

# 自噬干预对低剪切应力下血管内皮细胞 eNOS 和 ET-1 表达的影响

李小红<sup>1</sup>, 郭凤霞<sup>1,2</sup>, 杨沁<sup>1</sup>, 李荣庆<sup>1</sup>, 赵战芝<sup>1</sup>, 危当恒<sup>1</sup>

(1. 南华大学心血管病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室, 湖南省衡阳市 421001;

2. 菏泽市第二人民医院, 山东省菏泽市 274000)

[关键词] 剪切应力; 自噬; 血管内皮功能; 内皮型一氧化氮合酶; 内皮素 1

[摘要] **目的** 探讨自噬干预对低剪切应力下血管内皮细胞内皮型一氧化氮合酶(eNOS)和内皮素 1(ET-1)表达的影响。**方法** ApoE<sup>-/-</sup>小鼠高脂饮食喂饲 12 周, HE 染色法观察主动脉病理改变, 免疫组织化学法检测自噬标志物 Beclin1、微管相关蛋白轻链 3 II(LC3 II)和 p62 的表达。人脐静脉内皮细胞和新西兰大白兔颈总动脉置于体外灌流系统, 分别以低剪切应力(5 dyne/cm<sup>2</sup>)和正常剪切应力(15 dyne/cm<sup>2</sup>)灌流 1 h, Western blot 检测 Beclin1、LC3 II 和 p62 的表达; 在此基础上, 自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)和自噬激动剂雷帕霉素(rapamycin)孵育低剪切应力处理后的血管内皮细胞和兔颈总动脉 30 min, 观察自噬干预对低剪切应力诱导的 eNOS 和 ET-1 表达的影响。**结果** 动脉粥样硬化斑块中 Beclin1、LC3 II 和 p62 的表达明显增加; 与正常剪切应力组相比, 低剪切应力组 Beclin1、LC3 II 及 p62 的表达明显增加; 雷帕霉素上调低剪切应力下血管内皮细胞以及离体血管 eNOS 的表达, 抑制 ET-1 的表达; 3-MA 则进一步抑制血管内皮细胞以及离体血管 eNOS 的表达, 上调 ET-1 的表达。**结论** 低剪切应力抑制血管内皮细胞自噬从而抑制 eNOS 表达、上调 ET-1 表达, 增强自噬能改善该过程。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Effect of Autophagy Intervention on Vascular Endothelial Cells eNOS and ET-1 Expression Under Low Shear Stress

LI Xiao-Hong<sup>1</sup>, GUO Feng-Xia<sup>1,2</sup>, YANG Qin<sup>1</sup>, LI Rong-Qing<sup>1</sup>, ZHAO Zhan-Zhi<sup>1</sup>, and WEI Dang-Heng<sup>1</sup>

(1. The Institute of Cardiovascular Disease & Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. The Second People Hospital of Heze City, Heze, Shandong 274000, China)

[KEY WORDS] Low Shear Stress; Autophagy; Vascular Endothelial Function; Endothelial Nitric Oxide Synthase; Endothelin-1

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of autophagy intervention on endothelial cells endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and endothelin-1 (ET-1) expression under low shear stress. **Methods** ApoE<sup>-/-</sup> mice were fed with high fat diet for 12 weeks. HE staining was used to detect the pathological changes of aortic sinus. Immunohistochemistry was applied to detect the protein expression of autophagy markers Beclin1, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3II) and p62. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and separated New Zealand rabbits common carotid arteries were placed into an in vivo perfusion system with low shear stress (5 dyne/cm<sup>2</sup>) or normal shear stress (15 dyne/cm<sup>2</sup>) for 1 h, then the expression of Beclin1, LC3II/LC3I and p62 was measured using Western blot. After treated with 5 dyne/cm<sup>2</sup> for 1 h followed with or without rapamycin or 3-methyladenine (3-MA) for 30 min, the expression of eNOS and ET-1 in human vascular endothelial cells and common arteries of New Zealand rabbits was detected. **Results** The expression of Beclin1, LC3II and p62 was significantly increased in atherosclerotic plaque. Compared with 15 dyne/cm<sup>2</sup> treatment group, the expression of Beclin1, LC3II and p62 was significantly increased in 5 dyne/cm<sup>2</sup> treatment group ( $P < 0.05$ ). The autophagy inducer rapamycin up-regulated the eNOS expression and inhibited the ET-1 expression in both 5 dyne/cm<sup>2</sup> treated HUVEC

[收稿日期] 2014-06-09

[基金项目] 国家自然科学基金(81370378, 81100214)及湖南省高层次卫生人才“225”工程培养项目资助

[作者简介] 李小红, 硕士研究生, 主要从事动脉粥样硬化发病机制及其防治的研究, E-mail 为 lixiaohong01@126.com。通讯作者危当恒, 博士, 教授, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制及其防治, E-mail 为 weizhonghua99@126.com。

and common carotid arteries, whereas autophagy inhibitor 3-MA further inhibited eNOS expression and increased the ET-1 expression.

**Conclusion** The inhibition of autophagy might contribute to the decreased expression of eNOS and the increased expression of ET-1 under low shear stress, which was improved by promoting autophagy.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是发生于大中型动脉的一种病理改变,是心脑血管疾病的主要病理学基础,可导致脑卒中、心肌梗死、缺血性肾病和间歇性跛行等严重后果,严重危害人类的健康。新近的研究发现,As 斑块中存在血管细胞自噬 (autophagy)<sup>[1]</sup>。自噬是细胞在自噬相关基因 (autophagy associated gene, ATG) 的调控下利用溶酶体降解细胞内受损的细胞器以及衰老的大分子物质的过程,是细胞成分更新及组织重塑重要的调控机制。临床观察发现,As 的发生部位具有显著的局灶性,主要发生于动脉的分叉、分支等在血液湍流和低流体剪切应力的区域<sup>[2]</sup>。我们的前期研究发现,层流剪切应力上调血管内皮细胞自噬流 (autophagy flux),上调血管内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 并抑制内皮素 1 (endothelin-1, ET-1) 的表达<sup>[3]</sup>。本研究我们将进一步探讨自噬干预对低剪切应力下血管内皮细胞 eNOS 以及 ET-1 表达的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及主要试剂

人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 购自中科院上海细胞生物所细胞中心。新西兰大白兔,体重约 2 kg,购自南华大学动物部。高糖 DMEM 培养基、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 封闭液、3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA) 和雷帕霉素 (rapamycin) 购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 公司。ReverAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 购自于 Invitrogen (Carlsbad, USA)。多克隆兔抗 p62、Beclin1、微管相关蛋白轻链 3 II (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3 II)、血管内皮细胞内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、内皮素 1 (endothelin-1, ET-1) 和  $\beta$ -actin 购自于 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)。

### 1.2 实验动物分组

健康雄性 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠 20 只,8 周龄,体重约 30 g,购自北京大学实验动物中心。适应性喂养 1 周后,随机分为两组,其中对照组 10 只于 0 周处死,实验组 10 只高脂饮食 (碳水化合物 25%,蛋白质 9%,脂肪 66%) 喂饲 12 周处死。

### 1.3 HE 染色

切片固定 1 min,蒸馏水洗;染苏木素 3~5 min,蒸馏水洗;1% 盐酸酒精分化 1~2 s;自来水冲洗返蓝 30 min;0.5% 伊红染色 10~20 s,蒸馏水洗;脱水,透明,中性树胶封片;显微镜观察拍照。

### 1.4 免疫组织化学染色

冰冻切片室温风扇吹干,10% 的福尔马林固定 30 min;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温浸泡 30 min;蒸馏水洗 2 min × 2 次;用 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 (pH6.0) 进行热修复抗原;滴加 5% BSA 封闭液,室温 20 min,甩去多余液体,不洗;孵育一抗 (兔 IgG) (1:100) (PBS 稀释),37℃ 1~2 h 或 4℃ 过夜,PBS 洗 2 min × 3 次;孵育二抗 (生物素化山羊抗兔 IgG),室温 20 min,PBS 洗 2 min × 3 次;滴加试剂 SABC,室温 20 min PBS 洗 5 min × 4 次;DAB 显色:使用 DAB 显色试剂盒,取 1 mL 蒸馏水,加入 A、B、C 试剂各一滴,混匀后加至切片。室温显色,镜下控制反应时间,蒸馏水洗涤。苏木素轻度复染 2 min;1% 盐酸酒精分色数秒;自来水冲洗返蓝;稍干后滴加水溶性封片剂封片;显微镜观察拍照。

### 1.5 人血管内皮细胞培养及兔颈总动脉获取

HUVEC 用高糖 DMEM 培养基 (含 100 kU/L 青-链霉素 + 10% 胎牛血清) 于细胞培养箱中 (条件 37℃、5% CO<sub>2</sub>) 静置培养。待细胞生长至瓶底 80%~85% 左右进行实验。每次实验前 6 h 更换新鲜的无血清培养基使细胞获得同步化生长,然后加处理因素进行实验。

将新西兰大白兔固定于兔台,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,仰卧位,颈部除毛,络合碘消毒,颈部正中剪开皮肤,分离肌群,暴露颈动脉鞘,分离出左、右颈总动脉。

### 1.6 体外灌流系统

该实验装置由动力源、上液池、流动腔和下液池通过硅胶管连接而形成的一个循环模拟系统<sup>[3]</sup>。血管内皮细胞灌流系统剪切应力 ( $\tau_w$ ) =  $6 \mu Q / bh^2$ ,  $\mu$  表示流体的粘滞度,  $Q$  代表流速,  $b$  代表流室的宽度,  $h$  代表流经的高度<sup>[4]</sup>。离体血管剪切应力  $\tau_w = 32 \mu Q / \pi d^3$ ,  $\mu$  代表流体的粘滞度,  $Q$  代表流速,  $d$  是血管直径<sup>[5]</sup>。分别以 5、15 dyne/cm<sup>2</sup> 的剪切应力灌流 1 h,再用自噬激动剂雷帕霉素或自噬抑制剂 3-MA 处理 30 min。

### 1.7 RT-PCR

提取总 RNA,取 2  $\mu\text{g}$  RNA 使用 ULtraSYBR Two StepqRT-PCR Kit 逆转录试剂盒进行逆转录。取 cDNA 2  $\mu\text{g}$  在实时定量 PCR 系统中 (Biosystems) 进行 PCR 反应,用来检测 Beclin1、LC3II、eNOS 以及 ET-1 的 mRNA 水平。引物序列如下:Beclin1 上游引物 5'-CAAGATC-CTGGACCGTGTCA-3',下游引物 5'-TGGCACTTCTGTGGACATCA-3';LC3 上游引物 5'-GCCTTCTCCTGCTGCTGAAC-3',下游引物 5'-AGCCGTCCTCGTCTTCTCC-3';eNOS 上游引物 5'-GCCAGAGCAGCACAAGAGTT-3',下游引物 5'-ACGAGCAAAGGCACAGAAGT-3';ET-1 上游引物 5'-CACCTGTCTCCTTGGCTTC-3',下游引物 5'-AAAATCGTTGCGTGGACTCT-3'; $\beta$ -actin 上游引物 5'-GCCAACACAGTGTCTGTCTGG-3',下游引物 5'-GCTCAGGAGCAATGATCTTG-3',采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法对结果进行分析。

### 1.8 Western blot

提取总蛋白,取 40  $\mu\text{g}$  进行电泳,转膜、5% BSA 封闭,孵育一抗: BCL-1 (1: 500)、LC3 II (1: 1000)、p62 (1: 1000)、eNOS (1: 1000)、ET-1 (1: 1000)、 $\beta$ -actin (1: 500),TBST 洗膜 10 min  $\times$  4 次;孵育相应二抗,TBST 洗膜 10 min  $\times$  4 次。加入 ECL 发光剂,成像系统中记录并分析结果。

### 1.9 统计学方法

实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用  $t$  检验以及方差分析等统计学分析方法, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义,采用 GraphPad Prism 5 软件作统计图。

## 2 结果

### 2.1 As 斑块中自噬相关基因的表达

ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠高脂饮食喂养 0 和 12 周后,取主动脉窦部作冰冻切片,HE 染色法观察病理改变,免疫组织化学法检测自噬标志物 Beclin1 和 LC3 II 以及 p62 的表达,结果表明自噬相关基因 Beclin1、LC3

II 和 p62 在 As 斑块中含量明显增加 (图 1)。

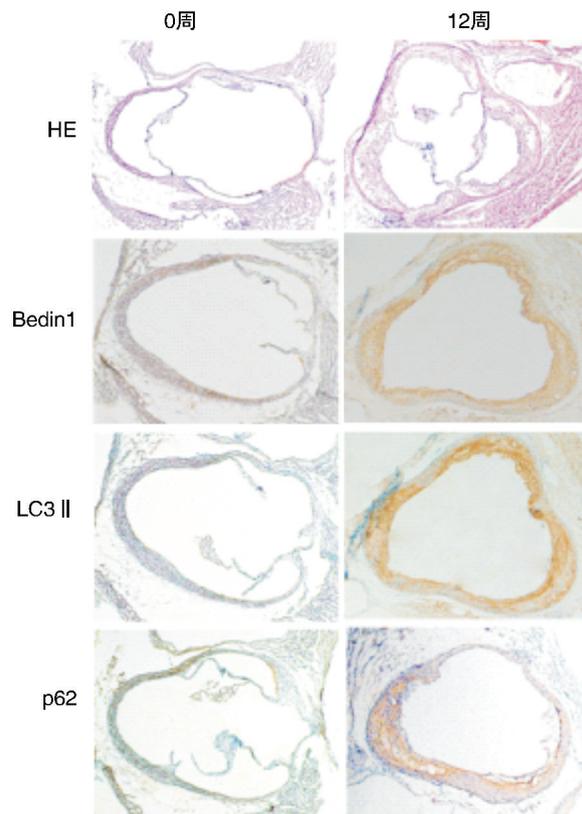


图 1. 小鼠主动脉 HE 染色结果及 As 斑块中自噬相关基因表达

Figure 1. HE staining results of mice and autophagy related gene Beclin1, LC3 II and p62 expression in atherosclerotic plaque

### 2.2 低剪切应力抑制血管内皮细胞自噬

低剪切应力 (5 dyne/cm<sup>2</sup>) 和正常剪切应力 (15 dyne/cm<sup>2</sup>) 处理人脐静脉内皮细胞 1 h 后,Western blot 检测自噬体标记物 Beclin1 和 LC3II 的蛋白表达情况。与正常剪切应力组相比,低剪切应力组自噬标记物 Beclin1 以及 LC3II/LC3I 比值明显降低,而自噬障碍标记物 p62 的蛋白水平明显增加 (图 2)。

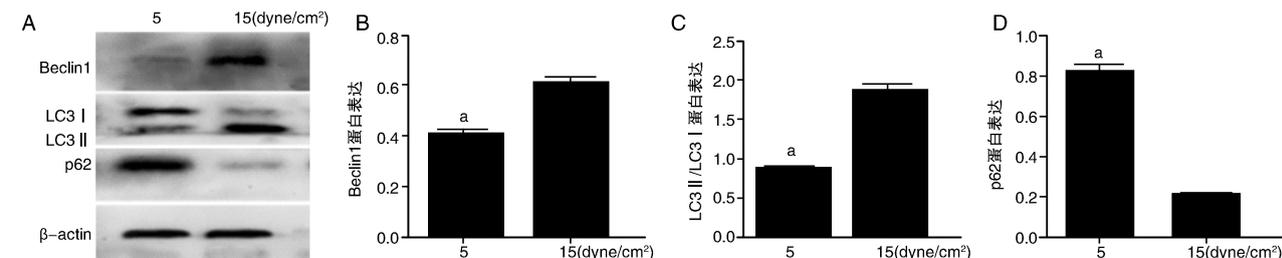


图 2. 低剪切应力抑制血管内皮细胞自噬 ( $n = 3$ ) A 为不同剪切应力下自噬相关基因 Beclin1、LC3 及 p62 表达的 Western blot 检测,B 为 Beclin1 表达的统计图,C 为 LC3II/LC3I 比值的统计图,D 为 p62 表达的统计图;a 为  $P < 0.05$ ,与正常剪切应力 (15 dyne/cm<sup>2</sup>) 组相比。

Figure 2. Endothelial cells autophagy was inhibited by low shear stress ( $n = 3$ )

### 2.3 自噬干预对低剪切应力下血管内皮细胞 eNOS 表达的影响

为了进一步探讨自噬是否影响低剪切应力下血管内皮细胞 eNOS 的表达,我们采用 5 dyne/cm<sup>2</sup>

剪切应力处理 HUVEC 后,再分别用自噬激动剂雷帕霉素和抑制剂 3-MA 孵育 30 min,结果表明在 5 dyne/cm<sup>2</sup> 剪切应力处理下,雷帕霉素上调 eNOS 的表达,3-MA 抑制 eNOS 的表达(图 3)。

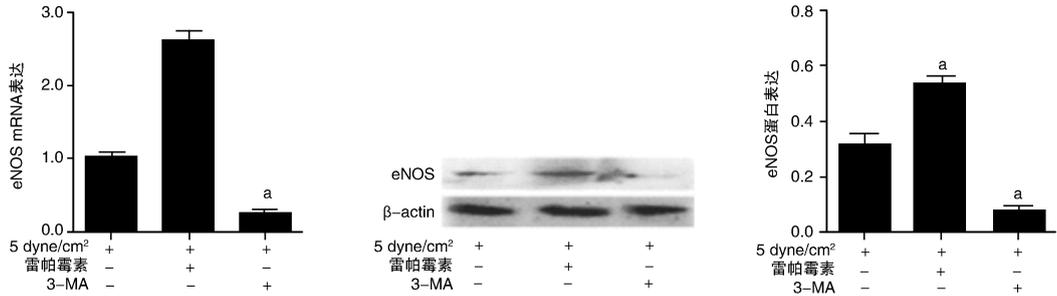


图 3. 自噬干预对低剪切应力下血管内皮细胞 eNOS mRNA (左) 和蛋白 (中和右) 表达的影响 ( $n=3$ ) a 为  $P<0.05$ , 与低剪切应力组比较。

Figure 3. The effect of autophagy intervention on endothelial cells eNOS expression under low shear stress ( $n=3$ )

### 2.4 自噬干预对低剪切应力下血管内皮细胞 ET-1 表达的影响

低剪切应力(5 dyne/cm<sup>2</sup>)处理 HUVEC 1 h,再分

别用自噬激动剂雷帕霉素和抑制剂 3-MA 孵育 30 min。实验结果表明雷帕霉素抑制低剪切应力下 ET-1 的表达,而 3-MA 则进一步上调 ET-1 的表达(图 4)。

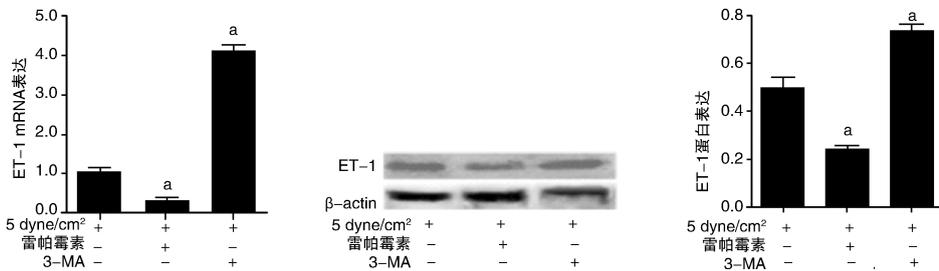


图 4. 自噬干预对低剪切应力下血管内皮细胞 ET-1 mRNA (左) 和蛋白 (中和右) 表达的影响 ( $n=3$ ) a 为  $P<0.05$ , 与低剪切应力组比较。

Figure 4. The effect of autophagy intervention on endothelial cells ET-1 expression under low shear stress ( $n=3$ )

### 2.5 自噬干预对低剪切应力下离体血管 eNOS 表达的影响

为了进一步证明自噬干预对低剪切应力下血管内皮细胞 eNOS 表达的影响,我们分离新西兰大白兔颈总动脉,5 dyne/cm<sup>2</sup> 层流剪切应力处理离体

血管 1 h,再分别给予自噬激动剂雷帕霉素或自噬抑制剂 3-MA 孵育 30 min。与前面细胞学实验结果相似,雷帕霉素上调灌流血管 eNOS 的表达,而 3-MA 则进一步抑制灌流血管 eNOS 的表达(图 5)。

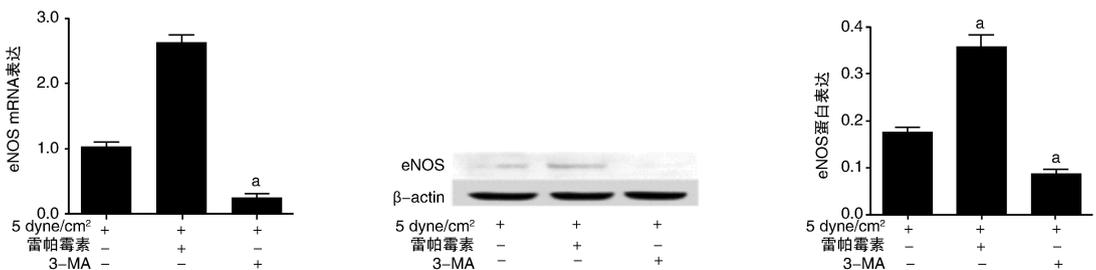


图 5. 自噬干预对低剪切应力下离体血管 eNOS mRNA (左) 和蛋白 (中和右) 表达的影响 ( $n=3$ ) a 为  $P<0.05$ , 与低剪切应力组比较。

Figure 5. The effect of autophagy intervention on vessel eNOS expression under low shear stress ( $n=3$ )

## 2.6 自噬干预对低剪切应力下离体血管 ET-1 表达的影响

低剪切应力(5 dyne/cm<sup>2</sup>)处理离体血管 1 h,再

分别用雷帕霉素或 3-MA 孵育 30 min,结果表明雷帕霉素抑制低剪切应力下离体血管 ET-1 的表达,而 3-MA 则上调 ET-1 的表达(图 6)。

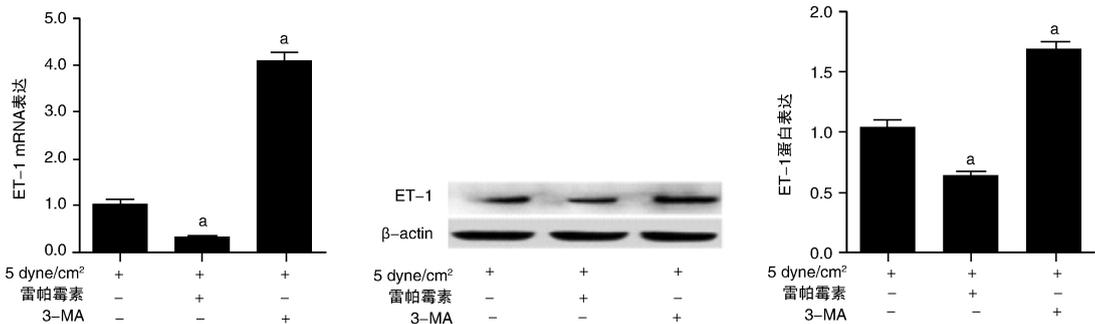


图 6. 自噬干预对低剪切应力下离体血管 ET-1 mRNA (左) 和蛋白 (中和右) 表达的影响( $n=3$ ) a 为  $P < 0.05$ , 与低剪切应力组比较。

Figure 6. The effect of autophagy intervention on vessel ET-1 expression under low shear stress( $n=3$ )

## 3 讨论

动脉粥样硬化的发生发展是一个多步骤、多因素、多因子参与的慢性炎症过程<sup>[6]</sup>。血流剪切应力直接作用于血管内皮细胞,调节血管内皮细胞的形态、结构和功能,在动脉粥样硬化和动脉瘤等心血管疾病的发生、发展和临床预后中具有重要的作用<sup>[7]</sup>。

我们的前期研究表明,层流剪切应力上调血管内皮细胞的自噬,然而是否可以通过干预自噬来调节血管内皮细胞的功能尚不清楚。研究表明,细胞自噬通过降解受损的细胞器或衰老的蛋白质,进而转化成小分子物质,供机体重新吸收和利用,从而促进和维持细胞在氧化应激或营养物质匮乏的环境下存活,调节着细胞的生存和死亡过程<sup>[8]</sup>。细胞自噬过程包括四个阶段:双层膜的形成、自噬体的形成、自噬体和溶酶体融合形成自噬溶酶体、自噬溶酶体的降解。近来的研究表明,自噬与动脉粥样硬化密切相关<sup>[1,9]</sup>。研究表明 ATG5 基因敲除小鼠出现了严重的动脉粥样硬化病变<sup>[10]</sup>。他汀类药物通过增强冠状动脉肌细胞自噬抑制动脉粥样硬化的发生发展<sup>[11]</sup>。我们的实验表明 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠动脉粥样硬化病变中自噬相关基因 Beclin1 和 LC3 II 的表达增加,而 p62 的表达也增加,说明在动脉粥样硬化的发生发展过程中自噬膜和自噬体的形成增加而自噬溶酶体的降解减少,自噬晚期出现了障碍。

研究表明,低剪切应力与动脉粥样硬化早期病变之间密切相关。在本实验中,我们发现与正常剪切应力(15 dyne/cm<sup>2</sup>)组相比,低剪切应力组自噬标

记物 Beclin1 的表达以及 LC3 II/LC3 I 明显降低,而 p62 的表达明显增加,说明低剪切应力(5 dyne/cm<sup>2</sup>)抑制内皮细胞自噬。

血管内皮细胞中 NO 的生成受损是内皮功能紊乱的重要标志,而且还会促进心血管疾病的发生和发展。NO 的生成主要受 eNOS 的影响。LaRocca 等<sup>[12]</sup>发现细胞自噬受损会导致内皮依赖性舒张功能障碍,而且抑制细胞自噬会促进氧化应激并减少 NO 的生成。ET-1 是目前最强的血管收缩物质,还是血管内皮细胞功能的标记物,上调 ET-1 的表达可损伤内皮细胞,从而导致内皮细胞功能障碍。过表达 ET-1 小鼠表现出内皮细胞功能障碍、血管重塑、氧化应激以及炎症的特征<sup>[13]</sup>。在本实验中,为了进一步探讨自噬干预对低剪切应力下 eNOS 和 ET-1 表达的影响,我们给予低剪切应力处理后的内皮细胞和离体血管自噬抑制剂 3-MA 和激动剂雷帕霉素孵育。雷帕霉素是 Ser/Thr 蛋白激酶抑制剂,在血管病变移植以及支架内再狭窄中发挥抗增殖以及保护作用<sup>[14,15]</sup>。在我们的实验中,我们发现自噬抑制剂 3-MA 进一步抑制低剪切应力下血管内皮细胞及离体血管 eNOS 的表达,上调 ET-1 的表达;而自噬激动剂雷帕霉素上调低剪切应力下血管内皮细胞及离体血管 eNOS 的表达,抑制 ET-1 的表达。由此提示,自噬干预影响低剪切应力下血管内皮细胞及离体血管 eNOS 及 ET-1 的表达,特别是自噬激动剂上调低剪切应力下血管细胞及离体血管 eNOS 而下调 ET-1 的表达,这将为动脉粥样硬化的防治提供新的策略。

## [参考文献]

- [1] Schrijvers DM, De Meyer GR, Martinet W. Autophagy in atherosclerosis: a potential drug target for plaque stabilization [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(12): 2 787-791.
- [2] Dhawan SS, Avati Nanjundappa RP, Branch JR, et al. Shear stress and plaque development [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2010, 8(4): 545-556.
- [3] Guo F, Li X, Peng J, et al. Autophagy regulates vascular endothelial cell eNOS and ET-1 expression induced by laminar shear stress in an ex vivo perfused system [J]. *Ann Biomed Eng*, 2014, 42(9): 1 978-988.
- [4] Viegas KD, Dol SS, Salek MM, et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* adhesion to human umbilical vein endothelial cells demonstrates wall shear stress dependent behavior [J]. *Biomed Eng Online*, 2011, 10: 20.
- [5] Yamawaki H, Lehoux H, Berk BC. Chronic physiological shear stress inhibits tumor necrosis factor-induced proinflammatory responses in rabbit aorta perfused ex vivo [J]. *Circulation*, 2003, 108(13): 1 619-625.
- [6] 杨永宗. 动脉粥样硬化性心血管病基础与临床[M]. 北京: 科学出版社, 2009; 537-551.
- [7] 危当恒, 王贵学. 血流剪切应力与动脉粥样硬化[J]. *中南医学科学杂志*, 2012, 40(3): 217-222.
- [8] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular selfdigestion [J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1 069-075.
- [9] Martinet W, De Meyer GR. Autophagy in atherosclerosis: a cell survival and death phenomenon with therapeutic potential [J]. *Circ Res*, 2009, 104(3): 304-317.
- [10] Razani B, Feng C, Coleman T, et al. Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression [J]. *Cell Metab*, 2012, 15(4): 534-544.
- [11] Wei YM, Li X, Xu M, et al. Enhancement of autophagy by simvastatin through inhibition of Rac1-mTOR signaling pathway in coronary arterial myocytes [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 31(6): 925-937.
- [12] LaRocca TJ, Henson GD, Thorburn A, et al. Translational evidence that impaired autophagy contributes to arterial ageing [J]. *J Physiol*, 2012, 590(Pt14): 3 305-316.
- [13] Li MW, Mian MO, Barhoumi T, et al. Endothelin-1 overexpression exacerbates atherosclerosis and induces aortic aneurysms in apolipoprotein e knockout mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(10): 2 306-315.
- [14] Zago AC, Raudales JC, Attizzani G, et al. Local delivery of sirolimus nanoparticles for the treatment of in-stent restenosis [J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2013, 81(2): E124-129.
- [15] Corbin F, Blaise GA, Parent M, et al. Effect of rapamycin on rat aortic ring vasomotion [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1994, 24(5): 813-817.

(此文编辑 许雪梅)