

家族聚集性高血压 Wnt 信号通路基因表达的研究

张巍 王志禄 石守兰 吴增颖 熊建文 杨小芳 马纪琳

【摘要】 目的 探讨 Wnt 信号通路是否参与家族聚集性高血压的形成。方法 选择 3 代以上直系亲属具有原发性高血压病史的患者作为观察组,并选择健康体检者作为对照组。采用实时定量聚合酶链反应(PCR)芯片检测外周血 Wnt 信号通路功能分类基因的表达。采用 $\Delta\Delta Ct$ 方法,以观察组/对照组基因表达大于 2.0 倍的基因为差异表达基因。结果 与对照组相比,观察组 Wnt 信号通路功能分类基因表达大于 2.0 倍的基因共有 6 条,其中 5 条上调,1 条下调。上调基因包括 Bcl-9、小眼畸形相关转录因子(Mitf)、分泌性卷曲相关蛋白-1(Sfrp-1)、Wnt 抑制因子-1(Wif-1)、核糖体蛋白-113a(Rp-113a);下调基因包括 Dickkopf 同系物-3(Dkk-3)。结论 Wnt 信号通路参与了家族聚集性高血压的发生发展。

【关键词】 高血压,家族聚集性; 基因芯片; 信号通路

A study on expression of Wnt signal pathway gene in familial aggregated hypertension ZHANG Po*, WANG Zhi-lu, SHI Shou-lan, WU Zeng-ying, XIONG Jian-wen, YANG Xiao-fang, MA Ji-lin.
*Department of Cardiology, Dingxi City Second People's Hospital, Dingxi 743000, Gansu, China
Corresponding author: WANG Zhi-lu, Department of Cardiology, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China, Email: wangzhilu@medmail.com.cn

【Abstract】 Objective To determine the role of gene expression of Wnt signal pathway in the pathogenesis of familial aggregated hypertension. Methods The patients having directly related family members for more than three generations suffering from hypertension were enlisted in the hypertension group, and healthy individuals served as control group. The real-time polymerase chain reaction (PCR) gene array was used to detect the expression of functional classification genes of Wnt signal pathway in peripheral blood, with standard value deviated > 2.0 from hypertension group/control group as differential genes. Results When hypertension group was compared with the control group, there were 6 differentially expressed genes, with 5 genes up-regulated, including Bcl-9, microphthalmia associated transcription factor (Mitf), secreted frizzled-related protein-1 (Sfrp-1), Wnt inhibiting factor-1 (Wif-1) and ribosomal protein-113a (Rp-113a). There was 1 gene down-regulated, i. e. dickkopf homolog-3 (Dkk-3). Conclusion The result of this study suggested that the Wnt signal pathway may be related to the occurrence and development of the familial aggregated hypertension.

【Key words】 Familial aggregated hypertension; Gene array; Signal pathway

原发性高血压具有家族聚集性发病特点,且与多条信号转导通路的参与有关。Wnt 通路是与肿瘤发生发展及脊椎动物胚胎发育有重要关系的细胞信号通路,近年发现其在心血管系统与早发冠心病、动脉粥样硬化、代谢综合征都有一定关系。Wnt/ β -连环蛋白(β -cat)通路的激活可导致高血压心肌肥厚。在成熟并正常生长的机体中,心肌细胞内几乎没有或仅有少量游离的 Wnt/ β -cat 蛋白,Wnt/ β -cat 信号通路处于相对静止状态,但在自发性高血压心肌肥厚小鼠中,心肌 Wnt/ β -cat、分泌型糖蛋白[即卷曲蛋白-1(Fzd-1)]、Wnt 信号元件 dishevelled-1(Dvl-1)、淋巴细胞增强因子-1(LEF-1)大量表

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.06.009

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:743000 甘肃,定西市第二人民医院心内科(张巍、马纪琳),兰州大学第一医院心内科(王志禄、吴增颖、熊建文、杨小芳),神经外科(石守兰)

通信作者:王志禄,Email:wangzhilu@medmail.com.cn

达^[1-2]。然而,在主动脉结扎致小鼠心肌肥厚模型中, β -cat 下调却导致心肌肥厚,与血管紧张素 I 致小鼠心肌肥厚模型中得出 β -cat 下调可改善适应性心肌肥厚的结论相反^[3-4]。因此,目前有关 Wnt-Fzd 信号通路与高血压心肌肥厚关系的结论并不一致。Wnt 蛋白参与细胞增殖、分化、凋亡以及控制细胞定位等过程,在无脊椎和脊椎动物心脏发育过程中也起到关键作用。但是,有关 Wnt 信号通路在人类原发性高血压方面的研究鲜有报道。本研究中选择家族聚集性高血压患者,采用实时定量聚合酶链反应(PCR)芯片检测其外周血 Wnt 信号通路功能分类基因表达,旨在探讨 Wnt 信号通路是否参与家族聚集性高血压的形成,理清该病的发病机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象:选择兰州大学第一医院心内科门诊就诊的高血压患者 5 例,经筛查 3 代以上直系亲属具有原发性高血压病史的家族聚集性患者作为观察

组, 静息状态下不同日 3 次血压 $\geq 140/90$ mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa); 排除肾脏、内分泌等其他疾病引起继发性高血压者, 合并其他影响血压变化的急慢性疾病的患者。另选取符合芯片检测要求的健康体检志愿者 5 例作为对照组。两组例数、性别、年龄及生化检查等均无选择性偏倚, 有可比性。本研究符合医学伦理学标准, 并经医院伦理委员会批准。

1.2 样本采集: 取静脉血 0.2 ml, 加入含 0.75 ml TRIzol 裂解液的试管中, 加入 1.25 mol/L 醋酸 20 μ l, 经 TRIzol 裂解后置干冰中, 送至上海康成生物公司进行后续实验。

1.3 基因表达的检测及方法: 用 TRIzol 一步法抽提 RNA, 合成 cRNA 保存备检。采用实时定量 PCR 进行测定: 准备好样品后打开 PCR 芯片上的膜, 加 10 μ l 混合液到 PCR 芯片对应的每个孔中, 加盖密封 PCR 芯片, 并且在设置 PCR 程序前将准备好的 PCR 芯片放在冰上。实时定量 PCR 程序设置后将 PCR 芯片置于实时定量 PCR 仪进行 PCR 反应。

1.4 数据分析: 采用 $\Delta\Delta Ct$ 方法计算观察组和对照组中每个通路相关基因的 ΔCt , 计算两组每个基因的 $\Delta\Delta Ct$, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算观察组与对照组对应基因的表达差异。以观察组/对照组基因表达大于 2.0 倍的基因为差异表达基因, 如倍数为正值则表示上调, 负值为下调。

2 结果

Wnt 信号通路基因包括 84 条与 Wnt 介导的信号转导相关基因, 其中 19 条糖基化细胞外信号分子属于 Wnt/Fzd-2 通路, 以及 Wnt 基因配体的细胞表面受体、细胞内信号分子和涉及生长调节和增殖有关的靶基因, 还包含了涉及 Wnt 信号蛋白修饰下游的基因, 包括与激酶和磷酸酶活性以及泛蛋白化作用有关的基因。本研究中对家族聚集性高血压患者 Wnt 信号通路基因表达进行了研究, 表 1 结果显示, 与对照组相比, 观察组 Wnt 信号通路基因表达大于 2.0 倍的基因有 6 条, 其中 5 条上调, 包括

Bcl-9、小眼畸形相关转录因子 (Mitf)、分泌性卷曲相关蛋白-1 (Sfrp-1)、Wnt 抑制因子-1 (Wif-1)、核糖体蛋白-l13a (Rp-l13a); 1 条下调, 为 Dickkopf 同系物-3 (Dkk-3)。

3 讨论

Wnt 蛋白是一组富含半胱氨酸的糖基化蛋白, 在多种组织细胞中均有表达, 通过自分泌或旁分泌的方式激活膜受体而发挥作用, 参与细胞的增殖、分化、凋亡以及控制细胞的定位等过程^[5]。在胚胎发育期, Wnt 信号失调会造成夭折或发育缺陷, 在成体中则会导致包括癌症在内的多种疾病的发生^[6-7]。Wnt 蛋白家族包括 16 个成员, 可分为 Wnt1 类和 Wnt5a 类。两类蛋白的不同功能可能反映了不同的信号转导机制: Wnt1 类蛋白倾向于通过 β -cat 转导信号, 称为经典途径; Wnt5a 类蛋白可刺激细胞内 Ca^{2+} 释放而称为非经典途径或 Wnt/ Ca^{2+} 通路。

本研究显示, 观察组表达上调的 Bcl-9、Mitf、Sfrp-1、Wif-1、Rp-l13a 基因蛋白和下调的 Dkk-3 基因蛋白均位于 Wnt 信号通路中, 可能参与了高血压心肌细胞增殖分化相关的细胞信号转导过程; 而与 B 细胞慢性淋巴细胞白血病、淋巴瘤有关的 Bcl-9 基因在家族聚集性高血压患者中表达上调难以阐释。

Wnt 信号通路由 Fzd 膜受体、 β -cat 细胞内蛋白、T 细胞样转录因子 (TCF/LEF) 等构成。正常发育成熟的细胞中缺乏 Wnt 信号表达, 该信号途径处于关闭状态^[8]。当 Wnt 通路中 β -cat 蛋白在胞质内的降解受阻而出现异常聚积并转位至细胞核时, 原本关闭的 Wnt 信号通路活化, 核内的 β -cat 与转录因子 Lef 结合, 激活 c-myc 等下游靶基因。在成熟并正常生长的机体中, 心肌细胞内几乎没有或仅有少量游离的 β -cat 蛋白存在, Wnt/ β -cat 信号通路处于一个相对静止状态^[1]。裴兆辉等^[9]研究显示, 肥厚心肌中 Wnt/ β -cat 信号通路发生变化, 与正常心肌细胞比较, 肥厚心肌细胞 β -cat 在胞质中异常聚积, c-myc 蛋白表达增加。在正常心肌细胞中 β -cat 基因

表 1 观察组较对照组表达大于 2.0 倍的 Wnt 信号通路基因比较

组别	方法	Bcl-9	Mitf	Sfrp-1	Wif-1	Rp-l13a	Dkk-3
观察组	AVG Δ Ct(Ct(GOI)-AveCt(HKG))	8.39	10.20	7.37	10.24	4.41	12.88
	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	1.3×10^{-4}	8.5×10^{-4}	6.1×10^{-3}	8.3×10^{-4}	4.7×10^{-2}	3.0×10^{-3}
对照组	AVG Δ Ct(Ct(GOI)-AveCt(HKG))	10.27	1.4	11.44	11.44	6.55	11.28
	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	4.0×10^{-4}	3.6×10^{-4}	3.6×10^{-4}	3.6×10^{-4}	1.1×10^{-2}	8.1×10^{-4}
倍差(观察组/对照组)		3.67	2.36	16.82	2.30	4.39	0.33
上调或下调倍数(观察组/对照组)		3.67	2.36	16.82	2.30	4.39	-3.04

注, Mitf, 小眼畸形相关转录因子, Sfrp-1, 分泌性卷曲相关蛋白-1, Wif-1, Wnt 抑制因子-1, Rp-l13a, 核糖体蛋白-l13a, Dkk-3, Dickkopf 同系物-3

受抑制;而在肥厚心肌细胞中,由于 β -cat 蛋白在胞质内异常聚积,转位至细胞核,使 Wnt/ β -cat 通路活性增强,导致 c-myc 基因过表达,心肌细胞过度增生。本研究结果提示,Wnt 信号通路也参与了家族聚集性高血压的发生发展。

总之,血压的调节涉及多个基因的相互作用。心肌和血管平滑肌的增殖也参与了高血压的发生发展过程。如果只研究单一基因,有时可能难以发现基因对血压的作用,所以研究基因与基因的相互作用,可能更接近高血压的发病本质。家族聚集性高血压相关基因的研究是原发性高血压发病机制研究的一部分,本课题组曾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,结果表明家族聚集性高血压涉及多种心血管标志物基因,尤其与凝血相关的 F-Ⅱ 和与细胞外分子蛋白酶抑制剂、凝血相关 SERPINE-1 两个基因有关^[10]。本研究在前期研究基础上采用第 2 代功能分类基因芯片技术,对家族聚集性高血压患者 Wnt 信号通路进行研究,结果表明基因芯片技术是目前较为理想的研究方法,使用针对该类基因的功能分类基因芯片也更为有效、便利。

参考文献

[1] Sugimachi K, Tanaka S, Kameyama T, et al. Transcriptional

repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res, 2003, 9, 2657-2664.

[2] Armstrong DD, Esser KA. Wnt/ β -catenin signaling activates growth-control genes during overload-induced skeletal muscle hypertrophy. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, 289, C853-859.

[3] Chen X, Shevtsov SP, Hsieh E, et al. The β -catenin/T-cell factor/lymphocyte enhancer factor signaling pathway is required for normal and stress-induced cardiac hypertrophy. Mol Cell Biol, 2006, 26, 4462-4473.

[4] Baurand A, Zelarayan L, Betney R, et al. β -catenin down-regulation is required for adaptive cardiac remodeling. Circ Res, 2007, 100, 1353-1362.

[5] Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. Cell, 2006, 127, 469-480.

[6] Johnson ML, Rajamannan N. Diseases of Wnt signaling. Rev Endocr Metab Disord, 2006, 7, 41-49.

[7] Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. Curr Opin Genet Dev, 2007, 17, 45-51.

[8] Meirmanov S, Nakashima M, Rogounovitch T, et al. Small cell carcinoma of the endometrium, report of a case with analysis of Wnt/ β -catenin pathway. Pathol Res Pract, 2003, 199, 551-558.

[9] 裴兆辉, 马虹, 朱妙章, 等. 心肌肥厚时 β -catenin 和 c-myc 的变化. 心脏杂志, 2006, 18, 640-642.

[10] 王志禄, 吴增颖, 杨小芳, 等. 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. 中国危重病急救医学, 2010, 22, 684-687.

(收稿日期: 2010-10-06)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

微点阵和功能性聚类分析能够反映失血性休克模型猪内皮细胞凋亡的转化生长因子水平

创伤引起的大量失血导致广泛的组织缺氧、无氧代谢、炎症细胞因子产生以及有害氧化分子进入血管内皮。尽管创伤相关的血管内皮细胞病理生理学已被广泛研究,但对这一过程中基因转换的变化了解甚少,特别是内皮方面。因此,美国研究人员采用荧光微点阵分析基因转录,以探讨内皮功能障碍方面的基因产物。研究人员选用 10 只约克夏种白猪制备创伤失血性休克模型,在失血 35% 后进行 6 h 的完全复苏。通过可视化集成 DAVID 软件对主动脉内皮进行微点阵和聚类分析。结果显示:创伤后猪发生了严重酸中毒、凝血功能紊乱以及微观下的缺血/再灌注损伤。1 007 个转录因子下调的同时有 529 个转录因子上调,DAVID 功能聚类分析表明 21 项显著改变,被分为 12 个不同功能类别,其中转化生长因子- β (TGF- β)最为相关;另外,血管内皮生长因子(VEGF)信号成员和白细胞化学诱导物都发生了改变。研究人员鉴别出了 TGF- β 和 VEGF 两种不同的信号通路,它们在血管内皮细胞损伤中都经历了早期转录改变。研究者由此得出结论:TGF- β 和 VEGF 在血管内皮细胞损伤中发挥了重要作用,促进了创伤休克过程中血管通透性增加。

钟毓贤, 编译自《J Physiol》, 2011-03-14(电子版); 胡森, 审校

四肢缺血预处理能够减轻失血性休克再灌注引起的肺损伤

失血性休克(HS)以及随后的再灌注会引起急性肺损伤。中国台湾的研究人员近日对双下肢缺血预处理(IP)是否可以减轻 HS 或再灌注引起的肺损伤进行了研究,同时也对血红素氧合酶-1(HO-1)的作用机制进行了探讨。学者们将成年雄性大鼠随机分为假休克组、HS 组、HS+IP 组、HS+IP+HO-1 抑制剂锡原叶啉(SnPP)组,每组 12 只。通过放血使平均动脉压降至 40~45 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)并维持 120 min 制备动物 HS 模型,回输失血或生理盐水进行复苏。IP 组在失血前迅速完成 3 个周期的肢体 IP; SnPP 组在复苏前 5 min 注入 SnPP。监测动脉血气、肺泡动脉氧差异(肺功能指标); 8 h 后处死大鼠检测肺组织中多核白细胞在肺泡内的比值(白细胞浸润指数)、湿/干重比值(含水量指标)、炎症分子、细胞因子(如趋化因子、前列腺素 E₂)、丙二醛(脂质过氧化反应指标)。结果显示:HS 或再灌注可以引起明显的肺功能改变,白细胞浸润、含水量、炎症和脂质过氧化在肺部均增加。组织学分析也证实 HS 或再灌注能够引起明显的肺损伤。肢体 IP 可以显著减轻 HS 或再灌注的严重程度,而 SnPP 能够逆转肢体 IP 的保护作用。研究人员得出结论:肢体 IP 可以缓解 HS 或再灌注大鼠肺损伤程度,其机制可能与 HO-1 有关。

钟毓贤, 编译自《J Surg Res》, 2011-03-05(电子版); 胡森, 审校