

王玉全,李程程,苏路路,等. *FOXO3A* 基因敲除小鼠繁殖鉴定及骨髓造血干细胞表型初步分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(1): 41-46.

Wang YQ, Li CC, Su LL, et al. Reproductive identification and hematopoietic stem cell phenotype analysis of *FOXO3A* knockout mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(1): 41-46.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.01.007

FOXO3A 基因敲除小鼠繁殖鉴定及骨髓造血干细胞表型初步分析

王玉全,李程程,苏路路,管博文,卢延华,孟爱民*,樊飞跃

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,北京 100021)

【摘要】 目的 繁育和鉴定 *FOXO3A* 基因敲除小鼠,选育的 *FOXO3A* 基因敲除杂合型小鼠用于保种,纯合型小鼠用于实验。初步分析 *FOXO3A* 基因敲除对小鼠造血细胞表型的影响,为后续 *FOXO3A* 基因对造血细胞损伤的调节研究奠定基础。**方法** 杂合型雌鼠与野生型雄鼠交配,选育出杂合型雌鼠和杂合型雄鼠,采用一雄一雌或一雄两雌同笼合养方式进行繁育获得纯合型小鼠;繁育的幼鼠剪趾标号,剪尾提取基因组 DNA,采用 PCR 方法进行基因型鉴定,鉴定获得 100 bp/186 bp 两条条带的为杂合型小鼠(*FOXO3A*^{+/-}),鉴定获得 186 bp 条带的为纯合型小鼠(*FOXO3A*^{-/-}),鉴定获得 100 bp 条带的为野生型小鼠(*FOXO3A*^{+/+},WT);采用流式细胞术对鉴定出的野生型和纯合型小鼠进行骨髓细胞分型分析。**结果** *FOXO3A* 基因敲除小鼠已成功繁殖鉴定,子代基因敲除纯合型小鼠与杂合型小鼠长势正常,与野生型 FVB/N 小鼠相比外观、生长发育未见明显差异;已得到一定数量的纯合型小鼠用于后续实验;骨髓细胞计数结果显示,*FOXO3A* 基因敲除纯合型小鼠骨髓有核细胞计数与野生型小鼠相比[(6.167 ± 1.424) vs. (10 ± 1.732)],未见明显差异(*P*=0.1625);流式分析结果显示;*FOXO3A* 基因敲除小鼠骨髓中造血祖细胞(lin-sca1-1⁻ckit⁺,HPC)比例明显升高(*P*<0.05),造血干细胞(lin-sca1-1⁺ckit⁺,HSC)比例没有明显差异;造血干细胞和造血祖细胞数目未发现有明显差异(*P*>0.05)。**结论** 经基因型鉴定已成功获得 *FOXO3A* 基因敲除小鼠。初步探讨 *FOXO3A* 基因敲除对小鼠骨髓细胞计数及分型未见明显影响,*FOXO3A* 基因敲除对小鼠造血细胞的影响需要进一步的实验加以证明。

【关键词】 *FOXO3A*;基因敲除小鼠;PCR;流式细胞术

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 01-0041-06

Reproductive identification and hematopoietic stem cell phenotype analysis of *FOXO3A* knockout mice

WANG Yuquan, LI Chengcheng, SU Lulu, GUAN Bowen, LU Yanhua, MENG Aimin*, FAN Feiyue
(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health Commission; Beijing Engineering Research Center for Laboratory Animal Models of Human Critical Diseases, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To breed and identify *FOXO3A* gene knockout mice, hybrid mice were bred for

[基金项目] 协和青年基金(2017310015);国家自然科学基金青年基金(81703170)。

[作者简介] 王玉全(1992—),男,硕士研究生,研究方向:放射医学。E-mail: bcybcyyx@163.com

[通信作者] 孟爱民(1963—),女,教授,博士生导师。E-mail: ai_min_meng@126.com

conservation and homozygous mice were used for experiments. The effect of *FOXO3A* gene knockout on the hematopoietic cell phenotype in mice was preliminarily analyzed, laying the foundation for subsequent studies on the regulation of the *FOXO3A* gene during hematopoietic cell injury. **Methods** Hybrid female mice were mated with wild type male mice. Female and male hybrid mice were selected and bred, and homozygous mice were bred using one male and one or two females per cage. Pedicle marking and tail snips of neonatal mice were used to extract genomic DNA, and PCR was used for genotype identification. Heterozygous mice (*FOXO3A*^{+/-}) with 100/186 bp bands, homozygous mice (*FOXO3A*^{-/-}) with 186 bp bands, and wild type mice (*FOXO3A*^{+/+}, WT) with 100 bp bands were identified. Wild type and homozygous mice were used for bone marrow cell typing by flow cytometry. **Results** *FOXO3A* gene knockout mice were successfully bred and identified. Homozygous and heterozygous mice from the daughters of gene knockout mice had normal growth, with no obvious difference in appearance or development compared with wild type FVB/N mice. A number of homozygous mice were obtained for subsequent experiments. The bone marrow cell count of *FOXO3A* knockout homozygous mice contained similar numbers of nucleated cells compared with wild type mice (6.167 ± 1.424 vs 10 ± 1.732 ; $P = 0.1625$). The results of flow analysis showed that the proportion of hematopoietic progenitor cells (Lin-Scal-1⁻c-kit⁺, HPC) in the bone marrow of *FOXO3A* knockout mice was significantly increased ($P < 0.05$) compared with the wild type mice. In addition, there was no significant difference in the proportion of hematopoietic stem cells (Lin-Scal-1⁺c-kit⁺, HSC), or number of hematopoietic stem cells and hematopoietic progenitor cells ($P > 0.05$). **Conclusions** *FOXO3A* gene knockout mice were successfully obtained by genotype identification. Our preliminary study demonstrated that *FOXO3A* gene knockout had no significant effect on the bone marrow cell count or typing in mice. Future studies will investigate the effect of *FOXO3A* gene knockout on hematopoietic cells in mice.

【**Keywords**】 *FOXO3A*; gene knockout mice; PCR; flow cytometry

FOXO3A 又名横纹肌肉瘤样 1 叉头框 (forkhead rhabdomyosarcoma-like1, FKHL1), 属于叉头框蛋白 (forkhead box protein, FOX) 家族的 O 亚型, 广泛参与细胞增殖分化调节, DNA 损伤应答以及抗氧化应激调节过程^[1-4]。近几年的研究发现 *FOXO3A* 在造血干细胞功能维持, 造血系统稳态调节上发挥重要作用^[4-7]。为了直接评价 *FOXO3A* 在造血系统损伤调节中的作用, 探索相应的调节机制, 为相关疾病的治疗提供思路 and 方向, 我们将 *FOXO3A* 基因敲除纯合型小鼠在 SPF 级动物屏障环境饲养繁殖, 成功繁育鉴定出 *FOXO3A* 基因敲除纯合型小鼠。同时, 通过流式细胞术技术对野生型小鼠和纯合型小鼠的骨髓细胞进行检测分析, 为以后开展造血系统损伤研究奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

FOXO3A 基因敲除小鼠 (*FOXO3A*^{+/-}) 由中国医学科学院医学实验动物研究所张连峰课题组储存 (store number: 016132-UCD), 雌性 FVB/N 小鼠 4 只, SPF 级, 体重 16~18 g, 5 周龄; 野生型雄性 FVB/N 小鼠 2 只, SPF 级, 体重 16~18 g, 5 周龄, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供 [SCXK (京) 2016-0011]。饲养于中国医学科学院医学实验动

物研究所屏障环境动物房 [SYXK (京) 2015-0035], 按照 SPF 级动物饲养标准进行饲养, 饲养过程实行自由采食和饮水, 垫料每周更换 1 次并补充饲料和饮用水。繁殖采用一雄一雌或一雄两雌同笼合养方式进行, 雌鼠孕期为 19~21 d, 哺乳期为 20~23 d, 幼鼠在 14 日龄剪趾标号, 剪尾鉴定基因型, 在 21~24 日龄分笼饲养。实验方案通过中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物管理和使用委员会 (IACUC) 审批, IACUC 号为: MAM17002。实验动物饲养繁育和实验过程中, 在不影响实验要求和实验结果的基础上, 严格按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

EasyPure Genomic DNA Kit 购自 Trans Gen Biotech 公司, 引物由上海赛默飞世尔科技公司合成, 2×GC buffer、Recombinant Taq DNA Polymerase Taq 购自 TaKaRa 公司, GelRed™ 购自 Bitotium 公司, 流式抗体 CD4、CD8、B220、Ter119、Gr-1、CD11b、Streptavidin、scal-1、ckit 均购自 BD 或 Bioscience 公司; Bio-Rad T100 Thermal Cycler, Tanon-1600 数码凝胶图像处理系统, BD FACSAria™ II 流式细胞仪。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠基因型鉴定

(1) 小鼠基因组 DNA 的提取: 小鼠剪趾标号,

剪尾 0.5 cm 置入 1.5 mL 无菌 EP 管中, 参照 Transgen 的 Genomic DNA Kit 说明书提取基因组。

(2)引物设计:如表 1。

(3) PCR 反应: 根据 Recombinant Taq DNA Polymerase Taq 说明采用 20 μ L 体系进行扩增, 其中 2 $\times$ GC buffer 10 μ L、dNTP (2.5 mmol/L each) 1.6 μ L、Forward Primer (50 μ mol/L) 0.2 μ L、Reverse Primer (50 μ mol/L) 0.2 μ L、rTaq polymerase 0.2 μ L、DNA template 3 μ L、H₂O 4.8 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性, 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性, 30 s; 58 $^{\circ}$ C 退火, 30 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸, 30 s; 72 $^{\circ}$ C 后延伸, 10 min; 35 个循环。

(4) 琼脂糖凝胶电泳鉴定: 取 PCR 扩增产物 10 μ L 在含 GelRed (1 $\times$) 的 2% 琼脂糖凝胶中以 120 V 电压电泳 20 min 后于凝胶成像仪中观察。小鼠组织基因组琼脂糖凝胶电泳基因型片段为野生型 (*FOXO3A*^{+/+}, WT): 100 bp; 纯合型 (*FOXO3A*^{-/-}): 186 bp; 杂合型 (*FOXO3A*^{+/-}): 100 bp、186 bp, 基于此基因条带可以鉴别每只小鼠基因型。

1.3.2 骨髓细胞检测分析

为探讨 *FOXO3A* 对造血系统的影响, 进行骨髓造血细胞计数及分型检测初步实验。

(1)骨髓细胞计数: 取 *FOXO3A* 基因敲除纯合型小鼠 3 只, 雄性, 体重 25~31 g, 11~16 周龄; 野生型 3 只作为对照, 雄性, 体重 19~29 g, 11~16 周龄。小鼠脱颈处死, 75% 酒精浸泡消毒, 无菌条件取小鼠双侧股骨和胫骨, 用 1 mL PBS 缓冲液冲洗骨髓至 2 mL EP 管中, 采用 KOVA 一次性计数板, 人工骨髓计数。

(2)造血干细胞和造血祖细胞比例测定^[8]: 分离的骨髓细胞, 每只小鼠取 5 $\times$ 10⁶ 个细胞, 终体积 100 μ L。按体积比 1:20 加入 biotin 标记的混合一抗抗体 (CD4、CD8、B220、Ter119、Gr1、cd11b), 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 洗涤一次, 1500 r/min 离心 5 min, 离心后去上清, 100 μ L PBS 重悬, 加入混合二抗抗体 streptavidin (percp 标记)、scal-1 (PE 标记)、ckit (APC 标记), 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 洗涤一次, 离心条件如上, 200 μ L PBS 重悬。BD 流式细胞仪检测

HPCs (Lin⁻ c-kit⁺ Sca1⁻ or LSK⁻ cells), HSCs (Lin⁻ c-kit⁺ Sca1⁺ or LSK⁺ cells) 在骨髓中所占的比例。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5 软件进行统计分析。计量数据以平均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 重复测量数据采用重复测量数据方差分析方法。以 *P* < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 小鼠的繁殖情况

FOXO3A 基因敲除杂合型雌鼠成功繁殖出子代幼鼠, 雌鼠妊娠期为 19~21 d, 哺乳期为 20~23 d, 每胎产 6~13 只幼鼠, 成活率在 98% 以上。

2.2 小鼠基因型鉴定

随机选择出生 15 d 1~9 号小鼠剪趾标号, 剪尾提取基因组, 分别用引物 *FOXO3A-A*、*FOXO3A-B* 和引物 *FOXO3A-A*、*FOXO3A-C* 进行 PCR 扩增, 采用水作为空白对照, 野生型小鼠基因组作为阴性对照, 杂合型小鼠基因组作阳性对照。扩增结果显示阴性对照只扩增得到 100 bp 条带, 为野生型小鼠; 阳性对照扩增得到 100 bp 和 186 bp 条带, 为杂合型小鼠; 5、6 号只扩增得到 186 bp 条带, 为 *FOXO3A* 基因敲除纯合型小鼠; 2、3、8、9 号为 *FOXO3A* 基因敲除杂合型小鼠, 1、4、7 号为野生型小鼠。(如图 1)

2.3 小鼠的生长情况

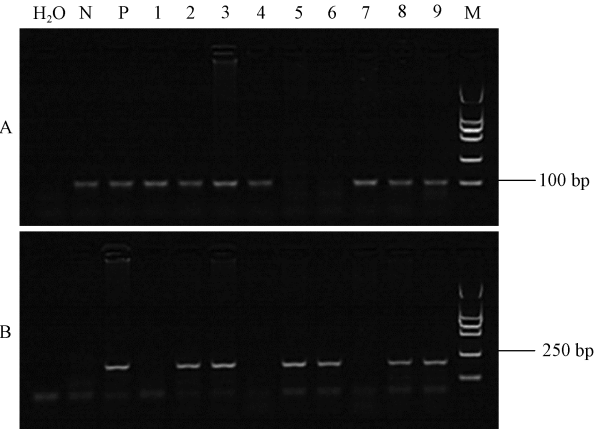
幼鼠由雌鼠哺乳喂养, 哺乳期为 21 d 左右, 产后 21~24 d 离乳分笼。子代基因敲除纯合型小鼠与杂合型小鼠长势正常, 与野生型 FVB/N 小鼠相比外观、生长发育未见明显差异。

2.4 *FOXO3A* 基因敲除小鼠骨髓计数结果

小鼠骨髓细胞计数结果显示, *FOXO3A* 基因敲除纯合型小鼠骨髓有核细胞计数与野生型小鼠相比 [(6.167 $\pm$ 1.424) vs. (10 $\pm$ 1.732)], 未见明显差异 (*P* = 0.1625)。结果表明, *FOXO3A* 基因敲除不会引起小鼠骨髓有核细胞数目的明显改变。(如图 2)

表 1 引物设计
Table 1 Protocol primers

引物 Primers	5' 探针 5' label	序列(5'→3') Sequences (5'→3')	3' 探针 3' label	引物类型 Primer type
<i>FOXO3A-A</i>	——	ATTCTTTGGAAATCAACAAAACCT	——	通用引物 Common
<i>FOXO3A-B</i>	——	TGCTTTGATACTATTCCACAAACCC	——	野生型下游引物 Wild type reverse
<i>FOXO3A-C</i>	——	AGATTTATGTTCCCACTTGCTTCCT	——	突变型下游引物 Mutant reverse



注:A:1~9 号小鼠用引物 *FOXO3A*-A、*FOXO3A*-B 扩增结果;B:1~9 号小鼠用引物 *FOXO3A*-A、*FOXO3A*-C 扩增结果。M:DNA marker,2000 bp 分子量标准;N:阴性对照;P:阳性对照。

图 1 子代小鼠基因型鉴定结果

Note. A: Mice 1-9 were amplified with the primers *FOXO3A*-A and *FOXO3A*-B. B: Mice 1-9 were amplified with the primers *FOXO3A*-A and *FOXO3A*-C. M: DNA marker, 2000 bp; N: Negative control; P: Positive control.

Figure 1 Genotype identification of daughter mice

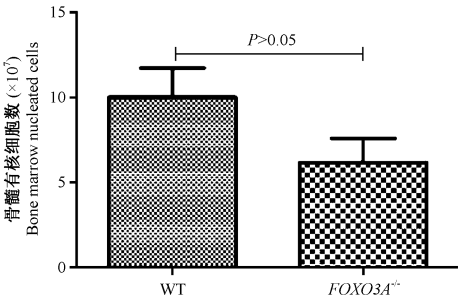


图 2 *FOXO3A* 基因敲除小鼠骨髓计数

Figure 2 *FOXO3A* gene knockout mouse bone marrow cell counts

2.5 *FOXO3A* 基因敲除小鼠造血细胞表型分析结果

为了直接观察 *FOXO3A* 基因敲除对小鼠造血系统的影响,我们采用流式细胞仪检测 *FOXO3A* 基因敲除纯合型小鼠和野生型小鼠的骨髓细胞,流式细胞仪分析时门的设置如图 3 所示。我们检测了造血祖细胞 ($\text{lin-sca1}^{-1}\text{ckit}^{+}$, HPC),造血干细胞 ($\text{lin-sca1}^{+}\text{ckit}^{+}$, HSC) 的比例和数目。结果如图 3 所示,与野生型小鼠相比,*FOXO3A* 基因敲除会引起骨

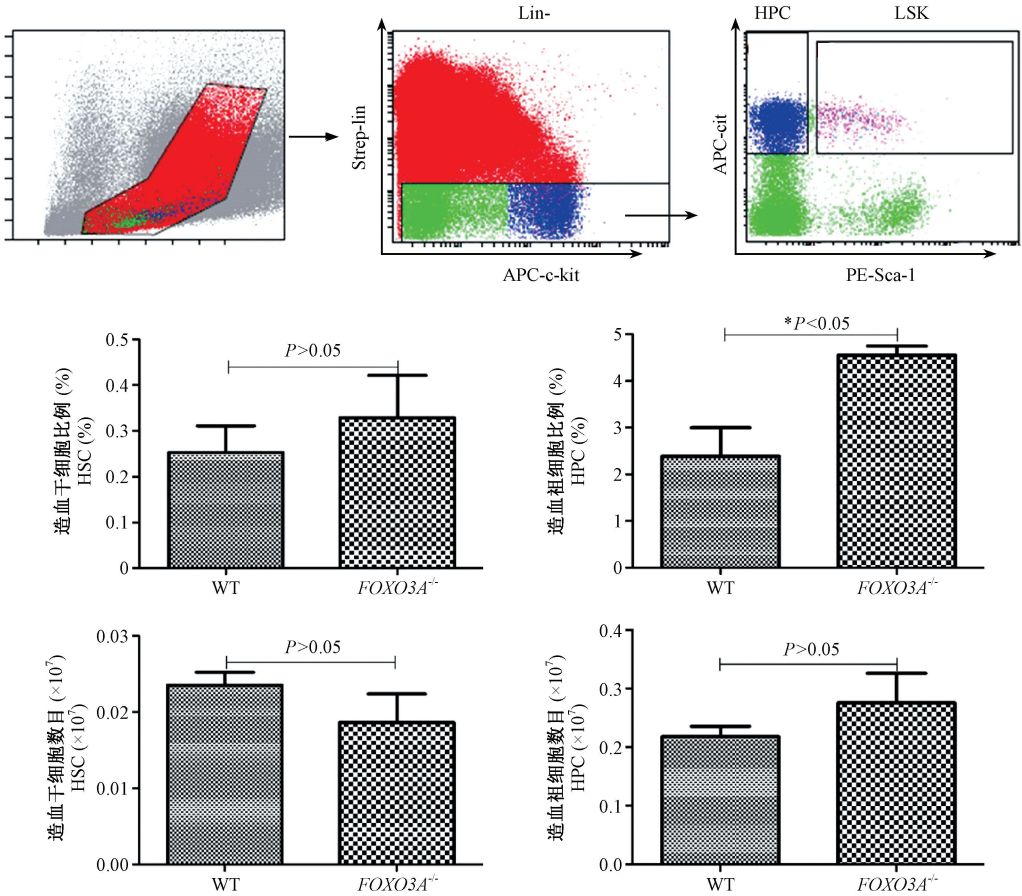


图 3 *FOXO3A* 基因敲除小鼠造血细胞表型分析

Figure 3 Analysis of the phenotype of hematopoietic cells in *FOXO3A* knockout mice

髓中造血祖细胞比例明显升高($P<0.05$),造血干细胞和造血祖细胞数目却没有明显改变($P>0.05$)。实验结果显示,*FOXO3A* 基因敲除未发现造血干细胞和造血祖细胞的明显差异。

3 讨论

FOXO3A 作为重要的核转录因子,有“长寿基因”之称,广泛表达于成人各种组织器官中。目前研究认为 *FOXO3A* 参与多种疾病致病调节过程,例如肿瘤^[9]、血液系统疾病、心血管疾病^[10]、神经系统疾病^[11]等。先前研究发现 *FOXO3A* 可以通过调控氧化应激和细胞周期来调节造血干细胞的功能^[12, 13],*FOXO3A* 基因缺陷小鼠随年龄增长或给予 5-氟尿嘧啶(5-FU)刺激表现中性粒细胞增多,造血干细胞中蛋白激酶 B (AKT)、胞外信号调节激酶(ERK)激活及增殖抑制蛋白 Sprad2 (Sprouty-related Ena/VASP homology 1 domain-containing proteins 2)、p27Kip1 表达下调,表明 *FOXO3A* 在造血干细胞功能维持及抗应激调节中发挥至关重要的作用^[7]。近来研究发现由 *Fancd2* 基因介导的 DNA 损伤修复通路与 *FOXO3A* 基因介导的应激调节通路在造血干细胞维持上存在功能性互作^[5],这为应激诱导的造血干细胞衰竭等血液疾病治疗开辟新的靶点。同时,衰老的造血干细胞中存在完整的 *FOXO3A* 介导的促自噬信号通路,保护其免受骨髓微环境中出现的能量危机、细胞因子匮乏等代谢应激损伤^[14]。衰老的造血干细胞易于积累 DNA 损伤,通常功能丧失,被认为是提高老年人血液系统疾病发生率的根本原因之一^[15]。由此,*FOXO3A* 调节的促自噬机制是否通过保护损伤、功能缺陷的衰老造血干细胞而直接导致衰老相关血液系统疾病的发展也是我们值得关注的。

FOXO3A 基因敲除动物模型对直接评价 *FOXO3A* 功能、活性调控机制,了解 *FOXO3A* 在不同情况下的调节机制,为血液病等疾病的治疗提供新思路是十分重要的。FVB/N 品系小鼠受精卵有大而显著的前核,易于进行显微注射,易于进行转基因模型构建,同时,FVB/N 小鼠繁殖力较强,子代数多,采用 FVB/N 品系小鼠构建基因缺陷动物模型能为后续实验顺利开展提供模型保障。

将 FVB 背景的 *FOXO3A* 基因敲除杂合型小鼠严格按照 SPF 级动物饲养标准进行饲养和繁育。杂合型小鼠与野生型交配,子代经基因型鉴定后选

育出杂合子,采用杂合子雌雄配对繁殖保种,可获得 *FOXO3A* 基因敲除纯合型小鼠用于后续实验。*FOXO3A* 基因敲除杂合型雌鼠成功繁殖出子代幼鼠,雌鼠妊娠期为 19~21 d,哺乳期为 20~23 d,每胎产 6~13 只幼鼠,成活率在 98% 以上。幼鼠由雌鼠哺乳喂养,哺乳期为 21 d 左右,产后 21~24 d 离乳分笼。子代基因敲除纯合型小鼠与杂合型小鼠长势正常,与野生型 FVB/N 小鼠相比外观、生长发育未见明显差异。饲养繁育过程中,雌鼠会出现长时间不孕或产子率低的情况,应考虑互换雄鼠或替换掉年龄较大的雌鼠;若在饲养过程中出现噪音分贝高或惊吓,会发生食子现象;偶尔也出现雌鼠怀孕或产仔后雄鼠死亡现象,建议平时多注意观察照料。

基因型鉴定过程中,我们设计了三条引物,一条为通用引物,一条与通用引物来鉴定野生型,另外一条与通用引物来对鉴定 *FOXO3A* 基因敲除。通过两对引物的扩增情况来反映小鼠的基因型。同时,为了避免结果中出现的假阳性,增加鉴定的可靠性,我们设置水作为空白对照,野生型作阴性对照,杂合子或纯合子作阳性对照。

为了评价 *FOXO3A* 基因敲除对小鼠造血系统的影响,我们分别对 *FOXO3A* 基因敲除小鼠和野生型对照小鼠进行骨髓有核细胞计数分析,并采用流式细胞仪分别检测其造血祖细胞和造血干细胞的比例和数目。结果显示,骨髓有核细胞计数,野生型小鼠和 *FOXO3A* 基因敲除小鼠相比,差异无显著性。HSC 比例和数目,两组间没有明显的变化。*FOXO3A* 基因敲除的 HPC 的比例较野生型有所增加,但是数目差异无显著性。综上,*FOXO3A* 基因敲除对小鼠造血系统表型没有明显的影响,初步测定结果可用于造血干细胞研究的基础数据。我们后续也会开展一系列实验来评价 *FOXO3A* 基因敲除对小鼠造血系统稳态及功能的影响。

(致谢:感谢中国医学科学院医学实验动物研究所张连峰教授、关菲菲老师、高翔老师给予的指导帮助。)

参考文献:

- [1] Roy SK, Chen Q, Fu J, et al. Resveratrol inhibits growth of orthotopic pancreatic tumors through activation of FOXO transcription factors [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25166.
- [2] Adamowicz M, Vermezovic J, d'Adda di Fagagna F. NOTCH1 inhibits activation of ATM by impairing the formation of an ATM-

- FOXO3a-KAT5/Tip60 complex [J]. *Cell Rep*, 2016, 16(8): 2068–2076.
- [3] Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress [J]. *Nature*, 2002, 419(6904): 316–321.
- [4] Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress [J]. *Cell*, 2007, 128(2): 325–339.
- [5] Li X, Zhang T, Wilson A, et al. Transcriptional profiling of Foxo3a and Fancd2 regulated genes in mouse hematopoietic stem cells [J]. *Genom Data*, 2015, 4: 148–149.
- [6] Warr MR, Binnewies M, Flach J, et al. FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells [J]. *Nature*, 2013, 494(7437): 323–327.
- [7] Miyamoto K, Miyamoto T, Kato R, et al. FoxO3a regulates hematopoietic homeostasis through a negative feedback pathway in conditions of stress or aging [J]. *Blood*, 2008, 112(12): 4485–4493.
- [8] Shao L, Feng W, Li H, et al. Total body irradiation causes long-term mouse BM injury via induction of HSC premature senescence in an Ink4a- and Arf-independent manner [J]. *Blood*, 2014, 123(20): 3105–3115.
- [9] Rehman A, Kim Y, Kim H, et al. FOXO3a expression is associated with lymph node metastasis and poor disease-free survival in triple-negative breast cancer [J]. *J Clin Pathol*, 2018, 71(9): 806–813.
- [10] Yu H1, Fellows A, Foote K, et al. FOXO3a (forkhead transcription factor O subfamily member 3a) links vascular smooth muscle cell apoptosis, matrix breakdown, atherosclerosis, and vascular remodeling through a novel pathway involving MMP13 (matrix metalloproteinase 13) [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(3): 555–565.
- [11] She DT, Wong LJ, Baik SH, et al. SIRT2 inhibition confers neuroprotection by downregulation of FOXO3a and MAPK signaling pathways in ischemic stroke [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(12): 9188–9203.
- [12] Miyamoto, Araki, Y. Kiyomi, et al. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool [J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(1): 101–112.
- [13] Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress [J]. *Cell*, 2007, 128(2): 325–339.
- [14] Warr MR, Binnewies M, Flach J, et al. FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells [J]. *Nature*, 2013, 494(7437): 323–327.
- [15] Rossi DJ, Jamieson CH, Weissman IL. Stems cells and the pathways to aging and cancer [J]. *Cell*, 2008, 132(4): 681–696.

〔收稿日期〕2018-09-01

(上接第 40 页)

- [10] Herzog BH, Fu J, Wilson SJ, et al. Podoplanin maintains high endothelial venule integrity by interacting with platelet CLEC-2 [J]. *Nature*, 2013, 502:105–109.
- [11] Larrousse M, Bragulat E, Segarra M, et al. Increased levels of atherosclerosis markers in salt-sensitive hypertension [J]. *Am J Hypertens*, 2006, 19(1): 87–93.
- [12] Bibbins-Domingo K. U.S. Preventive Services Task Force. Aspirin use for the primary prevention of cardiovascular disease and colorectal cancer: U. S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement [J]. *Ann Intern Med*, 2016, 164(12): 836–845.
- [13] Felder RA, White MJ, et al. Diagnostic tools for hypertension and salt sensitivity testing [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2013, 22(1): 65–76.
- [14] Baldo MP, Rodrigues SL, Mill JG. High salt intake as a multifaceted cardiovascular disease: new support from cellular and molecular evidence [J]. *Heart Fail Rev*, 2015, 20(4): 461–474.
- [15] Rondina MT, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets as cellular effectors of inflammation in vascular diseases [J]. *Circ Res*, 2013, 112: 1506–1519.
- [16] Bernardo A, Ball C, Nolasco L, Choi H, Moake JL, Dong JF. Platelets adhered to endothelial cell-bound ultra-large von Willebrand factor strings support leukocyte tethering and rolling under high shear stress [J]. *Thromb Haemost*, 2005, 3(3): 562–570.
- [17] Saito Y, Okada S, Ogawa H, et al. Low-dose aspirin for primary prevention of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus: 10-year follow-up of a randomized controlled trial [J]. *Circulation*, 2017, 135(7): 659–670.
- [18] Wu R, Lamontagne D, de Champlain J. Antioxidative properties of acetylsalicylic acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats [J]. *Circulation*, 2002, 105(3): 387–392.
- [19] Weitz JI, Lensing AWA, Prins MH, et al. Rivaroxaban or aspirin for extended treatment of venous thromboembolism [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(13): 1211–1222.
- [20] Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium-gatekeeper of vessel health [J]. *Atherosclerosis*, 2016, 248: 97–109.

〔收稿日期〕2018-09-11