

al. Phase II biomarker trial of a multimarker diagnostic for ovarian cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(1):1079-1088.

[19] AMONKAR S D, BERTENSHAW G P, CHEN T H, et al. Development and preliminary evaluation of a multivariate index assay for ovarian cancer[J]. PLoS One, 2009, 4(1):e4599.

[20] 刘远新, 伍细言, 邹珊珊. ROC 曲线在 Ca125 鉴别诊断卵巢癌和卵巢良性肿瘤中的应用[J]. 实用预防医学, 2010, 23(7):1398-1400.

[21] LAMBECK A J, CRIJNS A P, LEFFERS N, et al. Serum cytokine profiling as a diagnostic and prognostic tool in ovarian cancer: a potential role for interleukin 7[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(8):2385-2391.

[22] LOKSHIN A E, WINANS M, LANDSITTEL D, et al. Circulating IL-8 and anti-IL-8 autoantibody in patients with ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2006, 102(2):244-251.

[23] MOORE R G, BROWN A K, MILLER M C, et al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass[J]. Gynecol Oncol, 2008, 108(2):402-408.

[24] LENHARD M, STIEBER P, HERTLEIN L, et al. The diagnostic accuracy of two human epididymis protein 4 (HE4) testing systems in combination with CA125 in the differential diagnosis of ovarian masses[J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 49(12):2081-2088.

[25] VANGORP T, CADRON I, DESPIERRE E, et al. HE4 and CA125 as a diagnostic test in ovarian cancer: prospective validation of the risk of ovarian malignancy algorithm[J]. Br J Cancer, 2011, 104(5):863-870.

[26] SCHOLLER N, CRAWFORD M, SATO A, Drescher CW, et al. Bead-based ELISA for validation of ovarian cancer early detection markers[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(7):2117-2124.

[27] 薛苗, 陈园园, 李铭一, 等. 联合检测血清 HE4 和 CA125 对卵巢癌的诊断价值[J]. 诊断学理论与实践, 2016, 20(1):53-56.

[28] YURKOVETSKY Z, SKATES S, LOMAKIN A, et al. Development of a multimarker assay for early detection of ovarian cancer[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(1):2159-2166.

[29] 李君蕊, 赵宝春, 付盈菊, 等. 不同类型炎症中白细胞介素诸细胞因子水平变化及意义[J]. 中国综合临床, 2008, 24(3):244-247.

(收稿日期:2018-01-28 修回日期:2018-05-28)

• 综 述 •

Ox-LDL 在动脉粥样硬化中的致病机制及检测方法研究进展

张 强 综述, 徐 立[△]审校

(吉林大学第二医院检验科, 长春 130041)

摘 要:动脉粥样硬化是目前危害人类健康的常见病和多发病。氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)是动脉粥样硬化的独立危险因素,能够损伤血管内皮细胞、促进单核细胞的黏附、促进血管平滑肌细胞迁移和增值、促进泡沫细胞和血栓的形成、促进粥样斑块裂解。该文讨论 Ox-LDL 在动脉粥样硬化发生、发展中的作用机制及目前 Ox-LDL 的检测方法,有利于对动脉粥样硬化的发生和预后做出评价,具有重要的理论价值和实践意义。

关键词:氧化低密度脂蛋白; 动脉粥样硬化; 检测方法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.19.025 **中图法分类号:**R543.5

文章编号:1673-4130(2018)19-2432-05 **文献标识码:**A

动脉粥样硬化(AS)是多因素导致的慢性炎症过程,内皮下脂质尤其是低密度脂蛋白的堆积在动脉粥样硬化形成中起重要的作用^[1]。氧化应激等使大量的低密度脂蛋白发生氧化修饰,氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)在动脉粥样硬化的发生和发展中起重要的作用^[2]。研究表明,Ox-LDL 与早期动脉粥样硬化、高血压、冠脉和外周动脉疾病、急性冠脉综合征及缺血性心肌梗死等动脉粥样硬化的各个阶段都密切相关。Ox-LDL 被认为是引发动脉粥样硬化的独立危险因

素,可以作为动脉粥样硬化的血清学标志物^[3-4]。因此,人外周血循环中 Ox-LDL 的准确检测在动脉粥样硬化的预防、早期诊断及预后具有重要的价值。

1 Ox-LDL 导致 AS 的作用机制

1.1 血管内皮细胞的损伤 血管内皮细胞功能障碍和内皮细胞自身损伤是动脉粥样硬化的起始环节。Ox-LDL 可通过结合 LOX-1 受体,产生更多活性氧(ROS),激活 NF- κ B 等核转录因子,调节促炎基因的表达^[4],从而促进炎症的发生。Ox-LDL 能直接或间

[△] 通信作者, E-mail: ccydyl@sina.com。

本文引用格式: 张强, 徐立. Ox-LDL 在动脉粥样硬化中的致病机制及检测方法研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(19): 2432-2436.

接灭活内皮舒张因子 NO, 减少 NO 生物利用度。Ox-LDL 刺激内皮素-1 和血管紧张素转换酶的表达, 进一步损伤血管的紧张性^[5]。Ox-LDL 激活 PKC 信号通路^[6], 重排肌动蛋白, 促使细胞骨架发生改变。Ox-LDL 对内皮细胞产生细胞毒作用, 能激活 Ca^{2+} 通道, 内皮细胞内 Ca^{2+} 浓度增加, 引发线粒体功能障碍^[4], 诱导内皮细胞凋亡。Ox-LDL 还可通过 LOX-1 受体激活 NADPH 氧化酶, 增加胞内活性氧的含量, 进而刺激内皮细胞 Na^+ 通道^[7], 抑制血管的舒张及与之相关的信号转导通路, 导致内皮细胞功能紊乱。

1.2 Ox-LDL 促进单核细胞的黏附 Ox-LDL 可促进单核细胞和内皮细胞的相互作用。Ox-LDL 刺激内皮细胞表达趋化因子和黏附因子, 如单核细胞趋化因子-1(MCP-1)、细胞间黏附分子(ICAM-1)、E 选择素、P 选择素、PPAR γ 、血管内皮钙黏素等^[8-9]。Ox-LDL 可刺激内皮细胞表达巨噬细胞集落刺激因子^[4], 以上分子作用可使单核细胞黏附于内皮, 进而转移到内膜下转变为巨噬细胞。

1.3 Ox-LDL 诱导平滑肌细胞迁移和增殖 Ox-LDL 可激活 MAPK 等信号通路, 上调黏附分子、炎症因子、趋化因子、骨桥蛋白等基因的表达来调控平滑肌细胞的增殖^[10]。Ox-LDL 激活平滑肌细胞内 PLD 调控信号通路^[4], PLD 催化第二信使磷脂酸 PA 或 LPA 的产生, 促进平滑肌细胞的增殖。中膜平滑肌细胞的迁移和异常增殖是导致动脉粥样硬化的重要因素。

1.4 Ox-LDL 促进泡沫细胞的形成 Ox-LDL 可被巨噬细胞表面的清道夫受体 SR-A、CD36、CD68、LOX-1 等^[4]所识别, 进而巨噬细胞摄取大量的 Ox-LDL, 形成泡沫细胞, 泡沫细胞堆积在内皮下, 促进脂纹的形成, 即动脉粥样硬化的早期标志。使用清道夫受体抑制基因的巨噬细胞研究^[4]进一步阐明了清道夫受体对于促进泡沫细胞的形成及动脉粥样硬化的重要作用。Ox-LDL 存在时, 巨噬细胞表面清道夫受体 CD36 表达, 进一步导致磷酸酶受体类型 O(PT-PRO)过表达, 作用于下游的 toll 样受体 4(TLR4), 继而作用于 NF- κ B, 促进巨噬细胞的氧化应激及促进细胞凋亡^[11], 形成泡沫细胞。

1.5 促进血栓形成 一旦内皮发生损伤, 血小板会迅速活化聚集在受损部位。Ox-LDL 通过 CD36 受体作用于未活化血小板及 LOX-1 受体作用于活化的血小板, 使血小板聚集, 形成血栓^[12]。Ox-LDL 诱导纤溶酶原激活物抑制剂-1^[4]上调表达, 使纤维蛋白溶解能力减弱。研究证实, Ox-LDL 诱导单核细胞来源的巨噬细胞和内皮细胞表达组织因子^[13], 进一步促进血栓形成。

1.6 促进粥样斑块裂解 研究表明, Ox-LDL 不仅与动脉粥样硬化的发生发展有关, 也与斑块的不稳定

性有关。在较高浓度时, Ox-LDL 可以上调 LOX-1 的表达, 诱导单核细胞来源的巨噬细胞(VSMC)^[14]的凋亡, 促进斑块的不稳定。Ox-LDL 还可促进 VSMC 和成纤维细胞合成胶原, 形成纤维囊, 促进脂纹形成进而向粥样斑块转变, 斑块裂解后将 Ox-LDL 释放入血循环中^[10]。Ox-LDL 在动脉粥样硬化斑块中含量显著增高, 可影响基质金属蛋白酶 MMP-9 的表达, 使细胞外基质重建, 内皮细胞基底膜发生降解, 增强内皮细胞的通透性, 进一步使脂蛋白等血浆蛋白在内皮下积累, 增加斑块的不稳定性^[15], 加速斑块的破裂。

2 Ox-LDL 检测方法

LDL 是大分子物质, 相对分子质量为 $2\,000 \times 10^3$, 包含有一个 ApoB 分子, 大量的三酰甘油、游离胆固醇、胆固醇酯及磷脂质分子^[3]。因为脂质中的多聚不饱和脂肪酸易于氧化, 氧化一旦开始, 即使在反应的最初阶段, 也会有大量的氧化脂质形成, ApoB 会被一些氧化脂质修饰。体内 LDL 氧化分为两步, 第一步氧化为轻微修饰的 LDL(MM-LDL), 主要为脂质氧化, 富含氧化磷脂酰胆碱(OX-PC), 能被 LDL 受体所识别; 第二步继续氧化为 Ox-LDL, 含大量溶血卵磷脂(LPC), LPC 是氧化磷脂发挥致病性的主要成分, 完全氧化的 LDL 可被清道夫受体所识别^[16]。Ox-LDL 是多种异源性颗粒不同氧化程度的混合物。Ox-LDL 在血循环中能够迅速被肝网状内皮组织清除, 而且血液本身就有很强的抗氧化能力, 并且 Ox-LDL 相关的抗体的有效的清除机制, 完全氧化的 LDL 在外周血循环中的半衰期极为短暂^[16]。Ox-LDL 外周血中含量少, 所以外周血中的 Ox-LDL 检测相对比较困难。

2.1 酶联免疫吸附试验(ELISA) Ox-LDL 发挥致 AS 的关键在于氧化磷脂、胆固醇及 ApoB 修饰后产生的新的抗原表位。LDL 的氧化修饰是一个非常复杂的进程, 其蛋白质和脂质通过酶促和非酶促途径氧化, 产生不同的抗体种类和结合位点^[4]。基于 ApoE 敲除小鼠的动脉粥样硬化模型^[17]研究表明抗 Ox-LDL 自身抗体识别 LDL 氧化过程中的不同表位或者在不同病变部位形成的抗原表位。基于抗 Ox-LDL 氧化衍生物的抗体, 建立了外周血 Ox-LDL 含量的 ELISA。

2.1.1 4E6 抗体为基础的 ELISA 4E6 识别的结合位点为至少为 ApoB 中 60 个赖氨酸残基被醛基取代后的部分^[3]。4E6 抗体是 Cu^{2+} 诱导的 Ox-LDL 免疫小鼠获得的。以 4E6 抗体为基础的 ELISA 有竞争法和双抗体夹心法两种方法^[18]。竞争法为: 首先将血浆稀释, 与已知量的 4E6 单抗进行预反应, 转移到包被有 Ox-LDL 的酶标板上, 酶标板上 Ox-LDL 结合剩余的 4E6 抗体, 洗板, 再依次加入生物素标记的二抗, HRP 标记的链霉亲和素, 过氧化物酶底物 TMP, 终

止液, 450 nm 读数。酶标板结合的 4E6 抗体越少说明血浆中的 Ox-LDL 越多。双抗夹心法是将 4E6 抗体包被酶标板, 依次加入血浆, 酶标抗体, 底物, 终止液, 450 nm 读数。目前尚没有报道两种方法学的不同。Ox-LDL 单位用 U/L 表示, 该方法为目前最为常用的方法, 但是此方法的缺陷是低于 60 个 ApoB 赖氨酸残基修饰的 Ox-LDL 就不能检测出。另一缺陷是 4E6 与 Ox-LDL 和天然 LDL 有交叉反应, 但 4E6 抗体与血浆 Ox-LDL 的结合能力是 LDL 的 1 000 倍^[18]。

2.1.2 FOH1a/DLH3 双抗体夹心法 ELISA FOH1a/DLH3 抗体特异识别氧化磷脂卵磷脂 (Ox-PC)^[3], Ox-PC 包含醛基和 9-CHO-PC^[19]。该抗体不识别天然 LDL、MDA-LDL、乙酰化 LDL 及糖化 LDL^[20]。抗体来自人尸体动脉粥样硬化斑块匀浆作为抗原免疫的 BALB/c 小鼠^[19]。用 FOH1a/DLH3 抗体^[20]包被酶标板来捕获密度梯度超速离心法分离的 LDL 中的 Ox-LDL, 依次加入抗 ApoB 多克隆抗体, 碱性磷酸酶标记的二抗。因为每个微孔中的分离 LDL 是相同量, 所以得出的结果不直接反映体内的 Ox-LDL 浓度, 而反映的是 Ox-LDL 在血浆总 LDL 成分中的比例。结果以 ng Ox-LDL/ug LDL 表示。Kyowa Medex “MX”试剂盒, 用血浆替代密度梯度超速离心法分离的 LDL, 使用 Ox-LDL 标准品做标准曲线, 分析结果以 U/mL 表示, 一个单位等同于 250 ng 标准品的吸光度。但是所得结果与单独分离 LDL 结果并不一致。DLH3 既可以与 Ox-HDL 也可以与 Ox-LDL 反应, 甚至与 Ox-PC 中混合的小分子多肽反应。该方法还存在密度梯度超速离心法费时费力, 不适合大规模筛查, 多重氧化反应, 试剂现用现配、测试环境需严格控制等缺陷。

2.1.3 E06 双抗体夹心法 ELISA 鼠单克隆抗体 E06^[21]识别 Ox-PC, 但是识别的抗原表位是卵磷脂中的亲水部分即磷酸卵磷脂 (PhoCho)。该抗体来源于没有免疫的 ApoE 基因敲除小鼠 B 细胞。基于两种抗体即抗人 ApoB 100 抗体 MB47 和生物素标记的抗氧化磷脂抗体 E06。双重 ELISA 同时检测, 其一为抗 ApoB 单抗 MB47 和生物素标记 E06 单抗测定 Ox-LDL。其二为 MB47 单抗和抗 ApoB 单抗 MB24 测定 ApoB 的总量。两块酶标板结果比值反映的是 Ox-LDL 氧化修饰率。该抗体捕获所有包含 ApoB 的颗粒, 包括 LDL、Lp(a)、IDL、VLDL 等, 用 OxPL/ApoB 表示, 用化学发光技术检出, 单位为相对光单位每 100 ms。该方法没有使用标准参考品 Ox-PL, 所得结果为相对比例, 所以限制了与其他方法的比较。

2.1.4 $\gamma\kappa 5$ 与 LOX-1 配体的双抗体夹心法 ELISA 单链可变片段 (scFVs)^[22]对人 Ox-LDL 及相关配体具有高度亲和力。构建 scFv 基因文库和噬菌体文库, 在 scFv 噬菌体悬液中成功分离了两种类型 $\gamma + \kappa$

和 $\mu + \lambda$, 其中克隆到 pEt-22b(+), 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达的 $\gamma\kappa 5$ 的单链可变片段对 Ox-LDL 具有高度特异性。将 CTLD14 (LOX-1 配体识别片段) 包被酶标板, 依次加入待测 f-OxLDL 和提纯的 $\gamma\kappa 5$, HRP 标记的抗 His 抗体。450 nm 波长处读取结果。

2.1.5 WB-CAL-1 双抗体夹心法 ELISA 在 SLE, APS 等自身免疫系统疾病, $\beta 2\text{GP I}$ 广泛存在于患者血浆中, 与 Ox-LDL 作用形成 Ox-LDL/ $\beta 2\text{GP I}$ 复合物, 可掩盖捕获抗体识别 Ox-LDL 的抗原表位, 干扰免疫分析。WB-CAL-1 单克隆抗体^[23]是鼠抗 $\beta 2\text{GP I}$ IgG, 基于此原理, 先将血浆中的 Ox-LDL 与 $\beta 2\text{GP I}$ 进行预反应形成抗原抗体复合物, 用 WB-CAL-1 单抗包被酶标板, 依次加入反应复合物, HRP 标记的抗人 ApoB 100 单克隆抗体, TMP 底物, 硫酸终止反应, 在 450nm 波长处测定吸光度。同时设置 Ox-LDL/ $\beta 2\text{GP I}$ 阳性、阴性质控物。测定 Ox-LDL/ $\beta 2\text{GP I}$ 复合物可以更准确地测定血浆中 Ox-LDL 的含量。

2.1.6 抗 Ox-LDL 自身抗体的 ELISA 检测 健康人外周血中 Ox-LDL IgM 水平与 Ox-LDL 自身抗体水平成反比关系^[24], 也将就是说 Ox-LDL IgM 水平越高血循环中 Ox-LDL 越能有效地清除。针对于 LDL 特异的氧化表位的自身抗体 IgG 是导致动脉粥样硬化作用, 而 IgM 具有完整的遗传基因结构特征, 识别抗体从而保护机体免于普通病原菌如肺炎链球菌^[25]的侵袭。研究表明 Ox-LDL 自身抗体也可以作为动脉粥样斑块的标志物, 反映体内 LDL 氧化修饰的程度^[26]。采用体外诱导的 Ox-LDL 作为包被抗原, 依次加入待检血浆, 鼠抗人免疫球蛋白, HRP 标记的羊抗鼠抗体, 底物, 终止液, 读数的 ELISA 分析。或者以此为基础采用化学发光法或者放射免疫分析的方法检测 Ox-LDL 自身抗体 IgG 和 IgM 的水平。

2.2 荧光探针技术 利用异硫氰酸荧光素 (FITC) 对赖氨酸、色氨酸、酪氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、天冬氨酸七肽的 N 端赖氨酸进行荧光标记^[27], 高度特异结合 Ox-LDL、MM-LDL 及与之相应抗体结合聚乙二醇沉淀的免疫复合物, 并不与天然 LDL 结合。(FITC)KP6 对于 Ox-LDL 的检测开拓了新的发展方向。

2.3 毛细管电泳法 脂质过氧化反应决定了脂蛋白相关电泳迁移度 REM 的变化。脂肪酸的氧化产物醛类物质与 ApoB ϵ -氨基酸基团如赖氨酸残基共价结合, 中和阳性电荷, 增加脂蛋白的净负电荷, 在毛细管电泳上表现为电泳迁移率加快。根据迁移率的增高程度, 分析 Ox-LDL 的含量^[28-29]。

2.4 金纳米粒子联合 LC-ESI-MS/MS 该法定量检测 Ox-LDL 结合了抗原抗体特异性结合及 LC-ESI-MS/MS 的敏感性两大优势。使用交联剂将抗 Ox-LDL 抗体固化到金纳米粒子 (GNPs) 或者使用交联剂

将待测氧化磷脂与 GNPs 结合,用超声波等处理措施将待测物质反复洗脱、提纯,随即使使用高度特异和敏感的液相色谱仪串联质谱仪分析^[30-31]。与传统方法相比,金纳米粒子联合 LC-ESI-MS/MS 可大大提高 Ox-LDL 中氧化磷脂的检出率。

2.5 共轭双烯法 超速密度梯度离心法分离血浆中的 LDL,体外 Cu^{2+} 介导 LDL 氧化修饰,脂蛋白内的多聚不饱和脂肪酸被氧化形成共轭双烯(CD)^[32]。CD 在 234 nm 处有最大吸收峰。动态监测 LDL 氧化过程,分为 3 个阶段:延滞阶段、增殖阶段、降解阶段。主要通过延滞时间来间接表示 LDL 的氧化易感性。

2.6 TBARS、FOX 分析等间接反应方法 脂质氧化过程中的产物可以与硫代巴比妥酸反应生成硫代巴比妥酸反应物(TBARS),反应物经离心、正丁醇提取后在 532 nm 处有最大吸收峰。然后与四乙基丙烷配制的标准溶液的吸光度相比来反映 Ox-LDL 的浓度^[33]。血浆中的糖和氨基酸都可以与硫代巴比妥酸反应,因此该法缺乏特异性。Fox1B 试剂为二甲酚橙、硫酸亚铁铵、蔗糖、BHT、硫酸,与样本反应后离心在 580 nm 处测吸光度。结果为每单位胆固醇中过氧化物的含量^[34]。

2.7 质子核磁共振光谱法 Ox-LDL 在 1.17、1.18、1.20 ppm 三处具有特征性的共振态,从而与天然的 LDL 相鉴别。该方法的优点是不需特殊的预处理,检测需要的时间少,具有高度敏感性,可同时检测出所有的 LDL 氧化产物^[35]。

3 小 结

目前检测血浆 Ox-LDL 尚未有一个标准化的方法,其中 ELISA 法仍是检测血浆 Ox-LDL 比较成熟和最为常用的方法。但是 Ox-LDL 是多种异源性颗粒不同氧化程度的混合物,单抗识别的只是氧化修饰 LDL 中的一部分而非整个颗粒。随着对 Ox-LDL 深入研究及检测方法的发展,毛细管电泳、荧光探针、金纳米粒子联合 LC-ESI-MS/MS 等特异度强、灵敏度高的方法出现,为 Ox-LDL 的精准检测提供了发展方向。目前仍缺乏不同种 Ox-LDL 检测方法间比较的完整数据,不同方法间的差异性、一致性如何尚不明确。因此研发特异度强、灵敏度高、准确度高、具有标准化的 Ox-LDL 定量检测方法,尽早应用到临床检测,为动脉粥样硬化的早发现、早诊断、早治疗提供依据。

参考文献

[1] SKÅLÉN K, GUSTAFSSON M, RYDBERG E K, et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis[J]. *Nature*, 2002, 417 (6890): 750-754.

[2] KATTOOR A J, POTHINENI N V, PALAGIRI D, et al. Oxidative stress in atherosclerosis[J]. *Curr Atheroscler*

Rep, 2017, 19(11): 42-53.

[3] ITABE H, UEDA M. Measurement of plasma oxidized low-density lipoprotein and its clinical implications[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2007, 14(1): 1-11.

[4] TRPKOVIC A, RESANOVIC I, STANIMIROVIC J, et al. Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of cardiovascular diseases[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2015, 52(2): 70-85.

[5] AKHMEDOV A, SPESCHA R D, PANENI F A, et al. ENDOTHELIAL OVEREXPRESSION OF LOX-1 INCREASES STROKE SIZE IN VIVO[J]. *J Vasc Res*, 2013, 50(1): 4159.

[6] AHMADVAND H, BAGHERI S, KHOSROBEIGI A A, et al. Effects of olive leaves extract on LDL oxidation induced-CUSO₄ in vitro[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2012, 25(3): 571-575.

[7] LIANG C, WANG Q S, YANG X, et al. Oxidized low-density lipoprotein stimulates epithelial sodium channels in endothelial cells of mouse thoracic aorta[J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(8): 1318-1328.

[8] FU Z W, ZHOU E C, WANG X, et al. Oxidized low-density lipoprotein-induced microparticles promote endothelial monocyte adhesion via intercellular adhesion molecule 1[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2017, 313(5): C567-C574.

[9] PLOTKIN J D, ELIAS M G, DELLINGER A L. NF- κ B inhibitors that prevent foam cell formation and atherosclerotic plaque accumulation[J]. *Nanomedicine*, 2017, 13(6): 2037-2048.

[10] LIU J, REN Y, KANG L, et al. Oxidized low-density lipoprotein increases the proliferation and migration of human coronary artery smooth muscle cells through the upregulation of osteopontin[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(5): 1341-1347.

[11] LIANG C H, WANG X C, HU J P, et al. PTPRO promotes oxidized Low-Density lipoprotein induced oxidative stress and cell apoptosis through Toll-Like receptor 4/nuclear factor κ B pathway[J]. *Cellular Physiol Bio*, 2017, 42(2): 495-505.

[12] CARNEVALE R, BARTIMOCCIA S, NOCELLA C, et al. LDL oxidation by platelets propagates platelet activation via an oxidative stress-mediated mechanism[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 237(1): 108-116.

[13] OBERMAYER G, AFONYUSHKIN T, BINDER C J. Oxidized low density lipoprotein in inflammation-driven thrombosis[J]. *J Thromb Haemost*, 2018, 16(3): 418-428.

[14] KATAOKA H, KUME N, MIYAMOTO S, et al. Oxidized LDL modulates Bax/Bcl-2 through the lectinlike Ox-LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(6): 955-960.

[15] SIGALA F, KOTSINAS A, SAVARI P, et al. Oxidized LDL in human carotid plaques is related to symptomatic carotid disease and lesion instability[J]. *J Vasc Surg*,

- 2010,52(3):704-713.
- [16] VERHOYE E, LANGLOIS M R, ASKLEPIOS I. Circulating oxidized low-density lipoprotein; a biomarker of atherosclerosis and cardiovascular risk? [J]. Clin Chem Labor Med, 2009, 47(2):128-137.
- [17] PALINSKI W, HÖRKKÖ S, MILLER E, et al. Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice, demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma[J]. J Clin Invest, 1996, 98(3):800-814.
- [18] HOLVOET P, MACY E, LANDELOOS M, et al. Analytical performance and diagnostic accuracy of immunometric assays for the measurement of circulating oxidized LDL [J]. Clin Chem, 2006, 52(4):760-764.
- [19] ITABE H, YAMAMOTO H, SUZUKI M, et al. Oxidized phosphatidylcholines that modify proteins. Analysis by monoclonal antibody against oxidized low density lipoprotein[J]. J Biol Chem, 1996, 271(52):33208-33217.
- [20] KOHNO H, SUESHIGE N, OGURI K, et al. Simple and practical sandwich-type enzyme immunoassay for human oxidatively modified low density lipoprotein using anti-oxidized phosphatidylcholine monoclonal antibody and anti-human apolipoprotein-B antibody [J]. Clin Bio Chem, 2000, 33(4):243-253.
- [21] PENNY W F, BEN-YEHUDA O, KUROE K, et al. Improvement of coronary artery endothelial dysfunction with lipid-lowering therapy: heterogeneity of segmental response and correlation with plasma-oxidized low density lipoprotein[J]. J Am Coll Cardiol, 2001, 37(3):766-774.
- [22] KUMANO-KURAMOCHI M, FUJIMURA T, KOMBA S A, et al. Screening, expression, and characterization of an anti-human oxidized low-density lipoprotein single-chain variable fragment[J]. J Biosci Bioeng, 2016, 122(3):287-293.
- [23] LOPEZ L R, BUCKNER T R, HURKEY B L, et al. Determination of oxidized low-density lipoproteins(ox-LDL) versus ox-LDL/beta2GPI complexes for the assessment of autoimmune-mediated atherosclerosis [J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1109(1):303-310.
- [24] CRISBY M, HENAREH L, AGEWALL S. Relationship between oxidized LDL, IgM, and IgG autoantibodies to ox-LDL levels with recurrent cardiovascular events in Swedish patients with previous myocardial infarction[J]. Int J Offender Ther Comp Criminol, 2014, 65(10):932-936.
- [25] BINDER C J, HÖRKKÖ S, DEWAN A, et al. Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation; molecular mimicry between Streptococcus pneumoniae and oxidized LDL[J]. Nat Med, 2003, 9(6):736-743.
- [26] MAIOLINO G, PEDON L, CESARI M, et al. Antibodies to malondialdehyde oxidized low-density lipoproteins predict long term cardiovascular mortality in high risk patients[J]. Int J Cardiol, 2013, 168(1):484-489.
- [27] SATO A, YAMAZAKI Y, EBINA K. A method for in vitro measurement of oxidized Low-Density lipoprotein in blood, using its antibody, Fluorescence-Labeled heptapeptide and polyethylene glycol[J]. J Fluoresc, 2017, 27(6):1985-1993.
- [28] ZINELLU A, SOTGIA S, GALISTU F, et al. Applications on the monitoring of oxidative modification of LDL by capillary electrophoresis; a comparison with spectrophotometer assay[J]. Talanta, 2004, 64(2):428-434.
- [29] STOCKS J, MILLER N E. Analysis of apolipoproteins and lipoproteins by capillary electrophoresis[J]. Electrophoresis, 1999, 20(10):2118-2123.
- [30] HINTERWIRTH H, STUEBINGER G, LINDNER W A. Gold nanoparticle-conjugated anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies for targeted lipidomics of oxidative stress biomarkers [J]. Anal Chem, 2013, 85(17):8376-8384.
- [31] HALLER E, STUEBINGER G, LAFITTE D, et al. Chemical recognition of Oxidation-Specific epitopes in Low-Density lipoproteins by a nanoparticle based concept for trapping, enrichment, and liquid Chromatography-Tandem mass spectrometry analysis of oxidative stress biomarkers [J]. Anal Chem, 2014, 86(19):9954-9961.
- [32] ESTERBAUER H, STRIEGL G, PUHL H, et al. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein[J]. Free Radic Res Commun, 1989, 6(1):67-75.
- [33] WALLACE S, VAUGHN K, STEWART B W, et al. Milk thistle extracts inhibit the oxidation of Low-Density lipoprotein(LDL) and subsequent scavenger Receptor-Dependent monocyte adhesion [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(11):3966-3972.
- [34] NOUROOZZADEH J, TAJADDINISARMADI J, WOLFF S P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine[J]. Anal Biochem, 1994, 220(2):403-409.
- [35] SANDER P R, PEER M, GRANDL M, et al. NMR spectroscopy of macrophages loaded with native, oxidized or enzymatically degraded lipoproteins[J]. PLoS One, 2013, 8(2):118-125.