

[文章编号] 1007-3949(2009)17-06-0439-05

· 实验研究 ·

## NARC-1 蛋白在新西兰兔动脉粥样硬化病变中的表达

唐志哈<sup>1</sup>, 刘录山<sup>1</sup>, 彭娟<sup>2</sup>, 杨琼<sup>1</sup>, 刘慧婷<sup>1</sup>, 姜志胜<sup>1</sup>

(南华大学 1. 心血管病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室; 2. 显微形态实验中心, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 动脉粥样硬化; 新西兰兔; NARC-1/PCSK9; 基因表达

**[摘要]** 目的 探讨 NARC-1 在新西兰兔动脉粥样硬化病变血管壁中的表达。方法 健康纯种雄性新西兰白兔 16 只, 适应性喂养 1 周后, 随机分为对照组和高胆固醇组, 每组 8 只; 对照组给予普通颗粒饲料喂养, 高胆固醇组给予高胆固醇饲料(2% 胆固醇)喂养; 两组动物于 8 周末安乐处死。全自动生化分析仪测定兔血浆中甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇含量, 计算动脉粥样硬化指数、高密度脂蛋白胆固醇/低密度脂蛋白胆固醇比值。苏丹 IV 染色测量兔主动脉粥样硬化病变面积。油红 O 染色及 HE 染色观察兔主动脉病理组织学改变, 并进行病理形态学定量分析。免疫组织化学法与免疫印迹法检测兔主动脉组织 NARC-1 蛋白的分布及表达水平。结果 8 周末, 高胆固醇组兔血浆总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和、动脉粥样硬化指数水平明显升高, 而高密度脂蛋白胆固醇/低密度脂蛋白胆固醇比值明显降低。高胆固醇组出现了明显的动脉粥样硬化病变, 主动脉内、中膜粥样硬化病变面积为  $27.41\% \pm 2.12\%$ , 与对照组 ( $0.51\% \pm 0.20\%$ ) 相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。病理组织学显示高胆固醇组兔主动脉内、中膜明显增厚, 内、中膜厚度比明显增大; 油红 O 染色光镜下显示, 高胆固醇组兔主动脉内皮下斑块内泡沫细胞呈橘红色, 对照组主动脉内、中膜未见明显着色; HE 染色光镜下显示, 高胆固醇组兔主动脉内、中膜显著增生, 形成明显斑块, 斑块中纤维组织增生, 可见大量泡沫细胞, 胞核较小, 胞浆内含有大量脂质空泡, 对照组内、中膜薄且结构完整。免疫组织化学检测发现高胆固醇组兔主动脉 NARC-1 蛋白表达明显, 染色呈强阳性, 且聚集于内、中膜斑块处; 在高倍镜下, NARC-1 蛋白主要分布在泡沫细胞的胞浆和胞膜, 而在对照组兔血管壁组织中未见表达。免疫印迹检测发现高胆固醇组兔主动脉 NARC-1 蛋白呈高表达, 而对照组兔血管壁组织未见表达。结论 新西兰兔的主动脉粥样硬化病变处 NARC-1 蛋白表达明显, 其主要分布在泡沫细胞的胞浆和胞膜中, 正常对照组兔主动脉血管壁组织未检测到 NARC-1 蛋白。提示 NARC-1/PCSK9 是影响动脉粥样硬化病变形成与发展的重要因素。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Investigation of NARC-1 Protein Expression in Atherosclerotic Lesion of New Zealand Rabbit

TANG Zhi-Han<sup>1</sup>, LIU Lu-Shan<sup>1</sup>, PENG Juan<sup>2</sup>, YANG Qiong<sup>1</sup>, LIU Hui-Ting, and JIANG Zhi-Sheng<sup>1</sup>

(1. Institute of Cardiovascular Disease Key Lab for Arteriosclerosis of Hunan Province, University of South China; 2. Micromorphology Laboratory Center, University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; New Zealand Rabbit; NARC-1/PCSK9; Gene Expression

[ABSTRACT] **Aim** To examine the expression of NARC-1 protein in atherosclerotic lesion of New Zealand rabbits.

**Methods** Male purebred New Zealand rabbits with adaptation feeding for 1 week, were randomly divided into control group ( $n=8$ ) and high-cholesterol group ( $n=8$ ). The control group was given a normal control diet and the high-fat group was fed a high-cholesterol diet (2% cholesterol). All rabbits were euthanized at the end of the 8-week experiment.

Plasma triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL) and low density lipoprotein cholesterol (LDL) were determined by commercially enzymatic methods. Atherosclerosis index (AI) and the HDL/LDL ratio were calculated. Sudan IV staining was used to examine the aortic atherosclerotic lesions. The pathological changes of rabbit aortic preparations was quantified by computer-assisted image analysis of oil red O and HE staining using Image-Pro Plus image analysis software. NARC-1 protein distribution and expression was analyzed by immunohistochemistry and Western blotting. **Results** Plasma TC, HDL and LDL concentrations, and AI were markedly increased, but the HDL/LDL ratio was markedly decreased in high-cholesterol group. High-cholesterol diet induced significant aortic atherosclerotic lesions. Histopathology analysis showed that aortic intima was obviously thickened and the intima/media thickness ratio was significantly increased in high-cholesterol group rabbits. Oil red O staining indicated that the number of foam cells in artery endothelium were markedly increased in the high-cholesterol group compared with the

[收稿日期] 2009-02-29 [修回日期] 2009-06-07

[基金项目] 湖南省科技计划重点项目(2008FJ2006)和动脉硬化化学湖南省高校科技创新团队经费资助

[作者简介] 唐志哈, 硕士, 研究方向为心血管疾病发病机制与防治, E-mail 为 tangzhihan98@yahoo.com.cn. 刘录山, 博士, 研究方向为心血管疾病发病机制与防治. 通讯作者姜志胜, 博士, 研究方向为心血管疾病发病机制与防治, E-mail 为 zsjiang2005@163.com.

control group. HE staining revealed the aortic intima in control rabbits was intact and thin, compared to thickened aortic intima and remarkable atherosclerotic plaques in high-fat group rabbits. Immunohistochemical detection showed NARC-1 protein was found in the intima plaque and located in cytoplasm and plasma membrane of foam cells in high-fat group. Western blotting analysis also indicated NARC-1 protein expression was significantly elevated in the aortic atherosclerotic plaque of high-fat group rabbits. **Conclusion** The high-cholesterol diet induced aortic atherosclerotic lesion in New Zealand rabbits. NARC-1 protein was remarkably expressed in aortic atherosclerotic plaque and located in the cytoplasm and plasma membrane of the foam cells in high-fat group rabbits. The results indicate that NARC-1/PCSK9 is one of the important factors involved in atherosclerosis development.

人类前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin 9, PCSK9) 是应用生物信息学方法和 DNA 微阵列技术发现的一个新的与血液胆固醇代谢调节相关的基因<sup>[1,2]</sup>, 其突变与低胆固醇血症和常染色体显性高胆固醇血症 (autosomal dominant hypercholesterolemia, ADH) 发生相关, 所编码的蛋白为神经凋亡调节转化酶 (neural apoptosis-regulated convertase 1, NARC-1), 是 PC 家族的成员之一, 它能够在蛋白水平降解 LDLR, 影响 LDL 的内化, 使血液中 LDL 不能被清除, 从而导致高胆固醇血症, 该基因的突变被认为是家族性高胆固醇血症的第三种类型。研究 NARC-1/PCSK9 在动脉粥样硬化 (As) 病变中的表达, 将有助于阐明 PCSK9 基因与 As 的关系, 揭示 As 发生的新机制, 为 As 的早期防治提供新靶点和新思路。本研究将采用喂饲高胆固醇饲料的新西兰兔复制 As 动物模型, 观察 NARC-1 在 As 病变中的表达情况, 为进一步探索 NARC-1/PCSK9 在 As 发生发展中的作用提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物模型的建立及分组

健康纯种雄性新西兰白兔 16 只购自南华大学动物部, 按清洁级动物分笼饲养, 适应性喂养 1 周后, 随机分为对照组和高胆固醇组, 每组 8 只。对照组喂饲普通颗粒饲料, 每只 100 g/d; 高胆固醇组给予高胆固醇饲料 (2% 胆固醇) 喂养, 每只 100 g/d。所有动物均自由饮水。共喂养 8 周。

### 1.2 标本收集和处理

两组兔均于实验结束前 (满 8 周) 经耳缘静脉注射戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉, 仰卧位固定于手术台上, 剖开胸腹腔, 剥离腹主动脉全长, 除去外膜脂肪组织, 并把标本置冰浴 PBS 液清洗去除血液及血管外组织。取部分血管组织用 10% 中性福尔马林固定, 其余部分置液氮罐中保存。

### 1.3 血脂测定

于实验前、实验 8 周末分别空腹抽取兔耳缘静脉血 5 mL, 离心后, 用全自动生化分析仪测定血浆

中甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 含量, 计算动脉粥样硬化指数 (AI) 和 HDL-C/LDL-C 比值。

### 1.4 苏丹 IV 染色

将纵向剖开的主动脉 (主动脉根部至髂总分支处) 置于 70% 酒精脱水 2 min, 苏丹 IV 染色 40 min, 80% 酒精固定 20 min, 流水冲洗 1 h, 把动脉平铺于玻璃盘上并照相, As 病变面积与动脉内膜总面积用图像分析软件 (Image-Pro Plus 6.0) 进行计算, 检测 As 病变占动脉内膜总面积的百分比。

### 1.5 油红 O 染色

取两组动物主动脉弓滴加包埋剂包埋, 用冰冻切片机制备冰冻切片 (8  $\mu\text{m}$ ), 用油红 O 染色 10 min, 蒸馏水冲洗 3 次, 每次 1 min, 苏木素复染 5 min, 1% 盐酸酒精分色 1 s, 封片后在光镜下观察 As 病变。

### 1.6 HE 染色

两组动物取主动脉弓处, 甲醛固定后按常规制作石蜡切片 (5  $\mu\text{m}$ ) 并行 HE 染色, 树脂封片保存。在光镜下观察腹主动脉病理学改变并照相。采用 Image-Pro Plus 图像分析系统测量腹主动脉平均内膜厚度、中层厚度, 计算内膜/中膜厚度比。

### 1.7 免疫组织化学检测

将石蜡切片常规脱蜡、水化后, 用 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; 每张切片加一滴过氧化酶阻断剂, 室温下孵育 10 min; 再用 PBS 洗 3 次后, 滴加非免疫性动物血浆, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 min; 弃去非免疫性动物血浆; 滴加 NARC-1 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜; PBS 洗 3 次后再滴加二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min; PBS 洗 3 次后滴加链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min; PBS 洗 3 次后, 用新鲜配制的 DAB 显色液显色, 显微镜下观察 2~5 min; 自来水冲洗, 苏木素浅染, 自来水冲洗返蓝, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。光学显微镜观察。

### 1.8 免疫印迹法检测

取兔主动脉组织, 裂解组织提取蛋白, BCA 法进行蛋白定量, 取 50  $\mu\text{g}$  蛋白加入 2  $\times$  SDS 凝胶加样缓冲液中, 在 100 $^{\circ}\text{C}$  加热 10 min 以使蛋白质变性。

用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,转 PD-VF 膜,丽春红染色观察转移效果,并确定蛋白分子量标准位置。在 5% 脱脂牛奶中 4℃ 封闭 1 h。按 1: 3 000 加入一抗,于 4℃ 孵育过夜。TBST 洗 3 次,1: 1 000 加入辣根过氧化物酶标记兔抗羊二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次,用免疫印迹荧光检测试剂盒显示于 X 光片。

1.9 统计学方法

数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 12.0 统计软件进

行统计处理,组间比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血脂水平变化

高脂饮食 8 周后,高胆固醇组兔血脂 TC、HDLc、LDLc 和 AI 水平明显升高,而 HDLc/LDLc 比值降低( $P < 0.05$ ;表 1)。

表 1. 实验前后血脂水平比较( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

指标	0 周		8 周	
	对照组	高胆固醇组	对照组	高胆固醇组
TC (mmol/L)	0.78 ± 0.29	0.71 ± 0.25	0.81 ± 0.31	0.65 ± 0.32
TC (mmol/L)	2.29 ± 1.39	2.9 ± 1.04	3.99 ± 0.99	17.54 ± 3.57 <sup>ab</sup>
HDLc (mmol/L)	0.76 ± 0.30	0.99 ± 0.24	0.94 ± 0.32	1.36 ± 0.38 <sup>ab</sup>
LDLc (mmol/L)	1.37 ± 0.69	1.79 ± 0.76	2.89 ± 0.76	16.06 ± 3.34 <sup>ab</sup>
HDLc/LDLc 比值	0.77 ± 0.39	0.68 ± 0.39	0.33 ± 0.09	0.08 ± 0.02 <sup>ab</sup>
AI	1.29 ± 0.69	1.92 ± 0.84	2.99 ± 0.99	16.54 ± 3.57 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与同组实验前比较。

2.2 主动脉粥样硬化病变面积分析

苏丹 IV 染色后肉眼观察,对照组主动脉内膜光滑,无深染斑块,呈现内膜本色,仅有极少量散在红染;高胆固醇组主动脉壁内膜粗糙凹凸不平,病变部位隆起的脂质条纹及斑块被染成深红色,成片状分布,红、白分明,以主动脉弓部及动脉分叉处最多。对照组内膜面粥样硬化病变面积为  $0.51\% \pm 0.20\%$ ,高胆固醇组为  $27.41\% \pm 2.12\%$ ,两组比较差异显著( $P < 0.01$ ;图 1)。

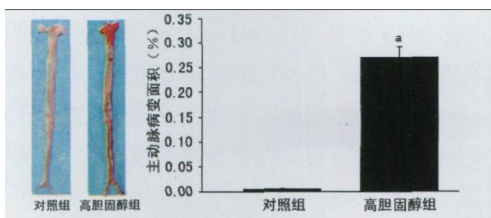


图 1. 实验 8 周后主动脉内膜粥样硬化病变面积变化( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) a 为  $P < 0.01$ ,与对照组比较。

2.3 主动脉病理组织学改变

油红 O 染色后光镜下观察,高胆固醇组主动脉内皮下出现大量呈橘红色染色的泡沫细胞,对照组未见着色(图 2)。HE 染色后光镜下观察,对照组内膜薄且结构完整;高胆固醇组主动脉内膜显著增生,形成明显斑块,斑块中纤维组织增生,可见大量泡沫

细胞,胞核较小,胞浆内含有大量脂质空泡(图 3)。

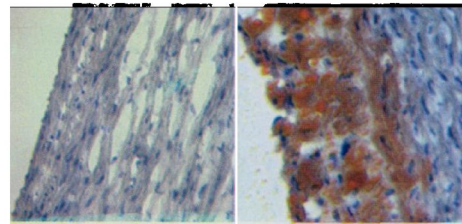


图 2. 油红 O 染色检测主动脉血管壁脂质沉积( $\times 200$ ) 左为对照组,右为高胆固醇组。

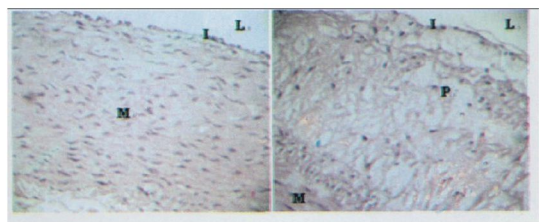


图 3. 主动脉 HE 染色( $\times 200$ ) 左为对照组,右为高胆固醇组;L 为血管腔,I 为内膜,M 为中膜,P 为斑块。

2.4 病理形态学定量分析

与对照组比较,高胆固醇组内膜明显增厚,内膜/中膜厚度比显著增大( $P < 0.01$ ;表 2)。

表 2. 兔主动脉病理形态学定量分析( $\bar{x} \pm s$ )

指 标	对照组	高胆固醇组
内膜厚度( $\mu\text{m}$ )	2.171 $\pm$ 1.350	192.732 $\pm$ 35.401 <sup>a</sup>
中膜厚度( $\mu\text{m}$ )	192.574 $\pm$ 12.723	250.534 $\pm$ 36.231
内膜/中膜厚度比	0.014 $\pm$ 0.003	0.771 $\pm$ 0.232 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

## 2.5 主动脉组织 NARC-1 蛋白表达及分布

免疫组织化学检测发现, NARC-1 蛋白在对照

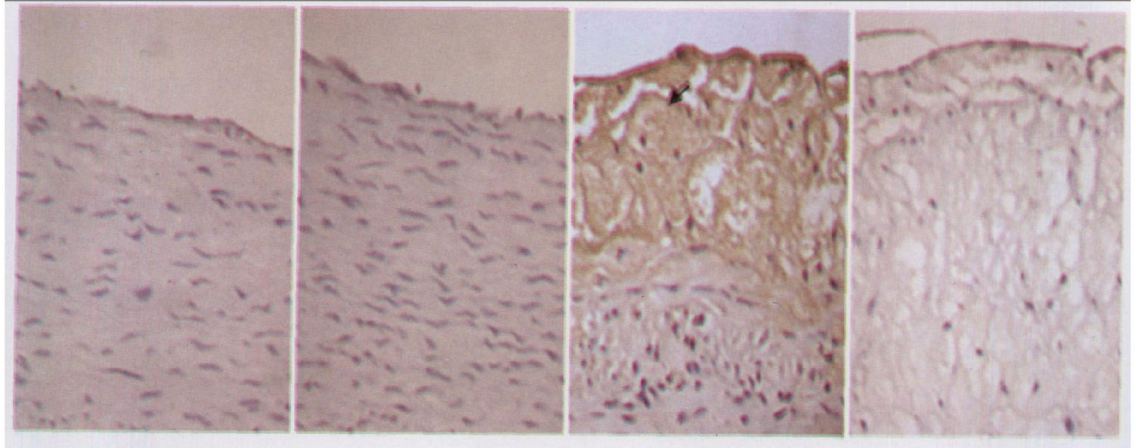


图 4. 免疫组织化学检测兔主动脉组织 NARC-1 蛋白表达( $\times 400$ ) A 为对照组未见阳性表达; B 为对照组阴性对照, 未加一抗; C 为高胆固醇组血管内膜斑块泡沫细胞呈阳性; D 为高胆固醇组阴性对照, 未加一抗。

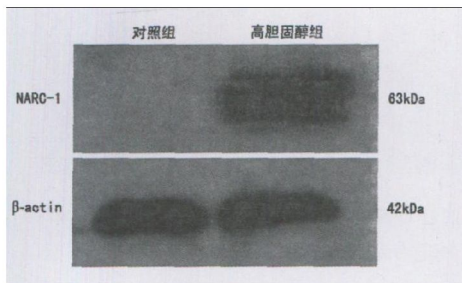


图 5. 免疫印迹检测兔主动脉组织 NARC-1 蛋白表达

## 3 讨论

As 发生的诸多影响因素中, 高胆固醇血症是 As 最重要的危险因素之一, 也是目前唯一能够单独复制出实验性 As 动物模型的危险因素<sup>[3]</sup>。大量证据表明血浆 LDLC 升高可诱发和促进 As 的发生、发展。肝脏 LDLR 与体内 LDL 的代谢密切相关, 对于血浆 LDL 维持于一定水平具有重要作用。有研究证明, NARC-1 能够降解 LDLR, 影响 LDL 的内化, 使血液中 LDL 不能被清除, 从而导致高胆固醇血症。该基因的突变被认为是家族性高胆固醇血症的第三种类型<sup>[4,5]</sup>。在许多种族人群的研究中, 都发现了

组兔血管壁组织中未见表达, 而高胆固醇组兔主动脉 NARC-1 蛋白的表达明显, 染色呈阳性, 群集于内膜斑块处; 在高倍镜下观察, 棕褐色颗粒主要分布在泡沫细胞的胞浆和胞膜, 血管中膜平滑肌细胞为阴性(图 4)。免疫印迹检测发现, 对照组兔血管壁组织 NARC-1 蛋白未见表达, 而高胆固醇组兔主动脉 As 病变处 NARC-1 蛋白呈现高表达(图 5)。

PCSK9 基因与血浆胆固醇浓度有非常密切的关系<sup>[6,7-10]</sup>, 功能获得性突变与高胆固醇血症有关, 功能丧失性突变与低胆固醇血症有关<sup>[11]</sup>。

已证实 NARC-1/PCSK9 调节肝脏 LDLR 蛋白水平, 在胆固醇的动态平衡以及凋亡中可能起着重要作用<sup>[12-14]</sup>。其多态性位点 E670G 可作为高血浆 LDLC 水平的独立预测因子, 并与冠状动脉粥样硬化的严重程度相关<sup>[15]</sup>。Abboud 等<sup>[16]</sup>研究表明, PCSK9 基因是 As 性大血管疾病的危险因素。Brown 等<sup>[17]</sup>则指出, NARC-1 也有可能对血管壁发挥直接作用, 而功能丧失性突变之所以导致 As 发生减少, 除了降低血液 LDL 水平之外, 避免了 NARC-1 的直接作用也可能在其中起着非常重要的作用。目前对 NARC-1 作用研究局限于肝脏, 同时研究表明 NARC-1 在肝、肾、脾、脑、空回肠等很多组织中都有表达, 那么其在 As 病变血管壁中的表达如何呢? NARC-1 是否通过在病变部位起作用而直接参与 As 的发生发展呢? 目前尚未见研究报道, 研究 NARC-1 在 As 发生的作用对进一步阐明 As 的发病机制有着非常重要的意义。

本研究应用免疫组织化学法检测发现 NARC-1

在正常兔血管壁组织中未见表达,而 As 兔主动脉内膜斑块中 NARC-1 的表达明显,染色呈阳性;在高倍镜下观察发现,棕褐色颗粒主要分布在泡沫细胞的胞浆和胞膜。免疫印迹检测亦发现正常兔血管壁组织 NARC-1 蛋白未见表达,而 As 兔主动脉 NARC-1 蛋白呈高表达。上述结果提示 As 病变中确实存在 NARC-1 高表达,并有可能对血管壁发挥直接作用而参与 As 的发生发展。

在 As 的形成与发展中,病变血管壁中发生三种主要改变:一是循环血液中的 LDL 沉积在血管壁并发生氧化修饰等;二是内皮细胞及巨噬细胞的凋亡和功能损害;三是循环血液中的单核细胞等被募集到动脉内皮下,转变为巨噬细胞,同时,中膜平滑肌细胞亦可迁移至内膜,这两类细胞均可大量吞噬脂质形成泡沫细胞。这些改变共同促进 As 的发生和发展<sup>[18]</sup>。除了影响肝脏 LDLR 水平参与 As 发生之外,NARC-1 可能通过影响以上一个或多个环节而影响 As 进程。

本研究结果证明,喂高胆固醇饲料的新西兰兔可复制出 As 动物模型;在新西兰兔的主动脉病变中,NARC-1 高表达,主要分布在泡沫细胞的胞浆和胞膜部位;该因子有可能直接作用于血管壁,参与调节 As 病变的发生发展。但是 NARC-1 在 As 病变处及周围其它细胞中的表达如何? As 病变处 LDLR 及细胞凋亡关键蛋白酶的表达及其与 NARC-1 表达的关系怎样? 这些问题还需进一步研究,以有助于进一步阐明 NARC-1 对血管壁的直接影响及其在 As 病变形成与发展中的作用,为 As 的发生机制提供新的科学依据。

#### [参考文献]

- [1] Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (3): 928-933.
- [2] Maxwell KN, Soccio RE, Duncan EM, et al. Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice [J]. *J Lipid Res*, 2003, 44 (11): 2 109-119.
- [3] 杨永宗. 动脉粥样硬化性心血管病基础与临床[M]. 北京: 科学出版社, 2004; 11-14.
- [4] Maxwell KN, Fisher EA, Breslow JL, et al. Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment [J]. *PNAS*, 2005, 102 (6): 2 069-074.
- [5] Maxwell KN, Breslow JL. Adenoviral-mediated expression of PCSK9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype [J]. *PNAS*, 2004, 101 (18): 7 100-105.
- [6] Berge KE, Ose L, Leren TP. Missense Mutations in the PCSK9 Gene Are Associated With Hypocholesterolemia and Possibly Increased Response to Statin Therapy [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26 (5): 1 094-100.
- [7] Timms KM, Wagner S, Samuels ME, et al. A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree [J]. *Hum Genet*, 2004, 114 (4): 349-353.
- [8] Shioji K, Mannami T, Kokubo Y, et al. Genetic variants in PCSK9 affect the cholesterol level in Japanese [J]. *J Hum Genet*, 2004, 49 (2): 109-114.
- [9] Damgaard D, Jensen JM, Larsen ML, et al. No genetic linkage or molecular evidence for involvement of the PCSK9, ARH or CYP7A1 genes in the Familial Hypercholesterolemia phenotype in a sample of Danish families without pathogenic mutations in the LDL receptor and apoB genes [J]. *Atherosclerosis*, 2004, 177 (2): 415-422.
- [10] Leren TP. Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia [J]. *Clin Genet*, 2004, 65 (5): 419-422.
- [11] Miyake Y, Kimura R, Kokubo Y, et al. Genetic variants in PCSK9 in the Japanese population: Rare genetic variants in PCSK9 might collectively contribute to plasma LDL cholesterol levels in the general population [J]. *Atherosclerosis*, 2008, 196 (1): 29-36.
- [12] Schmidt RJ, Zhang Y, Zhao Y, et al. A novel splicing variant of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 [J]. *DNA Cell Biol*, 2008, 27 (4): 183-189.
- [13] Qian YW, Schmidt RJ, Zhang Y, et al. Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis [J]. *J Lipid Res*, 2007, 48 (7): 1 488-498.
- [14] Kwon HJ, Lagace TA, McNutt MC, et al. Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9 [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2008, 105 (6): 1 820-825.
- [15] Chen SN, Ballantyne MC, Gotto AM, et al. Common PCSK9 Haplotype, Encompassing the E670G Coding Single Nucleotide Polymorphism, Is a Novel Genetic Marker for Plasma Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels and Severity of Coronary Atherosclerosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45: 1 611-619.
- [16] Abboud S, Karhunen PJ, Lütjohann D, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) gene is a risk factor of large-vessel atherosclerosis stroke [J]. *PLoS ONE*, 2007, 2 (10): e1043.
- [17] Brown MS, et al. Lowering LDL-Not only how low, but how long [J]. *Science*, 2006, 311: 1 721-723.
- [18] Lusis AJ. Atherosclerosis [J]. *Nature*, 2000, 407 (6801): 233-241.

(此文编辑 文玉珊)