

冠状动脉疾病差异基因富集和加权基因共表达网络分析

朱宝华¹, 孙岩²

(1. 山东省济南市人民医院 全科医学科, 山东 济南, 271100;

2. 山东第一医科大学附属省立医院 血管外科, 山东 济南, 250021)

摘要: **目的** 采用基因集富集分析和加权基因共表达网络分析探讨冠状动脉疾病的差异表达基因, 挖掘与冠状动脉疾病发病相关的关键基因。 **方法** 从美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 基因表达综合数据库下载 GSE71226 数据集, 筛选冠状动脉疾病差异基因并进行富集分析; 对差异基因进行基因集富集分析, 筛选冠状动脉疾病差异表达基因相关的微小 RNA (miRNAs) 并构建调控网络; 根据基因的相关性, 构建基因共表达模块, 并计算模块基因与临床信息的相关性; 选取与临床表型显著相关的模块, 构建蛋白质互作网络并筛选核心基因。 **结果** 经筛选, 共获取冠状动脉疾病差异表达基因 130 个, 富集于 Hippo、流体剪切力与动脉粥样硬化、一磷酸腺苷依赖的蛋白激酶 (AMPK)、Wnt、核苷酸结合寡聚化结构域 (NOD) 样受体和白细胞介素 17 等信号通路上。富集分析显示, miR-503-3p、miR-3674、miR-5088-5p、miR-4486 等 miRNAs 与冠状动脉疾病关系密切。根据基因表达的相关性, 获取 10 个共表达模块, 其中洋红色模块与冠状动脉疾病发病显著相关。经拓扑分析, BMP4 和 C3 在网络中处于核心地位。 **结论** 冠状动脉疾病发病过程中基因表达存在显著差异, 其病理过程涉及多靶点、多通路, 可能受到多个 miRNAs 调控。BMP4 和 C3 可能是冠状动脉疾病发病的关键基因。

关键词: 冠状动脉疾病; 信号通路; 富集分析; 蛋白质互作网络; 流体剪切力; 动脉粥样硬化; 骨形态发生蛋白

中图分类号: R 541.4; R 543.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2353(2021)17-015-07 **DOI:** 10.7619/jcmp.20212119

Analysis of differential gene enrichment and weighted gene co-expression network in coronary artery disease

ZHU Baohua¹, SUN Yan²

(1. Department of General Practice, Ji'nan City People's Hospital of Shandong Province,

Ji'nan, Shandong, 271100; 2. Department of Vascular Surgery, Provincial Hospital

Affiliated to Shandong First Medical University, Ji'nan, Shandong, 250021)

Abstract: Objective To explore the differential expression genes of coronary artery disease by gene set enrichment analysis and weighted gene co-expression network analysis and excavate key genes associated with the development of coronary artery disease. **Methods** The GSE71226 dataset was downloaded from the Gene Expression Omnibus database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), and the differential genes of coronary artery disease were screened and the enrichment analysis was performed. The gene set enrichment analysis was performed on the differential genes to screen for microRNAs (miRNAs) associated with differential expression genes in coronary artery disease, and the regulation network was constructed. The gene co-expression modules were constructed based on the correlation of genes, and the correlation between gene modules and clinical information was calculated. The genes of modules significantly correlating with clinical phenotypes were selected to construct protein-protein interaction network for screening of the core genes. **Results** After screening, a total of 130 differential expression genes in coronary artery disease were obtained, enriched in signaling pathways such as Hippo, fluid shear stress and atherosclerosis, adenosine monophosphate-dependent protein kinase (AMPK), Wnt, nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) like receptors and interleukin 17. Enrichment analysis showed that the miRNAs such as miR-503-3p, miR-3674, miR-5088-5p and miR-4486 were closely related to coronary artery disease. Based on the

收稿日期: 2021-05-21

基金项目: 山东省中医药科技发展计划项目(2019-0303); 山东省医药卫生科技发展计划项目(2018WS273)

通信作者: 孙岩, E-mail: sdxueguan@163.com

correlation of gene expression, 10 co-expression modules were obtained, and the magenta module was significantly associated with the development of coronary artery disease. Topological analysis showed that *BMP4* and C3 were the core genes of the protein-protein interaction network. **Conclusion** There are significant differences in gene expressions during the pathogenesis of coronary artery disease, the pathological process involves multiple targets and pathways, and pathogenesis involving in multiple targets and pathways may be regulated by multiple miRNAs. *BMP4* and C3 may be the core genes in the pathogenesis of coronary artery disease.

Key words: coronary artery disease; signaling pathway; enrichment analysis; protein-protein interaction network; fluid shear stress; atherosclerosis; bone morphogenetic protein

冠状动脉疾病(CAD)是世界范围内的首要死亡因素^[1]。CAD的基本病理改变为动脉粥样硬化,既往研究^[2-3]证实脂质代谢和炎症反应参与了CAD的发病过程。应用抗血小板药物和他汀类药物对预防CAD诱发的不良事件有积极的作用^[4],但抗血小板治疗的出血风险和他汀类药物的肝毒性等副作用也在一定程度上影响了CAD的治疗效果^[5]。

随着基因测序技术的成熟和成本的降低,基因组学在医学领域的应用范围逐渐扩大。相较于传统研究思路的单一靶点或通路的验证,以基因组学为基础的生物信息学方法可以在短时间内获取并分析海量的基因表达数据,深入挖掘疾病的潜在机制和核心通路^[6]。美国国家生物技术信息中心(NCBI)的基因表达数据库(GEO)是目前规模最大的疾病数据库^[7]。本研究采用生物信息学方法对GEO中CAD相关的基因数据集进行挖掘,筛选差异表达基因(DEGs)并进行功能富集分析,探讨CAD发病的潜在靶点和机制,为CAD的诊治提供理论依据,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 CAD的DEGs筛选

检索NCBI的GEO,获取CAD基因表达芯片数据,下载GSE71226和GSE23561数据集。GSE71226数据集包含3例CAD患者和3例健康对照者外周血的基因表达数据,实验平台为GPL570 [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array(美国昂飞)。GSE23561数据集包含9例健康对照者和6例CAD患者的外周血基因表达数据,实验平台为GPL10775 Human 50K Exonic Evidence-Based Oligonucleotide array(美国Microarrays)。采用R语言软件中的“limma”数据包对GSE71226和GSE23561数据集进行归一化处理,以 $P < 0.05$ 、

$|\text{foldchange}| \geq 1.5$ 为条件进行DEGs筛选和聚类分析,使用“ggord”“pheatmap”数据包将结果可视化。

1.2 CAD的DEGs富集分析

以 $P < 0.05$ 为条件,采用R语言“ClusterProfiler”数据包对筛选得到的CAD的DEGs进行信号通路富集分析,并将富集结果可视化。

1.3 CAD的DEGs功能聚类

采用基因集富集分析(GSEA)方法^[8],借助GSEA v4.1.0软件分析CAD的DEGs数据,以归一化富集得分绝对值 > 1 、 $P < 0.05$ 、错误发现率(FDR) < 0.25 为条件来筛选CAD的DEGs相关的微小RNA(miRNA),采用Cytoscape3.7.2软件(<http://www.cytoscape.org>)构建miRNA调控CAD的DEGs的网络。

1.4 构建CAD的DEGs加权基因共表达

网络分析(WGCNA)

将数据上传至WGCNA在线分析平台iDEP(integrated differential expression and pathway analysis, <http://bioinformatics.sdstate.edu/idep/>)^[9],采用加权矩阵模型将有相似表达模式的基因聚类,构建模块与疾病表型相关性热图并筛选主要模块的基因,构建蛋白质相互作用(PPI)网络,以网络节点度值为参考,采用Cytoscape 3.7.2软件中的cytoHubba插件筛选PPI网络中的核心靶点^[10],并进行内部验证。

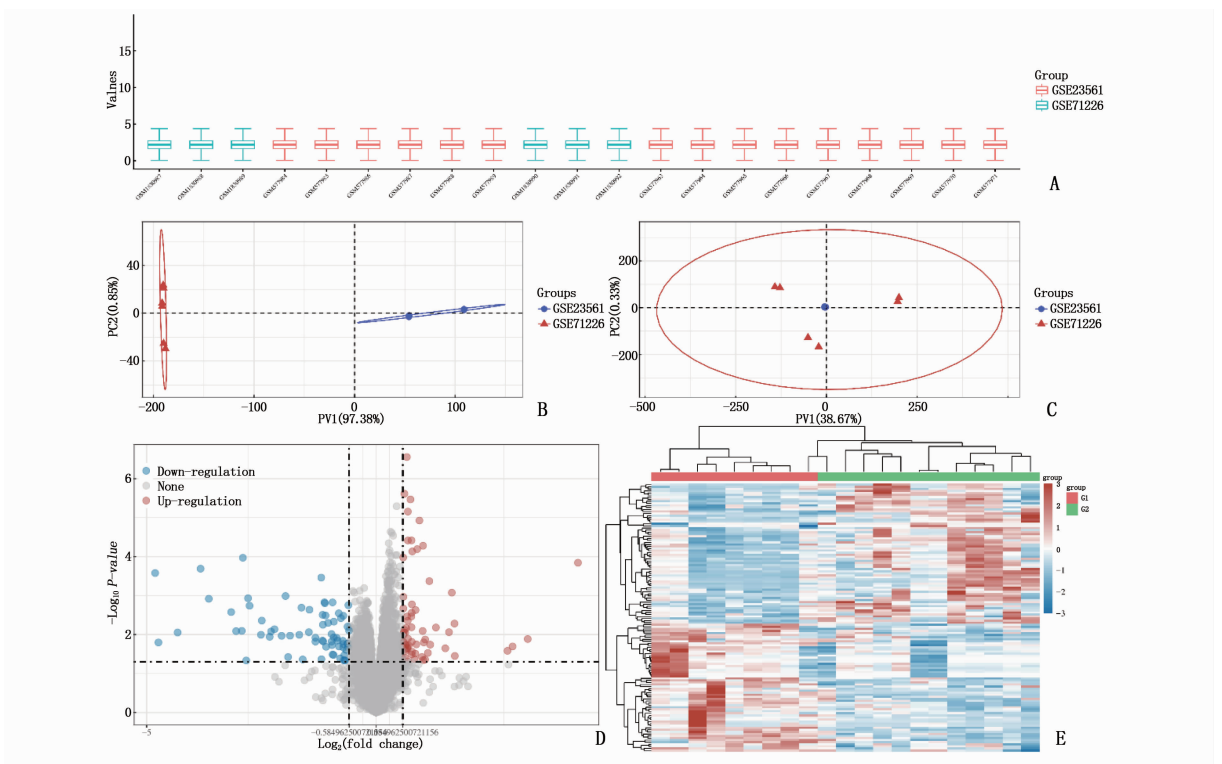
2 结果

2.1 CAD的DEGs

经筛选,与健康对照者相比,CAD外周血基因表达存在显著差异。共筛选获得130个差异基因,其中上调基因62个,下调基因68个,见表1。经批次效应去除、数据标准化和聚类分析等操作后,绘制数据标准化后箱线图、主成分分析(PCA)图、差异基因表达火山图和热图,见图1。

表 1 CAD 的 DEGs

表达水平	基因
上调	<i>CCNE1, LEFTY1, WNT10A, NCR2, SELENBP1, CFC1, IL1R2, SEMA4A, HBG1, INSRR, PNPLA2, TNMD, RNF182, DCAF12, METTL7B, LGI4, GNG13, S100A11, GYPC, PDZK1IP1, CACNG2, ACTG1, RAX2, SLC9A3, SCG5, R3HDM4, KATNB1, SIRPB1, FCGR3B, MUC2, DMTN, CLDN7, UBC, ACADS, RPL39, ZNF428, DRP2, CIB3, EPN1, CKB, RS1, TAF6, ADIPOR1, STRADB, GFRA3, ACTB, TYROBP, IFITM2, EPB42, KRT23, COG7, RPS12, UBA52, MKRN1, VNN2, SLC4A1, RILP, OR1E1, LATS2, S100A13, C5AR1, JGF1R</i>
下调	<i>ANAPC2, ENTPD4, PLCB3, TCTN3, HTR3A, CCDC183, ZNF646, NUDC, PCGF6, LIN28A, PARP10, RPL37A, INF2, EEF1D, NDUFB7, RPLA1, RPLP2, NHSL1, MTHFS, PWWP2B, CAMK2A, ADM2, GLUD2, YIF1B, ATXN7L2, PLB1, CCDC43, THPO, GET4, EFNA4, DROSHA, LCN1, PLEC, SEC14L5, XAB2, FAM78A, PFDN2, TXN2, ETS2, DYRK2, STAB1, GSPT2, PAM, CES2, BAZ1B, VANGL1, IRF7, RASGRP1, DCXR, S100A8, EML3, AVP, HIST1H2AC, TTC22, DYRK1B, TMSB4Y, TFPT, RBM4B, SLC1A5, RNF19A, QDPR, ISYNA1, BTBD3, MAPK9, LIM2, ARPC1B, DLGAP1, RPLP1</i>



A: 数据标准化后箱线图; B: 未进行批次去除前的 PCA 结果图, 2 个数据集各自分开, 无任何交集; C: 去除批次后的 PCA 结果图, 2 个数据集交集在一起, 可作为一批数据进行后续分析; D: 使用 Fold change 和校正后 P 值绘制火山图, 图中红点表示显著差异上调的基因, 蓝点表示显著差异下调的基因; E: 差异基因表达热图, 不同颜色代表在不同样本中的表达趋势, 红色代表上调, 蓝色代表下调。

图 1 经处理后的差异基因表达图

2.2 CAD 的 DEGs 富集分析

结果显示, CAD 上调基因显著富集在 Hippo、流体剪切力与动脉粥样硬化、一磷酸腺苷依赖的蛋白激酶(AMPK)等信号通路上, CAD 下调基因显著富集在 Wnt、核苷酸结合寡聚化结构域(NOD)样受体和白细胞介素(IL)17 等信号通路上, 见图 2。

2.3 CAD 的 DEGs 功能聚类

结果显示, miR-503-3p、miR-3674、miR-5088-5p、

miR-4486 与 CAD 发病关系密切, 可能是 CAD 相关的 miRNA, 见图 3、4。

2.4 CAD 的 DEGs 的 WGCNA 分析

WGCNA 分析 CAD 的 DEGs 并构建邻接矩阵, 聚类分析后获得 10 个模块, 分别为灰色、粉色、黑色、洋红色、红色、绿色、绿松石色、黄色、蓝色、棕色, 其中灰色模块与 CAD 相关性低, 见图 5。构建各模块基因表达热图, 可见各模块中 CAD 组

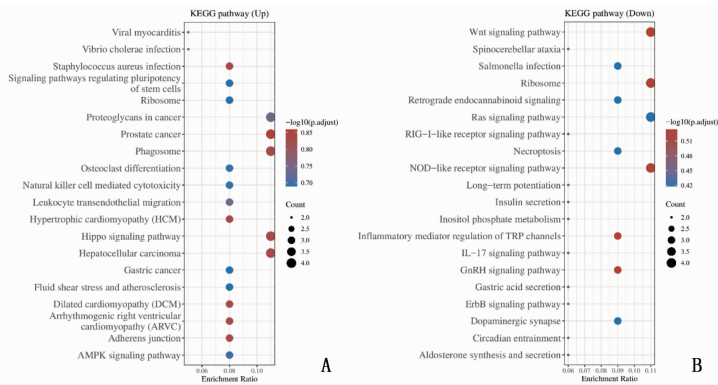
与健康组基因表达存在显著差异,见图 6。构建模块与疾病表型相关热图,分析发现洋红色模块与 CAD 发病关系最密切(相关系数 = 0.61, $P = 0.04$),见图 7。导出洋红色模块相关基因,采用 Cytoscape3.7.2 软件构建 PPI 网络,借助 cytoHubba 插件筛选 PPI 网络中的核心靶点,结果表明, *BMP4* 和 *C3* 是网络中的核心靶点。统计 2 个数据集中 *BMP4* 和 *C3* 的表达量,结果显示,与健康对照者相比, CAD 患者 *C3* 表达升高, *BMP4* 表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 8。

3 讨论

内皮细胞是 CAD 发生和发展的关键部位。内皮细胞的凋亡、血管新生、自噬等表型可直接参与动脉粥样硬化发病^[11]。Hippo 信号通路可促进

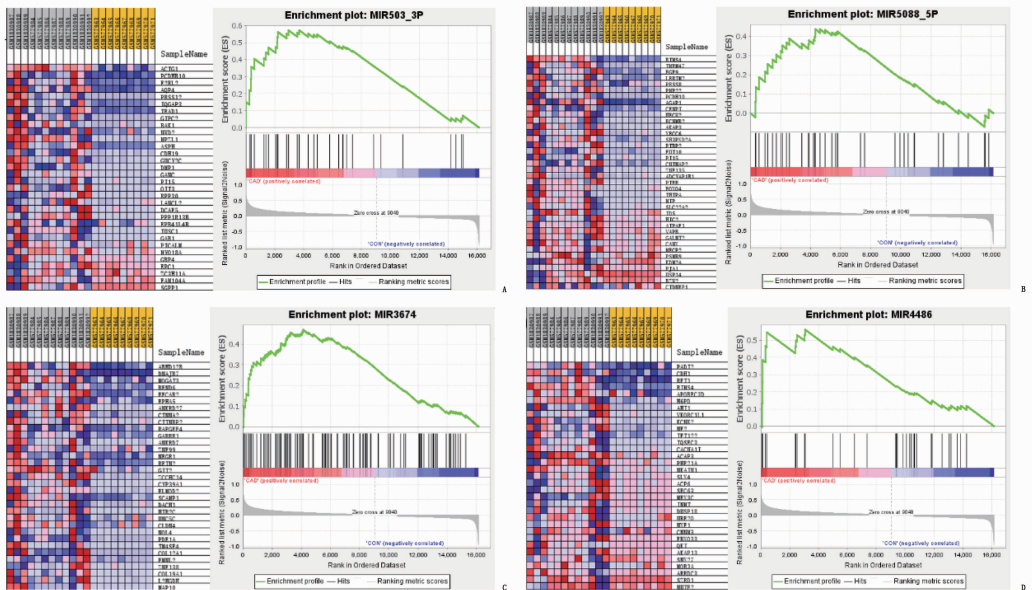
细胞死亡和分化,并抑制细胞增殖,也可响应细胞接触、机械传导等信号,参与动脉粥样硬化发病。YES 相关蛋白(YAP)和 PDZ 结合激活因子(TAZ)是内皮细胞功能调节的关键因子。研究^[12]证实,冠状动脉疾病相关的连接蛋白(JCAD)可负调节内皮细胞中的 Hippo 信号通路,介导 YAP/TAZ 活性以促进内皮功能障碍,参与动脉粥样硬化发病。

血管内皮细胞可以根据来自血流的机械传导力来辨识血流剖面的不同特征,并相应地调节血管生理和重塑,调整血管直径,在分叉、弯曲等区域,动脉血流方向会发生复杂的改变,使得这些部位容易形成动脉粥样硬化病变^[13]。ZHOU H 等^[14]应用超声粒子成像测速仪和流体力学测算等方法对 3 种狭窄程度的斑块模型进行了血流动力学切应力分析,结果表明,管腔狭窄程度对流体剪切力的分布有显著影响,斑块剪切力较强的部



A: CAD 上调 DEGs; B: CAD 下调 DEGs。

图 2 CAD 的 DEGs 信号通路富集分析



A: miR-503-3p; B: miR-3674; C: miR-5088-5p; D: miR-4486。

图 3 CAD 的 DEGs 相关的 miRNA 及热图

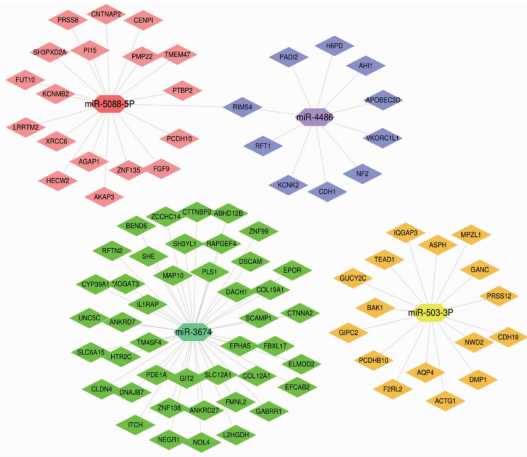


图 4 miRNA 调控 CAD 的 DEGs 的网络

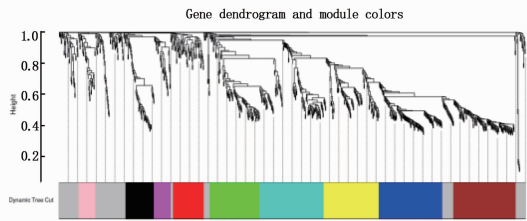


图 5 CAD 的 DEGs 模块聚类图

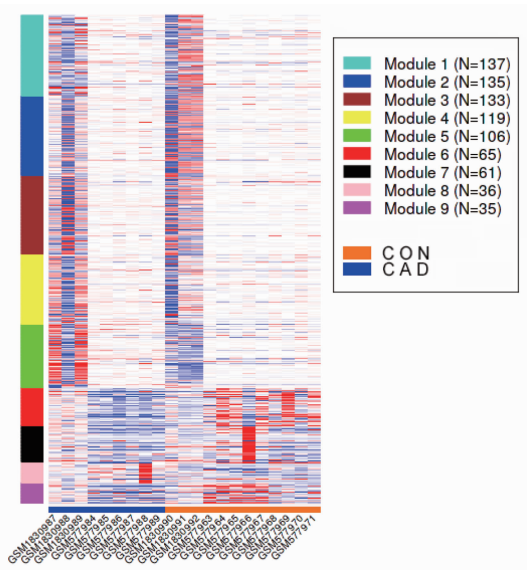


图 6 模块基因表达热图

位与斑块破裂好发部位相同,提示流体剪切力可影响动脉粥样硬化斑块的稳定性。

AMPK 是细胞能量代谢调节的关键激酶,可通过活化 AMPK、抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 1(mTORC1)、激活 ATG1 蛋白/ULK1/2 激酶复合体的途径启动自噬,广泛参与机体自噬调节过程。研究^[15]显示,丹皮酚可通过调控 AMPK/mTOR 信号通路而上调自噬反应,抑制血管平滑肌细胞增殖,发挥抗动脉粥样硬化作用。除自噬外,AMPK 还参与炎症反应。研究^[16]显示,苯溴马

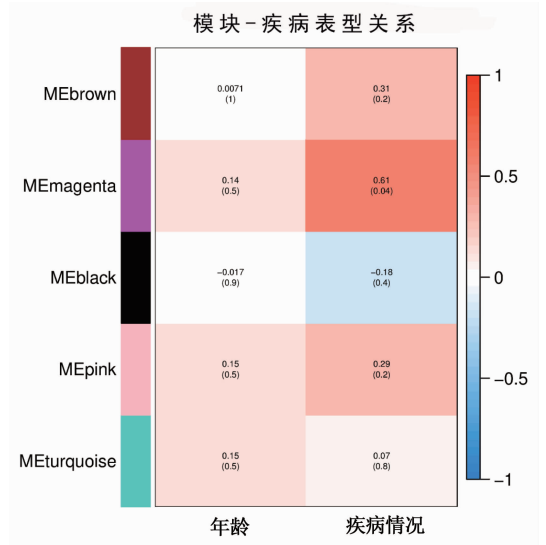


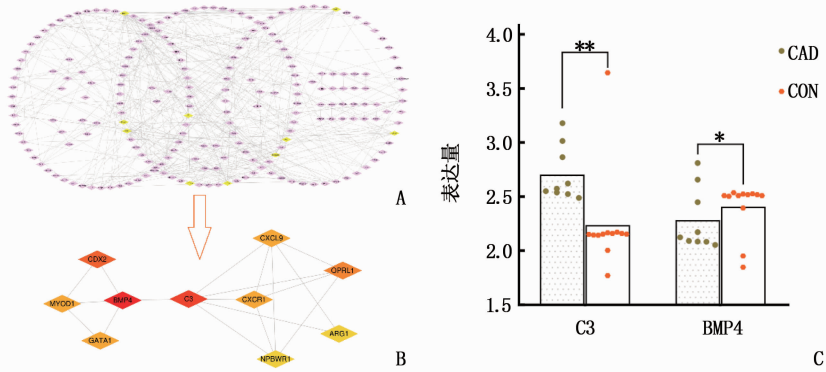
图 7 模块与疾病表型相关热图

隆可调控 AMPK/mTOR 信号通路,降低体内尿酸水平,减少人血浆中 IL-18 的表达水平,抑制炎症反应,发挥抗动脉粥样硬化作用。

Wnt5a 是 Wnt 家族的一种分泌型糖蛋白。研究^[17]表明,动脉粥样硬化患者循环 Wnt5a 水平高于健康对照组。泡沫细胞是动脉粥样硬化斑块形成的关键因素之一。研究^[18]表明,Wnt5a 在晚期动脉粥样硬化病变中显著表达,诱导脂质摄取受体白细胞分化抗原 36(CD36)的表达,加速了巨噬细胞中脂质的积累和泡沫细胞的形成,参与动脉粥样硬化发病。

研究^[19]表明,NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)炎症小体与硫氧还蛋白-1 协同作用可诱导糖尿病 ApoE 基因敲除小鼠模型血浆脂质和 IL-1 β 表达升高,加速动脉粥样硬化进程。研究^[20]发现,低密度脂蛋白受体和 NOD1/2 双基因敲除小鼠肠道胆固醇及其细菌降解产物粪甾醇升高,动脉粥样硬化斑块脂质沉积和炎症细胞浸润减少,动脉粥样硬化病变程度较轻,提示 NOD 信号通路可通过调节脂质代谢途径参与动脉粥样硬化发病。

IL-17 是由辅助性 T 细胞 17 产生的。DANZAKI K 等^[21]研究发现,IL-17 可以诱导血管平滑肌细胞表达 IL-6、重组人白介素 8(CXCL8)和重组人白介素 10(CXCL10)等促炎因子,参与动脉粥样硬化的发病。研究^[22]证实,IL-17A 可通过抑制血管内皮黏附分子-1 的表达发挥稳定小鼠动脉粥样硬化斑块的作用。此外,IL-17 可以刺激血管平滑肌细胞合成胶原,较高水平的 IL-17 可以稳定颈动脉斑块^[23]。



A: 洋红色模块基因 PPI 网络图; B: 经 cytoHubba 拓扑分析, 以网络节点度值为参考, 筛选出前 10 位的靶点, 颜色越深代表处于网络中的核心地位, 其中 *BMP4* 和 *C3* 为网络中的核心靶点; C: 验证数据集中 *C3* 和 *BMP4* 的表达情况, 与健康对照者 (CON) 相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

图 8 洋红色模块相关基因 PPI 网络及核心靶点图

在动脉粥样硬化的发生发展过程中, miRNA 参与调节炎症反应、血管生成、发育和脂质代谢等诸多生物学过程, 而 miR-145 是动脉粥样硬化相关的 miRNA, 肿瘤坏死因子 α 通过下调血管平滑肌细胞中 TET 甲基胞嘧啶双加氧酶 2 (TET2) 的表达来抑制 miR-145 的表达, 导致 CD137/NFATc1 信号的激活, 并加剧小鼠的动脉粥样硬化斑块形成。研究^[24]发现, 在低密度脂蛋白受体基因敲除小鼠中, miR145 水平降低可以减小动脉粥样硬化斑块的面积。在动脉粥样硬化的发展过程中, miR-223 可以调节血管平滑肌细胞和内皮细胞的脂质堆积^[25-26]。此外, miRNA 还可参与泡沫细胞形成、血管平滑肌细胞迁移等过程^[27]。本研究采用 GSEA 分析发现, miR-503-3p、miR-3674、miR-5088-5p、miR-4486 与 CAD 发病关系密切。

骨形态发生蛋白 (BMP) 与血管的生长发育关系密切。研究^[28]报道, BMP-2、BMP-4、BMP-6 和 BMP-7 可诱导血管生成、内皮细胞增殖和迁移。BMP4 与动脉粥样硬化的相关性尚未完全明确。研究^[29]表明, BMP4 及其受体 BMPR2 在晚期冠状动脉粥样硬化患者中的表达减少, 在动物模型中对动脉粥样硬化具有保护作用。研究^[30]发现, 2 型糖尿病患者血清 BMP-4 水平与收缩压、甘油三酯、游离脂肪酸水平以及颈动脉内膜中层厚度呈负相关。本研究中, 与健康对照者相比, CAD 患者 BMP4 表达显著降低, 与上述研究结果相似。研究^[31]还证实, 缺氧时内皮细胞可表达 BMP4, 并促进血管平滑肌细胞增殖, 这表明 BMP 对血管平滑肌细胞的影响取决于组织和微环境, 其与 CAD 的相关性有待进一步确认。

补体系统是人类抵御病原体的复杂蛋白质网络。补体 C3 主要由巨噬细胞和肝脏合成, 是心血管疾病的危险因素。补体 C3a 与颈动脉内膜中层厚度呈正相关, C3、C3a 与冠状动脉疾病密切相关^[32]。研究^[33]表明, 在 ApoE 基因敲除小鼠模型中, C3、C4 与外膜中的胶原蛋白和弹性纤维均广泛结合, 血管周围脂肪组织中也存在 C3、C4, 表明补体 C3、C4 可通过共价硫酯键与外膜中的胶原蛋白和弹性蛋白纤维结合, 导致血管僵硬, 参与动脉粥样硬化。本研究中, 与健康对照者相比, CAD 患者 C3 表达显著升高, 与上述结果相似。

综上所述, CAD 发病过程中基因表达存在显著差异, 其病理过程与 Hippo、流体剪切力与动脉粥样硬化、AMPK、Wnt、NOD 样受体和 IL-17 等信号通路相关。CAD 病理过程可能受到 miR-503-3p、miR-3674、miR-5088-5p、miR-4486 等 miRNA 调控, BMP4 和 C3 可能是 CAD 发病的关键基因。

参考文献

- [1] KHERA A V, KATHIRESAN S. Genetics of coronary artery disease: discovery, biology and clinical translation [J]. Nat Rev Genet, 2017, 18(6): 331-344.
- [2] 邱敏, 徐少华, 姜海, 等. 冠状动脉慢血流患者脂蛋白相关磷脂酶 A2 及超敏 C 反应蛋白的变化 [J]. 实用临床医药杂志, 2019, 23(10): 29-32.
- [3] 徐宝, 袁帅, 何胜虎. 残粒脂蛋白胆固醇与冠状动脉粥样硬化的相关性研究进展 [J]. 实用临床医药杂志, 2019, 23(9): 129-132.
- [4] BRAUN M M, STEVENS W A, BARSTOW C H. Stable coronary artery disease: treatment [J]. Am Fam Physician, 2018, 97(6): 376-384.
- [5] TUNG Y C, SEE L C, CHANG S H, et al. Impact of bleeding

- during dual antiplatelet therapy in patients with coronary artery disease[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 21345.
- [6] 刘亚文, 张红燕, 阳灵燕. 共词分析国内外生物信息学领域研究态势[J]. *生物信息学*, 2020, 18(3): 186-194.
- [7] CLOUGH E, BARRETT T. The gene expression omnibus database[J]. *Methods Mol Biol Clifton N J*, 2016, 1418: 93-110.
- [8] SUBRAMANIAN A, TAMAYO P, MOOTHA V K, *et al*. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles [J]. *PNAS*, 2005, 102(43): 15545-15550.
- [9] GE S X, SON E W, YAO R N. iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data[J]. *BMC Bioinformatics*, 2018, 19(1): 534.
- [10] CHIN C H, CHEN S H, WU H H, *et al*. cytoHubba; identifying hub objects and sub-networks from complex interactome[J]. *BMC Syst Biol*, 2014, 8(Suppl 4): S11.
- [11] GUPTA R M. Hippo pathway looms large for the function of the JCAD (junctional protein associated with coronary artery disease) on endothelial cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(11): 2546-2547.
- [12] JONES P D, KAISER M A, GHADERI NAJAFABADI M, *et al*. JCAD, a gene at the 10p11 coronary artery disease locus, regulates hippo signaling in endothelial cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(8): 1711-1722.
- [13] BAEYENS N, BANDYOPADHYAY C, COON B G, *et al*. Endothelial fluid shear stress sensing in vascular health and disease [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(3): 821-828.
- [14] ZHOU H, MENG L, ZHOU W, *et al*. Computational and experimental assessment of influences of hemodynamic shear stress on carotid plaque[J]. *Biomed Eng Online*, 2017, 16(1): 92.
- [15] WU H F, SONG A W, HU W J, *et al*. The anti-atherosclerotic effect of paeonol against vascular smooth muscle cell proliferation by up-regulation of autophagy via the AMPK/mTOR signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 948.
- [16] KIMURA Y, YANAGIDA T, ONDA A, *et al*. Soluble uric acid promotes atherosclerosis via AMPK (AMP-activated protein kinase)-mediated inflammation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(3): 570-582.
- [17] YE Z J, GO G W, SINGH R, *et al*. LRP6 protein regulates low density lipoprotein (LDL) receptor-mediated LDL uptake[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(2): 1335-1344.
- [18] ACKERS I, SZYMANSKI C, DUCKETT K J, *et al*. Blocking Wnt5a signaling decreases CD36 expression and foam cell formation in atherosclerosis[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2018, 34: 1-8.
- [19] TANG G, DUAN F Q, LI W X, *et al*. Metformin inhibited Nod-like receptor protein 3 inflammasomes activation and suppressed diabetes-accelerated atherosclerosis in apoE^{-/-} mice[J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2019, 119: 109410.
- [20] VLACIL A K, SCHUETT J, RUPPERT V, *et al*. Deficiency of Nucleotide-binding oligomerization domain-containing proteins (NOD) 1 and 2 reduces atherosclerosis[J]. *Basic Res Cardiol*, 2020, 115(4): 47.
- [21] DANZAKI K, MATSUI Y, IKESUE M, *et al*. Interleukin-17A deficiency accelerates unstable atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(2): 273-280.
- [22] GISTERÅ A, ROBERTSON A K, ANDERSSON J, *et al*. Transforming growth factor- β signaling in T cells promotes stabilization of atherosclerotic plaques through an interleukin-17-dependent pathway [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(196): 196ra100.
- [23] ZHONG W, LI B, XU Y, *et al*. Hypermethylation of the micro-RNA 145 promoter is the key regulator for NLRP3 inflammasome-induced activation and plaque formation [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2018, 3(5): 604-624.
- [24] SALA F, ARANDA J F, ROTILLAN N, *et al*. MiR-143/145 deficiency attenuates the progression of atherosclerosis in Ldlr^{-/-} mice[J]. *Thromb Haemost*, 2014, 112(4): 796-802.
- [25] ZHANG Y, LIU X, BAI X, *et al*. Melatonin prevents endothelial cell pyroptosis via regulation of long noncoding RNA MEG3/miR-223/NLRP3 axis [J]. *J Pineal Res*, 2018, 64(2): 12449.
- [26] WU W B, SHAN Z, WANG R, *et al*. Overexpression of miR-223 inhibits foam cell formation by inducing autophagy in vascular smooth muscle cells [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(7): 4326-4336.
- [27] TAO J, XIA L Z, CAI Z M, *et al*. Interaction between microRNA and DNA methylation in atherosclerosis [J]. *DNA Cell Biol*, 2021, 40(1): 101-115.
- [28] DAVID L, FEIGE J J, BAILLY S. Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2009, 20(3): 203-212.
- [29] KIM C W, SONG H, KUMAR S, *et al*. Anti-inflammatory and antiatherogenic role of BMP receptor II in endothelial cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(6): 1350-1359.
- [30] SON J W, JANG E H, KIM M K, *et al*. Serum BMP-4 levels in relation to arterial stiffness and carotid atherosclerosis in patients with Type 2 diabetes [J]. *Biomark Med*, 2011, 5(6): 827-835.
- [31] FRANK D, JOHNSON J, DE CAESTECKER M. Bone morphogenetic protein 4 promotes vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension [J]. *Chest*, 2005, 128(6 Suppl): 590S-591S.
- [32] HERTLE E, VAN GREEVENBROEK M M, ARTS I C, *et al*. Distinct associations of complement C3a and its precursor C3 with atherosclerosis and cardiovascular disease. The CODAM study[J]. *Thromb Haemost*, 2014, 111(6): 1102-1111.
- [33] SHIELDS K J, STOLZ D, WATKINS S C, *et al*. Complement proteins C3 and C4 bind to collagen and elastin in the vascular wall: a potential role in vascular stiffness and atherosclerosis [J]. *Clin Transl Sci*, 2011, 4(3): 146-152.