

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.08.014

nAChR α 1 调控尼古丁促进巨噬细胞 RAW264.7 增殖迁移的作用研究 *

任安民¹ 吴宏宪¹ 郭真真¹ 操群安¹ 戴秋艳^{1Δ} 刘丽萍²

(1 上海交通大学附属上海市第一人民医院心内科 上海 200080; 2 盐城市第一人民医院心内科 江苏 盐城 224000)

摘要 目的:探讨 nAChR α 1 是否参与调节尼古丁促进巨噬细胞 RAW264.7 增殖迁移的作用。**方法:**将体外培养的 RAW264.7 细胞分 4 组为:① 正常对照组;② 尼古丁组;③ 对照干扰+尼古丁组;④ nAChR α 1 干扰+尼古丁组。用尼古丁(5 ng/mL)刺激巨噬细胞 RAW264.7,特异性 nAChR α 1 siRNA 用脂质体 3000 转染细胞,CCK-8 法检测尼古丁处理 3 h、24 h 和 48 h 后细胞的增殖情况,细胞划痕实验检测细胞迁移情况,Western blot 和 RT-PCR 检测细胞内 nAChR α 1、MMP-2、MMP-9 的蛋白和 mRNA 的表达情况。**结果:**与空白对照组相比,尼古丁可显著促进 RAW264.7 细胞的增殖和迁移,增加 nAChR α 1、MMP-2、MMP-9 的蛋白和 mRNA 表达;而在干扰 nAChR α 1 表达后,尼古丁诱导的 RAW264.7 细胞的增殖和迁移明显被抑制,且细胞 nAChR α 1、MMP-2、MMP-9 的蛋白和 mRNA 表达均显著的降低。**结论:**nAChR α 1 可介导尼古丁促进 RAW264.7 细胞的增殖和迁移,这可能与参与调控尼古丁增加 RAW264.7 细胞分泌 MMP-2、MMP-9 有关。

关键词:nAChR α 1;尼古丁;细胞增殖;细胞迁移

中图分类号:R-33; R543.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)08-1474-05

nAChR α 1 Mediates Nicotine-induced the Proliferation and Migration of RAW264.7*

REN An-min¹, WU Hong-xian¹, GUO Zhen-zhen¹, CAO Qun-an¹, DAI Qiu-yan^{1Δ}, LIU Li-ping²

(1 Department of Cardiology, Shanghai General Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200080, China;

2 Department of Cardiology, Yancheng First People Hospital, Yancheng, Jiangsu, 224000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether nAChR α 1 mediate nicotine-induced proliferation and migration of macrophages RAW264.7. **Methods:** RAW264.7 cells cultured *in vitro* were divided into four groups: ① Control group; ② Control+Nicotine group; ③ NC-siRNA+Nicotine group; ④ α 1-siRNA+Nicotine group. RAW264.7 Cells were treated with nicotine(5 ng/mL), nAChR α 1-siRNA was transfected into RAW264.7 cells by Lipofectamine 3000 reagent; The cell proliferation at 3 h, 24 h and 48 h after nicotine treatment was measured by CCK-8 assay; Scratch wound healing was used to measure the migration of cells. The protein and mRNA expression of nAChR α 1, MMP-2, MMP-9 were determined by Western blot and RT-PCR. **Results:** Compared with the control group, the proliferation and migration of RAW264.7 cells under nicotine exposure were significantly increased ($P < 0.05$). In addition, the protein and mRNA expression of nAChR α 1, MMP-2, MMP-9 were obviously increased ($P < 0.05$). However, the inhibitor of nAChR α 1 by si-RNA interference can significantly reduce the proliferation and migration of RAW264.7 cells under nicotine exposure. And the protein and mRNA expression of nAChR α 1, MMP-2, MMP-9 were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusions:** nAChR α 1 mediated nicotine-induced proliferation and migration of RAW264.7 cells, which may related to the promotion of MMP-2 and MMP-9 secretion.

Key words: nAChR α 1; Nicotine; Cell proliferation; Cell migration

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

Article ID: 1673-6273(2018)08-1474-05

前言

动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是心血管系统最常见的疾病之一。既往的研究表明烟草中的尼古丁可能通过诱导内皮细胞功能障碍,促进血管平滑肌细胞增殖和迁移,激活炎症细胞及免疫细胞释放炎症因子,诱发细胞氧化应激等多方面作用促进 AS 的生成^[1]。 α 1 烟碱型乙酰胆碱受体(Alpha 1 nicotinic acetylcholine receptor, nAChR α 1)分布在神经肌肉接头处,对于

神经肌肉电信号传导起到重要作用。

本研究以巨噬细胞(RAW264.7)为研究对象,通过小干扰 RNA 降低细胞中 nAChR α 1 的表达,CCK-8 法检测 RAW264.7 细胞的增殖情况,细胞划痕法检测细胞迁移情况,Western Blot 和 RT-PCR 检测细胞中基质金属蛋白酶 -2 (MMP-2) 和 9 (MMP-9)的蛋白表达,旨在探讨 nAChR α 1 在尼古丁对巨噬细胞的增殖迁移影响中的作用及其可能的机制。

1 材料与方法

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81670399)

作者简介:任安民(1992-),硕士研究生,主要研究方向:心血管疾病的诊断与治疗,E-mail: renanmin2016@163.com

Δ 通讯作者:戴秋艳,博士,主任医师,主要研究方向:心血管疾病的诊断与治疗,E-mail: daiqiuyan66@163.com

(收稿日期:2018-02-14 接受日期:2018-02-28)

1.1 材料

1.1.1 仪器 酶标仪(Bio-Rad,美国);正置普通光显微镜(Zeiss,德国);定量 Real-time PCR 仪(Bio-Rad,美国)。

1.1.2 试剂 尼古丁(N-3876)购于美国 Sigma-Aldrich;小干扰 RNA (si-RNA) 购于广州市锐博生物科技有限公司;Lipofectamine 3000 转染试剂盒 (L3000001) 购于美国 Thermo Fisher Scientific;BCA 蛋白浓度试剂盒以及 CCK-8 试剂盒购于江苏碧云天生物技术有限公司;DMEM 培养基,胰蛋白酶和胎牛血清购于美国 Gibco;抗 GAPDH 单克隆抗体,抗 nAChR α 1,抗 MMP-2,MMP-9 抗体均购于美国 Cell Signaling Technology。Trizol 试剂购于美国 Invitrogen;SYBR Green PCR Master Mix 购于日本 Takara。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 巨噬细胞 RAW264.7 购于中国科学院上海生命科学研究所。培养在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中,加入 0.5×10^4 U/L 青、链霉素,放置于 5% CO₂,37℃ 密闭条件下培养。每隔 2 天换液一次,细胞密度长至 80%~90% 时进行胰酶消化传代。

1.2.2 细胞 nAChR α 1-siRNA 转染 取对数期细胞种于 6 孔板上,待细胞密度长至 70% 左右,饥饿处理 4 小时,分别用 125 μ L Opti-MEM 培养液混合 5 μ L 的 Lipofectamin3000 和 5 μ L 的 nAChR α 1-siRNA(20 μ M),室温孵育 10 分钟,加入 6 孔板中混匀,培养 48 h 后进行 RT-PCR 检测干扰效果,72 h 后进行 Western blot 检测蛋白的表达。nAChR α 1-siRNA 的序列为:5'-GTCGGCTCATTGAGTTACA-3',同时有 NC-siRNA 作为阴性对照。

1.2.3 荧光定量 PCR 细胞转染 48 h 后,加入尼古丁(5 ng/mL)处理细胞 3 h,然后将 6 孔板内培养基吸干,用 Trizol 提取细胞总 RNA,然后测 RNA 浓度,进行逆转录反应,将逆转录所得 cDNA 进行 PCR 反应。nAChR α 1 引物序列上游:5'-CT-GACCGTGTTCCTTCTGGT-3',下游:5'-GATGATGATGGACG CAATGA-3';MMP-2 引物序列上游:5'-GATAACCTGGATGC-CGTCGTG-3',下游:5'-GGTGTGCAGCGATGAAGATGATA-3';MMP-9 引物序列上游:5'-GCCCTGGAACACACGACA-3';下游:5'-TTGGAACTCACACGCCAGAAG-3';内参 GAPDH 引物序列上游:5'-GTATGACTCTACCCACGGCAAGT-3';下游:5'-TTCCCGTTGATGACCAGCTT-3'。PCR 反应条件是:94℃ 5 min;94℃ 30 s;60℃ 30 s;72℃ 45 s;共 40 个循环。每个样品设置 3 个复孔,基因表达量按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算。

1.2.4 Western blot 方法检测蛋白表达 RAW264.7 细胞转染 72 h 后,加入尼古丁(5 ng/mL)处理细胞 3 h,然后分别提取细胞总蛋白。测蛋白浓度,进行凝胶电泳、转膜、封闭、洗膜、一抗孵育过夜、TBST 洗膜、二抗孵育 3 h、再洗膜、曝光后显影。运用 ImageJ 软件进行定量分析。

1.2.5 CCK-8 法检测细胞增殖 取转染后 3、24、48 h 的细胞悬液 90 μ L,加入 96 孔板中,每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,每组设 8 个复孔,于培养箱中培养 3 h 后,使用酶标仪(450 nm)测吸光度,去掉一个最大值一个最小值,取剩下 6 个的平均值。实验重复 3 次。

1.2.6 细胞划痕实验 细胞转染 8 h 后,用 1 mL 枪头在六孔

板小孔中围绕圆心划一个“十”字,然后用 PBS 清洗两次,换液,按小组加入等量的 DMEM 培养基或者用 DMEM 稀释的尼古丁溶液,在显微镜下拍照记录,继续培养 24 h 后,弃培养基, PBS 清洗后再次拍照记录,使用 Image J 软件测得划痕面积。

1.3 统计学分析

使用 Graph-Pad Prism 7 统计软件进行统计,所有数据用均数加标准差表示(mean $\pm$ SD)。多组之间的比较用因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 nAChR α 1 参与调控尼古丁对于 RAW264.7 细胞的增殖的影响

采用 nAChR α 1 特异性 siRNA 转染 RAW264.7 细胞,分别在转染 3h、24h、48h 用 CCK-8 细胞增殖检测试剂盒测定细胞的增殖情况。在 24h、48h,与空白对照 Control 组相比 Control+Nicotine 组细胞 OD 值明显升高($P < 0.05$);而实验干扰组 α 1-siRNA+Nicotine 与对照干扰 NC-siRNA+Nicotine 组细胞 OD 值显著抑制 ($P < 0.01$),见图 1。这些结果提示尼古丁(5 ng/mL)能促进 RAW264.7 细胞的增殖,而 nAChR α 1 参与调控尼古丁(5 ng/mL)促 RAW264.7 细胞增殖的作用。

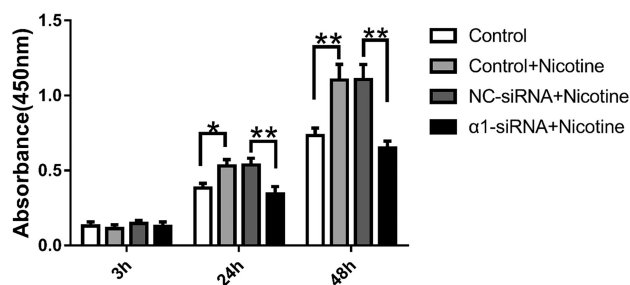


图 1 nAChR α 1 参与调控尼古丁促 RAW264.7 细胞增殖的作用

Fig.1 nAChR α 1 mediated the promotion effect of nicotine on the proliferation of RAW264.7 cells.

Note: Compared with Control group; Compared with NC-siRNA group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.2 nAChR α 1 参与调控尼古丁促 RAW264.7 细胞迁移的作用

尼古丁处理 RAW264.7 细胞 12 小时后,细胞的划痕面积率较对照组 Control 组显著减少($P < 0.05$);而 α 1-siRNA+Nicotine 组和 NC-siRNA+Nicotine 组相比,细胞的划痕面积率有所提高($P < 0.05$),见图 2。由此可见,nAChR α 1 参与调控尼古丁促 RAW264.7 细胞迁移的作用。

2.3 nAChR α 1 参与调控尼古丁对于 RAW264.7 细胞分泌 MMP-2/MMP-9 的作用

2.3.1 nAChR α 1 对尼古丁诱导的 RAW264.7 细胞后胞 MMP-2、MMP-9 mRNA 表达的影响 在尼古丁的刺激下,Control+Nicotine 组 nAChR α 1 的 mRNA 表达比 Control 组明显提高 ($P < 0.05$)。 α 1-siRNA+Nicotine 组 nAChR α 1 的 mRNA 表达比 NC-siRNA+Nicotine 组显著降低 ($P < 0.05$)。 NC-siRNA+Nicotine 与 Control+Nicotine 组 nAChR α 1 的 mRNA 表达相比较并无显著差异($P > 0.05$)。这说明转染 α 1-siRNA 可有效

降低 RAW264.7 细胞内 nAChR α 1 的表达(图 3A)。同时,尼古丁可促进 RAW264.7 细胞 MMP-2、MMP-9 的 mRNA 表达,而转染 α 1-siRNA 后,这种促进作用可被显著抑制(图 3B,3C)。

2.3.2 nAChR α 1 对尼古丁诱导的 RAW264.7 细胞后胞 MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响 如图 4 所示,尼古丁刺激

能增加 RAW264.7 细胞的 nAChR α 1、MMP-2、MMP-9 的蛋白表达,而通过转染 nAChR α 1 siRNA 后,RAW264.7 细胞内的 nAChR α 1、MMP-2、MMP-9 蛋白水平均较转染阴性对照 siRNA 组显著降低($P<0.05$)。

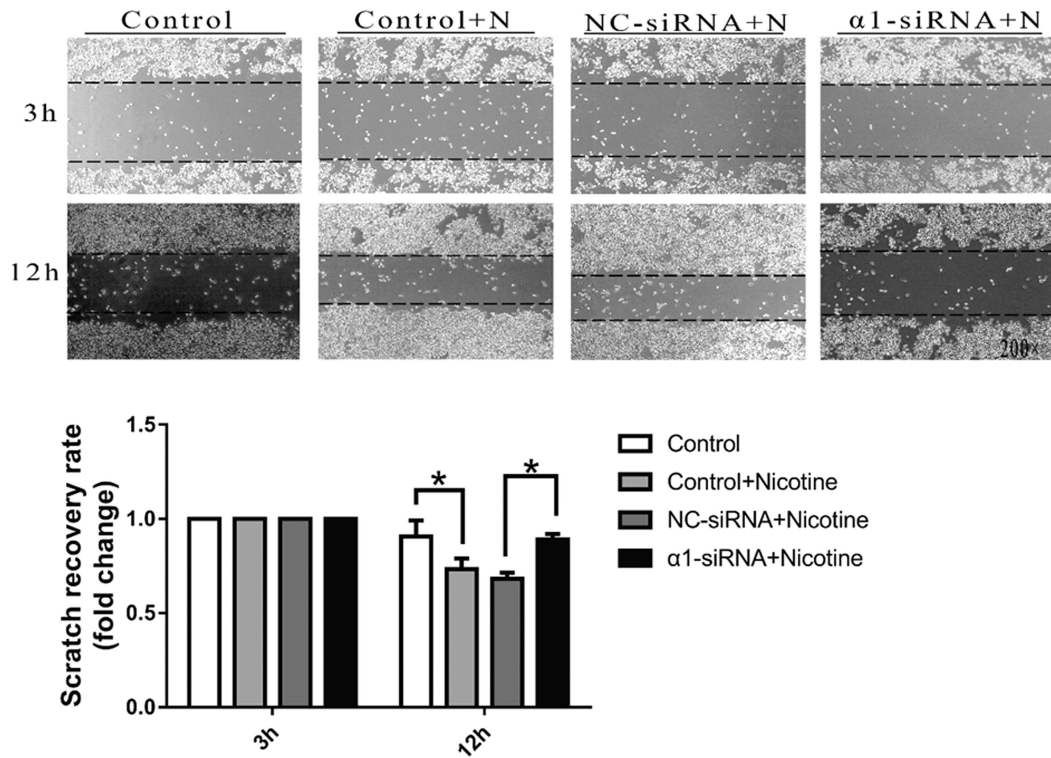


图 2 nAChR α 1 参与调控尼古丁促 RAW264.7 细胞迁移的作用

Fig.2 nAChR α 1 mediated the promotion effect of nicotine on the migration of RAW264.7 cells

Note: Compared with Control group; Compared with NC-siRNA+Nicotine group; * $P<0.05$.

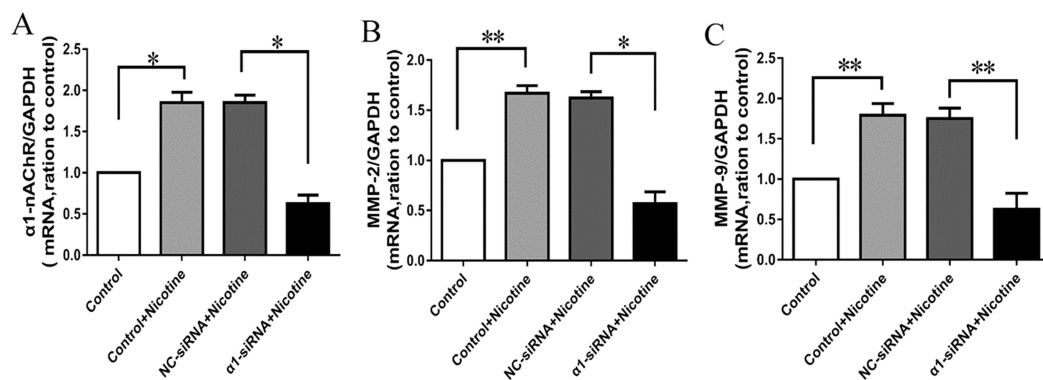


图 3 nAChR α 1 对尼古丁诱导的 RAW264.7 细胞后胞 MMP-2、MMP-9 mRNA 表达的影响

Fig.3 Effect of nAChR α 1 on nicotine-induced mRNA expressions of MMP-2 and MMP-9 in RAW264.7 cells

Note: Compared with Control group, Compared with NC-siRNA+Nicotine group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

3 讨论

动脉粥样硬化的是一种能引起心脏和大脑缺血性梗死的慢性血管炎症性疾病,主要危害是由于动脉硬化失去弹性,动脉血管管腔变窄甚至阻塞,导致重要脏器或组织的血供受影响,继发很多如冠心病、脑卒中、主动脉瘤、肾功能衰竭、四肢动脉疾病等临床疾病的发生。动脉粥样硬化的危险因素众多,包

括血液中高水平的总胆固醇和低密度脂蛋白浓度、低水平的高密度脂蛋白浓度、高血压、吸烟、糖尿病、肥胖等^[2,3],尤其是吸烟与动脉粥样硬化斑块的进展关系很大^[4,5]。烟草中含有 4000 多种化学物质,其中尼古丁是烟草中重要的成瘾成分,其在动脉粥样硬化的发生发展中的影响越来越受到关注^[6]。

烟碱乙酰胆碱受体 (nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)是一个大家族,在脊椎动物中目前已经发现有 17 种单

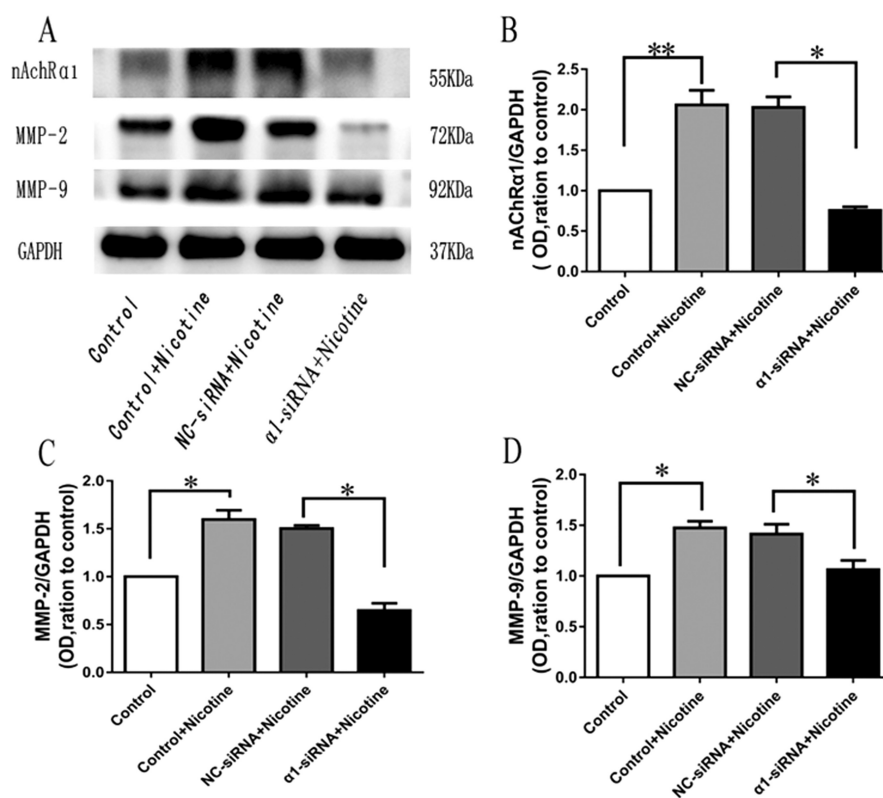


图4 nAChR α 1 对尼古丁诱导的 RAW264.7 细胞后胞 MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of nAChR α 1 on nicotine-induced protein expressions of MMP-2 and MMP-9 in RAW264.7 cells

Note: Compared with Control group; Compared with NC-siRNA+Nicotine group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

体,包括 $\alpha 1$ - $\alpha 10$ 、 $\beta 1$ - $\beta 4$ 、 γ 、 δ 和 ϵ 等^[7]。由于 nAChR 的多种单体在心血管细胞中有广泛表达,所以研究 nAChR 在心血管疾病中的作用有很重要的意义。目前的研究主要集中在 nAChR $\alpha 7$ 上,但存在矛盾报道。使用 nAChR $\alpha 7$ 的激动剂 (PNU-282987) 能够通过改变巨噬细胞表型,减轻急性肺损伤的炎症程度, nAChR $\alpha 7$ 起到是抗炎保护作用^[8]。而又有实验证明 nAChR $\alpha 7$ 参与晚期动脉粥样硬化斑块的形成,促进斑块内巨噬细胞的浸润^[9,10]。寻找新型受体是探索 nAChR 在 AS 中的重要途径。

nAChR $\alpha 1$ 分布在血管平滑肌细胞、巨噬细胞、内皮细胞等心血管细胞中。在高脂血症肾病模型中, nAChR $\alpha 1$ 能促进肾组织纤维化和巨噬细胞炎症反应^[11]。在 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化模型中,降低 nAChR $\alpha 1$ 的表达能够显著降低动脉粥样硬化斑块面积,并减少斑块中炎症反应水平^[12]。但是目前尚无 nAChR $\alpha 1$ 的体外实验研究。在我们的前期体外实验研究中证实尼古丁可诱导 MMP-2、MMP-9 以及 VCAM-1 表达增高,应用 nAChR $\alpha 7$ 的激动剂 (PNU-282987) 可阻断这种效果^[13]。在本实验中,用尼古丁刺激巨噬细胞 RAW264.7,胞内 nAChR $\alpha 1$ 的 mRNA 水平和蛋白水平均有明显增高,转染特异性 siRNA 抑制 nAChR $\alpha 1$ 的表达,发现细胞内的 MMP-2、MMP-9 的表达也随之下降,说明 nAChR $\alpha 1$ 参与调控尼古丁刺激 RAW264.7 细胞的 MMP-2、MMP-9 的表达。

基质金属蛋白酶家族主要是由锌离子介导,目前已经明确的种类有 26 种^[14],其中 MMP-2 和 MMP-9 降解细胞外基质的作用是最重要的^[15]。MMP-2 能够影响血管平滑肌细胞的增殖

迁移,对于血管重构产生作用^[16]。在自发性高血压大鼠模型中,尼古丁可刺激肾组织内 CD161a+/CD68+ 巨噬细胞的浸润和增殖导致肾炎的发生^[17],巨噬细胞在动脉粥样硬化发生发展中的作用巨大,在内皮下巨噬细胞的迁移,形成泡沫细胞,在动脉粥样硬化进展期,巨噬细胞大量增殖,促进斑块进展^[18]。我们的体外研究中也证明了尼古丁可以促进 RAW264.7 细胞的增殖,并且这种增殖效应在尼古丁刺激的 48h 尤其明显,在降低 nAChR $\alpha 1$ 后,这种效果又可被阻断。此外,巨噬细胞还可分泌基质金属蛋白酶 (MMPs) 加速细胞外基质的降解。有研究显示绿茶中的儿茶素可抑制 TLR4/MAPK/NF- κ B 信号通路,降低 MMP-9 和 MCP-1 的表达^[19];在巨噬细胞中 IL-33 能够通过 ERK1/2 和 NF- κ B 通路提高核转录因子 AP-1 的活性,增加对 MMP-9 表达^[20]。MMP-9 的表达提高可大量降解血管壁中的细胞外基质中的胶原蛋白,有减弱血管壁的屏障作用,促进了巨噬细胞的迁移运动增加^[21],同时增加了动脉粥样硬化斑块的不稳定性。此外,我们在实验中也发现了 nAChR $\alpha 1$ 能调控尼古丁对于巨噬细胞的促迁移现象。

综上所述, nAChR $\alpha 1$ 可介导尼古丁促进 RAW264.7 细胞的增殖和迁移,这可能与参与调控尼古丁增加 RAW264.7 细胞分泌 MMP-2、MMP-9 有关。巨噬细胞的增殖迁移是血管炎症产生和发展的重要组成部分,而尼古丁是香烟中重要成分,是诱发动脉粥样硬化等血管炎症的重要因子,探究 nAChR $\alpha 1$ 在细胞中的作用有助于阐明尼古丁促动脉粥样硬化的作用机制,为治疗动脉粥样硬化等血管类疾病提供新的思路。

参 考 文 献(References)

- [1] Santanam N, Thornhill B A, Lau J K, et al. Nicotinic acetylcholine receptor signaling in atherogenesis [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 225(2): 264-273
- [2] Torres N, Guevara-Cruz M, Vel Zquez-Villegas L A, et al. Nutrition and Atherosclerosis [J]. *Archives of Medical Research*, 2015, 46(5): 408-426
- [3] Suciu C F, Prete M, Ruscitti P, et al. Oxidized low density lipoproteins: The bridge between atherosclerosis and autoimmunity. Possible implications in accelerated atherosclerosis and for immune intervention in autoimmune rheumatic disorders[J]. *Autoimmun Rev*, 2018[Epub ahead of print]
- [4] Al Rifai M, Defilippis A P, Mcevoy J W, et al. The relationship between smoking intensity and subclinical cardiovascular injury: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) [J]. *Atherosclerosis*, 2017, 258: 119-130
- [5] Ngu N L, Mcevoy M. Environmental tobacco smoke and peripheral arterial disease: A review[J]. *Atherosclerosis*, 2017, 266: 113-120
- [6] Wu X, Zhang H, Qi W, et al. Nicotine promotes atherosclerosis via ROS-NLRP3-mediated endothelial cell pyroptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 171
- [7] Jeschke P, Nauen R, Beck M E. Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists: A Milestone for Modern Crop Protection [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(36): 9464-9485
- [8] Pinheiro N M, Santana F P, Almeida R R, et al. Acute lung injury is reduced by the alpha7nAChR agonist PNU-282987 through changes in the macrophage profile[J]. *FASEB J*, 2017, 31(1): 320-332
- [9] Lee R H, Vazquez G. Reduced size and macrophage content of advanced atherosclerotic lesions in mice with bone marrow specific deficiency of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor [J]. *PloS one*, 2015, 10(3): e0124584
- [10] Wang C, Chen H, Zhu W, et al. Nicotine Accelerates Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice by Activating alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor on Mast Cells [J]. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2017, 37(1): 53-65
- [11] Zhang G, Thomas A L, Marshall A L, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha1 promotes calpain-1 activation and macrophage inflammation in hypercholesterolemic nephropathy [J]. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 2011, 91(1): 106-123
- [12] Zhang G, Marshall A L, Thomas A L, et al. In vivo knockdown of nicotinic acetylcholine receptor alpha1 diminishes aortic atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 215(1): 34-42
- [13] Li Z Z, Guo Z Z, Zhang Z, et al. Nicotine-induced upregulation of VCAM-1, MMP-2, and MMP-9 through the alpha7-nAChR-JNK pathway in RAW264.7 and MOVAS cells [J]. *Molecular and cellular biochemistry*, 2015, 399(1-2): 49-58
- [14] Wang M, Kim S H, Monticone R E, et al. Matrix metalloproteinases promote arterial remodeling in aging, hypertension, and atherosclerosis[J]. *Hypertension*, 2015, 65(4): 698-703
- [15] LU H, AIKAWA M. Many faces of matrix metalloproteinases in aortic aneurysms [J]. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2015, 35(4): 752-754
- [16] Belo V A, Guimaraes D A, Castro M M. Matrix Metalloproteinase 2 as a Potential Mediator of Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Chronic Vascular Remodeling in Hypertension [J]. *Journal of vascular research*, 2015, 52(4): 221-231
- [17] Harwani S C, Ratcliff J, Sutterwala F S, et al. Nicotine Mediates CD161a+ Renal Macrophage Infiltration and Premature Hypertension in the Spontaneously Hypertensive Rat[J]. *Circulation research*, 2016, 119(10): 1101-1115
- [18] Murphy A J, Tall A R. Proliferating macrophages populate established atherosclerotic lesions[J]. *Circulation research*, 2014, 114(2): 236-238
- [19] Li Y F, Wang H, Fan Y, et al. Epigallocatechin-3-Gallate Inhibits Matrix Metalloproteinase-9 and Monocyte Chemotactic Protein-1 Expression Through the 67-kappaDa Laminin Receptor and the TLR4/MAPK/NF-kappaB Signalling Pathway in Lipopolysaccharide-Induced Macrophages [J]. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 2017, 43(3): 926-936
- [20] Ariyoshi W, Okinaga T, Chaweewannakorn W, et al. Mechanisms involved in enhancement of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages by interleukin-33 [J]. *Journal of cellular physiology*, 2017, 232(12): 3481-3495
- [21] Ordonez M, Rivera I G, Presa N, et al. Implication of matrix metalloproteinases 2 and 9 in ceramide 1-phosphate-stimulated macrophage migration[J]. *Cellular signalling*, 2016, 28(8): 1066-1074