

·专家笔谈·

先天性巨结肠的遗传发病机制及前瞻性队列研究进展

张彦 夏慧敏

先天性巨结肠(hirschsprung's disease, HSCR)是一种常见的胃肠动力障碍性疾病,由肠神经节细胞缺乏所致。其发病率约为1/4 000~1/5 000,男女发病率比约为41:1^[1]。按神经节细胞缺乏所累及肠管的长度不同,国际上常将HSCR分为三型:短段型(short-segment HSCR, SHSCR)、长段型(long-segment HSCR, LHSCR)和全结肠型(total colon aganglionosis, TCA)^[2]。此外,还有罕见累及全部肠管类型的全肠型巨结肠(total intestine aganglionosis, TIA)。HSCR患者在临床上常表现为功能性的结肠梗阻、便秘和小肠结肠炎等;累及肠管长度越长,病情越严重,如不及时进行治疗会导致死亡^[1-3]。目前HSCR以手术切除病变肠段为主,尚无其他有效的治疗手段。手术治疗虽能挽救患儿的生命,国内外研究人员发现,HSCR术后存在明显的并发症,以便秘、大便失禁、反复小肠结肠炎和营养障碍等多见,部分甚至需要行永久性回肠造瘘术^[1-3]。因此,亟需深入研究HSCR的发生机制,并研究新的治疗策略,以期改善疾病的预后,提高患儿的生活质量。

一、先天性巨结肠发病的病理及胚胎学基础

先天性巨结肠的基本病理改变为:病变肠壁缺乏神经节细胞;病变肠管的自主神经系统分布紊乱、神经递质含量异常。目前普遍认为HSCR主要发病机制与胚胎时期肠神经嵴细胞(enteric neural crest cells, ENCCs)迁移、发育、存活异常有关^[4]。ENCCs在肠道内发育形成肠神经系统是一个十分复杂的过程,受其自身与周围环境中各种调控因子的影响和精确调节^[5]。其中,胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)及其配体酪氨酸蛋白激酶受体(RET)信号途径的研究较为广泛^[3]。ENCCs表面

表达RET,而肠道间质细胞表达GDNF,趋化引导ENCCs在肠道内的迁移,不同部位GDNF的浓度差是影响ENCCs迁徙的重要因素^[6]。临床综合征病例中也证实GDNF所在染色体区域的整体缺失与HSCR有关^[4]。动物模型研究表明,RET信号是ENCCs在肠道内迁移、存活、增殖和分化所必需的^[3]。

二、先天性巨结肠发病的分子遗传学研究现状

目前广泛认为遗传因素在先天性巨结肠的发生发展中起着关键的作用^[7-10]。近年来,得益于高通量分型、测序技术的飞速发展,国内外研究人员发现了一系列与先天性巨结肠发病和临床亚型相关的遗传变异^[7]。研究证实,RET基因是胚胎时期决定肠神经系统命运的至关重要的基因。据报道,在50%的家族性HSCR患者及7%~35%散发性HSCR患者中可见RET编码区的基因突变^[11]。多数突变可导致RET蛋白剂量不足或RET蛋白的功能丧失^[12]。RET基因的异常表达可能导致ENCCs的异常定植,甚至可能促进ENCCs的凋亡,从而导致HSCR的发生。GDNF家族作为RET蛋白的受体在肠神经系统发育过程中对ENCCs的存活起着重要作用^[13]。虽然目前为止发现的GDNF基因突变尚未足以引起HSCR发生,但是否GDNF基因突变与其他基因共同作用从而导致HSCR的发生犹未可知^[14-18]。ednrb/edn3基因及其信号通路在HSCR的发病中也被广泛研究。Lee HO等^[19]研究表明ednrb蛋白及其配体edn3在小鼠的肠神经嵴细胞系及人黑色素瘤细胞系的发育及分化过程中起至关重要的作用。阻断ednrb的小鼠模型表现出常染色体隐性遗传的白斑性变及先天性巨结肠表型。可见ednrb/edn3基因及其信号通路在神经嵴细胞的分化发育中扮演重要角色。但至今为止,在家族性HSCR及散发性HSCR患者中发现的包括大片段的基因缺失在内的超过20个ednrb基因突变,仅占所有巨结肠患者中的5%^[20]。edn3基因研究结果与ednrb基因相似。研究表明,ednrb/edn3基因突变往

DOI:10.3969/j.issn.1671-6353.2018.02.003

基金项目:国家临床重点专科(小儿外科)建设项目(GJLCZ D1301)

作者单位:广州市妇女儿童医疗中心小儿外科(广东省广州市, 510623)

通信作者:夏慧敏, Email: xia-huimin@foxmail.com

往发生在肠神经细胞向后肠的迁移过程中^[21]。因此 *ednrb/edn3* 基因突变主要导致 SHSCR 发病风险。而 *RET* 基因突变可以发生在肠神经系统发育的任何时期,所以常见于 LHSCR 患者中。据估计,HSCR 患者中发现 *RET* 基因突变者占 50%,而 *ednrb* 突变约占 5%,并且 SHSCR 中 *RET* 基因突变占 25%,而 SHSCR 中 95% 的病例与 *ednrb* 突变相关。

此外,有学者对合并某些遗传综合征的家族性或散发型 HSCR 患者进行致病基因的挖掘。Lee KE 等^[22]报道 *sox10* 基因编码对神经嵴细胞的迁移、分化起重要作用。*sox10* 基因对胚胎期肠内神经细胞的功能状态维持起重要作用。除了 *avencia* 等报道了一例孤立性 HSCR 患者出现 *sox10* 基因突变以外,其他研究报道的 *sox10* 基因突变均合并某遗传综合征。因此,*sox10* 基因并非 HSCR 的主要致病基因。另外,*zfhx1b* 基因也作为合并其他遗传综合征的 HSCR 相关致病基因被报道,而孤立型 HSCR 中 *zfhx1b* 基因突变未见。Garcia-Barceló M 等^[23]报道 *phox2b* 基因突变可能通过影响 *RET* 蛋白表达从而导致 HSCR 发生。Nakakimura S 等^[24]报道 *l1cam* 作为 X 染色体连锁的脑积水相关基因,研究发现一例 *l1cam* 基因突变患者合并 HSCR。但孤立性 HSCR 患者中 *l1cam* 基因突变未见报道。也有学者在合并不同遗传综合征的 HSCR 患者中发现不同的基因突变,如 *kiaa1279* 基因、*TGF4* 基因等,但并没有相关基因的孤立性 HSCR 病例报道^[2]。

虽然 *RET* 信号通路被广泛认为与 HSCR 发病最为密切的通路,然而由于 HSCR 发病率较低,已知致病突变多来源于独立家系报道,针对该通路中的致病遗传突变尚未有系统性的群体研究,缺乏系统性的筛查总结指导临床诊断与治疗。随着高通量基因分型技术的广泛应用,全基因组关联分析 (GWAS) 被逐渐运用在包括先天性巨结肠在内的各种复杂疾病易感基因的发掘。2008 年 Garcia-Barceló MM 等^[7]首次证实 *NRG1* 为先天性巨结肠的易感基因;2012 年 Tang CS 等^[10]发现 *NRG3* 中 11 个新发结构突变被证实与 HSCR 相关。证实在先天性巨结肠散发病例存在较家系中发现的罕见突变而言外显率较低的易感基因。2014 年, Kim JH 等又提出了 *SLC6A20*、*RPRA*、*ABCC9* 等多个潜在易感基因。2016 年,相同的研究团队基于 *SLC6A20* 的潜在易感位点进行精细定位提出 *SLC6A20* 多个潜在易感位点^[25]。2016 年 Tang CS 等^[26]利用跨人群大样本在证实前期已知的 *RET*、*NRG1* 等以外,又提出了 *SE-*

MA3 为全新的易感基因。然而,HSCR 的病因比较复杂,虽然分子遗传学取得了如上述巨大进展,但仍不能完全解释先天性巨结肠的起因,提示尚有多种未发现的遗传因素。特别是基于不同人群中的群体遗传易感机制的筛查很少,故而有待后续挖掘。GWAS 方法鉴定出的复杂疾病易感基因上的遗传变异大多位于非编码区,且多为常见变异,故而尚未直接明确其与基因表达/功能、疾病发生三者之间的联系。Ng SB 等^[27]在 2010 年首次运用全外显子测序技术发现了米勒综合征 (Miller Syndrome) 的致病基因 *DHODH*,该研究不仅首次证明新一代测序在单基因疾病中运用的可靠性和巨大潜能,更为后来的相关研究开启了新的一扇大门^[21]。So MT 等^[28]利用目标区域测序技术,在 601 个散发先天性巨结肠病人中筛查了 *RET* 基因的 22 个外显子区域,发掘出编码区多个稀有突变,解释了 *RET* 基因针对先天性巨结肠疾病本身的人群异质性。此外, Luzóntoro B 等^[29]在 2015 年利用外显子测序的方法检测了 8 个复发家系,同样证明了家族性先天性巨结肠具有很高的遗传异质性。然而迄今为止,这些已知与先天性巨结肠发生、发展密切相关的常见变异、罕见变异并未见系统性遗传准则直接指导临床预防、诊断乃至治疗。

三、HSCR 临床精准医学研究及疾病队列建立

进一步探索 HSCR 未知的遗传机制至关重要。本团队前期已针对大宗华南地区 HSCR 患儿展开系列遗传筛查,验证了高加索人群的一系列遗传变异,同时提出了多个全新的遗传相关基因。例如提出新的易感基因 *AUTS2*,其表现为与 *NRG1* 相关位点之间产生遗传相互作用从而增加先天性巨结肠患病风险。并针对全新的遗传相关基因利用已建立的神经样细胞模型平台,斑马鱼模型平台进一步进行功能验证,已确认新证基因影响疾病本身的具体机制。完善疾病热点谱,合并新挖掘到的针对华南人群特异遗传变异,有效建立自己的遗传诊断文库,进而制备先天性巨结肠遗传诊断芯片,为临床诊断提供更为有效的证据,并为先天性巨结肠病人的个性化医疗提供帮助,为患儿及患者家属提供迅速的诊断指标以及临床建议^[30]。

诚然,基于 HSCR 本中心开展了一系列遗传机制的临床转化研究。其预防、诊断和治疗依然面临诸多挑战。众所周知,疾病的发生是一个动态的过程,在此期间发生的许多独立事件都可能是致病的协同作用。单纯针对某一时间点的临床样本进行

后续研究可能会有失偏颇。而队列研究可观察多个因素的多种临床效应,而这正是队列法不可取代的用途,为疾病个体的精准化医疗提供了更为详实的病程记录。本中心拟在前瞻性出生队列公共平台的基础上建立 HSCR 疾病队列,队列中健康人群组已逐步生成组学数据,包括基因组、转录组、蛋白组、代谢组和肠道菌群的宏基因组数据,可以综合、立体、量化反映个体健康状态,也可以成为疾病研究无可替代的黄金对照^[31]。这给 HSCR 的发生发展提供了重要的溯源研究资源,也为系统地、多时点地描述疾病的发展提供了可能,同时通过将生物样本库中的组学信息与流行病学数据、电子病历系统进行整合匹配,为 HSCR 提供更细致疾病分类,更深入的阐释发病原因和更准确的预测疾病风险或治疗效果。

近年来迅速发展起来的基因诊断技术,在出生缺陷与遗传病检测领域获得广泛应用。目前已经发现 160 多个与遗传性听力损失相关的位点,我国已经建立了筛查遗传性听力损失的基因芯片技术,在北京等地开展了大量人群的筛查。然而,针对遗传性较为明显的 HSCR 尚未有行之有效的早期预测方案。精准医疗能有效突破传统检测技术的效率瓶颈,但通常需要获得大量的序列变异数据,鉴别变异是否为致病突变,不仅需要大量数据库的信息比对,更需要结合患者的临床表型、家系分析,才能获得正确的诊断结果,对数据的准确分析、解读数据与疾病的关系,仍是目前高通量测序应用中的难点^[32]。如何将临床表型与组学大数据进行管理,实现患者精准诊断、治疗和预防,仍然是我们面临的困难。未来研究需要根据队列人群研究,通过流行病学设计和统计学方法建立起涵盖家族史、症状、体征、实验室检查结果、遗传检测结果和分子标志物检测结果等多位变量的诊断或预测模型,从而实现出生缺陷疾病风险的预测、对疾病的精准诊断和分类、对治疗方案的精准应用以及对疗效的精准评估和对预后的精准预测。

参考文献

- Alves MM, Sribudiani Y, Brouwer RW, et al. Contribution of rare and common variants determine complex diseases-Hirschsprung disease as a model[J]. *Dev Biol*, 2013, 382(1): 320-329. DOI:10.1016/j.ydbio.2013.05.019.
- Tam PK. Hirschsprung's disease: A bridge for science and surgery[J]. *J Pediatr Surg*, 2016, 51(1): 18-22. DOI:10.1016/j.jpedsurg.2015.10.021.
- Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, et al. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review[J]. *J Med Genet*, 2008, 45(1): 1-14. DOI:10.1136/jmg.2007.053959.
- Schriemer D, Sribudiani Y, A IJ, et al. Regulators of gene expression in Enteric Neural Crest Cells are putative Hirschsprung disease genes[J]. *Dev Biol*, 2016, 416(1): 255-265. DOI:10.1016/j.ydbio.2016.06.004.
- Lai FP, Lau ST, Wong JK, et al. Correction of Hirschsprung-Associated Mutations in Human Induced Pluripotent Stem Cells Via Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9, Restores Neural Crest Cell Function[J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(1): 139-153 e8. DOI:10.1053/j.gastro.2017.03.014.
- Mwizerwa O, Das P, Nagy N, et al. Gdnf is mitogenic, neurotrophic, and chemoattractive to enteric neural crest cells in the embryonic colon[J]. *Dev Dyn*, 2011, 240(6): 1402-1411. DOI:10.1002/dvdy.22630.
- Garcia-Barcelo MM, Tang CS, Ngan ES, et al. Genome-wide association study identifies NRG1 as a susceptibility locus for Hirschsprung's disease[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(8): 2694-2699. DOI:10.1073/pnas.0809630105.
- Luzon-Toro B, Espino-Paisan L, Fernandez RM, et al. Next-generation-based targeted sequencing as an efficient tool for the study of the genetic background in Hirschsprung patients[J]. *BMC Med Genet*, 2015, 16: 89. DOI:10.1186/s12881-015-0235-5.
- Luzon-Toro B, Gui H, Ruiz-Ferrer M, et al. Exome sequencing reveals a high genetic heterogeneity on familial Hirschsprung disease[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16473. DOI:10.1038/srep16473.
- Tang CS, Cheng G, So MT, et al. Genome-wide copy number analysis uncovers a new HSCR gene: NRG3[J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(5): e1002687. DOI:10.1371/journal.pgen.1002687.
- Parisi MA, Kapur RP. Genetics of Hirschsprung disease[J]. *Curr Opin Pediatr*, 2000, 12(6): 610-617. DOI:10.1097/00008480-200012000-00017.
- Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, et al. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret[J]. *Nature*, 1994, 367(6461): 380-383. DOI:10.1038/367380a0.
- Huang J, Dang R, Torigoe D, et al. Genetic variation in the GDNF promoter affects its expression and modifies the severity of Hirschsprung's disease (HSCR) in rats carrying Ednrb (sl) mutations[J]. *Gene*, 2016, 575(1): 144-148.

- DOI:10.1016/j.gene.2015.08.051.
- 14 Tou J, Wang L, Liu L, et al. Genetic variants in RET and risk of Hirschsprung's disease in Southeastern Chinese; a haplotype-based analysis [J]. BMC Med Genet, 2011, 12: 32. DOI:10.1186/1471-2350-12-32.
 - 15 Vaclavikova E, Kavalcova L, Skaba R, et al. Hirschsprung's disease and medullary thyroid carcinoma: 15-year experience with molecular genetic screening of the RET proto-oncogene [J]. Pediatr Surg Int, 2012, 28 (2): 123-128. DOI: 10.1007/s00383-011-2993-2.
 - 16 Nunez-Torres R, Fernandez RM, Acosta MJ, et al. Comprehensive analysis of RET common and rare variants in a series of Spanish Hirschsprung patients confirms a synergistic effect of both kinds of events [J]. BMC Med Genet, 2011, 12: 138. DOI:10.1186/1471-2350-12-138.
 - 17 Vaclavikova E, Dvorakova S, Skaba R, et al. RET variants and haplotype analysis in a cohort of Czech patients with Hirschsprung disease [J]. PLoS One, 2014, 9 (6): e98957. DOI:10.1371/journal.pone.0098957.
 - 18 Liang CM, Ji DM, Yuan X, et al. RET and PHOX2B genetic polymorphisms and Hirschsprung's disease susceptibility: a meta-analysis [J]. PLoS One, 2014, 9 (3): e90091. DOI: 10.1371/journal.pone.0090091.
 - 19 Lee HO, Levorse JM, Shin MK. The endothelin receptor-B is required for the migration of neural crest-derived melanocyte and enteric neuron precursors [J]. Developmental Biology, 2003, 259 (1): 162. DOI: 10.1016/S0012-1606 (03) 00160-X.
 - 20 Amiel J, Attié T, Jan D, et al. Heterozygous endothelin receptor B (EDNRB) mutations in isolated Hirschsprung disease [J]. Human Molecular Genetics, 1996, 5 (3): 355. DOI:10.1093/hmg/5.3.355.
 - 21 McCallion AS, Chakravarti A. EDNRB/EDN3 and Hirschsprung disease type II [J]. Pigment Cell Research, 2001, 14 (3): 161-169. DOI:10.1034/j.1600-0749.2001.140305.x
 - 22 Lee KE, Nam S, Cho EA, et al. Identification of direct regulatory targets of the transcription factor Sox10 based on function and conservation [J]. BMC Genomics, 2008, 9 (1): 408. DOI:10.1186/1471-2164-9-408.
 - 23 Garcia-Barceló M, Sham MH, Lui VCH, et al. Association study of PHOX2B as a candidate gene for Hirschsprung's disease [J]. Gut, 2003, 52 (4): 563-567. DOI: 10.1136/gut.52.4.563.
 - 24 Nakakimura S, Sasaki F, Okada T. Hirschsprung's disease, acrocallosal syndrome, and congenital hydrocephalus: report of 2 patients and literature review [J]. J Pediatr Surg, 2008, 43 (5): 13-17. DOI:10.1016/j.jpedsurg.2007.12.069.
 - 25 Lee JS, Oh JT, Kim JH, et al. Association Analysis of SLA-A20 Polymorphisms With Hirschsprung Disease [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2016, 62 (1): 64-70. DOI:10.1097/MPG.0000000000000880.
 - 26 Tang CS, Gui H, Kapoor A, et al. Trans-ethnic meta-analysis of genome-wide association studies for Hirschsprung disease [J]. Human Molecular Genetics, 2016, 25 (23): 5265-5275. DOI:10.1093/hmg/ddw333.
 - 27 Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, et al. Exome sequencing identifies the cause of a Mendelian disorder [J]. Nature Genetics, 2010, 42 (1): 30. DOI:10.1038/ng.499.
 - 28 So MT, Leon YY, Cheng G, et al. RET Mutational Spectrum in Hirschsprung Disease: Evaluation of 601 Chinese Patients [J]. PLoS One, 2011, 6 (12): e28986. DOI: 10.1371/journal.pone.0028986.
 - 29 Luzóntoro B, Gui H, Ruizferrer M, et al. Exome sequencing reveals a high genetic heterogeneity on familial Hirschsprung disease [J]. Sci Rep, 2015, 5: 16473. DOI:10.1038/srep16473.
 - 30 张彦, 夏慧敏. 精准医学在儿外科出生缺陷疾病谱中的应用 [J]. 临床小儿外科杂志, 2017, 16 (4): 324-327. DOI:10.3969/j.issn.1671-6353.2017.04.
 - Zhang Y, Xia HM. Applications of precision medicine in birth defect disease spectrum of pediatric surgery [J]. J Clin Ped Sur, 2017, 16 (4): 324-327. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2017.04.
 - 31 Qiu X, Lu JH, He JR, et al. The Born in Guangzhou Cohort Study (BIGCS) [J]. Eur J Epidemiol, 2017, 32 (4): 337-346. DOI:10.1007/s10654-017-0239-x.
 - 32 王阳, 蔡威. 精准医学背景下先天性巨结肠的研究进展 [J]. 临床小儿外科杂志, 2017, 16 (4): 319-323. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2017.04.003.
 - Wang Y, Cai W. Research advances of precision medicine for Hirschsprung disease [J]. J Clin Ped Sur, 2017, 16 (4): 319-323. DOI:10.3969/j.issn.1671-6353.2017.04.003.

(收稿日期:2017-12-21)

本文引用格式:张彦, 夏慧敏. 先天性巨结肠的遗传发病机制及前瞻性队列研究进展 [J]. 临床小儿外科杂志, 2018, 17 (2): 90-93. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2018.02.003.

Citing this article as: Zhang Y, Xia HM. Hirschsprung disease: genetic pathogenesis and progress of prospective cohort study [J]. J Clin Ped Sur, 2018, 17 (2): 90-93. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2018.02.003.