

冠心病患者血清前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 与小而密低密度脂蛋白胆固醇的相关性研究

韩耀霞¹, 张强¹, 边云飞², 张娜娜¹, 梁斌², 白瑞², 肖传实¹

(山西医科大学 1.第一临床医学院心内科, 2.第二临床医学院心内科 山西省临床心血管药理实验室, 山西省太原市 030001)

[关键词] 冠心病; 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9; 小而密低密度脂蛋白胆固醇

[摘要] 目的 探讨冠心病患者血清前蛋白转化酶枯草溶菌素 9(PCSK9) 与小而密低密度脂蛋白胆固醇(sdLDLC) 的关系。方法 收集 2014 年 3 月至 2014 年 12 月在山西医科大学第一医院住院且行冠状动脉造影术确诊为冠心病的患者 100 例作为冠心病组, 同期健康体检者 67 例作为对照组。Lipoprint 脂蛋白分析仪检测 LDLC 颗粒大小、sdLDLC 颗粒数及 sdLDLC 所占 LDLC 的百分比(简称 sdLDLC 百分比); 酶联免疫吸附法测定血清 PCSK9。结果 冠心病组 LDLC 颗粒大小低于对照组(264.07 ± 6.78 比 267.37 ± 5.15 , $P < 0.01$), sdLDLC 颗粒数多于对照组(5.0 ± 9.5 比 4.0 ± 5.0 , $P < 0.05$), sdLDLC 百分比大于对照组($5.95\% \pm 10.50\%$ 比 $3.70\% \pm 5.85\%$, $P < 0.01$)。冠心病组血清 PCSK9 显著高于对照组($15.48 \mu\text{g/L}$ 比 $14.95 \mu\text{g/L}$, $U = -2.74$, $P = 0.006$)。冠心病组血清 PCSK9 与 sdLDLC 百分比、LDLC 呈正相关($r = 0.212$, $P = 0.034$; $r = 0.202$, $P = 0.032$)。结论 冠心病患者血清 PCSK9 与 sdLDLC 百分比呈正相关, 抑制 PCSK9 可以预防冠心病。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

Study on the correlation between serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and small and dense low density lipoprotein cholesterol in patients with coronary artery disease

HAN Yao-Xia¹, ZHANG Qiang¹, BIAN Yun-Fei², ZHANG Na-Na¹, LIANG Bin², BAI Rui², XIAO Chuan-Shi¹

(1. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, 2. Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital & Clinical Cardiovascular Pharmacology Laboratory of Shanxi Province, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] Coronary heart disease; Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; Small and dense low density lipoprotein cholesterol

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and small and dense low density lipoprotein cholesterol (sdLDLC) in patients with coronary heart disease (CHD). **Methods** From March 2014 to December 2014 in the first hospital of Shanxi Medical University, 100 patients with CHD diagnosed by coronary angiography were collected as CHD group, and 67 healthy subjects were served as control group. Lipoprint lipoprotein analyzer was used to measure the LDLC particle size, sdLDLC particle number and the percentage of sdLDLC in LDLC (sdLDLC percentage). Serum PCSK9 level was detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Compared with the control group, LDLC particle size decreased (264.07 ± 6.78 vs. 267.37 ± 5.15 , $P < 0.01$), sdLDLC particle number increased (5.0 ± 9.5 vs. 4.0 ± 5.0 , $P < 0.05$), sdLDLC percentage increased ($5.95\% \pm 10.50\%$ vs. $3.70\% \pm 5.85\%$, $P < 0.01$) in the CHD group. The serum PCSK9 level in CHD group was significantly higher than that in control group ($15.48 \mu\text{g/L}$ vs. $14.95 \mu\text{g/L}$, $U = -2.74$, $P = 0.006$). In the CHD group, serum PCSK9 level was positively correlated with sdLDLC percentage and LDLC ($r = 0.212$, $P = 0.034$; $r = 0.202$, $P = 0.032$). **Conclusion** Serum PCSK9 level is positively correlated with sdLDLC percentage in patients with CHD, and the inhibition of PCSK9 can prevent CHD.

[收稿日期] 2015-05-07

[修回日期] 2016-08-30

[作者简介] 韩耀霞, 硕士研究生, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 664533164@qq.com。通讯作者肖传实, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病的基础与临床、心力衰竭及心律失常的诊断和治疗, E-mail 为 ganxi-baozhongxin@sina.com。

导致冠状动脉粥样硬化性心脏病的危险因素很多,如高血压、糖尿病、高胆固醇血症、吸烟等,其中高胆固醇血症被认为是最重要的危险因素^[1]。流行病学研究^[2]发现低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)与冠心病的发生密切相关。近年来,随着科技的进步,根据LDLC颗粒的大小和密度可将其分为7个亚型,LDLC亚型1-2以大而轻的LDLC为主,亚型3-7以小而密的LDLC为主。小而密低密度脂蛋白胆固醇(small and dense low density lipoprotein cholesterol, sdLDLC)是冠心病发生的危险因素已得到了证实。已有研究^[3]发现他汀类药物可使sdLDLC水平降低,然而,有一部分患者因他汀类药物的肌溶解和肝脏损害的副作用不能使用,因此,需要寻找新的降低sdLDLC的药物。前蛋白转化酶枯草溶菌素9(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)是一种由肝脏分泌的新的前蛋白转化酶,可以使低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)降解,从而使血清LDLC堆积,使冠心病的患病率增加。本文旨在研究冠心病患者血清PCSK9与sdLDLC的相关性,从而为将来寻找一种新的降低sdLDLC的药物提供依据。

1 资料和方法

1.1 研究对象及分组

收集2014年3月至2014年12月山西医科大学第一医院心内科住院的患者。将经冠状动脉造影术确诊为冠心病的100例患者作为冠心病组,同期健康体检者67例作为对照组。(1)冠心病组:100例,男性60例,女性40例,平均年龄 58.47 ± 10.46 岁,经冠状动脉造影证实主要冠状动脉(左主干、左前降支、左回旋支、右冠状动脉)中至少有一支狭窄 $\geq 50\%$ 。(2)对照组:67例,男性38例,女性29例,平均年龄 55.55 ± 8.77 岁。吸烟史定义为每天至少1支,并且连续吸烟 >1 年。冠心病组与对照组均排除各种原因导致的肺源性心脏病、肺动脉高压、血液病、严重肝肾功能不全、严重感染、恶性肿瘤等影响血脂及PCSK9检测结果的疾病者。

1.2 标本采集及生化指标检测

在受试者于4周内未服用降脂药、抗凝药情况下,禁食12 h,于次日晨采肘静脉血2 mL,送医院检验科,测定各项生化指标,如总胆固醇、甘油三酯、LDLC、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、空腹血糖等。

1.3 sdLDLC 检测

收集的标本离心(3000 r/min, 4℃, 10 min)后得到血清,将25 μL血清加入LDLC颗粒检测试剂胶管中,加入200 μL的凝胶试剂,于500 V、500 W,每个胶管3 mA电流电泳,电泳后静置30 min,经Lipoprint脂蛋白分析仪(Quantimetrix公司,美国)检测,得出LDLC颗粒大小、sdLDLC颗粒数及sdLDLC所占LDLC的百分比(简称sdLDLC百分比)。

1.4 PCSK9 检测

PCSK9酶联免疫吸附测定试剂盒购自上海研谨生物有限公司。收集的标本离心(3000 r/min, 4℃, 10 min)后得到血清,将标准品按说明书进行稀释,加入各孔,将稀释液40 μL和血清10 μL加入酶标板中,37℃温育30 min,用稀释后的洗涤液清洗5次,加入酶标试剂50 μL,温育30 min后再次洗5次,加入显色剂A、B各50 μL,37℃避光15 min,最后加入终止液50 μL,在450 nm波长处测吸光度。

1.5 统计学方法

所有资料均采用SPSS 13.0软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,率的比较用 χ^2 检验;非正态分布计量资料采用秩和检验;相关性分析采用Spearman秩相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组基本资料比较

冠心病组体质指数、总胆固醇、甘油三酯、LDLC均较对照组高,而HDLC较对照组低,差异有统计学意义($P < 0.05$;表1)。

表 1. 两组基本资料比较

Table 1. Comparison of basic data between the two groups

项 目	冠心病组 (<i>n</i> = 100)	对照组 (<i>n</i> = 67)	<i>t</i> / χ^2	<i>P</i> 值
男/女(例)	60/40	38/29	0.178	0.673
年龄(岁)	58.47 ± 10.46	55.55 ± 8.77	1.949	0.053
体质指数(kg/m ²)	25.26 ± 3.21	24.20 ± 3.38	2.055	0.041
糖尿病[例(%)]	45(45.0)	7(10.4)	22.338	<0.001
高脂血症[例(%)]	41(41.0)	14(20.9)	7.342	0.007
吸烟史[例(%)]	46(46.0)	20(29.9)	4.378	0.036
空腹血糖(mmol/L)	5.88 ± 1.49	5.55 ± 0.69	1.952	0.053
总胆固醇(mmol/L)	4.68 ± 1.03	4.36 ± 0.80	2.201	0.029
甘油三酯(mmol/L)	2.10 ± 1.31	1.66 ± 1.47	2.014	0.046
HDLC(mmol/L)	1.17 ± 0.35	1.29 ± 0.35	-2.156	0.033
LDLC(mmol/L)	2.89 ± 1.03	2.51 ± 0.87	2.486	0.014

2.2 两组 LDLC 颗粒及 sdLDLC 特点比较

冠心病组 LDLC 颗粒大小较对照组小, sdLDLC 颗粒数较对照组多, sdLDLC 百分比比较对照组高, 差异有统计学意义(表 2)。

表 2. 两组 LDLC 颗粒及 sdLDLC 特点比较

Table 2. Comparison of LDLC particle and sdLDLC characteristics between the two groups

项 目	冠心病组 (n=100)	对照组 (n=67)	t 值	P 值
LDLC 颗粒大小(Å)	264.07±6.78	267.37±5.15	-3.386	0.001
sdLDLC 颗粒数	5.0±9.5	4.0±5.0	-2.299	0.022
sdLDLC 百分比(%)	5.95±10.50	3.70±5.85	-2.914	0.004

2.3 秩和检验分析两组血清 PCSK9 差异

冠心病组血清 PCSK9 为 15.48 μg/L (12.39 ~ 55.09 μg/L), 对照组血清 PCSK9 为 14.95 μg/L (12.00~37.72 μg/L), 前者显著高于后者(秩和检验: $U=-2.74, P=0.006$)。

2.4 Spearman 秩相关性分析血清 PCSK9 与血脂指标的相关性

冠心病组血清 PCSK9 与 sdLDLC 百分比呈正相关($r=0.212, P=0.034$; 图 1), 与 LDLC 也呈正相关($r=0.202, P=0.032$), 而与其他血脂指标没有相关性($P>0.05$); 对照组血清 PCSK9 与各项血脂指标均没有相关性($P>0.05$; 表 3)。

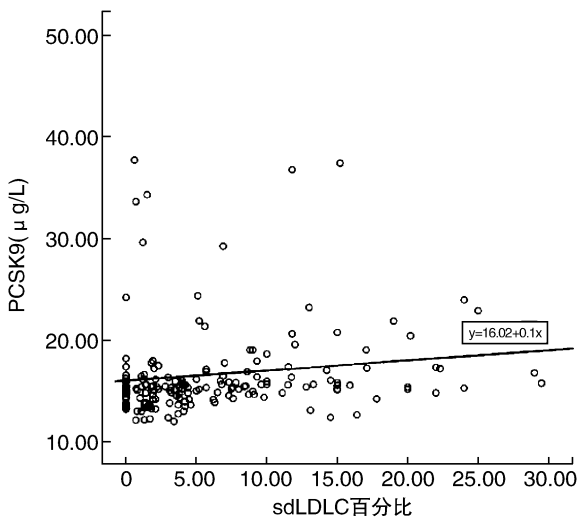


图 1. 冠心病组血清 PCSK9 水平与 sdLDLC 百分比的相关性

Figure 1. Correlation between serum PCSK9 level and sdLDLC percentage in the CHD group

表 3. PCSK9 与血脂的相关性分析

Table 3. Correlation analysis of PCSK9 and blood lipid

血 脂	冠心病组		对照组	
	r 值	P 值	r 值	P 值
总胆固醇	-0.045	0.656	-0.048	0.702
甘油三酯	-0.071	0.490	-0.097	0.437
HDL	0.140	0.166	0.016	0.895
LDLC	0.202	0.032	0.023	0.850
LDLC 颗粒大小	-0.082	0.420	-0.074	0.553
sdLDLC 颗粒数	0.049	0.626	0.029	0.814
sdLDLC 百分比	0.212	0.034	0.227	0.065

3 讨 论

高脂血症被认为是冠心病的重要危险因素, 尤其是 LDLC 增高。因此对于冠心病患者而言, 降低 LDLC 尤为重要。近年研究发现^[4], LDLC 可分为大而轻低密度脂蛋白胆固醇和 sdLDLC, 而 sdLDLC 才是 LDLC 中导致冠心病的罪魁祸首。我们团队的研究还发现, 相比冠状动脉单支病变组, 多支病变组 sdLDLC 所占 LDLC 的百分比更高; 此次研究结果与之前一致。他汀类药物目前被认为是降低 LDLC 的一线用药, 有很多学者对他汀类药物降低 sdLDLC 进行了研究, 发现服用他汀类降脂药物可增加 LDLC 颗粒大小, 减少 sdLDLC 的数量^[5]。蒋晓林等^[6]发现辛伐他汀可使 sdLDLC 水平明显下降且呈剂量依赖性。然而, 尽管强化他汀类药物可有效降低 LDLC 和 sdLDLC 水平, 但有一部分患者虽使用了大剂量的他汀类药物, LDLC 仍未达到正常水平, 还有一些患者因不能耐受他汀类药物的肝脏损害和肌溶解作用而受到限制, 因此, 对于他汀类药物降脂效果不良和不耐受的患者, 研究新型的降脂药物尤为重要^[7]。

PCSK9 是一种由肝脏分泌的新的前蛋白转化酶, 主要是通过结合固醇类调节元件结合蛋白 2 调节血脂水平, 当细胞内固醇类物质减少时, PCSK9 基因受到刺激而表达增加, 与肝脏表面 LDLR 结合, 使 LDLR 降解, 引起 LDLC 水平升高, 从而增加了心脑血管疾病的患病风险^[8-9]。PCSK9 基因敲除的小鼠, 其肝脏 LDLR 摄取 LDLC 能力显著下降^[10]。本研究对冠心病组与对照组血清 PCSK9 进行了比较, 发现冠心病组 PCSK9 水平高于对照组, 两者之间差异有统计学意义($P<0.05$); 通过 Spearman 秩相关分析, 冠心病组 PCSK9 与 LDLC 呈正相关($r=0.202, P=0.032$); 这与国内外研究是一致的。PCSK9 与 LDLC 的相关性已得到了认可。目前国外

学者^[11]发现 PCSK9 单克隆抗体 mAbI 可有效降低 LDLC,在非人的灵长类动物体内,单剂量注射 mAbI 可明显降低胆固醇和 LDLC,降低幅度高达 80%。PCSK9 的研究已经进入 II 期临床阶段^[12],对于不耐受他汀类药物的患者给予 PCSK9 单克隆抗体或他汀类药物联合治疗,比较两者疗效,发现 PCSK9 单克隆抗体可将 LDLC 降低 56%,而他汀类药物则只降低了 39%,表明 PCSK9 单克隆抗体降低 LDLC 的效果更好,且没有肌溶解危险性,PCSK9 抑制剂为调脂带来了新的希望。

在国内外学者研究的基础上,我们思考了能否通过研究 PCSK9 与 sdLDLC 的相关性,而通过另一种途径更有针对性的降低冠心病患者中 sdLDLC 的方法。Xu 等^[13]对 281 名稳定型冠心病患者血清 PCSK9 与脂蛋白微粒研究发现,PCSK9 与 LDLC 浓度、中间型 LDLC、小 LDLC 及其 LDLC 百分比呈正相关,而与平均 LDLC 颗粒大小无关。本实验首次发现 PCSK9 与 sdLDLC 百分比呈正相关($r=0.212$, $P=0.034$),而与 LDLC 颗粒大小、sdLDLC 颗粒数没有相关性;导致此结果的机制尚不清楚,还需要进一步的研究。

需要指出的是,本研究尚存在一些局限性,例如,样本量尚不足,需要进一步增加样本量进行研究。以后,我们可以使用 PCSK9 抗体对 sdLDLC 的作用效果进行研究,并进一步研究其作用机制,从而预防冠心病。

[参考文献]

- [1] Lewington S, Whitlock G, Clarke R, et al. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths [J]. *Lancet*, 2007, 370 (9602): 1 829-839.
- [2] Otvos JD, Collins D, Freedman DS, et al. Low-density lipoprotein and high-density lipoprotein particle subclass predict coronary events and are favorably changed by gemfibrozil therapy in the veterans affairs high-density lipoprotein intervention trial[J]. *Circulation*, 2006, 113(12): 1 556-563.
- [3] Tokuno I A, Hirano I T, Hayashi I T, et al. The effects of statin and fibrate on lowering small dense LDL-cholesterol in hyperlipidemic patients with type 2 diabetes[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2007, 14(3): 128-132.
- [4] 张晓刚, 边云飞, 肖传实, 等. 低密度脂蛋白颗粒大小及 sd-LDL 浓度比与冠状动脉病变严重程度的相关性研究[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(4): 399-403.
- [5] Bakers JM, Glison CA. Effect of lipid-lowering drug therapy on small-dense low-density lipoprotein [J]. *Am Pharmacother*, 2005, 39(3): 523-526.
- [6] 蒋晓林, 王惠林. 辛伐他汀对冠心病患者小而密低密度脂蛋白的影响研究[J]. *基层医学论坛*, 2013, 17(28): 3 715-717.
- [7] Moriarty PM, Jacobson TA, Bruckert E, et al. Efficacy and safety of alirocumaba a monoclonal antibody to PCSK9, in statin-intolerant patients: Design and rationale of ODYSSEY ALTERNATIVE, a randomized phase 3 trial [J]. *J Clin Lipidol*, 2014, 8(6): 554-561.
- [8] Luna Saavedra YG, Zhang J, Seidah NG. PCSK9 prosegment chimeras novel inhibitors of LDLR degradation [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72 113.
- [9] Joy TR. Novel therapeutic agents for lowering low density lipoprotein cholesterol [J]. *Pharmacol Ther*, 2012, 135 (1): 31-43.
- [10] Fattori E, Cappelletti M, Losurdo P, et al. Immunization against proprotein convertase subtilisin-like/kexin type 9 lowers plasma LDL cholesterol levels in mice [J]. *Lipid Res*, 2012, 53(8): 1 654-661.
- [11] Han JC, Piper DE, Cao Q, et al. A proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 neutralizing antibody reduces serum cholesterol in mice and nonhuman primates [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(24): 9 820-825.
- [12] Stroses E, Colquhoun D, Sullivan D. Anti-PCSK9 antibody effectively lowers cholesterol in patients with statin intolerance: the GAUSS-2 randomized, placebo-controlled phase 3 clinical trial of evolocum [J]. *Am Coll Cardiol*, 2014, 63(23): 2 541-548.
- [13] Xu RX, Li S, Zhang Y. Relation of plasma PCSK9 levels to lipoprotein subfraction in patients with stable coronary artery disease [J]. *Lipids Health Dis*, 2014, 13(1): 188.

(此文编辑 曾学清)