

滑珂鑫,彭宇娜,孙煜,等. Wnt/ β -catenin/VEGF通路在副猪嗜血杆菌引起猪内皮细胞损伤中的作用[J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(5): 186-192. DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.05.021

Wnt/ β -catenin/VEGF通路在副猪嗜血杆菌引起猪内皮细胞损伤中的作用

滑珂鑫¹, 彭宇娜¹, 孙煜¹, 张俐文¹, 张四化², 万云², 金卉¹

1. 华中农业大学动物科学技术学院、动物医学院, 武汉430070; 2. 武汉市动物疫病预防控制中心, 武汉430016

摘要 为探究副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)引起猪渗出性炎症的过程中血管内皮屏障的变化情况,以HPS感染原代猪血管内皮细胞,通过Western blot和荧光定量PCR检测HPS对Wnt/ β -catenin通路及其下游靶基因表达的影响,并通过间接免疫荧光和跨内皮电阻测定检测细胞间黏附连接结构的改变。结果显示:HPS感染激活猪内皮细胞中的Wnt/ β -catenin信号通路,促使胞质中的 β -catenin蛋白发生核转位,导致胞膜处由 β -catenin和血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin)构成的黏附连接结构被破坏,细胞通透性增加。抑制Wnt/ β -catenin通路下游血管内皮生长因子(VEGF)基因的表达,可以明显抑制 β -catenin的核转位,显著恢复内皮细胞间 β -catenin和VE-cadherin构成的黏附连接结构,恢复内皮细胞通透性。以上研究结果表明,HPS通过激活猪内皮细胞中Wnt/ β -catenin通路,破坏细胞间黏附连接,增加内皮细胞通透性;同时,Wnt/ β -catenin通路下游VEGF基因通过正反馈调节效应放大了HPS感染引起的Wnt/ β -catenin信号通路的激活效应和细胞结构的损伤。

关键词 副猪嗜血杆菌; Wnt/ β -catenin信号通路; 血管内皮生长因子; 黏附连接; 细胞通透性

中图分类号 S852.61 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)05-0186-07

副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)早期定殖于猪上呼吸道,在猪处于应激、免疫力低下等情况时侵入动物机体,引起以全身性的渗出性纤维素炎为特征的猪格拉泽氏病(Gläsner's disease),严重时死亡率可达50%^[1-2]。然而,目前对于HPS引起渗出性纤维素炎的病理机制缺乏充分研究。渗出性炎症的发生表明在HPS感染过程中,血管内皮通透性增加。在针对出血性休克疾病的研究中发现,微血管通透性过高主要由于内皮细胞间黏附连接(adherens junctions, AJs)结构受到破坏^[3],内皮细胞间AJs由血管内皮钙黏蛋白(vascular endothelial-cadherin, VE-cadherin)通过其胞外结构域与相邻内皮细胞的VE-cadherin形成同型性黏附,同时通过胞内结构域与 β -catenin连接,VE-cadherin/ β -catenin复合物共同锚定在构成细胞骨架的肌动蛋白上^[4]。 β -catenin除了作为构成AJs的结构蛋白,同时也是经典Wnt/ β -catenin信号通路中的核心信号转导蛋

白^[5]。Wnt/ β -catenin通路被激活后, β -catenin通过转位入核发挥转录调控作用,调节通路下游纤溶酶原激活抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)、胶原蛋白Ⅲ(collagen Ⅲ)、纤连蛋白(fibronectin)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等与细胞黏附及迁移相关基因的表达,影响细胞通透性和移动性^[6-7]。

Wnt/ β -catenin信号通路的下游靶基因VEGF通过与其受体VEGFR结合,阻断细胞连接中信号的传递,增强血管渗漏。VEGF加强血管通透性的作用强于组织胺约50 000倍^[8]。细胞超微结构研究显示,VEGF处理后的血管内皮细胞间出现大量裂隙及血管基底膜的退行性病变。临床血管渗漏相关研究表明,VEGF可以在15 min内切断内皮细胞中VE-cadherin/ β -catenin复合体间的连接,引起内皮通透性增高^[9-10]。

本研究解析HPS感染过程中Wnt/ β -catenin信

收稿日期: 2023-05-08

基金项目:湖北省自然科学基金杰出青年人才项目(2020CFA060);湖北省自然科学基金创新群体项目(2021CFA016);国家自然科学基金面上项目(31972643; 31572486)

滑珂鑫, E-mail: huakexin@mail.hzau.edu.cn

通信作者: 金卉, E-mail: jinhui@mail.hzau.edu.cn

号通路对内皮细胞间黏附连接结构变化的调节作用,分析 Wnt/ β -catenin 信号通路对内皮细胞通透性的影响。初步探究 HPS 引起渗出性纤维素炎的分子机制,旨在为疫苗设计和药物靶标选择奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞与菌株

猪血管内皮细胞 (porcine aortic endothelial cell, PAEC) 为原代分离细胞,根据 Beijnum 等^[11]的方法从 30 日龄的仔猪主动脉中分离。PAEC 使用添加 10% 胎牛血清且不含抗生素的 M199 培养基于 37 ℃、5% CO₂ 条件下进行细胞培养。副猪嗜血杆菌 SH0165 株为笔者所在研究室保存,在 TSA 培养基中复苏,挑取单菌落到含 5% 牛血清和 1% NAD 的 TSB 培养基中 200 r/min 振荡培养过夜至 OD_{600 nm} = 0.6。菌液收集至离心管中,12 000 r/min 离心 10 min, PBS 洗涤 3 次后用于感染细胞。

1.2 Western blot 检测

待细胞长至 80% 融合时进行 siRNA 转染或 HPS 感染。高毒力 HPS 菌株 HPS-SH0165 (10⁸ CFU/mL) 感染相应时间后收样。siRNA 转染 24 h 后继续用 HPS 感染 12 h 后收样。阴性对照组 (CON) 或 siRNA 对照组 (NC) 加入等体积 PBS 处理。LiCl (20 mmol/L) 作为 Wnt/ β -catenin 通路激活

的阳性对照。IWR-1-endo (10 μ mol/L) 处理作为抑制 Wnt/ β -catenin 通路激活的对照。PBS 洗涤细胞 3 次,每孔加入 200 μ L 裂解液裂解细胞。收集细胞裂解液与 2 \times SDS-PAGE 上样缓冲液混匀,沸水浴 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清上样。细胞膜质核蛋白分离样品根据试剂盒说明书制备。将 SDS-PAGE 胶中的蛋白质转印至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后放入根据说明书稀释的一抗和二抗溶液中分别孵育 2 h 和 1 h。洗涤 3 次后经成像仪显影。LiCl 购自 Sigma 公司。 β -catenin 抗体为 SantaCruz 公司产品。磷酸化 β -catenin 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司。 β -actin 抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自碧云天生物技术研究

1.3 实时荧光定量 RT-PCR (qRT-PCR) 检测基因 mRNA 水平

根据说明书使用 Omega 公司的细胞 RNA 提取试剂盒及反转录试剂盒提取细胞总 RNA 并反转录成 cDNA, 按照 SYBR Green Real-time PCR Mix 说明书检测细胞中待测基因 mRNA 水平, 程序为: 94 ℃ 预扩增 10 min; 94 ℃ 变性 15 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 40 个循环。mRNA 相对表达水平的定量采用比较 Ct 法来计算相对定量, 基因的相对 mRNA 表达水平通过 GAPDH 来标准化。荧光定量检测引物序列见表 1。

表 1 本研究所用的荧光定量引物序列

Table 1 The sequences of primers used in this study for qRT-PCR

基因 Gene	正向引物 (5'-3') Forward (5' to 3')	反向引物 (5'-3') Reverse (5' to 3')
VE-cadherin	ACCACGAGATGTGAAGTTCAA	GTGATGTTGGCCGTGTTATCG
Collagen III	GCATTCTTCGACTTCTCTCTAG	TTCCATGTACGCAATGCTATT
Fibronectin	GAACCAGCAACCGAGTACACAA	CCCGATCAGAGGCTCACTCT
VEGF	GCTCTCTGGGTGCATTGGA	GCAGCCTGGGACCACTTG
PAI-1	TGCCGCCCTACGA	TGAGCTGAGCGTCCAGAATG
GAPDH	CCCCAACGTGTCGGTTGT	CCTGCTTCACCACCTTCTTGA

1.4 间接免疫荧光试验

接种 PAEC 于细胞爬片上, 培养至 50%~60% 融合后进行 siRNA 转染、抑制剂预处理或直接进行细菌感染。各组细胞处理方法本文“1.2”所述。HPS (10⁸ CFU/mL) 感染 12 h 后依次使用 4% 多聚甲醛和 0.5% TritonX-100 于室温进行固定和通透。5% BSA 封闭 1 h 后依次使用一抗和荧光二抗各孵育 1 h。经 DAPI 染色 15 min 后用 50% 甘油封片, 使用激光共聚焦显微镜观察。Alexa Fluor 标记的羊抗兔及羊抗

鼠 IgG 购自碧云天生物技术研究

1.5 跨内皮电阻测定

在 Transwell 培养系统的上层小室中接种 PAEC 细胞, 按照说明书使用 EVOM2 仪器连续监测其 TEER 值直至数值稳定, 接种 HPS (10⁸ CFU/mL) 感染后连续监测上层小室细胞的 TEER 值, 记录数值。

1.6 小干扰 RNA (siRNA) 转染

细胞培养至 80% 融合后, 按脂质体转染试剂盒

说明书对各组细胞分别进行 siRNA 转染,每孔细胞转染 40 pmol 的 siRNA。转染 24 h 后进行 HPS(10⁸ CFU/mL)感染。各组细胞处理方法本文“1.2”所述。各干扰因子和阴性对照(negative control,NC)siRNA 由上海吉玛公司设计合成(序列见表 2),根据说明书要求配制。

表 2 本研究中所用的干扰因子序列

基因 Gene	正向序列(5'-3') Sense sequence (5' to 3')	反向序列(5'-3') Anti-sense sequence (5' to 3')
siVEGF-1	GCAGAUUAUGCGGAUCAAATT	UUUGAUCCGCAUAAUCUGCTT
siVEGF-2	GCGGAGAAAGCAUUGUUUTT	AAACAAAUGCUUUCUCCGCTT
siVEGF-3	GCGAGGCAGCUUGAGUUAATT	UUAACUCAAGCUGCCUCGCTT
Negative control	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

1.7 统计学分析

所有试验进行 3 次独立重复检测,数据以平均值±标准误差(SEM)表示。使用单向方差(ANOVA)进行统计学显著性分析。*表示其统计值存在显著差异, $P<0.05$;**表示其统计值存在极显著差异 $P<0.01$ 。统计分析使用软件 Prism 8(GraphPad)。

2 结果与分析

2.1 HPS 感染 PAEC 对 Wnt/ β -catenin 信号通路活性及其下游靶基因表达的影响

Western blot 检测结果显示,HPS-SH0165 感染后 PAEC 中 β -catenin 的蛋白水平呈时间依赖性增

高,磷酸化 β -catenin(p- β -catenin)水平显著降低,表明 HPS 感染的 PAEC 中 Wnt/ β -catenin 通路被激活(图 1A)。荧光定量 PCR 检测结果显示,HPS-SH0165 感染 PAEC 后,Wnt/ β -catenin 通路下游维持细胞与基底的黏附力的纤连蛋白(fibronectin)和胶原蛋白Ⅲ(collagen Ⅲ)基因表达量下降,促进细胞迁移的纤溶酶原激活物抑制物(PAI-1)基因和和促进内皮细胞渗漏的血管内皮生长因子(VEGF)基因表达量明显上调,表明 HPS 感染激活 PAEC 中的 Wnt/ β -catenin 通路促使内皮细胞黏附性降低、移动性增加,使得内皮细胞构成的屏障稳定性被破坏(图 1B)。

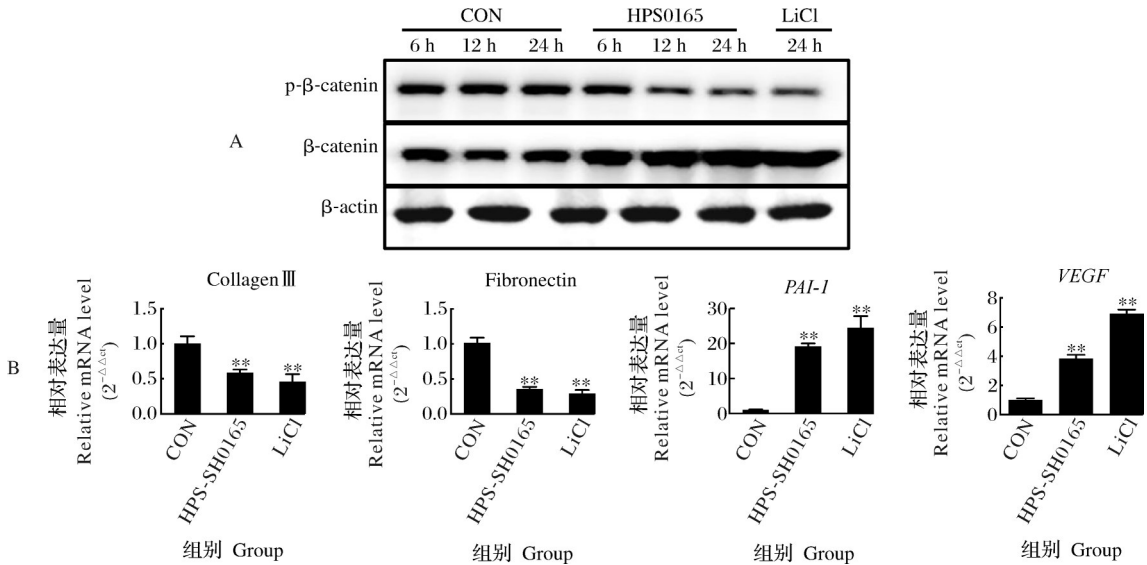


图 1 HPS 感染的 PAEC 中 Wnt/ β -catenin 通路活性(A)及下游靶基因表达水平(B)变化
Fig.1 Changes in Wnt/ β -catenin pathway activity (A) and expression levels of downstream target genes (B) in HPS-infected PAEC

2.2 HPS 对 PAEC 中 β -catenin 蛋白核转位效应的影响

分离提取 PAEC 不同细胞结构中的蛋白质,经过 Western blot 检测发现,HPS-SH0165 刺激 PAEC

后,胞膜上的 β -catenin 含量减少,而胞质和胞核中 β -catenin 蛋白水平显著增加(图 2A)。间接免疫荧光试验的结果同样显示,HPS-SH0165 刺激 PAEC 后,胞膜上的 β -catenin 含量减少, β -catenin 聚集于胞质并

大量转位入核(图 2B)。该结果进一步证明 HPS 对 PAEC 中 Wnt/ β -catenin 通路的激活效应。

2.3 Wnt/ β -catenin 通路对 HPS 感染的 PAEC 中黏附连接结构及细胞通透性的影响

间接免疫荧光检测结果显示, HPS 感染的 PAEC 细胞中 β -catenin 转位入核, VE-cadherin 表达水皮降低, 胞膜处构成细胞间黏附连接结构的 β -catenin/VE-cadherin 复合物减少。在使用 Wnt/ β -catenin 通路特异性抑制剂 IWR-1-endo 处理后,

HPS 感染的 PAEC 中 β -catenin 的核转位效应减弱, VE-cadherin 表达水平升高, β -catenin/VE-cadherin 复合物含量明显恢复(图 3A)。Transwell 检测结果显示, HPS 刺激后, PAEC 形成的单层细胞屏障通透性增强, 在用 Wnt/ β -catenin 通路特异性抑制剂 IWR-1-endo 处理后通透性明显恢复(图 3B)。以上结果表明, Wnt/ β -catenin 通路介导了对 HPS 感染时内皮细胞间黏附连接结构的调控, 从而影响血管内皮细胞通透性。

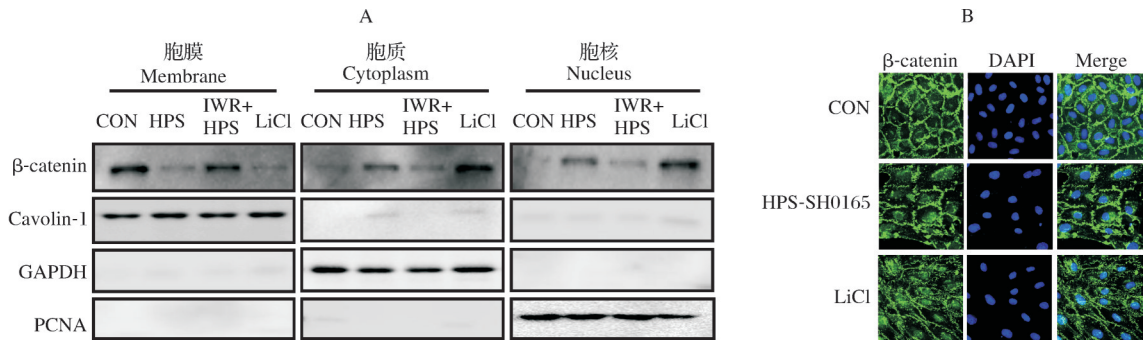


图2 Western blot (A)和间接免疫荧光(B)检测HPS感染的PAEC中 β -catenin的核转位效应
Fig.2 Western blot (A) and indirect immunofluorescence (B) detection of nuclear translocation of β -catenin in HPS-infected PAEC

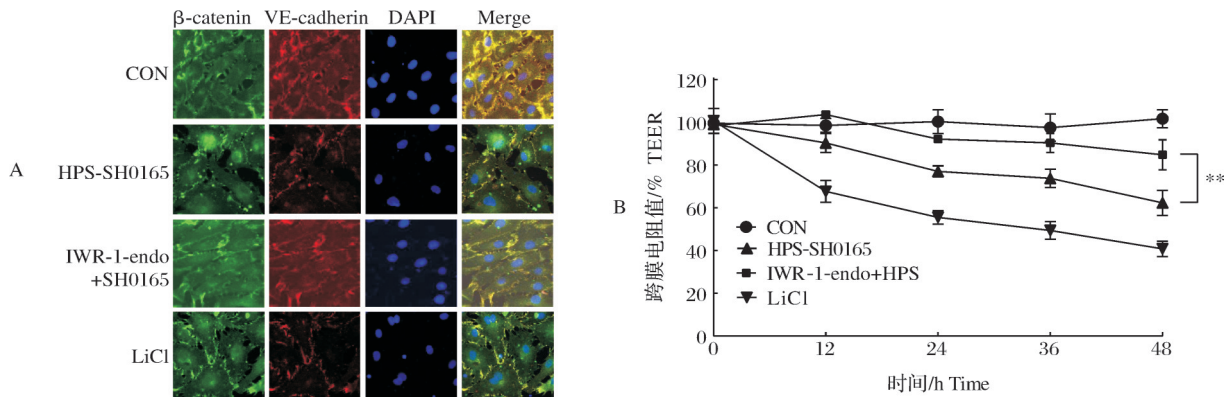


图3 HPS感染的PAEC中黏附连接结构(A)及细胞通透性(B)的变化

Fig.3 Changes in the structure of adherens junctions (A) and cell permeability (B) of HPS-infected PAEC

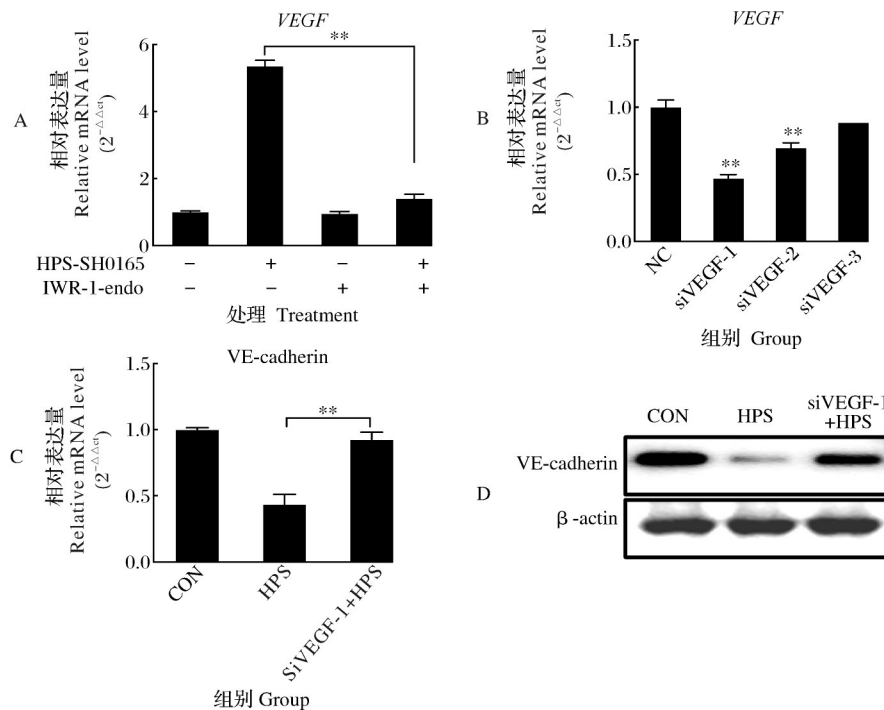
2.4 VEGF对HPS感染的PAEC中VE-caherin表达水平的影响

荧光定量检测结果显示, HPS 感染可以引起 VEGF 基因的显著上调, 在抑制 Wnt/ β -catenin 通路活性后, VEGF 的表达量明显下降, 表明 Wnt/ β -catenin 通路调控 HPS 感染引起的 PAEC 中 VEGF 基因的表达(图 4A)。筛选特异性沉默猪 VEGF 基因的 siRNA 抑制 PAEC 中 VEGF 基因的表达(图 4B), 荧光定量(图 4C)及 Western blot(图 4D)检测发现, 抑制 VEGF 表达可以显著恢复 HPS 感染的 PAEC 中 VE-cadherin 的表达水平。以上结

果表明, HPS 通过激活 Wnt/ β -catenin 通路上调 VEGF 表达, 促使 PAEC 中 VE-cadherin 的表达水平降低。

2.5 VEGF对HPS感染的PAEC中黏附连接结构的影响

间接免疫荧光检测结果显示, 抑制 VEGF 可以明显恢复 HPS 感染的 PAEC 胞膜处 VE-cadherin 的蛋白水平, 同时显著减少 β -catenin 的核转位, 增加胞膜处 β -catenin/VE-cadherin 复合物含量, 恢复内皮细胞间黏附连接结构(图 5A)。表明 VEGF 对 Wnt/ β -catenin 通路激活引起的 β -catenin 核转位存在放大反馈调节作用, 同时 HPS 上调 VEGF 可以显著抑制



A: 加入 Wnt/ β -catenin 通路抑制剂后 *VEGF* 表达水平的变化; B: siRNA 对 *VEGF* 表达水平的干扰; C, D: 荧光定量 PCR (C) 和 Western blot (D) 检测抑制 *VEGF* 表达后 VE-cadherin 表达水平。A: Changes of *VEGF* expression level after addition of Wnt/ β -catenin pathway inhibitors; B: Interference of *VEGF* expression levels by siRNA; C, D: The expression level of VE-cadherin was detected by fluorescence quantitative PCR (C) and Western blot (D).

图4 HPS感染的PAEC中 *VEGF* 对 Wnt/ β -catenin 通路活性的调控作用

Fig.4 Regulatory effect of *VEGF* on the activity of Wnt/ β -catenin pathway in PAECs infected with HPS

PAEC 中 VE-cadherin 的表达。Transwell 试验结果显示抑制 *VEGF* 的表达可以明显降低 HPS 感染时单层 PAEC 的通透性 (图 5B)。以上结果表明, HPS 感

染的 PAEC 中, *VEGF* 可以通过对 Wnt/ β -catenin 通路的放大反馈调节作用进一步破坏内皮细胞间黏附连接结构及内皮屏障的完整性。

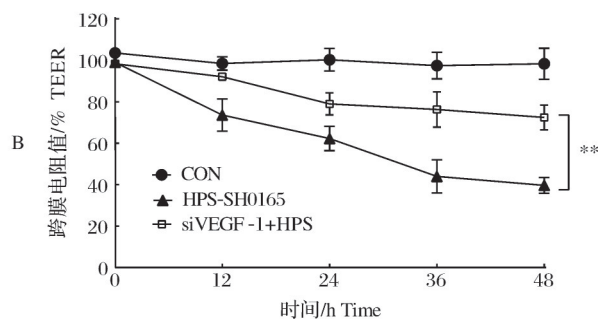
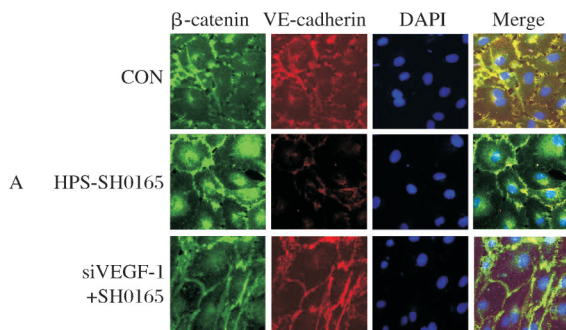


图5 干扰 *VEGF* 对 HPS 感染的 PAEC 中 *VEGF* 介导的黏附连接结构 (A) 及细胞通透性 (B) 的调控作用

Fig.5 Regulation of *VEGF*-mediated adhesion structure (A) and cell permeability (B)

in PAEC with interference of *VEGF* in HPS infection

3 讨论

前期研究表明, 在 HPS 感染过程中, 猪肺泡巨噬细胞分泌的抵抗素 (resistin) 可以破坏血管内皮细胞间由 Claudin-5 和 Occludin 蛋白构成的紧密连接结构

(tight junctions)^[12]。但在该研究中发现, 抵抗素对内皮细胞中负责构成黏附连接的 VE-cadherin 表达水平没有明显影响。本研究结果显示, HPS 可以通过 Wnt/ β -catenin 通路直接调控 PAEC 中 VE-cadherin 的表达, 而不依赖于抵抗素的调节作用。

在HPS感染过程中,Wnt/ β -catenin 信号通路的作用存在一定的复杂性。在以上皮细胞作为HPS感染模型的研究中发现,HPS激活Wnt/ β -catenin 信号通路后,可以抑制上皮细胞中E-cadherin的表达,同时促进间质细胞标志性基因N-cadherin的表达,促使上皮细胞表型向间质细胞转变,即发生上皮-间质转换效应(epithelial-mesenchymal transition, EMT),从而破坏上皮细胞屏障的稳定性,促进细菌向宿主全身的扩散^[13-14]。在此过程中,Wnt/ β -catenin 通路通过调控下游TCF/LEF 转录因子(如Snail 和Slug)与E-cadherin 基因启动子区域结合,直接调控细胞中E-cadherin 的表达^[15-16]。然而,目前尚未有研究证明Wnt/ β -catenin 通路可以直接调控VE-cadherin 的表达,本研究的结果显示,在HPS感染过程中,Wnt/ β -catenin 通路通过上调VEGF 表达,降低PAEC 中VE-cadherin 的表达水平,抑制VE-cadherin 在细胞间形成黏附连接。有研究表明,VEGF 对VE-cadherin 的调控在血管重塑与生成、人类卵巢癌的病理学腹水形成等生理和病理过程中都具有重要作用^[17-18],这与本研究的结果相符。

综上所述,本研究证明Wnt/ β -catenin 通路介导HPS感染的猪内皮细胞中黏附连接结构的断裂,促使内皮细胞结构受损、细胞通透性增加。同时,HPS感染上调Wnt/ β -catenin 通路下游靶基因VEGF 的表达,VEGF 通过正反馈调节放大HPS感染引起的Wnt/ β -catenin 通路的激活效应,并抑制PAEC 中VE-cadherin 的表达。本研究解析了HPS感染过程中Wnt/ β -catenin 通路对内皮细胞结构完整性的调节作用,明确了VEGF 在HPS引起内皮屏障损伤的过程中所发挥的正反馈放大效应。

参考文献 References

- [1] OLIVEIR S, PIJOAN C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control [J]. Veterinary microbiology, 2004, 99(1): 1-12.
- [2] 李继强. 副猪嗜血杆菌病的诊断和防治[J]. 中国畜牧业, 2022(6): 114-115. LI J Q. Diagnosis, prevention and treatment of *Haemophilus parasuis* disease [J]. China animal industry, 2022(6): 114-115(in Chinese).
- [3] THARAKAN B, HELLMAN J, SAWANT D, et al. β -catenin dynamics in the regulation of microvascular endothelial cell hyperpermeability [J]. Shock, 2012, 37(3): 306-311.
- [4] BALUK P, MCDONALD D. Buttons and zippers: endothelial junctions in lymphatic vessels [J/OL]. Cold spring harbor perspectives in medicine, 2022, 12(2): a041178 [2023-05-08]. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041178>.
- [5] AKHMETSHINA A, PALUMBO K, DEES C, et al. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- β -mediated fibrosis [J/OL]. Nature communication, 2012, 3: 735 [2023-05-08]. <https://doi.org/10.1038/ncomms1734>.
- [6] MATSUZAKI S, DARCHA C. Involvement of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in the cellular and molecular mechanisms of fibrosis in endometriosis [J/OL]. PLoS One, 2013, 8: e76808 [2023-05-08]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076808>.
- [7] ZHOU D, TAN R, ZHOU L, et al. Kidney tubular β -catenin signaling controls interstitial fibroblast fate via epithelial-mesenchymal communication [J/OL]. Scientific reports, 2013, 3: 1878 [2023-05-08]. <https://doi.org/10.1038/srep01878>.
- [8] SIMUNOVIC F, FINKENZELLER G. Vascularization strategies in bone tissue engineering [J/OL]. Cells, 2021, 10(7): 1749 [2023-05-08]. <https://doi.org/10.3390/cells10071749>.
- [9] WALLEZ Y, HUBER P. 2008. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis [J]. Biochimica et biophysica acta (BBA)-biomembranes, 2008, 1778(3): 794-809.
- [10] BATES D. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability [J]. Cardiovascular research, 2010, 87(2): 262-271.
- [11] BEIJNUM J, ROUSCH M, CASTERMANS K, et al. Isolation of endothelial cells from fresh tissues [J]. Nature protocol, 2008, 3(6): 1085-1091.
- [12] HUA KLIT, HE Y, et al. Resistin secreted by porcine alveolar macrophages leads to endothelial cell dysfunction during *Haemophilus parasuis* infection [J/OL]. Virulence, 2023, 2171636 [2023-05-08]. <https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2171636>.
- [13] 滑珂鑫. 抵抗素和p38 MAPK/Wnt 信号通路介导副猪嗜血杆菌感染引起细胞损伤的机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2021. HUA K X. Mechanisms of resistin- and p38 MAPK/Wnt pathway-mediated cell damage caused by *Haemophilus parasuis* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021(in Chinese with English abstract).
- [14] LOH C Y, CHAI J Y, TANG T F, et al. The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: signaling, therapeutic implications, and challenges [J/OL]. Cells, 2019, 8(10): 1118 [2023-05-08]. <https://doi.org/10.3390/cells8101118>.
- [15] ONDER T, GUPTA P, MANI S, et al. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways [J]. Cancer research, 2008, 68(10): 3645-3654.
- [16] NELSON W, NUSSE R. Convergence of Wnt, β -catenin, and cadherin pathways [J]. Science, 2004, 303(5663): 1483-1487.
- [17] CAO J, EHLING M, SEEBACH J, et al. Polarized actin and VE-cadherin dynamics regulate junctional remodelling and cell

- migration during sprouting angiogenesis [J/OL]. Nature communications, 2017, 8(1): 2210[2023-05-08]. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02373-8>.
- [18] BEKES I, FRIEDL T, KOHLER T, et al. Does VEGF facilitate local tumor growth and spread into the abdominal cavity by suppressing endothelial cell adhesion, thus increasing vascular peritoneal permeability followed by ascites production in ovarian cancer?[J]. Molecular cancer, 2016, 15: 1-13.

Role of Wnt/ β -catenin/VEGF pathway in endothelial cell damage caused by *Haemophilus parasuis* in pigs

HUA Kexin¹, PENG Yuna¹, SUN Yu¹, ZHANG Liwen¹, ZHANG Sihua², WAN Yun², JIN Hui¹

1. College of Animal Science and College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Wuhan Animal Disease Control Center, Wuhan 430016, China

Abstract To investigate the changes of vascular endothelial barrier during exudative inflammation caused by *Haemophilus parasuis* (HPS) in pigs, primary pig vascular endothelial cells were infected with HPS. The effects on the expression of the Wnt/ β -catenin pathway and its downstream target genes were detected by Western blot and fluorescence quantitative PCR, and the alterations in the structure of intercellular adhesion junctions were detected by indirect immunofluorescence and transendothelial electrical resistance assay. The results showed that HPS infection activated Wnt/ β -catenin pathway in porcine endothelial cells, and induced nuclear translocation of β -catenin protein in the cytoplasm, resulting in the destruction of the adhesive junction structure composed of β -catenin and VE-cadherin at the cell membrane and the increase of cell permeability. Moreover, inhibition of the expression of *VEGF* gene downstream of Wnt/ β -catenin pathway significantly suppressed the nuclear translocation of β -catenin and markedly restored the intercellular adherens junctions composed of β -catenin and VE-cadherin, which benefits the recovery of endothelial cell permeability. These results suggested that HPS infection disrupted intercellular adherens junctions and increased endothelial cell permeability by activating the Wnt/ β -catenin pathway in porcine endothelial cells; meanwhile, the *VEGF* gene downstream of the Wnt/ β -catenin pathway amplifies the Wnt/ β -catenin pathway activity and cell damage induced by HPS infection through a positive feedback.

Keywords *Haemophilus parasuis*; Wnt/ β -catenin signaling pathway; vascular endothelial growth factor (VEGF); adherens junction; cell permeability

(责任编辑:边书京)