

动脉粥样硬化相关基因在高血脂食蟹猴中的差异表达

夏机良¹, 郝香芬^{1,2}, 曾小明², 靳丽莎^{1,2}, 李学家¹, 孙云霄¹, 张秀娟¹,
张艳春¹, 季芳¹, 饶军华^{1,2}, 刘晓明^{1,2}, 彭白露^{1,2}

(1. 广东省昆虫研究所, 广东省广州市 510260; 2. 广东蓝岛生物技术有限公司, 广东省广州市 510555)

[关键词] 动脉粥样硬化相关基因; 食蟹猴; 荧光定量 PCR; 外周血白细胞; 早期诊断

[摘要] 目的 研究高血脂与动脉粥样硬化基因的相关性, 从中筛选动脉粥样硬化早期诊断基因。方法 采用温和的动脉粥样硬化膳食(0.22 mg 胆固醇/卡路里, 40% 的能量来源于脂肪)单笼喂养中老年雄性食蟹猴, 膳食诱导 12 个月后, 从膳食诱导实验猴中筛选出 10 只高血脂猴。然后采用荧光定量 PCR 方法检测对照组和高血脂组食蟹猴外周血白细胞内 113 个动脉粥样硬化相关基因的表达差异。结果 在食蟹猴外周血白细胞内共检测到 66 个动脉粥样硬化相关基因, 其中 18 个基因随血脂升高表达显著上调($P < 0.05$), 21 个基因表达显著下调($P < 0.05$), 另外还有 27 个基因无表达差异($P > 0.05$)。结论 以上结果为后续大样本相关研究缩小了基因遴选范围, 通过进一步研究可能从中筛选出基因表达水平上的动脉粥样硬化早期诊断指标。

[中图分类号] Q81

[文献标识码] A

Expression Differences of Atherosclerosis Related Genes in Hyperlipidemia Crab-Eating Macaque

XIA Ji-Liang¹, HAO Xiang-Fen^{1,2}, ZENG Xiao-Ming², JIN Li-Sha^{1,2}, LI Xue-Jia¹, SUN Yun-Xiao¹, ZHANG Xiu-Juan¹, ZHANG Yan-Chun¹, JI Fang¹, RAO Jun-Hua^{1,2}, LIU Xiao-Ming^{1,2}, and PENG Bai-Lu^{1,2}

(1. Guangdong Entomological Institute, Guangzhou, Guangdong 510260; 2. Guangdong Landao Biological Technology Co., LTD, Guangzhou, Guangdong 510555, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis Related Genes; Crab-Eating Macaque; Real-Time Polymerase Chain Reaction; Peripheral Blood Leucocyte; Early Diagnosis Target

[ABSTRACT] **Aim** Researching the correlation of atherosclerosis related genes and hyperlipidemia, in order to find atherosclerosis early diagnosis target. **Methods** Middle-aged male crab-eating Macaque (*Macaca fascicularis*) were fed moderately atherogenic diet (0.22 mg cholesterol/kcal and 40% of calories as saturated fat) for 12 months. According to blood-lipid hyperlipidemia crab-eating Macaques ($n = 10$) were selected, then the expression differences of 113 atherosclerosis related genes were analysed by real-time PCR. **Results** 66 genes were detected in peripheral blood leucocyte. There were 18 genes upregulation and 21 genes downregulation with elevated blood lipid ($P < 0.05$), besides 27 irregular genes. **Conclusions** Above result narrowed the scope of genes selection for further research, through further research we may select atherosclerosis early diagnosis target.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是心血管病的基础病因, 其潜伏期长, 在出现明显临床症状时往往已进入后期, 常常来不及医治。大量研究表明, 目前已明确的 As 危险因素中, 与 As 发病关系最密切, 在临床防治过程中作用最重要的指标是血脂异

常^[1-3]。血脂异常主要表现为高血脂, 是指血中胆固醇 (cholesterol, TC) 和甘油三酯 (triglyceride, TG) 过高或高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDLC) 过低。除了高血脂外, 高血压、糖尿病、血栓、内皮损伤和炎症等也是 As 的危险因

[收稿日期] 2010-12-16

[基金项目] 广州市科技计划项目大型实验动物国际认证与外包服务(2009A1-E051)资助项目; 大型实验动物(犬、猴)及药物评价研究重点实验室建设(2008]4-01)资助项目

[作者简介] 夏机良, 硕士, 主要从事动脉粥样硬化早期诊断及动脉粥样硬化食蟹猴模型研究, E-mail 为 jiliangxia2009@163.com。彭白露, 博士后, 副研究员, 主要从事实验猴糖尿病模型建立及其早期诊断基因芯片的开发。

素^[4]。外周血白细胞(peripheral blood leucocyte, PBL)取材方便,对机体无创伤性伤害,是一种理想的临床诊断材料。已有研究人员发现随着血脂变化 PBL 内相关基因也出现表达变化^[5]。目前研究人员已经发现了许多 As 相关基因^[6-8],但是这些基因与高血脂的关系,以及这些基因在动脉粥样硬化风险预警和早期诊断中的作用还不明确。我们以 PBL 内 As 相关基因作为研究对象,期望找到一些表达量随血脂变化而变化的基因,用于 As 早期基因诊断。

1 材料和方法

1.1 动物和饲料

选择 35 只中老年雄性食蟹猴作为实验动物,其中 30 只采用温和的 As 膳食(0.22 mg 胆固醇/卡路里,40%的能量来自于脂肪)单笼喂养。另外 5 只采用普通饲料喂养作为正常对照。考虑到其他研究人员在同等膳食条件下需诱导 20 个月以上才能得到成熟的动脉粥样硬化食蟹猴^[9,10],我们在膳食诱导 12 个月后采集样本,以便得到动脉粥样硬化早期样本。所有饲料均由广州饲料研究所生产,置于 4℃冷库中保存,保质期 2 周。

1.2 外周血白细胞提取以及 RNA 抽提和 cDNA 制备

实验猴禁食 14 h,于早上 8 点采用 10 mL 无菌注射器于实验猴股静脉取血 8 mL。其中 5 mL 血置于抗凝管中(含 EDTA 1 g/L),用于提取白细胞。另外 3 mL 血置于普通真空管中,用于提取血清。外周血白细胞提取采用红细胞裂解液^[5](1.6 mmol/L EDTA, 10 mmol/L KHCO₃, 153 mmol/L NH₄Cl, pH 7.4)。采用 Trizol (Invitrogen 公司产品)提取白细胞 RNA^[11],然后通过 RNA 变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量。取大约 0.5 μg RNA,采用两步法,用 EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (TransGen Biotech)将 RNA 逆转录成 cDNA,将制备好的 cDNA 置于 -20℃保存备用。

1.3 外周血血清提取及其血液生化指标检测

膳食诱导 12 个月后,采集实验猴血清,测量实验猴体重和坐高,计算体质指数(body mass index, BMI)。将普通真空管中的血液室温静置 30 min,然后 4℃、4000 g 离心 10 min (Eppendorf 5810R),将上层血清取出,平均分装到 3 个 1.5 mL 的 Eppendorf 管中,用于生化指标检测。实验猴血清提取出来后在 6 h 内由广州医药工业研究院(2004 年通过了国家食品药品监督管理局 GLP 检查认证)采用全自动

生化检测仪(日立 7020)完成血清 TC、TG、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和 HDLC 的检测。从膳食诱导食蟹猴中筛选 10 只血清 TC 和 TG 浓度高的作为高血脂组。

1.4 动脉粥样硬化相关基因

根据已有的人 As PCR 芯片(美国 SABiosciences 公司)和最新文献报道,挑选出 113 个 As 相关基因。目前食蟹猴全基因组序列还没公布,所以我们以恒河猴基因的 mRNA 序列作为引物设计模板,同时为了方便以后应用于临床,我们将所有引物序列设计在人和恒河猴同源区域。以 GAPDH 和 RPL13A 作为内参^[12,13],所有 As 基因和内参引物扩增出的核酸序列长度在 150 ~ 250 bp 之间,扩增效率接近。113 个 As 基因中有些基因具有几种生理功能,所有基因按功能分类如下:免疫应答分子包括 CCR2、IL-10、IL-18、IFNG、IL-1B、IL1RN、SAA1、CD40、CRLF1、IL-6、NFKB1、CD40LG、NOS2A、CRP、IL-8、PLA2G7、TNF、FAS、FASLG、IL6ST、LTA、LTB 和 vWF;黏附分子包括 EVA1、ICAM-1、VCAM-1、ITGA1、ITGA10、ITGA4、ITGA2、ITGA2B、ITGA3、ITGA5、ITGA6、ITGA7、ITGA8、ITGA9、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAV、ITGAX、ITGB1、ITGB2、ITGB3、ITGB4、ITGB5、ITGB6、ITGB7、ITGB8、GLG1、SELE、SELL、SELP、SELPLG、MSLN 和 PECAM1;血栓相关因子包括 F3、F7、FGA、FGB、FGG、PLAT、PLAU、PLUAR、SERPINE1 和 THBD;脂代谢相关基因包括 ApoA1、ApoA2、ApoA4、ApoA5、ApoB、ApoC1、ApoC2、ApoC3、ApoC4、ApoD、ApoE、ApoF、ApoH、LPA、PLTP、HSD11B1、OLR1 和 PPARG;细胞外基质包括 MMP-1、MMP-12、MMP-13、MMP-2、MMP-9、PAPPA、TIMP-1、AMH、CCL2、CRLF1、CTF1、EDN1、EDN2、EDN3、PON-1、PON-2、TNFRSF1A、GRN 和 MTHFR;血液循环相关基因包括 NPPA、NPPB、TNNT3、TNNT2、ACE 和 DBP;心肌梗死心力衰竭相关基因包括 CKM、MB 和 TNNT1。

1.5 荧光定量 PCR

采用 SYBR Green I 染料(TaKaRa 公司产品)在 ABI StepOnePlus Real-Time PCR 系统(ABI 公司产品)上进行荧光定量 PCR。荧光定量 PCR 采用 20 μL 反应体系:10 μL SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (2×), 0.4 μL 正义引物(10 μmol/L), 0.4 μL 反义引物(10 μmol/L), 0.4 μL ROX, 2 μL DNA 模板, 6.8 μL ddH₂O。荧光定量 PCR 步骤:(1) 95℃ 30 s; (2) 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 该步骤重复 40 个循环; (3) 反应结束后先加热到 95℃, 然后降至 60℃, 再

缓慢升温至 95℃,记录荧光信号的变化,得出扩增产物的熔解曲线。所有基因 PCR 产物均纯化回收,并测序验证,并将测序结果放到华大基因食蟹猴基因数据库(未发表)中比对验证。所有荧光定量 PCR 反应均重复三次。

1.6 数据分析

采用 ABI StepOne Software v2.1 对荧光定量 PCR 结果进行初步分析,首先调整阈值和基线,将阈值设置在指数期的初期,同一个基因阈值统一。然后去除无表达,熔解曲线较差,且 $C_t < 8$ 或 $C_t > 35$ 的反应。然后通过输出窗口将数据结果以 EX-CEL 形式输出,用比较 C_t 法($\Delta\Delta C_t$)计算基因的相对表达量^[14]。首先优化内标基因和目的基因扩增条件,分别测定内参基因和目的基因的 C_t 值,取平均值,然后通过内标基因对目的基因进行校正得到 $\Delta\Delta C_t$,最后通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 估算目的基因的相对表达量和系统误差。在计算相对表达量时,分别以对照组样本为参照,即将其值转换成 1,高血脂组再与其比较,获得相对表达值。应用 SPSS17.0 统计软件对各组间差异分析采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血液生化指标检测及食蟹猴风险期划分

高血脂组血清 TC、TG 和 LDLC 浓度显著高于对照组($P < 0.05$),而血清 HDLC 浓度、BMI 和年龄在两组之间差异均无统计学意义($P > 0.05$;表 1)。

表 1. 对照组和高血脂组实验猴基础数据

Table 1. Basic data of normal and hyperlipidemia experiment monkey

基础数据	对照组 ($n=5$)	高血脂组 ($n=10$)	P 值
年龄(岁)	15.2 ± 2.24	15.14 ± 2.98	0.485
BMI(kg/m ²)	48.23 ± 13.49	50.53 ± 4.65	0.942
TC(mmol/L)	2.33 ± 0.17	14.53 ± 3.29	0.000
LDLC(mmol/L)	0.65 ± 0.13	13.77 ± 4.38	0.000
TG(mmol/L)	0.6 ± 0.13	1.58 ± 0.92	0.014
HDLC(mmol/L)	1.22 ± 0.25	1.66 ± 0.54	0.074

2.2 随血脂升高表达上调的动脉粥样硬化相关基因

去除无表达,溶解曲线较差,且 $C_t < 8$ 或 $C_t >$

35 、 $\Delta C_t > 13$ 的反应,共检测到 66 个 As 相关基因,且这些基因的测序结果与华大基因食蟹猴基因数据库中相应基因基本一致。对 66 个有效表达 As 相关基因进行相对定量分析,结果发现有 18 个 As 相关基因随血脂升高表达显著上调,上调倍数在 $(2.14 \pm 0.34) \sim (499.48 \pm 127.54)$ 之间($P < 0.05$;表 2)。

表 2. 随血脂升高表达上调的动脉粥样硬化相关基因

Table 2. Up-regulation As related genes with the increase of blood lipid

基因	GeneBank (猕猴)	对照组 相对表达量	高血脂组相对 表达量	P 值
ApoA1	M83242.1	1.06 ± 0.30	7.08 ± 1.85	0.003
ApoE	AK240631.1	1.01 ± 0.14	2.14 ± 0.34	0.004
ApoF	XM_001115088.1	1.31 ± 0.89	40.95 ± 6.25	0.000
IL6ST	AB000554.1	1.02 ± 0.16	3.36 ± 0.48	0.000
PLP	XR_013264.1	1.00 ± 0.05	4.77 ± 1.08	0.029
SEG	XM_001103327.1	1.01 ± 0.16	6.35 ± 0.69	0.000
THBD	XM_001095416.1	1.04 ± 0.17	9.03 ± 1.28	0.000
SAA1	XM_001086137.1	1.00 ± 0.06	499.48 ± 127.54	0.000
CCR2B	NM_001032806.1	1.10 ± 0.93	26.93 ± 3.23	0.000
ICAM-1	NM_001047135.1	1.05 ± 0.33	2.70 ± 0.40	0.003
ApoB	X15737.1	1.06 ± 0.36	67.47 ± 11.06	0.000
ApoA5	XM_001090079.1	1.08 ± 0.14	11.27 ± 1.64	0.001
CD40	XM_001104255.1	1.04 ± 0.26	6.50 ± 1.11	0.004
FGG	XM_001090458.1	1.03 ± 0.23	75.50 ± 17.65	0.000
GLG1	XR_013529.1	1.05 ± 0.31	12.10 ± 1.60	0.000
GRN	AB171687.1	1.08 ± 0.34	4.94 ± 1.42	0.009
ITGA5	XM_001110116.1	1.22 ± 0.76	18.39 ± 8.03	0.012
LTA	NM_001047148.1	1.07 ± 0.39	5.80 ± 1.75	0.046

2.3 随血脂升高表达下调的动脉粥样硬化相关基因

相对定量结果发现,共有 21 个 As 相关基因随血脂升高表达显著下调($P < 0.05$),其下调倍数在 $(0.41 \pm 0.14) \sim (0.02 \pm 0.01)$ 之间(表 3)。

2.4 随血脂升高表达无变化的动脉粥样硬化相关基因

并不是所有检测到的 As 相关基因表达量随血脂变化而变化,通过相对定量和统计分析,我们发现 27 个 As 相关基因在对照组和高血脂组之间无差异表达($P > 0.05$),其中 ITGB2、ITGB3、AMH、ApoC1 和 NFKB1 表达变化幅度虽然都达到 2 倍以上,但差异无显著性(表 4)。

表 3. 随血脂升高表达下调的动脉粥样硬化相关基因

Table 3. Down-regulation As related genes with the increase of blood lipid

基 因	GeneBank (猕猴)	对照组 相对表达量	高血脂组相对 表达量	P 值
ApoD	AB072021.1	1.02 ± 0.19	0.09 ± 0.083	0.000
CCL2	AF276081.1	1.13 ± 0.43	0.16 ± 0.07	0.013
CD40LG	NM_001032839.1	1.10 ± 0.47	0.14 ± 0.06	0.002
DBP	AB174556.1	1.04 ± 0.23	0.12 ± 0.02	0.000
END1	XM_001089874.1	1.02 ± 0.16	0.07 ± 0.01	0.000
FAS	AB031420.1	1.09 ± 0.39	0.33 ± 0.12	0.006
FASLG	AB035138.1	1.01 ± 0.12	0.27 ± 0.02	0.000
IL-18	NM_001032834.1	1.02 ± 0.17	0.31 ± 0.16	0.003
IL-1B	AY172103.1	1.01 ± 0.11	0.11 ± 0.09	0.000
IL-8	NM_001032965.1	1.10 ± 0.45	0.38 ± 0.18	0.012
ITGA1	XM_001094788.1	1.18 ± 0.66	0.27 ± 0.04	0.047
ITGA6	XM_001086200.1	1.11 ± 0.49	0.06 ± 0.02	0.003
ITGAX	XM_001116046.1	1.00 ± 0.08	0.30 ± 0.13	0.001
PECAMI	XM_001116542.1	1.01 ± 0.16	0.14 ± 0.08	0.000
PON-2	XM_001094896.1	1.03 ± 0.25	0.21 ± 0.11	0.000
TIMP-1	NM_001032939.1	1.09 ± 0.36	0.33 ± 0.15	0.009
TNNC1	XM_001085656.1	1.08 ± 0.43	0.41 ± 0.14	0.024
IFNG	D89985.1	1.06 ± 0.29	0.04 ± 0.02	0.002
IL-10	NM_001044727.1	1.05 ± 0.29	0.28 ± 0.17	0.029
IL-16	AB173894.1	1.04 ± 0.24	0.02 ± 0.01	0.003
TNF	NM_001047149.1	1.02 ± 0.17	0.13 ± 0.02	0.001

3 讨 论

动脉粥样硬化性心血管疾病是危害人类健康的第一杀手,目前临床上主要以血液中血脂、载脂蛋白、炎症因子等作为 As 的早期诊断指标^[15]。这些传统的诊断指标主要是以疾病的表型改变为依据,常不能及时作出明确的诊断。20 世纪 70 年代末诞生了基因诊断,基因诊断可以揭示尚未出现症状时与疾病相关的基因状态,从而可以对表型正常的疾病早期患者及某种疾病的易感者作出诊断和预测^[16]。

高血脂是 As 的主要危险因素,大部分 As 早期患者都出现高血脂症状。所以我们通过检测高血脂食蟹猴 As 相关基因表达变化,从中筛选 As 早期诊断基因。结果共检测到 18 个 As 相关基因随血脂升高表达显著上调,21 个显著下调。已有研究表明高血脂与血栓形成、载脂蛋白、炎症和高血压等 As 危

险因素密切相关^[17,18],所以随着血脂的升高与这些表 4. 随血脂升高表达无变化的动脉粥样硬化相关基因

Table 4. No significant difference As related genes with the increase of blood lipid

基 因	GeneBank (猕猴)	对照组 相对表达量	高血脂组相对 表达量	P 值
IL1RN	AY182232.1	1.01 ± 0.09	0.79 ± 0.26	0.081
ITGA2	XM_001095246.1	1.01 ± 0.11	1.78 ± 1.25	0.349
ITGA2B	XM_001114526.1	1.04 ± 0.25	0.99 ± 0.34	0.848
ITGA4	XM_001100929.1	1.16 ± 0.61	0.88 ± 0.62	0.586
ITGAL	XM_001100800.1	1.32 ± 0.93	1.36 ± 0.73	0.955
ITGAM	XR_013069.1	1.01 ± 0.11	0.96 ± 0.48	0.485
ITGAV	XM_001104012.1	1.02 ± 0.18	0.51 ± 0.30	0.065
ITGB1	XR_013851.1	1.00 ± 0.04	0.89 ± 0.15	0.441
ITGB2	XR_012415.1	1.01 ± 0.14	2.36 ± 0.96	0.140
ITGB3	XM_001116010.1	1.03 ± 0.19	2.28 ± 0.98	0.157
ITGB7	XM_001087864.1	1.90 ± 0.37	1.24 ± 0.69	0.784
LTB	NM_001047150.1	1.05 ± 0.25	1.71 ± 0.72	0.215
MTHFR	XM_001105017.1	1.01 ± 0.11	1.71 ± 0.80	0.205
OLR1	XM_001115025.1	1.16 ± 0.47	1.28 ± 0.54	0.802
PLA2G7	XM_001103358.1	1.02 ± 0.20	1.58 ± 0.99	0.132
PLAT	XM_001095260.1	1.07 ± 0.39	0.59 ± 0.27	0.155
PLAUR	AF302073.1	1.06 ± 0.33	0.67 ± 0.16	0.093
SELP	XM_001094728.1	1.48 ± 1.12	0.89 ± 0.42	0.394
SERPINE1	XM_001107586.1	1.05 ± 0.28	0.73 ± 0.29	0.081
TNFRSF1B	XM_001105753.1	1.01 ± 0.09	1.06 ± 0.61	0.900
ACE	AY348177.1	1.23 ± 0.56	1.71 ± 0.31	0.363
NFKB1	XM_001108898.1	1.02 ± 0.17	0.48 ± 0.19	0.056
PPARG	AF033343.1	1.23 ± 0.72	0.71 ± 0.28	0.840
SELL	NM_001042763.1	1.02 ± 0.17	0.93 ± 0.23	0.328
TNFRSF1B	XM_001118232.1	1.29 ± 0.69	2.13 ± 0.06	0.157
AMH	XR_013651.1	1.57 ± 1.37	2.88 ± 1.02	0.207
ApoC1	AK240617.1	1.08 ± 0.37	2.60 ± 1.30	0.165

As 危险因素相关的基因也可能出现表达变化。其中 SAA1 上调倍数达到 499.48 ± 127.54 ,有研究表明该蛋白在 As 血栓形成、斑块破裂过程中表达均上调,该基因已经成为很大范围人群中心血管疾病风险的强有力的预测因子^[19,20]。载脂蛋白 ApoB、ApoE 随血脂升高表达分别上调 67.47 ± 11.06 和 2.14 ± 0.34 倍,这与血清中 ApoB 和 ApoE 的变化趋势一致,詹永妹等^[21]研究表明高血脂患者血清 ApoB 和 ApoE 与 TC 和 TG 正相关。总共 113 个心血管病相关基因还有 57 个没检测到,另外在检测到的 66 个基因中有 15 个在正常、低风险组和高风险

食蟹猴之间无表达差异,这些没检测到的和无表达差异的基因可能在其他组织或者以其他形式起作用,也可能由于样品数量较少导致结果无统计学意义。As 存在着发生与发展的自然病程,在这个过程中基因的表达变化往往要早于传统诊断指标,且更能揭示疾病自然病程的本质。目前 PCR 芯片已经应用于 As 的临床诊断当中,但是其在 As 风险预警和早期诊断中的应用还有待进一步开发。以上在高血脂和正常食蟹猴之间出现表达差异的 As 相关基因可作为候选指标应用于 As 风险预警和早期诊断当中。

然而荧光定量 PCR 技术只能从转录水平检测基因的表达量,为了确定基因的表达状态,有必要对基因进行蛋白表达分析。以上筛选出来的 As 相关基因的表达模式经确认以后可制备成 PCR 芯片才能应用于 As 早期诊断当中,目前该工作正在开展当中。

[参考文献]

[1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. *Nature*, 1993, 362: 801-809.

[2] Scott MG, James IC, Noel BM, et al. Implications of recent clinical trials for the national cholesterol education [J]. *Circulation*, 2004, 110: 227-239.

[3] 邢雅玲, 周吉, 王升启. 动脉粥样硬化的分子机制及相关治疗靶点的研究进展 [J]. *国际药学研究杂志*, 2008, 35(2): 116-119.

[4] Choy PC, Mymin D, Zhu Q, et al. Atherosclerosis risk factors: the possible role of homocysteine [J]. *Mol Cell Biochem*, 2000, 207(1-2): 143-148.

[5] Ma Jun, Adam A, Dimitri S, et al. Identifying leukocyte gene expression patterns associated with plasma lipid levels in human subjects [J]. *Atherosclerosis*, 2007, 191: 63-72.

[6] Judith CS, Natasja K, Kitty BC, et al. Dead or alive: gene expression profiles of advanced atherosclerotic plaques from autopsy and surgery [J]. *Physiol Genomics*, 2007, 30: 335-341.

[7] 侯津杰, 郭靠山, 张瑞娟, 等. 动脉粥样硬化相关基因和蛋白质数据库的初构 [J]. *山西医药杂志*, 2008, 37(11): 966-968.

[8] 陈赞, 凌锋. 动脉粥样硬化相关基因的研究进展 [J]. *中国脑血管病杂志*, 2005, 2(1): 39-46.

[9] Kaplan JR, Clarkson TB, Manuck SB. Pathogenesis of carotid bifurcation atherosclerosis in cynomolgus monkeys [J]. *Stroke*, 1984, 15: 994-1000.

[10] Adams MR, Kaplan JR, Clarkson TB, et al. Ovariectomy, social status, and atherosclerosis in cynomolgus monkeys [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1985, 5: 192-200.

[11] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156-159.

[12] 陈凤花, 王琳, 胡丽华. 实时荧光定量 RT-PCR 内参基因的选择 [J]. *临床检验杂志*, 2005, 23(5): 393-395.

[13] Sluimer JC, Kisters N, Cleutjens KB, et al. Dead or alive: gene expression profiles of advanced atherosclerotic plaques from autopsy and surgery [J]. *Physiol Genomics*, 2007, 30(3): 335-341.

[14] Kenneth J, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.

[15] Toru MD. Cardiovascular diagnostic biomarkers the past, present and future [J]. *Circulation*, 2009, 73: 806-809.

[16] 赵雨杰, 孙啸, 何农跃. 基因芯片在医学中的应用 [J]. *临床检验杂志*, 2000, 18(6): 3739-751.

[17] 陈亚锋, 刘昌慧, 韩其蔚. 高胆固醇血症患者血小板膜表达 CD40 配体 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, 12(2): 223-224.

[18] 张建丽, 叶德平. 高血压病血脂异常与中医辨证分型关系探讨 [J]. *河北中医*, 2005, 27(4): 264-265.

[19] Malle E, Steinmetz A, Raynes TG. Serum amyloid A (SAA) an acute phase protein and apolipoprotein [J]. *Atherosclerosis*, 1993, 102: 131-146.

[20] Yu SJ, Chen L. Serum amyloid A and the primary prevention of coronary heart disease [J]. *J Evid Based Med*, 2004, 4(4): 231-235.

[21] 詹永妹, 滕敏, 陈晓刚, 等. 吕血清载脂蛋白谱分析在高血脂血症患者中的意义 [J]. *江西医药*, 2007, 42(7): 601-603.

(此文编辑 许雪梅)