

泽泻汤对氧化型低密度脂蛋白诱导血管平滑肌细胞增殖的影响

汪玉成¹, 魏伟², 苏清平¹, 施凤飞¹, 薛偕华²

(1.福建中医药大学康复医学院,2.福建中医药大学附属康复医院神经康复科,福建省福州市 350003)

[关键词] 泽泻汤; 氧化型低密度脂蛋白; 血管平滑肌细胞; 增殖

[摘要] **目的** 观察泽泻汤对血管平滑肌细胞(VSMC)周期蛋白 Cyclin D1、Cyclin E、增殖细胞核抗原(PCNA)和 p27 表达的影响,探讨泽泻汤在氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的 VSMC 增殖中的作用和机制。**方法** 通过体外 50 mg/L ox-LDL 诱导 VSMC,建立 VSMC 增殖的动脉粥样硬化细胞模型;应用空白血清及 20%泽泻汤含药血清干预。MTS 法检测泽泻汤含药血清对 VSMC 增殖的影响;Western blot 检测增殖相关蛋白 Cyclin D1、Cyclin E、PCNA 和 p27 表达水平。**结果** 50 mg/L ox-LDL 可明显诱导 VSMC 增殖。与 ox-LDL 组比较,泽泻汤含药血清可显著抑制 ox-LDL 诱导的 VSMC 增殖,下调细胞 Cyclin D1、Cyclin E 和 PCNA 的表达,同时促进 p27 蛋白表达。**结论** 泽泻汤具有抗 VSMC 增殖的作用,机制可能与上调 p27 蛋白和抑制 Cyclin D1、Cyclin E、PCNA 表达有关。

[中图分类号] R28

[文献标识码] A

Effect of Alisma Decoction on Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein

WANG Yu-Cheng¹, WEI Wei², SU Qing-Ping¹, SHI Feng-Fei¹, and XUE Xie-Hua²

(1.College of Rehabilitation, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350003, China; 2.Department of Neurological Rehabilitation, Rehabilitation Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350003, China)

[KEY WORDS] Alisma Decoction; Oxidized Low Density Lipoprotein; Vascular Smooth Muscle Cell; Proliferation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of Alisma Decoction on expressions of cyclin D1, cyclin E, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and p27 in vascular smooth muscle cell (VSMC), and to explore the effect and mechanism of Alisma Decoction in VSMC proliferation induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL). **Methods** The atherosclerosis cell model of VSMC proliferation was established through induction of VSMC by 50 mg/L ox-LDL in vitro, and was intervened with normal rat serum (blank serum) and 20% Alisma Decoction-containing serum. The effect of Alisma Decoction-containing serum on VSMC proliferation was detected by MTS method. Expressions of proliferation associated proteins such as cyclin D1, cyclin E, PCNA and p27 were determined by Western blot. **Results** 50 mg/L ox-LDL could obviously promote VSMC proliferation. Compared with the ox-LDL group, Alisma Decoction-containing serum significantly inhibited VSMC proliferation induced by ox-LDL. Investigation demonstrated that Alisma Decoction-containing serum could decrease the expression level of cyclin D1, cyclin E and PCNA, at the same time, increase the expression level of p27. **Conclusion** Alisma Decoction can inhibit ox-LDL-induced VSMC proliferation, and its mechanism may be related to increasing p27 expression and inhibiting cyclin D1, cyclin E and PCNA expression.

血管应激损伤后引起的血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖是动脉粥样

[收稿日期] 2015-09-11

[修回日期] 2015-11-10

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81473744);福建省卫生系统中青年骨干人才培养项目(2013-ZQN-ZD-28);福建省卫生厅中医药科研项目(WZSY201304)

[作者简介] 汪玉成,硕士研究生,研究方向为脑血管病的基础研究,E-mail 为 863096292@qq.com。魏伟,硕士,医师,研究方向为脑血管病的基础和临床,E-mail 为 455719687@qq.com。通讯作者薛偕华,博士,副主任医师,研究方向为脑血管病的基础和临床,E-mail 为 465356738@qq.com。

样硬化(atherosclerosis, As)、血管再狭窄及内膜增生等心脑血管疾病发生发展过程中的关键因素^[1-2]。正常生理情况下,VSMC在血管壁中层处于G0/G1期,表现为静止、低增殖率状态,当血管受各种刺激后VSMC由中膜迁移至内膜,并再次启动细胞周期循环,促使细胞大量增殖^[3-4],最终形成As。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)是VSMC增殖的有丝分裂原,可通过多种途径损伤血管内皮细胞,促进VSMC增殖,是As形成的重要危险因素^[5]。泽泻汤出自东汉张仲景《金匮要略》,由泽泻、白术配伍而成,具有渗泻水饮、扶助脾胃之功效。研究发现泽泻汤具有降血脂、降血压、扩张血管等多种药理作用^[6-8]。但泽泻汤是否具有抗VSMC增殖的功效罕见报道。因此本实验利用ox-LDL诱导VSMC增殖模型,观察泽泻汤对VSMC增殖及细胞周期相关蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM/F12培养基、胎牛血清(Hyclone有限公司);ox-LDL(1.37 mg/L,北京协生生物科技公司);MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt]试剂盒(Promega公司);细胞周期蛋白Cyclin D1、Cyclin E、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)抗体、辣根过氧化物酶(horse-radish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔/抗鼠二抗(Cell Signaling Technology公司);p27抗体(Abcam公司); β -actin抗体(武汉博士德有限公司);一抗二抗稀释液、ECL显色试剂盒(北京碧云天有限公司)。清洁级SD雄性大鼠44只,购自福建医科大学实验动物中心[许可证号:SCXK(闽)2012-0001]。Western blot电泳设备(Bio-RAD公司)。

1.2 泽泻汤及泽泻汤含药血清制备

泽泻汤及泽泻汤含药血清制备:与我们之前实验的方法相同^[9]。泽泻汤由泽泻、白术组成,购自福建中医药大学附属康复医院药剂科,严格按《金匮要略》原方剂量比例配制,参考《中药药理实验方法学》制备,4℃冰箱储存备用。清洁级SD雄性大鼠40只,体重200~220 g,随机分为泽泻汤含药血清组和空白血清组(注射相同量的生理盐水),每组20只。按体重每100 g灌胃1 mL给药,每天2次,连续7天。腹主动脉采血,于4℃ 3000 r/min离心10 min分离血清。合并同组血清,56℃灭活30 min,

微孔滤膜过滤除菌,-20℃保存待用。

1.3 血管平滑肌细胞的分离与培养

颈椎脱臼处死SD大鼠,体积分数为0.75的乙醇浸泡5 min,超净工作台内取胸主动脉,置于含有预冷磷酸盐缓冲液的培养皿中去除血污,获取干净光滑的血管段,去除外膜与内膜。在另一个含少量DMEM/F12培养液的培养皿中,将中膜剪成1 mm²大小的组织块。用吸管将组织块贴于培养瓶底面,组织块间距2~3 mm。加入含20%胎牛血清的DMEM/F12培养液2~3 mL,将培养瓶直立于37℃、5%CO₂培养箱中,待4~6 h后组织块与培养瓶黏附后,平置培养瓶,4~5天后首次换液。待原代培养的细胞从组织块长出,数量增加至细胞长满瓶壁或占瓶壁60%~80%时,即可进行传代培养。每隔2天进行细胞换液,每隔4天进行细胞传代。

1.4 细胞免疫荧光鉴定

VSMC以 1.0×10^5 个/毫升的密度接种到24孔细胞培养板中的圆形盖玻片上,于37℃、5%CO₂培养箱中培养24 h后,按以下步骤操作:4%多聚甲醛固定5 min,0.5% Triton 穿孔5 min,1%牛血清白蛋白封闭30 min,实验组:加入一抗[1%牛血清白蛋白稀释的 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体,稀释比例1:400],37℃孵育2 h后,4℃过夜,异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的二抗室温孵育2 h;对照组:FITC标记的二抗室温孵育2 h,90%丙三醇封片。以上操作每步之间均由磷酸盐缓冲液清洗2次,每次5 min。在荧光显微镜下观察并拍照,记录抗体染色情况。

1.5 泽泻汤含药血清干预浓度的选择

选择最适细胞浓度 1.0×10^5 个/毫升铺入96孔板中,37℃、5%CO₂培养箱内培养24 h,不含胎牛血清的DEME/F12培养基饥饿细胞24 h,分别加入浓度为10%、20%、30%、40%、50%的泽泻汤含药血清干预细胞。干预24 h后,每孔加入20 μ L MTS和100 μ L DMEM/F12混合液,37℃培养箱内反应2 h,酶标仪于波长492 nm处进行比色,测定吸光度(absorbance, A)值。

1.6 实验分组

取对数生长期的细胞,按 1.0×10^5 个/毫升的密度接种于6孔板中,在含20%胎牛血清的培养基中置于37℃、5%CO₂培养箱内培养,待细胞生长至70%~80%汇合后换成不含胎牛血清培养基继续培养24 h,使细胞生长同步化,根据不同处理将细胞分为3组:(1)对照组:20%空白血清;(2)ox-LDL组:

50 mg/L ox-LDL+20%空白血清;(3)泽泻汤血清组: 50 mg/L ox-LDL+20%泽泻汤含药血清。培养 24 h 后收集细胞用于实验。

1.7 MTS 细胞增殖实验

选择最适细胞浓度 1.0×10^5 个/毫升铺入 96 孔板中培养 24 h, 不含胎牛血清的 DEME/F12 培养基饥饿细胞 24 h 后, 按上述实验分组进行药物干预。干预 24 h 后, 每孔加入 20 μ L MTS 和 100 μ L DMEM/F12 混合液, 37℃ 培养箱内反应 2 h, 酶标仪于波长 492 nm 处进行比色, 测定 A 值。

1.8 蛋白免疫印迹检测 Cyclin D1、Cyclin E、PCNA 和 p27 的表达

收获上述干预结束的细胞, 加入三去污细胞裂解液裂解细胞, 冰上放置 30 min, 4℃、12000 r/min 离心 2 min, 弃除沉淀, BCA 法测定各组总蛋白浓度。调整蛋白浓度, 95℃ 水浴 10 min 使蛋白变性, 各组取 30 μ g 蛋白样品于 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离。5% 脱脂奶粉封闭液封闭 2 h; 按 1:1000 加

入一抗, 4℃ 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 每次 10 min; 相应 HRP 标记二抗 (1:3000) 室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 予 ECL 显色剂显色后在凝胶成像系统扫描成像并分析各种蛋白的表达水平。

1.9 统计学处理

实验数据应用 SPSS 18.0 统计软件分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组均数间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠 VSMC 免疫荧光鉴定

在倒置相差显微镜下单个平滑肌细胞多呈梭形或不规则三角形, 并相互交织排列融合, 呈典型“峰-谷”状生长 (图 1A)。细胞经 α -SMA 免疫荧光染色呈阳性, 胞浆内肌丝沿长轴分布, 鉴定为平滑肌细胞 (图 1B)。

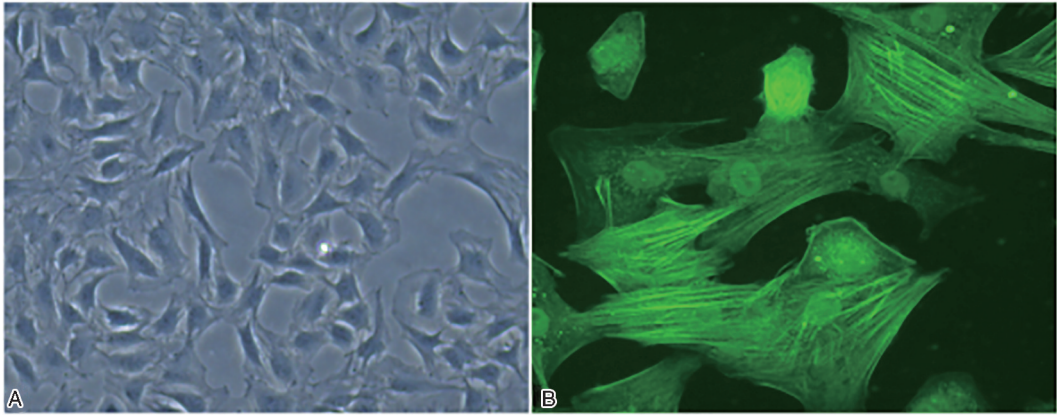


图 1. 原代大鼠 VSMC 形态学与免疫荧光鉴定 ($n=3$) A 为普通光镜下细胞排列呈“峰-谷”状 (100 \times); B 为细胞免疫荧光 α -SMA 染色阳性 (400 \times)。

Figure 1. Morphology and immunofluorescence identification of primary rat VSMC ($n=3$)

2.2 泽泻汤含药血清干预 VSMC 浓度的确定

对数生长期细胞加入不同浓度的泽泻汤含药血清, 共同孵育 24 h, 酶标仪上检测 $A_{492\text{ nm}}$ 值。与对照组比较及不同浓度泽泻汤含药血清组之间比较, 细胞活性均无明显差异 ($P > 0.05$), 提示对细胞无毒性作用, 但泽泻汤含药血清浓度为 20% 时 VSMC 活性相对较高 (图 2), 故作为本实验的干预浓度。

2.3 泽泻汤含药血清抑制 ox-LDL 诱导的 VSMC 增殖

采用 MTS 法检测泽泻汤对 VSMC 48 h 内的生长抑制作用。与对照组比较, ox-LDL 诱导 VSMC 增

殖速度显著提高 ($P < 0.05$), 而泽泻汤含药血清对 ox-LDL 诱导 VSMC 增殖具有明显的抑制作用 ($P < 0.05$; 图 3)。

2.4 泽泻汤含药血清对 Cyclin D1、Cyclin E、PCNA 和 p27 表达的影响

Western blot 检测 Cyclin D1、Cyclin E、PCNA 和 p27 表达水平。结果显示, 与对照组比较, ox-LDL 诱导 VSMC 的 Cyclin D1、Cyclin E、PCNA 蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$), p27 蛋白表达减弱 ($P < 0.05$); 20% 泽泻汤含药血清干预后, Cyclin D1、Cyclin E、PCNA 蛋白表达降低, p27 蛋白表达上调, 差异有显

著性 ($P < 0.05$; 图 4)。

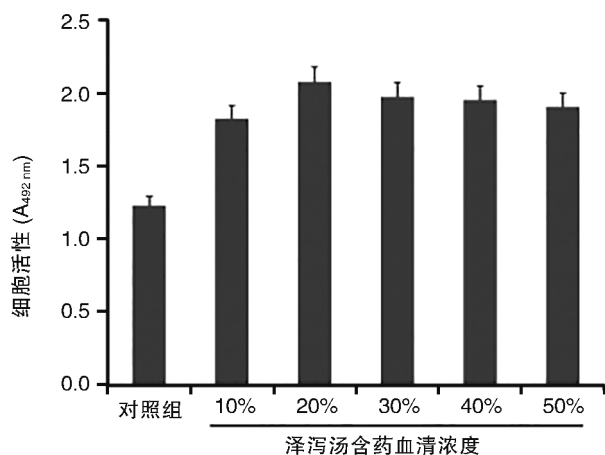


图 2. 泽泻汤含药血清对 VSMC 活性的影响 ($n = 3$)

Figure 2. Effect of Alisma Decoction-containing serum on the activity of VSMC ($n = 3$)

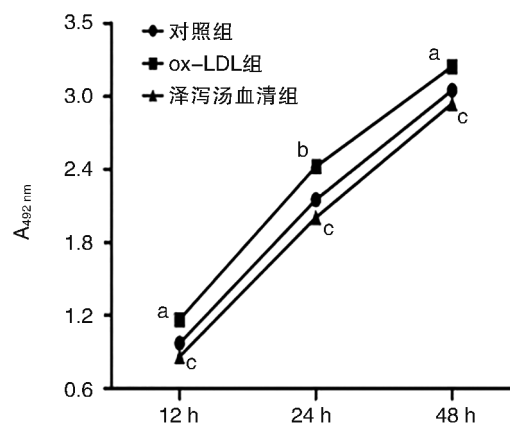


图 3. 泽泻汤含药血清对 ox-LDL 诱导 VSMC 增殖的影响 ($n = 6$) a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 3. Effect of Alisma Decoction-containing serum on VSMC proliferation induced by ox-LDL ($n = 6$)

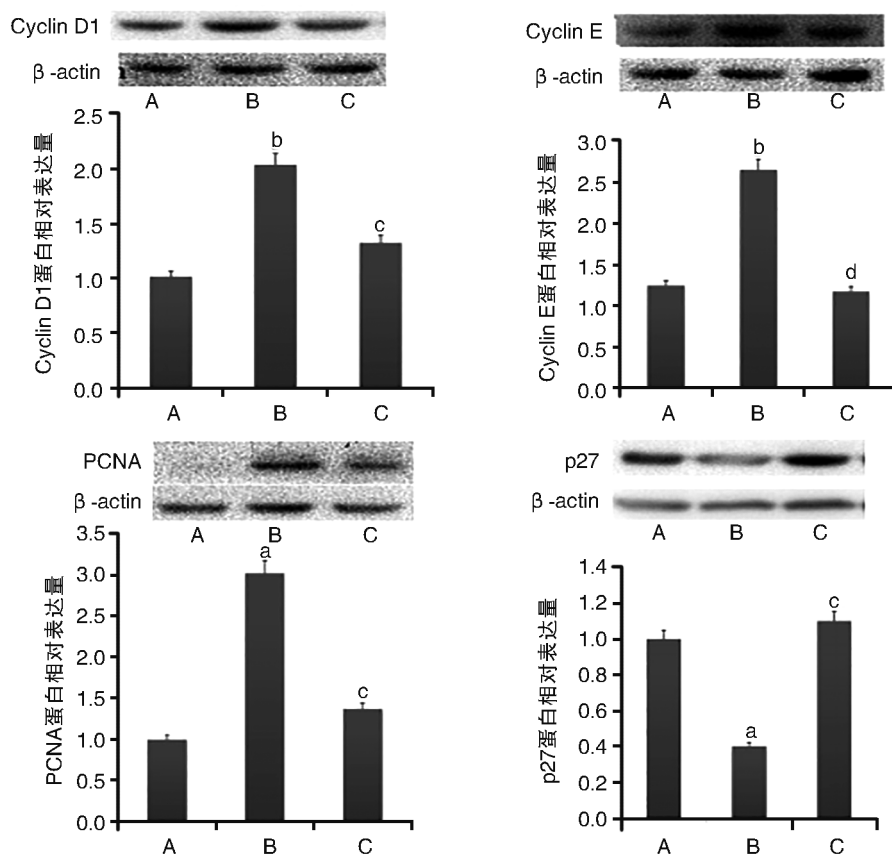


图 4. 泽泻汤含药血清对 ox-LDL 诱导的 VSMC 增殖相关蛋白表达的影响 ($n = 3$)

组。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 4. Effect of Alisma Decoction-containing serum on the expression of VSMC proliferation associated protein induced by ox-LDL ($n = 3$)

3 讨 论

VSMC 在心脑血管疾病中扮演着重要角色,是血管壁的主要构成成分,在 As 病变的发生发展中起着重要作用,其异常增殖可影响斑块病变发展过程中的稳定性^[10-12],进一步促进 As 的形成和进展。泽泻汤是中医临床经典处方,现代药理研究已发现其具有多种生物学功效,包括降压、降血脂、改善循环等,但其机制未明。故本研究通过 ox-LDL 诱导 VSMC 建立 As 模型,泽泻汤干预后检测 VSMC 增殖情况,结果显示泽泻汤可以抑制 ox-LDL 诱导的 VSMC 异常增殖,其机制可能是通过抑制细胞周期调控蛋白 Cyclin D1、Cyclin E 和 PCNA 的表达,上调细胞周期负性调控因子 p27 蛋白水平。

正常情况下,血管内的 VSMC 维持着刺激生长与抑制生长的稳定平衡状态,细胞多处于细胞周期的 G0/G1 期,无明显增殖现象。但血管受各种病理因素刺激后损伤,VSMC 的生长平衡被打破,细胞迁移至内膜下,细胞周期循环被激活,开始细胞增殖状态。细胞增殖受细胞周期的调控^[13],研究发现细胞周期进程是由一系列细胞周期相关蛋白(cyclins)调节的,在 VSMC 增殖过程中最主要的周期蛋白为 Cyclin D1、Cyclin E、PCNA,以及细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 p27,p27 可通过抑制这些周期蛋白而抑制 VSMC 进入 S 期,起到抑制细胞增殖的作用^[14-15]。并且这些细胞周期的进程依赖于各种 Cyclin 和周期蛋白依赖激酶(cyclin-dependent kinase,CDK)形成的复合物的作用^[16],其过程受到 Cyclin-CDK 抑制因子(CKI)的严格调控^[17]。其中 Cyclin D1、Cyclin E 与 CDK 形成的复合物是控制 G1 期向 S 期转换的重要正性调节因子^[18]。Cyclin D1 通过结合并激活细胞周期相关激酶 CDK4 或 CDK6,引起底物 Rb 蛋白磷酸化,促进细胞周期运行的蛋白如 Cyclin E 表达,导致 DNA 开始合成,细胞由 G1 期进入 S 期^[19]。Cyclin E 为 G1 期特异性周期蛋白,是细胞通过细胞周期 G1 期必要的限速因子,对于促使细胞由 G1 期进入 S 期至关重要^[20]。PCNA 是 DNA 聚合酶的辅助因子,为 DNA 合成 S 期所必须的^[21]。PCNA 位于细胞核内,其表达的增加预示细胞周期进入 S 期,是细胞增殖状态的指标。PCNA 不仅和 DNA 的复制和修复有关,而且在细胞周期的调控中起重要作用,研究证实 PCNA 可与 Cyclin 和 CDK 结合相互作用调节细胞周期进程^[22]。p27 作为 CKI 的一种,在抑制 VSMC 过度增殖中起重要作

用^[23]。有研究证实,p27 能抑制细胞 Cyclin 与 CDK 形成复合物,进而阻断 Rb 磷酸化和抑制 E2F 的活性,从而使细胞周期停滞于 G1 期,阻碍细胞增殖^[24]。Hedin 等^[25]研究发现在丝裂原的刺激下,p27 迅速降解而使 Cyclin D1 和 Cyclin E 活性增加,促进细胞增殖。由此可见,Cyclin D1、Cyclin E、PCNA、p27 是细胞增殖的重要指标,其表达量的改变预示细胞的增殖水平,Cyclin D1、Cyclin E、PCNA 等表达量增加表示促进细胞增殖,p27 表达量的上升提示细胞增殖受到抑制。本研究结果显示,泽泻汤可上调 p27 的表达,抑制 Cyclin D1、Cyclin E 和 PCNA 的表达,提示泽泻汤可能通过上调 p27 的表达,抑制 ox-LDL 诱导的 Cyclin D1、Cyclin E 和 PCNA 的表达,从而阻断细胞周期进程,抑制 VSMC 增殖。

综上所述,泽泻汤具有抑制 VSMC 增殖的功效,其机制可能是通过调控细胞周期相关蛋白 Cyclin D1、Cyclin E、PCNA 和 p27 的表达水平来实现的;这为泽泻汤防治 As 提供了新的视野,丰富了我国传统方剂的医疗作用。

[参考文献]

- [1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s[J]. Nature, 1993, 362(6423): 801-809.
- [2] Hanke H. Proliferative response of smooth muscle cells after experimental balloon angioplasty [J]. Circulation, 1996, 93(1): 202-209.
- [3] Kim JY, Kim KH, Lee WR, et al. Apamin inhibits PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration through suppressions of activated Akt and Erk signaling pathway[J]. Vascul Pharmacol, 2015, 70: 8-14.
- [4] Boehm M, Nabel EG. Cell cycle and cell migration: new pieces to the puzzle[J]. Circulation, 2001, 103(24): 2879-881.
- [5] Liu J, Ren Y, Kang L, et al. Oxidized low-density lipoprotein increases the proliferation and migration of human coronary artery smooth muscle cells through the upregulation of osteopontin[J]. Int J Mol Med, 2014, 33(5): 1341-347.
- [6] 胡雪峰,成忠煌,王松迪,等. 泽泻汤降血脂作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(9): 2073-074.
- [7] 范洪亮,张学洪. 泽泻汤治疗高血压病等研究进展[J]. 承德医学院学报, 2009, 26(1): 45-47.
- [8] 吴勇飞,范立红,陈顺泉. 泽泻汤治疗椎-基底动脉供血不足疗效观察[J]. 浙江中西医结合杂志, 2005, 15(7): 397-399.
- [9] 陈彤,魏伟,邹愉龙,等. 泽泻汤对巨噬细胞源性泡沫细胞 MM-9 表达的影响及其与 ERK 通路的相关性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(10): 876-880.

- [10] Zhan M, Yuan F, Liu H, et al. Inhibition of proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells by ghrelin [J]. *Acta Bioch Bioph Sin*, 2008, 40(9): 769-776.
- [11] Willis AI, Pierre PD, Sumpio BE, et al. Vascular smooth muscle cell migration: current research and clinical implications [J]. *Vasc Endovascular Surg*, 2004, 38(1): 11-23.
- [12] Clarke MC, Figg N, Maguire JJ, et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis [J]. *Nat Med*, 2006, 12(9): 1075-080.
- [13] Ferguson JE 3rd, Patterson C. Break the cycle: the role of cell-cycle modulation in the prevention of vasculoproliferative diseases [J]. *Cell Cycle*, 2003, 2(3): 211-219.
- [14] Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment [J]. *Trends Cell Biol*, 2003, 13(2): 65-70.
- [15] Kim TJ, Lim Y, Kim DW, et al. Epothilone D, a microtubule-stabilizing compound, inhibits neointimal hyperplasia after rat carotid artery injury by cell cycle arrest via regulation of G1-checkpoint proteins [J]. *Vascul pharmacol*, 2007, 47(4): 229-237.
- [16] Porter LA, Dellinger RW, Tynan JA, et al. Human speedy: a novel cell cycle regulator that enhances proliferation through activation of Cdk2 [J]. *J Cell Biol*, 2002, 157(3): 357-366.
- [17] Tanner FC, Greutert H, Barandier C, et al. Different cell cycle regulation of vascular smooth muscle in genetic hypertension [J]. *Hypertension*, 2003, 42(2): 184-188.
- [18] Song MC, Park J, Kim TJ. Diethyl stilbestrol induces arrest of rat vascular smooth muscle cell cycle progression through downregulation of cyclin D1 and cyclin E [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 360(2): 103-109.
- [19] 李峰, 陈临溪. 细胞周期蛋白 D 与细胞周期调控研究进展 [J]. *国外医学*, 2005, 25(3): 270-273.
- [20] Dulic V, Lees E, Reed SI. Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase [J]. *Science*, 1992, 257(5078): 1958-961.
- [21] Strzalka W, Ziemienowicz A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation [J]. *Ann Bot*, 2011, 107(7): 1127-140.
- [22] Szepesi A, Gelfand EW, Lucas JJ. Association of proliferating cell nuclear antigen with cyclin-dependent kinases and cyclins in normal and transformed human T lymphocytes [J]. *Blood*, 1994, 84(10): 3413-421.
- [23] 肖娟, 罗兴林. 细胞周期调控与血管平滑肌细胞增殖的研究进展 [J]. *西部医学*, 2008, 20(6): 1291-293.
- [24] Diez-Juan A, Andres V. Coordinate control of proliferation and migration by the p27 Kip1/cyclin-dependent kinase/retinoblastoma pathway in vascular smooth muscle cells and fibroblasts [J]. *Circ Res*, 2003, 92(4): 402-410.
- [25] Hedin U, Roy J, Tran PK. Control of smooth muscle cell proliferation in vascular disease [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2004, 15(5): 559-565.
- (此文编辑 曾学清)