

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2000)-02-0124-03

冠心病患者低密度脂蛋白亚组分颗粒大小的分析

汪俊军, 陈大宁, 张凌¹, 庄一义

(南京军区南京总医院全军医学检验中心, 江苏省南京市 210002; 1. 兰州医学院附属第二医院)

[主题词] 载脂蛋白; 脂蛋白, 低密度; 亚组分; 冠状动脉疾病; 动脉粥样硬化

[摘要] 为研究冠心病患者低密度脂蛋白亚组分颗粒直径的异常特征, 超速离心分离 37 例冠心病患者及 26 例对照组的血浆低密度脂蛋白, 采用 2%~16% 聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳法分析低密度脂蛋白颗粒直径及电泳图形。发现冠心病患者低密度脂蛋白颗粒直径(25.71 ± 0.66 nm)较对照组(26.41 ± 0.95 nm)显著变小($P < 0.01$), 两组间 A 型、B 型低密度脂蛋白分布不同($P < 0.05$)。低密度脂蛋白颗粒直径分别同血浆甘油三酯($r = -0.29$, $P < 0.05$)和载脂蛋白 B($r = -0.25$, $P < 0.05$)呈负相关, 同高密度脂蛋白胆固醇水平($r = 0.28$, $P < 0.05$)呈正相关。B 型低密度脂蛋白中游离胆固醇/蛋白质比值(1.02 ± 0.45)较 A 型(1.59 ± 1.21)显著下降($P < 0.05$); 低密度脂蛋白颗粒直径同游离胆固醇/蛋白质比值呈正相关($r = 0.31$, $P < 0.05$)。提示冠心病患者血浆低密度脂蛋白以小颗粒的 B 型为主; 且血浆甘油三酯对低密度脂蛋白颗粒直径具调节作用。

[中图分类号] R541.1

[文献标识码] A

Analyzing of Low Density Lipoprotein Subfraction Particle Size in Patients with Coronary Artery Disease

WANG Jun- Jun, CHEN Da- Ning, ZHANG Ling, and ZHUANG Yi- Yi

(Department of Medical Examination, Jingling Hospital, Nanjing 210002, China)

MeSH Apolipoprotein; Lipoprotein, LDL; Subfraction; Coronary Disease; Atherosclerosis

ABSTRACT **Aim** To study size of low density lipoprotein (LDL) particle in patients with coronary artery disease (CHD).**Methods** Plasma LDL in 37 CHD patients and 26 control subjects were analyzed by 2%~16% non-denaturing polyacrylamide gradient gels.**Results** The CHD patients had significantly less particle diameters than control subjects(25.71 ± 0.66 nm vs. 26.41 ± 0.95 nm, respectively; $P < 0.01$). The distribution of LDL subfraction pattern was significantly difference between two groups ($P < 0.05$). LDL particle diameter was found negatively correlated with plasma triglycerides ($r = -0.29$, $P < 0.05$) and apoB ($r = -0.25$, $P < 0.05$) level, while positively correlated with plasma HDLC level($r = 0.28$, $P < 0.05$). Free cholesterol to protein ratio of LDL in pattern B was found less than that in pattern A (1.02 ± 0.45 vs. 1.59 ± 1.21 , $P < 0.05$), meanwhile a significantly positive correlation was also found between LDL particle diameter and this ratio ($r = 0.31$, $P < 0.05$).**Conclusion** Small, density pattern B LDL subfraction may be a risk factor for atherosclerosis. Plasma triglyceride may be a factor in regulation of LDL subfraction particle diameter.

血浆低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)由分子结构、理化特性、动力学行为及来源不同的颗粒组成, 分成大而轻、小而密的两个亚组分, B 型 LDL(以小而密的 LDL 为主) 因易于氧化被国外众多学者确认为动脉粥样硬化发生的强危险因素^[1~3]。国内亦有类似报道^[4,5], 而有关 LDL 颗粒直径的研究尚未见报道, 本文对冠心病(coronary heart disease, CHD)患者 LDL 颗粒直径及电泳图形进行分

析, 并探讨 B 型 LDL 的形成机制。

1 对象与方法

1.1 研究对象

冠心病组为 37 例男性心肌梗死存活者, 年龄 50~65 岁(58 ± 5 岁); 对照组为无糖尿病、心脑血管疾病的男性体健者 26 例, 年龄 57 ± 7 岁。收集 EDTA-Na₂(1 g/L) 抗凝空腹血浆, -70℃冰冻保存。

1.2 低密度脂蛋白的分离^[6]

采用密度梯度超速离心法。1.5 mL 血清用溴化钾调密度为 1.10 kg/L, 加入离心管底部, 依次加入密度为 1.065、1.035、1.020 和 1.006 kg/L 的溴化

[基金项目] 江苏省应用基础研究课题(BJ97111)

[作者简介] 汪俊军, 男, 1966 年生, 1988 年毕业于上海医科大学。主要从事脂蛋白与动脉粥样硬化发病的关系研究, 在国内外发表有关研究论文 50 多篇。

钾溶液 2.5、2.5、2.0 和 2.0 mL。Beckman L- 80M 型超速离心 48 000 r/min, 10 h。由上起吸取 2.0~8.3 mL 的密度液为 LDL, 密度范围 1.025~ 1.060 kg/L, 透析浓缩, 4℃保存(含 1 kg/L EDTA- Na₂)。

1.3 聚丙烯酰胺电泳^[7]

2%~ 16% 聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳分离 LDL 亚组分。电泳缓冲液为 pH 8.3 Tris- 甘氨酸。150 V 预电泳 2 h 后, 加入 LDL 或系列标准 15 μL(含蛋白 0.5 g/L 和蔗糖 200 g/L), 依次于 80 V 电泳 2 h、150 V 电泳 12 h 及 220 V 电泳 12 h, 电泳温度 4℃。电泳后用考马斯亮兰染色, 密度扫描仪扫描(633 nm), 测量主峰的泳动距离。参考标准分别为乳胶颗粒(直径 38.0 nm)、甲状腺球蛋白(17.0 nm)、铁蛋白(12.20 nm)和过氧化氢酶(10.4 nm)。以参考样品的泳动距离为横坐标, 颗粒直径的对数值为纵坐标绘制标准曲线, 计算 LDL 颗粒直径。

1.4 低密度脂蛋白亚组分图形确定

低密度脂蛋白亚组分图形分为 A 型和 B 型。A 型指以颗粒直径大于或等于 25.5 nm 的 LDL 为主峰, 较小颗粒 LDL 为次峰; B 型指以颗粒直径小于 25.5 nm 的 LDL 为主峰, 较大颗粒 LDL 为次峰。图 1 (Figure 1) 为典型 A 型和 B 型 LDL 聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳扫描图谱。以该图形为标准将冠心病组和对照组的血浆 LDL 颗粒分为 A 型和 B 型。

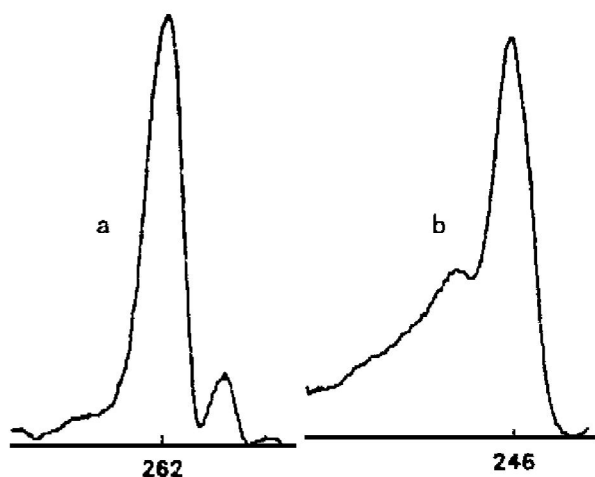


图 1. 低密度脂蛋白聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳扫描图谱。

Figure 1. Densitometric scans based on gradient PAGE of LDL.

1.5 血脂和载脂蛋白测定

酶法测定血浆总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和甘油三酯 (triglyceride, TG)。高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 用自动化分析一步直接测定法。低密度脂蛋白胆固醇 (low

density lipoprotein cholesterol, LDLC) 用 Friedewald 公式计算。载脂蛋白 AI、B 用免疫比浊法测定。以牛血清白蛋白为标准用 Lowry 法测定蛋白质含量。LDL 中游离胆固醇 (free cholesterol, FC)、胆固醇酯 (cholesterol esters, CE) 和 TG 用酶法测定。

1.6 统计学方法

数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据处理采用 *t* 检验、卡方检验及相关分析。

2 结果

2.1 冠心病患者血脂及载脂蛋白水平

从表 1 (Table 1) 可见, CHD 患者 TC、LDLC 及载脂蛋白 B 较对照组明显升高, HDLC 和载脂蛋白 AI 显著下降, 而 TG 水平尽管有所升高, 但无统计学差异, 可能为例数较少, 个体差异较大之故。

表 1. 冠心病患者及对照组血脂水平。

Table 1. Serum lipids and apolipoprotein level in patients with coronary heart disease ($\bar{x} \pm s$).

Index	Control (n= 26)	CHD (n= 37)
TC (mmol/L)	4.57 ± 0.75	5.28 ± 0.94 ^a
TG (mmol/L)	1.58 ± 0.69	1.86 ± 1.00
HDLC (mmol/L)	1.37 ± 0.24	1.24 ± 0.24 ^a
LDLC (mmol/L)	2.49 ± 0.67	3.19 ± 0.99 ^b
Apolipoprotein AI (g/L)	1.36 ± 0.16	1.27 ± 0.16 ^a
Apolipoprotein B (g/L)	0.88 ± 0.24	1.11 ± 0.24 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with control group.

2.2 低密度脂蛋白颗粒直径及分布

冠心病组及对照组血浆 LDL 颗粒直径分别为 25.71 ± 0.66 nm 和 26.41 ± 0.95 nm, 两组间比较差别显著 ($P < 0.01$)。CHD 患者 A 型 LDL 19 例, 占 51.4%; B 型 18 例, 占 48.6%。对照组 A 型 20 例, 占 76.9%; B 型 6 例, 占 23.1%。CHD 患者血浆 B 型 LDL 明显多于对照组 ($P < 0.05$)。

2.3 低密度脂蛋白颗粒直径与血浆脂质及载脂蛋白之间的关系

将两组作相关分析显示, LDL 颗粒直径分别与 TG ($r = -0.29$, $P < 0.05$) 和载脂蛋白 B ($r = -0.25$, $P < 0.05$) 呈负相关, 与 HDLC ($r = 0.28$, $P < 0.05$) 呈正相关, 而与 LDLC 和载脂蛋白 AI 无关。

2.4 低密度脂蛋白脂质组成

将两组合并分析 A、B 型 LDL 脂质组成, B 型 LDL 中 FC/Pro 比值显著下降, CE 和 TG 不变 (表 2, Table 2)。相关分析显示 LDL 颗粒直径分别同 LDL

中 FC/Pro ($r = 0.31$, $P < 0.05$) 和 FC+ CE/Pro ($r = 0.32$, $P < 0.05$) 比值呈正相关。

表 2. A 型和 B 型低密度脂蛋白脂质组成。

Table 2. Lipids composition of pattern A and B type of LDL ($\bar{x} \pm s$).

Index	Pattern A (n= 39)	Pattern B (n= 24)
LDL Diameter (nm)	26.46 \pm 0.71	25.20 \pm 0.23 ^b
LDL Composition		
FC/Pro	1.59 \pm 1.21	1.02 \pm 0.45 ^a
CE/Pro	0.30 \pm 0.23	0.27 \pm 0.13
FC+ CE/Pro	1.91 \pm 1.29	1.29 \pm 0.44 ^a
TG/Pro	0.33 \pm 0.20	0.27 \pm 0.10

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with pattern A group.

3 讨论

众多学者研究表明 B 型 LDL 是 CHD 的强危险因素, Austin 等^[2]报道含有 B 型 LDL 个体较具 A 型 LDL 个体增加 3 倍发生心肌梗死的危险性。Griffin 等^[8]比较经冠状动脉造影确诊的冠心病患者与造影阴性者、心肌梗死存活者与对照者的小而密 LDL 的水平,发现小而密的 LDL 超过 2.6 mmol/L 者冠心病及心梗危险性分别为对照者的 4.5 及 6.9 倍。且校正 TG、HDL 后,小而密 LDL 仍为独立的危险因素。Lamarche 等^[9]研究亦表明 LDL 颗粒 < 25.6 nm 者发生缺血性心脏病的危险性较直径 > 26.05 nm 者增加 3.6 倍。我们曾采用密度梯度离心法分析不同密度的 LDL 蛋白水平,亦显示冠心病患者 LDL 分布向致密 LDL 亚组分倾移,且致密的 LDL 颗粒易于氧化^[4],但有关 LDL 颗粒直径未见报道。本文结果也显示冠心病患者 LDL 直径显著小于对照组,血浆 LDL 电泳图形以小颗粒的 B 型为主。

血浆 TG 水平对小而密的 LDL 生成有着重要的调节作用。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,富含甘油三酯脂蛋白中的甘油三酯同 LDL 中的胆固醇酯交换; LDL 颗粒内甘油三酯增加至一定程度被肝脂酶水解,结果是 LDL 中 TC/Pro 比值降低,颗粒变小,密度增加。血浆 TG 水平越高,交换越多,生成的小而密 LDL 也越多^[10]。本文资料亦示 LDL 颗粒直径同血浆 TG 水平呈负相关,同 LDL 中 FC/Pro、FC+ CE/Pro 比值呈正相关;且 B 型 LDL 中 FC/Pro 比值较 A 型显著下降,表明 TG 对 LDL 颗粒大小、组成具调节作用。由于 B 型 LDL 中以上比值降低,具 B 型 LDL 的 CHD 患者 LDLC 升高常不明显,有学者认为小而密的 LDL 作

为预测冠心病的指标比 LDLC 更佳^[11], LDL 颗粒直径与血浆 HDLC 和载脂蛋白 B 水平亦具相关性^[9]。

正因为小而密 LDL 与高甘油三酯血症在代谢上密切联系,且高甘油三酯血症常伴有低 HDLC,所以将高甘油三酯、低 HDL 及小而密的 LDL 升高合称致粥样硬化性脂蛋白表型(atherogenic lipoprotein phenotype)或脂质三联症(lipid triad)。小而密的 LDL 因其易于氧化而具强的致动脉硬化作用,为预测冠心病的良好指标。

参考文献

- [1] Miller BD, Alderman EL, Haskell WL, et al. Predominance of dense low density lipoprotein particles predicts angiographic benefit therapy in Stanford coronary risk intervention project [J]. *Circulation*, 1996, **24**: 2 146– 153
- [2] Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, et al. Low density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction [J]. *JAMA*, 1988, **260**: 1 917– 921
- [3] De Rijke YB, Verwey HF, Vogelezang CJM, et al. Enhanced susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in coronary bypass patients with progression of atherosclerosis [J]. *Clin Chim Acta*, 1995, **243**: 137– 149
- [4] 汪俊军, 刘小传, 庄一义. 冠心病患者低密度脂蛋白亚组分的分布及氧化易感性的研究 [J]. *中华医学杂志*, 1998, **78**: 833– 834
- [5] 冯宁, 冯宗忱, 杨钧国, 等. 冠心病患者 LDL 亚组分分析初步报告 [J]. *中华心血管病杂志*, 1999, **27**: 95– 97
- [6] Graaf J, Hak-Lemmers H, Hectors M, et al. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the density low density lipoprotein subfraction in healthy subjects [J]. *Arterioscler Thromb*, 1991, **11**: 298– 306
- [7] Lagrost L, Gandjini H, Athias A, et al. Influence of plasma cholesteryl ester transfer activity on the LDL and HDL distribution profiles in normolipidemic subjects [J]. *Arterioscler Thromb*, 1993, **13**(6): 815– 825
- [8] Griffin BA, Freeman DJ, Tait GW, et al. Role of plasma triglyceride in the regulation of plasma LDL sub-fractions: relative contribution of small, dense LDL to coronary heart disease risk [J]. *Atherosclerosis*, 1994, **16**: 241– 253
- [9] Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, et al. Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in man – prospective results from the Quebec cardiovascular study [J]. *Circulation*, 1997, **95**: 69– 75
- [10] 孙林, 汪俊军, 庄一义. 脂类转运和脂酶水解对低密度脂蛋白的修饰作用 [J]. *基础医学与临床*, 1999, **19**: 58– 62
- [11] Gardner CD, Fortmann SP, Krauss RM, et al. Association of small low density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women [J]. *JAMA*, 1996, **276**: 875– 881

(此文 1999-09-05 收到, 1999-12-30 修回)

(此文编辑 朱文霞)