

低钠盐饮食对血压调控相关基因局部网络影响的初步研究

张治洲, 王秀锦, 常丽君, 韩潇, 刘安军

(天津科技大学泰达 BIO-X 系统生物技术研究中心, 营养基因组学与功能食品研究所, 天津 300457)

摘要: 目的: 调查食用低钠盐饮食对血压调控相关基因的表达的影响。方法: 确定正常组和疾病组两组测试人群各 3 人, 食用低钠盐两个月。抽提测试人群食用低钠盐前后外周血中的总 RNA, 经反转录应用 22 K Human Genome Array 芯片分析基因表达差异。结果: 在利用基因芯片监测的 150 个高血压候选基因中, 正常组和疾病组人群的部分基因表达都有差异 (比值大于 2 为表达升高, 小于 0.5 为表达降低)。在疾病组测试人群中 ADA、NPRB 基因 3 人共同表达降低, 正常组和疾病组 SLC8A1 基因都表达升高。结论: 根据本实验观测, 通过减少钠盐的摄入, 离子通道和转运通路等方面对应的局部基因网络状态发生改变, 为低钠盐成为降压非药物治疗的有力补充在基因表达层面上提供了证据。

关键字: 低钠盐; 高血压; 基因芯片; 基因网络

中图分类号: R54; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2007)12-0009-04

Preliminary Investigation of the Effect of Low-Sodium Intake on Hypertention-related Gene Network

ZHANG Zhi-zhou, WANG Xiu-jin, CHANG Li-jun, HAN Xiao, LIU An-jun

(TEDA BIO-X Center for Systems BioTechnology, Institute for Nutrigenomics and Functional Food, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Objective: to investigate the effect of low-sodium intake on the expression of hypertention related genes. **Method:** Six people were apportioned into a control and a patient group (n=3 each) to take the low-sodium intake for two months. Their total RNA samples were extracted, purified and treated by reverse-transcription. Then the gene expression profiles were analyzed by 22 K Human Genome Array experiments. **Result:** Among the 150 hypertension candidate genes, differences in some gene expression were found in both of the examined groups (the ratio of >2 and <0.5 were regarded as up-regulated and down-regulated expression, respectively). The expression levels of ADA and NPRB genes were decreased in the patient group, while that of the SLC8A1 gene increased in both the groups. **Conclusion:** Our preliminary investigations provided evidence that consumption of low-sodium salt could adjust local network status of some hypertension candidate genes functionally linked with iron channels/transporters.

Key words: low-sodium salt; hypertension; microarray; gene network

饮食中盐的摄入量偏高是高血压病的一个很重要的危险因素, 限制饮食中钠盐的摄入量成为非药物治疗的手段之一, 且其效果在国内外许多临床实验中得到证实^[1], 然而对低钠盐影响和调节基因参与的代谢通路或信号传导方面的研究还比较少。本文介绍了通过食用低钠盐和限制饮食中钠盐的含量, 利用基因芯

收稿日期: 2007-10-24

基金项目: 教育部新世纪优秀人才计划, 上海川崎集团药食同源研究基金项目 (TJ0601)

作者简介: 张治洲(1967-), 男(汉), 教授, 博士, 研究方向为基因网络技术、个性化营养及功能生物信息学

片高通量的特点, 同时监测 150 个高血压候选基因的表达差异, 从而初步观察通过限制饮食中钠盐的摄入对血压调控相关基因表达变化的影响。

1 资料与方法

1.1 实验对象和材料

所有实验对象均为本校已退休教职工, 其中男 2 人, 女 4 人; 年龄在 50~60 岁之间, 血压正常组和高血压组人数各 3 人。对测试者监测记录血压和抽取外周血后, 逐个进行限盐饮食指导, 对测试者讲解高血压防治的意义, 介绍限制食盐的摄入量是高血压非药物

防治和治疗的重要手段,明确告诉测试者减少食盐的摄入量不会影响生活质量。在取测试者及家属信任和积极配合的基础上,对测试者饮食中的钠盐摄入量进行干预。全部人群样本同意配合本研究,并签署知情同意书。具体方法是:由食用普通食盐(NaCl含量为99%)改为食用由上海川崎食品有限公司提供的川崎味仙(NaCl含量为普通食盐50%,配以其他增咸成分使总体咸度基本不变),并限制其它含盐食品如咸菜、酱油等的摄入。在测试期间我们随时和测试者保持联系,监督测试者限盐饮食的严格进行。2个月以后再次进行血压监测和外周血的抽取。在此期间,患者保持正常的生活规律,服药情况保持不变。

1.2 血液收集和RNA抽提

所有实验测试者均空腹,由本校校医抽血,所抽血液立即加入TRI Reagent BD(晶美公司)充分摇匀,存于-80℃冰箱,并用于制备RNA。抽提RNA过程严格按照试剂盒说明执行。样本抽提的总RNA经紫外分光光度计A260/A280测定,甲醛变性凝胶电泳检验,样本质量均符合实验要求,纯化后的mRNA供制备探针使用。

1.3 候选基因的选择

根据高血压数据库<http://cmbi.bjmu.edu.cn/genome/candidates/snps.html>的资料,包括SNP在内的高血压候选基因共计150个,利用全基因组基因芯片(晶芯人全基因表达谱芯片,22000个基因)对其同时进行监测,观察这些候选基因在限盐饮食前后的表达变化。

1.4 样品RNA荧光标记

将mRNA反转录成cDNA,用cDNA Synthesis Kit(Promega, USA)合成双链cDNA;再经过体外转录合成cRNA并纯化;用M-MLV反转录酶进行随机引物反转录并纯化;cDNA用KLENOW酶进行标记。其中以Cy3-dCTP标记食用低钠盐之前的外周血cDNA,以Cy5-dCTP标记食用低钠盐之后的外周血cDNA。

1.5 杂交与清洗

标记的DNA溶于30μL芯片杂交液中(3×SSC, 0.2% SDS, 5×Denhart's, 25%甲酰胺),于42℃杂交过夜。杂交结束后,先在42℃左右含0.2% SDS, 2×SSC的液体中洗5min,而后在0.2×SSC中室温洗5min。玻片甩干后即可用于扫描。

1.6 荧光扫描与结果分析

芯片用LuxScan 10KA双通道激光扫描仪(CapitalBio公司)进行扫描。采用LuxScan 3.0图像分析软件(CapitalBio公司)对芯片图像进行分析,

把图像信号转化为数字信号;然后对芯片上的数据用Lowess方法进行归一化;最后以差异为2倍的标准来确定差异表达基因。根据换算后的Cy5/Cy3比值。确定差异表达基因。其中比值大于2为表达增高基因;比值小于0.5为表达降低基因。

2 结果

表1 正常组表达明显变化的基因(2人及以上)

Table 1 Altered gene expression in the control group (in 2 or more persons)

GeneBank No	Symbol	Description	Cy5/Cy3
表达升高			
NM_000681	ADRA2A	adrenergic alpha-2A receptor	5.1612
NM_000164	GIPR	gastric inhibitory polypeptide receptor	3.5766
NM_024409	NPPC	natriuretic peptide precursor C	4.8524
NM_021097	SLC8A1	sodium/calcium exchanger	2.3909
NM_019903	ADD3	adducin 3	4.0142
表达降低			
NM_000024	ADRB2	adrenergic, beta-2-, receptor	0.4275
NM_003995	NPRB	natriuretic peptide receptor B/guanylate cyclase B	0.363
NM_00956	PTGER2	prostaglandin E receptor 2	0.2785
NM_030984	TBXAS1	thromboxane A synthase 1	0.4038

表2 疾病组表达明显变化的基因(2人及以上)

Table 2 Altered gene expression in the diseased group (in 2 or more persons)

GeneBank No	Symbol	Description	Cy5/Cy3
表达升高			
NM_006516	SLC2A1	facilitated glucose transporter	2.293
NM_021097	SLC8A1	sodium/calcium exchanger	8.7091
NM_002303	LEPR	leptin receptor	3.8581
NM_000305	PON2	Paraoxonase 2	3.8581
NM_000497	CYP11B1	cytochrome P450, family 11, subfamily B	0.3903
表达降低			
NM_000022	ADA	adenosine deaminase	0.3275
NM_000789	ACE	angiotensin I converting enzyme	0.2317
NM_003995	NPRB	natriuretic peptide receptor B/guanylate cyclase B	0.363
NM_000343	SLC5A1	sodium/glucose cotransporter	0.4486

NM_006931	SLC2A3	facilitated glucose transporter	0.2471
-----------	--------	---------------------------------	--------

对食用低钠盐前后的两组测试人群外周血 RNA 进行芯片检测, 结果符合信号分析的质量控制标准, 对前后表达数据进行分析比较, 所有重点监测的高血压候选基因中两组人群相关的基因表达都有所变化, 这些表达明显变化的基因包括涉及骨架蛋白和粘附分子、肾素-血管紧张素-醛固酮系统、下丘脑-垂体轴、脂质代谢、糖代谢、离子通道或转运体、凝血噁烷和前列腺素、载脂蛋白、交感神经系统、利钠肽、细胞内信使等相关功能。对两组表达变化基因进行对照, 发现疾病组基因 ADA, NPRB 3 人表达都降低; 基因 SLC8A1 在正常组和疾病组表达都升高。

3 讨论

高血压病是一种多个基因参与, 单个基因作用微弱的常见心血管基因, 到目前为止还没有报道导致高血压病的确切相关基因。国外有研究指出: 限制饮食中盐的摄入能够降低血压, 且成为非药物治疗的手段之一, 也是药物控制血压的重要补充^[2]。流行病学和临床试验发现, 钠摄入量与血压呈正相关^[3]。对于高血压致病机理说法很多, 其中之一是 Dewardener 提出高血压发病的钠泵抑制学说, 钠泵抑制导致血压升高的可能机制有①血管平滑肌细胞膜部分去极化对加压物质的敏感性提高。②细胞钠增高, 通过 Na⁺-Ca²⁺交换, 使细胞内游离钙增多。③交感神经末梢去甲肾上腺素摄取减少, 释放增加。高血压病患者可能存在不同的离子转运缺陷, 部分表现为钠泵抑制, 使细胞内 Na⁺浓度升高。本论文利用基因芯片高通量的特点对多个基因食用低盐食品前后的表达变化进行研究, 根据芯片结果分析, 每个人的基因表达变化数量有所不同, 且变化程度不一。这可能与每个人对盐的敏感性不同有关^[4]。但在表达发生明显变化的基因中也有一些基因的变化趋势是相同的, 如根据本实验研究结果在疾病组 ADA, NPRB 表达都降低。高血压反应之一是心肌肥大, 基因 ADA (Adenosine Deaminase) 参与心肌肥大中 EGF 受体被 GPCRs 受体激活, 而心肌肥大正是 G-蛋白连结受体信号与 EGF 受体之间通路异常而产生, EGF 受体的激活最终导致了心肌肥大。与此同时 EGF 受体被 GPCRs 受体激活直接影响到肾素-血管紧张素系统 (Renin-Angiotensin System, RAS)。在心肌、血管平滑肌等组织中, 肾素、血管紧张素具有较强的收缩血管加压作用, 这也进一步促进了血管管壁增厚, 从而阻碍金属离子在细胞内外进行交换,

钠离子在细胞内的浓度增高最终导致血压上升。另外, 尿钠排泄缩氨酸家族包含 ANP, BNP, CNP (C-type Natriuretic Peptide), 而 CNP 选择性地结合尿钠排泄缩氨酸受体 B (NPRB)^[5,6]。CNP 通过 NPRB 扩张血管并抑制动脉平滑肌细胞增殖^[7]。通过对原发性高血压大鼠的研究表明 NPRB 受体的异常导致高血压^[8]。表达升高的基因 SLC8A1 (Sodium Calcium Exchanger 1) 编码钠离子和钙离子交换因子。在心肌细胞中, Ca²⁺浓度在紧张时浓度高, 在放松时浓度低。在放松时, Na⁺-Ca²⁺之间的交换是 Ca²⁺被排出细胞的主要作用机制。以往的研究表明 SLC8A1 的 mRNA 水平的上调提示心房细胞存在 Ca²⁺处理异常^[9]。本实验中出现的 SLC8A1mRNA 表达水平升高可能表明, 低钠盐饮食确实直接调节了体内 Na⁺-Ca²⁺之间的交换活动。由于本次研究观察的是外周血中基因表达的总状况, 低钠盐饮食如何通过改变 SLC8A1 基因的表达状况来改善健康状况的具体机制需要将来的进一步研究。

根据 KEGG 数据库所提供的基因通路信息, 基因 ADA 所参与的代谢通路有 Purine metabolism, 基因 SLC8A1 所参与的代谢通路有 Calcium signaling pathway; NPR2 所参与的代谢通路有 Long-term depression, Gap junction 及 Purine metabolism。联系三个基因所参与的通路, 画出这些基因参与的局部基因网络示意图如下:

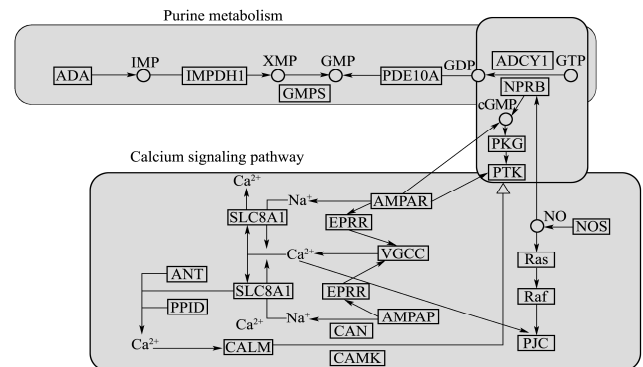


图1 表达变化基因所在信号通路构成的局部基因网络示意图

注: 有关信息详见KEGG网站: <http://www.genome.jp/kegg/>。其中ADA、NPRB表达降低, SLC8A1表达升高。

Fig.1 Up- or down-regulated genes and related local gene network

Note : Signaling pathways were taken from KEGG: <http://www.genome.jp/kegg/>

近几年来临床治疗高血压主要有 6 种常见的降压药物: 利尿剂、β 肾上腺素能受体阻滞剂、钙拮抗剂、血管紧张素转化酶 (Angiotensin-Converting Enzyme, ACE) 抑制剂、血管紧张素 II 受体拮抗剂和 α 肾上腺

素能受体阻滞剂^[10]。不同的药物利用不同的作用机制参与不同的代谢途径,与作用机制相关的候选基因也不同。据相关资料报导利尿剂发生作用的候选基因有血管紧张素转换酶基因、醛固酮合酶(CYP11B2)基因和 α -内收蛋白(α -adducin)基因^[11,12]。钙拮抗剂发生作用的候选基因有编码L一型钙通道 α_1 亚单位(CACNA1)、细胞色素P4502D6、细胞色素P4503A3、细胞色素P4503A4及细胞色素P4503A5等^[13-15],血管紧张素转换酶抑制剂发生作用的候选基因有血管紧张素转换酶ACE、缓激肽受体B2(Bradykinin receptor 2)等^[16]。血管紧张素受体拮抗剂发生作用的候选基因有血管紧张素II受1(angiotensin II receptor type I)、细胞色素P4503A4及细胞色素P4502C9等基因。肾上腺素能受体阻滞剂发生作用的候选基因有NF-KB和MCP-1等^[17]。观察基因芯片的结果发现利用食用低钠盐方法参与调节的基因和药物治疗参与调节的基因由于作用机制和代谢途径不同,其发生表达变化的候选基因除有部分重合如基因ACE,其它基因也有所不同,这似乎可以表示减少钠盐的摄入可能成为降压非药物治疗的有力补充,不过需要在后续的研究中扩大实验规模以提供更有力的证据。

高盐饮食对身体代谢或通路等负面影响是多方面的,如抑制平滑肌细胞膜钠泵;增加可激活交感神经的活性,并不同程度地损害肾脏排钠功能;钠盐的摄入量的增加可提高血管对各种升压物质的敏感性等等。限盐可以改变这些病理生理变化,而达到降压的目的。限盐是有效的非药物降压手段,同时亦是辅助治疗高血压最经济的方法之一,医务人员应在医疗行动中指导患者限制盐的摄入。

参考文献

- [1] 赵光胜.现代高血压学[M].北京:人民军医出版社,1999
- [2] 朱鼎良.高血压基因研究及应用前景[J].临床内科杂志,2004,21(1):7-8
- [3] Witteman JC, Willet WC, Stanpfer MJ. et. al. A prospective study of nutritional factors and hypertension among US women [J]. Circulation,1989,80:1320-1327
- [4] 刘治全.血压的盐敏感性与盐敏感性高血压[J].高血压杂志,2005,13(3):131-133
- [5] Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL et al. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP) [J]. Science,1991,252: 120-123
- [6] Maack T, Camargo MJ, Kleinert HD et al. Atrial natriuretic factor: structure and functional properties [J]. Kidney Int., 1985, 27:607-615
- [7] Januszewicz A. The natriuretic peptides in hypertension [J]. Curr Opin Cardiol.,1995,10:495-500
- [8] Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic Peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions [J]. Endocrine Reviews,2005,27 (1): 47- 72
- [9] 杨东辉,王春富,张万琴,杨延宗. 钙拮抗剂对高血压大鼠心房肌L一型钙通道和钠一钙离子交换器mRNA的影响[J].中国病理生理杂志,2004,20(3):339-342
- [10] 潘发明,徐希平.高血压的药物基因组学的研究进展[J].国外医学(遗传学分册),2004,27(3):191-193
- [11] 吴寿岭,周永,刘秀荣,等.血管紧张素转换酶基因型与氢氯噻嗪降压疗效的相关研究[J].中华心血管病杂志,2004,32:295- 299
- [12] 周永,张春香,高瑞志,等.醛固酮合酶基因多态性(C/T)与高血压患者左室肥厚相关性研究[J].高血压杂志,2004,12:315-318
- [13] Marez D, Legrand M, Sabhagh N. An additional allelic variant of the CYP2D6 gene causing impaired metabolism of sparteine [J]. Hum Genet.,1996,97(5):668-670
- [14] Masiillirembwa C, Persson I, Bertilsson L et al. A novel mutant variant of the CYP2D6 gene (CYP2D6*17)Common in a black African population: association with diminished debrisoquine hydroxylase activity [J]. Br J Clin Pharmacol,1996,42 (6):713-719
- [15] Wang SL, Lai MD, Huang JD. G169R mutation diminishes the metabolic activity of CYP2D6 in Chinese [J]. Drug Metab Dispos.,1999,27(3):385-388
- [16] Manor I, Eisenberg J, Eisenberg J. The short DRD4 repeats confer risk to attention deficit hyperactivity disorder in a family-based design and impair performance on a continuous performance test (TOVA) [J]. Mol Psychiatry,2002, 7(7):790-794
- [17] Roopashree SD, Saurabh S, Marpadga R. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 by the oxidized lipid, 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid, in vascular smooth muscle cells via nuclear factor-kappa B(NF-kB) [J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2004, 36:585-595