

PCKS9 通过 TLR4/NF- κ B/COX-2 途径调节单核-内皮细胞黏附性

鲍海龙¹, 廖付军², 方俐³, 钟菲¹, 刘稳¹, 李洁琪²

(1. 贵州医科大学临床医学院; 2. 贵州医科大学附属医院心血管内科;
3. 贵州省人民医院神经电生理中心, 贵州省贵阳市 550000)

[关键词] 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9; Toll 样受体 4; 核因子 κ B; 环氧合酶 2

[摘要] 目的 探讨前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (PCSK9) 是否通过人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) Toll 样受体 4 (TLR4)/核因子 κ B (NF- κ B)/环氧合酶 2 (COX-2) 途径调节单核-内皮细胞黏附性。方法 氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 处理 HUVECs, real-time PCR 与 Western blot 法检测 PCSK9、TLR4、NF- κ B p65、COX-2 mRNA 和蛋白表达; ox-LDL 处理后, 用人重组 PCSK9 蛋白孵育或 PCSK9 siRNA 转染 HUVECs, 检测 TLR4、NF- κ B p65、COX-2 mRNA 和蛋白表达; ox-LDL 处理后, 用人重组 PCSK9 蛋白与 TLR4 抑制剂瑞沙托维 (TAK-242) 或 NF- κ B 抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸 (PDTC) 共同孵育 HUVECs, 检测 NF- κ B p65 与 COX-2 的 mRNA 和蛋白表达; COX-2 抑制剂 (NS398) 与人重组 PCSK9 蛋白先后处理 HUVECs 后, 加入 THP-1 单核细胞检测单核-内皮细胞黏附性。结果 ox-LDL 上调 HUVECs 的 PCSK9、TLR4、NF- κ B p65、COX-2 mRNA 和蛋白表达 (P 均 < 0.05); 人重组 PCSK9 蛋白在 ox-LDL 基础上上调 TLR4、NF- κ B p65、COX-2 mRNA 和蛋白表达 (P 均 < 0.05); PCSK9 siRNA 转染可抑制 ox-LDL 对 TLR4、NF- κ B p65、COX-2 mRNA 和蛋白表达的上调作用 (P 均 < 0.05); TAK-242 抑制人重组 PCSK9 蛋白对 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 和蛋白表达的上调作用 (P 均 < 0.05); PDTC 抑制人重组 PCSK9 蛋白对 NF- κ B p65、COX-2 mRNA 和蛋白表达的上调作用 (P 均 < 0.05); NS398 可抑制人重组 PCSK9 蛋白的促单核-内皮细胞黏附作用 (P 均 < 0.05)。结论 PCSK9 可通过 TLR4/NF- κ B/COX-2 途径调节单核-内皮细胞黏附性。

[中图分类号] R543

[文献标识码] A

PCSK9 regulates monocyte-endothelial cell adhesion via TLR4/NF- κ B/COX-2 pathway

BAO Hailong¹, LIAO Fujun², FANG Li³, ZHONG Fei¹, LIU Wen¹, LI Jieqi²

(1. Clinical Medical College of Guizhou Medical University; 2. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University; 3. Neurophysiology Center of People's Hospital of Guizhou, Guiyang, Guizhou 550000, China)

[KEY WORDS] proprotein convertase subtilisin type 9; Toll like receptor 4; nuclear factor- κ B; cyclooxygenase-2

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) regulates monocyte-endothelial cell adhesion through Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor κ B (NF- κ B)/cyclooxygenase-2 (COX-2) pathway in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** HUVECs were incubated with oxidized low density lipoprotein (ox-LDL), real-time PCR and Western blot assay for detection of PCSK9, TLR4, NF- κ B, COX-2 mRNA and protein expression. After treatment with ox-LDL, recombinant PCSK9 protein was incubated or PCSK9 siRNA was transfected into HUVECs. Then the expression of TLR4, NF- κ B p65, COX-2 mRNA and protein was detected. After treatment with ox-LDL, human recombinant PCSK9 protein was incubated with TLR4 inhibitor TAK-242 or NF- κ B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) to detect mRNA and protein expression of NF- κ B p65 and COX-2. After COX-2 inhibitor (NS398) and human recombinant PCSK9 protein were treated successively, THP-1 monocytes were added and monocyte-endothelial cell adhesion was detected. **Results** ox-LDL up-regulates the mRNA and protein expression of PCSK9, TLR4, NF- κ B and COX-2 in HUVECs (all $P < 0.05$). Human recombinant PCSK9 protein up-regulated

[收稿日期] 2018-11-02

[修回日期] 2019-01-14

[作者简介] 鲍海龙, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向为冠心病与血脂, E-mail 为 359077777@qq.com。通信作者李洁琪, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病与血脂, E-mail 为 1469052469@qq.com。

TLR4, NF- κ B, COX-2 mRNA and protein expression on ox-LDL basis (all $P < 0.05$). PCSK9 siRNA transfection down-regulated the up-regulation of TLR4, NF- κ B, COX-2 mRNA and protein expression by ox-LDL (all $P < 0.05$). TAK-242 inhibits the up-regulation of TLR4 and NF- κ B mRNA and protein expression by human recombinant PCSK9 protein (all $P < 0.05$). PDTC inhibits the up-regulation of NF- κ B and COX-2 mRNA and protein expression by human recombinant PCSK9 protein (all $P < 0.05$). NS398 inhibits monocyte-endothelial cell adhesion induced by human recombinant PCSK9 protein (all $P < 0.05$). **Conclusion** PCSK9 regulates monocyte-endothelial cell adhesion via TLR4/NF- κ B/COX-2 pathway.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是心血管疾病的主要病理基础,发病机制十分复杂,受多重因素影响^[1]。其中氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)引起的内皮损伤及细胞因子交互作用对 As 的形成至关重要^[2]。而由血管内皮功能受损引发的单核巨噬细胞向内皮细胞的迁移及黏附是 As 发病的首要环节^[3]。环氧合酶 2(cyclooxygenase-2, COX-2)是一种诱导型酶,COX-2 可通过多种机制促进 As:如增加血管通透性,促进单核-内皮细胞黏附,诱导巨噬细胞趋化,产生炎性细胞因子等^[4]。前蛋白转化酶枯草溶菌素 9(proprotein convertase subtilisin type 9, PCSK9)作为一种丝氨酸蛋白酶,参与胆固醇稳态调节,间接参与 As 发生^[5]。随着对 PCSK9 的了解深入,发现 PCSK9 除了间接调节血脂代谢外,还参与血管壁脂质蓄积、细胞自噬和凋亡。但 PCSK9 对单核-内皮细胞黏附性的影响和机制并不十分明确。本研究旨在通过 ox-LDL 诱导的内皮细胞炎症损伤模型研究 PCSK9 是否通过 TLR4(Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)/COX-2 途径影响单核-内皮细胞黏附性,明确 PCSK9 的促 As 机制,为以 PCSK9 作为靶点抗 As 治疗的作用机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人急性单核细胞白血病细胞(THP-1)(中桥新州公司),人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)(美国 ATCC 细胞库);人重组 PCSK9 蛋白(novoprotein 公司);胎牛血清(FBS)和牛血清白蛋白(BSA)(Gibco 公司);内皮细胞培养基(ECM)(美国 Scien Cell 公司);CCK-8 试剂(Dojindo 公司);脂质体 Lipofectamine 2000(Invitrogen Life Technologies 公司);PKH26 细胞连接试剂盒、吡咯烷二硫代氨基甲酸(PDTC)、COX-2 抑制剂(NS-398)(Sigma 公司);瑞沙托维(TAK-242)(Millipore 公司);反转录试剂盒、SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒(Takara 公司);抗

PCSK9、抗 TLR4、抗 NF- κ B p65、抗 COX-2 抗体(Abcam 公司),抗 β -actin 抗体和山羊抗兔二抗(Affinity Biosciences 公司);氧化型低密度脂蛋白(oxidized LDL, ox-LDL)(奕元公司)。

1.2 细胞培养及分组

将 HUVECs 培养于含 5% FBS 与 1% 青链霉素的 ECM 培养液,THP-1 单核细胞培养于含 10% FBS 和 1% 青链霉素的 RPMI 1640 培养基,均置于体积分数 5% CO₂、饱和湿度、37℃ 孵箱中常规培养,取处于对数增殖期、状态良好的细胞用于实验。

ox-LDL 对 PCSK9、TLR4、NF- κ B P65、COX-2 的表达影响实验分组:(1)对照组,未经处理内皮细胞;(2)ox-LDL 12、24、48 h 组,用含 ox-LDL 80 mg/L 孵育内皮细胞 12、24、48 h。

人重组 PCSK9 蛋白对 TLR4、NF- κ B P65、COX-2 的表达影响实验分组:(1)对照组,用 80 mg/L ox-LDL 孵育内皮细胞 24 h;(2)PCSK9 10、20、40 nmol/L 组,在对照组处理基础上用人重组 PCSK9 蛋白 10、20、40 nmol/L 处理 24 h。

人重组 PCSK9 蛋白在 TAK-242 或 PDTC 干预下对 TLR4、NF- κ B、COX-2 表达的影响实验分组:(1)对照组,同上述对照组处理;(2)TAK-242 组、PDTC 组,在对照组处理基础上用 TAK-242 75 nmol/L 或 PDTC 100 μ mol/L 处理 24 h;(3)PCSK9 组,在对照组处理基础上用人重组 PCSK9 蛋白 40 nmol/L 处理 24 h;(4)PCSK9+TAK-242 组、PCSK9+PDTC 组,在对照组处理基础上用人重组 PCSK9 蛋白 40 nmol/L 和 TAK-242 75 nmol/L 或 PDTC 100 μ mol/L 共处理 24 h。所有实验均独立重复 ≥ 3 次。

1.3 siRNA 转染

PCSK9 siRNA 由上海吉玛生物公司合成,正义链:5'-GGC AGA GAC UGA UCC ACU U dTdT-3',反义链:5'-AAG UGG AUC AGU CUC UGC CTdTd-3'。将 HUVECs 用含 ox-LDL 80mg/L 的 0.2% BSA 无血清培养基 24 h,PCSK9 siRNA 组用脂质体 Lipofectamine 2000 在无抗生素无血清的 ECM 培养基中转染 PCSK9 siRNA,阴性对照组为同样方法转染一组无关序列,siRNA 的转染浓度为 100 nmol/L,培养

6 h 后更换为全培养基,继续培养至 48 h,然后检测 PCSK9、TLR4、NF- κ B P65、COX-2 mRNA 及蛋白表达。荧光标记 siRNA(cy3-siRNA)评价转染效率,转染效率约为 80%。

1.4 CCK-8 法测定细胞增殖抑制率

将细胞浓度稀释成 10×10^8 个/L,取 50 μ L 接种于 96 孔板,设置 5 个复孔,将 96 孔板置于培养箱中,待细胞贴壁 12 h 后加药,TAK-242 终浓度为 10、20、40 和 80 nmol/L,PDTC 终浓度为 50、100、150 和 200 μ mol/L,终体积均为 100 μ L。设置 1% DMSO 对照组,仅含 100 μ L 完全培养基的空白组,继续培养 24 h,结束前 2.5 h 避光加入 CCK-8 试剂 10 μ L/孔,继续孵育 2.5 h 后酶标仪检测 450 nm 波长吸光度(A)值。细胞增殖抑制率=(对照组 A_{450} -实验组 A_{450})/(对照组 A_{450} -空白组 A_{450}) $\times 100\%$ 。

1.5 单核-内皮细胞黏附性检测

根据 PKH26 细胞连接试剂盒说明书对 THP-1 染色,ox-LDL 处理 HUVECs 后,实验组 PCSK9 40 nmol/L 孵育 24 h,干预组 NS-398 10 μ mol/L 与 PCSK9 40 nmol/L 共孵育 24 h。去除培养基,加入含有预染色 THP-1 细胞(1×10^4)的新培养基,37 $^{\circ}$ C 培养 1 h;PBS 漂洗 3 次;4% 多聚甲醛室温固定 10 min;荧光显微镜(100 \times)计数每视野黏附 THP-1 细胞数。

1.6 real-time PCR 检测 mRNA

使用 TRIzol 试剂从细胞中分离出 RNA。根据反转录试剂盒的说明书反转录总 RNA,然后使用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒和所选基因的特异性引物进行定量实时 PCR。引物设计 PCSK9(R-CGA TGC CTG CCT CTA CTC C, F-TGG TCT TGG GCA

TTG GTG G), TLR4 (R-TCC CTG AAC CCT ATG AAC, F-CTA AAC CAG CCA GAC CTT), NF- κ B (R-AGC ACG ACA ACA TCT CAT T, F-GGC TCA AAG TTC TCC ACC), COX-2 (R-TTA CAA TGC TGA CTA TGG CTA C, F-CAT CAG GCA CAG GAG GAA)。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 1 min,进行 40 个循环。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对含量。

1.7 Western blot 检测蛋白

将细胞在裂解缓冲液中裂解,并通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE,10%凝胶)分离来自每个样品的 50 μ g 蛋白质,并转移到 PVDF 膜上。使用抗 PCSK9、抗 TLR4、抗 NF- κ B、抗 COX-2 抗体孵育。ECL 发光液进行发光反应,于暗室中曝光,将条带强度以 β -actin 标准化。

1.8 统计学分析

实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS22.0 进行统计处理,两样本均数的比较采用 t 检验,多样本组间均数比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 ox-LDL 对 PCSK9、TLR4、NF- κ B p65 和 COX-2 表达的影响

ox-LDL 孵育不同时间,PCSK9、TLR4、NF- κ B p65、COX-2 mRNA 及蛋白表达均高于对照组(P 均 < 0.05),以 48 h 组最显著(图 1)。

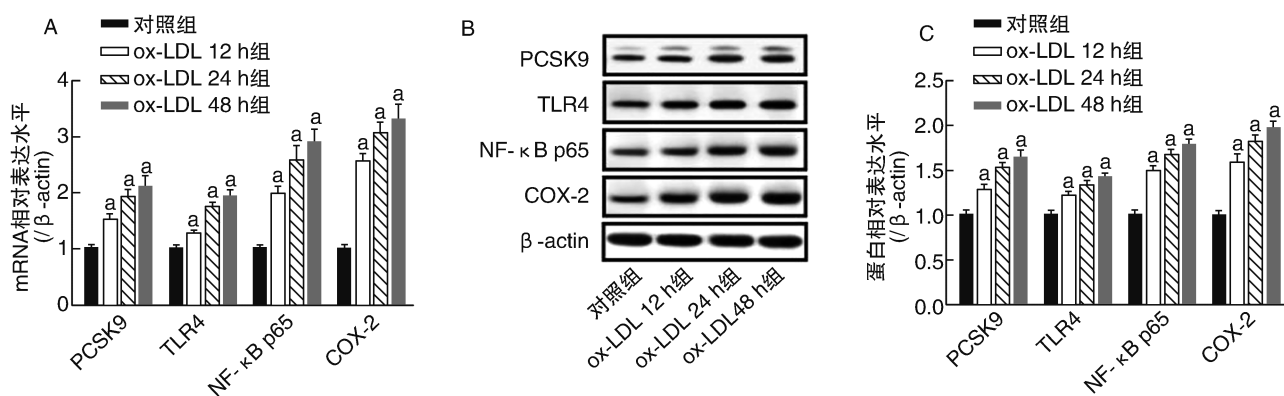


图 1. ox-LDL 对 PCSK9、TLR4、NF- κ B P65、COX-2 表达的影响($n=3$) A 为 real-time PCR, B、C 为 Western blot. a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

Figure 1. Effect of ox-LDL on the expression of PCSK9, TLR4, NF- κ B P65 and COX-2 ($n=3$)

2.2 人重组 PCSK9 蛋白对 TLR4、NF-κB p65 和 COX-2 表达的影响

以含 0、10、20、40 nmol/L 人重组 PCSK9 蛋白无血清培养基预处理 HUVECs 后与 ox-LDL 共孵育,检测 TLR4、NF-κB p65、COX-2 mRNA 及蛋白表达。人重组 PCSK9 蛋白相对于对照组上调了 TLR4、NF-κB p65、COX-2 mRNA 及蛋白表达(P 均 <0.05),以 40

nmol/L 组最显著(图 2),因此采用此浓度用于后续实验。

2.3 PCSK9 siRNA 对 TLR4、NF-κB p65 和 COX-2 表达的影响

PCSK9 siRNA 转染组较阴性对照组(Non-targeting siRNA)下调了 TLR4、NF-κB p65、COX-2 mRNA 及蛋白表达(P 均 <0.05)(图 3)。

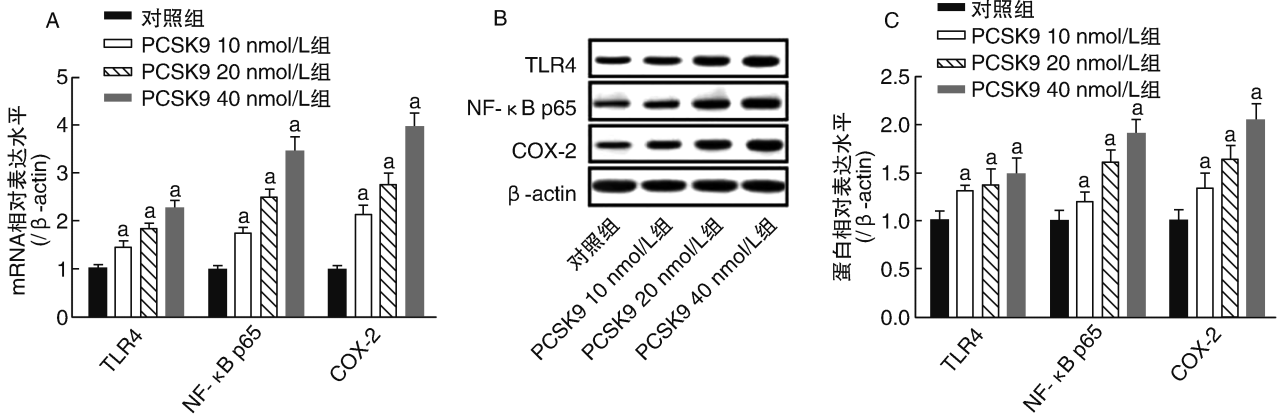


图 2. 人重组 PCSK9 蛋白对 TLR4、NF-κB P65、COX-2 表达的影响($n=3$) A 为 real-time PCR, B、C 为 Western blot。a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

Figure 2. Effect of human recombinant PCSK9 protein on the expression of TLR4, NF-κB P65 and COX-2 ($n=3$)

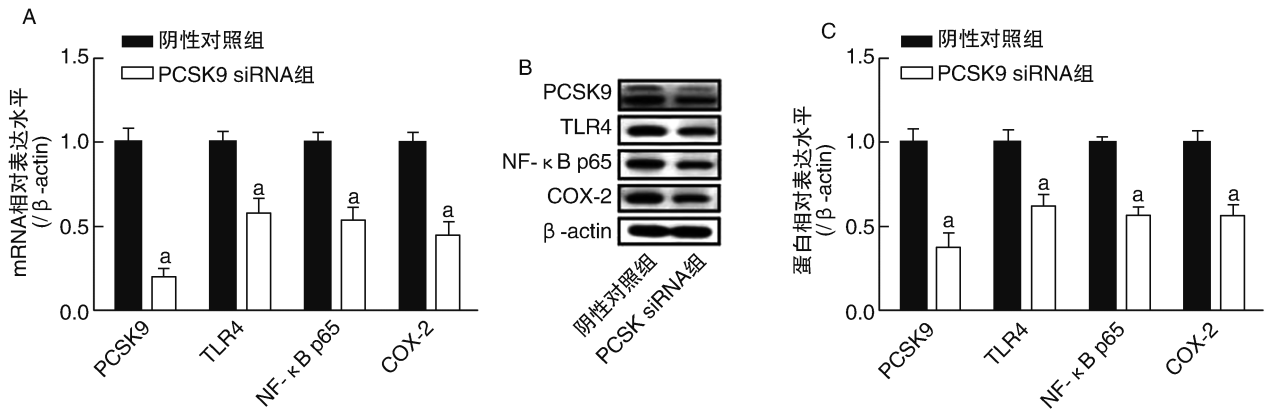


图 3. PCSK9 siRNA 对 PCSK9、TLR4、NF-κB p65、COX-2 表达的影响($n=3$) A 为 real-time PCR, B、C 为 Western blot。a 为 $P < 0.05$, 与阴性对照组比较。

Figure 3. Effect of PCSK9 siRNA on the expression of PCSK9, TLR4, NF-κB p65 and COX-2 ($n=3$)

2.4 CCK-8 法确定 TAK-242 与 PDTC 使用浓度

为选择适宜药物浓度,以 CCK-8 法检测不同浓度 TAK-242 与 PDTC 作用于 HUVECs 24 h 的增殖抑制率,不同浓度给药组增殖抑制率高于对照组(P 均 <0.05)(表 1 和 2)。TAK-242 与 PDTC 的 IC50 分别为 75.5 nmol/L 和 109.2 μmol/L。因此选用 75 nmol/L TAK-242 与 100 μmol/L PDTC 浓度用于后续实验。

2.5 人重组 PCSK9 蛋白在 TAK-242 与 PDTC 干预下对 NF-κB p65 和 COX-2 表达的影响

相比于对照组, TAK-242 组的 TLR4、NF-κB p65 和 PDTC 组的 NF-κB p65、COX-2 mRNA 及蛋白表达

降低。相比于 PCSK9 组, PCSK9 + TAK-242 组的 TLR4、NF-κB p65 和 PCSK9+PDTC 组的 NF-κB p65、COX-2 mRNA 及蛋白表达降低(P 均 <0.05)(图 4)。

2.6 NS398 对人重组 PCSK9 蛋白调节单核-内皮细胞黏附的影响

相比于对照组,人重组 PCSK9 蛋白促进单核-内皮细胞黏附, NS398 抑制单核-内皮细胞黏附(P 均 <0.05)。相比于人重组 PCSK9 蛋白组, NS398 可抑制人重组 PCSK9 蛋白对单核-内皮细胞黏附的促进作用(P 均 <0.05)(图 5、表 3)。

表 1. TAK-242 对 HUVECs 增殖抑制率的影响 (n=5)

Table 1. Effect of TAK-242 on the inhibition rate of HUVECs proliferation (n=5)

分 组	浓 度	24 h 抑制率 (%)
空白组		1.49±0.53
对照组		1.56±0.48
TAK-242 组	10 nmol/L	25.19±2.55 ^a
	20 nmol/L	33.22±4.07 ^a
	40 nmol/L	40.45±4.19 ^a
	80 nmol/L	51.34±3.87 ^a

a 为 P<0.05, 与对照组比较。

表 2. PDTC 对 HUVECs 增殖抑制率的影响 (n=5)

Table 2. Effect of PDTC on the inhibition rate of HUVECs proliferation (n=5)

分 组	浓 度	24 h 抑制率 (%)
空白组		1.38±0.47
对照组		1.46±0.41
PDTC 组	50 μmol/L	43.22±2.56 ^a
	100 μmol/L	47.51±2.87 ^a
	150 μmol/L	52.38±3.12 ^a
	200 μmol/L	57.43±4.32 ^a

a 为 P<0.05, 与对照组比较。

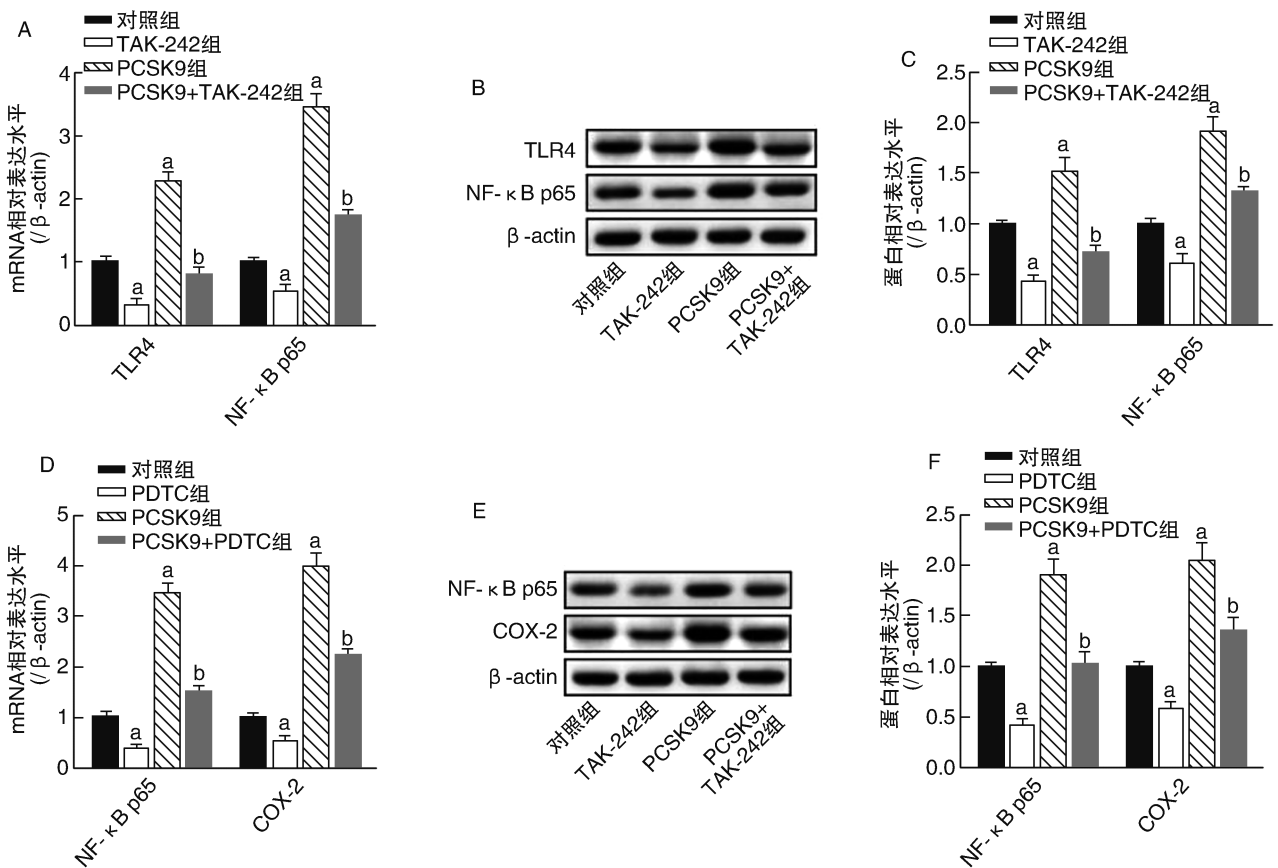


图 4. 人重组 PCSK9 蛋白在 TAK-242 或 PDTC 干预下对 TLR4、NF-κB、COX-2 表达的影响 (n=3) A 为 real-time PCR, B、C 为 Western blot, D 为 real-time PCR, E、F 为 Western blot。a 为 P<0.05, 与对照组比较; b 为 P<0.05, 与 PCSK9 组比较。

Figure 4. Effect of human recombinant PCSK9 protein on the expression of TLR4, NF-κB p65 and COX-2 in the presence of TAK-242 or PDTC (n=3)

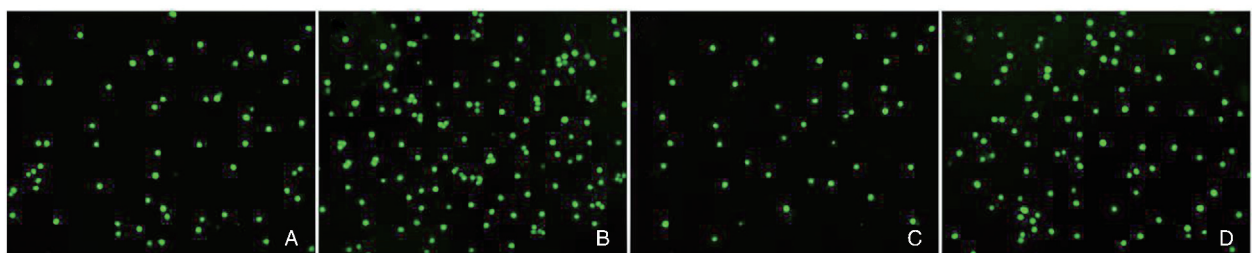


图 5. NS398 与 PCSK9 对单核-内皮细胞黏附的影响 (n=3) 荧光显微镜 (100×) 下观察每视野黏附 THP-1 细胞。A 为对照组, B 为 PCSK9 组, C 为 NS398 组, D 为 NS398+PCSK9 组。

Figure 5. Effect of NS398 and PCSK9 on adhesion of monocyte-endothelial cells (n=3)

表 3. NS398 与 PCSK9 对单核-内皮细胞黏附的影响 ($n=3$)
Table 3. Effect of NS398 and PCSK9 on adhesion of mono-cyte-endothelial cells ($n=3$)

分 组	THP-1 细胞黏附数(个/视野)
对照组	67.54±5.97
PCSK9 组	191.60±22.41 ^a
NS398 组	38.87±4.57 ^a
NS398+PCSK9 组	112.78±10.25 ^b

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 PCSK9 组比较。

3 讨 论

As 是导致全球心血管疾病发病率和死亡率持续升高的重要原因之一。ox-LDL 是导致血管内皮损伤的主要原因, 损伤的内皮细胞会促进单核细胞募集和黏附, 单核细胞随后穿过内膜迁移至内膜下分化成巨噬细胞, 摄取氧化型低密度脂蛋白形成泡沫细胞, 在血管壁上形成脂肪条纹。单核细胞与血管内皮细胞黏附是 As 形成过程中最早的现象之一, 也是 As 发生的重要环节。COX-2 在 As 发生发展过程中具有重要作用。炎性介质诱导产生的 COX-2 增加血管通透性, 促进单核-内皮细胞黏附, 诱导巨噬细胞趋化, 产生炎性细胞因子等多种途径参与 As 形成^[6]。有研究表明在兔 As 模型中 COX-2 在粥样斑块中表达增加, 使用 COX-2 抑制剂后可明显减少斑块面积^[7]。目前, PCSK9 对单核-内皮细胞黏附性的影响和机制并不十分明确, 因此本实验拟通过研究在 ox-LDL 作为炎性介质条件下研究 PCSK9 对 COX-2 介导的单核-内皮细胞黏附性的调节机制, 以了解 PCSK9 的促 As 机制。

Toll 样受体 (toll-like receptors, TLRs) 是 TLR 家族中第一个被发现的病原模式识别受体, 与 As 的发展密切相关^[8-9]。外来刺激因子与 TLR4 受体绑定, 经过一系列磷酸化的级联反应, 使 NF- κ B 定植于细胞核, 发挥其对 COX-2 等多种炎症相关基因进行表达调控的作用^[10]。据报道, 抵抗素可以通过其 C 末端部分与 TLR4 结合并上调 TLR4 表达, 从而激活 TLR4 信号传导^[11]。而 PCSK9 的 C 末端富含半胱氨酸的结构域与抵抗素在结构上是同源的, 其对于 TLR4 的作用可能与抵抗素相似^[12-13]。因此, 本研究提出假设 PCSK9 参与了 TLR4/NF- κ B/COX-2 信号通路的传导。并以 TAK-242 和 PDTC 分别阻断 TLR4 与 NF- κ B 的条件下观察人重组 PCSK9 蛋白对 TLR4/NF- κ B/COX-2 信号通路的作用机制。发现 TAK-242 和 PDTC 可抑制 PCSK9 蛋白对其阻断位点下游基因的上调作用。提示 PCSK9 可通过 TLR4 受体调控 NF- κ B p65 介导的 COX-2 表达。本研究

结果还发现 NS398 可抑制 PCSK9 的促单核-内皮细胞黏附作用。提示 PCSK9 可调节 COX-2 介导的单核-内皮细胞黏附作用。

综上所述, PCSK9 可通过 TLR4/NF- κ B p65 调控 COX-2 介导的单核-内皮细胞黏附作用。本研究首次提出 PCSK9 在单核-内皮细胞黏附中的作用及可能的机制, 这些发现为 PCSK9 促 As 作用提供了进一步见解, 以此为临床抗 PCSK9 药物的应用提供理论与实验依据。

[参考文献]

- [1] Otsuka F, Yasuda S, Noguchi T, et al. Pathology of coronary atherosclerosis and thrombosis [J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2016, 6 (4): 396-408.
- [2] Karaca M, Coban E, Ozdem S, et al. The association between endothelial dysfunction and hypertensive retinopathy in essential hypertension [J]. *Med Sci Monit*, 2014, 20(220): 78-82.
- [3] Wong BW, Meredith A, Lin D, et al. The biological role of inflammation in atherosclerosis [J]. *Can J Cardiol*, 2012, 28 (6): 631-641.
- [4] Santovito D, Mezzetti A, Cipollone F. Cyclooxygenase and prostaglandin synthases: roles in plaque stability and instability in humans [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2009, 20(5): 402-408.
- [5] Alallaf F, Fa HN, Alnefaie M, et al. The spectrum of familial hypercholesterolemia (FH) in Saudi Arabia: prime time for patient FH registry [J]. *Open Cardiovasc Med J*, 2017, 11(1): 66-75.
- [6] Liu X, Pan L, Wang X, et al. Leonurine protects against tumor necrosis factor- α -mediated inflammation in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 222(1): 34-42.
- [7] 王红艳, 蔡凡, 徐春亮, 等. 丹参酮 II A 对内皮细胞环氧化酶 2 表达的影响及相关机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22 (10): 997-1000.
- [8] Malgor R, Bhatt PM, Connolly BA, et al. Wnt5a, TLR2 and TLR4 are elevated in advanced human atherosclerotic lesions [J]. *Inflamm Res*, 2014, 63(4): 277-285.
- [9] Ren W, Wang Z, Hua F, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates LPS-induced TLR4/MD-2 pathway activation and inflammation in alveolar macrophages [J]. *Inflammation*, 2015, 38(1): 384-393.
- [10] Sina C, Arlt A, Gavrilova O, et al. Ablation of gly96/immediate early gene-X1 (gly96/iex-1) aggravates DSS-induced colitis in mice: Role for gly96/iex-1 in the regulation of NF- κ B [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2010, 16(2): 320-331.
- [11] Kang SW, Kim MS, Kim HS, et al. Celastrol attenuates adipokine resistin-associated matrix interaction and migration of vascular smooth muscle cells [J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114 (2): 398-408.
- [12] Hampton EN, Knuth MW, Li J, et al. The self-inhibited structure of full-length PCSK9 at 1.9 reveals structural homology with resistin within the C-terminal domain [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(37): 14604-14609.
- [13] 唐志哈, 江璐, 任重, 等. 枯草溶菌素转换酶 9 siRNA 抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的 THP-1 源性巨噬细胞炎症因子表达 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(3): 192-196.

(此文编辑 朱雯霞)