

单核细胞自体吞噬相关基因蛋白表达与冠状动脉粥样硬化斑块易损性的关系

赵凯, 陈文强, 徐兴晟, 孟晓, 张运, 李继福

(山东大学齐鲁医院心内科, 山东省济南市 250012)

[关键词] 动脉粥样硬化; 易损性斑块; 单核细胞; 自体吞噬; 血管内超声

[摘要] **目的** 研究人外周血单核细胞的自体吞噬与冠状动脉粥样硬化斑块易损性的关系。**方法** 对 40 例稳定型心绞痛(SAP)患者及 40 例急性冠状动脉综合征(ACS)患者行冠状动脉造影和血管内超声检查。应用 Western blot 技术检测两组患者外周血单核细胞的 Beclin-1 蛋白、微管相关蛋白 1 轻链 3(MAP1-LC3)及自噬相关蛋白 Atg5-Atg12 复合物的表达量,应用激光共聚焦显微镜检测自噬特异性蛋白 MAP1-LC3 在单核细胞内的表达量。**结果** 血管内超声检测 SAP 组斑块共计 62 个,其中纤维性斑块占 48% (30/62),而 ACS 组斑块共计 71 个,其中脂质斑块占 56% (40/71)。ACS 患者外周血单核细胞的 Beclin-1、MAP1-LC3 II 及 Atg5-Atg12 的表达量显著低于 SAP 组($P < 0.01$)。**结论** 稳定型心绞痛患者的冠状动脉斑块以较稳定的纤维性斑块为主,而急性冠状动脉综合征患者的冠状动脉斑块以易损性软的脂质斑块为主,且冠心病患者外周血单核细胞的自体吞噬随着冠状动脉粥样硬化斑块的不稳定性的增加而降低,增强外周血单核细胞的自体吞噬可能成为稳定冠状动脉粥样硬化斑块,减少急性冠状动脉事件,降低死亡风险的一个潜在的治疗靶点。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Study of Relationship Between Autophagy Related Proteins Expression in Monocytes and Vulnerability of Coronary Atherosclerotic Plaques

ZHAO Kai, CHEN Wen-Qiang, XU Xing-Sheng, MENG Xiao, ZHANG Yun, and LI Ji-Fu

(Department of Cardiology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan, Shandong 250012, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Vulnerable Plaque; Monocyte; Autophagy; Intravascular Ultrasound

[ABSTRACT] **Aim** To elucidate the relationship between autophagy of peripheral blood monocyte (PBM) and the vulnerability of atherosclerotic plaques. **Methods** Forty patients with stable angina pectoris (SAP), 40 patients with acute coronary syndrome (ACS) comprised the study groups. All patients underwent coronary angiography (CAG) and intravascular ultrasound (IVUS) examinations. The expression levels of autophagy related protein Beclin-1, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1-LC3) and Atg5-Atg12 complex in PBM were detected by Western blot. MAP1-LC3 (autophagy-specific protein) in the PMB was also examined by laser scanning confocal microscope. **Results** Sixty two plaques were detected by IVUS in the SAP patients, which included 30 fibrous ones, while 71 plaques were evidenced in the ACS group, which encompassed 40 lipid ones. The expression levels of Beclin-1, MAP1-LC3 and Atg5-Atg12 complex in PBM in ACS patients were significantly lower than those in SAP patients ($P < 0.01$). **Conclusion** The patients in SAP group had more stable fibrous plaques than those in the ACS group ($P < 0.01$), while the ACS patients had more vulnerable soft lipid ones than those in the SAP group ($P < 0.01$). The autophagy of PBM in patients with coronary heart disease (CHD) decreases with the increasing vulnerability of atherosclerotic plaques. Enhancing the autophagy of PBM may be a potential therapeutic target of stabilizing atherosclerotic plaques, which will reduce the acute coronary events and lower the mortality of patients with CHD.

[收稿日期] 2013-07-31

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30971216)

[作者简介] 赵凯, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化发生发展机制, E-mail 为 zhaokai198810@163.com。陈文强, 医学博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化发生发展机制, E-mail 为 chenwenqiang33@sina.com。通讯作者李继福, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化发生发展机制, E-mail 为 lijifu@medmail.com.cn。

急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)是导致冠心病死亡的主要原因,是以冠状动脉粥样硬化斑块破裂或糜烂,继发完全或不完全闭塞性血栓形成为病理基础的一组临床综合征^[1],主要包括不稳定型心绞痛、非ST段抬高型及ST段抬高型心肌梗死。通过对ACS死亡患者的尸检中发现冠状动脉斑块中存在大量的单核巨噬细胞、淋巴细胞和肥大细胞,其中巨噬细胞是破裂斑块中细胞的主要成分,斑块中的巨噬细胞是斑块不稳定的关键因素,而巨噬细胞主要来源之一为外周血中的单核细胞,深入研究冠心病患者外周血中单核细胞的功能状态对了解动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的病理生理和心血管事件的发生具有重要意义。研究发现As斑块中巨噬细胞的变化与细胞的自体吞噬(autophagy)关系密切,自体吞噬参与了As的发生、发展过程。本文通过对比稳定型心绞痛(stable angina pectoris, SAP)及ACS患者外周血单核细胞(peripheral blood monocyte, PBM)的自体吞噬水平,来探讨单核细胞的自体吞噬与冠状动脉粥样硬化斑块易损性的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选择2012年7月至2013年5月在山东大学齐鲁医院心内科住院治疗的冠心病患者80例,其中男52例,女28例,年龄42~79岁,平均 61.73 ± 7.21 岁。根据患者心绞痛症状和美国心脏协会(American Heart Association, AHA)诊断标准均诊断为稳定型心绞痛及急性冠状动脉综合征^[2,4]。SAP组、ACS组各40例,两组病人的全部患者均进行冠状动脉造影(coronary angiography, CAG)及血管内超声(intravascular ultrasound, IVUS)检查。根据病史、体征及实验室检查,所有患者均排除各种感染性疾病、肿瘤及结缔组织病。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 试剂及抗体 淋巴细胞分离液购自Solarbio公司,兔抗人单抗微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1-LC3)B(Cat3868)购自Cell Signaling Technology公司,兔抗人单抗Beclin-1购自PL Laboratories公司(CatPL031353R),兔抗人单抗ATG5(CatABC14)购自Merck Millipore公司,鼠抗人单抗 β -actin、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔、山羊抗鼠二抗以及山羊抗兔(荧光二抗)均购自北京中杉金桥生物技术有限公

司,ECL化学发光试剂购自美国Millipore公司,蛋白提取试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒免疫染色固定液购自碧云天生物技术研究所。

1.2.2 仪器 离心机购自Thermo Fisher Scientific公司,激光共聚焦显微镜购自德国Leica公司,日本JEM-1200透射电子显微镜,荷兰飞利浦公司生产的V-3000型心血管造影仪,美国Boston Scientific公司产型号为iLab的血管内超声仪。

1.3 冠状动脉造影术

采用荷兰飞利浦公司生产的V-3000型心血管造影仪,以Seldingers法穿刺右侧桡动脉,采用Judkins法行左、右冠状动脉造影,进行常规多角度体位投照。判断标准采用直径法,以左冠状动脉主干、左前降支、左回旋支、右冠状动脉中1支或1支以上的内径狭窄 $\geq 50\%$ 为诊断冠心病标准。造影结果均由2名经验丰富的医师进行读片分析。

1.4 血管内超声检查

采用美国Boston Scientific公司生产、型号为iLab的IVUS仪进行病变部位的检查。IVUS探头为3.2 F,频率为40 MHz。将0.014英寸导引钢丝送至病变血管,常规冠状动脉内注入0.2 mg硝酸甘油后,沿导引钢丝插入IVUS探头导管,通过狭窄病变至血管远端,然后以0.5 mm/s的速度缓慢回撤探头导管,标记斑块远端、近端图像,录像供脱机分析和存档。根据斑块的回声特性对斑块进行分类:(1)脂质性斑块:斑块回声低于外膜组织回声,具有低回声或无回声区;(2)纤维性斑块:回声强度与外膜组织相似;(3)钙化性斑块:斑块回声强度超过外膜组织,并伴有斑块后方声影;(4)混合性斑块:具有以上几种斑块的回声特征。斑块破裂表现为斑块中有一腔隙与管腔相连,其上可见残余的纤维帽成分,血栓的超声学特点为血管腔内的团块状回声,呈层状或叶状,当血流在血管中运动时,血栓呈现为闪亮的斑点状低回声图像。IVUS图像由2名操作者独立观察,结果达到完全一致者纳入本研究。

1.5 外周血单核细胞的分离

行冠状动脉造影的同时,在桡动脉内取动脉血20 mL,肝素抗凝,立即置4℃冰箱降温,以抑制血中单核细胞的活性。30 min后,5 mL血液以3 000 r/min离心10 min,血清标本冻存于-80℃冰箱中;其余15 mL动脉血用密度梯度离心法分离单个核细胞,根据单核细胞贴壁的特性,分离出单核细胞。

1.6 Western blot 检测单核细胞中的MAP1-LC3、Beclin-1及Atg5-Atg12含量

用RIPA裂解液裂解单核细胞,提取总蛋白,用

BCA 法测各组蛋白浓度,每泳道加总蛋白量 40 μg 左右。制备 15% SDS-PAGE,进行 90 V/120 V 恒压电泳,经湿转(200 mA,50 min)转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶室温下封闭 2 h,分别加入 MAP1-LC3 兔抗人多克隆抗体、Beclin-1 兔抗人多克隆抗体、ATG5 兔抗人多克隆抗体(1:1 000 稀释)和 β -actin 鼠抗人单克隆抗体(1:1 000 稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 洗涤后, β -actin 加入辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG(1:5 000 稀释),MAP1-LC3 加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(1:5 000 稀释),两者均于室温孵育 90 min,TBST 洗涤后,ECL 化学发光试剂显影。

1.7 细胞免疫荧光法检测 MAP1-LC3 在单核细胞的表达

1.7.1 单核细胞的分离及爬片

取已经 3 000 r/min 离心 20 min 后的全血 15 mL,吸取白细胞层,加入到 15 mL 离心管中,加无菌 PBS 溶液至 5 mL,混匀后吸取并缓慢加入另一已装有 5 mL 淋巴细胞分离液的 15 mL 离心管中,2 500 r/min 离心 30 min,吸取在上、中层界面处有一以单个核细胞包括淋巴细胞和单核细胞为主的白色云雾层狭窄带,PBS 溶液清洗 2 遍,去除血小板,按每毫升血液标本加 0.2 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基重新混悬细胞,取细胞悬液 0.1 mL,加等量 0.2% 锥虫蓝染液检查细胞存活度。本实验提取的单个核细胞纯度 90%,收获率达 80%,活细胞百分率达 95%。细胞按 $2 \times 10^8/\text{L}$ 密度接种于 24 孔板中(每孔底已放入已灭菌的薄膜片)。

1.7.2 免疫荧光染色鉴定

待细胞汇合度达到 70% 左右开始进行染色步骤,用 PBS 溶液洗 3 遍后,加入免疫染色固定液室温固定 30 min,PBS 溶液洗 3 遍,每次 5 min,用 0.1% Triton X-100 (PBS 配制)对细胞透化处理 10 min,PBS 溶液洗 2 遍,5% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) (PBS 配制)溶液室温封闭 30 min 后,PBS 溶液清洗 2 遍,加入 MAP1-LC3 兔抗人多克隆抗体(用 PBS 溶液以 1:200 稀释)后,放湿盒中 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。第 2 天,先用 PBS 洗 2 遍,加入 FITC 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(用 PBS 溶液以 1:50 稀释),室温孵育 2 h,PBS 溶液洗 3 遍,每次 5 min,加入 0.5 mg/L DAPI (PBS 配制)染色 10 min,用 PBS 洗 3 遍,去除多余的 DAPI 后,封片剂封片,用激光共聚焦显微镜镜检。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。所有计量资料予以正态分布检验,符合正态分布的以 $\bar{x} \pm s$ 表示,偏态资料采用中位数表示,两组间比较采用 t 检

验,偏态分布资料采用秩和检验;计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 冠状动脉造影结果

SAP 组中单支血管病变 17 例,2 支血管病变 18 例,3 支血管病变 3 例。ACS 组中单支血管病变 14 例,2 支血管病变 21 例,3 支血管病变 5 例。两组相比较,差异无统计学意义。两组病人典型的冠状动脉造影结果见图 1。

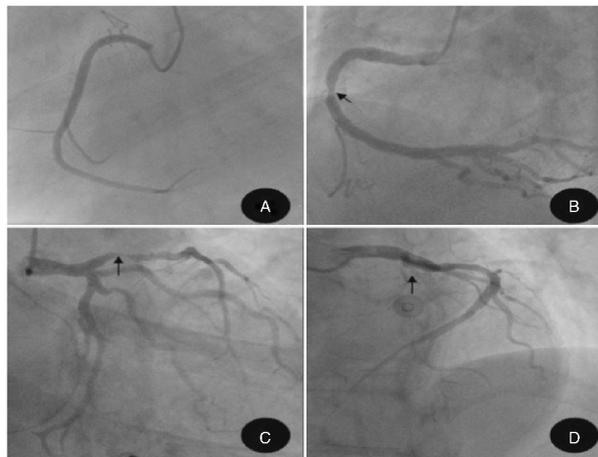


图 1. 两组患者典型的冠状动脉造影结果 A 为正常右冠状动脉,B 为右冠状动脉中段中度狭窄,C 为左前降支近段重度狭窄,D 为左前降支近段完全闭塞。

Figure 1. The typical results of coronary arteriography in two study groups

2.2 血管内超声结果

IVUS 在 SAP 组共检测出 62 处斑块,其中主要包括 30 处纤维性斑块,大约占 48%;而在 ACS 组检测出 71 处斑块,其中包含 40 处脂质斑块,大约占 56%。两组比较有统计学差异($P < 0.01$;表 1、图 2)。

表 1. 两组冠心病患者冠状动脉狭窄病变处的斑块类型

Table 1. Coronary plaque styles of the two groups

斑块类型	SAP 组 ($n = 40$)	ACS 组 ($n = 40$)
斑块数(个)	62	71
纤维性斑块(个)	30 (48.4%)	15 (21.1%) ^a
脂质斑块(个)	14 (22.6%)	40 (56.3%) ^a
钙化性斑块(个)	10 (16.1%)	9 (12.7%)
混合型斑块(个)	8 (12.9%)	7 (9.9%)
破裂斑块(个)	12 (19.4%)	31 (43.7%) ^a

a 为 $P < 0.01$,与 SAP 组比较。

2.3 Western blot 检测结果

单核细胞中 Beclin-1、MAP1-LC3 及 Atg5-Atg12 复合物蛋白含量的变化:以 β -actin 作为内参照, Beclin-1、MAP1-LC3 及 Atg5-Atg12 复合物蛋白表达量的光密度扫描分析显示, ACS 组的 Beclin-1、MAP1-LC3 及 Atg5-Atg12 蛋白表达水平均显著低于 SAP 组 ($P < 0.01$; 图 3)。

2.4 激光共聚焦显微镜检测两组单核细胞中

MAP1-LC3 的表达量

经绿色荧光 FITC 标记的自噬特异性蛋白 MAP1-LC3 和 DAPI 染色的细胞核,在激光共聚焦显微镜下清晰可见,MAP1-LC3 绿色荧光散在分布于胞膜附近。荧光强度分析显示,ACS 组荧光强度显著低于 SAP 组 ($P < 0.01$; 图 4)。表明冠心病患者外周血中单核细胞的自体吞噬随着动脉粥样硬化斑块不稳定性的增加而变弱。

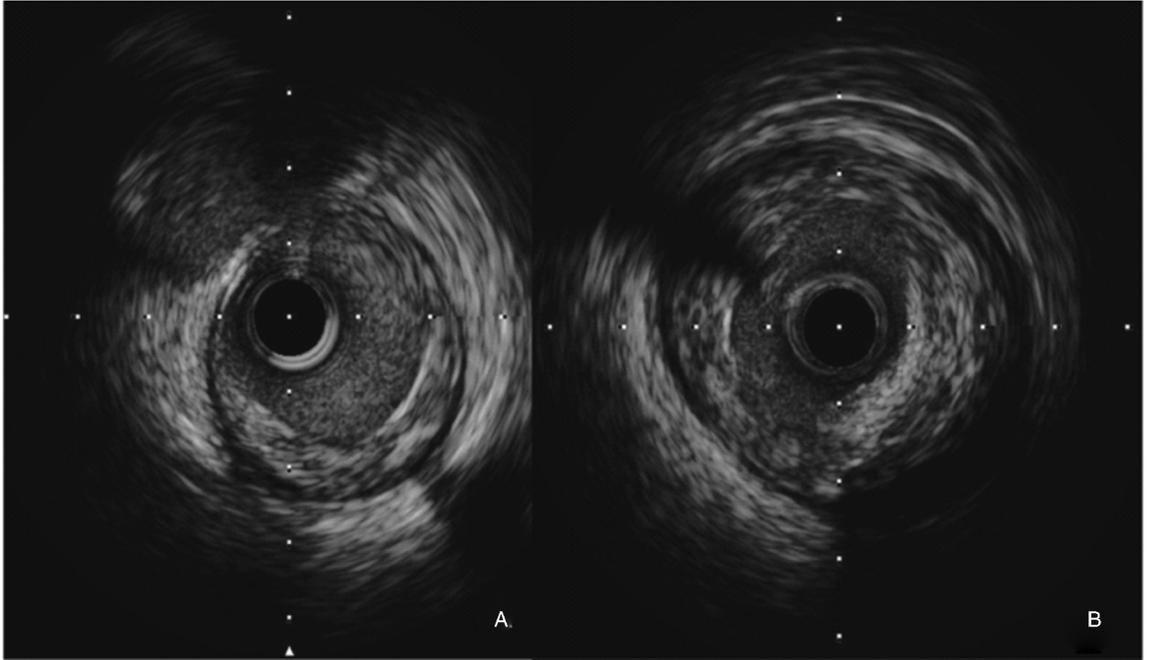


图 2. 冠状动脉血管内超声显像 A 为稳定型心绞痛患者的 IVUS 图像,显示为回声增强的纤维性斑块;B 为急性冠状动脉综合征患者的 IVUS 图像,显示为低回声的脂质性斑块。

Figure 2. Intravascular ultrasound imaging of coronary arteries

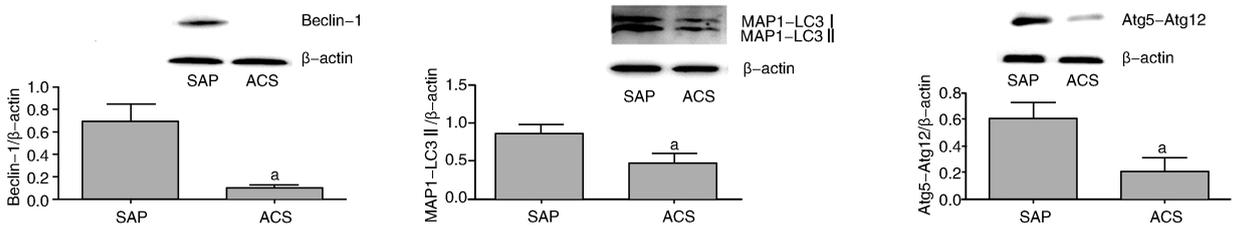


图 3. 两组患者单核细胞中 Beclin-1、MAP1-LC3 及 Atg5-Atg12 的表达含量 a 为 $P < 0.01$,与 SAP 组比较。

Figure 3. Expression levels of Beclin-1, MAP1-LC3 and Atg5-Atg12 in two different groups

3 讨论

冠状动脉粥样硬化性心脏病 (coronary atherosclerotic heart disease, CAHD) 简称冠心病,是全球死亡率最高的疾病之一。目前,我国以冠心病为主的心脑血管疾病发病趋势面临快速增长的严峻局面,根据世界卫生组织 2011 年的报告,中国的冠心病死

亡人数已列世界第 2 位。急性冠状动脉综合征为冠心病的一种急症,发病时情况最为危急,是导致冠心病死亡的主要原因,且有极高复发风险。研究表明,ACS 主要是由于动脉粥样硬化易损斑块破裂,继发完全或不完全闭塞性血栓形成为病理基础的一组临床综合征。所谓易损斑块是指具有较薄纤维帽、较大的脂质核心和富含巨噬细胞和新生血管

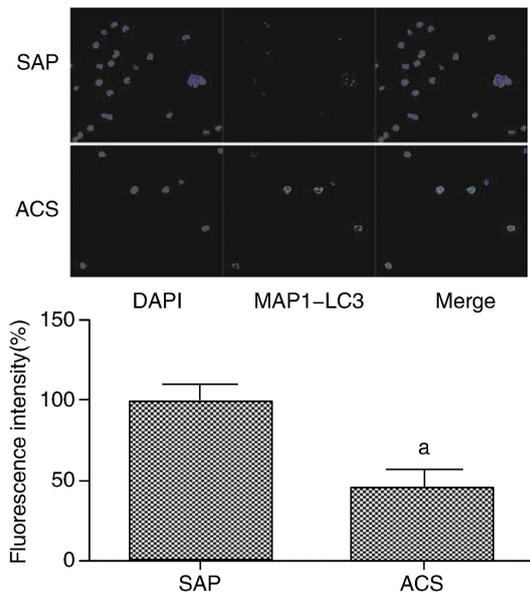


图 4. 两组单核细胞中 MAP1-LC3 在激光共聚焦显微镜下染色情况 ($\times 400$) a 为 $P < 0.01$, 与 SAP 组比较。

Figure 4. The expression of MAP1-LC3 in two different groups detected by immunofluorescence ($\times 400$)

的斑块,犹如薄皮大馅的饺子,易于破裂,继发形成血栓,造成冠状动脉的急性闭塞。而稳定型的动脉粥样硬化斑块为纤维帽较厚而脂质池较小的斑块,犹如馅少皮厚的饺子,存在这种斑块的冠状动脉,由于斑块不会发生破裂,冠状动脉不会完全闭塞,因而也不会出现急性心肌梗死。因此深入研究斑块不稳定性的发生机制,使易损斑块向稳定的方向转变,无疑对减少急性冠状动脉事件和降低冠心病的死亡率有重要的意义^[5,6]。

自体吞噬简称自噬,是真核细胞特有的普遍生命现象,是指细胞生长过程中,胞质内形成以双层膜结构包裹长寿命蛋白以及自体多余或失去功能的细胞器的自噬体为特征的一系列生物化学过程^[7,8]。自噬能够平衡细胞的合成和降解,循环利用细胞降解产物,因此在细胞发育、细胞免疫、组织重塑及对环境适应等方面有着十分重要的作用。除此之外,自噬参与了多种疾病的病理过程,如神经退行性疾病、肿瘤、心血管疾病及感染性疾病等^[9,10]。研究发现 As 斑块中细胞的变化与细胞的自噬关系密切,自体吞噬参与了 As 的发生、发展过程。

Beclin-1 基因叫自噬相关基因 6 (autophagy associated gene 6, Atg6), 在真核细胞中高度保守,其编码的蛋白 Beclin-1 分子量大约为 60 kDa,属于自噬相关蛋白家族之一,在自体吞噬中起到重要调节作用,Beclin-1 蛋白和它的结合物,即 III 型磷酸肌醇 3

激酶,也叫 Vps34,与在自体吞噬过程中形成吞噬小体的起始有关^[11]。通过 Western blot 检测 Beclin-1 蛋白的表达水平,可对细胞的自噬水平进行监测和评估。同样,Atg5-Atg12 可以与 Atg16 形成 Atg5-Atg12-Atg16 复合物,为自噬泡的伸展扩张及其形成提供了重要的平台^[12]。微管相关蛋白 1 轻链 3 分子量约 17 kDa,为广泛分布于哺乳动物组织和细胞中的可溶性蛋白,是酵母 Atg8 的同系物。MAP1-LC3 分为两种形式,即 MAP1-LC3 I 和 MAP1-LC3 II,MAP1-LC3 I 为胞质蛋白,而 MAP1-LC3 II 为细胞膜结合性蛋白。在自噬溶酶体内外膜形成的过程中,MAP1-LC3 I 在 E1 泛素样酶 Atg7 和 E2 泛素样酶 Atg3 的催化下,被磷脂酰乙醇胺修饰,形成膜结合蛋白 MAP1-LC3 II,定位于前自噬体和自噬体的膜上,MAP1-LC3 II 的含量多少与自噬泡的数量成正比,因此成为自噬的标志物^[13,14]。利用 Western blot 技术、细胞免疫荧光技术等对 MAP1-LC3 I 及 MAP1-LC3 II 进行监测,对研究哺乳动物的自噬现象具有重要意义^[15]。

近几年,大量研究表明自体吞噬现象与心血管的许多疾病有着极为密切的关系,在肥厚性心脏病、心力衰竭、心肌缺血再灌注损伤等疾病均检测出自噬的存在,但是在目前发病率极高的冠心病,尤其是关于动脉粥样硬化斑块易损性与自噬关系的研究比较缺乏。我们的 Western blot 实验结果表明,ACS 组外周血单核细胞中的 Beclin-1、Atg5-Atg12 及 MAP1-LC3 表达量均显著低于 SAP 组 ($P < 0.01$)。激光共聚焦检测细胞免疫荧光的结果同样表明,ACS 组单核细胞中的 MAP1-LC3 表达显著低于 SAP 组 ($P < 0.01$)。因此,我们得出结论,冠心病患者外周血单核细胞的自体吞噬随着冠状动脉粥样硬化斑块的不稳定性的增加而降低。

在众多影像学技术当中,血管内超声在冠心病的诊断治疗中越来越凸显其重要作用。冠状动脉造影虽然一直被称为诊断冠心病的“金标准”,但是它只能显示管腔的狭窄情况,而对评价管壁形态、壁厚以及评价斑块稳定性等方面都有很大的局限性。而 IVUS 不仅可以精确地测量管腔直径及横截面积,更重要的是可以评估冠状动脉斑块的稳定性,因为越来越多的资料表明,急性冠状动脉综合征的发生不是与冠状动脉狭窄的程度成正比,更多 ACS 患者是由于其冠状动脉存在易损斑块,具有这种斑块的冠状动脉,即使冠状动脉管腔狭窄程度不到 70%,也可能迅速进展为急性心肌梗死。而如果冠状动脉只存在稳定型的斑块,即使在管腔狭窄

90%以上,由于斑块不会发生破裂,冠状动脉不会完全闭塞,因而也不会出现急性心肌梗死^[16]。我们的IVUS检查结果也表明SAP患者以稳定质硬的纤维性斑块为主,ACS患者以易损质软的脂质性斑块为主。

总之,我们的研究表明,冠心病患者外周血单核细胞的自体吞噬随着冠状动脉粥样硬化斑块的不稳定性的增加而降低,增强外周血单核细胞的自体吞噬可能成为稳定冠状动脉粥样硬化斑块,减少急性冠状动脉事件,降低死亡风险的一个新的治疗靶点。

[参考文献]

- [1] Niessner A, Goronzy JJ, Weyand CM. Immune-mediated mechanisms in atherosclerosis: prevention and treatment of clinical manifestations [J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13 (36): 3 701-710.
- [2] Fraker TD Jr, Fihn SD, Gibbons RJ, et al. American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Writing Group. 2007 chronic angina focused update of the ACC/AHA 2002 guidelines for the management of patients with chronic stable angina: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Writing Group to develop the focused update of the 2002 guidelines for the management of patients with chronic stable angina [J]. *Circulation*, 2007, 116(23): 2 762-772.
- [3] Jneid H, Anderson JL, Wright RS, et al. American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Writing Group. 2012 ACCF/AHA focused update of the guideline for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Writing Group to develop the update of the 2007 guideline and replace the 2011 focused update [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 60(7): 645-681.
- [4] O'Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, et al. American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Writing Group. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: Executive summary--A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 61(4): 485-510.
- [5] 万槐斌, 成锦, 周婉明, 等. 阿托伐他汀联合小檗碱对稳定型心绞痛患者血脂水平的影响 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2013, 5(1): 19-20.
- [6] 赵秀峰, 刘丽军, 信栓力, 等. 急性冠状动脉综合征患者血浆IL-6、MMP水平及瑞舒伐他汀的干预作用 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2013, 5(2): 134-135.
- [7] Yoshimori T. Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(2): 453-458.
- [8] Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(11): 931-937.
- [9] Kundu M, Thompson CB. Autophagy: basic principles and relevance to disease [J]. *Annu Rev Pathol*, 2008, 3(11): 427-455.
- [10] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion [J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1 069-075.
- [11] Martinet W, Verheye S, De Meyer GR. Everolimus-induced mTOR inhibition selectively depletes macrophages in atherosclerotic plaques by autophagy [J]. *Autophagy*, 2007, 3(3): 241-244.
- [12] Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, et al. Dissection of autophagosome formation using ATG5-deficient mouse embryonic stem cells [J]. *J Cell Biol*, 2001, 152(1): 657-668.
- [13] Martinet W, De Meyer GR. Autophagy in atherosclerosis: A cell survival and death phenomenon with therapeutic potential [J]. *Circ Res*, 2009, 104(7): 304-317.
- [14] Ichimura Y, Imamura Y, Emoto K, et al. In vivo and in vitro reconstitution of ATG8 conjugation essential for autophagy [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(39): 40 584-592.
- [15] Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli AG, et al. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system [J]. *Nature*, 2007, 447(7148): 1 121-125.
- [16] Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I [J]. *Circulation*, 2003, 108(14): 1 664-672.

(此文编辑 曾学清)