

西罗莫司经利阿诺定受体 2 途径诱导血管内皮细胞钙超载

袁玲, 聂卫, 高萍, 李昕, 刘伟伟, 崔晓雪

(天津市医药科学研究所病理室, 天津市 300020)

[关键词] 西罗莫司; 利阿诺定受体; 血管内皮细胞; 钙超载

[摘要] **目的** 观察西罗莫司造成血管内皮钙超载引起细胞损伤并探讨其相关机制。**方法** 在西罗莫司处理和利阿诺定稳定利阿诺定受体通道的情况下, 采用 MTT 法检测人脐静脉内皮细胞(HUVEC)细胞存活率, HE 染色观察细胞形态, 一氧化氮(NO)检测试剂盒测定培养液 NO 含量, Ca^{2+} 敏感的荧光染料 Fluo-3 AM 标记胞质 Ca^{2+} , 分别采用流式细胞仪分析和激光共聚焦显微镜观察细胞内 Ca^{2+} 水平, JC-1 荧光探针检测线粒体膜电位, Annexin V-FITC/PI 染色法检测细胞凋亡率。**结果** 西罗莫司能降低细胞存活率($P < 0.01$)。西罗莫司 500 nmol/L 刺激 24 h 后, HE 染色发现细胞肿胀, 核固缩、核碎裂及胞浆空泡; NO 含量降低, 细胞内 Ca^{2+} 含量增高, 线粒体膜电位降低, 细胞凋亡率增加(P 均 < 0.01)。与西罗莫司 500 nmol/L 组相比, 利阿诺定 50 $\mu\text{mol/L}$ 干预组细胞存活率明显增加($P < 0.01$), 细胞内 Ca^{2+} 含量降低($P < 0.05$), 细胞培养液 NO 含量由 $28.33 \pm 4.18 \mu\text{mol/L}$ 增至 $47.03 \pm 3.87 \mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$), 线粒体膜电位水平由 0.24 ± 0.03 增至 0.45 ± 0.04 ($P < 0.01$), 细胞凋亡率由 $43.3\% \pm 2.0\%$ 降至 $30.7\% \pm 0.9\%$ ($P < 0.01$)。**结论** 西罗莫司可能通过内质网利阿诺定受体途径增加细胞内 Ca^{2+} 水平, 造成钙超载和线粒体损害, 继而引起细胞凋亡。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Sirolimus Induced Calcium Overload in Vascular Endothelial Cells via Ryanodine Receptor Pathway

YUAN Ling, NIE Wei, GAO Ping, LI Xin, LIU Wei-Wei, and CUI Xiao-Xue

(Pathological Department of Tianjin Institute of Medical Science, Tianjin 300020, China)

[KEY WORDS] Sirolimus; Ryanodine Receptor; Vascular Endothelial Cells; Calcium Overload

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect and discuss its potential mechanism of sirolimus induced calcium overload and apoptosis in vascular endothelial cells. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were exposed to sirolimus with or without intervention treatment with ryanodine. Effects on cell viability were assessed by the MTT assay. Effects on the production of nitric oxide (NO) were detected by nitric oxide assay kit. The intracellular calcium ion (Ca^{2+}) concentration was assayed with Fluo-3 AM staining, changes of mitochondrial membrane potential were detected by JC-1 fluorescence labeling, HUVEC apoptosis rate was analyzed by Annexin V FITC/PI staining. **Results** Compared with the normal control group, the cell survival rate was decreased significantly in the treatments of sirolimus injury group ($P < 0.01$). In sirolimus 500 nmol/L injury group, cell swelling, cytoplasm vacuoles, part of the nucleus pyknosis, nuclear fragmentation were observed by HE staining, levels of intracellular free Ca^{2+} and cell apoptosis rate were increased ($P < 0.01$), levels of NO and mitochondrial membrane potential were reduced ($P < 0.01$). The intervention treatments, ryanodine, significantly reduced the sirolimus 500 nmol/L treatment-induced Ca^{2+} ($P < 0.05$) and cell apoptosis ($43.3\% \pm 2.0\%$ reduced to $30.7\% \pm 0.9\%$, $P < 0.01$). Ryanodine also increased the sirolimus-treated cells' viability ($P < 0.01$), production of NO ($28.33\% \pm 4.18 \mu\text{mol/L}$ increased to $47.03 \pm 3.87 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$) and the level of mitochondrial membrane potential (0.24 ± 0.03 increased to 0.45 ± 0.04 , $P < 0.01$). **Conclusion** The possible mechanism of sirolimus induced calcium overload and apoptosis in HUVEC might be related to the increase of intracel-

[收稿日期] 2015-05-15

[修回日期] 2015-07-27

[基金项目] 天津市卫生局科技基金项目(2013KY37)

[作者简介] 袁玲, 硕士, 助理研究员, 主要从事药物毒理、病理以及医疗器械安全性评价研究, E-mail 为 1128sun@163.com。聂卫, 副主任技师, 主要从事药物毒理、病理以及医疗器械安全性评价研究。高萍, 副研究员, 主要从事医疗器械安全性评价研究。

lular Ca^{2+} via ryanodine receptor pathway.

血管内皮的完整性和功能健全是防止血小板聚集和血栓形成的关键,多种病理因素会损害内皮,引起其功能障碍,如动脉粥样硬化^[1]以及冠状动脉介入术等。西罗莫司是一种哺乳动物雷帕霉素靶点(mTOR)抑制剂,作为药物洗脱支架常用的载药成分,用以冠状动脉介入术后狭窄的预防。西罗莫司洗脱支架局部药物释放可能导致内膜巨噬细胞聚集,损害血管内皮,继而引起血栓事件^[2-3],其临床应用因此受到限制。

尽管西罗莫司的主要作用机制是通过抑制mTOR,目前尚不清楚其是否也通过其它机制引起血管内皮损伤。有研究表明西罗莫司能通过特异结合FK506结合蛋白(FK506-binding protein, FKBP),形成西罗莫司-FKBP复合体,使FKBP从钙释放通道RyR2上解离,RyR2通道开放,钙释放随之产生^[4],细胞内 Ca^{2+} 增加可激活多种钙依赖性蛋白激酶,通过介导不同信号通路导致内皮损伤,而阻断 Ca^{2+} 漏出可抵消西罗莫司的作用^[5]。本研究通过检测HUVEC在西罗莫司处理和利阿诺定稳定RyR2受体通道^[6]的情况下细胞内钙含量、线粒体膜电位及细胞凋亡变化情况等来衡量内皮细胞损害并探索其机制。

1 材料和方法

1.1 药物、试剂和仪器

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)及完全培养液(HUVEC-004)购自美国AllCells公司;0.25% Trypsin-EDTA (1X)购自Gibco公司;AnnexinV-FITC/PI凋亡检测试剂盒购自BD公司;线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)购自碧云天公司;西罗莫司、利阿诺定购自美国Santa Cruz公司;MTT购自美国Amresco公司;钙离子荧光探针Fluo-3 AM、嵌段式聚醚F-127(Pluronic 127)购自美国Biotium公司;一氧化氮(nitric oxide, NO)测定试剂盒购自南京建成生物工程所,激光共聚焦显微镜专用培养皿购自美国MatTek公司。 CO_2 细胞培养箱(美国Thermo公司),倒置显微镜(日本Nikon公司),多功能酶标仪(瑞士Tecan公司),流式细胞仪(美国BD公司),激光共聚焦显微镜(德国Leica公司)。

1.2 细胞培养及MTT检测细胞存活率

将细胞培养于完全培养液,置于37℃、5% CO_2 及

饱和湿度的细胞培养箱中培养,细胞贴壁并生长至80%汇合以上时,用0.25%胰酶-EDTA消化传代。将对数生长期的细胞用0.25%胰酶-EDTA消化制成单细胞悬液,将细胞按每孔 5×10^3 个接种于96孔板,实验分组:①正常对照组:磷酸盐缓冲液处理;②西罗莫司组:分别给予西罗莫司62.5、125、250及500 nmol/L处理细胞24 h;③西罗莫司+利阿诺定组:分别给予西罗莫司500 nmol/L+利阿诺定25、50或100 $\mu\text{mol/L}$ 处理细胞24 h。按上述分组处理后,每孔加入MTT试剂10 μL ,继续培养4 h,吸去上清,加入150 μL DMSO,振荡10 min,酶标仪测定570 nm处的吸光度(absorbance, A)值。仅加入150 μL DMSO的孔作为空白对照。细胞存活率(%) = $(A_{\text{加药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{正常对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。每组设置6个复孔,实验重复3次。同时筛选出西罗莫司和利阿诺定适宜浓度进行后续实验。

1.3 HE染色观察细胞损伤形态的变化

将细胞按每孔 5×10^4 个接种于6孔板,分为正常对照组、西罗莫司500 nmol/L组和西罗莫司500 nmol/L+利阿诺定50 $\mu\text{mol/L}$ 组,各组处理24 h后,吸弃上清液,PBS洗涤细胞2次,乙醇固定10 min,HE染色,倒置显微镜观察并采图。

1.4 细胞培养液NO含量检测

按每孔 5×10^4 个接种于6孔板,分组同1.3,各组处理24 h后,收集细胞培养液,按试剂盒说明,用721型可见光分光光度计测定550 nm的A值。根据所得的A值,计算NO浓度,绘制标准曲线。

1.5 流式细胞仪检测胞质 Ca^{2+} 浓度

将细胞按每孔 5×10^4 个接种于6孔板,分组同1.3,各组处理24 h后,消化细胞制成单细胞悬液,于细胞悬液中加入Fluo-3 AM(终浓度为5 $\mu\text{mol/L}$)及Pluronic 127,37℃孵育30 min,以含钙Hank's平衡盐溶液洗涤3次后,在FACS Calibur流式细胞仪上用FL1通道检测异硫氰酸荧光素绿色荧光(激发波长为488 nm,发射波长为520 nm),Cell Quest程序重复测量3次,并使用FCS Express 4.0软件分析 1×10^4 个细胞的平均荧光强度,结果以各组与正常对照组的荧光比值表示。

1.6 激光共聚焦显微镜观察细胞内 Ca^{2+} 荧光强度变化

将细胞按每孔 5×10^4 个接种于激光共聚焦显微镜专用培养皿,分组同1.3,各组处理24 h后,洗

涤 2 次,加入 Fluo-3 AM(终浓度为 5 μmol/L)及 Pluronic 127,37℃ 孵育 30 min,以含钙 Hank's 平衡盐溶液洗涤 3 次后,室温孵育 20 min 后于激光共聚焦显微镜观察并采图。

1.7 AnnexinV-FITC/PI 染色流式细胞术检测细胞凋亡

将细胞按每孔 5 × 10⁴ 个接种于 6 孔板,分组同 1.3,各组处理 24 h 后,PBS 洗涤细胞 2 次,胰酶消化细胞,离心去上清,并经缓冲液重悬,于 100 μL 细胞悬液中加入 5 μL Annexin V 及 5 μL PI,室温孵育细胞 15 min,再加入 400 μL 缓冲液,尽快用流式细胞仪检测,激发波长 Ex = 488 nm,发射波长 Em = 520 nm。

1.8 JC-1 检测线粒体膜电位

将细胞按每孔 5 × 10⁴ 个接种于 6 孔板,分组同 1.3,各组处理 24 h 后,配制适量的 1 × JC-1 染色缓冲液,弃去培养液,PBS 洗涤 2 次,0.25% 胰酶-EDTA 消化离心,弃上清,PBS 洗涤,加入 0.5 mL JC-1 染色工作液,颠倒数次混匀。细胞培养箱中 37℃ 孵育 20 min。用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次,再用适量 JC-1 染色缓冲液重悬,流式细胞仪检测,线粒体膜电位检测结果用 FL2 与 FL1 红绿荧光强度比值 (FL2/FL1) 表示。

1.9 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验或单因素方差分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 西罗莫司对细胞存活率的影响及利阿诺定的干预效应

西罗莫司 62.5、125、250 及 500 nmol/L 处理 HUVEC 24 h 后,细胞存活率均有不同程度降低,且呈浓度依赖性(*r* = -0.988, *P* < 0.01; 表 1)。西罗莫司 500 nmol/L 处理后细胞存活率为 69.46% ± 3.6%,因此选择 500 nmol/L 作为后续实验浓度。

西罗莫司 500 nmol/L 和不同浓度利阿诺定共同干预 24 h 后,利阿诺定 50 μmol/L 将细胞存活率提高至 87.25% ± 2.48% (*P* < 0.01; 表 2),因此选择 50 μmol/L 作为后续实验浓度。

2.2 西罗莫司处理和利阿诺定干预对细胞形态的影响

HE 染色显示,正常对照组和利阿诺定组细胞呈多角形、单层铺路石样排列;西罗莫司 500 nmol/L 组细胞肿胀,胞浆出现空泡,部分细胞核固缩、核碎裂;西罗莫司 500 nmol/L + 利阿诺定 50 μmol/L 组

细胞基本呈多角形、单层铺路石样排列,少见细胞肿胀及胞浆空泡(图 1)。

2.3 西罗莫司处理和利阿诺定干预对 NO 含量的影响

与正常对照组相比,西罗莫司 500 nmol/L 处理 24 h 细胞培养液 NO 含量降低,而利阿诺定干预后细胞培养液 NO 含量得到一定程度的恢复(表 3)。

表 1. 不同浓度西罗莫司对细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 1. Effect of different concentration sirolimus on HUVEC viability($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分 组	细胞存活率
正常对照组	100% ± 0%
62.5 nmol/L 西罗莫司组	77.64% ± 2.80% ^a
125 nmol/L 西罗莫司组	74.03% ± 3.50% ^a
250 nmol/L 西罗莫司组	72.48% ± 4.10% ^a
500 nmol/L 西罗莫司组	69.46% ± 3.60% ^a

a 为 *P* < 0.05,与正常对照组比较。

表 2. 西罗莫司 500 nmol/L 和不同浓度利阿诺定共同干预对细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 2. Effect of 500 nmol/L sirolimus and different concentration ryanodine on HUVEC viability($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分 组	细胞存活率
正常对照组	100% ± 0%
5 μmol/L 利阿诺定组	96.57% ± 3.72%
50 μmol/L 利阿诺定组	98.07% ± 3.67%
100 μmol/L 利阿诺定组	95.87% ± 2.36%
500 nmol/L 西罗莫司组	69.46% ± 3.60% ^a
500 nmol/L 西罗莫司 + 5 μmol/L 利阿诺定组	70.48% ± 2.56%
500 nmol/L 西罗莫司 + 50 μmol/L 利阿诺定组	87.25% ± 2.48% ^b
500 nmol/L 西罗莫司 + 100 μmol/L 利阿诺定组	88.52% ± 3.14% ^b

a 为 *P* < 0.05,与正常对照组比较;b 为 *P* < 0.05,与 500 nmol/L 西罗莫司组比较。

表 3. 西罗莫司处理和利阿诺定干预对 HUVEC 分泌 NO 的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 3. Effect of sirolimus and ryanodine on NO levels of HUVEC($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分 组	NO 含量(μmol/L)
正常对照组	60.20 ± 3.93
50 μmol/L 利阿诺定组	54.16 ± 3.75
500 nmol/L 西罗莫司组	28.33 ± 4.18 ^a
500 nmol/L 西罗莫司 + 50 μmol/L 利阿诺定组	47.03 ± 3.87 ^b

a 为 *P* < 0.05,与正常对照组比较;b 为 *P* < 0.05,与 500 nmol/L 西罗莫司组比较。

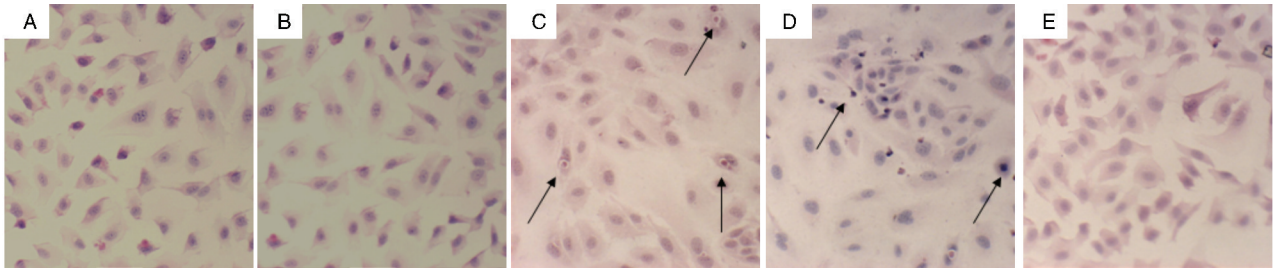


图 1. 西罗莫司处理和利阿诺定干预对细胞形态的影响(×200) A 为正常对照组;B 为利阿诺定组;C 为西罗莫司 500 nmol/L 组, 箭头示胞浆空泡;D 为西罗莫司 500 nmol/L 组,箭头示核固缩、核碎裂;E 为西罗莫司 500 nmol/L + 利阿诺定 50 μmol/L 组。

Figure 1. Effect of sirolimus and ryanodine on cell morphology of HUVEC(×200)

2.4 西罗莫司处理和利阿诺定干预对细胞内 Ca²⁺ 水平的影响

流式细胞仪检测结果显示,与正常对照组相比,西罗莫司 500 nmol/L 处理 24 h 细胞内 Ca²⁺ 水平增高,为正常对照组的 1.38 ± 0.09 倍(*P* <

0.01);利阿诺定 50 μmol/L 干预后细胞内 Ca²⁺ 水平降低,为正常对照组的 1.14 ± 0.07 倍(*P* < 0.05)。激光共聚焦检测各组细胞 Ca²⁺ 水平变化结果如图 2 所示。

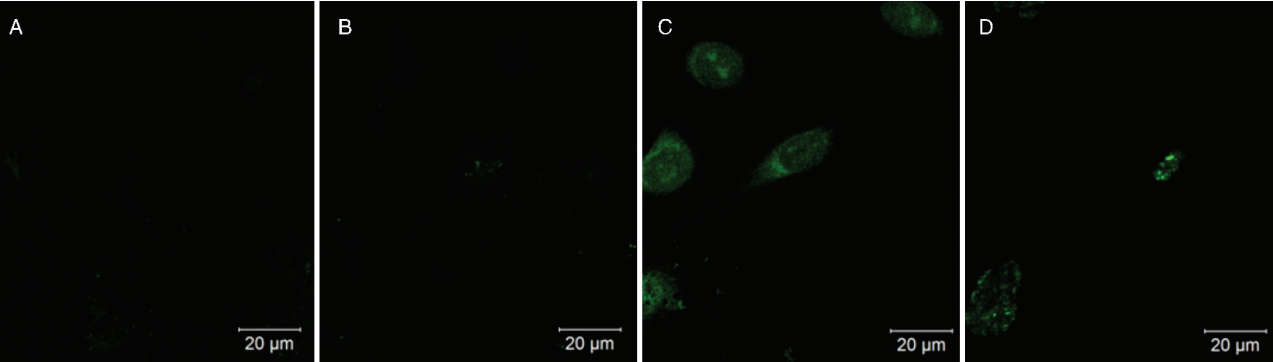


图 2. 西罗莫司处理和利阿诺定干预对细胞内 Ca²⁺ 水平的影响 A 为正常对照组,B 为利阿诺定 50 μmol/L 组,C 为西罗莫司 500 nmol/L 组,D 为西罗莫司 500 nmol/L + 利阿诺定 50 μmol/L 组。

Figure 2. Effect of sirolimus and ryanodine on Ca²⁺ level of HUVEC

2.5 西罗莫司处理和利阿诺定干预对细胞线粒体膜电位的影响

与正常对照组相比,西罗莫司 500 nmol/L 处理 24 h 细胞内线粒体膜电位水平降低(*P* < 0.01);利阿诺定 50 μmol/L 干预后细胞内线粒体膜电位水平有所恢复(*P* < 0.01;表 4)。

2.6 西罗莫司处理和利阿诺定干预对细胞凋亡率的影响

西罗莫司 500 nmol/L 处理 24 h 细胞凋亡率由正常对照组的 27.5% ± 1.8% 增至 43.3% ± 2.0% (*P* < 0.01),利阿诺定 50 μmol/L 干预后细胞凋亡率降至 30.7% ± 0.9% (*P* < 0.01;图 3)。

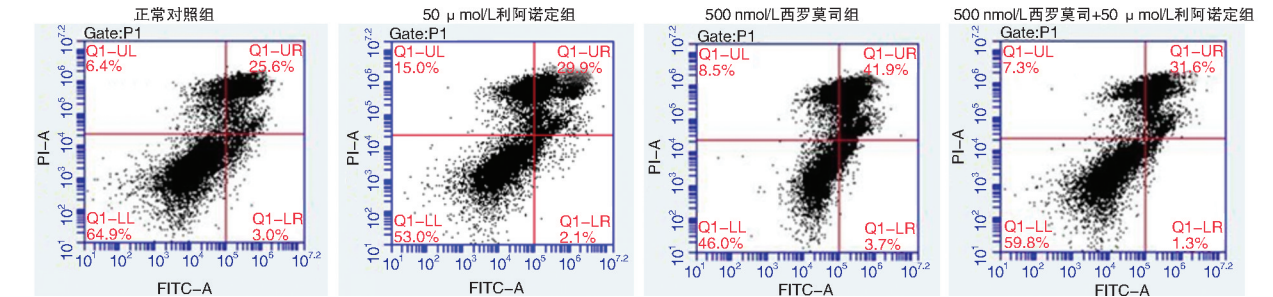


图 3. 西罗莫司处理和利阿诺定干预对细胞凋亡率的影响

Figure 3. Effect of sirolimus and ryanodine on cell apoptosis

表 4. 西罗莫司处理和利阿诺定干预对细胞线粒体膜电位的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4. Effect of sirolimus and ryanodine on mitochondrial membrane potential of HUVEC($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分 组	FL2/FL1
正常对照组	0.68 ± 0.06
50 μmol/L 利阿诺定组	0.61 ± 0.04
500 nmol/L 西罗莫司组	0.24 ± 0.03 ^a
500 nmol/L 西罗莫司 + 50 μmol/L 利阿诺定组	0.45 ± 0.04 ^b

a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 500 nmol/L 西罗莫司组比较。

3 讨 论

西罗莫司又名雷帕霉素,因能抑制细胞增殖发挥抗狭窄作用成为目前药物涂层支架的主要应用药物之一。但是,西罗莫司的抗增殖作用缺乏选择性,药物在抑制平滑肌细胞增殖减少支架内再狭窄的同时也可抑制血管内皮细胞的正常恢复,使损伤部位内皮化时间延长,因而有导致迟发性支架内血栓形成的危险。本研究也证实西罗莫司确实能损害血管内皮,同时减少 NO 分泌损害内皮细胞功能。以往研究多从其影响血管内皮舒张功能、抑制内皮细胞、内皮祖细胞增殖、迁移、黏附和体外血管形成等方面探讨其抑制内皮化的机制^[7-10]。

西罗莫司与 FK506 结构相似,进入细胞后结合在亲免蛋白 FKBP 上,形成西罗莫司-FKBP 复合物,FKBP 在各物种中都高表达,与细胞内 Ca^{2+} 释放的调控密切相关^[11]。本研究采用西罗莫司处理 HUVEC 24 h,Fluo-3 AM 标记细胞内 Ca^{2+} ,结果发现,与正常对照组相比,西罗莫司使细胞内 Ca^{2+} 水平明显升高。

Ca^{2+} 超载在细胞损伤及凋亡的启动与执行过程中至关重要。那么钙稳态失衡是否参与了西罗莫司诱导的细胞凋亡呢?我们进一步研究发现,随西罗莫司诱导细胞内钙浓度升高,细胞线粒体膜电位下降,膜电位下降提示通透性改变,线粒体损伤,发生钙超载。一旦线粒体跨膜电位崩溃,则细胞凋亡不可逆转。本研究结果发现西罗莫司处理 HUVEC 24 h 后随细胞内钙增加,线粒体膜电位下降,细胞凋亡率增加。

细胞内 Ca^{2+} 增高的机制较多,主要来源于胞外 Ca^{2+} 内流和内质网储存 Ca^{2+} 释放,细胞外 Ca^{2+} 内流主要通过胞膜上的通道,我们前期采用钙通道阻滞剂阿折地平减少胞外 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 阻断胞外 Ca^{2+} 内流干预西罗莫司对血管内皮的损害,细胞内

钙超载虽得到一定程度缓解,但细胞内钙水平仍远高于正常对照组,提示除细胞外钙内流外,细胞内质网钙释放也参与西罗莫司引起的血管内皮细胞内钙超载,并可能由于内质网 Ca^{2+} 巨大的储存量而发挥着重要甚至主要的作用。研究报道,西罗莫司可使 FKBP 从内质网 RyR2 通道上解离,导致包括输精管、胰岛、小肠、门静脉、心室、肺动脉及心肌在内的广泛的各种不同细胞内钙释放增加^[11]。在心肌细胞,FKBP 是肌浆网钙释放通道功能的关键调节因子,肌浆网中 RyR2 是胞内钙释放通道。研究显示,构建 FKBP 基因缺陷型小鼠或采用免疫抑制剂雷帕霉素或 FK506 分离 FKBP 与 RyR2,会导致肌浆网的 RyR2 通道呈现持续性微电导状态,引发钙渗漏现象^[12-13]。在内皮细胞,从内皮 RyR2 受体上直接敲除 FKBP 基因,细胞内 Ca^{2+} 亦增加^[4-5],以上提示西罗莫司-FKBP 复合物可通过引起内质网 RyR2 通道不稳定导致内皮钙释放增加。本研究采用利阿诺定稳定 RyR2 受体通道,并观察细胞内钙升高、线粒体损伤以及细胞凋亡变化情况。结果发现,利阿诺定处理细胞后,西罗莫司诱导的细胞内钙升高程度明显减轻,线粒体膜电位明显恢复,细胞凋亡明显减少,NO 释放明显恢复,可见内质网 RyR2 通道不稳定在西罗莫司诱导的细胞钙超载、线粒体损伤和细胞凋亡中起关键作用。本研究结果和文献^[14]报道一致。

综上所述,西罗莫司损伤内皮作用机制尚不十分清楚,可能与其诱导血管内皮细胞内 Ca^{2+} 浓度升高有关,外钙内流和内钙释放可能均参与西罗莫司引起的钙超载和线粒体损伤。内钙释放可能与其作用 FKBP,形成西罗莫司-FKBP 复合物影响内质网 RyR2 受体通道的稳定性有关,异常的 RyR2 与 FKBP 相互作用,可能是西罗莫司支架植入后内皮延迟修复的原因。随着对西罗莫司-FKBP-RyR2 调控的深入研究,瞄准特定的靶点以修复 RyR2 与 FKBP 之间的相互作用,将可能有望成为预防支架植入后内皮修复延迟继而引发血栓的重要突破点。

[参考文献]

[1] 李 鑫,李大勇,马贤德,等. 血管内皮细胞损伤和血清内源性代谢物的变化与动脉硬化闭塞症发病的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22 (6): 541-546.

[2] Nakazawa G, Otsuka F, Nakano M, et al. The pathology of neoatherosclerosis in human coronary implants bare-metal and drug-eluting stents[J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 57 (11): 1 314-322.

- [3] Park SJ, Kang SJ, Virmani R, et al. In-stent neoatherosclerosis; a final common pathway of late stent failure[J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 59 (23): 2 051-057.
- [4] Long C, Cook LG, Wu GY, et al. Removal of FKBP12/12.6 from endothelial ryanodine receptors leads to an intracellular calcium leak and endothelial dysfunction[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27 (7): 1 580-586.
- [5] Long C, Cook LG, Hamilton SL, et al. FK506 binding protein 12/12.6 depletion increases endothelial nitric oxide synthase threonine 495 phosphorylation and blood pressure [J]. Hypertension, 2007, 49 (3): 569-576.
- [6] 王桂君, 郭莲怡, 王洪新. 钙离子在肿瘤坏死因子 α 诱导心肌肥大中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21 (1): 47-51.
- [7] Liu HT, Li F, Wang WY, et al. Rapamycin inhibits re-endothelialization after percutaneous coronary intervention by impeding the proliferation and migration of endothelial cells and inducing apoptosis of endothelial progenitor cells[J]. Tex Heart Inst J, 2010, 37 (2): 194-201.
- [8] Wong MM1, Winkler B, Karamariti E, et al. Sirolimus stimulates vascular stem/progenitor cell migration and differentiation into smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase/ β -catenin signaling pathway[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, 33 (10): 2 397-406.
- [9] Jin C, Zhao Y, Yu L, et al. MicroRNA-21 mediates the rapamycin-induced suppression of endothelial proliferation and migration[J]. FEBS Lett, 2013, 587 (4): 378-385.
- [10] Banerjee S, Xu H, Fuh E, et al. Endothelial progenitor cell response to antiproliferative drug exposure[J]. Atherosclerosis, 2012, 225 (1): 91-98.
- [11] MacMillan D. FK506 binding proteins: cellular regulators of intracellular Ca^{2+} signaling [J]. Eur J Pharmacol, 2013, 700 (1-3): 181-193.
- [12] Zissimopoulos S, Seifan S, Maxwell C, et al. Disparities in the association of the ryanodine receptor and the FK506-binding proteins in mammalian heart[J]. J Cell Sci, 2012, 125 (7): 1 759-769.
- [13] Wen H, KRng S, Song Y, et al. Characterization of the binding sites for the interactions between FKBP12 and intracellular calcium release channels [J]. Arch Biochem Biophys, 2012, 517 (1): 37-42.
- [14] Habib A, Karmali V, Polavarapu R, et al. Sirolimus-FKBP12.6 impairs endothelial barrier function through protein kinase C- α activation and disruption of the p120-vascular endothelial cadherin interaction [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, 33 (10): 2 425-431.

(此文编辑 文玉珊)