



先天性巨结肠遗传学研究进展、问题与展望

高雅¹, 姜茜^{1,2*}

1. 首都儿科研究所遗传室, 北京 100020;

2. 中国医学科学院小儿外科微创诊疗创新单元2021RU015, 北京 100005

* 联系人, E-mail: teaco@126.com

2023-07-20 收稿, 2023-09-11 修回, 2023-09-13 接受, 2023-09-14 网络版发表

国家自然科学基金(82070532, 81771620)和中国医学科学院小儿外科微创诊疗创新单元(2021RU015)资助

摘要 先天性巨结肠(hirschsprung disease, HSCR)又称肠无神经节细胞症, 是引起儿童肠梗阻最常见的消化系统疾病, 以肠神经嵴细胞增殖、迁移、分化障碍导致远端肠组织中神经节细胞缺失为主要病理特征。基因变异导致的功能缺陷和基因-环境交互作用分别在疾病发生中扮演不同角色。得益于遗传学研究方法的快速发展及普及应用, 目前多数家族性患者及部分散发病例的致病基因及疾病遗传结构已被解析。本文首先对遗传及非遗传因素的疾病发生贡献进行了概述, 然后重点阐述了肠组织特异性基因相互作用与复杂调控网络、多变异协同致病、肠神经系统发育调控分子以及嵌合体变异作为该病潜在遗传机制的主要研究进展, 并围绕“遗传力丢失”、现有分析手段统计效力不足、针对弱效基因变异组合的检测模型缺乏及临床转化应用中面临的主要瓶颈问题进行了论述, 最后展望了基于基因编辑技术的疾病研究模型构建、干细胞移植治疗及多组学整合的未来研究方向与应用前景。

关键词 先天性巨结肠, 遗传力, 外显率, 基因调控网络, 嵌合体变异, 干细胞移植

先天性巨结肠(hirschsprung disease, HSCR), 又称肠无神经节细胞症(aganglionosis), 是引起儿童肠梗阻的最常见的消化系统先天发育异常性疾病, 由胚胎发育期肠神经嵴细胞(enteric neural crest cell, ENCC)的增殖、迁移、分化障碍导致^[1]。活产儿发病率在不同种族间存在明显差异, 欧洲、非洲、亚洲裔分别为1.5/10000、2.1/10000、2.8/10000。该病的主要病理改变是远端肠组织中肌间神经丛和黏膜下神经丛中的神经节细胞缺失^[2]。除少数家族性患者外, 大多数HSCR都以散发形式存在, 具有遗传方式复杂、性别依赖的外显率低及临床表型差异大等显著特征^[3,4]。国际上根据肠段受累的范围不同, 将HSCR分为短段型(short-segment HSCR, S-HSCR)、长段型(long-segment HSCR, L-HSCR)、全结肠型(total colonic aganglionosis, TCA)及

全肠型(total colonic and small-colon aganglionosis, TCSA)4种^[5]。近年来, 全基因组关联分析研究(genome wide association study, GWAS)及大规模全外显子组、全基因组测序研究为新的致病基因发现及疾病遗传结构的精准剖析提供了源源不断的新思路、新视角, 本文将对这些进展进行简要综述。

1 遗传及非遗传因素的疾病发生贡献概览

20世纪50年代, 外科手术的普及应用与不断改良大大降低了HSCR的病死率。患者所在家庭中, 包括其弟弟、妹妹在内一级亲属突出的疾病高发风险(最高可达4%)及家系分离研究均提示, HSCR是一种具有高遗传力(high heritability)的疾病^[6,7]。随后, 针对家族性患者开展的一系列连锁分析及候选基因测序明确了部

引用格式: 高雅, 姜茜. 先天性巨结肠遗传学研究进展、问题与展望. 科学通报, 2024, 69: 542–552

Gao Y, Jiang Q. Research progress, problems, and prospects in the genetic study of Hirschsprung disease (in Chinese). Chin Sci Bull, 2024, 69: 542–552, doi: 10.1360/TB-2023-0716

分家系的疾病发生原因, 包括 $RET^{[8]}$ 、 $EDNRB^{[9]}$ 、 $PHOX2B^{[10]}$ 、 $9q31^{[11]}$ 、 $11q23^{[12]}$ 、 $22q13^{[13]}$ 等在内的多个致病基因及基因座被陆续鉴定(图1)。1990年, Badner等人^[14]通过对487例欧美裔HSCR患者及其所在家庭成员进行复杂分离分析发现, 患者表型越轻, 男女发病之比相差越大, S-HSCR型甚至可接近4:1。随着受累肠段范围增加, 不同性别的疾病发生率趋于平衡。患者亲属的疾病发生风险主要取决于先证者的性别、HSCR类型及相应亲属的性别。其中, 女性L-HSCR型患者后代的疾病发生风险最高, 男孩可达27%~29%, 女孩可达21%~22%; S-HSCR型患者后代的疾病风险最小, 通常低于1%(表1)。

临床上70% HSCR患者以单纯、散发形式存在, 另30%则以综合征形式存在, 具有多器官受累特征。基因

变异导致的功能缺陷和基因-环境交互作用分别在疾病发生中扮演不同角色^[15]。母亲吸烟、BMI指数超标或在受孕早期服用抗抑郁药(选择性5-羟色胺再摄取抑制剂)可能与后代胃肠道畸形包括HSCR的发生风险增加有关^[16~18]。动物实验提示, 维生素A缺乏可影响甚至破坏小鼠肠神经系统(enteric nervous system, ENS)发育, 引起与人类HSCR相似的症状^[19]。菌群失调被证实与0~2岁婴幼儿发生巨结肠相关性小肠结肠炎的风险高度相关^[20,21]。多项近万名参与者的微生物全基因组关联分析研究提示, 肠道微生物组的组成和结构可能受到宿主遗传的影响, 不同种族人群的基因变异位点可通过调节肠道菌群的含量协同提高某些复杂遗传病的患病风险^[22~24]。现有证据提示, 临床表型较重的HSCR亚型遗传方式主要以显性遗传为主, 而以S-

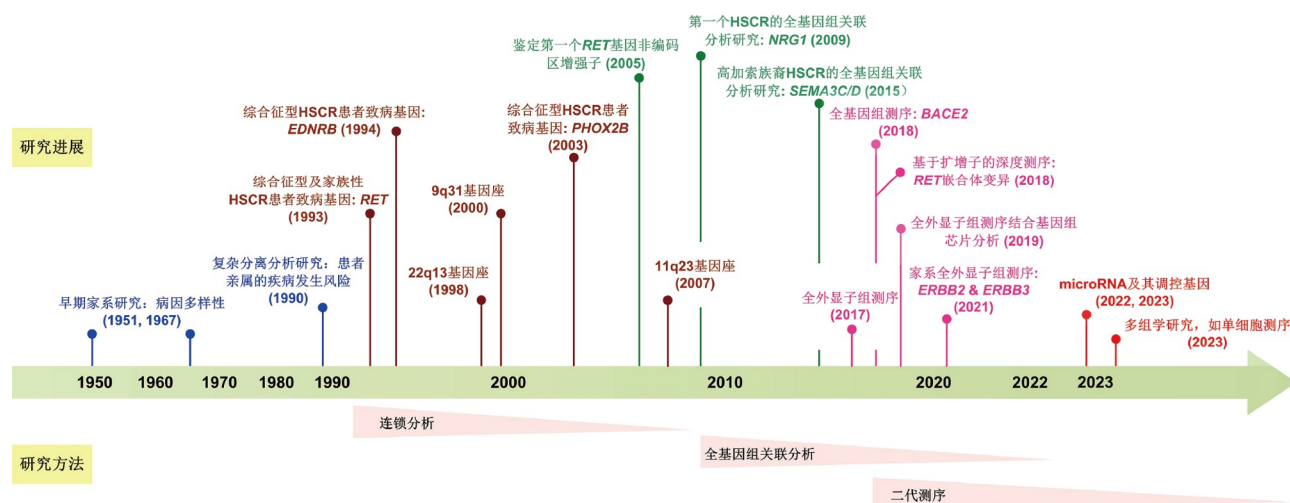


图1 先天性巨结肠主要遗传学研究进展时间图。时间轴下方展示主要研究方法及其所对应的应用年代, 时间轴上方展示主要研究发现、相关基因/基因座及时间

Figure 1 The timeline of main genetic discoveries of Hirschsprung disease (HSCR). The lower panel denotes the main genetic technologies used and their application period, and the upper panel denotes the main genetic discoveries, corresponding genes (loci) discovered and the time

表1 不同类型HSCR患者所在家庭亲属的疾病发生风险^[14]

Table 1 Risk to relatives for the different forms of HSCR^[14]

先证者HSCR类型 亲属性别	仅直肠与乙状结肠受累		降结肠或结肠脾曲受累		横结肠或横结肠近端受累	
	男性	女性	男性	女性	男性	女性
男性先证者的弟弟妹妹	4%~5%	1%	9%~10%	7%	9%~12%	7%~9%
女性先证者的弟弟妹妹	5%~6%	1%~2%	12%~13%	10%	21%~24%	17%~19%
男性先证者的后代	0%~1%	<1%	10%~11%	8%~9%	16%~19%	12%~14%
女性先证者的后代	0%~1%	<1%	14%~15%	11%	27%~29%	21%~22%
二级亲属的风险	<1%	~0%	4%~6%	3%~5%	4%~9%	3%~7%
多个患者所在家庭的风险	5%~10%	1%~4%	19%	14%	33%	25%

HSCR为代表的表型轻微亚型的遗传方式则以隐性遗传或多因素遗传为主^[25]。下面就近年来HSCR遗传学机制研究方面的进展重点整理、归纳如下。

2 遗传学机制研究进展

2.1 肠组织特异性基因相互作用及复杂调控网络

早在2003年, McCallion等人^[26]就利用双基因座非互补小鼠模型证实了*Ret*、*Ednrb*在肠组织中特异性时空表达模式及其相互作用。这对上位效应(epistasis)分子的功能异常程度可直接影响突变小鼠ENS中的神经节细胞缺失范围、雌雄小鼠发病率差异及表型缺陷严重程度。2019年, Chakravarti课题组^[27]通过对胚胎E10.5、E12.5、E14.5天雌、雄野生型小鼠及*Ret*纯合缺失突变小鼠进行转录组学测序分析, 发现ENS发育的4个重要特征: (1) 从E10.5到E14.5天, 基因组发生转变, 即从表达转录因子及其修饰基因为主转变为大量表达负责决定组织(上皮、平滑肌、内皮)特化的基因; (2) *Ret*基因除了调控ENCC分化为神经元外, 还广泛参与间充质细胞和上皮细胞的分化、发育; (3) 平滑肌细胞发育相关的整套基因调控程序对ENS的发育具有关键影响作用; (4) ENS发育特征的性别差异不大。此外, 美国研究者发现, 2种21三体突变模型小鼠(Ts65Dn、Tc1)整个肠道黏膜下神经丛中的神经元细胞数量及密度均较野生型显著下降, 提示该常染色体上增加的遗传物质及其与ENS发育相关基因的特异性相互作用可能与21三体综合征患者群体中显著增加的HSCR患病风险(平均可达一般人群的130倍)密切相关^[28]。

基因表达调控是器官乃至个体发育、形成过程中细胞分化和各项生理功能能够正常行使的基础。这一复杂、精密的调控机制是通过将诸多生物化学信号分子整合到一个网络中实现的, 它们相互协同, 历经时间和空间的考验并最终完成了进化适应。研究表明, 基因调控网络(gene regulatory network, GRN)功能异常是很多人类疾病的重要发生原因, 包括HSCR在内(图2)^[29,30]。2016年, Chatterjee等人^[31]利用拓扑结构信息、ENCODE数据库、CHIP-Seq及GWAS结果整合分析, 发现了*RET*基因上游非编码区的2个新的功能独立的增强子(enhancer), 证实不同等位基因可分别影响转录因子GATA2和RARB的结合, 从而调控*RET*基因的表达水平。在参与ENS发育调控的众多信号通路中, 相较于后发现的NRG1/ERBB2、SEMA3/PLEXIN、SHH/

PTCH1, GDNF/RET及EDN3/EDNRB分子信号转导系统无疑占据着最为核心的主导地位。2019年, 研究人员利用人和小鼠的细胞、动物模型证实, *EDNRB*基因的转录水平同时受到GATA2、SOX10和NKX2.5这3个转录因子的调控, GATA2和SOX10不但兼具调控*RET*及*EDNRB*基因表达的功能, 其自身的表达水平又同时受到后者的调节且存在剂量依赖性^[30], 这些分子间的正、负反馈调节机制最终通过网络级联效应共同参与了HSCR的发生。

2.2 常见非编码区变异及单体型与罕见编码区突变的协同致病作用

基因组范围内那些普通人群携带率超过1%的常见变异可通过影响相应基因的mRNA表达水平或表观遗传学机制参与调控复杂人类疾病的表型变异。2005年, Emison等人^[32]率先确证了*RET*基因内含子1中的一个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点具有增强子功能, 风险等位基因(risk allele)可通过影响转录因子SOX10与*RET*的结合而降低基因转录活性。此后, 5个主要的GWAS及荟萃分析研究又陆续发现了几个其他基因座内的疾病相关位点: *NRG1*及*SEMA3C/3D*^[33~35]。

2019年, Tilghman等人^[36]通过对190例欧美裔HSCR患者进行基因型分析和全外显子组测序, 精细量化了他们的“遗传负荷”(genetic burden)情况: (1) 非编码区变异在人群中的携带率最高, HSCR患者和对照人群分别为48.4%和17.1%。该类变异构成了HSCR最为广泛的疾病发生风险(OR值4.54); *RET*基因和*SEMA3*基因簇内的4个SNP分析结果提示, 当某个个体携带的风险等位基因总数超过5时患病风险即显著增加。人群中不同个体发生HSCR的风险差异最高可达24。 (2) 与ENCC命运决定相关的24个基因(表2)编码区内罕见突变对疾病发生风险的贡献率, 虽大于非编码区变异, 但人群携带率却较低, HSCR患者和对照人群的携带率分别为34.7%和5.0%(OR值10.02), 即HSCR患者携带的疾病相关基因致病性等位基因(pathogenic allele, PA)频率比对照人群高2.25倍, 且患者中发现的PA在ExAC数据库中的总体人群携带率远低于对照群体, 提示患者有较高的致病性突变负荷, 其携带的编码区罕见突变受到的进化选择压力也远大于对照人群。 (3) 大片段拷贝数变异(超过500 kb的缺失或大于1 Mb的重复)的携带率最低(HSCR患者和对照人群分别为11.4%和0.2%), 但是

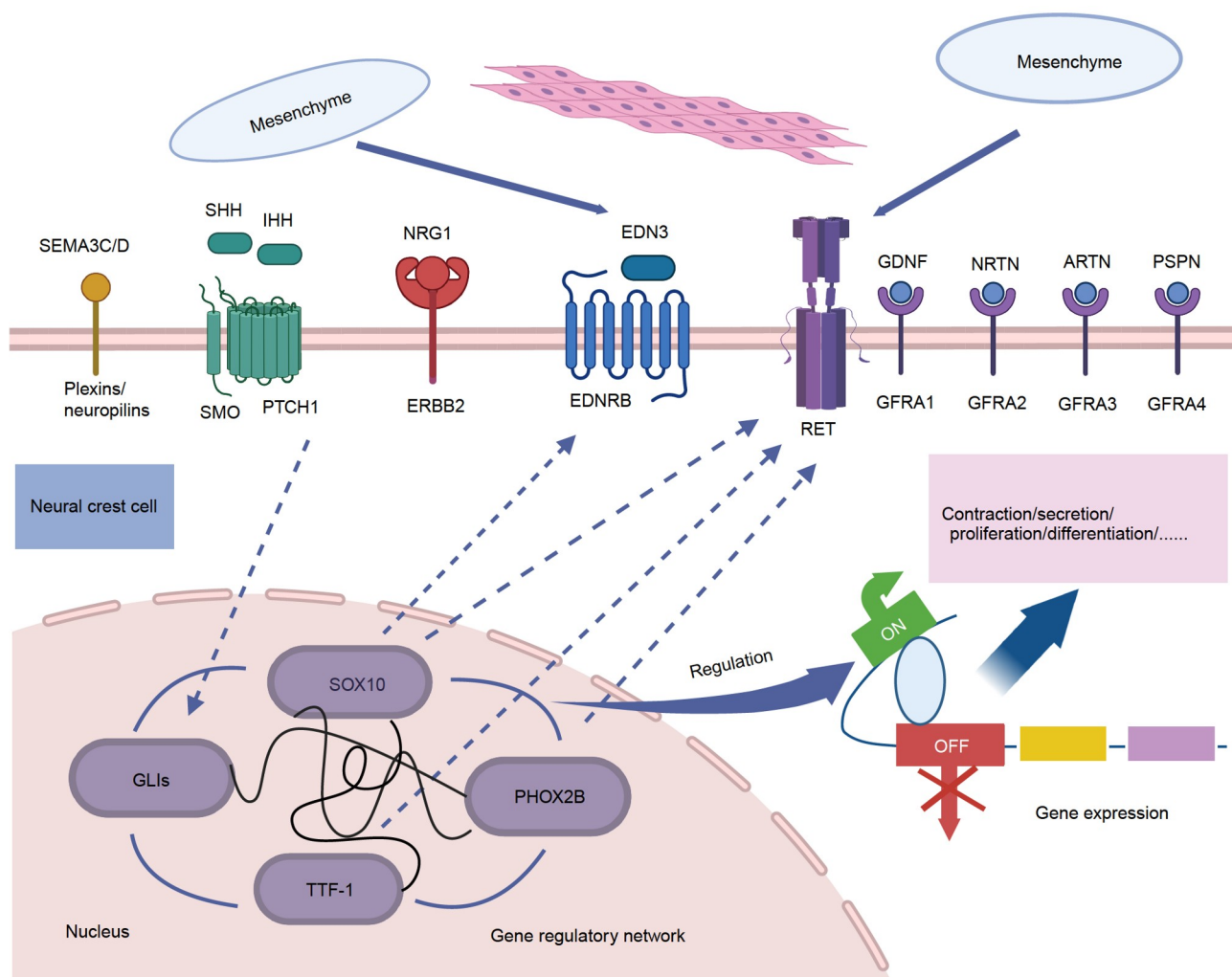


图 2 HSCR发生机制中涉及的主要生物学途径。目前已知的各类HSCR致病基因编码蛋白汇聚成几条主要的生物学途径，神经嵴细胞通过不同的细胞膜表面受体与各自配体结合，并把接收到的信号进一步传递给细胞核内的转录因子，通过复杂的基因调控网络调节下游基因的表达水平，最终实现其对细胞收缩、分泌、增殖、分化等过程的调控作用

Figure 2 Schematic figure showing the main biological pathways implicated in Hirschsprung disease (HSCR). HSCR causal genes were converged into several biological pathways. Different types of receptors expressing on the surface of neural crest cells were combined with their corresponding ligands, mediating signaling activities to regulate gene expression and the contraction, secretion, proliferation, differentiation and other features of the cell

对疾病发生风险的贡献最大(OR值63.07)。研究认为，72.1%的HSCR患者存在至少1个可确定的遗传学危险因素，48.4%的患者携带1个*RET*基因的结构性突变或非编码区调控因子变异。

本团队^[48]2021年研究发现，*RET*基因内3个反式调控增强子(rs2506030、rs7069590、rs2435357)对应的风险等位基因(G、T、T)频率在正常对照、HSCR家系内未受累个体及HSCR患者中逐渐升高，且呈聚集效应(OR值分别为2.09、2.71、7.59)，3个位点的杂合子型父母都存在风险等位基因相对于非风险等位基因的显著

传递不平衡现象(τ 值分别是0.80、0.81、0.94， $P < 0.001$)。中国各地区人群中风险单体型(G-T-T)的实际携带率都显著高于预期($P < 4.64 \times 10^{-186}$)，约60%的个体携带单拷贝风险单体型，10%携带双拷贝风险单体型。这些常见变异可通过降低*RET*的转录活性增加携带者的患病风险，从而与编码区突变构成复合杂合遗传的协同致病机制。

迄今为止，已经发现的全部常见变异可以解释大约10%~20% HSCR患者的表型变异现象。未来，通过荟萃分析方法进一步增加测试人群的样本量及纳入更多

表 2 数据库及文献中报道过HSCR相关变异及致病性等位基因的24个基因列表

Table 2 The list of 24 genes with disease-associated variants and pathogenic alleles reported in HSCR mutation databases and references

序号	基因名称	染色体位置	基因性质	相关的HSCR类型	遗传模式	体内/外功能研究情况	参考文献
1	<i>RET</i>	10q11.21	RET通路	单纯型	常显	体内研究	[8]
2	<i>EDNRB</i>	13q22.3	EDNRB通路	Waardenburg综合征, 4型(WS4)	常显、常隐	体内研究	[9]
3	<i>ZEB2</i>	2q22.3	转录因子	Mowat Wilson综合征(MWS)	常显	体内研究	[37]
4	<i>PHOX2B</i>	4p13	转录因子	先天性低通气综合征(CCHS)	常显	体内研究	[10]
5	<i>SOX10</i>	22q13.1	转录因子	Waardenburg综合征, 4型(WS4)	常显	体内研究	[38]
6	<i>GDNF</i>	5p13.2	RET通路	单纯型	常显	体内研究	[39]
7	<i>GFRA1</i>	10q25.3	RET通路	单纯型	多基因	体内研究	[40]
8	<i>NRTN</i>	19p13.3	RET通路	单纯型	多基因	体内研究	[41]
9	<i>ECE1</i>	1p36.12	EDNRB通路	单纯型	常显	体内研究	[42]
10	<i>EDN3</i>	20q13.32	EDNRB通路	Waardenburg综合征, 4型(WS4)	常显、常隐	体内研究	[43]
11	<i>SEMA3C</i>	7q21.11	SEMA3通路	单纯型	多基因	体内研究	[34]
12	<i>SEMA3D</i>	7q21.11	SEMA3通路	单纯型	多基因	体内研究	[34]
13	<i>NRG1</i>	8p12	NRG1通路	单纯型	常显	体内研究	[33]
14	<i>TCF4</i>	18q21.2	转录因子	Pitt Hopkins综合征(PHS)	常显	体内研究	[44]
15	<i>KIFBP</i> (<i>KLA1279</i>)	10q22.1	KIF结合蛋白 (具体功能未知)	Goldberg Shprintzen综合征 (GOSHS)	常隐	体内研究	[45]
16	<i>L1CAM</i>	Xq28	细胞黏附分子	L1CAM综合征(L1S)	X连锁隐性	体内研究	[46]
17	<i>IKBKAP</i>	9q31.3	IkappaB激酶复合物相关蛋白	Riley-Day综合征(RDS)	常隐	体内研究	[47]
18	<i>ACSS2</i>	20q11.22	新候选基因	单纯型	多基因	体内研究	[36]
19	<i>ADAMTS17</i>	15q26.3	新候选基因	单纯型	多基因	体外研究	[36]
20	<i>ENO3</i>	17p13.2	新候选基因	单纯型	多基因	体内研究	[36]
21	<i>PRXL2A</i> (<i>FAM213A</i>)	10q23.1	新候选基因	单纯型	多基因	体外研究	[36]
22	<i>SH3PXD2A</i>	10q24.33	新候选基因	单纯型	多基因	体内研究	[36]
23	<i>SLC27A4</i>	9q34.11	新候选基因	单纯型	多基因	体外研究	[36]
24	<i>UBR4</i>	1p36.13	新候选基因	单纯型	多基因	体内研究	[36]

不同种族尤其是亚洲裔人群的数据将可为揭示“隐藏的遗传力”(hidden heritability)提供更多可能。

2.3 影响神经发育、存活及其功能的多维度因素——新基因发现

HSCR属于典型的ENS先天发育异常性疾病。ENS由数目众多的神经元和胶质细胞组成,同时与间充质细胞、免疫细胞、肠上皮细胞构成精细的生态位(niche),共同维持肠道稳态^[49]。与解剖位置和细胞功能都高度相似的中枢神经系统不同,ENS被划分为小的不规则神经节,细胞亚型复杂。其自主调节功能需要各种神经元协同作用,同时还高度依赖于肠道中的其他

主要细胞系统^[50]。ENS的活性和组成可受发育、遗传以及环境等多种因素影响,是一个动态调整的过程。近年来,通过下一代测序技术对表型严重的HSCR患者所在核心家系及超过400例散发HSCR患者进行测序、分析,陆续发现了十几个新的HSCR候选基因,包括 β -分泌酶2编码基因*BACE2*^[51],表皮生长因子受体2/3编码基因*ERBB2*、*ERBB3*^[52],参与调控神经元发育的基因*DENND3*、*NCLN*、*NUP98*、*TBATA*^[53],负责编码维甲酸代谢酶的基因*CYP26A1*^[54],钙激活氯离子通道编码基因*ANO1*^[55]等。此外,部分microRNA在肠道发育过程中通过干扰ENCC的增殖、迁移活性从而增加疾病发生风险的研究也有报道^[56,57]。需要注意的是,与在家族

性或综合征型HSCR患者中发现的致病基因不同, 这些新候选基因的功能往往较弱, 且存在一定的低外显率特征. 部分基因参与调控ENS发育的功能虽然已通过斑马鱼模型或人诱导多能干细胞进行了检测, 但它们参与人类HSCR患者病理生理学的真正分子机制还有待证明.

2.4 嵌合体变异制造的隐藏风险及遗传咨询“陷阱”

2018年, Jiang等人^[58]利用基于扩增子的深度测序(amplicon-based deep sequencing, ADS)和TA克隆测序等方法, 发现9个散发HSCR家系中有6个存在*RET*基因嵌合体变异(mosaic mutation), 比例高达66.7%. 其中, 2名患者的突变等位基因频率介于35%~44%之间, 这是世界上首次报道; 4名患者父母的突变等位基因频率介于1%~28%之间, 有2例被常规Sanger检测漏检. 进一步针对117个新募集的HSCR核心家系的全部357个受试者样本进行*RET*基因特异性捕获和深度测序, 发现15名患者携带编码区罕见突变, 其中11个属于新发突变(占全部编码区罕见变异的73.3%), 3个遗传自父母的嵌合体变异(占全部编码区罕见变异的20%), 只有1个符合经典的父母杂合变异遗传^[59]. 上述结果提示: (1) 中国HSCR群体呈现*RET*编码区新发突变和父母生殖细胞嵌合体变异遗传突变的高负荷状态; (2) HSCR为剂量依赖性复杂人类疾病, *RET*基因突变的表型外显程度不仅决定于突变的性质, 更取决于突变细胞在相应组织器官中的占比频率; (3) 嵌合体变异的存在导致“嵌合体表型”(mosaic phenotype)的出现, 部分患者所在家系呈现出的疾病遗传方式可能不符合孟德尔遗传规律; (4) 现有临床检测手段下, *RET*基因嵌合体变异存在被严重低估的可能, 其背后隐藏的遗传咨询“陷阱”可能被忽视; (5) 针对严重致病突变携带者及其父母应考虑采用具有足够敏感度的方法进行检测、确证, 如ADS或微滴式数字PCR(droplet digital PCR, ddPCR)等, 以准确评估该家庭的疾病再发风险和患者后代的疾病严重程度; (6) 其他HSCR相关致病基因内是否也存在类似嵌合体变异高发的现象仍有待进一步检测予以明确^[60].

近年来新一代测序技术的飞速发展大大提高了新发突变和低频嵌合体突变的检出率, 为揭示很多罕见病、复杂综合征和发育异常类疾病的病因起到了决定性作用^[61,62]. Moore和Zaahl^[63]对53份HSCR患者和正常对照儿童的肠组织蜡块标本提取DNA进行检测, 通过

识别两个SNP位点基因型的不同得出结论, 认为组织特异性体细胞突变可能参与了HSCR的发生. 此后, 不同种族人群中HSCR患者的*RET*基因嵌合体变异也屡见报道^[64,65]. 我们曾在1例HSCR患者父亲的多个组织样本中检测到不同频率的*RET*基因变异, 其中精液中的变异检出率明显高于外周血和唾液, 分别为4%、1%、3%^[58]. 由此可见, 父母一方的生殖细胞嵌合体变异可能是导致患者新发突变的一个重要遗传机制, 应在遗传咨询中给予高度重视.

3 存在的主要问题及研究瓶颈

当前, HSCR致病机制研究中存在的主要问题有以下4个方面: (1) “遗传力丢失”(missing heritability)问题. 很多疾病相关变异的真正致病性还缺乏足够证据, 尤其是在生物体内进行的研究仍相对匮乏. 尽管某些变异已经在动物模型研究证实可以诱导产生类似人类HSCR患者样表型^[66], 但诸多家系研究却提示, 同一基因内的突变往往存在明显不完全外显特征^[67], 这种“遗传力丢失”问题给产前诊断、咨询带来了极大的困扰和挑战. (2) 现有分析手段统计效力不足问题. 与许多其他复杂人类疾病研究类似, 尽管少数家族性患者的研究结果为明确几个关键基因的致病作用提供了较为有效的观察窗口^[68], 但占比更多的散发患者的致病原因剖析目前仍是重大难题. 虽然GWAS研究发现了一些易感基因位点(susceptibility loci), 但真正的致病性变异及其潜在生物学机制仍远未阐明. 整合多组学数据以提高统计效力的尝试仍处于初步探索阶段. (3) 缺乏针对不同类型细胞互作对ENS发育影响作用的评价手段. 在漫长的人类进化史上, “负性选择效应”等进化压力的存在决定了常见变异通常只有较微弱的效应^[69], 需要多个变异的效应累加才能致病. 近年来新提出的“泛基因遗传”模型(omnigenic model)^[70,71]强调, 在疾病表型相关的组织或细胞内, 核心基因(core gene)与外周基因(peripheral gene)构成协作网络发挥致病作用. 对肠道而言, 复杂的细胞间相互作用对于ENS的发育、成熟无疑具有重要调控作用, 但目前尚缺乏合适的模型和分析手段来对影响这一功能的诸多变异及其不同组合方式进行客观评价. (4) 遗传学研究成果的转化、应用问题. 多基因风险评分(polygenic risk score, PRS)模型^[72,73]的构建让我们看到了遗传学研究成果转化的希望, 但目前在HSCR的临床应用范式尚不成熟. 此外, 临床决策的难度也来自其他几个方面, 如胚胎期

异常影像学指征的特异性缺乏问题、未知基因(变异)对疾病发生的贡献问题、基因与环境交互作用问题以及出生后某些不正确的临床处理手段对疾病进程的影响问题等。

4 基于基因编辑技术的疾病研究模型构建及干细胞移植治疗方法初探

基因编辑技术是一种通过修改细胞或生物体的DNA序列来精确改变或修复基因的技术,其中最为常用的工具是CRISPR/Cas9系统。通过这一技术,研究人员可以选择性地剪切、添加或修改特定基因,从而对生物体的遗传信息进行精准调控^[74]。基于基因编辑技术构建的疾病模型也为HSCR的研究提供了极大便利。香港大学医学院团队采集1例TCA患者的皮肤成纤维细胞,将其诱导、重编程为多能性干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs),然后利用CRISPR/Cas9系统修复相应的*RET*基因突变,结果证实iPSC来源的ENCC的迁移、分化潜力都得到了显著修复。与此同时,经过对比2例S-HSCR患者外周血样本及iPSC来源的ENCC的转录组学测序结果,研究者找到了一个新的疾病相关基因突变: VCL p.Met209Leu^[75]。2023年,该团队从HSCR患者中建立了7个iPSC谱系并在体外重现了疾病相关表型。通过对iPSC来源的ENCC进行转录组学测序、分析,最终发现氧化磷酸化功能缺陷与神经元细胞的分化缺陷高度相关,证实Hedgehog信号通路诱导的氧化磷酸化可显著增强患者细胞的存活和分化能力^[76]。相关疾病研究模型的构建及应用将为探索新的疾病发生机制和开发针对HSCR患者的个体化治疗方案提供更多可能性。

过去5年中,基于干细胞的移植治疗研究取得了一系列进展。首先,研究人员发现,从小鼠及HSCR患者的无神经节细胞段肠组织中可分离出施万细胞(Schwann cell, SC)。HSCR患者的SC经体外培养、扩增7~10 d后移植,细胞能顺利进入小鼠的病变段肠组织,并分化为有电生理活性的神经元细胞,重建平滑肌的蠕动功能^[77]。肠道间充质细胞(enteric mesenchymal cells, EMCs)可通过旁分泌信号分子的方式促进肠神经嵴来

源细胞的增殖和神经球生长。利用这一策略,研究人员发现,从HSCR模型小鼠的小肠取材的神经球可获得与正常小鼠肠组织几乎相当的增殖、迁移潜力,并同样可以在移植入肠组织后产生出具有功能的神经元细胞^[78]。Fan等人^[79]利用双报告基因人多功能干细胞明确了体外诱导其分化为4种不同类型神经嵴细胞(neural crest, NC)所需的生长因子,发现迷走神经嵴细胞和骶神经嵴细胞可分化形成不同组合的肠道神经元,且细胞迁移速度存在明显差异。将这2种具有互相排斥作用的NC共同移植到HSCR模型小鼠肠组织内,可更好地恢复其肠道蠕动能力。西安交通大学研究人员发现,粪菌移植可通过重塑肠道微生物组、增加产短链脂肪酸相关菌属*Bacteroides*、*Clostridium*的丰度,继而激活MEK1/2信号通路有效促进细胞移植的治疗效能,可作为干细胞移植治疗HSCR的有效优化策略^[80]。干细胞移植治疗由于有望为重建病变组织的生理功能而被寄予厚望,但在真正实施临床应用前仍面临技术和伦理两大挑战,相关核心细节问题主要包括^[81]:什么是理想的ENCC来源?移植前应采取何种策略保存并扩增干细胞?用于移植的细胞是否足够安全?是否有必要纠正供体细胞自身携带的突变?什么是最佳的移植手段?移植后的干细胞能否在人的肠组织中存活、生长并最终具备较为完善的功能等。

5 总结和展望

广泛遗传异质性、高度可变的外显率及基因间的复杂相互作用是HSCR遗传机制中的显著、普遍特征。未来,如何将这些基因组层面的众多研究结果进行有序整合,从而应用于疾病发生风险的精准预测、评估和优化患者的临床治疗结局将是本领域研究的终极目标。相信随着生命科学研究技术的不断创新,疾病研究模型的不断优化和迭代,现有临床转化路径上的诸多瓶颈和壁垒必将被一一攻克,遗传学变异及其编码蛋白质功能异常作为疾病风险、诊断、预后判断或对临床治疗反应的生物标志物潜力必将被逐一变为现实,并最终实现真正意义上的精准医疗和新干预方法的持续、有效开发。

参考文献

- 1 Benisch B M. To the editor. *Hum Pathol*, 1975, 6: 128
- 2 Whitehouse F R, Kernohan J W. Myenteric plexus in congenital megacolon. *Arch Intern Med (Chic)*, 1948, 82: 75-111

- 3 Badner J A, Chakravarti A. Waardenburg syndrome and Hirschsprung disease: Evidence for pleiotropic effects of a single dominant gene. *Am J Med Genet*, 1990, 35: 100–104
- 4 Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, et al. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: A review. *J Med Genet*, 2008, 45: 1–14
- 5 Karim A, Tang C S M, Tam P K H. The emerging genetic landscape of Hirschsprung disease and its potential clinical applications. *Front Pediatr*, 2021, 9: 638093
- 6 Passarge E. The genetics of Hirschsprung's disease. *N Engl J Med*, 1967, 276: 138–143
- 7 Bodian M, Carter C O, Ward B C. Hirschsprung's disease. *Lancet*, 1951, 1: 302–309
- 8 Lyonnet S, Bolino A, Pelet A, et al. A gene for Hirschsprung disease maps to the proximal long arm of chromosome 10. *Nat Genet*, 1993, 4: 346–350
- 9 Puffenberger E G, Hosoda K, Washington S S, et al. A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell*, 1994, 79: 1257–1266
- 10 Amiel J, Laudier B, Attié-Bitach T, et al. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene *PHOX2B* in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet*, 2003, 33: 459–461
- 11 Bolk S, Pelet A, Hofstra R M W, et al. A human model for multigenic inheritance: Phenotypic expression in Hirschsprung disease requires both the RET gene and a new 9q31 locus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 268–273
- 12 Prieto J C, Garcia N M, Elder F F, et al. Phenotypic expansion of the supernumerary derivative (22) chromosome syndrome: VACTERL and Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*, 2007, 42: 1928–1932
- 13 Pusch C, Hustert E, Pfeifer D, et al. The SOX10 / Sox10 gene from human and mouse: Sequence, expression, and transactivation by the encoded HMG domain transcription factor. *Hum Genet*, 1998, 103: 115–123
- 14 Badner J A, Sieber W K, Garver K L, et al. A genetic study of Hirschsprung disease. *Am J Hum Genet*, 1990, 46: 568–580
- 15 Wood N J. Role for nongenetic factors in the development of Hirschsprung disease? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10: 692
- 16 Nielsen S W, Ljungdahl P M, Nielsen J, et al. Maternal use of selective serotonin reuptake inhibitors during pregnancy is associated with Hirschsprung's disease in newborns—A nationwide cohort study. *Orphanet J Rare Dis*, 2017, 12: 116
- 17 Knudsen L B, Olsen J. The danish medical birth registry. *Dan Med Bull*, 1998, 45: 320–323
- 18 Löf Granström A, Svenningsson A, Hagel E, et al. Maternal risk factors and perinatal characteristics for Hirschsprung disease. *Pediatrics*, 2016, 138: e20154608
- 19 Fu M, Sato Y, Lyons-Warren A, et al. Vitamin A facilitates enteric nervous system precursor migration by reducing Pten accumulation. *Development*, 2010, 137: 631–640
- 20 Arnaud A P, Cousin I, Schmitt F, et al. Different fecal microbiota in Hirschsprung's patients with and without associated enterocolitis. *Front Microbiol*, 2022, 13: 904758
- 21 Li S, Zhang Y, Li K, et al. Update on the pathogenesis of the Hirschsprung-associated enterocolitis. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 4602
- 22 Sanna S, Kurilshikov A, van der Graaf A, et al. Challenges and future directions for studying effects of host genetics on the gut microbiome. *Nat Genet*, 2022, 54: 100–106
- 23 Quan Y, Zhang K X, Zhang H Y. The gut microbiota links disease to human genome evolution. *Trends Genet*, 2023, 39: 451–461
- 24 Xu F, Fu Y, Sun T, et al. The interplay between host genetics and the gut microbiome reveals common and distinct microbiome features for complex human diseases. *Microbiome*, 2020, 8: 145
- 25 Bahrami A, Joodi M, Moetamani-Ahmadi M, et al. Genetic background of Hirschsprung disease: A bridge between basic science and clinical application. *J Cell Biochem*, 2018, 119: 28–33
- 26 McCallion A S, Stames E, Conlon R A, et al. Phenotype variation in two-locus mouse models of Hirschsprung disease: Tissue-specific interaction between *Ret* and *Ednrb*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 1826–1831
- 27 Chatterjee S, Nandakumar P, Auer D R, et al. Gene- and tissue-level interactions in normal gastrointestinal development and Hirschsprung disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 26697–26708
- 28 Schill E M, Wright C M, Jamil A, et al. Down syndrome mouse models have an abnormal enteric nervous system. *JCI Insight*, 2019, 4: e124510
- 29 Niu X, Xu Y, Gao N, et al. Weighted gene coexpression network analysis reveals the critical lncRNAs and mRNAs in development of Hirschsprung's disease. *J Comput Biol*, 2020, 27: 1115–1129
- 30 Chatterjee S, Chakravarti A. A gene regulatory network explains RET–EDNRB epistasis in Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet*, 2019, 28: 3137–3147
- 31 Chatterjee S, Kapoor A, Akiyama J A, et al. Enhancer variants synergistically drive dysfunction of a gene regulatory network in Hirschsprung disease. *Cell*, 2016, 167: 355–368.e10
- 32 Emison E S, McCallion A S, Kashuk C S, et al. A common sex-dependent mutation in a RET enhancer underlies Hirschsprung disease risk. *Nature*,

- 2005, 434: 857–863
- 33 Garcia-Barcelo M M, Tang C S, Ngan E S, et al. Genome-wide association study identifies *NRG1* as a susceptibility locus for Hirschsprung's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 2694–2699
- 34 Jiang Q, Arnold S, Heanue T, et al. Functional loss of semaphorin 3C and/or semaphorin 3D and their epistatic interaction with *ret* are critical to hirschsprung disease liability. *Am J Hum Genet*, 2015, 96: 581–596
- 35 Tang C S, Gui H, Kapoor A, et al. *Trans*-ethnic meta-analysis of genome-wide association studies for Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet*, 2016, ddw333
- 36 Tilghman J M, Ling A Y, Turner T N, et al. Molecular genetic anatomy and risk profile of Hirschsprung's disease. *N Engl J Med*, 2019, 380: 1421–1432
- 37 Mowat D R. Mowat-Wilson syndrome. *J Med Genet*, 2003, 40: 305–310
- 38 Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, et al. *SOX10* mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet*, 1998, 18: 171–173
- 39 Ivanchuk S. De novo mutation of *GDNF*, ligand for the *RET*/*GDNFR*-alpha receptor complex, in Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet*, 1996, 5: 2023–2026
- 40 Myers S M, Salomon R, Goessling A, et al. Investigation of germline *GFR* alpha-1 mutations in Hirschsprung disease. *J Med Genet*, 1999, 36: 217–220
- 41 Doray B. Mutation of the *RET* ligand, neurturin, supports multigenic inheritance in Hirschsprung disease [published erratum appears in *Hum Mol Genet* 1998 Oct;7(11):1831]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7: 1449–1452
- 42 Hofstra R M W, Valdenaire O, Arch E, et al. A loss-of-function mutation in the endothelin-converting enzyme 1 (*ECE-1*) associated with Hirschsprung disease, cardiac defects, and autonomic dysfunction. *Am J Hum Genet*, 1999, 64: 304–307
- 43 Edery P, Attie T, Amiel J, et al. Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat Genet*, 1996, 12: 442–444
- 44 Peippo M M, Simola K O J, Valanne L K, et al. Pitt-Hopkins syndrome in two patients and further definition of the phenotype. *Clin Dysmorphology*, 2006, 15: 47–54
- 45 Brooks A S, Bertoli-Avella A M, Burzynski G M, et al. Homozygous nonsense mutations in *KIAA1279* Are associated with malformations of the central and enteric nervous systems. *Am J Hum Genet*, 2005, 77: 120–126
- 46 Okamoto N, Wada Y, Goto M. Hydrocephalus and Hirschsprung's disease in a patient with a mutation of *L1CAM*. *J Med Genet*, 1997, 34: 670–671
- 47 Azizi E, Berlowitz I, Vinograd I, et al. Congenital megacolon associated with familial dysautonomia. *Eur J Pediatr*, 1984, 142: 68–69
- 48 Jiang Q, Wang Y, Gao Y, et al. *RET* compound inheritance in Chinese patients with Hirschsprung disease: Lack of penetrance from insufficient gene dysfunction. *Hum Genet*, 2021, 140: 813–825
- 49 Marklund U. Diversity, development and immunoregulation of enteric neurons. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, 19: 85–86
- 50 Sharkey K A, Mawe G M. The enteric nervous system. *Physiol Rev*, 2023, 103: 1487–1564
- 51 Tang C S, Li P, Lai F P L, et al. Identification of genes associated with Hirschsprung disease, based on whole-genome sequence analysis, and potential effects on enteric nervous system development. *Gastroenterology*, 2018, 155: 1908–1922.e5
- 52 Le T L, Galmiche L, Levy J, et al. Dysregulation of the *NRG1*/*ERBB* pathway causes a developmental disorder with gastrointestinal dysmotility in humans. *J Clin Invest*, 2021, 131: e145837
- 53 Gui H, Schriemer D, Cheng W W, et al. Whole exome sequencing coupled with unbiased functional analysis reveals new Hirschsprung disease genes. *Genome Biol*, 2017, 18: 48
- 54 Tang C S, Zhuang X, Lam W Y, et al. Uncovering the genetic lesions underlying the most severe form of Hirschsprung disease by whole-genome sequencing. *Eur J Hum Genet*, 2018, 26: 818–826
- 55 Al Sharie A H, Abu Mousa B M, Al Zu'bi Y O, et al. A novel *ANO1* gene variant is associated with intestinal dysmotility syndrome masquerading as Hirschsprung disease: A case report. *JPGN Rep*, 2023, 4: e317
- 56 Xu Z, Yan Y, Gu B, et al. Up-regulation of microRNA-424 causes an imbalance in *AKT* phosphorylation and impairs enteric neural crest cell migration in Hirschsprung disease. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 6700
- 57 Hong M, Li X, Li Y, et al. Hirschsprung's disease: Key microRNAs and target genes. *Pediatr Res*, 2022, 92: 737–747
- 58 Jiang Q, Liu F, Miao C, et al. *RET* somatic mutations are underrecognized in Hirschsprung disease. *Genet Med*, 2018, 20: 770–777
- 59 Jiang Q, Wang Y, Li Q, et al. Sequence characterization of *RET* in 117 Chinese Hirschsprung disease families identifies a large burden of *de novo* and parental mosaic mutations. *Orphanet J Rare Dis*, 2019, 14: 237
- 60 MacKenzie K C, Garritsen R, Chauhan R K, et al. The somatic mutation paradigm in congenital malformations: Hirschsprung disease as a model. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 12354
- 61 Campbell I M, Shaw C A, Stankiewicz P, et al. Somatic mosaicism: Implications for disease and transmission genetics. *Trends Genet*, 2015, 31:

382–392

- 62 Gajecka M. Unrevealed mosaicism in the next-generation sequencing era. *Mol Genet Genomics*, 2016, 291: 513–530
- 63 Moore S W, Zaahl M G. Tissue specific somatic mutations and aganglionosis in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*, 2014, 49: 258–261; discussion 261
- 64 Müller C M, Haase M G, Kemnitz I, et al. Genetic mosaicism of a frameshift mutation in the RET gene in a family with Hirschsprung disease. *Gene*, 2014, 541: 51–54
- 65 Amiñoso C, García-Miñaur S, Martínez L, et al. Recurrence of Hirschsprung disease due to maternal mosaicism of a novel RET gene mutation. *Clin Genet*, 2014, 85: 401–402
- 66 Sunardi M, Ito K, Sato Y, et al. A single RET mutation in Hirschsprung disease induces intestinal aganglionosis via a dominant-negative mechanism. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2023, 15: 1505–1524
- 67 Wang X J, Camilleri M. Hirschsprung disease: Insights on genes, penetrance, and prenatal diagnosis. *NeuroGastroenterol Motil*, 2019, 31: e13732
- 68 Xiao J, Hao L W, Wang J, et al. Comprehensive characterization of the genetic landscape of familial Hirschsprung's disease. *World J Pediatr*, 2023, 19: 644–651
- 69 Zeng J, de Vlaming R, Wu Y, et al. Signatures of negative selection in the genetic architecture of human complex traits. *Nat Genet*, 2018, 50: 746–753
- 70 Mathieson I. The omnigenic model and polygenic prediction of complex traits. *Am J Hum Genet*, 2021, 108: 1558–1563
- 71 Liu X, Li Y I, Pritchard J K. Trans effects on gene expression can drive omnigenic inheritance. *Cell*, 2019, 177: 1022–1034.e6
- 72 Wand H, Kalia S S, Helm B M, et al. Clinical genetic counseling and translation considerations for polygenic scores in personalized risk assessments: A practice resource from the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Counseling*, 2023, 32: 558–575
- 73 Yao Q, Gorevic P, Shen B, et al. Genetically transitional disease: A new concept in genomic medicine. *Trends Genet*, 2023, 39: 98–108
- 74 Janik E, Niemcewicz M, Ceremuga M, et al. Various aspects of a gene editing system—CRISPR-Cas9. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 9604
- 75 Lai F P L, Lau S T, Wong J K L, 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. *Gastroenterology*, 2017, 153: 139–153.e8
- 76 Li Z, Lui K N C, Lau S T, et al. Transcriptomics of Hirschsprung disease patient-derived enteric neural crest cells reveals a role for oxidative phosphorylation. *Nat Commun*, 2023, 14: 2157
- 77 Pan W, Rahman A A, Stavely R, et al. Schwann cells in the aganglionic colon of Hirschsprung disease can generate neurons for regenerative therapy. *Stem Cells Transl Med*, 2022, 11: 1232–1244
- 78 Stavely R, Bhave S, Ho W L N, et al. Enteric mesenchymal cells support the growth of postnatal enteric neural stem cells. *Stem Cells*, 2021, 39: 1236–1252
- 79 Fan Y, Hackland J, Baggiolini A, et al. hPSC-derived sacral neural crest enables rescue in a severe model of Hirschsprung's disease. *Cell Stem Cell*, 2023, 30: 264–282.e9
- 80 Tian D, Xu W, Pan W, et al. Fecal microbiota transplantation enhances cell therapy in a rat model of hypoganglionosis by SCFA-induced MEK1/2 signaling pathway. *EMBO J*, 2023, 42: e111139
- 81 Alhawaj A F. Stem cell-based therapy for hirschsprung disease, do we have the guts to treat? *Gene Ther*, 2022, 29: 578–587

Summary for “先天性巨结肠遗传学研究进展、问题与展望”

Research progress, problems, and prospects in the genetic study of Hirschsprung disease

Ya Gao¹ & Qian Jiang^{1,2*}

¹ Department of Medical Genetics, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China;

² Research Unit of Minimally Invasive Pediatric Surgery on Diagnosis and Treatment (2021RU015), Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China

* Corresponding author, E-mail: teaco@126.com

Hirschsprung disease (HSCR), also known as aganglionosis, is the most common cause of colonic obstruction in children. It is a neurocristopathy characterized by the absence of enteric ganglia along a variable length of the intestine, and when the gut fails to be innervated, it loses motility. The disease was named after Dr. Harald Hirschsprung, who comprehensively described two unrelated infants who died from abdominal distension as a consequence of the dilatation and hypertrophy of the colon in 1888. In clinical practice, HSCR patients often present with delayed meconium passage, abdominal distension, vomiting, severe constipation, predisposition to bowel inflammation (enterocolitis), and even early death. According to the extent of aganglionosis, HSCR can be classified into four main types: Short-segment HSCR (S-HSCR), in which the aganglionic segment is limited to the rectal and distal sigmoid colon; long-segment HSCR (L-HSCR), in which the aganglionosis extends proximal to the sigmoid colon; total colonic aganglionosis (TCA), in which the entire colon is affected; and total colonic and small-colon aganglionosis (TCSA). HSCR has an incidence of approximately 1 in every 5000 newborns of European ancestry and is twice as common in Asians, with a high heritability (>80%) and marked sex differences (male:female ratio, 4:1). Although the disease occurs as an isolated disorder in approximately 70% of patients, it can also manifest with chromosomal abnormalities, additional congenital anomalies, or recognized syndromes.

Over the last several decades, surgical treatment has effectively decreased the mortality and morbidity of HSCR, allowing for the emergence of familial cases. As a classic developmental disorder of the enteric nervous system (ENS), HSCR is attributed to defective proliferation, migration and differentiation of enteric neural crest cells resulting from dysregulated gene functions and gene–environment interactions. Genetic defects play a major role in HSCR pathogenesis, including gene mutations, cytogenetic abnormalities, and abnormal gene expression. In addition, smoking, obesity and maternal use of selective serotonin reuptake inhibitors during pregnancy have been suggested to be associated with the development of HSCR in newborn children. Recent developments in genetic tools and techniques and the implementation of population screening have provided new insights into the causal genes and genetic architecture of most familial cases and some sporadic cases. Here, we outline the latest progress in genetic studies in HSCR, mainly focusing on gut-specific gene–gene interactions and gene regulatory networks, the synergetic effects of common noncoding variants and rare coding mutations, molecular defects related to ENS development and mosaic mutations. Furthermore, we discuss the major problems in this area, including the “missing heritability”, insufficient statistical effectiveness, lack of appropriate detection models for combined variants with moderate effects and clinical transformation and application. Finally, we summarize the future research directions and application prospects of gene editing-based disease model construction, stem cell transplantation therapy and multiomics integration studies.

hirschsprung disease, heritability, penetrance, gene regulatory network, mosaic mutation, stem cell transplantation

doi: [10.1360/TB-2023-0716](https://doi.org/10.1360/TB-2023-0716)