

αENaC 基因 T3593C 多态性与新疆哈萨克族人 高血压及血电解质的关联研究

徐 红 李南方 周 玲 杨 进

摘 要 目的 研究 αENaC 基因 T3593C 多态性与哈萨克族人原发性高血压(EH)及血电解质水平的关系。方法 采集 EH 组 253 例(EH 组)和正常对照组 255 例(NT 组)对象遗传标本,检测其血清 K⁺、Na⁺ 水平,应用 PCR-RFLP 方法检测其 T3593C 多态性。观察该人群此多态性的分布及其与高血压和血电解质的关系。结果 该人群 T3593C 多态 TT、TC、CC 基因型频率分别为 88.39%、10.63%、0.98%,T、C 等位基因频率分别为 93.7%、6.3%。EH 组和 NT 组 3 种基因型频率分别为 89.33%、9.88%、0.79% 和 87.45%、11.37%、1.18%,两等位基因频率分别为 94.36%、5.64% 和 93.14%、6.86%,同时按照年龄分层进一步发现两组间基因型和等位基因分布均无统计学差异($P > 0.05$)。TT 与 TC + CC 基因型对象间血压及血电解质水平均无统计学差异($P > 0.05$)。结论 该人群存在 T3593C 多态性,此多态可能与该民族高血压的发生及血电解质水平均不相关。

关键词 原发性高血压 哈萨克族 上皮细胞钠通道 α 亚单位基因 单核苷酸多态性

The Relationship Between T3593C Polymorphism of αENaC Gene and Essential Hypertension and Serum Electrolytes in Xinjiang Kazakhs.

Xu Hong, Li Nanfang, Zhou Ling, Yang Jing. Xinjiang Medical University, Xinjiang 830054, China

Abstract Objective To investigate the distributed characteristic of the T3593C polymorphism which located at the gene of epithelial sodium channel (ENaC) in Kazakhs, and to study the relationship between this polymorphism and essential hypertension (EH) and serum electrolytes. **Methods** We extracted 253 cases (EH group) and 255 cases (NT group) genome DNA and measured the gene polymorphism of T3593C by PCR-RFLP. Serum sodium and potassium ions were measured. We studied the relationship of this polymorphism and EH and serum electrolytes. **Results** The frequencies of the genotypes TT, TC, CC were 88.39%, 10.63%, 0.98% and alleles T, C were 93.7%, 6.3%, respectively. The frequencies of the genotypes TT, TC, CC were 89.33%, 9.88%, 0.79% in EH group and 87.45%, 11.37%, 1.18% in NT group, respectively. The frequencies of the allelic T, C were 94.36%, 5.64% in EH group and 93.14%, 6.86% in NT group, respectively. After stratifying the data with age groups, we found that all distribution of genotypic and allelic frequencies had no significant difference between two groups ($P > 0.05$). There was no significant difference in levels of blood pressure and serum electrolytes between subjects with the TT and TC + CC genotypes ($P > 0.05$). **Conclusion** T3593C polymorphism existed in Kazakhs. And it might not be associated with level of EH and serum electrolytes of Kazakhs.

Key words Essential hypertension; Kazakhs; α subunit gene of the epithelial sodium channel; Single nucleotide polymorphism

人类上皮细胞钠通道(human epithelial sodium channel, hENaC)是对阿米洛利敏感的非电压依赖性钠通道,ENaC 负责的 Na⁺ 限速重吸收对调节细胞外液容量和血压水平具有重要作用。ENaC 基因作为 EH 重要的盐敏感候选基因之一近年受到关注。ENaC α、β、γ 3 个高度同源的亚单位中 α 亚单位对通道的功能起主导作用^[1,2]。人类基因组计划共同遗

传基因库资料显示 αENaC 基因中存在两个共同遗传的单体型板块,该基因第 2 内含子区域的 T3593C 多态位点(rs3782727)位于第 2 个单体型板块中,且为该板块的标签 SNP(tSNP),意味该位点代表着更加丰富的遗传信息量,在汉族人群中该位点变异等位基因的频率为 11.1%。

流行病学调查显示新疆哈萨克族是高血压高发民族^[3],该人群是一个相对隔离群体,影响血压的因素,如生存环境、饮食习惯等均较一致,一定程度地减少了遗传异质性的影响;受当地医疗条件的限制,绝大多数 EH 患者未经药物治疗,故所测血压能客观地反映该人群的实际血压水平,是研究遗传相关疾病的理想人群。且有研究表明其高血压的发生与水盐代

基金项目:新疆维吾尔自治区科技攻关和重点科技项目[200633129(3)]

作者单位:830054 乌鲁木齐,新疆医科大学(徐红);830001 新疆维吾尔自治区人民医院高血压科、新疆维吾尔自治区高血压研究所(李南方、周玲、杨进)

通讯作者:李南方,电子信箱:lnanfang@yahoo.com.cn

谢及离子转运异常有关^[4],但目前尚未见有 T3593C 位点多态性与该民族高血压及血电解质关系的研究报道,因此我们选择生活在新疆哈萨克族牧民为研究对象,采用 PCR - RFLP 方法,检测 α ENaC 基因 T3593C 多态性,通过病例 - 对照研究的方法,研究该多态性在哈萨克族人群中的分布及其与该民族高血压及血电解质的关系。

对象与方法

1. 对象:采用整群抽样随机抽取的方式,以生活在新疆 30 岁以上的哈萨克族牧民为研究对象。经标准化的流行病学问卷调查和体格检查后,按照 2005 年中国高血压防治指南高血压诊断标准,共检出 253 例高血压患者(EH 组),男性 111 例,女性 142 例,平均 47.60 ± 7.82 岁;检出 255 例正常血压者(NT 组),男性 93 例,女性 162 例,平均 43.52 ± 7.21 岁。两组均排除有肝、肾、甲状腺、糖尿病和药源性疾病及正在服用避孕药的对象。

2. 标本采集:采集所有研究对象清晨空腹外周静脉血,现场快速分离血清和血细胞, -70°C 保存。采用 BECKMAN - CX7 型全自动生化分析仪测定血清 K^+ 、 Na^+ 水平。

3. 方法:(1)基因组 DNA 制备:使用 SK1252 试剂盒提取基因组 DNA(上海生物工程技术服务有限公司),溶于 TE 液中,放置 -20°C 。(2)DNA 片段的扩增:采用巢式 PCR 对 α ENaC 基因第 2 内含子区的目的片段进行扩增,由 Primer3.0 软件设计引物,上海生物工程技术服务有限公司合成。①扩增 757bp 外层 PCR 产物:外侧引物:5' - TGCCTCAACT - TCAGACAGACA - 3', 5' - CCTAAACCGTTCCTGGGACT - 3'。反应体系:GoTaq 试剂混合液 $25\mu\text{l}$ (Promega 公司)、DNA 模板 $1\mu\text{l}$ 、上下游引物各 $1.25\mu\text{l}$,加灭菌去离子水至 $50\mu\text{l}$ 。反应条件: 95°C 预变性 5min 进入 35 个循环(95°C 变性 30s, 58°C 退火 45s, 72°C 延伸 1.5min),最后 72°C 延伸 7min;②扩增 441bp 内层 PCR 产物:内侧引物:5' - AGGGCATCTCAGGTTAGCAG - 3', 5' - TCAGTGCTTTGTCCCCTTC - 3'。反应体系:GoTaq 试剂混合液 $25\mu\text{l}$ (Promega 公司)、757bp PCR 产物 $1\mu\text{l}$ 、上下游引物各 $1.25\mu\text{l}$,加灭菌去离子水至 $50\mu\text{l}$ 。反应条件: 95°C 预变性 5min 进入 35 个循环(95°C 变性 30s, 60°C 退火 45s, 72°C 延伸 1min),最后 72°C 延伸 7min;③取②中的 PCR 产物 $5\mu\text{l}$ 点样在含溴乙锭的 2.0% 琼脂糖凝胶上电泳,紫外灯下观察结果。(3)基因型检测:每个酶切体系含 PCR 产物 $6\mu\text{l}$, $10\times$ 缓冲液 $2\mu\text{l}$, 牛血清 $0.2\mu\text{l}$, BsrS I 限制性内切酶 5U(Promega 公司),加灭菌去离子水至 $20\mu\text{l}$ 。 65°C 水浴 4h,取酶切产物在含溴乙锭的 3.0% 琼脂糖凝胶上电泳,紫外灯下观察结果。

4. 统计学处理:采用 SPSS15.0 软件包,均数比较用 t 检验或方差分析,率的比较用卡方检验, $P < 0.05$ 被认为有统计学意义。

结 果

1. T3593C 多态 EH 组与 NT 组间临床资料:除性

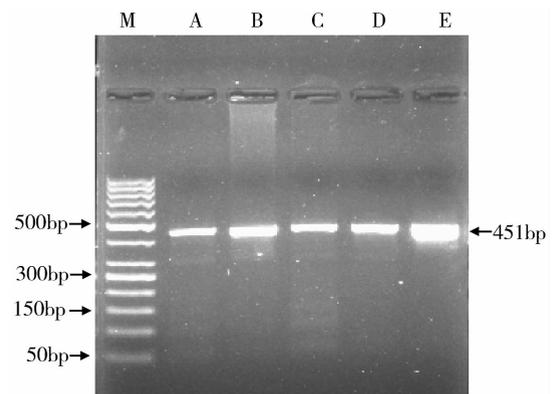
别构成外,EH 组的收缩压、舒张压、平均动脉压、脉压及平均年龄均显著高于 NT 组($P < 0.001$),EH 组 252 例,NT 组 105 例对象进行了血电解质检测,EH 组较 NT 组的 K^+ 、 Na^+ 水平显著增高,而 Na^+/K^+ 比值显著降低($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 EH 与 NT 两组间临床资料($\bar{x} \pm s$)

项目	EH	NT	P
n(男性/女性)	253(111/142)	255(93/162)	0.089
年龄(岁)	47.60 ± 7.82	43.52 ± 7.21	0.000*
SBP(mmHg)	169.66 ± 24.96	114.77 ± 9.84	0.000*
DBP(mmHg)	105.64 ± 14.78	72.53 ± 6.13	0.000*
MAP(mmHg)	126.99 ± 16.37	86.63 ± 6.33	0.000*
PP(mmHg)	64.00 ± 19.59	42.23 ± 8.91	0.000*
血电解质			
n(例)	252	105	0.075
K^+ (mmol/L)	4.49 ± 0.85	4.12 ± 0.60	0.000*
Na^+ (mmol/L)	143.20 ± 10.57	140.23 ± 11.56	0.02
Na^+/K^+	32.74 ± 4.85	34.45 ± 3.53	0.001

* $P < 0.001$

2. PCR 扩增结果及 BsrS I 酶切结果:PCR 扩增特异性产物片段为 441bp,包含 1 个 BsrS I 酶切位点。当 3593 多态为 T 时,产生 BsrS I 酶切位点,而当被 C 替换时,则无酶切位点,理论上在人群中存在 3 种基因型:TT、TC 和 CC。野生纯合子 TT 存在 332bp、139bp 2 条酶切片段;杂合子 TC 存在 441bp、332bp、139bp 3 条酶切片段;突变纯合子 CC 存在 451bp 一条酶切片段。本研究检测到了这 3 种基因型(图 1、图 2)。



M:标记;A-E:451bp²产物

图 1 VT3593C 扩增结果

3. EH 组与 NT 组间 T3593C 多态位点基因型和等位基因分布:TT、TC、CC 基因型频率分别为 88.39%(449 例)、10.63%(54 例)、0.98%(5 例),分布符合 Hardy - Weinberg 平衡定律($\chi^2 = 5.03, P =$

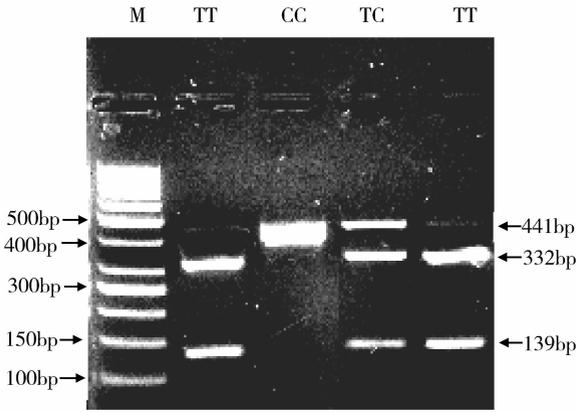


图2 T3593C位点扩增产物的结果

M. 标记; TT. 野生纯合子;
TC. 杂合子; CC. 突变纯合子

0.08)。两组间 T3593C 多态基因型和等位基因频率均无统计学差异 ($P > 0.05$) (表 2)。

5. 按年龄分层比较 T3593C 多态位点基因型及等位基因分布: 由于 EH 和 NT 组间研究对象年龄存在差异, 故按照 ≤ 39 岁、40~49 岁、 ≥ 50 岁分层, 在各年龄段两组间基因型、等位基因频率仍均无统计学差异 ($P > 0.05$) (表 3)。

6. T3593C 多态位点基因型临床资料比较: 因 CC 基因型仅有 5 例, 故将 TC 与 CC 基因型合并后比较 TT、TC + CC 基因型间研究对象临床资料, 结果显示它们在性别构成、年龄、SBP、DBP、MAP、PP 水平均未见有统计学差异 ($P > 0.05$)。在 TT 基因型与 TC + CC 基因型间, 357 例完成血电解质检测的研究对象

表2 EH组及NT组间T3593C多态位点基因型及等位基因分布

组别(n)	基因型			等位基因	
	TT[n(%)]	TC[n(%)]	CC[n(%)]	T[n(%)]	C[n(%)]
EH(n=253)	226(89.33)	25(9.88)	2(0.79)	477(94.36)	29(5.64)
NT(n=255)	223(87.45)	29(11.37)	3(1.18)	475(93.14)	35(6.86)
P		0.78			0.46

表3 按年龄分层T3593C多态性基因型及等位基因分布

组别(n)	基因型			等位基因	
	TT[n(%)]	TC[n(%)]	CC[n(%)]	T[n(%)]	C[n(%)]
≤ 39 岁					
EH(n=41)	38(92.7)	3(7.3)	0(0)	79(96.3)	3(3.7)
NT(n=96)	83(86.5)	12(12.5)	1(1.0)	178(92.7)	14(7.3)
P		0.53			0.41
40~49岁					
EH(n=98)	90(91.8)	7(7.1)	1(1.0)	194(95.6)	9(4.4)
NT(n=98)	84(85.7)	12(12.2)	2(2.0)	180(91.8)	16(8.2)
P		0.40			0.15
≥ 50 岁					
EH(n=114)	98(86.0)	15(13.2)	1(0.9)	211(92.5)	17(7.5)
NT(n=61)	56(91.8)	5(8.2)	0(0)	117(95.9)	5(4.1)
P		0.78			0.26

的 K^+ 、 Na^+ 、 Na^+/K^+ 水平未见有统计学差别 ($P > 0.05$) (表 4)。

讨 论

hENaC 属于变性素/上皮细胞钠通道 (DEG/ENaC) 家族, 为由 α 、 β 、 γ 亚单位组成的异源四聚体, 其作用主要通过 α 亚单位实现, 可在肾远曲小管和集合管高度表达, 受醛固酮和血管加压素调节, 基本生理功能是对 Na^+ 进行定向跨膜转运^[5]。既往研究证明, ENaC 基因突变可导致 ENaC 活性发生变化而参与血压的调节, 引起孟德尔式高血压或低血

表4 T3593C多态位点各基因型临床资料($\bar{x} \pm s$)

项目	TT	TC + CC	P
n(男性/女性)	449(176/273)	59(28/31)	0.40
年龄(岁)	45.61 \pm 7.82	45.07 \pm 7.57	0.61
SBP(mmHg)	141.97 \pm 32.87	143.17 \pm 37.18	0.80
DBP(mmHg)	89.27 \pm 19.73	87.17 \pm 22.41	0.45
MAP(mmHg)	106.85 \pm 23.31	105.85 \pm 26.65	0.76
PP(mmHg)	52.69 \pm 18.60	55.95 \pm 19.29	0.21
血电解质(n)	317	40	0.36
K^+ (mmol/L)	4.38 \pm 0.79	4.38 \pm 0.86	0.98
Na^+ (mmol/L)	142.38 \pm 10.69	141.93 \pm 12.89	0.81
Na^+/K^+	33.24 \pm 4.49	33.25 \pm 5.16	0.99

压^[6,7],目前认为 ENaC 基因可能与 EH 的发生也密切相关。

本研究临床资料显示, EH 组研究对象的 K⁺、Na⁺ 水平均显著高于 NT 组,而 Na⁺/K⁺ 水平则较 NT 组显著降低,与以往研究显示的血压水平与 Na⁺、Na⁺/K⁺ 水平呈正相关,而与 K⁺ 水平呈负相关的报道不一致^[8,9]。血压与电解质间的关系相当复杂,除与遗传、神经体液因素相关外,人及动物实验研究均表明 K⁺、Na⁺、Mg²⁺、Ca²⁺ 等在其吸收与排泄、胞膜转运及细胞内浓度的稳定方面存在复合作用, K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺ 能拮抗 Na⁺ 的升压作用;盐的摄取和排泄常因气温、出汗而不同;血压波动也受心理活动、姿势、气候等影响,故电解质与血压的真正关系常被掩盖。本研究采用 PCR - RFLP 技术,检测到 T3593C 多态的 TT、TC、CC 3 种基因型,证实哈萨克族人存在 T3593C 多态性,其中等位基因频率 T 为 0.94, C 为 0.06, 低于汉族人的 0.111。本研究结果显示,新疆哈萨克族人高血压组和正常对照组间 T3593C 多态基因型和等位基因的分布频率无显著性差异。比较不同基因型研究对象间的血压、血电解质,均未见统计学差异。提示 T3593C 多态性可能不是该民族高血压发生的遗传因素。分析本结果产生的原因认为:①本研究的 T3593C 位于内含子区域,其变异可能不会引起基因功能发生改变,从而不会影响其所编码的蛋白质的功能、表达和稳定性而使临床表型或中间表型发生改变;②我们只通过少量的样本研究了 αENaC 基因第 2 内含子区域 T3593C 多态性与新疆哈萨克族 EH 间的相关性;③在此单体型板块中与本

研究位点存在连锁不平衡关系的其他共同遗传的未知的变异位点可能与高血压的发生也无关联。

参考文献

- 1 Canessa CM, Schild L, Bueu G, et al. Amiloride - sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits[J]. Nature,1994, 367:463 - 467
- 2 Mcdonald FJ, Price MP, Snyder PM, et al. Cloning and expression of the β - and γ - subunits of the human epithelial sodium channel[J]. Am J Physiol,1995, 268: c1157 - c1163
- 3 汪师贞, 马依彤, 程祖亨, 等. 限制哈萨克族高血压患者盐摄入量的降压效应观察[J]. 中国慢性病预防与控制论,1994, 2:167 - 169
- 4 张月明, 徐臻荣, 贝仁礼. 新疆不同民族膳食特点与高血压的关系[J]. 营养学报,1982, 4:315 - 321
- 5 Strazzullo P, Galletti F, Barba G. Altered renal handling of sodium in human hypertension. Short review of the evidence[J]. Hypertension, 2003, 41:1000 - 1005
- 6 Furuhashi M, Kitamura K, Mdachi M, et al. Liddle's syndrome caused by a novel mutation in the praline - rich PY motif of the epithelial sodium channel beta - subunit[J]. J Clin Endocrinol Metab,2005, 90:340 - 344
- 7 Edelheit D, Hanukoglu I, Gizewska M, et al. Noval mutations in epithelial sodium channel (ENaC) subunit genes and phenotypic expression of multisystem pseudohypoaldosteronism [J]. Clin Endocrinol (Oxf),2005, 62:547 - 553
- 8 赵光胜. 微量、常量元素和高血压的研究 - 多因子逐步分析[J]. 中华心血管病杂志,1980, 8(4):211 - 213
- 9 黄大显. 钠、钾、钙、镁与血压调节机制的流行病学[J]. 中国人民解放军军医进修学院学报,1987, 8(3):203 - 206

(收稿:2010 - 01 - 20)

(修回:2010 - 04 - 07)

中药水蛭素对荷瘤鼠 Ki - 67 与 VEGF 表达的影响

任青华 牟忠祥 耿延君 张博 李焱 任海全

摘要 目的 分析 Ki - 67 增生抗原与 VEGF 细胞因子在荷瘤鼠组织中的表达,探讨其与肿瘤的内在关系。**方法** 取小鼠 48 只,随机分成 4 组,左前腋下接种 H₂₂ 肝癌瘤细胞 0.2 毫升/只。连续用药水蛭素,第 15 天处死动物,剥离肿块称重。同时取荷瘤鼠肿块组织固定、包埋、切片、染色、孵育、滴加抗体等,用免疫组化法检测 Ki - 67 增生抗原与 VEGF 细胞因子的表达。Ki - 67 阳性表达定位于细胞核,VEGF 阳性表达定位于细胞质。**结果** Ki - 67 与 VEGF 模型对照组呈强阳性;水蛭素大剂量组呈弱阳性;水蛭素小剂量组呈阳性。**结论** 水蛭素能抑制荷瘤鼠肝癌实体瘤 Ki - 67 增生抗原与 VEGF 细胞因子的高表达,具有明显的抗肿瘤作用,这与中药水蛭素活血化瘀及强大的抗凝血功效有密切关系。

基金项目:山东省中医药现代化重大科技专项基金(2008GG2NS02023)、山东省自然科学基金(Y2006C62)

作者单位:200062 济南,山东省医学科学院(任青华、张博、李焱、任海全);山东省中医院(牟忠祥);山东省平原县第一人民医院(耿延君)