mol/L SAG培养 6 h)。药用量及培养时间参照本实验室既往研究进行^[9,11]。RPMVEC细胞转染过程为: 取生长状态良好的第 3 代RPMVEC接种于 6 孔板, 密度达 70%~80%时进行转染, 对照组 (si-NC组) 转染si-NC, 沉默组 (si-RACK1) 转染si-RACK1, siRNA-RACK1 及阴性对照干扰序列见表 1, 实验过程严格按照Starvio^{PM} siRNA说明书进行, 转染 24 h后进行换液, 继续培养相应时间进入后续实验。

表 1 RACK1 siRNA序列
Tab.1 RACK1 siRNA sequences

Name	Sequences (5'- 3')
si-RACK1-1	S: CCACUUUGUUAGCGAUGUUTT AS: ACGUGACACGUUCGGAGAATT
si-RACK1-2	S: CCCGAGACAAGACCAUUAATT AS: AACAUCGCUAACAAGUGGTT
si-RACK1-3	S: GCCACACUGGCUAUCUGAATT AS: UUAAUGGUCUUGUCUCGGGTT
si-RACK1-4	S: GUGUAUGGCAGGUGACUAUTT AS: UUCAGAUAGCCAGUGUGGCTT
Negative control	S: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT AS: AUAGUCACCUGCCAUACACTT

1.2.2 Transwell法测量跨内皮细胞电阻 (transendothelial electrical resistance, TEER) 将体外分离培养的RPMVEC消化后按 1×10^5 个/ cm^2 密度接种于Transwell上室, 培养至细胞单层电阻值增长至稳定状态, 干预后使用Millicell ERS-2 电阻仪检测TEER变化。电阻仪电极置于 70%乙醇溶液中浸泡 15 min后用DMEM培养液冲洗备用。实验以未接种细胞并统一培养液的Transwell板为空白对照计算基础电阻值, 计算TEER值, TEER值 (单位: $\Omega\times\text{cm}^2$) = (内皮细胞电阻值-基础电阻值) $\times$ Transwell小室膜面积 (0.33 cm^2)。

1.2.3 免疫印迹试验 (Western blot, WB) 各组细胞处理完成后提取细胞总蛋白。使用 10% SDS-PAGE凝胶, 电泳分离蛋白各组分后, 恒流转至PVDF膜上, 无蛋白快速封闭液封闭 1.5 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗过夜 (至少 16 h), RACK1 (1:1 000)、 β -actin (1:2 000)、Caveolin-

1 (1:1 000)、Gli-1 (1:800)。TBST洗膜 10 min，重复 3 次。加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG (1:10 000) 室温孵育 1 h。TBST洗膜 10 min，重复 3 次。ECL超敏发光显影并拍照。使用ImageJ软件对条带进行灰度值分析。蛋白表达水平=蛋白灰度值/对应内参灰度值。

1.2.4 免疫荧光染色 将爬片置于 12 孔板皿底，接种细胞密度为 1×10^4 个/mL，待细胞生长至合适密度，弃培养液，室温下 4% 多聚甲醛固定。吸弃固定液，PBS 洗 3 次，每次 5 min。0.1% Triton-X100 室温通透细胞。加入 1 mLBSA 室温封闭 1 h。吸弃封闭液，PBS 洗 3 次，每次 5 min，加入 RACK1 (1:100)、caveolin-1 (1:100) 一抗 4 °C 过夜。吸弃一抗，PBS 洗 3 次，每次 5 min。加入 Alexa Fluor 标记的荧光二抗 (1:200)，避光、室温放置 1 h。PBS 洗 3 次，每次 5 min。滴加抗荧光淬灭封片剂 (含 DAPI) 于载玻片上，取出爬片与载玻片黏合，共聚焦显微镜下拍照。使用 ImageJ 软件进行荧光强度分析。相对荧光强度=各组平均荧光强度/对照组平均荧光强度。

1.2.5 统计学处理 应用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，两组间比较采用独立样本 *t* 检验，多组比较采用单因素方差分析，事后两两比较采用 Tukey 检验；*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 沉默 RACK1 的 RPMVEC 模型建立 si#1 组 RACK1 表达水平较 si-NC 组显著下降 (*P*_{Tukey} < 0.05)，因此，选择 si#1 用于后续实验。见图 1。

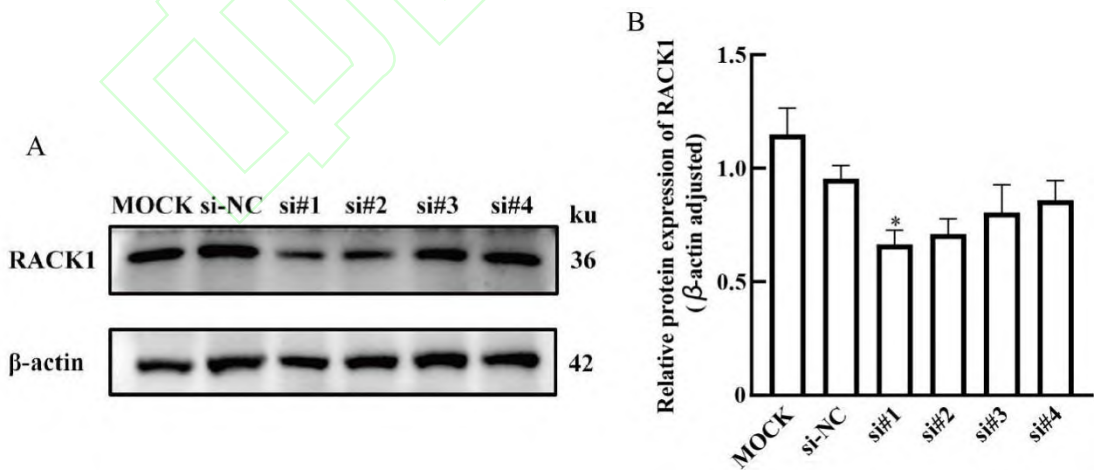


图 1 各组RPMVEC中RACK1 蛋白表达的比较 (n = 5)

Fig.1 Comparison of RACK1 protein expression in RPMVEC in each group (n = 5)

A: The expression of RACK1 was detected by WB in RPMVEC; B: Relative protein expression of

RACK1; * $P < 0.05$ vs si-NC group.

2.2 免疫荧光法检测RACK1在RPMVEC中表达及RACK1与caveolin-1的定位 共聚焦显微镜下观察到，RPMVEC中RACK1在核内外均有分布，caveolin-1在细胞膜和细胞质中分布。相较si-NC组，si-NC+LPS组RACK1和caveolin-1相对荧光强度升高（均 $P_{\text{Tukey}} < 0.05$ ）；相较si-NC+LPS组，si-RACK1+LPS组RACK1和caveolin-1相对荧光强度降低（均 $P_{\text{Tukey}} < 0.05$ ）。见图2。提示RACK1可能通过调控caveolin-1参与LPS致RPMVEC损伤过程。

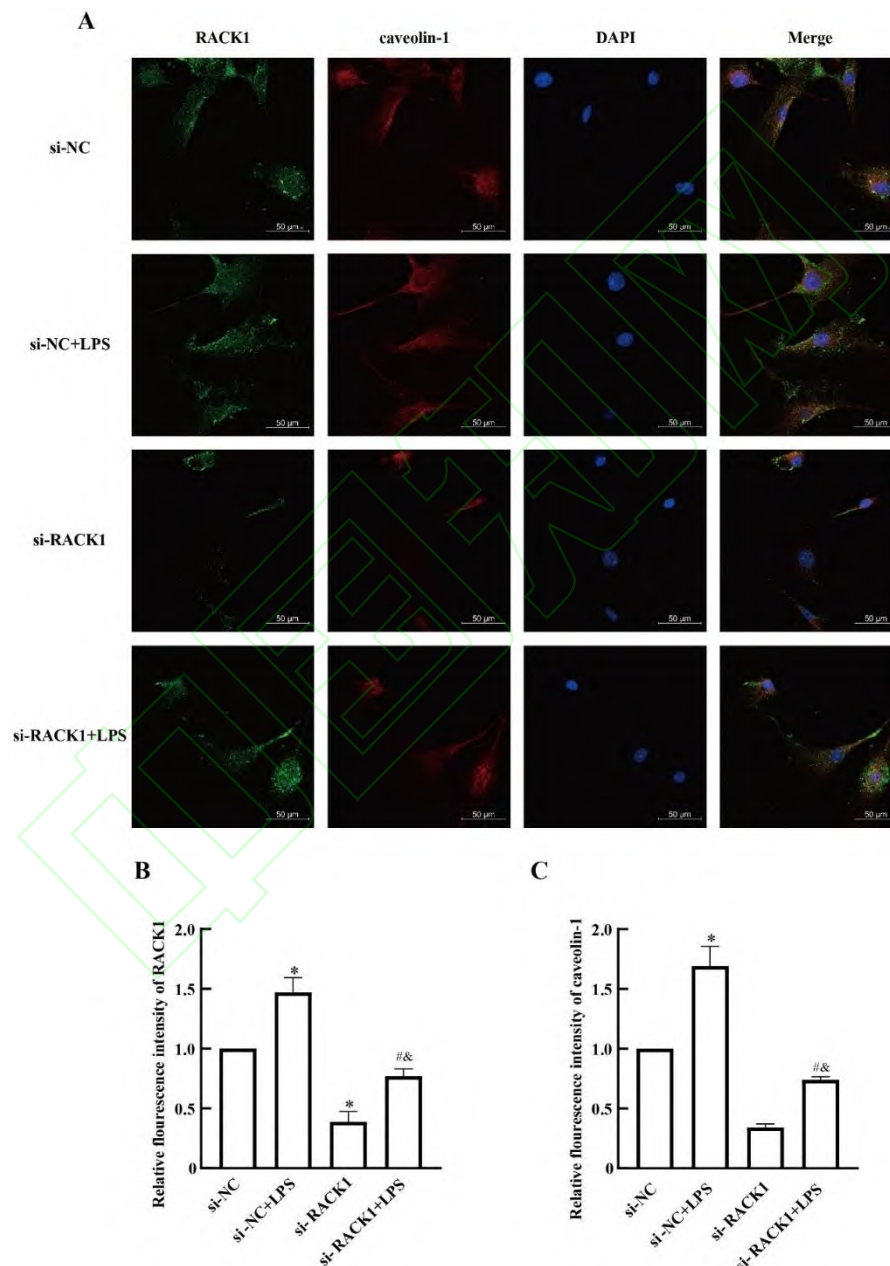


图2 RACK1在RPMVEC中表达及RACK1与caveolin-1的定位 ($n = 3$)

Fig.2 Expression of RACK1 and localization of RACK1 and caveolin-1 in RPMVEC ($n = 3$)

A: Immunofluorescence staining images of RACK1 and caveolin-1 in RPMVEC from each group ($\times 100$); B: Relative fluorescence intensity of RACK1; C: Relative fluorescence intensity of caveolin-1; * $P < 0.05$ vs si-NC group; # $P < 0.05$ vs si-NC + LPS group; & $P < 0.05$ vs si-RACK1 group.

2.3 沉默RACK1对LPS诱导的RPMVEC通透性的影响 相较si-NC组 (53.863 ± 2.035)，si-NC+LPS组TEER值 (31.570 ± 3.597) 降低 ($P_{\text{Tukey}} < 0.05$)；相较si-NC+LPS组，si-RACK1+LPS组TEER值 (44.843 ± 1.452) 升高 ($P_{\text{Tukey}} < 0.05$)。见图 3。TEER值与细胞通透性呈负相关，提示沉默RACK1可降低LPS诱导的RPMVEC高通透性。

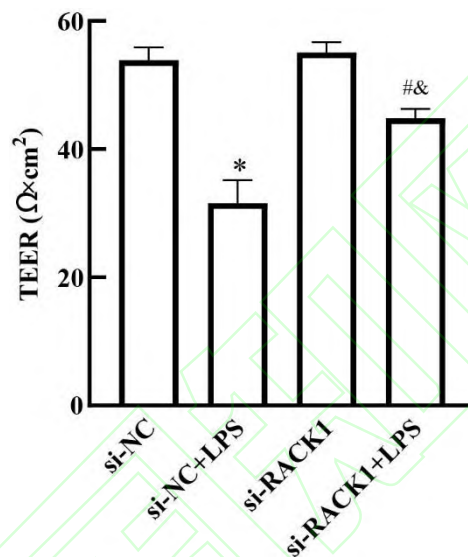


图 3 沉默RACK1对LPS诱导的RPMVEC通透性的影响 ($n = 3$)

Fig.3 The effects of silencing RACK1 on the permeability of RPMVEC induced by LPS ($n = 3$)

* $P < 0.05$ vs si-NC group; # $P < 0.05$ vs si-NC+LPS group; & $P < 0.05$ vs si-RACK1 group.

2.4 沉默RACK1对LPS诱导RPMVEC表达caveolin-1、Gli-1的影响 相较si-NC组，si-NC+LPS组caveolin-1表达水平升高 ($P < 0.05$)，Gli-1表达水平降低 ($P_{\text{Tukey}} < 0.05$)；相较si-NC+LPS组，si-RACK1+LPS组caveolin-1表达水平降低 ($P_{\text{Tukey}} < 0.05$)，Gli-1表达水平升高 ($P < 0.05$)。见图 4。提示RACK1可能通过SHH信号通路参与LPS致RPMVEC通透性升高。

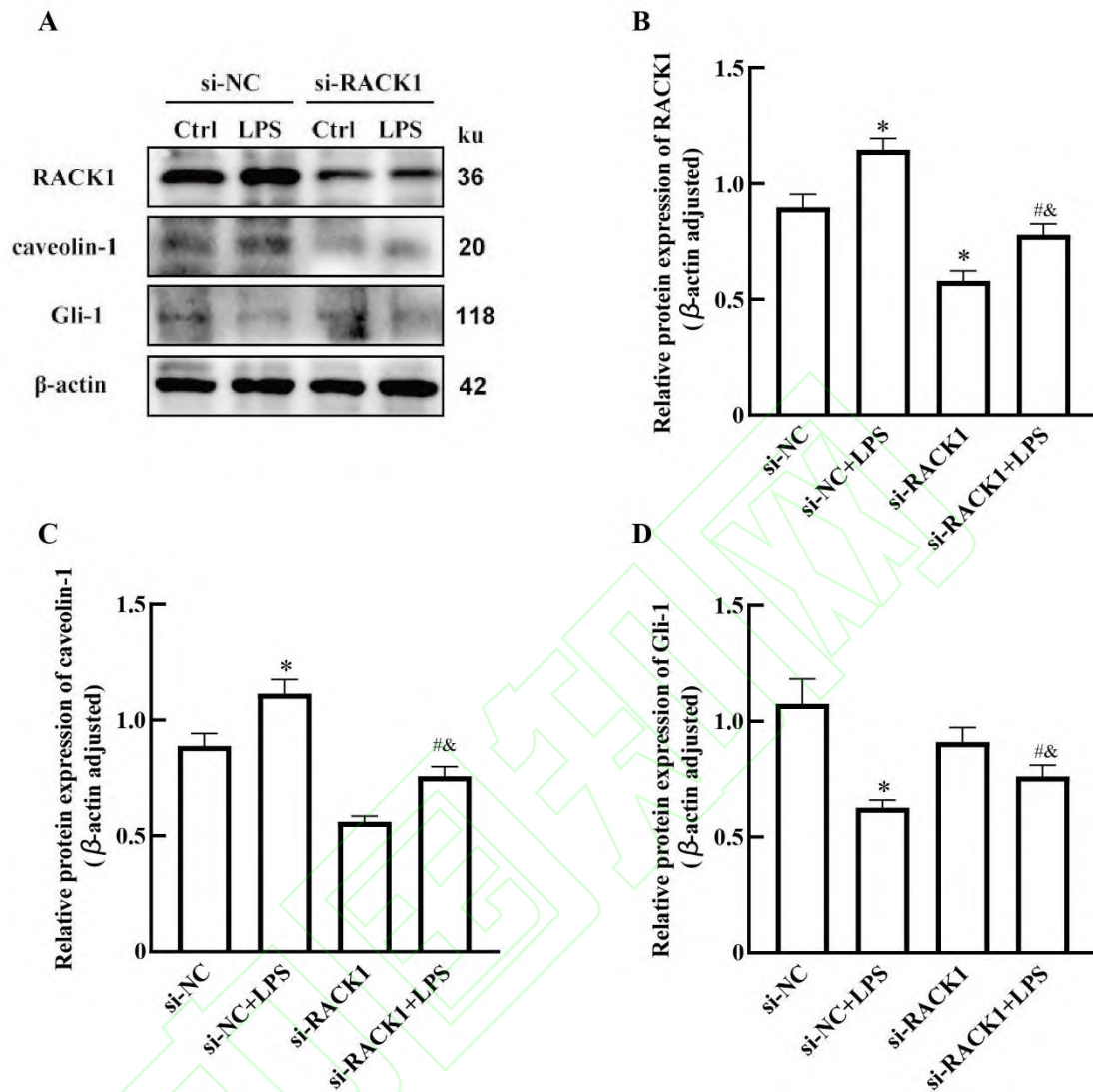


图4 沉默RACK1对LPS诱导RPMVEC表达caveolin-1、Gli-1的影响 ($n=5$)

Fig.4 The effects of silencing RACK1 on the expressions of caveolin-1 and Gli-1 in RPMVEC induced by LPS ($n=5$)

A: The expressions of RACK1, caveolin-1 and Gli-1 were detected by WB in RPMVEC in each group; B: Relative protein expression of RACK1; C: Relative protein expression of caveolin-1; D: Relative protein expression of Gli-1; * $P<0.05$ vs si-NC group; # $P<0.05$ vs si-NC+LPS group; & $P<0.05$ vs si-RACK1 group.

2.5 SHH 信号通路参与 RPMVEC 通透性调节 相较 si-RACK1+LPS 组 (47.813 ± 2.044) , si-RACK1+LPS+Vismodegib 组 TEER 值 (38.023 ± 1.975) 降低 ($P_{\text{Tukey}} < 0.05$) ; si-

RACK1+LPS+SAG 组 TEER 值 (52.800 ± 1.552) 升高 ($P_{\text{Tukey}}<0.05$)。见图 5。提示 SHH 信号通路可能参与 RPMVEC 通透性调节。

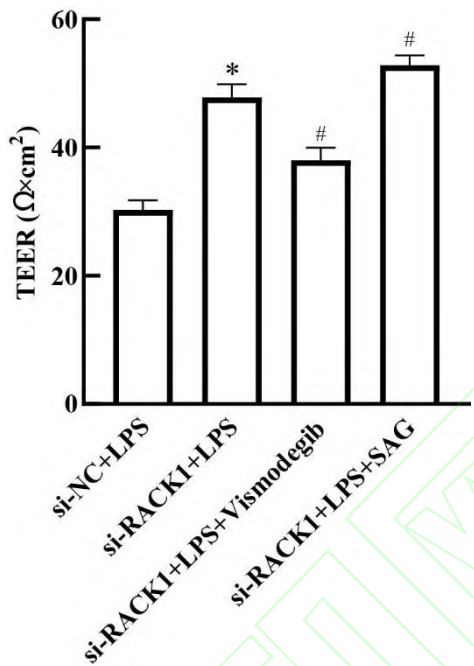


图 5 SHH信号通路参与RPMVEC通透性调节 ($n=3$)

Fig.5 The SHH signaling pathway was involved in the regulation of RPMVEC permeability
($n=3$)

* $P<0.05$ vs si-NC+LPS group; # $P<0.05$ vs si-RACK1+LPS group.

2.6 SHH信号通路通过调控RACK1 干扰LPS诱导RPMVEC中caveolin-1 表达 相较si-RACK1+LPS组， si-RACK1+LPS+Vismodegib组RACK1 和caveolin-1 表达水平升高（均 $P_{\text{Tukey}}<0.05$ ）， si-RACK1+LPS+SAG组RACK1 和caveolin-1 表达水平降低（均 $P_{\text{Tukey}}<0.05$ ）。见图 6。提示SHH信号通路可能通过调控RACK1 和caveolin-1 表达调节RPMVEC通透性。

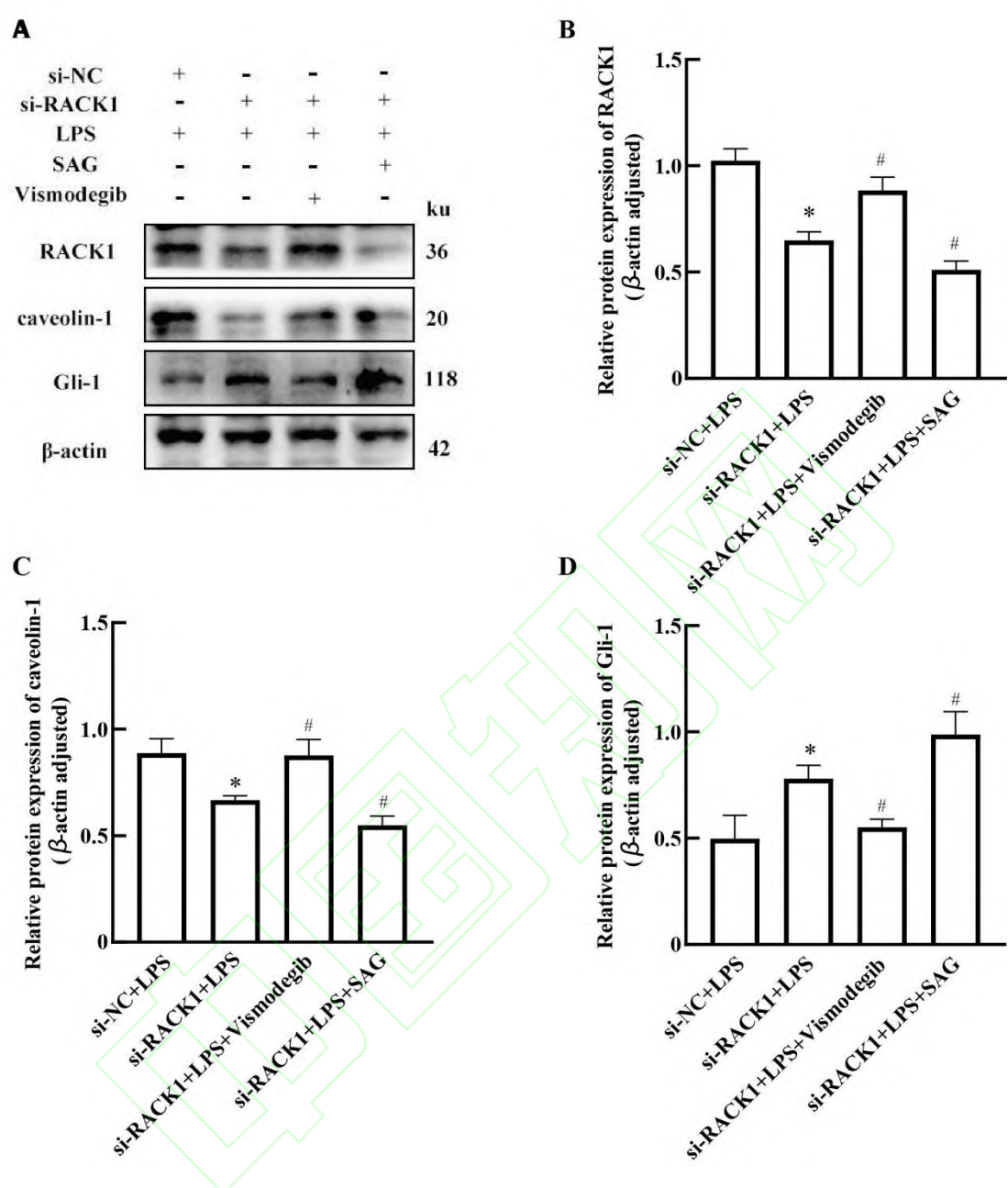


图 6 SHH信号通路通过调控RACK1 干扰LPS诱导RPMVEC中caveolin-1 表达 ($n = 4$)

Fig.6 The SHH signaling pathway disrupted the expression of caveolin-1 in LPS-induced RPMVEC by modulating RACK1 ($n = 4$)

A: The expressions of RACK1, caveolin-1 and caveolin-1 were detected by WB in RPMVEC in each group; B: Relative protein expression of RACK1; C: Relative protein expression of caveolin-1; D: Relative protein expression of Gli-1; * $P < 0.05$ vs si-NC+LPS group; # $P < 0.05$ vs si-RACK1+LPS group.

3 讨论

肺微血管通透性增加是ARDS发病的关键环节^[1]。在肺部炎症反应过程中，肺微血管内皮细胞和肺泡上皮细胞是炎症因子和炎症介质首先攻击的效应细胞，其损伤可致肺微血管通透性增加，严重时可引发肺水肿，甚至导致肺损伤，这是脓毒症、创伤及严重感染等所致ARDS的主要病理特征^[5]。

RACK1 是大小为 36 kDa高度保守的色氨酸-天门冬氨酸 40 (WD40) 重复序列的支架蛋白，与G蛋白的 β 亚基 (G β) 存在显著同源性，具有七叶 β 螺旋桨结构^[6]。单个WD40 重复序列能够同时与多种信号分子相互作用，有助于蛋白质结合，使RACK1 能够整合来自各种信号通路的输入，在细胞增殖、转录和蛋白质合成等基本细胞活动以及各种神经元功能方面发挥关键作用^[12]。多项研究表明^[6,9,13]，RACK1 可通过与蛋白激酶C (protein kinase C, PKC)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、c-Jun氨基末端激酶 (c-Jun N-terminalkinase, JNK) 等蛋白结合实现相关信号通路调控，而上述信号通路与ARDS发病密切相关^[9,14]。既往研究表明^[9]RACK1 可能参与调控LPS诱导的RPMVEC功能障碍。本研究发现沉默RACK1 可使LPS诱导的RPMVEC高通透性降低，提示RACK1 在LPS致RPMVEC损伤过程中可能发挥调控作用。

caveolin-1 作为细胞膜小窝 (caveolae) 的主要结构成分，广泛表达于血管内皮细胞，并参与调节脂质转运、炎症反应及多种细胞信号通路，对维持血管内皮细胞的稳态和功能至关重要^[15]。在血脑屏障和血肿瘤屏障中，caveolin-1 与紧密连接相关蛋白的表达和功能存在正性调节作用，其表达变化可影响紧密连接的完整性，进而调节屏障通透性^[16]。既往研究^[17]表明LPS通过增加caveolin-1 磷酸化并促进其表达转位，提高白蛋白跨细胞转运，从而实现RPMVEC通透性增加。本实验发现LPS作用于正常RPMVEC后caveolin-1 表达水平明显升高，这与既往研究一致^[17]，而LPS作用于沉默RACK1 后的RPMVEC，caveolin-1 表达水平较LPS组降低，提示RACK1 可能通过调控caveolin-1 表达参与LPS致RPMVEC通透性升高。

SHH信号通路由SHH蛋白配体、Ptch跨膜受体、Smo效应器及转录因子Gli家族组成，在胚胎发育和组织再生中扮演关键角色，调控多种细胞行为^[7]。SHH信号通路在肺损伤和修复过程中起到关键调节作用，激活SHH信号通路可促进肺组织的再生和修复，减少炎症反应和纤维化^[18]。Gli-1 是广泛用于SHH信号通路的生物标志物^[19-20]。既往研究^[9]发现Gli-1 表达在LPS刺激RPMVEC时受抑，激活SHH信号通路能够减轻LPS诱导RPMVEC高通透性。本实验发现沉默RACK1 可促进LPS诱导RPMVEC表达Gli-1，提示RACK1 可能抑制SHH信号通路对RPMVEC的保护作用。进一步实验发现SHH信号通路的激活或抑制分别加剧或逆

转了沉默RACK1 对LPS诱导RPMVEC高通透性及caveolin-1 表达的影响, 因此推测RACK1 可能通过调节SHH信号通路和caveolin-1 表达实现调控RPMVEC通透性作用, 且RACK1 与SHH信号通路可能存在反馈调节, 共同调控细胞功能。

综上所述, 本研究证实在LPS致RPMVEC损伤过程中沉默RACK1 可有效减轻LPS致RPMVEC高通透性; RACK1 通过调控caveolin-1 表达实现对细胞通透性的影响; RACK1 可能通过反馈调节SHH信号通路从而调控LPS诱导的RPMVEC高通透性。因此, RACK1 参与LPS刺激RPMVEC通透性改变, 并通过SHH信号通路调控炎症反应。这将为ARDS的治疗提供新的思路和靶点。

参考文献

- [1] Matthay M A, Arabi Y, Arroliga A C, et al. A new global definition of acute respiratory distress syndrome[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2024, 209(1): 37-47. doi: 10.1164/rccm.202303-0558WS.
- [2] Qu M, Zhang H, Chen Z, et al. The role of ferroptosis in acute respiratory distress syndrome[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 651552. doi: 10.3389/fmed.2021.651552.
- [3] Xu H, Sheng S, Luo W, et al. Acute respiratory distress syndrome heterogeneity and the septic ARDS subgroup[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1277161. doi: 10.3389/fimmu.2023.1277161.
- [4] Jiang J, Huang K, Xu S, et al. Targeting NOX4 alleviates sepsis-induced acute lung injury *via* attenuation of redox-sensitive activation of CaMKII/ERK1/2/MLCK and endothelial cell barrier dysfunction[J]. *Redox Biol*, 2020, 36: 101638. doi: 10.1016/j.redox.2020.101638.
- [5] Bos L D J, Ware L B. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes[J]. *Lancet*, 2022, 400(10358): 1145-56. doi: 10.1016/S0140-6736(22)01485-4.
- [6] Zhang X, Ma C, Lu Y, et al. Rack1 regulates B-cell development and function by binding to and stabilizing the transcription factor Pax5[J]. *Cell Mol Immunol*, 2024, 21(11): 1282-95. doi: 10.1038/s41423-024-01213-2.
- [7] Tail M, Zhang H, Zheng G, et al. The sonic hedgehog pathway modulates survival, proliferation, and differentiation of neural progenitor cells under inflammatory stress *in vitro*[J]. *Cells*, 2022, 11(4): 736. doi: 10.3390/cells11040736.
- [8] Wang W, Shiraishi R, Kawauchi D. Sonic hedgehog signaling in cerebellar development and cancer[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 864035. doi: 10.3389/fcell.2022.864035.
- [9] 王巾枚, 尤青海, 牛成成, 等. Sonic hedgehog信号通路参与脂多糖诱导肺微血管内皮细胞表达RACK1[J]. *中华急诊医学杂志*, 2018, 27(7): 757-63.

- [9] Wang J M, You Q H, Niu C C, et al. The Sonic hedgehog signaling pathway involved in the expression of RACK1 in the pulmonary microvascular endothelial cells induced by lipopolysaccharide[J]. *Chin J Emerg Med*, 2018, 27(7): 757-63.
- [10] Wu M, Liu J, Zhang S, et al. Shh signaling from the injured lung microenvironment drives BMSCs differentiation into alveolar type II cells for acute lung injury treatment in mice[J]. *Stem Cells Int*, 2024, 2024: 1823163. doi: 10.1155/2024/1823163.
- [11] 尤青海, 王巾枚, 孙耕耘, 等. PI3K/Akt信号通路参与LPS诱导大鼠肺微血管内皮细胞表达RACK1 及rac1[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(1): 41-5. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.01.009.
- [11] You Q H, Wang J M, Sun G Y, et al. The PI3K/Akt signaling pathway involved in the expression of RACK1 and rac1 in the rat pulmonary microvascular endothelial cells induced by lipopolysaccharide[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2020, 55(1): 41-5. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.01.009.
- [12] Zhao L, Chen Y, Li H, et al. Deciphering the neuroprotective mechanisms of RACK1 in cerebral ischemia-reperfusion injury: pioneering insights into mitochondrial autophagy and the PINK1/Parkin axis[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(8): e14836. doi: 10.1111/cns.14836.
- [13] Buoso E, Masi M, Racchi M, et al. Endocrine-disrupting chemicals' (EDCs) effects on tumour microenvironment and cancer progression: emerging contribution of RACK1[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 9229. doi: 10.3390/ijms21239229.
- [14] Zhou M, Meng L, He Q, et al. Valsartan attenuates LPS-induced ALI by modulating NF- κ B and MAPK pathways[J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1321095. doi: 10.3389/fphar.2024.1321095.
- [15] Fan J, Zheng S, Wang M, et al. The critical roles of caveolin-1 in lung diseases[J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1417834. doi: 10.3389/fphar.2024.1417834.
- [16] Zhang X L, Du W H, Qian S X, et al. Glial growth factor 2 treatment alleviates ischemia and reperfusion-damaged integrity of the blood-brain barrier through decreasing Mfsd2a/caveolin-1-mediated transcellular and Pdlim5/YAP/TAZ-mediated paracellular permeability[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2024, 45(11): 2241-52. doi: 10.1038/s41401-024-01323-7.
- [17] Wang N, Zhang D, Sun G, et al. Lipopolysaccharide-induced caveolin-1 phosphorylation-dependent increase in transcellular permeability precedes the increase in paracellular permeability[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 4965-77. doi: 10.2147/DDDT.S77646.

[18] Zeng L H, Barkat M Q, Syed S K, et al. Hedgehog signaling: linking embryonic lung development and asthmatic airway remodeling[J]. Cells, 2022, 11(11): 1774. doi: 10.3390/cells11111774.

[19] El-Baz L M F, Elaidy S M, Hafez H S, et al. Vismodegib, a sonic hedgehog signalling blockade, ameliorates ovalbumin and ovalbumin/lipopolysaccharide-induced airway inflammation and asthma phenotypical models[J]. Life Sci, 2022, 310: 121119. doi: 10.1016/j.lfs.2022.121119.

[20] Hill S A, Fu M, Denise R Garcia A. Sonic hedgehog signaling in astrocytes[J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(4): 1393-403. doi: 10.1007/s00018-020-03668-8.

