

慢性肾功能衰竭患者血清低密度脂蛋白亚组分的分布及氧化易感性

张 允^① 汪俊军^② 庄一义

(南京军区南京总医院全军医学检验中心, 南京 210002)

主题词 肾功能衰竭,慢性; 心血管病; 脂蛋白,低密度; 脂蛋白,高密度; 载脂蛋白; 胆固醇; 患者

摘 要 为探讨慢性肾功能衰竭患者血浆低密度脂蛋白亚组分的异常特性,采用密度梯度超速离心直接分离血浆低密度脂蛋白亚组分,并对其分布及体外铜离子介导的氧化易感性进行分析。结果发现,慢性肾功能衰竭患者血浆低密度脂蛋白亚组分分布与对照组无差别,低密度脂蛋白氧化延滞时间缩短48%,差异显著($P<0.001$),显示其易于氧化。血浆低密度脂蛋白氧化水平显著升高,氧化程度与低密度脂蛋白氧化延滞时间高度相关($r=-0.45$, $P<0.05$)。结果提示,慢性肾功能衰竭患者血浆低密度脂蛋白易于氧化的特性对肾病的发生、发展及并发心血管疾病起着重要作用。

Distribution of Low Density Lipoprotein Subfractions and Its Susceptibility to in Vitro Oxidation in Patients with Chronic Kidney Failure

ZHANG Yong, WANG Jun-Jun and ZHUANG Yi-Yi

(Department of Medical Examination, Nanjing General Hospital of PLA, Nanjing 210002, China)

MeSH Kidney Failure, Chronic; Cardiovascular Diseases; Lipoproteins, LDL; Lipoproteins, HDL; Apolipoproteins; Cholesterols; Patients

ABSTRACT **Aim** To study the distribution of low density lipoprotein (LDL) subfractions and its susceptibility to in vitro oxidation in patients with chronic kidney failure (CKF). **Methods** LDL subfractions were isolated from plasma by non equilibrium density gradient centrifugation directly, and distribution of LDL subfractions in CKF patients were analyzed. The continuous monitoring of LDL oxidation by absorbance measurements at 234 nm was used to analyze the susceptibility of LDL and its subfractions to Cu^{2+} -mediated oxidation in patients with CKF. **Results** The frequency distributions of LDL subfractions in CKF patients had no different from that of control. The lag time in the test for LDL oxidizability in CKF patients was shorter than that in control (48.2 ± 24.7 vs 93.3 ± 37.2 min, $P<0.05$). The degree of oxidized LDL was correlated with the lag time of LDL oxidizability. The total amount of conjugated dienes and the maximal rate of oxidation had no difference.

Conclusions Circulating LDL isolated from CKF patients is more susceptible to oxidation in vitro than that of controls, this may be associated with the level of oxidative modification LDL.

慢性肾功能衰竭(chronic kidney failure,CKF)患者心血管疾病高发生率与脂质代谢异常有关。我们既往的研究发现 CKF 患者血清低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)组成异常,且被高度氧化^[1]。氧化型 LDL 增加了其致病性,是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生的前提条件。近年来,国外十分关注 LDL 颗粒大小、密度及氧化易感性同 As 发生的关系,以小颗粒致密的 B 型为主的 LDL 是 As 发生的强危险因素^[2,3];冠心病(coronary heart disease, CHD)患者 As 发生程度同 LDL 氧化

②通讯联系人

易感性相关^[4]。本文对 CKF 患者 LDL 亚组分的分布及氧化易感性进行了分析,以探讨其心血管疾病高发生率的机制。

1 对象和方法

1.1 对象

慢性肾功能衰竭患者系本院肾病研究所确诊,共20例,其中男性12例,女性8例,平均年龄 41 ± 8 岁。对照组为无肾脏病与心脑血管疾病的体健者30例,其中男性17例,女性13例,平均年龄 42 ± 9 岁。收集空腹血浆(含 EDTA- Na_2 1 g/l),于 -70°C 冰冻保存。

1.2 血脂、载脂蛋白及氧化型低密度脂蛋白测定

酶法测定血清总胆固醇(total cholesterol,

TC)和甘油三酯(triglyceride, TG), 高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC)用自动化分析一步直接测定法。LDLC 用 Friedewald 公式计算。载脂蛋白(apolipoprotein) AI 和 B 用免疫比浊法测定。氧化型 LDL 测定采用单抗戊二醛氧化 LDL(同天然 LDL 无交叉反应)建立的双抗夹心 ELISA 检测法。Lowry 法测定蛋白质含量,以牛血清白蛋白为标准。

1.3 低密度脂蛋白亚组分分离

采用密度梯度超速离心法, 1.5 mL 血清用溴化钾调密度为1.10 kg/L 加入离心管底部, 依次加入密度为1.065、1.035、1.020和1.006 kg/L 的溴化钾溶液2.0、2.5、2.5和2.0 mL, Beckman L-80 M 型超速离心(48 kr/min) 20 h。由上起依次吸取1~7管不同密度成分(体积分别为1.0、1.5、1.5、1.5、1.5、1.5和2.0 mL), 经测定第3~6管密度范围分别为1.025~1.033、1.033~1.040、1.040~1.048和1.048~1.060 kg/L, 为 LDL₁到 LDL₄, 4℃保存(含 EDTA-Na₂1 kg/L)^[5]。

1.4 低密度脂蛋白的氧化修饰

低密度脂蛋白(密度为1.025 kg/L~1.060 kg/L)经 pH 7.4、0.01 mol/L PBS 充分透析, 去除 EDTA-Na₂, 调整脂蛋白浓度为0.05 g/L, 加入 CuSO₄ 溶液(终浓度10 μmol/L), 37℃, 每隔5 min 于波长 234 nm 测吸光度值^[6]。

1.5 统计学方法

所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异用两小样本均数 *t* 检验, 组间 LDL 亚组分分布差别用 χ^2 检验, LDL 氧化延滞时间同 LDL 氧化程度之间相关性用直线回归分析。

2 结果

2.1 血脂、氧化型低密度脂蛋白及载脂蛋白比较

慢性肾功能衰竭(CKF)患者组 TG 显著升高, HDLC、载脂蛋白 AI 降低, 载脂蛋白 B 显著升高, TC、LDLC 无变化, 但 ox-LDL 水平及 ox-LDL/LDLC 比值显著升高(表1, Table 1)。提示 CKF 患者除表现脂质异常外, 血浆 ox-LDL 水平及氧化程度均显著升高。

表1. 慢性肾功能衰竭患者组和对照组血脂、氧化型低密度脂蛋白及载脂蛋白比较

Table 1. Comparison of plasma lipids, oxidized LDL and apolipoprotein level in patients with CKF and control groups ($\bar{x} \pm s$)

Index	CKF group (n=20)	Control group (n=30)
TC (mmol/L)	3.99±0.85	3.95±0.69
TG (mmol/L)	1.53±0.60 ^b	0.82±0.29
HDLC (mmol/L)	1.19±0.25 ^a	1.58±0.29
LDLC (mmol/L)	2.11±0.70	2.05±0.59
ox-LDL (μg/L)	618.5±293.9 ^b	318.0±159.6
ox-LDL/LDLC	292.8±124.2 ^b	157.1±101.8
Apo AI (g/L)	1.16±0.19 ^a	1.43±0.1
Apo B (g/L)	1.07±0.26 ^a	0.92±0.22

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, compared with control group.

2.2 慢性肾功能衰竭患者低密度脂蛋白亚组分蛋白质组成分布

由表2(Table 2)可知, CKF 患者血浆总 LDL 水平同对照组相近, 除 LDL₂下降外, 其他 LDL 亚组分均无差别, 两组间 LDL 亚组分分布亦无差别。

表2. 慢性肾功能衰竭患者和对照组血清低密度脂蛋白的亚组分蛋白质组成分布

Table 2. The distribution of plasma LDL subfractions in patients with CKF and control groups

LDL Subfraction	CKF group (n=20)		Control group (n=30)	
	Protein (g/L)	Percentage (%)	Protein (g/L)	Percentage (%)
Total LDL	1.11±0.47		1.01±0.22	
LDL ₁	0.22±0.07	19.4±4.2	0.21±0.13	21.5±13.5
LDL ₂	0.28±0.08 ^a	25.5±5.1	0.22±0.12	21.8±8.7
LDL ₃	0.32±0.11	28.4±5.8	0.27±0.11	27.4±10.9
LDL ₄	0.30±0.08	26.8±5.7	0.30±0.16	29.3±13.6

a: $P<0.05$, compared with control group. LDL concentrations are expressed in lipoprotein mass (g) per litre (L) of plasma.

2.3 慢性肾功能衰竭患者血清低密度脂蛋白氧化易感性

脂蛋白内多聚不饱和脂肪酸的氧化产物—共轭双烯(conjugated dienes, CD)在234 nm 处有最大吸

收峰[$\epsilon=29\ 500\ \text{L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$],根据 CD 量随时间变化绘制氧化曲线,分为延滞阶段(延滞时间)、增殖阶段(CD 最大生成率)和降解阶段(总 CD 值)。同对照组相比,CKF 患者 LDL 氧化延滞时间显著下降,缩短 48%;最大氧化速率、总 CD 值无变化(表 3, Table 3)。提示 CKF 患者 LDL 抗氧化能力下降。

表3. 慢性肾功能衰竭患者和对照者血清低密度脂蛋白氧化易感性比较

Table 3. Comparison of susceptibility to oxidation of LDL and its subfractions from the CKF patients and controls in vitro ($\bar{x}\pm s$)

Index	CKF group (n=20)	Control group (n=30)
Lag time (min)	48.2±24.7 ^a	93.3±37.2
MR [$\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$]	1.04±2.83	0.98±1.36
Amount of CD ($\mu\text{mol}/\text{g}$)	89.2±54.2	78.6±76.3

a: $P<0.01$, compared with control group. MR: maxi rate.

2.4 低密度脂蛋白亚组分氧化易感性与血清低密度脂蛋白氧化程度的关系

慢性肾功能衰竭患者 LDL 氧化延滞时间与血清 LDL 氧化程度(ox-LDL/LDL_C)高度相关($r=-0.45$, $P<0.05$)。

3 讨论

肾脏病患者具有脂质代谢紊乱,肾病综合症以高胆固醇血症为主;而 CKF 患者主要表现为 TG 异常,TC 和 LDL_C 变化较小,HDLC 下降,载脂蛋白 B 升高^[7]。本文资料示 CKF 患者除表现上述脂质异常特征外,ox-LDL 水平及氧化程度均显著升高。小颗粒致密的 B 型 LDL 是 CHD 发生的强危险因素^[8]。Austin 等^[9]报道,含有以 B 型 LDL 为主的个体发生心肌梗死的危险性是一般 LDL 的 3 倍。最近报道,对大批人群随访的前瞻性研究均认为 LDL 亚组分分布同 CHD 发生密切相关^[10]。我们的研究亦表明中国人群中冠心病患者总 LDL、LDL₂、LDL₃ 和 LDL₄ 显著增高,且 LDL 分布向小颗粒致密的 LDL 亚组分倾移^[11]。本文资料中 CKF 患者 LDL 总蛋白含量及 LDL₁~LDL₄ 的分布与对照组相比无差别,LDL 分布并未向小颗粒致密的 LDL 亚组分倾移,可见高浓度的 B 型 LDL 不可能对本组 CKF 患者疾病发展起着重要作用,这对血清 LDL 的组成及特性的研究尤为重要。我们曾报道 CKF 患者 LDL-TG,LDL-TG/LDL_C 比值显著升高,LDL 的氧化程度同 LDL 组成(LDL-TG/LDL_C)高度相关^[1]。CKF 患者高

VLDL-TG 可促进胆固醇酯转移蛋白介导的 LDL 中胆固醇酯同 VLDL 中 TG 的交换;CKF 患者本身脂蛋白脂酶和肝脂酶活性下降,使用肝素又耗竭了脂蛋白脂酶,循环血液中载脂蛋白 C II 的丢失则使脂蛋白酶激活剂减少,对 TG 分解作用降低,导致 LDL 中 TG 积累^[12]。富含 TG 的 LDL 同细胞表面载脂蛋白 B 受体的结合力低,难以从循环血液中清除,在血清中停留时间长,更有机会被氧化^[13]。本文中 CKF 患者 LDL 氧化延滞时间较对照组明显缩短,易于氧化;LDL 氧化延滞时间同血清 LDL 氧化程度高度负相关,表明抗氧化性低的 LDL 直接导致其被高氧化状态。LDL 氧化易感性同 As 发生、发展程度密切相关^[4,14],而关于肾病患者 LDL 亚组分分布及氧化易感性国外报道较少,结果也不一致,如肾移植患者 B 型 LDL 增加,LDL 氧化延迟时间缩短^[15];而 Westhuyzen 等^[16]报道肾衰患者透析前后 LDL 氧化易感性无变化,且同对照组亦无差别。CKF 患者 LDL 组成及氧化易感性异常可能与肾病发生、发展及并发心血管疾病相关联。

参考文献

1 童凤琴,汪俊军,庄一义. 慢性肾衰患者血清低密度脂蛋白组成异常及氧化修饰水平. 肾脏病与透析肾移植杂志,1998,7: 43-45

2 Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, et al. Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in man-prospective results from the Quebec cardiovascular study. *Circulation*, 1997, 95: 69-75

3 汪俊军. 低密度脂蛋白亚组分不同特性在动脉粥样硬化中的作用. 国外医学临床生化与检验分册,1997,18: 159-161

4 De-Rijke YB, Verwey HF, Vogelesang CJM, et al. Enhanced susceptibility of lowdensity lipoproteins to oxidation in coronary bypass patients with progression of atherosclerosis. *Clin Chim Acta*, 1995, 243: 137-149

5 Graaf J, Hak-Lemmers H, Hectors M, et al. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the density low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arterioscler Thromb*, 1991, 11: 298-306

6 Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, et al. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human lowdensity lipoproteins. *Free Rad Res Commun*, 1989, 6: 67-75

7 Durrington PN. Secondary hyperlipidaemia. *Br Med Bull*, 1990, 46: 1 005-1 024

8 Miller BD, Alderman EL, Haskell WL, et al. Predominance of dense low density lipoprotein particles predicts angiographic benefit therapy in Stanford coronary risk intervention project. *Circulation*, 1996, 24: 2 146-153

9 Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, et al. Lowdensity lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA*, 1988, 260: 1 917-921

-
- 10 Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, et al. Small, dense lowdensity lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in man-prospective results from the Quebec cardiovascular study. *Circulation*, 1997, **95**: 69-75
- 11 汪俊军, 庄一义, 刘小传. 冠心病患者低密度脂蛋白亚组分的分布及氧化易感性. 中华医学杂志, 1998, **78**(11): 833
- 12 Griffin BA, Freeman DJ, Tait GW, et al. Role of plasma triglyceride in the regulation of plasma LDL sub-fractions: relative contribution of small, dense LDL to coronary heart disease risk. *Atherosclerosis*, 1994, **116**: 241-253
- 13 Viens L, Lagrost L. Effect of lipid transfer activity and triglyceride hydrolysis on apolipoprotein B immunoreactivity in modified low density lipoproteins. *J Lipid Res*, 1997, **38**: 129-138
- 14 Regnstrom J, Nilsson J, Tornvall P, et al. Susceptibility to lowdensity lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet*, 1992, **339**: 1183-1186
- 15 Van-den-Dorpel MA, Ghanem H, Rischen VJ, et al. Lowdensity lipoprotein oxidation is increased in kidney transplant recipients. *Transplant Int*, 1996, **9**: 54-57
- 16 Westhuyzen J, Saltissi D, Healy H. Oxidation of low density lipoprotein in hemodialysis patients: effect of dialysis and comparison with matched controls. *Atherosclerosis*, 1997, **129**: 199-205
- (此文 1998-07-22收到, 1999-02-04修回)
- (此文编辑 文玉珊)