

• 综述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.16.047

低密度脂蛋白亚组分及分离检测方法的研究进展*

孙浩行^{1,2}, 汪 骅³, 王长城²综述, 李保国^{1△}审校(1. 上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093; 2. 上海迪申生物技术有限公司
研发部, 上海 201201; 3. 上海交通大学医学院附属仁济医院检验科, 上海 200025)

关键词: 低密度脂蛋白; 动脉粥样硬化; 心血管疾病; 危险因素

中图分类号: R446

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)16-2505-04

以低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)升高为特点的血脂异常是引起动脉粥样硬化性心血管疾病(ASCVD)的重要危险因素^[1]。目前, 国际专家组和科学指南均声明 LDL-C 为 ASCVD 的独立危险因素, 并将减少 ASCVD 发病率及病死率的治疗方针专注于降低 LDL-C 上^[2]。然而, 部分研究发现, 对 ASCVD 患者进行降脂治疗后, ASCVD 发病风险却只减少了不到 30%, 部分患者 LDL-C 水平虽已降低至正常范围仍会发生 ASCVD^[1-2]。可见, 单从 LDL-C 定量评估 ASCVD 发病风险和病情严重存在局限性。近来, 低密度脂蛋白(LDL)亚组分颗粒大小的变化引起了人们关注。LDL 为多分子复合物, 在物理特性上具有异质性, 可分为一系列密度、体积和动力学行为各不同的亚组分, 密度为 1.006~1.063 g/mL^[3]。LDL 异质性会导致各亚组分胆固醇水平不同, 如 LDL 亚型颗粒直径减少 3 nm, 胆固醇减少约 40%^[4]。研究表明, LDL 亚组分与 ASCVD 密切相关, 同 LDL-C 相比, LDL 亚组分能更好地评估 ASCVD 的发生和发展^[2,5]。因此, ASCVD 的临床血脂检测研究应注重 LDL 亚组分的检测分析。本文就 LDL 亚组分的分型及其与 ASCVD 的关系和最新分离检测方法等方面予以综述。

1 LDL 亚组分

1.1 LDL 亚组分的分型 LDL 亚组分主要是依据颗粒直径和密度进行分型。AUSTIN 等^[6]用梯度凝胶电泳根据颗粒直径不同将 LDL 分为两类: 直径≥25.5 nm 的大而轻 LDL(lbLDL)和直径<25.5 nm 的小而密 LDL(sdLDL)。GEISS 等^[7]用密度梯度超速离心法(DGUC)根据密度不同将 LDL 分为 7 种亚型: LDL-1 和 LDL-2 为 lbLDL; LDL-3 和 LDL-4 为中间密度 LDL(ILDL); LDL-5、LDL-6 和 LDL-7 为 sdLDL。若进一步用 DGUC 分离 sdLDL, 可得到密度为 1.044~1.060 g/mL 的极小密度低密度脂蛋白(V-sdLDL)。同样, 有研究者采用 3% 预制聚丙烯酰胺管状凝胶电泳(TGE)分离出 7 种 LDL 亚组分^[8]。

另外, 有研究者用离子淌度法(IM)得到 4 种 LDL 亚型: LDL-I、LDL-II、LDL-III 和 LDL-IV^[9]; 在此基础上, KRAUSS 等^[10]用 IM 法进一步得到 7 种 LDL 亚组分: LDL-I 为 lbLDL; LDL-II a 和 LDL-II b 为 ILDL; LDL-III a 和 LDL-III b 为 sdLDL; LDL-IV a 和 LDL-IV b 为 V-sdLDL。LDL 亚组分的分型方法有很多, 虽然由于方法学原理不同而导致各研究结果有所差异, 但总体的分型一致。迄今, 国际上并未有标准的 LDL 亚组分分型标准, 以上几种暂为目前研究领域常见分型。

1.2 LDL 亚组分与 ASCVD 近年来, 有研究表明, LDL 亚组分不仅与 ASCVD 的发生和发展密切相关, 并且比 LDL-C 能更好地评估 ASCVD 及相关疾病^[10]。SHIFFMAN 等^[11]采用 TGE 法研究 416 例患者的 LDL 亚组分与心血管疾病(CVD)的关系, 得出 LDL-1 和 HDL 均与 CVD 呈负相关, 而 LDL-3 和 LDL-6 则与 CVD 呈正相关, 并指出 LDL 亚组分颗粒间的变化是解释 LDL-C 不能准确评估 CVD 的可能因素。此后, SRISAWASDI 等^[12]又研究了 260 例患者的 LDL 亚组分与代谢综合征(MetS)的关系发现, LDL-C 与 MetS 无显著相关性, 而回归分析得到比值(LDL-3~LDL-6)/LDL-1 与 MetS 有显著相关性($P<0.001$), 表明(LDL-3~LDL-6)/LDL-1 可作为评估 MetS 患者血脂代谢状态的优秀指标。

sdLDL 作为 LDL 亚组分中密度大和体积较小的颗粒, 由于其易于穿过动脉血管内壁, 与 LDL 受体结合能力低, 不易清除; 在血浆中具有较长的半衰期、糖化易感性高、抗氧化性较低等特点, 具有更强的致 ASCVD 潜在能力。诸多研究表明, sdLDL 比 LDL-C 具有更重要的检测意义。MELANDER 等^[5]用 IM 法分析了 1 919 例使用他汀类药物未受益型 CVD 患者的 LDL 亚组分发现, 随着患者 sdLDL 增加, CVD 发病率提高了 2.3 倍。与此类似的是, SHIFFMAN 等^[11]从马尔默预防计划参与者中随机抽取 1 784 例 CVD 患者作为研究对象, 在控制年龄、性别、高血压、

* 基金项目: 上海市科学技术委员会项目(15441906700)。

△ 通信作者, E-mail: lbaoguo@126.com。

抽烟和糖尿病等传统因素的影响后,发现 LDL 各亚组分都与 CVD 相关($P < 0.001$);进一步控制 LDL-C、HDL-C 和 TG 因素后, sdLDL 仍与 CVD 相关($P = 0.03$)。另外, MOGAREKAR 等^[13]在探究绝经后女性更易出现 ASCVD 原因时发现,绝经后女性体内 sdLDL 水平明显增高, sdLDL 与年龄、三酰甘油、总胆固醇和 LDL-C 等呈正相关,与 HDL-C 呈负相关,指出定量检测 sdLDL 比单纯检测 LDL-C 更具临床价值。

2 LDL 亚组分分离检测方法

2.1 DGUC DGUC 是根据 LDL 颗粒浮力密度的不同,经不同密度梯度盐溶液超速离心后 LDL 各亚组分依次转移至各密度区域。研究者可根据实际需求调整密度梯度,得到分型不同的亚组分。连续的 DGUC 可同时将脂蛋白各组分及亚组分分离,是分离 LDL 亚型的“黄金标准”方法,但所需血清样品较多,分离时间长,耗资高。并且由于脂蛋白 a[Lp(a)]密度和 sdLDL 密度存在交叉区,分离 LDL 亚组分易受 Lp(a)的影响。DONG 等^[14]选择 1.044 g/mL 作为 lbLDL 与 sdLDL 的分界点密度,在密度大于 1.044 g/mL 的分离溶液中加入巯基乙醇成功消除了 Lp(a)的影响,得到两种 LDL 亚型: lbLDL(1.006~1.044 g/mL)和 sdLDL(1.044~1.063 g/mL)。另外,由垂直转头发展的 VAP-II 密度梯度超速离心法能同时分离和定量检测 LDL 亚组分。VAP-II 法是利用垂直转头密度梯度超速离心 LDL 后,经 VAP-II 在线胆固醇检测仪检测后绘制出 LDL 亚组分的分布曲线,然后根据各曲线积分面积比例计算亚组分水平。同传统超速离心相比, VAP-II 法将离心时间缩短至 1 h,并拥有高分辨率的特点。WILLIAMS 等^[15]采用 VAP-II 法得到 4 种 LDL 亚组分,发现 LDL 亚组分中 sdLDL 与 CVD 相关性最强,并且独立于传统血脂指标。

2.2 梯度凝胶电泳法(GGE) GGE 是采用从大到小梯度孔隙的凝胶对 LDL 亚组分进行分离,并根据所占总染色面积的比例计算出各组分水平。AUSTIN 等^[6]用 2%~16%的非变性聚丙烯酰胺梯度凝胶将 LDL 分为 A 型和 B 型,而 WILLIAMS 等^[15]用 2%~14%的非变性聚丙烯酰胺梯度凝胶得到 7 种 LDL 亚组分。此外, Berkeley Heartlab™分段梯度凝胶电泳系统(LDL-S₃GGE™)也可将 LDL 分离为 7 种亚组分。LDL-S₃GGE™是分离 LDL 亚组分已标准化的梯度凝胶电泳体系,适用于临床诊断,但仅局限在 Berkeley Heartlab 实验室。GGE 为一般实验室研究 LDL 亚组分常用方法,但分离时间在 12 h 之上。

2.3 TGE Quantimetrix 公司研发的 Lipoprint™脂蛋白分析系统采用 3%高分辨率线性 TGE 可将 LDL 分为 7 种亚组分。其原理是:血清与上样胶溶液

(含亲脂染料苏丹黑 B,可与脂蛋白中的胆固醇酯结合)混合加于浓缩胶上,经 30 min 光聚合后,每管 3 mA,电泳 60 min,避光静止 30 min 后在 610 nm 下进行光密度扫描。基于分子筛效应各亚型 LDL 分布在 VLDL 与 HDL 间,然后根据阻滞系数 Rf 值($Rf_{VLDL} = 0$, $Rf_{HDL} = 1$)对 LDL 分型: $Rf > 0.40$, sdLDL; Rf 为 0.38~0.40, IDLDL; $Rf < 0.38$, lbLDL。其中 Rf 值等于 LDL 亚组分与 VLDL 间距离/VLDL 与 HDL 间距离的比值。Lipoprint™系统通过了美国 FDA 认证,可用于 LDL 临床诊断,具有良好的应用前景。BANULS 等^[16]将 Lipoprint™系统的 TGE 法同 GGE 法对比分析 LDL 亚组分发现,两种方法在检测 lbLDL(145 例)和 sdLDL(32 例)时一致性分别达到 97.2%和 81.3%。还有学者在 Lipoprint™系统的基础上做了优化, PATHAK 等^[17]根据质量设计方法发明一种分析 LDL 亚组分的高通量非变性 TGE,采用 3.15%分离胶可同时对 40 个样品进行分析检测, t 检测结果同 Lipoprint™系统差异无统计学意义($P = 0.05$),同时将每个样品检测的成本降低到 2 美元。

2.4 毛细管电泳法(CE) 毛细管等速电泳(CITP)可以将分离后的 LDL 组分压缩成窄小区带,具有高分辨率的特点。MORENO-GORDALIZA 等^[18]发明一种分离 LDL 亚组分的新型 CITP 法,在 pH 为 8.8~9.4 的梯度下 9.5 min 内完成分析,得到 6 个 LDL 亚组分峰。此外,由传统 CE 发展来的微芯片电泳技术实现了在刻蚀有微泳道的小型基片上分离检测 LDL 亚组分。WANG 等^[3]在此系统上向样品液中添加直径 5 nm、80 nmol/L 的纳米金提高了 LDL 亚组分间的分辨率。

2.5 核磁共振法(NMR) NMR 是根据 LDL 颗粒内核和外壳中脂类甲基团的质子磁共振信号检测颗粒大小,利用甲基团信号不同区分各亚组分,以 NMR 甲基团振幅测定亚组分浓度。MATYUS 等^[19]采用了 NMR 法对 LDL 进行检测分析,得到 3 种亚组分,批内、批间的精确度和重复试验变异系数 CV 为 2.6%~5.8%,结果符合临床实验室的常规检测,可用于个人临床诊断。NMR 虽能快速全自动检测 LDL 亚组分,但由于仪器特殊,难以在一般实验室展开。

2.6 IM IM 原理是使用电喷射产生气溶胶单电荷大粒子,然后经过不同的流动分析单元在大气压下根据离子淌度不同产生分离,随后冷凝聚集各粒子,最后进行激光散射扫描检测,将 LDL 颗粒直径和数量转化为各自的峰值和浓度。KRAUSS 等^[10]用 IM 分析了经两种血浆胆固醇酯转移蛋白抑制剂——默沙东和阿托伐他汀治疗后患者体内的 LDL 亚组分,结果显示虽然二者明显减少了患者 LDL 组分数量,但阿托伐他汀不会降低 LDL-IVb 水平,且默沙东会使患者 LDL-IV 水平增加,推测 V-sdLDL 可能是患者经降

脂治疗后仍出现 ASCVD 的关键因素。IM 可直接对 LDL 亚组分颗粒大小和水平进行定量检测,是近年用于分离检测 LDL 亚组分的新方法,并且 IM 与 DGUC、NMR 和 GGE 等方法都具有良好的一致性^[17]。

2.7 其他检测方法 除了以上方法,较常见的 LDL 亚组分检测方法还有均相检测法、动态光散射法和高效液相色谱法等。动态光散射法用两种乳胶粒子溶液作为标准,以散射光的波动强度来检测 LDL 亚组分,需要较高的专业技术,设备也昂贵。高效液相色谱法检测 LDL 亚组分,需要对样品进行超速离心预处理,检测费时。DONG 等^[14]将 HPLC 和 DGUC 结合建立了一种新型同时检测 HDL 和 LDL 亚组分的方法,准确度和灵敏度达到了临床诊断的水平。近來有报道,用阴离子交换色谱法可将 LDL 分为 5 种亚组分:L1~L5,电负性依次升高,并推测与已氧化 LDL 颗粒类似的 L5 为主要的 LDL,是致 ASCVD 的主要 LDL 亚组分^[20]。

3 小 结

国内外对于 ASCVD 的防治指南都将降低 LDL-C 放在首位。然而在临床治疗中,LDL-C 虽已降低,但 ASCVD 仍有发生。单纯检测 LDL-C 水平并不能全面评估 ASCVD 发病风险,应转移至 LDL 的微观结构上。大量研究都已证实,LDL 亚型组分和 ASCVD 有直接的相关性,特别是 sdLDL 对 ASCVD 的危险评估优于其他常规血脂指标,这使 LDL 亚组分的分离检测尤为重要。虽然已报道的 LDL 分析方法有很多,但能用于临床自动化分析的很少。加快研究 LDL 亚组分分离检测新方法,使其尽快走向临床自动化分析尤为重要。而且,目前国际上并未有划分 LDL 亚组分的统一标准,各分离检测方法间也没用统一的评价规则,导致采用各方法学研究 LDL 亚组分的结论有所差异。这在一定程度上阻碍了 LDL 检测分析和 LDL 亚组分与 ASCVD 关系的研究。因此,未来需提高 LDL 亚组分的分离检测方法,并制订评价各方法的统一标准,尽快走向临床自动化分析。另外,探究 LDL 亚组分与 ASCVD 发生和发展的机制也将会推动 LDL 亚组分的分离检测和 ASCVD 的防控与治疗。

参考文献

- [1] HIRAYAMA S, MIIDA T. Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease[J]. Clin Chim Acta, 2012, 414(1): 215-224.
- [2] SRISAWASDI P, VANAVANAN S, ROCHANAWUTANON M A, et al. Small-dense LDL/large-buoyant LDL ratio associates with the metabolic syndrome[J]. Clin Biochem, 2015, 48(7/8): 495-502.
- [3] WANG H, ZHANG W, WAN J, et al. Microchip-based human serum atherogenic lipoprotein profile analysis[J].

- Anal Biochem, 2014, 467: 75-83.
- [4] CROMWELL W C, OTVOS J D. Low-density lipoprotein particle number and risk for cardiovascular disease[J]. Curr Atheroscler Rep, 2004, 6(5): 381-387.
- [5] MELANDER O, SHIFFMAN D, CAULFIELD M P, et al. Low-density lipoprotein particle number is associated with cardiovascular events among those not classified into statin benefit groups[J]. JACC, 2015, 65(23): 2571-2573.
- [6] AUSTIN M A, BRESLOW J L, HENNEKEN C H, et al. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction[J]. JAMA, 1988, 160(13): 1917-1921.
- [7] GEISS H C, OTTO C, SCHWANDT P, et al. Effect of atorvastatin on low-density lipoprotein subtypes in patients with different forms of hyperlipoproteinemia and control subjects[J]. Metabolism, 2001, 50(8): 983-988.
- [8] HOEFNER D M, HODEL S D, O'BRIEN J F, et al. Development of a rapid, quantitative method for LDL subfractionation with use of the Quantimetrix Lipoprint LDL System[J]. Clin Chem, 2001, 47(2): 266-274.
- [9] CAULFIELD M P, LI S, LEE G K, et al. Direct determination of lipoprotein particle sizes and concentrations by ion mobility analysis[J]. Clin Chem, 2008, 54(8): 1307-1316.
- [10] KRAUSS R M, PINTO C A, LIU Y, et al. Changes in LDL particle concentrations after treatment with the cholesteryl ester transfer protein inhibitor anacetrapib alone or in combination with atorvastatin[J]. J Clin Lipidol, 2015, 9(1): 93-102.
- [11] SHIFFMAN D, LOUIE J Z, CAULFIELD M P, et al. LDL subfractions are associated with incident cardiovascular disease in the Malmo Prevention Project Study[J]. Atherosclerosis, 2017, 263: 287-292.
- [12] SRISAWASDI P, VANAVANAN S, ROCHANAWUTANON M A, et al. Heterogeneous properties of intermediate- and low-density lipoprotein subpopulations[J]. Clin Biochem, 2013, 46(15): 1509-1515.
- [13] MOGAREKAR M R, KULKARNI S K. Small dense low density lipoprotein cholesterol, paraoxonase 1 and lipid profile in postmenopausal women: quality or quantity? [J]. Arch Med Res, 2015, 46(7): 534-538.
- [14] DONG J, GUO H, YANG R, et al. A novel and precise method for simultaneous measurement of serum HDL and LDL subfractions and lipoprotein(a) cholesterol by ultracentrifugation and high-performance liquid chromatography[J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(13/14): 1071-1076.
- [15] WILLIAMS P T, ZHAO X Q, MARCOVINA S M, et al. Comparison of four methods of analysis of lipoprotein particle subfractions for their association with angiographic progression of coronary artery disease[J]. Atherosclerosis, 2014, 233(2): 713-720.
- [16] BANULS C, BELLOD L, JOVER A, et al. Comparability of two different polyacrylamide gel electrophoresis meth-

- ods for the classification of LDL pattern type[J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(1/2): 251-257.
- [17] PATHAK M, CHAUDHARY N, RATHORE A S. Development of a low-cost, high-throughput native polyacrylamide gel electrophoresis (N-PAGE) protocol for lipoprotein sub-fractionation using Quality by Design approach[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 92: 119-126.
- [18] MORENO-GORDALIZA E, VAN DER LEE S J, DEMIRKAN A, et al. A novel method for serum lipoprotein profiling using high performance capillary isotachopheresis[J]. Anal Chim Acta, 2016, 944: 57-69.
- [19] MATYUS S P, BRAUN P J, WOLAK-DINSMORE J A, et al. NMR measurement of LDL particle number using the Vantera (R) Clinical Analyzer[J]. Clin Biochem, 2014, 47(16/17): 203-210.
- [20] AKYOL S, LU J, AKYOL O, et al. The role of electro-negative low-density lipoprotein in cardiovascular diseases and its therapeutic implications[J]. Trends Cardiovasc Med, 2017, 27(4): 239-246.

(收稿日期: 2018-01-20 修回日期: 2018-03-28)

• 综 述 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2018.16.048

胰蛋白酶抑制剂在肿瘤治疗中的研究进展*

郑文骏¹, 毛智翔¹, 黄琳娟¹综述, 姚 军², 钱翠娟^{3△}审校

(台州学院医学院: 1. 临床医学系; 2. 医学检验教研室; 3. 临床医学教研室, 浙江台州 318000)

关键词: 胰蛋白酶抑制剂; 肿瘤治疗; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图法分类号: R730.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)16-2508-04

胰蛋白酶是胰腺分泌后活化的一种酶, 可以选择性地水解蛋白质中由赖氨酸或精氨酸的羧基所构成的肽链, 进而分解为氨基酸。科学家们在豆类、谷类、油料作物等植物中发现了多种胰蛋白酶抑制剂。其中, 植物来源的胰蛋白酶抑制剂具有相对分子质量较小、免疫反应较弱、原料来源广及价格低廉等优点, 受到研究者的关注。目前, 临床上胰蛋白酶抑制剂已用于治疗急性胰腺炎、防治脑缺血和脑水肿、抑制宫缩及预防早产等, 并且取得了很好的效果^[1]。已有的体外研究结果表明, 存在于豆类植物中的 Bowman-Birk 型(BBI)和 Kunitz 型(KTI)胰蛋白酶抑制剂能够通过抑制癌细胞增殖、黏附、迁移与侵袭, 或促进癌细胞凋亡等方式抑制肿瘤细胞的生长, 最终抑制肿瘤的发生和发展。此外, 胰蛋白酶抑制剂可以与多西他塞、多西紫杉醇、环磷酰胺等多种抗癌药物联合使用, 通过增强化疗药物的疗效或者减少化疗药物的耐药, 取得更优的抗肿瘤效果^[2]。但是, 胰蛋白酶抑制剂仍尚未应用于临床肿瘤的治疗。因此, 在肿瘤的分子靶向治疗的研究中, 胰蛋白酶抑制剂一直是目前研究的热点。

1 胰蛋白酶抑制剂的基本特征

胰蛋白酶抑制剂是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 在人体、动物和植物中都有分布, 主要功能是抑制胰蛋白酶的分泌^[1-2]。多数已开发的胰蛋白酶抑制剂来源于人和动物, 如从人尿中提取的人尿胰蛋白酶抑制

剂、从牛肺或牛胰中提取的抑肽酶等。但是, 这类胰蛋白酶抑制剂易受到病原微生物(如病毒等)的污染, 且相对分子质量较大, 可引起过敏反应等。另一些植物来源的胰蛋白酶抑制剂在自然界的含量丰富, 活性明确, 且相对分子质量较小, 所以受到越来越多科研工作者的青睐, 如从黄豆中提取的大豆胰蛋白酶抑制剂、从南瓜籽中提取的南瓜胰蛋白酶抑制剂等^[1-2]。根据结构和性质的不同, 通常将来源于豆类中的胰蛋白酶抑制剂分为两大类, 即 KTI 和 BBI^[3]。

1.1 KTI KTI 是在 1945 年首次从大豆中分离结晶出来而命名的^[3], 它是一种单体蛋白质, 相对分子质量在 20 kDa 左右, 由 181 个氨基酸和 2 对二硫键组成, 同时具有由几个半胱氨酸残基形成的 1 对或 2 对分子内二硫键所保持的高度保守的 N-末端区域和结构, 呈易变的非螺旋形, 对热不稳定^[4]。分子内只有 1 个活性中心, 其活性中心位于第 63 号的精氨酸和第 64 号的异亮氨酸上, 主要对胰蛋白酶直接地、专一地起作用^[5]。KTI 属单头抑制剂, 即一个抑制剂分子只结合一分子胰蛋白酶。

1.2 BBI BBI 是由 Bowman 在 1944 年作为丙酮不溶因子从大豆中分离出来的, Birk 又于 1961 年成功纯化并定义 BBI; BBI 也是一种单体蛋白质, 相对分子质量在 8 kDa 左右, 是由 71 个氨基酸组成的单肽链, 含有 7 个二硫键和大量的半胱氨酸, 具有热稳定性^[6]。2 个 BBI 结构域由保守的二硫键保持, 每个结

* 基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(No. LY16H160033); 浙江省公益技术应用研究项目(No. 2016C33189); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201710350008)。

△ 通信作者, E-mail: qiancuijuan2007@163.com。