

FOXO3a沉默或过表达对内皮祖细胞增殖的影响

黄黎亚 王飞 曹青 刘芳 桑甜甜 陈书艳*

(上海交通大学医学院附属新华医院老年医学科, 上海 200092)

摘要 观察FOXO3a(forkhead box O3a)沉默或过表达对内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)增殖的影响。构建了沉默型Ad-shRNA-FOXO3a和突变型Ad-TM(triple mutant)-FOXO3a重组腺病毒载体。密度梯度离心法结合荧光激活细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS)分离人脐血来源的EPCs(CD133+CD34+), 并进行体外培养及免疫荧光鉴定。将上述重组腺病毒载体转染EPCs并观察转染效率与细胞形态学改变; Western blot分析FOXO3a蛋白表达变化; 细胞计数与MTT法分析FOXO3a沉默或过表达对EPCs增殖的影响。成功构建了Ad-shRNA-FOXO3a、Ad-TM-FOXO3a重组腺病毒载体并转染人脐血来源EPCs。Western blot提示, Ad-shRNA-FOXO3a转染EPCs后明显抑制了FOXO3a蛋白的表达; Ad-TM-FOXO3a转染EPCs后明显增加了FOXO3a蛋白的表达。结合细胞形态学改变、细胞计数与MTT法实验结果提示, 有效沉默FOXO3a明显促进了EPCs增殖; FOXO3a过表达明显抑制了EPCs增殖。人脐血来源的EPCs中, FOXO3a参与了细胞增殖的调节。

关键词 FOXO3a; 基因沉默; 基因突变; 腺病毒载体; 内皮祖细胞; 细胞增殖

Effects of FOXO3a Silencing or Over-expression on the Proliferation of Endothelial Progenitor Cells

Huang Liya, Wang Fei, Cao Qing, Liu Fang, Sang Tiantian, Chen Shuyan*

(Department of Geriatrics, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

Abstract To observe the effects of FOXO3a silencing or over-expression on the proliferation of endothelial progenitor cells (EPCs), the silent type Ad-shRNA-FOXO3a and the mutant type Ad-TM(triple mutant)-FOXO3a recombinant adenovirus vectors were constructed. The CD133+/CD34+ EPCs from human cord blood were isolated by density gradient centrifugation and fluorescence-activated cell sorting (FACS), cultured *in vitro* and then identified by immunofluorescent staining. The above-mentioned recombinant adenovirus vectors were transfected into EPCs, the transfection efficiency and cell morphological changes were observed. The expression changes of FOXO3a were detected by Western blot. Cells counting and MTT assay were used to assess the effects of FOXO3a silencing or over-expression on the proliferation of EPCs. The recombinant adenovirus vectors Ad-shRNA-FOXO3a and Ad-TM-FOXO3a were successfully constructed and transfected into EPCs from human cord blood. The results of Western blot revealed that FOXO3a expression was obviously inhibited in transfected EPCs with Ad-shRNA-FOXO3a, and was obviously increased in transfected EPCs with Ad-TM-FOXO3a. Cell morphological changes, cells counting and MTT assay showed that the proliferation of EPCs was significantly promoted by

收稿日期: 2012-09-09 接受日期: 2012-10-23

国家自然科学基金(批准号: 30973152)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-25078999-7700, E-mail: shuyanchencn@yahoo.com.cn

Received: September 9, 2012 Accepted: October 23, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30973152)

*Corresponding author. Tel: +86-21-25078999-7700, E-mail: shuyanchencn@yahoo.com.cn

effectively silencing of *FOXO3a*, and was significantly inhibited by over-expression of *FOXO3a* as compared with control group. *FOXO3a* was involved in the regulation of cell proliferation of EPCs from human cord blood.

Key words *FOXO3a*; gene silencing; gene mutation; adenovirus vector; endothelial progenitor cells; cell proliferation

冠心病是动脉粥样硬化导致器官病变的最常见类型,血管内皮细胞损伤和功能失调是动脉粥样硬化发生的始动环节。治疗性血管新生是目前的研究热点之一,其中内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)移植促血管新生疗法作为治疗冠心病的一种重要手段已应用于临床试验并取得了一定成果,REPAIR-AMI试验两年随访结果显示:心肌梗死后冠脉内输注骨髓来源的EPCs能够显著改善心血管事件^[1]。内皮祖细胞(EPCs)是血管内皮细胞的前体细胞,它具有增殖、迁移、分化成内皮细胞和聚集形成新生血管的作用,而EPCs的功能状态是决定EPCs移植治疗效果的关键。*FOXO3a*(forkhead box O3a)是叉头基因(forkhead)转录因子家族中O亚家族的重要成员之一,该家族在调节细胞的增殖、凋亡、转化、分化、衰老等过程中发挥着重要作用。研究显示,*FOXO3a*通过PI3K/Akt/*FOXO3a*途径促进内皮细胞凋亡^[2]和抑制内皮细胞迁移^[3];且内皮细胞中表达的*FOXO3a*还调节与血管新生相关的基因表达,如一氧化氮合成酶(eNOS)、基质金属蛋白酶(MMP)、Angiopoitin2、PDGF-B、BMP4、sprouty2等^[4]。本实验以人*FOXO3a*基因为靶点,构建其沉默型、突变型两种重组腺病毒载体并转染人脐血来源EPCs,观察*FOXO3a*蛋白表达水平的改变对EPCs增殖的影响,为进一步研究*FOXO3a*及其下游靶基因调节EPCs的功能提供了实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pAdeno腺病毒骨架载体、RetroQ载体、pShuttle-Basic-EGFP穿梭载体、pShuttle-CMV-EGFP穿梭载体、感受态DH5 α 、HEK293细胞由汉恒生物科技(上海)有限公司提供;Ad-GFP由本课题组保存;含目的基因*FOXO3a*的原始质粒购自复能生物公司(GeneCopoeia, USA);引物合成于上海生工生物工程技术有限公司;所有限制性内切酶均购自NEB公司;T4 DNA连接酶(Fermentas公司);pfx DNA polymerase高保真酶(Invitrogen公司);全培养液EGM-2MV BulletKit(Lonza

公司);脂质体Lipofectamine 2000和人纤维连接蛋白Fibronectin(Gibco公司);Dil-AcLDL(Molecular Probes公司);淋巴细胞分离液Histopaque 10771、FITC-UEA-I和MTT(Sigma公司);FITC-CD34和PE-CD133抗体(Miltenyi Biotec公司);*FOXO3a*抗体(Cell Signaling Technology公司)。

1.2 方法

1.2.1 沉默型Ad-shRNA-*FOXO3a*重组腺病毒载体构建、鉴定、包装与扩增 采用RNA干扰(RNA interfering, RNAi)技术,合成与*FOXO3a*靶基因有互补短发夹结构的寡核苷酸(short hair RNA, shRNA),构建特异性沉默*FOXO3a*表达的Ad-shRNA-*FOXO3a*腺病毒载体。根据已验证的siRNA-*FOXO3a*序列CATGTTCAATGGGAGCTTGGA(Sigma, TRCN0000010335)设计上下游茎环结构引物如下,其两端导入*Bam*H I和*Eco*R I酶切位点: sense primer: 5'-GAT CCG CAT GTT CAA TGG GAG CTT GGA TTC AAG AGA TCC AAG CTC CCA TTG AAC ATG TTT TTT G-3'; antisense primer: 5'-AAT TCA AAA AAC ATG TTC AAT GGG AGC TTG GAT CTC TTG AAT CCA AGC TCC CAT TGA ACA TGC G-3',退火后与线性化的RetroQ载体连接,转化筛选得到阳性克隆,即为含目的基因干扰序列的质粒RetroQ-shRNA-*FOXO3a*。将上述质粒用*Bgl* II/*Eco*R I酶切后与经相同酶切的pShuttle-Basic-EGFP穿梭载体用T4 DNA连接酶连接并转化感受态DH5 α ,卡那抗性筛选后提取质粒,即为pShuttle-shRNA-*FOXO3a*重组穿梭载体质粒,进一步测序鉴定。*I-Ceu* I/*I-Sce* I双酶切处理pAdeno腺病毒骨架载体,CIP去磷酸化,乙醇沉淀法回收载体片段,与经相同酶切处理的pShuttle-shRNA-*FOXO3a*用T4 DNA连接酶连接,即为重组腺病毒载体质粒pAdeno-shRNA-*FOXO3a*,转化DH5 α ,氨卞抗性筛选后提取质粒,*Xho* I酶切鉴定。*Pac* I线性化pAdeno-shRNA-*FOXO3a*后由Lipofectamine 2000脂质体介导转染HEK293细胞。转染后观察细胞病理效应(cytopathic effect, CPE),约14 d细胞大部分病变并从底部脱落进行收毒,液氮和37 °C反复冻融3次后离心收集上清,取上清中的一部分用

于继续感染HEK293细胞, 其余作为毒种保留。经多轮感染后获得高滴度的Ad-shRNA-*FOXO3a*重组腺病毒载体。

1.2.2 突变型Ad-TM-*FOXO3a*重组腺病毒载体的构建、鉴定、包装与扩增 突变激活的FOXO3a, 其突变位于三个保守的Akt磷酸化位点(Thr32、Ser253、Ser315)^[5], 突变后不能被Akt磷酸化, 故在胞核中具转录活性。针对上述三个磷酸化位点, 根据FOXO3a[*Homo sapiens*](Gene ID: 2309)靶序列设计三对引物(表1), 使其在FOXO3a靶序列中的相应碱基位置发生点突变(93A>G、757T>G、943T>G), 最终使三个Akt磷酸化位点的丝/苏氨酸残基均突变为丙氨酸残基(T32A、S253A、S315A)。以突变后的TM-*FOXO3a*原始质粒为模板, 再设计一对引物如下, 两端导入*Kpn* I和*Bam*H I酶切位点: sense primer: 5'-CGG GGT ACC ATG GCA GAG GCA CCG GCT T-3'; antisense primer: 5'-CGC GGA TCT CAG CCT GGC ACC CAG CTC-3', 用pfx DNA polymerase高保真酶扩增TM-*FOXO3a*目的基因, PCR扩增后回收目的片段进行*Kpn* I/*Bam*H I酶切处理, 与同样酶切处理的pShuttle-CMV-EGFP穿梭载体连接后转化筛选提取质粒, 即为pShuttle-TM-*FOXO3a*重组穿梭载体质粒, 进一步测序鉴定。pAdeno-TM-*FOXO3a*重组腺病毒载体的构建与鉴定、Ad-TM-*FOXO3a*重组腺病毒载体的包装与扩增, 步骤同1.2.1。

1.2.3 人脐血来源EPCs的分离、培养和鉴定 取新鲜脐血50 mL, 肝素抗凝及PBS稀释后, 按密度梯度离心法分离并收集单个核细胞(mononuclear cells, MNCs), 进一步制成单细胞悬液后与FITC-CD34、PE-CD133抗体37 °C反应1 h, 流式细胞仪进行荧光激活细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS), 分选出CD133+CD34+双阳性的MNCs, 接种至人纤维连接蛋白(fibronectin, Fn)预先包被的6孔培

养板中, 培养体系为EGM-2MV BulletKit全培养液。培养细胞每3 d换液一次, 约14 d贴壁细胞呈现铺路石样形态, 当贴壁细胞占培养板孔底面积80%左右时传第一代, 之后按1:5的比例平均每4 d传代一次进行扩增并用于后续实验。对培养细胞进行免疫荧光鉴定, 在培养细胞中加入10 μg/mL的Dil-AcLDL, 37 °C孵育24 h后, 4%多聚甲醛固定15 min, PBS浸洗, 再将20 μg/mL的FITC-UEA-I加于上述标本, 37 °C孵育1 h, 最后DAPI染色细胞核, 荧光显微镜下观察。

1.2.4 转染EPCs及Western blot分析转染后FOXO3a蛋白表达 将重组腺病毒载体Ad-shRNA-*FOXO3a*、Ad-TM-*FOXO3a*及阴性对照Ad-GFP以感染复数MOI=40感染EPCs。感染2 h后, 置换新鲜培养液, 荧光显微镜下开始观察GFP绿色荧光表达与细胞形态学改变。感染48 h后提取细胞总蛋白, SDS-PAGE电泳, PVDF膜300 mA湿转80 min, 一抗(兔抗人FOXO3a 1:1 000、鼠抗人Tubulin 1:1 000)4 °C孵育过夜, TBST洗膜3次, 二抗为辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔或鼠(1:1 000)室温孵育1 h, TBST洗膜3次, ChemiDoc XRS化学发光成像仪分析转染后FOXO3a蛋白的表达。

1.2.5 细胞计数与MTT法分析转染后EPCs增殖情况 病毒感染48 h后, 消化收集三种EPCs。首先, 以每孔 1×10^5 cells+2.5 mL EGM-2MV全培养液接种至6孔板, 每种细胞3复孔, 培养72 h后, 每种细胞同一高倍镜下(200×)随机选取3个视野计数贴壁细胞数量, 并消化收集上述细胞进行计数板计数。其次, 以每孔 5×10^3 cells+200 μL EGM-2MV全培养液接种至96孔板, 每种细胞3复孔, 培养72 h后, 常规MTT显色法检测吸光度值。

1.2.6 统计分析 用SPSS 13.0软件进行统计分析。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)来表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计

表1 *FOXO3a*靶序列中三个点突变的引物序列

Table 1 The primer sequences of three point mutations in *FOXO3a* target sequence

引物名称	引物序列(5'-3')
Primer name	Primer sequences(5'-3')
T32A_sense	CGT CCG CGA TCC TGT GCG TGG CCC
T32A_antisense	GGG CCA CGC ACA GGA TCG CGG ACG
S253A_sense	GCG GCG GGC TGT CGC CAT GGA CAA TAG C
S253A_antisense	GCT ATT GTC CAT GGC GAC AGC CCG CCG C
S315A_sense	CGT TCA CGC ACC AAT GCT AAC GCC AGC ACA G
S315A_antisense	CTG TGC TGG CGT TAG CAT TGG TGC GTG AAC G

学意义。

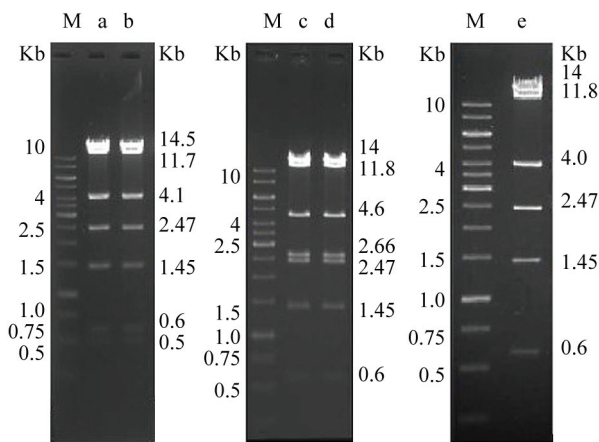
2 结果

2.1 重组质粒测序鉴定与 *Xho* I 酶切鉴定

2个穿梭质粒pShuttle-shRNA-*FOXO3a*、pShuttle-TM-*FOXO3a*送检上海桑尼有限公司测序,证实所设计的siRNA-*FOXO3a*序列以及含3个点突变的*FOXO3a*目的片段已正确插入各穿梭载体中。重组腺病毒载体质粒pAdeno-shRNA-*FOXO3a*被*Xho* I酶切后电泳图由以下7条带组成: 14.5, 11.7, 4.1, 2.47, 1.45, 0.6, 0.5 Kb(图1a, b)。pAdeno-TM-*FOXO3a*被*Xho* I酶切后由以下7条带组成: 14, 11.8, 4.6, 2.66, 2.47, 1.45, 0.6 Kb(图1c, d)。没有重组的腺病毒空载体质粒作为阴性对照被*Xho* I酶切后电泳图由以下6条带组成: 14, 11.8, 4.0, 2.47, 1.45, 0.6 Kb(图1e)。上述酶切结果与预期完全相符。

2.2 人脐血来源内皮祖细胞鉴定

经FACS分选出的CD133+CD34+双阳性细胞占人脐血中分离出的MNCs的0.1%(图2)。倒置显微镜下观察培养细胞的形态,约14 d左右出现铺路石样贴壁细胞,当贴壁细胞占培养板孔底面积80%左右时传第一代(P1)(图3)。研究表明,内吞Dil-AcLDL、结合FITC-UEA-I双荧光染色阳性的培养细胞为内皮祖细胞^[6]。免疫荧光鉴定结果提示,绝大部分培养的贴

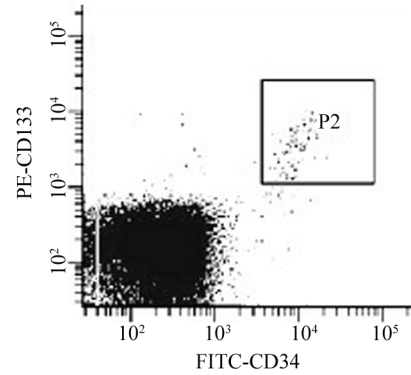


M: 1 Kb DNA ladder; a,b: *Xho* I酶切pAdeno-shRNA-*FOXO3a*; c,d: *Xho* I酶切pAdeno-TM-*FOXO3a*; e: 阴性对照。

M: 1 Kb DNA ladder; a,b: pAdeno-shRNA-*FOXO3a* digested by *Xho* I; c,d: pAdeno-TM-*FOXO3a* digested by *Xho* I; e: negative control.

图1 *Xho* I酶切鉴定重组腺病毒载体质粒

Fig.1 Enzyme digestion analysis of recombinant adenovirus vector plasmids by *Xho* I



P2: CD133+CD34+细胞占MNCs的0.1%。

P2: CD133+CD34+ cells accounted for 0.1% of MNCs.

图2 FACS分选CD133+CD34+细胞

Fig.2 CD133+CD34+ cells sorting by FACS

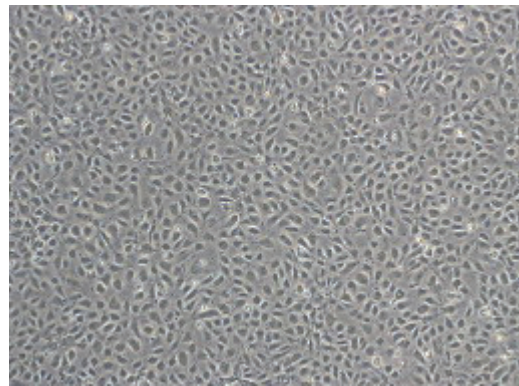


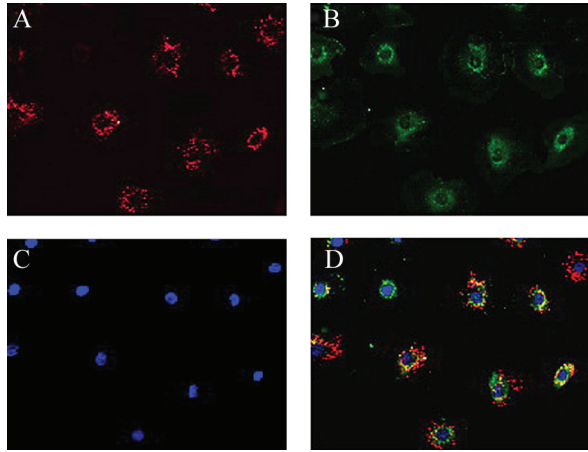
图3 培养细胞传第一代(P1)倒置显微镜下呈典型铺路石样形态(40×)

Fig.3 The first generation of the cultured cells passaging(P1) was typical cobblestone morphology under inverted microscope(40×)

壁细胞呈Dil-AcLDL+FITC-UEA-I双阳性, DAPI为非特异性染色细胞核(图4)。

2.3 EPCs转染效率鉴定与细胞形态学改变

重组腺病毒载体Ad-shRNA-*FOXO3a*、Ad-TM-*FOXO3a*及阴性对照Ad-GFP转染EPCs 48 h, 荧光显微镜下观测到GFP绿色荧光显著表达(图5)。与对照Ad-GFP转染组(图5A)相比, 沉默型Ad-shRNA-*FOXO3a*转染组(图5B) EPCs生长状态良好, 贴壁牢固, 细胞形态规则呈短梭或椭圆形, 细胞间空隙较小, GFP荧光主要定位于胞浆; 而突变型Ad-TM-*FOXO3a*转染组(图5C) EPCs生长状态不良, 部分细胞贴壁不完全且形态欠规则, 细胞间空隙加大, 同一高倍镜视野下(100×)贴壁细胞数量明显减少, GFP荧光主要定位于胞核。



A: Dil-AcLDL(红色荧光); B: FITC-UEA-I(绿色荧光); C: DAPI(蓝色荧光); D: 合并图, 橙色部分为Dil-AcLDL和FITC-UEA-I双染色阳性。
A: Dil-AcLDL(red fluorescence); B: FITC-UEA-I(green fluorescence); C: DAPI(blue fluorescence); D: merge, the orange parts were Dil-AcLDL and FITC-UEA-I double staining positive.

图4 内皮祖细胞Dil-AcLDL+FITC-UEA-I
双荧光染色鉴定(200×)

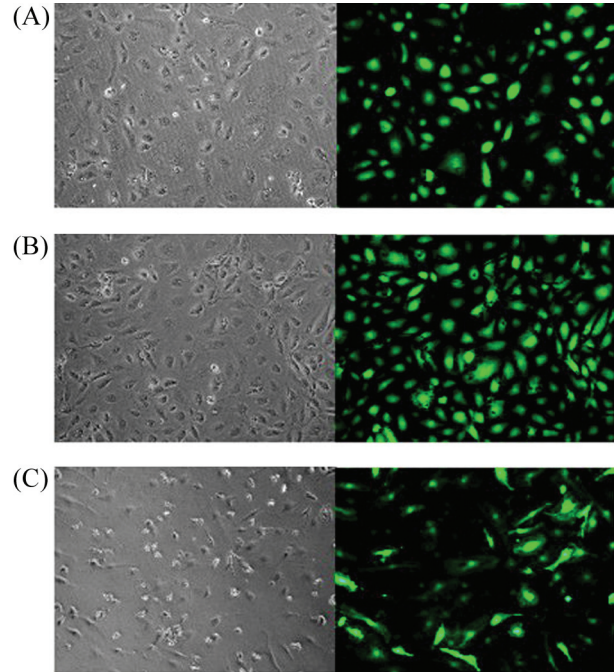
Fig.4 Dil-AcLDL+FITC-UEA-I double fluorescent
staining of EPCs(200×)

2.4 Western blot分析转染后EPCs的FOXO3a蛋白表达

EPCs转染48 h后, 提取细胞总蛋白, 经Western blot分析。与阴性对照Ad-GFP相比, 突变型Ad-TM-FOXO3a转染的EPCs中, FOXO3a的蛋白表达明显增加; 而沉默型Ad-shRNA-FOXO3a转染的EPCs中, FOXO3a的蛋白表达明显降低, Tubulin为内参(图6)。

2.5 细胞计数与MTT法分析转染后EPCs的增殖情况

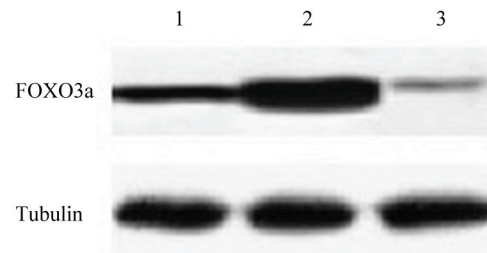
细胞计数(表2)与MTT法(表3)结果表明, 与阴性对照Ad-GFP相比, 突变型Ad-TM-FOXO3a转染组中EPCs的体外增殖受到明显抑制($P<0.05$), 而沉默型Ad-shRNA-FOXO3a转染对EPCs的体外增殖有明显促进作用($P<0.05$)。



A: Ad-GFP; B: Ad-shRNA-FOXO3a; C: Ad-TM-FOXO3a.

图5 同一视野正常光源与绿色荧光源下转染后内皮祖细胞的形态学改变(100×)

Fig.5 Morphological changes after EPCs transfection under view of the same field with normal light and green fluorescent light(100×)



1: Ad-GFP; 2: Ad-TM-FOXO3a; 3: Ad-shRNA-FOXO3a.

图6 内皮祖细胞转染后的FOXO3a蛋白表达

Fig.6 FOXO3a expression after EPCs transfection

表2 FOXO3a蛋白表达改变对内皮祖细胞增殖的影响(细胞计数)($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effects of FOXO3a expression changes on the proliferation of EPCs(cells counting)($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别 Groups	细胞计数(个) ^a Cells counting(cells) ^a	细胞计数(10^5 /孔) ^b Cells counting(10^5 /well) ^b
Ad-GFP	128±4	3.45±0.18
Ad-TM-FOXO3a	99±6*	2.43±0.10*
Ad-shRNA-FOXO3a	153±8*	4.10±0.13*

a: 同一高倍镜(200×)随机视野下直接计数贴壁细胞; b: 消化收集细胞后计数板计数。* $P<0.05$, 与Ad-GFP组比较。

a: directly counting the adherent cells in randomly selected fields of the same high magnification(200×); b: cells counting by the counting board after digestive cells were collected. * $P<0.05$ vs Ad-GFP group.

表3 FOXO3a蛋白表达改变对内皮祖细胞增殖的影响(MTT法)

Table 3 Effects of FOXO3a expression changes on the proliferation of EPCs(MTT assay)

组别	吸光度值($\bar{x} \pm s, n=3$)
Groups	Absorbance values($\bar{x} \pm s, n=3$)
Ad-GFP	0.423±0.011
Ad-TM-FOXO3a	0.324±0.010*
Ad-shRNA-FOXO3a	0.492±0.012*

* $P < 0.05$, 与Ad-GFP组比较。

* $P < 0.05$ vs Ad-GFP group.

3 讨论

FOXO3a高表达可抑制细胞增殖, 导致细胞周期阻滞, 促进细胞凋亡。研究表明, FOXO3a可增强周期抑制蛋白Cyclin G2的表达使细胞周期停止于G₀/G₁期^[7]。在紫杉醇诱导乳腺癌MCF7细胞株凋亡的实验中发现, FOXO3a及其靶基因*Bim*和*p27^{Kip1}*水平显著升高^[8]。磷酸化/去磷酸化修饰在调节FOXO3a转录因子的亚细胞定位及其转录活性中起重要作用, FOXO3a是蛋白激酶B(PKB/Akt)的一个重要作用底物, 其氨基酸序列中含有三个高度保守的Akt磷酸化位点, 磷酸化的FOXO3a定位于胞浆, 转录活性受到抑制, 去磷酸化的FOXO3a定位于细胞核, 通过调控靶基因表达在细胞周期、细胞凋亡等过程中发挥多种生物学作用。FOXO3a除了参与调控与细胞增殖、凋亡等有关的基因外, 还调节与血管新生相关的基因表达^[5], 而EPCs是治疗性血管新生研究中尤为重要的一种靶细胞, 目前对于FOXO3a在调节EPCs功能方面的研究还较少, 作用机制尚不明确。

本实验通过密度梯度离心法结合FACS分选, 成功分离并体外培养出人脐血来源EPCs(CD133+CD34+)。采用RNA干扰技术和点突变技术, 成功构建了沉默型Ad-shRNA-FOXO3a和突变型Ad-TM-FOXO3a重组腺病毒载体并转染EPCs, Western blot

提示转染后EPCs的FOXO3a表达分别为明显降低和明显增加; 结合细胞形态学改变、细胞计数与MTT法提示, 有效沉默FOXO3a促进EPCs增殖, FOXO3a过表达则明显抑制EPCs增殖。总之, 本实验证实, FOXO3a沉默或过表达对EPCs增殖存在显著影响, 与对照组相比具有统计学差异, 为进一步研究FOXO3a及其下游靶基因调节EPCs功能提供了实验基础, 并从转基因角度为改善EPCs功能、增强其促血管新生作用的研究提供了新思路。

参考文献 (References)

- 1 Assmus B, Rolf A, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, *et al.* Clinical outcome 2 years after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *Circ Heart Fail* 2010; 3(1): 89-96.
- 2 Skurk C, Maatz H, Kim HS, Yang J, Abid MR, Aird WC, *et al.* The Akt-regulated forkhead transcription factor FOXO3a controls endothelial cell viability through modulation of the caspase-8 inhibitor FLIP. *Biol Chem* 2004; 279(2): 1513-25.
- 3 Borniquel S, Garcia-Quintans N, Valle I, Olmos Y, Wild B, Martinez-Granero F, *et al.* Inactivation of FOXO3a and subsequent downregulation of PGC-1 alpha mediate nitric oxide-induced endothelial cell migration. *Mol Cell Biol* 2010; 30(16): 4035-44.
- 4 Papanicolaou KN, Izumiya Y, Walsh K. Forkhead transcription factors and cardiovascular biology. *Circ Res* 2008; 102(1): 16-31.
- 5 Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell* 1999; 96(6): 857-68.
- 6 Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, *et al.* Transplantation of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(7): 3422-7.
- 7 Martinez-Gac L, Marques M, Garcia Z, Campanero MR, Carrera AC. Control of cyclin G2 mRNA expression by forkhead transcription factors: Novel mechanism for cell cycle control by phosphoinositide 3-kinase and forkhead. *Mol Cell Biol* 2004; 24(5): 2181-9.
- 8 Sunter A, Madureira PA, Pomeranz KM, Aubert M, Brosens JJ, Cook SJ, *et al.* Paclitaxel induced nuclear translocation of FOXO3a in breast cancer cells is mediated by c-Jun NH₂-terminal kinase and Akt. *Cancer Res* 2006; 66(1): 212-20.