

人血清载脂蛋白 A (Ⅱ)的检测及与血脂的相关性

胡松, 赵水平, 刘琼, 胡敏

(中南大学湘雅二医院内科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 生物化学; 载脂蛋白 A (Ⅱ); 血脂; 体质指数; 酶联免疫吸附法; 相关性

[摘要] 目的 开发并利用了一种新的免疫学方法以检测人血清载脂蛋白 A (Ⅱ)含量, 进而观察健康中国人群中血清载脂蛋白 A (Ⅱ)与血脂的相关性。方法 血脂用酶法及匀相测定法测定; 应用针对不同抗原位点的抗重组载脂蛋白 A (Ⅱ)单克隆抗体配对, 形成双夹心酶联免疫吸附方法以检测人血清载脂蛋白 A (Ⅱ)。结果 92 例健康中国人群中血清载脂蛋白 A (Ⅱ)浓度为 $182.7 \pm 104.7 \mu\text{g/L}$ ($5.4 \sim 455.6 \mu\text{g/L}$)。所有研究对象中血清载脂蛋白 A (Ⅱ)浓度与甘油三酯呈负相关 ($r = -0.225, P = 0.031$), 在女性中更为显著 ($r = -0.496, P = 0.001$)。所有研究对象载脂蛋白 A (Ⅱ)浓度与高密度脂蛋白胆固醇呈正相关 ($r = 0.453, P < 0.001$), 在女性中更为显著 ($r = 0.617, P < 0.001$)。载脂蛋白 A (Ⅱ)浓度与低密度脂蛋白胆固醇和总胆固醇均不相关。载脂蛋白 A (Ⅱ)浓度与体质指数呈负相关 ($r = -0.345, P = 0.001$), 在女性中更显著 ($r = -0.456, P = 0.002$)。结论 人血清中载脂蛋白 A (Ⅱ)含量极低, 并与甘油三酯呈负相关, 与高密度脂蛋白胆固醇呈正相关, 与体质指数呈负相关。

[中图分类号] Q5

[文献标识码] A

Correlation Between Human Serum Apolipoprotein A (Ⅱ) and Lipid Homeostasis

HU Song, ZHAO Shui-Ping, LIU Qiong, and HU Min

(Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

[KEY WORDS] Apolipoprotein A (Ⅱ); Lipid Homeostasis; Body Mass Index; Enzyme-linked Immunosorbent Assay; Correlation

[ABSTRACT] **Aim** To determine apolipoprotein A (Ⅱ) (ApoA (Ⅱ)) levels and study the correlation with lipid parameters in normolipidemic human subjects. **Methods** Lipids were measured enzymatically. Serum ApoA (Ⅱ) levels were determined using a novel, validated enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Serum ApoA (Ⅱ) level in normolipidemic subjects was rather low ($5.4 \sim 455.6 \mu\text{g/L}$). An inverse correlation between serum ApoA (Ⅱ) and triglyceride (TG) levels was observed ($r = -0.225, P = 0.031$). In addition, ApoA (Ⅱ) concentration was positively related to high density lipoprotein cholesterol (HDL) ($r = 0.453, P < 0.001$), and negatively related to body mass index (BMI) ($r = -0.345, P = 0.001$). ApoA (Ⅱ) concentration was not related to low density lipoprotein cholesterol (LDL) and total cholesterol (TC). **Conclusions** The serum ApoA (Ⅱ) level was rather low, and inversely related to TG and BMI, but positively related to HDL.

血清甘油三酯 (triglyceride, TG) 升高是冠状动脉粥样硬化性心脏病 (coronary heart disease, CHD) 的重要危险因素^[1-4]。影响 TG 代谢的因素包括遗传及环境 (如吸烟、肥胖和缺乏运动等)。载脂蛋白 A (Ⅱ) (apolipoprotein A (Ⅱ) ApoA (Ⅱ)) 是载脂蛋白家族的新成员, 为调节 TG 代谢的关键因子^[5,6]。转人载脂蛋白 A (Ⅱ) 基因小鼠血清 TG 水平明显下降^[5], 而载脂蛋白 A (Ⅱ) 基因敲除小鼠血清 TG 水平则明显升高^[5,7]。载脂蛋白 A (Ⅱ) 基因在肝内特异性表达, 基因产物进入血液循环后定植于高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 及极低密度脂蛋白 (very low density

lipoprotein, VLDL) 颗粒^[6]。血清载脂蛋白 A (Ⅱ) 含量极低, 约为载脂蛋白 A (Ⅱ) 的 0.1%^[5,6,8], 故而检测困难, 方法极少。本研究开发并利用了一种新的双夹心酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 成功测定了人血清载脂蛋白 A (Ⅱ) 进而研究了健康者载脂蛋白 A (Ⅱ) 与血清 TG、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL cholesterol, HDL) 、总胆固醇 (total cholesterol, TC) 、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL cholesterol, LDL) 、体质指数 (body mass index, BMI) 及年龄的相关性, 现予报道。

1 对象与方法

1.1 研究对象

92 例来自于湘雅二医院体检科健康受试者, 年龄 21~80 (44.3 ± 11.0) 岁; 其中男 50 例, 年龄 21~80 (44.6 ± 12.6) 岁; 女 42 例, 年龄 29~72 ($44.0 \pm$

[收稿日期] 2006-10-20

[修回日期] 2007-02-10

[作者简介] 胡松, 博士研究生, 研究方向为血脂与动脉粥样硬化, E-mail 为 husongzi@126.com。通讯作者赵水平, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事血脂与动脉粥样硬化研究, E-mail 为 zhaosp@med-mail.com.cn。刘琼, 博士, 从事血脂与动脉粥样硬化研究, E-mail 为 liuqiong9918@yahoo.com.cn。

8.9) 岁。清晨空腹抽血。

1.2 血脂测定

甘油三酯测定用酶法(甘油磷酸氧化酶—过氧化物酶—4-氨基安替比林和酚法), TC 测定用酶法(胆固醇氧化酶—过氧化物酶—4-氨基安替比林和酚法); LDLC 和 HDLC 用匀相测定法(过氧化氢酶清除法), 以 Hitachi 7060 全自动分析仪进行检测, 试剂购自日本第一化学株式会社。

1.3 载脂蛋白 A (Apo) 检测

表达重组人载脂蛋白 A (Apo) 蛋白并免疫小鼠产生抗重组载脂蛋白 A (Apo) 单克隆抗体(蛋白及单抗均由长沙远泰生物技术有限公司与我科合作开发), 单抗配对形成双夹心 ELISA。以 0.05 mol/L、pH 9.6 碳酸盐缓冲液稀释包被抗体到 5 mg/L, 加样到高结合力 ELISA 酶标板(购自加拿大 JNC 公司)上各孔, 4℃过夜。次日, 用 0.01 mol/L、pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)-0.1% Tween20 (PBST) 洗板三次。再用 1% 牛血清白蛋白(BSA)-PBS 封板, 4℃过夜。PBST 洗三次。人血清用 PBST-1% BSA 按 1:10 稀释。分别向各孔加入血清稀释样品及校准品 100 μL。37℃温育 1 h。PBST 洗板 6 次。每孔加 100 μL 辣根过氧化物酶(HRP) 标记的检测抗体, 温育 1 h, PBST 洗板 6 次。各孔加入 100 μL 底物 TMB, 37℃温育 15 min, 加入 2 mol/L H₂SO₄ 50 μL 以终止反应, 450 nm 处测定吸光度。本法检测低限为 3.4 μg/L, 批内变异系数为 3.4%~6.0%; 批间变异系数为 5.5%~8.7%。

1.4 统计学分析

组间均数比较采用两独立样本 *t* 检验, 相关性用 Spearman 相关系数分析。

2 结果

2.1 一般情况及血脂状况

研究对象的一般情况及血脂状况见表 1, 女性 HDLC 高于男性, 而 LDLC、TG 和 BMI 则低于男性。

表 1. 男女两组的一般情况及血脂比较 ($\bar{x} \pm s$)

指 标	男性 (<i>n</i> = 50)	女性 (<i>n</i> = 42)	<i>P</i> 值
年龄 (岁)	44.6 ± 12.6	44.0 ± 8.9	0.789
BMI (kg/m ²)	23.67 ± 2.67	22.05 ± 2.69	0.005
TG (mmol/L)	1.47 ± 0.58	1.09 ± 0.53	0.002
TC (mmol/L)	4.94 ± 0.66	4.85 ± 0.51	0.441
HDLC (mmol/L)	1.17 ± 0.28	1.36 ± 0.26	0.002
LDLC (mmol/L)	3.00 ± 0.48	2.75 ± 0.47	0.013
空腹血糖 (mmol/L)	4.95 ± 0.51	5.08 ± 0.61	0.282

2.2 血清载脂蛋白 A (Apo) 含量

92 例受试者载脂蛋白 A (Apo) 浓度为 182.7 ± 104.7 μg/L (5.4~455.6 μg/L)。女性为 199.7 ± 105.9 μg/L, 男性为 168.4 ± 102.6 μg/L, 男女之间载脂蛋白 A (Apo) 浓度差异无显著性 (*P* = 0.154)。

2.3 血清载脂蛋白 A (Apo) 与血脂的相关性

血清载脂蛋白 A (Apo) 浓度与 TG 呈负相关 (*r* = -0.225, *P* = 0.031); 在女性中尤为显著 (*r* = -0.496, *P* = 0.001), 而在男性中则表现为不相关 (*r* = 0.054, *P* = 0.709)。血清载脂蛋白 A (Apo) 浓度与 HDLC 呈正相关 (*r* = 0.453, *P* < 0.001); 在女性中更为显著 (女性 *r* = 0.617, *P* < 0.001; 男性 *r* = 0.289, *P* = 0.042)。血清载脂蛋白 A (Apo) 浓度与 LDLC 和 TC 不相关。血清载脂蛋白 A (Apo) 浓度与 BMI 在女性中呈负相关, 在男性中则不相关 (总体 *r* = -0.345, *P* = 0.001; 女性 *r* = -0.456, *P* < 0.001; 男性 *r* = -0.198, *P* = 0.167)。女性血清载脂蛋白 A (Apo) 浓度与年龄呈负相关趋势 (*r* = -0.285, *P* = 0.067)。

3 讨论

目前人们对血清载脂蛋白 A (Apo) 功能的认识尚非常有限, 部分原因是血清载脂蛋白 A (Apo) 含量低和检测难所致。本研究开发了一种新的双夹心 ELISA 方法, 该法利用重组载脂蛋白 A (Apo) 蛋白免疫制备了单克隆抗体并配对形成 ELISA。通过检测 92 例健康中国人群血清载脂蛋白 A (Apo) 检出其浓度为 182.7 ± 104.7 (5.4~455.6) μg/L。O'Brien 等^[8]用抗载脂蛋白 A (Apo) 的多克隆抗体(由重组载脂蛋白 A (Apo) 蛋白的氨基端及羧基端免疫小鼠而获得)形成双夹心 ELISA, 检测了 40 例正常血脂的高加索人群血清载脂蛋白 A (Apo) 其含量为 157 (24~406) μg/L; Ishihara 等^[9]用另一种双夹心 ELISA (一种基于 DNA 免疫的方法制备抗载脂蛋白 A (Apo) 的单克隆抗体并配对形成 ELISA) 检测了 196 例健康日本人血清载脂蛋白 A (Apo) 其浓度为 179.2 ± 74.8 μg/L。两组数据均稍低于本研究结果, 其原因可能为不同种族或不同方法学所致, 但都说明人血清载脂蛋白 A (Apo) 含量甚微。

由于人血清中载脂蛋白 A (Apo) 浓度极低, 因此在建立检测载脂蛋白 A (Apo) 的方法时要求更敏感, 抗体的特异性更好。我们应用重组蛋白载脂蛋白 A (Apo) 及其两株单克隆抗体, 用 HRP 标记抗体作为显色系统, 在国内首先建立了检测人血中载脂蛋白 A (Apo) 浓度的 ELISA 法, 该方法灵敏度和特异性均可满足科研和临床的需要。本法批内变异偏大, 与显色系统

的敏感性有关。但与其它成熟的检测载脂蛋白的 ELISA 法相比, 该法稳定性均可满足科研和临床的需要。目前人们研究载脂蛋白 A 功能绝大多数均需在小鼠动物模型上进行, 尚不能直接在人体进行研究。而人血清载脂蛋白 A 测定方法的建立, 将有力地促进对人体自身载脂蛋白 A 功能的直接研究。本研究及 O'Brien 和 Ishihara 等^[8,9]的研究均表明载脂蛋白 A 与 TG 负相关, 说明人体血清载脂蛋白 A 能明显地影响血脂代谢。

本研究尚发现载脂蛋白 A 与 TG 的相关性受性别影响。本研究发现女性血清载脂蛋白 A 浓度相对较高, 且只有女性载脂蛋白 A 与 TG 负相关。Ishihara 等^[9]研究亦发现, 女性血浆载脂蛋白 A 浓度比男性高 ($P < 0.005$), 且与 TG 负相关 ($r = -0.228$, $P = 0.0262$)。以上表明性别差异是载脂蛋白 A 与 TG 相关性的重要影响因素, 但其具体机制尚待进一步探讨。

越来越多证据表明载脂蛋白 A 可影响 HDLC 代谢。有报道载脂蛋白 A 缺失小鼠 HDLC 水平显著升高^[10], 而过表达载脂蛋白 A 小鼠 HDLC 水平则显著降低^[11]。本研究观察到人血清载脂蛋白 A 与 HDLC 正相关, 且女性表现更为显著, 这与 Ishihara 等^[9]研究结果相同, 表明性别差异亦为载脂蛋白 A 与 HDLC 相关性之重要影响因素。

本研究首次报道了载脂蛋白 A 与 BMI 及年龄负相关, 并发现载脂蛋白 A 与 BMI 负相关在女性中表现更为显著。据此推测, 高 BMI 与高 TG 血症密切相关的原因可能为 BMI 与载脂蛋白 A 负相关所致。至于为何仅表现在女性中则有待进一步研究。BMI 升高与胰岛素抵抗相关, 而有证据表明胰岛素抵抗可下调载脂蛋白 A 表达, 糖尿病患者中载脂蛋白 A 下降^[9, 12], 因此, 推测载脂蛋白 A 与 BMI 的负相关性可能为胰岛素抵抗所致。

血清 TG 升高、HDLC 减低、BMI 升高及年龄增加皆为 CHD 的危险因素。基于载脂蛋白 A 与 TG、HDLC、BMI 及年龄皆密切相关, 因此载脂蛋白 A

可能也与 CHD 发病危险性相关, 但需要大规模临床研究以证实。

总之, 本研究发现人血清载脂蛋白 A 含量极低, 且与 TG、BMI 及年龄均呈负相关, 与 HDLC 正相关, 而所有相关性皆受性别影响。

[参考文献]

- [1] Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies [J]. *J Cardiovasc Risk*, 1996, 3 (2): 213-219.
- [2] Cullen P. Evidence that triglycerides are an independent coronary heart disease risk factor [J]. *Am J Cardiol*, 2000, 86 (9): 943-949.
- [3] Malloy MJ, Kane JP. A risk factor for atherosclerosis: triglyceride-rich lipoproteins [J]. *Adv Intern Med*, 2001, 47: 111-136.
- [4] Hopkins PN, Wu LL, Hunt SC, Brinton EA. Plasma triglycerides and type 2 hyperlipidemia are independently associated with premature familial coronary artery disease [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45 (7): 1003-1012.
- [5] Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in human and mice revealed by comparative sequencing [J]. *Science*, 2001, 294 (5540): 169-173.
- [6] Van der Vliet HN, Sammel MG, Leegwater AC, Levels JH, Reitsma PH, Boers W, et al. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (48): 44512-520.
- [7] Van der Vliet HN, Schaap FG, Levels JH, Ottenhoff R, Looije N, Wesseling JG, et al. Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 295 (5): 1156-159.
- [8] O'Brien PJ, Alborn WE, Sloan JH, Ulmer M, Boodhoo A, Knieman MD, et al. The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins [J]. *Clin Chem*, 2005, 51 (2): 351-359.
- [9] Ishihara M, Kujiraoka T, Iwasaki T, Nagano M, Takano M, Ishii J, et al. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human plasma apolipoprotein A-V concentration [J]. *J Lipid Res*, 2005, 46 (9): 2015-2022.
- [10] Grosskopf I, Barouk N, Lee SJ, Kamari Y, Harats D, Rubin EM, et al. Apolipoprotein A-V deficiency results in marked hypertriglyceridemia attributable to decreased lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins and removal of their remnants [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25 (12): 2573-579.
- [11] Schaap FG, Rensen PC, Voshol PJ, Vries C, Van der Vliet HN, Chamuleau RA, et al. ApoA-V reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (27): 27941-947.
- [12] Nowak M, Helleboit-Chapman A, Jakel H, Martin G, Dorru-Sandoval D, Staels B, et al. Insulin-mediated downregulation of apolipoprotein A5 gene expression through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role of upstream stimulatory factor [J]. *Mol Cell Bio*, 2005, 25 (4): 1537-548.

(此文编辑 许雪梅)