

• 论 著 •

磷脂转移蛋白在急性缺血性脑卒中早期诊断的价值研究

王 屹^{1,2}, 涂文军^{1,2}, 于 艳^{1,2,△}

(1. 中国康复研究中心北京博爱医院检验科 100068; 2. 首都医科大学康复医学院, 北京 100068)

摘 要:目的 探讨磷脂转移蛋白(PLTP)在急性缺血性脑卒中(AIS)中诊断的价值。方法 该研究采用多功能酶标仪检测 PLTP 水平和活性,同时对 AIS 组和对照组进行血液生化学检测。通过统计学方法分析 PLTP 水平和活性与 AIS 组危险因素等的相关性,从而评价 PLTP 在诊断 AIS 的特异度和敏感度,建立 PLTP 作为缺血性脑卒中早期预警和早期诊断的生物标记物临界值。结果 PLTP 活性受试者工作组曲线下面积为 0.832,表明其用于 AIS 的早期诊断具有较好的敏感度和特异度。PLTP 活性不受 AIS 危险因素如年龄、性别、血脂异常等干扰。结论 PLTP 活性可能成为 AIS 早期诊断和干预的新靶标。

关键词:急性缺血性脑卒中; 磷脂转移蛋白; 生物标记物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.03.028

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)03-0363-03

Research on value of phospholipid transfer protein in early diagnosis of acute ischemic stroke

WANG Yi^{1,2}, TU Wenjun^{1,2}, YU Yan^{1,2,△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Beijing Boai Hospital, China Rehabilitation Research Center, Beijing 100068, China; 2. School of Rehabilitation, Capital Medical University, Beijing 100068, China)

Abstract:Objective To study the value of phospholipid transfer protein (PLTP) in the diagnosis of acute ischemic stroke (AIS). **Methods** The level and activity of PLTP was detected by the multifunctional microplate reader. Meanwhile the blood biochemical detects were performed in the AIS group and control group. The correlation between the level and activity of PLTP with risk factors in the AIS group was analyzed by using the statistical method, thus the specificity and sensitivity of PLTP for diagnosing AIS were evaluated. Then the critical value of PLTP as a biomarker of early warning and early diagnosis of AIS was established. **Results** The area under ROC curve of PLTP was 0.832, indicating that its application in early diagnosis of AIS had better sensitivity and specificity. The PLTP activity was not interfered by the AIS risk factors such as age, gender, dyslipidemia and so on. **Conclusion** The PLTP activity might become a new target in the early diagnosis and intervention of AIS.

Key words: acute ischemic stroke; phospholipid transfer protein; biomarker

脑卒中的发病率、病死率、复发率和致残率较高,脂代谢异常和脑卒中的关系非常密切,磷脂转移蛋白(PLTP)是脂质代谢中的重要转移蛋白之一,介导脂蛋白间磷脂的转移,对高密度脂蛋白和极低密度脂蛋白的代谢都具有重要的调控作用。动脉粥样硬化的形成是缺血性脑卒中发生的危险因素之一,PLTP 水平降低可减少动脉粥样硬化的发生。因此研究 PLTP 与急性缺血性脑卒中的关系,对于脑卒中的预防、筛查、早期诊断及干预具有重要意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 1—12 月来自本院住院 AIS 患者 30 例(AIS 组)作为研究对象,平均年龄(65.97±13.23)岁。入选标准:所有入选对象均无颅脑创伤、中枢或周围神经系统疾病、主要器官衰竭、严重感染、恶性肿瘤、肝肾疾病,并至少经电子计算机断层扫描或磁共振成像其中一种影像学检查;所有患者经神经内科医生根据临床及影像学资料确诊,诊断标准符合中国 AIS 诊治指南^[2];排除诊断不明确及出血性脑卒中患者。另选取同期在本院体检健康者 32 例作为对照组,平均年龄(59.75±11.31)岁。

1.2 方法

1.2.1 血清处理 AIS 组在出现与缺血性相关的神经系统症状后,对照组于安静状态时抽取静脉血 4 mL,分离血清,标记

并于-80℃保存。

1.2.2 血脂水平检测 应用全自动生化仪检测(深圳迈瑞)所有血清标本的血脂水平,检测指标包括总胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、空腹血糖。

1.2.3 酶联免疫吸附试验检测血清中 PLTP 水平 20 μL 标准品、样品和对照品加入相应的微孔中,与 100 μL 零缓冲液充分混合 30 s,室温温育 30 min,弃掉温育混合物,用去离子水冲洗微孔板 5 次,完全除去微孔中残余的水滴。再加入 150 μL 酶联试剂,轻轻混合 10 s,室温温育 30 min 后洗板 5 次。加入 100 μL 显色液试剂轻混 10 s,室温暗处孵育 20 min 后加入 100 μL 终止液以终止反应,轻轻地混合 30 s,用酶标仪在 450 nm 处于 15 min 内读出光密度值。

1.2.4 实时荧光免疫分析仪检测 PLTP 活性 (1)将 2 μL 供体分子,加入 4 μL 异丙醇,其余进行倍比稀释用于制备标准曲线。(2)用 2 μL 兔血清代替样本作为阳性对照,准备空白管不含 PLTP,37℃条件下检测荧光值,在开始 1~2 min 内使用荧光自动化读数仪检测空白、阳性对照、样本的荧光强度,孵育过程在不同时间点不断检测。(3)计算血浆的 PLTP 活性: $Y = MX + B$,将初始读数和最终读数填入标准曲线, $Y =$ 血清样本荧光强度-空白的样本荧光强度, $M =$ 标准曲线斜率, $X =$ 血浆样本水平, $B =$ 截距。PLTP 活性 = $\Delta X / (\Delta T \times 2)$ pmol/μL/

min。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 6 统计软件根据统计资料的类型进行配对 *t* 检验或单因素方差分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 1 两组血液细胞学和生化检测结果比较 ($\bar{x}\pm s$,mmol/L)

组别	<i>n</i>	总胆固醇	三酰甘油	高密度脂蛋白	低密度脂蛋白	空腹血糖
AIS 组	30	4.497±0.242	1.623±0.268	1.201±0.066	2.776±0.176	5.834±0.278
对照组	32	4.603±0.075	0.921±0.062	1.811±0.075	2.620±0.067	5.288±0.083
<i>P</i>		0.670	0.011	<0.001	0.401	0.059

2.2 PLTP 水平及活性检测 应用 ELISA 方法检测血清中 PLTP 水平,酶标仪检测 AIS 组 PLTP 吸光值为 (0.289±0.062),而对照组为 (0.241±0.014),AIS 组的 PLTP 水平高于对照组,差异无统计学意义 ($P=0.441$)。研究表明 PLTP 在人体中存在两种功能形式,一种是“活性”形式,可以将卵磷脂从磷脂膜泡转移到高密度脂蛋白,另一种形式是“失活”的 PLTP,不具备这一功能^[3]。本研究应用时间分辨荧光的方法检测血清中 PLTP 的活性,AIS 患者血液中 PLTP 活性为 [(0.120±0.026)pmol/μL/min],高于对照组血清 PLTP 活性 [(0.088±0.028)pmol/μL/min],差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.3 PLTP 活性诊断特异度及敏感度 应用受试者工作 (ROC) 曲线,计算曲线下面积,评估 PLTP 活性作为 AIS 诊断标记物的敏感度和特异度。ROC 曲线见图 1,曲线下面积为 0.832,计算约登指数,得到诊断 AIS 的 cut-off 值为 0.099 pmol/μL/min,其诊断的敏感度为 80.00%,特异度为 84.38%。因此 PLTP 活性用于诊断 AIS 具有较好的敏感度和特异度。

表 2 AIS 组影响因素分层后 PLTP 水平和 PLTP 活性比较

危险因素	<i>n</i>	PLTP 水平(吸光值)	<i>P</i>	PLTP 活性(pmol/μL/min)	<i>P</i>
年龄(岁)					
40~60 岁	14	0.223±0.062	0.760	0.122±0.031	0.298
>60 岁	16	0.231±0.078		0.112±0.020	
性别					
男性	16	0.229±0.069	0.800	0.121±0.030	0.310
女性	14	0.230±0.074		0.112±0.020	
高密度脂蛋白					
0~1.04 mmol/L	11	0.249±0.065	0.222	0.118±0.023	0.914
>1.04 mmol/L	19	0.215±0.073		0.116±0.028	
三酰甘油					
0~1.7 mmol/L	21	0.218±0.075	0.231	0.110±0.021	0.029
>1.7 mmol/L	9	0.254±0.054		0.132±0.030	

3 讨 论

近年,包括髓鞘碱性蛋白(MBP)、S100、特异性神经元烯醇酶(NSE)、胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)、心脏脂肪酸结合蛋白(H-FABP)在内的一些血液生物标志物已被证明对于诊断 AIS 具有一定的意义,但到目前为止仍没有理想的血清生物标记物应用于 AIS 的早期预警和诊断^[4-6]。

血脂代谢异常是 AIS 的重要危险因素。研究表明 PLTP

2 结 果

2.1 两组血液细胞学和生化检测结果比较 AIS 组的高密度脂蛋白明显低于对照组,三酰甘油水平明显高于对照组,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 1。

2.4 PLTP 水平和活性与 AIS 影响因素分析 将 AIS 组患者年龄、性别、高密度脂蛋白、三酰甘油等因素进行分层分析,结果表明 AIS 组患者年龄、性别、高密度脂蛋白对 PLTP 的水平和活性无影响。然而三酰甘油异常 (>1.7 mmol/L) 的 AIS 患者 PLTP 活性高于三酰甘油正常 ($0\sim1.7$ mmol/L) 的 AIS 患者,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 2。

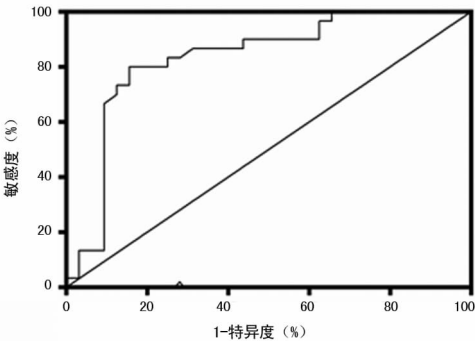


图 1 PLTP 活性诊断 AIS 特异度及敏感度

在脂类代谢的主要功能是在高密度脂蛋白颗粒和脂质之间的磷脂转移,有助于形成低密度脂蛋白、高密度脂蛋白颗粒的成熟。动脉粥样硬化的形成与脂质代谢密切相关,基因工程的鼠模型研究结果证明了 PLTP 在动脉粥样硬化的发展中发挥重要作用,PLTP 基因缺陷小鼠生育 apoB 转基因和 apoE 缺陷小鼠。在这两种高脂血症的模型中 PLTP 缺陷导致含 apoB 脂蛋白降低,显著降低了动脉粥样硬化的形成^[7],关于人类的相关

研究也证实了这一点。PLTP 介导的磷脂转移活性在增加 PLTP 转基因鼠动脉粥样硬化中具有很重要的作用,而在动脉粥样硬化小鼠过表达无磷脂转移活性的 PLTP 并不能增加动脉粥样硬化的形成^[8]。本研究通过 ELISA 和免疫时间分辨荧光方法,分别检测 AIS 组和对照组的 PLTP 水平和活性,发现虽然在 AIS 组 PLTP 活性高于对照组,但 PLTP 的水平并没有相同的趋势,表明 PLTP 的活性的变化与其水平并不平行,这与目前的许多报道是一致的,从而表明 PLTP 可能通过增加动脉粥样硬化这一病理过程可能参与了 AIS 的病理过程^[9]。

本研究中的 AIS 组高密度脂蛋白明显低于与对照组,但将 AIS 组按照高密度脂蛋白正常和异常进行再次分组,PLTP 活性在 AIS 组的变化不受高密度水平的影响。但 PLTP 活性与三酰甘油水平具有相关性,然而 AIS 患者 PLTP 活性水平的变化可能并不是由其三酰甘油高水平决定的。

本研究的结果表明,PLTP 活性可能成为 AIS 早期诊断的血清标记物,并且因其在动脉粥样硬化形成中的重要作用,PLTP 可能成为 AIS 早期预警或干预的靶点,对降低 AIS 所带来的危害具有重要意义。

参考文献

- [1] Bailey D, Ruel I, Hafiane A, et al. Analysis of lipid transfer activity between model nascent HDL particles and plasma lipoproteins: implications for current concepts of nascent HDL maturation and Genesis[J]. J Lipid Res, 2010, 51(4): 785-797.
- [2] 沈崇灵, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010[J]. 中国全科医学, 1994, 35(1): 51-52.
- [3] Oka T, Kujiraoka T, Ito M, et al. Distribution of phospho-

lipid transfer protein in human plasma: presence of two forms of phospholipid transfer protein, one catalytically active and the other inactive[J]. J Lipid Res, 2000, 41(10): 1651-1657.

- [4] Ustundag M, Orak M, Guloglu C, et al. The role of serum osteoprotegerin and S-100 protein levels in patients with acute ischaemic stroke: determination of stroke subtype, severity and mortality[J]. J Inter Med Res, 2011, 39(3): 780-789.
- [5] Anand N, Stead LG. Neuron-specific enolase as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review[J]. Cerebrovasc Dis, 2005, 20(4): 213-219.
- [6] Zimmer C. Fatty acid binding protein as a serum marker for the early diagnosis of stroke: a pilot study[J]. Mol Cell Proteomics, 2004, 3(1): 66-72.
- [7] Jiang XC, Qin S, Qiao C, et al. Apolipoprotein B secretion and atherosclerosis are decreased in mice with phospholipid-transfer protein deficiency[J]. Nat Med, 2001, 7(7): 847-852.
- [8] Samyn H, Moerland M, Van Gent T, et al. Plasma phospholipid transfer activity is essential for increased atherogenesis in PLTP transgenic mice: a mutation-inactivation study[J]. J Lipid Res, 2008, 49(12): 2504-2512.
- [9] Tan KC, Shiu SW, Wong Y, et al. Plasma apolipoprotein E concentration is an important determinant of phospholipid transfer protein activity in type 2 diabetes mellitus[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2006, 22(4): 307-312.

(收稿日期: 2016-08-04 修回日期: 2016-10-27)

(上接第 362 页)

免疫力更强等问题有待进一步研究。

参考文献

- [1] 李智敏, 曾俐琴, 彭秀红, 等. 高危型 HPV 阴性子宫颈癌患者的临床病理特点[J]. 中华妇产科杂志, 2016, 9(51): 683-687.
- [2] 朱蓉, 居会祥, 王锋, 等. 高危型 HPV DNA 检测应用于体检中的价值探讨[J]. 检验医学, 2014, 20(4): 347-349.
- [3] Mustafa RA, Santesso N, Khatib R, et al. Systematic reviews and meta-analyses of the accuracy of HPV tests, visual inspection with acetic acid, cytology, and colposcopy[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2016, 132(3): 259-265.
- [4] 倪颖华, 施幼豪. 高危型 HPV DNA 检测负荷量及其最佳阈值在宫颈癌前病变中的应用研究[J]. 检验医学, 2014, 20(5): 501-504.
- [5] Misiukiewicz K, Camille N, Gupta V, et al. The role of HPV status in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Clin Adv Hematol Oncol, 2014, 12(1): 812-819.
- [6] 刘集鸿, 何晓清, 张丽科, 等. 人乳头瘤病毒 E6/E7 mR-

NA 检测在宫颈癌筛查中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 22(8): 532-536.

- [7] Chiappetta C, Lendaro E, Cacciotti J, et al. The 16, 18, and 45 HPV infection in high grade squamous cervical lesions in primary hr-HPV test screening program[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2015, 36(6): 722-725.
- [8] 马莉, 丛笑, 卞美璐, 等. 高危型 HPV 分型检测作为子宫颈癌及其癌前病变初筛手段的探讨[J]. 中华妇产科杂志, 2015, 26(4): 246-252.
- [9] 张珊, 洪颖, 马莉, 等. 宫颈细胞学阴性 HPV 阳性妇女的 HPV 分型检测[J]. 山东医药, 2015, 26(3): 5-7.
- [10] Freitas BC, Suehiro TT, Consolaro ME, et al. HPV infection and cervical abnormalities in HIV positive women in different regions of Brazil, a Middle-Income country[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(18): 8085-8091.

(收稿日期: 2016-07-30 修回日期: 2016-10-20)

