

血浆神经酰胺含量与动脉粥样硬化的相关性研究

刘岩, 刘兵, 李斯琪, 李红帅, 徐丽斯, 刘艳霞

国家老年疾病临床研究中心 北部战区总医院老年医学中心干二科, 沈阳 110016

[摘要] **目的** 探讨血浆神经酰胺水平与动脉粥样硬化的相关性。**方法** 选取 2019 年 8 月 1 日至 2020 年 7 月 31 日北部战区总医院诊治的 45~55 岁动脉粥样硬化患者(AS 组)114 例,健康对照者(CO 组)134 例,应用高效液相色谱串联质谱法检测 4 种神经酰胺水平(Cer 16:0、Cer 18:0、Cer 24:0、Cer 24:1)并计算 3 种神经酰胺比值(Cer 16:0/24:0、Cer 18:0/24:0、Cer 24:1/24:0),研究神经酰胺水平与动脉粥样硬化的相关性。**结果** AS 组 Cer 16:0、Cer 18:0、Cer 24:1 及 Cer 18:0/24:0 较 CO 组明显增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。按神经酰胺水平分 3 个风险等级,2 组低、中、高风险等级所占人数比差异均有统计学意义($P < 0.05$),表明神经酰胺中、高风险水平与动脉粥样硬化呈正相关,神经酰胺低风险水平则与动脉粥样硬化呈负相关。应用二元 logistic 回归分析,对 2 组患者总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇水平进行校正,神经酰胺是动脉粥样硬化的独立危险因素 [$P < 0.05$, $OR(\text{神经酰胺中风险}) = 1.990$, $OR(\text{神经酰胺高风险}) = 6.071$]。**结论** Cer 16:0、Cer 18:0、Cer 24:1 高水平与动脉粥样硬化的发生相关,是动脉粥样硬化的独立危险因素。

[关键词] 神经酰胺类;动脉粥样硬化;气相色谱-质谱法;危险因素

DOI:10.3969/J.issn.1672-6790.2022.03.005

Correlation between ceramide content in plasma and atherosclerosis

Liu Yan, Liu Bing, Li Siqi, Li Hongshuai, Xu Lisi, Liu Yanxia

The Second Cadre Ward, General Hospital of Northern Theater Command, National Center for Clinical Research of Geriatric Diseases, Shenyang 110016, China

Corresponding author: Liu Yanxia, Email: lyxzp7029@sina.com

[Abstract] **Objective** To study the correlation between plasma ceramide level and atherosclerosis. **Methods** One hundred and fourteen patients aged 45-55 years with atherosclerosis (AS group) and 134 healthy controls (CO group) were selected from August 2019 to July 2020 in General Hospital of Northern Theater Command. Four ceramide levels (Cer 16:0, Cer 18:0, Cer 24:0, Cer 24:1) and three ceramide ratio (Cer 16:0/24:0, Cer 18:0/24:0, Cer 24:1/24:0) were determined by HPLC-MS to study the relevance of ceramide levels and atherosclerosis. **Results** The levels of three kinds of ceramides (Cer 16:0, Cer 18:0 and Cer 24:1) and Cer 18:0/24:0 in AS group were significantly higher than those in CO group ($P < 0.05$). There were three risk levels according to ceramide level. There were significant differences in the proportion of low, medium and high risk levels between the two groups ($P < 0.05$). The medium and high risk levels of ceramide were positively correlated with arteriosclerosis, while the low risk level of ceramide was negatively correlated with arteriosclerosis. Binary logistic regression analysis was used to correct the statistically significant levels of total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol in the general data of the two groups. The results showed that plasma ceramide was an independent risk factor for atherosclerosis [$P < 0.05$, $OR(\text{Ceramide medium risk}) = 1.990$, $OR(\text{Ceramide high risk}) = 6.071$]. **Conclusions** The levels of different types of ceramide can be determined simultaneously by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. The high levels of Cer 16:0, Cer 18:0 and Cer 24:1 were associated with the occurrence of atherosclerosis. High plasma ceramide level is an independent risk factor for atherosclerosis.

[Keywords] Ceramides; Atherosclerosis; Gas chromatography-mass spectrometry; Risk factors

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82170297);全军保健专项基金项目(19BJJ14)

作者简介:刘岩,主治医师,Email:33347049@qq.com

通信作者:刘艳霞,副主任医师,硕士研究生导师,Email:lyxzp7029@sina.com

神经酰胺是真核细胞中存在的一类复杂多样的高度疏水性脂质,它不仅是细胞膜的重要组成部分,而且作为脂质第二信使参与细胞生长、增殖、分化和凋亡等过程,同时也是鞘磷脂信号途径的重要中间产物^[1-3]。研究发现,神经酰胺与多种心血管危险因素关系密切,尤其在动脉粥样硬化的发生、发展过程中有着重要的作用^[4-5],测定生物样本中各种神经酰胺的含量,对研究神经酰胺的生物学效应机制有重要意义^[6]。本文采用高效液相色谱串联质谱法(HPLC-MS)的多反应监测模式检测血浆中不同类型神经酰胺含量,并探讨神经酰胺水平与动脉粥样硬化的相关性。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取 2019 年 8 月 1 日至 2020 年 7 月 31 日在北部战区总医院体检或入院诊治的动脉粥样硬化患者(AS 组)114 例,健康对照者(CO 组)134 例。

1.2 纳入与排除标准 纳入标准:年龄为 45 ~ 55 岁。颈部血管超声测量颈动脉内膜中层厚度(IMT),并重复测量 3 次,取平均值。以 IMT > 1.0 mm,定义为颈动脉内膜中层增厚;以 IMT > 1.3 mm,定义为颈动脉粥样硬化斑块形成^[7]。IMT > 1.0 mm 入选 AS 组,IMT ≤ 1.0 mm 入选 CO 组。资料完整且签署知情同意书。排除标准:妊娠期妇女;恶性肿瘤患者;不愿配合者。

1.3 研究方法

1.3.1 主要仪器及测定指标 超高效液相色谱仪(美国, Waters); ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQD 三重四极杆质谱仪(美国, Waters); CV100-DNA 真空离心浓缩仪(中国, 北京吉艾姆)。全谱神经酰胺指标包含: Ceramide 16:0 (Cer 16:0)、Ceramide 18:0 (Cer 18:0)、Ceramide 24:0 (Cer 24:0)、Ceramide 24:1 (Cer 24:1)。Cer 16:0-d7、Cer 18:0-d7、Cer 24:0-d7、Cer 24:1-d7 为相应神经酰胺内标。

1.3.2 实验室指标 按统一标准测定体重指数(BMI)、总胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、血糖、糖化血红蛋白、尿酸、同型半胱氨酸等指标,以及研究对象合并疾病、合并用药等基线资料。研究对象均空腹采静脉血,应用 HPLC-MS 检测血液中 4 种神经酰胺(Cer 16:0, Cer 18:0, Cer 24:0, Cer 24:1)的浓度。依据检测出的数值进行评分,评分标准^[8]见表 1,根据总分分级,神

经酰胺低水平(0 ~ 2 分),神经酰胺中水平(3 ~ 6 分)和神经酰胺高水平(7 ~ 12 分)。

表 1 UPLC-MS 法检测神经酰胺项目及评分标准(μmol/L)

检验项目	0 分	1 分	2 分
Cer 16:0	≤0.28	>0.28 且 <0.34	≥0.34
Cer 18:0	≤0.10	>0.10 且 <0.14	≥0.14
Cer 24:1	≤1.13	>1.13 且 <1.34	≥1.34
Cer 16:0/Cer 24:0	≤0.07	>0.07 且 <0.11	≥0.11
Cer 18:0/Cer 24:0	≤0.02	>0.02 且 <0.05	≥0.05
Cer 24:1/Cer 24:0	≤0.34	>0.34 且 <0.43	≥0.43

1.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计学软件分析数据,计数资料采用例数及百分比表示,组间率的比较采用 χ^2 检验。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用 *t* 检验;非正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,2 组间比较采用秩和检验。相关性采用二元 logistic 回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况比较 2 组研究对象的性别、年龄、BMI、三酰甘油、血糖、糖化血红蛋白、尿酸、同型半胱氨酸、吸烟、饮酒、高血压、糖尿病、脑梗死等患病情况,应用口服药物的情况等进行比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。AS 组患者的总胆固醇水平、低密度脂蛋白胆固醇水平高于 CO 组患者,高密度脂蛋白胆固醇水平低于 CO 组患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 神经酰胺水平比较 AS 组 3 种神经酰胺水平(Cer 16:0、Cer 18:0、Cer 24:1)及 Cer 18:0/24:0 均较 CO 组明显增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。2 组研究对象 Cer 16:0/24:0、Cer 24:1/24:0 比值差异无统计学意义。见表 3。

2.3 神经酰胺风险等级比较 按神经酰胺水平分 3 个风险等级,2 组低、中、高风险等级所占人数比差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

2.4 相关性分析 应用二元 logistic 回归分析,对 2 组研究对象的总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇水平进行校正,结果表明神经酰胺是动脉粥样硬化的独立危险因素 [$P < 0.05$, OR (神经酰胺中风险) = 1.990, OR (神经酰胺高风险) = 6.071]。见表 5。

表 2 2 组患者一般资料比较

组别	例数	性别(例)		年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	总胆固醇 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	三酰甘油 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	LDL-C ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	HDL-C ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	血糖 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	BMI ($\bar{x} \pm s$, kg/m ²)	吸烟 (例)	饮酒 (例)
		女	男									
AS 组	114	19	95	49.94±2.49	5.38±1.00	1.63±0.94	2.94±0.71	1.47±0.24	5.39±0.60	24.31±2.99	12	11
CO 组	134	31	103	49.47±2.32	5.10±0.84	1.42±0.90	2.64±0.60	1.54±0.26	5.34±0.59	23.88±2.21	6	14
χ^2 或 t 值		1.601		1.193	2.006	2.405	2.17	0.015	0.511	0.471	3.348	0.043
P 值		0.206		0.129	0.016	0.078	0.001	0.027	0.496	0.185	0.067	0.835

组别	例数	高血压 (例)	糖尿病 (例)	脑梗死 (例)	服用他汀药物 (例)	服用抗血小板药物 (例)	同型半胱氨酸 ($\bar{x} \pm s$, μ mol/L)	血尿酸 ($\bar{x} \pm s$, μ mol/L)	糖化血红蛋白 ($\bar{x} \pm s$, %)
AS 组	114	47	5	5	34	9	10.84±3.25	380.21±75.73	5.61±0.68
CO 组	134	45	6	7	26	6	11.49±5.62	361.01±86.42	5.48±0.30
χ^2 或 t 值		1.543	0.001	0.094	3.648	1.266	1.522	1.953	9.709
P 值		0.214	0.972	0.759	0.056	0.261	0.289	0.066	0.054

注: BMI 为体重指数; LDL-C 为低密度脂蛋白胆固醇; HDL-C 为高密度脂蛋白胆固醇。

表 3 2 组患者神经酰胺水平比较 [$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	例数	Cer 16:0(μ mol/L)	Cer 18:0(μ mol/L)	Cer 24:1(μ mol/L)	Cer 24:0(μ mol/L)	Cer 16:0/24:0	Cer 18:0/24:0	Cer 24:1/24:0
AS 组	114	0.288(0.251, 0.319)	0.072(0.054, 0.089)	0.864(0.706, 1.044)	3.415(2.786, 4.221)	0.082(0.074, 0.098)	0.022(0.016, 0.027)	0.252(0.205, 0.311)
CO 组	134	0.264(0.236, 0.298)	0.060(0.043, 0.078)	0.787(0.656, 0.959)	3.299(2.800, 3.877)	0.079(0.070, 0.090)	0.018(0.014, 0.023)	0.240(0.198, 0.284)
P 值		0.002	0.001	0.014	0.492	0.052	0.002	0.082

表 4 2 组神经酰胺不同风险等级评分人数比较 [例(%)]

组别	例数	低风险	中度风险	高风险
AS 组	114	66(57.89)	40(35.09)	8(7.02)
CO 组	134	101(75.37)	31(23.13)	2(1.49)
χ^2 值		8.556	4.307	4.859
P 值		0.003	0.038	0.028

注: 低风险为 0~2 分, 中风险为 3~6 分, 高风险为 7~12 分。

表 5 动脉粥样硬化与神经酰胺水平的二元 logistic 回归分析

因素	β 值	标准误	Wald χ^2 值	P 值	OR(95%CI) 值
神经酰胺中风险	0.688	0.304	5.116	0.024	1.990(0.477~8.959)
神经酰胺高风险	1.804	0.833	4.688	0.030	6.071(1.248~29.434)
总胆固醇	-0.078	0.702	0.012	0.912	0.925(0.900~1.759)
LDL-C	0.839	0.887	0.896	0.344	2.315(0.218~30.299)
HDL-C	-1.548	0.985	2.467	0.116	0.213(0.048~2.456)

注: LDL-C 为低密度脂蛋白胆固醇; HDL-C 为高密度脂蛋白胆固醇。

3 讨论

动脉粥样硬化是心血管疾病较常见的病因之一,也是患者死亡的主要原因之一^[9]。鞘脂分子可能通过不同的机制介导动脉粥样硬化的发生和发展。冠心病患者的神经酰胺亚型(Cer 16:0、Cer 18:0、Cer 22:0、Cer 24:0 和 Cer 24:1)与斑块不稳定^[10]、不良心血管事件^[11]和远期预后^[12]相关。患者动脉粥样硬化的发生受年龄、性别、血脂、肥胖等因素影响^[13]。本研究中 2 组研究对象年龄、性别、BMI、血糖、糖化血红蛋白、血尿酸、三酰甘油、同型

半胱氨酸、吸烟饮酒史、并发疾病、应用药物等多项指标差异无统计学意义,而总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇等差异有统计学意义($P<0.05$)。

本研究结果显示:AS 组 3 种神经酰胺水平(Cer 16:0、Cer 18:0、Cer 24:1)及 Cer 18:0/24:0 均较 CO 组明显增高。按神经酰胺水平评分分级,2 组研究对象低、中、高风险等级所占人数比差异均有统计学意义,表明神经酰胺中、高风险水平与动脉硬化有关。应用二元 logistic 回归分析得出,高水平神经酰胺是动脉粥样硬化的独立危险因素。神经酰胺参与动脉粥样硬化的病理生理过程,神经酰胺可刺激人内皮细胞中的活性氧(包括 H₂O₂、O₂⁻ 和 OH)的产生,而 H₂O₂ 创造了一个促进炎症、血栓形成和动脉粥样硬化的环境^[14]。氧化应激可使生物大分子退化,如核酸退化、脂质氧化、膜蛋白退化,继而导致细胞功能障碍甚至死亡,与动脉粥样硬化的发生和发展具有密切的关系^[15]。研究表明,神经酰胺参与内皮损伤,可导致动脉粥样硬化,进而诱发血栓形成^[16-17]。神经酰胺在动脉斑块区域尤为丰富,促进脂蛋白渗入血管壁,介导心肌细胞脂毒性反应,从而进一步促进动脉粥样硬化^[18]。

目前,神经酰胺的检测方法主要有薄层色谱法(TLC)、高效液相色谱法(HPLC)、质谱法和 HPLC-MS 法。其中 HPLC 是分离神经酰胺的最主要技术,但前期处理复杂,耗时长,存在灵敏度和分

分辨率不高的缺陷,增加了实验的难度和误差。而质谱法,虽然灵敏度高、所需样品少且用时较短,但由于可能出现质量数重叠的脂质分子之间的相互干扰,常常导致其检测特异性不佳^[19-21]。本研究采用的 HPLC-MS 技术,是一种通过制备、分离、检测气相离子来鉴定化合物的专门技术,广泛地应用于各个领域^[22]。在众多的分析测试方法中,质谱法被认为是一种同时具备高特异性和高灵敏度的且被广泛应用的方法,在临床研究的应用方面,质谱已成为国际公认的定量分析技术。HPLC-MS 可以用于检测多种神经酰胺^[23]。

本研究入选人群年龄在 45~55 岁,对于研究广泛人群的神经酰胺水平仍有一定局限性,有待于进一步加大样本量,并对此人群进行随访,观察未来 1~3 年心血管事件发生情况,进一步研究神经酰胺水平与动脉硬化及心血管事件的相关性。

综上所述,采用 HPLC-MS 可同时测定不同类型神经酰胺水平,Cer 16:0、Cer 18:0、Cer 24:1 高水平与动脉粥样硬化的发生相关。高神经酰胺水平与动脉粥样硬化的发生呈明显正相关,是动脉粥样硬化的独立危险因素。

参 考 文 献

- [1] CZUBOWICZ K, JEŚKO H, WENCEL P, et al. The role of ceramide and sphingosine-1-phosphate in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56 (8): 5436-5455.
- [2] GALADARI S, RAHMAN A, PALLICHANKANDY S, et al. Tumor suppressive functions of ceramide: evidence and mechanisms [J]. *Apoptosis*, 2015, 20 (5): 689-711.
- [3] ANGOULVANT D, PATHAK A. Monoclonal antibodies in cardiovascular diseases and metabolic disorders today [J]. *Medecine Sci (Paris)*, 2019, 35 (12): 1014-1016.
- [4] 张鹏, 陈夏欢, 王昊, 等. 神经酰胺在心血管疾病预测价值中的研究进展 [J]. *中国心血管杂志*, 2020, 25 (2): 189-192.
- [5] 刘潇, 王雷. 神经酰胺与心血管疾病关系的研究进展 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2020, 19 (15): 1668-1671.
- [6] NGANGA R, OLEINIK N, OGRETMENT B. Mechanisms of ceramide-dependent cancer cell death [J]. *Adv Cancer Res*, 2018, 140: 1-25.
- [7] MUSHENKOVA N V, SUMMERHILL V I, ZHANG D, et al. Current advances in the diagnostic imaging of atherosclerosis: insights into the pathophysiology of vulnerable plaque [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (8): 2992-2998.
- [8] CAI Z, HE W, ZHUANG F J, et al. The role of high high-sensitivity C-reactive protein levels at admission on poor prognosis after acute ischemic stroke [J]. *Int J Neurosci*, 2019, 129 (5): 423-429.
- [9] DE CARVALHO L P, TAN S H, OW G S, et al. Plasma ceramides

as prognostic biomarkers and their arterial and myocardial tissue correlates in acute myocardial infarction [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2018, 3 (2): 163-175.

- [10] CHENG J M, SUONIEMI M, KARDYS I, et al. Plasma concentrations of molecular lipid species in relation to coronary plaque characteristics and cardiovascular outcome: results of the ATHEROREMO-IVUS study [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 243 (2): 560-566.
- [11] MEEUSEN J W, DONATO L J, BRYANT S C, et al. Plasma ceramides [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38 (8): 1933-1939.
- [12] PETERSON L R, XANTHAKIS V, DUNCAN M S, et al. Ceramide remodeling and risk of cardiovascular events and mortality [J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7 (10): e007931. DOI: 10.1161/JAHA.117.007931.
- [13] INOMOTO A, DEGUCHI J, FUKUDA R, et al. Cohabiting with smokers is an independent factor for worsening arterial stiffness even in smoking workers [J]. *J UOEH*, 2020, 42 (3): 251-259.
- [14] WIHASTUTI T A, AMIRUDDIN R, CESA F Y, et al. Decreasing angiogenesis vasa vasorum through Lp-PLA2 and H2O2 inhibition by PSP from *Ganoderma lucidum* in atherosclerosis: in vivo diabetes mellitus type 2 [J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2020, 30 (6): 349-399.
- [15] KATTOOR A J, POTHINENI N, PALAGIRI D, et al. Oxidative stress in atherosclerosis [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2017, 19 (11): 42.
- [16] MEIKLE P J, SUMMERS S A. Sphingolipids and phospholipids in insulin resistance and related metabolic disorders [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13 (2): 79-91.
- [17] LAW B A, LIAO X, MOORE K S, et al. Lipotoxic very-long-chain ceramides cause mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and cell death in cardiomyocytes [J]. *Faseb J*, 2018, 32 (3): 1403-1416.
- [18] LI W, YANG X, XING S, et al. Endogenous ceramide contributes to the transcytosis of oxLDL across endothelial cells and promotes its subendothelial retention in vascular wall [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014: 823071.
- [19] 黄庆霞, 雷和花, 唐惠儒, 等. 基于超高效液相色谱-质谱联用技术的神经酰胺定量分析 [J]. *上海交通大学学报 (医学版)*, 2019, 39 (12): 1353-1359.
- [20] LAFFET G P, GENETTE A, GAMBOA B, et al. Determination of fatty acid and sphingoid base composition of eleven ceramide subclasses in stratum corneum by UHPLC/scheduled-MRM [J]. *Metabolomics*, 2018, 14 (5): 69.
- [21] CHUANG W L, PACHECO J, ZHANG K. A simple, high-throughput method for analysis of ceramide, glucosylceramide, and ceramide trihexoside in dried blood spots by LC/MS/MS [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1378: 263-272.
- [22] SAHU P K, RAMISETTI N R, CECCHI T, et al. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 147: 590-611.
- [23] REZK M R, BASALIOUS E B, AMIN M E. Novel and sensitive UPLC-MS/MS method for quantification of sofosbuvir in human plasma: application to a bioequivalence study [J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30 (9): 1354-1362.

(收稿日期: 2022-02-26)