

CD151 通过囊泡内化再循环调控血管通透性的机制

范诗浪¹, 蒋卢映^{2,3,4}, 章子璇^{3,4}, 季萌萌^{3,4}, 左后娟^{1,3,4}, 刘竞搏²

[¹ 武汉科技大学附属天佑医院心血管内科, 武汉 430064; ² 华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院 (武汉市妇幼保健院) 儿童保健科, 武汉 430016; ³ 华中科技大学同济医学院, 武汉 430014; ⁴ 华中科技大学同济医学院附属同济医院心血管内科, 武汉 430014]

摘要 **目的** 探究 CD151 通过调控囊泡内化再循环对血管通透性的影响及机制。**方法** 野生型小鼠和 CD151 敲除小鼠分别分为 WT-con 组、WT-模型组、KO-con 组和 KO-模型组, 每组 6 只。WT-模型组和 KO-模型组采用腹腔注射脂多糖(LPS)制备脓毒症急性肺损伤(ALI)模型, WT-con 组和 KO-con 组腹腔注射磷酸盐缓冲液(PBS)作为对照。造模后 24 h, 通过 Miles 实验测定肺血管通透性; 将沉默 CD151 表达的 siRNA (si-CD151) 和阴性对照 si-NC 转入 EA.hy 926 细胞, 分别观察基础条件及血管内皮生长因子(VEGF-A)刺激条件下, 内皮细胞层在不同时间点对 FITC-dextran 的通透性; CD151 敲低组和对照组内皮细胞行转录组测序; 免疫荧光检测各组细胞 CD151 分布及内化; Western bolt 及 RT-qPCR 检测 CD151 敲低组及对照组 VE-cadherin 表达情况, 免疫荧光检测各组细胞 VE-cadherin 分布及内化。**结果** Miles 实验结果提示, WT-模型组小鼠肺组织中染料渗出相较 WT-con 组增加($P < 0.01$), KO-模型组小鼠肺组织中染料渗出相较 WT-模型组增加($P < 0.05$)。内皮细胞层通透性检测结果提示, 在 VEGF-A 刺激 30、60 和 120 min 后, CD151 敲低组对 FITC-dextran 的通透性显著高于对照组($P < 0.05$)。转录组测序结果提示, 内皮细胞中 CD151 与囊泡介导的转运存在密切关联。Western bolt 和 RT-qPCR 结果提示, CD151 敲低的内皮细胞中 VE-cadherin 在蛋白和 mRNA 水平表达较对照组显著下降(均 $P < 0.01$)。免疫荧光染色结果提示, 在 VEGF-A 刺激后, 与对照组比较, CD151 表达下降显著破坏细胞-细胞连接处 VE-cadherin 的表达, 降低了 CD151 和 VE-cadherin 在核周区域的共定位。**结论** CD151 的缺失影响内皮细胞囊泡内化再循环, 影响 VE-cadherin 的表达与内化活动, 进而影响血管通透性。

关键词 急性肺损伤; CD151; 内化再循环; 内皮细胞; 血管通透性; VE-cadherin

中图分类号 R 631 + 1.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)02-0218-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.02.005

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是以进行性低氧血症、呼吸困难和非心源性肺水肿为主要表现的临床综合征。肺血管完整性的缺失以及血管内皮功能障碍是 ALI 的重要发病机制之一^[1]。ALI 期间, 内皮细胞屏障功能受损, 内皮细胞对液体和蛋白质的通透性增加, 其胞吞转运作用显著增强, 引起 ALI 后水肿形成, 肺组织正常功能严重受损, 导致 ALI 相关病死率升高^[2]。因此, 维持内皮细胞屏障功能、降低血管通透性是 ALI 的一个重要治疗方向。

CD151 是四跨膜蛋白超家族中重要的成员之一, 在维持血管内皮完整性方面发挥重要作用^[3], 可能是 ALI 治疗的一个新靶点。研究^[4]显示,

CD151 可通过囊泡运输调控膜蛋白分子内化。已知囊泡运输与多种疾病发生发展密切相关, 如 GOLPH3 复合物参与的囊泡运输可连接高尔基体与肌动蛋白细胞骨架, 促进细胞迁移, 可能与癌症的侵袭和转移有关^[5]。因此, 由 CD151 通过囊泡运输调控的内化再循环活动, 可能是 ALI 发病期间血管通透性改变的机制之一。该研究通过观察 CD151 敲除对小鼠肺血管内皮通透性的影响, 探讨 CD151 通过囊泡内化再循环调控血管通透性的作用机制, 为临床上 ALI 的治疗提供理论参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 C57/BL6 背景的 CD151 敲除小鼠制备于中国医学科学院实验动物研究所。为了进行基因分型, 使用小鼠组织直接 PCR 试剂盒[CAT: 10185ES70, 翌圣生物科技(上海)股份有限公司]按照制造商的方案从尾尖提取基因组 DNA。本研究使用的是 7~12 周龄的 CD151 敲除小鼠, 并将其与

2024-09-24 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81873535); 湖北省自然科学基金(编号: 2020CFB573)

作者简介: 范诗浪, 女, 硕士研究生;

刘竞搏, 女, 硕士, 住院医师, 通信作者, E-mail:

m13079945917@163.com

相同年龄和性别的野生型小鼠进行比较。动物饲养于同济医学院实验动物中心,饲养室光照-黑暗循环 12 h,温度(22±2)℃,湿度 40%~50%。所有动物实验均经同济医学院机构动物研究委员会批准,实验过程遵循 3R 原则。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);Lipofectamine 2000(美国赛默飞世尔科技公司);CD151 小干扰 RNA (si-CD151)、阴性对照 si-NC 的寡核苷酸序列(山东维真生物科技有限公司);Real-time PCR 引物(武汉奥科生物技术有限公司);CD151 抗体、GAPDH 抗体(美国 Proteintech 公司);抗 VE-cadherin 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);用于 IF 染色的抗 CD151 抗体(美国 Abcam 公司);VEGF-A165(人)、VEGF-A164(小鼠)抗体(美国 R&D Systems 公司);Sulfo-NHS-SS-Biotin(美国 ApexBio Technology 公司);链霉亲和素磁珠(美国 MedChemexpress 生物科技公司);异硫氰酸荧光素标记的葡聚糖(FITC-dextran)工作液、伊兰染料、脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)(美国 Sigma-Aldrich 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与建模 野生型小鼠和 CD151 敲除小鼠分别分为 WT-con 组、WT-模型组、KO-con 组和 KO-模型组,每组 6 只。WT-模型组和 KO-模型组采用腹腔注射 LPS 制备脓毒症 ALI 模型,方法如下:小鼠经腹腔注射 LPS,剂量为 12 mg/kg,以诱导其出现 ALI 相关的肺血管渗漏。WT-con 组和 KO-con 组小鼠经腹腔注射等量 PBS 作为对照。

1.2.2 Miles 实验 采用改良的 Miles 实验^[6]检测野生型和 CD151 敲除的 C57/BL6 小鼠肺血管通透性。在制备脓毒症 ALI 模型 24 h 后,经尾静脉将 100 μl 浓度为 1% 的伊兰染料注射到小鼠体内。30 min 后,经右心室灌注磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)以灌洗去除血管中的染料。将肺脏剪下拍照后,提取肺组织中染料并测量染料浓度,在 620 nm 处测定吸光度,定量染料浓度,根据标准曲线计算血浆中的染料浓度,以评价肺血管通透性。

1.2.3 细胞培养与转染 人内皮细胞系 EA.hy 926 在 DMEM 完全培养基(含 10% FBS, 100 U/ml 青-链霉素双抗)中,于 37℃ 恒温,95% 空气、5% CO₂ 的环境下培养。每周传代 2 次,每间隔 2 d 换液。靶向 CD151 的小干扰 si-RNA 片段和阴性对照 si-RNA 片段由山东维真生物科技有限公司合成。人 CD151 siRNA 序列为 5'-AGTACCTGCTGTTTAC-

CTACA-3', 人 si-NC 序列为 5'-GCGAGACCATGC-CTCCAACAT-3'。使用 Lipofectamine 2000 试剂转染。

1.2.4 内皮单层通透性测定 使用 Lipo2000 及 Opti-MEM 体系转染 EA.hy 926 细胞,将转染后的细胞分为:con 组、lipo 组、si-NC 组及 si-CD151 组。各组细胞干预 48 h 后,用胰酶消化。轻柔吹散细胞、计数,调整细胞数目,按照每上室 200 μl 细胞悬液(含 1×10⁴ 个细胞)接种,下室每孔加入 500 μl 培养基(确保能浸没上室底部的细胞,且避免形成气泡)。继续培养至形成内皮细胞单层。内皮单层形成后,将 1 g/L 的 FITC-dextran 置于上室中,并用 50 μg/L 的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A)刺激细胞 15、30、60 和 120 min。将下室的培养基充分混合,置于黑色 96 孔不透明板上进行测量,在 Synergy 2 多模式酶标仪(Bio-Tek)上读取相应的荧光值。

1.2.5 RT-qPCR 提取 EA.hy 926 细胞总 RNA,逆转录获得 cDNA。RT-qPCR 采用 SYBR Green 法,使用 7900HT FAST 实时 PCR 系统进行检测。以 GAPDH 作为校正内参,采用 2^{-ΔΔC_T} 方法计算 VE-cadherin 的 mRNA 相对表达量,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

Primer names	Sequences (5'-3')
GAPDH	F: ATGGGGAAGGTGAAGGTCG R: GGGGTCATTGATGCAACAATA
VE-cadherin	F: GAAGCCTCTGATTGGCACAGTG R: TTTTGTGACTCGGAAGAACTGGC

1.2.6 Western blot 用 IP 裂解缓冲液裂解细胞,BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离,转移到聚偏氟乙烯膜上,用 5% BSA 在含 Tween 20 的 Tris 缓冲盐溶液中室温封闭 1 h。然后将膜与一抗在 4℃ 下孵育过夜。与过氧化物酶结合的二抗孵育 2 h 后,使用 ECL 化学发光法显影成像。通过 Image J 软件对 Western blot 条带进行半定量分析。

1.2.7 免疫荧光染色 取内皮细胞在 0.1% 明胶涂层玻璃底 24 孔板上生长,按需分组干预细胞后,吸弃培养基,用 PBS 洗涤细胞 3 次,4% 多聚甲醛固定 15 min,沿孔壁加入 500 μl 0.1% Triton X-100,5 min 后清洗,用 5% 正常驴血清封闭 30 min。加入一抗工作液在 4℃ 下孵育过夜,用 PBS 洗涤 3 次,并与

稀释的 Alexa Fluor® 偶联二抗在室温下孵育 1 h。采用 4'-6-二甲基-2-苯基吡啶染色。使用 Zeiss Axio Imager 荧光显微镜采集图像, Zen 软件(Zen 3.0 blue edition)对采集到的图像进行处理。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism V8.0 软件进行统计分析,所有的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠基因型鉴定结果 使用基因编辑技术构建 CD151 敲除小鼠,琼脂糖凝胶电泳结果显示,野生型小鼠 DNA 扩增后产物大小为 958 bp,CD151 敲除小鼠 DNA 扩增产物大小为 215 bp,且 Western blot 结果显示 CD151 的表达下调,差异有统计学意义($t = 12.390, P < 0.0001$)。见图 1。表明 CD151 敲除小鼠构建成功。

2.2 CD151 缺失对肺血管渗透性的影响 通过改良血管 Miles 实验与肺组织 HE 染色检测肺血管通透性,结果如图 2 显示,WT-模型组小鼠肺组织中染料渗出相较 WT-con 组增加($q = 5.294, P = 0.0021$)。同时,与 WT-模型组比较,KO-模型组小鼠肺组织中染料渗出增加($q = 27.528, P = 0.0068$)。HE 染色结果显示,与 WT-con 组比较,WT-模型组肺泡腔变小,肺间质炎细胞浸润;与 WT-模型组比较,KO-模型组小鼠肺泡水肿、出血,大量炎细胞聚集浸润。以上结果均提示 CD151 缺失导致肺血管渗透性升高。

2.3 CD151 敲除内皮细胞构建情况 将小干扰 RNA 转染入 EA.hy 926 细胞实现 CD151 蛋白水平降低,Western blot 检测结果显示,si-CD151 组 CD151 蛋白表达水平较 si-NC 组下降($q = 12.880, P = 0.0003$)。见图 3。提示 CD151 敲除内皮细胞构建成功。

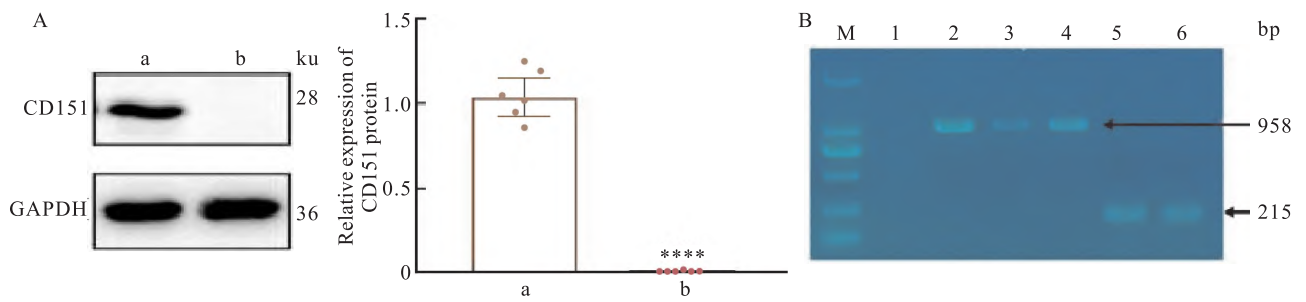


图 1 小鼠基因型鉴定结果

Fig. 1 Genotyping results of mice

A: The expression of CD151 protein in mice detected by Western blot; a: WT group; b: CD151 KO group; **** $P < 0.0001$ vs WT group; B: The expression of CD151 in mice detected by mouse tail identification; M: DNA Marker; 1: blank control group; 2: positive control group; 3,4: WT group; 5,6: CD151 KO group.

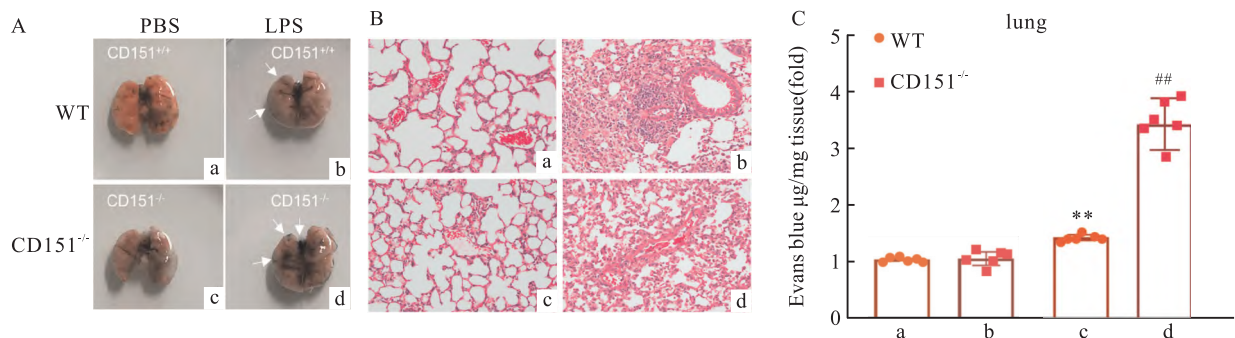


图 2 CD151 缺失对肺血管渗透性影响

Fig. 2 Effect of CD151 deficiency on pulmonary vascular permeability

A: Evans blue exudation in lung tissue of 4 groups of mice; B: Pathological changes in lung tissue of 4 groups of mice HE $\times 400$; C: Statistical histogram of Evans blue content in tissues; a: WT-con group; b: KO-con group; c: WT-model group; d: KO-model group; The white arrow indicated that there was obvious dye exudation in the lung tissue; ** $P < 0.01$ vs WT-con group; ## $P < 0.01$ vs WT-model group.

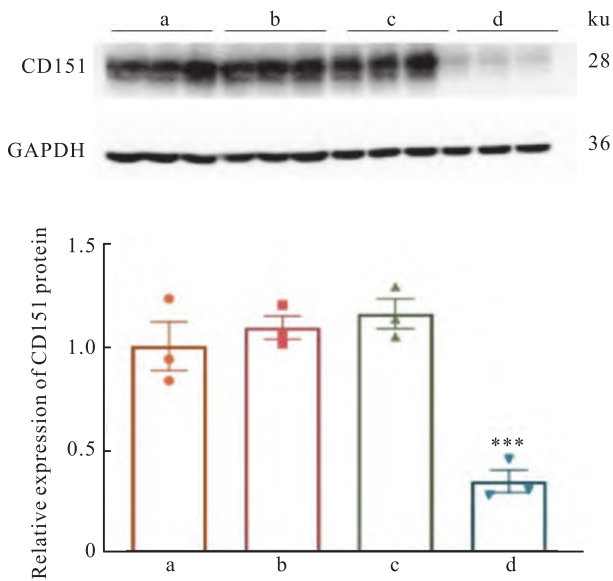


图3 小干扰RNA敲低CD151蛋白水平验证
Fig.3 Verification of CD151 protein level knockdown by small interfering RNA

a: con group; b: lipo group; c: si-NC group; d: si-CD151 group; *** $P < 0.001$ vs si-NC group.

2.4 CD151 缺失对内皮细胞通透性的影响 取 si-CD151 组及 con 组、lipo 组、si-NC 组内皮细胞形成内皮细胞单层,分别观察基础条件下和 VEGF-A 刺激条件下 FITC-dextran 的通透性。结果显示,在基础条件下,各组 FITC-dextran 的渗透性随着时间的延长均明显增加(图 4A),但各组间 FITC-dextran 的渗透性差异无统计学意义($q = 1.912, P > 0.05$);给

予 VEGF-A 诱导刺激后,si-CD151 组对 FITC-dextran 的通透性较 si-NC 组增高,在 VEGF-A 刺激 30、60 和 120 min 后,si-CD151 组对 FITC-dextran 的通透性高于 si-NC 组(图 4B),差异有统计学意义($q = 6.936, P < 0.05$)。以上结果提示 CD151 表达降低可导致内皮细胞通透性升高。

2.5 CD151 敲低对囊泡运输的影响 将 si-CD151 组与 si-NC 组内皮细胞进行转录组测序,共鉴定出 1 328 个差异基因,其中包括 804 个上调基因和 524 个下调基因,见图 5A、5B。GO 富集分析结果表明,CD151 与囊泡转运强相关,如细胞质囊泡、细胞内囊泡、细胞外泌体、细胞外囊泡,见图 5C、5D。这些结果强调内皮细胞中 CD151 与囊泡介导的转运存在密切关联。

2.6 CD151 缺失对 VE-cadherin 表达的影响 为了探究 CD151 的缺失对囊泡运输的影响是否与 VE-cadherin 有关,取 si-CD151 组及 con 组、lipo 组、si-NC 组内皮细胞形成细胞单层。Western bolt 及 RT-qPCR 实验结果显示,si-CD151 组内皮细胞中 VE-cadherin 的蛋白表达较 si-NC 组下降($q = 4.508, P = 0.0052$),见图 6A;在 mRNA 水平,si-CD151 组内皮细胞中 VE-cadherin 的表达较 si-NC 组下降($q = 6.109, P = 0.0048$),见图 6B。免疫荧光染色实验检测结果显示,无诱导剂组中,所有组别的 VE-cadherin 主要表达于细胞-细胞连接处。在 VEGF-A 刺激后,与 si-NC 组比较,si-CD151 组内皮细胞中 CD151 表达下降显著破坏了细胞-细胞连接处

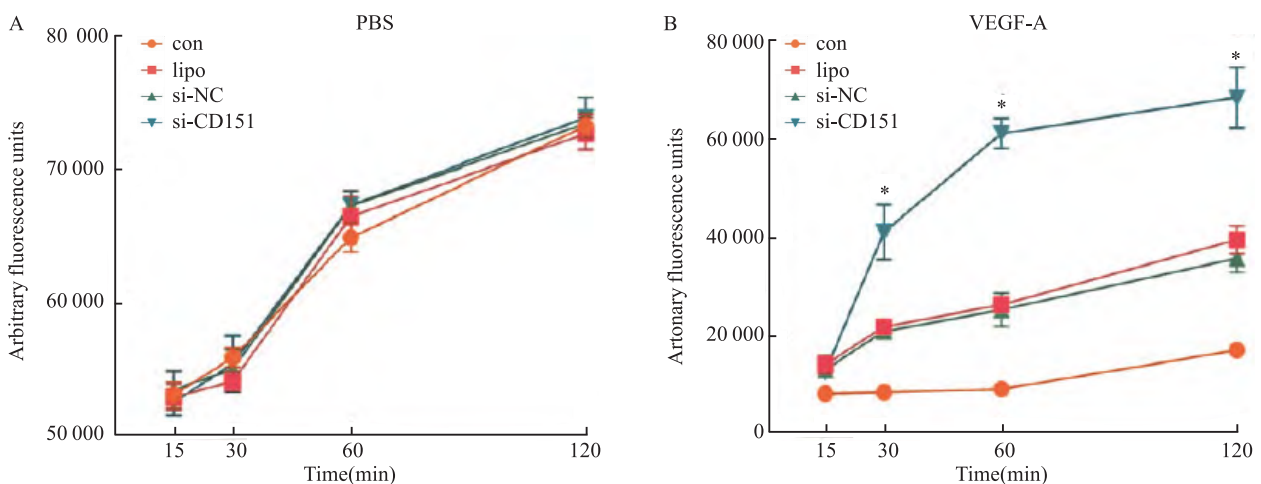


图4 CD151敲低对内皮细胞层通透性的影响

Fig.4 Effect of CD151 knockdown on endothelial cell layer permeability

A: Under basic conditions, the comparison of the average fluorescence intensity of each group at different time points; B: Under the condition of VEGF-A stimulation, the comparison of the average fluorescence intensity of each group at different time points; * $P < 0.05$ vs con group.

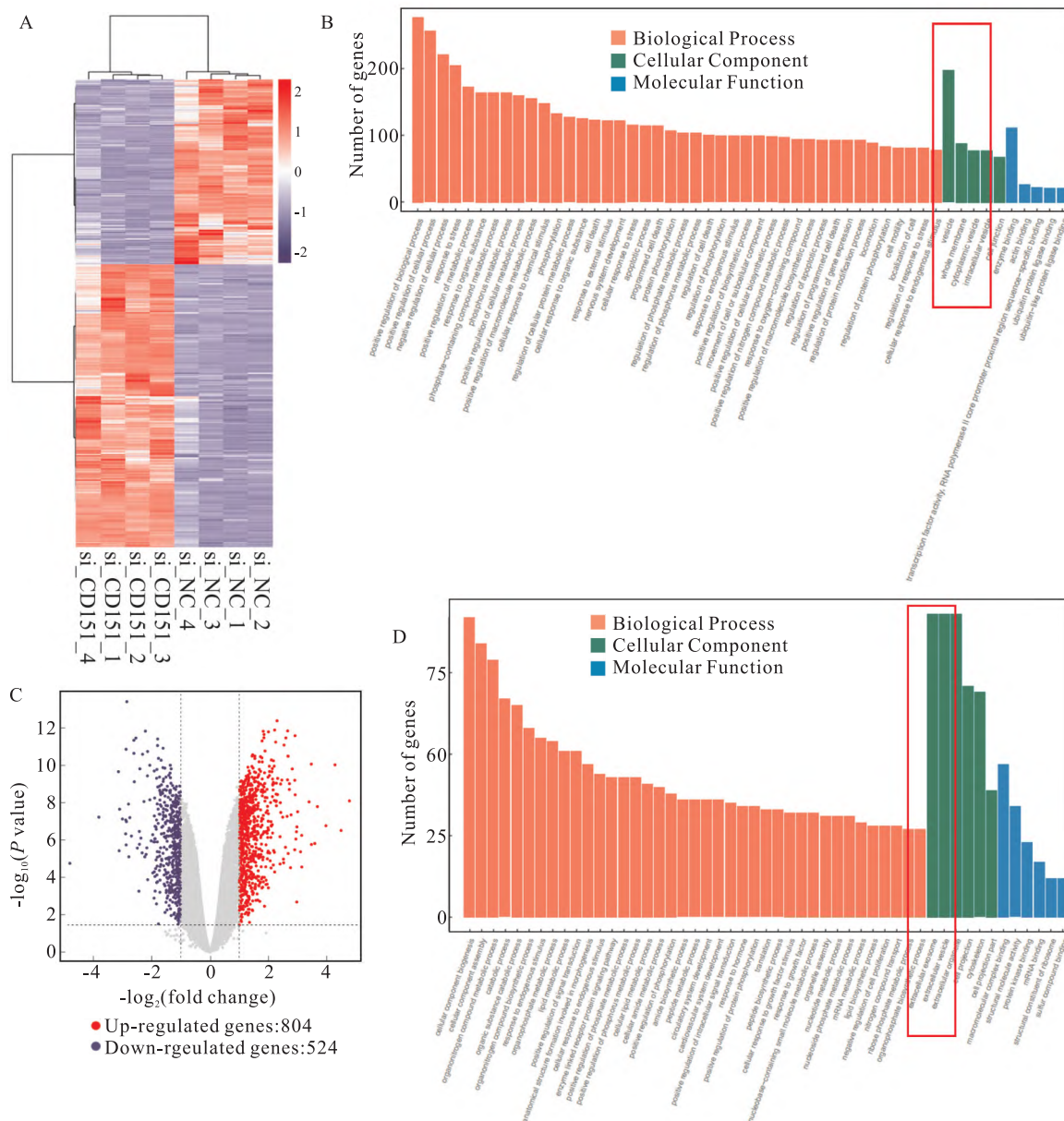


图5 对照组与 CD151 敲低组转录组测序

Fig.5 Transcriptome sequencing of control group and CD151 knockdown group

A: Differential gene heatmap; B: Volcano Plot; C: GO enrichment of up-regulated genes, the red frame circled part indicated that the genes related to cytoplasmic vesicles and intracellular vesicle were up-regulated; D: GO enrichment of down-regulated genes, the red frame circled part indicated that the genes related to exosomes and extracellular vesicles were down-regulated.

VE-cadherin 的表达,如图 6C。上述结果提示,CD151 缺失不但影响 VE-cadherin 的表达,也破坏 VE-cadherin 在细胞上的分布。

2.7 CD151 敲低对 VE-cadherin 内化的影响 进一步探究 CD151 敲低对 VE-cadherin 内化活动的影响,免疫荧光检测 si-CD151 组及 si-NC 组内皮细胞中 VE-cadherin 分布情况,观察其与 CD151 的共定位情况,结果如图 7 所示,发现 con 组、lipo 组、si-NC

组中 VE-cadherin 和 CD151 在胞质和胞膜均出现共定位,且核周的共定位更加明显;CD151 敲低后,与 si-NC 组比较,si-CD151 组 VE-cadherin 的表达及其与 CD151 共定位均明显下降,尤其是核周区域,表明 VE-cadherin 的内化运输被破坏。

3 讨论

脓毒症诱导的ALI是以难治性低氧血症、呼吸

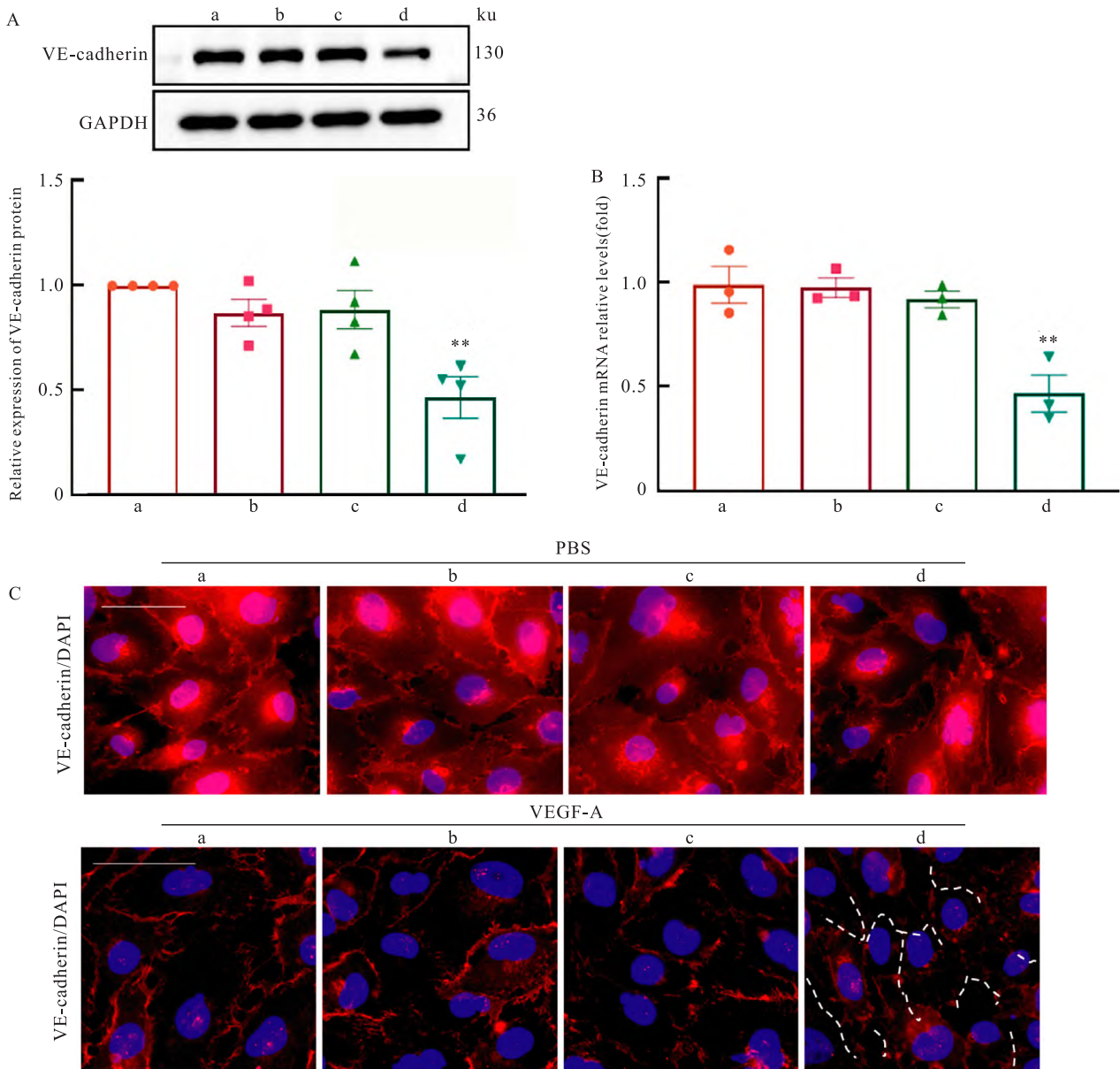


图6 CD151 敲低对 VE-cadherin 表达的影响

Fig. 6 Knockdown of CD151 affected VE-cadherin expression

A: Comparison of VE-cadherin protein expression in each group; B: Comparison of VE-cadherin expression at mRNA level in each group; C: VE-cadherin immunofluorescence image $\times 400$, the white dotted line indicated that the expression of VE-cadherin at the cell-cell junctions was destroyed; a: con group; b: lipo group; c: si-NC group; d: si-CD151 group; ** $P < 0.01$ vs si-NC group.

窘迫和非心源性肺水肿为特征的临床危重症^[7]。在 ALI 发病期间,内皮细胞表面可感知机械、化学和细胞刺激的糖萼结构降解脱落,内皮表面的信号受体暴露^[8]。上皮层和内皮层的损伤导致肺泡-毛细血管屏障破裂,肺泡腔内积聚大量水肿液和碎片,严重损伤肺内血管和组织。已知 CD151 在维持血管稳定性中发挥重要作用^[9],本研究通过构建 CD151 敲除小鼠,使用该小鼠构建 ALI 模型,观察

CD151 缺失对肺血管通透性影响。Miles 实验结果表明,CD151 敲除组 ALI 小鼠肺组织中染料渗出较对照组明显增加。通过构建 CD151 敲低内皮细胞,检测 CD151 对单层内皮细胞通透性的影响,实验结果表明,CD151 敲低可显著增加 VEGF-A 诱导的内皮细胞单层的通透性。以上实验结果说明 CD151 表达降低导致内皮细胞通透性上升,其缺失导致 ALI 发生发展期间肺血管通透性明显升高。

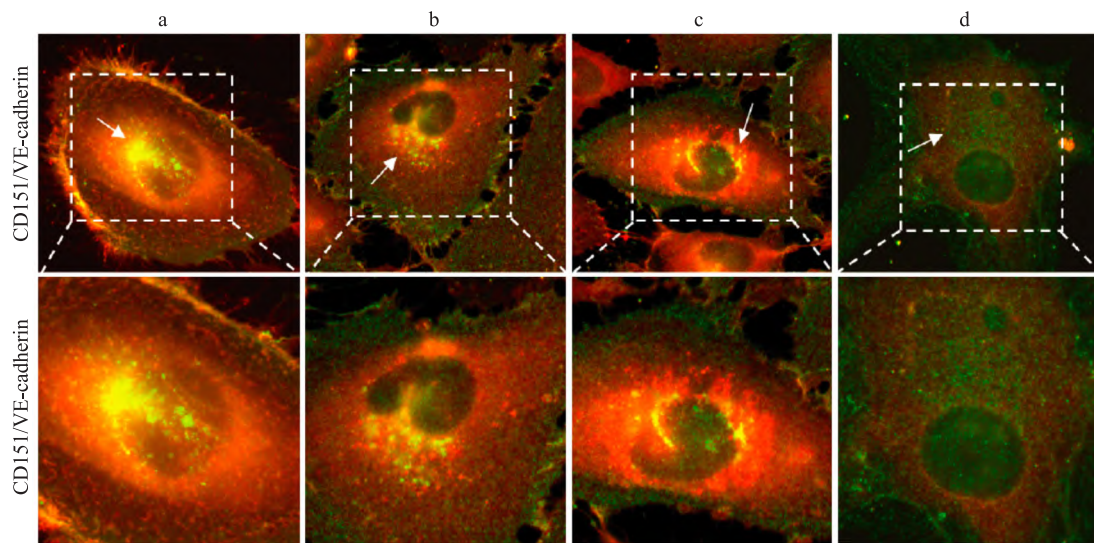


图7 CD151 敲低影响 VE-cadherin 的内化

Fig.7 Knockdown of CD151 affected the internalization of VE-cadherin

Endothelial cell immunofluorescence staining images; upper images $\times 600$; lower images $\times 1\ 200$; a: con group; b: lipo group; c: si-NC group; d: si-CD151 group; Green fluorescence indicated VE-cadherin; Red fluorescence indicated CD151; White arrow indicated the co-localization of VE-cadherin and CD151.

细胞膜表面存在与相应蛋白结合的膜受体,经细胞内吞、囊泡运输、胞吐回细胞表面以完成自身调节,这个过程通常称为内化再循环^[10]。如驱动蛋白-3 家族蛋白 KIF13B 可介导 VEGF-A 细胞表面受体 VEGFR2 经囊泡运输返回细胞表面,调节血管生成时血管壁对 VEGF-A 的反应^[11]。内化再循环过程与人类某些疾病的发生发展密切相关,如肿瘤、ALI、心血管疾病等^[12-13]。其中,四跨膜蛋白超家族与众多分子结合,在调节囊泡内化和细胞内运输过程中发挥重要作用^[14]。本研究中,为了探究 CD151 在 ALI 发生发展期间影响血管通透性的机制,取 CD151 敲低组和对照组内皮细胞进行转录组测序。GO 富集分析表明,CD151 与囊泡转运强相关,这与既往研究中的四跨膜蛋白超家族成员参与内化和细胞内运输的结果一致^[14]。另外,免疫荧光染色结果显示,内皮细胞上 CD151 的敲低明显降低其在核周区域的共定位。由于 CD151 介导内皮细胞的细胞间黏附与细胞-胞外基质黏附,在维持内皮细胞血管样结构、维持血管稳定性中发挥重要作用^[9]。已知 VE-cadherin 是最重要的黏附连接蛋白,既往研究^[15]表明,该基因敲除可导致血管通透性增加、内皮细胞屏障的完整性被破坏,主要体现在其参与的内皮细胞的囊泡运输功能受损。故进一步探究 CD151 是否影响参与内皮细胞囊泡运输的最重要的黏附连接蛋白 VE-cadherin 的表达及相关功能,结果

表明,CD151 的缺失可抑制 VE-cadherin 的表达,破坏其在相邻细胞间的分布,影响其本身与 VE-cadherin 的共定位,同时影响 VE-cadherin 的内化。这表明 CD151 通过调控 VE-cadherin 的表达与内化,进而在囊泡转运中发挥作用。

本研究揭示了 CD151 调控血管通透性的潜在途径和可能机制,但存在一定局限性。首先,未充分证明 CD151 是影响 VE-cadherin 的表达与内化再循环的上游因子。其次,CD151 中具体是什么结构调控囊泡内化再循环,其是否还影响除 VE-cadherin 之外的其它膜蛋白的囊泡内化再循环以调控血管通透性,均有待进一步探索。

综上所述,本研究从脓毒症诱导的 ALI 小鼠血管通透性的变化切入,证实了 CD151 通过调控 VE-cadherin 的囊泡内化再循环,进而调控血管通透性。为 ALI 的治疗和预后提供了新的靶点。

参考文献

- [1] Long M E, Mallampalli R K, Horowitz J C. Pathogenesis of pneumonia and acute lung injury[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2022, 136(10): 747-69. doi:10.1042/CS20210879.
- [2] 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.

- [3] Zhang F, Michaelson J E, Moshiah S, et al. Tetraspanin CD151 maintains vascular stability by balancing the forces of cell adhesion and cytoskeletal tension[J]. *Blood*, 2011, 118(15): 4274 – 84. doi:10.1182/blood-2011-03-339531.
- [4] Mukherjee S, Tessema M, Wandinger-Ness A. Vesicular trafficking of tyrosine kinase receptors and associated proteins in the regulation of signaling and vascular function[J]. *Circ Res*, 2006, 98(6): 743 – 56. doi:10.1161/01.RES.0000214545.99387.e3.
- [5] Kuna R S, Field S J. GOLPH3: a Golgi phosphatidylinositol(4) phosphate effector that directs vesicle trafficking and drives cancer [J]. *J Lipid Res*, 2019, 60(2): 269 – 75. doi:10.1194/jlr.R088328.
- [6] Clark P R, Kim R K, Poher J S, et al. Tumor necrosis factor disrupts claudin-5 endothelial tight junction barriers in two distinct NF- κ B-dependent phases [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0120075. doi:10.1371/journal.pone.0120075.
- [7] Lindstedt S, Wang Q, Niroomand A, et al. High resolution fluorescence imaging of the alveolar scaffold as a novel tool to assess lung injury[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 6662. doi:10.1038/s41598-024-57313-6.
- [8] Inagawa R, Okada H, Takemura G, et al. Ultrastructural alteration of pulmonary capillary endothelial glycocalyx during endotoxemia[J]. *Chest*, 2018, 154(2): 317 – 25. doi:10.1016/j.chest.2018.03.003.
- [9] Xu W, Gao C, Wu J. CD151 alleviates early blood-brain barrier dysfunction after experimental focal brain ischemia in rats[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2021, 41(1): 151 – 62. doi:10.1007/s10571-020-00842-1.
- [10] De Franceschi N, Hamidi H, Alanko J, et al. Integrin traffic - the update[J]. *J Cell Sci*, 2015, 128(5): 839 – 52. doi:10.1242/jcs.161653.
- [11] Cho H D, Nhàn N T T, Zhou C, et al. KIF13B mediates VEGFR2 recycling to modulate vascular permeability[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2023, 80(4): 91. doi:10.1007/s00018-023-04752-5.
- [12] Qiao X, Yin J, Zheng Z, et al. Endothelial cell dynamics in sepsis-induced acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and therapeutic implications[J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1): 241. doi:10.1186/s12964-024-01620-y.
- [13] Méndez-Barbero N, San Sebastian-Jaraba I, Blázquez-Serra R, et al. Annexins and cardiovascular diseases: beyond membrane trafficking and repair[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 1000760. doi:10.3389/fcell.2022.1000760.
- [14] Rana S, Claas C, Kretz C C, et al. Activation-induced internalization differs for the tetraspanins CD9 and TSPAN8: impact on tumor cell motility[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(1): 106 – 19. doi:10.1016/j.biocel.2010.10.002.
- [15] Wu F T, Paez-Ribes M, Xu P, et al. Aflibercept and Ang1 supplementation improve neoadjuvant or adjuvant chemotherapy in a preclinical model of resectable breast cancer[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36694. doi:10.1038/srep36694.

The mechanism of CD151 regulating vascular permeability through vesicle internalization and recycling

Fan Shilang¹, Jiang Luying^{2,3,4}, Zhang Zixuan^{3,4}, Ji Mengmeng^{3,4}, Zuo Houjuan^{1,3,4}, Liu Jingbo²

[¹Dept of Cardiology, Tianyou Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064; ²Dept of Child Health, Wuhan Children's Hospital (Wuhan Maternal and Child Health Hospital), Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430016; ³Tongji Medical College of HUST, Wuhan 430014; ⁴Dept of Cardiology, Tongji Hospital Tongji Medical College of HUST, Wuhan 430014]

Abstract Objective To explore the effect and mechanism of CD151 on vascular permeability by regulating vesicle internalization and recycling. **Methods** Wild-type mice and CD151 knockout mice were divided into WT-con group, WT-model group, KO-con group and KO-model group, with 6 mice in each group. WT-model group and KO-model group were intraperitoneally injected with LPS to prepare sepsis ALI model, and WT-con group and KO-con group were intraperitoneally injected with phosphate buffer saline (PBS) as a control. 24 h after modeling, pulmonary vascular permeability was measured by Miles test. The siRNA silencing CD151 expression (si-CD151) and negative control si-NC were transfected into EA. hy 926 cells. The permeability of endothelial cell layer to FITC-dextran at different time points was observed under basic conditions and vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) stimulation conditions. Transcriptome sequencing of endothelial cells in si-CD151 group and si-NC group; the distribution and internalization of CD151 in each group were measured using immunofluorescence. Western blot and real-time quantitative RT-qPCR were used to detect the expression of VE-cadherin in si-CD151 group

(下转第 233 页)

ty, scratch experiment and tube formation experiment. On the 7th day after birth, C57BL/6J mice were randomly assigned to different treatment groups: control group, oxygen-induced retinopathy (OIR) group, OIR + si-HIF-1 α group and OIR + si-BNIP group. The neovascularization and vascular occlusion were measured. **Results** Compared with normoxic group, the rate of LC3 + MitoTracker + spots, glucose uptake and lactic acid release in HUVECs in hypoxia + si-NC group increased significantly ($P < 0.001$). Compared with hypoxia + si-NC group, the rate of LC3 + MitoTracker + spots, glucose uptake and lactic acid release in HUVECs in hypoxia + si-HIF-1 α group decreased significantly ($P < 0.01$). Compared with normoxic group, the proliferation activity of HUVECs in hypoxia + si-NC group decreased significantly ($P < 0.05$), and the wound healing area and the number of tubes formed increased significantly ($P < 0.01$). Compared with hypoxia + si-NC group, the proliferation activity of HUVECs in hypoxia + si-HIF-1 α group decreased significantly at the 24th, 48th and 72th hours of culture ($P < 0.05$), and the wound healing area and the number of tubes formed decreased significantly ($P < 0.001$). Overexpression of BNIP3 reversed the effects of HIF-1 α knock-down on mitochondrial autophagy, glycolysis and biological function. Compared with OIR group, the neovascularization and vascular occlusion areas in retina of mice in OIR + si-HIF-1 α group and OIR + si-BNIP3 group reduced significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway promotes mitochondrial autophagy activation in HUVECs under hypoxia, which plays an important role in controlling endothelial function and angiogenesis.

Key words hypoxia inducible factor-1 α ; newborn mice; retinal blood vessels; glycolysis; mitochondrial autophagy; human umbilical vein endothelial cells

Fund program Natural Science Foundation of Hubei Province (No. 2019CFB401)

Corresponding author Yi Yan, E-mail: oylg07@163.com

(上接第 225 页)

and other groups. The distribution and internalization of VE-cadherin in each group were measured using immunofluorescence. **Results** Miles experiment results indicated that dye exudation in lung tissue of WT-model group was significantly higher than that of WT-con group ($P < 0.01$). The dye exudation in the lung tissue of KO-model group increased compared with WT-model group ($P < 0.05$). The results of endothelial cell layer permeability test showed that the permeability of FITC-dextran in si-CD151 group was significantly higher than that in control group after VEGF-A stimulation for 30, 60 and 120 min ($P < 0.05$). Transcriptome sequencing results suggested that CD151 in endothelial cells was closely related to vesicle-mediated transport. Compared with other groups, protein and mRNA levels of VE-cadherin in CD151 knockdown endothelial cells was significantly lower (all $P < 0.01$). The immunofluorescence assay demonstrated that after VEGF-A stimulation, the decrease of CD151 expression significantly impaired the expression of VE-cadherin at cell-cell contacts and reduced the CD151-VE-cadherin colocalization in the perinuclear region compared with other groups. **Conclusion** The absence of CD151 affects the internalization and recycling of endothelial cell vesicles, affects the expression and internalization of VE-cadherin, and then influences vascular permeability.

Key words acute lung injury; CD151; internalized recycling; endothelial cells; vascular permeability; VE-cadherin

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 81873535); Natural Science Foundation of Hubei Province (No. 2020CFB573)

Corresponding author Liu Jingbo, E-mail: m13079945917@163.com