

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

利用等距毛細管電泳法來研究富含三酸甘油酯之脂蛋白與
臨床粥狀硬化性疾病發生之關連(3/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2314-B-002-017-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院內科

計畫主持人：許秀卿

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 11 月 9 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

利用等距毛細管電泳法來研究富含三酸甘油酯之脂蛋白與
臨床粥狀硬化性疾病發生之關連 (3/3)
**Study on the Clinical Implication of Triglyceride-rich
Lipoprotein of Hypertriglyceridemic Patients by Capillary
Isotachopheresis (3/3)**

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC 93-2314-B-002-017

執行期間：93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

計畫主持人：許秀卿

共同主持人：李源德、陳明豐

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

執行單位：國立台灣大學醫學院內科

中華民國九十四年十月三十一日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

利用等距毛細管電泳法來研究富含三酸甘油酯之脂蛋白與臨床粥狀硬化性疾病
發生之關連(3/3)

Study on the Clinical Implication of Triglyceride-rich Lipoprotein of Hypertriglyceridemic Patients by Capillary Isotachopheresis (3/3)

計劃編號：NSC 93-2314-B-002-017

執行期限：93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

主持人：許秀卿 教授 執行機構及單位名稱：國立台灣大學醫學院內科

電子信箱：hhching@ha.mc.ntu.edu.tw

一、中文摘要

愈來愈多的實驗以及臨床上證據說明富含三酸甘油酯之脂蛋白 (Triglyceride-rich lipoprotein, TGRL) 在粥狀硬化形成之過程中扮演重要角色。血液中攜帶三酸甘油酯的脂蛋白具有許多種，例如乳糜微粒，大小粒子極低密度脂蛋白，以及與殘存物，這些粒子通稱為 TGRL。由於這些 TGRL 的異質性與複雜性，很難區隔，而且其致粥狀硬化特性也不一致，本計劃的主要目標在利用等距毛細管電泳法將血中 TGRL 區分為子類，來探討 TGRL 子類分佈與粥狀硬化疾病發生的關連。

當將 TGRL 分成五個波峰，分別稱之為 TGRL₁、TGRL₂、TGRL₃、TGRL₄ 和 TGRL₅ 等。在正常血脂的受試者檢體之 TGRL₁~TGRL₅ 所佔脂蛋白粒子的百分比為 11.8 ± 2.5 ，而各子類的分佈會隨著受試者不同而有差異。而罹患冠狀心臟病的人，其 TGRL₁ 的含量較一般健康者為高 (8.2 ± 1.6 vs. 4.5 ± 1.6)，而 TGRL₂ 的量也有增加的傾向，當合併 TGRL₁ 及 TGRL₂，則趨勢更加明顯，統計上的差異更加顯著。此外，其他 TGRL 粒子，包括 TGRL₃、TGRL₄、TGRL₅ 也會有個別性的差異。但並未發現與心血管疾病相關險項因子具差異性，當以一般生化分析測得血漿三酸甘油酯較高時，相對地在等距毛細管分析的結果也呈現出 TGRL 的粒子無論何種子類皆增加，但各別增加的程度是有差異性的。很有趣的發現是，在高三酸甘油酯血症的受試者中，若其在臨床上有冠心病症的病徵，則其增加 TGRL₁ 和 TGRL₂ 所佔的

人員比例相對地沒有病徵的組別為高。當將血脂中全部脂蛋白子類加入自變數分析項中，以罹患冠心病當做應變項則得到當高密度脂蛋白子類 2 波峰(HDL2)多量，TGRL1 含量多，以及低密度脂蛋白子蛋白第四波峰(LDL4)含量多時比相對應的組別之粗 odd ratios 為 5.65 倍 ($P < 0.001$)，當以性別、年齡、高血壓等因子校正後的 odd ratios 亦達 4.36 倍 ($p < 0.01$)，至於是否可以依增加 TGRL₁、HDL2、LDL4 的量多寡來加以判別冠心病呢？冠心病其形成是為多樣因子所造成，因此，其應是眾多險項因子之一理當和其他可能的因子一併考量，才能有更確切的結論，而進一步探討這些子類的生物特性誠屬必需。

二、英文摘要

Increasing experimental and clinical evidences suggest that triglyceride-rich lipoprotein (TGRL) play a significant role in the pathogenesis of atherosclerosis. The TGRL is composed of a number of different lipoprotein and can be identified, separated and/or quantified in plasma according to their density, charge, size, specific lipid component, apoprotein composition. This study is nevertheless under way for more accurate and clinical applicable TGRL assays that will be better define coronary artery disease risk in patients with hypertriglyceridemia. Isotachopheresis, a high resolvable technique of capillary electrophoresis, was used to separate plasma lipoproteins according their net charge and without molecular sieve effects. In the present study, plasma lipoproteins were separated into four subclasses of low density lipoprotein (LDL1~ LDL4), five subclasses of TGRL (TGRL1~ TGRL5) and two subclasses of high density lipoprotein (HDL1~ HDL2). The TGRL1 levels was higher in hypertriglyceridemic patients with coronary artery diseases (CAD) as compared with subjects without CAD (8.2 ± 1.6 VS. 4.5 ± 1.6). Interesting, the statistical analysis showed that high levels of HDL2, TGRL1 and LDL4 subclasses were associated to atherogenesis. Although other plasma lipoprotein subclass distributions were individually different, they were not associated with other atherogenic risk factors or related to atherogenesis. Some clinical cases showed the level of HDL2, TGRL1 and/or LDL4 subclasses distribution was predictive for CAD, however, the characteristics and biological effects of these lipoprotein subclasses will be further

exploded.

三、前言

愈來愈多的實驗以及臨床上證據說明富含三酸甘油酯之脂蛋白 (Triglyceride-rich lipoprotein, TGRL) 在粥狀硬化形成之過程中扮演重要角色。因此，關於正確測量血漿中三酸甘油酯濃度以及治療高三酸甘油酯血症就亦形重要。血液中攜帶三酸甘油酯的脂蛋白具有許多種，例如乳糜微粒，大小粒子極低密度脂蛋白，以及與殘存物，這些粒子通稱為 TGRL。由於這些 TGRL 的異質性與複雜性，很難區隔，而且其致粥狀硬化特性也不一致，造成解析的困難度。分析 TGRL 粒子目前並沒有一致性，發展出一套直接簡便正確的定量 TGRL 的分析方法，並且證明此分析結果可應用於冠狀動脈疾病的評估特別是分析高三酸甘油酯血症的病人，就是目前迫切需要的。

本計劃的主要目標在發展出一套等距毛細管電泳法其可將血中 TGRL 區分為子類，並利用已建立等距毛細管電泳分析法來探討 TGRL 子類分佈與粥狀硬化疾病發生的關連，並進一步探討致病 TGRL 子類的組成特性。並且將分析結果以將與傳統上常用分析方法做一比較，以期為臨床上提供一簡便正確的血脂蛋白定量分析，特別是應用於高三酸甘油酯患者的血脂蛋白分析上，以及提供可靠性的危險因子評估。

四、研究材料與方法

受試者選擇於台大醫院門診追蹤或住院病人，具有至少觀察一年以上，於觀察期間經 3 次以上測定血漿三酸甘油酯濃度大於 200 mg/dl 而且經心導管證實有無冠狀動脈疾病。對照組則將取年齡、性別和試驗組相匹配之健康人，受試者在隔夜空腹 12 小時以上，經靜脈抽血 15 CC、分離血清血球，並將收集之血清通過 0.45 μm 孔徑的過濾膜以便去除雜質。取已過濾的血漿 50 μl 的體積，加入 25 μl 的 1% Sudan Black B，使體積比為 2:1。Sudan Black B 為一種脂溶性的染劑，可專一性的與脂質結合，將均勻混合含 Sudan Black B 的血清，置於 4°C，避光反應三十分鐘。反應完之後，則加入由各種胺基酸和 peptide

所組成的間隔物 36 μ l。毛細管電泳系統進行分析之過程中需要 leading electrolyte、terminating electrolyte 及 DB-1 Column。首先利用 20.0 psi 的壓力將 leading buffer 注滿並沖洗 DB-1 column 五分鐘，再採用 0.5 psi 的壓力連續注射樣品十秒鐘之後，以 12.0 KV 的電壓通電二十分鐘分離脂蛋白，最後於 570 nm 的波長下偵測並收集每一個 peak 的變化。所得各組間的 TGRL 的子類含量，以及脂質或過氧化物等危險因子，比較採用 Kruskal-Walsh 試驗接著用 Dunnett multiple-comparison 試驗來比較其差異。另將計算脂蛋白子類對各種疾病之關係，包括粗 odds ratios 以及其他因子校正後之 odds ratios。

五、結果與討論

本研究利用等距毛細管電泳將血漿中的子彈白區分子類，其中高密度脂蛋白區分為二個波峰，TGRL 則可區分為五個波峰，而低密度脂蛋白則區分為 4 個波峰。在正常血脂的受試者之檢體 TGRL1-TGRL5 所佔全部脂蛋白粒子量的百分比為 11.8 ± 2.5 而其中各子類的分布亦隨著受試者不同而有差異性。當將罹患冠心病組和健康者比較其 TGRL1 的含量明顯增加 ($8.2 \pm 1.6\%$ vs. $4.5 \pm 1.6\%$)，而 TGRL2 的量亦有增加傾向，若合併兩者含量則益發顯著區隔兩組的差異性。在冠心病組中其 TGRL3、TGRL4 及 TGRL5 的分布量具有很大的差異性，當將三者含量合併計算則總量高於控制對照組，但未達統計意義的區別。而以 TGRL1-TGRL5 為變數來分析和其他冠心病高脂血因子除外的險項因子的相關性時，並未有具統計意義的發現，有趣的發現是當將血脂中全部脂蛋白子類加入自變數分析項中，以罹患冠心病當做應變項則得到當高密度脂蛋白子類 2 波峰(HDL2)多量，TGRL1 含量多，以及低密度脂蛋白子蛋白第四波峰(LDL4)含量多時比相對應的組別之粗 odd ratios 為 5.65 倍 ($P < 0.001$)，當以性別、年齡、高血壓等因子校正後的 odd ratios 亦達 4.36 倍 ($p < 0.01$)，由此統計分析結果亦吻和目前已知的報告所言粥狀硬化所導致的冠心病是為多樣因子所造成，然單就脂蛋白的種類而言，除了目前已被相當熟悉應用脂蛋白分類 – 極低密度脂蛋白、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白之外，再將其細分子類，可以更精準地分析受試者

的致粥狀硬化性的脂蛋白(如本研究分析中所提的 HDL2、TGRL1 和 LDL4)的含量，如此對於其罹患週狀硬化性疾病的預測，乃至臨床上的治療都有莫大助益，例如本研究利用等距毛細管電泳法來分析多位年紀約為 60-70 歲罹患家族性高脂血症病人，其於門診追蹤治療長達 10-20 年，並已接受心導管顯影檢查並沒有冠狀動脈狹窄，阻塞性病徵，但長久以來血脂肪分析報告指出其三酸甘油酯介於 400-1000 mg/dL，HDL-Cholesterol 介於 20-35 mg/dL、LDL-Cholesterol 介於 280-400 mg/dL 之間，若依據血脂報告，此人應該是為冠狀動脈的高危險群，其預測和臨床血管顯影結果很難吻合，極難用已知的學理來解釋。然而當本研究用毛細管電泳分析其血脂時結果顯示，這些人的 HDL2 量、TGRL1 以多 LDL4 粒子的含量並沒有特別多，亦即和正常健康人的含量相類同，此分析結果亦較能吻合臨床冠狀動脈顯影結果，對於以子類的分析能吻合臨床檢測結果是值得將本分析方法推行於臨床分析應用，然而關於各子類間的差異，生物特性則待進一步研究加以釐清。

參考文獻

Belani SS. Goldberg AC. Coyne DW. Ability of non-high-density lipoprotein cholesterol and calculated intermediate-density lipoprotein to identify nontraditional lipoprotein subclass risk factors in dialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases*. 43(2):320-9, 2004

Hammad SM. Powell-Braxton L. Otvos JD. Eldridge L. Won W. Lyons TJ. Lipoprotein subclass profiles of hyperlipidemic diabetic mice measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Metabolism: Clinical & Experimental*. 52(7):916-21, 2003

Johnson JL. Slentz CA. Duscha BD. Samsa GP. McCartney JS. Houmard JA. Kraus WE. Gender and racial differences in lipoprotein subclass distributions: the STRRIDE study. *Atherosclerosis*. 176(2):371-7, 2004

Klein RL. McHenry MB. Lok KH. Hunter SJ. Le NA. Jenkins AJ. Zheng

- D. Semler AJ. Brown WV. Lyons TJ. Garvey WT. DCCT/EDIC Research Group. Apolipoprotein C-III protein concentrations and gene polymorphisms in type 1 diabetes: associations with lipoprotein subclasses. *Metabolism: Clinical & Experimental*. 53(10):1296-304, 2004
- Lee W. Min WK. Chun S. Jang S. Kim JQ. Lee do H. Park JY. Park H. Son JE. Low-density lipoprotein subclass and its correlating factors in diabetics.[erratum appears in Clin Biochem. 2004 Mar;37(3):245]. *Clinical Biochemistry*. 36(8):657-61, 2003
- Lyons TJ. Jenkins AJ. Zheng D. Lackland DT. McGee D. Garvey WT. Klein RL. Diabetic retinopathy and serum lipoprotein subclasses in the DCCT/EDIC cohort. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 45(3):910-8, 2004
- Petersen M. Dyrby M. Toubro S. Engelsen SB. Norgaard L. Pedersen HT. Dyerberg J. Quantification of lipoprotein subclasses by proton nuclear magnetic resonance-based partial least-squares regression models. *Clinical Chemistry*. 51(8):1457-61, 2005.
- Soedamah-Muthu SS. Chang YF. Otvos J. Evans RW. Orchard TJ. Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. Lipoprotein subclass measurements by nuclear magnetic resonance spectroscopy improve the prediction of coronary artery disease in Type 1 diabetes. A prospective report from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetologia*. 46(5):674-82, 2003
- Superko HR. Enas EA. Kotha P. Bhat NK. Garrett B. High-density lipoprotein subclass distribution in individuals of Asian Indian descent: the National Asian Indian Heart Disease Project. *Preventive Cardiology*. 8(2):81-6, 2005.
- Superko HR. McGovern ME. Raul E. Garrett B. Differential effect of

two nicotinic acid preparations on low-density lipoprotein subclass distribution in patients classified as low-density lipoprotein pattern A, B, or I. *American Journal of Cardiology*. 94(5):588-94, 2004