

## 血清脂蛋白亚组分和脂蛋白 (a) 分离技术的研究进展

邹继华<sup>1</sup>, 张 维<sup>1</sup>, 沈 敏<sup>1</sup>, 张 曼<sup>2</sup>, 屠敏敏<sup>1</sup>, 王惠民<sup>3</sup>, 周厚清<sup>4</sup>

(1. 美康生物参考实验室, 浙江 宁波 315104; 2. 首都医科大学附属北京世纪坛医院

检验科, 北京 100038; 3. 南通大学附属医院检验科, 江苏 南通 226019;

4. 深圳市心血管病研究所临床研究及流行病学室 中国医学科学院阜外

医院深圳医院检验科, 广东 深圳 100037)

**摘要:** 心血管疾病 (CVD) 是全世界死亡事件的主要原因之一。血清脂蛋白是由大小、组成及功能极其不均一的颗粒组成的集合体, 具有高度异质性。血清脂蛋白亚组分和脂蛋白 (a) [Lp (a)] 被认为是评估心血管疾病的重要风险因子, 其临床意义显著优于传统的低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 和高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)。在临床实践中, 准确和标准化的实验室检测数据对于血脂异常和心血管疾病预防的管理是必不可缺少的。因此, 为更好地实现脂蛋白亚组分和 Lp (a) 的溯源, 统一脂蛋白亚组分分类和实现 Lp (a) 的完全分离较为关键。文章旨在对脂蛋白亚类和 Lp (a) 的分离技术加以归纳及论述。

**关键词:** 脂蛋白; 亚组分; 脂蛋白 (a); 分离技术

**Research progress in the separation of serum lipoprotein subfractions and lipoprotein (a)** ZOU Jihua<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>1</sup>, SHEN Min<sup>1</sup>, ZHANG Man<sup>2</sup>, TU Minmin<sup>1</sup>, WANG Huimin<sup>3</sup>, ZHOU Houqing<sup>4</sup>. (1. Reference Laboratory, Medical System Biotechnology Co., Ltd., Ningbo 315104, Zhejiang, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226019, Jiangsu, China; 4. Department of Clinical Research and Epidemiology, Shenzhen Institute for Cardiovascular Disease, Department of Clinical Laboratory, Fuwai Hospital, Shenzhen 100037, Guangdong, China)

**Abstract:** Cardiovascular disease (CVD) still persists as the leading cause of morbidity and mortality all over the world. Serum lipoproteins are highly heterogeneous lipoproteins, which are composed of the particles that have different sizes, compositions and functions. Thus, lipoprotein subfractions and lipoprotein (a) [Lp (a)] are considered as important CVD risk factors. The clinical significance of measuring lipoprotein subfractions and Lp (a) is greater than traditional low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) determinations. In clinical practice, accurate and standardized laboratory diagnosis is crucial for the management of dyslipidemia and CVD prevention. Unifying the classification of lipoprotein subfractions and achieving complete separation of Lp (a) in order to achieve good traceability of lipoprotein subfractions and Lp (a) is essential. This review will summarize and discuss the separation technology of lipoprotein subfractions and Lp (a).

**Key words:** Serum lipoprotein; Subfraction; Lipoprotein (a); Separation technology

心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 是循环系统疾病的统称, 主要包括心脏、动脉、静脉、毛细管等部位的疾病, 一般与动脉粥样硬化密切相关。全球每年大约有

**基金项目:** 国家重点研发计划 (SQ2019YFF020064); 深圳市医疗卫生三名工程 (SZSM201811096)

**作者简介:** 邹继华, 男, 1979年生, 硕士, 高级工程师, 主要从事体外诊断试剂量值溯源及研发工作。

张 维, 女, 1994年生, 硕士, 工程师, 主要从事体外诊断试剂量值溯源及研发工作。

邹继华和张维对本研究具有同等贡献, 并列第一作者。

**通信作者:** 周厚清, E-mail: 307483820@qq.com。

1 790万人死于CVD, 占全世界死亡人数的31%, 85%的CVD死亡事件由心脏病和卒中引起<sup>[1]</sup>。

《中国心血管病报告2018》<sup>[2]</sup>中指出, 我国CVD患病率及死亡率仍处于上升阶段, 并居各种疾病死亡率的首位, 占居民疾病死亡构成的40%以上。因此, 对CVD高危人群进行干预可降低CVD发生率。血脂异常是CVD的重要风险因素之一。据2002中国健康与营养调查(China Health and Nutrition Survey, CHNS)<sup>[3]</sup>、中国慢性肾病工作组调查<sup>[4]</sup>、2011 CHNS<sup>[5]</sup>及《中国居民营养与慢性病状况报告(2015年)》<sup>[6]</sup>显示, 2002—2012年, 我国成人血脂异常率从18.60%上升至40.40%。因此, 开展血脂检查及测量结果的标准化对于全面防治CVD意义重大。

血液中的脂类基本上会与蛋白质结合成为脂蛋白。一般将血清脂蛋白分为低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)、中间密度脂蛋白(intermediate-density lipoprotein, IDL)、极低密度脂蛋白(very low-density lipoprotein, VLDL)和乳糜微粒(chylomicron, CM)。美国胆固醇教育计划将血清低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)含量作为CVD主要的治疗效果评价指标之一。有研究发现, HDL和LDL亚组分具有不同的临床意义<sup>[7-8]</sup>。因此, 如何提高脂蛋白亚组分的分离技术及测量方法的标准化也显得非常重要。脂蛋白(a)[lipoprotein(a), Lp(a)]是CVD的独立危险因素, 其蛋白与脂质结合的特殊性使其在人群中分布的异质性很大, 且具有遗传倾向。通过分析各脂蛋白亚组分和Lp(a), 并结合传统的血脂检测, 可更精准地评估CVD风险, 预测CVD的发生概率, 有利于及早干预, 降低CVD的患病率及死亡率。

## 1 LDL亚组分

LDL亚组分主要是依据颗粒粒径、密度以及阻滞系数进行分型。

### 1.1 根据颗粒粒径进行LDL分型

根据颗粒粒径进行分型的分离技术主要有

凝胶电泳(gel electrophoresis, GE)、核磁共振波谱(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)法和离子淌度(ion mobility, IM)法。HOEFNER等<sup>[9]</sup>通过采用NMR法测定颗粒粒径对LDL进行分类, 共分出3种不同类型的LDL亚组分, A类粒径为20.6~22.0 nm, 中间类型粒径为20.4~20.5 nm, B类粒径为19.0~20.3 nm。DAVY等<sup>[10]</sup>将同一血浆样本分别送往2家实验室进行分析, 其中1家实验室采用GE法将LDL分为3类, A类粒径为26.30~28.50 nm, AB类粒径为25.75~26.34 nm, B类粒径为<25.74 nm; 另1家实验室采用NMR法将LDL分为2类, A类粒径为20.6~22.0 nm, B类粒径为≤20.5 nm。梯度凝胶电泳(gradient gel electrophoresis, GGE)检测的LDL颗粒大小与NMR法平均相差5.38 nm(NMR法测出的颗粒较小), 但是该差值在实践中无法统一应用, 因为随着LDL粒径的增加, 该差值会变得更大。从临床角度来看, 观察到B类的一致性是中等的, 这意味着在重要亚组分的个体风险评估中, GGE和NMR法不可互换, 需要与前瞻性研究进行比较, 以确定哪种方法在心血管风险评估中更好, 但迄今为止尚未见此报道。HIRANY等<sup>[11]</sup>通过聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳参考方法(polyacrylamide gradient gel electrophoresis reference method, PGGE-REF)将LDL分为3类: 小粒径为>25.8 nm, 中粒径为25.8~26.3 nm, 大粒径为>26.3 nm。CAULFIELD等<sup>[12]</sup>用超速离心结合IM法得到4种LDL亚组分, 分别为LDL-I、LDL-II、LDL-III和LDL-IV, 其粒径分别为21.99~23.80、21.10~21.99、20.17~21.10和18.00~20.17 nm。KRAUSS等<sup>[13]</sup>采用IM法将LDL分为7种亚组分, LDL1的粒径为22.46~23.32 nm, LDL2a的粒径为22.20~22.45 nm, LDL2b的粒径为21.41~22.19 nm, LDL3a的粒径为20.82~21.40 nm, LDL3b的粒径为20.49~20.81 nm, LDL4a的粒径为19.90~20.48 nm, LDL4b的粒径为19.00~19.89 nm。NMR法直接测定LDL颗粒数, GE法测定的是载脂蛋白B(apolipoprotein B, apo B)含量。由于每个LDL均带有apo B, 因此虽然apo B含量和LDL颗粒数2个变量并不相同, 但相互之间有一定的关联。另外, VLDL和IDL也携带着

apo B。有研究结果显示,对于同一批的27个样本,采用GE法根据apo B浓度(>1 200 mg/L)可确定6例样本处于高风险状态,而采用NMR法,根据LDL颗粒数(1 300~1 599 nmol/L)可确定20例样本处于高风险状态<sup>[10]</sup>,因此使用LDL颗粒数这一参数可以识别更多的高风险个体,有利于临床进行干预。由此可见,使用LDL颗粒数来评估CVD风险更为可靠。

### 1.2 根据颗粒密度进行LDL分型

根据颗粒密度进行LDL分型的分离技术主要是超速离心法。DAVIES等<sup>[14]</sup>用碘克沙醇作为密度液,通过密度梯度超速离心(density gradient ultracentrifugation, DGUC)将LDL分为4类,分别为LDL-I、LDL-II、LDL-III和LDL-IV,密度依次是1.022~1.025、1.025~1.028、1.028~1.036和>1.036 kg/L。GEISS等<sup>[15]</sup>采用DGUC将LDL分为7种亚型,LDL-1和LDL-2为大而轻低密度脂蛋白(large buoyant low-density lipoprotein, lb-LDL),LDL-3和LDL-4为中间密度LDL,LDL-5、LDL-6和LDL-7为小而密低密度脂蛋白(small and dense low-density lipoprotein, sd-LDL),并证实sd-LDL的密度为1.044~1.060 kg/L。WILLIAMS等<sup>[16]</sup>采用垂直梯度离心(vertical auto profile, VAP)得到4种LDL亚组分(LDL-1~LDL-4)。尽管各个文献中LDL亚组分的种类有多有少,但总体上,根据颗粒密度LDL可分为3种:lb-LDL(1.020~1.025 kg/L)、中间密度LDL(1.030~1.040 kg/L)和sd-LDL(1.041~1.066 kg/L)。

### 1.3 根据颗粒阻滞系数(retardation factor, Rf)进行LDL分型

Rf是LDL亚组分谱带相对于VLDL谱带和HDL谱带的移动距离之比,计算公式为: $Rf = \text{VLDL与LDL亚组分之间的距离} / \text{VLDL与HDL之间的距离}$ 。HIRANY等<sup>[11]</sup>采用管状聚丙烯酰胺凝胶电泳使LDL亚组分谱带在VLDL和HDL谱带之间迁移,将VLDL带(迁移最慢)的Rf值标记为0, HDL带(迁移最快)的Rf值标记为1,根据Rf值将LDL分为大LDL、中LDL和小LDL, Rf值分别为<0.38、0.38~0.40和>0.40。HOEFNER等<sup>[9]</sup>使用平均Rf值,通过软

件计算LDL亚组分分数(low-density lipoprotein subfraction score, LDLSF),根据LDLSF将LDL分为3类, A类LDL<5.5, B类LDL>8.5, 中间类型LDL为5.5~8.5。

## 2 HDL亚组分

HDL亚组分主要依据颗粒粒径和密度进行分型。

### 2.1 根据颗粒粒径的HDL分型

通过GGE可将HDL按粒径分为HDL2b(12.9~9.8 nm)、HDL2a(9.7~8.9 nm)、HDL3a(8.8~8.3 nm)、HDL3b(8.2~7.9 nm)和HDL3c(7.8~7.2 nm)。通过二维凝胶电泳可将HDL分为 $\alpha$ -1(11.2~10.8 nm)、 $\alpha$ -2(9.4~9.0 nm)、 $\alpha$ -3(8.5~7.6 nm)、 $\alpha$ -4(7.5~7.0 nm)和Pre- $\beta$ -1(6.0~5.0 nm)。通过NMR检测出的HDL分类与GGE分类方法相同,都可根据粒径大小分为5类,分别为HDL-1~HDL-5,与GGE分离的5类HDL密切相关。采用IM法可将HDL分为2类,分别是HDL2b(14.5~10.6 nm)和HDL2a+3(10.5~7.65 nm)。

### 2.2 根据颗粒密度的HDL分型

采用DGUC可将HDL按密度不同分为HDL2b(1.063~1.087 g/mL)、HDL2a(1.088~1.109 g/mL)、HDL3a(1.110~1.128 g/mL)、HDL3b(1.129~1.153 g/mL)和HDL3c(1.154~1.170 g/mL)。除此之外,正常人血浆中HDL还可分为HDL2(1.063~1.124 g/mL)和HDL3(1.125~1.210 g/mL), HDL1仅存在于高胆固醇膳食诱导后<sup>[17]</sup>。

## 3 LDL与HDL亚组分的分离技术

### 3.1 沉淀法

1984年, LUNDBERG等<sup>[18]</sup>提出利用硫酸葡聚糖和聚乙二醇6000等作为沉淀剂,通过调节溶液浓度和pH值,将HDL2和HDL3进行分离,该法方便、省力、无需专用设备。但沉淀法会受高水平三酰甘油(triglyceride, TG)的影响, apo B颗粒不能完全被沉淀,影响了分离效果,因此沉淀法已逐渐被淘汰。

### 3.2 均相检测法

ITO等<sup>[19]</sup>建立了快速、有效、全自动的HDL3-C测定方法。(1)第1步。鞘磷脂酶

优先与富三酰甘油脂蛋白 (triglyceride-rich lipoprotein, TRL) 和 LDL 反应, 并分解它们。这些脂蛋白释放的胆固醇通过胆固醇酯酶/氧化酶生成过氧化氢。过氧化氢酶将过氧化氢转化为水和氧气, 因没有生色源, 所以产生非生色产物。(2) 第 2 步。聚氧乙烯苯乙烯化的苯醚衍生物与 HDL3 选择性地反应, 然后将 HDL3-C 作为标准过氧化物酶系统中的显色物进行测定。反应混合物中的过氧化氢酶被叠氮化钠抑制。总 HDL-C 用均相法测定, 通过总 HDL-C 与测得的 HDL3-C 的差值来估算 HDL2-C。该法与超速离心法测得的 HDL3-C 和 HDL2-C 结果有极好的相关性 ( $r^2$  值分别为 0.848 和 0.982)。均相检测法由于测定快速, 一般只应用于临床常规检测。另外, 由于不同均相检测法试剂的变异性较大, 因此准确性不足。

### 3.3 超速离心法

DGUC 是根据 HDL 和 LDL 颗粒浮力密度的不同, 经不同密度梯度氯化钠溶液超速离心后, 将 HDL 和 LDL 各亚组分依次转移至各密度区域。DGUC 可根据实际需求调整密度梯度, 从而得到不同的亚组分。连续的 DGUC 可同时将脂蛋白各组分及亚组分分离, 是分离 HDL 和 LDL 亚组分的“金标准”, 但所需样本量较大, 分离时间长, 成本较高, 并且由于 Lp(a) 密度和 sd-LDL 密度存在交叉区, 该法分离得到的 LDL 亚组分常混有 Lp(a)。DONG 等<sup>[20]</sup>在密度  $>1.044$  g/mL 的分离溶液中加入巯基乙醇, 成功消除了 Lp(a) 的影响, 从而实现了超速离心法对 HDL 亚组分、LDL 亚组分及 Lp(a) 的分离。

### 3.4 VAP

VAP 是利用垂直转头密度梯度离心脂蛋白, 经 VAP-II 在线胆固醇检测仪 (简称 VAP-II) 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。VAP-II 使用窄口聚四氟乙烯线圈作为反应器, 代替了上一代 VAP 仪器中的 Technicon 自动分析仪, 避免了因气泡导致的分析物流分段。与耗时 10 h 的传统超速离心法相比, VAP 将离心时间缩短至 1 h。VAP 使用的是一个垂直转子, 其中脂蛋白在离心管较短的水平轴上分离, 且分辨率较高。WILLIAMS 等<sup>[16]</sup>采用 VAP-II 得到 4 种

LDL 亚组分 (LDL-1 ~ LDL-4), LDL 亚组分中的 sd-LDL 与 CVD 的相关性最强, 并且独立于传统血脂指标。

VAP 血脂分型在传统实验室血脂项目的基础上增加了特殊内容, 临床操作性更强、耗时更少、信息更丰富, 避免了多次检测带来的成本浪费和时间压力。目前, 我国关于 VAP 的血脂检测结果在 CVD 中的应用的研究较少, 其分区、分型和计算是否能真实反映该地区人群血脂紊乱的类型和状态仍需进一步研究。VAP 的临床应用价值和体系还需要多地区、多中心的研究数据来支撑。另外, 脂蛋白亚组分测量参考系统也急需建立, 以进一步提高 VAP 检测的准确度。

### 3.5 GE 法

3.5.1 GGE GGE 是一种操作简单的测定 HDL 和 LDL 亚组分的方法。利用分子筛和电荷效应分离 HDL 和 LDL 亚组分, 并根据所占总面积的比例计算出各组分水平, 只需微量血清就能检测, 且可同时检测多个样本, 但分离时间超过 24 h, 且特异性较差, 无法对 HDL 和 LDL 亚组分进行定量分析。AUSTIN 等<sup>[21]</sup>用 2% ~ 16% 的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳将 LDL 分为 A 型和 B 型, 而 WILLIAMS 等<sup>[16]</sup>用 2% ~ 14% 的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳得到 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。

3.5.2 管状凝胶电泳法 (tube gel electrophoresis, TGE) 美国 Quantimetrix 公司研发的 Lipoprint 脂蛋白分析系统采用高分辨率的 3% 聚丙烯酰胺凝胶管, 可将 LDL 分为 7 种亚组分。其原理是将 25  $\mu$ L 样本与 200  $\mu$ L 液体加载凝胶 (含苏丹黑 B 染料, 用于脂蛋白染色) 混合, 将所得混合物添加到预制的 3% 聚丙烯酰胺凝胶管的顶部, 在室温下光聚合 30 min 后, 将样本电泳 1 h (每凝胶管 3 mA)。电泳后, 在进行光密度测定之前, 将试管在黑暗环境中静置 1 h。添加黑暗环境孵育的作用是增加条带在扫描前的均匀性。使用 Helena EDC 系统 (美国 Helena Laboratories 公司) 在 610 nm 处进行光密度测定。Helena EDC 系统添加了 12 管固定装置, 可在扫描过程中固定凝胶管, 显著提高了凝胶管扫描的一致性。

使用配套的软件分析Helena EDC系统的原始数据和不同LDL亚组分的电泳扫描图样,以计算LDL分级分数并指定表型(A型、B型或中间型)。Lipoprint系统已通过了美国食品与药品监督管理局认证,可用于LDL临床检测,具有良好的应用前景。

### 3.6 毛细管电泳法 (capillary electrophoresis, CE)

3.6.1 毛细管等速电泳 (capillary isokinetic electrophoresis, CITP) CITP是采用不连续介质的电泳技术,即缓冲液由前导电解质 (leading electrolyte, LE) 和终末电解质 (terminating electrolyte, TE) 组成,样本成分的迁移率介于LE和TE之间,达到平衡后各组分迁移速度与LE相同。CITP的特点是具有浓缩效应,可与其他模式联用,以达到柱上浓缩的目的。MORENO-GORDALIZA等<sup>[22]</sup>建立的分离LDL亚组分的CITP,可在pH值为8.8~9.4的梯度下,在9.5 min内完成分析,得到6个LDL亚组分峰。有研究结果显示,CITP可在7 min内将脂蛋白分成9条区带,其中HDL被分成3个亚类[快速迁移带,被称为 $\alpha$ -HDL,主要含载脂蛋白A1 (apolipoprotein A1, apo A1) 和磷脂酰胆碱;中间迁移带,富含胆固醇,蛋白质成分为载脂蛋白A2 (apolipoprotein A2, apo A2)、载脂蛋白E (apolipoprotein E, apo E) 和载脂蛋白C (apolipoprotein C, apo C);慢速迁移带,被称为pre- $\beta$ -HDL,含apo A1和载脂蛋白A4 (apolipoprotein A4, apo A4)]<sup>[23]</sup>。该法目前尚处于研究阶段,还未商品化。

3.6.2 微流控芯片电泳 (microfluidics electrophoresis, ME) ME是在传统CE的基础上发展而来的。该方法可在石英、玻璃、塑料等材质的基片上刻蚀微管道网络,在一块几平方厘米的基片上完成电泳分离。ME可方便地进行小体积 (nL) 进样、分离等操作,实现快速、高效分离。2002年,WEILLER等<sup>[24]</sup>首次采用ME分析血清脂蛋白,但LDL和HDL未实现基线分离,重复性较差。2005年,PING等<sup>[25]</sup>利用聚甲基丙烯酸甲酯微芯片分析HDL标准品,HDL2和HDL3被初步分离;钱晶晶等<sup>[26]</sup>采用十二烷基硫酸钠同时修饰HDL和微管道,可在

4 min内实现血清HDL2和HDL3的基线分离。他们同时对多例临床样本进行分析,发现健康体检者和CHD患者的HDL2区带有明显差异。WANG等<sup>[27]</sup>在刻蚀有微泳道的小型基片上实现了LDL亚组分的分离检测,在该检测系统上向样本中添加直径为5 nm、浓度为80 nmol/L的纳米金可明显提高LDL亚组分的分辨率。

### 3.7 NMR

NMR根据HDL和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,利用甲基团的不同信号区分各亚组分,以NMR甲基团振幅测定亚组分浓度。MATYUS等<sup>[28]</sup>采用NMR对LDL颗粒数目进行检测,得到3种亚组分,批内、批间精密度为2.6%~5.8%,满足临床实验室的常规检测要求。MCGARRAH等<sup>[29]</sup>采用NMR将HDL根据颗粒直径分为大HDL (9.4~14.0 nm)、中HDL (8.2~9.4 nm) 和小HDL (7.3~8.2 nm) 三大类,并通过计算风险比评估出高密度脂蛋白颗粒 (high-density lipoprotein particle, HDL-P) 浓度与CVD死亡率密切相关,因此可将HDL-P纳入全球急性冠状动脉综合征注册 (the Global Registry of Acute Coronary Events, GRACE) 风险评分中来提高风险识别。但该法使用仪器——核磁共振仪极其昂贵,且需专人使用并进行图谱分析,检测成本很高,尚无法在临床推广。

### 3.8 IM法

IM法的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IM的不同进行分离,随后冷凝聚集各粒子,最后进行激光散射扫描检测。经过超速离心去除白蛋白的步骤后,根据IM确定血清样本中脂蛋白颗粒的大小和浓度。扫描时间为2 min,覆盖的范围为17.2~540.0 Å。扫描后,通过在与特定脂蛋白亚类相对应的预定大小范围内的总颗粒数来合并数据。IM法得出的LDL颗粒浓度与超速离心法得出的LDL-C和apo B结果呈正相关 ( $r$ 值分别为0.90、0.79,  $P<0.05$ )。

### 3.9 高效液相色谱法 (high-performance liquid chromatography, HPLC)

HPLC可与超速离心法结合,用于HDL或LDL亚组分的分离和检测<sup>[20]</sup>。检测步骤:取5份

血清, 其中2份血清与含有脯氨酸的溴化钠溶液混合, 使背景密度为1.006和1.044 kg/L; 另外3份血清与含脯氨酸和巯基乙醇的溴化钠溶液混合, 使背景密度为1.044、1.063和1.125 kg/L, 超速离心后, 用HPLC测定超速离心底部各种组分的胆固醇。巯基乙醇可使Lp(a)解离, 解离前后Lp(a)存在明显的密度分界点(1.044 kg/L), 从而使脂蛋白亚组分和脂蛋白(a)胆固醇[lipoprotein(a) cholesterol, Lp(a)-C]测定成为可能。HPLC结合超速离心法已成功用于高脂血症患者血浆脂蛋白的分析, 且显示出比连续超速离心法更高的准确性。

### 3.10 阴离子交换色谱法

HIROWATARI等<sup>[30]</sup>成功建立了一种准确、方便的脂蛋白亚组分分离检测方法。该方法将血清注入阴离子交换色谱柱, 通过不同高氯酸根离子浓度梯度洗脱分离出2类HDL亚组分, 分别为HDL2和HDL3; 之后将含有脂蛋白亚组分的洗脱液与酶试剂混合, 并在37 °C下反应2.1 min, 最后在600 nm波长下进行检测。

### 3.11 动态光散射(light-scattering, LS)法

LS法使用的技术是光子相关光谱, 用2种乳胶粒子溶液作为标准, 由于颗粒受到周围液体分子的撞击做布朗运动, 观察到的散射光强度将不断地随时间起伏涨落, 以散射光的波动强度来检测脂蛋白亚组分<sup>[31]</sup>。LS法不会受到凝胶梯度和质量不一致的影响, 可在30 min内确定样本中LDL的峰值粒径, 具有实现自动化检测的潜力。虽然不同的脂蛋白类别需要具有不同梯度的凝胶, 但是基于LS原理的仪器理论上可测定各种脂蛋白颗粒的大小。然而, 使用LS法检测脂蛋白颗粒时, 样本的制备至关重要, 任何污染的颗粒或聚集体都会影响检测结果。因此, 该方法需与超速离心法结合使用, 并通过过滤器过滤掉粉尘等颗粒物质。

## 4 Lp(a)的组成及分离检测

Lp(a)核心部分由TG、磷脂、胆固醇、胆固醇酯等脂质和2种载脂蛋白组成, 结构类似LDL, 含有LDL中没有的载脂蛋白(a)[apolipoprotein(a), apo(a)]。apo(a)与纤溶酶原具有高度同源性, 在纤溶系统多个环节发挥作用, 从而影响动脉粥样硬化性疾病的

发生和发展。Lp(a)含有2类载脂蛋白, 即apo B100和apo(a), 二者通过1~2个二硫键共价相连。用还原剂巯基乙醇处理Lp(a)时, apo(a)可从Lp(a)分子上脱落下来, 成为不含脂质的一类糖蛋白。剩下仅含apo B100的颗粒, 被称为Lp(a-)

### 4.1 Lp(a)的分离检测方法

4.1.1 Lp(a)纯品的分离制备 (1) 超速离心法。许平等<sup>[32-34]</sup>采用超速离心法, 根据Lp(a)的密度将Lp(a)分离出来, 再经柱层析制备出Lp(a)。然而, 此法有2个缺点: 一是超速离心时间长, 费用高; 二是离心时密度范围窄, 凝胶柱层析回收率低, 这就导致Lp(a)的得率很低, 一般只有15%~20%。因此, 张文武等<sup>[35]</sup>利用免疫亲和层析高特异性和高回收率的特点, 建立了一种短时间超速离心结合免疫亲和层析分离Lp(a)的方法, 成功地分离了几批Lp(a), 纯度和得率均优于国外常规方法, 并已用于基础研究和临床研究。刘忠民等<sup>[36]</sup>先用多价阴离子化合物磷酸-Mg<sup>2+</sup>沉淀包括Lp(a)在内的全部含apo B的脂蛋白, 然后经超速离心和Sepharose 6B柱、抗apo(a) IgG-Sepharose 4B免疫亲和柱层析, 得到Lp(a)、LDL和VLDL纯品。林春榕等<sup>[37]</sup>使用固体溴化钾将血浆密度调至1.055和1.120 g/mL, 即得到密度为1.055~1.120 g/mL的富含Lp(a)的脂蛋白液。将该脂蛋白液使用0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(pH值7.4, 含1 mmol/L乙二胺四乙酸二钠、0.01% NaN<sub>3</sub>)彻底透析, 最后使用30%聚乙二醇20000浓缩至6 mL左右。高玉敏等<sup>[38]</sup>分析了几种用于分离Lp(a)的方法, 发现大多数方法都需要超速离心这一步骤, 超速离心需要昂贵的实验设备和大量的时间, 样本处理量有限, 而且分离出来的Lp(a)只是在1个限定密度内的Lp(a)。但考虑到游离的apo(a), Lp(a)的实际漂浮密度无法明确范围, 可以低于1.006 g/mL, 也可以高于1.120 g/mL, 所以经过超速离心, Lp(a)损耗较大, 超速离心后一般还需要去除HDL和LDL, 因此得率更低。(2) 亲和层析法。常用的亲和层析主要有赖氨酸-琼脂糖凝胶柱亲和层析, 但是用赖氨酸类似物洗脱时, 往往会同时洗脱下来纤溶酶原, 还需要更复杂

的方法去除纤溶酶原。商品化的Lp(a)纯品一般在超速离心分离后经Lp(a)单抗亲和层析纯化,价格昂贵。针对此现象,高玉敏等<sup>[38]</sup>建立了一种经一系列层析柱(LIPOSORBER LA15柱、SephacryS-400HR分子筛和离子交换柱)批量分离纯化Lp(a)的方法,采用上述3种柱层析后,Lp(a)的纯度较好[纤溶酶原含量仅占Lp(a)的0.03%],但得率不高,分离的Lp(a)总得率仅为27%,从100 mL血液中仅能分离出1.5 mg Lp(a)。

4.1.2 Lp(a)的检测方法 Lp(a)浓度大部分是通过免疫化学方法检测其apo(a)部分得出的。选择一种合适的Lp(a)免疫测定法的困难之处在于apo(a)的异质性。(1)电泳法。早期检测Lp(a)多采用电泳法。BAUDHUIN等<sup>[39]</sup>调查了Lp(a)-C的测量是否不受apo(a)大小的影响,是否可以替代测量Lp(a)的质量,他们采用电泳方法分别检测了进行和未进行超速离心预处理的血浆样本中的Lp(a)-C水平,结果显示,未进行超速离心预处理的血浆Lp(a)-C水平与进行超速离心预处理的血浆Lp(a)-C水平高度相关。因此,可取消超速离心步骤,直接使用电泳法测定Lp(a)-C浓度。但电泳法的灵敏度较差,主要用于定性检测。

(2)免疫透射比浊法。免疫透射比浊法是将血清中的Lp(a)与试剂中的特异性Lp(a)抗体结合,形成不溶性免疫复合物,使反应液产生浊度,然后测定波长340 nm处的吸光度值,根据吸光度值得出血液样本中Lp(a)的水平。该方法的优点是快速、简便、精密度高、易于自动化,适用于大批量样本的检测;缺点是抗体用量大[是酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)的数倍],对抗体要求高(应具有高特异性、高滴度和高亲和力),颗粒大小不同的Lp(a)会产生不一致的光散射与光吸收,而且受样本基质的影响较明显。(3)ELISA。ELISA是早期测定Lp(a)常用的方法,基本原理是用聚苯乙烯微量反应板为固相载体,采用apo(a)单克隆抗体包被,加入待测样本,使其中的apo(a)单克隆抗体与结合到固相抗体上的apo(a)作用,洗涤除去未结合的酶标记物,加入酶的相应底物产生颜色

反应,显色程度取决于结合在固相载体上的apo(a)的量。ELISA的优点是基质效应不明显,可以用抗apo(a)抗体或抗apo B抗体的量代表Lp(a)水平,这也是避免apo(a)分子影响测定结果的主要方法;缺点是精密度差。为了准确检测Lp(a),确认其与apo(a)颗粒多态性无关,有研究者使用抗apo(a)KIV-9型的表面决定簇单克隆抗体,建立了直接结合的双单克隆抗体ELISA方法<sup>[40]</sup>。该方法的详细评价结果显示,apo(a)的不均一性不影响测定准确度。因为该单克隆抗体不会与apo(a)分子多变部分的决定簇反应,所以可以以摩尔(mol)为单位设定靶值<sup>[40]</sup>。(4)超速离心法结合HPLC。董军<sup>[41]</sup>建立了2次超速离心直接分离和测定Lp(a)-C的方法。首先,血清中含有脯氨酸时,以1.044 kg/L的背景密度超速离心,有>95%的Lp(a)分布在离心管底部;用含巯基乙醇的密度液将底部组分密度调节至1.040 kg/L,再次超速离心,使Lp(a)解离,解离后的Lp(a-)分布在顶部,采用HPLC测定顶部组分中的胆固醇即为Lp(a)-C。该方法通过使用巯基乙醇解离Lp(a)及调节超速离心的背景密度,大大提高了Lp(a)-C测定的灵敏度和特异性,但超速离心耗时较长。

## 5 脂蛋白亚组分和Lp(a)的标准化研究

### 5.1 脂蛋白亚组分的标准化研究

随着血清脂蛋白亚组分被认为是评估CVD的风险因子,脂蛋白亚组分检测的标准化显得极为重要。然而,由于目前国内外尚缺乏脂蛋白亚组分测定的正式标准化方案,因此其标准化工作困难重重。脂蛋白亚组分检测的标准化主要在于标准化方案的制定和实施、标准物质和质控材料的制备、检测方法的合理选择及测定标准化。我国现已推行的总胆固醇测定标准化以及国家卫生健康委老年医学研究所建立的超速离心HPLC测定血清脂蛋白亚类胆固醇的方法可在脂蛋白亚组分测定标准化中发挥作用。脂蛋白亚组分检测标准化的难点主要在于脂蛋白各亚组分纯品的制备,即缺乏可以长期监测脂蛋白亚组分测定的参考物质与质控材料,仅能通过与其他实验室进行比对来评估检测结果的正确度。

## 5.2 Lp(a) 检测的标准化研究

目前, 由于缺乏共同的Lp(a)参考物, 不同实验室之间Lp(a)检测结果的差异大, 精密度差, 无可比性。当务之急是制定可用的二级参考物质, 使不同分析系统之间和不同实验室之间的Lp(a)检测结果较为接近, 或有可比性。

2003年, 世界卫生组织确定IFCC SRM 2B为Lp(a)免疫测定国际参考物质。该参考物质瓶内Lp(a)的含量为(0.107 1±0.008 6) nmol(分装时的不精密度为2.9%), 其定值可溯源至美国华盛顿大学西北脂类研究实验室的Lp(a)参考检测系统。IFCC SRM 2B一般作为通用校准品, 用于进行一致性检测调查前为各个检测系统的厂商校准品定值。

随着用于测量脂蛋白亚组分和Lp(a)的新方法的引入, 标准化变得越来越重要。这些方法是基于不同的原理分离出不同类型的亚组分, 因此统一脂蛋白亚组分的定义, 即制备参考物质和质控材料是标准化的第1步。如果要将脂蛋白亚组分和Lp(a)有意义地纳入患者的CVD风险评估中, 则应考虑制定标准化计划, 至少应制定用于实验室间常规测试结果比对的测试程序, 该程序可以帮助识别和消除方法之间的不一致, 保证临床检测结果的准确性。

## 6 结语

综上所述, 脂蛋白亚组分常用的检测技术主要是VAP、超速离心结合HPLC、ME和NMR, Lp(a)常用的检测技术主要是免疫透射比浊法、ELISA和超速离心结合HPLC。随着临床上越来越多地使用脂蛋白亚组分和Lp(a)作为评估CVD风险的指标, 脂蛋白亚组分和Lp(a)的标准化研究越来越重要。脂蛋白亚组分和Lp(a)标准化方案的建立以及参考物质和质控材料的制备是实现标准化最重要的一步。

## 参考文献

[1] World Health Organization. Cardiovascular diseases[EB/OL]. (2019-01-18) [2020-06-01]. [https://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/](https://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/).

[2] 胡盛寿, 高润霖, 刘力生, 等. 《中国心血管病报告2018》概要[J]. 中国循环杂志, 2019, 34(3): 209-220.

[3] 张坚, 满青青, 王春荣, 等. 中国18岁以上人群血脂水

平及分布特征[J]. 中华预防医学杂志, 2005, 39(5): 302-305.

[4] TÓTH P P, POTTER D, MING E E. Prevalence of lipid abnormalities in the United States: the National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2006[J]. J Clin Lipidol, 2012, 6(4): 325-330.

[5] 戴璟, 闵杰青, 杨云娟. 中国九省市成年人血脂异常流行特点研究[J]. 中华心血管病杂志, 2018, 46(2): 114-118.

[6] 国家卫生计生委疾病预防控制局. 中国居民营养与慢性病状况报告(2015年)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.

[7] 郑慧斐, 丛辉, 王惠民, 等. 高密度脂蛋白亚类的检测方法[J]. 临床检验杂志, 2009, 27(6): 477-479.

[8] 孙浩行, 汪骅, 王长城. 低密度脂蛋白亚组分及分离检测方法的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(16): 2505-2508.

[9] 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.

[10] DAVY B M, DAVY K P. Comparison of assessment techniques: plasma lipid and lipoproteins related to the metabolic syndrome[J]. Lipids Health Dis, 2006, 5: 3.

[11] HIRANY S V, OTHMAN Y, KUSTSCHER P, et al. Comparison of low-density lipoprotein size by polyacrylamide tube gel electrophoresis and polyacrylamide gradient gel electrophoresis[J]. Am J Clin Pathol, 2003, 119(3): 439-445.

[12] CAULFIELD M P, 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.

[13] KRAUSS R M, WOJNOOSKI K, ORR J, et al. Changes in lipoprotein subfraction concentration and composition in healthy individuals treated with the CETP inhibitor anacetrapib[J]. J Lipid Res, 2012, 53(3): 540-547.

[14] DAVIES I G, GRAHAM J M, GRIFFIN B A. Rapid separation of LDL subclasses by iodixanol gradient ultracentrifugation[J]. Clin Chem, 2003, 49(11): 1865-1872.

[15] 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.

[16] 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.

[17] 侯卓奇, 李刚, 张至. 高密度脂蛋白胆固醇的前世今生和未来[J]. 中华高血压杂志, 2017, 25(12): 1185-1189.

[18] LUNDBERG B, HÖGSTRÖM S, PIETILÄINEN P, et al. Separation of plasma high-density lipoprotein subclasses by a combined precipitation method using polyethylene glycol 6000 and dextran sulphate[J]. Scand J Clin Lab Invest,

- 1984, 44 (4) : 305-309.
- [19] ITO Y, SATOH N, ISHII T, et al. Development of a homogeneous assay for measurement of high-density lipoprotein-subclass cholesterol[J]. Clin Chim Acta, 2014, 427: 86-93.
- [20] 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.
- [21] AUSTIN M A, BRESLOW J L, HENNEKENS C H, et al. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction[J]. JAMA, 1988, 260 (13) : 1917-1921.
- [22] 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.
- [23] SCHMITZ G, MÖLLER R, RICHTER V. Analytical capillary isotachopheresis of human serum lipoproteins[J]. Electrophoresis, 1997, 18 (10) : 1807-1813.
- [24] WEILLER B H, CERIOTTI L, SHIBATA T, et al. Analysis of lipoproteins by capillary zone electrophoresis in microfluidic devices: assay development and surface roughness measurements[J]. Anal Chem, 2002, 74 (7) : 1702-1711.
- [25] PING G, ZHU B, JABASINI M, et al. Analysis of lipoproteins by microchip electrophoresis with high speed and high reproducibility[J]. Anal Chem, 2005, 77 (22) : 7282-7287.
- [26] 钱晶晶, 季伙燕, 丛辉, 等. 聚二甲基硅氧烷 (PDMS) / 玻璃微流控芯片电泳快速分离血清高密度脂蛋白亚类及临床应用研究[J]. 分析化学, 2012, 40 (2) : 230-235.
- [27] WANG H, ZHANG W, WAN J, et al. Microchip-based human serum atherogenic lipoprotein profile analysis[J]. Anal Biochem, 2014, 467: 75-83.
- [28] MATYUS S P, BRAUN P J, WOLAK-DINSMORE J, et al. NMR measurement of LDL particle number using the Vantera clinical analyzer[J]. Clin Biochem, 2014, 47 (16-17) : 203-210.
- [29] MCGARRAH R W, CRAIG D M, HAYNES C, et al. High-density lipoprotein subclass measurements improve mortality risk prediction, discrimination and reclassification in a cardiac catheterization cohort[J]. Atherosclerosis, 2016, 246: 229-235.
- [30] HIROWATARI Y, TSUNODA Y, OGURA Y, et al. Analyzing of high-density lipoprotein subfractions and low-density lipoprotein subfractions in human serum with anion-exchange chromatography[J]. Atherosclerosis, 2009, 204 (2) : e52-e57.
- [31] CHATTERTON J E, SCHLAPFER P, BÜTLER E, et al. Identification of apolipoprotein B100 polymorphisms that affect low-density lipoprotein metabolism: description of a new approach involving monoclonal antibodies and dynamic light scattering[J]. Biochem, 1995, 34 (29) : 9571-9580.
- [32] 许平, 庄一义, 汪俊军. 脂蛋白 (a) 的分离鉴定和抗血清的制备[J]. 临床检验杂志, 1990, 8 (1) : 51.
- [33] 许平, 庄一义, 汪俊军. 脂蛋白 (a) 的分离纯化及其抗血清的制备[J]. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17 (3) : 216.
- [34] 许平, 庄一义, 汪俊军. 人血清脂蛋白 (a) 的分离纯化及其抗血清的制备[J]. 金陵医院学报, 1991, 4 (1) : 50-52.
- [35] 张文武, 许春玲, 洪嘉玲. 一种分离人血浆脂蛋白 (a) 的简便方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1993, 20 (4) : 294-297.
- [36] 刘忠民, 张华征. 人血浆脂蛋白 (a) 的分离纯化[J]. 咸宁医学院学报, 1995, 9 (1) : 8-10.
- [37] 林春榕, 吴学东, 狄勇. 人血浆脂蛋白 (a) 的分离纯化[J]. 大理医学院学报, 2001, 10 (3) : 3-5.
- [38] 高玉敏, 赵瑞东, 呼和巴特尔. 一种从血浆中分离纯化脂蛋白 (a) 的方法[J]. 内蒙古农业大学学报 (自然科学版), 2009, 30 (2) : 1-4.
- [39] BAUDHUIN L M, HARTMAN S J, O'BRIEN J F, et al. Electrophoretic measurement of lipoprotein (a) cholesterol in plasma with and without ultracentrifugation: comparison with an immunoturbidimetric lipoprotein (a) method[J]. Clin Biochem, 2004, 37 (6) : 481-488.
- [40] 冯仁丰. 脂蛋白 (a) 检测的标准化[J]. 检验医学, 2017, 32 (7) : 555-560.
- [41] 董军. 血清脂蛋白胆固醇准确测定方法研究[D]. 北京: 北京协和医科大学, 2008.

(收稿日期: 2020-07-13)

(本文编辑: 龚晓霖)



健康  
给生命带来光和热