

恶性高血压患者血清补体测定及其意义*

王纪霞¹ 邢广群¹ 丁冉冉¹ 刘湘萍²

[摘要] **目的:**探讨恶性高血压患者是否存在补体活化及其与临床的相关性。**方法:**选取恶性高血压肾损害患者 18 例(恶高组),原发性高血压患者 15 例(原发组),同期健康查体的正常人 18 例(对照组)。采用双抗体夹心酶联免疫吸附(ELISA)法测定血清经典途径、旁路途径、凝集素途径各自激活标志物 C1q、Bb、FCN2,经典及凝集素途径共同激活产物 C4d、共同调节因子 sCR1,旁路途径的调节因子补体 H 因子(CFH),以及 3 条途径共同的补体激活产物 C3a、C5a、SC5b-9,同时收集研究对象血清生化、补体 C3、C4 及尿蛋白等临床指标。**结果:**恶高组血清 Bb、C4d、CFH、C3a 及 SC5b-9 水平明显高于原发组和对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),原发组与对照组比较差异无统计学意义;恶高组血清 sCR1、C5a 水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);恶性高血压患者血清 CFH 水平与血清肌酐呈正相关($r = 0.682, P = 0.009$),C4d 与 24 h 尿蛋白定量呈正相关($r = 0.804, P = 0.002$)。**结论:**恶性高血压患者补体系统被激活,且旁路途径活化并参与恶性高血压患者肾损伤。sCR1、C4d 水平升高是否与经典和(或)凝集素途径相关有待于进一步探讨。

[关键词] 恶性高血压;补体

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2015.08.007

[中图分类号] R544.1 **[文献标志码]** A

The significance of serum complement in patients with malignant hypertension

WANG Jixia¹ XING Guangqun¹ DING Ranran¹ LIU Xiangping²

(¹Department of Nephrology, Affiliated Hospital of The Medical College of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266555, China; ²Central Laboratory, Affiliated Hospital of Qingdao University)

Corresponding author: XING Guangqun, E-mail: gqx99monash@163.com

Abstract Objective: To investigate the presence of complement activation and its association with clinical feature in patients with malignant hypertension. **Method:** Double antibody sandwich enzyme linked immune sorbent assay (ELISA) was used to evaluate the serum levels of complement component (C1q, Bb, FCN2, C4d, sCR1, CFH, C3a, C5a, SC5b-9) in 18 patients with malignant hypertension, 15 patients with hypertension and 18 normal controls. At the same time, the indicators of clinical biochemistry, complement C3 and C4, and protein in the urine of the patients with malignant hypertension were collected. **Result:** The levels of serum Bb, C4d, CFH, C3a and SC5b-9 in patients with malignant hypertension were significantly higher than those in patients with hypertension and in normal controls ($P < 0.05$) with no significant difference between the hypertension group and control group. The levels of serum sCR1 and C5a in patients with malignant hypertension were significantly higher than those in normal control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); The level of serum CFH was positively correlated with creatinine ($r = 0.682, P = 0.009$), and the level of serum C4d was positively correlated with 24-hour urine protein ($r = 0.804, P = 0.002$). **Conclusion:** The complement system is activated in patients with malignant hypertension, and the alternative pathway activation participates in the malignant hypertensive renal damage. Further study is needed for the correlation between the increase of sCR1/C4d and classical and/or the lectin pathway.

Key words malignant hypertension; complement

恶性高血压(malignant hypertension, MHT)是一种以严重高血压合并眼底视网膜出血渗出和

(或)视乳头水肿为表现的临床综合征,且病变常累及心、脑、肾等多个实质脏器。因其发病机制不清且缺乏有效治疗手段,患者预后常较差。有研究表明原发或继发于血管损伤的免疫机制参与 MHT 发病^[1],在 MHT 患者纤维素坏死的小动脉壁内发现有 γ 球蛋白、白蛋白、和某些补体成分的沉积。目前国内外补体活化参与 MHT 发病的相关报道

* 基金项目:山东省自然科学基金(No:ZR2011HM079);青岛市科技局应用基础研究[11-2-4-2-(5)-jch]

¹ 青岛大学附属医院黄岛院区肾病科(山东青岛,266555)

² 青岛大学附属医院中心实验室

通信作者:邢广群, E-mail: gqx99monash@163.com

少见,本研究的主要目的是探讨 MHT 患者是否存在补体激活及其与临床的相关性。

1 对象与方法

1.1 对象

选取 2011-09—2013-05 于我院住院及门诊患者 33 例。MHT 患者 18 例(恶高组),其中男 15 例,女 3 例;年龄 27~48 岁,平均 34 岁;入选标准:①短期内血压急剧增高,舒张压 ≥ 130 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa);②眼底见双侧视网膜出血、棉絮样渗出,可伴或不伴视乳头水肿(KW 分级 III 级或 IV 级)。18 例患者中原发性恶性高血压 1 例、继发于慢性肾小球肾炎 15 例,继发于肾上腺腺瘤者 2 例,排除糖尿病、肝脏疾病、手术外伤、结缔组织病等,此 18 例患者均无血栓性微血管病临床表现,均未行血液透析治疗。单纯原发性高血压组患者 15 例(原发组),其中男 12 例,女 3 例;年龄 25~57 岁,平均 41 岁;入选根据 1999 年世界卫生组织/国际高血压学会(WHO/ISH)高血压诊断标准:测量 3 次非同日血压,均收缩压 ≥ 140 mmHg 和(或)舒张压 ≥ 90 mmHg,排除肾脏病、手术外伤、结缔组织病等。对照组 18 例均来自我院体检中心,其中男 15 例,女 3 例;年龄 24~47 岁,平均 34 岁。本研究所有研究对象均未应用激素、免疫调节药物、免疫活性多糖、补体抑制剂、抗菌药物等影响补体系统的药物。本研究获得青岛大学附属医院伦理委员会审查同意,所有患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 清晨空腹抽取静脉血,4℃静置 2 h 后,于 4℃离心机中 1 000 r/min 离心 20 min。取上层血清分装至 EP 管中(避免反复冻融),-80℃低温冻存。

1.2.2 检测方法 血清补体因子水平分别使用商品化试剂盒以双抗体夹心 ELISA 法测定(表 1),均严格按照说明书进行操作,其中补体 C1q、FCN2、C4d、sCR1、CFH、C3a 及 C5a 测定的基本方法为:

将各补体因子抗体包被于 96 孔微孔板中,制成固相载体,向微孔中分别加入各因子标准品和稀释后的标本 100 μ l,37℃温育 2 h,使其与连接于固相载体上的抗体结合,然后每孔加入生物素化的各补体因子抗体 100 μ l,37℃温育 1 h,将未结合的生物素化抗体洗净后,加入 HRP 标记的亲合素 100 μ l,37℃温育 30 min,再次洗涤后加入 TMB 底物 90 μ l,37℃避光显色 15 min,每孔加终止液 50 μ l 终止反应,用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),绘制出标准曲线,求出回归方程,将样本 OD 值代入回归方程,计算出样品浓度,然后乘以稀释倍数。血清补体 Bb、SC5b-9 测定的实验步骤为:①每孔加入 300 μ l 1×洗液,20℃下温育 2 min,拍干(洗版 2 次);②向板内分别加入 100 μ l 样本稀释液(空白)、标准品、对照样本及稀释好的样本(Bb 稀释 20 倍 SC5b-9 稀释 40 倍),20℃下温育(Bb 温育 30 min,SC5b-9 温育 60 min);③洗板 5 次;④每孔加入 50 μ l Bb/SC5b-9 结合抗体,20℃下温育 30 min;⑤洗板 5 次;⑥每孔加入 100 μ l 底物溶液,20℃下温育 15 min;⑦加入 100 μ l 终止液(轻轻拍打板子,使颜色均匀);⑧450 nm 波长下读取吸光度值,线性曲线分析实验结果($y=mx+b$)。全自动生化分析仪测定血血清肌酐等生化指标,散射比浊法测定血补体 C3、C4,手工比色法测定 24 h 尿蛋白定量。

1.3 统计学处理

所有统计学处理均采用 SPSS17.0 软件完成,非正态资料用中位数(四分位数间距)表示,近似正态分布计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,若方差齐性组间比较采用单因素方差分析,两两之间的比较采用 bonferrion 检验,方差不齐及非正态分布资料采用非参数检验,两两比较采用两个独立样本的非参数检验(Mann-Whitney U 检验)^[2]。相关性分析,正态分布计量资料采用 Pearson 相关分析;非正态分布资料采用 Spearman 相关分析。以双向 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 补体各因子所用试剂盒及稀释倍数

Table 1 ELISA kits and dilution multiples

试剂盒	厂家	批号	稀释倍数
SC5b-9	Quidel, San Diego, CA, USA	909608	40
C5a	Usen life Science, Wuhan, China	L121029509	50
C3a	Usen life Science, Wuhan, China	L121029483	100
sCR1	Usen life Science, Wuhan, China	L121029508	10
C4d	Usen life Science, Wuhan, China	L121029482	10 000
C1q	Usen life Science, Wuhan, China	L121029480	40 000
FCN2	Usen life Science, Wuhan, China	L121012171	50 000
CFH	Usen life Science, Wuhan, China	L121012171	20
Bb	Quidel, San Diego, CA, USA	909233	20

2 结果

2.1 一般资料

3组间年龄、性别无显著性差异(表2)。18例恶性高血压患者中12例测定了24h尿蛋白定量;

16例测定了血清肌酐;13例测定了血清补体C3、C4,其中有6例出现补体C3降低,血清补体C4均在正常值范围内(表3)。

表2 恶高组与对照组的一般资料

Table 2 General information of malignant hypertension group and control group

组别	例数	男:女/例	年龄/岁	收缩压/mmHg	舒张压/mmHg	24h尿蛋白量/g	$\bar{x} \pm s$
							血清肌酐/(mmol·L ⁻¹)
恶高组	18	15:3	34.43±6.79	215.50±33.95 ¹⁾²⁾	146.14±23.02 ¹⁾²⁾	3.11±2.17 ¹⁾²⁾	510.73±236.45 ¹⁾²⁾
原发组	15	12:3	40.60±10.26	156.70±8.47 ¹⁾	100.60±5.50 ¹⁾	0.10±0.01	90.13±10.08
对照组	18	15:3	33.93±6.58	119.15±8.47	77.77±5.20	0.31±0.01	95.48±7.56

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与原发组比较,²⁾ $P < 0.01$ 。

表3 恶性高血压患者补体C3、C4值及正常值范围

Table 3 The level of C3, C4 of patients with malignant hypertension g/L

病例编号	补体	
	补体C3 (0.9~1.8)	补体C4 (0.1~0.4)
例1	0.87 ¹⁾	0.20
例2	0.94	0.21
例3	0.91	0.15
例4	0.81 ¹⁾	0.14
例5	0.96	0.23
例6	0.79 ¹⁾	0.17
例7	1.05	0.24
例8	1.09	0.23
例9	0.75 ¹⁾	0.13
例10	1.06	0.55
例11	0.90	0.21
例12	0.85 ¹⁾	0.18
例13	0.73 ¹⁾	0.19

¹⁾ 小于正常值低限的病例。

2.2 3组间C1q, FCN2, Bb, sCR1, CFH, C3a, C5a, SC5b-9, C4d浓度比较

恶高组补体CFH、SC5b-9、Bb、C3a、C4d浓度明显高于原发组及对照组($P < 0.05$), sCR1及C5a

明显高于对照组($P < 0.05$)(表4)。恶高组患者补体C3、C4水平正常或偏低(表3),而C3a、C4d、C5a、SC5b-9水平明显升高,说明补体活化,而B因子裂解产物Bb水平明显高于对照组,提示补体旁路途径激活;C4d水平显著高于原发组和对照组。

2.3 相关性分析

恶性高血压患者血清CFH水平与肌酐成正相关($r = 0.682, P = 0.009$);C4d与尿蛋白量呈正相关($r = 0.804, P = 0.002$)(图1)。

3 讨论

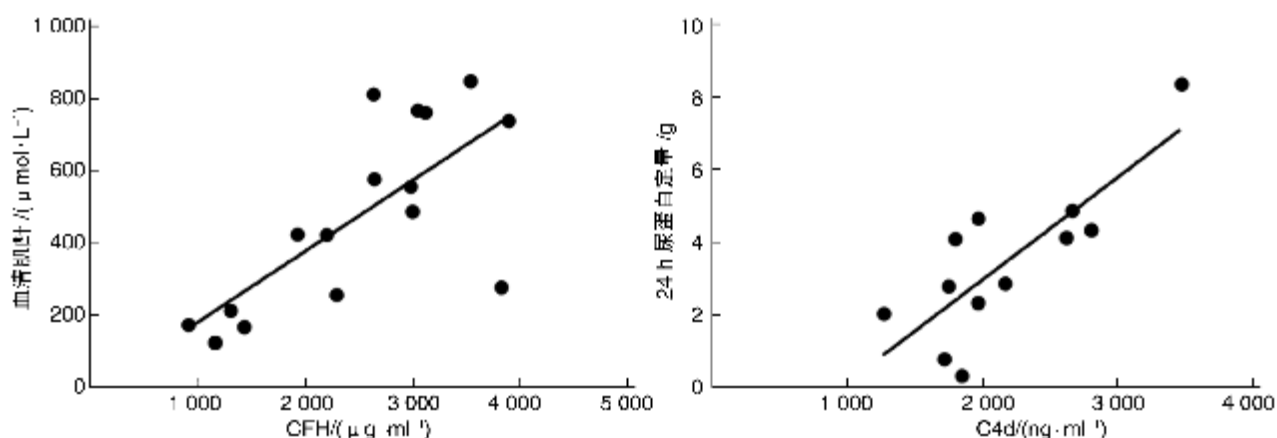
补体活化途径主要有3条:经典途径(CP)、甘露聚糖结合凝集素途径(MBL)和旁路途径(AP)。C3a、C5a、SC5b-9分别为补体C3、C5的裂解产物及可溶性的补体末端复合物,其水平反映补体整体活化的程度。本研究发现恶高组患者血清中补体C3水平正常或降低,而血清C3a、C5a及SC5b-9水平较对照组明显升高,且血清C3a、SC5b-9水平较原发组明显升高,三者在原发组与对照组之间无显著性差异,说明恶性高血压患者有补体的活化且到达终末阶段,而原发性高血压患者没有。Bb因子是旁路途径的激活标志物,CFH是旁路途径的重要调节因子,本研究发现恶性高血压患者血清Bb、CFH水平均显著性升高,提示补体旁路途径活化。

表4 恶高组与对照组血清补体因子检测结果比较

Table 4 The serum levels of complement component between malignant hypertension group and control group

组别	$\bar{x} \pm s, M(IQR)$				
	SC5b-9/(ng·ml ⁻¹)	C5a/(ng·ml ⁻¹)	C3a/(ng·ml ⁻¹)	sCR1/(ng·ml ⁻¹)	Bb/(μg·ml ⁻¹)
恶高组	3452.35±2110.90 ¹⁾²⁾	231.72±60.79 ¹⁾	50.00±12.01 ¹⁾²⁾	42.82(71.24) ¹⁾	9.57(6.65) ¹⁾²⁾
原发组	1475.17±382.11	198.92±78.09	20.16±8.76	22.42(41.52)	3.71(4.50)
对照组	1478.72±656.65	162.19±65.03	16.81±8.69	13.29(25.09)	5.38(5.80)
组别	C4d/(ng·ml ⁻¹)	C1q/(μg·ml ⁻¹)	FCN2/(μg·ml ⁻¹)	CFH/(μg·ml ⁻¹)	
恶高组	1967.99±702.39 ¹⁾²⁾	88.59±57.36	4.09(7.36)	2814.93(1436.54) ¹⁾²⁾	
原发组	1150.96±493.15	98.07±29.15	4.37(3.67)	839.99(355.91)	
对照组	1037.76±308.14	59.71±14.48	4.49(3.09)	935.32(201.77)	

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与原发组比较,²⁾ $P < 0.01$ 。



a: 血清肌酐; b: 24 h 尿蛋白定量。

图 1 相关性分析

Figure 1 Correlation analysis

旁路途径活化可能由于旁路途径抑制因子的功能异常或缺失或遗传变异或者旁路途径活化因子过度活化导致,产生大量活化 C3b 及终末期补体因子,这些补体因子可沉积于肾小球,引起肾脏病变^[3]。C1q、FCN2 分别为经典和 MBL 途径的激活标志物,sCR1 是经典途径和 MBL 途径的共同调节因子,C4 是经典途径和 MBL 途径的共同成分,C4d 为 C4 的裂解片段之一,是经典及 MBL 途径共同激活产物,本研究中恶高组患者血清 C1q、FCN2 水平与另两组间比较无显著性差异,sCR1 水平较对照组显著升高,C4 水平正常,而 C4d 水平显著升高。恶高组患者血清 sCR1 及 C4d 水平均升高,而 C1q、FCN2 无明显差异,其水平升高是否与经典和(或)凝集素途径相关有待于进一步探讨。

本研究中恶高组患者血清旁路途径激活标志物 Bb、调节因子 CFH 均明显升高,血清 CFH 水平与肌酐呈正相关($r=0.682, P=0.009$),提示补体旁路途径的激活可能是恶性高血压肾损害的主要致病途径。C4d 是补体经典途径和凝集素途径激活后的产物,本研究中恶高组血清 C4d 水平显著升高,且 C4d 与 24 h 尿蛋白定量呈正相关($r=0.804, P=0.002$),相关研究显示 C4d 在肾小球的沉积影响组织病理情况及疾病预后^[4],补体经典途径和(或)MBL 途径是否参与其致病,可进一步行病理检查,进一步明确,并有扩大样本继续深入研究的价值。CFH 是补体旁路激活途径的主要负调控因子,在动脉内膜表层通过结合 C3b 加速旁路途径 C3 转化酶灭活,抑制补体激活^[5]。本研究发现恶性高血压患者血清中 CFH 显著性升高,这与同为血栓性微血管病的溶血性尿毒症(HUS)相矛盾,可能原因为本研究的 18 例恶性高血压患者均无血栓性微血管病临床表现,不存在先天性 H 因子缺乏等易诱发血栓性微血管病的基础条件。本研究恶高组血清 CFH 浓度升高,可

能与恶性高血压患者血管内皮损害后,大量 CFH 释放入血有关,也可能是补体激活后,肝脏代偿合成增多有关。

本研究中恶高组血清补体激活产物 C3a、C5a 及 C5b-9 水平较对照组明显升高。这些激活产物可直接损伤内皮细胞并影响其功能^[6]。已有研究表明恶性高血压肾损害患者血管内皮受损,组织损伤及炎症反应程度较原发高血压患者重^[7]。C3a、C5a 能趋化炎症细胞,具有很强的致炎作用。C3a、C5a 可分别与肥大细胞或嗜碱性粒细胞表面的 C3a 和 C5a 受体结合,触发靶细胞脱颗粒,释放组胺及其他血管活性介质,介导局部炎症反应;与中性粒细胞受体结合,产生氧自由基和弹性蛋白酶,从而杀死内皮细胞,扰乱内皮细胞间联结,破坏内皮细胞屏障功能^[8],肾小球因含大量毛细血管可能成为其重要的攻击对象。SC5b-9 浓度升高提示膜攻击复合物(MAC)的形成,MAC 直接损伤肾小球毛细血管内皮,且 C5b-9 可沉积于肾小球,成为肾小球疾病的新抗原^[9]。

本研究结果显示,恶性高血压患者补体系统被激活,补体系统在肾脏损害中起重要作用。补体旁路途径参与了补体活化和肾脏损伤;C4d 的阳性发现提示补体经典和(或)MBL 途径参与恶性高血压的致病,但有待进一步扩大样本量并行肾脏病理研究明确。针对补体激活的干预可能成为阻止恶性高血压病情进展及治疗恶性高血压的一个新途径。

参考文献

- [1] HILME E, HANSSON L, SANDBERG L, et al. Abnormal immune function in malignant hypertension. *Journal of Hypertension*[J]. *Hypertens*, 1993, 11: 989-994.
- [2] 刘万里, 薛茜, 曹明芹, 等. 用 SPSS 实现完全随机设计多组比较秩和检验的多重比较[J]. *地方病通报*, 2007, 22(2): 27-29.

绝经后女性雌激素水平对高血压 伴心功能不全患者的影响*

王楠¹ 宋继洋² 马慧元¹ 吕娜娜²

【摘要】 目的:观察绝经后女性高血压、心功能不全患者雌激素水平变化;探讨女性绝经后雌激素水平和高血压、心功能不全的相关关系。方法:选取甘肃省人民医院心内科和体检科绝经女性患者 107 例,分为对照组(37 例)、高血压组(40 例)和高血压合并心功能不全组(30 例),同时测定雌二醇(E2)、脂质过氧化物(LPO)、血清总抗氧化能力(TAS)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、左室射血分数(LVEF)、N 末端脑利钠肽前体(NT-proBNP)、肌酐、尿酸、空腹血糖及 BMI 等指标,并进行统计分析。结果:①高血压组 E2、HDL-C、TAS、LVEF 显著低于对照组($P<0.05$),LPO 显著高于对照组($P<0.01$)。高血压合并心功能不全组 E2、TAS、HDL-C、LVEF 显著低于对照组和高血压组($P<0.01$),LPO、LDL-C、NT-proBNP 显著高于对照组和高血压组($P<0.05$)。②各组间在年龄、肌酐、尿酸、空腹血糖及 BMI 指数等方面无显著性差异($P>0.05$)。③经 Pearson 相关分析,E2 与 LPO 之间呈负相关($r=-0.707, P<0.01$),E2 与 TAS 之间呈正相关($r=0.847, P<0.01$),E2 与 TC 之间呈负相关($r=-0.304, P<0.01$),E2 与 LDL-C 之间呈负相关($r=-0.823, P<0.01$),E2 与 HDL-C 之间呈正相关($r=0.887, P<0.01$),E2 与 LVEF 之间呈正相关($r=0.725, P<0.01$),E2 与 NT-proBNP 之间呈负相关($r=-0.766, P<0.01$)。结论:雌激素可通过多种途径改善血管内皮功能、抑制心肌细胞肥大、减少心肌细胞凋亡,是女性高血压和心功能不全的保护性因素;雌激素可能降低了 TC、LPO 及 LDL-C 水平,并增高了 TAS、HDL-C 水平,二者具有相关性;氧化与抗氧化能力失衡可能参与了绝经后女性高血压和心功能不全的发生发展。

【关键词】 雌激素;脂质过氧化物;总抗氧化能力;血脂;高血压;心功能不全

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2015.08.008

【中图分类号】 R544.1 **【文献标志码】** A

The impact of estrogen levels on postmenopausal women patients with hypertension and heart failure

WANG Nan¹ SONG Jiyang² MA Huiyuan¹ LV Nana²

(¹Gansu Provincial Hospital, Lanzhou, 730000, China; ²Ningxia Medical University)

Corresponding author: SONG Jiyang, E-mail: songjiyang620xyz@163.com

* 基金项目:甘肃省自然科学基金研究基金计划(No:1208RJZA110)

¹甘肃省人民医院干三心内科(兰州,730000)

²宁夏医科大学临床医学院

通信作者:宋继洋, E-mail: songjiyang620xyz@163.com

- [3] MERI S. Complement activation in diseases presenting with thrombotic microangiopathy[J]. Eur J Intern Med, 2013, 24: 496-502.
- [4] XING G Q, CHEN M, LIU G, et al. Differential deposition of C4d and MBL in glomeruli of patients with ANCA-negative pauci-immune crescentic glomerulonephritis[J]. Clin Immunol, 2010, 30: 144-156.
- [5] OKSJOKI R, JARVA H, KOVANEN P T, et al. Association between complement factor H and proteoglycans in early human coronary atherosclerotic lesions: implications for local regulation of complement activation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Bio, 2003, 23: 630-636.
- [6] MORQAN B P. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects[J]. Biochem J, 1989, 264: 1-14.
- [7] 李长红, 郑斌, 李振海. 恶性高血压患者血浆高敏 C 反应蛋白、血管性血友病因子和血管性血友病因子裂解酶的变化及意义[J]. 中华高血压杂志, 2011, 19(1): 57-60.
- [8] OWEN C A, CAMPBELL M A, SANNE P L, et al. Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases[J]. J Cell Biol, 1995, 131: 775-789.
- [9] MA R, CUI Z, LIAO Y H, et al. Complement activation contributes to the injury and outcome of kidney in human anti-glomerular basement membrane disease [J]. J Clin Immunol, 2013, 33: 172-178.

(收稿日期:2014-12-05;修回日期:2015-01-27)