

同型半胱氨酸通过诱导 miR-33 激活 NF- κ B 途径上调 RAW264.7 源性泡沫细胞 TNF- α 、IL-6 的表达

代佩, 高奋, 高宏伟, 王远, 冯高洁, 张秦风, 白瑞, 秦卫伟, 宋晓苏, 李虹

(山西医科大学第二医院心内科, 山西省太原市 030001)

[关键词] 同型半胱氨酸; RAW264.7 源性泡沫细胞; 微小 RNA; 核因子 κ B; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素 6

[摘要] **目的** 研究同型半胱氨酸(Hcy)是否通过诱导 miR-33 激活核因子 κ B(NF- κ B)途径上调肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6)的表达,促进炎症反应,加剧动脉粥样硬化(As)。**方法** RAW 264.7 源性巨噬细胞,经氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导为泡沫细胞后,分别将 miR-33 mimics 和 miR-33 inhibitor 转染入细胞内后每组给予 5.0 mmol/L 的 Hcy 干预;油红“O”染色确定泡沫细胞模型是否诱导成功;Western blot 和实时定量 PCR 测定 NF- κ B、TNF- α 、IL-6 的蛋白和 mRNA 表达;高效液相色谱检测细胞内胆固醇含量。**结果** 油红“O”染色后含脂滴的泡沫细胞被染成红色;与其它组相比,miR-33 mimics 组的 NF- κ B、TNF- α 、IL-6 的蛋白和 mRNA 表达均增高且细胞内的胆固醇含量增加($P < 0.05$);miR-33 inhibitor 组的 NF- κ B、TNF- α 、IL-6 的蛋白和 mRNA 表达均降低且细胞内的胆固醇含量降低($P < 0.05$);空白对照组、miR-33 mimics 对照组和 miR-33 inhibitor 对照组间相比,所有检测指标均无统计学差异($P > 0.05$)。**结论** Hcy 通过诱导 miRNA-33 激活 NF- κ B 途径上调 TNF- α 和 IL-6 的表达,增加炎症反应,促进动脉粥样硬化。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Homocysteins upregulates the expression of tumor necrosis factor α , interleukin-6 in RAW264.7-derived foam cells by inducing miR-33 to activate nuclear factor kappa B pathway

DAI Pei, GAO Fen, GAO Hongwei, WANG Yuan, FENG Gaojie, BAI Rui, QINWeiwei, SONG Xiaosu, LI Hong

(Department of Cardiology, Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] homocysteine; RAW264.7-derived foam cells; microRNA; nuclear factor- κ B; tumor necrosis factor α ; interleukin-6

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether homocysteine (Hcy) upregulates the expression of tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) by inducing activation of nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway by miR-33, promotes inflammatory lesions and exacerbates atherosclerosis (As). **Methods** RAW264.7-derived macrophages were induced by oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) as foam cells, and miR-33 mimics/miR-33 inhibitors were transfected into cells. Each group received 5.0 mmol/L of Hcy intervention; oil red “O” staining was used to determine whether the foam cell model was successfully induced; Western blot and real-time quantitative PCR was used to determine the protein and mRNA expression of NF- κ B, TNF- α , IL-6; the cellular cholesterol content was analyzed by HPLC. **Results** The successfully induced foam cells were stained with oil red “O”, and the nuclei containing lipid droplets were stained red; compared with other group, the expression of NF- κ B, TNF- α and IL-6 protein and mRNA, the intracellular cholesterol content was significantly increased in the miR-33 mimics group ($P < 0.05$). No difference was observed in the above indexes between blank group, miR-33 mimics-NC group and miR-33 inhibitor-NC group ($P > 0.05$). **Conclusion** Hcy can upregulate the expression of TNF- α and IL-6 by inducing miR-33 to activate NF- κ B pathway, increase inflammatory

[收稿日期] 2018-05-20

[修回日期] 2018-07-02

[基金项目] 山西省自然科学基金资助项目(2014011040-3)

[作者简介] 代佩, 硕士研究生, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 353292006@ qq.com。通信作者高奋, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 gao55555@ sina.com。

reaction and promote atherosclerosis (As).

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是由多种原因导致的慢性进展性炎性病变,一系列炎症因子的释放在病变过程中起重要作用^[1]。同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是As的独立危险因素,可通过氧化应激、炎症反应、损害内皮细胞功能等多种机制导致病变,研究证实Hcy通过核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)途径上调肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α)、白细胞介素6(interleukin, IL-6)的表达,促进炎症反应,加剧As^[2]。微小RNA(microRNA, miRNA)是近年来研究的热点,参与调控机体的生化、病理过程,且相关miRNA的表达水平可以作为炎症反应的标志物^[3]。miRNA-33(miR-33)是本实验研究的重点,其不仅参与脂质代谢而且参与炎症反应的调控,可通过NF- κ B通路上调TNF- α 、IL-6等炎症因子的释放^[4]。本实验旨在研究Hcy是否通过诱导miR-33激活NF- κ B通路上调TNF- α 、IL-6的表达,增加炎症反应,加剧As。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

RAW264.7细胞株(上海中科院细胞中心,中国);Hcy、RNA提取试剂Trizol(索莱宝公司,中国);氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)(欣和佳源公司,中国);DMEM培养基(武汉博士德公司,中国);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所,中国);OPTI-MEM专用培养基(Gibco公司,美国);LipofectamineTM 2000转染试剂(Invitrogen公司,美国);miRNA-33 mimics/inhibitor(上海吉玛制药技术有限公司,中国);逆转录试剂盒(大连宝生物工程公司,中国)。

1.2 主要仪器

CO₂培养箱(Thermo公司,美国);PCR仪、酶标仪(Bio-Rad,美国);倒置相差显微镜(Nikon TS100);低温离心机(Eppendorf公司,德国);酸碱度仪PB-10、电子天平(Sartorius公司,德国)。

1.3 RAW264.7巨噬细胞的培养

取出冻存的RAW264.7巨噬细胞,置于25 cm²的培养瓶中,用DMEM培养基(10%胎牛血清、1%青、链霉素钠),在温度37℃、5%CO₂条件下培养,待细胞覆盖培养瓶的80%~90%时,用含0.25%的胰蛋白酶消化并按1:4进行传代。

1.4 RAW264.7源性泡沫细胞的诱导

细胞传2~3代后,取生长较好的对数期细胞经消化、离心、稀释后,每孔细胞数按 1.8×10^9 个/L进行种板,观察待细胞密度接近70%~80%时,每孔加入50 mg/L ox-LDL诱导,同时更换为DMEM培养基(4%胎牛血清及1%青、链霉素钠)培养24 h后油红“O”染色鉴定诱导是否成功。

1.5 细胞转染及实验分组

1.5.1 转染方法 诱导成功后的RAW264.7源性泡沫细胞,根据LipofectamineTM 2000转染试剂说明书将miRNA的浓度配置成40 nmol/L进行转染,转染前12 h更换成OPTI-MEM无血清培养基培养6~8 h后,每组均给予5.0 mmol/L Hcy干预(包括空白对照组),24 h后收集细胞进行实验。

1.5.2 实验分组 (1)空白对照组:细胞正常培养及诱导,给予5.0 mmol/L Hcy孵育24 h;(2)miR-33 mimics组:将40 nmol/L miR-33 mimics转染入细胞中,给予5.0 mmol/L Hcy孵育24 h;(3)miR-33 mimics对照组:将40 nmol/L模拟miR-33 mimics转染入细胞中,给予5.0 mmol/L Hcy孵育24 h;(4)miR-33 inhibitor组:将40 nmol/L miR-33 inhibitor转染入细胞中,给予5.0 mmol/L Hcy孵育24 h;(5)miR-33 inhibitor对照组:将40 nmol/L模拟miR-33 inhibitor转染入细胞中,给予5.0 mmol/L Hcy孵育24 h。

1.6 油红“O”染色

按一定比例提前配置油红“O”染色液,吸取6孔板的培养液,用遇冷的PBS清洗3次;4%中性甲醛固定10 min后,再次清洗;每孔加入约1.5 mL油红“O”染色液,30 min后清洗,于荧光倒置相差显微镜下观察。

1.7 Western blot检测NF- κ B、TNF- α 和IL-6的蛋白表达

轻轻吸去细胞培养液,用预冷PBS清洗3次细胞;以一定比例加入细胞裂解液和蛋白酶抑制剂(100:1),刮刀刮下细胞,静置20~30 min后将裂解的蛋白装入有标记EP管经超声波粉碎机粉碎、离心(4℃ 12000 r/min 10 min),将上层液体(即收集的蛋白)移入另一EP管,直接用于实验或-80℃保存。用BCA蛋白定量法测定蛋白浓度,根据凝胶配置试剂盒说明书进行配胶,经聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜将蛋白转移至PVDF膜上,用含5%牛奶TBST封闭2 h后孵育I抗,4℃摇床过夜后,TBST洗膜5 min×3次,室温摇床孵育II抗2 h,再次洗膜后进行曝光(超敏ECL法)。

1.8 RT-qPCR 检测 miR-33 的转染效率及 NF- κ B、TNF- α 和 IL-6 mRNA 表达

待细胞干预后,吸取培养液,PBS 清洗细胞 3 次,用 Trizol 试剂提取 RNA,用紫外分光光度计来测定 RNA 的浓度以及纯度,使 RNA 的 A260/A280 保持在 1.9~2.1 之间;按照 TAKARA 逆转录试剂盒说明书合成 cDNA;PCR 扩增反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30~60 s,循环 40 次进行 PCR 反应,以 HS-ACTB 作为参照。运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行分析。

1.9 高效液相色谱检测细胞内胆固醇含量

药物干预后按上述方法清洗 RAW 264.7 源性泡沫细胞,加入一定量的 0.5% NaCl 溶液,超声波粉碎 10 min,将裂解的液体分成 2 份,分别用于总胆固醇和游离胆固醇的提取。取合适的胆固醇标准品溶解于流动相中,置于 10 mL 玻璃瓶中,等倍比稀释 5 个不同浓度梯度于 EP 管中,分别是 0、78.125、156.25、312.5、625、1250 mg/L,将上述标准品溶液分别注入高效液相色谱仪,进样量为 10 μ L,以胆固醇

的质量浓度为横坐标(X 轴),其峰面积为纵坐标(Y 轴),绘制标准曲线。采用 Waters 反向 C18 柱,流动相为异丙醇:乙腈(50:50),流速 1 mL/min,柱温 40 $^{\circ}$ C,将各实验组所得的样品溶液按上述色谱条件,进样 20 μ L,记录胆固醇的峰面积。计算总胆固醇量(total cholesterol, TC)和游离胆固醇(free cholesterol, FC)量,总胆固醇量减去游离胆固醇量为胆固醇酯(cholesterol ester, CE)的量。

1.10 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件进行分析,数据均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较采用 SNK-q 检验法,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 油红“O”染色观察细胞内脂滴含量

倒置相差荧光显微镜观察诱导成功后的泡沫细胞被染成红色(图 1)。

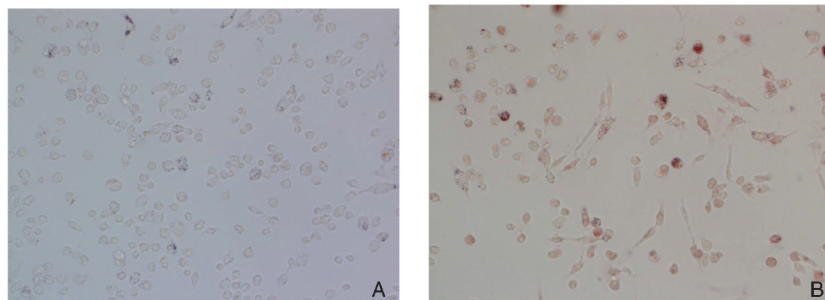


图 1. 油红“O”染色观察诱导成功后的 RAW264.7 源性泡沫细胞(20 \times) A 为未经 ox-LDL 诱导的巨噬细胞,染色未见富含脂滴的泡沫细胞;B 为经 ox-LDL 诱导成功后的泡沫细胞,可见富含脂滴的泡沫细胞被染成红色。

Figure 1. Oil red “O” staining was used to observe the RAW264.7 derived foam cells after successful induction(20 \times)

2.2 Hcy 经 miR-33 mimics/inhibitor 调节 RAW264.7 源性泡沫细胞 NF- κ B、TNF- α 和 IL-6 蛋白表达

将配置好一定浓度的 miR-33 mimics、miR-33 inhibitor 转染至 RAW264.7 源性泡沫细胞内,分别给予 5.0 mmol/L Hcy 干预后,Western blot 检测 NF- κ B、TNF- α 和 IL-6 的蛋白表达,结果发现与其它组相比,miR-33 mimics 组的 NF- κ B、TNF- α 和 IL-6 蛋白表达量增加,而 miR-33 inhibitor 组的 NF- κ B、TNF- α 和 IL-6 蛋白表达量降低(图 2);其余三组间相比较差异无显著性。

2.3 Hcy 经 miR-33 mimics/inhibitor 调节 RAW264.7 源性泡沫细胞 NF- κ B、TNF- α 和 IL-6 mRNA 表达

将配置好一定浓度 miR-33 mimics、miR-33 in-

hibitor 转染至 RAW264.7 源性泡沫细胞内,分别给予 5.0 mmol/L Hcy 干预后,实时定量 PCR 检测 NF- κ B、TNF- α 和 IL-6 mRNA 的表达,结果发现与其它组相比,miR-33 mimics 组的 NF- κ B、TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 表达量增加,而 miR-33 inhibitor 组的 NF- κ B、TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 表达量降低(图 3),其余三组间相比较差异无显著性。

2.4 Hcy 经 miR-33 mimics/inhibitor 调节 RAW264.7 源性泡沫细胞内胆固醇含量

将 miR-33 mimics、miR-33 inhibitor 转染至 RAW264.7 源性泡沫细胞内,经同一浓度 Hcy 干预后,高效液相色谱检测 miR-33 mimics 组和 miR-33 inhibitor 组细胞内胆固醇含量,结果显示 miR-33

mimics 组细胞胆固醇含量较高, miR-33 inhibitor 组 细胞胆固醇含量低下(表 1)。

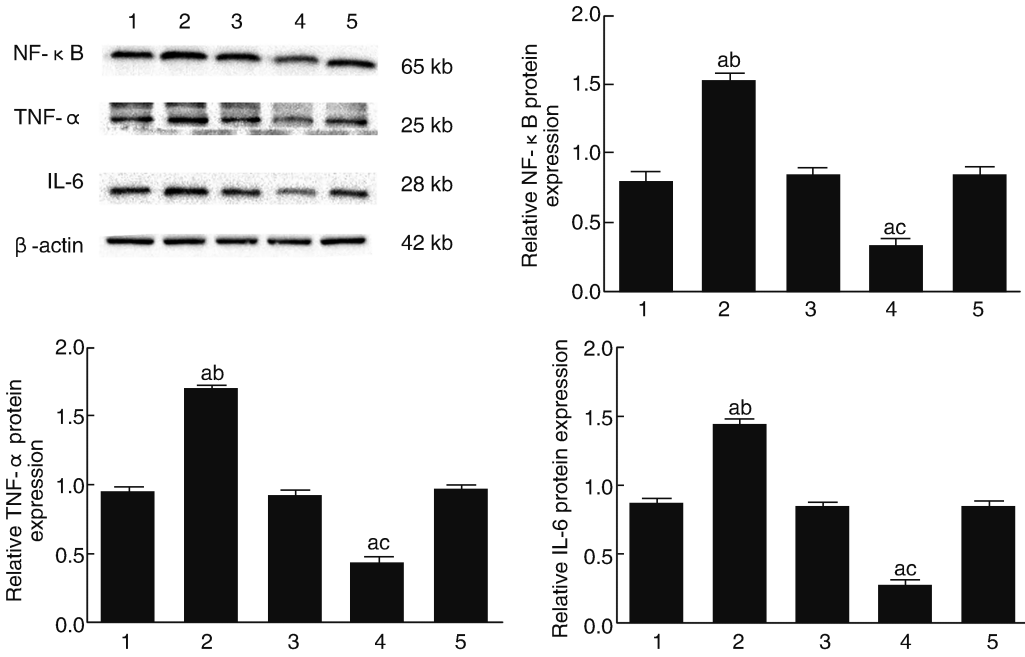


图 2. Western blot 检测 NF-κB、TNF-α 和 IL-6 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$) 1 为空白对照组, 2 为 miR-33 mimics 组, 3 为 miR-33 mimics 对照组, 4 为 miR-33 inhibitor 组, 5 为 miR-33 inhibitor 对照组。a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 miR-33 对照组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 miR-33 inhibitor 对照组比较。

Figure 2. Western blot detected the protein expression of the NF-κB, TNF-α, IL-6 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

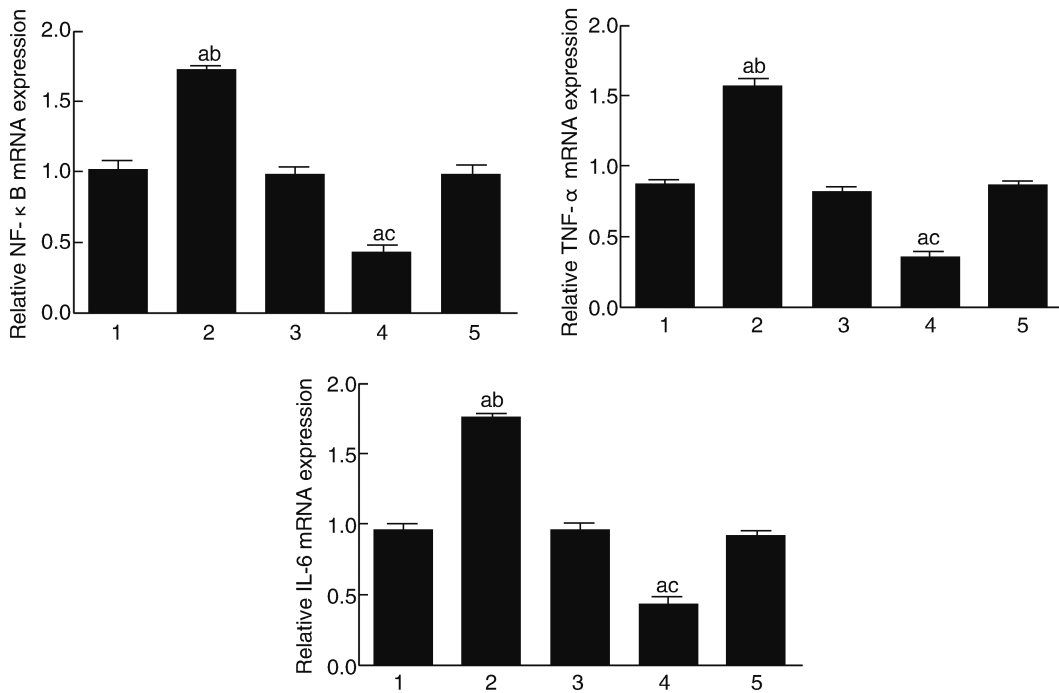


图 3. 实时定量 PCR 检测 NF-κB、TNF-α 和 IL-6 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$) 1 为空白对照组, 2 为 miR-33 mimics 组, 3 为 miR-33 mimics 对照组, 4 为 miR-33 inhibitor 组, 5 为 miR-33 inhibitor 对照组。a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 miR-33 对照组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 miR-33 inhibitor 对照组比较。

Figure 3. Real-time quantitative PCR detected the mRNA expression of the NF-κB, TNF-α, IL-6 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 1. 同型半胱氨酸经 miR-33 mimics/inhibitor 调节 RAW264.7 源性泡沫细胞内胆固醇含量($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1. Homocysteine regulates cholesterol content in the RAW264.7 derived foam cells through miR-33 mimics/inhibitor($\bar{x}\pm s, n=3$)

分组	TC (mg/dL)	FC (mg/dL)	CE (mg/dL)	CE/TC (%)
空白对照组	386±25.1	136±15.2	250±10	64
miR-33 mimics 组	683±35.1 ^{ab}	246±41.6 ^{ab}	403±125.8 ^{ab}	59
miR-33 mimics 对照组	391±9.2	120±12.6	272±6.0	69
miR-33 inhibitor 组	237±35.6 ^{ac}	91±7.0 ^{ac}	146±40.9 ^{ac}	61
miR-33 inhibitor 对照组	399±9.6	123±11.9	275±19.8	68

a 为 $P<0.01$, 与空白对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与 miR-33 对照组比较; c 为 $P<0.01$, 与 miR-33 inhibitor 对照组比较。

3 讨论

As 是由多种炎症因子共同导致的慢性炎性疾病,“炎症反应学说”是 As 病变的主要学说之一^[1]。Hcy 是导致 As 的独立危险因素, Hcy 自身硫内酯的形成及氧化应激反应可激活 NF- κ B 途径上调 TNF- α 、IL-6 等炎症因子的释放, 导致炎症反应^[5]。

通过 NF- κ B 途径上调炎症因子的释放导致的“瀑布级联反应”及泡沫细胞的形成是 As 病变的起始标志。NF- κ B 是存在于真核生物的主要以 p50/p65 二聚体形式存在的转录因子, 当存在氧化应激等外界信号时, κ B 抑制蛋白被磷酸化, 磷酸化后 κ B 抑制蛋白通过碱基配对参与所调控的基因表达, 如快速上调 TNF- α 、IL-6 及 IL-8 的释放^[6]。Liu^[7]证实 κ B 抑制蛋白在高 Hcy 血症体内明显降低, 间接证实 Hcy 促进了 NF- κ B 活化, 导致炎症因子的释放。TNF- α 作为重要的炎症因子, 通过激活丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 及 NF- κ B 途径上调炎症因子 IL-6、IL-1 β 的表达^[8]。Kilnam 等^[9]研究发现 NF- κ B 上调 TNF- α 的释放, 而增高的 TNF- α 会进一步促进 NF- κ B 的活化, 提示两者在炎症反应过程中互相影响。在炎症反应中处于核心地位的炎症递质 IL-6, 在非酒精性脂肪肝发现 IL-6 可以促进 TNF- α 的分泌, 总之 NF- κ B 的活化调控炎症反应的起始阶段, 而 IL-6 的释放及表达则贯穿始终, 证明 NF- κ B、TNF- α 、IL-6 三者具有协同作用^[10]。我们实验结果中发现, 三者的表达趋

势一致, 说明均在炎症病变中发挥作用。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是由 20~25 个核苷酸组成的单链 RNA, 主要在转录后水平表达, 可参与调控机体的病理、生化、炎症反应、免疫反应和肿瘤等过程^[11]。已有研究证实体内 miRNA 表达水平可作为潜在的炎症反应标记, 并且表达水平的增加伴随 TNF- α 、IL-6、角蛋白趋化因子 (keratinocyte chemoattractant, KC) 等炎症因子的释放^[12]。miR-33 作为 microRNA 家族的成员, 2010 年由 Rayner 等^[13]发现, 最初关于 miR-33 的研究仅限于脂质代谢, 但研究发现其还参与炎症反应的调控, 通过促进 RIP140 蛋白表达上调 NF- κ B 促进 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的释放, 促进炎症病变, 加剧 As。RIP140 作为一种转录抑制因子, 可激活 NF- κ B 信号通路, 调控炎症因子的表达^[14]。我们实验中发现在给予 Hcy 干预后的 miR-33 mimics 转染组 NF- κ B、TNF- α 、IL-6 蛋白及 mRNA 表达均增加且细胞的脂质含量增多, 而经 Hcy 干预后 miR-33 inhibitor 组的检测结果则与 miR-33 mimics 组相反, 并且细胞内的脂质含量减少; 而空白对照组、miR-33 mimics 对照组和 miR-33 inhibitor 对照组所检测指标均无统计学差异, 因此得出 Hcy 通过 miR-33 经 NF- κ B 通路上调 TNF- α 、IL-6 的释放, 增加炎症反应, 促进 As。

我们从细胞水平进行本实验研究, 仍存在一定的局限性, 接下来我们将从动物水平进一步验证。

[参考文献]

- [1] Wei G, Liu H, Jie Y, et al. Exosomes derived from mature dendritic cells increase endothelial inflammation and atherosclerosis via membrane TNF- α mediated NF- κ B pathway [J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(12): 2318-2327.
- [2] Zanin RF, Bergamin LS, Morrone FB, et al. Pathological concentrations of homocysteine increases IL-1 β production in macrophages in a P2X7, NF- κ B, and ERK-dependent manner [J]. Purinergic Signal, 2015, 11(4): 463-470.
- [3] Zhu B, Ju S, Chu H, et al. The potential function of microRNAs as biomarkers and therapeutic targets in multiple myeloma (Review) [J]. Oncol Lett, 2018; 6094-6106.
- [4] 阿希, 李玉琳, 王绿娅, 等. 炎症小体 Nlrp3 在高血压小鼠心肌纤维化中的作用 [J]. 心肺血管病杂志, 2015, 34(6): 496-500.
- [5] 孔炜, 王宪. 免疫炎症反应与动脉粥样硬化——高同型半胱氨酸血症促进动脉粥样硬化早期发病的免疫炎症机制 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(7): 525-526.
- [6] 许选选, 尹凯, 李涛, 等. 亲环素 A 对氧化型低密度脂蛋白诱导的 RAW264.7 细胞中 NF- κ B 蛋白表达的影响

- [J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(4): 311-314.
- [7] 刘粉叶. 益肾活血胶囊对高同型半胱氨酸血症所致兔动脉粥样硬化相关炎症因子表达调节的研究[D]. 山东大学, 2008.
- [8] Ma ZN, Liu Z, Wang Z, et al. Supplementation of American ginseng berry extract mitigated cisplatin-evoked nephrotoxicity by suppressing ROS-mediated activation of MAPK and NF- κ B signaling pathways[J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 110: 62.
- [9] Kilnam K, Soojin H, Weonjong Y, et al. Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF- κ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages.[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 649(1): 369-375.
- [10] 杨娟, 王洪新, 张英杰, 等. TLR4/NF- κ B 信号通路在黄芪甲苷抑制异丙肾上腺素诱导大鼠心肌肥厚中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(7): 577-582.
- [11] 叶青, 王坚刚. 微小RNA 参与调控心房颤动相关机制的研究进展[J]. 心肺血管病杂志, 2014, 33(6): 903-905.
- [12] Jyonouchi H, Geng L, Streck D L, et al. MicroRNA expression changes in association with changes in interleukin-1 β /interleukin10 ratios produced by monocytes in autism spectrum disorders; their association with neuropsychiatric symptoms and comorbid conditions (observational study) [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 229.
- [13] Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, et al. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis[J]. *Science*, 2010, 328(5985): 1570-3.
- [14] Ho PC, Chang KC, Chuang YS, et al. Cholesterol regulation of receptor-interacting protein 140 via microRNA-33 in inflammatory cytokine production[J]. *FASEB J*, 2011, 25(5): 1758-1766.
- (此文编辑 许雪梅)

(上接第 1200 页)

- [2] Zhang K, Zhang Y, Feng W, et al. Interleukin-18 enhances vascular calcification and osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells through Trpm7 activation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(10): 1933-1943.
- [3] Jung IH, Choi JH, Jin J, et al. CD137-inducing factors from T cells and macrophages accelerate the destabilization of atherosclerotic plaques in hyperlipidemic mice[J]. *FASEB J*, 2014, 28(11): 4779-4791.
- [4] Olofsson PS, Söderström LA, Wågsäter D, et al. CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice [J]. *Circulation*, 2008, 117(10): 1292-1301.
- [5] Jeon HJ, Choi JH, Jung IH, et al. CD137 (4-1BB) deficiency reduces atherosclerosis in hyperlipidemic mice[J]. *Circulation*, 2010, 121(9): 1124-1133.
- [6] 陈瑶, 严金川, 翁嘉懿, 等. CD137-CD137L 信号通路对小鼠动脉粥样斑块及血管平滑肌细胞钙化的影响[J]. 中华心血管病杂志, 2016, 44(10): 879-884.
- [7] Tkach M, Théry C. Communication by extracellular vesicles: Where we are and where we need to go[J]. *Cell*, 2016, 164(6): 1226-1232.
- [8] Kapustin AN, Chatrou ML, Drozdov I, et al. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion[J]. *Circ Res*, 2015, 116(8): 1312-1323.
- [9] Xu JF, Yang GH, Pan XH, et al. Altered microRNA expression profile in exosomes during osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114627.
- [10] 王中群, 戴俏武, 邵晨. 血管钙化的骨调控机制新进展[J]. 中华心血管病杂志, 2017, 45(1): 78-80.
- [11] Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease [J]. *Circulation*, 2008, 117(22): 2938-2948.
- [12] Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J, et al. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications[J]. *Circ Res*, 2006, 99(10): 1044-1059.
- [13] Zhang C, Zhang K, Huang F, et al. Exosomes, the message transporters in vascular calcification[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(9): 4024-4033.
- [14] Zhong W, Li B, Yang P, et al. CD137-CD137L interaction modulates neointima formation and the phenotype transformation of vascular smooth muscle cells via NFATc1 signaling [J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 439(1-2): 65-74.
- (此文编辑 曾学清)