

环状 RNA 在 H 型高血压患者中的表达及与血压水平的相关性研究

尹章汉¹, 陈自然², 邹耐受²

1. 深圳市龙华区人民医院, 广东 深圳 518000; 2. 深圳市龙华区疾病预防控制中心, 广东 深圳 518109

摘要: **目的** 探讨环状 RNA 在 H 型高血压患者中的表达及与血压水平的相关性。 **方法** 选择 2016 年 5 月—2018 年 11 月深圳市龙华区人民医院治疗的 H 型高血压患者 49 例设为观察组; 选择同期该院治疗的单纯性高血压患者 37 例, 设为对照组; 选择同期健康体检者 28 例, 设为空白对照组。采用血压测定仪完成患者舒张压、收缩压水平的测定; 采用环状 RNA 芯片技术完成观察组与对照组具有差异性表达的环状 RNA 测定, 并对表达存在差异性的环状 RNA 给予实时定量 PCR 验证。采用 Pearson 相关性分析环状 RNA 在 H 型高血压患者中的表达与血压水平。 **结果** 观察组与对照组舒张压、收缩压水平, 均高于空白对照组 ($P < 0.05$); 与对照组相比, 观察组血清标本中 198 和 175 个环状 RNA 分别显示上调和下调 ($FC \geq 2.0, P < 0.05$); 前 20 个显著上升、下调的环状 RNA, 其中 ENSMUST00000153785 和 NR_037990 是上调和下调的环状 RNA 转录物, 具有显著的变化。同时分层聚类分析表明从观察组与对照组成功分离出环状 RNA 表达谱; Pearson 相关性分析结果表明: 环状 RNA 中 ENSMUST00000153785 上调基因水平与舒张压、收缩压呈正相关性 ($P < 0.05$); 环状 RNA 中下调基因 NR_037990 与舒张压、收缩压呈负相关性 ($P < 0.05$)。 **结论** 环状 RNA 在 H 型高血压患者中表达异常, 且与血压水平呈相关性, 环状 RNA 表达水平能反映患者疾病的严重程度。

关键词: 环状 RNA; H 型高血压; 血压水平; 实时定量 PCR; 相关性

中图分类号: R544.1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2020)06-0740-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2020.06.029

高血压是指以体循环动脉压(如:收缩压/舒张压)增高为主要特征,部分患者可伴有心、脑、肾功能异常^[1]。高血压病因复杂,普遍认为与遗传因素、精神和环境因素、年龄因素及生活习惯因素等有关,成为心脑血管疾病的重要危险因素^[2]。数据报道显示^[3]: 70.0%心脑血管事件与高血压存在紧密的联系,且我国高血压患者已经超过 3 亿人。同型半胱氨酸(Hcy)属于蛋氨酸的代谢产物,能加速血管疾病的机制,引起血管内皮细胞损害,增加平滑肌细胞活性,从而引起及脂质氧化应激反应,增加动脉粥样硬化发生率^[4]。环状 RNA 是一类由外显子、内显子序列反向剪接形成的新型环状非编码 RNA,具有结构稳定、高度序列保守等特点,在细胞、组织及生长发育中发挥了重要作用^[5]。但是,临床上对于环状 RNA 的研究更多的集中在肿瘤方面,在 H 型高血压患者中研究较少^[6]。因此,本研究以 H 型高血压、单纯高血压及健康体检者开展研究,探讨环状 RNA 在 H 型高血压患者中的表达及与血压水平的相关性,报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择 2016 年 5 月—2018 年 11 月深

圳市龙华区人民医院治疗的 H 型高血压患者 49 例作为对象,设为观察组,男 32 例,女 17 例,年龄(42~79)岁,平均(57.49±5.31)岁;病程(1~8)年,平均(4.23±0.61)年;Hcy 水平(10~18) μmol/L,平均(15.39±2.13) μmol/L;选择同期治疗的单纯性高血压患者 37 例,设为对照组,男 20 例,女 17 例,年龄(41~80)岁,平均(58.21±5.35)岁;病程(1~7)年,平均(4.26±0.64)年;Hcy 水平(1~9) μmol/L,平均(6.14±0.98) μmol/L;选择同期健康体检者 28 例,设为空白对照组,男 17 例,女 11 例,年龄(40~82)岁,平均(58.53±5.36)岁。

1.2 纳入、排除标准 **纳入标准:** (1)符合《中国高血压防治指南 2010》^[7]中 H 型高血压、单纯性高血压诊断标准; (2)均完成环状 RNA 测定,且患者均能耐受; (3)意识清楚,能与医生进行沟通、交流。 **排除标准:** (1)合并继发性高血压、入院资料不全者; (2)近 3 个月服用影响 Hcy 检测药物或伴有严重心脑血管疾病者; (3)合并自身免疫系统疾病、内分泌系统疾病者。

1.3 方法 (1)血压水平测定。三组入院后均采用血压测定仪完成患者舒张压、收缩压水平; (2)环状 RNA 表达水平测定。采用环状 RNA 芯片技术完成三组具有差异性表达的环状 RNA 测定。①标本采集。观察组、对照组入院后次日空腹状态下抽取外周静脉

作者简介: 尹章汉(1981-),男,本科,主治医师,主要从事公共卫生工作。

血 5 ml, 放置在 EDTA 抗凝管中, 充分混合均匀后放置在 4 ℃ 冰箱中, 10 min 离心, 离心力 1 824 g, 离心半径 50 cm, 放置在 -80 ℃ 冰箱中备用^[8]; ②RNA 的提取与纯化。采用 Trizol 法完成 RNA 的提取与纯化。将标本放置在 Trizol 500 μl 中, 利用破碎机对血清标本破碎, 获得均匀的溶浆, 最终获得的匀浆液转移到离心管 1.0 ml 中, 振荡摇晃后常温下 5 min 静置; 向离心管中加入氯仿 200 μl, 连续进行 15 s 剧烈振荡, 5 min 静置后 15 min 离心, 离心力 1 216 g; 将获得的上层水相转移到离心管 1.5 ml 中并加入两倍体积异丙醇, 过夜后 10 min 离心, 离心力 1 216 g, 温度 4 ℃。去除上层清液, 加入预冷的乙醇(浓度 75.0%) 1 ml, 5 min 离心, 离心力 3 258 g, 温度 4 ℃; 去除上层清液、乙醇, 常温下进行 7 min 干燥; 加入 DEPC 20 μl 溶解后完成 OD 值及 RNA 完整性测定。③芯片杂交测定。采用环状 RNA 芯片技术完成三组具有差异性表达的环状 RNA 测定。实验过程中使用 4~8 μg 总的 RNA 样品, 利用 Poly(A) 聚合酶在 RNA 3' 端加上 Poly(A) 尾巴, 然后利用寡聚核苷酸完成标记。利用微循环泵作用于 uParaFlo 微流体芯片上进行(每一条检测探针均由化学修饰的核苷酸编码段、聚乙二醇组成的间隔段构成), 采用 PCR 检测探针利用化学法完成原位合成, 实验过程中通过化学修饰检测探针完成杂交解链温度的调控。杂交过程中利用含有甲酰胺的 SSPE 缓冲液, 温度 34 ℃, 杂交完毕后与标记特异结合, 在微流体芯片上完成循环流动染色。通过特征提取软件(Agilent Technologies 11.0.1.1)获得的阵列图像^[9-10]。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件处理, 计数资料行 χ^2 检验, 采用 ($n, \%$) 表示, 所有计量资料均符合

正态分布, 计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多个样本均数比较采用方差分析, 进行两两比较采用 LSD- t 检验, 采用 SPSS Pearson 相关性分析软件对环状 RNA 在 H 型高血压患者中的表达与血压水平进行相关性分析, 分层聚类分析观察组与对照组的环状 RNA 表达谱, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 三组血压水平比较 观察组与对照组舒张压、收缩压水平比较均无统计学意义 ($P > 0.05$); 观察组与对照组舒张压、收缩压水平, 均高于空白对照组 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 三组血压水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	舒张压(mmHg)	收缩压(mmHg)
观察组	49	95.32±7.58 ^b	167.35±10.99 ^b
对照组	37	96.21±7.62 ^a	169.28±11.21 ^a
空白对照组	28	78.48±3.59	102.42±7.56
F 值		6.361	5.092
P 值		0.000	0.000

注: 与空白对照组比较, a $P < 0.05$; 与对照组比较, b $P > 0.05$ 。

2.2 观察组与对照组环状 RNA 表达比较 为了进一步分析观察组与对照组环状 RNA 表达存在的差异, 采用微阵列检测 35,923 个环状 RNA 和 24,881 个 mRNA 转录物。结果表明: 与对照相比, 观察组血清标本中 198 和 175 个环状 RNA 分别显示上调和下调 ($FC \geq 2.0, P < 0.05$); 前 20 个显著上升、下调的环状 RNA, 其中 ENSMUST00000153785 和 NR_037990 是上调和下调的环状 RNA 转录物, 具有显著的变化。同时, 分层聚类分析表明从观察组与对照组成功分离出环状 RNA 表达谱, 见图 1。

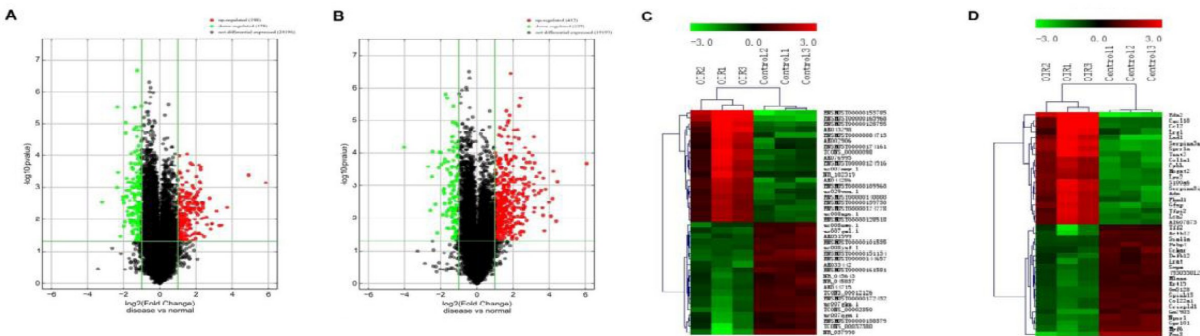


图 1 观察组与对照组环状 RNA 表达水平比较

2.3 环状 RNA 在 H 型高血压患者中的表达与血压水平相关性 SPSS Pearson 相关性分析结果表明: 环状 RNA 中 ENSMUST00000153785 上调基因水平与舒张

压、收缩压呈正相关性 ($P < 0.05$); 环状 RNA 中下调基因 NR_037990 与舒张压、收缩压呈负相关性 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 环状 RNA 在 H 型高血压患者中的
表达与血压水平相关性(r, P)

相关性	舒张压	收缩压
ENSMUST00000153785	0.598(0.012)	0.636(0.046)
NR_037990	-0.712(0.031)	-0.635(0.038)

3 讨论

近年来,随着人们生活方式的改变,导致高血压发生率呈上升趋势,成为影响患者健康的慢性非传染性疾病^[11]。临床研究表明^[12]:同型半胱氨酸(Hcy)与高血压的发生、发展存在紧密的联系,并提出了 H 型高血压。H 型高血压是指已经确诊的高血压患者中 Hcy 水平>10 μmol/L 者。本研究中,观察组与对照组舒张压、收缩压水平,均高于空白对照组($P<0.05$),说明 H 型高血压与单纯型高血压患者血压水平高于健康人。

环状 RNA 于上世纪 70 年代首次提出,属于是一种外显子、内显子序列反向剪接形成的内源性环状非编码 RNA,具有共价闭环结构,普遍存在于真核生物细胞的高度稳定性、保守性^[13]。国外学者研究表明:环状 RNA 广泛存在于心血管、神经系统、免疫系统及恶性肿瘤中。国内学者研究表明:环状 RNA 在体内中呈高表达,且表达水平相对稳定,有望成为 H 型高血压患者新型靶向治疗靶点^[14]。本研究中,与对照组相比,观察组血清标本中 198 和 175 个环状 RNA 分别显示上调和下调;前 20 个显著上升、下调的环状 RNA,其中 ENSMUST00000153785 和 NR_037990 是上调和下调的环状 RNA 转录物,具有显著的变化。同时,分层聚类分析表明从观察组与对照组成功分离出环状 RNA 表达谱,说明环状 RNA 在 H 型高血压患者中呈高表达,且经微阵列分析能了解其表达水平、变化情况。国内学者研究表明^[15]:环状 RNA 具有以下功能:(1)与 RNA 结合蛋白相互结合;(2)发挥间接或转录作用;(3)翻译;(4)衍生假基因等。而环状 RNA 在 H 型高血压患者中能影响细胞的功能、机体的生长,在疾病的发生、发展中发挥了重要的作用。同时,环状 RNA 在 H 型高血压患者中能参与机体氧化应激反应、信号传导及细胞的生长迁移。为了进一步分析环状 RNA 表达水平与血压水平的相关性,本研究中对二者进行相关性分析,结果表明:环状 RNA 中 ENSMUST00000153785 上调基因水平与舒张压、收缩压呈正相关性($P<0.05$);环状 RNA 中下调基因 NR_037990 与舒张压、收缩压呈负相关性($P<0.05$),说明环状 RNA 与 H 型高血压患者血压水平存在明显相关性,患者环

状 RNA 水平测定能反映患者的疾病严重程度并评估患者预后。

综上所述,环状 RNA 在 H 型高血压患者中表达异常,且与血压水平呈相关性,环状 RNA 表达水平测定能反映患者疾病的严重程度。

参考文献

[1] 高峰利, 韩涛, 张维, 等. 血压变异性与急性脑梗死合并 H 型高血压患者脑梗死严重程度及颈动脉内膜中膜厚度的关系研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2017, 25(8):45-48.

[2] 孙海涛, 郝铁, 杨卫红, 等. 血清超敏 C 反应蛋白水平与 H 型高血压患者靶器官功能的相关性研究[J]. 广西医科大学学报, 2018, 35(1):29-32.

[3] Tan WLW, Lim BTS, Anene-Nzelu CGO, et al. A landscape of circular RNA expression in the human heart[J]. Cardiovasc Res, 2017, 113(3):250.

[4] 吕大民, 张芳, 吴迪, 等. 左房容积指数在 H 型高血压患者舒张功能中的应用及相关性研究[J]. 中国实验诊断学, 2017, 21(7):1148-1150.

[5] 王玥, 周志峰. H 型高血压与急性脑梗死患者颈动脉内膜中层厚度及功能的相关性分析[J]. 海南医学院学报, 2017, 23(17):2427-2430.

[6] Zhang SJ, Chen X, Li CP, et al. Identification and characterization of circular RNAs as a new class of putative biomarkers in diabetes retinopathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58(14):6500.

[7] 孟丽琴, 利定建, 傅应昌, 等. H 型高血压患者血管内皮功能及脉搏波传导速度的研究[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2017, 9(8):934-936.

[8] 郭行雅, 章瑞南, 何崇信, 等. 人环状 RNA-0046366 与肝细胞脂肪变性的相关性及其机制研究[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2017, 26(6):713-717.

[9] 田芳, 王云, 肖哲, 等. 环状 RNAcH1PK3 通过 miR-379 调控 IGF1 表达促进非小细胞肺癌细胞系 NCI-H1299 与 NCI-H2170 的细胞增殖[J]. 中国肺癌杂志, 2017, 20(7):459-467.

[10] Zeng Y, Xu Y, Shu R, et al. Altered expression profiles of circular RNA in colorectal cancer tissues from patients with lung metastasis[J]. Int J Mol Med, 2017, 40(6):1818-1828.

[11] 熊玮, 骆瑜, 刘峰, 等. 外泌体环状 RNA30741 在小鼠血管平滑肌细胞增殖中的作用[J]. 中国热带医学, 2018, 18(5):430-433.

[12] 李勇, 陈义天, 彭建华, 等. 小鼠蛛网膜下腔出血后早期大脑皮层环状 RNA 的表达谱研究[J]. 中华神经医学杂志, 2018, 17(5):433.

[13] 张勇. H 型高血压患者血管内皮功能变化及与血浆同型半胱氨酸水平的关系[J]. 河北医药, 2017, 39(17):2593-2596.

[14] 王蕾, 熊声贺, 张俊, 等. 同型半胱氨酸、血脂、肾功能指标及颈动脉超声在 H 型高血压中的临床应用价值[J]. 检验医学, 2017, 32(12):1109-1113.

[15] 吴迪, 马宁, 王芳, 等. H 型高血压患者血清 25-羟维生素 D 浓度与颈动脉斑块稳定性的相关性研究[J]. 河北医科大学学报, 2018, 39(11):114-117.