

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.19.016

原发性高血压患者血清 miRNA-663 水平与 RAAS 生化标志物的相关性分析

刘文果¹, 陈石磊², 万志佳³, 魏 星⁴

(1. 重庆市结核病防治所检验科 400050; 2. 陆军军医大学军事预防医学院防原医学教研室, 重庆 400038; 3. 重庆市沙坪坝区妇幼保健计划生育服务中心检验科 400030; 4. 重庆市奉节县人民医院检验科 404600)

摘 要:目的 探讨原发性高血压患者血清 miRNA-663 水平与肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)生化标志物的相关性。方法 受试者分为原发性高血压组、健康对照组, 每组 50 例。分别采用荧光实时定量聚合酶链反应、化学比色法及放射免疫法检测外周血血清 miRNA-663、血管紧张素转换酶(ACE)活性, 以及肾素(RA)、血管紧张素(Ang)Ⅱ、醛固酮(ALD)的表达。结果 相对于健康对照组, 原发性高血压组患者外周血血清 miRNA-663 表达显著降低, ACE 活性及 RA、Ang Ⅱ、ALD 表达均显著升高($P < 0.01$); 原发性高血压患者血清 miRNA-663 水平与血清 ACE 活性及 RA、Ang Ⅱ、ALD 水平均呈显著负相关。结论 原发性高血压患者外周血血清 miRNA-663 表达显著下调, RAAS 生化标志物显著升高, 外周血血清 miRNA-663 表达与 RAAS 生化标志物呈显著负相关关系。

关键词: miRNA-663; 高血压; 肾素; 血管紧张素转换酶; 血管紧张素Ⅱ

中图分类号: R446.11

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)19-2899-04

Analysis on correlation between serum miRNA-663 level and biochemical markers of RAAS in patients with essential hypertension

LIU Wenguo¹, CHEN Shilei², WAN Zhijia³, WEI Xing⁴

(1. Department of Clinical Laboratory, Chongqing Municipal Institute of Tuberculosis Treatment and Prevention, Chongqing 400050, China; 2. Department of Preventive Medicine, Military Preventive Medical College, Military Medical University, Chongqing 400038, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Shapingba District Maternal and Child Health Care Family Planning Service Center, Chongqing 400030, China; 4. Department of Clinical Laboratory, Fengjie County People's Hospital, Chongqing 404600, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between serum miRNA-663 level and biochemical markers of renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) in the patients with essential hypertension. **Methods** The subjects were divided into the primary hypertension group and healthy control group, 50 cases in each group. The levels of peripheral serum miRNA-663, angiotensin converting enzyme (ACE) activity and the expressions of rennin (RA), Ang Ⅱ and aldosterone (ALD) were detected by adopting qRT-PCR, chemical colorimetric and radioimmunoassay methods, respectively. **Results** Compared with the healthy control group, the expression of peripheral serum miRNA-663 in the patients with PH was decreased significantly ($P < 0.01$), and the ACE activity and expressions of RA, Ang Ⅱ and ALD were increased significantly ($P < 0.01$). The level of serum miRNA-663 had significantly negative correlation with serum ACE activity and levels of RA, Ang Ⅱ and ALD in the patients with primary hypertension. **Conclusion** The expression of peripheral serum miRNA-663 is significantly decreased, and biochemical markers of RAAS are significantly increased in the patients with primary hypertension. The peripheral serum miRNA-663 expression has significantly negative correlation with the biochemical markers of RAAS.

Key words: miRNA-663; hypertension; renin; angiotensin converting enzyme; Ang Ⅱ

原发性高血压是以血压升高为主要临床表现的综合征, 是多种心、脑血管疾病的重要病因和危险因素。原发性高血压会严重影响心、脑、肾等重要脏器

的结构与功能, 最终导致这些器官的功能衰竭, 迄今其仍是心血管疾病死亡的主要原因之一^[1-2]。原发性高血压的发病机制十分复杂且不明确, 目前研究表明

原发性高血压是多因素、多层次共同作用的结果。肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)在高血压病的发生、发展中发挥极其重要的作用^[3-4],肾素是 RAAS 调控血压的始动因子,是 RAAS 级联反应中的限速环节^[5]。最近研究表明,miRNA 在原发性高血压的发病机制中可能发挥了重要作用^[6-7]。相关研究发现 miRNA-663 表达降低可引起肾素 mRNA 水平升高^[8-10],但原发性高血压患者 miRNA-663 的表达及其与 RAAS 生化标志物的相关性研究较少见报道。本研究观察了原发性高血压患者外周血血清 miRNA-663 表达水平及其与 RAAS 生化标志物的相关性,为原发性高血压的诊疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 原发性高血压组:2016 年 3 月至 2017 年 3 月在奉节县人民医院门诊和住院的原发性高血压患者 50 例,均符合世界卫生组织及国际高血压协会对原发性高血压的诊断标准:I 级高血压为 140~159/90~99 mm Hg,II 级高血压为 160~179/100~109 mm Hg。其中男 30 例,女 20 例;年龄 45~71 岁,平均(58.4±6.8)岁;I 级高血压 29 例,II 级高血压 21 例。排除合并肾脏疾病、糖尿病和严重心脑血管疾病的患者。健康对照组:健康者 50 例,其中男 30 例,女 20 例;年龄 45~70 岁,平均(57.5±7.2)岁。两组的年龄、性别差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 血液标本处理 血液标本均在采集后立即处理:4℃ 2 000 r/min,离心 10 min,收集血清,-80℃ 保存备用。

1.2.2 血清 miRNA-663 测定

1.2.2.1 miRNA 的提取和纯化 采用 mirVana PARIS Kit(Ambion 公司,美国)试剂盒提取和纯化 miRNA,取血清样品 500 μL,室温下加入等体积变性液,立即充分混匀后加入等体积酸性酚氯仿,涡旋震荡 30~60 s;室温下 14 000 r/min 离心 5 min。取上清液于新管中,加入 1.25 倍体积的无水乙醇,充分混匀后加入柱子中,12 000 r/min 离心 30 s,弃滤液;往柱子中加入 700 μL 洗液,12 000 r/min 离心 30 s,弃滤液;往柱子中加入 500 μL 洗液,12 000 r/min 离心 30 s,弃滤液;重复用 500 μL 洗液洗涤 1 次,弃滤液后 12 000 r/min 离心 1 min;加入 60 μL 95℃ 预热的缓冲液到柱子中,12 000 r/min 离心 1 min,收集 miRNA 立即进行反转录。

1.2.2.2 反转录 采用 TaqMan[®] MicroRNA 反转录试剂盒将提取的 miRNA 反转录成 cDNA,按说明书操作。miRNA-663 反转录的反应条件:16℃ 30 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min;miRNA-663 反转录

引物序列:5'-CTC AAC TGG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TCA GTT GCG GTC CC-3';上游引物序列:5'-ACA CTC CAG CTG GGA GAT G-3';下游引物序列:5'-ACT ATG GTG TCG TGG AGT CG-3'。U6 反转录的反应条件:37℃ 30 min,85℃ 5 min;U6 反转录引物序列:5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA AAA ATA T-3';上游引物序列:5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3';下游引物序列:5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'。

1.2.2.3 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR) 采用 Maxima SYBR Green qPCR Kit(Thermo scientific, 美国)试剂盒进行,按试剂盒说明书操作:95℃ 预变性 15 min;95℃ 变性 20 s,退火 30 s,72℃ 延伸 40 s,重复 40 个循环,然后进行溶解曲线分析,结果采用比较阈值法计算,即目的基因的量 = $2^{-\Delta\Delta CT}$, $\Delta\Delta CT = (\text{实验组目的基因 Ct 值} - \text{实验组管家基因 Ct 值}) - (\text{对照组目的基因 Ct 值} - \text{对照管家基因 Ct 值})$ 。

1.2.3 血清血管紧张素转换酶(ACE)活性测定 取适量血清,根据试剂盒操作说明书用化学比色法检测 ACE 活性,试剂盒购自 Baomanbio 公司(JK50235.2)。

1.2.4 血清肾素(RA)、血管紧张素(Ang)II、醛固酮(ALD)水平检测 取适量血清,根据试剂盒操作说明书采用放射免疫法检测血清 RA、Ang II、ALD 水平,试剂盒购自北京福瑞生物工程公司。

1.2.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验分析,相关性分析采用 Pearson 相关。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组受试者外周血 miRNA-663 表达 本研究通过提取两组受试者外周血 miRNA,反转录后采用荧光实时定量 PCR 法检测了外周血 miRNA-663 表达,发现原发性高血压患者外周血 miRNA-663 表达相对于健康对照组显著下调($P<0.01$),相对于健康对照组,原发性高血压患者外周血 miRNA-663 表达下调了 39.10%。见图 1。

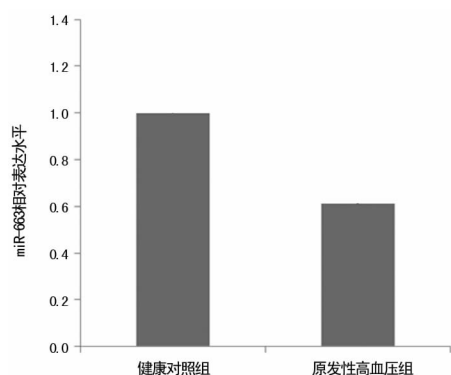


图 1 两组受试者血清 miR-663 表达水平比较

2.2 两组受试者外周血血清 ACE 活性及 RA、Ang II、ALD 水平测定 分离两组受试者外周血血清,分别采用化学比色法和放射免疫法检测了外周血 ACE 活性及 RA、Ang II、ALD 水平,发现原发性高血压患者外周血血清 ACE 活性及 RA、Ang II、ALD 水平相对于健康对照组均显著上调($P<0.01$),原发性高血压患者外周血血清 ACE 活性升高了 53.29%,外周血血清

RA、Ang II、ALD 水平分别升高了 38.61%、72.39%、54.23%。见表 1。

2.3 原发性高血压患者外周血血清 miRNA-663 水平与 RAAS 生化标志物的相关性分析 Pearson 相关性分析结果显示,原发性高血压患者外周血血清 miRNA-663 水平与外周血血清 ACE 活性及 RA、Ang II、ALD 均呈显著负相关关系。见表 2。

表 1 两组受试者外周血血清 ACE 活性及 RA、Ang II、ALD 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	ACE 活性(U/L)	RA(μ g/L)	Ang II (ng/L)	ALD(ng/L)
健康对照组	50	114.57 $\pm$ 28.95	1.58 $\pm$ 0.31	54.26 $\pm$ 29.53	38.56 $\pm$ 17.29
原发性高血压组	50	175.62 $\pm$ 31.58*	2.19 $\pm$ 0.46*	93.54 $\pm$ 37.65*	59.47 $\pm$ 31.53*

注:与健康对照组比较,* $P<0.01$

表 2 原发性高血压患者外周血血清 miRNA-663 水平与 RAAS 生化标志物的相关性分析

统计量	ACE 活性	RA	Ang II	ALD
<i>r</i>	-0.800	-0.720	-0.850	-0.830
<i>P</i>	0.014	0.021	0.009	0.010

3 讨 论

原发性高血压是一种遗传因素和环境因素相互作用所致的心血管疾病,其发病机制复杂。研究结果显示,RAAS 过度激活、交感神经活动亢进、血管内皮功能受损、自身免疫、炎症反应、氧化应激等均被证实参与了原发性高血压的发生,其相应的血液循环生化标志物在原发性高血压的发生、发展中发挥了重要作用^[11-12],在原发性高血压的诊疗、预防等方面也发挥了重要的提示作用。RAAS 与血管舒张、收缩及水盐代谢关系密切,在高血压形成、发展中起着关键作用;在 RAAS 各个环节中,肾素、ACE、Ang II、ALD 等起到了重要作用^[13-14]。肾素主要由肾小球旁器的球旁细胞所合成,催化血管紧张素原产生 Ang I,Ang I 在 ACE 催化下形成 Ang II,Ang II 能够高效地收缩血管,增加 ALD 分泌,最终导致血压升高。

miRNA 是一类长约 22 个碱基的非编码单链小分子 RNA,其可作用于相应靶基因 mRNA,在细胞增殖与分化、细胞凋亡、神经发育等多种生命活动中发挥调控作用。现在研究发现多种 miRNA 表达异常可能参与了原发性高血压的发生、发展^[15-18]。在高血压性肾病患者肾脏髓质 miRNA-181a 表达降低可以引起肾素 mRNA 水平升高。GOYAL 等^[19]发现小鼠胎儿大脑中 miRNA-27a、miRNA-27L 的升高可以降低 ACE-1 蛋白水平。ESKILDTSEN 等^[20]发现 miRNA-132 在 Ang II 介导的高血压大鼠心脏、大动脉及肾脏中高表达。

本研究通过对比研究发现,原发性高血压患者血

清 miRNA-663 表达显著降低,同时发现原发性高血压患者的 RAAS 系统生化标志物 ACE 活性及 RA、Ang II、ALD 表达升高;通过相关性研究发现,原发性高血压患者血清 miRNA-663 水平与 ACE 活性及 RA、Ang II、ALD 水平呈显著负相关关系,提示 miRNA-663 可能有抑制原发性高血压患者 RAAS 系统活性升高的效应,miRNA-663 可能在原发性高血压发生、发展过程中发挥重要效应,其有望成为原发性高血压诊断及区分严重程度分子标志物,值得进一步研究探讨。

参考文献

[1] KRAKOFF L R. Worldwide Hypertension: the growing threat and the potential opportunities [J]. Ann Glob Health,2016,82(2):225-226.

[2] 张前锋,徐晓阳,李捷.运动对原发性高血压的降压作用及可能作用机制[J].中国循环杂志,2016,12(1):24-27.

[3] FERRARI R. RAAS inhibition and mortality in hypertension;from pharmacology to clinical evidence[J]. Kardiol Pol,2013,71(1):1-7.

[4] YAMAMOTO T,NISHIYAMA A. Overview of the RAAS in renal damage and hypertension[J]. Nihon Jinzo Gakkai Shi,2010,52(2):87-91.

[5] BESSAGUET F,MAGY L,DESMOULIÈRE A,et al. The therapeutic potential of renin angiotensin aldosterone system (RAAS) in chronic pain: from preclinical studies to clinical trials[J]. Expert Rev Neurother,2016,16(3):331-339.

[6] KLIMCZAK D,JAZDZEWSKI K,KUCH M. Regulatory mechanisms in arterial hypertension;role of microRNA in pathophysiology and therapy[J]. Blood Press,2017,26(1):2-8.

[7] SOLAYMAN M H,LANGAEE T,PATEL A,et al. Identification of Suitable Endogenous Normalizers for qRT-PCR analysis of plasma microRNA expression in essential hypertension [J]. Mol Biotechnol, 2016, 58 (3): 179-187.

(下转第 2905 页)

- 4233.
 - [2] NAGAPPAN V, DERESINSKI S. Reviews of anti-infective agents: posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal agent[J]. Clin Infect Dis, 2007, 45(12): 1610-1617.
 - [3] WALSH T J, ANAISSIE E J, DENNING D W, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the infectious diseases society of america[J]. Oxford journals CID, 2008, 46(3): 327-60.
 - [4] BRÜGGEMANN R J, TOUW D J, AARNOUTSE R E, et al. International interlaboratory proficiency testing program for measurement of azole antifungal plasma concentrations[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(1): 303-305.
 - [5] HOPE W, BILLAUD E J, DENNING D. Therapeutic drug monitoring for triazoles [J]. Curr Opin Infect Dis, 2008, 21(6): 580-586.
 - [6] GOODWIN M L, DREW R H. Antifungal serum concentration monitoring: an update[J]. J Antimicrob Chemother 2008, 52(1): 17.
 - [7] LEWIS R E. Antifungal therapeutic drug monitoring[J]. Curr Fungal Infect Rep, 2010, 4(3): 158-167.
 - [8] ANDES D, PASCUAL A, MARCHETTI O. Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(1): 24-34.
 - [9] KRISHNA G, MOTON A L. Pharmacokinetics and absorption of posaconazole oral suspension under various gastric conditions in healthy volunteers [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(3): 958-962.
 - [10] 宁书蔚, 臧彬. B 和 T 淋巴细胞弱化因子在感染性疾病中的免疫作用[J]. 实用检验医师杂志, 2016, 8(2): 106-110.
 - [11] 魏秀举, 马韬. 46 例老年肾移植患者疗效评价[J/CD]. 实用器官移植电子杂志, 2014, 2(3): 153-156.
 - [12] 徐思成, 董旭南, 拜合提尼沙·吐尔地, 等. 侵袭性肺曲霉病的初次 CT 特点[J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25(4): 229-232.
 - [13] 孙禾, 苏欣, 施毅. 三唑类抗真菌新药泊沙康唑的药理基础[J]. 中国新药与临床杂志, 2012, 31(11): 633-637.
 - [14] 詹莹, 疏楠, 郭楠, 等. 三氮唑类抗真菌药的治疗药物监测研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(6): 706-710.
 - [15] 李力, 项迎春, 韩奇. HPLC-MS/MS 法测定人血浆中泊沙康唑的浓度[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(2): 153-155.
 - [16] 高宁舟, 沈杰, 宋钟娟, 等. 三唑类抗真菌药物治疗药物监测的研究进展[J]. 药学服务与研究, 2009, 9(5): 336-339.
 - [17] 王磊, 刘红星, 孙文利. HPLC-MS/MS 法在骨髓移植患者他克莫司血药浓度测定中的应用[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(2): 126-130.
 - [18] 王磊, 孙文利, 李培余, 等. 环孢素 A 血药浓度检测方法比较分析[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2017, 11(3): 417-421.
 - (收稿日期: 2018-01-22 修回日期: 2018-04-06)
-
- (上接第 2901 页)
- [8] MARQUES F Z, CAMPAIN A E, TOMASZEWSKI M, et al. Gene expression profiling reveals renin mRNA over-expression in human hypertensive kidneys and a role for microRNAs [J]. Hypertension, 2011, 58(6): 1093-1098.
 - [9] CARDEN T, SINGH B, MOOGA V, et al. Epigenetic modification of miR-663 controls mitochondria-to-nucleus retrograde signaling and tumor progression[J]. J Biol Chem, 2017, 292(50): 48-54.
 - [10] LIANG S, ZHANG N, DENG Y, et al. miR-663 promotes NPC cell proliferation by directly targeting CDKN2A[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(4): 4863-4870.
 - [11] AGITA A, ALSAGAFF M T, ALSAGAF F. Inflammation, Immunity, and Hypertension[J]. Acta Med Indones, 2017, 49(2): 158-165.
 - [12] GUZIK T J, TOUYZ R M. Oxidative stress, inflammation, and vascular aging in hypertension[J]. Hypertension, 2017, 70(4): 660-667.
 - [13] VEGA I L. ACE Inhibitors vs ARBs for Primary Hypertension[J]. Am Fam Physician, 2015, 91(8): 522-523.
 - [14] ALLISON S J. Hypertension: role of renal ACE in response to hypertensive stimuli [J]. Nat Rev Nephrol, 2013, 9(7): 372.
 - [15] YANG S, GAO Y, LIU G, et al. The human ATF1 rs11169571 polymorphism increases essential hypertension risk through modifying miRNA binding[J]. FEBS Lett, 2015, 589(16): 2087-2093.
 - [16] 张磊, 王春. MicroRNA 与血管内皮细胞功能调节机制进展[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2016, 23(3): 29-34.
 - [17] 李巧琳, 冯建明, 李文倩, 等. MicroRNA210 和 microRNA486 与红系造血调控的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2016, 45(15): 51-56.
 - [18] 齐斌, 余丽梅. microRNA 概述及其研究进展[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2014, 10(6): 34-38.
 - [19] GOYAL R, GOYAL D, LEITZKE A, et al. Brain Renin-angiotensin system: fetal epigenetic programming by maternal protein restriction during pregnancy [J]. Reprod Sci, 2010, 17(3): 227-238.
 - [20] ESKILDSEN T V, JEPPESEN P L, SCHNEIDER M, et al. Angiotensin II regulates microRNA-132/-212 in hypertensive rats and humans[J]. Inter J Mol Sci, 2013, 14(6): 11190-11207.
 - (收稿日期: 2018-01-28 修回日期: 2018-05-01)