

论著

文章编号:1000-5404(2012)22-2288-04

罗格列酮对泡沫细胞中胆固醇贮存与运输相关蛋白 ACAT-1、ABCA-1 表达的影响

蒙颖¹,徐芳¹,王志禄²,李万玲¹,贾军正¹,郭文芬¹,谢宛霞¹,胡海英¹,胡旭堂¹ (730000 兰州,兰州大学:第一临床医学院心内科¹,第一医院心内科²)

[摘要] **目的** 观察罗格列酮对 RAW264.7 巨噬源性泡沫细胞形成中胆固醇含量及酰基辅酶 A-胆固醇酰基转移酶-1 (acyl coenzyme A cholesterol acyl transfer enzyme 1, ACAT-1)、三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 A-1 (ATP combination box of transporter 1, ABCA-1) 表达的影响,探讨罗格列酮对泡沫细胞形成的影响及可能的作用机制。**方法** 在 DMEM 高糖培养基中培养 RAW264.7 巨噬细胞,按完全随机分组方法分为:①空白对照组(常规培养基培养巨噬细胞);②氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, oxLDL)组(用终浓度为 30 mg/L 的 oxLDL 孵育 48 h);③oxLDL + 罗格列酮组(分别用终浓度 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的罗格列酮 + 30 mg/L oxLDL 共同孵育 48 h) ($n = 10$)。采用油红 O 染色观察泡沫细胞,胆固醇检测试剂盒测定各组细胞内总胆固醇(total cholesterol, TC)和游离胆固醇(free cholesterol, FC)的含量,Western blot 法检测各组细胞 ACAT-1 和 ABCA1 的表达水平。**结果** oxLDL 组中大量泡沫细胞的胞质被油红 O 染色,oxLDL + 罗格列酮组泡沫细胞胞质染色明显浅于 oxLDL 组的细胞;与 oxLDL 组相比,oxLDL + 罗格列酮组 TC 及 FC 显著降低($P < 0.05$),且呈浓度依赖性;Western blot 检测结果表明,不同浓度(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) oxLDL + 罗格列酮组 ACAT-1 蛋白表达分别为(0.94 \pm 0.11)、(0.86 \pm 0.13)、(0.58 \pm 0.12),与 oxLDL 组(1.19 \pm 0.12)相比有显著差异($P < 0.05$),不同浓度 oxLDL + 罗格列酮组 ABCA1 蛋白表达分别为(0.72 \pm 0.08)、(0.91 \pm 0.15)、(1.15 \pm 0.11),与 oxLDL 组(0.63 \pm 0.05)相比有显著差异($P < 0.05$),且呈浓度依赖性。**结论** 罗格列酮可能通过抑制 ACAT-1 的表达及促进 ABCA-1 的表达减少泡沫细胞形成,从而发挥其抗动脉粥样硬化的作用。

[关键词] 罗格列酮;泡沫细胞;胆固醇;动脉粥样硬化

[中图法分类号] R543.5;R966;R977.15

[文献标志码] A

Effect of rosiglitazone on expression of acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase 1 and ATP-binding cassette transporter A1 in foam cells

Meng Ying¹, Xu Fang¹, Wang Zhilu², Li Wanling¹, Jia Junzheng¹, Guo Wenfen¹, Xie Wanxia¹, Hu Haiying¹, Hu Xu-tang¹ (¹Department of Cardiology, First Clinical Medical College of Lanzhou University, ²Department of Cardiology, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of rosiglitazone on cholesterol content and the expression of acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase 1 (ACAT1) and ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) in RAW264.7 macrophage-derived foam cells, and to explore the mechanism of rosiglitazone in foam cell formation. **Methods** Mouse macrophage RAW264.7 cells were cultured in high-glucose DMEM and were randomly divided into a control group, an oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) group, in which cells were incubated with 30 mg/L oxLDL for 48 h, and an oxLDL + rosiglitazone group, in which cells were incubated with 30 mg/L oxLDL plus 5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ rosiglitazone for 48 h, respectively ($n = 10$). The formation of foam cells were identified by oil red O staining. The levels of intracellular total cholesterol (TC) and free cholesterol (FC) in each group were determined by a cholesterol detection kit, and the expression of ACAT-1 and ABCA-1 protein was determined by Western blotting. **Results** Mouse macrophage RAW264.7 cells in the oxLDL group were stained by oil red O, but the color of the macrophages in the oxLDL + rosiglitazone group was lighter than that in the oxLDL group. Compared with the oxLDL group, the contents of intracellular TC and FC in the oxLDL + rosiglitazone group significantly decreased ($P < 0.05$) in a dose-dependent manner. Western blot results showed the expression levels of ACAT-1 in the oxLDL + rosiglitazone group with different concentrations of rosiglitazone (5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$) were (0.94 \pm 0.11), (0.86 \pm 0.13) and (0.58 \pm 0.12),

[基金项目] 甘肃省自然科学基金(1010RJZA122);甘肃省卫生行业科研计划管理项目(GWGL2010-16)

[通信作者] 王志禄, E-mail: wangzhilu@medmail.com.cn

respectively, which were significantly different from that in the oxLDL group (1.19 ± 0.12) ($P < 0.05$). The expression levels of ABCA-1 in the oxLDL + rosiglitazone group with different concentrations of rosiglitazone (5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$) were (0.72 ± 0.08), (0.91 ± 0.15) and (1.15 ± 0.11), respectively, which were also significantly different from that in the oxLDL group (0.63 ± 0.05) ($P < 0.05$). **Conclusion** Rosiglitazone may inhibit foam cell formation by decreasing the expression of ACAT-1 and increasing the expression of ABCA-1, which plays an important role in inhibiting atherosclerosis.

[**Key words**] rosiglitazone; foam cell; cholesterol; atherosclerosis

Supported by the Natural Science Foundation of Gansu Province (1010RJZA122) and the Management Project of Gansu Provincial Health Industry (GWGL2010-16). Corresponding author: Wang Zhilu, E-mail: wangzhilu@medmail.com.cn

过氧化体增殖物激活型受体 γ (peroxide content activated receptor γ , PPAR γ) 属于配体调控的转录因子,被配体激活后能够调节与脂质代谢,炎症及细胞分化相关的基因转录^[1]。噻唑烷二酮类药物罗格列酮是 PPAR γ 的激动剂,临床上主要用于2型糖尿病的治疗。近年来有关动物模型研究发现罗格列酮能够抑制动脉粥样硬化斑块的形成^[2],但其机制尚未明确。本实验采用 oxLDL 作用于 RAW264.7 巨噬细胞建立泡沫细胞模型,通过观察罗格列酮对巨噬源性泡沫细胞内胆固醇含量及酰基辅酶 A-胆固醇酰基转移酶-1 (acyl coenzyme A cholesterol acyl transfer enzyme 1, ACAT-1)、三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 A-1 (ATP combination box of transporter 1, ABCA-1) 蛋白表达的影响,探讨其可能的细胞水平的机制,以寻找罗格列酮对抗动脉粥样硬化的潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

小鼠单核巨噬细胞株 RAW264.7 细胞购自中科院上海细胞库;胎牛血清购自杭州四季青生物制品公司,批号: XQ-111031;DMEM 高糖培养基(含葡萄糖 4.5g/L)购自美国 Sigma 公司,批号:PYJ-D5648;氧化低密度脂蛋白购自广州奕源生物科技有限公司,批号: XBYZ-YB002;罗格列酮购自美国 Sigma 公司,批号: SJ-R2408;油红 O 粉剂购自美国 Sigma 公司,批号: SJ-00625;总胆固醇检测试剂盒购自北京普利莱生物科技有限公司,批号: SJ-E1015;游离胆固醇检测试剂盒购自北京普利莱生物科技有限公司,批号: SJ-E1016;兔抗人 ACAT-1 抗体购自美国 Abcam 公司,批号: ab71407;兔抗人 ABCA-1 抗体购自美国 Abcam 公司,批号: ab66217。

1.2 细胞培养及泡沫细胞模型的建立

RAW264.7 细胞用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、通有 95% O_2 和 5% CO_2 混合气体的细胞孵育箱内培养。待细胞生长至贴壁 60% ~ 70% 后弃细胞液,加入无血清培养基及终浓度为 30 mg/L 的 oxLDL 孵育 48 h 使其转变为泡沫细胞。细胞内胆固醇酯/总胆固醇比值大于 50% 界定为造模成功^[3]。

1.3 泡沫细胞油红 O 染色鉴定

oxLDL 与巨噬细胞共同孵育 48 h 后,油红 O 染色鉴定造模

是否成功。具体操作步骤:将 oxLDL 处理后的巨噬细胞用 PBS 缓冲液冲洗 3 遍,加入 4% 多聚甲醛固定 30 min,再用 PBS 冲洗 3 遍,加入油红 O 染液后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中孵育 30 min,最后用 75% 酒精洗涤细胞 1 遍以去除多余染液。在倒置显微镜下观察染色结果并在高倍视野($\times 400$)下行彩色照相。

1.4 实验分组

实验分组为:①空白对照组,采用常规培养基培养巨噬细胞;②oxLDL 组,施以 oxLDL(30 mg/L)孵育细胞 48 h;③oxLDL + 罗格列酮组,分别加入不同浓度的罗格列酮(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 预孵育细胞 2 h 后,再加入 oxLDL(30 mg/L) 共同孵育 48 h,每组设 10 个复孔。

1.5 细胞内总胆固醇及游离胆固醇含量测定

收集各组细胞,用 PBS 缓冲液冲洗 3 遍,按照每 10^6 细胞中加入 0.1 ml 裂解液的比例,在各组中加入细胞裂解液使细胞裂解,超速离心后取上清液测定各组细胞内总胆固醇(TC)和游离胆固醇(FC)的含量,TC 与 FC 之差为胆固醇酯(CE)的含量。具体操作按胆固醇检测试剂盒说明书进行。

1.6 Western blot 检测 ACAT-1 和 ABCA-1 的蛋白表达水平

收集各组细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 PBS 缓冲液洗涤 3 遍,加入 RIPA 细胞裂解液充分裂解细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 下超速离心(12 000 r/min 离心 5 min)收集各组上清液,使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。收集的蛋白提取物中加入 2 倍 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(0.5 mmol/L Tris, pH 6.8, 20% SDS, 50% 甘油, 2% 溴酚蓝),100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 使蛋白变性,变性蛋白加入 SDS-PAGE 凝胶加样孔内电泳分离。将凝胶分离的蛋白转移至 PVDF 膜,转移膜置于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液(含 0.05% Tween20)封闭 2 h,加入一抗孵育过夜, TBST 缓冲液洗涤 3 遍,加入二抗孵育 2 ~ 3 h。蛋白条带通过 ECL 液荧光显色, X 线曝光拍照,用 Image J 图像分析软件分析结果。

1.7 统计学处理

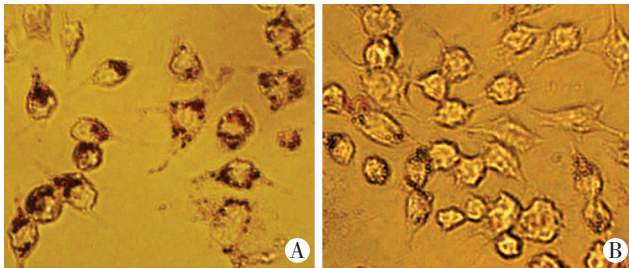
采用 SPSS 19.0 统计软件系统进行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间比较采用 *t* 检验,大于两组比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 罗格列酮对 oxLDL 诱导的 RAW264.7 源性泡沫细胞形成的影响

油红 O 染色后镜检显示 oxLDL 组中多数细胞被油红 O 染

色,胞质中有大量红色颗粒,符合泡沫细胞形态特点(图1)。检测细胞内胆固醇含量显示胆固醇酯/总胆固醇比值大于50%,提示已转化为泡沫细胞(表1),与油红O染色结果相一致。而 oxLDL + 罗格列酮组中被染色的细胞数量明显减少,且胞质染色明显浅于 oxLDL 组的细胞(图1)。



A: oxLDL 组; B: oxLDL + 罗格列酮组

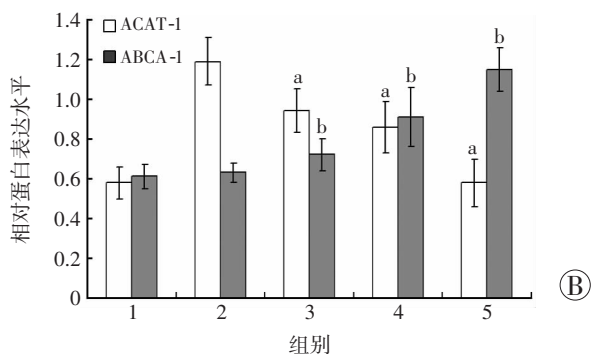
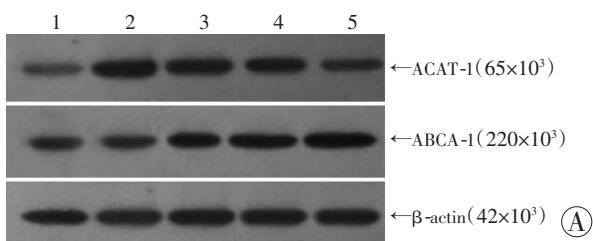
图1 油红O染色观察各组罗格列酮对 oxLDL 诱导的 RAW264.7 源性泡沫细胞形成的影响 (×400)

2.2 罗格列酮对泡沫细胞内胆固醇含量的影响

与空白对照组相比,oxLDL 组细胞内总胆固醇及游离胆固醇均明显增加,且有显著性差异($P < 0.05$)。与 oxLDL 组相比,oxLDL + 罗格列酮组细胞内总胆固醇及游离胆固醇均显著降低($P < 0.05$),且呈浓度依赖性(表1)。

2.3 罗格列酮对泡沫细胞表达的 ACAT-1 及 ABCA-1 蛋白水平的影响

RAW264.7 巨噬源性泡沫细胞经不同浓度罗格列酮(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)处理后,Western blot 检测显示,与 oxLDL 组相比,oxLDL + 罗格列酮组随着罗格列酮干预浓度的升高,ACAT-1 蛋白表达水平降低($P < 0.05$),而 ABCA-1 蛋白表达水平升高($P < 0.05$),且呈浓度依赖性(图2、表1)。



1:空白对照组;2: oxLDL 组;3: oxLDL + 5 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组;4: oxLDL + 10 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组;5: oxLDL + 20 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组
A: Western blot 检测结果; B: 半定量分析结果 a: $P < 0.05$, 与 oxLDL 组比较

图2 Western blot 检测不同罗格列酮干预组细胞 ACAT-1 和 ABCA-1 蛋白的表达

表1 各组细胞中胆固醇水平的比较 (mg/L, $n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	TC	FC	CE
空白对照组	20.92 \pm 0.41	15.33 \pm 1.09	5.51 \pm 0.83
oxLDL 组	98.73 \pm 4.48 ^a	44.17 \pm 4.87 ^a	54.55 \pm 1.4 ^a
oxLDL + 5 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组	73.48 \pm 2.93 ^b	38.39 \pm 2.82 ^b	39.75 \pm 6.81 ^b
oxLDL + 10 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组	51.08 \pm 8.22 ^b	23.85 \pm 4.15 ^b	20.89 \pm 1.06 ^b
oxLDL + 20 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组	22.61 \pm 1.08 ^b	16.51 \pm 1.09 ^b	6.11 \pm 1.26 ^b

a: $P < 0.05$, 与空白对照组比较; b: $P < 0.05$, 与 oxLDL 组比较

3 讨论

动脉粥样硬化相关的心血管疾病已成为威胁人类生命健康的一个主要问题。在动脉粥样硬化斑块中,巨噬细胞由于摄取了过多胆固醇而使胞质内形成大量脂滴,在显微镜下观察可见这些细胞呈泡沫样外观,因而被称为泡沫细胞^[4]。胆固醇富载的巨噬源性泡沫细胞是早期动脉粥样硬化斑块的突出特点,其主要由于调节胆固醇流入和流出过程的机制发生异常所致。因此,对抗泡沫细胞胆固醇的代谢失衡是抗动脉粥样硬化的关键。本实验结果显示使用罗格列酮干预后,泡沫细胞内胆固醇含量显著减少,证实了罗格列酮对泡沫细胞形成的抑制作用。

ACAT-1 属于酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶家族,其可以催化胆固醇合成胆固醇酯,在人体大多数被鉴定的组织和细胞中都能检测到这种酶。研究^[5]表明在动脉粥样硬化斑块形成中尤其是早期阶段,ACAT-1 在巨噬细胞形成的泡沫细胞中高度表达,并在泡沫细胞的形成中起着重要作用。当巨噬细胞内聚积大量的修饰 LDL 源的游离胆固醇时,其会被转运到内质网,由 ACAT-1 酯化为胆固醇酯并储存在细胞质中形成脂滴,从而使巨噬细胞转化成为泡沫细胞。据此可以将 ACAT-1 看作药理学干预动脉粥样硬化的潜在目标。我们在本实验中,观察到随着罗格列酮干预浓度的增加,巨噬源性泡沫细胞内 ACAT-1 的表达水平逐渐下调。但是,也有研究^[6]报道单独使用 ACAT-1 抑制剂增加了斑块的形成,这主要是由于细胞内积累了大量的游离胆固醇引发细胞毒性所致。巨噬泡沫细胞要阻止游离胆固醇过度积累所致细胞毒性的唯一方式,就是使其流出到细胞外。因此,减少细胞内 ACAT-1 合成的胆固醇酯并联合使细胞内游离胆固醇及时排出的方式应当成为抑制泡沫细胞形成的根本途径。

研究^[7]发现受体介导的游离胆固醇流出是转移细胞内胆固醇的主要机制,也是阻止泡沫细胞形成的关键。通过细胞膜转运蛋白介导的主动转运在此过程中起到了主要作用,而发挥此作用的主要蛋白就是 ABCA-1^[8]。它是一个完整的膜蛋白,利用 ATP 作为

能量运输血脂和其他代谢产物跨膜,通过载脂蛋白类如 apoA-I 将其移出细胞。现已证实 ABCA-1 与动脉粥样硬化相关^[9]。研究^[10]发现,当给小鼠移植来自 ABCA-1 基因过表达的小鼠骨髓后,会使小鼠的动脉粥样硬化斑块减少。体内实验^[11]也证实,ABCA-1 缺乏的巨噬细胞胆固醇逆向转运过程减少,增加了动脉粥样硬化发生的风险。本研究证实罗格列酮以浓度依赖性方式使泡沫细胞 ABCA-1 表达增加,从而避免了泡沫细胞内游离胆固醇的聚集及继发的细胞毒性。

研究^[12-13]表明 ACAT-1 和 ABCA-1 均涉及巨噬细胞胆固醇逆向转运(reverse cholesterol transport, RCT)过程,因为巨噬细胞的 RCT 过程依赖于细胞内的胆固醇状态及细胞膜上转运蛋白的表达水平,只有游离胆固醇在细胞膜上转运蛋白的参与下才能流出到细胞外受体,而 ACAT-1 和 ABCA-1 分别影响巨噬细胞的胆固醇合成及外流,通过协同作用参与巨噬细胞 RCT 的连续过程,从而调节巨噬细胞内胆固醇含量^[6,14]。本研究使用不同浓度的 PPAR γ 激动剂罗格列酮(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)干预 RAW264.7 巨噬源性泡沫细胞后发现,与 oxLDL 组相比,oxLDL + 罗格列酮组的细胞内 ACAT-1 表达显著下降($P < 0.05$),同时 ABCA-1 表达显著升高($P < 0.05$),且呈浓度依赖性。该结果证实,罗格列酮通过激动 PPAR γ 影响与巨噬泡沫细胞内胆固醇代谢相关蛋白 ACAT-1 和 ABCA-1,在下调 ACAT-1 的同时上调了 ABCA-1 的表达,这种联合作用促进了巨噬泡沫细胞 RCT 的连续过程,抑制巨噬源性泡沫细胞的形成,从而发挥抗动脉粥样硬化的作用。

本实验的不足之处在于观察罗格列酮对模型细胞的影响时只设置了3组不同浓度的药物干预组,虽然在本研究的浓度范围中罗格列酮的作用是积极的,但是否高于该干预剂量的罗格列酮仍能产生良好的抗动脉粥样硬化效应,还需要进一步的实验证实,同时对 RCT 在巨噬泡沫细胞胆固醇流出中作用的深入研究也是必要的。此外,Nissen 等^[15]的研究曾显示罗格列酮可能增加急性心血管事件的风险,但大规模临床试验 RECORD 的研究结果证实,与对照组相比罗格列酮并没有增加急性心血管事件的风险^[16]。目前,罗格列酮对心血管方面的安全性仍存在争议,尚需进一步研究。

综上所述,本研究证实罗格列酮可以抑制巨噬泡沫细胞的形成,发挥抗动脉粥样硬化的作用,并通过下调 ACAT-1 和上调 ABCA-1 的表达,促进巨噬细胞的胆固醇逆向转运,从而减少胆固醇在巨噬细胞内的聚集。本结果可能将为临床治疗动脉粥样硬化提供新的方向。

参考文献:

- [1] Wang N, Yin R, Liu Y, *et al.* Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in atherosclerosis: an update[J]. *Circ J*, 2011, 75(3): 528-535.
- [2] Tikellis C, Jandeleit-Dahm K A, Sheehy K, *et al.* Reduced plaque formation induced by rosiglitazone in an STZ-diabetes mouse model of atherosclerosis is associated with downregulation of adhesion molecules [J]. *Atherosclerosis*, 2008, 199(1): 55-64.
- [3] Shashkin P, Dragulev B, Ley K. Macrophage differentiation to foam cells[J]. *Curr Pharm Des*, 2005, 11(23): 3061-3072.
- [4] Glass C K, Witztum J L. Atherosclerosis. the road ahead[J]. *Cell*, 2001, 104(4): 503-516.
- [5] Chang T Y, Li B L, Chang C C, *et al.* Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferases[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 297(1): E1-E9.
- [6] Lopez-Farre A J, Sacristan D, Zamorano-Leon J J, *et al.* Inhibition of acyl-CoA cholesterol acyltransferase by F12511 (Eflucimibe): could it be a new antiatherosclerotic therapeutic? [J]. *Cardiovasc Ther*, 2008, 26(1): 65-74.
- [7] Yuan Y, Li P, Ye J. Lipid homeostasis and the formation of macrophage-derived foam cells in atherosclerosis[J]. *Protein Cell*, 2012, 3(3): 173-181.
- [8] Aye I L, Singh A T, Keelan J A. Transport of lipids by ABC proteins: interactions and implications for cellular toxicity, viability and function [J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 180(3): 327-339.
- [9] Attie A D. ABCA1: at the nexus of cholesterol, HDL and atherosclerosis[J]. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32(4): 172-179.
- [10] Van-Eck M, Singaraja R R, Ye D, *et al.* Macrophage ATP-binding cassette transporter A1 overexpression inhibits atherosclerotic lesion progression in low-density lipoprotein receptor knockout mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(4): 929-934.
- [11] Wang X, Collins H L, Ranalletta M, *et al.* Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport *in vivo*[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(8): 2216-2224.
- [12] Rader D J, Alexander E T, Weibel G L, *et al.* The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis[J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(Suppl): S189-S194.
- [13] Ghosh S, Zhao B, Bie J, *et al.* Macrophage cholesteryl ester mobilization and atherosclerosis[J]. *Vascul Pharmacol*, 2010, 52(1/2): 1-10.
- [14] Tall A R, Yvan-Charvet L, Terasaka N, *et al.* HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis[J]. *Cell Metab*, 2008, 7(5): 365-375.
- [15] Nissen S E, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes[J]. *N Engl J Med*, 2007, 356(24): 2457-2471.
- [16] Home P D, Pocock S J, Beck-Nielsen H, *et al.* Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial[J]. *Lancet*, 2009, 373(9681): 2125-2135.

(收稿:2012-06-31;修回:2012-07-31)

(编辑 栾嘉)