

·基础研究·

整合素 $\beta 4$ 调控脑血管发育

邓昭华, 董影影, 李颖雯, 何欢欢

(中山大学附属第五医院, 广东省生物医学影像重点实验室//广东省分子影像工程研究中心, 广东 珠海 519000)

摘要:【目的】探讨整合素 $\beta 4$ (ITGB4)对脑血管生长发育的调控作用。【方法】通过逆转录PCR(RT-PCR)检测靶向*itgb4* mRNA序列的吗啉环(MO)在斑马鱼胚胎中的敲低效果。利用体视显微镜和激光共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)观察抑制*itgb4*表达后,斑马鱼胚胎脑部血管的发育变化。通过在斑马鱼胚胎中注射4,6-联脒-2-苯基吡啶(DAPI)染料检测血脑屏障(BBB)发育的完整性。使用小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)在永生化人脑微血管内皮细胞(hCMEC/D3)中敲低ITGB4,用蛋白免疫印迹(WB)检测其敲低效果。通过活细胞成像分析仪(IncuCyte®)、基质胶(Matrigel® matrix)成管实验和transwell迁移实验分别检测ITGB4在hCMEC/D3中调控细胞增殖、成管和迁移的作用。应用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测敲低*itgb4*后Wnt/ β -catenin信号通路下游靶基因表达变化。【结果】在斑马鱼胚胎中敲降*itgb4*引起脑水肿、脑部出血、血脑屏障形成障碍以及后脑血管数量减少等相关表型。细胞实验结果显示,在hCMEC/D3细胞中抑制ITGB4的表达导致细胞增殖减缓,管腔形成减少及迁移能力减弱。此外,qRT-PCR结果表明,在斑马鱼胚胎中敲低*itgb4*抑制Wnt/ β -catenin通路下游靶基因的表达。最后,在hCMEC/D3细胞中敲低ITGB4后,通过添加Wnt/ β -catenin通路激活剂(BML-284)能明显挽回迁移减少的表型。【结论】ITGB4通过调节脑血管内皮细胞的增殖、迁移和成管等功能促进脑血管发育并参与调控血脑屏障的形成。

关键词:整合素 $\beta 4$; 血管发育; 血脑屏障; 血管畸形; 斑马鱼

中图分类号:R743.4 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2022)05-0738-10

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0507

Integrin $\beta 4$ Regulates Cerebral Vascular Development in Zebrafish

DENG Zhao-hua, DONG Ying-ying, LI Ying-wen, HE Huan-huan

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Biomedical Imaging and Guangdong Provincial Engineering Research Center of Molecular Imaging, The Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, China)

Correspondence to: HE Huan-huan; E-mail: hehh23@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】To explore the effect of integrin $\beta 4$ (ITGB4) on cerebrovascular development.【Methods】We confirmed the knock down effect of morpholino (MO) targeting *itgb4* mRNA sequence on zebrafish embryos by using RT-PCR. Upon the knockdown effect of *itgb4* in zebrafish embryos by MO, we observed the phenotypes of cerebrovascular development via laser scanning confocal microscope and stereomicroscope. To examine the integrity of blood-brain barrier (BBB), we injected the DAPI to the zebrafish embryos. To detect the functional changes of cerebrovascular endothelial cells, we inhibited the expression of ITGB4 by siRNA and confirmed the knockdown effect by western blot (WB). To inspect the role of ITGB4 in brain microvascular endothelial cell (hCMEC/D3), we performed cell proliferation assay, tube formation assay and cell migration assay on ITGB4 knock-down cells. We used qRT-PCR to detect the change of the downstream target genes in the Wnt/ β -catenin pathway upon the knockdown effect of *itgb4*.【Results】*Itgb4* knocked down by

收稿日期:2022-04-08

基金项目:广东省科技计划项目(2020A050510028)

作者简介:邓昭华,硕士,研究方向:血管生物学,E-mail: dengzh37@mail2.sysu.edu.cn;何欢欢,通信作者,研究员,博士生导师,E-mail: hehh23@mail.sysu.edu.cn

MO resulted in dramatic defects in the zebrafish embryos, including brain edema, brain hemorrhage, blood-brain barrier dysfunction and reduction of the number of the central arteries (CtAs) in hindbrain. Downregulation of ITGB4 protein expression in hCMEC/D3 disrupted the cell function, including the suppression of cellular proliferation, the reduction of the tube formation and the inhibition of cellular migration. In addition, the downstream target genes in the Wnt/ β -catenin signal pathway were suppressed since the downregulation of *itgb4* expression in zebrafish embryos. Finally, the reduction of the cells migration after knocking down the *ITGB4* could be rescued when we add the activator (BML-284) of the Wnt/ β -catenin signal pathway to the hCMEC/D3 cells.【Conclusions】ITGB4 promotes the development of cerebrovascular by regulating cellular proliferation, migration and tube formation of cerebral vascular endothelial cells, and plays an important role in regulating the formation of blood-brain barrier.

Key words: ITGB4; vascular development; blood-brain barrier; vascular malformation; zebrafish

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2022, 43(5): 738-747]

整合素是由 α 亚基和 β 亚基通过非共价修饰形成的异源二聚体^[1]。整合素通过与跨膜蛋白或细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 结合, 参与细胞质激酶的调节和细胞骨架重构, 并在细胞迁移、增殖和分化等过程中发挥重要作用^[2-3]。血脑屏障作为脑组织重要的防御系统, 主要由形成细胞间紧密连接的无孔血管内皮细胞、完整及连续的基底膜、血管周细胞和星形胶质细胞终足组成^[4]。由于整合素家族分子在脑血管内皮细胞中广泛表达并作为多种细胞外基质蛋白的主要受体^[5], 因此已有相关研究表明, 整合素家族成员能参与血脑屏障功能的调控。例如, 整合素 $\beta 1$ 可通过与细胞质内的骨架蛋白结合, 介导脑血管内皮细胞锚定在细胞外基质中以维持血脑屏障的稳态^[6]。除此以外, 在斑马鱼胚胎中敲除整合素 $\alpha 4$ (integrin $\alpha 4$, ITGA4), 也会导致斑马鱼胚胎颅内出血, 血脑屏障的破坏^[7]。整合素 $\beta 4$ (integrin $\beta 4$, ITGB4) 作为整合素家族的重要成员之一, 能与整合素 $\alpha 6$ (integrin $\alpha 6$, ITGA6) 形成异源二聚体, 是层粘连蛋白 (laminin) 的主要受体。ITGB4 的主要功能是通过半桥粒的结构介导上皮细胞与胞外基质间相互作用, 维持上皮细胞屏障的完整性^[8]。过去对 ITGB4 的功能性研究主要集中在促进肿瘤进展^[9]与呼吸道炎症方面^[10]。近年来, ITGB4 在血管乃至脑部血管中的功能已被进一步探索。有研究表明, 肝生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 通过加强 c-Met/S1PR1/ITGB4 复合体之间的相互作用以增强血管内皮细胞的屏障功能^[11]。除此之外, 有文献进一步报道 ITGB4 在脑小动脉上特异性表达^[12], 并在神经炎症中表达上调^[13], 以对抗炎症对血脑屏障造成的

损伤^[14]。然而, 在正常生理状态下 ITGB4 对脑部血管发育以及血脑屏障形成中的作用尚未明确。因此, 本研究以斑马鱼为模式生物, 通过抑制 *itgb4* 基因表达, 首次揭示 *itgb4* 在脑血管发育过程中的作用, 并通过体外功能实验探索其主要作用机制。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

内皮细胞培养基 (ECM) 购自 ScienCell; Opti-MEM 培养基购自美国英杰生命技术有限公司 Gibco 系列 (Invitrogen, USA); ITGB4 小干扰 RNA (siRNA) 购自广州锐博生物科技有限公司。Lipofectamine™ LTX Reagent with PLUS™ Reagent 购自美国 Thermo Fisher 公司; Omega 总 RNA 提取试剂盒 (E.Z.N.A.® Total RNA Kit I) 购自美国宝特公司; 逆转录试剂盒 (HiScript III RT SuperMix for qPCR)、实时荧光定量 PCR 检测试剂盒 (ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix) 购自中国南京诺唯赞生物科技有限公司; 24 孔 transwell 小室购买于美国康宁公司。依照实验所需要的蛋白抗体 β -actin 抗体购自美国 CST 公司; HRP 偶联的山羊抗兔/鼠二抗均购自美国 EARTHOX 公司; ITGB4 抗体购买于成都正能生物技术有限责任公司。

1.2 实验动物

本实验采用血管内皮荧光标记转基因斑马鱼 *Tg (fil1a:EGFP)^{fl}*, 购于国家斑马鱼资源中心, 饲养于广东省生物医学影像重点实验室斑马鱼房实验室, 动物实验操作均遵循中山大学动物实验制度伦理指南和实验动物护理和使用指南 (guide for the

care and use of laboratory animals)。实验斑马鱼饲养和胚胎培育均在28.5 °C标准条件下进行。

1.3 实验方法

1.3.1 永生化人脑微血管内皮细胞培养 实验用的永生化人脑微血管内皮细胞(hCMEC/D3)细胞系在ECM完全培养基中培养,细胞均置于温度为37 °C和CO₂浓度为5%的细胞培养箱中培养。细胞培养过程中,每2 d进行换液,3~4天传代。

1.3.2 细胞蛋白质提取和蛋白免疫印迹 等渗DPBS溶液清洗1次后加入适量PBS,用细胞刮刮下细胞后置于1.5 mL离心管中,在4 °C下以180 × g离心5 min后弃上清,根据细胞沉淀量向其中加入适量裂解液混合物(包含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂混合液,比例为100:1:2),在4 °C下以200 × g离心20 min后吸取上清可得到细胞总蛋白,于-80 °C保存。用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度并置于100 °C金属浴变性10 min。各样本以相同蛋白量(30 μg)上样用120 V恒压电泳。电泳结束后置于冰浴以350 mA恒流电转1 h。转膜完成后用TBST漂洗后加入抗ITGB4抗体(1:1 000)、抗ACTIN抗体(1:1 000),4 °C摇床孵育过夜。次日加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(1:5 000)常温孵育1 h。二抗完成后加入新配制的ECL液,用化学发光凝胶成像系统曝光成像。

1.3.3 细胞转染 根据美国Thermo fisher公司转染试剂Lipofectamine™ LTX Reagent with PLUS™ Reagent方法说明进行转染,具体步骤如下:待细胞贴壁、生长状态稳定及融合度达70%~80%时行转染实验。将siRNA与Lipofectamine™ LTX分别与Opti-MEM培养基混合加入细胞中。于温度为37 °C和CO₂浓度为5%的细胞培养箱中培养4~6 h后将培养基更换为完全培养基,继续在培养箱中培养48~72 h。

1.3.4 细胞增殖实验 将转染后的细胞按照每孔8 000个的细胞密度,用完全培养基配成200 μL单细胞悬液,接种于96孔培养板中。96孔板周围36个孔用PBS填充,把96孔培养板置于温度为37 °C和CO₂浓度为5%的IncuCyte细胞培养箱(ESSEN Bioscience, S3)中培养,设置仪器每2 h拍照1次,持续拍摄5 d。

1.3.5 细胞成管实验 基质胶放在冰上,待其溶解具有流动性后,加在96孔板中,每个孔50 μL,后放

置于37 °C培养箱中待其凝固。将转染后48 h的细胞按照1.5×10⁴/100 μL密度准备好。将细胞悬液加入到铺好基质胶的96孔板中,10 min后移至Incu-Cyte细胞培养箱(Essen bioscience, S3)持续拍照,24 h后挑取相应时间点做统计。

1.3.6 细胞迁移实验 将转染后48 h的细胞按照3×10⁴/200 μL的细胞密度准备好。取24孔板,加入700 μL完全培养基,放入0.8 μm的小室,加制备好的细胞加入上室,放置培养箱在37 °C中迁移20 h左右。之后去除培养基,用PBS洗2次,加入1 mL 75%的乙醇固定30 min,用PBS洗2次,加入结晶紫染色30 min后,用PBS把结晶紫洗干净,用棉签把小室的内侧擦干净,待小室干燥后,拍照统计分析。

1.3.7 实时定量PCR 按照Omega总RNA提取试剂盒(E.Z.N.A.® Total RNA Kit I)实验步骤提取细胞以及斑马鱼胚胎总RNA。20 μL mRNA逆转录体系中分别加入4 μL 4×gDNA wiper Mix和5×HiScript III qRT SuperMix以及1.0 μg总RNA模板进行逆转录,获得相应的cDNA,以GAPDH或者ACTIN为内参照检测相关基因mRNA表达水平。利用QuantStudio 7 Flex实时荧光定量PCR并计算相应的2^{-ΔΔCt}值,相关的引物列于表1。

1.3.8 显微注射以及活体成像 斑马鱼在注射的前1天雌雄同缸,用挡板隔开。注射当天抽开隔板,让斑马鱼产卵,在胚胎处于1~2细胞期时进行显微注射,注射后用培养液饲养。当天晚上换含0.1% PTU的培养液,抑制色素沉着,以便后续拍照。将需要观察的胚胎用1%的低熔点琼脂糖固定于载玻片上,待低熔点琼脂糖凝固后,加水保持胚胎存活,在激光共聚焦显微镜(Zeiss 880)下10×镜头观察与拍摄脑部血管,在体视显微镜(Nikon, SMZ18)下4×镜头观察与拍摄斑马鱼胚胎脑部。

1.3.9 血管通透性实验 在斑马鱼胚胎发育到60 h(hours post fertilization, hpf)时,麻醉于浓度为0.05%的三卡因溶液,通过显微注射将4,6-联脒-2-苯基吡啶(DAPI)注射到胚胎的中心静脉(caudal vein plexus, CVP)中,固定于低熔点琼脂糖,15 min后通过激光共聚焦观察DAPI渗入到脑实质中的情况。

1.4 统计学分析

本研究所涉及的图片采用Image J进行图片处理与分析,GraphPad Prism软件(8.0版本)进行数据

统计,实验数据均来自2~3次独立实验,计量资料用均数±标准差来表示。两组间比较采用两独立样本 Student's *t*-test 分析检验,三组之间比较采

用 one-way ANOVA 分析检验,事后检验采用 Bonferroni 法比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。¹⁾代表 $P < 0.05$,²⁾代表 $P < 0.01$,³⁾代表 $P < 0.001$ 。

表1 PCR引物序列
Table1 Primer sequence for PCR

Gene	The primer sequence (5'-3')	Product/bp
<i>actin</i>	F, CCAGCCTTCCTCCTGGGTATG	186
<i>actin</i>	R, GTGGAAGGAGCAAGAGAGGTG	
<i>lef1</i>	F, TCCTCTGGGTTGGTTCTCAC	176
<i>lef1</i>	R, TGTGAGGTCTTTTGGGCTCC	
<i>prickle1a</i>	F, GCATCAGTTCTGCTCCTTCAC	170
<i>prickle1a</i>	R, ATCACTAACACCCCCTCAGTCA	
<i>itgb4</i> -exon1	F, TGGCTTGGATTTGTAAGACGCAGGT	326
<i>itgb4</i> -exon3	R, CTCATCAGGGCAGTATGCACATCCTGC	
<i>ITGB4</i>	F, GCACTTCCGGGTTCTCT	99
<i>ITGB4</i>	R, TGAGGGGACAGTCACAGCTT	
<i>AXIN2</i>	F, GCCAATGGCCAAGTGTCTCT	116
<i>AXIN2</i>	R, AGCTTTCCAGCCTCGAGAT	
<i>GAPDH</i>	F, GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	197
<i>GAPDH</i>	R, GGCTGTGTCATACTTCTCATGG	

2 结果

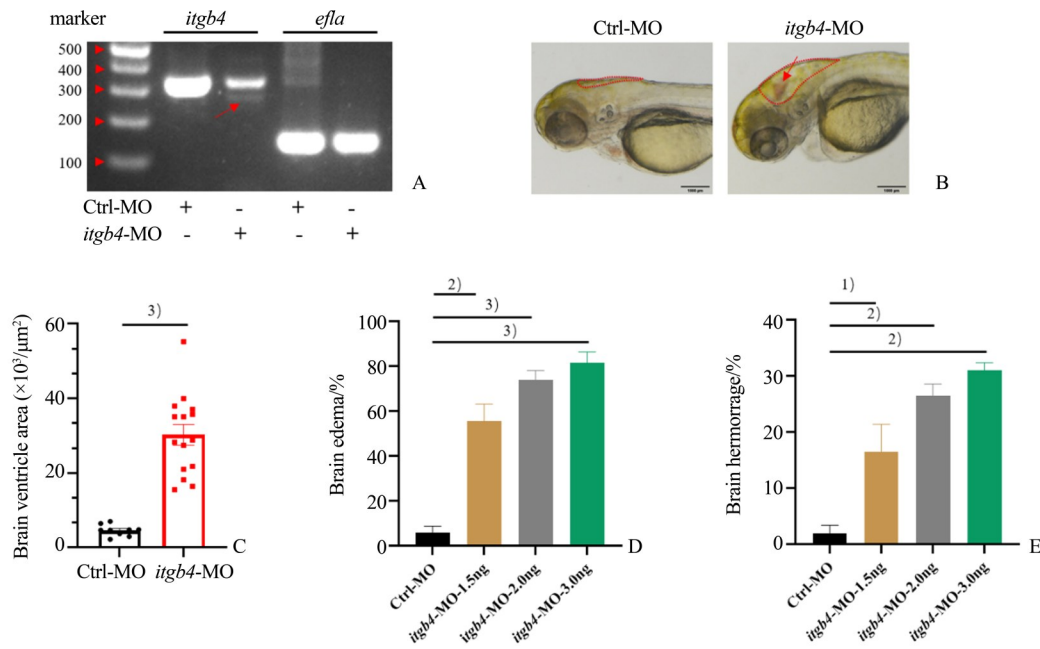
2.1 抑制 *itgb4* 的表达导致斑马鱼胚胎脑水肿和脑部出血

RT-PCR 结果显示,以 *efla* 作为对照 MO (Ctrl-MO) 和 *itgb4*-MO 组的内参, *itgb4*-MO 可致 *itgb4* 的第二外显子的转录缺失, 出现条带较短的截短体 (图 1A)。因此, 结果表明 *itgb4*-MO 能有效靶向 *itgb4*, 并在斑马鱼胚胎中起敲低效应。与 Ctrl-MO 组相比, *itgb4*-MO 组胚胎第四脑室面积显著增加 ($t=7.034, P < 0.0001$), 且伴随脑部出血 (图 1B-C)。用梯度剂量的 *itgb4*-MO 处理斑马鱼胚胎, 经单因素方差分析, 4 组间脑水肿的比率差异有统计学意义 ($F=83.18, P=0.0005$), 两两比较发现 *itgb4*-MO-1.5ng、*itgb4*-MO-2ng、*itgb4*-MO-3ng 三个试验组分别与 Ctrl-MO 对照组比较均有统计学意义 (P 值依次分别为 $P=0.0021, P=0.0006, P=0.0004$)。此外, 经单因素方差分析, 4 组间脑出血的比率差异

同样具有统计学意义 ($F=40.04, P=0.0019$), 两两比较发现 *itgb4*-MO-1.5ng、*itgb4*-MO-2ng、*itgb4*-MO-3ng 3 个试验组分别与 Ctrl-MO 对照组比较均有统计学意义 (P 值依次分别为 $P=0.0217, P=0.0031, P=0.0016$)。综上所述, 脑水肿和脑部出血的现象具有浓度剂量依赖性 (图 1D-E)。

2.2 抑制 *itgb4* 的表达破坏血脑屏障的形成

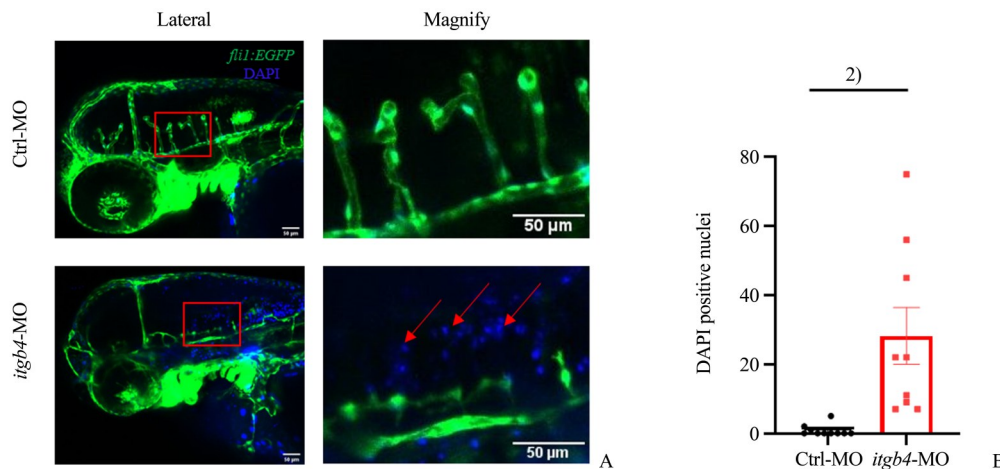
脑出血以及脑水肿与血脑屏障形成密切相关。为此, 我们待斑马鱼胚胎发育至 60 hpf 时, 在其中心静脉丛 (caudal vein plexus, CVP) 处注射高浓度的 DAPI 染料, 并通过观察 DAPI 渗漏到血管外的数量指示血脑屏障的紧密程度。实验结果显示, Ctrl-MO 组胚胎在 60 hpf 时已能形成紧密的血脑屏障, 脑组织中几乎无渗出到血管外的 DAPI 染料; 而 *itgb4*-MO 组渗出到脑实质的 DAPI 与对照组相比显著增加 ($t=3.512, P=0.0027$), 说明降低 *itgb4* 的表达抑制了斑马鱼胚胎血脑屏障的形成 (图 2A-B)。



A: RT-PCR of *itgb4* transcripts from embryos at 72 hpf injected with control or *itgb4*-MO and the arrow demonstrated exon 2 skipping (red arrow). The PCR product of normal *itgb4* transcripts was 326 bp, and that of exon 2 skipped transcripts was 238 bp. Arrowhead indicates molecular weight. B: Compared with Ctrl-MO injected zebrafish embryos, *itgb4* MO-injected zebrafish embryos showed the expanded brain ventricle (red dotted line) and brain hemorrhage (red arrow). Scale bar: 1000 μm . C: Brain ventricle area of embryos injected with Ctrl-MO ($n=9$) or *itgb4*-MO ($n=15$) at 72 hpf. D, E: The percentage of brain edema (D) or hemorrhage (E) in the zebrafish injected with control or concentration gradient *itgb4* MO ($n=2$). n represent independent experiments and are shown as mean \pm s.e.m. ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$.

图1 抑制 *itgb4* 表达导致斑马鱼胚胎脑水肿和出血

Fig. 1 Inhibition of *itgb4* expression resulted in brain edema and hemorrhage in zebrafish embryos



A: The images from Ctrl-MO treated or *itgb4*-MO treated embryos injected with nucleus dye (DAPI, 0.85 mg/mL) at 60 hpf. Hindbrain vasculature were shown from dorsal view. Scale bar: 50 μm . The arrows indicate the DAPI permeated into the brain parenchyma. B: Quantification of DAPI permeated into the brain parenchyma. Ctrl-MO ($n=10$), *itgb4*-MO ($n=9$). n represent independent experiments and are shown as mean \pm s.e.m. ²⁾ $P < 0.01$.

图2 抑制 *itgb4* 的表达破坏斑马鱼血脑屏障形成

Fig. 2 Suppression of *itgb4* expression restrained the formation of blood-brain barrier in zebrafish

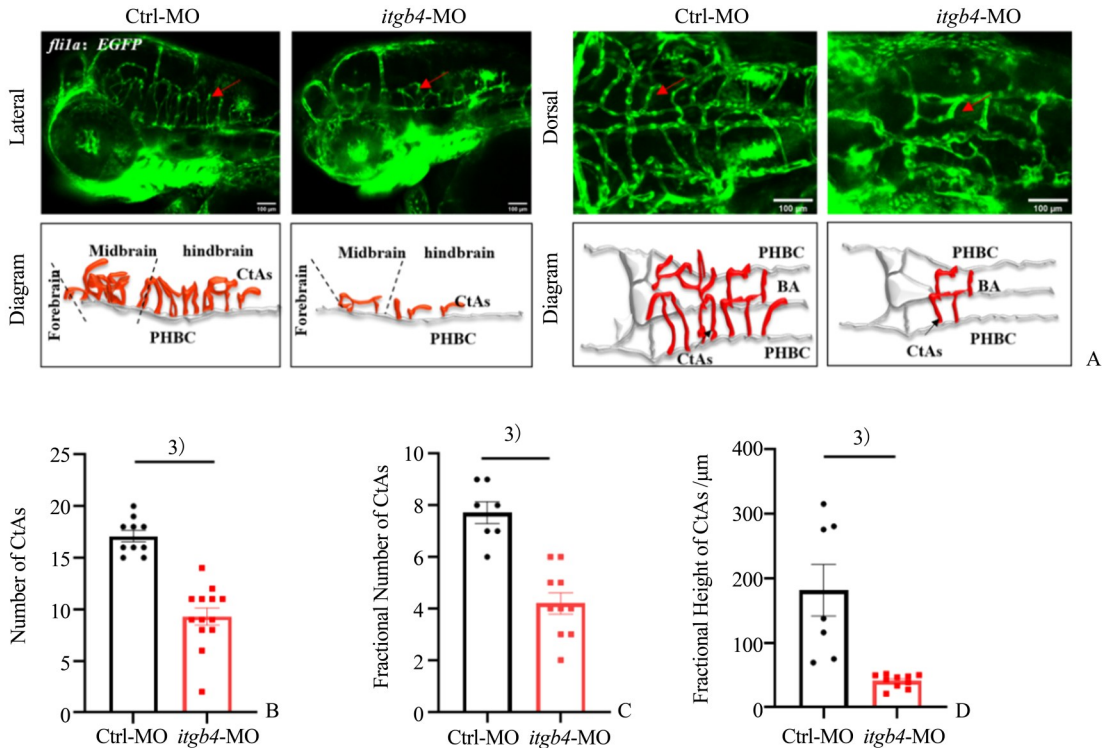
2.3 抑制 *itgb4* 的表达导致斑马鱼胚胎后脑血管发育缺陷

除了血脑屏障发育缺陷,脑出血及脑水肿还可

能与脑部血管发育异常相关。因此,我们用激光共聚焦显微镜观察 72 hpf 斑马鱼胚胎脑部的背侧面和腹侧面血管的发育情况。结果显示,与 Ctrl-MO

组相比, *itgb4*-MO 组脑部不仅背侧面中央动脉 (central arteries, CtAs) 的数量显著减少 ($t=7.289$, $P<0.0001$) (图 3A-B), 而且腹侧面的 CtAs 的数量也显著减少 ($t=5.755$, $P<0.0001$) (图 3C)。同样

地, 腹侧面 CtAs 深入后脑实质的高度也显著降低 ($t=4.243$, $P=0.0007$; 图 3D)。结果表明, 降低 *itgb4* 的表达抑制斑马鱼胚胎后脑血管的形成。



A: The images from Ctrl-MO or *itgb4*-MO injected embryos at 72 hpf showing the hindbrain vasculature from lateral and dorsal view. Scale bar: 100 μm. The arrows indicate central arteries (CtAs). B: Quantification of CtAs in Ctrl-MO ($n=10$) or *itgb4*-MO ($n=13$) embryos with dorsal view. C, D: Quantification of CtA number (C) and height (D) in Ctrl-MO ($n=7$) or *itgb4*-MO ($n=10$) embryos with lateral view. n represent independent experiments and are shown as mean \pm s.e.m. ³⁾ $P < 0.001$.

图3 抑制 *itgb4* 表达导致斑马鱼后脑血管发育缺陷

Fig. 3 Suppression of *itgb4* expression induced the deficit in hindbrain vascular development in zebrafish

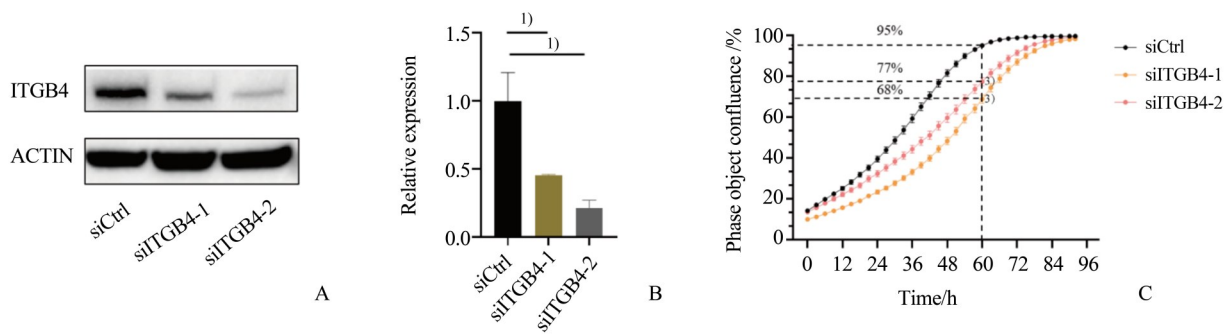
2.4 敲低 *ITGB4* 抑制脑血管内皮细胞增殖

为进一步探究 *ITGB4* 对脑血管发育的作用, 我们分别使用两个不同的靶向 *ITGB4* 的小干扰 RNA (siRNA) 序列抑制 *ITGB4* 的表达并用 WB 检测敲低效果。如图所示 (图 4A-B), 经单因素方差分析, 3 组间差异有统计学意义 ($F=20.65$, $P=0.0176$); 两两比较发现 siITGB4-1、siITGB4-2 两个试验组分别与 siCtrl 组比较差异有统计学意义 (P 值依次分别为 $P=0.0453$, $P=0.0163$)。因此, 两组 siRNA 均可在人脑微血管内皮细胞 (hCMEC/D3) 中有效降低 *ITGB4* 的蛋白水平。随后, 我们使用活细胞成像分析仪 (Incucyte®) 检测 siRNA 处理后 hCMEC/D3 细胞的增殖情况。如图所示 (图 4C), 经单因素方差分析, 3 组间差异有统计学意义 ($F=359.5$, $P<$

0.0001); 两两比较发现 siITGB4-1、siITGB4-2 两个试验组分别与 siCtrl 组比较差异有统计学意义 (均为 $P<0.0001$)。因此, 下调 *ITGB4* 的表达可抑制脑血管内皮细胞增殖。

2.5 敲低 *ITGB4* 抑制脑血管内皮细胞成管和迁移

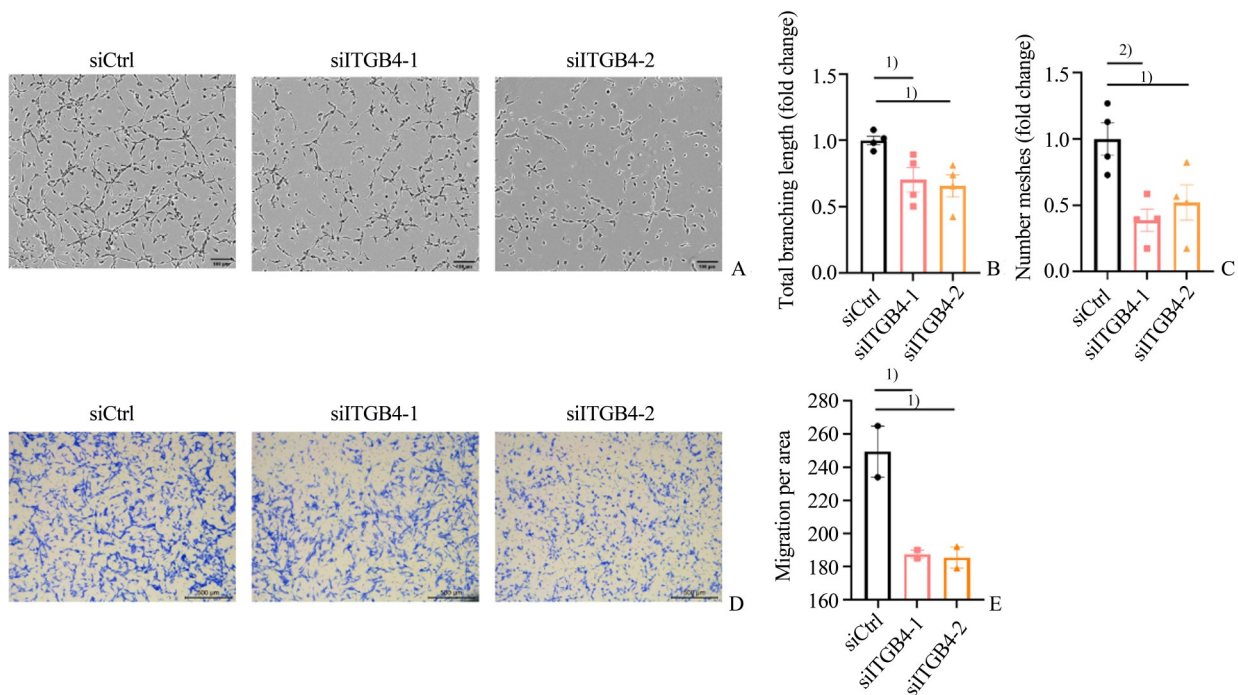
除了增殖情况, 我们还用细胞成管实验检测敲低 *ITGB4* 对脑血管内皮细胞的成管和迁移能力。如图所示 (图 5A-B), 经单因素方差分析, 3 组间成管的总分支长度差异有统计学意义 ($F=6.093$, $P=0.0212$); 两两比较发现 siITGB4-1、siITGB4-2 两个试验组分别与 siCtrl 组比较差异有统计学意义 (P 值依次分别为 $P=0.0424$, $P=0.0212$)。此外, 经单因素方差分析, 3 组间成管的总网格数量差异有统计学意义 ($F=7.762$, $P=0.0110$); 两两比较发



A, B: Western blot and quantification detecting the protein levels of ITGB4 upon knockdown. C: Quantification of proliferation capacity of hCMEC/D3 cells treated by control-siRNA (siCtrl) and ITGB4-siRNA (siITGB4-1 and -2) respectively. Two independent experiments and are shown as mean \pm s.e.m. ¹⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.001$.

图4 敲降 *ITGB4* 抑制脑血管内皮细胞增殖

Fig. 4 Knockdown of *ITGB4* inhibited the proliferation of brain endothelial cells



A: Representative graphs of tube formation of hCMEC/D3 treated by control-siRNA and ITGB4-siRNA, respectively. Scale bar: 100 μ m. B, C: Quantification of total branching length (B) and meshes (C) from siCtrl, siITGB4-1 or siITGB4-2 in hCMEC/D3. $n=4$ for each group. D, E: Representative graphs (D) and quantification (E) of migrated hCMEC/D3 cells treated by siCtrl, siITGB4-1 or siITGB4-2, respectively. $n=2$ for each group. Scale bar: 500 μ m. n represent independent experiments and are shown as mean \pm s.e.m. ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

图5 敲降 *itgb4* 抑制脑血管内皮细胞成管和迁移

Fig. 5 Knockdown of *itgb4* suppressed the tube formation and migration of brain endothelial cells

现 siITGB4-1、siITGB4-2 两个试验组分别与 siCtrl 组比较差异有统计学意义 (P 值依次为 $P=0.0091$, $P=0.0338$; 图 5C)。除此之外, 经单因素方差分析, 3 组间细胞迁移数量差异有统计学意义 ($F=13.76$, $P=0.0308$); 两两比较发现 siITGB4-1、siITGB4-2 两个试验组分别与 siCtrl 组比较差异有

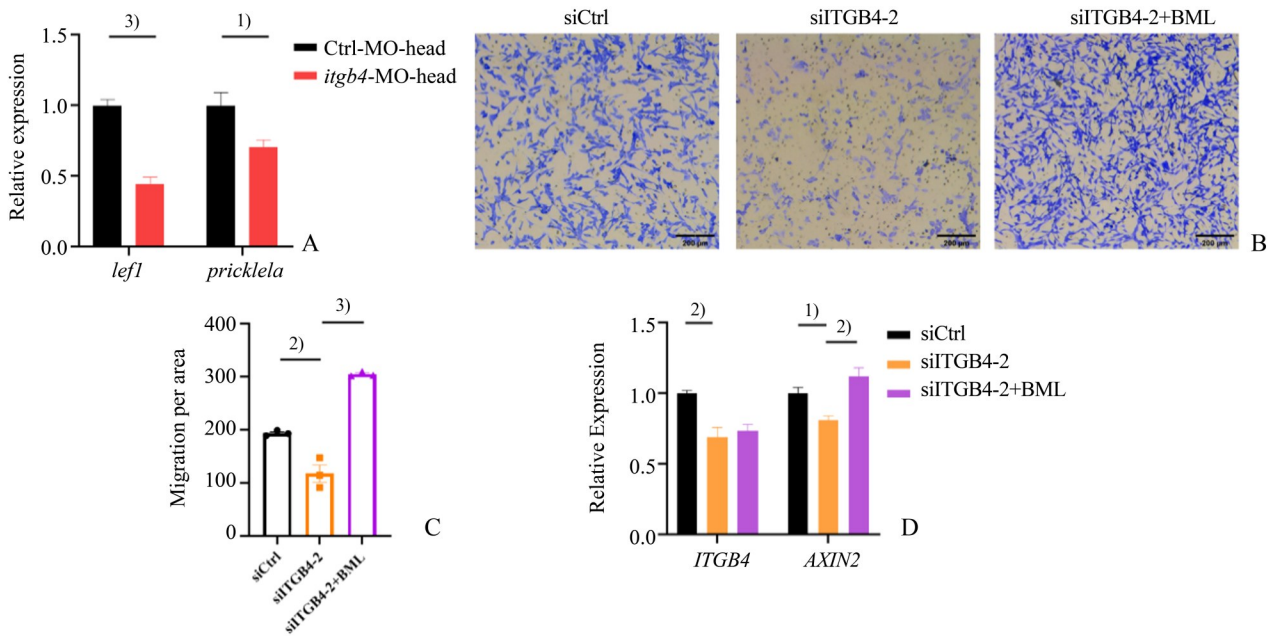
统计学意义 (P 值依次为 $P=0.0418$, $P=0.0383$; 图 5D-E)。因此, 降低 ITGB4 的表达抑制脑血管内皮细胞的成管和迁移能力。

2.6 敲低 *ITGB4* 阻碍 Wnt/ β -catenin 信号通路

Wnt/ β -catenin 通路在脑血管发育过程中发挥重要作用。因此, 为了进一步探索 *itgb4* 调控脑血

管发育的分子机制,我们在斑马鱼胚胎中敲低 *itgb4* 并检测 Wnt/β-catenin 信号通路的变化。结果显示,在斑马鱼中敲低 *itgb4* 并在 36 hpf 取其头部进行 mRNA 水平检测发现, Wnt/β-catenin 下游靶基因 *lef1* ($t=8.648, P<0.0001$) 和 *prickle1a* ($t=2.572, P=0.0422$) 明显下调(图 6A)。此外,我们在 hC-MEC/D3 细胞中探索敲低 ITGB4 后使用 Wnt/β-catenin 通路激活剂(BML-284)可否挽回细胞迁移减少的表型。如图所示(图 6B-C),经单因素方差分析,3 组间细胞迁移数量差异有统计学意义($F=95.81, P<0.0001$);两两比较发现 siCtrl、siITGB+BML-284 两组分别与 siITGB4-2 组比较差异有统计学意义($P=0.0028, P<0.0001$),且 siITGB+BML-284 组与 siITGB4-2 组相比细胞迁移明显增加。此

外,我们也检测了下游靶基因的表达情况。如图所示(图 6D),经单因素方差分析,3 组间 *ITGB4* 基因表达有统计学意义($F=12.16, P=0.0028$);两两比较发现 siITGB4-2 组与 siCtrl 组比较差异有统计学意义($P=0.0028$),但 siITGB4-2 组与 siITGB+BML-284 组比较差异无统计学意义($P>0.9999$)。此外,经单因素方差分析,3 组间 *AXIN2* 基因表达有统计学意义($F=11.47, P=0.0033$);两两比较发现 siCtrl、siITGB+BML-284 两组分别与 siITGB4-2 组比较差异有统计学意义($P=0.0325, P=0.0021$),且 siITGB+BML-284 组与 siITGB4-2 组相比 *AXIN2* 的表达明显上调。综上所述,*ITGB4* 可通过 Wnt/β-catenin 通路调控脑血管内皮细胞的功能。



A: qRT-PCR detecting the mRNA levels of the downstream targeted genes of Wnt/β-catenin pathway in zebrafish embryos. B, C: Representative graphs (B) and quantification (C) of migrated hCMEC/D3 cells treated by control-siRNA (siCtrl), siITGB4 or siITGB+BML-284, respectively. Scale bar: 200 μm. $n=3$ for each group. D: qRT-PCR detecting the mRNA levels of *ITGB4* and the downstream targeted gene of Wnt/β-catenin pathway in hC-MEC/D3 cells treated by siCtrl, siITGB4-2 or siITGB4-2+BML-284, respectively. n represent independent experiments and are shown as mean ± s.e. m; ns, not significant; ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$.

图6 敲降 *itgb4* 阻碍 Wnt/β-catenin 信号通路

Fig6 Knockdown of *itgb4* hindered the Wnt/β-catenin signaling pathway

3 讨论

脑血管作为人体循环系统中重要的血管分支,其主要作用是给脑组织输送氧气和养分^[15]。当脑

血管发育出现畸形时,可引发一系列严重的脑功能障碍以及神经系统症状。例如,大海绵状血管畸形(cerebral cavernous malformation, CCM)会出现颅内出血以及以难治性癫痫、头痛为临床特征的神经

系统症状^[16-17]。脑血管发育异常除了引起血脑屏障损害导致颅内出血之外,还会引起继发性的血管源性的脑水肿,导致颅内高压;严重时可形成脑疝导致脑死亡^[18]。因此,进一步探索与脑血管发育相关的基因,有助于更加深入地了解脑血管畸形的致病因素,为后续临床诊断和治疗提供新的方向。

斑马鱼作为生物学研究中的重要模式生物,由于它与人类脑血管系统的形态和生理功能极为相似而且其胚胎具有基因可操作性,因此以斑马鱼作为模式动物研究脑血管发育已相当成熟^[19]。除此之外,斑马鱼胚胎具有透明可视化的特点,荧光标记的斑马鱼胚胎可通过激光共聚焦显微镜动态观察脑血管的发育过程^[20]。为此,已有多种与脑血管发育相关的疾病可通过斑马鱼模型研究其发生发展的全过程。如通过构建激活素受体样激酶 I (alk1) 突变品系斑马鱼阐明了脑部动静脉畸形(arteriovenous malformations, AVMs)的发生机制,并揭示了动静脉畸形与血液流动密切相关^[21]。因此,本研究已采用斑马鱼作为模式动物,探索整合素 $\beta 4$ 在脑血管发育中的作用。我们通过体视显微镜观察斑马鱼胚胎脑组织发育情况,并发现 *itgb4*-MO 组有明显的脑水肿、脑部出血以及血脑屏障形成障碍,为此我们想进一步探索 *itgb4* 对脑血管发育的影响。此前已有文献报道,通过构建整合素 $\beta 1$ 基因敲除的斑马鱼品系,发现了斑马鱼胚胎有明显的脑部出血和脑部血管畸形^[22]。因此,我们通过共聚焦显微镜观察 72 hpf 斑马鱼胚胎,发现 *itgb4* MO 组脑血管 CtAs 的数量明显减少并且从腹侧面统计 CtAs 深入脑实质的高度也明显降低。有文献表明,脑血管尖端细胞(tip cell)受到 Gpr124/Reck 依赖的 Wnt/ β -catenin 通路调控,其功能受损时会导致斑马鱼脑血管发育缺失^[23]。此外,我们还通过查阅文

献发现,在斑马鱼胚胎中敲除整合素家族的另一个成员 *itgb1* 会导致节间血管形成减少,通过进一步观察其血管形态学的改变,发现节间血管中 tip cell 的丝状伪足明显减少^[22]。为此,我们在后续实验中,将尝试在斑马鱼胚胎中敲低 *itgb4* 观察后脑血管尖端细胞的形态变化,这可能是引起脑血管畸形的重要原因之一。

为了进一步探究 ITGB4 在脑血管内皮细胞中的作用,我们通过一系列血管内皮细胞的功能测试发现,降低 ITGB4 的表达会抑制人脑微血管内皮细胞的增殖、迁移和成管能力。ITGB4 作为整合素中重要的家族成员,已有报道 ITGB4 参与调控肿瘤细胞增殖和迁移功能^[24]。脑血管的生长同样需要血管内皮细胞增殖、迁移并且形成有效的血管管腔以维持日常生命活动^[25]。经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路作为独特调控脑血管发育的重要途径,在促进脑血管内皮细胞迁移以及血管新生方面发挥至关重要的作用。有研究表明,ITGA6 作为 ITGB4 的异源二聚体,能通过抑制蓬松蛋白 2 (dishevelled segment polarity protein 2, DVL2) 的表达从而激活 Wnt/ β -catenin 通路^[26]。本研究初步验证了 ITGB4 对脑血管内皮的功能调控依赖于 Wnt/ β -catenin 信号通路,但其具体作用机制尚未明确。除了 Wnt/ β -catenin 通路以外,VEGF 和 Notch 通路同样参与血管生长发育的调控,本研究未能完全排除 ITGB4 对上述两条通路的影响。

综上所述,本研究以斑马鱼为模式生物证实了 *ITGB4* 参与调控脑血管发育以及血脑屏障形成的过程,并且通过体外实验证明了 ITGB4 通过调控脑血管内皮细胞的增殖、迁移和成管等功能进而影响脑血管发育,该过程依赖于 Wnt/ β -catenin 通路。上述结果有望为研究脑血管畸形及其相关疾病的药物筛选提供新靶点。

参考文献

- [1] YA K, DA C. Chapter 22: Structural and signaling functions of integrins [J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2020, 1862(5):183206.
- [2] Harburger DS, Calderwood DA. Integrin signalling at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 2):159-163.
- [3] Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins [J]. *Cell Tissue Res*, 2010, 339(1):269-280.
- [4] Edwards DN, Bix GJ. Roles of blood-brain barrier integrins and extracellular matrix in stroke [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 316(2):C252-C263.
- [5] Mezu-Ndubuisi OJ, Maheshwari A. The role of integrins in inflammation and angiogenesis [J]. *Pediatr Res*,

- 2021, 89(7):1619–1626.
- [6] Engelhardt B. $\beta 1$ -integrin/matrix interactions support blood–brain barrier integrity [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31(10):1969–1971.
- [7] Iida A, Wang Z, Sehara–Fujisawa A. Disruption of integrin $\alpha 4$ in zebrafish leads to cephalic hemorrhage during development [J]. *Genes Genet Syst*, 2019, 94(4): 177–179.
- [8] Dowling J, Yu QC, Fuchs E. Beta4 integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival [J]. *J Cell Biol*, 1996, 134(2):559–572.
- [9] Guo W, Pylayeva Y, Pepe A, et al. Beta 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis [J]. *Cell*, 2006, 126(3):489–502.
- [10] Du X, Yang Y, Yang M, et al. ITGB4 deficiency induces mucus hypersecretion by upregulating MUC5AC in RSV-infected airway epithelial cells [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(1):349–359.
- [11] Ephstein Y, Singleton PA, Chen W, et al. Critical role of S1PR1 and integrin $\beta 4$ in HGF/c-Met-mediated increases in vascular integrity [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(4):2191–2200.
- [12] Welser–Alves JV, Boroujerdi A, Tigges U, et al. Endothelial $\beta 4$ integrin is predominantly expressed in arterioles, where it promotes vascular remodeling in the hypoxic brain [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(5):943–953.
- [13] Milner R, Campbell IL. Increased expression of the beta4 and alpha5 integrin subunits in cerebral blood vessels of transgenic mice chronically producing the pro-inflammatory cytokines IL-6 or IFN- α in the central nervous system [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2006, 33(4):429–440.
- [14] Welser JV, Halder SK, Kant R, et al. Endothelial $\alpha 6\beta 4$ integrin protects during experimental autoimmune encephalomyelitis-induced neuroinflammation by maintaining vascular integrity and tight junction protein expression [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1):217.
- [15] Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2008, 73(7):751–762.
- [16] Satzer D, Tao JX, Issa NP, et al. Stereotactic laser interstitial thermal therapy for epilepsy associated with solitary and multiple cerebral cavernous malformations [J]. *Neurosurg Focus*, 2020, 48(4):E12.
- [17] Schuss P, Marx J, Borger V, et al. Cavernoma-related epilepsy in cavernous malformations located within the temporal lobe: surgical management and seizure outcome [J]. *Neurosurg Focus*, 2020, 48(4):E6.
- [18] Kim BS, Sarma D, Lee SK, et al. Brain edema associated with unruptured brain arteriovenous malformations [J]. *Neuroradiology*, 2009, 51(5):327–335.
- [19] Walcott BP, Peterson RT. Zebrafish models of cerebrovascular disease [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2014, 34(4):571–577.
- [20] Kugler EC, Frost J, Silva V, et al. Zebrafish vascular quantification: a tool for quantification of three-dimensional zebrafish cerebrovascular architecture by automated image analysis [J]. *Development*, 2022, 149(3): dev199720.
- [21] Corti P, Young S, Chen CY, et al. Interaction between alk1 and blood flow in the development of arteriovenous malformations [J]. *Development*, 2011, 138(8):1573–1582.
- [22] Iida A, Wang Z, Hirata H, et al. Integrin $\beta 1$ activity is required for cardiovascular formation in zebrafish [J]. *Genes Cells*, 2018, 23(11):938–951.
- [23] Vanhollebeke B, Stone OA, Bostaille N, et al. Tip cell-specific requirement for an atypical Gpr124- and Reck-dependent Wnt/ β -catenin pathway during brain angiogenesis [J]. *eLife*, 2015, 4.
- [24] Shi WK, Shang QL, Zhao YF. SPC25 promotes hepatocellular carcinoma metastasis via activating the FAK/PI3K/AKT signaling pathway through ITGB4 [J]. *Oncol Rep*, 2022, 47(5).
- [25] Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development [J]. *Nature*, 2005, 438(7070):937–945.
- [26] Groulx JF, Giroux V, Beauséjour M, et al. Integrin $\alpha 6A$ splice variant regulates proliferation and the Wnt/ β -catenin pathway in human colorectal cancer cells [J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(6):1217–1227.