

OX40/OX40L 逆向信号对小鼠主动脉内皮细胞 MMP-9 表达及机制的研究

张丹丹¹, 夏文龙¹, 刘 强¹, 张大伟¹, 徐晋妤², 吴恒芳², 陈相健^{2*}, 杨 笛^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院心内科, ²心肺疾病研究所, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨 OX40 配体(OX40 ligand, OX40L)逆向通路激活对培养的小鼠主动脉内皮细胞基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)表达及活性的作用。方法:分离与培养 8~10 周龄 C57BL/6J 小鼠主动脉内皮细胞,传代至第 2 代,用可溶性 OX40(sOX40)、OX40L 单克隆抗体(anti-OX40L)和钙离子螯合剂 bapta-AM 刺激内皮细胞,RT-PCR 和 Western blot 方法检测内皮细胞 MMP-9 的 mRNA 和蛋白表达水平,明胶酶谱法检测内皮细胞培养上清 MMP-9 活性,应用钙离子成像方法观察内皮细胞胞浆游离钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)的改变。结果:与对照组相比,可溶性 OX40(0.1 mg/L)刺激后内皮细胞 MMP-9 的 mRNA 及蛋白表达水平均显著增高,内皮细胞培养上清 MMP-9 活性明显增高,内皮细胞胞浆 $[Ca^{2+}]_i$ 也明显增高。分别应用可溶性 OX40L 单克隆抗体(0.1 mg/L)和 Bapta-AM(20 μ mol/L)预处理培养内皮细胞后,由可溶性 OX40 引起的内皮细胞基因和蛋白表达水平明显降低,内皮细胞培养上清 MMP-9 活性明显下降。结论:内皮细胞 OX40L 逆向信号的激活可以通过调节胞内的游离钙离子水平参与内皮细胞中 MMP-9 表达的调控,这可能是 OX40/OX40L 逆向信号通路参与动脉粥样硬化的发生、发展的机制之一。

[关键词] OX40 配体;钙离子;基质金属蛋白酶-9;内皮细胞

[中图分类号] Q256

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)01-020-06

The effects and mechanism of OX40/OX40L reverse signaling on the expression of MMP-9 in mouse aortic endothelial cells

ZHANG Dan-dan¹, XIA Wen-long¹, LIU Qiang¹, ZHANG Da-wei¹, XU Jin-dan², WU Heng-fang², CHEN Xiang-jian^{2*}, YANG Di^{1*}

(¹Department of Cardiology, ²Research Institute of Cardio-pulmonary Disease, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of OX40 ligand(OX40L) reverse signaling on the expression and activity of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in the cultured mouse aortic endothelial cells (MAECs). **Methods:** Aortic endothelial cells were isolated from C57BL/6J mice aged 8 to 10 weeks and cultured to the second passage for experiments. The cultured MAECs were divided into 4 groups: control group, sOX40 group, sOX40+anti-OX40L group and sOX40+Bapta-AM group, and stimulated with DMEM, soluble OX40, anti-OX40L monoclonal antibody and calcium chelator Bapta-AM, respectively. The mRNA and protein expressions of MMP-9 were determined by RT-PCR and Western blot. The activity of MMP-9 was assayed by zymography. The intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) in MAECs was detected by calcium imaging using fura-2. **Results:** A significant increase in intracellular calcium level of MAECs was observed after stimulation with soluble OX40 (0.1 mg/L) for 48 hours compared to the control, and MMP-9 mRNA and protein levels were also markedly elevated. The activity changes of MMP-9 in cell culture supernatant was consistent with that of intracellular level. Notably, these elevations can be blocked by soluble anti-OX40L monoclonal antibody (0.1 mg/L) or Bapta-AM(20 μ mol/L). **Conclusion:** The stimulation of OX40L reverse signaling can activate the expression of MMP-9 on both mRNA and protein levels through the elevation of intracellular calcium of MAECs, suggesting that the OX40/OX40L signaling pathway may be one of the pathways contributing to the MMP-9 elevation in progression of atherosclerosis.

[Key words] OX40 ligand; $[Ca^{2+}]_i$; matrix metalloproteinase-9; endothelial cells

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30772781, 30770894)

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(1): 020-025]

*通讯作者, E-mail: chenxiangjian@gmail.com; diyang@njmu.edu.cn

近年来,越来越多的证据表明动脉粥样硬化是一种由多种细胞和炎症因子参与的血管壁的慢性炎症^[1-4],其致病性主要在于斑块的不稳定,而不仅限于斑块的形成^[5]。动脉粥样硬化事件起始于内皮细胞受刺激、内皮功能受损、继而炎症趋化因子高表达最终斑块不稳定甚至破裂^[5]。事件发生过程中有多种细胞因子参与,其中包括肿瘤坏死因子(TNFR/TNF)超家族成员中的 OX40/OX40L,它是动脉粥样硬化形成过程中重要的共刺激分子^[6]。OX40L(OX40 ligand)是 OX40 的特异性配体,主要表达在巨噬细胞、活化的 B 细胞、血管平滑肌细胞以及血管内皮细胞上^[7]。已有研究显示,OX40 能够活化巨噬细胞及血管平滑肌细胞产生炎症细胞因子、趋化因子及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)等,进而启动并加剧动脉粥样硬化的炎症反应^[8-9]。OX40 是否可通过激活主动脉内皮细胞进一步促进动脉粥样硬化事件发生尚有待研究,但目前有临床研究表明,冠状动脉粥样硬化患者血清中以及斑块部位 OX40L 的水平较正常人明显增高^[10];另外, MMP-9 在斑块部位同样表达上调^[11],而且与血清中 OX40L 水平有正相关关系^[9],两者之间可能存在着相互调节和相互作用^[12-14],但其详细的作用机制尚不明确。本研究通过探讨可溶性 OX40 在主动脉内皮细胞中的作用及其机制,从而为 MMPs 在动脉粥样硬化斑块部位表达上调的机制研究提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 材 料

8~10 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠由南京医科大学动物中心提供,体重 25~28 g。所有动物实验操作都遵循南京医科大学动物实验规章制度。DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;内皮细胞生长添加物、Fura-2/AM、钙离子螯合剂 Bapta-AM、明胶、GAPDH 一抗及二抗购自美国 Sigma 公司;可溶性 OX40、anti-OX40L 单克隆抗体由美国 R&D 公司提供;兔抗 MMP-9 抗体、辣根过氧化物酶标记的抗兔二抗购自英国 Abcam 公司;逆转录聚合酶链式反应(PT-PCR)试剂盒购自大连 TaKaRa 公司;激光共聚焦培养皿购自无锡 NEST 公司;细胞培养板及培养皿购自美国 Corning 公司。

1.2 方 法

1.2.1 内皮细胞培养及分组干预

8~10 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠,分离主动脉后,胰酶消化法取得主动脉内皮细胞,接种于含 20%胎

牛血清的内皮培养基中,培养条件为 37℃、5%CO₂,传代至第 2 代,细胞生长至 80%融合时实验分组,设立 Control 组(无血清 DMEM 处理)、sOX40 组(溶于 DMEM 的 0.1 mg/L 的可溶性 OX40 处理)及 sOX40+anti-OX40L 组(溶于 DMEM 的 0.1 mg/L OX40L 抗体预处理 6 h 后加入 0.1 mg/L 可溶性 OX40)。孵育 48 h 后,收集细胞用于 MMP-9 的 mRNA 和蛋白检测;收集细胞上清用于 MMP-9 的活性检测,所有实验至少重复 3 次。

1.2.2 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法

MMP-9 及 GAPDH 引物序列由上海生工生物工程有限公司合成。MMP-9 引物序列:上游引物 5'-AACCTCACGGACACCCAG-3';下游引物 5'-TCTCGCGGCAAGTCTTCA-3';PCR 产物长度 290 bp;GAPDH 引物序列:上游引物 5'-CTCTGCTCCTC-CCTGTTC-3';下游引物 5'-CAATCTCCACTTTGC-CACT-3';PCR 产物长度 154 bp;应用 TRIzol 试剂盒(美国 Gibco 公司),按说明书提取主动脉内皮细胞总 RNA,并检测 RNA 浓度和纯度。各取 1 μg RNA (2 μl)加随机引物及逆转录酶合成 cDNA。取 2 μl cDNA 作为模板,总体积为 25 μl 的反应体系中包括 MgCl₂ 1.5 mmol/L, 拓扑异构酶 2.5 U, MMP-9 引物浓度为 0.5 μmol/L。94℃ 5 min;95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 共 32 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 反应结束后,取出扩增产物 10 μl 进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 Western blot 方法

培养的各組内皮细胞于裂解液中裂解、匀浆、提取细胞蛋白,Bradford 法测定蛋白浓度后加入适量蛋白上样缓冲液,100℃ 变性 10 min,每个泳道以 40 μg 蛋白量上样,以 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后电转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入兔抗鼠 MMP-9(1:1 000)多克隆抗体,GAPDH 一抗(1:3 000)4℃ 孵育过夜,TBST 洗 3 次,每次 10 min,然后分别加入抗兔二抗(1:2 500)及 GAPDH 二抗(1:3 000),37℃ 孵育 1 h,TBST 洗 3 次,每次 10 min,然后 ECL 显色,压片曝光。

1.2.4 明胶酶谱方法

主动脉内皮细胞药物预处理 48 h 后,取细胞上清,超速离心管离心浓缩约 30 倍后,加入适量 5×非变性电泳缓冲液,充分混匀,于含有 0.1% 明胶底物的 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上电泳 2 h,然后用 2.5% Triton X-100 室温洗涤 30 min,2 次,转移至底物消化缓冲液中(10 mmol/L Tris-Base, 40 mmol/L

Tris-Cl, 0.2 mol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂, 0.02% Brij-35, pH 7.6), 37°C 孵育 30 h, 0.25% 考马斯亮蓝染色 30 min, 洗脱液内脱色, 直至出现清晰的消化条带。电泳结果进行图像扫描分析, 用 Gel-Pro Analyzer 4.0 图像分析软件分析条带 IOD 值。

1.2.5 钙离子成像方法

取生长密度适中的内皮细胞, 用台氏液洗涤 3 次, 然后用 4 μmol/L Fura-2/AM 负载, 在 37°C 避光孵育 30 min, 去除负载液后, 用正常台氏液洗涤 3 次去除胞外残余的 Fura-2/AM。将培养皿固定在荧光显微镜的载物台上, 选用贴壁良好, 细胞膜完整, 折光良好的细胞用荧光离子成像系统检测各分组中药物干预后内皮细胞胞浆游离钙离子浓度 ([Ca²⁺]_i) 的变化, 激发光波长为 340 nm 和 380 nm, 发射光波长为 510 nm。经 TillVision 软件分析得到细胞在 F340/F380 的荧光比值即 R 值, 间接反映 [Ca²⁺]_i 的变化。

细胞培养于激光共聚焦培养皿中, 在细胞生长互不融合时分组, 设立 Control 组、sOX40 组及 sOX40+anti-OX40L 组。按上述方法处理细胞, 48 h 后, 钙离子成像法检测各组主动脉内皮细胞胞浆内钙离子的荧光强度并比较其差异。

1.2.6 Anti-OX40L 单克隆抗体及钙离子螯合剂 Bapta-AM 对 sOX40 引起的 MMP-9 表达的影响

细胞培养于六孔板中, 细胞生长至 80% 融合时分组, 设立 Control 组、sOX40 组、sOX40+ Bapta-AM 组、sOX40+anti-OX40L 组及 Bapta-AM 对照组, 细胞

处理方法如上所述。为排除钙离子螯合剂对 MMP-9 活性检测的影响 (MMP-9 的活性依赖于二价离子如: 钙、锌等), 在明胶酶谱法检测时特加 Bapta-AM 对照组: 20 μmol/L Bapta-AM 处理细胞。48 h 后, 收集细胞用于检测 MMP-9 在基因和蛋白水平的表达; 收集细胞上清用于 MMP-9 的活性检测。

1.3 统计学方法

MMP-9 的 mRNA 表达水平用与 GAPDH mRNA 水平比较的相对值表示。MMP-9 的蛋白表达水平用与 GAPDH 蛋白水平比较的相对值表示。用各组 MMP-9 酶活性的光密度分析值与对照组的比值表示 MMP-9 酶活性的变化程度。[Ca²⁺]_i 的变化由钙离子成像系统检测 F340/F380 的荧光比值间接反映。测量值以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理, 组间比较采用方差分析; 两两比较用 SNK-q 检查, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 药物刺激后各组细胞中 MMP-9 的 mRNA 表达

与对照组相比, sOX40 处理后小鼠主动脉内皮细胞中 MMP-9 的 mRNA 表达水平显著增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05, n = 4$)。而钙离子螯合剂 Bapta-AM 和 anti-OX40L 单克隆抗体能够显著的抑制 MMP-9 的 mRNA 表达。两种药物处理后 MMP-9 的 mRNA 表达水平由 0.61 分别降至 0.45 和 0.43, 差异有统计学意义 ($P < 0.05, n = 4$, 图 1)。

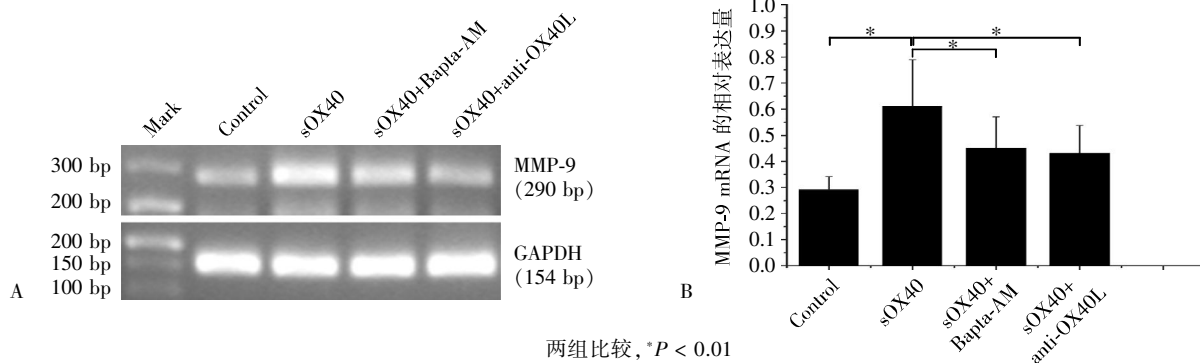


图 1 不同因素刺激 48 h 后内皮细胞中 MMP-9 mRNA 的表达

Figure 1 Identification of MMP-9 mRNA by RT-PCR after incubation for 48 h

2.2 MMP-9 的蛋白表达及其活性变化

通过免疫印迹结果分析, sOX40 处理后 MMP-9 的蛋白表达显著上调, MMP-9 蛋白与 GAPDH 的光密度比值由原来的 0.17 上调至 0.84, 统计结果显示 $P < 0.01$ 。而 sOX40+Bapta-AM 及 sOX40+anti-

OX40L 组中 MMP-9 蛋白表达明显低于 OX40 刺激组, 分别降低至 0.41 和 0.22 (图 2)。而明胶酶谱结果显示在各组细胞上清中 MMP-9 的活性变化趋势与其蛋白表达基本相同, 但由于钙离子螯合剂 Bapta-AM 对明胶酶谱检测方法本身有影响, 特设

Bapta-AM 组, 虽然 sOX40+Bapta-AM 组中 MMP-9 的活性低于 OX40 组, 但高于钙离子螯合剂 Bapta-AM 组, Bapta-AM 组与空白对照组相比, MMP-9

蛋白活性差异无明显统计学意义。这表明 sOX40 处理后 MMP-9 的活性依然是上调的(图3)。

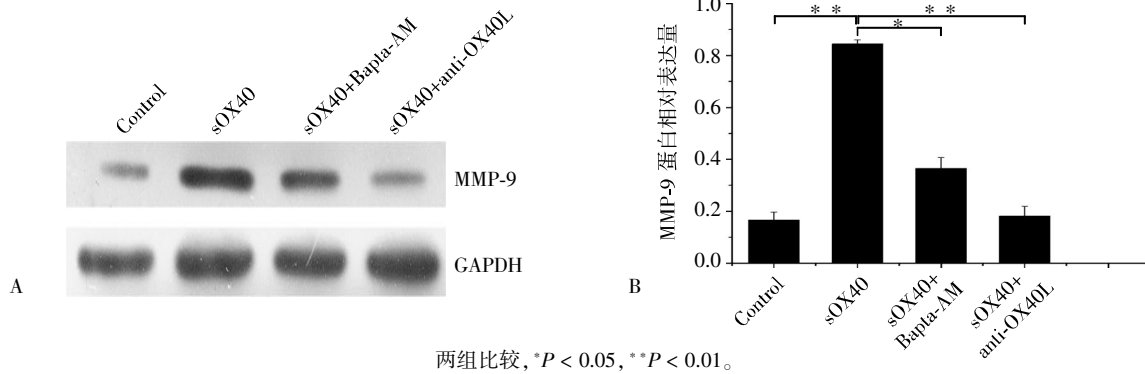


图 2 sOX40 及通路抑制剂对主动脉内皮细胞中 MMP-9 蛋白表达的影响

Figure 2 Effect of sOX40 and inhibitors on the expression of MMP-9 protein in aortic endothelial cells

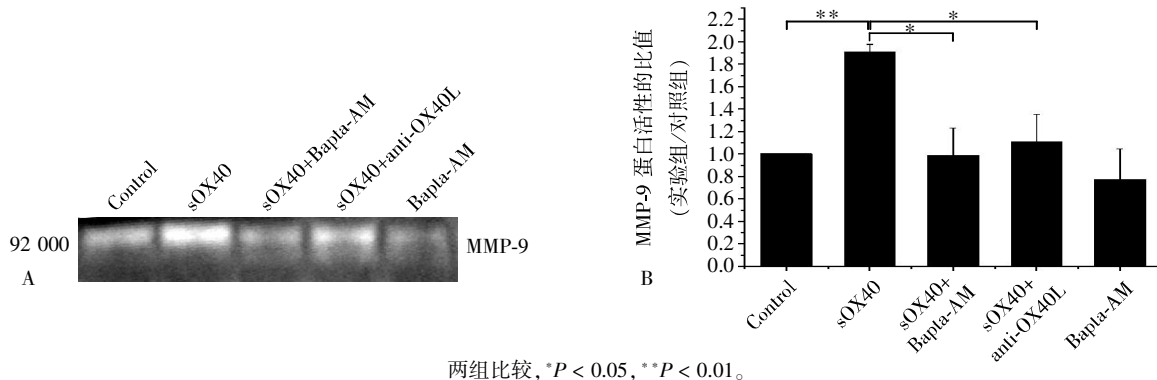


图 3 各组内皮细胞上清中 MMP-9 的活性变化

Figure 3 The activity of MMP-9 in endothelial cells culture supernatant determined by zymography

2.3 药物刺激后各组细胞内游离钙离子的变化

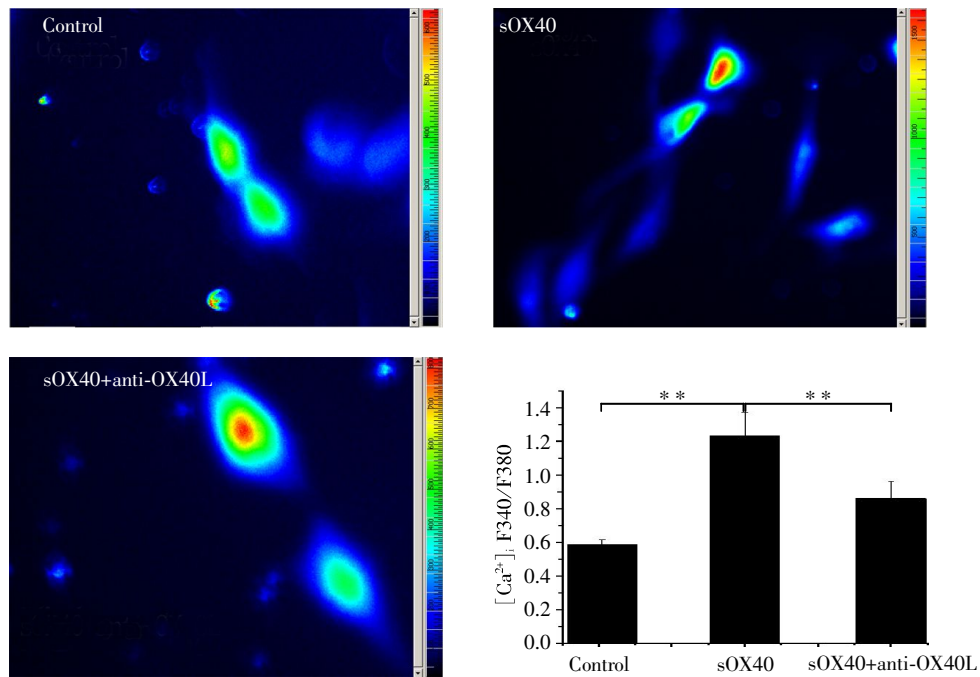
激光共聚焦显微镜成像结果显示 0.1 mg/L sOX40 刺激小鼠主动脉内皮细胞 48 h 后, 内皮细胞胞浆内钙离子的荧光强度明显增强, F340/F380 值由原来的 0.58 ± 0.03 增加到 1.22 ± 0.19 , 差异有统计学意义 ($P < 0.01, n = 7$)。使用终浓度为 0.1 mg/L 的 anti-OX40L 单克隆抗体预处理后, 这种增高趋势明显下降, 与 sOX40 刺激组 (0.85 ± 0.10) 相比差异有统计学意义 ($P < 0.01, n = 5$, 图 4)。

3 讨论

急性冠脉综合征 (acute coronary syndrom, ACS) 的发生是一个复杂的病理过程, 有很多病理因素参与, 不稳定斑块破裂是其发病的病理基础。细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 合成或降解失衡、内皮损伤及功能不良、大量生长因子和血管调节分子的生成调节失衡等在粥样斑块形成过程中均发挥

重要作用。其中, ECM 是构成斑块纤维帽的主要成分, 决定了斑块的稳定性^[15]。而 MMPs 作为调节细胞外基质代谢的主要酶类, 可降解基底膜和细胞外基质的大多数蛋白质, 在细胞外基质的沉积和降解中发挥着关键作用, 与动脉粥样硬化斑块的不稳定性尤为相关^[15-16]。此外, 近年来的研究发现冠状动脉内皮损伤在不稳定斑块的形成、发展直至最终破裂的过程中也发挥着重要的作用。OX40/OX40L 与内皮损伤的关系密切, 在动脉粥样硬化中的作用在临床上已经受到重视, 并且具有成为心肌损伤标志物的潜质^[7,17]。

此外, Ca^{2+} 作为细胞内重要的第二信使, 在内皮细胞的信号转导中起重要作用, 与很多信号通路密切相关^[18], 细胞内钙离子升高可以促使多种炎症介质、促栓塞物质、组织因子等从内皮细胞中释放^[19-21]。Yan 等^[22]研究表明 sOX40 刺激能够促进内皮细胞胞内游离钙离子的增高, 而且动脉粥样



两组比较, **P < 0.01。

图 4 刺激 48 h 后各组内皮细胞胞内游离钙离子的变化

Figure 4 Changes in intracellular[Ca²⁺]_i induced by sOX40 and sOX40+anti-OX40L in endothelial cells

硬化患者血清中及斑块部位高表达 OX40L 和 MMP-9,因此 sOX40 是否能够与细胞膜上的 OX40L 特异性结合激活胞内钙离子途径调节 MMPs 的表达尚有待研究。

本实验通过分离培养原代小鼠主动脉内皮细胞研究 OX40/OX40L 逆向信号在内皮细胞损伤机制中的作用,使用 sOX40 处理内皮细胞激活 OX40/OX40L 逆向信号通路,anti-OX40 单克隆抗体及钙离子螯合剂分别阻断 sOX40 的激活作用及胞内游离钙离子的变化,从而研究其对 MMP-9 表达的影响。结果发现 sOX40 作用 48 h 后 MMP-9 的 mRNA 和蛋白表达水平显著增高,其活性也明显高于对照组。钙离子成像检测发现内皮细胞中胞浆游离钙离子水平也显著增高,差异有统计学意义(P < 0.01)。而细胞膜 OX40L 特异性阻断剂 anti-OX40L 单克隆抗体预处理能够显著的阻断 sOX40 刺激引起的内皮细胞中胞浆游离钙离子的浓度增高,而且与 sOX40 刺激组相比 sOX40+anti-OX40L 组内皮细胞中 MMP-9 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低,其活性也明显降低,这表明 OX40/OX40L 信号可以上调胞内钙离子途径和内皮细胞 MMP-9 的表达,胞内钙离子水平与 MMP-9 的表达相关。本实验进一步研究发现,Bapta-AM 也能够显著的抑制 sOX40 诱导的 MMP-9 mRNA 和蛋白的表达上调。这表明 sOX40

可以通过调节胞内的游离钙离子水平参与内皮细胞中 MMP-9 表达的调控。此外,前期研究还发现 sOX40 作用于内皮细胞 72 h 以上,细胞上清中可以检测到 MMP-2 的活性较对照组有增高趋势(数据文章中未列出)。但由于小鼠主动脉内皮细胞在无血清的培养基中较为脆弱,死亡率高,无法进行基因及蛋白水平检测,故放弃对 MMP-2 分析研究。

综上所述,OX40/OX40L 逆向信号可以通过调节胞内的游离钙离子水平参与内皮细胞中 MMP-9 表达的调控。但本研究发现,anti-OX40L 单克隆抗体和钙离子螯合剂 Bapta-AM 均未能完全阻断 MMP-9 的表达,这表明在 sOX40 和钙离子通路之外可能还存在着其他的信号通路可以使 MMP-9 的表达上调。因此,需要对 sOX40 及其他信号通路进一步研究,以便能够深入了解 ACS 发病过程中 MMP-9 的表达上调机制从而为 ACS 的治疗寻找新途径。

[参考文献]

[1] Shibata N, Glass CK. Regulation of macrophage function in inflammation and atherosclerosis [J]. J Lipid Res, 2009, 50(Suppl): S277-S281

[2] Breland UM, Michelsen AE, Skjelland M, et al. Raised MCP-4 levels in symptomatic carotid atherosclerosis; an inflammatory link between platelet and monocyte activation[J]. Cardiovasc Res, 2010, 86(2): 265-273

- [3] Tousoulis D, Davies G, Stefanadis C, et al. Inflammatory and thrombotic mechanisms in coronary atherosclerosis [J]. *Heart*, 2003, 89(9):993-997
- [4] Wajchenberg BL, Nery M, Cunha MR, et al. Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis [J]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2009, 53(2):145-150
- [5] Mestas J, Ley K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2008, 18(6):228-232
- [6] Compaan DM, Hymowitz SG. The crystal structure of the costimulatory OX40-OX40L complex [J]. *Structure*, 2006, 14(8):1321-1330
- [7] Brocker T, Gulbranson-Judge A, Flynn S, et al. CD4 T cell traffic control; *in vivo* evidence that ligation of OX40 on CD4 T cells by OX40-ligand expressed on dendritic cells leads to the accumulation of CD4 T cells in B follicles [J]. *Eur J Immunol*, 1999, 29(5):1610-1616
- [8] Wang X, Ria M, Kelmenson PM, et al. Positional identification of TNFSF4, encoding OX40 ligand, as a gene that influences atherosclerosis susceptibility [J]. *Nat Genet*, 2005, 37(4):365-372
- [9] Liu DM, Yan JC, Wang CP, et al. The clinical implications of increased OX40 ligand expression in patients with acute coronary syndrome [J]. *Clin Chim Acta*, 2008, 397(1-2):22-26
- [10] Yan J, Chen G, Gong J, et al. Upregulation of OX40-OX40 ligand system on T lymphocytes in patients with acute coronary syndromes [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2009, 54(5):451-455
- [11] Mukherjee S, Roth MJ, Dawsey SM, et al. Increased matrix metalloproteinase activation in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Transl Med*, 2010, 8(1):91-98
- [12] 陈广华, 严金川. 急性冠脉综合征患者循环血中 OX40L 高表达的临床价值 [J]. *现代医学*, 2009, 37(2):96-99
- [13] 唐其东, 吴平生, 侯玉清, 等. 急性冠脉综合征和冠脉慢性完全闭塞患者 MMP2、MMP9 升高及临床意义 [J]. *南方医科大学学报*, 2009, 29(5):1004-1007
- [14] 王林军, 宋新, 侯思南, 等. 急性冠状动脉综合征患者可溶性 OX40 配体与基质金属蛋白酶 9 的变化 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2010, 12(8):751
- [15] Heo SH, Cho CH, Kim HO, et al. Plaque rupture is a determinant of vascular events in carotid artery atherosclerotic disease; involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9 [J]. *J Clin Neurol*, 2011, 7(2):69-76
- [16] Hans CP, Feng Y, Naura AS, et al. Opposing roles of PARP-1 in MMP-9 and TIMP-2 expression and mast cell degranulation in dyslipidemic dilated cardiomyopathy [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2010, 20(2):e57-e68
- [17] van Wanrooij EJ, van Puijvelde GH, de Vos P, et al. Interruption of the Tnfrsf4/Tnfsf4 (OX40/OX40L) pathway attenuates atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(1):204-210
- [18] 刘强, 张丹丹, 徐晋妣, 等. C 反应蛋白对小鼠主动脉内皮细胞内游离钙的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2011, 31(5):679-683
- [19] Vanhoutte PM, Tang EH. Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad [J]. *J Physiol*, 2008, 586(Pt 22):5295-5304
- [20] Wong SL, Leung FP, Lau CW, et al. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandine F2alpha mediates endothelium-dependent contractions in the aortae of hamsters with increased impact during aging [J]. *Circ Res*, 2009, 104(2):228-235
- [21] Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(10):803-815
- [22] Yan J, Wang C, Du R, et al. OX40-OX40 ligand interaction may activate phospholipase C signal transduction pathway in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 180(3):460-464

[收稿日期] 2011-07-27