嘉南藥理學院專題研究計畫成果報告

Study on The Prevalence of Hyperhomocysteinemia in Patients with Cardiovascular Disease by High Performance Liquid Chromatographic Analysis

計畫編號：CNPH-88-02
執行期間：87 年 9 月 1 日至 88 年 6 月 30 日
計畫類別：□個別型
主持人：楊竹茂 副教授
協同研究：郭玫君 講師

摘要

1. 以 HPLC 方法檢測 206 位嘉南藥理學院 87 年度二技部學生之血中 homocysteine 之濃度，結果證明以研究中採用之條件，精密度與正確性皆良好，確實簡單易行，於 10 分鐘內即可檢測一個血樣。
2. 206 位學生之平均血中 homocysteine 濃度爲 5.63 ± 2.19 (μM)，屬於正常值範圍，但仍有少數學生之值偏高，需要持續追蹤，並接受基因分析。
3. 血中 Homocysteine 濃度在男、女性別之間，在統計學上具有顯著意義差($P<0.05$)。
4. 血中 Homocysteine 平均濃度與高血壓之間有顯著差異($F=9.53$, $p<0.01$)。以 Scheffe's 作事後比較，顯示高血壓者比正常血壓者，具有較高濃度的 Homocysteine ($p<0.01$)。
5. 雖然具有高危險膽固醇濃度者其血中 Homocysteine 濃度較高(7.27 ± 4.66 μM)，惟與正常者 Homocysteine 濃度之間的關係，在統計學上未達有意義差。
6. 本研究結果顯示，肥胖者血中 Homocysteine 濃度與非肥胖者之間在統計學上也未達有意義差之程度。
7. 對於少數 homocysteine 濃度值偏高者與具高血壓者之追蹤測定及基因分析仍待持續進行。

關鍵字：Homocysteine, HPLC, 血壓，膽固醇，肥胖，統計學。

前言

高半胱胺酸血症(hyperhomocysteinemia)已被證實是引發心臟血管疾病之一種獨立因子。血中高半胱胺酸濃度提高可導因於遺傳基因或營養因素使得半胱胺酸（homocysteine）代謝中之再甲基化（remethylation）或轉硫作用（transsulfuration）之過程造成障礙。其中 MTHFR（5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)）係將半胱胺酸代謝成 methionine 最重要的酵素，如果病人帶有 homozygous thermolabile variant (nt 677=T→Val)之 MTHFR 者，即可能因半胱胺酸累積而導致發生冠狀動脈疾病的危險。

本研究旨在以文獻發表的 HPLC 分析方法測定本校八十七學年度 206 位二技新生之血樣中之半胱胺酸濃度，以瞭解在年青人口中發生高半胱胺酸血症之盛行率，並以統計方法分析半胱胺酸濃度與性別、血壓、總膽固醇濃度與及肥胖程度之關係。

方法與材料

(1)本研究中的受試者選擇本校八十七學年度二技新生體檢之抽血血樣爲研究標本，其中男性 109 人，女性 97 人，合計 206 人。

(2)血樣收集(blood collection)：每位受試者皆被要求禁食(fasting)至少 10 小時，抽血時以 10-ml 含 0.1%EDTA 的真空採血器自靜脈抽血 10 ml 並立即放入冰水中貯放數分鐘，於 4 ^{o}C, 4000 g 離心 4 min，立即將血漿分離，血漿以每管 1 ml 分裝於玻璃樣品管內貯存於-70 ^{o}C 冰庫中以備分析。

(3)血漿中高半胱胺酸(homocysteine)濃度之測定：主要參考文獻[48,49]。 血漿(240 μl) 加 60 μl 2.5 mM acetyl-cysteine (內部標準品)混合後加入 30 μl 的 0.6 M tri-n-butylphosphine 之 DMF 溶液，混合後於 4 ^{o}C 中放置 30 min 以還原 thiol 並將其從血漿蛋白中釋出。蛋白質以含 1 mM EDTA 之 0.6 M 冷過氯酸 300 μl 沉澱，在充分混合後於室溫下放置 10 min，以 2000g 離心 10 min. 取上澄液 50 μl 混合 10 μl 之 1.55M NaOH，125 μl 0.125M 含 4 mM EDTA 之 borate buffer (pH 9.5) 以及 50 μl 1mg/ml 之 SBD-F borate buffer。在 60 ^{o}C 水浴中振搖 60 min.冷卻後以 HPLC 分析之。SBD-F：ammonium 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulphonate。HPLC 分析條件：Column：ODS RP18; 150 x 4.6 mm.(含 guard column 4.5 x 4.6 mm)

Detector：Excitation 305~395 nm　Emission 430~470 nm

Mobile phase：0.1 M acetate buffer (pH 4.0)，含 2% MeOH

含量計算：由預先配製之標準溶液依同操作程序所得之校正曲線求得。

結果判定：血漿中 Homocysteine 平均濃度爲 7.6 ± 1.1 μmol/L 視爲正常值[50]。

(5) 其他血漿中總膽固醇、中性脂肪及肝腎功能、血糖、血球計數等分析則依醫院常規檢驗分析。

(6) 統計分析(Statistic analysis)： 男女性別之差異性以 Student's *t* test 分析，多變數之數據分析則以先 ANOVA 檢定，再配合 Scheffe's test 作事後比較。 P<0.05 用於定義統計學的意義差。所有統計皆將以 SPSS 統計軟體運算。

結果與討論

表一，206 位學生血液中 Homocysteine 濃度(μm)之平均值，標準差及相關資料摘要表 (N=206)

最小值	**3.01**
最大值	23.81
平均值	5.63
標準差	2.19

表二，206 位學生中不同性別與血液 Homocysteine 濃度(μM)之 T-Test

變項	人數	平均值	標準差	t 值
男	109	6.35	2.63	-5.324*
女	97	4.83	1.11	

*P<0.05　**p<0.01

表三，206 位學生中不同血壓與血液 Homocysteine 濃度(μM)之平均值及標準差

變項	人數	平均值	標準差
正常血壓	137	5.20	1.64
正常偏高血壓	35	6.17	2.16
高血壓	34	6.83	3.37

正常血壓 ： 收縮壓<130 mmHg，舒張壓<85 mmHg
正常偏高血壓 ： 收縮壓 130-139 mmHg，舒張壓 85-89 mmHg
高血壓 ： 收縮壓>140 mmHg，舒張壓>90 mmHg

表四，206 位學生中不同血壓與血液 Homocysteine 濃度之變異數摘要表

變項	變異來源	離均差平方和	自由度	平均離均差	F 值
正常血壓,	組間	84.36	2	42.18	9.53**
正常偏高血壓,	組內	898.77	203	4.43	
高血壓	全體	983.13	205		

*P<0.05 **p<0.01

表五，206 位學生中不同血壓與血液 Homocysteine 濃度之 Scheffe’s 事後比較

	正常血壓	正常偏高血壓	高血壓
正常血壓	-	-	**
正常偏高血壓	-	-	-
高血壓	**	-	-

*P<0.05 **p<0.01

表六，206 位學生中不同膽固醇含量與血液 Homocysteine 濃度(μM)之平均值及標準差

變項	人數	平均值	標準差
理想膽固醇濃度	174	5.62	2.16
邊際高危險膽固醇濃度	26	5.33	1.36
高危險膽固醇濃度	6	7.27	4.66

理想膽固醇濃度<200mg/dl
邊際高危險膽固醇濃度 200-239mg/dl
高危險膽固醇濃度>=240mg/dl

表七，206 位學生中不同膽固醇含量與血液 Homocysteine 濃度之變異數摘要表

變項	變異來源	離均差平方和	自由度	平均離均差	F 值
理想膽固醇濃度,	組間	18.40	2	9.20	1.94
邊際高危險膽固醇濃度,	組內	964.72	203	4.75	
高危險膽固醇濃度	全體	983.13	205		

*P<0.05 **p<0.01

表八，206 位學生中不同膽固醇含量與血液 Homocysteine 濃度之 Scheffe's 事後比較

	理想膽固醇濃度	邊際高危險膽固醇濃度	高危險膽固醇濃度
理想膽固醇濃度	-	-	-
邊際高危險膽固醇濃度	-	-	-
高危險膽固醇濃度	-	-	-

*P<0.05 **p<0.01

表九，206 位學生中不同 Body Mass Index (BMI) 與血液 Homocysteine 濃度(μM)之平均值及標準差

變項	人數	平均值	標準差
體重過重	180	5.59	2.26
體重過重	19	6.13	1.85
肥胖	7	5.38	0.87

BMI=體重/身高^2
體重過重: BMI 20-25
體重過重: BMI 26-28
肥胖: BMI >28

表十，206 位學生中不同 BMI 與血液 Homocysteine 濃度之變異數摘要表

變項	變異來源	離均差平方和	自由度	平均離均差	F 值
體重正常,	組間	5.46	2	2.73	0.567
體重過重,	組內	977.66	203	4.82	
肥胖	全體	983.13	205		

*P<0.05 **p<0.01

表十一，206 位學生中不同 BMI 與血液 Homocysteine 濃度之 Scheffe's 事後比較

	體重正常	體重過重	肥胖
體重正常	-	-	-
體重過重	-	-	-
肥胖	-	-	-

*P<0.05 **p<0.01

結論

一、 本研究所採用的分析方法與條件，精確度與準確度良好，能在 10 分鐘內完成一個血樣測定。

二、 由 206 位學生血樣(男：109 位；女：97 位)所測得 homocysteine 平均濃度分別爲 6.35 ± 2.63 (μM)及 4.83 ± 1.11 (μM)，在統計學上具有顯著意義差(P<0.05)。

三、 由血壓測定值發現，206 位學生中，血壓偏高者(收縮壓 130-139 mmHg，舒張壓 85-89 mmHg)達 35 位，約佔 17 %；具高血壓者(收縮壓>140 mmHg，舒張壓>90 mmHg)達 34 位，約佔 16.5 %。經以 ANOVA 統計發現，Homocysteine 平均濃度與高血壓之間有顯著差異(F=9.53, p<0.01)，以 Scheffe's 作事後比較，顯示高血壓者比正常血壓者具有較高濃度的 Homocysteine(p<0.01)。

四、 在 206 位學生中，具有邊際高危險膽固醇濃度者(膽固醇濃度 200-239 mg/dl)有 26 位(12.6 %)，具有高危險膽固醇濃度者(膽固醇濃度>=240mg/dl)有 6 位(2.9 %)，雖然測定結果後者之 Homocysteine 濃度較高(7.27 ± 4.66)，惟與正常者 Homocysteine 濃度之間的關係，在統計學上未達有意義差。

五、 雖然所有受測學生之體重皆超過理想體重(BMI>20-28)，且其中屬於肥胖者(MBI>28)有 7 位，然而與 Homocysteine 濃度之間的關係，在統計學上也未達有意義差。

六、 由本研究結果顯示，雖然平均血中 homocysteine 濃度爲 5.63 ± 2.19(μM)屬於正常值範圍，但仍有少數學生之值偏高，需要持續追蹤，並接受基因分析。此外，具高血壓者，雖然 homocysteine 濃度仍在正常範圍，但經統計分析，與正常血壓者仍具有 p 值<0.01 之顯著意義差，因此，高血壓者實有必要接受 homocysteine 之追蹤測定與基因分析。本研究限於經費未能實施基因分析爲一憾事，期待爾後有足夠經費時再加補充。目前對於患有心臟血管疾病者之血液分析仍然持續著，其結果將待全部完成後再提出報告。