

## Rap1A DNA 甲基化在 Hcy 促进巨噬细胞增殖中的作用

张玲<sup>1,2</sup>, 李思睿<sup>1,3</sup>, 赵迅雷<sup>4</sup>, 田荣<sup>2</sup>, 袁茵<sup>2</sup>, 孙卓成<sup>2</sup>, 马生贤<sup>2</sup>, 郝银菊<sup>5</sup>, 杨晓玲<sup>1,2</sup>

(1. 宁夏血管损伤与修复研究重点实验室, 2. 宁夏医科大学基础医学院, 3. 宁夏医科大学公共卫生与管理学院, 4. 宁夏医科大学基础学院实验中心, 5. 宁夏医科大学药学院, 宁夏银川市 750004)

[关键词] RAW264.7 细胞; 同型半胱氨酸; Ras 相关蛋白 1A; DNA 甲基化

[摘要] 目的 探讨 Rap1A DNA 甲基化在同型半胱氨酸(Hcy)促进小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 增殖中的作用。方法 将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞分为对照组(Hcy 0  $\mu\text{mol/L}$ )和不同浓度的 Hcy(20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{mol/L}$ )干预组, 24 h 后用 XTT 检测细胞活力; Edu 检测细胞增殖情况; qRT-PCR 和 Western blot 检测 Rap1A 的 mRNA 和蛋白的表达; 甲基化特异性 PCR 法(MSP)检测 Rap1A 启动子区甲基化改变; 激光共聚焦显微镜观察 Rap1A 的变化; 将 Rap1A 干扰腺病毒转染 RAW264.7 细胞并用 Hcy 刺激, 检测 Rap1A 的 mRNA 和蛋白水平的变化及细胞的增殖情况。结果 与对照组相比, 不同浓度的 Hcy 干预细胞后, 细胞活力增强, 其中 100  $\mu\text{mol/L}$  Hcy 浓度最为明显( $P < 0.01$ ), 且细胞增殖水平明显增加( $P < 0.01$ ); 经 Hcy 刺激后, 细胞 Rap1A 的 mRNA 和蛋白表达量显著增加( $P < 0.01$ ), 启动子区甲基化水平降低( $P < 0.01$ ); 干扰 Rap1A 的表达后能够部分逆转 Hcy 所致的细胞增殖( $P < 0.01$ )。结论 Rap1A 启动子区低甲基化介导了 Hcy 导致的 RAW264.7 细胞增殖。

[中图分类号] R5; R363

[文献标识码] A

### Effect of DNA methylation of Rap1A on macrophages proliferation induced by Hcy

ZHANG Ling<sup>1,2</sup>, LI Sirui<sup>1,3</sup>, ZHAO Xunxia<sup>4</sup>, TIAN Rong<sup>2</sup>, YUAN Yin<sup>2</sup>, SUN Zhuocheng<sup>2</sup>, MA Shengxian<sup>2</sup>, HAO Yinju<sup>5</sup>, YANG Xiaoling<sup>1,2</sup>

(1. Ningxia Key Laboratory of Vascular Injury and Repair; 2. School of Basic Medicine, Ningxia Medical University; 3. School of Public Health and Management, Ningxia Medical University; 4. Experimental Center, School of Basic Medicine, Ningxia Medical University; 5. School of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

[KEY WORDS] RAW264.7 cells; homocysteine; Rap1A; DNA methylation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of DNA methylation of Rap1A in Hcy-induced RAW264.7 cell proliferation. **Methods** RAW264.7 cells in logarithmic growth phase were divided into control group (Control) and Hcy treated groups with different concentrations (20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{mol/L}$  Hcy). Cell viability was detected by XTT to screen optimal intervention time and concentration of Hcy after cells were treated for 24 hours. Edu test was used to analyze cell proliferation. The expression levels of Rap1A mRNA and protein were measured by qRT-PCR and Western blot respectively. Methylation-specific PCR (MSP) was used to detect the change of Rap1A promoter region. The changes of Rap1A were examined by immunofluorescence staining. Rap1A interference adenovirus was transfected into RAW264.7 cells and stimulated with Hcy to detect the changes of mRNA and protein levels of Rap1A and cell proliferation. **Results** Compared with control group, the cell viability was enhanced after cells were treated with different concentration of Hcy, which was the most obvious when cells were treated by 100  $\mu\text{mol/L}$  Hcy ( $P < 0.01$ ), as well as cell proliferation ( $P < 0.01$ ). But there was no time and concentration dependence. After Hcy stimulation, the expression of mRNA and protein of Rap1A increased significantly ( $P < 0.01$ ). The result of MSP revealed that the methylation level of Rap1A promoter region was decreased ( $P < 0.01$ ). Interfering with the expression of Rap1A can partially reverse the proliferation of cells induced by Hcy ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** DNA hypomethylation of Rap1A promoter region may play

[收稿日期] 2019-07-09

[修回日期] 2019-09-16

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81760095); 宁夏高等教育科学研究项目(NGY2017122); 宁夏高等学校一流学科建设(宁夏医科大学西部一流建设学科基础医学)(NXYLXK2017B07)

[作者简介] 张玲, 硕士研究生, 研究方向为心血管病理生理, E-mail 为 2537544865@qq.com。通信作者杨晓玲, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管病理生理, E-mail 为 yangxl@nxmu.edu.cn。

an important role in macrophage proliferation induced by Hcy.

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是甲硫氨酸循环代谢的中间产物<sup>[1]</sup>,可通过促血管平滑肌细胞增殖、诱导氧化应激、细胞凋亡和血管内皮功能紊乱等多种机制导致动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)<sup>[2-3]</sup>。在As病变早期,巨噬细胞增殖活性较高,晚期则相反<sup>[4]</sup>,相关研究表明Hcy可促进巨噬细胞增殖和激活,但机制尚未完全阐明。Ras相关蛋白1A(Ras related protein 1A, Rap1A)属于小GTP酶超家族,有文献报道其与细胞增殖、凋亡、分化和生存等细胞过程密切相关<sup>[5]</sup>。DNA甲基化是一种经典的表观遗传学修饰,能够负向调控基因的表达。但Rap1A甲基化是否参与了Hcy导致的巨噬细胞增殖,目前尚不清楚。本研究以小鼠单核巨噬细胞RAW264.7为研究对象,探讨Rap1A及其启动子甲基化在Hcy所致巨噬细胞增殖中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞来源及试剂

小鼠巨噬细胞RAW264.7购自美国ATCC公司。Rap1A鼠单克隆抗体(Abcam公司,ab181858);山羊抗鼠辣根过氧化物酶标抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);DMEM高糖培养基(Thermo公司);Hcy(索莱宝公司);胎牛血清(Sigma公司);cDNA反转录试剂盒(Thermo公司);实时荧光定量PCR检测试剂盒和EdU试剂盒(Takara公司);总RNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);总蛋白提取试剂盒(凯基公司);BCA蛋白含量检测试剂盒(凯基公司);XTT试剂盒(凯基公司);Rap1A扩增引物由上海生工生物股份有限公司设计合成;Cell-Light™ EdU染色试剂盒(Ribobio,中国广州);Rap1A干扰腺病毒由汉恒生物科技有限公司提供。

### 1.2 实验分组

Hcy最佳药物浓度筛选:RAW264.7细胞长至80%,加入Hcy使培养液中Hcy的终浓度分别为0、20、40、60、80和100 μmol/L。细胞孵育24 h,通过XTT实验检测细胞增殖活力,筛选最佳药物浓度。

实验分为对照组、Hcy组、Ad-GFP组、Ad-shRap1A组、Hcy+Ad-GFP组、Hcy+Ad-shRap1A组。Hcy组为100 μmol/L Hcy干预RAW264.7细胞24 h;Ad-GFP组为在RAW264.7细胞转染过表达腺病毒的GFP对照;Ad-shRap1A组为转染Rap1A过表达腺病毒;Hcy+Ad-GFP组为Hcy干预RAW264.7细胞

的基础上转染过表达腺病毒GFP对照;Hcy+Ad-shRap1A组为在Hcy干扰RAW264.7细胞的基础上转染Rap1A过表达腺病毒。

### 1.3 RAW264.7 细胞培养

将RAW264.7细胞培养于含10%胎牛血清、1%青链霉素DMEM培养基,37℃、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱内培养。细胞覆盖培养瓶的80%~90%时,用含0.25%胰蛋白酶消化并按1:4进行传代。待细胞融合80%左右时进行实验。RAW264.7细胞生长达到80%时,加入相应腺病毒(MOI=100)孵育8 h,加入Hcy(100 μmol/L),继续孵育24 h进行后续实验。

### 1.4 XTT 实验检测 RAW264.7 细胞活力

细胞计数后接种于96孔板,每孔10<sup>5</sup>个细胞,贴壁培养24 h后按不同实验目的处理。分别加入不同浓度,每个浓度设3个平行孔,设对照孔和空白孔,取24 h时段细胞进行检测,实验重复3次。每次测定时孔中加入XTT液10 μL,培养3 h后取出,在酶标仪上450 nm处测定吸光度,参考波长为655 nm;计算SI:SI=试验孔OD均值/对照孔OD均值。

### 1.5 EdU 染色法检测 RAW264.7 细胞增殖

Hcy干预方法与上述增殖测定相同。用EdU染色试剂盒检测DNA增殖活性。细胞用10 μmol/L EdU处理。3 h后,将细胞固定,用DAPI染色并用倒置显微镜观察。计算EdU阳性细胞比例。

### 1.6 Western blot 检测 Rap1A 的蛋白表达水平

收集巨噬细胞裂解物,通过BCA法测量蛋白质浓度。将蛋白质样品上样后进行电泳、转膜,用5%脱脂奶粉封闭2 h,加入稀释好的Rap1A鼠单克隆抗体4℃过夜,PBST洗三次,每次5 min,加入稀释好的山羊抗鼠辣根过氧化物酶标抗体孵育2 h,PBST洗涤后,加入显色底物,以β-actin为内参,凝胶成像分析仪上成像分析,计算灰度值比值。

### 1.7 荧光定量 PCR 检测巨噬细胞 Rap1A 的表达水平

细胞用PBS洗涤2次后,收集细胞,加入1 mL Trizol充分裂解细胞后,按照细胞RNA提取步骤,提取总RNA并测定其浓度和纯度,利用反转录试剂盒配置反应体系,在反转录仪上经25℃反应5 min,42℃ 60 min,70℃ 5 min终止反应,合成cDNA后,利用PCR扩增试剂盒配置反应体系,在PCR扩增仪上对目的基因Rap1A和内参基因GAPDH进行扩增。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算实验组目的基因相对于对照组目的基因的表达倍数。实验重复3次,取均值。采用Primer 5.0软件设计引物:Rap1A引物为上游5'-

TCCTTGTTTCAGGAGGCGTG-3', 下游 5'-TCGGTTC-CTGCAGTGTCCAG-3'; GAPDH 引物为上游 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3', 下游 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGACG-3'。

### 1.8 甲基化特异性 PCR

根据制造商的说明, 用 DNeasy Tissue Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) 提取来自细胞的基因组 DNA。在基因组 DNA 定量后, 使用 EZ DNA 甲基化-直接试剂盒 (Zymo Research, Orange, CA, USA) 对 1  $\mu\text{g}$  基因组 DNA 进行亚硫酸氢盐修饰。将亚硫酸氢盐转化的 DNA 重悬于 Tris-EDTA (TE) 缓冲液中

并储存在  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  直至样品准备好进行分析。在总体积为 20  $\mu\text{L}$  的溶液中扩增修饰的 DNA, 所述溶液含有 1 $\times$ PCR 缓冲液, 1.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 0.2  $\mu\text{mol/L}$  的每种引物, 200  $\mu\text{mol/L}$  的每种 dNTP 和 1 U Platinum Taq 聚合酶 (Life Technologies, Carlsbad, CA)。设计引物以使用 MethPrimer 程序 (<http://itsa.ucsf.edu/~urolab/methprimer>) 检测 CpG 位点的甲基化状态。用于未甲基化 PCR (MSP-U) 和甲基化反应 (MSP-M) 的引物序列如表 1 中所列。最终产物在 2% 琼脂糖凝胶中在 100 V 下电泳 20 min, 凝胶成像分析仪上成像分析。

表 1. Rap1A MSP 甲基化引物设计

Table 1. Primer sequences of methylated and unmethylated genes

基因	引物序列	温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )
Rap1A 上游	5'-CGGAGTATGTTATATACGGGG-3'	51.7
(M) 下游	5'-AAAATTCCCGTTCTAAACTACGAA-3'	51.4
Rap1A 上游	5'-TGGAGTATGTTATATATGGGG-3'	47.4
(U) 下游	5'-AAAATTCCCATTTCTAAACTACAAAT-3'	47.3
Rap1A 上游	5'-TTGGGTAATGAGTTTATAAGGG-3'	48.8
下游	5'-AAACTTCAACCCACCTAATATACAACAAAT-3'	52.2

### 1.9 统计学处理

定量数据以  $\bar{x}\pm s$  表示, 确定为正态分布后, 两组间比较采用  $t$  检验, 多样本均数间比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。所有统计计算均采用 SPSS 17.0 进行,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Hcy 对 RAW264.7 细胞增殖的影响

RAW264.7 细胞经不同浓度 Hcy (0、20、40、60、80 和 100  $\mu\text{mol/L}$ ) 刺激 24 h 后, 用 XTT 检测细胞活力, 结果发现不同浓度 Hcy 干预细胞 24 h 后, 细胞活力均出现了变化, 但无浓度依赖性, 以 100  $\mu\text{mol/L}$  Hcy 刺激后细胞增殖最为明显, 差异有统计学意义 ( $P<0.01$ ) (图 1A)。100  $\mu\text{mol/L}$  Hcy 刺激细胞, EdU 掺入 RAW264.7 细胞核的量最多 (图 1B)。

### 2.2 Hcy 对 Rap1A 表达的影响

RAW264.7 经 100  $\mu\text{mol/L}$  Hcy 干预后, 用 qRT-PCR 及 Western blot 检测 Rap1A 的表达, 结果显示, 与对照组相比, Rap1A 的 mRNA 及蛋白表达量分别升高了 80% 和 113%, 差异有统计学意义 ( $P<0.01$ ; 图 2A 和 2B)。

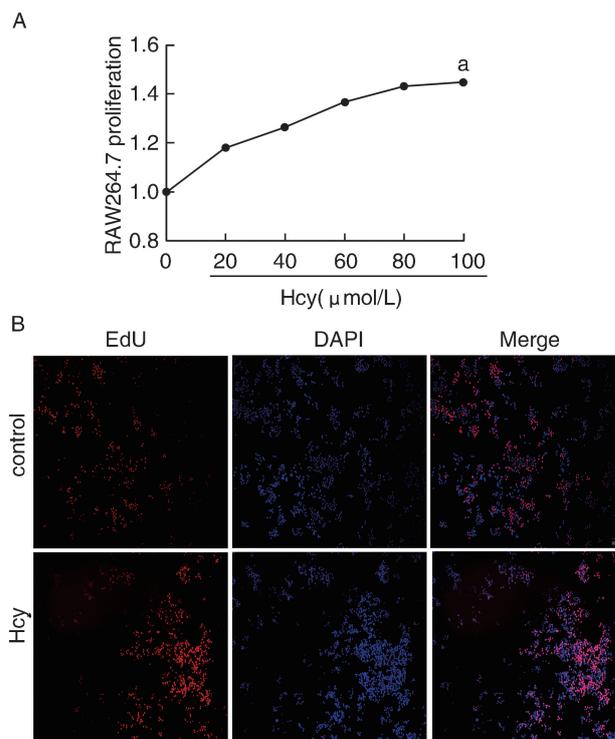


图 1. Hcy 对 RAW264.7 细胞增殖的影响 A 为不同浓度 Hcy 诱导细胞 24 h 后用 XTT 检测细胞活力; B 为 100  $\mu\text{mol/L}$  Hcy 诱导 RAW264.7 细胞 24 h 后细胞核 EdU 掺入量 (100 $\times$ )。a 为  $P<0.01$ , 与对照组比较。

Figure 1. Effect of Hcy on proliferation of RAW264.7 cells

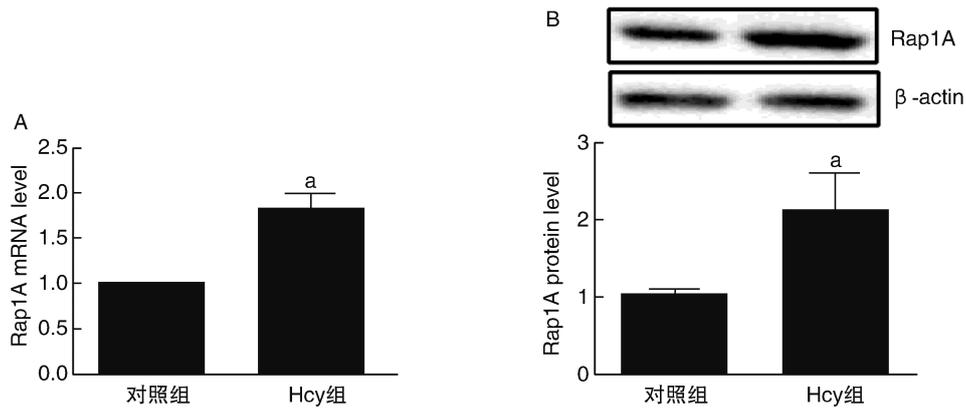


图2. Hcy对Rap1A mRNA(A)和蛋白(B)表达的影响 a为P<0.01,与对照组比较。

Figure 2. Effect of Hcy on mRNA (A) and protein (B) expression of Rap1A

2.3 Hcy对Rap1A启动子区甲基化的影响

利用生物信息学软件分析预测 Rap1A 启动子区结构,在启动子上游413~1 207 bp的位置存在一个 CpG 岛(图3A)。进一步用 100 μmol/L Hcy 干预

RAW264.7 后,利用 MSP 检测 Rap1A 启动子区的改变,结果显示,与对照组相比,Hcy 干预后,Rap1A 启动子区甲基化水平降低了 20%(图3B)。

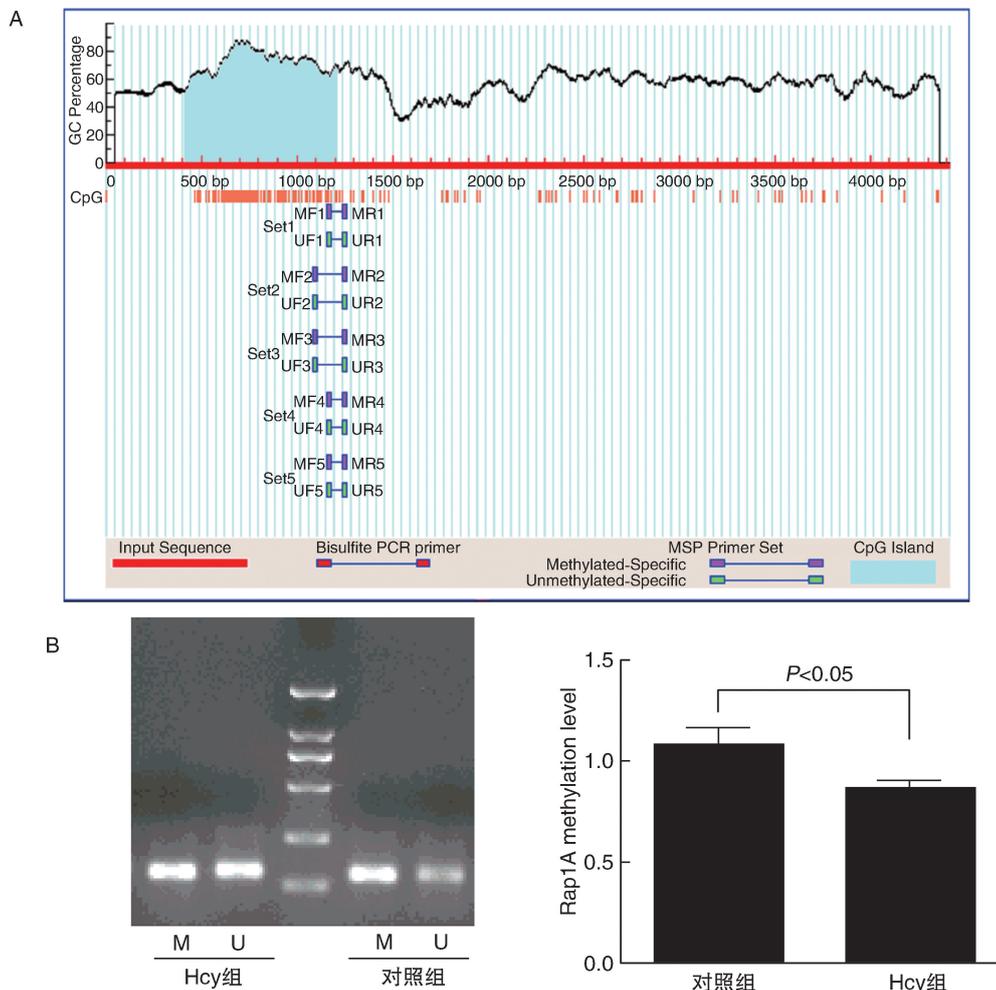


图3. Hcy对Rap1A启动子区甲基化的作用

A为生物信息学分析预测 Rap1A 启动子区 CpG 岛;B为MSP检测 Rap1A 启动子区甲基化状态。M为甲基化;U为非甲基化。

Figure 3. Effect of Hcy on methylation of the Rap1A promoter region

#### 2.4 转染 Rap1A 干扰腺病毒后 Rap1A 的表达变化

利用 Rap1A 干扰腺病毒(Ad-shRap1A)和 GFP-干扰对照(Ad-GFP)分别转染 RAW264.7 细胞,在荧光显微镜下观察荧光表达量,验证病毒转染成功

(图 4A)。qRT-PCR 和 Western blot 检测 Rap1A mRNA 及蛋白的表达,结果表明,与对照组相比,Ad-shRap1A 组 Rap1A 表达明显减少,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ;图 4B 和 4C)。

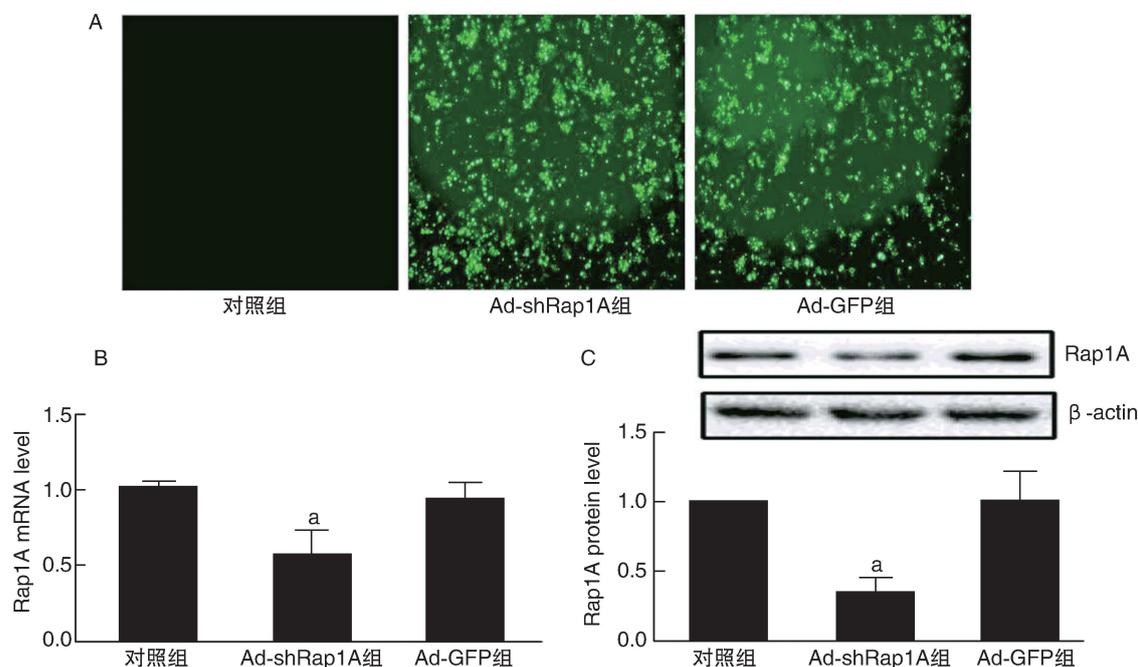


图 4. 转染 Rap1A 干扰腺病毒后 Rap1A 的表达水平变化 A 为荧光显微镜观察病毒转染效率(100×);B 和 C 分别为 qRT-PCR 和 Western blot 检测病毒 Rap1A 的表达。a 为  $P < 0.01$ ,与对照组比较。

A 为荧光显微镜观察病毒转染效率(100×);B 和 C 分别为 qRT-PCR 和 Western blot 检测病毒 Rap1A 的表达。

Figure 4. Expression change of Rap1A after transfection with Rap1A adenovirus

#### 2.5 Rap1A 对 RAW264.7 细胞增殖的影响

为了明确 Rap1A 在 Hcy 致 RAW264.7 细胞增殖中的作用,进一步转染 Ad-shRap1A、Ad-GFP 病毒至 RAW264.7 细胞,并用 100  $\mu\text{mol/L}$  Hcy 刺激 24 h 后,XTT 和 EdU 检测细胞增殖情况,结果表明,与对照组相比,Hcy + Ad-shRap1A 组 RAW264.7 细胞的增殖率明显降低,差异具有显著性( $P < 0.05$ ;图 5A);同时,Hcy 促进 EdU 掺入 RAW264.7 细胞核的量也明显减少(图 5B)。

### 3 讨论

Hcy 是甲硫氨酸循环代谢的中间产物,临床上将由各种原因导致血浆 Hcy 水平超过 15  $\mu\text{mol/L}$  称为高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)<sup>[6]</sup>,已经被确认为是 As 的独立危险因素,在心、脑血管疾病及外周血管硬化等疾病中具有重要作用<sup>[7]</sup>。HHcy 诱发 As 的机制与下述因素有关:引起内皮细胞损伤及功能障碍;使胆固醇和甘油三酯生物合成代谢异常;刺激血管平滑肌细胞增殖和迁

移;激活单核细胞;促进血栓形成<sup>[8]</sup>等。由于巨噬细胞增殖和吞噬脂质变成泡沫细胞是 As 的重要环节<sup>[9]</sup>,探讨 Hcy 在巨噬细胞增殖中的机制具有重要的意义。本研究结果显示,以 100  $\mu\text{mol/L}$  Hcy 刺激 24 h 巨噬细胞的增殖率增加最为明显,表明 Hcy 可以促进巨噬细胞增殖,与文献报道一致<sup>[10]</sup>。

Rap1 是小 G 蛋白三磷酸酶超家族成员,在细胞运动连接形成中具有重要的作用<sup>[11-12]</sup>。Rap1 在哺乳动物中表达<sup>[13]</sup>,是整合素活性和白细胞黏附的调节因子。Rap1A 为 Rap1 的两种同种亚型之一(Rap1A 和 Rap1B),是 Ras 相关成员蛋白质(Raps),与 Ras<sup>[14-15]</sup>的相似性最高。Rap1A 可以在 GTP 和 GDP 绑定位点之间转换并且刺激下游效应器传递信号<sup>[16-17]</sup>。近年发现,Rap1A 的作用包括调节细胞外信号,激活细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK),参与整合素介导的细胞活动,并且与细胞增殖、黏附、细胞转移以及成骨细胞分化密切相关<sup>[15,18-20]</sup>。然而,不同细胞类型 Rap1A 的具体作用各不相同。研究显示:在胶质母细胞瘤中 Rap1A 促进胶质母细胞瘤

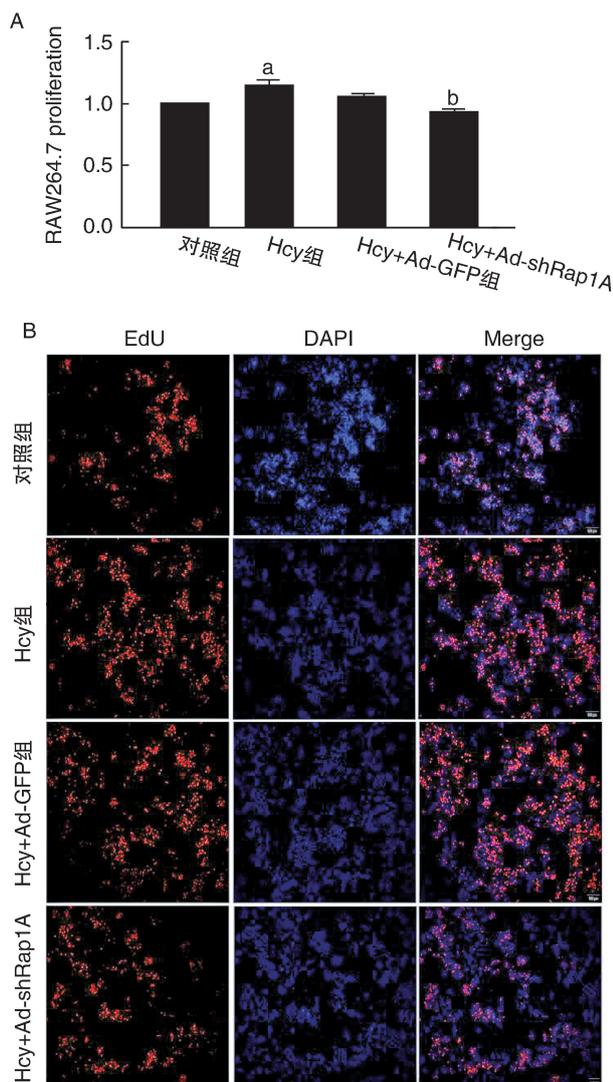


图5. XTT(图A)和EdU染色(图B,100×)检测Rap1A对RAW264.7细胞增殖的影响 a为 $P<0.05$ ,与对照组比较;b为 $P<0.05$ ,与Hcy组比较。

Figure 5. Effect of Rap1A on proliferation of RAW264.7 cells

增殖和肿瘤生长<sup>[21]</sup>;用miRNA敲低Rap1A后,能够抑制Rac1/PAK1通路,并减弱前列腺癌细胞增殖<sup>[22-23]</sup>,表明Rap1A参与细胞的增殖过程。本研究结果显示:在Hcy干预巨噬细胞后,伴随细胞增殖活性的增加,Rap1A表达水平升高,提示Hcy导致的巨噬细胞增殖可能与上调Rap1A的表达有关。为了进一步明确Rap1A在Hcy致巨噬细胞增殖中的作用,我们在巨噬细胞中转染腺病毒干扰Rap1A的表达,结果显示,转染干扰腺病毒后,Rap1A的表达明显降低,且能够一定程度逆转Hcy导致的巨噬细胞增殖,表明Rap1A是Hcy致巨噬细胞增殖的重要机制。

DNA甲基化是指在DNA甲基转移酶(DNA

methyltransferase, DNMT)的作用下,在CpG岛二核苷酸5'端的胞嘧啶加入甲基,使之变为5-甲基胞嘧啶,这种DNA修饰方式并没有改变基因碱基序列,但它却调控着基因的表达。在体内,Hcy通过甲硫氨酸循环的转甲基途径将甲基转移至DNA和蛋白质等受体从而发挥生物学效应,因此DNA甲基化成为调控基因表达的重要方式,也是目前研究的热点。生物信息学分析发现,Rap1A启动子区存在一长度为795 bp的CpG岛,提示Rap1A的表达可能受甲基化调控。进一步用MSP检测Rap1A启动子区甲基化,结果显示,Hcy刺激RAW264.7细胞后,Rap1A启动子区甲基化水平明显降低,与Rap1A表达趋势相反,表明Hcy引起巨噬细胞增殖与Rap1A启动子区低甲基化上调Rap1A的表达有关。NF- $\kappa$ B信号通路的异常激活与As疾病的发生密切相关。有研究发现,在As病灶中的巨噬细胞、平滑肌细胞等多种细胞中NF- $\kappa$ B过度活化<sup>[24-25]</sup>,但Rap1A是否通过此通路来调控巨噬细胞增殖还有待进一步研究。

综上所述,Rap1A表达上调介导了Hcy导致的巨噬细胞增殖,其机制与Rap1A启动子区低甲基化改变有关。我们的研究提示,以Rap1A信号为靶标调控巨噬细胞的增殖与炎症反应,可能为早期干预As病变的发生、发展提供新的思路。

#### [参考文献]

- [1] 张勇. 探究同型半胱氨酸与血脂的相关性及Hcy在脑梗死中的诊断价值[J]. 当代医学, 2019, 9: 122-123.
- [2] Bhatia P, Singh N. Homocysteine excess: delineating the possible mechanism of neurotoxicity and depression [J]. Fundam Clin Pharmacol, 2016, 29(6): 522-528.
- [3] 李者龙, 侯广立, 袁丽君. 靶向高密度脂蛋白的动脉粥样硬化防治研究: 从升高水平到改善功能[J]. 心脏杂志, 2019, 2: 212-216.
- [4] Lhoták Š, Gyulay G, Cutz JC, et al. Characterization of proliferating lesion-resident cells during all stages of atherosclerotic growth[J]. J Am Heart Assoc, 2016, 5(8): e003945.
- [5] Shimizu A, Zankov DP, Kurokawa-Seo M, et al. Vascular endothelial growth factor-A exerts diverse cellular effects via small G proteins, Rho and Rap[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(4): 1203.
- [6] 姜怡邓, 杨安宁, 王菊, 等. 高同型半胱氨酸血症对ApoE<sup>-/-</sup>鼠心肌酶谱的影响及与P53基因的相关性分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(1): 16-21.
- [7] Farhangi MA, Moradi F, Najafi M, et al. 10-y survival in patients who underwent coronary artery bypass grafting surgery in Tehran Heart Center-Coronary Outcome Measure-

- ment Study: The powerful predicting ability of the dietary inflammatory index and dietary antioxidant quality[J]. *Nutrition*, 2019, 63-64: 22-28.
- [8] Diez-Juan A, Perez P, Aracil M, et al. Selective inactivation of p27 (Kip1) in hematopoietic progenitor cells increases neointimal macrophage proliferation and accelerates atherosclerosis[J]. *Blood*, 2004, 103(1): 158-161.
- [9] 廖端芳, 龚勇珍, 孙少卫. 细胞炎症反应与脂质代谢的相互作用及调节[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(6): 623-629.
- [10] Korkmaz HI, Hahn NE, Jansen KM, et al. Homocysteine-induced inverse expression of tissue factor and DPP4 in endothelial cells is related to NADPH oxidase activity[J]. *Physiol Int*, 2019, 106(1): 29-38.
- [11] Duchniewicz M, Zemojtel T, Kolanczyk M, et al. Rap1A-deficient T and B cells show impaired integrin-mediated cell adhesion[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 26: 643-653.
- [12] Chu H, Awasthi A, White GC, et al. Rap1b regulates B cell development, homing, and T cell-dependent humoral immunity[J]. *J Immunol*, 2008, 181: 3373-3383.
- [13] Li Y, Yan J, De P, et al. Rap1A null mice have altered myeloid cell functions suggesting distinct roles for the closely related Rap1A and 1b proteins[J]. *J Immunol*, 2007, 179: 8322-8331.
- [14] Gomi F, Uchida Y, Endo S. Up-regulation of NSP3 by oligomeric A $\beta$  accelerates neuronal death through Cas-independent Rap1A activation[J]. *Neuroscience*, 2018, 386: 182-193.
- [15] Llaveró, Luque Montoro, Arrazola Sastre, et al. Epidermal growth factor receptor controls glycogen phosphorylase in T cells through small GTPases of the RAS family[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(12): 4345-4358.
- [16] Cantrell DA. GTPases and T cell activation[J]. *Immunol Rev*, 2003, 192: 122-130.
- [17] Marada S, Truong A, Ogden SK. The small GTPase Rap1 is a modulator of Hedgehog signaling[J]. *Dev Biol*, 2016, 409(1): 84-94.
- [18] Zou W, Izawa T, Zhu T, et al. Talin1 and Rap1 are critical for osteoclast function[J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(4): 830-844.
- [19] Dorn A, Zoellner A, Follo M, et al. Rap1A deficiency modifies cytokine responses and MAPK-signaling in vitro and impairs the in vivo inflammatory response[J]. *Cell Immunol*, 2012, 276: 187-195.
- [20] Mo SJ, Hou X, Hao XY, et al. EYA4 inhibits hepatocellular carcinoma growth and invasion by suppressing NF- $\kappa$ B-dependent RAP1 transactivation[J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2018, 38(9): 1-15.
- [21] Sayyah J, Bartakova A, Nogal N, et al. The Ras-related protein, Rap1A, mediates thrombin-stimulated, integrin-dependent glioblastoma cell proliferation and tumor growth[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(25): 17689-17698.
- [22] Xiang J, Bian C, Wang H, et al. miR-203 down-regulates Rap1A and suppresses cell proliferation, adhesion and invasion in prostate cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34: 8.
- [23] Bailey CL, Kelly P, Casey PJ. Activation of Rap1 promotes prostate cancer metastasis[J]. *Cancer Res*, 2009, 69: 4962-4968.
- [24] Gu LL, Qin Yang TT, Fu Y, et al. Role of GRP78, CHOP and TRB3 in cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2017, 10(1): 789-794.
- [25] Ye Z, Wang N, Xia P, et al. Parecoxib suppresses CHOP and Foxo1 nuclear translocation, but increases GRP78 levels in a rat model of focal ischemia[J]. *Neurochem Res*, 2013, 38(4): 686-693.

(此文编辑 许雪梅)