

血浆氧化型低密度脂蛋白水平与低密度脂蛋白循环免疫复合物的相关性

胡兵¹, 汪俊军², 张春妮², 蔡辉¹

(中国人民解放军南京军区南京总医院 1. 中医科, 2. 全军医学检验中心; 江苏省南京市 210002)

[关键词] 生物化学; 氧化修饰低密度脂蛋白与循环免疫复合物的关系; 酶联免疫吸附测定; 冠状动脉疾病; 脂蛋白, 低密度, 氧化型; 循环免疫复合物; 动脉粥样硬化

[摘要] 为探讨血浆氧化型低密度脂蛋白水平与低密度脂蛋白循环免疫复合物间关系。分别建立了以抗人 IgG 为包被抗体、酶标抗载脂蛋白 B 为检测抗体的低密度脂蛋白循环免疫复合物酶联免疫吸附试验; 以抗氧化型低密度脂蛋白为包被抗体、酶标抗载脂蛋白 B 为检测抗体的氧化型低密度脂蛋白酶联免疫吸附试验。同时测定 60 例冠心病患者及 50 例对照人群低密度脂蛋白循环免疫复合物、氧化型低密度脂蛋白水平并进行相关性分析。结果发现, 冠心病患者甘油三酯、脂蛋白(a)和载脂蛋白 B 水平均显著升高; 高密度脂蛋白胆固醇和载脂蛋白 AI 水平降低; 且低密度脂蛋白循环免疫复合物(2.74 ± 0.73 比 1.38 ± 0.78 , $P < 0.001$)、氧化型低密度脂蛋白水平(595.5 ± 194.8 比 $440.3 \pm 175.0 \mu\text{g/L}$, $P < 0.001$)均显著升高。低密度脂蛋白循环免疫复合物水平分别同血浆总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、脂蛋白(a)及载脂蛋白 B 正相关; 同载脂蛋白 AI 负相关。氧化型低密度脂蛋白水平亦分别同血浆总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、脂蛋白(a)及载脂蛋白 B 正相关。氧化型低密度脂蛋白水平与低密度脂蛋白循环免疫复合物亦呈正相关($r = 0.313$, $P < 0.005$)。结果提示, 氧化型低密度脂蛋白及循环免疫复合物升高是动脉粥样硬化发生的危险因素。

[中图分类号] Q513

[文献标识码] A

Analyzing the Relationship between in Vivo Oxidized Low Density Lipoprotein and Low Density Lipoprotein Immune Complexes

HU Bing, WANG Jun-Jun, ZHANG Chun-Ni, and CAI Hui

(Department of Traditional Chinese Medicine, Nanjing General Army Hospital, Nanjing 210002, China)

[KEY WORDS] Lipoprotein, LDL; Oxidation; Immune Complexes; Coronary Disease; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the possible relationship between oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and LDL-immune complexes (IC) level. **Methods** We developed a "sandwich" ELISA for measuring plasma LDL-IC level using anti-human IgG (Fab) as the capture antibody and quantitating with monoclonal anti-apoB enzyme conjugate. Oxidized LDL was also detected by a sandwich ELISA method using monoclonal antibodies against ox-LDL as the capture antibody and quantitating with anti-apoB enzyme conjugate. Their levels were studied in 60 patients with coronary heart disease (CHD) and 50 control subjects. **Results** Plasma concentrations of TG, lipoprotein (a) and apolipoprotein B in CHD patients were all significantly increased whereas HDLC and apolipoprotein AI levels were decreased. Plasma LDL-IC (2.74 ± 0.73 AU vs 1.38 ± 0.78 AU, $P < 0.001$) and ox-LDL ($595.5 \pm 194.8 \mu\text{g/L}$ vs $440.3 \pm 175.0 \mu\text{g/L}$, $P < 0.001$) concentrations in the patients with CHD were both significantly higher than those of control. The relationships between LDL-IC, ox-LDL levels and other lipid traits in all the studied subjects ($n = 110$) were carried out. LDL-IC levels were positively correlated with TC, TG, LDL-C, lipoprotein(a) and apolipoprotein B concentrations while negatively correlated with apolipoprotein AI concentrations respectively. Similarly ox-LDL levels were also found positively correlated with TC, LDL-C, or apolipoprotein B concentrations respectively. Furthermore a significantly positive relation between ox-LDL and LDL-IC levels was found ($r = 0.313$, $P < 0.005$). **Conclusions** Increased oxidized LDL and LDL immune complexes levels are risk factors for atherosclerosis.

氧化型脂蛋白在动脉粥样硬化(atherosclerosis,

As)发生、发展中起着重要作用。文献[1,2]报道, 血浆氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)及其自身抗体水平是预测 As 性心血管疾病发生的有力指标。氧化型 LDL 除经清道夫受体途径被巨噬细胞吞噬外; 还可与自身抗体结合, 形成 LDL 循环免疫复合物(immune complexes, IC), 诱导巨噬细胞内胆固醇酯堆积并转化为泡沫细胞, 且

[收稿日期] 2003-03-11 [修回日期] 2003-10-21

[作者简介] 胡兵, 女, 1966 年出生, 江苏省镇江市人, 学士, 主治医师, 主要从事中西医结合治疗心脑血管疾病。汪俊军, 男, 1966 年出生, 安徽省怀宁县人, 硕士, 副主任技师; 主要从事脂蛋白与动脉粥样硬化发病的关系研究, 在国内外发表有关研究论文 50 多篇, 稿件联系人, E-mail 为 wangjj6@jlonline.com。张春妮, 女, 1963 年出生, 江苏省徐州市人, 博士研究生, 副主任技师; 主要从事脂蛋白与动脉粥样硬化发病的关系研究, 在国内外发表有关研究论文 40 多篇。

效果强于其他途径;同时释放多种细胞因子、破坏血管内皮、诱导平滑肌细胞增殖,加速 As 进程;且 LDL-IC 水平高低亦是冠心病(coronary heart disease, CHD)发生的预测指标^[3,4]。Mironova 等^[5]认为 LDL 颗粒的大小、氧化易感性和脂肪酸组成在体内促使 ox-LDL 自身抗体的产生和 LDL-IC 的形成中起重要作用。我们的研究也表明 LDL 氧化易感性、脂质组成与体内 ox-LDL 水平相关^[6,7],提示氧化型 LDL 与 LDL-IC 水平相关联,但未见文献报道,本文对此进行分析以揭示体内 LDL-IC 升高机制。

1 对象和方法

1.1 实验对象

男性冠心病患者(经冠状动脉造影确诊或心肌梗死存活者)60 例,年龄 57.8 ± 4.9 岁。对照组 50 例,选自健康体检者(临床、心电图和实验室检查正常),男性,年龄 54.8 ± 3.8 岁。

1.2 血标本采集

血液标本采自禁食 12 h 以上,3 000 r/min 离心 5 min 后留取血浆, -70°C 保存。

1.3 低密度脂蛋白免疫复合物和氧化型低密度脂蛋白的酶联免疫吸附法测定

两法均是本室自行建立。LDL-IC 采用以抗人 IgG 为包被抗体,酶标抗载脂蛋白 B 为检测抗体的酶联免疫吸附法测定^[8]。待测血清经 PEG 沉淀 IC,复溶后进行测定。参考血清浓度定为 1 个相对单位(AU)。氧化型 LDL 采用以抗人 ox-LDL 为包被抗体,酶标抗载脂蛋白 B 为检测抗体的酶联免疫吸附法测定^[6]。使用的 ox-LDL 单抗与天然 LDL 之间无交叉免疫性;抗载脂蛋白 B 与天然的和氧化型 LDL 均具有免疫反应性。

1.4 血脂及载脂蛋白的测定

总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)及高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein, HDLC)用酶法测定,使用 BM 公司试剂。LDL 胆固醇(LDL cholesterol, LDLC)用 Friedewald 公式计算。载脂蛋白 A I、载脂蛋白 B 采用日本第一化学免疫比浊试剂测定。测定仪器为日立 7600 生物化学自动分析仪。脂蛋白(a)采用酶联免疫吸附法检测^[8]。

1.5 统计学方法

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据处理采用统计软件。各变量间的差异用非参数 Mann-Whitney U 检验;变量间相关性采用非参数 Spearman rank

coefficient test 分析。

2 结果

2.1 冠心病患者的血脂和载脂蛋白水平

冠心病患者甘油三酯、脂蛋白(a)和载脂蛋白 B 水平显著升高,而高密度胆固醇及载脂蛋白 A I 水平下降(表 1, Table 1)。

表 1. 冠心病患者血脂和载脂蛋白水平($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Plasma lipids and apolipoproteins concentrations in patients with coronary heart disease

指 标	冠心病 ($n=60$)	对照组 ($n=50$)
总胆固醇 (mmol/L)	5.12 ± 1.03	4.73 ± 1.14
甘油三酯 (mmol/L)	2.40 ± 1.30^a	1.45 ± 0.86
HDLC (mmol/L)	1.17 ± 0.23^a	1.30 ± 0.23
LDLC (mmol/L)	2.84 ± 0.86	2.76 ± 1.01
载脂蛋白 A I (g/L)	1.36 ± 0.23^a	1.48 ± 0.16
载脂蛋白 B (g/L)	1.15 ± 0.31^a	0.83 ± 0.23
脂蛋白(a) (mg/L)	274.1 ± 212.0^a	181.0 ± 110.6

a: $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 冠心病患者血浆氧化型低密度脂蛋白和低密度脂蛋白免疫复合物水平

冠心病患者血浆 ox-LDL 浓度为 $595.5 \pm 194.8 \mu\text{g/L}$,高于对照组的 $440.3 \pm 175.0 \mu\text{g/L}$,差异有显著性统计学意义($P < 0.001$)。冠心病患者血浆 LDL-IC 浓度为 $2.74 \pm 0.73 \text{ AU}$,亦高于对照组($1.38 \pm 0.78 \text{ AU}$, $P < 0.001$)。

表 2. 氧化型低密度脂蛋白和低密度脂蛋白免疫复合物水平同血脂的相关分析

Table 2. Spearman rank correlations between LDL-IC and ox-LDL levels and other lipid traits

因 素	LDL-IC		ox-LDL	
	r	P	r	P
总胆固醇	0.483	< 0.0001	0.313	< 0.005
甘油三酯	0.466	< 0.0001	0.154	> 0.05
LDLC	0.386	< 0.001	0.350	< 0.0005
HDLC	-0.119	> 0.05	-0.089	> 0.05
脂蛋白(a)	0.377	< 0.001	0.074	> 0.05
载脂蛋白 A I	-0.296	< 0.005	-0.096	> 0.05
载脂蛋白 B	0.584	< 0.0001	0.268	< 0.01

2.3 氧化型低密度脂蛋白和低密度脂蛋白免疫复

合物水平同血脂的相关分析

表 2(Table 2)为氧化型低密度脂蛋白和低密度脂蛋白免疫复合物水平同血脂的相关分析。可见 LDL-IC 水平分别同血浆总胆固醇、甘油三酯、LDL 胆固醇、脂蛋白(a)和载脂蛋白 B 浓度正相关,同载脂蛋白 A I 浓度负相关;ox-LDL 水平分别同血浆总胆固醇、LDL 胆固醇和载脂蛋白 B 浓度正相关。LDL-IC 与 ox-LDL 水平亦呈正相关($r = 0.313, P < 0.005$)。

3 讨论

血浆中可检测出 ox-LDL,其浓度与冠心病的发病呈正相关。对不稳定冠心病患者血浆中分离的 ox-LDL 和 As 斑块中 ox-LDL 特性进行分析发现,两者电泳迁移率、赖氨酸残基和不饱和脂肪酸含量均一致,表明血浆中有少量 ox-LDL 直接来源于不稳定斑块的释放。在病情较稳定的患者中,血浆高 ox-LDL 水平可能反映动脉中新形成的、或斑块进一步损伤处 ox-LDL 的更新代谢。若冠心病患者血浆中含有大量的 ox-LDL,周围的 LDL 就更易被氧化,同时也潜伏着 As 发生的高风险。血浆轻微氧化的 LDL 较重度氧化 LDL 清除速率慢,可进一步转变为中度氧化的 LDL^[1]。

氧化型 LDL 在动脉内膜通过巨噬细胞清道夫 A I 型和 II 型受体途径被摄入,促进胆固醇酯的堆积和泡沫细胞的形成。在外周血 ox-LDL 的清除过程中,清道夫 A 受体的作用比较小,ox-LDL 的清除主要依靠肝脏的枯否细胞,枯否细胞除拥有清道夫 A 受体外,还具有其他 ox-LDL 受体,如 Fc γ 受体等。Fc γ 受体 I 介导 LDL-IC 的摄取引起胆固醇酯的堆积;Fc γ 受体 II 同时识别 ox-LDL 和 LDL-IC;Fc γ 受体 III 介导与致敏红细胞结合的大颗粒 IC 的摄取^[4,9,10]。循环中的 ox-LDL 经过上述不同途径被清除,同时新生的 ox-LDL 又补充到外周血中,维持体内 ox-LDL 水平的动态平衡。

文献[1,11]报道了测定血浆 ox-LDL 水平的临床意义,认为结合其他的血脂、炎症指标可用于评估冠心病发生的危险性及 As 斑块的稳定性。有关 ox-LDL 自身抗体的临床价值报道不一。部分研究表明高滴度的自身抗体水平同急性心肌梗死的发生以及 As 发生的程度密切相关;而另一些研究没有得到类似得结论,有学者认为血浆中 LDL-IC 可能干扰自身抗体的测定^[12]。

高 LDL-IC 水平作为 As 发生的一个强预测指标

已得到认可。我们通过对大样本的病例一对照研究证实冠心病患者 LDL-IC 水平升高^[8]。Shoji T 等^[13]发现 ox-LDL 水平与其自身抗体水平负相关。Mustafa 等^[14]报道 LDL-IC 水平与心磷脂抗体间正相关,心磷脂抗体与 ox-LDL 抗体一样都参与 LDL-IC 形成,但未发现 ox-LDL 自身抗体与 LDL-IC 水平相关。

本文发现体内 ox-LDL 和 LDL-IC 水平呈高度正相关。我们使用的 ox-LDL 单抗与天然 LDL 之间无交叉免疫性,因此天然 LDL 不被检测 ox-LDL 的 ELISA 法检测出。而抗载脂蛋白 B 与天然及氧化型 LDL 均具有免疫反应性,故同时含有载脂蛋白 B 和 IgG 位点的复合物能被检测出。体内 ox-LDL 可存在多种氧化位点,国内外已制备出多种针对 ox-LDL 不同位点的单抗,但 ox-LDL 仍然具有与抗载脂蛋白 B 的免疫反应性。而体内不存在针对天然 LDL 的自身抗体,天然 LDL 也就不能形成 IC,因此只有氧化型 LDL 才能与相应的自身抗体结合形成 IC 被检测出^[8]。

本组冠心病患者甘油三酯水平显著升高,高甘油三酯促进易于氧化的 B 型 LDL 形成,高水平 ox-LDL 导致强的免疫应答,进而形成高浓度的 IC;本文资料亦显示甘油三酯水平分别与 ox-LDL 和 LDL-IC 相关。我们同时分析了 ox-LDL 和 LDL-IC 同其他血脂的相关性,发现 LDL-IC 分别与 LDL 胆固醇、总胆固醇、脂蛋白(a)和载脂蛋白 B 浓度正相关,这与高水平的 LDL、脂蛋白(a)相应引起强的免疫应答有关;而 LDL-IC 同载脂蛋白 A I 浓度负相关,与 HDL 的抗氧化作用有关,减少氧化型脂蛋白的产生。另外,ox-LDL 与总胆固醇、LDL 胆固醇及载脂蛋白 B 水平相关,与我们以前报道的 ox-LDL 水平与小而密的 LDL 浓度相关一致^[6,7]。

以上结果表明高 ox-LDL、LDL-IC 是 As 发生的危险因素;ox-LDL 与 LDL-IC 间相关进一步明确了 LDL 自身免疫在 As 发生中的作用。

【参考文献】

- [1] 汪俊军. 血浆氧化 LDL 水平与动脉粥样硬化的关系. 临床检验杂志, 2003, 21 (1): 48-50
- [2] 汪俊军, 史利宁, 张春妮. 低密度脂蛋白自身免疫在动脉粥样硬化发生中的作用. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10 (6): 545-548
- [3] Kearney JF. Immune regulation of ox-LDL in atherosclerosis. J Clin Invest, 2000, 105 (20): 1 683-685
- [4] Lopes-Virella MF, Binzafar N, Rackley S, Takei A, La Via M, Virella G. The uptake of LDL-IC by human macrophages: predominant involvement of the Fc gamma RI receptor. Atherosclerosis, 1997, 135 (2): 161-170
- [5] Mironova MA, Klein RL, Virella GT, Lopes-Virella MF. Anti-modified LDL antibodies LDL-containing immune complexes and susceptibility of LDL to in vitro oxidation in patients with type 2 diabetes. Diabetes, 2000, 49 (6): 1 033-041
- [6] Wang JJ, Liu XZ, Zhang YY, Li LY. Correlation between susceptibility of LDL

- subfractions to in vitro oxidation and in vivo oxidized LDL. *Clin Biochem*, 2000, **33** (1): 71-73
- [7] Wang JJ, Zhang YY, Liu XZ, Chen DN. The in vivo oxidized LDL to LDL-cholesterol ratio is correlated with lipid content of LDL. *Atherosclerosis*, 2000, **149** (1): 217-218
- [8] Wang JJ, Qiang HJ, Zhang CN, Liu XZ, Chen DN, Wang SM. Detection of IgG-bound lipoprotein(a) immune complexes in patients with coronary heart disease. *Clin Chem Acta*, 2003, **327** (1-2): 115-122
- [9] Ling W, Loughheed M, Suzuki H, Buchan A, Kodama T, Steinbrecher UP. Oxidized or acetylated low density lipoproteins are rapidly cleared by the liver in mice with disruption of the scavenger receptor class A type I/II gene. *J Clin Invest*, 1997, **100** (2): 244-252
- [10] Morganeli PM, Rogers RA, Kitzmiller TJ, Bergerson A. Enhanced metabolism of LDL aggregates mediated by specific human monocyte IgG Fc receptors. *J Lipid Res*, 1995, **36** (4): 714-724
- [11] Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive correlation with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation*, 2001, **103** (15): 1955-960
- [12] Lopes-Virella MF, Virella G, Orchard TJ, Koskinen S, Evans RW, Becker DJ, Forrest KY. Antibodies to oxidized LDL and LDL-containing immune complexes as risk factors for coronary artery disease in diabetes mellitus. *Clin Immunol*, 1999, **90** (2): 165-172
- [13] Shoji T, Nishizawa Y, Fukumoto M, Shimamura K, Kimura J, Kanda H, et al. Inverse relationship between circulating oxidized low density lipoprotein (α -LDL) and anti- α -LDL antibody levels in healthy subjects. *Atherosclerosis*, 2000, **148** (1): 171-177
- [14] Mustafa A, Nityanand S, Berghlund L, Lithell H, Lefvert AK. Circulating immune complexes in 50-year-old men as a strong and independent risk factor for myocardial infarction. *Circulation*, 2000, **102** (21): 2576-581

(此文编辑 胡必利)

·资料·

《中国动脉硬化杂志》创刊 10 周年统计数据(之一)

1993 ~ 2003 年收稿、录用和出版统计

年 份	收 稿			增长率	录用篇数			退稿率	编辑出版		刊载文章			刊载研究论文		刊载文献综述		其它文章	
	投稿	组稿	合计		全文	摘要	合计		期数	内芯页数	全文	摘要	合计	篇数	构成比	篇数	构成比	篇数	构成比
1993	10	24	34	0	30	0	30	11.8%	1	96	20	0	20	15	0.75	2	0.1	3	0.15
1994	64	10	74	117.6%	59	0	59	20.3%	3	202	51	0	51	33	0.648	9	0.176	9	0.176
1995 ^①	59	132	191	158.1%	55	117	172	9.9%	4	362	79	117	196	158	0.806	26	0.133	12	0.061
1996	104	10	114	-40.3%	90	4	94	17.5%	4	334	78	4	82	62	0.756	13	0.159	7	0.085
1997	147	20	167	46.5%	123	2	125	25.1%	4	384	90	2	92	60	0.652	17	0.185	15	0.163
1998	180	13	193	15.6%	125	6	131	32.1%	4	398	106	6	112	75	0.670	25	0.223	12	0.107
1999	224	12	236	22.3%	140	9	149	37.0%	4	400	114	9	123	92	0.748	22	0.179	9	0.073
2000 ^②	257	53	310	31.4%	150	46	196	36.8%	5	478	119	46	165	95	0.576	26	0.157	44	0.267
2001	320	10	330	6.5%	190	3	193	41.6%	5	496	142	3	145	110	0.759	25	0.172	10	0.069
2002 ^③	339	110	449	36.1%	207	82	289	35.6%	7	728	202	82	284	223	0.785	55	0.194	6	0.021
2003	443	56	499	11.1%	223	33	256	48.7%	7	768	197	21	218	179	0.821	33	0.151	6	0.028
合计	2189	408	2597	—	1392	302	1694	—	48	—	1198	290	1488	1003	0.741	253	0.170	133	0.089

注:①1995 年第 2 期为中国病理生理学会动脉粥样硬化专业委员会《张家界会议专辑》,刊发文章 132 篇(含摘要)。

②2000 年出版增刊 1 期,为第一次全国防治动脉硬化性心脏病学术会议专辑,刊发文章 53 篇(含摘要)。

③2002 年出版增刊 1 期,为第二次全国防治动脉硬化性心脏病学术会议专辑,刊发文章 110 篇(含摘要)。