



中医痰湿体质基因表达谱研究

李玲孺¹, 冯娟², 姚海强¹, 谢兰², 侯淑涓¹, 赵时鹏¹, 孙冉冉¹, 武彦伶¹, 白彤彤¹,
李英帅¹, 俞若熙¹, 王济^{1*}, 王琦^{1*}

1. 北京中医药大学, 中医体质与生殖医学研究中心, 北京 100029;

2. 清华大学, 医学系统生物学研究中心, 北京 100083

* 联系人, E-mail: doctorwang2009@126.com; wangqi710@126.com

收稿日期: 2016-07-25; 接受日期: 2016-09-27; 网络版发表日期: 2017-03-12

国家自然科学基金(批准号: 81503471)和北京市自然科学基金(批准号: 7162118)资助

摘要 中医体质理论与个体化医学理念相通, 在疾病防治个体化中发挥着重要作用. 痰湿体质作为体质类型的一种, 存在其独特的特征及发病倾向性. 对比痰湿体质与平和体质(健康人)外周血单个核细胞全基因组表达谱, 在 $FDR < 0.05$ 且 $FC \geq 1.5$ 条件下, 共获得355个差异基因. GO注释和信号通路富集分析显示, 差异基因主要与代谢紊乱密切相关. 通过qRT-PCR验证, 发现*ELOVL7*, *PRKARIA*, *SOC3*, *ACSL4*, *CLU*及*ABCG1*等6个基因在痰湿体质中表达与平和体质相比存在显著差异. 该研究表明, 基于体质分类的个体差异存在其生物学基础. 痰湿体质的特征基因识别为该体质的分子机制研究及相关疾病探索奠定了基础.

关键词 痰湿体质, 基因表达谱, 代谢紊乱, 动脉硬化

个体差异是医学界共同关注的现象, “个体化医学”一词首见于1956年Williams^[1]撰写的*Biochemistry Individuality*. 随着后基因组时代的到来, 个体化精准医学受到越来越多的关注, 基因诊断和治疗可以用于多种疾病的防治, 特别是肿瘤疾病^[2,3]. 中医亦有个体化医学的概念, 即20世纪70年代提出的中医体质学说^[4]. 体质学研究发现, 一般人群可以分为9种体质, 包括1种平和体质和8种偏颇体质(气虚体质、阳虚体质、阴虚体质、痰湿体质、湿热体质、血瘀体质、气郁体质和特禀体质). 每种体质都有其特定的生理和心理特征, 存在某些(或某类)疾病的发病倾向性, 应区别对待^[5]. 中医体质学理念为健康促进提供了一个全新的思维方式^[6]. 2009年, 中华中医药学会颁布了

《中医体质分类与判定》标准, 体质辨识及分类方法在全国得到推广应用^[7].

痰湿体质为9种体质之一. 通过文献调研和临床经验总结, 凝练出痰湿体质的主要特征, 包括面部油脂分泌增加、面色晦暗、面部和眼睑浮肿、多汗且黏稠、胸闷、多痰、腹部肥满、容易疲倦、四肢沉重、舌苔厚腻和滑脉等^[8], 痰湿体质者对梅雨季节和潮湿环境适应能力差, 易患湿证, 多性格温和、平静, 比较有耐心, 善与人相处^[9]. 流行病学调查显示, 痰湿体质与糖尿病、高血压和代谢综合征高度相关^[10-12].

虽然前期研究对痰湿体质的生理、心理特征进行了描绘, 但是尚未对其分子基础进行揭示. 本研究进行了痰湿体质和平和体质(健康人)全基因组表达谱

引用格式: 李玲孺, 冯娟, 姚海强, 等. 中医痰湿体质基因表达谱研究. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 305-313, doi: 10.1360/N052017-00016
英文版见: Li L R, Feng J, Yao H Q, et al. Gene expression signatures for phlegm-dampness constitution of Chinese Medicine. Sci China Life Sci, 2017, 60: 105-107, doi: 10.1007/s11427-016-0212-9

对比分析,筛选出区别痰湿质与平和质的信号通路和特征基因。痰湿体质特征基因有利于进一步探索该体质的分子机制和发病倾向。

1 材料与方法

1.1 诊断标准

痰湿质和平和质诊断采用《中医体质分类与判定》标准^[7]。

1.2 纳入与排除标准

纳入标准:符合体质诊断标准;年龄在18~60岁之间;签署知情同意书。

排除标准:兼夹体质;患有代谢性疾病及其他明确诊断疾病;正在服药者;孕妇及哺乳期妇女。

1.3 研究对象

选择2011年4月~2012年1月在北京普仁医院体检中心及北京中医药大学国医堂体质门诊体检人群36例的外周血单个核细胞进行表达谱分析。其中痰湿质组(T, $n=19$),平和质组(N, $n=17$),两组性别、年龄、体重指数等无差异($P>0.05$)。选择原始样品(4T对3N)和另一独立的30个受试者(15T对15N,基本信息总结在表1中)进行qRT-PCR验证。研究通过北京中医药大学医学实验动物伦理委员会批准(2012BZYLL0301),

所有参与者自愿参加这项研究并获得知情同意。

1.4 样品采集、单核细胞分离、RNA制备和基因表达谱检测

样品采集:抽取受试者空腹静脉血10 mL,嘱采集样品前1天禁酒和劳累,女性避开月经期。早晨9点北京市普仁医院统一采集空腹静脉血5 mL,乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)抗凝,并放置于冰盒中。5 mL促凝,分离血清,在医院检验科进行空腹血糖及血脂四项检测。

外周血单个核细胞分离:于2 h内分离抗凝血中的外周血单个核细胞,置 -80°C 冰箱备检。分离PBMC实验条件及步骤:(i)在短管中加入4 mL淋巴细胞分离液;(ii)取EDTA抗凝静脉血4 mL与等量磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)混匀,沿管壁缓缓倒入分离液上,注意一定要缓慢,保持界面清楚。1413 $\times g$ 水平离心20 min,将加速度调到最低;(iii)离心后管内分为3层,上层为血浆和PBS液,下层为红细胞和粒细胞,中层为淋巴细胞分离液,在上中层界面处有以单个核细胞为主的白色云雾层狭窄带;(iv)用毛细吸管插到云雾层,吸取单个核细胞,加入5倍以上PBS液。再加入1 mL红细胞裂解液,453 $\times g$ 离心3 min,洗涤两次;(v)末次离心后,弃上清,加入TRIZOL稳定剂,置于 -80°C 冰箱内冻存。

表1 痰湿质组与平和质组基线资料比较^{a)}

项目	N ($n=17$)	T ($n=19$)	P 值
性别(男/女)	7/10	8/11	1.000 ^{NS}
年龄	34.06 $\pm$ 9.44	37.44 $\pm$ 9.53	0.299 ^{NS}
腰围(cm)	80.67 $\pm$ 7.67	81.31 $\pm$ 7.29	0.798 ^{NS}
体重指数(kg/m ²)	21.81 $\pm$ 2.07	21.89 $\pm$ 2.28	0.438 ^{NS}
体脂防率(%)	23.13 $\pm$ 5.20	24.40 $\pm$ 5.05	0.465 ^{NS}
舒张压(mmHg)	76.59 $\pm$ 12.79	74.05 $\pm$ 12.10	0.545 ^{NS}
收缩压(mmHg)	105.35 $\pm$ 12.14	112.47 $\pm$ 12.79	0.590 ^{NS}
空腹血糖(mmol/L)	4.70 $\pm$ 0.43	4.95 $\pm$ 0.42	0.089 ^{NS}
甘油三酯(mmol/L)	1.01 $\pm$ 0.27	1.29 $\pm$ 0.55	0.304 ^{NS}
总胆固醇(mmol/L)	4.44 $\pm$ 0.96	4.55 $\pm$ 0.79	0.698 ^{NS}
高密度脂蛋白(mmol/L)	1.42 $\pm$ 0.41	1.35 $\pm$ 0.26	0.552 ^{NS}
低密度脂蛋白(mmol/L)	2.40 $\pm$ 0.79	2.34 $\pm$ 0.62	0.912 ^{NS}

a) 数据采用 $\bar{x}\pm\text{SD}$ 表示。采用 T 检验和非参数检验进行两组之间差异统计(NS: 没有差异, $P>0.05$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$)

RNA抽提与Affymetrix基因芯片杂交: RNA抽提参照RNeasy kit(Invitrogen,美国)说明书进行,并用RNeasy kit(Qiagen, 德国)纯化,并经分光光度计($A_{280/260}$)和2.0%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA浓度和片段完整性. 将抽提的总RNA与人类基因组U133 Affymetrix plus 2.0表达谱芯片进行杂交. 样品制备包括: RNA抽提, RNA扩增, cDNA合成, cRNA纯化、洗脱、片段化, 第二次洗涤后与生物素标记孵育, 芯片的杂交、染色、扫描.

1.5 微阵列数据的统计分析

原始数据预处理: 通过RMA方法进行背景矫正、数据归一化处理; 斑点强度过滤; 基因表达值log₂转化.

经过归一化和转化后, 过滤筛选出芯片之间误差较小的基因. 采用多维标度(multidimensional scaling, MDS)对样品基因表达值进行降维处理, 以便更直观地描述样品基因表达值之间的距离.

采用线性模型和经验贝叶斯方法进行差异表达基因筛选^[13], 采用BH FDR算法对P值进行校正^[14]. FDR(false discovery rate)<0.05且FC(fold change)≥1.5, 差异有统计学意义.

利用GO分析对差异表达基因的主要功能进行分析^[15]. 采用费希尔精确(Fisher)检验对GO类别进行分类($P<0.01$).

对差异表达基因富集的信号通路进行分析, 从KEGG网站(<http://www.genome.jp/kegg/>)下载信号通路的注释^[16]. 同样采用Fisher检验确定显著富集的通路.

1.6 实时荧光定量PCR

对每份样本进行总RNA提取后, 利用Turbo DNA消化试剂盒(ABI, 美国)去除基因组DNA的污染, 之后反转成cDNA. 实时荧光定量PCR采用SYBR染料在96孔板进行, 设置复孔, 总反应体系为10 μL. PCR反应温度循环条件为: 95℃ 3 min后, 95℃, 10 s, 60℃, 30 s重复40个温度循环.

2 结果

2.1 痰湿质组与平和质组基础资料比较

两组在性别、年龄、体重指数(body mass index, BMI)、腰围、血压、空腹血糖、甘油三酯、总胆固

醇、高密度脂蛋白或低密度脂蛋白方面无显著差异($P>0.05$).

2.2 基于全基因组表达谱进行痰湿质组和平和质组的识别

采用非监督聚类法, 根据所有探针的表达值可以将36个样品分为两个组, 与宏观体质量表分类几乎吻合, 仅有N134/N108/T180/T179/T175/T168等6个样品离散(图1A). 36个样本全基因组表达谱的MDS分析结果显示, 36个样本明显分为两组, 只有少数样本出现分类错误(图1B).

2.3 痰湿组和平和组的差异表达基因

中医体质诊断主要采用量表主观判定, 难免存在患者夸大或低估自身症状的情况. 因此, 选择体质判定和基因表达聚类重叠的样本进行后续分析, 即剔除N134, N108, T180, T179, T175和T168共计6个样本.

与平和质组相比, 痰湿质组共有355个差异表达基因(391个探针, $FC\geq 1.5$, $FDR<0.05$), 包括189个上调基因和166个下调基因. 在355个差异表达基因的基础上, 通过监督聚类(图2A)可以将30个受试者明确地分为两组. 基于表达谱基因表达值, 189个基因显示在痰湿组中的表达显著高于平和组(图2B), 而166个基因显示出相反的模式(图2C).

2.4 上调基因GO注释和通路分析

GO分析显示, 189个上调基因富集在21个生物过程, 如血小板活化、血小板脱粒和凝血等, 完整列表如图3A所示.

信号通路分析显示, 上调基因富集在吞噬体、ECM-受体相互作用、黏着斑、造血细胞谱系、疟疾和线粒体中脂肪酸链延长等通路中(图3B).

2.5 下调基因GO注释和通路富集分析

GO分析显示, 166个下调表达基因富集在14个生物过程, 包括胆固醇生物合成和细胞内胆固醇转运的正调节和钙离子依赖性胞外分泌的负调节. 完整列表如图4A所示.

信号通路分析显示, 下调基因富集在脂肪细胞因子信号通路、胰岛素信号通路、PPAR信号通路和肥大性心肌病等信号通路(图4B).

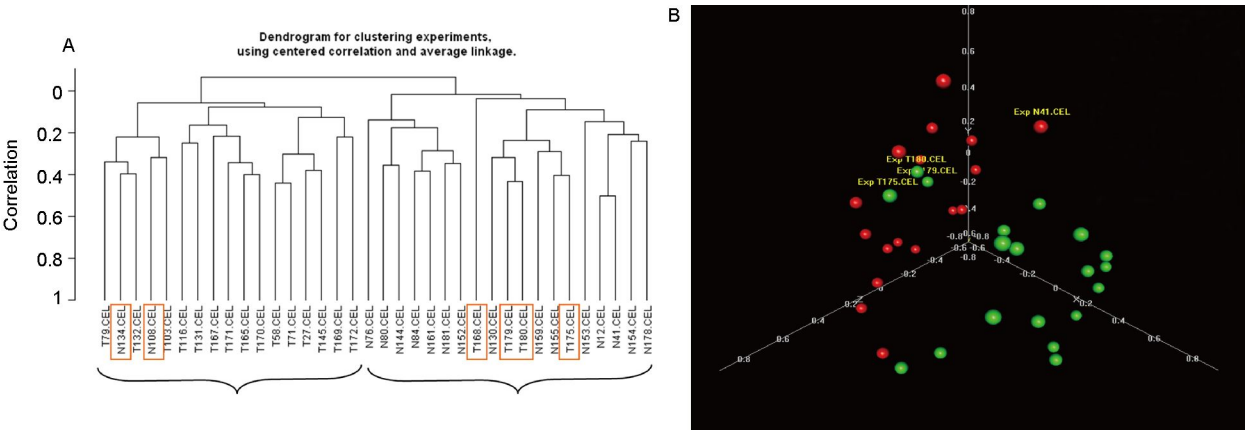


图1 痰湿质和和平和质样本基因表达谱非监督聚类结果和MDS

A: 36个样本的非监督层次聚类; B: 36个样本全基因组表达谱MDS展示. 红点: 平和质组(N); 绿点: 痰湿质组(T)

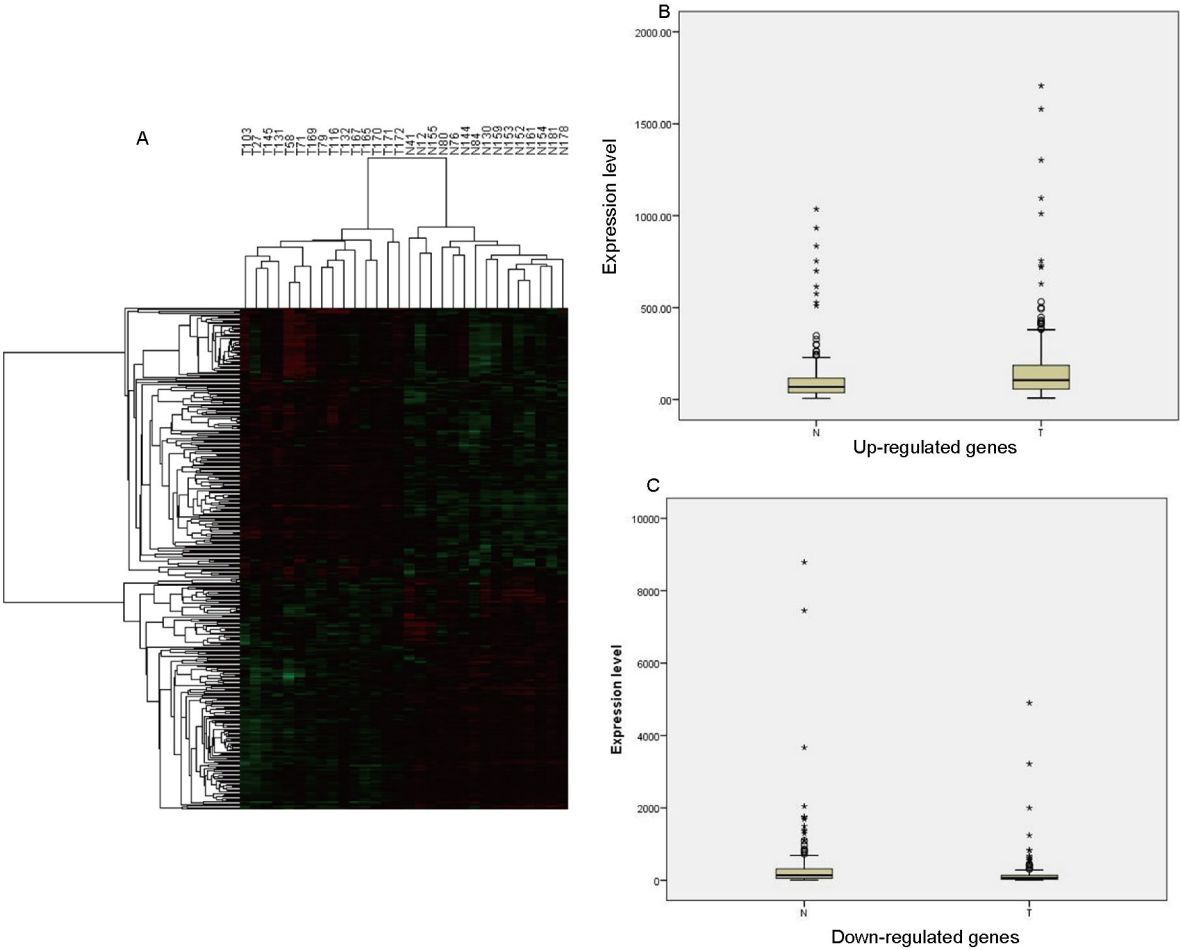


图2 30例痰湿质和和平和质样本基因表达谱差异表达基因的监督聚类结果和表达水平分析

A: 30例样本监督聚类. 绿到红: 表达值由低到高; B: 189个上调基因表达箱线图. 痰湿(T)和正常组(N), $P<0.01$. C: 166个下调基因表达箱线图, 痰湿(T)和正常组(N), $P<0.01$

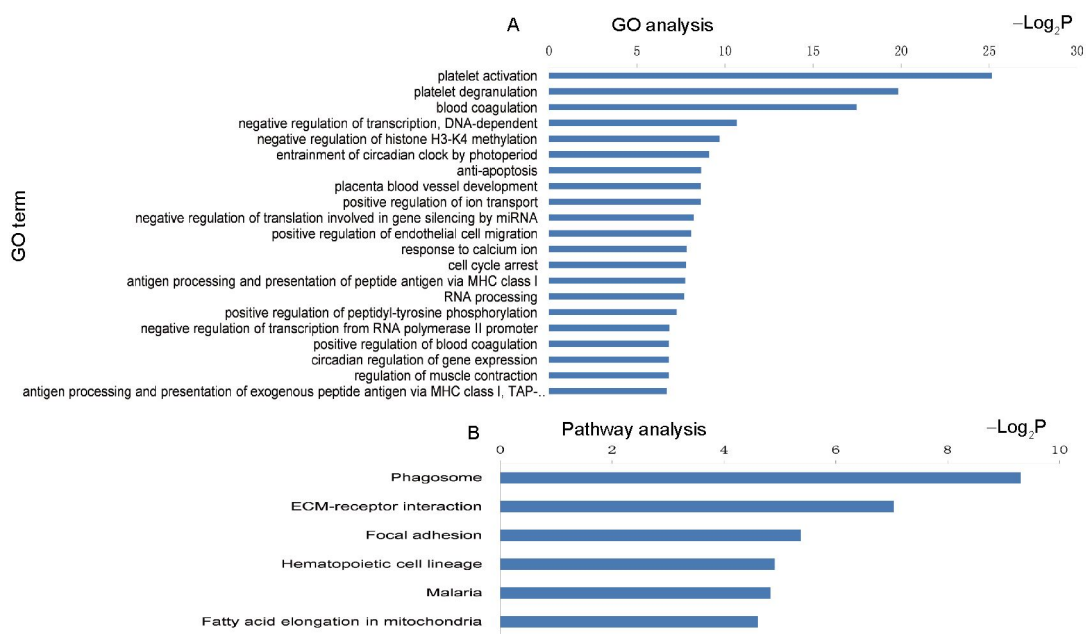


图 3 痰湿体质人群中上调基因富集的GO和信号通路分析
A: 上调基因的GO分析; B: 上调基因的信号通路分析

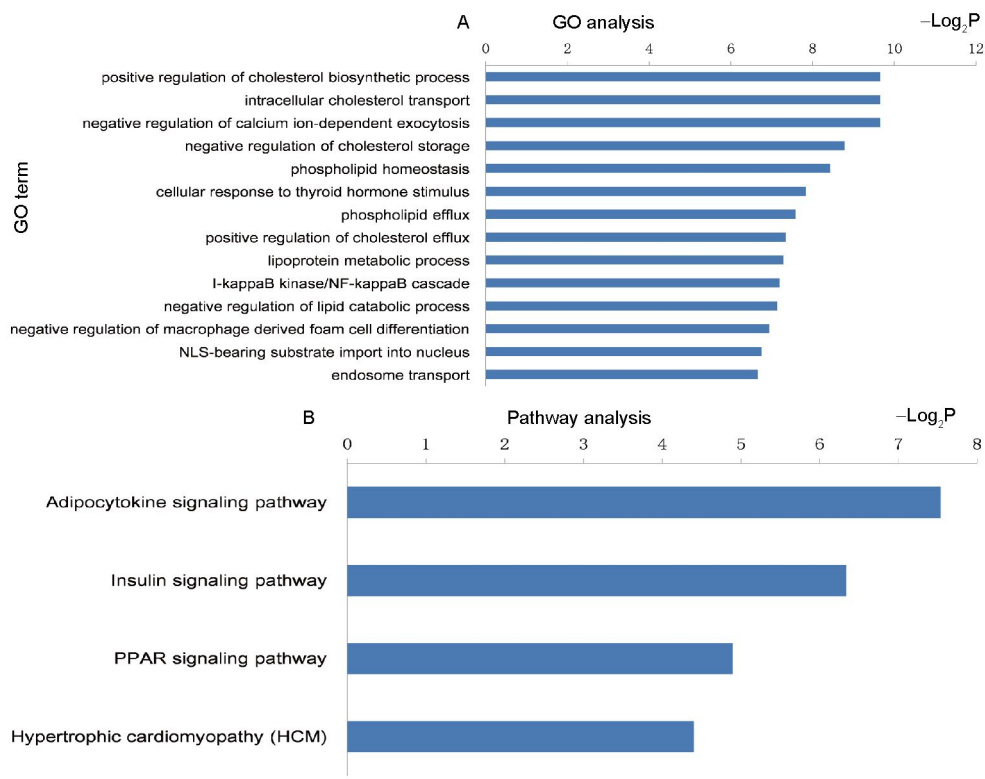


图 4 痰湿体质人群中下调基因富集的GO和信号通路分析
A: 下调基因的GO分析; B: 下调基因的信号通路分析

2.6 差异表达基因的qRT-PCR验证

上述分析结果显示,痰湿体质差异表达基因明显富集在糖脂代谢相关信号通路,这些信号通路上的差异基因可能是痰湿质区别于平和质的分子基础。本课题组最终选取了与糖脂代谢有关的通路或生物过程中的6个差异基因进行qRT-PCR验证: *ELOVL7*(elongation of very long-chain fatty acids protein 7)与线粒体脂肪酸延长链相关; *PRKAR1A*(protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit alpha)和*SOCS3*(suppressor of cytokine

signaling 3)与胰岛素信号通路相关; *ACSL4*(acyl-CoA synthetase long-chain family member 4)与*PPAR*信号通路相关; *CLU*(clusterin)与脂质代谢相关; *ABCG1*(ATP binding cassette subfamily G member 1)与胆固醇代谢相关。对原始样品(4T对3N)和独立样品(15T对15N)合并检测结果显示,上述6个基因表达呈显著性差异($P<0.05$)(图5)。其中,*ELOVL7*、*SOCS3*、*ACSL4*和*CLU*在痰湿组中表达上调,而*PRKAR1A*和*ABCG1*在痰湿组中表达下调。

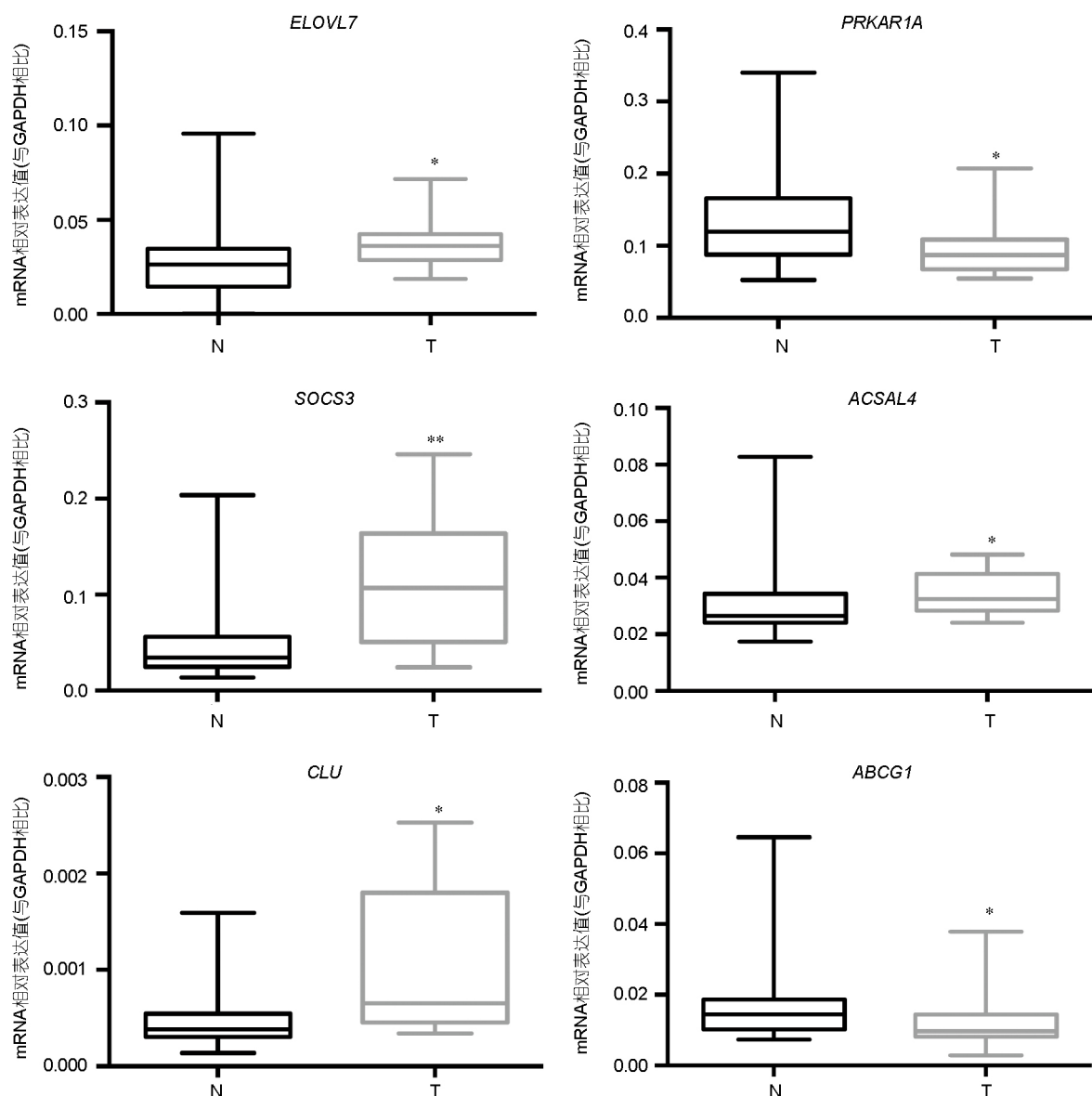


图5 痰湿质和平和质差异表达基因qRT-PCR验证

箱线图展示平和质组(黑色线条)和痰湿质组(灰色线条) mRNA表达值。差异统计采用T检验。*: $P<0.05$; **: $P<0.01$

3 讨论

3.1 痰湿体质与平和体质可通过外周血全基因组表达谱进行分类

体质是整体健康状态的体现, 采用机体的任何特定组织进行研究都会有失偏颇. 文献研究表明, 血细胞和全身9个脏器相比, 80%的转录组是相同的^[13,17], 因此本课题组提出外周血可以反映机体整体状况, 可用于体质的生物标志物筛选.

实验结果显示, 在不给定样本体质分类信息的情况下, 利用全基因组表达值对样本进行非监督聚类分析, 所有样本明显聚成两类, 与体质宏观分类法几乎吻合(图1). 并且两组受试者均无明确疾病诊断, 属于一般健康人群. 因此, 本课题组认为, 个体化同时适用于健康人群辨识和疾病诊断. 中医体质分类法可以针对健康人群进行分类, 并且存在相应的分子基础.

前期研究发现, 痰湿体质无论肥胖与否, 均与代谢性疾病密切相关. 文献研究表明, 正常体重呈现代谢紊乱亦为常见现象^[18,19], 然而由于体重未超标, 通常被忽视. 痰湿体质的诊断可能有助于识别该类人群.

3.2 差异基因分析显示痰湿体质存在代谢紊乱潜在风险

采用两组间355个差异表达基因进行监督聚类分析, 可以将痰湿质和平和质完全区分. 差异基因GO和信号通路富集分析显示, 差异表达基因主要集中在代谢紊乱相关疾病分子特征中. 这与前期文献和流行病学调查结果一致, 即痰湿体质与糖尿病、高血压、高脂血症和代谢综合征密切相关.

脂肪酸代谢调节是非酒精性脂肪肝、2型糖尿病(T2DM)、胰岛素抵抗和代谢综合征(MS)发病的促发因素^[20]. 信号通路分析显示, 上调表达基因富集在线粒体脂肪酸链延长信号通路. 其中, *ELOVL7*基因在痰湿质组表达显著上调. *ELOVL7*为极长链脂肪酸延伸家族*ELOVL*成员之一. 由*ELOVL*编码的脂肪酸延伸酶, 催化极长链脂肪酸合成中的第一步和限速步骤, 在脂肪酸代谢^[21]、三酰基甘油合成^[22]和其他代谢疾病中起重要作用. 抑制*ELOVL*基因表达是改善胰岛素耐受性、糖尿病和心血管风险的潜在治疗方法, 即使是长期处于肥胖状态的人亦可得到改善^[21,23].

胰岛素信号通路是典型代谢信号通路, 胰岛素信

号通路抑制会导致胰岛素抵抗和代谢性疾病^[24]. 信号通路分析显示, 下调基因富集在胰岛素信号通路. 其中, *SOCS3*在痰湿质组中表达上调. *SOCS3*是胰岛素信号的重要负调节蛋白^[25]. 文献证据表明, 在含肥胖基因的人骨骼肌中*SOCS3*过表达^[26]. 敲除小鼠(*Mus musculus*)肝脏*SOCS3*基因会促进胰岛素信号传导^[27]. 值得注意的是, 瘦素受体表达细胞中*SOCS3*的灭活会改善小鼠饮食诱导的胰岛素抵抗现象, 无论小鼠肥胖与否^[28]. 说明, *SOCS3*和肥胖之间不存在直接相关性, 其与胰岛素抵抗关系更为密切. 本研究在痰湿和正常体质之间未观察到体重上的差异, 进一步表达谱测试组受试者未达肥胖标准. 因此, 推测痰湿体质与胰岛素抵抗密切相关, 即使具有这种体质的个体并不肥胖. 肥胖不是表征和评价痰湿质的必要条件. 代谢紊乱不仅表现在肥胖这一单方面, 还包括面部油脂分泌过盛、面部和眼睑浮肿、痰多、四肢沉重、舌苔厚腻和脉滑等多个方面. 证据表明, 未达代谢综合征诊断的肥胖个体没有罹患心脑血管疾病的高风险, 而代谢综合征患者, 无论肥胖与否, 均存在心脑血管疾病患病高风险^[29]. 或许, 痰湿体质, 相较于肥胖, 更接近代谢紊乱的本质.

PRKARIA, 胰岛素信号通路中的另一个基因, 在痰湿质中表达下调. 该基因是cAMP依赖性蛋白激酶(cAMP-dependent protein kinase, PKA)的重要正向调节蛋白. PKA在能量平衡和脂肪代谢中起重要作用. 证据表明, 肥胖个体表现出PKA表达抑制和RI α 蛋白代偿性升高不足, 而RI α 蛋白是*PRKARIA*的产物^[26,30]. 此外, *PRKARIA*可调节PKA介导的胰腺 β 细胞胰岛素分泌, 是T2DM潜在药理药物开发靶标^[31]. 研究结果表明, 痰湿体质个体缺乏调节PKA的代偿能力, 可能有糖脂代谢紊乱的风险.

研究表明, PPARs核受体家族与脂肪酸氧化、脂肪酸储存和脂肪形成密切相关^[32]. 研究通路分析显示, 下调基因富集在PPAR信号传导通路中. 其中, *ACSL4*在痰湿质个体中表达上调. *ACSL4*, 作为长链酰基辅酶A合成酶家族ACSL成员之一, 具有调节脂肪酸分解的作用, 而脂肪酸分解的变化与许多代谢疾病相关. 用于治疗糖尿病的噻唑烷二酮胰岛素增敏药物, 也可抑制脂肪酸分解为二酰基甘油和三酰基甘油. 其并非通过PPAR γ 依赖途径发挥作用, 而时直接通过抑制*ACSL4*发挥调节作用^[33,34]. *ACSL4*或许可以作为调节痰湿体

质防治代谢性疾病的靶标。

3.3 差异基因提示痰湿体质存在动脉硬化风险

本研究还选择了*CLU*进行了验证, 因为该基因在脂质代谢过程中起到关键作用。此外, 还选择了*ABCG1*基因, 该基因在GO分析中高度富集, 并与胆固醇代谢密切相关。

*CLU*存在于早期动脉粥样硬化患者动脉壁的内膜和中膜中, 是具有细胞保护和抗炎作用的多功能糖蛋白, 在动脉粥样硬化进展过程中由平滑肌细胞

合成^[35], 并且是抗动脉粥样硬化的候选靶标^[36]。本研究发现, *CLU*在痰湿体质中过表达。因此, 推测痰湿个体存在动脉粥样硬化高风险, *CLU*可能是预防动脉粥样硬化的重要靶基因。

*ABCG1*作为一个重要的细胞转运体基因, 可以通过增加细胞膜跨双层胆固醇转运来促进巨噬细胞趋化, 并有益于提高高密度脂蛋白改善动脉硬化的作用^[37]。巨噬细胞中*ABCG1*基因下调会导致动脉硬化^[38]。本研究观察到痰湿体质*ABCG1*表达减少。该结果进一步表明, 痰湿体质个体存在患动脉粥样硬化的风险。

参考文献

- Williams R J. Biochemical Individuality—the Basis for the Genetotrophic Concept. New York: John Wiley&Sons, Inc, 1956. 195
- Ciccarese C, Santoni M, Massari F, et al. Present and future of personalized medicine in adult genitourinary tumors. *Future Oncol*, 2015, 11: 1381–1388
- Lazaridis K N, McAllister T M, Babovic-Vuksanovic D, et al. Implementing individualized medicine into the medical practice. *Am J Med Genet*, 2014, 166: 15–23
- Wang Q. Individualized medicine, health medicine, and constitutional theory in Chinese medicine. *Front Med*, 2012, 6: 1–7
- 王琦. 中国人九种体质的发现. 北京: 科学出版社, 2011
- Sun Y, Liu P, Zhao Y, et al. Characteristics of TCM constitutions of adult Chinese women in Hong Kong and identification of related influencing factors: a cross-sectional survey. *J Transl Med*, 2014, 12: 140
- 中华中医药学会. 中医体质分类与判定. 北京: 中国中医药出版社, 2009. ZZYXH/T157
- 王琦. 9种基本中医体质类型的分类及其诊断表述依据. 北京中医药大学学报, 2005, 28: 1–8
- 王东坡, 王琦. 痰湿体质研究现状分析与展望. 中华中医药杂志, 2008, 23: 5–8
- 吴小秋, 罗玉韵, 徐进华, 等. 2型糖尿病中医体质特点及与胰岛素抵抗、分泌的关系. 广州中医药大学学报, 2013, 30: 312–319
- 朱燕波, 王琦, 邓棋卫, 等. 中医体质类型与高血压的相关性研究. 中西医结合学报, 2010, 8: 40–45
- 董静, 王琦, 吴宏东, 等. 代谢综合征体质因素的病例-对照研究. 中国康复理论与实践, 2007, 13: 464–465
- Smyth G K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 2004, 3: 1–25
- Reiner A, Yekutieli D, Benjamini Y. Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics*, 2003, 19: 368–375
- Ashburner M, Ball C A, Blake J A, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet*, 2000, 25: 25–29
- Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: 27–30
- Liew C C, Ma J, Tang H C, et al. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J Lab Clin Med*, 2006, 147: 126–132
- Park Y W, Zhu S, Palaniappan L, et al. The metabolic syndrome. *Arch Intern Med*, 2003, 163: 427
- Yoo H J, Hwang S Y, Hong H C, et al. Association of metabolically abnormal but normal weight (MANW) and metabolically healthy but obese (MHO) individuals with arterial stiffness and carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2014, 234: 218–223
- Scorletti E, Byrne C D. Omega-3 fatty acids, hepatic lipid metabolism, and nonalcoholic fatty liver disease. *Annu Rev Nutr*, 2013, 33: 231–248
- Jakobsson A, Jørgensen J A, Jacobsson A. Differential regulation of fatty acid elongation enzymes in brown adipocytes implies a unique role for Elovl3 during increased fatty acid oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 289: E517–E526
- Kobayashi T, Zdravac D, Jacobsson A. ELOVL2 overexpression enhances triacylglycerol synthesis in 3T3-L1 and F442A cells. *FEBS Lett*, 2007, 581: 3157–3163
- Moon Y A, Hammer R E, Horton J D. Deletion of ELOVL5 leads to fatty liver through activation of SREBP-1c in mice. *J Lipid Res*, 2008, 50: 412–423

- 24 Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J Endocrinol*, 2014, 220: T1–T23
- 25 Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, et al. SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J Biol Chem*, 2000, 275: 15985–15991
- 26 Rieusset J, Bouzakri K, Chevillotte E, et al. Suppressor of cytokine signaling 3 expression and insulin resistance in skeletal muscle of obese and type 2 diabetic patients. *Diabetes*, 2004, 53: 2232–2241
- 27 Sachithanandan N, Fam B C, Fynch S, et al. Liver-specific suppressor of cytokine signaling-3 deletion in mice enhances hepatic insulin sensitivity and lipogenesis resulting in fatty liver and obesity1. *Hepatology*, 2010, 52: 1632–1642
- 28 Pedrosa J A B, Buonfiglio D C, Cardinali L I, et al. Inactivation of SOCS3 in leptin receptor-expressing cells protects mice from diet-induced insulin resistance but does not prevent obesity. *Mol Metab*, 2014, 3: 608–618
- 29 Dhana K, Koolhaas C M, van Rossum E F C, et al. Metabolically healthy obesity and the risk of cardiovascular disease in the elderly population. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0154273
- 30 London E, Rothenbuhler A, Lodish M, et al. Differences in adiposity in cushing syndrome caused by *PRKARIA* mutations: clues for the role of cyclic AMP signaling in obesity and diagnostic implications. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99: E303–E310
- 31 Hussain M A, Stratakis C, Kirschner L. Prkar1a in the regulation of insulin secretion. *Horm Metab Res*, 2012, 44: 759–765
- 32 Desvergne B, Michalik L, Wahli W. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev*, 2006, 86: 465–514
- 33 Bronfman M, Inestrosa N C, Nervi F O, et al. Acyl-CoA synthetase and the peroxisomal enzymes of β -oxidation in human liver. Quantitative analysis of their subcellular localization. *Biochem J*, 1984, 224: 709–720
- 34 Askari B, Kanter J E, Sherrid A M, et al. Rosiglitazone inhibits acyl-CoA synthetase activity and fatty acid partitioning to diacylglycerol and triacylglycerol via a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanism in human arterial smooth muscle cells and macrophages. *Diabetes*, 2007, 56: 1143–1152
- 35 Schwarz M, Spath L, Lux C A, et al. Potential protective role of apoprotein J (clusterin) in atherogenesis: binding to enzymatically modified low-density lipoprotein reduces fatty acid-mediated cytotoxicity. *Thromb Haemost*, 2008, 100: 110–118
- 36 Hamada N, Miyata M, Eto H, et al. Loss of clusterin limits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via reduced expression of Egr-1 and TNF- α . *J Atheroscler Thromb*, 2011, 18: 209–216
- 37 Pagler T A, Wang M, Mondal M, et al. Deletion of ABCA1 and ABCG1 impairs macrophage migration because of increased Rac1 signaling. *Circul Res*, 2011, 108: 194–200
- 38 Miroshnikova V V, Demina E P, Mayorov N V, et al. The expression of ABCG1 transporter gene in peripheral blood mononuclear cells of patients with atherosclerosis. *Cell Tiss Biol*, 2014, 8: 337–343