



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： CD151 YXX ϕ 基序点突变体通过囊泡内化再循环调控血管通透性的机制研究
作者： 姜树芑, 范诗浪, 蒋卢映, 章子璇, 季萌萌, 左后娟, 刘竞搏
网络首发日期： 2026-04-27
引用格式： 姜树芑, 范诗浪, 蒋卢映, 章子璇, 季萌萌, 左后娟, 刘竞搏. CD151 YXX ϕ 基序点突变体通过囊泡内化再循环调控血管通透性的机制研究[J/OL]. 安徽医科大学学报. <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20260427.1337.003>



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。

***CD151* YXX ϕ 基序点突变体通过囊泡内化再循环调控血管通透性的机制研究**

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

[¹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; ²武汉科技大学医学院

基础医学, 武汉 430072; ³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; ⁴华中科技大学同济医学院, 武汉 430014]

摘要 **目的** 探究 *CD151* YXX ϕ 基序点突变体是否通过调控囊泡内化再循环过程影响血管通透性。**方法** 采用 *CD151* 基因敲除 (KO) 与野生型 (WT) 小鼠, 通过改良 Miles 实验比较两组小鼠在血管内皮生长因子 A (VEGF-A) 刺激下背部及耳后皮肤的血管通透性。构建 *CD151* YXX ϕ 基序点突变体 YALA, 利用腺病毒转染至人内皮细胞 EA.hy926, 设立多个实验组, 检测基础条件及 VEGF-A 刺激下内皮细胞单层对异硫氰酸荧光素标记的葡聚糖 (FITC-dextran) 的通透性; 采用蛋白质免疫印迹 (WB)、RT-qPCR 及免疫荧光技术检测血管内皮钙黏蛋白 (VE-cadherin) 的表达与分布; 通过细胞表面生物素化实验定量比较 VE-cadherin 的内吞率; 使用鬼笔环肽标记纤维状肌动蛋白 (F-actin), 观察细胞骨架张力变化。**结果** Miles 实验显示, 在 VEGF-A 刺激下, KO 组小鼠背部及耳后皮肤染料渗出量显著高于 WT 组 (均 $P < 0.05$)。在 VEGF-A 刺激 60 min 和 120 min 后, 过表达 YALA 突变体的内皮细胞单层对 FITC-dextran 的通透性显著增高 ($P < 0.05$)。WB 与 RT-qPCR 结果显示, YALA 突变体不影响 VE-cadherin 的总蛋白及 mRNA 表达水平。免疫荧光结果显示, YALA 突变体破坏 VEGF-A 刺激下 VE-cadherin 在细胞膜上的连续分布及其与 CD151 在核周区域的共定位。细胞表面生物素化实验证实, YALA 突变体显著降低 VE-cadherin 的内吞率 ($P < 0.05$)。细胞骨架染色显示, YALA 突变体导致内皮细胞肌动蛋白骨架形成粗大张力丝, 提示细胞收缩。**结论** *CD151* YXX ϕ 基序点突变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 *CD151*; YXX ϕ 基序; 血管内皮钙黏蛋白; 内化再循环; 内皮细胞; 血管通透性
中图分类号 R 631⁺1.2

文献标志码 A

Study on the mechanism of *CD151* YXX ϕ motif point mutant regulating vascular permeability through vesicle internalization and recycling

Jiang Shupeng^{1,4}, Fan Shilang², Jiang Luying^{1,4}, Zhang Zixuan^{1,4}, Ji Mengmeng^{1,4}, Zuo Houjuan^{1,4},

Liu Jingbo³

[¹Department of Cardiovascular Medicine, Tongji Hospital Tongji Medical College of Huazhong

University of Science and Technology, Wuhan 430014; ²Basic Medicine, School of Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430072; ³Department of Child Health, Wuhan Children's Hospital (Wuhan Maternal and Child Health Hospital), Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430016; ⁴Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430014]

Abstract Objective To investigate whether the *CD151* YXX ϕ motif point mutant affects vascular permeability by regulating vesicle internalization and recycling. **Methods** *CD151* knockout (KO) and wild-type (WT) mice were used. A modified Miles assay was performed to compare vascular permeability in the dorsal and postauricular skin of the two groups of mice under vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) stimulation. The *CD151* YXX ϕ motif point mutant YALA was constructed and transfected into human endothelial cells (EA.hy926) using an adenoviral vector. Multiple experimental groups were set up to detect the permeability of endothelial cell monolayers to FITC-dextran under baseline conditions and after VEGF-A stimulation. Western blot (WB), RT-qPCR, and immunofluorescence were used to examine the expression and distribution of VE-cadherin. The internalization rate of VE-cadherin was quantitatively compared using a cell surface biotinylation assay. Phalloidin was used to label F-actin to observe changes in cytoskeletal tension. **Results** The Miles assay showed that under VEGF-A stimulation, dye extravasation in the dorsal and postauricular skin of KO mice was significantly higher than that in WT mice (all $P < 0.05$). At 60 min and 120 min after VEGF-A stimulation, the permeability of endothelial cell monolayers overexpressing the YALA mutant to FITC-dextran significantly increased ($P < 0.05$). WB and RT-qPCR results indicated that the YALA mutant did not affect the total protein or mRNA expression levels of VE-cadherin. Immunofluorescence revealed that the YALA mutant disrupted the continuous distribution of VE-cadherin on the cell membrane and its perinuclear co-localization with CD151 under VEGF-A stimulation. The cell surface biotinylation assay confirmed that the YALA mutant significantly reduced the internalization rate of VE-cadherin ($P < 0.05$). Cytoskeletal staining showed that the YALA mutant caused the formation of thick tension fibers in the actin cytoskeleton of endothelial cells, indicating cell contraction. **Conclusion** The *CD151* YXX ϕ motif point mutation affects vesicle internalization and recycling in endothelial cells, influences the expression and internalization of VE-cadherin, and

consequently affects vascular permeability.

Key words CD151; YXX ϕ motif; VE-cadherin; internalized recycling; endothelial cells; vascular permeability

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

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

血管通透性指物质透过血管壁的能力,是维持血管、组织和器官之间物质交换的选择性机制^[1]。血管通透性增加可致疾病急剧恶化^[1],如炎症引起肺水肿^[2]。由于血管内皮细胞在控制血管通透性方面至关重要,故探究调控内皮细胞通透性相关蛋白,研究其作用机制,对探究疾病的发生发展具有重要意义。

CD151 是四跨膜蛋白超家族 (transmembrane 4 superfamily, TM4SF) 重要成员,在内皮细胞中丰度极高,通过囊泡运输调控膜蛋白分子内化^[3]。研究表明,囊泡运输与多种疾病密切相关,例如,癌细胞通过分泌细胞外囊泡破坏血脑屏障,促进多种脑部疾病的进展^[4]。因此,CD151 可能成为多种血管相关疾病的潜在治疗靶点。已知 CD151 在其羧基端胞内结构域中含有 YXX ϕ 囊泡运输基序,该基序可调控囊泡的内化再循环及运输过程^[5-7],推测 CD151 可能通过 YXX ϕ 基序影响相关蛋白的内化与运输,从而调控生成血管的稳定性。本研究通过观察 *CD151* 敲除对小鼠皮肤血管内皮通透性的影响,探究 *CD151* YXX ϕ 基序点突变体通过囊泡内化再循环调控血管通透性的机制,为血管相关疾病的发生发展及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

本研究使用的 7 至 12 周龄 *CD151* 全身敲除雄性小鼠 12 只 (体质量 20~25g) 构建于中国医学科学院实验动物研究所,背景为 C57/BL6 种系。基因分型采用小鼠组织直接 PCR 试剂盒 [翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; 货号: 10185ES70], 依照说明书方案从尾尖提取基因组 DNA, 并以同龄、同性别野生型同窝小鼠作为对照。所有小鼠饲养于同济医学院实验动物中心 SPF 级环境中,环境条件为: 12 h 光照/黑暗循环, 温度 (22 \pm 2) $^{\circ}$ C, 湿度

40%~50%。动物实验方案经同济医学院机构动物研究委员会批准（IACUC 编号：3392），并严格遵守 3R 原则执行。动物合格证许可证号：SCXK（苏）2025-0008。

1.1.2 细胞与试剂

人内皮细胞系 EA.hy926(ATCC, 货号:CRL-2922)。DMEM 培养基(货号:C11995500BT)、胎牛血清 (fetalbovine serum, FBS, 货号: 10270-106) (美国 Gibco 公司)。Lipofectamine 2000 试剂 (美国赛默飞世尔科技公司, 货号: 11668019)。CD151 (货号: 66567-1-Ig) 和 GAPDH 抗体 (货号: 60004-1-Ig) (美国 Proteintech 公司)。抗血管内皮钙黏蛋白 (anti-VE-cadherin) 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号: 2500S)。用于免疫荧光 (immunofluorescence, IF) 染色的抗 CD151 抗体 (美国 Abcam 公司, 货号: ab33315)。血管内皮生长因子 A165 (vascular endothelial growth factor A165, VEGF-A165) (人) (货号: AF-293-NA) 和血管内皮生长因子 A164 (vascular endothelial growth factor A164, VEGF-A164) (小鼠) (货号: AF-493-NA) (美国 R&D Systems 公司)。重组 CD151 腺病毒 (Adeno-CD151, 1.02×10^{11} PFU/mL)、空腺病毒 (Adeno-CMV-3*flag-tagged) (上海和元生物技术有限公司)。Sulfo-NHS-SS-Biotin (美国 ApexBio Technology 公司, 货号: A8005)。链霉亲和素磁珠 (美国 MedChemexpress 生物科技公司, 货号: HY-K0208)。异硫氰酸荧光素标记的葡聚糖 (fluorescein isothiocyanate-labeled dextran, FITC-dextran) 工作液 (货号: 46945)、伊兰染料 (货号: E2129)、脂多糖 (货号: L2630) 和所有其他化学物质和试剂 (美国 Sigma-Aldrich 公司)。

1.1.3 实验设备

本研究使用的仪器设备有 CO₂ 恒温培养箱 (德国 Heraeus Holding GmbH 公司, 型号: MCP-120)、低温高速离心机 (美国 Beckman Coulter 公司, 型号: Allegra V-15R)、常温高速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司, 型号: H1850)、垂直电泳转膜系统 (美国 Bio-Rad 公司, 型号: XU-Mini4)、化学发光成像系统 (上海天能科技有限公司, 型号: LJ-GI NZ)、多模式酶标仪 (美国 Bio-Tek 仪器股份有限公司, 型号: Synergy 2)、96 孔快速热循环仪 (美国 Applied Biosystems 公司, 型号: Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler)、7900HT FAST real-time PCR system (美国 Life Technologies Corporation 公司, 型号: Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System)、荧光显微镜 (德国 Carl Zeiss AG 公司, 型号: Axio Imager A2)、超微量分光光度计 (北京凯奥科技发展有限公司, 型号: KAIAO K5800)、倒置荧光显微镜 (日本 Olympus Corporation 公司, 型号: IX71)、暗箱式紫外分析仪 (上海路阳仪器有限公司, 型号: LUV-270)。

1.2 方法

1.2.1 分组与处理

将小鼠分为 WT (野生型) 组和 KO (*CD151* 基因敲除) 组, 每组 6 只。每只小鼠两侧皮肤分别注射 PBS 和 VEGF-A, 将实验小鼠分为 2 组, 根据每只小鼠不同侧用药再划分组别, 分为: WT-PBS 组、WT-VEGF-A 组、KO-PBS 组、KO-VEGF-A 组。对于腹背部皮肤: 暴露小鼠一侧腹背部, 左手固定皮肤, 右手持针与皮肤成 10~15° 上挑状进针, 注射上下两点 VEGF (每点 VEGF 剂量 50 ng, 体积 50 μ L), 注射完毕旋转状缓慢退针; 另一侧对称部位注射同体积无菌 PBS 作为对照。对于耳部皮肤: 采用同样的方法, 于一侧耳后注射 VEGF (剂量 25 ng, 体积为 10 μ L), 对侧耳后注入同体积 PBS。

1.2.2 Miles 实验

采用改良的 Miles 实验检测 WT 和 *CD151* 敲除的 C57/BL6 小鼠背部皮肤和耳后血管通透性。在小鼠腹背部或耳后注射 VEGF-A 或 PBS 后, 经尾静脉将 100 μ L 浓度为 1% 的伊兰染料注射到小鼠体内。30 min 后, 脊髓脱臼法处死小鼠。固定小鼠, 用镊子提起后剪开其皮肤, 钝性分离皮肤及组织, 拍照记录染料从血管内漏出的情况。将每点注射部位的皮肤块及 2 只耳朵分别完整切下, 提取组织中染料并测量染料浓度, 在 620 nm 处测定吸光度值, 定量染料浓度, 根据标准曲线计算血浆中的染料浓度, 以评价小鼠背部及耳后血管通透性。

1.2.3 细胞培养与感染

人内皮细胞系 EA.hy926 用 DMEM 完全培养基 (含 10% FBS, 100 U/mL 青-链霉素双抗), 于 37 °C 恒温, 95% 空气、5% CO₂ 环境培养。每周传代 2 次, 间隔 2~3 d 换液。在腺病毒载体介导的基因转导中, 用过表达-控制载体或过表达-靶蛋白载体感染细胞 48 h。

1.2.4 蛋白质结构建模

将 *CD151* 蛋白质序列上传至服务器后, 其基于已知结构白细胞表面抗原 CD5 (3 PDB ID 6WVG) 的晶体结构, 同源建模得到预测的 *CD151* 结构。*CD151* 蛋白结构预测由 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>) 完成。YXX ϕ 基序的点突变及可视化使用 PyMOL (<http://www.pymol.org>) 完成。

1.2.5 内皮单层通透性测定

使用腺病毒 (Adenovirus, AdV) 感染 EA.hy926 细胞, 将感染后的细胞分为: ① con 组; ② Ad-con 组; ③ Ad-*CD151* 组; ④ Ad-YALA 组; ⑤ con+VEGF 组; ⑥ Ad-con+VEGF 组; ⑦ Ad-*CD151*+VEGF 组; ⑧ Ad-YALA+VEGF 组。将细胞在完全培养基中继续常规培养 48 h (期间无其他特殊处理) 后, 用胰酶消化下来。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 1×10^4 个细胞）接种，下室每孔加入 500 μL 培养基，继续培养至形成内皮细胞单层。内皮单层形成后，将 1 mg/mL 的 FITC-dextran 置于上室中，并用 50 ng/mL 的 VEGF-A 刺激细胞 15、30、60 和 120 min（其中⑤~⑧组加 VEGF-A 刺激，①~④组不加 VEGF-A，作为基础对照）。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。

1.2.6 RT-qPCR

提取 EA.hy926 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（Life Technologies）进行检测。以 GAPDH 作为校正内参，采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 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 sequence

Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>GAPDH</i>	F: ATGGGGAAGGTGAAGGTCG
	R: GGGGTCATTGATGGCAACAATA
<i>VE-cadherin</i>	F: GAAGCCTCTGATTGGCACAGTG
	R: TTTTGTGACTCGGAAGAAGTGGC

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（con 组、Ad-con 组、Ad-YALA 组、Ad-YALA+VEGF 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（兔抗 *VE-cadherin* 单克隆抗体，按稀释比 1 : 200 稀释于封闭液中）工作液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜，用 PBS 洗涤 3 次，并与稀释的 Alexa Fluor[®] 偶联二抗（稀释比 1 : 1 000）在室温下孵育 1 h。采用 DAPI 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。

1.2.8 生物素标记膜蛋白内化实验

将上述各组细胞（con 组、Ad-con 组、Ad-CD151 组、Ad-YALA 组）取出置于冰上，与 sulfo-NHS-SS-biotin 工作液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育 15 min，以最大限度地标记细胞表面蛋白。加入终止液充分清洗细胞 3 次，彻底洗去未反应生物素。已标记细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的预热的内化缓冲液中孵育不同时间，用冰 NT 缓冲液（chilled NT buffer）快速洗涤以停止内吞作用。为了

去除细胞表面结合的生物素，将细胞与新鲜洗脱液（NT 缓冲液配制的 50 mmol/L TCEP 溶液）在冰上孵育 15 min，重复 3 次。所有细胞板用 PBS²⁺洗涤后，在含有蛋白酶抑制剂 IP 裂解液中裂解细胞。生物素化蛋白用链霉亲和素磁珠沉淀，电泳后采用 Western blot 检测目的蛋白。

1.2.9 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（SDS-PAGE）分离，转移到聚偏氟乙烯（PVDF）膜上，用 5% BSA 在 TBS-T 中室温封闭 1 h。然后将膜与一抗（小鼠抗 CD151 单克隆抗体，每孔 70 μ L，保证覆盖爬片，且不会完全蒸发，工作浓度 0.2 μ g/mL，稀释比 1：1 000，稀释于封闭液中）在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。与过氧化物酶结合的二抗[Alexa Fluor 488 标记的山羊抗小鼠 IgG(H+L)，工作浓度 0.2 μ g/mL，稀释比 1：1 000，稀释于 PBS 中]孵育 2 h 后，使用 Western Bright ECL HRP 发光试剂盒在化学发光成像系统（Tanon Science and Technology）上显影成像。通过 ImageJ 软件对 Western blot 条带进行半定量分析。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism（v8.0）软件进行统计分析，首先对数据进行正态性检验（Shapiro-Wilk 检验）和方差齐性检验（Levene 检验），所有正态分布数据均采用均数 \pm 标准误表示，非正态分布数据采用中位数（四分位数间距）表示。进行组间比较，若数据满足正态性和方差齐性，多组间比较采用单因素方差分析或重复测量方差分析，分析前进行 Mauchly 球形检验，若违反球形假设，则采用 Greenhouse-Geisser 校正后的结果。方差分析后采用 Bonferroni 法进行两两比较。若数据不满足正态性或方差齐性，多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验，事后两两比较采用 Dunnett's t 检验。 $P < 0.05$ 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* 全身敲除小鼠，鼠尾鉴定（图 1）结果显示野生型（WT）小鼠在对应位置出现特异性扩增条带，表明其 *CD151* 基因正常表达，*CD151* 敲除（KO）小鼠则未出现该特异性条带，表明其 *CD151* 基因被成功全身性敲除。Western blot（图 1）结果显示 CD151 的蛋白表达显著下调，差异具有统计学意义（ $t=18.5$ ， $P < 0.0001$ ）。这表明 *CD151* 全身敲除小鼠构建成功。

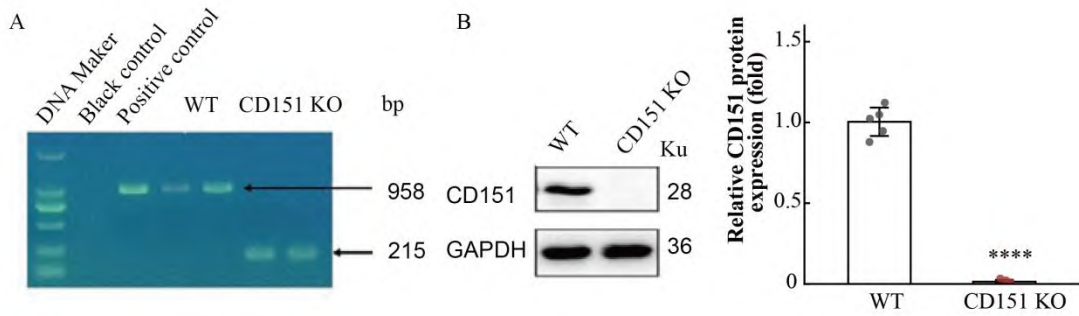


图 1 小鼠基因型鉴定结果

Fig.1 Genotyping results of mice

A: Mouse tail genotyping assay for CD151 expression; B: Western blot analysis of CD151 protein expression levels in mouse tissues ($n=6$); **** $P<0.0001$ vs WT group.

2.2 CD151 缺失导致皮肤血管通透性升高

通过改良血管 Miles 实验检测小鼠背部及耳后血管通透性。背部皮肤血管 Miles 实验结果显示,在非刺激条件下,WT 组与 CD151 KO 组小鼠背部皮肤血管的通透性无显著性差异。然而,给予 VEGF 诱导刺激后,与 WT 组小鼠相比, KO 组小鼠背部皮肤血管的通透性明显增加 ($t=2.85$, $P<0.05$) (图 2A)。耳后皮肤血管 Miles 实验结果表明 KO 组小鼠耳后皮肤血管的通透性较 WT 组明显增加 ($t=3.84$, $P<0.01$) (图 2B)。以上实验结果提示在 VEGF 诱导刺激下, CD151 缺失导致小鼠皮肤血管通透性明显增加。

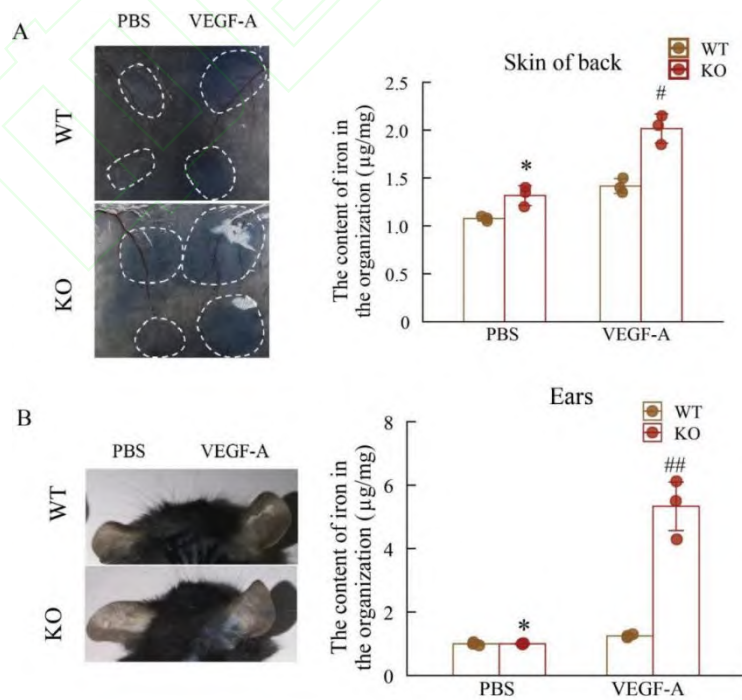


图2 *CD151* 缺失对小鼠背部、耳后血管渗透性影响

Fig.2 The effects of *CD151* deficiency on vascular permeability in the back and behind the ears of mice

A: Comparison of Evans blue dye extravasation in the dorsal skin of mice between the two groups ($n=6$); B: Comparison of Evans blue dye extravasation in the postauricular skin of mice between the two groups ($n=6$); * $P<0.05$ vs WT-PBS group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs WT-VEGF-A group.

2.3 构建 *CD151* YXX ϕ 基序点突变体 YALA

在体外研究中, 构建 *CD151* 突变体 YALA, 其结构如图 3A 所示。运用包装的腺病毒进行内皮细胞转染, Western blot 检测各组细胞 *CD151* 蛋白表达情况, 结果表明, Ad-*CD151* 和 Ad-YALA 转染促进 *CD151* 蛋白高表达 ($t=18.5$, $P<0.0001$), 且突变体 YALA 不影响 *CD151* 蛋白的高表达 ($t=0.85$, $P>0.05$) (图 3B)。

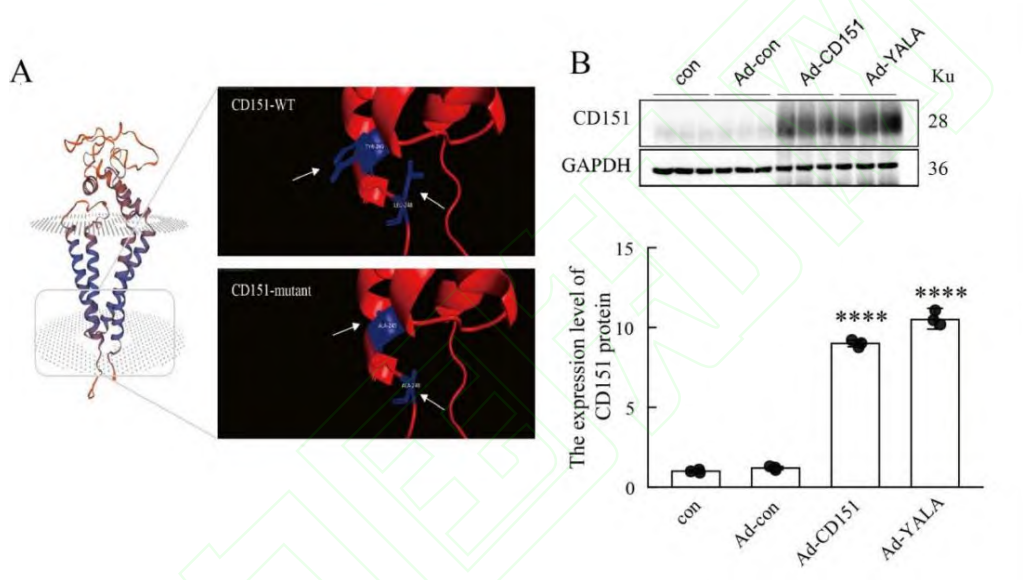


图3 *CD151* YXX ϕ 基序点突变体 YALA 空间结构

Fig.3 The spatial structure of the *CD151* YXX ϕ motif mutant YALA

A: Schematic diagram of the spatial structure of the *CD151* YXX ϕ motif point mutant YALA; B: Western blot analysis of *CD151* expression levels ($n=6$); **** $P<0.0001$ vs Ad-con group.

2.4 *CD151* YXX ϕ 基序点突变导致体外血管通透性升高

取腺病毒干预后的各组内皮细胞形成细胞单层, 分别观察基础条件及 VEGF-A 刺激条件下对内皮细胞对 FITC-dextran 的通透性, 检测各组别内皮细胞层屏障功能。结果显示, 在给予 VEGF 诱导刺激 60 min 和 120 min 后, Ad-YALA+VEGF 组对 FITC-dextran 的通透性高于对照组 ($t=3.24$ 、 3.78 , 均 $P<0.05$) (图 4)。

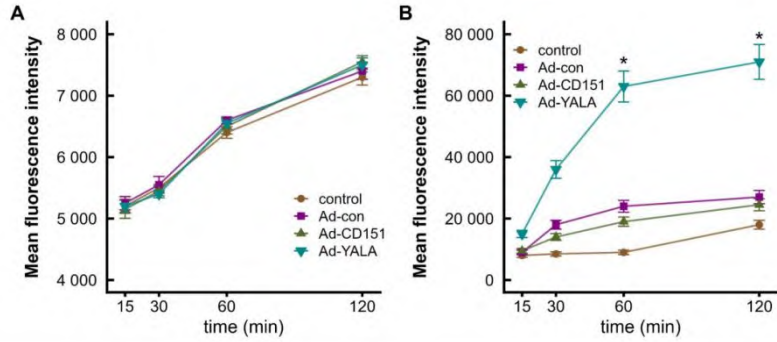


图4 *CD151* 突变体 YALA 过表达对内皮细胞层通透性的影响

Fig.4 The effects of overexpression of *CD151* mutant YALA on the permeability of the endothelial cell layer

A: Comparison of the mean fluorescence intensity of each group at different time points under baseline conditions ($n=6$); B: Comparison of the mean fluorescence intensity of each group at different time points under VEGF-A stimulation conditions ($n=6$); * $P<0.05$ vs Ad-con group.

2.5 *CD151* YXX ϕ 基序点突变影响 VE-cadherin 的分布

由于 VE-cadherin 是最重要的黏附连接蛋白，其所参与的囊泡运输在维持血管稳定性方面发挥重要作用，故探究 *CD151* 中 YXX ϕ 基序对 VE-cadherin 分布的影响。Western blot 结果显示（图 5A），*CD151* 突变体 YALA 组内皮细胞中 VE-cadherin 蛋白表达与对照组内皮细胞无明显差异。实时定量 PCR 结果显示（图 5B），在 mRNA 水平上，*CD151* 突变体 YALA 组内皮细胞，相较对照组内皮细胞，VE-cadherin 的表达有下降趋势，但差异无统计学意义。免疫荧光染色检测显示，在给予 VEGF 诱导刺激后，各组细胞层上的 VE-cadherin 均出现毛刺状分布，局部有小的缺损。其中，*CD151* 突变体 YALA 组较对照组损伤更重，甚至出现较大范围的缺失，而 Ad-CD151 组缺损较轻，呈现出保护效应（图 5C）。

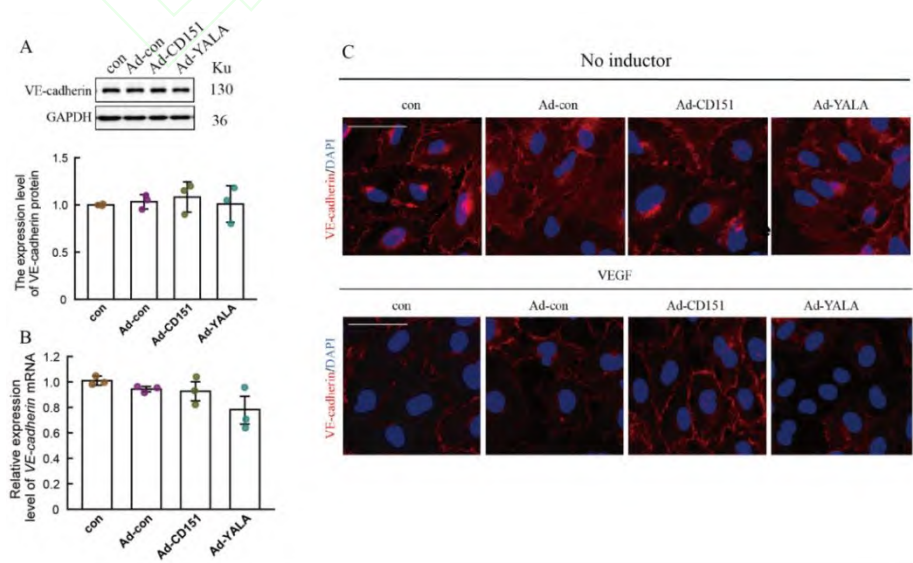


图5 *CD151* 突变体 YALA 过表达对 VE-cadherin 表达的影响

Fig.5 The effects of overexpression of *CD151* mutant YALA on the expression of VE-cadherin

A: Comparison of VE-cadherin protein expression among groups; B: Comparison of VE-cadherin mRNA expression levels among groups; C: Immunofluorescence images of VE-cadherin $\times 600$.

2.6 VE-cadherin 的内化受 *CD151* YXX ϕ 基序点突变调控

免疫荧光染色检测结果显示, 在 *CD151* 突变体 YALA 组 (Ad-YALA 组) 中, *CD151* 蛋白相比于对照组 (con 组、Ad-con 组) 更多分布于内皮细胞周边, 表明内化活动减少 (图 6A)。且 *CD151* 突变体转染明显降低了 *CD151* (红色) 和 VE-cadherin (绿色) 在核周区域的共定位, 表明 VE-cadherin 的运输被破坏 (图 6B, 白色箭头指示 *CD151* 与 VE-cadherin 的共定位信号)。

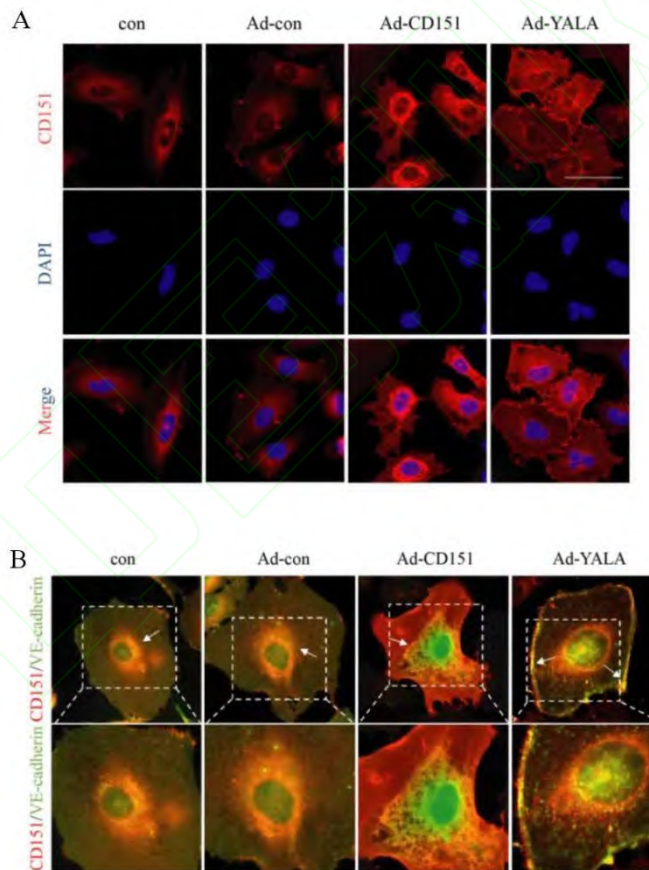


图6 *CD151* 突变体 YALA 对 *CD151* 在内皮细胞的分布及 *CD151* 与 VE-cadherin 在核周共定位的影响

Fig.6 The effects of *CD151* mutant YALA on the distribution of *CD151* in endothelial cells and the co-localization of *CD151* and VE-cadherin at the nuclear periphery

A: Immunofluorescence image of *CD151* $\times 600$; B: Immunofluorescence image of *CD151* and VE-cadherin co-localization $\times 1200$.

2.7 *CD151* YXX ϕ 基序点突变影响 VE-cadherin 的内吞过程

通过细胞表面生物素化实验，定量比较 VE-cadherin 的内吞率，结果显示，与对照组相比，*CD151* 突变组在 5、10 和 15 min 内化 VE-cadherin 的量减少（图 7）。以上实验结果表明，YXX ϕ 结构调控 VE-cadherin 内化活动，*CD151* 突变体 YALA 对 VE-cadherin 分布的影响与调控其内化活动有关。

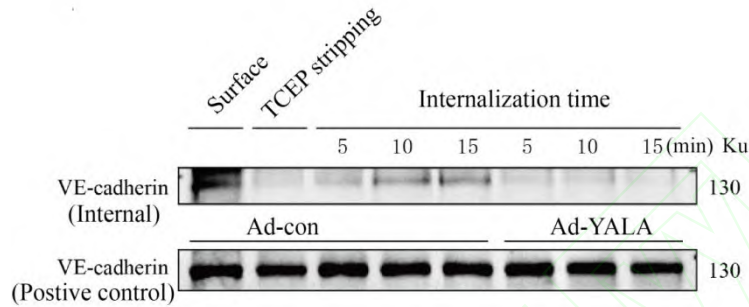


图 7 Western blot 检测 *CD151* 突变体 YALA 对 VE-cadherin 内吞率的影响

Fig.7 The effects of *CD151* mutant YALA on the endocytosis rate of VE-cadherin detected by Western blot

2.8 *CD151* 对内皮细胞骨架张力的调节依赖于其结构中的 YXX ϕ 基序

通过细胞免疫荧光对鬼笔环肽标记 F-actin 对 VE-cadherin 所锚定的细胞骨架进行检测，结果显示 *CD151* 突变体 YALA 组细胞内出现粗大放射状的张力丝，提示因细胞骨架收缩所致的高张力状态，而在对照细胞中，细胞骨架则呈纤细均匀的皮质肌动蛋白束（图 8）。以上实验结果说明 *CD151* 突变体 YALA 使内皮细胞骨架收缩，即 *CD151* 对内皮细胞骨架张力的调节依赖于其结构中的 YXX ϕ 基序。

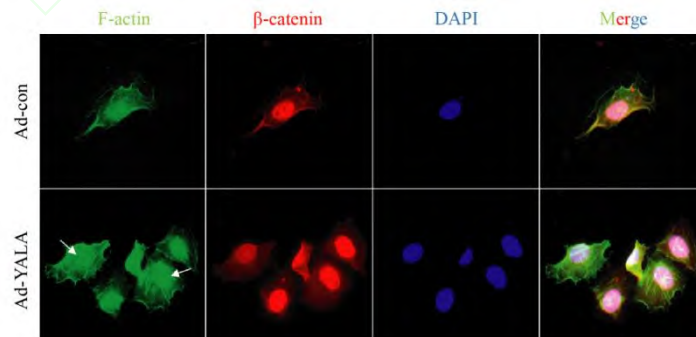


图 8 *CD151* 突变体 YALA 对内皮细胞骨架张力的调节

Fig.8 The regulation of endothelial cell cytoskeletal tension by the *CD151* mutant YALA
Immunofluorescence staining of endothelial cells $\times 600$.

3 讨论

内皮细胞在血管内壁上形成连续的单层，调节各种血管功能，如炎症、血管生成、止血和血管舒张^[8]。内皮功能障碍和通透性增加在许多疾病进展中起重要作用，如动脉粥样硬化^[9]。在生理条件下，微血管通透性受到严格控制，但各种刺激（如缺氧、炎症等）会导致血管通透性短暂上调，通透性丧失又会导致各种病理状况，如缺氧、慢性炎症、肿瘤血管生成和动脉粥样硬化^[10-11]。本研究通过构建 *CD151* 敲除小鼠，观察 *CD151* 缺失对小鼠皮肤血管通透性的影响。Miles 实验结果表明，*CD151* 敲除组小鼠背部及耳后皮肤血管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* 表达降低可导致内皮细胞通透性上升。

膜受体与其配体结合，通过内吞、囊泡运输和胞吐作用返回细胞表面的过程，称为内化再循环^[12]，该过程对维持血管稳定性和内皮屏障功能至关重要^[13]。既往研究表明，*CD151* 分子结构中的 YXX ϕ 基序调控囊泡的内化再循环过程，且该基序点突变（245 位的酪氨酸和 248 位的亮氨酸均突变为丙氨酸，即 Y \rightarrow A 和 L \rightarrow A）会破坏 *CD151* 的内化再循环过程，导致其因内化受阻而异常分布在细胞周边^[14-15]，这证实了 *CD151* 通过 YXX ϕ 基序调控囊泡内化活动，但其下游机制仍待进一步研究。本研究为探究 *CD151* YXX ϕ 基序点突变体影响血管通透性的机制，构建了 *CD151* YXX ϕ 基序点突变体 YALA 并转入内皮细胞。Miles 实验结果表明，在给予 VEGF 诱导刺激 60 min 和 120 min 后，过表达突变体 YALA 组对 FITC-dextran 的通透性相较对照组显著升高。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和血管稳定性中起重要作用^[16-17]，故进一步探究 *CD151* 是否影响参与内皮细胞囊泡运输的黏附连接蛋白 VE-cadherin 的表达及相关功能。免疫荧光结果显示，过表达突变体 YALA 影响 VE-cadherin 在细胞膜上的表达。且突变体 YALA 抑制 *CD151* 的内化活动，影响 *CD151* 和 VE-cadherin 在核周区域的共定位。细胞表面生物素化实验结果表明，过表达突变体 YALA 后，内皮细胞在 5、10 和 15 min 内化 VE-cadherin 的量显著减少。上述实验结果表明，*CD151* YXX ϕ 基序点突变体 YALA 影响 *CD151* 及 VE-cadherin 的分布，破坏 VE-cadherin 的运输。此外，在黏附连接结构中，VE-cadherin 通过其他蛋白复合体锚定在细胞骨架上，骨架的动态重塑影响细胞间与细胞-胞外基质的黏附连接，这与血管稳态密切相关^[17-20]。为进一步探究 *CD151* 突变体 YALA 对 VE-cadherin 所锚定的细胞骨架的影响，本研究使用鬼笔环肽标记 F-actin 对其进行检测，实验结果表明，*CD151* 突变体 YALA 使内皮细胞骨架收缩，即 *CD151* 对内皮细胞骨架张力的

调节，依赖于其结构中的 YXX ϕ 基序。上述实验结果表明，*CD151* 突变体 YALA 抑制细胞骨架重塑，可能削弱血管内皮细胞黏附连接功能，进而破坏血管稳态。

本研究揭示了 *CD151* YXX ϕ 基序点突变体调控血管通透性的潜在途径和机制，但存在一定局限性。*CD151* 中是否有其他可调控囊泡内化再循环的结构，其是否还影响除 VE-cadherin 之外的其他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 VEGF-A 诱导的 *CD151* 敲除小鼠皮肤血管渗透性的变化切入，证实了 *CD151* YXX ϕ 基序点突变体 YALA 通过调控 VE-cadherin 的囊泡内化再循环，进而调控血管通透性，为血管稳态的研究提供了新方向。

参考文献

- [1] Wautier J L, Wautier M P. Vascular permeability in diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7): 3645. doi:10.3390/ijms23073645.
- [2] Friedrich E E, Hong Z, Xiong S, et al. Endothelial cell Piezo1 mediates pressure-induced lung vascular hyperpermeability *via* disruption of adherens junctions[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(26): 12980-5. doi:10.1073/pnas.1902165116.
- [3] Lin Y, Zheng H, Jia L, et al. Integrin α 6-containing extracellular vesicles promote lymphatic remodelling for pre-metastatic niche formation in lymph nodes *via* interplay with CD151[J]. *J Extracell Vesicles*, 2024, 13(10): e12518. doi:10.1002/jev2.12518.
- [4] Morad G, Carman C V, Hagedorn E J, et al. Tumor-derived extracellular vesicles breach the intact blood-brain barrier *via* transcytosis[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(12): 13853-65. doi:10.1021/acsnano.9b04397.
- [5] Sharma J N, Al-Dhalmawi G S. Bradykinin receptor antagonists: therapeutic implications[J]. *IDrugs*, 2003, 6(6): 581-6.
- [6] Pallesen L T, Gustafsen C, Cramer J F, et al. PAK kinases target sortilin and modulate its sorting[J]. *Mol Cell Biol*, 2020, 40(3): e00411-19. doi:10.1128/mcb.00411-19.
- [7] Fischer K, Groschup M H, Diederich S. Importance of endocytosis for the biological activity of cedar virus fusion protein[J]. *Cells*, 2020, 9(9): 2054. doi:10.3390/cells9092054.
- [8] Trimm E, Red-Horse K. Vascular endothelial cell development and diversity[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20(3): 197-210. doi:10.1038/s41569-022-00770-1.
- [9] Xu S, Ilyas I, Little P J, et al. Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular

- diseases and beyond: from mechanism to pharmacotherapies[J]. *Pharmacol Rev*, 2021, 73(3): 924-67. doi:10.1124/pharmrev.120.000096.
- [10] Claesson-Welsh L, Dejana E, McDonald D M. Permeability of the endothelial barrier: identifying and reconciling controversies[J]. *Trends Mol Med*, 2021, 27(4): 314-31. doi:10.1016/j.molmed.2020.11.006.
- [11] Park-Windhol C, D'Amore P A. Disorders of vascular permeability[J]. *Annu Rev Pathol*, 2016, 11: 251-81. doi:10.1146/annurev-pathol-012615-044506.
- [12] Cullen P J, Steinberg F. To degrade or not to degrade: mechanisms and significance of endocytic recycling[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(11): 679-96. doi:10.1038/s41580-018-0053-7.
- [13] Chi C, Fu H, Li Y H, et al. Exerkine fibronectin type-III domain-containing protein 5/irisin-enriched extracellular vesicles delay vascular ageing by increasing SIRT6 stability[J]. *Eur Heart J*, 2022, 43(43): 4579-95. doi:10.1093/eurheartj/ehac431.
- [14] Partlow E A, Cannon K S, Hollopeter G, et al. Structural basis of an endocytic checkpoint that primes the AP2 clathrin adaptor for cargo internalization[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2022, 29(4): 339-47. doi:10.1038/s41594-022-00749-z.
- [15] di Lorenzo A, Fernández-Hernando C, Cirino G, et al. Akt1 is critical for acute inflammation and histamine-mediated vascular leakage[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(34): 14552-7. doi:10.1073/pnas.0904073106.
- [16] Furtado J, Eichmann A. Vascular development, remodeling and maturation[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2024, 159: 344-70. doi:10.1016/bs.ctdb.2024.02.001.
- [17] Davis G E, Kemp S S. Extracellular matrix regulation of vascular morphogenesis, maturation, and stabilization[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2023, 13(4): a041156. doi:10.1101/cshperspect.a041156.
- [18] Rho S S, Ando K, Fukuhara S. Dynamic regulation of vascular permeability by vascular endothelial cadherin-mediated endothelial cell-cell junctions[J]. *J Nippon Med Sch*, 2017, 84(4): 148-59. doi:10.1272/jnms.84.148.
- [19] Chan Y H, Harith H H, Israf D A, et al. Differential regulation of LPS-mediated VE-cadherin disruption in human endothelial cells and the underlying signaling pathways: a mini review[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 280. doi:10.3389/fcell.2019.00280.

[20] 范诗浪, 蒋卢映, 章子璇, 等. CD151 通过囊泡内化再循环调控血管通透性的机制[J]. 安徽医科大学学报, 2025, 60(2): 218-25, 233. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.02.005.

[20] Fan S L, Jiang L Y, Zhang Z X, et al. The mechanism of CD151 regulating vascular permeability through vesicle internalization and recycling[J]. Acta Univ Med Anhui, 2025, 60(2): 218-25, 233. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.02.005.

