

N-3 脂肪酸作为长期血液透析患者心血管疾病二级预防使用：一项随机、采用安慰剂对照的干预试验

长期血液透析（HD）患者过早的发生心血管疾病并且死亡率增加。N-3 多不饱和脂肪酸（PUFA）可能对心血管疾病二级预防有效，但这对 HD 患者的效果以前并未有报道。假设使用 n-3 多不饱和脂肪酸的二级预防可减少长期血透患者心血管疾病的发生和死亡。本研究采用随机、双盲、安慰剂对照干预试验比较了 n-3 多不饱和脂肪酸和安慰剂治疗作为血透患者心血管事件二级预防的效果。试验主要结果为心血管事件总数和死亡数的综合。共有 206 例患者被随机分配到 n-3PUFA 治疗组或对照组并且随访 2 年或直到试验预定的终点。在试验中，206 例患者中 121 例（59%）达到了主要终点。N-3PUFA 对心血管事件和死亡的主要复合终点无显著影响（62 对 59; NS）。在 n-3 多不饱和脂肪酸组，心肌梗死的患者数量显著减少（4 对比 13, $P=0.036$ ）。这项试验的不足之处在于大量患者退出导致相对少的患者完成了试验。但是这也证明了用 n-3 多不饱和脂肪酸治疗并不能减少这种高风险人群的心血管事件总数和死亡数。N-3 多不饱和脂肪酸治疗的次要结果是能显著减少心肌梗死的患者数。这一发现可能会成为临床热点。

长期血液透析（HD）治疗的患者具有心血管疾病（CVD）的高发病率和更多的过早死亡（1,2）。传统心血管疾病的危险因素在肾脏疾病患者频发有发生（3）。此外，尿毒症环境导致的炎症（4）、脂质代谢的特异性改变（5）、尿毒症毒素的累积（6）、这些都可增加 CVD 的高风险。近年来，出现了专注于这方面需要的干预试验，以防止这个高风险人群的心血管疾病和降低死亡率（7）。来自流行病学（8）和干预研究（9）的证据表明 n-3 多不饱和脂肪酸（PUFA）可能是有效的心血管疾病的二级预防并可能防止心脏性猝死（10）。然而，最近的 Cochrane 分析得出的结论指出目前并没有明确的证据表明 n-3 多不饱和脂肪酸能够降低心血管疾病的死亡率，并且指出在这一研究领域中需要额外的干预试验（11）。N-3 PUFA 的可能机制包括使血浆中的甘油三酯降低的降脂作用（12）和一个温和的降压作用（13）。N-3 PUFA 的几个其它可能的保护机制也已经被报道，如抗炎（14）、抗动脉硬化（15）、抗血栓形成（16）和抗心律不齐（17）。关于 n-3 多不饱和脂肪酸对血液透析病人心血管疾病的治疗效果以前没有研究，但最近开始强调对这一人群使用 n-3 多不饱和脂肪酸干预试验的需要（7, 18）。因此，本试验的目的是考察使用 n-3 多不饱和脂肪酸作为长期血透患者心血管事件和死亡的二级预防的效果。

材料和方法

试验目的

我们假设给予长期血液透析病人 n-3 多不饱和脂肪酸治疗作为心血管疾病的二级预防可减少心血管事件和死亡的发生率。

试验设计

我们进行了一项随机，双盲干预试验。该试验的患者从丹麦的 11 个透析中心招募。HD 患者的招募是通过回顾病人的医疗记录进行评估，并且只要符合要求的患者都要求参加（图 1）。

经稳定透析治疗至少 6 个月并患有心血管疾病的患者被纳入试验。心血管疾病被定义为先前记录有心肌梗死（MI）、心绞痛、血管造影证实冠脉粥样硬化、中风、短暂性脑缺血发作（TIA）、或外周血管疾病。排除标准是那些正在参加其他临床试验、恶性疾病活动期、以及已知依从性差的患者。该试验得到了地区伦理委员会批准，并根据香港修订赫尔辛基宣言进行。签署知情同意后，患者被随机分配至 n-3 多不饱和脂肪酸治疗组或对照组，两组患者每日均服用 2 粒胶囊。患者接受随访 2 年的临床评估和 4 次血样采集（在试验期间 0、3、12、和 24 个月）。患者的依从性通过测定 n-3 多不饱和脂肪酸在血清磷脂脂肪酸的组成来评估。前期已有膳食补充 n-3 多不饱和脂肪酸的患者在进入实验前被给予 4 周的洗脱期。

随机和盲法

随机分组是在一个独立的公司---GM park（丹麦的 Hadsund）通过计算机产生的分配顺序进行。这家公司也打包和运输胶囊。分配顺序保存在 GM park 公司，数据库在 2005 年 9 月关闭，在数据库关闭前研究者并未获得分配顺序。每个参与者信息都保存在密封的信封中，以应对紧急情况，但在试验中盲法未被打破。主要研究者对所有患者登记，并随机给患者一个连续的数字用以分组。所有的参与者、研究者、服务提供者和数据监控者在整个研究期间对治疗分组不知情。此外，直到研究结束后所有血清磷脂才被分析，这进一步保证了盲法。

主要和次要结果

预定义的终点在整个试验中得到持续应答。主要结果由急性心肌梗死、需要冠脉检查或介入的心绞痛、中风、短暂性脑缺血、需要手术治疗的周围血管疾病或死亡组成。此外，我们评估了以下次要结果：急性心肌梗死；需要冠状动脉检查或介入的心绞痛；中风；短暂性脑缺血；外周血管病和主要冠脉事件如心肌梗死和心绞痛的一起导致需要冠状动脉介入治疗。临床终点委员会成员在对治疗分组并不知情的情况下评估所有终点。终点的定义为急性心肌梗死，依据以下三项中的两项确定：（1）典型的胸痛；（2）心电图变化；及（3）心肌标志物升高，即不稳定性心绞痛或递增型心绞痛使心脏检查或介入成为必要；短暂性脑缺血（临床诊断定义为突然发作的局灶性神经症状在 24 小时内消退）；中风（定义为突然发作的局部神经系统症状经计算机断层成像验证有梗塞存在和/或症状持续超过 24 小时）；外周血管疾病发展到以前没有受影响的肢体（由外围血压测量验证或之前有病变的末端病情恶化因此需要手术检查或干预）和死亡。

治疗

n-3 多不饱和脂肪酸治疗给药采用两种胶囊 Omacor（ ω -3-酸乙酯 90）给予：20:5n-3、浓度为 45%

二十碳五烯酸（EPA）和22:6n-3、浓度为37.5%二十二碳六烯酸（DHA），总计为1.7克/天的n-3多不饱和脂肪酸。对照组为77%的 18:1 N-9（橄榄油）。n-3多不饱和脂肪酸和对照组治疗采用相同颜色的明胶胶囊。N-3多不饱和脂肪酸和对照组胶囊是由Ronova Biocare（挪威尤尔）提供。

血液采样和实验室方法

病人血液样本于常规透析前抽出。所有安全参数和标准血脂分析根据奥尔堡医院化验标准完成。为避免氧化，在我们的脂质研究实验室分析前，血清保存在充满氮气的试管并置于负80°C。简言之，血清中总脂是按照布莱和代尔（19）报道的方法提取。血清（400ul）与500ul氯仿（三氯甲烷）和1000ul的甲醇（含有作为抗氧化剂的二丁基羟基甲苯）混合。再加入500ul氯仿和500ul水短暂混合后，将试管在1000g的转速下离心2分钟，进行相分离。总共550ul的氯仿相转移到已用己烷准备的Sep Pak氮气柱（Waters公司，马萨诸塞州米尔福德市）。从其他脂质类分离磷脂是采用Kaluzny等所描述的方法（20）。所提取的磷脂在氮气（N₂）下进行干燥，再溶于250ul庚烷，并根据Christoffersen and Glass (21)报道方法使用0.5M甲醇钠和乙酸转移。脂肪酸含量测定通过气相色谱法，采用一个配有液体进样器（CP 9050）、一个火焰离子化检测器、和一个Highpolar CP-sil 88 60米×0.25 微米内径的毛细管柱的CHROMPACK CP-9002气相色谱仪（瓦里安，荷兰米德尔）完成。分割喷射模式、程序升温90~210°C、和恒定压力被使用。氮气作为载气。此方法允许14~24个碳原子的脂肪酸甲基酯的定量为和几个反式脂肪酸的分离。血清磷脂脂肪酸的测量方法误差为EPA 3.5%和DHA 2.8%。

统计分析

该试验设计对危险性小于0.6的患者具有80%检测能力，和40%的2年预期事件发生率。这种风险降低建立在GISSI研究（22）和Kutner等（23）观察性研究的基础上。检测能力的计算并没有考虑到患者退出。统计分析按治疗意向性进行并包括所有被随机分配到治疗组的患者。连续数据以平均值±方差报道。采用双尾、置信水平设定在95%来计算所有P值。P<0.05被认为有统计学意义。组间比较时，对连续变量使用非配对t检验和卡方检验来比较频率。两组的心血管事件累积率采用Kaplan-Meier生存曲线和Cox回归分析进行。所使用的统计软件为STATA和SPSS（11.0版本；SPSS公司，伊利诺州芝加哥市）

结果

患者于2002年11月和2003年5月之间进入试验。共有206例患者随机分为n-3多不饱和脂肪酸治疗组或对照组进行治疗。病人征集流程示于流程图（图1）。两组基线特征和药物治疗史（表1）均匹配良好。患者接受2年随访，或直到试验的主要终点（中等随访时间为558天，而范围为219至730天）。

随访期间206例中的121例（59%）达到了主要终点（表2）。在心血管终点的总数和死亡数上比较两个治疗组之间被认为没有显著差异：n-3多不饱和脂肪酸组中62例，与对照组中59例相比较（图2）。随访过程中观察到总共17例心肌梗塞；n-3多不饱和脂肪酸组4例，对照组13例，两组比较有显著差异（图3；P=0.036）。尽管无显著差异，n-3多不饱和脂肪酸治疗组有更多

中风倾向患者。从试验方法结果分析、包括所有遵从治疗的患者，都与意向性治疗分析（数据未显示）是一致的。在整个试验中，n-3 多不饱和脂肪酸组血清磷脂 EPA 和 DHA 与对照组比较显著增加（表 3）。

51 例（25%）患者退出试验，主要因患者以各种理由拒绝或发生不良事件。n-3 多不饱和脂肪酸治疗组（n=28）和对照组（n=23）患者退出数量比较没有显著差异。所有退出试验（61%）与未退出试验（58%）的患者相比其主要终点发生并没有显著不同。退出试验患者的所有基线特征（数据未显示）与表 1 所示未退出试验患者相似。

与对照组相比（103 例中的 22 例 [21%]），n-3 多不饱和脂肪酸治疗组（103 例中的 31 例 [30%]；没有显著差异）有更多不良事件的倾向。在 n-3 多不饱和脂肪酸组，103 例中 12 例（12%）出现严重不良事件，与对照组 103 例中 7 例（7%）相比无显著差异。多数不良事件为肠胃不适（表 4）。

讨论

在这项试验中诊断为患有 CVD 的血液透析患者，用 n-3 多不饱和脂肪酸作为二级预防对试验主要终点---各种原因导致的死亡率和心血管事件总人数无显著作用。然而，用 n-3 多不饱和脂肪酸治疗 2 年后显著降低了这些高风险患者心肌梗死的人数。

一些证据表明，n-3 多不饱和脂肪酸可作为普通人群有效的心血管事件二级预防（8-10）。He 等（8）在队列研究后设分析表明，鱼类摄入量的增加伴随心血管疾病死亡率的降低。鱼类的摄入量每增加 20 克/天，心血管病死亡率对应下降 7%。然而，最近的 Cochrane 评价（11）表明 n-3 多不饱和脂肪酸对心血管疾病没有任何有益的影响。该 Cochrane 评价一直是人们讨论的话题，因为阴性结果主要是饮食和再梗死试验 II（DART II）的研究结果。这项研究表明患者被随机分配到肥鱼组（24）的心绞痛患者有不明原因的死亡率增加。这些结果与第一次 DART 研究（25）中心梗后患者接受饮食建议后的结果不相吻合。与对照组相比，食用富含脂肪的鱼饮食每周两次，持续 2 年的观察组患者其总死亡率降低了 29%。类似的结果也在对心肌梗死幸存者的大型 GISSI-Prevenzione 试验（22）中观察到，经一粒胶囊（N-3 多不饱和脂肪酸 0.85 克）Omacor 治疗，以心肌梗死、卒中、和心血管死亡为主要复合终点的患者数有显著降低。到目前为止，很少有用 n-3 多不饱和脂肪酸干预血液透析患者的数据报道。我们以前发现 n-3 多不饱和脂肪酸对透析前患者（26）的血脂具有益处，以及 Kutner 等（23）在一项观察性研究显示，摄入大量鱼的透析患者比摄入鱼少的患者存活时间更长。最近已由 Friedman 和 Moe（18）发表综述讨论了 N-3 多不饱和脂肪酸对透析人群几种可能的有益作用。据我们所知，目前没有更早的研究解决 n-3 多不饱和脂肪酸对透析患者心血管终点和死亡的影响。

在本试验中，主要试验终点---心血管事件和死亡无显著变化。一种可能的解释是，基于 GISSI 研究（22）和 Kutner 等人（23）的观察数据，本试验设计目的是显示 N-3 多不饱和脂肪酸能使风险降低的幅度相对大。因此，它可能使我们忽略了一个主要终点较小的减少，而我们的试验设计未能观察到。此外，只有约一半透析患者死于心血管疾病。因此，选择总死亡数作为终点可能减弱了结果的可信度，因为在这一人群中非心脏因素所致死亡对死亡率的影响似乎是可信的。也可能是介入治疗应该开始于更早的阶段以达到对这些高风险患者心血管疾病的预防作用。此外，n-3

多不饱和脂肪酸的剂量可能太低，尽管以前的数据建议使用 1 克/天的 n-3 多不饱和脂肪酸作为心血管疾病的二级预防（27）。我们选择 1.7 克/天的剂量是因为一些规模较小的研究表明血液透析病人可能会耗尽脂肪酸（28，29），并且较大剂量可能不适合在临床上使用，因为随着 n-3 多不饱和脂肪酸剂量的增加胃肠道疾病的发病率也增加。

虽然 N-3 多不饱和脂肪酸对主要终点---总的心血管终点和死亡没有效果，但我们发现 N-3 多不饱和脂肪酸组心肌梗死患者数显著减少。这个终点的次要性质和使用偏少数目的心肌梗死来做出这样的解释仍然属于一种推测，然而，也有几种可能的机制可用来解释。。首先，n-3 多不饱和脂肪酸的抗血栓作用可能是重要的，并且以前的动物研究表明 n-3 多不饱和脂肪酸能够抑制血栓形成（30）。尽管在人体试验中大剂量的 n-3 多不饱和脂肪酸已被用来实现抗血栓作用，但在日常诊疗中 n-3 多不饱和脂肪酸的抗血栓作用还没有得到令人信服地证明（16）。此外，在 DART 研究（25）和 GISSI 试验中（22），以心肌梗死为单一结束点的患者数目没有差异。相反，长期透析治疗患者止血参数和血栓形成多项指标有改变（31）。在我们的试验中，用 n-3 多不饱和脂肪酸治疗与对照治疗相比，心肌梗死风险相对减少为 70%，绝对风险降低为 8.7%，表明 n-3 多不饱和脂肪酸对这一人群有强效抗血栓作用。此外，Schmitz 等（32）报道，补充 n-3 多不饱和脂肪酸使血透患者植入血栓的形成数量显著减少，这一结果进一步支持了 n-3 多不饱和脂肪酸在血透患者中的抗血栓作用。第二，Theis 等（33）最近发现，颈动脉手术前接受 n-3 多不饱和脂肪酸可引起 n-3 多不饱和脂肪酸在颈动脉斑块中的增加及更有趣的是使斑块中的炎症在减少。作者认为 n-3 多不饱和脂肪酸可稳定粥样硬化斑块，这一机制可能也是我们研究结果可能的解释。最后，我们不能排除抗氧化在这一人群中作用的可能性。有报道表明尿毒症患者氧化应激水平升高，而这一现象可能是长期血透患者增加的风险负担的一部分（34）。之前有研究报道在透析患者中使用 n-3 多不饱和脂肪酸可增加 LDL 颗粒的抗氧化能力（35）并且 Ando 等（36）报道，与安慰剂相比，使用 1.8 克 N-3 多不饱和脂肪酸治疗 3 个月后能减少氧化低密度脂蛋白水平。在普通人群中，抗氧化疗法的干预试验没有显示出有益作用（37）。然而，来至于慢性透析治疗患者的一些数据表明抗氧化治疗可能是有效的。虽然在普通人群中维生素 E 显示对心血管疾病的死亡率或发病率（37）没有任何影响，但 SPACE 的调查表明在血液透析人群中使用维生素 E 治疗后可使心肌梗死的数量和心血管终点减少（38）。这些结果与我们的研究结果在某些方面是相似的。首先，研究人口规模相近；其次，干预的效果根据心肌梗死的数量来显示；最后，对总死亡率没有影响。Tepel 等报道对血透患者采用乙酰半胱氨酸治疗虽然对总死亡率无效，但能显著减少心血管事件的发生（39）。这些研究表明，抗氧化治疗可能在血液透析患者中起重要作用，因此 N-3 多不饱和脂肪酸的抗氧化作用可能是本研究结果一个可能的解释。

优势与不足

我们研究的一个优势是通过测定血浆脂肪酸组成来记录患者的依从性。因此，我们能够证明，在整个试验期间与对照组相比，n-3 多不饱和脂肪酸治疗组中 EPA 和 DHA 显著增加。但是，衡量患者依从性的力度因大量退出患者没有血液样本而受到一定程度的限制。参与试验者能够代表血透

患者的人群特征，n-3 多不饱和脂肪酸治疗添加为伴随用药，这对试验结果有良好的外部验证。本试验也存在一些局限性。对结果评价的力度是基于一个大弧度的风险降低，因此，我们可能忽略了治疗组之间较小的差异。把总死亡数纳入主要复合终点可能使结果不确定，因而未能表现出群体之间的差异。虽然有趣，但组间心肌梗死患者数的显著差异是次要结果，因此应谨慎理解。

结论

在我们将 N-3 多不饱和脂肪酸作为长期血透患者心血管疾病的二级预防研究中，死亡主要复合终点和心血管事件的总人数无显著差异。有趣的是，作为次要结果，我们报道了用 n-3 多不饱和脂肪酸治疗可使心肌梗塞的数量显著减少。心肌梗死患者数量显著减少的可能由抗血栓、抗炎、或从 N-3 多不饱和脂肪酸在这一人群中抗氧化作用来解释。这些发现需要在更大型、使用 n-3 多不饱和脂肪酸为干预，并以心肌梗死为主要结果的试验中，来得到证实。

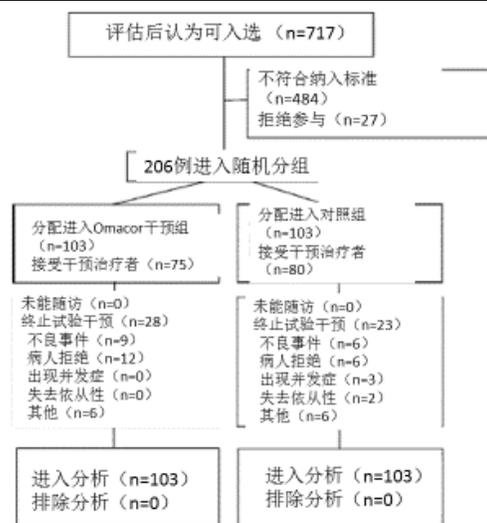


图1. 试验流程图

表1. 206例肾透析患者患者基线数据

	n-3 PUFA (n = 103)	Control (n = 103)
年龄	66 ± 11	68 ± 12
女性	34 (33)	39 (38)
体重指数	24.7 ± 4.4	24.0 ± 4.1
透析月数	44 ± 42	44 ± 39
吸烟者	29 (28)	28 (27)
糖尿病	23 (22)	26 (26)
高血压	79 (77)	81 (79)
收缩压	148 ± 28	154 ± 28
舒张压	77 ± 17	77 ± 13
心血管疾病		
心肌梗塞	40 (39)	26 (25)
冠状搭桥/经皮冠脉介入	26 (25)	29 (28)
心绞痛	38 (37)	37 (36)
中风/短暂性缺血	41 (40)	44 (43)
周围血管疾病	35 (34)	36 (35)
实验室参数		
血红蛋白	11.7 ± 1.3	11.8 ± 1.3
总胆固醇	4.9 ± 1.3	4.9 ± 1.3
白蛋白	36.2 ± 3.1	36.0 ± 5.2
尿素清除指数	1.42	1.40
尿量减少率	74	74
合并用药		
β受体阻滞剂	52 (50)	59 (57)
钙拮抗剂	35 (34)	33 (32)
血管紧张素转化酶抑制剂	28 (27)	25 (24)
血管舒张素II拮抗剂	14 (14)	6 (6)
阿司匹林	69 (67)	78 (76)
他汀类药物	21 (20)	20 (19)

数据以平均值±标准差或n(%)表示。ACE, 血管紧张素转换酶; BMI, 体重指数; CABG, 冠状动脉搭桥术; CVD, 心血管疾病; MI, 心肌梗死; PCI, 经皮冠状动脉介入治疗; PUFA, 多不饱和脂肪酸; TIA, 短暂性缺血性发作; URR, 尿量减少率。

表2. 随访期间两组心血管终点数量

	n-3 PUFA	对照组	HR (95% CI)	P
心血管事件的主要终点或死亡	62 (60.2)	59 (57.3)	1.04 (0.72 to 1.48)	0.85
次要重点				
心肌梗死	4 (3.9)	13 (12.6)	0.30 (0.10 to 0.92)	0.036
冠状动脉介入	3 (2.9)	4 (3.9)	0.73 (0.16 to 3.25)	0.68
主要的冠心病事件	7 (6.8)	17 (16.5)	0.40 (0.17 to 0.97)	0.043
中风	7 (6.8)	3 (2.9)	2.23 (0.58 to 8.64)	0.24
短暂性脑缺血	5 (4.9)	2 (1.9)	2.54 (0.49 to 13.1)	0.26
周围血管病变	9 (8.7)	7 (6.8)	1.26 (0.47 to 3.39)	0.65
总死亡数	34 (33.0)	30 (29.1)	1.12 (0.69 to 1.83)	0.65

数据为n(%)。CI, 置信区间; HR, 风险率。

心血管事件和死亡

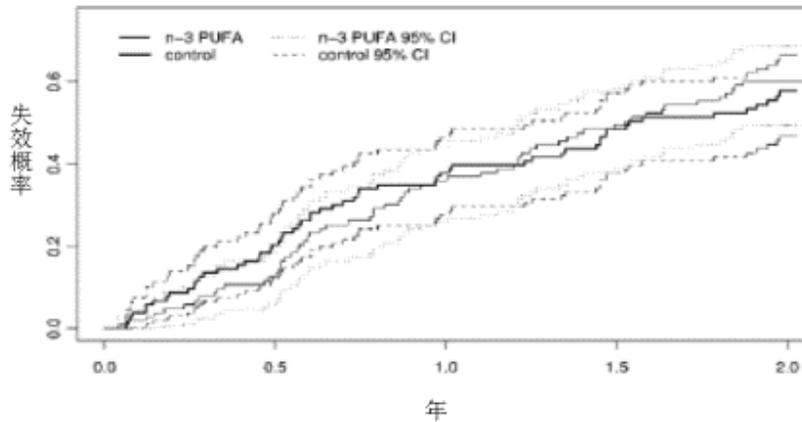


图2. Kaplan-Meier生存曲线显示两组心血管事件总数和死亡数。

心肌梗死

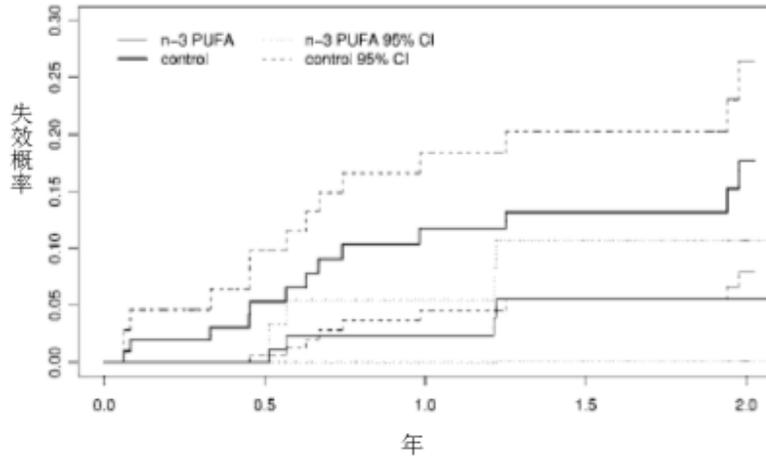


图3. Kaplan-Meier曲线显示两组心肌梗死的发病率。

表3. 血清磷脂脂肪酸成份作为患者依从性的数据：基线值及治疗3、12、和24个月份后。

	n-3 PUFA				Control			
	基线值 (n = 103)	3 Mo (n = 86)	12 Mo (n = 53)	24 Mo (n = 32)	基线值 (n = 103)	3 Mo (n = 82)	12 Mo (n = 53)	24 Mo (n = 36)
n-3, 20:5	1.4 ± 0.6	3.8 ± 1.2 ^b	3.8 ± 1.3 ^b	3.8 ± 1.4 ^b	1.6 ± 0.8	1.5 ± 0.7	1.3 ± 0.5	1.6 ± 0.7
n-3, 22:6	4.0 ± 1.0	5.5 ± 1.2 ^b	5.6 ± 1.1 ^b	5.5 ± 1.3 ^b	4.0 ± 1.1	4.0 ± 1.1	3.9 ± 0.8	3.8 ± 1.3

脂肪酸表示为脂肪酸总量百分比±标准差。
p<0.001对比于基线值和对照组。

表4. 两治疗组的不良事件

	n-3 PUFA	Control
腹痛	9	2
腹泻	7	7
恶心和呕吐	10	10
其他胃肠道症状	3	2
胃肠道出血	8	5
脑出血	2	1
其他出血	5	1
其他不良反应	12	9
总数	56	37

某些患者具有不止一种不良反应。