

文章编号: 1004-0374(2009)03-0370-07

· 评述与综述 ·

LDL 亚组分研究进展

邢瑞青, 许飞, 李晓颖, 傅强*

(四川大学华西基础医学与法医学院生物化学与分子生物学教研室, 成都 610041)

摘要 根据低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)颗粒的不均一性,可以利用密度梯度超速离心法和梯度凝胶电泳法将其分成若干亚组分。近年来,对于LDL亚组分分离方法的研究取得了显著进展。除对上述两种基本实验方法进行改进外,有实验室采用Western印迹法对LDL颗粒进行分离。LDL亚组分分离方法的进步,使对LDL亚组分的认识更加深入:LDL亚组分的高度不均一性、氧化易感性及电负性等不同特性与动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)关系密切。LDL亚组分的研究为认识动脉粥样硬化及其相关疾病提供了重要的理论依据。

关键词: LDL亚组分; 密度梯度超速离心法; 梯度凝胶电泳法; 动脉粥样硬化

中图分类号: R603 **文献标识码**: A

Progress on low density lipoprotein subfractions research

XING Rui-qing, XU Fei, LI Xiao-ying, FU Qiang*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, West China Medical School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: LDL can be divided into several subfractions by density gradient ultracentrifugation and gradient gel electrophoresis according to its heterogeneity. Several novel methods to identification of LDL subfractions have been developed recently. Except for the improvement of the two above-mentioned basic experimental methods, there is another method, i.e., Western blotting. The development of separation methods for LDL subfractions promotes the cognition of their characteristics: the highly heterogeneity, affectability to oxidation and electronegativity of LDL subfractions are closely related to atherogenesis. The theory of LDL subfractions provides important theoretical evidences for understanding of atherosclerosis and diseases related to atherosclerosis.

Key words: LDL subfractions; density gradient ultracentrifugation; gradient gel electrophoresis; atherosclerosis

低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)是体内转运内源性胆固醇的主要脂蛋白,其代谢紊乱在动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的发生和发展中起着重要的作用。大量动物实验及临床流行病学的研究都一致表明,低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)浓度的异常升高是动脉粥样硬化的重要危险因子。然而,近年来临床上常见很多动脉粥样硬化患者的LDL-C水平正常;并且不少患者经降胆固醇治疗后,LDL-C水平明显下降,但仍可发生动脉粥样硬化。为此,国内外学者对LDL颗粒的大小及分布做了深入研究,发现LDL亚组分及其不同特性与

AS的发生密切相关。本文就LDL亚组分的相关研究作一综述。

1 LDL亚组分特性的研究

LDL颗粒呈球形结构,具有某些共同的组成特点,它含有大约50%的胆固醇(包括游离胆固醇和胆固醇酯)、约25%的蛋白质、20%的磷脂和5%

收稿日期: 2008-12-05; 修回日期: 2009-01-12

基金项目: 国家自然科学基金(30770985)

*通讯作者 Tel: 028-85503135(0); E-mail: fucar1@scu.edu.cn

的甘油三酯。球形颗粒的中心是非极性的甘油三酯和胆固醇酯,外周包被游离胆固醇和磷脂。

LDL颗粒具有高度的不均一性。Austin等^[1]按凝胶扫描测定的LDL主峰颗粒直径(peak particle diameter, PPD)将LDL分成两种亚型。其中LDL颗粒较大(PPD \geq 25.5nm),密度接近1.02 g/mL的称之为A型;另一种LDL颗粒较小(PPD < 25.5nm),其密度接近1.06 g/mL的称之为B型。LDL颗粒的不均一性是其复杂的合成途径和血管内重构的结果。但其具体的生化机制尚不十分清楚。有研究表明,LDL的颗粒大小与血浆三酰甘油(TG)水平密切相关。赵凤丽等^[2]通过对比37例健康人研究了81例颈动脉粥样硬化患者的LDL颗粒大小与血脂成分的相关性,结果表明:单因素分析时,LDL-PPD与TG、HDL-C、载脂蛋白B(apoB)具有一定相关性,而经多元回归分析之后发现仅TG含量具有显著意义。而血浆TG水平对小颗粒致密LDL的生成有着重要的调节作用。汪俊军等^[3]的报道表明,血浆脂蛋白之间不断进行脂类交换,在胆固醇酯转运蛋白作用下,富含TG的脂蛋白中的TG同LDL中的胆固醇酯交换;LDL颗粒内TG增加至一定程度被肝脂酶水解,结果是LDL中的总胆固醇/蛋白质的比值降低,颗粒变小,密度增加,从而形成小而致密的LDL(small dense LDL, sdLDL)。B型LDL,即sdLDL颗粒中富含TG,而其中的TG可直接改变apoB的结构和组成,使其免疫反应能力下降,与其受体的结合力减低,不易通过LDL受体途径从循环中清除,在血浆中停留时间长,更有机会被氧化和被巨噬细胞摄取,且其本身易于氧化,上述特性均促使了AS的发生和发展。

LDL的氧化修饰,尤其是sdLDL的氧化易感性与AS的发生密切相关。Kondo等^[4]的研究结果表明,随着LDL颗粒逐渐减小和TG浓度的逐渐升高,sdLDL的氧化修饰水平逐渐增加,其氧化修饰易感性的截点为25.5nm(LDL直径)和1500 mg/L(TG浓度)。Kitano等^[5]利用阴离子高效液相色谱法(AE-HPLC)按照LDL颗粒所带负电荷的多少将LDL分为LDL-1、LDL-2和LDL-3三个亚组分,然后通过脂质过氧化反应标记物分别对各亚组分的氧化性进行评估,这三个亚组分的氧化程度按照LDL-1 < LDL-2 << LDL-3顺序逐渐增强。Ohmura等^[6]的研究表明,LDL亚组分的氧化易感性与其自身的脂质组成有关,与大而密的LDL(large dense LDL, ldLDL)相

比,sdLDL亚组分颗粒中的游离胆固醇、胆固醇酯和磷脂含量显著缺乏,而甘油三酯的含量并无明显差别。他们的研究还发现,LDL亚组分,尤其是sdLDL的氧化易感性与颗粒中脂质含量下降,尤其是与游离胆固醇的含量下降密切相关。

近年来,对影响LDL亚组分的抗氧化性的研究也日益增多。Sakuma等^[7]研究发现,抗坏血酸对孵育48h后的LDL的氧化修饰具有抑制作用,96h后则加速LDL的氧化;而HDL₃和HDL₂则能够很大程度上抑制抗坏血酸对LDL的加速氧化作用,进而推测HDL₃和HDL₂在体内可能通过该种方式起到抗氧化作用。Baldi等^[8]通过研究LDL脂质成分、丙氨酸和HDL对LDL氧化易感性的影响时发现,LDL中的TG含量在抗氧化反应中起着重要作用,推测其原因可能是:与其他已被氧化的脂质(如胆固醇酯和磷脂)相比,TG中含有较多不易被氧化的饱和脂肪酸,并且TG亦是体内运载抗氧化剂维生素E的载体。另外,研究结果还表明,HDL对LDL的抗氧化保护作用在于HDL亦作为氧化修饰的底物对LDL起到了底物稀释作用。尽管这种保护作用十分微弱,而丙氨酸具有直接的抗氧化作用,与以前的研究结果不同的是,它对LDL的抗氧化保护作用并没有特定的规律。因此,对利用丙氨酸评价天然LDL的氧化程度的可能性提出了质疑。

2 LDL亚组分的分离与测定方法的研究

目前常规分离LDL亚组分的方法有密度梯度超速离心法和梯度凝胶电泳法,但前者耗时长,长时间的超速离心会导致LDL中可溶性蛋白质的丢失,影响亚组分的特性;后者易于进行,可将LDL分成两种大小不同的颗粒,但其操作复杂,不能进行亚组分组成及理化特性的研究。近年来,不少学者对这两种方法进行了改进,并在此基础上提出了一些新的见解和主张。

2.1 密度梯度超速离心法 密度梯度超速离心法作为血浆脂蛋白研究的金标准,可为脂蛋白研究提供大量的信息。一般所说的超速离心法是指基于盐溶液的密度梯度超速离心,但该方法所形成的密度梯度不稳定,重复性也较差,另外为了使脂蛋白很好的进入密度层,通常需要延长离心时间或加大盐溶液的浓度,而高浓度的盐溶液会使脂蛋白的结构发生改变并可造成部分载脂蛋白丢失,并且在进一步的脂蛋白组分测定时,需要将分离脂蛋白成分分别取出进行透析。

基于以上盐溶液密度梯度超速离心的诸多弊端, Graham等^[9]首次提出了一种独特的利用碘克沙醇(iodixanol)所形成的密度梯度分离脂蛋白的方法。该方法形成的密度梯度对脂蛋白进行超速离心所需时间短,一般在4h以内即可完成,其形成的梯度较盐溶液密度梯度更稳定,并具有较好的重复性。由于与盐溶液相比,碘克沙醇对脂蛋白中的脂质和载脂蛋白以及用于检测脂质含量所需的酶活性无影响,因此在对脂蛋白进行进一步观察时无需对其进行脱盐处理,各梯度中脂质(胆固醇和TG)的回收率可达100%,但此研究只是用于分离血浆中的脂蛋白,而对各脂蛋白亚类的分离可行性差。Sawle等^[10]在此基础上对其进行了改进:他们将利用碘克沙醇密度梯度超速离心分离得到的各脂蛋白组分分别在450nm和570nm测定胆固醇和TG的吸光度值,进而在电子显微镜下得到各组分的胆固醇和TG的扫描图。该实验经过对272份样品的扫描图进行比较得到,其不同样品的LDL-C峰的差别主要在19-29之间,峰上存在的副峰或者拐点将LDL-C峰分成了3部分,即15-22、23-26和27-33,其所对应的碘克沙醇密度梯度范围分别在1.038-1.060 g/mL、1.019-1.038 g/mL和1.011-1.019 g/mL即代表了LDL的三种亚类。利用该方法可在对血浆HDL、LDL、VLDL胆固醇和TG含量进行测量的同时对LDL亚类分离进行观察,两者可以同时进行。然而,该方法对LDL亚类的分离不具有特异性,并且也未经过盐溶液密度梯度超速离心方法的验证,因此使其推广受到限制。Davies等^[11]则在Graham和Sawle等的实验基础上设计了一种新的快速分离LDL亚类的碘克沙醇密度梯度超速离心法。该法与以上两种实验方法不同,在制备密度梯度的实验操作中,他们将下层梯度液中血浆体积由原来的5mL减少到3mL,其碘克沙醇的最终浓度仍调至120 g/L;上层梯度液中Tris盐缓冲液的体积由原来的5mL增加到7.9mL,其碘克沙醇的最终浓度由原来的60 g/L增加到90 g/L,其超速离心可以在2.5h或3h内完成。同时,在对分离得到的LDL组分进行进一步的扫描观察时,采用了自动化数字成像系统和凝胶扫描软件,在操作上无需再将梯度离心管中的LDL组分取出后再对其进行测定分析,而是直接在离心管中进行,从而简化了实验步骤,很快得出LDL的扫描图。对扫描图的分析发现LDL的密度峰值 $>1.028\text{kg/L}$ 的曲线下面积代表了sdLDL,而

用LDL扫描图面积比值 $>51\%$ 的部分表示,其特异性和敏感性可达100%,因此可以作为sdLDL定性判断的一个较为理想的指标。另外,由于碘克沙醇对LDL无毒性,不破坏其结构和生物活性,该方法亦可作为研究脂蛋白代谢方面的预分离方法。总之,该方法操作简单,其形成的密度梯度稳定,根据所用转子的不同可同时进行多个血清样本的离心,并且无需将分离的各脂蛋白组分取出后做进一步的处理,因此易于在临床进行推广应用。

2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳法 聚丙烯酰胺凝胶电泳是另一种实验室分离LDL亚组分的常用方法。相对于密度梯度超速离心法分离脂蛋白,PAGE法可以避免长时间超速离心对LDL颗粒的破坏,而且对技术设备要求较低,一次可以分析多个标本,具备了在临床和科研中推广和应用的前提,但目前尚没有现成的商品化梯度聚丙烯酰胺凝胶提供,且该方法重复性较差,尚未有成熟的方法学,因此虽在一些临床研究中采用PAGE法分离LDL亚组分,但其进一步的推广受到限制。多年来国内外的不少学者针对聚丙烯酰胺凝胶电泳法的诸多缺陷对该实验方法进行了大量改进。

Rainwater等^[12]和Singh等^[13]先后设计了两种具有高重复性、能特异分离HDL和LDL亚组分的聚丙烯酰胺梯度凝胶的实验方法,并在此基础上采用与上述两种方法同一体系的实验操作程序,设计了能在同一块梯度胶中同时分离HDL和LDL亚型的梯度凝胶制备方法^[14],并通过实验证明了在该复合凝胶上测得的HDL和LDL亚型的颗粒大小和反映吸光度分布的中位直径与在特异分离两者亚型的凝胶上所得到的数据相一致。该实验方法可缩短样品的冷藏周期,可使两种脂蛋白的电泳、染色和光密度测量同时进行,从而简化了操作步骤,更为重要的是增加了同一样品不同实验数据间的可比性。在上述的实验过程中,Rainwater等发现同一块凝胶上各样品孔中样品的迁移率不完全一致。一般来说,外周泳道中的样品要比内部泳道的样品电泳速度快,即所谓的“皱眉现象”。该种现象主要发生在梯度胶的LDL部分,而分布在高浓度梯度的HDL亚型的迁移率并不受影响。针对以上问题,Rainwater等^[15]在以前方法的基础上,在高浓度聚丙烯酰胺溶液中加入一定浓度的蔗糖溶液,从而在凝胶中又形成一定的蔗糖梯度。该实验通过与未加入蔗糖溶液的复合梯度凝胶的大量数据比较发现,同一块凝胶内部

样品迁移率的一致性,其蔗糖梯度(0—10%)阳性的凝胶优于蔗糖梯度阴性的凝胶,尤其对较大的可折射蛋白样品迁移率的一致性具有明显的改善作用

自梯度凝胶电泳技术建立以来,其脂蛋白的电泳分离以前都是在 PharmaciaGE-2/4 电泳装置中进行,但由于这种专用电泳槽和商业凝胶材料的不可靠性,使 Pharmacia 电泳装置的有效性受到质疑。Alabakovska 等^[16]对复合凝胶的灌注方案进行了改进,同时又首次采用 BioRad Mini Protean II 电泳装置代替 PharmaciaGE-2/4 电泳装置对 HDL 和 LDL 亚型进行分离。该实验中 BioRad Mini Protean II 灌注槽中包含 8 个凝胶盒,因此可同时制备多块凝胶。

聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 LDL 所面临的一个重要问题就是重复性较差。Fonda 等^[17]利用常规的灌注仪器和电泳设备发展了一种新的能有效分离 LDL 的不连续线性梯度聚丙烯酰胺凝胶的制备方法。该方法的特色之一在于使预染的样品血清在极低的丙烯酰胺浓度范围内进行 LDL 亚组分的分离,其梯度的上部为 1.8%—10% 的低浓度梯度部分,其底部为 16% 的固定浓度梯度部分。这种低浓度并且不连续的梯度范围可使 LDL 亚组分得到有效分离,分离后测得 LDL 峰的板内变异系数为 0.58%,板间变异系数为 0.51%。而 16% 的固定梯度部分不仅可以加强条带的分离,更为重要的是还可以防止凝胶变形和分离条带的弯折。此外,Fonda^[17]等还通过采用直接透过制胶玻璃板对分离得到的脂蛋白条带进行扫描,对所加样品进行预染处理等改进措施对该方法进行了改进。胡予等^[18]通过与金标准的 DUC 法进行比较,制备了重复性好,分辨率高的聚丙烯酰胺凝胶,从而建立了一种敏感性和特异性较高,重复性良好的 PAGE 法。该研究分别采用经典的 DUC 方法学和本实验建立的 PAGE 方法学分离 28 份血清 LDL 亚组分。结果显示,与经典的 DUC 法相比,该方法的敏感性为 70%,特异性为 100%。板内平均差异为 0.44%,板间平均差异为 2.05%,板间变异系数为 1.20%。

一般来说,采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 LDL 亚组分其操作过程复杂,耗时较长。Shahrul 和 Faridah^[19]通过优化凝胶的灌注和电泳等实验条件建立了一种 LDL 亚型定量测量的简化梯度凝胶电泳法。采用该方法制备的 2%—16% 的非变性梯度聚丙烯酰胺凝胶在 Hoefler 系列的电泳设备中稳流 50mA,电压 90V 的情况下仅需 5h 就可完成整个电

泳过程。通过制定标准曲线和 LDL 峰条扫描图,采用计算 LDL 峰扫描曲线下面积(AUC%)对 LDL 个亚型进行半定量计算。由标准曲线可知直径范围在 18—27.8nm LDL 各亚型的迁移距离在 23.0—24.8mm 之间,其所对应的扫描曲线在 X 轴上 23.0—23.4mm 的曲线下面积代表直径大于 25.5 nm 的 LDL 亚型,而 23.4—24.8mm 的曲线下面积则代表了直径小于 25.5nm 的 LDL 亚型。

Tsukamoto 等^[20]在 Krauss 和 Burke^[21]利用电泳法测定 LDL 亚组分颗粒直径的方法基础上对其进行了改进。他们首先采用聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法对 LDL 亚组分进行分离,从而消除存在于脂蛋白表面带负电荷的游离脂肪酸对 LDL 亚组分迁移率的影响。然后用考马斯亮蓝对凝胶进行染色,同时他们还在样品中加入脱铁铁蛋白作为测量各亚组分迁移距离的内部标准。这时的凝胶脱色后可直接用于观察测量 LDL 亚组分的颗粒直径而不再需要进行脂质染色,并且对颗粒迁移距离的测量结果亦更加准确。因此,与以前的用于测量 LDL 亚组分颗粒直径的实验方法相比,该操作简单、精确,可在临床推广应用。

另外,值得一提的是除上述两种基本的用于分离 LDL 亚型的实验方法外,近年来中有一种新的实验方法出现——沉淀法。雷森林等^[22]将沉淀法与密度梯度超速离心法相结合分离 LDL 亚组分,并经预染脂蛋白凝胶和免疫双扩散实验证实分离得到的 LDL 亚组分均为纯品,不混杂其他脂蛋白,电镜检测其颗粒直径分别为 $26.1 \pm 0.21 \text{ nm}$ 和 $24.5 \pm 0.14 \text{ nm}$,两者大小有区别。

Hirano 等^[23]利用肝素-镁离子选择性的沉淀密度 $< 1.044 \text{ g/mL}$ 脂蛋白的这一特点,分离得到密度 $> 1.044 \text{ g/mL}$ 的 sdLDL 和 HDL 上清液,然后通过自动分析仪选择性地测定上清液中 sdLDL-C 和 sdLDL-apoB 含量,进而对 sdLDL 进行定量评价。Hirano 等的研究表明,利用超速离心法和肝素-镁离子沉淀法测得的 sdLDL-C 含量,两者具有显著相关性($y=1.049X+1, r=0.884, P<0.0001$)。同时利用两种方法测得的 sdLDL-apoB 含量亦具有明显相关性($y=1.072X+1, r=0.896, P<0.0001$)。该方法操作简单,可以对大量样品进行快速测量。Hirano 等^[24]还对该方法的临床意义做了进一步的研究,其结果表明利用该方法测得的 sdLDL-C 和 sdLDL-apoB 含量对动脉粥样硬化的危险性具有很好的评价作用,因此可作为

常规的临床检测方法应用。

与Hirano等的方法类似, Ito等^[25]利用肝素-锰离子沉淀法对sdLDL进行定量测量, 通过对比发现, 该方法测得的sdLDL-C结果与超速离心法测得的结果, 两者相关性显著, 为 $y=1.090x-1.8$ ($r=0.900$), 他们还利用该方法对不同高脂血症患者的样品血清sdLDL-C含量的进行测定, 进而对sdLDL-C的临床意义做了进一步的验证。其结果亦表明, 与LDL-C相比, sdLDL-C对CHD的危险性评估具有更重要的意义。

2.3 免疫印迹法 本实验室分离LDL亚组分所采用的实验方法为免疫印迹法, 即Western印迹。目前由于该方法实验条件尚未成熟, 因此鲜有报道, 现亦无这方面的论文先行发表。我们认为, 该方法的应用将为LDL亚组分的分离开辟一条新的途径。现就本实验室采用免疫印迹法分离LDL亚组分的进展情况作一简单介绍。

本实验室对LDL的电泳分离采用非变性梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳法。其凝胶为本实验室自制, 浓度范围为2%—16%, 其血清样品经溴酚兰预染处理。在本方法中, 所用标准蛋白为铁蛋白、甲状腺球蛋白和乳胶颗粒作为对照, 上样后的凝胶在100V稳压电泳12h; 然后取出凝胶, 在4℃下, 用全湿法进行电泳转移至PVDF膜(稳压30V, 电泳12h)。转移结束后, 取出凝胶和转移膜, 凝胶直接用考马斯亮蓝染色, PVDF膜用5%的脱脂奶粉封闭, 室温下振摇1h或4℃过夜, 然后加入用5%脱脂奶粉配置的一定比例浓度的酶联抗体(本实验室自制)进行免疫反应, 同样室温下振摇1h或4℃过夜。最后将洗涤好的PVDF膜放入另一密封袋中, 并在其中加入显色液, 在凝胶成像仪上用化学发光法观察其显色情况, 从而检测电泳分离的特异LDL亚组分。

由于实验室条件和实验时间的限制, 本实验方法还处在探索阶段, 其各种实验条件的优化还需要进一步摸索; 但总体来看, 该实验方法具备了PAGE电泳分辨率高和固相免疫测定的特异、敏感的优点, 其检测蛋白的灵敏度可达1—5ng。Western印迹还具有蛋白质反应均一, 固相膜保存时间长, 并且可以从混杂抗原中检测出特定抗原, 或从多克隆抗体中检测出单克隆抗体等多种优越性。

3 低密度脂蛋白亚组分与动脉粥样硬化

LDL亚组分的不同特性与AS的关系, 早期即

有大量报道。大量资料显示, LDL亚组分的不同特性, 包括其大小、密度、组成(包括TG、CH、载脂蛋白含量)等, 均与AS相关联, 其中研究最多且最为重要的是小而密、富含TG的LDL亚组分(即B型亚组分)是独立的致AS高危因素。另外, 自Avogaro等首先报道通过离子交换色谱法将LDL分为LDL(+)和LDL(-)两种亚类以来, 有关LDL亚组分电负性的研究逐渐增多, 并通过对比色谱法进行改进将LDL分为5个亚类(L1—L5)。有报道表明, 其中电负性最强的L5可导致内皮细胞和单核细胞释放多种炎症介质和诱导内皮细胞凋亡, 从而参与AS的病变过程^[26, 27]。近年随着这些方面研究的不断深入和发展, 又有了一些新的发现。

3.1 LDL亚组分的不均一性与AS LDL由大小和密度等不均一的颗粒组成。以前的大量研究表明, 与大而轻的A型LDL亚组分相比, 小而密的B型亚组分与AS更具相关性。然而, 这些研究大多只是在LDL的亚组分的分布和颗粒大小层面来分析其与AS的关系, 并未对LDL亚组分的分子浓度与AS的相关性做更加深入的探讨。而且, 也没有对A型和B型分子浓度之间的负相关性以及由于两种亚组分与AS危险因素间的不同相关性而造成的潜在混杂做充分的控制。同时, 以前的研究也很少探讨两种亚型单一分子与AS危险因素间相关性的差异。然而, 这种差异是非常重要的。研究发现, 小而密的B型LDL亚组分颗粒比A型含有更少的胆固醇, 而在相同的LDL胆固醇浓度下, 以小而密亚组分为主的个体却含有更高的总体LDL分子浓度^[28]。

Mora等^[29]在多民族人群的AS调查研究中, 利用核磁共振波谱学对不同种族健康个体的脂蛋白水平进行定量测量, 然后研究其与颈动脉内膜厚度之间的联系。他们在研究中发现, 两种亚组分的分子浓度之间存在负相关($r=-0.63$, $P<0.0001$), 并且当只对危险因素进行控制而不考虑两亚组分间的负相关性时, LDL的大小和sdLDL亚组分颗粒都分别与颈动脉内膜的厚度具有相关性(其内膜厚度每1-S.D分别改变-20.9和31.7 μm , 两者均 $P<0.001$), 但ldLDL亚组分则不具有相关性(4.9 μm , $P=0.27$); 当对两者均进行控制后, ldLDL和sdLDL亚组分则均与动脉内膜的厚度具有相关性(每1-S.D动脉内膜增厚36.6和52.2 μm , 两者 $P<0.001$)。而这时由于LDL亚组分大小改变所引起的内膜厚度的差异则不再具有显著意义($P=0.10$)。由此, Mora等^[29]认为LDL

两种亚组分应均与亚临床的AS显著相关,而sdLDL亚组分是1dLDL与此具有相关性的混杂因素,在对LDL颗粒大小进行研究时应注意两种亚组分间的负相关性。

3.2 LDL亚组分电负性与AS 单核细胞和淋巴细胞在血管内膜的黏附和聚集在AS斑块的形成中起着重要作用,该过程包括内皮细胞对白细胞的初期捕获,白细胞的稳定黏附聚集和在内皮下间隙的游走等复杂过程。Abe等^[30]将从纯合性家族性高胆固醇血症患者体内分离得到的LDL利用大容量离子交换色谱法分为五个亚型(L1—L5),然后通过DNA点阵分析法观察分别与L1(20 μg/mL)和L5(20 μg/mL)混合孵育(22h)的脐静脉内皮细胞的基因表达情况,其结果表明,与电负性最高的L5混合孵育的内皮细胞VCAM-1和CXC化学增活素GRO-α、GRO-β、IL-8、ENA-78、GRO-γ和GCP-2基因表达增高,同时,利用单克隆抗体的封闭研究法还显示,与L5混合孵育的人脐静脉内皮细胞和主动脉内皮细胞对单核巨噬细胞的初期捕获和稳定黏附是通过VCAM-1/a4 integrin介导的,而GRO及其受体CXCR2则参与经L5处理的人主动脉内皮细胞与单核巨噬细胞间的稳定黏附。

Yang等^[31]利用快速蛋白液相色谱法亦将从糖尿病患者体内分离得到的LDL分为五个亚型(L1—L5),但其中最具电负性的D-L5则与Abe等分离得到的FH-L5有所不同,D-L5亚型分子中含有大量的载脂蛋白A1、E和CIII,更高浓度的游离脂肪酸和较低浓度的三硝基苯磺酸活性。他们的研究结果表明,与其他亚型相比,糖尿病患者体内的D-L5亚型具有更加显著的致牛主动脉内皮细胞凋亡的作用,因此认为D-L5在体内的这种毒性作用可能是糖尿病患者发生AS等血管并发症的重要原因,但其具体的致细胞凋亡的分子机制尚需进一步研究证实。

在此基础上,Lu等^[32]的实验证实,FGF2是启动其自身表达的主要因子,并通过FGF2-PI3K-Akt特殊环路进行自我调节。而D-L5则可以抑制FGF2的释放并破坏FGF2的自身调节作用,同时增强细胞凋亡蛋白酶3的活性导致血管内皮细胞的凋亡,抑制内皮细胞的再生和血管的生成,进而导致糖尿病患者血管并发症的发生。

总之,随着对LDL基础研究的深入,其分离和测定方法的完善,对LDL亚组分及其与AS等心血管疾病关系的认识将会不断提高,从而为临床疾病的治疗和预防提供理论和方法学上的支持。

[参 考 文 献]

- [1] Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, et al. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA*, 1988, 260(13): 1917-21
- [2] 赵凤丽, 廖仁昊, 王拥军. 低密度脂蛋白亚类与血脂的相关性观察. *临床检验杂志*, 2005, 23(5): 363-4
- [3] 汪俊军, 张春妮, 庄一义. 低密度脂蛋白亚组分不同特性在动脉粥样硬化中的作用. *中国动脉硬化杂志*, 2004, 2(12): 227-32
- [4] Kondo A, Muranaka Y, Ohta I, et al. Relationship between triglyceride concentrations and LDL size evaluated by malondialdehyde-modified LDL. *Clin Chem*, 2001, 47(5): 893-900
- [5] Kitano S, Yoshida Y, Kawano K, et al. Oxidative status of human low density lipoprotein isolated by anion-exchange high-performance liquid chromatography—assessment by total hydroxyoctadecadienoic acid, 7-hydroxycholesterol, and 8-iso-prostaglandin F(2α). *Anal Chim Acta*, 2007, 585(1): 86-93
- [6] Ohmura H, Mokuno H, Sawano M, et al. Lipid compositional differences of small, dense low-density lipoprotein particle influence its oxidative susceptibility: possible implication of increased risk of coronary artery disease in subjects with phenotype B. *Metabolism Clin Exp*, 2002, 51(9): 1081-7
- [7] Sakuma N, Saeki T, Yajima K, et al. Both HDL3 and HDL2 exert a powerful anti-oxidative and protective effect against acceleration of oxidative modification of LDL by ascorbic acid. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2005, 51(2): 75-9
- [8] Baldi S, Frascerra S, Ferrannini E, et al. LDL resistance to oxidation: effects of lipid phenotype, autologous HDL and alanine. *Clin Chim Acta*, 2007, 379(1-2): 95-100
- [9] Graham JM, Higgins JA, Gillott T, et al. A novel method for the rapid separation of plasma lipoproteins using self-generating gradients of iodixanol. *Atherosclerosis*, 1996, 124(1): 125-35
- [10] Sawle A, Higgins MK, Olivant MP, et al. A rapid single-step centrifugation method for determination of HDL, LDL, and VLDL cholesterol, and TG, and identification of predominant LDL subclass. *J Lipid Res*, 2002, 43(2): 335-43
- [11] Davies IG, Graham JM, Griffin BA. Rapid separation of LDL subclasses by iodixanol gradient ultracentrifugation. *Clin Chem*, 2003, 49(11): 1865-72
- [12] Rainwater DL, Andres DW, Ford AL, et al. Production of polyacrylamide gradient gels for the electrophoretic resolution lipoproteins. *J Lipid Res*, 1992, 33(12): 1876-81
- [13] Singh AT, Rainwater DL, Haffner SM, et al. Effect of diabetes on lipoprotein size. *Arterioscler, Thromb Vasc Biol*, 1995, 15(11): 1805-11
- [14] Rainwater DL, Moore PH Jr, Shelledy WR, et al. Characterization of a composite gradient gel for the electrophoretic separation of lipoproteins. *J Lipid Res*, 1997, 38(6): 1261-6
- [15] Rainwater DL, Moore PH Jr, Gamboa IO. Improved method for making nondenaturing composite gradient gels for the electrophoretic separation of lipoproteins. *J Lipid Res*, 2004, 45(4): 773-5

- [16] Alabakovska SB, Todorova BB, Labudovic DD, et al. Gradient gel electrophoretic separation of LDL and HDL subclasses on BioRad Mini Protean II and size phenotyping in healthy Macedonians. *Clin Chim Acta*, 2002, 317(1-2): 119-23
- [17] Fonda M, Semolic AM, Soranzo MR, et al. Production of polyacrylamide gradient gel for lipoprotein electrophoretic separation. *Clin Chim Acta*, 2003, 338(1-2): 73-8
- [18] 胡予, 高鑫, 将小红. 聚丙烯酰胺梯度凝胶法测定低密度脂蛋白颗粒直径方法的建立. *上海医学*, 2008, 31(1): 34-8
- [19] Shahru BS, Faridah AR. Simplified gradient gel electrophoresis for quantification of low-density lipoprotein subclass. *Clin Chim Acta*, 2003, 336(1-2): 145-7
- [20] Tsukamoto H, Takei I, Ishii K, et al. Simplified method for the diameter sizing of serum low-density lipoprotein using polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Clin Chem Lab Med*, 2004, 42(9): 1009-12
- [21] Krauss RM, Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low-density lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res*, 1982, 23(1): 97-104
- [22] 雷森林, 刘梦琼. 血浆低密度脂蛋白亚组分分离与鉴定. *武汉大学学报*, 2002, 23(2): 169-70
- [23] Hirano T, Ito Y, Saegusa H, et al. A novel and simple method for quantification of small, dense LDL. *J Lipid Res*, 2003, 44(11): 2193-201
- [24] Hirano T, Ito Y, Koba S, et al. Clinical significance of small dense low-density lipoprotein in cholesterol levels determined by the simple precipitation method. *Arterioscler, Thromb & Vasc Biol*, 2004, 24(3): 558-63
- [25] Ito Y, Hirano T, Yamazaki J, et al. New simple method for small, dense LDL: development of a new quantification method and clinical significance. *Rinsho Byori - Jpn J Clin Pathol*, 2004, 52(5): 406-13
- [26] Chen CH, Jing T, Yang JH, et al. Low-density lipoprotein in HC human plasma induces vascular endothelial cell apoptosis by inhibiting fibroblast growth factor 2 transcription. *Circulation*, 2003, 107(16): 2102-8
- [27] Sanchez-Quesada JL, Benitez S, Ordonez-Llanos J. Electronegative low-density lipoprotein. *Curr Opin Lipid*, 2004, 15(3): 329-35
- [28] Cromwell WC, Otvos JD. Low-density lipoprotein particle number and risk for cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep*, 2004, 6(5): 381-7
- [29] Mora S, Szklo M, Otvos JD, et al. LDL particle subclasses, LDL particle size, and carotid atherosclerosis in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis*, 2007, 192(1): 211-7
- [30] Abe Y, Fornage M, Yang CY, et al. L5, the most electronegative subfraction of plasma LDL, induces endothelial vascular cell adhesion molecule 1 and CXC chemokines, which mediate mononuclear leukocyte adhesion. *Atherosclerosis*, 2007, 192(1): 56-66
- [31] Yang CY, Chen HH, Huang MT, et al. Pro-apoptotic low-density lipoprotein subfractions in type II diabetes. *Atherosclerosis*, 2007, 193(2): 283-91
- [32] Lu J, Jiang W, Yang JH, et al. Electronegative LDL impairs vascular endothelial cell integrity in diabetes by disrupting fibroblast growth factor 2 (FGF2) autoregulation. *Diabetes*, 2008, 57(1): 158-66