

Изменение уровня мРНК натрий-водородного обменника, натрий-калиевой атфазной помпы, натрий-калий-хлор симпортера и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы в лимфоцитах пациентов с мягкой артериальной гипертензией

А.А. Веренинов, В.В. Матвеев, Л.Н. Глушанкова, В.Е. Юринская, И.О. Васильева^а, А.А. Калюзный, В.А. Исаков, Ю.Р. Ковалев^б

^а – лаборатория физиологии клетки института цитологии РАН, Санкт-Петербург

^б – кафедра факультетской терапии государственной педиатрической медицинской академии, Санкт-Петербург

Резюме

Цель настоящего исследования – получить новые данные об экспрессии NHE1 мРНК в периферических лимфоцитах человека у пациентов с артериальной гипертензией и сравнить экспрессию NHE1 мРНК с экспрессией мРНК, кодирующей синтез двух ранее неизученных переносчиков ионов, а также белков несвязанных с ионным транспортом: β-актином, глицеральдегид-фосфатдегидрогеназой (GAPDH), регуляторным антиапоптотическим белком (Bcl-2), и сывороточной глюкокортикоидрегулирующей киназой (hSGK) Методы: мРНК выделенная из лимфоцитов периферической крови подвергалась полимеразной цепной реакции (ПЦР). Количество кДНК оценивалось методом фотометрии с использованием фотокамеры и компьютерной программы. Группа больных включала 26 мужчин в возрасте 18–30 лет с мягкой артериальной гипертензией, группа контроля – лиц с нормальным АД – 18 сопоставимых мужчин. Уровни NHE1, ATP1B1, NKCC1, GAPDH мРНК, в отличие от Bcl-2 и hSGK, в лимфоцитах больных с АГ были выше, чем у нормотензивных лиц в 2.4–2.6 раза для ионных транспортеров и в 3.5 для GAPDH.

Выводы: лимфоциты больных с АГ отличаются от аналогичных клеток здоровых лиц не только по уровню NHE1, но и по ATP1B1, NKCC1, и GAPDH мРНК. Эффект NHE1 является неспецифичным.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, экспрессия генов, ионные обменники, натрий-калиевая помпа, кровь, патофизиология.

Changes in the level of NHE1, ATP1B1, NKCC1, and GAPDH mRNAs in lymphocytes from patients with mild essential hypertension

A.A. Veremnov^a, V.V. Matveev^a, L.N. Glushankova^a, V.E. Yurinskaya^a, I.O. Vassilieva^a, A.A. Kalyuzny^b, V.A. Isakov^b, Y.R. Kovalev^b

^a Laboratory of Cell Physiology, Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia,

^b State Medical Academy of Pediatrics, St. Petersburg, Russia

Resume

Objective: To study whether lymphocytes from patients with mild essential hypertension differ from healthy persons in the levels of mRNAs encoding Na/H exchanger (NHE1), some other ion transporters, i.e. sodium pump (ATP1B1), NaK2Cl symporter (NKCC1), and proteins unrelated to ion transport: glycolytic enzyme (GAPDH), antiapoptotic regulator (Bcl-2) and kinase hSGK. Methods: Human peripheral blood lymphocyte mRNAs were assayed by RT PCR procedure. The amount of cDNA was quantified by photometry of electrophoretic bands stained with ethidium bromide, using digital photometer and PC program. Hypertensive group included 26 males aged 18–30 years with mild essential hypertension, while normotensives – 18 males with the same baseline characteristics except that for blood pressure. Results: The levels of NHE1, ATP1B1, NKCC1, GAPDH mRNAs, but not Bcl-2 or hSGK, in lymphocytes from hypertensives are higher than in normotensives by about factor 2.4–2.6 for ion transporters and 3.5 for GAPDH. Conclusions: The lymphocytes from young males with mild hypertension differ from normotensive ones in that there is a change in abundance of a group of mRNAs comprising not only NHE1, but either ATP1B1, NKCC1, and GAPDH mRNAs. The NHE1 effect is not specific.

Key words: hypertension, gene expression, leukocytes, ion exchangers, Na/K pump experimental, blood, subcellular, pathophysiology.

Статья поступила в редакцию: 12.05.07. и принята к печати: 10.09.07.

КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУПП

Показатели	Гипертензивная группа (n=26, M±SE)	Нормотензивная группа (n=18, M±SE)	Уровень значимости, p
Возраст (г.)	22.2 ± 3.7	24.1 ± 4.9	нз
Рост (см)	180 ± 7.3	177 ± 9.1	нз
Вес (кг)	74 ± 4.6	70 ± 6.1	нз
Индекс массы тела (кг/м ²)	22.9 ± 6.4	22.4 ± 5.6	нз
Систолическое АД (mm Hg)	148 ± 7.2	118 ± 4, 8	p<0.01
Диастолическое АД (mm Hg)	92 ± 3.3	78 ± 5.1	p<0.01
Среднее АД (mm Hg)	111±6.8	91 ± 5.5	p<0.01
ОХС (ммоль/л)	4.71 ± 0.18	4.55 ± 0.27	нз
ЛПВП (ммоль/л)	1.17 ± 0.06	1.22 ± 0.07	нз

Введение

На клеточном уровне регуляция водно-ионного баланса организма осуществляется с помощью белков-переносчиков в число которых, в первую очередь, входят натрий-водородный обменник (NHE), Na, K-АТФазная помпа (АТР1) и NaK2Сl симпортер (NKCC1). Они вовлечены в ряд физиологических процессов, потенциально влияющих на уровень артериального давления, таких как: почечная реабсорбция натрия и воды, тонус мускулатуры сосудов и сократимость сердечной мышцы. Многочисленные данные, полученные у людей и животных, показывают, что эссенциальная гипертензия сопровождается широким спектром изменений активности переносчиков ионов в различных тканях, в том числе, и в клетках крови (1–6). До настоящего времени взаимосвязь между изменением активности переносчиков ионов и повышенным артериальным давлением изучена недостаточно. Несомненна сложность этих взаимосвязей, которая зависит и от особенностей функционирования разных типов клеток, и от состояния переносчиков. В частности, в одних случаях изменение интенсивности транспорта ионов обусловлено исключительно нарастанием активности переносчиков, зависящим от процессов их фосфорилирования (7, 8), в то время как в других может возникать избыток переносчиков ионов, регулируемый уровнем мРНК и процессами синтеза или разрушения белка (9–12). Данные об экспрессии мРНК переносчиков ионов в человеческих лимфоцитах при артериальной гипертензии немногочисленны. Некоторые исследования посвящены натрий-водородному антипортеру, однако их результаты противоречивы (14–16).

Цель настоящего исследования получить новые данные об экспрессии NHE1 мРНК в периферических лимфоцитах человека у пациентов с артериальной гипертензией и сравнить экспрессию NHE1 мРНК с экспрессией мРНК, кодирующей синтез двух ранее неизученных переносчиков ионов, а также белков, несвязанных с ионным транспортом: β-актином, глицеральдегид-фосфатдегидрогеназой (GAPDH), регуляторным антиапоптотическим белком (Bcl-2), и сывороточной глюкокортикоидрегулирующей киназой (hSGK) (17).

В целях уменьшения возможных вторичных эффектов на изучаемые системы при длительном течении гипертензии и для исключения влияния пола в исследование включались молодые мужчины с мягкой артериальной гипертензией (18).

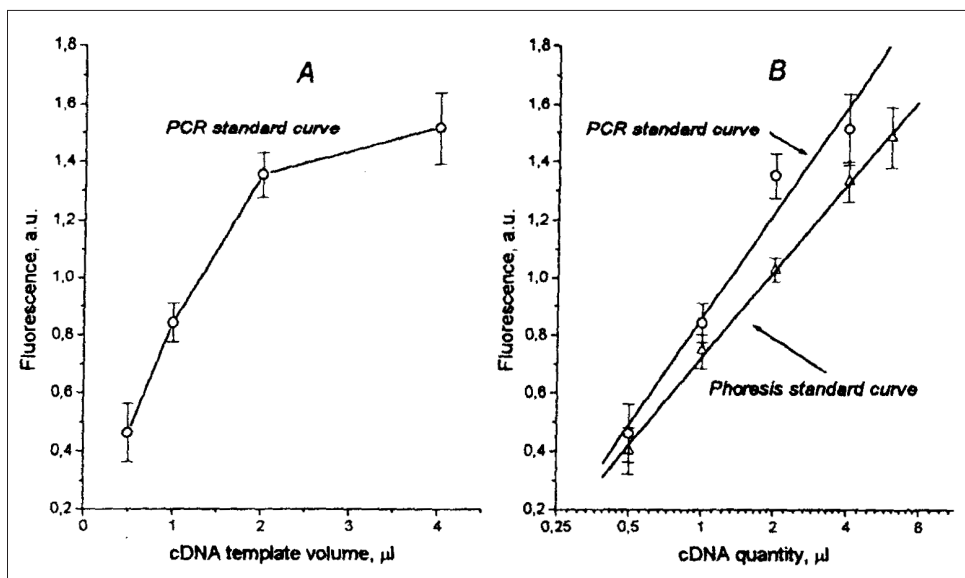
Методы

Исследуемая группа

Были отобраны 44 мужчины в возрасте от 18–30 лет, неродственники, жители Санкт-Петербурга. Пациенты были обследованы в военном госпитале им. Соколова и амбулаторно. У двадцати шести человек была мягкая артериальная гипертензия и у восемнадцати нормальное артериальное давление. Вторичная гипертензия была исключена. Средний рост, вес и индекс массы тела не имели достоверных различий у лиц с нормальным и повышенным АД (табл. 1). Во всех случаях, наблюдался нормальный уровень креатинина. Все пациенты получали неограниченную по натрию диету. Тринадцать человек с повышенным (50%) и 5 человек с нормальным АД (28%) имели отягощенную наследственность по гипертензии по первой степени родства. Пробы крови брались натощак утром между 7 и 9 часами и антикоагулировались 20% (v/v) цитратом (75 mM цитрата натрия, 38 mM лимонной кислоты) и 11 mM раствором глюкозы.

Выделение лимфоцитарной мРНК

Лимфоциты из периферической крови изолировались рутинным методом, включающим седиментацию декстраном и центрифугирование с фикол-верографинном (1,077 г/мл, 400 × g). Общая лимфоцитарно-клеточная мРНК экстрагировалась посредством гуанидин-изотиоцианат-фенол-хлороформа (19). кДНК синтезировалась шаблонно с использованием 2–3 мкг раствора, содержащего 200 U MMLV транскриптазы (Amersham) согласно рекомендациям производителя. После 1 часа инкубации при 37°C реакция останавливалась повышением температуры раствора до 95°C градусов на 10 минут. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась одновременно для всех исследуемых проб в объеме 10 мкл, содержащем 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM KCl, 1,5 MgCl₂, и по 0,2 mM dNTP и 0,5 U Taq ДНК-полимеразы (Биомастер, Россия), 0,5 мкл каждого специфического праймера и 2 мкл разведенной в отношении 1:6 шаблонной кДНК. Специфические праймеры и размеры NHE1 см. 20, АТР1В1 – 21, β-актин – 22, NKCC1 – получены от C.M. Gillen, h-SGK, GAPDH – получены от S. Waldegger, Bcl-2 IDT, Inc. Число циклов было специфично для каждой пары праймеров и выбиралось по экспоненциальной фазе амплификации. Минус контроль содержал воду и ДНК взамен кДНК. После амплификации 6 мкл полученного продукта электрофорезировали в 6% по-



лиакриламидном геле. Размеры продуктов находились в допустимых пределах.

Квантификация cДНК

Относительная флуоресцентная интенсивность пленки, окрашенной бромистым эфиром количественно оценивалась с использованием цифровой фотокамеры Kodak DC-20 и компьютерной программы. Для стандартизации в некоторые образцы к обычным 2,0 мкл добавляли дополнительные объемы кДНК по 0,5 мкл. Взаимосвязь между количеством кДНК и интенсивностью флуоресценции пленки, определенной DC-20 была нелинейной (рис.1А). Стандартные кривые, полученные при варьировании объемом полученной кДНК (рис. 1В, ПЦР стандартная кривая) или объемом продуктов ПЦР в начале фореа (Стандартная кривая фореа) имеют нелинейный разброс, являющийся, главным образом, следствием особенностей фотодетектора. Нелинейность подобна таковой, полученной на обычной фотопленке.

Было обнаружено, что приращение интенсивности флуоресценции продуктов с увеличением количества кДНК не различается для сравниваемых генов. С точки зрения нелинейности стандартной кривой, актуальные изменения в кДНК количественных единицах выше, чем в флуоресцентной интенсивности единиц. Например, увеличение интенсивности флуоресценции на 0,5 единицы связано с увеличением количества кДНК в 2,6 раза.

Для оценки содержания мРНК в лимфоцитах у гипертензивных и нормотензивных субъектов, было использовано отношение X/актин, где X-флуоресцентная интенсивность пленки для ПЦР продукта, полученного с праймерами специфичными для мРНК и актин – флуоресцентная интенсивность пленки для β -актина. Это отношение не показывает истинное отношение концентраций между кДНК, вследствие различий в скорости ПЦР при амплификации различных кДНК. Однако поскольку условия ПЦР для каждого из генов

ОТНОСИТЕЛЬНЫЕ УРОВНИ мРНК В ЛИМФОЦИТАХ ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ОТ ЛИЦ С ПОВЫШЕННЫМ И НОРМАЛЬНЫМ АРТЕРИАЛЬНЫМ ДАВЛЕНИЕМ

Таблица 2

mRNA	Нормотензивная группа			Гипертензивная группа			M2/M1	p
	Среднее (M1)	Ошибка среднего (m1)	N	Среднее (M2)	Ошибка среднего (m2)	N		
ATP1B1	0.72	0.07	16	1.03	0.05	23	1.43	0.013
Bcl-2	0.86	0.10	16	0.95	0.05	25	1.10	0.2
GAPDH	0.78	0.08	13	1.42	0.24	10	1.82	0.012
NHE1	0.74	0.05	18	0.97	0.05	23	1.31	0.001
NKCC1	0.84	0.05	15	1.17	0.08	22	1.39	0.0005
hSGK	1.18	0.21	13	1.18	0.22	11	1.00	0.999

Относительный уровень мРНК определяется как отношение интенсивности флуоресценции ленты для продуктов ПЦР взятых со специфическим праймером сравниваемой мРНК к таковой для β -актина, тогда как аналогичная кДНК панель была использована как ПЦР. кДНК панель получена обратной транскрипцией от общей мРНК со случайным праймером. Результаты представлены как среднее $\pm$ ошибка, N – число субъектов. 2–3 ПЦР были выполнены для определения каждой мРНК в лимфоцитах каждого испытуемого. Статистическое сравнение было проведено по t-критерию Стьюдента для непарных сравнений.

были одинаковы для гипертензивных и нормотензивных субъектов, сравнение соотношений представляется корректным.

Исследование проведено согласно с принципами хельсинской декларации.

Результаты

Лица с артериальной гипертензией не отличались от лиц с нормальным артериальным давлением по клиническим показателям АД (табл. 1).

Таблица 2 показывает относительное содержание мРНК, кодирующих три ионных транспортера: Na/H антипортера (NHE1), β -субъединицы Na,K-АТФазной помпы, NaK2Cl-симпортера (NK2Cl), одной мРНК связанной с гликолитическим ферментом – глицеральдегидфосфатдегидрогеназой (GAPDH) и одной, кодирующей антиапоптозный регуляторный белок Bcl-2 в лимфоцитах.

Достоверные различия между гипертензивными и нормотензивными были обнаружены в уровнях мРНК всех ионных транспортеров (табл. 2). Количество ионтранспортерной мРНК, установленное по флуоресцентной интенсивности, отнесенное к бета-актину в группе лиц с артериальной гипертензией, выше, чем в нормотензивной группе в 1,4 раза. Уровень мРНК, кодирующей два несвязанных с транспортом ионов белка, Bcl-2 и hSGK, в лимфоцитах от гипертензивных и нормотензивных различается недостоверно. Обнаружено значимое увеличение отношения интенсивности флуоресценции мРНК глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФД) к мРНК актина, примерно в 1,8 раза в лимфоцитах гипертензивных субъектов. Вследствие существенной степени экспрессии гена ГАФД уровень соответствующей мРНК часто используется подобно мРНК β -актина, как внутренний стандарт в изучении экспрессии других генов. Представленные данные показывают, что при использовании гена ГАФД в качестве стандарта уровень ион-транспортной мРНК, Bcl-2 и hSGK ниже у гипертензивных, чем у нормотензивных, хотя взаимоотношения между мРНК ионных транспортеров и актин-Bcl-hSGK группой остаются теми же, что и при использовании β -актина.

Приведенный пример показывает, что использование экспрессии гена ГАФД в качестве внутреннего контроля должно проходить с осторожностью. Следует придать особое значение, что с точки зрения противоречивости изложенных результатов и относительно малых наблюдаемых различий, специальное внимание было уделено идентификации ПЦР образцов проб от гипертензивных и нормотензивных субъектов. Каждая серия ПЦР включала от 13 до 26 проб из двух групп и денситометрия продуктов выполнялась одновременно. Гипертензивная группа включала 13, тогда как нормотензивная 5 лиц с наследственной отягощенностью по гипертензии (1 степень родства). Не обнаружено достоверных различий у этих лиц в сравнении с целой группой.

Представляется интересным корреляционный анализ вариации уровней различных мРНК от донора к донору. Таблица 3 показывает, что в случае нормотензивных субъектов статистически достоверная корреляция ($p < 0,05$) проявилась в 6 случаях из 15 возможных комбинаций шести изученных мРНК, тогда как в гипертензивной группе значимая корреляция найдена для 5 пар мРНК, 4 из которых отличны от нормотензивной группы. Функциональное значение этих корреляций остается еще неясным.

Дискуссия

Много данных демонстрируют, что гипертензия часто сопровождается изменениями в транспорте моновалентных ионов в различных клетках и тканях (1–6), но функциональная достоверность этих изменений в патогенезе гипертензии еще остается неясной. Изначально большинство данных о патологии моновалентных ионов транспорта получено на клетках крови, чья функциональная связь с повышенным кровяным давлением совершенно не очевидна. Считается, что патология транспортных моновалентных ионов у гипертензивных животных и людей должна быть, главным образом, следствием поврежденной регуляции на уровне транскрипции, белкового синтеза или функционирования транспортеров и реже – следствием мутации транспортерных генов. (5, 6, 11).

КОРРЕЛЯЦИИ УРОВНЕЙ мРНК В ЛИМФОЦИТАХ

Таблица 3

Пары сравнений мРНК	Коэффициент корреляции Пирсона	p	N
А. Нормотензивная группа			
ATP[B] и Bcl-2	0.483	0.068	15
ATP[B] и NHE1	0.527	0.036	16
ATP[B] и NKCC1	0.492	0.074	14
Bcl-2 и NKCC1	0.605	0.029	13
Bcl-2 и GAPDH	0.533	0.074	12
NKCC1 и hSGK	0.663	0.037	10
Гипертензивная группа			
ATP[B] и NHE1	0.430	0.046	22
Bcl-2 и NHE1	0.447	0.032	23
GAPDH и NKCC1	0.769	0.016	9
GAPDH и hSGK	0.877	0.001	10
NKCC1 и hSGK	0.746	0.013	10

В таблице представлена корреляция между каждой парой мРНК, нормализованной по р-актину при достоверном уровне значимости p ниже 0,05, который показывает значимую ненулевую корреляцию в 95% доверительном интервале. N – число обследованных, представивших пары мРНК.

Хотя связь артериального давления с полиморфизмом ион-транспортных генов и отмечена для Na,K-атфазы у здоровых субъектов (24). Лимфоциты – наиболее подходящий объект для изучения транскрипционной регуляции ионных транспортеров, особенно у человека. Представленные данные на экспрессию моновалентных ионотранспортной мРНК в человеческих лимфоцитах с отношением к эссенциальной гипертензии впервые получено с Na/H антипортером. Используя блот-анализ по Northem, Rosskopf et.al. 14, изучили функциональную активность и мРНК экспрессию NHE1 в умерщвленных вирусом Эпштейн-Барр лимфоцитах пациентов с эссенциальной гипертензией. Они не выявили отличий в мРНК NHE1 функциональной активности в группах с повышенным и нормальным артериальным давлением, несмотря на присутствие увеличенной NHE1 функциональной активности в гипертензивной группе. Напротив, Garcandia A. с соавт. (15), используя более чувствительный RT ПЦР метод определения мРНК NHE1 и изучая свежеизолированные лимфоциты периферической крови, нашли, что NHE1/актин мРНК соотношение примерно в 1.3 раза выше при эссенциальной гипертензии. Позднее в той же лаборатории (16) выявлено, что редукция NHE функциональной активности в лимфоцитах от гипертензивных пациентов, леченных квинаприлом, не ассоциируется с какими-либо изменениями NHE1 мРНК экспрессии. По мнению авторов, увеличенная функциональная активность NHE в лимфоцитах, которая свойственна для 30–50% пациентов с эссенциальной гипертензией, не может быть объяснена изменением регуляции транспортера на уровне мРНК. Анализируя эти данные, а также сведения об экспрессии NHE3 мРНК в проксимальных канальцах соль-чувствительных гипертензивных крыс (25) Orlov S.N. с соавт. (5, 6) считают, что транскрипционная регуляция мРНК соотношения NHE1/NHE3 не играет значимой роли в нарушении функциональной активности Na/H антипортера, связанного с гипертензией. Мы не могли изучать корреляцию NHE1 мРНК с функциональной активностью этого транспортера в нашей гипертензивной группе, однако его собственное увеличение статистически значимо. Необходимо заметить, что тенденция к увеличению NHE1 мРНК уровня наблюдалась по данным Fortune A. с соавт. (16) и, вероятно, различие могло быть значимым, если бы исследуемая группа была бы больше. Наше исследование согласуется с данными Garcandia A. с соавт. (15), который нашел увеличение NHE1/актин мРНК соотношения в свежеизолированных лимфоцитах от пациентов с эссенциальной гипертензией. Несогласованность с находками Rosskopf D. и др. (14), которые не смогли выявить различий в NHE1 мРНК экспрессии в лимфоцитах пациентов с эссенциальной гипертензией, может быть следствием умерщвления лимфоцитов в этом исследовании, иным методом отбора гипертензивных пациентов или менее чувствительным методом мРНК выделения.

Мы не обнаружили сообщений в литературе об экспрессии мРНК кодирующей Na,K-атфазную

помпу или NaK2Cl в лимфоцитах при эссенциальной гипертензии. Увеличение уровней мРНК впервые было прослежено в нашем исследовании. Мы не знаем насколько они опосредуют изменения функциональной активности этих транспортеров в лимфоцитах лиц с артериальной гипертензией и возможную функциональную связь этих изменений с повышенным артериальным давлением. Следует особо подчеркнуть, что Na,K-атфазная помпа или NaK2Cl симпортер и NHE антипортер сдвигают ионно-водный баланс клетки в противоположных направлениях. Наиболее интересный вывод который может быть сделан сейчас – это множественный характер изменений мРНК ряда ионных транспортеров в лимфоцитах лиц с артериальной гипертензией. Мы считаем, что существует некий фактор или факторы, связанные с эссенциальной гипертензией, которые инициируют комплексный клеточный ответ, включающий изменения в функционально связанных системах, то есть названных выше ионных транспортерах и ГАФД, но не Bcl-2 или hSGK, которые могут быть связаны с мРНК уровнями внутриклеточными реже, чем экстраклеточными сигналами. В этом контексте необходимо отметить данные о связи генетического дефекта аддуктина в цитоскелете с нарушением активности почечной NaK-атфазы у миланских гипертензивных крыс (9–11). G-протеин может быть другим кандидатом на роль гипотетического общего регулятора 26.

Благодарность

Авторы благодарят S. Waldegger и F. Lang за hSGK праймеры, С.М. Gillen за NKCC1 праймеры и Т.С. Голдовикову за синтез АТР1В1 праймеров. Работа была поддержана Российским фондом фундаментальных исследований. (проект: 98–04–49850, 98–04–04125)

Литература

- 1 Rosskopf D, Dusing R, Siffert W. Membrane sodium-proton exchange and primary hypertension. *Hypertension* 1993; 21: 607–617.
- 2 Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR. Genetics and Mechanisms. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996: 209–235.
- 3 Geering K. Na,K-ATPase. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1997, 6: 434–439.
- 4 Grambert G, Li C, Geering K. FXYD3 (Mat-8), a new regulator of Na,K-ATPase. *Mol Biol cell*. 2005 May; 16 (5): 2363–71
- 5 Orlov SN, Adragna NC, Adarichev VA, Hamet P. Genetic and biochemical determinants of abnormal monovalent ion transport in primary hypertension. *Am J Physiol* 1999, 276: C511–C536.
- 6 Orlov SN, Taurin S, Hamet P. The alpha1-Na/K pump does not mediate the involvement of ouabain in the development of hypertension in rats. *Blood Press*. 2002;11(1):56–62.
- 7 Ng LL, Sweeney FP, Siczowski M, et al. Na⁺-H⁺ antiporter phenotype, abundance, and phosphorylation of immortalized lymphoblasts from humans with hypertension. *Hypertension* 1995, 25: 971–977.
- 8 Sweeney FP, Quinn PA, Ng LL. Enhanced mitogen-activated protein kinase activity and phosphorylation of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform-1 of human lymphoblasts in hypertension. *Metabolism* 1997;46: 297–302.

9 Ferrandi M, Tripodi G, Salardi S, et al. Renal Na,K-ATPase in genetic hypertension. *Hypertension* 1996; 28: 1018–1025.

10 Ferrandi M, Barassi P, Minotti E, Duzzi L, Molinari I, Bianchi G, Ferrari P. PST 2238: a new antihypertensive compound that modulates renal Na-K pump function without diuretic activity in Milan hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002 Dec;40(6):881–9.

11 Lodwick D, Zagato L, Kaiser MA, et al. Genetic analysis of the SA and Na⁺/K⁺-ATPase α 1 genes in the Milan hypertensive rat. *J Hypertens* 1998; 16: 139–144.

12 Ferrari P, Ferrandi M, Tripodi G, et al. PST 2238: A new antihypertensive compound that modulates Na,K-ATPase in genetic hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288: 1074–1083.

13 Ferrari P, Ferrandi M, Torielli L, Barassi P, Tripodi G, Minotti E, Molinari I, Melloni P, Bianchi G. Antihypertensive compounds that modulate the Na-K pump. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Apr;986:694–701.

14 Roskopf D, Fromter E, Siffert W. Hypertensive sodium-proton exchanger phenotype persists in immortalized lymphoblasts from essential hypertensive patients. A cell culture model for human hypertension. *J Clin Invest* 1993; 92: 2553–2559.

15 Garciandia A, Lopez R, Tisaire J, et al. Enhanced Na⁺-H⁺ exchanger activity and NHE-1 mRNA expression in lymphocytes from patients with essential hypertension. *Hypertension* 1995; 25: 356–364.

16 Fortune A, Tisaire J, Lopez R, Bueno J, Diez J. Angiotensin converting enzyme inhibition corrects Na⁺/H⁺ exchanger overactivity in essential hypertension. *Am J Hypertens* 1997; 10: 84–93.

17 Waldegger S, Barth P, Raber G, Lang F. Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4440–4445.

18 Horiguchi M, Kimura M, Skumick J, Aviv A. Parameters of lymphocyte Na⁺-Ca²⁺ regulation and blood pressure: the gender effect. *Hypertension* 1998; 32: 869–874.

19 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156–159.

20 Quednau B, Roskopf D, Reusch HP, Luft FC, Siffert W. Enhanced Na⁺-H⁺ exchanger activity and NHE-1 mRNA levels in human lymphocytes during metabolic acidosis. *Am J Physiol* 1994; 266: C480–8.

21 Akopyanz NS, Broude NE, Bekman EP, Marzen EO, Sverdlov ED. Tissue-specific expression of Na,K-ATPase β -subunit. Does β 2 expression correlate with tumorigenesis? *FEBS Lett* 1991; 289: 8–10.

22 Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 1991; 254: 277–279.

23 Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH, β -actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 259: 523–526.

24 Rankinen T, Perusse L, Deriaz O, et al. Linkage of the Na,K-ATPase α 1 and β 2 genes with resting and exercise heart rate and blood pressure: cross-sectional and longitudinal observations from the Quebec Family Study. *J Hypertens* 1999; 17: 339–349.

25 Hayashi M, Yoshida T, Monkawa T, Yamaji Y, Sato S, Saruta T. Na⁺H⁺-exchanger 3 activity and its gene in the spontaneously hypertensive rat kidney. *J Hypertens* 1997; 15: 43–48.

26 Siffert W. G proteins and hypertension: an alternative candidate gene approach. *Kidney Int* 1998; 53: 1466–1470.