

文章编号:1004-7220(2016)02-0160-07

# 长链非编码 RNA XR007793 在病理性高张应变诱导平滑肌细胞增殖中的作用

王凯旋, 包晗, 姚庆革, 齐颖新

(上海交通大学 生命科学技术学院, 力学生物学研究所, 上海 200240)

**摘要:** **目的** 探讨高血压条件下异常升高的周期性张应变刺激对血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 增殖活性的影响以及 VSMCs 中一种长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) XR007793 在其中可能的作用。 **方法** 应用体外周期性张应变加载系统 Flexcell-4000 对 VSMCs 分别施加 5% 生理性张应变和 15% 病理性高张应变, 加载频率为 1.25 Hz, 加载时间 24 h。荧光实时定量 PCR 检测 XR007793 及其共表达基因: 信号转导与转录激活因子 2 (STAT2)、细胞分裂相关蛋白 8 (CDCA8)、原癌基因 LMO2 和干扰素调节因子 (IRF7) 的表达变化, Western blotting 方法检测增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 表达变化, RNA 干扰技术抑制 VSMCs 的 XR007793 表达, 静态条件下流式细胞术检测 VSMCs 周期变化, 牵拉条件下 Brdu 检测 VSMCs 增殖变化情况。 **结果** 与 5% 生理性张应变组相比, 15% 病理性高张应变显著下调 XR007793 表达水平, 促进 VSMCs 增殖活性并上调 STAT2 和 CDCA8 的表达水平。静态条件下干扰 XR-007793, VSMC 增殖水平显著上升。高周期性张应变条件下干扰 XR-007793, VSMC 增殖水平上升, CDCA8 表达水平上升。 **结论** 病理性高张应变可能通过降低 XR007793 表达来影响 CDCA8 表达变化, 进而调控 VSMCs 增殖功能变化过程。研究结果为阐明高血压条件下血管重建机制和药物治疗靶标的研究提供新的实验依据。

**关键词:** 高血压; 周期性张应变; 血管平滑肌细胞; 长链非编码 RNA; 细胞增殖

中图分类号: R318.01 文献标志码: A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2016.02.160

## The role of lncRNA-XR007793 in hypertensively cyclic strain induced-proliferation of vascular smooth muscle cells

WANG Kai-xuan, BAO Han, YAO Qing-ping, QI Ying-xin (*Institute of Mechanobiology and Medical Engineering, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China*)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of pathologically elevated-cyclic strain induced by hypertension on proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) and the role of long non-coding RNA (lncRNA)-XR007793 during this process. **Methods** Flexcell-4000 tension system was used to apply physiologically (5% magnitude) and pathologically (15% magnitude) cyclic strain with frequency of 1.25 Hz on VSMCs for 24 h respectively. qRT-PCR was used to detect the expression of XR007793 and 4 co-expressed genes: signal transducer and activator of transcription 2 (STAT2), cell division cycle associated 8 (CDCA8), proto-oncogene LMO2 and interferon regulatory factor (IRF7). Western blot was used to detect the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) level in VSMCs. RNA interference was used to inhibit XR007793 expression. The cell cycle of VSMCs was measured by flow cytometry in static condition and the cell proliferation was detected by Brdu-Elisa in cyclic strain loading condition. **Results** Compared with 5% cyclic strain, 15% cyclic strain remarkably decreased the

收稿日期:2015-11-18; 修回日期:2016-01-11

基金项目:国家自然科学基金项目(11202133,11222223,11232010)。

通信作者:齐颖新,研究员, E-mail: qiyx@sjtu.edu.cn;姚庆革,助理研究员, E-mail: qpyao@sjtu.edu.cn。

XR007793 level and increased the proliferation of VSMCs, along with the increasing expression of STAT2 and CDCA8. XR007793 specific siRNA transfection under static condition decreased the expression of XR007793 and increased the VSMC proliferation. Under 15% cyclic strain, XR007793 specific siRNA transfection also increased the VSMC proliferation and the expression of CDCA8 compared with the non-specific siRNA control. **Conclusions** Pathologically elevated-cyclic strain decreases the XR007793 expression level and increases the CDCA8 expression level to modulate VSMC proliferation. These results provide new experimental evidence for the study of mechanobiological mechanism during hypertension and potential targets for hypertension therapy.

**Key words:** Hypertension; Cyclic strain; Vascular smooth muscle cells; Long non-coding RNA; Cell proliferation

高血压是一种常见的心血管疾病,其发生机制一直是心血管领域研究的热点之一。研究显示,血管重建是高血压发生的基本病理过程,其中力学因素发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。高血压病理条件下,血管壁中膜层血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)所承载的周期性张应变(应力)上升,例如高血压患者肱动脉的周期性张应变可高达15%以上<sup>[2]</sup>。体外研究表明,不同力学条件的周期性张应变对 VSMCs 表型转变、迁移、增殖等功能有不同调控作用<sup>[3-5]</sup>。目前认为,周期性张应变刺激能够激活细胞表面不同的机械感受器,并将机械刺激信号转变为生物响应信号传导进细胞内,激活不同的信号通路,实现对基因表达和细胞功能的调节作用<sup>[6-7]</sup>。Li 等<sup>[8]</sup>研究发现,频率 1 Hz、幅度 15% 的张应变可以通过激活 Ras/Rac 依赖的 p38 信号分子,促进体外培养的 VSMCs 迁移。Morrow 等<sup>[9]</sup>研究表明,生理性张应变通过抑制 Notch/CBF-1/RBP-J $\kappa$  信号转导通路降低 VSMCs 的增殖活性;病理性高张应变通过下调 Rho-GDI $\alpha$  表达,引起 Rac1 和 p38 磷酸化,从而促进 VSMCs 增殖。细胞内存在复杂的应力信号转导网络,但是其中的分子机制目前尚未完全清楚。

现有的血管力学生物学研究大部分关注蛋白编码基因以及小分子非编码 RNA (small non-coding RNA),而忽略了长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 在血管重建过程中的作用及其机制。lncRNA 是长度大于 200 核苷酸的 RNA 分子,与编码 RNA 相比,lncRNA 无开放式阅读框和翻译功能。在早期发现阶段,研究人员认为 lncRNA 是转录噪声,并无实际的生物学功能。近年来,越来越多的研究表明,lncRNA 具有广泛的生物学功能,一些重要的 lncRNA 被发现,如 Hist,其定位于失活的 X 染色体,表观调控雌性哺乳动物 X 染色体剂量补偿效

应<sup>[10]</sup>;HOTAIR,其定位于核仁,可通过招募 LSD1/CoREST/REST 复合物表观抑制多个基因表达<sup>[11]</sup>。研究提示,lncRNA 可在基因的表观遗传学修饰、转录调控以及转录后调控等多层次发挥重要的调节作用<sup>[12]</sup>。

本实验室前期工作选取高血压研究的模式动物自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)和对照组正常血压大鼠(wistar-kyoto rats, WKY),应用基因芯片检测其胸主动脉 VSMCs 的差异表达 lncRNA,其中 XR007793 在 SHR 大鼠的胸主动脉中高表达,构建共表达网络并经生物信息学聚类及 IPA 分析(ingenuity pathway analysis)发现,与 XR007793 共表达 mRNA 同细胞增殖功能变化密切相关。因此,本文推测 lncRNA-XR007793 在 VSMCs 增殖功能变化以及高血压血管重建过程中可能发挥作用。

本文应用周期性张应变体外加载系统对 VSMCs 进行力学加载,模拟生理条件和高血压病理条件下 VSMCs 受到的张应变刺激,观察在高周期性张应变条件下 VSMCs 的增殖功能变化,XR007793 及其共表达基因 STAT2、CDCA8、LMO2、IRF7 的表达变化。同时,应用 RNA 干扰技术抑制 VSMCs 的 XR007793 表达,检测 XR007793 在高张应变调控 VSMCs 增殖功能中的作用。上述研究将从 lncRNA 角度为阐明高血压条件下血管重建的力学生物学机制研究提供一些新的实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 VSMCs 培养和鉴定

取 150 g 左右雄性 SD 大鼠的胸主动脉,采用组织贴壁法培养原代 VSMCs<sup>[13]</sup>。置于细胞培养箱内,第 2 d 补液至 1.5 mL,此后每 2 d 换 1 次液,7~9 d 后可观察到有 VSMCs 从组织块边缘爬出。用抗

$\alpha$  肌动蛋白抗体(1:200)对 VSMCs 进行细胞免疫荧光鉴定,取 4~7 代,阳性率 > 95% 的 VSMCs 用于后续实验。

### 1.2 周期性张应变加载

VSMCs 用 0.125% 胰酶消化后计数,按  $2 \times 10^5$ /孔浓度接种于 Bio-Flex 6 孔培养板中;每孔加 1.5 mL 含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基,第 2 d 待细胞融合至 70%~80% 时换成无血清 DMEM 培养基,同步化培养 24 h 后安装至 Flexcell-4000 张应变加载系统中,Bio-Flex 6 孔培养板置于 CO<sub>2</sub> 孵育箱内,外部连接真空泵,牵拉幅度、频率以及时间通过计算机进行设定<sup>[14]</sup>。设定牵拉幅度 5% 为生理性张应变,15% 为病理性高张应变,加载时间 24 h,频率 1.25 Hz。

### 1.3 蛋白免疫印迹实验

2 × 上样缓冲液提取细胞总蛋白,煮沸 5 min,离心 1 200 r/min,2 min。SDS-PAGE 分离蛋白(4% 浓缩胶,10% 分离胶)。转膜恒压 15 V,1 h (Bio-Rad 公司,美国);封闭液(5 g 脱脂奶粉:100 mL TBST)封闭 1 h;I 抗增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)(1:500,Cell Signal Technology 公司,美国), $\beta$ -actin(1:500,Proteintech 公司,美国)4 °C 孵育过夜;碱性磷酸酶标记的二抗(1:1 000, Jackson ImmunoResearch 公司,美国),室温下孵育 2 h;BCIP/NBT 避光显色。扫描条带后使用 Quantity One(Bio-Rad 公司,美国)进行分析, $\beta$ -actin 为内参,计算 PCNA 与  $\beta$ -actin 的比值用作统计分析。

### 1.4 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

Trizol 法提取细胞总 RNA,应用紫外分光光度计(北京天根生化科技公司)检测 RNA 浓度及质量。根据反转录试剂盒(Takara 公司,日本)的操作说明进行 RNA 的反转录,反应总体积 20  $\mu$ L,转录条件为:65 °C,5 min;42 °C,60 min;70 °C,5 min,最后置于 -20 °C 保存。PCR 扩增总体积 20  $\mu$ L,反应采用三步法:95 °C,15 s;60 °C,30 s;72 °C,30 s,总共 40 个循环,以管家基因 GAPDH 为标准基因,采用  $^{-\Delta\Delta CT}$  法计算基因相对表达含量。

### 1.5 RNA 干扰实验

VSMCs 用 0.125% 胰酶消化后计数,按  $2 \times 10^5$ /孔浓度接种于六孔培养板中;每孔加 1.5 mL 含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基,第 2 d 待细胞

表 1 大鼠目的基因引物

Tab. 1 Target gene primer of the rat

基因	引物序列	产物大小/bp
XR007793	上游:CATAACCCAAGCGTCAAAGG	123
	下游:CATGAAGGCAGGTAAGAAAACAC	
STAT2	上游:GGCATTACCTGCTCTTGGGT	310
	下游:ATAGAGGAAGCGGAGTGGGT	
CDCA8	上游:TCCCGGTCTCATTGCTAAC	151
	下游:CTCGCGGTGCAAGTCCTTTA	
LMO2	上游:TGGACTCTTCTGGGCACTA	91
	下游:TCTCCTAGGGCTGGTCTTT	
IRF7	上游:TCTGCTTCTGCTGATGCTG	287
	下游:GGAAGGTGTTCTGCTCCTG	
GAPDH	上游:GATGGTGAAGGTCGGTGTGA	164
	下游:TGAACCTGCCGTGGGTAGAG	

融合至 70%~80% 时换成 500  $\mu$ L 无血清培养基。依据 Lipofectamine<sup>TM2000</sup> 说明书进行 RNA 干扰操作。将 5  $\mu$ L 小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 和 5  $\mu$ L Lipofectamine<sup>TM2000</sup> 分别溶于 250  $\mu$ L opti-MEM 中,轻轻混匀后将两者混合放置约 5 min,每个孔内加入干扰混合液 500  $\mu$ L。培养 6 h 后每孔补加 1 mL DMEM,继续培养 24 h。

XR007793 特异性 siRNA 序列为:

sense 5'-GCAAUCCUAUGGUGUUCUATT-3'

anti-sense 5'-UAGAACACCAUAGGAUUGCTT-3'

对照组使用非特异 siRNA 序列为:

sense 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'

anti-sense 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

### 1.6 流式细胞术分析细胞周期

静态干扰 XR007793 24 h 后,0.125% 胰蛋白酶消化细胞,制成单细胞悬液,PBS 清洗,PI 溶液(300  $\mu$ L PBS:15  $\mu$ g PI:3  $\mu$ g RNA 酶)染色 30 min,用流式细胞仪(BD 公司,美国)检测细胞周期。应用 ModFit 分析软件检测细胞增殖指数(S+G<sub>2</sub>)/G<sub>0</sub> 值。

### 1.7 Brdu 检测细胞增殖<sup>[15]</sup>

周期性张应变加载结束前 6 h,将 Brdu 原液按 1:1 000 的比例加入细胞培养液中。处理结束后用 0.125% 胰蛋白酶消化细胞,按照  $1 \times 10^4$ /孔浓度接种于 96 孔酶标板内,根据 Brdu kit 说明书(Roche 公

司,瑞士)进行操作:吸除培养液,加入 200  $\mu\text{L}$  Fix-Denat,室温下 30 min,移除 FixDenat,加入 100  $\mu\text{L}$  anti-Brdu-POD,室温下 90 min,1PBS 冲洗 3 次后加入 100  $\mu\text{L}$  显色底物,避光孵育 5 ~ 30 min。待颜色反应足够进行分光光度计测定时,加入 25  $\mu\text{L}$  的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 mol/L) 终止反应,中速振荡 1 min 后利用分光光度计 (Bio-Rad 680) 测量吸光度值,测定波长 450 nm,参考波长 630 nm,5 min 内测量完毕。

### 1.8 统计学分析

各组间实验数据以均数  $\pm$  标准差表示。成组数据间差异采用  $t$  检验。 $P < 0.05$  为具有显著性差异, $P < 0.01$  为具有非常显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 周期性张应变调控 VSMCs 的 XR007793 表达

应用体外张应变加载系统 Flex-4000 对培养于 Bio-Flex 6 孔培养板中的 VSMCs 分别施加幅度为 5% 和 15%、频率 1.25 Hz 的张应变 24 h。qRT-PCR 结果显示,与 5% 生理性张应变相比,15% 病理性张应变能显著抑制 VSMCs 的 XR007793 表达 (见图 1)。

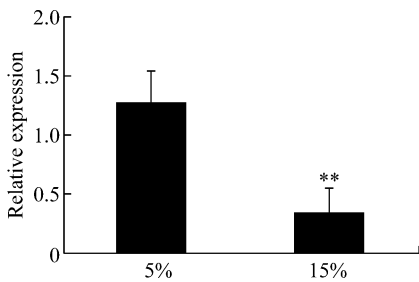


图 1 不同周期性张应变条件下 XR007793 的表达水平 (\*\*  $P < 0.01, n = 5$ )

Fig.1 Expression level of XR007793 under different cyclic strain loading conditions

### 2.2 周期性张应变调控 VSMCs 的增殖活性变化

利用 Western blotting 技术检测张应变加载后 VSMCs 的 PCNA 表达变化情况。与 5% 生理性张应变相比,15% 病理性张应变能显著上调 VSMCs 的 PCNA 表达,表明异常增高的周期性张应变可能通过调控 VSMCs 的增殖活性变化参与到高血压血管重建过程 (见图 2)。

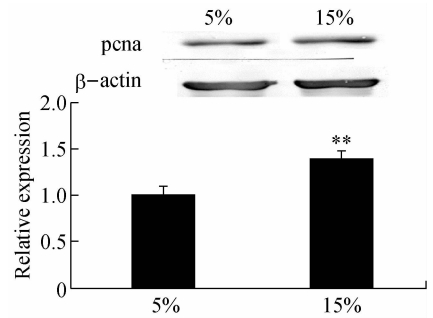


图 2 不同周期性张应变条件下 PCNA 的表达水平 (\*\*  $P < 0.01, n = 5$ )

Fig.2 Protein level of PCNA under different cyclic strain loading conditions

### 2.3 RNA 干扰抑制 VSMCs 的 XR007793 表达, VSMCs 的增殖活性上升

为探讨 XR007793 变化对 VSMCs 增殖功能的影响。应用 RNAi 技术特异性抑制静态培养条件下 VSMCs 的 XR007793 表达 (见图 3)。采用流式细胞仪检测细胞周期变化。结果显示,干扰 XR007793 条件下,VSMCs 增殖指数较阴性对照组显著上升 (见图 4)。

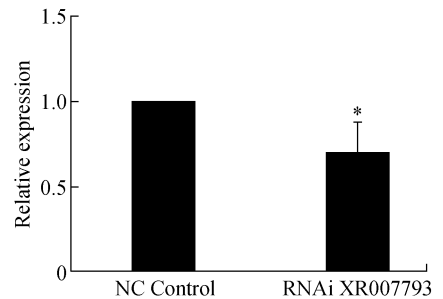


图 3 siRNA 转染对 XR007793 表达水平的影响 (\*  $P < 0.05, n = 5$ )

Fig.3 Influence of specific siRNA on the expression level of XR007793

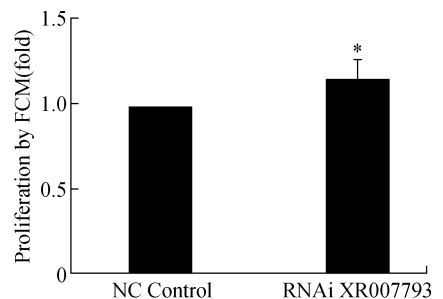


图 4 siRNA 转染对 VSMCs 增殖活性的影响 (\*  $P < 0.05, n = 5$ )  
Fig.4 Influence of specific siRNA on the proliferation of VSMCs

## 2.4 周期性张应变调控 XR007793 共表达基因 STAT2、CDCA8 表达

应用体外张应变加载系统 Flex-4000 对培养于 Bio-Flex 6 孔培养板中的 VSMCs 分别施加幅度为 5% 和 15%、频率 1.25 Hz 的张应变 24 h。qRT-PCR 结果显示,与 5% 生理性张应变相比,15% 病理性张应变能显著上调 XR007793 共表达基因 STAT2 和 CDCA8 的表达,而对 LMO2 和 IRF7 表达无影响(见图 5)。

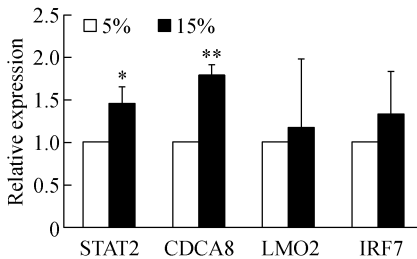


图 5 不同周期性张应变条件下 STAT2、CDCA8、LMO2 和 IRF7 的表达水平 (\*  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ )

Fig. 5 Expression level of STAT2, CDCA8, LMO2 and IRF7 under different cyclic strain loading conditions

## 2.5 干扰 XR007793 条件下的高周期性张应变促进 VSMC 增殖

为进一步探讨干扰 XR007793 条件下高周期性张应变对 VSMCs 增殖的影响,对干扰及阴性对照组 VSMCs 施加 15% 高周期性张应变,应用 Brdu 渗入法检测 VSMCs 增殖活性变化。与对照加载组相比,干扰 XR007793 联合高周期性张应变能够显著促进 VSMCs 增殖活性(见图 6)。

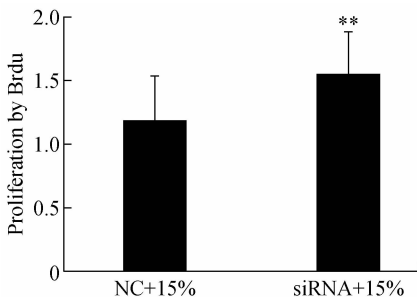


图 6 干扰 XR007793 后,不同周期性张应变对 VSMCs 增殖活性的影响 (\*  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ )

Fig. 6 Influence of different cyclic strain loading conditions on the proliferation of VSMCs under specific siRNA

## 2.6 干扰 XR007793 条件下的高周期性张应变促进共表达基因 CDCA8 的表达

与单纯高周期性张应变加载组相比,干扰 XR007793 条件下的高周期性张应变能显著促进 XR007793 共表达基因 CDCA8 的表达,而对 STAT2、LMO2 和 IRF7 表达变化无影响(见图 7)。

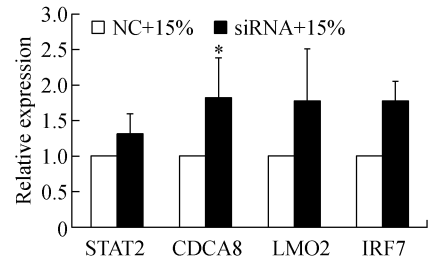


图 7 干扰 XR007793 后,不同周期性张应变对 STAT2、CDCA8、LMO2 和 IRF7 表达水平的影响 (\*  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ )

Fig. 7 Influence of different cyclic strain loading conditions on the expression of STAT2, CDCA8, LMO2 and IRF7 under specific siRNA

## 3 讨论

正常生理条件下,血管壁中膜层的 VSMCs 主要承载血流脉动导致血管周期性形变所引起的周向牵张,而血管相应的形变即为周期性张应变。本研究重点关注由 VSMCs 所承载的周期性张应变对细胞增殖活性改变的影响。PCNA 表达量变化与胞内 DNA 合成一致,故检测 PCNA 表达量变化可作为衡量细胞增殖状态的一类重要指标。Western blotting 检测发现,病理性高牵张条件下,VSMCs 的 PCNA 表达量较生理性张应变组显著上升,表明高周期性张应变可促进 VSMCs 增殖活性。在本课题组前期工作中,应用 Brdu 渗入法检测高周期性张应变条件下 VSMCs 增殖活性变化<sup>[7]</sup>,与本实验结果一致。本文为研究高牵张条件下 VSMCs 增殖功能变化提供了新的实验证据,并进一步提示在高血压病理条件下,异常增高的周期性张应变可能通过调控 VSMCs 增殖活性对血管重建产生影响。

目前,大量研究已经揭示在细胞表面存在多种力学感受结构,其与细胞内的多种信号通路相关联,构成了错综复杂的细胞力学信号转导网络,这也是近年来力学生物学研究的热点。本研究发现,Rho-

GDI $\alpha$  可作为力学响应分子调控下游信号分子 Rac1 及 p38 的表达,进而影响 VSMCs 的迁移和增殖功能<sup>[7]</sup>。Ohkawa 等<sup>[17]</sup> 研究发现,由 VSMCs 表面的整合素、细胞骨架成分 paxillin、黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 组成的复合体能够在感受外界应力刺激后自身磷酸化,并激活酪氨酸蛋白激酶,从而导致下游信号转导网络中多种蛋白质分子的磷酸化水平变化,并最终导致 VSMCs 增殖、凋亡等细胞功能发生变化。有研究发现,层流剪应力能够显著上调 miR-19a 的表达水平,而 miR-19a 对于调节 cyclin D1 表达水平及内皮增殖都具有重要作用,该研究提示了机械力调控内皮基因表达的可能机制<sup>[18]</sup>。当然,这些研究主要关注蛋白编码基因以及小分子非编码 RNA (如 miRNA 等) 所参与构成的细胞内复杂的应力转导网络,而较少关注 lncRNA 在其中可能发挥的重要作用。

研究表明,lncRNA 是一类广泛存在的转录本,其与 mRNA 有很多相似之处,如由逆转录酶 II 介导转录,可以进行剪切并且有 Poly A 的尾巴和启动子结构,在分化过程中具有动态表达特性。不同之处在于其表达水平往往较 mRNA 低,且物种间保守性较差<sup>[19]</sup>。在本研究中,首先利用美国 Arraystar 公司 lncRNA 芯片筛选出 SHR 与 WKY 差异表达 lncRNA 和 mRNA 分子。综合考虑差异倍数、原始灰度以及分子长度等条件,共筛选到 14 个差异表达 lncRNA 分子进行后续组织学水平验证。验证发现, XR007793 组织学水平验证结果与芯片结果相符,且在芯片中 XR007793 差异倍数最大,达 59 倍。因此,选取 XR007793 作为后续研究 lncRNA 分子。构建 CNC (coding-non-coding gene expression network) 网络<sup>[20]</sup> 发现,与 XR007793 共表达 mRNA 共有 46 个,其中经 IPA 筛选与细胞增殖功能相关的 mRNA 分子共 4 个: STAT2、CDCA8、LMO2 和 IRF7。其中, STAT2 是 JAK-STAT 信号通路的重要组成部分,参与细胞的增殖、分化、凋亡和免疫调节等许多重要的生物学过程<sup>[21]</sup>。CDCA8 编码的 Borealin 是染色质过客复合体的重要组成部分,在染色体的分离和胞质分裂中发挥着重要作用,其功能异常与染色体非整倍体产生以及肿瘤的发生有关,调控细胞发育和增殖<sup>[22]</sup>。本研究结果发现, XR007793、STAT2 和 CDCA8 作为力学响应分子,其表达变化受周期性张

应变调控,表明其可能参与了高血压条件下异常升高张应变诱导的 VSMCs 功能变化。同时,单纯施加高周期性张应变以及干扰 XR007793 条件下施加高周期性张应变, XR007793 与 CDCA8 均存在共表达关系,提示高血压病理条件下, XR007793 与异常增高的周期性张应变可能存在协同作用,通过调节 CDCA8 的表达参与了 VSMCs 增殖活性变化过程。本研究从 lncRNA 角度为研究细胞内复杂的应力信号转导网络提供了新的实验证据,揭示在高周期性张应变诱导 VSMCs 增殖功能改变及血管重建过程中 lncRNA 可能发挥重要作用。

当然,本文中异常增高的周期性张应变可能通过降低 XR007793 表达进而参与 VSMCs 增殖功能变化过程的详细分子机制仍需要后续深入研究。Pandolfi 等<sup>[23]</sup> 提出竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 假说: ceRNA (如 lncRNA) 活性能形成大规模的转录调控网络,其能够通过 miRNAs 的应答元件 (microRNA response elements, MREs) 结合 miRNAs 进而影响 miRNAs 所导致的基因沉默。有研究发现, TGF- $\beta$  激活的 lncRNA-ATB 在肝癌转移中上调,并与预后不良有关。lncRNA-ATB 通过与 miR-200 家族竞争性结合,上调 ZEB1 和 ZEB2 表达水平,然后诱导 EMT 和侵袭。此外, lncRNA-ATB 通过结合 IL-11 mRNA 增强了 IL-11 mRNA 稳定性,从而自分泌 IL-11, 激活 STAT3 信号通路,促进散播肿瘤细胞的器官克隆形成<sup>[20]</sup>。目前,本课题组所在实验室的多项研究结果显示, miRNA 在 VSMCs 增殖功能调控中发挥重要作用,如 miRNA-33、miRNA-1 和 miRNA-34a 等。本研究中结合 ceRNA 分析发现, XR007793、CDCA8 可能与 miRNA-298、miRNA-1224 和 miRNA-3594 均存在相同的结合位点。这些结果提示, lncRNA XR007793 可能作为一种 ceRNA 与 miRNA 共同调控 VSMCs 增殖。在今后的研究中,将从以下几方面进行深入研究: ① 通过构建 XR007793 过表达载体来研究干预 XR007793 后相关共表达基因表达水平变化以及对 VSMCs 的增殖活性影响; ② 通过 RNA pull-down 结合质谱测序等方法检测与 XR007793 结合的 DNA、RNA、蛋白质,重点研究 XR007793-microRNA-mRNA 三者之间可能存在的调控机制。深入探讨以上问题,对于认识 XR007793 在异常升高的周期性张

应变诱导 VSMCs 增殖功能变化过程中的作用具有重要意义,同时也为细胞内应力信号转导网络以及血管重建机制的研究提供更为全面的实验参考。

### 参考文献:

- [1] Hayashi K, Naiki T. Adaptation and remodeling of vascular wall: Biomechanical response to hypertension [J]. *Mech Behav Biomed Mater*, 2009, 2(1): 3-19.
- [2] Touyz RM. Vascular remodeling, retinal arteries, and hypertension [J]. *Hypertension*, 2007, 50(4): 603-604.
- [3] Haga JH, Li YS, Chien S. Molecular basis of the effects of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells [J]. *Biomech*, 2007, 40(5): 947-960.
- [4] Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: Roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis [J]. *Hypertension*, 2001, 38(3 Pt 2): 581-587.
- [5] Qu MJ, Liu B, Wang HQ, *et al.* Frequency-dependent phenotype modulation of vascular smooth muscle cells under cyclic mechanical strain [J]. *Vasc Res*, 2007, 44(5): 345-353.
- [6] Yan ZQ, Yao QP, Zhang ML *et al.* Histone acetylases modulate vascular smooth muscle cell migration induced by cyclic mechanical strain [J]. *J Biomech*, 2009, 42(7): 945-948.
- [7] Qi YX, Qu MJ, Yan ZQ, *et al.* Cyclic strain modulates migration and proliferation of vascular smooth muscle cells via Rho-GDIalpha, Rac1, and p38 pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 109(5): 906-914.
- [8] Li C, Xu Q. Mechanical stress-initiated signal transduction in vascular smooth muscle cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cell Signal*, 2007, 19(5): 881-891.
- [9] Morrow D, Sweeney C, Birney YA, *et al.* Cyclic strain inhibits Notch receptor signaling in vascular smooth muscle cells *in vitro* [J]. *Circ Res*, 2005, 96(5): 567-575.
- [10] Ogawa Y, Sun BK, Lee JT. Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways [J]. *Science*, 2008, 320(5881): 1336-1341.
- [11] Gupta RA, Shah N, Wang K C, *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis [J]. *Nature*, 2010, 464(7291): 1071-1076.
- [12] Chu C, Qu K, Zhong FL, *et al.* Genomic maps of long non-coding RNA occupancy reveal principles of RNA-chromatin interactions [J]. *Molecular cell*, 2011, 44(4): 667-678.
- [13] 顾翔, 姜隽, 吴全磊, 等. FOXO1 参与高血压条件下异常张应变诱导的血管平滑肌细胞增殖[J]. *医用生物力学*, 2014, 29(5): 440-446.  
Gu X, Jiang J, Wu BL, *et al.* The role of FOXO1 in cyclic stretch induced-proliferation of vascular smooth muscle cells during hypertension [J]. *J Med Biomech*, 2014, 29(5): 440-446.
- [14] 沈岩, 王璐, 韩悦, 等. 活化激酶 C 受体 1 在切应力调控血管平滑肌细胞增殖中的作用[J]. *医用生物力学*, 2014, 29(6): 491-497.  
Shen Y, Wang L, Han Y, *et al.* Shear stress modulates the proliferation of vascular smooth muscle cells via receptor for activated C kinase 1 [J]. *J Med Biomech*, 2014, 29(6): 491-497.
- [15] Yao QP, Zhang P, Qi YX, *et al.* The role of SIRT6 in the differentiation of vascular smooth muscle cells in response to cyclic strain [J]. *Int J Biochem Cell B*, 2014, 49: 98-104.
- [16] Chien S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: The wisdom of the cell [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(3): H1209-224
- [17] Ohkawa Y, Hayashi K, Sobue K. Calcineurin-mediated pathway involved in the differentiated phenotype of smooth muscle cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 301(1): 78-83
- [18] Qin X, Wang X, Wang Y, *et al.* MicroRNA-19a mediates the suppressive effect of laminar flow on cyclin D1 expression in human umbilical vein endothelial cells [J]. *PNAS*, 2010, 107(7): 3240-3244
- [19] Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long non-coding RNAs [J]. *Cell*, 2009, 136(4): 629-641.
- [20] Yuan JH, Yang F, Wang F, *et al.* A long non-coding RNA activated by TGF-beta promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer cell*, 2014, 25(5): 666-681.
- [21] Hernandez JM, Elahi A, Clark W, *et al.* The tumor suppressive effects of HPP1 are mediated through JAK-STAT-Interferon signaling pathways [J]. *DNA Cell Biol*, 2015, 34(8): 541-549.
- [22] Dai C, Miao CX, Xu XM, *et al.* Transcriptional activation of human CDCA8 gene regulated by transcription factor NF-Y in embryonic stem cells and cancer cells [J]. *JBC*, 2015, 290(37): 22423-22434.
- [23] Salmena L, Poliseno L, Tay Y, *et al.* A ceRNA hypothesis: The rosetta stone of a hidden RNA language? [J]. *Cell*, 2011, 146(3): 353-358.