

临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002102

血清 HDL-S1P 水平与冠状动脉狭窄的相关性分析

姜 岚¹, 吕富荣², 汤小漫³

(重庆医科大学附属第一医院 1. 超声科; 2. 放射科; 3. 心内科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨血清中与高密度脂蛋白(high-density lipoproteins, HDL)结合的 1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate, S1P)即 HDL-S1P 与冠状动脉狭窄的相关性。**方法:**纳入冠状动脉造影检查确诊冠脉狭窄的患者共 40 例(狭窄组),并选取同期冠脉造影明确无狭窄者 40 例(对照组)做对照,收集患者的一般临床资料,通过超速离心法分离出血清中 HDL,使用高效液相色谱测定 HDL-S1P 浓度,并通过 ELISA 试剂盒测定血清超敏 C 反应蛋白水平,采用多因素分析方法讨论其与冠状动脉狭窄的相关性。**结果:**①冠状动脉狭窄组血清总 S1P、HDL-S1P 及 HDL 水平低于对照组,超敏 C 反应蛋白水平高于对照组[HDL-S1P: (34.17 ± 10.62) ng/mL vs. (44.66 ± 11.94) ng/mL, $P=0.000$; HDL: (1.01 ± 0.24) mmol/L vs. (1.18 ± 0.39) mmol/L, $P=0.024$; 超敏 C 反应蛋白: (2.96 ± 1.40) mg/L vs. (2.10 ± 0.99) mg/L, $P=0.002$]; ②逐步 logistic 回归分析显示, HDL-S1P 是冠脉狭窄的独立保护因素($OR=0.904$, 95% $CI=0.856\sim0.956$, $P=0.000$), 超敏 C 反应蛋白是独立危险因素($OR=1.734$, 95% $CI=1.121\sim2.682$, $P=0.013$)。 **结论:** HDL-S1P 可能是冠脉狭窄的独立预测因素,冠脉狭窄发生可能与血清 HDL-S1P 水平下降有关。

【关键词】1-磷酸鞘氨醇; 冠脉狭窄**【中图分类号】**R541.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-12-15

Association between serum level of high-density lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate and coronary artery stenosis

Jiang Lan¹, Lü Furong², Tang Xiaoman³

(1. Department of Ultrasound; 2. Department of Radiology; 3. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the association between serum level of high-density lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate (HDL-S1P) and coronary artery stenosis. **Methods:** A total of 40 patients confirmed by coronary angiography with coronary artery stenosis were selected as stenosis group, while 40 others confirmed without stenosis were selected as control group. General clinical data of the two groups were collected. HDL was isolated from serum by ultracentrifugation, and HDL-S1P concentration was determined by high-performance liquid chromatography. C-reactive protein concentration was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Multivariate analysis was performed to assess the association of HDL-S1P and C-reactive protein with coronary artery stenosis. **Results:** Compared with the control group, the stenosis group had significantly lower serum levels of total S1P, HDL-S1P, and HDL and a significantly higher C-reactive protein concentration [HDL-S1P: (34.17 ± 10.62) ng/mL vs. (44.66 ± 11.94) ng/mL, $P=0.000$; HDL: (1.01 ± 0.24) mmol/L vs. (1.18 ± 0.39) mmol/L, $P=0.024$; C-reactive protein: (2.96 ± 1.40) mg/L vs. (2.10 ± 0.99) mg/L, $P=0.002$]. Stepwise logistic regression analysis showed that HDL-S1P was an independent protective factor for coronary artery stenosis ($OR=0.904$, 95% $CI=0.856$ to 0.956 , $P=0.000$), while C-reactive protein was an independent risk factor ($OR=1.734$, 95% $CI=1.121$ to 2.682 , $P=0.013$). **Conclusion:** HDL-S1P might be an independent predictor of coronary artery stenosis, the development of which may be associated with a decrease in serum HDL-S1P.

【Key words】high-density lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate; coronary artery stenosis

作者介绍: 姜 岚, Email: helene_jiang_420@yahoo.fr,

研究方向: 医学影像诊断。

通信作者: 吕富荣, Email: lfr918@sina.com。

基金项目: 卫生部医药卫生科技发展研究中心资助项目(编号: W2014RQ01)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190505.1724.006.html>

(2019-05-07)

冠心病可引起心肌梗死、心功能衰竭甚至源性猝死等急性心血管事件,严重危害健康,其本质是冠状动脉粥样硬化(arteriosclerosis, AS)导致的冠状动脉狭窄。冠脉狭窄可选的治疗手段较多且疗效较好,故早期筛查可疑患者、预测该病发生风险尤为重要。冠脉狭窄的主要机制是血管内皮细胞损伤、炎症反应及血管重构等,通过检测相关血清标志物等炎症指标可早期识别冠脉狭窄的发生。

磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate, S1P)是一种具有生物活性的鞘磷脂,能与细胞表面的特定受体结合,在免疫、炎症反应及心血管生理及病理过程中发挥广泛作用。已有研究证实血清 S1P 水平与稳定型冠心病、心肌梗死、经皮冠状动脉介入中短暂缺血、冠状动脉支架内再狭窄等情况发生存在相关性^[1-2]。人体血浆中 65%~80% 的 S1P 与高密度脂蛋白(high-density lipoproteins, HDL)结合,即 HDL-S1P^[3]。有理论认为,血清中游离 S1P 的增加可能会促进炎症反应,进而促进动脉粥样硬化的发生^[4],与 HDL 结合部分则对心血管起保护作用^[5]。本研究旨在探讨血清 HDL-S1P 水平的改变与冠状动脉狭窄的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

纳入 2017 年 9 月至 2018 年 1 月经冠脉造影确诊的冠脉狭窄的患者为狭窄组,并选取同期冠脉造影明确冠脉未狭窄者为对照组;排除患重型炎症、恶性肿瘤、周围血管闭塞及血栓形成、自身免疫性疾病及有近期手术史等影响血清 S1P 浓度者。共入组狭窄组 40 例[男, 24 例, (67.68 ± 6.51) 岁],对照组 40 例[男 22 例, (65.45 ± 6.61) 岁]。本研究经医院医学伦理委员会审核通过,研究对象均签署知情同意书。

1.2 研究方法

收集相关临床资料:冠心病相关危险因素(性别、年龄、吸烟及饮酒史、高血压及糖尿病史)及冠脉造影时血脂指标等。

冠脉狭窄的影像学评价:行冠脉造影,由 2 名有经验的介入医生采用传统三维定量冠脉分析法(QCA 法)评估冠脉病变情况,冠脉直径狭窄 ≥ 50% 定义为狭窄,无或 < 50% 狭窄标记为未狭窄^[6]。

1.3 HDL-S1P 的检测

采集研究对象冠脉造影前 24 h 内空腹外周静脉血 5 mL,低温离心(4 °C, 3 000 r/min, 15 min)后取上层血清 1 mL,采用密度梯度超速离心法(1.069~1.210 g/mL)提取血

清中 HDL^[7],剩余血清标本统一编号后于 -80 °C 冻存。取样品 50 μL,加入 200 μL 甲醇漩涡混匀,静置 30 min 后 15000 r/min 离心 30 min,移取上清液,进样 20 μL,进行 LC-MS 测定 S1P 的浓度^[8]。基本流程:50 μL HDL 中加入 200 μL 甲醇后涡旋震荡 10 s,然后 15 000 r/min 离心 30 min。取上清至加样管中,10 μL 上清液被自动加样器注入 LC-MS/MS 系统中处理分析。LC-MS/MS 系统由质谱泵(1260 Binpump, USA),自动加样器(ThermoFinnigan, USA)和量子三重四极杆质谱仪(San Jose, USA)组成。色谱条件:column-SL(150 mm L × 2 mm i.d., 5 μm particle size and 100 Å pore size)和 C18 色谱柱(4.0 mm L × 2.0 mm i.d.) (Phenomenex, USA),流速:300 μL/min,柱温:23 °C;进样量:10 μL;流动相:流动相 A 为 0.1% 的甲酸水溶液,流动相 B 为甲醇。质谱条件:离子源,电喷雾离子源(ESI);扫描方式:正离子扫描;干燥气: N₂;干燥气温度:340 °C;干燥气流速:12 L/min;电压:4 000 V;S1P 碰撞能量的最优化转换:308.2~264.2 S1P(12 V)。超敏 C 反应蛋白检测采用酶联免疫吸附法测定。HDL-S1P 样品色谱分析图和质谱分析图如图 1、图 2 所示。

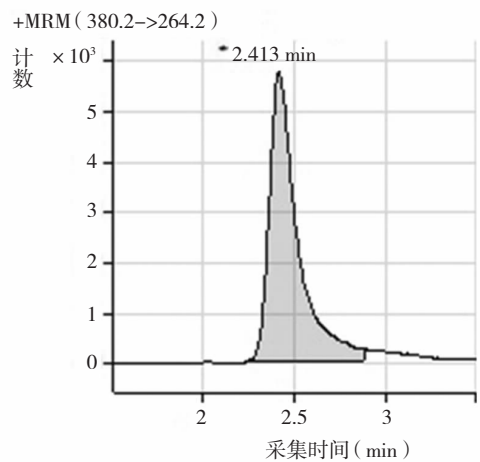


图 1 HDL-S1P 色谱分析图

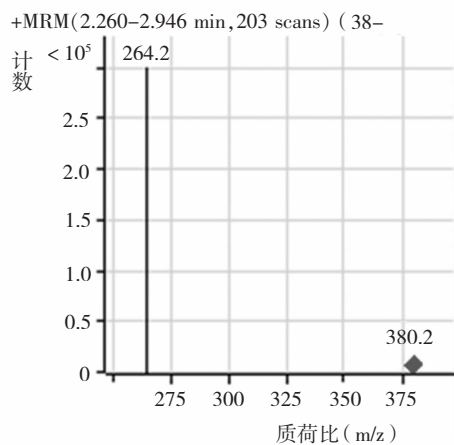


图 2 HDL-S1P 质谱分析图

1.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件对所得数据进行统计分析。计数资料用百分率表示,组间比较采用卡方检验;连续计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,符合正态分布指标组间比较采用独立样本 t 检验,不符合正态分布数据采用秩和检验。冠脉狭窄危险因素采用多因素 logistic 回归分析方法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 相关临床资料比较

冠脉狭窄组和对照组在年龄、性别、吸烟及饮酒史、高血压及糖尿病史等方面均无明显统计学差异;狭窄组 HDL 水平较对照组明显降低 (1.01 ± 0.24 vs. 1.18 ± 0.39 , $P<0.05$),除 HDL 外其余血脂浓度水平均无明显统计学差异。见表 1。

表 1 相关临床资料统计

临床资料	狭窄组	对照组	χ^2 值	P 值
年龄(岁)	67.68 ± 6.51	65.45 ± 6.61	1.517	0.133
性别(男/女)	24/16	22/18	0.205	0.651
吸烟史(%)	52.5	45	0.450	0.502
饮酒史(%)	17.5	12.5	0.392	0.531
高血压病史(%)	67.5	60	0.487	0.485
糖尿病病史(%)	30	35	0.228	0.633
HDL(mmol/L)	1.01 ± 0.24	1.18 ± 0.39	-2.312	0.024
LDL(mmol/L)	2.54 ± 0.80	2.49 ± 0.77	0.307	0.760
TG(mmol/L)	1.77 ± 0.85	1.78 ± 0.81	-0.074	0.941
TC(mmol/L)	4.56 ± 1.00	4.54 ± 1.10	0.088	0.930

2.2 HDL-S1P 及超敏 C 反应蛋白水平比较

狭窄组 HDL-S1P 水平较对照组明显降低 (34.17 ± 10.62 vs. 44.66 ± 11.94 , $P<0.05$);狭窄组超敏 C 反应蛋白浓度较对照组明显升高 (2.96 ± 1.40 vs. 2.10 ± 0.99 , $P<0.05$)。见表 2。

表 2 HDL-S1P 及超敏 C 反应蛋白水平

指标	狭窄组	对照组	t 值	P 值
HDL-S1P(ng/mL)	31.17 ± 10.62	44.66 ± 11.94	-4.152	0.000
超敏 C 反应蛋白(mg/L)	2.96 ± 0.40	2.10 ± 0.99	3.200	0.002

2.3 多因素逐步 logistic 回归分析

在 2 组数据独立样本 t 检验分析的基础上,将有统计学差异的 HDL、HDL-S1P、超敏 C 反应蛋白纳入逐步 logistic 回归分析,结果见表 3。

表 3 冠脉狭窄相关因素多因素 logistic 回归分析

自变量	OR	95%CI	P 值
HDL-S1P	0.904	0.856~0.956	0.000
超敏 C 反应蛋白	1.734	1.121~2.682	0.013
HDL	0.112	0.016~0.785	0.028

HDL-S1P、超敏 C 反应蛋白均是冠脉狭窄的独立预测因素。其中,超敏 C 反应蛋白是独立危险因素,浓度水平升高使冠脉狭窄的风险加大 ($OR=1.734$, $95\%CI=1.121\sim2.682$, $P=0.013$);HDL-S1P 可能是独立保护因素,相对较高的 HDL-S1P 浓度水平可能降低冠脉狭窄的风险 ($OR=0.904$, $95\%CI=0.856\sim0.956$, $P=0.000$);血清 HDL 水平增高也可能与冠脉狭窄的风险呈负相关。

3 讨论

冠状动脉粥样硬化导致的冠状动脉狭窄在出现明显临床症状之前就已经发生,因此预测其进展的标志物将具有巨大的价值。目前认为冠脉狭窄与血管内皮细胞损伤、炎症反应及血管重构等多种病理过程有关^[9],通过相关血清标志物可协助识别冠脉狭窄的发生。

S1P 是鞘磷脂代谢中间产物,是一类重要的生物活性信号分子,在心血管、呼吸、神经、免疫等多系统生理及病理过程中都有重要作用。S1P 可调控炎症相关基因转录和表达,影响炎症的发生发展;同时可作用于 5 种亚型 1-磷酸鞘氨醇受体(S1PR1-5),调节多种生理生化过程^[10]。在心血管系统中,S1PR 不同亚型在血管内皮细胞、心肌细胞、平滑肌细胞内广泛表达,促使 S1P 在心脏生长发育、血管新生、血管通透性维持等方面发挥重要作用。在血管平滑肌细胞 S1PR1-3 型均有表达,S1P 能通过下调 PDGF、TNF- α 等炎症因子的信号转导,抑制血管平滑肌细胞的迁移和增殖^[11]。血管内皮细胞以 S1PR1 和 S1PR3 表达为主,S1P 与血管内皮细胞 S1PR1 结合可抑制白细胞聚集到血管内皮引发血管炎症反应,从而抑制粥样硬化斑块生成^[12],同时血浆 S1PR1 的活化可增强内皮屏障功能^[13],也可激活细胞内一氧化氮合成酶释放一氧化氮,从而舒张血管、抑制炎症反应,发挥抗 AS 作用。本研究发现,狭窄组 HDL-S1P 水平较对照组明显降低,多因素逐步 logistic 回归分析其提示是冠脉狭窄的独立保护因素。此外,超敏 C 反应蛋白被公认是促进 AS 病理过程的炎症因子,本实验也显示狭窄组超敏 C 反应蛋白浓度较对照组明显升高,多因素逐步 logistic 回归分析其提示是冠脉狭窄的独立危险因素。

有研究提示血清中游离的 S1P 的增加可能会促进炎症反应,进而促进动脉粥样硬化的发生^[4],而结合型 S1P 对则心血管起保护作用^[9]。结合型 S1P

的主要载体是 HDL,流行病学数据表明 HDL 具有抗 AS 作用,既往认为其机制与 HDL 介导胆固醇逆向转运有关,即 HDL 介导周围细胞流出过量胆固醇并逆向转运回肝脏转化为胆汁酸过程^[14];新的研究认为该作用也与 HDL 活化内皮细胞 S1PR1 有关。S1P 通过载脂蛋白 M 与 HDL 结合,激发 S1P 保护内皮细胞,抑制内皮细胞和血管平滑肌细胞炎症反应作用,进而在 HDL 的抗炎、抗氧化应激及抗血栓过程中发挥作用^[3,5]。此前尚未有临床试验对结合型 HDL-S1P 浓度水平与冠状动脉狭窄的相关性进行研究,本研究通过密度梯度超速离心法提取出血清中的 HDL,进一步通过 LC-MS/MS 法测定 HDL-S1P 的浓度。且既往研究测定 S1P 使用血清或血浆中的问题未有定论,两者 S1P 浓度的差异主要是血小板在凝血过程中释放 S1P 所致。本研究中选择使用血清,避免血小板在血液样本储存期间漏出 S1P,确保 S1P 数量变异性较小。统计分析后发现,冠脉狭窄组的 HDL-S1P 浓度较对照组明显降低,且多因素逐步 logistic 回归分析提示 HDL-S1P 是冠脉狭窄的独立保护因素,相对较高 HDL-S1P 浓度水平可能降低冠脉狭窄的风险,表明 HDL-S1P 在冠状动脉粥样硬化引起冠状动脉狭窄的病理过程中起到了一定保护作用。这进一步说明,S1P 的血管保护作用很可能是由与结合型 HDL-S1P 发挥作用。

本研究结果提示 HDL-S1P 是冠脉狭窄的独立预测因子,冠脉狭窄患者血清 HDL-S1P 水平较正常者偏低,但其浓度降低的机制尚不明确,有报道称使用他汀类药物治疗轻度至中度 AS 患者会导致血浆 S1P 升高,但 S1P 升高并没有达到统计学意义^[15],亦有报道提示急性或脓毒症患者血清 S1P 水平下降,可能与血管通透性增强有关^[16]。且本研究样本量偏小,尚未能对 HDL-S1P 水平与冠脉狭窄严重程度做相关性分析。HDL-S1P 在心血管疾病发生发展过程中的作用未来需要更大样本量、更深入的研究来进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Argraves KM, Sethi AA, Patrick J, Gazzolo, et al. S1P, dihydro-S1P and C24:1-ceramide levels in the HDL-containing fraction of serum inversely correlate with occurrence of ischemic heart disease[J]. *Lipids Health Dis*, 2011, 10: 70.

[2] Egom EE, Mamas MA, Chacko S, et al. Serum sphingolipids level

as a novel potential marker for early detection of human myocardial ischaemic injury[J]. *Front Physiol*, 2013, 4: 130.

[3] Bodo Levkau. HDL-S1P: cardiovascular functions, disease-associated alterations, and therapeutic applications[J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6: 243.

[4] Deutschman DH, Carstens JS, Klepper RL, et al. Predicting obstructive coronary artery disease with serum sphingosine-1-phosphate[J]. *Am Heart J*, 2003, 146(1): 62-68.

[5] Christoffersen C, Obinata H, Kumaraswa SB, et al. Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(23): 9613-9618.

[6] Lai HC, Lee WL, Wang KY, et al. Late proximal coronary artery stenosis complicating percutaneous endovascular catheterisation procedures[J]. *Neth Heart J*, 2011, 19(9): 379-385.

[7] Nofer JR, Giet van der M, Tolle M, et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3[J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(4): 569-581.

[8] Egom EE, Fitzgerald R, Canning R, et al. Determination of sphingosine-1-phosphate in human plasma using liquid chromatography coupled with Q-TOF mass spectrometry[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(8): 1800.

[9] Park CB, Park HK. Identification of independent risk factors for restenosis following bare-metal stent implantation: role of bare-metal stents in the era of drug-eluting stents[J]. *Exp Ther Med*, 2013, 6(3): 840-846.

[10] Santos WL, Lynch KR. Drugging sphingosine kinases[J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(1): 225-233.

[11] Zhao J, Garcia D, Gartung A, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor subtype 2 signaling in endothelial senescence-associated functional impairments and inflammation[J]. *Current Atherosclerosis Reports*, 2015, 17(5): 504.

[12] Kurano M, Yatomi Y. Sphingosine 1-phosphate and atherosclerosis[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2018, 25(1): 16-26.

[13] Christensen PM, Liu CH, Swendeman SL, et al. Impaired endothelial barrier function in apolipoprotein M-deficient mice is dependent on sphingosine-1-phosphate receptor 1[J]. *FASEB J*, 2016, 30(6): 2351-2359.

[14] Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(12): 3090-3100.

[15] Sugiura T, Dohi Y, Yamashita S, et al. Analytical evaluation of plasma serotonin and sphingosine 1-phosphate and their clinical assessment in early atherosclerosis[J]. *Coron Artery Dis*, 2012, 23(4): 234-238.

[16] Winkler MS, Nierhaus A, Holzmann M, et al. Decreased serum concentrations of sphingosine-1-phosphate in sepsis[J]. *Crit Care*, 2015, 19: 372.

(责任编辑:张辉洁)