

• 论著 •

家族聚集性高血压心血管疾病标志物 功能分类基因表达的研究

王志禄 吴增颖 杨小芳 熊建文 石守兰 马纪琳 张魄

【摘要】 目的 对家族聚集性高血压心血管疾病标志物功能分类基因表达进行研究,以筛查候选基因。
方法 选择 3 代以上直系亲属均有原发性高血压病史的患者作为实验组,并以健康志愿者作为对照组。采用 Oligo GEArray 基因芯片技术检测外周血液心血管疾病标志物基因的表达,以阳性标准值/阴性标准值 > 2.0,或 ≤ 0.5 和 > 0 的基因为差异表达基因。**结果** 与对照组相比,实验组心血管疾病标志物功能分类基因表达上调的基因共有 10 条,涉及脂质代谢、免疫应答相关分子、细胞黏附分子、细胞外分子及凝血基因,包括载脂蛋白 E(ApoE)、上皮 V 样抗原-1(EVA-1)、γ-干扰素(IFN-γ)、白细胞介素-1β(IL-1β)、IL-8、整合蛋白-β(ITGB-1)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、核转录因子-κB(NF-κB)、血小板-内皮细胞黏附分子-1(PECAM-1)、P-选择素(SEL-P);下调基因 3 条,包括凝血因子-Ⅲ(F-Ⅲ)、血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体-1(LOX-1)、丝氨酸蛋白酶抑制因子-1(SERPINE-1)。**结论** 家族聚集性高血压涉及多种心血管疾病标志物基因,尤其与凝血相关的 F-Ⅲ 和与细胞外分子蛋白酶抑制剂、凝血相关的 SERPINE-1 两个基因有关。

【关键词】 高血压,家族聚集性; 功能分类基因芯片; 差异表达基因

Study on cardiovascular diseases marker gene expression profile of familial aggregation hypertension
 WANG Zhi-lu *, WU Zeng-ying, YANG Xiao-fang, XIONG Jian-wen, SHI Shou-lan, MA Ji-lin, ZHANG Po. * Department of Cardiology, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China

【Abstract】 Objective To explore the cardiovascular diseases marker gene expression profile of the familial aggregation hypertension patients, and to screen differentially expressed genes. **Methods** The patients who had directly related family members for more than three generations suffering from hypertension were selected as experiment group, and healthy individuals as control group. Oligo GEArray gene chip technique was used to detect the expression of cardiovascular diseases marker gene in peripheral blood. The ratio of positive/negative standard value > 2.0, or ≤ 0.5 and > 0 was indentified as differential gene. **Results** Compared with control group, there were 10 up-regulated differential genes in experiment group, composing genes involved in lipid metabolism, immune response-related molecules, cell adhesion molecules, extracellular molecules and coagulation, including apolipoprotein E (ApoE), epithelial V-like antigen-1 (EVA-1), interferon-γ (IFN-γ), interleukin-1β (IL-1β), IL-8, integrin-β1 (ITGB-1), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), nuclear factor-κB (NF-κB), platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), selectin-P (SEL-P). There were 3 down-regulated genes, including coagulation factors-Ⅲ (F-Ⅲ), lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1), and serine protease inhibitor-1 (SERPINE-1). **Conclusion** This study suggested that familial aggregation hypertension related to a variety of gene markers of cardiovascular disease, especially elements concerning coagulation and extracellular protease inhibitor-related genes.

【Key words】 Hypertension, familial aggregation; Functional classification gene array; Differentially expressed gene

人类基因组计划的完成为疾病的诊断和治疗提供了新的思路和方法,并且正逐步成为医学研究的主要内容之一。高血压的发病是遗传易感性与环境因素相互作用的结果,其发生具有明显的家族聚集性,故将家族发病者称为家族聚集性高血压。因为家

族聚集性高血压是一种遗传异质性疾病,具有延迟外显性,并受一系列环境因素的影响,所以目前具有哪些较为肯定的基因参与家族聚集性高血压的发病尚不十分清楚。本研究中采用功能分类基因芯片技术对家族聚集性高血压患者的心血管疾病标志物基因表达进行了研究,期望筛选候选基因,以探讨家族聚集性高血压发生发展的病理生理机制,并为早期诊断、早期预防和早期治疗该病提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象:选择本院门诊就诊的高血压患者,

DOI:10.3750/cma.j.issn.1003-0603.2010.11.012

基金项目:甘肃省科学事业费研究资助项目(QS061-C33-15)

作者单位:730000 甘肃,兰州大学第一医院心内科(王志禄、吴增颖、杨小芳、熊建文),神经内科(石守兰);定西市第二人民医院心内科(马纪琳、张魄)

Email:wangzhilu@medmail.com.cn

以静息状态下不同日 3 次血压 $\geq 140/90$ mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa), 并经筛查 3 代以上直系亲属均具有原发性高血压病史的家族聚集性患者作为实验组。排除由肾脏、内分泌等其他疾病引起继发性高血压患者, 及合并其他影响血压变化的急慢性疾病患者(如糖尿病、肾衰竭等)。另外选取无高血压及其他急慢性疾病的健康志愿者作为对照组。两组研究对象的例数、性别、年龄及生化检查等均无选择性偏倚, 有可比性。

1.2 样本采集: 抽取研究对象静脉血 0.2 ml, 加入 0.75 ml TRIzol 裂解液、1.25 mol/L 醋酸 20 μ l, 经 TRIzol 裂解后置于干冰中运送至上海康成生物公司, 进行后续实验。

1.3 基因芯片杂交及检测分析: 用 TRIzol 一步法抽提标本总 RNA。然后依次合成 cDNA、标记探针、纯化 cRNA, 与 Oligo GEArray 基因芯片(含 113 条基因, 由上海康成生物有限公司提供)预杂交、杂交过夜、洗膜完成芯片杂交后, 按照 SuperArray 化学发光检测试剂盒(美国 SuperArray Bioscience 公司)说明书进行膜封闭、加入链亲和素耦联的碱性磷酸酶(AP), 洗膜后用 X 线胶片曝光检测。

1.4 图像采集和数据分析: 采用化学发光底物 CDP-Star 孵育后的芯片, 将 X 线胶片上的图像用扫描仪扫描并转换为灰度, 以 TIFF 格式的图片文件保存, 使用网上提供的综合型 GEArray 表达分析配套软件分析完整的芯片数据。以阳性标准值/阴性标准值 > 2.0 , 或 ≤ 0.5 和 > 0 的基因为差异表达基因。

2 结果

实验组与对照组相比心血管疾病标志物功能分类基因表达上调或下调的基因共有 13 条, 其中 10 条上调, 3 条下调(图 1)。

2.1 上调基因(表 1): 实验组较对照组表达上调的基因有载脂蛋白 E(ApoE)、上皮 V 样抗原-1(EVA-1)、 γ -干扰素(IFN- γ)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-8、整连蛋白- β (ITGB-1)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、核转录因子- κ B(NF- κ B)、血小板-内皮细胞黏附分子-1(PECAM-1)和 P-选择素(SEL-P)。

2.2 下调基因(表 1): 实验组较

对照组表达下调的基因有凝血因子-III(F-III)、血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体-1(LOX-1)及丝氨酸蛋白酶抑制因子-1(SERPINE-1)。

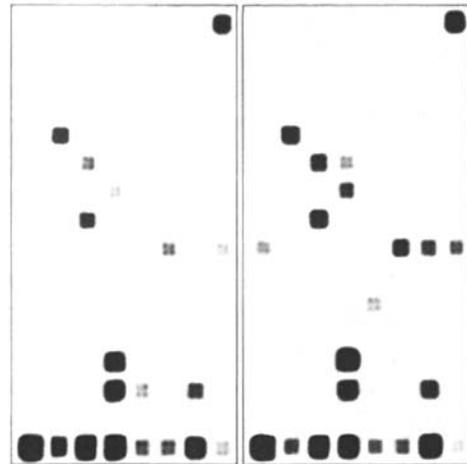


图 1 家族聚集性高血压患者(实验组,左)与健康对照者(对照组,右)心血管疾病标志物功能分类基因芯片扫描图片

3 讨论

以往对基因的研究多采用第 1 代基因表达谱芯片技术从基因水平研究疾病的分子机制^[1]。本研究中应用近年来发展起来的功能分类基因芯片技术, 对家族聚集性高血压患者的心血管疾病标志物基因表达进行研究。这种技术与表达谱芯片本质区别就

表 1 家族聚集性高血压患者较健康对照者表达上调和下调的心血管疾病标志物功能分类基因

基因库	上调基因名称	阴性	阳性	阴性	阳性	阳性/阴性
		原始值	原始值	标准值	标准值	标准值比值
NM_000041	载脂蛋白 E(ApoE)	4 390	6 203	0.007	0.018	2.51
NM_005797	上皮 V 样抗原-1(EVA-1)	4 346	6 285	0.006	0.020	3.08
NM_000619	γ -干扰素(IFN- γ)	6 184	9 745	0.041	0.088	2.12
NM_000576	白细胞介素-1 β (IL-1 β)	11 933	33 216	0.151	0.548	3.63
NM_000584	IL-8	7 832	16 577	0.073	0.223	3.04
NM_002211	整连蛋白- β (ITGB-1)	22 336	44 650	0.349	0.772	2.21
NM_004994	基质金属蛋白酶-9(MMP-9)	6 464	11 339	0.047	0.119	2.54
NM_003998	核转录因子- κ B(NF- κ B)	16 487	31 320	0.238	0.510	2.15
NM_000442	血小板-内皮细胞黏附分子-1(PECAM-1)	8 884	16 460	0.093	0.220	2.36
NM_003005	P-选择素(SEL-P)	10 350	17 776	0.121	0.245	2.03

基因库	下调基因名称	阴性	阳性	阴性	阳性	阳性/阴性
		原始值	原始值	标准值	标准值	标准值比值
NM_001993	凝血因子-III(F-III)	5 019	5 411	0.019	0.003	0.14
NM_002543	血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体-1(LOX-1)	5 188	5 420	0.022	0.003	0.13
NM_000602	丝氨酸蛋白酶抑制因子-1(SERPINE-1)	6 580	6 482	0.049	0.024	0.48

注: 实验数据的标准值低于 0.05(即原始值去背景后小于看家基因数值 5%)的基因, 其结果准确度较低

在于剔除了基因芯片上对研究对象毫无意义的基因,而保留了几百条或更少的基因,这些基因包括了那些与研究对象有确定关系的基因,或至少是与研究对象的关系有待考证的基因^[2],使用该技术可以缩短发现诊治高血压生物学标志物的时间。心血管疾病标志物基因芯片可用于分析与心血管疾病表现有关的 113 条基因表达水平改变。这一芯片依据最近心血管疾病的最新进展选定相关基因,是心血管疾病和卒中诊断及预后的标志物。动脉硬化和高血压,以及相关的炎症反应、细胞凋亡、细胞黏附所涉及的基因也包含在内。

本研究中,实验组较对照组表达上调的基因共 10 条,分别为 ApoE、EVA-1、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-8、ITGB-1、MMP-9、NF- κ B、PECAM-1 和 SEL-P 基因。其中 ApoE 与血液循环、细胞凋亡的诱导、脂质代谢等有关。ApoE 基因多态性与血压之间的关系颇为复杂,可能通过基因-基因及基因-环境间的相互作用,以直接或间接的方式影响血压。也有学者认为 ApoE 基因多态性不是高血压的主要危险因素,但它确实影响血压的变化^[3],而 de Knijff 等^[4]认为 ApoE 基因多态性与血压无关。EVA-1 与细胞膜的完整性、细胞黏附、蛋白结合、嗜同种细胞黏附等有关。IFN- γ 蛋白与细胞生长调节、免疫反应、表面受体耦联信号转导等有关。IFN- γ 既可促进血管内皮细胞表达主要组织相容性复合体 I (MHC-I) 类抗原的细胞因子,激活免疫活性细胞,加重血管内皮的损害,又可促使巨噬细胞和血管内皮细胞产生 IL-1、肿瘤坏死因子(TNF)和血小板源性生长因子(PDGF),促进血管平滑肌细胞和成纤维细胞增殖,使总的周围血管阻力增高,引起高血压^[5]。但也有研究发现,低浓度 IFN- γ 预孵育可有效防止大鼠血管内皮损伤^[6]。另有研究表明,IFN- γ 可直接诱导心肌细胞凋亡,同时可激活细胞内生长机制,导致心肌肥大^[7]。IL-1 β 可通过刺激内皮细胞表达白细胞黏附分子,使白细胞向缺血区浸润,释放各种炎症介质,并促进 IL-8、TNF- α 、克隆刺激因子和 IL-1 β 的自身合成,形成出血后损伤^[8]。MMP-9 主要在上皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞表达,降解 IV 和 V 型胶原。研究显示,维持血管腔内高压可诱发小鼠 MMP-9 和 MMP-2 激活^[9],心肌缺血/再灌注研究中 MMP-9 表达明显增强^[10]。同时有研究提示,高血压患者部分 MMP 过度表达,早期升高的 MMP-9、MMP-2、MMP-10 联合导致靶器官损伤^[11]。SEL-P 又称颗粒膜蛋白 GMP140 或 CD62,可以识别活化血小板膜

蛋白抗原,准确判断血小板活化程度。Schumacher 等^[12]发现脑梗死患者炎性细胞和 SEL-P 表达升高,SEL-P 是血小板活化的标志物,并且炎症反应加重了卒中中损害。NF- κ B 体系广泛参与机体防御反应,组织损伤和应激,细胞分化和凋亡以及肿瘤生长抑制过程的信息传递。研究表明,心肌细胞间黏附分子-1(ICAM-1)过度表达及其介导的炎性细胞浸润在高血压左室肥厚的发病过程中具有重要作用^[13]。本研究发现,参与细胞-细胞黏附的 EVA-1、与细胞基质黏附有关的 ITGB-1、与生长因子和其他细胞黏附分子有关的 PECAM-1 基因在高血压及其他心血管疾病研究中尚未见报道,有待于进一步探讨。

另外,本研究还发现实验组较对照组 F- II 、LOX-1 及 SERPINE-1 基因表达下调,表明它们在家族聚集性高血压时起到保护作用。LOX-1 是日本学者 Sawamura 等^[14]于 1997 年首先在牛主动脉内皮细胞上发现和鉴定的,它主要表达于血管内皮细胞、平滑肌细胞和单核/巨噬细胞。体外研究证实血管紧张素 I (Ang I) 和内皮素-1 分别通过其受体上调内皮细胞 LOX-1 表达,而高血压患者血液中 Ang I 和内皮素-1 水平往往升高,提示 LOX-1 可能与高血压关系密切^[15]。但本实验结果显示 LOX-1 在家族聚集性高血压中表达下调,可见与以上结论还有矛盾之处,尚需进一步研究。而与凝血相关的 F- II 和与细胞外分子蛋白酶抑制剂、凝血相关的 SERPINE-1 两种基因尚未见相关的研究报道。

Chon 等^[16]对原发性高血压患者研究发现,未进行有效治疗的患者较健康对照组血样有 680 条基因呈显著差异性高表达,而血压得到良好控制的患者血样中仅有 7 条基因呈显著表达上调,并且这些基因大多数与细胞炎症和氧化应激活动有关。该项研究表明原发性高血压与基因表达有关,药物治疗在控制血压的同时,还可以抑制这种基因表达水平的上调。本实验结果与该项研究结果相似,也显示促炎症相关基因表达上调,表明家族聚集性高血压与炎症活动密切相关。

总之,本研究结果表明,家族聚集性高血压是一种涉及多种功能基因参与的疾病,对于本研究发现的 13 条相关基因,将在以后的研究中予以验证。对相关未知基因的功能进行深入分析,并期望通过对这些差异基因的研究为家族聚集性高血压的诊断和基于基因水平的治疗提供依据。

参考文献

- [1] 李志军,李银平,盖慧荣,等. 腺毒症大鼠肝组织基因表达的研

究. 中国危重病急救医学, 2007, 19: 156-159.

[2] 王娜, 黄志刚, 陈锡美, 等. 肥胖与大肠腺瘤关系的临床及分子机制. 世界华人消化杂志, 2008, 16: 3283-3288.

[3] Katsuya T, Sato N, Asai T, et al. Association of polymorphism in the promoter region of the apolipoprotein E gene with diastolic blood pressure in normotensive Japanese. *Hypertens Res*, 2000, 23: 271-275.

[4] de Knijffp, Boomsma DI, Feskens EJ, et al. Apolipoprotein E phenotype and blood pressure. *Lancet*, 1994, 343: 1234-1235.

[5] 张国安, 徐国焱. 高血压患者血浆细胞因子的测定及其临床意义. 中国高血压杂志, 1994, 2: 94-95.

[6] 周荣, 刘良明, 胡德耀, 等. γ -干扰素对过氧化氢诱导血管内皮氧化应激损伤的作用研究. 中国危重病急救医学, 2009, 21: 540-543.

[7] Ikeda Y, Takeuchi K, Kato T, et al. Transcriptional suppression of rat angiotensin AT1a receptor gene expression by interferon-gamma in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 262: 494-498.

[8] Blamire AM, Anthony DC, Rajagopalan B, et al. Interleukin-1beta-induced changes in blood-brain barrier permeability, apparent diffusion coefficient, and cerebral blood volume in the rat brain: a magnetic resonance study. *J Neurosci*, 2000, 20: 8153-8159.

[9] Lehoux S, Lemarié CA, Esposito B, et al. Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. *Circulation*, 2004, 109: 1041-1047.

[10] 吴黎明, 范林, 陈良龙. 强力霉素预处理减轻在体大鼠心肌缺血/再灌注损伤及基质金属蛋白酶-1/9 的表达. 中国危重病急救医学, 2007, 19: 679-682.

[11] Friese RS, Rao F, Khandrika S, et al. Matrix metalloproteinases; discrete elevations in essential hypertension and hypertensive end-stage renal disease. *Clin Exp Hypertens*, 2009, 31: 521-533.

[12] Schumacher H, Kaiser E, Schnabel PA, et al. Immunophenotypic characterisation of carotid plaque; increased amount of inflammatory cells as an independent predictor for ischaemic symptoms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2001, 21: 494-501.

[13] 占成业, 陶秀良, 田橙, 等. 细胞间黏附分子-1 在高血压左室肥厚发病中的作用及丹参酮 I A 对其表达的影响. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11: 208-211.

[14] Sawamura T, Kume N, Aoyama T, et al. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature*, 1997, 386: 73-77.

[15] Nagase M, Kaname S, Nagase T, et al. Expression of LOX-1, an oxidized low-density lipoprotein receptor, in experimental hypertensive glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11: 1826-1836.

[16] Chon H, Gaillard CA, van der Meijden BB, et al. Broadly altered gene expression in blood leukocytes in essential hypertension is absent during treatment. *Hypertension*, 2004, 43: 947-951.

(收稿日期: 2010-06-19) (本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

自体脂肪移植后脓毒症

自体脂肪移植由于众多显著疗效正在成为一种越来越流行的技术。保证无菌技术操作和手术中在组织层小剂量注射是取得良好疗效的关键。虽然自体脂肪移植不良反应的报告不多, 但有些报告也出现了感染和美容方面的并发症。其中 1 例发生了包括脓肿形成、致命脓毒症和残余畸形在内等极端并发症发生。这个案例提醒人们, 在没有对关键原则和技术水平有很好把握的情况下, 仓促实施手术治疗可能会产生灾难性后果。此外, 医师在对患者做任何治疗时必须了解疗法有无并发症发生的可能, 并能以有效手段来处理。

崔倩, 编译自《Plast Reconstr Surg》, 2010, 126: e162-164; 尹明, 审校

脓毒症中的自然杀伤 T 细胞

脓毒症是目前导致医院重症监护病房患者的主要死因。既往研究表明, 脓毒症病理生理学涉及到复杂的促炎症级联反应, 其中包括不同类型免疫细胞的激活和促炎症细胞因子分泌增加。自然杀伤 T 细胞(NKTs)是 T 细胞的一种亚型, 具备传统 T 细胞和自然杀伤细胞(NK 细胞)先天性及适应性免疫的共同之处。最近研究发现, NKT 细胞与微生物免疫相关, 可能参与了脓毒症的发生。此外, 除了众所周知的脂质代谢机制外, 载脂蛋白 E(ApoE)与富含三酰甘油蛋白成分在脓毒症和革兰阴性杆菌感染等疾病中发挥保护作用。美国加州大学的研究人员以此提出将重新考虑 NKT 细胞在脓毒症和脓毒性休克中的作用, 以及 ApoE 在宿主免疫反应中的免疫调节作用, 从而探索免疫调节的新机制。

崔倩, 编译自《Clin Dev Immunol》, 2010-10-04(电子版); 尹明, 审校

单纯胸外按压与标准心肺复苏效果的荟萃分析

院外心搏骤停时目击者只行胸外按压的心肺复苏(CPR)可能优于标准 CPR, 即胸外按压的同时予以通气, 但目前还没有明显改善的结果。通过检索 Medline 和 Embase 数据库, 研究人员系统回顾了从 1985 年 1 月至 2010 年 8 月发表的相关研究, 比较由目击者只行胸外按压和行标准 CPR 的院外心搏骤停患者的效果。在初级荟萃分析中, 研究者将接受这两种方式急救的患者随机分组, 在二级荟萃分析中, 观察了只行胸外按压 CPR。初级荟萃分析中的随机试验结果显示, 胸外按压 CPR 比标准 CPR 有更高的存活率, 显著增长了 2.4%; 二级荟萃分析的结果显示无明显差异。由此推出, 对于院外心搏骤停的成年患者应优先采取只行胸外按压的 CPR。

崔倩, 编译自《Lancet》, 2010, 376: 1552-1557; 尹明, 审校