

低氧促进大鼠肺动脉平滑肌细胞Periostin 表达及其信号转导机制

施孟如¹ 郑 易¹ 王良兴² 林 全^{2*}

(¹温州医科大学检验与生命科学学院, 温州 325035; ²温州医科大学附属第一医院呼吸内科, 温州 325000)

摘要 观察低氧对大鼠肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PAMSCs) Periostin表达的影响及其相关信号转导机制。胶原酶I法原代培养PAMSCs, 经低氧(5% O₂)分别处理PAMSCs 2, 6, 12, 24 h后, RT-PCR和Western blot法检测Periostin mRNA和蛋白表达。加入PI3K/Akt通路特异性抑制剂LY294002(10 μmol/L)进行干预, Western blot分析比较不同条件下低氧处理24 h后大鼠PAMSCs中Periostin和Akt/P-Akt的蛋白表达。结果表明, 与常氧组比较, 低氧处理6 h组、12 h组和24 h组Periostin mRNA和蛋白的表达均显著上升($P<0.05$, $P<0.01$), 低氧处理后的PAMSCs中Periostin mRNA和蛋白的表达逐渐升高; 低氧处理2 h组无显著差异($P>0.05$)。用LY294002对PAMSCs处理, 并低氧24 h后, Periostin的表达被显著抑制($P<0.01$), 细胞P-Akt的表达下调($P<0.05$), 总Akt的蛋白表达没有明显差异($P>0.05$)。推测低氧可诱导大鼠PAMSCs中Periostin mRNA和蛋白的表达上调。低氧可能通过激活PI3K/Akt通路促进Akt的磷酸化, 进而使 Periostin在PAMSCs中过表达, 提示Periostin在低氧性PAMSCs增殖过程中可能起着重要作用。

关键词 低氧; 肺动脉平滑肌细胞; Periostin; 肺血管重建; PI3K/Akt通路

Hypoxia Increases Periostin Expression and the Related Signal Pathway in Rat Pulmonary arter Smooth Muscle Cells

Shi Mengru¹, Zheng Yi¹, Wang Liangxing², Lin Quan^{2*}

(¹School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China;

²Respiratory Physicians, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

Abstract The effects of hypoxia on the Periostin expression and the related signal transduction pathway in rat pulmonary arterials smooth muscle cells (PAMSCs) were observed in this study. Primary PAMSCs were cultured with collagenase I. The PAMSCs were treated at hypoxia (5% O₂) for 2, 6, 12, 24 h separately. The expressions of Periostin mRNA and protein in PAMSCs of rat were detected by RT-PCR and Western blot. LY294002 (10 μmol/L), a specific inhibitor of PI3K/Akt signal pathway, was used to treat PAMSCs at hypoxia for 24 h. Periostin and Akt/P-Akt protein were detected by Western blot. Compared with control group, the mRNA and protein expressions of Periostin increased significantly in hypoxia PAMSCs treated for 6, 12, 24 h ($P<0.05$, $P<0.01$), and there was no significant difference between normal group and hypoxia 2 h group ($P>0.05$). After treated with LY294002 for 24 h at hypoxia, the expressions of Periostin and P-Akt were down-regulate significantly ($P<0.01$, $P<0.05$) compared

收稿日期: 2013-10-08 接受日期: 2014-01-16

浙江中医药管理局(批准号: 2010ZA084)和国家自然科学基金(批准号: 30370612)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-86689717, E-mail: lquan007@163.com

Received: October 8, 2013 Accepted: January 16, 2014

This work was supported by Administration of Traditional Chinese Medicine of Zhejiang Province (Grant No.2010ZA084) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30370612)

*Corresponding author. Tel: +86-577-86689717, E-mail: lquan007@163.com

网络出版时间: 2014-05-05 10:12 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.05.0322.html>

with hypoxia 24 h group. But there was no significant difference for Akt protein expression ($P>0.05$). The results suggested that hypoxia exposure could upregulate the mRNA and protein expressions of Periostin in PASMCs. Hypoxia exposure might activate the PI3K/Akt signal pathway, promote Akt phosphorylation, and then induce Periostin protein overexpression. It indicated that Periostin might play an important role in hypoxia-induced PASMCs proliferation.

Key words hypoxia; pulmonary artery smooth muscle cells; Periostin; pulmonary vascular reconstruction; PI3K/Akt signal pathway

缺氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary hypertension, HPH)是慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)的重要病理生理改变。低氧可以引起低氧性肺血管重建、低氧性肺血管收缩和红细胞增多^[1]。肺血管结构重建是低氧性肺动脉高压形成的一个重要病理过程。而低氧条件下肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCs)增殖在肺血管结构重建过程中具有极其重要的作用^[2]。

Periostin, 又被称为成骨细胞特异性因子-2 (osteoblast-specific factor 2, OSF-2), 是1993年日本学者 Takeshita等^[3]最初从小鼠的成骨细胞系Mc3T3-E1中分离得到的具有细胞黏附作用的蛋白质。Periostin作为细胞黏附蛋白能够促进成骨, 它不仅能够促进细胞的黏附作用, 还能调控细胞的迁移和增殖, 在血管形成过程中表现突出。近年来的研究证实, Periostin在大鼠血管损伤后新生内膜中的表达明显上调, 而且它能促进血管平滑肌细胞、外膜细胞的迁移, 证明其与细胞迁移的趋化性和趋触性有密切关系^[4]。目前, 低氧刺激是否影响肺动脉平滑肌细胞Periostin的表达及其机制尚不明确。本实验通过不同低氧时间对大鼠PASMCs进行低氧干预, 观察低氧对Periostin表达的影响及其相关信号转导机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

体重(200±20) g的健康SD雄性大鼠购自温州医科大学实验动物中心; DMEM干粉状培养基、胰蛋白酶(Trypsin)、100×青霉素-链霉素双抗液、胶原酶I(collagenase I)均购自美国Gibco公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司; LY294002购自美国Sigma公司; 兔抗大鼠Periostin多克隆抗体、Akt以及P-Akt抗体、 β -actin单抗购自Abcam公司; Periostin、GAPDH引物、Trizol和RT-PCR两步法试剂盒购自宝生物工程(大连)公司。其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 原代细胞培养 参照文献[5-6]的方法, SD大鼠用乙醚麻醉后, 放入75%酒精中浸泡3 min。在超净工作台上无菌操作取出大鼠心肺组织, 用预冷的PBS清洗残留血液, 置解剖显微镜下逐步分离出肺动脉, 尽量将结缔组织剥离干净, 弃肺动脉干, 保留2~4级细小动脉, 于预冷的Hank's液中漂洗数次, 纵向剖开动脉, 内膜朝上, 用显微镊刮除动脉内皮细胞。将动脉剪成小块, 放入预先盛有含0.2%胶原酶I的离心管中。置于CO₂培养箱中, 每30 min观察一次并轻轻摇动, 直至消化成絮状物; 1 000 r/min离心10 min, 弃上清, 重悬于含20%胎牛血清DMEM的培养瓶中, 37 °C、10 % CO₂培养箱中培养。3~5 d后细胞贴壁生长, 呈梭形, 并出现“峰-谷”状。每周更换2次培养液, 0.25%胰酶消化传代, 实验选用3~8代细胞。

1.2.2 实验分组和低氧处理 实验分为3组: (1)常氧组(N(normoxia group): 细胞在培养箱(37 °C、21% O₂、10% CO₂)中培养。(2)低氧组(hypoxia group): 细胞在三气培养箱(德国贺氏公司, 37 °C、5% O₂、10% CO₂、90% N₂)中培养。低氧组又分为低氧处理2 h组(H2)、低氧处理6 h组(H6)、低氧处理12 h组(H12)和低氧处理24 h组(H24)共4个亚组。(3)药物处理组(LY294002+低氧处理24 h): 参考文献[7-8], 选择10 μ mol/L LY294002作为PI3K/Akt通路特异性抑制剂加入细胞, 预处理细胞2 h后, 低氧培养24 h。

将各组PASMCs以 1×10^4 /mL细胞数培养于20 mL培养瓶中, 培养24 h, 换不含小牛血清的DMEM培养液静置同步培养24 h后, 将细胞进行低氧处理。各组在常氧(N)及低氧中分别处理 2, 6, 12, 24 h。药物干预(LY294002+低氧处理24 h)组加入10 μ mol/L LY294002预处理细胞2 h后, 换培养基, 继续低氧24 h。RT-PCR、Real-time PCR和Western blot检测Periostin和AKT/P-Akt。

1.2.3 RT-PCR扩增 (1)逆转录(reverse transcription, RT)合成cDNA。Trizol抽提PASMCs总RNA, Nano-

drop2000测定RNA纯度和浓度, 稀释成1 ng/ μ L。取RNA模板1 ng, 10 $\times$ RT Buffer 1 μ L, 25 mmol/L dNTP 2 μ L, MgCl₂ 2 μ L, Rnase inhibitor 0.25 μ L, AMV逆转录酶0.5 μ L, Randon 9 mers 0.5 μ L, 加无RNA酶的水至总体积为10 μ L。30 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 30 min, 99 $^{\circ}$ C 5 min, 5 $^{\circ}$ C 5 min。合成的cDNA用于PCR反应。(2) PCR反应。取cDNA 2 μ L, 20 μ mol/L的上、下游引物各1 μ L, 10 $\times$ PCR buffer 3 μ L, Taq酶HS 0.2 μ L, 加ddH₂O至总反应体积为20 μ L, 进行PCR扩增。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 然后94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min; 35个循环; 最后于72 $^{\circ}$ C延伸10 min。*Periostin*上游引物为: 5'-CGC AGA GGA CTG GAG AAC AAT-3', 下游引物为: 5'-GGA GCA AAG AGC GTG AAG TGA-3', 预计产物片段大小为374 bp。*GAPDH*为内参, *GAPDH*上游引物为: 5'-ACC ACA GTC CAT CAC-3', 下游引物为: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3', 预计PCR产物片段大小为451 bp。PCR扩增完毕后, 1%琼脂糖凝胶中行电泳分析, 采用凝胶成像系统对电泳影像进行光密度扫描, 以Quantity One软件分析各组*Periostin*条带光密度与内参*GAPDH*条带光密度比值表示目的基因mRNA相对表达水平。

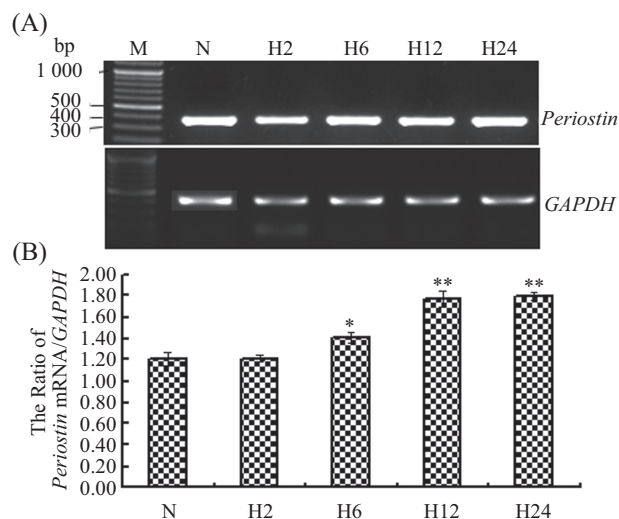
1.2.4 Western blot检测*Periostin*、P-Akt及总Akt蛋白的表达 各组PAMSCs用PBS洗2次, 每瓶加入300 μ L含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液, 充分振荡混匀后, 静置30 min, 转移至1.5 mL EP管, 于4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心30 min, 吸取上清液测蛋白浓度。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 电转膜至硝酸纤维素膜, 5%脱脂奶粉封闭1 h, 加一抗(*Periostin*: 1:500稀释; β -actin: 1:1 000稀释; Akt: 1:1 000稀释; P-Akt: 1:500稀释), 4 $^{\circ}$ C过夜。TBST洗膜5 min/次 $\times$ 3次, 加1:2 000二抗, 室温放置2 h, 再洗膜3次, 加入ECL荧光剂, 经ChemiDoc MP荧光化学发光成像系统(Bio-Rad公司, 美国)曝光获得图像。Quantity One图像分析软件对结果进行分析。以目的蛋白与内参 β -actin光密度D值的比值代表目的蛋白表达的相对含量。

1.2.5 统计学处理方法 数据采用($\bar{x} \pm s$)表示, 应用SPSS 13.0统计学软件进行F检验和方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低氧对*Periostin* mRNA和蛋白表达的影响

用低氧(5% O₂)分别刺激大鼠PAMSCs 2, 6, 12,



A: RT-PCR检测PAMSCs中*Periostin* mRNA表达的电泳条带; B: 各实验组PAMSCs中*Periostin* mRNA的表达分析。N: 正常对照组; H2: 低氧处理2 h组; H6: 低氧处理6 h组; H12: 低氧处理12 h组; H24: 低氧处理24 h组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与N组比较($\bar{x} \pm s$, $n=3$)。

A: RT-PCR electrophoresis bands of *Periostin*; B: the expression analysis of *Periostin* mRNA in PAMSCs. N: normal control group; H2: hypoxia for 2 h group; H6: hypoxia for 6 h group; H12: hypoxia for 12 h group; H24: hypoxia for 24 h group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with N ($\bar{x} \pm s$, $n=3$).

图1 不同低氧时间对PAMSCs中*Periostin* mRNA表达影响

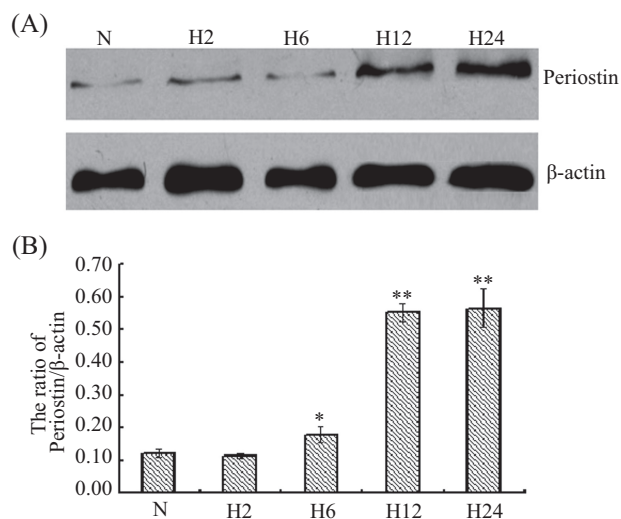
Fig.1 Effects of different hypoxia period on *Periostin* mRNA expression of PAMSCs

24 h后, RT-PCR检测*Periostin*的mRNA表达。结果显示, 与常氧组比较, 低氧处理2 h组差异不显著($P > 0.05$); 低氧处理6, 12, 24 h组*Periostin* mRNA较常氧组表达升高且有显著差异($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而且随着低氧时间延长, *Periostin* mRNA的表达逐渐增加(图1)。

Western blot检测*Periostin*的蛋白表达, 结果显示, 在分子量93 kDa处均出现蛋白印迹杂交结果。与常氧组比较, 低氧处理6, 12, 24 h组*Periostin*的表达升高且有显著差异($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且随低氧时间的延长*Periostin*的表达进行性升高。低氧处理2 h组差异不显著($P > 0.05$)(图2)。上述结果提示, 低氧可以促进*Periostin*的mRNA和蛋白表达。

2.2 LY294002对PAMSCs中*Periostin*、Akt/P-Akt蛋白表达的影响

研究结果显示, PAMSCs加入PI3K/Akt通路特异性抑制剂10 μ mol/L LY294002预处理2 h, 更换培养基后继续低氧处理24 h, 与未加LY294002的低氧24 h组(H24)相比, *Periostin*蛋白的表达显著下降($P < 0.01$)。LY294002显著抑制P-Akt表达($P < 0.05$), 总Akt的蛋白表达没有明显差异(图3)。



A: Western blot检测PAMSCs中Periostin蛋白表达的条带; B: 各实验组PAMSCs中Periostin蛋白的表达分析。N: 正常对照组; H2: 低氧处理2 h组; H6: 低氧处理6 h组; H12: 低氧处理12 h组; H24: 低氧处理24 h组。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与N组比较($\bar{x}\pm s$, $n=3$)。

A: Western blot bands of Periostin protein; B: the expression analysis of Periostin protein in PAMSCs. N: normal control group; H2: hypoxia for 2 h group; H6: hypoxia for 6 h group; H12: hypoxia for 12 h group; H24: hypoxia for 24 h group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with N ($\bar{x}\pm s$, $n=3$).

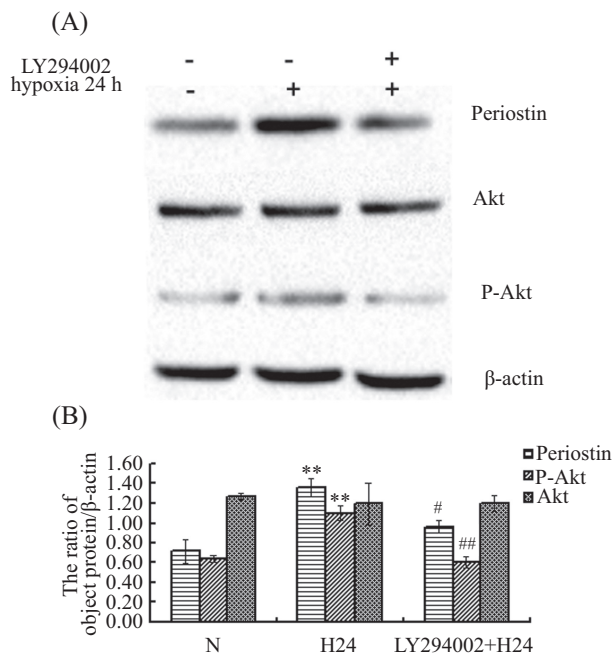
图2 不同低氧时间对PAMSCs中Periostin蛋白表达影响

Fig.2 Effects of different hypoxia period on Periostin protein expression of PAMSCs

3 讨论

低氧可以引起低氧性肺血管重建、低氧性肺血管收缩和红细胞增多。低氧性肺动脉高压是慢性阻塞性肺疾病(COPD)向肺心病发展的重要环节, 肺血管结构重建是低氧性肺动脉高压形成的一个重要病理过程。而低氧条件下肺动脉平滑肌细胞(PAMSCs)增殖在肺血管结构重建过程中具有极其重要的作用^[2]。在肺微血管重构过程中的, 平滑肌细胞的异常增殖、中膜增厚、管腔狭窄, 是导致重构的重要原因之一^[9]。因此, 抑制肺微血管平滑肌细胞的增殖有可能成为抑制肺动脉高压的有效策略。

1993年, 日本学者首先从小鼠的成骨细胞系Mc3T3-E1中分离得到Periostin, 因此又被称为成骨细胞特异性因子-2(osteoblast-specific factor 2, OSF-2), 这是在成骨细胞中发现的具有细胞黏附作用的蛋白质^[3]。2004年, 在骨膜和牙周韧带中被发现并重新命名为Periostin, 简称POSTN^[10]。Periostin作为细胞黏附蛋白能够促进成骨, 起初被认为其只特异性表达于骨组织, 后来研究发现其在多种组织中过表达, 尤



A: Western blot检测PAMSCs中Periostin、Akt、P-Akt蛋白表达的条带; B: 各实验组PAMSCs中Periostin、Akt、P-Akt的表达分析。N: 正常对照组; H24: 低氧处理24 h组; LY294002+H24: 经LY294002预处理2 h并低氧处理24 h组。** $P<0.01$, 与对照组比较; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与H24组比较($\bar{x}\pm s$, $n=3$)。

A: the expressive bandings of Periostin, Akt, P-Akt in PAMSCs; B: the expression analysis of Periostin, Akt, P-Akt in PAMSCs. N: normal control group; H24: hypoxia for 24 h group; LY294002+H24: pretreated with LY294002 for 2 h, and then treated at hypoxia for 24 h. ** $P<0.01$ compared with N; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ compared with H24 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$).

图3 LY294002对PAMSCs中Periostin、Akt和P-Akt蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of LY294002 on the protein expressions of Periostin, Akt and P-Akt in PAMSCs

其是在各种创伤愈合和恶性肿瘤组织内, 它不仅能够促进细胞的黏附作用, 还能调控细胞的迁移和增殖, 在血管形成过程中表现突出。在血管形成中, 细胞的迁移包含3个主要的机制, 即趋应力性、趋触性和趋化性^[11]。研究证实, Periostin在大鼠血管损伤后新生内膜中的表达明显上调, 而且它能促进血管平滑肌细胞、外膜细胞的迁移, 证明其与细胞迁移的趋化性和趋触性有密切关系^[4]。

根据本实验室以往的研究, PAMSCs在低氧环境影响下发生表型转变: 常氧时细胞狭长, 处于稳定的分化状态; 低氧时PAMSCs体积明显变大, “峰-谷”长势不明显, 光镜下可观察到其表型从收缩型向合成型的转变^[12]。PAMSCs表型的此种转变为肺动脉平滑肌细胞增殖的重要前提之一, 同时也是肺血管结构重建发生的结构基础。PAMSCs在其增殖和迁移的过程中依赖于细胞骨架蛋白的改变^[13], 细胞增殖

可引起肺血管发生结构重建、管腔狭窄、管壁增厚、阻力增大,最终导致肺动脉高压的发展和持续。

磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)是一种异二聚体酶,在多种细胞的生长和增殖过程中起到重要作用。Akt是其下游的丝氨酸-苏氨酸激酶,它能够被多种细胞因子激活,传导信号。PI3K/Akt通路参与多种细胞的增殖、分化,而LY294002是PI3K信号通路公认的抑制剂,它可通过跨膜酪氨酸激酶抑制PI3K的活化^[14]。以往的研究发现,球囊损伤后大鼠颈动脉中的Periostin蛋白表达显著上调,生长因子可以通过PI3K/Akt信号通路介导,从而上调血管平滑肌细胞中Periostin的表达^[15]。而体外研究中,血管平滑肌细胞分泌的Periostin蛋白在血管平滑肌细胞的迁移调控中起到重要作用。

本研究结果显示,低氧刺激可以显著增加PAMSCs Periostin的mRNA和蛋白表达,当采用LY294002阻断PI3K活性后,磷酸化Akt(P-Akt)的表达显著降低,Periostin的表达也同样呈下降趋势。低氧环境可能通过激活PAMSCs中的PI3K/Akt通路,从而促使Periostin表达上调,而LY294002则可以有效地阻断低氧24 h组中Periostin表达升高的作用。以上实验结果提示,低氧可能通过诱导某些生长因子或炎症因子的表达,进而激活胞内PI3K/Akt通路,从而上调PAMSCs中的Periostin蛋白表达,促进细胞的黏附、增殖和迁移^[16]。

本实验仅检测了PI3K/Akt信号通路的P-Akt的表达,其上下游可能还有其他因子参与信号通路调控,另外可能还有其他的信号通路或细胞因子参与到对靶蛋白Periostin的表达调控机制中,这些有待于我们进一步的深入研究。

总之,本实验表明低氧作用下,可诱导大鼠PAMSCs中Periostin mRNA和蛋白的表达上调。低氧可能通过激活PI3K/Akt通路,促进Akt的磷酸化,进而使Periostin在PAMSCs中过表达,提示Periostin在低氧性PAMSCs增殖过程中可能起着重要作用。调控Periostin蛋白表达对于防治因低氧性PAMSCs异常增殖所导致的肺动脉高压可能有效,可望成为肺动脉高压基因治疗的候选基因。

参考文献 (References)

- Rubin LJ. Pulmonary arterial hypertension. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3(1): 111-5.
- A Mark E. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Essays Biochem* 2007; 43: 61-76.
- Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K, Amann E. Osteoblast-specific factor 2: Cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem J* 1993; 294(Pt 1): 271-8.
- Butcher JT, Norris RA, Hoffman S, Mjaatvedt CH, Markwald RR. Periostin promotes atrioventricular mesenchyme matrix invasion and remodeling mediated by integrin signaling through Rho/PI 3-kinase. *Dev Biol* 2007; 302(1): 256-66.
- 洪城, 王健, 李冰, 彭公永, 胡锦兴, 冉丕鑫. 分次胶原酶消化法分离、培养成人肺微小动脉平滑肌细胞. *中国病理生理杂志* (Hong Cheng, Wang Jian, Li Bin, Peng Gongyong, Hu Jinxing, Ran Peixin. Separating and culture of adult pulmonary distal artery smooth muscle cells by step-by-step collagenase digestion. *Chinese Journal of Pathophysiology*) 2010; 6: 1240-3.
- 钱国清, 王良兴, 陈婵, 黄晓颖, 叶舒婷. 大鼠细肺动脉平滑肌细胞原代培养和鉴定方法的研究. *中国应用生理学杂志* (Qian Guoqing, Wang Liangxing, Chen Chan, Huang Xiaoying, Ye Shuting. Primary cell culture and identification methods of rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Chin J Appl Physiol*) 2010; 1: 125-8.
- Yang L, Serada S, Fujimoto M, Terao M, Kotobuki Y, Kitaba S, et al. Periostin facilitates skin sclerosis via PI3K/Akt dependent mechanism in a mouse model of scleroderma. *PLoS One* 2012; 7(7): e41994.
- Li P, Oparil S, Feng W, Chen YF. Hypoxia-responsive growth factors upregulate periostin and osteopontin expression via distinct signaling pathways in rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 2004; 97(4): 1550-8; discussion 49.
- Mark Evans A, Ward JP. Hypoxic pulmonary vasoconstriction—invited article. *Adv Exp Med Biol* 2009; 648: 351-60.
- Kudo H, Amizuka N, Araki K, Inohaya K, Kudo A. Zebrafish periostin is required for the adhesion of muscle fiber bundles to the myoseptum and for the differentiation of muscle fibers. *Dev Biol* 2004; 267(2): 473-87.
- Lamallice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res* 2007; 100(6): 782-94.
- 郑易, 施孟如, 林全, 楼永良. 低氧对大鼠肺动脉平滑肌细胞骨架微丝影响的激光共聚焦显微观察. *温州医学院学报* (Zheng Yi, Shi Mengru, Lin Quan, Lou Yongliang. Observation of the influence of hypoxia on the image of cytoskeleton in pulmonary arterial smooth muscle cells under laser confocal scanning microscope. *Journal of Wenzhou Medical College*) 2011; 2: 152-5.
- Hu WY, Fukuda N, Satoh C, Jian T, Kubo A, Nakayama M, et al. Phenotypic modulation by fibronectin enhances the angiotensin II-generating system in cultured vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(6): 1500-5.
- Wu J, Ding WG, Matsuura H, Tsuji K, Zang WJ, Horie M. Inhibitory actions of the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002 on the human Kv1.5 channel. *Br J Pharmacol* 2009; 156(2): 377-87.
- Li G, Oparil S, Sanders JM, Zhang L, Dai M, Chen LB, et al. Phosphatidylinositol-3-kinase signaling mediates vascular smooth muscle cell expression of periostin *in vivo* and *in vitro*. *Atherosclerosis* 2006; 188(2): 292-300.
- Ouyang G, Liu M, Ruan K, Song G, Mao Y, Bao S. Upregulated expression of periostin by hypoxia in non-small-cell lung cancer cells promotes cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Lett* 2009; 281(2): 213-9.