

[文章编号] 1671-587X(2024)05-1275-11

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240511

水泡性口炎病毒对体外血管内皮屏障功能的损伤作用及其机制

曹宇璇¹, 陈为^{2,3}, 孙成彪², 赵娜², 王燕², 董明鑫², 许娜⁴, 刘文森², 李咏梅¹

(1. 北华大学基础医学院病原生物学教研室, 吉林 吉林 132013; 2. 中国农业科学院长春兽医研究所动物性食品安全与生物交叉研究室, 吉林 长春 130122; 3. 河南科技大学应用工程学院食品医药教研组, 河南 三门峡 472099; 4. 吉林医药学院教务处, 吉林 吉林 132013)

[摘要] **目的:** 探讨水泡性口炎病毒(VSV)对血管内皮(VE)屏障的损伤作用, 并阐明其作用机制。**方法:** 采用犬肾细胞对VSV进行扩增, 采用小鼠脑血管内皮瘤bEnd.3细胞检测VSV的半数组织培养感染剂量(TCID₅₀), 采用300倍TCID₅₀进行后续实验。将bEnd.3细胞分为感染0 h组、感染4 h组、感染8 h组和感染12 h组, 进行VSV感染损伤VE屏障实验; 将bEnd.3细胞分为对照组、感染组和纠正组, 进行抑制VSV复制与VE屏障恢复实验。将bEnd.3细胞接种于Transwell小室, 构建体外VE屏障模型, 采用细胞电压电阻仪检测感染VSV不同时间后各组bEnd.3细胞中跨上皮电阻(TER), 采用异硫氰酸荧光素-葡聚糖渗漏实验检测各组渗透系数, 采用免疫荧光染色法观察VSV感染后各组bEnd.3细胞骨架及黏附连接(AJs)中VE-钙黏蛋白、 β -连环蛋白(β -catenin)和磷酸化 β -连环蛋白(p- β -catenin)定位变化, 采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测各组细胞中Wnt和 β -catenin mRNA表达水平, 采用Western blotting法检测各组细胞中Wnt、 β -catenin和p- β -catenin表达水平。**结果:** VSV的TCID₅₀为 $10^{-4.5} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ 。Transwell小室实验检测, 与感染0 h比较, 其他各组细胞中TER明显降低($P < 0.05$), 渗透系数明显升高($P < 0.05$)。免疫荧光染色, 与对照组比较, 感染组bEnd.3细胞骨架紊乱, 细胞间隙增大, AJs线性指数明显降低($P < 0.05$), β -catenin和p- β -catenin从细胞膜转移至细胞核周围。RT-qPCR法检测, 与感染0 h比较, 其他各组细胞中Wnt mRNA表达水平明显降低($P < 0.05$), β -catenin mRNA表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。Western blotting法检测, 与感染0 h比较, 其他各组细胞中Wnt蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$), β -catenin表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$), p- β -catenin表达水平明显升高($P < 0.05$)。在抑制VSV复制并纠正低密度脂蛋白受体(LDLR)异常后, Transwell小室实验检测, 与感染组比较, 纠正组bEnd.3细胞中TER明显升高($P < 0.05$), 渗透系数明显降低($P < 0.05$)。免疫荧光染色, 与感染组比较, 纠正组细胞间隙减小, 细胞中 β -catenin和p- β -catenin核周聚集现象有所改善。RT-qPCR法检测, 与感染组比较, 纠正组细胞中Wnt mRNA表达水平明显升高($P < 0.05$)。Western blotting法检测, 与感染组比较, 纠正组细胞中Wnt蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$), β -catenin表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$), p- β -catenin表达水平明显降低($P < 0.05$)。**结论:** VSV感染后可引起LDLR失活, 降低Wnt蛋白表达水平, 造成 β -catenin磷酸化水平升高并发生内化, 破坏AJs稳定性, 最终导致VE屏障损伤。

[关键词] 水泡性口炎病毒; 血管内皮屏障; 黏附连接; 低密度脂蛋白受体; Wnt/ β -连环蛋白信号通路

[中图分类号] S852.65 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2023-10-24

[基金项目] 吉林省卫健委卫生健康科技能力提升项目(2022JC021)

[作者简介] 曹宇璇(1999—), 女, 安徽省合肥市人, 在读硕士研究生, 主要从事病原生物致病机制方面的研究。

[通信作者] 李咏梅, 教授, 硕士研究生导师(E-mail: lymjyx@126.com);

刘文森, 教授, 博士研究生导师(E-mail: liuws85952@163.com)

Damage effect of VSV on vascular endothelial barrier function *in vitro* and its mechanism

CAO Yuxuan¹, CHEN Wei^{2,3}, SUN Chengbiao², ZHAO Na², WANG Yan², DONG Mingxin², XU Na⁴,
LIU Wensen², LI Yongmei¹

(1. Department of Pathogen Biology, School of Basic Medical Sciences, Beihua University, Jilin 132013, China; 2. Animal Food Safety and Biological Intersection Research Laboratory, Changchun Institute of Veterinary Medicine, Chinese Agricultural Sciences, Changchun 130122, China; 3. Food and Medicine Teaching and Research Group, School of Applied Engineering, Henan University of Science and Technology, Sanmenxia 472099, China; 4. Academic Affairs Office, Jilin Medical University, Jilin 132013, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the damage effect of vesicular stomatitis virus (VSV) on the vascular endothelial (VE) barrier, and to clarify its mechanism. **Methods:** The canine kidney cells were used to amplify VSV. The half tissue culture infective dose (TCID₅₀) of VSV was determined using mouse brain endothelial tumor bEnd. 3 cells, and subsequent experiment was conducted using 300 times the TCID₅₀. The bEnd. 3 cells were divided into infection 0 h group, infection 4 h group, infection 8 h group, and infection 12 h group for VE barrier damage experiments due to VSV infection. The bEnd. 3 cells were also divided into control group, infection group, and correction group for experiments to inhibit the VSV replication and restore the VE barrier. The bEnd. 3 cells were inoculated into Transwell chambers to construct an *in vitro* VE barrier model. Cell voltage resistance meter was used to detect the transepithelial resistance (TER) in various groups after the bEnd. 3 cells were infected with VSV at different time points; fluorescein isothiocyanate-dextran leakage assay was used to detect the permeability coefficients of the cells in various groups; immunofluorescence staining was used to observe the localization changes of VE-cadherin, β -catenin, and phosphorylated β -catenin (p- β -catenin) in cytoskeleton and adherens junctions (AJs) of the bEnd. 3 cells after VSV infection; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of Wnt and β -catenin mRNA in the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of Wnt, β -catenin, and p- β -catenin proteins in the cells in various groups. **Results:** The TCID₅₀ of VSV was $10^{-4.5} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$. The Transwell chamber experiment results showed that compared with infection 0 h group, the TERs in the cells in the other groups were significantly decreased ($P < 0.05$), and the permeability coefficients were significantly increased ($P < 0.05$). The immunofluorescence staining results showed that compared with control group, the cytoskeleton of the bEnd. 3 cells in infection group was disordered, the cell gaps was increased, the linear index of AJs was significantly decreased ($P < 0.05$), and β -catenin and p- β -catenin translocated from the cell membrane to the perinuclear area. The RT-qPCR results showed that compared with infection 0 h group, the expression levels of Wnt mRNA in the cells in the other groups were significantly decreased ($P < 0.05$), while the expression levels of β -catenin mRNA showed no statistically significant difference ($P > 0.05$). The Western blotting results showed that compared with infection 0 h group, the expression levels of Wnt protein in the cells in the other groups were significantly decreased ($P < 0.05$), the expression levels of β -catenin showed no statistically significant differences ($P > 0.05$), and the expression levels of p- β -catenin were significantly increased ($P < 0.05$). After inhibiting the VSV replication and correcting the low density lipoprotein receptor (LDLR) abnormalities, the Transwell chamber experiment results showed that compared with infection group, the TER in the cells in correction group was significantly increased ($P < 0.05$), and the permeability coefficient was significantly decreased ($P < 0.05$). The immunofluorescence staining results showed that compared with infection group, the gaps in the cells in correction group were

reduced, and the perinuclear aggregation of β -catenin and p- β -catenin in the cells was restrained. The RT-qPCR results showed that compared with infection group, the expression level of Wnt mRNA in the cells in correction group was significantly increased ($P < 0.05$). The Western blotting results showed that compared with infection group, the expression level of Wnt protein in the cells in correction group was significantly increased ($P < 0.05$), the expression level of β -catenin showed no statistically significant difference ($P > 0.05$), and the expression level of p- β -catenin was significantly decreased ($P < 0.05$).

Conclusion: VSV infection can cause the LDLR inactivation, reduce the expression level of Wnt protein, increase the phosphorylation level of β -catenin and cause its internalization, disrupt the stability of AJs, and ultimately lead to VE barrier damage.

KEYWORDS Vesicular stomatitis virus; Vascular endothelial barrier; Adherent junction; Low density lipoprotein receptor; Wnt/ β -catenin signaling pathway

水泡性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV) 是一种负性单链 RNA 病毒, 属弹状病毒科^[1], 可破坏血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB), 侵犯中枢神经系统, 引起病毒性脑炎^[2-3], 但其具体机制尚未阐明。

血管内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 分布于血管内表面, 通过彼此相连接形成血管内皮 (vascular endothelial, VE) 屏障。黏附连接 (adherent junctions, AJs) 是相邻 ECs 连接的关键结构^[4], 由细胞外 VE-钙黏蛋白和细胞中连环蛋白 (catenin) 组成。 β -连环蛋白 (β -catenin) 作为细胞中重要的连接蛋白之一, 受到细胞外信号如 Wnt/ β -catenin 信号通路调节^[5]。研究^[6]显示: 低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 是 VSV 感染人类和小鼠细胞的重要受体, 其家族亚群 LDLR 相关蛋白 5 (LDLR-related protein 5, LRP5) 和 LRP6 是 Wnt 通路的共受体^[7], 可触发典型的 Wnt/ β -catenin 信号传导。

VSV 是否可通过 LDLR 影响 Wnt/ β -catenin 信号通路, 引起 AJs 结构异常并最终破坏 VE 屏障尚无相关研究。本研究通过构建体外 VE 屏障模型, 探讨 VSV 对 VE 屏障的损伤作用及其机制, 为阐明 VSV 破坏 BBB 的机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒、主要试剂和仪器 小鼠脑血管内皮瘤 bEnd. 3 细胞 (中国国家生物医学实验细胞资源库), VSV 病毒和犬肾细胞 (本实验室自备), RNA 提取试剂盒 (上海奕杉生物科技有限公司), 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 试剂盒 (大连宝生物工程有限公

司), 二喹啉甲酸蛋白定量试剂盒 (上海碧云天公司), 增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂盒、 $4 \times$ 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 上样缓冲液 (日本 TaKaRa 公司), β -肌动蛋白引物 (广州复能基因公司), 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、杜氏改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) 和 0.25% 胰酶 (美国 Gibco 公司), 干扰素 $\alpha 1b$ (北京三元基因工程有限公司), 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 干粉 (武汉博士德生物公司), VE-钙黏蛋白抗体 (英国 Abcam 公司), Wnt 抗体、 β -catenin 抗体、 β -肌动蛋白抗体、CoraLite594-标记山羊抗兔荧光二抗、CoraLite488-标记山羊抗兔荧光二抗、羊抗兔和羊抗鼠 IgG 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司), 磷酸化 β -连环蛋白 (phosphorylated β -catenin, p- β -catenin) 抗体 (美国亲科生物公司), 微丝红色荧光探针、4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 和防淬灭封片剂 (上海碧云天生物技术有限公司), 异硫氰酸荧光素-葡聚糖 (fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-Dextran) (上海麦克林生化科技股份有限公司)。CO₂ 细胞培养箱、低温高速离心机和转膜仪 (美国赛默飞世尔科技公司), 荧光显微镜 (日本奥林巴斯公司), PCR 仪 (美国珀金埃尔默仪器有限公司), RT-qPCR 仪 (美国应用生物系统公司), 微量紫外分光光度计 (美国通用电器公司), Infinite F500 多功能高端酶标仪 (奥地利帝肯公司), 电转套装 (美国赛默飞世尔科技公司), 电泳仪 (美国伯乐公司), Gelview 6000Plus 智能图像工作站 (广州博鹭腾生

物科技有限公司), Millicell ERS-2细胞电阻电压仪器(美国 Millipore 公司), Transwell 小室(孔径 $0.4\ \mu\text{m}$)(美国 Corning 公司)。

1.2 病毒扩增 提前将犬肾细胞接种于 T25 细胞培养瓶中,待细胞融合率达 80% 后采用无血清培养基洗涤 3 次。吸净残余培养液,加入 $100\ \mu\text{L}$ VSV 原液和 $900\ \mu\text{L}$ 2% FBS DMEM,置入培养箱中孵育。每 15 min 振荡 1 次,使病毒悬液充分均匀接触细胞表面。1 h 后加入 $4\ \text{mL}$ 2% FBS DMEM,置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、 CO_2 细胞培养箱中培养。待细胞 80% 变圆飘起后,采用吹打管多次吹打混匀病毒培养上清液,分装置于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存。

1.3 VSV 感染 bEnd.3 细胞半数组织培养感染剂量(50% tissue culture infective dose, TCID_{50})的测定 提前将 bEnd.3 细胞以每孔 2×10^4 个的密度接种于 96 孔细胞培养板中,待细胞完全贴壁后,弃去培养基。采用无血清培养基洗涤 3 次,10 倍梯度向下将待测病毒原液稀释 10 个浓度。每个浓度 5 个复孔,每孔加入相应病毒稀释液 $100\ \mu\text{L}$,同时设置对照组。置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、 CO_2 细胞培养箱中培养 24 h,观察细胞病变情况并统计不同稀释倍数下出现病变的孔数,根据 Reed&Muench 法检测 VSV 的 TCID_{50} ^[8]: $\text{TCID}_{50} = \log_{10}(\text{高于 } 50\% \text{ 感染病毒稀释度}) + \text{距离比} \times \log_{10} \text{ 稀释系数}$,距离比计算公式:距离比 = $(\text{高于 } 50\% \text{ 的病变病毒百分率} - 50\%) / (\text{高于 } 50\% \text{ 的病变百分率} - \text{低于 } 50\% \text{ 的病变病毒百分率})$

1.4 细胞分组和培养方式 bEnd.3 细胞采用含 10% FBS 和 1% 双抗 DMEM,置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、 CO_2 细胞培养箱中培养,每 24 h 更换培养液 1 次,取对数生长期细胞进行后续实验。

VSV 感染损伤 VE 屏障实验: 以 300 倍 TCID_{50} 感染细胞,感染前 24 h 将培养液更换为无血清 DMEM。将细胞分为感染 0 h 组、感染 4 h 组、感染 8 h 组和感染 12 h 组。

抑制 VSV 复制和 VE 屏障恢复实验: 将细胞分为对照组、感染组和纠正组,纠正组细胞于 VSV 感染 4 h 后将培养液更换为含干扰素的 10% FBS DMEM 继续培养。

1.5 Wnt 和 β -catenin 引物序列 本研究所采用的引物由吉林省库美生物科技有限公司设计合成。引物序列见表 1。

1.6 VE 屏障跨上皮电阻(trans epithelial electrical resistance, TER)和渗透系数检测 将各组 bEnd.3

表 1 引物序列

Tab. 1 Sequences of primers

Gene	Primer sequence (5'-3')
Wnt	F:CGAGGCTGCCGAGAAACAG
	R:GCCAAAGAGGCGACCAAAA
β -catenin	F:CCCAAGCCTTAGTAAACATAA
	R:AGCAGACAGACAGCACCTT

细胞以每孔 5×10^4 个的密度接种于 Transwell 小室,同时设置空白无细胞孔。每日检测 TER 直至数值稳定。上室加入 VSV 进行诱导,并在不同时间点进行 TER 检测,TER 计算公式^[9]:电阻值 = $(\text{检测值} - \text{无细胞孔值}) \times 0.33\ \Omega \cdot \text{cm}^2$ 。诱导结束后将上室每孔加入 $10\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ FITC-Dextran $10\ \mu\text{L}$, $37\ ^\circ\text{C}$ 作用 5 min。收集上下室培养液,各取 $100\ \mu\text{L}$ 加入 96 孔细胞培养板中,将多功能酶标仪调整为荧光模式,检测各孔吸光度(A)值,计算渗透系数。渗透系数 = 下室荧光 A 值 / 上室荧光 A 值。

1.7 RT-qPCR 法检测各组细胞中 Wnt 和 β -catenin mRNA 表达水平 VSV 感染后,各组细胞弃培养液并采用 PBS 冲洗,加入 $500\ \mu\text{L}$ 细胞裂解液,用力吸吹 10 次后转移至微量离心管中,振荡 10 s 以充分裂解细胞。加入等体积无水乙醇充分混匀后加入离心柱,按照试剂盒说明书操作步骤进行后续操作。采用微量分光光度计检测所提取 RNA 浓度,按照 $1\ \text{ng}$ 取相应体积 RNA,根据逆转录试剂盒说明书加入逆转录试剂、RNA 和 ddH_2O ,置于 PCR 仪中进行逆转录。获得 cDNA 后,采用 SYBR™ Green PCR Master Mix 进行 RT-qPCR 反应。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各组细胞中 Wnt 和 β -catenin mRNA 表达水平。

1.8 Western blotting 法检测各组细胞中 Wnt、 β -catenin 和 p- β -catenin 蛋白表达水平 采用放射免疫沉淀法裂解液裂解各组 bEnd.3 细胞,提取总蛋白。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,剩余按照 1/3 体积,加入 $4 \times \text{SDS-PAGE}$ 上样缓冲液, $100\ ^\circ\text{C}$ 水浴 5 min,每样本取等量蛋白进行 SDS-PAGE,将电泳分离蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上,采用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后,将膜分别与 Wnt 抗体 (1:1 000)、 β -catenin 抗体 (1:5 000)、p- β -catenin 抗体 (1:2 000) 和 β -肌动蛋白抗体 (1:5 000) 室温孵育 2 h 后, $4\ ^\circ\text{C}$ 条件下孵育过夜,磷酸盐吐温缓冲液 (phosphate buffer solution with Tween-20, PBST) 洗膜 5 次,每次 10 min,二抗

(1:8 000) 室温孵育 1 h, PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, ECL 发光后使用凝胶成像系统成像, 拍照保存。采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/ β -肌动蛋白条带灰度值。

1.9 免疫荧光法检测各组细胞中 VE-钙黏蛋白和细胞骨架形态表现并计算 AJs 线性指数 bEnd. 3 细胞接种于 24 孔细胞培养板上, 生长至 80% 左右分组诱导。4% 多聚甲醛固定 10~20 min, 0.1% Triton X-100 作用 10 min, 1% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 封闭液室温封闭 30 min, 加入 VE-钙黏蛋白 (1:1 000) 一抗, 4 °C 孵育过夜。加入对应抗兔 488 荧光二抗室温避光孵育 1 h, 细胞骨架染色直接采用微丝红色荧光探针室温避光孵育 1 h, DAPI 核染料染色 10 min, 采用防淬灭封片剂进行封片。荧光显微镜下对各组细胞进行拍摄, 采用 Image J 软件进行分析。细胞 AJs 线性指数=细胞外围连接总周长/净线性连接长度^[9]。

1.10 免疫荧光法检测各组细胞中 β -catenin 和 p- β -catenin 定位情况 bEnd. 3 细胞接种于 24 孔细胞培养板上, 生长至 80% 左右分组诱导。4% 多聚甲醛固定 10~20 min, 0.1% Triton X-100 作用 10 min, 1% BSA 封闭液室温封闭 30 min, 分别加入 β -catenin (1:300)、p- β -catenin (1:200) 一抗, 4 °C 孵育过夜。加入对应荧光二抗室温避光孵育 1 h, DAPI 核染料染色 10 min, 采用防淬灭封片剂进行封片。荧光显微镜下观察各组细胞中 β -catenin 和 p- β -catenin 的定位情况。

1.11 统计学分析 采用 GraphPad Prism 9.5 统计软件进行统计学分析。各组细胞 TER、渗透系数和线性指数, 各组细胞中 Wnt 和 β -catenin mRNA 表达水平及 Wnt、 β -catenin 和 p- β -catenin 蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 Tukey 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VSV 感染 bEnd. 3 细胞的 TCID₅₀ 采用显微镜观察并记录 VSV 感染后 bEnd. 3 细胞病变情况。见表 2。采用 Reed&Muench 法测定 VSV 的 TCID₅₀ 为 $10^{-4.5} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ 。

表 2 bEnd.3 细胞 VSV 感染情况

Tab. 2 VSV infection conditions of bEnd. 3 cells

Dilution	Positive	Negative
10^{-1}	5	0
10^{-2}	5	0
10^{-3}	4	1
10^{-4}	3	2
10^{-5}	2	3
10^{-6}	1	4
10^{-7}	0	5
10^{-8}	0	5
10^{-9}	0	5
10^{-10}	0	5
10^{-11}	0	5

2.2 VSV 感染后各组细胞 VE 屏障 TER 和渗透系数 bEnd. 3 细胞接种于 Transwell 小室后连续检测上室和下室 TER, 5~6 d 可形成稳定屏障。随着 VSV 感染时间延长, 与感染 0 h 比较, 其他各组细胞中 TER 明显降低 ($P < 0.05$), 渗透系数明显升高 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.3 VSV 感染后 VE-钙黏蛋白和细胞骨架形态表现

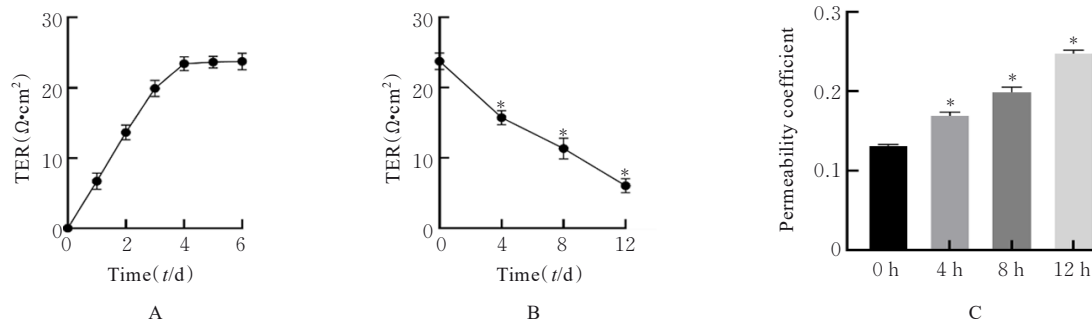
感染 0 h 组 bEnd. 3 细胞间 AJs 为清晰、连续且紧密的线状分布, AJs 线性指数几乎为 1。与感染 0 h 组比较, VSV 感染不同时间组 AJs 由线状变为锯齿状, 细胞间距增宽, 形成间隙, AJs 线性指数明显降低 ($P < 0.05$)。感染 12 h 组细胞中 VE-钙黏蛋白连接中断, 细胞膜结构出现损伤。VSV 感染后细胞骨架发生重组, 在核周聚拢且出现典型的应力纤维。见图 2 和 3。

2.4 VSV 感染后各组细胞中 Wnt 和 β -catenin mRNA 及蛋白表达水平

RT-qPCR 法检测结果显示: 随着 VSV 作用时间延长, 与感染 0 h 组比较, 其他各组细胞中 Wnt mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$), β -catenin mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3。Western blotting 法检测结果显示: 与感染 0 h 组比较, 随着 VSV 感染时间延长, 与感染 0 h 组比较, 其他各组细胞中 Wnt 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), β -catenin 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 4。

2.5 VSV 感染后各组细胞中 p- β -catenin 表达水平及其细胞内定位

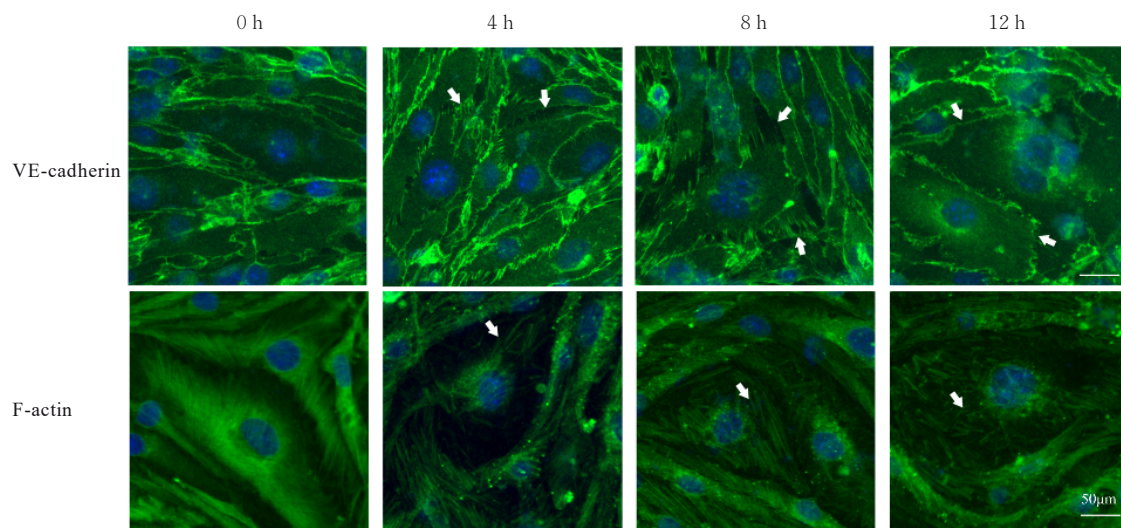
Western blotting 法检测结果显示: 随着 VSV 感染时间延长, 与感染 0 h 组比较, 感染 8 h 和感染 12 h 组细胞中 p- β -catenin 表达水平



* $P < 0.05$ compared with 0 h group.

图1 体外VE屏障模型的TER和VSV感染后体外VE屏障模型的TER(B)及渗透系数(C)

Fig. 1 TER (A) in *in vitro* VE barrier model and TER (B) and permeability coefficients (C) of VE barrier model after VSV infection



Arrows indicated serrated change of VE-cadherin and the recombination of F-actin.

图2 VSV感染后各组细胞中VE-钙黏蛋白和F-肌动蛋白表达情况(免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 2 Expressions of VE-cadherin and F-actin in cells in various groups after VSV infection (Immunofluorescence, $\times 400$)

明显升高 ($P < 0.05$)。见图5。免疫荧光染色结果显示: 与对照组比较, VSV感染后bEnd. 3细胞中 β -catenin内化进入细胞质, p- β -catenin呈现核周围聚集增加。见图6。

2.6 纠正LDLR异常后各组细胞TER和渗透系数

与对照组比较, 感染组和纠正组TER均明显降低, 渗透系数均明显升高 ($P < 0.05$); 与感染组比较, 纠正组TER明显升高, 渗透系数明显降低 ($P < 0.05$)。见图7。

2.7 纠正LDLR异常后各组细胞中Wnt mRNA表达水平

对照组、感染组和纠正组细胞中Wnt mRNA表达水平分别为 1.00 ± 0.06 、 0.78 ± 0.03 和 0.89 ± 0.02 。与对照组比较, 感染组和纠正组细胞中Wnt mRNA表达水平明显降低 ($P < 0.05$);

与感染组比较, 纠正组细胞中Wnt mRNA表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。

2.8 纠正LDLR异常后各组细胞中Wnt、 β -catenin和p- β -catenin表达水平

与对照组比较, 感染组和纠正组细胞中Wnt蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), β -catenin表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), p- β -catenin表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与感染组比较, 纠正组细胞中Wnt蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), β -catenin表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), p- β -catenin表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见图8。

2.9 各组细胞中 β -catenin和p- β -catenin细胞内定位及VE-钙黏蛋白荧光染色情况 免疫荧光结果显示: 与感染组比较, 纠正组细胞中 β -catenin内化

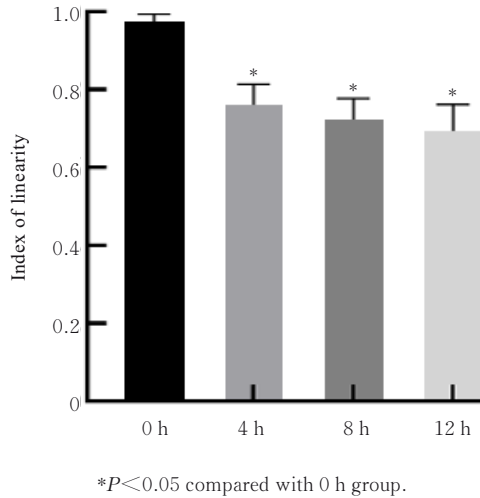


图3 VSV 感染后各组细胞中AJs线性指数
Fig. 3 Linear indexes of AJs in cells in various groups after VSV infection ($\times 400$)

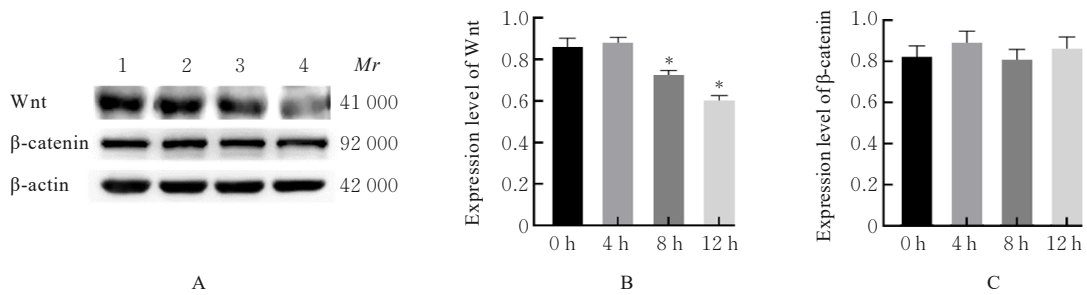
表3 VSV 感染后各组细胞中 Wnt 和 β -catenin mRNA 表达水平

Tab. 3 Expression levels of Wnt and β -catenin mRNA in cells in various groups after VSV infection ($n=3, \bar{x}\pm s$)

Group	Wnt mRNA	β -catenin mRNA
Infection 0 h	1.00 \pm 0.06	1.00 \pm 0.04
Infection 4 h	0.69 \pm 0.03*	0.99 \pm 0.11
Infection 8 h	0.55 \pm 0.06*	1.03 \pm 0.12
Infection 12 h	0.48 \pm 0.04*	0.99 \pm 0.06

* $P < 0.05$ compared with infection 0 h group.

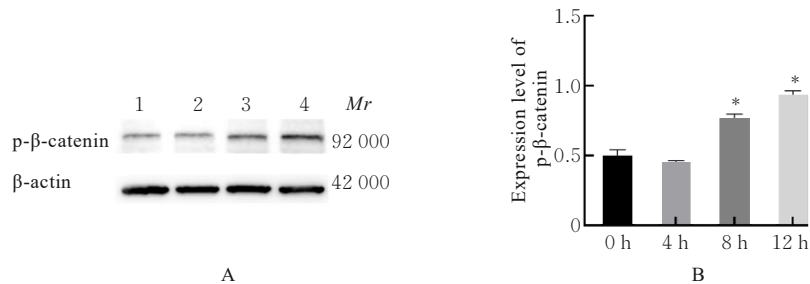
进入细胞质的现象减少, 在细胞核周围聚集的程度减轻, p- β -catenin的内化和核周围聚集现象均有所改善, VE-钙黏蛋白染色后锯齿状程度减轻, 细胞间隙变小, 细胞膜损伤减轻。与感染组比较, 纠正组细胞中AJs线性指数明显升高 ($P < 0.05$)。见图9和10。



Lane 1: Infection 0 h group; Lane 2: Infection 4 h group; Lane 3: Infection 8 h group; Lane 4: Infection 12 h group. * $P < 0.05$ compared with infection 0 h group.

图4 VSV 感染后各组细胞中 Wnt 和 β -catenin 表达电泳图(A)和直条图(B,C)

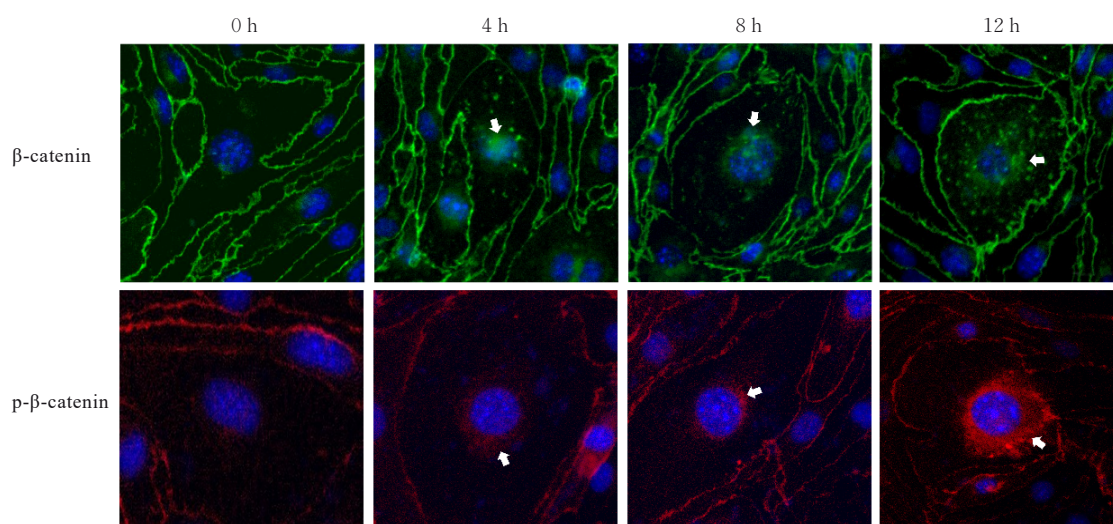
Fig. 4 Electrophoregram (A) and histograms (B, C) of expressions of Wnt and β -catenin in cells in various groups after VSV infection



Lane 1: Infection 0 h group; Lane 2: Infection 4 h group; Lane 3: Infection 8 h group; Lane 4: Infection 12 h group. * $P < 0.05$ compared with infection 0 h group.

图5 VSV 感染后各组细胞中 p- β -catenin 表达电泳图(A)和直条图(B)

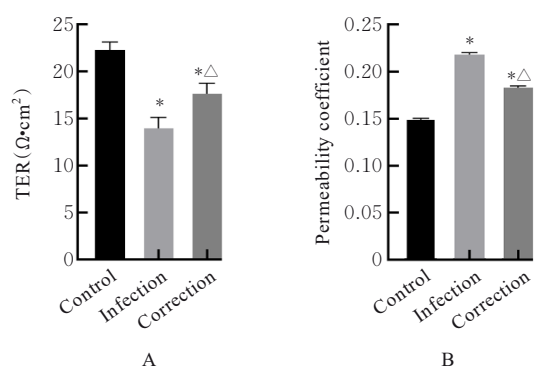
Fig. 5 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of p- β -catenin in cells in various groups after VSV infection



Arrows indicated perinuclear aggregation phenomenon of β -catenin and p- β -catenin.

图6 VSV感染后各组细胞中 β -catenin和p- β -catenin表达情况(免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 6 Expressions of β -catenin and p- β -catenin in cells in various groups after VSV infection (Immunofluorescence, $\times 400$)



* $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with infection group.

图7 纠正LDLR异常后各组细胞中TER(A)和渗透系数(B)

Fig. 7 TER (A) and permeability coefficients (B) in cells in various groups after correction of abnormal LDLR

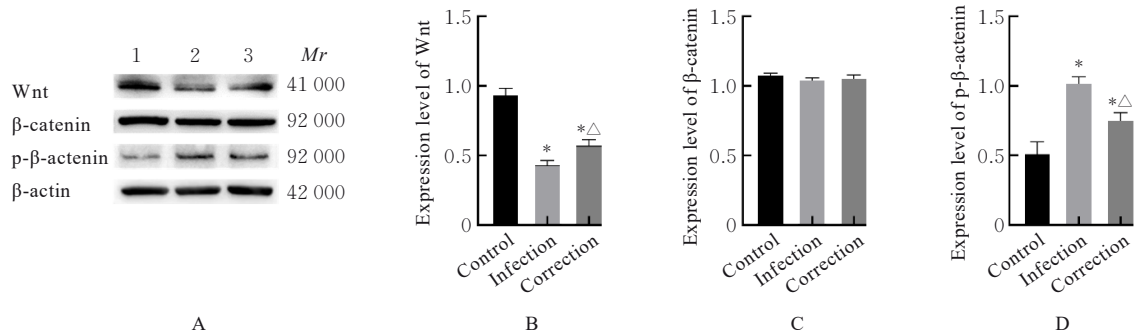
3 讨论

VSV是一种较为常见的人畜共患病毒,其神经嗜性和神经毒力在动物模型中已被证实。研究^[10-12]显示:VSV具有诱导BBB损伤的作用,可引起脑和脊髓病变等,但其机制尚未明确。

VE屏障由ECs、细胞间连接和细胞外成分组成,其中ECs是防止病毒、细菌等病原微生物侵入组织器官的“守门人”^[10]。研究^[11-12]显示:VSV等病毒感染能够破坏AJs并导致血管渗漏。Transwell小室常用于模拟VE屏障模型,同时联合细胞电阻

仪测量TER,能够较好地反映VE屏障的损伤情况^[9]。本研究采用bEnd.3细胞构建体外VE屏障模型,结果显示:VSV感染后TER降低且渗透系数增加,表明VSV感染能够损伤VE屏障,导致VE屏障通透性增加。

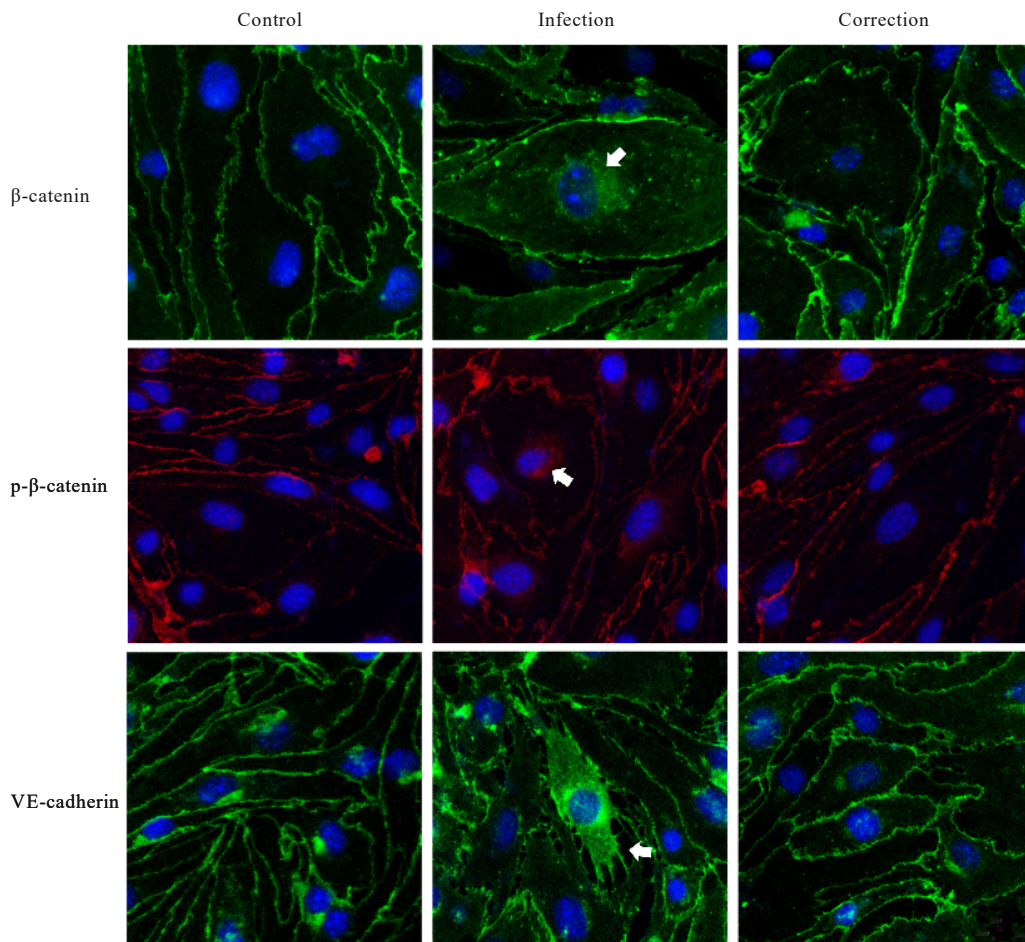
细胞间连接主要由AJs、紧密连接和间隙连接组成,其中AJs具有介导细胞识别、黏附、形态发生和组织完整性的功能,是VE屏障的关键结构^[13]。AJs是VE-钙黏蛋白与连接蛋白共同构成的复合体,VE-钙黏蛋白的胞外域相互连接形成异源二聚体,胞内域尾端借助 β -连环蛋白等连接蛋白与细胞骨架肌动蛋白相连^[14]。因此,AJs的稳定性与VE-钙黏蛋白、 β -catenin和肌动蛋白有密切关联。VE屏障的稳定性是细胞间连接代表的离心力和细胞骨架代表的收缩力共同作用的结果^[15]。本研究结果显示:VSV感染bEnd.3细胞后,ECs力平衡被打破,细胞骨架肌动蛋白形成应力纤维提示收缩力增强,VE-钙黏蛋白呈现锯齿状提示离心力减弱,从而引起细胞间隙增大,VE屏障破坏。另一方面, β -catenin在VE屏障中的作用也得到了较多关注。研究^[16]显示:黄病毒的非结构蛋白1(non-structural 1, NS1)可通过改变VE-钙黏蛋白和 β -catenin的正常分布导致VE通透性增加和血管功能障碍。WENG等^[17]研究显示: β -catenin磷酸化会导致细胞间连接完整性降低和ECs通透性升高。本研究结果显示:随着VSV感染时间延长,细胞



Lane 1: Control group; Lane 2: Infection group; Lane 3: Correction group. * $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with infection group.

图8 纠正 LDLR 异常后各组细胞中 Wnt、 β -catenin 和 p- β -catenin 表达电泳图(A)和直条图(B~D)

Fig. 8 Electrophoregram (A) and histograms (B–D) of expressions of Wnt, β -catenin, and p- β -catenin in cells in various groups after correction of abnormal LDLR



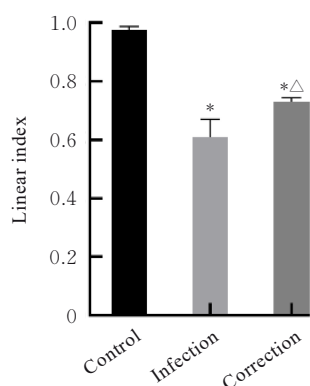
Arrows indicated perinuclear aggregation phenomenon of β -catenin and p- β -catenin, and serrated change of VE-cadherin.

图9 纠正 LDLR 异常后各组细胞中 β -catenin、p- β -catenin 和 VE-钙黏蛋白表达情况(免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 9 Expressions of β -catenin, p- β -catenin, and VE-cadherin proteins in cells in various groups after correction of abnormal LDLR (Immunofluorescence, $\times 400$)

中 β -catenin 表达水平并未发生改变, 说明 VSV 并不会影响细胞中总 β -catenin 表达水平。bEnd. 3 细胞膜处的 β -catenin 会内化进入细胞, 同时 p- β -连环

蛋白表达水平升高, 并且 p- β -catenin 在细胞核周围聚集, 说明 VSV 可能通过影响 β -catenin 的分布和磷酸化状态进而影响 VE-钙黏蛋白, 导致 VE 屏障



* $P < 0.05$ compared with control group; $\triangle P < 0.05$ compared with infection group.

图10 纠正LDLR异常后各组细胞中AJs线性指数

Fig. 10 Linear indexes of AJs in cells in various groups after correction of abnormal LDLR

通透性增加,而与其表达水平变化无关。 β -catenin的磷酸化和异常分布是VSV作用于ECs引起AJs结构破坏的关键。

Wnt是一种分泌性糖蛋白,具有调节细胞生物活性的作用,可激活不同的细胞内信号转导途径,参与维持机体的稳态^[5]。Wnt/ β -catenin信号通路是维持VE屏障或者ECs正常生理功能的重要通路^[18],其功能丧失影响脑血管发育和BBB的完整性^[19]。研究^[20-21]显示:Wnt/ β -catenin信号通路激活可以促进血管生成,有助于损伤后的血管修复,维持BBB功能的完整性。MARTIN等^[22]研究显示:特异性调节Wnt信号能够恢复BBB正常功能。当Wnt信号异常时, β -catenin在细胞质中被磷酸化;当Wnt信号被激活时, β -catenin磷酸化蛋白质复合物破坏, β -catenin结构恢复稳定^[23]。本研究结果显示:VSV感染后bEnd.3细胞中Wnt表达水平降低。抑制VSV复制,bEnd.3细胞表面LDLR的正常生理状态恢复后,细胞中Wnt信号表达水平升高, β -catenin内化程度和磷酸化水平降低,AJs的损伤得到修复,ECs间隙缩小。本研究结果显示:VSV感染可能通过LDLR影响Wnt蛋白的表达水平,引起ECs中 β -catenin修饰和定位的改变,进而影响VE屏障的通透性,涉及的Wnt/ β -catenin信号通路具体分子机制有待进一步探讨。

综上所述,VSV通过LDLR感染血管ECs后影响Wnt/ β -catenin信号通路相关蛋白表达,引起VE-钙黏蛋白异常分布和AJs损伤,最终导致VE屏障的通透性增加。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

曹宇璇和陈为参与研究选题、实验设计、数据分析及论文撰写,孙成彪、赵娜、王燕和董明鑫参与实验操作及数据分析,许娜、刘文森和李咏梅与课题指导、论文审阅及修改。

[参考文献]

- [1] LETCHWORTH G J, RODRIGUEZ L L, DEL CBARRERA J. Vesicular stomatitis[J]. Vet J, 1999, 157(3): 239-260.
- [2] COOPER D, WRIGHT K J, CALDERON P C, et al. Attenuation of recombinant vesicular stomatitis virus-human immunodeficiency virus type 1 vaccine vectors by gene translocations and g gene truncation reduces neurovirulence and enhances immunogenicity in mice[J]. J Virol, 2008, 82(1): 207-219.
- [3] TOMCZYK T, WRÓBEL G, CHABER R, et al. Immune consequences of *in vitro* infection of human peripheral blood leukocytes with vesicular stomatitis virus[J]. J Innate Immun, 2018, 10(2): 131-144.
- [4] 黄焰霞,刘艾然,杨毅. 内皮细胞间黏附连接调节机制的研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 2013, 25(3): 190-192.
- [5] 张新,巨朝娟,金鑫,等. 外源性神经生长因子对形觉剥夺性近视豚鼠巩膜组织的保护作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2021, 47(6): 1455-1461.
- [6] FINKELSHTEIN D, WERMAN A, NOVICK D, et al. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(18): 7306-7311.
- [7] 王海英,武心洁,苑金香,等. Wnt5a/Frizzled-2/ Ca^{2+} 和Wnt3a/Frizzled通路的生理及病理学研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版), 2021, 47(3): 811-818.
- [8] 孙成彪. 犬干扰素 α /RTB重组融合蛋白制备及抗病毒活性研究[D]. 北京:军事科学院, 2020.
- [9] CHEN W, YU H T, SUN C B, et al. γ -Bungarotoxin impairs the vascular endothelial barrier function by inhibiting integrin $\alpha 5$ [J]. Toxicol Lett, 2023, 383: 177-191.
- [10] CHEN Y, TANG D, ZHU L J, et al. hnRNPA2/B1 ameliorates LPS-induced endothelial injury through NF- κ B pathway and VE-cadherin/ β -catenin signaling modulation *in vitro* [J]. Mediators Inflamm, 2020, 2020: 6458791.
- [11] LIU L, DODD S, HUNT R D, et al. Early detection of

- cerebrovascular pathology and protective antiviral immunity by MRI[J]. *Elife*, 2022, 11: e74462.
- [12] HASHIMOTO R, TAKAHASHI J, SHIRAKURA K, et al. SARS-CoV-2 disrupts respiratory vascular barriers by suppressing Claudin-5 expression[J]. *Sci Adv*, 2022, 8(38): eabo6783.
- [13] MACIEL R A P, CUNHA R S, BUSATO V, et al. Uremia impacts VE-cadherin and ZO-1 expression in human endothelial cell-to-cell junctions [J]. *Toxins*, 2018, 10(10): 404.
- [14] MISHRA J, DAS J K, KUMAR N. Janus kinase 3 regulates adherens junctions and epithelial mesenchymal transition through β -catenin [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(40): 16406-16419.
- [15] MCEVOY E, SNEH T, MOEENDARBARY E, et al. Feedback between mechanosensitive signaling and active forces governs endothelial junction integrity [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 7089.
- [16] PUERTA-GUARDO H, BIERING S B, DE SOUSA F T G, et al. Flavivirus NS1 triggers tissue-specific disassembly of intercellular junctions leading to barrier dysfunction and vascular leak in a GSK-3 β -dependent manner[J]. *Pathogens*, 2022, 11(6): 615.
- [17] WENG J, CHEN Z F, LI J Y, et al. Advanced glycation end products induce endothelial hyperpermeability via β -catenin phosphorylation and subsequent up-regulation of ADAM10 [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(16): 7746-7759.
- [18] SCHULTE G, BRYJA V. WNT signalling: mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(24): 4543-4546.
- [19] 黄晓雯. 脑血管内皮Wnt/ β -catenin信号通路对外周炎症导致的血脑屏障损伤的介导作用和机制研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2021.
- [20] SONG S S, HUANG H C, GUAN X D, et al. Activation of endothelial Wnt/ β -catenin signaling by protective astrocytes repairs BBB damage in ischemic stroke[J]. *Prog Neurobiol*, 2021, 199: 101963.
- [21] GUO R L, WANG X, FANG Y N, et al. rhFGF20 promotes angiogenesis and vascular repair following traumatic brain injury by regulating Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2021, 143: 112200.
- [22] MARTIN M, VERMEIREN S, BOSTAILLE N, et al. Engineered Wnt ligands enable blood-brain barrier repair in neurological disorders [J]. *Science*, 2022, 375(6582): eabm4459.
- [23] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities [J]. *Cell*, 2017, 169(6): 985-999.