[文章编号] 1007- 3949(2000) - 04- 0365- 03 ·文献综述·

脂蛋白电泳术的研究进展

鄢盛恺 综 述, 陈保生[1] 审 校

(中国医学科学院 中国协和医科大学 北京协和医院检验科, 北京 100730;
1. 中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005)

[主题词] 脂蛋白; 电泳术; 等速电泳; 动脉粥样硬化

[摘 要] 以往临床实验多使用脂蛋白电泳进行不同类型的高脂血症分型。随着检测方法的不断改进与完善,特别是自动化检测仪器的广泛应用,实验室已多用一些血脂、脂蛋白和载脂蛋白定量测定指标进行脂质代谢紊乱及动脉粥样硬化研究,相比而言,脂蛋白电泳术的应用减少。利用琼脂糖凝胶电泳结合酶试剂染色测定血浆各种脂蛋白胆固醇或甘油三酯,应用等速电泳分析各脂蛋白组份含量和评价脂解酶活性是近年来国内外报道的两类新方法,均操作简便、精密度高,易于自动化,为动脉粥样硬化、高脂血症及调脂药疗效观察提供了新的研究手段。

[中图分类号] Q503 [文献标识码] A

自从 Fredrickson 等提出可根据血浆中脂蛋白组份的变化将高脂血症进行分型以来,脂蛋白电泳技术取得了很大的进步与发展。临床实验室多应用琼脂糖凝胶电泳法检测血浆(清)中脂蛋白的类型与相对百分含量,或根据脂蛋白电泳图谱将高脂血症进行分型。但随着人们对脂蛋白与冠心病、动脉粥样硬化之间关系的认识与研究的进一步深入,特别是美国国家胆固醇教育计划(national cholesterol education program, NCEP)提出的一些专家建议[1,2],促使实验室对传统的脂蛋白电泳方法进行改革,使之能对脂蛋白及其组份[如胆固醇、甘油三酯(triglyceride, TG)]进行定量测定。近年来,国内外相继报道了一些新的脂蛋白电泳技术,已引起临床研究者的兴趣与关注。

1 传统方法

1.1 基本原理

利用脂蛋白中所含载脂蛋白电荷的不同、颗粒大小不同以及分子量、等电点的不同,通过电泳法将各种脂蛋白分成 4 大类:乳糜微粒(chylomicron, CM)、前-β 脂蛋白、β-脂蛋白和 α-脂蛋白,分别相当于超速离心法分离的乳糜微粒、极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)和高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)。此外,应用一些技术还能从血浆脂蛋白中分离出中间密度脂蛋白(intermediate density lipoprotein, IDL)和脂蛋白(a),并能将 HDL 和 LDL 进一步分为数目不等的亚组份。电泳区带经脂质染料(如脂红 7B、油红 O、苏丹黑 B 及硝基四氮唑蓝等)染色后,进行肉眼观察或用光密度扫描仪扫描,即可对脂蛋白组份进行定性或定量分析。这类方法中所用的支持介质有纸、淀粉凝胶、醋酸纤维薄膜、琼脂糖及聚丙烯酰胺凝胶等[3],每种介质具有不同的强度、脆性。支持介质的好坏,不仅决定脂蛋白分离效果的好坏,也决定检测的效果。

1.2 主要问题

上述方法存在以下几个问题: 由于每种脂蛋白组份的异质性而使分辨率降低,导致难以准确区分各脂蛋白组份; ④由于每一种脂蛋白及其组份所含脂质不同,且其与脂质染料的亲和力不同,可导致染色深浅度的差异,从而影响脂蛋白组份的定量; ㈣由于电泳法分离的区带与超速离心法所分离的区带并不完全等同,故用超速离心法对电泳法进行校正也有其缺点,尚未发现一种可校正扫描峰值或染色强度以对脂蛋白进行准确定量的方法; 每一次或每一批脂蛋白电泳产物进行染色时,染料与酒精浓度很难保持一致。此外,支持物的选择、环境条件(如室温和相对湿度)、电压/电流及电泳时间的选择、脂蛋白颗粒的大小和所带电荷等都会影响脂蛋白电泳带的异常迁移或重叠,导致不能对每种脂蛋白组份进行准确定量,尤其是前 β-脂蛋白和 β-脂蛋白。目前琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳经过改进或与其它技术相结合,在脂蛋白组份分析及脂蛋白研究中的应用仍较广泛。

2 琼脂糖凝胶电泳技术定量检测脂蛋白胆固醇或甘油三酯

2.1 脂蛋白胆固醇的快速检测

2.1.1 原理 Helena 公司供 REP 快速自动电泳系统用的脂蛋白胆固醇检测试剂盒的原理是:血清(1 μL)经琼脂糖凝胶电泳(400 V, 15 min)后,空气干燥 2 min,仪器自动将胆固醇基质试剂(含胆固醇酯酶、胆固醇脱氢酶、黄递酶、NAD、NBT 等)均匀铺在凝胶表面, 30 ℃孵育 15 min。取出凝胶片,即可见清晰的兰色条带,从阳极起依次为 HDLC、快前 β-脂蛋白胆固醇[即脂蛋白(a)-C]、VLDLC 和 LDLC。凝胶片用 10% 冰醋酸固定 5 min 后,再用水振荡清洗 5 min。然后将凝胶置

[作者简介] 鄢盛恺,男,1969 年出生,博士助理研究员。 陈保生,男,教授,博士研究生导师。

仪器上烤干(54℃, 7 min)。570 nm 波长下自动扫描, 即可确定各自百分含量。同时将血清总胆固醇(total cholesterol, TC)值输入, 则可求得这 4 种脂蛋白胆固醇值[3~5]。

2.1.2 *方法学评价与应用* 本法检测胆固醇线性至 10.35 mmol/L, 或每条带胆固醇至 8.38 mmol/L, 检测灵敏度为每条带胆固醇至 0.06 mmol/L。如患者标本量超出检测限, 则应用去离子水稀释后重新测定。此法可很好分离 LDL、VLDL、快前 β 脂蛋白(α) 和 HDL, 并可对其进行直接定量。我们用 3 份不同水平的患者标本进行精密度实验, 结果显示, LDLC、VLDLC 和 HDLC 的批内 CV 分别为 1.26% ~ 3.28%、5.16% ~ 7.46% 和 3.78% ~ 5.86%, 批间 CV 分别为 2.78% ~ 4.08%、8.35% ~ 11.25% 和 4.23% ~ 6.36%, 具有较好的批内和批间精密度。此法同美国疾病控制中心的参考方法(超速离心法) 相比, HDLC、VLDLC 和 LDLC 均具有较好的相关性, 相关系数(r) 分别为 0.9924、0.9768 和 0.9981。比较研究认为电泳法在 HDLC 的 2 个重要的医学决定水平—即在 0.91 mmol/L 时, 偏差为 3.1%; 在 1.54 mmol/L 时偏差为 6.0%。测定总误差为 27.3%, 略高于 NCEP 推荐分析总误差 13% 的目标[1]。本法测定 HDLC 的总误差主要来自于方法的不精密度, 如浓度为 0.87 mmol/L 时总误差为 11.6%, 对于高浓度 HDLC 测定时的精密度尚有待进一步研究。在 LDLC 的医学决定水平—如 3.46 mmol/L 时, 偏差为 5.8%; 在 4.14 mmol/L 时, 偏差为 6.0%。测定总误差为 13.3%, 略高于 NCEP 推荐分析总误差 12% 的目标[2]。Contois 等[6] 比较了电泳法与超速离心法测定 64 例血脂异常标本的 VLDLC、LDLC 和 HDLC, 平均偏差分别为-0.19 mmol/L、0.09 mmol/L 和 0.09 mmol/L, 相关系数 r 分别为 0.83、0.97 和 0.92。近来 Benlian 等[7] 应用 Sebia 公司产 Hydrasys 快速电泳系统分析了 725 例新鲜血清标本(其中 512 例为血脂异常标本) 的 HDLC 和 LDLC 水平, 研究发现电泳法检测胆固醇线性至 10.35 mmol/L, 灵敏度至每条带胆固醇至 0.11 mmol/L。HDLC 和 LDLC 检测的批内和批间 CV 分别小于 6% 和 3%, TG 至 7.12 mmol/L 不干扰测定。Nauck 等[5] 研究认为, 电泳法测定脂蛋白(a)-C 的 CV 为 6.8% ~ 16.4%, 脂蛋白(a)-C 值与散射比浊法测定脂蛋白(a) 值呈线性相关(r = 0.906)。我们分析了免疫透射比浊法(x) 测定脂蛋白(a) 与用 REP 电泳系统测定脂蛋白(a)-C(y), 结果显示, 两者具有较好的相关性(r = 0.9235), 回归方程为 y = 0.4330x + 0.0566。北京地区健康人脂蛋白(a)-C 参考范围上限为 0.22 mmol/L, 与国外报道基本一致。虽然电泳法可清晰分离并定量脂蛋白(a)-C, 且有较好精密度, 但结果的判定与操作者关系密切。关于脂蛋白(a)-C 的临床应用价值正在进一步研究探讨。从上述研究可以看出, 琼脂糖凝胶电泳法经过改进后可同时测定 4 种脂蛋白胆固醇, 且简单、快速, 准确及经济地用于高脂血症的分型、冠心病风险估计及疗效评价。

2.2 脂蛋白甘油三酯的快速检测

2.2.1 *原理* 利用琼脂糖凝胶电泳分离脂蛋白结合甘油三酯酶试剂[如磷酸甘油脱氢酶-硝基四氮唑蓝法[8] 或磷酸甘油氧化酶(GPO)-Trinder 法[10] 等显色, 即可见清晰的兰色条带, 从阳极起依次为 HDL-TG、VLDL-TG 和 LDL-TG(标本中若有乳糜微粒, 可在原点处检出), 通过扫描得出各种脂蛋白甘油三酯区带所占的百分含量, 同血清 TG 浓度相乘, 即可求出各脂蛋白组份中甘油三酯的含量。Helena 公司已推出供 REP 快速自动电泳仪用的脂蛋白甘油三酯检测试剂盒。

2.2.2 *方法学评价与应用* Winkler 等[8] 利用 Helena REP 快速电泳系统采用琼脂糖凝胶电泳法分离脂蛋白, 继之酶法(磷酸甘油脱氢酶-硝基四氮唑蓝法) 染甘油三酯并定量的方法。该法同检测脂蛋白胆固醇操作相似, 具有较好精密度(批内 CV 为 5.2% ~ 9.8%, 批间 CV 为 3.2% ~ 12.9%)。此法与超速离心法具有良好的相关性, HDL-TG 与 α-脂蛋白 TG: r = 0.847; VLDL-TG 与前 β-脂蛋白 TG: r = 0.989; LDL-TG 与 β-脂蛋白 TG: r = 0.815。HDL-TG、VLDL-TG 和 LDL-TG 的回收率分别为 89%、95%、90%。近来, 孙翠平等[9] 报道了采用手工琼脂糖凝胶电泳分离脂蛋白结合甘油三酯酶试剂(GPO-Trinder 法) 测定脂蛋白甘油三酯的方法及临床应用。结果显示, HDL-TG、VLDL-TG 和 LDL-TG 的批内 CV 分别为 8.0% ~ 10.2%、3.8% ~ 6.5% 和 4.3% ~ 7.0%; 批间 CV 分别为: 9.5% ~ 16.2%、6.8% ~ 8.5% 和 4.8% ~ 9.7%。HDL-TG、VLDL-TG 和 LDL-TG 的平均回收率分别为 88.8%、93.4% 和 91.7%。电泳法与参考方法(超速离心法) 比较, HDL-TG、VLDL-TG 和 LDL-TG 的相关系数分别为 0.873、0.955 和 0.912。冠心病组同相应对照组比较 LDL-TG 及 LDL-TG/LDLC 比值均显著升高。该法简便易行, 是当前精密准确定量各脂蛋白组份中甘油三酯的理想方法。Helena 公司已推出的试剂盒可用于仪器进行自动测定, 并能同时进行脂蛋白胆固醇和甘油三酯的检测, 这为动脉粥样硬化、冠心病及调脂药疗效观察提供了很好的研究手段。

3 等速电泳技术分析各种脂蛋白组份

3.1 原理

等速电泳(isotachophoresis, ITP) 是一种不连续介质电泳技术, 也是根据样品的有效迁移率(也称淌度) 的差别进行分离。为达到分离的目的, 还要有两个特殊的条件: ⒃特殊的电解质体系, 即具有一定 pH 缓冲能力的前导电解质和终末电解质, 这是 ITP 的首要条件; 背景电流要小到足以克服区带电泳效应。ITP 有分析与制备两种类型, 其中分析型 ITP 即毛细管 ITP 已发展成为商品化毛细管电泳系统, 用于脂蛋白分析研究。以往多在毛细管 ITP 前将脂蛋白用脂质染料苏丹黑 B 进行染色[10~13]。近来多采用荧光标记的磷脂类, 如 NBD-酰基鞘氨醇用于各脂蛋白组份的定量, 它对脂蛋白标记显示动态饱和性。待血液凝固后, 离心, 与 NBD-酰基鞘氨醇共同孵育 1 min, 再将血清加样至前导电解质与终末电解质间的硅化毛细管(内径 180 μm, 至检测器长 20 cm) 中, 电泳 6 min 后染色的脂蛋白因其有效迁移率不同而得到分离。通过激光诱导的荧光检测器(激发光波长 488 nm, 发射光波长 510 nm) 可使非荧光区组份分为 9 个亚组份[3]。

3.2 方法学评价与应用

毛细管 ITP 法可将 HDL 分为 3 种主要亚类: 快速迁移

带, 主要含载脂蛋白 A iv和磷脂酰胆碱, 与血清载脂蛋白 A iv水平呈正相关, 而与 TG 浓度呈负相关; ④中速迁移带, 主要含载脂蛋白 A ㊆、E、C, 与 LDL 颗粒浓度呈负相关; ㈣慢速迁移带, 主要含载脂蛋白 A iv、A ㊄J、胆固醇酯转运蛋白、磷脂转运蛋白和卵磷脂胆固醇酰基转移酶。含载脂蛋白 B 的脂蛋白可分为 3 个主要亚类: CM 和富含 TG 的大颗粒 VLDL; ④小 VLDL 和 IDL 颗粒; ㈣LDL, 又可分为大而轻 LDL、小颗粒致密 LDL 两种。其中 VLDL 组份与血清载脂蛋白 E 水平呈正相关, IDL 组份与血清载脂蛋白 C ㊃水平呈正相关, LDL 与 LDLC 浓度呈正相关。快速迁移 LDL 带与载脂蛋白 B 水平和载脂蛋白 C ㊃B 呈正相关[3, 13]。毛细管 ITP 法与常规的 HDLC 和 LDLC 测定法(如沉淀法)相比, 具有较好的相关性(r 分别为 0.90 和 0.91)。Bittolo-Bon 等[13]应用分析型毛细管 ITP 法将血浆 LDL 分成 4 类, 慢速迁移带占多数(LDL4), 接着是 LDL3, 然后是快速迁移带 LDL2 和 LDL1。其中 LDL4 与血浆 TG 和 LDLC 呈负相关, 与 HDLC 及 LDL 直径呈正相关, 而 LDL1 正相反。(LDL1+ LDL2)/(LDL3+ LDL4)与 LDLC 呈正相关, 而与 LDL 颗粒直径呈明显负相关。根据其电荷的差异, 在血浆中至少可发现 3 类致动脉粥样硬化的 LDL, 名为氧化型 LDL、糖化型 LDL 和小颗粒致密 LDL。根据毛细管 ITP 法所得出的 LDL 谱可计算快速或慢速迁移 LDL 带的相对频率, 判断存在多少致动脉粥样硬化的 LDL。除定量测定 HDLC 与 LDLC 外, 毛细管 ITP 法还可根据前体/底物比评价主要的脂解酶活性来进一步了解脂代谢过程。如根据电泳图谱中 HDL 慢迁移带与快迁移带之比估计人血浆中卵磷脂胆固醇酰基转移酶活性, 根据峰 5(主要含未水解的富含 TG 的脂蛋白)和峰 6(主要含 IDL)比值估计脂蛋白脂酶活性, 根据 VLDL/IDL 和 LDL 的相对分布可用来分析混合型高脂血症患者肝脂酶活性。毛细管 ITP 法是唯一能定量检测人血浆中前 β-HDL 的分析技术。此外, 毛细管 ITP 法还可用于 CM、富含 TG 的大颗粒 VLDL、富含胆固醇酯的 VLDL 残粒及 IDL 颗粒等定量检测, 用于血浆 TG 代谢的脂肪餐研究等[3]。分析型毛细管 ITP 技术是临床实验室进行脂质代谢紊乱和动脉粥样硬化研究的一种快速、可靠、自动化的脂蛋白组份分析方法。缺点是需专门仪器, 技术要求高。

4 结束语

改良琼脂糖凝胶电泳法约需 1 h, 可直接同时测定血清(浆)中 HDL、VLDL、LDL 胆固醇或甘油三酯浓度, 也用于分离和定量脂蛋白(a)-C。该法分析步骤简便合理, 主要问题在于 β 和前 β 带的界定和分离, 这需要操作者进行分析判别。分析型毛细管 ITP 技术也可用于 HDLC 和 LDLC 的直接定量测定, 此法约需 7 min, 精密度与目前所用常规方法相似, 其最大优点在于可通过测定一些脂蛋白颗粒水平对人血清中几种主要脂解酶活性进行估计与评价。随着脂蛋白电泳技术的不断改进与发展, 这类技术在动脉粥样硬化及相关疾病的基础与临床研究中的应用也将不断深入。

参考文献

[1] Warnick GR, Wood PD. National cholesterol education program recommendations for measurement of high-density lipoprotein cholesterol: Executive summary [J]. *Clin Chem*, 1995, **41**: 1 427- 433

[2] Bachorik PS, Ross JW. National cholesterol education program recommendations for measurement of low-density lipoprotein cholesterol: Executive summary [J]. *Clin Chem*, 1995, **41**: 1 414- 420

[3] Naito HK, Ward KM, Schmitz G, et al. New approaches to the use of lipoprotein electrophoresis in the clinical laboratory [M]. In: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH, eds. *Handbook of Lipoprotein Testing*. Washington, DC: AACC press, 1997; 477- 495

[4] Warnick GR, Leary ET, Goetsch J. Electrophoretic quantitation of LDL-cholesterol using the Helena REP [J]. *Clin Chem*, 1993, **39**: 1 122

[5] Nauck M, Winkler K, Marz W, et al. Quantitative determination of high-, low-, and very low density lipoproteins and lipoprotein(a) by agarose gel electrophoresis and enzymatic cholesterol staining [J]. *Clin Chem*, 1995, **41**: 1 761- 767

[6] Contois JH, Gillmor RG, Moore RE, et al. Quantitative determination of cholesterol in lipoprotein fractions by electrophoresis [J]. *Clin Chim Acta*, 1999, **282**: 1- 14

[7] Benlian P, Cansier C, Hennache G, et al. Comparison of a new method for the direct and simultaneous assessment of LDL- and HDL-cholesterol with ultracentrifugation and established methods [J]. *Clin Chem*, 2000, **46**: 493- 505

[8] Winkler K, Nauck M, Siekmeier R, et al. Determination of triglycerides in lipoproteins separated by agarose gel electrophoresis [J]. *J Lipid Res*, 1995, **36**: 1 839- 847

[9] 孙翠平, 汪俊军, 庄一义. 脂蛋白电泳结合酶显色测定血清各脂蛋白中甘油三酯及临床应用. 临床检验杂志, 1999, 17: 203- 205

[10] Nowicka G, Bruning T, Bottcher A, et al. Macrophage interaction of HDL subclasses separated by flow isotachophoresis [J]. *J Lipid Res*, 1990, **31**: 1 947

[11] Nowicka G, Bruning T, Grothaus B, et al. Characterization of apolipoprotein B-containing lipoproteins separated by preparative free flow isotachophoresis [J]. *J Lipid Res*, 1990, **31**: 1 173- 186

[12] Schlenck A, Herbeth B, Siest G, et al. Characterization and quantification of serum lipoprotein subfractions by capillary isotachophoresis: relationships with lipid, apolipoprotein, and lipoprotein levels [J]. *J Lipid Res*, 1999, **40**: 2 125- 133

[13] Bittolo-Bon G, Cazzolato G. Analytical capillary isotachophoresis of total plasma lipoproteins: a new tool to identify atherogenic low density lipoproteins [J]. *J Lipid Res*, 1999, **40**: 170- 177

(此文 2000- 04- 26 收到, 2000- 11- 09 修回)
(此文编辑　胡必利　朱雯霞)