DOI:10.16016/j.1000-5404.202009065

LncRNA GASL1 通过 Wnt/β-catenin 信号通路促进血管平滑肌细胞增殖

刘彦廷[1],罗 然[1],孙 拯[1],田春雷[1],王雄伟[2,3] 443000 湖北 宜昌,三峡大学第一临床医学院,宜昌市中心人民医院神经外科[1];200090 上海,上海市杨浦区中心医院(同济大学附属杨浦医院)神经外科[2];200090 上海,同济大学医学院[3]

[摘要] **目的** 探讨 lncRNA GASL1 能否通过激活 Wnt/β-catenin 信号通路,促进血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)增殖。**方法** 构建 lncRNA GASL1 相关的 mRNAs 共表达网络,并对其进行信号通路分析。将 lncRNA GASL1(lncRNA GASL1 组)或 lncRNA NC(lncRNA NC 组)分别转染人动脉 VSMCs,采用 CCK-8 法检测 lncRNA GASL1 对 VSMCs 细胞活力的影响,免疫荧光检测增殖相关蛋白 bcl-2 的表达,Western blot 检测 Wnt/β-catenin 信号通路蛋白的变化,最后将 lncRNA GASL1 和 Wnt/β-catenin 通路抑制剂(ICG001)加入 VSMCs 细胞共培养,检测 VSMCs 细胞活力及 bcl-2 蛋白变化。**结果** lncRNA GASL1 相关的 mRNAs 共 374 个,Pathway 分析显示 lncRNA GASL1 与 Wnt/β-catenin 通路相关性最高。CCK-8 检测结果显示:lncRNA GASL1 组细胞活力高于 lncRNA NC 组细胞;Western blot 结果显示:lncRNA GASL1 组细胞 Wnt1、β-catenin 蛋白含量高于 lncRNA NC 组;免疫荧光观察显示:lncRNA GASL1 组 bcl-2 蛋白含量高于 lncRNA NC 组($P<0.05$)。将 lncRNA GASL1 与 ICG001 共培养 VSMCs 细胞后,CCK-8 检测显示:lncRNA GASL1+ ICG001 组细胞活力低于 lncRNA GASL1+对照剂组;免疫荧光观察显示:lncRNA GASL1+ICG001 组 bcl-2 蛋白含量低于 lncRNA GASL1+对照剂组;差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** lncRNA GASL1 可促进血管平滑肌细胞增殖,阻断 Wnt/β-catenin 信号通路后,lncRNA GASL1 对血管平滑肌的促增殖作用下降。

[关键词] lncRNA GASL1;细胞增殖;血管平滑肌细胞;Wnt/β-catenin 信号通路
[中图法分类号] R322.12; R329.28; R394.3 [文献标志码] A

Long non-coding RNA GASL1 promotes proliferation of vascular smooth muscle cells through Wnt/β-catenin signaling pathway

LIU Yanting[1], LUO Ran[1], SUN Zheng[1], TIAN Chunlei[1], WANG Xiongwei[2,3] [1]Department of Neurosurgery, First College of Clinical Medical Science of China Three Gorges University, Yichang Central People's Hospital, Yichang, Hubei Province, 443000; [2]Department of Neurosurgery, Yangpu Central Hospital (Yangpu Affiliated Hospital of Tongji University), Shanghai, 200090; [3]School of Medicine, Tongji University, Shanghai, 200090, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate whether long non-coding (lnc) RNA GASL1 can promote the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) by activating the Wnt/β-catenin signaling pathway. **Methods** The mRNAs co-expression network related to lncRNA GASL1 was constructed and analyzed with Pathway analysis to predict the signaling pathway of the highest correlation with lncRNA GasL1. After LncRNA GASL1 and lncRNA negative control (lncRNA NC) were transfected into VSMCs respectively, cell counting kit-8 (CCK-8) assay was performed to detect VSMCs viability. Immunofluorescence assay was performed to determine the expression level of proliferation-related protein Bcl-2, and Western blotting to detect the levels of the proteins of Wnt/β-catenin signaling pathway. Finally, Wnt/β-catenin pathway inhibitor ICG001 was added into VSMCs along with lncRNA GASL1 for co-culturing (lncRNA GASL1+ ICG001 group), and the alterations

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81671155);湖北省卫生健康委员会面上项目(WJ2019M063);宜昌市医疗卫生科研项目基金(A18-301-03)
[通信作者] 王雄伟,E-mail:1836509883@qq.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

of VSMCs viability and bcl-2 protein level were detected and compared with those in the lncRNA GASL1+control group. **Results** There were 374 mRNAs associated with lncRNA GASL1, of which the Wnt/β-catenin pathway had the highest correlation. CCK-8 assay showed that the VSMCs viability was higher in the lncRNA GASL1 group than in the lncRNA NC group ($P<0.05$). The results of immunofluorescence assay and Western blotting revealed that both the Bcl-2 protein level and the levels of Wnt1 and β-catenin were increased in lncRNA GASL1 group ($P<0.05$) when compared to the lncRNA-NC group. After co-culturing with lncRNA GASL1 and ICG001, the VSMCs viability was significantly decreased ($P<0.05$), and the Bcl-2 protein level was decreased when compared with the the lncRNA GASL1+control group ($P<0.05$). **Conclusion** LncRNA GASL1 promotes the proliferation of VSMCs through the Wnt/β-catenin signaling pathway. Blocking the signaling pathway can reduce the promotive effect of lncRNA GASL1 on VSMCs.

[**Key words**] LncRNA GASL1; cell proliferation; vascular smooth muscle cells; Wnt/β-catenin signaling pathway

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81671155), the General Project of Hubei Provincial Health Commission (WJ2019M063), and the Foundation of Medical and Health Research Projects of Yichang City (A18-301-03). Corresponding author: WANG Xiongwei, E-mail:1836509883@qq.com

近年来,颅内动脉瘤发病率逐年升高,是严重威胁人类健康的脑血管疾病。虽然动脉瘤夹闭手术及介入治疗已取得良好进展,但如何及早发现疾病,降低治疗风险,仍较困难[1]。因此,探索更加安全、无创的生物治疗方法仍很迫切。血管中层平滑肌细胞是颅内动脉血管在机械因素及炎性因子刺激下发挥收缩松弛功能的重要成分。颅内动脉瘤主要的病理学改变是血管中层平滑肌细胞大量缺失伴随内弹性层断裂。在颅内高速血流的剪切应力,或炎性因子及巨噬细胞刺激下,改变细胞的增殖凋亡平衡,导致血管对抗血流压力改变,最终形成动脉瘤样突起,直至破裂出血[2-3]。

目前发现,在血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)增殖及颅内动脉瘤形成过程中,Wnt/β-catenin 信号通路发挥重要调控作用。如在大鼠颅内动脉瘤模型中,过表达 β-catenin 蛋白可导致 VSMCs 增殖活性增强,激活 Wnt/β-catenin 信号通路活性可降低颅内动脉瘤的形成率;与之相反,抑制 Wnt 及 β-catenin 后,VSMCs 增殖活性随之降低,并伴随细胞周期蛋白 cyclin D1 表达下降[4]。最新研究发现,长链非编码 RNA GASL1(lncRNA GASL1),在组织细胞的增殖、凋亡中发挥重要作用。在脑动脉瘤患者外周血中,lncRNA GASL1 明显增高,并可通过上皮细胞间充质转化,在动脉瘤的形成中发挥调控作用[5]。此外,lncRNA GASL1 可通过调控 Wnt/β-catenin 信号通路,改变胃癌细胞的增殖速度[6]。那么,lncRNA GASL1 是否与 Wnt/β-catenin 信号通路存在相关性,并通过该通路对 VSMCs 的增殖发挥调控作用呢?本研究拟针对上述问题进行探索,为血管平滑肌细胞的基础研究提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 主要药品和试剂

人动脉血管平滑肌细胞(VSMCs)购于武汉华中科技大学同济医学院分子生物学实验室细胞库,RT-PCR 试剂盒购于日本 TaKaRa 公司,CCK-8 试剂盒购于美国 Sigma 公司;兔抗人 Wnt1、β-Catenin,α-SMA 和 bcl-2 单克隆抗体均购于美国 Cell Signaling Technolog 公司,β-actin 单克隆抗体、FITC 标记羊抗兔 IgG 购于上海康成生物公司;胎牛血清、培养基购于美国 Gibco 公司;Wnt/β-catenin 信号抑制剂 ICG001 购于美国 Selleck 公司。

1.2 血管平滑肌细胞培养

人动脉血管平滑肌细胞(VSMCs)置于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中常规培养,添加青链霉 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL 降低细胞污染,设定培养箱参数为 37 ℃、95%饱和湿度,5% CO_2 培养箱,每 2~3 天更换 1 次培养基,待细胞进入对数生长期进行后续实验。

1.3 构建 lncRNA GASL1 非编码基因共表达网络(construction of the coding-non-coding gene co-expression network,CNC)

于 NCBI 网站(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)分析 lncRNA GASL1 生物信息学特点,将 lncRNA GASL1 基因标准化后,根据 R 语音内部计算方法,预测 lncRNA GASL1 顺式作用方式与反式作用方式的靶基因;将编码基因(mRNA)部分相同基因的不同转录本取平均值;计算 mRNA 与 lncRNA GASL1 间的 Pearson 相关系数(Pearson correlation coefficient,PCC)。设定 PCC ≥ 0.995 为相互关系的筛选标准。采用 KEGG pathway

富集分析对 lncRNA GASL1 共表达的 mRNAs 进行功能预测,推断 lncRNA GASL1 相关性最高的信号通路。

1.4 慢病毒感染及分组

实验分为两组。lncRNA NC 组(对照):转染阴性空载病毒(negative control,NC);lncRNA GASL1 组:转染过表达 lncRNA GASL1 的慢病毒。采用胰酶收集细胞,重悬沉淀后用细胞培养液将细胞数调至 5×10^6/mL,接种于 6 孔板中培养。lncRNA GASL1 过表达和阴性空载病毒载体由上海吉玛生物制药有限公司构建,根据慢病毒包装与使用工具手册进行操作。

1.5 CCK-8 检测细胞增殖

取处于对数生长期各组的 VSMCs 细胞,配置为 1×10^5/mL 细胞悬液,置于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养,待细胞生长约 70%时,按实验分组转染 lncRNA GASL1 或 lncRNA NC,每组设 6 个复孔,培养 48 h 后,于 96 孔板中每孔加入 100 μL 混合培养液(CCK-8 工作液和培养基比例为 1∶10),空白孔加入等量的培养基,置于 37 ℃、恒定饱和湿度、5% CO_2 培养箱中孵育 2 h,置于酶标仪用 450 nm 单波长测光密度值[D(450)]。

1.6 RT-PCR 检测 lncRNA GASL1 表达

参照 TRIzol 试剂说明书操作提取总细胞总 RNA,鉴定 RNA 浓度及纯度。采用 RT-PCR 试剂盒,按照上面反应体系进行 cDNA 的合成逆转录反应体系。GASL1 正向引物序列:5′-CTGAGGCCAAAGTTTC-CAAC-3′,反向引物序列:5′-CAGCCTGACTTTCCCTCT-TCT-3′。选择 GAPDH 为内参,正向引物序列:5′-CCCACTCCTCCACCTTTGAC-3′,反向引物序列:5′-AT-GAGGTCCACCACCCTGTT-3′。ABI Prism7500 型荧光定量 PCR 仪中扩增,以内参 GAPDH 进行标准化,采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算基因的相对表达量。

1.7 免疫荧光染色检测 bcl-2 蛋白表达

VSMCs 细胞 PBS 冲洗后,依次加入多聚甲醛溶液固定,0.1% Tirton X-100,BSA 溶液封闭,按预设时间间隔加入兔抗人 bcl-2 抗体(1∶100 稀释),α-SMA 抗体(1∶100 稀释),羊抗兔多克隆 IgG 抗体(1∶300 稀释),避光条件下孵育 1 h,DAPI 染核 3 min,PBS 冲洗后取出细胞爬片,封片,荧光显微镜下观察。运用激光共聚焦显微镜(Nikon,日本)采集图像。图像采用 Image Pro 软件分析,计算 bcl-2 指标阳性指数(positive index,PI)= 阳性平均光密度值×阳性面积百分率。

1.8 Western blot 检测 Wnt1 和 β-catenin 蛋白表达

取对数生长期细胞,提取总蛋白后行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离目标蛋白。将目标蛋白转膜后上脱脂乳封闭 2 h,4 ℃下加入 Wnt1(1∶1 000)、β-catenin(1∶1 000)抗体摇床孵育,PBS 冲洗后滴加二抗(1∶2 000),室温下温育 2 h。滴加化学发光试剂(ECL)2 min,使用 Chemi DocMP 显现。

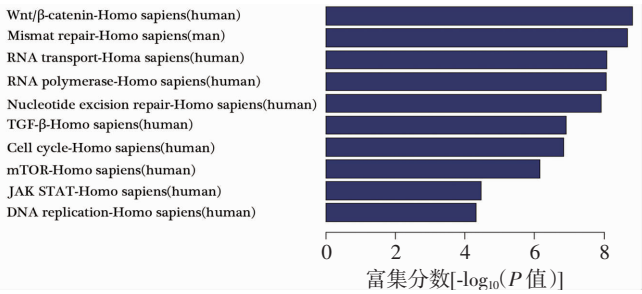
1.9 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA GASAL1 相关信号通路

LncRNA GASAL1 全名为 growth arrest associated lncRNA1,位于 8 号染色体,NC_000008.11(102806822~102811214),全长 4 393 nt,基因类型为 ncRNA。CNC 分析显示,GASAL1 与 102 个 mRNAs 存在正相关,与 272 个 mRNAs 存在负相关,对上述 mRNAs 进行 pathway 分析显示,Wnt/β-catenin 信号富集分数最高(图 1)。

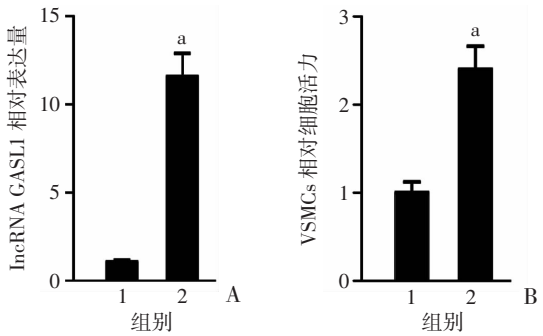


以-$\log_{10}$ 为富集分数标准,按降序排列与之相关的信号通路

图 1 KEGG pathway 富集分析 lncRNA GASL1 共表达的 mRNAs

2.2 lncRNA GASL1 过表达可促进 VSMCs 细胞增殖

将 lncRNA GASL1 与 lncRNA NC 分别转染 VSMCs 细胞 48 h 后,RT-PCR 结果显示,lncRNA GASL1 组 GASL1 水平显著高于 lncRNA NC 组($P<0.05$,图 2A)。CCK-8 检测显示:lncRNA GASL1 组 VSMCs 细胞活性显著高于 lncRNA NC 组($P<0.05$,图 2B)。



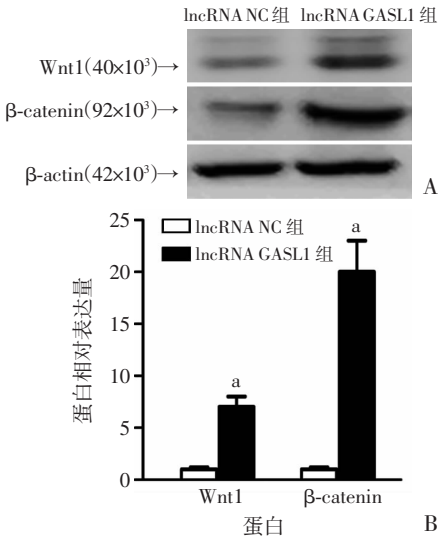
1:lncRNA NC 组;2:lncRNA GASL1 组;a:$P<0.05$,与 lncRNA NC 组比较

A:RT-PCR 检测 lncRNA GASL1 表达;B:CCK-8 检测 lncRNA GASL1 转染 VSMCs 细胞 48 h 后细胞活性改变

图 2 lncRNA 过表达 GASL1 对 VSMCs 细胞增殖的影响

2.3　lncRNA GASL1 对 Wnt/β-catenin 信号通路蛋白 Wnt1、β-catenin 表达的影响

将 lncRNA GASL1 与 lncRNA NC 分别转染 VSMCs 细胞 48 h 后,Western blot 检测结果显示,lncRNA GASL1 组细胞 Wnt1、β-catenin 蛋白表达高于 lncRNA NC 组($P<0.05$,图 3)。



A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果　a:$P<0.05$,与 lncRNA NC 组比较

图 3　lncRNA GASL1 转染 VSMCs 细胞 48 h 后 Wnt1、β-catenin 蛋白的表达

2.4　lncRNA GASL1 对增殖相关蛋白 bcl-2 表达的影响

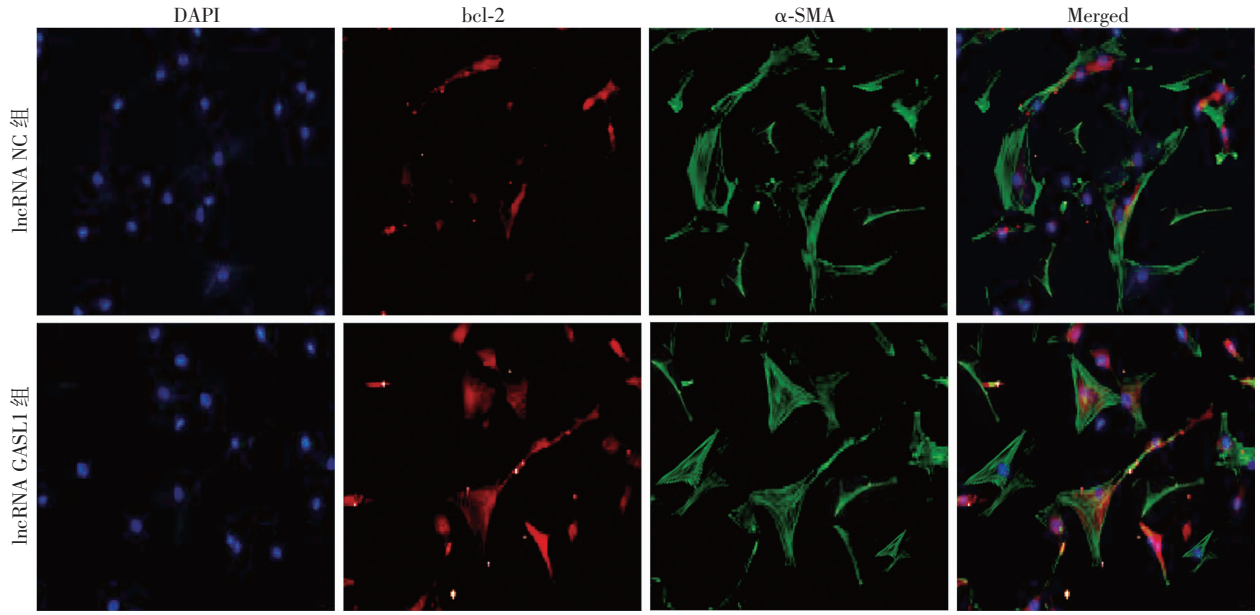
将 lncRNA GASL1 与 lncRNA NC 分别转染 VSMCs 细胞 48 h 后,免疫荧光检测显示:lncRNA NC 组与 lncRNA GASL1 组 α-SMA 蛋白染色均阳性;lncRNA NC 组 bcl-2 阳性细胞比例(1.03±0.29)低于 lncRNA GASL1 组(3.54±0.64,$P<0.05$,图 4)。

2.5　lncRNA GASL1 通过 Wnt/β-catenin 信号通路影响 VSMCs 细胞增殖活性

为检测 lncRNA GASL1 是否通过 Wnt/β-catenin 信号通路影响 VSMCs 细胞增殖活性,首先采用 Wnt/β-catenin 信号通路抑制剂 ICG001 或对照剂分别加入 VSMCs 细胞共培养,Western blot 检测 Wnt1、β-catenin 蛋白表达变化。结果显示:ICG001 组 Wnt1、β-catenin 蛋白含量均低于对照剂组,差异均具有统计学意义($P<0.05$,图 5A、B)。随后分别将 lncRNA GASL1+对照剂或 lncRNA GASL1+Wnt/β-catenin 信号通路抑制剂 ICG001 转染 VSMCs 细胞,CCK-8 检测结果显示,lncRNA GASL1+ ICG001 组 VSMCs 细胞活性低于 lncRNA GASL1+对照剂组($P<0.05$,图 5C)。

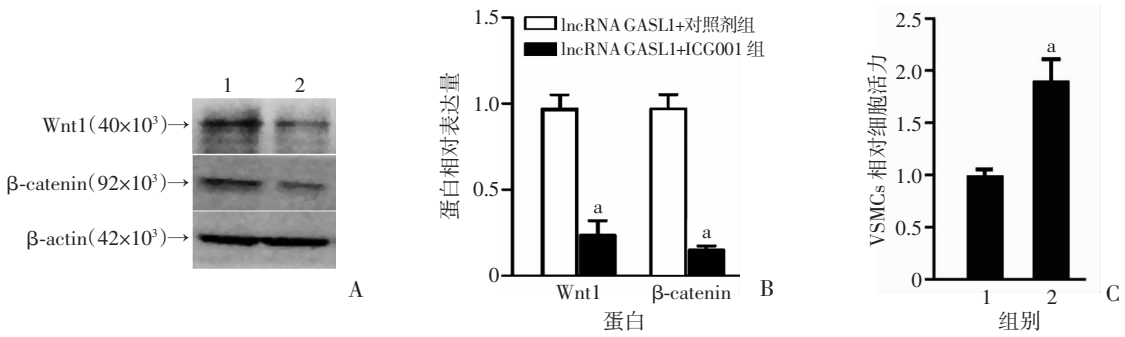
2.6　lncRNA GASL1 通过 Wnt/β-catenin 信号通路影响增殖相关蛋白 bcl-2 的表达

分别将 lncRNA GASL1+对照剂或 lncRNA GASL1+Wnt/β-catenin 信号通路抑制剂 ICG001 转染 VSMCS 细胞 48 h 后,免疫荧光检测显示:lncRNA GASL1+对照剂组与 lncRNA GASL1+ICG001 组细胞 α-SMA 蛋白染色阳性;lncRNA GASL1+对照剂组 bcl-2 阳性细胞比例(0.93±0.21)高于 lncRNA GASL1+ICG001 组(0.35±0.11,$P<0.05$,图 6)。



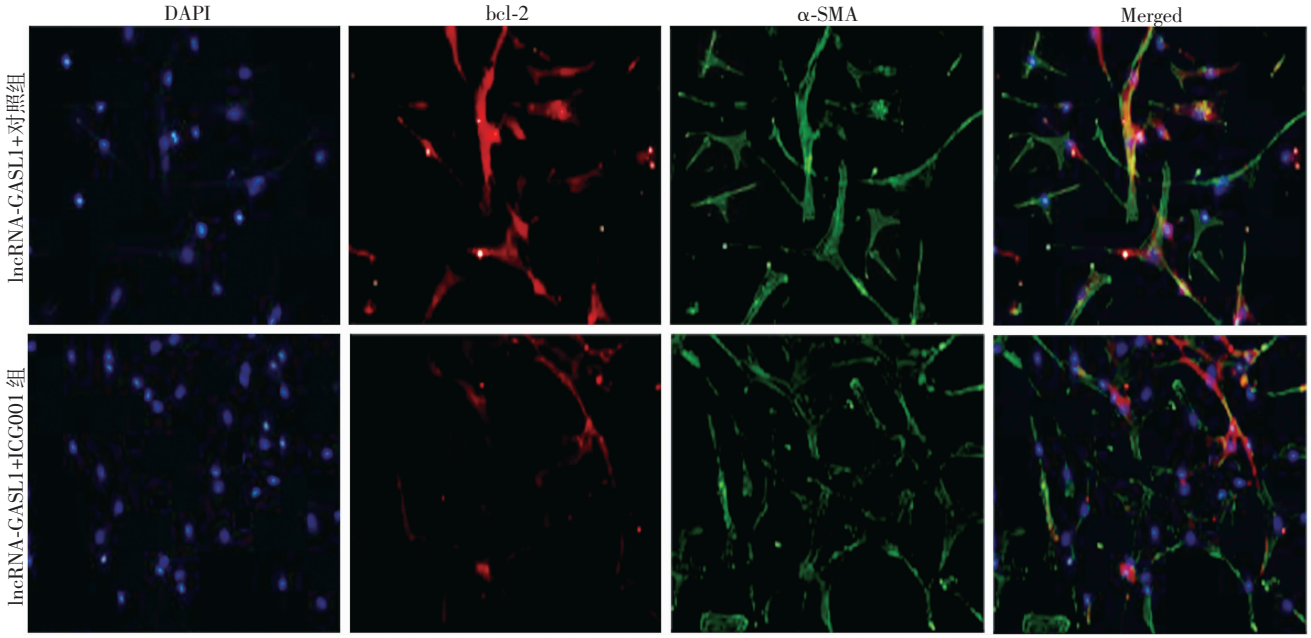
DAPI:细胞核染色;bcl-2:bcl-2 蛋白红色荧光染色;α-SMA:α-SMA 蛋白绿色荧光染色;Merged:合图

图 4　免疫荧光检测 lncRNA GASL1 转染 VSMCs 细胞 48 h 后 bcl-2 蛋白表达的变化　(×200)



1:lncRNA GASL1+对照剂组;2:lncRNA GASL1+ICG001 组;a: $P<0.05$,与 lncRNA GASL1+对照剂组比较
A: Western blot 检测 Wnt/β-catenin 信号通路抑制剂 ICG001 与 VSMCs 细胞共培养 48 h 后 Wnt1、β-catenin 蛋白表达;B:半定量分析;C:CCK-8 检测 VSMCs 细胞活力变化

图 5　lncRNA GASL1 通过 Wnt/β-catenin 信号通路影响 VSMCs 细胞增殖活性



DAPI:细胞核染色; bcl-2: bcl-2 蛋白红色荧光染色; α-SMA:α-SMA 蛋白绿色荧光染色;Merged:合图

图 6　免疫荧光检测各组 VSMCs 中 bcl-2 蛋白的表达　(×200)

3　讨论

研究发现,颅内动脉血管的 VSMCs 是承担血管压力、耐受血流冲击的重要结构。生理状态下,VSMCs 通过低频率增殖,低迁移、低蛋白分泌的细胞表型,保持动脉血管壁的功能性;而在病理状态下,VSMCs 增殖凋亡比例失衡,细胞数量减少,则最终导致动脉管壁变薄,对血流冲击的耐受力减弱[2-3]。因此,VSMCs 的增殖凋亡失衡,是导致动脉血管壁病理性重构、颅内动脉瘤形成及破裂出血的重要原因。左乔等[7]在大鼠颅内动脉瘤模型中发现,骨形成蛋白 2 通过激活 p-Smad1/5,促进 VSMCs 凋亡,可增加大鼠动脉瘤形成及破裂的概率。在本研究中,VSMCs 内 lncRNA GASL1 高表达后,可促进影响 VSMCs 细胞增殖,抑制 VSMCs 整体数量降低。有对 ROC 曲线研究发现,在颅脑动脉瘤壁患者组织中,lncRNA GASL1 表达含量低于正常动脉管壁组织,且具有诊断价值[5,8],提示 lncRNA GASL1 可能通过增加 VSMCs 数量,影响动脉管壁对血流流体动力的对抗作用,与颅内动脉瘤的形成破裂概率存在相关性。

LncRNAs 属于非编码 RNA 分子,可对细胞增殖相关 mRNA 在转录后水平均发挥调控作用,引起细胞增殖特性改变。如:lncRNA MEG3 通过调控 P53 基因活性,抑制胃癌细胞生长增殖[9];lncRNA SNHG5 通过调

控 miR-132/PTEN 信号通路,抑制慢阻肺患者肺表面上皮细胞凋亡及炎性浸润[10]。在动脉瘤等脑血管病研究领域,不断有学者提出 lncRNAs 参与疾病的病理生理变化。如:SUN 等[11]研究发现,lncRNA H19 通过竞争性结合 RNA 调控血管炎性因子,促进腹主动脉瘤的形成。ZHANG 等[12]利用小鼠辅助动脉瘤模型研究发现,降低 lncRNA PVT1 可抑制 VSMCs 细胞凋亡和细胞外基质紊乱。HUANG 等[13]在胸主动脉瘤动脉模型中发现过表达 lncRNA LOXL1-AS 后可对 VSMCs 增殖凋亡发挥调控作用。目前发现,lncRNA GASL1 在颅内动脉瘤等多个疾病中出现差异性表达,同时对细胞增殖发挥重要作用。如 GASL1 可通过抑制 TGF-β 信号通路,抑制胶质瘤细胞增殖,或通过抑制 Wnt/β-catenin,抑制胃腺细胞癌生长[6,14]。在急性颅内动脉瘤破裂的患者中,外周血外泌体中 lncRNA GASL1 呈高表达,可用于未破裂颅内动脉瘤患者和健康志愿者的筛查指标[5]。在本研究中,lncRNA GASL1 表现为促进 VSMCs 细胞增殖。在 CCK-8 细胞增殖实验中,过表达 lncRNA GASL1 可明显增强细胞增殖活性,同时发现,细胞增殖相关蛋白 bcl-2 含量增高。Bcl-2 蛋白表达升高直接提示细胞增殖能力提高。因此,研究结果提示 lncRNA GASL1 在 VSMCs 细胞增殖中发挥重要调控作用。

lncRNA GASL1 如何对 VSMCs 细胞增殖发挥作用呢? 研究显示,在胃癌细胞中,GASL1 表达下调或敲除,可上调 catenin 基因的表达[15]。在肝癌细胞模型中,GASL1 表达下调可导致肿瘤增大,伴随 E2F1 转录因子活性改变[16]。此外,lncRNA GASL1 还可以通过调控 TGF-β 或 Wnt/β-catenin 信号通路,或 GLUT-1 活性,在不同细胞中发挥作用[6,14,17]。在本研究中,当将 lncRNA GASL1 和 Wnt/β-catenin 信号通路拮抗剂共同处理细胞后发现,拮抗剂可逆转 lncRNA GASL1 对细胞的增殖作用,以及对 bcl-2 的调控作用。结果提示:lncRNA GASL1 可能通过 Wnt/β-catenin 对 VSMCs 细胞的增殖发挥调控作用。目前关于 Wnt 信号通路在 VSMCs 增殖中的重要作用,已在多个体内体外实验中证实。无论是外周血管还是脑血管的 VSMCs,Wnt 信号通路均广泛参与其增殖、迁移、凋亡和分化过程[4]。如 Wnt 信号通路激活后,可激活细胞核内 T 细胞因子及 cyclin D1 分子,导致细胞增殖活性改变[4]。MARCHAND[18]及 TSAOUSI[19]等研究发现,Wnt1、Wnt3a 和 Wnt4 等多个亚型均可促进 VSMCs 增殖。如 Wnt 4 蛋白敲除的小鼠构建动脉瘤模型中,单侧颈内动脉结扎后,在生长因子刺激下,小鼠血管内膜增厚下降。此外,Wnt 非经典信号通路也可参与 VSMCs 增殖。如骨形成蛋白 2、钙调蛋白依赖激酶Ⅱ以及活化 T 细胞核因子等,均可通过 Wnt 非经典信号通路促进 VSMCs 增生[20]。

本研究发现,lncRNA GASL1 对 Wnt/β-catenin 信号通路中的关键节点表现为激活作用,呈现正相关性,提示 lncRNA GASL1 可激活 Wnt 通路活性。将 lncRNA GASL1 和 Wnt 信号通路拮抗剂共同处理 VSMCs 后发现,拮抗剂可逆转 lncRNA GASL1 对细胞的增殖作用。综上所述,lncRNA GASL1 可能通过激活 Wnt/β-catenin 信号通路,促进 VSMCs 细胞增殖。

本研究的局限性在于仅对 Wnt/β-catenin 信号通路做出初步分析,对于其他通路的影响尚不能明确。此外,该信号通路复杂,与细胞内多个其他信号通路存在交联,该作用是否与巨噬细胞浸润、炎性因子的刺激存在相关性,尚有待进一步研究证实。

参考文献:

[1] 黄波, 刘耀华, 潘磊, 等. 颅内动脉瘤夹闭术、血管内栓塞术治疗颅内动脉瘤的疗效及安全性研究[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(9): 1788-1792. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.09.041.
HUANG B, LIU Y H, PAN L, *et al*. Efficacy and safety of intracranial aneurysm clipping and endovascular embolization in the treatment of intracranial aneurysm[J]. Prog Modern Biomed, 2020, 20(9): 1788-1792. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.09.041.

[2] 林惠岚, 邱昭平, 冯屹, 等. 颅内动脉瘤形态学和血流动力学特点分析[J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13(16): 172-173. DOI: 10.15887/j.cnki.13-1389/r.2020.16.104.
LIN H L, QIU S P, FENG Y, *et al*. Morphological and hemodynamic analysis of intracranial aneurysms [J]. Chin J Clin Rational Drug Use, 2020, 13(16): 172-173. DOI: 10.15887/j.cnki.13-1389/r.2020.16.104.

[3] 史源, 朱巍. 血管平滑肌细胞表型调控在颅内动脉瘤发生、发展过程中作用的研究进展[J]. 中华神经外科杂志, 2018, 34(7): 751-754. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-2346.2018.07.026.
SHI Y, ZHU W. Phenotypic regulation of vascular smooth muscle cells in the development and progression of intracranial aneurysms[J]. Chin J Neurosurg, 2018, 34(7): 751-754. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-2346.2018.07.026.

[4] 唐海双, 闫亚洲, 黄清海, 等. Wnt 信号通路调控血管平滑肌细胞在脑血管病变中的研究进展[J]. 中国脑血管病杂志, 2019, 16(1): 53-56.
TANG H S, YAN Y Z, HUANG Q H, *et al*. Research advancement of Wnt signaling pathway regulating vascular smooth muscle cells in cerebrovascular disease[J]. Chin J Cerebrovasc Dis, 2019, 16(1): 53-56.

[5] MAN H, BI W. Expression of a novel long noncoding RNA

(lncRNA), GASL1, is downregulated in patients with intracranial aneurysms and regulates the proliferation of vascular smooth muscle cells *in vitro*[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 1133-1139. DOI: 10.12659/msm.912204.

[6] PENG C, LI X, YU Y, *et al*. LncRNA GASL1 inhibits tumor growth in gastric carcinoma by inactivating the Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(5): 4039-4045. DOI: 10.3892/etm.2019.7409.

[7] 左乔, 唐海双, 张小曦, 等. 骨形成蛋白2通过上调磷酸化Smad1/5促进大鼠颅内动脉瘤血管平滑肌细胞凋亡[J]. 中华神经外科杂志, 2020, 36(5): 509-515. DOI: 10.3760/cma.j.cn112050-20191216-00524.
ZUO Q, TANG H S, ZHANG X X, *et al*. Bone morphogenetic protein 2 facilitates the apoptosis of smooth muscle cells of intracranial aneurysms in rats through up-regulation of Smad1/5 phosphorylation[J]. Chin J Neurosurg, 2020, 36(5): 509-515. DOI: 10.3760/cma.j.cn112050-20191216-00524.

[8] LI H, YUE H Y, HAO Y J, *et al*. Expression profile of long noncoding RNAs in human cerebral aneurysms: a microarray analysis[J]. J Neurosurg, 2017, 127(5): 1055-1062. DOI: 10.3171/2016.9.jns16839.

[9] DAN J, WANG J, WANG Y H, *et al*. LncRNA-MEG3 inhibits proliferation and metastasis by regulating miRNA-21 in gastric cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 99: 931-938. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.01.164.

[10] SHEN Q, ZHENG J, WANG X, *et al*. LncRNA SNHG5 regulates cell apoptosis and inflammation by miR-132/PTEN axis in COPD[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 126: 110016. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110016.

[11] SUN Y, ZHONG L, HE X, *et al*. LncRNA H19 promotes vascular inflammation and abdominal aortic aneurysm formation by functioning as a competing endogenous RNA[J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 131: 66-81. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2019.04.004.

[12] ZHANG Z, ZOU G, CHEN X, *et al*. Knockdown of lncRNA PVT1 inhibits vascular smooth muscle cell apoptosis and extracellular matrix disruption in a murine abdominal aortic aneurysm model[J]. Mol Cells, 2019, 42(3): 218-227. DOI: 10.14348/molcells.2018.0162.

[13] HUANG B, LU S, LAI H, *et al*. LncRNA LOXL1-AS is up-regulated in thoracic aortic aneurysm and regulated proliferation and apoptosis of aortic smooth muscle cells[J]. Biosci Rep, 2019, 39(9): BSR20191649. DOI: 10.1042/BSR20191649.

[14] HU Y H, JIAO B H, CHEN L Y, *et al*. Long non-coding RNA GASL1 may inhibit the proliferation of glioma cells by inactivating the TGF-β signaling pathway[J]. Oncol Lett, 2019, 17(6): 5754-5760. DOI: 10.3892/ol.2019.10273.

[15] WANG B, CHEN H W, ZHANG Y. Involvement of GASL1 in postoperative distant recurrence of gastric adenocarcinoma aftergastrectomy distal resection and the possible mechanism[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(7): 11454-11461. DOI: 10.1002/jcb.28423.

[16] GASRI-PLOTNITSKY L, OVADIA A, SHAMALOV K, *et al*. A novel lncRNA, GASL1, inhibits cell proliferation and restricts E2F1 activity[J]. Oncotarget, 2017, 8(14): 23775-23786. DOI: 10.18632/oncotarget.15864.

[17] LI Z, LIU H, JU W, *et al*. LncRNA GASL1 inhibits growth and promotes expression of apoptosis-associated proteins in prostate carcinoma cells through GLUT-1[J]. Oncol Lett, 2019, 17(6): 5327-5334. DOI: 10.3892/ol.2019.10244.

[18] MARCHAND A, ATASSI F, GAAYA A, *et al*. The Wnt/beta-catenin pathway is activated during advanced arterial aging in humans[J]. Aging Cell, 2011, 10(2): 220-232. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2010.00661.x.

[19] TSAOUSI A, WILLIAMS H, LYON C A, *et al*. Wnt4/β-catenin signaling induces VSMC proliferation and is associated with intimal thickening[J]. Circ Res, 2011, 108(4): 427-436. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.233999.

[20] PEREZ V A, ALI Z, ALASTALO T P, *et al*. BMP promotes motility and represses growth of smooth muscle cells by activation of tandem Wnt pathways[J]. J Cell Biol, 2011, 192(1): 171-188. DOI: 10.1083/jcb.201008060.

(**收稿**:2020-10-10;**修回**:2020-11-06)

(编辑 吴培红)