

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.19.005

巨噬细胞的自噬和极化抑制其泡沫化进程*

樊 瑛¹ 张秀坤² 林朝兰¹ 宫甜甜³ 王 琪³ 孙瑞珍^{3Δ}

(1 哈尔滨医科大学附属第一医院 黑龙江 哈尔滨 150007; 2 黑龙江省医院 黑龙江 哈尔滨 150030;

3 哈尔滨医科大学组织胚胎学教研室 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要 目的:巨噬细胞是动脉粥样硬化斑块中最丰富的免疫细胞,巨噬细胞泡沫化加速动脉粥样硬化,本研究探讨巨噬细胞自噬与极化对泡沫化的影响。**方法:**分离培养小鼠腹腔巨噬细胞,免疫荧光检测巨噬细胞的标记物 F4/80。不同浓度雷帕霉素处理巨噬细胞,western blot 检测自噬标记物 LC3II,经典激活的巨噬细胞(Classically activated macrophages, M1)标记物白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)和替代激活的巨噬细胞(Alternatively activated macrophages, M2)标记物转化生长因子 β (transform growth factor, TGF- β)的表达。用 ox-LDL 诱导巨噬细胞泡沫化,油红 O 染色鉴定泡沫细胞形成及巨噬细胞泡沫化情况。**结果:**免疫荧光结果显示,小鼠腹腔巨噬细胞 F4/80 阳性率达 87.6%;雷帕霉素处理巨噬细胞 24 h,western blot 结果显示 LC3II 表达增加,M1 标记物 IL-6 表达增加,而 M2 标记物 TGF- β 表达减少,对其条带进行统计分析结果显示都具有显著性差异($P<0.05$);油红 O 染色结果显示雷帕霉素明显减少巨噬细胞泡沫化形成。**结论:**雷帕霉素能诱导巨噬细胞自噬,促进其向 M1 型极化,从而抑制巨噬细胞泡沫化。

关键词:巨噬细胞;自噬;极化;动脉粥样硬化

中图分类号:R-33;R543.5 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2019)19-3621-05

Autophagy and Polarization of Macrophage Inhibit Foaming Process*

FAN Ying¹, ZHANG Xiu-kun², LIN Chao-lan¹, GONG Tian-tian³, WANG Qi³, SUN Rui-zhen^{3Δ}

(1 Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150007, China;

2 Hospitals of Heilongjiang Province, Harbin, Heilongjiang, 150030, China;

3 Department of Histology and Embryology, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150081, China)

ABSTRACT Objective: Macrophages are the most abundant immune cells in atherosclerotic plaque, and macrophage foaming accelerates atherosclerosis. The study aims to explore the effect of macrophage autophagy and polarization on foaming. **Methods:** Mouse peritoneal macrophages were isolated and cultured, and the marker F4/80 of macrophages was detected by immunofluorescence. Macrophages were treated with rapamycin at different concentrations. Western blot was used to detect the expression of autophagy markers LC3II, classically activated macrophages(M1) macrophage markers interleukin 6(IL-6) and alternatively activated macrophages (M2) markers transforming growth factor- β (TGF- β). Macrophages were foamed by ox-LDL, and the foam cells formation and macrophage foaming were identified by oil red O staining. **Results:** Immunofluorescence assay showed that the positive rate of F4/80 was 87.6%. Western blot showed that increased the expression of LC3II and IL-6, decreased the expression of TGF- β in rapamycin treatment of macrophages for 24 hours. And, statistical analysis of the bands showed that there were significant differences ($P<0.05$). Oil red O staining showed that the formation of macrophage foam cells was decreased in rapamycin treatment macrophages. **Conclusion:** Rapamycin promotes macrophage autophagy and M1 polarization to inhibit foam cell formation.

Key words: Macrophage; Autophagy; Polarization; Atherosclerosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R543.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)19-3621-05

前言

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是发生在大、中动脉壁组织上,可引发急性心肌梗死和猝死的疾病^[1-4],具有脂质蓄积和炎症浸润的特征。有免疫细胞和非免疫细胞参与其中。单核吞噬细胞系统中的巨噬细胞,是动脉粥样硬化斑块中最丰富的

免疫细胞,且在 AS 中处于动态平衡态^[5]。在 AS 早期,因单核吞噬系统能够正常清除凋亡细胞,并不会继发炎症和坏死;在 AS 晚期,单核吞噬系统对斑块内凋亡细胞的吞噬清除作用缺陷,导致继发性坏死和炎症反应,形成易损斑块。其中巨噬细胞吞噬大量 ox-LDL 发生泡沫化形成泡沫细胞加速动脉粥样硬化进程^[1,6,7]。因此,抑制和稳定巨噬细胞泡沫化是治疗动脉粥样硬

* 基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12541450)

作者简介:樊瑛(1976-),副教授,硕士生导师, E-mail: fyflying1@163.com

Δ 通讯作者:孙瑞珍, E-mail: srz_1983@126.com

(收稿日期:2019-02-05 接受日期:2019-02-28)

化疾病的目标之一。

巨噬细胞在功能上非常复杂,根据它们所处的微环境不同会出现不同功能状态,称之为巨噬细胞的极化或表型转换。经典激活的巨噬细胞(classically activated macrophages, M1)和替代激活的巨噬细胞(alternatively activated macrophages, M2)是巨噬细胞的两个极端状态。在动脉粥样硬化中^[11],M1和M2同时存在,但在斑块中的分布有差异。因此选择性清除或改变巨噬细胞,是早期干预AS或晚期稳定AS斑块的有效途径。自噬是真核细胞通过溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质进而实现细胞内再循环的过程;受依赖mTOR(mammal target of rapamycin, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白)和不依赖mTOR途径调节。小鼠动脉粥样硬化模型证实,利用支架载药局部投递mTOR抑制剂依维莫司,可诱导巨噬细胞自噬而实现AS斑块巨噬细胞的选择性清除,且没有继发炎症和坏死^[12]。但另有文献报道局部投递TLR7激动剂咪喹莫特能够诱导巨噬细胞自噬,反而导致斑块扩大,炎症因子大量释放而加重AS^[13]。因此,本研究利用巨噬细胞作为AS早期体外模型,应用自噬途径mTOR抑制剂雷帕霉素处理巨噬细胞,检测其自噬标记物LC3II和极化M1标记物IL-6、M2标记物TGF- β 表达,确定雷帕霉素对巨噬细胞自噬和极化的影响;然后用ox-LDL诱导泡沫细胞,油红O染色观察雷帕霉素对细胞成脂即泡沫化的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6-8周龄的B6D2F1小鼠购自北京维通利华有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 腹腔巨噬细胞的分离和培养 成年B6D2F1小鼠腹腔注射3%巯基乙酸培养基(T9032-500G, Sigma-Aldrich)刺激小鼠腹腔渗出细胞^[14],3天后断颈处死。应用含3%FBS的DPBS冲洗腹腔3次,收集腹腔液体1000×g离心5min,用含10%FBS(04-001-1, biological industries)的RPMI1640(22400089, Invitrogen)重悬细胞并接种,37℃培养,24h后更换液体。实验共分三组:0 μ M雷帕霉素(ab120224, Abcam)为对照组,1 μ M和5 μ M雷帕霉素实验组。

1.2.2 F4/80 抗体染色 细胞爬片,用含4%多聚甲醛的PBS 4℃固定细胞20min。接着用含0.25% Triton X-100的PBS清洗1次,70%乙醇处理细胞5min,之后用含2%BSA的PBS进行室温封闭30min。封闭结束后弃掉封闭液,用1:50稀释的F4/80抗体(565612, BD)4℃孵育过夜。次日弃掉一抗,用含0.1% tween20的PBS清洗3次,最后用Hoechst 33342(14533, Sigma-Aldrich)复染细胞核,PBS清洗,防荧光淬灭剂封片,等待观察。

1.2.3 泡沫细胞诱导 收集的腹腔巨噬细胞接种于12孔或6孔板,用含10%FBS的PRIM1640培养液培养过夜。次日换液,用含有ox-LDL(UBC_oxldl, 北京协生生物科技有限责任公司)的培养液培养48h,诱导巨噬细胞泡沫细胞形成,油红O染色观察巨噬细胞泡沫化。

1.2.4 油红O染色 细胞用PBS清洗2次,4%多聚甲醛-PBS室温固定15min,PBS清洗2次,0.05%油红O

(00625-25G, Sigma-Aldrich)(油红O浓储液:0.5g油红O溶于100mL 100%异丙醇避光保存;工作液:60%异丙醇稀释浓储至0.05%,过滤静置30min)室温孵育1h,之后60%异丙醇脱色去除多余染料,PBS清洗,观察细胞。

1.2.5 Western blot 蛋白质的提取:PBS冲洗细胞,用细胞刮刀收集细胞并转移至离心管中,5000rpm×10min离心弃上清;加入适量的RIPA缓冲液(Sigma Aldrich)混匀后冰上置30min以裂解细胞。20000rpm×20min 4℃离心,转移上清至新Eppendorf管中,测定蛋白质浓度,分装,保存备用。

PAGE 胶电泳分离蛋白质:使用110V电压12%PAGE胶分离蛋白;300mA电流1h转膜。结束后,蛋白膜用5%脱脂奶粉室温封闭1h;封闭后按照抗体说明书用封闭液稀释抗体进行一抗4℃孵育过夜;次日PBS-T液洗膜3次,然后加入相应二抗室温孵育1h,再用TBS-T液洗膜4次;最后使用ECL自显影观察结果。文中所用一抗:自噬标记物LC3(14600-1-AP, Proteintech),M1标记物IL-6(21865-1-AP, Proteintech),M2标记物TGF- β (ab66043, Abcam)、内参GAPDH(KG-48, 北京康成)。

1.3 统计分析

实验结果用均值±标准差的形式表示;收集巨噬细胞数通过细胞计数板统计活细胞数进行计算,免疫荧光结果随机选取3个重复实验6个视野统计阳性率,并采用双尾两样本T检验;Western blot条带利用NIH-ImageJ software进行蛋白条带的灰度定量分析,并进行T检验;当P<0.05时,差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 腹腔巨噬细胞的收集和鉴定

成年B6D2F1小鼠腹腔注射不同体积的3%巯基乙酸培养基,3天后断颈处死。应用DPBS冲洗腹腔,收集腹腔液体并进行细胞计数,统计不同体积巯基乙酸培养基收集的巨噬细胞量,结果如图1A显示,3mL 3%巯基乙酸培养基获得的细胞量最多。对收集的腹腔巨噬细胞应用巨噬细胞标记物F4/80进行免疫染色鉴定,结果如图1B所示,获得的F4/80阳性细胞数达87.6%。

2.2 泡沫细胞形成

泡沫细胞形成是巨噬细胞脂质蓄积的结果,本研究用不同浓度ox-LDL(0、50 μ g/mL和150 μ g/mL)处理细胞,48h固定进行油红O染色观察泡沫细胞形成。结果如图2所示。可见50 μ g/mL和150 μ g/mL ox-LDL都能明显诱导巨噬细胞胞质中脂质聚集,即泡沫细胞形成,但150 μ g/mL效果更明显。因此,诱导泡沫细胞即泡沫化使用150 μ g/mL ox-LDL处理48h。

2.3 雷帕霉素激活自噬且促进M1抑制M2,减轻巨噬细胞泡沫化

雷帕霉素抑制mTOR途径而激活自噬。本研究首先检测雷帕霉素对巨噬细胞的自噬的作用。用雷帕霉素(0 μ M、1 μ M、5 μ M)处理巨噬细胞,24h收样,western blot检测自噬的标记物LC3的表达。结果如图3A所示,LC3有14KD、18KD两条带,证实LC3I(18KD)被脂质化为LC3II(14KD),有自噬发生,且雷帕霉素能显著诱导巨噬细胞自噬。同时,本研究用1

μM 、 $5\mu\text{M}$ 雷帕霉素处理巨噬细胞,24 h 后收集细胞提取蛋白,进行 western blot 分别检测 M1 和 M2 标记物 IL-6 和 TGF- β 的表达,结果如图 3A 所示。与对照组相比,雷帕霉素能显著促进 M1 细胞标记物 IL-6 表达,抑制 M2 细胞标记物 TGF- β 表达。上述结果显示,雷帕霉素处理巨噬细胞增加自噬,促进巨噬细

胞向 M1 极化而抑制 M2 极化。

最后,本研究检测雷帕霉素对巨噬细胞泡沫化的影响。结果如图 3B 所示,油红 O 染色结果显示雷帕霉素明显抑制巨噬细胞脂质聚集,抑制巨噬细胞泡沫化。

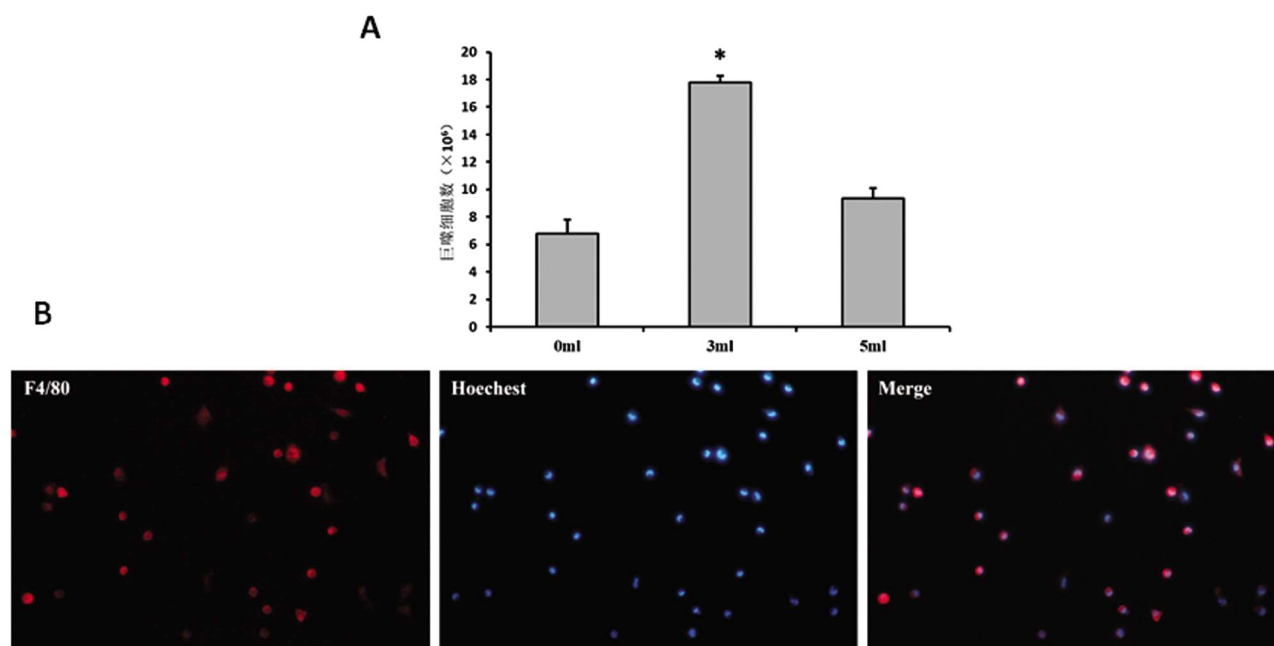


图1 腹腔巨噬细胞统计和免疫荧光染色鉴定结果

A 收集腹腔巨噬细胞的统计结果,B F4/80 的免疫染色鉴定巨噬细胞结果

Fig.1 Statistics of peritoneal macrophages and immunofluorescence staining

A The statistics of collecting peritoneal macrophages, B Results of F4/80 immunostaining in macrophages

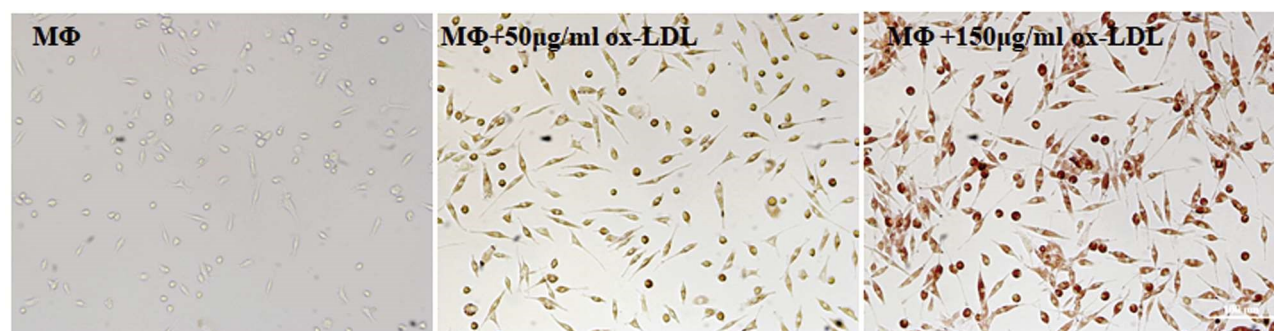


图2 油红 O 染色显示 ox-LDL 诱导泡沫细胞的形成

MΦ : 巨噬细胞

Fig. 2 Oil red O staining showed that ox-LDL induced macrophages to foam cell formation.

MΦ : macrophage

3 讨论

动脉粥样硬化发生在动脉血管壁上,以炎症改变为主的一种慢性、增生性疾病,其发生发展过程多被认为是从变质、渗出和增生等炎症反应,到粥样斑块的形成,乃至不稳定斑块的破裂和继发血栓形成^[5]。现在研究认为 AS 具有脂质蓄积和炎症浸润的特征,有许多免疫和非免疫细胞参与该病理过程。血管壁的主要细胞类型包括血管内皮细胞、平滑肌细胞以及巨噬细胞。其中巨噬细胞是 AS 中最丰富的免疫细胞,巨噬细胞在动脉粥样硬化发生、进展及消退中起着重要作用^[6]。AS 进展以形

成 AS 斑块为特征。AS 病变的形成过程始于损伤的内皮细胞激活和功能失调,随之内皮细胞表达并释放特异的粘附分子,且内皮细胞附近的平滑肌细胞、淋巴细胞也释放各种趋化因子及生长调节因子。这种情况下,外周血液中的单核细胞迁移到内膜下转变成巨噬细胞。巨噬细胞经表面的清道夫受体识别多种修饰过的脂蛋白并大量摄取,转化形成泡沫细胞。另外,平滑肌细胞不断增殖和迁移,并能释放大量的炎性因子,且能吞噬脂质形成平滑肌源性泡沫细胞。最后,这些细胞的不断增生和聚集,加剧了 AS 的发展,形成明显的纤维增生斑块。巨噬细胞的堆积和泡沫化是其形成的关键步骤^[1,6,7]。因此,巨噬细胞和泡

沫细胞成为 AS 研究和治疗的目标。

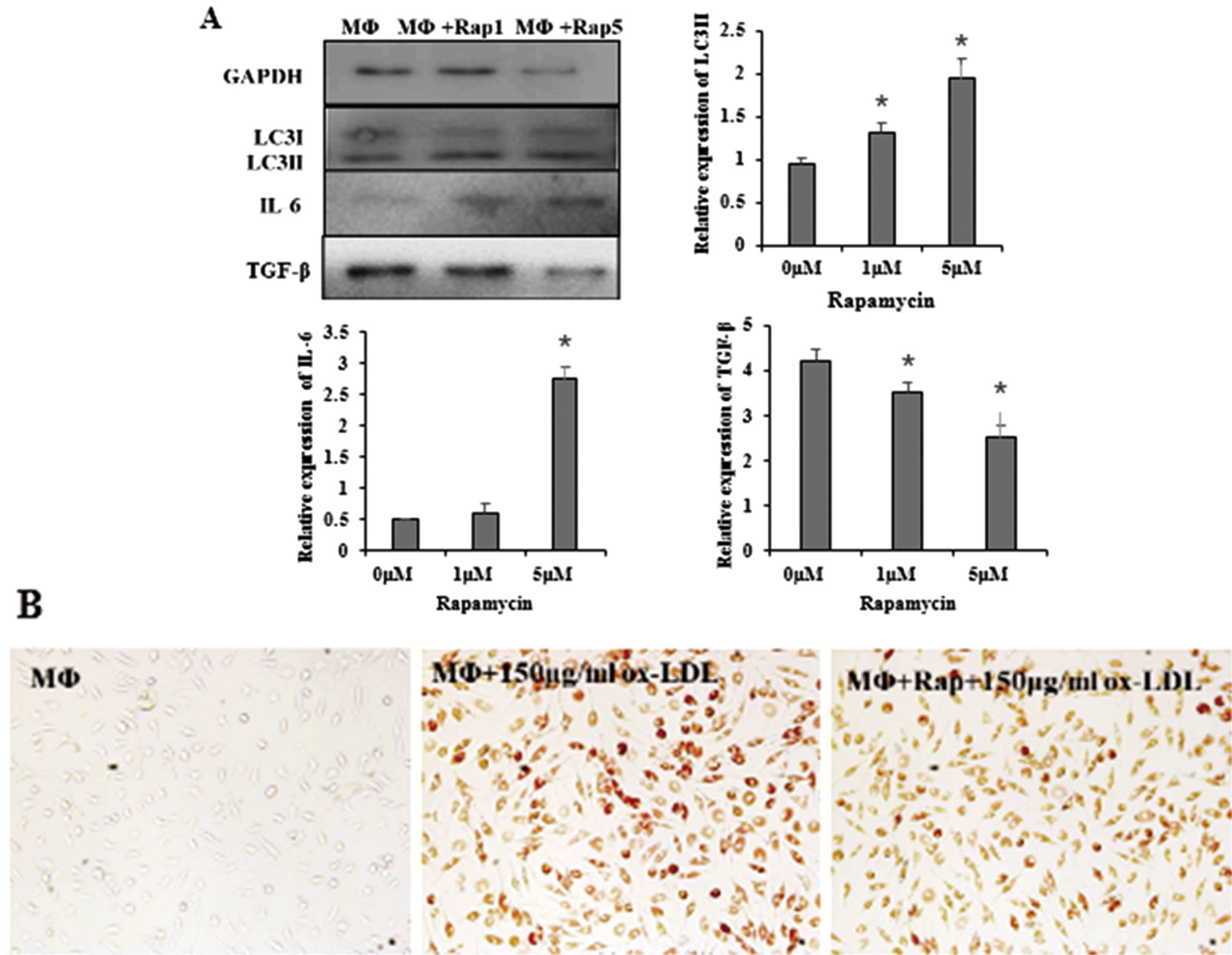


图 3 雷帕霉素对巨噬细胞自噬、极化和泡沫化的影响

A western blot 检测雷帕霉素处理巨噬细胞后自噬与极化标记物的表达及条带灰度分析统计, B 油红 O 染色显示雷帕霉素处理巨噬细胞泡沫化结果

Fig. 3 The effects of rapamycin on autophagy, polarization and foaming in macrophages

A Western blot showed that the expression of autophagy and polarization markers in rapamycin treated macrophages and Grayscale analysis statistics of bands, B Oil red O staining showed the foaming in rapamycin treated macrophages

自噬是真核细胞通过溶酶体降解自身受损、变性、衰老的细胞器或大分子物质进而实现细胞内自身代谢需要及细胞器更新的再循环过程。根据细胞内物质进入溶酶体途径的不同,自噬可分为巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬。通常所说的自噬即指巨自噬。在动脉粥样硬化过程中,自噬参与了细胞存活和死亡的调控^[16]。在动脉粥样硬化中^[11],M1 和 M2 同时存在,但在斑块中的分布有差异。因此选择性清除或改变巨噬细胞,是早期干预 AS 或晚期稳定 AS 斑块的有效途径。因此,本文应用经典自噬途径 mTOR 抑制剂雷帕霉素处理巨噬细胞来研究其自噬和极化情况,探讨巨噬细胞对 AS 发生的影响。

自噬有多种信号途径调控,包括 mTOR 非依赖性途径和经典 mTOR 依赖性途径。mTOR 由 mTORC1 和 mTORC2 亚型组成。其中,雷帕霉素抑制 mTORC1 激活自噬。在自噬过程中胞质中的 LC3-I 被脂质化为 LC3-II,表达于自噬体。在免疫染色中呈现点状分布,western blot 结果中出现大约 14 KD、18 KD 两条带,其中 14 KD 为 LC3II,即认为有自噬发生。Wang X 等通过 RNA 干扰 mTOR 的方法显示抑制 mTOR 能诱导巨噬

细胞株的自噬^[17]。AS 动物模型中,利用支架载药局部投递自噬诱导剂依维莫司能诱导巨噬细胞自噬,实现 AS 斑块巨噬细胞的选择性清除而缓解 AS^[8]。Mireille Ouimet 也报道,自噬促进泡沫细胞的胆固醇流出^[18]。Li S 等通过对 RAW264.7 和 THP-1 巨噬细胞细胞系进行程序性细胞死亡蛋白 4 (Programmed cell death protein 4, PDCD4) 干扰,再进行糖基化低密度脂蛋白 (Advanced glycation end of low-density lipoprotein, AGE-LDL) 泡沫化诱导,结果显示干扰 PDCD4 的巨噬细胞系激活细胞自噬,而抑制了泡沫细胞形成^[19]。Ma Y 等也报道 THP-1 巨噬细胞系自噬的增加抑制了 ox-LDL 诱导巨噬细胞泡沫细胞的形成^[20]。在本研究中,应用经典自噬激活剂雷帕霉素处理腹腔巨噬细胞 24 h,结果与文献报道一致,明显可见巨噬细胞自噬标记物 LC3II 表达增强。AGE-LDL 或 ox-LDL 处理巨噬细胞,导致 ox-LDL 进入巨噬细胞形成泡沫细胞,泡沫细胞中有胆固醇酯沉积。泡沫细胞的聚积、增多以及炎症反应都是 AS 形成的病变因素。在本研究中,我们利用雷帕霉素处理巨噬细胞后再进行 ox-LDL 泡沫化诱导,油红 O 染色结果显示雷帕霉素能明显

抑制巨噬细胞脂质沉积。这与文献报道一致,表明雷帕霉素能抑制巨噬细胞泡沫化。

巨噬细胞根据它们所处的微环境不同会出现不同极化状态。其中在 LPS(lipopolysaccharide,脂多糖)和 / 或 IFN- γ (interferon- γ , γ 干扰素) 等炎性因子刺激时, 巨噬细胞被极化为 M1, 被 TLR-4 (toll-like receptor 4, Toll 样受体 4)、MARCO (Collagen structure macrophage receptor, 胶原结构巨噬细胞) 受体、CD25 和 CD80 识别, 分泌促炎因子 TNF- α (肿瘤坏死因子- α , Tumor Necrosis Factor)、IL-12 (Interleukin -12, 白细胞介素-12)、IL-6、iNOS (诱导性一氧化氮合酶, inducible nitric oxide synthase), 发挥杀菌、杀死肿瘤细胞的功能^[8]; 在 IL-10、IL-13 或 TGF- γ (转化生长因子 β , transform growth factor) 等抗炎性因子或细胞因子的刺激下, 巨噬细胞可极化成 M2^[9], 被甘露醇受体, SR-A、CD163、CD209 和 FIZZ1 (found in inflammatory zone protein, 发现炎症区蛋白) 识别, 分泌精氨酸酶 1、IL-10 和 Mrc1 (甘露糖受体 C 型 1, Mannose Receptor C-Type 1) 等, 发挥抗感染、促进组织再生和修复等功能^[10]。在动脉粥样硬化中^[11,21-24], M1 和 M2 同时存在, 但在不同斑块中的分布有差异。因此选择性清除或改变巨噬细胞, 是早期干预 AS 或晚期稳定 AS 斑块的有效途径。在本研究中, 雷帕霉素处理腹腔巨噬细胞使得巨噬细胞 M1 细胞标记物 IL-6 表达, 抑制 M2 细胞标记物 TGF- β 表达。这与文献报道一致雷帕霉素可激活 RAW 264.7 自噬而抑制 M2 极化^[25], 且自噬可诱导巨噬细胞向 M1 极化^[26]。大多数 AS 文献报道中显示促进 M1 极化可导致 AS 发展^[27,28]。也有文献报道在纤维性斑块中, 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、白细胞介素(interleukin-6, IL-6)和 IL-12 mRNA 高表达; 粥样硬化斑块中, 精氨酸酶(arginase-1, Arg-1)、转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β)、CD163 和 IL-10 mRNA 高表达, 且自噬高表达。并认为在 AS 早期表达中等水平的自噬, 通过 p-STAT1/NF- κ B 途径诱导巨噬细胞向 M1 极化, AS 晚期 M2 细胞的自噬水平更高, 巨噬细胞通过 p-STAT6 途径激活其向 M2 极化^[21]。然而文章中, 提到的纤维性斑块已经进入了 AS 进程, 此时抑制 M1 促进 M2 可能减缓 AS 进程。在本研究使用正常小鼠的腹腔巨噬细胞, 此时巨噬细胞聚集增多是 AS 最早期, 因此, 增加巨噬细胞向 M1 极化可能会促进 M1 的吞噬和清除能力从而达到干预 AS。本研究的结果显示雷帕霉素处理巨噬细胞自噬增多, M1 极化增多, 且巨噬细胞泡沫化减轻。这间接的说明巨噬细胞可能提高自噬途径抑制 M1 而减轻巨噬细胞泡沫化。另, Li X 等报道通过促进 TFEB 的 ROS 依赖性核转位可诱导 THP-1 巨噬细胞系自噬并降低其脂质沉积^[29]。这说明巨噬细胞脂质沉积减轻也可以提高其他途径。在结肠癌中, 抑制巨噬细胞向 M2 极化, 可使得肿瘤细胞自噬增加而抑制肿瘤细胞生长^[30]。在 AS 早期, 抑制巨噬细胞向 M2 极化也可能使得内皮细胞自噬增加或平滑肌细胞自噬增加而抑制平滑肌细胞的过度增多, 基质成分增多而抑制斑块的形成, 从而起到干预 AS 的作用。

综上所述, 经典自噬途径 mTOR 抑制剂雷帕霉素处理早期 AS 体外模型巨噬细胞可提高巨噬细胞自噬, 并促进其 M1 极化, 抑制巨噬细胞泡沫化, 为巨噬细胞在动脉粥样硬化早期

的预防和干预提供指导。

参考文献(References)

- [1] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease[J]. N Engl J Med, 2005, 352: 1685-1695
- [2] Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis the road ahead [J]. Cell, 2001, 104: 503-516
- [3] Cooper R, Cutler J, Desvigne-Nickens P, et al. Trends and disparities in coronary heart disease, stroke, and other cardiovascular diseases in the United States: findings of the national conference on cardiovascular disease prevention[J]. Circulation, 2000, 102: 3137-3147
- [4] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease [J]. N Engl J Med, 1999, 340: 115-126
- [5] Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance[J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13: 709-721
- [6] Schulz C, S Massberg. Atherosclerosis--multiple pathways to lesional macrophages[J]. Sci Transl Med, 2014, 6(239): 239
- [7] Tabas I, Garcia-Cardena G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis[J]. J Cell Biol, 2015, 209(1): 13-22
- [8] Weisser S B, K W McLauren, E Kuroda, et al. Generation and characterization of murine alternatively activated macrophages [J]. Methods Mol Biol, 2013, 946: 225-239
- [9] Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines [J]. Immunity, 2014, 41(1): 14-20
- [10] Gordon S, F O Martinez. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions[J]. Immunity, 2010, 32(5): 593-604
- [11] Prateek Neupane, 肖胜军. 动脉粥样硬化中的巨噬细胞极化 [J]. 华夏医学, 2014, 27(6): 174-177
- [12] Verheye S, Martinet W, Kockx MM, et al. Selective clearance of macrophages in atherosclerotic plaques by autophagy [J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 49(6): 706-715
- [13] De Meyer I, Martinet W, Schrijvers DM, et al. Toll-like receptor 7 stimulation by imiquimod induces macrophage autophagy and inflammation in atherosclerotic plaques [J]. Basic Res Cardiol, 2012, 107: 269-281
- [14] Soo-Jin Park, Kyoung-Pil Lee, Saeromi Kang, et al. Sphingosine 1-phosphate induced anti-atherogenic and atheroprotective M2 macrophage polarization through IL-4 [J]. Cellular Signalling, 2014, 26: 2249-2258
- [15] 王嘉宜, 杜文婷, 顾耘. 巨噬细胞自噬与动脉粥样硬化的关系及相关中药研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(11): 1515-1519
- [16] 李亮, 裴芊芊, 董丽华. 自噬与动脉粥样硬化关系的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2016, 38(1): 104-109
- [17] Wang X, Li L, Niu X, et al. mTOR Enhances Foam Cell Formation by Suppressing the Autophagy Pathway [J]. DNA and Cell Biology, 2014, 33(4): 198-204
- [18] Mireille Ouimet, Vivian Franklin, Esther Mak, et al. Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase[J]. Cell Metabolism, 2011, 13(6): 655-667
- [19] Li S, Gao G, Wu F, et al. Programmed cell death protein 4 deficiency suppresses foam cell formation by activating autophagy in advanced glycation end-product low-density lipoprotein-induced macrophages [J]. J Cell Biochem, 2018, 13 (下转第 3669 页)

- test, Borg scale questionnaire and hemodynamic responses in patients with chronic heart failure [J]. *J Phys Ther Sci*, 2017, 29 (12): 2133-2137
- [10] Grebennikova AA, Stoliarov AY, Lopatin YM. The use of platform for remote monitoring on the base of mobile app for improving self-care in patients with chronic heart failure [J]. *Kardiologiia*, 2017, 57(S4): 11-18
- [11] 李勤, 刘盈盈. 左卡尼汀+辅酶 Q10 辅助治疗对慢性心力衰竭患者血管活性分子、内皮损伤、氧化应激反应的影响[J]. *海南医学院学报*, 2017, 23(18): 2472-2475
- [12] Chirinos J A, Sweitzer N. Ventricular-Arterial Coupling in Chronic Heart Failure[J]. *Card Fail Rev*, 2017, 3(1): 12-18
- [13] van Kessel P, de Boer D, Hendriks M, et al. Measuring patient outcomes in chronic heart failure: psychometric properties of the Care-Related Quality of Life survey for Chronic Heart Failure (CaRe-QoL CHF)[J]. *BMC Health Serv Res*, 2017, 17(1): 536
- [14] Dolinsky VW, Cole LK, Sparagna GC, et al. Cardiac mitochondrial energy metabolism in heart failure: Role of cardiolipin and sirtuins[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1861(10): 1544-1554
- [15] 周芳, 杨洁, 符炜. 心肌钙蛋白 T 与慢性心力衰竭的相关性及对急性心肌梗死的鉴别意义[J]. *中国社区医师*, 2017, 17(28): 116-117
- [16] 中华神经科学会中华神经外科学会. 各类脑血管疾病诊断要点 (1995)[J]. *临床和实验医学杂志*, 2013, 12(07): 559
- [17] 李志广, 马高峰, 王雪, 等. 左卡尼汀联合阿托伐他汀钙治疗慢性心力衰竭的疗效及对心功能和血清 CRP, IL-6, TNF- α 水平的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2018, 16(03): 323-326
- [18] 张亮, 黄文胜, 冷利华. 老年慢性心力衰竭患者应用左卡尼汀的临床疗效及安全性[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(05): 1052-1054
- [19] 吉杨. 急诊 PCI 联合 rh-BNP 治疗对急性前壁心肌梗死患者神经内分泌指标及心功能的影响 [J]. *海南医学院学报*, 2016, 22(11): 1054-1057
- [20] Miller C S, Foley J R, Floriano P N, et al. Utility of salivary biomarkers for demonstrating acute myocardial infarction [J]. *J Dent Res*, 2014, 93(7 Suppl): 72S-79S
- [21] 曹锐红, 李献良. 功能性室性期前收缩与左心结构及功能的相关性[J]. *临床心血管病杂志*, 2015, 31(09): 965-968
- [22] Lupon J, Bayes-Genis A. Left ventricular ejection fraction in heart failure: a clinician's perspective about a dynamic and imperfect parameter, though still convenient and a cornerstone for patient classification and management[J]. *Eur J Heart Fail*, 2018, 20(3): 433-435
- [23] Mele D, Nardoza M, Ferrari R. Left ventricular ejection fraction and heart failure: an indissoluble marriage?[J]. *Eur J Heart Fail*, 2018, 20 (3): 427-430
- [24] 中国老年学和老年医学学会心脑血管病专业委员会, 中国医师协会心血管内科医师分会. 老年高血压的诊断与治疗中国专家共识 (2017 版)[J]. *中华内科杂志*, 2017, 56(11): 885-893
- [25] Rahimi K, Emdin CA, Macmahon S. The epidemiology of blood pressure and its worldwide management [J]. *Circ Res*, 2015, 116(6): 925-936
- [26] 李莉萍, 韩雪玲. 简述老年高血压与心力衰竭 [J]. *医学美学美容 (中旬刊)*, 2014, (12): 766-767
- [27] Inoue M, Matsumura K, Haga Y, et al. Role of renin-angiotensin aldosterone system on short-term blood pressure variability in hypertensive patients[J]. *Clin Exp Hypertens*, 2018, 40(7): 624-630
- [28] 刘聪, 李文杰, 谢静. 真武汤对心力衰竭大鼠血清 Ang II 及 ALD 的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(06): 1374-1376
- [29] 周志安, 边树伟, 金明磊, 等. 左卡尼汀对老年非 ST 段抬高型心肌梗死患者内皮素和 CA125 水平的影响[J]. *河北医学*, 2016, 22(12): 2052-2054
- [30] 陈汉想, 李婧, 李琦, 等. 左卡尼汀对冠心病患者血管内皮功能的保护作用[J]. *现代医药卫生*, 2018, 34(03): 349-351

(上接第 3625 页)

- [20] Ma Y, Huang Z, Zhou Z, et al. A novel antioxidant Mito-Tempol inhibits ox-LDL-induced foam cell formation through restoration of autophagy flux[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 129: 463-472
- [21] 陈文娜, 郭胜男, 王俊岩, 等. 下肢动脉硬化闭塞症患者股动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞极化表型与自噬信号相关性的研究 [J]. *药学报*, 2016, 51(1): 68-74
- [22] 龚敏, 卓小祯, 马爱群. 小鼠动脉粥样硬化发展不同阶段巨噬细胞表型变化研究[J]. *陕西医学杂志*, 2016, 45(5): 515-516
- [23] Chu L, Liu FY, Wang LC. Polarization of macrophages and its correlation with the occurrence of atherosclerosis in elderly patients [J]. *J Pract Med*, 2015, 31: 944-947
- [24] Adamson S, Leitinger N. Phenotypic modulation of macrophages in response to plaque lipids[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2011, 22: 335-342
- [25] Shan M, Qin J, Jin F, et al. Autophagy suppresses isoprenaline-induced M2 macrophage polarization via the ROS/ERK and mTOR signaling pathway[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 110: 432-443
- [26] Yuan Yuan Guo, Cai Lin, Peng Xu, et al. AGEs Induced Autophagy Impairs Cutaneous Wound Healing via Stimulating Macrophage Polarization to M1 in Diabetes[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36416
- [27] Zhao XN, Li YN, Wang YT. Interleukin-4 regulates macrophage polarization via the MAPK signaling pathway to protect against atherosclerosis[J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(1)
- [28] Li X, Luo H, Ye Y, et al. β -glucan, a dectin-1 ligand, promotes macrophage M1 polarization via NF- κ B/autophagy pathway [J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(1): 271-282
- [29] Li X, Zhang X, Zheng L, et al. Hypericin-mediated sonodynamic therapy induces autophagy and decreases lipids in THP-1 macrophage by promoting ROS-dependent nuclear translocation of TFEB [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(12): e2527
- [30] Sun P, Wang H, He Z, et al. Fasting inhibits colorectal cancer growth by reducing M2 polarization of tumor-associated macrophages [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(43): 74649-74660