

## 冠心病患者血清抗丙二醛-乙醛加合物抗体 IgG 水平变化及其临床意义

潜学勤, 杨德光, 董瑞, 郑德仲, 卓茹, 何彩云, 吕倩, 高燕男, 周滔

(南方医科大学第三附属医院心内科, 广东省广州市 510630)

[关键词] 抗丙二醛-乙醛加合物抗体 IgG; 不稳定型心绞痛; 急性心肌梗死

[摘要] **目的** 探讨不同类型冠心病患者血清抗丙二醛-乙醛加合物抗体 IgG 水平变化及其临床意义。**方法** 87 例入选患者根据临床及冠状动脉造影结果分为对照组 30 例, 稳定型心绞痛组 15 例, 不稳定型心绞痛组 12 例, 急性心肌梗死组 30 例。应用 ELISA 测定血清抗丙二醛-乙醛加合物抗体 IgG 水平。**结果** 稳定型心绞痛组、不稳定型心绞痛组和急性心肌梗死组血清抗丙二醛-乙醛加合物抗体 IgG 水平显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 急性心肌梗死组和不稳定型心绞痛组血清抗丙二醛-乙醛加合物抗体 IgG 水平显著高于稳定型心绞痛组 ( $P < 0.05$ ), 而不稳定型心绞痛组和急性心肌梗死组无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。**结论** 血清抗丙二醛-乙醛加合物抗体 IgG 水平和冠心病的发生发展明显相关, 对冠心病尤其是急性冠状动脉综合征有很好的预测作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Changes and Clinical Significance of Serum IgG Antibodies Against Malondialdehyde-acetaldehyde Adducts in Patients with Coronary Heart Disease

QIAN Xue-Qin, YANG De-Guang, DONG Rui, ZHENG De-Zhong, ZHUO Ru, HE Cai-Yun, LV Qian, GAO Yan-Nan, and ZHOU Tao

(Department of Cardiology, the Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510630, China)

[KEY WORDS] IgG Antibodies Against Malondialdehyde-acetaldehyde Adducts; Unstable Angina Pectoris; Acute Myocardial Infarction

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the changes and its clinical significance of serum IgG antibodies against malondialdehyde-acetaldehyde adducts in patients with different types of coronary heart disease. **Methods** 87 patients were divided into four groups according to the clinical condition and coronary angiography results: control group ( $n = 30$ ), stable angina pectoris group ( $n = 15$ ), unstable angina pectoris group ( $n = 12$ ), acute myocardial infarction group ( $n = 30$ ). Serum levels of IgG antibodies against malondialdehyde-acetaldehyde adducts were determined by ELISA. **Results** The serum levels of IgG antibodies against malondialdehyde-acetaldehyde adducts in the stable angina pectoris group, unstable angina pectoris group and acute myocardial infarction group were significantly higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ), the serum levels of IgG antibodies against malondialdehyde-acetaldehyde adducts in the acute myocardial infarction group and unstable angina pectoris group were significantly higher than those in the stable angina pectoris group ( $P < 0.05$ ), there was no significant difference between unstable angina pectoris group and acute myocardial infarction group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The serum levels of IgG antibodies against malondialdehyde-acetaldehyde adducts were related to the development of coronary heart disease, which had a good predictive effect on coronary heart disease, especially in patients with acute coronary syndrome.

[收稿日期] 2016-02-04

[修回日期] 2016-04-01

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81300119);广东省自然科学基金项目(2015A030313277 和 2015A030313264)

[作者简介] 潜学勤, 硕士研究生, 主要研究方向为冠心病及动脉硬化, E-mail 为 qianjackie01@163.com。杨德光, 博士, 副主任医师, 主要研究方向为冠心病介入治疗, E-mail 为 yangguang98198@vip.sina.com。通讯作者周滔, 博士, 主任医师, 主要研究方向为冠心病介入治疗, E-mail 为 zhoutao6240@sina.com。

研究已证实脂质沉积、斑块表面基质降解、斑块新生血管形成和炎症浸润是冠状动脉粥样硬化斑块进展与破裂的重要机制<sup>[1]</sup>,丙二醛(malondialdehyde,MDA)是多不饱和脂肪酸过氧化反应的产物,在体内可降解为乙醛<sup>[2]</sup>。丙二醛、乙醛能和蛋白质上的赖氨酸氨基残基反应,进而形成丙二醛-乙醛(malondialdehyde-acetaldehyde,MAA)加合物<sup>[3]</sup>,以往研究发现动脉粥样斑块组织中存在MAA加合物及其特异性抗体IgG<sup>[4-6]</sup>,且已证实MAA加合物及其特异性抗体IgG与体内的脂质代谢和斑块炎症活动是明显相关的,临床研究也发现MAA加合物及其特异性抗体IgG与冠心病相关。本研究通过检测87例我科住院患者的血清抗MAA加合物抗体IgG水平,旨在探讨冠心病患者血清抗MAA加合物抗体IgG水平变化及其临床意义,为其临床应用提供理论依据。

## 1 对象和方法

### 1.1 研究对象

选取2014年11月至2015年11月在我科住院并接受冠状动脉造影的患者87例。30例对照组,入选标准:根据临床表现及冠状动脉造影排除冠心病。15例稳定型心绞痛(stable angina pectoris,SAP)患者,入选标准:参照2013年ESC稳定性冠状动脉疾病管理指南<sup>[7]</sup>,并结合病史、临床症状、心电图改变及实验室检查,至少有>3个月的典型心绞痛。12例不稳定型心绞痛(unstable angina pectoris,UAP)患者,入选标准:初发型心绞痛、劳累恶化型心绞痛、静息心绞痛,且在入院前48h内至少发作1次心绞痛。30例急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)患者,入选标准:参照2012年ESC ST段抬高AMI患者管理指南<sup>[8]</sup>诊断AMI。患者中已剔除:①长期大量饮酒患者;②近期接受过抗氧化治疗患者;③腹主动脉瘤患者;④陈旧性心肌梗死患者;⑤有脑血管意外病病史(如既往有短暂性脑缺血发作、脑梗死、脑出血等)患者;⑥肝硬化患者;⑦肿瘤患者;⑧自身免疫系统疾病患者。所有患者以无抗凝管抽取肘静脉血3mL,标本在抽血后1h内以3000r/min离心20min,分离血清,-80℃冰箱保存,其中AMI患者于冠状动脉介入治疗前完成标本的采集。

### 1.2 血清抗MAA加合物抗体IgG水平检测

1.2.1 丙二醛的制备 丙二醛性质不稳定,故选

用Marnett等<sup>[9]</sup>描述的方法制备丙二醛。1.1g1,1,3,3-四乙氧基丙烷(北京索莱宝公司)和5gDowex50(上海慈太龙公司)在10mL水中混匀,室温下反应30min,使用5N和1N氢氧化钠滴定pH值至7.0,滤除Dowex50。使用饱和乙酸乙酯(上海芃硕生物科技公司)萃取3次,保留水相并冻干,将冻干粉溶于1.5mL水中,用Sephadex LH-20(北京Biosharp公司)层析柱洗脱。液体再次冻干溶于水,制成饱和溶液,滴入丙酮至浊点后,在-15℃冰箱中静置过夜,NaMDA以白色针状结晶(260mg,1.4mmol)析出。

1.2.2 MAA加合物的制备 将1.4mmol丙二醛、0.7mmol乙醛(上海晶纯生化科技公司)、30mg人白蛋白(瑞士杰特贝林生物制品公司)、30mLPBS液体(pH7.4,0.1mol/L)混匀,氮气密封置于37℃的水浴中孵浴3天,4℃下过夜并用透析袋(北京Biosharp公司)除去未反应的丙二醛和乙醛。

1.2.3 包被显色 将MAA加合物与等体积的包被液(pH9.6,NaHCO<sub>3</sub>2.93g,Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>1.59g,加蒸馏水至1000mL)混匀,按100μL/孔加入96孔酶标板中,4℃过夜。移走上层液体,加入0.3mL缓冲液(含3%牛血清白蛋白的PBS液体,pH7.4),37℃孵浴1h,使用PBS液体(含有0.25%TritonX-100)冲洗3次。

将患者血清和包被液按1:50稀释,酶标板每孔加入0.2mL,37℃静置1h,使用PBS液体(含有0.25%TritonX-100)冲洗3次。加入辣根过氧化物酶标记小鼠抗人IgG(美国Sigma公司,1:600),37℃静置1h,并用PBS液体(pH7.4,0.1mol/L)冲洗3次,加入TMB显色剂(武汉伊莱瑞特生物科技公司),37℃静置15min后加入终止液(武汉伊莱瑞特生物科技公司),于酶标仪读取A450值。绘制标准曲线:用标准品(美国Sigma公司)吸光度值对应其浓度值做出标准曲线,在标准曲线上依据待测标本的吸光度值得出其浓度值。

### 1.3 冠状动脉造影

采用Judkins法多角度行冠状动脉造影检查,由至少两名具有冠状动脉介入资质的高年资医师独立分析冠状动脉病变情况。冠状动脉狭窄的判断采用目测直径法,即血管狭窄程度=(狭窄近心端正常血管直径-狭窄处直径)/狭窄近心端正常血管直径×100%,以冠状动脉直径狭窄大于50%定义为冠心病病变。

### 1.4 统计学方法

利用SPSS 19.0统计软件进行统计分析,计量

资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,行方差齐性检验后采用单因素方差分析,两变量间的相关性采用 Pearson 相关性分析,率的比较采用  $\chi^2$  检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 基线资料

对照组、SAP 组、UAP 组及 AMI 组患者在年龄、性别构成、吸烟、糖尿病、高脂血症、血清肌酐、低密

度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)、载脂蛋白 A1 及载脂蛋白 B 方面差异无显著性( $P>0.05$ ;表 1)。

### 2.2 对照组和冠心病组血清抗 MAA 加合物抗体 IgG 水平变化

SAP 组、UAP 组和 AMI 组血清抗 MAA 加合物抗体 IgG 水平显著高于对照组( $P<0.05$ ),AMI 组和 UAP 组血清抗 MAA 加合物抗体 IgG 水平显著高于 SAP 组( $P<0.05$ ),而 UAP 组与 AMI 组差异无显著性( $P>0.05$ ;表 2 和图 1)。

表 1. 患者一般资料比较

Table 1. Comparison of general data of patients

项目	对照组(n=30)	SAP 组(n=15)	UAP 组(n=12)	AMI 组(n=30)
年龄(岁)	56.5±15.2	56.4±14.2	60.8±11.3	58.6±13.4
男/女(例)	16/14	11/4	8/4	22/8
吸烟	23.3%	40%	50%	46.7%
高血压	26.6%	33.3%	30%	40%
糖尿病	20%	40%	41.6%	36.7%
高脂血症	20%	33.3%	30%	40%
肌酐(μmol/L)	81.2±6.4	85.1±12.8	82.5±10.7	88.8±6.3
LDL(mmol/L)	2.9±0.9	3.1±0.7	2.7±0.5	3.1±0.8
HDL(mmol/L)	1.3±0.4	1.3±0.3	1.3±0.3	1.2±0.2
载脂蛋白 A1(g/L)	1.5±0.4	1.4±0.4	1.4±0.3	1.3±0.4
载脂蛋白 B(g/L)	0.8±0.2	0.8±0.2	0.7±0.2	0.9±0.2

表 2. 对照组和冠心病组血清抗 MAA 加合物抗体 IgG 水平比较

Table 2. Comparison of serum levels of IgG antibodies against MAA adducts between different types of coronary heart disease group and control group

分组	例数	IgG 水平(mg/L)
对照组	30	74.7±9.6
SAP 组	15	88.5±9.5 <sup>a</sup>
UAP 组	12	103.4±8.3 <sup>ab</sup>
AMI 组	30	110.1±15.8 <sup>ab</sup>

a 为  $P<0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P<0.05$ ,与 SAP 组比较。

### 2.3 AMI 组和 UAP 组血清抗 MAA 加合物抗体 IgG 水平与 LDL/HDL 比值的相关性

对 AMI 组和 UAP 组血清抗 MAA 加合物 IgG 抗体水平与 LDL/HDL 比值进行相关性分析,结果显示,抗 MAA 加合物 IgG 抗体水平与 LDL/HDL 比值呈正相关( $r=0.57, P<0.01$ ;图 2)。

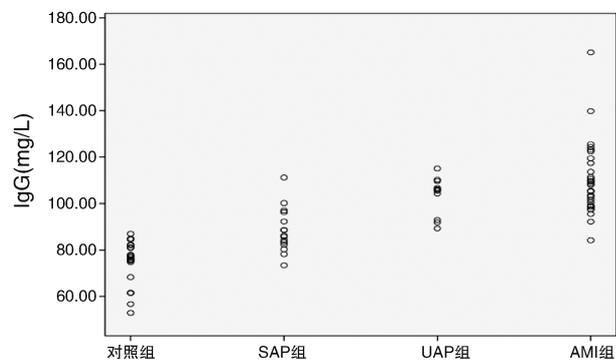


图 1. 对照组和冠心病组抗 MAA 加合物抗体 IgG 水平的散点图

Figure 1. The scatterplot of serum levels of IgG antibodies against MAA adducts between different types of coronary heart disease group and control group

## 3 讨论

随着冠心病发病机制研究的深入,慢性炎症、

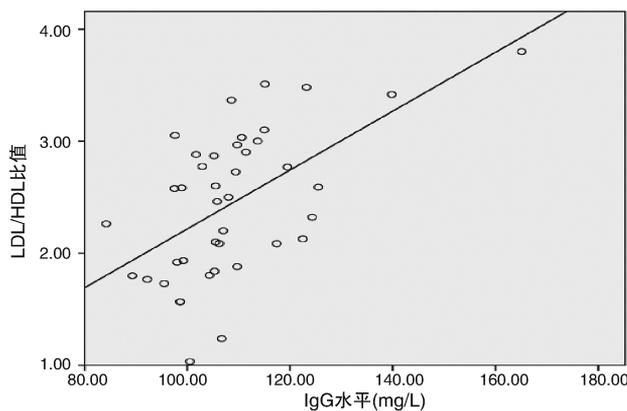


图2. AMI组、UAP组抗MAA加合物抗体IgG水平与LDL/HDL比值的相关性

Figure 2. Correlation between serum levels of IgG antibodies against MAA adducts and LDL/HDL ratio in AMI group and UAP group

脂质沉积和氧化应激的作用日益引起人们的关注,越来越多的证据表明MAA加合物及其特异性抗体与冠心病的发生发展是明显相关的。MAA加合物化学性质比丙二醛和乙醛稳定,是一种良好的反映机体氧化应激水平的指标。同时MAA加合物表面存在特异性的抗原,能够诱导机体产生特异性抗体<sup>[5]</sup>。

近年发现冠心病的高危因素如高血压、高脂血症、糖尿病、吸烟等均能导致体内MAA加合物及其特异性抗体升高<sup>[10]</sup>。本研究发现SAP组、UAP组和AMI组血清抗MAA加合物抗体IgG水平均显著高于对照组,提示MAA加合物及其抗体IgG水平和冠心病是密切相关的。由于体内IgG主要是B细胞经过亲和成熟,再次接触抗原后免疫应答产生的,血清抗MAA加合物抗体IgG水平与冠心病的相关性一般认为是MAA加合物性质所决定的。

在UAP和AMI患者中,血清抗MAA加合物抗体IgG水平与LDL/HDL比值呈正相关,提示血清抗MAA加合物抗体IgG水平与脂质代谢是明显相关的,MAA加合物可能影响脂质的代谢过程。MAA能和参与脂质代谢的多种蛋白(如载脂蛋白B100)反应,生成特异性抗体,导致载脂蛋白B100功能缺陷,使其降低对LDL的结合能力<sup>[10-11]</sup>,导致体内LDL蓄积,形成高胆固醇血症。LDL在活性氧的作用下,可形成氧化型LDL(oxidized LDL, ox-LDL), ox-LD不能经LDL受体途径进行负反馈性代谢,反而促进巨噬细胞对其大量摄取,使ox-LDL和胆固醇酯在细胞内大量蓄积,成为大脂核斑块,促进动脉粥样硬化发展及易损斑块形成<sup>[12-13]</sup>。

目前认为UAP和AMI的发病机制主要是易损斑块形成,斑块突然破裂,并在此基础上形成的血栓加重或者堵塞原狭窄血管<sup>[14]</sup>。本研究发现AMI组和UAP组血清抗MAA加合物抗体IgG水平显著高于SAP组,而UAP组与AMI组无显著性差异,提示MAA加合物及其特异性抗体IgG与冠心病的类型及其发生发展是明显相关的,血清抗MAA加合物抗体水平可能与冠状动脉粥样斑块稳定性相关,高浓度的血清抗MAA加合物抗体IgG提示粥样斑块稳定性差,易于破裂。研究发现MAA加合物及其抗体参与机体的炎症反应,MAA加合物的细胞毒作用能导致大量细胞凋亡坏死<sup>[4,15]</sup>。大量凋亡坏死的细胞提高巨噬细胞CD40的表达,而可溶性CD40配体(soluble CD40 ligand, sCD40L)引起促炎因子表达上调,促进巨噬细胞、T淋巴细胞等的组织浸润,削弱动脉斑块的纤维帽<sup>[16-19]</sup>。大脂核斑块、薄纤维帽、活跃的炎症反应导致易损斑块形成<sup>[1,20]</sup>,最终导致冠状动脉粥样斑块破裂出血,引发冠状动脉内血栓形成,导致急性冠状动脉事件发生。

综上所述,冠心病患者MAA加合物及其特异性抗体IgG水平与冠心病的发生发展明显相关,我们认为,血清抗MAA加合物抗体IgG水平可以初步评估机体的氧化应激水平和冠状动脉粥样斑块的炎症状态及其稳定性,对冠心病尤其是急性冠状动脉综合征有很好的预测作用。

#### [参考文献]

- [1] Goncalves I, den Ruijter H, Nahrendorf M, et al. Detecting the vulnerable plaque in patients[J]. *J Intern Med*, 2015, 278 (5): 520-530.
- [2] Uchida K. Lipofuscin-like fluorophores originated from malondialdehyde[J]. *Free Radic Res*, 2006, 40 (12): 1335-338.
- [3] Tuma DJ, Kearley ML, Thiele GM, et al. Elucidation of reaction scheme describing malondialdehyde-acetaldehyde-protein adduct formation[J]. *Chem Res Toxicol*, 2001, 14 (7): 822-832.
- [4] Duryee MJ, Klassen LW, Schaffert CS, et al. Malondialdehyde-acetaldehyde adduct is the dominant epitope after MDA modification of proteins in atherosclerosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49 (10): 1480-486.
- [5] Anderson DR, Duryee MJ, Shurmur SW, et al. Unique antibody responses to malondialdehyde-acetaldehyde (MAA)-protein adducts predict coronary artery disease[J]. *PLoS One*, 2014, 9 (9): e107440.
- [6] Carson JS, Xiong W, Dale M, et al. Antibodies against

- malondialdehyde-acetaldehyde adducts can help identify patients with abdominal aortic aneurysm[J]. *J Vasc Surg*, 2016, 63 (2): 477-485.
- [7] Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, et al. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease; the task force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology[J]. *Eur Heart J*, 2013, 34 (38): 2 949-3 003.
- [8] Steg PG, James SK, Atar D, et al. ESC guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation[J]. *Eur Heart J*, 2012, 33 (20): 2 569-619.
- [9] Marnett LJ, Tuttle MA. Comparison of the mutagenicities of malondialdehyde and the side products formed during its chemical synthesis [J]. *Cancer Res*, 1980, 40 (2): 276-282.
- [10] Antoniak DT, Duryee MJ, Mikuls TR, et al. Aldehyde-modified proteins as mediators of early inflammation in atherosclerotic disease[J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 89: 409-418.
- [11] Gonen A, Hansen LF, Turner WW, et al. Atheroprotective immunization with malondialdehyde-modified LDL is hapten specific and dependent on advanced MDA adducts: implications for development of an atheroprotective vaccine [J]. *J Lipid Res*, 2014, 55 (10): 2 137-155.
- [12] Ding Z, Liu S, Wang X, et al. LOX-1, oxidant stress, mtDNA damage, autophagy, and immune response in atherosclerosis [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2014, 92 (7): 524-530.
- [13] Niccoli G, Mongiardo R, Lanza GA, et al. The complex link between oxidised low-density lipoprotein and unstable angina[J]. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2007, 8 (5): 387-391.
- [14] Amsterdam EA, Wenger NK, Brindis RG, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines[J]. *Circulation*, 2014, 130 (25): 2 354-394.
- [15] Willis MS, Klassen LW, Carlson DL, et al. Malondialdehyde-acetaldehyde haptenated protein binds macrophage scavenger receptor(s) and induces lysosomal damage[J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4 (7): 885-899.
- [16] Tousoulis D, Androulakis E, Papageorgiou N, et al. From atherosclerosis to acute coronary syndromes: the role of soluble CD40 ligand[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2010, 20 (5): 153-164.
- [17] Zhao W, Zhang F, Li Z, et al. Soluble CD40 ligand is associated with angiographic severity of coronary artery disease in patients with acute coronary syndrome[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2014, 127 (12): 2 218-221.
- [18] Kwon HJ, Won YS, Park O, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 deficiency ameliorates alcoholic fatty liver but worsens liver inflammation and fibrosis in mice[J]. *Hepatology*, 2014, 60 (1): 146-157.
- [19] 董西刚, 孙林, 张戈. 易损斑块的血清标记物研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20 (6): 568-572.
- [20] 张洁, 周聊生, 史浩, 等. 易损斑块组织特征的影像学研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21 (3): 285-288.

(此文编辑 文玉珊)