中华高血压杂志（中英文）
CHINESE JOURNAL OF HYPERTENSION
ISSN 1673-7245
CN 11-5540/R
主管：国家疾病预防控制局
主办：中华预防医学会
福建医科大学

G蛋白耦联受体激酶4变异体R65L在盐敏感性高血压发生中的作用及机制

蒋良宏，王 静，郑 硕，余骏逸，曾春雨

在线阅读 View online: https://doi.org/10.16439/j.issn.1673-7245.2025-0394

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

盐摄入量对不同盐敏感性高血压患者反应性充血指数及颈-股动脉脉搏波传导速度的影响

中华高血压杂志. 2024, 32(3): 243-250 https://doi.org/10.16439/j.issn.1673-7245.2024.03.009

高敏C反应蛋白/白蛋白比值与新发高血压的关联

中华高血压杂志. 2025, 33(4): 343-350 https://doi.org/10.16439/j.issn.1673-7245.2025.04.008

25羟基维生素D_3与高血压的因果关系及高敏C反应蛋白的中介作用：中介孟德尔随机化研究

中华高血压杂志. 2025, 33(7): 653-660 https://doi.org/10.16439/j.issn.1673-7245.2024-0175

黄芪甲苷通过抑制氯化物细胞内通道蛋白4/ADP核糖基化因子6信号通路改善血管紧张素Ⅱ诱导的高血压大鼠模型的心肌损伤

中华高血压杂志. 2024, 32(1): 43-50 https://doi.org/10.16439/j.issn.1673-7245.2024.01.010

解耦联蛋白2在大鼠高血压心肌重构中的作用

中华高血压杂志. 2023, 31(5): 435-441 https://doi.org/10.16439/j.issn.1673-7245.2023.05.007

盐敏感性高血压相关基因变异位点研究进展

中华高血压杂志. 2024, 32(6): 535-541 https://doi.org/10.16439/j.issn.1673-7245.2024.06.006

关注微信公众号，获得更多资讯信息

•论 著•

G 蛋白耦联受体激酶 4 变异体 R65L 在盐敏感性高血压发生中的作用及机制

蒋良宏[1,2,3]，王静[4]，郑硕[2,3]，余骏逸[2,3]，曾春雨[1,2,3,4]

1. 西南医科大学附属医院心血管内科，四川 泸州 646000；2. 陆军军医大学大坪医院心血管内科；
3. 老年心脑血管病教育部重点实验室(陆军军医大学)；4. 昆明医科大学第一附属医院心血管内科

摘要：目的 探讨 G 蛋白耦联受体激酶 4(GRK4)γ 变异体 R65L 在盐敏感性高血压发生中的作用及机制。**方法** 通过成簇规律间隔短回文重复序列关联蛋白 9(CRISPR-Cas9)基因编辑技术将人源性野生型(WT)及 R65L 变异体 *GRK4γ* 基因敲入大鼠基因组，构建人源化 *GRK4 γ* WT 及 *GRK4γ* R65L 基因敲入大鼠，并分别研究 *GRK4γ* R65L 变异体对基础血压及肾脏尿钠排泄功能、4% 高盐饮食后血压及肾脏尿钠排泄功能的影响，检测肾脏尿钠排泄关键调控受体多巴胺 D1 受体(D1R)的表达及磷酸化水平变化情况。**结果** 通过 CRISPR-Cas9 技术构建了 h*GRK4γ* WT 及 h*GRK4γ* R65L 基因敲入大鼠模型。正常盐饮食(0.4% 氯化钠)条件下，h*GRK4γ* R65L 大鼠与 h*GRK4γ* WT 大鼠及野生型 SD 大鼠在基础血压、尿量及尿钠排泄方面差异均无统计学意义[基础尿钠：(1.678 ± 0.336)比(1.730 ± 0.295)比(1.678 ± 0.328) mmol/kg，F = 0.063，P = 0.939；尿量：(41.03 ± 6.08)比(38.68 ± 7.03)比(43.57 ± 6.56) mL/kg，F = 1.178，P = 0.327]。给予高盐饮食(4% 氯化钠)诱导后，与 h*GRK4γ* WT 及野生型 SD 大鼠相比，h*GRK4γ* R65L 大鼠表现出显著的血压升高，伴随尿钠排泄能力显著降低[(7.156 ± 0.685)比(6.680 ± 1.235)比(3.722 ± 0.706) mmol/kg，F = 25.00，P＜0.05]。肾脏动脉灌注结果显示，h*GRK4γ* R65L 大鼠肾脏多巴胺 D1R 介导的利尿利钠作用显著下降，提示肾脏多巴胺 D1R 功能受损。D1R 蛋白表达水平未发生明显变化，而 D1R 蛋白磷酸化水平升高。**结论** *GRK4γ* R65L 变异体导致肾脏尿钠排泄功能降低和盐敏感性高血压发生，*GRK4γ* R65L 介导的肾脏 D1R 过度磷酸化是潜在分子机制。

关键词： G 蛋白耦联受体激酶 4； 高血压； 盐敏感性高血压； 多巴胺受体

Role of the G protein-coupled receptor kinase 4 R65L variant in salt-sensitive hypertension

JIANG Lianghong[1,2,3], WANG Jing[4], ZHENG Shuo[2,3], YU Junyi[2,3], ZENG Chunyu[1,2,3,4]

1. Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, 646000, China;
2. Department of Cardiology, Daping Hospital, Third Military Medical University; 3. Key Laboratory of Geriatric Cardiovascular and Cerebrovascular Disease Research (Army Medical University), Ministry of Education;
4. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University

Abstract: Objective To investigate the role and mechanism of the G protein-coupled receptor kinase 4γ (*GRK4γ*) variant R65L in the development of salt-sensitive hypertension. **Methods** Humanized *GRK4γ* wild-type (WT) and *GRK4γ* R65L gene knock-in rats were generated using Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein 9 (CRISPR-Cas9) gene editing technology to introduce the human *GRK4γ* WT or R65L variant into the rat genome. The effects of the *GRK4γ* R65L variant on basal blood pressure and renal sodium excretion, as well as on blood pressure and renal sodium excretion after a high-salt diet (4% NaCl), were investigated. Changes in the expression and phosphorylation levels of the key renal natriuretic regulatory receptor, dopamine D1 receptor (D1R), were detected. **Results** In this study, humanized *GRK4γ* WT and *GRK4γ* R65L gene knock-in rats were successfully constructed using CRISPR-Cas9 technology. Under normal salt diet (0.4% NaCl), no difference was observed in basal blood pressure, urine volume, or urinary sodium excretion among wild-type SD rats, h*GRK4γ* WT or h*GRK4γ* R65L rats (baseline urinary sodium: [1.678 ± 0.336] *vs.*

doi: 10.16439/j.issn.1673-7245.2025-0394

基金项目(Fund programs)： 国家自然科学基金项目(82530015, 82522009)；重庆市自然科学基金创新发展联合基金项目(市教委)(CSTB2024NSCQ-LZX0131)

通信作者(Corresponding authors)： 曾春雨(ZENG Chunyu)；余骏逸(YU Junyi)

［1.730 ± 0.295］*vs*.［1.678 ± 0.328］mmol/kg, F = 0.063, P = 0.939; urine volume:［41.03 ± 6.08］*vs*.［38.68 ± 7.03］*vs*.［43.57 ± 6.56］mL/kg, F = 1.178, P = 0.327). After administration of a high-salt diet (4% NaCl), compared with h*GRK4γ* WT and wild-type SD rats, h*GRK4γ* R65L rats exhibited significantly elevated blood pressure and a marked reduction in urinary sodium excretion (［7.156 ± 0.685］*vs*.［6.680 ± 1.235］*vs*.［3.722 ± 0.706］mmol/kg, F = 25.00, P < 0.05). Renal artery perfusion experiments further revealed a significant impairment in diuresis and natriuresis mediated by the renal dopamine D1R in h*GRK4γ* R65L rats. While the protein expression level of D1R remained unchanged, its phosphorylation level was significantly increased, indicating dysfunction of renal D1R. **Conclusions** The *GRK4γ* R65L variant leads to impaired renal sodium excretion and salt-sensitive hypertension. Excessive phosphorylation of renal D1R induced by *GRK4γ* R65L may be the potential mechanism.

Keywords: *G protein-coupled receptor kinase 4* γ; hypertension; salt-sensitive hypertension; dopamine receptor

高血压是心血管疾病的首要危险因素，其发病机制复杂，受到遗传和环境因素共同调节。我国高血压患者数量众多，其中盐敏感人群比例高，且大部分患者存在容量负荷过重的情况[1]，肾脏通过水钠排泄在血压长期调控中发挥核心作用[2]。肾脏血管紧张素受体、多巴胺受体等 G 蛋白耦联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)在肾脏尿钠排泄稳态维持中发挥重要作用，肾脏 GPCR 活性异常导致尿钠潴留，进而引起高血压发生[3]。GPCR 活性主要受 G 蛋白耦联受体激酶(G protein-coupled receptor kinase, GRK)介导的磷酸化修饰调控[4-6]，GRK 由 7 种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(GRK 1-7)组成，其中 GRK4 主要在大脑和肾脏组织中表达，在血压调控中发挥关键作用。GRK4 编码基因位于人染色体 4p16.3 位点，目前发现 *GRK4* 基因存在 4 种剪接变体，分别为 *GRK4α*(最长形式)、*GRK4β*(无外显子 2)、*GRK4γ*(无外显子 15)和 *GRK4δ*(无外显子 2 和 15)[3]。全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)提示 *GRK4γ* 基因的三种变体亚型(R65L、A142 V 和 A486V)与高血压发病呈正相关[7-11]。本团队前期通过动物实验证实，*GRK4γ* A142V 变异体能够介导肾脏多巴胺 D1 受体(dopamine D1 receptor, D1R)过度磷酸化，导致肾脏尿钠排泄异常，诱发自发性高血压[12-13]。GWAS 提示，携带 *GRK4γ* R65L 变异体的高血压患者需用更强的药物类型，特别是利尿剂类降压药，才能达到与携带 *GRK4γ* 野生型基因的高血压患者相同的降压水平[14]；而在特定族群正常血压人群中，*GRK4γ* R65L 变异体携带频率与肾脏尿钠排泄能力呈负相关[15]，但 *GRK4γ* R65L 变异体对肾脏尿钠排泄功能及高血压发病的影响仍不清楚。为实现在体水平研究 *GRK4γ* R65L 变异体对血压的调控作用，并利用肾脏动脉灌注实验探究肾脏尿钠排泄功能，本研究通过成簇规律间隔短回文重复序列关联蛋白 9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein 9, *CRISPR-Cas*9)基因编辑技术构建人源性 *GRK4γ* R65L 变异体大鼠模型，探讨其参与高血压发生的作用。

1　材料与方法

1.1　人源化 *GRK4γ* WT(humanized *GRK4γ* WT, *GRK4γ* WT)及 *hGRK4γ* R65L(humanized *GRK4γ* R65L, hGRK4γ R65L)变异体大鼠的构建　采用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术结合同源重组修复策略，针对大鼠 *GRK4* 基因设计两对单向导 RNA(single-guide RNA, sgRNA)：引导 RNA1(guide RNA, gRNA)(反向链)：TAACCCCAGGGGGGATTTCAGGG；gRNA2(正向链)：AGACAAAATTCTTACCACGTGCGG，供体载体包含以下元件：5'和 3'同源臂(各 1～2 kb)、CAG 启动子、Kozak 序列(GCCGCCACC)、人源 *GRK4* 互补 DNA (complementary DNA, cDNA)(含 R65L 变异)、rBG polyA 信号，通过显微注射将 Cas9 mRNA(50 ng/μL)、sgRNAs(各 25 ng/μL)和供体载体(20 ng/μL)混合导入 Sprague-Dawley(SD)大鼠受精卵，将携带人源 *GRK4* WT 或 R65L 变异体(CGT→CTT)的 *GRK4γ* 基因编码序列(coding sequence, CDS)区敲入大鼠 *GRK4* 基因第 3、4 号外显子；经聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、DNA 印迹法(Southern blot)和测序等多重验证获得阳性 F0 代，并通过繁殖获得稳定遗传的杂合子和纯合子大鼠品系。该基因敲入大鼠由 Cyagen(苏州赛业生物科技有限公司)协助构建。

1.2　实验动物　所有实验大鼠饲养于陆军军医大学大坪医院动物中心 12/12 h 光照/黑暗循环的温控室内。并自由采食正常盐饲料(0.4% NaCl)及正常饮水。在 9 周龄时，将雄性(250～350 g)SD 大鼠组、h*GRK4γ* WT 组与 h*GRK4γ* R65L 组大鼠转换为高盐饲料(high-salt, HS, 4.0% NaCl)饲喂 4 周，期间使用无创鼠尾测压仪检测血压和尿钠[16]。研究中使用的方案获得了陆军军医大学动物使用和福利委员会的批准(AMUWEC20247153)，所有实验均符合动物伦理使用指南。实验结束时，将大鼠在戊巴比妥麻醉(60 mg/kg)下处死。各基因型大鼠基础状态血压检测使用相同周龄雌雄大鼠，由于雌激素潜在介导盐抵抗效应，高盐饮食诱导实验均使用同周龄雄

性大鼠[17]。

1.3 大鼠血压测量 用 Softron(北京软隆生物技术有限公司)智能无创鼠尾血压仪 BP-2010A 检测大鼠血压,在安静条件下将清醒大鼠放于 37 ℃ 加热筒中预热 15 min 左右,使尾部血管扩张。连接无创鼠尾测压仪,将套囊置于大鼠尾巴根部,待波形稳定后开始测量血压,测定 10～15 次/只,记录收缩压、舒张压及平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)并分析数据。

1.4 24 h 动态血压监测 采用 2.5% 戊巴比妥钠麻醉大鼠,消毒备皮后,于左侧腹外侧做一切口,分离并暴露左侧髂动脉。用一丝线阻断髂动脉近心端,于髂动脉远心端做一切口。将植入子(DSI; HD-S10)导管沿切口插入左侧髂动脉,并逆行入腹主动脉。清除周围渗血,结扎插入髂动脉导管。在左侧下腹部间隙固定植入子,逐层缝合切口。待术后恢复 1 周,开启血压监测软件和植入子,成功感应后,连续体内血压监测。血压测量期间,给予充足进食进水,保持安静舒适的周围环境。完成测量后,关闭数据发生器,停止监测。

1.5 大鼠 24 h 基础尿量及尿钠排泄率测定 在收集尿液之前,将 h*GRK4γ* R65L 大鼠及 h*GRK4γ* WT 大鼠置于大鼠代谢笼,给予正常进食及饮水,使其适应代谢笼 24 h 之后,再进行尿钠的收集。代谢笼下安装尿液过滤网(120 目),并接 50 mL 离心管同步收集尿液。24 h 后,取下离心管,采用 4 000 转/min 转速,低温离心 10 min(离心机半径 17 cm)后取上清,测量其体积,并送至大坪医院检验科测定尿钠,分析数据。

1.6 肾动脉灌注手术 大鼠的详细手术过程如前所述[16],用戊巴比妥(50 mg/kg, 腹膜内)麻醉 9～10 周龄大鼠,进行气管切开及气管导管插管(PE-240)。通过大鼠右侧静脉输注 0.8 mg/100 g 的戊巴比妥钠维持麻醉,将导管(PE-50)置入大鼠左侧颈外静脉进行补液。将导管置入右侧颈动脉连接心电监护仪以监测全身动脉压。剖腹手术时,对源自右肾动脉的右肾上动脉插入导管(PE-10),以 40 μL/h 的速率输注溶剂(生理盐水)或药物。对右侧和左侧输尿管插管(PE-10)采集尿液,持续约 1 h。手术过程中的液体损失在 30 min 内用 1% 体重的 5% 白蛋白生理盐水溶液替代。在 2 h 的平衡期后,连续 5 次收集尿液,每次 40 min。在第一阶段通过右肾上动脉输注的溶剂单独给药作为基线,末次采集作为恢复期以形成自身对照。将收集到的尿液送至大坪医院检验科测量尿钠浓度。

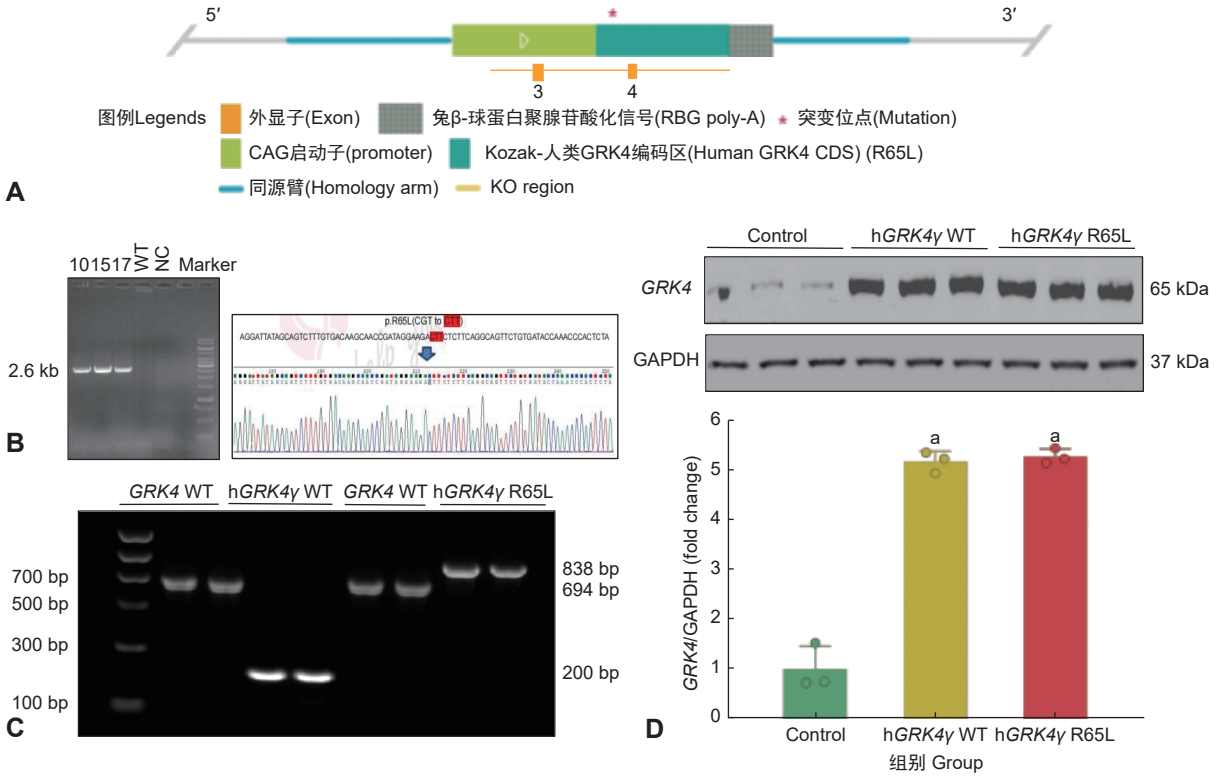
1.7 蛋白质免疫印迹 用放射免疫沉淀测定(radio immunoprecipitation assay, RIPA)裂解缓冲液(碧云天, P0013B)制备细胞或组织裂解物。用 BCA 蛋白质测定试剂盒(碧云天, P0010S)定量蛋白质浓度。将等量的蛋白质用 8% 聚丙烯酰胺凝胶进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),然后电转移到硝酸纤维素膜(nitrocellulose membrane, NC)膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 Tris 缓冲盐水(Tris-buffered saline with Tween-20, TBST)封闭 1 h。将印迹的膜与以下一抗在 4 ℃ 下孵育过夜:抗 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(1∶50 000; 小鼠; 武汉三鹰; 60004-1-Ig)、抗 D1R 抗体(1∶200; 小鼠; Santa Cruz Biotechnology; sc-518273)、抗 AT2 抗体(1∶1 000; 兔; Abcam; ab92445)、抗 GRK4 抗体(1∶500; 兔; Origene; TA323501)。将膜用 TBST 洗涤 3 次,并与相应二抗[驴抗兔红外线(infrared, IR)染料 800, 驴抗小鼠 IR 染料 800; 1∶15 000; Li-Cor Biosciences]在室温下孵育 1 h。洗涤后,通过 Odyssey 红外成像系统观察条带。用 Quantity One 图像分析软件通过光密度测定法分析蛋白质条带的相对强度。GAPDH 用作内部对照以归一化对应于每个条带的灰度值。所有一抗均由生产商通过蛋白质印迹法验证,并如免疫沉淀方案中所述。所有实验至少重复 3 次。

1.8 蛋白质免疫共沉淀 为了测定 D1R 磷酸化水平,将大鼠肾皮质在冰冷的蛋白裂解缓冲液[Western 及免疫沉淀(immunoprecipitation, IP)细胞裂解液; 碧云天; P0013]中匀浆 1 h, 并在 12 000 转/min 下离心 15 min。测量蛋白浓度后,将等量的肾匀浆(300 μg /mL 蛋白上清液)与亲和纯化的抗磷酸丝氨酸/苏氨酸抗体(Abcam, 兔; ab 17464)(5 μg/mL)、抗磷酸丝氨酸抗体(小鼠; Santa Cruz biotechnology; sc-81514)孵育 1 h, 并与 protein G/A 磁珠(MCE; HY-K0202)4 ℃ 下置于翻转混合仪孵育 12 h。磁性分离,将免疫沉淀物用裂解缓冲液洗涤 3 次,室温,每次 10 min。将沉淀悬浮在样品缓冲液中,煮沸 10 min, 并用 D1R(1∶200; 小鼠; Santa Cruz biotechnology; sc-518273)抗体进行免疫印迹。为了确定免疫印迹上发现的条带的特异性,使用免疫(immunoglobulin G, IgG)(小鼠; 武汉三鹰; B900620)作为阴性对照进行免疫沉淀。

1.9 统计学方法 统计分析用 GraphPad Prism 9.0 软件(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)。所有数据先进行正态性检验(Shapiro-Wilk 检验)和方差齐性检验(Levene 检验)。符合正态分布且方差齐的数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间比较用独立样本 t 检验;三组及以上比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),事后检验用 Tukey 多重比较法。若方差不齐,则用 Welch 方差分析,事后检验用 Games-Howell 法。对于重复测量数据,用双因素重复测量方差分析(two-way repeated measures ANOVA),若数据不满足球形假设则用 Greenhouse-Geisser 校正,事后检验用 Bonferroni 法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　人源性 h*GRK4γ* R65L 大鼠的构建　通过 CRISPR-Cas9 介导的同源重组技术(图 1A)，在 SD 大鼠背景上构建了人源性 h*GRK4γ* WT 及 *GRK4γ* R65L 变异体基因敲入 F0 代大鼠，将 F0 代大鼠与野生型大鼠进行交配获得 F1 代大鼠，选取外源基因成功整合的 F1 代大鼠进行建系(大鼠基因组 5'同源臂与人源 *GRK4* 序列总长为 2.6 kb，图 1B)，使用 PCR 鉴定大鼠基因型(图 1C)。使用蛋白质免疫印迹，在 h*GRK4γ* WT 及 *GRK4γ* R65L 变异体大鼠的肾脏组织中验证了 h*GRK4γ* 蛋白成功过表达(图 1D)。综上，本研究构建了 h*GRK4γ* WT 及 R65L 变异体敲入大鼠，用于 *GRK4γ*R65L 变异体在体功能研究。



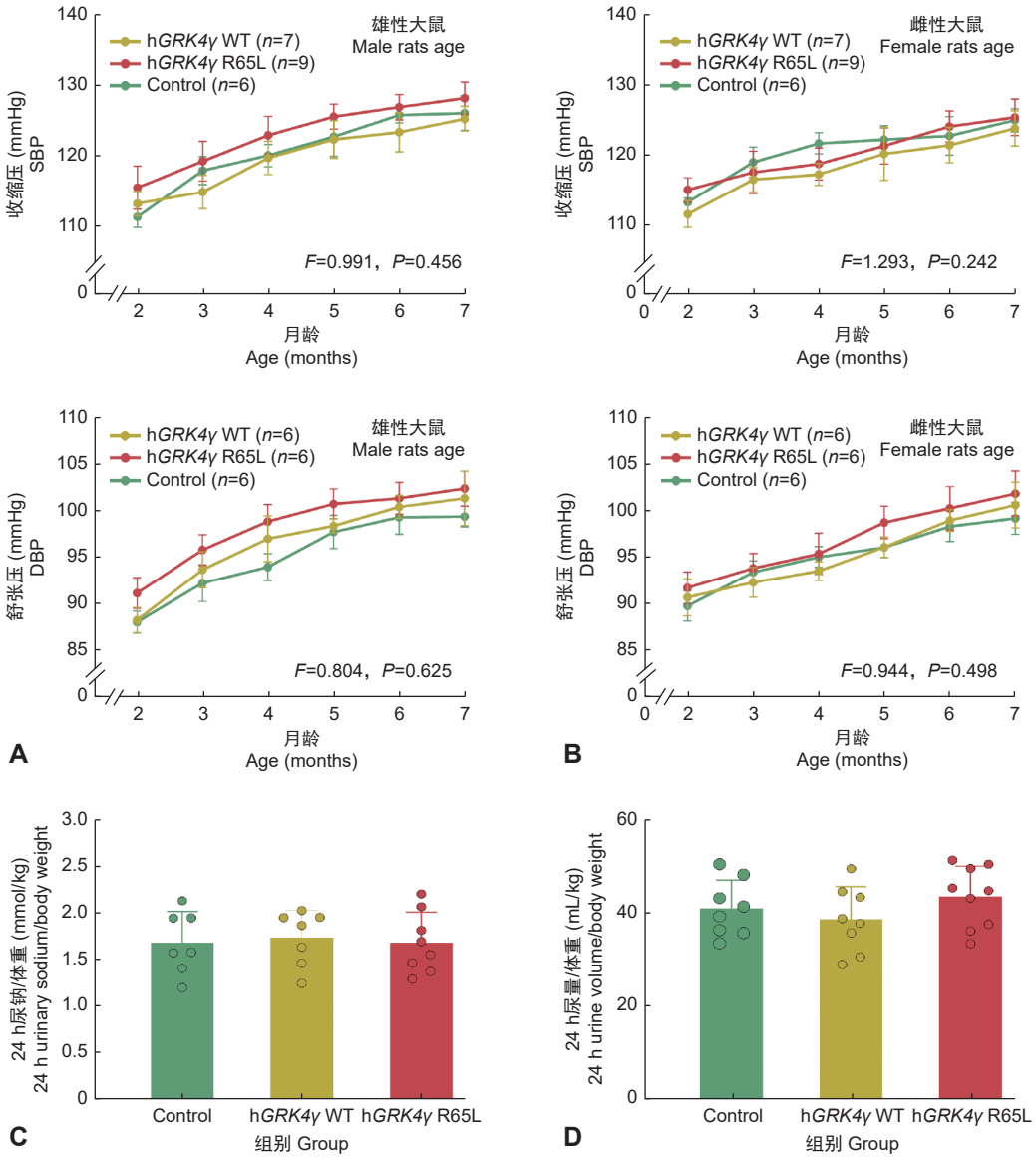
注：A，模式图展示将 SD 大鼠 *GRK4* 基因的第三第四外显子替换为人源性含 R65L 变异序列的 *GRK4γ* 编码序列(CDS)；B，DNA 电泳展示子一代 h*GRK4γ* R65L 大鼠聚合酶链式反应(PCR)结果(左)及代表性 DNA 测序结果(右)，子一代大鼠编号 10、15、17 号大鼠 PCR 均为 h*GRK4γ* R65L 基因型大鼠，提示敲入成功并稳定遗传；C，子一代大鼠互交产生的纯合子 *GRK4* WT 野生型大鼠(694 bp)、h*GRK4γ* R65L 大鼠(838 bp)及 h*GRK4γ* WT(200 bp)大鼠 PCR 基因鉴定电泳图；D，蛋白质免疫印迹检测 SD 大鼠(对照组，Control)，纯合子 h*GRK4γ* WT 大鼠及 h*GRK4γ* R65L 大鼠肾脏皮质组织中人源性 GRK4 蛋白表达情况的代表图及统计分析($n=3$)。与 SD 大鼠组比较，$^aP<0.05$。h*GRK4γ* 人源化 G 蛋白偶联受体激酶 4 γ；WT 为野生型；GRK 为 G 蛋白偶联受体激酶 4；R65L 为变异体 R65L；NC 为阴性对照；Marker 为标志物；GAPDH 为抗 3-磷酸甘油醛脱氢酶。GAPDH 为抗 3-磷酸甘油醛脱氢酶。

A, The 3rd and 4th exons of the *GRK4* gene in SD rats were replaced with the humanized *GRK4γ* CDS containing the R65L variant. B, PCR (left) and DNA sequencing (right) of F1 *GRK4γ* R65L rats. Rats number 10, 15, and 17 were positive for the h*GRK4γ* R65L genotype, indicating successful knock-in. C, PCR genotyping of homozygous *GRK4γ* WT (694 bp), humanized *GRK4γ* R65L (838 bp), and humanized *GRK4γ* WT (200 bp) rats from F1 intercrosses. D, Western blot and quantification of humanized *GRK4* in renal cortex of control SD rats, homozygous h*GRK4γ* WT, and h*GRK4γ* R65L rats ($n=3$). $^aP<0.05$ *vs* control. Abbreviations: h*GRK4γ* , humanized G protein-coupled receptor kinase 4γ; WT, wild-type; *GRK4γ* , G protein-coupled receptor kinase 4γ; PCR, polymerase chain reaction.

图 1　构建 h*GRK4γ* WT 及 *GRK4γ* R65L 变异体基因敲入大鼠

Figure 1　Construction of humanized *GRK4γ* WT and *GRK4γ* R65L mutant gene knock-in rats

2.2　*GRK4γ* R65L 变异体对大鼠基础血压及尿钠的影响　采用大鼠鼠尾血压测量仪检测 2～7 月龄 SD 大鼠(Control)、纯合子 h*GRK4γ* WT 大鼠及 h*GRK4γ* R65L 大鼠的血压，发现基础状态下，与 SD 大鼠相比，h*GRK4γ* WT 大鼠及 h*GRK4γ* R65L 大鼠收缩压及舒张压变化趋势无统计学意义(图 2A，B)，在 12 周龄时基础尿钠[(1.678 ± 0.336)比(1.730 ± 0.295)比(1.678 ± 0.328) mmol/kg，$F=0.063$，$P=0.939$]、尿量[(41.03 ± 6.08)比(38.68 ± 7.03)比(43.57 ± 6.56) mL/kg，$F=1.178$，$P=0.327$]差异也无统计学意义(图 2C，D)，提示在基础状态下，h*GRK4γ* WT 及 h*GRK4γ* R65L 变异体对血压及尿钠排泄功能无显著影响。



注：A, 雄性 SD 大鼠、hGRK4γ R65L 大鼠与 hGRK4γ WT 大鼠 2～7 月龄收缩压（F=0.991, P=0.456）、舒张压（F=0.804, P=0.625）；B, 雌性 SD 大鼠、hGRK4γ R65L 大鼠与 hGRK4γ WT 大鼠 2～7 月龄收缩压（F=1.293, P=0.242）、舒张压（F=0.944, P=0.498）；C 和 D, 12 周龄 SD 大鼠（对照组，Control），纯合子 hGRK4γ WT 大鼠及 hGRK4γ R65L 大鼠的尿钠（C）与尿量（D）（n≥7）。

A, Systolic blood pressure (F=0.991, P=0.456) and diastolic blood pressure (F=0.804, P=0.625) in male SD rats, hGRK4γ R65L rats and hGRK4γ WT rats at 2–7 months of age (between-group comparison, P≥0.05); B, Systolic blood pressure (F=1.293, P=0.242) and diastolic blood pressure (F=0.944, P=0.498) in female SD rats, hGRK4γ R65L rats and hGRK4γ WT rats at 2–7 months of age (between-group comparison, P≥0.05); C and D, Urinary sodium(C) and urine volume (D) in 12-week-old SD rats (Control), homozygous hGRK4γ WT rats and hGRK4γ R65L rats (n≥7). Abbreviations: SBP, systolic bloodpressure; DBP, diastolic blood pressure.

图 2 h*GRK4γ* WT 及 h*GRK4γ* R65L 变异体对基础血压及尿钠排泄的影响

Figure 2 Effects of h*GRK4γ* WT and h*GRK4γ* R65L mutants on basal blood pressure and urinary sodium excretion

2.3 *GRK4γ* R65L 变异体加重高盐饮食诱导的血压升高伴尿钠排泄障碍 对 8 周龄雄性 SD 大鼠 (Control), 纯合子 h*GRK4γ* WT 大鼠及 h*GRK4γ* R65L 大鼠进行 4 周 4% NaCl 高盐饮食喂养[18]（图 3A）。在基线期（0.4% NaCl, 第 0 天），3 组大鼠收缩压差异无统计学意义，给予高盐饮食（HS, 4.0% NaCl）后，h*GRK4γ* R65L 大鼠随着高盐饮食喂养时间的延长，收缩压呈现逐渐升高的趋势，且收缩压显著高于 SD 大鼠及 h*GRK4γ* WT 大鼠，而 h*GRK4γ* WT 大鼠与 SD 大鼠血压在高盐饮食后升高趋势不显著，且无明显差异（图 3B），高盐饮食 4 周后 24 h 动态血压显示 h*GRK4γ* R65L 大鼠收缩压显著高于 SD 大鼠及 h*GRK4γ* WT 大鼠（图 3C）。高盐饮食 48 h 后，将 3 组大鼠置于代谢笼中收集 24 h 尿钠，发现 h*GRK4γ* R65L 大鼠的钠排泄量显著低于 h*GRK4γ* WT 大鼠和 SD 大鼠[图 3D;（7.156 ± 0.685）比（6.680 ± 1.235）比（3.722 ± 0.706）mmol/kg, F = 25.00,

$P<0.05$]。h*GRK4γ* R65L 大鼠的尿钠排泄与血压的关系图(图 3E)相对于 h*GRK4γ* WT 大鼠和 SD 大鼠右移，表明 h*GRK4γ* R65L 大鼠排钠负荷的能力受损。上述结果提示，h*GRK4γ* R65L 变异体能够加重盐敏感性高血压及肾脏尿钠排泄异常。

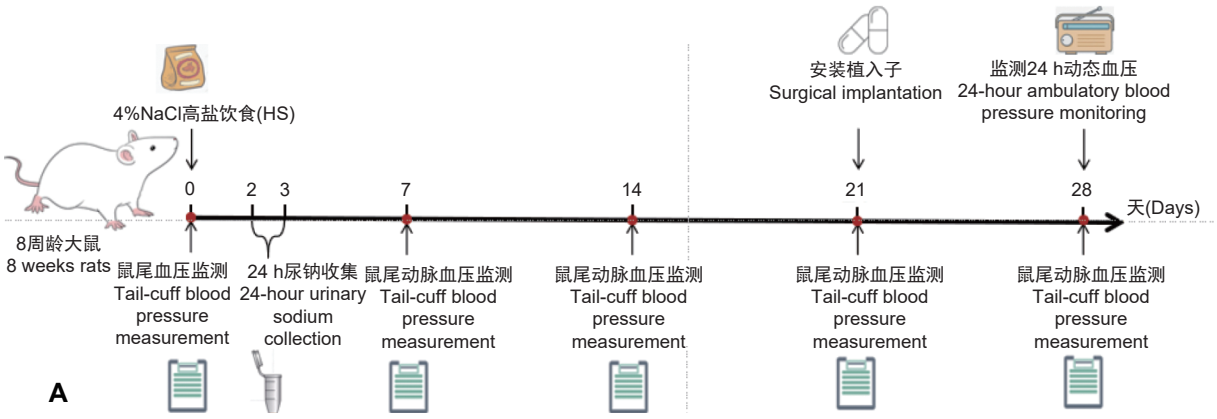
2.4　h*GRK4γ* R65L 大鼠的肾脏 D1R 功能受损　为了研究 *GRK4γ* R65L 变异体是否通过抑制肾脏降压受体 D1R 活性导致尿钠排泄障碍，在 h*GRK4γ* WT 大鼠及 h*GRK4γ* R65L 大鼠通过肾内动脉灌注 D1 样受体激动剂非诺多泮[16]，发现 h*GRK4γ* WT 大鼠的尿流量和钠排泄显著增加，而在 h*GRK4γ* R65L 大鼠中，非诺多泮无法诱导 D1R 受体介导的利尿和尿钠作用(图 4 A，B)，提示 *GRK4γ* R65L 变异体能够导致 D1R 受体失活。

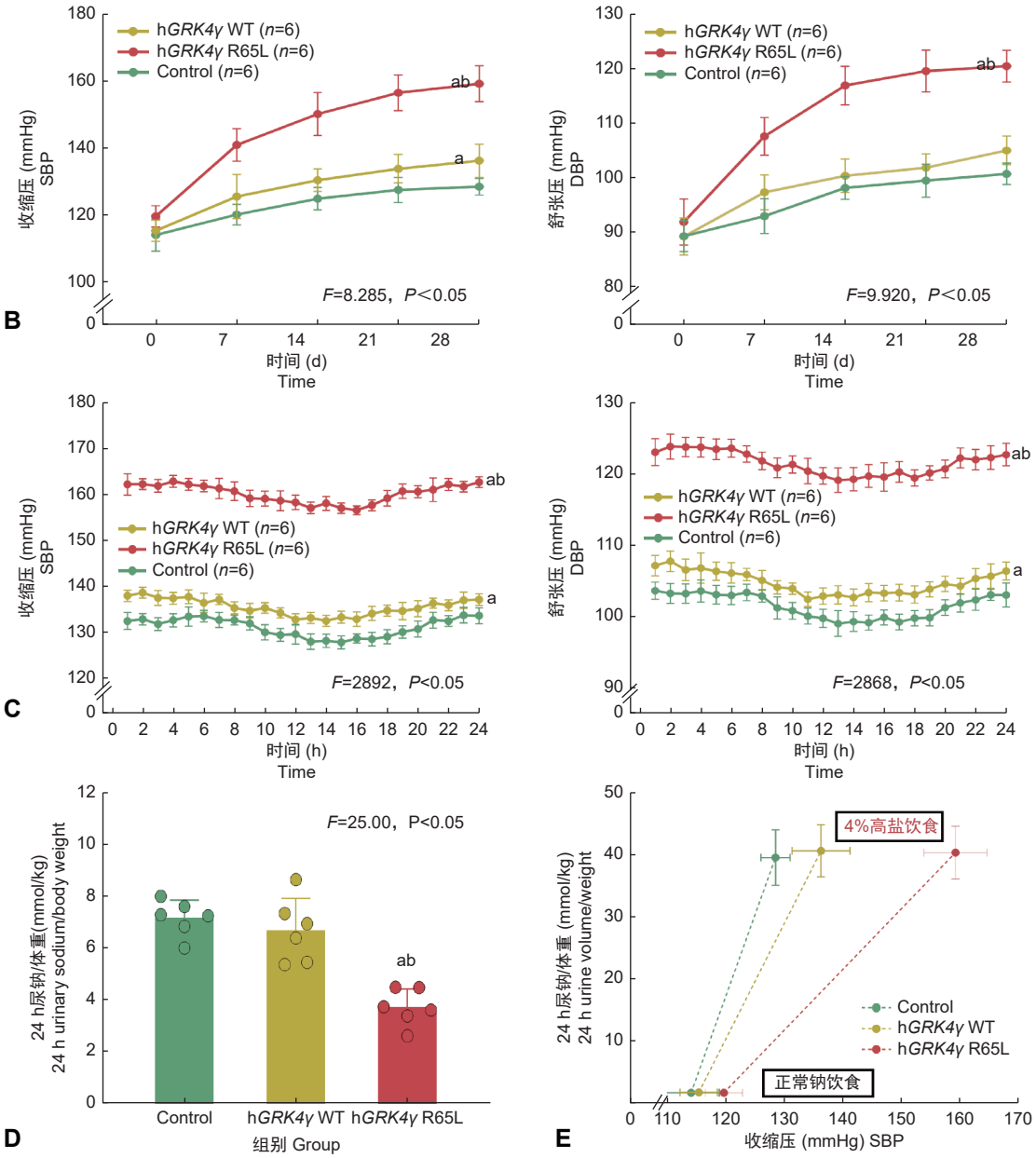
肾脏多巴胺是重要的内源性降压因子，通过其 1 型受体(D1R)，促进肾小管钠排泄，发挥降血压作用[19-21]。本研究检测了 h*GRK4γ* WT 大鼠及 h*GRK4γ* R65L 大鼠肾皮质中 D1R 表达水平，发现尽管 D1R 蛋白(图 4 C)表达水平在两组之间差异无统计学意义，但在 h*GRK4γ* R65L 大鼠的肾皮质中，D1R 磷酸化水平(图 4D)显著高于 h*GRK4γ* WT 大鼠，提示 h*GRK4γ* R65L 大鼠盐敏感高血压的发生机制与 D1R 磷酸化水平升高有关。

3　讨　论

既往多项 GWAS 提示，人染色体 4p16.3 中 *GRK4* 基因座位与高血压及盐敏感性相关[3,22]，*GRK4γ* 变异体与原发性高血压、盐敏感性高血压发病相关[3]，在高加索人群、我国北方汉族人群中的遗传学研究报道了 *GRK4γ* A486V 变异体与原发性高血压相关，*GRK4γ*R65L、A142V 变异体与男性原发性高血压患者舒张压升高相关[23-25]。当研究对象纳入盐敏感高血压患者后，在日本人群中 *GRK4* 基因变异体在盐敏感性高血压患者中出现的频率显著增高，排出盐负荷的能力也与 *GRK4* 基因变异体是否存在具有负相关性[15]；在黑人正常血压青少年群体中，*GRK4γ* R65L 变异体与尿钠排泄能力呈负相关[26]；在另一项加纳非洲人群研究中，结合血管紧张素转换酶水平后，*GRK4γ* R65L 变异体具有最高的高血压风险预测效能[27]；GWAS 提示，携带 *GRK4γ* R65L 变异体的高血压患者需要使用更强的药物类型，特别是利尿剂类降压药，才能达到与 *GRK4* 野生型基因携带的高血压患者相同的降压水平[14]。上述人群研究提示，*GRK4γ* R65L 变异体可能通过肾脏尿钠排泄调控，介导盐敏感性高血压发生，但需要动物研究证实其在高血压发病中的因果作用。本团队前期通过动物研究证实 *GRK4γ* A142V 变异体能够引发自发性高血压[28]，*GRK4γ* A486V 变异体能够引发盐敏感性高血压[29]，但 *GRK4γ* R65L 变异体在高血压发生发展的作用及调控机制尚不明确。因此，本研究首次构建了人源性 *GRK4γ* WT 及 *GRK4γ* R65L 变异体转基因大鼠。在体研究发现，h*GRK4γ* R65L 转基因大鼠在高盐饮食后血压显著升高，同时伴随尿钠排泄能力下降，表明 *GRK4γ* R65L 变异体能够导致盐敏感性高血压发生，而人源性 *GRK4γ* WT 及 *GRK4γ* R65L 变异体转基因大鼠为盐敏感性高血压研究提供了新的动物模型。我国盐敏感人群比例较高[30]，部分高血压患者出现容量负荷过重的状况[1]，此动物模型能够更好地解释盐敏感高血压患者血压升高的机制。

肾脏 D1R 是重要的内源性降压受体。既往研究发现，在肾脏中 GRK4 能诱导 D1R 过度磷酸化，导致其与 G 蛋白解偶联，从而抑制多巴胺等内源性降压因子促进肾小管的钠排泄功能[10,12-13]。本研究发现，h*GRK4γ* R65L 转基因大鼠的肾脏组织中尽管 D1R 蛋白表达量未发生改变，但其磷酸化水平显著升高。D1R 在 *GRK4γ* R65L 介导的尿钠排泄异常中的必要作用也通过肾脏灌注 D1R 激动剂非诺多泮加以证实。既往研究部分阐述盐敏感高血压的发生机制[31]。本研究提示，与其他 GRK4 变异体分子功能相似，*GRK4γ* R65L 增加 GRK4 活性从而增加肾脏 D1R 磷酸化效应，减弱以 D1R 为代表的利尿类 GPCR 尿钠排泄功能。



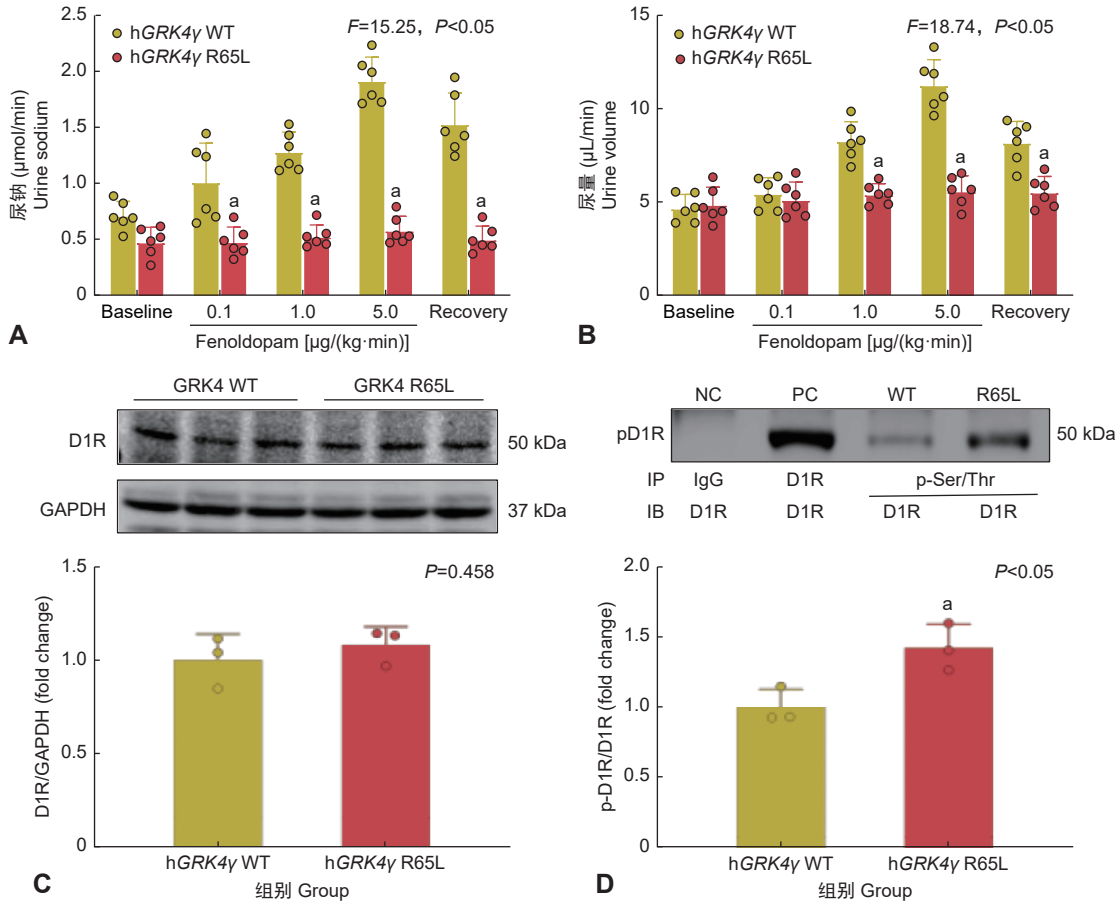


注：A, 高盐饮食诱导及血压测量示意图；B, 8 周龄雄性 SD 大鼠(对照组 Control)，纯合子 h*GRK4γ* WT 大鼠及 h*GRK4γ* R65L 大鼠饲喂 4% NaCl 高盐饮食后鼠尾袖带法检测收缩压(F = 8.285, P<0.05)(左)、舒张压(F = 9.920, P<0.05)(右)情况；C, 8 周龄雄性 SD 大鼠(对照组，Control)，纯合子 h*GRK4γ* WT 大鼠及 h*GRK4γ* R65L 大鼠饲喂 4% NaCl 高盐饮食 4 周后植入子检测收缩压(F = 2892, P<0.05)(左)、舒张压(F =2868, P<0.05)(右)情况；D, 4% NaCl 高盐饮食 2 d 后 SD 大鼠(对照组，Control)，纯合子 h*GRK4γ* WT 大鼠及 h*GRK4γ* R65L 大鼠 24 h 尿钠情况(n = 6, 组间比较，F = 25.00, P<0.05)；E, 高盐饮食 4 周后 SD 大鼠(对照组，Control)，纯合子 h*GRK4γ* WT 大鼠及 h*GRK4γ* R65L 大鼠尿钠排泄曲线(n = 6)。与 SD 大鼠组比较，^{a}P<0.05；与 h*GRK4γ* WT 组比较，^{b}P<0.05。h*GRK4γ* 为人源化 G 蛋白耦联受体激酶 4γ；R65L 为变异体 R65L；WT 为野生型。

A, Schematic diagram of high-salt diet treatment and blood pressure measurement; B, Systolic blood pressure (left) (F = 8.285, P < 0.05) and diastolic blood pressure (right) (F = 9.920, P < 0.05) measured by tail-cuff method in 8-week-old male SD rats (Control), homozygous h*GRK4γ* WT rats and h*GRK4γ* R65L rats after being fed a 4% NaCl high-salt diet (P < 0.05); C, Systolic blood pressure (left) (F = 2892, P < 0.05) and diastolic blood pressure (right) (F = 2868, P<0.05) detected by implantable telemetry in 8-week-old male SD rats (Control group), homozygous h*GRK4γ* WT rats and h*GRK4γ* R65L rats after 4 weeks of 4% NaCl high-salt diet (P<0.05); D, 24 h urinary sodium excretion in SD rats (Control group), homozygous h*GRK4γ* WT rats and h*GRK4γ* R65L rats after 2 days of 4% NaCl high-salt diet (n = 6, comparison among groups, F = 25.00, P<0.05); E, Urinary sodium excretion curve in SD rats (Control group), homozygous h*GRK4γ* WT rats and hGRK4γ R65L rats after 4 weeks of high-salt diet (n = 6). Compared with the SD rat group, ^{a}P < 0.05; compared with the hGRK4γ WT group, ^{b}P < 0.05. Abbreviation: h*GRK4γ*, humanized G protein-coupled receptor 4 γ; SBP, systlic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure.

图 3 h*GRK4γ* R65L 加重高盐饮食诱导的血压升高伴尿钠排泄障碍

Figure 3 h*GRK4γ* R65L exacerbates high-salt diet-induced hypertension accompanied by impaired urinary sodium excretion



注：肾动脉灌注后绝对钠排泄量(A)和 24 h 尿量(B)水平检测，hGRK4γ R65L 大鼠与 hGRK4γ WT 大鼠肾脏按照 0.04 mL/min 速率灌注不同剂量[0.1、1、5 μg/(kg·min)]多巴胺受体激动剂非诺多泮(*n*=6，组间比较，A：*F* =15.25，*P*＜0.05；B：*F* =18.74，*P*＜0.05)；C，蛋白免疫印迹检测 4%NaCl 高盐饮食后肾脏皮质 D1R 蛋白表达情况(*n*=3，*t*=0.821，*P*=0.458)；D，蛋白质免疫共沉淀检测 4% NaCl 高盐饮食后大鼠肾脏皮质 D1R 蛋白磷酸化水平(NC 组为阴性对照，PC 组为阳性对照，*n*=3，*t*=3.480，*P*＜0.05)。与 hGRK4γ WT 大鼠组比较，^{a}P＜0.05。Baseline 为基线期；Recovery 为恢复期；WT 为野生型；hGRK4γ 为人源化 G 蛋白耦联受体激酶 4γ；D1R 为多巴胺 D1 受体；Fenoldopam 为非诺多泮(多巴胺受体激动剂)；IP 为免疫沉淀；IB 为免疫印迹；GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶；P-Ser/Thr 为磷酸化丝氨酸/磷酸化苏氨酸；IgG 同型普通阴性对照抗体；fold change 为 hGRK4γ R65L 组蛋白信号与 hGRK4γ WT 对照组蛋白信号均值之比。

Levels of absolute sodium excretion (A) and 24- hour urine volume (B) after renal artery perfusion. Kidneys from hGRK4γ R65L and hGRK4γ WT rats were perfused with fenoldopam, a dopamine receptor agonist, at different doses [0.1, 1, 5 μg/(kg·min)] at a rate of 0.04 mL/min [*n*= 6, between- group comparison: A: *F*=15.25, *P*< 0.05, B: *F*=18.74, *P*< 0.05]. C: Renal cortical D1R protein expression after 4% NaCl high-salt diet detected by Western blot (*n*=3, *t*=0.821, *P*=0.458). D: Renal cortical D1R protein phosphorylation after 4% NaCl high-salt diet detected by co-immunoprecipitation (NC, negative control group; PC, positive control group; *n*=3, *t*=3.480, *P*< 0.05). ^{a}P< 0.05 vs hGRK4γ WT rat group. Abbreviations: Baseline: baseline phase; Recovery: recovery phase; WT: wild-type; hGRK4γ: human G-protein-coupled receptor kinase 4γ; D1R: dopamine D1 receptor; Fenoldopam: dopamine receptor agonist; IP: immunoprecipitation; IB: immunoblotting; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; P-Ser/Thr: phosphorylated serine / phosphorylated threonine; IgG: isotype-matched negative control antibody; fold change: the ratio of mean protein signal in hGRK4γ R65L group to mean protein signal in hGRK4γ WT control group.

图 4　h*GRK4γ* R65L 大鼠的 D1R 功能受损

Figure 4　Impaired D1R function in h*GRK4γ* R65L rats

本研究仍有局限性。首先，*GRK4γ* R65L 变异体对除 D1R 之外的 GPCR 的调控作用尚未明确。其次，本研究用 h*GRK4γ* 全身敲入大鼠，替换大鼠原有 *GRK4* 基因，旨在模拟人类 *GRK4γ* R65L 变异体携带者基因，随后通过肾脏尿钠排泄机制部分阐明其在盐敏感性高血压中的必要作用，但在非肾脏组织(如血管和中枢神经系统)中对血压的作用，仍有待于探索。此外，转化研究方面，针对 *GRK4γ* R65L 的干预措施(如抑制剂或基因治疗)是否能够逆转高血压表型，仍需进一步验证。

综上所述，*GRK4γ* R65L 变异体通过增强肾脏 D1R 的磷酸化，损伤肾脏尿钠排泄功能，进而促进盐敏感性高血压的发生。这一发现不仅深化了对高血压发病机制的理解，也为开发针对性治疗策略提供理论依据。

利益冲突声明　无利益冲突

作者贡献声明 蒋良宏：研究设计、实验操作、数据收集与分析、论文初稿撰写；王静：数据整理、实验操作；郑硕：实验操作、数据收集；余骏逸：经费支持、课题管理、实验设计、文章修改及校审；曾春雨：经费支持、研究设计、课题管理、学术指导、文章修改与审校

本主题国内外已有的结论

• GRK4 通过调控肾脏钠排泄参与高血压发病。

• GWAS 发现 *GRK4γ* 存在多个与高血压显著相关的变异体，如 R65L、A142V、A486V。*GRK4γ* A142V、*GRK4γ* A486V 在高血压中的作用机制，但 *GRK4γ* R65L 与高血压之间的因果关联缺乏实验证据。

本文特色与见解

• 利用 CRISPR-Cas9 技术精准基因编辑技术，首次构建 h*GRK4γ* R65L 基因敲入大鼠模型，相较于基因过表达动物模型，更能够模拟基因变异体携带人群的基因背景。

• *GRK4γ* R65L 在高盐饮食条件下可独立引发血压升高与尿钠排泄障碍，明确了其作为盐敏感性高血压致病因素的因果作用。

参考文献

[1] 高血压联盟 (中国), 中国医疗保健国际交流促进会高血压病学分会,《高血压患者高容量负荷的评估和管理专家共识》委员会. 高血压患者高容量负荷的评估和管理专家共识[J]. 中华高血压杂志(中英文), 2025, 33(10): 906-912.

[2] Wadei HM, Textor SC. The role of the kidney in regulating arterial blood pressure[J]. Nat Rev Nephrol, 2012, 8(10): 602-609.

[3] Yang J, Hall JE, Jose PA, et al. Comprehensive insights in GRK4 and hypertension: from mechanisms to potential therapeutics[J]. Pharmacol Ther, 2022, 239: 108194.

[4] Li L, Homan KT, Vishnivetskiy SA, et al. G protein-coupled receptor kinases of the GRK4 protein subfamily phosphorylate inactive G protein-coupled receptors (GPCRs)[J]. J Biol Chem, 2015, 290(17): 10775-10790.

[5] Varney MJ, Benovic JL. The role of G protein-coupled receptors and receptor kinases in pancreatic β-Cell function and diabetes[J]. Pharmacol Rev, 2024, 76(2): 267-299.

[6] Gao P, Cao M, Wang X, et al. G protein-coupled receptor kinase 3 exacerbates diabetic heart injuries through direct phosphorylation of cannabinoid receptor 2 in humans and mice[J]. Circulation, 2025, 152(12): 882-898.

[7] Sanada H, Yoneda M, Yatabe J, et al. Common variants of the G protein-coupled receptor type 4 are associated with human essential hypertension and predict the blood pressure response to angiotensin receptor blockade[J]. Pharmacogenomics J, 2016, 16(1): 3-9.

[8] Benovic JL. Historical perspective of the G protein-coupled receptor kinase family[J]. Cells, 2021, 10(3): 555.

[9] Yang J, Villar VA, Armando I, et al. G protein-coupled receptor kinases: crucial regulators of blood pressure[J]. J Am Heart Assoc, 2016, 5(7): e003519.

[10] Watanabe H, Xu J, Bengra C, et al. Desensitization of human renal D1 dopamine receptors by G protein-coupled receptor kinase 4[J]. Kidney Int, 2002, 62(3): 790-798.

[11] Kimura L, Angeli CB, Auricchio MTBM, et al. Multilocus family-based association analysis of seven candidate polymorphisms with essential hypertension in an african-derived semi-isolated brazilian population[J]. Int J Hypertens, 2012, 2012: 859219.

[12] 曾春雨, 王铮, 杨志伟, 等. G 蛋白激酶 4γA142V 转基因小鼠血压升高的机制探讨[J]. 中华心血管病杂志, 2006, 34(5): 411-414.

[13] Zeng C, Armando I, Yang J, et al. Dopamine receptor D1R and D3R and GRK4 interaction in hypertension[J]. Yale J Biol Med, 2023, 96(1): 95-105.

[14] Muskalla AM, Suter PM, Saur M, et al. G-protein receptor kinase 4 polymorphism and response to antihypertensive therapy[J]. Clin Chem, 2014, 60(12): 1543-1548.

[15] Sanada H, Yatabe J, Midorikawa S, et al. Single-nucleotide polymorphisms for diagnosis of salt-sensitive hypertension[J]. Clin Chem, 2006, 52(3): 352-360.

[16] Chen Y, Asico LD, Zheng S, et al. Gastrin and D1 dopamine receptor interact to induce natriuresis and diuresis[J]. Hypertension, 2013, 62(5): 927-933.

[17] Drury ER, Wu J, Gigliotti JC, et al. Sex differences in blood pressure regulation and hypertension: renal, hemodynamic, and hormonal mechanisms[J]. Physiol Rev, 2024, 104(1): 199-251.

[18] Abais-Battad JM, Dasinger JH, Lund H, et al. Sex-dependency of T cell-induced salt-sensitive hypertension and kidney damage[J]. Hypertension, 2024, 81(7): 1511-1523.

[19] Jose PA, Eisner GM, Felder RA. Renal dopamine receptors in health and hypertension[J]. Pharmacol Ther, 1998, 80(2): 149-182.

[20] Olivares-Hernández A, Figuero-Pérez L, Cruz-Hernandez JJ, et al. Dopamine receptors and the kidney: an overview of health- and pharmacological-targeted implications[J]. Biomolecules, 2021, 11(2): 254.

[21] Yang J, Villar VAM, Jose PA, et al. Renal dopamine receptors and oxidative stress: role in hypertension[J]. Antioxid Redox Signal, 2021, 34(9): 716-735.

[22] Zeng C, Villar VA, Eisner GM, et al. G protein-coupled receptor kinase 4: role in blood pressure regulation[J]. Hypertension, 2008, 51(6): 1449-1455.

[23] Wang Y, Li B, Zhao W, et al. Association study of G protein-coupled receptor kinase 4 gene variants with essential hypertension in northern Han Chinese[J]. Ann Hum Genet, 2006, 70(Pt 6): 778-783.

[24] Bengra C, Mifflin TE, Khripin Y, et al. Genotyping of essential hypertension single-nucleotide polymorphisms by a homogeneous PCR method with universal energy transfer primers[J]. Clin Chem, 2002, 48(12): 2131-2140.

[25] Bhatnagar V, O'Connor DT, Brophy VH, et al. G-protein-coupled receptor kinase 4 polymorphisms and blood pressure response to metoprolol among African Americans: sex-specificity and interactions[J]. Am J Hypertens, 2009, 22(3): 332-338.

[26] Zhu H, Lu Y, Wang X, et al. The G protein-coupled receptor kinase 4 gene modulates stress-induced sodium excretion in black normotensive adolescents[J]. Pediatr Res, 2006, 60(4): 440-442.

[27] Williams SM, Ritchie MD, Phillips JA, et al. Multilocus analysis of hypertension: a hierarchical approach[J]. Hum Hered, 2004, 57(1): 28-38.

[28] Wang Z, Zeng C, Villar VA, et al. Human GRK4γ142V variant promotes angiotensin Ⅱ type Ⅰ receptor-mediated hypertension via renal histone deacetylase type Ⅰ inhibition[J]. Hypertension, 2016, 67(2): 325-334.

[29] Diao Z, Asico LD, Villar VAM, et al. Increased renal oxidative stress in salt-sensitive human GRK4γ486V transgenic mice[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 106: 80-90.

[30] 杨宁, 李玉明.《盐敏感性高血压管理的中国专家共识》解读[J]. 中华高血压杂志 (中英文), 2024, 32(3): 214-216.

[31] 祝之明, 高鹏, 刘道燕, 等. 盐敏感性高血压的新机制与新的干预措施[J]. 中华高血压杂志, 2022, 30(12): 1122-1124.

收稿日期：2025-11-17 **修回日期**：2026-02-01
录用日期：2026-02-10 **责任编辑**：罗晓惠