

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.10.007

含 G0S2 基因启动子的荧光素酶报告基因载体的构建*

张翠珍¹ 蒋学俊^{1△} 钱 航² 张 鹏² 杨汉东^{2△}

(1 武汉大学人民医院心血管内科 湖北 武汉 430060; 2 湖北医药学院心脏病研究中心 湖北 十堰 442000)

摘要 目的:克隆人 G0S2 基因启动子并构建荧光素酶报告基因载体,为进一步研究 G0S2 基因转录调控提供质粒。**方法:**利用 PCR 技术从人胚肾 293A 细胞基因组 DNA 中克隆获得 G0S2 基因启动子的 DNA 片段,将其克隆至 pGL3-basic 表达载体中,并转化入大肠杆菌 DH5 α ,经限制性内切酶酶切、PCR 及测序鉴定得到确认;将重组载体质粒与半乳糖苷酶表达质粒 psV- β -Galactosidase 共转染至大鼠血管平滑肌细胞(VSMC),检测细胞中荧光素酶的活性。**结果:**pGL3-G0S2-Promoter 重组质粒插入片段和相邻序列正确,克隆的 G0S2 基因片段有启动子活性($P<0.05$)。**结论:**成功构建了 pGL3-G0S2-Promoter 报告基因质粒,为进一步研究 G0S2 基因的表达奠定了基础。

关键词:G0S2 基因;启动子;荧光素酶;报告基因质粒

中图分类号:Q782 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)10-1830-04

Construction and Significance of G0S2 Promoter-Directed Luciferase Reporter Gene Plasmid*

ZHANG Cui-zhen¹, JIANG Xue-jun^{1△}, QIAN Hang², ZHANG Peng², YANG Han-dong^{2△}

(1 Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430060, China;

2 Cardiovascular Research Center, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei, 442000, China)

ABSTRACT Objective: To clone the luciferase reporter gene and construct promoter region from human G0S2 gene. **Methods:** A region containing human G0S2 gene promoter was obtained by PCR amplification from 293A cells, and the segment was cloned into the pGL3-Basic vector and transformed into *E.Coli*, which was verified by endonuclease, PCR amplification and direct sequencing. The final construct (pGL3-G0S2-Promoter) was transferred into VSMC (vascular smooth muscle cells), and the luciferase activity was measured. **Results:** The insert and surrounding regions in pGL3-G0S2-Promoter plasmid were confirmed. There was significant promoter activity for pGL3-G0S2-Promoter vector ($P<0.05$). **Conclusions:** Luciferase reporter plasmid pGL3-G0S2-Promoter containing G0S2 promoter can be built successfully. It will be used to study the transcriptional regulation of G0S2 gene.

Key words: G0S2; Promoter; Luciferase; Reporter gene vector

Chinese Library Classification(CLC): Q782 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)10-1830-04

前言

G0S2(G0/G1 switch gene 2)基因是 1991 年 Russell 等人首次发现的,在利用 lectin 和放线菌酮刺激单核细胞时,G0S2 基因在细胞周期 G0 向 G1 期过渡过程中瞬时增高,又被称为 lectin 诱导基因^[1]。G0S2 基因是脂肪甘油三酯脂肪酶(adipose triacylglyceride lipase, ATGL)脂解过程的有效抑制因子,其高表达于脂肪组织和分化的脂细胞中^[2,3]。研究表明,G0S2 基因敲除后脂肪细胞基础和刺激状态下的二酰甘油(TAG)脂解过程会加快,而 G0S2 基因过表达时则相反^[2]。ATGL 是甘油三酯分解过程的关键脂肪酶,在催化整个机体脂解反应第一步过程中起着关键作用^[4]。G0S2 通过影响 ATGL 的酶活性及在细胞的定位来调节人体内脂肪分解过程^[3,5,6]。机体内甘油三酯的脂解过程紊乱,会导致血浆中未酯化的脂肪酸升高,促进甘油三酯在非脂肪组织中如肝脏、心肌和胰脏中的堆积,引起代谢综合

征的发生^[7]。胰岛素抵抗的发病机制与脂类分解增加有关,研究表明,血糖控制不佳的 2 型糖尿病患者体内 G0S2 表达水平降低,脂肪组织中 G0S2 下调可能是导致胰岛素抵抗状态脂肪分解增加的一个潜在原因^[8]。G0S2 基因通过调节 ATGL 参与脂质代谢过程,可能与脂质代谢紊乱相关的疾病如 2 型糖尿病、动脉硬化、高血压等的发生发展有关。因此,研究 G0S2 基因的生物学作用可能为临床相关疾病的治疗提供新的思路。

G0S2 基因除了主要表达在白色和棕色脂肪组织外,在肝、肾、心脏和骨骼肌等组织中也有表达^[9]。本课题组在体外培养的大鼠血管平滑肌细胞中检测到了 G0S2 基因的表达。G0S2 基因在血管平滑肌细胞中的生物学作用还需要进一步研究。作为研究 G0S2 基因转录调控及其生物学作用的前期工作,本研究拟克隆含有 G0S2 基因的启动子,并构建该片段的荧光素酶报告基因载体。

1 材料与方法

* 基金项目:湖北省教育厅科研项目(T201212 和 Q20122401)

作者简介:张翠珍(1987-),女,硕士研究生,研究方向:血管成形术后再狭窄的分子机制

共同通讯作者:蒋学俊,博士,教授,E-mail: xjjiang@whu.edu.cn

△ 通讯作者:杨汉东,博士,教授,E-mail: yanghand@dongfeng.net

(收稿日期:2013-09-12 接受日期:2013-10-10)

1.1 实验材料

载体质粒 pGL3-Basic、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、半乳糖苷酶表达质粒 psV- β -Galactosidase、荧光素酶活性测定试剂盒及 β -半乳糖苷酶活性检测试剂盒购于 Promega 公司;人胚肾 293A 细胞和 GFP 质粒由湖北医药学院心脏病研究所冻存;PCR 引物、高保真 Pfu DNA 聚合酶、DNA 纯化试剂盒、质粒提取及胶回收试剂盒购自 Omega 公司;限制性内切酶 Kpn I 购于 NEB 公司;In-fusion 交换酶购于 clontech 公司;高糖 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 购于 invitrogen 公司;胎牛血清购于杭州四季青生物工程有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 G0S2 启动子序列扩增及纯化 根据 G0S2 基因 (Gen ID: 49457381) 序列,设计两对引物扩增包含 G0S2 启动子核心区域的 DNA 片段 (上游引物序列:TTT CTC TAT CGA TAG GTA CCA CAA GCC CTT GCC TGA ACT A;下游引物序列:ACG CGT AAG AGC TCG GTA CCG GAA GAA GAG GAG GGG AAA A,由上海生工生物工程有限公司合成),扩增片段全长约 1700 bp。反应模板为人胚肾 293A 细胞基因组 DNA,反应体系为 50 μ L,含有 10 $\times$ PCR buffer 5 μ L、上下游引物(10 μ M)各 1 μ L、dNTPs(10 mM)1 μ L、模版 DNA 1 μ L、高保真 DNA 聚合酶 1.5 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,共 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min。将 PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,并对目的条带进行胶回收。

1.2.2 重组质粒 pGL3-G0S2-Promoter 的构建及鉴定 载体 pGL3-Basic 在限制性内切酶 Kpn I 作用下,37 $^{\circ}$ C 1 h 酶切成线性。利用 Clontech 公司的 In-fusion 技术将 G0S2 启动子 PCR 产物与 pGL3-Basic 载体质粒酶切产物进行连接反应,反应条件为 37 $^{\circ}$ C 15 min,然后 50 $^{\circ}$ C 15 min,4 $^{\circ}$ C 1 min。将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,菌液均匀涂布于含有氨苄青霉素(Amp)的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 12 h,随机挑取 5 个克隆,进行 PCR 鉴定,取阳性克隆置于 LB/Amp 液态培养基中 37 $^{\circ}$ C 震荡培养 12 h,根据 Promega 公司质粒提取试剂盒说明书,提取质粒 DNA(pGL3-G0S2-Promoter)。载体质粒经 Kpn I 酶切,1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.2.3 大鼠血管平滑肌细胞体外分离及培养 无菌条件下取健康 SD 大鼠胸主动脉,剥除动脉外膜并去除内膜,采用贴壁法置于 25 cm² 细胞培养瓶中,加入含 1 $\times$ 10⁵ U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素以及含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液,置 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。培养 7~9 d 组织块长出细胞团,14 d 首次进行传代,然后隔天换液、3~4 d 传代 1 次,取指数生长期内的细胞进行实验。

1.2.4 电穿孔法转染启动子 采用 BTX ECM830 电转仪,所有操作均在无菌条件下进行。电转前,用 0.1 M PBS 平衡液洗细胞 2 次,于 1500 rpm 离心 5 min 后去上清,用不含血清的 DMEM 培养液重悬细胞,并加入 GFP 质粒,制成细胞密度为 1 $\times$ 10⁷/L、DNA 浓度为 30 μ g/L 的细胞混悬液。移取 400 μ L 混悬液置于 4 mm 电击杯中待转。选择方波、1 个脉冲、不同的脉冲电压(160,180,200,280 V)及不同的脉冲时间(50,70,90 ms)条件下进行瞬时转染。电击完毕将电击杯静置 5 min,加入含有 10%FBS 的 DMEM 培养基,以细胞密度 1 $\times$ 10⁶/L 接种

到 24 孔培养板中,置 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养。培养 12 h 后荧光显微镜下观察细胞,200 V、90 ms 条件下细胞存活率及转染效率均较高。采用此优化的电转条件(200 V、90 ms)进行质粒转染,实验分为 4 组,1 组为实验组,转染 pGL3-G0S2-Promoter 质粒;2 组为阳性对照组,转染 pGL3-Promoter;3 组为阴性对照组,转染载体质粒 pGL3-Basic;4 组为空白对照组。为校正组间转染效率,每组均采用表达 β -半乳糖苷酶的质粒 psV- β -Galactosidase 同时进行转染。培养 12 h 后换液,继续培养至 24 h。每组设 2 个复孔,在相同条件下重复 3 次实验。

1.2.5 荧光素酶转录活性测定及 β -Gal 活性测定 培养 48 h 弃去细胞培养液,用 0.1 M PBS 洗 3 次,每孔加入细胞裂解液 100 μ L。充分裂解细胞后,以 12000 $\times$ G 于 4 $^{\circ}$ C 离心 2 min 留上清。取 20 μ L 上清加入 100 μ L 荧光素酶的底物,用生物发光仪检测荧光素酶的活性。另取 30 μ L 上清加 20 μ L 1 $\times$ 裂解 buffer 进行稀释,加入 50 μ L 含 β -半乳糖苷酶的反应底物 ONPG 的 Assay 2 $\times$ Buffer,于 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min 后,加入 150 μ L Na₂CO₃(1 M)终止反应,于波长 420 nm 测定吸光度(A)值,根据标准曲线计算每孔含 β -半乳糖苷酶的量。以荧光素酶的活性与 β -半乳糖苷酶含量的比值为校正后的结果。

1.2.6 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各样本间数据比较采用 ANOVA 方差分析,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 G0S2 启动子扩增结果

通过上下游引物进行 PCR 扩增后,产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,长度约为 1700 bp 的条带即为目的条带,见图 1。目的基因进行切胶回收。

2.2 G0S2 启动子与 pGL3-Promoter 质粒的链接与鉴定

随机挑取 5 个单克隆菌落,运用菌斑 PCR 技术进行鉴定,结果见图 2。提取鉴定正确的阳性克隆扩增测序,测序结果证明重组载体克隆正确。重组质粒 pGL3-G0S2-Promoter 经 Kpn I 酶切后,1.2% 琼脂糖凝胶电泳,结果显示出约 4.8 kb 的大片段和 1.7 kb 的小片段,与理论结果相符,证明质粒构建成功,见图 3。

2.3 荧光素酶报告基因转录活性

重组质粒转染大鼠血管平滑肌细胞,结果显示,质粒转染组和阳性对照组均有明显差异(P<0.05),质粒组与阳性对照组相比有明显荧光素酶转录活性(P<0.05),见图 3。

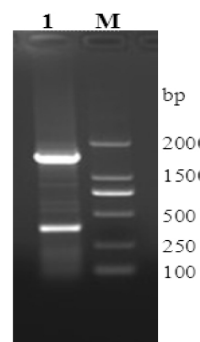


图 1 PCR 产物电泳结果 M:DNA 分子量标准;1:PCR 产物
Fig.1 PCR agarose gel electrophoresis M: DNA Maker; 1: PCR product

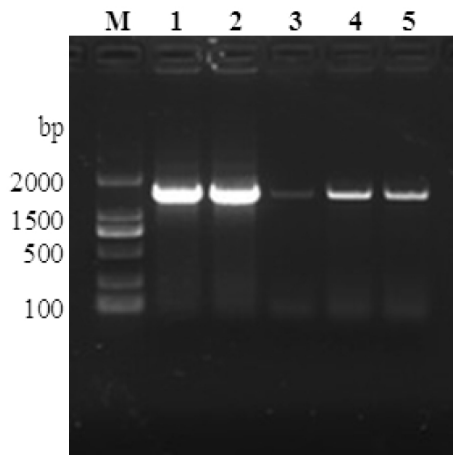


图2 重组质粒转化克隆菌的PCR鉴定 M:DNA分子量标准;1~5:重组载体

Fig.2 Recombinant plasmids agarose gel electrophoresis M: DNA Maker; 1~5: recombinant plasmids

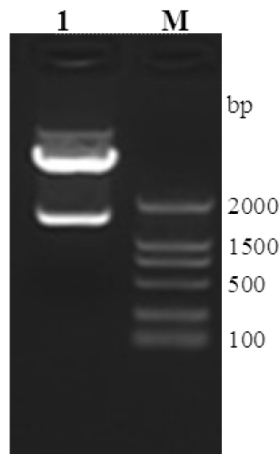


图3 重组质粒酶切电泳结果 1:重组质粒酶切产物;M:DNA分子量标准

Fig.3 Recombinant plasmids digested by enzyme 1: digestion of recombinant by *Kpn* I ; M: DNA Maker

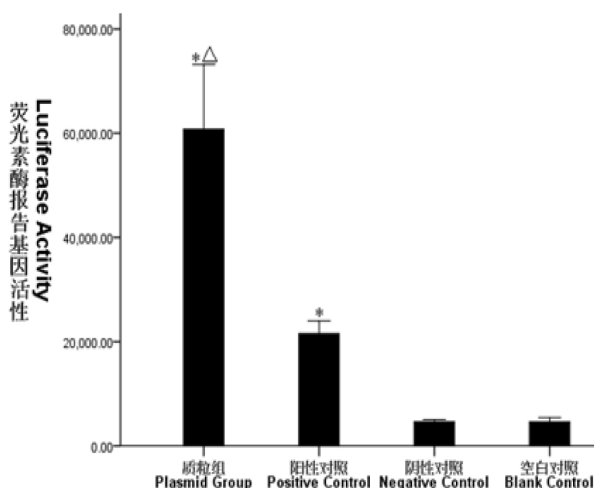


图4 血管平滑肌细胞中 pGL3-G0S2-Promoter 启动子活性分析

Fig.4 Luciferase assay of pGL3-G0S2-Promoter in VSMC

* vs. 阴性对照 / 空白对照 * $P < 0.05$

* vs. Negative Control/Blank Control * $P < 0.05$

△ vs. 阳性对照 △ $P < 0.05$

△ vs. Positive Control △ $P < 0.05$

3 讨论

G0S2 参与机体内脂质代谢过程,与肥胖、糖尿病胰岛素抵抗等脂质代谢相关疾病密切相关。研究还发现,G0S2 蛋白是一种含有 103 个氨基酸的碱性蛋白,在脂肪细胞和造血细胞分化过程中基因 G0S2 基因表达明显增加,被认为是调节细胞周期由 G0 期向 G1 期转换的开关基因^[8-10]。成年动物肝脏、骨骼肌及衰老细胞增殖能力降低的同时 G0S2 基因表达明显增加,HepG2、FAO 和 Hepa1-6 等有较高增殖能力的肿瘤细胞系中 G0S2 基因表达水平明显降低^[8],G0S2 基因与细胞增殖和分化可能密切相关。血管平滑肌细胞增殖、迁移是临床上血管成形术后再狭窄发生的主要原因之一^[11,12],因此研究血管平滑肌细胞中 G0S2 基因的生物学作用还可能为心血管疾病的临床防治提供新的思路。

启动子是转录激活过程中起发动作用的特异 DNA 序列,与转录因子结合后调节基因的转录^[13]。基因的转录受到启动子的精确调控,要明确基因的转录调控机制,启动子的活性分析是前提。启动子的克隆,一是利用启动子探针质粒载体筛选启动子,二是利用 PCR 技术^[14]。本研究根据 G0S2 启动子序列,设计特异性引物,用 PCR 技术钓取目的基因,利用 In-Fusion 技术将扩增产物克隆到 pGL3-Basic 载体中。

In-Fusion 技术是近年来新兴的克隆技术,自 2009 年张明娟等人在国内首次报道成功利用 In-Fusion 技术构建重组载体^[15],In-Fusion 技术已逐渐被采用,现已逐渐应用于基因突变、多片段克隆及多基因融合等研究^[16]。In-Fusion 技术是一种非连接酶依赖的克隆技术,不需要连接酶和磷酸化酶,也不需要 PCR 产物进行酶切,简化了克隆步骤并节省了实验时间和经费^[17,18]。In-Fusion 技术不受基因序列和载体酶切位点的影响,只需要在设计 PCR 引物时分别引入 15 个碱基的载体末端序列,使线性化载体与 PCR 产物与 15 个共同碱基,然后在反应体系中加入 In-Fusion 交换酶,室温反应就可以将 PCR 产物克隆到目标载体上,这就使得在质粒载体无合适酶切位点的情况下也可以实现基因克隆,具有高效、精确、便捷的优点。且与传统克隆方法相比,In-Fusion 技术具有较高的克隆阳性率^[19],本研究随机挑选 5 个单克隆,鉴定结果显示均为阳性,克隆阳性率非常高。

pGL3-Basic 是一个能表达荧光素酶蛋白的载体质粒,是研究启动子活性和功能的常用载体^[20]。pGL3-Basic 载体中不含启动子及增强子,因此将外源基因的启动子序列克隆到荧光素酶基因的上游,再将重组载体转染细胞,启动子序列可以驱动荧光素酶的表达,通过测定转染后细胞中的荧光素酶活性就可以得到启动子的活性。本研究将 G0S2 启动子与 pGL3-Basic 载体连接后,得到重组质粒 pGL3-G0S2-Promoter,经限制性内切酶酶切鉴定,得到的 4.8 kb 的大片段即为 pGL3-Basic 载体,1.7 kb 的小片段即为 G0S2 启动子,证明质粒构建正确。而将重组质粒、pGL3-Promoter 及 pGL3-Basic 分别转染进入大鼠血管平滑肌细胞,进行荧光素酶报告基因转录活性分析。结果显示:重组质粒和阳性对照质粒具有转录活性,且重组质粒与 pGL3-Promoter 相比,有明显转录活性,表明重组载体 pGL3-G0S2-Promoter 具有生物学活性。

本实验成功构建了含有 G0S2 基因启动子的萤光素酶报告基因表达载体,并且在血管平滑肌细胞中有明显转录活性,可以进一步对 G0S2 基因功能及调控机制进行研究,为基因核心启动子区域的分析及功能研究提供了极大的方便。

参考文献(References)

- [1] Russell L, Forsdyke D R. A human putative lymphocyte G0/G1 switch gene containing a CpG-rich island encodes a small basic protein with the potential to be phosphorylated [J]. DNA Cell Biol, 1991, 10(8): 581-591
- [2] Yang X, Lu X, Lombes M, et al. The G (0)/G (1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase [J]. Cell Metab, 2010, 11(3):194-205
- [3] Nielsen T S, Vendelbo M H, Jessen N, et al. Fasting, but not exercise, increases adipose triglyceride lipase (ATGL) protein and reduces G(0)/G(1) switch gene 2 (G0S2) protein and mRNA content in human adipose tissue[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(8):E1293-E1297
- [4] Zimmermann R, Strauss J G, Haemmerle G, et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase [J]. Science, 2004, 306(5700):1383-1386
- [5] Cornaciu I, Boeszoermenyi A, Lindermuth H, et al. The minimal domain of adipose triglyceride lipase (ATGL) ranges until leucine 254 and can be activated and inhibited by CGI-58 and G0S2, respectively [J]. PLoS One, 2011, 6(10):e26349
- [6] Schweiger M, Paar M, Eder C, et al. G0/G1 switch gene-2 regulates human adipocyte lipolysis by affecting activity and localization of adipose triglyceride lipase [J]. J Lipid Res, 2012, 53(11):2307-2317
- [7] Boden G, Shulman G I. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction [J]. Eur J Clin Invest, 2002, 32 Suppl 3:14-23
- [8] Zandbergen F, Mandard S, Escher P, et al. The G0/G1 switch gene 2 is a novel PPAR target gene [J]. Biochem J, 2005, 392(Pt 2):313-324
- [9] Ahn J, Oh S A, Suh Y, et al. Porcine G (0)/G (1) switch gene 2 (G0S2) expression is regulated during adipogenesis and short-term in-vivo nutritional interventions [J]. Lipids, 2013, 48(3):209-218
- [10] Heckmann B L, Zhang X, Xie X, et al. The G0/G1 switch gene 2 (G0S2): regulating metabolism and beyond [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1831(2):276-281
- [11] Holvoet P, Sinnaeve P. Angio-associated migratory cell protein and smooth muscle cell migration in development of restenosis and atherosclerosis [J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 52(4):312-314
- [12] Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system [J]. Annu Rev Physiol, 1999, 61:391-415
- [13] 祁胜宾,双剑博,卢晓昭,等. 人 GDDR 基因启动子的克隆和报告基因载体构建[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2011,27(2):229-230, 232
- Qi Sheng-bin, Shuang Jian-bo, Lu Xiao-zhao, et al. Molecular Cloning of Human GDDR Gen Promoter and Constructer of Luciferase Reporter Gene Vector [J]. Chinese journal of cellular and molecular immunology, 2011, 27(2): 229-230, 232
- [14] Scorpione RC, De Camargo SS, Schenberg AC, et al. A new promoter-probe vector for Saccharomyces cerevisiae using fungal glucoamylase cDNA as the reporter gene[J]. Yeast, 1993, 9(6):599-605
- [15] 张明娟,杨军,朱参战,等. In-fusion 技术构建表达、纯化钠泵 $\alpha 3$ 亚单位膜外区截断性片段重组质粒 [J]. 四川大学学报 (医学版), 2009, 40(2):203-207
- Zhang Ming-Juan, Yang Jun, Zhu Can-Zhan, et al. Expression and Purification of Truncated Fragment of Extracellular Segment of Sodium Pump $\alpha 3$ Subunit in Escherichia coli by In-fusion Technology[J]. Journal of sichuan university (medical science edition), 2009, 40(2): 203-207
- [16] Benoit RM, Wilhelm RN, Scherer-Becker D, et al. An improved method for fast, robust, and seamless integration of DNA fragments into multiple plasmids [J]. Protein Expr Purif, 2006, 45(1):66-71
- [17] Irwin CR, Farmer A, Willer DO, et al. In-fusion (R) cloning with vaccinia virus DNA polymerase [J]. Methods Mol Biol, 2012, 890: 23-35
- [18] Wang S, Zeng X, Liu Y, et al. Construction and characterization of a PDCD5 recombinant lentivirus vector and its expression in tumor cells [J]. Oncol Rep, 2012, 28(1):91-98
- [19] Berrow NS, Alderton D, Sainsbury S, et al. A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(6):e45
- [20] Potter E, Braun S, Lehmann U, et al. Molecular cloning of a functional promoter of the human plakoglobin gene [J]. Eur J Endocrinol, 2001, 145(5):625-633
- [16] 邵丽珠. 224 例酒精性肝损害并发胆囊病变分析[J]. 中国工业医学杂志, 2010, 23(2):85
- Shao Li-zhu. Analysis of 224 cases of alcoholic liver injury in patients with gallbladder diseases[J]. Chinese Journal of industrial medicine, 2010, 23(2):85
- [17] Mabuchi H, Higashikata T, Kawashiri M, et al. Reduction of serum ubiquinol-10 and ubiquinone-10 levels by atorvastatin in hypercholesterolemic patients[J]. J Atheroscler Thromb, 2005, 12(2):111-119
- [18] Jeffrey S, Peter R, Dean P, et al. The coenzyme Q10 analog decyl ubiquinone inhibits the redox-activated mitochondrial permeability transition role of m itochondrial respiratory complex 111 [J]. Biol Chem, 2003, 278(5):49079-49084
- [19] Frederick L. Biochemical function of coenzyme Q10 [J]. J Am Coll Nutr, 2001, 20(6):591-598
- [20] 谢晓莉, 郭文怡. 辅酶 Q10 与阿托伐他汀联合应用对冠心病伴血脂增高患者肝脏酶活性及血脂水平的影响 [J]. 医学临床研究, 2009, 26(9):1589-1592
- Xie Xiao-li, Guo Wen-yi. Effects of coenzyme Q10 combination with atorvastatin liver enzyme activity and blood lipids in patients with coronary heart disease patients [J]. Journal of clinical research, 2009, 26(9):1589-1592
- [21] Allan PL, Mowbray PL, Lee AJ, et al. Relationship between carotid IMT and symptomatic peripheral arterial disease [J]. Stroke, 1997, 28(2):348-353
- [22] Wald NJ, Watt HC, Law MR, et al. Homocysteine and ischemic heart disease: results of a prospective study with implications regarding prevention[J]. Arch Intern Med, 1998, 158(8):862-867

(上接第 1889 页)