

体细胞突变在醛固酮腺瘤发病中的作用

郑芳芳 朱理敏 高平进

【摘要】 原发性醛固酮增多症是继发性高血压的常见病因,可导致严重的心脑血管病变,影响患者预后。KCNJ5、ATP1A1、ATP2B3 和 CACNA1D 基因体细胞突变通过影响不同的离子稳态,增加细胞内钙离子浓度,从而刺激肾上腺皮质球状带细胞分泌过多的醛固酮。该文主要介绍醛固酮腺瘤发病中上述基因体细胞突变的作用。

【关键词】 体细胞突变;原发性醛固酮增多症;醛固酮腺瘤;离子通道

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2016.01.012

原发性醛固酮增多症(PA)是一种常见的继发性高血压。由于肾上腺皮质球状带(ZG)病变,分泌过多的醛固酮,导致水钠潴留和排钾增加^[1]。在首次确诊的高血压患者中,PA 的发病率约为 10%^[2],而在难治性高血压中可能占到 20%^[3]。与原发性高血压相比,PA 患者发生糖脂代谢异常和心脑血管并发症的风险更高^[4-5]。绝大部分 PA 患者为散发型,主要病因是醛固酮瘤(APA)和双侧肾上腺增生^[6-7]。1%~10%的 PA 患者为家族型醛固酮增多症(FH),分为 FH-I、FH-II 和 FH-III 型。2011 年,作为 PA 研究的一项突破性进展,Choi 等^[8]报道了 KCNJ5 基因(编码内向整流钾通道 Kir3.4)突变与 APA 和 FH-III 的发病相关,PA 的分子生物学机制逐渐引起关注。

1 基因突变的发生率

Choi 等^[8]通过全基因组测序技术,首次证实了编码内向整流钾通道 Kir3.4 的 KCNJ5 是 APA 的致病基因,在 22 例瑞典 APA 患者中,2 例发生 Gly151Arg 突变,6 例发生 Leu168Arg 突变。对来自英国和澳大利亚的 73 例散发型 PA 患者的研究发现,26.0%的患者存在 Gly151Arg 突变,13.7%存在 Leu168Arg 突变,另有 1 例少见突变位点 del11e157^[9]。另一项纳入了瑞典、德国、澳大利亚和法国 348 例 PA 患者的研究发现,Gly151Arg 和 Leu168Arg 的突变率分别为 24.1%和 20.4%,另有 2 例患者出现少见突变 Glu145Gln^[10]。来自法国、德国

和意大利的 474 例 PA 患者中,Gly151Arg 和 Leu168Arg 突变率分别为 23.8%和 13.7%^[11]。总的来说,APA 患者的 KCNJ5 突变率约为 40%^[12-13],Gly151Arg 和 Leu168Arg 是突变热点。

本研究组前期对 168 例中国 APA 患者的研究显示,KCNJ5 基因的体细胞突变率高达 76.8%,其中 Gly151Arg 和 Leu168Arg 的突变率分别为 39.9%和 35.7%,另有 Thr158Ala 和 Thr148-Thr149insArg 突变各 1 例^[14]。另一项研究报道,中国 APA 患者 KCNJ5 基因突变率为 75.4%^[15],与本研究组的结果接近。另外,中国台湾地区和新疆 APH 患者 KCNJ5 基因的突变率略低,分别为 59.5%和 45.7%^[16-17]。日本 APA 患者 KCNJ5 基因突变率为 65.2%^[18]。目前,亚洲 APA 患者的 KCNJ5 基因突变率普遍高于其他地区^[13]。主要原因可能是种族差异,但仍需多中心研究进一步明确。另一方面,不同中心的 PA 诊断和入选标准存在差异^[12-13]。

对 KCNJ5 野生型合并低钾血症的男性 PA 患者的研究发现,P 型三磷酸腺苷(ATP)酶家族成员 ATP1A1 基因[编码钠离子(Na^+)/钾离子(K^+)-ATP 酶 α 亚单位]和 ATP2B3 基因[编码细胞膜钙离子(Ca^{2+})-ATP 酶]体细胞突变与 APA 相关。德国、法国和意大利的 308 例 APA 患者中,有 16 例(5.2%)ATP1A1 突变样本和 5 例(1.6%)ATP2B3 突变样本^[19]。另有 2 项国外研究显示,CACNA1D 基因(编码 L-型电压门控性钙通道的 α_1 亚单位 $\text{Ca}_v1.3$)体细胞突变与 APA 的发病也存在关联,其突变率分别为 15.5%和 7.8%^[20-21]。

2 基因突变与临床表型

研究显示,KCNJ5 基因体细胞突变状态与

基金项目:国家自然科学基金青年项目(81500324)

作者单位:200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院高血压科,上海市高血压研究所

通信作者:高平进,Email:gaopingjin@sibs.ac.cn

APA 患者的临床表型相关^[9-11,14,18-19,22-23]。首先,与野生型患者相比,KCNJ5 体细胞突变在女性中更常见(56.6%对 33.3%, $P=0.02$)。其次,KCNJ5 基因突变患者的腺瘤直径更大(15 mm 对 11 mm, $P=0.021$)、醛固酮水平更高(23.3 $\mu\text{g}/24\text{ h}$ 对 16.6 $\mu\text{g}/24\text{ h}$, $P=0.038$)、醛固酮(ng/dL)/肾素 [$\text{ng}/(\text{mL} \cdot \text{h})$]比值更高(102 对 42, $P=0.007$),提示醛固酮过度分泌与突变的腺瘤可能存在关联。同时,KCNJ5 突变患者的血钾水平更低(2.6 mmol/L 对 2.9 mmol/L, $P=0.022$)^[14]。严重的低钾血症是 PA 患者的典型表现之一,因此 KCNJ5 突变患者更倾向于就诊,从而接受 PA 的筛查。一项纳入 13 项研究、约 1 636 例 APA 患者的荟萃分析也显示,KCNJ5 突变患者的血浆醛固酮水平更高、年龄更小、腺瘤更大,且突变多见于女性,亚洲人群长期高钠饮食可能促进 KCNJ5 突变的发生^[13]。但是,关于 KCNJ5 基因突变的研究中,仍缺乏 APA 患者饮食习惯的数据。另外,KCNJ5 突变与手术预后的关系仍不明确^[24-25],需要长期随访研究,进一步明确。

与 KCNJ5 突变型和野生型相比,ATP1A1 和 ATP2B3 突变的 APA 患者多见于男性,且血浆醛固酮水平更高,低钾血症更严重^[19]。而 CACNA1D 突变的腺瘤直径(9 mm)显著小于 KCNJ5 突变型(16 mm)和野生型(12 mm)^[11]。因此,CACNA1D 突变患者易被忽视,可能影响了 APA 患者中 CACNA1D 基因突变的检出率。

3 功能学研究

生理状态下,醛固酮由 ZG 细胞分泌。以胆固醇作为原料,在一系列特异性酶类的参与下进行转换,最终醛固酮合成酶(CYP11B2)催化皮质酮转变为醛固酮。高钾血症和血管紧张素 II (Ang II) 等因素可刺激醛固酮的产生。在背景内向整流钾通道 TASK 等因素的作用下,ZG 细胞由静息状态下转为超极化状态。Ang II 与其 I 型受体的结合,可阻断这种漏电流及其它钾通道,引起细胞膜去极化、电压门控性钙通道激活和 Ca^{2+} 内流。细胞外 K^+ 也可直接引起细胞膜去极化和 Ca^{2+} 内流。同时, Ca^{2+} 内流可通过激活钙/钙调蛋白激酶信号通路等机制,引起醛固酮合成限速酶的表达^[26]。另外,慢性 Ca^{2+} 信号可刺激 ZG 细胞增殖^[7]。

KCNJ5 既可单独形成同源四聚体,又可与 KCNJ3 形成活性更强的异源四聚体^[27]。Choi 等^[8]将野生型

(WT)或突变型 KCNJ5 和 KCNJ3 共转染至 293T 细胞,发现 KCNJ3/KCNJ5^{WT}使细胞膜超极化,反转电位为(-65 ± 2) mV,且电流可被钡离子(Ba^{2+})阻断, K^+ 与 Na^+ 通透比约为(25.3 ± 4.4):1。相反,KCNJ3/KCNJ5^{Gly151Arg}和 KCNJ3/KCNJ5^{Leu168Arg}均可使细胞膜去极化,反转电位分别为(0 ± 2) mV 和(-5 ± 1) mV,且电流不能被 Ba^{2+} 阻断, K^+ 与 Na^+ 通透比下降至(1.0 ± 0.1):1 和(1.3 ± 0.1):1。 K^+ 通道的 GlyTyrGly 序列构成一个狭窄孔道,可特异性允许 K^+ 进入细胞。Gly151 是 GlyTyrGly 序列的第 1 个甘氨酸。Leu168 位于第 2 个跨膜区域,侧链毗邻 GlyTyrGly 序列的酪氨酸侧链。选择性滤器附近的其他体细胞突变(delIle157 ^[28]、 insThr149 ^[29]和 $\text{Thr148-Thr149insArg}$ ^[14])也表现出类似的电生理学特征,不过远离选择性滤器的 Trp126Arg 突变可间接影响选择性滤器附近的氨基酸和 K^+ 通道选择性^[30]。体外实验也证实,KCNJ5 基因体细胞突变可促进 CYP11B2 基因 mRNA 表达上调^[14,29-30]。总之,KCNJ5 突变体可能引起 K^+ 通道的选择性丧失,导致 Na^+ 内流,细胞膜去极化, Ca^{2+} 通过电压门控性钙通道和 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换进入细胞,醛固酮合成增加^[8,29]。

进一步研究发现,G 蛋白偶联钾通道阻断剂 tertiapin-Q 可阻断野生型通道的大部分 K^+ 电流,而对于突变通道的电流阻断效果明显降低。KCNJ5 突变体改变了孔道结构形态,影响 tertiapin-Q 与离子通道的结合,这可能是引起 Na^+ 通透性异常的普遍机制^[28]。L 型钙通道阻断剂维拉帕米可抑制突变体部分 Na^+ 内流, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换体阻断剂 KB-R7943 可完全阻断 Na^+ 内流^[29]。这些药物是否可抑制醛固酮的自主分泌仍需进一步体外实验证实。

目前,尚无体外实验研究支持 KCNJ5 突变可引起细胞增殖,并且细胞内 Ca^{2+} 超载通常引起细胞凋亡。一项关于视锥蛋白样蛋白 1(VSNL1)的研究可能有助于解释为何 KCNJ5 基因突变患者的腺瘤直径更大。VSNL1 是一种神经元钙感受器蛋白,参与钙信号的转导。与野生型腺瘤比较,KCNJ5 突变型腺瘤的 VSNL1 表达增加,可能抑制细胞内 Ca^{2+} 超负荷引起的细胞凋亡^[31]。另外,也有研究发现,大部分 APA 患者中 Wnt/ β -catenin 信号通路异常激活,Wnt 抑制剂 SFRP2 可下调部分患者的 Wnt 信号,并且抑制 APA 的形成^[32]。该信号通路在

APA 形成中的作用,及是否与 KCNJ5 突变存在关联,仍需更深入的研究。

ATP1A1、ATP2B3 和 CACNA1D 突变效应与 KCNJ5 基因突变类似,影响醛固酮的产生。ATP1A1 基因的 Leu104 位于跨膜 α 螺旋的 M1 区, Val332(可能影响 Glu334 定位)位于 M4 区,同时 Glu334 和 Leu104 的相互作用可能影响 K^+ 与 Na^+/K^+ -ATP 酶的结合和门控^[19,33-34]。ATP1A1 突变可显著降低 ATP 酶的活性,增加细胞内 Ca^{2+} 浓度^[19]。ATP2B3 基因突变 Leu425-Val426del 和 Val426-Val427del 通过影响跨膜 α 螺旋 M4 的谷氨酸(对应于 ATP1A1 基因的 Glu334),改变 Ca^{2+} 结合位点的空间结构^[19]。ATP 酶突变能引起细胞膜显著去极化,激活电压门控性钙通道^[19],促进 CYP11B2 和 NR4A2 的表达^[30]。另外,CACNA1D 基因体细胞突变可引起细胞膜电位负值增加,抑制通道失活或增加 Ca^{2+} 电流,从而激活细胞内 Ca^{2+} 信号通路和刺激醛固酮产生^[20]。有研究发现,作为一种临床常用的 L 型钙通道阻滞剂,氨氯地平可能降低血浆醛固酮水平,影响部分 PA 患者的诊断^[35]。这间接提示调控 Ca^{2+} 稳态的相关基因突变可能影响醛固酮的产生。

4 结语

KCNJ5、ATP1A1、ATP2B3 和 CACNA1D 基因体细胞突变通过影响不同的离子稳态,增加细胞内 Ca^{2+} 浓度,从而刺激 ZG 细胞分泌过多的醛固酮^[36]。Dekkers 等^[37]研究发现,ATP1A1 和 CACNA1D 基因突变可同时发生于同一多结节肾上腺内,不同结节也可发生 KCNJ5 基因的不同突变。推测这些突变的发生晚于肾上腺结节的形成,两个过程并无直接因果关系。然而,APA 患者的这些突变是何时发生以及如何发生的,仍需进一步探索。目前关于 APA 体细胞突变的研究局限于已切除的腺瘤,探索无创性检测手段以在术前确定突变状态,将为 APA 的靶向治疗提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] 马 毓,高平进. 盐皮质激素及其受体在血压调节中的作用[J]. 国际心血管病杂志,2014,41(4):252-255.
- [2] Rossi GP, Bernini G, Caliumi C, et al. A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1, 125 hypertensive patients[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 48(11): 2293-2300.
- [3] Calhoun DA, Nishizaka MK, Zaman MA, et al. Hyperaldosteronism among black and white subjects with resistant hypertension [J]. Hypertension, 2002, 40 (6):

- 892-896.
- [4] 玛丽娅·木哈什,龚艳春,郭冀珍,等. 原发性醛固酮增多症与原发高血压的糖脂代谢比较[J]. 国际心血管病杂志, 2012,39(3):178-181.
- [5] Mulatero P, Monticone S, Bertello C, et al. Long-term cardio- and cerebrovascular events in patients with primary aldosteronism[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98(12): 4826-4833.
- [6] Monticone S, Else T, Mulatero P, et al. Understanding primary aldosteronism: impact of next generation sequencing and expression profiling[J]. Mol Cell Endocrinol, 2015, 399: 311-320.
- [7] Zennaro MC, Rickard AJ, Boulkroun S. Genetics of mineralocorticoid excess: an update for clinicians[J]. Eur J Endocrinol, 2013, 169(1): R15-R25.
- [8] 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.
- [9] Azizan EA, Murthy M, Stowasser M, et al. Somatic mutations affecting the selectivity filter of KCNJ5 are frequent in 2 large unselected collections of adrenal aldosteronomas[J]. Hypertension, 2012, 59(3): 587-591.
- [10] Åkerström T, Crona J, Delgado Verdugo A, et al. Comprehensive re-sequencing of adrenal aldosterone producing lesions reveal three somatic mutations near the KCNJ5 potassium channel selectivity filter[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41926.
- [11] Fernandes-Rosa FL, Williams TA, Riester A, et al. Genetic spectrum and clinical correlates of somatic mutations in aldosterone-producing adenoma[J]. Hypertension, 2014, 64 (2): 354-361.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Wang B, Li X, Zhang X, et al. Prevalence and characterization of somatic mutations in Chinese aldosterone-producing adenoma patients [J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94 (16): e708.
- [16] Wu VC, Huang KH, Peng KY, et al. Prevalence and clinical correlates of somatic mutation in aldosterone producing adenoma-Taiwanese population[J]. Sci Rep, 2015, 5: 11396.
- [17] 邵 丹,李南方,胡燕荣,等. 醛固酮组织体细胞 KCNJ5 基因错义突变与原发醛固酮增多症的相关性研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2013, 29(10): 862-866.
- [18] 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.
- [19] 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, 444e1-2.
 - [20] 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.
 - [21] Schöll 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.
 - [22] Seccia TM, Mantero F, Letizia C, et al. Somatic mutations in the KCNJ5 gene raise the lateralization index; implications for the diagnosis of primary aldosteronism by adrenal vein sampling [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(12):E2307-E2313.
 - [23] Boulkroun S, Beuschlein F, Rossi GP, et al. Prevalence, clinical, and molecular correlates of KCNJ5 mutations in primary aldosteronism [J]. Hypertension, 2012, 59(3):592-598.
 - [24] Rossi GP, Cesari M, Letizia C, et al. KCNJ5 gene somatic mutations affect cardiac remodelling but do not preclude cure of high blood pressure and regression of left ventricular hypertrophy in primary aldosteronism [J]. J Hypertens, 2014, 32(7):1514-1521.
 - [25] Arnesen T, Glomnes N, Strømsøy S, et al. Outcome after surgery for primary hyperaldosteronism may depend on KCNJ5 tumor mutation status: a population-based study from Western Norway [J]. Langenbecks Arch Surg, 2013, 398(6):869-874.
 - [26] Al-Salameh A, Cohen R, Desailoud R. Overview of the genetic determinants of primary aldosteronism [J]. Appl Clin Genet, 2014, 7:67-79.
 - [27] Bettahi I, Marker CL, Roman MI, et al. Contribution of the Kir3.1 subunit to the muscarinic-gated atrial potassium channel IKACH [J]. J Biol Chem, 2002, 277(50):48282-48288.
 - [28] Murthy M, Azizan EA, Brown MJ, et al. Characterization of a novel somatic KCNJ5 mutation delI157 in an aldosterone-producing adenoma [J]. J Hypertens, 2012, 30(9):1827-1833.
 - [29] Kuppusamy M, Caroccia B, Stindl J, et al. A novel KCNJ5-insT149 somatic mutation close to, but outside, the selectivity filter causes resistant hypertension by loss of selectivity for potassium [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2014, 99(9):E1765-E1773.
 - [30] Williams TA, Monticone S, Schack VR, et al. Somatic ATP1A1, ATP2B3, and KCNJ5 mutations in aldosterone-producing adenomas [J]. Hypertension, 2014, 63(1):188-195.
 - [31] Williams TA, Monticone S, Crudo V, et al. Visinin-like 1 is upregulated in aldosterone-producing adenomas with KCNJ5 mutations and protects from calcium-induced apoptosis [J]. Hypertension, 2012, 59(4):833-839.
 - [32] Berthon A, Drelon C, Ragazzon B, et al. WNT/ β -catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production [J]. Hum Mol Genet, 2014, 23(4):889-905.
 - [33] Einholm AP, Andersen JP, Vilsen B. Importance of Leu99 in transmembrane segment M1 of the Na^+ , K^+ -ATPase in the binding and occlusion of K^+ [J]. J Biol Chem, 2007, 282(33):23854-23866.
 - [34] Einholm AP, Andersen JP, Vilsen B. Roles of transmembrane segment M1 of Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} -ATPase, the gatekeeper and the pivot [J]. J Bioenerg Biomembr, 2007, 39(5-6):357-366.
 - [35] Brown MJ, Hopper RV. Calcium-channel blockade can mask the diagnosis of Conn's syndrome [J]. Postgrad Med J, 1999, 75(882):235-236.
 - [36] Moraitis AG, Rainey WE, Auchus RJ. Gene mutations that promote adrenal aldosterone production, sodium retention, and hypertension [J]. Appl Clin Genet, 2013, 7:1-13.
 - [37] Dekkers T, ter Meer M, Lenders JW, et al. Adrenal nodularity and somatic mutations in primary aldosteronism: one node is the culprit? [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2014, 99(7):E1341-E1351.

(收稿:2015-08-11 修回:2015-12-07)

(本文编辑:梁英超)