

高血脂患者血清血管生成素样蛋白 3 水平测定及临床意义

李 晞^{1,2}, 王继红^{1,2}, 肖亚雄^{1,2}, 王永红³

(重庆医科大学 1. 基础医学实验教学中心生物化学与分子生物学实验室,

2 分子医学与肿瘤研究中心, 3 附属第一医院体检中心, 重庆市 400016)

[关键词] 血管生成素样蛋白 3 酶联免疫吸附法; 高甘油三酯血症; 高总胆固醇血症

[摘要] 目的 应用 ELISA 双抗夹心法测定高血脂患者血清血管生成素样蛋白 3 水平, 探讨其对检测脂质代谢紊乱的临床价值。方法 通过检测高甘油三酯血症、高总胆固醇血症和甘油三酯与胆固醇两者均升高 3 组高血脂患者血清中血管生成素样蛋白 3 含量, 并与正常对照组比较, 分析其检测的临床意义。结果 单纯高甘油三酯血症患者血清血管生成素样蛋白 3 含量与正常对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$), 且与临床诊断高甘油三酯血症的常用方法 GOD-POD 法比较, 诊断效率差异无显著性 ($P > 0.05$)。单纯高总胆固醇血症患者血清血管生成素样蛋白 3 含量与正常对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。总胆固醇和甘油三酯均升高患者血清血管生成素样蛋白 3 含量与对照组, 单纯高甘油三酯血症和单纯高总胆固醇血症差异无显著性 ($P > 0.05$)。结论 ELISA 方法可以灵敏地检测到入血清中血管生成素样蛋白 3 含量, 在单纯高甘油三酯血症时明显增加, 而在单纯高胆固醇血症时, 患者血清血管生成素样蛋白 3 含量变化不明显, 为建立入血清血管生成素样蛋白 3 检测的可行性奠定了基础。

[中图分类号] Q54

[文献标识码] A

Clinical Significance of Detecting Serum Angiotensin-Like Protein 3 in Patients with Hyperlipidemia

LIX J, WANG JH, XIAO YX, and WANG YH

(1 Lab of Biochemistry and Molecular Biology of Experimental Teaching Center, 2 Molecular Medicine and Cancer Research Center, 3 Healthy Check-up Center, The First affiliated Hospital, Chongqing Medical University Chongqing 400016, China)

[KEY WORDS] Angiotensin-Like Protein 3 ELISA; Hypercholesterolemia Hypertriglyceridemia

[ABSTRACT] **Aim** To explore the clinical value of the content of Angiotensin-like protein 3 (ANGPTL3) in patients with hyperlipidemia by ELISA. **Methods** Serum ANGPTL3 was examined by ELISA in the patients with hypercholesterolemia (HTC), hypertriglyceridemia (HTG) and patients with both of them, and compared with normal group.

Results In comparison with the normal group, the content of serum ANGPTL3 of patients with HTG was increased significantly ($P > 0.05$), and there was no significant difference in diagnosis of HTG between detecting ANGPTL3 by ELISA and TG by GOD-POD method. But the content of serum ANGPTL3 of patients with HTC made no difference with normal group ($P > 0.05$). And variance in the contents of serum ANGPTL3 of patients with both of HTC and HTG was not significant.

Conclusion ELISA method can detect the increase in the patients with HTG, and there was no difference in the patients with HTC sensitively, which laid a foundation for application of ANGPTL3 ELISA kit in clinical laboratory.

血管生成素样蛋白 3 (angiotensin-related protein 3, ANGPTL3) 是 1999 年 Conklin 等^[1]发现的一种多功能分泌因子, 其主要作用之一是参与脂类代谢, 造成血浆中脂类的蓄积, 并能与脂肪组织直接结合, 导致脂肪细胞分解^[2,3]。在饮食诱导的高血脂症大鼠模型动物实验中发现, 与正常大鼠比较, ANGPTL3 肝脏的表达明显升高^[4]。本研究旨在通过测定临床高血脂患者血清 ANGPTL3 表达水平, 研

究入血清 ANGPTL3 检测的临床意义, 为进一步建立入血清 ANGPTL3 检测的 ELISA 方法奠定基础。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集诊断明确、尚未接受系统治疗的单纯高甘油三酯血症 (hypertriglyceridemia, HTG)、单纯高总胆固醇血症 (hypercholesterolemia, HTC)、甘油三酯与胆固醇两者均升高患者 60 例和正常者对照组血清 20 例 (均采集于重庆医科大学附属第一医院体检中心病例, 且体格检查未见其他指标异常, 年龄范围 48.35 ± 12.75 岁), 其中高总胆固醇血症者 (TC > 5.17 mmol/L) 20 例, 高甘油三酯血症者 (TG $>$

[收稿日期] 2009-11-25 [修回日期] 2010-04-11

[基金项目] 重庆市科委自然科学基金 (CSTC, 2008CE9142) 和重庆医科大学创新基金 (CX200528)

[作者简介] 李晞, 硕士研究生, 主要研究方向为功能蛋白质组学, Email 为 lixi10@163.com。通讯作者王继红, 副教授, 硕士研究生导师, 联系电话为 023-68485140, Email 为 wjhkyh@163.com。肖亚雄, 硕士研究生, Email 为 xiaoyaxiong@163.com。

1. 69 mmol/L) 20例, 总胆固醇和甘油三酯均升高者 (TC > 5.17 mmol/L 且 TG > 1.69 mmol/L) 20例, 男女比例为 1: 1。

1.2 试剂

人 ANGPTL3 ELISA 测定试剂盒 (美国 UCL 公司); CO-POD 法胆固醇测定试剂盒和 GOD-POD 法甘油三酯测定试剂盒 (北京金豪制药有限公司)。

1.3 仪器设备

全自动生化仪 (日本日立 7020); 酶标仪 (奥地利 Sunrise RC); 低温冰箱 (MDF-382E 型, 日本三洋); 超净工作台; 离心机; 恒温水浴箱。

1.4 血清标本的分离与保存

采集受试者早 7: 30-8: 30 间肘静脉空腹血样品 5 mL, 静置 1 h, 3 kr/min 离心 5 min, 分离血清, 放 -70℃ 低温冰箱贮存待用。

1.5 血清血管生成素样蛋白 3 含量检测

标准曲线的制作与高脂血症患者血清中 ANGPTL3 含量的测定同时进行, 分别设空白孔、标准品孔、待测样品孔 (每份标本设 3 个复孔)。加样温育 120 min 后, 加入生物素标记抗体, 再次温育 60 min, 加底物 (TMB) 显色, 于 450 nm 波长处测 $A_{450\text{ nm}}$ 值, 绘制标准曲线, 结果取平均值。

1.6 统计学处理方法

用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析, 两组间比较用两独立样本 t 检验和 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 血管生成素样蛋白 3 含量与单纯高甘油三酯血症和单纯高胆固醇血症的关系

20例 HTG 患者、20例 HTC 患者和 20例 HTC + HTG 患者血清 ANGPTL3 含量与正常对照组比较, 高甘油三酯患者血清 ANGPTL3 含量显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1), 但甘油三酯和 ANGPTL3 二者增高的程度无相关性 (表 2); HTC 患者血清 ANGPTL3 含量与正常对照组比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$); HTC + HTG 患者血清 ANGPTL3 含量测定结果显示, 测定值本身差异较大 (极差 $r = 89.700$), 部分结果较正常对照组增高, 而其余较之降低, 并且与 TG 和 TC 水平无相关性 (表 2)。

2.2 ELISA 法测定血管生成素样蛋白 3 含量对诊断高甘油三酯血症的诊断效率与 GOD-POD 法直接测定 TG 含量比较

通过与 GOD-POD 法测定 TG 含量诊断高甘油

三酯血症的诊断标准比较, 发现用 ELISA 法测定 ANGPTL3 含量检测高甘油三酯血症的敏感性为 77.5%, 特异性为 80%, 假阳性率为 20%, 假阴性率为 22.5%, 诊断符合率为 78.75%。两种方法间进行 χ^2 检验, 统计学结果提示, ELISA 检测 ANGPTL3 含量同用 GOD-POD 法测定 TG 含量诊断高甘油三酯血症的效率差异无显著性, 提示人血清 ANGPTL3 含量与血清 TG 含量具有相关性。

表 1 人血清血管生成素样蛋白 3 含量与高甘油三酯血症和高胆固醇血症的关系 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	ANGPTL3 (mg/L)
正常对照组	0.78 ± 0.35	4.32 ± 0.71	27.45 ± 3.76
HTG 组	3.18 ± 0.87 ^a	4.76 ± 0.42	85.43 ± 34.75 ^a
HTC 组	1.19 ± 0.42	6.55 ± 0.61 ^a	26.78 ± 12.78
HTG + HTC 组	6.79 ± 3.12 ^a	6.73 ± 0.96 ^a	49.84 ± 42.95 ^a

a 为 $P < 0.05$ 与正常对照组比较。

表 2 人血清血管生成素样蛋白 3 含量与血清胆固醇、甘油三酯含量的 Pearson 相关系数

指 标	HTC 组	HTG 组	HTC + HTG 组
TC	0.526	0.589	-0.456
TG	0.065	-0.503	-0.304

3 讨论

血管生成素样蛋白 3 是一种分子量约为 70 kD 的分泌蛋白, 肝 X 受体 (liver X receptor, LXR) 作为其配体, 特异性地表达于肝脏, 也有研究表明在肾脏 ANGPTL3 也有少量表达^[1]。ANGPTL3 作为血管生成素家族的一员, 其羧基端的纤维蛋白原样结构域与调节血管生成有关, 而氨基端的螺旋样结构域则与其调节脂质代谢的功能相关^[5]。本研究通过 ELISA 方法测定单纯高甘油三酯血症、单纯高总胆固醇血症、甘油三酯与胆固醇两者均升高患者和查体正常者血清中 ANGPTL3 的含量, 比较临床常见各型代谢紊乱疾病时 ANGPTL3 的表达差异, 探讨人血清 ANGPTL3 与脂质代谢紊乱的关系, 并为进一步建立人血清 ANGPTL3 检测的 ELISA 方法奠定基础。

体外实验表明, ANGPTL3 的脂质调节功能主要通过剂量依赖性的抑制脂蛋白脂肪酶 (lipoprotein lipase, LPL) 的催化活性来提高血浆 TG 水平^[2, 6]。通过对人体血清中 ANGPTL3 含量测定的研究发

现,高甘油三酯患者血清 ANGPTL3 含量较正常对照组明显增加,而单纯高胆固醇血症患者血清其含量无明显变化,提示人血清 ANGPTL3 的升高与单纯高甘油三酯血症有明显相关性,并可以通过 ELISA 方法测定人血清 ANGPTL3 在不同类型高血脂患者间显示出明显的差异。

酶联免疫吸附法 (Enzyme-linked immune-sorbent assay, ELISA) 是当今国际上应用最广泛的检测技术之一,与 Western-Blot 等现代分子生物学技术比较,其具有很高的特异性和灵敏性、操作简便,对环境没有污染,尤其是其很容易推广,适合临床大规模开展工作。通过 ELISA 方法测定 ANGPTL3 含量来检测高甘油三酯血症的敏感性为 77.5%,特异性为 80%,假阳性率为 20%,假阴性率为 22.5%,诊断符合率为 78.25%,与用 GOD-POD 法测定甘油三酯含量诊断高甘油三酯血症的效率没有明显差别。

随着社会经济的发展,我国人民生活水平得到了很大的提高,生活方式也发生了很多变化,高血脂等相关疾病已成为影响我国人民健康的重要危险因素。很多研究已表明,在动物和体外实验中,血管生成素样蛋白 3 可以通过对下游多种活性蛋白的调控,从不同的角度影响脂质代谢,促进脂质和能量的转化。我们通过对不同类型高脂血症患者的检查发现,ELISA 方法可以灵敏地检测到人血清中 ANGPTL3 在高脂血症情况下的变化,证明 ELISA 方法能够方便的应用于人血清 ANGPTL3 检测。根据现有的研究成果,ANGPTL3 除了与原发性高血脂的发

生发展有密切关系外,还与很多疾病有关,如糖尿病^[7]、肾病引起的脂代谢紊乱^[8-9]及肝癌^[10]等。所以,用 ELISA 方法检测人血清 ANGPTL3 含量在临床的诊断价值有待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Conklin D, Gilbertson D, Taft D, et al. Identification of a Mammalian Angiopoietin-Related Protein Expressed Specifically in Liver [J]. *Genomics*, 1999, **62** (3): 477-482.
- [2] Shimazawa T, Ono M, Shinamura M, et al. ANGPTL3 Decreases Very Low Density Lipoprotein Triglyceride Clearance by Inhibition of Lipoprotein Lipase [J]. *Biol Chem*, 2002, **277** (37): 33 742-748.
- [3] Shinamura M, Matsuda M, Kobayashi S, et al. Angiopoietin-like protein 3, a hepatic secretory factor, activates lipolysis in adipocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **301** (2): 604-609.
- [4] 王欣, 王继红, 黄家利, 等. AngpD 基因在大鼠高脂模型中组织表达及其与血脂的关系 [J]. 第三军医大学学报, 2008, **30** (12): 1 167-169.
- [5] Ono M, Shimazawa T, Shinamura M, et al. Protein Region Important for Regulation of Lipid Metabolism in Angiopoietin-like 3 (ANGPTL3) [J]. *Biol Chem*, 2003, **278** (43): 41 804-809.
- [6] Shan L, Shan L, Yu XC, et al. The angiopoietin-like proteins ANGPTL3 and ANGPTL4 inhibit lipoprotein lipase activity through distinct mechanisms [J]. *Biol Chem*, 2009, **284** (3): 1 419-424.
- [7] Inukai K, Nakashima Y, Watanabe M, et al. ANGPTL3 is increased in both insulin-deficient and -resistant diabetic states [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **317** (4): 1 075-079.
- [8] 武建文, 徐虹, 赵晓晴, 等. 阿霉素肾病大鼠肾组织中血管生成素样蛋白 3 基因表达 [J]. 中华肾脏病杂志, 2006, **22** (1): 37-42.
- [9] Shoji T, Hatsuda S, Tsuchikura S, et al. Plasma angiopoietin-like protein 3 (ANGPTL3) concentration is associated with uremic dyslipidemia [J]. *Atherosclerosis*, 2009, **207** (2): 579-584.
- [10] 宋其同, 单云峰, 周蒙滔, 等. 血管生成素样蛋白 3 的表达及其与肝细胞癌侵袭和生长的关系研究 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2006, **12** (7): 450-452.

(此文编辑 李玲玲)