

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.01123

## 生物力学——胚胎血管系统发育研究新视野

谢翔, 胡建军, 王贵学

重庆大学生物工程学院力-发育生物学研究室, 生物流变科学与技术教育部重点实验室, 重庆市血管植入物工程实验室, 重庆 400044

**摘要:** 胚胎血管系统发育是一个复杂的过程, 其进程受多种刺激和抑制信号的调控, 这些信号必须协调作用, 以确保血管发育的每个阶段得以正常进行。血管发育过程在一定程度上是由基因控制的, 而且其研究也在很广的范围展开。但是近年研究发现, 生物力学作用是胚胎血管发育的必要因素, 胚胎血管发育过程中涉及到不同的细胞生物力学机制。文章主要就生物力学因素在血管系统发育过程中所起的作用及最新相关研究进展作一概述。

**关键词:** 生物力学; 血管发育; 细胞分化; 细胞迁移; 动静脉分化; 模式建成

## Advance in biomechanical study of embryonic vascular system development

XIE Xiang, HU Jian-Jun, WANG Gui-Xue

Key Laboratory of Biorheology and Technology (Chongqing University), Ministry of Education; Chongqing Engineering Laboratory in Vascular Implants; Laboratory of Mechano-developmental Biology, Bioengineering College of Chongqing University; Chongqing 400044, China

**Abstract:** Embryonic vascular system development is a complex process, whose progress is regulated by a variety of the stimulation and inhibition signals, and these signals must play synergistic effect so as to ensure that each stage of vascular development can proceed normally. The vascular development is controlled by the gene to a certain extent, and has received extensive attention. Recent studies have revealed the biomechanical role is necessary to embryonic vascular development, in which different mechanism of cell biomechanics is involved. In this review, we summarize the latest research progress on the role of biomechanical factors during embryonic vascular system development.

**Keywords:** biomechanics; vascular development; cell differentiation; cell migration; arterial-venous differentiation; modeling

血管发育过程中新血管的形成包括两种形式: 一种为血管形成 (Vasculogenesis), 即由成血管干细胞原位分化为内皮细胞并形成原始新生血管; 另一种为血管新生 (Angiogenesis), 由原已存在的血管内

收稿日期: 2012-03-01; 修回日期: 2012-06-30

基金项目: 国家重大科学研究计划项目(编号: 2012CB945101)和重庆国家生物产业基地公共实验中心建设项目(编号: 发改办高技[2008]1692号)资助

作者简介: 谢翔, 博士研究生, 研究方向: 血管生物力学。Tel: 023-65112675; E-mail: linfq007@163.com

通讯作者: 王贵学, 教授, 博士生导师, 研究方向: 血管生物力学与组织修复材料。E-mail: wanggx@cqu.edu.cn

网络出版时间: 2012-7-31 04:17:32

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120731.1617.004.html>

皮以出芽、增殖等方式形成毛细血管丛<sup>[1]</sup>。依据发育学的观点,血管细胞来源于胚胎的中胚层。血管的发育在很大程度上是由遗传控制,但是近年的研究发现血管的发育不仅仅是一个遗传因素控制的过程,表观遗传因素(包括力学因素、细胞的相对位置关系等)也是心血管系统发育所必需的<sup>[2]</sup>。血管系统本身就是一个复杂的力学系统,宏观上包括血液流动产生的切应力、血流搏动产生的张应力、血流产生的压应力等。血管是由细胞和胞外基质构建的一个复杂系统,细胞和细胞之间以及细胞和基质之间的黏附力和张力也是血管发育,甚至可能是血管病变发生的重要因素。血管力学环境的变化通过影响血管细胞的形态和排列,引起血管细胞骨架结构和细胞间连接发生变化,影响成血管细胞的迁移、增殖和凋亡进而影响血管发育。这些都可能为将来血管疾病的预防和治疗提供依据。本文就力学因素在血管发育过程中所起的作用相关国内外研究的进展作简要概述,并对以后的研究工作展望。

## 1 血管发育和血管生物力学

心血管是脊椎动物胚胎发育过程中最先建立功能的器官系统,它保证了其他组织器官生长发育过程的物质交换和能量供应。血管发育过程大致会经历原始血管的形成、血管稳定、血管分支的形成、血管重构和血管功能特化等一系列过程<sup>[3]</sup>。

在胚胎早期,原始血管的形成是通过血管发生过程实现的。来源于中胚层的血管干细胞逐步分化和迁移,最终分化为内皮细胞并迁移至特定的部位组装成原始血管,形成体内主要动脉和静脉血管、心脏原基和胚外毛细血管网<sup>[4]</sup>。这些原始血管的结构极不稳定,仅由一层血管内皮细胞(ECs)构成。血管平滑肌细胞在某些因子如PDGF- $\beta$ 的刺激下逐渐成熟并迁移到原始血管的表面形成保护层,稳定血管的结构<sup>[5]</sup>。在胚胎循环建立之后,这些不成熟的血管系统还需经过重构形成血管分支建立起血液循环的毛细血管网络,这一过程即血管生成。血管生成就是在原有血管基础上长出新的毛细血管,它是通过出芽或套叠式生长的方式实现<sup>[6]</sup>。芽生是原有血管基底膜降解,血管舒张,在刺激信号作用下内皮细胞开始有丝分裂,新的ECs组装成原始血管样管腔,与相邻的芽生官腔连接后形成循环通路<sup>[7]</sup>。套叠

式生长是通过相应的特化结构嵌入血管内将血管腔分开。血管发育还要通过动静脉分化过程形成功能特化的血管和完善的血管网络系统。经过上述一系列过程便建立起了成熟的血管网络系统,生命活动从此以后依赖血液循环系统完成物质和能量交换。

生物体处于力学环境之中,力学因素影响机体整体、器官、组织、细胞和分子各层次的生物学过程。血管系统是一个以心脏(机械泵)为中心的力学系统。血液循环过程包含着血液流动、血细胞和血管的变形、血液和血管的相互作用等,其中均蕴藏着丰富的力学规律,因此,力学因素在血管发育中的作用尤为重要。流体切应力和血管张应力能够调节心血管细胞成分,包括膜受体和整合素、信号蛋白激酶、生长因子和细胞因子等心血管活性物质的变化,从而参与血管发育过程,其中包含着许多生物力学和生物学基础问题。血管力学生物学研究要从基因-蛋白-细胞-器官-整体不同层次上综合探讨血管的“应力-生长”关系,着眼于力学环境对心血管系统作用,阐明力学因素如何产生生物学效应(即血管活性物质的变化)而导致血管发育异常,研究心血管信号转导通路和力学调控途径;血管活性多肽的功能及其分子网络调控机制;寻找力学因素对心血管作用的药物靶标。从细胞分子水平深入了解心血管发育的本质,这些研究将为探讨心血管病发病机制和防治提供新的生物力学思路。

## 2 力学刺激与血管细胞分化

内皮细胞和平滑肌细胞由其各自的前体细胞分化为成熟的细胞是血管发育中的关键事件之一,这些细胞分化过程受大量的化学因子调控。近年来研究发现力学刺激也是细胞分化的一个重要因素,可以决定细胞的分化方向。Engler等<sup>[8]</sup>研究发现间充质干细胞在不同硬度的基底上细胞的分化方向有很大差异,在流动基底上干细胞分化为血细胞,随着基底硬度的逐渐增加,细胞依次分化为脑细胞、肌细胞和骨细胞。心血管系统处在一个力学环境中,血管细胞会受到流动剪切和拉伸应力的作用。内皮细胞位于血管管腔内壁,直接与血液接触并受到血流剪切力的作用。内皮细胞在分化成熟过程中切应力是否参与呢?Yamamoto等<sup>[9]</sup>发现在仅有流动剪切力的作用下,*Flk-1*<sup>(+)</sup>多能胚胎干细胞可分化为内皮细

胞,并且表达成熟内皮细胞的表面分子标记物;同时,在成体血管生成中起重要作用的内皮祖细胞(EPCs)在血流剪切力作用下分化为内皮细胞<sup>[10]</sup>。Wang等<sup>[11]</sup>将间充质干细胞置于平行平板流动腔中施加流动剪切力,结果证明细胞处于此条件下能分化为血管内皮细胞。这些研究结果显示,不同类型和来源的干细胞在血液流动剪切力的作用下都会朝内皮细胞的方向分化,证明流动剪切力是内皮细胞分化和成熟的一个重要调控因素。

平滑肌细胞同样处于复杂的力学微环境中,与内皮细胞相比平滑肌细胞主要受到周期性张应力的作用。成体平滑肌细胞会受到周期性的张应力作用从而改变细胞的形态、功能和基因表达。但是,平滑肌细胞由其祖细胞分化的过程是否受到应力作用的调控是研究血管发育广泛关注的问题。最近的研究证明周期性应力会影响干细胞向平滑肌细胞的分化。Schmelter等<sup>[12]</sup>的研究表明胚胎干细胞在应力作用下会朝心血管细胞的方向分化,这一过程是通过应力诱导活性氧的产生实现。Shimizu等<sup>[13]</sup>证明小鼠胚胎干细胞在周期性应力作用下可分化为平滑肌细胞,表达平滑肌细胞相关的表面标记分子 $\alpha$ -actin和SM22;并且证明这一过程是通过周期性应力调节受体磷酸化作用激活PDGF受体 $\beta$ 实现。这些体外实验的研究结果证明,周期性应力对平滑肌细胞的分化和成熟很有意义,可以指导构建模拟血管发育体外模型的力学微环境。

### 3 细胞黏附力、细胞张力与细胞迁移

血管内皮细胞和平滑肌细胞的前体细胞在胚胎早期并不是就在胚胎内血管形成的位置,细胞为什么能够准确无误地到达预定位置,又是通过什么途径完成这一过程的呢?这一过程的主要事件就是细胞迁移,它通过多种作用机制协同完成细胞的运动。细胞迁移在个体发育过程中作用十分重要,其参与的重要过程有原肠诱导、形态建成、神经元定位、血管建成等。而细胞迁移不仅受趋化因子和抑制因子类的调节,还与细胞间的直接相互作用和细胞与基质相互作用有关。

#### 3.1 胚胎细胞迁移

胚胎发育早期的原肠作用中,细胞迁移会导致

细胞相对位置的变化,进而决定细胞将来的命运。细胞相对位置差异的原因之一是细胞之间的黏附力和细胞张力的差异,细胞之间的这种力学差异导致细胞“类聚”。Steinberg等<sup>[14]</sup>提出假设:细胞-细胞、细胞-基质之间的黏附力越强的细胞位于组织的内部,反之黏附力越弱的细胞位于组织的外部。Krieg等<sup>[15]</sup>用原子力显微镜研究了斑马鱼胚胎3种不同胚层细胞的黏附力和细胞张力,实验结果发现细胞之间的黏附力为:中胚层>内胚层>外胚层,细胞张力为:外胚层>中胚层>内胚层。这些研究结果表明尽管血管前体细胞及血管细胞相对于其他细胞的细胞黏附力之间的差异由于实验技术的限制还不明确,但可以肯定的是这种差异是存在的,至于具体的关系还有待进一步研究。

#### 3.2 血管内皮前体细胞的迁移

血管新生是胚胎血管系统发育的起始事件,其关键步骤是从中胚层到成血管细胞的建成,成血管细胞组装成血管结构并形成血管腔,最后形成连续性的血管网络<sup>[16]</sup>。成血管细胞如何由中胚层向预定位置运动最后形成原始的内皮管,以及平滑肌细胞怎样到达原始血管表面行使稳定血管结构的功能是血管发育中需要深入研究的内容。

在胚胎早期,成血管细胞发生表型转换,变为能够运动的细胞表型并向原始血管丛形成的位置迁移;细胞迁移到预定的位置后表型再转变为不具有迁移能力的表型<sup>[17]</sup>。这一过程受一系列的因子和调控蛋白的调节。VEGF/VEGFR在血管干细胞的迁移中发挥重要作用。在VEGF或VEGFR缺失的小鼠模型中,小鼠胚胎血管发育严重异常或缺失导致死胎<sup>[18,19]</sup>。脑信号蛋白(Semaphorin3A1)也是一个与成血管细胞迁移有关的一个分子。在过表达和反义技术敲减基因表达斑马鱼模型中证明semaphorin调节neuropilin阳性的成血管干细胞的迁移和血管发育;Semaphorin3A可能通过干扰VEGF的趋化活性调节细胞的迁移<sup>[20]</sup>。CXCR4/SDF-1在体外培养的人胚胎干细胞形成的类胚体中证明与血管发育相关,可增强血管网络的形成<sup>[21]</sup>。血管生成抑制因子(Angiostatin)是血液循环中的一种血管生成抑制剂。Trojanovsky等<sup>[22]</sup>通过酵母双杂交技术获得了angiostatin结合蛋白angiostatin,体外实验中它可调

节angiostatin抑制内皮细胞的迁移及管腔形成过程。胚胎血管系统发育成高度有序的血管网络需要精确调控内皮细胞的迁移和原始血管分支的形成。Aase等<sup>[23]</sup>研究了angiomin在斑马鱼和小鼠胚胎正常生理条件下血管发育中的作用。降低angiomin的表达会减少内皮层生长顶端细胞的数量和内皮细胞的迁移,表达量下降75%的小鼠胚胎在胚胎期11~11.5 d时因血管发育不全死亡。

成血管干细胞变为具有迁移能力的表型是血管新生的前提,这些细胞如何到达预定的正确位置也是一个重要的问题。新生血管在胚胎内的正确定位不仅受趋化因子和抑制因子类的调节,还与细胞间黏附力和细胞张力有关,它们共同指导成血管干细胞迁移到正确的部位并分化组装成原始血管。细胞黏附分子是细胞间发生相互作用的媒介。在内皮细胞分化过程中最早表达的黏附分子之一是PECAM-1,它在原始血管形成前的成血管干细胞簇中表达,参与调节成血管干细胞的迁移<sup>[24]</sup>。VE-cadherin也是在胚胎血管新生早期成血管干细胞迁移时表达的黏附分子,它的缺失会导致死胎<sup>[25]</sup>,它可能在原始血管建立后阻止成血管干细胞的迁移和内皮细胞介入过程中发挥重要作用。细胞外基质(ECM)在血管新生中的作用也不可忽视。细胞基质蛋白 $\beta 1$  integrins是ECM的主要受体,在其缺失的情况下细胞迁移能力下降,血管生成受阻,血管网络形成推迟。纤维连接蛋白(Fibronectin)也是重要的细胞基质蛋白,在fibronectin基因敲除的小鼠模型中,胚外几乎没有血管生成,胚内血管内皮细胞也呈分散无序分布,未能形成正确的血管结构<sup>[26]</sup>。

### 3.3 内皮细胞和平滑肌细胞迁移

血管生成过程中内皮细胞的来源因情况而异。在胚胎发育的血管网络建成过程中主要来源于成血管干细胞,成体血管生成主要来源于组织和骨髓中的干细胞。内皮细胞的迁移一般包括3种机制:趋化刺激、接触刺激和力学刺激。趋化刺激是由某些生长因子如VEGF、bFGF、血管生成素(angiotensin)、FGF-2、PDGF、EGF、TGF- $\beta$ 等及其受体的结合驱动<sup>[27]</sup>。这些因子一般通过与受体的作用,将信号传导到细胞核内。细胞迁移过程中首先形成丝足作为感知器指导细胞迁移,Cdc42在其中起重要作用。血

管生成过程芽生的内皮前端细胞可以依赖VEGF的浓度指导细胞迁移<sup>[28]</sup>。接触刺激是细胞整合素类黏附分子(Integrins)与ECM中的成分结合导致内皮细胞的迁移。ECM对细胞迁移非常重要,细胞依赖于其结构和成分决定自身的去留。在促血管生成刺激条件下,ECM在基质金属蛋白酶(MMPs)等的作用下降解,促使内皮细胞的迁移<sup>[29]</sup>。细胞表面的基质结合蛋白integrins与ECM结合后促进自身活化,通过一系列的信号分子的激活导致肌动蛋白多聚化、细胞收缩和迁移。血管内皮细胞位于血管的内侧,会一直受到血流剪切力的作用。细胞感知切应力刺激的分子是integrins以及细胞骨架(Cytoskeleton),切应力会导致细胞骨架肌动蛋白的重构,并增加内皮细胞尾部应力纤维的收缩性,最终促使细胞向血流方向迁移,促进新生血管的延伸<sup>[30]</sup>。细胞的迁移过程是通过力学刺激、趋化刺激和接触刺激这几种机制相互调节和协同作用的结果。细胞受到力学作用后,受到多种内皮机械力学感受器的响应,趋化刺激和接触刺激相关的感应器也同时开启。Integrins是一种连接细胞外基质和细胞骨架的跨膜蛋白,将细胞外力学信号传递进细胞内转化为细胞收缩信号,有证据显示抑制Integrins信号可以干扰剪切力诱导的MAPKs、PI3K/Akt和GTPase Rac1活性<sup>[31~33]</sup>。Integrins/ECM/cytoskeleton的相互作用是剪切力作用关键的下游调节信号响应过程,剪切力触发的integrins和Shc持续的结合是在基质上特异的相互作用<sup>[34]</sup>。ECM的动力传导包括ECM蛋白如胶原蛋白(Collagen)和fibronectin的激活<sup>[35,36]</sup>,基质动力学依赖的降解和聚合<sup>[35,37]</sup>。越来越多的证据表明,剪应力通过调节内皮细胞的基因表达,来施加生理影响。汪南平教授<sup>[38]</sup>的研究小组使用LC Sciences的microRNA芯片,比较了人脐静脉内皮细胞(HUVEC)在有无层流剪切压力(1.2N/m<sup>2</sup>, 12 h)下的miRNA表达谱。研究人员通过一系列分析,证实层流剪应力调节了miRNA的表达,而miR-19a在细胞周期蛋白(Cyclin D1)表达的流动调节及内皮增殖和迁移中扮演了重要角色。Weinberg等<sup>[39]</sup>通过体外实验研究证明血流动力学环境对心脏瓣膜内皮细胞的表型变化和迁移有决定性的影响,而这一过程是通过klf2以及MCP-1信号通路来实现的。

原始血管形成后血管极不稳定,很易崩解。只

有在内皮层覆盖支持细胞后才能稳定血管的结构,平滑肌细胞则是这一过程的主要角色。平滑肌细胞在动脉粥样硬化发生、血管损伤后内膜增生等病理过程中也十分重要。但是在体内动态描述平滑肌细胞的迁移与血管发育的关系目前还鲜有报导。平滑肌细胞迁移到血管内皮管腔后附着在其表面并分泌大量的细胞外基质蛋白,稳定血管结构。很多蛋白分子包括VEGF、PDGF、bFGF、IGF-1、TGF- $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、Collagen、Fibronectin、层粘连蛋白(Laminin)等都可促进平滑肌细胞迁移<sup>[40]</sup>。

#### 4 力学作用与造血干细胞发育

血流动力学切应力一旦产生,势必引起血管壁细胞的周向拉伸,血管壁细胞的拉伸是在血管形态建成过程中基底降解引起力学作用,导致细胞受到拉伸,其对血管内皮以及平滑肌细胞有相当明显的作用,进而影响造血干细胞的发育过程。Trista<sup>[41]</sup>的研究证明血流量对造血干细胞发育有很大的影响,而在造血干细胞发育和血流量之间NO是关键的作用因子。Luigi等<sup>[42]</sup>通过从小鼠中分离胚胎干细胞,体外力学加载培养实验,表明生物力学促进胚胎干细胞的造血作用,并且也证明了该过程是通过NO信号通路实现的。Katrin等<sup>[43]</sup>的研究中借助没有心跳的转基因鼠,通过标记造血干细胞的特异性表达抗体(Runx1-lacZ和CD41)追踪造血干细胞在鼠胚胎中的表达,研究证明血液循环对造血干细胞的出现以及分布有决定性的影响。以上结果均表明血液循环过程中,可以通过将血流动力学机械力学信号转导为化学信号进而影响造血干细胞发育,但是由于在体力学研究技术和手段的限制,目前对其力学机械化学信号转导机制的研究还处于摸索阶段,还有待进一步的深入研究。

#### 5 力学作用与血管模式建成和动静脉分化及分子机制

##### 5.1 力学作用与血管模式建成和动静脉分化

在血管初级循环系统建立之后,血流动力学一直是其中的一个重要作用因素,对血管分支的形成和血管结构稳定可能有比较重要的作用。血流动力学在胚胎发育后期血管生成过程中发挥重要作用,

不同的血流大小以及血流模式影响胚胎基因表达,从而调节血管发育<sup>[44]</sup>。血流剪切力被认为是动脉生成的推动力<sup>[45]</sup>,在动脉生成过程中血流剪切力的冲刷让管腔的直径变大,进而满足让更多的血流进入管腔,为后续的发育奠定基础<sup>[46]</sup>。Bianca等<sup>[47]</sup>采用静脉打结导致静脉血流改变的模型,不仅证明血流改变会引起心血管系统发育的畸形,而且这个过程中还会引起*ET-1*、*klf2*以及*enos*基因表达的变化。血管系统发育和后续的血管稳定维持以及动-静脉网络结构的发育中,血流动力学与分子因素相互作用对其进行调控<sup>[48]</sup>。Stefania等<sup>[49]</sup>通过化学药物控制血流动力学的方法,研究血流变化导致的血管发育畸形的分子机理,证明*klf2*作为血流动力学的响应因子通过*mir-126*信号通路与VEGF通路协同作用调节血管生成过程。血流也是维持血管分支的关键因素<sup>[50]</sup>,通过实验的方法<sup>[51]</sup>改变血流动力学会导致血管分支的角度发生变化,而且血流动力学很可能通过改变动脉生成的相关分子信号通路,调节改变最初的血管网络结构和分支角度来最优化整个血液流动系统的<sup>[52]</sup>。

动静脉分化的机制尚存在很大争议,早期认为是血流动力学因素造成了动静脉的差异,血流造成了动脉和静脉的差异并可以改变血管的直径<sup>[53]</sup>。但后来发现动静脉血管的命运决定早在血管发育早期的内皮细胞就确定了<sup>[54]</sup>。而最近的研究表明,尽管基因确定了动静脉分化的早期命运,但是血流动力学因素是后期动静脉分化的决定性因素。Noble等<sup>[55]</sup>采用结扎的方法阻止血流流到鸡胚卵黄囊的部位,制作没有血流的模型。并通过实时录像观察发现,对照组一旦血流出现,动脉和静脉就开始长出出芽,接着连接成网络形成很好血液循环,而在结扎了的组别则不能形成完整的动静脉以及网络结构。后续研究发现随着结扎的程度越深,动静脉分化的程度越差<sup>[56]</sup>,证明血流调节鸡胚卵黄囊动静脉分化以及血管网络结构形成。借助没有心跳的转基因斑马鱼作为研究的对象,发现没有心跳及血液循环的斑马鱼不能形成静脉管腔<sup>[57]</sup>,也不能形成血管功能网络结构<sup>[58]</sup>,循环血流动力学不仅调节血管最初建成以及出芽发育过程,而且对动静脉确定以及其功能网络的构建有决定性的作用。

## 5.2 力学传导分子机制

由于动脉和静脉血管一直处于持续的血液循环系统中,因此内皮层作为血流的直接接触者是感知生物力学、传递信号进而影响血管发育和血管稳态维持主要的承载体。关于血管内皮细胞如何将剪切力等机械刺激信号转化为细胞内的化学信号机制尚未完全明白。许多因子,如受体、离子通道、细胞质膜微囊蛋白、Src、粘着斑激酶(FAK)、G-蛋白、转录因子以及在启动子区域特异的剪切应力响应元件等都与机械力学信号的传导有很大的关系。力学刺激可以直接调节蛋白构象、引起功能开关的启动(如离子信号的开启)或者是改变磷酸化作用的状态,进而引起下游信号通路的改变来施加生理作用。

### 5.2.1 力学诱导的转录激活

内皮细胞基因能够对剪切应力改变做出反应的过程受特定的启动子序列和转录因子的调节,它们分别为含有 12 bp 特异启动子区域序列的剪切应力反应元件(Shear stress response elements, SSREs) 和剪切应力诱导转录因子(Shear stress inducible transcription factor)。自第一个来源于血小板衍生生长因子B(PDGF-B) 启动子的 SSRE被确定后<sup>[59]</sup>,陆续有一些 SSREs 的序列被发现,包括来源于 MCP1、ICAM-1、TGF- $\beta$ 和 eNOS<sup>[60]</sup>等。他们可以结合在 NF-kappa B、NFATp、c-fos 及 c-jun 等特定的因子和蛋白上,通过感受血流剪切应力的变化,调节促血管生长物质如 eNOS、VEGFR2 及血小板内皮细胞粘附分子等的表达量,以改变血管的生长状态。转录因子 *Klf2* 在剪切应力作用下表达显著上调。在小鼠和斑马鱼研究中发现, *Klf2* 的缺失会导致严重的心力衰竭和血管发育畸形<sup>[61]</sup>,说明剪切应力诱导的 *Klf2* 表达调节血管的发育。而细胞外基质弹性力学的改变同样可以通过调节转录因子 *TFII-I*和 *GATA2* 的表达来控制 VEGFR2 的表达,进而影响血管管腔形成和血管生成过程<sup>[62]</sup>。

### 5.2.2 力学信号感受器及信号传导

从细胞结构水平进行分析,粘附受体作为连接胞外基质和细胞骨架的中介是主要的力学信号感受器(表 1)。而内皮细胞骨架由于其对剪切应力快速而特异的力学结构改变,其也是力学信号传导的主要元素。在蛋白水平上, integrins 和粘附受体(包括

PECAM-1、E-selectin, cadherins)不仅可以作为细胞外基质和细胞内细胞骨架的连接纽带,并且还可以在细胞表面形成机械力学相关偶联复合体进行下游信号调节<sup>[63]</sup>。Fibronectin,  $\alpha_5\beta_1$ -integrin 以及胞外基质复合物如凝血酶敏感蛋白(Thrombospondin 1,2)的缺失会导致血管生成和血管重构的失败。

整合素类粘附分子可以通过在特异的粘附位点招募细胞支架复合物和信号分子(如 Shc、Src 和 FAK 等),从而将信号从细胞外传导到细胞内。研究显示 FAK 会影响血管管腔的形成<sup>[64]</sup>,在 FAK-/- 的小鼠中血管发育严重畸形<sup>[65]</sup>,而 FAK 的激活是依赖于整合素类粘附分子的。因此力学刺激可通过整合素类粘附分子激活 FAK 进而影响血管发育。

内皮细胞之间的粘附位点也是力学信号传导的潜在位点。血管内皮细胞钙依粘连蛋白(VE-cadherin)是内皮细胞主要的粘附蛋白,它通过锚定分子连环蛋白( $\beta$ -catenin)与细胞骨架之间相互作用。在老鼠中,VE-cadherin 的缺失会导致严重的血管重塑缺失和 VEGFR2 信号通路的中断<sup>[66]</sup>。周期性剪切应力刺激会促进 VEGFR2、VE-cadherin 以及  $\beta$ -catenin 表达上调,层流剪切应力调控 VEGFR2 及 VEGFR2、VE-cadherin 以及  $\beta$ -catenin 复合体的形成,而这个复合体可以激活下游的 SSRE 依赖的基因转录<sup>[67]</sup>。VE-cadherin 缺失会导致 PDGF-A/SSRE 荧光素酶无活性,而且 VE-cadherin-/- 细胞在层流剪切力作用下 Akt1 和 p38 的磷酸化作用也不会出现。VEGFR2、VE-cadherin 以及  $\beta$ -catenin 复合物在力学信号传导中起到非常重要的作用,且粘附分子是及其关键的力学信号传导元件。

在 PECAM-1-/- 和 VE-cadherin-/- 细胞中肌动蛋白纤维对应力刺激没有响应<sup>[68]</sup>。PI(3)激酶是力学刺激调节  $\alpha_5\beta_3$  整联蛋白包含 C-Src 活性过程中必须的,而 PECAM-1 在 Src 激活中也是必须的,同时在 PI(3)激酶力学信号传递过程中 VE-cadherin 也是不可或缺的因素。粘附分子作为重要的力学信号感受器是另外一个感受器整合素类粘附分子的上游调节因子<sup>[68]</sup>。VEGFR2 的活性依赖于 Src 相关通路的调节,但是 Src 通路在 PECAM-1-/- 和 VE-cadherin-/- 细胞中是缺失的,说明 VEGFR2 是整个通路中的下游调节因子。PECAM-1—VE-cadherin— $\beta$ -catenin—VEGFR2 是在血管发育中内皮细胞非常重要的力学信号通路。

表1 血管发育相关的机械力学信号感应分子

功能	名称	分类
连接细胞骨架和细胞外基质	PECAM-1	粘附分子
	E-selectin	粘附分子
	$\alpha_5\beta_1$ -integrin	粘附分子
建立细胞骨架和细胞之间联系	fibronectin	粘附分子
	VE-cadherin	粘附分子
	PI(3)Kinase	激酶
力学信号转导	FAK	激酶
	$\beta$ -catenin	细胞骨架/TF
	VEGFR2	受体
力学信号转导依赖的信号	PDGF-A	配体
	PDGF-B	配体
	ICAM-1	粘附分子
	<i>KLF2</i>	转录因子
	<i>TFII-I</i>	转录因子
	<i>GATA2</i>	转录因子
	MCP1	趋化因子

## 6 展望

力学因素在个体发育中的作用近年来引起了广泛的关注,但由于研究手段的局限,很难在体内动态跟踪力学因素在个体发育中的作用。血管系统作为一个复杂的系统,随着其发育进程的推进,涉及的力的种类和作用方式更为复杂,因此研究血管发育过程中力学因素的作用仍然还是一个难点。随着高清显微成像系统(如双光子激光共聚焦)和相关软件的开发利用以及能够测定细胞及分子间作用力的原子力显微镜的广泛应用<sup>[69, 70]</sup>,不仅可以在体外进行精确的定量的细胞力学相互作用测定,同时可以在体跟踪细胞运动。基于斑马鱼这种模式生物在心血管发育研究领域的开发和应用<sup>[71, 72]</sup>,利用其胚胎透明的优势进行在体的力学运动观察和计算,建立活体的血管流体力学网络结构;其拥有多种心血管相关的转基因品系进行力学生物学的研究,如使用没有心跳的转基因斑马鱼可以在体的观察血流动力学的改变对血管发育的影响<sup>[57]</sup>,将来发育生物学将向这一新的研究领域迈进。同时更多转基因动物品系的获得和人工突变遗传工程实验动物模型的建立,为力-发育生物学的研究工作提供了宝贵的资源。因此我们有必要抓住这个有利时机,从力学的角度对发育生物学展开系统的研究。

## 参考文献(References):

- [1] Tallquist MD, Soriano P, Klinghoffer RA. Growth factor signaling pathways in vascular development. *Oncogene*, 1999, 18(55): 7917–7932. [DOI](#)
- [2] Ribatti D. Genetic and epigenetic mechanisms in the early development of the vascular system. *J Anat*, 2006, 208(2): 139–152. [DOI](#)
- [3] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 2003, 9(6): 653–660. [DOI](#)
- [4] Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 2000, 407(6801): 242–248. [DOI](#)
- [5] Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*, 1999, 126(14): 3047–3055. [DOI](#)
- [6] Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995, 11: 73–91. [DOI](#)
- [7] Wilting J, Brand-Saberi B, Kurz H, Christ B. Development of the embryonic vascular system. *Cell Mol Biol Res*, 1995, 41(4): 219–232. [DOI](#)
- [8] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 2006, 126(4): 677–689. [DOI](#)
- [9] Yamamoto K, Sokabe T, Watabe T, Miyazono K, Yamashita JK, Obi S, Ohura N, Matsushita A, Kamiya A, Ando

- J. Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells *in vitro*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288(4): 1915–1924. [DOI](#)
- [10] Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, Ohura N, Sokabe T, Kamiya A, Ando J. Proliferation, differentiation, and tubeformation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J Appl Physiol*, 2003, 95(5): 2081–2088. [DOI](#)
- [11] Wang H, Riha GM, Yan SY, Li M, Chai H, Yang H, Yao QZ, Chen CY. Shear stress induces endothelial differentiation from a murine embryonic mesenchymal progenitor cell line. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(9): 1817–1823. [DOI](#)
- [12] Schmelter M, Ateghang B, Helmig S, Wartenberg M, Sauer H. Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducers of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation. *FASEB J*, 2006, 20(8): 1182–1184. [DOI](#)
- [13] Shimizu N, Yamamoto K, Obi S, Kumagaya S, Masumura T, Shimano Y, Naruse K, Yamashita JK, Igarashi T, Ando J. Cyclic strain induces mouse embryonic stem cell differentiation into vascular smooth muscle cells by activating PDGF receptor. *J Appl Physiol*, 2008, 104(3): 766–772. [DOI](#)
- [14] Steinberg MS, Gilbert SF. Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. *J Exp Zool*, 2004, 301(9): 701–706. [DOI](#)
- [15] Krieg M, Arboleda-Estudillo Y, Puech PH, Käfer J, Graner F, Müller DJ, Heisenberg CP. Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(4): 429–436. [DOI](#)
- [16] Drake CJ, Fleming PA. Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo. *Blood*, 2000, 95(5): 1671–1679. [DOI](#)
- [17] Schmidt A, Brixius K, Bloch W. Endothelial Precursor cell migration during vasculogenesis. *Circ Res*, 2007, 101(2): 125–136. [DOI](#)
- [18] Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 1996, 380(6573): 435–439. [DOI](#)
- [19] Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 1995, 376(6535): 62–66. [DOI](#)
- [20] Shoji W, Isogai S, Sato-Maeda M, Obinata M, Kuwada JY. Semaphorin3a1 regulates angioblast migration and vascular development in zebrafish embryos. *Development*, 2003, 130(14): 3227–3236. [DOI](#)
- [21] Chen T, Bai H, Shao Y, Arzigian M, Janzen V, Attar E, Xie Y, Scadden DT, Wang ZZ. SDF-1/CXCR4 signaling modifies the capillary-like organization of human embryonic stem cell-derived endothelium *in vitro*. *Stem Cells*, 2007, 25(2): 392–401. [DOI](#)
- [22] Troyanovsky B, Levchenko T, Månsson G, Matvijenko O, Holmgren L. Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. *J Cell Bio*, 2001, 152(6): 1247–1254. [DOI](#)
- [23] Aase K, Ernkvist M, Ebarasi L, Jakobsson L, Majumdar A, Yi C, Birot O, Ming Y, Kvanta A, Edholm D, Aspenström P, Kissil J, Claesson-Welsh L, Shimono A, Holmgren L. Angiomotin regulates endothelial cell migration during embryonic angiogenesis. *Gene Dev*, 2007, 21(16): 2055–2068. [DOI](#)
- [24] Pinter E, Barreuther M, Lu T, Imhof BA, Madri JA. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) tyrosine phosphorylation state changes during vasculogenesis in the murine conceptus. *Am J Pathol*, 1997, 150(5): 1523–1530. [DOI](#)
- [25] Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviaro F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oosthuyse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the *VE-cadherin* gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*, 1999, 98(2): 147–157. [DOI](#)
- [26] George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes RO. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development*, 1993, 119(4): 1079–1091. [DOI](#)
- [27] Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res*, 2007, 100(6): 782–794. [DOI](#)
- [28] Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*, 2003, 161(6): 1163–1177. [DOI](#)
- [29] Wang D, Anderson JC, Gladson CL. The role of the extracellular matrix in angiogenesis in malignant glioma tumors. *Brain Pathol*, 2005, 15(4): 318–326. [DOI](#)
- [30] Li S, Huang NF, Hsu S. Mechanotransduction in endothe-



- lial cell migration. *J Cell Bio Chem*, 2005, 96(6): 1110–1126. [DOI](#)
- [31] Yeh CR, Chiu JJ, Lee CI, Lee PL, Shih YT, Sun JS, Chien S, Cheng CK. Estrogen augments shear stress-induced signaling and gene expression in osteoblast-like cells via estrogen receptor-mediated expression of  $\beta 1$ -integrin. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(3): 627–639. [DOI](#)
- [32] Loufrani L, Retailleau K, Bocquet A, Dumont O, Danker K, Louis H, Lacolley P, Henrion D. Key role of  $\alpha 1 \beta 1$ -integrin in the activation of pi3-kinase-akt by flow (shear stress) in resistance arteries. *Am J Physiol-Heart C*, 2008, 294(4): H1906–H1913. [DOI](#)
- [33] Goldfinger LE, Tzima E, Stockton R, Kiosses WB, Kinbara K, Tkachenko E, Gutierrez E, Groisman A, Nguyen P, Chien S, Ginsberg MH. Localized  $\alpha 4$  integrin phosphorylation directs shear stress-induced endothelial cell alignment. *Circ Res*, 2008, 103(2): 177–185. [DOI](#)
- [34] Lee DY, Yeh CR, Chang SF, Lee PL, Chien S, Cheng CK, Chiu JJ. Integrin-mediated expression of bone formation-related genes in osteoblast-like cells in response to fluid shear stress: Roles of extracellular matrix, she, and mitogen-activated protein kinase. *J Bone Miner Res*, 2008, 23(7): 1140–1149. [DOI](#)
- [35] Canty EG, Starborg T, Lu YH, Humphries SM, Holmes DF, Meadows RS, Huffman A, O'Toole ET, Kadler KE. Actin filaments are required for fibripositor-mediated collagen fibril alignment in tendon. *J Biol Chem*, 2006, 281(50): 38592–38598. [DOI](#)
- [36] Chiquet M, Reneda AS, Huber F, Fluck M. How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? *Matrix Biol*, 2003, 22(1): 73–80. [DOI](#)
- [37] Nguyen TD, Liang R, Woo SLY, Burton SD, Wu CF, Almarza A, Sacks MS, Abramowitch S. Effects of cell seeding and cyclic stretch on the fiber remodeling in an extracellular matrix-derived bioscaffold. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(4): 957–963. [DOI](#)
- [38] Wang KC, Garmire LX, Young A, Nguyen P, Trinh A, Subramaniam S, Wang NP, Shyy JY, Li YS, Chien S. Role of microRNA-23b in flow-regulation of Rb phosphorylation and endothelial cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(7): 3233–3239. [DOI](#)
- [39] Weinberg EJ, Mack PJ, Schoen FJ, Garcia-Cardena G, Kaazempur Mofrad MR. Hemodynamic environments from opposing sides of human aortic valve leaflets evoke distinct endothelial phenotypes *in vitro*. *Cardiovasc Eng*, 2010, 10(1): 5–11. [DOI](#)
- [40] Gerthoffer WT. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res*, 2007, 100(5): 607–621. [DOI](#)
- [41] North TE, Goessling W, Peeters M, Li PL, Ceol C, Lord AM, Weber GJ, Harris J, Cutting CC, Huang P, Dzierzak E, Zon LI. Hematopoietic stem cell development is dependent on blood flow. *Cell*, 2009, 137(4): 736–748.
- [42] [Adamo](#) L, Naveiras O, Wenzel PL, McKinney-Freeman S, Mack PJ, Gracia-Sancho J, Suchy-Dacey A, Yoshimoto M, Lensch MW, Yoder MC, Garcia-Cardena G, Daley GQ. Biomechanical forces promote embryonic haematopoiesis. *Nature*, 2009, 459 (7250): 1131–1135. [DOI](#)
- [43] Rhodes KE, Gekas C, Wang YL, Lux CT, Francis CS, Chan DN, Conway S, Orkin SH, Yoder MC, Mikkola HKA. The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(3): 252–263. [DOI](#)
- [44] Jones EAV, le Noble F, Eichmann A. What determines blood vessel structure? Genetic prespecification vs. hemodynamics. *Physiology*, 2006, 21(6): 388–395. [DOI](#)
- [45] Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(7): 1143–1151. [DOI](#)
- [46] van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, Hoefler I, Voskuil M, Schaper W. Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res*, 2001, 49(3): 543–553. [DOI](#)
- [47] Groenendijk BCW, Hierck BP, Vrolijk J, Baiker M, Pourquie MJB, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE. Changes in shear stress-related gene expression after experimentally altered venous return in the chicken embryo. *Circ Res*, 2005, 96(12): 1291–1298. [DOI](#)
- [48] le Noble F, Klein C, Tintu A, Pries A, Buschmann I. Neural guidance molecules, tip cells, and mechanical factors in vascular development. *Cardiovasc Res*, 2008, 78(2): 232–241. [DOI](#)
- [49] Nicoli S, Standley C, Walker P, Hurlstone A, Fogarty KE, Lawson ND. MicroRNA-mediated integration of haemodynamics and Vegf signalling during angiogenesis. *Nature*, 2010, 464(7292): 1196–1200. [DOI](#)
- [50] le Noble F, Fleury V, Pries A, Corvol P, Eichmann A, Reneman RS. Control of arterial branching morphogenesis in embryogenesis: go with the flow. *Cardiovasc Res*, 2005, 65(3): 619–628. [DOI](#)
- [51] Bennett SH, Eldridge MW, Zaghi D, Zaghi SE, Milstein JM, Goetzman BW. Form and function of fetal and neonatal pulmonary arterial bifurcations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 279(6): H3047–H3057. [DOI](#)
- [52] Djonov V, Kurz HM, Burri PH. Optimality in the developing vascular system: branching remodeling by means of

- intussusception as an efficient adaptation mechanism. *Dev Dyn*, 2002, 224(4): 391–402. [DOI](#)
- [53] Murray CD. The physiological principle of minimum work 1: The vascular system and the cost of blood volume. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1926, 12(3): 207–214. [DOI](#)
- [54] Zhong TP, Childs S, Leu JP, Fishman MC. Gridlock signaling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature*, 2001, 414(6860), 216–220. [DOI](#)
- [55] le Noble F, Moyon D, Pardanaud L, Yuan L, Djonov V, Matthijsen R, Bréant C, Fleury V, Eichmann A. Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. *Development*, 2003, 131(2): 361–375. [DOI](#)
- [56] Eichmann A, Yuan L, Moyon D, Lenoble F, Pardanaud L, Breant C. Vascular development: from precursor cells to branched arterial and venous networks. *Int J Dev Biol*, 2005, 49(2–3): 259–267. [DOI](#)
- [57] Herbert SP, Huisken J, Kim TN, Feldman ME, Houseman BT, Wang RA, Shokat KM, Stainier DY. Arterial-venous segregation by selective cell sprouting: an alternative mode of blood vessel formation. *Science*, 2009, 326(5950): 294–298. [DOI](#)
- [58] Isogai S, Lawson ND, Torrealday S, Horiguchi M, Weinstein BM. Angiogenic network formation in the developing vertebrate trunk. *Development*, 2003, 130(21): 5281–5290. [DOI](#)
- [59] Resnick N, Collins T, Atkinson W, Bonthron DT, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr. Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(10): 4591–4595. [DOI](#)
- [60] Davis ME, Grumbach IM, Fukai T, Cutchins A, Harrison DG. Shear stress regulates endothelial nitric-oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappaB binding. *J Biol Chem*, 2004, 279(1): 163–168. [DOI](#)
- [61] Lee JS, Yu Q, Shin JT, Sebzda E, Bertozzi C, Chen M, Mericko P, Stadtfeld M, Zhou DE, Cheng L, Graf T, MacRae CA, Lepore JJ, Lo CW, Kahn ML. Klf2 is an essential regulator of vascular hemodynamic forces *in vivo*. *Dev Cell*, 2006, 11(6): 845–857. [DOI](#)
- [62] Mammoto A, Connor KM, Mammoto T, Yung C W, Huh D, Aderman CM, Mostoslavsky G, Smith LEH, Ingber DE. A mechanosensitive transcriptional mechanism that controls angiogenesis. *Nature*, 2009, 457(7233): 1103–1108. [DOI](#)
- [63] Ingber DE. Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Circ Res*, 2002, 91(10): 877–887. [DOI](#)
- [64] Ilic D, Kovacic B, McDonagh S, Jin F, Baumbusch C, Gardner DG, Damsky CH. Focal adhesion kinase is required for blood vessel morphogenesis. *Circ Res*, 2003, 92(3): 300–307. [DOI](#)
- [65] Ilić D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N, Nomura S, Fujimoto J, Okada M, Yamamoto T, Aizawa S. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*, 1995, 377(6549): 539–544. [DOI](#)
- [66] Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oosthuysen B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*, 1999, 98(2): 147–157. [DOI](#)
- [67] Shay-Salit A, Shushy M, Wolfvitz E, Yahav H, Breviario F, Dejana E, Resnick N. VEGF receptor 2 and the adherens junction as a mechanical transducer in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(14): 9462–9467. [DOI](#)
- [68] Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, Cao GY, DeLisser H, Schwartz MA. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature*, 2005, 437(7057): 426–431. [DOI](#)
- [69] Keller PJ, Schmidt AD, Wittbrodt J, Stelzer EH. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy. *Science*, 2008, 322(5904): 1065–1069. [DOI](#)
- [70] Puech PH, Taubenberger A, Ulrich F, Krieg M, Muller DJ, Heisenberg CP. Measuring cell adhesion forces of primary gastrulating cells from zebrafish using atomic force microscopy. *J Cell Sci*, 2005, 118(Pt 18): 4199–4206. [DOI](#)
- [71] Stoletov K, Fang LH, Choi SH, Hartvigsen K, Hansen LF, Hall C, Pattison J, Juliano J, Miller ER, Almazan F, Crosier P, Witztum JL, Klemke RL, Miller YI. Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish. *Circ Res*, 2009, 104(8): 952–960. [DOI](#)
- [72] Bakkars J. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovasc Res*, 2011, 91(2): 279–288. [DOI](#)