

高血压

新疆哈萨克族高血压患者血压水平与 T 淋巴细胞钙调神经磷酸酶及肿瘤坏死因子 α 的相关性研究^{*}谭猛¹ 张源明¹ 孟小攀¹ 董建¹ 戴晨²

【摘要】 目的:研究新疆哈萨克族原发性高血压患者血压水平与外周血 T 淋巴细胞钙调神经磷酸酶(CaN)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)表达情况的相关性。**方法:**随机选取 2018-01—2019-06 在新疆医科大学第一附属医院、达坂城社区保健站和乌鲁木齐市友谊医院就诊的未经降压药物治疗的 120 例哈萨克族原发性高血压患者,按最新高血压防治指南中高血压分级标准分为高血压 1 级组、高血压 2 级组与高血压 3 级组,另随机选取健康体检者作为对照组。每组 40 例,男女各 20 例。采集外周血并使用磁性激活细胞分选法(MACS)分离 T 淋巴细胞。分别运用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测外周血 T 淋巴细胞 CaN 和 TNF- α mRNA 和蛋白表达水平。**结果:**与对照组相比,高血压 2 级组和高血压 3 级组 T 淋巴细胞 CaN mRNA 和蛋白以及 TNF- α mRNA 表达均提高(均 $P<0.05$),高血压 1 级组与对照组相比无明显差异。Spearman 秩相关性分析和有序多分类 Logistic 回归结果显示,CaN 和 TNF- α 表达水平与血压水平呈正相关,高血压患者血压水平随着 CaN 和 TNF- α 表达增高而增高。**结论:**新疆哈萨克族原发性高血压患者血压水平随着 CaN 和 TNF- α 表达的增高而增高,CaN 和 TNF- α 可能参与高血压发生发展过程。

【关键词】 高血压;哈萨克族;T 淋巴细胞;钙调神经磷酸酶;肿瘤坏死因子 α

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2019.12.015

【中图分类号】 R544.1 **【文献标志码】** A

Correlation among blood pressure level, calcineurin and tumor necrosis factor α in T lymphocyte in Xinjiang Kazakh patients with essential hypertension

TAN Meng¹ ZHANG Yuanming¹ MENG Xiaopan¹ DONG Jian¹ DAI Chen²

(¹Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, 830054, China; ²Department of Nephrology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University)

Corresponding author: ZHANG Yuanming, E-mail: zymdxx@163.com

Abstract Objective: To investigate the correlation among expression of calcineurin (CaN) and tumor necrosis factor α (TNF- α) in peripheral blood T lymphocytes and blood pressure in Xinjiang Kazakh patients with essential hypertension. **Method:** A total of 120 Kazakh patients with essential hypertension without anti-hypertensive drugs treatment from the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Friendship Hospital and Da-bancheng Community Health Service Center from January 2018 to June 2019 were selected. According to the hypertension grading standard in the latest Hypertension Prevention and Treatment Guidelines, these patients were divided into hypertension group 1, hypertension group 2, and hypertension group 3. In addition, healthy subjects were selected as the control group. There were 20 males and 20 females in each group. Peripheral blood was collected and T lymphocytes were isolated using immunomagnetic cell sorting (MACS). The mRNA and protein expression of CaN and TNF- α in peripheral blood T lymphocytes were detected by real-time PCR and Western blot respectively. **Result:** Compared with control group, the mRNA and protein expressions of CaN and mRNA expression of TNF- α in hypertension group 2 and hypertension group 3 were significantly higher (all $P<0.05$), and there was no significant difference between hypertension group 1 and control group. Spearman rank correlation analysis and ordered multi-class Logistic regression analysis showed that the expression of CaN and TNF- α were positively correlated with blood pressure level, and the blood pressure level of hypertensive patients increased with the

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(No.81760081)

¹ 新疆医科大学第一附属医院心脏中心(乌鲁木齐,830054)

² 新疆医科大学第一附属医院肾病科

通信作者:张源明, E-mail: zymdxx@163.com

increase expression of CaN and TNF- α . **Conclusion:** The blood pressure level of Kazakh patients with essential hypertension increase with the increase expression of CaN and TNF- α . CaN and TNF- α may be involved in the development of hypertension.

Key words hypertension;Kazakh;T lymphocytes;calcineurin;tumor necrosis factor α

近年来关于慢性炎症作为原发性高血压(essential hypertension,EH)的一种重要发病机制的研究越来越多^[1]。其主要机制可能是 T 淋巴细胞介导炎症细胞因子如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α ,TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)等释放,通过部分作用于血管内皮细胞,改变血管结构,介导促炎活动,参与高血压的发病过程^[2-3]。研究表明钙调神经磷酸酶(calcineurin,CaN)-活化 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cells,NFAT)信号通路是 T 淋巴细胞激活介导炎症反应的一条重要的信号通路。CaN 作为该信号通路的限速蛋白,是淋巴细胞促炎作用的关键。哈萨克族是新疆第 2 大人口的少数民族,其 EH 的患病率高于同地域其他人群。本次研究选取新疆哈萨克族不同等级高血压患者,采用实时荧光定量 PCR 检测外周血 T 淋巴细胞中 CaN 和 TNF- α mRNA 表达,采用 Western blot 检测 CaN 蛋白表达,探讨新疆哈萨克 EH 患者高血压水平和 CaN、TNF- α 的相关性。

1 对象与方法

1.1 对象

采用随机数字表法选取 160 个数字,每个高血压分级组男女各 20 个数字,正常对照组男女各 20 个数字,数字代表就诊号。随机选取 2018-01—2019-06 在新疆医科大学第一附属医院、达坂城社区保健站和乌鲁木齐市友谊医院就诊的未经降压药物治疗的 120 例哈萨克族 EH 患者。患者入组时非同日测量 3 次左上肢动脉血压,根据 2018 高血压防治指南中高血压等级分类和定义将患者分为 3 组:高血压 1 级组,平均血压(141.82±7.92/90.15±5.21) mmHg(1 mmHg=0.133 kPa);高血压 2 级组,平均血压(156.47±10.65/93.90±7.79) mmHg;高血压 3 级组,平均血压(184.10±10.17/101.15±11.69) mmHg。每组男女各 20

例。另选取同时期哈萨克族健康体检者作为对照组,男女各 20 例。排除标准:近 2 周内或正在服用降压药物的高血压患者;试验室和临床检查诊断为急性脑血管病、肾功能不全、急慢性感染患者、继发性高血压、糖尿病、多器官功能衰竭、急慢性免疫疾病。本研究流程经过新疆医科大学第一附属医院伦理委员会批准。所有研究对象均签订知情同意书。

1.2 主要试剂和设备

人淋巴细胞分离液,RPMI 1640,胎牛血清,重组人白细胞介素 2,植物凝集素,磁力分选器和磁珠,FITC 抗 CD3 抗体,Trizol,实时荧光定量 PCR 试剂盒,一抗、二抗,cDNA 反转录试剂盒及 ECL 发光显色试剂盒,PCR 荧光定量仪和 Quanlity 凝胶成像分析系统。

1.3 方法

1.3.1 外周血 T 淋巴细胞样本采集 收取受试者新鲜静脉血 10 ml,稀释后加入含有人淋巴细胞分离液的离心管中,低速离心后获得外周血单个核细胞。采用 MACS 法分离 T 淋巴细胞。流式细胞术测定,>95% 细胞为 T 淋巴细胞。将 T 淋巴细胞平均分为两份,一份用于 PCR 的 mRNA 测定,一份用于 Western blot 的蛋白测定。

1.3.2 CaN 和 TNF- α mRNA 的检测 按照 TR-izol 说明书提取 T 淋巴细胞总 RNA,RNA 吸光度 A260/A280 在 1.8~2.0。将 RNA 逆转录为 cDNA,条件:42℃ 1 h,70℃ 5 min。将获取的 cDNA 放置于 -80℃ 保存。在 GenBank 中获取人类 TNF- α 、CaN 和 β -actin mRNA 序列,见表 1。使用实时荧光定量 PCR 仪进行扩增,反应条件:95℃ 2 min,95℃ 5 s,60℃ 10 s,35~40 次循环,72℃ 5 min 终止反应。扩增结果采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法分析。

1.3.3 Western blot 检测 CaN 蛋白表达 RIPA 裂解液提取 T 淋巴细胞总蛋白,使用蛋白定量试剂

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称	序列(5'-3')	退火温度/℃	产物长度/bp
CaN	F:CGACCCAGTCATAAACTATGA	55	153
	R:CCATTTCTCTTCTTCCTCCTA		
TNF- α	F:GTGCTCCTCACCCACACCATA	57	152
	R:AAGACCCCTCCCAGATAGATA		
β -actin	F:TGGCACCCAGCACAATGAA	55	186
	R:CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA		

盒测定蛋白浓度,每孔上样蛋白 30 μg ,加入 5 μl 缓冲液,混匀后 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,冰上冷却。每孔上样体积 20 μl ,采用 SDS-PAGE 电泳,电泳后采用湿转法电转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,5%脱脂牛奶封闭 2 h。洗膜后加入兔抗人一抗(CaN 1 : 5 000, β -actin 1 : 2 500),4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育 18 h,洗膜后加入山羊抗兔二抗(1 : 5 000),室温,避光,摇床孵育 2 h,加入适量增强型 ECL 显色液后进行显色,Quality 图像软件分析蛋白条带灰度值。

1.4 统计学处理

采用 SPSS21.0 软件进行统计学处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内两两比较采用 LSD-T 检验,计数资料用率表示采用 χ^2 检验,多组间比较采用单因素方差分析,相关性采用 Spearman 相关性分析,影响因素采用有序多分类 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

4 组人群年龄、性别、吸烟率、饮酒率、BMI、白细胞、空腹血糖、肌酐(Cr)、总胆固醇(TC)、三酰甘

油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)及高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)等比较均差异无统计学意义。见表 2。

2.2 T 淋巴细胞中 CaN 和 TNF- α mRNA 表达水平

与对照组相比,高血压 2 级组和高血压 3 级组 T 淋巴细胞 CaN 和 TNF- α mRNA 表达水平均增加,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$);高血压 1 级组与对照组比较差异无统计学意义。见图 1。

2.3 T 淋巴细胞中 CaN 蛋白表达水平

与对照组相比,高血压 2 级组和高血压 3 级组 T 淋巴细胞 CaN 蛋白表达水平均增加,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$);高血压 1 级组与对照组比较差异无统计学意义。见图 2。

2.4 CaN 和 TNF- α 表达水平与血压水平的相关性

Spearman 相关分析显示,CaN mRNA、CaN 蛋白和 TNF- α mRNA 表达水平均与血压水平高度相关。见表 3。

表 2 研究对象一般情况
Table 2 General data of participants

组别	对照组(40 例)	高血压 1 级组(40 例)	高血压 2 级组(40 例)	高血压 3 级组(40 例)
年龄/岁	49.70 $\pm$ 9.23	49.37 $\pm$ 8.69	53.17 $\pm$ 7.93	52.83 $\pm$ 9.67
男:女/例	20:20	20:20	20:20	20:20
吸烟率/%	27.5	25.0	25.0	30.0
饮酒率/%	27.5	32.5	27.5	25.0
BMI	27.17 $\pm$ 5.67	27.05 $\pm$ 2.80	27.93 $\pm$ 4.97	28.03 $\pm$ 4.44
白细胞/($\times 10^9/\text{L}$)	5.85 $\pm$ 1.58	5.88 $\pm$ 1.30	5.86 $\pm$ 1.62	6.25 $\pm$ 1.51
空腹血糖/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	4.53 $\pm$ 0.85	4.87 $\pm$ 1.14	4.93 $\pm$ 1.22	4.83 $\pm$ 1.24
Cr/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	81.61 $\pm$ 13.15	82.10 $\pm$ 15.21	82.23 $\pm$ 23.42	84.68 $\pm$ 17.63
TC/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	4.59 $\pm$ 0.96	4.75 $\pm$ 0.81	4.64 $\pm$ 0.92	4.91 $\pm$ 1.13
TG/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.81 $\pm$ 1.92	1.76 $\pm$ 1.07	1.76 $\pm$ 0.83	1.86 $\pm$ 0.76
LDL-C/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.51 $\pm$ 0.78	2.27 $\pm$ 0.85	2.54 $\pm$ 0.76	2.25 $\pm$ 0.84
HDL-C/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.20 $\pm$ 0.45	1.18 $\pm$ 0.36	1.11 $\pm$ 0.33	1.14 $\pm$ 0.35

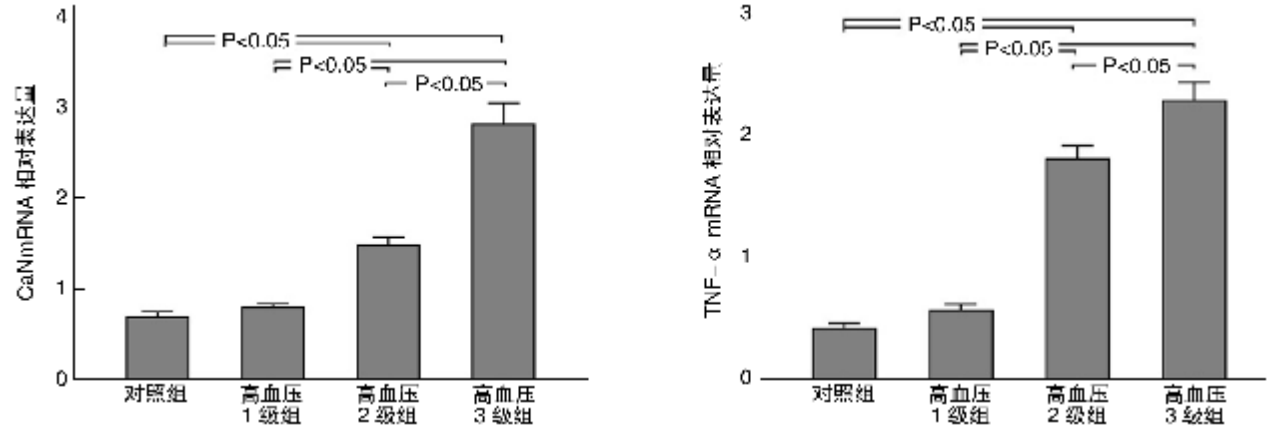


图 1 各组 CaN 和 TNF- α mRNA 表达
Figure 1 Expression of CaN and TNF- α mRNA

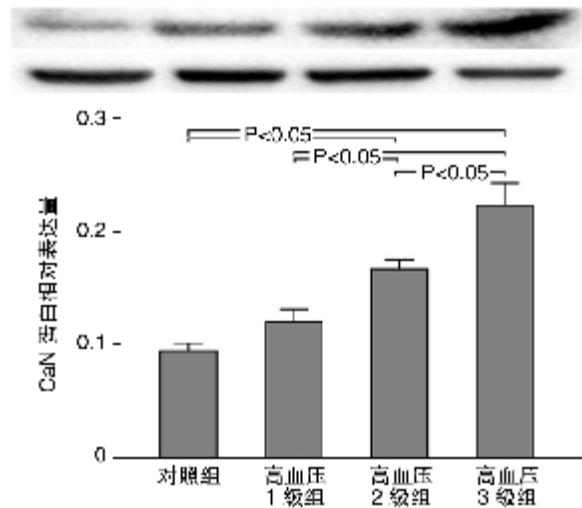


图 2 各组 CaN 蛋白表达
Figure 2 Expression of CaN protein

表 3 CaN 和 TNF- α 表达水平与血压水平的相关性分析
Table 3 Correlation between CaN and TNF- α expressions and blood pressure levels

项目	CaN mRNA	CaN 蛋白	TNF- α mRNA
<i>r</i>	0.788	0.580	0.794
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

2.5 CaN 和 TNF- α 表达水平对高血压的影响

以血压水平为因变量,以年龄、性别、是否吸烟、是否饮酒、BMI、白细胞、空腹血糖、Cr、TC、TG、LDL-C、HDL-C、CaN 蛋白、CaN mRNA 和 TNF- α mRNA 为自变量进行有序多分类 Logistic 回归分析,变量赋值见表 4,分析结果见表 5。结果表明,哈萨克族高血压患者血压水平随着 CaN 和 TNF- α 表达升高而升高,估测 CaN 和 TNF- α 是影响高血压的独立危险因素。

模型诊断:平行线检验的结果($\chi^2 = 11.438, P = 0.99$)说明比例优势假设存在,拟合优度检验显示模型拟合良好(Pearson 检验 $P = 0.795$),本模型优于只有常数项的模型($\chi^2 = 229.636, P < 0.001$)。

表 4 有序多分类 Logistic 回归的变量赋值
Table 4 Variable assignment

因素	赋值
血压水平	健康对照=0;高血压 1 级=1;高血压 2 级=2;高血压 3 级=3
性别	男性=1;女性=2
吸烟	是=1;否=2
饮酒	是=1;否=2

表 5 血压影响因素的有序多分类 Logistic 回归分析
Table 5 Influencing factors of blood pressure analyzed by Logistic regression model

因素	B 值	SE	Wald	P 值	95%CI	
					下限	上限
年龄	-0.007	0.023	0.087	0.768	-0.052	0.038
性别=1	0.233	0.471	0.244	0.621	-0.691	1.156
是否吸烟=1	-0.580	0.548	1.124	0.289	-1.654	0.493
是否饮酒=1	0.003	0.464	0.000	0.994	-0.906	0.912
BMI	-0.003	0.046	0.004	0.950	-0.093	0.088
白细胞	0.153	0.127	1.434	0.231	-0.097	0.402
空腹血糖	0.218	0.182	1.440	0.230	-0.138	0.575
Cr	-0.006	0.011	0.241	0.623	-0.028	0.017
TC	0.120	0.209	0.332	0.565	-0.289	0.530
TG	0.232	0.237	0.954	0.329	-0.233	0.697
LDL-C	-0.199	0.221	0.810	0.368	-0.633	0.235
HDL-C	-0.429	0.519	0.681	0.409	-1.446	0.589
CaN 蛋白	13.507	3.036	19.789	<0.001	7.556	19.458
CaN mRNA	2.225	0.458	23.609	<0.001	1.327	3.122
TNF- α mRNA	2.051	0.351	34.165	<0.001	1.364	2.739

3 讨论

EH 是一种由于炎性信号通路激活介导炎性细胞因子释放导致的慢性炎症性疾病^[1-2,8]。炎性因子引发内皮功能障碍,影响血管舒张是炎症促进高血压的一个潜在机制^[2,5]。许多研究表明,T 淋巴细胞在慢性炎症中扮演了重要的角色。活化的 T 淋巴细胞膜上开放的钾通道使细胞跨膜电位差增大,促进钙离子内流,钙浓度短暂提高,活化

CaN^[6]。CaN 是一种钙敏感磷酸酶,这种丝氨酸/苏氨酸特异性磷酸酶在细胞信号转导通路中发挥生物反应和调节基因表达的作用,能够激活 NFAT 转录因子家族^[7-8]。研究发现,CaN 可以通过与 NFAT 的特定调控区域直接结合,促使 NFAT 去磷酸化,去磷酸化的 NFAT 与细胞核中靶基因的结合元件结合并调节基因表达,诱导包括 IL-6、TNF- α 等炎性因子分泌和释放^[9-11]。大量研究表

明,TNF- α 可以通过破坏内皮型一氧化氮合酶(eNOS) mRNA的稳定来减弱一氧化氮的产生,降低eNOS蛋白表达,降低对血管内皮细胞的保护,诱导高血压发生^[12]。抑制TNF- α 产生可以恢复人体内皮依赖性血管舒张^[13]。

本课题组前期研究证明,新疆哈萨克单纯性高血压患者外周血T淋巴细胞上的钾通道存在激活状态,且CaN-NFAT信号通路活性与钾离子通道的开放存在密切关系^[14-15]。本研究在前期研究的基础上,对CaN-NFAT信号通路活化程度及相关炎症因子表达情况与高血压等级的相关性进行进一步研究,分别检测新疆哈萨克族不同级别单纯性高血压患者外周血T淋巴细胞中CaN和TNF- α 的mRNA和蛋白表达水平,结果显示,高血压2级和3级组的CaN mRNA和蛋白表达水平均高于对照组;同样的,CaN-NFAT信号通路介导产生的炎症因子TNF- α mRNA在高血压2级和3级组的T淋巴细胞中表达也高于对照组,说明CaN依赖的信号通路可能与高血压发病有关。Spearman秩相关性分析和有序多分类Logistic回归分析结果显示,CaN和TNF- α 表达水平与血压水平相关,并且高血压患者血压水平随着CaN和TNF- α 的表达升高而升高,提示高血压等级越高的患者T淋巴细胞中有更多的CaN-NFAT信号通路被激活,介导包括TNF- α 在内的多种炎症因子大量释放,成为诱导高血压发病的独立危险因素。高血压1级组与对照组表现无差异,可能是早期高血压的发病过程中T淋巴细胞介导的慢性炎症作用尚未形成,对高血压发病过程影响较低。

本研究从基因和蛋白水平观察新疆哈萨克族不同级别原发性高血压患者CaN和TNF- α 表达情况,所得结果提示,血压级别高的患者T淋巴细胞中CaN存在更程度的激活并进一步介导产生炎症因子加重循环系统的炎症环境,为慢性炎症诱导高血压发病的相关学说提供了一定依据。本研究为横断面研究,尚不能确认CaN和TNF- α 表达与血压水平的因果关系,将来须扩大研究群体,进行纵向研究并随访记录,开展药物干预实验,对CaN-NFAT信号通路和高血压炎症发病机制的相关性做进一步研究。

参考文献

[1] Wenzel U, Turner JE, Krebs C, et al. Immune Mechanisms in Arterial Hypertension[J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2015, 27(3): 677-686.
[2] Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: mechanisms and treatment[J]. Hypertension, 2012, 59(2): 367-374.
[3] 朱建,张源明,郁洁,等.新疆哈萨克族高血压患者外

周血单个核细胞炎症激活与NLRP3炎症体通路相关性研究[J]. 临床心血管病杂志, 2015, 31(9): 993-997.
[4] Schiffrin EL. Immune mechanisms in hypertension and vascular injury[J]. Clin Sci (Lond), 2014, 126(4): 267-274.
[5] Dinh QN, Drummond GR, Sobey CG, et al. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension[J]. Biomed Res Int, 2014; 406960.
[6] Vig M, Kinet JP. Calcium signaling in immune cells[J]. Nat Immunol, 2009, 10(1): 21-27.
[7] Hu L, Pennington M, Jiang Q, et al. Characterization of the functional properties of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 in human CD4+ T lymphocytes[J]. J Immunol, 2007, 179(7): 4563-4570.
[8] Huang SS, Zhang QB, Yuan QY, et al. Inhibitory effects of telmisartan on culture and proliferation of and Kv1.3 potassium channel expression in peripheral blood CD4+ T lymphocytes from Xinjiang Kazakh patients with hypertension[J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2016, 17(4).
[9] Crabtree GR, Schreiber SL. SnapShot: Ca2+-calcineurin-NFAT signaling[J]. Cell, 2009, 138(1): 210, 210.e1.
[10] Walther S, Awad S, Lonchyna VA, et al. NFAT transcription factor regulation by urocortin II in cardiac myocytes and heart failure[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014, 306(6): H856-866.
[11] Quang CT, Lebouche S, Passaro D, et al. The calcineurin/NFAT pathway is activated in diagnostic breast cancer cases and is essential to survival and metastasis of mammary cancer cells[J]. Cell Death Dis, 2015, 6: e1658.
[12] Yan G, You B, Chen SP, et al. Tumor necrosis factor- α downregulates endothelial nitric oxide synthase mRNA stability via translation elongation factor 1- α 1[J]. Circ Res, 2008, 103(6): 591-597.
[13] Maki-Petaja KM, Hall FC, Booth AD, et al. Rheumatoid arthritis is associated with increased aortic pulse-wave velocity, which is reduced by anti-tumor necrosis factor- α therapy[J]. Circulation, 2006, 114(11): 1185-1192.
[14] Zhang QB, Zhang YM, Cheng LF, et al. Voltage-dependent potassium channel and calcium-activated potassium channel current changes of peripheral blood T-lymphocytes from hypertensive patients in Xinjiang Kazakh[J]. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi, 2013, 41(12): 1020-1024.
[15] 贺思利,张源明,黄莎莎,等.新疆哈萨克族高血压患者淋巴细胞白细胞介素6与其上游信号分子的表达[J]. 临床心血管病杂志, 2016, 32(7): 694-697.
(收稿日期:2019-06-28; 修回日期:2019-10-29)