

脂蛋白(a)测定的标准化和在心血管疾病中的价值

庄 一 义

(中国人民解放军南京军区南京总医院全军医学检验中心, 江苏省南京市 210002)

[关键词] 临床诊断学; 脂蛋白(a); 标准化; 心血管疾病; 综述

[摘要] 简述脂蛋白(a)测定国际标准化程序和存在的问题。载脂蛋白(a)分子大小的不均一性不同程度地影响免疫化学测定,使脂蛋白(a)测定标准化不易推广和应用,同时脂蛋白(a)测定值的不准确性影响评估个体心血管疾病危险状态。文章综合分析了国内外冠心病和脑卒中与脂蛋白(a)水平的关系。国内报道的病例一对照结果均指示冠心病和脑卒中患者的脂蛋白(a)增高,而且脂蛋白(a)水平与冠状动脉狭窄程度相关。国外前瞻性报告亦证实冠心病患者脂蛋白(a)增高,但是对脂蛋白(a)是否为脑卒中的危险因素尚有争论。文章讨论了脂蛋白(a)测定的指征及其在心血管疾病的预防和治疗中的价值。

[中图分类号] R44

[文献标识码] A

动脉粥样硬化性心血管疾病(atherosclerotic cardiovascular disease, ACVD)包括冠心病、脑卒中和周围动脉疾病。2003年国际动脉粥样硬化学会发表的“预防 ACVD 临床指南”中认定脂蛋白(a) [lipoprotein (a), Lp(a)] 为新显现的 ACVD 危险因素。尽管新显现的危险因素与 ACVD 患病危险增加有关,但对它的病理生理机制尚未完全了解。我国临床实验室已逐渐开展脂蛋白(a)测定。脂蛋白(a)测定国际标准化实施于 1998 年至 2000 年,2004 年 WHO/IFCC 正式接受 SRM2B 为国际脂蛋白(a)参考材料,保存在美国西雅图西北脂类和糖尿病研究实验室,供研究实验室和诊断试剂厂商使用。但是载脂蛋白(a)分子大小的不均一性不同程度地影响免疫化学测定,使脂蛋白(a)测定标准化不易推广。近年来,国外一些文献用脂蛋白(a)标准化的参考材料和参考方法测定大人群脂蛋白(a)水平评估脂蛋白(a)在 ACVD 中的价值,并且与商业试剂盒作了对比。本文参考国外有关资料,简述脂蛋白(a)测定标准化情况及存在的问题,同时综合国内外文献讨论脂蛋白(a)测定在 ACVD 中的临床意义。

1 脂蛋白(a)测定标准化程序和存在的问题^[1-3]

1.1 脂蛋白(a)测定国际标准化程序

1.1.1 脂蛋白(a)一级参考材料的制备 健康人新鲜血清,单载脂蛋白(a)多态,19个K4,分别由 Scanu 和 Marcovina 两个实验室用超速离心法和分子层析或凝胶过滤制备纯脂蛋白(a),用氨基酸分析测定蛋白质克分子数的绝对质量。

1.1.2 脂蛋白(a)参考方法 直接结合双单抗 ELISA,捕获抗体 a6 作用 K4-2 位点,检测抗体 a40 作用 K4-9 位点,此方法对载脂蛋白(a)多态大小不敏感。

1.1.3 二级参考材料靶值的设定 由 12 个国家、33 个实验室、40 个系统参加,对 8 个推荐的参考材料(proposed refer-

ence material, PRM) 进行评估,包括脂蛋白脂质组成、脂蛋白电泳、K4 数目、精密度、线性和平行性等检定,最后选定 PRM2B 作为脂蛋白(a)的二级参考材料(secondary reference material, SRM)。用 2 个脂蛋白(a)一级参考材料作标准,二种脂蛋白(a)参考方法(分别为 a40 和 a1-1 检测抗体),对 SRM 设定脂蛋白(a)值为 107 nmol/L。SRM 的载脂蛋白(a)多态主要为 16、17、18 K4,还有少量 14、20、32 K4。

1.1.4 二级参考材料的脂蛋白(a)靶值转移到各脂质实验室或生产厂商测定系统的校准物 第一步测定系统用 SRM 标化后测定 3 个定值质控血清,第二步再用 SRM 标化后测定各系统自制的校准物,第三步用自制校准物设定的脂蛋白(a)值标化测定系统,分析 30 个定值冰冻血清的脂蛋白(a)值,分析各测定系统脂蛋白(a)靶值转移的分析性能。

1.2 脂蛋白(a)测定标准化存在的问题

1.2.1 脂蛋白(a)测定标准化存在的问题 虽然脂蛋白(a)国际标准化程序已完成,WHO/IFCC 确定了国际脂蛋白(a)参考材料,但是脂蛋白(a)测定标准化并不能像载脂蛋白 A1 和载脂蛋白 B 测定标准化那样顺利地在国际上推广应用,其原因归咎于载脂蛋白(a)分子大小不均一性而不同程度地影响免疫化学测定。首先,校准物所选择的载脂蛋白(a)大小是随意的,所以校准物不能代表大部分标本载脂蛋白(a)大小。其次,作用 K4-2 位点的抗体反应性取决于载脂蛋白(a)分子大小即 K4-2 重复的数目,如标本载脂蛋白(a)多态小于测定校准物载脂蛋白(a)大小,测定结果低估,相反较大载脂蛋白(a)多态的标本载脂蛋白(a)高估。Marcovina 等^[4]用二种单抗实验,单抗(a5)作用 K4-2 位点,每一个分子的免疫反应性随载脂蛋白(a)大小变化,另一种单抗(a40)作用 K4-9 特异性位点。二种单抗 ELISA 都用同一种以含载脂蛋白(a)21K 为主的血清校准物,用一级脂蛋白(a)参考物标定校准物。脂蛋白(a)蛋白质以 nmol/L 表示反映血清脂蛋白(a)颗粒的数目。正如预想,在标本载脂蛋白(a)大小与校准物相同时,二种 ELISA 测定的结果一致。对照单抗(a40),用单抗(a5)对含载脂蛋白(a)K4 数目 < 21 或 > 21 的标本,测定

[收稿日期] 2006-08-28

[修回日期] 2006-11-06

[作者简介] 庄一义,教授,主要从事脂蛋白与动脉粥样硬化性心血管疾病关系的实验和临床研究, E-mail: junlang@vip.163.com。

值低估或高估。当各测定系统用靶值转移后的校准物测定定值质控血清时,可获得与 SRM 作校准物相同的结果。21 个系统测定 SRM 的系统变异系数仅 2.8%。但是,各测定系统以定值后的自制血清作校准物测定 30 份新鲜冰冻定值血清[脂蛋白(a)值 10~414 nmol/L,含 13~31 个 K4],排除局外物后系统间变异系数 6%~31%,脂蛋白(a)偏差的百分数与载脂蛋白(a)大小成正比,小载脂蛋白(a)多态(<19 K4)为负偏差,大载脂蛋白(a)多态(≥ 19 K4)为正偏差。

1.2.2 对脂蛋白(a)大小敏感的方法测定的脂蛋白(a)值不准确影响评估个体动脉粥样硬化性心血管疾病危险性状态 Marcovina 等^[5]用参考方法测定从 Framingham 研究收集的 2 940 例标本,其中 2 556 例同时用免疫比浊法测定和 2 662 例用商业 ELISA,以参考方法 75 nmol/L 约相当于 Framingham 人群 75 百分位作为临界值。免疫比浊法中 136 例错误分类为危险增高(假阳性),23 例错误分类为无危险(假阴性)。商业 ELISA 328 例错误分类为假阳性,25 例假阴性。免疫比浊法错误分类源于标本载脂蛋白(a)大小不同。对比 ELISA 中假阳性明显多于假阴性,原因是校准物为小分子载脂蛋白(a),而大多标本的载脂蛋白(a)大于校准物的载脂蛋白(a)大小。

综上所述,SRM 不能避免对载脂蛋白(a)大小敏感测定方法产生载脂蛋白(a)结果的不准确性,引起高估或低估脂蛋白(a)值。另外,不同方法系统测得脂蛋白(a)值的可比性依赖于评估方法对脂蛋白(a)分子大小的影响即抗体对不同脂蛋白(a)分子反应性和亲和性的差别。非载脂蛋白(a)K4-2 的特异性抗体不受载脂蛋白(a)多态影响但只适用 ELISA,不适用免疫比浊法。目前临床实验室常用的免疫比浊法(ITA、INA)所用的单抗或多抗主要作用 K4-2,对载脂蛋白(a)分子大小敏感的方法产生较大的偏差。因此,建议建立一个不受载脂蛋白(a)大小影响的准确的脂蛋白(a)常规测定方法才能使脂蛋白(a)测定标准化得到完全贯彻和推广。

脂蛋白(a)检测试剂选择原则:方法性能。特异性、线性、平等性、稳定性、批间差等。④经较长期临床应用的考证。大多数文献以脂蛋白(a)300 mg/L 作为临界值。健康人群脂蛋白(a)>300 mg/L 仅占 15% 左右,心血管疾病患者脂蛋白(a)>300 mg/L 约占 30%,脂蛋白(a)升高为心血管疾病危险因素。

2 脂蛋白(a)检测在心血管疾病中的价值

2.1 脂蛋白(a)与冠心病

检索清华同方期刊全文数据库,国内 1993 年至 2006 年发表有关脂蛋白(a)与冠心病的文献约 250 篇,都为病例对照分析,除 2 篇文献外,绝大多数资料表明冠心病患者血清脂蛋白(a)水平显著高于对照组。对冠心病病例的选择以陈旧性心肌梗死或冠状动脉造影确定的患者更有价值。因此我们选择了其中 16 篇冠状动脉造影的资料。总计冠状动脉造影诊断冠心病和非冠心病对照分别为 2 465 例和 1 302 例。16 篇冠心病患者脂蛋白(a)水平全部高于对照组(10 篇 $P < 0.01$,6 篇 $P < 0.05$)。其中 13 篇分析了冠状动脉狭窄的程

度和范围与脂蛋白(a)水平的相关性,除 1 篇无显著相关外($P > 0.05$),其它 8 篇 $P < 0.01$,4 篇 $P < 0.05$ 。

继 1974 年 Berg 首次发表脂蛋白(a)与冠心病的临床研究后,国外大量病例一对照分析已经确定了脂蛋白(a)升高为冠心病的危险因素。Danesh 等^[6]2000 年综合 27 篇前瞻性研究的资料,平均随访 10 年,共计 5 436 例冠心病患者(冠心病死亡或非致死性心肌梗死)和大量对照人群。尽管脂蛋白(a)检测方法不同,但总人群以脂蛋白(a)基线水平分为顶部 1/3 与底部 1/3 比较,危险比率 RR1.6~1.7($P < 0.00001$),冠心病的危险性增加 70%。2002 年 Luc 等^[7]前瞻性流行病学研究包括 9 133 例法国和北爱尔兰男性,年龄 50~59 岁,无冠心病史,随访 5 年,发生冠状动脉事件(心肌梗死、冠状动脉死亡和心绞痛)288 例,控制其它危险因素后行回归分析,最高 1/4 脂蛋白(a)和最低 1/4 比较,RR 1.56($P < 0.0006$),证实脂蛋白(a)是预示冠状动脉事件的危险因素。2003 年 Ariyo 等^[8]报道 3 972 例无心血管疾病的美国人(女 2 375 例,男 1 597 例),年龄 ≥ 65 岁,平均随访 7.4 年,按脂蛋白(a)水平分为最高 1/4 和最低 1/4 比较,RR 2.54,确定脂蛋白(a)升高是冠心病的独立危险因素。Zorio 等^[9]检测 222 例早发心肌梗死或严重冠状动脉粥样硬化患者,血清脂蛋白(a)和小分子载脂蛋白(a)多态水平平均显著高于 199 例对照者($P < 0.001$),确定脂蛋白(a)和小分子载脂蛋白(a)多态水平为早发心肌梗死的危险性指标。认为脂蛋白(a) ≥ 300 mg/L 是一种冠状动脉粥样硬化的严重预示。

综合国内外文献资料,脂蛋白(a)是冠心病的危险因素或重要的危险因素已确定无疑。值得重视的是在冠心病发病机制研究中把脂蛋白(a)作为动脉粥样硬化和纤维蛋白溶介之间的桥梁,分析脂蛋白(a)与各种纤溶、凝血因子对冠心病的致病性。Marcovina 等^[10]指出,脂蛋白(a)干扰纤溶可能通过两种途径,一为载脂蛋白(a)抑制纤溶酶原激活是通过载脂蛋白(a)与组织纤溶酶原激活剂、纤溶酶原和纤维蛋白三元复合物作用的结果,而不是载脂蛋白(a)与纤溶酶原竞争纤维蛋白结合位点;二为降低外部凝血系统的抑制而促进血凝。最近,Sotiriou 等^[11]指出,脂蛋白(a)的载脂蛋白(a)作为配体与巨噬细胞 1 的 β_2 整合蛋白结合,使炎症细胞容易聚集到动脉粥样硬化的斑块,促进动脉粥样硬化的形成和发展。

2.2 脂蛋白(a)与脑卒中

同期检索国内脂蛋白(a)与脑卒中相关文献约 150 篇,统计资料完整的病例一对照有 28 篇,总计脑卒中患者 3 423 例,对照者 3 273 例,除 1 篇脑卒中患者脂蛋白(a)水平与对照组差异无显著性外($P > 0.05$),11 篇差异有显著性($P < 0.05$),16 篇差异有非常显著性($P < 0.01$)。27 篇中 22 篇分析的病例为脑梗死,其它 5 篇统称脑卒中,未分脑梗死或脑出血。2 篇报道急性期脑卒中与恢复期脑卒中脂蛋白(a)水平差异无显著性,1 篇差异有显著性。3 篇脑梗死脂蛋白(a)水平显著高于脑出血。北京协和、阜外医院^[12]大宗病例分析,脑梗死 809 例(CT 证实),对照 1 817 例,逻辑回归分析 OR 为 1.6($P < 0.001$)。国外对脂蛋白(a)是否为脑卒中的危险

因素尚有争论, Milionis 等^[13] 总结 1987~1999 年 16 篇文献, 主要为前瞻性研究, 大部分文献支持脂蛋白(a) 是脑卒中的危险因素。Jurgens 等^[14] 评估 265 例脑梗死患者, 脂蛋白(a) 水平显著高于 288 例对照。Moque 等^[15] 分析 60 例出血性脑血管病患者(㉔组)、60 例缺血性脑血管病患者(㉕组) 和年龄、性别匹配的 30 例健康对照者(iv 组), ㉔、㉕组脂蛋白(a) 水平明显高于 iv 组。而 ㉔、㉕组其它血脂浓度与 iv 组差异无显著性, 认为脂蛋白(a) 浓度是脑血管病症的独立危险因素。有些文献不支持脂蛋白(a) 为脑卒中的危险因素, 如 Ridker 等^[16] 随访 14 916 例健康中年白人, 以前无脑卒中病史, 7.5 年期间发生脑卒中 198 例(155 例脑梗死、35 例脑出血和 8 例未定型), 结果脂蛋白(a) 水平与总的脑卒中或脑梗死的危险性差异无显著性。

文献认为有些因素影响分析判断的结论: 未标准化的脂蛋白(a) 检测; 病例数量较少, 不能确定载脂蛋白(a) 多态与脂蛋白(a) 浓度的关系; 不同民族类组; 女性患者性激素对脂蛋白(a) 水平的影响; 检测前血清储存条件; 不恰当分析和统计方法等。另外患者并存其它危险因素如异常脂蛋白血症和高半胱氨酸等增强脂蛋白(a) 的致病作用。有资料指出脑梗死与脑出血患者血浆脂蛋白谱不同, 脑梗死与对照组比较, 总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 和脂蛋白(a) 增高, 而脑出血患者 TC、LDLC 和脂蛋白(a) 低于对照组。血凝和纤维蛋白溶解实验的结果两者也显著不同, 这些都有待深入探讨。

2.3 脂蛋白(a) 检测的指征及其在心血管疾病预防和治疗中的意义^[17]

2.3.1 有心血管疾病家族史, 特别是有早发心肌梗死、脑卒中和周围血管疾病发作史的亲属 脂蛋白(a) 有很强的遗传特征, 对上属人群特别对早发冠状动脉事件的子女应检测脂蛋白(a), 并在长期生命过程中监测脂蛋白(a), 及时进行必要的干预。

2.3.2 有外加的心血管疾病危险因素, 特别是增强脂蛋白(a) 致病力的其它危险因素, 如低密度脂蛋白胆固醇高、高半胱氨酸、高血压、糖尿病等 脂蛋白(a) 和 LDLC 同时升高对致心血管疾病有协同作用, 应立即下降 LDLC 治疗, 有研究者认为 LDLC 低于 1 g/L 时高脂蛋白(a) 不构成对冠心病的危险。高血压引起动脉损害, 高血压伴有高脂蛋白(a) 和其它凝血因子异常促进动脉粥样硬化形成, 应使用降低脂蛋白(a) 的抗高血压药物。升高的脂蛋白(a)、TC、LDLC、甘油三酯、纤维蛋白原和纤溶酶激活抑制因子 1 活性加重糖尿病的进展, 检测脂蛋白(a) 水平有助于进行早期有效的预防。高半胱氨酸和脂蛋白(a) 增高同时存在冠心病和周围血管疾病有协同致病作用, 应予叶酸治疗有效地降低高半胱氨酸水平。

2.3.3 已确定心血管疾病或早发动脉粥样硬化疾病 对该类患者脂蛋白(a) 浓度仍能预示心血管疾病的进展和心血管事件的发生, 检测脂蛋白(a) 有助于心血管疾病或心血管事件的治疗和预防。

2.3.4 施行血管内检查或手术 预防性降低脂蛋白(a)

和 LDLC, 如 LDL 换血治疗或其它降脂治疗防止手术后血管再狭窄和再梗死。

2.3.5 绝经期妇女 绝经期妇女失去内源性雌激素, 引起血浆脂蛋白谱的改变。近年研究认为绝经期妇女脂蛋白(a) 增高是冠心病的重要危险因素, 因此绝经期妇女要检测各种心血管疾病危险因素包括脂蛋白(a), 需要时可及时用激素替代疗法预防心血管疾病。

2.3.6 视网膜静脉或动脉梗死患者 脂蛋白(a) 与视网膜血管梗死有密切的相关性, 视网膜静脉或动脉梗死患者应检测脂蛋白(a)。

[参考文献]

- [1] International Federation of Clinical Chemistry Standardization Project for the Measurement of Lipoprotein(a). Phase I: evaluation of the analytical performance of lipoprotein(a) assay systems and commercial calibrators [J]. *Clin Chem*, 1998, **44** (8): 1 629-640
- [2] International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) Standardization Project for the Measurement of Lipoprotein(a). Phase 2: selection and properties of a proposed secondary reference material for lipoprotein(a) [J]. *Clin Chem Lab Med*, 1999, **37** (10): 949-958
- [3] Marcovina SM, Albers JJ, Scanu AM, Kennedy H, Giaculli F, Berg K, et al. Use of a reference material proposed by the international federation of clinical chemistry and laboratory medicine to evaluate analytical methods for the determination of plasma lipoprotein(a) [J]. *Clin Chem*, 2000, **46** (12): 1 956-976
- [4] Marcovina SM, Albers JJ, Gabel B, Koschinsky ML, Gaur VP. Effect of the number of apolipoprotein(a) kringle 4 domains on immunochemical measurements of lipoprotein(a) [J]. *Clin Chem*, 1995, **41** (2): 246-255
- [5] Marcovina SM, Koschinsky ML, Albers JJ, Skavlatos S. Report of the national heart, lung, and blood institute workshop on lipoprotein(a) and cardiovascular disease: recent advances and future directions [J]. *Clin Chem*, 2003, **49** (11): 1 785-796
- [6] Danesh J, Collins R, Peto R. Lipoprotein(a) and coronary heart disease meta-analysis of prospective studies [J]. *Circulation*, 2000, **102** (10): 1 082-085
- [7] Luc G, Bard JM, Arveiler D, Ferrieres J, Evans A, Amouyel P, et al. Lipoprotein(a) as a predictor of coronary heart disease: the PRIME Study [J]. *Atherosclerosis*, 2002, **163** (2): 377-384
- [8] Ariyo AA, Thach C, Tracy R. Lp(a) lipoprotein, vascular disease, and mortality in the elderly [J]. *N Engl J Med*, 2003, **349** (22): 2 108-115
- [9] Zorio E, Falco C, Arnaud MA, Espana F, Osa A, Ramon LA, et al. Lipoprotein(a) in young individuals as a marker of the presence of ischemic heart disease and the severity of coronary lesions [J]. *Haematologica*, 2006, **91** (4): 562-565
- [10] Marcovina SM, Koschinsky ML. Evaluation of lipoprotein(a) as a prothrombotic factor: progress from bench to bedside [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2003, **14** (4): 361-366
- [11] Sotiropoulos SN, Orlova VV, Al-Fakhri N, Ihanus E, Economopoulou M, Iseman B, et al. Lipoprotein(a) in atherosclerotic plaque recruits inflammatory cells through interaction with Mac-1, integrin [J]. *FASEB J*, 2006, **20** (3): 559-561
- [12] 刘晓宁, 孙莉, 李照晖, 高岩, 惠汝太. 心肌梗死和脑梗死病人载脂蛋白(a) 五核苷酸重复序列基因多态性及与血浆脂蛋白(a) 水平的关系[J]. *中华医学杂志*, 2002, **82** (20): 1 396-400
- [13] Milionis HJ, Winder AF, Mikhailidis DP. Lipoprotein(a) and stroke [J]. *J Clin Pathol*, 2000, **53** (7): 487-496
- [14] Jurgens G, Tadder-peters WC, Koltringer P. Lipoprotein(a) serum concentration and apolipoprotein(a) phenotype correlate with severity and presence of ischemic cerebrovascular disease [J]. *Stroke*, 1995, **26** (10): 1 841-848
- [15] Moque MM, Sulatana P, Arslan MI. Lipoprotein(a): an independent risk factor CVD [J]. *Myrmensingh Med J*, 2005, **14** (2): 136-140
- [16] Ridker PM, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of lipoprotein(a) and the risk of future stroke [J]. *JAMA*, 1995, **273** (26): 1 269-273
- [17] Lippi G, Guidi G. Lipoprotein(a): an emerging cardiovascular risk factor [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2003, **40** (1): 1-42 (此文编辑 许雪梅)