

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.33.006

qPCR array 检测高糖对胆固醇合成基因表达的影响 *

朱长保 徐福意 晁天柱 薛慧慧 肖君华 李 凯[△]

(东华大学生物科学与技术研究所 上海 201620)

摘要 目的:高血糖易引起胆固醇在体内积聚,增加糖尿病合并动脉粥样硬化性心血管疾病的患病风险。本文通过建立稳定的实时定量 PCR 芯片 (Real-time quantitative polymerase chain reaction array, qPCR array) 检测方案,研究高糖对小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 胆固醇合成基因表达的影响,探讨胆固醇合成基因在糖尿病大血管并发症发展中的作用机制。**方法:**以不同浓度葡萄糖(5、15、30 mmol/L)和不同时间(0、6、12、18、24 h),刺激肝癌细胞 Hepa1-6,利用 qPCR array 检测其胆固醇合成基因的表达差异。**结果:**与 5 mmol/L 相比,高糖组(15、30 mmol/L)处理细胞 18 h 后,胆固醇合成基因 CYP51、EBP、NSDHL、SQLE、FDFT1 和 PMVK 的表达上调($P<0.05$),呈现剂量依赖性。与 0 h 相比,15 mmol/L 高糖处理细胞 12 h, CYP51、EBP 和 SQLE mRNA 表达量上调($P<0.01$)。至 24 h, CYP51、EBP 降至 0 h 水平,而 SQLE 的表达量继续增加; NSDHL 在 12 h 表达无差异,至 18 h 表达量发生上调($P<0.05$)。**结论:**该 qPCR array 检测方案能特异性检测胆固醇合成基因的表达量。高糖能够促进胆固醇合成基因的表达,使细胞内胆固醇积聚,这可能是糖尿病患者容易发生动脉粥样硬化的原因。这提示我们将胆固醇合成基因作为药物靶点可能延缓糖尿病动脉粥样硬化进展。

关键词:高糖; Hepa1-6; 胆固醇合成; 实时定量 PCR 芯片

中图分类号:R587.1; R-33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)33-6420-05

Detection the Effect of High Glucose on the Expression of Cholesterol Biosynthesis Gene by qPCR Array *

ZHU Chang-bao, XU Fu-yi, CHAO Tian-zhu, XUE Hui-hui, XIAO Jun-hua, LI Kai[△]

(Institute of Biological Sciences and Biotechnology, Donghua University, Shanghai, 201620, China)

ABSTRACT Objective: An elevation in blood glucose concentration leads to increased risk of developing diabetes-associated atherosclerotic cardiovascular disease due to an excessive accumulation of cholesterol. To investigate the effect of high glucose on the expression of cholesterol biosynthesis gene in mouse hepatoma cells (Hepa1-6), a stable and accurate real-time quantitative polymerase chain reaction array method was established in order to inquire the mechanism of cholesterol biosynthesis gene on diabetic atherosclerosis. **Methods:** Hepa1-6 cells were cultured with different concentration (5, 15 and 30 mmol/L) of glucose and different time (0, 6, 12, 18, 24 h). qPCR array method was used to examine the mRNA expression of cholesterol biosynthesis gene. **Results:** High glucose (15, 30 mmol/L) can up-regulated the mRNA levels of CYP51, EBP, NSDHL, SQLE, FDFT1 and PMVK in a concentration-dependent manner compared to control cells cultured with 5 mmol/L glucose ($P<0.05$). As compared to control (0 h), the mRNA levels of CYP51, EBP and SQLE were increased by 15 mmol/L glucose in 12 h. However, CYP51, EBP in the cells treated for 24 h decreased to approximately control group, but SQLE continued to increase ($P<0.01$). High glucose did not affect the mRNA levels of NSDHL in 12h, but NSDHL expression was increased in 18 h ($P<0.05$). **Conclusions:** qPCR array can specifically detect the cholesterol biosynthetic gene expression. Hyperglycemia may promote the accumulation of the cholesterol for the improvement of gene expression in Hepa1-6. The reason may be that more people on diabetes have atherosclerosis than normal. Cholesterol biosynthesis gene which was regarded as the targets of drugs can delay the process of diabetic atherosclerosis.

Key words: High glucose; Hepa1-6; Cholesterol biosynthesis; qPCR array

Chinese Library Classification: R587.1; R-33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)33-6420-05

前言

糖尿病人群的心血管病死率是普通人群的 3 倍以上^[1],

而高血糖是诱发糖尿病患者发生血脂异常,进而加速动脉粥样硬化的形成的重要因素^[2]。维持体内胆固醇的代谢平衡是糖尿病患者积极进行调脂治疗的关键,相关调脂药物的靶点多为胆

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31171199);中央高校基本科研业务费专项资金(13D110521)

作者简介:朱长保(1988-),男,硕士研究生,研究方向:小鼠遗传学,电话:021-67792650, E-mail: zhuchangbao2008@163.com

△ 通讯作者:李凯(1978-),男,副教授,研究方向:小鼠遗传学,电话:021-67792652, E-mail: likai@dhu.edu.cn

(收稿日期:2014-03-16 接受日期:2014-04-12)

固醇代谢相关的基因^[3]。研究证实,高糖对胆固醇逆转运载体三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 (ABCA1)、HDL 受体 B 类 I 型清道夫受体(SR-B1)表达有重要的作用^[4-6],但高血糖诱发糖尿病大血管并发症的机制仍不清楚。

目前,研究基因表达差异的检测技术主要有表达谱芯片、RNA 测序和 qPCR array 技术^[7-10]。表达谱芯片不仅无定量信息,而且其大量的无关基因数据会干扰结果分析,从而导致结果不准确。RNA 测序检测的是总 RNA,而细胞中很大一部分 RNA 来自核糖体和线粒体,限制了其他 RNA 的读取数量以及这些 RNA 表达水平的准确性。qPCR array 技术结合了实时定量 PCR 的精确定量以及基因芯片的高通量检测技术与功能分类的优点,能够同时准确定量分析上百个基因,是一种高度灵敏和可靠的功能基因组研究方法。所以,qPCR array 是研究一组特定基因表达的理想工具。

本研究拟设计稳定可靠的 qPCR array 检测方案,以小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 为研究对象,利用 qPCR array 检测高糖诱导下 Hepa1-6 中胆固醇合成基因 mRNA 的表达量,旨在 mRNA 水平上探讨高糖对胆固醇合成相关基因的影响,进一步揭示胆固醇合成基因的作用,以及为预防和治疗糖尿病动脉粥样硬化的措施提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。Low DMEM 培养基(美国 Hyclon)、胎牛血清(美国 Hyclon)、D-葡萄糖(美国 Sigma)、Trizol(美国 Invitrogen)、Dnase1、反转录试剂(美国 Fermentas)、SYBR real-time PCR Premixture 试剂盒(Bioteke)、PCR 引物由上海生工设计合成。酶标仪(美国 Thermo)、实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 7500)。

1.2 实验分组

首先将 Hepa1-6 肝癌细胞培养于 Low DMEM 中,待其生长至铺满瓶底 70%时,分别用 5、15、30 mmol/L D-葡萄糖刺激 Hepa1-6 肝癌细胞 18 h,以 5 mmol/L 为对照组。用 15 mmol/L D-葡萄糖分别刺激 Hepa1-6 肝癌细胞 0、6、12、18、24 h,以 0 h 为对照组。实验重复 3 次。

1.3 MTT 法检测葡萄糖对细胞生长的影响

取对数生长期的细胞接种于 96 孔板上,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱培养 24 h。分别更换不同葡萄糖浓度的 DMEM(5、15、30 mmol/L)200 μL,设置调零孔(培养基、MTT、二甲基亚砜)、对照孔(细胞、5 mmol/L 葡萄糖、MTT、二甲基亚砜)及 3 个复孔,培养箱中继续培养。在不同时间点(0、6、12、18、24 h),分别加入 20 μL MTT(5 mg/mL),继续培养 4 h。弃上清液,每孔加入 200 μL DMSO 置于摇床上震荡溶解 10 min。用酶标仪在 492 nm 波长处测定吸光度(A),重复 3 次。以时间为横坐标,A 值为纵坐标作生长曲线。

1.4 RNA 抽提、cDNA 反转录

用 Trizol 法提取各组细胞的总 RNA,详细操作按照说明书进行。通过 Nanodrop 2000c 鉴定 RNA 的质量和浓度。反转录试剂盒逆转录合成 cDNA,具体操作参照说明书,置于 -80℃保存

待用。

1.5 引物设计及 qPCR array

根据代谢通路数据库 KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>),选取与胆固醇合成密切相关的 20 个基因(表 1),另外选取看家基因 B2M,设计横跨内含子引物,DNA 序列信息来自 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

引物固化:将引物顺序加入 96 孔 PCR 板中,65℃ 20 min。设置基因组污染质控、阴性对照。qPCR array 反应体系:10 μL 定量 PCR mix,2.5 μL cDNA,7.1 μL H₂O,0.4 μL ROX。反应条件:95℃ 预变性 2 min;95℃ 15 s,60℃ 15 s,72℃ 40 s,40 个循环。利用 ABI 7500 进行定量 PCR。采用 $\Delta\Delta Ct$ 计算各基因相对表达量。

1.6 统计学分析

基因表达定量分析每组实验均重复 3 次,所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 软件处理。两个样本均数间的比较采用 t 检验,以 P<0.05 为差异有显著性。

表 1 qPCR array 中胆固醇合成基因

Table 1 Cholesterol biosynthesis gene include in the qPCR array

Pathway	Gene
Mevalonate pathway	HMGCR, HMGC1, HMGC2, IDI1, MVD, PMVK,
Conversion of activated isoprene to form lanosterol	FDFT1, FDPS, GGPS1, SQLE, LSS, CYP51, DHCR24, DHCR7, EBP,
Conversion of lanosterol to cholesterol	HSD17B7, NSDHL, SC4MOL, SC5D, TM7SF2

2 结果

2.1 MTT 法测定葡萄糖对 Hepa1-6 细胞生长的影响

在三种浓度的葡萄糖(5、15、30 mmol/L)作用下,高糖组细胞(15、30 mmol/L)的生长曲线较正常浓度葡萄糖组低(5 mmol/L)。如图 1 所示,高糖处理 12 h 内,各组细胞生长趋势相似,无明显差异。18 h 后,高糖组细胞生长率下降,具有统计学差异(P<0.05)。说明高糖抑制细胞生长。

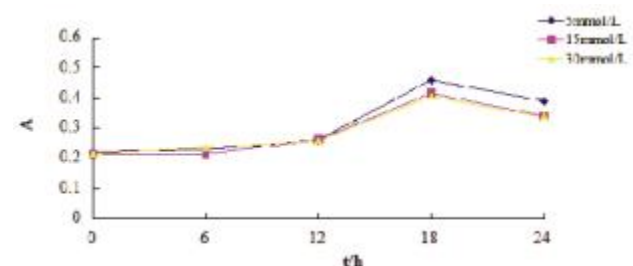


图 1 葡萄糖对 Hepa1-6 生长的影响

Fig. 1 Effect of glucose on growth curve of Hepa1-6

2.2 qPCR array 方案

qPCR array 是一种扩增效率高、重复性好、特异性强的检测方案。如图 2 所示:将 cDNA 模板连续稀释 4 倍形成 4 个浓度梯度,绘制标准曲线并计算扩增效率,所有基因扩增效率均接近于 1,说明方案扩增效率高(图 2A);20 个基因 CT 值标准差均小于 0.25,说明方案重复性好(图 2B);定量 PCR 的溶解曲

线(图 2C)和 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图(图 2D),融解曲线 单峰、电泳条带唯一,说明方案特异性强。

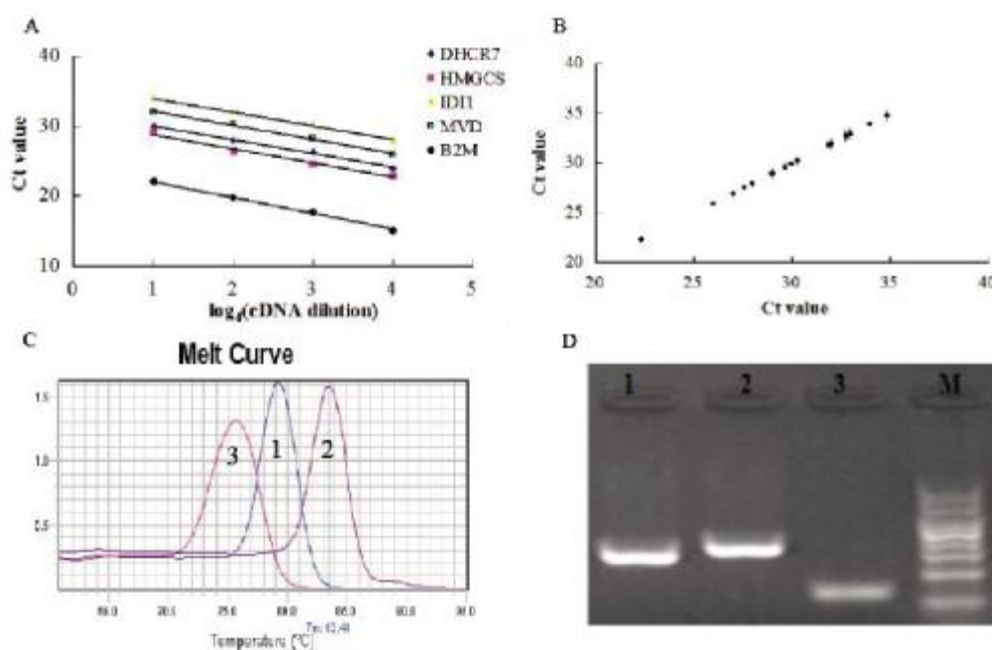


图 2 qPCR array 的评估

Fig. 2 Evaluation of the qPCR array

*注:A)基因扩增效率(DHCR7、HMGCS1、IDI1、MVD、B2M)B)CT 值的均值及标准差(20 个基因)C)溶解曲线 1、2、3 依次为 FDFT1、FDPS、GGPS1 D)PCR 产物琼脂糖凝胶电泳,1、2、3、M 依次为 FDFT1、FDPS、GGPS1 以及 50bp DNA Ladder Marker。

*Note: A) PCR efficiency (DHCR7、HMGCS1、IDI1、MVD、B2M); B) Average threshold cycle value (20 gene) C) Melt curve 1, 2, 3 gene name: FDFT1, FDPS, GGPS1; D) Agarose gel electrophoresis, lane 1, 2, 3: FDFT1, FDPS, GGPS1, M: 50bp DNA Ladder Marker.

2.3 胆固醇合成相关基因在 mRNA 水平上的差异

利用 qPCR array 检测高糖诱导下 Hepa1-6 肝癌细胞中 20 个胆固醇合成基因的表达,发现 CYP51、EBP、NSDHL、SQLE、FDFT1 和 PMVK 6 个基因的表达量存在差异,其余基因无显著差异(图 3)。

1) 剂量效应: 不同葡萄糖浓度处理 18 h 后,与对照组相比,在 15 mmol/L 时,CYP51、EBP、NSDHL 和 SQLE 表达均发生上调($P<0.05$)。30 mmol/L 时,CYP51、EBP 和 NSDHL 的表达与 15 mmol/L 时持平,而 SQLE 则持续上调($P<0.01$)。基因 FDFT1 和 PMVK 的表达只在 30 mmol/L 时上调($P<0.01$)(图 4 和 6)。

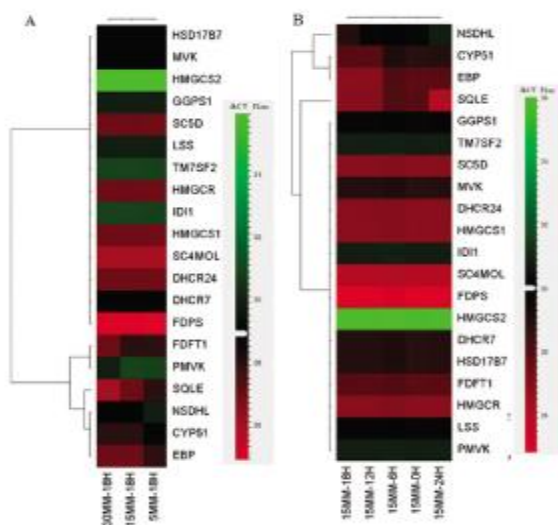


图 3 高糖诱导下胆固醇合成基因表达水平热图

Fig. 3 Heat map diagrams of cholesterol biosynthesis gene expressed in mouse Hepa 1-6 upon high glucose

*注:A)不同浓度葡萄糖处理,B)葡萄糖处理不同时间;DataAssist software v3.01 分析。

*Note: A) different concentrations(at the same time,18 h), B) different times (at the same concentration,15 mmol/L) DataAssist software v3.01 analysis.

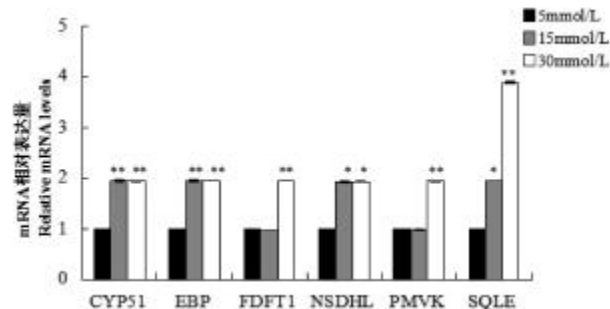


图 4 高糖刺激 18 h 后胆固醇合成基因 mRNA 的表达(qPCR array)

Fig. 4 Effects of high glucose on Cholesterol biosynthesis gene expression in Hepa1-6. Hepa1-6 were treated with different concentrations of glucose as indicated for 18 h

注:与对照组比较(5 mmol/L), $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

*Note: Compared with control (5 mmol/L), * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

2) 时间效应: 15 mmol/L 高糖诱导不同时间(0、6、12、18、24 h)后,与 0 h 相比,CYP51、EBP 和 SQLE 基因的 mRNA 表达量在 12 h 开始上升,CYP51 和 EBP 的表达量在 12 h 增至最大,

具有统计学意义($P<0.05$);随后 CYP51 和 EBP 开始减少,24 h 降至 0 h 水平;SQLE 的表达量则是至 24 h 达到最大($P<0.01$)。NSDHL 的表达量在 18 h 开始明显增加($P<0.05$),其后又恢复至 0 h 水平(图 5 和 6)。

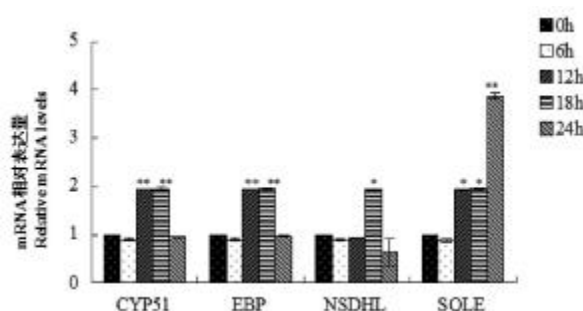


图 5 高糖刺激不同时间后胆固醇合成基因 mRNA 的表达(qPCR array)

Fig. 5 Effects of 15mmol/L glucose concentration on Cholesterol biosynthesis expression in Hepa1-6. Hepa1-6 were treated with different times (0, 6, 12, 18, 24 h)

* 注:与对照组比较(0 h), * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

*Note: Compared with control (0 h), * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

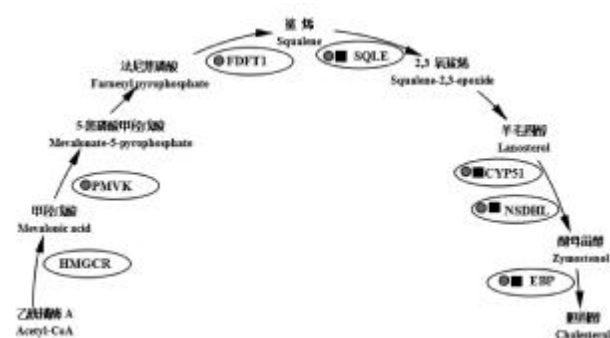


图 6 高糖对胆固醇合成基因 mRNA 表达的影响

Fig. 6 Time-and dose-dependent effects of glucose on the expression of Cholesterol biosynthesis expression

* 注:浓度依赖性 时间依赖性。

*Note: Dose-dependent Time-dependent.

3 讨论

本研究建立了扩增效率高、重复性好、特异性强、稳定可靠的 qPCR array 方案,并利用该方案检测了高糖诱导下肝癌细胞胆固醇合成相关基因的 mRNA 水平差异。发现 CYP51、EBP、NSDHL 以及 SQLE 同时存在浓度和时间依赖性。而 PMVK 和 FDFT1 则存在浓度依赖性,无时间依赖性(图 6)。通过 MTT 法检测,显示高糖对细胞生长存在抑制作用。

甲羟戊酸合成途径是内源性胆固醇生物合成中最重要的组成部分^[12]。本研究结果显示,作为胆固醇生物合成途径中的限速酶 HMGCR 并没有随着葡萄糖浓度升高和处理时间增加而发生明显的变化。因此,HMGCR 可能是通过转录后途径来调节胆固醇的生物合成^[13]。然而 PMVK、FDFT1 以及 SQLE 随着葡萄糖浓度的升高而升高。此外高糖处理 12 h 后 SQLE 表达量升

高,并且表达量随着时间的延长而升高,提示长时间高糖刺激对 SQLE 起上调作用。胆固醇调节元件结合蛋白(SREBP)通过 Insig-Srebp-Scap 途径对细胞内胆固醇合成进行反馈调节,且 SREBP 的靶基因包括 PMVK、FDFT1、SQLE^[14,15]。葡萄糖也可以促进 SREBP mRNA 和蛋白质的表达^[16]。因此,高糖可能通过 SREBP 途径调节这些基因的表达。但是高糖诱导下基因表达发生差异是否归结于 SREBP 途径,还需在今后实验中进一步验证。

在羊毛固醇合成胆固醇途径中,羊毛固醇-14 α -脱甲基酶(CYP51)、固醇脱氢酶(NSDHL)、甾醇异构酶(EBP)参与了胆固醇的合成^[17,18]。研究发现 Cyp51-/- 小鼠体内胆固醇合成途径受到阻断,导致胆固醇在体内减少^[19]。NSDHL 和 EBP 位于 CYP51 基因的下游,催化胆固醇的生物合成。位于内质网膜上的 NSDHL 与脂滴向高尔基体转运相关,从而成为调节脂滴转运以及胆固醇的靶点^[20]。EBP 可以催化酵母甾醇转化为胆固醇的前体物质,EBP 突变可导致患软骨发育不全,影响胆固醇的生物合成^[21]。虽然这些基因不是胆固醇生物合成中最基本的限速酶,但是通过调节这些基因的表达可以维持体内胆固醇代谢平衡,起到对生物体内的保护作用。

在本实验中 CYP51、NSDHL 以及 EBP mRNA 表达量随着葡萄糖浓度升高而增加,随着时间的增加先上升后下降。这可能是由于高糖促进 CYP51、NSDHL 以及 EBP 基因的表达,使细胞内胆固醇积聚;当胆固醇增加到一定程度时,通过反馈调节抑制基因的表达。已知葡萄糖是肝 X 受体(LXR)的内源性激动剂,生理浓度下葡萄糖即可激活 LXR,促进 LXR 调控目的基因的转录^[22],LXR 也可抑制 CYP51 的表达,控制胆固醇合成^[23]。同时,CYP51 还受到 SREBP、cAMP 等调控^[24]。但是高糖诱导下 CYP51 表达量的变化是否归结于 LXR 途径,以及 NSDHL、EBP 拥有怎样的调节机制,还需在今后实验中进行验证。

本研究结果表明,qPCR array 方案能准确检测胆固醇合成基因的表达。体外模拟糖尿病状态,以高糖为刺激因素,发现高糖能上调胆固醇合成基因的表达,且部分基因呈现剂量及时间依赖性。说明高糖可促使胆固醇合成基因的表达,使胆固醇合成加速,导致胆固醇积聚,增加患糖尿病合并动脉粥样硬化性心血管疾病的风险。本结果可为探索糖尿病动脉粥样硬化类疾病的发生机制,以及把胆固醇合成基因作为防治动脉粥样硬化的药物靶点,提供初步的理论依据。但是高糖处理下,胆固醇积聚是否仅由胆固醇合成基因增加所引起的,还是有其它因素的存在,如高糖是否会抑制胆固醇分解代谢基因的表达,延缓胆固醇清除速率,从而使胆固醇在体内积聚,有待下一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Fagan TC, Sowers J. Type 2 diabetes mellitus: greater cardiovascular risks and greater benefits of therapy [J]. Arch Intern Med, 1999, 159 (10): 1033-1034
- [2] Haffer SM. Dyslipidemia management in adults with diabetes [J]. Diabetes Care, 1998, 21(1): 160-178
- [3] 李慧,景贤,邓晓兰,等.调脂药物的作用靶点 [J].中南大学学报, 2013, 38(1): 101-108
- Li Hui, Jing Xian, Deng Xiao-lan, et al. Targets of anti-hyperlipidemia drugs[J]. J Cent South Univ, 2013, 38(1): 101-108
- [4] Chang YC, Sheu WH, Chien YS, et al. Hyperglycemia accelerates

- ATP-binding cassette transporter A1 degradation via an ERK-dependent pathway in macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2013, 114(6): 13 64-1374
- [5] Murao K, Yu X, Imachi H, et al. Hyperglycemia suppresses hepatic scavenger receptor class B type I expression [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 294(1): 78-87
- [6] 田慧, 韩越, 吴秀萍, 等. ABCA1 和 PPAR γ 与糖尿病动脉粥样硬化关系的研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(3): 452-455
Tian Hui, Han Yue, Wu Xiu-ping, et al. Study on the Relationship between ABCA1 and PPAR γ in Diabetic Atherosclerosis [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2013, 13(3): 452-455
- [7] DeRisi J, Penland L, Brown PO, et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer[J]. *Nature Genetics*, 1996, 14(4): 457-460
- [8] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolution-ary tool or transcriptomics[J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(1): 57-63
- [9] Fakhari FD, Dittmer DP. Charting latency transcripts in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by whole-genomereal-time quantitative PCR[J]. *J Virol*, 2002, 76(12): 6213-6223
- [10] Jensen KK, Previs SF, Zhu L, et al. Demonstration of diet-induced decoupling of fatty acid and cholesterol synthesis by combining gene expression array and $2H_2O$ quantification [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 302(2): 209-217
- [11] 曲佳, 熊鸣, 赵晓航. 实时定量 PCR 芯片 - 功能基因组研究的有用工具 [J]. *生命科学*, 2009, 21(2): 241-245
Qu Jia, Xiong Ming, Zhao Xiao-hang. Quantitative PCR array: a useful tool for functional genomic studies[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2009, 21(2): 241-245
- [12] Vance DE, Vance JE, Laura Liscum, et al. *Biochemisntry of Lipids, lipoproteins and Memhranes*[M]. Ireland: Elsevier, 2008: 399-422
- [13] De Vogel-van den Bosch HM, de Wit NJ, Hooiveld GJ, et al. A cholesterol-free, high-fat diet suppresses gene expression of cholesterol transporters in murine small intestine [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 294(5): 1171-1180
- [14] Brown MS, Goldstein JL. Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL[J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(Suppl): S15-S27
- [15] Nagai M, Sakakibara J, Nakamura Y, et al. SREBP-2 and NF-Y are involved in the transcriptional regulation of squalene epoxidase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 295(1): 74-80
- [16] Hasty AH, Shimano H, Yahagi N, et al. Sterol Regulatory Element-binding Protein-1 is regulated by Glucose at the Transcriptional Level[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(40): 31069-31077
- [17] Debose-Boyd RA. A Helping Hand for Cytochrome P450 Enzymes [J]. *Cell Metabolism*, 2007, 5(2): 81-83
- [18] Deniz Ekinci. *Biochemistry*[M]. Croatia: Intech, 2012: 419-442
- [19] Keber R, Motaln H, Wagner KD, et al. Mouse Knockout of the Cholesterogenic Cytochrome P450 Lanosterol 14-Demethylase (Cyp51) Resembles Antley-Bixler Syndrome [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(33): 29086-29097
- [20] Caldas H, Herman GE. NSDHL, an enzyme involved in cholesterol biosynthesis, traffics through the Golgi and accumulates on ER membranes and on the surface of lipid droplets [J]. *Human Molecular Genetics*, 2003, 12(22): 2981-2991
- [21] Porter FD, Herman GE. Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis[J]. *J Lipid Res*, 2011, 52 (1): 6-34
- [22] Mitro N, Mak PA, Vargas L, et al. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor[J]. *Nature*, 2007, 445(7124): 219-223
- [23] Wang Y, Rogers P M, Su C, et al. Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXR- α [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(39): 26332-26339
- [24] Acimovic J, Fink M, Pompon D, et al. CREM modulates the circadian expression of CYP51, HMGCR and cholesterologenesis in the liver[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 376(1): 206-210

(上接第 6419 页)

- [13] 储真真, 陈信义, 李宏. 对化疗后骨髓抑制的中医临床理论探讨与防治对策[J]. *中华中医药杂志*, 2005, 20(11): 676-678
Chun Zhen-zhen, Chen Xin-yi, Li Hong. The theory of TCM clinical investigation and prevention and cure measures of bone marrow suppression after chemotherapy [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2005, 20(11): 676-678
- [14] 黄朝忠, 刘智, 苏颖. 中医药对肿瘤化疗免疫调节作用的研究[J]. *长春中医药大学学报*, 2014, 30(2): 256-258
Huang Chao-zhong, Liu Zhi, Su Ying. The immune regulation effect of TCM on tumor chemotherapy[J]. *Journal of Changchun University of Tradional Chinese Medicine*, 2014, 30(2): 256-258
- [15] 贾英杰, 于建春, 杨佩颖, 等. 扶正解毒祛瘀法治化疗后骨髓抑制的探讨[J]. *中医杂志*, 2014, 55(3): 198-201
Jia Ying-jie, Yu Jiang-chun, Yang Pei-ying, et al. Discussion on Body Resistance-Strengthening, Toxin-Resolving and Stasis-Dispelling Therapy for Chemotherapy-Induced Myelosupression [J]. *Journal of Tradional Chinese Medicine*, 2014, 55(3): 198-201
- [16] 祝东升, 赵立娜, 钟馨, 等. 益气生血汤防治乳腺癌化疗期间骨髓抑制 35 例[J]. *中医杂志*, 2011, 52(2): 159-160
Zhu Dong-sheng, Zhao Li-na, Zhong Xin, et al. Decoction of replenishing qi and blood of chemotherapy for breast cancer prevention and treatment during the 35 cases with bone marrow suppression [J]. *Journal of Tradional Chinese Medicine*, 2011, 52(2): 159-160
- [17] 蔡新生, 闫朝光. "脾肾方" 防治化疗骨髓抑制 60 例临床研究[J]. *江苏中医药*, 2009, 41(6): 25-26
Cai Xin-sheng, Yan Chao-guang. Clinical study of 60 cases of "spleen and kidney prescription" inhibition and prevention of chemotherapy induced bone marrow suppression [J]. *Jiangsu Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2009, 41(6): 25-26
- [18] 王兴海, 曹瑞, 张波, 等. 维血宁对环磷酰胺致骨髓抑制模型小鼠的 WBC、RBC、PLT 和 Hb 的影响 [J]. *西北药学杂志*, 2011, 26(5): 354-356
Wang Xing-hai, Cao Rui, Zhang Bo, et al. Effect of Weixuening on WBC, RBC, PLT and Hb of myelosuppression mice induced by cyclophosphamide [J]. *Northwest Pharmaceutical Journal*, 2011, 26 (5): 354-356