

综述

先天性脊柱侧凸遗传学病因的研究进展

The research progress of genetics etiological of congenital scoliosis

寇 瑶¹, 杜柏均¹, 田 静¹, 祝 勇²

(1 西北大学西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室 710069 西安市;

2 内蒙古医科大学第二附属医院脊柱外科 010030 呼和浩特市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2016.07.12

中图分类号: R682.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2016)-07-0650-04

脊柱侧凸分为特发性、先天性、伴随其他症状的继发性三种类型^[1]。先天性脊柱侧凸(congenital scoliosis, CS)是脊柱侧凸的常见类型, 每 1000 个新生儿中即有 1 例患儿^[2]。遗传因素参与了 CS 的形成, 然而脊柱侧凸确切的遗传学病因仍不清楚。笔者就近年来 CS 遗传学病因研究的最新进展进行综述, 为相关领域的研究提供参考。

1 脊柱畸形的形成

CS 由先天性脊柱畸形 (congenital vertebral malformation, CVM) 引起。脊椎动物中, 椎体来源于反复出芽的体节, 由前体节中胚层 (presomitic mesoderm, PSM) 通过周期性表达 FGF、Wnt、Notch 通路的基因介导^[3]。1976 年, Cooke 和 Zeeman 首次提出体节形成的“时钟和前向波”模型^[4]。在这个模型中, “钟”代表连接前体节中胚层细胞的振荡器, “波”代表“快速的细胞变化”的体节发育发生的区域, 可能是由这三个信号通路靶基因成分的梯度变化介导, 这种节律性被 PSM 中一个呈周期性振荡的分节时钟 (segmentation clock) 调控。FGF、Wnt、Notch 信号通路互相影响, 也可以独立发生, 影响椎体分节的分子振荡^[5]。

2 CS 遗传学研究

2.1 CS 致病基因的研究

对脊椎肋骨发育不全 (spondylocostal dysostosis, SCDO) 的研究使人们对于脊椎分节异常的遗传学病因有了更深入的了解。SCDO 的表型包括半椎体异常、肋骨融合与缺失等, 属于非进行性脊柱侧凸。DLL3 (delta-like 3)、MESP2 (mesoderm posterior bHLH transcription factor 2)、LFNG (O-fucosyltransferase 3-β-N-acetylglucosaminyltransferase)、HES7 (hes family bHLH transcription factor 7)、TBX6 (T-box 6) 基因的突变分别引发了 SCDO I、II、

III、IV、V 五种类型, 这五个基因都是 Notch 通路的成员, 对体节形成和发育有着非常重要的调控作用^[6]。

Notch 信号通路通过相邻细胞间的信号传递对骨骼发育起着非常重要的作用, 当通路中的基因突变引起功能缺失或功能获得, 都会导致严重的骨骼疾病^[7]。DLL3 是 Notch 通路的抑制因子, 大约 70% 的 SCDO 患者带有 DLL3 的纯合突变, 目前已确定 DLL3 的 40 种不同突变, 是导致 SCDO 的主要致病基因^[8]。MESP2 是 Notch 通路的一个靶基因, 参与调节 LFNG 和 Ripply2 (ripplly transcriptional repressor 2) 的表达, 对 Notch 通路起抑制作用, 为体节形成所必需^[9]。同时, MESP2 也是另一种先天性椎体异常脊柱胸廓发育不全 (spondylothoracic dysostosis, STD) 的致病基因^[10], 由不同于 SCDO 的致病突变位点引发。LFNG 编码一个糖基转移酶, 可在高尔基体内修饰 Notch 通路重要的细胞表面受体, 而突变的 LFNG 编码的蛋白则失去原有的糖基转移酶活性^[11]。LFNG 的异常导致了包括颈椎、胸椎和腰椎严重的脊柱发育紊乱^[12]。研究表明, 带有纯合无效等位基因 *Lfng* 的小鼠, 表现出脊柱侧凸和肋骨融合的表型, 而其不同的杂合异构体也会有一定的致畸性^[13, 14]。HES7 属于螺旋-环-螺旋 (helix-loop-helix, bHLH) 超家族 HES 的转录因子, 是 Notch 通路的靶点, 并起着负反馈作用调节 Notch 通路^[15]。Dll1 (delta-like 1) 激活邻近细胞的 Notch 通路, 诱导 Notch 胞内区 (Notch intracellular domain, NICD) 和 *Hes7* 表达, *Hes7* 表达量升高又可负反馈调节 Notch 通路和 *Dll1* 的表达^[16]。*Hes7* 基因敲除小鼠表现出体节分节不良, 前后极断裂, 从而引起严重的脊柱畸形。人体的 HES7 突变和片段缺失除了导致脊柱和肋骨畸形, 还会引起其他表型特征, 如膈疝、神经管缺陷及内脏移位等^[17-20]。体外研究表明, MESP2^[21]和 HES7^[22]mRNA 的一些异构体翻译出的蛋白功能有缺失是脊柱畸形的一个起因。

TBX6 基因位于染色体 16p11.2, 编码发育调控转录因子, 已有研究表明, TBX6 可能是 CS 的致病基因。2006 年, Yasuhiko 等^[23]用小鼠作为模型的实验表明, Tbx6 可以结合 *Mesp2* 基因上游转录起始区域, 调节 Notch 信号通路, 并调节 *Mesp2* 在前体节中胚层前部的转录。Tbx6 通过

第一作者简介: 女 (1987-), 博士研究生在读, 研究方向: 人类先天性骨骼遗传疾病

电话: (029)88302339 E-mail: kouyao@stumail.nwu.edu.cn

通讯作者: 祝勇 E-mail: 1036227632@qq.com

影响 Notch 通路的部分基因转录, 调节下游 *Mesp2* 和 *Ripply2* (rippy transcriptional repressor 2) 的表达来影响脊柱的发育, 同时, *Ripply2* 和 *Mesp2* 通过翻译后调控对 *Tbx6* 起着抑制作用^[24]。Sparrow 等^[25]发现一个拥有近亲血缘家系的 CS 为显性遗传, 而之前报道的 SCDO 的致病基因 *DLL3*、*LFNG*、*MESP2* 和 *HES7* 基因都没有发生突变, 他们通过外显子测序技术发现 *TBX6* 的一个单碱基杂合突变引入氨基酸终止位点, 推测为 *TBX6* 单倍剂量不足对 *MESP2* 激活效率降低而致病。2015 年, Wu 等^[26]通过比较基因组杂交技术 (comparative genomic hybridization, CGH), 对中国汉族人群中 161 例散发性 CS 患者和 2 个 CS 家系进行遗传学病因研究, 发现 17 个有无义突变的杂合子 *TBX6* 基因, 突变包括单核苷酸点突变、移码突变和大片段缺失, 然而他们发现这种突变并不足以致病, 进一步的研究表明当 *TBX6* 的缺失、无义或移码等无效突变的单倍体与一个常见的 *TBX6* 亚效等位基因同时存在时, 会导致 CS 的发生。他们将这一类 CS 定义为 *TBX6* 相关的 CS, 其表型特征为半椎体畸形。

除了以上在 Notch 通路中起重要作用的基因外, 还有其他一些基因被认为与脊柱缺陷和 CS 的发生有关, 是重要的 CS 致病候选基因。如 *PAX1* (paired box 1) 基因的突变影响椎体分节, Giampietro 等^[27]报道 48 例 CS 患者中有 5 例 *PAX1* 基因发生不同位点的突变, 可能是 CS 致病的候选基因。*SHOX* (short stature homeobox) 基因在 1997 年被报道其同源基因的表达缺陷在生长发育过程中, 通过影响椎节的发育, 引起脊柱侧凸等多种骨骼发育畸形^[28]。Hayes 等^[29]在斑马鱼中对 *ptk7* (protein tyrosine kinase 7) 基因进行研究, 发现母型-合子型 *ptk7* (maternal-zygotic *ptk7*, MZ*ptk7*) 的功能缺失会导致 CS。

2.2 CS 易感性基因及单核苷酸多态性

对 CS 患者的人群关联性分析已证明 rs2289292、rs3809624 这两个 *TBX6* 基因的单核苷酸多态性 (single-nucleotide polymorphisms, SNP) 分别含有等位基因 A、G 时具有 CS 易感性^[30]。Wu 等^[31]在 *LMX1A* (LIM homeobox transcription factor 1) 与 CS 临床表型的关联分析中发现, rs1819768 基因型 AC 型、rs12023709 基因型 AG 型、rs16841013 基因型 CT 型与有椎体形成障碍 CS 的易感性升高有关, 结果提示在中国汉族人群中 *LMX1A* 基因可能和 CS 的发生、发展相关, 是一个重要的易感基因。2009 年原所茂等^[32]采用高通量 SNP 分型系统对 *HES7* 基因的 SNP 位点 rs3027279 和 rs1442849 进行基因分型检验分析, 结果表明中国汉族人群在这两个位点的多态性可能与 CS 的易感性有一定关联性。这两个 SNP 位点在 2015 年同样被 Gu 等^[33]的研究证实与中国汉族人群的 CS 易感性有关联。

2.3 环境因素影响 CS 的遗传

基因和环境相互作用 (gene-environment interaction, “GXE”) 很有可能会影响到脊柱缺损的外显率和表现度,

外显率是指有缺陷表型的携带者所携带的突变比例, 表现度是指突变基因携带者出现表型的程度。Sparrow 等^[22]利用遗传和环境模型, 将 Notch 信号通路基因 *Mesp2*、*Hes7*、*Dll1* 和 *Notch1* 为杂合子的小鼠胚胎置于轻度缺氧环境的子宫中, 结果和遗传因素及环境因素单独作用时相比, 出现外显率增加且椎体缺陷更加严重的现象, 其基本分子机制为胚胎缺氧阻滞了 PSM 的 FGF 信号通路, 导致体节形成所需的 Notch 通路循环中断, 从而使体节分割失败。

2.4 CS 遗传学研究策略

定位克隆法使用家系或大量样本分析和全基因组扫描, 对比正常人群的染色体结构, 通过遗传连锁得到基因在染色体上位置的信息, 然后采用各种实验方法进行定位并检测突变功能, 定位克隆法覆盖面广, 在全基因组范围内定位染色体片段的位置, 有利于发现目前尚未报道过的与疾病相关的基因。候选基因法通过筛选已知的或各种病因假说中与疾病发生相关的基因, 直接研究基因与群体间的关联, 分析正常群体和患病群体之间等位基因、基因频率的差异, 候选基因法直接去证实已有的但证据不完整的基因与疾病的关联, 建立在各种病因学假说上, 为与此疾病发病机制有关的基因提供证据^[34]。

以上两种方法是 CS 传统的遗传学研究策略。近年来, 分子遗传学技术的快速发展促进了致病突变位点的染色体位置精准描绘, 应用高通量测序研究 CS 遗传病成为高效快速的研究方法。从 SNP 位点阵列的分析^[30-32]到全外显子组测序技术^[25, 29]进行疾病致病基因定位研究, 全基因组范围的分析覆盖面广, 并能够探寻 CS 的新致病基因和突变, 以及不完全外显的现象, 在整个遗传病领域成功定位了大量的致病基因, 已成为最有效的常用手段。

但这些方法也存在一定缺陷, 如对于不改变碱基序列的染色体结构改变, 或染色体倍数改变等导致的遗传疾病的致病机制探寻中, 不能够很好地鉴定染色体异常的致病性^[35]。CGH 技术则可以解决这个问题, Wu 等^[26]应用 CGH, 通过 CS 患者和正常人的基因组片段杂交比对, 很好地描绘了患者整个基因组片段表达状况变化, 再通过图像分析技术, 其染色体拷贝数量的变化也可得出, 是研究遗传疾病致病基因的另一种思路。

3 展望

综上所述, 过去的研究中, 先天性脊椎缺陷的研究在很大程度上推进了 CS 的研究进程。基因敲除小鼠的胚胎发育是研究体节形成的重要手段, 大多数骨骼发育的信号通路和体节发育所必需的基因都可以在小鼠胚胎中得到证实。在 CS 病因学的研究中, CS 被认为是一种复杂的多基因遗传病, 遗传因素与环境因素共同影响着胎儿的脊柱发育。现在, 全基因组测序技术发展迅速, 已成为遗传病研究的主要手段, 其覆盖面广和对新致病基因的发掘具有重要的意义, 但如何区分个体潜在的有害的等位基因异

构体和正常的基因异构体依然是个问题。Wu 等^[26]关于 TBX6 基因的亚效等位基因和无义突变共同作用的致病模式的论述,突破了以往的遗传病因认知,揭示了由不同等位基因共同导致 CS 的新机制,为其他复杂遗传病病因研究提供了新思路。CS 的遗传学病因探索还需要对更多的散发性 CS 病例并且结合有多个 CS 患者的家系进行研究,进一步的致病机制则需利用模式动物进行深入的功能研究,如小鼠^[16,17]、斑马鱼^[29]、鸡胚^[36]和玉米蛇^[37]等,用以验证变异的致病性,探索其分子机制和在发育中起到的作用,以期 CS 早期诊断、治疗和药物筛选提供重要的理论依据。

4 参考文献

- Liu J, Li Z, Shen J, et al. Spinal growth modulation with posterior unilateral elastic tether in immature swine model [J]. *Spine*, 2014, 15(1): 138-145.
- Alexander PG, Tuan RS. Role of environmental factors in axial skeletal dysmorphogenesis[J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2010, 90(2): 118-132.
- Pourquié O. Vertebrate segmentation: from cyclic gene networks to scoliosis[J]. *Cell*, 2011, 145(5): 650-663.
- Cooke J, Zeeman EC. A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis[J]. *J Theor Biol*, 1976, 58(2): 455-476.
- Hubaud A, Pourquié O. Signalling dynamics in vertebrate segmentation[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(11): 709-721.
- Dunwoodie SL, Sparrow DB. Genetic and Environmental Interaction in Malformation of the Vertebral Column [M]. New York: Springer, 2015. 131-151.
- Zanotti S, Canalis E. Notch signaling and the skeleton [J]. *Endocr Rev*, 2016, 37(3): 223-253.
- Turnpenny PD, Young E. Spondylocostal dysostosis, autosomal recessive. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al. editors [DB/OL]. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2016. [updated 2013 Jan 17].
- Morimoto M, Takahashi Y, Endo M, et al. The Mesp2 transcription factor establishes segmental borders by suppressing Notch activity[J]. *Nature*, 2005, 435(7040): 354-359.
- Berdon WE, Lampl BS, Cornier AS, et al. Clinical and radiological distinction between spondylothoracic dysostosis (Lavy-Moseley syndrome) and spondylocostal dysostosis (Jarcho-Levin syndrome)[J]. *Pediatr Radiol*, 2011, 41(3): 384-388.
- Haines N, Irvine KD. Glycosylation regulates Notch signaling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(10): 786-797.
- Sparrow DB, Chapman G, Wouters MA, et al. Mutation of the LUNATIC FRINGE gene in humans causes spondylocostal dysostosis with a severe vertebral phenotype[J]. *Am J Hum Genet*, 2006, 78(1): 28-37.
- Evrard YA, Lun Y, Aulehla A, et al. Lunatic fringe is an essential mediator of somite segmentation and patterning [J]. *Nature*, 1998, 394(6691): 377-381.
- Zhang N, Gridley T. Defects in somite formation in lunatic fringe-deficient mice[J]. *Nature*, 1998, 394(6691): 374-377.
- Bessho Y, Hirata H, Masamizu Y, et al. Periodic repression by the bHLH factor Hes7 is an essential mechanism for the somite segmentation clock [J]. *Genes Dev*, 2003, 17 (12): 1451-1456.
- Shimojo H, Kageyama R. Oscillatory control of Delta-like1 in somitogenesis and neurogenesis: a unified model for different oscillatory dynamics [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, 49: 76-82.
- Cetinkaya M, Özkan H, Köksal N, et al. Spondylocostal dysostosis associated with diaphragmatic hernia and neural tube defects[J]. *Clin Dysmorphol*, 2008, 17(2): 151-154.
- Cogulu O, Gunduz C, Karaca E, et al. Duane anomaly, meningocele, dextroposition of heart and localized vertebrocostal alterations with associated anomalies in a girl [J]. *Genet Couns*, 2006, 18(1): 77-83.
- Giacoia GP, Say B. Spondylocostal dysplasia and neural tube defects[J]. *J Med Genet*, 1991, 28(1): 51-53.
- Sharma AK, Phadke SR. Another case of spondylocostal dysplasia and severe anomalies: a diagnostic and counseling dilemma[J]. *Am J Med Genet*, 1994, 50(4): 383-384.
- Maisenbacher MK, Han JS, O'Brien ML, et al. Molecular analysis of congenital scoliosis: a candidate gene approach [J]. *Hum Genet*, 2005, 116(5): 416-419.
- Sparrow DB, Chapman G, Smith AJ, et al. A mechanism for gene-environment interaction in the etiology of congenital scoliosis[J]. *Cell*, 2012, 149(2): 295-306.
- Yasuhiko Y, Haraguchi S, Kitajima S, et al. Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific Mesp2 expression[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(10): 3651-3656.
- Zhao W, Ajima R, Ninomiya Y, et al. Segmental border is defined by Ripply2-mediated Tbx6 repression independent of Mesp2[J]. *Dev Biol*, 2015, 400(1): 105-117.
- Sparrow DB, McInerney-Leo A, Gucev ZS, et al. Autosomal dominant spondylocostal dysostosis is caused by mutation in TBX6[J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(8): 1625-1631.
- Wu N, Ming X, Xiao J, et al. TBX6 null variants and a common hypomorphic allele in congenital scoliosis[J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(4): 341-350.
- Giampietro PF, Raggio CL, Reynolds CE, et al. An analysis of PAX1 in the development of vertebral malformations [J]. *Clin Genet*, 2005, 68(5): 448-453.
- Day G, Szvetko A, Griffiths L, et al. SHOX gene is expressed in vertebral body growth plates in idiopathic and congenital scoliosis: implications for the etiology of scoliosis in Turner syndrome [J]. *J Orthop Res*, 2009, 27(6): 807-813.
- Hayes M, Gao X, Yu LX, et al. ptk7 mutant zebrafish

O型臂导航系统在脊柱外科手术中的应用进展

Application progress of the O-arm based-navigation system in spine surgery

刘亚明, 童 通, 申 勇

(河北医科大学第三医院脊柱外科 050051 石家庄)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2016.07.13

中图分类号: R681.5, R816.8 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2016)-07-0635-05

近些年, 随着脊柱外科手术技术及内置物的不断更新进步, 脊柱外科得到了很大的发展, 但脊柱解剖结构复杂, 毗邻重要血管神经, 手术的复杂性、高风险性也越来越明显。计算机辅助导航系统应运而生, 其主要作用是提高术野的可视度, 使手术操作更加微创、安全、精准^[1]。O型臂导航系统可短时间内获得较高质量的三维 CT 图像, 直接输入到导航计算机中自动匹配、注册, 使术者能够近乎“直视下”精准的完成手术操作, 被公认为是目前脊柱外科领域最先进的导航技术^[2]。笔者就 O 型臂导航系统在脊柱外科中的应用进展综述如下。

1 O型臂导航辅助下的手术设计

O 型臂术中导航技术出现以前, 术者往往单纯依靠术前 X 线、CT、MRI 等影像资料来进行手术设计, 但临床工作中常发现患者经过体位摆放后脊柱形态会发生变化或手术过程中发现手术设计会有不合理之处, 需重新进行

手术设计, 尤其是复杂畸形矫正类手术。O 型臂导航的出现使得术者可以快速获得手术体位下的第一手影像资料, 根据术中扫描不断调整手术方案, 选择最佳置钉位置和数量。Larson 等^[3]曾在 O 型臂引导下手术治疗 14 例先天性脊柱侧凸畸形患儿, 术前计划置入螺钉 173 枚, 最终基于术中 CT 扫描结果 31 枚螺钉因各种解剖变异或经钉道模拟发现没有合适大小的螺钉而放弃置入, 他认为这样可以避免对因合并有复杂畸形而不具备置钉条件的部位进行不必要的骚扰, 降低手术风险。Mengran 等^[4]在一项针对 I 型神经纤维瘤病伴营养不良型脊柱侧凸畸形的手术治疗的研究中发现, 与徒手置钉组相比, O 型臂导航组顶椎区域置钉密度显著提高(58% VS 42%, $P < 0.001$), 此类患者由于侧凸节段短而弧度锐利, 顶椎区域常伴有半椎体、椎体旋转、椎弓根畸形等复杂情况, 但已有文献^[5]指出顶椎区域置钉密度会影响最终矫形效果的好坏, 提高顶椎区域置钉密度可以改善矫形效果。Guppy 等^[6]曾在 O 型臂导航下完成了 4 例复杂上颈椎畸形矫正手术, 他指出术前的影像资料无法满足手术设计需求, 必须根据术中 O 型臂导航扫描结果引导准确置钉, 还可以达到精准减压、精确截骨的目的。

第一作者简介: 男(1988-), 硕士在读, 研究方向: 脊柱外科
电话: (0311)88602316 E-mail: liuyamingspine@163.com
通讯作者: 申勇 E-mail: spineshenyong@163.com

- models of congenital and idiopathic scoliosis implicate dysregulated Wnt signalling in disease [J]. Nat Commun, 2014, 5: 4777.
30. Fei Q, Wu Z, Wang H, et al. The association analysis of TBX6 polymorphism with susceptibility to congenital scoliosis in a Chinese Han population[J]. Spine, 2010, 35(9): 983-988.
31. Wu N, Yuan S, Liu J, et al. Association of LMX1A genetic polymorphisms with susceptibility to congenital scoliosis in Chinese Han population [J]. Spine, 2014, 39(21): 1785-1791.
32. 原所茂, 邱贵兴. HES7 基因多态性与先天性脊柱侧凸的关联性分析[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2009, 19(3): 222-226.
33. Gu Z, Qiu G, Zhang Y. Genetic association analysis between polymorphisms of HAIRY-AND-ENHANCER-OF SPLIT-7 and congenital scoliosis[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(9): 16714-16718.
34. 沈岩. 致病基因的定位候选克隆[J]. 生命科学, 1999, 11(5): 205-208.
35. Cirulli ET, Goldstein DB. Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing [J]. Nat Rev Genet, 2010, 11(6): 415-425.
36. Bobyn JD, Little DG, Gray R, et al. Animal models of scoliosis[J]. J Orthop Res, 2015, 33(4): 458-467.
37. Gomez C, Özbudak EM, Wunderlich J, et al. Control of segment number in vertebrate embryos[J]. Nature, 2008, 454(7202): 335-339.
- (收稿日期: 2016-04-14 修回日期: 2016-06-12)
(本文编辑 李伟霞)