

## 研究论文

# 脾脏酪氨酸激酶促进肝肺综合征大鼠肺血管新生

高伟忠<sup>1</sup>, 杨义辉<sup>1</sup>, 但伶<sup>2</sup>, 朱稀雯<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>遵义市第一人民医院麻醉科, 遵义 563000; <sup>2</sup>重庆医科大学附属第二医院麻醉科, 重庆 400010

**摘要:** 本研究旨在研究脾脏酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, Syk)在肝肺综合征(hepatopulmonary syndrome, HPS)血管新生过程中的作用及其机制。Sprague Dawley (SD)大鼠随机分为3组: 假手术组(Sham组)、胆总管结扎(common bile duct ligation, CBDL) 5周组(5W组)和R788药物干预组(R788组), 通过CBDL术进行HPS造模, R788组大鼠在CBDL术后每日腹腔注射1次R788 (20 mg/kg)至第5周。用Western blot和免疫组织化学法检测Syk、p-Erk1/2、p-Akt在肺组织中的表达和分布情况, 用免疫荧光染色法观察Syk在肺中的定位和肺组织血管新生数目。结果显示, 相对Sham组, 5W组大鼠Syk蛋白表达水平显著上调, Erk1/2和Akt磷酸化水平显著上调, 肺微血管数量显著增加; 相对5W组, R788组大鼠Syk蛋白表达水平显著下调, Erk1/2和Akt磷酸化水平显著下调, 肺微血管数量显著减少。以上结果表明, Syk可能通过激活下游Erk1/2和Akt信号转导通路促进HPS模型大鼠肺内血管新生, 这为HPS的临床治疗提供了理论依据和潜在药物治疗靶点。

**关键词:** 脾脏酪氨酸激酶; 肝肺综合征; 血管新生; Erk1/2; Akt

**中图分类号:** Q25

## Splenic tyrosine kinase promotes pulmonary angiogenesis in rats with hepatopulmonary syndrome

GAO Wei-Zhong<sup>1</sup>, YANG Yi-Hui<sup>1</sup>, DAN Ling<sup>2</sup>, ZHU Xi-Wen<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Anesthesiology, the First People's Hospital of Zunyi, Zunyi 563000, China; <sup>2</sup>Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

**Abstract:** The present paper was aimed to study the role of spleen tyrosine kinase (Syk) in angiogenesis in hepatopulmonary syndrome (HPS) and the underlying mechanism. Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups: sham operation group (sham group), common bile duct ligation (CBDL) 5-week group (5W group) and R788 intervention group (R788 group). HPS model was established by CBDL. Rats in R788 group were intraperitoneally injected with R788 (20 mg/kg) once daily to week 5 after CBDL operation. The protein expression levels and distribution of Syk, p-Erk1/2, and p-Akt in lung tissue were detected by Western blot and immunohistochemistry. Immunofluorescence staining was used to observe the location of Syk expression and the number of angiogenesis in lung tissue. The results showed that, compared with sham group, 5W group exhibited up-regulated protein expression level of Syk, increased phosphorylation levels of Erk1/2 and Akt, and increased number of pulmonary microvessels. Compared with 5W group, R788 group exhibited down-regulated protein expression level of Syk, decreased phosphorylation levels of Erk1/2 and Akt, and decreased number of pulmonary microvessels. These results suggest that Syk may promote pulmonary angiogenesis in HPS model rats by activating downstream Erk1/2 and Akt signaling pathways, which provides a theoretical basis and potential drug therapeutic targets for the clinical treatment of HPS.

**Key words:** spleen tyrosine kinase; hepatopulmonary syndrome; angiogenesis; Erk1/2; Akt

Received 2019-11-07 Accepted 2020-09-21

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81601715).

\*Corresponding author. E-mail: 125625844@qq.com

肝肺综合征 (hepatopulmonary syndrome, HPS) 是由各种终末期肝病和 / 或门脉高压并发低氧血症为特点的肺部并发症<sup>[1]</sup>。4%~32% 的成人终末期肝病存在 HPS, 9%~20% 的儿童终末期肝病存在 HPS<sup>[2]</sup>。晚期肝硬化患者常伴有肺部并发症, 包括肝胸水、肺动脉高压以及 HPS<sup>[3]</sup>。HPS 的发生明显增加患者术后呼吸功能不全, 甚至出现呼吸衰竭, 有无法摆脱呼吸机的风险, 临床预后不佳, 肝移植方可提高 HPS 病人的存活率<sup>[4, 5]</sup>。HPS 病理表现主要是肺内气体交换受损<sup>[6]</sup>、动脉血氧合不足<sup>[7]</sup>以及肺泡动脉血氧分压差 (alveolar-arterial O<sub>2</sub> gradient, A-aDO<sub>2</sub>) 增大<sup>[8]</sup>。近些年关于 HPS 发生机制的研究显示, HPS 的发生主要与肺内血管新生<sup>[9]</sup>、肺微小血管直径改变<sup>[10]</sup>以及肺内巨噬细胞的聚集<sup>[11]</sup>有关, 但关于 HPS 发生的分子机制研究仍有待探索。探讨其血管新生发生机制, 使用有效的药物或者干预措施减少新生血管可能是减轻 HPS 患者缺氧症状的可取途径。

研究显示, 脾脏酪氨酸激酶 (spleen tyrosine kinase, Syk) 是上皮细胞生长的调节剂和人类乳腺癌中潜在的因子<sup>[12]</sup>。Fruchon 等研究显示, Syk-mTOR 通路参与滤泡淋巴瘤细胞侵袭和血管新生, 通过腹腔注射 Syk 抑制剂 R788 明显减轻肿瘤血管新生, 降低其侵袭性<sup>[13]</sup>。Buharalioglu 等研究显示, 表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 诱导的管形成和主动脉发芽分别被 Syk 抑制剂、Syk 短发夹干扰 RNA 和小干扰 RNA 减弱, 在血管中表达的 Syk 与内皮细胞的迁移、增殖以及血管发生有关<sup>[14]</sup>。Syk 被激活后, 可进一步激活多种信号传导通路, 包括 PI3K/Akt、Ras/ERK、磷脂酶 C- $\gamma$ /活化 T 细胞核因子 (phospholipase C  $\gamma$ /nuclear factor of activated T cells, PLC $\gamma$ /NFAT) 和 I $\kappa$ B 激酶 / 核因子  $\kappa$ B (I $\kappa$ B kinase/nuclear factor  $\kappa$ B, IKK/NF- $\kappa$ B)<sup>[15, 16]</sup>。蛋白激酶 Akt 控制基本的细胞功能, 包括增殖、凋亡、代谢和转录。Ras/Raf/MAPK 通路参与细胞增殖、生长及生存等进程, 激活的 MAPKs 可促使血管基底膜降解、引起内皮细胞的迁移<sup>[17]</sup>。但 Syk 是否参与 HPS 并调节其血管新生仍无相关研究报道。本研究采用大鼠胆总管结扎 (common bile duct ligation, CBDL) 模型, 应用 Western blot、免疫组织化学法、免疫荧光染色法等技术, 探讨 Syk 对 HPS 血管新生的作用及其机制, 为研究 HPS 发生的分子基础

提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂与设备** RIPA 裂解液、DAB 显色液、SDS-PAGE 凝胶盒、PMSF 试剂购自碧云天公司; TRNzol 总 RNA 提取试剂、荧光定量 RNA 试剂盒购自 Takara 公司; PVDF 膜购自 Bio-Rad 公司; 小鼠抗大鼠 GAPDH 抗体、苏木素购自索莱宝公司; 兔抗大鼠 Syk、兔抗大鼠 p-Erk1/2、兔抗大鼠 Erk1/2、兔抗大鼠 p-Akt、兔抗大鼠 Akt 抗体购自 Abcam 公司; Fostamatinib (R788) 购自 Selleck 公司; 离心机购自 Sigma 公司; 显微镜购自 Leica 公司。

**1.2 实验动物及动物模型** SPF 级健康雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠 30 只, 体重 242~286 g, 许可证号为 SCXK (渝)2017-0712, 动物实验方案已获得重庆医科大学附属第二医院伦理委员会批准。采用随机抽签法把大鼠分成 3 组 ( $n = 10$ ): 假手术组 (Sham 组)、CBDL 5 周组 (5W 组) 和 R788 干预组 (R788 组)。本研究所用麻醉剂为水合氯醛, 剂量 50 mg/kg, 5W 组大鼠在腹腔注射麻醉后行开腹手术, 分别结扎胆总管的十二指肠端和肝门部结扎胆总管 (CBDL 术), Sham 组仅打开腹腔, 不结扎胆总管, R788 组在 CBDL 术后腹腔注射 R788 (20 mg/kg), 每日 1 次, 5 周后 3 组大鼠在麻醉后打开腹腔, 并用肝素化的动脉采血针采集腹主动脉血, 肺组织在充分灌洗去除肺内血液后摘除, 浸泡于 4% 多聚甲醛中。血气分析结果满足动脉血氧分压 (arterial blood partial pressure of oxygen, PaO<sub>2</sub>) < 80 mmHg、A-aDO<sub>2</sub> > 18 mmHg 的大鼠确诊为 HPS<sup>[18]</sup>。

**1.3 HE 染色** 分离大鼠肺组织后用 4% 多聚甲醛浸泡, 石蜡切片后 HE 染色: 切片烘 2 h, 二甲苯去蜡, 乙醇 (100% → 75% 浓度递减) 水化, HE 染色后封片。最后每只大鼠随机选择 3 张切片, 每张切片选择 5 个视野高倍镜下观察并拍照。

**1.4 免疫组织化学染色法** 石蜡切片置于 60 °C 烤至融化, 置于二甲苯中洗蜡, 依次按二甲苯 I → 75% 乙醇顺序依次清洗; 置入柠檬酸钠修复液中高压锅 (117 °C, 80 kPa) 内修复抗原 5~8 min, 冷却后 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭 50 min; 山羊血清封片 40 min, 弃血清后滴加一抗溶液并放置于 4 °C 摇床上孵育 10 h; PBST 洗涤后加二抗室温反应 90 min; DAB 显色 5~10 s 后冲洗, 然后苏木素反应 20 s, 充分洗涤, 封片, 镜下观察。每只大鼠随机选择 3 张切片, 随

机选择 5 个镜下视野拍照, 通过 Image-Pro Plus 软件测量得到积分光密度值 (integral optical density, IOD)。

**1.5 Western blot** 肺组织样本中加适量 RIPA 和 PMSF (1:100) 提取蛋白, 测蛋白浓度后加上  $5 \times$  蛋白上样缓冲液并煮沸。按照说明配制浓缩胶和分离胶, 每孔上样  $60 \mu\text{g}$ ,  $80 \text{ V}/100 \text{ V}$  电泳后转到 PVDF 膜上, BSA 室温封闭 90 min, 分别加入一抗 (Syk 1:900、GAPDH 1:1 500、Erk1/2 1:900、p-Erk1/2 1:1 000、Akt 1:900 或 p-Akt 1:1 000),  $4^\circ\text{C}$  冰箱内 12 h, TBST 充分漂洗后加二抗 (1:4 000),  $37^\circ\text{C}$  下孵育 60 min, TBST 洗涤后加发光试剂显影, 实验均重复 3 次。用 Image Lab 定量条带灰度值, 目的蛋白灰度值除以内参蛋白 GAPDH 数值得到相对值后, 再进行统计。

### 1.6 免疫荧光染色法定位 Syk 在大鼠肺中的表达

冰冻切片经 PBS 漂洗后, 滴加 10% 的山羊血清室温下孵育 1 h, 加入抗 Syk 抗体 (1:100) 和抗 vWF 抗体 (1:100), 放入暗盒内在  $4^\circ\text{C}$  冰箱中孵育 10 h; PBS 漂洗后滴加荧光二抗 (1:150), 暗盒内孵育 1 h; 加 DAPI 液反应 15 min; 洗涤后加抗淬灭试剂并盖片, 荧光镜下调整转换后拍照, 每只大鼠随机抽选 3 个样本片, 每个样本片随机拍 3 个视野并计数血管个数, 统计后的平均微血管数目用于微血管密度的评估<sup>[13]</sup>。

**1.7 统计分析** 所有数据均以  $\text{mean} \pm \text{SD}$  表示, 用 SPSS 17.0 进行统计学检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 方差齐时两两比较采用 LSD 法, 方差不齐时两两比较采用 Dunnett' T3 法。  $P < 0.05$  时认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠腹主动脉血气分析结果

血气分析结果显示, 相对于 Sham 组, 5W 组 A-aDO<sub>2</sub> 显著升高; 相对于 5W 组, R788 组 A-aDO<sub>2</sub> 则显著降低 ( $P < 0.05$ ) (图 1A)。相对于 Sham 组, 5W 组 PaO<sub>2</sub> 显著降低; 而相对于 5W 组, R788 组 PaO<sub>2</sub> 有显著升高 ( $P < 0.05$ ) (图 1B)。5W 组 PaO<sub>2</sub> 为  $(77.92 \pm 1.98) \text{ mmHg}$ , A-aDO<sub>2</sub> 为  $(21.05 \pm 1.62) \text{ mmHg}$ , 符合 HPS 诊断标准, 表明 CBDL 大鼠模型建立成功。

### 2.2 各组肺组织大体和微观改变

从肺外观来看, Sham 组大鼠肺比较健康, 无病灶点; 而 5W 组大鼠肺脏上有多个病灶点, 呈椭圆形, 直径约 2 mm, 呈散在点状或融合; 经 R788 干预后的 R788 组大鼠肺与 5W 组大鼠相比有明显的改善, 点状病灶明显减少, 直径减小至 0.5~1.0 mm (图 2)。

HE 染色结果显示, Sham 组大鼠肺结构清晰, 炎细胞较少, 微小血管数量少; 而 5W 组大鼠肺泡壁和血管腔大量炎症细胞浸润, 部分肺泡被破坏; 相对于 5W 组, R788 组大鼠肺泡炎症细胞数量减少, 肺泡结构较规整 (图 3)。

### 2.3 各组大鼠肺 Syk、p-Erk1/2 以及 p-Akt 蛋白表达水平改变

相对 Sham 组大鼠, 5W 组大鼠肺组织 Syk 蛋白表达水平显著上调, Erk1/2 和 Akt 蛋白磷酸化水平均显著上调 (均  $P < 0.05$ ); 而相对于 5W 组大鼠, R788 组大鼠肺组织 Syk 蛋白表达水平显著下调, Erk1/2 和 p-Akt 蛋白磷酸化水平均显著下调 (均  $P < 0.05$ ) (图 4)。

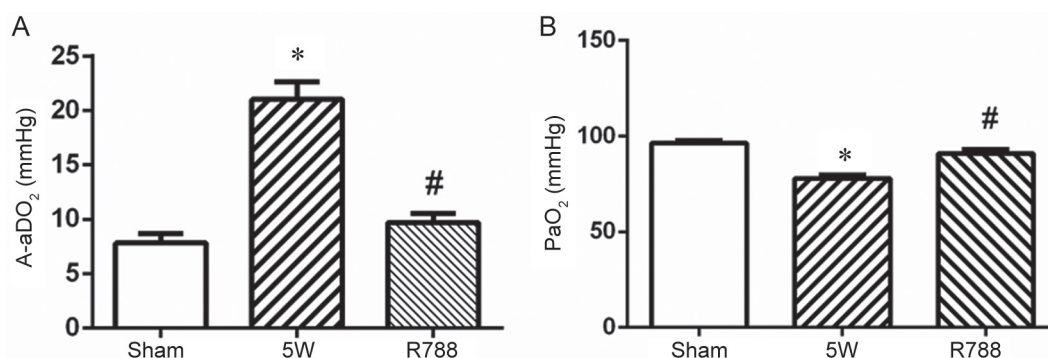


图 1. 各组大鼠血气分析结果

Fig. 1. Results of blood gas analysis of different groups. A: Alveolar-arterial O<sub>2</sub> gradient (A-aDO<sub>2</sub>); B: Arterial blood partial pressure of oxygen (PaO<sub>2</sub>). Mean  $\pm$  SD,  $n = 10$ . \* $P < 0.05$  vs sham group; # $P < 0.05$  vs 5W group.



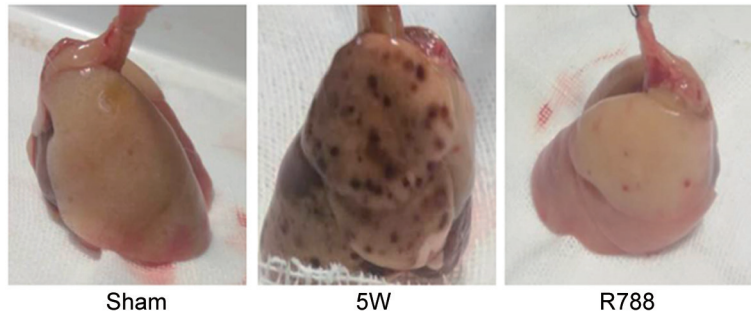


图 2. 各组大鼠肺组织外观  
 Fig. 2. Appearance of lung tissue of different groups. The lungs of sham rats were healthy, while the lungs of CBDL 5W rats showed multiple lesions and blood stasis points. The lungs of R788 rats had significant improvement compared with those of CBDL 5W rats.

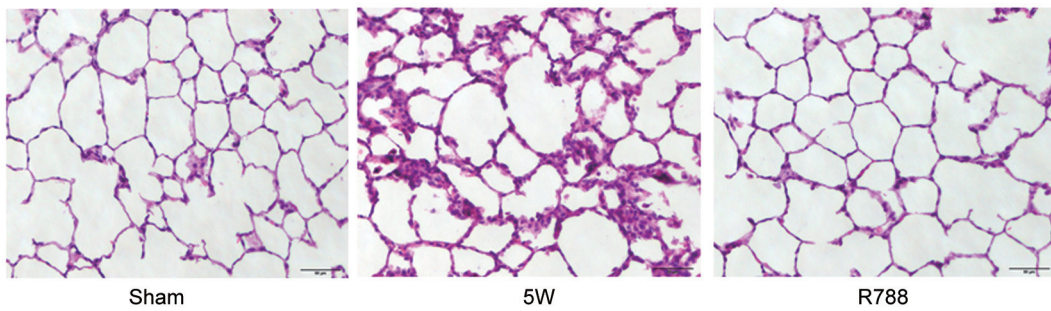


图 3. 各组大鼠肺组织的病理学变化  
 Fig. 3. Pathological changes of lung tissue in different groups detected by HE staining. Scale bar, 50  $\mu$ m.

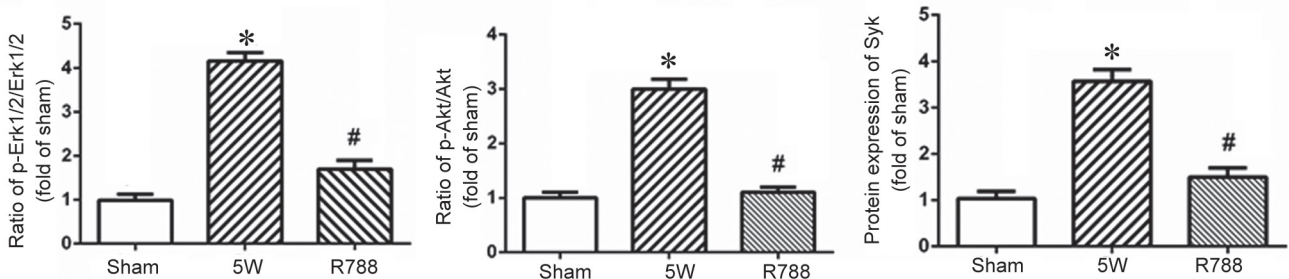
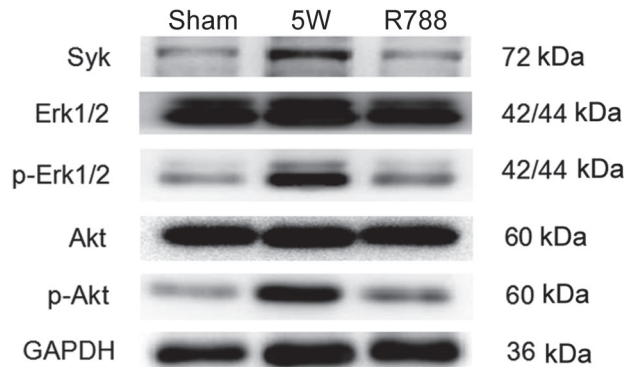


图 4. 各组大鼠肺Syk、p-Erk1/2和p-Akt蛋白表达水平  
 Fig. 4. Protein expression levels of Syk, p-Erk1/2 and p-Akt in lung tissue of rats in different groups detected by Western blot. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$  vs sham group; # $P < 0.05$  vs 5W group.

## 2.4 各组大鼠肺Syk、p-Erk1/2以及p-Akt蛋白表达和定位

免疫组织化学染色法结果显示，Syk 主要表达于肺血管内皮细胞及部分上皮细胞。IOD 值统计结果与 Western blot 结果类似，相对 Sham 组大鼠，5W 组大鼠肺组织 Syk、p-Erk1/2 及 p-Akt 蛋白表达水平均显著上调(均  $P < 0.05$ )；而相对于 5W 组大鼠，R788 组大鼠肺组织 Syk、p-Erk1/2 及 p-Akt 蛋白均显著下调(均  $P < 0.05$ )(图 5)。

## 2.5 Syk在各组大鼠肺微小血管中的表达

vWF 为微血管内皮细胞标志物，vWF 与 Syk 共同标记可定位 Syk 在微血管内皮细胞的表达。用 vWF (红色) 标记微小血管内皮细胞，Syk (绿色) 作为目的蛋白进行标记。免疫荧光染色结果显示，相对于 Sham 组，5W 组 Syk 阳性的肺微小血管数量显著增多，肺微血管直径显著减小 ( $P < 0.05$ )；而相对 5W 组，R788 组 Syk 阳性的肺微小血管数量显著减少 ( $P < 0.05$ )，肺微血管直径显著增大 ( $P < 0.05$ )(图 6)。

## 3 讨论

在本研究中，5W 组大鼠死亡 1 只，R788 组死亡 1 只，5W 组大鼠血气指标符合 HPS 诊断标准，表明 CBDL 大鼠模型的建立是成功且可靠的。已有研究表明改良后的 CBDL 结扎方法减少了实验鼠的死亡，并能提高造模成功率和指标可靠性<sup>[19]</sup>。

HPS 患者表现为低氧血症，主要是因为 HPS 患者肺病理性血管新生导致动静脉分流、通气/血流失衡和弥散能力减弱，Raevens 等研究显示 CBDL 小鼠肺血管新生伴有功能障碍<sup>[20]</sup>，不能发挥正常氧合功能，形成难以纠正的低氧症状。Syk 是一类非受体酪氨酸激酶，在各种细胞类型的信号转导途径中起着关键作用<sup>[21]</sup>。新近研究表明 Syk 参与了血管内皮细胞的迁移、增殖以及血管发生<sup>[14]</sup>，长期的内皮细胞异常增殖、迁移、肌样分化及间质样改变导致肺血管异常增生<sup>[22]</sup>、血管壁重塑<sup>[23]</sup>等，最终发展为结构性改变，导致严重低氧血症，并且 Syk 可以通过 SH2 结构域与效应物(包括 Tec- 家族成员、脂质激酶、磷脂酶等)进行对接<sup>[24, 25]</sup>，激活多种信

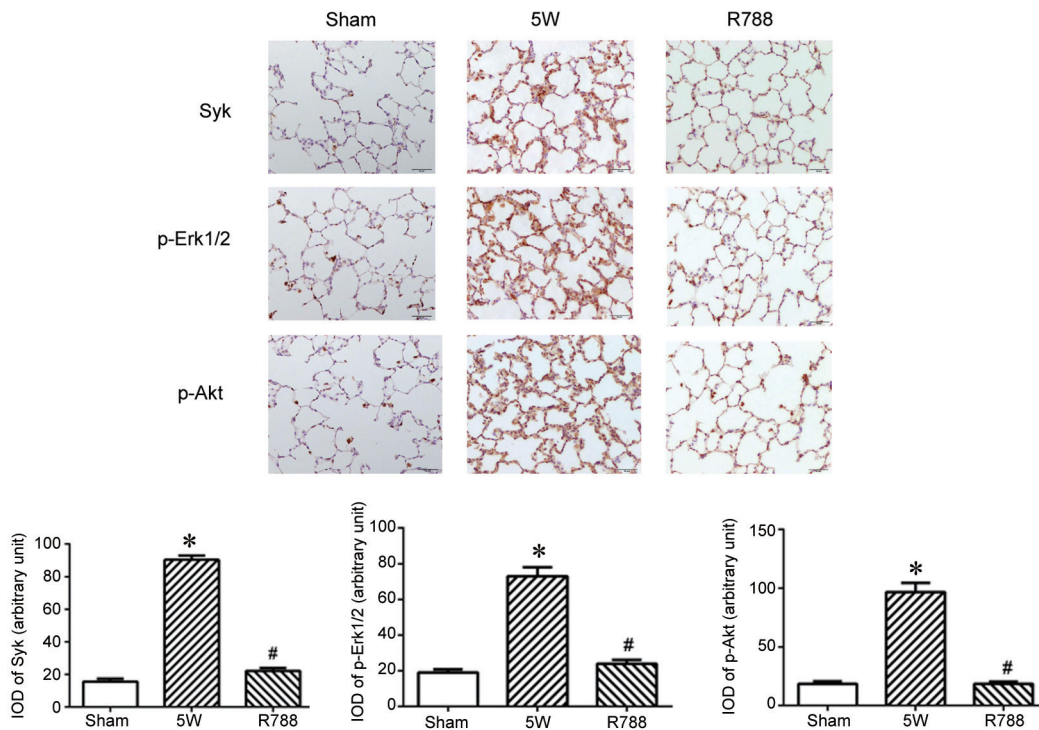


图 5. Syk、p-Erk1/2及p-Akt在各组大鼠肺中的表达

Fig. 5. Protein expression levels of Syk, p-Erk1/2 and p-Akt in the lung tissue of rats in different groups detected by immunohistochemical staining. The relative expression levels were assessed by integral optical density (IOD) value. Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . Mean  $\pm$  SD,  $n = 15$ . \* $P < 0.05$  vs sham; # $P < 0.05$  vs 5W.

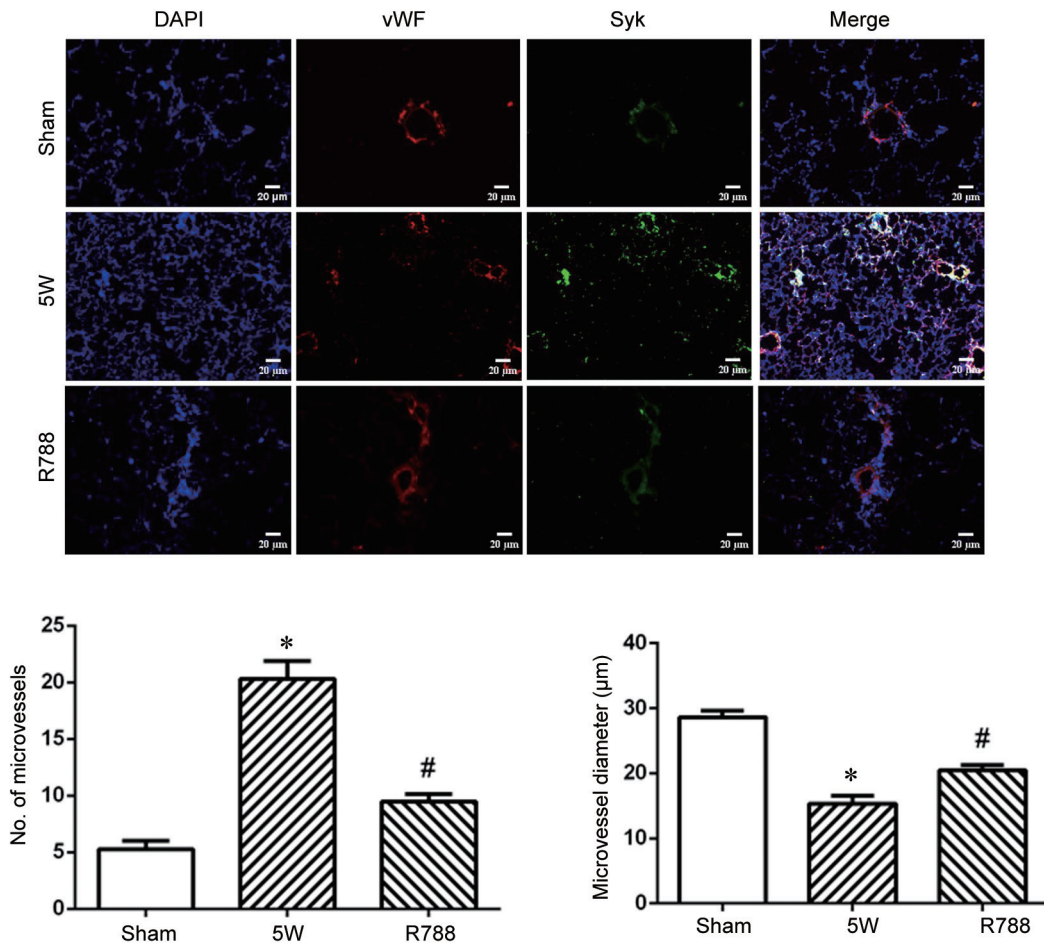


图 6. 各组大鼠Syk阳性的肺微小血管的数量及直径比较

Fig. 6. Number of Syk-positive pulmonary microvessels of rats in different groups detected by immunofluorescence staining and comparison of microvessel diameters. Red, vWF positive; Green, Syk positive. Scale bar, 20 μm. Mean ± SD,  $n = 15$ . \* $P < 0.05$  vs sham group; # $P < 0.05$  vs 5W group.

号转导途径, 包括 PI3K/Akt、Ras/ERK、PLCγ/NFAT、Vav-1/Rac 和 IKK/NFκB 通路<sup>[15,16]</sup>。研究表明, MAPK/ERK 通路参与再障小鼠的造血功能, 并且 PI3K/Akt 及 Ras/ERK 通过磷酸化活化调控血管内皮细胞的迁移、增殖、凋亡、代谢等<sup>[26,27]</sup>, 在血管新生及内皮细胞的迁移、增殖中发挥重大作用<sup>[28,29]</sup>。本研究显示, Syk 蛋白表达水平以及 Erk1/2 和 Akt 的磷酸化水平在 CBDL 大鼠中显著升高。vWF 为血管内皮细胞重要标志物<sup>[30,31]</sup>, 本研究采用 vWF 和 Syk 双标记肺微小血管, 结果显示 CBDL 5W 大鼠肺微小血管中的 Syk 表达水平以及血管增生数目显著升高, 提示 Syk 极有可能参与了 CBDL 大鼠肺微小血管新生的调控。

R788 是 Syk 抑制剂 R406 的前药, 可抑制 Syk 信号下游分子的磷酸化。研究显示, R788 可抑制

胶原抗体诱导的关节炎<sup>[32]</sup>, 抑制 M-CSF 引起的巨噬细胞分化过程<sup>[33]</sup>, 对弥漫性大 B 细胞淋巴瘤和淋巴细胞白血病有改善作用<sup>[34]</sup>。Frochon 等研究显示, Syk-mTOR 参与滤泡淋巴瘤细胞侵袭和血管新生, 而腹腔注射 R788 明显抑制血管新生, 降低肿瘤的侵袭性<sup>[13]</sup>。Buharalioglu 等研究显示, Syk 抑制剂 piceatannol 和 Syk 短发夹干扰 RNA 可抑制 EGF 和 VEGF 诱导的管形成和主动脉发芽<sup>[14]</sup>。不过, Syk 在 HPS 中的表达及改变尚未见研究报道。本研究结果显示, R788 可有效抑制 CBDL 5W 大鼠肺 Syk 的表达, 并抑制 Erk1/2 和 Akt 的磷酸化激活; R788 组新生血管数目较 5W 组明显减少, 表明抑制 Syk 可抑制 HPS 血管新生; R788 干预大鼠肺无融合坏死, 病灶数量相对于 5W 组也有所减少; R788 干预大鼠肺内炎细胞浸润减少, 肺组织结构



更接近正常; 血气分析显示 R788 干预大鼠 PaO<sub>2</sub> 升高, A-aDO<sub>2</sub> 减小, 肺泡氧合得到改善。这表明 R788 有效抑制 Syk 在肺微小血管的表达, 从而抑制了 Erk1/2 和 Akt 的激活, 减少了 CBDL 大鼠肺微小血管新生, 最终改善了低氧分压和高 A-aDO<sub>2</sub>。

综上所述, 本研究结果表明, Syk 参与调控 HPS 肺内血管新生, 其机制与激活 Erk1/2 和 Akt 有关; R788 抑制 Syk 在肺微小血管中的表达水平可下调 Erk1/2 和 Akt 的磷酸化水平, 从而减轻 HPS 肺内血管新生, 改善肺内氧合异常并减轻肺组织损伤。本研究通过建立大鼠 CBDL 模型模拟人 HPS 发生结果和内环境, 通过检测肺内 Syk 的表达和微小血管内的定位, 并通过抑制剂 R788 进行体内干预, 结果表明, Syk 抑制剂可明显改善 CBDL 大鼠肺内血管新生和氧合异常, 这为 HPS 的临床治疗提供了基础理论依据和潜在药物治疗靶点。但 CBDL 模型是通过结扎胆总管形成肝硬化模型, 周期相对较短, 形成过程和人 HPS 有所不同, 后续需进一步探讨更理想的 HPS 动物模型。R788 虽能显著抑制 Syk 的表达并抑制下游通路蛋白的磷酸化, 但具体机制仍不明确, 后续需要在蛋白组学层面详细研究 R788 抑制 Syk 的机制, 并结合临床进一步探讨抑制 Syk 后 HPS 患者氧合及病理改变的情况。

### 参考文献

- 1 Lv Y, Fan D. Hepatopulmonary syndrome. *Dig Dis Sci* 2015; 60(7): 1914–1923.
- 2 Schenk P, Fuhrmann V, Madl C, Funk G, Lehr S, Kandel O, Müller C. Hepatopulmonary syndrome: prevalence and predictive value of various cut offs for arterial oxygenation and their clinical consequences. *Gut* 2002; 51(6): 853–859.
- 3 Soulaïdopoulos S, Cholongitas E, Giannakoulas G, Vlachou M, Goulis I. Review article: Update on current and emergent data on hepatopulmonary syndrome. *World J Gastroenterol* 2018; 12(10): 1285–1298.
- 4 Swanson KL, Wiesner RH, Krowka MJ. Natural history of hepatopulmonary syndrome: Impact of liver transplantation. *Hepatology* 2005; 41(5): 1122–1129.
- 5 Iyer VN, Swanson KL, Rodrigo CC, Dierkhising RA, Rosen CB, Heimbach JK, Wiesner RH, Krowka MJ. Hepatopulmonary syndrome: Favorable outcomes in the MELD exception era. *Hepatology* 2013; 57(6): 2427–2435.
- 6 Herve P, Pavec JL, Sztrymf B, Decante B, Savale L, Sitbon O. Pulmonary vascular abnormalities in cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21(1): 141–159.
- 7 Hoerning A, Raub S, Neudorf U, Müntjes C, Kathemann S, Lainka E, Stehling F, Hoyer PF, Germer P. Pulse oximetry is insufficient for timely diagnosis of hepatopulmonary syndrome in children with liver cirrhosis. *J Pediatr* 2014; 164(3): 546–552.
- 8 Fuhrmann V, Madl C, Mueller C, Holzinger U, Kitzberger R, Funk GC, Schenk P. Hepatopulmonary syndrome in patients with hypoxic hepatitis. *Gastroenterology* 2006; 131(1): 69–75.
- 9 Zhang ZJ, Yang CQ. Progress in investigating the pathogenesis of hepatopulmonary syndrome. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010; 9(4): 355–360.
- 10 Luo B, Liu L, Tang L, Zhang J, Stockard CR, Grizzle WE, Fallon MB. Increased pulmonary vascular endothelin B receptor expression and responsiveness to endothelin-1 in cirrhotic and portal hypertensive rats: a potential mechanism in experimental hepatopulmonary syndrome. *J Hepatol* 2003; 38(5): 556–563.
- 11 Liu C, Gao J, Chen B, Chen L, Belguise K, Yu W, Lu K, Wang X, Yi B. Cyclooxygenase-2 promotes pulmonary intravascular macrophage accumulation by exacerbating BMP signaling in rat experimental hepatopulmonary syndrome. *Biochem Pharmacol* 2017; 138: 205–215.
- 12 Liu D, Mamorska-Dyga A. SYK inhibitors in clinical development for hematological malignancies. *J Hematol Oncol* 2017; 10(1): 145–152.
- 13 Fruchon S, Kheirallah S, Al Saati T, Ysebaert L, Laurent C, Leseux L, Fournié JJ, Laurent G, Bezombes C. Involvement of the Syk-mTOR pathway in follicular lymphoma cell invasion and angiogenesis. *Leukemia* 2012; 26(4): 795–805.
- 14 Buharalioglu CK, Song CY, Yaghini FA, Ghafoor HU, Motiwala M, Adris T, Estes AM, Malik KU. Angiotensin II-induced process of angiogenesis is mediated by spleen tyrosine kinase via VEGF receptor-1 phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301(3): H1043–H1055.
- 15 Geahlen RL. Syk and pTyr<sup>d</sup>: Signaling through the B cell antigen receptor. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793(7): 1115–1127.
- 16 Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VL. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(6): 387–402.
- 17 Liebmann C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal* 2001; 13(11): 777–785.
- 18 Zhang J, Fallon MB. Hepatopulmonary syndrome: update on pathogenesis and clinical features. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 9(9): 539–549.
- 19 Yang Y, Chen B, Chen Y, Zu B, Yi B, Lu K. A comparison of two common bile duct ligation methods to establish hepa-

- topulmonary syndrome animal models. *Lab Anim* 2015; 49(1): 71–79.
- 20 Raevens S, Geerts A, Paridaens A, Lefere S, Verhelst X, Hoorens A, Van DJ, Maes T, Bracke KR, Casteleyn C, Jonckx B, Horvatits T, Fuhrmann V, Van Vlierberghe H, Van Steenkiste C, Devisscher L, Colle I. Placental growth factor inhibition targets pulmonary angiogenesis and represents a novel therapy for hepatopulmonary syndrome in mice. *Hepatology* 2017; 68(2): 634–651.
- 21 Alaa A. Spleen tyrosine kinase as a target therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Innate Immun* 2018; 10(4): 1–9.
- 22 Gao J, Chen L, Zeng J, Cui J, Ning J I, Wang GS, Belguise K, Wang XB, Qian GS, Lu KZ, Yi B. The involvement of aquaporin 1 in the hepatopulmonary syndrome rat serum-induced migration of pulmonary arterial smooth muscle cells via the p38-MAPK pathway. *Mol BioSyst* 2015; 11(11): 3040–3047.
- 23 Yang C, Lv K, Chen B, Yang Y, Ai X, Yu H, Yang Y, Yi B, Lu K. miR144-3p inhibits PMVECs excessive proliferation in angiogenesis of hepatopulmonary syndrome via Tie2. *Exp Cell Res* 2018; 365(1): 24–32.
- 24 Geahlen RL. Getting Syk: spleen tyrosine kinase as a therapeutic target. *Trends Pharmacol Sci* 2014; 35(8): 414–422.
- 25 Deng Z, Ma S, Zhou H, Zang A, Fang Y, Li T, Shi H, Liu M, Du M, Taylor PR, Zhu HH, Chen J, Meng G, Li F, Chen C, Zhang Y, Jia XM, Lin X, Zhang X, Pearlman E, Li X, Feng GS, Xiao H. Tyrosine phosphatase SHP-2 mediates C-type lectin receptor-induced activation of the kinase Syk and anti-fungal TH17 responses. *Nat Immunol* 2015; 16(6): 642–652.
- 26 Somanath PR, Razorenova OV, Chen J, Byzova TV. Akt1 in endothelial cell and angiogenesis. *Cell Cycle* 2006; 5(5): 512–518.
- 27 Fu C, Chen B, Jin X, Liu X, Wang F, Guo R, Chen Z, Zheng H, Wang L, Zhang Y. Puerarin protects endothelial progenitor cells from damage of angiotensin II via activation of ERK1/2-Nrf2 signaling pathway. *Mol Med Rep* 2018; 17(3): 3877–3883.
- 28 Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res* 2002; 90(12): 1243–1250.
- 29 Miyake M, Goodison S, Urquidi V, Gomes Giacoia E, Rosser CJ. Expression of CXCL1 in human endothelial cells induces angiogenesis through the CXCR2 receptor and the ERK1/2 and EGF pathways. *Lab Invest* 2013; 93(7): 768–778.
- 30 Lionello M, Staffieri A, Marioni G. Potential prognostic and therapeutic role for angiogenesis markers in laryngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2012; 132(6): 574–582.
- 31 Matluobi D, Araghi A, Maragheh BFA, Rezabakhsh A, Soltani S, Khaksar M, Siavashi V, Feyzi A, Bagheri HS, Rahbarghazi R, Montazersaheb S. Carvacrol promotes angiogenic paracrine potential and endothelial differentiation of human mesenchymal stem cells at low concentrations. *Microvascul Res* 2017; 115(7): 20–27.
- 32 Pine PR, Chang B, Schoettler N, Banquerigo ML, Wang S, Lau A, Zhao FF, Grossbard EB, Payan DG, Brahn E. Inflammation and bone erosion are suppressed in models of rheumatoid arthritis following treatment with a novel Syk inhibitor. *Clin Immunol* 2007; 124(3): 244–257.
- 33 Hilgendorf I, Eisele S, Remer I, Schmitz J, Zeschky K, Colberg C, Stachon P, Wolf D, Willecke F, Buchner M, Zirlik K, Ortiz-Rodriguez A, Lozhkin A, Hoppe N, von zur Muhlen C, zur Hausen A, Bode C, Zirlik A. The oral spleen tyrosine kinase inhibitor fostamatinib attenuates inflammation and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31(9): 1991–1999.
- 34 Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, Johnston PB, Vose JM, Lacasce A, Cutillo JS, Vos SD, Sinha R, Leonard JP, Cripe LD, Gregory SA, Sterba MP, Lowe AM, Levy R, Shipp MA. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010; 115(13): 2578–2585.