

# 假性醛固酮减少症Ⅱ型的分子遗传学研究进展

杜凤立 谢国红 吴会会 苏国海

**【摘要】** 假性醛固酮减少症Ⅱ型(PHA Ⅱ)是一类罕见的单基因遗传性高血压,以高血钾、高血压为突出表现。PHA Ⅱ通常为染色体显性遗传,染色体隐性遗传少见。目前已克隆与该病有关的基因包括 WNK1、WNK4、KLHL3 和 CUL3 基因。临床上由于对该病认识不足,较易漏诊和误诊。该文介绍 PHA Ⅱ的分子遗传学研究进展。

**【关键词】** 假性醛固酮减少症Ⅱ型;高血压;分子遗传学

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2019.04.009

假性醛固酮减少症(PHA)是指醛固酮水平正常或升高,但由于机体对内源性醛固酮反应性降低而表现出醛固酮减少相关症状的一类疾病。该病可分为Ⅰ型的与Ⅱ型,PHA Ⅰ型的特点为盐丢失,表现为低钠性脱水及低血压。PHA Ⅱ型临床表现为高血钾、高血压、低肾素、代谢性酸中毒,但肾小球滤过率正常<sup>[1]</sup>,是一种罕见的常染色体遗传病。该病于 1964 年由 Paver 和 Pauline 首先报道,其患病率目前尚不清楚,呈家族性发病,亦有散发病例报道<sup>[2-3]</sup>。

PHA Ⅱ分为 5 个亚型,分别为 PHA ⅡA、PHA ⅡB、PHA ⅡC、PHA ⅡD 和 PHA ⅡE,其中 PHA ⅡA 亚型的致病基因定位于 1q31-q42,尚未被克隆,其他 4 个亚型的致病基因已被克隆,分别是 WNK4、WNK1、KLHL3 和 CUL3 基因,通常以显性方式遗传,少数 PHA ⅡD 也以隐性方式遗传。

## 1 1q31-q42 与 PHA ⅡA

PHA ⅡA 又称家族高钾性高血压、Gordon 综合征。Mansfield 等<sup>[4]</sup>于 1997 年通过对 8 个常染色体显性遗传的 PHA Ⅱ家族研究初步发现,PHA ⅡA 与染色体 1q31-q42 有关,其连锁系数(LOD)为 3.95。之后未见 1q31-q42 与 PHA ⅡA 关系的进一步研究。至今 PHA ⅡA 的致病基因未被克隆。

## 2 WNK4 与 PHA ⅡB

2001 年 Wilson 等<sup>[5]</sup>将 PHA ⅡB 的致病基因 WNK4 基因定位于 17q21.2,该基因含 19 个外显子,

基因全长 16 kb。WNK4 属于赖氨酸缺乏蛋白激酶(WNK)家族,该家族是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,因在激酶功能域缺乏保守的赖氨酸而得名,其主要作用为调控钾-氢交换和钠-氯吸收。WNK 家族共有 4 个成员,分别是 WNK1、WNK2、WNK3 和 WNK4,其中 WNK4 和 WNK1 异常分别导致 PHA ⅡB 和 PHA ⅡC<sup>[6]</sup>。

目前已经发现 8 种 WNK4 基因突变与 PHA ⅡB 有关,突变形式为错义突变和无义突变<sup>[1,7-10]</sup>,突变位点位于外显子 7 和 17,如 Arg1185Lys、Glu562Lys、Asp564Ala、Lys1169Glu、Gln565Glu、Glu560Gly、Pro561Leu、Asp564His,这些突变均导致 WNK4 基因功能改变<sup>[11]</sup>。

WNK4 基因的主要功能是抑制位于远曲小管肾小管上皮细胞膜的噻嗪敏感性钠-氯协同转运蛋白(NCC)。WNK1、WNK4 基因突变均可增强 NCC 活性,导致钠重吸收增加<sup>[12]</sup>。另外, Ring 等<sup>[13]</sup>发现 WNK4 基因可以通过影响网格蛋白介导的胞吞过程调节肾脏外髓钾通道的表达情况,WNK4 基因突变使钾通道在细胞表面表达减少,导致肾脏泌钾减少进而引起体内血钾升高。WNK4 基因表达的 WNK4 蛋白和糖皮质激素诱导激酶可通过相互磷酸化,影响肾脏上皮钠通道的活性,编码 WNK4 蛋白的基因发生功能获得性突变增加了该部位钠通道的活性,进而增加体内电解质重吸收,同时减少钾离子的分泌,最终导致体内水钠潴留和高血钾症<sup>[14]</sup>。WNK4 基因突变可能通过多种机制参与 PHA ⅡB 的发生。

## 3 WNK1 与 PHA ⅡC

2001 年 Wilson 等<sup>[5]</sup>将 PHA ⅡC 的致病基因

基金项目:山东省自然科学基金(ZR2018MH003)

作者单位:250013 济南,山东大学附属济南市中心医院心内科

通信作者:苏国海,Email:gttstg@163.com

WNK1 基因定位于 12p13.33, 该基因含有 28 个外显子, 基因全长为 156 kb。WNK1 基因是 WNK 家族中首个被发现的成员, 它有多个转录起始点, 在不同组织有不同的转录产物。Delaloy 等<sup>[15]</sup>还在 WNK1 基因的外显子 1 中发现了 2 个启动子。WNK1 蛋白表现为 2 种形式: 肾脏特异性 WNK1 (KS-WNK1) 和全长 WNK1 (L-WNK1), 前者缺乏激酶活性, 后者具有丝氨酸苏氨酸激酶活性。L-WNK1 蛋白可以通过血清糖皮质激素激酶 (SGK) 调节上皮细胞钠通道 (ENaC) 活性, L-WNK1 蛋白通过诱导 SGK 磷酸化, 使磷酸化泛素连接酶 Nedd4-2 蛋白磷酸化并抑制其功能, 而 Nedd4-2 蛋白可通过网格蛋白依赖机制促进 ENaC 胞吞从而使其活性减少<sup>[16]</sup>, 因此, WNK1 基因功能获得性突变增强了对 Nedd4-2 的抑制, 从而增强 ENaC 活性, 引起钠离子重吸收增多, 导致容量性高血压。进一步研究发现, WNK1 基因能激活亚硒酸合酶 1 相关富含脯氨酸-丙氨酸的蛋白激酶 (SPAK), 继之磷酸化 NCC, 促进远曲小管处钠氯的重吸收, 同样引起容量性高血压<sup>[17]</sup>。L-WNK1 蛋白通过抑制 ROMK 减少钾离子的排泄, 而 KS-WNK1 蛋白抑制 L-WNK1 对 ROMK 的作用, 并不能激活 ENaC<sup>[14]</sup>。因此, 当 L-WNK1/KS-WNK1 的比值  $>1$  时, 可通过 ROMK 降低钾排泄率, 引起血钾升高<sup>[18]</sup>。

目前, 已发现 2 种与 PHA IIC 有关的 WNK1 基因突变, 突变形式均为 1 号内含子的大片段缺失突变。2000 年, Disse-Nicodème 等<sup>[19]</sup>在 PHA IIC 家系中发现 WNK1 基因内含子 1 中存在 22 kb 的大片段缺失。次年, Wilson 等<sup>[5]</sup>在 WNK1 基因内含子 1 中发现了 41 kb 的大片段缺失, 并证实携带 22 kb 缺失的患者白细胞中 WNK1 基因转录物水平比未携带 22 kb 缺失的亲属高 5 倍, 证明了 WNK1 基因的大片段缺失增强 WNK1 蛋白的表达。

#### 4 KLHL3 与 PHA IID

2000 年, Lai 等<sup>[20]</sup>首次将 PHA IID 致病基因 KLHL3 定位于 5q31.2, 该基因含 17 个外显子, 基因全长约 120 kb。2012 年, Boyden 等<sup>[21]</sup>对 52 个 PHA II 家系, 包括 126 例受累者的研究发现, KLHL3 基因中的显性和隐性突变均可导致 PHA IID, 说明 PHA IID 既可显性遗传, 又可隐性遗传。Louis-Dit-Picard 等<sup>[22]</sup>通过体外远曲小管细胞 RNA 干扰 KLHL3 蛋白后发现细胞膜 NCC 表达增加, 与暴露于低渗低氯培养基诱导的 NCC 高表达相似, 表明 KLHL3 蛋白抑制 NCC 膜表达。

免疫共沉淀研究显示 KLHL3 蛋白和 NCC 之间存在相互作用, 进一步验证了 KLHL3 蛋白是 NCC 表达的调节因素之一。Lin 等<sup>[23]</sup>构建了携带 M131V 错义突变的 KLHL3 敲入小鼠, 该小鼠的基因突变与人类 KLHL3 的 M78V 突变相对应, 研究结果发现, 该突变未引起 KLHL3 蛋白的变化, KLHL3 蛋白与 WNK1、WNK4 蛋白结合完整, 但与 CUL3 蛋白的亲和力降低, 导致 WNK1、WNK4 蛋白的降解失效, 下游 SPAK/OSR1-NCC 磷酸化级联增强, 引起小鼠表现出典型的 PHA II 表型。KLHL3 基因突变导致 KLHL3 蛋白抑制 NCC 膜表达的作用减弱, 靶器官细胞膜 NCC 表达增加, 促进钠氯重吸收, 引起高容量性高血压。

目前共发现 36 种 KLHL3 基因突变与 PHA IID 有关, 突变形式有错义、无义、缺失和剪切位点突变, 其中既有显性突变, 又有隐性突变。Boyden 等<sup>[21]</sup>发现 KLHL3 基因隐性突变分布在整个编码区, 而 KLHL3 基因显性突变呈明显的聚集, 如 16 个显性突变中有 9 个改变了  $\delta$  环的最后 4 个氨基酸之一, 另外 3 个显性突变聚集在 BTB 结构域内。

#### 5 CUL3 与 PHA IIE

PHA IIE 的致病基因为 CUL3 基因, 该基因定位于 2q36.2。研究发现缺失 9 号外显子的 CUL3 基因致病突变体 CUL3 <sup>$\Delta 9$</sup> 可使 CUL3 蛋白自身类泛素化修饰增加, 显著降解 KLHL3 蛋白, 导致 WNK 蛋白因泛素化降解减少而累积, 增强 NCC 活性, 导致钠重吸收增加<sup>[24]</sup>。牛伟等<sup>[25]</sup>提出关于 PHA IIE 发病机制的新观点, 由于 CUL3 <sup>$\Delta 9$</sup> 与光形态建成调控因子 9 信号小体 (CSN) 的结合减弱, 导致其无法正常去类泛素化修饰, 故其类泛素化修饰处于高水平, 使 KLHL3 蛋白被过度降解而导致底物 WNK 蛋白积累, 通过 SPAK/氧化应激反应激酶 1 (OSR1) 通路激活 NCC 导致 PHA IIE。

目前已经发现 17 种 CUL3 基因突变, 突变形式有错义、无义、插入、缺失和剪切位点突变。CUL3 基因突变集中在与 9 号外显子剪切有关的部位, 如 Shao 等<sup>[26]</sup>发现了 1 个新的同义突变 c. 1221A  $>$  G (p. Glu407Glu), Glover 等<sup>[27]</sup>发现 CUL3 基因中 8 号内含子的错义突变 c. 3826T  $>$  G, 这些均导致 9 号外显子的跳跃, 激活 NCC 导致 PHA IIE 的发生。

PHA II 是一种罕见的高血压, 家族倾向明显, 国内报道极少, 对该病的病因学以及临床特征的了解均

远远不够。提高对该病的认识,应用高通量二代测序等技术手段开展基因突变检测,并以此开展致病机制研究,或许能为高血压的治疗提供新的思路。

### 参 考 文 献

- [1] Sethar GH, Almoghawi A, Khan N, et al. Pseudohypoaldosteronism type II: a young girl presented with hypertension, hyperkalemia and metabolic acidosis[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2018, 28(3):S21-S22.
- [2] Casas-Alba D, Vila Cots J, Monfort Carretero L, et al. Pseudohypoaldosteronism types I and II: little more than a name in common[J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2017, 30(5):597-601.
- [3] 迟相林. 合并糖尿病的高血压患者是否可以常规应用噻嗪类利尿剂? [J]. 中华高血压杂志, 2015, 23(7):616-621.
- [4] Mansfield TA, Simon DB, Farfel Z, et al. Multilocus linkage of familial hyperkalaemia and hypertension, pseudohypoaldosteronism type II, to chromosomes 1q31-42 and 17p11-q21[J]. Nat Genet, 1997, 16(2):202-205.
- [5] Wilson FH, Disse-Nicodème S, Choate KA, et al. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases [J]. Science, 2001, 293(5532):1107-1112.
- [6] Rafael C, Soukaseum C, Baudrie V, et al. Consequences of SPAK inactivation on hyperkalemic hypertension caused by WNK1 mutations; evidence for differential roles of WNK1 and WNK4[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):3249.
- [7] Susa K, Sohara E, Takahashi D, et al. WNK4 is indispensable for the pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II caused by mutant KLHL3[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 491(3):727-732.
- [8] Brooks AM, Owens M, Sayer JA, et al. Pseudohypoaldosteronism type 2 presenting with hypertension and hyperkalaemia due to a novel mutation in the WNK4 gene[J]. QJM, 2012, 105(8):791-794.
- [9] Zhang C, Wang Z, Xie J, et al. Identification of a novel WNK4 mutation in Chinese patients with pseudohypoaldosteronism type II [J]. Nephron Physiol, 2011, 118(3):53-61.
- [10] López-Cayule KI, Chavez-Canales M, Pillot A, et al. A mouse model of pseudohypoaldosteronism type II reveals a novel mechanism of renal tubular acidosis[J]. Kidney Int, 2018, 94(3):514-523.
- [11] Kamide K, Takiuchi S, Tanaka C, et al. Three novel missense mutations of WNK4, a kinase mutated in inherited hypertension, in Japanese hypertensives; implication of clinical phenotypes[J]. Am J Hypertens, 2004, 17(5 pt 1):446-449.
- [12] Yang YS, Xie J, Yang SS, et al. Differential roles of WNK4 in regulation of NCC in vivo[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2018, 314(4):999-1007.
- [13] Ring AM, Cheng SX, Leng Q, et al. WNK4 regulates activity of the epithelial Na<sup>+</sup> channel in vitro and in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(10):4020-4024.
- [14] Heise CJ, Xu BE, Deaton SL, et al. Serum and glucocorticoid-induced kinase (SGK) 1 and the epithelial sodium channel are regulated by multiple with no lysine (WNK) family members[J]. J Biol Chem, 2010, 285(33):25161-25167.
- [15] Delaloy C, Lu J, Houot AM, et al. Multiple promoters in the WNK1 gene: one controls expression of a kidney-specific kinase-defective isoform[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(24):9208-9221.
- [16] Yuan YP, Zhao H, Peng LQ, et al. The SGK3-triggered ubiquitin-proteasome degradation of podocalyxin (PC) and ezrin in podocytes was associated with the stability of the PC/ezrin complex[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(11):1114.
- [17] 朱占芳, 徐蕾, 刘建虎, 等. WNK1 基因 rs2301880 位点多态性与血压钠反应性的家系关联分析[J]. 精准医学杂志, 2018, 33(2):107-109.
- [18] 王思远, 苏可, 严苗, 等. 抑制酪氨酸激酶 Src 对血管紧张素 II 诱导足细胞损伤的保护作用[J]. 武汉大学学报(医学版), 2016, 37(1):1-5.
- [19] Disse-Nicodème S, Achard JM, Desitter I, et al. A new locus on chromosome 12p13.3 for pseudohypoaldosteronism type II, an autosomal dominant form of hypertension[J]. Am J Hum Genet, 2000, 67(2):302-310.
- [20] Lai F, Orelli BJ, Till BG, et al. Molecular characterization of KLHL3, a human homologue of the Drosophila kelch gene [J]. Genomics, 2000, 66(1):65-75.
- [21] Boyden LM, Choi M, Choate KA, et al. Mutations in kelch-like 3 and cullin 3 cause hypertension and electrolyte abnormalities[J]. Nature, 2012, 482(7383):98-102.
- [22] Louis-Dit-Picard H, Barc J, Trujillano D, et al. KLHL3 mutations cause familial hyperkalemic hypertension by impairing ion transport in the distal nephron[J]. Nat Genet, 2012, 44(4):456-460.
- [23] Lin CM, Cheng CJ, Yang SS, et al. Generation and analysis of a mouse model of pseudohypoaldosteronism type II caused by KLHL3 mutation in BTB domain[J]. FASEB J, 2019, 33(1):1051-1061.
- [24] McCormick JA, Yang CL, Zhang C, et al. Hyperkalemic hypertension-associated cullin 3 promotes WNK signaling by degrading KLHL3 [J]. J Clin Invest, 2014, 124(11):4723-4736.
- [25] 牛伟, 周波, 吴萍, 等. 家族性高血钾型高血压 Cullin3 致病突变体 neddylation 异常的分子机制研究[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2016, 36(10):1420-1424.
- [26] Shao L, Cui L, Lu J, et al. A novel mutation in exon 9 of Cullin 3 gene contributes to aberrant splicing in pseudohypoaldosteronism type II [J]. FEBS Open Bio, 2018, 8(3):461-469.
- [27] Glover M, Ware JS, Henry A, et al. Detection of mutations in KLHL3 and CUL3 in families with FHHt (familial hyperkalaemic hypertension or Gordon's syndrome)[J]. Clin Sci(Lond), 2014, 126(10):721-726.

(收稿:2019-01-10 修回:2019-05-18)

(本文编辑:丁媛媛)