

本文引用: 李玉婷, 冯森玲, 林彩燕, 等. 雷帕霉素脂质体对 ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞迁移的抑制作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(7): 581-587. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.07.004.

[文章编号] 1007-3949(2023)31-07-0581-07

• 实验研究 •

雷帕霉素脂质体对 ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞迁移的抑制作用

李玉婷, 冯森玲, 林彩燕, 贾梦磊, 钟文飞, 严鹏科

(广州医科大学附属第三医院药学部 广州医科大学药学院 广东省产科重大疾病重点实验室, 广东省广州市 510510)

[摘要] **[目的]** 探讨雷帕霉素脂质体(RL)对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的人主动脉血管平滑肌细胞(HA-VSMC)迁移的影响及其与 S100 钙结合蛋白 A4(S100A4)相关的作用机制。**[方法]** 使用敲低 S100A4 基因的慢病毒转染 HA-VSMC, 随后加入嘌呤霉素筛选 S100A4 基因敲低的稳定株。50 mg/L ox-LDL 处理 HA-VSMC, 加入不同剂量的 RL(3、6 及 12 mg/L), 观察处理前后对细胞迁移的影响。采用细胞划痕法、Transwell 实验检测细胞迁移, Western blot 检测 S100A4、磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶(p-PI3K)、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)、I 型胶原蛋白(COL I)、波形蛋白的表达。**[结果]** ox-LDL 处理细胞 48 h 后, 与空白对照组相比, S100A4、p-PI3K、p-Akt、p-mTOR、COL I 及波形蛋白的表达明显升高($P<0.05$), 细胞迁移速度明显加快($P<0.05$)。与 ox-LDL 组相比, 不同剂量的 RL 处理 48 h 后显著抑制 S100A4、p-PI3K、p-Akt、p-mTOR、COL I 及波形蛋白的表达并显著抑制细胞迁移($P<0.05$), 其中 6 mg/L、12 mg/L RL 的抑制作用更明显($P<0.05$)。敲低 S100A4 基因后细胞迁移率显著降低($P<0.05$)。**[结论]** RL 能显著抑制 ox-LDL 诱导的 HA-VSMC 迁移, 可能与 RL 下调 S100A4、p-PI3K、p-Akt、p-mTOR、COL I 及波形蛋白的表达相关。

[关键词] 血管平滑肌细胞; 雷帕霉素脂质体; 氧化型低密度脂蛋白; S100 钙结合蛋白 A4

[中图分类号] R363; R5

[文献标识码] A

Inhibitory effect of rapamycin liposomes on ox-LDL induced vascular smooth muscle cell migration

LI Yuting, FENG Senling, LIN Caiyan, JIA Menglei, ZHONG Wenfei, YAN Pengke

(Department of Pharmacy, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University & School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou Medical University & Guangdong Provincial Key Laboratory of Major Obstetric Diseases, Guangzhou, Guangdong 510150, China)

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of rapamycin liposomes (RL) on the migration of human aortic vascular smooth muscle cells (HA-VSMC) induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and its mechanism related to S100 calcium binding protein A4 (S100A4). **Methods** Vascular smooth muscle cells were transfected with lentivirus knockdown S100A4 gene, and then added puromycin to screen stable strain of S100A4 gene knockdown. Vascular smooth muscle cells were treated with 50 mg/L ox-LDL, and different doses of RL (3, 6 and 12 mg/L) were added to observe the effect on cell migration before and after treatment. Cell migration was detected by cell scratch method and Transwell, and the expression of S100A4, phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase (p-PI3K), phosphorylated protein kinase B (p-Akt), phosphorylated mammalian target of rapamycin (p-mTOR), type I collagen protein (COL I), and vimentin were detected by Western blot. **Results** After 48 h treatment with ox-LDL, compared with the blank control group, the expression of S100A4, p-PI3K, p-Akt, p-mTOR, COL I and vimentin was significantly increased ($P<0.05$), and the speed of cell migration was significantly accelerated ($P<0.05$). Compared with ox-LDL group, different doses of RL significantly inhibited the expression of S100A4, p-PI3K, p-Akt, p-mTOR, COL I and vimentin and significantly inhibited

[收稿日期] 2022-12-08

[修回日期] 2023-03-07

[基金项目] 国家自然科学基金项目(C0038660); 广东省自然科学基金项目(2022A1515010199)

[作者简介] 李玉婷, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化, E-mail: liyuting1286993263@163.com。通信作者严鹏科, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化与新药研发方向, E-mail: gysyypk@126.com。

cell migration after 48 h treatment ($P < 0.05$), of which 6 mg/L and 12 mg/L of RL had more significant inhibitory effects ($P < 0.05$). After S100A4 gene knockdown, the cell migration rate was significantly reduced ($P < 0.05$).

Conclusion RL can significantly inhibit the migration of HA-VSMC induced by ox-LDL, which may be related to the down-regulation of S100A4, p-PI3K, p-Akt, p-mTOR, COL I and vimentin expression by RL.

[**KEY WORDS**] vascular smooth muscle cells; rapamycin liposomes; oxidized low density lipoprotein; S100 calcium binding protein A4

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种慢性炎症性病变^[1],是引起不良心血管事件的主要病理基础。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)可诱导平滑肌细胞增殖与迁移^[2],导致脂质积累及泡沫细胞形成,被认为是造成 As 的关键因素。雷帕霉素又称西罗莫司,是哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)的选择性抑制剂,口服剂型常用于肾脏移植中免疫排斥的抑制剂^[3],在 As 疾病治疗方面,可将其涂布于支架,雷帕霉素洗脱支架是防治冠状动脉再狭窄的有效介入治疗手段^[4],但口服剂型全身给药对冠状动脉疾病效果不佳^[3]。S100 钙结合蛋白 A4(S100 calcium binding protein A4, S100A4)又称为成纤维细胞特异性蛋白 1(fibroblast specific protein 1, FSP1),具有一种 E-hand 的特征性环-螺旋-环结构,相对分子质量约为 12 kD^[5],近来研究发现 S100A4 与纤维化疾病有潜在的联系,在人颈动脉粥样斑块的内膜和中层均有表达^[6]。S100A4 在炎症部位释放,具有一定的促进细胞运动、侵袭、细胞外基质重塑、自噬和血管生成的生物学功能。本研究在前期发现雷帕霉素脂质体(rapamycin liposomes, RL)注射给药能有效抑制血管平滑肌细胞增殖的基础上,探讨 RL 对 ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞迁移的影响及其机制,以期揭示雷帕霉素抗 As 的新机制,为 As 的诊治提供新的线索。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂

主动脉血管平滑肌细胞(human aortic vascular smooth muscle cells, HA-VSMC)购自浙江美森生物公司。以健康志愿者的血清制备低密度脂蛋白;胎牛血清(货号:FSP500)购自 Excell 生物公司;DMEM 培养基(货号:10-013-CVRC)购自康宁公司;BCA 蛋白定量试剂盒(货号:23228)购自碧云天生物研究所;4%多聚甲醛固定液(货号:P1110)购自 Solarbio 公司;S100A4(Ab197896)购自 Abcam 公司;波形蛋白(货号:bs-0756R)购自 Bioss 公司;磷

脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)(货号:ab91606)、I 型胶原蛋白(collagen I, COL I)(货号:ab260043)购自 Abcam 公司;p-PI3K(货号:12057)购自 SAB 公司;蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)(货号:10176-2-AP)购自 Proteintech 公司;mTOR(货号:2983)、p-mTOR(货号:5536)、p-Akt(货号:9271)购自 Cell Signaling Technology 公司;山羊抗兔 IgG(货号:CW0103S)购自康为试剂;慢病毒转染试剂 pLKO.1-S100A4-sh1-EF1a-copGFP-T2A-Puro(感染敲低 S100A4)、PLKO.1-U6-scramble-EF1a-copGFP-T2A-Puro(感染对照)、助转染试剂(5 g/L)购自广州威佳科技有限公司。

RL 冻干粉为本课题组自行研发,具体方法详见文献^[7]。将冻干粉复溶后,用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,吸取 100 μL ,加 900 μL 甲醇,振荡,破乳,超声 3 min,使用超速离心机于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 000 r/min 离心 15 min,取上清进行高效液相层析(high performance liquid chromatography, HPLC)检测,测得峰面积,利用雷帕霉素标准曲线公式($Y = 173\ 108X + 805.56$, $R^2 = 0.999\ 1$)计算药物浓度。使用时用 0.2 μm 的无菌过滤器过滤除菌。

1.2 低密度脂蛋白的氧化修饰及鉴定

根据参考文献^[8]自行制备,调整蛋白质浓度,50 mg/L ox-LDL 用于实验,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 RL 的表征观察

取适量 RL 溶液按一定比例稀释,使用 Mallvern Zetasizer Nano ZS90 粒径仪测定其粒径分布及电位。取适量液体滴加在碳网上,去除多余水分,2%磷钨酸染色,随后使用透射电子显微镜(JEM-1400 plus)观察脂质体纳米粒的形态及分布情况。RL 的包封率及载药量采用高效液相色谱仪测定。

1.4 细胞培养

HA-VSMC 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养,密度达到 90% 时,弃去培养基,加入 2 mL 含 0.25% EDTA 的胰酶,待细胞皱缩变圆,加入 2 mL 完全培养基终止消化,随后收集于离心管中,1 300 r/min 离心 3 min,弃上清液,用含 10% FBS 的培养基重悬细胞为单个细胞,以用于后续实验。

1.5 细胞慢病毒转染

将生长良好的细胞接种至 6 孔板中,分为 3 组:空白对照组(含 10% FBS 的完全培养基)、sh 组(转染慢病毒绿色荧光蛋白)、shS100A4 组(转染慢病毒干扰 S100A4),待细胞密度约 70%,以最佳 MOI 值感染 HA-VSMC,8 h 后更换完全培养基继续感染 72 h,在倒置荧光显微镜下观察,绿色荧光为成功转染的细胞,随后加入嘌呤霉素筛选稳定细胞株,用于后续实验。

1.6 细胞划痕实验

将细胞悬液以 5×10^4 个细胞/孔接种于 12 孔板中,待细胞贴壁后饥饿处理 24 h,随后使用 200 μ L 枪头划痕,PBS 洗涤,将提前配制好的药物加入对应组中,在倒置显微镜下拍照,记录给药 0 h、48 h 的划痕宽度,使用 Image J 软件统计分析,评价划痕愈合程度:划痕迁移率 = (0 h 划痕宽度 - 48 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度 $\times 100\%$ 。

1.7 Transwell 实验

用无血清培养基重悬细胞,将提前配制好的药物加入对应组中,以 2×10^4 个细胞/孔接种于上室中,下室中加入 700 μ L 含 10% FBS 的细胞培养基,37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h,用棉签擦去上室细胞,4% 多聚甲醛固定液固定 20 min,0.1% 结晶紫溶液染色 20 min,PBS 清洗,随机选取 5 个视野拍照,计数。

1.8 Western blot 检测

使用细胞裂解液提取蛋白,BCA 法进行蛋白定

量。配制 10% SDS-PAGE 胶,加入蛋白样品,80 V 电泳 20 min,随后调整电压,120 V 电泳 1 h,待条带分离后,恒流 200 mA 转膜 90 min,加入 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,用 TBST 洗涤 3 次;加入一抗 S100A4 (1 : 1 000)、COL I (1 : 1 000)、波形蛋白 (1 : 1 000)、PI3K (1 : 1 000)、p-PI3K (1 : 1 000)、mTOR (1 : 1 000)、p-mTOR (1 : 1 000)、Akt (1 : 1 000)、p-Akt (1 : 1 000),置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜。加入相应二抗 (1 : 3 000),常温孵育 1 h,用 TBST 洗涤 3 次,每次 5 min,在全功能凝胶成像系统下显影,使用 Image J 分析蛋白条带灰度值。

1.9 统计学分析

采用 Graph Pad Prism 9 统计分析实验数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RL 的表征

脂质体冻干粉白色蓬松,溶液澄清透亮且无结晶或沉淀析出;颗粒平均粒径为 (89.136 ± 0.312) nm,多分散系数为 0.140 ~ 0.152,Zeta 电位为 (-2.831 ± 0.486) mV;透射电子显微镜下,脂质体颗粒形态呈圆形或似球形结构,大小分布均匀,平均粒径相近,其包封率为 $(86.58\% \pm 0.85\%)$,载药量为 $(4.98\% \pm 0.16\%)$ (图 1)。

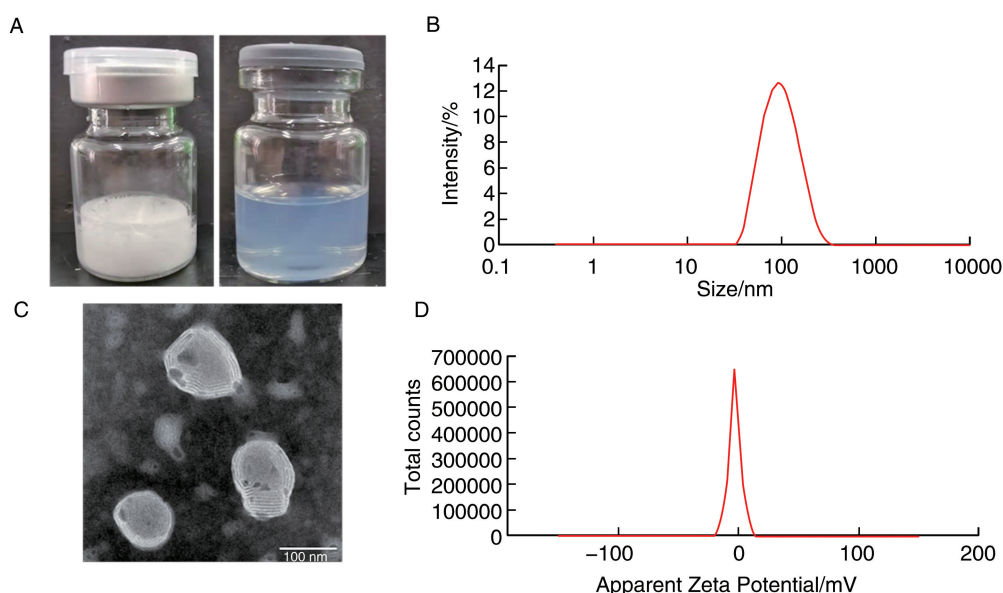


图 1. RL 的表征

A 为 RL 冻干粉及溶液,B 为 RL 的粒径分布,C 为透射电子显微镜图,D 为 RL Zeta 电位。

Figure 1. Characterization of RL

2.2 RL对ox-LDL诱导的血管平滑肌细胞S100A4、mTOR信号通路相关蛋白表达的抑制作用

与空白对照组相比,ox-LDL组S100A4的表达明显升高,升高1.53倍($P<0.05$),p-PI3K、p-Akt、p-mTOR的表达明显升高,分别上升1.46倍、1.63倍、2.14倍(均 $P<0.05$);COL I、波形蛋白的表达明显升高,分别上升1.44倍、1.46倍(均 $P<0.05$)。与ox-LDL组相比,3 mg/L、6 mg/L、12 mg/L RL能明显抑制S100A4的表达,分别下降28.58%、52.83%、70.21%(均 $P<0.05$),p-PI3K、p-Akt、p-mTOR的表达明显降低,分别下降20.49%、61.28%、87.78%、35.96%、60.95%、66.55%、35.55%、57.35%、79.07%

(均 $P<0.05$),COL I、波形蛋白的表达明显降低,分别下降40.37%、54.94%、66.30%、15.93%、29.96%、32.87%(均 $P<0.05$)。由于6 mg/L、12 mg/L RL对S100A4的表达抑制作用更明显,后续实验选用6 mg/L(图2)。

2.3 HA-VSMC低表达S100A4细胞株的构建

慢病毒感染后,sh组和shS100A4组的细胞均能持续表达绿色荧光且生长状态良好。与空白对照组相比,sh组无明显差异,但shS100A4组细胞S100A4蛋白的表达明显下调($P<0.05$),降低41.91%($P<0.05$),证明该慢病毒成功敲低了S100A4的表达(图3)。

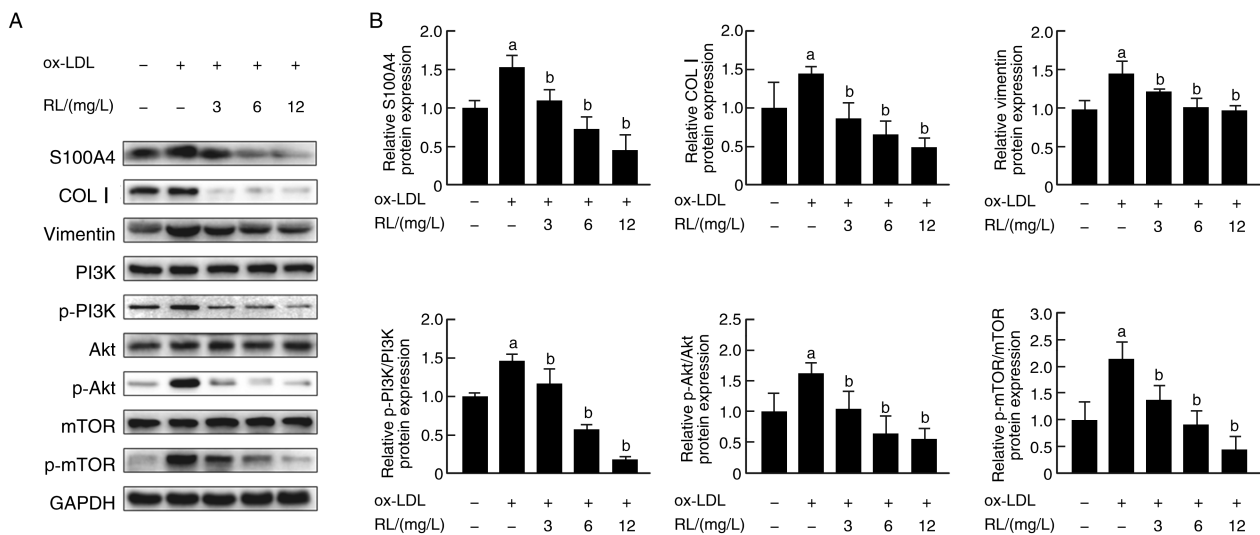


图2. RL对S100A4、mTOR信号通路相关蛋白表达的影响($n=3$)

A为Western blot检测S100A4、COL I、波形蛋白、PI3K、p-PI3K、mTOR、p-mTOR、Akt、p-Akt的蛋白表达,B为S100A4、COL I、波形蛋白、PI3K、p-PI3K、mTOR、p-mTOR、Akt、p-Akt的蛋白表达量化图。a为 $P<0.05$,与空白对照组比较;b为 $P<0.05$,与ox-LDL组比较。

Figure 2. Effect of RL on the expression of S100A4 and mTOR signaling pathway related proteins($n=3$)

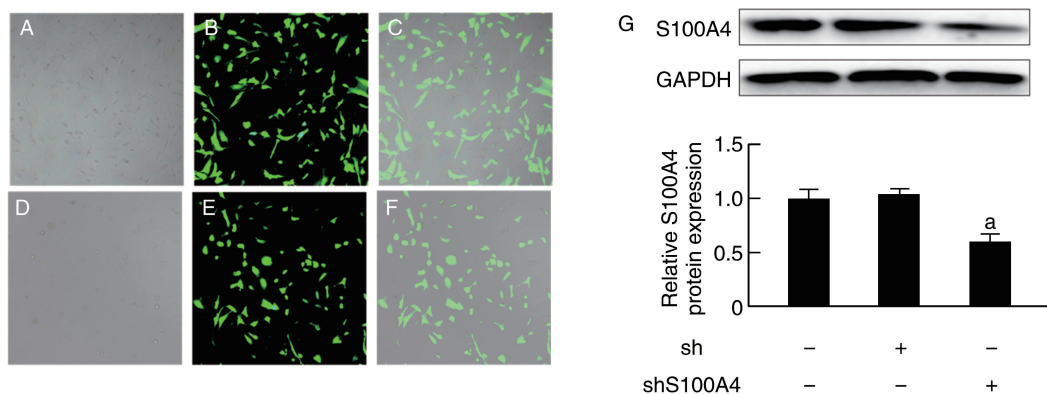


图3. HA-VSMC低表达S100A4细胞株的构建及S100A4蛋白表达水平($n=3$)

A、B为慢病毒感染对照细胞(10×),D、E为慢病毒感染敲低S100A4细胞(10×),A、D为明场视野,B、E为荧光视野,C、F为合并视野,G为Western blot检测S100A4蛋白的表达。a为 $P<0.05$,与sh组比较。

Figure 3. Construction of S100A4 cell line with low expression of HA-VSMC and the expression level of S100A4 protein($n=3$)

2.4 敲低 S100A4 对 ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞 S100A4 蛋白表达的抑制作用

经 ox-LDL 诱导后, shS100A4 组 S100A4 蛋白的表达降低 45.95% ($P<0.05$), 且 RL 抑制 S100A4 蛋白的表达, 降低 44.74% ($P<0.05$; 图 4)。

2.5 RL 和敲低 S100A4 对 ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞迁移的抑制作用

与空白对照组相比, ox-LDL 组细胞横向迁移率明显增加, 升高 1.45 倍 ($P<0.05$); 与 ox-LDL 组相比, RL 组、敲低 S100A4 组细胞迁移率下降, 分别下降 50.71%、83.54% (均 $P<0.05$)。与空白对照组相比, ox-LDL 组细胞纵向迁移率明显增加, 上升 1.77 倍 ($P<0.05$); ox-LDL 组相比, RL 组、敲低 S100A4 组细胞迁移数下降, 分别下降 45.24%、62.59% (均 $P<0.05$)。说明 RL 和敲低 S100A4 能够抑制 ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞迁移 (图 5)。

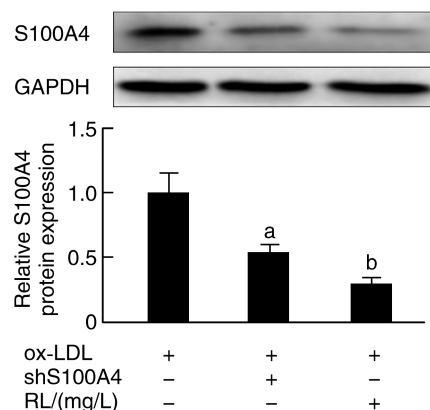


图 4. 敲低 S100A4 对 ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞 S100A4 蛋白表达的影响 ($n=3$)

a 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL 组比较;

b 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL+shS100A4 组比较。

Figure 4. Effect of S100A4 knockdown on S100A4 protein expression in vascular smooth muscle cells induced by ox-LDL ($n=3$)

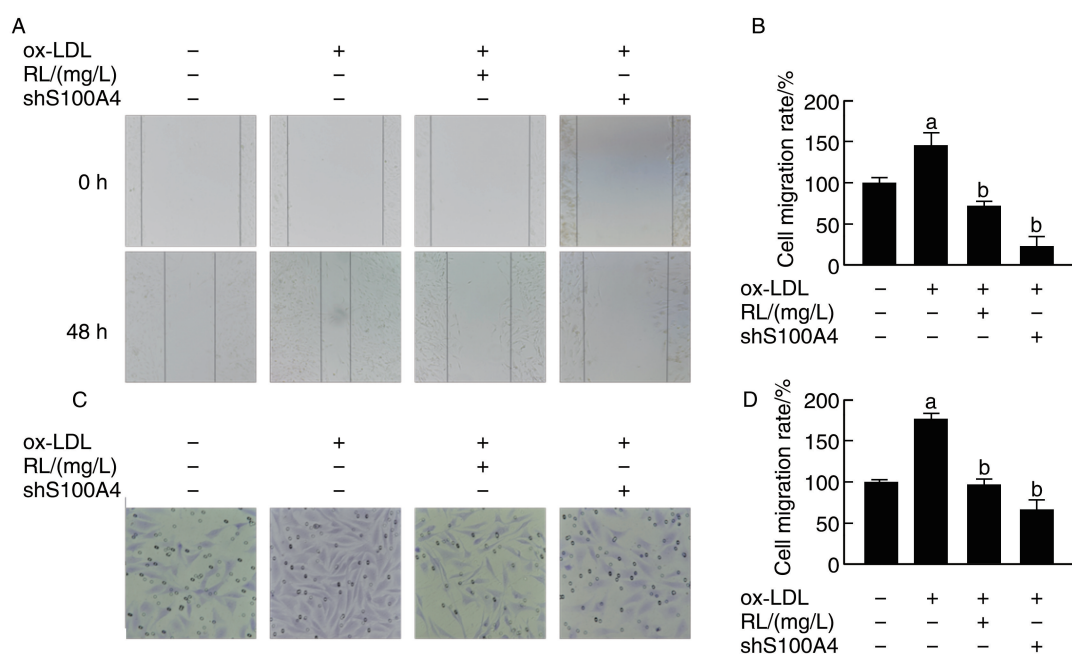


图 5. RL 和敲低 S100A4 对 ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞迁移的影响 ($n=3$)

A 为细胞划痕实验 (100 \times), B 为细胞划痕实验的定量分析, C 为细胞迁移实验 (400 \times), D 为细胞迁移实验的定量分析。

a 为 $P<0.05$, 与空白对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 5. Effects of RL and S100A4 knockdown on vascular smooth muscle cell migration induced by ox-LDL ($n=3$)

3 讨论

雷帕霉素是一种大环内酯类免疫抑制剂^[9], 2000 年研究者将雷帕霉素涂布于支架上用于急性冠状动脉综合征的治疗, 雷帕霉素涂层支架置入后 6 个月血管再狭窄发生率下降至 2% ~ 10%, 大大提

高了患者的生存质量^[10-12], 但其口服制剂仍有很多缺点, 如药物成分不稳定, 水溶性差, 在体内吸收及生物利用度受到限制。纳米颗粒因其尺寸较小可以渗透到组织中, 促进细胞对药物的吸收, 提高生物利用度, 且长时间停留在血液循环系统中不易引起不良反应^[13-15]。因此, 本课题组结合纳米载体的

优势构建了水溶性好、缓释、高效的 RL, 实验初步提示雷帕霉素能够抑制血管平滑肌细胞的增殖^[16]。研究表明, 在人类冠状动脉 As 斑块中, 50% 以上的泡沫细胞来自平滑肌细胞^[17], 正常的生理条件下血管平滑肌细胞具有可塑性, 出现病理状态时收缩型细胞去分化为合成表型^[18], 其表型转化受血小板源生长因子 BB (platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB)、可溶性细胞因子等的综合调节^[19]。因此, 寻找抑制血管平滑肌细胞迁移的药物是延缓 As 发生发展的重要策略之一。S100A4 存在于细胞内和细胞外, 是 S100 蛋白家族的重要成员, 在人非肿瘤疾病中扮演重要的角色^[20]。Sakic 等^[21]研究证明细胞外 S100A4 可参与平滑肌细胞表型的转化, 认为中和细胞外 S100A4 可增强 As 斑块的稳定性。Nagata 等^[6]研究证明 S100A4 在人和小鼠的颈动脉 As 斑块中表达升高, 细胞外 S100A4 可促进血管平滑肌细胞的增殖与迁移, 认为 S100A4 可作为 S100A4 颈动脉狭窄的生物标志物。而下调 S100A4 对血管平滑肌细胞功能的影响少有报道。Lu 等^[22]研究表明激活 mTOR 通路可抑制血管平滑肌细胞的去分化、增殖和迁移。激活的 mTOR 是 PI3K/Akt 的重要下游靶点, Wang 等^[23]研究发现 S100A4 可通过激活大肠癌细胞 PI3K/Akt/mTOR/p70S6K 信号通路诱导细胞存活和迁移。

本研究发现, RL 能够抑制 ox-LDL 诱导的 HA-VSMC 迁移, 且在 3 ~ 12 mg/L 范围内随着药物剂量的增加其疗效更强, 同时发现 RL 能够抑制细胞迁移相关蛋白的表达, 尤其是抑制 S100A4 的表达。为了进一步探讨 S100A4 与血管平滑肌细胞的关系, 本研究利用慢病毒转染技术构建了低表达 S100A4 的细胞模型, 初步验证 RL、S100A4 与 As 之间的关系。本研究中, Western blot 实验表明 RL 可抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白的表达, 且可抑制 S100A4 的表达以及参与细胞迁移的相关蛋白波形蛋白^[24]、COL I 的表达; 使用慢病毒转染技术敲低细胞株 S100A4 的表达, 通过 Western blot 实验进一步证实 S100A4 的表达受 RL 的调控; 通过细胞划痕实验发现不同浓度的 RL 均可抑制 ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞迁移, 敲低 S100A4 的表达也可抑制 ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞迁移, Transwell 实验进一步证明了这一点。

本研究采用不同浓度的 RL 能够抑制 ox-LDL 诱导的 HA-VSMC 迁移, 与已有的文献报道相符, 但是其作用机制是否与 S100A4 的表达有关尚少有报道。本研究发现 RL 抑制 HA-VSMC 过度迁移的机制

可能是通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 减弱 S100A4 的表达, 降低细胞迁移相关蛋白波形蛋白、COL I 的表达, 从而发挥作用。本研究结果可为探索 As 的发病机制及治疗提供新线索。为了进一步探索 RL 与 S100A4 在 HA-VSMC 及 As 中的作用和机制, 本研究组将在 As 常用模型如 ApoE^{-/-}、LDLR^{-/-} 小鼠模型上进行探讨。

[参考文献]

- [1] KOBAYAMA K, LEY K. Atherosclerosis: a chronic inflammatory disease with an autoimmune component [J]. *Circ Res*, 2018, 123(10): 1118-1120.
- [2] SAHRANAVARD T, CARBONE F, MONTECUCCO F, et al. The role of potassium in atherosclerosis [J]. *Eur J Clin Invest*, 2021, 51(3): e13454.
- [3] BOADA C, ZINGER A, TSAO C, et al. Rapamycin-loaded biomimetic nanoparticles reverse vascular inflammation [J]. *Circ Res*, 2020, 126(1): 25-37.
- [4] 王威, 张颖倩, 李中轩, 等. 雷帕霉素抑制冠状动脉支架置入术后血管再内皮化相关机制进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(11): 995-999.
WANG W, ZHANG Y Q, LI Z X, et al. Role of rapamycin in delaying re-endothelialization after angioplasty [J]. *Chin J Arterioscler*, 2019, 27(11): 995-999.
- [5] WU Y, ZHANG W, GUNST S J. S100A4 is secreted by airway smooth muscle tissues and activates inflammatory signaling pathways via receptors for advanced glycation end products [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2020, 319(1): L185-L195.
- [6] NAGATA M, MINAMI M, YOSHIDA K, et al. Calcium-binding protein S100A4 is upregulated in carotid atherosclerotic plaques and contributes to expansive remodeling [J]. *J Am Heart Assoc*, 2020, 9(18): e016128.
- [7] CHEN Y Q, ZHU W T, LIN C Y, et al. Delivery of rapamycin by liposomes synergistically enhances the chemotherapy effect of 5-fluorouracil on colorectal cancer [J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16: 269-281.
- [8] 严鹏科, 廖端芳, 杨永宗. 普罗布考对巨噬细胞分泌基质金属蛋白酶 9 的抑制作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11(3): 199-202.
YAN P K, LIAO D F, YANG Y Z. Probucol reduces matrix metalloproteinase-9 secretion of THP-1 monocyte-derived macrophages induced by oxidized low density lipoprotein [J]. *Chin J Arterioscler*, 2003, 11(3): 199-202.
- [9] BATTAGLIONI S, BENJAMIN D, WÄLCHLI M, et al. mTOR substrate phosphorylation in growth control [J]. *Cell*, 2022, 185(11): 1814-1836.
- [10] MORICE M C, SERRUYS P W, SOUSA J E, et al. A

- randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization[J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(23): 1773-1780.
- [11] DOGGRELL S A. Sirolimus- or paclitaxel-eluting stents to prevent coronary artery restenosis[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2004, 5(11): 2209-2220.
- [12] LEMOS P A, LEE C, DEGERTEKIN M, et al. Early outcome after sirolimus-eluting stent implantation in patients with acute coronary syndromes: insights from the rapamycin-eluting stent evaluated at rotterdam cardiology hospital (research) registry [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41(11): 2093-2099.
- [13] 朴明慧, 曲文博, 刘冰, 等. 纳米载药在心肌梗死及其并发症防治中的应用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(11): 989-994.
- PIAO M H, QU W B, LIU B, et al. Application of nano-drug delivery for treatment of myocardial infarction and its complications[J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(11): 989-994.
- [14] PATRA J K, DAS G, FRACETO L F, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects[J]. *J Nanobiotechnology*, 2018, 16(1): 71.
- [15] TEDESCO-SILVA H, DEL CARMEN RIAL M, CRUZ SANTIAGO J, et al. Optimizing the clinical utility of sirolimus-based immunosuppression for kidney transplantation[J]. *Clin Transplant*, 2019, 33(2): e13464.
- [16] HUANG W Q, ZOU Y, TIAN Y, et al. Mammalian target of rapamycin as the therapeutic target of vascular proliferative diseases: past, present, and future[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2022, 79(4): 444-455.
- [17] ALLAHVERDIAN S, CHEHROUDI A C, MCMANUS B M, et al. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2014, 129 (15) : 1551-1559.
- [18] TANG H Y, CHEN A Q, ZHANG H, et al. Vascular smooth muscle cells phenotypic switching in cardiovascular diseases[J]. *Cells*, 2022, 11(24): 4060.
- [19] MALEKMOHAMMAD K, BEZSONOV E E, RAFIEIAN-KOPAEI M. Role of lipid accumulation and inflammation in atherosclerosis: focus on molecular and cellular mechanisms[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 707529.
- [20] FEI F, QU J, LI C, et al. Role of metastasis-induced protein S100A4 in human non-tumor pathophysiologies [J]. *Cell Biosci*, 2017, 7: 64.
- [21] SAKIC A, CHAABANE C, AMBARTSUMIAN N, et al. Neutralization of S100A4 induces stabilization of atherosclerotic plaques: role of smooth muscle cells[J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 118(1): 141-155.
- [22] LU Q B, WAN M Y, WANG P Y, et al. Chicoric acid prevents PDGF-BB-induced VSMC dedifferentiation, proliferation and migration by suppressing ROS/NFκB/mTOR/P70S6K signaling cascade [J]. *Redox Bio*, 2017, 14: 656-668.
- [23] WANG H, DUAN L, ZOU Z, et al. Activation of the PI3K/Akt/mTOR/P70S6K pathway is involved in S100A4-induced viability and migration in colorectal cancer cells [J]. *Int J Med Sci*, 2014, 11(8): 841-849.
- [24] BATTAGLIA R A, DELIC S, HERRMANN H, et al. Vimentin on the move: new developments in cell migration [J]. *F1000Res*, 2018, 7: F1000 Faculty Rev-1796.
- (此文编辑 文玉珊)