

联合基因沉默 TLR2、4 对于 LPA 诱导的 RASMCs 表型转化的影响*

李小好^{1,2}, 杨波³, 姜丹⁴, 周志斌^{4△}(1. 武汉科技大学附属天佑医院急诊科, 武汉 430064 2. 武汉工程大学医院, 武汉 430074;
3. 湖北省中山医院心内科, 武汉 430030; 4. 武汉科技大学附属天佑医院神经内科, 武汉 430064)

[摘要] 目的 应用 RNA 干扰技术单一或者联合沉默 Toll 样受体 (TLR) 2、4 基因, 探讨其在溶血磷脂酸 (LPA) 诱导的平滑肌细胞 (VSMCs) 表型转化中的作用。方法 根据文献建立分化表型大鼠 VSMCs (RASMCs) 培养体系, 予 TLR2、4 特异性小干扰 RNA (siRNA) 转染 RASMCs, LPA 1 $\mu\text{mol/L}$ 处理 4 h 后, 荧光定量 RT-PCR 法、Western blot 法检测分化和去分化细胞表型标志基因平滑肌肌动蛋白 (SMA- α) 和骨桥蛋白 (OPN) 基因及蛋白水平的表达。结果 TLR2、4-siRNA 分别转染细胞后可显著抑制 LPA 诱导的 RASMCs 细胞 SMA- α 基因、蛋白下调及 OPN 基因、蛋白上调, TLR2、4 联合干扰组对于 LPA 诱导的 RASMCs 细胞 SMA- α 基因、蛋白下调及 OPN 基因、蛋白上调的抑制作用较 TLR2、4 单独干扰组进一步加强。结论 TLR2、4 信号通路参与了 LPA 诱导的表型转化, 联合干预 TLR2、4, 有可能成为稳定动脉粥样硬化斑块、抗粥样硬化治疗的一个新途径之一。

[关键词] Toll 样受体; RNA 干扰; 溶血磷脂素类; 血管; 肌细胞, 平滑肌; 表型转化

[中图分类号] R34

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)04-0448-03

Effects of joint gene silence of TLR2 and TLR4 on LPA induced phenotypic modulation of RASMCs*

Li Xiaohao^{1,2}, Yang Bo³, Jiang Dan⁴, Zhou Zhibin^{4△}

(1. Department of Emergency, Affiliated Tianyou Hospital, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430064 China; 2. Hospital of Wuhan Institute of Technology, Wuhan, Hubei 430074, China; 3. Department of Cardiology, Hubei Provincial Zhongshan Hospital, Wuhan, Hubei 430030, China; 4. Department of Neurology, Affiliated Tianyou Hospital, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430064, China)

[Abstract] **Objective** To apply the RNA interference technology to singly or jointly to silence toll-like receptor (TLR)-2, 4 genes and to investigate their effects on lysophosphatidic acid (LPA) induced phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells (VSMCs). **Methods** The culture system of rat aortic smooth muscle cells (RASMCs) in differentiated phenotype rats was established according to the literature. Then TLR-2 and TLR 4 specially small interference RNA (TLR2-siRNA, TLR4-siRNA) were transfected into RASMCs. After the treatment by 1 $\mu\text{mol/L}$ of LPA for 4 h, the gene and protein levels of SMA- α and OPN as the marker genes for VSMC differentiated and dedifferentiated phenotype were detected by real-time quantitative RT-PCR and Western blot respectively. **Results** TLR2-siRNA and TLR4-siRNA transfection could significantly inhibit the down-regulation of SMA- α gene and protein, and the up-regulation of OPN gene and protein in LPA induced RASMCs, the inhibiting effect of the joint interference of TLR2 and TLR4 on the down-regulation of SMA- α gene and protein, and the up-regulation of OPN gene and protein in LPA induced RASMCs was further strengthened than the single interference of TLR2 and TLR 4. **Conclusion** The TLR2 and TLR4 signal pathway participates in the LPA-stimulated phenotypic modulation of RASMCs. The joint intervention on TLR2 and TLR4 might become one of new pathway for stabilizing atherosclerotic plaque and anti-atherosclerotic therapy.

[Key words] toll-like receptors; RNA interference; lysophospholipids; blood vessels; myocytes, smooth muscle; phenotypic modulation

Toll 样受体 (toll-like receptors, TLRs) 是一个模式识别受体家族, 其可以识别多种病原相关分子模式, 是天然免疫和获得性免疫系统中非常关键的受体, 其可调节、控制天然免疫向后天免疫的转变, 被认为是联系二者之间的桥梁^[1-2]。大量研究证明, TLR 信号通路在动脉粥样硬化进程中起着重要的作用, TLR 与相应配体结合后, 通过系列级联反应激活核因子- κB (nuclear factor- κB , NF- κB), 启动受 NF- κB 调控的炎症因子转录^[3], 参与动脉粥样硬化炎症反应。血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 表型转化可导致血管重构, 最终导致血管再狭窄和动脉粥样硬化等血管疾病。TLRs 的重要内源性配体氧化脂蛋白的主要活性成份——溶血磷脂酸 (lysophosphatidic acid, LPA) 是血清中导致 VSMCs 表型转换的惟一成份^[4]。本研究应用 RNA 干扰技术分别或联合沉默 TLR2、4 基因后, 予 LPA 刺激体外培养的大鼠 VSMCs (RASMCs), 观察 TLR2、4 在 LPA 诱导的 RASMCs 表

型转化中的作用, 进一步探讨 LPA 致动脉粥样硬化相关信号传导途径。

1 材料与与方法

1.1 材料 健康 SD 大鼠 5 只, 体质量 150~200 g, 雌雄不限, 10~12 周龄, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。18:1 溶血磷脂酸 (1-oleoyl-sn-glycero-3-phosphate, 18:1 LPA)。LPA 溶解于包含不含脂肪酸的 0.1% 牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 中。胰岛素样生长因子-1 (Insulin-like growth factor 1, IGF-1) 购自 Lab Vision Corporation。层粘连蛋白购自 BD discovery labware。Trizol Reagent, (Invitrogen) Taq RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) Deoxyribonuclease I (DNase I) (Fermentas) RiboLockTM Ribonuclease Inhibitor, (Fermentas), SYBR Green PCR Master Mix (ABI), Lipofectamine[®] 2000 (Invitrogen), Opti-MEM[®] I 低血

清培养基(GIBCO)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及干预试验 根据文献[4]方法,取 SD 大鼠胸主动脉 VSMCs,进行分化型血管 VSMCs 的原代培养,将 TLR2、4 特异性 siRNA 分别或联合转染 RASMCs, LPA 1 μmol/L 处理 4 h,检测平滑肌肌动蛋白(smooth muscle actin, SMA-α)和骨桥蛋白(osteopontin, OPN)基因、蛋白的表达。

1.2.2 荧光定量 RT-PCR Trizol 法提取各组细胞总 RNA。行实时定量 PCR 扩增,以 β-actin 为内参,反应体系为:cDNA 1.0 μL、2×SYBR Green PCR Master mix 12.5 μL、上下游引物各 100 nm、ddH₂O 补足至 25.0 μL。扩增的反应条件:95 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 20 s,56 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 20 s,72 °C 再延伸 5 min,55 °C 退火 10 s,共 40 个循环。循环结束后进行融点曲线分析,于 60~95 °C 进行测定,(升温幅度:每次 0.5 °C,每次 5 s)。引物序列如下:TLR2 上游 5'-TGC TAT GAC GCT TTC GTG TC-3',下游 5'-TTC TCG GAA AGC ACG AAG AT-3'; TLR 上游 5'-ACA TCA AAT GCC CCT ACT CA-3',下游 5'-CTA AAC CAG CCA GAC CTT GA-3';β-actin 上游 5'-CAT TAA GGA GAA GCT GTG CT-3',下游 5'-GTT GAA GGT AGT TTC GTG GA-3';SMA-α 上游 5'-GCA TCC ACG AAA CCA CCT A-3',下游:5'-CGC CGA TCC AGA CAG AAT A-3';OPN 上游 5'-GCT GAA GCC TGA CCC ATC T-3',下游 5'-GGT CTT CCC GTT GCT GTC-3'。反应结束后,根据 Ct 值通过公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析计算各目的基因相对表达量。

1.2.3 Western blot 检测 收集 RASMC,各组细胞蛋白抽提,BCA 法定量。取蛋白样品 10 μg 行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)转膜,脱脂奶粉封闭,然后分别与小鼠抗 SMA-α、OPN(1:300, Santa Cruz)室温反应 2 h,洗膜 3 次,随后加入辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠二抗(1:80 000, Santa Cruz)室温反应 2 h,于 4-氯-1-萘酚, H₂O₂ 溶液中显色,显示蛋白条带。Gelpro4 版凝胶光密度分析软件分析阳性条带,测其 IOD 值,然后用其表达量与对应的 GAPDH 表达量的比值进行比较分析。

1.2.4 干涉片段的设计 针对 TLR2、4 的序列,设计干涉序列和阴性对照序列,TLR2 正义和反义链序列如下:TLR2-siRNA-1 正义链 5'-CAA AGA GUC UGA GGU CAA UUC AGA A-3',反义链 5'-UUC UGA AUU GAC CUC AGA CUC UUU G-3';TLR2-siRNA-2 正义链 5'-UGG ACA CAA UUA AAU CCC UCG GUA A-3',反义链 5'-UUA CCG AGG GAU UUA AAU GUG UCC A-3';TLR2-siRNA-3 正义链 5'-CCU GUU CCC UUU CAC AGC AUU UAA A-3',反义链 5'-UUU AAA UGC UGU GAA AGG GAA CAG G-3'。TLR4 正义和反义链序列如下:TLR4-siRNA-1 正义链 5'-UCU AGA GCA CUU GGA CCT TTT-3',反义链 5'-TTA GAU CUC GUG AAC CUG GUU-3';TLR4-siRNA-2 正义链 5'-GUU GAU CUA CCA AGC CUU GTT-3',反义链 5'-TTC AAC UAG AUG GUU CGG AAC-3';TLR4-siRNA-3 正义 5'-CGA AUG GAA UGU GCA ACA CTT-3',反义链 5'-TTG CUU ACC UUA CAC GUU GUG-3'。阴性对照:siRNA 正义链 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3',反义链 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'。

1.2.5 RNA 干扰 转染前 1 d,将 RASMC 细胞以 1×10^5 密度接种于 6 孔板上过夜,培养基为 2 mL 含 FBS 的基础培养基。第 2 天细胞达到 70% 融合后,培养基更换为无血清、无抗生素培养液,准备转染。RASMC 分为空白对照组(未转染组),阴性对照组(转染阴性 siRNA)及转染阳性 siRNA 组。转染方法参照 Lipofectamine2000 说明书,细胞转染后 24 h 在荧

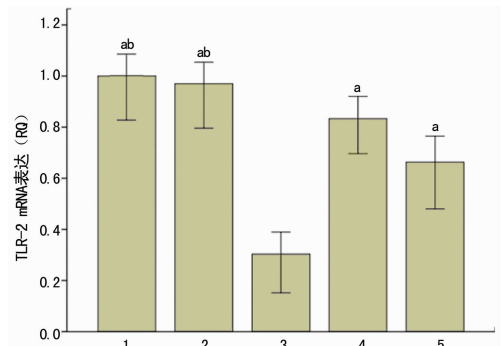
光显微镜下观察转染效率,并进行荧光定量 RT-PCR 检测,以确定最佳干预片段。

1.2.6 VSMCs 表型判断 选取 SMA-α 和 OPN 分别作为分化和去分化 VSMC 表型标志基因^[4-5]。SMA-α 在分化表型 VSMC 表达升高,在去分化表型 VSMC 则降低,OPN 则与之相反。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

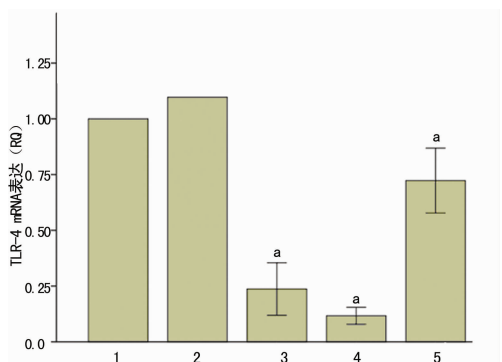
2 结果

2.1 最佳 siRNA 序列的筛选 荧光定量 RT-PCR 法检测转染前、后细胞中 TLR2、4 mRNA 的表达,结果显示 RASMCs 表达 TLR2、4 mRNA。转染 TLR2-siRNA-1、TLR2-siRNA-3 细胞组中 TLR2 mRNA 表达水平均显著低于空白对照组和阴性对照组($P < 0.05$);转染 TLR2-siRNA-2 细胞组中 TLR2 mRNA 表达水平与空白对照组和阴性对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组细胞中,转染 TLR2-siRNA-1 的细胞组 TLR2 mRNA 的表达最低,空白对照组和阴性对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 1。转染 TLR4-siRNA-1、TLR4-siRNA-2 和 TLR4-siRNA-3 的 3 组细胞中 TLR4 mRNA 表达水平均显著低于空白对照组和阴性对照组($P < 0.05$),且以转染 TLR4-siRNA-2 的细胞组 TLR4 mRNA 的表达最低,空白对照组和阴性对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 2。上述结果证实了 TLR2、4 siRNA 分子对 TLR2、4 基因抑制作用的特异性,并排除了转染试剂的作用。因此,将 TLR2-siRNA-1、TLR4-siRNA-2 用于后续相关实验研究。



1:空白对照组;2:阴性对照组;3:转染 TLR2-siRNA-1 组;4:转染 TLR2-siRNA-2 组;5:转染 TLR2-siRNA-3 组。^a: $P < 0.01$,与转染 TLR2-siRNA-1 组比较;^b: $P < 0.01$ 与转染 TCR2-siRNA-3 组比较。

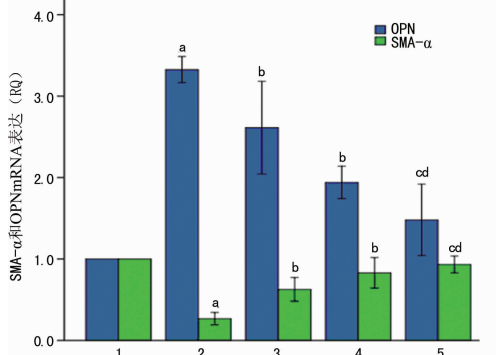
图 1 转染 TLR2-siRNA 对 TLR2 mRNA 表达的影响(n=3)



1:空白对照组;2:阴性对照组;3:转染 TLR2-siRNA-1 组;4:转染 TLR2-siRNA-2 组;5:转染 TLR2-siRNA-3 组。^a: $P < 0.01$,与空白及阴性对照组比较。

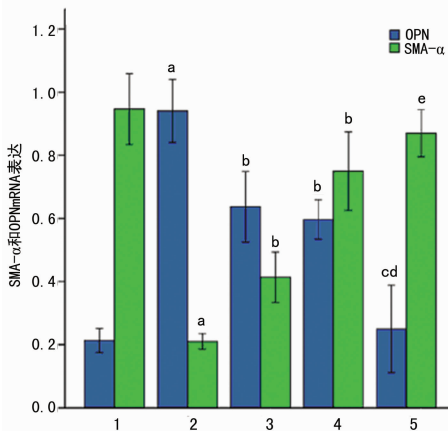
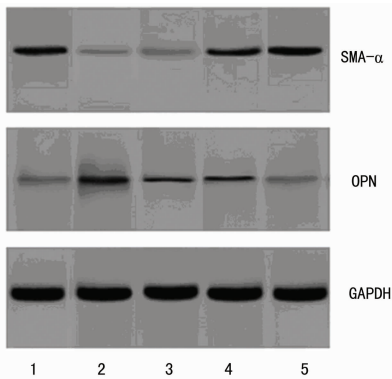
图 2 转染 TLR4-siRNA 对 TLR4mRNA 表达的影响(n=3)

2.2 TLR2-siRNA-1、TLR4-siRNA-2 转染细胞后对 LPA 诱导的 RASMCs 细胞表型转化的影响 原代培养的分化表型 VSMC 予 LPA-1 $\mu\text{mol/L}$ 处理 4 h 后,显著下调 SMA- α 基因、蛋白的表达,并同时上调 OPN 基因、蛋白表达,TLR2-siRNA-1、TLR4-siRNA-2 分别转染细胞后均可抑制 LPA 诱导的 RASMCs 细胞 SMA- α 基因、蛋白下调及 OPN 基因、蛋白上调,TLR2、4 联合干扰组对于 LPA 诱导的 RASMCs 细胞 SMA- α 基因、蛋白下调及 OPN 基因、蛋白上调的抑制作用较 TLR2、4 单独干扰组进一步加强,见图 3、4。



1: 分化表型细胞组; 2: LPA 干预组; 3: TLR2 干扰组; 4: TLR4 干扰组; 5: TLR2、4 联合干扰组; ^a: $P < 0.01$, 与分化表型细胞组比较; ^b: $P < 0.01$ 与 LPA 干预组比较; ^c: $P < 0.01$, 与 TLR2 干扰组比较; ^d: $P < 0.05$, 与 TLR4 干扰组比较。

图 3 TLR2、4 干扰对 LPA 诱导的 RASMCs 表型转化标志基因 mRNA 的影响 ($n=3$)



1: 分化表型细胞组; 2: LPA 干预组; 3: TLR2 干扰组; 4: TLR4 干扰组; 5: TLR2、4 联合干扰组; ^a: $P < 0.01$, 与分化表型细胞组比较; ^b: $P < 0.01$, 与 LPA 干预组比较; ^c: $P < 0.01$, 与 TLR2 干扰组比较; ^d: $P < 0.05$, 与 TLR4 干扰组比较; ^e: $P < 0.01$, 与 TLR2、4 干扰组比较。

图 4 TLR2、4 干扰对 LPA 诱导的 RASMCs 表型转化标志基因、蛋白水平的影响 ($n=3$)

3 讨论

血管疾病中 VSMC 的改变可以认为是其分化状态的改变, LPA 则是低密度脂蛋白致血管内皮病变的活性成分^[6], 体内 LPA 主要来源于对损伤和炎症刺激应答所致激活的血小板、受损的细胞及生长因子刺激的细胞^[7]。体外及活体实验均充分证明不饱和 LPA 可以诱导 VSMC 表型转化, 刺激 VSMC 迁移和增殖^[8], 本课题前期研究表明 LPA 以剂量依赖的方式促进 RASMCs 表型转化^[9], 但 LPA 诱导 RASMCs 表型转化信号通路尚需进一步阐明。

多项研究证实, 迄今发现的 12 种 TLRs 中, 主要是 TLR2 和 TLR4 信号通路参与了动脉粥样硬化病理、生理过程^[10-11]。参与动脉粥样硬化的巨噬细胞、树突状细胞、内皮细胞和血管平滑肌细胞均表达 TLR2、4, 某些 T 淋巴细胞表达 TLR2^[12]。在低密度脂蛋白受体缺失 (LDLR^{-/-}) 和载脂蛋白 E 缺失 (ApoE^{-/-}) 小鼠粥样硬化模型中, TLR2、4 在粥样硬化斑块的表达均增高。TLR4 或 TLR2 缺失的 ApoE^{-/-} 小鼠粥样硬化损伤面积较正常小鼠粥样硬化模型比, 显著下降^[13-14], Cao 等^[15]对 TLR4 和 ApoE 双基因敲除小鼠高胆固醇喂养 6 个月后, 发现小鼠主动脉窦处的巨噬细胞浸润程度较 ApoE 基因敲除小鼠降低了 65%, 斑块面积减少了 55%; 而 TLR 的下游基因 MyD88 与 ApoE 双基因敲除小鼠的巨噬细胞浸润程度较对照组降低了 75%, 斑块面积减少了 60%。

本研究应用 RNA 干扰技术分别沉默 TLR2、4 基因后, 发现 LPA 诱导的 RASMCs 细胞 SMA- α 基因、蛋白下调及 OPN 基因、蛋白上调均可被显著抑制, 表明 TLR2、4 信号通路均参与了 LPA 诱导的平滑肌细胞表型转化, 并且联合干扰 TLR2、4 对于 LPA 诱导的 RASMCs 细胞 SMA- α 基因、蛋白下调及 OPN 基因、蛋白上调的抑制作用较 TLR2、4 单独干扰组进一步加强。联合干扰 TLR2、4 对于 LPA 诱导的 RASMCs 表型转化具有更强的抑制作用, 二者具有协同作用。

综上所述, TLR 信号通路主要是 TLR2、4 参与了 LPA 诱导的表型转化, 联合干预 TLR2、4, 抑制信号通路后的炎症反应及免疫反应, 有可能成为稳定动脉粥样硬化斑块、抗粥样硬化治疗的一个新途径之一。

参考文献

- [1] Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity[J]. *Immunity*, 2011, 34(5): 637-650.
- [2] Lin YT, Verma A, Hodgkinson CP. Toll-like receptors and human disease: lessons from single nucleotide polymorphisms [J]. *Curr Genomics*, 2012, 13(8): 633-645.
- [3] Raveendran VV, Tan X, Sweeney ME, et al. Lipopolysaccharide induces H1 receptor expression and enhances histamine responsiveness in human coronary artery endothelial cells[J]. *Immunology*, 2011, 132(4): 578-588.
- [4] Hayashi K, Takahashi M, Nishida W, et al. Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acids[J]. *Circ Res*, 2001, 89(3): 251-258.
- [5] Shanahan CM, Weissberg PL, Metcalfe JC. Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells[J]. *Circ Res*, 1993, 73(1): 193-204.
- [6] 牛建平, 周志斌, 宋叶华, 等. 溶血磷脂酸对人单核细胞株 THP-1 细胞核因子- κ B 表达的影响[J/OL]. *中华脑血管病杂志: 电子版*, 2013, 7(5): 236-242.
- [7] Cui MZ. Lysophosphatidic acid effects (下转第 453 页)

TNF- α 和 NO 表达水平亦显著优于模型组和灭活瘤苗组,此结果显示 ISCOM 型瘤苗对荷瘤小鼠免疫后,巨噬细胞数量和活力均得到增强。巨噬细胞作为机体抗原提呈细胞和免疫效应细胞在 ISCOM 型瘤苗介导抗肿瘤免疫反应中起重要作用。

综上所述,ISCOM 型瘤苗可以增加巨噬细胞的数量,增强巨噬细胞的吞噬作用及抗原呈递能力,也意味着提高了荷瘤小鼠的非特异性细胞免疫功能,如免疫监视、抗原递呈等,以便活化 T 淋巴细胞。白血病作为血液恶性肿瘤,临床中需考虑化疗后或骨髓移植后对残留微小病灶的治疗及预防复发,而 ISCOM 型瘤苗明显提高荷瘤小鼠的巨噬细胞杀伤功能,为进一步激活 T 淋巴细胞创造条件。在临床中,白血病患者治疗后采用 ISCOM 型瘤苗,对消灭残留微小病灶、防止复发意义重大。

参考文献

- [1] Morein B, Hu KF, Abusugra I. Current status and potential application of ISCOMs in veterinary medicine[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(10): 1367-1382.
 - [2] Iino T, Suehiro Y, Hasegawa A, et al. A therapeutic vaccine in adult T-cell leukemia patients with autologous dendritic cells pulsed with peptides corresponding to tax-specific cytotoxic T lymphocyte epitopes[J]. *Blood*, 2013, 122(21): 5130-5130.
 - [3] Lövgren-Bengtsson K, Morein B. The ISCOMTM technology[M]. *Methods Molecular MedicineTM*, New York, 2000: 239-258.
 - [4] Conrad DP, Tsang J, Maclean M, et al. Leukemia cell-rhabdovirus vaccine: personalized immunotherapy for acute lymphoblastic leukemia[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(14): 3832-3843.
 - [5] Subklewe M, Geiger C, Lichtenegger FS, et al. New generation dendritic cell vaccine for immunotherapy of acute myeloid leukemia[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2014, 63(10): 1093-1103.
 - [6] Camussone CM, Veaute CM, Pujato N, et al. Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell and lysate vaccine formulated with ISCOM Matrix adjuvant[J]. *Res Vet Sci*, 2014, 96(1): 86-94.
 - [7] Xiong Q, Wei Y, Feng Z, et al. Protective efficacy of a live attenuated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine with an ISCOM-matrix adjuvant in pigs[J]. *Vet J*, 2014, 199(2): 268-274.
 - [8] Lele SS, Mukhopadhyay BN, Mardikar MM, et al. Impact of catalytic iron on mortality in patients with acute coronary syndrome exposed to iodinated radiocontrast-The Iscom Study[J]. *Am Heart J*, 2013, 165(5): 744-751.
 - [9] Moore DP, Hodgins DC, Firth MA, et al. Incorporation of antigens from *Mannheimia haemolytica* culture supernatant, and recombinant bovine C3d into ISCOM matrix using neutravidin-biotin interaction[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2011, 58(3): 198-202.
 - [10] Rasool MH. Preparation and evaluation of an experimental iscom-based infectious bursal disease vaccine[J]. *Indian J Microbiol*, 2008, 48(3): 401-404.
 - [11] McManus M, Frangoul H, McCullers JA, et al. Safety of high dose trivalent inactivated influenza vaccine in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2014, 61(5): 815-820.
 - [12] 尤旭. 日本血吸虫尾蚴分泌蛋白 SjCa8 对小鼠巨噬细胞作用的实验研究[D]. 广州: 中山大学, 2010.
 - [13] 熊祺琰, 王占伟, 甘源, 等. 免疫刺激复合物基质为佐剂的猪支原体肺炎活疫苗肌肉注射免疫效果评价[J]. *江苏农业学报*, 2011, 27(6): 1310-1315.
 - [14] Berenjian S, Hu K, Abedi-Valugerdi M, et al. The nanoparticulate Quillaja saponin KGI exerts anti-proliferative effects by down-regulation of cell cycle molecules in U937 and HL-60 human leukemia cells[J]. *Leuk Lymphoma*, 2014, 55(7): 1618-1624.
 - [15] Ahlberg V, Lvgren Bengtsson K, Wallgren P, et al. Global transcriptional response to ISCOM-Matrix adjuvant at the site of administration and in the draining lymph node early after intramuscular injection in pigs[J]. *Dev Comp Immunol*, 2012, 38(1): 17-26.
- (收稿日期: 2015-06-18 修回日期: 2015-10-24)
-
- (上接第 450 页)
- on atherosclerosis and thrombosis[J]. *Clin Lipidol*, 2011, 6(4): 413-442.
 - [8] Schober A, Siess W. Lysophosphatidic acid in atherosclerotic diseases[J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 167(3): 465-482.
 - [9] 李小好, 杨波, 尚桂莲, 等. 溶血磷脂酸受体 3 介导溶血磷脂酸诱导的平滑肌细胞表型转化[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2012, 14(10): 1082-1086.
 - [10] Hodgkinson CP, Ye S. Toll-like receptors, their ligands, and atherosclerosis[J]. *Sci World J*, 2011, 14(11): 437-453.
 - [11] Lundberg AM, Yan ZQ. Innate immune recognition receptors and damage-associated molecular patterns in plaque inflammation[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2011, 22(5): 343-349.
 - [12] Falck-Hansen M, Kassiteridi C, Monaco C. Toll-like receptors in atherosclerosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(7): 14008-14023.
 - [13] Mullick AE, Soldau K, Kiosses WB, et al. Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events[J]. *J Exp Med*, 2008, 205(2): 373-383.
 - [14] Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, et al. Lack of Toll like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(29): 10679-10684.
 - [15] Cao F, Castrillo A, Tontonoz P, et al. Chlamydia pneumoniae-induced macrophage foam cell formation is mediated by Toll-like receptor 2[J]. *Infect Immun*, 2007, 75(2): 753-759.
- (收稿日期: 2015-08-05 修回日期: 2015-10-13)