

论著·基础研究

基于单细胞测序技术解析冠状动脉粥样硬化患者平滑肌细胞的细胞间通信及关键基因

司春婴^{1,2}, 王建茹², 李晓辉², 王永霞^{1,2}, 关怀敏²

1. 河南中医药大学第一临床医学院 (中西医结合学院), 郑州 450003; 2. 河南中医药大学第一附属医院心脏中心/国家区域(中医)心血管诊疗中心, 郑州 450003

[摘要] **目的**·利用单细胞RNA测序技术 (single-cell RNA sequencing, scRNA-Seq) 阐释冠状动脉粥样硬化 (coronary atherosclerosis, CA) 的细胞通信景观, 挖掘主导细胞亚群及其关键基因。**方法**·下载GSE131778数据集并进行预处理、质控、降维聚类及注释; 利用CellChat包进行细胞通信分析, 识别主导细胞亚群。利用FindAllMarker函数, 筛选主导细胞亚群与其他细胞亚群间的差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 并构建其蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 将Degree算法排序前五位的DEGs作为关键基因。将关键基因与CellChat分析出的细胞通信网络进行匹配和挖掘, 获取关键基因参与的配体-受体对 (ligand-receptor pair, L-R) 及其介导的信号通路, 并对结果进行可视化。构建动脉粥样硬化小鼠模型, 并利用反转录聚合酶链式反应检测关键基因在颈动脉粥样硬化病变处的表达情况。**结果**·在CA病变处共鉴定出11个细胞亚群, 包括平滑肌细胞、内皮细胞、巨噬细胞、单核细胞等。细胞通信分析结果显示, CellChat在11个细胞亚群中检测到70对显著的L-R和26条相关的信号通路; 平滑肌细胞处于通信活跃状态, 与其他细胞亚群间相互作用的次数和强度最显著, 是主导细胞亚群。DEGs筛选结果显示, 平滑肌细胞亚群和其他细胞亚群之间共有206个DEGs, 其中ITGB2、PTPRC、CCL2、DCN、IGF1被识别为关键基因。关键基因介导的细胞通信分析结果显示: CCL2与ACKR1形成L-R, 通过介导CCL信号通路参与平滑肌细胞与内皮细胞间的通信网络; ITGB2分别与ITGAM、ITGAX组成受体复合物, 再与C3形成L-R介导补体信号通路, 参与平滑肌细胞与巨噬细胞、单核细胞间的通信网络。动物实验对关键基因的验证结果同生物信息学分析的结果一致。**结论**·平滑肌细胞在CA病理过程中是主导细胞, 与其他细胞间有广泛的通信网络, 可通过CCL2-ACKR1、C3-(ITGAM+ITGB2) 和C3-(ITGAX+ITGB2) 介导的CCL和补体信号通路, 与内皮细胞、巨噬细胞和单核细胞构建细胞通信网络。

[关键词] 冠状动脉粥样硬化; 单细胞RNA测序; 平滑肌细胞; 细胞通信**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2024.02.003 **[中图分类号]** R543.3 **[文献标志码]** A

Study on intercellular communication and key genes of smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis based on single cell sequencing technology

SI Chunying^{1,2}, WANG Jianru², LI Xiaohui², WANG Yongxia^{1,2}, GUAN Huaimin²

1. The First Clinical Medical College (College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine), Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China; 2. Heart Center/National Regional (Traditional Chinese Medicine) Cardiovascular Diagnosis and Treatment Center, The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China

[Abstract] **Objective**·To use single-cell RNA sequencing (scRNA-Seq) technology to interpret the cellular communication landscape of coronary atherosclerosis (CA), and to explore the dominant cell subsets and their key genes. **Methods**·The GSE131778 data set was downloaded and preprocessed, and quality controlling, dimension reduction clustering and annotation were carried out. Then cell communication analysis was conducted by using CellChat package to identify dominant cell subsets. The FindAllMarker function was used to screen differentially expressed genes (DEGs) between the dominant cell subpopulation and

[基金项目] 河南省自然科学基金青年基金项目 (232300420273); 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (LHGJ20230690); 国家自然科学基金青年基金项目 (82205021); 河南省科技攻关项目 (212102311083); 河南中医药大学科研苗圃工程项目 (MP2020-16)。

[作者简介] 司春婴 (1987—), 男, 讲师, 主治医师, 硕士; 电子邮箱: chunying1987@163.com。

[通信作者] 李晓辉, 电子邮箱: 478103511@qq.com。

[Funding Information] Henan Natural Science Foundation Youth Fund Project (232300420273); Henan Province Medical Science and Technology Research Plan Jointly Construction Project (LHGJ20230690); Youth Fund Project of National Natural Science Foundation of China (82205021); Henan Province Science and Technology Research Project (212102311083); Research Nursery Engineering Project of Henan University of Chinese Medicine (MP2020-16)。

[Corresponding Author] LI Xiaohui, E-mail: 478103511@qq.com。



other cell subpopulations, and its protein-protein interaction (PPI) network was constructed. The DEGs ranked in the top five of the Degree algorithm were taken as key genes. Then, the key genes were matched and mined with the cell communication network analyzed by CellChat to obtain the ligand-receptor pairs (L-R) and the signal pathways mediated by the key genes, and the results were visualized. At the same time, the atherosclerosis mouse model was constructed and RT-PCR was used to detect the expression of key genes in carotid atherosclerosis lesions. **Results** A total of 11 cell subsets were identified in CA lesions, including smooth muscle cells, endothelial cells, macrophages, monocytes, etc. Cell communication results showed that CellChat detected 70 significant L-R and 26 related signal pathways in 11 cell subsets. Smooth muscle cell was the dominant cell subgroup with the most significant interaction frequency and intensity with other cell subgroups in the active state of communication. The results of DEGs screening showed that there were 206 DEGs between smooth muscle cell subsets and other cell subsets, among which *ITGB2*, *PTPRC*, *CCL2*, *DCN* and *IGF1* were identified as key genes. The results of cell communication mediated by key genes showed that CCL2 and ACKR1 formed L-R and participated in the communication network between smooth muscle cells and endothelial cells through mediating CCL signaling pathway. ITGB2 formed receptor complexes with ITGAM and ITGAX respectively, and then formed L-R with C3 to mediate the complement signal pathway, participating in the communication network among smooth muscle cells, macrophages and monocytes. The validation results of hub genes in animal experiments were consistent with the results of bioinformatics analysis. **Conclusion** Smooth muscle cells are the dominant cells in the pathological process of CA, and have extensive communication networks with other cells. They can construct cellular communication networks with endothelial cells, macrophages and monocytes through CCL and complement signaling pathways mediated by CCL2-ACKR1, C3-(ITGAM+ITGB2) and C3-(ITGAX+ITGB2).

[Key words] coronary atherosclerosis; single-cell RNA sequencing (scRNA-Seq); smooth muscle cell; cellular communication

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种涉及多个血管床的进行性炎症性疾病, 其特征是脂质、纤维成分和钙化在动脉内膜中积累。然而, 不同血管区域的病理特征和临床表现各不相同。冠状动脉因其特殊的解剖位置及其血流动力学特征, 是最早和最容易产生斑块的血管部位^[1]。多项证据表明, AS 及其并发的冠状动脉疾病是导致大多数心血管疾病患者死亡的原因^[2]。一项关于冠状动脉粥样硬化 (coronary atherosclerosis, CA) 斑块变化与不良心血管事件的 meta 分析结果显示, 无论急性冠脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 患者, 还是非 ACS 患者, 其冠状动脉斑块的消退与减少心肌梗死和重复血管重建的发生率具有显著的相关性^[3]。因此, 研究 CA 发生机制一直是防治心血管疾病的重点。众所周知, 细胞间通信作为一个关键过程, 可确保不同类型细胞之间的合作并维持体内平衡^[4]。研究发现细胞通信介导了与 CA 发病相关的免疫反应、炎症、增殖及血管重塑等相关机制^[5-6]。因此, 深入探索 CA 中细胞间通信作用及相关病理机制, 挖掘关键基因, 对于更好地理解 CA 的发病机制以及寻求防治靶点具有积极的作用。

近年来, 单细胞 RNA 测序 (single-cell RNA sequencing, scRNA-Seq) 技术已成为研究动脉性疾病细胞机制的重要工具^[7]。该技术以较高的分辨率揭示了细胞异质性, 能够在复杂的群体组合中对所有细胞类型进行分子区分, 同时将空间信息纳入细胞间

通信分析, 这对于系统、全面地探索组织中的细胞间通信至关重要^[8-9]。既往研究主要集中在 AS 中巨噬细胞、平滑肌细胞等细胞的异质性^[10-11]。借助 scRNA-Seq 技术分析 AS 血管中的细胞功能和通信作用, 有助于探索新的 AS 治疗途径^[12]。因此, 本研究结合 scRNA-Seq 技术和生物信息学分析, 探索人 CA 平滑肌细胞的细胞间通信及关键基因, 以期更好地理解 CA 的病理过程及平滑肌细胞介导 CA 的潜在作用机制, 为 AS 诊断和治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 数据来源

CA 的 scRNA-Seq 数据集 GSE131778 源自 GEO 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)。该数据集利用 10×Chromium 平台对人右冠状动脉近中端的 8 个样本进行高通量单细胞转录组分析。在排除支架区域后, 病变部位包括从轻度、非钙化斑块到晚期钙化病变区域^[11]。使用 stringr 包将样本的 GSM 号与细胞的 barcodes 号进行关联, 并保存为 “CA.txt” 文件。

1.2 数据的质控、降维和聚类

使用 R 语言读取 “CA.txt” 文件中的数据, 若基因名重复, 则使用 avereps 函数对其取均值。使用 CreateSeuratObject 函数将 “CA.txt” 文件的数据矩阵

转换为 Seurat 对象,使用 PercentageFeatureSet 函数计算线粒体基因的百分比,过滤掉测到的基因数目 (nFeature) < 50、线粒体基因百分比 (percent.mt) > 5% 的细胞^[13]。然后,使用 NormalizeData 函数对数据进行标准化,利用 FindVariableFeatures 函数提取在细胞间变异系数较大的基因(可代表细胞间的异质性)。使用 ScaleData 函数对数据进行标准化预处理后,再依次进行主成分分析(principal component analysis, PCA)和 *t* 分布随机邻接嵌入(*t*-distributed stochastic neighbor embedding, *t*-SNE)降维聚类。

1.3 细胞类型注释

基于 FindAllMarker 函数筛选出的细胞亚群(Cluster)间的高变异差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),利用 SingleR 包对不同的 Cluster 进行细胞名注释。

1.4 细胞间通信分析

利用 CellChat 包进行细胞间通信分析^[14]。分别读取 Seurat 对象中经过质控标准化的矩阵数据和细胞亚群注释信息,创建 CellChat 对象;使用 CellChatDB.human 配体和受体数据库进行比对,计算细胞通信的概率,推断细胞通信网络,识别主导细胞亚群,从细胞层面对细胞通信结果进行可视化。

1.5 主导细胞亚群 DEGs 的筛选及功能富集分析

利用 FindAllMarker 函数,以 $|\log(\text{fold change, FC})| > 1$ 和校正后的 $P < 0.05$ 为标准,筛选主导细胞亚群与其他细胞亚群间的 DEGs^[13]。利用 clusterProfiler 包对 DEGs 进行基因本体论(Gene Ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析,并进行可视化。

1.6 主导细胞亚群关键基因的筛选

将获得的 DEGs 载入 STRING 数据库(<https://string-db.org>)中,选择“Multiple proteins”,将相互作用得分设置为最高置信度 ≥ 0.400 ,进行蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)分析。同时,利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建 PPI 网络,将 CytoHubba 插件中 Degree 算法排序前五位的 DEGs 作为关键基因^[15]。

1.7 关键基因参与的细胞通信

基于“1.4”部分的细胞通信网络,载入关键基因,寻找关键基因参与的细胞通信网络,获取关键基因介导的信号通路,并对通路和关键基因,即参与的配体-受体对(ligand-receptor pair, L-R)介导的细胞通信结果进行可视化。

1.8 实验验证

1.8.1 构建动物模型及分组 健康雄性 C57BL/6Cnc 小鼠,SPF 级,7~8 周龄[湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证号为 SCXK(湘)2019-0004];以 C57BL/6Cnc 小鼠为背景的雄性 ApoE^{-/-}小鼠,SPF 级,7~8 周龄[常州卡文斯实验动物有限公司,实验动物生产许可证号为 SCXK(苏)2021-0013]。实验动物使用许可证号为 SYXK(鄂)2023-0104。动物体质量为 20~24 g,饲养在 SPF 条件下。

以 C57BL/6Cnc 小鼠为空白组($n=3$),给予普通饲料;以 ApoE^{-/-}小鼠为 AS 模型组($n=3$),给予高脂饲料。喂养 8 周后,摘取小鼠主动脉组织,部分存放于 4% 多聚甲醛中,用于苏木精-伊红(H-E)染色;部分置于冻存管中,于 -80 °C 冰箱中保存备用。通过 H-E 染色,镜下观察到小鼠主动脉组织内中膜厚薄不均,斑块内可见胆固醇脂的沉积、泡沫细胞和炎症细胞浸润、纤维组织增生等改变,则判定为 AS 造膜成功^[16]。

1.8.2 主要试剂及仪器 苏木精(Servicebio,货号 G1004),伊红(Servicebio,货号 E8090),中性树脂(Solarbio,货号 G8590),DAB 浓缩型试剂盒(Solarbio,货号 DA1010-2),10 mmol/L dNTP Mix(Solarbio,货号 PC2200),DNase/RNase-Free Water(Solarbio,货号 R1600),二甲苯(国药集团,货号 10023418),氯仿(国药集团,货号 10006818),异丙醇(国药集团,货号 80109218),无水乙醇(国药集团,货号 10009218),SYBR FAST qPCR Master Mix(KAPA Biosystems,货号 KM4101)。组织包埋机(湖北泰维,TB-718D),显微镜(德国徕卡,DM1000),恒温烘箱(上海一恒,DHG-9023A),石蜡切片机(德国徕卡,RM2235),PCR 仪(杭州柏恒,GE48527),荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad,CFX-Connect 96)。

1.8.3 H-E 染色观察 AS 小鼠主动脉斑块 切取小鼠

主动脉组织块厚度约为3 μm ; 常规水浴展片、捞片, 并及时烤片; 将组织切片常规脱蜡至水, 水洗1~2 min; 苏木精液染色5 min, 伊红液染色3 min, 梯度乙醇及二甲苯处理后, 用中性树脂封片, 显微镜下观察。

1.8.4 RT-PCR检测关键基因的mRNA表达 取小鼠主动脉组织样本100 mg, 提取总RNA, 用PrimeScript II RTase预混液进行反转录提取cDNA, 再用SYBR FAST qPCR Master Mix预混液制备cDNA, 然后进行PCR扩增。数据分析运用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法, 计算*ITGB2*、*PTPRC*、*CCL2*、*DCN*和*IGF1*的相对表达量。引物序列由武汉天一华煜基因科技有限公司合成(表1)。

2 结果

2.1 数据质控的结果

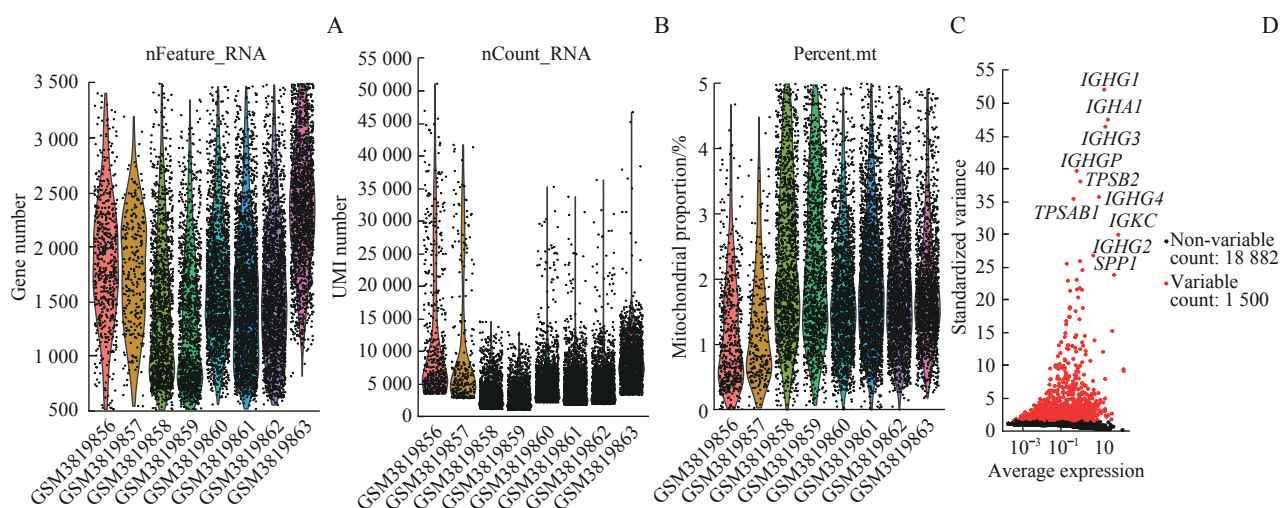
对GSE131778数据集中的样本进行预处理后,

表1 RT-PCR引物序列

Tab 1 Primer sequence for RT-PCR

Primer	Sequence (5'→3')	Length/bp
<i>ITGB2</i> -F	ACCTCATGGATCTCTCCTACTC	274
<i>ITGB2</i> -R	CCGACCTCTGTCTGAAACTG	
<i>PTPRC</i> -F	AGTCTCTACGCAAAGCACGG	254
<i>PTPRC</i> -R	AGCACTATTGGTAGGCTCCG	
<i>CCL2</i> -F	GCTGACCCCAAGAAGGAATG	183
<i>CCL2</i> -R	TGAGGTGGTTGTGGAAGG	
<i>DCN</i> -F	AATCCCTTATGACCCTGACA	275
<i>DCN</i> -R	TTTCCAACCTTCACGAGAGGT	
<i>IGF1</i> -F	GATGCTCTTCAGTTCGTGTG	259
<i>IGF1</i> -R	GCTTCGTTTCTTGTGTTGTC	
<i>GAPDH</i> -F	CCTTCCGTGTTCTCTAC	152
<i>GAPDH</i> -R	GACAACCTGGTCTCTCA	

共获得11 756个细胞。如图1所示, 创建Seurat对象后, 过滤掉nFeature<50且percent.mt>5%的细胞, 筛选出细胞间标准化方差较大的1 500个基因用于后续分析。



Note: A. Number of cell genes in the sample. B. Number of transcript sequencing counts in the sample. C. The proportion of mitochondria in all the cells in the sample. D. The top 1 500 mutated genes with high intercellular standard deviation.

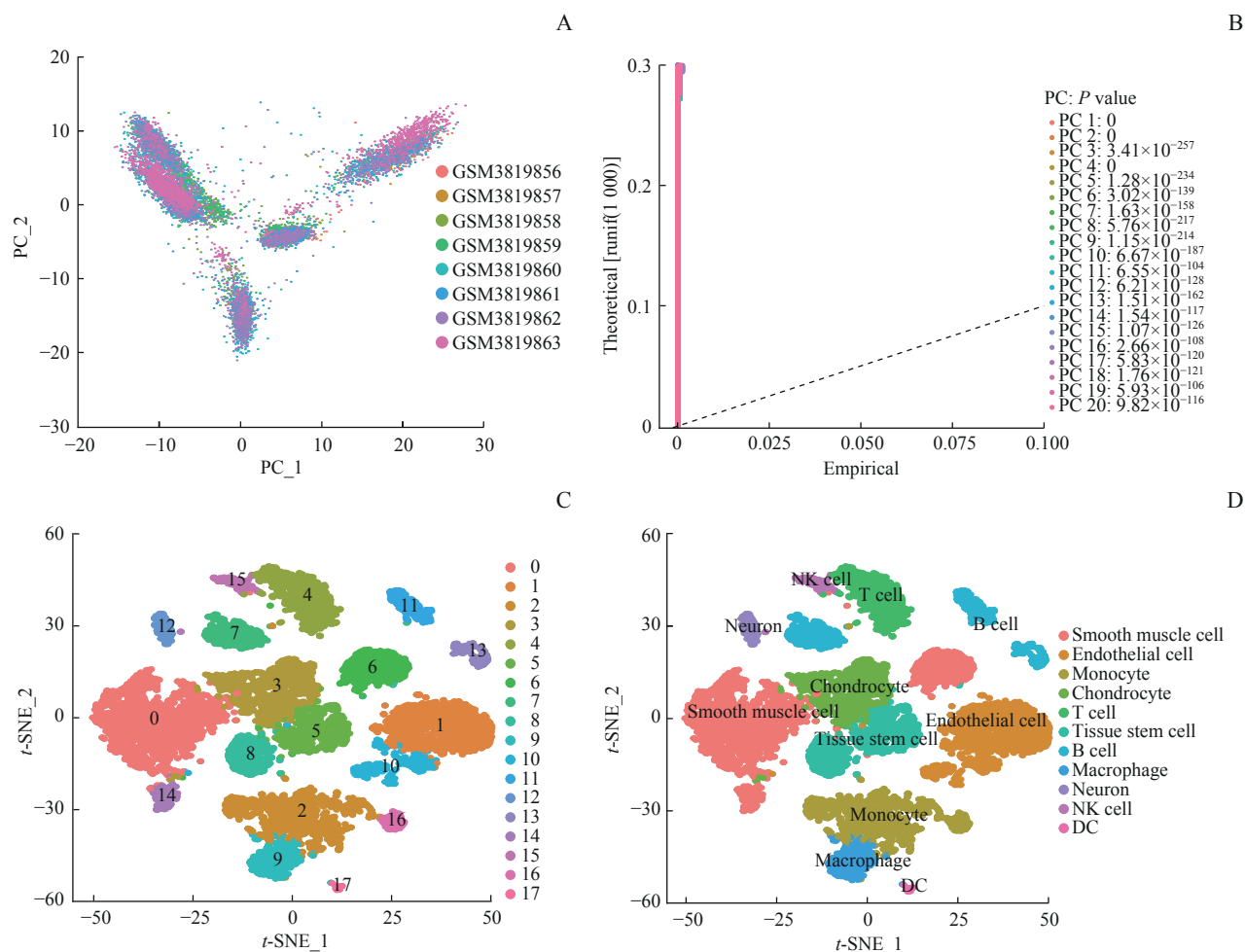
图1 GSE131778数据集样本的质控结果

Fig1 Quality control results for samples from the GSE131778 dataset

2.2 降维聚类及注释结果

图2A展示了变异最显著的主成分PC1和PC2中每个样本所含细胞的总体分布。图2B显示了前20个 $P<0.05$ 的主成分。 t -SNE聚类分析结果显示, 11 315个细胞被分为18个Cluster(图2C); 注释后18个Cluster又被分为11种细胞亚群, 包括平滑肌细胞

(3个Cluster)、B细胞(3个Cluster)、软骨细胞(1个Cluster)、树突细胞(dendritic cell, DC; 1个Cluster)、内皮细胞(2个Cluster)、巨噬细胞(1个Cluster)、单核细胞(2个Cluster)、T细胞(1个Cluster)、组织干细胞(2个Cluster)、自然杀伤细胞(1个Cluster)、神经元细胞(1个Cluster), 见图2D。



Note: A. The distribution of cells in the sample in PC1 and PC2. B. P value for each PC. C. t-SNE plot of clustering distribution of 18 cell subpopulations. D. t-SNE diagram of the distribution of cell subpopulations after annotation. NK cell—nature killer cell; DC—dendritic cell.

图2 GSE131778数据集中样本的降维聚类及注释结果

Fig 2 Dimension reduction clustering and annotation results for samples in the GSE131778 dataset

2.3 细胞通信分析结果

通过CellChat包在人CA病变处的11个细胞亚群中检测到70对显著的L-R,介导26条分泌型信号通路,主要包括CC族趋化因子配体(CC chemokine ligand, CCL)、趋化因子(C-X-C基序)配体(C-X-C chemokine ligand, CXCL)、补体、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)等,参与了CA的病理过程。在CA病理变化过程中,不同的细胞亚群间存在着广泛的交流和通信网络关系,其中平滑肌细胞与其他细胞亚群间交互作用的次数最多,强度最大(图3A、B)。平滑肌细胞不仅可以向自身发送通信信号,还可以向其他10种细胞亚群发送通信信号,其中与巨噬细胞、单核细胞、内皮细胞的相互作用强度最明显(图3C)。以上结果提示,平滑肌细胞与其他细胞亚群间的通信状态较为活跃,是CA病变处的主导细胞亚群。

2.4 平滑肌细胞DEGs的筛选及其富集分析

差异分析的结果显示,平滑肌细胞亚群和其他细胞亚群之间的有206个DEGs,其中138个上调,68个下调(图4A)。GO功能富集分析结果显示:依据 $q < 0.05$ 确定了1201个GO条目;生物学过程(biological process, BP)条目为1032条,主要涉及靶向细胞膜的共翻译蛋白、核转录mRNA分解代谢过程、靶向内质网(endoplasmic reticulum, ER)的蛋白质等;细胞组分条目(cellular component, CC)为108条,主要涉及黏着斑、核糖体、细胞质等;分子功能(molecular function, MF)条目为61条,主要涉及核糖体的结构组成、细胞黏附分子的结合、rRNA的结合等(图4B)。KEGG通路富集分析结果显示,依据 $q < 0.05$ 共映射出43条信号通路,与AS相关的通路包括吞噬体、抗原加工提呈、细胞黏附分子、补体及凝血级联反应等(图4C)。

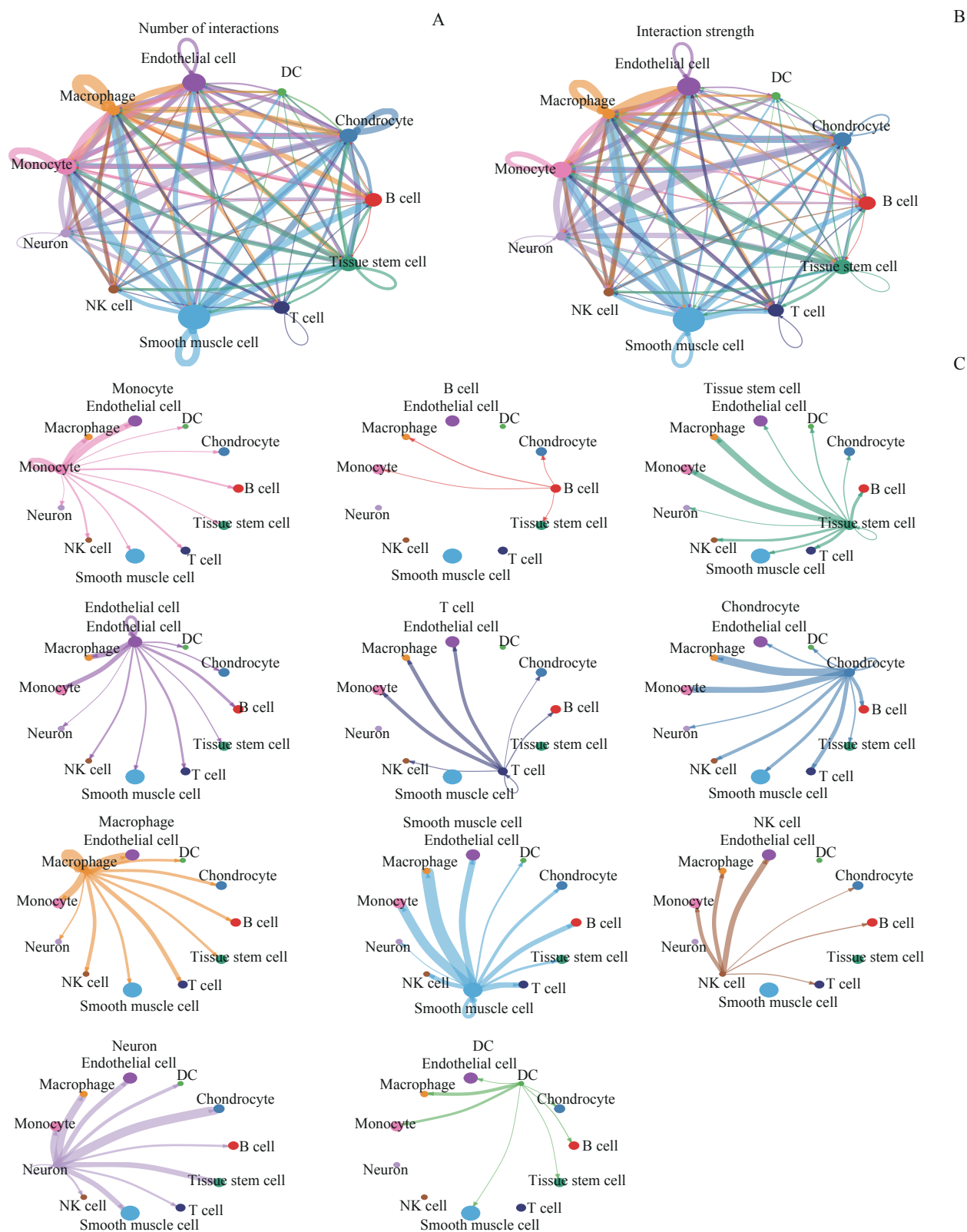
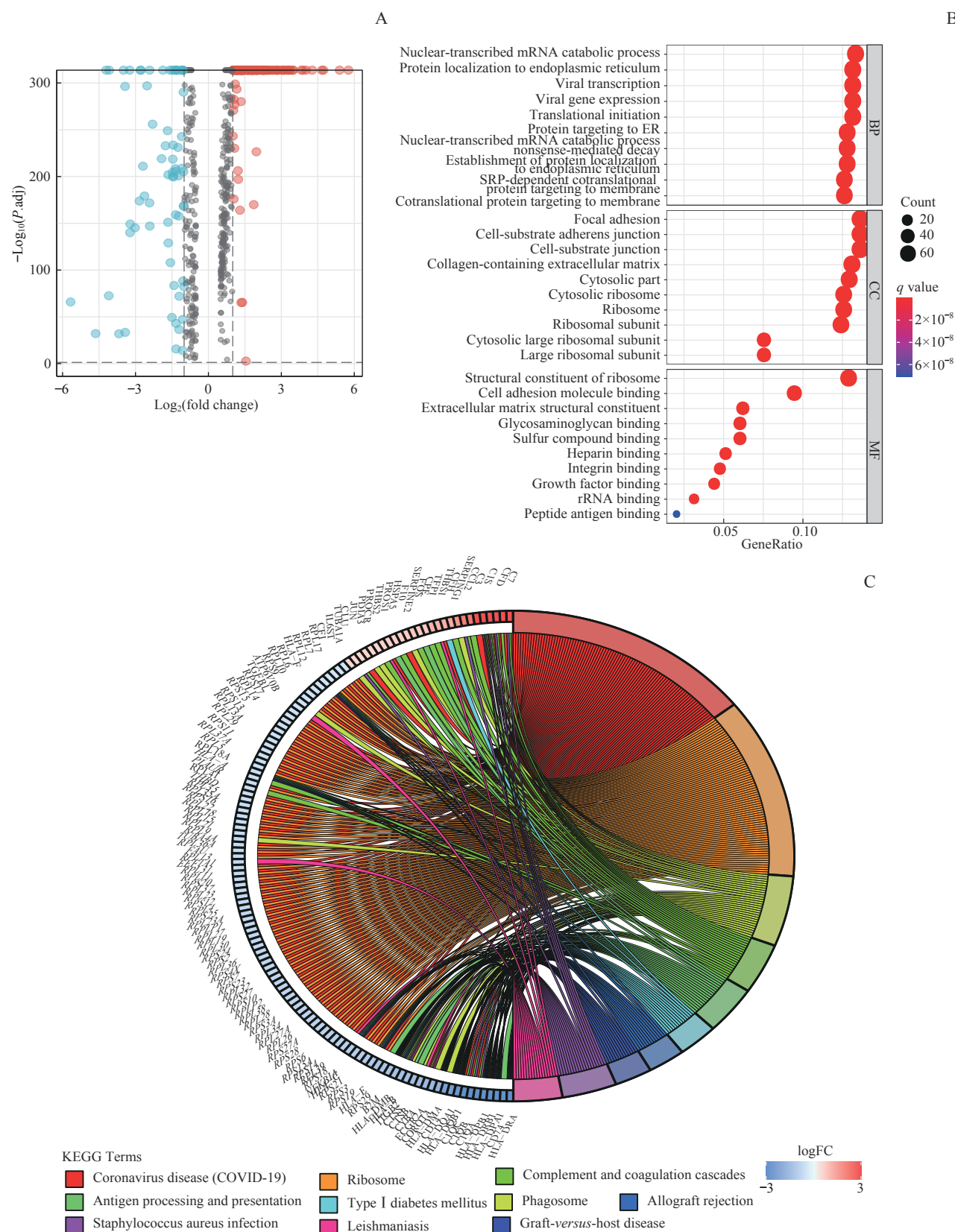


图3 CA病变处的细胞通信网络

Fig 3 Cellular communication network at CA lesions



Note: A. Volcano plot of DEGs in smooth muscle cells (dots represent genes, black represents genes with no differential expression, red represents upregulated DEGs, and blue represents downregulated DEGs). B. Bubble plots for GO enrichment analysis of DEGs. C. Circle diagram of KEGG enrichment analysis of DEGs.

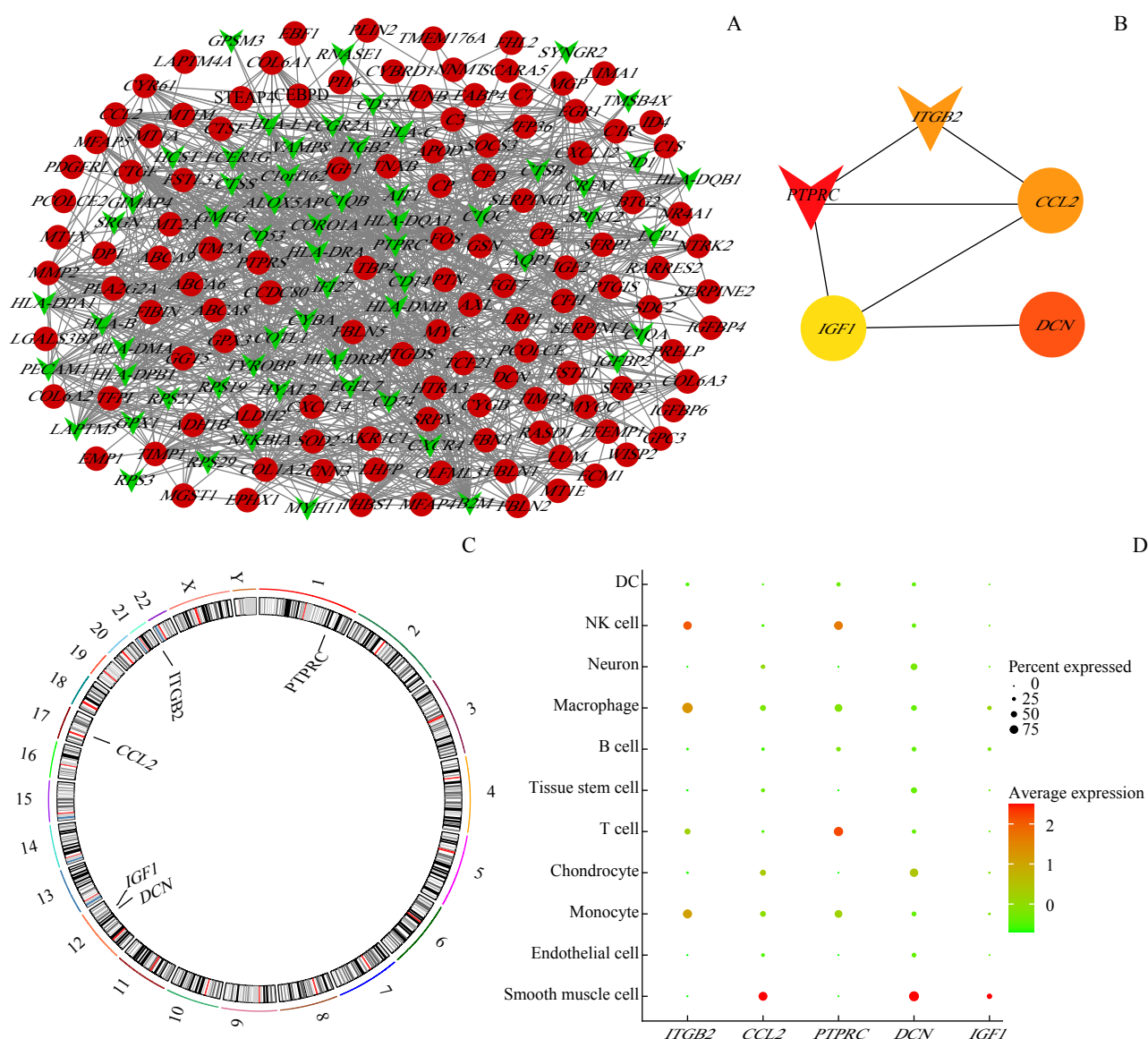
图4 平滑肌细胞 DEGs 的筛选及其富集分析

Fig 4 Screening of DEGs in smooth muscle cells and their enrichment analysis

2.5 平滑肌细胞关键基因的筛选

将平滑肌细胞的 DEGs 上传至 STRING 数据库进行 PPI 分析后, 利用 Cytoscape 软件对网络进行可视化分析, 该网络包括 980 条边和 179 个节点 (图 5A)。如图 5B、C 所示, CytoHubba 插件中 Degree 算法排序前五的 DEGs 为关键基因, 即 *ITGB2*、*CCL2*、

PTPRC、*DCN* 和 *IGF1*, 其中 *ITGB2* 和 *PTPRC* 为下调关键基因, *CCL2*、*DCN*、*IGF1* 为上调关键基因。如图 5D 所示, 与其他 Cluster 相比, 在平滑肌细胞中 *CCL2*、*DCN*、*IGF1* 的表达和分布相对较高, *ITGB2* 和 *PTPRC* 的表达和分布相对偏低。



Note: A. PPI network diagram of smooth muscle cell DEGs, with red circles representing upregulated DEGs and green triangles representing downregulated DEGs. B. PPI diagram of 5 hub genes. C. Circle diagram of chromosomal positions of hub genes. D. Bubble plot of 5 hub genes expressed in 11 clusters.

图5 平滑肌细胞关键基因的筛选结果

Fig 5 Results of screening for hub genes in smooth muscle cells

2.6 关键基因介导的细胞通信结果

在 CellChat 包推算的 70 对显著的 L-R 及其介导的 26 条分泌型信号通路中, 关键基因 *CCL2* 和 *ITGB2* 参与了平滑肌细胞与其他 Cluster 间的细胞通信。

CCL2 与 *ACKR1* 形成 L-R 介导 CCL 信号通路; *ITGB2* 分别与 *ITGAM*、*ITGAX* 形成复合物作为受体, 与 *C3* 形成 L-R 介导补体信号通路 (表 2)。CCL 信号通路介导了除 DC 和 B 细胞之外的 Cluster 间的细

胞通信，其中平滑肌细胞的主要信号角色为发送者（sender）和 影响者（influencer）（图 6A、B）。CCL2-ACKR1 对 CCL 信号通路的贡献度最高，并在平滑肌细胞与内皮细胞间的通信关系中发挥重要的作用（图 6C、D）。如图 6E~I 所示：补体信号通路介导了平滑肌细胞与巨噬细胞、单核细胞间的相互作用关系，平滑肌细胞的信号角色为发送者和影响者，C3-(ITGAM+ITGB2) 和 C3-(ITGAX+ITGB2)

在补体信号通路中具有一定的贡献度；C3-(ITGAM+ITGB2) 介导了平滑肌细胞与巨噬细胞、单核细胞间的通信，C3-(ITGAX+ITGB2) 介导了平滑肌细胞与巨噬细胞间的通信。总之，平滑肌细胞可通过 CCL2-ACKR1 介导的 CCL 信号通路、C3-(ITGAM+ITGB2) 和 C3-(ITGAX+ITGB2) 介导的补体信号通路在 CA 病变处与其他细胞相互作用和交流。

表2 关键基因介导的细胞间信号通路

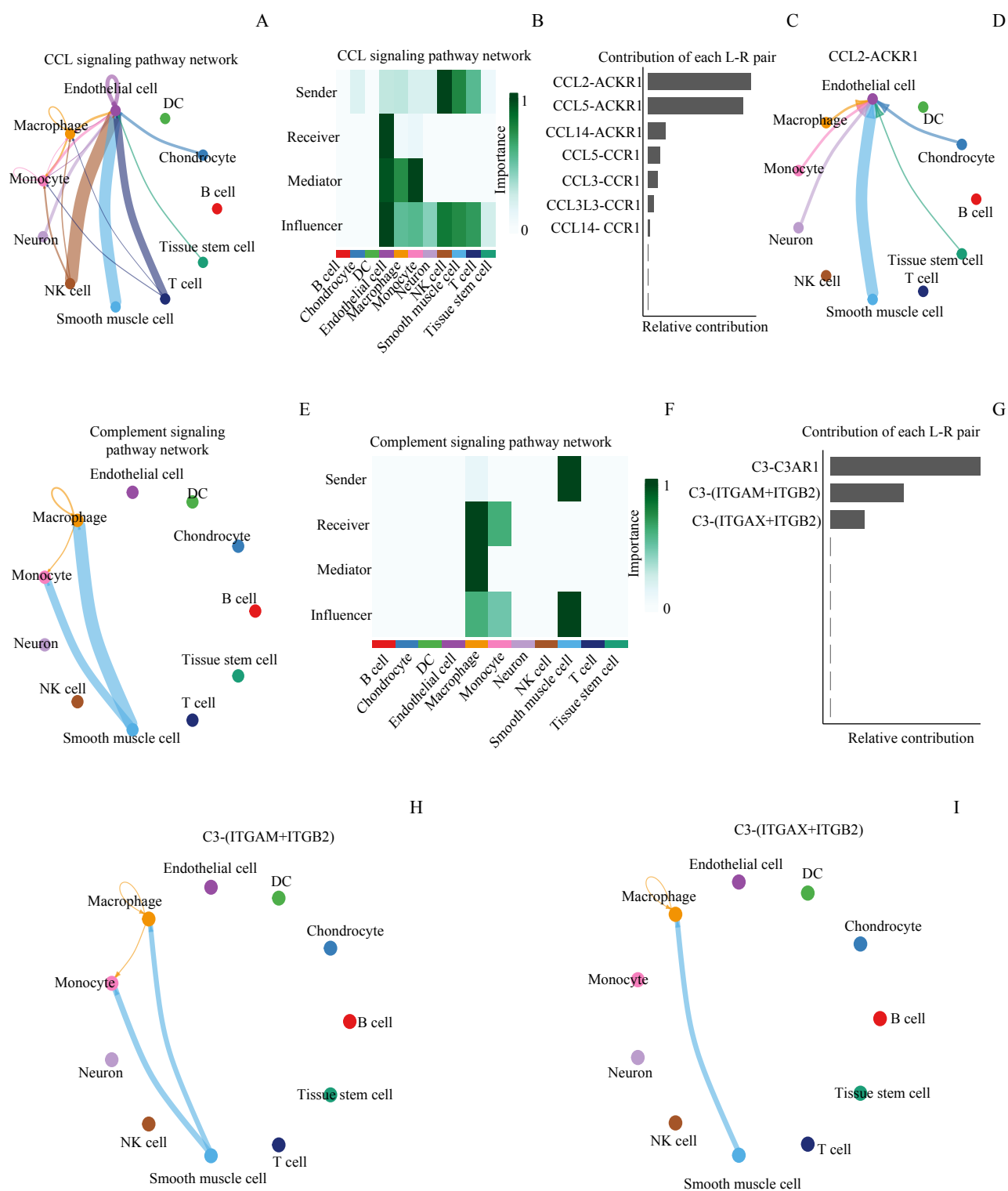
Tab 2 Hub genes-mediated cell signaling pathway

Source	Target	Ligand	Receptor	Probability	P value	Interaction name	Pathway	Annotation	Evidence (PMID)
Chondrocyte	Endothelial cell	CCL2	ACKR1	0.053	0.000	CCL2-ACKR1	CCL	Secreted signaling	26740381
Macrophage	Endothelial cell	CCL2	ACKR1	0.042	0.000	CCL2-ACKR1	CCL	Secreted signaling	26740381
Monocyte	Endothelial cell	CCL2	ACKR1	0.047	0.000	CCL2-ACKR1	CCL	Secreted signaling	26740381
Neuron	Endothelial cell	CCL2	ACKR1	0.060	0.000	CCL2-ACKR1	CCL	Secreted signaling	26740381
Smooth muscle cell	Endothelial cell	CCL2	ACKR1	0.244	0.000	CCL2-ACKR1	CCL	Secreted signaling	26740381
Tissue stem cell	Endothelial cell	CCL2	ACKR1	0.021	0.000	CCL2-ACKR1	CCL	Secreted signaling	26740381
Macrophage	Macrophage	C3	ITGAM_ITGB2	0.004	0.000	C3-(ITGAM+ITGB2)	Complement	Secreted signaling	16234578
Smooth muscle cell	Macrophage	C3	ITGAM_ITGB2	0.040	0.000	C3-(ITGAM+ITGB2)	Complement	Secreted signaling	16234578
Macrophage	Monocyte	C3	ITGAM_ITGB2	0.005	0.000	C3-(ITGAM+ITGB2)	Complement	Secreted signaling	16234578
Smooth muscle cell	Monocyte	C3	ITGAM_ITGB2	0.046	0.000	C3-(ITGAM+ITGB2)	Complement	Secreted signaling	16234578
Macrophage	Macrophage	C3	ITGAX_ITGB2	0.004	0.000	C3-(ITGAX+ITGB2)	Complement	Secreted signaling	16234578
Smooth muscle cell	Macrophage	C3	ITGAX_ITGB2	0.040	0.000	C3-(ITGAX+ITGB2)	Complement	Secreted signaling	16234578

2.7 实验结果验证

2.7.1 AS小鼠主动脉斑块情况 H-E染色结果显示：空白组主动脉组织中无AS病理改变，动脉组织结构完整；AS模型组病理组织中可见明显斑块改变，内膜显著增厚，平滑肌细胞排列紊乱（图7）。

2.7.2 AS模型小鼠中关键基因的mRNA表达 与空白组比较，AS模型小鼠颈动脉AS斑块组织中ITGB2和PTPRC mRNA表达水平显著下调（P<0.05），CCL2、DCN和IGF1 mRNA明显上调（P<0.05），见表3。



Note: A. Cellular communication network diagram mediated by CCL signaling pathway. B. Heat map of cell action types in the CCL signaling pathway. C. Bar chart of the contribution of L-R in the CCL signaling pathway. D. CCL2-ACKR1-mediated cellular communication network diagram. E. Cellular communication network diagram mediated by complement signaling pathway. F. Heat map of cellular action types in complement signaling pathways. G. Bar graph of the contribution of L-R in the complement signaling pathway. H. C3-(ITGAM+ITGB2)-mediated cellular communication network diagram. I. C3-(ITGAX+ITGB2)-mediated cellular communication network diagram.

图6 关键基因介导的细胞间通信

Fig 6 Hub genes-mediated cellular communication

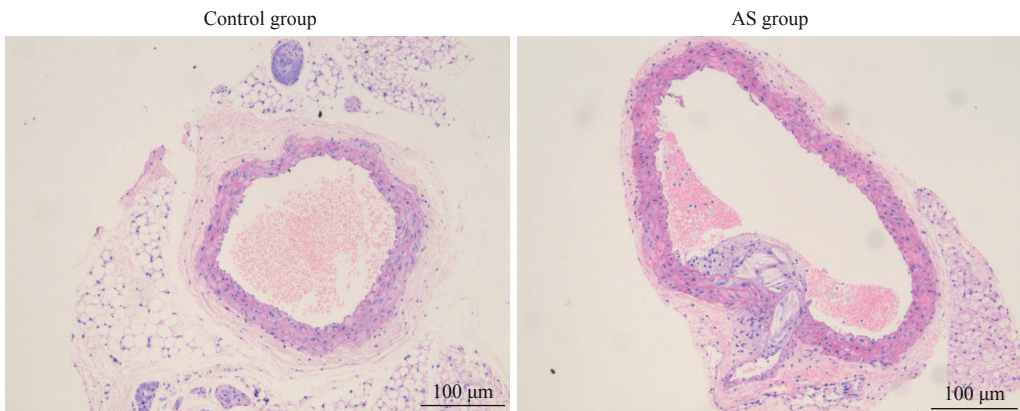


图7 小鼠主动脉组织 H-E 染色
Fig 7 H-E staining of aortic tissue of mice

表3 各组小鼠关键基因 mRNA 表达水平 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Tab 3 mRNA expression levels of hub genes in each group of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Group	<i>ITGB2</i>	<i>PTPRC</i>	<i>CCL2</i>	<i>DCN</i>	<i>IGF1</i>
Control	1.04±0.34	1.00±0.06	1.01±0.19	1.01±0.15	1.00±0.06
AS	0.45±0.11 ^①	0.21±0.01 ^②	2.19±0.57 ^③	1.57±0.11 ^④	4.24±1.14 ^⑤

Note: ^① $P=0.044$, ^② $P=0.042$, ^③ $P=0.027$, ^④ $P=0.006$, ^⑤ $P=0.008$, compared with the control group.

3 讨论

AS是一个复杂的病理过程，涉及多种细胞的多种改变，包括单核细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞和平滑肌细胞，以及血小板等之间复杂的相互作用模式，可导致缺血性心脏病^[17]。有研究报道，不同细胞类型可以通过L-R建立高度连接的信号网络进行通信^[18]，并且这种细胞间通信对于协调多种生物学过程至关重要^[19]。目前，我们对于CA过程中发生的细胞间相互作用的了解仍然有限。因此，为进一步探究在CA过程中不同细胞类型之间通过配体与受体结合而相互调控交流的信息，本研究利用CellChat进行细胞间通信分析。

首先，本研究通过scRNA-Seq技术将人CA斑块组织中11 315个细胞进行了聚类，并注释了平滑肌细胞、B细胞、软骨细胞及DC等11个细胞亚群，筛选CA中存在的70对显著的L-R，其可介导多种细胞之间的通信网络关系，包含内皮细胞与平滑肌细胞、巨噬细胞与B细胞、单核细胞与T细胞等。结果显示，平滑肌细胞的通信作用最频繁，且与巨噬细胞的细胞间通信最强。本研究与既往研究结果相一致，CA组织中的平滑肌细胞不仅可以向自身发送通信信号，还可以向其他细胞（巨噬细胞、内皮细胞等）发送通信

信号。例如，TGF-β/Smad3的升高诱导平滑肌细胞分泌的血管内皮生长因子A，是其凋亡的自分泌抑制剂，继而抑制平滑肌细胞凋亡^[20]。平滑肌细胞衍生的TGF-β可以促进活化的新生内膜病变样巨噬细胞的成熟^[21]。此外，平滑肌细胞通过低密度脂蛋白受体相关蛋白1受体将内膜中脂质内化，获得促血栓形成表型并释放组织因子，加速疾病进展^[22]。

本研究还发现，与其他细胞亚群相比，在CA的平滑肌细胞中存在206个DEGs，主要通过吞噬体、细胞黏附分子、补体及凝血级联反应等途径参与调控血管动脉硬化的病理过程。进一步筛选出5个关键基因，包括*ITGB2*、*CCL2*、*PTPRC*、*DCN*及*IGF1*，其中*ITGB2*和*PTPRC*为下调DEGs，*CCL2*、*DCN*、*IGF1*为上调DEGs。*ITGB2*即整合素β2，作为调节白细胞功能（如黏附和迁移）的细胞表面跨膜蛋白，其黏附作用被认为是心血管疾病的关键事件^[23]。此外，*ITGB2*的低表达影响了AS中平滑肌细胞的迁移^[24]。*PTPRC*是一种跨膜糖蛋白，又称CD45，通常存在于细胞表面，在先天免疫系统中起着重要的作用^[25]。已有研究证实*PTPRC*不仅在CA斑块内的表达水平影响动脉斑块的炎症反应^[26]，其在冠状动脉粥样硬化性心脏病患者外周血中的表达与支架内再狭窄密切相关^[27]。*CCL2*又称单核细胞趋化蛋白-1（monocyte chemotactic protein-1, MCP-1），是一种炎症介质，能够诱导趋化活性和增加钙内流^[28]。有研究报道平滑肌细胞自噬能力减弱，能增强细胞中*CCL2*表达，继而加重血管重构及AS病变^[29]。还有研究发现，平滑肌细胞衍生的*CCL2*不仅可以诱导血管干/祖细胞的迁移及有助于新内膜形成^[30]，还可与血小板表面结合，触发单细胞阻滞作用^[31]。*DCN*是

一种细胞外基质蛋白聚糖,通过调节炎症、纤维化、细胞增殖及迁移等过程,影响AS发生和进展^[32-33]。有研究通过微阵列分析发现平滑肌细胞中的DCN与AS中血管钙化相关机制有关^[34]。IGF1作为一种内分泌和自分泌/旁分泌生长因子,是参与CA的胰岛素样生长因子系统的主要配体^[35]。研究发现,miR-378a的上调通过靶向IGF-1能显著抑制染色体结构维持蛋白(structural maintenance of chromosome, SMC)增殖、迁移和炎症,发挥抑制AS进展的作用^[36]。

这5个存在SMC中的关键基因介导的细胞间通信,主要包括2条途径。①通过CCL2-ACKR1介导CCL通路,在多个细胞间发挥了重要的通信作用。趋化因子及其受体与AS的病理过程密切相关^[37]。有研究^[38]发现在AS病变动脉中CCL2及其受体ACKR1表达增加最显著。平滑肌细胞释放的CCL2能促进纤维细胞的迁移^[39],而ACKR1在内皮连接处富集^[40]。基于L-R的细胞-细胞相互作用分析表明,ACKR1表达的内皮细胞簇之一表现出强趋化性和弱血管生成能力,并随着疾病进展而扩大^[41]。然而,目前尚无研究报道CCL2-ACKR1形成的L-R通过介导平滑肌细胞与其他细胞间通信作用发挥调节CA的作用。但本研究发现,CCL2与ACKR1复合物相结合,激活CCL通路从而加速CA斑块形成。这对进一步研究CA的病理生理过程具有重要参考价值,为靶向调控CA斑块进展提供了新的依据。②通过C3-(ITGAM+ITGB2)和C3-(ITGAX+ITGB2)介导补体通路,在平滑肌细胞与巨噬细胞、单核细胞间的通信中发挥了一定作用。补体系统在先天免疫中起着核心作用,在AS的诱导和发展中起着重要作用,包括促进单细胞募集、诱导平滑肌细胞的活化和增殖^[42]、诱导内皮功能障碍、促进炎症小体活化及白细胞介素的分泌、参与血栓形成等^[43]。目前,已有研究发现免疫细胞与免疫相关SMC之间存在复杂的细胞间通信网络。C3作为一种关键炎症介质,通过免疫复合物激活补体系统参与AS过程,且与平滑肌细胞的合成表型相关^[44-45]。 $\beta 2$ 整合素包括整合素 $\alpha M\beta 2$ (ITGAM与ITGB2复合物)和整合素 $\alpha X\beta 2$ (ITGAX+ITGB2复合物),具有白细胞分布特征;其中整合素 $\alpha X\beta 2$ 参与DC中的抗原提呈,以及单核细胞和巨噬细胞至动脉血管硬化病变处的跨内皮迁移^[46]。单核细胞/巨噬细胞通过活化的整合素 $\alpha M\beta 2$ 的黏附,在巨噬细胞交替活化过程中具有调节和潜在

的动脉粥样硬化保护功能^[47]。此外,C3通过与 $\beta 2$ 整合素受体结合,参与吞噬、细胞黏附、细胞外基质重排及迁移等作用^[48]。本研究发现C3分别与 $\alpha X\beta 2$ 和 $\alpha M\beta 2$ 形成L-R参与补体通路,并在SMC与相关免疫细胞的通信网络中发挥了一定作用,为靶向调控CA病理过程提供一定的参考依据。

本研究的动物实验验证结果显示,与空白组比较,AS小鼠表现出明显的斑块病理改变;AS模型组中ITGB2和PTPRC mRNA表达水平显著下调,CCL2、DCN和IGF1 mRNA表达水平平均明显上调,与预测的结果一致。

综上所述,在CA中平滑肌细胞可以通过CCL通路、补体系统招募内皮细胞、巨噬细胞、单核细胞,加剧动脉血管壁堵塞。本研究阐释了CA环境中不同细胞间的通信景观,有助于理解各细胞在CA病程中的通信关系,以及以平滑肌细胞为主要通信关系的关键靶点及作用机制在CA中作用。

本研究尚存在一些局限性。第一,本研究是基于公共数据库开展的研究。GEO数据库中有关CA的scRNA-Seq数据较少,且缺乏其不同病理阶段的样本数据,故而本研究纳入的样本偏少,不能观察CA早期至晚期或稳定斑块至不稳定斑块等不同病理过程的动态演变特征。第二,scRNA-Seq技术在分析单细胞的转录组方面仍面临许多挑战和局限性^[49]。例如,scRNA-Seq技术无法可靠地检测低丰度转录本;丢失了细胞在组织中至关重要的空间位置信息;对样本要求比较高,样本制备的过程可能会导致细胞死亡,造成背景信号较高等。这些问题可能会导致一些基因及细胞亚群不能被有效地挖掘。第三,CellChat基于当前已证明的L-R相互作用关系,对细胞间的通信网络进行建模。因其与Seurat衔接比较好,同时又具备丰富的可视化函数,是当前研究细胞通信的热门工具。但由于L-R相互作用数据库尚不够完善,仍有较多的L-R未被发现和验证,可能会使CellChat构建的细胞通信缺失或不全面。第四,本研究对主要结果未开展生物学验证。后续还需要利用空间转录组、单细胞核转录组测序等先进的技术方法进行验证。

总之,本研究从单细胞的视角探索了CA内细胞间的全局通信景观,拓宽了其研究维度,结果发现在CA病理过程中平滑肌细胞与其他细胞亚群间存在广泛的通信关系,是主导细胞亚群;ITGB2、PTPRC、CCL2、DCN、IGF1是平滑肌细胞的关键高变异

DEGs; 平滑肌细胞可通过 CCL2-ACKR1、C3-(ITGAM+ITGB2) 和 C3-(ITGAX+ITGB2) 介导的 CCL 和补体信号通路与内皮细胞、巨噬细胞和单核细胞产生复杂的通信关系。本研究有助于以平滑肌细胞为切入点阐释 CA 的病理生理学机制, 可为 CA 的精准防治提供一定的思路。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

本研究涉及的所有动物实验均已通过武汉华联科生物技术有限公司动物伦理委员会的审核批准(审批号 HLK-20210710-06)。所有实验过程均遵照《实验动物使用和管理指南》和《医学实验动物管理实施细则》的条例进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and

approved by Model Animal Research Institute at Wuhan Myhalic Biotechnology Co., Ltd. (Approval Letter No. HLK-20210710-06), and all experimental animal protocols were carried out by following the *Guidelines for the Use and Management of Laboratory Animals* and *Implementation Rules for the Management of Medical Laboratory Animals*.

作者贡献/Authors' Contributions

司春婴提出研究思路和框架, 负责撰写论文; 王建茹负责实验设计; 王建茹、李晓辉参与数据统计和修改论文; 王永霞和关怀敏指导研究实施。

SI Chunying proposed research ideas and framework, and wrote the paper. WANG Jianru was responsible for the experiment design. WANG Jianru and LI Xiaohui participated in data statistics and paper revision. WANG Yongxia and GUAN Huaimin guided the research and implementation.

• Received: 2023-05-19

• Accepted: 2023-12-11

• Published online: 2024-02-28

参 · 考 · 文 · 献

- [1] 郝俊海, 林展翼. 冠状动脉粥样硬化相关生物力学因素的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(11): 1009-1012.
HAO J H, LIN Z Y. Research progress of biomechanical factors related to coronary atherosclerosis[J]. Chinese Journal of Arteriosclerosis, 2020, 28(11): 1009-1012.
- [2] HOSEN M R, GOODY P R, ZIETZER A, et al. MicroRNAs as master regulators of atherosclerosis: from pathogenesis to novel therapeutic options[J]. Antioxid Redox Signal, 2020, 33(9): 621-644.
- [3] D'ASCENZO F, AGOSTONI P, ABBATE A, et al. Atherosclerotic coronary plaque regression and the risk of adverse cardiovascular events: a meta-regression of randomized clinical trials[J]. Atherosclerosis, 2013, 226(1): 178-185.
- [4] BERUMEN SÁNCHEZ G, BUNN K E, PUA H H, et al. Extracellular vesicles: mediators of intercellular communication in tissue injury and disease[J]. Cell Commun Signal, 2021, 19(1): 104.
- [5] CHARLA E, MERCER J, MAFFIA P, et al. Extracellular vesicle signalling in atherosclerosis[J]. Cell Signal, 2020, 75: 109751.
- [6] ZHANG L Z, LEI S. Changes of junctions of endothelial cells in coronary sclerosis: a review[J]. Chronic Dis Transl Med, 2016, 2(1): 22-26.
- [7] WEN D, WANG X, CHEN R, et al. Single-cell RNA sequencing reveals the pathogenic relevance of intracranial atherosclerosis in blood blister-like aneurysms[J]. Front Immunol, 2022, 13: 927125.
- [8] JIN S, RAMOS R. Computational exploration of cellular communication in skin from emerging single-cell and spatial transcriptomic data[J]. Biochem Soc Trans, 2022, 50(1): 297-308.
- [9] POTTER S S. Single-cell RNA sequencing for the study of development, physiology and disease[J]. Nat Rev Nephrol, 2018, 14(8): 479-492.
- [10] COCHAIN C, VAFADARNEJAD E, ARAMPATZI P, et al. Single-cell RNA-seq reveals the transcriptional landscape and heterogeneity of aortic macrophages in murine atherosclerosis[J]. Circ Res, 2018, 122(12): 1661-1674.
- [11] WIRKA R C, WAGH D, PAIK D T, et al. Atheroprotective roles of smooth muscle cell phenotypic modulation and the TCF21 disease gene as revealed by single-cell analysis[J]. Nat Med, 2019, 25(8): 1280-1289.
- [12] TILLIE R J H A, VAN KUIJK K, SLUIMER J C. Fibroblasts in atherosclerosis: heterogeneous and plastic participants[J]. Curr Opin Lipidol, 2020, 31(5): 273-278.
- [13] 王建茹, 李晓辉. 基于单细胞 RNA 测序技术筛选颈动脉粥样硬化中巨噬细胞特征基因的研究[J]. 医学研究生学报, 2022, 35(10): 1014-1021.
WANG J R, LI X H. Screening of macrophage characteristic genes in carotid atherosclerosis by single-cell RNA sequencing[J]. Journal of Medical Graduate students, 2022, 35(10): 1014-1021.
- [14] JIN S, GUERRERO-JUAREZ C F, ZHANG L, et al. Inference and analysis of cell-cell communication using CellChat[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1088.
- [15] 王建茹, 朱明军, 王永霞, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨芪参益气滴丸改善心肌缺血再灌注损伤的潜在分子机制[J]. 中医学报, 2021, 36(7): 1537-1544.
WANG J R, ZHU M J, WANG Y X, et al. Study on the potential molecular mechanism of Qishenyiqi Dropping pills to improve myocardial ischemia reperfusion injury based on network pharmacology and molecular docking technique[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2021, 36(7): 1537-1544.
- [16] 陈馨浓, 葛其卉, 赵一璇, 等. 四妙勇安汤对动脉粥样硬化巨噬细胞泡沫化的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2023, 43(6): 705-711.
CHEN X N, GE Q H, ZHAO Y X, et al. Effect of Simiao Yong'an Decoction on macrophage foam cell formation in atherosclerosis[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2023, 43(6): 705-711.
- [17] XU H, NI Y Q, LIU Y S. Mechanisms of action of miRNAs and lncRNAs in extracellular vesicle in atherosclerosis[J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 733985.
- [18] RAMIŁOWSKI J A, GOLDBERG T, HARSHBARGER J, et al. A draft network of ligand-receptor-mediated multicellular signalling in human[J]. Nat Commun, 2015, 6: 7866.
- [19] EFREMOVA M, VENTO-TORMO M, TEICHMANN S A, et al. CellPhoneDB: inferring cell-cell communication from combined expression of multi-subunit ligand-receptor complexes[J]. Nat Protoc, 2020, 15(4): 1484-1506.



- [20] SHI X, GUO L W, SEEDIAL S M, et al. TGF- β /Smad3 inhibit vascular smooth muscle cell apoptosis through an autocrine signaling mechanism involving VEGF-A[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(7): e1317.
- [21] OSTRIKER A, HORITA H N, POCZOBUTT J, et al. Vascular smooth muscle cell-derived transforming growth factor- β promotes maturation of activated, neointima lesion-like macrophages[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(4): 877-886.
- [22] BADIMON L, STOREY R F, VILAHUR G. Update on lipids, inflammation and atherothrombosis[J]. *Thromb Haemost*, 2011, 105 (Suppl 1): S34-S42.
- [23] MERCHED A, TOLLEFSON K, CHAN L. β 2 integrins modulate the initiation and progression of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 85(4): 853-863.
- [24] KANG S W, KIM M S, KIM H S, et al. Celastrol attenuates adipokine resistin-associated matrix interaction and migration of vascular smooth muscle cells[J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(2): 398-408.
- [25] AL BARASHDI M A, ALI A, MCMULLIN M F, et al. Protein tyrosine phosphatase receptor type C (PTPRC or CD45)[J]. *J Clin Pathol*, 2021, 74(9): 548-552.
- [26] 王玉, 孙晓宇, 罗亚, 等. 冠状动脉粥样斑块内CD45表达水平与病灶结构变化的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(2): 114-119, 140.
WANG Y, SUN X Y, LUO Y, et al. Relationship between CD45 expression level and lesion structure in coronary artery plaque[J]. *Chinese Journal of Arteriosclerosis*, 2019, 27(2): 114-119, 140.
- [27] 胡永涛, 刘洪智. 冠心病患者外周血CD45、HMGB1水平与支架内再狭窄的相关性分析[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2022, 14(5): 581-584.
HU Y T, LIU H Z. Correlation analysis of peripheral blood CD45, HMGB1 and stent restenosis in patients with coronary heart disease[J]. *Chinese Journal of Evidence-Based Cardiovascular Medicine*, 2022, 14(5): 581-584.
- [28] ZHU S, LIU M, BENNETT S, et al. The molecular structure and role of CCL2 (MCP-1) and C-C chemokine receptor CCR2 in skeletal biology and diseases[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(10): 7211-7222.
- [29] OSONOI Y, MITA T, AZUMA K, et al. Defective autophagy in vascular smooth muscle cells enhances cell death and atherosclerosis[J]. *Autophagy*, 2018, 14(11): 1991-2006.
- [30] YU B, WONG M M, POTTER C M, et al. Vascular stem/progenitor cell migration induced by smooth muscle cell-derived chemokine (C-C motif) ligand 2 and chemokine (C-X-C motif) ligand 1 contributes to neointima formation[J]. *Stem Cells*, 2016, 34(9): 2368-2380.
- [31] SCHOBBER A, ZERNECKE A, LIEHN E A, et al. Crucial role of the CCL2/CCR2 axis in neointimal hyperplasia after arterial injury in hyperlipidemic mice involves early monocyte recruitment and CCL2 presentation on platelets[J]. *Circ Res*, 2004, 95(11): 1125-1133.
- [32] KUNNAS T, SOLAKIVI T, MÄÄTTÄ K, et al. Decorin genotypes, serum glucose, heart rate, and cerebrovascular events: the Tampere adult population cardiovascular risk study[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2016, 20(8): 416-419.
- [33] AL HAJ ZEN A, CALIGIURI G, SAINZ J, et al. Decorin overexpression reduces atherosclerosis development in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Atherosclerosis*, 2006, 187(1): 31-39.
- [34] BURTON D G A, GILES P J, SHEERIN A N P, et al. Microarray analysis of senescent vascular smooth muscle cells: a link to atherosclerosis and vascular calcification[J]. *Exp Gerontol*, 2009, 44(10): 659-665.
- [35] FIERRO-MACÍAS A E, FLORIANO-SÁNCHEZ E, MENA-BURCIAGA V M, et al. Association between IGF system and PAPP-A in coronary atherosclerosis[J]. *Arch Cardiol Mex*, 2016, 86(2): 148-156.
- [36] CHONG H, WEI Z, NA M, et al. The PGC-1 α /NRF1/miR-378a axis protects vascular smooth muscle cells from FFA-induced proliferation, migration and inflammation in atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2020, 297: 136-145.
- [37] 涂少文, 陈云宪, 唐良秋. 趋化因子在动脉粥样硬化中的作用及研究进展[J]. *中国医学创新*, 2022, 19(15): 175-179.
TU S W, CHEN Y X, TANG L Q. The role and research progress of chemokines in atherosclerosis[J]. *Chinese Medical Innovation*, 2022, 19(15): 175-179.
- [38] HERNÁNDEZ-AGUILERA A, FIBLA M, CABRÉ N, et al. Chemokine (C-C motif) ligand 2 and coronary artery disease: tissue expression of functional and atypical receptors[J]. *Cytokine*, 2020, 126: 154923.
- [39] SINGH S R, SUTCLIFFE A, KAUR D, et al. CCL2 release by airway smooth muscle is increased in asthma and promotes fibrocyte migration[J]. *Allergy*, 2014, 69(9): 1189-1197.
- [40] GIRBL T, LENN T, PEREZ L, et al. Distinct compartmentalization of the chemokines CXCL1 and CXCL2 and the atypical receptor ACKR1 determine discrete stages of neutrophil diapedesis[J]. *Immunity*, 2018, 49(6): 1062-1076. e6.
- [41] LIAO Z, JIN Y, CHU Y, et al. Single-cell transcriptome analysis reveals aberrant stromal cells and heterogeneous endothelial cells in alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Commun Biol*, 2022, 5(1): 324.
- [42] SPEIDL W S, KASTL S P, HUBER K, et al. Complement in atherosclerosis: friend or foe? [J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 9(3): 428-440.
- [43] 刘艾婷, 彭旷, 欧蕾宇, 等. 补体系统在动脉粥样硬化中的作用研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(4): 363-368.
LIU A T, PENG K, OU L Y, et al. Research progress on the role of complement system in atherosclerosis[J]. *Chinese Journal of Arteriosclerosis*, 2021, 29(4): 363-368.
- [44] WAN J X, FUKUDA N, ENDO M, et al. Complement 3 is involved in changing the phenotype of human glomerular mesangial cells[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 213(2): 495-501.
- [45] RUS H, CUDRICI C, NICULESCU F. The role of the complement system in innate immunity[J]. *Immunol Res*, 2005, 33(2): 103-112.
- [46] BUYANNEKHEK D, NHAM S U. Characterization of α X I-domain binding to receptors for advanced glycation end products (RAGE)[J]. *Mol Cells*, 2017, 40(5): 355-362.
- [47] YAKUBENKO V P, BHATTACHARJEE A, PLUSKOTA E, et al. α M β 2 integrin activation prevents alternative activation of human and murine macrophages and impedes foam cell formation[J]. *Circ Res*, 2011, 108(5): 544-554.
- [48] BAJTAY Z. Biologia futura: stories about the functions of β ₂-integrins in human phagocytes[J]. *Biol Futur*, 2021, 72(1): 7-13.
- [49] WANG M, GU M, LIU L, et al. Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) in cardiac tissue: applications and limitations[J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2021, 17: 641-657.

[本文编辑] 吴 洋

