

## 食蟹猴心血管病风险因素与心血管病相关基因 在外周血白细胞表达的相关性

夏机良<sup>1</sup>, 郝香芬<sup>1</sup>, 曾小明<sup>2</sup>, 靳丽莎<sup>1</sup>, 周彤<sup>2</sup>, 李学家<sup>1</sup>, 孙云霄<sup>1</sup>,  
饶军华<sup>1</sup>, 刘晓明<sup>1</sup>, 彭白露<sup>1,\*</sup>

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

**摘要:** 研究心血管病风险因素和心血管病相关基因表达的相关性有助于心血管病风险预警和早期诊断研究。该文采用温和的动脉粥样硬化膳食(0.053 mg 胆固醇/千焦、40%的能量来源于脂肪)喂养中老年雄性食蟹猴(*Macaca fascicularis*)(12个月), 根据传统心血管病风险因素筛选低、高风险食蟹猴, 然后采用荧光定量PCR技术检测113个心血管病相关基因在正常组、低风险和高风险组食蟹猴外周血白细胞内的表达差异。结果在食蟹猴外周血白细胞中共检测到65个心血管病相关基因, 其中低、高风险组有16个基因相对于正常组表达上调( $P < 0.05$ ), 19个基因表达下调( $P < 0.05$ ), 另外, 还有15个基因表达模式特异( $P < 0.05$ )。此外, 还检测到42个心血管病相关基因在人和食蟹猴外周血白细胞内均有效表达, 其中22个基因在两者之间表达模式一致。上述结果为进一步研究心血管病风险预警和早期诊断指标, 缩小了基因筛选范围。

**关键词:** 心血管病; 风险预警; 早期诊断; 食蟹猴; 荧光定量PCR; 外周血白细胞

中图分类号: Q959.848; R54 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2011)03-0293-07

## Correlation between cardiovascular risk factors and the expression of cardiovascular disease related genes in cynomolgus monkeys

XIA Ji-Liang<sup>1</sup>, HAO Xiang-Fen<sup>1</sup>, ZENG Xiao-Ming<sup>2</sup>, JIN Li-Sha<sup>1</sup>, ZHOU Tong<sup>2</sup>, LI Xue-Jia<sup>1</sup>,  
SUN Yun-Xiao<sup>1</sup>, RAO Jun-Hua<sup>1</sup>, LIU Xiao-Ming<sup>1</sup>, PENG Bai-Lu<sup>1,\*</sup>

(1. Guangdong Entomological Institute, Guangzhou 510260, China;

2. Guangdong Landao Biological Technology Limited Company, Guangzhou 510555, China)

**Abstract:** The correlation between cardiovascular risk factors and cardiovascular disease related genes plays an important role in early-warning risk and early diagnosis. Thirty middle-aged male crab-eating macaques were fed a moderately atherogenic diet (0.053 mg cholesterol/kJ and 40% of calories as saturated fat) for twelve months. According to cardiovascular risk factors, we selected low-risk and high-risk crab-eating macaques, then analyzed the expression of 113 cardiovascular related genes by real-time PCR. A total of 65 genes were detected in peripheral blood leukocytes by real-time PCR. Sixteen up-regulated genes and nineteen down-regulated genes were detected in low-risk and high-risk crab-eating macaques compared to normal crab-eating macaques ( $P < 0.05$ ), in addition to fifteen genes that showed unique expression patterns ( $P < 0.05$ ). We also detected 42 genes in human peripheral blood leukocytes. The expression patterns of 22 genes were consistent between human and crab-eating macaques. These results narrowed the scope of genes for further research.

**Key words:** Cardiovascular diseases; Early-warning risk; Early diagnosis; Crab-eating macaque; Real-time PCR; Peripheral blood leukocytes

美国国家胆固醇教育计划(National Cholesterol Education Program, NCEP)将心血管病危险性分为

收稿日期: 2010-12-24; 接受日期: 2011-03-10

基金项目: 国家科技重大专项人类重大疾病灵长类动物模型资源平台的建设项目(2011ZX09307-303-03); 广州市科技计划项目大型实验动物国际认证与外包服务项目(2009A1-E051)

\*通讯作者(Corresponding author), E-mail: pengbailu@hotmail.com

第一作者简介: 夏机良(1983-), 男, 硕士, 专业方向: 灵长类疾病模型制备和疾病早期诊断。E-mail: jiliangxia2009@163.com

四个级别(Brewer et al, 2004): 高度危险、中高度危险、中危险、低危险。其中中高以下患者大部分没有临床症状, 且诊断方法不成熟, 只能通过传统的心血管病风险因素对其进行风险预测。

目前, 研究人员已开发出多种心血管病预测方法(Lisa et al, 2001; Carol et al, 2007; Cobain et al, 2008), 且已广泛应用于临床。年龄、体重指数(body mass index, BMI)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、甘油三酯(triglyceride, TG)、血糖(glucose, GLU) 和高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)等心血管病风险因素均被应用于心血管病风险预测(Lisa et al, 2001; Carol et al, 2007; Cobain et al, 2008)。当血清HDL-C浓度大于1.81 mmol/L(60 mg/dL)时是一个负风险因素, 可抵消掉一个正风险因素; 浓度小于1.21 mmol/L(40 mg/dL)时是一个正风险因素(Li, 2002)。心血管病风险预测模型缺陷也很明显, 一是前瞻性不够; 二是准确性不高。因此, 寻找更多的心血管病诊断指标对于心血管病早期预防意义重大。

外周血白细胞取材方便, 对机体无创性伤害, 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白细胞内相关基因也出现表达变化(Dempsey et al, 2007)。我们采用实时荧光定量PCR方法检测113个心血管病相关基因在食蟹猴外周血白细胞中的表达状态。期望找到一些表达量随心血管病的危险程度变化而变化的基因, 这些基因可作为心血管病风险预测和早期诊断的候选指标。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

中老年雄性食蟹猴35只由华南灵长类研究开发中心提供, 其中30只采用温和的动脉粥样硬化膳食(0.053 mg胆固醇/千焦、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。5个正常男性和10个心血管疾病高风险男性患者血液由广州市花都区中医院提供(均自愿)。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个星期。红细胞裂解液自己配制(1.6 mmol/L EDTA, 10 mmol/L KHCO<sub>3</sub>, 153 mmol/L NH<sub>4</sub>Cl, pH 7.4), Trizol试剂购自Invitrogen公司, SYBR® Green染料及SYBR® Premix Ex Taq™购自TaKaRa公司、EasyScript First-Strand cDNA

Synthesis SuperMix由TransGen Biotech公司提供, 引物合成和测序由上海生工生物工程公司完成。

### 1.2 实验方法

1.2.1 外周血血清和白细胞提取以及RNA抽提和cDNA制备 实验猴禁食18 h, 然后使用10 mL无菌注射器于股静脉取血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。其余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(Dempsey et al, 2007)。采用Trizol提取白细胞RNA(Chomczynski & Sacchi, 1987), 然后通过凝胶电泳检测RNA的质量。取大约0.5 μg RNA, 采用两步法, 用EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix将RNA逆转录成cDNA, 将制备好的cDNA置于-20℃保存备用。将普通真空管中的血液室温静置30 min, 然后4℃, 3 000 g/min离心15 min(eppendorf 5810), 将上层血清取出, 用于生化指标检测。

1.2.2 血液生化指标检测 实验猴血清提取出来后立刻送到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)检测血清TC、TG、LDL-C、HDL-C和GLU的浓度。

1.2.3 心血管病相关基因和引物设计 根据已有的人心血管病PCR芯片和最新文献报道, 挑选出113个心血管病相关基因。目前食蟹猴全基因组序列还没公布。所以, 我们以恒河猴心血管病相关基因的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mRNA同源区域。以GAPDH和RPL13A作为内参(Chen et al, 2005; Anton et al, 2007), 所有心血管病相关基因和内参引物扩增出的核酸序列长度在150~250 bp之间, 且扩增效率基本一致。113个基因按功能分类, 如下所示: 免疫应答分子: *CCR2*, *IL10*, *IL18*, *IFNG*, *IL1B*, *IL1RN*, *SAA1*, *CD40*, *CRLF1*, *IL6*, *NFKB1*, *CD40LG*, *NOS2A*, *CRP*, *IL8*, *PLA2G7*, *TNF*, *FAS*, *FASLG*, *IL6ST*, *LTA*, *LTB* 和 *VWF* 等23个; 黏附分子: *EVA1*, *ICAM1*, *VCAM1*, *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*, *SELPG*, *MSLN* 和 *PECAM1* 等34个; 血栓相关因子: *F3*, *F7*, *FGA*, *FGB*, *FGG*, *PLAT*, *PLAU*, *PLUAR*,

*SERPINE1* 和 *THBD* 等 10 个；脂代谢相关基因：*APOA1*、*APOA2*、*APOA4*、*APOA5*、*APOB*、*APOC1*、*APOC2*、*APOC3*、*APOC4*、*APOD*、*APOE*、*APOF*、*APOH*、*LPA*、*PLTP*、*HSD11B1*、*OLR1* 和 *PPARG* 等 18 个；细胞外基质：*MMP1*、*MMP12*、*MMP13*、*MMP2*、*MMP9*、*PAPPA*、*TIMP1*、*AMH*、*CCL2*、*CRLF1*、*CTF1*、*EDN1*、*EDN2*、*EDN3*、*PON1*、*PON2*、*TNFRSF1A*、*GRN* 和 *MTHFR* 等 19 个；血液循环相关基因：*NPPA*、*NPPB*、*TNNI3*、*TNNT2*、*ACE* 和 *DBP* 等 6 个；心肌梗塞心力衰竭相关基因：*CKM*、*MB* 和 *TNNC1* 等 3 个。

1.2.4 荧光定量 PCR 采用 SYBR Green 染料 (TaKaRa) 在 ABI StepOnePlus Real-Time PCR 系统 (ABI) 上进行荧光定量 PCR。荧光定量 PCR 采用 20  $\mu$ L 反应体系：10  $\mu$ L SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (2 $\times$ )，0.4  $\mu$ L PCR 上游引物 (10  $\mu$ mol/L)，0.4  $\mu$ L PCR 下游引物 (10  $\mu$ mol/L)，2  $\mu$ L PCR 模板，0.4  $\mu$ L ROX，6.8  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。荧光定量 PCR 步骤：(1) 95  $^{\circ}$ C，30 s；(2) 95  $^{\circ}$ C，5 s；60  $^{\circ}$ C，34 s，该步骤重复 40 个循环；(3) 溶解曲线分析，反应结束后先加热到 95  $^{\circ}$ C，然后降至 60  $^{\circ}$ C，再缓慢升温至 95  $^{\circ}$ C，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，然后，将测序结果与华大基因食蟹猴数据库中相应基因 (未发表) 比对验证。所有荧光定量 PCR 反应均重复 3 次。

1.2.5 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，同一个基因阈值调成一样。然后，去除无表达，溶解曲线较差，且  $8 > C_t$  或  $C_t > 35$ 、 $C_t > 13$  的反应。采用  $2^{-C_t}$  法 (Kenneth & Thomas, 2001; Jason et al, 2003) 比较

低风险组、高风险组和正常实验猴之间心血管病相关基因表达差异。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  $C_t$ ；最后，通过  $2^{-C_t}$  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，分别以正常对照组样本为参照，即将其值转换成 1，低风险组和高风险组样本再与其比较，获得相对表达值。采用 EXCEL 函数 AVERAGE 和 AEDEV 计算所有实验结果的平均值和标准偏差。用 SPSS 17.0 对实验数据进行统计分析。

## 2 结果与分析

2.1 食蟹猴血液生化指标检测及心血管病风险评价 膳食诱导 12 个月后，根据 TC、LDL-C、TG、HDL-C、GLU、BMI 和年龄等心血管病风险因素，从 30 只采用温和的动脉粥样硬化膳食喂养的实验猴中筛选出 7 只心血管病风险因素危险性较高的实验猴作为高风险组；6 只心血管病风险因素危险性较低实验猴作为低风险组；5 只采用普通饲料喂养的实验猴作为正常组。各组实验猴心血管病风险因素平均值及其统计结果如表 1 所示。BMI 和年龄在 3 组实验猴之间无显著差异 ( $P > 0.05$ )；高风险组实验猴的血清 TC、LDL-C、TG、GLU 浓度均显著高于正常组和低风险组 ( $P < 0.05$ )；低风险组血清 TC、LDL-C 显著高于正常组 ( $P < 0.05$ )，但其 HDL-C 也显著高于正常组，而且低风险组 HDL-C 浓度达到 (1.96 $\pm$ 0.25) mmol/L，可抵消掉一个正风险因素。

### 2.2 食蟹猴心血管病相关基因表达差异

采用 ABI StepOne Software v2.1 软件对荧光定量 PCR 结果进行初步分析，结果显示共有 65 个心

表 1 正常组、低风险组和高风险组实验猴心血管病风险因素比较结果

Tab. 1 Comparison results of cardiovascular risk factors between normal, low-risk and high-risk crab-eating macaques

风险因素 Risk factor	正常对照 Normal control (n=5)	低风险 Low risk (n=6)	高风险 High risk (n=7)	P-value <sup>1</sup>		
				正常/低风险 Normal/Low	正常/高风险 Normal/High	低风险/高风险 Low/High
TC (mmol/L)	2.33 $\pm$ 0.11	6.62 $\pm$ 1.96	14.53 $\pm$ 3.29	0.029	0.000	0.000
LDL-C (mmol/L)	0.65 $\pm$ 0.13	5.17 $\pm$ 3.02	13.77 $\pm$ 4.38	0.036	0.000	0.000
TG (mmol/L)	0.60 $\pm$ 0.13	0.52 $\pm$ 0.24	1.58 $\pm$ 0.92	0.727	0.019	0.006
GLU (mmol/L)	3.49 $\pm$ 0.64	3.84 $\pm$ 0.24	5.33 $\pm$ 0.58	0.367	0.000	0.001
HDL-C (mmol/L)	1.22 $\pm$ 0.25	1.96 $\pm$ 0.25	1.66 $\pm$ 0.54	0.007	0.074	0.197
BMI (kg <sup>2</sup> /cm)	48.23 $\pm$ 13.49	46.33 $\pm$ 5.32	50.53 $\pm$ 4.65	0.079	0.738	0.524
Age	11.00 $\pm$ 1.60	12.83 $\pm$ 2.44	14.29 $\pm$ 2.61	0.344	0.090	0.413

<sup>1</sup>P-values: 采用 SPSS 17.0 软件计算 P 值,  $P < 0.05$ : 差异显著;  $P < 0.01$ : 差异极显著。

<sup>1</sup>P-values: P-value were calculated by SPSS 17.0, Two-sided  $P < 0.05$  were considered statistically significant,  $P < 0.01$  were considered highly significant.

血管病相关基因有效表达(表 2), 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序列基本一致。看家基因 *GAPDH* 和 *RPL13A* 在三组实验猴之间表达恒定( $P>0.05$ ), 我们以 *GAPDH* 作为看家基因, 正常对照组作为参照, 对心血管病相关基因进行相对定量分析。结果显示: 低风险组实验猴有 45 个心血管病相关基因相对于正常组出现表达差异( $P<0.05$ ); 高风险组实验猴与正常组相比有 39 个基因表达上调或者下调( $P<0.05$ ); 低、高风险组实验猴之间有 14 个基因出现表达差异( $P<0.05$ )。

低、高风险组共有 16 个基因相对于正常组表达上调, 19 个基因表达下调( $P<0.05$ ), 其中 *CD40*、*PLTP*、*SELP*、*IFNG* 在低风险组中表达量明显高于高风险组( $P<0.05$ ), *GRN*、*FASLG* 表达量显著低于高风险组( $P<0.05$ )。

此外, 还有 15 个心血管病相关基因出现表达差异, 但表达模式特异( $P<0.05$ )。 *ACE*、*TNFRSF1A*、*IL1RN*、*ITGAV*、*PLAT*、*PLAUR*、*SERPINE1*、*NFKB1* 只在低风险组和正常组之间出现表达差异, 其中 *ACE*、*TNFRSF1A* 在低风险组的表达量显著高于正常组, 其他基因表达量显著低于正常组; *APOE*、*ICAM1*、*TNF* 在正常组、低风险组和高风险组之间均出现表达差异, 其中 *APOE* 和 *ICAM1* 在高风险组的表达量最高、正常组次之、低风险组最低, *TNF* 表达模式刚好与之相反; *IL10*、*PPARG*、*SELL*、*MTHFR* 在低风险组和高风险组之间出现表达差异, 其中 *IL10*、*PPARG*、*SELL* 在低风险组的表达量显著高于高风险组, 而 *MTHFR* 在低风险组的表达量显著低于高风险组, 而 *IL10* 在高风险组表达量显著低于正常组, *PPAR* 在低风险组表达量显著高于正常组, *SELL* 在低风险组表达量显著低于正常组。

表 2 正常组、低风险组和高风险组实验猴心血管病相关基因相对表达量  
Tab. 2 Relative expression quantity of cardiovascular disease-related genes between normal, low-risk and high-risk crab-eating macaques

基因 Gene	猕猴 GenBank Macaque GenBank	相对表达 Relative expression quantity			P-value	
		高风险组 High-risk	低风险组 Low-risk	低风险/正常 Low/Normal	高风险/正常 High/Normal	低风险/高风险 Low/High
<i>GAPDH</i>	NC_007865.1	1.05±0.32	1.20±0.22	0.267	0.328	0.831
<i>RPL13A</i>	XP_002805463	1.07±0.15	0.96±0.18	0.264	0.210	0.912
<i>AMH</i>	XR_013651.1	1.42±0.37	2.88±1.02	0.886	0.207	0.134
<i>APOA1</i>	M83242.1	9.56±1.18	7.08±1.85	0.001	0.003	0.116
<i>APOA5</i>	XM_001090079.1	15.16±3.25	11.27±1.64	0.000	0.001	0.065
<i>APOB</i>	X15737.1	73.93±12.68	67.47±11.06	0.000	0.000	0.509
<i>APOC1</i>	AK240617.1	0.12±0.05	2.60±1.30	0.401	0.165	0.064
<i>APOD</i>	AB072021.1	0.005±0.003	0.09±0.083	0.000	0.000	0.409
<i>APOE</i>	AK240631.1	0.19±0.11	2.14±0.34	0.021	0.004	0.000
<i>APOF</i>	XM_001115088.1	52.54±9.04	40.95±6.25	0.000	0.000	0.091
<i>CCL2</i>	AF276081.1	0.06±0.02	0.16±0.07	0.009	0.013	0.746
<i>CD40</i>	XM_001104255.1	9.63±2.24	6.50±1.11	0.000	0.004	0.020
<i>CD40LG</i>	NM_001032839.1	0.10±0.03	0.14±0.06	0.002	0.002	0.843
<i>DBP</i>	AB174556.1	0.08±0.01	0.12±0.02	0.000	0.000	0.699
<i>EDN1</i>	XM_001089874.1	0.04±0.02	0.07±0.01	0.000	0.000	0.744
<i>FAS</i>	AB031420.1	0.19±0.10	0.33±0.12	0.003	0.006	0.491
<i>FASLG</i>	AB035138.1	0.07±0.06	0.27±0.02	0.000	0.000	0.036
<i>FGG</i>	XM_001090458.1	65.19±7.83	75.50±17.65	0.001	0.000	0.359
<i>GLG1</i>	XR_013529.1	12.32±0.22	12.10±1.60	0.000	0.000	0.811
<i>GRN</i>	AB171687.1	2.25±0.92	4.94±1.42	0.284	0.009	0.032
<i>IL18</i>	NM_001032834.1	0.07±0.01	0.31±0.16	0.001	0.003	0.176
<i>IL1B</i>	AY172103.1	0.03±0.02	0.11±0.09	0.000	0.000	0.319
<i>IL1RN</i>	AY182232.1	0.65±0.16	0.79±0.26	0.008	0.081	0.182
<i>IL6ST</i>	AB000554.1	2.90±0.11	3.36±0.48	0.001	0.000	0.180

续表

基因 Gene	猕猴 GenBank Macaque GenBank	相对表达 Relative expression quantity			P-value	
		高风险组 High-risk	低风险组 Low-risk	低风险/正常 Low/Normal	高风险/正常 High/Normal	低风险/高风险 Low/High
<i>IL8</i>	NM_001032965.1	0.13±0.02	0.38±0.18	0.003	0.012	0.277
<i>ITGA1</i>	XM_001094788.1	0.03±0.02	0.27±0.04	0.014	0.047	0.522
<i>ITGA2</i>	XM_001095246.1	0.31±0.09	1.78±1.25	0.428	0.349	0.099
<i>ITGA2B</i>	XM_001114526.1	0.54±0.20	0.99±0.34	0.113	0.848	0.126
<i>ITGA4</i>	XM_001100929.1	0.14±0.07	0.88±0.62	0.109	0.586	0.184
<i>ITGA5</i>	XM_001110116.1	21.00±4.66	18.39±8.03	0.006	0.012	0.611
<i>ITGA6</i>	XM_001086200.1	0.05±0.03	0.06±0.02	0.003	0.003	0.940
<i>ITGAL</i>	XM_001100800.1	0.79±0.25	1.36±0.73	0.518	0.955	0.458
<i>ITGAM</i>	XR_013069.1	1.32±0.65	0.96±0.48	0.316	0.485	0.090
<i>ITGAV</i>	XM_001104012.1	0.11±0.06	0.51±0.30	0.008	0.065	0.134
<i>ITGAX</i>	XM_001116046.1	0.39±0.08	0.30±0.13	0.001	0.001	0.432
<i>ITGB1</i>	XR_013851.1	1.07±0.07	0.89±0.15	0.647	0.441	0.190
<i>ITGB2</i>	XR_012415.1	1.26±0.78	2.36±0.96	0.752	0.140	0.190
<i>ITGB7</i>	XM_001087864.1	1.07±0.46	1.24±0.69	0.975	0.784	0.743
<i>LTA</i>	NM_001047148.1	8.83±3.16	5.80±1.75	0.006	0.046	0.142
<i>LTB</i>	NM_001047150.1	1.02±0.23	1.71±0.72	0.972	0.215	0.192
<i>MTHFR</i>	XM_001105017.1	0.33±0.17	1.71±0.80	0.195	0.205	0.022
<i>OLR1</i>	XM_001115025.1	0.22±0.08	1.28±0.54	0.097	0.802	0.054
<i>PECAM1</i>	XM_001116542.1	0.12±0.07	0.14±0.08	0.000	0.000	0.959
<i>PLA2G7</i>	XM_001103358.1	1.08±0.38	1.58±0.99	0.915	0.132	0.129
<i>PLAT</i>	XM_001095260.1	0.08±0.03	0.59±0.27	0.016	0.155	0.139
<i>PLAUR</i>	AF302073.1	0.34±0.11	0.67±0.16	0.008	0.093	0.124
<i>PLTP</i>	XR_013264.1	8.60±2.16	4.77±1.08	0.001	0.029	0.018
<i>PON2</i>	XM_001094896.1	0.13±0.07	0.21±0.11	0.000	0.000	0.592
<i>SELP</i>	XM_001094728.1	0.86±0.35	0.89±0.42	0.369	0.394	0.956
<i>SELPG</i>	XM_001103327.1	8.60±0.47	6.35±0.69	0.000	0.000	0.033
<i>SERPINE1</i>	XM_001107586.1	0.22±0.13	0.73±0.29	0.012	0.081	0.201
<i>THBD</i>	XM_001095416.1	8.91±1.24	9.03±1.28	0.001	0.000	0.922
<i>TIMP1</i>	NM_001032939.1	0.23±0.09	0.33±0.15	0.005	0.009	0.645
<i>TNFRSF1B</i>	XM_001105753.1	0.41±0.19	1.06±0.61	0.191	0.900	0.131
<i>TNNC1</i>	XM_001085656.1	0.64±0.12	0.41±0.14	0.106	0.024	0.336
<i>SAA1</i>	XM_001086137.1	626.33±64.41	499.48±127.54	0.000	0.000	0.145
<i>ACE</i>	AY348177.1	2.43±0.45	1.71±0.31	0.050	0.363	0.193
<i>CCR2B</i>	NM_001032806.1	25.39±3.33	26.93±3.23	0.000	0.000	0.643
<i>ICAM1</i>	NM_001047135.1	0.00	2.70±0.40	0.000	0.003	0.000
<i>IFNG</i>	D89985.1	0.78±0.12	0.04±0.02	0.224	0.002	0.011
<i>IL10</i>	NM_001044727.1	1.36±0.20	0.28±0.17	0.325	0.029	0.013
<i>IL6</i>	AB173894.1	0.00	0.02±0.01	0.000	0.003	0.000
<i>NFKB1</i>	XM_001108898.1	0.19±0.18	0.48±0.19	0.006	0.056	0.059
<i>PPARG</i>	AF033343.1	3.26±1.08	0.71±0.28	0.014	0.840	0.009
<i>SELL</i>	NM_001042763.1	0.00	0.93±0.23	0.000	0.328	0.000
<i>TNF</i>	NM_001047149.1	1.45±0.15	0.13±0.02	0.027	0.001	0.000
<i>TNFRSF1A</i>	XM_001118232.1	2.85±0.36	2.13±0.06	0.024	0.157	0.217

RQ: 相对表达量(Relative expression quantity)。

### 2.3 人和食蟹猴心血管病相关基因表达模式比较

荧光定量 PCR 共检测到 42 个心血管病相关基因在人和食蟹猴外周血白细胞内均有效表达。分别以正常人和食蟹猴作为参照, 计算心血管病相关基因在心血管疾病高风险人和食蟹猴中相对表达量。通过比较分析人和食蟹猴心血管病相关基因表达模式, 我们发现共有 22 个心血管病相关基因在人和食蟹猴中随着心血管病危险性升高表达模式一致。其中 *APOA1*、*APOF*、*FGG*、*GLG1*、*IL6ST*、*LTA* 和 *PLTP* 在心血管疾病高风险人和心血管疾病高风险食蟹猴中表达量均显著上调 ( $P < 0.05$ ) (图 1); *CCL2*、*CD40LG*、*DBP* 等 13 个基因均表达下调

( $P < 0.05$ ) (图 2); 此外, *SERPINE1* 和 *TNFRSF1B* 在人和食蟹猴中均表达恒定 ( $P > 0.05$ )。

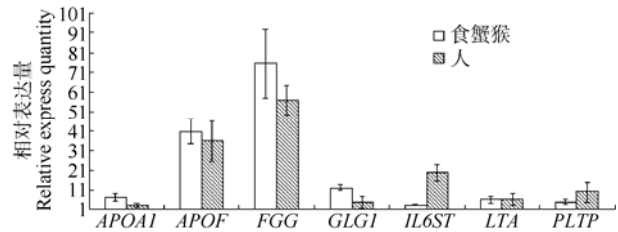


图 1 人和食蟹猴中表达均上调的心血管病相关基因  
Fig. 1 Up-regulated cardiovascular disease-related genes between human and crab-eating macaques

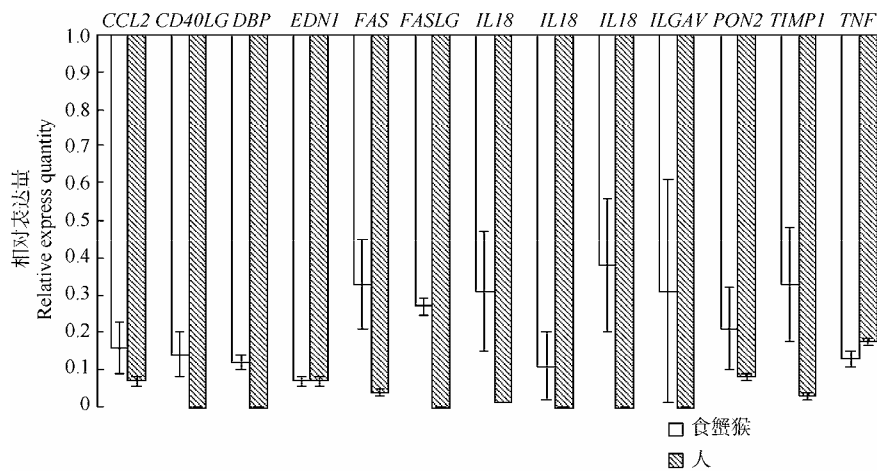


图 2 人和食蟹猴中表达均下调的心血管病相关基因  
Fig. 2 Down-regulated cardiovascular disease-related genes between human and crab-eating macaques

## 3 讨论

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携带者及某种疾病的易感者作出诊断和预测。心血管病在出现明显临床症状之前有一个较长的潜伏期, 通常在出现症状时已进入后期, 急性冠心病事件, 心肌梗塞等通常为突然发生, 常常来不及医治 (World Health Organization, 2007; World Health Organization, 2003)。因此, 利用基因诊断技术对心血管病进行风险预警和早期诊断对人类健康意义重大。

我们采用实时荧光定量 PCR 方法检测低风险、高风险和正常组食蟹猴外周血白细胞内心血管病相关基因表达状态, 结果共检测到 65 个心血管病相关基因。通过分析三组实验猴心血管病危险性和

基因表达的相关性, 我们发现如果用传统的心血管病风险因素对实验猴进行心血管病危险性评估, 高风险组实验猴心血管病危险性要显著高于低风险组和正常组实验猴, 而低风险组和正常组之间差异不大; 但是实时荧光定量 PCR 结果显示高、低风险组之间只有 14 个心血管病相关基因出现表达差异, 低风险和正常组之间却有 45 个心血管病相关基因出现表达差异。该结果表明, 心血管病早期心血管病相关基因表达变化的出现往往要早于传统的风险因素, 而那些在正常组和低风险组之间出现表达差异的基因可作为心血管病风险预警指标。

大量研究表明, 血脂异常、炎症、血栓、内皮损伤等都是心血管病的重要危险因素 (Toru, 2009)。炎症因子 (David et al, 2004) C-反应蛋白、ICAM1、IL6、CD40LG、IL18, 以及载脂蛋白 (Chen et al, 2007) *APOA1*、*APOB* 等已经应用于心血管病早

期诊断和研究当中。因此，我们筛选出来的出现表达差异的基因不但能反映相应的病理状态，还能应用于心血管病风险预警和早期诊断当中。16 个表达明显上调和 19 个表达明显下调的心血管病相关基因可用于区分正常和异常；*CD40*、*PLTP*、*SELPG*、*IFNG*、*GRN*、*FASLG* 和 15 个表达模式特异的心血管病相关基因可用于区分低风险和高风险。

共有 42 个心血管病相关基因在人和食蟹猴外周血白细胞内均有效表达，其中 22 个心血管病相关基因在人和食蟹猴之间表达模式一致，这表明食

蟹猴的研究结果也可应用于人。有些基因在人和食蟹猴之间表达模式不一致，这可能是由人猴差异或其他病理现象导致的，我们正在研究其具体原因。

目前 PCR 芯片技术已经被应用于心血管病临床诊断当中，但是其在心血管病风险预警和早期诊断中的应用还有待开发。通过进一步研究确认上述心血管病相关基因的表达模式，然后将这些基因制备成 PCR 芯片，再结合传统的心血管病风险因素可更早、更准确的对心血管病进行风险预警和早期诊断。

### 参考文献：

- Anton JH, Ann-Pascale JB, Judith CS, Kitty BC, Luc H, Mat JD, Natasja K, Oscar LV. 2007. Dead or alive: gene expression profiles of advanced atherosclerotic plaques from autopsy and surgery [J]. *Physiol Genomics*, **30**(3): 335-411.
- Brewer HB, Donald BH, James IC, Luther TC, Merz NB, Scott MG. 2004. Implications of recent clinical trials for the national cholesterol education [J]. *Circulation*, **110**: 227-239.
- Carol C, Julia HC, Yana V. 2007. Derivation and validation of QRISK, a new cardiovascular disease risk score for the United Kingdom: prospective open cohort study [J]. *BMJ*, **335**(136): 1-12.
- Chen FH, Hu LH, Wang L. 2005. The selection of real-time PCR control genes [J]. *Chn J Clin Lab Sci*, **23**(5): 393-395. [陈凤花, 胡丽华, 王琳. 2005. 实时荧光定量 RT-PCR 内参基因的选择 [J]. 临床检验杂志, **23**(5): 393-395.]
- Chen XG, Lv GC, Teng M, Zhang YM. 2007. Distribution spectrum of each apolipoprotein in patients with hyperlipaemia [J]. *Jiangxi Med J*, **42**(7): 601-603. [陈晓刚, 吕国才, 滕敏, 詹永妹. 2007. 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, **42**(7): 601-603.]
- Cobain M, D'Agostino RB, Kannel WB, Massaro JM, Wolf PA, Pencina MJ, Vasan RS. 2008. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the framingham heart study [J]. *Circulation*, **117**: 743-753.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal. Biochem*, **162**: 156-159.
- David GH, Douglas EV, Jawahar LM, Nancy JB, Paul MR. 2004. Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events [J]. *Circulation*, **109**: 6-19.
- Dempsey AA, Liew CC, Ma J, Marshall KW, Stamatou D. 2007. Identifying leukocyte gene expression patterns associated with plasma lipid levels in human. Subjects [J]. *Atherosclerosis*, **191**: 63-72.
- Jason NB, Russell GF, Stuart NP. 2003. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, **31**(14): 73-80.
- Kenneth JL, Thomas DS. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method [J]. *Methods*, **25**: 402-408.
- Li CH. 2002. American latest revision of ATP cholesterol detecting and processing clinical guidelines[J]. *Chn Comm Doctor*, **18**(17): 8-9.[黎赐惠. 2002. 美国最新修订的 ATP 胆固醇检测和处处理临床指南. 中国社区医师, **18**(17): 8-9.]
- Lisa MS, Peter W, Ralph BD, Scott G. 2001. Prediction scores: results of a multiple ethnic groups validation of the framingham coronary heart disease [J]. *JAMA*, **286**(2): 180-187.
- Toru MD. 2009. Cardiovascular diagnostic biomarkers the past, present and future. *Circulation*, **73**: 806-809.
- World Health Organization. 2007. Prevention of Cardiovascular Disease: Guidelines for Assessment and Management of Cardiovascular Risk [M]. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization. 2003. Prevention of Recurrent Heart Attacks and Strokes in Low and Middle Income Populations: Evidence-Based Recommendations for Policy Makers and Health Professionals [M]. Geneva: World Health Organization.