

文章编号: 1004-7220(2021)01-0144-07

钙离子参与周期性高张应变和血小板源性微囊协同诱导的血管平滑肌细胞迁移

高爽, 李珊珊, 李子通, 范洋晶, 刘泽, 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 探究周期性高张应变和血小板源性微囊(platelet-derived microvesicles, PMVs)对血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)迁移功能的影响,以及Ca²⁺在其中的作用。方法 应用FX-5000T应变加载系统对体外培养VSMCs施加5%、15%幅度周期性张应变,分别模拟VSMCs受到生理、高血压条件下的周期性高张应变;使用划痕实验检测VSMCs迁移;使用无Ca²⁺培养基创造细胞外无游离Ca²⁺条件;应用IP₃R拮抗剂2-APB阻断细胞内Ca²⁺释放;施加TRPV4通道拮抗剂GSK219和L型电压门控钙通道的抑制剂Nifedipine分别阻断相应Ca²⁺通道;体外施加凝血酶激活血小板产生PMVs以模拟高血压病理环境。结果 与5%周期性张应变相比,15%周期性张应变可以显著促进VSMCs迁移。去除细胞外Ca²⁺可以抑制VSMCs迁移,但GSK219和Nifedipine对于15%高张应变诱导的VSMCs迁移无显著作用;2-APB可以抑制15%高张应变诱导的VSMCs迁移过程。同时PMVs可以显著促进15%高张应变诱导的VSMCs迁移,并且细胞外和细胞内Ca²⁺均参与其中。结论 细胞内钙和细胞外钙在15%周期性高张应变诱导的VSMCs迁移中均发挥重要作用,并且PMVs可以协同参与到上述过程中。研究结果为高血压病理性张应变诱导血管重建的分子机制和临床治疗提供力学生物学新思路。

关键词:周期性张应变;血小板源性微囊;血管平滑肌细胞;细胞迁移

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2021.01.023

Calcium Participates in Migration of VSMCs Synergistically Induced by Cyclic Stretch and Platelet-Derived Microvesicles

GAO Shuang, LI Shanshan, LI Zitong, FAN Yangjing, LIU Ze, QI Yingxin

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

Abstract: Objective To investigate the synergistic effects of pathologically elevated cyclic stretch and platelet-derived microvesicles (PMVs) on migration of vascular smooth muscle cells (VSMCs) and the potential role of calcium in this process. **Methods** The FX-5000T strain loading system was used to apply cyclic stretch to VSMCs with magnitudes of 5% and 15%, which simulated physiological and hypertensive situation respectively *in vitro*; wound healing assay was used to analyze VSMCs migration; Ca²⁺-free medium was used to remove extracellular calcium; 2-APB (an antagonist of IP₃R) was used to inhibit the release of intercellular stored calcium; GSK219 (an antagonist of TRPV4) and Nifedipine (an inhibitor of L-type voltage-gated calcium channel) were applied to block the activity of respective calcium channel; thrombin was used to stimulate platelets *in vitro* which simulated

收稿日期:2020-02-24; 修回日期:2020-03-28

基金项目:国家自然科学基金项目(11625209,31700816)

通信作者:齐颖新,教授,E-mail: qiyn@sju.edu.cn

the hypertensive activation of PMVs *in vivo*. **Results** Compared with 5% cyclic stretch, 15% cyclic stretch significantly promoted VSMC migration. Removal of extracellular calcium inhibited VSMCs migration, but the application of GSK219 and Nifedipine did not affect the migration up-regulated by 15% cyclic stretch; while 2-APB which inhibited the release of intracellular stored calcium could also repress VSMCs migration under 15% cyclic stretch. PMVs further promoted VSMC migration under 15% cyclic stretch condition, and both extracellular calcium and intercellular stored calcium were involved in this process. **Conclusions** Both intracellular and extracellular calcium play important roles in VSMC migration induced by 15% cyclic stretch, and PMVs synergistically participate in the above process. The study is aimed to provide new mechanobiological insights into the molecular mechanism and clinical targets of vascular remodeling in hypertension.

Key words: cyclic stretch; platelet-derived microvesicles (PMVs); vascular smooth muscle cells (VSMCs); cell migration

高血压作为一种常见的慢性病,是脑卒中、冠心病等多种心血管疾病的重要独立危险因素^[1-2]。高血压的病理环境会引起血管内皮细胞(endothelial cells, ECs)和血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)功能变化,导致血管结构改变和血管内膜损伤,进而引发血管壁增厚、弹性降低等一系列的并发症^[3]。其中,中膜层 VSMCs 异常增殖和迁移是血管结构和功能变化的重要病理过程^[4]。

在心脏和血管组成的脉动循环系统中,动脉血管主要受到 3 个方向机械力的刺激,分别是与血流方向平行的切应力、垂直于血管的正压力以及由血管脉动引起的沿血管壁方向的周向张应力^[5]。其中,VSMCs 主要承担周期性周向张应力。临床上,高血压患者会出现高于生理性的周期性张应力,使得弹性血管壁形变增加,血管壁细胞承受异常增高的张应变^[6]。上述机械力刺激可以作用于细胞膜上的机械感受分子,包括整合素蛋白、血管内皮细胞钙黏着蛋白、拉伸激活的钙通道等,将力学信号向内传递并转变为生化级联信号,引起细胞生理功能的变化^[7-8]。

除了多种力学因素调控 VSMCs 功能外,在高血压病理条件下,会出现异常升高的凝血酶,激活循环血液中的血小板,并释放血小板源性微囊(platelet-derived microvesicles, PMVs)^[9]。此外,高血压引起血管内膜损伤后内膜完整性破坏,导致中膜层 VSMCs 暴露并与 PMVs 接触,加速 VSMCs 增殖、迁移和表型转化等过程,共同调节血管重建^[10]。据报道,与健康的人体血液相比较,血栓、动脉粥样

硬化、高血压等疾病患者循环血液中的 PMVs 浓度均较高,提示高浓度 PMVs 可能是疾病的重要指标,并在疾病病理过程中起到关键作用^[11-12]。然而,高血压病理过程中升高的 PMVs 与周期性高张应变对 VSMCs 迁移的作用仍有待研究。

研究显示,VSMCs 收缩与细胞迁移息息相关,且细胞收缩受到胞浆中 Ca^{2+} 浓度的调节^[13]。 Ca^{2+} 作为细胞内最简单的重要第 2 信使,对调节细胞兴奋性、骨架完整性、代谢、收缩、迁移等功能至关重要^[14]。胞浆 Ca^{2+} 浓度通常处于较低水平,而当细胞受到一定刺激(例如生长因子、机械力)时,胞浆 Ca^{2+} 浓度会迅速升高^[15]。增加的 Ca^{2+} 通常有两种来源,胞内储存 Ca^{2+} 释放和胞外 Ca^{2+} 内流,进入胞浆的 Ca^{2+} 可以通过钙调蛋白调节下游信号通路影响细胞功能^[16]。研究发现,机械应力通过整联蛋白诱导 VSMCs 内 Ca^{2+} 浓度升高和细胞局部的钙火花^[17]。周期性张应变拉伸激活机械敏感的瞬态受体电位香草酸 4(transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4) 通道,通过激活磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI_3K) 促进细胞骨架重塑和细胞的定向迁移^[18]。上述研究提示,应力刺激引起的胞浆 Ca^{2+} 变化可能是高血压下 VSMCs 迁移的机制之一。然而,VSMCs 在力学刺激下的 Ca^{2+} 响应机制,尤其是力学刺激和 PMVs 协同作用下的 Ca^{2+} 响应尚不明确。

本文应用 FX-5000T 周期性张应变加载系统对 VSMCs 加载不同幅度的张应变,探究细胞内储存和细胞外 Ca^{2+} 在张应变加载条件下对 VSMCs 迁移的作用,施加 PMVs 探究高张应变和 PMVs 两者协同

对 VSMCs 迁移的影响。研究结果为深入理解高血压血管重建病理机制提供一定的力学生物学实验基础,并为疾病的临床诊断和治疗提供潜在的干预靶点。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

通过组织贴块法从雄性 SD 大鼠胸主动脉中分离 VSMCs^[19]。将细胞在含有 10% 小牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素的改良 DMEM 培养基 (Gibco 公司, 美国) 中培养, 置于 37 °C、5% CO₂ 湿润恒温培养箱中。使用平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 特异性抗体对 VSMCs 进行免疫荧光鉴定, 阳性率 >95%, 培养至 4~6 代用于后续实验。

1.2 力学加载

应用 FX-5000T (Flexcell 公司, 美国) 进行周期性张应变加载。在胶原蛋白包被的 Flexcell 6 孔板 (Flexcell 公司, 美国) 上种植 VSMCs, 培养至单层后施加无血清 DMEM 进行饥饿处理 24 h 后分别加载 5% 幅度、1.25 Hz 频率张应变, 以模拟 VSMCs 受到的生理性周期性张应变; 15% 幅度、1.25 Hz 频率张应变, 以模拟 VSMCs 受到的高血压病理条件下的周期性高张应变, 循环拉伸 12、24 h^[19]。

1.3 划痕实验

为了确定不同刺激条件对体外培养 VSMCs 迁移的作用, 对无血清 DMEM 饥饿处理 24 h 的 VSMCs 采用划痕方法进行检验。细胞生长至单层后用 10 μ L 移液枪头刮过培养皿, 然后用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次, 施加周期性张应变或相应的药物刺激。配备相机的倒置相差显微镜 (Olympus 公司, 美国) 在 0、12、24 h 分别捕获相差图像, 统计 VSMCs 伤口愈合度: (初始伤口面积-某时刻伤口面积)/初始伤口面积 \times 100%, 并用 Image J 9.0 和 Excel 比较分析划痕愈合情况。

1.4 施加药物

细胞培养在 Flexcell 六孔板上生长至单层后, 使用无血清 DMEM 饥饿处理 24 h 后进行划痕实验, 使用无钙培养基 (Gibco 公司, 美国) 创造无细胞外游离 Ca²⁺ 条件; 氨基乙氧基二苯基硼酸酯 (2-APB, 0.1 mmol/L, Sigma-Aldrich 公司, 美国), 一种

可透过细胞膜的肌醇 1,4,5-三磷酸受体 (inositol 1,4,5-triphosphate receptor, IP₃R) 拮抗剂, 用于抑制肌醇 1,4,5-三磷酸 (inositol 1,4,5-triphosphate receptor, IP₃) 诱导的细胞内储存钙释放; Nifedipine (Nife, 10 μ mol/L, Sigma-Aldrich 公司, 美国) 阻断 L 型电压门控钙通道 (L-type voltage-gated calcium channel, LTCC); 选择性拮抗剂 GSK219 (GSK2193874, 0.1 mmol/L, Sigma-Aldrich 公司, 美国) 阻断 TRPV4 通道。

1.5 PMVs 的分离和富集

使用注射器 (含 100 μ L/mL 抗凝剂) 从大鼠腹主动脉中获得全血, 将其置于 0.5% 氯化钠溶液中, 以 1 500 r/min 速度离心分离血小板、白细胞和红细胞。获取上清液并以 2 800 r/min 速度离心 15 min, 获取沉淀中的血小板, 并使用 Tyrode Buffer 溶液将底物重悬, 添加凝血酶 (V/V=1:1 000), 并在 37 °C 温水中放置 90 min。然后, 将混合物溶液以 2 800 r/min 的速度离心 15 min, 以去除血小板, 将上部的悬液转移到高速离心管 (Beckman Coulter 公司, 美国), 并以 20 500 g 离心 90 min 收集 PMVs, 实验中刺激比例为 PMVs:VSMCs=100:1^[20]。

1.6 数据统计分析

使用 GraphPad 9.0 进行数据分析。所有结果均表示为均值 \pm 标准差, 应用 R 语言进行方差检验, 结果显示数据均方差齐次。使用非配对 *t* 检验分析不同组间的统计差异, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 周期性高张应变对 VSMCs 迁移的作用

应用 5%、15% 幅度周期性张应变分别对饥饿处理后的 VSMCs 进行力学加载。划痕愈合结果显示, 相比于 5% 周期性张应变, 15% 周期性高张应变加载 12、24 h 后均促进划痕愈合 [见图 1(a)]; 统计结果显示, 15% 周期性高张应变在 12 h 时, VSMCs 划痕面积相比于初始面积缩小 19%, 在 24 h 时相比于初始划痕面积缩小 30%, 与 5% 周期性张应变相比较均具有显著性差异 [见图 1(b)]。上述结果提示, 周期性高张应变可以显著促进 VSMCs 迁移。

为了探究 Ca²⁺ 是否参与到 15% 周期性高张应变诱导的 VSMCs 迁移过程, 首先应用无钙培养基创

造无细胞外 Ca^{2+} 条件,并施加 15% 周期性高张应变。结果显示,与正常培养基相比,无钙培养基在 12 h、24 h 均显著抑制了 15% 周期性高张应变诱导的 VSMCs 划痕愈合。上述结果提示,细胞外游离 Ca^{2+} 参与了病理性高张应变诱导的 VSMCs 迁移过程。

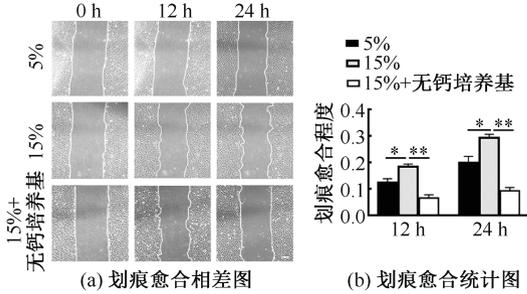


图 1 周期性张应变对 VSMCs 划痕愈合的影响
(标尺 = 200 μm , * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 4$)

Fig.1 Effects on VSMC wound healing induced by cyclic tensile stretch (a) Phase graphs of wound healing, (b) Column statistical chart of wound healing

2.2 GSK219 和 Nife 对周期性高张应变诱导 VSMCs 迁移的作用

由于 TRPV4 和 LTCC 是 VSMCs 上介导细胞外 Ca^{2+} 内流的离子通道^[18],进一步探究上述两种 Ca^{2+} 通道是否参与了周期性高张应变诱导的 VSMCs 迁移。施加 TRPV4 通道的拮抗剂 GSK219 后给予 15% 周期性高张应变力学加载。结果显示,GSK219 施加组与 DMSO 对照组相比,VSMCs 划痕愈合在 15% 周期性高张应变加载 12、24 h 均无显著差异。除此之外,LTCC 的抑制剂 Nife 对 VSMCs 划痕愈合亦无显著作用(见图 2)。上述结果提示,TRPV4 通道和 LTCC 通道可能未参与病理性高张应变诱导的 VSMCs 迁移,因此进一步探究细胞内存储 Ca^{2+} 的作用。

2.3 细胞内 Ca^{2+} 对周期性高张应变诱导 VSMCs 迁移的作用

为了探究细胞内 Ca^{2+} 是否参与 15% 周期性高张应变诱导的 VSMCs 迁移,应用 IP_3R 的拮抗剂 2-APB 抑制 IP_3 诱导的细胞内存储 Ca^{2+} 释放。结果显示,与 DMSO 对照组比较,应用 2-APB 后加载 15% 周期性高张应变可以抑制 VSMCs 划痕愈合,并且在 12、24 h 抑制愈合程度显著(见图 3)。上述结

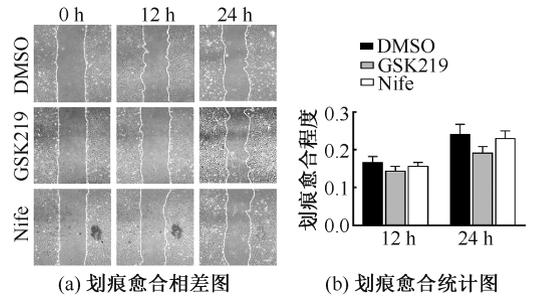


图 2 GSK219 和 Nife 对周期性高张应变诱导的 VSMCs 划痕愈合的影响(标尺 = 200 μm , $n = 4$)

Fig.2 Effects of GSK219 and Nife on VSMC wound healing induced by 15% cyclic stretch (a) Phase graphs of wound healing, (b) Column statistical chart of wound healing

果提示,细胞内储存的 Ca^{2+} 参与病理性高张应变诱导的 VSMCs 迁移过程。

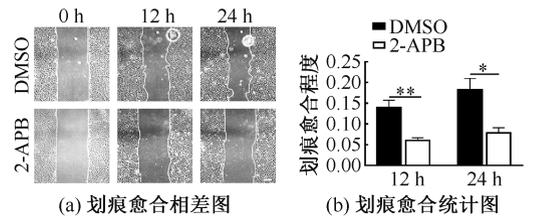


图 3 细胞内存储 Ca^{2+} 对 15% 周期性高张应变诱导 VSMCs 划痕愈合的影响(标尺 = 200 μm , * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 4$)

Fig.3 Effects of intracellular calcium storage on VSMC wound healing induced by 15% cyclic stretch (a) Phase graphs of wound healing, (b) Column statistical chart of wound healing

2.4 PMVs 对 15% 周期性高张应变条件下 VSMCs 迁移的作用

为了进一步探究 PMVs 是否可以与周期性高张应变协同调节 VSMCs 迁移过程,在 15% 周期性高张应变加载条件下对 VSMCs 给予 PMVs 刺激。与单独 15% 高张应变加载的对照组比较,PMVs 条件下同时给予 15% 高张应变力学刺激在 24 h 显著增加 VSMCs 划痕愈合程度(见图 4)。上述结果提示,PMVs 可以促进 15% 病理性高张应变诱导的 VSMCs 迁移。

2.5 Ca^{2+} 对 PMVs 与 15% 周期性高张应变诱导 VSMCs 迁移的作用

应用无钙培养基和 2-APB 分别创造无细胞外钙条件和阻断细胞内钙的释放,之后给予 PMVs 和 15% 周期性高张应变共同作用。结果显示,与正常

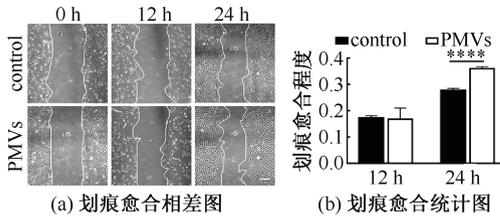


图4 PMVs对15%周期性高张应变诱导VSMCs划痕愈合的影响(标尺=200 μm , $***P<0.0001$, $n=4$)

Fig. 4 Effects of PMVs on VSMC wound healings induced by 15% cyclic stretch (a) Phase graphs of wound healing, (b) Column statistical chart of wound healing

培养基对照组相比,无 Ca^{2+} 培养基可降低 PMVs 和 15% 周期性高张应变诱导的 VSMCs 划痕愈合程度;与 DMSO 对照组相比,2-APB 对于 PMVs 和 15% 周期性高张应变协同诱导的 VSMCs 划痕愈合也起到显著的抑制作用(见图 5)。上述结果提示,细胞内钙和细胞外钙均参与了 PMVs 与病理性高张应变协同诱导的 VSMCs 迁移的过程中。

2.6 生物信息学分析预测 PMVs 参与调控细胞迁移的分子

根据 Dean 等^[21]发表的 thrombin 激活血小板释放 PMVs 的蛋白组学数据,利用在线网站 <https://>

表1 PMVs表达的靶向钙信号的9个蛋白分子

Tab.1 Nine molecules expressed in PMVs target calcium signaling

基因缩写	蛋白全称	功能注释
HTR2B	5-hydroxytryptamine receptor 2B	神经细胞迁移,平滑肌收缩
ITPR3	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	对 Ca^{2+} 的反应,长期突触增强
PHKA1	phosphorylase kinase regulatory subunit alpha 1	Ca^{2+} 跨膜转运
SLC25A31	solute carrier family 25 member 31	运输,跨膜运输
SLC25A5	solute carrier family 25 member 5	正调控细胞增殖,跨膜转运
SLC25A6	solute carrier family 25 member 6	运输,跨膜运输
VDAC1	voltage dependent anion channel 1	行为恐惧反应,阴离子转运
VDAC2	voltage dependent anion channel 2	蛋白质聚合的负调控,内在的凋亡信号通路的负调控
VDAC3	voltage dependent anion channel 3	纤毛组装调控

3 讨论与结论

在高血压的病理环境下血管承受高于生理的周期性高张应变,这一力学刺激可以调节血管壁的重要细胞组分 VSMCs 的功能,在高血压血管重建中发挥重要作用,进而参与动脉粥样硬化等心血管疾病的发生、发展。本文关注高血压病理过程中周期

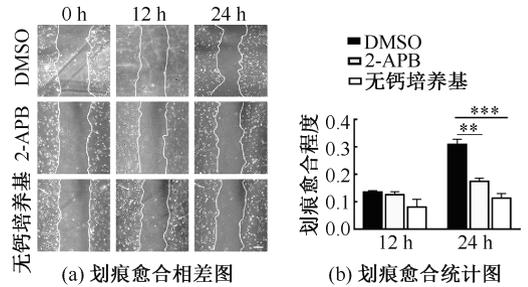


图5 Ca^{2+} 在 PMVs 和周期性高张应变协同诱导的 VSMCs 划痕愈合的影响(标尺=200 μm , $**P<0.01$, $***P<0.001$, $n=4$)

Fig.5 Effects of calcium on VSMC wound healing induced by PMVs and 15% cyclic stretch synergistically

(a) Phase graphs of wound healing, (b) Column statistical chart of wound healing

david. nci. gov/tools. jsp 中的 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 信号通路和 GO (Gene Ontology) 功能注释进行生物信息学分析,预测结果显示,PMVs 表达的 9 个蛋白分子(见表 1)可以直接靶向调节钙信号通路,提示 PMVs 可能通过携带的细胞膜受体如 G 蛋白偶联受体(G protein coupled receptor, GPCR)和内质网膜受体 IP_3R 等参与 VSMCs 内 Ca^{2+} 变化,进而在细胞迁移、收缩等功能中发挥重要作用。

性高张应变和异常升高的 PMVs 在 VSMCs 迁移功能中的作用,结果表明,周期性高张应变可以显著诱导 VSMCs 迁移,而且 PMVs 可以协同增强这一过程。

PMVs 是由血小板在活化过程中由细胞质膜向外发芽和裂变而释放、直径为 100~1 000 nm 的亚显微双层膜囊泡^[22]。PMVs 是血液循环系统中

丰富的微囊,占70%~80%,可以选择性地携带不同分子,包括血小板特征性抗原,如GP II b/III a和GP I b、P-选择素、CXCR4^[23]等,并将携带的信息分子转移到其他细胞,从而影响受体细胞的功能。

研究发现,血小板活化产生的PMVs可以通过调节血小板整合素 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 促进VSMCs黏附,以CX3CL1-CX3CR1依赖性方式促进细胞增殖,迁移和表型转换^[24]。PMVs以浓度依赖性方式刺激p42/p44 MAP激酶磷酸化,并通过原癌基因Fos诱导DNA合成,促进血栓病理过程中冠状动脉VSMCs的增殖和迁移^[25]。本文研究显示,PMVs可以通过细胞外Ca²⁺进入和细胞内Ca²⁺释放促进周期性高张应变诱导的VSMCs迁移。

胞浆内游离Ca²⁺浓度通常很低,90%以上储存于内质网等细胞内钙库,多种因素通过细胞内第2信使IP₃激活内质网上的IP₃R,将内质网中储存的Ca²⁺释放到胞浆中^[26]。此外,细胞膜上也表达多种Ca²⁺通道,包括电压依赖性钙通道和受体操纵钙通道等^[26]。钙通道可响应各种环境刺激介导细胞外Ca²⁺流入细胞内^[27]。胞浆内升高的Ca²⁺可以进一步与钙调蛋白结合形成复合物,从而激活下游细胞内信号通路(如PI₃K、钙依赖性蛋白激酶II、肌球蛋白轻链激酶等),参与细胞迁移、增殖等功能调节^[28]。本文研究结果揭示,细胞内存储Ca²⁺释放和细胞外Ca²⁺内流均可以参与到高张应变诱导的VSMCs迁移过程中。但是在探究细胞外Ca²⁺内流可能发挥作用的质膜离子通道时,LTCC和TRPV4通道的作用均不显著。此外,施加内Ca²⁺抑制剂或者去除外钙的12 h或24 h(长时相),可以抑制VSMCs迁移,提示高张应变和PMVs背景下持续的Ca²⁺来源供应不足可以抑制VSMCs迁移。但为了进一步确定胞内Ca²⁺的时空动态变化规律,还需要借助Ca²⁺荧光探针或者生物活性探针进行直观地检测。

为了确定PMVs调控细胞Ca²⁺和迁移功能的关键分子,本课题组基于已发表的蛋白质组学数据^[21],应用生物信息学分析预测得到了PMVs上9个参与调节Ca²⁺变化的分子,其中溶质载体家族(solute carrier family)对于Ca²⁺运输至关重要^[29]。上述分子在病理性高张应变和PMVs协同调控VSMCs钙信号的分子机制,仍需要未来进一步探究。

本文结果显示,周期性高张应变条件下施加PMVs可以显著促进VSMCs迁移,细胞内储存的Ca²⁺和细胞外Ca²⁺内流在其中均起到重要作用。高血压病理条件下,升高的张应变量学刺激和凝血酶激活的PMVs可以协同作用,通过Ca²⁺这一重要的细胞内信使调控VSMCs迁移功能。本文旨在为高血压条件下VSMCs异常迁移的机制提供新的实验依据,并为高血压血管重建的转化研究提供新思路。

参考文献:

- [1] MILLS KT, BUNDY JD, KELLY TN, *et al.* Global burden of hypertension: Analysis of population-based studies from 89 countries [J]. *J Hypertension*, 2015, 33: e2.
- [2] 张廷芳, 张木坤, 班灵敏. 高血压患者血液流变学危险指标的分析[J]. *医用生物力学*, 2000, 15(1): 63-65.
ZHANG TF, ZHANG MK, BAN XM. An analysis of hemorheologic danger indexes in hypertension patients [J]. *J Med Biomech*, 2000, 15(1): 63-65.
- [3] RAIJ L. Hypertension, endothelium, and cardiovascular risk factors [J]. *Am J Med*, 1991, 90(2A): 13S-18S.
- [4] LEE DY, WON KJ, LEE KP, *et al.* Angiotensin II facilitates neointimal formation by increasing vascular smooth muscle cell migration: Involvement of APE/Ref-1-mediated overexpression of sphingosine-1-phosphate receptor 1 [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2018, 347: 45-53.
- [5] KAO YH, CHEN PH, SUN CK, *et al.* Cyclic mechanical stretch up-regulates hepatoma-derived growth factor expression in cultured rat aortic smooth muscle cells [J]. *Bioscience Rep*, 2017, 38(2): BSR20171398.
- [6] TOUYZ MR. Vascular remodeling, retinal arteries, and hypertension [J]. *Hypertension*, 2007, 50(4): 603-604.
- [7] CHRISTENSEN OVE. Mediation of cell volume regulation by Ca²⁺ influx through stretch-activated channels [J]. *Nature*, 1987, 330(6143): 66-68.
- [8] CHATZIZISIS YS, COSKUN AU, JONAS M, *et al.* Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: Molecular, cellular, and vascular behavior [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49(25): 2379-2393.
- [9] 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.
- [10] CAILLON A, MIAN MOR, FRAULOB-AQUINO JC, *et al.* Gamma delta T cells mediate angiotensin ii-induced hypertension and vascular injury [J]. *Circulation*, 2017, 135(22): 2155-2162.

- [11] ZALDIVIA MTK, MCFADYEN JD, LIM B, *et al.* Platelet-derived microvesicles in cardiovascular diseases [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2017, 4: 74.
- [12] NIEUWLAND R, BERCKMANS RJ, ROTTEVEEL-EIJKMAN RC, *et al.* Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant [J]. *Circulation*, 1997, 96(10): 3534-3541.
- [13] GRZEŚK G, MALINOWSKI B, GRZEŚK E, *et al.* Direct regulation of vascular smooth muscle contraction by mastoparan-7 [J]. *Biomed Rep*, 2013, 2(1): 34-38.
- [14] WEI C, WANG X, ZHENG M, *et al.* Calcium gradients underlying cell migration [J]. *Curr Opin Cell Bio*, 2012, 24(2): 254-261.
- [15] LIU B, LU S, ZHENG S, *et al.* Two distinct phases of calcium signalling under flow [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 91(1): 124-133.
- [16] KIM TJ, JOO C, SEONG J, *et al.* Distinct mechanisms regulating mechanical force-induced Ca^{2+} signals at the plasma membrane and the ER in human MSCs [J]. *Elife*, 2015, 4: e04876.
- [17] CHAN WL, HOLSTEINRATHLOU NH, YIP KP. Integrin mobilizes intracellular Ca^{2+} in renal vascular smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 280(3): C593-603.
- [18] THODETI CK, MATTHEWS 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.
- [19] 陈远秀, 包晗, 阎靖, 等. 周期性张应变调控血管平滑肌细胞黏附血小板微粒及其在自噬中的作用[J]. *医用生物力学*, 2020, 35(1): 49-56.
 CHEN YX, BAO H, YAN Q, *et al.* Cyclic stretch induces adhesion of VSMCs with platelet-derived microparticles and the role in autophagy [J]. *J Med Biomech*, 2020, 35(1): 49-56.
- [20] DIEHL P, FRICKE A, SANDER L, *et al.* Microparticles: Major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 93(4): 633-644.
- [21] DEAN WL, LEE MJ, CUMMINS TD, *et al.* Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes [J]. *Thromb Haemost*, 2009, 102(4): 711-718.
- [22] YÁÑEZ-MÓ M, SILJANDER PR, ANDREU Z, *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions [J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4: 27066.
- [23] AATONEN M, GRONHOLM M, SILJANDER P. Platelet-derived microvesicles: Multitalented participants in intercellular communication [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2012, 38(1): 102-113.
- [24] LIU H, XIONG W, LIU Q, *et al.* Chemokine-like receptor 1 regulates the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells [J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 4054-4061.
- [25] WEBER AA, KÖPPEN HO, SCHRÖR K. Platelet-derived microparticles stimulate coronary artery smooth muscle cell mitogenesis by a PDGF-independent mechanism [J]. *Thromb Res*, 2000, 98(5): 461-466.
- [26] FORSÉN S. Calcium [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 1998, 2(2): 293-302.
- [27] WU S, JIAN MY, XU YC, *et al.* Ca^{2+} entry via $\alpha 1G$ and TRPV4 channels differentially regulates surface expression of P-selectin and barrier integrity in pulmonary capillary endothelium [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 297(4): 650-657.
- [28] MASON DP, KENAGY RD, HASENSTAB D, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery [J]. *Circ Res*, 1999, 85(12): 1179-1185.
- [29] YU N, JIANG J, YU Y, *et al.* SLC41A1 knockdown inhibits angiotensin II-induced cardiac fibrosis by preventing Mg^{2+} efflux and Ca^{2+} signaling in cardiac fibroblasts [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 564: 74-82.