

原发性醛固酮增多症的分子机制研究进展

蒋怡然, 王卫庆

(上海交通大学医学院附属瑞金医院内分泌代谢科 上海市内分泌代谢病研究所
国家代谢性疾病临床医学研究中心(上海) 国家卫健委内分泌代谢病重点实验室
上海市内分泌肿瘤重点实验室, 上海 200025)

关键词: 原发性醛固酮增多症; 基因突变; 醛固酮产生细胞簇; 动物模型

中图分类号: R586.24 文献标志码: A 文章编号: 1673-6087(2023)04-0261-05

DOI: 10.16138/j.1673-6087.2023.04.010

原发性醛固酮增多症是继发性高血压最常见的形式, 早期诊断和治疗对预防不良心血管结局至关重要。近年来, 随着分子诊断进展, 发现驱动醛固酮合成的基因胚系和体系突变是导致疾病发生的主要机制。本文将阐述原发性醛固酮增多症的分子机制及基于机制的动物模型。

基因突变与原发性醛固酮增多症

一、内向整流型钾离子通道亚家族 J 成员 5 (recombinant potassium inwardly rectifying channel subfamily J, member 5, *KCNJ5*) 基因

2011 年, Choi 等^[1]在 22 例醛固酮腺瘤 (aldosterone-producing adenomas, APA) 患者中发现 8 例 *KCNJ5* 体细胞突变。人类 *KCNJ5* 基因编码 G 蛋白耦联内向整流钾离子通道 4 蛋白 (G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels 4, GIRK4), APA 组织中 *KCNJ5* 突变导致 GIRK4 蛋白结构和功能改变, 最常见的突变包括 p. Gly151Arg、p. Thr158Ala、p. Leu168Arg, 位于通道选择性过滤器区域, 突变使钾离子选择性缺失, 增加钠离子渗透性, 因电压-门控钙离子通道开放导致膜去极化, 激活钙离子信号通路, 并最终增加醛固酮合成酶 (aldosterone synthase, *CYP11B2*) 表达和醛固酮生物合成。

KCNJ5 体细胞突变在 APA 中最为常见, 西方国家报道 APA 中 *KCNJ5* 突变率约 40%^[2-3], 在亚洲国家更高, 为 60%~77%^[4-5]。*KCNJ5* 突变的腺瘤

患者更年轻, 女性多见, 血醛固酮水平更高, 肿瘤体积更大。Cao 等^[6]通过二代测序发现 *KCNJ5* 突变率为 80.7%, 同时发现 10 个新的显著突变基因 (significantly mutated genes, SMG), 并提出 APA 基因表达谱, 为原发性醛固酮增多症进一步分子分型奠定基础。相比其他突变, 携带 *KCNJ5* 突变的 APA 表达 CYP11B1 细胞比例更高, 但 CYP11B2 及 GIRK4 蛋白表达较低^[7]。也有研究表明 *KCNJ5* 突变是肾上腺切除术后手术获益的标志^[8]。*KCNJ5* 胚系突变与家族性醛固酮增多症 III 型 (familial hyperaldosteronism III, FH-III) 相关。2008 年, FH-III 首次被描述, 临床表现为严重早发性高血压伴低钾血症^[9], 之后在此患者中鉴定出 *KCNJ5* 基因种系突变^[1]。在 FH-III 家系中观察到不同严重程度的醛固酮增多症, 部分患者严重程度与 *KCNJ5* 突变类型相关^[10]。体外研究表明, 高剂量钙通道阻滞剂维拉帕米或大环内酯类药物可以阻断突变的 GIRK4, 从而降低 CYP11B2 表达和醛固酮合成^[11]。目前已有针对该现象进行的临床研究, 以评估大环内酯类药物用于 *KCNJ5* 突变的 APA 的无创诊断及靶向治疗效果^[12]。

二、L-型电压依赖性钙离子通道 $\alpha 1D$ 亚基 (calcium channel, voltage-dependent, L type, $\alpha 1D$ subunit, *CACNA1D*) 和 T-型电压依赖钙离子通道 $\alpha 1H$ 亚基 (calcium channel, voltage dependent, T-type, $\alpha 1H$ subunit, *CACNA1H*) 基因

CACNA1D 基因编码 L 型钙通道 Cav1.3 的 $\alpha 1$ 亚单位, 包含 4 个重复结构域 (I~IV), 每个重复结构域有 6 个跨膜段 (S1~S6)。这些改变的残基位于 S6 片段中沿沟道孔排列, 突变影响 Cav1.3 通道多种特性, 包括延迟电压门控依赖的失活状态或者在低水平去极化情况下诱导通道开放, 细胞内钙离子聚集, 醛固酮大量合成, 导致 APA 发生^[13-14]。

基金项目: 国家重点研发计划项目 (项目编号:

2021YFC2501600)

通信作者: 王卫庆 E-mail: wqingw61@163.com

利用 CYP11B2 免疫组化引导的高通量测序发现该突变在美国、法国及非裔 APA 患者中分别为 21%、37% 和 42%^[15-16]。而在 2 例严重早发醛固酮增多症患儿中发现 *CACNA1D* 的新种系突变, 该醛固酮增多症与复杂的神经障碍 [原发性醛固酮增多症、癫痫发作和神经异常 (syndrome of primary aldosteronism, seizures and neurologic abnormalities, PASNA)] 相关^[17]。

CACNA1H 基因转录翻译 T 型钙离子通道 Cav3.2, 该基因的胚系突变影响 Cav3.2 通道特性, 诱导其功能增强, 导致钙离子内流增加, 激活钙信号通路, 是 FH-IV 的发病基因。一项研究发现 5 例患儿具有 *CACNA1H* 的 p.Met1549Val 位点突变, 在 10 岁前就出现 APA^[18], 其中 2 例患儿伴有发育迟缓或注意力缺陷障碍。在家族遗传的成人患者中也同样发现了 *CACNA1H* 的胚系突变^[19]。在一项 75 例 APA 患者研究中发现 3 例 *CACNA1H* 的体细胞突变^[20], 提示该基因突变在散发 APA 体细胞中可能致病, 但是更大规模的人群数据还有待进一步探究。钙通道阻滞剂可靶向用于 *CACNA1H* 突变或体细胞 *CACNA1D* 突变的 APA 患者。也有报道 PASNA 患者对于硝苯地平治疗反应良好。

三、Na⁺-K⁺ATP 酶 α 1 亚单位 (sodium/potassium ATPase alpha-1, *ATPIA1*) 和钙离子转运 ATP 酶 B3 (ATPase plasma membrane Ca²⁺ transporting 3, *ATP2B3*) 基因

Beuschlein 等^[21]报道 52% APA 患者携带 *ATPIA1* 突变, *ATPIA1* 基因编码细胞膜上 *ATPIA1*, 由 10 个跨膜蛋白组成 M1~M10 结构域和细胞内的 N 端和 C 端。*ATPIA1* 的体细胞突变主要位于 M1、M4 及 M9 结构域。M1 和 M4 结构域中的突变会影响钾离子结合带, 降低离子泵对钾离子的亲和性; M9 结构域中的突变可能会影响钠特异性位点, 所有突变都降低离子泵的活性。对钾离子亲和性降低和离子泵活性的下降在不明显升高细胞内钙离子浓度的情况下导致膜去极化。利用 CYP11B2 免疫组织化学 (组化) 引导的高通量测序技术发现 8%~17% 的 APA 患者具有 *ATPIA1* 突变。

Beuschlein 等^[21]报道 1.6% APA 患者携带 *ATP2B3* 突变, *ATP2B3* 基因编码细胞膜钙泵 (Ca²⁺-ATP 酶, 又称 PMCA3), 由 10 个跨膜蛋白组成 M1~M10 结构域和细胞内的 N 端和 C 端。所有 *ATP2B3* 突变均是框内缺失突变, 影响在 M4 结构域的

PEGL (脯氨酸-谷氨酸-甘氨酸-亮氨酸) 位点, 该区域参与钙结合以及离子门控。一些研究发现 1.7%~10% APA 中携带有 *ATP2B3* 突变, 利用 CYP11B2 免疫组化引导的高通量测序技术这一比例可进一步提高。*ATP2B3* 突变导致离子泵活性下降, 使钙外流受损, 增加胞浆内的钙离子浓度, 激活钙信号通路。另外有研究证明, 该突变可能通过离子泵的钠离子内流, 导致细胞膜去极化, 从而使电压门控的钙离子通道开放, 或由钙内流直接引起细胞内钙离子浓度增加^[22]。

四、氯化物通道 2 (chloride channel 2, *CLCN2*) 基因

FH-II 是 FH 最常见形式, 其表型具有多样性, 既往 FH-II 诊断基于 2 个或 2 个以上家庭成员受到影响, 且无法确定其他的遗传病因^[23]。2018 年发表的一项研究中, 在第一个报道 FH-II 家族中发现了编码氯离子通道 CIC-2 的 *CLCN2* 种系突变^[24]。*CLCN2* 编码在肾上腺、肾小球表达的电压门控的氯离子通道, 该通道在超极化膜电位下开放, 通道开放使肾小球细胞去极化, 并诱导醛固酮合成酶的表达。基因突变可使通道功能增强, 在肾小球静息电位下的开放率更高, 该研究证明了阴离子通道在肾小球膜电位测定、醛固酮生成和高血压中的作用^[25]。而在多项对 APA 行全外显子组测序的研究中, 均未发现体细胞的 *CLCN2* 突变。

五、 β -连环素 (catenin beta-1, *CTNNB1*)、环磷酸腺苷激活性蛋白激酶 α 催化亚基 (protein kinase cAMP-activated catalytic subunit alpha, *PRKACA*) 和犰狳重复序列蛋白质 5 (armadillo-repeat containing 5, *ARMC5*) 基因

CTNNB1 基因编码 β -连环素, 在 2.1%~5.1% APA 中可检测到该基因的体细胞突变^[26]。*CTNNB1* 突变定位于 3 号外显子, 在皮质醇分泌腺瘤及肾上腺皮质癌中也曾被发现。有研究发现女性中该突变更为普遍, 且提示与怀孕期间性腺受体在 APA 内的异常表达相关^[27], 但没有 *CTNNB1* 基因突变的 APA 组织内同样发现由性腺激素调控醛固酮合成的现象。*PRKACA* 基因催化合成环磷酸腺苷依赖蛋白激酶催化亚基 α (cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit α), 在 2 例 APA 及 1 例醛固酮和皮质醇共分泌的患者中发现有该基因的体细胞突变^[28]。皮质醇腺瘤中也存在 *PRKACA* 突变, 其在自主醛固酮生成和 APA 发展中的作用尚不清

楚。在美国非裔原发性醛固酮增多症患者中观察到 *ARMC5* 的胚系突变^[29], 以及在欧洲的一个原发性醛固酮增多症患者队列中发现有胚系 *ARMC5* 突变, 但是后者经生物学工具预测, 未提示有明确的致病作用^[30]。之前的研究提示 *ARMC5* 突变与原发性大结节性肾上腺增生的皮质醇增多症相关。以上 3 个基因的体细胞突变在 APA 中均较罕见, 与其其他肾上腺疾病关系更多。

醛固酮产生细胞簇的研究进展

醛固酮产生细胞簇 (aldosterone-producing cell clusters, APCC) 的概念首先于 2010 年被提出和描述^[31]。在此之前, 醛固酮合成酶 (*CYP11B2*) 的表达及醛固酮的合成被认为只发生在肾上腺球状带细胞内, 并主要受血管紧张素 II 及钾离子调控。APCC 位于包膜下, 主要由外部的球状带样细胞和内部的束状带样细胞组成。利用 *CYP11B2* 免疫组化指引的二代测序技术分析 APCC 的基因突变, 结果在 35% 的 APCC 内发现与 APA 相同的肿瘤驱动基因, 包括 *CACNA1D*、*ATPIA1*、*ATP2B3*, 但是没有发现 *KCNJ5* 突变^[32]。近来, 有研究描述了从 APCC 到 APA 的转变过渡状态, 包括包膜下 APCC 样结构和微小 APA 样结构组成, 并且带有体细胞突变, 提示 APCC 可能是 APA 发生的起点^[33]。然而, 有其他研究表示 APA 的发展有两条独立的路线, 结果显示毗邻 APA 的肾上腺皮质可能出现球状带的增生及结节增多, 血管生成减少。相互远离的 *CYP11B2* 阳性结节在同一肾上腺内可能带有不同的体细胞突变, 与 APA 相邻的不同 APCC 同样可能带有不同的体细胞突变^[34]。在过去 10 年中, 对于 APCC 的发现和探索为理解调控醛固酮生物合成的机制提供了一种新的模式, 但其在正常肾上腺中的生理性作用有待进一步研究。APCC 中存在 APA 驱动基因的体细胞突变, 表明其可能在 APA 及增生型醛固酮增多症的发生、发展过程中发挥作用, APCC 模型支持 APA 可能来源于 APCC 的观点。

原发性醛固酮增多症的动物模型

以上遗传学研究极有助于理解原发性醛固酮增多症的发病机制, 明确了离子通道以及 Wnt/ β -连环素信号通路的重要作用。虽然小鼠模型并未能完全复制人原发性醛固酮增多症的典型症状, 但其在

机制的深入研究、药物的筛选研发中有着不可替代的作用。研究同样发现钾通道与 Wnt/ β -连环素信号通路在调节肾上腺皮质醛固酮合成和稳态中起关键作用。在小鼠中, TASK1 和 TASK3 是钾通道的双孔域蛋白, 由 *KCNK3* 和 *KCNK9* 基因编码合成。通过全身敲除这 2 个基因, 研究明确了钾通道在肾上腺皮质结构和功能中的重要作用, 敲除基因小鼠出现不同形式的醛固酮增多症/低肾素性高血压^[35-37]。

如前述 *CACNA1H* 激活突变在人群中导致 FH-IV, 最新有研究利用规律成簇间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR 相关蛋白 9 (Cas9) 在小鼠中敲入 M1560V 突变位点, 并同时研究 *CACNA1H* 基因敲除小鼠。结果显示, 突变小鼠醛固酮明显升高, *CYP11B2* 表达也明显增加。敲除小鼠的 *Ren1* 表达升高, 但是 *CYP11B2* 表达没有改变。以上小鼠实验结果是人群基因测序结果的有力补充, 证明了 *CACNA1H* 胚系突变足以引起原发性醛固酮增多症, 并且在 Cav3.2 丢失后能通过激活肾素-血管紧张素系统进行功能代偿^[38]。

前述 *CLCN2* 突变是 FH-II 的致病基因, 2 种不同的基因敲入小鼠模型提供了有关氯离子通道在原发性醛固酮增多症发展中的作用^[39-40]。敲除在 ClC-2 氯离子通道失活区域的 N 端 8 个残端, 而人 p.Met22Lys、p.Gly24Asp 和 p.Tyr26Asn 突变均在该区域, 可以使小鼠同样出现高血压、低血钾症、醛固酮升高和肾素水平降低, 重现原发性醛固酮增多症的主要特征。携带 p.Arg180Gln 杂合突变的小鼠, 与 FH-II 中发现的人 p.Arg172Gln 突变相似, 表现为轻度原发性醛固酮增多症, 包括醛固酮水平升高, 轻度血压升高, 但没有导致肾上腺形态的异常。这些模型是研究 FH-II 自主醛固酮产生机制有价值的工具。此外, 有研究利用人工突变模拟大部分原发性醛固酮增多症相关的人 *CLCN2* 突变, 结果有力地支持了以下观点, ClC-2 离子内流增加足以导致原发性醛固酮增多症, 而不需其他额外突变相关的机制参与。

[参考文献]

- [1] Choi M, Scholl UI, Yue P, et al. K⁺ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension[J]. Science, 2011, 331(6018): 768-772.
- [2] Fernandes-Rosa FL, Williams TA, Riester A, et al. Ge-

- netic spectrum and clinical correlates of somatic mutations in aldosterone-producing adenoma[J]. *Hypertension*, 2014, 64(2): 354-361.
- [3] Lenzini L, Rossitto G, Maiolino G, et al. A meta-analysis of somatic KCNJ5 K⁺ channel mutations in 1636 patients with an aldosterone-producing adenoma[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(8): E1089-E1095.
 - [4] Taguchi R, Yamada M, Nakajima Y, et al. Expression and mutations of KCNJ5 mRNA in Japanese patients with aldosterone-producing adenomas[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(4): 1311-1319.
 - [5] Zheng FF, Zhu LM, Nie AF, et al. Clinical characteristics of somatic mutations in Chinese patients with aldosterone-producing adenoma[J]. *Hypertension*, 2015, 65(3): 622-628.
 - [6] Cao Y, Zhou W, Li L, et al. Pan-cancer analysis of somatic mutations across 21 neuroendocrine tumor types[J]. *Cell Res*, 2018, 28(5): 601-604.
 - [7] De Sousa K, Boulkroun S, Baron S, et al. Genetic, cellular, and molecular heterogeneity in adrenals with aldosterone-producing adenoma[J]. *Hypertension*, 2020, 75(4): 1034-1044.
 - [8] Zhang C, Wu L, Jiang L, et al. KCNJ5 mutation contributes to complete clinical success in aldosterone-producing adenoma[J]. *Endocr Pract*, 2021, 27(7): 736-742.
 - [9] Geller DS, Zhang J, Wisgerhof MV, et al. A novel form of human mendelian hypertension featuring nonglucocorticoid-remediable aldosteronism [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(8): 3117-3123.
 - [10] Mulatero P, Monticone S, Rainey WE, et al. Role of KCNJ5 in familial and sporadic primary aldosteronism[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2013, 9(2):104-112.
 - [11] Scholl UI, Abriola L, Zhang C, et al. Macrolides selectively inhibit mutant KCNJ5 potassium channels that cause aldosterone-producing adenoma[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(7): 2739-2750.
 - [12] Maiolino G, Ceolotto G, Battistel M, et al. Macrolides for KCNJ5-mutated aldosterone-producing adenoma (MAPA): design of a study for personalized diagnosis of primary aldosteronism[J]. *Blood Press*, 2018, 27(4): 200-205.
 - [13] Azizan EA, Poulsen H, Tuluc P, et al. Somatic mutations in ATP1A1 and CACNA1D underlie a common subtype of adrenal hypertension[J]. *Nat Genet*, 2013, 45(9): 1055-1060.
 - [14] Scholl UI, Goh G, Stölting G, et al. Somatic and germline CACNA1D calcium channel mutations in aldosterone-producing adenomas and primary aldosteronism[J]. *Nat Genet*, 2013, 45(9): 1050-1054.
 - [15] Nanba K, Omata K, Else T, et al. Targeted molecular characterization of aldosterone-producing adenomas in white Americans[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018, 103(10): 3869-3876.
 - [16] Nanba K, Omata K, Gomez-Sanchez CE, et al. Genetic characteristics of aldosterone-producing adenomas in Blacks[J]. *Hypertension*, 2019, 73(4): 885-892.
 - [17] Pinggera A, Mackenroth L, Rump A, et al. New gain-of-function mutation shows CACNA1D as recurrently mutated gene in autism spectrum disorders and epilepsy [J]. *Hum Mol Genet*, 2017, 26(15): 2923-2932.
 - [18] Scholl UI, Stölting G, Nelson-Williams C, et al. Recurrent gain of function mutation in calcium channel CACNA1H causes early-onset hypertension with primary aldosteronism[J]. *Elife*, 2015, 4: e06315.
 - [19] Daniil G, Fernandes-Rosa FL, Chemin J, et al. CACNA1H mutations are associated with different forms of primary aldosteronism[J]. *EBioMedicine*, 2016, 13: 225-236.
 - [20] Nanba K, Blinder AR, Rege J, et al. Somatic CACNA1H mutation as a cause of aldosterone-producing adenoma[J]. *Hypertension*, 2020, 75(3): 645-649.
 - [21] Beuschlein F, Boulkroun S, Osswald A, et al. Somatic mutations in ATP1A1 and ATP2B3 lead to aldosterone-producing adenomas and secondary hypertension[J]. *Nat Genet*, 2013, 45(4): 440-444.
 - [22] Tauber P, Aichinger B, Christ C, et al. Cellular pathophysiology of an adrenal adenoma-associated mutant of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase ATP2B3 [J]. *Endocrinology*, 2016, 157(6): 2489-2499.
 - [23] Stowasser M, Gordon RD. Familial hyperaldosteronism[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2001, 78(3): 215-229.
 - [24] Scholl UI, Stölting G, Schewe J, et al. CLCN2 chloride channel mutations in familial hyperaldosteronism type II [J]. *Nat Genet*, 2018, 50(3): 349-354.
 - [25] Fernandes-Rosa FL, Daniil G, Orozco IJ, et al. A gain-of-function mutation in the CLCN2 chloride channel gene causes primary aldosteronism[J]. *Nat Genet*, 2018, 50(3): 355-361.
 - [26] Åkerström T, Maharjan R, Sven Willenberg H, et al. Activating mutations in CTNNB1 in aldosterone producing adenomas[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19546.
 - [27] Berthon A, Drelon C, Val P. Pregnancy, primary aldosteronism, and somatic CTNNB1 mutations[J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(15): 1493-1494.
 - [28] Rhayem Y, Perez-Rivas LG, Dietz A, et al. PRKACA somatic mutations are rare findings in aldosterone-producing adenomas[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101(8): 3010-3017.

- [29] Zilbermint M, Xekouki P, Faucz FR, et al. Primary aldosteronism and ARMC5 variants[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100(6): E900-E999.
- [30] Mulatero P, Schiavi F, Williams TA, et al. ARMC5 mutation analysis in patients with primary aldosteronism and bilateral adrenal lesions[J]. J Hum Hypertens, 2016, 30(6): 374-378.
- [31] Nishimoto K, Nakagawa K, Li D, et al. Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(5): 2296-2305.
- [32] Nishimoto K, Tomlins SA, Kuick R, et al. Aldosterone-stimulating somatic gene mutations are common in normal adrenal glands[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(33): E4591-E4599.
- [33] Nishimoto K, Koga M, Seki T, et al. Immunohistochemistry of aldosterone synthase leads the way to the pathogenesis of primary aldosteronism [J]. Mol Cell Endocrinol, 2017, 441: 124-133.
- [34] Fernandes-Rosa FL, Giscos-Douriez I, Amar L, et al. Different somatic mutations in multinodular adrenals with aldosterone-producing adenoma[J]. Hypertension, 2015, 66(5): 1014-1022.
- [35] Davies LA, Hu C, Guagliardo NA, et al. TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(6): 2203-2208.
- [36] Guagliardo NA, Yao J, Hu C, et al. TASK-3 channel deletion in mice recapitulates low-renin essential hypertension[J]. Hypertension, 2012, 59(5): 999-1005.
- [37] Penton D, Bandulik S, Schweda F, et al. Task3 potassium channel gene invalidation causes low renin and salt-sensitive arterial hypertension[J]. Endocrinology, 2012, 153(10): 4740-4748.
- [38] Seidel E, Schewe J, Zhang J, et al. Enhanced Ca^{2+} signaling, mild primary aldosteronism, and hypertension in a familial hyperaldosteronism mouse model (*Cacna1h^{M1560V/+}*) [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(17): e2014876118.
- [39] Schewe J, Seidel E, Forslund S, et al. Elevated aldosterone and blood pressure in a mouse model of familial hyperaldosteronism with *CLC-2* mutation[J]. Nat Commun, 2019, 10(1):5155.
- [40] Göppner C, Orozco IJ, Hoegg-Beiler MB, et al. Pathogenesis of hypertension in a mouse model for human *CLCN2* related hyperaldosteronism[J]. Nat Commun, 2019,10(1): 4678.

(收稿日期:2023-05-24)

(本文编辑:王朝晖)