

多聚赖氨酸结合脂蛋白(a)检测方法的初步确立 及其对急性心肌梗死的实验诊断价值

张金红¹, 刘爱兵¹, 韩润林², 刘晓军³, 程志英³

(中国人民解放军武警总医院 1. 医学实验中心, 3. 药房, 北京市 100039;
2. 内蒙古农业大学脂蛋白免疫学研究中心, 内蒙古呼和浩特市 010018)

[关键词] 脂蛋白(a); 多聚赖氨酸; 急性心肌梗死

[摘要] 目的 初步建立检测功能性脂蛋白(a)质量的检测方法, 分析该方法的精密度和准确度和干扰因素。方法 利用该方法测定急性心肌梗死和不稳定型心绞痛患者冠状动脉造影确诊时即支架术前和术后 4 h、8 h、12 h、24 h、48 h、72 h、4~9 天、10~12 天各个时间点与多聚赖氨酸结合的脂蛋白(a)的质量, 并用直接酶联免疫吸附试验和免疫比浊试验检测急性心肌梗死和不稳定型心绞痛患者的脂蛋白(a)的总质量, 比较检测二者的诊断价值, 并将该方法与传统心肌标志物肌酸激酶同工酶进行比较, 评价其诊断和监测心血管疾病的价值。结果 酶联免疫吸附试验和免疫比浊试验检测的心血管患者的脂蛋白(a)质量变化不大($P > 0.05$); 与多聚赖氨酸结合的脂蛋白(a)的吸光度值明显增高($P < 0.05$); 该方法的精密度和准确度都很高($> 90\%$), 诊断价值优于肌酸激酶同工酶。结论 传统检测脂蛋白(a)的方法不能解释其与心血管疾病的关系; 自建的检测与多聚赖氨酸结合的脂蛋白(a)的方法与心血管疾病状态一致, 该方法的可行性高, 并且也能进一步研究功能性脂蛋白(a)的生理病理功能。

[中图分类号] R44

[文献标识码] A

Tentatively Establishing the Method of Detecting Lipoprotein (a) of Combining to Polyphosphate Lysine and the Laboratory Diagnostic Value of the Method in Acute Myocardial Infarction

ZHANG Jin-Hong¹, LIU Ai-Bing¹, and HAN Run-Lin², LIU Xiao-Jun³, CHENG Zhi-Ying³

(1. Medical Experimental Center, 3. Pharmacy Department, the General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039; 2. Lipoprotein Immunology Research Center, Inner Mongolia Agriculture University, Huhehaote, Neimenggu 010018, China)

[KEY WORDS] Lipoprotein (a); Polyphosphate Lysine; Acute Myocardial Infarction

[ABSTRACT] **Aim** To establish the method of detecting functional lipoprotein (a) [Lp (a)], and evaluate it, then compare its effect with creatine kinase isozyme at the diagnosis and detection of the acute myocardial infarction. **Methods** The level of lipoprotein (a) and lipoprotein (a) combining to polyphosphate lysine at preoperative and postoperative 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h and 72 h, 4~9 days and 10~12 days points were detected respectively in acute myocardial infarction and unstable angina patients by enzyme-linked immunosorbent assay and immune turbidimetric assay. **Results** The change of lipoprotein (a) level was lower ($P > 0.05$); However, the change of lipoprotein (a) combining to polyphosphate lysine was larger in acute myocardial infarction ($P < 0.05$); The precision and accuracy of the method is better ($> 90\%$); The diagnostic value was more superior than creatine kinase isozyme. **Conclusion** The level of lipoprotein (a) detected by traditional methods fail to associate with the cardiovascular disease; The method that detecting the level of lipoprotein (a) combining to polyphosphate lysine can diagnose and monitor cardiovascular disease, and the method can be used to research the pathological mechanism of lipoprotein (a).

[收稿日期] 2010-11-03

[作者简介] 张金红, 硕士研究生, 主要从事脂蛋白(a)抗感染研究。通讯作者刘爱兵, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为临床化学、临床免疫学、医学遗传学与分子生物学, E-mail 为 doctor_liuailing@yahoo.com.cn。韩润林, 教授, 博士研究生导师, 主要从事脂蛋白抗感染研究。

脂蛋白(a) [lipoprotein (a), Lp(a)] 是动脉粥样硬化的独立危险因素, 有人认为检测其质量可早期预测动脉粥样硬化程度, 并能判断心血管疾病的状态^[1]。然而, 临床上发现其对心血管疾病的诊断价值和治疗价值很低, 并且 Lp(a) 的质量, 使用不同的试剂或检测系统, 可以出现相差数倍的差异, 限制了它在临床中的广泛应用。目前, 检测 Lp(a) 方法多用免疫比浊法 (immune turbidimetric assay, ITA) 和酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 采用的是 Lp(a) 多克隆抗体, 但导致动脉粥样硬化的功能性 Lp(a) 成分有很多说法。喻红等^[2,3] 认为 Lp(a) 存在异质性, 有与赖氨酸结合的 Lp(a) [Lp(a) Lys⁺] 和不与其结合的 Lp(a) [Lp(a) Lys⁻], Lp(a) Lys⁺ 与血小板和细胞外基质蛋白的结合能力远远高于 Lp(a) Lys⁻, 所以 Lp(a) Lys⁺ 与心血管疾病的关系非常密切。因此我们设计了此实验方法检测心血管疾病不同状态下 Lp(a) Lys⁺ 质量的变化, 以评估其对心血管疾病的实验室诊断和监测价值。

1 材料与方 法

1.1 试剂和仪器

血清 Lp(a) 总质量所用试剂盒由 R&D 公司提供。生化仪测定 Lp(a) 总质量所用试剂、校准品及质控品均由日本第一化学药品株式会社提供 (批号为 GB150Z)。间接 ELISA 法测定血清 Lp(a) Lys⁺ 所用多聚赖氨酸由 Sigma 公司提供, 分子量为 70000 ~ 150000; 牛血清白蛋白和驴抗羊 IgG-HRP 抗体由 R&D 公司提供; 羊抗人 Apo Lp(a) 多克隆抗体由 Fitzgerald 公司提供。血清肌酸激酶同工酶 (creatin kinase MB, CK-MB) 所用试剂、校准品及质控品均由上海德赛诊断系统有限公司提供。生化分析仪为雅培 Aeroset 全自动生化分析仪; 酶标仪为 Thermo Scientific 酶标仪。

1.2 病例资料

29 例冠心病患者为 2009 年 12 月至 2010 年 6 月武警总医院心内科住院患者。其中急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 患者 15 例, 年龄 61.4 ± 13.3 岁; ST 段抬高型不稳定型心绞痛 (unstable angina, UA) 患者 14 例, 年龄 59.0 ± 9.7 岁。诊断依据临床症状、动态心电图、心肌酶学变化, 最终经冠状动脉造影确诊。29 例冠心病患者均行经皮冠状动脉球囊扩张术及药物涂层支架植入术治疗, 术后效果好, 临床治愈出院。选择同一时期在本

院体检中心体检的 30 例健康者作为对照组, 排除肝、肾、胰和肾上腺等器官障碍, 体检结论为健康者, 年龄 42.3 ± 12.1 岁。设年龄和性别为协变量, 经统计学分析各组间差异有显著性 ($P < 0.05$)。

1.3 Lp(a) Lys⁺ 测定方法的建立

采用 ELISA 法, 用多聚赖氨酸包被酶标板 4℃ 过夜, 洗板后牛血清白蛋白封闭, 4℃ 过夜, 洗板后加入待测血清, 37℃ 孵育 1 h, 洗板后加入羊抗人 Lp(a) 一抗, 37℃ 孵育 1 h, 洗板后加入辣根过氧化物酶标记的驴抗羊二抗, 37℃ 孵育 1 h, 洗板后加入四甲基联苯胺 (tetramethylbenzidine, TMB) 避光显色 15 min, 在 450 nm 波长下测吸光度 (A)。设阳性对照、阴性对照和空白对照孔, 每份标本做复孔取其平均值, 消除板间、板内差异和操作误差。目前尚无检测 Lp(a) Lys⁺ 水平的标准品, 无法测定它的质量, 本实验用吸光度值表示其水平。

1.4 Lp(a) Lys⁺ 测定方法的评价

取 AMI 和 UA 患者术前、术后 4 h 和术后 8 h 的血清混合标本共 6 份, 在同一块酶标板上进行测定 15 次, 计算各自批内精密度; 在不同酶标板上再进行测定 15 次, 计算批间精密度。将 Lp(a) 的标准品 (1200 μg/L) 用 PBS 进行系列稀释后, 检测与多聚赖氨酸结合的 Lp(a) 的质量, 取直线上升的稀释浓度, 做线性回归分析。向 1:100 稀释的 Lp(a) 的标准品中加入已知吸光度值的样品血清, 测其混合后的吸光度值, 计算回收率。向 Lp(a) 的标准品中分别加入系列稀释的高胆红素、高血红蛋白和高极低密度脂蛋白的血清, 进行干扰实验 (计算结果时对标准物引起的稀释作校准)。

1.5 脂蛋白(a) 总质量测定

采用 ITA 法和直接 ELISA 法检测 29 例冠心病患者和 30 例健康者 Lp(a) 总质量, 用以验证 Lp(a) 总质量对冠心病患者的诊断价值。

1.6 自建的 Lp(a) Lys⁺ 法对急性心肌梗死的实验诊断价值

采用本文建立的间接 ELISA 法测定 Lp(a) Lys⁺ 法, 检测 29 例冠心病患者和 30 例健康者 Lp(a) Lys⁺ 的水平, 并动态观察患者吸光度值变化; 并以 AMI 的经典血清学诊断指标肌酸激酶同工酶 (creatin kinase MB, CK-MB) 作比对分析, 以确定两种方法的正确率、灵敏度和特异度。

1.7 标本采集

冠心病组在手术前和手术后 4、8、12、24、48、72 h 和 4 ~ 9 天、10 ~ 12 天各时间点分别采静脉血, 离心后取血清, 放入 -70℃ 保存备检或上生化仪进

行检测。对照组抽健康者空腹静脉血 2 mL, 离心后取血清上生化仪检测或 -70°C 保存备用。

1.8 统计学分析

采用 SPSS17.0 软件包处理数据。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间差异比较用方差分析, 两组间比较用 t 检验, 线性检测用回归分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脂蛋白(a)总质量在冠心病组和对照组的變化

分别用 ELISA 和 ITA 两种方法对 AMI 患者、UA 患者和对照组进行检测, 去掉年龄和性别协变量影响, 结果发现用 ELISA 法检测的 Lp(a) 总质量在 UA 组和 AMI 组比对照组低, 但各组间的各个时间点比较, 差异均无显著性 ($P > 0.05$); ITA 法检测的 Lp(a) 总质量, UA 组和 AMI 组术前比对照组低,

术后升高后降低, 各组间各个时间点的变化差异无显著性 ($P > 0.05$; 表 1)。

三组的标准差很大, 用标准误表示离散程度, 连接均值点对比两种方法检测 Lp(a) 总质量, 从冠心病组行经皮冠状动脉球囊扩张术及药物涂层支架植入术术前、术后的动态变化曲线可见, 两种方法检测的 Lp(a) 总质量水平变化在冠心病组和对照组离散程度都大。从 ELISA 法检测图可见, UA 和 AMI 两组的曲线在对照组均值水平线下呈波浪状, 两线有交叉, 术后 10~12 天后升至对照组均值水平。该方法不易诊断 AMI, 不能检测冠心病的病程。从 ITA 法检测图可见, 术前 UA 和 AMI 两组的曲线在对照组均值水平线下, 24 h 后略有增加, 48 h 开始降低, 3~4 天降至均值水平线水平。该方法术前也不易诊断 AMI; 术后病程曲线变化与 UA 组区别很小, 诊断窗宽, 不易检测病情变化 (图 1)。

表 1. Lp(a) 总质量在冠心病组和对照组的變化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Level of lipoprotein(a) in coronary artery heart disease group and control group

方 法	检测时间	AMI 组	UA 组	对照组	主体效应 F 值	校正 P 值
ELISA 法 ($\mu\text{g/L}$)	术前	589.3 \pm 426.7	811.6 \pm 1023.8	938.0 \pm 1044.5	0.584	0.675
	术后 4 h	601.2 \pm 392.7	783.7 \pm 930.1		0.569	0.686
	术后 8 h	644.4 \pm 493.6	945.4 \pm 1167.6		0.420	0.793
	术后 12 h	552.4 \pm 328.7	660.6 \pm 834.4		0.936	0.451
	术后 24 h	765.9 \pm 684.5	765.9 \pm 684.5		0.945	0.401
	术后 48 h	440.5 \pm 148.8	440.5 \pm 148.8		0.670	0.617
	术后 72 h	657.3 \pm 364.1	657.3 \pm 364.1		0.656	0.627
	术后 4~9 天	549.3 \pm 416.2	549.3 \pm 416.2		0.445	0.775
	术后 10~12 天	976.7 \pm 221.2	976.7 \pm 321.1		0.642	0.637
ITA 法 (mg/L)	术前	228.0 \pm 159.0	206.4 \pm 140.8	244.4 \pm 71.03	0.697	0.567
	术后 24 h	297.6 \pm 215.3	273.4 \pm 218.2		0.894	0.440
	术后 72 h	152.2 \pm 112.2	429.5 \pm 218.2		0.837	0.532
	术后 4~9 天	75.3 \pm 55.3	316.5 \pm 260.1		0.358	0.835

2.2 方法学结果

2.2.1 精密度实验 从 Lp(a) Lys⁺ 的精密度实验可知, 该方法测得的 Lp(a) Lys⁺ 的批内变异系数在 1.26%~3.73% 之间, 批间变异系数在 3.12%~8.56% 之间, 精密度良好 (表 2)。

2.2.2 线性检测 取吸光度值随稀释比例呈直线上阶段的 1:1000~5:100。线性估计可得: $y = 15.53x + 0.94$ ($R^2 = 0.84$; 图 2)。

2.2.3 回收试验 测 1:100 Lp(a) 的标准品吸光度值为 0.58 ± 0.09 , 某样品 1:100 的吸光度值为 0.50 ± 0.15 , 将二者按一定比例混合后测吸光度值,

求出回收率为 90.3%。

2.2.4 干扰试验 总胆红素 $< 0.216 \mu\text{mol/L}$, 血红蛋白 $< 0.358 \mu\text{mol/L}$ 和甘油三酯 $< 0.71 \mu\text{mol/L}$ 时对结果无影响。

2.3 Lp(a) Lys⁺ 水平在急性心肌梗死组、不稳定型心绞痛组及对照组的變化

去掉协变量影响后, 术前及术后 4 h、8 h、12 h 冠心病组 Lp(a) Lys⁺ 水平均比对照组高, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 术后 24 h 差异无显著性 ($P > 0.05$); 术后 48 h 差异有显著性 ($P < 0.01$)。术后 4~9 天 Lp(a) Lys⁺ 水平低于对照组, 但差异无显著

性 ($P > 0.05$; 表 3)。

进一步观察 UA 组和 AMI 组术后 Lp(a) Lys⁺ 水平的变化趋势,发现在术前 AMI 组和 UA 组 Lp(a) Lys⁺ 水平就比对照组明显增高,其中 AMI 组比较明显。AMI 组在术后 4 h 比术前增高,术后 8 h 降低甚

至降至术前水平以下,但术后 12 h 又急剧增高,超过术后 4 h 水平,曲线呈明显的双峰。随后急剧降低,3~4 天降至对照组平均水平线水平。UA 组术前 Lp(a) Lys⁺ 水平比对照组高,术后轻微增高后,缓慢降低,3~4 天降至对照组平均水平线水平(图 3)。

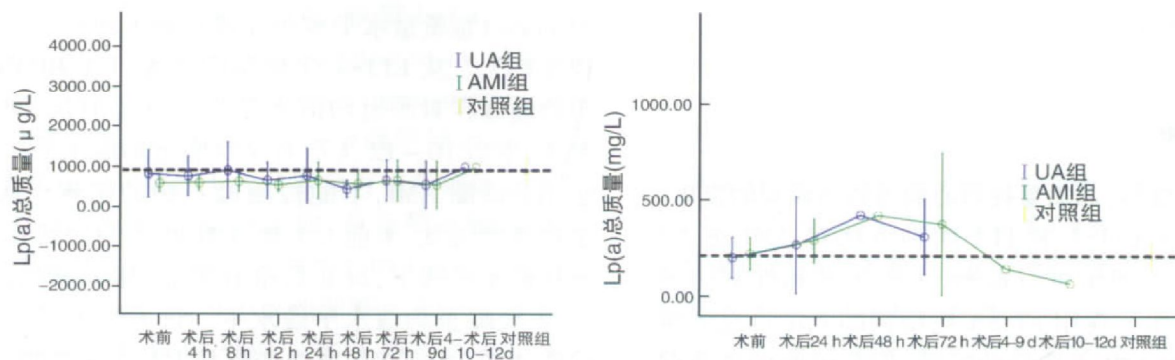


图 1. ELISA 法(左)和 ITA 法(右)动态检测 Lp(a) 总质量在冠心病组和对照组的变化的变化

Figure 1. The level of lipoprotein (a) at preoperative and postoperative 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h and 72 h, 4~9 days and 10~12 days points respectively in coronary artery heart disease group and control group by enzyme-linked immunosorbent assay and immune turbidimetric assay

表 2. Lp(a) Lys⁺ 的精密度实验

Table 2. Lp(a) Lys⁺ precision experiment

混合血清	平均吸光度	批内 CV	批间 CV
AMI 术前	0.79	3.28%	8.56%
AMI 术后 4 h	0.88	1.66%	6.36%
AMI 术后 24 h	0.59	1.26%	8.00%
UA 术前	0.43	3.73%	4.23%
UA 术后 24 h	0.42	1.33%	5.56%
对照组	0.35	2.12%	3.12%

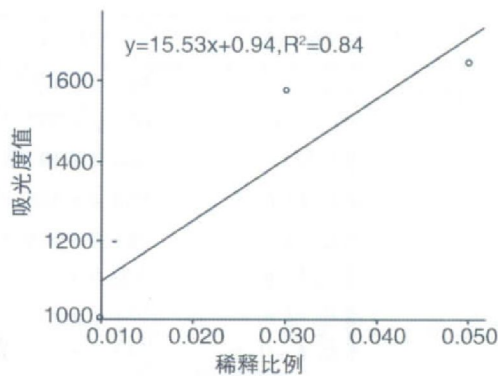


图 2. Lp(a) Lys⁺ 的线性检测

Figure 2. Lp(a) Lys⁺ linear test

表 3. Lp(a) Lys⁺ 水平在冠心病组和对照组的变化的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3. Level of Lp(a) Lys⁺ in coronary artery heart disease group and control group

测定时间	AMI 组	UA 组	对照组	主体效应 F 值	P 值
术前	0.79 ± 0.14	0.43 ± 0.15	0.35 ± 0.07	31.771	0
术后 4 h	0.88 ± 0.16	0.49 ± 0.21		6.678	0
术后 8 h	0.74 ± 0.12	0.39 ± 0.119		46.496	0
术后 12 h	0.89 ± 0.23	0.43 ± 0.15		38.472	0
术后 24 h	0.59 ± 0.24	0.42 ± 0.20		0.239	0.789
术后 48 h	0.59 ± 0.23	0.44 ± 0.20		6.326	0
术后 72 h	0.44 ± 1.00	0.44 ± 1.00		4.863	0.004
术后 4~9 天	0.26 ± 0.06	0.26 ± 0.06		1.926	0.132
术后 10~12 天	0.27 ± 0.03	0.29 ± 1.00		2.082	0.107

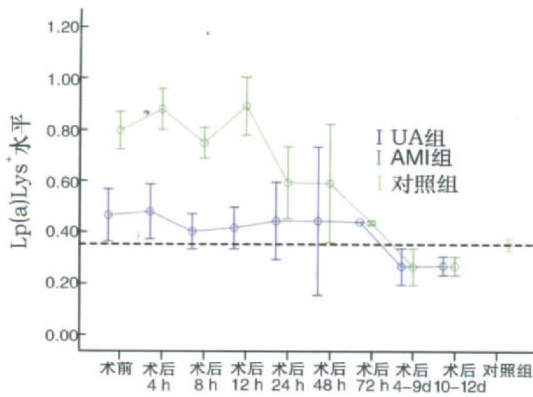


图 3. Lp(a) Lys⁺ 水平在冠心病组和对照组的动态变化曲线

Figure 3. The level of Lp(a) Lys⁺ at preoperative and postoperative 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h and 72 h, 4~9 days and 10~12 days points respectively in coronary artery heart disease group and control group

2.4 Lp(a) Lys⁺ 对急性心肌梗死的诊断价值

2.4.1 急性心肌梗死和不稳定型心绞痛患者及对

表 4. 各组 CK-MB 水平 ($\bar{x} \pm s$, U/L)

Table 4. Levels of CK-MB in every group

测定时间	AMI 组	UA 组	对照组	主体效应 F 值	P 值
术前	167.52 ± 179.98	9.86 ± 5.43	11.43 ± 6.41	5.745	0.001
术后 4 h	2218.12 ± 7151.01	7.54 ± 4.81		0.771	0.552
术后 8 h	178.96 ± 122.09	8.54 ± 8.67		11.61	0
术后 12 h	130.04 ± 106.23	8.04 ± 6.78		6.755	0
术后 24 h	185.21 ± 155.36	5.33 ± 4.19		3.12	0.1
术后 48 h	162.29 ± 136.61	16.50 ± 5.45		5.832	0.002
术后 72 h	91.06 ± 90.59			4.699	0.006
术后 4~9 天	69.11 ± 54.58			2.821	0.064
术后 10~12 天	17.87 ± 30.86			3.689	0.036

2.4.3 Lp(a) Lys⁺ 和 CK-MB 的诊断阈值判断

不同阈值对应不同的灵敏度和特异度,CK-MB 测定的参考值上限为 15 U/L^[4],根据此上限,回判 AMI 组术前和对照组的诊断效果,发现 AMI 组 15 例中有 2 例低于上限;对照组 30 例中有 7 例超过上限。在术前,UA 组与对照组之间 Lp(a) Lys⁺ 差异无显著性 ($P > 0.05$),而 AMI 组与对照组和 UA 组相比,差异均有显著性意义 ($P < 0.01$)。取 UA 组的均值 ± 2 倍标准差为 AMI 诊断值 (99%) 的下限值,即 0.73,以 A 值 > 0.73 做为诊断 AMI 的阈值,对 AMI 患者和对照组进行回判,发现 AMI 患者有 3 例患者的 A 值 ≤ 0.73 ,对照组没有 1 例患者 A 值 > 0.73 。

2.4.4 Lp(a) Lys⁺ 和 CK-MB 对 AMI 的诊断价值效

果评价 根据 Lp(a) Lys⁺ 对 AMI 的诊断阈值 (0.73) 和 CK-MB 的诊断阈值 (15 U/L)^[4] 评价诊断效果,发现 Lp(a) Lys⁺ 和 CK-MB 两指标对 AMI 诊断的正确率、灵敏度、特异度和 Youden 指数都很高,误诊率、漏诊率都很低。两指标比较,Lp(a) Lys⁺ 对 AMI 诊断的正确率、特异度、误诊率和 Youden 指数优于 CK-MB,灵敏度和漏诊率与 CK-MB 相似。从相关性可判断,Lp(a) Lys⁺ 与 AMI 的相关性高于 CK-MB 与 AMI 的相关性 (表 5)。

对照组 CK-MB 水平变化 CK-MB 在 AMI 组术前即心肌梗死发生后明显增加,术后 4 h 急剧增高,比术前高出十几倍,术后 8 h 降低,术后 10~12 天尚未降到正常水平上限 (15 U/L);而在 UA 组变化很小,术前即心绞痛发生时 CK-MB 比对照组低,术后比术前浓度更低,术后 48 h 略有增高。AMI 组和 UA 组与对照组相比,在各时间点的总方差分析差异无显著性意义 ($F = 0.714, P = 0.679$),术前三组之间差异有显著性意义 ($P < 0.05$),其余各时间点各组之间差异有显著性意义 ($P < 0.05$; 表 4)。

2.4.2 Lp(a) Lys⁺ 和 CK-MB 对 AMI、UA 的诊断 ROC 曲线和诊断价值判断 以 1 - 特异性为横坐标,敏感度为纵坐标两指标对 AMI 和 UA 分别做 ROC 曲线,ROC 曲线线下面积可反映诊断试验的价值大小,取值范围为 0.5~1 为完全无价值的诊断,完全理想的诊断为 ROC 曲线下面积为 1。可见,Lp(a) Lys⁺ 优于 CK-MB,是诊断 AMI 理想的指标;而两指标诊断 UA 的价值都较低 (图 4)。

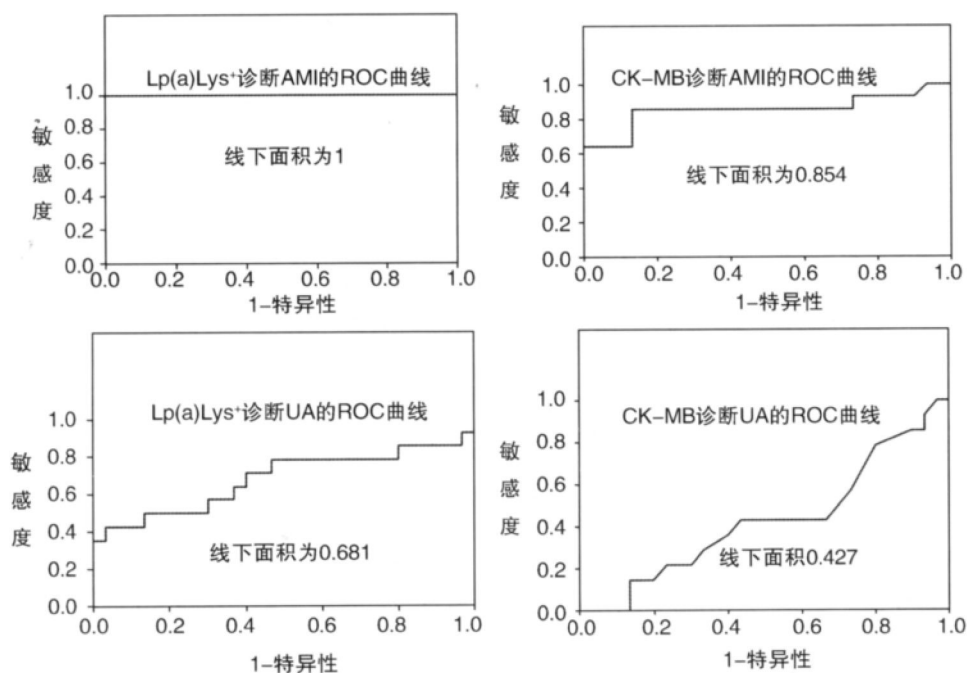


图4. Lp(a) Lys⁺和CK-MB对AMI、UA的诊断ROC曲线

Figure 4. Lp(a) Lys⁺ and CK-MB for AMI, UA diagnosis of receiver operating characteristic curves

表5. Lp(a) Lys⁺和CK-MB对AMI的诊断效果评价

Table 5. The evaluation of Lp(a) Lys⁺ and CK-MB in diagnosis of AMI

诊断效果	CK-MB	Lp(a) Lys ⁺
正确率	77.78%	93.00%
灵敏度	80.00%	80.00%
特异度	76.67%	100%
漏诊率	20.00%	20.00%
误诊率	23.33%	0%
Youden 指数	0.57	0.80
相关性	0.60	0.91
P 值	0	0

注: Youden 指数是指真阳性率与假阳性率之差。

3 讨论

3.1 Lp(a) Lys⁺检测方法的建立

目前,临床上检测 Lp(a) 方法,采用的是 Lp(a) 多克隆抗体,针对 Lp(a)、Apo(a)、ox-Lp(a)、疏松结构/紧密结构的 Lp(a)、氧化型 Lp(a) 的抗原抗体复合物、Lp(a) Lys⁺/Lp(a) Lys⁻等多种抗原位点,不能准确检测功能性 Lp(a) 的质量。喻红等^[2,3]认为 Lp(a) 存在异质性,有与赖氨酸结合的 Lp(a) [Lp(a) Lys⁺] 和不与其结合的 Lp(a) [Lp(a) Lys⁻],两者在不同个体比例相差很大;Lp(a) Lys⁺与血小板和细胞外基质蛋白的结合能力远远高于 Lp(a) Lys⁻;双层火箭免疫电泳法显示二者具有相同的免疫学活性^[2]。所以利用现有的免疫方法不能准确定量血清中的功能性 Lp(a) 的质量,为此我们设计了将多聚赖氨酸先包被于酶标板,将待测血清与多聚赖氨酸结合,再用一抗结合上去,再用二抗显色,从得出结果的精密度和阴阳性对照结果来说,此实验方法是可行的;通过精密度实验、线性检测、回收试验和干扰试验发现此方法检测与多聚赖氨酸结合的 Lp(a) 的方法是可行的,但此方法的其它评估还需要进一步研究,这需要进行凝胶层析过柱分离提纯 Lp(a),并将 Lp(a) 进行多聚赖氨酸亲和层析制备 Lp(a) Lys⁺的纯品,进行参考范围和其它方法检测的验证。

3.2 Lp(a) Lys⁺检测冠心病疾病的诊断效果评价

据文献 [5] 报道 Lp(a) 在冠心病不同临床类型中水平有差异,AMI 组 > UA 组 > 稳定型心绞痛组 > 非冠心病组;有人认为 Lp(a) 是敏感的正急性时相蛋白^[6];也有人认为 Lp(a) 可能是一种负急性时相蛋白,至今没有定论。我们的结果显示用 ELISA 和 ITA 法检测 Lp(a) 总质量在急性心肌梗死和稳定型心绞痛发生时水平略低于健康对照组,行经皮冠状动脉球囊扩张术及药物涂层支架植入术后与术前

比较差异也无显著性意义。而 Lp(a) Lys⁺ 冠心病组明显高于对照组;术前即急性心肌梗死和稳定型心绞痛发作时比对照组增高,其中 AMI 组增高比 UA 组明显;Lp(a) Lys⁺ 的这一特点说明它才是正急性时相蛋白,在动脉血管缺血损伤时 Lp(a) 增加和消耗相平衡,所以 Lp(a) 总质量的诊断价值不大,而 Lp(a) Lys⁺ 对心血管疾病可以早期诊断动脉血管的缺血损伤。AMI 和 UA 两组患者 Lp(a) Lys⁺ 术后 4 h 都比术前增高,8 h 降低至术前水平,这可能是心肌损伤过程中肝脏合成 Lp(a) Lys⁺ 增加所致;术后 12 h AMI 组又再次升高,Lp(a) Lys⁺ 水平在 AMI 术前、术后动态变化曲线呈双峰。第二个波峰可能是心肌梗死后经手术治疗,心肌再灌注导致心肌再灌注损伤,肝脏合成增加或再灌注致使心肌梗死区域原有的 Lp(a) Lys⁺ 重新入血导致 Lp(a) Lys⁺ 水平再次升高。而 UA 患者,术后 4 h Lp(a) Lys⁺ 开始缓慢降低,没有出现动态曲线双峰。这一结果说明 Lp(a) Lys⁺ 可能是正急性时相蛋白,参与心肌细胞缺血坏死与再灌注损伤的病理过程,是 Lp(a) 的功能性部分。

Lp(a) Lys⁺ 诊断 AMI 的临界值未定的情况下,使用金标准——冠状动脉造影确诊的 AMI 和 UA,及 ROC 曲线能较全面的评价该方法的诊断价值。从 ROC 曲线可知,Lp(a) Lys⁺ 诊断 AMI 的线下面积为 1,诊断 UA 的线下面积为 0.681,诊断 AMI 的效果要优于 UA 的诊断。

我们以 UA 组 Lp(a) Lys⁺ 均值 ± 2 倍标准差为 AMI 诊断值(99%)的下限值(0.73),作为 Lp(a) Lys⁺ 诊断 AMI 的诊断界值,Lp(a) Lys⁺ 的灵敏度、特异度、正确率、误诊率、漏诊率和 Youden 指数,也优于 CK-MB 的诊断。CK-MB 在 AMI 发生 2 h 即上升,10~18 h 达峰值,12~24 h 下降,是世界上应用最广泛的心肌损伤指标,既可用于较早期诊断 AMI,

也可用于估计梗死范围大小或再梗死。但 Lp(a) Lys⁺ 确诊 AMI 的诊断效果还需与其它心肌损伤标志物相比较。

本研究基于对 Lp(a) 存在功能性和非功能性结构或成分、影响其检测和病理生理功能的认识,建立了检测 Lp(a) Lys⁺ 的方法,并对 AMI 和 UA 患者进行动态检测。从本研究结果发现,它对预测 AMI 的发生、监测其病程发展有重要意义,诊断效果都优于 CK-MB。Lp(a) Lys⁺ 参与了 AMI 的发生和发展,是一种功能性、正急性时相蛋白。Lp(a) Lys⁺ 在抗感染免疫、抑制肿瘤转移和炎症反应中可能发挥重要作用^[7],其作用机制和分子结构还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 孙明晓, 国汉帮, 蒋蕾, 等. 2 型糖尿病患者脂蛋白亚组份与颈动脉内膜中层厚度的相关性分析 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(8): 634-637.
 - [2] 喻红, 汪炳华, 洪嘉玲, 等. 脂蛋白(a)的赖氨酸结合异质性对动脉 SMC 增殖的影响 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16(5): 665-668.
 - [3] 汪炳华, 洪嘉玲, 陈丽达, 等. 脂蛋白(a)的赖氨酸结合异质性对纤溶酶原与血小板结合的影响 [J]. 基础医学与临床, 1999, 19(2): 56-60.
 - [4] 丛玉隆. 实用检验医学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009; 356.
 - [5] 张剑. 脂蛋白(a)检测及其临床应用 [J]. 沈阳医学院学报, 2006, 4(8): 296-298.
 - [6] 张丽霞, 只野寿太郎, 山本匡介. 脂蛋白(a)是最敏感的急性时相蛋白 [J]. 中华医学检验杂志, 1997, 20(3): 167.
 - [7] 贺艳丽, 周新. 脂蛋白(a)致动脉粥样硬化作用机制研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10(1): 80-82.
- (此文编辑 许雪梅)