

## 载脂蛋白 B 免疫遗传表型与高脂血症的关系

南京医学院动脉粥样硬化研究中心 陈 琪 蔡海江 戚晓红

**摘 要** 本文报告用抗人载脂蛋白 B (apo B) 单克隆抗体 ( $B_5$ ), 检测不同个体等量低密度脂蛋白 (LDL) 的免疫反应性, 发现其 apo B 均表现为高、中或低三种结合表型中的一种。遗传学调查结果证明, 三种免疫反应表型变化系来源于 apo B 一对共显性等位基因 ( $B_5^+/B_5^-$ ) 的遗传,  $B_5^+$  基因频率为 0.593,  $B_5^-$  为 0.407。血脂测定结果表明, 高胆固醇血症组的  $B_5^+/B_5^-$  纯合子出现率明显低于正常组; 在正常组内,  $B_5^+/B_5^+$  纯合子的血脂水平明显低于  $B_5^-/B_5^-$  纯合子, 提示  $B_5^+$  等位基因似与低血脂, 特别是低胆固醇有关。

**关键词** 免疫遗传表型; 载脂蛋白 B; 单克隆抗体; 血清脂质

血浆载脂蛋白 B (apo B) 与动脉粥样硬化发生之间的密切关系已被公认。然而无论 apo B 的质或量的改变在很大程度上受遗传因素的影响。利用多次接受输血病人的抗血清, 早已证明人 apo B 上存在 5 对由等位基因组编码的 Ag 抗原<sup>①</sup>。近年来 Young<sup>②</sup>、Tikkanen<sup>③</sup>、Duriez<sup>④</sup> 等学者则用单克隆抗体也发现人类 apo B 上存在不同的免疫遗传表型。关于这种多态性与血脂及动脉粥样硬化的关系, 则至今尚未见到有肯定结果的报告。只有 Rapacz<sup>⑤</sup> 报告过猪 LDL 免疫遗传表型与动脉粥样硬化的发生密切相关。

应用杂交瘤技术, 我们制备了 8 株抗人 apo B 的单克隆抗体<sup>⑥</sup>。经过筛选, 发现其中一株单抗  $B_5$  在与不同个体等量 LDL 反应时, 表现为三种免疫反应性: 高、中或低亲和性结合中的一种。遗传学调查结果证明, 三种免疫反应表型的变化系来源于 apo B 一对共显性基因 ( $B_5^+/B_5^-$ ) 的遗传。根据对 150 人测定的结果,  $B_5^+$  的基因频率为 0.593,  $B_5^-$  为 0.407。进一步的研究还表明, 不同免疫遗传表型与血脂水平之间存在着一定的联系。现报告如下。

### 1 材料和方法

**1.1 观察对象** 共检测了 150 例 20—40 岁成年男女血清 LDL, 并对其中 136 例进行了血脂测定。健康组 (I 组) 共 49 例, 经体格检查, 无心、肝、肾及甲状腺疾病, 其血清总胆固醇水平 (TC)  $\leq$  220mg/dl, 血清甘油三酯水平 (TG)  $\leq$  130mg/dl; 高

胆固醇血症组 (II 组) 共 24 例, 其诊断标准为 TC  $>$  220mg/dl, TG 在正常范围, 高甘油三酯血症组 (III 组) 共 37 例, 其 TG  $>$  130mg/dl, TC 在正常范围; 混合型高脂血症组 (IV 组) 共 26 例, 其 TC  $>$  220mg/dl, TG  $>$  130mg/dl。

**1.2 抗 apo B 单克隆抗体的制备** 用 LDL 免疫 BALB/C 小鼠, 免疫脾细胞与 SP<sub>2</sub>/O 骨髓瘤细胞在 50% 聚乙二醇作用下融合, 置含 20% 小牛血清的 HAT 选择性培养液中培养。用 ELISA 间接测定法检测抗体活性。分泌抗体阳性的杂交瘤细胞经 4 次以上的克隆化 (有限稀释法) 培养后, 接种于同系鼠腹腔, 收集腹水液抗体。经免疫双扩散反应鉴定, 全部抗体为 IgG<sub>1</sub>, 竞争性液相放射免疫测定法结果表明, 全部抗体系特异性针对 apo B<sup>⑦</sup>。

**1.3 脂蛋白分离** 用 Beckman L<sub>8</sub>-80M 型超速离心机, Ti80 转头, 进行不连续密度梯度超速离心, 分离人血清 LDL<sup>⑧</sup>。所得 LDL 经 3.6% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 呈现单一条带。蛋白质含量测定采用 Lowry 氏法。

**1.4 apo B 免疫反应表型的测定** 全部测定采用 ELISA 检测法, 以抗原抗体最大结合为 100% 计, 达到 50% 结合率时的腹水液抗体稀释度作为工作浓度 ( $B_5$  抗体的稀释度为 1:8000)。每次实验均用呈高亲和性结合表型的 LDL 包被聚苯乙烯孔板, 每孔中加液 200  $\mu$ l (5  $\mu$ g/ml), 4℃ 过夜。次日甩去包被液, 用含 0.5% Tween-20 的 PBS 洗 3 遍, 加

100 $\mu$ l 含 1% 牛血清白蛋白的 PBS, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, 以封闭多孔板上的剩余结合位点。清洗后, 每孔加 50 $\mu$ l 单抗、50 $\mu$ l 不同浓度 LDL 或 PBS, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。第二抗体为辣根过氧化物酶标记单抗鼠 IgG 抗体 (100 $\mu$ l, 1:4000 稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时后, 再清洗 3 遍并加 100 $\mu$ l 邻苯二胺显色液, 室温放置 20 分钟, 加 50 $\mu$ l 2mol/LH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 于酶联免疫检测仪上 (华东电子管厂 DC-I 型) 读取 O.D. 490nm 值。

在正式试验时, 采用单点测定法代替置换反应曲线。选择能最大程度地区别 3 种不同反应曲线的 LDL 浓度 (150 $\mu$ g/ml) 作为检测浓度 (图 1), 结果以 B/Bo 表示; B 代表样品测定值, Bo 代表无竞争性 LDL 时所测得的 O.D. 值, 每个样品做二个复孔。

1.5 脂质测定 取空腹血清, 用酶法测定胆固醇含量, 甘油三酯测定系乙酰丙酮显色法, 高密度脂蛋白-胆固醇 (HDL-C) 测定为聚乙二醇 6000 法。

## 2 结果

### 2.1 免疫反应表型

不同浓度的 LDL 与单抗 B<sub>s</sub> 作竞争性结合反应, 置换反应曲线结果表明, 所测个体的 LDL 均表现为高、中或低亲和性三种免疫反应表型中的一种 (图 1)。当 B/Bo=0.5 时, 高亲和性 apo B 竞争性抑制浓度为 76 $\mu$ g/ml, 中亲和性为 215 $\mu$ g/ml, 低亲和性为 359 $\mu$ g/ml。对 150 例成年男女血清 LDL 进行检测, 高亲和性表型的 B/Bo 平均值为 0.307 $\pm$ 0.066 (n=48), 中亲和性表型的 B/Bo=0.514 $\pm$ 0.067 (n=82), 低亲和性表型的 B/Bo=0.750 $\pm$ 0.091 (n=20)。三种免疫反应表型的频率分布见图 2。

### 2.2 免疫反应表型的遗传学特点

血清标本置-20 $^{\circ}$ C, 存放 3 个月以上, 其 apo B 的 B<sub>s</sub> 免疫反应表型特征保持不变; 脂蛋白组成成份以及构象的改变, 也不影响单抗 B<sub>s</sub> 与 apo B 结合

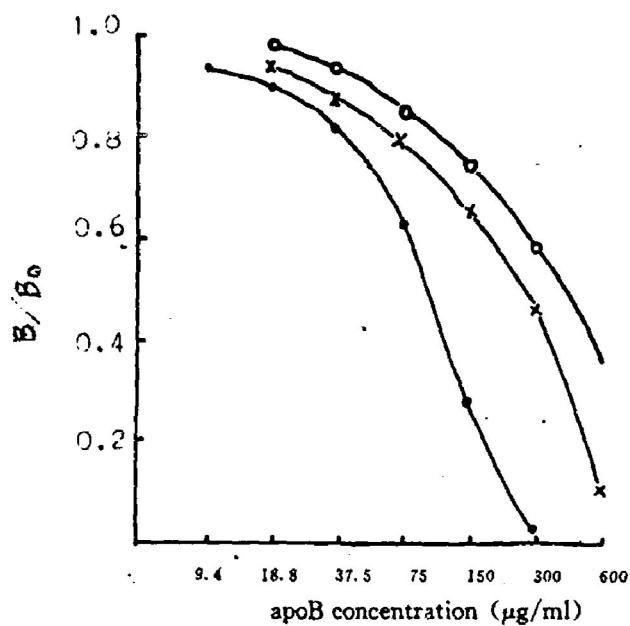
的亲性和性<sup>⑥</sup>, 提示抗体所识别的为序列决定簇, 其结合特性的改变, 反映了 apo B 中某个氨基酸序列的改变。因而我们认为人群中所以出现三种 B<sub>s</sub> 免疫反应表型, 可能系人染色体上存在 2 个 apo B 共显性等位基因: B<sub>s</sub><sup>+</sup> 和 B<sub>s</sub><sup>-</sup>。等位基因 B<sub>s</sub><sup>+</sup> 编码能被单抗 B<sub>s</sub> 识别的抗原决定簇。因此, 呈 B<sub>s</sub> 高亲和性表型的个体基因型应为 B<sub>s</sub><sup>+</sup>/B<sub>s</sub><sup>+</sup> 纯合子, 呈 B<sub>s</sub> 低亲和性表型的个体基因型为 B<sub>s</sub><sup>-</sup>/B<sub>s</sub><sup>-</sup> 纯合子, 而中亲和性表型则为杂合子 B<sub>s</sub><sup>+</sup>/B<sub>s</sub><sup>-</sup>。为证明这一推测, 本研究对 150 例个体进行了检测, 发现 B<sub>s</sub><sup>+</sup>/B<sub>s</sub><sup>+</sup> 为 48 例, B<sub>s</sub><sup>+</sup>/B<sub>s</sub><sup>-</sup> 为 82 例, B<sub>s</sub><sup>-</sup>/B<sub>s</sub><sup>-</sup> 为 20 例。由此求得 B<sub>s</sub> 基因频率 p=0.593, B<sub>s</sub><sup>-</sup> 基因频率 q=0.407。根据 Hardy-Weinberg 遗传平衡法则, 对实验值和理论期望值作  $\chi^2$  检验<sup>⑥</sup>, 结果表明样本与群体平衡期望值相符 ( $\chi^2=2.861, p<0.05$ )。

进一步对 B<sub>s</sub> 免疫反应表型进行家系调查 (图 3), 在 3 个受检家系中, 1 号家系的父亲为低亲和性表型, 母亲为中亲和性表型, 其 3 个子女中, 1 个为低亲和性表型, 2 个为中亲和性表型。2 号和 3 号家系的父母均为中亲和性表型, 其子女也均为中亲和性表型, 符合共显性等位基因遗传规律。

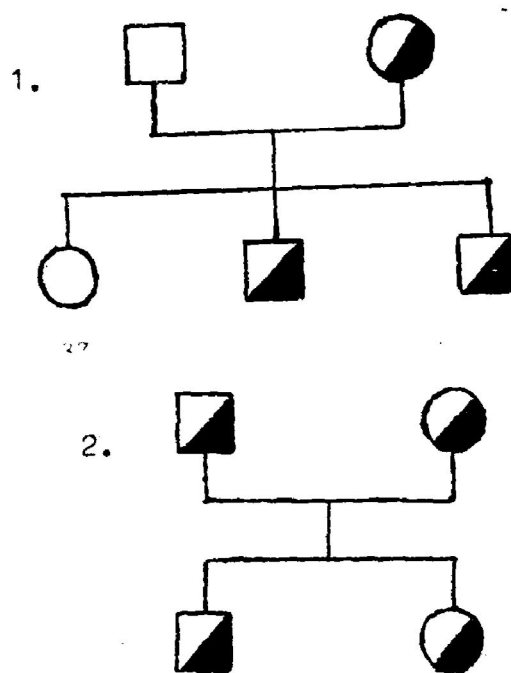
### 2.3 免疫反应表型与血清脂质水平

比较健康和不同类型高脂血症组之间三种 B<sub>s</sub> 免疫反应表型的发生率, 发现高胆固醇血症组的高亲和性表型发生率低于健康组, 而中亲和性表型则高于健康组, 两者均有显著性意义 ( $p<0.05$ , 表 1)。

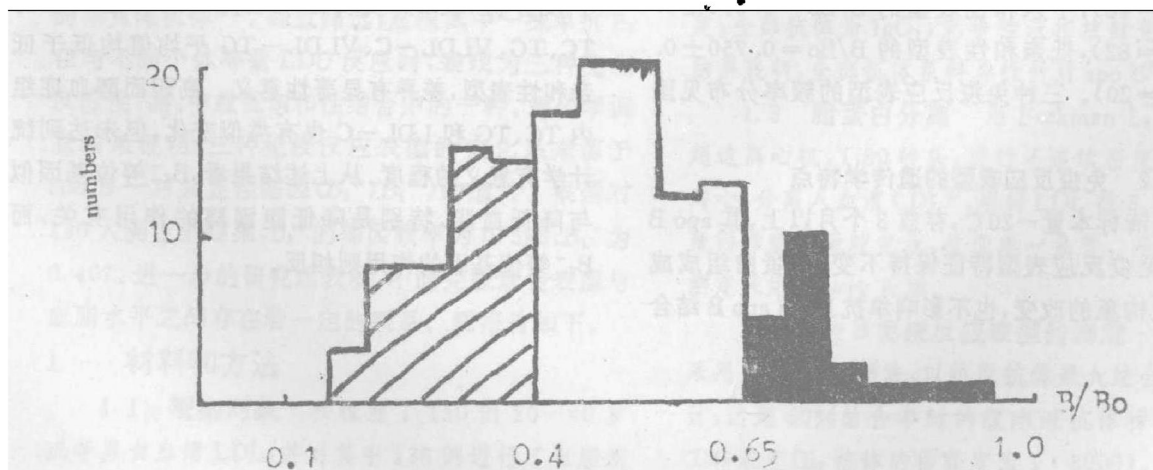
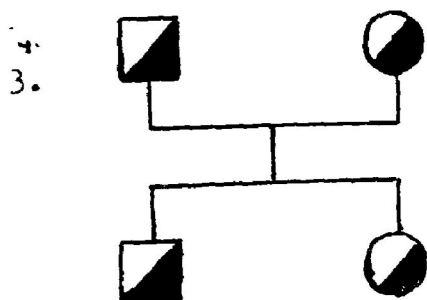
对每一组内 B<sub>s</sub> 免疫反应表型的血脂水平作进一步分析 (表 2), 发现健康组内高亲和性表型的 TC、TG、VLDL-C、VLDL-TG 平均值均低于低亲和性表型, 差异有显著性意义。高胆固醇血症组内 TC、TG 和 LDL-C 也有类似变化, 但未达到统计学有意义的程度。从上述结果看, B<sub>s</sub><sup>+</sup> 等位基因似与降低血脂, 特别是降低胆固醇的作用有关, 而 B<sub>s</sub><sup>-</sup> 等位基因的作用则相反。



**Fig 1** Substitute curves of immunologic phenotype of  $B_s$



**Fig 2** Frequency distribution of immunologic phenotypes of  $B_s$  in persons measured. Oblique line was phenotype of high-affinity. blank was phenotype of high-affinity. black area was phenotype of low-affinity



**Fig 3** Families of immunological reaction of  $B_s$ . Black area was immunologic phenotype of high-affinity; black and white area was middle-affinity; blank was low-affinity of immunologic phenotype; circle; female; square area; male

**Table 1 Immunologic phenotypes of B<sub>s</sub> of normal and hypercholesterolemic subjects**

immunologic phenotypes of B <sub>s</sub>	persons measured				
	control	HTC	HTG	mixed phenotype	total
High(B <sub>s</sub> <sup>+</sup> /B <sub>s</sub> <sup>+</sup> )	17(34.7)	3(12.5)*	12(32.4)	8(30.8)	40(29.4)
middle(B <sub>s</sub> <sup>+</sup> /B <sub>s</sub> <sup>-</sup> )	26(53.1)	18(75.0)*	20(54.1)	15(57.7)	79(58.1)
low(B <sub>s</sub> <sup>-</sup> /B <sub>s</sub> <sup>-</sup> )	6(12.2)	3(12.5)	5(13.5)	3(11.5)	17(12.5)
total	49	24	37	26	136

Notes: 1. HTC: hypercholesterolemia, HTG: hypertriglyceridemia

2. Values in brackets were percentage of B<sub>s</sub> immunologic phenotype in each group among total group.

3. \*  $p < 0.05$ , compared with immunologic phenotype

**Table 2 Serum lipid levels (mg/dl) of normal and hypercholesterolemic subjects of three kinds of immunologic phenotypes**

persons measured		TC	TG	VLDL-C	VLDL-TG	LDL-C	HDL-C	$\frac{LDL-C}{HDL-C}$
group I	high(n=17)	120.7(7.3)	81.4(5.2)	6.5(0.9)	35.6(4.0)	66.6(7.8)	43.2(1.4)	1.6(0.2)
	middle(n=26)	* * 146.4(5.5)	81.2(4.2)	9.1(1.4)	40.0(4.2)	82.3(6.6)	43.1(1.8)	2.0(0.2)*
	low(n=6)	$\Delta\Delta$ * * 175.5(17.0)	$\Delta$ * 105.9(6.5)	$\Delta$ * 28.0(14.1)	* * 60.7(6.5)	94.2(16.0)	42.7(8.1)	2.8(1.0)
group II	high(n=3)	262.3(22.6)	61.3(11.7)	10.2(0.04)	38.9(3.0)	208.8(11.4)	49.7(7.0)	4.3(0.5)
	middle(n=18)	417.1(46.7)	84.4(4.3)	9.2(8.2)	34.3(5.6)	320.8(51.4)	45.7(3.2)	9.3(2.3)
	low(n=3)	439.2(168.8)	109.7(25.9)	—	—	392.0(173.8)	33.5(3.2)	12.5(6.4)
group III	high(n=12)	175.0(11.3)	204.2(15.1)	30.8(5.3)	142.5(42.5)	99.2(8.3)	37.6(2.6)	2.8(0.3)
	middle(n=20)	157.4(8.8)	194.4(10.5)	26.4(2.8)	100.9(9.8)	88.9(9.0)	38.9(2.1)	2.5(0.2)
	low(n=5)	163.6(22.5)	188.3(24.6)	27.6(7.5)	114.5(23.9)	67.5(11.7)* *	47.7(3.8)	1.5(0.2)*
group IV	high(n=8)	251.9(12.5)	358.2(100.2)	46.4(8.9)	197.5(82.5)	121.5(18.4)	40.5(4.1)	3.9(0.7)
	middle(n=15)	254.8(47.6)	238.4(38.5)	40.9(8.4)	159.4(35.4)	274.7(51.2)	43.0(3.6)	8.7(2.2)*
	low(n=3)	274.1(4.9)	256.0(73.0)	52.2(19.0)	158.1(57.1)	159.4(22.1)	55.6(2.9)	2.9(0.3)

notes: 1. high, high-affinity phenotype; group I, healthy group; group II, hypercholesterolemic group; group III, hyperglyceridemic; group IV, mixed hyperlipemia. 2. values in Fig 2. were means  $\pm$  SE 3. \*  $p < 0.05$ , \* \*  $p < 0.01$ , compared with high-affinity phenotype  $\Delta p < 0.05$ ,  $\Delta\Delta p < 0.01$ , in same group compared with high-affinity phenotype in same group

### 3 讨论

本研究结果表明,用本室自制的单抗 B<sub>3</sub> 检测我国健康及高脂人群,发现存在着高、中和低三种不同的免疫反应表型。群体调查和家系分析结果均证明,这种表型的分布符合共显性等位基因 (B<sub>3</sub><sup>+</sup>/B<sub>3</sub><sup>-</sup>) 遗传规律, B<sub>3</sub><sup>-</sup> 的基因频率为 0.593, B<sub>3</sub><sup>+</sup> 的基因频率为 0.407。Young 等<sup>③</sup> 用单抗 MB19 在美国人群中检测, MB19<sub>1</sub> 基因频率为 0.336, MB19<sub>2</sub> 基因频率为 0.664; Duriez 等<sup>④</sup> 用单抗 BIP45 在法国北部人群中检出, BIP<sup>+</sup>/BIP<sup>-</sup> 的基因频率为 0.3/0.7。他们的结果非常接近。我们所测得的基因频率与上述报告不同,其原因可能为:一是我们用 B<sub>3</sub> 抗体测得的等位基因与上述基因不同,为 5 对等位基因组中的另外一种。二是我们测得的也属同一对基因组,但由于种族不同,所以基因频率各异。

迄今为止国外学者均未发现应用单克隆抗体测得的 apo B 免疫遗传表型与血浆脂质或动脉粥样硬化有联系。我们用单抗 B<sub>3</sub> 测得的免疫遗传表型则表现与血脂水平有一定的相关性,特别是与胆固醇浓度: B<sub>3</sub><sup>+</sup>/B<sub>3</sub><sup>+</sup> 纯合子的 TC 水平明显低于 B<sub>3</sub><sup>+</sup>/B<sub>3</sub><sup>-</sup>, 而后者又明显低于 B<sub>3</sub><sup>-</sup>/B<sub>3</sub><sup>-</sup>。高胆固醇血症组的 B<sub>3</sub><sup>+</sup>/B<sub>3</sub><sup>+</sup> 纯合子发生频率也明显低于健康组。因而 B<sub>3</sub> 所编码的 apo B 结构域似乎与血清胆固醇浓度有关。

在我们所获得的全部单抗中,有 1 株 B<sub>6</sub> 是针对 apo B 上 LDL 受体结合位点的<sup>⑤</sup>,但在本试验中它不能检出 apo B 免疫遗传表型,反之 B<sub>3</sub> 抗体则并不能抑制 LDL 与纤维母细胞上 LDL 受体的结合。Young 等<sup>③</sup> 的 MB19 情况也相同。因此可以认为 B<sub>3</sub> 抗原决定簇与 LDL 受体结合位点不同。由于 MB19 不同免疫遗传表型之间的血脂水平无差异, Young 等遂认为其免疫遗传表型与 apo B 上的脂质结合部位亦无关。然而根据本研究结果,我们认为 B<sub>3</sub> 似乎影响 apo B 与胆固醇等脂质的结合,使其结合减少。当然其他直接或间接影响含 apo B 脂蛋白的合成或分解代谢机制也可能参与作用,最后表现出血脂水平降低。

已知 LDL 受体基因的突变直接使血浆胆固醇升高并引起动脉粥样硬化。从理论上说, apo B 基因突变引起的 apo B 结构及功能异常具有同等重

要性。已有报告指出, apo B XBa 1 基因多态性与血脂胆固醇水平以及心肌梗死有关<sup>⑥</sup>。在我们所发现的 B<sub>3</sub> 免疫遗传表型与 apo B 的 DNA 多态性之间存在着何种联系,是很值得深入研究的课题。单抗 B<sub>3</sub> 的发现,以及 ELISA 这种比较简便的方法的应用,使得在我国人群中对 apo B 免疫遗传表型进行大规模的检测成为可能,如能进一步肯定其在动脉粥样硬化发病学方面的作用,将其有十分重要的理论及应用价值。

### 参考文献

1. Butler R et al. Contribution to the inheritance of the Ag-group: a population genetic study. Vox. Sang 1974;26:485.
2. Young SG, et al. Monoclonal antibody MB19 detects genetic polymorphism in human apolipoprotein B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986;83:1101
3. Tikkanen MJ, et al. Detection of two apolipoprotein B species (apo Bc) and apo Bg) by a monoclonal antibody. Atherosclerosis 1987;85:27.
4. Duriez P, et al. A monoclonal antibody (BIP 45) detects Ag (c, g) polymorphism of human apolipoprotein B. J. Immunol. Method 1987;102:205.
5. Rapacz J, et al. Correlation of an immunogenetically defined lipoprotein type with aortic intimal lipidosis in swine. Exp. Mol. pathol 1977;27:249.
6. 陈琪, 等. 人血浆载脂蛋白 B-100 抗原决定簇的研究. 中国免疫学杂志 1988;4:275
7. 陈琪, 等. 载脂蛋白 B-100 上低密度脂蛋白受体结合部位的研究. 生物化学与生物物理学报 1989;21:140
8. 解用虹, 等. 载脂蛋白 E 异构体的分离及其表型测定. 生物化学与生物物理学报 1987;19:272
9. 向中辉美. 群体遗传学. 第一版, 长春: 吉林科学技术出版社, 1984:8
10. Young SG, et al. Apolipoprotein B allotypes MB19<sub>1</sub>, and MB19<sub>2</sub> in subjects with coronary artery disease and hypercholesterolemia. Arteriosclerosis 1987;7:61
11. Hegele RA, et al. Apolipoprotein B gene polymorphisms associated with myocardial infarction.

## **Immunogenetic Phenotype of Apolipoprotein B and Hyperlipdemia**

Chen Qi, Cai Haijiang, Qi Xiaohong

Atherosclerosis Research Center, **Nanjing** Medical College, Nanjing 210029, P. R. China

A monoclonal antibody against human apolipoprotein B (apoB),  $B_5$ , was used to test the immunnoreactivities of apo B in unrelated individuals. We found that the apo B in each person exhibited one of the three binding patterns: high, intermediate, or low affinity. Genetic investigation showed that these binnding patterns might result from co-dominant transmission of a pair of apo B alleles ( $B_5^+/B_5^-$ ). The frequency of gene  $B_5^+$  was 0.593 and  $B_5^-$  was 0.407. We also found that the frequency of  $B_5^+/B_5^+$  homozygotes in the hypercholesterolemic patient group was significantly lower than that in healthy subject group. The serum levels of total cholesterol, triglycerides, very low density lipoprotein (VLDL) — cholesterol, and VLDL — triglycerides in  $B_5^+/B_5^-$  homozygotes were significantly lower than those in  $B_5^-/B_5^-$  in the group of healthy subject. It is suggested that allele  $B_5^+$  might be associated with lower serum concentrations of lipids, especially the concentration of cholesterol.

**Key Words**    Immunogenetic phenotype;    Apolipoprotein B;    Monoclonal antibody;  
Serum lipids