

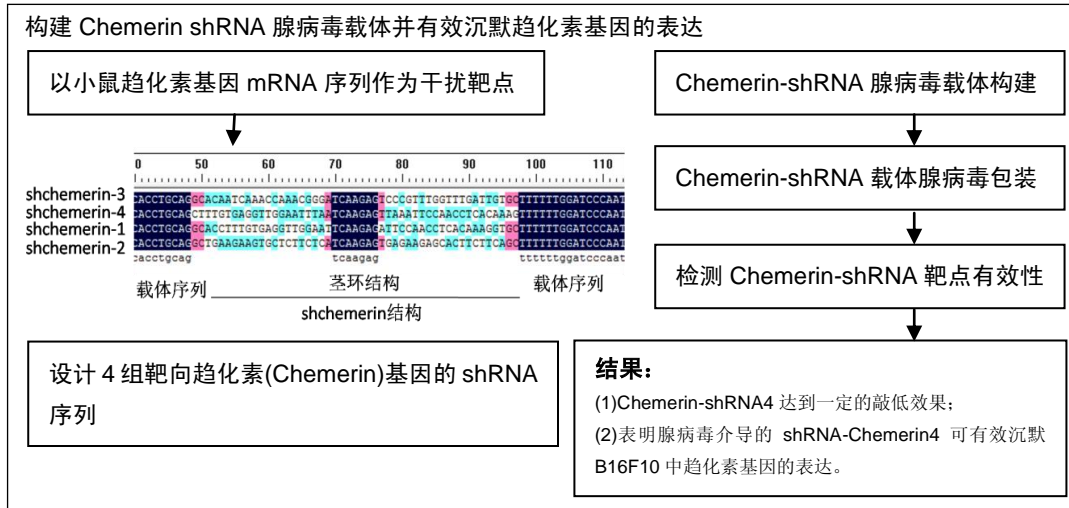
## 腺病毒载体构建小鼠趋化素基因缺陷性细胞系

陈婷婷, 曹园芝, 熊 玮, 董少红(暨南大学第二临床医学院深圳市人民医院心内科, 广东省深圳市 518020)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0326

ORCID: 0000-0001-5507-4590(陈婷婷)

文章快速阅读:



陈婷婷, 女, 1985 年生, 山东省威海市人, 汉族, 2013 年香港中文大学毕业, 博士, 副研究员, 主要从事动脉粥样硬化的研究。

通讯作者: 董少红, 博士, 主任医师, 教授, 暨南大学第二临床医学院 深圳市人民医院心内科, 广东省深圳市 518020

中图分类号: R318

文献标识码: B

稿件接受: 2018-04-08



## 文题释义:

**趋化因子:** 也称做趋化激素、趋化素。是指具有吸引白细胞移行到感染部位的一些低分子量趋化因子(多为 8-10 ku)的蛋白质(如白细胞介素 8、MCP-1 等), 在炎症反应中具有重要作用。趋化因子的主要作用是趋化细胞的迁移, 细胞沿着趋化因子浓度增加的信号向趋化因子源处的迁徙。在所有脊椎动物和一些病毒和一些细菌中有趋化因子存在, 但不存在于其他无脊椎动物。这些蛋白质结合到趋化因子受体而起作用, 趋化因子受体是 G 蛋白偶连的跨膜受体, 选择性地表达在靶细胞表面。

**腺病毒(adenovirus):** 是一种没有包膜的直径为 70-90 nm 的颗粒, 由 252 个壳粒呈廿面体排列构成。衣壳里是线状双链 DNA 分子, 腺病毒分两个属, 共约 100 余血清型。一般会造成呼吸系统的舒适, 对啮齿类动物有致癌能力, 或能转化体外培养的啮齿类动物细胞, 但对人体不出现致癌性。

**载体:** 在基因操作过程中使用运载体有 2 个目的: 一是表达载体, 用它作为运载工具, 将目的基因转移到宿主细胞中去; 二是克隆载体, 利用它在宿主细胞内对目的基因进行大量的复制(称为克隆)。现在所用的运载体主要有两类: 一类是细菌细胞质的质粒, 它是一种相对分子量较小、独立于染色体 DNA 之外的环状 DNA(一般有 1-200 kb), 有的一个细菌中有一个, 有的一个细菌中有多个。质粒能通过细菌间的接合由一个细菌向另一个细菌转移, 可以独立复制, 也可整合到细菌染色体 DNA 中, 随着染色体 DNA 的复制而复制。另一类运载体是噬菌体或某些病毒等。现在人们还在不断寻找新的运载体, 如叶绿体或线粒体 DNA 等也有可能成为运载体。

## 摘要

**背景:** 趋化素在动脉粥样硬化中的表达水平上调, 趋化素可能参与了动脉粥样硬化的病理过程。

**目的:** 应用腺病毒介导的 RNA 干扰技术, 构建并有效沉默趋化素基因的表达体, 为研究其对动脉粥样硬化机制奠定实验技术基础。

**方法:** 以小鼠趋化素基因 mRNA 序列作为干扰靶点, 以腺病毒基因 pCD316-ZsGreen-shRNA 作为质粒载体, 设计 4 组靶向趋化素基因的 shRNA 序列, 构建靶向鼠趋化素的 shRNA 表达质粒, 另构建不针对任何已知 mRNA 的阴性对照 shRNA 表达质粒, 筛选出干扰效果最好的 shRNA, 并在 293T 细胞对腺病毒进行包装和滴度测定。体外培养小鼠黑色素瘤细胞 B16F10, 转染腺病毒形成趋化素基因缺陷性 B16F10 细胞, 用 qPCR 和 Western blot 检测感染腺病毒后细胞中趋化素 mRNA 和蛋白水平。

**结果与结论:** ① PCR 以及基因测序结果表明 Chemerin shRNA 腺病毒载体构建成功, 腺病毒的滴度为  $2 \times 10^{10}$  PFU/mL, pDC-shRNA4 对趋化素基因的抑制效果最显著 ( $P < 0.001$ ); ② qPCR 和 Western 检测 B16F10 细胞中趋化素 mRNA 水平和蛋白水平, 结果显示 Chemerin-shRNA4 达到一定的敲低效果; ③ 表明腺病毒介导的 shRNA-Chemerin4 可有效沉默 B16F10 中趋化素基因的表达。

## 关键词:

趋化素; 腺病毒; RNA 干扰; 动脉粥样硬化; 质粒; 基因转染; 免疫印迹; 组织工程; 血管平滑肌细胞

## 主题词:

趋化因子类; 腺病毒科; RNA 干扰; 动脉粥样硬化; 质粒; 组织工程

Chen Ting-ting, M.D.,  
Associate researcher,  
Department of Cardiology,  
Second Clinical Medical  
College of Jinan  
University/Shenzhen  
People's Hospital, Shenzhen  
518020, Guangdong  
Province, China

Corresponding author:  
Dong Shao-hong, M.D.,  
Chief physician, Professor,  
Department of Cardiology,  
Second Clinical Medical  
College of Jinan  
University/Shenzhen  
People's Hospital, Shenzhen  
518020, Guangdong  
Province, China

基金资助:

深圳市知识创新基础研究项目(JCYJ20150403101028192); 深圳市科创委(JCYJ20170307100703967)

## Construction of mouse chemerin gene knock-down cell lines mediated by adenovirus vector

Chen Ting-ting, Cao Yuan-zhi, Xiong Wei, Dong Shao-hong (Department of Cardiology, Second Clinical Medical College of Jinan University/Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Level of chemerin is elevated in atherosclerosis, indicating that chemerin may participate in the pathological process of atherosclerosis.

**OBJECTIVE:** To construct and effectively silence the expression of chemerin gene by adenovirus-mediated RNA interference technique, so as to lay an experimental foundation for the study on the mechanism of atherosclerosis.

**METHODS:** Four chemerin shRNA sequences were designed by pCD316-ZsGreen-shRNA adenovirus vector for RNAi targeting the coding region of mouse chemerin mRNA, and another control vector containing a nonsense sequence was constructed. The best pCD316-shRNA was picked up to package recombinant adenovirus in 293T cells, which was infected in cultured mouse melanoma B16F10 cells. The chemerin mRNA and protein levels in B16F10 cells were detected by qPCR and western blot assay.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The adenovirus vectors chemerin shRNA was successfully constructed, which was confirmed by PCR and DNA sequencing. The titer of adenovirus reached  $2 \times 10^{10}$  PFU/mL in the packaging cells, and pDC-shRNA4 showed the most significant interfering effects on chemerin gene ( $P < 0.001$ ). QPCR and western blot assay showed that the expression levels of chemerin mRNA and protein in B16F10 cells were significantly inhibited, suggesting that chemerin-shRNA4 showed the interfering effects on chemerin gene. We finally confirmed that the expression of chemerin gene can be effectively silenced by adenovirus-mediated siRNA in mouse B16F10.

**Subject headings:** Chemotactic Factors; Adenoviridae; RNA interference; Atherosclerosis; Plasmids; Tissue Engineering

**Funding:** the Basic Research Project of Knowledge Innovation in Shenzhen, No. JCYJ20150403101028192; a grant from Science and Innovation Commission of Shenzhen, No. JCYJ20170307100703967

## 0 引言 Introduction

动脉粥样硬化是脂肪物质沿着动脉壁堆积所造成的<sup>[1]</sup>, 随着时间的迁移, 动脉内膜脂质沉着、粥样斑块形成、管壁硬化<sup>[2]</sup>。动脉粥样硬化涉及多个组织器官和系统, 至今机制未完全阐明。Ross<sup>[3]</sup>于1999年在血管损伤反应学说的基础上提出慢性炎症学说为动脉粥样硬化的研究指明了方向, 大量的炎性细胞和因子参与了动脉粥样硬化的发生和发展的全过程。

趋化素(Chemerin)是近年来新发现的一种脂肪因子。在多种炎症组织中参与天然免疫和获得性免疫的作用<sup>[4]</sup>。最近研究发现, 趋化素可能参与了动脉粥样硬化的发生和发展<sup>[5-6]</sup>。一方面, 趋化素与其受体作用于脂肪组织、抗原呈递细胞及肝脏细胞等, 调节脂肪细胞分化; 另一方面, 趋化素刺激树突状细胞或巨噬细胞促进局部炎症反应。Spiroglou等<sup>[7]</sup>对人类主动脉旁、冠脉周围及心尖外膜脂肪组织进行免疫组织化学染色, 明确了多种脂肪因子在上述组织均有表达, 且多数因子还可表达于血管粥样硬化损伤部位的平滑肌细胞及泡沫细胞。主动脉粥样硬化程度与其周围脂肪中趋化素水平相关。在血管内皮细胞表达的趋化素, 其受体CMKLR1受多种炎性细胞因子的调控, 譬如肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白细胞介素 $1\beta$ 或者白细胞介素6<sup>[8]</sup>。在动脉粥样硬化硬化病变部位, 血清中的趋化素趋化免疫细胞, 重塑血管壁, 并在脂肪细胞和骨骼肌中, 趋化素促进脂肪细胞分化、降低脂肪细胞及骨骼肌细胞的胰岛素敏感性, 增加内皮脂质堆积及斑块的形成, 进而促进动脉粥样硬化的发生和发展<sup>[9]</sup>。在血管内皮细胞中, 趋化素通过激活PI3K/Akt/eNOS信号通路, 增加一氧化氮的产生而影响内皮的炎性状态<sup>[10]</sup>。然而, 动脉粥样硬化的发生和发展与趋化素的表达水平仍

然有很多方面尚未研究清楚, 譬如, 趋化素在促进血管平滑肌细胞的增殖、迁移和凋亡或者斑块的形成方面, 需要更多的研究进行阐明。

因此, 该实验拟在体外通过RNA干扰技术, 采用腺病毒介导的方法构建趋化素基因缺陷性的载体质粒, 为下一步研究该信号通路在血管平滑肌细胞增殖和冠心病、再狭窄中的作用奠定基础。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 重复测量, 细胞水平体外实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年12月至2017年3月在深圳市人民医院转化医学协同创新中心完成。

1.3 材料 DMEM培养基、胎牛血清FBS和胰蛋白酶(美国invitrogen公司); 动物总RNA快速提取试剂盒(上海捷瑞生物工程公司); qPCR试剂盒RealMasterMix (TIANGEN); PrimeScript RT Master Mix(TAKARA); 趋化素(chemerin)抗体(Abcam); Tubulin抗体(BIOWORLD); 0.45  $\mu\text{mol/L}$  PVDF膜(Millipore); 脱脂奶粉(伊利); 彩色预染蛋白分子量标准(Fermentas公司); ECL Plus发光试剂盒、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5X)、Western及IP细胞裂解液、PMSF、BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天公司); Tris-Hcl/SDS (1.5 mmol/L, pH 8.8), Tris-Hcl/SDS(0.5 mmol/L, pH 6.8) (上海生工生物工程有限公司); 30% Acrylamide(Bio-Rad公司); Tris碱、SDS、过硫酸铵(Biosharp公司); DH5 $\alpha$ 感受态细胞、T<sub>4</sub>连接酶、限制性内切酶Pst I、限制性内切酶BamH I、Taq酶(TAKARA公司); 高纯度质粒小量中提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒(北京天根生化有限公司); DNA引物合成(上海桑尼公司); DNA测序(上海铂尚);

Qiagen大规模质粒抽提试剂盒(德国Qiagen公司)。

## 1.4 实验方法

**1.4.1 ShRNA片段设计与合成** 根据趋化素sequence设计shRNA, 从上海桑尼公司合成shRNA片段, 合成序列如下:

引物名称	shRNA 引物序列
NC-F (5'-3')	gtt ctc cga acg tgt cac gtt tca aga gaa cgt gac acg ttc gga gaa ttt ttt g
NC-R (5'-3')	gat cca aaa aat tct cag aac gtg tca cgt tct ctt gaa acg tga cac gtt cgg aga act gca
Chemerin-shRNA-1-F (5'-3')	ggc acc ttt gtg agg ttg gaa ttc aag aga ttc caa cct cac aaa ggt gct ttt ttg
Chemerin-shRNA-1-R (5'-3')	gat cca aaa aag cac ctt tgt gag gtt gga atc tct tga att cca acc tca caa agg tgc ctg ca
Chemerin-shRNA-2-F (5'-3')	ggc aca atc aaa cca aac ggg atc aag agt ccc gtt tgg ttt gat tgt gct ttt ttg
Chemerin-shRNA-2-R (5'-3')	gat cca aaa aag cac aat caa acc aaa cgg gac tct tga tcc cgt ttg gtt tga ttg tgc ctg ca
Chemerin-shRNA-3-F (5'-3')	gct ttg tga ggt tgg aat tta atc aag agt taa att cca acc tca caa agt ttt ttg
Chemerin-shRNA-3-R (5'-3')	gat cca aaa aac ttt gtg agg ttg gaa ttt aac tct tga tta aat tcc aac ctc aca aag ctg ca
Chemerin-shRNA-4-R (5'-3')	ggc tga aga agt gct ctt ctc atc aag agt gag aag agc act tct tca gct ttt ttg
Chemerin-shRNA-4-R (5'-3')	gat cca aaa aag ctg aag aag tgc tct tct cac tct tga tga gaa gag cac ttc ttc agc ctg ca

注: shRNA 正向引物序列(F)即为 shRNA 序列; NC 为已构建好的 shRNA 对照, 其包含的序列是无干扰序列, 不能干扰任何基因的表达。

**1.4.2 腺病毒载体构建** 分别用ddH<sub>2</sub>O充分溶解合成的DNA片段至100 μmol/L。各取1 μL正反(F/R)向引物片段, 加入48 μL退火Buffer中, 充分混匀, 100 °C水浴5 min, 自然冷却至室温。

载体pCD316-ZsGreen-shRNA用限制性内切酶Pst I和 BamH I酶切, 37 °C酶切过夜, 1%琼脂糖电泳, 切取大片段, 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收骨架载体片段。质粒 pCD316-ZsGreen-shRNA 酶切回收片段与 Chemerin-shRNA退火产物连接, 16 °C PCR仪过夜。

各取5 μL过夜连接产物转化100 μL DH5α感受态细胞, 将连接产物与感受态混匀后冰浴30 min, 42 °C热激45 s, 立即置冰上放置5 min, 加入预热至室温的400 μL LB培养基, 100 r/min, 37 °C恒温摇床培养1h, 4 000 r/min离心1 min, 弃去400 μL LB培养上清, 剩余100 μL用移液器混匀后均匀涂布于含100 mg/L Ampicillin抗性的LB平板上, 倒置, 37 °C恒温培养箱培养过夜。分别挑取6个单菌落接种于含500 μL, 100 mg/L Ampicillin抗性的LB培养液中, 250 r/min, 37 °C恒温摇床培养4 h, 进行PCR鉴定以及测序鉴定。

**1.4.3 腺病毒包装** 将2 μg Shchemerin质粒及4 μg包装质粒共转染到293T细胞包装腺病毒, 48 h后收集含病毒的上清培养基, 超速离心纯化, 收获腺病毒, 在荧光显微镜下每孔随机选择5个视野, 10倍物镜下计算荧光细胞个数, 计算腺病毒的滴度。

**1.4.4 检测 Chemerin-shRNA靶点有效性** qPCR和Western blot法检测Chemerin-shRNA腺病毒感染小鼠黑色素瘤B16F10细胞样品中趋化素的表达情况, 筛选获得最佳干扰效果的shRNA。离心柱法提取总RNA, 反转录成cDNA, 用qPCR法检测B16F10中趋化素mRNA水平。提取总蛋白, Western检测B16F10中趋化素蛋白水平。

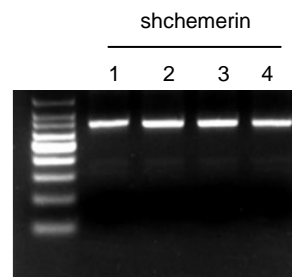
**1.5 主要观察指标** ①Chemerin-shRNA腺病毒载体PCR鉴定结果; ②Chemerin-shRNA腺病毒载体测序结果; ③Chemerin-shRNA载体腺病毒包装; ④qPCR检测Chemerin-shRNA靶点有效性; ⑤Western blot检测Chemerin-shRNA靶点有效性。

**1.6 统计学分析** 所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用SPSS 13.0在计算机上完成数据处理。多组间计量资料比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 Chemerin-shRNA腺病毒载体PCR鉴定结果** 分别挑取6个单菌落接种于含500 μL, 100 mg/L Ampicillin抗性的LB培养液中, 250 r/min, 37 °C恒温摇床培养4 h, 进行PCR鉴定。阳性克隆得到约300 bp条带, 阴性克隆(空载体自连)得到约250 bp条带。

PCR鉴定结果见图1。



图注: M: Marker; 1, 2, 3, 4 分别为 chemerin-shRNA-1, chemerin-shRNA-2, chemerin-shRNA-3, chemerin-shRNA-4 组。阳性克隆得到约 300 bp 条带。

图1 Chemerin-shRNA PCR 鉴定结果

Figure 1 Identification result of Chemerin-shRNA PCR

**2.2 Chemerin-shRNA腺病毒载体测序结果** 将腺病毒构建载体进行基因序列检测, 测序结果显示基因序列正确, 表明重组腺病毒载体构建成功(见图2)。

**2.3 Chemerin-shRNA载体腺病毒包装** 经检测计算病毒滴度为 $2 \times 10^{10}$  PFU/mL(见图3)。

**2.4 qPCR检测 Chemerin-shRNA靶点有效性** 采用qPCR检测Chemerin-shRNA腺病毒感染B16F10细胞样品中趋化素的表达情况, 筛选获得最佳干扰效果的shRNA。结果显示, 与shRNA对照组细胞相比, 4个Chemerin shRNA组的趋化素mRNA水平均有下降, 其中Chemerin-shRNA4的沉默效果最明显( $P < 0.01$ )(见图4)。

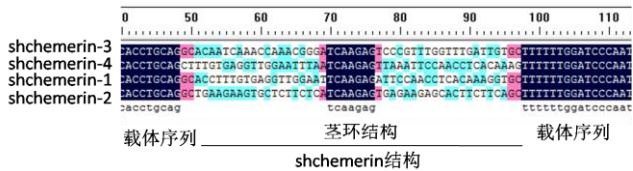


图2 腺病毒载体基因测序

Figure 2 Sequencing of chemerin-shRNA

图注: 测序结果显示基因序列正确, 表明重组腺病毒载体构建成功。

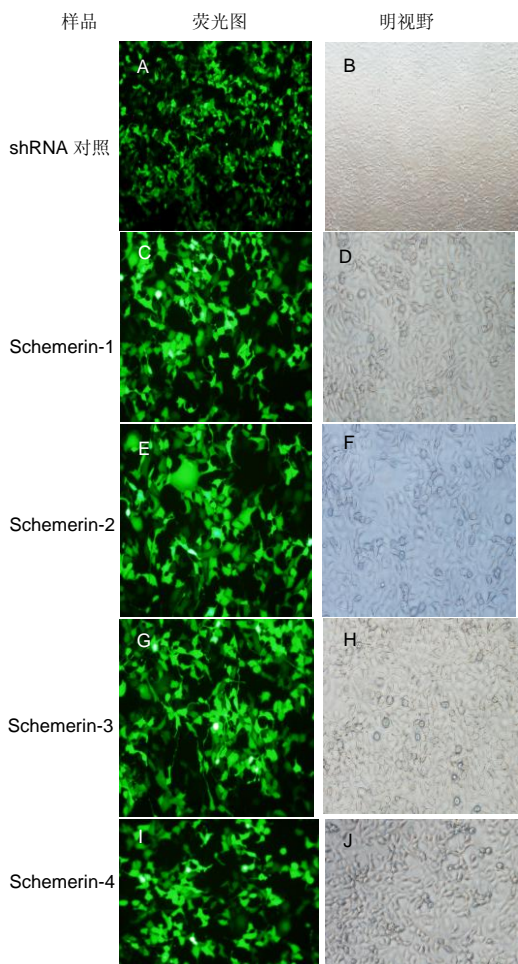


图3 转染 Chemerin-shRNA 载体腺病毒荧光图(x40)

Figure 3 Transfection fluorescent map of chemerin-shRNA adenovirus vector (x40)

图注: 图A, B为shRNA对照; C, D为Schemerin-1组; E, F为Schemerin-2; G, H为Schemerin-3; I, J为Schemerin-4。经检测计算病毒滴度为 $2 \times 10^{10}$  PFU/mL。

2.5 Western blot检测Chemerin-shRNA靶点有效性 采用Western blot检测Chemerin-shRNA腺病毒感染B16F10细胞样品中趋化素的蛋白表达情况, 筛选获得最佳干扰效果的shRNA。结果显示, 与shRNA对照组细胞相比, 3个Chemerin shRNA组的趋化素蛋白水平均有下降, 其中Chemerin-shRNA4的沉默效果最明显( $P < 0.01$ ), 见图5。

### 3 讨论 Discussion

许多因素都会导致动脉粥样硬化的发生和发展。过去的

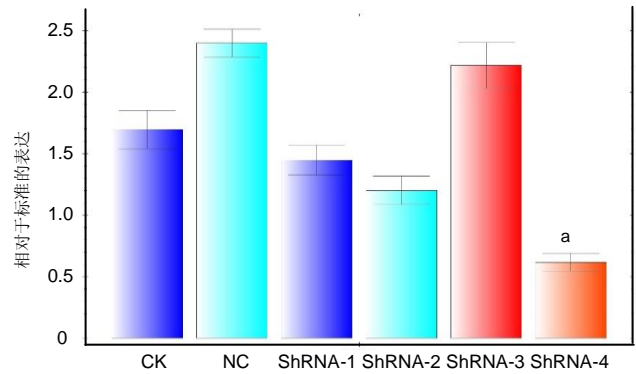


图4 qPCR 检测趋化素 mRNA 水平

Figure 4 Chemerin mRNA level detected by qPCR

图注: CK: B16F10 空细胞组; NC: 为已构建的 shRNA 对照; shRNA-1: B16F10 感染干扰病毒 chemerin-shRNA-1 组; shRNA-2: B16F10 感染干扰病毒 chemerin-shRNA-2 组; shRNA-3: B16F10 感染干扰病毒 chemerin-shRNA-3 组; shRNA-4: B16F10 感染干扰病毒 chemerin-shRNA-4 组。与 shRNA 对照组相比,  $^aP < 0.01$ 。

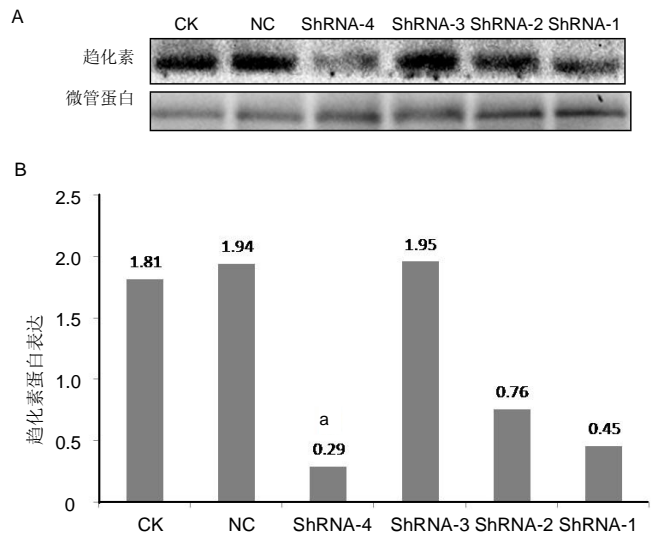


图5 Western blot 检测趋化素蛋白水平

Figure 5 Chemerin protein level detected by western blot assay

图注: 图A为Western blot 显影结果, B为基因表达柱状图, 灰度分析。CK: B16F10 空细胞组; NC: 为已构建的 shRNA 对照; shRNA-1: B16F10 感染干扰病毒 chemerin-shRNA-1 组; shRNA-2: B16F10 感染干扰病毒 chemerin-shRNA-2 组; shRNA-3: B16F10 感染干扰病毒 chemerin-shRNA-3 组; shRNA-4: B16F10 感染干扰病毒 chemerin-shRNA-4 组。与 shRNA 对照组相比,  $^aP < 0.01$ 。

几年内, 对炎性在动脉粥样硬化发展的各个阶段中的作用和血栓并发症的研究显得尤为重要。在正常的生理条件下, 血管作为一个网络系统, 其病理生理机制非常复杂, 血管稳态失衡与重构是动脉粥样硬化发生发展的关键<sup>[11]</sup>。持续的代谢刺激比如高血压, 胰岛素耐药或者肥胖等就会导致这个平衡受到破坏。大部分的代谢刺激导致的紊乱主要是通过内皮细胞和血管平滑肌细胞中炎症的发生, 募集炎症细胞, 增加黏附分子, 分泌化学驱动因子和促炎性细胞因子<sup>[12]</sup>。

随着研究的发现, 脂肪组织不仅承担着储备能量的作

用,还承担着内分泌调节功能,可表达多种细胞因子并参与炎症细胞的激活和募集<sup>[13]</sup>。趋化素是近年来被纳入脂肪因子家族的新成员,也被称为他扎罗汀诱导基因2蛋白(TIG2)或者维甲酸受体应答器2(RARRES2),参与天然免疫和获得性免疫<sup>[14]</sup>。研究表明,促炎症因子白细胞介素1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 能促进趋化素的合成和分泌,同时趋化素以正反馈的方式促进白细胞介素1 $\beta$ 、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、核因子 $\kappa$ B的表达,导致炎症级联反应不断放大<sup>[15]</sup>。在系统性红斑狼疮、类风湿关节炎以及牛皮癣中,骨髓细胞里面的趋化素激活浆细胞样树突状细胞,可以作为早期斑块形成的一个潜在生物学指标<sup>[16-21]</sup>。在溃疡性结肠炎和炎性肠病中,趋化素高表达,抑制抗炎性巨噬细胞而影响炎症<sup>[22-23]</sup>。

血管平滑肌细胞是血管中膜的主要细胞,在各种炎症因子的作用下,其从中膜向内膜迁移并大量增殖是导致动脉粥样斑块、血管成形术后再狭窄的重要环节之一<sup>[24]</sup>。鉴于研究发现Chemerin/CMKLR1信号通路在动脉粥样硬化中可能的作用,课题拟采用RNAi的方法设计和合成4个shRNA,与腺病毒载体连接构建pCD316-Chemerin shRNA,经PCR和DNA测序鉴定证实载体构建成功,用qPCR和免疫印迹证实pCD316-Chemerin shRNA4对趋化素基因的抑制作用最为有效( $P < 0.01$ )。

在下一步研究中,将挑选出来的pCD316-Chemerin shRNA4包装形成腺病毒并感染血管平滑肌细胞,利用该细胞系研究趋化素对沉默后的血管平滑肌细胞增殖、迁移和凋亡的变化情况,同时将病毒转染进载脂蛋白E缺失的动脉粥样硬化的小鼠模型中,进一步研究趋化素体内调节炎症反应以及对血管平滑肌细胞增殖和迁移的影响。

**作者贡献:** 设计、评估者为第一作者和通讯作者。

**经费支持:** 该文章接受了“深圳市知识创新基础研究项目(JCYJ20150403101028192)”、“深圳市科创委(JCYJ20170307100703967)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

[1] Schrijvers DM, De Meyer GR, Kockx MM, et al. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1256-1261.

[2] Kojima Y, Volkmer JP, McKenna K, et al. CD47-blocking antibodies restore phagocytosis and prevent atherosclerosis. *Nature*. 2016;536(7614):86-90.

[3] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-126.

[4] Ernst MC, Sinal CJ. Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21:660-667.

[5] Dessein PH, Tsang L, Woodiwiss AJ, et al. Circulating concentrations of the novel adipokine chemerin are associated with cardiovascular disease risk in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2014;44(9):1746-1754.

[6] Kostopoulos CG, Spiroglou SG, Varakis JN, et al. Chemerin and CMKLR1 expression in human arteries and periaortic fat: a possible role for local chemerin in atherosclerosis? *BMC Cardiovasc Disord*. 2014;14:56.

[7] Spiroglou SG, Kostopoulos CG, Varakis JN, et al. Adipokines in periaortic and epicardial adipose tissue: differential expression and relation to atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2010;17(2):115-130.

[8] Kaur J, Adya R, Tan BK, et al. Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: chemerin-induced endothelial angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391:1762-1768.

[9] Yamawaki H. Vascular effects of novel adipocytokines: focus on vascular contractility and inflammatory responses. *Biol Pharm Bull*. 2011;34:307-310.

[10] Rhee EJ. Chemerin: A novel link between inflammation and atherosclerosis? *Diabetes Metab J*. 2011;35(3):216-218.

[11] Li Y, Stone JR. The impact of splenectomy on human coronary artery atherosclerosis and vascular macrophage distribution. *Cardiovasc Pathol*. 2016;25(6):453-460.

[12] Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-874.

[13] Mathis D, Shoelson SE. Immunometabolism: an emerging frontier. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:81.

[14] Hutcheson J. Adipokines influence the inflammatory balance in autoimmunity. *Cytokine*. 2015;75(2):272-279.

[15] Mattern A, Zellmann T, Beck-Sickinger AG. Processing, signaling, and physiological function of Chemerin. *IUBMB Life*. 2014;66(1):19-26.

[16] Skrzeczyńska-Moncznik J, Wawro K, Stefańska A, et al. Potential role of chemerin in recruitment of plasmacytoid dendritic cells to diseased skin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;380(2):323-327.

[17] Vermi W, Riboldi E, Wittamer V. Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin. *J Exp Med*. 2005;201(4):509-515.

[18] Parolini S, Santoro A, Marcenaro E. The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues. *Blood*. 2007;109(9):3625-3632.

[19] Zabel BA, Ohyama T, Zuniga L. Chemokine-like receptor 1 expression by macrophages in vivo: regulation by TGF- $\beta$  and TLR ligands. *Exp Hematol*. 2006;34(8):1106-1114.

[20] Albanesi C, Scarponi C, Pallotta S. Chemerin expression marks early psoriatic skin lesions and correlates with plasmacytoid dendritic cell recruitment. *J Exp Med*. 2009;206(1):249-258.

[21] Albanesi C, Scarponi C, Bosisio D. Immune functions and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in psoriasis. *Autoimmunity*. 2010;43(3):215-219.

[22] Weigert J, Obermeier F, Neumeier M. Circulating levels of chemerin and adiponectin are higher in ulcerative colitis and chemerin is elevated in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(4):630-637.

[23] Lin Y, Yang X, Yue W. Chemerin aggravates DSS-induced colitis by suppressing M2 macrophage polarization. *Cell Mol Immunol*. 2014;11(4):355-366.

[24] Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*. 2004;84(3):767-801.