

*klf2a*对斑马鱼动脉粥样硬化影响的初步探究

唐丹丹 李慧聪 张瑞霖*

(武汉大学基础医学院, 武汉 430071)

摘要 动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是许多严重危害人类生命健康的心血管疾病的共同病理学基础,由多因素共同作用引起,发病机制复杂,目前尚未被完全阐明。血流动力与AS发生发展的关系越来越受到人们的关注,而KLF2是传导血流动力变化的关键机械敏感因子。该研究利用脂质代谢研究中的新型模式生物斑马鱼,探究同源基因*klf2a*对AS的影响。首先通过高胆固醇饮食喂养建立斑马鱼AS模型,接下来比较野生型和*klf2a*^{-/-}突变体斑马鱼中总胆固醇、甘油三酯水平以及油红O染色结果,发现*klf2a*缺失加剧了AS的严重程度。另外该研究还检测了氧化应激、炎症因子和Notch受体表达水平,结果表明*klf2a*^{-/-}斑马鱼可能通过调控Notch信号通路和加剧炎症因子表达,从而使AS加重。该研究为进一步探究Klf2a影响AS的可能机制奠定了良好的基础。

关键词 动脉粥样硬化; 斑马鱼; *klf2a*; 炎症因子; Notch信号通路

A Preliminary Study on the Role of *klf2a* in Atherosclerosis

TANG Dandan, LI Huicong, ZHANG Ruilin*

(School of Basic Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract AS (atherosclerosis) is the common pathological basis of many cardiovascular diseases that seriously endanger human life. The pathogenesis of AS is complex and has not yet been fully elucidated. Recently, the relationship between hemodynamics and the development of AS has attracted researchers' attention. Since KLF2 is a key mechanosensitive factor that transmits hemodynamic changes, in this study the role of homologue gene *klf2a* in AS is explored using zebrafish, a new excellent animal model for lipid and metabolic research. A zebrafish AS model was first established by feeding a HCD (high cholesterol diet). Next the total cholesterol level, total triglyceride level, and Oil red O staining in wild-type and *klf2a*^{-/-} mutant zebrafish were compared, which revealed that *klf2a* deficiency exacerbated the severity of AS. The levels of oxidative stress, inflammatory factor expression and Notch receptor expression were also examined, and the results indicated that *klf2a*^{-/-} mutant zebrafish might aggravate AS by regulating Notch signaling pathway and inflammatory factor expression. This study lays a good foundation for further exploring the mechanism how Klf2a affects AS.

Keywords atherosclerosis; zebrafish; *klf2a*; inflammatory factor; Notch signaling

心血管疾病是一类严重危害人类生命健康的疾病,具有发病率、致残率、死亡率均高以及并发症多等特点,而动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是许多心血管疾病的共同病理学基础^[1-2]。AS的特征

为大量脂质沉积在动脉血管壁形成斑块,造成动脉狭窄,随着脂质沉积不断累积,斑块可能破裂,脂质核心进入血液形成血栓,导致心梗、脑梗等重大急性心血管疾病的发生。

收稿日期: 2022-05-02 接受日期: 2022-05-14

国家重点研发计划(批准号: 2018YFA0801000)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13916763446, E-mail: zhangruilin@whu.edu.cn

Received: May 2, 2022 Accepted: May 14, 2022

This work was supported by the National Key R&D Program of China (Grant No.2018YFA0801000)

*Corresponding author. Tel: +86-13916763446, E-mail: zhangruilin@whu.edu.cn

AS是由多因素共同作用引起的,其发病机制复杂,目前尚未被完全阐明。目前主要的假说包括炎症、脂质代谢异常、内皮功能障碍以及血流动力学等^[3-4],其中血流动力学与AS的发生越来越受到人们的关注^[5-7]。临床研究和以小鼠为模型的动物实验都发现,AS斑块并非随机均匀地分布在动脉壁上,而是集中于血管弯曲或分叉的低剪应力区域,如主动脉弓;在血管笔直的高剪应力区域则很少发现斑块的形成^[8-9]。近年来,研究发现一些转录因子可以响应不同的剪应力,从而调节下游基因的表达。KLF2是其中第一个被发现的机械敏感型转录因子^[10]。

KLF2是锌指转录因子Krüppel-like factor家族的成员。它在高剪应力区域被激活,而在低剪应力区域被抑制^[11]。在高剪应力区域,KLF2通过调控AS相关基因的表达来发挥其对AS的保护作用。KLF2上调AS保护相关因子,如内皮一氧化氮合酶(eNOS)和血栓调节蛋白(thrombomodulin)等,并下调促AS因子和相关信号通路,如血管细胞黏附分子1(vascular cell adhesion molecule 1, VCAM1)、单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemoattractant protein 1, MCP1)和NF- κ B信号通路等^[12-14]。近年来有研究发现,常见的降脂药他汀类药物能够激活血管内皮细胞中KLF2的表达,来进一步抑制AS斑块的形成^[15]。因此,KLF2作为AS药物的潜在靶点,研究其对AS的影响具有重大意义。

斑马鱼作为脂质代谢研究中的新型模式生物,与小鼠相比有一些自身优势^[16]。首先,斑马鱼在无需基因突变的条件下就可以通过高胆固醇饮食诱导出高胆固醇血症等AS早期表型^[17-18]。其次,斑马鱼幼鱼可通过药物处理保持近一个月的透明状态,便于活体成像观察。此外,斑马鱼还有繁殖周期短、产卵量大、饲养成本低等特点。本研究将利用斑马鱼来探究同源基因 $klf2a$ 对AS的影响。通过高胆固醇饮食喂养野生型和 $klf2a^{-/-}$ 突变体斑马鱼后,比较总胆固醇(total cholesterol, TC)和甘油三酯(triglycerides, TG)水平以及油红O(Oil red O)染色情况来判断 $klf2a$ 缺失对AS的影响。然后通过检测氧化水平、炎症因子和Notch受体表达水平初步探究Klf2a影响AS的可能原因。

1 材料与方

1.1 材料

斑马鱼野生型品系AB、转基因品系 $Tg(Alk:GFP)$

和 $klf2a^{-/-}$ 突变体^[19]斑马鱼均由本实验室保存。蛋黄粉购自上海源叶生物科技有限公司;胆固醇、BCA蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;TRIzol试剂、荧光胆固醇替代物CholEsteryl BODIPY™ 542/563 C11购自美国Thermo Fisher公司;逆转录试剂盒购自日本TaKaRa公司;PBS、ddH₂O购自生工生物工程(上海)股份有限公司;三氯甲烷、异丙醇、无水乙醚、1,2-丙二醇购自国药集团化学试剂有限公司;油红O粉末、低熔点琼脂糖购自美国Sigma公司;MDA测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;总胆固醇测定试剂盒、甘油三酯试剂盒、SOD测定试剂盒购自南京建成生物科技有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 斑马鱼高胆固醇饮食喂养 受精后5天(5 days-post-fertilization, 5 dpf)的斑马鱼幼鱼以50条为一组,随机分组分成对照(control)组和高胆固醇饮食(high cholesterol diet, HCD)组,喂养10天。每组每天喂食两次,每次喂食7.5 mg蛋黄粉或添加了4%(w/w)胆固醇的蛋黄粉饲料,10天后进行相应的指标测定。

1.2.2 荧光胆固醇替代物血管沉积水平检测 将喂养10天的 $Tg(Alk:GFP)$ 幼鱼用三卡因(tricaine)麻醉后,用1%低熔点琼脂糖固定在玻璃底皿中。使用Leica激光共聚焦显微镜获取幼鱼尾静脉血管的Z-Stack图像,然后利用Leica自带图像分析软件对相应数据进行测定和分析。

1.2.3 血管油红O染色 收集足量的斑马鱼,PBS漂洗后用4% PFA常温固定1 h或4 °C过夜。经25%、50%、75%、100%的丙二醇(PBS稀释)处理后,常温避光条件下油红染色液染色过夜。随后依次经75%、50%、25% 丙二醇(PBS稀释)处理,甘油保存,体视镜下拍照。

1.2.4 总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和BCA法总蛋白测定 将喂养10天的斑马鱼幼鱼饥饿禁食一天后,每组30尾准确称取组织重量,以1:4(mg/ μ L)的比例加入PBS稀释匀浆,5 000 r/min离心5 min,取上清根据试剂盒说明书测定总胆固醇和甘油三酯。将上清适当稀释后,以BCA法测定总蛋白含量。

1.2.5 丙二醛(MDA)、超氧歧化酶(SOD)测定 将喂养10天的斑马鱼幼鱼按每组30尾准确称取组织重量,按1:9(mg/ μ L)的比例加入匀浆介质稀释匀浆,5 000 r/min离心5 min,取上清根据试剂盒说明书进

行相应的检测。

1.2.6 mRNA表达 取30尾喂养10天的斑马鱼幼鱼, TRIzol法进行总RNA提取, 以逆转录试剂盒进行逆转录, 随后实时荧光定量PCR检测基因表达水平, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算mRNA相对表达量。

1.2.7 数据统计 所有数据采用SPSS 20.0软件进行统计学分析, 以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组数据之间使用 Student's-*t*检验, 两组以上使用 One-Way ANOVA分析, 最后确定统计学显著性。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

2 结果

2.1 建立斑马鱼动脉粥样硬化模型

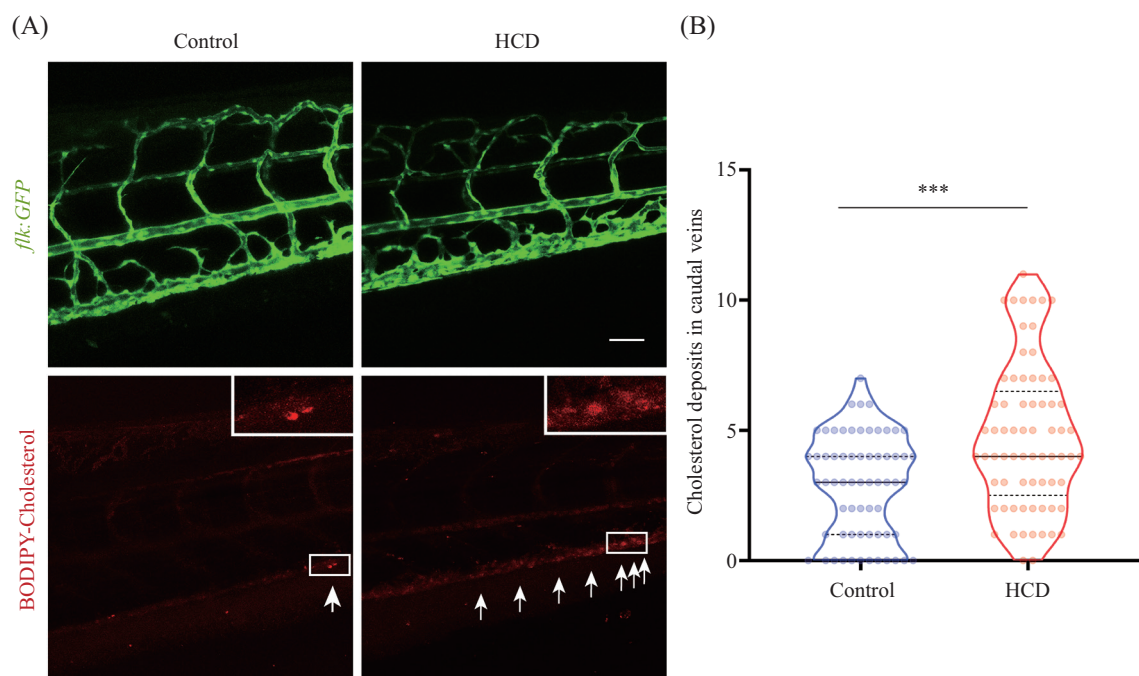
之前文献报道在基础饲料中添加4%胆固醇能够构建出良好的斑马鱼AS模型^[17-18], 所以我们以蛋黄粉为对照(control)饲料、添加了4%胆固醇的蛋黄粉作为高胆固醇饮食(HCD)饲料, 对受精后5天(5dpf)的斑马鱼幼鱼进行为期10天的喂养处理。我们使用了*Tg(flk:GFP)*转基因品系用于特异性标记血管, 同时我们在饲料中添加了胆固醇的荧光代替物BODIPY-Cholesterol(10 $\mu\text{g/g}$ 饲料)^[18], 以便活体观

察斑马鱼体内胆固醇的走向和其在血管内的沉积。喂养10天后将幼鱼麻醉, 在激光共聚焦显微镜下观察尾静脉血管处的胆固醇沉积。与control组相比, HCD组红色荧光胆固醇沉积十分明显(图1A), HCD组红色荧光胆固醇平均沉积个数大于control组的个数, 且有显著的统计学差异(图1B)。这表明, 我们建立了高胆固醇饮食诱导的斑马鱼AS模型。

2.2 HCD喂养野生型和*klf2a*^{-/-}斑马鱼的脂质水平变化

接下来我们以不含胆固醇荧光替代物的control和HCD饲料喂养野生型和*klf2a*^{-/-}突变体幼鱼, 并比较不同基因型在不同饲料喂养后的脂质水平变化。首先, 我们通过油红O染色来观察尾部血管的脂质沉积情况。在染色时间相同的情况下, 尾部血管的脂质沉积情况可以分为轻度和重度两种(图2A)。统计轻度沉积和重度沉积的占比发现, HCD喂养野生型和*klf2a*^{-/-}斑马鱼都会导致其血管脂质沉积显著加剧, 而且在相同处理情况下, *klf2a*^{-/-}斑马鱼的血管脂质沉积情况比野生型严重(图2B)。

其次, 将喂养10天的斑马鱼饥饿一天后, 以30尾为一组进行匀浆并检测TC和TG水平。HCD喂养



A: 激光共聚焦显微镜照片展示胆固醇荧光替代物(红色)在血管(绿色)中的沉积(白色箭头), 插入部分为图中白色方框的放大图。B: control和HCD组胆固醇沉积数量统计($n=60$, *** $P<0.001$)。

A: representative confocal images showing deposits (white arrows) of BODIPY-Cholesterol (red) in blood vessels (green), inlets: enlargement of white box areas. B: quantification of cholesterol deposit numbers in control and HCD-fed group ($n=60$, *** $P<0.001$).

图1 HCD喂养斑马鱼的荧光胆固醇沉积升高

Fig.1 Increased fluorescent cholesterol deposits in HCD-fed zebrafish

之后,野生型和 $klf2a^{-/-}$ 斑马鱼的TC水平都显著上升,且对比相同处理组, $klf2a^{-/-}$ 斑马鱼的TC水平显著高于野生型(图2C)。虽然野生型和 $klf2a^{-/-}$ 斑马鱼的TG在HCD喂养后没有明显差异,但是与野生型相比, $klf2a^{-/-}$ 斑马鱼的TG水平显著上升(图2D)。以上结果表明, $klf2a$ 的缺失会导致斑马鱼的TC和TG水平升高,且血管脂质沉积加剧。

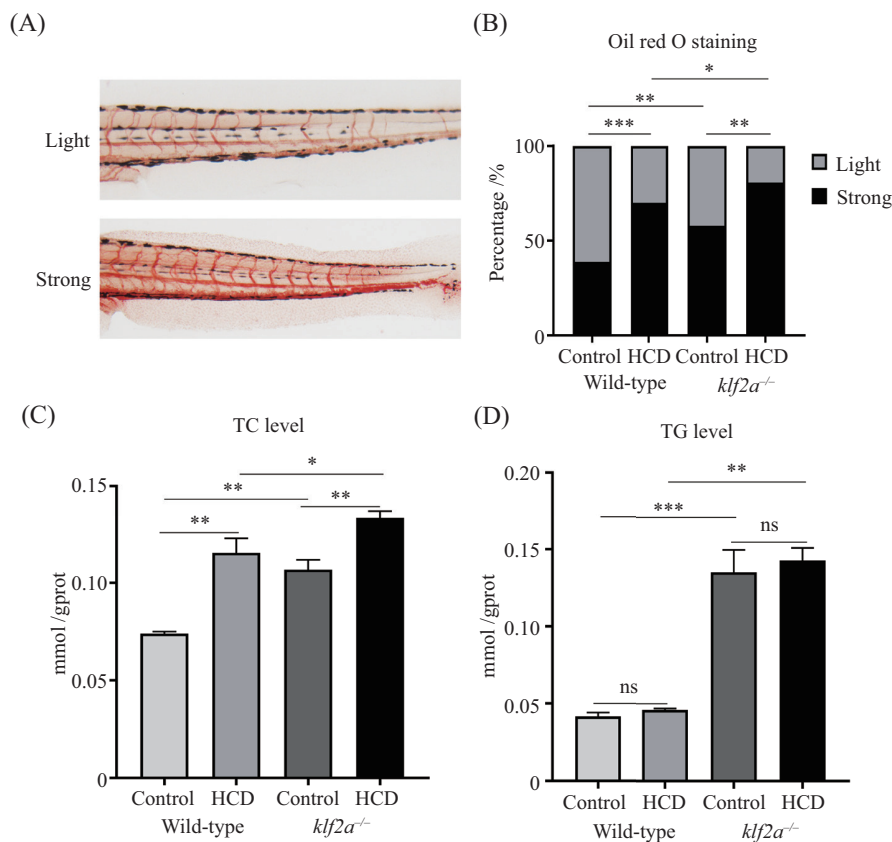
2.3 HCD喂养野生型和 $klf2a^{-/-}$ 斑马鱼的氧化水平变化

为了探究 $klf2a$ 缺失对不同饲料喂养后的氧化水平的影响,我们检测了MDA和SOD的水平。MDA被广泛用作检测脂质氧化的指标^[20-21]。在HCD喂养后,野生型和 $klf2a^{-/-}$ 斑马鱼的MDA水平都上升,而且 $klf2a^{-/-}$ 斑马鱼的上升程度显著高于野生型(图3A)。SOD是生物体内十分重要的一种抗氧化酶^[22-23]。在HCD喂养后,野生型和 $klf2a^{-/-}$ 斑马鱼的SOD水平都

上升,而且同种喂养条件下 $klf2a^{-/-}$ 斑马鱼的SOD活性显著高于野生型(图3B)。这说明, $klf2a$ 的缺失会导致体内脂质氧化水平和抗氧化水平都升高。

2.4 HCD喂养野生型和 $klf2a^{-/-}$ 斑马鱼的炎症因子表达水平变化

为检测HCD喂养后野生型与 $klf2a^{-/-}$ 斑马鱼的炎症水平,我们分别提取了各组的总RNA进行逆转录,通过荧光定量PCR检测炎症因子 $il1b$ 、 $il6$ 和 $tnfa$ 的mRNA表达水平。HCD喂养后, $tnfa$ 在野生型和 $klf2a^{-/-}$ 斑马鱼中都呈现上升趋势,且同等喂养条件下在 $klf2a^{-/-}$ 斑马鱼的表达水平都显著高于在野生型中(图4A)。虽然 $il1b$ 的表达水平在野生型HCD组中显著上升,但是在 $klf2a^{-/-}$ 组别中无显著性差异(图4B)。 $il6$ 的表达水平在野生型HCD组中显著下降,在 $klf2a^{-/-}$ HCD组中呈上升趋势,但低于野生型control组(图4C)。

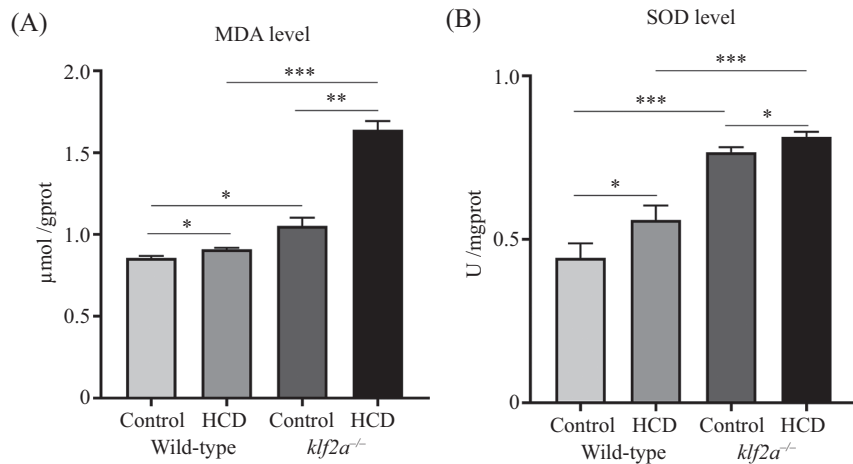


A: 油红O染色照片展示血管中轻型和重型脂质沉积。B: 轻型和重型脂质沉积占比统计($n=60$)。C: 总胆固醇水平定量分析($n=3$)。D: 甘油三酯水平定量分析($n=3$)。ns: 无显著差异, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

A: representative images of Oil red O staining showing light and strong lipid accumulation in blood vessels. B: quantification of percentages of light and strong lipid accumulation ($n=60$). C: quantification of total cholesterol levels ($n=3$). D: quantification of triglyceride levels ($n=3$). ns: no significant difference, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$.

图2 $klf2a$ 缺失影响HCD喂养后斑马鱼的脂质水平

Fig.2 $klf2a$ deficiency affects lipid levels of zebrafish after HCD feeding

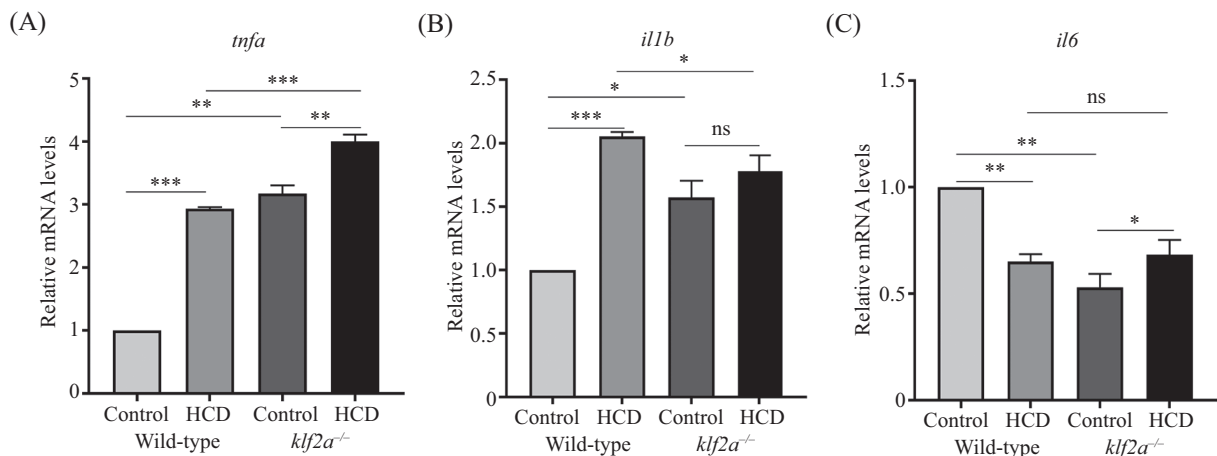


A: 丙二醛水平定量分析($n=3$)。B: 超氧化物歧化酶水平定量分析($n=3$)。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: quantification of MDA levels ($n=3$)。B: quantification of SOD levels ($n=3$)。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图3 *klf2a*缺失影响HCD喂养后斑马鱼的氧化水平

Fig.3 *klf2a* deficiency affects oxidative stress of zebrafish after HCD feeding



荧光定量PCR检测*tnfa* (A)、*il1b* (B)和*il6* (C)的表达水平。 $n=3$, ns: 无显著差异, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

Fluorescent quantitative PCR analysis of expression levels of *tnfa* (A), *il1b* (B) and *il6* (C). $n=3$, ns: no significant difference, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图4 *klf2a*缺失对HCD喂养后斑马鱼炎症因子表达水平的影响

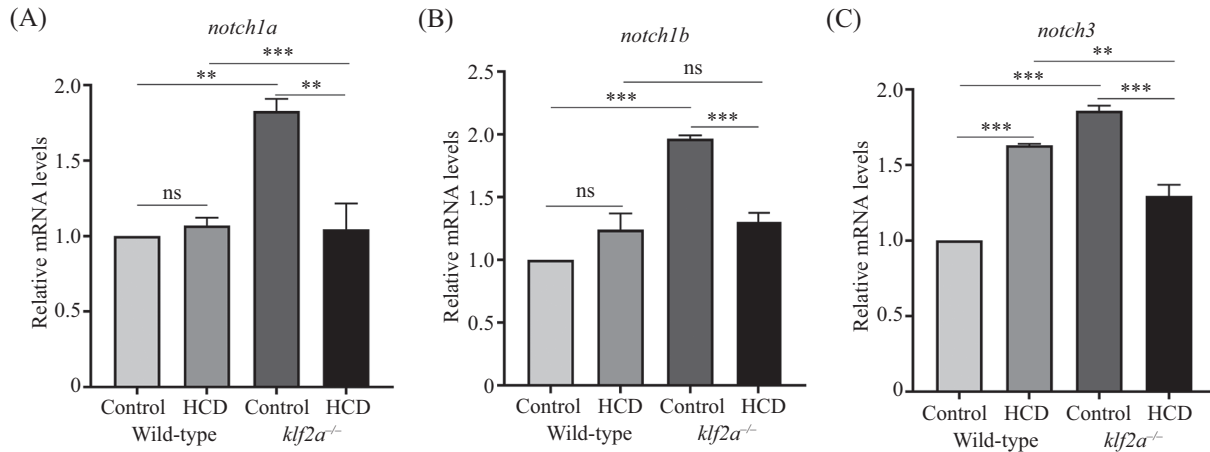
Fig.4 *klf2a* deficiency affects expression of inflammatory factors of zebrafish after HCD feeding

2.5 HCD喂养野生型和*klf2a*^{-/-}斑马鱼的Notch受体表达水平变化

在心血管发育和疾病发生过程中KLF2与Notch信号通路存在密切的相互作用^[19,24], Notch信号通路也被报道与AS的发生和进展有关^[25-26]。我们用荧光定量PCR检测Notch受体表达水平发现,在野生型组中, *notch1a*和*notch1b*的表达水平在HCD喂养后没有显著变化,但是*notch3*的表达水平显著上调(图5)。与野生型control相比, *klf2a*^{-/-} control组中的三个Notch受体表达均上调,但是经HCD喂养后,三者的表达水平都显著下降。

3 讨论

AS是一种渐进型的心血管疾病,严重影响到全世界人类的生命健康。尽管目前已建立大鼠、小鼠和家兔等多种AS模型,但每种模型都有一定的局限性,它们都无法实现AS发展过程中的实时监测,且不适用于药物大规模筛选^[16]。本文主要以斑马鱼为模式动物,建立AS模型,并探究*klf2a*缺失对AS的影响。通过HCD喂养,野生型斑马鱼的荧光胆固醇替代物沉积以及血管脂质沉积显著加剧,TC、MDA和SOD水平都显著上升,初步判断斑马鱼AS模型成功建立。同时,与野生型相比, *klf2a*^{-/-}突变体的血管脂



荧光定量PCR检测notch1a (A)、notch1b (B)和notch3 (C)的表达水平。n=3, ns: 无显著差异, **P<0.01, ***P<0.001。

Fluorescent quantitative PCR analysis of expression levels of notch1a (A), notch1b (B) and notch3 (C). n=3, ns: no significant difference, **P<0.01, ***P<0.001.

图5 *klf2a*缺失对HCD喂养后斑马鱼Notch受体表达水平的影响
Fig.5 *klf2a* deficiency affects expression of Notch receptors of zebrafish after HCD feeding

质沉积、TC、MDA、和SOD水平也上调,且趋势更为明显,说明Klf2a有一定的AS保护作用。

炎症和氧化应激是AS早期进程中的两个重要因素^[2,4]。与炎症有关的细胞因子如TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等,可以调节炎症水平。我们的研究发现,HCD喂养后*klf2a*^{-/-}与野生型相比,TNF- α 显示出明显上调的趋势,相应炎症的水平升高。TNF- α 是具有促炎作用的关键炎症因子,其基因转录启动区或增强子上有NF- κ B的结合位点,主要通过NF- κ B途径发挥作用,从而可以调控AS^[27-28]。同时,与氧化应激有关的MDA和SOD水平上调,表明体内脂质氧化水平以及抗氧化能力都升高。

Notch信号通路是多种生物和组织类型中分化的关键调节因子,对心血管系统的发育和维持,以及炎症的调节均起到重要作用^[29-31]。2012年,FUKUDA等^[25]报道Notch信号通路与AS的发生和进展有关。此外,AQUILA等^[32]报道Notch配体DLL4和Jagged-1参与了动脉疾病的进展。本研究检测了Notch受体基因*notch1a*、*notch1b*以及*notch3*的表达,结果表明*klf2a*^{-/-} control组中的三个Notch受体表达相对于野生型均上调,但是经HCD喂养后,三者的表达水平都显著下降。以往研究表明,在心脏发育和再生过程中,Klf2a都参与调控Notch信号通路的激活和Notch受体的表达,*klf2a*缺失之后Notch受体在正常心脏发育中的表达不受影响,而在心脏再生中的表达明显下降^[19,29]。另外也有研究表明,血液中的循

环脂质会抑制小鼠血管上皮细胞的*Notch1*表达,促进AS^[33]。因此我们推测,Klf2a能通过调控Notch受体的表达拮抗AS的发生,当*klf2a*缺失之后Notch受体表达在HCD刺激下急剧下降,AS表型加剧,但具体机制仍有待进一步研究。

综上所述,*klf2a*缺失斑马鱼可能通过Notch相关受体调节Notch信号通路,或者炎症有关的信号通路加剧了炎症相关通路的表达,从而使AS加重,这为后续深入探究Klf2对AS的保护作用机制奠定了一个良好的基础。

参考文献 (References)

- [1] THOMAS H, DIAMOND J, VIECO A, et al. Global atlas of cardiovascular disease 2000—2016: the path to prevention and control [J]. *Glob Heart*, 2018, 13(3): 143-63.
- [2] KATTOOR A J, POTHINENI N V K, PALAGIRI D, et al. Oxidative stress in atherosclerosis [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2017, 19(11): 42.
- [3] LUSIS A J. Atherosclerosis [J]. *Nature*, 2000, 407(6801): 233-41.
- [4] WOLF D, LEY K. Immunity and inflammation in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2019, 124(2): 315-27.
- [5] NIU N, XU S, XU Y, et al. Targeting mechanosensitive transcription factors in atherosclerosis [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2019, 40(4): 253-66.
- [6] SIMMONS R D, KUMAR S, JO H. The role of endothelial mechanosensitive genes in atherosclerosis and omics approaches [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2016, 591: 111-31.
- [7] SOUILHOL C, SERBANOVIC-CANIC J, FRAGIADAKI M, et al. Endothelial responses to shear stress in atherosclerosis: a novel role for developmental genes [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17(1): 52-63.

- [8] CHIU J J, CHIEN S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives [J]. *Physiol Rev*, 2011, 91(1): 327-87.
- [9] REZVAN A, NI C W, ALBERTS-GRILL N, et al. Animal, *in vitro*, and *ex vivo* models of flow-dependent atherosclerosis: role of oxidative stress [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(5): 1433-48.
- [10] LEE J S, YU Q, SHIN J T, et al. Klf2 is an essential regulator of vascular hemodynamic forces *in vivo* [J]. *Dev Cell*, 2006, 11(6): 845-57.
- [11] WU W, XIAO H, LAGUNA-FERNANDEZ A, et al. Flow-dependent regulation of kruppel-like factor 2 is mediated by microRNA-92a [J]. *Circulation*, 2011, 124(5): 633-41.
- [12] TURPAEV K T. Transcription factor KLF2 and its role in the regulation of inflammatory processes [J]. *Biochemistry*, 2020, 85(1): 54-67.
- [13] SWEET D R, FAN L, HSIEH P N, et al. Kruppel-like factors in vascular inflammation: mechanistic insights and therapeutic potential [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2018, 5: 6.
- [14] DABRAVOLSKI S A, SUKHORUKOV V N, KALMYKOV V A, et al. The role of KLF2 in the regulation of atherosclerosis development and potential use of KLF2-targeted therapy [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(2): 254.
- [15] PARMAR K M, NAMBU DIRI V, DAI G, et al. Statins exert endothelial atheroprotective effects via the KLF2 transcription factor [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(29): 26714-9.
- [16] TANG D, GENG F, YU C, et al. Recent application of zebrafish models in atherosclerosis research [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 643697.
- [17] STOLETOV K, FANG L, CHOI S H, et al. Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish [J]. *Circ Res*, 2009, 104(8): 952-60.
- [18] FANG L, HARKEWICZ R, HARTVIGSEN K, et al. Oxidized cholesteryl esters and phospholipids in zebrafish larvae fed a high cholesterol diet: macrophage binding and activation [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(42): 32343-51.
- [19] LI X, LU Q, PENG Y, et al. Primary cilia mediate Klf2-dependant Notch activation in regenerating heart [J]. *Protein Cell*, 2020, 11(6): 433-45.
- [20] POLIDORI M C, PRATICO D, PARENTE B, et al. Elevated lipid peroxidation biomarkers and low antioxidant status in atherosclerotic patients with increased carotid or iliofemoral intima media thickness [J]. *J Investig Med*, 2007, 55(4): 163-7.
- [21] BUSCH C J, BINDER C J. Malondialdehyde epitopes as mediators of sterile inflammation [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017, 1862(4): 398-406.
- [22] FUKAI T, USHIO-FUKAI M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(6): 1583-606.
- [23] KHOSRAVI M, POURSALEH A, GHASEMPOUR G, et al. The effects of oxidative stress on the development of atherosclerosis [J]. *Biol Chem*, 2019, 400(6): 711-32.
- [24] DUCHEMIN A L, VIGNES H, VERMOT J. Mechanically activated piezo channels modulate outflow tract valve development through the Yap1 and Klf2-Notch signaling axis [J]. *eLife*, 2019, 8.
- [25] FUKUDA D, AIKAWA E, SWIRSKI F K, et al. Notch ligand delta-like 4 blockade attenuates atherosclerosis and metabolic disorders [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(27): E1868-77.
- [26] VIECELI DALLA SEGA F, FORTINI F, AQUILA G, et al. Notch signaling regulates immune responses in atherosclerosis [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1130.
- [27] GAO W, LIU H, YUAN J, et al. Exosomes derived from mature dendritic cells increase endothelial inflammation and atherosclerosis via membrane TNF- α mediated NF- κ B pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(12): 2318-27.
- [28] BROWN J D, LIN C Y, DUAN Q, et al. NF- κ B directs dynamic super enhancer formation in inflammation and atherogenesis [J]. *Mol Cell*, 2014, 56(2): 219-31.
- [29] LI H, CHANG C, LI X, et al. The roles and activation of endocardial Notch signaling in heart regeneration [J]. *Cell Regen*, 2021, 10(1): 3.
- [30] MACGROGAN D, MUNCH J, DE LA POMPA J L. Notch and interacting signalling pathways in cardiac development, disease, and regeneration [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(11): 685-704.
- [31] MAYEUF-LOUCHART A, LAGHA M, DANCKAERT A, et al. Notch regulation of myogenic versus endothelial fates of cells that migrate from the somite to the limb [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(24): 8844-9.
- [32] AQUILA G, FORTINI C, PANNUTI A, et al. Distinct gene expression profiles associated with Notch ligands Delta-like 4 and Jagged1 in plaque material from peripheral artery disease patients: a pilot study [J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 98.
- [33] BRIOT A, CIVELEK M, SEKI A, et al. Endothelial NOTCH1 is suppressed by circulating lipids and antagonizes inflammation during atherosclerosis [J]. *J Exp Med*, 2015, 212(12): 2147-63.