

• 论著 •

血小板膜受体 P2Y12 基因多态性与原发性高血压血瘀证的相关性研究

骆杰伟¹, 王建军¹, 陈 慧¹, 吴小盈¹, 洪丹丹¹, 郑星宇¹, 郑美钦¹, 严 威², 马建芳³
(1. 福建医科大学省立临床医学院, 福建 福州 350001; 2. 福建中医学院, 福建 福州 350108; 3. 福州总医院四七六医院, 福建 福州 350002)

【摘要】 目的 探讨血小板膜受体 P2Y12 基因 G52T、- T744C 多态性与原发性高血压(EH)血瘀证易感性的关系。方法 选择福建省汉族人群 EH 血瘀证患者 216 例, EH 非血瘀证患者 220 例, 血压正常对照组 193 例。抽取受试者外周静脉血, 提取 DNA, 采用聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性(PCR-RFLP)检测 P2Y12 基因 G52T、- T744C 多态性类型。结果 3 组间 G52T 的 GG、GT 和 TT 基因型分布频率差异无统计学意义($\chi^2=2.041, P=0.728$), - T744C 的 TT、TC 和 CC 基因型分布频率差异有统计学意义($\chi^2=10.500, P=0.033$); 经进一步 χ^2 分割检验显示, EH 血瘀证组 TC/CC 基因型分布频率(43.1%)高于 EH 非血瘀证组(30.9%)和健康对照组(33.2%), 差异有统计学意义($\chi^2=7.598, P=0.006$)。多因素 Logistic 回归分析显示, 以健康对照组为参照系, TC/CC 基因型人群是患 EH 血瘀证的独立危险因素; 调整相关混杂因素后, TC/CC 基因型人群患 EH 血瘀证的相对危险度是 1.518, 95% 可信区间(95%CI)为 1.011~3.025, $P=0.042$ 。结论 P2Y12 基因 TC/CC 型可能是汉族人群 EH 血瘀证发病的易感危险因素之一。

【关键词】 原发性高血压; 血瘀证; 血小板膜受体; P2Y12 基因

中图分类号: R259.441; R241.3 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.04.004

Relationship between polymorphisms of P2Y12 receptor gene of platelet and essential hypertension with blood stasis syndrome (血瘀证) of traditional Chinese medicine LUO Jie-wei *, WANG Jian-jun, CHEN Hui, WU Xiao-ying, HONG Dan-dan, ZHENG Xing-yu, ZHENG Jiang-qin, YAN Wei, MA Jian-fang. *Fujian Provincial Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian, China

【Abstract】 **Objective** To explore the relationship between the G52T, - T744C polymorphisms of P2Y12 receptor gene of platelet and essential hypertension (EH) with blood stasis syndrome (血瘀证, BSS) of traditional Chinese medicine (TCM). **Methods** All the patients were of Han nationality (汉族) in Fujian Province in China. Peripheral blood was collected for DNA examination. The G52T, - T744C genotype of P2Y12 gene in 216 patients of EH of BSS type (EH-BSS group), 220 patients of EH of non-BSS type (EH-non-BSS group) and 193 healthy subjects (control group) was determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay. **Results** The constituent ratio of G52T GG, GT and TT genotype was not significantly different among the three groups ($\chi^2=2.041, P=0.728$); while the constituent ratio of - T744C TT, TC and CC genotype was significantly different among the three groups ($\chi^2=10.500, P=0.033$). Partitions of χ^2 method showed that the frequencies of - T744C TC/CC genotype in patients with EH-BSS (43.1%) were higher than those of EH-non-BSS group (30.9%) and control group (33.2%), $\chi^2=7.598, P=0.006$, and multinomial Logistic-regression indicated that - T744C TC/CC genotype in a person was an independent risk factor for contracting EH-BSS with the reference category of control; the odds ratio (OR) of - T744C TC/CC genotype for EH-BSS was 1.518 (95% confidence interval; 1.011 - 3.025, $P=0.042$) after adjusting for age, gender, fasting plasma glucose, creatinine, body mass index (BMI), uric acid and blood fat. **Conclusion** - T744C TC/CC genotype is possibly one of the risk factors susceptible to EH-BSS in the Chinese mass of Han nationality.

【Key words】 Essential hypertension; Blood stasis syndrome; Platelet membrane receptor; P2Y12 gene

2005 年第 20 届美国高血压学会(ASH)年会上提出的高血压新定义认为: 高血压是一个由许多病因引起的处于不断进展状态的心血管综合征, 可导致心脏和血管功能的改变。而中医所言的高血压血瘀证恰恰是心血管功能障碍的表现。血瘀是指体内有血液停滞, 包括积存于体内的离经之血, 或血运不

畅, 阻滞于经脉及脏腑内之瘀血。血瘀形成与血小板黏附、释放和聚集反应等密切相关, 这其中与体质的差异所导致病症的易感性和多样性有关^[1]。本研究选择了血小板膜受体 P2Y12 基因的热点多态点(G52T、- T744C)进行相关性研究, 报告如下。

1 资料与方法

1.1 诊断标准及排除标准: ①西医诊断标准: 按照 2005 年修订的中国高血压防治指南诊断标准, 根据患者的病史、家族史、体检及实验室检查进行诊断性评估, 并排除继发性高血压、严重贫血、甲状腺功能

基金项目: 福建省青年科技人才创新项目(2008F3025); 福建省自然科学基金资助项目(2008J0322)

作者简介: 骆杰伟(1973-), 男(汉族), 福建省人, 医学博士, 主治医师, Email: docluo0421@yahoo.com.cn.

亢进、风湿性心脏病、先天性心脏病、心肌病、动静脉瘘、缩窄性心包炎、心包积液、肝硬化、哮喘、恶性肿瘤、自身免疫性疾病等全身其他器官和系统重大疾病。②中医血瘀证诊断标准^[2]:舌紫暗或有瘀斑、瘀点;典型涩脉或无脉;痛有定处;皮肤黏膜瘀血斑、脉络异常;偏瘫麻木;瘀血狂躁;理化检查具有血液循环瘀滞表现等。具备以上任何一项可诊断为血瘀证。

1.2 一般资料:选择 2005 年 9 月至 2009 年 2 月在福建省立医院和福州总医院四七六医院门诊及住院的原发性高血压(EH)患者共 436 例,其中血瘀证 216 例,病程 1~47 年,中位数 11.3 年;非血瘀证 220 例,病程 1~35 年,中位数 10.0 年。随机抽取同期健康体检者 193 例作为健康对照组,家族中一级亲属无高血压病史,并排除糖尿病及其他心脑血管疾病史者。各组受试者年龄、性别、收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、体质指数(BMI)、空腹血糖(FPG)、肌酐(Cr)、尿酸(UA)、三酰甘油(TG)、胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)等临床资料及生化指标比较见表 1。

1.3 P2Y12 基因多态性检测方法:根据知情同意原则,抽取受试者静脉血 2 ml,乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)抗凝,离心柱型法提取基因组 DNA,试剂盒购自厦门泰京公司。

1.3.1 聚合酶链反应(PCR):用 Primer 3 软件设计引物,G52T 位点引物:上游 5'-AAGATGAGA AACCTCAACTTTTAG-3',下游 5'-AACAGGAC AGTGTAGAGCAGTG-3';-T744C 位点引物:上游 5'-TTTGGGAATTTAAGTGCTAC-3',下游:5'-CCACAATAGGCCTATAATG-3'。反应体系 25 μl,TaqDNA 聚合酶 0.125 μl。用 PCR 仪进行扩增,用含溴化乙锭(EB)的普通琼脂糖电泳鉴定 PCR 扩增产物。G52T 反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,63 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 36 个循环;最后 72 °C 延伸 8 min。-T744C 反应条

件:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,58 °C 退火 36 s,72 °C 延伸 30 s,共 42 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。引物由美国 Invitrogen 公司合成。PCR 反应液购自大连宝生物工程有限公司。

1.3.2 酶切反应:酶切反应体系总量 20 μl,G52T、-T744C 分别用 BseD I、Tai I 限制性内切酶进行酶切,55 °C 水浴 6 h。酶切产物采用琼脂糖凝胶电泳,DNA 经 EB 染色后,于紫外灯下观察或拍照。BseD I、Tai I 购自加拿大 Fermentas 公司,DNA Marker 购自上海生物工程技术服务有限公司。Tai I 的酶切位点为 5'-ACGT[^]-3'或 3'-[^]TGCA-5',BseD I 的酶切位点为 5'-C[^]CNNGG-3'或 3'-GG NNC[^]C-5'([^]代表酶切位置)。

1.4 统计学处理:采用 SPSS 11.5 软件统计,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,均数比较用 *F* 检验,Hardy-Weinberg 遗传定律检验用拟合 χ^2 检验,各组间不同基因型及等位基因频率比较采用 χ^2 检验及 χ^2 分割;用多因素 Logistic 回归调整混杂因素,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组临床资料及生化指标比较(表 1):3 组间性别构成、年龄、FPG、Cr、TG 比较差异均无统计学意义(均 *P*>0.05),但 SBP、DBP、BMI、UA、TC、HDL、LDL 比较差异均有统计学意义(*P*<0.05 或 *P*<0.01)。

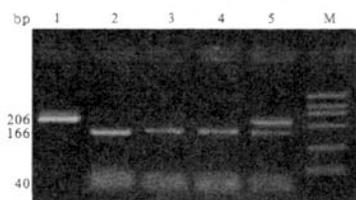
2.2 P2Y12 受体基因酶切后电泳结果(图 1~2):经 PCR 扩增出 P2Y12 受体基因 G52T 的 206 bp 片段,用 BseD I 酶切后,产物是 166 bp、40 bp 的片段为 GG 型,206 bp 的片段为 TT 型,206、166、40 bp 的片段为 GT 型;扩增出 -T744C 的 252 bp 片段,用 Tai I 酶切后,产物是 163 bp、89 bp 的片段为 CC 型,252 bp 的片段为 TT 型,252、163、89 bp 的片段为 TC 型,并经测序证实。

2.3 各组 P2Y12 基因型 Hardy-Weinberg 遗传平

表 1 健康对照组与 EH 血瘀证、非血瘀证组患者临床资料及生化指标比较

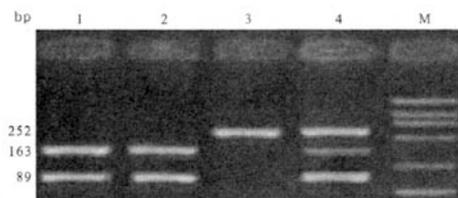
组别	例数	性别(例)		年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	SBP ($\bar{x} \pm s$, mm Hg)	DBP ($\bar{x} \pm s$, mm Hg)	BMI ($\bar{x} \pm s$, kg/m ²)	FPG ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)
		男	女					
健康对照组	193	99	94	61.76±10.86	123.76±9.05	73.90±8.70	23.35±3.79	5.23±0.52
EH 血瘀证组	216	126	90	63.91±11.55	157.70±12.60 ^b	86.90±10.90 ^b	24.44±2.84 ^a	5.81±1.54
EH 非血瘀证组	220	111	109	62.90±12.21	154.50±11.50	85.70±10.20	23.96±2.91	5.32±1.09
组别	例数	Cr ($\bar{x} \pm s$, μmol/L)		UA ($\bar{x} \pm s$, μmol/L)	TG ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	TC ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	HDL ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	LDL ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)
健康对照组	193	79.58±33.01	343.71±85.87	1.66±1.12	4.69±0.83	1.46±0.55	2.74±0.88	
EH 血瘀证组	216	83.12±36.25	366.43±102.61 ^a	1.74±1.09	5.35±1.18 ^b	1.34±0.57 ^a	3.14±0.96 ^b	
EH 非血瘀证组	220	79.84±23.16	334.83±95.16	1.65±0.88	5.19±1.17	1.33±0.51	3.07±0.85	

注:与健康对照组比较,^a*P*<0.05,^b*P*<0.01;与 EH 非血瘀证组比较,^c*P*<0.05;1 mm Hg=0.133 kPa



1, TT 基因型; 2~4, GG 基因型; 5, GT 基因型; M, Marker

图 1 P2Y12 受体基因 G52T 多态位点被 BseD I 酶切后电泳图



1, 2, CC 基因型; 3, TT 基因型; 4, TC 基因型; M, Marker

图 2 P2Y12 受体基因 -T744C 多态位点被 Tai I 酶切后电泳图

衡定律检验: ① G52T 基因型: EH 血瘀证组 $\chi^2 = 0.120, P = 0.729$; EH 非血瘀证组 $\chi^2 = 0.178, P = 0.673$; 健康对照组 $\chi^2 = 0.251, P = 0.616$ 。② -T744C 基因型: EH 血瘀证组 $\chi^2 = 0.079, P = 0.779$; EH 非血瘀证组 $\chi^2 = 0.868, P = 0.352$; 健康对照组 $\chi^2 = 0.327, P = 0.567$ 。分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律, 说明具有群体代表性。

2.4 各组 P2Y12 基因 G52T、-T744C 多态性类型分布频率比较(表 2): 3 组 G52T 基因型分布频率差异无统计学意义($\chi^2 = 2.041, P = 0.728$); -T744C 基因型分布频率差异有统计学意义($\chi^2 = 10.500, P = 0.033$)。进一步 χ^2 分割检验发现: EH 血瘀证组 TC/CC 型分布频率高于 EH 非血瘀证组和健康对照组($\chi^2 = 7.598, P = 0.006$)。

2.5 多因素 Logistic 强迫回归分析: 以是否患 EH 血瘀证作为因变量, 在调整性别、年龄、BMI、FPG、Cr、UA、TG、TC、HDL、LDL 后, 以健康对照组为参照系, 相对于 TT 基因型, TC/CC 型患 EH 血瘀证相对危险度(OR)为 1.518, 95% 可信区间(95%CI) 1.011~3.025, $P = 0.042$ 。

3 讨论

P2Y12 受体基因位于人类 3 号染色体 q24-25 上, 包括 2 个外显子和 1 个内含子, 其中外显子 2 为蛋白质编码区, 编码 342 个氨基酸。目前发现多个位点多态性, 如 2 号外显子的 G52T、C34T, 内含子的 -C139T、-T744C、-ins801A 等^[3]。Fontana 等^[4]在高加索人种中发现, -C139T、-T744C、-ins801A、G52T 呈完全连锁状态, 分别命名为主要单倍体 H1(不携带 4 种多态性)和次要单倍体 H2(携带所有 4 种多态性), 频率分别为 86.2% 和 13.8%; 在 H2 单倍体人群中, 二磷酸腺苷(ADP)诱导的血小板聚集率明显升高。目前较多关注 P2Y12 受体基因与血栓性疾病的关系及与氯吡格雷等药物遗传学药理学研究^[5]。

血小板膜受体 P2Y12 基因编码一种关键的 G-(α) 蛋白耦联受体, 主要生理功能是与血小板膜上其他 ADP 受体一同参与血小板活化的启动。P2Y12 是 ADP 作用的主要受体, 噻氯匹定、氯吡格雷等作用的靶点。ADP 与 P2Y12 受体结合, P2Y12 受体与 Gi 蛋白耦联, 抑制血小板的腺苷酸环化酶的活化, 降低了血小板中环磷酸腺苷(cAMP)的水平, 诱发血小板的聚集^[6]。P2Y12 受体可通过 Gi 蛋白的信号通路激活磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3)激酶, 调节 P2Y12 介导的 Ca^{2+} 反应^[7]。P2Y12 基因多态性可能影响血小板功能, 促进血栓形成, 形成血瘀证, P2Y12 基因敲除小鼠模型证实参与了凝血机制环节的启动^[8], 人类该基因缺陷者凝血机制同样也会出现障碍^[9]。Sirotkina 等^[3]发现年轻男性携带 T18G36 单倍体型可降低心肌梗死(心梗)危险性。Martinelli 等^[10]检测 804 例冠心病(CAD)患者 10 个与凝血机制有关的基因多态性, 发现携带 ≤ 2 个不利等位基因者患心梗的危险性比携带 3~7 个不利等位基因者下降(OR 0.34, 95%CI 0.13~0.93), 携带 ≥ 8 个不利等位基因者患心梗的危险性明显升高(OR 2.49, 95%CI 1.03~6.01)。Rudez 等^[11]的研究也显示, P2Y12 基因多态性可预测经皮冠状动脉介入治疗(PCI)后冠状动脉再狭窄事件,

表 2 健康对照组与 EH 血瘀证组、非血瘀证组患者血小板膜受体 P2Y12 基因 G52T、-T744C 多态性分布频率比较

组别	例数	G52T 基因型(例(%))			-T744C 基因型(例(%))			
		GG 型	GT 型	TT 型	TT 型	TC 型	CC 型	TC/CC 型
健康对照组	193	132(68.4)	54(28.0)	7(3.6)	129(66.8)	59(30.6)	5(2.6)	64(33.2)
EH 血瘀证组	216	137(63.4)	69(31.9)	10(4.6)	123(56.9)	81(37.5)	12(5.6)	93(43.1) ^{bd}
EH 非血瘀证组	220	148(67.3)	66(30.0)	6(2.7)	152(69.1)	64(29.1)	4(1.8)	68(30.9)

注: 与健康对照组比较, ^b $P < 0.01$; 与 EH 非血瘀证组比较, ^d $P < 0.01$

尤其是携带有 H5 和 H7 的单倍体型患者。Cavallari 等^[12]研究发现,不吸烟的 CAD 患者有较高的 H2 单倍体型携带率,而在抽烟组中并未发现此现象。本研究结果显示,P2Y12-T744C 基因 TC/CC 型患 EH 血瘀证的危险相对升高,推测 TC/CC 类型可能是汉族人群 EH 血瘀证发病的易感危险因素之一。

参考文献

- [1] 陶丽丽,马晓昌.原发性高血压中医辨证分型的研究进展.中国中西医结合急救杂志,2008,15(3):190-192.
- [2] 史载祥,陈可冀.实用血瘀证学.北京:人民卫生出版社,1999:5-8.
- [3] Sirotkina OV, Zabolina AM, Berkovich OA, et al. Genetic variants of platelet ADP receptor P2Y12 associated with changed platelet functional activity and development of cardiovascular diseases. Genetika, 2009, 45(2):247-253.
- [4] Fontana P, Gaussem P, Aiach M, et al. P2Y12 H2 haplotype is associated with peripheral arterial disease: a case-control study. Circulation, 2003, 108(24):2971-2973.
- [5] Grdinić A, Vojvodić D, Ilić V, et al. The importance of tests applied to evaluate the effectiveness of antiplatelet therapy in patients with recurrent coronary stent thrombosis. Vojnosanit Pregl, 2009, 66(4):328-332.
- [6] Goto S, Tamura N, Eto K, et al. Functional significance of adenosine 5'-diphosphate receptor P2Y12 in platelet activation

initiated by binding of von Willebrand factor to platelet GP 1 b alpha induced by conditions of high shear rate. Circulation, 2002, 105(21):2531-2536.

- [7] Nylander S, Mattsson C, Ramström S, et al. Synergistic action between inhibition of P2Y12/P2Y1 and P2Y12/thrombin in ADP-and thrombin-induced human platelet activation. Br J Pharmacol, 2004, 142(8):1325-1331.
- [8] Kunapuli SP, Ding Z, Dorsant RT, et al. ADP receptors: targets for developing antithrombotic agents. Curr Pharm Des, 2003, 9(28):2303-2316.
- [9] Cattaneo M, Zighetti ML, Lombardi R, et al. Molecular bases of defective signal transduction in the platelet P2Y12 receptor of a patient with congenital bleeding. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(4):1978-1983.
- [10] Martinelli N, Trabetti E, Pinotti M, et al. Combined effect of hemostatic gene polymorphisms and the risk of myocardial infarction in patients with advanced coronary atherosclerosis. PLoS One, 2008, 3(2):e1523.
- [11] Rudez G, Pons D, Leebeck F, et al. Platelet receptor P2RY12 haplotypes predict stenosis after percutaneous coronary interventions. Hum Mutat, 2008, 29(3):375-380.
- [12] Cavallari U, Trabetti E, Malerba G, et al. Gene sequence variations of the platelet P2Y12 receptor are associated with coronary artery disease. BMC Med Genet, 2007, 8:59.

(收稿日期:2009-12-06)

(本文编辑:李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

《中国中西医结合急救杂志》对图表的要求

作者投稿时,原稿中若有图(表),每幅图表应占 1 页,集中附于文后,分别按其 在正文中出现的先后次序连续编码。每幅图表应冠有图(表)题。说明性的文字应置于图(表)下方注释中,并在注释中 标明图表中使用的全部非公知公用的缩写。线条图应墨绘在白纸上,高宽比例以 5:7 为宜。以计算机制图者应提供激光打印图 样。照片图要求有良好的清晰度和对比度;图中需标注的符号(包括箭头)请 用另纸标上,不要直接写在照片上。每幅图的背面应贴上标签,注明图号、方 向及作者姓名。若刊用人像,应征得本人的书面同意,或遮盖其能被辨认出系何 人的部分。大体标本照片在图内应有尺度标记。病理照片要求注明染色方法 和放大倍数。图表中如有引自他刊者,应注明出处。电子版投稿中图片建议 采用 JPG 格式。

关于表格,建议采用三横线表(顶线、表头线、底线),如遇有合计和统计 学处理内容(如 t 值、 P 值等),则在此行上面加一条分界横线;表内数据要求 同一指标有效位数一致,一般按标准差的 1/3 确定有效位数。

《中国中西医结合急救杂志》对文后参考文献著录格式的要求

《中国中西医结合急救杂志》参考文献的著录格式,基本参照执行 GB/T 7714-2005《文 后参考文献著录规则》。采用顺序编码制著录,依照文献在文中出现的先后顺 序用阿拉伯数字标出,并将序号置于方括号中,排列于文后。尽量避免引用摘 要作为参考文献。引用文献(包括文字和表达的原意)务必请作者与原文核对 无误。日文汉字请按日文规定书写,勿与汉字及简化字混淆。

同一文献作者不超过 3 人,全部著录;超过 3 人,可以只著录前 3 人,后依 文种加表示“等”的文字(如西文加“et al”,日文加“他”)。作者姓名一律姓 氏在前,名字在后,外国人的名字采用首字母缩写形式,缩写名后不加缩写 点;不同作者姓名之间用“,”隔开,不用“和”、“and”等连词。引用日期、 获取和访问途径为联机文献必须著录的项目。书籍出版项中的出版地(者) 有多个时,只著录第一出版地(者)。出版项中的期刊名称,中文期刊用全 称;外文期刊名称用缩写,以 *Index Medicus* 中的格式为准。每条参考文献均 须著录起止页码。著录格式示例如下。

- 1 期刊著录格式:主要责任者.题名.刊名,年,卷(期):起页-止页.
- 2 图书著录格式:主要责任者.题名.版本项(第 1 版不著录).出版地:出版者,出版年:引文起页-止页.
- 3 会议论文集(集)著录格式:主要责任者.题名.出版地:出版者,出版年:引文起页-止页.
- 4 析出文献著录格式:析出文献主要责任者.析出文献题名//专著、会议文献主要责任者.专著、会议题名.版本项(第 1 版不著录).出版地:出版者,出版年:析出文献起页-止页.
- 5 学位论文著录格式:论作者.题名.学位授予单位所在城市:学位授予或论文出版单位,年份.
- 6 专利文献著录格式:专利申请者或所有者.专利题名:专利国别,专利号.公告日期或公开日期.
- 7 标准(包括国际标准、国家标准、行业标准等)著录格式:主要责任者.标准编号 标准名称.出版地:出版者,出版年.
注:标准编号与标准名称之间留 1 个汉字的空隙.
- 8 报纸文章著录格式:主要责任者.题名.报纸名,出版日期(版次).
- 9 电子文献著录格式:主要责任者.题名[文献类型标志/文献载体标志,是必选著录项目].出版地:出版者,出版年(更新或修改日期)[引用日期].获取和访问途径.
- 10 待发表材料:对于已明确被杂志接受的待发表文献,可以标明期刊及年代,其后标注:待发表,或 In press.
- 11 以电子版优先发表的文献著录格式示例:Kurth T, Gaziano JM, Cook NR. Unreported financial disclosures in a study of migraine and cardiovascular disease [published online ahead of print July 18, 2006]. JAMA, 2006, 296:E1. http://jama.ama-assn.org/cgi/data/296/3/283/DC1/1. Accessed August 1, 2006.