

tRF-His-GTG-037在血管平滑肌细胞表型转换中的表达及生物信息学分析

冯越¹, 李新秋², 燕银芳³, 王思敏³, 赵朝³, 纪玉强^{3,4*}

¹西北大学生命科学学院, 陕西 西安

²仁怀市人民医院外科, 贵州 遵义

³西北大学第一附属医院西安市第一医院中心实验室, 陕西 西安

⁴西安市神经免疫疾病创新转化重点实验室, 陕西, 西安

收稿日期: 2023年2月10日; 录用日期: 2023年4月3日; 发布日期: 2023年4月13日

摘要

目的: 探讨tRF-His-GTG-037在血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)表型转换中的表达水平并利用生物信息学分析其潜在的作用。方法: 利用荧光定量PCR检测tRF-His-GTG-037在VSMC表型转化过程中的表达水平。基于miRanda和TargetScan预测tRF-His-GTG-037的靶基因。对预测的靶基因进行GO (Gene Ontology)功能分析和KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)通路分析。结果: 与正常VSMC (1.18 ± 0.25)相比, tRF-His-GTG-037在血小板衍生因子BB (platelet-derived growth factor BB, PDGF-BB)诱导VSMC中的表达水平(2.50 ± 0.40)明显升高($t = 2.78, P = 0.008$)。预测tRF-His-GTG-037共有93个靶基因, 其中49个基因与心血管疾病发病有关, Rac1、组织因子途径抑制物(tissue factor pathway inhibitor, TFPI)、细胞色素P450家族成员1B1 (recombinant cytochrome P450 1B1, CYP1B1)、TWIST1与VSMC的增殖、迁移有关。GO分析结果发现生物过程(biological process, BP)富集项目429个, 细胞成分(cell composition, CC)富集项目50个, 分子功能(molecular function, MF)富集项目29个。KEGG通路分析结果发现的cAMP信号通路、AMPK信号通路与VSMC的增殖、迁移有关。结论: tRF-His-GTG-037在VSMC表型转换表达水平增高, 可能作用于Rac1、TFPI、CYP1B1、TWIST1等靶基因通过cAMP信号通路、AMPK信号通路在VSMC表型转换过程中发挥作用。

关键词

血管平滑肌细胞, tRNA衍生的小RNAs, 表型转换

Expression and Bioinformatics Analysis of tRF-His-GTG-037 in the Phenotypic Transformation of Rat Vascular Smooth Muscle Cells

*通讯作者。

文章引用: 冯越, 李新秋, 燕银芳, 王思敏, 赵朝, 纪玉强. tRF-His-GTG-037在血管平滑肌细胞表型转换中的表达及生物信息学分析[J]. 生物医学, 2023, 13(2): 190-198. DOI: 10.12677/hjbm.2023.132022

Yue Feng¹, Xinqiu Li², Yinfang Yan³, Simin Wang³, Zhao Zhao³, Yuqiang Ji^{3,4*}

¹College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an Shaanxi

²Department of Surgery, Renhuai City People Hospital, Zunyi Guizhou

³Department of Central Laboratory, The First Affiliated Hospital of Northwestern University, The First Hospital of Xi'an, Xi'an Shaanxi

⁴Xi'an Key Laboratory for Innovation and Translation of Neuroimmunological Diseases, Xi'an Shaanxi

Received: Feb. 10th, 2023; accepted: Apr. 3rd, 2023; published: Apr. 13th, 2023

Abstract

Objective: To investigate the expression level of tRF-His-GTG-037 in the phenotypic transformation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) and analyze its potential role with bioinformatics. **Methods:** The expression level of tRF-His-GTG-037 in VSMC phenotype transformation was detected by fluorescence quantitative PCR. The target gene of tRF-His-GTG-037 was predicted based on miRanda and TargetScan. The predicted target genes were analyzed for GO (Gene Ontology) function and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway. **Results:** Compared with normal VSMC (1.18 ± 0.25), the expression level of tRF-His-GTG-037 in PDGF-BB (platelet-derived growth factor BB) induced VSMC (2.50 ± 0.40) was significantly higher ($t = 2.78, P = 0.008$). It was predicted that there were 93 target genes in tRF-His-GTG-037, 49 of which were related to the pathogenesis of cardiovascular disease. Rac1, tissue factor pathway inhibitor (TFPI), recombinant cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) and TWIST1 are related to the proliferation and migration of VSMC. The results of GO analysis found 429 biological process (BP) enrichment projects, 50 cell composition (CC) enrichment projects, and 29 molecular function (MF) enrichment projects. The results of KEGG pathway analysis showed that the cAMP signal pathway and AMPK signal pathway were related to the proliferation and migration of VSMC. **Conclusions:** The expression level of tRF-His-GTG-037 in VSMC phenotypic transformation increased. tRF-His-GTG-037 may play a role in VSMC phenotypic transformation by targeting genes such as Rac1, TFPI, CYP1B1 and TWIST1 through cAMP signal pathway and AMPK signal pathway.

Keywords

Vascular Smooth Muscle Cell, Transfer RNA tRNA-Derived Small RNAs, Phenotypic Transformation

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)是血管壁的主要细胞成分之一, 在维持血管张力、正常血压和血流分布过程中发挥重要作用。在生理条件下, VSMC 表现出收缩表型, 调节血管张力并维持组织血流[1]; 当血管受损时, VSMC 转化为合成表型, 并获得增殖、迁移和合成大量细胞外基质成分的能力, 进而导致血管壁增厚、管腔狭窄、血管顺应性降低和血管重塑。多项研究证实, VSMC 的表型转化是其增殖和向血管内膜迁移的基础[1], 是高血压[2]、动脉粥样硬化[3] [4]、肺动脉高压[5]、动脉瘤[6]、移植后动脉疾病和血管成形术后再狭窄[7]等血管重塑疾病的细胞病理学基础。因此, 阐明 VSMC

表型转化的调控机制将有助于预防和治疗血管重塑以及逆转增殖性血管疾病,然而 VSMC 表型转化的调控机制尚不清楚。

tRNA 衍生的小 RNAs (Transfer RNA tRNA-derived small RNAs, tsRNAs)是一类来源于成熟 tRNA 或 tRNA 前体的非编码单链 RNAs, 大致分为两大类: tiRNA (或者 tRNA halves)和 tRFs (tRNA 衍生片段), 参与应激反应、蛋白质翻译调控、核糖体生物合成、细胞增殖与凋亡、表观遗传信息的跨代传递等多种生理和病理过程[8], 在肿瘤、神经退行性疾病、代谢性疾病、感染性疾病、心血管疾病等病理过程中发挥重要作用[9], 有关 tsRNAs 与 VSMC 表型转换的研究刚刚起步。我们前期测序结果发现 tRF-His-GTG-037 在 VSMC 表型转化过程中表达水平增高, 为了进一步研究 tRF-His-GTG-037 的生物学功能, 本研究利用荧光定量 PCR 进一步验证 tRF-His-GTG-037 的 VSMC 表型转化过程中的表达水平, 采用生物信息学方法分析 tRF-His-GTG-037 的靶基因和潜在的功能, 初步探讨 tRF-His-GTG-037 在 VSMC 表型转化过程中的作用。

2. 材料与方法

2.1. 材料

大鼠胸主动脉平滑肌细胞 A7r5 由中国科学院细胞库/干细胞库提供; 胎牛血清、DMEM、TRIzol™ 试剂购自美国赛默飞公司; 血小板衍生因子 BB (platelet-derived growth factor BB, PDGF-BB)购自美国 R&D 公司; rtStar™ tRF&tiRNA 预处理试剂盒、rtStar 第一链 cDNA 合成试剂盒、荧光定量试剂盒购自美国 Arraystar 公司; 引物购自上海生工公司。荧光定量 PCR 仪(7500)购自美国 ABI 公司, 倒置显微镜(s100)购自日本尼康公司, 冷冻高速离心机(5804R)购自德国 Eppendorf 公司。

2.2. 方法

2.2.1. 细胞培养

A7r5 细胞在含有 10% (v/v)胎牛血清的 DMEM 中培养, 培养温度为 37℃, CO₂ 浓度为 5%。VSMC 以 2×10^5 个细胞/孔的密度接种在 6 孔板中培养 12 小时, 饥饿 24 小时后用 20 ng/ml PDGF-BB 诱导 24 小时后收集细胞[10]。

2.2.2. 荧光定量 PCR

用 TRIzol™ 试剂从 VSMC 中提取总 RNA, 采用 rtStar™ tRF&tiRNA 预处理试剂盒对总 RNA 进行预处理, 使用 rtStar 第一链 cDNA 合成试剂盒进行逆转录反应, 严格按照试剂盒说明书进行操作。利用 Primer 5.0 设计合成 tRF-His-GTG-037 及内参 U6 PCR 引物, 序列如下: U6: F:5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'; R:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3'tRF-His-GTG-037: F: 5'-GTCCGACGATCTAGACTGTGA-3'; R: 5'-CGTGTGCTCTTCCGATCTAG-3'。PCR 反应体系如下: 2 × Master Mix 5 μl、10 μM 的 PCR 特异上下游引物各 0.5 μl、模板 2.0 μl 加水至总体积为 10 μl; 反应条件: 95℃, 10 min; 40 个 PCR 循环(95℃, 10 秒; 60℃, 60 秒)。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析 tRF-His-GTG-037 的相对表达水平[11]。

2.2.3. 生物信息学分析

基于 miRanda [12]和 TargetScan [13]预测 tRF-His-GTG-037 的靶基因。对预测的靶基因的进行 GO (Gene Ontology)功能分析和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)通路分析, GO 分析用于描述基因和基因产物属性(<http://www.geneontology.org>), GO 分析包括生物过程(biological process, BP)、细胞组成(cell composition, CC)和分子功能(molecular function, MF)。Fisher 检验用于计算每个 GO 的显著性水平, P 值越小, GO 越显著。通路分析是利用 KEGG 数据库(<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)

对 tRF-His-GTG-037 功能进行分析, P 值(EASE 得分、Fisher-P 值或 Hypergeometric-P 值)表示与条件相关的路径的显著性, P 值越小, 通路越重要。

2.3. 统计学分析

所有数据均采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行处理, Fisher 精确检验进行 GO 分析, EASE 得分、Fisher-P 值或 Hypergeometric-P 值用于检验相关通路的显著性。两组之间 tRF-His-GTG-037 表达水平的比较采用使用 t 检验, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

3. 结果

3.1. tRF-His-GTG-037 在 VSMC 表型转换过程中的表达

为了进一步验证 tRF-His-GTG-037 在 VSMC 表型转换过程中的表达水平, 采用荧光定量 PCR 检测其水平, 结果发现与正常 VSMC(1.18 ± 0.25)相比, tRF-His-GTG-037 在 PDGF-BB 诱导 VSMC 中的表达水平(2.50 ± 0.40)明显升高, 两组间差异具有统计学意义($t = 2.78, P = 0.008$)。

3.2. tRF-His-GTG-037 靶基因预测

利用 miRanda [12]和 TargetScan [13]预测 tRF-His-GTG-037 的靶基因, 结果显示共有 93 个靶基因。根据查阅文献, 其中 49 个基因与心血管疾病发病有关(见图 1)。目前国内外研究发现 Rac1 [14] [15]、组织因子途径抑制物(tissue factor pathway inhibitor, TFPI) [16] [17]、细胞色素 P450 家族成员 1B1 (Recombinant Cytochrome P450 1B1, CYP1B1) [18]、TWIST1 [19]与 VSMC 的增殖、迁移有关。

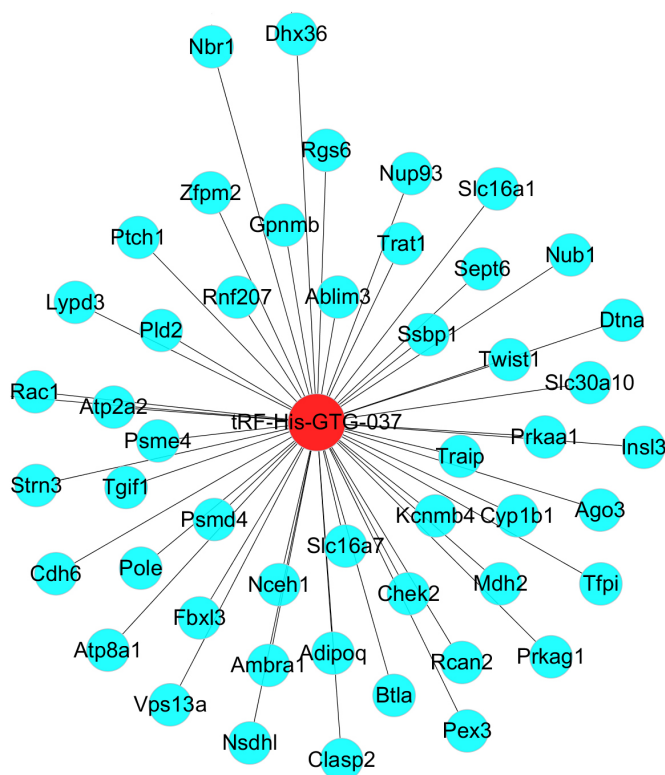


Figure 1. Target genes of tRF-His-GTG-037 related to cardiovascular disease

图 1. 与心血管疾病相关 tRF-His-GTG-037 靶基因

Table 1. GO analysis of target gene tRF-His-GTG-037 (top 10)
表 1. tRF-His-GTG-037 靶基因的 GO 分析(前 10 个)

GO.ID	Term	Number of genes	P value
Biological process			
GO:0009966	regulation of signal transduction	23	0.000143
GO:0071466	cellular response to xenobiotic stimulus	6	0.000147
GO:0035556	intracellular signal transduction	21	0.000177
GO:0048583	regulation of response to stimulus	27	0.000195
GO:0010646	regulation of cell communication	25	0.000256
GO:0023051	regulation of signaling	25	0.000271
GO:0045834	positive regulation of lipid metabolic process	5	0.000394
GO:0031952	regulation of protein autophosphorylation	3	0.000585
GO:0007167	enzyme linked receptor protein signaling pathway	11	0.000640
GO:0048585	negative regulation of response to stimulus	15	0.000704
Cell composition			
GO:0005622	intracellular anatomical structure	63	0.000035
GO:0070013	intracellular organelle lumen	31	0.000042
GO:0031974	membrane-enclosed lumen	31	0.000042
GO:0043233	organelle lumen	31	0.000042
GO:0043231	intracellular membrane-bounded organelle	55	0.000055
GO:0043227	membrane-bounded organelle	55	0.000271
GO:0043229	intracellular organelle	57	0.000275
GO:0005654	nucleoplasm	25	0.000297
GO:0031981	nuclear lumen	27	0.000308
GO:0031588	nucleotide-activated protein kinase complex	2	0.000739
Molecular function			
GO:0016208	AMP binding	2	0.002418
GO:0019900	kinase binding	8	0.014169
GO:1901618	organic hydroxy compound transmembrane transporter activity	2	0.014842
GO:0098772	molecular function regulator	13	0.017146
GO:0008028	monocarboxylic acid transmembrane transporter activity	2	0.017909
GO:0019899	enzyme binding	15	0.017976
GO:0016712	oxidoreductase activity	2	0.023319
GO:0140030	modification-dependent protein binding	3	0.023722
GO:0019901	protein kinase binding	7	0.023816
GO:0008395	steroid hydroxylase activity	2	0.024037

3.3. tRF-His-GTG-037 靶基因的 GO 分析

为了进一步探讨 tRF-His-GTG-037 的功能,对 tRF-His-GTG-037 预测的靶基因进行 GO 分析,结果发现生物过程(BP)富集项目 429 个,细胞成分(CC)富集项目 50 个,分子功能(MF)富集项目 29 个,这些项目具有统计学意义($P < 0.05$)。表 1 列出了每个部分的前 10 个富集项目和每个富集项目的差异表达基因的数量,共有 161 个 BP 基因、377 个 CC 基因和 56 个 MF 基因。BP、CC 和 MF 的富集分数最高的项目分别是信号转导调控(GO:0009966, $P = 0.000143$)、细胞内结构(GO:0005622, $P = 0.000035$)和 AMP 结合(GO:0016208, $P = 0.002418$)。

3.4. tRF-His-GTG-037 靶基因的通路分析

条形图显示了显著富集通路的前十个富集分数($-\log_{10}(P\text{value})$)值(见图 2),差异基因分别富集于昼夜节律、脂肪细胞因子信号通路、非酒精性脂肪肝、长寿调节途径、肥厚型心肌病、DNA 复制、cAMP 信号通路、AMPK 信号通路、蛋白酶体、酒精性肝病。

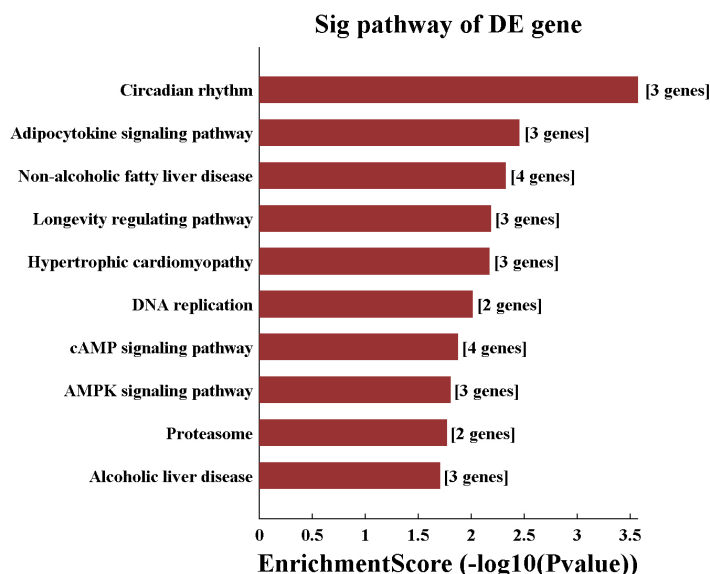


Figure 2. Pathway analysis of target genes of tRF-His-GTG-037 (top 10)

图 2. tRF-His-GTG-037 靶基因的通路分析(前 10 位)

4. 讨论

转运 RNA (transfer RNA, tRNA)是细胞内主要的 RNA 分子之一,通常由 73~93 个核苷酸组成,tRNA 具有保守的三叶草二级结构,在蛋白质合成过程中发挥关键作用。近年来研究表明在特定的细胞/组织中成熟 tRNA 或 tRNA 前体经过核酸酶(如 Dicer、血管生成素)剪切,可以产生 tsRNAs [8]。越来越多的研究发现 tsRNAs 与心肌炎、心房颤动、动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)、心肌缺血、主动脉夹层(aortic dissection, AD)等心血管疾病密切相关[20]。Wang 等人对急性期和恢复期暴发性心肌炎患儿血浆和配对健康志愿者进行小 RNA 测序,结果发现暴发性心肌炎患儿急性期血浆中 tiRNA-Gln-TTG-001 表达水平增高,其表达水平与高敏心肌肌钙蛋白和一些炎症标志物的值相关;体外模拟心肌炎细胞模型证实心肌细胞可以释放 tiRNA-Gln-TTG-001;生物信息学分析发现 tiRNA-Gln-TTG-001 的潜在靶基因与肌管分化和代谢有关,推测 Ras、MAPK、PI3K-Akt 信号通路可能对暴发性心肌炎的发病和进展产生关键影响,凋亡和自噬,这些结果提示 tiRNA-Gln-TTG-001 可能在暴发性心肌炎发病中起重要作用[21]。

利用高通量测序在房颤或不患有房颤的风湿性心脏病患者的三对心脏乳头肌中共鉴定出 219 个精确匹配的 tsRNAs, 其中 77 个 tsRNAs 发生了不同的变化[22]。利用动物模型发现心肌缺血期间 166 个 tsRNAs 上调, 136 个 tsRNAs 下调, 而热量限制可以调节 55 个 tsRNAs 的表达[23]。在 AS 斑块中发现的 315 个 tsRNAs 中, 131 个和 184 个分别上调和下调, 进一步研究提示 tRFGly-GCC 可能通过调节 VSMC 中的细胞粘附、增殖、迁移和表型转化参与 AS 发病[24]。对正常和球囊损伤的大鼠颈总动脉进行小 RNA 测序结果发现 tRFs/tiRNAs 的表达谱在两组间有显著差异, tRNA^{GlnCTG} 衍生片段(tRF^{GlnCTG})在受损颈总动脉中过度表达, 且丰度较高, 在体外实验中, 合成的 tRF^{GlnCTG} 模拟物可促进大鼠 VSMC 的增殖和迁移[25]。临床研究发现对照组相比, AD 患者主动脉组织中共有 41 个 tRFs/tiRNAs 表达失调(12 个上调, 29 个下调), 细胞实验证实 tRF-1:30-chrM.Met-CAT 可促进 VSMC 的增殖、迁移和表型转换[26]。另外一项研究在人和小鼠 AD 模型中发现 5'-tiRNA-Cys-GCA 显著下调, 体外实验发现 5'-tiRNA Cys-GCA 过度表达抑制了 VSMCs 的增殖和迁移, 5'-tiRNA Cys-GCA 通过 STAT4 信号通路是主动脉夹层病理过程的潜在调节因子[27]。利用高通量测序研究发现在增殖人主动脉平滑肌细胞中有 1838 个差异表达的 tsRNA, 其中 887 个表达增加, 951 个表达减少[28]。这些研究结果均提示 tsRNAs 在心血管疾病和 VSMC 增殖、迁移过程中发挥重要作用。tRF-His-GTG-037 是我们前期利用 RNA 测序技术在 VSMC 表型转化过程中表达水平增高的一种 tsRNA, 荧光定量 PCR 的结果显示 tRF-His-GTG-037 在 PDGF-BB 诱导的 VSMC 表达水平明显升高, 进一步验证了测序结果, 提示 tRF-His-GTG-037 可能参与了 VSMC 表型转换过程。

研究证实 tsRNAs 通过结合 mRNA 发挥类似 miRNA 的作用(降解 mRNA 或使 mRNA 稳定), 或者 tsRNAs 与蛋白相互作用, 进而影响蛋白的作用[8] [9]。本研究利用生物信息学预测了 93 个 tRF-His-GTG-037 的靶基因, 根据目前的研究报道其中 49 个基因与心血管疾病发病有关, 其中 Rac1、TFPI、CYP1B1、TWIST1 基因与 VSMC 的增殖、迁移有关。Rac1 属于小 G 蛋白 Rho 家族, 研究发现 Rac1 与 GTP 结合后可以调节多种信号通路, 进而调节肌动蛋白细胞骨架重组、细胞迁移[14]。Ashino 等人[15]研究证实培养的在培养的大鼠主动脉平滑肌细胞中, PDGF 刺激可快速促进 ATP7A 与 IQGAP1 和 Rac1 的结合, 促进 VSMC 迁移和血管重塑。TFPI 是一种抗凝蛋白, 可以通过调节组织因子的活性发挥抗凝作用, 有研究表明 TFPI 可以抑制细胞凋亡抑制蛋白的表达进而诱导平滑肌细胞凋亡的作用[16]。有研究发现 TFPI 在 TNF- α 刺激的 VSMC 中具有抗增殖作用[17]。国外一项研究采用从雄性 Cyp1b1^{+/+}和 Cyp1b1^{-/-}小鼠主动脉分离的 VSMC 进行体外实验, 结果发现在 Cyp1b1^{-/-}小鼠的 VSMC 和用 4-羟基-2, 2, 6, 6-四甲基哌啶-1-氧基(一种超氧化物歧化酶和过氧化氢酶模拟物)处理的 Cyp1b1^{+/+}小鼠的 VSMCs 中, 血小板衍生生长因子-BB 诱导的迁移和增殖以及 H₂O₂ 产生减弱, 提示 Cyp1b1 在 VSMC 的增殖、迁移中发挥作用[18]。TWIST1 是调控细胞分化重要的转录因子之一, 体内和体外 SMC 表型转换过程中 TWIST1 蛋白水平显著升高, 研究表明 TWIST1 上调参与了血管平滑肌细胞表型转换的生物学过程。TWIST1 过表达促进 VSMC 的表型转换, 而 TWIST1 的 siRNA 靶向阻止细胞转变[19]。提示 tRF-His-GTG-037 可能通过作用于 Rac1、TFPI、CYP1B1、TWIST1 靶基因发挥功能。进一步通过 tRF-His-GTG-037 靶基因通路分析发现了显著富集通路, 目前实验研究证实其中的 cAMP 信号通路[29]、AMPK 信号通路[30]在 VSMC 的增殖、迁移过程中发挥重要作用。综合以上研究提示 tRF-His-GTG-037 可能通过 cAMP 信号通路、AMPK 信号通路发挥作用, 但具体机制需要通过进一步的实验来证实。

综上所述, tRF-His-GTG-037 在 VSMC 表型转换表达水平增高, 可能作用于 Rac1、TFPI、CYP1B1、TWIST1 等靶基因通过 cAMP 信号通路、AMPK 信号通路在 VSMC 表型转换过程中发挥作用, 这将为进一步阐明 VSMC 表型转化的调控机制提供新的思路。

基金项目

教育部重点实验室项目(ZSK2019009); 陕西省重点研发计划项目(2021SF-151; 2022SF-548); 西安市科技计划项目(21YXYJ0028); 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzwbkj2021-202); 仁怀市科技计划项目(仁科支撑[2021]08号)。

参考文献

- [1] Louis, S.F. and Zahradka, P. (2010) Vascular Smooth Muscle Cell Motility: From Migration to Invasion. *Experimental & Clinical Cardiology*, **15**, e75-e85.
- [2] Rossi, G.P., Cavallin, M., Belloni, A.S., *et al.* (2002) Aortic Smooth Muscle Cell Phenotypic Modulation and Fibrillar Collagen Deposition in Angiotensin II-Dependent Hypertension. *Cardiovascular Research*, **55**, 178-189. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00400-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00400-5)
- [3] Basatemur, G.L., Jorgensen, H.F., Clarke, M.C.H., *et al.* (2019) Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*, **16**, 727-744. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0227-9>
- [4] Aherrahrou, R., Guo, L., Nagraj, V.P., *et al.* (2020) Genetic Regulation of Atherosclerosis-Relevant Phenotypes in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research*, **127**, 1552-1565. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317415>
- [5] Satoh, K., Satoh, T., Kikuchi, N., *et al.* (2014) Basigin Mediates Pulmonary Hypertension by Promoting Inflammation and Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *Circulation Research*, **115**, 738-750. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.304563>
- [6] Clement, M., Chappell, J., Raffort, J., *et al.* (2019) Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity and Autophagy in Dissecting Aortic Aneurysms. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **39**, 1149-1159. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311727>
- [7] Bkaily, G., Abou Abdallah, N., Simon, Y., *et al.* (2021) Vascular Smooth Muscle Remodeling in Health and Disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **99**, 171-178. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2020-0399>
- [8] Chen, Q., Zhang, X., Shi, J., *et al.* (2021) Origins and Evolving Functionalities of tRNA-Derived Small RNAs. *Trends in Biochemical Sciences*, **46**, 790-804. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.05.001>
- [9] Chu, X., He, C., Sang, B., *et al.* (2022) Transfer RNAs-Derived Small RNAs and Their Application Potential in Multiple Diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **10**, Article ID: 954431. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.954431>
- [10] Iso, Y., Usui, S., Toyoda, M., *et al.* (2018) Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Inhibit Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Neointimal Hyperplasia after Arterial Injury in Rats. *Biochemistry and Biophysics Reports*, **16**, 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.10.001>
- [11] Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- [12] Enright, A.J., John, B., Gaul, U., *et al.* (2003) MicroRNA Targets in Drosophila. *Genome Biology*, **5**, R1. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-5-1-r1>
- [13] Pasquinelli, A.E. (2012) MicroRNAs and Their Targets: Recognition, Regulation and an Emerging Reciprocal Relationship. *Nature Reviews Genetics*, **13**, 271-282. <https://doi.org/10.1038/nrg3162>
- [14] Salloum, G., Jaafar, L. and El-Sibai, M. (2020) Rho A and Rac1: Antagonists Moving Forward. *Tissue and Cell*, **65**, Article ID: 101364. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2020.101364>
- [15] Ashino, T., Kohno, T., Sudhahar, V., *et al.* (2018) Copper Transporter ATP7A Interacts with IQGAP1, a Rac1 Binding Scaffolding Protein: Role in PDGF-Induced VSMC Migration and Vascular Remodeling. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **315**, C850-C862. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00230.2018>
- [16] 马丹丹, 李辉, 傅羽, 等. TFPI 基因转染对血管平滑肌细胞中细胞凋亡抑制蛋白的调控[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(8): 769-773.
- [17] Fu, Y., Ma, D., Liu, Y., *et al.* (2015) Tissue Factor Pathway Inhibitor Gene Transfer Prevents Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation by Interfering with the MCP-3/CCR2 Pathway. *Laboratory Investigation*, **95**, 1246-1257. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.106>
- [18] Mukherjee, K., Song, C.Y., Estes, A.M., *et al.* (2018) Cytochrome P450 1B1 Is Critical for Neointimal Growth in Wire-Injured Carotid Artery of Male Mice. *Journal of the American Heart Association*, **7**, e010065. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.010065>

- [19] Zhang, J., Guo, J.R., Wu, X.L., *et al.* (2021) TWIST1 Induces Phenotypic Switching of Vascular Smooth Muscle Cells by Downregulating p68 and microRNA-143/145. *FEBS Open Bio*, **11**, 932-943. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13092>
- [20] Wang, S., Luo, Z., Yuan, L., *et al.* (2022) tRNA-Derived Small RNAs: Novel Insights into the Pathogenesis and Treatment of Cardiovascular Diseases. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. <https://doi.org/10.1007/s12265-022-10322-0>
- [21] Wang, J., Han, B., Yi, Y., *et al.* (2021) Expression Profiles and Functional Analysis of Plasma tRNA-Derived Small RNAs in Children with Fulminant Myocarditis. *Epigenomics*, **13**, 1057-1075. <https://doi.org/10.2217/epi-2021-0109>
- [22] Yang, Z.Y., Li, P.F., Li, Z.Q., *et al.* (2021) Altered Expression of Transfer-RNA-Derived Small RNAs in Human with Rheumatic Heart Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, **8**, Article ID: 716716. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.716716>
- [23] Liu, W., Liu, Y., Pan, Z., *et al.* (2020) Systematic Analysis of tRNA-Derived Small RNAs Discloses New Therapeutic Targets of Caloric Restriction in Myocardial Ischemic Rats. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **8**, Article ID: 568116. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.568116>
- [24] He, X., Yang, Y., Wang, Q., *et al.* (2021) Expression Profiles and Potential Roles of Transfer RNA-Derived Small RNAs in Atherosclerosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **25**, 7052-7065. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16719>
- [25] Zhu, X.L., Li, T., Cao, Y., *et al.* (2020) tRNA-Derived Fragments tRF^{GlnCTG} Induced by Arterial Injury Promote Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, **23**, 603-613. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.12.010>
- [26] Fu, X., He, X., Yang, Y., *et al.* (2021) Identification of Transfer RNA-Derived Fragments and Their Potential Roles in Aortic Dissection. *Genomics*, **113**, 3039-3049. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.06.039>
- [27] Zong, T., Yang, Y., Lin, X., *et al.* (2021) 5'-tiRNA-Cys-GCA Regulates VSMC Proliferation and Phenotypic Transition by Targeting STAT4 in Aortic Dissection. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, **26**, 295-306. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.07.013>
- [28] Zhao, J.Z., Li, Q.Y., Lin, J.J., *et al.* (2022) Integrated Analysis of tRNA-Derived Small RNAs in Proliferative Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Cellular & Molecular Biology Letters*, **27**, 47. <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00346-4>
- [29] Smith, S.A., Newby, A.C. and Bond, M. (2019) Ending Restenosis: Inhibition of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation by cAMP. *Cells*, **8**, 1447. <https://doi.org/10.3390/cells8111447>
- [30] Rodríguez, C., Muñoz, M., Contreras, C., *et al.* (2021) AMPK, Metabolism, and Vascular Function. *FEBS Journal*, **288**, 3746-3771. <https://doi.org/10.1111/febs.15863>