

本文引用: 房慧琴, 马晓维, 陈秋, 等. 基于生物信息学探讨与铜死亡相关的早、晚期动脉粥样硬化的差异基因及潜在标志物[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(11): 938-944. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.11.003.

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2023)31-11-0938-07

基于生物信息学探讨与铜死亡相关的早、晚期动脉粥样硬化的差异基因及潜在标志物

房慧琴¹, 马晓维², 陈秋¹, 崔淑菲³, 赵军绩², 赵宗芹⁴, 臧运华²

(1. 山东中医药大学第一临床医学院, 山东省济南市 250014; 2. 青岛大学附属青岛市海慈医院(青岛市中医医院)神经内科, 山东省青岛市 266033; 3. 青岛市黄岛区人民医院中医科, 山东省青岛市 266499; 4. 青岛大学附属青岛市海慈医院(青岛市中医医院)病理科, 山东省青岛市 266033)

[摘要] **[目的]** 通过生物信息学的方法筛选出与铜死亡相关的早、晚期动脉粥样硬化的差异基因, 探讨其作用机制, 并预测其潜在标志物。 **[方法]** 从 GEO 数据库中下载符合早、晚期动脉粥样硬化相关的信息 (GSE28829 和 GSE43292 数据集), 进行标准化处理等, 从文献中获得 19 个铜死亡相关基因, 并对铜死亡相关基因进行差异分析、富集分析、共识聚类算法、主成分分析、免疫细胞浸润和筛选核心基因以找到其作用机制及潜在标志物。 **[结果]** 最终筛选出 10 个铜死亡相关差异基因表达, 铜死亡相关差异基因相关性分析显示 GLS 与 DBT 呈强正相关 ($r=0.78, P<0.001$), NLRP3 与 DBT、GLS 呈强负相关 ($r=-0.62, P<0.001$); 铜死亡相关差异基因的 GO 富集分析显示, 主要与铜离子转运、铜离子稳态等过程有关, 且 KEGG 分析显示主要富集在铂耐药性、矿物质吸收、癌症中的中心碳代谢通路上。通过 MCODE 插件筛选出核心基因 SLC31A1、MTF1、ATP7B 和 ATP7A 4 种; 免疫细胞浸润以 M2 巨噬细胞、M0 巨噬细胞、静息 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞为主 ($P<0.05$); 免疫细胞与铜死亡相关差异基因相关性分析显示, 在动脉粥样硬化早期, GLS 与激活 NK 细胞呈强正相关 ($r=0.52, P<0.001$), FDX1、SLC31A1 与 CD8⁺T 细胞呈强负相关 ($r=-0.51, P<0.001$); 在动脉粥样硬化晚期, FDX1 与 M0 巨噬细胞呈强正相关 ($r=0.58, P<0.001$), FDX1 与 CD8⁺T 细胞呈强负相关 ($r=-0.55, P<0.001$); 主成分分析显示, 根据铜死亡相关差异基因的表达可以明确区分出 C1 和 C2 两种亚型。 **[结论]** 铜死亡与动脉粥样硬化发展之间的免疫相关变化很可能是诊治早、晚期动脉粥样硬化的关键, 核心基因 SLC31A1、MTF1、ATP7B 和 ATP7A 可能是动脉粥样硬化发展的潜在标志物及治疗靶点。

[关键词] 动脉粥样硬化; 铜死亡; 差异分析; 免疫细胞浸润; 生物信息学

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Study on differential genes and potential biomarkers of early and advanced atherosclerosis related to cuproptosis based on bioinformatics

FANG Huiqin¹, MA Xiaowei², CHEN Qiu¹, CUI Shufei³, ZHAO Junji², ZHAO Zongqin⁴, ZANG Yunhua²

(1. The First Clinical Medical College of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250014, China; 2. Department of Neurology, Qingdao Hiser Hospital Affiliated of Qingdao University (Qingdao Traditional Chinese Medicine Hospital), Qingdao, Shandong 266033, China; 3. Department of Traditional Chinese Medicine, Qingdao Huangdao District People's Hospital, Qingdao, Shandong 266499, China; 4. Department of Pathology, Qingdao Hiser Hospital Affiliated of Qingdao University (Qingdao Traditional Chinese Medicine Hospital), Qingdao, Shandong 266033, China)

[ABSTRACT] **Aim** To screen the early and advanced atherosclerosis differential genes associated with cuproptosis by bioinformatic methods, and analyze their mechanisms of action, and predict potential biomarkers. **Methods** The information related to early and advanced atherosclerosis (GSE28829 and GSE43292 data sets) was downloaded from GEO

[收稿日期] 2023-03-02

[修回日期] 2023-09-01

[基金项目] 山东省中医药科技发展计划项目 (2019-0605); 2018—2019 年度青岛市中医药科研计划项目 (2019-zyy015); 青岛市 2020 年度医药科研指导计划项目 (2020-WJZD226); 2022 年度医药卫生科研指导项目 (2022-WJZD041)

[作者简介] 房慧琴, 硕士研究生, 研究方向为中西医结合防治神经系统性疾病, E-mail: 1261487064@qq.com。通信作者臧运华, 博士, 主任医师, 研究方向为中西医结合防治神经系统性疾病, E-mail: 1477817427@qq.com。

database and standardized. 19 cuproptosis genes were obtained from the literature. Difference analysis, enrichment analysis, consensus clustering algorithm, principal component analysis, immune cell infiltration and screening core genes were used to find their action mechanisms and potential biomarkers. **Results** Finally, 10 differential genes related to cuproptosis were screened. The correlation analysis of differential genes related to cuproptosis showed a strong positive correlation between GLS and DBT ($r=0.78$, $P<0.001$), while NLRP3 showed a strong negative correlation with DBT and GLS ($r=-0.62$, $P<0.001$). GO enrichment analysis of differential genes related to cuproptosis was mainly related to copper ion transport and copper homeostasis, and KEGG analysis showed that it was mainly enriched in platinum resistance, mineral absorption and central carbon metabolic pathway in cancer. The PPI network analysis and MCODE were used to screen core genes. The results of immune cell infiltration showed that M2 macrophages, M0 macrophages, resting CD4 memory T cells, and CD8⁺T cells were dominant ($P<0.05$). The correlation analysis of differential genes related to immune cells and cuproptosis showed that in the early stage of atherosclerosis, GLS was strongly positively correlated with activated NK cells ($r=0.52$, $P<0.001$), FDX1 and SLC31A1 was strongly negatively correlated with CD8⁺T cells ($r=-0.51$, $P<0.001$); in the advanced stage of atherosclerosis, FDX1 was strongly positively correlated with M0 macrophages ($r=0.58$, $P<0.001$) and FDX1 was strongly negatively correlated with CD8⁺T cells ($r=-0.55$, $P<0.001$). Principal component analysis showed that two subtypes C1 and C2 could be clearly distinguished according to the expression of cuproptosis-related differential genes. **Conclusion** The immune-related changes between cuproptosis and the development of atherosclerosis may be the key to the diagnosis and treatment of early and advanced atherosclerosis, and the core genes SLC31A1, MTF1, ATP7B and ATP7A may be potential markers and therapeutic targets for the development of atherosclerosis.

[**KEY WORDS**] atherosclerosis; cuproptosis; difference analysis; immune cell infiltration; bioinformatics

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种慢性炎症性病变,可涉及多条血管。早期 As 可以没有临床表现,但当血管狭窄时,可导致部分器官缺血,As 的临床表现也会随着血管狭窄的范围不同有所差异;As 晚期易形成不稳定性斑块,进而发生破裂或糜烂,导致心肌梗死和脑卒中等^[1]。不稳定性 As 斑块的主要特征:薄纤维帽、大脂质坏死核心及斑点样钙化等^[2]。目前,对于早、晚期 As 的潜在标志物及作用机制尚不明确,需要深入研究,为 As 进展的靶向治疗和基因治疗提供依据。

铜死亡是一种依赖于细胞内铜的积累导致铜离子载体诱导细胞死亡的一种新型细胞死亡方式。铜以 Cu⁺和 Cu²⁺形式存在于生物体内,参与调节细胞的生理或病理过程^[3]。Cu²⁺过度积累在依赖线粒体呼吸的细胞中, Cu²⁺与二氢硫辛酸转乙酰基酶(dihydrolipoyl transacetylase, DLAT)结合,使 DLAT 发生异聚化。不溶性 DLAT 的增加将会产生细胞毒性,诱导细胞死亡^[4-5]。铜在组织修复、新内膜增厚和 As 中的作用已被提出,但其潜在的详细机制仍然未知。Bagheri 等^[6]发现 As 患者的血清铜水平升高,并随 As 的严重程度而升高。As 引发的并发症也与铜死亡密切相关,血浆铜水平升高与脑卒中风险增加有关^[7],饮用水中的铜污染也可能是脑卒中的危险因素^[8],这些金属离子水平的升高可能会影响 As 斑块的稳定性和破裂的程度。

目前,生物信息学分析已广泛用于各类疾病的研究中,但有关早、晚期 As 的铜死亡相关基因(cuproptosis-related genes, CRG)尚无相关报道。在本研究中,将 GSE28829 和 GSE43292 数据集合并,共 45 例 As 早期斑块样本和 48 例 As 晚期斑块样本,消除批处理效应,根据 Tsvetkov 等^[5]提供的 19 个铜死亡相关基因,分析 As 不同阶段的免疫细胞浸润及与 CRG 之间的差异性,并进行 PPI 网络、GO、KEGG 富集分析等确定早、晚期 As 与 CRG 作用的分子机制及潜在标志物。通过对早期 As 斑块样本与晚期 As 斑块样本的数据集进行深入分析,探讨 As 斑块进展过程中的免疫学变化,并从中寻找新的靶点来预防 As 的进展。

1 材料和方法

1.1 基因数据来源及预处理

本研究以“atherosclerosis”为关键词,通过 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载 GSE28829 和 GSE43292 两个数据集, GSE28829 数据集由 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 阵列检测出 13 例 As 早期斑块样本和 16 例 As 晚期斑块样本, GSE43292 数据集由 Affymetrix 人类基因 1.0ST 阵列检测出 32 例 As 早期斑块样本和 32 例 As 晚期斑块样本。

1.2 数据处理及差异基因识别

通过 R 语言对两个数据集的数据及差异基因

进行处理及识别,合并数据、校正数据及标准化等,如果有多个探针对应同一基因时,取其平均值作为表达值。通过 R 语言中的 SVA 包、combat 函数将校正后的数据与收集到的铜死亡基因取交集,消除批处理效应,得到 CRG,运用 limma 包进行差异基因分析,最终得到差异表达的铜死亡相关基因(differentially expressed cuproptosis-related genes, DE-CRG)。

1.3 DE-CRG 的 GO、KEGG 富集分析及核心基因的筛选

使用在线工具 (<https://www.bioinformatics.com.cn>) 对差异基因进行 GO、KEGG 富集分析,并将其导入到 STRING 11.0 数据库 (<https://string-db.org/cgi/input.pl>) 中,生物类型设为“Homo sapiens”,最低要求交互分数>0.4 高置信度,构建靶点蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,最后将得到的 PPI 网络导入到 Cytoscape3. 9.1 中,运用 MCODE 插件进行核心基因筛选。

1.4 免疫细胞浸润

采用 R 语言中 CIBERSORT 包对 As 进行免疫细胞浸润分析,CIBERSORT 是基于线性支持向量回归原理进行反卷积分析,预测基因表达谱中多种细胞类型的比例。以 $P<0.05$ 为标准进行过滤,以此来确定 As 免疫微环境中的 22 种免疫细胞比例,用 vioplot 包进行可视化分析;利用 R 语言对 CRG 进行相关性分析。

1.5 DE-CRG 亚型的识别及分析

引用 Consensus Cluster Plus 包对 CRG 进行聚类分析,进行一致性打分得到分型结果,并进行主成分分析(principal component analysis, PCA),绘制箱线图进行描述。

1.6 统计学分析

使用 R4.2.1 版本进行统计分析,两组之间的差异比较采用 t 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 差异基因的识别

对两组数据集进行差异基因分析,早期 As 与晚期 As 样本之间 CRG 的表达差异均具有统计学意义($P<0.05$),最终得到 10 个 DE-CRG(图 1A)。与晚期 As 相比,ATP7A、GLS、DBT、ATP7B 和 PDHA1 在早期 As 中呈现高表达,而 FDX1、CDKN2A、NLRP3、SLC31A1 和 MTF1 在晚期 As 中呈现高表达。DE-CRG 的相关性分析显示,GLS 与 DBT 呈强正相关($r=0.78$),ATP7A 与 DBT($r=0.53$)呈中等强度正相关,起协同作用;NLRP3 与 DBT、GLS 呈强负相关($r=-0.62$),NLRP3 与 ATP7B 呈中等强度负相关($r=-0.56$),CDKN2A 与 GLS 呈中等强度负相关($r=-0.52$),起拮抗作用(图 1B)。

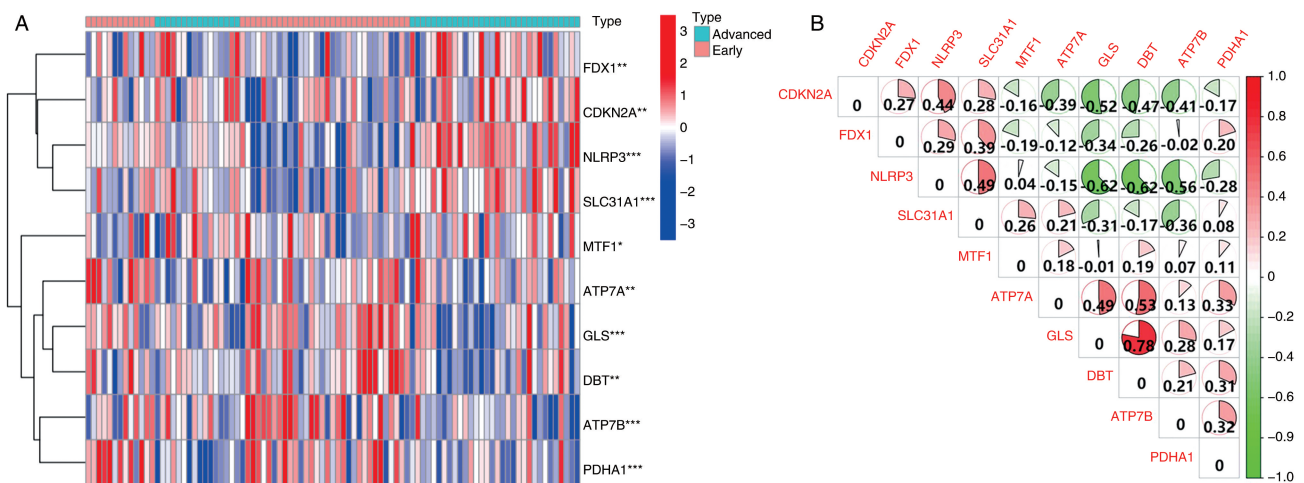


图 1. CRG 差异表达及相关性分析

CRG 的差异分析(A):红色代表高表达,蓝色代表低表达;***为 $P<0.001$,**为 $P<0.01$,*为 $P<0.05$ 。

DE-CRG 的相关性分析(B):红色代表两者正相关,绿色代表两者负相关;红色越深代表正相关越显著,绿色越深代表负相关越显著。

Figure 1. Differential expression and correlation analysis of CRG

2.2 GO、KEGG 富集分析及核心基因的识别

为了探讨 DE-CRG 的作用通路,使用在线工具

对 DE-CRG 进行 GO、KEGG 富集分析,选择前 10 的通路(图 2A、2B)。DE-CRG 的生物学过程(biological

process, BP) 主要富集在铜离子转运、铜离子稳态、过渡金属离子转运等, DE-CRG 的细胞学组分 (cellular components, CC) 主要富集在线粒体基质、晚期胞内体、反式-高尔基网络膜等, DE-CRG 的分子功能 (molecular function, MF) 主要富集在过渡金属离子跨膜转运体活性、ATP 酶-偶联阳离子跨膜转运体活性、铜离子结合等。KEGG 富集分析显示,

DE-CRG 主要以铂类耐药、矿物质吸收、癌症的中枢碳代谢通路为主。将 10 个 DE-CRG 输入到 STRING 数据库中构建 DE-CRG 的 PPI 网络 (图 2C), 并将其导入到 Cytoscape3. 9. 1 中, 通过 MCODE 插件筛选出核心基因 SLC31A1、MTF1、ATP7B、ATP7A (图 2D), 这 4 种基因可能是通过 DE-CRG 治疗 As 的关键基因。

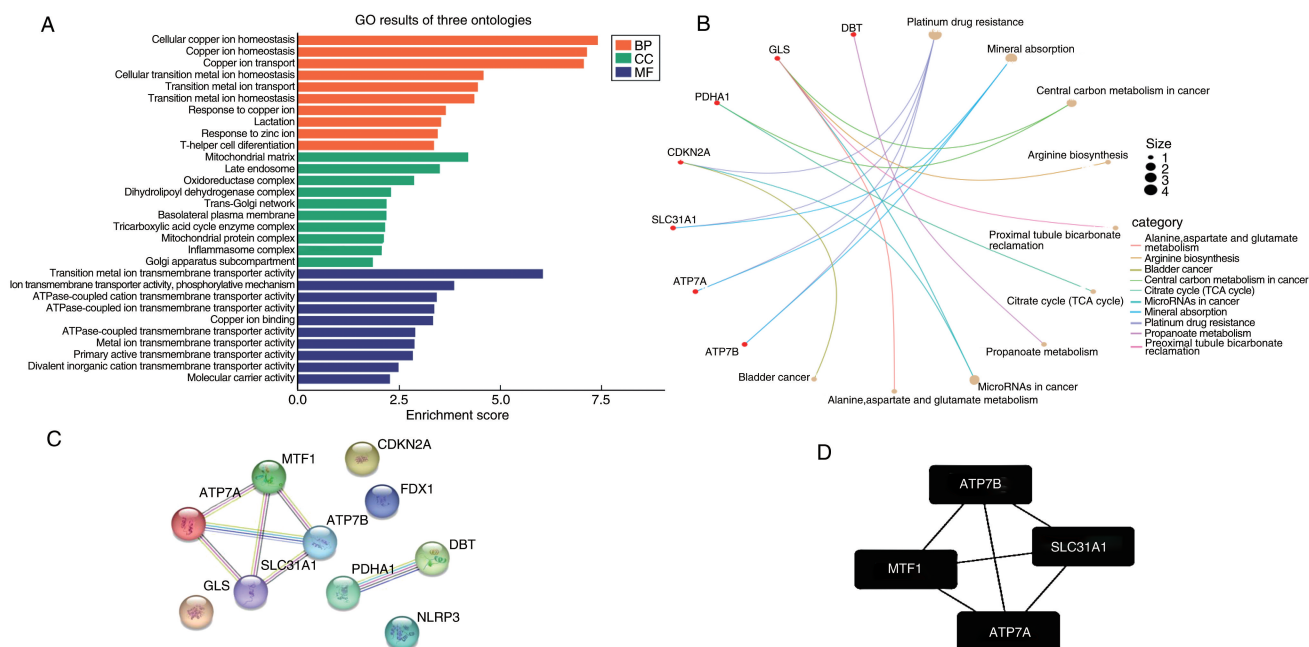


图 2. DE-CRG 的 KEGG、GO 富集分析及核心基因

A、B 为 DE-CRG 的 GO、KEGG 富集分析, C 为构建 DE-CRG 的 PPI 网络, D 为 MCODE 筛选出的核心基因。

Figure 2. KEGG and GO enrichment analysis of DE-CRG and core genes

2.3 免疫细胞浸润

根据两个数据集的基因表达谱, 运用 CIBERSORT 算法计算出多种细胞类型比例, 并通过 barplot 包进行可视化分析。免疫细胞浸润差异分析显示, 在 As 斑块中免疫细胞浸润程度最高的是 M0 巨噬细胞、M2 巨噬细胞、静息 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞, 而嗜酸性粒细胞浸润程度较少。与晚期 As 斑块相比, 早期 As 斑块中含有更高比例的 CD8⁺T 细胞、CD4 记忆休眠 T 细胞、激活 NK 细胞等 ($P < 0.05$), 而 CD4 记忆激活 T 细胞和 M0 巨噬细胞含量较低 ($P < 0.05$)。免疫细胞与 DE-CRG 的相关性分析显示, As 早期 GLS 与激活 NK 细胞呈强正相关 ($r = 0.52$, $P < 0.001$), FDX1、SLC31A1 与 CD8⁺T 细胞呈强负相关 ($r = -0.51$, $P < 0.001$), NLRP3 与 CD8⁺T 细胞呈中等强度负相关性 ($r = -0.50$, $P < 0.01$); As 晚期 FDX1 与 M0 巨噬细胞呈强正相关 ($r = 0.58$, $P < 0.001$), FDX1 与 CD8⁺T 细胞呈强负相关 ($r =$

-0.55 , $P < 0.001$)。表明 DE-CRG 均与免疫浸润中的多个细胞具有显著相关性, 可能是调节 As 患者免疫细胞浸润状态的重要因子 (图 3)。

2.4 DE-CRG 亚型的识别及免疫学特征

运用一致聚类算法将早、晚期 As 与 DE-CRG 进行免疫亚型分型, 当 $k = 2$ 时聚类分析最稳定 (图 4A), 最终将 45 例早期 As 斑块样本和 48 例晚期 As 斑块样本分为两种亚型: C1 和 C2。PCA 分析表明, 根据 DE-CRG 的表达可以明确区分这两种亚型 (图 4B)。分型免疫细胞浸润差异性分析显示, 在 As 早期, C1、C2 两个亚型在 CD8⁺T 细胞上存在差异; 在 As 晚期, C1、C2 两个亚型在 CD8⁺T 细胞、M0 巨噬细胞有显著差异 (图 4C、4D)。热图显示两种免疫亚型中的差异基因表达, FDX1、CDKN2A、NLRP3、SLC31A1、MTF1 在 C2 中的表达高于 C1, ATP7A、GLS、DBT、ATP7B、PDHA1 在 C2 中的表达低于 C1 (图 4E)。

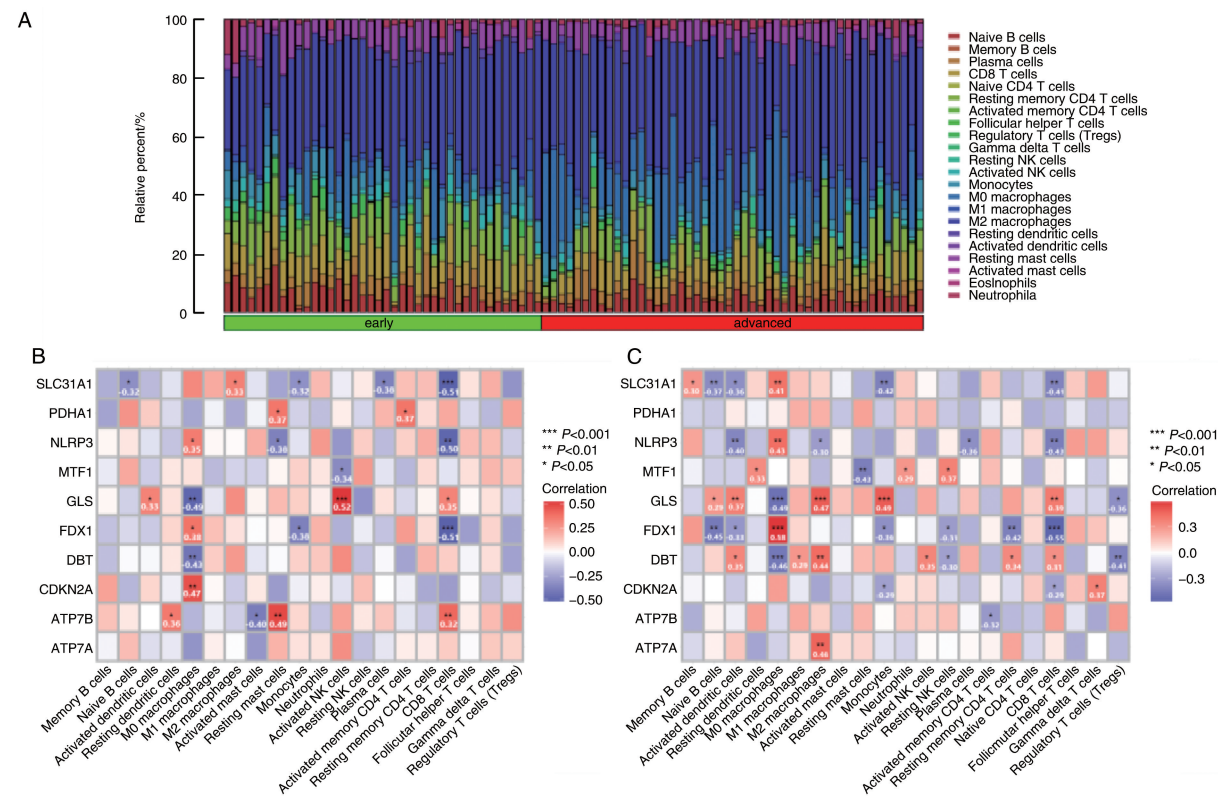


图 3. 免疫细胞浸润及相关性分析

A 为 As 斑块中免疫细胞浸润早期与晚期之间的差异分析,B 为免疫细胞与 DE-CRG 之间相关性分析;蓝色代表负相关,红色代表正相关,横坐标代表免疫细胞名称,纵坐标代表 DE-CRG。

Figure 3. Immune cell infiltration and correlation analysis

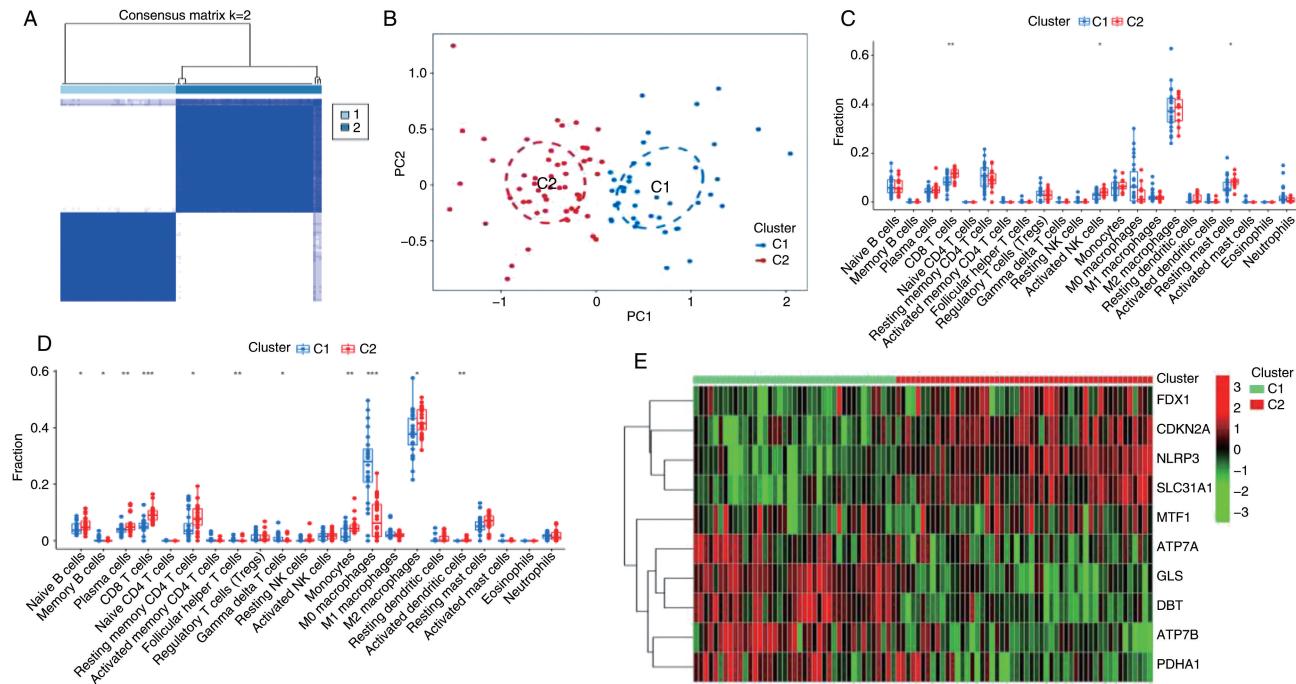


图 4. DE-CRG 亚型

A 为 k=2 时 consensus matrix 热图;B 为 PCA 分析显示两种亚型;C、D 为 DE-CRG 分型免疫细胞分析,横坐标为免疫细胞名称,纵坐标免疫细胞含量,蓝色代表 C1,红色代表 C2,*** 为 $P<0.001$,** 为 $P<0.01$,* 为 $P<0.05$;
E 为两种免疫亚型差异性热图,红色代表基因在样品中高表达,绿色代表基因在样品中低表达。

Figure 4. Subtypes of DE-CRG

3 讨论

As 是心脑血管疾病进展的重要因素^[9], 早期 As 斑块可发展到晚期且变成不稳定性斑块。As 的发病机制虽然提出了以脂质浸润、氧化应激、内皮损伤、炎症反应等为主的各种观点, 但病理过程比较复杂, 主要涉及到炎症、免疫相关机制等^[10-14]。目前尚无 CRG 与早、晚期 As 相关研究的报道, 且 CRG 在 As 早期和晚期的表达不同, 可影响到 As 的相关分析。

免疫细胞参与 As 主要体现在早、晚期 As 之间的差异表达。免疫细胞浸润分析显示, 早期 As 斑块与晚期 As 斑块浸润免疫细胞亚群有所相似, 其中以激活 NK 细胞、CD8⁺T 细胞、M0 巨噬细胞、M2 巨噬细胞和单核细胞浸润程度偏高。T 细胞和巨噬细胞代表了 As 斑块中最大的白细胞群^[15], T 细胞在病变血管中局部激活抗原是参与不稳定性斑块的先决条件^[16], 并参与调节 As 各个阶段, 揭示了其重要的分子机制^[17-18]。As 生成过程中促炎物质的主要来源是单核细胞, 单核细胞的积累和高密度脂蛋白胆固醇的减少与 As 的发生发展密切相关^[19-20]; 巨噬细胞可以调控炎症反应, 其减少主要依赖于循环单核细胞和血管壁中炎症和黏附分子表达减少^[21]; 而巨噬细胞死亡和坏死核心形成与 CD8⁺T 细胞的细胞毒性作用有关; 当铜缺乏时, 活化的内皮细胞在血管内粘附及黏附分子 ICAM-1/VCAM-1 的表达也会随之改变^[22]。之前多数研究的重点放在 T 细胞、巨噬细胞和单核细胞上, 其他免疫细胞如 NK 细胞等较少被关注。Nour-Eldine 等^[23]发现, 在 ApoE^{-/-}小鼠中用抗 asialo-GM-1 抗体将 NK 细胞耗尽, As 病变的发展显著减少; Winkels 等^[24]发现经 IL-2 预激活的 NK 细胞转移到 ApoE^{-/-}Rag2^{-/-}IL2rg^{-/-}小鼠体内, 可促进 As 病变中坏死核心形成。因此, NK 细胞很可能是 DE-CRG 治疗 As 的关键免疫细胞。

本研究进行了 GO 和 KEGG 富集分析来探讨 As 的 DE-CRG 潜在作用通路, 主要与铜离子转运、铜离子稳态、线粒体基质等铜死亡过程密切相关。铜离子促进细胞增殖与迁移, 参与生理修复过程, 如血管形成、神经生成, 以及各种病理过程, 包括肿瘤生长、As 和神经退行性疾病等^[25]; 铜离子参与低密度脂蛋白的氧化修饰, 从而促进 As 斑块形成^[26]。线粒体是细胞稳态所必需的, 参与凋亡、炎症、ROS 合成等^[27], 而 As 纤维帽和核心区表现出明显的线粒体功能障碍, 主要以线粒体 DNA 拷贝数减少和氧耗减少为主, 线粒体功能障碍与 As 之间密切相关^[28-29]。线粒体氧化代谢有助于巨噬细胞的激活,

且 M2 巨噬细胞的诱导和维持需要线粒体的功能^[30], 因此, 可以通过调节铜离子稳态、改善线粒体功能障碍来影响血管内皮功能、巨噬细胞极化等过程来治疗 As。

本研究利用 MCODE 进行核心基因的筛选, 筛选出 ATP7B、ATP7A、SLC31A1 和 MTF1 这 4 种基因作为 As 的 DE-CRG 的潜在标志物。铜转运 P 型 ATP 酶, 即 ATP7A、ATP7B, 利用能量将铜离子泵送过膜, 是细胞和全身铜稳态所必需的离子门控通道, 在哺乳动物铜稳态中起着重要作用。ATP7B 主要与威尔逊氏病和神经退行性疾病等有关, 通过调节脂质代谢进而阻止 As 的发生^[31]; ATP7A 是一种编码在 X 染色体上的多位点跨膜蛋白, 在鼠 As 病变中, ATP7A 在巨噬细胞中高表达, ATP7A 的下调可以减弱 THP-1 巨噬细胞中低密度脂蛋白的氧化^[32], 并可能减少巨噬细胞浸润^[33]。本研究发现, 在人体 As 晚期 ATP7A 与 M2 巨噬细胞高表达, 有强正相关性 ($r=0.46, P<0.01$), 与文献报道一致。高亲和铜转运体 SLC31A1 (又称 CTR1) 是细胞摄取铜的主要途径, ATP7A 和 SLC31A1 通过反式高尔基体网络的铜依赖性易位共同调节细胞内铜离子的生物利用度, 其中 SLC31A1-ATP7A-Rac1 通路参与板状伪足形成和血管平滑肌细胞迁移, 在血管损伤后形成新生内膜进而降低 As 的发生^[34-35]。MTF1 是重要的缺氧敏感转录因子, 与核因子 E2 相关因子 2 (NF-E2 related factor 2, NRF2) 共同控制金属硫蛋白启动子, 可保护内皮细胞免受重金属和 ROS 的毒性从而预防 As 的形成与发展^[36]。ATP7A、ATP7B、SLC31A1 和 MTF1 这 4 种基因变化的分析有助于早、晚期 As 的诊断与治疗策略的选择。

综上所述, 本研究的分析结果对于后续铜死亡在 As 进展方面的基础研究具有一定的参考价值。虽然从生物信息学角度识别出与 As 相关的铜死亡差异基因及潜在标志物, 但仍需实验研究阐述其作用机制。

[参考文献]

- [1] CHANG H J, LIN F Y, LEE S E, et al. Coronary atherosclerotic precursors of acute coronary syndromes [J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 71(22): 2511-2522.
- [2] KRUK M E, GAGE A D, JOSEPH N T, et al. Mortality due to low-quality health systems in the universal health coverage era: a systematic analysis of amenable deaths in 137 countries [J]. Lancet, 2018, 392(10160): 2203-2212.
- [3] SHI H, JIANG Y, YANG Y, et al. Copper metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: an update [J]. Biometals, 2021, 34(1): 3-14.
- [4] WANG Y, ZHANG L, ZHOU F. Cuproptosis: a new form of programmed cell death [J]. Cell Mol Immunol, 2022, 19(8): 867-868.

- [5] TSVETKOV P, COY S, PETROVA B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins [J]. *Science*, 2022, 375(6586): 1254-1261.
- [6] BAGHERI B, AKBARI N, TABIBAN S, et al. Serum level of copper in patients with coronary artery disease [J]. *Niger Med J*, 2015, 56(1): 39-42.
- [7] ZHANG J, CAO J, ZHANG H, et al. Plasma copper and the risk of first stroke in hypertensive patients: a nested case-control study [J]. *Am J Clin Nutr*, 2019, 110(1): 212-220.
- [8] JIANG Y, WANG L P, DONG X H, et al. Trace amounts of copper in drinking water aggravate cerebral ischemic injury via impairing endothelial progenitor cells in mice [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2015, 21(8): 677-680.
- [9] ZHU Y, XIAN X, WANG Z, et al. Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation [J]. *Biomolecules*, 2018, 8(3): 80.
- [10] GISTERÅ A, HANSSON G K. The immunology of atherosclerosis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2017, 13(6): 368-380.
- [11] WOLF D, LEY K. Immunity and inflammation in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2019, 124(2): 315-327.
- [12] KOELWYN G J, CORR E M, ERBAY E, et al. Regulation of macrophage immunometabolism in atherosclerosis [J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(6): 526-537.
- [13] TABARES-GUEVARA J H, VILLA-PULGARIN J A, HERNANDEZ J C. Atherosclerosis: immunopathogenesis and strategies for immunotherapy [J]. *Immunotherapy*, 2021, 13(14): 1231-1244.
- [14] 毕千叶, 冯磊, 马琦欣, 等. 炎症因素在自身免疫性疾病与动脉粥样硬化中的研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(5): 437-441.
- BI Q Y, FENG L, MA Q X, et al. Research progress on the association of inflammatory factors in the pathogenesis of autoimmune diseases and atherosclerosis [J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(5): 437-441.
- [15] BUSINARO R. Neuroimmunology of the atherosclerotic plaque: a morphological approach [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2013, 8(1): 15-27.
- [16] 李文浩, 李香. T细胞在动脉粥样硬化性心血管疾病中的研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(4): 1003-1006.
- LI W H, LI X. Research progress of T cells in atherosclerosis cardiovascular disease [J]. *Chin J Gerontol*, 2023, 43(4): 1003-1006.
- [17] TABAS I, LICHTMAN A H. Monocyte-macrophages and T cells in atherosclerosis [J]. *Immunity*, 2017, 47(4): 621-634.
- [18] HERRERO-FERNANDEZ B, GOMEZ-BRIS R, SOMOVILLA-CRESPO B, et al. Immunobiology of atherosclerosis: a complex net of interactions [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(21): 5293.
- [19] GANJALI S, GOTTO AM JR, RUSCICA M, et al. Monocyte-to-HDL-cholesterol ratio as a prognostic marker in cardiovascular diseases [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(12): 9237-9246.
- [20] 杨尧, 闫明静, 徐昆, 等. 代谢重编程: 单核/巨噬细胞训练免疫参与动脉粥样硬化的新机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2023, 31(3): 199-204.
- YANG Y, YAN M J, XU K, et al. Metabolic reprogramming: a novel mechanism of monocyte/macrophage trained immunity in atherosclerosis [J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(3): 199-204.
- [21] POTTEAUX S, GAUTIER E L, HUTCHISON S B, et al. Suppressed monocyte recruitment drives macrophage removal from atherosclerotic plaques of ApoE^{-/-} mice during disease regression [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(5): 2025-2036.
- [22] LIUZZO G, PEDICINO D, VINCI R, et al. CD8 lymphocytes and plaque erosion: a new piece in the jigsaw [J]. *Eur Heart J*, 2020, 41(37): 3561-3563.
- [23] NOUR-ELDINE W, JOFFRE J, ZIBARA K, et al. Genetic depletion or hyperresponsiveness of natural killer cells do not affect atherosclerosis development [J]. *Circ Res*, 2018, 122(1): 47-57.
- [24] WINKELS H, LEY K. Natural killer cells at ease: atherosclerosis is not affected by genetic depletion or hyperactivation of natural killer cells [J]. *Circ Res*, 2018, 122(1): 6-7.
- [25] FUKAI T, USHIO-FUKAI M, KAPLAN J H. Copper transporters and copper chaperones: roles in cardiovascular physiology and disease [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 315(2): C186-C201.
- [26] EL-HAJJAR L, HINDIEH J, ANDRAOS R, et al. Myeloperoxidase-oxidized LDL activates human aortic endothelial cells through the LOX-1 scavenger receptor [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(5): 2837.
- [27] ALEVRIADOU B R, SHANMUGHAPRIYA S, PATEL A, et al. Mitochondrial Ca²⁺ transport in the endothelium: regulation by ions, redox signalling and mechanical forces [J]. *J R Soc Interface*, 2017, 14(137): 20170672.
- [28] PENG W, CAI G, XIA Y, et al. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis [J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38(7): 597-606.
- [29] 乔莞宁, 陈虹印, 张杨. 氧化应激与动脉粥样硬化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2023, 31(4): 312-321.
- QIAO W N, CHEN H Y, ZHANG Y. Oxidative stress and atherosclerosis [J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(4): 312-321.
- [30] VAN DEN BOSSCHE J, BAARDMAN J, OTTO N A, et al. Mitochondrial dysfunction prevents repolarization of inflammatory macrophages [J]. *Cell Rep*, 2016, 17(3): 684-696.
- [31] BLADES B, AYTON S, HUNG Y H, et al. Copper and lipid metabolism: a reciprocal relationship [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2021, 1865(11): 129979.
- [32] QIN Z, KONANIAH E S, NELTNER B, et al. Participation of ATP7A in macrophage mediated oxidation of LDL [J]. *J Lipid Res*, 2010, 51(6): 1471-1477.
- [33] KIM H W, CHAN Q, AFTON S E, et al. Human macrophage ATP7A is localized in the trans-Golgi apparatus, controls intracellular copper levels, and mediates macrophage responses to dermal wounds [J]. *Inflammation*, 2012, 35(1): 167-175.
- [34] ASHINO T, SUDHAHAR V, URAO N, et al. Unexpected role of the copper transporter ATP7A in PDGF-induced vascular smooth muscle cell migration [J]. *Circ Res*, 2010, 107(6): 787-799.
- [35] DAS A, ASH D, FOU DA A Y, et al. Cysteine oxidation of copper transporter CTR1 drives VEGFR2 signalling and angiogenesis [J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(1): 35-50.
- [36] FUJIE T, SEGAWA Y, YOSHIDA E, et al. Induction of metallothionein isoforms by copper diethyldithiocarbamate in cultured vascular endothelial cells [J]. *J Toxicol Sci*, 2016, 41(2): 225-232.

(此文编辑 文玉珊)