

· 论 著 ·

常规饲养 C57BL/6 乳糜泻小鼠模型的构建及其评价

殷双双, 范文涛, 范志宁, 赵黎黎, 刘莉

南京医科大学第一附属医院消化内镜科, 江苏 南京 210029

摘要: **目的** 利用麦醇溶蛋白 (gliadin) 诱导小鼠乳糜泻模型, 通过检测乳糜泻相关指标来评价该模型的可行性。 **方法** 将健康的 C57BL/6 小鼠随机分成 2 组: 正常组与乳糜泻组 (CeD 组)。第 1 天对 CeD 组的小鼠腹部两侧皮下注射 100 μ l 的 gliadin 与完全弗氏佐剂的乳液 (含 100 μ g gliadin), 对正常组的小鼠腹部两侧皮下注射 100 μ l 的 1 \times PBS 溶液。第 8 天对 CeD 组的小鼠腹部两侧皮下注射 100 μ l 的 gliadin 与不完全弗氏佐剂的乳液 (含 50 μ g gliadin), 对正常组的小鼠腹部两侧再次皮下注射 100 μ l 的 1 \times PBS 溶液。第 14 天, 测量注射 25 μ l gliadin 溶液 (2.5 mg/ml) 和 DMSO 溶液前后的 CeD 组, 小鼠的足底厚度。连续测量灌胃 0.2 ml gliadin 的 0.1 mol/L 醋酸溶液的小鼠体重。造模结束后, 处死小鼠, 测量小肠长度。利用实时荧光定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 检测小鼠十二指肠组织中的干扰素 (IFN)- γ 、白细胞介素-15 (IL-15)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、组织转谷氨酰胺酶 (TG2) 的水平。 **结果** gliadin 溶液刺激足底后, CeD 小鼠足底的厚度明显高于刺激前 [(3.25 \pm 0.05) mm *vs* (2.30 \pm 0.05) mm, P <0.01], CeD 组 (gliadin) 小鼠的足底肿胀程度为 (0.95 \pm 0.05) mm, 明显大于正常组的 (0.54 \pm 0.08) mm 及 CeD (DMSO) 组的 (0.53 \pm 0.21) mm (P <0.01)。相对于对照组, CeD 组小鼠出现体重下降、肠损伤。CeD 组的 TNF- α 、TG2、IL-15 和 IFN- γ 这 4 种乳糜泻发生的标志性产物的含量显著增加 (P <0.01)。 **结论** 该造模方法在肠损伤、肠道炎症等方面均能很好的模仿临床上乳糜泻的疾病特征, 可为未来乳糜泻治疗的研究提供基础。 **关键词:** 麦醇溶蛋白; 乳糜泻; 动物模型; 迟发超敏反应; 干扰素- γ ; 白细胞介素-15; 肿瘤坏死因子- α ; 组织转谷氨酰胺酶

中图分类号: R574.4 R-332 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2022)06-0770-05

Construction and evaluation of C57BL/6 celiac disease mouse model

YIN Shuang-shuang, FAN Wen-tao, FAN Zhi-ning, ZHAO Li-li, LIU Li

Department of Digestive Endoscopy, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China

Corresponding author: LIU Li, E-mail: kit9178@sina.com; ZHAO Li-li, E-mail: Lili_zhao15@163.com

Abstract: Objective To evaluate the feasibility of the mouse model of celiac disease (CeD) induced by gliadin through testing the relevant indexes of celiac disease. **Methods** Healthy C57BL/6 mice were randomly divided into normal group and CeD group. On Day 1, 10 mice in the CeD group were injected subcutaneously with 100 μ l complete Freund adjuvant (containing 100 μ g gliadin) on both sides of the abdomen, and the mice in the normal group were injected subcutaneously with 100 μ l 1 \times PBS solution on both sides of the abdomen. On Day 8, the CeD group were injected subcutaneously with 100 μ l Freund incomplete adjuvant (containing 50 μ g gliadin) on both sides of the abdomen, and the normal group were injected subcutaneously with 100 μ l 1 \times PBS solution on both sides of the abdomen again. On Day 14, the plantar thickness of mice in CeD group before and after injection of 25 μ l gliadin (2.5 mg/ml) or DMSO was measured. The body weight of mice was continuously measured by gavage of 0.2 ml gliadin in 0.1 mol/L acetic acid solution. After modeling, the mice were executed and the length of small intestine was measured. Real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the levels of interferon (IFN)- γ , interleukin-15 (IL-15), tumor necrosis factor α (TNF- α) and tissue transglutaminase (TG2) in mouse duodenum. **Results** After gliadin solution stimulated the plantar, the thickness of plantar was significantly higher than that before stimulation [(3.25 \pm 0.05) mm *vs* (2.30 \pm 0.05) mm, P <0.01]. The degree of plantar swelling in CeD (gliadin) group

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2022.06.006

基金项目: 江苏省“六大人才高峰”高层次人才项目 (WSW-006); 南京医科大学姑苏学院重点项目立项 (GSKY20220109)

通信作者: 刘莉, E-mail: kit9178@sina.com; 赵黎黎, E-mail: Lili_zhao15@163.com

出版日期: 2022-06-20

was (0.95±0.05) mm, which was significantly higher than that in normal group [(0.54±0.08) mm] and CeD (DMSO) group [(0.53±0.21) mm]. Compared with the control group, the mice in the CeD group had weight loss and intestinal injury. The level of TNF- α , TG2, IL-15 and IFN- γ in CeD group was significantly increased ($P<0.01$). **Conclusion** This modeling method can well imitate the clinical characteristics of celiac disease in terms of intestinal injury and intestinal inflammation, which provides a basis for the research of celiac disease treatment in the future.

Keywords: Gliadin; Celiac disease; Animal model; Delayed hypersensitivity; Interferon- γ ; Interleukin-15; Tumor necrosis factor- α ; Transglutaminase

Fund program: Selection and Training of High-Level Talents of "Six Talent Peaks" in Jiangsu Province (WSW-006); Key Project Approval of Suzhou College of Nanjing Medical University (GSKY20220109)

乳糜泻是遗传易感个体摄入含麸质蛋白制品而诱发的慢性自身免疫性肠病,全球流行率为1.4%,患者常伴随腹泻、腹痛、贫血和骨质疏松症^[1],研究报道乳糜泻能够增加患者结直肠癌风险^[2]。中国尚未建立相关诊断检测体系,人群诊断存在严重“冰山”现象,特别是以小麦为主食的北方人群^[3]。Dicke首先明确了小麦等类似谷物食物含有麸质蛋白免疫原,与疾病发生密切相关^[4]。目前乳糜泻的主要疗法是坚持终生严格无麸质饮食^[1],但是效果不理想;主要原因是小麦粉和麸质蛋白常被用做食品加工配料,而无麸质食物在日常中易受麸质污染,从而导致患者病情加重^[5]。而且无麸质产品较贵,维持无麸质饮食对患者及其家属来说是一项经济负担,这会导致患者焦虑、饮食紊乱、与社会隔离及其整体生活品质受损^[6-9]。根据报道,即使维持无麸质饮食,仍有30%的患者有持续性症状,60%的患者小肠绒毛萎缩的愈合也不理想^[10]。因此,迫切需要发展安全有效的替代无麸质饮食疗法。

近年来乳糜泻发病机制取得较为显著进展。麸质的脯氨酸含量高,胃肠消化酶无法有效降解麸质蛋白^[11]。因此,能够在乳糜泻患者中诱导适应性和先天免疫反应的长寡肽(与乳糜泻相关的自身抗原)持续存在于肠腔中,被内源性酶组织转谷氨酰胺酶(tissue transglutaminase TG2)催化脱酰胺,将特定的谷氨酰胺残基转化为谷氨酸。脱酰胺都会增加麸质肽与人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)-DQ2或DQ8异源二聚体的亲和力,随后两者的结合肽被抗原递呈细胞(antigen-presenting cell, APC)呈递给麸质特异性CD4⁺T细胞,导致它们激活、克隆扩增和促炎细胞因子的分泌,例如干扰素(interferon, IFN)- γ ^[12]。上皮和固有层中白细胞介素(interleukin, IL)-15的慢性上调是乳糜泻的标志,与患者的黏膜损伤程度呈正相关^[13]。本实验利用麦醇溶蛋白诱导小鼠乳糜泻模型,并通过检测乳糜泻相关指标评价该模型的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验相关试剂 麦醇溶蛋白(gliadin)、冰醋酸、二甲基亚砜(DMSO)、异丙醇、无水乙醇购自上海麦克林生化科技;完全弗式佐剂(CFA)、不完全弗式佐剂(IFA)、三氯甲烷购于美国Sigma公司;1×PBS购于美国Gibco公司;异硫氰酸荧光素-葡聚糖(FITC-Dextran)4000购于上海阿拉丁生化科技;RNA稳定保存液(RNAlater™)购于美国ThermoFisher Scientific公司。本实验所用C57BL/6小鼠购自南京医科大学动物中心生产部,通过动物实验伦理审核(伦理编号:IACUC-2009045)。

1.2 实验相关仪器 抗原乳化接头购于南京巴傲得生物科技;超声波细胞破碎仪购于南京先欧仪器制造;胰岛素注射针、1 ml注射器购于上海康德莱;游标卡尺购于广州锂阁科技;高速冷冻离心机、荧光定量PCR仪-QuantStudio 7、梯度PCR仪器购于美国ThermoFisher Scientific公司;多功能酶标仪购于美国基因公司;组织研磨仪购于武汉塞维尔公司;灌胃针购于广州翔博生物科技;96孔黑色透明平底板购于美国Corning公司。

1.3 实验方法

1.3.1 溶解 gliadin 称取30 mg的gliadin粉末,溶于5 ml的DMSO溶液,充分涡旋混匀后,于冰水环境中超声破碎(600 s, 4 s/4 s),使得其完全溶解。随后将所得溶液2 000 r/min离心5 min,取上清。

1.3.2 乳糜泻模型致敏试剂的制备 用1×PBS溶液将5 mg/ml的gliadin溶液稀释2.5倍,以1:1的比例与CFA混合,同时用1×PBS溶液将5 mg/ml的gliadin溶液稀释5倍,以1:1的比例与IFA混合,并通过注射器与抗原乳化接头分别将两者完全乳化,得到两种致敏乳液。

1.3.3 小鼠乳糜泻模型的造模实验 (1)将健康的C57BL/6小鼠随机分成2组:正常组与乳糜泻组(CeD组),每组各5只。(2)在第1天对CeD组的小

鼠腹部两侧皮下注射 100 μl 的 gliadin 与 CFA 的乳液(含 100 μg gliadin),对正常组的小鼠腹部两侧皮下注射 100 μl 的 1×PBS 溶液。随后,在第 8 天对 CeD 组的小鼠腹部两侧皮下注射 100 μl 的 gliadin 与 IFA 的乳液(含 50 μg gliadin),对正常组的小鼠腹部两侧再次皮下注射 100 μl 的 1×PBS 溶液。(3)第 14 天,测量小鼠足底厚度,随后将 gliadin 溶液(5 mg/ml)用 1×PBS 溶液稀释 2 倍,用胰岛素针注射 25 μl 该溶液于小鼠的足底,同时用胰岛素器注射 25 μl 的 DMSO 溶液于 CeD 组小鼠的另一侧足底,24 h 后测量足底厚度,对小鼠足底肿胀厚度对比分析。(4)从第 15 天开始,各组小鼠每天分别灌胃 0.2 ml gliadin 的 0.1 mol/L 醋酸溶液(含 gliadin 25 mg),同时每天测量体重,连续灌胃 14 d 后停止灌胃,汇总数据。(5)第 28 天开始,所有小鼠禁食 24 h,在第 29 天,予以 0.2 ml 的 FITC-葡聚糖 4000(以 50 mg/ml 的浓度溶于 PBS 溶液),2 h 后收集血清测吸光度。计算出血清中的 FITC-葡聚糖浓度。(6)处死所有小鼠,将肠段全部取出,测量小肠长度,以正常组小肠长度为基线,计算 CeD 组鼠小肠的萎缩程度,最后进行比较分析。(7)取十二指肠肠段,取部分进行实时荧光定量 PCR 实验。另一段将其放入提前准备好的 4%多聚甲醛中避光固定 24~36 h 后,行石蜡包埋,采用苏木精-伊红染色(HE)法观察组织形态。

1.3.4 总 RNA 提取与实时荧光定量 PCR 本实验采用 TRIzol 法来提取小鼠十二指肠中的总 RNA。称取适量的十二指肠组织加入 1 ml TRIzol 中,然后在组织研磨仪中进行研磨,加入三氯甲烷进行抽提,离心后取上清液,随后加入等体积的异丙醇沉淀 RNA 后离心,弃上清,用 75%的乙醇(DEPC 水配制)清洗后离心,风干沉淀,用 DEPC 水溶解沉淀。使用 PrimeScript™ RT Master Mix 进行逆转录。使用 TB Green Premix Ex Taq 试剂配置 20 μl 实时荧光定量(RT-qPCR)体系,5 μl 2×TB Green Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus),0.2 μl ROX Reference Dye II、0.2 μl 上游引物、0.2 μl 下游引物、2.5 μl 稀释后的互补 DNA(cDNA)和 1.9 μl 无菌 ddH₂O。按照基因相对表达水平 = 2^{-ΔΔCt} 来计算目的基因[IFN-γ、IL-15、肿瘤坏死因子 α (TNF-α)、TG2]相对管家基因(Actb)的表达变化。实时荧光定量 PCR 相关引物见表 1。

1.4 统计学方法 所有数据采用 SPSS 23.0 进行统计分析。采用 GraphPad Prism 8 进行图形绘制。采用 ImageScope 处理病理图片及绒毛长度、隐窝深度测量。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布且满足方

差不齐性的两组比较采用 Student's *t* 检验进行分析,不满足方差齐性的数据采用校正 *t* 检验进行分析;不符合正态分布的数据采用非参数检验进行分析。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

表 1 实时荧光定量 PCR 相关引物
Tab. 1 Specific primers for RT-qPCR

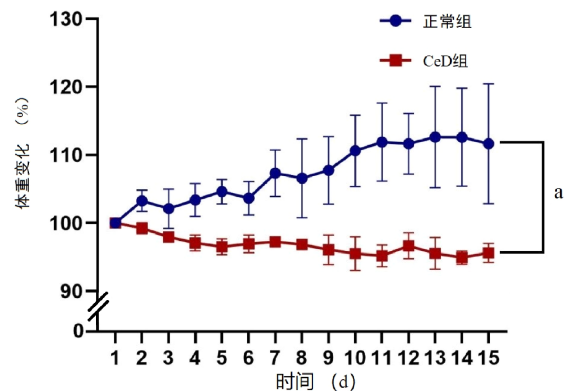
基因	正向序列(5'-3')	反向序列(5'-3')
Actb	GGCTGTATTCCCTCCATCG	CCAGTTGTAACAATGCCATGT
IL-15	CATCCATCTCGTCTACTTGTG	GCCTCTGTTTTAGGGAGACCT
TGM2	GCTGGACCAACAGGACAATGT	CTCTAGGCTGAGACGGTACAG
IFN-γ	GCCACGGCACAGTCATTGA	TGCTGATGGCCTGATTGCTTT
TNF-α	CCCACGTCGTAGCAAACCA	CCGGACTCCGCAAAGTCTAA

2 结果

2.1 乳糜泻模型迟发超敏实验 在用 gliadin 溶液刺激足底后,小鼠足底的厚度明显高于刺激前的足底厚度[(3.25±0.05)mm vs (2.30±0.05)mm, *P* < 0.01],同时,CeD(gliadin)组小鼠的足底肿胀程度为(0.95±0.05)mm,明显大于正常组的(0.54±0.08)mm及 CeD(DMSO)组的(0.53±0.21)mm,差异均有统计学意义(*P* < 0.01)。

2.2 小鼠乳糜泻模型的验证

2.2.1 gliadin 引起的乳糜泻相关的表现指标变化 乳糜泻的典型表现是体重下降及肠道损伤,其中,在体重变化这一方面,CeD 组的小鼠在经过 14 天的 gliadin 灌胃之后,体重下降至初始体重的(95.61±1.40)%,相比于正常组小鼠的体重变化[上升至初始体重的(111.64±8.80)%],体重下降趋势明显(图 1)。



注:a 为 *P* < 0.01。

图 1 小鼠体重变化

Fig. 1 Weight change of mice

肠道损伤方面,从小肠长度、通透性及绒毛长度与隐窝深度比例(V/C)这三个方面来验证乳糜泻模型。(1)小肠长度:相比于正常组,CeD 组的小鼠在

长度上萎缩至(80.00±1.10)% ($P<0.01$);(2)肠道通透性:CeD组小鼠的血清 FITC-葡聚糖 4000 浓度为(1.45±0.26) $\mu\text{g}/\text{ml}$,明显大于正常组的(0.93±0.04) $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($P<0.01$);(3)绒毛长度与隐窝深度比例(V/C):CeD组小鼠的V/C为2.77±0.61,正常组小鼠的V/C为4.91±0.87,CeD组小鼠的V/C比例显著降低($P<0.01$)。

2.2.2 gliadin 引起的乳糜泻小鼠的炎症因子的变化

CeD组的TNF- α 和IFN- γ 表达显著高于正常组($P<0.01$)。相对正常组而言,IL-15在CeD组十二指肠组织中的表达显著升高($P<0.01$),CeD组的TG2在基因上的表达水平明显高于正常组($P<0.05$)。见表2。

表2 乳糜泻小鼠十二指肠组织炎症因子 mRNA 相对表达量 ($n=15, \bar{x}\pm s$)

Tab. 2 Relative expression of inflammatory factor mRNA in duodenum of CeD mice ($n=15, \bar{x}\pm s$)

分组	TNF- α	IFN- γ	IL-15	TG2
正常组	1.010±0.038	1.088±0.133	1.000±0.009	1.000±0.011
CeD组	3.180±0.601	2.097±0.402	1.862±0.209	1.107±0.120
<i>t</i> 值	4.405	2.799	2.984	2.136
<i>P</i> 值	<0.001	0.009	0.006	0.042

3 讨论

乳糜泻是麸质致敏导致的慢性免疫疾病,全球超过1%人口受其困扰。目前乳糜泻动物模型研究仍较少,妨碍新治疗策略等研究开发,亟需发展简便可靠的乳糜泻动物模型支持创新诊疗研究。

已知佐剂可增强先天性和适应性免疫反应。其中,将CFA与抗原的溶液完全乳化是在啮齿动物中诱发自身免疫性疾病最广泛的使用方法,CFA(矿物油加表面活性剂中的热灭活结核分枝杆菌)是在自身免疫性疾病研究模型中引发相应抗原的细胞介导免疫(CMI)的“金标准”佐剂^[14]。然而,在啮齿动物中诱发自身免疫性疾病有时需要两次皮下注射CFA,对动物重复给予CFA会导致多处注射部位效应,最常见的是肉芽肿和疼痛。IFA由85%的矿物油(石蜡油)和15%的乳化剂(甘露醇单油酸酯)组成,与水相结合形成油包水乳液^[15]。IFA缺乏CFA中的结核分枝杆菌,因此它可以最大限度地减少副作用,与抗原的水溶液完全乳化已被证明可以增强动物的抗原特异性免疫反应^[16]。

本研究建立C57BL/6乳糜泻模型,结合迟发超敏模型诱导和麸质蛋白灌胃致敏,简化了造模要求,无需无麸质蛋白饲料的严格控制。乳糜泻模型组小

鼠肠管皱缩、绒毛萎缩、V/C减少,发生抗原特异性肠道屏障损伤,肠道通透性增加。乳糜泻在破坏肠道屏障的同时,在受到gliadin刺激后也会使得肠道内的各种细胞释放许多炎症因子,从而导致局部的免疫反应^[17-18]。与此同时,在固有层中,CD4⁺T免疫细胞受gliadin的刺激^[19],促进Th1细胞因子的分泌,即IFN- γ 和TNF- α 。这种反应会导致基质降解、黏膜重塑、绒毛萎缩、隐窝细胞增生和上皮内细胞数量增加^[20]。乳糜泻标志细胞因子IFN- γ 、IL-15、TG2均在CeD组小鼠肠组织中增加。本研究结果与Masaebi等^[21]检测乳糜泻患者所得的结果相符。TG2作为乳糜泻发病机制的核心,其在被激活后可使得gliadin脱酰胺,从而增加gliadin的免疫原性,促进APC发挥作用,增强免疫反应对上皮的破坏程度^[22]。无论是体重减轻、肠损伤,迟发超敏反应等乳糜泻的表观特征,还是IFN- γ 、IL-15这类乳糜泻的标志性炎症因子,以及乳糜泻机制的关键因子TG2均证实小鼠模型肠道屏障受损并发展麸质抗原特异性的免疫反应。与IFN- γ 同时分泌的TNF- α 在乳糜泻模型中也有明显的上升,进一步确定模型构建成功。

利益冲突 无

作者贡献 殷双双、范文涛对本研究贡献相同

参考文献

- [1] Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms [J]. Gut, 2013, 62(1): 43-52.
- [2] Leibold B, Green PHR, Emilsson L, et al. Cancer risk in 47,241 individuals with celiac disease: a nationwide cohort study [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2022, 20(2): e111-e131.
- [3] 袁娟丽. 中国青年人群的乳糜泻风险性分析 [D]. 南昌: 南昌大学, 2014.
Yuan JL. Risk analysis of celiac disease in Chinese young population [D]. Nanchang: Nanchang University, 2014.
- [4] Lammers KM, Herrera MG, Dodero VI. Translational chemistry meets gluten-related disorders [J]. ChemistryOpen, 2018, 7(3): 217-232.
- [5] Yoosuf S, Makharia GK. Evolving therapy for celiac disease [J]. Front Pediatr, 2019, 7: 193.
- [6] Mårild K, Størdal K, Bulik CM, et al. Celiac disease and anorexia nervosa: a nationwide study [J]. Pediatrics, 2017, 139(5): e20164367.
- [7] Silvester JA, Weiten D, Graff LA, et al. Living gluten-free: adherence, knowledge, lifestyle adaptations and feelings towards a gluten-free diet [J]. J Hum Nutr Diet, 2016, 29(3): 374-382.
- [8] Shah S, Akbari M, Vanga R, et al. Patient perception of treatment burden is high in celiac disease compared with other common conditions [J]. Am J Gastroenterol, 2014, 109(9): 1304-1311.
- [9] Zingone F, Swift GL, Card TR, et al. Psychological morbidity of celiac disease: a review of the literature [J]. United European Gastroenterol

- J,2015,3(2):136-145.
- [10] Lebwohl B, Granath F, Ekblom A, et al. Mucosal healing and risk for lymphoproliferative malignancy in celiac disease: a population-based cohort study[J]. *Ann Intern Med*, 2013, 159(3):169-175.
- [11] Shan L, Molberg Ø, Parrot I, et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue[J]. *Science*, 2002, 297(5590):2275-2279.
- [12] Kivelä L, Caminero A, Leffler DA, et al. Current and emerging therapies for coeliac disease[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(3):181-195.
- [13] di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cupelli F, et al. Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease[J]. *Gut*, 2006, 55(4):469-477.
- [14] Vogel FR. Improving vaccine performance with adjuvants[J]. *Clin Infect Dis*, 2000, 30(Suppl 3):S266-S270.
- [15] Koh YT, Higgins SA, Weber JS, et al. Immunological consequences of using three different clinical/laboratory techniques of emulsifying peptide-based vaccines in incomplete Freund's adjuvant[J]. *J Transl Med*, 2006, 4:42.
- [16] Dietrich FM. The immune response of c57bl-6 mice to protein antigens incorporated into Freund's incomplete adjuvant[J]. *Pathol Microbiol (Basel)*, 1964, 27:1025-1034.
- [17] Korponay-Szabó IR, Halttunen T, Szalai Z, et al. *In vivo* targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies[J]. *Gut*, 2004, 53(5):641-648.
- [18] Kagnoff MF. Overview and pathogenesis of celiac disease[J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(4 Suppl 1):S10-S18.
- [19] Koning F. Pathophysiology of celiac disease [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2014, 59(Suppl 1):S1-S4.
- [20] Lionetti E, Catassi C. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment [J]. *Int Rev Immunol*, 2011, 30(4):219-231.
- [21] Masaebi F, Azizmohammad Looha M, Rostami-Nejad M, et al. The predictive value of serum cytokines for distinguishing celiac disease from non-celiac gluten sensitivity and healthy subjects[J]. *Iran Biomed J*, 2020, 24(6):340-346.
- [22] Sulic AM, Kurppa K, Rauhavirta T, et al. Transglutaminase as a therapeutic target for celiac disease[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2015, 19(3):335-348.

收稿日期:2022-03-23 编辑:叶小舟

(上接第769页)

- [7] 《中国循环杂志》编辑部.《中国成人血脂异常防治指南(2016年修订版)》补充说明[J]. *中国循环杂志*, 2017, 32(1):53. Editorial Department of Chin Circ J. Chinese Adult Dyslipidemia Prevention and Treatment Guidelines (2016 Revised Edition) [J]. *Chin Circ J*, 2017, 32(1):53.
- [8] Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel[J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(32):2459-2472.
- [9] Navarese EP, Robinson JG, Kowalewski M, et al. Association Between Baseline LDL-C Level and Total and Cardiovascular Mortality After LDL-C Lowering: A Systematic Review and Meta-analysis [J]. *JAMA*, 2018, 319(15):1566-1579.
- [10] Baigent C, Blackwell L, Emberson J, et al. 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.
- [11] Tziomalos K, Katrini K, Papagianni M, et al. Impaired antioxidative activity of high-density lipoprotein is associated with more severe acute ischemic stroke[J]. *Metabolism*, 2019, 98:49-52.
- [12] Khatana C, Saini NK, Chakrabarti S, et al. Mechanistic Insights into the Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Atherosclerosis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020:5245308.
- [13] Barbalho SM, Tofano RJ, de Oliveira MB, et al. HDL-C and non-HDL-C levels are associated with anthropometric and biochemical parameters[J]. *J Vasc Bras*, 2019, 18:e20180109.
- [14] Tziomalos K, Giampatzis V, Bouziana SD, et al. Prognostic significance of major lipids in patients with acute ischemic stroke [J]. *Metab Brain Dis*, 2017, 32(2):395-400.
- [15] Zhao Q, Liu F, Wang YH, et al. LDL-C: HDL-C ratio and common carotid plaque in Xinjiang Uyghur obese adults: a cross-sectional study [J]. *BMJ Open*, 2018, 8(10):e022757.
- [16] Cappelletti A, Astore D, Godino C, et al. Relationship between Syntax Score and prognostic localization of coronary artery lesions with conventional risk factors, plasma profile markers, and carotid atherosclerosis (CAPP Study 2) [J]. *Int J Cardiol*, 2018, 257:306-311.
- [17] Zhang XX, Wei M, Shang LX, et al. LDL-C/HDL-C is associated with ischaemic stroke in patients with non-valvular atrial fibrillation: a case-control study [J]. *Lipids Health Dis*, 2020, 19(1):217.

收稿日期:2022-02-18 修回日期:2022-03-07 编辑:石嘉莹