

## • 文献综述 •

## 抗氧化型低密度脂蛋白自身抗体研究进展

刘行超<sup>①</sup> 陈 媛 周 攻

(第一军医大学自由基医学研究室, 广州 510515)

**摘要** 低密度脂蛋白在体内经脂质过氧化修饰产生新的抗原决定簇, 刺激机体的免疫系统产生抗氧化型低密度脂蛋白自身抗体。国外许多学者在动脉粥样硬化性疾病、原发性高血压、非胰岛素依赖型糖尿病、肾病及先兆子痫等疾病患者体内查到了抗氧化型低密度脂蛋白自身抗体的存在。尤其在动脉粥样硬化性疾病中, 自身抗体的浓度、效价与病程的发生、发展存在密切的关系, 其作用越来越受到重视。

**关键词** 低密度脂蛋白; 氧化修饰; 自身抗体; 动脉粥样硬化

近年来, 大量研究结果表明, 低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的氧化修饰是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生和发展的重要原因<sup>[1~3]</sup>, LDL经脂质过氧化修饰(即氧化修饰)后, 结构发生明显变化<sup>[4,5]</sup>, 载脂蛋白B100在LDL表面折迭并改变脂相的物理性质, 发生蛋白分解, 从而出现新的抗原决定簇<sup>[6]</sup>。这种新的抗原决定簇能刺激体内的免疫系统, 引起自身免疫反应, 产生抗氧化型LDL自身抗体(autoantibody against oxidised LDL, OLDL-Ab)<sup>[7]</sup>, 并能形成LDL免疫复合物(LDL-immune complexes, LDL-IC), 干扰脂蛋白和胆固醇代谢<sup>[8]</sup>。国外许多学者在研究中已证实了OLDL-Ab在一些疾病中的存在, 尤其在As疾病过程中占有重要地位。本文就近年来的有关报道作一简要综述。

## 1 自身抗体在疾病中的作用

### 1.1 自身抗体与动脉粥样硬化

动脉粥样硬化是多因素所致的疾病<sup>[1]</sup>, 越来越多的事实说明As损伤的某些病理过程和环节与体内LDL的氧化修饰程度有关, OLDL刺激机体的免疫系统产生的OLDL-Ab能进一步促进As的损伤。1990年, Palinski等<sup>[7]</sup>在人和家兔体内均查到了OLDL-Ab。

Maggi等<sup>[9]</sup>认为体内OLDL-Ab与As的发生和发展存在特殊的关系, 并证实OLDL-Ab在绝大多数有明显冠状As的病人血清中存在, 特别是在As疾病出现临床症状之前如果测得OLDL-Ab效价升高, 被认为是一种典型的危险因素, 表明体内存在LDL的氧化修饰。因此, OLDL-Ab与As的发生和发展有着特殊的关系, 不能简单地将它看作体内氧化过程中出现的一种副现象。

除OLDL能诱导动脉壁内膜细胞脂质积累外, Orekhov等<sup>[10]</sup>认为OLDL-Ab也具有这种功能, 他们用亲和层析法从冠心病(coronary heart disease, CHD)病人血清中分离出免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)Gs, IgGs与经修饰的LDL之间亲和常数可达 $89.4 \times 10^7$  mol/L, 而与正常LDL(normal LDL, n-LDL)之间亲和常数仅为 $2.4 \times 10^7$  mol/L, 病人血清中自身抗体含量比健康对照组高30倍。体外试验证明, 这种自身抗体能使动脉壁内膜细胞摄取LDL的能力提高2.5倍。同样, Mironova等<sup>[11]</sup>用亲和层析法测得的5例As患者的IgG(主要为IgG1和IgG3亚类)的亲和常数明显高于健康人。

低密度脂蛋白脂质过氧化的终产物中含有大量醛类物质, 其中主要为丙二醛(malondialdehyde, MDA)<sup>[12]</sup>, 丙二醛能与LDL中的载脂蛋白B100上的赖氨酸(lysine)残基共价交链形成MDA-lysine。Salonen等<sup>[13]</sup>认为这是OLDL的主要抗原决定簇。他们检测了30例颈动脉硬化的芬兰男子血清中抗丙二醛修饰LDL自身抗体(MDA-LDL-Ab), 经与30例对照组(按年龄配对)比较, 发现颈动脉硬化患者MDA-LDL-Ab效价可作为颈动脉硬化发展的一项独立预测指标。

此外, Bergmark等<sup>[14]</sup>认为外周血管性疾病早期, 病人体内OLDL-Ab就开始增加, 通过对62例患外周动脉阻塞的病人和按年龄、性别配对的健康对照者进行多项血清生物化学指标测定, 发现患者OLDL-Ab、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、甘油三酯和载脂蛋白AI都显著高于对照组, 而高密度脂蛋白胆固醇显著低于对照组。经多元回归分析发现, 测定OLDL-Ab比测

<sup>①</sup>桂林市解放军第一八一中心医院在职研究生

定其它任何脂蛋白成分都能更好地区别病人和健康人,并认为高血压和家族性心血管疾病与 OLDL-Ab 效价的增加显著相关。

慢性主动脉周炎(chronic periaortitis, CP)是中老年人易患的疾病,在 CP 患者体内也存在 OLDL-Ab,且与炎症处粥样斑块提取物有交叉反应,提示 CP 与自身变态反应有关<sup>[15]</sup>。

在冠心病的发生和发展中,OLDL-Ab 效价往往随病情恶化而升高,但在急性心肌梗塞发作时,会出现暂时性降低,8 h 后达最低值,因此,有人认为 OLDL-Ab 可作为急性心肌梗塞严重程度的一项敏感指标<sup>[16]</sup>。

然而,也有一些研究者对自身抗体与 As 的关系得出了不同的结论。为了评价 OLDL-Ab 在经皮腔内冠状血管成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)后再梗塞中的作用,Eber 等<sup>[17]</sup>随机选取 48 例 PTCA 手术后的男子,其中 26 例患者术后出现血管再梗塞,另外 22 例术后无血管再梗塞,比较两组血管中 OLDL-Ab 效价,发现尽管 OLDL-Ab 在 PTCA 术后再狭窄患者中有升高的趋势,但在统计学上两组效价并无显著的差异。因此,认为 OLDL-Ab 还不能作为 PTCA 术后血管再狭窄的一个敏感指标。

同样,Boullier 等<sup>[18]</sup>将 70 例(男 54 例,女 26 例)经冠状动脉造影证实患有冠心病的患者分为 3 组:第 1 组 19 人,均无冠状动脉狭窄;第 2 组 26 人,至少有一条血管狭窄,但狭窄程度小于 50%;第 3 组 25 人,至少有一条血管狭窄,且狭窄程度大于 50%。按年龄、总胆固醇含量等指标与另外 70 例健康志愿者配对,用酶联免疫吸附试验分析法测其 MDA-LDL-Ab 效价,发现冠状动脉狭窄患者与对照组之间无显著性差异。

现在已公认 As 是一种多因素所致的疾病。吸烟和高胆固醇血症被认为是 As 发生和发展的两个十分重要的因素。它们协同作用损害血管内皮功能,促进 LDL 的氧化,从而引起体内 OLDL-Ab 增加<sup>[19]</sup>。但 Boullier 等<sup>[18]</sup>按年龄和血中总胆固醇含量进行配对,检测了 32 例长期吸烟(大于 10 支/天)男子和 32 例不吸烟男子血中 MDA-LDL-Ab,发现两组结果无显著差异。说明在总胆固醇含量正常的情况下,吸烟这一单一因素不足以导致 As 的发生。

有人在健康人血清中查得 OLDL-Ab<sup>[20]</sup>,而 Parums 等<sup>[15]</sup>在 20 例无冠心病的健康成年人(年龄 21~27 岁)血清中没查到 OLDL-Ab,但在 20 例无冠心病的健康老年人(年龄 50~81 岁)血清中,查到 10 人存在 OLDL-Ab。这些研究结果表明,年龄与 OLDL-Ab 有一定关系,随着年龄增大,体内抗氧化能力下降,LDL 脂

质过氧化作用增强,从而出现 OLDL-Ab。

由此,Boullier 等<sup>[18]</sup>认为不同的研究者在检测自身抗体过程中出现不一致的结论,可能有三个方面的原因:①不同的研究者测自身抗体时,所采用的方法不尽相同;②针对 OLDL 不同的抗原决定簇,所测得的自身抗体不同,如有的研究者以体外修饰的 MDA-LDL 作为抗原包被聚乙烯反应板,测血清中 MDA-LDL-Ab,而有的以 Cu<sup>2+</sup>修饰的 LDL 即 Cu<sup>2+</sup>-OLDL 作为抗原测 OLDL-Ab;③不同的受试者疾病的进程不同,如有人测疾病早期患者体内自身抗体的含量,有人测疾病晚期的自身抗体含量。

### 1.2 自身抗体与其它疾病

慢性肾功能衰竭(chronic renal failure, CRF)、原发性高血压、糖尿病、先兆子痫等疾病与脂质过氧化损伤有关。最近,许多研究者从这些疾病患者的血清中查到了 OLDL-Ab。CRF 病人经透析治疗时常出现血脂升高并加剧 As 的发展,50%以上的病人往往死于冠状血管并发症。Maggi 等<sup>[21]</sup>测定了 56 例经血液透析、24 例经腹膜透析治疗的 CRF 患者和 72 例健康人血浆中 OLDL-Ab、MDA-LDL-Ab 及抗丙二醛修饰的人血清蛋白自身抗体(autoantibodies against MDA-derivatized human serum albumin, MDA-HSA-Ab)IgG、IgM,发现实验组抗体效价显著高于对照组。Bellomo 等<sup>[22]</sup>从 138 例非胰岛素依赖性糖尿病患者体内均测得 OLDL-Ab IgG、MDA-LDL-Ab IgG 和 IgM、MDA-HSA-Ab IgG 的存在,经与 80 例健康者比较,其效价有显著差异。

原发性高血压作为 As 的危险因素越来越受到人们的关注,Maggi 等<sup>[23]</sup>发现原发性高血压病人体内 LDL 比正常人 LDL 更易被氧化修饰,病人体内 OLDL-Ab IgG、IgM 和 MDA-LDL-Ab IgG、IgM 显著高于对照组,且 MDA-LDL-Ab 与 OLDL-Ab 呈显著正相关,这与丙二醛是 LDL 脂质过氧化的终产物及 MDA-lysine 是 OLDL 的主要抗原决定簇<sup>[12,13]</sup>的观点相符合。

另外,在先兆子痫病人中,蜕膜血管中出现纤维样坏死,病灶处有大量吞噬细胞聚积<sup>[26]</sup>。Brach 等用放射免疫分析法(RIA)分析了 16 例有先兆子痫的待产妇和 14 例正常孕妇血清中 MDA-LDL-Ab 的效价,发现先兆子痫患者抗体平均滴度显著高于正常孕妇(P=0.028)。因此,推测在蜕膜泡沫细胞的形成和先兆子痫病变过程中脂质过氧化作用可能增强<sup>[20]</sup>。

## 2 自身抗体的作用机理

动脉粥样硬化是多因素引起的疾病,LDL 在体内

经脂质过氧化作用后,其结构和物理化学性质被改变,而结构和物理化学性质的改变是生物学功能改变的基础。目前较一致的认为是:一方面,脂质过氧化修饰是起始于脂质过氧化作用所产生的MDA等一系列醛类与载脂蛋白B 100上的赖氨酸残基交链,如MDA-lysine,由此改变了载脂蛋白B100的构象,从而为巨噬细胞上的清道夫受体所识别、内吞,使巨噬细胞形成泡沫细胞;另一方面,由于结构改变,修饰的LDL抗原性发生了改变,在LDL表面可出现新的抗原决定簇,因此,在患者血中产生自身免疫性抗体,并能通过形成自身免疫脂蛋白复合物损伤动脉血管<sup>[6]</sup>,同时,自身抗体与脂蛋白形成的复合物通过激活补体系统生成C5a,吸引中性粒细胞,再与免疫复合物共同触发中性粒细胞呼吸爆发,产生活性氧,使已受损的血管进一步受到损伤,从而加速As的发展<sup>[24]</sup>。

有些研究者认为,OLDL-Ab能改变脂蛋白的代谢,抗原-抗体复合物进入细胞可增加胆固醇的合成,导致细胞内脂质积累<sup>[25]</sup>。Kacharava等<sup>[13]</sup>认为LDL-IC能干扰脂蛋白和胆固醇的代谢。体外试验证明,内皮细胞暴露在LDL-IC环境中能促进细胞内胆固醇积累<sup>[10]</sup>,LDL-IC比其它物质更易诱导泡沫细胞的形成<sup>[26]</sup>。

### 3 自身抗体的检测

自身抗体的检测方法较多,目前,分离纯化自身抗体主要有离子交换层析与亲和层析法,测其血清中效价及特异性主要有ELISA法、RIA法和免疫印迹法。

#### 3.1 自身抗体的纯化

Orekhov等用33%的硫酸铵溶液沉淀健康人和CDH病人血清中免疫球蛋白IgGs,然后用DE-52纤维素进行离子交换层析分离纯化IgGs。由于IgGs对氧化修饰的LDL有亲和力,因此,将LDL固定在溴化氰(CNBr)活化的琼脂糖球Sepharose CL 4B上,按30mg IgG与10mL LDL-Sepharose比例装柱,用200 ml PBS和50 ml 0.5M NaCl平衡柱后,用0.15M pH2.5的甘氨酸缓冲液洗脱IgGs,洗脱出的IgGs用2000倍体积的PBS透析过夜除去盐份,然后用Ficoll-400浓缩,即可得到纯化的IgGs<sup>[10]</sup>。

#### 3.2 自身抗体效价的测定

Boullier等<sup>[18]</sup>分别以n-LDL、BSA和体外修饰的MDA-LDL作为抗原,包被聚苯乙烯微孔反应板,以辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG Fab段为第二抗体,采用间接酶联免疫吸附试验法测待测标本中的MDL-LDL-Ab的光密度(OD)值。以包被MDA-LDL抗原的

反应孔中OD值与包被n-LDL抗原的反应孔中OD值的比率作为效价1(Titre 1),以二者OD值之差作为效价2(Titre 2),从而获得病人组和对照组的Titre 1的均值、标准差及Titre 2的均值、标准差,然后对其进行统计学分析,比较实验组与对照组的差异。

目前,大多数研究者都采用间接酶联免疫吸附试验法,用相应修饰程度的抗原包被反应板,测定血清中对应的自身抗体<sup>[10,14~16,21,23,27]</sup>。

但由于RIA法比ELISA法有较高的灵敏度,因此,一些研究者以<sup>125</sup>I标记的第二抗体代替酶标二抗用RIA法检测自身抗体的存在,比较病人与正常人之间的差异<sup>[13,20]</sup>。另外,Orekhov等<sup>[10]</sup>和Parums等<sup>[15]</sup>分别用免疫印迹法测定了冠心病病人体内OLDL-Ab和慢性主动脉周炎病人血清中OLDL-Ab。而分析自身抗体特异性多采用竞争性酶联免疫吸附试验法<sup>[18]</sup>。

#### 3.3 自身抗体检测的临床意义

最近的流行病学调查显示,OLDL-Ab是预测As发展的一项重要生化指标<sup>[13]</sup>。LDL氧化修饰是As发生过程中决定性的一步,自身抗体在绝大多数冠状动脉硬化病人血清中出现,在As出现临床症状之前,若查得OLDL-Ab效价升高,被认为是一个非常危险的信号<sup>[12,23]</sup>。在MI病人血清中,OLDL-Ab含量下降可作为MI的一项诊断指标<sup>[16]</sup>。另外,Jansen等<sup>[27]</sup>测定了92例冠心病患者体内MDA-LDL-Ab IgM,其中46例体内LDL为亚型A,46例患者为亚型B,发现亚型B患者IgM的浓度、效价显著高于亚型A患者。结果表明,MDA-LDL-Ab IgM的浓度、效价是判断冠心病患者LDL亚型的一个独立的指标,同时也代表了体内LDL氧化作用的水平。

总之,随着As及其它相关疾病的深入研究,OLDL-Ab在临床上的作用将越来越受到重视,通过测定体内自身抗体,在疾病的诊断、治疗和预防方面都有一定实用价值<sup>[15]</sup>。

#### 参考文献

- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, 362: 801~809.
- 陈瓊,周玫. 脂质过氧化作用与动脉粥样硬化. *生物化学与生物物理进展*, 1989, 16(4): 278~283.
- 陈瓊,周玫. 脂质过氧化损伤在动脉粥样硬化发生发展中的作用. *中国科学基金*, 1995, 4: 43~45.
- 刘尚喜,周玫,陈瓊. 低密度脂蛋白的氧化修饰与丙二醛的比较研究. *生物化学与生物物理进展*, 1992, 24(6): 569~574.
- 刘尚喜,陈瓊,周玫. 巨噬细胞对氧化修饰和丙二醛修饰

- 的低密度脂蛋白结合与降解特性的比较研究. *生物物理学报*, 1992, 8(3):497~501.
- 6 Vladimirov. Free radical lipid peroxidation in biomembranes: mechanism, regulation, and biological consequences. In: Johnson JE, et al. eds. *Free Radical, Aging, and Degeneration Disease*. New York: Alan R Liss, 1986, 141~195.
  - 7 Palinski W, Yla-Herttuala, Rosenfeld ME, et al. Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during oxidative modification of low density lipoprotein. *Arteriosclerosis*, 1990, 10: 325~335.
  - 8 Kacharava AG, Tertov W, Orekhov AN. Autoantibodies against low-density lipoprotein and atherogenic potential of blood. *Ann Med*, 1993, 25:551~555.
  - 9 Maggi E, Finardi G, Poli M, et al. Specificity of autoantibodies against oxidized LDL as an additional marker for atherosclerotic risk. *Coron-Artery-Dis*, 1993, 4(12): 1119~122.
  - 10 Orekhov AN, Tertov W, Kabakov AE, et al. Autoantibodies against modified low density lipoprotein, nonlipid factor of blood plasma that stimulates foam cell formation. *Arterioscler Thromb*, 1991, 11(2):316~326.
  - 11 Mironova M, Virella G, Lopes VM. Isolation and characterization of human antioxidantized LDL autoantibodies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, 16(2): 222~229.
  - 12 Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*, 1991, 88: 1785~792.
  - 13 Salonen JT, Yla HS, Yamamoto R, et al. Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet*, 1992, 339: 883~887.
  - 14 Bergmark C, Wu R, de-Faire-U, et al. Patients with early onset peripheral vascular disease have increased levels of autoantibodies against oxidized LDL. *Arterioscler-Thrombovasc-Biol*, 1995, 15(4):441~445.
  - 15 Paruns DV, Brown DL, Mitchinson MJ. Serum antibodies to oxidized low density lipoprotein and cerotid in chronic periaortitis. *Arch Pathol Lab Med*, 1990, 114: 383~387.
  - 16 Schumacher M, Eber B, Tatzber F, et al. Transient reduction of autoantibodies against oxidized LDL in patients with acute myocardial infarction. *Free-Radic-Biol-Med*, 1995, 18(6): 1087~091.
  - 17 Eber B, Schumacher M, Tatzber F, et al. Autoantibodies to oxidized low density lipoproteins in restenosis following coronary angioplasty. *Cardiology*, 1994, 84(4~5): 310~315.
  - 18 Boullier A, Hamon M, Walters Laporte E, et al. Detection of autoantibodies against oxidized low-density lipoproteins and of IgG-bound low density lipoproteins in patients with coronary artery disease. *Clin-Chim-Acta*, 1995, 238(1):1~10.
  - 19 Heitzer T, Yla Herttuala, Luoma J, et al. Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. Role of oxidized LDL. *Circulation*, 1996, 93(7):1346~353.
  - 20 Branch DW, Mitchell MD, Miller E, et al. Pre-eclampsia and serum antibodies to oxidized low-density lipoprotein. *Lancet*, 1994, 343(8898): 645~646.
  - 21 Maggi E, Bellazzi R, Gazo A, et al. Autoantibodies against oxidatively modified LDL in uremic patients undergoing dialysis. *Kidney-Int*, 1994, 46(3): 869~876.
  - 22 Bellomo G, Maggi E, Poll M, et al. Autoantibodies against oxidatively modified low density lipoproteins in NIDDM. *Diabetes*, 1995, 44(1): 60~66.
  - 23 Maggi E, Marchesi E, Ravetta V, et al. Presence of autoantibodies against oxidatively modified low density lipoprotein in essential hypertension: a biochemical signature of an enhanced in vivo low density lipoprotein oxidation. *J-Hypertens*, 1995, 13(1): 129~138.
  - 24 Hansson GK. Immune and inflammatory mechanisms in the development of atherosclerosis. *Br Heart J*, 1993, 69(Suppl): S38~41.
  - 25 Orekhov AN, Tertov W, Mukhin DN, et al. Insolubilization of low density lipoprotein induces cholesterol accumulation in cultured subendothelial cells of human aorta. *Atherosclerosis*, 1989, 79: 59~70.
  - 26 Virella G, Virella I, Leman RB, et al. Anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies in patients with coronary heart disease and normal healthy volunteers. *Int J Clin Lab Res*, 1993, 23: 95~101.
  - 27 Jansen H, Ghanem H, Kuypers JH, et al. Autoantibodies against malondialdehyde modified LDL are elevated in subjects with an LDL subclass pattern B. *Atherosclerosis*, 1995, 115(2): 255~262.

(1997-01-19收到, 1997-07-23修回)