

血清 β_2 -糖蛋白 IV-脂蛋白(a)复合物水平的测定 及其对 IgA 肾病的诊断价值

张春妮, 王相栋, 汪俊军, 刘小传, 李 克

(南京军区南京总医院检验科, 江苏省南京市 210002)

[关键词] 脂蛋白(a); β_2 -糖蛋白 I 酶联免疫吸附法; IgA 肾病

[摘要] 目的 建立检测人血清 β_2 -糖蛋白 I-脂蛋白(a)复合物的酶联免疫吸附法, 探讨该复合物存在于人血循环中的可能性, 并通过对 IgA 肾病患者的检测分析该复合物的临床诊断价值。方法 以抗人 β_2 -糖蛋白 I 抗体为包被抗体、酶标记抗载脂蛋白(a)为检测抗体建立双抗体夹心酶联免疫吸附法, 对 50 例 IgA 肾病患者和 50 例健康对照者进行检测分析。结果 建立的 β_2 -糖蛋白 I-脂蛋白(a)检测法批内、批间变异系数为 6.61% 和 13.02%, 在 0.33 ~ 1.83 ku/L 范围内呈线性。IgA 肾病患者 β_2 -糖蛋白 I-脂蛋白(a)水平显著高于健康对照者 (1.45 ± 0.57 ku/L 比 0.42 ± 0.29 ku/L, $P < 0.01$), 检测敏感性为 80%, 特异性为 96%。结论 β_2 -糖蛋白 I 与脂蛋白(a)能以复合物的形式存在于人血循环中, 该复合物在 IgA 肾病患者血清中的水平明显增高, 提示其潜在的临床诊断价值。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Measurement of Serum Levels of β_2 -Glycoprotein I-Lipoprotein (a) Complex and Its Clinical Significance for IgA Nephropathy

ZHANG Chun-Ni, WANG Xiang-Dong, WANG Jun-Jun, LIU Xiao-Zhuan, and LI Ke

(Department of Clinical Laboratory, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, Nanjing 210002, China)

[KEY WORDS] Lipoprotein(a); β_2 -Glycoprotein I Enzyme Linked Immunosorbent Assay; IgA Nephropathy

[ABSTRACT] **Aim** To develop a sandwich ELISA for measuring serum β_2 -glycoprotein I-lipoprotein (a) complex (β_2 -GPI-Lp(a)) concentration and to explore the existence of serum complexes β_2 -GPI-Lp(a) and its clinical value for IgA nephropathy. **Methods** ELISA was established using rabbit anti-human β_2 -GPI antibody as the capture antibody and quantitating with polyclonal antibody against apolipoprotein (a) enzyme conjugate. The concentrations of β_2 -GPI-Lp(a) complexes were studied in 50 patients with IgA nephropathy and 50 control subjects. **Results** Mean intra-assay and inter-assay coefficients of variation of the assay were 6.61% and 13.02%, respectively. Linear range of the assay was between 0.33 ~ 1.83 ku/L. Serum β_2 -GPI-Lp(a) concentrations in IgA nephropathy were significantly higher than those of controls (1.45 ± 0.57 ku/L vs 0.42 ± 0.29 ku/L, $P < 0.01$). Forty patients (80%) were found to have elevated β_2 -GPI-Lp(a) concentrations, whereas only two out of the fifty healthy controls had high β_2 -GPI-Lp(a) levels. **Conclusions** β_2 -GPI may form complexes with lipoprotein (a) in circulation. β_2 -GPI-Lp(a) complexes concentration was increased in patients with IgA nephropathy, suggesting its potential clinical value as a diagnostic marker for IgA nephropathy.

β_2 -糖蛋白 I (β_2 -glycoprotein I β_2 -GPI) 亦称载脂蛋白 H, 是抗心磷脂自身抗体与心磷脂结合所必需的辅因子。在体内与脂蛋白结合, 参与脂质代谢并具有抗凝血活性^[1]。在人体内 β_2 -GPI 能与低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 尤其是氧化型 LDL (oxidized LDL, ox-LDL) 以复合物的形式存在, 一些常伴心血管病变的自身免疫性疾病和具有

慢性炎症反应的疾病患者血清 β_2 -GPI-ox-LDL 复合物水平显著升高^[2]。体外实验证实, β_2 -GPI-ox-LDL 通过 β_2 -GPI 自身抗体介导途径促进巨噬细胞吞噬 ox-LDL, 导致泡沫细胞形成, 参与动脉粥样硬化的发生和发展, 揭示 ox-LDL 致动脉粥样硬化的新机制^[3]。血 β_2 -GPI-ox-LDL 水平已被认为是自身免疫和一些慢性炎症性疾病血栓形成和动脉粥样硬化发生新的诊断指标^[4]。

脂蛋白(a) [lipoprotein (a), Lp(a)] 是心脑血管疾病的独立危险因素^[5]。鉴于脂蛋白(a) 分子结构和脂肪酸组成与 LDL 相似, 并且与 β_2 -GPI 也有高度亲和力^[6], 我们推测脂蛋白(a) 与 β_2 -GPI 也能结合形成复合物, 存在于人血循环中。为此, 本研究

[收稿日期] 2008-10-29 [修回日期] 2009-02-01

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (NSFC 30872411)

[作者简介] 张春妮, 博士, 主任技师, 硕士研究生导师, 研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化发病机制的关系, Email 为 zchunni27@hotmail.com。王相栋, 硕士, 技师, 主要从事临床检验工作。汪俊军, 硕士, 主任技师, 硕士研究生导师, 研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化发病机制的关系。

首先建立 β_2 -GPI-Lp(a) 复合物 ELISA 检测方法, 观察 β_2 -GPI-Lp(a) 是否存在于人血清中, 并进一步对 IgA 肾病患者和健康人进行比较分析, 以初步探讨 β_2 -GPI-Lp(a) 的临床诊断价值。

1 对象和方法

1.1 研究对象

IgA 肾病患者 50 例, 年龄 35.3 ± 10.7 岁, 均经肾活检病理证实。年龄、性别匹配的健康体检者 50 例, 年龄 33.4 ± 8.8 岁。

1.2 实验动物与试剂

新西兰雄性白兔两只, 2 kg 3~4 月龄, 清洁级, 南京军区动物实验中心提供。琼脂糖 6B (sepharose 6B) 为 Sigma 公司产品; 肝素钠为博尔迪生物公司产品; DEAE 纤维素 -52 Whatman 公司产品; 蛋白标准博尔迪生物公司产品; 兔抗人 β_2 -GPI 多克隆抗体参考品为 Chemicon 公司产品; DAB 显色液为南京生兴技术有限公司产品; 血清脂蛋白 (a) 水平测定试剂盒为上海申峰生物试剂有限公司产品。肝素亲和柱 Heparin-sepharose 6B、抗原亲和柱和 HRP-载脂蛋白 (a) 多克隆抗体由本室自制^[6-8]。

1.3 β_2 糖蛋白 I 抗原提取及其多克隆抗体的制备

按照本实验建立的方法从人血浆提取纯化 β_2 -GPI 经 SDS-PAGE、Western-blotting 和氨基酸组成成分鉴定为纯 β_2 -GPI^[7]。用纯化的 β_2 -GPI 免疫兔获兔抗人 β_2 -GPI 多克隆抗体, 琼脂扩散法抗血清效价 1:32。经 ELISA 和 dot-ELISA 方法证实所得抗体与 BSA 无交叉反应, 和国外 Chemicon 公司抗体相似, 与 β_2 -GPI 有较好的反应性和特异性^[7]。

1.4 血清标本预处理

待测血清加入终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ MgCl₂, 37℃ 水浴 2 h, 按 1:1 比例加入 90 g/L PEG, 4℃ 过夜。次日 10 000 r/min 离心 5 min, 取沉淀, 复溶于 5 g/L 明胶-0.01 mol/L PBST 中。健康人混合血清以相同方法处理作为参考血清。

1.5 酶联免疫吸附法检测

2.5 mg/L 抗 β_2 -GPI 抗体 100 μL /孔, 37℃ 反应 2 h, 4℃ 过夜包被。0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次后加 10 g/L 明胶-0.01 mol/L PBS, 37℃ 封闭 1 h。同上洗涤后, 分别设空白管、系列稀释的参考血清管和待测血清管。参考血清 (复溶液) 用稀释液依次倍比稀释 5 管 (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32)。待测血清 (复溶液) 1:6 稀释, 每孔 100 μL , 空白管加 PBS, 37℃ 反应 2 h, 洗涤 4 次。加入 1:4000 稀释的

HRP-抗载脂蛋白 (a) 多抗 100 μL /孔, 37℃ 2 h, 洗涤 4 次。加入底物 TMB-过氧化尿素溶液显色, 以 2 mol/L H₂SO₄ 100 μL /孔终止反应, 于酶联仪 450 nm 处测定吸光度。测定 50 份健康人血清 β_2 -GPI-Lp(a), 以其 $\bar{x} + 2s$ 定为 1 ku/L 作临界值, > 1 ku/L 为水平升高。

1.6 统计学方法

采用 Statistica 6.0 软件进行统计分析。组间比较用成组设计的 *t* 检验。相关性分析用非参数 Spearman 处理。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 包被抗体和酶标抗体工作浓度确定

包被抗体及酶标抗体分别做梯度稀释, 采用棋盘滴定法确定其工作浓度, 检测 β_2 -GPI-Lp(a) 复合物。抗 β_2 -GPI 抗体定为 2.5 mg/L。HRP-抗载脂蛋白 (a) 1:4000 稀释。

2.2 标准曲线

参考血清倍比稀释 5 个稀释度作为自变量, 以 OD₄₅₀ 值为因变量, 绘制标准曲线, 并计算其直线线性关系系数, 平均 $R^2 = 0.986$ 。 β_2 -GPI-Lp(a) 浓度在 0.33~1.83 ku/L 范围内呈线性。

2.3 精密度

标本平行测定 24 次, 批内变异系数为 6.61%。连续测定 7 天, 批间变异系数为 13.02%。

2.4 血清 β_2 -GPI-Lp(a) 浓度

50 例 IgA 肾病患者血清 β_2 -GPI-Lp(a) 水平为 1.45 ± 0.57 ku/L, 明显高于对照组 (0.42 ± 0.29 ku/L, $P < 0.01$)。对照组 2 例超出界值 (特异性 96%), IgA 肾病患者中 40 例 (80%) 明显增高。

2.5 相关性分析

IgA 肾病患者血清脂蛋白 (a) 浓度为 272.8 ± 217.4 mg/L, 明显高于对照组 (120.7 ± 86.9 mg/L, $P < 0.01$)。IgA 肾病组 β_2 -GPI-Lp(a) 复合物与脂蛋白 (a) 无明显相关性 ($r = 0.26$, $P = 0.069$)。

3 讨论

β_2 -GPI 作为抗心磷脂抗体和抗 β_2 -GPI 抗体的主要靶抗原, 是自身免疫性疾病中重要的自身抗原^[1]。 β_2 -GPI 也是血浆中的一种天然抗凝剂, 它通过影响凝血因子和凝血酶原复合物的形成抑制凝血过程, 并抑制外源性 ADP 诱导血小板聚集。 β_2 -GPI 的一个显著特点是它与带负电荷的分子如 LDL 有亲和力。LDL 氧化后分子的负电荷增加, 与 β_2 -GPI

的亲合力增加^[4]。据报道^[2],在人血循环中 β_2 -GPI 能与 ox-LDL 结合形成稳定、不易解离的复合物 β_2 -GPI-ox-LDL。已知脂蛋白 (a) 与 LDL 结构相似,除含有特异的载脂蛋白 (a) 外,也含有载脂蛋白 B。并且已有研究发现, β_2 -GPI 也与脂蛋白 (a) 具有高度亲合力^[6],提示 β_2 -GPI 与脂蛋白 (a) 结合形成复合物的可能性。本研究以兔抗人 β_2 -GPI 为包被抗体,羊抗人载脂蛋白 (a) 抗体作酶标记抗体建立 ELISA。检测发现,人血清中存在 β_2 -GPI-Lp(a) 复合物,且该复合物在 IgA 肾病患者血清中的水平明显高于健康对照者。 β_2 -GPI-Lp(a) 复合物对 IgA 肾病具有较高的检测敏感性 (80%) 和特异性 (96%)。

自身免疫患者血清中含有较高水平的 β_2 -GPI 为避免血清中游离 β_2 -GPI 对实验的干扰,我们采用 PEG 沉淀法对血清标本进行预处理。先将结合成复合物的 β_2 -GPI-Lp(a) 与游离型 β_2 -GPI 分离开来,再检测沉淀中 β_2 -GPI-Lp(a) 复合物水平。通过比较不同浓度的 PEG,发现 4.5% 的 PEG 沉淀效果较好,可最大限度地去除游离 β_2 -GPI 的干扰,而又保证复合物被沉淀下来。在预处理血清时加入 10 μ mol/L MgCl₂ 是为了解离 β_2 -GPI 靠分子间的静电引力与脂蛋白 (a) 形成的不稳定的复合物来测量体内稳定的不易解离的复合物。

β_2 -GPI 可能不仅能与脂蛋白 (a) 结合,也能与氧化修饰的脂蛋白 (a) [ox-Lp(a)] 结合成复合物。由于本 ELISA 系统中所使用的载脂蛋白 (a) 多克隆抗体不仅能识别天然脂蛋白 (a) 中的载脂蛋白 (a),也识别 ox-Lp(a) 中的氧化载脂蛋白 (a),因此本方法检测的应是 β_2 -GPI 与脂蛋白 (a) 以及与 ox-Lp(a) 形成的复合物的总和。在人的动脉斑块部位及血循环中已检测到 ox-Lp(a)。我们以往的研究发现,ox-Lp(a) 存在于冠心病和类风湿关节炎患者血清中且浓度高于健康正常人^[8,9]。IgA 肾病患者有明显的免疫紊乱现象,其体内氧化应激明显增加,脂蛋白易发生氧化修饰^[10]。Kabahara 等^[2]报道, IgA 肾病患者血清 ox-LDL 水平增加。这些结果提示, IgA 肾病患者体内的脂蛋白 (a) 可能也易发生氧化修饰形成 ox-Lp(a)。脂蛋白 (a) 氧化后由于分子表面的负电荷增加,与 β_2 -GPI 的亲合力也会增加,因此 β_2 -GPI 与 ox-Lp(a),较之与脂蛋白 (a) 更易结合成稳定的复合物。本研究发现, IgA 肾病患者中 β_2 -GPI-Lp(a) 复合物与脂蛋白 (a) 水平之间无相关性。由此揭示,本研究中所测得的复合物可能主要是 β_2 -GPI 与 ox-Lp(a) 结合形成的复合物,但需进一步研究加以证实。研究报道显示^[2,11], IgA 肾病患

者 β_2 -GPI-ox-LDL 复合物水平增加非常显著,被认为在 IgA 肾病肾小球血管硬化过程中起了重要作用^[2]。我们也建立了 β_2 -GPI-ox-LDL 复合物的 ELISA 检测方法,得到相似的结果^[12]。据报道^[11], β_2 -GPI-ox-LDL 可通过 β_2 -GPI 自身抗体介导的途径促进巨噬细胞吞噬 ox-LDL,导致泡沫细胞的形成,参与动脉粥样硬化的发生和发展。至于 β_2 -GPI-Lp(a) 复合物是否也能通过与 β_2 -GPI-ox-LDL 相同的免疫途径致病尚不清楚,还有待进一步研究。

本研究首次建立了人血清 β_2 -GPI-Lp(a) 复合物的 ELISA 检测法,发现人血清中存在该复合物,相对于正常人, IgA 肾病患者水平明显升高,提示 β_2 -GPI-Lp(a) 复合物潜在的临床价值。下一步,我们将对其他自身免疫疾病进行观察分析,为 β_2 -GPI-Lp(a) 的临床应用提供更多、更详实的依据,并期望通过体外实验探讨该复合物在动脉粥样硬化发生中的病理作用。

[参考文献]

- [1] Danowski A, Kikler TS, Petri M. Anti-beta2-glycoprotein I prevalence: clinical correlations and importance of persistent positivity in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus [J]. *J Rheumatol*, 2006, 33 (9): 1775-779.
- [2] Kabahara J, Kobayashi K, Maeshima Y, et al. Clinical significance of serum oxidized low density lipoprotein/ β_2 -glycoprotein I complexes in patients with chronic renal diseases [J]. *Nephron*, 2004, 98 c15-c24.
- [3] Matsuura E, Kobayashi K, Koike T, et al. Atherogenic autoantigen oxidized LDL complexes with β_2 -glycoprotein I [J]. *Immunobiology*, 2003, 207 (1): 17-22.
- [4] 王相栋, 张春妮. β_2 糖蛋白 I 氧化型低密度脂蛋白复合物的研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, 15 (8): 644-647.
- [5] 汪俊军, 顾振华, 孟扬, 等. 脂蛋白 (a) 免疫复合物对 U937 细胞基质金属蛋白酶 1 及其抑制物的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 15 (5): 345-349.
- [6] Lopez-Lira F, Rosales Leon I, Monroy Martinez V, et al. The role of beta2-glycoprotein I (beta(2)GPI) in the activation of plasminogen [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1764 (4): 815-823.
- [7] 王相栋, 张春妮, 汪俊军, 等. 自制肝素亲和柱分离纯化载脂蛋白 H 及其抗体制备与鉴定 [J]. *中国免疫学杂志*, 2008, 24 (10): 931-934.
- [8] Wang JJ, Hu B, Kong LT, et al. Native oxidized lipoprotein and lipoprotein (a) immune complex in patients with active and inactive rheumatoid arthritis: relationship to inflammation [J]. *Clin Chim Acta*, 2008, 390 (1): 67-71.
- [9] Wang JJ, Zhang CN, Gong JR, et al. Development of new enzyme-linked immunosorbent assay for oxidized lipoprotein (a) by using purified human oxidized lipoprotein (a) autoantibodies as capture antibody [J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 385 (1): 73-78.
- [10] Huang WN, Tso TK, Huang HY. Enhanced oxidative status but not corresponding elevated antioxidative status by anticardiolipin antibody and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Rheumatol Int*, 2007, 27 (5): 453-458.
- [11] Kobayashi K, Kishi M, Atsumi T, et al. Circulating oxidized LDL forms complexes with β_2 -glycoprotein IV: implication as an atherogenic autoantigen [J]. *J Lipid Res*, 2003, 44 (2): 716-726.
- [12] 张春妮, 王相栋, 田迎, 等. 建立 ELISA 法检测 IgA 肾病患者血清 β_2 -GPI/LDL 复合物 [J]. *临床检验杂志*, 待发表.

(此文编辑 文玉珊)