

PCSK9 基因 5'UTR 区 rs45448095 基因多态性与血浆 LDL-C 水平的相关性*

张莹¹, 吴晟¹, 鲍海龙¹, 刘兴德^{2**}

(1. 贵州医科大学附院 心内科, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025)

[摘要] 目的: 探讨前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (PCSK9) 基因 5'端非编码区 (5'UTR) rs45448095 基因多态性与血浆低密度脂蛋白 (LDL) 水平及冠心病风险的相关性。方法: 使用千人基因组计划数据库分析中国汉族人群 PCSK9 基因 5'UTR 区基因多态性, 利用荧光报告实验验证候选 SNP 位点的功能; 收集 96 例健康对照人群 (对照组) 和 96 例冠心病患者 (疾病组) 的外周血, 利用 Sanger 法完成 rs45448095 位点测序, 应用 Logistic 回归分析对照组人群中 rs45448095 不同基因型与血脂水平的关系, 分析对照组和疾病组人群 rs45448095 不同基因型与冠心病风险的相关性。结果: 中国汉族人群中 PCSK9 基因 5'UTR 区存在 rs45448095 (MAF > 0.05), 荧光报告基因实验显示在多个细胞系中 (293T/L02) rs45448095-T 比 rs45448095-C 表达显著下降 ($P < 0.0001$); 对照组人群中携带 rs45448095-T 基因多态性有更低水平的 LDL 水平 [β (SE) = -0.353 (0.158), $t = -2.237$, $P = 0.028$], rs45448095 不影响冠心病的发病风险。结论: PCSK9 基因 5'UTR 区上一个有功能的 rs45448095 突变可影响血浆 LDL 水平。

[关键词] 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 基因; 5'端非编码区; 基因多态性; 血浆低密度脂蛋白; 冠心病

[中图分类号] R544.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2020)01-0039-06

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2020.01.008

Correlation of PCSK9 5' UTR rs45448095 Polymorphism with Plasma LDL-C Levels

ZHANG Ying¹, WU Cheng¹, BAO Hailong¹, LIU Xingde²

(1. Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, 550004, China;

2. Guizhou University of Chinese Traditional Medicine, Guiyang, 550025, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the correlation of a PCSK9 5'-untranslated region (5' UTR) rs45448095 polymorphism with plasma LDL-C levels and coronary heart disease (CHD). **Methods:** A process of bioinformatic analysis was used to analyze the PCSK9 5'UTR polymorphism in Chinese Han Group. Luciferase report assays were used to verify the function of variant. 96 controls and 96 people with Chinese Han CHD were collected. The logistic regression was used to analyze the correlation of a PCSK9 5' UTR rs45448095 polymorphism with plasma LDL-C levels and CHD. **Results:** There was a common SNP rs45448095 in PCSK9 5' UTR. Both in L02 and 293T cells, the luciferase reporter activity of the PGL3-T vector (containing T allele of rs45448095) decreased significantly ($P < 0.0001$) when compared with the PGL3-C construct (containing c allele of 45448095). Furthermore, the T allele was significantly related with the decreased LDL-C levels [β (SE) = -0.353 (0.158), $t = -2.237$, $P = 0.028$]. Finally, the case-control study suggested that the rs45448095 polymorphism is related with CHD risk. **Conclusions:** The potential functional variant in 5' UTR of PCSK9,

*[基金项目] 国家自然科学基金地区项目 (31760294); 贵州省科技厅项目[黔科合基础(2016)1120]; 贵阳市科技局项目[筑科合同(2017)5-14]; 贵州省科技厅项目[黔科合平台人才(2018)5608]

** 通信作者 E-mail: 2360040895@qq.com

网络出版时间: 2020-01-09 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20200109.2011.008.html>

rs45448095 can effect Chinese Han plasma LDL-C levels.

[**Key words**] *PCSK9*, 5'UTR, polymorphism, plasma LDL-C, coronary heart disease (CHD)

研究表明,血浆低密度脂蛋白(LDL-C)的高水平表达不仅仅影响冠心病,还可以增加缺血性脑卒中的风险^[1-3]。全球人群中肥胖、高 LDL-C 以及相关疾病发病率、致死率越来越高^[4-5],降 LDL-C 治疗成为一个值得重视的问题。2003 年关于家族性高胆固醇血症的大型全基因组关联分析(GWAS)的研究表明,前蛋白转化酶枯草溶菌素 9(*PCSK9*)是影响血脂代谢的关键基因^[6],其抑制剂可作为降低 LDL-C 药物被应用于临床。临床试验表明,不管单独应用、还是联合应用 *PCSK9* 抑制剂可降低 45%~60% 的 LDL-C 水平^[7-8]。目前关于 *PCSK9* 基因非编码区的基因多态性与血浆 LDL-C 水平、以及冠心病风险的研究并不多,本研究对 *PCSK9* 基因 5'UTR 区基因多态性进行分析,探讨基因多态性与血浆 LDL-C 水平及冠心病风险的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 96 名于 2014 年 5 月-2015 年 10 月来自武汉同济医院心内科住院冠心病患者为疾病组。冠心病诊断标准:(1)冠状动脉造影评估至少一段冠状动脉(右冠状动脉、旋支或前降支)>50% 狭窄,(2)有典型的心肌酶学升高(肌钙蛋白 T、肌钙蛋白 I、肌酸激酶)、典型心电图改变和临床症状,(3)有冠状动脉搭桥术或经皮冠状动脉介入治疗的病史;排除有先天性心脏病、心肌病、瓣膜病和肾脏或肝脏疾病,严重肿瘤病史的患者。选取同期 96 例空腹血脂(总胆固醇、甘油三脂、高密度脂蛋白和低密度脂蛋白)正常的体检者为对照组,入选人群未使用降脂药物、重大疾病或病态肥胖(体质量指数 $> 30 \text{ kg/m}^2$);疾病组患者和对照组均为汉族血统,并提供书面知情同意书,本研究获医院伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂 HEK293T 细胞系、L02 细胞由华中科技大学附属同济医院高血压研究所馈赠,PrimeSTAR GXL DNA 聚合酶、dNTP、 $5 \times$ PrimeSTAR GXL 缓冲液购自宝日医生物技术(北京)有限公司(takara 中国),引物由武汉天一辉远公司合成,DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,pGL3-basic 荧光报告基因载体购自武汉启

动子生物有限公司,转染试剂 Lipofectamine2000 购自 invitrogen 公司,双荧光素酶报告检测试剂购自美国 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及 DNA 提取 抽取疾病组及健康对照组人群外周静脉血 2 mL,采用天根 DNA 提取试剂盒提取外周血白细胞 DNA,放入 -20°C 冰箱保存。

1.2.2 信息学分析 使用千人基因组数据库(<http://grch37.ensembl.org>)分析中国汉族人群(han chinese in beijing, southern han chinese,共计 208 人)*PCSK9* 基因 5'UTR 区基因多态性。

1.2.3 荧光报告基因实验 采用聚合酶链反应(PCR)从人 DNA 中扩增包含野生型等位基因(rs45448095-C)的 362 bp *PCSK9* 序列,其中 MluI 或 HindIII 限制性内切酶切位点分别位于 5'和 3'端,PCR 产物经酶切后插入 pGL3 荧光素酶报告载体。利用携带突变等位基因的引物进行 PCR 重叠,得到包含 rs45448095-T 序列的突变载体(引物 F 为 GTCCGATGGGGCTCTGGTG,引物 R 为 GAGGCCAGGGGAGAGGTT)。HEK293T 细胞和 L02 细胞接种在 24 孔板中,带细胞密度至 1×10^6 细胞/孔时,将 PGL3-T(rs45448095-T)或 PGL3-C(rs45448095-C)400 ng 与 Renilla 荧光素酶质粒 50 ng 共转染, 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 48 h,用冷磷酸盐缓冲盐水(PBS)冲洗细胞,用被动裂解缓冲液裂解细胞(Promega, WI, USA),反复冻融 3 遍保证细胞充分裂解。使用荧光素酶活性发光计(SIRIUS, Pforzheim, Germany)测量荧光素酶的表达水平。每组选取 6 个副孔,重复 3 次独立实验。

1.2.4 rs45448095 位点检测 从人血 DNA 中扩增 362 bp 片段,采用 Sanger 法完成位点测序,方法参考文献[9]。Applied Biosystems 3130XL 毛细管测序仪(applied biosystems, foster city, CA)分析 PCR 片段中荧光染料终结者循环产物;通过 Chromas 程序(technelysium Pty)鉴定了假定的多态性。结果由 2 名独立观察员证实。所有已鉴定的变异均经重复测序证实。

1.3 统计学分析

统计分析均采用 SPSS 17.0,实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间的定量数据比较采用

配对或未配对 t 检验,所有概率值均为双面性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。评估基因型频率与哈迪-温伯格假设(HW平衡)的偏差采用 χ^2 ,基于传统危险因素调节的不同遗传模型,采用Logistic回归分析比较冠心病患者的危险等位基因频率。

2 结果

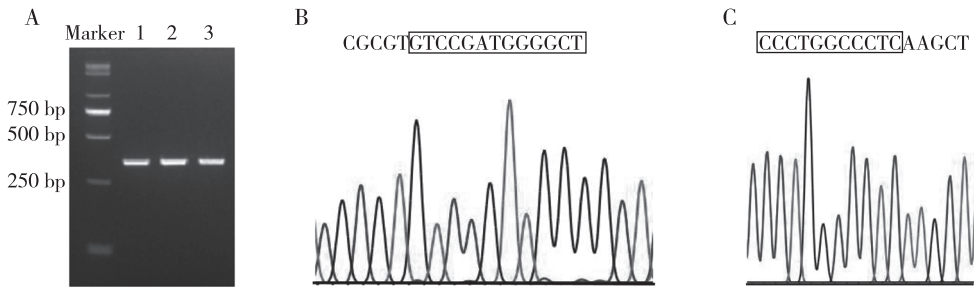
2.1 PCSK9 基因 5'UTR 信息学分析

千人基因组数据库(<http://grch37.ensembl.org>)中显示中国汉族人群(包含中国北京汉族人和

中国南方汉族人,共计208人)位于PCSK9基因5'UTR区上的SNP,只有一个常见SNP(Common SNP),最小等位基因频率(MAF) > 0.05 ,即rs45448095(MAF为0.095)。

2.2 构建 PCSK9 基因 5'UTR 荧光素酶报告基因载体

PCSK9基因5'UTR编码序列全长约为362 bp(NM_174936.3),经PCR扩增后,在2%琼脂糖凝胶电泳中显示362 bp处有明显的目的条带,电泳结果与理论结果一致,测序结果比对与原始序列吻合(图1)。



注:A为琼脂糖凝胶电泳结果,Marker为标准分子量参照物,1~3为PCR扩增样本;B为PCSK9基因5'UTR区起始段DNA序列;C为PCSK9基因5'UTR区终末段DNA序列。

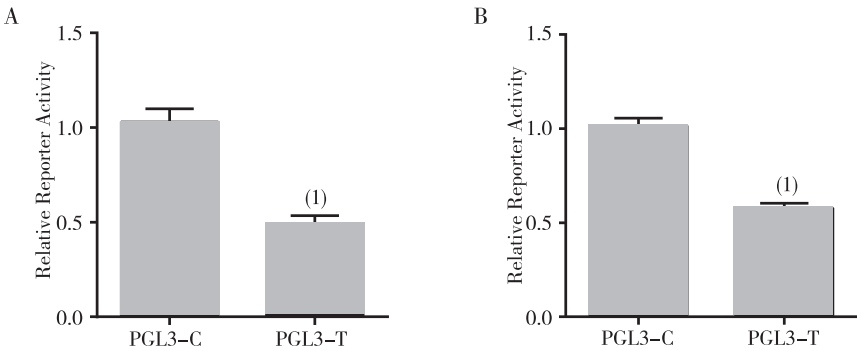
图1 琼脂糖凝胶电泳鉴定及DNA测序验证PCSK9基因5'UTR区

Fig. 1 The PCSK9 gene was detected by agarose gel electrophoresis

2.3 基因多态性对 PCSK9 5'UTR 活性的影响

在L02细胞中,PGL3-T(rs45448095-T)的荧光素酶活性较PGL3-C(rs45448095-C)显著降低(-

54.1% \pm 2.3%, $P < 0.0001$),HEK293T细胞中PGL3-T与PGL3-C亦出现相同的变化(-47.6% \pm 1.4%, $P < 0.0001$)。图2。



注:A为L02细胞,B为HEK293T细胞;⁽¹⁾与PGL3-C比较, $P < 0.0001$ 。

图2 293T细胞和L02细胞中rs45448095C/T的荧光报告基因结果

Fig. 2 Luciferase assay of expression of PCSK9 5'UTR constructs carrying rs45448095C/T in L02 cells and 293T cells

2.4 rs45448095 测序结果

Sanger法测序可以明显分辨rs45448095基因多态性,见图3。对照组人群rs45448095频率为

0.13,符合HW平衡;疾病组人群的rs45448095频率为0.115,符合HW平衡;2组人群的基因型分布差异无统计学意义($P = 0.072$),见表1。

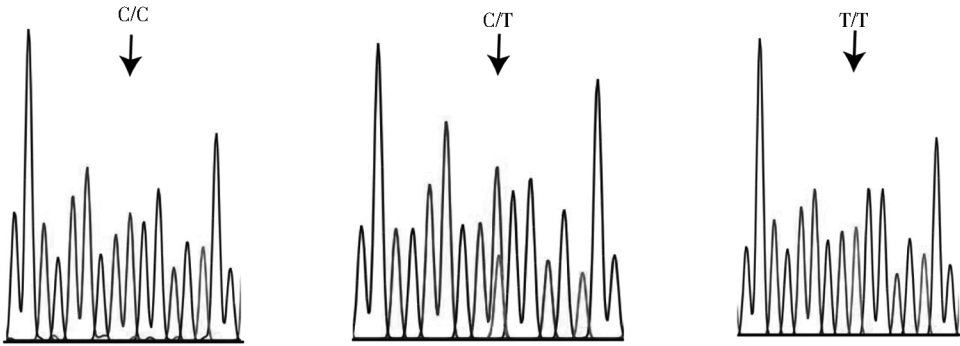


图 3 rs45448095 测序结果
Fig. 3 DNA sequences results of rs45448095

表 1 两组人群的 rs45448095 基因多态性分布及等位基因频率比较

Tab. 1 The distribution of rs45448095 gene polymorphisms and their frequencies

指标	疾病组			对照组		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT
数量/ <i>n</i>	75	20	1	74	19	3
MAF		0.115			0.130	
HWE- <i>P</i>		0.793			0.216	
<i>P</i>			0.072			

2.5 对照组人群 rs45448095 不同基因型与血浆血脂水平关系

对照组人群的 rs45448095 不同基因型分布影响 LDL 水平,每一个基因型的改变,减少血浆 LDL 水平的风险的 β (*SE*) 为 $-0.353(0.158)$, $t = -2.237$, $P < 0.05$ 。不同基因型对血浆 TG、TC、HDL 水平无影响($P > 0.05$),见表 2。

表 2 对照组人群 rs45448095 不同基因型对血浆血脂水平的影响

Tab. 2 Association of rs45448095 genotype with plasma lipid levels in control group

血脂指标	rs45448095/ <i>n</i>			β (<i>SE</i>)	校正 <i>P</i>
	CC	CT	TT		
TG	74	19	3	0.044(0.144)	0.761
TC	74	19	3	0.242(0.162)	0.140
HDL	74	19	3	0.063(0.076)	0.411
LDL	74	19	3	0.353(0.158)	0.028

2.6 rs45448095 不同基因型对冠心病相关危险度分析

对 rs45448095 基因多态性与冠心病风险进行分析。采用不同遗传特性模型分析结果显示,隐性

模型(CC + CT vs TT)、显性模型(CC vs CT + TT)、加性模型(CC vs CT vs TT),rs45448095 基因多态性皆对冠心病风险无影响($P > 0.05$),见表 3。

表 3 rs45448095 不同基因型对冠心病风险的影响
Tab. 3 Association between rs45448095 variant with CHD

模型	OR 95% CI	<i>P</i>
加性	0.87(0.48 ~ 1.58)	0.649
显性	0.97(0.69 ~ 1.36)	0.863
隐性	0.57(0.18 ~ 1.79)	0.340

3 讨论

本研究结果显示,结合千人基因组计划数据库发现在中国汉族人群中常见的 SNP(rs45448095),对该 SNP 位点进一步进行简单功能验证,发现突变型(rs45448095-T)明显影响 PCSK9 基因的表达活性;这种影响不管是在肝细胞系(L02)中,还是肾脏细胞系(293T)中都存在;同样人群验证中,亦发现 rs45448095-T 可以减低血浆 LDL-C 水平,但并未影响其他血脂水平以及冠心病风险。

2003 年发现 PCSK9 后,多项研究表明位于 PCSK9 基因码区上的错义突变、同义突变或多个突变组合的单体型都与血浆 LDL-C 水平强相关^[10-11]。虽然没有过多的研究表明,这些突变是如何调节血浆 LDL-C 水平。但所有研究结果都证实,不管是 PCSK9 基因上的功能获得型突变还是功能缺失型突变都会影响 LDL-C 水平^[6,12]。后续研究还发现低血浆 PCSK9 水平人群同样存在低血浆 LDL-C 水平^[13]。由此可以认可 PCSK9 与血浆 LDL-C 的关系。鉴于此,研究工作者针对 LDL-C

代谢异常的患者研发了新的药物——PCSK9 单克隆抗体、PCSK9 抑制剂。与设想中一样,临床试验结果表明,抑制 PCSK9 后取得很好的降低 LDL-C 效果^[14-15]。也有部分研究表明 PCSK9 上的突变在影响 LDL-C 后,可以影响冠心病或是缺血性卒中的风险^[16-17]。虽然关于 PCSK9 上的基因突变与 LDL-C 的关系的研究很多,但大多研究都是位于编码区上的基因突变,关于基因领域研究新热点——非编码区上的基因突变未受到太多关注。而且深入探讨 PCSK9 基因突变影响血脂水平机制的研究不多,尤其是关于 PCSK9 可受什么调控继而影响 LDL-C 的研究并不多。越来越多的研究证实,非编码区上的突变是可结合调控因子继而对基因进行调控达到功能确实型或者功能缺失型突变,继而影响基因的变达和影响血脂水平亦或疾病风险^[18-19]。

本研究首次证实,PCSK9 基因 5'UTR 区的基因突变——rs45448095,是一个功能缺失型突变。细胞荧光报告基因实验显示 rs45448095-T 突变后明显减低了 PCSK9 表达活性,且在多个不同细胞系皆出现此结果。假设可能存在于一个多组织高表达的调控因子可结合在此处调控 PCSK9 的表达,基因多态性破坏了这种结合。就像本实验研究者之前曾经证实的 *ChREBP* 基因 3'UTR 区基因多态性破坏了与 miRNA 的结合位点继而影响 *ChREBP* 的表达^[9]。不过遗憾的是,本研究曾运用多种生物信息学的方法并没有预测到这个调控因子,无法证实实验假设。与此同时,人群研究表明 rs45448095-T 突变影响人群血浆 LDL-C 水平,未影响 TG、TC 及 HDL-C 水平。表明 PCSK9 上的功能缺失型基因突变主要降低人群血浆 LDL-C 水平,这与前人研究一致^[20]。但不同于前人的是,本研究没有证实这种突变带来了 LDL-C 降低的突变可降低冠心病风险。不过鉴于本研究的样本量过小、功能实验不够严谨,该研究无法充分证实 rs45448095 是否影响冠心病风险,rs45448095-T 突变型是否具有类似 PCSK9 抑制剂的作用。后续仍需要更大的临床研究以及更多的功能实验证实研究者的假想。但本研究为后续研究提供了一个新方向,亦降脂治疗提供了一个新可能。

综上所述,PCSK9 基因 5'UTR 区 rs45448095 基因多态性可以显著降低中国汉族人血浆 LDL-C 水平,本研究进一步证实了 PCSK9 表达与 LDL-C 的关系,可为 PCSK9 抑制剂的药效研究提供依据。

4 参考文献

- [1] EMERIGN RISK FACTORS COLLABORATION. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease[J]. JAMA, 2009, 302(18):1993-2000.
- [2] CHOLESTEROL TREATMENT TRIALISTS COLLABORATION. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170 000 participants in 26 randomised trials[J]. Lancet, 2010, 376(9753):1670-1681.
- [3] CANNON C P, BLAZING M A, GIUGLIANO R P, et al. Ezetimibe added to statin therapy after acute coronary syndromes[J]. N Engl J Med, 2015, 372(25):2387-2397.
- [4] ALBERTI K G, ECKEL R H, GRUNDY S M, et al. Harmonizing the metabolic syndrome. A joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute; American heart association; world heart federation; international atherosclerosis society; and international association for the study of obesity [J]. Circulation, 2009, 120(16):1640-1645.
- [5] VENKETASUBRAMANIAN N, YOON B W, PANDIAN J, et al. Stroke epidemiology in South, East, and South-East Asia: a review [J], Journal of Stroke, 2017, 19(3):286-294.
- [6] ABIFADEL M, VARRET M, RABES J P, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia[J]. Nat Genet, 2003, 34(2):154-156.
- [7] SABATINE M S, GIUGLIANO R P, WIVIOTT S D, et al. Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events[J]. N Engl J Med, 2015, 372(16):1500-1509.
- [8] ROBINSON J G, FARNIER M, KREMPF M, et al. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events[J]. N Engl J Med, 2015, 372(16):1489-1499.
- [9] ZHANG Y, HU S L, LIU X D, et al. MiR-1322 regulates ChREBP expression by via binding a 3'-UTR variant (rs1051943)[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(11):5322-5332.
- [10] COHEN J, PERTSEMLIDIS A, KOTOWSKI K, et al. Low LDL cholesterol in individuals of african descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9[J]. Nat Genet, 2005, 37(2):161-165.
- [11] CHEN S N, BALLANTYNE C M, GOTTO A M, et al. A 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(10):1611–1619.
- [12] COHEN J C, BOERWINKLE E, MOSLEY T H, et al. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease [J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(12):1264–1272.
- [13] LAMBERT G, PETRIDES F, CHATELAIS M, et al. Elevated plasma PCSK9 level is equally detrimental for patients with nonfamilial hypercholesterolemia and heterozygous familial hypercholesterolemia, irrespective of low-density lipoprotein receptor defects [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63(22):2365–2373.
- [14] BERNELOT S J, NEELE A E, KROON J, et al. PCSK9 monoclonal antibodies reverse the pro-inflammatory profile of monocytes in familial hypercholesterolaemia [J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(20):1584–1593.
- [15] REYES G, PAVLYHA M, NGAI C, et al. effects of pc-sk9 inhibition with alirocumab on lipoprotein metabolism in healthy humans [J]. *Circulation*, 2017, 135(4):352–362.
- [16] HOPEWELL J C, MALIK R, VALDES E, et al. Differential effects of PCSK9 variants on risk of coronary disease and ischaemic stroke [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(5):354–359.
- [17] BENN M, NORDESTGAARD B G, GRANDE P, et al. PCSK9 R46L, low-density lipoprotein cholesterol levels, and risk of ischemic heart disease: 3 independent studies and meta-analyses [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55(25):2833–2842.
- [18] DING H, WU B, WANG H, et al. A novel loss-of-function DDAH1 promoter polymorphism is associated with increased susceptibility to thrombotic stroke and coronary heart disease [J]. *Circ Res*, 2010, 106(6):1145–1152.
- [19] CUI G, LI Z, LI R, et al. A functional variant in APOA5/A4/C3/A1 gene cluster contributes to elevated triglycerides and severity of CAD by interfering with microRNA 3201 binding efficiency [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 64(3):267–277.
- [20] KENT S T, ROSENSEN R S, AVERY C L, et al. PCSK9 loss-of-function variants, low-density lipoprotein cholesterol, and risk of coronary heart disease and stroke: data from 9 studies of blacks and whites [J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2017, 10(4):e001632.

(2019-10-20 收稿, 2020-01-05 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 丁廷森

(上接第 38 页)

- [6] BRUCKBAUER A, BANERJEE J, CAO Q, et al. Leucine-nicotinic acid synergy stimulates AMPK/Sirt1 signaling and regulates lipid metabolism and lifespan in *Caenorhabditis elegans*, and hyperlipidemia and atherosclerosis in mice [J]. *Am J Cardiovasc Dis*, 2017, 7(2):33–47.
- [7] 李建英, 郑霞, 张丽珍. 谈中药对高血脂的防治 [J]. *中国实用医药*, 2012, 7(6):160–162.
- [8] 谭志辉, 梁燕玲, 蓝景生, 等. 心脉通胶囊配合阿托伐他汀治疗老年高血压患者颈动脉斑块的临床观察 [J]. *中国当代医药*, 2013, 20(2):119–120.
- [9] 王冬艳, 华欣, 叶记林, 等. 江苏地产白首乌 C_{21} 甾体苷对高血脂大鼠肝脏的保护作用和抗氧化作用研究 [J]. *河北医药*, 2016, 38(3):335–337.
- [10] 韩秀敏. 心脉通胶囊联合苯磺酸氨氯地平治疗高血压临床疗效观察 [J]. *河南中医*, 2014, 34(6):57–58.
- [11] 雷燕妮. 黄芩总黄酮对高血脂大鼠降脂作用研究 [J]. *动物医学进展*, 2014, 35(7):64–68.
- [12] 马杭琨, 徐风芹. 中药降脂机制及其有效降脂成分的研究进展 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2016, 14(13):1494–1495.
- [13] 陈燕, 陈雪霞, 杨建梅. 肝病治疗仪对脂肪肝患者的临床治疗效果和护理干预 [J]. *实用临床护理学电子杂志*, 2019, 26(4):46.
- [14] 曹玉丽, 李艳丽. 糖尿病肾病患者血尿酸、血肌酐、血脂水平分析及对患者预后的观察 [J]. *河北医药*, 2016, 38(3):402–404.
- [15] 刘芬, 张鑫, 刘淑美. 心脉通胶囊联合丹参多酚酸盐治疗不稳定型心绞痛临床研究 [J]. *中国药业*, 2019, 12(28):57–59.
- [16] 胡骏程, 李素梅, 王伟, 等. 血肌酐正常的 2 型糖尿病患者临床生化指标水平及其与肾功能的相关性 [J]. *安徽医学*, 2016, 37(5):521–524.
- [17] 丁丽. 心脉通胶囊联合阿托伐他汀治疗冠心病患者疗效及对血压、血脂及血液流变学的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2019, 28(7):751–754.
- [18] 李谦, 付凌云, 潘迪, 等. 心脉通胶囊对麻醉 Beagle 犬血流动力学的影响 [J]. *贵州医科大学学报*, 2018, 43(4):406–411.

(2019-10-14 收稿, 2019-12-30 修回)

中文编辑: 严征; 英文编辑: 赵毅