

• 临床检验研究论著 •

冠心病患者血浆游离脂肪酸组分分析

林 晖, 彭素媚, 陈振皋

(南京军区福州总医院第一附属医院检验科, 福建莆田 351100)

摘 要:目的 探讨血浆游离脂肪酸(FFAs)组分及含量与冠状动脉粥样硬化性心脏病(CHD)的关系。方法 应用气相色谱技术检测 106 例 CHD 患者(CHD 组)和 106 例健康者(对照组)血浆 FFAs 各组分含量。结果 与对照组比较, CHD 组血浆游离饱和脂肪酸(软脂酸和硬脂酸)、单不饱和脂肪酸(油酸)、 ω 6-多不饱和脂肪酸(二十碳三烯酸、亚油酸、花生四烯酸)、 ω 3-PUFAs(α -亚麻酸和二十二碳六烯酸)含量明显降低($P < 0.05$), ω 6-PUFAs/ ω 3-PUFAs 比值无统计学差异($P > 0.05$)。结论 气相色谱法检测血浆 FFAs 结果稳定可靠; CHD 患者血浆 FFAs 含量较健康者明显降低, 可作为 CHD 早期监测指标应用于临床。

关键词:气相色谱; 冠心病; 游离脂肪酸

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.009

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)01-0023-02

Determination of free fatty acids in plasma of patients with coronary heart disease by gas chromatography

Lin Hui, Peng Sumei, Chen Zhengao

(Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Fuzhou General Hospital, Putian, Fujian 351100, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between free fatty acids (FFAs) contents and coronary heart disease (CHD). **Methods** Gas chromatography method was used to detect plasma levels of variant contents of FFAs in 106 patients with CHD(CHD group) and 106 healthy subjects(control group). **Results** Compared with control group, plasma level of free SFA(palmitic acid, stearic acid), MUFAs(oleic acid), ω 6-PUFAs(DGLA, linoleic acid and arachidonic acid) and ω 3-PUFAs(α -linolenic acid and ducosahexenoic acid) in CHD group significantly decreased($P < 0.05$), and the ratio of ω 6-PUFAs and ω 3-PUFAs did not change significantly($P > 0.05$). **Conclusion** Gas chromatography method could detect plasma FFAs with high sensitivity and accuracy. Plasma FFAs could become a monitoring index for CHD in clinical applications.

Key words: gas chromatography; coronary heart disease; free fatty acids

冠状动脉粥样硬化性心脏病(CHD)是一个动态的慢性炎症过程, 而多不饱和脂肪酸(PUFAs)及其代谢产物可作为炎症介质的前体分子参与调控炎症反应, 因而与冠心病发病密切相关^[1]。PUFAs 是人体必需脂肪酸, 需从食物中摄取。有研究表明食用富含 ω 3-PUFAs 的鱼和鱼油可明显降低心血管事件发病风险^[2]。 ω 3-PUFAs 具有抗炎和消炎作用, 尤其是二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)可保护血管避免发生动脉粥样硬化^[3]。脂肪酸(FA)代谢异常可导致 CHD、肿瘤、糖尿病等^[4-5]。游离脂肪酸(FFAs)的"脂毒性"逐渐成为研究热点。FFAs 是未酯化的 FA, 可与清蛋白结合而存在于血浆中。血浆 FFAs 包括饱和脂肪酸(SFA)、单不饱和脂肪酸(MUFAs)和 PUFAs。PUFAs 不仅影响细胞膜流动性、膜相关蛋白功能及信号转导通路, 并且参与炎症介质的合成。本研究通过气相色谱法测定 CHD 患者血浆 FFAs 组分及含量, 以期探讨血浆 FFAs 与 CHD 的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 于武汉亚洲心脏病医院经冠脉造影确诊的 CHD 患者 106 例(CHD 组), 男 64 例、女 42 例, 年龄(61.0 $\pm$ 9.8)岁; 同期体检健康者 106 例(对照组), 男 59 例、女 47 例, 年龄(56.7 $\pm$ 7.9)岁, 无 CHD 家族史, 排除其他心脏疾病及肝、肾疾病, 血糖、血脂等生化指标正常。两组个体间均无亲属关系。本研究经医院伦理委员会审核批准, 患者本人知情。

1.2 仪器与试剂 450 型气相色谱仪(GC)、自动进样器、320 型质谱仪(MS)、DB-WAX 型色谱柱(10 m $\times$ 0.1 mm $\times$ 0.1 μ m)均购自美国瓦里安公司; 数据分析软件 Bruker Worksta-

tion(美国布鲁克·道尔顿)。含 37 种脂肪酯的混合标准品(美国 Sigma), 优级纯硫酸、色谱纯甲醇和色谱纯正己烷(天津科密欧), NaCl(上海国药集团)。试验用水取自 Milli-Q 系统(美国 Millipore)。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件 柱温箱初始温度 40 $^{\circ}$ C, 以 25 $^{\circ}$ C/min 由 40 $^{\circ}$ C 升至 195 $^{\circ}$ C, 以 3 $^{\circ}$ C/min 由 195 $^{\circ}$ C 升至 205 $^{\circ}$ C, 以 8 $^{\circ}$ C/min 由 205 $^{\circ}$ C 升至 230 $^{\circ}$ C。载气流速 0.5 mL/min。检测器为氢火焰离子化检测器(FID), 分流比 1:30, 1 μ L 自动进样。

1.3.2 定性和定量分析 用正己烷稀释标准品, 配制 5 组脂肪酸甲酯标准液, 倍比稀释比例分别为 1:5、1:10、1:50、1:100、1:200。GC 分析后, 绘制各组峰面积-浓度标准曲线。利用标准品保留时间对待测样品各组分进行定性。定性结果经 MS 分析确认, 并利用标准曲线对待测样品各组分进行定量。

1.3.3 样品处理 采集受试对象乙二胺四乙酸二钾抗凝静脉血, 分离血浆 200 μ L 加入 2.5%硫酸/甲醇 1 mL, 混匀后置 90 $^{\circ}$ C 水浴 60 min。待酯化反应完全并冷却至室温后, 加 NaCl 溶液 1.5 mL 混匀; 加入正己烷 1 mL 震荡混匀 10 min, 静置后 3 000 r/min 离心 5 min, 取上层溶液 1 mL 用氮气吹干, 加入 500 μ L 正己烷复溶, 取 1 μ L 自动进样分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据分析。正态分布资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 偏态分布资料以中位数和四分位数[M(QL, QU)]表示; 正态分布且方差齐的两组资料比较采用 t 检验, 方差不齐或偏态分布资料采用 t' 检验或秩转换的非参数检

验;显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 方法学评价 FFAs 标准曲线在分析范围内线性关系良好, $r^2>0.99$ 。检测低限为 $0.4\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。重复性实验中,血浆 FFAs 组分软脂酸(C16:0)、十六碳烯酸(C16:1)、油酸(C18:1)、亚油酸(LA,C18:2 ω 6)、 α -亚麻酸(ALA,C18:3 ω 3)、二花生四烯酸(AA,C20:4 ω 6)日内变异系数均小于 5%。

2.2 FFAs 标准品及血浆样品色谱图 标准品 1:100 后可检出 37 个吸收峰,每个峰代表一种 FFA,见图 1。健康者及 CHD 患者血浆游离脂肪酸甲酯色谱图见图 2~3。彩图 1~3 见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”。

2.3 血浆 FA 含量分析 CHD 组与对照组血浆 FFAs 含量见表 1。CHD 组和对照组比较,饱和脂酸[C16:0 和硬脂酸 C18:0]、C18:1 及多不饱和脂酸[C18:2 ω 6、C18:3 ω 3、二十碳三烯酸(DGLA,C20:3 ω 6)、C20:4 ω 6、C22:6 ω 3)]含量显著下降($P<0.05$),其余 FFAs 成分含量及 ω 6 族脂酸/ ω 3 族脂酸比值(ω 6-PUFAs/ ω 3-PUFAs 比值)无统计学差异($P>0.05$)。

表 1 CHD 组与对照组血浆 FFAs 含量
[$\mu\text{g/mL}$, $\bar{x}\pm s$ 或 M(QL,QU)]

项目	对照组($n=106$)	CHD 组($n=106$)
软脂酸(C16:0)*	336.28 $\pm$ 73.49	287.80 $\pm$ 78.60
十六碳烯酸(C16:1)	9.76(6.19,14.05)	10.09(6.10,15.55)
硬脂酸(C18:0)*	138.98 $\pm$ 27.99	113.88 $\pm$ 31.09
油酸(C18:1)	219.66(177.91,273.07)	187.12(148.18,244.43)
LA(C18:2 ω 6)*	580.42 $\pm$ 137.39	402.07 $\pm$ 153.33
ALA(C18:3 ω 3)	7.30(4.02,11.58)	5.42(2.76,8.53)
DGLA(C20:3 ω 6)	18.02(13.99,22.78)	14.90(10.00,21.07)
AA(C20:4 ω 6)	119.93(98.01,139.65)	102.47(80.84,127.46)
EPA(C20:5 ω 3)	1.33(0.00,4.75)	1.05(0.00,3.35)
DHA(C22:6 ω 3)	40.92(30.84,53.79)	31.65(23.89,39.81)
ω 6-PUFAs/ ω 3-PUFAs 比值	13.73(10.47,16.78)	12.60(10.65,16.57)

*:数据经对数转换后采用 t 检验。

3 讨 论

血浆 FA 组分的分析方法包括高效液相色谱法(HPLC)和 GC。本文采用 GC 法(标准曲线 $r^2>0.99$,重复性好,灵敏度高,结果可靠)进行了主要 FFAs 及 DGLA、EPA、DHA 等多种微量多不饱和脂肪酸检测,结果表明 CHD 患者血浆 FFAs 各组分含量发生了显著变化。

血浆 FFAs 包括饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸,多不饱和脂肪酸可分为 ω 6-PUFAs 和 ω 3-PUFAs。本研究结果显示,CHD 患者饱和脂肪酸(软脂酸和硬脂酸)、油酸及多不饱和脂肪酸 DGLA、LA、ALA、AA 和 DHA 含量均降低,提示上述保护性脂肪酸含量降低可能与 CHD 密切相关;CHD 患者十六碳烯酸含量虽然高于健康者,但差异不具有统计学意义($P>0.05$),有待后期加大样本量进一步验证。有研究报道 PUFAs 可降低 CHD 发病风险,尤其是来自 ω 3-PUFAs 的 EPA 和 DHA^[6]。外周血 EPA 含量或 EPA/AA 降低可导致血小板脆性增加,与急性冠脉综合征的发生有关^[7]。本研究未发现 CHD 患者存在 EPA 含量异常,或许是由于 EPA 含量稍高于 GC 法检测下限所致。 ω 6-PUFAs 在 CHD 发病过程中的作用尚无定论,因为炎症细胞通过分泌 ω 6-PUFAs 刺激内皮细胞促炎基因表达,而 AA 则是前列腺素(PG)E1、PGI2、白细胞三烯等炎性介质的前体。因此,许多证实 ω 6-PUFAs 对心血管有益的研究结论并未得到公认,当然,促炎物质对适当

的免疫功能很重要,而目前并没有证据证实 ω 6-PUFAs 可促进 CHD 的发展^[8]。CHD 属于多基因复杂疾病,其发病受遗传因素和生活环境双重影响。FA 在炎症中的作用机制相当复杂,其含量异常是动脉粥样硬化发生发展的重要因素^[9-12]。

综上所述,血浆游离脂肪酸与冠心病密切相关,本文为进一步研究其致病机制提供了依据。多不饱和脂肪酸对冠心病或动脉粥样硬化患者是有益的。随着生活水平的提高,研究血浆游离脂肪酸对心血管疾病的作用非常重要,检测血浆游离脂肪酸对冠心病的预防,早期诊断及临床治疗具有重要意义。

致谢:本文得到武汉大学中南医院基因诊断中心周新教授的帮助和指导,在此表示衷心感谢!

参考文献

[1] Das UN. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology[J]. Biotechnol J, 2006, 1(4): 420-439.

[2] Iso HKM, Ishihara J, Sasaki S, et al. Intake of fish and n3 fatty acids and risk of coronary heart disease among Japanese: the Japan Public Health Center-Based (JPHC) Study Cohort I[J]. Circulation, 2006, 113(2): 195-202.

[3] Calder PC. The role of marine omega-3(n-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability[J]. Mol Nutr Food Res, 2012, 56(7): 1073-1080.

[4] Das UN. A defect in the activity of Δ 6 and Δ 5 desaturases may be a factor in the initiation and progression of atherosclerosis[J]. Prostaglandins Leukot Essen Fatty Acids, 2007, 76(5): 251-268.

[5] Sergeant SHC, Rudock ME, Ziegler JT, et al. Differences in arachidonic acid levels and fatty acid desaturase(FADS) gene variants in African Americans and European Americans with diabetes or the metabolic syndrome[J]. Bri J Nutr, 2012, 107(4): 547-555.

[6] Mozaffarian DAA, Hu FB, Stampfer MJ, et al. Interplay between different polyunsaturated fatty acids and risk of coronary heart disease in men[J]. Circulation, 2005, 111(2): 157-164.

[7] Amano TMT, Uetani T, Kato M, et al. Impact of omega-3 polyunsaturated fatty acids on coronary plaque instability: an integrated backscatter intravascular ultrasound study[J]. Atherosclerosis, 2011, 218(1): 110-116.

[8] Grenon SM, Hughes-Fulford M, Rapp J, et al. Polyunsaturated fatty acids and peripheral artery disease[J]. Vascu Med, 2012, 17(2): 51-63.

[9] Martinelli N, Consoli L, Olivieri O. A Desaturase hypothesis for atherosclerosis: Janus-Faced enzymes in ω -6 and ω -3 polyunsaturated fatty acid metabolism[J]. J Nutrigenet Nutrigenom, 2009, 2(3): 129-139.

[10] Gabriellsson BG, Wikström J, Jakubowicz R, et al. Dietary herring improves plasma lipid profiles and reduces atherosclerosis in obese low-density lipoprotein receptor-deficient mice[J]. Int J Mol Med, 2012, 29(3): 331-337.

[11] Barkia A, Mohamed K, Smaoui M, et al. Change of diet, plasma lipids, lipoproteins, and fatty acids during Ramadan; a controversial association of the considered Ramadan model with atherosclerosis risk[J]. J Health Popul Nutr, 2011, 29(5): 486-493.

[12] Torrejón C, Uauy R. Quality of fat intake, atherosclerosis and coronary disease: effects of saturated and trans fatty acids[J]. Rev Med Chil, 2011, 139(7): 924-931.