Kruppel样因子6基因对巨噬细胞中胆固醇蓄积的影响

王慧清，张宗棨，黄文红，王晓菲，朱 燕(上海交通大学医学院附属第三人民医院心电图室，上海市 201999)

文章亮点：

实验特点在于在总结以往研究的基础上，探索Kruppel样因子6在巨噬泡沫细胞形成过程中的作用及可能的分子机制，显示Kruppel样因子6可能通过促进ATP结合盒转运蛋白A1蛋白的表达加速巨噬细胞内胆固醇流出，减少泡沫细胞形成，延缓动脉粥样硬化的发生、发展，为动脉粥样硬化等血管性疾病的防治提供新靶点。

关键词：

组织构建；组织工程；巨噬泡沫细胞； Raw 264.7细胞；Kruppel样因子6；ATP结合盒转运体A1；氧化低密度脂蛋白；动脉粥样硬化；国家自然科学基金

主题词：

脂蛋白类, LDL；胆固醇；巨噬细胞；Kruppel样转录因子类

基金资助：

国家青年科学基金项目(81200206)；上海市卫生局课题(2010073)

摘要

背景：研究表明，Kruppel样因子6与巨噬细胞极化密切相关。但是，关于Kruppel样因子6在巨噬泡沫细胞形成中的作用尚不清楚。

目的：观察Kruppel样因子6过表达对氧化低密度脂蛋白刺激下的小鼠巨噬细胞(RAW264.7)胆固醇蓄积及对ATP结合盒转运蛋白A1表达的影响。

方法：取Raw264.7巨噬细胞株分别转染慢病毒空载体和重组载体pCDH-KLF6，作为对照组和Kruppel样因子6组，另取稳定感染慢病毒空载体的Raw264.7巨噬细胞株和稳定感染重组载体pCDH-KLF6的Raw264.7巨噬细胞株均加入50 mg/L氧化低密度脂蛋白共孵育48 h后，得到氧化低密度脂蛋白组和Kruppel样因子6+氧化低密度脂蛋白组。

结果与结论：与对照组相比，氧化低密度脂蛋白组巨噬细胞内总胆固醇和胆固醇酯表达水平显著增加(P <0.05)。与氧化低密度脂蛋白组巨噬细胞相比，Kruppel样因子6+氧化低密度脂蛋白组细胞内总胆固醇和胆固醇酯表达水平明显下降，胆固醇酯/总胆固醇明显降低(P <0.05)。而未加入氧化低密度脂蛋白处理的2组细胞内脂质表达水平少，且对照组与Kruppel样因子6组相比，细胞内脂质表达水平差异无显著性意义。提示Kruppel样因子6可能通过促进ATP结合盒转运蛋白A1的表达，抑制氧化低密度脂蛋白诱导的RAW264.7巨噬细胞胆固醇蓄积。

王慧清，张宗棨，黄文红，王晓菲，朱燕. Kruppel样因子6基因对巨噬细胞中胆固醇蓄积的影响[J].中国组织工程研究，2014，18(51):8269-8274.

王慧清，女，1982年生，江苏省江阴市人，汉族，2006年徐州医学院毕业，医师，主要从事心脏电生理方面的研究。

通讯作者：朱燕，主治医师，上海交通大学医学院附属第三人民医院心内科，上海市 201999

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.51.013
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344(2014)51-08269-06
稿件接受：2014-11-16

Effect of Kruppel-like factor 6 overexpression on cholesterol accumulation in macrophages

Wang Hui-qing, Zhang Zong-qi, Huang Wen-hong, Wang Xiao-fei, Zhu Yan (Department of Electrocardiogram, No. 3 People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201999, China)

Abstract

BACKGROUND: Recent studies have shown that Kruppel-like factor 6 (KLF6) gene is closely related to macrophage polarization. However, the role of KLF6 in the formation of macrophage foam cells is completely unknown.

OBJECTIVE: To investigate the effect of KLF6 gene on oxidized low density lipoprotein (ox-LDL)-induced cholesterol accumulation and expression of ATP binding cassette transporter A1 in RAW264.7 macrophages.

METHODS: RAW264.7 cell lines were transfected with lentiviral empty vector and recombinant vector carrying pCDH-KLF6, respectively, which acted as control group and KLF6 gene group. RAW264.7 cell lines stably transfected with lentiviral empty vector and recombinant vector carrying pCDH-KLF6 were cultured in 50 mg/L ox-LDL for 48 hours to establish ox-LDL group and ox-LDL+KLF6 group, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: The contents of total cholesterol and cholesterol ester in the ox-LDL group were significantly higher than those in the control group (P < 0.05) and the ox-LDL+KLF6 group (P < 0.05). In addition, the ratio of cholesterol ester to total cholesterol in the ox-LDL group was also lower in the ox-LDL+KLF6 group than the ox-LDL group (P < 0.05). However, the intracellular lipid level was lower in the control and KLF6 groups than in the two ox-LDL groups, and there was no difference between the control and KLF6 groups. These findings

Wang Hui-qing, Physician, Department of Electrocardiogram, No. 3 People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201999, China

Corresponding author: Zhu Yan, Attending physician, Department of Electrocardiogram, No. 3 People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201999, China

Accepted: 2014-11-16

indicate that KLF6 can upregulate the expression of ATP binding cassette transporter A1 and inhibit the cholesterol accumulation induced by ox-LDL in RAW 264.7 macrophages.

Subject headings: lipoproteins, LDL; cholesterol; macrophages; Kruppel-like transcription factors
Funding: the National Science Fund for Distinguished Young Scholars, No. 81200206; the Project of Shanghai Health Bureau, No. 2010073

Wang HQ, Zhang ZQ, Huang WH, Wang XF, Zhu Y. Effect of Kruppel-like factor 6 overexpression on cholesterol accumulation in macrophages. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(51):8269-8274.

0 引言 Introduction

巨噬泡沫细胞的形成是动脉粥样硬化早期最主要的病理改变，并且贯穿于动脉粥样硬化的发生和发展过程[1-8]。研究表明胆固醇转运稳态的失衡是巨噬泡沫细胞形成的关键[9]。Kruppel样因子6是一种功能广泛的锌指转录因子，在炎症、脂代谢与动脉粥样硬化相关的病理生理状态中发挥重要作用[10-18]。最新研究表明Kruppel样因子6是调控巨噬细胞极化的关键因子之一，进一步研究证实Kruppel样因子6通过调控巨噬细胞过氧化物酶体增生物激活受体γ的表达，从而抑制M2型抗炎因子的表达[19]，提示Kruppel样因子6可能在动脉粥样硬化发病过程中起到重要作用。目前，关于Kruppel样因子6在巨噬泡沫细胞形成是否具有调控作用尚不清楚。实验以小鼠源性巨噬细胞RAW264.7为研究对象，用氧化低密度脂蛋白诱导其泡沫化[20]，观察Kruppel样因子6对RAW264.7细胞泡沫化的影响并探讨可能存在的机制。

1 材料和方法 Materials and methods

设计：细胞分子生物学体外观察实验。

时间及地点：实验于2013年6月至2014年8月在上海交通大学附属第三人民医院中心实验室完成。

材料：

细胞：小鼠巨噬细胞株RAW264.7、293T人胚肾细胞株(293T细胞)均购自中科院上海细胞生物所细胞中心。

方法：

细胞培养：Raw264.7巨噬细胞及293T细胞均采用DMEM+体积分数10%胎牛血清培养基培养于37 ℃、体积分数5% CO_2饱和湿度培养箱。每24 h更换培养液，每两三天按照1∶3比例进行传代。

慢病毒表达载体的构建及鉴定：根据PubMed中查找的Kruppel样因子6(Mus musculus)基因信息(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23849)及pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP载体多克隆位点信息，采用Primer Premier 5.0软件(加拿大Premier公司)设计合成PCR引物， 上、下游引物分别引入限制性内切酶位点*Eco*RⅠ与*Bam*HⅠ，序列为：F：5'- CCG GAA TCC ATG AAA CTT TCA CCT-3'，R：5'-CGC GGA TCC TCA GAG GTG CCT CTT-3'。培养293T细胞株，Trizol法提取RNA，反转录后引入上述引物进行Kruppel样因子6基因扩增。*Eco*RⅠ与*Bam*HⅠ双酶切pMIR-REPORT和上述PCR扩增产物，采用T_4 DNA连接酶将线性化的pCDH-CMV-MCS- EF1-copGFP载体与Kruppel样因子6基因相连，转化大肠杆菌DH5 α，挑取单克隆，提取质粒，使用载体多克隆位点上游引物对重组质粒进行测序，分析插入片段序列信息(上海英骏生物技术公司)。对测序正确的重组表达载体命名为pCDH-KLF6。

RAW264.7巨噬细胞实验使用的主要试剂及仪器：

试剂及仪器	来源
DMEM高糖培养基、opti-MEM 培养基及胎牛血清	美国GIBCO公司
慢病毒包装系统pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP质粒、psPAX2质粒、pMD2.G质粒、E.coli DH5α 感受态细菌及嘌呤霉素	上海交通大学附属第三人民医院中心实验室提供
限制性内切酶、T4 DNA连接酶、质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒以及RrimeScript ^{RT} reagent Kit Perfect Real Time试剂盒和SYBR® Premix Ex Taq™ Ⅱ试剂盒	日本TaKaRa公司
Trizol试剂、转染试剂 Lipofectamine 2000 及胆固醇检测试剂盒	美国Invitrogen公司
氧化低密度脂蛋白	上海奕源生物有限公司
BCA蛋白浓度测定试剂盒	上海生物工程有限公司
Kruppel样因子6、ATP结合盒转运蛋白A1、β-actin一抗及辣根过氧化物酶标记的二抗	Santa Cruz公司
ECL显色试剂盒	Pierce公司
PCR-System-7500	Applied Biosystems公司
ND-2000超微量分光光度计	美国Thermo公司
Quantity One图像分析系统	美国Bio-Rad 公司

慢病毒的包装及稳定细胞株的构建与筛选：取处于对数生长期的293T细胞，待其融合度达到80%时使用Lipofectmaine 2000共转染表达载体pCDH-KLF6、psPAX2质粒和pMD2.G质粒(按照质量比4∶3∶1)到293T细胞，转染后6 h换回完全培养液，并于转染后48 h收集上清，8 000 r/min：离心10 min去除细胞沉淀，0.45 μm除菌滤膜过滤处理后加入1，5-二甲基-1，5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物至终浓度为8 mg/L混匀，感染Raw264.7巨噬细胞(细胞密度达80%)48 h。嘌呤霉素筛选出稳定感染慢病毒空载体的Raw264.7巨噬细胞株(对照组)及重组载体pCDH-KLF6 Raw264.7巨噬细胞株(Kruppel样因子6组)。

氧化低密度脂蛋白干预：分别取对照组和Kruppel样因子6组Raw264.7巨噬细胞株(细胞密度达80%)加入50 mg/L氧化低密度脂蛋白共孵育48 h后，分别得到氧化低密度脂蛋白组和Kruppel样因子6+氧化低密度脂蛋白组。

细胞内胆固醇表达水平测定[21]：收集各组细胞，用PBS漂洗3次，用氯仿：甲醇(体积比2：1)的比例抽提细胞内的总胆固醇，按照胆固醇检测试剂盒说明书的步骤，采用酶荧光学法分别测定各组细胞内总胆固醇和游离胆固醇表达水平，总胆固醇与游离胆固醇之差为胆固醇酯的表达水平。BCA法检测各组细胞蛋白浓度；分别将各组细胞胆固醇量与蛋白浓度做出比值后，比较各组间的相对胆固醇浓度。

实时PCR法检测ABCA1 mRNA表达水平：收集各组细胞，按照Trizol说明书提取总RNA，应用分光光度计测定核酸浓度。取等量1 μg RNA分别按照PrimeScript® RT reagent Kit Perfect Real Time及SYBR® Premix Ex Taq™ Ⅱ试剂盒说明书进行相应的反转录和实时荧光定量PCR反应。采用PCR-System-7500进行实时荧光定量PCR，反应结束后进行熔解曲线分析，将得出的Ct值按公式$2^{-\Delta\Delta Ct}$求出基因表达的相对变化量，再进行2组间比较。实验重复3次。PCR引物由上海生物工程技术有限公司合成：序列为：ABCA1：F：5’-AAA ACC GCA GAC ATC CTT CAG-3’，R：5’-CAT ACC GAA ACT CGT TCA CCC-3’；GAPDH：F：5’-ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG-3’，R：5’-CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC-3’。

Western blot检测ATP结合盒转运蛋白A1蛋白表达水平：提取各组细胞总蛋白，用Bradford法测蛋白含量[22]。取20 μg蛋白上样到10% SDS聚丙烯酰胺凝胶进行电泳，然后电转移到PVDF膜上。5%脱脂牛奶封闭1 h，加入TBST稀释后的一抗，ATP结合盒转运蛋白A1和β-肌动蛋白一抗稀释比分别为1：1 000和1：2 000，4 ℃摇床孵育过夜。TBS-T漂洗5 min×3次，加入辣根过氧化物酶标记的抗兔IgG(1：5 000)室温孵育1 h；TBS-T漂洗5 min×3次，ECL显色。采用Quantity One图像分析系统进行灰度扫描，以ATP结合盒转运蛋白A1蛋白与内参β-肌动蛋白的灰度值比值作为ATP结合盒转运蛋白A1蛋白的相对表达水平。

主要观察指标：Raw264.7巨噬细胞中Kruppel样因子6和ATP结合盒转运蛋白A1的表达水平，细胞内游离胆固醇及胆固醇酯的表达水平。

统计学分析：所有计量数据均以$\bar{x}\pm s$表示，两组间比较采用*t* 检验，采用SPSS13.0统计软件(美国SPSS公司)进行统计学分析。以$P<0.05$为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 稳定转染细胞株中Kruppel样因子6的表达水平 实时PCR检测发现，Kruppel样因子6组(过表达组)Raw264.7巨噬细胞中Kruppel样因子6 mRNA的表达量较对照组平均高31.9倍，两者比较差异有显著性意义($P < 0.05$；**图1A**)。Western blot方法进一步检测2组细胞Kruppel样因子6蛋白的表达情况，发现在过表达组细胞株中Kruppel样因子6蛋白表达量较对照组平均增加31.8倍($P < 0.05$，**图1B**)。说明稳定过表达Kruppel样因子6的Raw264.7细胞株构建成功。

2.2 过表达Kruppel样因子6对氧化低密度脂蛋白诱导的巨噬细胞内游离胆固醇及胆固醇酯表达水平的影响 酶荧光学法检测结果显示，与对照组相比，氧化低密度脂蛋白组巨噬细胞内总胆固醇和胆固醇酯表达水平显著增加($P < 0.05$)。与氧化低密度脂蛋白组巨噬细胞相比，Kruppel样因子6+氧化低密度脂蛋白组细胞内总胆固醇和胆固醇酯表达水平明显下降，胆固醇酯/总胆固醇明显降低，且差异有显著性意义($P < 0.05$)。而未加入氧化低密度脂蛋白处理的2组细胞内脂质表达水平少，且对照组与Kruppel样因子6组相比，细胞内脂质表达水平差异无显著性意义($P > 0.05$；**表1**)。

2.3 过表达Kruppel样因子6对巨噬细胞ATP结合盒转运蛋白A1 mRNA和蛋白表达的影响 实时PCR结果显示，与对照组相比，Kruppel样因子6组巨噬细胞ATP结合盒转运蛋白A1 mRNA表达增加($P < 0.05$)；而与对照组相比，氧化低密度脂蛋白组巨噬细胞ATP结合盒转运蛋白A1 mRNA的表达水平明显上升($P < 0.05$)，且Kruppel样因子6+氧化低密度脂蛋白组细胞ATP结合盒转运蛋白A1 mRNA的表达水平较氧化低密度脂蛋白组显著增加($P < 0.05$；**图2A**)。并且Western blot结果显示，各组巨噬细胞ATP结合盒转运蛋白A1蛋白表达改变与mRNA上调变化一致。Kruppel样因子6+氧化低密度脂蛋白组巨噬细胞ATP结合盒转运蛋白A1蛋白表达较氧化低密度脂蛋白组细胞显著升高($P < 0.05$；**图2B**)。

3 讨论 Discussion

动脉粥样硬化是一种严重危害人类生命健康的疾病，是心脑血管疾病的发病基础[23-32]。血脂异常是一个重要的危险因素。由于血浆脂质水平升高促使大量脂质尤其是低密度脂蛋白胆固醇进入血管壁，并在局部沉积后经氧化修饰形成氧化低密度脂蛋白，激活血管内皮细胞，释放趋化因子，吸引循环中的单核细胞粘附继而进入血管壁分化为巨噬细胞，进而吞噬大量脂质后形成泡沫细胞[33-40]。巨噬泡沫细胞的形成是动脉粥样硬化斑块损伤形成、发展的关键，深入探索巨噬泡沫细胞在动脉粥样硬化形成过程中的机制对于早期阻断动脉粥样硬化发生发展具有重要意义。

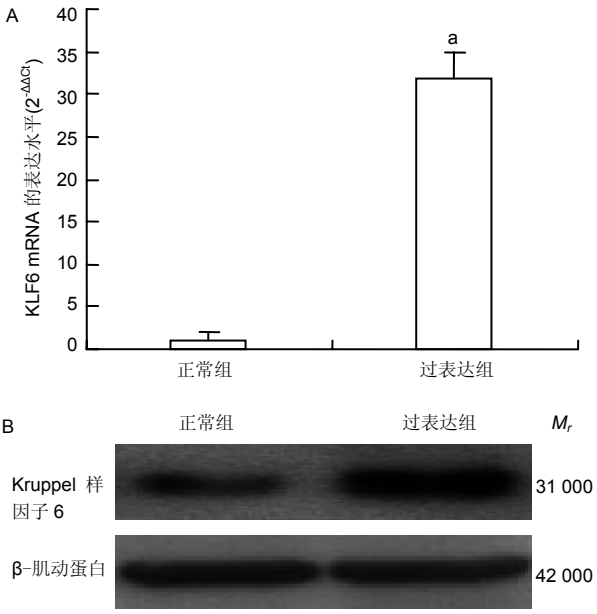
Kruppel样因子6基因是一个新发现的Kruppel样因子家族成员，在大多数组织、器官中均有表达，是一类具有锌指结构域的核转录因子，主要通过调控下游基因的转录而发挥其生物学功能，与生长发育、细胞分化、增生、凋亡、血管生成及组织修复等生理或病理过程有关[4, 10, 41-44]。近年来，

表 1　过表达 Kruppel 样因子 6 对氧化低密度脂蛋白诱导的巨噬细胞内游离胆固醇及胆固醇酯表达水平的影响

Table 1　The effect of Kruppel-like factor 6 gene overexpression on oxidized low density lipoprotein-induced cholesterol accumulation in RAW264.7 macrophages　($\bar{x}\pm s$)

组别	总胆固醇(mg/g)	游离胆固醇(mg/g)	胆固醇酯(mg/g)	胆固醇酯/总胆固醇(%)
对照组	140.1±16.3	110.1±10.5	25.4±3.7	16.4±1.5
Kruppel样因子6组	125.3±12.6	104.3±9.15	23.3±1.2	22.2±1.6
氧化低密度脂蛋白组	423.8±23.6[a]	150.1±12.9[a]	271.2±17.2[a]	64.3±3.9[a]
Kruppel样因子6+氧化低密度脂蛋白组	318.5±20.3[b]	143.1±13.9	139.4±11.8[b]	43.2±3.9[b]

表注：与对照组相比，[a]$P < 0.05$；与氧化低密度脂蛋白组相比，[b]$P < 0.05$。



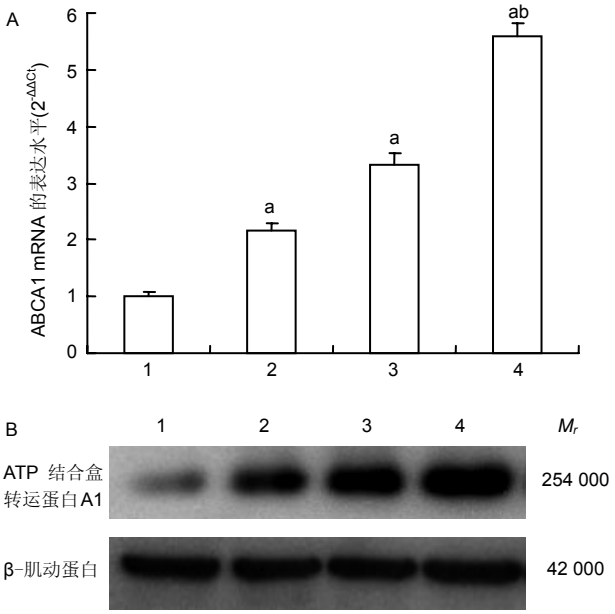


图 1　稳定 Raw264.7 巨噬细胞株中 Kruppel 样因子 6 mRNA 及蛋白的表达水平

Figure 1　Kruppel-like factor 6 mRNA and protein expression in RAW264.7 stable cell lines

图注：图中 A 为 Raw264.7 巨噬细胞株中 Kruppel 样因子 6 mRNA 的表达水平，与对照组相比，[a]$P < 0.05$；B 为 Raw264.7 巨噬细胞株中 Kruppel 样因子蛋白的表达水平。

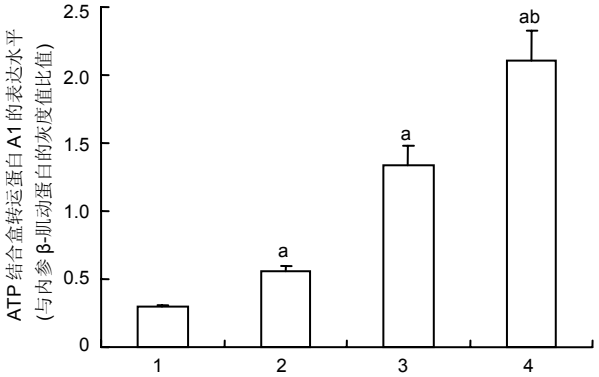


图 2　稳定 Raw264.7 巨噬细胞株中 ATP 结合盒转运蛋白 A1 mRNA 及蛋白的表达水平

Figure 2　ATP binding cassette transporter A1 mRNA and protein expression in RAW264.7 stable cell lines

图注：图中 A 为 Raw264.7 巨噬细胞株中 ATP 结合盒转运蛋白 A1 mRNA 的表达水平；B 为 Raw264.7 巨噬细胞株中 ATP 结合盒转运蛋白 A1 蛋白的表达水平。1：对照组；2：Kruppel 样因子 6 组；3：氧化低密度脂蛋白组；4：Kruppel 样因子 6+氧化低密度脂蛋白组。与对照组相比，[a]$P < 0.05$；与氧化低密度脂蛋白组相比，[b]$P < 0.05$。

大量研究证实了Kruppel样因子家族的一系列成员如Kruppel样因子2，4均与巨噬细胞极化、炎症和动脉粥样硬化形成密切相关[45-48]。最新研究报道了Kruppel样因子6是巨噬细胞促炎信号的一个调节因子，能够调控巨噬细胞M1，M2表型转化，以及动脉粥样硬化密切相关的炎症递质基因如白细胞介素10，1的表达及释放[19]。以上研究结果表明，Kruppel样因子6可能在动脉粥样硬化的发生发展中起到关键性的作用。但目前关于Kruppel样因子6在动脉粥样硬化病程中的具体病理作用及其调节机制均未见报道。文章分析过表达Kruppel样因子6抑制巨噬细胞内脂质聚集，降低细胞内胆固醇表达水平，减少泡沫细胞形成。

既往研究表明泡沫细胞的形成与细胞胆固醇代谢失衡密切相关。胆固醇逆向转运过程是调节胆固醇稳态的关键环节，而胆固醇流出是胆固醇逆向转运的关键步骤[9]。ATP结合盒转运蛋白A1是一种重要的细胞胆固醇外排蛋白，以ATP为能源介导细胞内游离胆固醇的流出，是泡沫细胞胆固醇流出的主要途径，具有抗动脉粥样硬化的重要作用[49]。以往研究将小鼠ATP结合盒转运蛋白A1基因敲除将会导致脂肪组织和巨噬细胞内大量的胆固醇沉积[50]。并且，研究显示高表达ATP结合盒转运蛋白A1能够显著促进细胞内游离胆固醇流出，抑制泡沫细胞形成。然而，ATP结合盒转运

蛋白A1功能障碍将导致细胞内游离胆固醇流出减少，大量的胆固醇沉积在巨噬细胞内成为泡沫细胞，继而促进动脉粥样硬化的发生发展[51]。因此，调节ATP结合盒转运蛋白A1的表达是维持细胞胆固醇代谢平衡的关键。PPAR/LXR信号途径是调控ATP结合盒转运蛋白A1基因表达的关键信号途径[52]。并且已有研究发现Kruppel样因子6通过靶向调控PPAR α、PPAR γ靶基因的表达，进一步调控脂代谢[19, 41]。重要的是，作者所在课题组通过生物信息学软件分析得知ATP结合盒转运蛋白A1基因启动子区含有多个Kruppel样因子6结合元件，提示Kruppel样因子6有可能通过与其结合调控ATP结合盒转运蛋白A1的表达，从而发挥抗动脉粥样硬化的作用，这一结果有待进一步实验验证。基于上述理论研究基础，实验发现过表达Kruppel样因子6能够促进细胞胆固醇转运蛋白ATP结合盒转运蛋白A1的转录和表达，这一研究不仅是对细胞内胆固醇稳态维持机制的阐明，也是对ATP结合盒转运蛋白A1参与动脉粥样硬化机制的探索。

综上所述，Kruppel样因子6参与到斑块内巨噬细胞的脂质代谢中的具体机制。发现其可能通过促进ATP结合盒转运蛋白A1蛋白的表达加速巨噬细胞内胆固醇流出，减少泡沫细胞形成，延缓动脉粥样硬化的发生、发展，可为动脉粥样硬化等血管性疾病的防治提供新靶点。

致谢：感谢上海交通大学附属第三人民医院中心实验室老师的技术指导。

作者贡献：实验设计为朱燕，实验实施为王慧清和张宗棨，实验评估为张宗棨和朱燕。王慧清成文，张宗棨校审，朱燕对文章负责。

利益冲突：文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求：实验未涉及伦理学问题。

学术术语：泡沫细胞形成–是动脉粥样硬化形成的早期事件，在血管内皮发生损伤的情况下，血液中的单核细胞通过内皮间隙，在内膜下转化为巨噬细胞。巨噬细胞介导渗入血管内皮下的低密度脂蛋白胆固醇发生氧化修饰，形成氧化型低密度脂蛋白胆固醇，并主要通过A型清道受体吞噬大量氧化型低密度脂蛋白胆固醇，导致细胞内脂质堆积，形成泡沫细胞。大量泡沫细胞堆积在一起形成脂质条纹乃至脂质斑块。

作者声明：文章为原创作品，无一稿两投，无内容剽窃，无作者署名争议，无保密泄露问题，无与他人课题及专利技术的争执。

4 参考文献 References

[1] Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. Cell. 2011;145(3): 341-355.

[2] Bobryshev YV. Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. Micron. 2006;37(3):208-222.

[3] Taghavie-Moghadam PL, Butcher MJ, Galkina EV. The dynamic lives of macrophage and dendritic cell subsets in atherosclerosis. Ann N Y Acad Sci. 2014;1319:19-37.

[4] Botham KM, Wheeler-Jones CP. Postprandial lipoproteins and the molecular regulation of vascular homeostasis. Prog Lipid Res. 2013;52(4):446-464.

[5] Imanishi T, Akasaka T. Novel strategies to target inflammatory processes in atherosclerosis. Curr Pharm Des. 2013;19(9): 1616-1625.

[6] Webb NR, Moore KJ. Macrophage-derived foam cells in atherosclerosis: lessons from murine models and implications for therapy. Curr Drug Targets. 2007;8(12):1249-1263.

[7] Fernández-Velasco M, González-Ramos S, Boscá L. Involvement of monocytes/macrophages as key factors in the development and progression of cardiovascular diseases. Biochem J. 2014;458(2):187-193.

[8] Gui T, Shimokado A, Sun Y, et al. Diverse roles of macrophages in atherosclerosis: from inflammatory biology to biomarker discovery. Mediators Inflamm. 2012;2012:693083.

[9] Yuan Y, Li P, Ye J. Lipid homeostasis and the formation of macrophage-derived foam cells in atherosclerosis. Protein Cell. 2012;3(3):173-181.

[10] Andreoli V, Gehrau RC, Bocco JL. Biology of Krüppel-like factor 6 transcriptional regulator in cell life and death. IUBMB Life. 2010;62(12):896-905.

[11] Zhang Y, Lei CQ, Hu YH, et al. Krüppel-like factor 6 is a co-activator of NF-κB that mediates p65-dependent transcription of selected downstream genes. J Biol Chem. 2014;289(18):12876-12885.

[12] Qi W, Holian J, Tan CY, et al. The roles of Kruppel-like factor 6 and peroxisome proliferator-activated receptor-γ in the regulation of macrophage inflammatory protein-3α at early onset of diabetes. Int J Biochem Cell Biol. 2011;43(3): 383-392.

[13] Duan SZ, Usher MG, Mortensen RM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effects in the vasculature. Circ Res. 2008;102(3):283-294.

[14] Mao Z, Ong AC. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists in kidney disease--future promise, present fears. Nephron Clin Pract. 2009;112(4):c230-241.

[15] Ketsawatsomkron P, Pelham CJ, Groh S, et al. Does peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR gamma) protect from hypertension directly through effects in the vasculature? J Biol Chem. 2010;285(13):9311-9316.

[16] Chen YC, Wu JS, Tsai HD, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-γ) and neurodegenerative disorders. Mol Neurobiol. 2012;46(1): 114-124.

[17] Freitag CM, Miller RJ. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists modulate neuropathic pain: a link to chemokines? Front Cell Neurosci. 2014;8:238.

[18] Yang J, Zhou Y, Guan Y. PPARγ as a therapeutic target in diabetic nephropathy and other renal diseases. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2012;21(1):97-105.

[19] Date D, Das R, Narla G, et al. Kruppel-like transcription factor 6 regulates inflammatory macrophage polarization. J Biol Chem. 2014;289(15):10318-10329.

[20] Steinberg D. Modified forms of low-density lipoprotein and atherosclerosis. J Intern Med. 1993;233(3):227-232.

[21] Lei L, Xiong Y, Chen J, et al. TNF-alpha stimulates the ACAT1 expression in differentiating monocytes to promote the CE-laden cell formation. J Lipid Res. 2009;50(6): 1057-1067.

[22] Luo ZF, Feng B, Mu J, et al. Effects of 4-phenylbutyric acid on the process and development of diabetic nephropathy induced in rats by streptozotocin: regulation of endoplasmic reticulum stress-oxidative activation. Toxicol Appl Pharmacol. 2010;246(1-2):49-57.
[23] Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. Cell. 2001;104(4):503-516.
[24] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N Engl J Med. 2005;352(16):1685-1695.
[25] Mehta JL, Saldeen TG, Rand K. Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease. J Am Coll Cardiol. 1998;31(6): 1217-1225.
[26] Steinberg D. Hypercholesterolemia and inflammation in atherogenesis: two sides of the same coin. Mol Nutr Food Res. 2005;49(11):995-998.
[27] Malkin CJ, Pugh PJ, Jones RD, et al. Testosterone as a protective factor against atherosclerosis--immunomodulation and influence upon plaque development and stability. J Endocrinol. 2003;178(3):373-380.
[28] George JF, Pinderski LJ, Litovsky S, et al. Of mice and men: mouse models and the molecular mechanisms of post-transplant coronary artery disease. J Heart Lung Transplant. 2005;24(12):2003-2014.
[29] Li JJ. Inflammation: an important mechanism for different clinical entities of coronary artery diseases. Chin Med J (Engl). 2005;118(21):1817-1826.
[30] O'Kelly BF, Massie BM, Tubau JF, et al. Coronary morbidity and mortality, pre-existing silent coronary artery disease, and mild hypertension. Ann Intern Med. 1989;110(12):1017-1026.
[31] Bellosta S, Bernini F, Chinetti G, et al. Macrophage function and stability of the atherosclerotic plaque: progress report of a European project. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2002;12(1): 3-11.
[32] Granada JF, Kaluza GL, Wilensky RL, et al. Porcine models of coronary atherosclerosis and vulnerable plaque for imaging and interventional research. EuroIntervention. 2009;5(1): 140-148.
[33] Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. Nat Med. 2002;8(11):1235-1242.
[34] Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. Nat Rev Immunol. 2006;6(7):508-519.
[35] Hansson GK, Nilsson J. Vaccination against atherosclerosis? Induction of atheroprotective immunity. Semin Immunopathol. 2009;31(1):95-101.
[36] Nilsson J, Nordin Fredrikson G, Schiopu A, et al. Oxidized LDL antibodies in treatment and risk assessment of atherosclerosis and associated cardiovascular disease. Curr Pharm Des. 2007;13(10):1021-1030.
[37] Loppnow H, Werdan K, Buerke M. Vascular cells contribute to atherosclerosis by cytokine- and innate-immunity-related inflammatory mechanisms. Innate Immun. 2008;14(2):63-87.
[38] Meier P, Meier R, Blanc E. Influence of $CD4^+/CD25^+$ regulatory T cells on atherogenesis in patients with end-stage kidney disease. Expert Rev Cardiovasc Ther. 2008;6(7): 987-997.
[39] Gibson FC 3rd, Ukai T, Genco CA. Engagement of specific innate immune signaling pathways during Porphyromonas gingivalis induced chronic inflammation and atherosclerosis. Front Biosci. 2008;13:2041-2059.
[40] Nilsson J, Fredrikson GN, Björkbacka H, et al. Vaccines modulating lipoprotein autoimmunity as a possible future therapy for cardiovascular disease. J Intern Med. 2009;266(3): 221-231.
[41] Bechmann LP, Vetter D, Ishida J, et al. Post-transcriptional activation of PPAR alpha by KLF6 in hepatic steatosis. J Hepatol. 2013;58(5):1000-1006.
[42] Narla G, Friedman SL, Martignetti JA. Krüppel cripples prostate cancer: KLF6 progress and prospects. Am J Pathol. 2003;162(4):1047-1052.
[43] Weber U, Rodriguez E, Martignetti J, et al. Luna, a Drosophila KLF6/KLF7, is maternally required for synchronized nuclear and centrosome cycles in the preblastoderm embryo. PLoS One. 2014;9(6):e96933.
[44] Ozdemir F, Koksal M, Ozmen V, et al. Mutations and Krüppel-like factor 6 (KLF6) expression levels in breast cancer. Tumour Biol. 2014;35(6):5219-5225.
[45] Das H, Kumar A, Lin Z, et al. Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates proinflammatory activation of monocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(17):6653-6658.
[46] Nayak L, Goduni L, Takami Y, et al. Kruppel-like factor 2 is a transcriptional regulator of chronic and acute inflammation. Am J Pathol. 2013;182(5):1696-1704.
[47] Feinberg MW, Cao Z, Wara AK, et al. Kruppel-like factor 4 is a mediator of proinflammatory signaling in macrophages. J Biol Chem. 2005;280(46):38247-38258.
[48] Liao X, Sharma N, Kapadia F, et al. Krüppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. J Clin Invest. 2011;121(7): 2736-2749.
[49] Joyce CW, Amar MJ, Lambert G, et al. The ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) modulates the development of aortic atherosclerosis in C57BL/6 and apoE-knockout mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(1):407-412.
[50] Westerterp M, Murphy AJ, Wang M, et al. Deficiency of ATP-binding cassette transporters A1 and G1 in macrophages increases inflammation and accelerates atherosclerosis in mice. Circ Res. 2013;112(11):1456-1465.
[51] Chen X, Zhao Y, Guo Z, et al. Transcriptional regulation of ATP-binding cassette transporter A1 expression by a novel signaling pathway. J Biol Chem. 2011;286(11):8917-8923.
[52] Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, et al. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. Mol Cell. 2001;7(1): 161-171.