

原发性高血压患者 Th17 细胞及其相关细胞因子与颈动脉内膜中膜厚度的相关性

孙晓林^{1,2}, 刘振东¹, 王舒健¹, 赵颖馨¹, 张华¹, 刁玉涛¹, 栾萌¹, 王秀红³

(1. 山东省医学科学院基础医学研究所心脑血管病防治研究中心, 山东省济南市 250062;

2. 济南大学 山东省医学科学院医学与生命科学学院, 山东省济南市 250022;

3. 山东省地方病防治研究所, 山东省济南市 250022)

[关键词] 原发性高血压; 颈动脉; 内膜中膜厚度; Th17 细胞; 细胞因子

[摘要] **目的** 探讨原发性高血压患者 Th17 细胞及其相关细胞因子与颈动脉内膜中膜厚度(IMT)的相关性。**方法** 选取原发性高血压患者 206 例,行颈动脉超声检查,根据颈动脉 IMT 三分位数分为高三分位组、中三分位组和低三分位组。检测并比较 3 组患者外周血 Th17 细胞频率及其相关细胞因子白细胞介素 17(IL-17)、IL-6 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平。分析各因素与颈动脉 IMT 的相关性。**结果** 高三分位组、中三分位组、低三分位组外周血 Th17 细胞频率分别为 $1.45\% \pm 0.30\%$ 、 $1.19\% \pm 0.29\%$ 、 $1.03\% \pm 0.28\%$, IL-17 分别为 24.03 ± 6.38 、 18.85 ± 6.23 、 15.84 ± 5.36 ng/L, IL-6 分别为 87.09 ± 13.65 、 75.26 ± 17.21 、 68.40 ± 16.15 ng/L, TNF- α 分别为 77.24 ± 14.91 、 65.39 ± 17.62 、 60.30 ± 17.51 ng/L。高三分位组 Th17 细胞频率、IL-17、IL-6、TNF- α 均高于中三分位组和低三分位组($P < 0.05$);中三分位组 Th17 细胞频率、IL-17、IL-6 均高于低三分位组($P < 0.05$)。Pearson 相关分析显示, Th17 细胞频率、IL-17、IL-6、TNF- α 与颈动脉 IMT 呈显著正相关($P < 0.01$)。多元线性逐步回归分析显示, Th17 细胞频率、IL-17、IL-6 和 TNF- α 是影响颈动脉 IMT 的主要危险因素。**结论** 原发性高血压患者 Th17 细胞及其相关细胞因子的血清水平与颈动脉 IMT 密切相关。

[中图分类号] R54

[文献标识码] A

Th17 Cell and Th17-associated Cytokines Related to Carotid Artery Intima-media Thickness in Essential Hypertension Patient

SUN Xiao-Lin^{1,2}, LIU Zhen-Dong¹, WANG Shu-Jian¹, ZHAO Ying-Xin¹, ZHANG Hua¹, DIAO Yu-Tao¹, LUAN Meng¹, and WANG Xiu-Hong³

(1. Center of Cardio- and Cerebral Vascular Disease Prevention and Treatment, Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan, Shandong 250062, China; 2. School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan, Shandong 250022, China; 3. Shandong Institute of Endemic Diseases Control and Prevention, Jinan, Shandong 250022, China)

[KEY WORDS] Essential Hypertension; Carotid Artery; Intima-media Thickness; Th17 Cell; Cytokines

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the correlation of Th17 cells and Th17-associated cytokines with carotid artery intima-media thickness (IMT) in essential hypertensive patients. **Methods** After carotid ultrasound examination, 206 essential hypertensive patients were categorized into three groups by the tertiles of IMT, namely, high tertile group, middle tertile group and low tertile group. Peripheral blood Th17 cell frequency and serum levels of Th17-associated cytokines interleukin-17 (IL-17), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were tested and compared in three groups. The correlation between the various factors and carotid IMT was analyzed. **Results** In high tertile

[收稿日期] 2014-12-31

[修回日期] 2015-02-20

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81470489);山东省自然科学基金项目(ZR2014HM098、ZR2012HL46、ZR2014HQ042);山东省医药卫生科技发展计划项目(2014WS0312、2014WS0316、2013WS0364、2013WS0176)

[作者简介] 孙晓林,硕士研究生,主要从事高血压及动脉硬化研究,E-mail 为 sunxiaolin@126.com。通讯作者刘振东,研究员,硕士研究生导师,主要从事高血压及动脉硬化研究,E-mail 为 zhendongliu876@126.com。王舒健,博士,主要从事高血压及动脉硬化研究,E-mail 为 158362351@qq.com。

group, middle group and low group, respectively, Th17 cell frequency was $1.45\% \pm 0.30\%$, $1.19\% \pm 0.29\%$, $1.03\% \pm 0.28\%$; IL-17 was 24.03 ± 6.38 , 18.85 ± 6.23 , 15.84 ± 5.36 ng/L; IL-6 was 87.09 ± 13.65 , 75.26 ± 17.21 , 68.40 ± 16.15 ng/L; TNF- α was 77.24 ± 14.91 , 65.39 ± 17.62 , 60.30 ± 17.51 ng/L. Th17 cell frequency, IL-17, IL-6, and TNF- α in high tertile group were higher than those in middle tertile group and low tertile group ($P < 0.05$). Th17 cell frequency, IL-17, and IL-6 in middle tertile group were higher than those in low tertile group ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed that Th17 cell frequency, IL-17, IL-6, and TNF- α were positively correlated with carotid IMT ($P < 0.01$). Multivariate linear stepwise regression analysis showed that Th17 cell frequency, IL-17, IL-6, and TNF- α were main risk factors for carotid IMT. **Conclusion** Th17 cell and Th17-associated cytokines are closely related to carotid artery IMT in patient with essential hypertension.

动脉粥样硬化是一种低度慢性炎症反应性疾病,炎症反应贯穿了其发生发展的整个过程,以淋巴细胞和单核细胞积聚为特征,呈进展性炎症反应。辅助性T细胞17(T helper cell 17, Th17)是近年来新发现的一种效应T细胞,分泌白细胞介素17(interleukin-17, IL-17)、IL-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等细胞因子,并介导炎症反应^[1]。但Th17细胞及其相关细胞因子是否参与动脉粥样硬化慢性炎症的相关研究较少。颈动脉内膜中膜厚度(intima-media thickness, IMT)可反映冠状动脉、脑动脉、外周动脉的硬化程度,是监测全身动脉粥样硬化程度的窗口和指标^[2]。本研究拟探讨原发性高血压患者Th17细胞及其相关细胞因子水平与颈动脉IMT的相关性。

1 对象与方法

1.1 研究对象

自2013年7月至2014年6月于山东省医学科学院心脑血管病研究中心入选原发性高血压患者206例,其中男99例,女107例,年龄56~88岁,平均 67.67 ± 7.55 岁,高血压病程1~27年,平均 8.32 ± 5.08 年。高血压诊断标准依据2010年《中国高血压防治指南》。根据颈动脉IMT三分位数将所有受试者分为3组,即高三分位组($IMT \geq 1.63$ mm)、中三分位组(1.42 mm \leq $IMT < 1.63$ mm)和低三分位组($IMT < 1.42$ mm)。所服用的降压药物为钙离子拮抗剂、血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张素受体拮抗剂、复方制剂或中药制剂等。排除标准:继发性高血压、自身免疫性疾病、糖尿病、心脏瓣膜病、甲状腺功能亢进症、心肝肾功能不全及严重创伤和感染性疾病。所有受试者均于采血前1周停药,期间密切监测血压,如不能耐受则立即退出研究。入选受试者均签署知情同意书。

1.2 颈动脉IMT测定

采用美国GE Vivid i型彩色电脑声像仪进行颈

动脉IMT检查,探头频率为7.0 MHz。受试者取仰卧位,放松,平静呼吸,颈后置薄枕,头部偏向检查区约45°,血流声束夹角 $< 60^\circ$,于颈总动脉分叉近端1 cm处后壁观察,超声图像为两条平行亮线,即“双线型图像”,亮线间的距离为IMT。左右两侧各测量3次,取最大值为IMT。

1.3 血标本采集

受试者禁食12 h后于次日晨起空腹抽取肘静脉血,置2个肝素抗凝的5 mL真空管中。其中1管颠倒混匀,37℃水浴30 min后,3000 r/min离心15 min,收集上层血浆,置于无菌EP管中, -80℃低温冻存,用于细胞因子检测;另1管在2 h内处理完毕,用于流式细胞术检测。

1.4 外周血Th17细胞频率测定

将血标本以等体积磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)稀释后,采用人淋巴细胞分离液获取外周血单个核细胞。采用无血清的RPMI-1640培养基清洗2次,用含100 kU/L青霉素、100 mg/L链霉素、2 mmol/L谷氨酰胺、10%胎牛血清的完全培养基(RPMI-1640)调整细胞浓度至 2×10^9 /L,接种至24孔板后加入佛波酯(50 μ g/L)、离子霉素(1 μ mol/L)、莫能菌素(500 μ g/L),置于37℃、5% CO₂细胞培养箱培养4 h后转移至5 mL无菌管中,1500 r/min离心5 min。用PBS清洗2次后等分为测定管和对照管,加入20 μ L藻红蛋白标记的鼠抗人CD4单抗,4℃避光孵育30 min。PBS洗涤2次后固定液室温避光固定反应20 min,1500 r/min离心5 min后弃去上清,PBS洗涤2次。加入破膜剂进行细胞打孔,1500 r/min离心5 min后弃去上清,予细胞因子染色。测定管加入异硫氰酸荧光素标记的鼠抗人IL-17A,4℃避光孵育30 min。PBS洗涤2次后重悬细胞。应用FACS Aria型流式细胞仪,根据前向散射光和侧向散射光以淋巴细胞群设门对外周血Th17细胞的频率进行检测,并应用Cell Quest软件分析数据。

1.5 Th17 细胞相关细胞因子与生物化学指标的测定

取冻存的血浆上清液采用 ELISA 法测定 IL-17、IL-6 及 TNF- α 的水平,按照说明书进行操作,并设立空白对照和阴性对照组,IL-17、IL-6 及 TNF- α 的灵敏度分别为 0.5 ng/L、1.0 ng/L 及 <4.0 ng/L。应用日本 Olympus AU400 全自动生物化学仪测定空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)及低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件包进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以百分比表示;计量资料组间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA),

组间两两比较用 LSD-t 检验,计数资料采用 χ^2 检验;用偏相关分析排除多个变量的相互作用,各危险因素对颈动脉 IMT 的贡献用多元线性逐步回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组一般临床资料比较

与高三分位组比较,中三分位组、低三分位组年龄、收缩压(systolic blood pressure, SBP)、舒张压(diastolic blood pressure, DBP)、FBP、TC、TG 明显降低($P < 0.01$);低三分位组 LDLC 升高($P < 0.05$)。与中三分位组比较,低三分位组体质指数(body mass index, BMI)降低($P < 0.05$)。低三分位组高血压病程较中三分位组、高三分位组短($P < 0.05$)。3 组 HDLC 差异无统计学意义($P > 0.05$;表 1)。

表 1. 3 组一般情况及生物化学指标比较

Table 1. Comparison of general clinical data and biochemical indexes in the three groups

项目	高三分位组	中三分位组	低三分位组	P 值
男/女(例)	40/29	30/40	29/38	0.130
年龄(岁)	71.36 \pm 6.70 ^{ab}	67.63 \pm 7.56	67.24 \pm 5.60	0.000
BMI(kg/m ²)	24.98 \pm 3.06	25.23 \pm 3.20 ^a	24.09 \pm 2.79	0.070
SBP(mmHg)	175.26 \pm 14.05 ^{ab}	167.43 \pm 12.68	163.63 \pm 13.70	0.000
DBP(mmHg)	86.23 \pm 8.97 ^{ab}	79.67 \pm 12.00	79.85 \pm 9.03	0.000
高血压病程(年)	9.28 \pm 5.05 ^a	8.74 \pm 5.51 ^a	6.88 \pm 4.33	0.015
FBG(mmol/L)	4.82 \pm 0.49 ^{ab}	4.55 \pm 0.43	4.52 \pm 0.45	0.000
TC(mmol/L)	4.41 \pm 0.70 ^{ab}	4.10 \pm 0.67	3.87 \pm 0.69	0.000
TG(mmol/L)	1.88 \pm 0.65 ^{ab}	1.52 \pm 0.60	1.53 \pm 0.62	0.001
HDLC(mmol/L)	1.14 \pm 0.26	1.16 \pm 0.23	1.24 \pm 0.32	0.064
LDLC(mmol/L)	2.18 \pm 0.67 ^a	2.26 \pm 0.90	2.47 \pm 0.74	0.084

a 为 $P < 0.05$,与低三分位组比较;b 为 $P < 0.05$,与中三分位组比较。

2.2 3 组 Th17 细胞及其相关细胞因子水平比较

从高三分位组、中三分位组到低三分位组, Th17 细胞频率、IL-17、IL-6、TNF- α 水平依次降低(P

<0.01)。与中三分位组比较,低三分位组 Th17 细胞频率、IL-17 和 IL-6 降低($P < 0.05$;表 2)。

表 2. 3 组 Th17 细胞及其相关细胞因子水平比较

Table 2. Comparison of Th17 cell and Th17-associated cytokines in the three groups

项目	高三分位组	中三分位组	低三分位组	P 值
Th17 细胞	1.45% \pm 0.30% ^{ab}	1.19% \pm 0.29% ^a	1.03% \pm 0.28%	0.000
IL-17(ng/L)	24.03 \pm 6.38 ^{ab}	18.85 \pm 6.23 ^a	15.84 \pm 5.36	0.000
IL-6(ng/L)	87.09 \pm 13.65 ^{ab}	75.26 \pm 17.21 ^a	68.40 \pm 16.15	0.000
TNF- α (ng/L)	77.24 \pm 14.91 ^{ab}	65.39 \pm 17.62	60.30 \pm 17.51	0.000

a 为 $P < 0.05$,与低三分位组比较;b 为 $P < 0.05$,与中三分位组比较。

2.3 Pearson 相关分析

Pearson 相关分析显示, Th17 细胞频率、IL-17、IL-6、TNF- α 与颈动脉 IMT 呈显著正相关,相关系数

r 分别为 0.572、0.537、0.426、0.416(均 $P < 0.01$)。

2.4 回归分析

以颈动脉 IMT 为应变量,性别、年龄、BMI、SBP、

DBP、高血压病程、FBG、TC、TG、HDL、LDL、Th17 细胞、IL-17、IL-6、TNF- α 为自变量,进行多元线性逐步回归分析,结果显示 Th17 细胞频率、IL-17、IL-6、TNF- α 、年龄、TC 是影响颈动脉 IMT 的主要因素(表 3)。

表 3. 各因素与颈动脉 IMT 的多元线性逐步回归分析

Table 3. Multivariate linear stepwise regression analysis between the various factors and carotid IMT

因素	回归系数	标准误	标准回归系数	t 值	P 值
常数	0.079	0.143	-	0.556	0.579
Th17 细胞	0.308	0.037	0.410	8.433	0.000
IL-17	0.007	0.002	0.168	3.590	0.000
IL-6	0.003	0.001	0.258	4.030	0.000
TNF- α	0.003	0.001	0.237	3.673	0.000
年龄	0.006	0.002	0.177	3.028	0.003
TC	0.065	0.019	0.200	3.443	0.001

3 讨论

研究表明,动脉硬化与局部及全身的慢性炎症反应密切相关^[3]。Th17 细胞作为一群新发现的炎症介导细胞,其本身及分泌的细胞因子在炎症反应的发生发展中有着重要的意义^[4]。IL-17、IL-6 和 TNF- α 是 Th17 细胞分泌的特征性效应细胞因子。IL-17 具有强大的招募激活中性粒细胞的作用,并且可以通过诱导多种细胞释放促炎性因子及中性粒细胞趋化因子来调整局部组织炎症反应^[5]。IL-6 主要通过趋化作用来调节炎症反应,趋化中性粒细胞到达炎症部位并诱导其变形、脱颗粒和诱导溶酶体释放蛋白酶,直接损伤血管内皮和组织细胞,是心脑血管缺血损伤的重要炎症细胞因子^[6]。TNF- α 可通过促进炎症细胞的聚集和炎症因子的释放加重局部血管的病理损害,在动脉损伤、斑块破裂或者溃疡时均能引起 TNF- α 的释放^[7]。TNF- α 、IL-6 两者在炎症反应急性相中联系紧密,TNF- α 可诱导 IL-6 生成。

吉庆伟等^[8]研究显示,高血压合并颈动脉粥样硬化组的 Th17 细胞活性显著高于颈动脉正常的高血压对照组,Th17 细胞频率是对照组的两倍,IL-17 水平明显升高。van Es 等^[9]将 IL-17 受体缺陷骨髓细胞移植到低密度脂蛋白受体基因敲除(LDLR^{-/-})小鼠并给予 12 周高脂饮食,结果显示,移植后的 LDLR^{-/-}小鼠与未移植的 LDLR^{-/-}小鼠比较,主动脉根部动脉硬化病变减少了 46%;另一组实验显示,与未接受抗 IL-17 中和性抗体小鼠比较,接受抗 IL-17 中和性抗体小鼠的主动脉根部动脉硬化病变减小约 50%。Liu 等^[2]研究表明,外周血 Th17 细胞频率与颈动脉 IMT 呈正相关,其频率的增加伴有

颈动脉 IMT 的增加,IL-6、IL-17 和 TNF- α 水平的增加与颈动脉 IMT 呈显著正相关。本研究结果显示,颈动脉 IMT 较高组高血压患者的 Th17 细胞频率、IL-17、IL-6 和 TNF- α 血清水平均高于颈动脉 IMT 较低组,Th17 细胞频率、IL-17、IL-6 和 TNF- α 血清水平与颈动脉 IMT 呈显著正相关,Th17 细胞频率、IL-17、IL-6 和 TNF- α 是影响 IMT 的主要危险因素。提示炎症反应可能在高血压动脉粥样硬化的进程中发挥重要作用,Th17 细胞及其相关细胞因子与原发高血压患者动脉粥样硬化相关。在临床上,Th17 细胞及其相关细胞因子的水平或许可作为判断动脉粥样硬化程度的指标,监测其水平的高低将有助于原发高血压患者动脉粥样硬化的预防、诊断、治疗和预测。

本研究仅探讨了外周血 Th17 细胞及其相关细胞因子与颈动脉 IMT 的相关性,而对具体机制及病理生理过程并未进行进一步研究。Th17 细胞及其相关细胞因子对于心血管系统疾病的预测及评估价值有待我们进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Dong C. Genetic controls of Th17 cell differentiation and plasticity [J]. *Exp Mol Med*, 2011, 43(1): 1-6.
- [2] Liu Z, Lu F, Pan H, et al. Correlation of peripheral Th17 cells and Th17-associated cytokines to the severity of carotid artery plaque and its clinical implication [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 221(1): 232-241.
- [3] Woollard KJ. Immunological aspects of atherosclerosis [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2013, 125(5): 221-235.
- [4] 刘振东, 路方红, 赵颖馨, 等. 原发性高血压患者动脉僵硬度与 Th17 细胞相关效应因子的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20(1): 57-60.
- [5] Karbach S, Croxford AL, Oelze M, et al. Interleukin 17 drives vascular inflammation, endothelial dysfunction, and arterial hypertension in psoriasis-like skin disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 14, 34(12): 2 658-668.
- [6] 熊国祥, 戴先鹏, 毕国善, 等. Caveolin-1 对血管吻合口白细胞介素 10 和白细胞介素 6 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(8): 700-704.
- [7] 李大勇, 马贤德, 陈文娜, 等. 内皮细胞功能的变化与动脉硬化闭塞症发病的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(10): 871-875.
- [8] 吉庆伟, 曾秋棠, 刘伶, 等. 高血压合并颈动脉粥样硬化患者外周血效应性 T 细胞亚群的变化及意义 [J]. *中国免疫学杂志*, 2011, 27(6): 556-564.
- [9] van Es T, van Puijvelde GH, Ramos OH, et al. Attenuated atherosclerosis upon IL-17R signaling disruption in LDLr deficient mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 388(2): 261-265.

(此文编辑 曾学清)