

血浆脂蛋白亚组分检测方法的研究进展与评价

朱心雨,明心亮,冯艳林,贺丁冬,涂建成(武汉大学中南医院检验科基因诊断中心,武汉 430071)

摘要:世界范围内心血管疾病(CVD)患病率逐年上升,脂类代谢异常尤其是血浆脂蛋白异常是动脉粥样硬化、冠心病等 CVD 的重要危险因素。脂蛋白在脂质代谢过程中其密度、颗粒大小、电荷以及组成成分不断发生变化,形成各亚组分。在过去的几十年中,已经涌现出了许多分离、测量和定量脂蛋白的新方法,这些方法也被称为高级脂蛋白检测方法。新型检测技术为相关疾病的早期筛查、风险评价和治疗选择提供较为全面的血脂检测数据,弥补了传统检测技术血脂项目的空白。因此,本文将对当前实验室中所应用的血浆脂蛋白亚组分检测方法的研究进展作一综述。

关键词:脂蛋白;亚组分;检测技术;心血管疾病;风险评估

中图分类号:R446**文献标志码:**A

血浆脂蛋白是在体内输送或摄取特定脂质的异质性血液颗粒,因此其在脂质代谢、信号传导和调节中起着至关重要的作用。这些颗粒由疏水性三酰甘油和胆固醇酯的核心组成,被磷脂、胆固醇和载脂蛋白等组成的亲水性外壳所包围,根据其密度、大小和蛋白质组成不同,脂蛋白可分为 5 个主要类别:乳糜微粒(CM)、极低密度脂蛋白(VLDL)、中间密度脂蛋白(IDL)、低密度脂蛋白(LDL),即主要是含 apoB 的脂蛋白;以及高密度脂蛋白(HDL),即主要是含 apoA1 的脂蛋白(见表 1)。血浆脂蛋白因其大小、组成和代谢特性方面

有所不同又可以进一步分为几个亚组分,在心血管疾病(cardiovascular diseases, CVD)尤其是动脉粥样硬化发病中发挥重要作用。目前血浆脂蛋白常根据超速离心法(ultracentrifugation, UC)对其进行分离;此外,脂蛋白也可以根据其电泳迁移率或其载脂蛋白的含量进行分离,以进一步分离脂蛋白并建立相应的脂蛋白谱。尽管目前对于脂蛋白颗粒或亚组分在 CVD 风险评估中尚无共识,但已有研究表明,LDL 和 HDL 大小或颗粒浓度是未来预测 CVD 风险的重要检测指标。以下将对几种新型的检测方法进行介绍。

表 1 脂蛋白组分分类

分类	水合密度 (g/mL)	颗粒直径 (nm)	主要成分	主要载脂蛋白	来源	功能
CM	<0.950	80~500	TG	B48、A1、A2	小肠合成	将食物中的 TG 和胆固醇从小肠转运至其他组织
VLDL	0.950~1.006	30~80	TG	B100、E、Cs	肝脏合成	转运内源性 TG 至外周组织,经脂酶水解后释放游离脂肪酸
IDL	1.006~1.019	27~30	TG、胆固醇	B100、E	VLDL 中 TG 经脂酶水解后形成	属 LDL 前体,部分经肝脏代谢
LDL	1.019~1.063	20~27	胆固醇	B100	IDL 中 TG 经脂酶水解后形成	胆固醇的主要载体,经 LDL 受体介导而被外周组织摄取和利用
HDL	1.063~1.210	8~10	磷脂、胆固醇	A1、A2、Cs	主要是肝脏和小肠合成	促进胆固醇从外周组织移去,转运胆固醇至肝脏或其他组织再分布

1 电喷雾差分电迁移率分析

电喷雾差分电迁移率分析(electrospray differential mobility analysis, ES-DMA)也被称为离子迁移率分析法(ion mobility, IM),Kaufman 等^[1]于 1998 年首次报道该方法用于纳米颗粒和大离子尺寸的测量;Caulfield 等^[2]在 2008 年报道了该方法首次应用于脂蛋白分析。ES-DMA 是一个可以选择和计算气溶胶相中完整脂蛋白颗粒的系统,其工作原理为用电喷雾接口将血清中的脂蛋白雾化,随后电喷雾接口中的中和源向生成的气溶胶施加已知的电荷分布,在下游使用由漂移管组成的差分电迁移率分析仪来选择雾化的脂蛋白,根据大气压下的电迁移率逐渐选择在大气压力下经受电场倾斜的脂蛋白,然后在凝结核粒子计数器中通过激光检测并对选定的脂蛋白进行计数。ES-DMA 已被证明其在脂蛋白检测中具有一定价值,但在临床实验室中几乎没有开展该项

目。对于 ES-DMA 来说自动化和大样本检测是可以实现的;此外,ES-DMA 对干扰尤其是血清蛋白产生的干扰相对较敏感,因此通常需要特定的样品制备步骤来获得精确的脂蛋白谱。尽管如此,ES-DMA 的一个优点是它可以在短时间内检测出样品的完整脂蛋白谱,与报道的大多数脂蛋白谱分析和定量方法不同,ES-DMA 是唯一一种被测物是完整脂蛋白的方法^[3]。

2 垂直自动分离法

垂直自动分离法(vertical auto profile, VAP)由 Chung 等^[4]在 80 年代首次报道。该方法是一种半自动化的系统,其原理主要是通过顺序超速离心进行脂蛋白分离。

VAP-II[®]检测脂蛋白谱有两个过程。首先,通过单垂直旋转密度梯度 UC 分离脂蛋白,不连续的梯度可确保根据脂蛋白各自的浮悬率充分分离脂蛋白,使密度最高的最终位于

作者简介:朱心雨,1997 年生,男,硕士研究生,主要从事疾病的分子致病机制及早期分子诊断技术研究。
通信作者:涂建成,主任技师,教授,博士研究生导师,E-mail: jianchengtu@whu.edu.cn。

管的底部;自动连续酶促测定法通过胆固醇含量对这些分离的脂蛋白进行定量;然后在 505 nm 处测量吸光度以确定每个脂蛋白类别和亚类相关的胆固醇浓度,从而提供脂蛋白谱。此外,可通过软件中包含的算法将胆固醇浓度进一步转换为 apoB 的等效浓度。梁纯子等^[5]研究得出 VAP 血脂分型检测在传统实验室血脂项目的基础上增加了特殊内容,使患者脂质数据更有临床操作性、耗时更少、信息更丰富,避免了多重检测带来的经济负担和时间压力。该系统经历了各种优化,并由 Atherotech 在 2016 年对其进行了优化^[3],VAP-II-fingerstick®(VAP-II-fs)可通过少量的血浆(18 μL)检测出患者的脂蛋白谱,而 VAP-II 是具有更好分辨率和性能的系统,但用该方法检测需要更多的患者血浆。VAP 在我国临床应用需要多地区、多中心的研究数据支撑。

3 核磁共振波谱法

核磁共振波谱(nuclear magnetic resonance, NMR)是一种能够分析脂蛋白颗粒的新型检测技术,其原理主要取决于不同脂蛋白颗粒中脂质的甲基部分以不同的频率共振,因此脂蛋白可以通过将核心脂质的甲基信号分解为单个信号,或在整个甲基包膜上使用统计方法估算脂质浓度来定量。当前已有 3 种方法使用 NMR 对脂蛋白颗粒进行检测。Otvos^[6-7]所描述的方法提供了主要脂蛋白类型(VLDL、LDL 和 HDL)的大小和颗粒数以及 9 种脂蛋白亚类的颗粒数,此方法基于某种算法将其 NMR 甲基信号与血清或血浆样品中脂蛋白的 NMR 信号进行拟合,通过透射电子显微镜和梯度凝胶电泳确定分离的脂蛋白部分的粒度。Kaess 等^[8]描述的第 2 种方法通过磁场梯度强度和温度来测量样品的 12 种脂蛋白亚类。Ala-Korpela 等^[9-11]描述的第 3 种方法估计主要脂蛋白类别的脂质含量、大小和颗粒数量,以及 14 种脂蛋白亚类的颗粒数量并且通过高效液相色谱获得的颗粒粒径。目前对将基于 NMR 的高级脂蛋白检测方法引入临床实践仍存在一些争议,作为 NMR 方法的替代方法,研究人员开发出了一种基于二维扩散有序 1H NMR 光谱(2D diffusion-ordered 1H NMR spectroscopy, DOSY)用来检测脂蛋白颗粒的新方法,也被称作 Liposcale 测试^[12-13]。NMR 需要训练有素的技术人员和精密的仪器,脂蛋白的定量准确性很大程度上取决于用于信号解卷积的处理软件,该软件使用实验库来处理高度复杂的光谱,目前没有找到有关建立处理算法的方式或系统校准的数据,结果的溯源性仍然不清楚;但脂蛋白谱检测自动化、更少的分离步骤、检测时间缩短和患者负担得起的测定方法使其逐渐在临床试验中广泛得到使用。

4 凝胶渗透高效液相色谱法

凝胶渗透高效液相色谱法(gel permeation-high-performance liquid chromatography, GP-HPLC)由 Hara 等^[14]于 1980 年首次报道,近来,该方法被用于常规和高通量脂蛋白谱测量,涉及自动数据处理的 GP-HPLC 系统被称为 LipoSE-ARCH®,该系统已被全球许多研究人员所使用,发表文章近 300 多篇^[15-16]。GP-HPLC 根据尺寸排阻色谱(size exclusion chromatography, SEC)的原理按照其水合粒径的不同而分离脂蛋白。Oda 等^[17]和 Yanai 等^[18]建立了一种新方法,即阴离子交换高效液相色谱法(anion-exchange high-performance

liquid chromatography, AEX-HPLC),并评估了 AEX-HPLC 在冠心病、糖尿病和肾病患者以及健康志愿者中的临床有效性,结果表明通过 AEX-HPLC 测定的 IDL 和 VLDL 中的胆固醇水平可能是冠心病或糖尿病的危险生物标志物。AEX-HPLC 可以代替超速离心法分离人血清中 HDL、LDL、IDL、VLDL 等 5 种脂蛋白馏分。该方法还于 2014 年在日本的公共医疗保险中被批准用于临床。HPLC 作为脂蛋白分析的工具,其优点如下:(1)可以从色谱柱中回收样品中的相应成分,并对其进行重复分析;(2)分离过程中样品的降解或变性比超速离心等其他分离技术更低;(3)色谱图的分析简单、容易,因为其分离的基础仅基于粒径。

5 同位素稀释质谱法

同位素稀释质谱法(isotope-dilution mass spectrometry, ID/MS)是临床生物化学检验中许多生物标志物尤其是 TG 和 TC 测量的高级参考方法。通过液相色谱 ID/MS(liquid chromatography ID/MS, LC-ID/MS)对载脂蛋白进行定量分析由 Barr 等^[19]在 1990 年代末首次报道,并在接下来的几年中进一步应用于检测其他载脂蛋白(apoA-I、apoB、apoC 和 apoE)。通过 LC-ID/MS 对载脂蛋白进行绝对定量分析时,需要依靠胰蛋白酶消化血清载脂蛋白,消化后针对每种主要的载脂蛋白鉴定载脂蛋白特异的胰蛋白酶肽,并选择其中一些肽进行 ID/MS 定量,ID/MS 定量使用带有¹³C、¹⁵N 或²H 作为内标(internal standards, IS)的合成标记实体来加标样品。鉴于该方法的高精度、良好可比性、可溯源性以及高通量等特点,LC-ID/MS 已成为用于血清中 apoB 和 apoA 等脂蛋白定量候选参考方法之一。但是由于这种方法需要使用昂贵的试剂以及专业的技术人员和精密仪器,因此目前主要用于科研中,尚未应用到临床实验室进行常规检查^[20]。

6 高级脂蛋白检测方法可比性

对于高级脂蛋白检测方法可比性的讨论,主要集中于方法之间缺乏标准化,以及每种方法所涉及的测量原理不同。一些方法根据其密度分离脂蛋白,一些根据其大小分离脂蛋白,有些根据其脂质或蛋白质含量分离脂蛋白;类似地,一些方法通过其载脂蛋白成分检测脂蛋白,而另一些方法检测完整的脂蛋白;尽管高级脂蛋白检测方法都旨在测量脂蛋白及其亚类的构成情况,但分离技术和操作条件不同,用这些方法获得结果的可比性和等效性不足;迄今为止,尚无直接比较所有高级脂蛋白检测方法检测结果的报道,大多数仅通过一对一比较,少有研究直接比较几种高级脂蛋白检测方法。2006 年 Ensign 等^[21]使用 VAP、NMR、梯度凝胶电泳(gradient gel electrophoresis, GGE)和管式凝胶电泳(tube gel electrophoresis, TGE)基于 LDL 大小测量结果对不同的患者表型分类,结果表明,在 39 个患者样本中,只有 3 个被归类为具有相同的 LDL 表型,即几种方法一致性不到 8%。2011 年 Grundy 等^[22]在 SAFARI(辛伐他汀联合非诺贝特治疗高脂血症)队列研究中通过 VAP、NMR 和免疫比浊法测量 apoB 浓度与非 HDL-C 并进行比较,最终结果显示每种方法得出的 apoB 浓度一致性较差。

在过去的几十年中,研究工作集中在确定新的生物标志物以更好地预测患者发生 CVD 的风险上^[23]。据报道,大量

临床和前瞻性研究旨在证明这些疾病与某一种特定生物标志物的相关性,但是这些研究结果往往受到质疑,特别是关于 apoB 和 LDL 颗粒浓度测量之间的相关性^[24]。许多专业组织发布了有关 CVD 风险管理的指南^[25-26],其中关于高级脂蛋白检测方法尤其是 apoB 浓度测量的争论仍然存在。实际上,最新指南并不一定建议对患者进行风险管理时应使用高级脂蛋白检测方法,并且大多数与高级脂蛋白检测方法相关的综述都表示没有足够的证据来促进高级脂蛋白检测方法在常规中的使用。因此,除非当出现特殊的血脂异常时,大多数监管机构都不建议使用高级脂蛋白检测方法。

7 总结

临床实验室对疾病诊断的作用正在不断发展,以向临床医生提供更多信息,评估 CVD 风险并更有效地进行靶向治

疗。在常规检测中,广泛采用 DGUC、免疫比浊法(immunonephelometry, IN)或 ELISA 等进行脂蛋白定量。全自动性、较低的成本、可接受的精度以及高通量分析等优点使它们成为常规脂蛋白检测的方法;然而,对脂蛋白谱的高度关注导致了许多其他高级脂蛋白检测方法的发展,这些新方法依赖于各种分离原理,这些原理利用脂蛋白的不同特征来建立脂蛋白谱,例如它们的脂质含量、载脂蛋白含量或大小。尽管目前已有许多方法都用于检测脂蛋白谱(见表 2),但由于各种方法在检测脂蛋白亚组分中缺乏统一标准、数据相关性和结果可比性,在一定程度上可能会导致不同的临床诊断和医疗决策,对研究脂蛋白亚组分与 CVD 等相关疾病之间的关系产生影响。为了解决这一问题,我们应在脂蛋白分离检测方法以及检测指标标准化等方面做出更多努力,为评估脂蛋白亚组分在 CVD 等疾病发病风险和预后中提供帮助。

表 2 高级脂蛋白检测检测方法的优缺点比较

方法	检测原理	优点	缺点
DGUC	颗粒密度	脂蛋白分离的金标准	高的离子强度、离心力、剪切力和盐浓度可能破坏颗粒的最小结构
VAP	颗粒密度	快速且可在全血中使用,只有一个预定义的窄浓度范围	一些脂蛋白亚组分无法分离
NMR	脂质核的甲基 ¹ H-NMR 共振频率	无需事先进行样品处理,适用于高工作量,有效地定量脂蛋白亚组分	无法提供某些脂蛋白的化学成分信息,并非以相同的准确度测量所有脂蛋白类别,HDL-C 以外的 CVD 风险预测的证据有限
HPLC	颗粒大小	快速、准确、可重复的分离,不影响脂蛋白组成	更多应用于专业或临床实验室,清蛋白与 HDL 组分的共洗脱
ES-DMA	脂蛋白电迁移率直径	短时间内检测出完整脂蛋白谱,且无需进行数据反卷积	仪器昂贵,需专业技术人员,不适用于一般的临床实验室
ID/MS	载脂蛋白含量	高精度、良好可比性、可溯源性以及高通量	仪器昂贵,需专业技术人员,目前主要用于科研中
毛细管等速电泳	电泳电荷分离	易于自动化、监控和快速分离	昂贵,有限的高通量分析
梯度凝胶电泳	颗粒大小	灵敏的量化脂蛋白亚组分大小分布	非制备性技术
蛋白质组学	蛋白含量	识别 HDL 蛋白质和多肽的多样性	技术尚未标准化,分析缺乏一致性
脂质组学	脂质种类含量	识别 HDL 蛋白质和多肽的多样性	技术尚未标准化,分析缺乏一致性

8 参考文献

[1] Kaufman SL, Kuchumov AR, Kazakevich M, *et al.* Analysis of a 3.6-MDa hexagonal bilayer hemoglobin from *Lumbricus terrestris* using a gas-phase electrophoretic mobility molecular analyzer[J]. *Anal Biochem*, 1998, 259(2): 195-202.

[2] Caulfield MP, Li S, Lee G, *et al.* Direct determination of lipoprotein particle sizes and concentrations by ion mobility analysis[J]. *Clin Chem*, 2008, 54(8): 1307-1316.

[3] Clouet-Foraison N, Gaie-Levrel F, Gillery P, *et al.* Advanced lipoprotein testing for cardiovascular diseases risk assessment: a review of the novel approaches in lipoprotein profiling[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2017, 55(10): 1453-1464.

[4] Chung BH, Segrest JP, Cone JT, *et al.* High resolution plasma lipoprotein cholesterol profiles by a rapid, high volume semi-automated method[J]. *J Lipid Res*, 1981, 22(6): 1003-1014.

[5] 梁纯子, 朱满, 涂建成. VAP 检测血浆脂蛋白亚组分的新进展及应用分析[J]. *检验医学*, 2019, 34(1): 76-81.

[6] Otvos JD. Measurement of lipoprotein subclass profiles by nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. *Clin Lab*, 2002, 48(3-4): 171-180.

[7] Otvos JD. Measurement of triglyceride-rich lipoproteins by nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. *Clin Cardiol*, 1999, 22(6 Suppl): I21-I27.

[8] Kaess B, Fischer M, Baessler A, *et al.* The lipoprotein subfraction profile: heritability and identification of quantitative trait loci[J]. *J Lipid Res*, 2008, 49(4): 715-723.

[9] Ala-Korpela M, Pentikainen MO, Korhonen A, *et al.* Detection of low density lipoprotein particle fusion by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. *J Lipid Res*, 1998, 39(8): 1705-1712.

[10] Ala-Korpela M, Hiltunen Y, Bell JD. Quantification of biomedical NMR data using artificial neural network analysis: lipoprotein lipid profiles from ¹H NMR data of human plasma[J]. *NMR Biomed*, 1995, 8(6): 235-244.

[11] Ala-Korpela M, Hiltunen Y, Jokisaari J, *et al.* A comparative study of ¹H NMR lineshape fitting analyses and biochemical lipid analyses of the lipoprotein fractions VLDL, LDL and HDL, and total human blood plasma[J]. *NMR Biomed*, 1993, 6(3): 225-233.

[12] Mallol R, Amigo N, Rodriguez MA, *et al.* Liposcale: a novel advanced lipoprotein test based on 2D diffusion-ordered ¹H NMR spectroscopy[J]. *J Lipid Res*, 2015, 56(3): 737-746.

[13] Mallol R, Rodriguez MA, Heras M, *et al.* Particle size measurement of lipoprotein fractions using diffusion-ordered NMR spectroscopy[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 402(7): 2407-2415.

[14] Hara I, Okazaki M, Ohno Y. Rapid analysis of cholesterol of high

- density lipoprotein and low density lipoprotein in human serum by high performance liquid chromatography[J]. J Biochem, 1980, 87(6): 1863-1865.
- [15] Okazaki M, Ohno Y, Hara I. Rapid method for the quantitation of cholesterol in human serum lipoproteins by high performance liquid chromatography[J]. J Biochem, 1981, 89(3): 879-887.
- [16] 李卿, 居漪, 孙贺伟, 等. 液相色谱串联质谱法检测血清载脂蛋白 C 的酶解效率[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(10): 747-750.
- [17] Oda H, Mori A, Hirowatari Y, *et al.* Cholesterol concentrations in lipoprotein fractions separated by anion-exchange-high-performance liquid chromatography in healthy dogs and dogs with hypercholesterolemia[J]. Res Vet Sci, 2017, 114: 163-169.
- [18] Yanai H, Hirowatari Y, Ito K, *et al.* Understanding of diabetic dyslipidemia by using the anion-exchange high performance liquid chromatography data[J]. J Clin Med Res, 2016, 8(5): 424-426.
- [19] Barr JR, Maggio VL, Patterson DJ, *et al.* Isotope dilution--mass spectrometric quantification of specific proteins: model application with apolipoprotein A-I[J]. Clin Chem, 1996, 42(10): 1676-1682.
- [20] 李卿, 居漪, 孙贺伟, 等. ID-LC-MS/MS 候选参考方法测定血清载脂蛋白 A-I 和 B 的优化[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(12): 899-902.
- [21] Ensign W, Hill N, Heward CB. Disparate LDL phenotypic classification among 4 different methods assessing LDL particle characteristics[J]. Clin Chem, 2006, 52(9): 1722-1727.
- [22] Grundy SM, Vega GL, Tomassini JE, *et al.* Comparisons of apolipoprotein B levels estimated by immunoassay, nuclear magnetic resonance, vertical auto profile, and non-high-density lipoprotein cholesterol in subjects with hypertriglyceridemia (SAFARI Trial)[J]. Am J Cardiol, 2011, 108(1): 40-46.
- [23] Bress AP, Colantonio LD, Cooper RS, *et al.* Potential cardiovascular disease events prevented with adoption of the 2017 American College of Cardiology/American Heart Association Blood Pressure Guideline[J]. Circulation, 2019, 139(1): 24-36.
- [24] 钱迎芬, 沈东华, 张敏健, 等. 一种脂蛋白磷脂酶 A2 (Lp-PLA2) 活性检测方法的性能验证[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(9): 714-716.
- [25] Joint Task Force for Guideline on the Assessment and Management of Cardiovascular Risk in China. Guideline on the assessment and management of cardiovascular risk in China[J]. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi, 2019, 53(1): 13-35.
- [26] 中国心血管病风险评估和管理指南编写联合委员会. 中国心血管病风险评估和管理指南[J]. 中国循环杂志, 2019, 34(1): 4-28.

(收稿日期: 2019-12-12)
(本文编辑: 王海燕)

• 读者 • 作者 • 编者 •

临床检验杂志网站及远程稿件处理系统开通

为方便读者投稿、专家审稿并加快杂志出版周期及提升办刊质量,本刊开通网站和远程稿件处理系统。系统包括作者远程投稿系统、专家远程审稿系统、编辑在线办公系统、网上期刊发行系统及读者订阅系统等。为方便作者、读者和审稿专家熟悉使用本系统,现将有关注意事项告知如下:

1. 第一次使用本系统的作者登录本刊网站(www.lcyjzz.com)后点击用户登录菜单下的作者投稿进行注册,注册时请按要求逐项填写完整,所填内容必须真实。注册完成后即可在线投稿,系统在作者投稿成功后自动将相关信息发至作者指定邮箱。一次注册,长期有效。请务必注意不要重复注册。
2. 投稿后,作者以注册时设定的用户名(E-mail)和密码登录投稿系统,可随时了解稿件的编审进程。
3. 编委和审稿专家可以用同一用户名登录审稿系统或以作者身份投稿。
4. 在使用过程中如遇问题或有好建议请和我们联系,联系电话:025-83620683;E-mail:editor@lcjyzz.com 或 lcjyzz@163.com。

《临床检验杂志》编辑部