

论著·基础研究

ox-LDL 抑制大鼠骨髓间充质干细胞的体外增殖和 Oct-4 表达*

吕铁伟¹, 孙慧超¹, 张 蕾¹, 刘玲娟², 吴晓云¹, 刘晓燕¹, 朱 静², 刘振国³, 田 杰^{1△}

(1. 重庆医科大学儿童医院心血管内科, 重庆 400014; 2. 儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室/儿科学重庆市重点实验室/重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014; 3. 美国俄亥俄州立大学医学中心, 哥伦布 43210)

摘要:目的 以大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)为研究对象,在体外培养过程中观察氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)对 MSCs 增殖、干细胞表面标志 Oct-4 表达的影响。方法 将体外培养的 MSCs 分为 4 组:对照组,不加任何干预因素;Ox-LDL 组,在培养基中分别加入不同浓度(1、5、10、20 μg/mL)的 ox-LDL;Ox-LDL+NAC 组,采用抗氧化剂乙酰半胱氨酸(NAC)预处理后再加入 ox-LDL;阴性对照组,在培养基中加入对应浓度的天然低密度脂蛋白(nLDL)。在不同培养时间点收集细胞计数并绘制生长曲线;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测干细胞特异表面标记 Oct-4 表达水平;电子顺磁共振技术检测氧化活性产物(ROS)产量。结果 ox-LDL 抑制 MSCs 的增殖,浓度越大细胞增殖抑制越明显,当浓度大于 5 μg/mL 时细胞出现凋亡,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平减弱;ox-LDL 干预后 Oct-4 的表达水平显著减弱,且与干预浓度呈正相关;ox-LDL 干预后 ROS 的产量明显升高,而 nLDL 对 ROS 生成没有影响。结论 ox-LDL 抑制 MSCs 的体外增殖和 Oct-4 表达,可能与 ROS 增加有关。

关键词:脂蛋白类, LDL;骨髓细胞;细胞增殖;Oct-4

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.14.020

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)14-1737-04

oxidized low-density-lipoprotein inhabits the proliferation and Oct-4 express of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro*

Lv Tiewei¹, Sun Huichao¹, Zhang Lei¹, Liu Lingjuan¹, Wu Xiaoyun¹, Liu Xiaoyan¹, Zhu Jing², Liu Zhenguo³, Tian Jie^{1△}

(1. Department of Cardiology, the Children's Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 400014 China; 2. Key Laboratory of Children Development and Disorder Co-founded by Provincial Government and Ministry of Education/Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing/Chongqing Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Chongqing 400014, China; 3. The Ohio State University Medical Center, Columbus, Ohio 43210, USA)

Abstract: Objective To detect the effect of ox-LDL on self-renewal and Oct-4 express of MSCs in vitro. Methods MSCs cultured in vitro were divided into 4 groups: blank control (no reagents in culture system), ox-LDL (1, 5, 10, 20 μg/mL ox-LDL were added into culture system), ox-LDL+NAC (corresponding ox-LDL were added into culture system after NAC treatment), negative control (corresponding nLDL were added into culture system). Growth curve were drawn at different time, Oct-4, a stem cell special marker, were detected by real-time PCR, the production of ROS (reactive oxygen species, ROS) in culture system were measured with electron paramagnetic resonance spectroscopy. Results proliferation of MSCs was inhibited by ox-LDL, when concentration of ox-LDL was more than 5 μg/mL; apoptosis of MSCs appeared as well as attenuated expression of Bcl-2, ox-LDL generated a significant amount of ROS in the culture system, which was completely prevented by NAC. Conclusion The proliferation and Oct-4 expression of MSCs were inhibited by ox-LDL, which may be related to increase of ROS in culture system.

Key words: lipoproteins, LDL; bone marrow cells; cell proliferation; Oct-4

大鼠骨髓间充质干细胞(rat bone marrow mesenchymal stem cells, MSCs)是经过实验室纯化的单一干细胞株,已经被证明能够诱导转化为具有内皮功能的成熟内皮细胞^[1],其可以作为以内皮受损或功能失调为基础病理改变的动脉粥样硬化和冠心病等心血管疾病的根治种子细胞。而氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)是导致动脉粥样硬化和冠心病等心血管疾病发生发展的重要因素,Oct-4 (octamer binding transcription factor-4)是高表达于干细胞的八聚体转录因子,能够维持干细胞自我更新的能力,而在干细胞定向分化的过程中表达逐渐减弱甚至消失,是当前公认的干细胞表面标记之一。本文以 MSCs 为研究对象,拟在 MSCs 体外培养过程中加入 ox-LDL 进行干预,明确其对 MSCs 增殖能力和 Oct-4 表达情况的影响及可能机制。

1 材料与与方法

1.1 材料 MSCs 为俄亥俄州立大学医学中心刘振国实验室

分离和提纯的细胞株,细胞培养体系包括低糖 DMEM 培养液(Gibco)、MCDB、ITS、LA-BSA、L-ascorbic acid、EGF(均购自 Sigma)、PDGF(R&D Systems)、β-Mercaptoethanol(Fisher 公司)、LIF(Esgro 公司)和青/链霉素(Cellgro 公司),ox-LDL 及天然低密度脂蛋白(native low density lipoprotein, nLDL)为俄亥俄州立大学医学中心 Sam's 实验惠赠,蛋白免疫印迹法(West blot)检测 Oct-4、Bcl-2 相关试剂及抗氧化剂乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 MSCs 培养传代 本研究将 MSCs 以 100~200/cm² 的密度接种于玻璃培养皿中,置入 37℃、5% CO₂ 和 5% O₂ 的孵箱中培养,一般 2~3 h 细胞即贴壁生长,细胞培养 24~48 h 后在细胞相互接触之前,采用胰酶消化传代细胞,每个培养皿中加入胰酶 1 mL 消化细胞,收集细胞于 10 mL 试管中,4℃ 1 500 r/min 离心,培养基混悬细胞,计数,以低密度(100

~200/cm²)接种于新的培养皿放入孵箱继续培养备用。

1.2.2 ox-LDL 影响细胞增殖能力的检测 MSCs 被分为 4 组:ox-LDL 组,在培养基中加入不同浓度(1、5、10、20 μg/mL)的 ox-LDL;ox-LDL+NAC 组,采用抗氧化剂 NAC 预处理后再在培养基中加入 ox-LDL;阴性对照组,在培养基中加入相对应浓度的 nLDL;对照组,MSCs 放在正常培养不加其他任何干预因素;ox-LDL 组分别在培养基加入终浓度分别为 1、5、10、20 μg/mL 的 ox-LDL;nLDL 组则加入与 ox-LDL 相对应浓度的 nLDL;在细胞培养的第 12、24 和 48 小时收集 3 组细胞,计数并绘制生长曲线,每实验组要求的样本量分别为 3 个。

1.2.3 检测细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 及 Oct-4 的表达 采用蛋白提取试剂盒提取不同时间点细胞总蛋白,分光光度计测定蛋白浓度,按照蛋白印迹技术检测 Bcl-2 和 Oct-4 的表达,首先进行变性十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),放入电转系统恒流转膜 2 h 后,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,封闭结束后加入相对应的一抗于 4 ℃孵育过夜, TBST 洗膜后加二抗(辣根过氧化物酶标记的与一抗相对应的种属特异性二抗)室温震荡孵育 1 h, TBST 洗膜后加入化学发光剂室温孵育 3 min,暗室中进行定影显影,采用凝胶图形分析软件对特异性条带进行灰度扫描和定量分析,蛋白的灰度值用内参 GAPDH 进行校正。

1.2.4 氧化活性产物(ROS)检测 采用电子顺磁共振(EPR)技术检测各组培养基中 ROS 的含量。首先收集细胞计数,使细胞浓度达到 10⁷/mL,每个样本中抽取 100 μL 细胞悬液加入 EPR 微小玻璃吸管中,再置于 EPR 仪器进行检测,每个样本重复进行 3 次测定,描绘各组的 EPR 信号,统计 EPR 信号强度并进行对比。

1.3 统计学处理 采用 SPSS15.0 软件进行数据处理,曲线及直方图采用 Sigmaplot 软件绘制,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

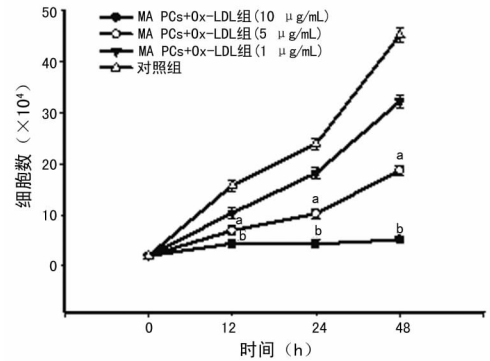
2 结果

2.1 细胞培养阶段的形态 将 MSCs 以低密度(100~200/cm²)接种培养在氧含量为 5%的 CO₂ 孵箱中,大约 2~3 h 后细胞全部贴壁,贴壁细胞在倒置显微镜下呈梭形、圆形或不规则形状,细胞体积大,细胞核明显,细胞间互不接触,培养 48 h 后细胞增殖明显增加,几乎铺满培养皿底部,细胞间形成接触。

2.2 ox-LDL 影响 MSCs 增殖能力的检测结果 细胞培养皿底部面积约为 53 cm²,每个培养皿总接种细胞数约为(1~2) × 10⁴,加 6 mL 基础培养基进行培养,培养 48 h 后细胞数量约扩增至 4 × 10⁵ 个,大约扩增 20 倍,传代后细胞仍保持同样的扩增能力。细胞生长曲线结果显示 ox-LDL 对 MSCs 增殖的抑制作用与培养时间和干预浓度呈正相关:与正常培养细胞相比,浓度为 1 μg/mL 的 ox-LDL 使 MSCs 增殖速度稍有降低,但差异无统计学意义($P < 0.05$),而浓度为 5 μg/mL 和 10 μg/mL 时则导致 MSCs 的增殖速度明显减弱(5 μg/mL 时 $P < 0.05$, 10 μg/mL 时 $P < 0.01$),其中,10 μg/mL 及 20 μg/mL 在培养的不同时间点细胞数量增加极少,到 48 h 细胞增加的量不到初始接种浓度的 1 倍,见图 1,而 nLDL 组细胞增殖未受影响(结果未显示),NAC 预处理后提高了 MSCs 的数量,但在 ox-LDL 浓度为 10、20 μg/mL 时提升效率不明显,差异无统计学意义($P > 0.05$),而在 5 μg/mL 时,NAC 预处理后大大增加了 MSCs 的数量($P < 0.05$),见图 2。

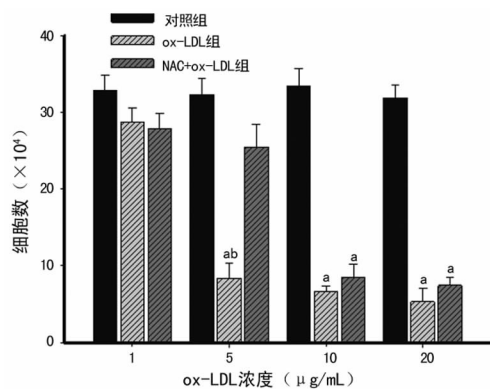
2.3 不同浓度 ox-LDL 引起细胞凋亡及对 Bcl-2 表达水平的影响 在 MSCs 体外培养过程中,与原代培养的细胞相比,高

浓度的 ox-LDL 明显抑制 MSCs 的增殖,显微镜下观察细胞数量明显减少,大部分细胞已破碎且失去了细胞完整的结构,见图 3;采用 Western blot 观察 ox-LDL 干预后不同实验组 Bcl-2 表达情况发现,与对照组比较,用 10 μg/mL 及以上浓度的 ox-LDL 进行干预后的细胞抗细胞凋亡蛋白 Bcl-2 几乎没有出现表达,NAC 预处理后则出现 Bcl-2 的表达,但表达量与对照组比,差异有统计学意义($P < 0.05$,具体数据未显示),见图 4。



^a: $P < 0.05$; ^b: $P < 0.01$, 与同时时间点对照组比较。

图 1 各浓度 ox-LDL 对 MSCs 增殖的影响



^a: $P < 0.01$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.01$, 与 NAC + ox-LDL 组比较。

图 2 抗氧化剂 NAC 对 ox-LDL 处理后 MSCs 增殖的逆转作用

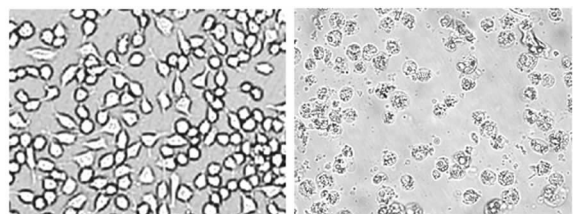
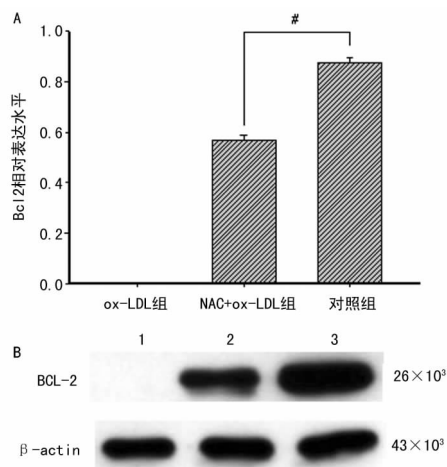


图 3 原代培养传代前(左)和 ox-LDL 干预后(右)细胞形态的改变(×100)

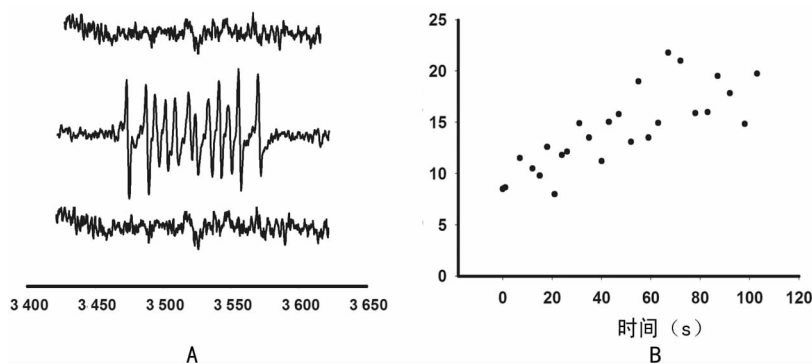
2.4 ox-LDL 对干细胞表面标记 Oct-4 表达水平的影响 本实验采用 Western blot 观察 ox-LDL 对 Oct-4 表达水平的影响,在细胞体外培养 24 h,分别提取浓度为 5 μg/mL 的 ox-LDL 组和对照组细胞蛋白进行检测,结果发现 5 μg/mL ox-LDL 组 Oct-4 的表达明显减弱,表达相对量仅为对照组的 14%左右,差异有统计学意义($P < 0.01$,具体数据未显示),见图 5,10 μg/mL 及以上浓度的 ox-LDL 干预后 Oct-4 的表达更减弱,仅有极微量的表达(结果没有显示),而 NAC 预处理后 Oct-4 的表达量恢复接近正常,约为 79%。而 nLDL 组 Oct-4 的表达却没有受到明显影响。



A: Western blot 分析图; B: Western blot 图; 1: ox-LDL 组 (ox-LDL 浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 2: NAC+ox-LDL 组; 3: 对照组。

图 4 不同实验组 Bcl-2 的表达

2.5 NAC 阻止 ox-LDL 来源的 ROS 的产生 EPR 技术检测不同实验组培养体系中 ROS 的形成情况, 结果显示对照组没有出现 EPR 信号, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ox-LDL 组则出现典型的 EPR 信号, 而 ox-LDL+NAC 组中则没有检测到 EPR 信号 (图 6); ROS 的产生具有时间依赖性, 当 ox-LDL 干预 MSCs 时培养体系中即刻就出现 EPR 信号, 信号表达的强度在 ox-LDL 干预后 60 s 达到最高峰, 以后稳定在高水平状态 (图 6B); 同样 ROS 的产生是剂量依赖型的, 正常培养的细胞体系几乎检测不到 EPR 信号, 而加入 ox-LDL 干预后的细胞体系 EPR 信号



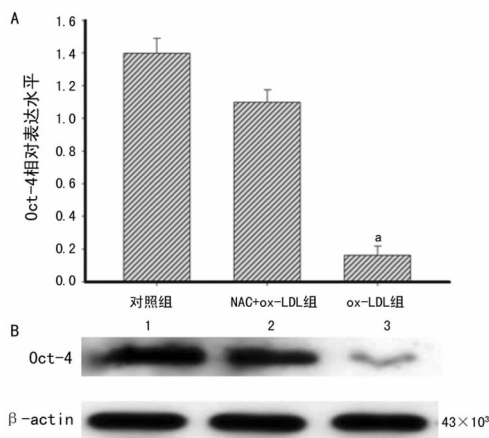
1: 对照组; 2: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ox-LDL 组; 3: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ox-LDL 组; 4: ox-LDL+NAG 组; ^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.01$ 与 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ox-LDL 组比较。

图 6 不同组别活性氧产物 ROS 形成的检测结果

3 讨论

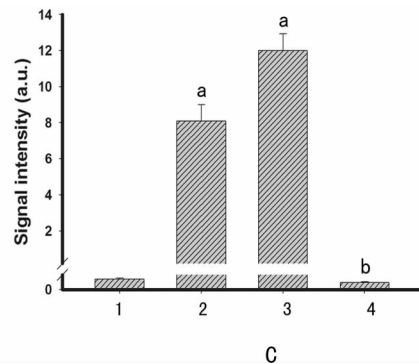
大鼠骨髓间充质干细胞作为成体干细胞的一种, 具有自我更新和多向分化的特点, 其存在于骨髓基质中, 含量极低 (0.1%), 但在体外扩增容易, 适宜条件下自身数量能够迅速增加, 另外骨髓基质是低氧环境 (小于 7%), 该环境能够维持细胞的无限增殖和自我更新的能力, 体外低氧条件下培养能最大限度发挥细胞的生物学特性^[2-3]。而体外培养的骨髓间充质干细胞混杂有少量如成纤维细胞等其他细胞群体, 这种混杂细胞群体会影响研究的准确性和单一性, 因此, 本实验所采用的 MSCs 为俄亥俄州立大学医学中心实验室分离和提纯的细胞株, 被认为是单一的干细胞株, 经研究发现该细胞群阳性表达 Oct-4, Rex-1, c-Kit 和 Pdgfr- α , 而细胞表面标记 Sca-1, CD34, CD45, Sox-2 和 Nanog 的表达却为阴性^[3]; Oct-4 属 POU 家族蛋白, 是一类在动物早期胚胎发育过程中起重要作用的转录因子, 能够维持干细胞的全能性及未分化状态^[4]。Oct-4 蛋白的

强度明显增加, 且随着 ox-LDL 干预浓度的增加, EPR 信号强度相应增加, 但是培养体系经抗氧化剂 NAC 预处理 5 min 后, 即便再加入 ox-LDL 干预, 细胞培养体系中 EPR 信号强度则明显减弱接近正常细胞水平 (图 6C), 而 nLDL 组则没有类似现象, 说明培养体系中 ROS 的产生来源于 ox-LDL, 且 ROS 产生量与 ox-LDL 的浓度和作用时间呈正相关, 但抗氧化剂 NAC 预处理后可以完全阻止 ox-LDL 来源的 ROS 的产生。



A: Western blot 分析图; ^a: $P < 0.01$, 分别与对照组、NAC+ox-LDL 组比较; B: Western blot 图; 1: 对照组; 2: NAC+ox-LDL 组; 3: ox-LDL 组。

图 5 不同组别 Oct-4 的表达情况



主要结构特征为具有 POU 家族特有的保守结构域 (POUs) 和 POU 同源异型结构域 (POUHD), 这两个结构域可与 DNA 上特定区域形成双向结合, 进而对基因转录进行调控^[5]。本实验显示 MSCs 高表达 Oct-4, 当 MSCs 受到 ox-LDL 干预时 Oct-4 的表达明显降低, 细胞的增殖能力显著下降, 进一步证实 Oct-4 是维持干细胞的全能性及未分化状态的关键因素之一。

内皮遍及整个心血管系统, 主管血液运输、物质交换和血管活性物质的分泌等功能, 内皮的受损或功能失调导致动脉粥样硬化和冠心病等心血管事件的发生和发展^[6], 故内皮正常功能的重建或内皮再生是严重心血管事件未来治疗的主攻方向。内皮再生来源于循环内皮祖细胞 (EPCs), 内皮细胞受损或者破坏导致细胞数量减少, 可触发循环 EPCs 的成熟过程, 最后 EPCs 分化为内皮细胞来弥补其数量的不足从而维持心血管内皮系统的正常功能, 而 EPCs 来源于骨髓, 其数量和功能与骨髓间充质干细胞状态密切相关; 临床上内皮受损或功能失调

导致动脉粥样硬化和冠心病等心血管疾病的发生,研究证实这些心血管疾病个体体内 EPCs 的数量明显减少^[6-8],因此,推测可能是某些因素导致骨髓间充质干细胞分化受到抑制,继而内皮细胞的生成数量降低,从而促进严重心血管事件的发生,因此,该过程中相关机制的阐明具有重大的临床和社会意义,也是本研究实施的原始推动力。

多种因素可以引起内皮受损或功能失调,脂代谢紊乱是一大诱因,高脂血症导致内膜受损,脂点脂纹形成,继而出现纤维斑块和粥样斑块。最后导致动脉粥样硬化和冠心病的形成,而 ox-LDL 和氧化应激是这一过程的物质和病理生理基础,但其作用机制尚不清楚。ox-LDL 对靶细胞的作用因细胞类型不同而不同,并且这种作用机制复杂而多变,ox-LDL 能够促进巨噬细胞和血管平滑肌细胞的增殖,抑制巨噬细胞及单核细胞的凋亡,但另一方面 ox-LDL 在抑制内皮细胞和循环 EPCs 的增殖进而促进巨噬细胞和单核细胞的凋亡^[9-10],最近文献又证明 ox-LDL 同样可以引起内皮的受损^[11],但受损的机制尚未阐明;ox-LDL 另外一个重要的机制则是 ROS 的形成和氧化应激。Ox-LDL 能够提供 ROS 的丰富来源,而 ROS 与组织氧化应激和高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病的发生及进展密切相关,ROS 和氧化应激在对包括骨髓干细胞在内的干细胞调控发挥重要作用^[12-14]。

本研究结果是通过细胞的体外实验获得的,但仍具有紧密的临床相关性,最近的临床研究显示一个健康个体血清中 ox-LDL 的浓度为 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而稳定型冠心病患者血清 ox-LDL 水平则为 17.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,急性冠脉综合征患者血清 ox-LDL 水平更是高达 23.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$,本实验选取的 ox-LDL 浓度(1~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)在健康和患病个体的平均范围之内进行研究发现,当 ox-LDL 浓度是 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对细胞形态和增殖没有影响,但当其浓度增加,出现了抑制作用,并且这种作用与浓度成剂量依赖性,这就提示 ox-LDL 在这些心血管事件的发生发展中起促进作用,本实验中采用抗氧化剂 NAC 预处理来对抗 ox-LDL 对细胞的抑制作用,根据相关文献^[13]选取浓度为 1 mM 的 NAC 进行实验,结果显示 NAC 能够逆转但不能完全恢复 ox-LDL 对 MSCs 的抑制作用,提示在该过程中还有其它因素参与其中,下一步作者拟通过体内实验研究 ox-LDL 对 MSCs 特性和内皮分化的影响及其机制。

本研究明确 ox-LDL 能够抑制 MSCs 增殖和 MSCs 细胞表面标记 Oct-4 的表达,而抗氧化剂 NAC 却能够逆转 ox-LDL 对 MSCs 的抑制作用,进一步证实了 ox-LDL 可能通过氧化应激方式抑制 MSCs 的增殖和细胞表面标志的表达,而抗氧化剂使氧化应激水平降低甚至消退时,ox-LDL 对 MSCs 的抑制作用也随之降低甚至消退。而研究显示心血管疾病个体体内 EPCs 的数量明显减少^[6-8],是否与其骨髓间充质干细胞分化受到抑制导致内皮细胞的生成减少相关?而 Ox-LDL 是动脉粥样硬化和冠心病等心血管事件发生发展的关键环节之一,在本研究明确 ox-LDL 抑制 MSCs 生物学特性基础上,拟通过进一步实验验证其是否抑制 MSCs 的内皮分化及其可能机制。

参考文献:

[1] Urbich C,Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology[J]. *Circ Res*,

2004,95(4):343-353.

- [2] Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, et al. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain[J]. *Exp Hematol*, 2002, 30(8): 896-904.
- [3] Breyer A, Estharabadi N, Oki M, et al. Multipotent adult progenitor cell isolation and culture procedures[J]. *Exp Hematol*, 2006, 34(11): 1596-1601.
- [4] Chu L, Jiang Y, Hao H, et al. Nitric oxide enhances Oct-4 expression in bone marrow stem cells and promotes endothelial differentiation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 591(1/3): 59-65.
- [5] Bhartiya D, Kasiviswanathan S, Unni SK, et al. Newer insights into premeiotic development of germ cells in adult human testis using Oct-4 as a stem cell marker[J]. *J Histochem Cytochem*, 2010, 58(12): 1093-1106.
- [6] Chen JZ, Zhang FR, Tao QM, et al. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia[J]. *Clin Sci(Lond)*, 2004, 107(3): 273-280.
- [7] Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2004, 109(23 suppl 1): III-27-III-32.
- [8] Wang X, Chen J, Tao Q, et al. Effects of ox-LDL on number and activity of circulating endothelial progenitor cells[J]. *Drug Chem Toxicol*, 2004, 27(3): 243-255.
- [9] Imanishi THT, Nishio I. Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004, 31(7): 407-413.
- [10] Chen J, Mehta JL, Haider N, et al. Role of caspases in Ox-LDL-induced apoptotic cascade in human coronary artery endothelial cells[J]. *Circ Res*, 2004, 94(3): 370-376.
- [11] Chu L, Hao H, Luo M, et al. Ox-LDL modifies the behaviour of bone marrow stem cells and impairs their endothelial differentiation via inhibition of Akt phosphorylation[J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(2): 423-432.
- [12] Cominacini L, Garbin U, Pasini AF, et al. Oxidized low-density lipoprotein increases the production of intracellular reactive Oxygen species in endothelial cells: inhibitory effect of lacidipine[J]. *J Hypertens*, 1998, 16(12 Pt 2): 1913-1919.
- [13] Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, et al. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease[J]. *Circulation*, 2001, 104(22): 2673-2678.
- [14] Itabe H, Ueda M. Measurement of plasma oxidized low-density lipoprotein and its clinical implications[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2007, 14(1): 1-11.