

应用外显子测序技术芯片对妊娠期单基因致病型高血压的研究

孙成娟 刘晓巍

摘要 **目的** 探讨妊娠中晚期因高血压急症终止妊娠患者的单基因致病型高血压基因的表达情况。**方法** 选取 2015 年 8 月 ~ 2017 年 6 月 31 例有慢性高血压病史且在妊娠 32 周前因高血压急症医源性终止妊娠孕妇和 31 例正常孕妇为研究对象,应用包含 43 个靶基因的 17 种单基因致病型高血压外显子复合芯片进行目标区域捕获测序。并对所有发现基因变异位点患者进行临床资料评估。**结果** 以亚洲人群的频率 <0.001 为标准,在 11 例患者中发现 12 个不同的基因变异,均为错义突变、杂合突变。突变致病型预测分析软件发现 PPARG、NF1、KLHL3 3 个基因的 4 个 DNA 变异可能与疾病相关。其中 PPARG 基因突变 (c.1276C > G) 位点突变频率极低,在 ExAC 数据库中未有该位点突变记录。**结论** 对因高血压急症终止妊娠患者可行单基因致病型高血压基因检测明确致病基因,给予用药指导。

关键词 单基因致病型高血压 外显子组测序技术 高血压急症 PPARG NF1 KLHL3

中图分类号 R71 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.09.016

Application of Exon Sequencing Technology in the Study of Single Gene Induced Hypertension in Hypertensive Emergencies Pregnancy.

Sun Chengjuan, Liu Xiaowei. Department of Perinatology, Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100026, China

Abstract **Objective** To investigate the association of single gene induced hypertension in pregnancy during the second trimester of pregnancy due to hypertensive emergencies. **Methods** Totally 31 pregnancy meeting criteria for termination of pregnancy with chronic hypertension before 32 weeks of gestation because of hypertensive emergencies and 31 normal pregnant women were recruited during the period of August 2015 and June 2019. The peripheral blood of chronic hypertension with hypertensive emergencies during pregnancy before 32 weeks were applied for the sequencing chips, which contains 43 target genes of 17 single - gene pathogenic hypertension exon in induced hypertension. Noninvasive gene sequencing was performed on the offspring of the captured sites. Clinical data were evaluated for all patients with identified gene mutation sites. **Results** In the 31 patients with a history of chronic hypertension who terminated iatrogenic pregnancy before 32 weeks of gestation due to acute hypertension, the frequency of Asian population <0.001 as the standard, 12 different gene mutations were found in 11 patients, all of which were missense mutations and heterozygous mutations. Polyphen - 2, SIFT, Mutation Taster and FATHMM, etc., were used to predict and analyze pathogenic types of mutations. 4 DNA mutations of PPARG, NF1 and KLHL3 genes were found to be related to disease. Among them, the mutation frequency of PPARG gene mutation (c.1276C > G) site is extremely low, and there is no record of mutation at this site in the ExAC database sequencing data of east Asian exome. **Conclusion** The single gene induced hypertension chip examination is necessary for patient with history of hypertensive emergencies in pregnancy, and give medication guide. Pregnancy with hypertensive emergencies were needs for chip examination to prolong gestational weeks by given special medication.

Key words Monogenic hypertension; Exome sequencing; Hypertensive emergencies; PPARG; NF1; KLHL3

妊娠期高血压是导致孕产妇及围生儿死亡的主要原因,妊娠期常用的降压药物为肾上腺受体阻滞剂(拉贝洛尔)、钙离子拮抗剂(硝苯地平、尼卡地平)和

α 受体阻滞剂(酚妥拉明)等^[1]。若血压仍无法控制,短期内迅速升高,发生高血压急症,必要时短期应用硝普钠降压后医源性终止妊娠,尤其是孕周 <28 周者,且这类胎儿存活率极低。单基因致病型高血压是由单个基因突变直接引发的高血压,常表现为难治性高血压,服用 3 ~ 4 种降压药物而血压仍不能达标,并且靶器官损害严重,起病时间早,程度重,同时伴有

基金项目:北京市医院管理局青年人才培养“青苗”计划项目 (QML20151301)

作者单位:100026 首都医科大学附属北京妇产医院围产医学部

通讯作者:刘晓巍,电子邮箱:liuxiaowei@mail.ccmu.edu.cn

较多并发症。单基因致病型高血压致病基因目前有 17 种,包括 40 余种亚型^[2,3]。国际上研究单基因致病型高血压多为男性患者或高血压门诊住院患者,而妊娠期进行单基因致病型高血压的发病情况的研究,目前国内外少有报道^[4,5]。随着妊娠的进展,心血管系统容量增加,增加了对孕妇合并症的考验。而单基因致病型高血压患者妊娠时,应用妊娠期常用的降压药物治疗无效。高血压急症可发生于有或没有既往存在慢性高血压病史的患者^[6]。国外对绝大多数单基因致病性高血压患者均进行了致病基因的突变检测,而国内在这方面的的工作亦初步开展。考虑到疾病的多样性和致病基因突变的多样性,本研究对符合纳入标准的病例进行临床表型的观察和相关基因的突变检测,以期发现新的突变,加深对单基因致病型高血压的认识,并为临床诊治妊娠期高血压疾病提供思路,并期望对既往有妊娠期高血压急症而导致不良妊娠结局病史且有再孕要求患者明确病因,给予针对性药物调整,改善妊娠预后。

资料与方法

1. 研究对象:选取 2015 年 8 月~2017 年 6 月在笔者医院行产前检查,有慢性高血压病史且于妊娠 32 周内因高血压急症终止妊娠的汉族孕妇 31 例为研究组,另选择同期无高血压家族史且无合并症和并发症的正常孕妇 31 例为对照组,均随访至分娩结束。高血压急症诊断标准:血压明显升高[舒张压达 120~130mmHg,同时合并靶器官损害;或收缩压 $\geq$ 220mmHg 和(或)舒张压 $\geq$ 140mmHg,无论有无症状]^[7];或应用盐酸拉贝洛尔 100mg,每 8h 口服 1 次,加用硝苯地平缓释片口服及应用拉贝洛尔静脉泵入及尼卡地平等多种药物静脉泵入,仍无法控制血压。排除多胎妊娠,排除因心力衰竭、肾功能不全、高血压眼底改变终止妊娠者,排除应用盐酸拉贝洛尔配合硝苯地平缓释片治疗可控制血压者。本研究经笔者医院医学伦理学委员会批准,研究对象均签署知情同意书。

2. 临床和实验室资料获得:通过查阅电子病历或电话咨询获得,包括年龄、孕周、高血压病程、身高、体重、基础血压、不同时期血钾水平及分娩后的血压。本实验在百世诺(北京)医疗科技有限公司进行。

3. 标本取材及检测内容:抽取研究组终止妊娠时和正常孕妇妊娠 32 周时肘静脉血 5ml,加入到含有 0.5ml 10% 乙二胺四乙酸二钾抗凝管中,立即提取基因组 DNA。

4. 基因组 DNA 的提取:使用 QIAamp[®] DNA 试剂盒(德国 Qiagen 公司),参照标准操作方法提取血液中 DNA。所有受检样本提取的 DNA 经过检测,吸光度(A)_{260/280}为 1.75~1.85,浓度 $>30\text{ng}/\mu\text{l}$,质量符合第 2 代测序要求,可以进行建库实验。

5. 目标基因芯片测序:使用液体处理自动化设备(美国 Perkin Elmer 公司)修改基于溶液的 Agilent SureSelect 目标富集系统(美国 Agilent 公司)制备文库。将 3 μg 基因组 DNA 随机片段化至 250bp 的平均大小,片段末端修补,接头连接,缺口修补纯化,扩增文库。同时靶基因定位,第 2 次扩增测序。31 例制备好的样本文库和 31 例对照文库均使用 MiSeq Reagent Kits V2 试剂盒(美国 Illumina 公司)参照标准方案上机,在 MiSeq 测序平台上进行大规模平行测序。测序得到的原始图像数据经过碱基识别转化为序列数据,对得到的测序结果完成质量评估后进行生物信息学分析。

6. 单基因致病型高血压不同外显子复合芯片:基因包括 NF1B、CLCNKB、BSND、SDHC、AGT、CYP17A1、MEN1、SDHD、KCNJ5、SCNN1A、SLC12A1、SCNN1G、HSD11B2、NF1、CUL3、NF2、PPARG、CASR、NR3C2、GDNF、NR3C1、CYP11B1、CLCNKA、SDHB、KCNJ10、REN、RET、SDHAF2、CCND1、KCNJ1、WNK1、MAX、SLC12A3、SCNN1B、ACE、WNK4、TMEM127、VHL、CACNA1D、AGTR1、SDHA、KLHL3、CYP21A2、KIF1B。

7. 测序质量评估:每个碱基的测序质量值(Q_{phred} 值)是由公式 $Q_{\text{phred}} = -10\log_{10}(e)$ 转化得到,其中 Q30 表示碱基正确识别率达到 99.9%。本研究的测序数据的质量主要分布在 Q30($\geq 90\%$)以上,这样可以更好地保证后续分析的准确性。使用去冗余后的比对结果进行覆盖度、深度等统计。当一个位点的碱基覆盖深度达到 150~100 倍以上,并且该位点的突变频率 $>20\%$,则认为该位点处检测出的单核苷酸多态性比较可信。

8. 受检样本测序比对分析:本研究采用的参考基因组是 Human GRCh37/hg19。使用 BWA 软件将测序片段比对回参考基因组序列上,并使用 Picard 软件去除测序序列中的重复。应用 Picard 软件去除聚合酶链反应扩增导致的重复序列后,应用 CLC Genomics Workbench 软件进行序列对比和寻找基因差异。变异基因的检测和定位致病变异。排除常见的基因多态性:等义突变,等位基因频率 $\geq 1\%$ (基于 GO Ex-

ome 序列基因计划 <http://evs.gs.washington.edu>, 1000Genomes 计划 <http://www.1000genomes.org>); 在正常人中发现的多态性位点; 使用 PolyPhen 软件和 SIFT 软件预测基因多态性变异, 前者评分越接近于 1, 后者评分 < 0.1 被认为变异致病性越强。然后使用 4 个在线突变致病性预测分析软件 Polyphen-2、SIFT、Mutation Taster 和 FATHMM 对 12 个变异进行生物信息学层面的突变致病性分析, 得到每个变异的致病性预测。

结 果

31 例高血压急症患者每个 DNA 样本的碱基测序深度在 45 ~ 160 倍的范围内, 10 倍以上测序覆盖度占比 98.731% ± 0.508%。

考虑到高血压急症约占所有高血压患者的 1% ~ 2%, 且高血压患者在所有人群中约占 1/7, 因

此高血压急症在所有人群中占比约为 2‰。在进行变异筛选时, 结合考虑该疾病可能的多基因致病特点, 本研究将等位基因频率大于 1‰的变异过滤掉, 因而保留 31 例患者中所有等位基因频率低于 1‰的变异。然后进一步仅保留错义突变、移码突变、无义突变、内含子剪接位点突变, 最终在 11 例患者中发现 12 个不同的基因变异, 涉及 10 个不同基因。这 12 个变异的类型均为错义突变、杂合突变。通过查阅包括千人基因组和 ExAC 等外显子组测序数据库, 本研究发现的 12 个变异中有 7 个变异的等位基因频率在这两个数据库中均为 0, 表明这些变异非常罕见。然后使用 4 个在线突变致病性预测分析软件 Polyphen-2、SIFT、Mutation Taster 和 FATHMM 对 12 个变异进行生物信息学层面的突变致病性分析, 得到每个变异的致病性预测(表 1)。

表 1 对高血压急症患者测序发现的罕见变异的生物信息学分析

患者 编号	基因	NCBI 中的 mRNA 编号	突变类型	DNA 变异	氨基酸改变	Polyphen-2 预测 ^a	SIFT 预测 ^b	Mutation Taster 预测 ^c	FATHMM 预测 ^d
3	KIF1B	NM_183416	错义突变	c.2573T > C	p.L858S	P(0.809)	T(0.21)	D(1.000)	T(-0.74)
7	PPARG	NM_005037	错义突变	c.1276C > G	p.P426A	D(0.996)	D(0.02)	D(1.000)	D(-4.21)
8	NR3C1	NM_000176	错义突变	c.376A > G	p.I126V	D(0.991)	T(0.10)	D(1.000)	T(0.94)
11	AGTR1	NM_009585	错义突变	c.1007C > T	p.T336M	B(0.004)	T(0.12)	D(0.854)	T(0.39)
13	NF1	NM_000267	错义突变	c.8093C > T	p.S2698L	D(0.962)	D(0.02)	D(1.000)	T(3.29)
14	CUL3	NM_001257198	错义突变	c.111C > A	p.N37K	B(0.031)	T(0.08)	D(1.000)	T(1.56)
15	HSD11B2	NM_000196	错义突变	c.1213C > T	p.R405W	B(0.0)	D(0)	N(1.000)	D(-1.76)
17	KLHL3	NM_001257194	错义突变	c.112G > A	p.A38T	P(0.861)	D(0.03)	D(1.000)	T(-0.78)
19	WNK1	NM_014823	错义突变	c.4583G > A	p.S1528N	P(0.447)	D(0.04)	N(1.000)	T(0.42)
25	WNK1	NM_213655	错义突变	c.2341G > A	p.A781T	N.A.	T(0.18)	D(1.000)	T(0.91)
26	NF1	NM_000267	错义突变	c.8345C > T	p.P2782L	D(0.994)	D(0.01)	D(1.000)	T(3.3)
27	SLC12A3	NM_000339	错义突变	c.2489T > A	p.I830N	B(0.071)	T(0.56)	D(0.983)	D(-3.14)

^aPolyphen-2 的预测值范围是从 0 到 1, 数值越接近 1 代表变异致病性越强, D 代表很可能致病, P 代表可能致病, B 代表该突变是良性的, N. A. 代表该位点无法进行预测; ^bSIFT 的预测值范围是从 0 到 1, 数值越接近 0 代表变异致病性越强, D 代表变异是有害的, T 代表变异是可以忍受的; ^cMutation Taster 的预测值代表预测的准确性, 数值越接近 1 代表该预测的可信程度越高, D 代表变异可能致病, N 代表变异是多态性; ^dFATHMM 是一种通过隐马尔可夫模型而做出的功能分析, D 代表变异是有害的, T 代表变异是可以忍受的

涉及 PPARG、NF1、KLHL 3 个基因的 4 个变异被 ≥ 3 个软件预测为可能致病。特别是 PPARG 基因突变(c.1276C > G; p.P426A)同时被 4 个在线突变致病性分析软件预测为致病性突变, 且该位点突变的频率极低, 在 ExAC 数据库的东亚人种外显子组测序数据中尚未有该位点突变的记录, 以上均提示该基因

突变很可能与导致高血压急症的致病突变相关。对致病突变进行病例回顾及妊娠期化验检查发现, 4 例患者的风湿免疫化验结果均为阴性, 不考虑由免疫系统疾病导致的高血压急症, 因高血压急症或胎儿宫内窘迫(胎心型)以剖宫产终止妊娠, 新生儿均存在胎儿生长受限(表 2)。

表 2 具有致病突变的妊娠期单基因致病型高血压患者的一般情况

患者编号	年龄(岁)	基因	DNA 变异	血钾(mmol/L)	病史
7	29	PPARG	c.1276C > G	2.66 ~ 2.99	慢性高血压病史, FGR
13	28	NF1	c.8093C > T	4.01 ~ 4.17	肾功能受损, FGR
15	36	KLHL3	c.112G > A	4.64 ~ 5.98	FGR
26	30	NF1	c.8345C > T	3.8 ~ 3.86	早发型重度子痫前期病史; 中孕期胎死宫内; 32 周终止妊娠

讨 论

大多数高血压是行为和环境因素共同作用的结果,然而基因突变也被确定为原因之一。我国高血压患者达 2.43 亿,而难治性高血压占 10% ~ 12%,其中继发性高血压占高血压比例 6% ~ 12%。单基因高血压是继发性高血压重要病因之一。目前已明确的单基因致病性高血压有 17 种,其中包含 40 余种亚型。《单基因遗传性心血管疾病基因诊断指南》中,根据受累基因的功能分为 3 类:①基因突变直接影响远端肾小管的远曲小管和(或)集合管细胞的钠转运系统,增加水钠吸收,包括 Liddle's 综合征、Gordon's 综合征、类盐皮质激素增多症和妊娠加重型高血压;②基因突变导致肾上腺类固醇合成异常,进而造成远端肾单位的盐皮质激素受体异常激活,远端肾小管钠转运失调,包括家族性醛固酮增多症、先天性肾上腺皮质增生症和家族性糖皮质激素抵抗综合征等;③以嗜铬细胞瘤等为代表的、在肿瘤综合征基础上合并了高血压表现的各种神经内分泌肿瘤,包括嗜铬细胞瘤/副神经节瘤、多发性内分泌腺瘤、VHL 综合征、神经纤维瘤病等^[7,8]。

当孕妇年龄 ≤ 40 岁并应用多种降压药物,血压控制仍不满意,临床上除了考虑为子痫前期病情进展,同时需要警惕是否存在单基因致病型高血压。后者靶器官损害通常较严重,发病年龄轻,治疗困难,常呈现家族聚集性发病,部分患者为散发性基因突变,其确诊需基因检测,而常见的各项临床生化检查只能作为辅助手段。这些致病基因主要与调节血压的激素合成、代谢以及激素作用的靶细胞位点有关,集中在肾脏和肾上腺的相关细胞内。而单基因致病型高血压治疗必须个性化治疗,针对独特的盐皮质激素、糖皮质激素或交感神经通路紊乱给予对症治疗。对于年龄 < 35 岁的高血压患者,一旦有高血压家族遗传史,且具有低血浆肾素活性特征时,应考虑进行基因筛查。基因筛查有助于早期病因诊断,行针对性的特异治疗;并且能够通过筛查直系亲属,发现携带突变的家庭成员,达到早期诊断、早期针对性治疗和改善预后的目的^[2]。目前尚未有妊娠期单基因致病型高血压的相关研究。

本研究应用外显子测序技术芯片发现 2 例早发型重度子痫前期患者存在抑癌基因 NF1 突变(c. 8093C > T, c. 8345C > T),而 NF1 突变导致神经纤维瘤病 1 型是神经纤维瘤病中最常见的类型,主要表型包括神经纤维瘤、典型的牛奶咖啡斑的色素沉着、癫痫或智力障碍^[9~11]。一项针对动物实验的文

献认为,NF1 基因可能与血管性疾病的发生存在因果关系^[12]。本研究中虽然这 2 例早发性重度子痫前期患者存在 NF1 基因突变(c. 8093C > T, c. 8345C > T),但无典型的临床表型,故 NF1 基因的某些突变类型及突变基因产物的比例与临床表型关系尚不清楚。NF1 基因突变检测结果为阳性并不能预测疾病的严重程度或并发症。

既往研究表明,过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferators - activated receptors, PPARs, PPARG)下调基质金属蛋白酶 9 mRNA 表达,阻碍胎盘雌激素和基质金属蛋白酶的合成分泌,可导致胎盘缺血缺氧,胎儿生长受限^[13]。本研究中 1 例既往因孕中期慢性高血压和胎儿畸形引产的 29 岁孕妇,此次妊娠自早孕期血压进行性升高,伴有低钾血症,孕 32 周因为高血压急症并发重度子痫前期行剖宫产终止妊娠,胎儿生长受限;基因检测为错义突变, c. 1276C > G, 氨基酸发生改变为 p. P426A, 是 PPARG1 异构体转录子 4 发生变异,与变异 2 在 5'非翻译区和 5'编码区有所不同。患者低钾血症推测可能由于 PPARG 基因突变,导致 ATP 敏感钾通道活性增加引起,目前正在进行家系验证中。

本研究发现 1 例慢性高血压并发早发性高血压患者 KLHL3 (Kelch - like 3) 基因发生杂合突变,使碱基由 G 变为 A,氨基酸 p. A38T 发生改变。而 KLHL3 基因是引起以高血压、高钾血症而肾小球滤过率正常为特征 Gordon 综合征的重要组成基因之一。作为常染色体显性遗传疾病,Gordon 综合征发病基因包括 WNK1 (With - No - Lysine 1)、WNK4 (With - No - Lysine 4)、CUL3 (cullin - 3) 和 KLHL3 4 个基因。KLHL3/CUL3 泛素连接酶可以降解 WNK1、WNK4 调节血压^[14,15]。KLHL3 中成分的突变引起持续性肾脏钠重吸收增加和钾离子的分泌受损,导致高血压和高钾血症。Ishizawa 等^[16]研究发现 KLHL3 泛素连接酶复合物参与低钾介导的肾脏中 Na - Cl 协同转运蛋白的激活。本研究中发现 1 例 KLHL3 基因碱基由 G 变为 A,氨基酸 p. A38T 发生改变,考虑其代谢产物通过影响泛素连接酶,调整血管紧张素信号通路,并导致 Na - Cl 持续性重吸收,同时损害钾离子的分泌。既往研究表明无论是 KLHL3^{s433N} 还是 KLHL3^{s433G} 的替代都可以导致高血压和高钾血症,而氢氯噻嗪及限钠饮食能够有效纠正患者的电解质紊乱和高血压^[17]。给予该患者氢氯噻嗪降压和限钠饮食治疗后血压控制理想,并嘱其避免口服高盐、高钾食物。

综上所述,本研究应用外显子测序技术芯片对妊娠期单基因致病型高血压进行研究,以亚洲人群的频率 <0.001 为标准,在11例患者中发现12个不同的基因变异,均为错义突变、杂合突变。突变致病型预测分析软件发现PPARG、NF1、KLHL 3个基因的4个DNA变异可能与疾病相关。其中PPARG基因突变(c.1276C>G)位点突变频率极低,在ExAC数据库中未有该位点突变记录。本研究单基因致病型高血压发生率明显高于文献报道率,考虑与笔者医院为全国孕产妇危重症抢救中心,病情危重的妊娠期高血压病例集中有关,且此项研究应用外显子测序技术芯片的基因检测,诊断明确。

对于妊娠期高血压疾病,目前临床上强调的主要是妊娠期血压监测,但对既往有高血压不良孕产史患者的随访及再次妊娠患者的指导目前还欠缺。目前有相当数量妊娠期高血压急症患者或者既往因血压高,应用多种降压药物无法控制血压,不得不在孕中晚期终止妊娠患者,无法期待至胎儿存活且早产儿常合并胎儿生长受限或各系统发育不完善而预后欠佳者,有迫切的再次生育的要求。应对此类患者进行病因诊断、完善免疫系统疾病、机体是否存在血液高凝状态的同时,应用外显子测序技术芯片进行基因诊断,明确是否存在单基因致病型高血压。这将有助于进一步阐明妊娠期高血压疾病发生的分子机制,可为妊娠期高血压急症的防治提供新思路,为妊娠期急进型高血压治疗寻找有效的干预靶点,一方面可以明确病因,给予用药指导;另一方面可以提前预防,改善妊娠结局。这对母婴近远期合并症的预防、提高人口素质具有重要的社会效益和经济效益。

参考文献

- 1 杨孜,张为远.妊娠期高血压疾病诊治指南[J].中华妇产科杂志,2020,55(4):227-236
- 2 邹玉宝,孙筱璐,王继征,等.单基因致病型高血压[J].中国医学前沿杂志:电子版,2016,8(5):16-22
- 3 Padmanabhan S, Caulfield M, Dominiczak AF. Genetic and molecular aspects of hypertension[J]. Circ Res, 2015, 116(6): 937-59
- 4 Awadalla M, Patwardhan M, Alsamsam A, et al. Management of liddle syndrome in pregnancy: a case report and literature review[J].

- Case Rep Obstet Gynecol, 2017, 2017: 6279460
- 5 Hayes NE, Aslani A, McCaul CL. Anaesthetic management of a patient with Liddle's syndrome for emergency caesarean hysterectomy [J]. Int J Obstet Anesth, 2011, 20(2): 178-180
- 6 Martin JF, Higashima E, Garcia E, et al. Hypertensive crisis profile. Prevalence and clinical presentation [J]. Arq Bras Cardiol, 2004, 83(2): 125-136
- 7 李为民,王政.高血压急症的处理原则与经验[J].中国实用内科杂志,2007,27(2):102-105
- 8 中华医学会心血管病学分会,精准心血管病学学组,中国医疗保健国际交流促进会,等.单基因遗传性心血管疾病基因诊断指南[J].中华心血管病杂志,2019,47(3):175-196
- 9 Evans DG, Howard E, Giblin C, et al. Birth incidence and prevalence of tumor-prone syndromes: estimates from a UK family genetic register service[J]. Am J Med Genet A, 2010, 152A(2): 327-332
- 10 Upadhyaya M, Huson SM, Davies M, et al. An absence of cutaneous neurofibromas associated with a 3-bp inframe deletion in exon 17 of the NF1 gene(c.2970-2972 delAAT): evidence of a clinically significant NF1 genotype-phenotype correlation [J]. Am J Hum Genet, 2007, 80(1): 140-151
- 11 Moles KJ, Gowans GC, Gedela S, et al. NF1 microduplications: identification of seven nonrelated individuals provides further characterization of the phenotype[J]. Genet Med, 2012, 14(5): 508-514
- 12 Milewicz DM, Kwartler CS, Papke CL, et al. Genetic variants promoting smooth muscle cell proliferation can result in diffuse and diverse vascular diseases: evidence for a hyperplastic vasculomyopathy [J]. Genet Med, 2010, 12(4): 196-203
- 13 Li W, Mata KM, Mazzuca MQ, et al. Altered matrix metalloproteinase-2 and -9 expression/activity links placental ischemia and anti-angiogenic sFlt-1 to uteroplacental and vascular remodeling and collagen deposition in hypertensive pregnancy [J]. Biochem Pharmacol, 2014, 89(3): 370-385
- 14 Ohta A, Schumacher FR, Mehellou Y, et al. The CUL3-KLHL3 E3 ligase complex mutated in Gordon's hypertension syndrome interacts with and ubiquitylates WNK isoforms: disease-causing mutations in KLHL3 and WNK4 disrupt interaction [J]. Biochem J, 2013, 451(1): 111-122
- 15 Shibata S, Zhang J, Puthumana J, et al. Kelch-like 3 and Cullin 3 regulate electrolyte homeostasis via ubiquitination and degradation of WNK4[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(19): 7838-7843
- 16 Ishizawa K, Xu N, Loffing J, et al. Potassium depletion stimulates Na-Cl cotransporter via phosphorylation and inactivation of the ubiquitin ligase Kelch-like 3 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 480(4): 745-751
- 17 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

(收稿日期:2021-03-18)

(修回日期:2021-04-10)

(上接第6页)

- 19 中央纪委国家监委网站.中国日记I从1.3万到700,国家医保局“灵魂砍价”又来了[EB/OL]. https://www.ccdi.gov.cn/toutu/202011/t20201106_229490.html,2020-11-06
- 20 仇雨临,王昭茜.守正、发展与创新:“十四五”时期医疗保障的完善思路[J].行政管理改革,2021,4:32-41
- 21 于保荣.未来5-10年中国医疗保障制度的设计与思考——《中共中央国务院关于深化医疗保障制度改革的意见》的解读[J].

卫生经济研究,2020,37(4):3-7

- 22 何文炯.健全多层次社会保障体系[N].中国社会科学报,2021,5(13):1
- 23 国家医疗保障局.国家医疗保障局关于《医疗保障法(征求意见稿)》公开征求意见的公告[G]. http://www.nhsa.gov.cn/art/2021/6/15/art_48_5268.html,2021-06-15

(收稿日期:2020-06-10)

(修回日期:2020-08-30)