

血浆晚期氧化蛋白产物与 HDL 亚类组成的关系

陈志军¹, 龙石银¹, 丁岚¹, 韩瑛², 陈浩³, 张彩平¹, 王小鸥⁴, 杨滢¹, 田英¹

(1. 南华大学生物化学与分子生物学教研室, 湖南省衡阳市 421001; 2. 湘南学院基础医学课部, 湖南省郴州市 423000; 3. 南华大学附属第一医院检验科, 湖南省衡阳市 421001; 4. 南华大学附属第一医院急诊科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 高密度脂蛋白亚类; 晚期氧化蛋白产物; 双向电泳-免疫印迹检测法; 氯胺-T 法

[摘要] **目的** 探讨血浆晚期氧化蛋白产物(AOPPs)对血浆高密度脂蛋白(HDL)亚类组成及含量的影响。**方法** 采用氯胺-T法和双向电泳免疫印迹检测法对346例受试者分别测定血浆AOPPs的相对含量和血浆HDL亚类的组成及含量。按AOPPs浓度均值加或减去一个标准差作为分割点,将受试者分为3组,即低AOPPs(AOPPs \leq 60 $\mu\text{mol/L}$)组、中AOPPs(60 $\mu\text{mol/L}$ < AOPPs < 90 $\mu\text{mol/L}$)组、高AOPPs(AOPPs \geq 90 $\mu\text{mol/L}$)组。**结果** 与低AOPPs组相比,高AOPPs组中pre β_1 -HDL及HDL_{3a}显著增多($P < 0.001$),而HDL_{2a}、卵磷脂胆固醇酰基转移酶及HDL_{2b}显著降低($P < 0.001$),各组胆固醇酯转运蛋白无变化。相关性分析表明AOPPs与血浆HDL亚类分布存在显著相关。**结论** 随着血浆AOPPs水平的升高HDL颗粒有变小的趋势,AOPPs可能阻碍了HDL的成熟代谢。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Relationships Between HDL Subpopulation and Advanced Oxidation Protein Products

CHEN Zhi-Jun¹, LONG Shi-Yin¹, DING Lan¹, HAN Ying², CHEN Hao³, ZHANG Cai-Ping¹, WANG Xiao-Ou⁴, YNAG Ying¹, and TIAN Ying¹

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Department of Basic Medical, University of Xiang Nan, Chenzhou, Hunan 423000, China; 3. Department of Laboratory, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 4. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] High Density Lipoprotein Subclasses; Advanced Oxidation Protein Products; Two Dimensional Gelelectrophoresis-Immunodetection; Chloramine-T Method

[ABSTRACT] **Aim** To study the influence of plasma advanced oxidation protein products (AOPPs) level on the contents of high density lipoprotein (HDL) subclasses. **Methods** Contents of AOPPs were detected by the chloramine-T method and the composition of HDL subclasses were measured with two-dimensional electrophoresis immunoblot in 346 subjects. According to the concentration of AOPPs, subjects were divided into three layers amount: low AOPPs (AOPPs \leq 60 $\mu\text{mol/L}$) group, middle AOPPs (60 $\mu\text{mol/L}$ < AOPPs < 90 $\mu\text{mol/L}$) group, high AOPPs (AOPPs \geq 90 $\mu\text{mol/L}$) group. **Results** Compared with the low AOPPs group, pre β_1 -HDL and HDL_{3a} were significantly increased ($P < 0.001$), but lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT), HDL_{2a} and HDL_{2b} were significantly decreased ($P < 0.001$) in high AOPPs group. Cholesterol ester transfer protein (CETP) did not change in subjects. Correlation analysis showed AOPPs effect on changes in plasma HDL subclass. **Conclusion** With elevated plasma AOPPs concentration, the particle size of HDL shows a shift toward smaller size, AOPPs may hinder mature metabolism of HDL.

流行病学研究发现,血浆中高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)与动脉粥样硬化(athero-

sclerosis, As)和冠心病(coronary heart disease, CHD)的发生和严重程度呈负相关^[1],其主要功能是参与

[收稿日期] 2012-10-24

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30800474);湖南省科技厅项目(2010SK3037);湖南省教育厅重点项目(11A104);湖南省研究生创新项目(CX2010B385)

[作者简介] 陈志军,硕士研究生,研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化,E-mail为sw0603chenzhijun@126.com。龙石银,教授,硕士研究生导师,研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化,E-mail为longshiyin@126.com。通讯作者田英,教授,硕士研究生导师,研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化,E-mail为uscty@163.com。

机体胆固醇逆向转运 (reverse cholesterol transport, RCT), RCT 促进组织细胞内胆固醇转运至肝脏转化清除, 维持细胞内胆固醇量的相对恒定, 从而限制动脉粥样硬化发生发展, 具有抗动脉粥样硬化的作用。HDL 是颗粒大小、组成及功能极不均一的一类脂蛋白。根据双向电泳免疫印迹检测法^[2] 可分为 pre β_1 -HDL、pre β_2 -HDL、HDL_{3c}、HDL_{3b}、HDL_{3a}、HDL_{2a} 和 HDL_{2b} 七个亚类。有学者提出血浆 HDL 亚类组成及含量变化可作为评价 As、CHD 危险性及其严重程度的重要指标^[3], 但其机理尚未阐明。晚期氧化蛋白产物 (advanced oxidation protein products, AOPPs) 是 Witko-Sarsat 等^[4] 于 1996 年首先报道的由尿毒症血液透析患者血浆中分离出的含有双酪氨酸的蛋白交联产物, 系因患者体内过高的氧化应激水平导致各种蛋白质氧化损伤所形成的终末产物的总称。As 患者血浆 AOPPs 水平明显高于正常人, 另有学者^[5] 用尿毒症透析血浆样品中的 AOPPs 作用于仓鼠卵巢细胞, 结果显示 AOPPs 竞争拮抗 HDL 的清道夫 B 类 I 受体 (scavenger receptor class B type I, SR-BI)。以上研究结果提示: 血浆中一定浓度的 AOPPs 有可能通过抑制肝、肾等器官对胆固醇的摄取导致血浆总胆固醇水平升高, 进而促进了 As 的形成, 但其作用机制目前尚未完全阐明。因此, 本文将通过分析 AOPPs 与 HDL 亚类的关系, 探讨 AOPPs 是否影响 HDL 的代谢来促进 As。

1 材料与方法

1.1 研究对象

346 例受试者来于南华大学附属第一医院作血脂及载脂蛋白 (apolipoprotein, Apo) 含量测试的人员。经询问病史及体检, 排除有心、肝、肾、内分泌及其他脂代谢相关的疾病和近 1 个月内服用降脂药者。其中男性 186 例, 平均年龄 56.8 ± 8.9 岁, 体质指数 (body mass index, BMI) 为 23.7 ± 3.1 kg/m²; 女性 160 例, 平均年龄 57.6 ± 10.2 岁, BMI 为 22.8 ± 2.9 kg/m²。受试者血浆 AOPPs 浓度符合正态分布 (图 1), 按 AOPPs 浓度均值加或减去一个标准差作为分割点, 将受试者分为 3 组, 即低 AOPPs (AOPPs ≤ 60 $\mu\text{mol/L}$) 组、中 AOPPs (60 $\mu\text{mol/L} < \text{AOPPs} < 90$ $\mu\text{mol/L}$) 组、高 AOPPs (AOPPs ≥ 90 $\mu\text{mol/L}$) 组。本研究经南华大学医学伦理委员会批准, 并与所有受试者签订知情同意书。

1.2 样本处理

全部受试者空腹 12 ~ 14 h, 取血, 分离血浆, 并

将血浆样品分为 3 份: 1 份用于血脂及载脂蛋白的测定; 1 份 -20℃ 保存, 用于 AOPPs 的检测; 另 1 份 -70℃ 保存, 用于 HDL 亚类的检测。

1.3 血脂及载脂蛋白的测定

甘油三酯 (triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 含量采用酶法试剂盒 (北京中生生物高技术公司提供) 测定, 血浆 ApoA1、ApoB100、ApoA5、卵磷脂胆固醇酰基转移酶 (lecithin-cholesterol acyltransferase, LCAT) 及胆固醇酯转运蛋白 (cholesterol ester transfer protein, CETP) 均采用酶联免疫吸附检测 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒测定。

1.4 AOPPs 浓度测定

按照 Witko-Sarsat 等^[4] 确定的紫外分光光度计法, 于酸性条件下、340 nm 波长处测样品中 AOPPs 的相对浓度, 以氯胺-T (碘化钾存在时最大吸收波长为 340 nm) 为标准品, 实际测定的为 AOPPs 对氯胺-T 的相对浓度。空白管、标准管、测定管及对照管分别含 200 μL 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS)、氯胺-T (0 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$)、血浆样本 (PBS 1:5 稀释), 各管加入 1.16 mol/L 碘化钾 10 μL , 静置 2 min, 再加入 20 μL 醋酸, 混匀后立即于 340 nm 波长下测定吸光度。以氯胺-T 的浓度和吸光度制作标准曲线, 从而查出测定和对照样品中 AOPPs 的相对浓度 ($\mu\text{mol/L}$)。

1.5 HDL 亚类免疫印迹试验

用人血浆 HDL 亚类免疫印迹检测法^[1] 进行测定, 将测得的 HDL 各亚类的相对百分含量再与样品中的 ApoA1 含量相乘, 即为 HDL 各亚类 (以 ApoA1 计) 的含量。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间均数比较采用 *t* 检验。排除性别、年龄及体质指数的干扰后, 采用直线相关分析确定 HDL 亚类与各因素相关性。

2 结果

2.1 血浆晚期氧化蛋白产物的含量

所有受试者血浆晚期氧化蛋白产物浓度呈正态分布 ($P = 0.496$; 图 1)。

2.2 血脂及载脂蛋白含量

随着 AOPPs 浓度的升高, 受试者 BMI、TG、TC、

ApoB100、LDLC 含量呈增加趋势;与低 AOPPs 组相比,中 AOPPs 组 BMI、TG、TC、ApoB100 及 LDLC 升高($P < 0.05$),高 AOPPs 组 BMI、TG、TC 及 LDLC 升高($P < 0.001$),与此相反,HDLC、ApoA1、LCAT 及 ApoA5 呈减少趋势;与低 AOPPs 组相比,中 AOPPs 组 HDLC、ApoA1、LCAT 及 ApoA5 浓度降低($P < 0.05$),高 AOPPs 组 HDLC、ApoA1、LCAT 及 ApoA5 浓度显著降低($P < 0.001$);各组中 CETP 含量无显著性差异(表 1)。以上结果提示受试者血浆 AOPPs 浓度升高与脂质代谢紊乱关系密切。

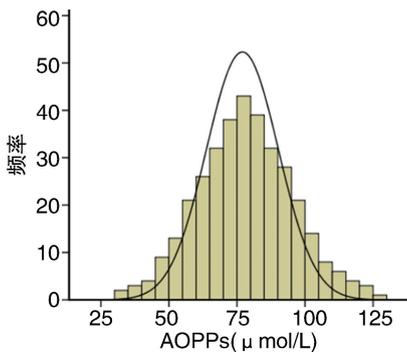


图 1. AOPPs 含量的频率分布 总例数为 346 例,均值为 75,标准差为 15, P 值为 0.496。

Figure 1. Frequency distribution of concentration in AOPPs

表 1. 不同 AOPPs 水平的血脂及载脂蛋白含量 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. The plasma lipids and apolipoproteins contents according to plasma AOPPs level in subjects ($\bar{x} \pm s$)

指 标	低 AOPPs 组 ($n = 89$)	中 AOPPs 组 ($n = 163$)	高 AOPPs 组 ($n = 94$)
BMI(kg/m^2)	22.93 \pm 2.16	24.46 \pm 2.24 ^a	25.81 \pm 1.96 ^b
AOPPs($\mu\text{mol}/\text{L}$)	48.44 \pm 7.30	75.32 \pm 10.08 ^a	102.10 \pm 10.61 ^b
TG(mmol/L)	0.85 \pm 0.37	1.94 \pm 1.48 ^a	3.69 \pm 1.42 ^b
TC(mmol/L)	3.96 \pm 0.62	4.38 \pm 0.72 ^a	4.53 \pm 0.70 ^b
HDLC(mmol/L)	1.19 \pm 0.32	1.06 \pm 0.30 ^a	0.93 \pm 0.28 ^b
LDLC(mmol/L)	2.53 \pm 0.63	2.92 \pm 0.67 ^a	2.97 \pm 0.70 ^a
ApoA1(mg/L)	1 483 \pm 625	1 337 \pm 389 ^a	1 275 \pm 235 ^b
ApoB100(mg/L)	538 \pm 136	593 \pm 148 ^a	618 \pm 135 ^a
ApoA5(mg/L)	296 \pm 80	253 \pm 104 ^a	199 \pm 107 ^b
LCAT(mg/L)	59.74 \pm 20.03	45.81 \pm 19.08	38.56 \pm 22.03 ^b
CETP(mg/L)	0.78 \pm 0.29	0.81 \pm 0.32	0.83 \pm 0.27

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与低 AOPPs 组相比。

2.3 HDL 亚类的含量

与低 AOPPs 组相比,中 AOPPs 组中 $\text{pre}\beta_1$ -HDL 及 HDL_{3a} 含量增加($P < 0.05$), HDL_{2a} 含量降低($P < 0.05$), HDL_{2b} 含量显著降低($P < 0.001$), 而高 AOPPs 组中 $\text{pre}\beta_1$ -HDL 及 HDL_{3a} 含量显著增加($P < 0.001$), HDL_{2a} 及 HDL_{2b} 含量显著降低($P = 0.001$) (表 2)。提示随着 AOPPs 浓度的升高, HDL 颗粒大小有变小趋势, HDL 成熟代谢受阻。

表 2. 不同 AOPPs 水平的 HDL 亚类含量 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. The ApoA1 contents of plasma HDL subpopulations according to plasma AOPPs level in subjects ($\bar{x} \pm s$)

指 标	低 AOPPs 组 ($n = 89$)	中 AOPPs 组 ($n = 163$)	高 AOPPs 组 ($n = 94$)
$\text{pre}\beta_1$ -HDL(mg/L)	91 \pm 40	103 \pm 40 ^a	114 \pm 30 ^b
$\text{pre}\beta_2$ -HDL(mg/L)	89 \pm 37	75 \pm 28	68 \pm 21
HDL_{3c} (mg/L)	85 \pm 59	88 \pm 45	101 \pm 32
HDL_{3b} (mg/L)	165 \pm 79	170 \pm 71	208 \pm 61
HDL_{3a} (mg/L)	294 \pm 145	304 \pm 98 ^a	320 \pm 92 ^b
HDL_{2a} (mg/L)	315 \pm 151	283 \pm 101 ^a	250 \pm 59 ^b
HDL_{2b} (mg/L)	405 \pm 173	326 \pm 143 ^b	227 \pm 69 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.001$, 与低 AOPPs 组相比。

2.4 HDL 亚类与血脂及其他参数的相关性分析

在控制性别、年龄和 BMI 下,相关性分析发现, AOPPs 含量与小颗粒的 $\text{pre}\beta_1$ -HDL 和 HDL_{3a} 呈显著正相关(相关系数 r 值分别为 0.628、0.531, $P < 0.001$), 而与 HDL_{2a} 和 HDL_{2b} 呈显著负相关(r 值分别为 -0.736、-0.674, $P < 0.001$)。TG 含量与 $\text{pre}\beta_1$ -HDL 呈正相关(r 值为 0.217, $P < 0.05$), 而与 HDL_{2a} 和 HDL_{2b} 呈负相关(r 值分别为 -0.390、-0.405, $P < 0.05$)。ApoA1 与 $\text{pre}\beta_1$ -HDL、 HDL_{2a} 和 HDL_{2b} 呈正相关(r 值分别为 0.213、0.238、0.104, $P < 0.05$)。LCAT 与 $\text{pre}\beta_1$ -HDL 和 HDL_{3a} 呈负相关(r 值分别为 -0.178、-0.228, $P < 0.05$), 而与 HDL_{2a} 和 HDL_{2b} 呈正相关(r 值分别为 0.354、0.153, $P < 0.05$) (表 3)。以上分析表明, AOPPs 对血浆 HDL 亚类含量改变的影响最大。

3 讨 论

近年血浆 AOPPs 含量与 As、CHD 的发生关系日益受到重视^[6,7], 已有研究发现 AOPPs 是 CHD 的独立危险因素并作为氧化应激标志物参与了微炎症反应来促进 As 的发生^[8]。而 HDL 与动脉粥样硬化是呈负相关的且其亚类在抗动脉粥样硬化中的功能是不同的。为了探讨 AOPPs 与 HDL 亚类组成的关系, 我们对 346 例受试者按血浆 AOPPs 含量分组, 观察和分析了 HDL 亚类组成含量变化的规律。结果发现, 在受试人群中随着血浆 AOPPs 水平的升高, 颗粒小的 $\text{pre}\beta_1$ -HDL 含量及颗粒较小的 HDL_{3a} 含量逐渐增加, 而颗粒大的 HDL_{2b} 及 HDL_{2a} 的含量逐渐减少, 表明 HDL 颗粒表现变小趋势。HDL 亚类出现这些变化可能与高的血浆 AOPPs 水平时 HDLC 代谢有关。Marsche 等^[5] 研究表明 AOPPs 无论在体内还是体外都与 HDL 受体即清道夫受体 SR-BI 有

表 3. 受试者 HDL 亚类与血脂等参数的相关性分析

Table 3. Correlation coefficients between HDL subclasses and biochemical parameters in subject

指 标	pre β_1 -HDL	pre β_2 -HDL	HDL _{3c}	HDL _{3b}	HDL _{3a}	HDL _{2a}	HDL _{2b}
AOPPs	0.628 ^b	0.052	0.107	0.254	0.531 ^b	-0.736 ^b	-0.674 ^b
TG	0.217 ^a	-0.064	0.108	0.101	0.277	-0.390 ^a	-0.405 ^a
TC	0.099	0.129	0.100	0.038	0.053	-0.107	-0.041
HDLC	-0.036	0.130	0.135	0.039	-0.192	0.162	0.108
LDLC	0.139	0.088	0.076	-0.021	-0.019	0.114	0.015
ApoA1	0.213 ^a	0.588	0.435	0.239	0.497	0.238 ^a	0.104 ^a
ApoB100	0.161	0.067	0.150	0.131	0.102	-0.148	-0.140
ApoA5	-0.320	0.054	-0.125	-0.234	-0.214	0.238	0.116
LCAT	-0.178 ^a	0.053	0.040	-0.074	-0.228 ^a	0.354 ^b	0.153 ^a
CETP	0.012	0.095	0.108	0.013	0.022	-0.176	-0.016

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$ 。

高亲和力和,能够通过拮抗清道夫受体 SR-BI 介导 HDL 的胆固醇摄取,影响 HDLC 的代谢,导致 HDL 代谢障碍,进而使 HDL 亚类的组成发生变化,促进 As 的发生。

本研究发现随着血浆 AOPPs 水平的升高, TG、TC 都显著升高,结果与 Franch 等^[9] 研究结果一致。TG 水平升高时,可引起肝脂酶 (hepatic lipase, HL) 活性增加及 LCAT 活性降低^[10,11]。LCAT 是催化游离胆固醇酯化的关键酶,促进 HDL 由 pre β_1 -HDL、HDL₃ 向 HDL₂ 的转变和成熟;血浆 LCAT 浓度或活性的降低, HDL 成熟会受阻,造成小颗粒 HDL 水平的升高。HL 是促进富含 TG 的大颗粒 HDL 分解代谢的酶,其活性的增加会加快大颗粒的 HDL₂ 的分解代谢,造成大颗粒 HDL 水平的降低。本研究结果表明随着血浆 AOPPs 水平的升高,血浆 LCAT 水平也随之降低,而血浆 LCAT 水平降低,可能导致小颗粒的 pre β_1 -HDL 和 HDL_{3a} 含量显著增加,大颗粒的 HDL₂ 含量显著减少。提示 HDL 颗粒呈变小趋势,其成熟代谢过程受阻。

本研究发现随着血浆 AOPPs 水平升高,血浆 HDLC 含量显著降低。AOPPs 可通过 JAK/STAT 信号途径来下调三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP binding cassette transporter A1, ABCA1) 的表达,从而抑制胆固醇流出;细胞中胆固醇流出的减少会从源头上导致总 HDL 的降低^[12]。血浆 AOPPs 水平升高必然会降低血浆 HDLC 的含量,从而导致胆固醇逆转运效率降低,影响 HDL 抗动脉粥样硬化能力。在控制性别、年龄和 BMI 下,相关性分析表明 AOPPs 对血浆 HDL 亚类含量改变的影响最大。这些结果提示血浆 AOPPs 可能会阻碍了 HDL 的成熟代谢,至于是否存在必然联系,还需更大的临床样本来进一步研究探讨。

[参考文献]

- [1] 张慧平, 孙福成, 王 抒. 高密度脂蛋白与动脉粥样硬化和冠心病[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(6): 733-736.
- [2] 吴新伟, 傅明德, 刘秉文, 等. 人血清高密度脂蛋白亚类免疫印迹检测法[J]. 中国动脉硬化杂志, 1999, 7(3): 253-255.
- [3] Atger V, Giral P, Simon A, et al. High density lipoproteins sub-fractions as markers of early atherosclerosis [J]. Am J Cardiol, 1995, 75(2): 127-131.
- [4] Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere Blandin C, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia [J]. Kidney Int, 1996, 49(5): 1304-313.
- [5] Marsche G, Frank S, Hrenjak A, et al. Plasma-advanced oxidation protein products are potent high-density lipoprotein receptor antagonists in vivo [J]. Circ Res, 2009, 104(6): 750-757.
- [6] Kaneda H, Taguchi J, Ogasawara K, et al. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease [J]. Atherosclerosis, 2002, 162(2): 221-225.
- [7] Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, et al. Advanced oxidation protein products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients [J]. Am J Kidney Dis, 2005, 45(1): 39-47.
- [8] Liu SX, Hou FF, Guo ZJ, et al. Advanced oxidation protein products accelerate atherosclerosis through promoting oxidative stress and inflammation [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(5): 1156-162.
- [9] Codoer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Murria-Estal R. Elevated advanced oxidation protein products (AOPPs) indicate metabolic risk in severely obese children [J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2012, 22(3): 237-243.
- [10] Lee M, Kim JQ, Kim J, et al. Studies on the plasma lipid profiles, and LCAT and CETP activities according to hyperlipoproteinemia phenotypes (HLP) [J]. Atherosclerosis, 2001, 159(2): 381-389.
- [11] 张 蕾, 倪培华, 应雅韵, 等. 高三酰甘油血症与肝脂酶启动子 710T/C 多态性的关系 [J]. 检验医学, 2006, 21(3): 210-214.
- [12] Zhongcheng Mo, Ji Xiao, Chaok Tang, et al. AOPPs inhibits cholesterol efflux by down-regulating ABCA1 expression in a JAK/STAT signaling pathway-dependeng manner [J]. J Atheroscler Thromb, 2011, 18(9): 796-807.

(此文编辑 曾学清)