

# Src/RUNX2参与调控周期性高张应变诱导的血管平滑肌细胞迁移

李子通<sup>1</sup>, 闫旭<sup>2</sup>, 张守敏<sup>1</sup>, 包晗<sup>1</sup>, 齐颖新<sup>1</sup>

(1.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; 2.上海交通大学附属第六人民医院 骨科,上海 200233)

**摘要:**目的 探讨周期性高张应变对血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)Src/Runt 相关转录因子2 (Runt-related transcription factor 2, RUNX2)的影响,及其在 VSMCs 迁移过程中的调控作用。方法 应用 FX-5000 T 张应变加载系统,对 VSMCs 施加幅度为 5% (模拟生理条件)和 15% (模拟高血压病理条件)的张应变;Western blotting检测 VSMCs 内 RUNX2 和磷酸化 Src 表达量;IPA 生物信息学分析 Src 对 RUNX2 的调控作用;小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)转染下调 VSMCs 中 RUNX2 表达,Src 抑制剂-1 抑制细胞内 Src 激酶活性;利用划痕愈合实验检测 VSMCs 的迁移能力。结果 15% 高张应变显著增强 VSMCs 内 RUNX2 的表达水平;静态和 15% 张应变加载条件下,降低 RUNX2 的表达均显著抑制 VSMCs 的迁移。IPA 结果提示 Src 激酶可能通过多种分子调控 RUNX2,且抑制 Src 活性后 RUNX2 的表达量显著降低;在施加 15% 高周期性张应变的同时抑制 Src 活性,高张应变诱导的 RUNX2 表达与 VSMCs 迁移被逆转。结论 高张应变上调 Src 激酶磷酸化促进 RUNX2 的表达,进而诱导 VSMCs 异常迁移。探讨张应变力学刺激调控 VSMCs 迁移的力学生物学分子机制,对于揭示血管生理稳态维持和血管病理重建的分子机制具有一定意义,并为寻找高血压血管重建临床诊断、治疗的转化研究提供了新视角。

**关键词:** 周期性张应变; Src 激酶; 血管平滑肌细胞; 细胞迁移; 血管重建

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2022.03.003

## Src/RUNX2 Modulates the Migration of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Cyclic Stretch

LI Zitong<sup>1</sup>, YAN Xu<sup>2</sup>, ZHANG Shoumin<sup>1</sup>, BAO Han<sup>1</sup>, QI Yingxin<sup>1</sup>

(1. Institute of Mechanobiology and Medical Engineering, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 2. Department of Orthopedics, the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of cyclic stretch on Src and Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), and their pivotal roles in migration of vascular smooth muscle cells (VSMCs). **Methods** The 5% cyclic stretch (to simulate normotensive physiological condition) or 15% cyclic stretch (to simulate hypertensive pathological condition) was applied to VSMCs by FX-5000 T system. Western blotting was used to detect the expression of RUNX2 and phosphorylation of Src in VSMCs. The Ingenuity Pathway Analysis (IPA) bioinformatic software was used to analyze the potential regulatory effect of Src on RUNX2. Small interfering RNA (siRNA) was transfected to decrease the expression of RUNX2. Src inhibitor-1 was used to repress Src kinase activity;

Wound-healing assay was applied to detect VSMC migration. **Results** Compared with 5% cyclic stretch, 15% cyclic stretch significantly increased RUNX2 expression in VSMCs. Under both static and 15% cyclic stretch conditions, VSMC migration was significantly inhibited after reducing RUNX2 expression with siRNA transfection. IPA indicated that Src kinase might be the upstream modulator of RUNX2, and Western blotting validated that RUNX2 expression was significantly decreased after inhibiting Src. Furthermore, under 15% cyclic stretch, Src inhibitor-1 markedly repressed RUNX2 expression and VSMC migration. **Conclusions** High cyclic stretch increased phosphorylation of Src kinase and expression of RUNX2, which subsequently induced VSMC abnormal migration. Exploring the mechanobiological mechanism of VSMC migration regulated by cyclic stretch may contribute to further revealing the mechanism of vascular physiological homeostasis and vascular pathological remodeling, as well as providing new perspective for the translational research of vascular remodeling upon hypertension.

**Key words:** cyclic stretch; Src kinase; vascular smooth muscle cells (VSMCs); cell migration; vascular remodeling

高血压是心衰、动脉粥样硬化、心肌梗塞等心血管疾病的重要危险因素,根据《中国心血管健康与疾病报告 2019》,我国现有高血压患者 2.45 亿,其巨额治疗费用造成家庭、社会和国家的沉重负担<sup>[1]</sup>。研究表明,升高的血压会导致血管重建,主要表现为血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)增殖、迁移等功能异常和细胞外基质成分改变。适量的血管重建对血管适应外界环境变化至关重要,但过度重建会导致血管顺应性降低、血管壁增厚、管腔狭窄等严重后果<sup>[2]</sup>。血流动力学因素、血管活性物质、生长因子和多种炎症介质等都可以导致血管重建,其中高血压作用下血管承载的周期性张应变幅度可达 14%~18%<sup>[3-4]</sup>,远超正常血管所承受的 5%~10%<sup>[5]</sup>。本课题组前期研究表明,周期性高张应变在高血压血管重建过程中起到直接而且明显的作用。例如,在高张应变诱导下,内皮细胞(endothelial cells, ECs)释放的细胞外囊泡显著促进 ECs 的凋亡,同时促进 ECs 与炎症细胞的黏附<sup>[6]</sup>;周期性高张应变激活 p66<sup>Shc</sup>的磷酸化,诱导 ECs 产生更多超氧阴离子的同时降低对一氧化氮(NO)的利用度,加剧血管内皮功能障碍<sup>[7]</sup>。从张应变诱导血管重建的角度深入阐明高血压疾病的力学生物学机制,对于预防和治疗高血压疾病具有重要的意义。

正常生理条件下,VSMCs 位于血管中膜层,是血管保持收缩性的主要细胞。VSMCs 维持收缩表现,表达更多的收缩相关蛋白<sup>[8]</sup>,例如平滑肌肌球蛋白、钙蛋白、平滑肌肌球蛋白重链和平滑肌蛋

白 22 等,同时具有较低的增殖、迁移、凋亡率。大量的研究证实,在病理性血管重建过程中,VSMCs 的迁移功能发生了明显的变化。在体外对 VSMCs 施加血小板衍生生长因子刺激显著促进 VSMCs 迁移,参与动脉粥样硬化小鼠胸主动脉血管重建<sup>[9]</sup>。内膜损伤后,小窝蛋白 Cav-1 的缺失导致基质金属蛋白酶 14 表达上调,促进了 VSMCs 迁移<sup>[10]</sup>。原发性高血压大鼠中,miR-155-5p 含量降低,促进血管紧张素转换酶与其下游产物血管紧张素、超氧离子、炎症因子的表达,诱导 VSMCs 迁移<sup>[11]</sup>。上述研究表明,VSMCs 异常迁移在多种心血管疾病血管重建过程中至关重要,但其分子机制尚未完全阐明。

Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, RUNX2) 是一类重要的转录调控因子,激活后发生核质转位进入细胞核,调控下游基因的表达<sup>[12]</sup>。现有关于 RUNX2 的研究主要聚焦于骨骼发育过程中,敲除 RUNX2 不仅导致小鼠胚胎死亡,而且导致小鼠骨骼系统的不完全骨化<sup>[13]</sup>。近年研究揭示,RUNX2 促进癌症细胞的迁移、侵袭,影响多种癌症发展进程<sup>[14-15]</sup>。在心血管疾病中,RUNX2 的上调与血管钙化、血管僵硬和动脉粥样硬化显著相关,细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)/丝裂原活化蛋白激酶和磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/AKT 信号通路分别通过激活 RUNX2 乙酰化和 RUNX2 磷酸化调控血管钙化过程<sup>[12]</sup>。最近研究表明,细胞可以通过整合素  $\beta 1$ -ERK1-RUNX2 途径将生物力学信号从细胞外基质传递至细胞内部,提示

RUNX2 可以响应细胞力学刺激,在细胞功能调控中发挥重要作用<sup>[16]</sup>。但张应变如何调控 RUNX2 及其在 VSMCs 迁移功能中的作用,目前并不清楚。

本文应用 FX-5000 T 周期性张应变加载系统,体外模拟在体 VSMCs 受到的生理性张应变和高血压病理性高张应变,探讨张应变力学刺激对 RUNX2 表达的影响;应用生物信息学、小干扰 RNA (small interfering RNAs, siRNAs) 转染等方法,探讨张应变调控 RUNX2 的可能分子机制及其在 VSMCs 迁移中的作用。本文通过探究周期性高张应变诱导 VSMCs 迁移的机制,为高血压条件下血管重建的分子机制提供新的实验依据与研究思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 原代细胞培养

体重 180~200 g 雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠(北京维通利华实验技术有限公司),腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉后无菌条件下取胸主动脉,使用组织块贴壁法分离并培养原代 VSMCs。将血管剪成约为 1 mm<sup>3</sup> 组织块,加入少量含有 10% 小牛血清、双抗的杜氏改良伊格尔培养基 (Dulbecco's Modified Eagle's medium, DMEM) (Gibco 公司,美国),使组织块均匀地平铺于培养皿底。将细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。

### 1.2 VSMCs 周期性张应变加载

将 VSMCs 以 2×10<sup>5</sup> 个/孔密度种植于 Flexercell 六孔细胞培养板,待细胞贴壁后加入 DMEM 培养液进行同步化处理 24 h。应用 FX-5000 T 细胞张应变加载系统对 VSMCs 施加频率 1.25 Hz、幅度 5% 或 15% 的周期性张应变,加载时间 24 h。5% 幅度模拟体内生理条件下 VSMCs 承载的周期性张应变,15% 幅度模拟体内高血压条件下 VSMCs 承载的周期性高张应变。

### 1.3 RNA 干扰实验

RUNX2 的 siRNA 片段由上海吉玛公司设计并合成,序列信息如下:5'-CGUC CUAU CAGU UCCC AAUT T-3' (正向),5'-AUUG GGAA CUGA UAGG ACGT T-3' (反向);阴性对照 (negative control, NC) 序列信息如下:5'-UUCU CCGA ACGU GUCA CGUT T-3' (正向),5'-ACGU GACA CGUU CGGA GAAT T-3' (反向)。使用 DEPC 水将 siRNA 片段

干粉溶解成为 20 mmol/L 溶液。

将 VSMCs 以 1×10<sup>5</sup> 个/孔密度种植于细胞培养板上,待细胞贴壁后进行转染。Lipofectamine TM2000 (Thermo Scientific 公司,美国) 与 opti-MEM (Thermo Scientific 公司,美国) 按照 1:50 比例混匀,siRNA 干扰片段与 opti-MEM 按照 1:50 的比例混匀,分别放置 5 min 后将以上两种混合溶液等比例混合成为干扰溶液,室温放置 15 min。使用 DMEM 培养液清洗细胞两次,分别加入 0.5 mL DMEM 培养液与 0.5 mL 干扰溶液,混合均匀后放置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,6~8 h 后补充 1 mL 含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液,共转染 48 h。

### 1.4 划痕愈合实验

使用划痕愈合实验检测 VSMCs 的迁移能力。将 VSMCs 以 2×10<sup>5</sup> 个/孔密度种植于细胞培养板上,使用小枪头对细胞进行“十”字型划痕,24 h 后拍照记录细胞的划痕愈合情况。每孔细胞至少选取两个区域,使用 Image J 软件对划痕愈合面积进行统计。划痕愈合率的计算公式为:

划痕愈合率 = [(初始时刻划痕面积 - 某时刻划痕面积) / 初始时刻划痕面积] × 100%

### 1.5 RT-qPCR

使用 TRIzol (Thermo Scientific 公司,美国) 法提取细胞内总 RNA。RNA 反转录实验使用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific 公司,美国),并按照厂商的说明书进行实验操作。

实时荧光定量 PCR 反应使用 SYBR 试剂盒 (Takara 公司,日本),引物由生工生物工程有限公司合成,GAPDH 序列如下:5'-GGCA AGGT CATC CCAG AGC-3' (正向),5'-CCCA GGAT GCCC TTTA GTGG-3' (反向);RUNX2 序列如下:5'-CCAA GAAG GCAC AGAC AGAA-3' (正向),5'-ATAC TGGG ATGA GGAA TGCG-3' (反向)。使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法分析比较目标基因的相对表达量。

### 1.6 Western blotting 实验

使用聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白后,将蛋白转印至聚偏二氟乙烯膜上。于 TBST 溶液配置的 5% 脱脂牛奶封闭液中室温封闭 1 h 后,分别加入 RUNX2 (1:500,上海碧云天生物技术有限公司),Phosphate-Src Y416 (1:1000,Cell Signaling Technology 公司,美国),GAPDH (1:1000,武汉三鹰生物技术

有限公司)一抗溶液,4℃孵育过夜。TBST溶液洗涤条带后室温孵育辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000,Cell Signaling Technology公司,美国)2 h,洗涤后使用超敏化学发光试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)显色,经过化学发光显色仪(Licor公司,美国)记录蛋白条带灰度值,Image Studio进行图像灰度分析。

### 1.7 统计学方法

本文所涉及的所有实验均至少独立重复4次,实验组的数据以均值±标准差的形式表示。两组间数据使用配对*t*检验来检测统计学差异, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。使用Graphpad Prism 7.0软件进行统计分析并绘制统计图。

## 2 结果

### 2.1 周期性高张应变促进 RUNX2 的表达

5%周期性张应变(模拟正常生理条件)和15%周期性高张应变(模拟高血压病理条件)加载24 h后,检测VSMCs内RUNX2的表达量情况。结果显示,15%高张应变显著上调RUNX2的表达水平;与5%张应变组相比,平均RUNX2蛋白表达水平升高至1.54倍(见图1)。实验室前期的实验结果表明,加载15%高张应变后,VSMCs迁移能力显著增强<sup>[17]</sup>。综合以上结果,本文提出假设,RUNX2可能参与调控高张应变诱导的VSMCs迁移。

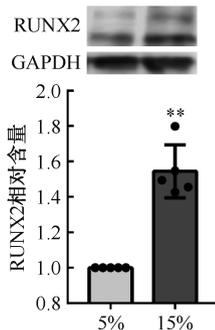


图1 不同张应变加载24 h后RUNX2的表达水平

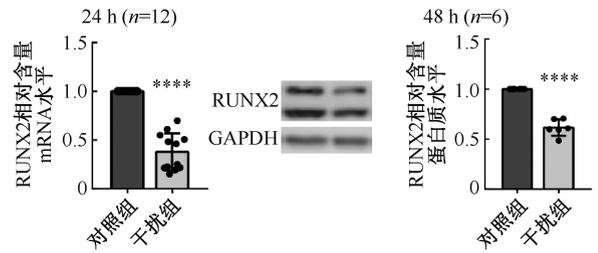
Fig.1 Expression of RUNX2 after different cyclic stretch application for 24 h

注: \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 5$ 。

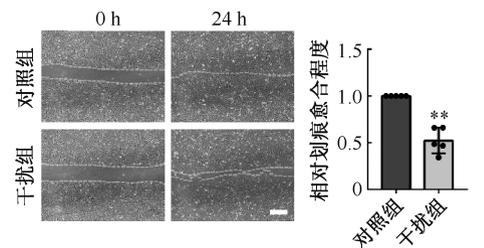
### 2.2 RUNX2 调控 VSMCs 的迁移

为探究RUNX2是否在VSMCs迁移过程中发挥调控作用,应用siRNA转染技术下调VSMCs内

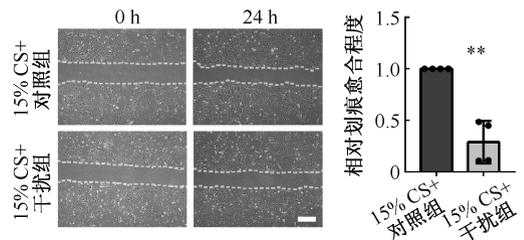
RUNX2。RT-qPCR和Western Blotting结果显示,干扰24、48 h后,RUNX2在mRNA与蛋白质水平的含量分别降低至干扰前的0.38倍与0.62倍,干扰效果良好[见图2(a)]。干扰24 h后对VSMCs进行划痕,24 h后检测愈合能力,结果显示,在静态条件下,RUNX2干扰组VSMCs的划痕愈合能力显著降低至对照组的0.52倍[见图2(b)]。干扰24 h后再对细胞进行划痕并施加15%的周期性张应变,24 h后对VSMCs的划痕愈合能力进行检测。结果显示,RUNX2干扰组VSMCs的划痕愈合能力亦显



(a) 干扰后RUNX2 mRNA和蛋白含量



(b) 静态条件下干扰RUNX2后VSMCs划痕愈合情况( $n=5$ )



(c) 15%张应变加载条件下干扰RUNX2后VSMCs划痕愈合情况( $n=4$ )

图2 干扰RUNX2后VSMCs的迁移能力

Fig.2 VSMC migration after RUNX2 siRNA transfection

(a) The mRNA and protein levels of RUNX2 in VSMCs after RUNX2 siRNA, (b) Wound healing of VSMCs after RUNX2 siRNA under static condition, (c) Wound healing of VSMCs after RUNX2 siRNA under 15% cyclic stretch condition

注: \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; 标尺 = 500  $\mu\text{m}$ ; CS: 周期性张应变; Src IN: Src抑制剂-1。

著降低,至对照组的 0.28 倍,提示 RUNX2 参与高张应变诱导的 VSMCs 迁移[见图 2(c)]。

### 2.3 Src 激酶调控 RUNX2 表达

应用 IPA (Ingenuity Pathway Analysis) 生物学信息软件 (Qiagen 公司, 德国 <https://www.qiagen->

bioinformatics.com/products/ingenuitypathway-analysis, content version: 62089861/) 分析、预测调控 RUNX2 的上游靶分子。结果显示,在所有可能调控 RUNX2 的上游基因中有 26 个可以被 Src 激酶调控,其中与细胞迁移功能相关的分子有 21 个(见图 3)。

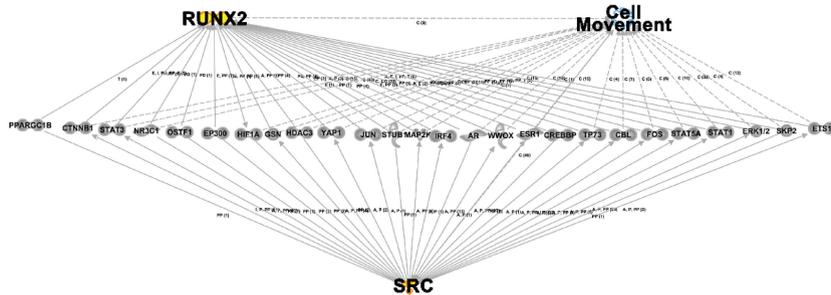


图 3 IPA 预测 Src 可能通过多种信号分子调控 RUNX2

Fig.3 Src regulates RUNX2 expression via various signaling molecules predicted by IPA

为进一步确定 Src 对 RUNX2 的调控作用,对 VSMCs 施加 10  $\mu\text{mol/L}$  Src 抑制剂-1 (Sigma 公司, 美国) 以抑制 Src 磷酸化激活, 对照组 VSMCs 施加等量的 DMSO。Src 抑制剂-1 是一种可以有效抑制 Src 激酶活性的物质, 常被用于 Src 激酶介导的细胞信号转导研究<sup>[18]</sup>。分别使用 RT-qPCR 和 Western blotting 检测抑制 Src 磷酸化后, VSMCs 内 RUNX2 mRNA 和蛋白质的表达量。结果显示, 抑制 Src 激酶活性 24 h 后, RUNX2 的 mRNA 含量显著降低, 为对照组的 0.56 倍[见图 4(a)]; 同样地, RUNX2 的蛋白表达水平在抑制 Src 磷酸化 24 h 后显著降低

至对照组的 0.29 倍[见图 4(b)]。上述结果提示, Src 是 RUNX2 的重要上游调控分子。

### 2.4 高张应变上调 Src 激酶活性调控 RUNX2 表达

对 VSMCs 加载张应变应力刺激 24 h 后检测 Src 的磷酸化激活水平。结果显示, 与 5% 张应变对照组相比, 15% 高张应变加载后 Src 的磷酸化激活水平显著升高, 平均升高 1.52 倍(见图 5)。

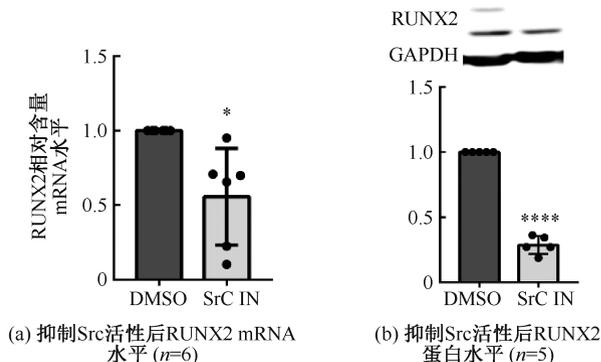


图 4 Src 调控 RUNX2 表达

Fig.4 Src kinase is the upstream regulator of RUNX2

(a) RUNX2-mRNA level after inhibiting Src,

(b) RUNX2-protein level after inhibiting Src

注: \*  $P < 0.05$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ; Src IN: Src 抑制剂-1。

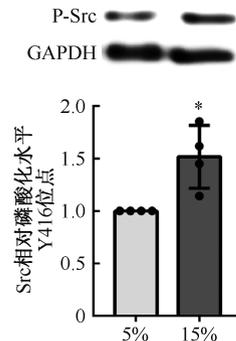


图 5 不同张应变加载 24 h 后 VSMCs 内 Src 磷酸化激活水平

Fig.5 Src phosphorylation level after different cyclic stretch application for 24 h

进而探讨高张应变对于 RUNX2 的上调是否依赖 Src 激酶激活。对 VSMCs 给予 Src 抑制剂-1 预处理 1 h 之后施加 15% 高张应变力学刺激, Western

blotting 检测 RUNX2 表达。实验结果表明,15% 高张应变加载条件下,抑制 Src 磷酸化显著下调 RUNX2 表达(见图 6)。

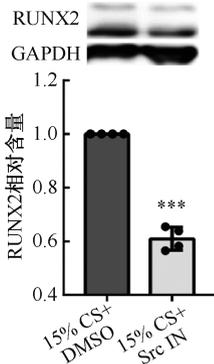


图 6 15% 高张应变刺激下抑制 Src 活性对 RUNX2 表达水平的影响

Fig.6 Effects of Src repression on RUNX2 expression under 15% cyclic stretch

注:\*\*\* $P < 0.001$ ,  $n = 4$ ; Src IN; Src 抑制剂-1。

## 2.5 Src 激酶参与高张应变诱导的 VSMCs 迁移

划痕愈合实验结果显示,与只加入 DMSO 的对照组相比,Src 抑制剂显著降低 15% 高张应变条件下 VSMCs 迁移[见图 7(a)],VSMCs 的划痕愈合能力降低至未对照组的 0.43 倍[见图 7(b)]。

以上结果揭示,周期性高张应变上调的 RUNX2 表达和 VSMCs 迁移可以被 Src 抑制剂逆转,提示高张应变调控的 RUNX2 表达和 VSMCs 迁移依赖 Src 激酶的磷酸化。

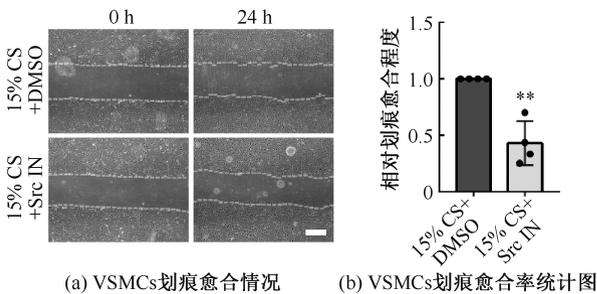


图 7 15% 高张应变刺激下抑制 Src 活性对 VSMCs 迁移能力的影响

Fig.7 Effect of Src repression on VSMC migration under 15% cyclic stretch (a) Wound healing of VSMCs, (b) Histogram of wound healing rate

注:\*\* $P < 0.01$ ,  $n = 4$ ;标尺 = 500  $\mu\text{m}$ ;CS;周期性张应变; Src IN; Src 抑制剂-1。

## 3 讨论

在体条件下,血管中循环流动的血液主要对血管壁产生 3 个方向的机械力:血液与血管内表面摩擦产生的与血流方向平行的切应力,周期性脉动血压引起的沿血管壁的周向应力,以及血液充盈产生的垂直作用于血管壁的正压力<sup>[2]</sup>。高血压条件下,沿血管壁的周向应力显著增加,使得弹性血管壁形变幅度明显增加,血管细胞暴露于高张应变力学环境<sup>[5]</sup>。异常升高的周向张应变诱导 VSMCs 发生迁移、凋亡、增殖等功能的变化,并合成大量细胞外基质,参与高血压血管重建发生、发展<sup>[19]</sup>。

研究表明,血管中膜层的 VSMCs 承受张应变作用,通过细胞膜、细胞浆和细胞核内多种力学感受和响应分子,调控细胞功能。如细胞膜上阳离子通道 Piezo1,在张应变和切应力等多种力学刺激下形成同源多聚体,介导  $\text{Ca}^{2+}$  这一重要的胞内第 2 信使内流<sup>[20]</sup>;细胞核内的骨架蛋白 Emerin 与 Lamin A/C 受张应变力学刺激后,通过与具有序列特异性的染色质结合调控多种基因转录和 VSMCs 增殖、迁移功能<sup>[21]</sup>;胞浆内的多种激酶(例如黏着斑激酶、蛋白激酶 C<sup>[22]</sup>)、非编码 RNA(例如 microRNA-19b<sup>[23]</sup> 和 microRNA124<sup>[24]</sup>)等在张应变力学信号转导、细胞功能调控中也起到重要作用。本实验研究发现,高张应变通过激活胞浆内重要信号分子 Src 激酶磷酸化诱导 VSMCs 迁移。

Src 是一类非受体酪氨酸激酶,通过催化 ATP 末端的磷酸基团转移到特定蛋白质底物上的酪氨酸残基来激活下游信号分子,转导生物信号<sup>[25]</sup>。Src 参与了包括细胞增殖、细胞骨架调节、细胞形状控制、细胞与基质的黏附动力学、细胞的运动和迁移等在内的多种生物过程,在细胞稳态维持和功能异常中具有重要作用<sup>[26]</sup>。Src 激酶在癌症细胞中的功能受到广泛关注。Kaplan 等<sup>[27]</sup> 研究发现,在咽喉癌中,Src 通过介导 E-钙黏蛋白与  $\beta$ -连环素磷酸化促进细胞间的黏附连接,进而促进癌细胞迁移。Zhang 等<sup>[28]</sup> 研究证实,在直肠癌细胞系中,Src 可以催化己糖激酶磷酸化增强葡萄糖向 6-磷酸葡萄糖的转化,促进细胞的迁移和侵袭。在心血管系统中,Src 可以激活 Yes 相关蛋白上 Y357 位点的磷酸化,进而调控 Gp130 蛋白促进心脏再生过程中心肌

细胞的增殖<sup>[29]</sup>。Callera 等<sup>[30]</sup>研究发现,Src 的失活可以抑制 ERK1/2、c-Jun 氨基末端激酶信号通路,改善血管紧张素诱导的高血压。本研究发现,VSMCs 内 Src 激活可以促进一种重要转录因子 RUNX2 的表达。

RUNX2 最早被发现对成骨细胞骨化具有重要作用<sup>[13]</sup>。有趣的是,有研究报道了 RUNX2 在调控细胞迁移中作用。Wang 等<sup>[31]</sup>发现,酪蛋白激酶 1 $\alpha$ /染色体盒蛋白同族体可以通过上调 RUNX2 的转录促进骨肉瘤转移。在成骨细胞和软骨细胞中,RUNX2 可以激活 PI3K-AKT 信号通路诱导细胞迁移<sup>[32]</sup>。近年来研究揭示,RUNX2 参与血管钙化、血管僵硬和动脉粥样硬化等病理过程,其在心血管系统中的作用受到了广泛关注<sup>[12]</sup>。Byon 等<sup>[33]</sup>研究证实,RUNX2 响应氧化应激诱导 VSMCs 的 PI3K、ERK 和 AKT 的激活,促进细胞外基质分泌和细胞钙化。本文研究证实,RUNX2 响应高张应变力学刺激,促进 VSMCs 的迁移。

本文基于 IPA 生物信息学发现了 26 种可能参与 Src 调控 RUNX2 表达的分子,如组蛋白脱乙酰基酶 3(histone deacetylase 3, HDAC3)、信号传导与转录激活因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)家族蛋白 STAT 1/3/5、JUN 原癌基因等。已有研究表明,Src 可以促进 YAP 与 RUNX2 的结合,影响 RUNX2 的表达<sup>[34]</sup>。然而,病理性高张应变条件下 Src 调控 RUNX2 的分子机制仍需要未来更加深入的研究。

## 4 结论

高张应变促进 Src 激酶磷酸化激活,诱导 RUNX2 表达并上调 VSMCs 的迁移能力。探究高血压条件下高张应变调控 VSMCs 功能的机制,不仅可以为揭示高血压血管重建病理过程提供力学生物学新机理,而且能够为疾病临床治疗提供潜在转化新靶点。

## 参考文献:

- [ 1 ] 国家心血管病中心. 中国心血管健康与疾病报告 2019 [M]. 北京; 科学出版社. 2020.
- [ 2 ] CHIU JJ, CHIEN S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives [J]. *Physiol Rev*, 2011, 91(1): 327-387.
- [ 3 ] GIBBONS GH, DZAU VJ. The emerging concept of vascular remodeling [J]. *N Engl J Med*, 1994, 330(20): 1431-1438.
- [ 4 ] SAFAR ME, PERONNEAU PA, LEVENSON JA, et al. Pulsed doppler: Diameter, blood flow velocity and volumic flow of the brachial artery in sustained essential hypertension [J]. *Circulation*, 1981, 63(2): 393-400.
- [ 5 ] ANWAR MA, SHALHOUB J, LIM CS, et al. The effect of pressure-induced mechanical stretch on vascular wall differential gene expression [J]. *J Vasc Res*, 2012, 49(6): 463-478.
- [ 6 ] ZHUANG F, BAO H, SHI Q, et al. Endothelial microparticles induced by cyclic stretch activate Src and modulate cell apoptosis [J]. *FASEB J*, 2020, 34(10): 13586-13596.
- [ 7 ] SPESCHA RD, GLANZMANN M, SIMIC B, et al. Adaptor protein p66 (Shc) mediates hypertension-associated, cyclic stretch-dependent, endothelial damage [J]. *Hypertension*, 2014, 64(2): 347-353.
- [ 8 ] 陈远秀, 包晗, 阎靖, 等. 周期性张应变调控血管平滑肌细胞黏附血小板微体及其在自噬中的作用 [J]. *医用生物力学*, 2020, 35(1): 49-56.
- CHEN YX, BAO H, YAN J, et al. Cyclic stretch induces adhesion of VSMCs with platelet-derived microparticles and the role in autophagy [J]. *J Med Biomech*, 2020, 35(1): 49-56.
- [ 9 ] XU J, ZHANG Y, YOU S, et al. Paired box 9 regulates VSMC phenotypic transformation, proliferation, and migration via sonic hedgehog [J]. *Life Sci*, 2020, 257: 118053.
- [ 10 ] MA YD, THIYAGARAJAN V, TSAI MJ, et al. Pyrogallol abates VSMC migration via modulation of Caveolin-1, matrix metalloproteinase and intima hyperplasia in carotid ligation mouse [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 48: 63-75.
- [ 11 ] WU N, YE C, ZHENG F, et al. MiR155-5p inhibits cell migration and oxidative stress in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats [J]. *Antioxidants*, 2020, 9(3): 204.
- [ 12 ] CHEN Y, ZHAO X, WU H. Transcriptional programming in arteriosclerotic disease: A multifaceted function of the Runx2 (runt-related transcription factor 2) [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2021, 41(1): 20-34.
- [ 13 ] KOMORI T, YAGI H, NOMURA S, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts [J]. *Cell*, 1997, 89(5): 755-764.
- [ 14 ] YAN X, HAN D, CHEN Z, et al. RUNX2 interacts with BRG1 to target CD44 for promoting invasion and migration

- of colorectal cancer cells [J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 505.
- [15] WANG Q, YU W, HUANG T, *et al.* RUNX2 promotes hepatocellular carcinoma cell migration and invasion by upregulating MMP9 expression [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(5): 2777-2784.
- [16] WU X, HU J, LI G, *et al.* Biomechanical stress regulates mammalian tooth replacement via the integrin  $\beta$ 1-RUNX2-Wnt pathway [J]. *EMBO J*, 2020, 39(3): e102374.
- [17] 高爽, 李珊珊, 李子通, 等. 钙离子参与周期性高张应变和血小板源性微囊协同诱导的血管平滑肌细胞迁移 [J]. *医用生物力学*, 2021, 36(1): 144-150.
- GAO S, LI SS, LI ZT, *et al.* Calcium participates in migration of VSMCS synergistically induced by cyclic stretch and platelet-derived microvesicles [J]. *J Med Biomech*, 2021, 36(1): 144-150.
- [18] BOSCHELLI DH, WANG YD, JOHNSON S, *et al.* 7-Alkoxy-4-phenylamino-3-quinolinecar-bonitriles as dual inhibitors of Src and Abl kinases [J]. *J Med Chem*, 2004, 47(7): 1599-1601.
- [19] QI YX, HAN Y, JIANG ZL. Mechanobiology and Vascular Remodeling: From Membrane to Nucleus [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1097: 69-82.
- [20] LI J, HOU B, TUMOVA S, *et al.* Piezo1 integration of vascular architecture with physiological force [J]. *Nature*, 2014, 515(7526): 279-282.
- [21] QI YX, YAO QP, HUANG K, *et al.* Nuclear envelope proteins modulate proliferation of vascular smooth muscle cells during cyclic stretch application [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(19): 5293-5298.
- [22] HASHIMOTO Y, KINOSHITA N, GRECO TM, *et al.* Mechanical force induces phosphorylation-mediated signaling that underlies tissue response and robustness in xenopus embryos [J]. *Cell Syst*, 2019, 8(3): 226-41.e7.
- [23] WANG WB, LI HP, YAN J, *et al.* CTGF regulates cyclic stretch-induced vascular smooth muscle cell proliferation via microRNA-19b-3p [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 376(1): 77-85.
- [24] BAO H, LI HP, SHI Q, *et al.* Lamin A/C negatively regulated by miR-124-3p modulates apoptosis of vascular smooth muscle cells during cyclic stretch application in rats [J]. *Acta Physiol*, 2020, 228(3): e13374.
- [25] THOMAS SM, BRUGGE JS. Cellular functions regulated by Src family kinases [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1997, 13: 513-609.
- [26] GUARINO M. Src signaling in cancer invasion [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 223(1): 14-26.
- [27] COHEN-KAPLAN V, ILAN N, VLODAVSKY I. Heparanase loosens E-cadherin-mediated cell-cell contact via activation of Src [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 2.
- [28] ZHANG J, WANG S, JIANG B, *et al.* c-Src phosphorylation and activation of hexokinase promotes tumorigenesis and metastasis [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 13732.
- [29] LI Y, FENG J, SONG S, *et al.* gp130 controls cardiomyocyte proliferation and heart regeneration [J]. *Circulation*, 2020, 142(10): 967-82.
- [30] CALLERA GE, ANTUNES TT, HE Y, *et al.* c-Src inhibition improves cardiovascular function but not remodeling or fibrosis in angiotensin II-induced hypertension [J]. *Hypertension*, 2016, 68(5): 1179-90.
- [31] WANG X, QIN G, LIANG X, *et al.* Targeting the CK1 $\alpha$ /CBX4 axis for metastasis in osteosarcoma [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1141.
- [32] FUJITA T, AZUMA Y, FUKUYAMA R, *et al.* Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling [J]. *J Cell Biol*, 2004, 166(1): 85-95.
- [33] BYON CH, JAVED A, DAI Q, *et al.* Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(22): 15319-15327.
- [34] ZAIDI SK, SULLIVAN AJ, MEDINA R, *et al.* Tyrosine phosphorylation controls Runx2-mediated subnuclear targeting of YAP to repress transcription [J]. *EMBO J*, 2004, 23(4): 790-799.