

文章编号:1004-7220(2020)01-0049-08

周期性张应变调控血管平滑肌细胞黏附血小板微体及其在自噬中的作用

陈远秀, 包晗, 阎靖, 肖倩, 齐颖新
(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)

摘要:目的 探讨周期性张应力学刺激对血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)与血小板微体(platelet-derived microparticles, PMPs)黏附能力的影响,以及黏附的PMPs对VSMCs自噬的调控作用。方法 应用FX-5000T张应变加载系统,对体外培养VSMCs施加5%幅度的生理性张应变和15%幅度的高张应变;应用流式细胞术检测不同张应变作用的VSMCs与PMPs的黏附;免疫荧光检测PMPs刺激24h后自噬标志分子微管相关蛋白轻链3(autophagy microtubule associated protein light chain 3, LC3)的表达水平;Western blotting检测PMPs刺激24h后VSMCs自噬相关蛋白(autophagy related protein, Atg)的表达水平。结果 与5%生理性张应变加载相比,15%高张应变加载24h能显著增强VSMCs与PMPs的黏附水平,提示高张应变促进PMPs与VSMCs的黏附。免疫荧光和Western blotting结果显示,PMPs刺激可显著上升VSMCs中自噬标志蛋白LC3表达,同时Western blotting检测到PMPs刺激后Atg5、Atg7、Atg12蛋白表达水平显著上升。结论 高张应变可以促进VSMCs黏附PMPs,黏附的PMPs可能通过增加Atg5、Atg7、Atg12、LC3表达,从而增强VSMCs自噬。

关键词:周期性张应变;血小板微体;血管平滑肌细胞;细胞自噬

中图分类号: R 318.01 **文献标志码:** A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2020.01.012

Cyclic Stretch Induces Adhesion of VSMCs with Platelet-Derived Microparticles and the Role in Autophagy

CHEN Yuanxiu, BAO Han, YAN Jing, XIAO Qian, QI Yingxin

(Institute of Mechanobiology and Medical Engineering, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of cyclic stretch on adhesion of vascular smooth muscle cells (VSMCs) with platelet-derived microparticles (PMPs), and the role of PMPs in VSMC autophagy. **Methods** Cyclic stretch with the magnitude of 5% (simulating physiological mechanical stretch) or 15% (simulating pathological mechanical stretch) was subjected to VSMCs *in vitro* by using FX-5000T cyclic stretch loading system, and the adhesion of PMPs in VSMCs was detected by using flow cytometry. Immunofluorescence was used to detect the expression of autophagy microtubule associated protein light chain 3 (LC3) after 24 h stimulation with PMPs. Western blotting was used to detect the expression of autophagy related protein (Atg) in VSMCs after 24 h stimulation by PMPs. **Results** Compared with 5% cyclic stretch, 15% cyclic stretch significantly increased the adhesionability of VSMCs with PMPs. Immunofluorescence and Western blotting result revealed that PMPs stimulationsignificantly increased the expression of autophagy marker protein LC3 in VSMCs. Furthermore, the

收稿日期:2019-01-18;修回日期:2019-02-15

基金项目:国家自然科学基金项目(11625209, 11222223)

通信作者:齐颖新,教授,E-mail: qiyx@sjtu.edu.cn

protein expressions of Atg5, Atg7 and Atg12 were all significantly increased in VSMCs stimulated with PMPs.

Conclusions High cyclic stretch may enhance the autophagy of VSMCs by promoting the adhesion of PMPs, which will subsequently increase the expressions of Atg5, Atg7, Atg12 and LC3.

Key words: cyclic stretch; platelet-derived microparticles; vascular smooth muscle cells (VSMCs); cell autophagy

正常生理条件下,血管壁中膜层的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)主要承载血流脉动导致的血管周期性张应变。高血压病理条件下, VSMCs 所承载的周期性张应变上升,可高达 15% 及以上^[1]。研究表明,高张应变能够显著促进 VSMCs 增殖、凋亡等功能,在血管重建中有着重要的作用^[2-4]。

临床数据显示,超过 80% 颈动脉狭窄患者伴发高血压^[5],而高血压患者术后再狭窄的风险比无高血压者增加将近 1 倍^[6],表明高血压与颈动脉内膜新生、血管再狭窄有密切关系。大量研究表明,高血压引起的血管内膜损伤是 VSMCs 异常增殖和内膜新生的重要诱导因素。内膜损伤后,位于血管中膜的 VSMCs 在复杂物理、化学因素的诱导下进行表型转换,从维持血管弹性的收缩表型转换成高增殖率的合成表型,并且迁移到内膜层进行大量增殖^[7]。在这个过程中,自噬作为细胞自我更新和自我修复的机制,在维持 VSMCs 稳态以及表型转换中有着重要的作用。VSMCs 自噬被抑制不仅能显著抑制氧化低密度脂蛋白诱导的 VSMCs 异常增殖,还能够抑制血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)诱导的 VSMCs 由收缩型向成型的表型转化^[8];自噬激活剂雷帕霉素可以通过抑制细胞周期蛋白的表达抑制 VSMCs 的增殖及迁移^[9];缺血/再灌注损伤能上调人脐静脉内皮细胞中的诱导型一氧化氮合酶,从而诱导自噬并通过自噬促进细胞迁移和凋亡^[10]。虽然已证实高血压条件下, VSMCs 的自噬水平显著增强^[11],然而高血压内膜损伤过程中 VSMCs 的自噬调控是一个复杂的过程。

近年来研究发现,在内膜损伤条件下,血小板黏附到内皮下基质,被胶原激活并释放血小板微体(platelet-derived microparticles, PMPs),参与包括凝血、炎症等多种生理病理功能。在高血压、动脉粥样硬化、急性冠状动脉综合征等心血管疾病中,

PMPs 数量显著增加,提示 PMPs 可以作为心血管疾病临床诊断和药物疗效评价的靶标^[12]。PMPs 是血小板释放的直径为 100~1 000 nm、具有封闭脂质双分子层膜结构的微体,其中包含了大量血小板来源的蛋白质以及微小 RNA(microRNA, miRs)等核酸类物质,能够进行细胞间的信息交流^[13]。PMPs 是循环系统中数量最多的微体,占据外周血微体 2/3^[14],其作为能够进行细胞间信息交流的、有生物活性的物质,近年来成为血管重建的研究热点之一。已有研究表明, PMPs 能够调控 VSMCs 进行表型转换,从收缩表型转换为增殖水平高的合成表型^[15],然而高血压异常张应变力学刺激对 VSMCs 与 PMPs 黏附的作用以及 PMPs 对细胞自噬的调控目前均不清楚。

本文使用 FX-5000T 周期性张应变加载系统(Flexcell 公司,美国)对 VSMCs 进行体外张应变加载实验,加载幅度分别为 5% (模拟正常生理状态下 VSMCs 所受张应变)、15% (模拟高血压状态下 VSMCs 所受高张应变)。提取、分离、纯化 PMPs 并进行活细胞膜染料染色,并与 5%、15% 张应变加载 24 h 后的 VSMCs 共培养,流式细胞术检测不同幅度周期性张应变加载对 VSMCs 黏附 PMPs 的影响。之后,应用细胞免疫荧光染色和蛋白免疫印迹法(Western blotting)检测 PMPs 对 VSMCs 中的微管相关蛋白轻链 3 (autophagy microtubule associated protein light chain 3, LC3) 以及自噬相关蛋白 (autophagy related protein, Atg) Atg5、Atg7、Atg12 表达水平的作用。本文旨在研究 PMPs 调控 VSMCs 自噬的机制,为高血压条件下内膜损伤后血管重建的分子机制提供新的实验依据以及研究思路。

1 材料和方法

1.1 大鼠 VSMCs 原代培养

采用组织块贴壁法原代培养大鼠动脉 VSMCs。选用北京维通利华实验技术有限公司培养的雄性

Sprague-Dawley (SD)大鼠,质量为150~200 g,饲养于上海交通大学实验动物中心。在无菌环境下,1%戊巴比妥钠麻醉SD大鼠后取动脉血管,将血管剪成1 mm³组织块;加入少量VSMCs培养液[DMEM (Gibco公司,美国),10%胎牛血清(Gibco公司,美国),青链霉素(BBI公司,美国)],使组织块平铺于培养皿底;于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养。用平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(1:200, Dako Denmark A/S公司,丹麦)对第1代VSMCs进行细胞免疫荧光鉴定,阳性率大于95%用于后续实验。

1.2 血小板提取、纯化以及PMPs提取

大鼠腹主动脉取血,转移至0.9%氯化钠、Apyrase(终浓度1 U/mL)、PGE1(终浓度0.1 μ g/mL)溶液中,并于37℃水浴保存。1 400 r/min室温离心15 min,取出离心管,此时血液分为3层,从上到下分别为富含血小板的血浆、白细胞层以及红细胞,取上层血浆,加入终浓度为5 mmol/L EDTA以及终浓度为1 U/mL Apyrase,混匀后2 800 r/min室温离心15 min,沉淀用TB缓冲液重悬,加入I型胶原(Sigma公司,美国)至终浓度为0.1 U/mL,用于模拟内膜损伤后暴露的胶原激活血小板释放PMPs,于37℃水浴1 h。2 800 r/min室温离心15 min,取上清,4℃、20 500 r/min离心90 min,弃去上清,用DMEM重悬,则可得到PMPs。以DMEM重悬液和从全血中提取的总微体(total microvesicles, t-MVs)作为对照。

1.3 VSMCs周期性张应变加载

VSMCs按照 2×10^5 个/孔密度种植于Flexercell 6孔细胞培养板(BioFlex公司,美国)中。加入DMEM基础培养基同步化24 h后,应用FX-5000T细胞张应变加载系统对VSMCs施加幅度为5%或15%张应变,频率均为1.25 Hz,加载时间为24 h。5%张应变模拟体内生理条件下在体VSMCs所承载的周向张应变力学刺激,15%张应变模拟高血压条件下在体VSMCs所承载的周期性高张应变刺激^[16]。

1.4 PMPs黏附VSMCs实验

研究发现,微体(microparticles, MPs)与靶细胞的黏附呈时间依赖性,随着时间的延长,黏附的MPs数量会逐渐增加^[17-18]。本实验室前期研究表明,PMPs与靶细胞共培养1 h能够有效地黏附到靶

细胞上^[19],故选择1 h为PMPs与VSMCs共培养的时间。用红色亲脂性荧光染料PKH26(1:200, Sigma公司,美国)染色5 min;10%胎牛血清的DMEM培养液终止染色。将带有红色荧光的PMPs加入到幅度为5%、15%,频率为1.25 Hz张应变加载的VSMCs,孵育1 h,消化细胞,800 r/min室温离心10 min,弃去上清,PBS重悬细胞后,应用流式细胞仪(BD FACSCalibur公司,美国)检测荧光强度。

1.5 细胞免疫荧光染色

将VSMCs按照 1×10^5 个/孔密度种植于Confocal皿(Next公司,澳大利亚)上,提取I型胶原激活血小板后释放的PMPs,与VSMCs共培养。24 h后,PBS清洗5 min \times 3次,4%多聚甲醛固定细胞30 min,PBS清洗5 min \times 3次。0.3% Triton X-100破膜30 min,PBS清洗5 min \times 3次。10%山羊血清封闭30 min。加入一抗LC3(1:100, Cell Signaling Technology公司,美国),4℃孵育过夜。PBS清洗5 min \times 3次,加入Alexa Flour 555标记二抗(1:1 000, Cell Signaling Technology公司,美国)和DAPI(1:1000, Sigma公司,美国),室温孵育2 h。PBS清洗后,荧光显微镜(Olympus公司,日本)观察。

1.6 Western blotting实验

10% SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白后,将蛋白转印到硝酸纤维素膜。于5%脱脂奶粉TBST溶液中封闭1 h后,加入一抗Atg5、Atg7、Atg12、LC3(1:500, Cell Signaling Technology公司,美国),GAPDH(1:1 000, Proteintech公司,美国),4℃孵育过夜。碱性磷酸酶标记二抗(1:1 000, Jackson Immuno Research公司,美国)室温孵育2 h,NBT/BCIP(KPL公司,美国)底物显色。扫描后使用Quantity One一维分析软件(BIO-RAD公司,美国)进行图像灰度分析。

1.7 统计学方法

本文所涉及的实验独立重复至少3次,各组间实验数据以均值 \pm 标准差形式来表示,两组数据用 t 检验来检测差异, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 高张应变加载后VSMCs与PMPs黏附能力增强

应用FX-5000T细胞张应变加载系统,对体外培养的VSMCs施加幅度为5%、15%周期性张应变,

分别模拟生理和高血压状态下的张应变力学刺激。张应变加载 24 h 后,将 PKH26 染色的 PMPs 与 VSMCs 共培养 1 h,以加入 DMEM 重悬液的细胞为对照组。流式细胞术分析结果显示,与 DMEM 对照组相比,加入 PMPs 后,5%、15% 周期性张应变加载

VSMCs 组都有显著的荧光,提示 PMPs 被成功染色并黏附到 VSMCs 上。与 5% 张应变加载相比,15% 高张应变加载的 VSMCs 组荧光强度显著增强。上述结果提示,与 5% 周期性张应变相比,15% 高张应变能显著促进 VSMCs 黏附 PMPs (见图 1)。

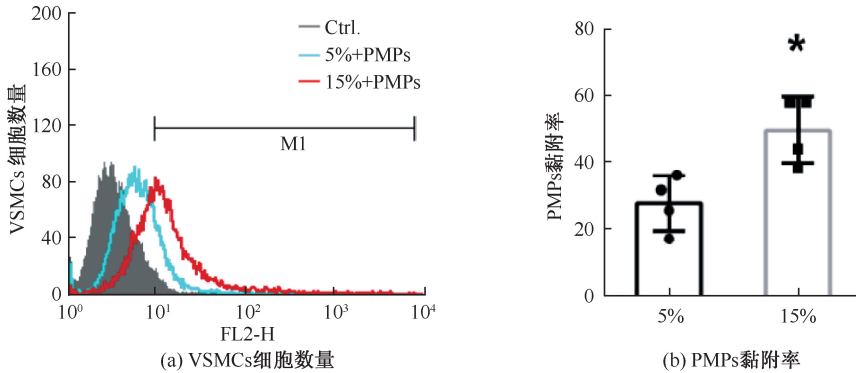


图 1 5%、15% 张应变加载后 VSMCs 与 PMPs 的黏附 (* $P < 0.05$, $n = 4$)

Fig.1 Adhesion of VSMCs with PMPs under 5% and 15% cyclic stretch (a) Number of VSMCs, (b) Adhesion rate of PMPs

2.2 PMPs 促进 VSMCs 自噬

为了研究 PMPs 对 VSMCs 自噬的作用,提取胶原激活血小板释放的 PMPs 和 t-MVs (血浆中总的微体),分别与 VSMCs 共培养 24 h,以 DMEM 重悬液组为阴性对照,检测 VSMCs 中自噬标记物 LC3 的表达。Western blotting 结果显示,PMPs 能显著上调 VSMCs 内 LC3 II/GAPDH 的表达,但是对 LC3 II/

LC3 I 的表达没有显著作用(见图 2);细胞免疫荧光结果显示,PMPs 刺激后,VSMCs 表达 LC3 的细胞数量上升,并且在阳性表达细胞中 LC3 的荧光强度也显著上调(见图 3)。上述结果表明,血小板激活后释放的 PMPs 能显著促进 VSMCs 自噬,提示内膜损伤后,血小板被内皮下基质激活后释放的 PMPs 可能在 VSMCs 自噬调控中有重要作用。

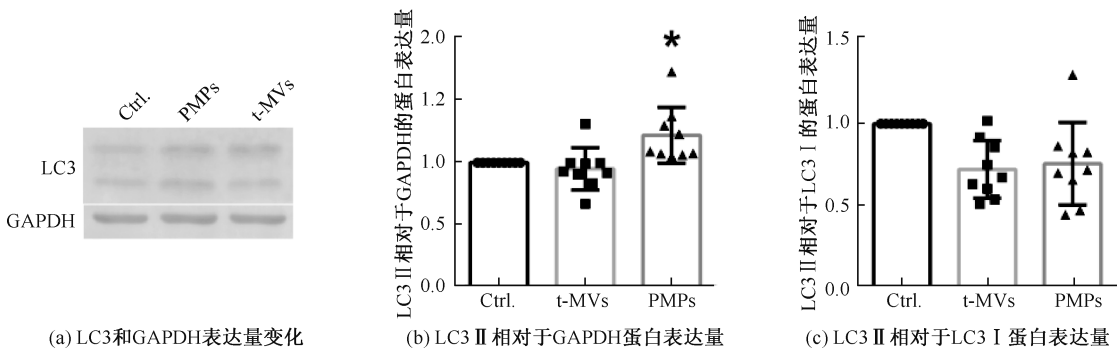


图 2 激活的 PMPs 刺激后检测 VSMCs 中 LC3 表达(* $P < 0.05$, $n = 9$)

Fig.2 Detection of LC3 expression in VSMCs induced by activated PMPs (a) Changes in LC3 and GAPDH expression, (b) LC3 II protein expression relative to GAPDH, (c) LC3 II protein expression relative to LC3 I

2.3 PMPs 促进自噬相关分子 Atg5、Atg7 表达

在经典宏自噬过程中,自噬相关分子 Atg5 可通过形成 Atg12-Atg5 复合物^[20],参与自噬膜的延伸过程,而 Atg7 则促进 LC3 II 形成^[21],故 Atg5 和 Atg7 是自噬形成过程中重要的分子。为了研究 PMPs 促

进 VSMCs 自噬的机制,将 VSMCs 分别和 PMPs、t-MVs 共培养 24 h,以 DMEM 重悬液组为阴性对照,检测 VSMCs 中 Atg5、Atg7 的表达。与 DMEM 对照组相比,PMPs 和 t-MVs 都能显著上调 Atg5 的表达,而 PMPs 同时还能显著促进 Atg7 的表达。上述结

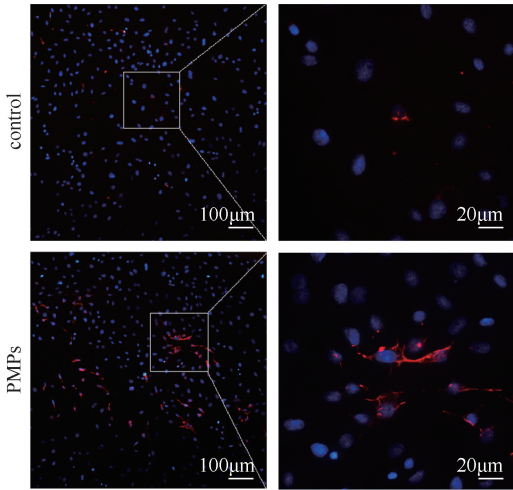


图3 激活的PMPs刺激VSMCs后自噬小体的免疫荧光图
Fig. 3 Immunofluorescence images showing activated PMPs induced autophagy in VSMCs

果提示,PMPs可能是通过上调自噬相关分子 Atg5、Atg7 的表达从而促进 VSMCs 自噬(见图4)。

2.4 PMPs 促进 Atg5-Atg12 复合物形成

在宏自噬过程中需要 Atg12 与 Atg5 通过泛素化共轭体系的共价结合而促进自噬体的形成^[22],Atg12 的分子量为 16 kDa,与 Atg5 形成的复合物分子量为 55 kDa^[23]。为了研究在 PMPs 刺激过程中 Atg5-Atg12 复合物是否形成,将 VSMCs 分别和 PMPs、t-MVs共培养 24 h,以 DMEM 重悬液组为阴性对照,检测 VSMCs 中 Atg12 蛋白在分子量 16 kDa 和 55 kDa 位置的表达。与对照组相比,各组 Atg12 蛋白在分子量 16 kDa 位置的表达量并没有显著变化;而 PMPs 刺激后,Atg12 在分子量 55 kDa 位置的表达量显著上升。上述结果提示,PMPs 可能促进 Atg5-Atg12 复合物形成,从而调控 VSMCs 自噬(见图5)。

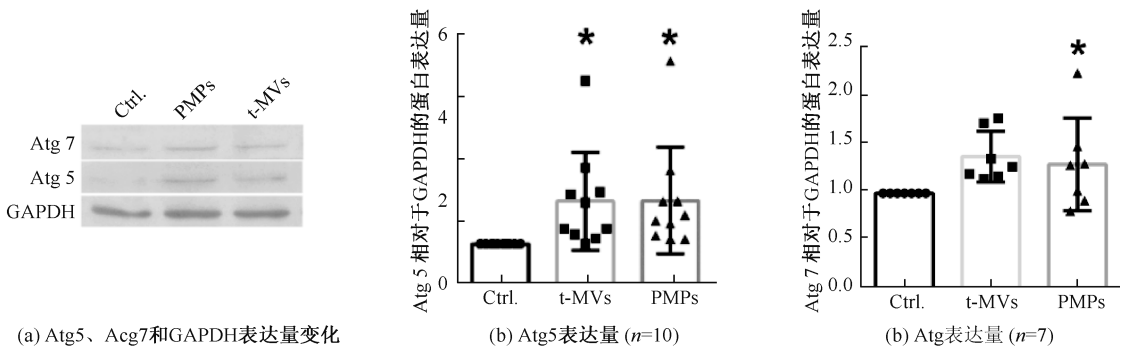


图4 激活的PMPs刺激VSMCs后Atg5和Atg7表达(* $P < 0.05$)

Fig.4 Atg5 and Atg7 expression induced by activated PMPs (a) Changes in Atg5, Atg 7 and GAPDH protein expression, (b) Protein expression of Atg5, (c) Protein expression of Atg7

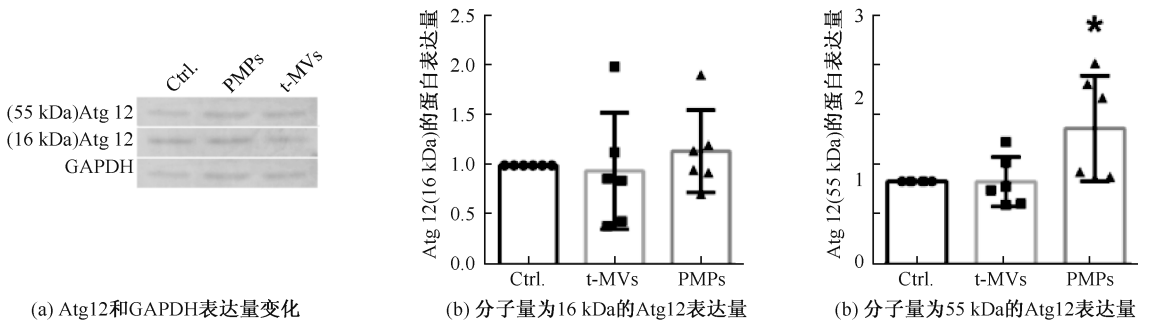


图5 激活的PMPs刺激VSMCs后Atg12表达(* $P < 0.05, n = 6$)

Fig.5 Expression of Atg12 induced by activated PMPs (a) Changes in Atg12 and GAPDH protein expression, (b) Protein expression of Atg12 with a molecular weight of 16 kDa, (c) Protein expression of Atg12 with a molecular weight of 55 kDa

3 讨论与结论

VSMCs 位于血管中膜,主要承载脉动血压作用在血管壁的周向张应力。研究表明,VSMCs 可以响应周向张应力力学刺激而改变细胞功能,不仅参与血管正常生理稳态的维持,还在血管重建过程中发挥重要作用。在高血压疾病病理过程中,异常升高血压引起的内膜损伤是血管重建的重要起始因素^[7]。其中,内膜损伤后血小板被激活并释放大量的 PMPs,可能在内膜损伤血管重建过程中起重要作用^[12]。本文关注高张应力力学条件下 VSMCs 与激活血小板释放的 PMPs 的黏附作用,并探讨黏附的 PMPs 对 VSMCs 自噬的调控作用。研究结果为高血压内膜损伤后血管重建的机制研究提供新的思路以及研究方向。

为研究周期性张应变对 VSMCs 黏附 PMPs 能力的作用,对体外培养的 VSMCs 施加幅度为 5%、15% 周期性张应变,分别模拟生理状态和高血压状态下的张应力力学刺激。结果显示,15% 高张应变能显著促进 VSMCs 与 PMPs 的黏附。研究表明,VSMCs 的细胞膜表面存在多种机械应力感受器,如整合素-局部黏着斑激酶复合体、血小板内皮细胞黏附分子 1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM1)^[24]、活化激酶 C 受体 1 (receptor for activated C kinase 1, RACK1)^[25] 以及多种离子通道^[26] 等。其中,整合素作为细胞表面的跨膜蛋白,在基质蛋白和细胞骨架之间形成桥接,在细胞与细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 组分的结合和附着中有着重要的作用。研究表明,VSMCs 响应周期性张应变是整合素依赖性的,并且周期性张应变可以上调整合素 $\beta 3$ 的表达^[27];胶原激活血小板后释放的 PMPs 能够与白细胞上的整合素结合,从而介导血小板和白细胞的相互作用。这一过程主要通过 PMPs 细胞膜上的糖蛋白 GPIb 与白细胞上的配体白介素 Mac-1 结合,并且在静脉水平剪切应力下 PMPs 可以增强白细胞的聚集^[28]。上述研究结果提示,高周期性张应变可能通过增强 VSMCs 膜表面的整合素与 PMPs 膜表面的糖蛋白结合,从而促进 PMPs 的黏附。

自噬是一种细胞组分降解和循环过程,在所有真核生物中都是高度保守的。在哺乳动物细胞中,

有 3 种主要的自噬类型:微自噬、宏自噬和分子伴侣介导自噬,这 3 种自噬都是通过溶酶体降解细胞质中的蛋白质或细胞器,以实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新^[29]。在这 3 种自噬中,宏自噬是最为重要也是研究最多的过程^[30]。在宏自噬的自噬体形成的延伸阶段,需要两类泛素化结合系统的调控:①由泛素化蛋白 Atg12 通过 Atg7 (E1 泛素活化酶样蛋白) 和 Atg10 (E2 泛素交联酶样蛋白) 介导与 Atg5 结合形成 Atg12-Atg5 复合物,该复合物再与 Atg16 L 结合,参与自噬膜的延伸过程^[31];②通过泛素化蛋白 LC3 发挥作用。LC3 可被细胞内的脂质磷脂酰乙醇胺 (phosphatidyl ethanolamine, PE) 激活^[32]。PE 通过 Atg7 和 Atg3 连续激活反应与无活性的 LC3 I 结合形成有活性的 LC3 II (PE 结合形式)^[33],进而通过 Atg5-Atg12-Atg16 L 复合物的介导与自噬体膜结合^[34]。

自噬在血管重建中有着重要的作用,自噬激活时能促进 VSMCs 的表型转换^[35],也引发细胞凋亡^[36]。本文研究 PMPs 黏附对 VSMCs 自噬功能的作用,结果提示胶原激活血小板后释放的 PMPs 可能在 VSMCs 自噬调控中有重要作用。此外,胶原激活血小板释放的 PMPs 能显著促进 Atg5、Atg7 的表达,而 Atg12 在原分子量 16 kDa 位置的表达量并没有显著变化,但是在 55 kDa 位置表达量显著上升,提示 PMPs 可能通过增强 Atg7 的表达并促进 Atg5-Atg12 复合物和 LC3 II 的形成,从而促进 VSMCs 自噬的发生。

本文结果表明,在高张应变刺激下 VSMCs 对 PMPs 的黏附能力增强,并且 PMPs 能够显著促进 VSMCs 的自噬,提示高血压条件下 PMPs 能够调控损伤内膜局部 VSMCs 的自噬,参与血管重建。PMPs 包含大量血小板来源的蛋白质、脂质、RNA 以及 miRs,已有研究表明,凝血酶激活后的血小板可通过释放微体传递 Ago2-miR-223 到人脐静脉内皮细胞中,调控靶分子 FBXW7 以及 EFNA1 的表达^[37],提示 PMPs 能够传递内容物到受体细胞中并调控其功能,从而进行细胞间的信息交流。在本研究中,PMPs 调控 VSMCs 自噬的细胞间交流分子机制还未揭示,PMPs 是否通过传递 miRs 或者蛋白质调控 VSMCs 功能,需要更加深入的研究。

参考文献:

- [1] TOUYZ RM. Vascular remodeling, retinal arteries, and hypertension [J]. *Hypertension*, 2007, 50(4): 603-604.
- [2] QI YX, YAO QP, HUANG K, *et al.* Nuclear envelope proteins modulate proliferation of vascular smooth muscle cells during cyclic stretch application [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(19): 5293-5298.
- [3] MAYR M, HU Y, HAINAUT H, *et al.* Mechanical stress-induced DNA damage and Rac-p38MAPK signal pathways mediate p53-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells [J]. *FASEB J*, 2002, 16(11): 1423-1425.
- [4] INTENGAN HD, SCHIFFRIN EL. Vascular remodeling in hypertension: Roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis [J]. *Hypertension*, 2001, 38(3): 581-587.
- [5] BROTT TG, HOBSON RW, HOWARD G, *et al.* Stenting versus endarterectomy for treatment of carotid-artery stenosis [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(1): 11-23.
- [6] FLURI F, HATZ F, VOSS B, *et al.* Restenosis after carotid endarterectomy: Significance of newly acquired risk factors [J]. *Eur J Neurol*, 2010, 17(3): 493-498.
- [7] WU B, MOTTOLA G, SCHALLER M, *et al.* Resolution of vascular injury: Specialized lipid mediators and their evolving therapeutic implications [J]. *Mol Aspects Med*, 2007, 58: 72-82.
- [8] LI J, ZHAO L, YANG T, *et al.* c-Ski inhibits autophagy of vascular smooth muscle cells induced by oxLDL and PDGF [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98902.
- [9] MARTIN KA, MERENICK BL, DING M, *et al.* Rapamycin promotes vascular smooth muscle cell differentiation through insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt2 feedback signaling [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(49): 36112-36120.
- [10] ZHU T, YAO Q, WANG W, *et al.* iNOS induces vascular endothelial cell migration and apoptosis via autophagy in ischemia/reperfusion injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(4): 1575-1588.
- [11] DENG Y, WU W, GUO S, *et al.* Altered mTOR and Beclin-1 mediated autophagic activation during right ventricular remodeling in monocrotaline-induced pulmonary hypertension [J]. *Respir Res*, 2017, 18(1): 53.
- [12] ZALDIVIA MTK, MCFADYEN JD, LIM B, *et al.* Platelet-derived microvesicles in cardiovascular diseases [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2017, 4: 74.
- [13] BUZAS EI, GYORGY B, NAGY G, *et al.* Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2014, 10(6): 356-364.
- [14] JY W, HORSTMAN LL, JIMENEZ JJ, *et al.* Measuring circulating cell-derived microparticles [J]. *J Thromb Haemost*, 2004, 2(10): 1842-1843.
- [15] VAJEN T, BENEDIKTER BJ, HEINZMANN ACA, *et al.* Platelet extracellular vesicles induce a pro-inflammatory smooth muscle cell phenotype [J]. *J Extracell Vesicles*, 2017, 6(1): 1322454.
- [16] SAFAR ME, PERONNEAU PA, LEVENSON J A, *et al.* Pulsed doppler: Diameter, blood flow velocity and volumic flow of the brachial artery in sustained essential hypertension [J]. *Circulation*, 1981, 63(2): 393-400.
- [17] JANSEN F, YANG X, HOYER FF, *et al.* Endothelial microparticle uptake in target cells is annexin I/phosphatidylserine receptor dependent and prevents apoptosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(8): 1925-1935.
- [18] JANSEN F, STUMPF T, PROEBSTING S, *et al.* Intercellular transfer of miR-126-3p by endothelial microparticles reduces vascular smooth muscle cell proliferation and limits neointima formation by inhibiting LRP6 [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2017, 104: 43-52.
- [19] BAO H, CHEN YX, HUANG K, *et al.* Platelet-derived microparticles promote endothelial cell proliferation in hypertension via miR-142-3p [J]. *FASEB J*, 2018, 32(8): 3912-3963.
- [20] KIM J, DALTON VM, EGGERTON KP, *et al.* Apg7p/Cvt2p is required for the cytoplasm-to-vacuole targeting, macroautophagy, and peroxisome degradation pathways [J]. *Mol Biol Cell*, 1999, 10(5): 1337-1351.
- [21] FUJITA N, ITOH T, OMORI H, *et al.* The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy [J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(5): 2092-2100.
- [22] OHSUMI Y. Molecular dissection of autophagy: Two ubiquitin-like systems [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2: 211-216.
- [23] BANSAL M, MOHARIR SC, Sailasree SP, *et al.* Optineurin promotes autophagosome formation by recruiting the autophagy-related Atg12-5-16L1 complex to phagophores containing the Wipi2 protein [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(1): 132-147.
- [24] TZIMA E, IRANI-TEHRANI M, KIOSSES WB, *et al.* A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress [J]. *Nature*, 2005, 437(7057): 426-431.
- [25] 沈岩, 王璐, 韩悦, 等. 活化激酶 C 受体 1 在切应力调控血管平滑肌细胞增殖中的作用 [J]. *医用生物力学*, 2014, 29(6): 491-497.
- SEHN Y, WANG L, HAN Y, *et al.* Shear stress modulates the proliferation of vascular smooth muscle cells via receptor for activated C kinase I [J]. *J Med Biomech*, 2014, 29(6): 491-497.

- [26] THODETI CK, MATTEWS B, RAVI A, *et al.* TRPV4 channels mediate cyclic strain-induced endothelial cell reorientation through integrin-to-integrin signaling [J]. *Circ Res*, 2009, 104(9): 1123-1130.
- [27] SUZUKI M, NARUSE K, ASANO Y, *et al.* Up-regulation of integrin $\beta 3$ expression by cyclic stretch in human umbilical endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 239(2): 372-376.
- [28] LO SC, HUNG CY, LIN DT, *et al.* Involvement of platelet glycoprotein Ib in platelet microparticle mediated neutrophil activation [J]. *J Biomed Sci*, 2006, 13(6): 787-796.
- [29] YANG Z, KLIONSKY DJ. Mammalian autophagy: Core molecular machinery and signaling regulation [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(2): 124-131.
- [30] YORIMITSU T, KLIONSKY DJ. Autophagy: Molecular machinery for self-eating [J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12: 1542-1552.
- [31] OHSUMI Y. Molecular dissection of autophagy: Two ubiquitin-like systems [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(3): 211-216.
- [32] ICHIMURA Y, KIRISAKO T, TAKAO T, *et al.* A ubiquitin-like system mediates protein lipidation [J]. *Nature*, 2000, 408(6811): 488-492.
- [33] KIRISAKO T, ICHIMURA Y, OKADA H, *et al.* The reversible modification regulates the membrane binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway [J]. *J Cell Biol*, 2000, 151(2): 263-276.
- [34] FUJITA N, ITOH T, OMORI H, *et al.* The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy [J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(5): 2092-2100.
- [35] GROOTAERT MO, COSTA MARTINS PA, BITSCH N, *et al.* Defective autophagy in vascular smooth muscle cells accelerates senescence and promotes neointima formation and atherogenesis [J]. *Autophagy*, 2015, 11(11): 2014-2032.
- [36] RUBINSTEIN AD, EISENSTEIN M, BER Y, *et al.* The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis [J]. *Molecular cell*, 2011, 44(5): 698-709.
- [37] LAFFONT B, CORDUAN A, PLÉ H, *et al.* Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2-microRNA complexes to endothelial cells via microparticles [J]. *Blood*, 2013, 122(2): 253-261.

冯元桢先生百年纪念感言

齐颖新

相信每一位关注过生物力学的人都必然听过一个名字——“现代生物力学之父”冯元桢先生；相信每一位听过冯先生研究经历的人都必然会为从空气动力学向生物力学的华丽转身而赞叹；也相信每一位从事生物力学相关研究的人都必然会为先生杰出的贡献而折服！

2019年9月是冯先生100岁寿诞，包括我在内的世界各地的生物力学学者齐聚美国圣迭戈为先生庆生，因为我们中的每一位或多或少都是在冯先生的引领下走进生物力学的大门，因为我们中的每一位都深深感佩于先生精深的学术造诣和严谨的学术思想，也因为我们中的每一位对先生的敬仰和热爱！

欢聚似乎才刚刚过去，北京时间2019年12月16日一早，突然惊闻先生逝世的消息，我脑中突然闪现的是2011年有幸第一次拜访冯元桢先生时圣迭戈明媚的阳光和先生孩子般真挚的笑容，是先生和我讲起论语中“吾日三省吾身；为人谋而不忠乎？与朋友交而不信乎？传不习乎？”时闪闪发亮的眼睛，是和先生一起谈起生物力学时我们共同、无尽的爱！

先生对于现代生物力学学科创立的贡献我们将铭记，先生对于中国生物力学奠基性的贡献我们将铭记！先生永远是我辈楷模，激励我们为共同热爱的生物力学砥砺前行！

纪念冯元桢先生！