

CTLA-4Ig 融合蛋白对 ApoE 基因缺陷小鼠动脉粥样硬化的抑制作用

陈洁¹, 李玉杰¹, 郑东诞², 熊艳¹, 李欣¹, 廖晓星¹
(中山大学附属第一医院 1. 急诊科; 2. 心内科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨 CTLA-4Ig 融合蛋白对高脂饮食饲养的载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠(ApoE^{-/-})动脉粥样硬化病变的抑制作用。【方法】25 只 10 周龄 ApoE^{-/-}小鼠, 高脂饮食饲养 4 周后, 随机取 5 只验证 AS 病变(对照组); 剩余 20 只随机分为 4 组(每组 5 只), 继续高脂饮食饲养, 分别采用 CTLA-4Ig、PBS、IgG1 腹腔注射, 第 4 组不予处理; 8 周后取小鼠主动脉进行病理学检查, 检测 AS 相关指标, 包括斑块面积/管腔面积比、血管内膜/中膜厚度比, 斑块内脂质、胶原和平滑肌细胞含量。【结果】高脂饮食饲养 4 周后, 出现明显 AS 病变。继续高脂饮食饲养 8 周, 形成典型 AS 斑块, CTLA-4Ig 组、PBS 组、IgG1 组和空白组的斑块面积/管腔面积比分别为 0.27 ± 0.08 、 0.40 ± 0.08 、 0.43 ± 0.08 和 0.46 ± 0.10 , 较 4 周时(0.05 ± 0.01)明显增加($P < 0.05$), 4 组的血管内膜/中膜厚度比分别为 2.6 ± 0.6 、 6.0 ± 0.9 、 5.7 ± 0.8 和 5.9 ± 0.6 , 高于对照组(0.5 ± 0.1 , $P < 0.05$), 4 组斑块内脂质含量(%)分别为 26.0 ± 3.0 、 40.8 ± 5.7 、 40.6 ± 3.0 和 43.2 ± 5.7 较 4 周时明显增加(7.2 ± 1.4 , $P < 0.05$)。采用 CTLA-4Ig 进行干预后, 其斑块面积/管腔面积比、血管内膜/中膜厚度比和斑块内脂质含量显著低于 PBS、IgG1 和空白处理组($P < 0.05$), 而后 3 组间上述指标的差异无统计学意义($P > 0.05$); CTLA-4Ig 组斑块内胶原含量(16.0 ± 1.1)% 高于其他 3 组 [$(8.6 \pm 1.2)\%$ 、 $(9.2 \pm 1.5)\%$ 和 $(9.0 \pm 1.3)\%$, $P < 0.05$], 其斑块内平滑肌细胞含量 (11.8 ± 1.0)% 明显高于其他 3 组 [$(7.8 \pm 0.8)\%$ 、 $(7.5 \pm 0.9)\%$ 和 $(7.3 \pm 0.7)\%$, $P < 0.05$], 另外 3 组间上述指标的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。【结论】CTLA-4Ig 融合蛋白能够抑制高脂饮食饲养的 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化进程, 其增加斑块内血管平滑肌细胞生成胶原作用有助增加 AS 斑块的稳定性。

关键词: 动脉粥样硬化; B7/CD28; CTLA-4; CTLA-4Ig; 载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠

中图分类号: R541.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2009)04-0395-05

Inhibitory Effect of CTLA-4Ig Fusion Protein on Atherosclerosis in ApoE^{-/-} Mice

CHEN Jie¹, LI Yu-jie¹, ZHENG Dong-dan², XIONG Yan¹, LI Xin¹, LIAO Xiao-xing¹

(1. Department of Emergency; 2. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the inhibitory effect of CTLA-4Ig fusion protein on atherosclerosis in the mice with an apolipoprotein-E gene defect fed on cholesterol diet. 【Methods】Twenty-five male 10-week-old ApoE^{-/-} mice were selected and fed on cholesterol diet for 4 weeks, 5 out of which were executed at random as control group and their pathological sections were kept to observe the early fatty streaks. The other 20, divided into CTLA-4Ig treatment group, PBS group, IgG1 group, and blank group at random, 5 in each. Three groups were given intraperitoneal injection of CTLA-4Ig (10 μ g per time), PBS (100 μ L per time), Rat-IgG1 (10 μ g per time) respectively, twice a week, for 8 weeks. The blank group has no treatment. Followed by 8-week treatment, the whole aorta from the root to crotch of iliac artery was separated after anesthesia with the intraperitoneal injection of 1% pentobarbital. Subsequently, the area ratio of plaque and lumen, the thickness ratio of endangium and tunica media, the lipid-soaking extent intra-plaque and the content of collagen fibrils and smooth muscle cells intra-plaque were analyzed by image-processing soft. 【Results】After fed on cholesterol diet for 4 weeks, there were obviously atherosclerosis in the aorta in the ApoE^{-/-} mice. There were typical atherosclerotic plaque in ApoE^{-/-} mice fed on cholesterol diet after another 8 weeks. The

收稿日期: 2008-12-30

基金项目: 广东省自然科学基金(07001655); 广东省科技计划项目(2006B36007003)

作者简介: 陈洁, 硕士生, 现工作单位: 东莞市人民医院 ICU; * 通讯作者: 李玉杰, 副教授, 硕士生导师, E-mail: yujieli@163.com

area ratios of plaque and lumen in CTLA-4Ig group, PBS group, IgG1 group, and blank group were 0.27 ± 0.08 , 0.40 ± 0.08 , 0.43 ± 0.08 , and 0.46 ± 0.10 , and obviously increased than those in control group (0.05 ± 0.01 , $P < 0.05$). The thickness ratios of endangium and tunica media in four groups were 2.6 ± 0.6 , 6.0 ± 0.9 , 5.7 ± 0.8 , and 5.9 ± 0.6 and obviously increased than those in control group (0.5 ± 0.1 , $P < 0.05$). The lipid-soaking extent intra-plaque in experimental groups were 26.0 ± 3.0 , 40.8 ± 5.7 , 40.6 ± 3.0 , and 43.2 ± 5.7 , and were obviously increased than those in control group (7.2 ± 1.4 , $P < 0.05$). It was found that the area ratio of plaque and lumen, the thickness ratio of endangium and tunica media, and the lipid-soaking extent intra-plaque in CTLA-4Ig group were significantly lower than those in PBS group, IgG1 group, and blank group ($P < 0.05$), but there was no significant difference in those between the PBS group, IgG1 group, and blank group ($P > 0.05$). The content of collagen fibrils in CTLA-4Ig group were 16.0 ± 1.1 and higher than those in PBS group, IgG1 group, and blank group (8.6 ± 1.2 , 9.2 ± 1.5 , and 9.0 ± 1.3 , $P < 0.05$). The content of smooth muscle cells in plaque in CTLA-4Ig group were 11.8 ± 1.0 and higher than those in PBS group, IgG1 group, and blank group (7.8 ± 0.8 , 7.5 ± 0.9 , and 7.3 ± 0.7 , $P < 0.05$). There was no significant difference in content of collagen fibrils and smooth muscle cells between the PBS group, IgG1 group, and blank group (all $P > 0.05$). 【Conclusion】 CTLA-4Ig fusion protein could evidently inhibit the atherosclerosis progression and enhance the stability of plaque through increasing the content of collagen fibrils produced by smooth muscle cells intra-plaque in ApoE^{-/-} mice fed on cholesterol diet.

Key words: atherosclerosis; B7/CD28; CTLA-4; CTLA-4Ig; ApoE^{-/-} mice

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(4):395-399;417]

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症性疾病^[1],属于机体对损伤的一种反应。AS 斑块内有大量巨噬细胞、T 淋巴细胞等免疫细胞的浸润与激活,各种抗原、免疫细胞启动血管壁的炎症免疫反应,最终诱发 AS 斑块的形成,炎症免疫反应在 AS 的发生、发展到最后斑块破裂并发血栓形成的所有阶段均发挥着作用^[2-4]。共刺激分子如 B7/CD28;CTLA-4、CD40/CD40L 等,是 T 淋巴细胞活化的重要分子,其所传递的第二信号是 T 淋巴细胞激活的关键环节^[5]。研究证实 B7/CD28 在 AS 发生发展过程中具有重要促进作用^[6-9]。目前,B7/CD28;CTLA-4 已成为免疫干预的一个靶点,其特异性阻断剂 CTLA-4Ig 已成功应用于多种疾病的防治^[10-11],但尚未见 CTLA-4Ig 应用于 AS 防治的报道。本实验以高脂饮食饲养的 ApoE^{-/-}小鼠为对象,首次采用 CTLA-4Ig 干预其动脉粥样硬化的进程,探讨通过阻断 B7/CD28 途径阻抑 AS 的可能性。

1 材料和方法

1.1 实验动物和饲料

25 只健康雄性 ApoE^{-/-}小鼠,10 周龄,体质量(17 ± 1) g,购自北京大学医学部实验动物中心[合格证号:SCXK(京)21060008]。

高脂饲料(0.15%胆固醇,25%猪油,5%糖,69.85%基础饲料)购自广东省医学实验动物中心。

1.2 主要实验试剂及仪器

rmCTLA-4/Fc Chimera(R&D systems),rmIgG1 Fc(R&D systems),PBS(广州展晨生物科技有限公司);Actin,Smooth Muscle(Thermo scientific),二抗(KPL),DAB 显色试剂盒(Gene Tech Biotechnology Company),100 mL/L 胎牛血清(TBD)。

石蜡切片机(Leica 公司),脱水机(SHANDON),包埋机(Tissue-Tek, SAKURA 公司),封片机(MEISEI 公司),恒温干燥箱(上海迅能电热设备有限公司),冰冻切片机(美国 Lambert 公司),图象分析系统(Image Pro Plus 5.0,美国 Macro media 公司),相差显微镜及照相系统(日本 Olympus 公司)。

1.3 动脉粥样硬化模型的建立

10 周龄健康雄性 ApoE^{-/-}小鼠 25 只,高脂适应性喂养,4 周时随机处死 5 只(对照组)观察主动脉病变情况,见到明显早期脂质条纹后,将余下 20 只小鼠按体质量编号后,按随机数字表分为 CTLA-4Ig 组、PBS 组、IgG1 组、空白组,每组各 5 只。将实验小鼠在中山大学公共卫生学院 SPF 级动物实验中心,按组别在层流架中分笼高脂饲料喂养,自由摄食及饮水,室内温度控制在 24℃ 左右。3 组分别给予 CTLA-4Ig(用 PBS 溶解,质量浓度 0.1 g/L,10 μg/次)、PBS(100 μL/次)、Rat-IgG1(用 PBS 溶解,质量浓度 0.1 g/L,10 μg/次)腹腔注射,2 次/周,共 8 周;空白组无干预。8 周实验过程中,实验动物生长良好,无死亡情况。

1.4 血管病变观察及指标检测

8周后,用10 g/L戊巴比妥腹腔注射麻醉,将小鼠固定于解剖板上,打开胸腔、腹腔,分离主动脉根部至髂动脉分叉处全长主动脉,用眼科镊分离周围脂肪组织及结缔组织,将主动脉切成3~4 mm的动脉段。取2段立即放入液氮中,新鲜组织冰冻切片,每隔10 μm 制作1张10 μm 的切片,每张玻片上放4片组织,每只小鼠制作5张切片,后行苏丹Ⅲ染色;所余动脉段放入40 g/L多聚甲醛中固定过夜后,常规脱水石蜡包埋后连续切片,切片厚度6 μm ,每张玻片放4片组织,每个标本留取30张切片,每间隔5张切片取1张行HE染色;剩余切片依次做masson染色及 α -actin免疫组织化学染色。

采用Image-Pro Plus图象分析系统,按照说明进行操作,分别检测以下指标,包括脂质在AS斑块中的含量、AS斑块面积及主动脉管腔面积(斑块面积/管腔面积比)、血管内膜与中膜厚度比、斑块内胶原纤维的含量、斑块内平滑肌细胞的含量。

1.5 数据处理和统计

全部数据以均数 $\pm$ 标准差表示,各组数据比较用单因素方差分析(ANOVA),不满足方差齐性者用Welch检验。使用SPSS 10.0统计学软件进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 实验期间小鼠体质量和进食量

实验开始时,4组小鼠每组的平均体质量是(20 $\pm$ 1)g;实验8周后,各组小鼠的平均体质量为25~27 g,不同实验组小鼠体质量差异不具统计

学意义($P > 0.05$)。

在实验期间,CTLA-4Ig组进食量为(2.70 $\pm$ 0.19)g/d,PBS组进食量为(2.64 $\pm$ 0.26)g/d,IgG1组小鼠进食量为(2.58 $\pm$ 0.31)g/d,空白组小鼠进食量为(2.68 $\pm$ 0.21)g/d。4组小鼠的日平均进食量差异不具统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 动脉粥样硬化情况

高脂饮食饲养4周后出现明显脂质条纹性改变(图1);继续高脂饮食饲养8周后,形成明显AS斑块,但CTLA-4Ig组最轻(图2)。

2.3 AS病变的形态学指标

5组间斑块面积/管腔面积比差异有统计学意义($P = 0.001$)。CTLA-4Ig组、PBS组、IgG1组及空白组斑块面积/管腔面积比显著高于对照组($P < 0.05$),但CTLA-4Ig组比值明显低于PBS组、IgG1组及空白组($P < 0.05$),而后3组间比值差异不具统计学意义。

5组间血管内膜/中膜厚度比差异有统计学意义($P = 0.02$)。CTLA-4Ig组、PBS组、IgG1组及空白组内膜/中膜厚度比显著高于对照组($P < 0.05$),但CTLA-4Ig组比值明显低于PBS组、IgG1组及空

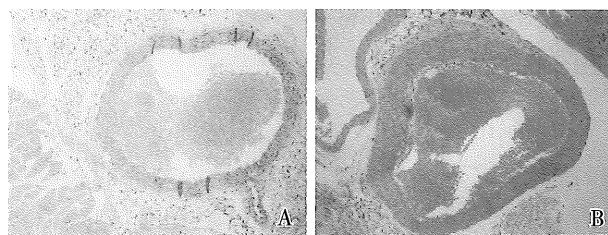


图1 高脂饮食引起的动脉粥样硬化

Fig.1 The atherosclerosis in apoE(-/-) mice fed on cholesterol diet.

A: 10 weeks; B: 14 weeks; $\times 100$

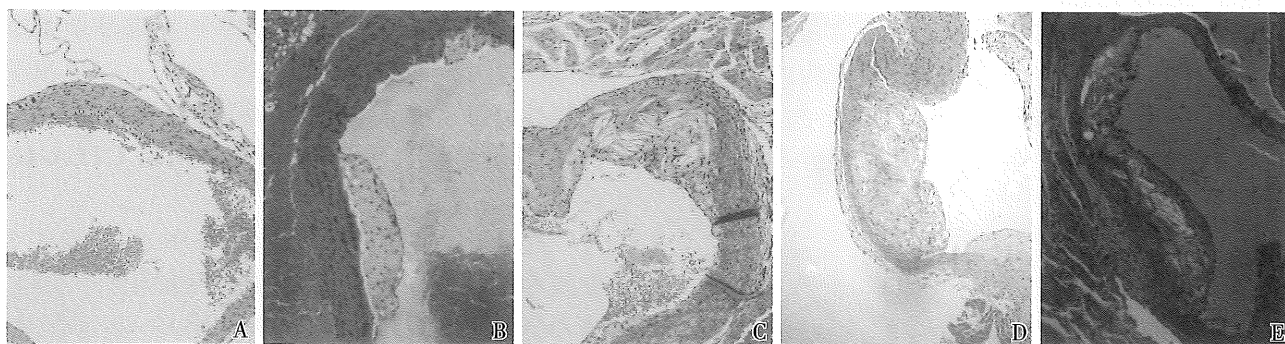


图2 CTLA-4Ig对动脉粥样硬化的抑制作用

Fig.2 The inhibitory effect of CTLA-4Ig on atherosclerosis in apoE(-/-) mice

A: Control group; B: CTLA-4Ig group; C: PBS group; D: IgG1 group; E: Blank group; HE $\times 200$

白组 ($P < 0.05$), 后 3 组间差异不具统计学意义 (表 1)。

表 1 小鼠动脉粥样硬化的形态学指标结果

Table 1 Results of atherosclerosis in morphology in ApoE^{-/-} mice

Group	n	The area ratio of plaque and lumen	The thickness ratio of endangium and tunica media
Control	5	0.05 ± 0.01	0.5 ± 0.1
CTLA-4Ig	5	0.27 ± 0.08 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	2.6 ± 0.6 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾
PBS	5	0.40 ± 0.08 ¹⁾	6.0 ± 0.9 ¹⁾
IgG1	5	0.43 ± 0.08 ¹⁾	5.7 ± 0.8 ¹⁾
Blank	5	0.46 ± 0.10 ¹⁾	5.9 ± 0.6 ¹⁾

1) compared with control group, $P < 0.05$; 2) compared with PBS group, $P < 0.05$; 3) compared with IgG1 group, $P < 0.05$; 4) compared with blank group, $P < 0.05$

2.4 AS 病变的组织学指标

5 组间斑块内脂质含量差异有统计学意义 ($P = 0.001$)。CTLA-4Ig 组、PBS 组、IgG1 组及空白组斑块内脂质含量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 但 CTLA-4Ig 组脂质含量明显低于 PBS 组、IgG1 组及空白组 ($P < 0.05$), 而 PBS 组、IgG1 组及空白组间差异不具统计学意义。

对照组主动脉切片 (masson 染色) 镜下观察很少有胶原纤维表达; 实验组斑块内胶原含量差异有统计学意义 ($P = 0.02$), CTLA-4Ig 组斑块内胶原含量显著高于 PBS 组、IgG1 组及空白组 ($P < 0.05$), PBS 组、IgG1 组及空白组间差异不具统计学意义。

对照组主动脉切片免疫组织化学染色后镜下观察, 很少有平滑肌细胞表达, 有些甚至没有平滑肌表达; 实验组斑块内平滑肌细胞含量差异有统计学意义 ($P = 0.04$), CTLA-4Ig 组斑块内平滑肌细胞含量显著高于 PBS 组、IgG1 组及空白组 ($P < 0.05$)。PBS 组、IgG1 组及空白组间差异不具统计学意义 (表 2)。

3 讨 论

3.1 炎症及其调控在 AS 过程的作用

动脉粥样硬化病灶的形成和发展是一个连续的过程, 在内膜层巨噬细胞的吞噬及分泌作用之

表 2 小鼠动脉粥样硬化斑块内脂质、胶原和平滑肌细胞含量

Table 2 Results of the lipid-soaking extent intra-plaque and the content of collagen fibrils and smooth muscle cells in plaque in ApoE^{-/-} mice

Group	n	The lipid-soaking extent (%)	The content of collagen (%)	The content of smooth muscle cells (%)
Control	5	7.2 ± 1.4		
CTLA-4Ig	5	26.0 ± 3.0 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	16.0 ± 1.1 ²⁾³⁾⁴⁾	11.8 ± 1.0 ²⁾³⁾⁴⁾
PBS	5	40.8 ± 5.7 ¹⁾	8.6 ± 1.2	7.8 ± 0.8
IgG1	5	40.6 ± 3.0 ¹⁾	9.2 ± 1.5	7.5 ± 0.9
Blank	5	43.2 ± 5.7 ¹⁾	9.0 ± 1.3	7.3 ± 0.7

1) compared with control group, $P < 0.05$; 2) compared with PBS group, $P < 0.05$; 3) compared with IgG1 group, $P < 0.05$; 4) compared with blank group, $P < 0.05$

外, T 淋巴细胞具有更重要意义^[1,3,12-13]。T 细胞的激活需要 2 个刺激信号, 一是由抗原递呈细胞 (APC) 递呈的抗原信号; 二是共刺激信号, 由 APC 表面的共刺激分子与 T 细胞上的协同受体结合提供, 该途径活化与否及其程度决定着受到抗原刺激的 T 细胞是分化、增殖为效应细胞还是进入无应答状态, 其中 B7/CD28; CTLA-4 是最重要的共刺激途径^[5]。Afek 等^[6]研究成熟程度不同的 ApoE^{-/-} 小鼠, 证实动脉粥样硬化小鼠在 B 细胞上有更高的 CD80 (B7-1)、CD86 (B7-2) 表达, 不论成熟程度分级, CD80、CD86 都有斑块中存在的证据。Buono 等^[7]研究饲喂富含胆固醇食物的 B7-1/B7-2/LDLR 缺乏小鼠和 LDLR 缺乏的对照鼠后发现, CD80、CD86 能促进胆固醇引起的动脉粥样硬化与抗原特异性 T 细胞激活, CD80、CD86 缺乏可以引起 INF- γ 生成减少, 斑块内 SMC 及胶原增加, 纤维帽更不容易破裂。Russel 等^[14]发现早期阻断 CD28/B7 共刺激通路可以阻断 LEW to F334 鼠模型慢性心脏移植排斥反应的动脉粥样硬化的发展。

3.2 干预免疫过程防治 AS 的方法及 CTLA-4Ig 的作用

通过干预免疫过程来防治 AS 的途径, 现在主要集中在免疫疫苗、免疫调节剂和细胞因子、细胞表面分子阻断剂的研究。目前使用的一些药物, 如阿司匹林、他汀类、贝特类等也具有抑制炎症和免疫反应的作用, 从而对动脉粥样硬化起到抑制作用^[15]。

Schonbeck等^[16]用 ApoE^{-/-}小鼠为研究对象,发现阻断 CD40 信号通路,能够抑制 AS 的发生发展,并能增加斑块的稳定性。1991 年 Linsley 等^[10]利用分子生物学的方法,将人 CTLA-4 分子的胞外区与人 IgG1Fc 段的 CH2、CH3 及 γ 区的氨基酸相融合,构建了可溶性 CTLA-4Ig,可与人、大鼠、小鼠的 B7 分子结合,保留了与 B7 的高度亲和力,可竞争性抑制 CD28 与 B7 的结合,从而阻止共刺激信号的传递,使接受了第一信号的异体抗原反应性 T 细胞处于无反应状态,甚至凋亡,使来源于 T 细胞的细胞因子分泌减少,并可抑制 T 细胞依赖的抗体反应。目前,CTLA-4Ig 已经成功应用于器官移植(包括胰腺、小肠、肾脏、肝脏、心脏)以及系统性红斑狼疮性肾炎、肾小球基底膜肾炎、实验性自身免疫性脑脊髓膜炎、过敏性鼻炎等自身免疫性疾病小鼠模型中^[11],并已初步应用于临床,均证实 CTLA-4Ig 是一种具有广泛应用前景的新型免疫调节剂,但未见其应用于 AS 研究的报道。

3.3 CTLA-4Ig 对 ApoE^{-/-}小鼠 AS 的阻抑作用

本研究以高脂饮食饲养 ApoE^{-/-}小鼠,并首次应用 CTLA-4Ig 对其进行特异性干预。结果显示,与干预前的对照组相比,继续高脂饮食饲养 8 周后,实验组(CTLA-4Ig 组、PBS 组、IgG1 组及空白组)的内膜明显增厚,斑块隆起明显,脂质核心增大,中膜受压变薄;IPP 图象分析结果显示,4 组斑块面积/管腔面积比显著高于对照组 ($P < 0.05$),并且内膜/中膜厚度比也高于对照组 ($P < 0.05$),差异有统计学意义,提示 4 组病变均较前有所进展;但 CTLA-4Ig 组病变斑块面积/管腔面积比显著低于 PBS 组、IgG1 组及空白组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且 PBS 组、IgG1 组及空白组间的斑块面积/管腔面积比差异无统计学意义;同时,CTLA-4Ig 组血管内膜/中膜厚度比显著小于 PBS 组、IgG1 组及空白组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而 PBS 组、IgG1 组及空白组间的血管内膜/中膜厚度比差异无统计学意义。上述结果提示,与 PBS 组、IgG1 组及空白组相比,CTLA-4 组动脉粥样硬化病变进展相对缓慢,说明 CTLA-4Ig 可以抑制斑块面积的增加、延缓动脉粥样硬化的进展,具有抗动脉粥样硬化的作用。

本实验发现,与 PBS 组、IgG1 组及空白组相比,CTLA-4Ig 组动脉粥样硬化斑块内脂质含量降低、胶原及平滑肌细胞含量增高,差异均有统计学

意义 ($P < 0.05$),而 PBS 组、IgG1 组及空白组间上述指标无明显差异,说明 CTLA-4Ig 融合蛋白腹腔注射可以减少 AS 斑块内脂质含量、增加 AS 斑块内胶原含量,从而增加 AS 斑块的稳定性,有助于减少斑块破裂性并发症的发生。

3.4 进一步研究

本实验采用 ApoE^{-/-}小鼠为研究对象,应用 CTLA-4Ig 融合蛋白腹腔注射,通过病理学观察证明 CTLA-4Ig 融合蛋白可以阻抑小鼠 AS 病变的进程、增加斑块的稳定性,其可能机制包括 CTLA-4Ig 对 B7/CD28 的特异性阻断、及通过上调调节性 T 细胞功能等^[7],抑制效应性 T 细胞的作用,产生抗 AS 作用;其具体环节包括促进 Th2 极化、影响细胞因子作用、抑制单核/巨噬细胞及平滑肌细胞迁移和转化等,有待进一步研究。本研究结果为动脉粥样硬化性疾病的免疫治疗提供了初步的实验依据。

参考文献:

- [1] Ross R. Atherosclerosis — an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115–126.
 - [2] Hansson GK. Immune Mechanisms in Atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(12): 1876–1890.
 - [3] Libby P. Inflammation in Atherosclerosis [J]. *Nature*, 2002, 420(6917): 868–874.
 - [4] Greaves DR, Channon KM. Inflammation and Immune responses in atherosclerosis [J]. *Trends Immunol*, 2002, 23(11): 535–541.
 - [5] McAdam AJ, Schwesitzer AN, Sharpe AH. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells [J]. *Immunol Rev*, 1998, 165: 231–247.
 - [6] Afek A, Harats D, Roth A, et al. Evidence for the involvement of T cell costimulation through the B-7/CD28 pathway in atherosclerotic plaques from apolipoprotein E knockout mice [J]. *Exp Mol Pathol*, 2004, 76(3): 219–223.
 - [7] Buono C, Pang H, Uchida Y, et al. B7-1/B7-2 costimulation regulates plaque antigen-specific T-cell responses and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice [J]. *Circulation*, 2004, 109(16): 2009–2015.
 - [8] Buono C, Lichtman AH. Co-stimulation and plaque-
- (下转第 417 页 to page 417)