

文章编号:1004-7220(2014)05-0440-07

FOXO1 参与高血压条件下异常张应变诱导的血管平滑肌细胞增殖

顾翔¹, 姜隽^{1,2}, 吴垒磊¹, 杨煜晨¹, 张萍¹, 韩海潮^{1,3}, 姜宗来¹, 齐颖新¹

(1. 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; 2. 四川省泸州医学院附属医院 血管外科, 泸州 646000; 3. Department of Mechanical Engineering, the University of Texas, San Antonio, USA)

摘要: **目的** 探讨高血压条件下异常升高的周期性张应变刺激对血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 增殖的影响, 以及 Forkhead 转录因子 1 (FOXO1) 在其中可能的作用。 **方法** 构建腹主动脉缩窄高血压大鼠模型, 并以假手术组为对照, 应用 FX-4000T 体外周期性张应变加载系统, 分别对 VSMCs 施加 5% 的生理性张应变和 15% 的高血压病理性张应变。 Western blot 检测 VSMCs 的 FOXO1 及 p-FOXO1 表达水平, BrdU 法检测 VSMCs 增殖活性。 RNA 干扰技术抑制 VSMCs 的 FOXO1 表达, 检测 FOXO1、p-FOXO1 表达以及 VSMCs 增殖活性变化。 **结果** 腹主动脉缩窄术后 2 和 4 周, 大鼠血压较假手术大鼠明显增高。 与假手术大鼠相比, 高血压大鼠血管壁细胞增殖活性明显增高, 同时 FOXO1 及 p-FOXO1 表达水平也显著性升高。 细胞实验表明, 与 5% 张应变组相比, 15% 张应变加载显著上调 VSMCs 的 FOXO1、p-FOXO1 表达水平, 以及 VSMCs 增殖活性。 静态条件下 RNA 干扰抑制 VSMCs 的 FOXO1 及 p-FOXO1 表达, VSMCs 的增殖活性明显降低。 **结论** 高血压病理条件下, 异常增高的周期性张应变可能通过促进 FOXO1 表达和磷酸化诱导 VSMCs 增殖。 以动物模型观察现象, 在细胞分子水平探讨机制, 旨在明确 FOXO1 在高血压血管重建中的作用及其力学生物学机制, 为阐明高血压血管重建的发病机理和药物治疗靶标的研究提供新的实验依据。

关键词: 高血压; 周期性张应变; 血管平滑肌细胞; Forkhead 转录因子; 细胞增殖

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

The role of FOXO1 in cyclic stretch induced-proliferation of vascular smooth muscle cells during hypertension

GU Xiang¹, JIANG Jun^{1,2}, WU Lei-lei¹, YANG Yu-chen¹, ZHANG Ping¹, HAN Hai-chao^{1,3}, JIANG Zong-lai¹, QI Ying-xin¹ (1. Institute of Mechanobiology and Medical Engineering, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 2. Department of Vascular Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China; 3. Department of Mechanical Engineering, the University of Texas, San Antonio, USA)

Abstract: Objective To investigate the role of pathologically increased-cyclic stretch in proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) during hypertension, and the effect of Forkhead box protein O1 (FOXO1) during this process. **Methods** Coarctation of abdominal aorta above kidney artery of rat was used as hypertensive animal model, and sham-operated animal as control. FX-4000 cyclic stretch loading system was used to apply 5% physiologically cyclic stretch and 15% pathologically cyclic stretch during hypertension on VSMCs *in vitro*. Western blot was used to reveal the expressions of FOXO1 and phospho-FOXO1 in VSMCs, and BrdU kit to detect the proliferation of VSMCs *in vitro*. By using RNA interference in static, the role of FOXO1 on cell proliferation was

收稿日期:2013-12-17; 修回日期:2014-01-03

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31170892, 11229202, 11232010), 上海市青年科技启明星计划(11QA1403200)。

通信作者:齐颖新, 副教授, Tel: (021)34204863; E-mail: qiyyx@sjtu.edu.cn。

further detected. **Results** After abdominal aorta coarctation for 2 and 4 weeks, respectively, the blood pressure was significantly increased compared with the sham-operated rats. The proliferation of vascular cells in aorta of hypertensive rat was significantly increased, and so did the expressions of FOXO1 and phospho-FOXO1. *In vitro* experiment revealed that 15% cyclic stretch remarkably increased the proliferation and expressions of FOXO1 and phospho-FOXO1 in VSMCs. Target siRNA transfection in static decreased the expression of FOXO1 and phospho-FOXO1, as well as the proliferation of VSMCs. **Conclusions** Pathologically increased-cyclic stretch may increase the expression and phosphorylation of FOXO1, subsequently modulate VSMC proliferation during hypertension. Based on animal models, this study intends to reveal the role of FOXO1 in vascular reconstruction of hypertension and the involved biomechanical mechanism, so as to make the mechanobiological mechanism of hypertension explicit and discover new target in the prevention and treatment of vascular remodeling.

Key words: Hypertension; Cyclic stretch; Vascular smooth muscle cells (VSMCs); Forkhead box protein O1 (FOXO1); Cell proliferation

血管重建是有机体在生长、发育、疾病和衰老等过程中,血管为适应体内外环境而发生的形态、结构和功能上的变化,其主要表现为血管细胞迁移、分化、增殖、凋亡等功能的改变^[1]。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)是成年动物血管中一种高度特化的细胞,在调节血压、维持血管生理稳态以及病理性的重建中均起重要作用^[2]。已有研究表明,血管重建是高血压、动脉粥样硬化等多种心血管疾病的共同病理表现,且 VSMCs 的增殖功能异常在其中起关键作用^[3]。

高血压病理状态下,动脉所承受的机械应力持续增高,高血压患者肱动脉承受的周向张应变可高达 15% 以上^[4]。作为血管中膜的主要细胞成分, VSMCs 主要承载周向张应变的刺激。研究显示,生理范围的张应变抑制 VSMCs 增殖,并维持其收缩表型^[5];高血压病理条件下,异常增高的周向张应变激活多种细胞内信号通路,促进 VSMCs 增殖。例如,生理性张应变通过抑制 Notch/CBF-1/RBP-1κ 信号转导通路降低 VSMCs 增殖活性^[6];病理性高张应变通过下调 Rho-GDIα 表达,引起 Rac1、p38 磷酸化,从而促进 VSMCs 增殖^[7];病理性高张应变通过 PDGFR-ras/raf/ERKs-AP1 信号通路引起 VSMCs 增殖^[8]。上述研究提示,张应变在调节 VSMCs 活性、维持血管形态结构和功能的稳定方面起重要作用,而其中的力学生物学分子机制尚需进一步探讨。研究张应变对 VSMCs 增殖活性的调控及其力学生物学机制,对于深入了解心血管疾病血管重建发病机制具有重要的理论和临床意义。

Forkhead 转录因子(Forkhead box protein O1, FOXO1)作为一类重要的转录调控因子家族,已被

证实在血管稳态维持、血管新生以及内皮细胞生长和存活等多种血管生物学功能调控中具有重要作用^[9]。牙周膜成纤维细胞受到张应变作用时, FOXO1 磷酸化水平升高^[10];内皮细胞在受到切应力作用时,同样会引起 FOXO1 磷酸化^[11-12]。上述研究结果显示,FOXO1 可能是一种重要的力学响应分子。基因敲除小鼠研究发现,FOXO1 完全敲除小鼠,由于血管形成障碍导致胚胎在第 10.5 d 时死亡,提示 FOXO1 在血管生长、发育中具有重要作用^[13-14]。然而,力学条件下 FOXO1 在血管功能调控,尤其是血管重建过程中的作用目前尚不清楚。

本文应用高血压大鼠模型,探讨高血压对在体动脉血管组织 FOXO1 表达及其磷酸化水平的作用;应用体外细胞周期性张应变加载系统对 VSMCs 进行力学加载,以模拟生理条件及高血压病理条件下 VSMCs 受到的张应变力学刺激,在细胞水平上探讨不同张应变对 VSMCs 的 FOXO1 表达、磷酸化及细胞增殖活性的影响;同时,应用 RNA 干扰技术研究 FOXO1 分子在 VSMCs 增殖活性调控中的作用。上述研究将为探讨高血压血管重建的力学生物学机制提供一些实验基础。

1 材料和方法

1.1 高血压大鼠模型的建立

取雄性 SD 大鼠(200 ± 20) g,戊巴比妥钠(100 mg/kg)腹腔麻醉,行腹主动脉缩窄术;以不缩窄腹主动脉、接受假手术的大鼠为对照^[15]。手术后动物饲养 2 周或 4 周,期间给予标准大鼠饲料,自由饮食,室内照明保持黑夜、白昼各 12 h,室温 23 ~ 25 °C。

术后2周和4周时,分别测量假手术对照组和腹主动脉缩窄手术组SD大鼠的颈总动脉收缩压,之后每只大鼠取长度约1.5 cm胸主动脉,分离掉外膜部分,液氮储存备用。

1.2 VSMCs 培养及鉴定

采用组织块贴壁法培养原代大鼠胸主动脉VSMCs^[16]。每3 d换液,约1周后观察细胞自组织块边缘爬出。用抗 α -肌动蛋白抗体(1:200, Sigma公司)对VSMCs进行细胞免疫荧光鉴定,阳性率>95%用于后续实验。

1.3 周期性张应变加载

第4~7代VSMCs胰酶消化后按照 3×10^5 /孔密度种植于Flexcell 6孔细胞培养板(BioFlex)中。次日细胞达到70%左右融合,用DMEM基础培养基同步化24 h后,应用FX-4000T细胞应变加载系统对VSMCs施加不同拉伸幅度(5%、15%)的张应变,加载时间分别为12和24 h,频率均为1.25 Hz。5%牵拉幅度模拟VSMCs在体生理条件所受到的张应变刺激,15%牵拉幅度模拟VSMCs在高血压病理条件所受到的异常增高的张应变刺激。

1.4 蛋白免疫印记实验(Western blot)

液氮法提取血管组织蛋白,蛋白裂解液提取细胞样品蛋白。12% SDS-PAGE凝胶电泳分离。5%脱脂奶粉TBST溶液封闭1 h;抗FOXO1(Cell Signal Technology, 1:500), phospho-FOXO1(Cell Signal Technology, 1:500), GAPDH(Proteintech, 1:1000), 4℃孵育过夜;碱性磷酸酶标记二抗(Jackson ImmunoResearch, 1:1000)室温孵育2 h;NBT/BCIP(KPL公司)底物显色。扫描后使用BIO-RAD公司一维分析软件Quantity One进行图像灰度分析。

1.5 RNA 干扰实验

第4~7代VSMCs胰酶消化后按照 2×10^5 /孔的密度种植于6孔细胞培养板(Costar)中,次日细胞达到70%左右融合。RNA干扰操作依据Lipofectamine™2000说明书,100 nmol特异性小干扰RNA(small interference RNA, siRNA)和5 μ L Lipofectamine™2000分别溶于250 μ L opti-MEM中轻轻混匀,之后将两者混合放置15 min后加入种有VSMCs的6孔板中,置于37℃、5%CO₂细胞培养箱培养8 h,每孔补加1 mL含10%胎牛血清的VSMCs培养液(不含抗生素),继续培养至48 h。FOXO1特

异性 siRNA 序列:5'-GCAG ACAC CUUG CUAU UCAT T-3', 5'-UGAA UAGC AAGG UGUC UGCT T-3'。对照组使用无意义 siRNA,序列:5'-UUCU CCGA ACGU GUCA CGUT T-3', 5'-ACGU GACA CGUU CGGA GAAT T-3'。

1.6 增殖检测

1.6.1 血管组织原位增殖检测 把新鲜胸主动脉血管切成1 mm的血管环,在含有20%胎牛血清和BrdU(1:1000)的M199培养基中,37℃培养箱中孵育60 min,更换成无BrdU培养基再孵育30 min。4%多聚甲醛固定后进行冰冻切片,常规免疫组织荧光法进行染色,二抗为anti-BrdU-FLUOS抗体37℃孵育2 h,荧光显微镜拍照分析。

1.6.2 细胞增殖检测 不同处理(周向张应变加载、RNA干扰)结束前8 h,将BrdU(1:1000)加入细胞培养液,处理结束后用按照 2×10^4 /孔密度接种在96孔酶标板中,37℃、5%CO₂培养箱中继续培养12 h,VSMCs贴壁后吸出培养液,4℃过夜。固定后加入anti-BrdU抗体(1:100),25℃湿盒中孵育2 h。加入POD显色底物,25℃避光孵育3~10 min,待样品呈现适当深度的天蓝色以1 mol/L H₂SO₄终止显色反应。用酶标仪(Bio-Rad)读数,测定光谱设定为450 nm,矫正光谱设定为630 nm。

1.7 统计学分析

实验结果均用均数 \pm 标准差表示。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较两组间的差异, $P < 0.05$ 为有显著性差异, $P < 0.01$ 为有非常显著性差异。

2 结果

2.1 高血压模型大鼠的血压

术后2周时,腹主动脉缩窄手术组SD大鼠颈总动脉收缩压为(23.94 \pm 2.26) kPa[(180 \pm 17) mmHg,1 mmHg=0.133 kPa],较假手术对照组(15.96 \pm 1.86) kPa[(120 \pm 14) mmHg]显著升高($P < 0.05$)。4周时,假手术对照组SD大鼠颈总动脉收缩压为(16.23 \pm 2.13) kPa[(122 \pm 16) mmHg],腹主动脉缩窄手术组SD大鼠颈总动脉收缩压为(24.74 \pm 2.00) kPa[(186 \pm 15) mmHg] ($P < 0.05$),说明高血压大鼠模型建立成功。

2.2 高血压大鼠胸主动脉血管壁细胞增殖水平增高

血管组织原位增殖检测发现,与假手术组大鼠相比,高血压大鼠胸主动脉血管壁中膜内 BrdU 掺入阳性染色细胞明显增多,提示高血压显著上调动脉血管细胞的增殖水平(见图1)。

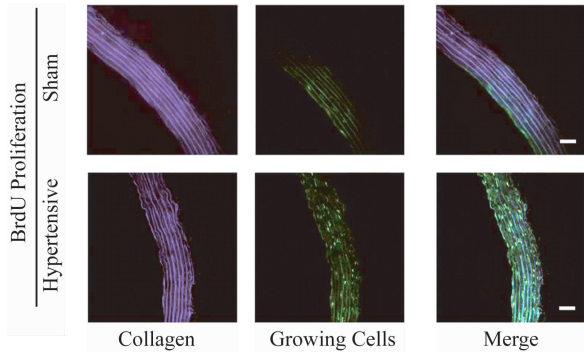


图1 高血压大鼠胸主动脉血管壁细胞的增殖较假手术组大鼠明显增高(标尺=500 μm)

Fig.1 The proliferation level of hypertensive rats was significantly elevated as compared to the sham-operated rats

2.3 高血压诱导大鼠胸主动脉组织的 FOXO1 及 p-FOXO1 表达

为探讨高血压疾病条件下 VSMCs 增殖的可能分子调控机制,本文关注 FOXO1 及其磷酸化在其中的作用。应用动物模型,研究高血压条件下血管组织 FOXO1 和 p-FOXO1 的表达水平。Western blot 结果显示,与假手术组相比,高血压大鼠胸主动脉组织的 FOXO1 及 p-FOXO1 在腹主动脉缩窄术后 2 和 4 周表达水平均显著增高(见图2),提示高血压诱导了动脉组织 FOXO1 表达及其磷酸化。

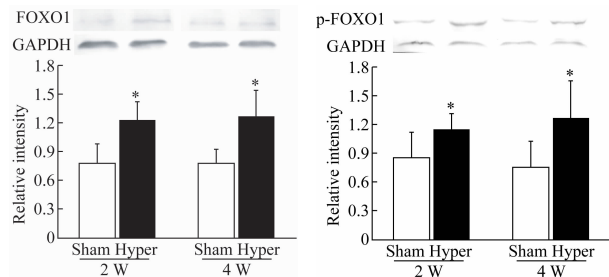


图2 高血压大鼠胸主动脉组织中 FOXO1 及 p-FOXO1 表达水平较假手术组明显增高 (* $P < 0.05$, $n = 5$)

Fig.2 Expressions of FOXO1 and p-FOXO1 in the thoracic aorta of hypertensive rats were significantly elevated as compared to the sham-operated rats

2.4 张应变调控 VSMCs 的 FOXO1 及 p-FOXO1 表达

应用 FX-4000T 细胞张应变加载系统,对体外培养 VSMCs 施加 1.25 Hz、不同拉伸幅度(5%、15%)的张应变 12 和 24 h。Western blot 结果显示,张应变加载 12 h 后,与生理性张应变(5%)相比,高张应变(15%)组抑制 VSMCs 的 FOXO1 表达,但对 p-FOXO1 表达作用不明显;张应变加载 24 h,与生理性张应变(5%)相比,高张应变(15%)显著上调 VSMCs 的 FOXO1 和 p-FOXO1 表达(见图3),提示周向张应变调控的 FOXO1 表达及其磷酸化可能在生理条件和高血压病理条件下血管组织中具有重要的生物学功能;长时相张应变加载时,异常增高的张应变力学刺激可能通过上调 FOXO1 表达及其磷酸化参与高血压病理条件下的血管重建过程。

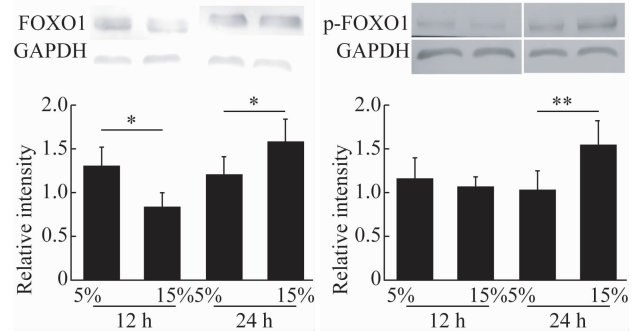


图3 不同张应变作用下 VSMCs 的 FOXO1、p-FOXO1 表达变化 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 5$)

Fig.3 Expressions of FOXO1 and p-FOXO1 in VSMCs subjected to different cyclic stretch

2.5 张应变调控 VSMCs 增殖

应用 BrdU 掺入法检测细胞增殖。与生理性张应变组(5%)相比,高张应变组(15%)加载 24 h 显著促进了 VSMCs 的增殖活性(见图4),提示异常增高的张应变刺激可能参与高血压血管重建疾病过程中 VSMCs 增殖活性的调控。

2.6 RNA 干扰抑制 VSMCs 的 FOXO1 表达,即抑制了 VSMCs 的增殖

为探讨 FOXO1 及其磷酸化水平变化对 VSMCs 增殖的影响,应用 RAN 干扰技术特异性抑制静态培养 VSMCs 的 FOXO1 表达。Western blot 结果显示,FOXO1 特异性 siRNA 转染显著抑制了 VSMCs 的 FOXO1 及 p-FOXO1 表达(见图5)。

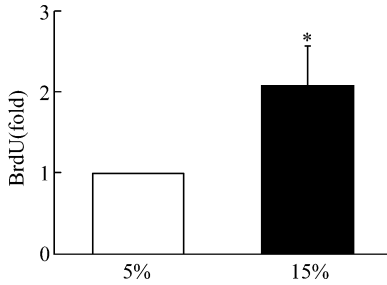


图4 高张应变促进 VSMCs 的增殖 (* $P < 0.05$, $n = 5$)

Fig. 4 15% cyclic stretch promoted the proliferation of VSMCs

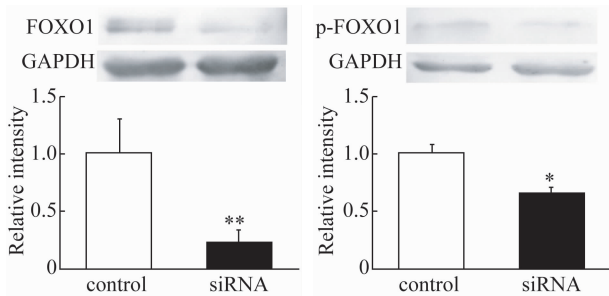


图5 siRNA 转染显著降低 VSMCs 的 FOXO1 和 p-FOXO1 表达 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 5$)

Fig. 5 Expressions of FOXO1 and p-FOXO1 in VSMCs were significantly decreased by FOXO1 target siRNA transfection

FOXO1 表达被抑制后,应用 BrdU 掺入法检测 VSMCs 的增殖活性。结果发现,与对照组相比,干扰 FOXO1 后 VSMCs 的增殖水平显著降低(见图 6),提示 FOXO1 以及 p-FOXO1 的表达变化可能参与了 VSMCs 增殖的调控。

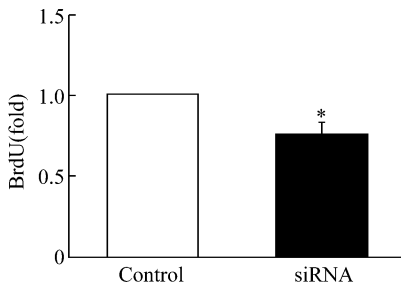


图6 FOXO1 特异性 siRNA 转染显著抑制 VSMCs 的增殖 (* $P < 0.05$, $n = 5$)

Fig. 6 FOXO1 target siRNA transfection decreased the proliferation of VSMCs

3 讨论

基于血液的脉动和流动特性,血管壁受到至少

3 个方向的机械应力作用,即血流脉动产生的周期性的周向牵张(张应变)作用(circumferential stretch)、血流静水压产生的正压力(normal stress)和沿血流方向的切应力(shear stress)^[17]。位于血管壁中膜的 VSMCs 主要承载周向张应变的作用。周向张应变对于维持血管壁的结构与功能具有密切关系。当血压升高时,血管壁受到的周向张力增大,VSMCs 合成胶原蛋白和弹性蛋白等细胞外基质蛋白量增加^[5],同时 VSMCs 肥大和增殖^[18],血管管壁变厚,间质纤维化,血管刚度增加^[1],最终导致血管重建。本研究应用腹主动脉缩窄高血压大鼠模型,结果显示高血压病理条件下血管壁细胞原位增殖明显增高;同时,体外张应变加载细胞研究发现,15% 病理性高张应变显著上调 VSMCs 增殖活性,提示高血压疾病条件下,异常增高的周期性张应变量学刺激在血管重建病理过程中起到重要调控作用。

VSMCs 受到张应变后,细胞通过整合素、G 蛋白耦联受体、钙激活钾通道等多种离子通道^[1,5]以及骨形态发生蛋白受体复合体^[19],激活细胞内骨架成分 Paxillin、局部黏着斑激酶、小 GTP 酶家族、Smad 家族等多种细胞内信号分子,将张应变量学刺激传导入细胞核,调控基因表达和蛋白质合成,并最终调控细胞的结构和功能。然而,高血压血管重建涉及复杂的细胞内应力信号转导过程,其机制还远未阐明。

FOXOs 家族是一类调控细胞周期、增殖、凋亡、分化、细胞存活和代谢等多种细胞功能的转录因子^[9],从酵母细胞到人类细胞中都有表达。FOXOs 分子在血管生物学中具有重要作用,当小鼠缺失 3 种 FOXOs 分子(FOXO1、FOXO3a、FOXO4)时会导致血管瘤普遍发生^[9,20]。FOXO1 分子在调控多种细胞增殖中具有重要作用^[21-22]。本研究发现,在高血压模型大鼠胸主动脉中,FOXO1 和 p-FOXO1 表达都有显著性上升;细胞实验表明,异常增高的张应变加载 24 h 诱导 FOXO1 表达和磷酸化,同时抑制 FOXO1 显著降低 VSMCs 增殖。但加载 12 h,FOXO1 的表达在高张应变组降低,这与在体实验和长时相(24 h)细胞实验结果并不相符,提示高血压条件下异常张应变诱导 FOXO1 的表达可能是一个长时间的积累变化,而 VSMCs 在受到力学刺激时,可能通过时间依赖方式激活不同细胞内信号分子。

当 FOXO1 被磷酸化后,会从细胞核内转移到胞浆中,促进细胞增殖,如在心肌细胞中通过 IGF1/PI3K/AKT 信号通路磷酸化 FOXO1 后,p-FOXO1 从细胞核进入胞浆,FOXO1 靶基因 p21^{cip1}、p27^{kip1}、p57^{kip2} 表达下降,心肌细胞增殖^[23]。上述研究结果提示,异常张应变力学刺激诱导的 FOXO1 磷酸化可能在调控 VSMCs 增殖中发挥重要作用,从而参与高张应变引起的血管重建。

本文首先通过腹主动脉缩窄建立高血压动物模型,并在后续实验中应用 FX-4000T 细胞张应变加载系统,探讨高血压血管重建的力学生物学分子机制。FX-4000T 力学加载系统在体外模拟 VSMCs 承载张应变作用中得到广泛应用^[5,7],其优点是可以根据实验设计不同,对张应变加载条件如幅度、频率和持续时间进行设定。正常生理条件下,在体大动脉的周向张应变在 5% 左右^[7];而高血压病理状态下,动脉所承受的机械应力持续增高,高血压患者动脉血管承受的周向张应变可高达 15% 以上^[4,7]。因此,本实验设置 5% 和 15% 两种拉伸幅度,以模拟生理条件和高血压环境下血管壁细胞受到的张应变力学刺激;通过高血压动物模型和体外细胞力学加载模型,探讨高血压条件下异常升高的周期性张应变刺激对 VSMCs 增殖的影响,以及信号分子 FOXO1 在其中可能的作用。本研究结果提示,异常增高的周向张应变可能通过激活 FOXO1 磷酸化上调 VSMCs 增殖,从而参与高血压血管重建的力学生物学机制。

然而,异常增高的张应变力学刺激引起 FOXO1 表达和磷酸化,进而调控 VSMCs 增殖的具体分子机制仍需要后续的深入研究。FOXO1 作为一类转录调控因子通过哪些下游靶基因调控 VSMCs 增殖? FOXO1 表达和磷酸化的上游调控分子是哪些(即 VSMCs 如何感知细胞外的张应变机械刺激进而调控 FOXO1 表达和磷酸化)? 深入探讨上述问题,对于认识血管重建的力学生物学机制以及防治心血管疾病具有重要意义。

参考文献:

[1] Lehoux S, Castier Y, Tedgui A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces [J]. J In-

tern Med, 2006, 259(4): 381-392.

[2] Liu QF, Yu HW, You L, et al. Apelin-13-induced proliferation and migration induced of rat vascular smooth muscle cells is mediated by the upregulation of Egr-1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 439(2): 235-240.

[3] 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.

[4] Williams B. Mechanical influences on vascular smooth muscle cell function [J]. J Hypertens, 1998, 16(12 Pt 2): 1921-1929.

[5] Haga JH, Li YS, Chien S. Molecular basis of the effects of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells [J]. J Biomech, 2007, 40(5): 947-960.

[6] Morrow D, Sweeney C, Birney YA, et al. Cyclic strain inhibits Notch receptor signaling in vascular smooth muscle cells in vitro [J]. Circ Res, 2005, 96(5): 567-575.

[7] Qi YX, Qu MJ, Yan ZQ, et al. Cyclic strain modulates migration and proliferation of vascular smooth muscle cells via Rho-GDIalpha, Rac1, and p38 pathway [J]. J Cell Biochem, 2010, 109(5): 906-914.

[8] Li C, Xu Q. Mechanical stress-initiated signal transduction in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo [J]. Cell Signal, 2007, 19(5): 881-891.

[9] Paik JH. FOXOs in the maintenance of vascular homeostasis [J]. Biochem Soc Trans, 2006, 34(Pt 5): 731-734.

[10] Danciu TE, Gagari E, Adam RM, et al. Mechanical strain delivers anti-apoptotic and proliferative signals to gingival fibroblasts [J]. J Dent Res, 2004, 83(8): 596-601.

[11] Fisslthaler B, Fleming I, Kaseru B, et al. Fluid shear stress and NO decrease the activity of the hydroxy-methylglutaryl coenzyme A reductase in endothelial cells via the AMP-activated protein kinase and FOXO1 [J]. Circ Res, 2007, 100(2): e12-21.

[12] Dixit M, Bess E, Fisslthaler B, et al. Shear stress-induced activation of the AMP-activated protein kinase regulates FOXO1a and angiopoietin-2 in endothelial cells [J]. Cardiovasc Res, 2008, 77(1): 160-168.

[13] Hosaka T, Biggs WH 3rd, Tieu D, et al. Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(9): 2975-2980.

[14] Furuyama T, Kitayama K, Shimoda Y, et al. Abnormal angiogenesis in FOXO1 (Fkhr)-deficient mice [J]. J Biol Chem, 2004, 279(33): 34741-34749.

[15] Barton CH, Ni Z, Vaziri ND. Enhanced nitric oxide inactivation in aortic coarctation-induced hypertension [J]. Kid-

- ney Int, 2001, 60(3): 1083-1087.
- [16] 姜晓华, 姚庆莘, 姜隽, 等. 切应力与血管平滑肌细胞对内皮细胞增殖的影响及 TGF β 1 与 p-Akt 信号通路在其中的作用[J]. 医用生物力学, 2010, 25(5): 316-320.
- Jiang XH, Yao QP, Jiang J, *et al.* Shear stress and vascular smooth muscle cells modulate the proliferation of endothelial cells via TGF β 1 and p-Akt pathways [J]. J Med Biomech, 2010, 25(5): 316-320.
- [17] Chien S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: The wisdom of the cell [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(3): H1209-1224.
- [18] 孔翰, 张明亮, 严志强, 等. 高血压与低切应力对大鼠颈总动脉血管重建的影响[J]. 医用生物力学, 2011, 26(2): 109-115.
- Kong H, Zhang MI, Yan ZQ, *et al.* Effects of hypertension and low shear stress on common carotid remodeling in rats [J]. J Med Biomech, 2011, 26(2): 109-115.
- [19] Zhou J, Lee PL, Lee CI, *et al.* BMP receptor-integrin interaction mediates responses of vascular endothelial Smad1/5 and proliferation to disturbed flow [J]. J Thromb Haemost, 2013, 11(4): 741-755.
- [20] Lee HY, You HJ, Won JY, *et al.* Forkhead factor, FOXO3a, induces apoptosis of endothelial cells through activation of matrix metalloproteinases [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(2): 302-308.
- [21] Abid MR, Yano K, Guo S, *et al.* Forkhead transcription factors inhibit vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia [J]. J Biol Chem, 2005, 280(33): 29864-29873.
- [22] Fritz RD, Varga Z, Radziwill G. CNK1 is a novel Akt interaction partner that promotes cell proliferation through the Akt-FoxO signalling axis [J]. Oncogene, 2010, 29(24): 3575-3582.
- [23] Evans-Anderson HJ, Alfieri CM, Yutzey KE. Regulation of cardiomyocyte proliferation and myocardial growth during development by FOXO transcription factors [J]. Circ Res, 2008, 102(6): 686-694.

· 致读者 ·

论文写作中的注意事项

论文的写作前言主要概述研究的背景、目的、研究思路、理论依据等。有些研究还应说明该研究开始的具体时间。前方必须开门见、简要、清楚,切忌套话、空话、牵涉面过宽、详述历史过程或复习文献过多等。不要涉及本研究中的数据或结论。不要与摘要雷同。未经检索,前言中不可写“国内外未曾报道”等字样,也不可自我评价达到“xx水平”或“填补xx空白”等。前言通常不需要标题。论著文稿的前言一般不超过250字;比较短的论文可以只用小段文字起前言作用。

方法主要介绍研究对象(人或实验动物,包括对照组)的选择及其基本情况,以及研究所采用的方法及观察指标。常用标题有“材料与方法”、“对象与方法”、“资料与方法”等。

临床研究需交代病例和对照者的来源、选择标准及研究对象的年龄、性别和其他重要特征等,并注明参与研究者是否知情同意。临床随机对照组研究应交代干预方法(随机方法)和所采用的盲法。实验研究需注明动物的名称、种系、等级、数量、来源、性别、年龄、体重、饲养条件和健康状况等。

个人创造的方法应详细说明“方法”的细节,以备他人重复。改进的方法应详述改进之外,并以引用文献的方式给出原方法的出处。原封不动地使用他人方法,应以引用文献的方式给出方法的出处,无须展开描述。

药品、试剂应使用化学名,并注明剂量、单位、纯度、批号、生产单位和生产时间。仪器、设备应注明名称、型号、规格、生产单位、精密度或误差范围。无须描述其工作原理。

统计学处理项应说明统计分析方法及其选择依据。

结果的叙述应客观真实、简洁明了、重点突出、层次分明、合乎逻辑,不应与讨论内容混淆。若文稿设有图表,则正文不需重述其全数据,只需摘述其主要发现或数据。若使用文字描述,内容冗长烦琐不易读懂,则应改用图或表来表达数据,以收到一目了然的效果。应认真核对正文和图表的数据,达到准确、统一。统计学分析应交代统计方法、统计值,仅有P值不能体现重要的定量信息。

讨论应着重讨论研究中的新发现及从中得出的结论,包括发现的意义及其限度,以及对进一步研究的启示。若不能导出结论,出可以进行必要的讨论,提出建议、设想、改进的意见或待解决的问题。应将研究结果与其他有关的研究相联系,并将本研究的结论与目的相关联。不必重述已在前言和结果部分详述过的数据或资料。不要过多罗列文献。避免作不成熟的主观推断。讨论中一般不应设置图或表。