

## 研究论文

# CCL2促进大鼠原代心肌微血管内皮细胞血管形成

娄强<sup>1, #, \*</sup>, 刘永莲<sup>1, #</sup>, 张舒曼<sup>2</sup>, 李园园<sup>1</sup>, 黄小凤<sup>1</sup>

<sup>1</sup>河南大学抗体药物开发技术国家地方联合实验室, 河南大学基础医学院, 开封 475004; <sup>2</sup>河南大学淮河临床学院, 开封 475000

**摘要:** 本文旨在探讨趋化因子CCL2在成年大鼠原代心肌微血管内皮细胞(cardiac microvascular endothelial cell, CMEC)血管形成中的作用。分离原代大鼠CMEC, 用CD31和VIII因子免疫染色鉴定, 观察不同时间点基质胶(Matrigel)上CMEC血管形成情况, 用real-time RT-PCR和ELISA分别检测在血管形成过程中CCL2的表达和分泌情况。结果显示: (1)大鼠原代CMEC分离成功, 该细胞具有形成血管能力, 成网数和节点数在Matrigel处理后4 h显著增加; (2) CMEC血管形成过程中CCL2和CCR2的表达量显著上调, 并且CCL2的分泌量明显增加; (3) CCL2阻断抗体和CCR2拮抗剂均可显著降低CMEC血管形成能力。上述结果提示, 大鼠原代CMEC在血管形成过程中可分泌CCL2, 并且CCL2-CCR2信号通路促进了CMEC血管形成。

**关键词:** CCL2; 大鼠原代心肌微血管内皮细胞; 血管形成

**中图分类号:** R329.28

## CCL2 promotes angiogenesis of primary rat cardiac microvascular endothelial cells

LOU Qiang<sup>1, #, \*</sup>, LIU Yong-Lian<sup>1, #</sup>, ZHANG Shu-Man<sup>2</sup>, LI Yuan-Yuan<sup>1</sup>, HUANG Xiao-Feng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National and Local Joint Laboratory for Antibody Drug Development Techniques, Basic Medical School of Henan University, Kaifeng 475004, China; <sup>2</sup>The Huaihe Clinical College of Henan University, Kaifeng 475000, China

**Abstract:** The aim of the present study was to investigate the role of chemokine CCL2 in angiogenesis of primary adult rat cardiac microvascular endothelial cells (CMEC). The rat CMECs were isolated and identified through morphology examination and immunostaining with CD31 and factor VIII antibodies. The angiogenesis of CMEC on Matrigel was evaluated at different time points. The expression and secretion of CCL2 during the process of angiogenesis was detected by real-time RT-PCR and ELISA, respectively. The results showed that, the primary rat CMEC was isolated successfully, and the angiogenesis of CMEC was significantly induced after Matrigel treatment for 4 h. The expression of CCL2 and CCR2 were increased during angiogenesis, and the secretion of CCL2 was detected after 2 h of angiogenesis and reached the peak concentration of 1 588.1 pg/mL after 4 h. Either CCL2 blocking antibody or CCR2 antagonist significantly reduced the angiogenesis of CMEC. These results suggest that CCL2 is secreted during the process of angiogenesis of CMEC, and CCL2/CCR2 signaling pathway may play an important role in promoting angiogenesis.

**Key words:** CCL2; primary rat cardiac microvascular endothelial cells; angiogenesis

近年来心血管疾病的发病率和死亡率逐年增高, 心肌缺血、心肌肥大过程中心肌微血管代偿性

增加并伴随心肌微血管内皮细胞 (cardiac microvascular endothelial cell, CMEC) 的功能改变<sup>[1,2]</sup>。CMEC

Received 2019-08-07 Accepted 2020-03-05

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81970592), Science and Technology Program of Henan Province, China (No. 192102310314), and the Basic Research Funding of Henan University, China.

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding author. E-mail: qiang\_lou@126.com

对心脏代谢、生长、节律性和血管形成起着重要作用,具有异质性和器官特异性<sup>[3]</sup>。小鼠 CMEC 经内毒素刺激后可分泌趋化因子 CCL2 (C-C motif chemokine ligand 2),即单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1),并且核因子  $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 激活增加<sup>[4]</sup>。大鼠 CMEC 低氧/复氧后促炎细胞因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  分泌明显增加<sup>[5]</sup>。目前研究显示,趋化因子 CCL2 是由 76 个氨基酸残基组成的分子量为 13 kDa 的趋化因子,参与细胞的生长、发育、分化、凋亡和分布等多种生理功能,并在多种病理生理过程中发挥重要作用,如炎症反应、病原体感染、创伤修复及肿瘤形成和转移等<sup>[6]</sup>。研究显示,趋化因子 CCL2 也参与血管形成过程,CCL2 敲除小鼠血管形成能力受损<sup>[7,8]</sup>。CCL2 通过与其特异性受体 CCR2 结合,可在乳腺癌组织中显著促进血管形成<sup>[9]</sup>。然而,CCL2 对于 CMEC 血管形成的作用仍不清楚。本研究从成年 Wistar 大鼠中分离原代 CMEC,分析在血管形成过程中趋化因子 CCL2 分泌的变化,及 CCL2 对 CMEC 血管形成能力的影响,本研究结果将有助于理解 CCL2 对大鼠原代 CMEC 的调控作用。

## 1 材料与方法

**1.1 大鼠 CMEC 的分离与培养** 大鼠原代 CMEC 的分离方法参考已有文献报道<sup>[10,11]</sup>,并做改进。本研究动物实验方案经河南大学医学院医学与科研伦理委员会批准(许可证编号:HUSOM2020-263)。成年 Wistar 雄性大鼠(200~240 g)购自北京维通利华实验动物技术有限公司,用 2% 戊巴比妥钠腹腔麻醉后将其固定于手术台上,75% 酒精消毒皮肤,开胸,无菌剪下心脏,置于预冷的 PBS 中,用预冷的 PBS 清洗心脏至无淡红色血液流出,在超净工作台内剥离左心室部分后用 PBS 洗 1 次,去除心内、外膜,在 70% 的乙醇中灭活 30 s,用 PBS 清洗 1 次,在冰上用手术刀片将组织切成 1 mm<sup>3</sup> 大小的组织块,将其转移到锥形瓶中,再用 D-Hanks 缓冲液(H1040-500, Solarbio 公司)清洗一次,弃去液体,加入 15 mL 提前配制好的 0.2% 的 II 型胶原酶(LS004176, Worthington 公司),37 °C 振荡消化 25 min,然后加入同等体积的 0.05% 胰酶(无 EDTA)(15050057, Gibco 公司)反复吹打几次,继续 37 °C 振荡消化 25 min,加入 15 mL 含有 10% 胎牛血清(ST30-3302, PAN-Seratech 公司)的 DMEM 培养基

(16000-044, Gibco 公司)终止消化,用 70  $\mu$ m 孔径的网筛将细胞悬液过滤到新的 50 mL 离心管中,800 g 离心 10 min,弃上清,用 CMEC 细胞培养基重悬。CMEC 细胞培养基为 DMEM 和 M199 (11150-059, Gibco 公司)等比例混合,并含有 20% 胎牛血清、2 ng/mL VEGF (DC083, Novoprotein 公司)、870 nmol/L 胰岛素 (I9278, Sigma 公司)、65 nmol/L 转铁蛋白 (T8158, Sigma 公司)、29 nmol/L 亚硒酸钠 (S5261, Sigma 公司)、青链霉素 (100 $\times$ , SV30010, Hyclone 公司)。细胞计数后接种 ( $2 \times 10^5$  个/孔)到提前 4 h 采用 1 mg/mL 鼠尾胶原 (C7661, Sigma 公司)包被好的 12 孔板中,在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 温箱中培养 6 h 后更换新鲜的培养基,以后每 2 天换一次液,待细胞接近融合时进行传代。

**1.2 大鼠 CMEC 的鉴定** 分离的原代大鼠 CMEC 采用形态观察和细胞表面 VIII 因子相关抗原及 CD31 抗体染色鉴定。分别于 1、2、3、5 d 在倒置显微镜下观察 CMEC 的形态,并记录细胞生长状态。将生长至融合状态的细胞按 5 000 个/孔接种到 96 孔板中,每隔 1 天后分别进行:(1) 消化收集细胞,取 20  $\mu$ L 细胞悬液与台盼蓝 1:1 混合后进行细胞计数,绘制生长曲线;(2) 将培养基换成培养基与 MTS (G3580, Promega 公司)等比例混合液,置于细胞培养箱中避光孵育 4 h,检测 490 nm 波长下的吸光度值。

**1.3 CMEC 表面标志物的免疫荧光染色** 消化收集细胞,按照  $2 \times 10^4$  个/孔接种到放有细胞爬片的 24 孔板中,置于含有 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 温箱中培养 24 h。弃培养基,用 PBS 洗三遍,4% 的多聚甲醛室温固定 20 min。用 PBS 洗涤细胞 3 次,2 min/次,加入 30 mmol/L 甘氨酸 1 mL,室温反应 5 min,用 PBS 洗涤细胞 3 次,2 min/次,与 0.1% Triton-X-100 于 4 °C 孵育 10 min,加 3% BSA-PBS 室温封闭 1 h,弃封闭液,将细胞爬片置于载玻片上,滴加用 3% BSA-PBS 稀释的小鼠抗大鼠 CD31 抗体 (ab119339, Abcam 公司)或兔抗大鼠 VIII 因子相关抗原抗体 (NB100-91761, Novusbio 公司)(稀释比例均为 1:100),湿盒内 4 °C 冰箱孵育过夜。用 PBS 洗涤细胞 3 次,5 min/次,加入相应的 Alexa Fluor594-羊抗鼠 IgG (A11005, Invitrogen 公司)或 AF488 羊抗兔 IgG 抗体 (A11008, Invitrogen 公司)(3% BSA-PBS 1:1 000 稀释)于湿盒内避光孵育 1 h, PBS 洗涤细胞 3 次,5 min/次,加 1:1 000 稀释的 DAPI 染液,

避光孵育 5 min。DAPI 染液用 3% BSA-PBS 稀释。弃 DAPI 染液, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 5 min/ 次, 取出细胞爬片, 封片后于倒置荧光显微镜下观察。

**1.4 CMEC 血管形成实验** 提前一天把基质胶 (Matrigel) (354234, Corning 公司) 置于冰上 4 °C 融化。在无菌条件下, 将 200 μL Matrigel 迅速铺到 -20 °C 预冷的 24 孔板中, 使 Matrigel 均匀铺满整个板孔, 随后 24 孔板置于含 95% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 温箱中孵育 30 min, 使 Matrigel 成固态。消化收集细胞, 计数, 取 2 × 10<sup>5</sup> 个细胞均匀接种到有 Matrigel 的 24 孔板中。在光学显微镜下观察不同时间点 (2, 4, 6 h) 的 CMEC 血管形成情况。用 ImageJ 软件分析血管管腔和血管节点个数。

**1.5 ELISA 检测血管形成过程中 CCL2 分泌** 按照 CCL2/MCP-1 ELISA 检测试剂盒 (DY3144-05, RD systems) 说明书进行如下操作: 每孔加 100 μL Coating buffer, 4 °C 过夜。弃去液体, 用 Wash buffer 洗 3 次, 2 min/ 次, 最后一次拍干。每孔加入 200 μL 稀释液, 室温孵育 1 h。每孔分别加 100 μL 样品或标准品 (标准品用稀释液稀释为不同浓度, 最高稀释至 200 倍), 室温孵育 2 h。弃去液体, 用 Wash buffer 洗 5 次, 每次洗 30 s~1 min, 最后一次拍干。加入 100 μL/ 孔工作液, 室温孵育 1 h 后弃去液体, 用 Wash buffer 洗 5 次, 最后一次拍干。每孔加 100 μL 底物溶液, 避光孵育 30 min。加入 50 μL 终止液后测 450 和 570 nm 波长处吸光度值, 根据 OD<sub>570</sub> 与 OD<sub>450</sub> 的读数差值计算样品浓度。

**1.6 Real-time RT-PCR 检测 CCL2 和 CCR2 mRNA 表达** 取 2 × 10<sup>5</sup> 个细胞均匀接种到有 Matrigel 的 24 孔板中, 分别于血管形成过程中的 0 和 4 h 收集细胞。采用 Trizol 裂解处理后提取 RNA, 以逆转录的 cDNA 作为模板进行 real-time RT-PCR 检测 CCL2 和 CCR2 mRNA 表达水平, 以 β-actin 作为内参。引物序列见表 1。采用 7500 Fast real time PCR system

(Life Technologies 公司) 进行上机检测。程序为: 预加热: 95 °C, 10 min; 40 个循环: 95 °C, 10 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 32 s。

**1.7 用 CCL2 阻断抗体或 CCR2 拮抗剂处理 CMEC 后血管形成能力观察** CMEC 消化计数后每孔接种 2 × 10<sup>5</sup> 个细胞到铺有 Matrigel 的 24 孔板中, 将细胞分为对照组 (未添加试剂)、IgG 组 [用 IgG (EPR25A, Abcam 公司) 处理]、CCL2 抗体组 [用 CCL2 中和抗体 (ab25124, Abcam 公司) 处理]。IgG 和 CCL2 中和抗体浓度均为 5 μg/mL。

另取同样铺有 Matrigel 的 24 孔板中的 CMEC 进行 CCR2 拮抗剂 RS504393 (2517, RD systems) 处理, 细胞分为对照组 (未添加试剂) 和 CCR2 拮抗剂组 (用 RS504393 处理)。CCR2 拮抗剂的浓度为 10 μmol/L。各组处理 4 h 后在显微镜下进行拍照。

**1.8 统计学处理** 数据均采用 mean ± SEM 表示, 用 GraphPad Prism 7 统计软件进行分析。多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 两两比较采用 LSD 分析, P < 0.05 时认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功分离原代大鼠 CMEC

成年 Wistar 大鼠原代 CMEC 分离培养 24 h 后, 呈梭形贴壁细胞。3~5 d 时细胞增长较快, 细胞呈梭形或三角形, 在细胞密度高时呈铺路石形 (图 1A), 待细胞长至近融合状态时进行传代。台盼蓝染色后进行细胞计数 (图 1B) 及 MTS 增殖实验 (图 1C) 结果显示, 原代 CMEC 培养 3~4 d 进入呈对数期增殖期, 4 d 以后细胞增殖缓慢, 进入稳定期。

免疫荧光染色结果显示, 原代培养 5 d 的 CMEC 细胞质与细胞核周围存在 CD31 抗原阳性颗粒 (红色荧光) 和 VIII 因子相关抗原阳性颗粒 (绿色荧光, 图 1D), 表明本研究成功分离出原代 CMEC。

表 1. Real-time RT-PCR 引物  
Table 1. Real-time RT-PCR primers

Primers	Sequences (5' to 3')	Target length (bp)
CCL2 forward	TGGGCCTGTTGTTACAGT	127
CCL2 reverse	TTCTCCAGCCGACTCATTG	
CCR2 forward	CATACTTGTTGGCCCTTATTTTCC	174
CCR2 reverse	GATGAGCCTCACAGCCCTAT	
β-actin forward	CTTCCAGCCTTCCTTCCTGG	145
β-actin reverse	AATGCCTGGGTACATGGTGG	

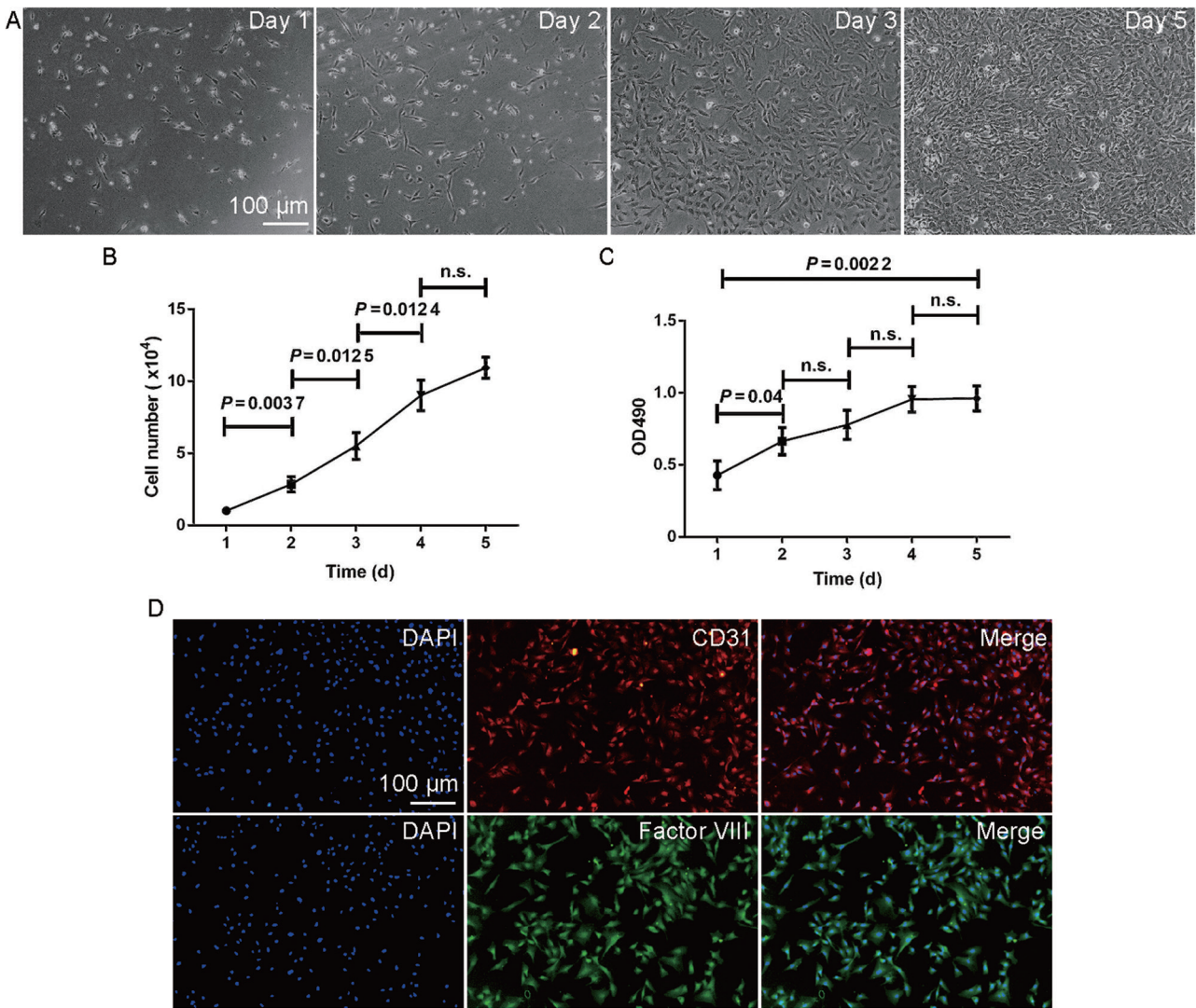


图 1. 大鼠原代心肌微血管内皮细胞的分离与鉴定

Fig. 1. Isolation and identification of primary rat cardiac microvascular endothelial cells (CMEC). *A*: Cell morphology after incubation for 1, 2, 3, and 5 days. *B*: Results of trypan blue staining. *C*: Results of MTS staining. Mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . n. s., no significance. *D*: Representative images of immunofluorescence staining with CD31 and factor VIII antibodies. Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ .

## 2.2 原代CMEC体外血管形成能力及CCL2/CCR2表达

CMEC 具有内皮细胞形成血管的特点，在铺有 Matrigel 的 24 孔板中 2 h 可见黏附、分散网状结构，4 h 可见血管网络状结构 (图 2A)。血管形成不同时间点管腔的变化明显，表现为成网数和节点数在 4 h 达到最高，与 2 h 相比具有显著差异 ( $P < 0.05$ ) (图 2B、C)。

为了验证 CCL2 是否在血管生成中发挥作用，本研究用 real-time RT-PCR 方法检测了血管形成过程中 CCL2 和 CCR2 mRNA 表达水平，结果显示，在 Matrigel 上 4 h 时 CCL2 和 CCR2 的表达量分别上调为 0 h 的 3.59 倍和 3.36 倍，差异具有显著性 (图 3A)；

进一步采用 ELISA 方法检测了血管形成过程中细胞培养液上清 CCL2 的分泌量，结果显示在 Matrigel 上 4 h 后 CCL2 分泌量达到高峰，为 1 588.1 pg/mL (图 3B)。

## 2.3 CCL2-CCR2信号通路阻断后抑制CMEC血管形成

为了验证 CCL2 对血管形成的影响，本研究在 CMEC 形成管腔过程中加入 CCL2 中和抗体，结果显示，和对照组相比，CCL2 抗体组培养上清中游离的 CCL2 含量显著降低 (图 4A)，血管的成网数和节点数均显著减少，分别为对照组的 66.2% 和 73% ( $P < 0.05$ ) (图 4B~D)。

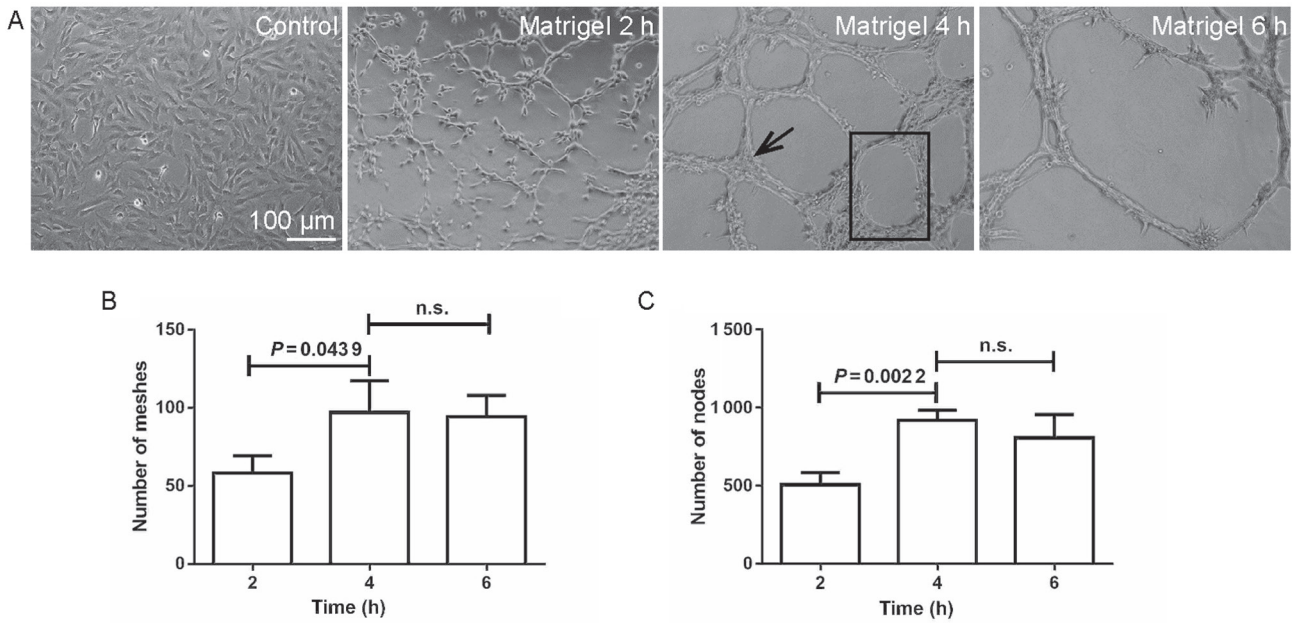


图 2. 大鼠原代心肌微血管内皮细胞的血管形成能力

Fig. 2. The angiogenesis of rat cardiac microvascular endothelial cells (CMEC) after treatment with Matrigel for 2, 4, and 6 h. A: Cell morphology. Scale bar, 100  $\mu$ m. Square: mesh; Arrow: node. B: Number of meshes. C: Number of nodes. Mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . n. s., no significance.

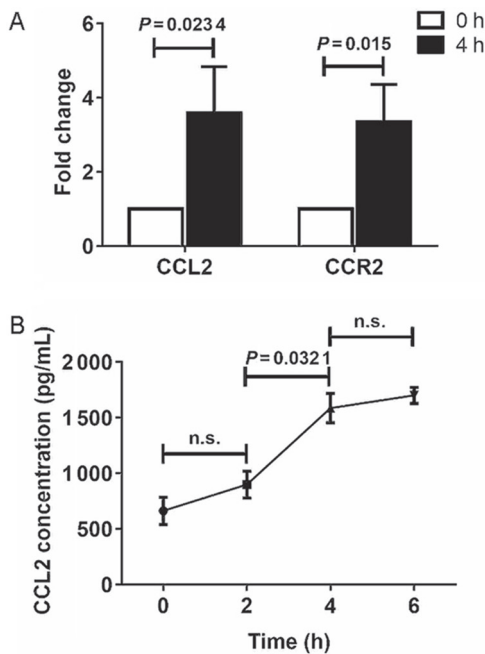


图 3. 血管形成过程中大鼠原代心肌微血管内皮细胞CCL2和CCR2的表达及CCL2的分泌

Fig. 3. mRNA expression levels of CCL2 and CCR2 (A) and CCL2 secretion (B) in rat cardiac microvascular endothelial cells (CMEC) during angiogenesis. The mRNA expression levels were detected by real-time RT-PCR. The CCL2 concentrations in the supernatant were analyzed using ELISA. Mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . n. s., no significance.

另外，在 CMEC 形成管腔过程中加入 CCR2 拮抗剂 RS504393 (10  $\mu$ mol/L) 处理，结果显示，和对照组相比，CCR2 拮抗剂组 CMEC 血管形成能力受到显著抑制，成网数和节点数显著下降，分别为对照组的 59.1% 和 59.6% ( $P < 0.05$ ) (图 5)。

### 3 讨论

血管形成在恢复心肌缺血 / 再灌注过程中起重要作用，内皮细胞活化是血管形成的重要步骤。本研究成功分离大鼠原代 CMEC 用以研究血管形成，模拟体内血管重建的生理过程，探讨了趋化因子 CCL2 在血管形成过程中的分泌与作用。

在大鼠原代 CMEC 的分离上，本研究做了如下改进：剥除心内膜以及心外膜，用 75% 乙醇灭活 30 s，更好地避免了心内膜的内皮细胞及心外膜的间质细胞对 CMEC 的污染，另外，本研究把组织块切成 1 mm<sup>3</sup> 的大小，这有利于更好把握消化时间，避免对细胞造成更多的损伤。本研究分离出的细胞的形态和形成管腔样的结构特点符合 CMEC 的特点，内皮细胞表面分子标志 CD31 及 VIII 因子相关抗原染色鉴定结果也确认了原代大鼠 CMEC 分离成功。我们将分离的 CMEC 进行了 Vimentin 抗体染色 (补充图 1A，网址 <http://www.actaps.com.cn/>)

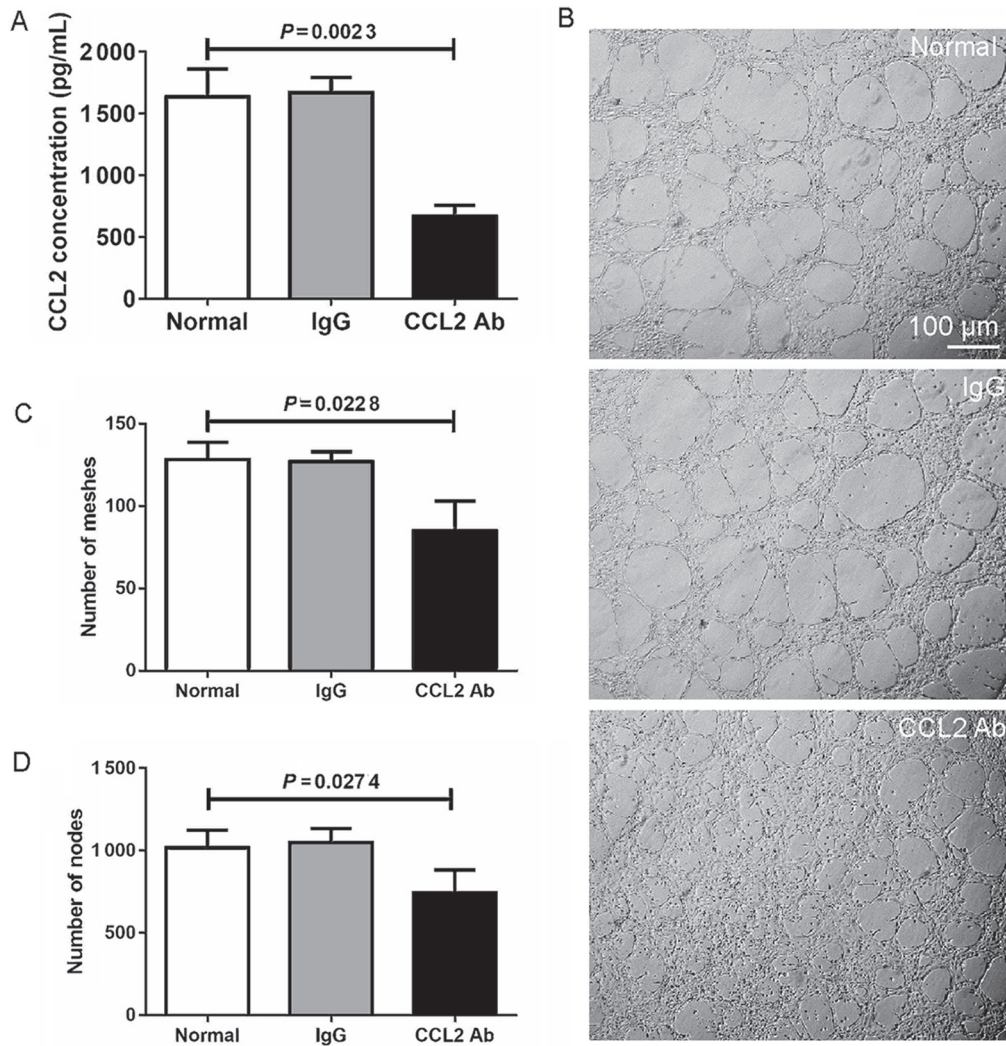


图 4. CCL2中和抗体抑制大鼠原代心肌微血管内皮细胞血管形成

Fig. 4. The CCL2 neutralizing antibody inhibited angiogenesis of rat cardiac microvascular endothelial cells (CMEC). *A*: CCL2 concentration in the supernatant analyzed by ELISA. *B*: Cell morphology after incubation with or without CCL2 antibody (Ab) for 4 h. Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ . *C*: Number of meshes. *D*: Number of nodes. Mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ .

supplement/195Sfig.pdf), 结果显示免疫荧光染色呈阴性, 排除了分离出的细胞是成纤维细胞的可能。此外, 我们同时分离了大鼠原代心肌成纤维细胞 (adult rat ventricular fibroblast, ARVF), 免疫荧光染色显示 Vimentin 和  $\alpha$ -SMA 抗体染色呈阳性, 而 CD31 和 VIII 因子抗体染色呈阴性 (补充图 1B, 网址 <http://www.actaps.com.cn/supplement/195Sfig.pdf>), 表明 CD31 和 VIII 因子是 CMEC 较为特异的分子标志物。

肿瘤细胞 (如小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10) 形成的血管可能具有较小的内腔, 更易于片段化和崩解, 这有利于肿瘤细胞在体内的扩散<sup>[12]</sup>。在本研究中, 成年大鼠原代 CMEC 形成血管 4 h 的管腔明显比

2 h 管腔大, 这可能与血管形成的过程中并不伴随血管内皮细胞增殖能力的增强有关。

CCL2 被认为能促进人脐静脉和皮肤内皮细胞的血管形成<sup>[13]</sup>, 并且可以上调低氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达水平<sup>[14]</sup>, 因此 CCL2 在内皮细胞血管形成过程中可能发挥了关键作用。CCL2 阻断抗体应用于乳腺癌小鼠可以明显降低肺转移<sup>[13]</sup>。本研究结果显示, 与对照组相比, CCL2 抗体组 CMEC 血管形成能力显著降低, 提示 CCL2 可能在 CMEC 血管形成过程中起作用。CCL2 阻断抗体并不能完全抑制 CMEC 的血管形成能力, 说明 CCL2 在 CMEC 介导的血管

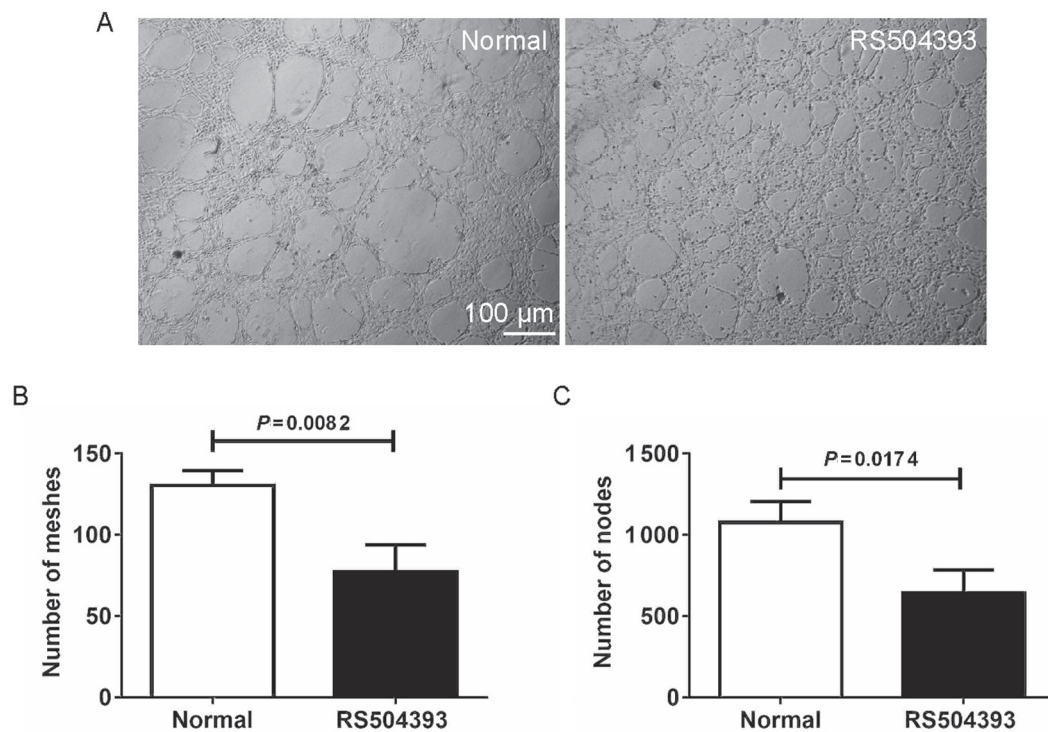


图 5. CCR2拮抗剂抑制大鼠原代心肌微血管内皮细胞血管形成  
 Fig. 5. The CCR2 antagonist inhibited angiogenesis of rat cardiac microvascular endothelial cells (CMEC). *A*: Cell morphology after incubation without or with CCR2 antagonist (RS504393) for 4 h. Scale bar, 100  $\mu$ m. *B*: Number of meshes. *C*: Number of nodes. Mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ .

形成中不是唯一的因素，可能是对下游信号途径调控，如 Ets-1 信号途径<sup>[15]</sup>，但是具体机制尚不明确。

心肌肥大或心脏失代偿等情况伴随了心脏血管生成和血管重构的缺陷<sup>[16]</sup>。心脏血流动力学的改变或缺氧刺激可能促使促血管生成因子如 CCL2 释放增加，进而诱导适应性的心肌重构。CMEC 对血管生成的作用可能依赖于 CCL2 的表达与分泌。

综上所述，本研究结果显示，在 CMEC 血管形成过程中，CCL2 和 CCR2 的表达量显著上调，并且 CCL2 的分泌量明显增加，应用 CCL2 阻断抗体后发现其血管形成能力受到明显抑制，提示 CCL2 在大鼠 CMEC 血管形成中可能起促进作用。

### 参考文献

- 1 Pries AR, Kuebler WM, Habazettl H. Coronary microcirculation in ischemic heart disease. *Curr Pharm Des* 2018; 24(25): 2891–2892.
- 2 Juni RP, Kuster DWD, Goebel M, Helmes M, Musters RJP, van der Velden J, Koolwijk P, Paulus WJ, van Hinsbergh VWM. Cardiac microvascular endothelial enhancement of cardiomyocyte function is impaired by inflammation and

restored by empagliflozin. *JACC Basic Transl Sci* 2019; 4(5): 575–591.

- 3 Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncali L, Dammacco F. Endothelial cell heterogeneity and organ specificity. *J Hematother Stem Cell Res* 2002; 11(1): 81–90.
- 4 Li J, Zhai Y, Ao L, Hui H, Fullerton DA, Dinarello CA, Meng X. Interleukin-37 suppresses the inflammatory response to protect cardiac function in old endotoxemic mice. *Cytokine* 2017; 95: 55–63.
- 5 Guo X, Jiang H, Chen J, Zhang BF, Hu Q, Yang S, Yang J, Zhang J. RP105 ameliorates hypoxia/reoxygenation injury in cardiac microvascular endothelial cells by suppressing TLR4/MAPKs/NF-kappaB signaling. *Int J Mol Med* 2018; 42: 505–513.
- 6 Winter C, Silvestre-Roig C, Ortega-Gomez A, Lemnitzer P, Poelman H, Schumski A, Winter J, Drechsler M, de Jong R, Immler R, Sperandio M, Hristov M, Zeller T, Nicolaes GAF, Weber C, Viola JR, Hidalgo A, Scheiermann C, Soehnlein O. Chrono-pharmacological targeting of the CCL2-CCR2 axis ameliorates atherosclerosis. *Cell Metabolism* 2018; 28(1): 175–182.
- 7 Le Y, Zhou Y, Iribarren P, Wang J. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease.

- Cell Mol Immunol 2004; 1(2): 95–104.
- 8 Ridiandries A, Bursill C, Tan J. Broad-spectrum inhibition of the CC-chemokine class improves wound healing and wound angiogenesis. *Int J Mol Sci* 2017; 18(1): e155.
  - 9 Han R, Gu S, Zhang Y, Luo A, Jing X, Zhao L, Zhao X, Zhang L. Estrogen promotes progression of hormone-dependent breast cancer through CCL2-CCR2 axis by upregulation of Twist via PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling. *Sci Rep* 2018; 8(1): 9575.
  - 10 Rayile A (热依兰·艾沙), Zhang XY, Dilnuel M, Aertzguli T, Yang N. Primary culture and identification of adult rat heart microvascular endothelial cells. *Chin J Cell Mol Immunol (细胞与分子免疫学杂志)* 2016; 32(4): 505–507 (in Chinese with English abstract).
  - 11 Nishida M, Carley WW, Gerritsen ME, Ellingsen O, Kelly RA, Smith TW. Isolation and characterization of human and rat cardiac microvascular endothelial cells. *Am J Physiol* 1993; 264(2): H639–H652.
  - 12 Conradi LC, Brajic A, Cantelmo AR, Bouché A, Kalucka J, Pircher A, Brünig U, Teuwen LA, Vinckier S, Ghesquière B, Dewerchin M, Carmeliet P. Tumor vessel disintegration by maximum tolerable PFKFB3 blockade. *Angiogenesis* 2017; 20(4): 599–613.
  - 13 Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 2000; 96(1): 34–40.
  - 14 Hong KH, Ryu J, Han KH. Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood* 2005; 105(4): 1405–1407.
  - 15 Stamatovic SM, Keep RF, Mostarica-Stojkovic M, Andjelkovic AV. CCL2 regulates angiogenesis via activation of Ets-1 transcription factor. *J Immunol* 2006; 177(4): 2651–2661.
  - 16 Gogiraju R, Bochenek ML, Schafer K. Angiogenic endothelial cell signaling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Front Cardiovasc Med* 2019; 6: 20.