研究报告

血压的性别差异与小鼠肾脏钠离子通道的关系

王伟,俞国峰,程梦婷,赵蓉,刘珍*

(温州医科大学,检验医学院生命科学学院,浙江省遗传学重点实验室,浙江 温州 325035)

【摘要】 **目的** 研究雌雄小鼠的血压、肾脏尿钠排泄以及相关的肾脏钠离子通道和信号通路,初步探讨血压的性别差异与肾脏钠离子通道的关系。**方法** 选取成年雌雄小鼠,用无创血压仪检测小鼠血压,火焰分光光度计测量小鼠血、尿钠离子浓度,Real-time PCR 和 Western-Blot 检测小鼠肾脏钠氯同向转运体(NCC)、钠钾氯同向转运体(NKCC2)、上皮钠离子通道(ENaC)的表达水平,以及上游的缺乏赖氨酸的丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(WNK 激酶)的 mRNA 水平。**结果** 雌鼠血压低于雄鼠,尿钠排泄高于雄鼠,NCC、NKCC2 的 mRNA 和蛋白水平均明显增加,ENaC 无明显差异,WNK4 显著升高,WNK1 无差异。**结论** 雌鼠血压低于雄鼠可能是由雌鼠尿钠排泄增加导致,WNK4-NCC/NKCC2 信号通路参与其调控。

【关键词】 性别;血压;钠离子通道;WNK;小鼠
【中图分类号】R-332 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2016)09-0013-06
doi: 10.3969.j.issn.1671 – 7856. 2016.09.003

Relationship between gender difference of blood pressure and sodium ion channels in the kidney of mice

WANG Wei, YU Guo-feng, CHENG Meng-ting, ZHAO Rong, LIU Zhen*
(Wenzhou Medical University, School of Laboratory Medicine and Life Science, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical, Wenzhou 325035, China)

【**Abstract**】 **Objective** Study on the blood pressure, renal sodium excretion, related renal sodium ion channels and signaling pathways between male and female mice, to investigate the relationship between gender differences in blood pressure and renal sodium ion channel. **Methods** Blood pressure of adult female and male mice was measured using tail-cuff sphygmomanometer. Plasma and urine electrolytes were performed using flame photometer. Protein levels of renal sodium transporters NCC, NKCC2, ENaC were determined by western blot, mRNA levels of these transporters and the upstream With No lysine (WNK) kinases were determined by Real-time PCR. **Results** The blood pressure of female mice was significantly lower than that of male mice. Renal sodium excretion and mRNA levels of NCC&NKCC2 were increased significantly in female mice. No obvious difference was observed in ENaC. The mRNA level of WNK4 was increased while no change in WNK1. **Conclusions** The lower blood pressure of female mice may caused by increasing renal sodium excretion and WNK4-NCC/NKCC2 signaling pathway involved.

【**Key words**】 Gender; Blood pressure; Sodium ion channels; WNK; Mice

血压存在两性差异,女性在绝经前的血压和高血压的患病率均低于男性,其具体机制尚未完全阐明[1,2]。血压的调控受多种因素影响[3],其中肾脏起着至关重要的作用[4,5]。已有报道,肾脏主要通

[基金项目]国家自然科学基金(81300709);浙江省自然科学基金(LY13H070007)。
[作者简介]王伟(1986 –),男,研究生,专业:生物学。E-mail: aster2103@126.com。
[通讯作者]刘珍(1975 –),女,教授,研究生导师,研究方向:肾脏生理学。E-mail: zhenliuus@163.com。

过肾素血管紧张素醛固酮(RAAS)系统[6]调节离子转运[7]以维持血压平衡。大量的研究表明,性别与RAAS 系统密切相关[8-12]。其中肾脏中参与血压调节的钠离子转运蛋白有钠氯同向转运体(NCC),钠钾氯同向转运体(NKCC2)以及上皮钠离子通道(ENaC)等[13]。

近来研究发现,NCC/NKCC2 受 WNK- SPAK/OSR1-NCC/NKCC2 信号通路的调节[14-16]。WNK 激酶是丝氨酸/苏氨酸激酶家族新成员,自 2001 年耶鲁大学首次提出 WNK 突变会导致一种新型的家族性高血钾高血压(FHHt)后,WNK 激酶对肾脏离子通道影响的研究成为热点。

本研究通过分析雌、雄小鼠的血压、肾脏钠离子通道以及 WNK 信号通路的异同,以期发现它们之间的关联,初步探讨血压的性别差异与肾脏钠离子通道的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物

20~24 周龄的 SPF 级 C57BL/6J 雌、雄小鼠各 10 只,体重 20~25 g,购于上海斯莱克实验动物有限公司[SCXK(沪)2012-0002]。动物实验均于温州医科大学实验动物中心[SYXK(浙)2015-0009]进行,实验中涉及的动物操作均遵守实验动物使用的 3R 原则。

1.2 主要仪器及试剂

仪器:小鼠代谢笼购自北京佳源兴业科技有限公司;小鼠无创血压计(BP-98A)购自日本 Softron 公司;火焰分光光度计(PFP7)购自英国 JENWAY 公司;蛋白电泳仪(Bio-Rad 通用蛋白电泳及转膜系统);蛋白印迹成像系统(Bio-Rad Chemi Doc MP);Real-time PCR System(Bio-Rad:CFX96 系统)。

试剂:TRIzol © RNA 分离试剂购自 Life Technologies;反转录试剂盒(Takara);荧光定量试剂盒 SYBR(Bio-Rad);蛋白浓度定量试剂盒(Thermo Fisher Scientific)。

抗体:兔抗鼠 NCC (Stress Marq);兔抗鼠 NKCC2 (Stress Marq);兔抗鼠 WNK4 (Alpha Diagnostic);兔抗鼠 ENaC (Alonmone);兔抗鼠 β-actin (Beyotime)。

1.3 血压的测量

采用尾套法测量小鼠尾动脉血压。小鼠在训练 3 d 后每天固定时间测量至少 20 个循环,持续测量 5~7 d 的血压。

1.4 血钠与尿钠的检测分析

血钠:小鼠麻醉后眼眶静脉取血,低速离心取上清,用火焰光度计检测血清钠水平。

尿钠:小鼠置于代谢笼,期间供给常规饲料和自由饮水,待其稳定后收集尿样,用火焰光度计检测尿钠离子浓度。

1.5 肾脏相关蛋白分子的检测

1.5.1 转录水平—Real-time PCR

小鼠麻醉后取肾脏,按照 TRIzol 试剂盒操作说明裂解分离提取总 RNA,经反转录后得到 cDNA,按照 Real-time PCR 仪器操作要求进行荧光定量分析。其中所用的引物序列如下:

Renin (F:5'-ATGAAGGGGGTGTCTGTG-3';R:5'-ATGTCGGGGGAGGGTGGGC-3');

NCC (F:5'-GGGTTTGTGTCATGAGGAT-3';R:5'-AGATGGTGCTAGCCTGCT-3');

NKCC2 (F:5'-CCAGAGCGTTGTCTAAAGC-3';R:5'-TGGGCAGCTGTCATCACTTA-3');

WNK4 (F:5'-GCGGAGGAGGTGGCT-3';R:5'-GCCACTGGCTGGTAGTCA-3');

WNK1 (F:5'-GTCTGGACACCGAAACCAC-3';R:5'-AGAAACTACTAGTAGTAGCAAAATCCT-3');

Cyclophilin (F:5'-CGTGGCTCCGTTGTCTT-3;R:5'-TGACTTTAGGTCCCTTCTTCT-3')。

1.5.2 蛋白水平—Western-blot

小鼠麻醉后取肾脏,裂解提取总蛋白,经 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转移至 PVDF 膜。一抗均为兔抗鼠单克隆抗体,稀释度为 1:2000。为避免免疫印迹不同标本蛋白量不同造成的影响,免疫印迹结果用 β-actin 进行矫正。二抗均为山羊抗兔单克隆抗体,稀释度为 1:4000。

1.6 数据统计分析

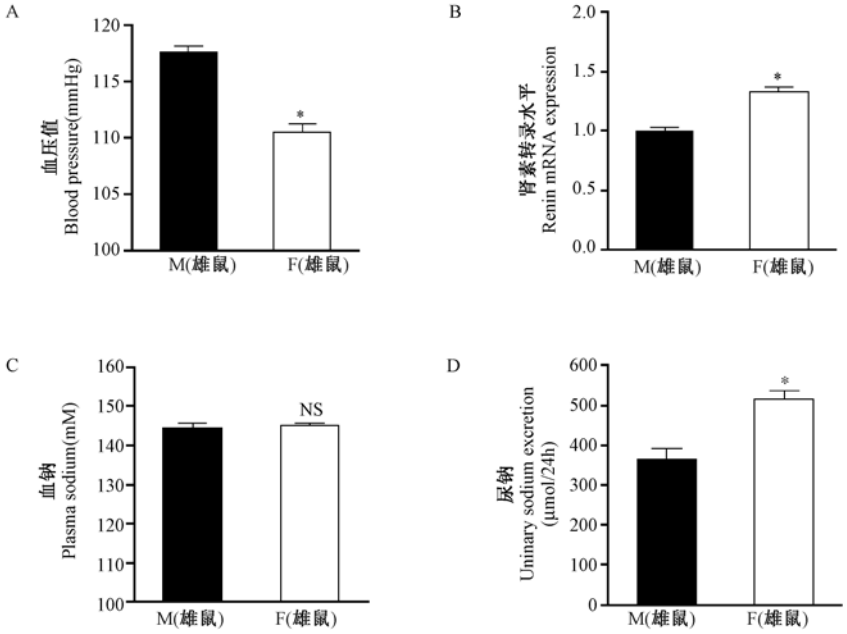
所有数据均运用 SPSS20.0 软件进行数据分析处理。蛋白印迹结果用 ImageJ 软件进行分析处理,采用 Graph Pad 软件对数据进行作图分析;实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;组间差异性用 t 检验,$P < 0.05$,表示差异有统计学意义。所有数据均是独立重复三次以上实验得到。

2 结果

2.1 血压和钠代谢

基础状态下,雌鼠血压明显低于雄鼠(F:117.6±

0.54 vs M:110.0 ± 0.67 mmHg, $P < 0.05$, 图 1A), 伴随雌鼠肾素 mRNA 水平升高 50% (图 1B)。虽然雌、雄小鼠血钠水平无明显差异(图 1C), 但雌鼠尿钠排泄明显高于雄鼠(F:514.30 ± 23.1 vs M:365.0 ± 27.2 μmol/24 h, $P < 0.05$, 图 1D)。这提示雌鼠血压低于雄鼠可能是由雌鼠尿钠排泄增加导致。



注: $^{*}P < 0.05$; $^{NS}P > 0.05$, 与雄鼠相比。

图 1　雌雄小鼠的血压、肾素、血钠和尿钠的分析

Note. $^{*}P < 0.05$; $^{NS}P > 0.05$, compared with M group.

Fig. 1　Analysis of blood pressure, renin, plasma sodium level and urinary sodium excretion in male and female mice

2.2　肾脏钠离子通道蛋白

在肾脏钠分泌中起重要调控作用的钠离子通道蛋白主要有远曲小管的钠氯共转运体(NCC)、髓袢升支粗段的钠钾氯共转运体(NKCC2)和皮质集合管处的上皮钠离子通道蛋白(ENaC)。为研究雌、雄小鼠血压与肾脏钠离子通道的关系, 我们检测了上述通道的 mRNA 和蛋白水平表达量。

2.2.1　NCC(sodium chloride cotransporter)钠氯同向转运体

如图 2A 所示, Western-blot 结果显示, 与雄鼠相比, 雌鼠 NCC 蛋白表达量增加约 80%, Real-time PCR 显示雌鼠 NCC 的 mRNA 水平比雄鼠增加 70% (图 2B)。

2.2.2　钠钾氯共转运体(Na-K-2Cl cotransporter-2, NKCC2)

如图 3A 的 Western-blot 结果显示: 相对于雄鼠, 雌性小鼠 NKCC2 蛋白表达量升高一倍。Real-time PCR 显示雌鼠 NKCC2 的 mRNA 水平高于雄鼠约 60% (图 3B)。

2.2.3　ENaC-β(epithelial sodium channel)上皮钠离子通道蛋白

雌、雄小鼠 ENaC 转录水平和翻译水平表达差异无统计学意义(图 4A、4B)。

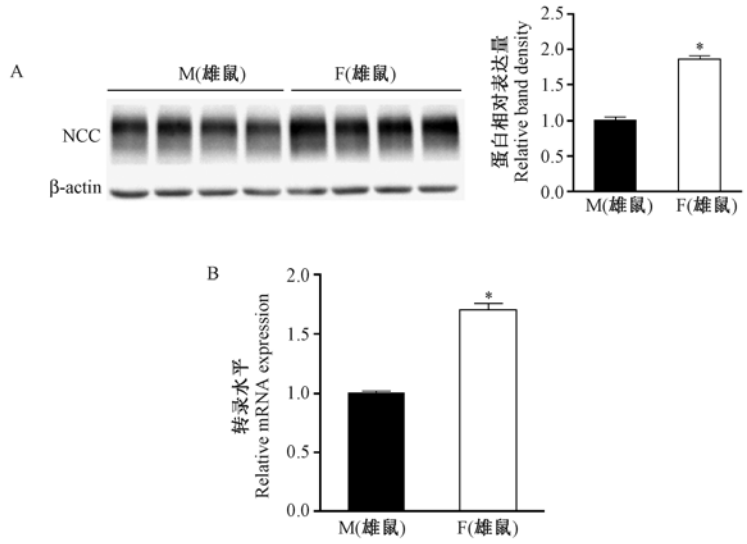
2.3　WNK 激酶

通过检测 WNK 激酶家族中的 WNK1 和 WNK4, 发现雌鼠肾脏 WNK4 转录水平高于雄鼠约 50% (图 5A), 而 WNK1 在雌、雄小鼠之间无显著差异(图 5B)。

3　讨论

大量研究表明, 血压存在着一定的性别差异, 已发现与同龄男性相比, 绝经前女性的血压较低, 但具体机制尚未阐明。我们发现雌鼠的血压低于雄鼠, 虽然之前 Swasti Tiwari[17] 报道雌、雄小鼠血压差别不明显, 可能是小鼠的背景不同, 或是血压测量方法不同导致。肾素-血管紧张素-醛固酮系统可维持血压的平衡, 我们的结果显示, 雌鼠肾素水平高于雄鼠, 可能是血压低导致的反馈性上升。

血压的调控受多方面影响, 其中肾脏钠离子的重吸收对维持血压的稳定起着重要调控作用。我

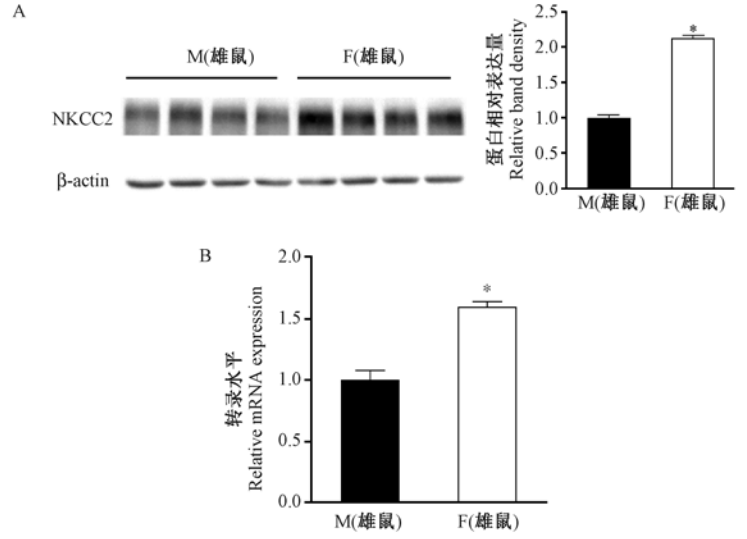


注:(A)蛋白印迹分析;(B)实时荧光定量分析;$^{*}P < 0.05$,与雄鼠相比。

图 2 雌雄小鼠肾脏 NCC 的表达

Note. A: Western-blot ; B: Real-time PCR analysis; $^{*}P < 0.05$, compared with M group.

Fig. 2 The expression of NCC in male and female mice



注:(A)蛋白印迹分析;(B)实时荧光定量分析;$^{*}P < 0.05$,与雄鼠相比。

图 3 雌雄小鼠肾脏 NKCC2 的表达

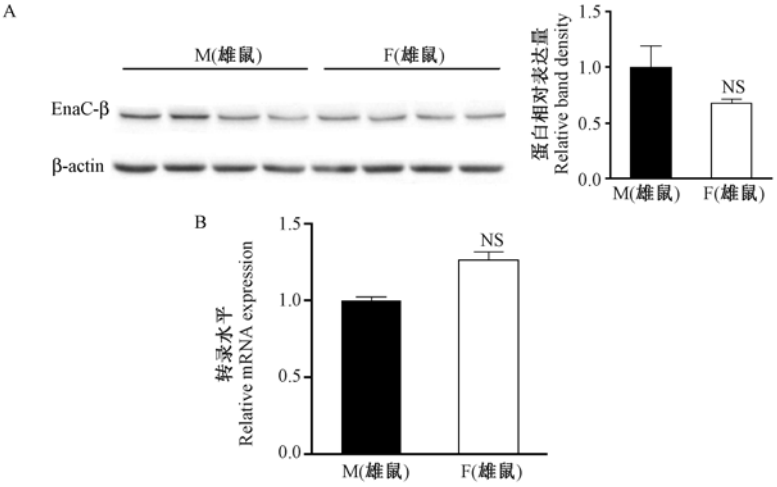
Note. (A) Western-blot ; (B) Real-time PCR analysis; $^{*}P < 0.05$, compared with M group.

Fig. 3 The expression of NKCC2 in male and female mice

们的研究发现,雌鼠尿钠排泄升高,这可能是导致雌鼠血压下降的一个重要因素。尿钠的排泄增加一般会伴随着肾脏钠离子转运通道的下降,但是我们的研究表明,NCC、NKCC2 的表达量上升,这和雌鼠血压下降、排钠增多的结果相悖,其具体机制未知,可能是钠排泄增加导致的 NCC、NKCC2 代偿性上升[18-23]。

已有研究表明,WNK 激酶与 SPAK/OSR1 形成的信号通路对 NCC &NKCC2 起着重要的调控作用,Rojas-Vega[24] 报道,雌鼠的 SPAK/OSR1 明显高于雄鼠,我们的结果显示,雌鼠 WNK4 的表达量明显高于雄鼠,WNK1 无统计学意义,提示 WNK4-SPAK / OSR1-NCC/NKCC2 信号通路可能参与雌雄小鼠血压差异的调控。

综上所述,不同性别小鼠之间存在血压差异,这一差异与肾脏的钠离子转运通道 NCC /NKCC2 以及 WNK4 激酶信号通路密切相关,其具体机制尚待进一步研究[25-27]。

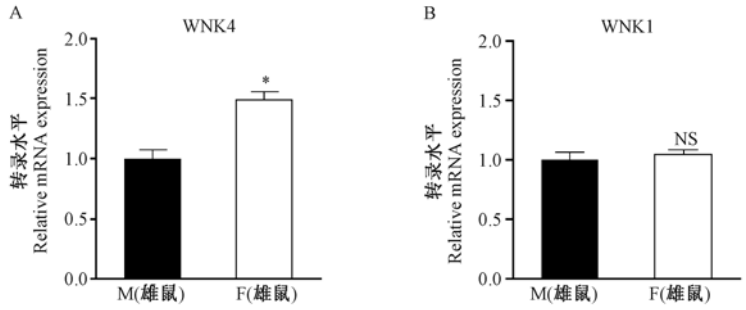


注：(A)蛋白印迹分析；(B)实时荧光定量分析；$^{NS}P > 0.05$，与雄鼠相比。

图 4　雌雄小鼠肾脏 ENaC-β 的表达

Note. (A) Western-blot ; (B) Real-time PCR analysis; $^{NS}P > 0.05$, compared with M group.

Fig. 4　The expression of ENaC-β in male and female mice



注：$^{*}P < 0.05$；$^{NS}P > 0.05$，与雄鼠相比。

图 5　实时荧光定量分析 WNK4 和 WNK1 的 mRNA 水平

Note. $^{*}P < 0.05$; $^{NS}P > 0.05$, compared with M group.

Fig. 5　Real-time PCR analysis of WNK4 and WNK1 mRNA expression

参考文献：

[1] Reckelhoff JF. Gender differences in the regulation of blood pressure [J]. Hypertension, 2001, 37(5):1199 – 1208.

[2] Antoinette PB, Michel B. Female sex hormones, salt, and blood pressure regulation [J]. American Journal of Hypertension, 2004, 17(10):994 – 1001.

[3] Lyngdoh T, Viswanathan B, Myers GJ, *et al.* Impact of different adiposity measures on the relation between serum uric acid and blood pressure in young adults [J]. Journal of Human Hypertension, 2012, 26(11):677 – 683.

[4] 李卓, 刘双信, 史伟. 高血压与肾脏病 [J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2012, 11(1):11 – 14.

[5] 唐政, 尹广. 肾脏和高血压的相互关系 [J]. 中国医师进修杂志, 1995(9):1 – 4.

[6] 杜新平, 柯生发, 蒋文平. 肾素-血管紧张素系统与高血压研究进展 [J]. 心血管病学进展, 2001, 22(2):104 – 105.

[7] María CB, Gerardo G. Mechanisms of sodium chloride cotransporter modulation by angiotensin II [J]. Current Opinion in Nephrology & Hypertension, 2012, 21(5):516 – 522.

[8] Tiwari S, Li LS, Halagappa VK, *et al.* Sex differences in adaptive downregulation of pre-macula densa sodium transporters with ANG II infusion in mice [J]. American Journal of Physiology Renal Physiology, 2010, 298(1):187 – 195.

[9] Baojian Xue, Alan Kim Johnson, Meredith Hay. Sex differences in angiotensin II- and aldosterone-induced hypertension: the central protective effects of estrogen [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2013, 305(5):459 – 463.

[10] Komukai K, Mochizuki S, Yoshimura M. Gender and the renin-angiotensin-aldosterone system [J]. Fundamental & Clinical Pharmacology, 2010, 24(6):687 – 698.

[11] Brown RD, Hilliard LM, Head GA, *et al.* Sex differences in the pressor and tubuloglomerular feedback response to angiotensin II [J]. Hypertension, 2012, 59(1):129 – 135.

[12] Qi Y, Wang X, Rose KL, *et al.* Activation of the Endogenous Renin-Angiotensin-Aldosterone System or Aldosterone Administration Increases Urinary Exosomal Sodium Channel Excretion [J]. American Society of Nephrology, 2016, 27(2): 646 – 656.

[13] Heo NJ, M-J S, Lee JW, *et al.* Effect of estradiol on the expression of renal sodium transporters in rats [J]. Climacteric, 2013, 16(2):265 – 273.

[14] Rafiqi FH, Annie Mercier Zuber, Mark Glover, *et al.* Role of the WNK-activated SPAK kinase in regulating blood pressure [J]. Embo Molecular Medicine, 2010, 2(2):63 – 75.

[15] Bergaya S, Faure S, Baudrie V, *et al.* WNK1 regulates vasoconstriction and blood pressure response to α 1-adrenergic stimulation in mice [J]. Hypertension, 2011, 58(3):439 – 445.

[16] Richardson C, Alessi DR. The regulation of salt transport and blood pressure by the WNK-SPAK/ OSR1 signalling pathway [J]. Cell Sci, 2008, 121(20):3293 – 3304.

[17] Swasti T, Lijun L, Shahla R, *et al.* Sex and age result in differential regulation of the renal thiazide-sensitive NaCl cotransporter and the epithelial sodium channel in angiotensin II-infused mice [J]. American Journal of Nephrology, 2009, 30(6):554 – 562.

[18] 张艳荣,全雄志,董伟,等. 多巴胺 D5 受体转基因小鼠的建立[J]. 中国比较医学杂志,2008,18(5):54 – 58.

[19] 唐振旺,肖莉, 郭紫芬,等. 血压的性别差异及其生物学意义[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010,18(12):996 – 1000.

[20] 董伟, 杨志伟, 曹兴水,等. 不同鼠龄的人多巴胺 D5F173L 突变基因转基因高血压小鼠血压及心脏结构与功能分析[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(8): 1 – 5.

[21] 黄群英, 罗素芬, 晋学庆. 不同年龄自发性高血压大鼠肾脏 AT-1R 和 AT-2R 的表达[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(12): 19 – 23.

[22] 张敏,王艳. 肾小管 Na-Cl 共同转运体与血压关系的研究[J]. 中华肾脏病杂志, 2015, 31(12): 941 – 943.

[23] 华琦, 王艳玲. 女性高血压的发病特点及治疗对策 [J]. 中华高血压杂志, 2010(9):803 – 805.

[24] Rojasvega L, Reyescastro LA, Ramírez V, *et al.* Ovarian hormones and prolactin increase renal NaCl cotransporter phosphorylation [J]. American Journal of Physiology Renal Physiology, 2015, 308(8): 799 – 808.

[25] Pedro SC, Paola DLH, Jose PC, *et al.* WNK kinases, renal ion transport and hypertension [J]. American Journal of Nephrology, 2008, 28(5):860 – 870.

[26] Yang SS, Lin SH, Huang CL. Role of WNK Kinases in Blood Pressure Control [J]. Current Hypertension Reviews, 2008, 4(3):161 – 166.

[27] Yang CL, Zhu X, Wang Z, *et al.* Mechanisms of WNK1 and WNK4 interaction in the regulation of thiazide-sensitive NaCl cotransport [J]. Clin. Invest, 2005, 115(5):1379 – 1387.

〔修回日期〕2016-03-30