

原发性高血压患者单核细胞 TRPC3 的表达水平与细胞因子的关系

马前军¹, 孙康云², 程志坚², 曾元英¹, 钱丽娟²

(1 南京医科大学附属苏州医院急诊科, 2 心内科, 江苏 苏州 215001)

[摘要] **目的:**探讨原发性高血压(essential hypertension, EH)患者单核细胞中经典瞬时受体电位通道 3(transient receptor potential canonical channel 3, TRPC3)转录水平与单核细胞中白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的转录水平以及外周血单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1)浓度的关系。**方法:**抽取 20 例原发性高血压患者和 20 例血压正常的健康体检者的静脉血,分离获得单核细胞,运用实时定量聚合酶链反应法(real-time PCR)分别检测外周血单核细胞中 TRPC3、TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA,用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测外周血 MCP-1 浓度。**结果:**与血压正常对照组比较,原发性高血压组单核细胞中 TRPC3、TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 表达升高, MCP-1 浓度增高,具有统计学差异($P < 0.05$)。单核细胞中 TRPC3 的 mRNA 水平与 TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 水平以及 MCP-1 浓度呈现正相关。**结论:**原发性高血压作为一个慢性炎症过程,单核细胞中 TRPC3 表达与细胞因子水平相关, TRPC3 表达上调可被认为是单核细胞活化的指标之一。

[关键词] 经典瞬时受体电位通道; 细胞因子; 高血压; 单核细胞; 炎症

[中图分类号] R544.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)03-382-04

Relations between TRPC3 expression and cytokines in monocytes from patients with essential hypertension

MA Qian-jun¹, SUN Kang-yun², CHENG Zhi-jian², ZENG Yuan-ying¹, QIAN Li-juan²

(1 Department of Emergency, 2 Department of Cardiology, Suzhou Hospital Affiliated of NJMU, Suzhou 215001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the relationship of transient receptor potential canonical channel 3 (TRPC3) transcription and mRNA levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in monocytes, and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) level in peripheral blood of patients with essential hypertension (EH). **Methods:** The levels of TRPC3, TNF- α and IL-1 β mRNA in monocytes of 20 patients with essential hypertension and 20 normotensive controls were analyzed by real-time PCR, the concentration of MCP-1 was measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** The elevated TRPC3, TNF- α , IL-1 β mRNA levels in monocytes and MCP-1 protein in peripheral blood were observed in patients with essential hypertension. There were significant differences between the two groups ($P < 0.05$). The level of TRPC3 mRNA was positively correlated with the levels of TNF- α , IL-1 β mRNA and MCP-1 protein. **Conclusion:** Essential hypertension is considered as a chronic inflammation process. The expression of TRPC3 in monocytes is related to cytokines. Overexpression of TRPC3 may be regarded as one of indicators of activations of monocytes.

[Key words] transient receptor potential canonical channel; cytokines; hypertension; monocytes; inflammation

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(3): 382-385]

经典瞬时受体电位通道 3(transient receptor potential canonical channel 3, TRPC3)属于瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)超家族,是一种非选择性的离子通道,胞外的钙离子可以通过胞膜上 TRPC3 内流进入细胞,引起细胞内的钙离子浓度升高^[1]。TRPC3 广泛存在于各种细胞中,如内皮细

胞、平滑肌细胞和外周血细胞等。自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)和原发性高血压(essential hypertension, EH)患者的单核细胞中 TRPC3 表达增高^[2-3], TRP 通道表达上调可引起细胞内钙浓度的上升,参与多个信号转导通路^[4]。

原发性高血压患者外周血中肿瘤坏死因子 α

(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1) 等细胞因子浓度呈现升高, 这些细胞因子与血管炎症关系密切, 因而原发性高血压是一种慢性炎症过程^[5], 是动脉粥样硬化的危险因素。TNF- α 等细胞因子主要由单核/巨噬细胞合成和分泌, TRP 通道途径的钙离子内流在脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导单核细胞产生细胞因子过程中发挥重要作用^[6]。为此, 本文拟探讨原发性高血压患者单核细胞中 TRPC3 mRNA 与 TNF- α 、IL-1 β mRNA 的相关性, 以及 TRPC3 与表示血管炎症的外周血 MCP-1 的关系, 以期预防高血压基础上发生的动脉粥样硬化提供理论依据。

1 对象与方法

1.1 对象

按《中国高血压病防治指南》(2005 修订版) 制定的测量和诊断标准, 选取 2010 年 7 月~10 月新诊断尚未进行降压治疗的 EH 患者 20 例, 同时选取血压正常的 20 例健康志愿者作为对照组。剔除标准: 继发性高血压、急性冠脉综合征、糖尿病、高脂血症、肝肾功能不全、自身免疫性疾病、肿瘤、吸烟、酗酒、近期感染、手术或外伤者。本研究通过了苏州市立医院伦理委员会的审议批准。

RNA 反转录试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、SYBR[®] Premix *Ex Taq*[™] II (日本 TaKaRa 公司); TRIzol 总 RNA 提取试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); MCP-1 ELISA 试剂盒 (美国 Raybiotech 公司); LightCycler Real-time PCR Kit (美国 Roche Diagnostics)。

1.2 方法

1.2.1 MCP-1 浓度的测定

受检者空腹采集静脉血 2 ml, 离心后取血浆用酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 测量 MCP-1 浓度。依照 MCP-1 ELISA 试剂盒说明书的步骤操作, 用酶标仪检测在 450 nm 波长下各孔吸光度, 根据吸光度值计算标本中 MCP-1 蛋白的浓度。

1.2.2 单核细胞的分离

受检者空腹采集静脉血 5 ml, 用 Ficoll 密度梯度离心法提取外周血单个核细胞, 再用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 重悬, 制备成 1×10^6 个/ml 的细胞悬液。于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养 2.5 h, 获取贴壁的单核细胞。

1.2.3 单核细胞中 TRPC3、TNF- α 和 IL-1 β mRNA 的测定

用 TRIzol 一步法提取细胞总 RNA, 按逆转录试剂盒说明书步骤合成 cDNA, -80 $^{\circ}$ C 保存待用。

引物根据文献检索和 GenBank 序列设计, 由生物工程(上海)有限公司合成, 引物序列如下: TRPC3 (NM_003305) forward, 5'-CAAGAATGACTATCGGAAGC-3'; reverse, 5'-GCCACAACTTTTTGACTTC-3'; IL-1 β (NM_000576.2) forward, 5'-ACAGATGAAGTGCTCCTTCCA-3'; reverse, 5'-GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT-3'; TNF- α (NM_000594.2) forward, 5'-CCCAGGGACCTCTCTCTAATC-3'; reverse, 5'-ATGGGCTACAGGCTTGTC-3'; GAPDH (NM_002046) forward, 5'-AACTGCTTAGCACCCCTGGC-3'; reverse, 5'-ATGACCTTGCCACAGCCTT-3'。

实时定量聚合酶链反应 (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) 的总反应体系为 25 μ l, 由 12.5 μ l SYBR Premix DimerEraser、1 μ l forward 引物、1 μ l reverse 引物、4 μ l 单链 cDNA 和 6.5 μ l 的去离子水组成。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 54 $^{\circ}$ C (TRPC3、GAPDH) 或 60 $^{\circ}$ C (TNF- α 、IL-1 β) 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 40 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。扩增产物行琼脂糖凝胶电泳, 观察产物大小。

用对照组 TRPC3 基因作为参照因子 (calibrator), GAPDH 为内标基因进行均一化处理; 基因表达量以相对于参照因子基因表达的倍数来表示 ($\Delta\Delta C_T$ 法)。

1.3 统计学方法

应用 SPSS11.5 统计分析软件进行分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *t* 检验或方差分析; 计数资料以构成比表示, 采用 χ^2 检验; 采用 Spearman 相关法分析参数之间的关系; 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 研究对象的基本资料

原发性高血压患者与血压正常对照组的基本资料见表 1。原发性高血压组的舒张压和收缩压高于正常对照组, 两组在年龄、性别、体质指数、血红蛋白、红细胞压积、血糖、肌酐和血脂等水平上无统计学差异。

2.2 单核细胞 TRPC3 等基因转录水平检测

原发性高血压患者单核细胞中 TRPC3、TNF- α

表 1 受试者的一般资料

Table 1 General characteristics of participants

参 数	$(\bar{x} \pm s)$	
	高血压组(n=20)	对照组(n=20)
年龄(岁)	46.45 ± 10.31	42.55 ± 9.50
性别(男/女)	14/6	13/7
体质指数(kg/m ²)	22.5 ± 1.9	24.2 ± 3.4
收缩压(mmHg)	151.0 ± 7.6*	118.0 ± 6.7
舒张压(mmHg)	97.0 ± 5.9*	72.0 ± 5.0
血红蛋白(g/L)	139 ± 12	141 ± 9
红细胞压积(%)	42.0 ± 3.3	43.0 ± 2.9
血糖(mmol/L)	4.31 ± 0.34	4.28 ± 0.42
肌酐(μmol/L)	94.0 ± 8.6	92.0 ± 10.2
甘油三酯(mmol/L)	0.86 ± 0.14	0.78 ± 0.11
总胆固醇(mmol/L)	4.32 ± 1.03	4.04 ± 1.27

与对照组相比, *P < 0.05。

和 IL-1β 的 mRNA 表达显著高于对照组(6.83 ± 3.07 vs 1.00 ± 0.42、9.38 ± 2.54 vs 1.12 ± 0.39、1.82 ± 0.40 vs 0.51 ± 0.33, 图 1)。TRPC3 和内参 GAPDH 的 RT-PCR 产物大小分别为 201 bp 和 200 bp(图2)。

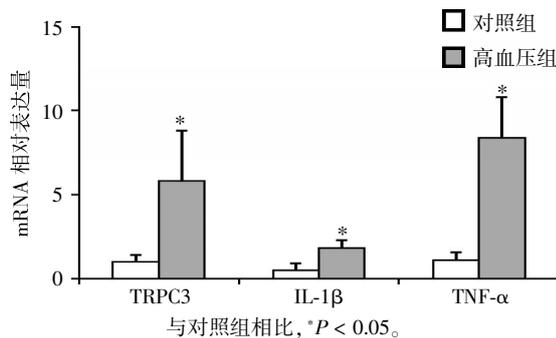
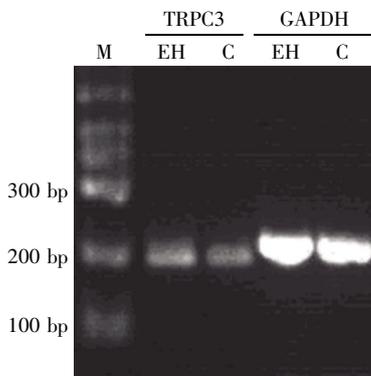


图 1 单核细胞中 TRPC3、TNF-α 和 IL-1β 的转录情况

Figure 1 Transcripts of TRPC3, TNF-α and IL-1β in monocytes



EH: 高血压组; C: 对照组。

图 2 TRPC3 和 GAPDH 的 RT-PCR 结果

Figure 2 Expression of TRPC3 and GAPDH detected by RT-PCR

2.3 外周血 MCP-1 的浓度

原发性高血压患者外周血 MCP-1 浓度高于对照组,分别为(34.48 ± 8.06)ng/ml 和(11.14 ± 2.95) ng/ml,两者差别有显著性(P < 0.01)。

2.4 TRPC3 与细胞因子的相关性

单核细胞中 TRPC3 mRNA 与 TNF-α 的 mRNA (r = 0.512, P < 0.05)和 IL-1β 的 mRNA (r = 0.428, P < 0.05) 以及外周血 MCP-1 浓度 (r = 0.461, P < 0.05)正相关。

3 讨论

本实验结果显示原发性高血压患者单核细胞中 TRPC3 表达上调。动物实验^[2]发现与 WKY 大鼠相比,SHR 大鼠的单核细胞 TRPC3 表达上调,TRPC3 途径的钙内流增加。这些表明单核细胞中 TRPC3 表达上调在高血压时是一个普遍现象。TRPC3 作为一种非选择性的离子通道,钙离子可以通过其进入细胞内。TRPC3 的特性可表现为钙池操纵性钙通道(store-operated Ca²⁺ channel, SOC),即当内质网或肌浆网中钙离子释放,引起内质网或肌浆网钙减少时,细胞外的钙离子通过离子通道内流,这种钙内流被称作钙池操纵性钙内流 (store-operated Ca²⁺ entry, SOCE),SOCE 增加导致细胞内钙离子浓度的升高,进而影响着细胞功能和基因表达^[1]。

本研究结果表明原发性高血压患者单核细胞中 TRPC3 的转录水平与 TNF-α 和 IL-1β 的转录水平以及外周血 MCP-1 水平正相关。迄今为止,TRP 在细胞因子表达的地位和具体机制尚未完全清楚。体外培养发现^[6],细胞因子的表达与胞外钙离子内流导致细胞内钙离子浓度增高有关,培养液中加入钙离子螯合剂后,LPS 刺激单核细胞产生细胞因子量明显下降。运用 RNA 干扰技术抑制 TRP 超家族中瞬时受体电位 M2 型 (transient receptor potential melastatin 2, TRPM2) 的表达,单核细胞中细胞因子的表达也明显受到抑制^[6],提示 TRP 途径的钙内流在细胞因子的合成过程中发挥着重要作用。原发性高血压患者单核细胞活性增强与 TRPC3 途径钙内流的增加有关^[7],TRPC3 表达上调可被认为是单核细胞活化的标志之一。

TRPC3 高表达引起细胞因子表达上调的可能机制为各种促炎因子通过信号转导通路,触发 TRP 通道介导钙内流,导致胞质内钙离子浓度升高,引起细胞因子转录和表达的上调。例如,高血压时肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotensin-al-

dosterone system, RAAS) 激活, 作为一种促炎因子的血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 与细胞膜上 Ang II 1 型受体结合, 激活磷脂酶 C (phospholipase C, PLC), PLC 将膜脂质中的二磷酸磷脂酰肌醇 (PIP2) 水解成三磷酸肌醇 (IP3), 触发 TRP 通道途径钙内流, 细胞内钙离子浓度上升, 通过 T 细胞核因子 (nuclear factor of activated T cells, NFAT)^[1] 或核因子 κ B^[8] 途径, 引起细胞因子表达增加。给予原发性高血压患者 6 周的 Ang II 1 型受体拮抗剂奥美沙坦, 能降低细胞因子水平, 拮抗炎症反应^[9]。

高血压是动脉粥样硬化的危险因素, 循环血液中的单核细胞活化和募集在动脉粥样硬化中占有重要地位。原发性高血压患者单核细胞中 TNF- α 和 IL-1 β 高表达和外周血 MCP-1 浓度呈现升高。TNF- α 等细胞因子是重要的致炎症因子, 可抑制内皮细胞中组成型一氧化氮合酶 (cNOS) 的表达, 从而抑制一氧化氮 (NO) 的合成, 继而抑制 NO 的舒张血管作用, 内皮细胞功能受损, 产生血管痉挛, 血压升高, 在高血压的发生和维持中发挥着作用^[10]。MCP-1 具有强大的诱导单核/巨噬细胞聚集、黏附、游走的功能。单核/巨噬细胞进入血管壁, 参与并扩大炎症反应, 损伤内皮细胞, 引起内皮细胞通透性增加, 使脂质易于沉积到内膜下, 发生动脉粥样硬化。原发性高血压本身就是慢性炎症过程^[5,11], 易发生动脉粥样硬化, 其原因至少部分与细胞因子增多有关。研究高血压时单核细胞的 TRPC3 表达变化及其与细胞因子之间的关系, 对预防和治疗高血压基础上的动脉粥样硬化有着重要临床意义。

[参考文献]

- [1] Watanabe H, Murakami M, Ohba T, et al. TRP channel and cardiovascular disease [J]. *Pharmacol Ther*, 2008, 118(3): 337-351
- [2] Liu D, Scholze A, Zhu Z, et al. Increased transient receptor potential channel TRPC3 expression in spontaneously hypertensive rats [J]. *Am J Hypertens*, 2005, 18(11): 1503-1507
- [3] Liu D, Scholze A, Zhu Z, et al. Transient receptor potential channels in essential hypertension [J]. *J Hypertens*, 2006, 24(6): 1105-1114
- [4] Inoue R, Jensen LJ, Shi J, et al. Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease [J]. *Circ Res*, 2006, 99(2): 119-131
- [5] Madej A, Okopien B, Kowalski J, et al. Plasma concentrations of adhesion molecules and chemokines in patients with essential hypertension [J]. *Pharmacol Rep*, 2005, 57(6): 878-881
- [6] Wehrhahn J, Kraft R, Harteneck C, et al. Transient receptor potential Melastatin 2 is required for lipopolysaccharide-induced cytokine production in human monocytes [J]. *J Immunol*, 2010, 184(5): 2386-2393
- [7] Thilo F, Scholze A, Liu DY, et al. Association of transient receptor potential canonical type 3 (TRPC3) channel transcripts with proinflammatory cytokines [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 471(1): 57-62
- [8] Smedlund K, Tano JY, Vazquez G. The constitutive function of native TRPC3 channels modulates vascular cell adhesion molecule-1 expression in coronary endothelial cells through nuclear factor kappaB signaling [J]. *Circ Res*, 2010, 106(9): 1479-1488
- [9] Fliser D, Buchholz K, Haller H. Antiinflammatory effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade in hypertensive patients with microinflammation [J]. *Circulation*, 2004, 110(9): 1103-1107
- [10] Bautista LE. Inflammation, endothelial dysfunction, and the risk of high blood pressure: epidemiologic and biological evidence [J]. *J Hum Hypertens*, 2003, 17(4): 223-230
- [11] Blandberg FG, Wen P, Dai M, et al. Detection of early atherosclerosis with radiolabeled monocyte chemoattractant protein-1 in prediabetic Zucker rats [J]. *Pediatr Radiol*, 2002, 31(12): 827-835

[收稿日期] 2011-04-23