

• 论著—实验研究 •

Hippo-YAP 信号通路通过 Beclin1 调控自噬参与
血管平滑肌细胞表型转换的机制研究*刘超利¹ 李桑柔¹ 岳秀青¹ 杨帆¹ 陈睦虎¹ 钟武¹

【摘要】 目的:探索 Hippo-YAP 信号通路自噬在血管平滑肌细胞表型转换中的作用关系及其机制。方法:①培养小鼠血管平滑肌细胞(VSMCs),选取第 4~8 代用于实验,使用血管紧张素 II (Ang II, 1×10^{-7} mol/L) 处理 24 h 构建 VSMCs 表型转换模型,对照组细胞以同浓度的二甲亚砜(DMSO)处理。②使用 Western Blot、qRT-PCR 技术在蛋白质及 mRNA 水平对 YAP, VSMCs 表型标志物 OPN、 α -SMA,以及自噬相关标志物 LC3、P62、Beclin1 进行检测。③分别构建 YAP 与 Beclin1 的小干扰 RNA(siRNA)对其进行敲减,构建 YAP 的过表达质粒(pcDNA-YAP)对其进行过表达,使用 WB 与 qRT-PCR 验证各基因的表达变化。结果:①与对照组相比,Ang II 处理后 VSMCs 收缩型标志物 α -SMA 表达下调、合成型标志物 OPN 表达上调,YAP 及自噬相关标志物 LC3 II、Beclin1 表达上调、P62 表达下调,在蛋白质及 mRNA 水平均差异有统计学意义。②与对照组相比,YAP siRNA 转染后,VSMCs 中 YAP 在蛋白质与 mRNA 水平出现明显下调;过表达 YAP 后,YAP 的表达水平出现明显上调。③与单纯 Ang II 刺激组相比,在 Ang II 联合 YAP siRNA 组中,表型转换的发生及自噬相关标志物的上调明显受到抑制;而过表达 YAP 组中,表型转换的发生及自噬相关标志物的上调得到进一步增强。④与单纯 Ang II 刺激组相比,Ang II 联合 Beclin1 siRNA 组中,表型转换的发生及自噬相关标志物的上调均受到抑制,但两组中 YAP 的表达变化差异无统计学意义。结论:在 VSMCs 发生表型转换过程中,自噬相关基因及 YAP 的表达均明显上调,且 YAP 可能通过增加 Beclin1 的表达促进自噬,从而参与表型转换的发生。

【关键词】 血管平滑肌细胞;表型转换;Yes 相关蛋白;自噬;Beclin1

DOI:10.13201/j.issn.1009-5918.2022.12.013

[中图分类号] R543.1 [文献标志码] A

Study on the mechanism of Hippo-YAP signaling pathway regulate autophagy
by Beclin1 in phenotypic transition of vascular smooth muscle cells

LIU Chaoli LI Sangrou YUE Xiuqing YANG Fan CHEN Muhu ZHONG Wu

(Department of Emergency Medicine, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, 646000, China)

Corresponding author: ZHONG Wu, E-mail: zhongwu2876@sina.com

Abstract Objective: To explore interaction and mechanism between Hippo-YAP signaling pathway and autophagy in phenotypic transition of vascular smooth muscle cells(VSMCs). **Methods:** ① To construct phenotypic transition model of mouse VSMCs, the 4th to 8th generations of VSMCs were treated with angiotensin II (Ang II, 1×10^{-7} mol/L) for 24 hours, and the control group was treated with DMSO. ② Western Blot and qRT-PCR were used to detect the expression of YAP, OPN, α -SMA, autophagy-related markers LC3, P62 and Beclin1. ③ siRNA was constructed to knock down YAP and Beclin1, respectively. The plasmid was constructed to overexpress YAP. WB and qRT-PCR were used to verify the expression changes of each gene. **Results:** ① Compared to the control group, the expression of α -SMA was significantly down-regulated, While the expression of OPN was up-regulated. YAP and autophagy-related markers LC3 II、Beclin1 were up-regulated, and the expression of P62 was down-regulated after Ang II treatment. There were statistical differences at protein and mRNA levels. ② Compared to the control group, YAP's protein and mRNA in VSMCs were significantly down-regulated after YAP siRNA transfection. After YAP overexpression, YAP was significantly up-regulated. ③ Compared to the Ang II group, the phenotypic transition and the up-regulation of autophagy-related markers were significantly inhibited in the group treated with both Ang II and YAP siRNA. While in the YAP overexpression group, phenotypic transi-

*基金项目:四川省科技厅重点研发项目(No:2022YFS0275);西南医科大学附属医院博士科研启动基金(No:19085)

¹西南医科大学附属医院急诊医学部(四川泸州,646000)

通信作者:钟武,E-mail:zhongwu2876@sina.com

引用本文:刘超利,李桑柔,岳秀青,等. Hippo-YAP 信号通路通过 Beclin1 调控自噬参与血管平滑肌细胞表型转换的机制研究[J]. 临床急诊杂志,2022,23(12):870-877. DOI:10.13201/j.issn.1009-5918.2022.12.013.

tion and up-regulation of autophagy-related markers were further enhanced. ④ Compared to the Ang II treat group, the phenotypic transition and the up-regulation of autophagy-related markers were inhibited in the group treated with both Ang II and Beclin1 siRNA, while the expression of YAP in the two groups was no statistical difference. **Conclusion:** The expression of autophagy-related markers and YAP were up-regulated in VSMCs during phenotypic transitioning, and YAP may promote autophagy by upregulate the expression of Beclin1 and ultimately accelerate phenotypic transition.

Key words vascular smooth muscle cells; phenotypic transition; Yes-associated protein; autophagy; Beclin1

主动脉夹层(aortic dissection, AD)是一种高危性血管疾病^[1-2]。研究表明,位于中膜的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)是维持血管功能的重要结构^[3], VSMCs从收缩型到合成型的转换参与调节AD的发生^[2,4-5]。

Hippo-YAP信号网络作为控制细胞增殖和分化的信号整合器发挥着核心作用^[6],其中Yes相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)作为该信号通路下游的关键效应分子已被证明与VSMCs的表型转换有密切关联^[7-8]。研究发现,在使用血管紧张素II(Angiotensin II, Ang II)处理的VSMCs中,YAP的表达以剂量和时间依赖性方式增加^[9],这种现象在PDGF-BB处理后也可以观察到,同时伴随有自噬标志物的变化^[10-11]。

自噬是一种蛋白质或细胞器自我消化的过程,已被证实参与调节血管重塑^[12]。在VSMCs发生表型转换的过程中,检测到自噬标志物表达上调,阻断自噬明显抑制了表型转换发生^[13]。自噬受到哺乳动物雷帕霉素靶点(mTOR)的抑制已被充分证实,抑制mTOR从而激活下游PIK3C3-Beclin1-ATG14复合物是自噬发生的关键^[14-15]。另有研究表明,Hippo-YAP信号通路与mTOR在调控细胞生长方面具有协同作用^[16]。

因此,我们设想YAP可能通过调控自噬参与VSMCs表型转换,并且该过程与Beclin1相关。本研究成功构建出VSMCs表型转换模型,采用过表达及沉默基因的方法,检测YAP、VSMCs及自噬标志物的表达情况。对于进一步深入探索AD的发病机制、预防及治疗具有重大意义。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠主动脉平滑肌细胞(武汉普诺赛生物科技); DMEM/F12培养基(gibco)、胎牛血清、0.25% EDTA胰蛋白酶、青霉素-链霉素、无血清细胞冻存液(赛尔瑞成); RIPA裂解液、PMSF、蛋白质磷酸酶抑制剂、BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天)、PVDF膜、超敏ECL化学发光试剂盒(葆光生物)、预染蛋白Marker(赛默飞); 一抗(Proteintech): OPN、 α -SMA、LC3、P62、YAP1、Beclin1、 β -actin(碧云天); 二抗(碧云天): HRP标志山羊抗兔、HRP标志山羊抗小鼠; Ang II(MCE公司); YAP1 siRNA、Beclin1 siRNA、riboFECTCP转染

试剂(锐博公司); FTLipo转染试剂、pcDNA-YAP、pcDNA3.1-3xFlag-C(湖南丰晖生物科技); 引物(欣科盛生物科技); 快速RNA提取试剂盒、反转录预混试剂盒、SYBR Green Tag HS预混型qPCR试剂盒(艾科瑞公司)。

1.2 VSMCs培养与传代

复苏购买的小鼠VSMCs并接种在6 cm培养皿,细胞在含有10%胎牛血清及1%青霉素-链霉素的DMEM/F12培养基中培养,置于37℃恒温、含5%CO₂的培养箱中,细胞呈贴壁生长,每1~2天更换一次培养基,生长至80%用胰蛋白酶消化传代,后续实验用第4~8代细胞进行。

1.3 细胞模型

①将VSMCs用胰蛋白酶消化成细胞悬液,接种于6孔板;②待细胞贴壁后更换培养基,改为无血清培养基培养16 h实现同步化生长;③对照组加入完全培养基(含同浓度DMSO)2 mL,实验组加入使用DMSO溶解的Ang II,使终浓度为 1×10^{-7} mol/L^[17];④于恒温培养箱中培养24 h后,提取蛋白质及RNA,采用WB及qRT-PCR检测OPN及 α -SMA的表达,以此评估建模成功与否。

1.4 细胞转染

1.4.1 基因沉默 ①将消化后的细胞接种于6孔板,待细胞贴壁生长至30%~50%,更换无双抗培养基;②分为空白对照组、阴性对照组(NC)、实验组,分别用 $1 \times$ Buffer稀释YAP siRNA、Beclin1 siRNA,轻轻混匀后各加入12 μ L转染试剂,混匀后室温下孵育15 min;③将上述转染复合物加入6孔板中,置于恒温培养箱中转染48 h,检测转染效率。

1.4.2 质粒过表达 ①将细胞按照 1×10^6 个/孔接种于六孔板内,待细胞贴壁汇合至50%~70%更换为2 mL无双抗培养基;②分为空白对照组、对照质粒组、实验组,将10 μ L FTLipo转染试剂与250 μ L无双抗培养基混匀,室温孵育5 min;③将4 μ g质粒DNA与250 μ L无双抗培养基混匀;④将上述500 μ L LFTLipo-DNA-培养基混合液混匀,室温孵育20 min,均匀滴加至六孔板中,培养6 h后更换为2 mL无双抗培养基继续培养48 h,检测转染效率。

1.5 实验方法

1.5.1 Western Blot检测 ①取出处理后的细

胞,吸出培养基,用预冷 PBS 水冲洗 2 遍,加入胰酶消化细胞,用两倍体积的完全培养基终止消化,吹打细胞并将其转移至 1.5 mL EP 管离心收集细胞;②加入配置好的 RIPA 细胞裂解液 200 μ L/管,冰上裂解 30 min,4 $^{\circ}$ C、15894 \times g,离心 10 min,取上清转移至新的 EP 管,BCA 试剂盒测蛋白浓度,加入 Loading Buffer 配平,金属浴 100 $^{\circ}$ C、10 min 蛋白变性,室温冷却后待上样;③配制 10%(15%) SDS-PAGE 进行电泳,将蛋白转至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温下封闭 2 h,一抗(1:1000 稀释) 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,10 min/次,二

抗(1:1000 稀释)室温摇床孵育 1 h,洗膜,条带置于化学发光成像仪(Tanon)中,滴加 ECL 显色剂曝光,结果采用 imageJ 软件定量分析。

1.5.2 实时荧光定量 PCR 检测 ①使用新型快速提取 RNA 试剂盒提取细胞 RNA,以 RNA 为模板逆转录获得 cDNA,采用 SYBR 荧光定量检测方法进行 PCR 扩增;②引物序列及产物长度见表 1,反应条件为 95 $^{\circ}$ C 30 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 cycles。反应结束后分析扩增曲线,整理数据,计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值进行数据分析。

表 1 引物序列及产物长度

引物名称	引物序列	产物长度
YAP	F:5'-CAAATACAGCTGCAGCAGTTAC-3' R:5'-CAAATACAGCTGCAGCAGTTAC-3'	83 bp
Beclin1	F:5'-TAATAGCTTCACTCTGATCGGG-3' R:5'-CAAACAGCGTTTGTAGTTCTGA-3'	217 bp
OPN	F:5'-AAACACACAGACTTGAGCATTC-3' R:5'-TTAGGGTCTAGGACTAGCTTGT-3'	148bp
α -SMA	F:5'-CGTGGCTATTCCTTCGTGACTACTG-3' R:5'-CGTCAGGCAGTTCGTAGCTCTTC-3'	148 bp
LC3	F:5'-CTGTCCTGGATAAGACCAAGTT-3' R:5'-GTCTTCATCCTTCTCTCTGTTCA-3'	185 bp
P62	F:5'-TTCTGGGCCAATCGTTTAAATG-3' R:5'-ATGCTGCAGAAATACCAACATC-3'	82 bp
GAPDH	F:5'-TCAACAGCAACTCCCCTCT-3' R:5'-TGCTCAGTGTGGGGCCGA-3'	

注:YAP:Yes 相关蛋白; α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白;OPN:骨桥蛋白;LC3:微管相关蛋白 1 轻链 3;GAPDH:三磷酸甘油醛脱氢酶;F:上游引物;R:下游引物。

1.6 统计学方法

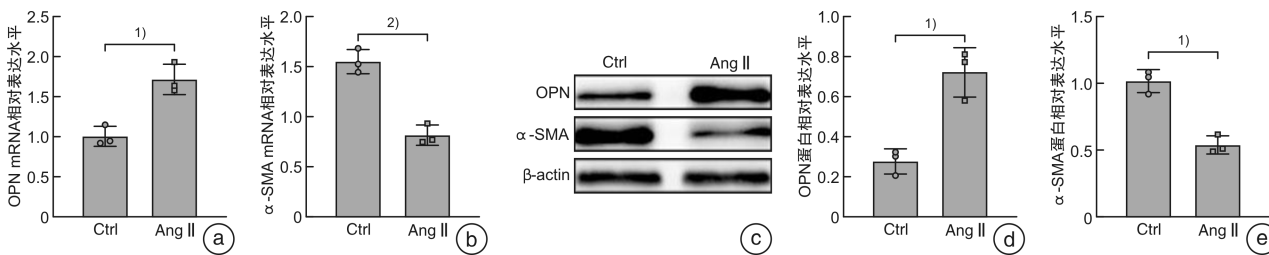
采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析,结果以 $\bar{X} \pm S$ 表示,2 组间差异比较采用独立样本 *t* 检验,3 组及以上差异比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ang II 促进 VSMCs 的表型转换

使用 1×10^{-7} mol/L 的 Ang II 刺激 VSMCs

24 h,根据 qRT-PCR 结果分析显示,与对照组相比,Ang II 刺激组中 VSMCs 收缩型标志物 α -SMA 的 mRNA 表达水平下降,合成型标志物 OPN 的 mRNA 表达水平上升,差异具有统计学意义(图 1a,1b)。同样, WB 结果证明了在蛋白质水平,Ang II 刺激组中 α -SMA 表达水平下调以及 OPN 表达水平上调(图 1c~1e)。



a, b: Ang II 对 VSMCs 中 OPN 及 α -SMA 的 mRNA 表达水平的影响; c~e: Ang II 对 VSMCs 中 OPN 及 α -SMA 的蛋白质表达水平的影响。¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

图 1 Ang II 对 VSMCs 标志物的 mRNA 及蛋白质表达水平的影响

2.2 Ang II 促进 VSMCs 发生表型转换伴随 YAP 及自噬相关标志物表达水平的变化

在 VSMCs 发生表型转换的同时,检测到 YAP 及自噬相关标志物 LC3、Beclin1 及 P62 的表达水平发生变化。qRT-PCR 结果分析显示,与对照组相比,Ang II 刺激组中 YAP 表达明显上调,自噬相关标志物 LC3 II、Beclin1 的表达上调以及 P62 表达下调,同样的变化在 WB 检测的蛋白质水平中也可以观察到(图 2)。

2.3 过表达 YAP 对 Ang II 诱导的 VSMCs 表型转换及自噬的影响

与对照质粒 (pcDNA3.1) 组和空白对照组相比,pcDNA3.1-YAP(mYAP) 转染组中 YAP 的表达在 mRNA 及蛋白质水平均上调(图 3a、3g、3i)。WB 及 qRT-PCR 分析表明,与空白对照组相比,Ang II 刺激组中 OPN 的表达明显上调,而 YAP 的过表达进一步增加了 Ang II 诱导的 OPN 表达上调。相比之下,Ang II 刺激组中 α -SMA 表达下调,而 YAP 过表达进一步增加了 Ang II 诱导的 α -SMA 表达下调(图 3b、3c、3h、3j、3l)。

与单纯 Ang II 刺激组相比,Ang II 联合 YAP 过表达进一步增加了单纯 Ang II 诱导的自噬相关标志物 LC3 II、Beclin1 表达上调。相比之下,YAP 过表达进一步增加了 Ang II 诱导的 P62 表达下调(图 3d、3e、3f、3k、3m、3n、3o)。

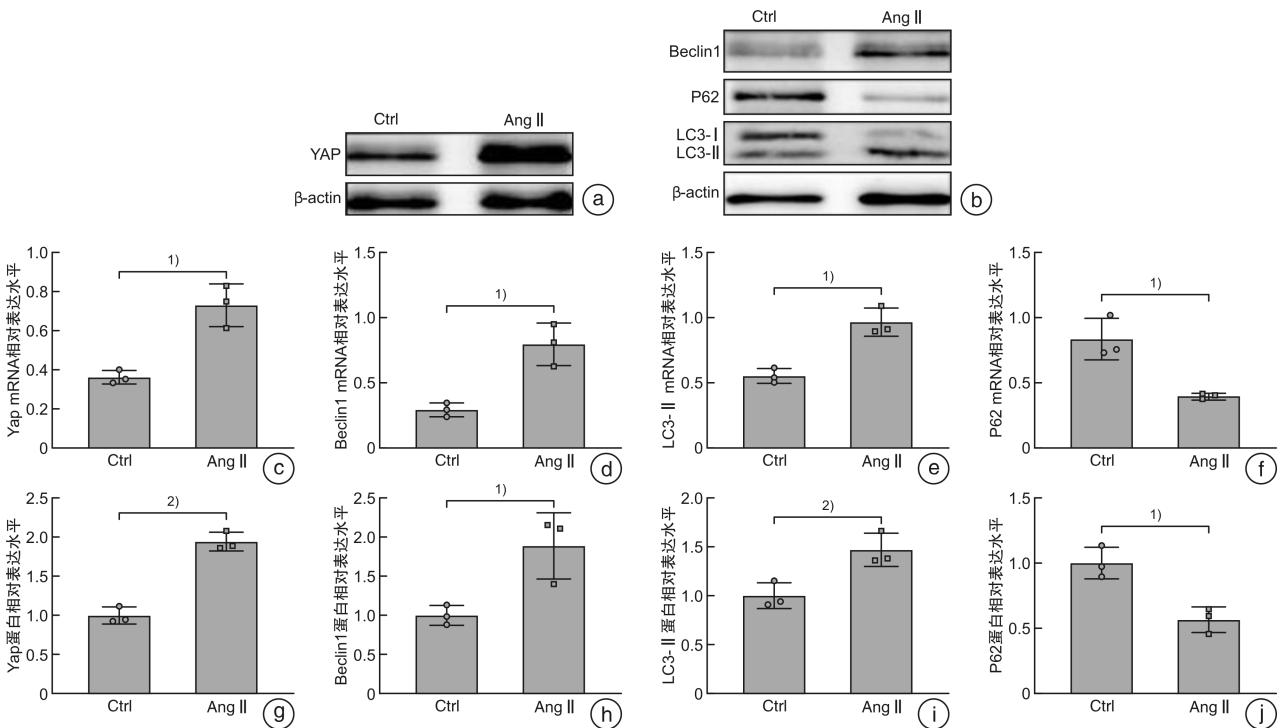
2.4 沉默 YAP 对 Ang II 诱导的 VSMCs 表型转换及自噬的影响

与阴性对照 (NC) 组和空白对照组相比,YAP siRNA 转染组中 YAP 的表达在 mRNA 及蛋白质水平均受到明显抑制(图 4a、4g、4i)。与空白对照组相比,Ang II 刺激组中 OPN 的表达明显上调;与单纯 Ang II 刺激组比较,Ang II 联合 YAP siRNA 则抑制了单纯 Ang II 诱导的 OPN 表达上调。相比之下,Ang II 联合 YAP siRNA 则抑制了单纯 Ang II 诱导的 α -SMA 表达下调(图 4b、4c、4h、4j、4l)。

与单纯 Ang II 刺激组相比,Ang II 联合 YAP siRNA 抑制了单纯 Ang II 诱导的自噬相关标志物 LC3 II、Beclin1 的表达上调。相反,Ang II 联合 YAP siRNA 抑制了 Ang II 诱导的 P62 表达下调(图 4d、4e、4f、4k、4m、4n、4o)。

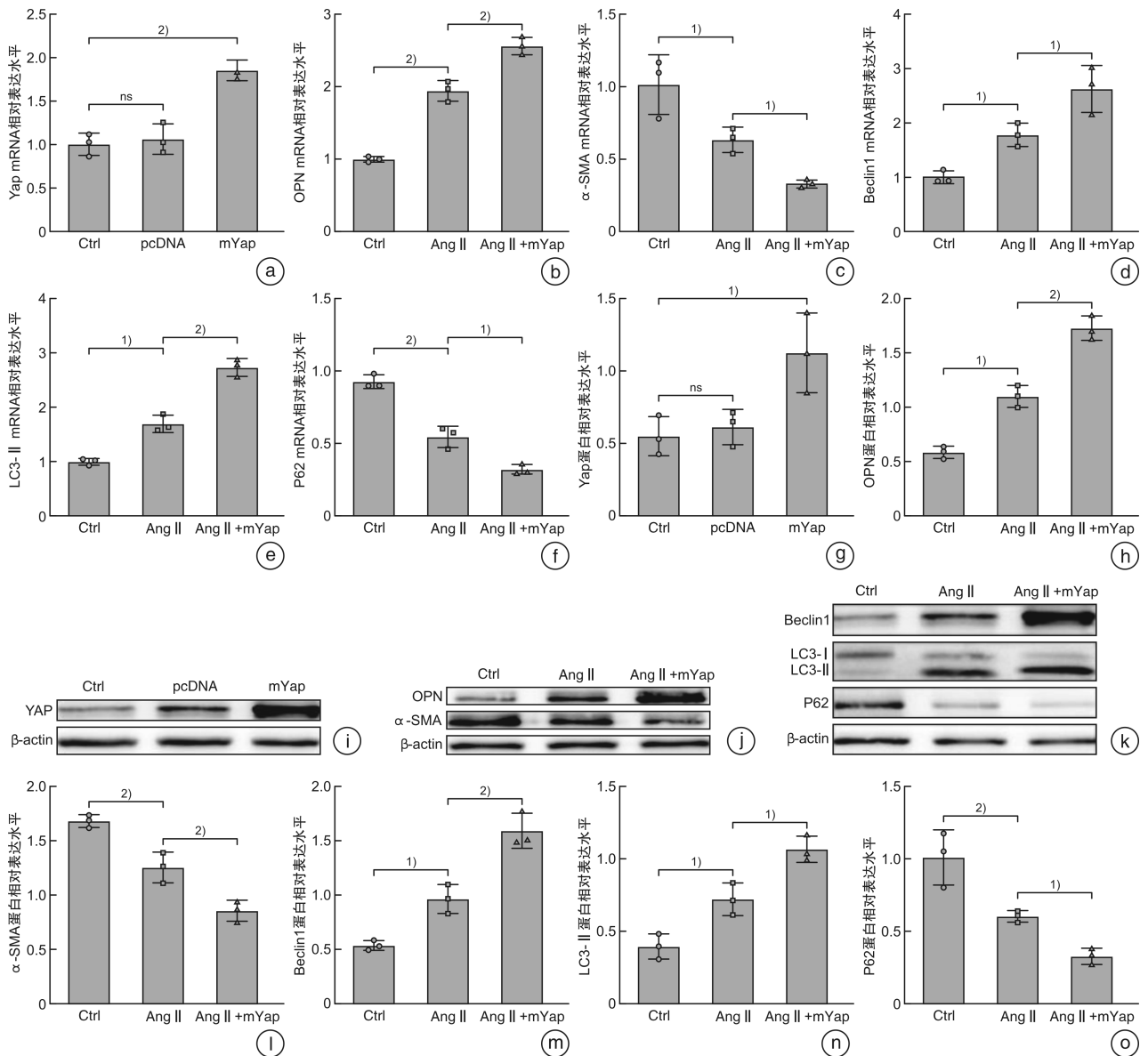
2.5 沉默 Beclin1 对 VSMCs 表型转换及 YAP 的影响

与阴性对照 (NC) 组和空白对照组相比,Beclin1 siRNA 转染组中 Beclin1 的表达明显下调(图 5a、5e、5h);与单纯 Ang II 刺激组相比,Ang II 联合 Beclin1 siRNA 组则抑制了 Ang II 诱导的 VSMCs 表型转换发生(图 5b、5c、5f、5i、5j);与空白对照组相比,单纯 Ang II 刺激组及 Ang II 联合 Beclin1 siRNA 组中 YAP 表达均上调,但两组间 YAP 表达变化没有统计学差异(图 5d、5g、5k)。



2a、2c、2g: Ang II 对 VSMCs 中 YAP 的 mRNA 及蛋白质表达水平的影响; 2b、2d、2e、2f、2h、2i、2j: Ang II 对 VSMCs 中自噬相关标志物 Beclin1、LC3 及 P62 的 mRNA 及蛋白质表达水平影响。¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

图 2 Ang II 对 VSMCs 中 YAP 及自噬相关标志物的 mRNA 及蛋白质表达水平影响



3a、3g、3i: pcDNA3.1-YAP(mYAP)转染后细胞中 YAP 的 mRNA 及蛋白质表达水平变化; 3b、3c、3h、3j、3l: Ang II 组及 Ang II 联合 mYAP 组中 OPN 及 α-SMA 的 mRNA 及蛋白质表达水平变化; 3d、3e、3f、3k、3m、3n、3o: Ang II 组及 Ang II 联合 mYAP 组中自噬相关标志物 Beclin1、LC3 及 P62 的 mRNA 及蛋白质表达水平变化。¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

图 3 过表达 YAP 对 Ang II 诱导的 VSMCs 表型转换及自噬的影响

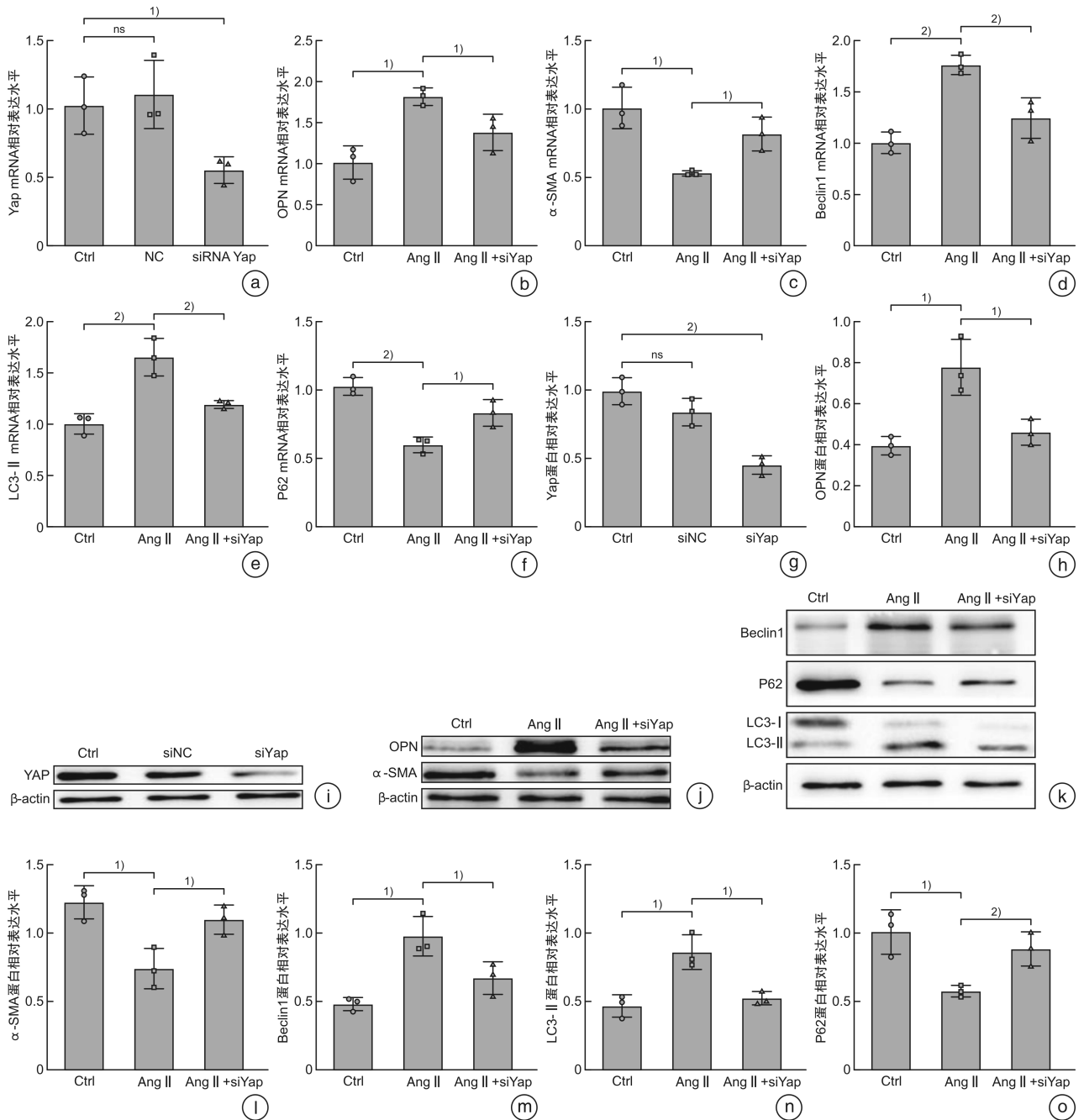
3 讨论

AD 具有发病快、治疗难、病死率高等特点, 研究其发病机制对于在临床上的干预及治疗十分重要, 但迄今为止, AD 的具体发病机制尚未完全阐明^[18]。研究表明, AD 的发病机制与血管的结构及功能状态有关, 而位于主动脉中膜的血管平滑肌 (VSM) 是维持血管功能的重要结构^[2,19], 因此, 血管平滑肌细胞 (VSMCs) 结构及功能状态的改变是 AD 发生的关键因素。正常情况下, VSMCs 以收缩型状态来维持主动脉的正常生理功能, 高表达 α-平滑肌肌动蛋白 (α-SMA), 研究表明, 在心血管事件的发生发展中, VSMCs 历经从收缩型到合成型的转变, 合成型的 VSMCs 有较强的增殖、迁移及分泌能力, 高表达骨桥蛋白 (osteopontin, OPN), 分

泌金属基质蛋白酶降解弹力纤维及胶原蛋白, 最终导致血管壁扩张甚至破裂, 从而引起 AD 的发生^[2,20-22]。近来大量研究揭示, 作为 Hippo-YAP 信号通路下游的重要效应分子 YAP 通过与心肌蛋白结合从而抑制心肌蛋白-SRF 复合物的形成, 促使 VSMCs 由收缩型向合成型转变^[10]。YAP 通过抑制平滑肌分化基因的表达, 同时在体外和体内促进平滑肌细胞增殖和迁移, 在平滑肌细胞表型调节中发挥新的整合作用^[23]。在诱导 VSMCs 发生表型转换过程中, 不仅存在 YAP 表达量的变化, 同时也伴随有自噬通量的改变^[24-25]。因此, 探究 AD 的发病机制需要明确 VSMCs 发生表型转换的病理过程, 但在 AD 中, YAP 及自噬是如何影响 VSMCs 的表型以及是否通过某种作用关系促进

VSMCs 发生表型转换却少有研究。本研究中, 我们假设 Hippo-YAP 信号通路是调控 VSMCs 发生

表型转换的关键, 并且该过程通过调控自噬来实现。



4a,4g,4i: YAP siRNA 转染后细胞中 YAP 的 mRNA 及蛋白质表达水平变化; 4b,4c,4h,4j,4l: Ang II 组及 Ang II 联合 YAP siRNA 组中 OPN 及 α -SMA 的 mRNA 及蛋白质表达水平变化; 4d,4e,4f,4k,4m,4n,4o: Ang II 组及 Ang II 联合 YAP siRNA 组中自噬相关标志物 Beclin1、LC3 及 P62 的 mRNA 及蛋白质表达水平变化。¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

图 4 沉默 YAP 对 Ang II 诱导的 VSMCs 表型转换及自噬的影响

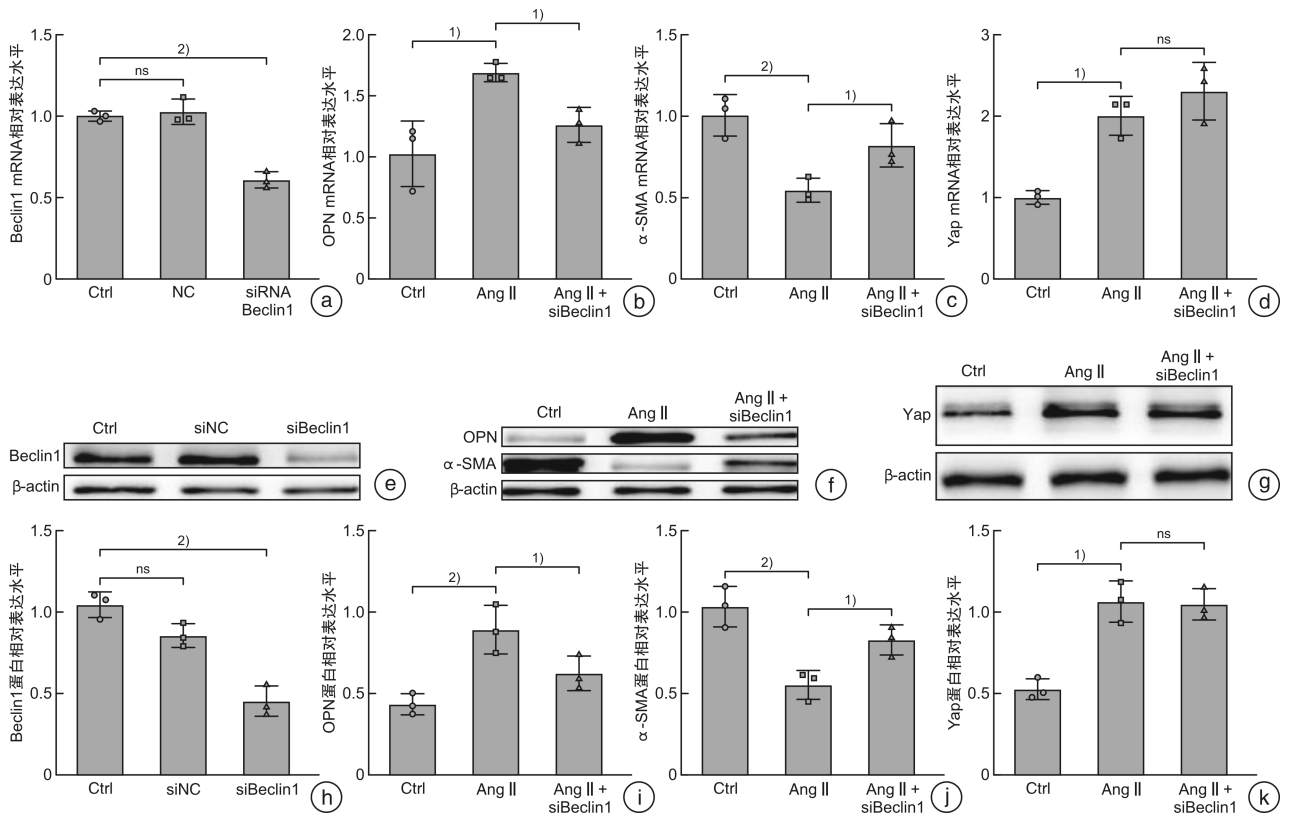
本实验前期采用 Ang II 刺激小鼠 VSMCs 发生表型转换, 该方法是目前构建 VSMCs 表型转换模型的最常见方法^[26-27]。Ang II 刺激之后分别在 mRNA 及蛋白质水平双重验证建模成功率, 实验组中 α -SMA 表达下调, 同时 OPN 表达明显上调, 成功构建出 VSMCs 表型转换模型。

为了研究 YAP 在 VSMCs 表型转换中的作

用, 利用 YAP siRNA 转染细胞以沉默 YAP 基因表达, 通过 Western Blot 及 qRT-PCR 结果分析显示, 与单纯 Ang II 处理组相比, 联合 YAP siRNA 组中 OPN 的表达相对减少, 同时观察到自噬现象的减弱, 过表达 YAP 再次反向验证, 出现相反的结果。实验过程中进一步验证 VSMCs 发生表型转换时自噬相关标志物的变化, 与对照组比较, Ang

II 处理组中自噬相关标志物 P62 的表达减少,而 LC3 II 表达明显升高,证明在 VSMCs 发生表型转换过程中,自噬被激活,同时作为自噬的另一标志物 Beclin1 表达也明显上调,因此我们推测,YAP 可能通过调控自噬参与 VSMCs 表型转换发生,并

且该过程伴随有 Beclin1 的表达水平变化,在接下来的 Beclin1 siRNA 实验中,检测到 VSMCs 合成表型标志物 OPN 的表达相对被削弱,但 YAP 的表达水平并未受到明显影响,这进一步验证了我们的猜想。



5a,5e,5h:siRNA Beclin1 转染后细胞中 Beclin1 的 mRNA 及蛋白质表达水平变化;5b,5c,5f,5i,5j:Ang II 组及 Ang II 联合 siRNA Beclin1 组中 OPN 及 α -SMA 的 mRNA 及蛋白质表达水平变化;5d,5g,5k:Ang II 组及 Ang II 联合 siRNA Beclin1 组中 YAP 的 mRNA 及蛋白质表达水平变化。¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

图 5 沉默 Beclin1 对 VSMCs 表型转换及 YAP 的影响

对此,我们提出 Hippo-YAP 信号通路可能通过促进 Beclin1 表达从而调控自噬参与 VSMCs 表型转换的发生,本实验成功构建出 VSMCs 表型转换模型,通过在 mRNA 及蛋白质水平验证了造模的成功,并观察到了 YAP 及自噬相关标志物的表达水平发生变化。在此基础上,利用 siRNA 沉默基因及构建质粒载体过表达基因等技术,初步验证了 YAP 与自噬在调控 VSMCs 表型转换中的作用关系。然而,研究发现,Hippo-YAP 信号通路及自噬的相互调控作用不仅限于本实验研究中所描述的,在不同的病理发生过程中两者关系并不唯一,这将有待于进一步深入挖掘。本实验不足之处在于未进一步在动物实验层面去完成体内验证,就目前实验研究结果显示,Hippo-YAP 信号通路调控自噬参与 VSMCs 表型转换,YAP 和自噬相关标志物可能成为 AD 的新的潜在治疗靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Hagan PG, Nienaber CA, Isselbacher EM, et al. The International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD): new insights into an old disease[J]. JAMA, 2000, 283(7): 897-903.
- [2] Yang K, Ren J, Li X, et al. Prevention of aortic dissection and aneurysm via an ALDH2-mediated switch in vascular smooth muscle cell phenotype[J]. Eur Heart J, 2020, 41(26): 2442-2453.
- [3] Wang F, Chen HZ. Histone Deacetylase SIRT1, Smooth Muscle Cell Function, and Vascular Diseases [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 537519.
- [4] Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease[J]. Physiol Rev, 2004, 84(3): 767-801.
- [5] Chin DD, Poon C, Wang J, et al. miR-145 micelles

- mitigate atherosclerosis by modulating vascular smooth muscle cell phenotype[J]. *Biomaterials*,2021, 273:120810.
- [6] Ibar C, Irvine KD. Integration of Hippo-YAP Signaling with Metabolism[J]. *Dev Cell*,2020, 54(2):256-267.
- [7] 姜文剑,兰峰,张宏家. 主动脉血管平滑肌细胞凋亡和 Hippo-YAP 信号通路作用于主动脉夹层发病的研究进展[J]. *中华胸心血管外科杂志*,2016, 32(1):51-54.
- [8] Zhou W, Zhao M. How Hippo Signaling Pathway Modulates Cardiovascular Development and Diseases [J]. *J Immunol Res*,2018,2018:3696914.
- [9] Lin M, Yuan W, Su Z, et al. Yes-associated protein mediates angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell phenotypic modulation and hypertensive vascular remodelling [J]. *Cell Prolif*, 2018, 51(6): e12517.
- [10] Xie C, Guo Y, Zhu T, et al. Yap1 protein regulates vascular smooth muscle cell phenotypic switch by interaction with myocardin[J]. *J Biol Chem*,2012, 287(18):14598-14605.
- [11] Han JH, Park HS, Lee DH, et al. Regulation of autophagy by controlling Erk1/2 and mTOR for platelet-derived growth factor-BB-mediated vascular smooth muscle cell phenotype shift[J]. *Life Sci*,2021, 267: 118978.
- [12] Qi Y, Dai F, Gu J, et al. Biomarkers in VSMC phenotypic modulation and vascular remodeling [J]. *Pharmazie*,2019, 74(12):711-714.
- [13] Mondaca-Ruff D, Riquelme JA, Quiroga C, et al. Angiotensin II-Regulated Autophagy Is Required for Vascular Smooth Muscle Cell Hypertrophy[J]. *Front Pharmacol*,2018,9:1553.
- [14] Munson MJ, Ganley IG, MTOR, PIK3C3, and autophagy: Signaling the beginning from the end[J]. *Autophagy*,2015, 11(12):2375-2376.
- [15] Kim J, Kundu M, Viollet B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1[J]. *Nat Cell Biol*,2011, 13(2):132-141.
- [16] Csibi A, Blenis J. Hippo-YAP and mTOR pathways collaborate to regulate organ size[J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(12):1244-1245.
- [17] Yaghini FA, Song CY, Lavrentyev EN, et al. Angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell migration and growth are mediated by cytochrome P450 1B1-dependent superoxide generation[J]. *Hypertension*,2010, 55(6):1461-1467.
- [18] Sherk WM, Khaja MS, Williams DM. Anatomy, Pathology, and Classification of Aortic Dissection[J]. *Tech Vasc Interv Radiol*,2021, 24(2):100746.
- [19] Milewicz DM, Trybus KM, Guo DC, et al. Altered Smooth Muscle Cell Force Generation as a Driver of Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2017, 37(1):26-34.
- [20] Lu QB, Wan MY, Wang PY, et al. Chicoric acid prevents PDGF-BB-induced VSMC dedifferentiation, proliferation and migration by suppressing ROS/NFκB/mTOR/P70S6K signaling cascade[J]. *Redox Biol*,2018, 14:656-668.
- [21] Zhou C, Lin Z, Cao H, et al. Anxa1 in smooth muscle cells protects against acute aortic dissection[J]. *Cardiovasc Res*,2022, 118(6):1564-1582.
- [22] Huang B, Niu Y, Chen Z, et al. Integrin α9 is involved in the pathogenesis of acute aortic dissection via mediating phenotype switch of vascular smooth muscle cell[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 533(3):519-525.
- [23] Liu M, Yu T, Li M, et al. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain promotes cell proliferation and phenotypic modulation through 14-3-3ε/YAP signaling in vascular smooth muscle cells[J]. *J Mol Cell Cardiol*,2020, 147:35-48.
- [24] 陈琳,程玲霞,杨帆,等. 血管平滑肌细胞自噬对小鼠主动脉夹层形成的影响[J]. *中山大学学报(医学科学版)*,2021, 42(2):226-234.
- [25] Clément M, Chappell J, Raffort J, et al. Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity and Autophagy in Dissecting Aortic Aneurysms[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2019, 39(6):1149-1159.
- [26] Sun SY, Cao YM, Huo YJ, et al. Nicotinate-curcumin inhibits AngII-induced vascular smooth muscle cell phenotype switching by upregulating Daxx expression [J]. *Cell Adh Migr*,2021, 15(1):116-125.
- [27] Wang N, Xu F, Lu S, et al. Septin4 as an autophagy modulator regulates Angiotensin-II mediated VSMCs proliferation and migration[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2020, 525(2):272-279.

(收稿日期:2022-08-24)