

文章编号: 1004-7220(2023)01-0156-08

# 周期性高张应变通过下调 PGC1 $\alpha$ 表达抑制血管平滑肌细胞线粒体生物发生

张守敏, 李之音, 田文浩, 陶雨婷, 齐颖新, 韩悦  
(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 探讨高血压背景下病理性高张应变对血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)线粒体生物发生的影响,以及 PGC1 $\alpha$  蛋白在这一过程中的作用。方法 采用 Flexcell-5000T 体外细胞张应变加载系统对 VSMCs 施加频率为 1.25 Hz、幅度分别为 5% 和 15% 的周期性张应变,模拟正常生理情况和高血压病理情况下的力学环境;通过蛋白免疫印迹(Western blotting)和荧光定量 PCR(qPCR)方法检测正常生理和高血压病理力学条件下 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$  蛋白表达,以及柠檬酸合酶和线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)拷贝数变化情况;应用 PGC1 $\alpha$  特异性激活剂 ZLN005 和有效干扰片段 siRNA 检测 PGC1 $\alpha$  表达上调或下调对柠檬酸合酶和 mtDNA 拷贝数的影响。结果 与 5% 生理性周期性张应变相比,15% 病理性高张应变显著抑制 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$  和柠檬酸合酶的表达,mtDNA 拷贝数显著降低。与对照组相比,对 VSMCs 转染 PGC1 $\alpha$  干扰片段 siRNA 或孵育 PGC1 $\alpha$  特异性激活剂 ZLN005,分别下调和上调 PGC1 $\alpha$  蛋白表达,VSMCs 的柠檬酸合酶表达和 mtDNA 拷贝数也相应地降低和增加。在加载生理性周期性张应变条件下,对 VSMCs 转染 PGC1 $\alpha$  干扰片段 siRNA 显著下调其蛋白表达;对 VSMCs 施加 PGC1 $\alpha$  特异性激活剂 ZLN005 显著上调 PGC1 $\alpha$  蛋白表达,柠檬酸合酶表达和 mtDNA 拷贝数也被增加。结论 高血压背景下病理性周期性高张应变通过抑制 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$  蛋白显著下调 VSMCs 的柠檬酸合酶表达和 mtDNA 拷贝数,进而导致 VSMCs 线粒体功能障碍。PGC1 $\alpha$  可能是缓解高血压病理进程的潜在治疗靶向分子。

**关键词:** 周期性张应变; 血管平滑肌细胞; 线粒体生物发生; PGC1 $\alpha$ ; 线粒体 DNA 拷贝数; 柠檬酸合酶

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2023.01.023

## Pathologically Elevated-Cyclic Stretch Suppressed Vascular Smooth Muscle Cell Mitochondrial Biogenesis by Down-Regulating PGC1 $\alpha$ Expression

ZHANG Shoumin, LI Zhiyin, TIAN Wenhao, TAO Yuting, QI Yingxin, HAN Yue

(*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 stretch induced by hypertension on mitochondrial biogenesis of vascular smooth muscle cells (VSMCs), and the role of PGC1 $\alpha$  in this process. **Methods** The Flexcell-5000T stretch loading system *in vitro* was applied to VSMCs with a frequency of 1.25 Hz and an amplitude of 5% or 15% to simulate the mechanical environment under normal physiological or hypertensive pathological conditions respectively. Western blotting and qPCR were used to detect the expression of PGC1 $\alpha$ , citrate synthase and mitochondrial DNA (mtDNA) copy number in VSMCs under normal physiological or hypertensive pathological conditions. VSMCs were treated with PGC1 $\alpha$  specific activator ZLN005 to promote

收稿日期: 2022-06-09; 修回日期: 2022-06-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(12072197, 11972232, 12032003)

通信作者: 韩悦, 副研究员, E-mail: hanyue625@sjtu.edu.cn

PGC1 $\alpha$  expression or specific interfering fragment siRNA to inhibit PGC1 $\alpha$  expression in order to detect the effect on citrate synthase and mtDNA copy number. **Results** Compared with 5% physiological cyclic stretch, 15% pathologically elevated-cyclic stretch significantly suppressed the expression of PGC1 $\alpha$ , citrate synthase and mtDNA copy number in VSMCs. Compared with control group, the protein expression of PGC1 $\alpha$  was significantly decreased and increased respectively. When VSMCs transfected with PGC1 $\alpha$  siRNA or incubated PGC1 $\alpha$  activator ZLN005, the expression of citrate synthase and mtDNA copy number were also significantly down-regulated and up-regulated in VSMCs accordingly. Under physiological cyclic stretch conditions, the protein level of PGC1 $\alpha$  was significantly down-regulated by PGC1 $\alpha$  siRNA, which also significantly down-regulated citrate synthase expression and mtDNA copy number. The protein expression of PGC1 $\alpha$  was significantly up-regulated by ZLN005, which also enhanced the expression of citrate synthase and mtDNA copy number. **Conclusions** The pathological cyclic stretch induced by hypertension significantly down-regulated the expression of citrate synthase and mtDNA copy number via suppressing the expression of PGC1 $\alpha$ , resulting in mitochondrial dysfunction of VSMCs. PGC1 $\alpha$  may be a potential therapeutic target molecule to alleviate the progression of hypertension.

**Key words:** cyclic stretch; vascular smooth muscle cells (VSMCs); mitochondrial biogenesis; PGC1 $\alpha$ ; mitochondrial DNA (mtDNA) copy number; citrate synthase

高血压是心血管疾病常见的危险因素<sup>[1]</sup>。高血压导致血管功能障碍,表现为炎症和氧化应激、内皮功能受损和位于中膜层的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)异常增殖,继而引发血管壁变厚和管腔变窄<sup>[2]</sup>。高血压的动脉血管暴露于持续增加的脉动压力,导致血管出现病理性周期性高张应变<sup>[3]</sup>。VSMCs 主要承载着周期性张应变力学作用,在高血压血管重建过程中起主要作用<sup>[4]</sup>。在体外研究中,周期性高张应变导致大鼠 VSMCs 自噬、迁移和增殖功能增加,发生动脉血管重建<sup>[5]</sup>。高血压导致的病理性张应变诱导 VSMCs 的促肾上腺皮质激素高表达,通过参与 ERK 信号通路导致 VSMCs 异常增殖<sup>[6]</sup>。因此,深入探讨高血压病变进程中周期性高张应变影响 VSMCs 功能的具体分子机制,具有重要的科学意义。

线粒体功能障碍(诸如高血压、动脉粥样硬化、心力衰竭等)是多种心血管疾病共同的早期病变特征<sup>[7]</sup>。线粒体是细胞的能量工厂,通过氧化磷酸化提供机体所需的大部分化学能。而三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)是机体获取能量的主要方式,柠檬酸合酶是 TCA 过程的第 1 个关键限速酶,通常被作为完整线粒体存在的定量酶标记物,具有表征线粒体能量代谢功能活性的重要意义<sup>[8]</sup>。研究表明,在骨骼肌细胞中柠檬酸合酶的最大活性可表明骨骼肌中的线粒体含量,通过耐力训练或高强度间歇训练可以增加柠檬酸合酶表达,进一步增加其最大活动量<sup>[9]</sup>。线粒体有独立的基因组,即线

粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA),控制和编码部分蛋白质,其在基因组中所占个数称为 mtDNA 拷贝数,mtDNA 拷贝数与细胞生长代谢相关并表征线粒体生物发生<sup>[10]</sup>。动脉粥样硬化中患者血浆中 mtDNA 拷贝数异常降低,线粒体生物发生功能损伤,提示 mtDNA 拷贝数可能成为心血管疾病有用的生物标记物<sup>[11]</sup>。过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  辅激活因子-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 $\alpha$ , PGC1 $\alpha$ ) 是一种转录共激活因子,通过与不同的转录因子相互作用参与调节能量代谢过程,例如糖酵解、糖异生、脂肪酸氧化和线粒体生物发生等<sup>[12]</sup>。在肺动脉高压患者外周循环血中,缺氧显著下调 PGC1 $\alpha$  表达,损害线粒体生物发生和氧化代谢功能<sup>[13]</sup>。PGC1 $\alpha$  已被作为动脉粥样硬化、肥胖、II 型糖尿病或其他代谢类疾病治疗的潜在靶标<sup>[14]</sup>。然而,高血压导致的周期性高张应变是否影响 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$  及线粒体生物发生,这一过程仍不清楚。

本文应用体外细胞张应变加载系统对 VSMCs 施加频率为 1.25 Hz,幅度分别为 5% 和 15% 周期性张应变加载,模拟正常生理和高血压病理情况下的力学环境。通过蛋白免疫印迹(Western blotting)实验和 qPCR 实验,观察高血压情况下周期性高张应变对 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$ 、柠檬酸合酶表达和 mtDNA 拷贝数影响,以及利用 PGC1 $\alpha$  特异性的激活剂和干扰片段明确周期性张应变通过调节 PGC1 $\alpha$  表达介导柠檬酸合酶表达和 mtDNA 拷贝数变化,从而影

响线粒体的正常功能。本文研究结果将为进一步了解高血压导致周期性高张应变影响线粒体生物发生的分子机制提供有效的力学生物学实验支持,并有可能为心血管疾病临床诊断与治疗提供潜在靶点。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞培养

分离雄性 Sprague-Dawley 大鼠(体重 180 ~ 200 g)胸主动脉组织,剥离去除凝血组织块后,纵向剖开血管,内膜面朝下置于浓度为 0.2% 的 I 型胶原酶中,37 °C 消化 5 min。剪碎血管后浸没于浓度为 0.3% 的 II 型胶原酶中,37 °C 消化 90 min。筛网过滤组织块,1 200 r/min 离心 8 min,收集细胞并置于含有 10% 小牛血清(Gibco 公司,美国)和 1% 双抗(100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素)的 DMEM 完全培养液,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,7~8 d 后进行传代。使用 VSMCs 特异性抗体 α-smooth muscle specific actin 进行细胞免疫荧光鉴定,阳性率大于 95% 的第 4~7 代 VSMCs 用于后续实验。

### 1.2 周期性高张应变力学加载

应用 Flexcell-5000T(Flexcell 公司,美国)体外细胞张应变加载系统对 VSMCs 施加周期性张应变加载。在 Flexcell 六孔板(Flexcell 公司,美国)上种植 VSMCs,待细胞贴壁后,将培养液替换为无血清的 DMEM 基本培养基,同步化处理 24 h,继续使用 DMEM 基本培养基进行力学加载。对照组加载幅度为 5%,频率为 1.25 Hz,模拟正常生理性周期性张应变(5% CS 组);实验组加载幅度为 15%,频率为 1.25 Hz,模拟高血压病理性周期性高张应变(15% CS 组),加载时间均为 24 h<sup>[15]</sup>。

### 1.3 药物处理

应用 PGC1α 特异性激活剂 ZLN005(MCE 公司,美国)处理 VSMCs,浓度为 10 μmol/L 孵育 48 h。静态条件下,添加 ZLN005 至 VSMCs 孵育 48 h,命名为 ZLN005 组。在同步化前添加药物,之后进行病理性周期性张应变加载,命名为 15% CS+ZLN005 组,且张应变加载过程中无须再次添加药物。

### 1.4 RNA 干扰实验

将 VSMCs 种植于 6 孔细胞培养板,密度为 2×10<sup>5</sup>/孔,待细胞贴壁后进行干扰实验。步骤如

下:取 250 μL opti-MEM(Thermo Fisher 公司,美国)加入 5 μL 小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA)(Sangon Biotech 公司,中国),另取 250 μL opti-MEM 加入 5 μL Lipo-fectamine™ 2000(Thermo Fisher 公司,美国),将两种混合液按 1:1 体积混合,终体积为 500 μL,室温静置 20 min。6 孔板内每孔预留 500 μL DMEM 基本培养液,加入上述 500 μL 混合液,终体积为 1 mL。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养 4~6 h 后,每孔补加 1 mL DMEM 完全培养液,最终体积为 2 mL,48 h 后收集蛋白样品。静态条件下对 VSMCs 进行 RNA 干扰,命名为 siRNA 组。同步化处理前进行 RNA 干扰实验,之后加载生理性周期性张应变,命名为 5% CS+siRNA 组,且张应变加载过程中无须再次干扰。干扰片段序列见表 1。

表 1 siRNA 和引物序列

Tab. 1 Sequences of siRNA and primers

片段	正向序列	反向序列
scrambled siRNA	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUCGCGAGAATT
siRNA	GCAGAAGCAGAAAGCAAUUTT	AAUUGCUUUCUGUCUUCUGCTT
mtDNA	CTTCATAGCCGAGTACACCAAT	GGTCATATCGAAAACGGGGGTA
β-actin	CCGCCACCAGTTCGCCA	CCTTCTGACCCATACCCACCA

### 1.5 Western blotting 实验

蛋白上样量为 10 μL/孔进行 10% SDS-PAGE 凝胶 80 V 恒压电泳,300 mA 恒流湿转 1 h,5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h。结束后,孵育抗 PGC1α(1:1 000,Proteintech 公司,美国),β-actin(1:1 000,Proteintech 公司,美国),柠檬酸合酶(1:500,Santa Cruz 公司,美国)一抗抗体,4 °C 过夜。第 2 天,对条带孵育对应物种的辣根过氧化物酶标记二抗(1:1 000,Cell Signaling Technology 公司,美国),室温 2 h。最终使用 ECL 灵敏试剂盒进行化学发光,Image Studio 软件进行定量分析。

### 1.6 线粒体 DNA 拷贝数检测

细胞基因组 DNA 提取使用基因组 DNA 快速抽提分离试剂盒(Sangon Biotech 公司,中国),细胞密度为 2×10<sup>5</sup>/孔的 VSMCs 加入 500 μL 裂解液,65 °C 水浴 1 h 至细胞完全裂解。以有机溶剂抽提法分离细胞总基因组 DNA,通过 qPCR 检测 VSMCs 线粒体 DNA 和 β-actin 的 mRNA 相对表达量,计算线粒体 DNA 拷贝数。用于 qPCR 分析的引物序列见表 1。

## 1.7 数据统计分析

使用 GraphPad Prism 8.0 进行数据分析和图形制作。每个实验重复 4 次,所有数据均以均数 $\pm$ 标准差的形式展示。使用  $t$  检验分析组间差异, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 周期性高张应变抑制 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$ 表达和线粒体生物发生

应用 Flexcell-5000T 体外细胞张应变加载系统对 VSMCs 施加频率为 1.25 Hz、幅度分别为 5% 和 15%

周期性张应变,分别模拟正常生理和高血压病理情况下的力学环境。通过 Western blotting 和 qPCR 实验检测周期性高张应变对 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$ 、柠檬酸合酶表达和 mtDNA 拷贝数影响。结果显示,与 5% 周期性张应变相比,15% 周期性高张应变显著下调 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$ 、柠檬酸合酶表达和 mtDNA 拷贝数(见图 1)。柠檬酸合酶作为线粒体能量代谢通路关键酶,mtDNA 拷贝数表征线粒体生物发生,PGC1 $\alpha$  调控线粒体生物合成和能量代谢,它们的表达失调反映线粒体生物发生功能受损。本文结果提示,周期性高张应变导致 VSMCs 线粒体生物发生功能障碍。

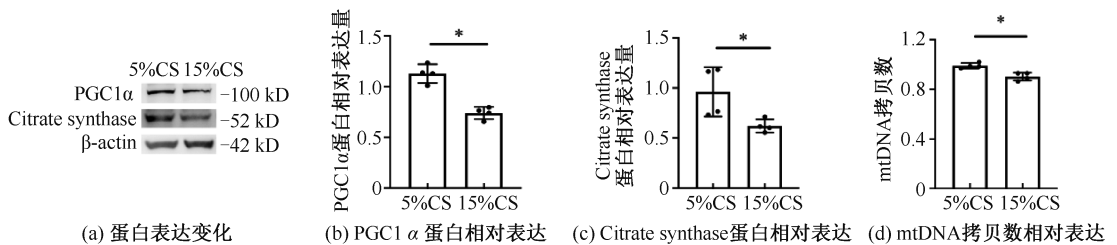


图 1 周期性高张应变对 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$ 、柠檬酸合酶表达和 mtDNA 拷贝数的影响

Fig. 1 Effect of elevated-cyclic stretch on PGC1 $\alpha$ , citrate synthase expression and mtDNA copy number in VSMCs

- (a) Changes in protein expression, (b) Relative expression of PGC1 $\alpha$ , (c) Relative expression of citrate synthase, (d) Relative expression of mtDNA copy number

注:5% CS 代表生理性周期性张应变加载组,15% CS 代表病理性周期性高张应变加载组;\*  $P < 0.05$ ,  $n = 4$ 。

### 2.2 下调 PGC1 $\alpha$ 抑制线粒体生物发生

为探讨 PGC1 $\alpha$  是否参与周期性高张应变调控 VSMCs 的 mtDNA 拷贝数的生物学过程,利用 PGC1 $\alpha$  有效干扰片段 siRNA 下调 PGC1 $\alpha$  表达,模拟周期性高张应变对 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$  的抑制效果。

结果显示,与转染无关干扰片段的对照组相

比,PGC1 $\alpha$  siRNA 处理 VSMCs 能显著抑制 PGC1 $\alpha$  蛋白表达,并同时下调柠檬酸合酶蛋白表达和 mtDNA 拷贝数(见图 2)。本文认为,周期性高张应变有可能通过调控 PGC1 $\alpha$  表达影响 VSMCs 的柠檬酸合酶表达和 mtDNA 拷贝数,导致线粒体生物发生功能障碍。

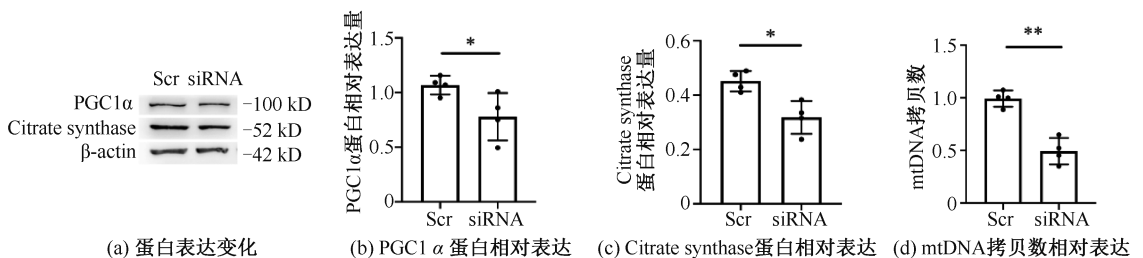


图 2 PGC1 $\alpha$  siRNA 对 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$ 、柠檬酸合酶表达和 mtDNA 拷贝数的影响

Fig. 2 Effect of PGC1 $\alpha$  siRNA on PGC1 $\alpha$ , citrate synthase expression and mtDNA copy number in VSMCs

- (a) Changes in protein expression, (b) Relative expression of PGC1 $\alpha$ , (c) Relative expression of citrate synthase, (d) Relative expression of mtDNA copy number

注:Scr 代表 scramble siRNA 对照组,siRNA 代表在静态条件下进行 RNA 干扰实验组;\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ,  $n = 4$ 。

### 2.3 上调 PGC1 $\alpha$ 表达增强 VSMCs 的线粒体生物发生

为了进一步明确 PGC1 $\alpha$  调控 VSMCs 的柠檬酸合酶表达与 mtDNA 拷贝数的作用,应用 PGC1 $\alpha$  特异性激活剂 ZLN005 孵育 VSMCs 上调其 PGC1 $\alpha$  表达,观察 PGC1 $\alpha$  高表达对柠檬酸合酶和 mtDNA 拷贝数的影响。

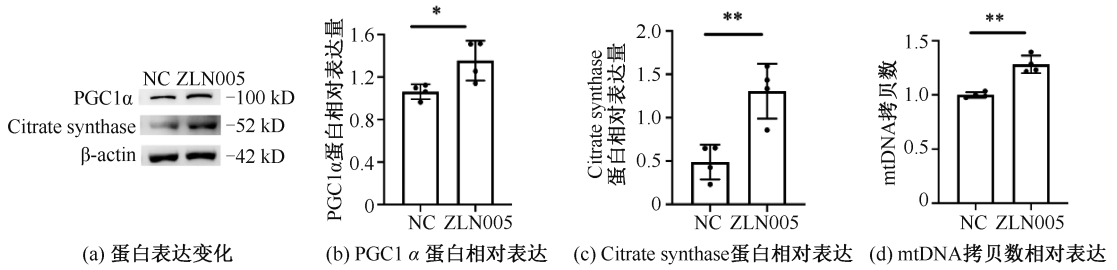


图3 ZLN005对VSMCs的PGC1 $\alpha$ 、柠檬酸合酶表达和mtDNA拷贝数的影响

**Fig. 3 Effect of ZLN005 on PGC1 $\alpha$ , citrate synthase expression and mtDNA copy number in VSMCs** (a) Changes in protein expression, (b) Relative expression of PGC1 $\alpha$ , (c) Relative expression of citrate synthase, (d) Relative expression of mtDNA copy number

注:NC代表空白对照组,ZLN005代表静态条件下添加PGC1 $\alpha$ 激活剂药物刺激实验组;\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ , $n = 4$ 。

### 2.4 生理性周期性张应变条件下,降低 PGC1 $\alpha$ 的表达会抑制 VSMCs 线粒体生物发生

为了进一步明确周期性张应变条件下,PGC1 $\alpha$  调控 VSMCs 线粒体生物发生的作用,在生理性周期性张应变情况下,添加 PGC1 $\alpha$  干扰片段 siRNA 抑制 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$  蛋白水平,进一步检测其对柠檬酸合酶表达和 mtDNA 拷贝数的作用。

结果显示,5%周期性张应变条件下,PGC1 $\alpha$

siRNA 能显著下调 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$  蛋白表达,并抑制柠檬酸合酶蛋白表达和 mtDNA 拷贝数(见图4)。本文认为,在生理性周期性张应变情况下,下调 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$  表达能降低柠檬酸合酶的蛋白表达和 mtDNA 拷贝数,且生理性周期性张应变条件下,VSMCs 的 PGC1 $\alpha$  通过调控线粒体中柠檬酸合酶和 mtDNA 拷贝数来参与 VSMCs 线粒体生物发生。

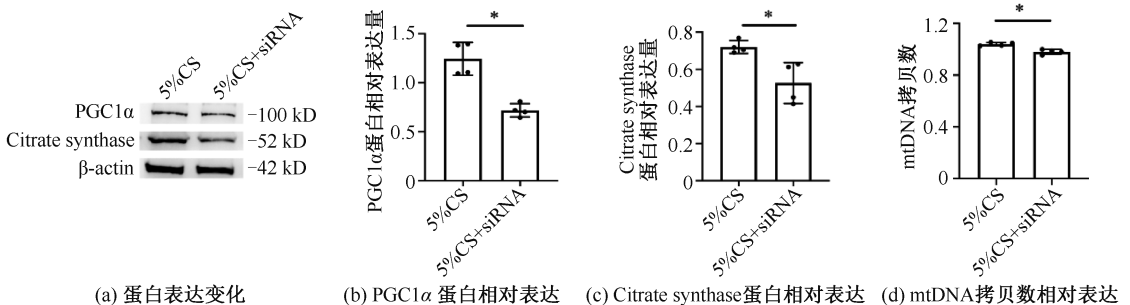


图4 生理性周期性张应变条件下,转染 PGC1 $\alpha$  siRNA 对 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$ 、柠檬酸合酶表达和 mtDNA 拷贝数的影响

**Fig. 4 Effects of PGC1 $\alpha$  siRNA on PGC1 $\alpha$ , citrate synthase expression and mtDNA copy number under physiological cyclic stretch in VSMCs** (a) Changes in protein expression, (b) Relative expression of PGC1 $\alpha$ , (c) Relative expression of citrate synthase, (d) Relative expression of mtDNA copy number

注:5%CS代表生理性周期性张应变对照加载组,5%CS+siRNA代表在生理性周期性张应变条件下进行RNA干扰实验组;\* $P < 0.05$ , $n = 4$ 。

## 2.5 周期性高张应变条件下,PGC1 $\alpha$ 激活剂能够逆转高张应变对 VSMCs 线粒体生物发生的抑制

为了进一步明确周期性高张应变条件下,PGC1 $\alpha$  参与调控 VSMCs 线粒体生物发生的作用,在 15% 病理性周期性高张应变条件下,添加 PGC1 $\alpha$  特异性激活剂 ZLN005,检测高张应变条件下 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$  高表达对柠檬酸合酶和 mtDNA 拷贝数的作用。

结果显示,与 15% 周期性张应变相比,ZLN005 能显著促进 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$  蛋白表达,并同时增强了柠檬酸合酶的蛋白表达和 mtDNA 拷贝数(见图 5)。本文认为,VSMCs 加载病理性周期性张应变情况下,ZLN005 能显著增强 PGC1 $\alpha$  表达,并促进柠檬酸合酶表达和 mtDNA 拷贝数,恢复部分线粒体正常功能活性,逆转了高血压导致的周期性高张应变对 VSMCs 线粒体生物发生的抑制作用。

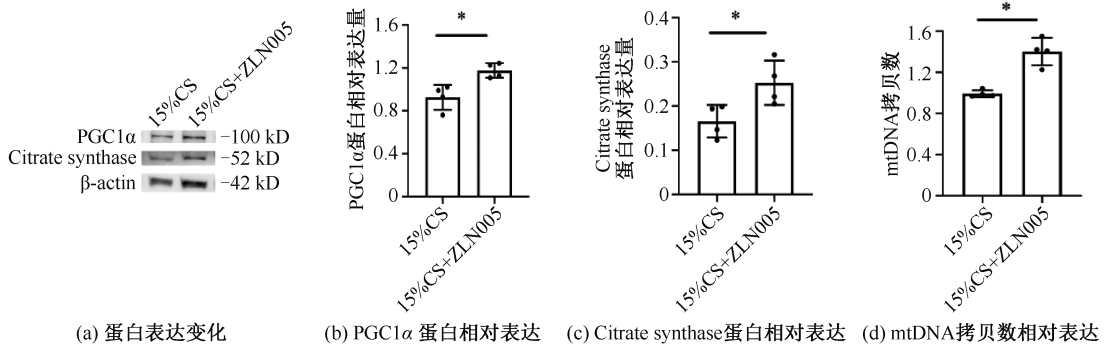


图 5 周期性高张应变条件下,ZLN005 对 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$ 、柠檬酸合酶表达和 mtDNA 拷贝数的影响

Fig. 5 Effects of ZLN005 on PGC1 $\alpha$ , citrate synthase expression and mtDNA copy number under elevated cyclic stretch in VSMCs (a) Changes in protein expression, (b) Relative expression of PGC1 $\alpha$ , (c) Relative expression of citrate synthase, (d) Relative expression of mtDNA copy number

注:15% CS 代表病理性周期性张应变对照加载组,15% CS+ZLN005 代表在病理性周期性张应变条件下添加 PGC1 $\alpha$  激活剂药物刺激实验组;\*  $P < 0.05$ ,  $n = 4$ 。

## 3 讨论

高血压是以体循环动脉血压持续增高为特征的最常见心血管疾病之一。血压持续升高显著改变血管内的血流动力学,导致 VSMCs 受到周期性高张应变作用后功能受损并诱发血管重建<sup>[3-4]</sup>。此外,高血压还会影响机体能量代谢稳态,导致 VSMCs 线粒体功能障碍<sup>[8]</sup>。然而,周期性张应变对 VSMCs 线粒体生物发生功能如 PGC1 $\alpha$  和柠檬酸合酶表达,以及 mtDNA 拷贝数仍不清楚。

线粒体对于维持细胞的正常生理功能至关重要,通过氧化磷酸化为机体提供大部分能量,能够感知并响应不断变化的细胞环境和外界压力,介导细胞存活和死亡。柠檬酸合酶作为 TCA 循环过程中的第 1 步关键限速酶,在调节线粒体能量代谢过程中发挥重要作用。例如在慢性肾病患者骨骼肌细胞的柠檬酸合酶表达显著下调,抑制线粒体生物

合成功能并最终导致线粒体数量减少<sup>[16]</sup>。线粒体能量代谢过程同时为生物合成和信号转导提供多种关键代谢物,例如乙酰辅酶 A 可作为合成脂肪酸、胆固醇、酮体、氨基酸的原料,因此线粒体损伤和功能障碍会对整体细胞功能产生影响<sup>[17]</sup>。研究表明,线粒体功能损伤是心血管疾病的早期病变特征,导致 mtDNA 拷贝数显著下调<sup>[12]</sup>。mtDNA 损伤也与高血压性心脏病的发展有关,高血压引发的氧化应激,加剧线粒体活性氧生成,导致 mtDNA 拷贝数显著降低<sup>[18]</sup>。

PGC1 $\alpha$  是线粒体生物合成的关键标志分子,也是细胞代谢的主要调节因子,其表达失调反应体内能量代谢紊乱<sup>[13]</sup>。例如:在心肌缺血/再灌注损伤模型中,与肿瘤生长和进展相关的关键调节因子 Oip5-as1 通过结合 microRNA-29a 激活 SIRT1/AMPK 通路,促进 PGC1 $\alpha$  表达,活性氧生成显著降低,抑制心肌细胞凋亡<sup>[19]</sup>。正常生理性周期性张应

变刺激小鼠心肌细胞,促进 PGC1 $\alpha$  表达,增强线粒体生物合成和能量代谢功能<sup>[20]</sup>。力学因素对 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$  以及线粒体生物发生影响尚不完全清楚,特别是在病理背景下血液动力学发生显著变化,例如高血压导致的周期性高应变对 PGC1 $\alpha$  表达变化,柠檬酸合酶表达变化和 mtDNA 拷贝数变化均尚不清楚。

本文使用体外细胞张应变加载系统模拟 VSMCs 在正常生理和高血压病理情况下所受到的力学条件,探究周期性张应变对 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$  和柠檬酸合酶表达,mtDNA 拷贝数的影响。结果显示,与 5% 生理性周期性张应变相比,15% 病理性周期性张应变显著抑制 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$  表达,并下调柠檬酸合酶的蛋白水平和 mtDNA 拷贝数,提示周期性高张应变导致 VSMCs 线粒体生物发生损伤。通过分别使用 PGC1 $\alpha$  特异性激活剂 ZLN005 和 PGC1 $\alpha$  干扰片段,发现当分别上调或下调 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$  蛋白水平,能够促进或抑制柠檬酸合酶的蛋白水平和 mtDNA 拷贝数,提示 PGC1 $\alpha$  介导 VSMCs 线粒体柠檬酸合酶的表达和 mtDNA 拷贝数,参与调控线粒体生物发生功能。为了进一步明确力学条件下 PGC1 $\alpha$  的作用,在生理性周期性张应变条件下,PGC1 $\alpha$  siRNA 下调 PGC1 $\alpha$  表达也降低柠檬酸合酶表达和 mtDNA 拷贝数,抑制线粒体生物发生功能活性。而加载病理性周期性张应变条件下,PGC1 $\alpha$  特异性激活剂 ZLN005 上调 PGC1 $\alpha$  表达也增强柠檬酸合酶表达和 mtDNA 拷贝数,逆转了周期性高张应变对 VSMCs 线粒体生物发生的损害,进一步提示病理性周期性高应变通过调节 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$  表达影响其线粒体生物发生功能。

## 4 结论

高血压导致的周期性高张应变通过抑制 VSMCs 的 PGC1 $\alpha$  表达显著下调了 VSMCs 的柠檬酸合酶表达和 mtDNA 拷贝数,从而影响线粒体正常功能。而 PGC1 $\alpha$  的高表达能够显著逆转周期性高张应变对线粒体生物发生功能的抑制,恢复部分线粒体功能活性,表明力学环境下 PGC1 $\alpha$  能够调节 VSMCs 线粒体功能变化。然而,关于周期性张应变刺激下 PGC1 $\alpha$  调节 VSMCs 线粒体功能变化的具体分子机制还未完全揭示,如 PGC1 $\alpha$  如何调控柠檬

酸合酶或者 mtDNA 拷贝数,仍需要今后更深入的探讨。本研究结果表明,周期性张应变刺激下 PGC1 $\alpha$  调节 VSMCs 线粒体功能变化的生物学机制可能在高血压血管重建过程中发挥重要作用,并期望为阐明和干预病变引发新生内膜过度增生的分子机制提供潜在有用的力学生物学理论和实验依据。

## 参考文献:

- [1] MILLS KT, STEFANESCU A, HE J. The global epidemiology of hypertension [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16(4): 223-237.
- [2] BUFORD TW. Hypertension and aging [J]. *Ageing Res Rev*, 2016, 26: 96-111.
- [3] MESSERLI FH, WILLIAMS B, RITZ E. Essential hypertension [J]. *Lancet*, 2007, 370(9587): 591-603.
- [4] WANG R, WANG M, YE J, *et al*. Mechanism overview and target mining of atherosclerosis: Endothelial cell injury in atherosclerosis is regulated by glycolysis [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(1): 65-76.
- [5] 范洋晶, 李之音, 姜宗来, 等. 生理性周期性张应变通过激活 AMPK 磷酸化抑制血管平滑肌细胞迁移[J]. *医用生物力学*, 2022, 37(2): 335-341.
- FAN YJ, LI ZY, JIANG ZL, *et al*. Physiological cyclic stretch inhibits vascular smooth muscle cell migration via activating AMPK phosphorylation [J]. *J Med Biomech*, 2022, 37(2): 335-341.
- [6] TANG X, LIU Y, XIAO Q, *et al*. Pathological cyclic strain promotes proliferation of vascular smooth muscle cells via the ACTH/ERK/STAT3 pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(10): 8260-8270.
- [7] BONORA M, WIECKOWSKI MR, SINCLAIR DA, *et al*. Targeting mitochondria for cardiovascular disorders: Therapeutic potential and obstacles [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(1): 33-55.
- [8] MENG LB, HU GF, SHAN MJ, *et al*. Citrate synthase and ogdh as potential biomarkers of atherosclerosis under chronic stress [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 9957908.
- [9] GILLEN JB, MARTIN BJ, MACINNIS MJ, *et al*. Twelve weeks of sprint interval training improves indices of cardiometabolic health similar to traditional endurance training despite a five-fold lower exercise volume and time commitment [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0154075.
- [10] ROGER AJ, MUNOZ SA, KAMIKAWA R. The origin and diversification of mitochondria [J]. *Curr Biol*, 2017, 27(21): R1177-R1192.
- [11] LIU X, LONGCHAMPS RJ, WIGGINS KL, *et al*.

- Association of mitochondrial DNA copy number with cardiometabolic diseases [J]. *Cell Genom*, 2021, 1(1): 100006.
- [12] CAI N, KUNDU K, GOLDER ZJ, *et al.* Mitochondrial DNA variants modulate N-formylmethionine, proteostasis and risk of late-onset human diseases [J]. *Nat Med*, 2021, 27(9): 1564-1575.
- [13] FINCK BN, KELLY DP. PGC-1 coactivators: Inducible regulators of energy metabolism in health and disease [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(3): 615-22.
- [14] MATA M, SARRION I, MILIAN L, *et al.* PGC-1 $\alpha$  induction in pulmonary arterial hypertension [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012: 236572.
- [15] 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.
- [16] WATSON EL, BAKER LA, WILKINSON TJ, *et al.* Reductions in skeletal muscle mitochondrial mass are not restored following exercise training in patients with chronic kidney disease [J]. *FASEB J*, 2020, 34(1): 1755-1767.
- [17] ANNESLEY SJ, FISHER PR. Mitochondria in health and disease [J]. *Cells*, 2019, 8(7): 680.
- [18] EIRIN A, LERMAN A, LERMAN LO. Mitochondrial injury and dysfunction in hypertension-induced cardiac damage [J]. *Eur Heart J*, 2014, 35(46): 3258-3266.
- [19] NIU X, PU S, LING C, *et al.* lncRNA Oip5-as1 attenuates myocardial ischaemia/reperfusion injury by sponging miR-29a to activate the SIRT1/AMPK/PGC1 $\alpha$  pathway [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(6): e12818.
- [20] KIM HK, KANG YG, JEONG SH, *et al.* Cyclic stretch increases mitochondrial biogenesis in a cardiac cell line [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(3): 768-774.

(上接第 155 页)

- [23] 李扬, 杨旺, 张泽洋, 等. 整合素传递力学信号影响间充质干细胞分化的研究进展 [J]. *医用生物力学*, 2020, 35(2): 247-252.
- LI Y, YANG W, ZHANG ZY, *et al.* advances in effects of integrin signaling on mesenchymal stem cell differentiation [J]. *J Med Biomech*, 2020, 35(2): 247-252.
- [24] LAU EO, DAMIANI D, CHEHADE G, *et al.* DIAPH3 deficiency links microtubules to mitotic errors, defective neurogenesis, and brain dysfunction [J]. *Elife*, 2021, 10: e61974.
- [25] KIM JH, LEE HK, TAKAMIYA K, *et al.* The role of synaptic GTPase-activating protein in neuronal development and synaptic plasticity [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(4): 1119-1124.