

文章编号 1006-8147(2023)05-0494-07

论著

周期性拉伸通过组蛋白乳酸化修饰调控平滑肌细胞增殖功能

陈鑫, 吕慧珍, 艾玎

(天津医科大学基础医学院生理学与病理生理学系, 天津 300070)

摘要 目的: 利用细胞单轴周期性拉伸模型, 探究静脉移植手术后的周期性拉伸应力对血管平滑肌细胞(VSMC)组蛋白乳酸化修饰的影响。方法: 使用细胞单轴周期性拉伸装置, 对大鼠原代 VSMC 给予拉伸幅度 15%、频率 1 Hz 的拉伸刺激来模拟动脉的周期性拉伸, 对照组以细胞静止于拉伸小室来模拟静脉的拉伸状态。细胞收样后, 使用 Western 印迹检测 VSMC 周期性拉伸 24 h 前后的增殖细胞核抗原(PCNA)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的蛋白水平, qPCR 检测平滑肌细胞增殖和分化基因的 mRNA 水平。随后用比色法检测周期性拉伸前后细胞内的乳酸含量, 并提取在两种不同力学条件下处理 24 h 的 VSMC 的组蛋白来检测泛和位点特异性的乳酸化修饰水平。结果: Western 印迹结果说明, 和静息状态相比, VSMC 周期性拉伸 24 h 后的 PCNA 蛋白水平没有明显变化($P=0.777$), α -SMA 的蛋白水平下降($t=4.715, P<0.01$)。qPCR 结果显示, 和静息状态相比, PCNA 的 mRNA 水平在 VSMC 周期性拉伸 12 h 后上升, 24 h 恢复到初始水平; 细胞周期蛋白 Ccnd1 和 Cdk6 的 mRNA 水平呈时间依赖性上升, 细胞周期依赖性激酶抑制剂 Cdkn1a 和分化相关基因 Acta2、Tagln 的 mRNA 水平呈时间依赖性下降。比色法结果显示, 和静息状态相比, VSMC 周期性拉伸 24 h 后的乳酸积累增加($t=5.554, P<0.01$)。Western 印迹结果显示, 和静息状态相比, VSMC 周期性拉伸 24 h 后的泛乳酸化修饰水平上升($t=3.603, P<0.01$), 特异性位点乳酸化修饰如 H3K9la、H3K14la 和 H3K18la 的水平均增加。与静息状态(0 h)相比, H3K9la、H3K14la 和 H3K18la 的水平显著增加($t=6.001, 6.966, 12.750$, 均 $P<0.0001$)。结论: 周期性拉伸后 VSMC 的代谢状态发生改变, 糖酵解的最终代谢产物乳酸积累增加, 组蛋白乳酸化修饰水平也增加, 这可能是引起 VSMC 增殖的原因。

关键词 周期性拉伸; 乳酸; 组蛋白乳酸化修饰; 血管平滑肌细胞

中图分类号 R363.1+

文献标志码 A

Cyclic stretch regulates smooth muscle cell proliferation through histone lactylation modification

CHEN Xin, LYU Hui-zhen, AI Ding

(Department of Physiology and Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of cyclic stretch (CS) stress on histone lactylation modification in vascular smooth muscle cells (VSMC) after vein graft surgery using a cellular uniaxial cyclic stretching model. **Methods:** Using a uniaxial cyclic stretching device, the primary VSMCs of rats were subjected to stretch stimulus with a stretch amplitude of 15% and a frequency of 1 Hz to simulate the cyclic stretch of arteries, while cells static in the stretch chamber were to simulate the cyclic stretch of veins and served as control. After cell collection, Western blotting was used to detect PCNA and α -SMA protein levels before and after 24 h of cyclic stretching in VSMC. The mRNA levels of VSMC proliferation and differentiation-related genes were detected by qPCR. Subsequently, the intracellular lactate levels before and after cyclic stretch were detected by colorimetric assay. Histones of VSMC treated under two different mechanical conditions for 24 h were extracted for detection of pan- and site-specific lysine lactonization levels. **Results:** Western blotting results showed that the protein level of PCNA did not change significantly after 24 hours of cyclic stretch of VSMC compared with the static state ($P=0.777$), but α -SMA decreased ($t=4.715, P<0.01$). The qPCR results showed that the mRNA levels of PCNA increased after 12 h of VSMC cyclic stretch and returned to basal level at 24 h. The mRNA levels of cell cycle proteins Ccnd1 and Cdk6 increased in a time-dependent manner, and the mRNA levels of cell cycle-dependent kinase inhibitor Cdkn1a, differentiation-related genes Acta2 and Tagln decreased in a time-dependent manner. Colorimetric assay showed the accumulation of lactic acid in VSMC after 24 hours of periodic stretching elevated compared to static state ($t=5.554, P<0.01$). Western blotting results showed an increase in the level of pan-lysine lactation of VSMC after 24 hours of cyclic stretching compared to the static state ($t=3.603, P<0.01$), including significant elevation of site-specific lactation modifications such as H3K9la, H3K14la and H3K18la ($t=6.001, 6.966, 12.75$, all $P<0.0001$). Compared with the resting state (0 h), the levels of H3K9la, H3K14la, and H3K18la were significantly increased. **Conclusion:** After cyclic stretch, the metabolic state of VSMC is altered, the accumulation of lactate as the final metabolite of glycolysis increases and the level of histone lactylation modifications also increases, which may be the cause of VSMC proliferation.

基金项目 国家自然科学基金青年科学基金项目(82000423)

作者简介 陈鑫(1998-), 女, 硕士在读, 研究方向: 生物学; 通信作者: 艾玎, E-mail: edin2000cn@163.com。

Key words cyclic stretch;lactate;histonelactylation modification;smooth muscle cells

冠状动脉粥样硬化性心脏病(CHD)是世界范围内的主要致死病因。冠状动脉旁路手术是最常用于治疗闭塞性冠状动脉粥样硬化病变的策略之一^[1]。该手术通过移植患者自身其他部位的血管来代替因动脉粥样硬化斑块而堵塞的病变血管,重新恢复该血管的血流从而达到治疗目的。手术常用自体隐静脉,但与动脉移植相比,静脉移植的通畅率通常不高^[2]。早期(移植1个月内)造成通畅率不高的原因通常是急性血栓的生成,晚期(>2年)通畅率不高的原因通常是内膜增厚和动脉粥样硬化^[3-4]。有研究发现,由动脉循环高压引起的高水平的周期性拉伸可导致静脉移植血管壁平滑肌细胞功能和状态改变,进而促进血管重塑的重要因素,其具体机制目前还未充分得到研究。

组蛋白修饰是基因表达的表观调控层面之一,它可以通过改变染色体的疏松程度来影响转录因子与基因的亲和性从而调控基因表达。近年来发现了各种新型的组蛋白修饰标记,如丙酰化、丁酰化、琥珀酰化、丙二酰化、戊二酰化和巴豆酰化。2019年芝加哥大学赵英明教授课题组在《Nature》杂志报道了全新的蛋白翻译后修饰(posttranslational modifications, PTMs)类型——乳酸化修饰。该研究证实H3K18la位点的修饰直接刺激基因转录从而参与调控巨噬细胞的M1/2极化,糖酵解衍生的乳酸被确定为组蛋白乳酸化的底物^[5]。本研究旨在研究血管平滑肌细胞(VSMC)在周期性拉伸后是否存在乳酸积累的增加和组蛋白乳酸化修饰的增加,为阐明代谢重编程和表观遗传修饰在这一力学刺激过程中的作用与机制作出探索。

1 材料与方法

1.1 实验材料 RNA提取试剂盒(北京全式金公司), Taq-PCR Mix(美国 Thermo 公司), DMEM 培养基(美国 Gibco 公司), 胎牛血清(美国 Gibco 公司), 鼠抗 GAPDH 抗体(美国 Proteintech 公司), 兔抗 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体(PTM-5216)(杭州景杰生物科技有限公司), 乳酸含量检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司), 兔抗 L-Lactyl Lysine、Lactyl-Histone H3(Lys9)、Lactyl-Histone H3(Lys14)、Lactyl-Histone H3(Lys18)抗体(杭州景杰生物科技有限公司), 兔抗 H3 抗体(北京索莱宝科技有限公司), 细胞拉伸培养室(广州市华粤行仪器科技有限公司), 荧光实时定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司), NST-1400-04-R5 细胞拉伸仪(日本 Nepa Gene 公司), 恒温细

胞培养箱(美国 Thermo 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠主动脉平滑肌细胞的分离和培养 取 Sprague-Dawley (SD) 大鼠(150 g), 麻醉后固定到手术板上, 开胸, 沿着脊柱取腹主动脉到主动脉弓的一段血管, 用显微剪去除血管周围的结缔组织, 显微镜下小心撕去血管外膜留下中膜部分, 剪碎, 用滴管转移到培养瓶中, 两周后细胞生长融合。传代到 P5 用于实验, 每代培养到 80% 的密度时传代。

1.2.2 蛋白质免疫印迹和杂交实验 用细胞裂解液提取细胞的蛋白质, 使用细胞超声破碎仪破碎细胞(3 s/次, 超声 3 个循环), 12 000 r/min 下 4℃ 离心 10 min, 收集上清液, 用 BCA 法测好浓度后计算所需上样量, 加入 SDS 上样缓冲液, 100℃ 变性 10 min。制备不连续的 SDS-PAGE 凝胶, 上样, 跑胶, 用快速湿转仪设定的程序转膜, 室温脱脂牛奶封闭 1 h, 之后依次孵育一抗和二抗, 最后用 ECL 显色曝光, Image J 进行后续的定量分析。

1.2.3 细胞总 RNA 的提取和 qPCR 使用全式金 RNA 提取试剂盒, 按照说明书提取细胞的 RNA 后, 再按照逆转录试剂盒两步法合成 cDNA, 按照 2× Taq-PCR Mix(10 μ L), cDNA 和 RNAasefree 水(总体积为 9 μ L), qPCR 引物(1 μ L)。具体的程序为: 预变性: 95℃, 300 s; 设置 40 个循环: 变性: 95℃, 30 s, 退火: 60℃, 30 s, 延伸: 72℃, 30 s; 溶解: 95℃, 30 s, 60℃, 30 s, 72℃, 30 s。根据 qPCR 得出的荧光曲线的 Ct 值, 以 GAPDH 基因为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算结果。所用到的引物序列见表 1。

表 1 qPCR 所需的引物序列

Tab 1 Primer sequences for qPCR

基因名称(种属 rat)	引物序列(5'→3')	产物(bp)
<i>Pcna</i>	TTTCACAAAAGCCACTCCACTG CTTTAAGTGTCCCATGTCAGCAAT	103
<i>Acta2</i>	TGACCTGAAGTATCCG TCCAGAGTCCAGCACAA	295
<i>Tagln</i>	AGGACTGTAATGGCTTTGG TGTGAACTCCCTCTTATGCT	111
<i>Gapdh</i>	ACCCAGAAGACTGTGGATGG CACATTTGGGGGTAGGAACAC	171
	TGGACCTCTGGAGTGTTC	183
<i>Cdk6</i>	GTTGGGCAGATTGGAG GCGTACCCTGACACCAAT	179
<i>Ccnd1</i>	TCTTCGCACTTCTGCTCC GCAAAGTATGCCGTCGTCT	111
<i>Cdkn1a</i>	CAAAGTTCCACCGTTCTCG	

注: *Pcna*: 增殖细胞核抗原; *Acta2*: 平滑肌肌动蛋白 $\alpha 2$; *Tagln*: 转运蛋白基因; *Gapdh*: 内参基因; *Cdk6*: 周期蛋白依赖性激酶 6; *Ccnd1*: 细胞周期蛋白 D1; *Cdkn1a*: 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A

1.2.4 组蛋白提取 收集细胞,并用冰 PBS 洗涤两次。可以在 PBS 和后续的缓冲液中补加 5 mmol/L 丁酸钠,以保持组蛋白的乙酰化水平。将细胞重悬于 TEB 提取缓冲液[TEB:含 0.5% Triton \times 100(v/v)、2 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF)和 0.02%NaN₃(w/v)的 PBS],细胞密度为 10⁷ 个/mL。轻柔搅拌,冰上裂解细胞 10 min。4℃以 650 g 的离心力离心沉淀细胞核 10 min。去除并丢弃上清液。用一半体积的 TEB 洗涤细胞核,并按照前述方法进行离心。在 0.2 mol/L HCl 中重悬沉淀,随后 4℃过夜,第二天在 4℃以 650 g 的离心力离心样本 10 min 后收集上清液(含组蛋白),加入等量的 50%三氯乙酸,冰上混匀 30 min,10 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,冰丙酮洗涤沉淀,10 000 r/min 离心 10 min,风干,将沉淀溶解在高

压水中。测量蛋白浓度后存储于-80℃。

1.2.5 细胞内乳酸含量测定 在 10⁷ 个细胞中加入 1 mL 提取液一,冰浴超声波破碎细胞(功率 300 W,超声 3 s,间隔 7 s,总时间 3 min);4℃,12 000 g 离心 10 min,取 0.8 mL 上清液,再加入 0.15 mL 提取液二,4℃ 12 000 r/min 离心 10 min 后留取上清待测。根据说明书配制标准品,将测定管、对照管和空白管于 570 nm 处测定吸光值,利用标准曲线得到细胞内的乳酸含量。

1.2.6 细胞单轴周期性拉伸装置的使用 在使用细胞拉伸仪之前,使用 75%酒精对仪器整体进行消毒,特别是拉伸小室安装的区域。细胞拉伸系统在运行时需要提前准备冷却水并连接至水泵,拉伸单元放置于孵箱里,控制单元放置在孵箱外(图 1)。

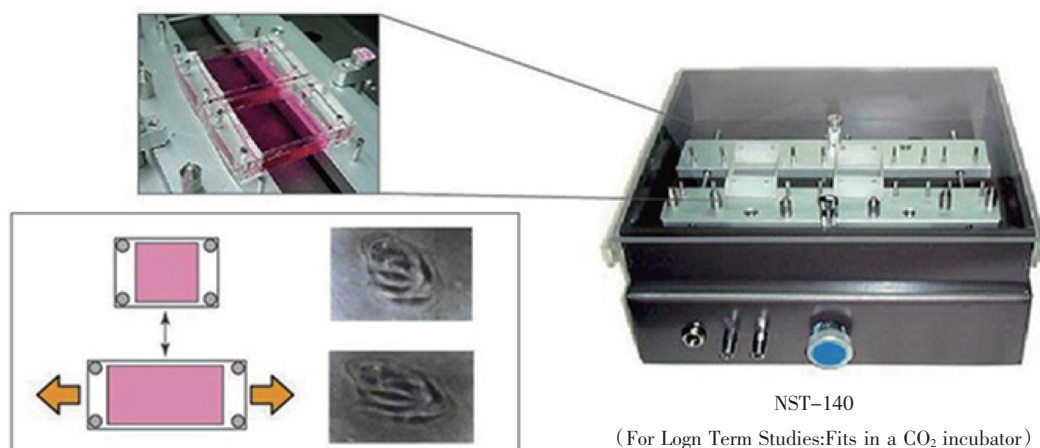


图1 细胞拉伸仪示意图

Fig1 Diagram of cell stretching instrument

(1)设置好频率和幅度后打开控制单元总电源开关,打开后开关灯闪烁绿光。(2)按下 START 按钮,拉伸小室支架随之开始移动,此时按钮灯会闪烁绿光。(3)按下 STOP 按钮,拉伸室支架停止移动。(4)拉伸完毕后关闭总电源和水泵开关。

既往研究中常用的拉伸幅度和频率条件有:25%、1 Hz^[6-8],20%、1 Hz^[9-10],15%、1 Hz^[11],10%、0.5 Hz^[12],10%、1 Hz^[13]及 10%、1.25 Hz^[14-15]。

1.3 统计学处理 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用非配对 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),*P*<0.05 为差异有统计学意义。结果部分中标注的实验结果的次数(*n*),是多次实验重复获得的样本数量。采用 GraphPad Prism6 统计软件进行统计和画图。

2 结果

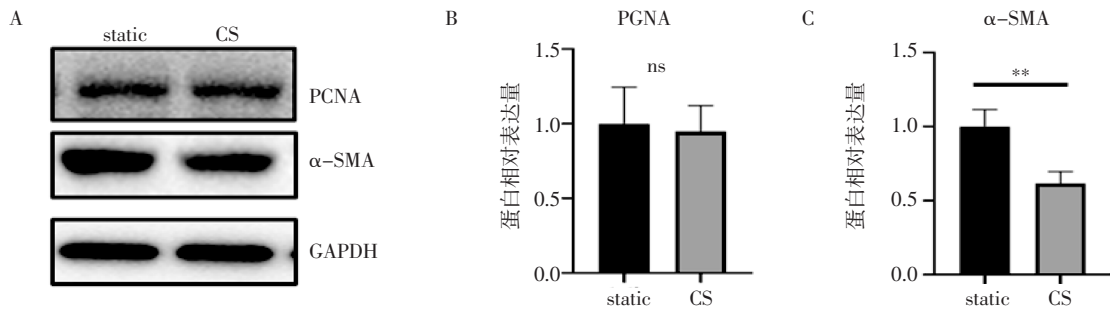
2.1 周期性拉伸后 VSMC 的收缩和增殖相关基因表达的改变 周期性拉伸的频率和幅度对细胞的

功能改变也不相同,笔者确定了拉伸幅度 15%、频率为 1 Hz 的周期性拉伸作为模拟动脉循环中 VSMC 受到的力学条件,静止于拉伸小室作为模拟静脉循环中 VSMC 受到的力学条件。

当 VSMC 处于上述两种力学条件 24 h 后收集细胞的蛋白和 RNA,通过免疫印迹实验和 qPCR 对 VSMC 中的增殖和表型转换的标志蛋白进行检测。

Western 印迹结果显示,周期性拉伸 24 h 后 PCNA 的蛋白表达水平无明显变化(*P*=0.777), α -SMA 的蛋白表达水平下降(*t*=4.715,*P*<0.01)(图 2)。qPCR 结果显示,和静息状态相比,PCNA 的 mRNA 水平在 VSMC 周期性拉伸 12 h 后上升,24 h 后恢复到正常水平;细胞周期蛋白 Ccnd1 和 Cdk6 的 mRNA 水平呈时间依赖性上升,细胞周期依赖性激酶抑制剂 Cdkn1a 和分化相关基因 Acta2、Tagln 的 mRNA 水平呈时间依赖性下降(图 3)。

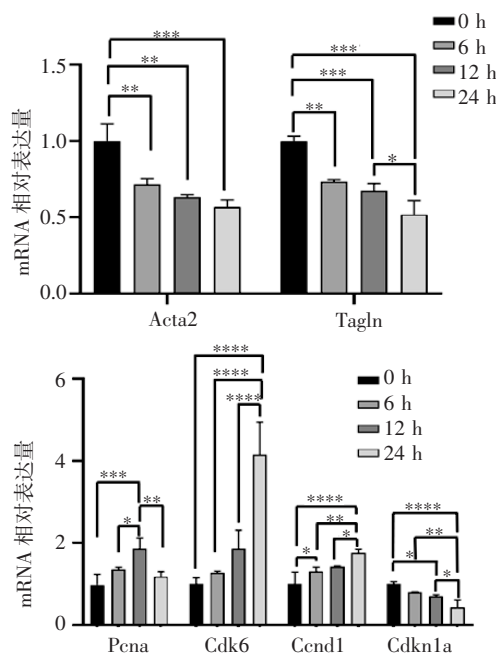
2.2 周期性拉伸对细胞内乳酸含量的影响 检测



注:A:Western印迹检测血管平滑肌细胞中PCNA和 α -SMA的蛋白水平;B、C:Western印迹统计分析结果($n=3$);static:静息(对照);cs:周期性拉伸;VSMC:血管平滑肌细胞;PCNA:增殖细胞核抗原; α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白;GAPDH:内参蛋白;ns:没有统计学意义;** $P<0.01$

图2 周期性拉伸后VSMC的PCNA和 α -SMA的蛋白表达变化

Fig 2 Changes in protein expression of PCNA and α -SMA in VSMC after cyclic stretch



注:Acta2:平滑肌肌动蛋白 α 2;Tagln:转运蛋白基因;PcnA:增殖细胞核抗原;Cdk6:周期蛋白依赖性激酶6;Cend1:细胞周期蛋白D1;Cdkn1a:细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A;VSMC:血管平滑肌细胞;* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$

图3 周期性拉伸后VSMC的增殖和分化相关基因的mRNA变化

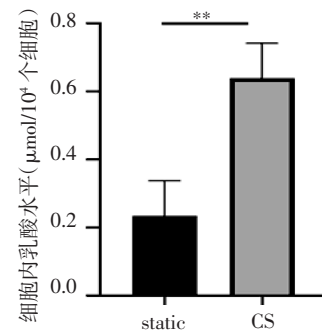
Fig 3 Changes in mRNA levels of genes associated with proliferation and differentiation in VSMC after cyclic stretch

VSMC周期性拉伸24h后细胞内的乳酸水平,与静息状态相比,细胞内乳酸积累增加($t=5.554$, $P<0.01$)(图4)。

2.3 周期性拉伸对组蛋白泛乳酸化修饰的影响 和静息状态相比,周期性拉伸24h后的组蛋白的泛乳酸化修饰水平升高($t=3.603$, $P<0.01$)(图5)。

2.4 周期性拉伸对位点特异性组蛋白乳酸化修饰的影响 随着周期性拉伸时间的延长,特异性位点乳酸化修饰如H3K9la、H3K14la和H3K18la的水平升高并且表现出时间梯度依赖性。与静息状态(0h)相比,H3K9la、H3K14la和H3K18la的水平显著增

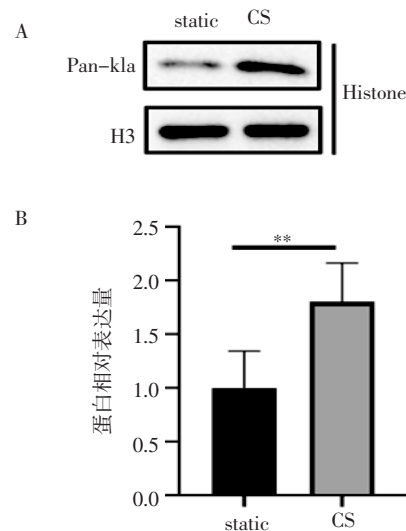
加($t=6.001$ 、6.966、12.750,均 $P<0.0001$)(图6)。



注:测量平滑肌细胞内乳酸含量的统计分析结果($n=4$);static:静息(对照);cs:周期性拉伸;VSMC:血管平滑肌细胞;** $P<0.01$

图4 周期性拉伸后VSMC的乳酸含量变化

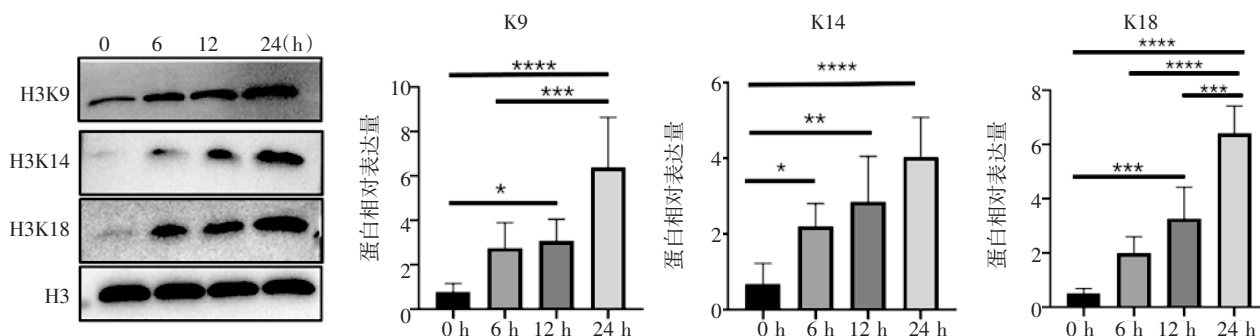
Fig4 Changes of lactate levels in VSMC after cyclic stretch



注:A:Western印迹检测VSMC中pan-kla的蛋白表达水平;B:Western印迹统计分析结果($n=5$);VSMC:血管平滑肌细胞;pan-kla,泛乳酸化修饰;static:静息(对照);cs:周期性拉伸;H3:内参蛋白;*** $P<0.01$

图5 周期性拉伸后VSMC的组蛋白泛乳酸化修饰的变化

Fig 5 Changes of pan-histone lactylation in VSMC after cyclic stretch



注:K:赖氨酸;H3:内参蛋白;VSMC:血管平滑肌细胞; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$

图 6 周期性拉伸 6、12、24 h 后 VSMC 的特异性位点组蛋白乳酸化修饰的变化

Fig 6 Changes of site-specific histone lactylation modifications of VSMC after cyclic stretching for 6, 12 and 24 h

3 讨论

在血液循环系统中,左心室泵出的血液会对血管壁有 3 种力学刺激:血液流动时和管壁的摩擦力,即剪切应力;血液压力引起管壁扩张所引起的周期性应力;由循环系统平均充盈压所产生的静水压力。血管内皮细胞直接接触血流因而主要受剪切应力调节,血管平滑肌细胞则主要受周期性应力调节^[16]。周期性应力包括沿着管壁圆周传播的周向应力和纵向应力^[17]。其中,VSMC 主要受周向应力的调控^[18],形成细胞周期性拉伸。许多研究结果说明,VSMC 周向应力的增加会导致动脉粥样硬化病变的发生。

静脉移植物内膜增厚是静脉及其血管细胞在植入后生物力学和环境因素共同影响的结果,这会导致 VSMCs 的激活,并通过包括细胞外基质和钙黏蛋白在内的多个因素共同调节其行为。增厚的内膜极易发生动脉粥样硬化,导致症状再次发生,需要进一步治疗。因此,深入探究静脉移植后周期性拉伸对 VSMC 的作用机制,对静脉移植疾病的临床用药和治疗至关重要。静脉受心脏搏动的影响很小,管腔内压力大约为 9~15 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),血管壁细胞的周期性拉伸幅度约为 5%~10%。在移植到动脉循环后,其周向应变最高值大约增加了 1 倍。基于动、静脉管壁平滑肌细胞所处的周期性拉伸环境和前期对静脉移植的研究实验,笔者最终采用拉伸幅度 15%、频率为 1 Hz 的周期性拉伸来模拟动脉管壁的力学环境,静止于拉伸小室中则被用来模拟静脉管壁的力学环境。成熟 VSMCs 表达 α -SMA,这一蛋白标志表明细胞收缩能力强。和静息状态的对照组相比,15%、1 Hz 的周期性拉伸可以降低收缩标志 α -SMA 的蛋白和 mRNA 水平,说明周期性拉伸可能使 VSMC 去分化,这一结果和之前的研究一致^[19-20],说明本研究的模型

构建成功。

乳酸是细胞糖酵解途径生成的重要代谢产物,其生物学功能因肿瘤细胞中 Warburg 效应的存在得到了广泛关注。组蛋白乳酸化修饰水平受细胞乳酸含量的调控。与组蛋白乙酰化类似,组蛋白乳酸化可以直接刺激染色质的基因转录。之前有相关研究的代谢组学数据显示,15%、1 Hz 的周期性拉伸条件下 VSMC 会改变其产能方式,即由氧化磷酸化转向糖酵解方向^[21]。本工作证实了周期性拉伸的条件下 VSMC 的乳酸积累增多,并且增多的乳酸会作为组蛋白乳酸化的底物,导致组蛋白乳酸化水平的改变。与静息状态相比,周期性拉伸后的 VSMC 的泛乳酸化和特异性位点(K9、K14、K18)的乳酸化修饰水平均显著增加。目前已发现,即使在充分氧化的条件下,VSMC 也会产生大量乳酸,并且局部缺血、心脏骤停以及休克、烧伤、创伤和其他病理情况都会引起局部和全身的乳酸浓度升高。2017 年研究结果首次证明了 VSMCs 在富含乳酸的微环境中可以呈现出更多的合成表型,明确了 VSMC 的代谢状态和平滑肌细胞表型转换的关系^[22]。VSMC 的增殖和肿瘤细胞一样需要大量能量,一些研究表明异常增殖的 VSMCs 中也存在 Warburg 效应^[23]。内皮损伤后,VSMCs 中葡萄糖转运蛋白 1 水平升高,表明葡萄糖摄取与 VSMCs 增殖之间存在相关性^[24]。有研究提出,血小板衍生生长因子(PDGF)通过糖酵解途径显著诱导 VSMCs 增殖。在肺动脉高压中,Warburg 效应的抑制剂能够降低肺动脉 VSMCs 的增殖水平、缓解肺血管重构,并改善心肌肥厚及心力衰竭^[25-27]。这说明糖酵解在 VSMCs 的增殖中具有十分重要的作用。

已有报道证实,H3K18la 和 H4K5la 参与了缺氧性肺动脉高压的平滑肌细胞增殖过程,破坏乳酸的产生或组蛋白的乳酸化则使平滑肌细胞的增殖

和血管重塑减弱^[28]。机械力刺激下的组蛋白乳酸化,能够在早期激活 VSMC 增殖相关细胞因子,提示组蛋白的乳酸化可能是 VSMC 增殖的早期启动信号。周期性拉伸能够诱导 VSMC 中血管内皮生长因子- α 、转化生长因子- β 等细胞因子的表达并促进 VSMC 增殖^[29-30]。有报道乳酸和组蛋白乳酸化能够在内皮细胞、单核细胞等多种细胞类型中激活血管内皮生长因子、转化生长因子- β 通路^[31-33],推测 VSMC 中也存在类似的细胞因子激活机制,即机械牵张可能通过组蛋白乳酸化激活血管内皮生长因子、转化生长因子- β 等信号通路,促进 VSMC 增殖。周期性拉伸时,VSMC 中高度糖酵解活性和高组蛋白乳酸化水平的相互作用机制仍待进一步研究。

综上所述,本研究说明了周期性拉伸后 VSMC 存在代谢状态的改变,糖酵解的最终代谢产物乳酸积累增加,并且组蛋白乳酸化修饰水平也增加,这可能是 VSMC 增殖的早期启动信号。

参考文献:

- [1] EAGLE K A, GUYTON R A, DAVIDOFF R, et al. ACC/AHA 2004 guideline update for coronary artery bypass graft surgery: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Update the 1999 Guidelines for Coronary Artery Bypass Graft Surgery) [J]. *Circulation*, 2004, 110: e340-e437.
- [2] WADEY K, LOPES J, BENDECK M, et al. Role of smooth muscle cells in coronary artery bypass grafting failure [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(4): 601-610.
- [3] YAHAGI K, KOLODZIE F D, OTSUKA F, et al. Pathophysiology of native coronary, vein graft, and instent atherosclerosis [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2015, 13(2): 79-98.
- [4] CARREL T, WINKLER B. Current trends in selection of conduits for coronary artery bypass grafting [J]. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 2017, 65(10): 549-556.
- [5] ZHANG D, TANG Z, Huang H, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation [J]. *Nature*, 2019, 574(7779): 575-580.
- [6] KOZAI T, ETO M, YANG Z, et al. Statins prevent pulsatile stretch-induced proliferation of human saphenous vein smooth muscle cells via inhibition of Rho/Rho-kinase pathway [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 68(3): 475-482.
- [7] LIU S, LI Y, ZHANG Z, et al. Alpha1-adrenergic receptors mediate combined signals initiated by mechanical stretch stress and norepinephrine leading to accelerated mouse vein graft atherosclerosis [J]. *J Vasc Surg*, 2013, 57(6): 1645-1656.
- [8] PREDEL H G, YANG Z, VON SEGESSER L, et al. Implications of pulsatile stretch on growth of saphenous vein and mammary artery smooth muscle [J]. *Lancet*, 1992, 340(8824): 878-879.
- [9] MAYR M, LI C, ZOU Y, et al. Biomechanical stress-induced apoptosis in vein grafts involves p38 mitogen-activated protein kinases [J]. *FASEB J*, 2000, 14(2): 261-270.
- [10] CHENG J, DU J. Mechanical stretch simulates proliferation of venous smooth muscle cells through activation of the insulin-like growth factor-1 receptor [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(8): 1744-1751.
- [11] CHENG J, WANG Y, MA Y, et al. The mechanical stress-activated serum-, glucocorticoid-regulated kinase 1 contributes to neointima formation in vein grafts [J]. *Circ Res*, 2010, 107(10): 1265-1274.
- [12] DE WAARD V, ARKENBOUT E K, VOS M, et al. TR3 nuclear orphan receptor prevents cyclic stretch-induced proliferation of venous smooth muscle cells [J]. *Am J Pathol*, 2006, 168(6): 2027-2035.
- [13] PING S, LIU S, ZHOU Y, et al. Protein disulfide isomerase-mediated apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells induced by mechanical stress and advanced glycosylation end products result in diabetic mouse vein graft atherosclerosis [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(5): e2818.
- [14] HUANG K, BAO H, YAN Z Q, et al. MicroRNA-33 protects against neointimal hyperplasia induced by arterial mechanical stretch in the grafted vein [J]. *Cardiovasc Res*, 2017, 113(5): 488-497.
- [15] LIU J T, LIU Z, CHEN Y, et al. MicroRNA-29a Involvement in phenotypic transformation of venous smooth muscle cells via ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1 in response to mechanical cyclic stretch [J]. *J Biomech Eng*, 2020, 142(5): 051009.
- [16] HUMPHREY J D, SCHWARTZ M A, TELLIDES G, et al. Role of mechanotransduction in vascular biology: focus on thoracic aortic aneurysms and dissections [J]. *Circ Res*, 2015, 116(8): 1448-1461.
- [17] CHIEN S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(3): H1209-H1224.
- [18] QI Y X, HAN Y, JIANG Z L. Mechanobiology and vascular remodeling: from membrane to nucleus [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1097: 69-82.
- [19] RODRÍGUEZ A I, CSÁNYI G, RANAYHOSSAINI D J, et al. MEF2B-Nox1 signaling is critical for stretch-induced phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(2): 430-438.
- [20] WAN X J, ZHAO H C, ZHANG P, et al. Involvement of BK channel in differentiation of vascular smooth muscle cells induced by mechanical stretch [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 59: 21-29.
- [21] TANG Y, JIA Y, FAN L, et al. MFN2 prevents neointimal hyperplasia in vein grafts via destabilizing PFK1 [J]. *Circ Res*, 2022, 130(11): e26-e43.
- [22] YANG L, GAO L, NICKEL T, et al. Lactate promotes synthetic phenotype in vascular smooth muscle cells [J]. *Circ Res*, 2017, 121(11): 1251-1262.
- [23] CHEN Z, LIU M, LI L, et al. Involvement of the Warburg effect in non-tumor diseases processes [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(4): 2839-2849.
- [24] CHIONG M, MORALES P, TORRES G, et al. Influence of glucose metabolism on vascular smooth muscle cell proliferation [J]. *Vasa*, 2013, 42(1): 8-16.
- [25] ZHOU Q, XU J, LIU M, et al. Warburg effect is involved in apelin-13-induced human aortic vascular smooth muscle cells proliferation

- month randomized phase 2 study: AURORA study[J]. *Ophthalmology*, 2014, 121(9): 1740–1747.
- [22] LIU K, SONG Y, XU G, et al. Conbercept for treatment of neovascular age-related macular degeneration: results of the randomized phase 3 PHOENIX study[J]. *Am J Ophthalmol*, 2019, 197: 156–167.
- [23] WILLIAMSON T R, BARRETT G V. Feasibility of measuring eye movements in real-world and simulated driving situations[J]. *Percept Mot Skills*, 1966, 23(1): 329–330.
- [24] CHEUNG CMG, LAI TYY, TEO K, et al. Polypoidal choroidal vasculopathy: consensus nomenclature and non-indocyanine green angiograph diagnostic criteria from the Asia-Pacific ocular imaging society PCV workgroup[J]. *Ophthalmology*, 2021, 128(3): 443–452.
- [25] SPAIDE R F, JAFFE G J, SARRAF D, et al. Consensus nomenclature for reporting neovascular age-related macular degeneration data: consensus on neovascular age-related macular degeneration nomenclature study group[J]. *Ophthalmology*, 2020, 127(5): 616–636.
- [26] THONGSUWAN S, HANUTSAHA P, CHANTARASORN Y, et al. Treatment outcome of wet age-related macular degeneration management in thailand: a retrospective real-world study (TOWER study)[J]. *Ophthalmol Ther*, 2022, 11(2): 739–757.
- [27] PAPADOPOULOS N, MARTIN J, RUAN Q, et al. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab[J]. *Angiogenesis*, 2012, 15(2): 171–185.
- [28] 张香闰, 宋艳萍, 黄珍, 等. 康柏西普治疗新生血管性老年性黄斑变性中 1 型黄斑新生血管合并不同类型视网膜色素上皮脱离的疗效观察[J]. *中华眼底病杂志*, 2022, 38(3): 217–224.
- [29] 万承, 林仲, 林克, 等. 不同药物玻璃体内注射后短期眼压变化[J]. *中华眼外伤职业眼病杂志*, 2022, 44(7): 486–491.
- [30] SUDHALKAR A, BILGIC A, VASAVADA S, et al. Current intravitreal therapy and ocular hypertension: a review[J]. *Indian J Ophthalmol*, 2021, 69(2): 236–243.
- [31] 韩嵩. 玻璃体内注射雷珠单抗治疗新生血管性年龄相关性黄斑变性的疗效及对患者血清 CRP VEGF 眼压和视力的影响[J]. *河北医学*, 2020, 26(9): 1478–1482.
- [32] HOGUET A, CHEN P P, JUNK A K, et al. The effect of anti-vascular endothelial growth factor agents on intraocular pressure and glaucoma: a report by the American Academy of Ophthalmology [J]. *Ophthalmology*, 2019, 126(4): 611–622.
- [33] TANWAR S, SHARMA A K, SRIVASTAVA R M, et al. Comparison between two intravitreal injection techniques with respect to fluid reflux, intraocular pressure, and therapeutic effect[J]. *Oman J Ophthalmol*, 2021, 14(1): 33–37.
- [34] BILGIC A, KODJIKIAN L, CHHABLANI J, et al. Sustained intraocular pressure rise after the treat and extend regimen at 3 years: aflibercept versus ranibizumab[J]. *Ophthalmol*, 2020, 2020: 7462098. (2023-02-11 收稿)

(上接第 499 页)

- tion[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(9): 14413–14421.
- [26] XIAO Y, PENG H, HONG C, et al. PDGF promotes the Warburg effect in pulmonary arterial smooth muscle cells via activation of the PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α signaling pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(4): 1603–1613.
- [27] WERLE M, KREUZER J, HOFELE J, et al. Metabolic control analysis of the Warburg-effect in proliferating vascular smooth muscle cells[J]. *J Biomed Sci*, 2005, 12(5): 827–834.
- [28] CHEN J, ZHANG M, LIU Y, et al. Histone lactylation driven by mROS-mediated glycolytic shift promotes hypoxic pulmonary hypertension[J]. *J Mol Cell Biol*, 2023, 14(12): mjac073.
- [29] SCHAD J F, MELTZER K R, HICKS M R, et al. Cyclic strain up-regulates VEGF and attenuates proliferation of vascular smooth muscle cells[J]. *Vasc Cell*, 2011, 3: 21.
- [30] YAO Q P, ZHANG P, QI Y X, et al. The role of SIRT6 in the differentiation of vascular smooth muscle cells in response to cyclic strain [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 49: 98–104.
- [31] WANG N, WANG W, WANG X, et al. Histone lactylation boosts reparative gene activation post-myocardial infarction[J]. *Circ Res*, 2022, 131(11): 893–908.
- [32] CUI H, XIE N, BANERJEE S, et al. Lung myofibroblasts promote macrophage profibrotic activity through lactate-induced histone lactylation[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2021, 64(1): 115–125.
- [33] GU J, ZHOU J, CHEN Q, et al. Tumor metabolite lactate promotes tumorigenesis by modulating MOESIN lactylation and enhancing TGF- β signaling in regulatory T cells[J]. *Cell Rep*, 2022, 39(12): 110986. (2023-03-20 收稿)