

综述

先天性脊柱侧凸的病因学研究进展

The research progress of etiological of congenital scoliosis

周 航, 周太峰, 苏培强

(中山大学附属第一医院脊柱外科 510080 广州市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2016.01.14

中图分类号: R682.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2016)01-0082-04

先天性脊柱侧凸(congenital scoliosis, CS)是指由于胎儿时期脊椎发育不良所造成的脊柱一个或多个节段的侧方弯曲。临床上将由于胚胎时期椎体结构异常导致脊柱弯曲 $>10^\circ$ 定义为CS。CS既可单独存在,也可与其他先天性畸形、器官缺陷综合征(如Alagille综合征、Klippel-Feil综合征和VACTERL综合征等)相伴发生^[1]。CS在活产婴儿中的发生率约为1/1000,其病因未明,但近年的研究表明可能与遗传因素、环境因素以及发育异常密切相关^[2,3]。笔者综述近年来CS病因学研究方面的新进展,为相关研究提供参考。

1 遗传因素

1.1 遗传学证据

流行病学资料发现,CS主要呈散发状态,但也有家族性聚集现象。Shahcheraghi等^[4]对60例CS患者的家系调查发现,CS患者中有8%的患者有家族史,40%患者的父母为近亲结婚。另一组对237例CS患儿的调查资料显示,有20.7%的患儿有脊柱畸形家族史,其中17.3%有特发性脊柱侧凸的家族史^[5]。一项针对1753例CS伴发多发性先天畸形患者的细胞遗传学研究表明,有114例脊柱侧凸与染色体缺失有关,2p13-15、6p13或15p12三个区段的点突变或单倍剂量不足(haploinsufficiency)与脊柱侧凸存在明显相关性^[6]。以上证据均说明CS患病因素中遗传致病因素是不可忽略的。

1.2 遗传模式

虽然有学者认为CS呈常染色体显性或隐性遗传^[7],但其遗传模式总体上并不清楚,目前的主流研究支持CS为多基因遗传^[1]。有一种伴有CS的少见综合征——脊柱肋骨发育不良(spondylocostaldysostosis, SCD)的遗传学模式研究则较为清楚。SCD可以分为四种亚型,皆为常染色体单基因隐性遗传,其突变基因分别是DLL3(I型)、MESP2(II型)、LFNG(III型)、HES7(IV型),这些基因均为

NOTCH信号通路的相关基因^[8-11]。NOTCH信号通路在多种组织及器官发育早期对器官的发生、发育及细胞凋亡起着重要作用,当MESP2、HES7和DLL3等核心基因表达异常时,体节发育过程中软骨内成骨明显受限^[11]。对SCD这种伴脊柱畸形的遗传病的研究,为CS遗传模式提供了重要信息,提示这些基因在脊柱的正常发育中起着重要作用。

1.3 致病基因的筛查

通过全基因组测序、全基因组外显子测序、全基因组关联分析等多种测序手段,结合斑马鱼模型和点突变小鼠等多种模式动物实验,研究者们已经筛选出一些与CS发病相关的致病基因。Maisenbacher^[12]将DLL3作为候选基因,对46例CS患者进行DLL3基因测序,发现了一个新的高度保守的错义突变(S225N)。Sparrow等^[13]通过点突变小鼠模型的验证实验发现,HES7为NOTCH的效应基因,编码HES转录抑制因子,当HES7的单倍剂量不足时,可通过干扰成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)的表达导致胚胎体节发育的缺陷,并最终引起小鼠的CS畸形。Dunty等^[14]发现,WNT3A基因也可能与体节发育及CS相关,WNT3A/ β -catenin通路通过激活DLL1和TBX6的活性来调节体节界限决定基因MESP2和Ripply2的表达,并最终决定体节发育过程的边界形成。

邱贵兴等^[15]通过全基因组外显子测序及比较基因组杂交芯片的方法,锁定了TBX6基因可能与CS相关。TBX6基因全称为T-box6,位于16p11.2,主要分布于细胞核,翻译产物作为转录因子参与中胚层发育,并对形态发生过程进行转录调控。该课题组发现,TBX6基因存在一种包含了三个非同义突变的单倍体,当该单倍体与另一条染色体上的无效突变同时存在时,携带者全部出现侧凸畸形,且表型皆为半椎体畸形。TBX6的发现,可以解释该课题组研究所涉及病例中11%CS的形成。

2 环境因素

环境因素特别是母亲在妊娠早期所处某些环境因素对CS的发病有重要影响。已经被证明与椎体发育缺陷相关的主要环境因素包括低氧、酒精、维生素缺乏、高热、糖

第一作者简介:男(1992-),硕士研究生在读,研究方向:运动系统遗传疾病

电话:(020)87755766-6236 E-mail:zhouh68@mail2.sysu.edu.cn

通讯作者:苏培强 E-mail:supq@mail.sysu.edu.cn

尿病等^[6]。环境致畸因素导致 CS 的机制非常复杂,不同的致畸因素可能通过作用于不同的分子信号通路来影响相关基因的表达,并最终导致脊柱轴向发育的畸形^[1]。致畸因素对胚胎的影响可能是通过分子模拟的模式,或者通过干扰细胞发育的过程,包括细胞分裂、表观遗传学修饰、信号转导等^[7]。虽然具体致病机制尚未明确,但研究表明,胚胎期的各种环境致病因素是 CS 不可忽略的致病因素^[6]。

2.1 低氧

在器官形成的早期,随着胚胎血液循环的发生,胚胎经历了从无氧呼吸到有氧呼吸的转变。在器官形成过程中,神经管和体节中胚层比周围组织代谢更为活跃,若在此期间出现缺氧,有可能导致体节发育异常出现 CS。Rivard^[8]在低氧处理小鼠的实验中,发现小鼠脊柱出现半椎体畸形,且这种畸形发生于脊椎发育中的软骨形成阶段,约在小鼠胚胎期的 e8.5d~e9.5d,与人类胸腰椎发生的时间相吻合。Sparrow 等^[13]将受孕 9.5d 的雌鼠在 8% 的大气氧压中暴露 8h,在受孕后第 14.5 天观察发现,大部分小鼠出现轻重不等的先天性脊柱畸形,包括肋骨发育不全、椎体融合及半椎体畸形等。在同一实验中,Sparrow 将正常小鼠及 MESP 杂合突变小鼠分别进行低氧处理后发现,MESP 杂合突变小鼠无论是出现畸形的比例还是畸形的严重程度均较正常小鼠显著增加;分别对 HES7、DLL3、DLL1 及 NOTCH1 杂合突变小鼠进行低氧压处理,也观察到了畸形比例及严重程度增加的情况,提示低氧可增加具有易感基因小鼠的脊柱畸形的比例及严重程度^[13]。

2.2 维生素缺乏

维生素 A 及其衍生物在生命中的必要性已经被研究得十分透彻。最近,关于视黄酸的研究进展进一步加深了人们对维生素 A 在椎体发育过程中的作用的认识。视黄酸受体(retinoic acid receptors, RARs)与类维生素 A 受体(retinoid X receptor)间的相互作用对视黄酸受体转录因子在基因水平调节维生素 A 的功能有明显影响^[9]。Clagett-Dame 等^[20]发现,母亲在妊娠早期摄入维生素 A 不足有可能导致后代出现严重的先天性骨骼畸形;在动物实验中发现,在胚胎期第 10.5 天分别给予小鼠胚胎不同剂量全反式视黄酸(all-trans retinoic acid, RA)处理后,RA 缺乏组出现颈椎椎弓根缺失、胸骨发育不良、肋骨缺失及骨盆区畸形。但由于缺乏大规模的流行病学调查,还不能确定维生素 A 缺乏与人 CS 存在直接相关。

叶酸属于 B 族维生素,对胚胎期神经系统的发育有重要影响。妊娠早期叶酸缺乏是胎儿出现神经管缺陷(neural tube defects, NTDs)的重要因素^[21]。叶酸缺乏或利用障碍可导致高同型半胱氨酸血症,叶酸和同型半胱氨酸代谢相关的关键酶的基因突变,如 MTHFR 突变导致在甲基四氢叶酸减少的同时出现同型半胱氨酸堆积,可能与 NTDs 的发生相关^[22]。胎儿神经管畸形主要表现为无脑儿、脑膨出、脑脊髓膜膨出、脊柱裂/隐性脊柱裂、唇裂及腭裂等。在一项面对 94 例平均年龄为 12.7 岁的 NTDs 患者进

行的临床调查中发现,脊柱侧凸的发生率与 NTDs 的严重程度显著相关^[23]。

3 发育生物学研究

CS 的脊柱畸形实际为中轴骨发育异常。中轴骨起源于胚胎期的轴旁中胚层。伴随着“体节发生(somitogenesis)”,脊柱逐步形成。根据发育生物学理论,体节形成的过程可以用分子时钟(clock model)和前向波模型(wavefront model)解释^[24]。前向波(the wavefront)是体节由前向后沿着体轴逐渐推移的过程。分子时钟(the molecular clock)指调节体节沿体轴向后推移过程中的周期性分子振荡过程,某个特定的分子振荡触发了体节发育的周期性停滞,随后下一次前向波又将这种分子振荡取代,使本已停滞的体节发育得以继续,这个过程周而复始地重复便形成了体节,每个体节的大小也是由前向波的速度和分子振荡的频率所决定的。

WNT、NOTCH 和 FGF 三条信号通路在体节发生中有重要作用。这三条通路产物靶基因成分的梯度变化决定了下一体节形成的界限,并由此来调节体节大小^[24]。尽管 NOTCH、WNT 和 FGF 三条主要通路在前体节中胚层的形成中都被阶段性地激活并表达,但任何一条通路都不足以单独解释分子时钟及前向波模型。三条主要通路既可以独立产生不相互依赖的分子振荡,又可以相互作用、相互调节^[25]。体节形成的异常可能是遗传因素及环境因素的共同作用而导致体节发育相关通路表达异常所致^[26]。

3.1 NOTCH 信号通路

NOTCH 是一类穿膜受体蛋白,以级联反应形式介导细胞间的信号传递,在多种组织和器官的早期发育过程中担负着重要作用。NOTCH 信号通路有 4 种受体(NOTCH1/2/3/4)和 5 种配体(Jagged-1/2, Delta1/3/4),对软骨形成、软骨细胞的存活及骨重建起关键作用,动物实验结果表明,NOTCH 信号核心基因和调整基因(DLL1, DLL3, Presenilin1, LFNG 和 HES7)敲除或突变都可以出现体节发育异常^[27]。小鼠的 NOTCH 通路的配体、受体或下游靶基因的突变均可导致严重的体节发育障碍,在 PSEN1-/- 和 PWEN2-/- 双突变的小鼠或以 NOTCH 通路阻滞剂培养的野生型小鼠的胚胎中,NOTCH 活性完全缺失,此时前体节中胚层(presomitic mesoderm, PSM)中基因的周期性表达缺失,小鼠胚胎体节的发育完全停滞^[28]。

HES 及 LFNG 基因是 NOTCH 通路的下游靶基因,也是继 c-Hairy1 基因后在模式动物的胚胎中观察到的另外两个周期性表达的基因。LFNG 既可以通过糖基化 NOTCH 受体来活化 NOTCH 信号,也可以通过抑制其下游转录因子的活性来对 NOTCH 通路产生负反馈调节^[29]。基于 NOTCH 信号通路产物的这种特性,Wahi 等^[27]提出,HES、LFNG 等基因可能通过被其下游不稳定产物的多层级的负反馈模式所调节。

3.2 WNT 信号通路

WNT信号通路因其启动蛋白为WNT蛋白而得名。WNT蛋白通过自分泌或旁分泌方式与细胞膜表面的受体相结合,激活细胞内信号通路,调节靶基因的表达,对细胞的增殖、分化、迁移、细胞极性和细胞凋亡都有重要作用,对轴突导向(axon guidance)和重塑(remodeling)也有重要影响。在小脑和脊髓中,WNT7A和WNT3的表达会使圆锥增大,轴索增粗,诱导轴突分支,从而参与轴突导向^[30]。在动物实验中发现,虽然低密度脂蛋白受体相关蛋白6(LRP6,WNT经典通路的特异性受体)敲除的小鼠模型中出现了脊髓形成障碍,但LRP6在脊髓连接处的轴突导向作用中并非必须^[31]。

脊椎动物发育的早期,WNT信号通路控制了前后轴索形成和神经元的发育^[31]。Kim等^[32]通过化学诱变构建无脑畸形的斑马鱼模型,通过基因测序后发现,无脑畸形的斑马鱼中TCF3基因(WNT通路的下游基因)出现7bp的插入突变,而向无脑畸形斑马鱼中注射野生型TCF3RNA后畸形可以被纠正。在上述实验中,通过原位杂交实验发现,TCF3在胚胎早期广泛表达,但随着时间推移,TCF3的表达开始逐渐局限于神经管前部,TCF3的这种表达模式可能与其在头节及神经管发育中的作用相关。另外,在尾部异位表达Cwnt8C(WNT通路下游基因)能导致前脑、中脑和其他神经结构的完全缺失^[33]。

在不同的模式动物中已经证明,很多WNT信号通路成分的缺失与神经管缺陷相关。AXIN(WNT通路抑制剂)突变可导致神经管闭合不全或头端神经褶的畸形^[34]。LRP6(WNT复合受体)在小鼠胚胎期活性增高可导致神经管缺陷、腰骶部及尾部发育障碍;LRP6活性下降则会导致四肢发育缺陷、脑膨出及脊柱裂畸形^[35]。至于人类WNT信号通路与先天性脊柱畸形是否直接相关,尚未见报道。

3.3 FGF 信号通路

FGF主要通过细胞膜表面特异性受体FGFRs结合,将信号传递到胞内,从而调节细胞生长。FGFRs是典型的膜结合酪氨酸激酶受体,有四种类型(FGFRs1/2/3/4),主要由胞外段、单次跨膜区和胞内段组成。FGF信号通路与胚胎的发育有密切关系。Fgf4、Fgf8、Fgf9基因敲除的小鼠会发生胚胎死亡或出生后立即死亡^[36]。FGF家族部分成员(FGF8和FGF17)对于前后中轴发育非常重要。FGF8在中脑始基表达,对中脑沿着中轴头尾发育起关键作用^[37]。Spry2、Spry4、Dusp4和Dusp6等基因参与到体节发育的FGF信号通路中,FGF调节基因的周期性表达与NOTCH同步FGF信号通路被证明参与调控分子振荡过程^[38]。Kawamura等^[39]发现,在斑马鱼模型中,FGF的调节基因her13.2能够调节her1/her7的分子振荡。在小鼠模型中,前体节中胚层中Fgfr1的条件性缺失可导致Hes7、Lfng、Axin2以及Spry2的分子振荡消失,提示FGF在这三条通路的上游发挥作用^[40]。

总之,CS是一种受遗传、环境及发育因素共同影响的复杂疾病,在遗传致病因素领域,DLL3、HES7、TBX6等

致病基因突变的致畸作用不断被证实;宫内低氧、妊娠期糖尿病、妊娠期高热等环境性致病因素的作用研究也在不断深入。对这些致病因素加强了解,一方面可以对孕妇作出产前指导,另一方面也有助于产前诊断,降低严重畸形婴儿的出生率。

4 参考文献

1. Giampietro PF, Raggio CL, Blank RD, et al. Clinical, genetic and environmental factors associated with congenital vertebral malformations[J]. *Mol Syndromol*, 2013, 4(1-2): 94-105.
2. McMaster MJ, Ohtsuka K. The natural history of congenital scoliosis: a study of two hundred and fifty-one patients[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1982, 64(8): 1128-1147.
3. Pourquie O. Vertebrate segmentation: from cyclic gene networks to scoliosis[J]. *Cell*, 2011, 145(5): 650-663.
4. Shahcheraghi GH, Hobbi MH. Patterns and progression in congenital scoliosis[J]. *J Pediatr Orthop*, 1999, 19(6): 766-775.
5. Purkiss SB, Driscoll B, Cole WG, et al. Idiopathic scoliosis in families of children with congenital scoliosis [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2002, (401): 27-31.
6. Connor JM, Conner AN, Connor RA, et al. Genetic aspects of early childhood scoliosis[J]. *Am J Med Genet*, 1987, 27(2): 419-424.
7. Hensinger RN. Congenital scoliosis: etiology and associations [J]. *Spine*, 2009, 34(17): 1745-1750.
8. Sparrow DB, Guillen-Navarro E, Fatkin D, et al. Mutation of Hairy-and-Enhancer-of-Split-7 in humans causes spondylocostaldysostosis[J]. *Hum Mol Genet*, 2008, 17(23): 3761-3766.
9. Sparrow DB, Chapman G, Wouters MA, et al. Mutation of the LUNATIC FRINGE gene in humans causes spondylocostaldysostosis with a severe vertebral phenotype [J]. *Am J Hum Genet*, 2006, 78(1): 28-37.
10. Bulman MP, Kusumi K, Frayling TM, et al. Mutations in the human delta homologue, DLL3, cause axial skeletal defects in spondylocostaldysostosis[J]. *Nat Genet*, 2000, 24(4): 438-441.
11. Makino Y, Takahashi Y, Tanabe R, et al. Spatiotemporal disorder in the axial skeleton development of the Mesp2-null mouse: a model of spondylocostaldysostosis and spondylothoracicdysostosis[J]. *Bone*, 2013, 53(1): 248-258.
12. 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.
13. 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.
14. Dunty WJ, Biris KK, Chalamalasetty RB, et al. Wnt3a/beta-catenin signaling controls posterior body development by coordinating mesoderm formation and segmentation [J]. *Development*, 2008, 135(1): 85-94.

15. 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.
16. Li Z, Yu X, Shen J. Environmental aspects of congenital scoliosis[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2015, 22(8): 5751–5755.
17. Alexander PG, Tuan RS. Role of environmental factors in axial skeletal dysmorphogenesis[J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2010, 90(2): 118–132.
18. Rivard CH. Effects of hypoxia on the embryogenesis of congenital vertebral malformations in the mouse[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1986, 208: 126–130.
19. Li N, Sun S, Wang D, et al. Suppression of retinoic acid receptors may contribute to embryonic skeleton hypoplasia in maternal rats with chronic vitamin A deficiency [J]. *J Nutr Biochem*, 2010, 21(8): 710–716.
20. Clagett-Dame M, Knutson D. Vitamin A in reproduction and development[J]. *Nutrients*, 2011, 3(4): 385–428.
21. Wilson RD, Davies G, Desilets V, et al. The use of folic acid for the prevention of neural tube defects and other congenital anomalies[J]. *J Obstet Gynaecol Can*, 2003, 25(11): 959–973.
22. Yang Y, Chen J, Wang B, et al. Association between MTHFR C677T polymorphism and neural tube defect risks: a comprehensive evaluation in three groups of NTD patients, mothers, and fathers[J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2015, 103(6): 488–500.
23. Sabova L, Horn F, Drdulova T, et al. Clinical condition of patients with neural tube defects[J]. *Rozhl Chir*, 2010, 89(8): 471–477.
24. Murray PJ, Maini PK, Baker RE. The clock and wavefront model revisited[J]. *J Theor Biol*, 2011, 283(1): 227–238.
25. Hubaud A, Pourquie O. Signalling dynamics in vertebrate segmentation[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(11): 709–721.
26. Pourquie O. Vertebrate segmentation: from cyclic gene networks to scoliosis[J]. *Cell*, 2011, 145(5): 650–663.
27. Wahi K, Bochter MS, Cole SE. The many roles of Notch signaling during vertebrate somitogenesis[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014 Dec 4. [Epub ahead of print]
28. Ferjentsik Z, Hayashi S, Dale JK, et al. Notch is a critical component of the mouse somitogenesis oscillator and is essential for the formation of the somites [J]. *PLoS Genet*, 2009, 5(9): e1000662.
29. Gibb S, Maroto M, Dale JK. The segmentation clock mechanism moves up a notch[J]. *Trends Cell Biol*, 2010, 20(10): 593–600.
30. Morello F, Prasad AA, Rehberg K, et al. Frizzled3 controls axonal polarity and intermediate target entry during striatal pathway development[J]. *J Neurosci*, 2015, 35(42): 14205–14219.
31. Avilés EC, Stoeckli ET. Canonical wnt signaling is required for commissural axon guidance[J]. *Dev Neurobiol*, 2016, 76(2): 190–208.
32. Kim CH, Oda T, Itoh M, et al. Repressor activity of Headless/Tcf3 is essential for vertebrate head formation[J]. *Nature*, 2000, 407(6806): 913–916.
33. Popperl H, Schmidt C, Wilson V, et al. Misexpression of Cwnt8C in the mouse induces an ectopic embryonic axis and causes a truncation of the anterior neuroectoderm [J]. *Development*, 1997, 124(15): 2997–3005.
34. Zeng L, Fagotto F, Zhang T, et al. The mouse fused locus encodes axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation[J]. *Cell*, 1997, 90(1): 181–192.
35. Gray JD, Kholmanskikh S, Castaldo BS, et al. LRP6 exerts non-canonical effects on Wnt signaling during neural tube closure[J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(21): 4267–4281.
36. Sun X, Mariani FV, Martin GR. Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development [J]. *Nature*, 2002, 418(6897): 501–508.
37. Jaeger I, Arber C, Risner-Janiczek JR, et al. Temporally controlled modulation of FGF/ERK signaling directs midbrain dopaminergic neural progenitor fate in mouse and human pluripotent stem cells[J]. *Development*, 2011, 138(20): 4363–4374.
38. Dequeant ML, Glynn E, Gaudenz K, et al. A complex oscillating network of signaling genes underlies the mouse segmentation clock[J]. *Science*, 2006, 314(5805): 1595–1598.
39. Kawamura A, Koshida S, Hijikata H, et al. Zebrafish hairy/enhancer of split protein links FGF signaling to cyclic gene expression in the periodic segmentation of somites [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(10): 1156–1161.
40. Shamim H, Mahmood R, Logan C, et al. Sequential roles for Fgf4, En1 and Fgf8 in specification and regionalisation of the midbrain[J]. *Development*, 1999, 126(5): 945–959.

(收稿日期:2015-11-08 修回日期:2016-01-11)

(本文编辑 李伟霞)