

先天性肛门直肠畸形基础研究的进展与展望



全文二维码

朱中贤 唐维兵

南京医科大学附属儿童医院新生儿外科, 南京 210008

通信作者: 唐维兵, Email: twbcn@njmu.edu.cn

【摘要】 先天性肛门直肠畸形是一类表型及遗传异质性疾病, 了解其发病机制有助于疾病的早期预防与治疗。在基础研究迅猛发展的今天, 先天性肛门直肠畸形的研究深度远不如其他先天性疾病, 研究方向亦相对局限。本文就先天性肛门直肠畸形基础研究(主要包括胚胎学研究、遗传学研究及表观遗传学研究)的进展与展望进行阐述。

【关键词】 肛门直肠畸形; 胚胎发育; 基因; 遗传学研究; 表观基因组学; 基因表达调控; 发育期

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81901513)

DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202210017-002

Recent advances and future prospects of basic researches on congenital anorectal malformations

Zhu Zhongxian, Tang Weibing

Department of Neonatal Surgery, Affiliated Children's Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China

Corresponding author: Tang Weibing, Email: twbcn@njmu.edu.cn

【Abstract】 Congenital anorectal malformations are a diverse set of phenotypic and genetically heterogeneous diseases. Understanding the underlying pathogenesis aids in its early preventions and treatments. In rapidly developing basic researches, the studies of congenital anorectal malformations are not as thorough as those of other congenital diseases and research direction is relatively limited. This review summarized the latest basic researches on congenital anorectal malformations (esp. embryological, genetic and epigenetic studies).

【Key words】 Anorectal Malformations; Embryonic Development; Genes; Epigenomics; Genetic Research; Gene Expression Regulation, Developmental

Fund program: Youth Science Fund Project of National Natural Science Foundation of China(81901513)

DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202210017-002

先天性肛门直肠畸形(anorectal malformations, ARM)是最常见的消化系统出生缺陷, 发病率为 $1/5\,000 \sim 1/2\,000$ ^[1]。ARM 产前诊断困难, 手术是唯一有效的治疗手段。由于 ARM 病理类型复杂, 并伴有肛门括约肌和盆底神经发育不良, 术后疗效常不确定, 易遗留不同程度肛门直肠和括约肌功能障碍。从致病机制入手, 探究 ARM 发病原因, 以早期诊断、早期预防、全方位治疗, 是 ARM 研究的重要内容。但受限于发病率低、畸形胎儿获得困难、难以模拟胚胎发育异常过程等因素, 目前 ARM 的基础研究进展缓慢, 主要集中在胚胎学研究、遗传学研究及近期新起的表观遗传学研究。现针对 ARM 基础研究领域的进展与展望进行阐述。

一、ARM 的研究进展

(一) 胚胎学研究

在胚胎发生领域, 后肠多指由外胚层起源、来自肛窝的消化管部位, 其在时间、空间上的发育过程至今仍无定论, 泄殖腔分隔理论和直肠迁移理论分别解释了后肠如何分化为尿道(腹侧)和肛门(背侧)。20 世纪初, 大家普遍认为后肠发育取决于尿道直肠隔对泄殖腔的分隔作用, 但尿道直肠隔在正常胚胎发育过程中是否与泄殖腔膜发生融合仍存在争议^[2-3]。Tourneux 等^[2]认为尿道直肠隔从头侧到尾侧向下移动; 而 Retterer 等^[3]推测泄殖腔内出现侧褶, 这些侧褶通过融合形成尿道直肠隔。van der Putte^[4]在猪模型中否认了尿道直肠隔在泄殖腔

分隔过程中的主要作用,推测背侧泄殖腔向下转移至尾部区域建立肛门开口。Kluth 等^[5]使用扫描电子显微镜详细记录三维立体胚胎结构,并未发现侧褶融合使泄殖腔分隔,且未观察到肛门开口的迁移或背侧泄殖腔的移动,从而推翻了 Retterer^[3]和 van der Putte^[4]的理论。波士顿儿童医院针对胎鼠泄殖腔发育的不同阶段构建了三维形态学图像,发现泄殖腔形态的发生和泌尿生殖道与直肠肛门的分隔是尿道直肠隔背侧周围间充质组织在时空维度上重新排列的结果^[6]。众多且相对有争议的胚胎学理论导致研究者在面对 ARM 胚胎学背景时仍然感到困惑。部分学者通过观察新生儿 ARM 形态,认为直肠在正常发育过程中从高位迁移到肛门的正常区域,如果迁移过程被迫停止,则会形成异位肛门,但至今尚无研究者能拿出支持这种理论的胚胎学证据^[7-8]。胚胎学研究进展也常因缺乏合适的动物模型而受阻。目前应用的动物模型包括 Danforth 短尾小鼠模型、家猪模型、阿霉素、维甲酸、乙烯硫脲致畸大鼠模型等^[4,9-16]。各类基因突变小鼠模型也逐渐应用于 ARM 发病机制的研究中,主要信号通路相关基因突变有以下几种。

1. *Hox* 基因:*HoxD12* 和 *HoxD13* 主要调节间充质组织,特别是平滑肌的发育,*HoxD13*(-/-)小鼠表现为平滑肌肌层与黏膜异常分离并在某些区域中断,进而出现直肠扩张。*HoxD12*(-/-)小鼠括约肌区域直肠肌层明显紊乱,也有肌层中断现象,与 *HoxD13*(-/-)小鼠表现类似但较为轻微^[17]。*HoxA13*(-/-)突变小鼠表现出苗勒管发育不全、膀胱发育停滞和脐动脉狭窄。*HoxA13*(+/-)/*HoxD13*(-/-)复合突变小鼠阴道、尿道和肛门开口位置不正确,直肠肌层和上皮层发育异常;*HoxA13*(-/-)/*HoxD13*(+/-)复合突变小鼠的泌尿生殖窦发育严重受损;*HoxA13*(-/-)/*HoxD13*(-/-)双基因敲除小鼠未见泄殖腔分离成泌尿生殖窦和直肠^[18]。

2. *Shh*(sonic hedgehog)基因:*Shh*(-/-)小鼠表现为永存泄殖腔。*Gli2* 和 *Gli3* 是 *Shh* 信号通路中的转录因子,*Gli2*(-/-)和 *Gli3*(-/-)小鼠分别表现为直肠尿道瘘和肛门狭窄;在 *Gli2*(-/-)/*Gli3*(+/-)、*Gli2*(+/-)/*Gli3*(-/-)和 *Gli2*(-/-)/*Gli3*(-/-)复合突变小鼠中也观察到永存泄殖腔,表明存在基因剂量依赖性效应^[19]。

3. *Fgf*(fibroblast growth factor)基因:*Fgf10* 于胚胎建立肛门直肠连续性时在直肠中表达。*Fgf10*

(-/-)小鼠在肛门直肠发育关键期直肠和肛门融合失败,出现了肛门直肠畸形表型^[20]。

4. *Wnt* (wingless-type integration site) 基因:*Wnt5a* 在胚胎结直肠中表达。*Wnt5a*(-/-)小鼠表现出包括肛门直肠畸形在内的多种畸形,在胚胎第 15.5 天可以观察到尿道和肠道之间的瘘管,至胚胎第 18.5 天,大多数突变小鼠远端肠管显示有盲端^[21]。*Dkk1* 是 *Wnt*/β-catenin 信号通路的有效抑制剂,肛门生殖系统发育依赖 *Dkk1* 介导的 *Wnt*/β-catenin 通路动态抑制,*Dkk1*(-/-)小鼠表现出尿道生殖器过早形成,最终形成肛门直肠畸形伴尿道瘘表型^[22]。

以上胚胎学研究均依据相关信号传导通路基因在肛门直肠发育中的核心作用来构建动物模型,未直接从人类遗传学研究中获取信息,不能真实地模拟人类 ARM 的胚胎学发病机制。

(二)遗传学研究

目前 ARM 遗传学病因仍不完全清楚,遗传学研究主要分为以下三类。

1. 根据信号通路相关基因筛选遗传学变异:*SHH*、*WNT* 和 *FGF* 等信号通路在胚胎发育过程中必不可少,动物研究证明这些基因及其信号通路参与后肠发育^[19-21]。因此,这些通路中的基因及其下游分子是 ARM 遗传研究的重要部分。2008 年中国香港地区在 88 例 ARM 患儿中筛选 *SHH*、*GLI3* 基因突变和单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP),发现 10 个 *GLI3* 罕见突变 (IVS3 + 141C > G、T183A、IVS4 + 124T > C、IVS7 + 17G > A、IVS8 + 1G > C、N503N、P941P、P998L、A1005A、A1039A) 和 4 个 *SHH* 罕见突变 (IVS1-49C > T、IVS2 + 111A > C、L214L、G290D),表明罕见突变对 ARM 可能存在致病作用^[23]。Carter 等^[24]选取 150 例 ARM 患儿和 623 例无严重畸形的婴儿,针对 25 个候选基因中位于转录因子结合位点、CpG 岛、剪接位点和 miRNA 靶向位点的 71 个常见突变进行筛查,结果显示影响 *WNT3A*、*PCSK5*、*TCF4*、*MKKS*、*GLI2*、*HOXD12* 和 *BMP4* 中转录因子结合、剪接和 DNA 甲基化的突变与 ARM 发生相关。还有一些研究调查了 *FGF* 和 *WNT* 信号通路是否参与 ARM 的发生,波恩大学研究团队分析了 10 例 VACTERL 综合征 [vertebral defects (V), anorectal malformations (A), cardiac defects (C), tracheoesophageal fistula with esophageal atresia (TE), renal malformations (R) and limb defects (L)] 和 10 例泄殖腔外翻患儿

的 *FGF10* 编码区和外显子-内含子交界区的基因突变,最终结果不支持 *FGF10* 作为本研究内 ARM 或泄殖腔外翻的遗传原因^[25]。该大学另一研究团队对 78 例 ARM 患儿中的 *WNT3A*、*WNT5A*、*WNT11*、*DACT1*、*FGF10*、*FGFR2* 和 *T* 基因进行了测序分析,将有意义的突变进一步在家庭成员中进行验证,最终未发现这些突变与该 ARM 研究队列有因果关系^[26]。

2. 根据动物研究相关基因筛选遗传学变异:候选基因也可根据动物实验,或与结直肠相关的先天性畸形等方面研究成果来选择。国内有课题组纳入 108 例 ARM 患儿和 120 例对照,在筛选 *CDX1* 基因后得到了 4 个杂合突变(c. 213-214InsGAA, c. 6G > C, c. 27G > T, c. 18A > C),与对照组直肠组织相比,ARM 中 *CDX1* 的 mRNA 及蛋白表达均显著降低,提示 *CDX1* 下调可能与 ARM 的发生发展相关^[27]。该突变筛选结果并不能直接反映疾病发展过程中蛋白质的变化,确定易感基因的本质仍需进行功能性研究,相比其他 ARM 遗传学研究,该研究在人群样本中验证了基因表达,但仍然没有直接针对筛选出的突变进行功能探索。中国台湾地区比较了 *RET* 基因中特异的 SNP 位点与 ARM、小儿假性肠梗阻及先天性巨结肠的相关性,结果显示 ARM 患者与正常人群 SNP 等位基因频率没有差异,先天性巨结肠患者中 5 个 SNP 频率与正常人群不同,加强了 *RET* 基因中特定 SNP 与中国台湾地区先天性巨结肠发生的关联^[28]。Schramm 等^[29]报告了一个 ARM 家系,先证者为 ARM 合并先天性巨结肠,先证者母亲及姐姐为轻度 ARM,在对 4 个先天性巨结肠相关基因(*RET*、*EDNRB*、*EDN3* 和 *GDNF*)和 *HLXB9* 进行序列分析后,未发现有意义的遗传改变^[29]。Moore 等^[30]通过 14 例 ARM 患儿末端结肠组织标本,筛选 *EDNRB* 基因突变,发现 3 个 SNP(178G/A、702C/T、831G/A)分别与相应的 ARM 表型相关。

依据信号通路或动物研究策略筛选 ARM 变异的重大问题在于提前假设致病因素位于候选基因,不能排除上游启动子区、非编码区域的突变是否促成畸形,更不能确定其他基因是否参与了疾病的发生发展。

3. 从基因组或外显子组层面筛选遗传学变异:2013 年以后的遗传学研究大多在全基因组或全外显子组层面探索 ARM 致病因素,例如全基因组关联性研究(genome-wide association study, GWAS)、全基因组拷贝数变异(copy number variant, CNV)研究

或全外显子测序研究。在一项规模较小的 GWAS 及全基因组 CNV 研究中,未发现任何与 ARM 相关的常见 SNP,但鉴定出 114 种 ARM 患儿特有的罕见 CNV,确定了 1 例具有 8p11.21 区域重复(包含 *DKK4* 基因)的患儿,并在小鼠模型中证实 *Dkk4* 过表达通过影响 WNT 信号通路导致 ARM^[31]。与罕见突变相比,常见 SNP 影响相对较小,且很难映射到相关基因,对于 ARM 这类罕见的异质性疾病,若缺乏大样本多中心合作,GWAS 研究是否合理有效有待考量。波恩大学遗传学团队对 12 例罹患 ARM 且合并两种及以上 VACTERL 相关临床特征的患者进行了分子核型分析,在其中 1 例患者中发现了染色体 22q11.21 区域的微小重复,22q11.2 区域易形成重复区段,相关综合征包括 velo-cardio-facial 综合征、DiGeorge 综合征和 22q11.2 重复综合征,该研究扩展了 22q11.2 重复综合征的表型谱^[32]。该团队随后又在 2 例 ARM 患者中使用 SNP 芯片分析鉴定出染色体 13q 的缺失,阐述了染色体 13q 缺失与 ARM 的关联,提示常规分子诊断应注意寻找这些染色体重复或缺失^[33]。为了解释同卵双胞胎为何生后表型不一,他们又使用分子核型分析研究了 4 对同卵双胞胎(双胎之一表型正常,双胎之二出现 ARM 或膀胱外翻伴尿道上裂),结果未发现仅存在于双胎之二且可能致病的 CNV,表型不一致的原因可能是调控元件的变化或编码区内较小的遗传改变,需通过全外显子组测序进一步检测^[34]。Hilger 等^[35]对 41 例具有 VATER/VACTERL 特征(包含至少 3 种畸形)和 6 例具有 VATER/VACTERL 表型的患者及其父母进行了分子核型芯片分析,发现涉及染色体区域 1q41、2q37.3 和 8q24.3 的 CNV,分别包含 *SPATA17* 和 *CAPN10*、*GPR35* 及 *EPPK1*、*PLEC*、*PARP10* 基因,胎鼠表达研究表明 *Gpr35* 参与了 VATER/VACTERL 表型的发生发展,对 *GPR35* 和包含已确定 CNV 的其他基因,需要在 ARM 人群样本中加以验证。以上研究表明,进一步探索染色体结构异常有助于推进 ARM 遗传学研究。笔者团队曾对一 ARM 家系进行全外显子测序,初步确定 *MYH14* 基因第 38 外显子中的纯合错义突变(c. 5393C > A [p. Ala1806Asp])可能为致病因素,后续将根据此位点设计基因敲除小鼠模型进行验证^[36]。

(三)表观遗传学研究

近 10 年来,国内学者在 ARM 的表观遗传学研究中开展了重要工作。2014 年, Huang 等^[37]通过检

测 ARM 儿童末端直肠组织中 *SHH* 基因的启动子甲基化和表达,发现 *SHH* 基因启动子区域高度甲基化,mRNA 表达降低,可能是 ARM 的发病机制。随后诸多学者开始关注非编码 RNA 在 ARM 中的表观调控,有学者分别整合了 miRNA 与 mRNA、lncRNA 与 mRNA 在 ARM 胎鼠后肠组织中的表达谱,构建了包括 25 个 miRNA 和 76 个 mRNA 的靶基因调控网络,建立了 lncRNA 和转录因子核心网络,确认了分别由 *Jun*、*c-Myc*、*Usf1*、*Alf2* 和 *Stat3* 控制的五类 lncRNA 通路,为进一步研究 ARM 发病机制提供了依据^[38-39]。中国医科大学附属盛京医院团队通过 miRNA 微阵列分析发现在大鼠肛门直肠形成关键时期,miR-125b-2-3p、miR-92a-2-5p 和 miR-99a-5p 的差异表达可能导致 ARM 发生,随后通过 RNA-seq 分析 circRNA 表达并构建 circRNA-miRNA-mRNA 网络,在接下来的研究中分别验证了 miR-92a-2-5p/*Prkca*/ β -catenin、*rno_circ_0004002*/miR-342-5p/*Wnt3a*、*rno_circ_0005139*/miR-324-3p/*Wnt5a* 三条通路在 ARM 发生中的作用,为未来 ARM 的治疗提供了潜在靶点^[40-44]。此外,为解释横纹肌复合体发育不良在 ARM 中的潜在分子机制,中国医科大学附属盛京医院团队还测定了 ARM 胎鼠横纹肌复合体 mRNA 和 lncRNA 表达谱,为开发改善术后肛门排便功能的干预措施提供了理论基础^[45]。Yao 等^[46]发现 miR-193 可能在调节肛门直肠发育的关键基因 *HoxD13* 中发挥重要作用;Mattiske 等^[47]则发现了 lncRNA *Leat1* 的缺失会导致雌性小鼠胚胎发育期泌尿生殖组织中 *EfnB2* 的表达减少,并导致雌性小鼠肛门与生殖器距离缩短。

二、目前 ARM 的研究难点

(一) 胚胎学研究

现今仍然缺乏足够多的 ARM 胚胎模型用于系统的胚胎学研究。多数团队采取连续切片的方式进行胚胎学研究,缺乏三维重建合理解释动态演变过程。在后肠发育理论中,虽然大家普遍接受尿道直肠隔的分隔作用,但对尿道直肠隔的性质及其发育方式没有达成一致。

(二) 遗传学研究

不同特征的 ARM 或不同 ARM 相关综合征可能具有不同的遗传特征,目前大多数遗传学研究未解决 ARM 的异质性问题。由于 ARM 相对罕见,多数研究受到样本量的限制,全外显子测序价格昂贵也成为限制罕见疾病研究开展的因素之一。动物模型有助于揭示 ARM 的发病机制,为疾病的发育

和生理学研究提供新的见解,但很少有 ARM 研究者在动物模型中验证筛选到遗传改变。

(三) 表观遗传学

表观遗传学还包含 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑等,目前 ARM 的研究思路并未拓宽,大多集中于非编码 RNA 调控,其余方面的作用机制研究尚不丰富,且基本都未纳入人群验证。多篇研究初步确定了 miRNA 的表达谱,但对 miRNA 的功能研究多是通过生物信息学工具预测分析其作用靶基因,进而在细胞中进行报告基因实验以证明靶向关系,缺乏 miRNA 调控网络以及反馈机制的研究。

三、展望

以上研究难点导致了目前 ARM 基础研究推进缓慢,但也为未来基础研究提供了方向。已有学者利用光学投影断层扫描(optical projection tomography,OPT)、扫描电子显微镜(scanning electron microscopy,SEM)和光片荧光显微镜(light sheet fluorescence microscopy,LSFM)等三维重建技术对晚期胚胎后肠结构发育进行深刻解读,大范围开展三维相关技术并与遗传学研究相结合是未来胚胎学研究的前景^[48]。构建具有 ARM 表型的基因突变小鼠模型是进一步进行机制研究的重要手段,这些动物模型的研究结果有助于指导、评估和验证从 ARM 患者身上发现各种变异在疾病中的作用。动物研究与临床研究结果的配对还可以提供开发治疗方法的手段,改善 ARM 患者的预后。此外,研究重心还应集中在多中心、多家系 ARM 队列的数据收集,跨地区、跨国合作有助于阐明 ARM 潜在的异质病因,进一步根据特定的疾病表型、患者预后和变异结果进行分层分析,也将揭示 ARM 的遗传结构。研究 ARM 中基因-基因和基因-环境相互作用能增加对 ARM 发病机制的了解,有助于更好地指导患者及其家属更准确地预估疾病发生的风险,识别高危人群并制定预防策略。

作为基因调控的开关,拓宽 ARM 表观遗传学研究领域、构建完善成熟的 ARM 表观遗传网络,对 ARM 的诊断、预后及新型治疗等具有重要意义。深入研究 miRNA 的关键在于构建 miRNA 调控的网络关系以及反馈机制。通过 miRNA 靶标网络,可以识别出 ARM 中涉及的关键 miRNA,进一步利用 miRNA 模拟物或拮抗剂调节 miRNA 在体内的表达和活性,可以达到治疗目的;确定最佳 miRNA 候选物或 miRNA 靶标、设计 miRNA 递送载体、为治疗候选药物提供更高的稳定性、实现组织特异性靶向,

以及避免潜在的毒性和脱靶效应,是这种治疗方式必须解决的问题^[49-50];不过 ARM 的非编码 RNA 研究还处于初级阶段,可以预见从初步探索到最终治疗的实施,路途依然坎坷。

综上所述,作为最常见的消化系统先天畸形,ARM 的基础研究现状远不如其他先天畸形,研究领域也相对局限,这既是机遇,也是挑战。未来的研究趋势应是进一步完善胚胎学、遗传学、表观遗传学、蛋白质组学、代谢组学研究,并将其整合到 ARM 发生过程中,以提高对 ARM 发病机制的理解;或为阐明 ARM 所致的肌肉神经病理改变奠定基础,进而改善术后排便功能,提高治疗效果及远期生存质量,推动精准医疗在 ARM 预防和治疗中的发展。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 朱中贤、唐维兵负责文章的撰写;唐维兵负责文章的修改,并对文章知识性内容进行审阅

参 考 文 献

- [1] Cuschieri A,EUROCAT Working Group. Descriptive epidemiology of isolated anal anomalies;a survey of 4.6 million births in Europe[J]. Am J Med Genet,2001,103(3):207-215. DOI:10.1002/ajmg.1532. abs.
- [2] Tourneux F. On the early development of the cloaca,the genital tubercles and the anus in sheep embryos,including some remarks on the development of the prostatic glands[J]. J Anat Physiol,1888,24:503-517.
- [3] Retterer E. Sur l'origine et de l'évolution de la region Ano-genitale des mammiferes[J]. J Anat Physiol,1890,26:126-210.
- [4] van der Putte SC. Normal and abnormal development of the anorectum[J]. J Pediatr Surg,1986,21(5):434-440. DOI:10.1016/S0022-3468(86)80515-2.
- [5] Kluth D, Hillen M, Lambrecht W. The principles of normal and abnormal hindgut development[J]. J Pediatr Surg,1995,30(8):1143-1147. DOI:10.1016/0022-3468(95)90007-1.
- [6] Huang YC, Chen F, Li X. Clarification of mammalian cloacal morphogenesis using high-resolution episcopic microscopy[J]. Dev Biol,2016,409(1):106-113. DOI:10.1016/j.ydbio.2015.10.018.
- [7] Bill AH Jr, Johnson RJ. Failure of migration of the rectal opening as the cause for most cases of imperforate anus[J]. Surg Gynecol Obstet,1958,106(6):643-651.
- [8] Gans SL, Friedman NB. Some new concepts in the embryology, anatomy, physiology and surgical correction of imperforate anus[J]. West J Surg Obstet Gynecol,1961,69:34-37.
- [9] Gluecksohn-Schoenheimer S. The morphological manifestations of a dominant mutation in mice affecting tail and urogenital system[J]. Genetics,1943,28(4):341-348. DOI:10.1093/genetics/28.4.341.
- [10] Thompson DJ, Molello JA, Strebing RJ, et al. Teratogenicity of adriamycin and daunomycin in the rat and rabbit[J]. Teratology,1978,17(2):151-157. DOI:10.1002/tera.1420170207.
- [11] Diez-Pardo JA, Baoquan Q, Navarro C, et al. A new rodent experimental model of esophageal atresia and tracheoesophageal fistula: preliminary report[J]. J Pediatr Surg,1996,31(4):498-502. DOI:10.1016/S0022-3468(96)90482-0.
- [12] Hashimoto R, Nagaya M, Ishiguro Y, et al. Relationship of the fistulas to the rectum and genitourinary tract in mouse fetuses with high anorectal malformations induced by all-trans retinoic acid[J]. Pediatr Surg Int,2002,18(8):723-727. DOI:10.1007/s00383-002-0874-4.
- [13] Sasaki Y, Iwai N, Tsuda T, et al. Sonic hedgehog and bone morphogenetic protein 4 expressions in the hindgut region of murine embryo with anorectal malformations[J]. J Pediatr Surg,2004,39(2):170-173. DOI:10.1016/j.jpedsurg.2003.10.009.
- [14] Arana J, Villanueva A, Guarch R, et al. Anorectal atresia. An experimental model in the rat[J]. Eur J Pediatr Surg,2001,11(3):192-195. DOI:10.1055/s-2001-15489.
- [15] Yuan ZW, Lui VCH, Tam PKH. Deficient motor innervation of the sphincter mechanism in fetal rats with anorectal malformation: a quantitative study by fluorogold retrograde tracing[J]. J Pediatr Surg,2003,38(9):1383-1388. DOI:10.1016/S0022-3468(03)00401-9.
- [16] Bai YZ, Chen H, Yuan ZW, et al. Normal and abnormal embryonic development of the anorectum in rats[J]. J Pediatr Surg,2004,39(4):587-590. DOI:10.1016/j.jpedsurg.2003.12.002.
- [17] Kondo T, Dollé P, Zákány J, et al. Function of posterior HoxD genes in the morphogenesis of the anal sphincter[J]. Development,1996,122(9):2651-2659. DOI:10.1242/dev.122.9.2651.
- [18] Warot X, Fromental-Ramain C, Fraulob V, et al. Gene dosage-dependent effects of the Hoxa-13 and Hoxd-13 mutations on morphogenesis of the terminal parts of the digestive and urogenital tracts[J]. Development,1997,124(23):4781-4791. DOI:10.1242/dev.124.23.4781.
- [19] Mo R, Kim JH, Zhang JR, et al. Anorectal malformations caused by defects in sonic hedgehog signaling[J]. Am J Pathol,2001,159(2):765-774. DOI:10.1016/S0002-9440(10)61747-6.
- [20] Fairbanks TJ, De Langhe S, Sala FG, et al. Fibroblast growth factor 10 (Fgf10) invalidation results in anorectal malformation in mice[J]. J Pediatr Surg,2004,39(3):360-365. DOI:10.1016/j.jpedsurg.2003.11.034.
- [21] Tai CC, Sala FG, Ford HR, et al. Wnt5a knock-out mouse as a new model of anorectal malformation[J]. J Surg Res,2009,156(2):278-282. DOI:10.1016/j.jss.2009.03.087.
- [22] Guo CS, Sun Y, Guo CM, et al. Dkk1 in the peri-cloaca mesenchyme regulates formation of anorectal and genitourinary tracts[J]. Dev Biol,2014,385(1):41-51. DOI:10.1016/j.ydbio.2013.10.016.
- [23] Garcia-Barceló MM, Chi-Hang Lui V, Miao XP, et al. Mutational analysis of SHH and GLI3 in anorectal malformations[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol,2008,82(9):644-648. DOI:10.1002/bdra.20482.
- [24] Carter TC, Kay DM, Browne ML, et al. Anorectal atresia and variants at predicted regulatory sites in candidate genes[J]. Ann Hum Genet,2013,77(1):31-46. DOI:10.1111/j.1469-1809.2012.00734.x.
- [25] Krüger V, Khoshvaghti M, Reutter H, et al. Investigation of FGF10 as a candidate gene in patients with anorectal malformations and exstrophy of the cloaca[J]. Pediatr Surg Int,2008,24(8):893-897. DOI:10.1007/s00383-008-2193-x.
- [26] Draaken M, Prins W, Zeidler C, et al. Involvement of the WNT and FGF signaling pathways in non-isolated anorectal malformations: sequencing analysis of WNT3A, WNT5A, WNT11,

- DACT1, FGF10, FGFR2 and the T gene [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(6):1459-1464. DOI:10.3892/ijmm.2012.1124.
- [27] Zhang T, Tang XB, Wang LL, et al. Mutations and down-regulation of CDX1 in children with anorectal malformations [J]. *Int J Med Sci*, 2013, 10(2):191-197. DOI:10.7150/ijms.4929.
- [28] Wu TT, Tsai TW, Chang H, et al. Polymorphisms of the RET gene in Hirschsprung disease, anorectal malformation and intestinal pseudo-obstruction in Taiwan [J]. *J Formos Med Assoc*, 2010, 109(1):32-38. DOI:10.1016/S0929-6646(10)60019-8.
- [29] Schramm C, Draaken M, Tewes G, et al. Autosomal-dominant non-syndromic anal atresia: sequencing of candidate genes, array-based molecular karyotyping, and review of the literature [J]. *Eur J Pediatr*, 2011, 170(6):741-746. DOI:10.1007/s00431-010-1332-2.
- [30] Moore SW, Zaahl MG. Association of endothelin- β receptor (ED-NRB) gene variants in anorectal malformations [J]. *J Pediatr Surg*, 2007, 42(7):1266-1270. DOI:10.1016/j.jpedsurg.2007.02.019.
- [31] Wong EHM, Cui L, Ng CL, et al. Genome-wide copy number variation study in anorectal malformations [J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(3):621-631. DOI:10.1093/hmg/ddt451.
- [32] Schramm C, Draaken M, Bartels E, et al. De novo microduplication at 22q11.21 in a patient with VACTERL association [J]. *Eur J Med Genet*, 2011, 54(1):9-13. DOI:10.1016/j.ejmg.2010.09.001.
- [33] Dworschak GC, Draaken M, Marcellis C, et al. De novo 13q deletions in two patients with mild anorectal malformations as part of VATER/VACTERL and VATER/VACTERL-like association and analysis of EFNB2 in patients with anorectal malformations [J]. *Am J Med Genet A*, 2013, 161A(12):3035-3041. DOI:10.1002/ajmg.a.36153.
- [34] Baudisch F, Draaken M, Bartels E, et al. CNV analysis in monozygotic twin pairs discordant for urorectal malformations [J]. *Twin Res Hum Genet*, 2013, 16(4):802-807. DOI:10.1017/thg.2013.29.
- [35] Hilger A, Schramm C, Pennimpede T, et al. De novo microduplications at 1q41.2q37.3, and 8q24.3 in patients with VATER/VACTERL association [J]. *Eur J Hum Genet*, 2013, 21(12):1377-1382. DOI:10.1038/ejhg.2013.58.
- [36] Zhu ZX, Peng L, Chen GL, et al. Mutations of MYH14 are associated to anorectal malformations with recto-perineal fistulas in a small subset of Chinese population [J]. *Clin Genet*, 2017, 92(5):503-509. DOI:10.1111/cge.12993.
- [37] Huang YL, Zhang P, Zheng S, et al. Hypermethylation of SHH in the pathogenesis of congenital anorectal malformations [J]. *J Pediatr Surg*, 2014, 49(9):1400-1404. DOI:10.1016/j.jpedsurg.2014.03.007.
- [38] Xiao H, Huang R, Diao M, et al. Integrative analysis of microRNA and mRNA expression profiles in fetal rat model with anorectal malformation [J]. *Peer J*, 2018, 6:e5774. DOI:10.7717/peerj.5774.
- [39] Xiao H, Huang R, Chen L, et al. Integrating lncRNAs and mRNAs expression profiles in terminal hindgut of fetal rats with anorectal malformations [J]. *Pediatr Surg Int*, 2018, 34(9):971-982. DOI:10.1007/s00383-018-4311-8.
- [40] Long CY, Tang XB, Wang WL, et al. Microarray analysis of miRNAs during hindgut development in rat embryos with ethylenethiourea-induced anorectal malformations [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(5):2363-2372. DOI:10.3892/ijmm.2018.3809.
- [41] Li SY, Wang CY, Xiao YX, et al. RNA-seq profiling of circular RNAs during development of hindgut in rat embryos with ethylenethiourea-induced anorectal malformations [J]. *Front Genet*, 2021, 12:605015. DOI:10.3389/fgene.2021.605015.
- [42] Long CY, Xiao YX, Li SY, et al. Upregulation of miR-92a-2-5p potentially contribute to anorectal malformations by inhibiting proliferation and enhancing apoptosis via PRKCA/ β -catenin [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127:110117. DOI:10.1016/j.biopha.2020.110117.
- [43] Qu Y, Liu D, Jia HM, et al. Circular RNA rno_circ_0004002 regulates cell proliferation, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition through targeting miR-342-5p and Wnt3a in anorectal malformations [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9):15483-15493. DOI:10.1002/jcb.28814.
- [44] Liu D, Qu Y, Cao ZN, et al. Rno_circ_0005139 regulates apoptosis by targeting Wnt5a in rat anorectal malformations [J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(29):4272-4287. DOI:10.3748/wjg.v26.i29.4272.
- [45] Yao ZY, Yuan ZW, Bai YZ, et al. Altered mRNA and lncRNA expression profiles in the striated muscle complex of anorectal malformation rats [J]. *Pediatr Surg Int*, 2020, 36(11):1287-1297. DOI:10.1007/s00383-020-04741-w.
- [46] Jin SG, Wang JX, Chen H, et al. Differential miRNA expression analysis during late stage terminal hindgut development in fetal rats [J]. *J Pediatr Surg*, 2017, 52(9):1516-1519. DOI:10.1016/j.jpedsurg.2017.02.015.
- [47] Mattiske D, Behringer RR, Overbeek PA, et al. A novel long non-coding RNA, Leat1, causes reduced anogenital distance and fertility in female mice [J]. *Differentiation*, 2020, 112:1-6. DOI:10.1016/j.diff.2019.10.007.
- [48] Isaacson D, Shen J, Overland M, et al. Three-dimensional imaging of the developing human fetal urogenital-genital tract: indifferent stage to male and female differentiation [J]. *Differentiation*, 2018, 103:14-23. DOI:10.1016/j.diff.2018.09.003.
- [49] Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(3):203-222. DOI:10.1038/nrd.2016.246.
- [50] Li ZH, Rana TM. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(8):622-638. DOI:10.1038/nrd4359.

(收稿日期:2022-10-12)

本文引用格式:朱中贤,唐维兵.先天性肛门直肠畸形基础研究的进展与展望[J].临床小儿外科杂志,2022,21(11):1006-1011. DOI:10.3760/cma.j.cn101785-202210017-002.

Citing this article as: Zhu ZX, Tang WB. Recent advances and future prospects of basic researches on congenital anorectal malformations [J]. *J Clin Ped Sur*, 2022, 21(11):1006-1011. DOI:10.3760/cma.j.cn101785-202210017-002.