

RET 原癌基因与先天性巨结肠相关性的 分子遗传学研究进展

刘翠平 李继承*

(浙江大学细胞生物学研究所, 杭州 310058)

摘要 先天性巨结肠(hirschsprung disease, HSCR), 又称肠无神经节细胞症, 是典型的肠神经系统发育异常疾病。目前已经发现 11 种基因和 5 个易感位点与 HSCR 发病相关。其中 RET 原癌基因(RET proto-oncogene, RET)是主要的易感基因。虽然大部分 HSCR 发病风险都与 RET 基因相关, 但只有不到 15% 的散发性 HSCR 患者发生 RET 基因编码区的突变。近期研究发现, RET 基因非编码区的调节性突变可能在 HSCR 发生中起重要作用。现着重对 RET 基因与 HSCR 相关性的最新研究进展进行综述。

关键词 RET; 非编码区突变; 先天性巨结肠

先天性巨结肠(hirschsprung disease, HSCR)是典型的肠神经系统发育异常疾病, 其最重要的病理改变为患儿肠道末端神经结细胞完全缺如, 肠道神经调节紊乱, 以致受累肠段异常收缩, 其近端结肠代偿性扩张与肥厚, 形成巨结肠。HSCR 临床表现为完全或不完全性肠梗阻症状。根据神经节缺失的程度, 可分为三类: 短段型(S-HSCR), 约占 80%, 病变部位位于直肠近端或乙状结肠交界处, 甚至达乙状结肠远端; 长段型(L-HSCR), 约占 20%, 病变延至乙状结肠或降结肠; 全结肠型(TCA)和全肠型(TIA), 极其少见, 病变波及全部结肠及回肠以上累及十二指肠^[1-4]。HSCR 还可分为综合病征型和非综合病征型, 约 15% 的患者伴发其他疾病症状, 如 21 三体综合征、Shah-Waardenburg 综合征等。HSCR 的平均发病率约为 1/5 000, 其中以高加索人最低, 亚洲人最高。男女发生之比约为 4:1, 在 S-HSCR 中这种性别差异尤其显著^[5,6]。

L-HSCR 多发于家族性先天性巨结肠患者, 其遗传特点为常染色体显性, 不完全外显性和多样的表现型。90% 散发性的先天性巨结肠都是 S-HSCR, 其遗传特点是多基因遗传或隐性遗传^[4]。目前认为先天性巨结肠的主要致病基因是 RET 原癌基因(RET proto-oncogene, RET)。然而, 近期研究发现, 占该病绝大部分的散发性、短段型患者中, RET 基因突变往往并不发生在编码区, 而是发生在 RET 基因的调节序列上^[7,8]。本文着重对 RET 基因与 HSCR 相关性的最新研究进展进行综述。

1 HSCR 遗传相关基因和易感位点

HSCR 的发生与胚胎发育时肠神经系统发育异常有关。因此, 目前鉴定的 HSCR 相关基因主要来自肠神经系统发育中起主要作用的 2 个信号转导通路: RET 信号通路和内皮素信号通路。目前为止, 已经发现了 11 个 HSCR 相关基因: RET 及其配体胶质细胞源性神经生长因子(GDNF)和神经营养蛋白(NTN), 内皮素 B 受体(EDNRB)及其配体内皮素 3 (EDN3)和内皮素转化酶 1 (ECE1), 还有四个信号通路相关的转录因子基因: SOX10、ZFHX1B、PHOX2B、TTF1, 以及在神经系统发育中起重要作用的 KIAA1279 基因^[9,10]。

RET 基因定位于染色体 10q11.2, 编码酪氨酸激酶受体, 目前认为是主要的 HSCR 致病基因。在 HSCR 中, RET 基因以外的相关基因突变很少并且都表现为低外显性, RET 基因的突变频率相对较高。综合征型 HSCR 中 RET 基因的突变率为 11%~53%, 非综合征型 HSCR 中其突变率为 9%~35%^[11,12]。约 50% 家族性 HSCR 和 15% 散发性 HSCR 患者中 RET 基因的突变发生在编码区或剪接区域。其他基因的突变频率不超过 10%, 主要发生于综合征型 HSCR 中, 并且这部分突变中有一半发生在 EDNRB(定位于 13q22)基因上^[13]。如 Shah-Waardenburg 综合征中,

收稿日期: 2007-08-13 接受日期: 2007-11-16
浙江省医药卫生科学基金资助项目(No.2002A027)

* 通讯作者。Tel: 0571-88208088, Fax: 0571-88208094, E-mail:

lijichen@zju.edu.cn

耳聋、色素沉积等症状是由 EDNRB、EDN3 和 SOX10 的突变引起的。先天中枢性低通气综合征 (congenital central hypoventilation syndrome, CCHS) 中, 中枢性肺换气不足、成神经细胞瘤、自主运动障碍等症状是由 PHOX2B 突变引起的^[14]。Mowat-Wilson 综合征中, 智力延迟、头小畸形、癫痫等症状与 ZFH1B 基因突变有关。而 KIAA1279 与 HSCR 伴随 Goldberg-Shprintzen 综合征病症相关^[15]。

目前已经发现的 HSCR 相关基因突变大部分为编码序列突变(coding sequence, CDS), 与 L-HSCR、TCA 和家族性、综合征型 HSCR 相关, 即只能解释一小部分 HSCR 发病机制。而占相当大比例的非综合征型、散发性 HSCR 患者中, 很难检测到目前已知相关基因的编码序列突变^[7,8,13]。近年来, 有学者用连锁分析的方法对可能的 HSCR 易感位点进行了一系列预测。Bolk 等^[16]对不同的家系进行基因连锁分析研究, 发现 9q31 位点与 HSCR 密切相关。然而, 这个位点只有在没有 RET 基因编码区突变的情况下才有意义。12 个家系中, 11 个与 RET 基因相关联, 其中有 6 个家系没有发生 RET 基因编码序列突变, 并显示与 9q31 相关。该研究提示当 RET 基因编码区无显著突变时, 9q31 位点是个必要的修饰区域。虽然缺乏 RET 基因编码序列突变, 但与 RET 基因位点连锁, 表明 RET 基因中可能存在微弱的起调节作用的突变位点, 降低 RET 基因的表达水平。Gabriel 等^[7]对 67 例 S-HSCR 患者进行全基因组扫描, 发现 65 例 HSCR 单倍体型包括 RET 基因位点, 其中只有 40% 发生 RET 基因编码序列突变, 这与 Bolk 等^[16]的家系研究结果相一致, 证实了 RET 基因在 HSCR 中的主导作用。除了位于 10q11 的 RET 位点外, 他们还发现了 2 个 HSCR 患病相关风险位点, 3p21 和 19q12。根据多基因遗传模型和最佳外显率模型, 这三个位点对于预测 S-HSCR 的发生是必需的。

Mennonite 家族是一个相对孤立遗传的家族, 该家族中 HSCR 患病率为 1/500, 是世界平均患病率的 10 倍, 因此是非常典型的 HSCR 家系^[17]。Carrasquillo 等^[17]对 43 个 Mennonite 家系进行全基因组扫描, 研究发现 13q22.3-q31.1 位点 LOD 值最高, 为 55.60, 说明在这个家系中 EDNRB 基因可能是 HSCR 主要的易感基因。次要位点为 10q11.21, 即 RET 基因所在位点, LOD 值为 5.60。另外新发现了一个位点位于 16q23.3。这三个易感位点与以往研究中的易感位点均无关联, 提示 Mennonite 家系可能具有独特的遗传背景。

2006 年, Brooks 等^[18]在 Duth 家系中发现新的 4q31-q32 位点可能与 HSCR 低外显率相关。

2 HSCR 与 RET 位点调节性突变

虽然只有 15% HSCR 患者中存在 RET 基因编码序列突变, 但是基于家族性 HSCR 连锁分析结果显示几乎所有的家系都与 RET 基因位点相关^[7,16,19]。多个欧洲和亚洲散发性 HSCR 人群关联分析也证实了 RET 基因在非家族性 HSCR 发生中的作用^[20-24]。种种证据表明, RET 基因中可能存在功能性的非编码区突变, 并最终改变 RET 基因表达。基于这种假设, 研究者们最终发现了一个起始于 RET 基因 5' 末端长约 27 kb (5' UTR 和外显子 1~4 kb, 内含子 1 和外显子 2~23 kb) 的单倍型与 HSCR 相关。这个单倍型在欧洲人群中的频率为 56%~62%^[20,23], 在中国人群中的频率高达 85%^[24]。结果表明, RET 基因启动子或者其调节序列上可能存在突变。

近年来, 用易感基因单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphism, SNP)构建疾病相关单倍型的研究成为研究的热点。含有 HSCR 相关突变的 RET 基因的多态性和单倍型可能起着遗传修饰的作用, 从而增加 HSCR 患病风险。在发育过程中, 这些多态性位点可能与其他的突变位点相互作用, 在发育过程中调节疾病的表型。

Fitze 等^[25]推测 RET 基因外显子 2 上的 SNP 位点 rs1800858 可形成新的受体位点, 从而导致 RET 基因异常剪切。Griseri 等^[22]构建了该位点不同基因型的荧光素报告载体, 将其转染入 COS7 细胞中进行 RNA 体外表达分析, 没有检测到异常剪接产物。另一个倍受关注的位点是 RET 基因启动子区域的 2 个 SNP 位点: rs10900296 和 rs10900297 (也叫 SNP-5 G>A 和 SNP-1 A>C, 定位于 RET 基因转录起始点上游)。荧光素酶基因报告系统显示该位点“AC”单倍型可降低 RET 基因启动子活性^[21]。此外, Garcia-Barcelo 等^[24]的结果显示, 在肠发育过程中甲状腺转录因子 -1 (TTF-1)与 RET 基因表达一致, 并与这 2 个 SNP 位点结合。当该位点突变成“AC”单倍型后, 可显著降低 TTF-1 结合能力和 RET 基因启动子的转录活性。然而, Griseri 等^[22]的结果也指出这 2 个 SNP 位点引起的启动子活性减弱具有细胞特异性。因此, 现在将这 2 个位点定义为功能 SNP 位点或者作为连锁不平衡标签为时过早。

2005 年, 2 个独立的研究小组运用关联分析和

比较基因组分析的方法发现 HSCR 发病相关 RET 基因突变可能定位于内含子 1 (intron1) 的增强子区域^[8,26]。Burzynski 等^[26]全基因组扫描了 HSCR 患者和正常对照样本的风险单倍型区域, 最终鉴定了 84 个变异序列, 通过序列比对检测这些变异是否发生在转录因子结合区域。同时他们也对 RET 基因 5' 区域进行了不同物种序列比对, 通过序列的进化保守性推测可能的调节序列。结果发现, 只有 intron1 中的一个区域比较保守, 在这个区域中只有一个 SNP 位点 rs2506004。进一步分析发现 rs2506004 与 HSCR 高度相关, 该位点突变导致 ETV4 结合位点丢失。ETV4 属于 Ets 转录因子家族, 该家族成员在细胞发育、分化、增殖、凋亡和组织重建中都起重要作用, 其大部分靶基因位于 RAS/MAPK 信号转导通路下游, 参与 RET 信号转换过程。但他们并没有对该位点功能进行深入研究。Emison 等^[8]运用类似的研究方法对 126 个 HSCR 家系的 RET 基因内含子 1 邻近区域进行基因组扫描, 发现了 29 个新的 SNP 位点, 其中 12 个位于 5' UTR 和 intron1 区域。位于 rs2506004 上游 200 bp 的 rs2435357(RET+3) 具有最高传递频率, 该位点的 T 等位基因在 HSCR 患者中高频发生, 可增加 HSCR 易感性。RET+3 位点和其邻近的 rs2506004、rs2506005 被包含在多种属保守序列 MCS+9.7 中。我们对 99 例中国人散发性 HSCR 样本的 RET+3 位点进行基因分型。发现 RET+3 位点 T 等位基因的基因频率为 72%, C 等位基因的基因频率为 28%, 通过进一步统计分析, 认为 RET+3 位点 T 等位基因的高发与中国人的 HSCR 具有明显相关性。此外, 我们还检测了 rs2506004 和 rs2506005 位点的基因型, 发现这 2 个位点与 RET+3 位点完全连锁平衡。这三个位点构成 TCC 和 CTA 两种单倍体型, 在女性中可增加 2.1 倍的 HSCR 发病风险, 在男性中则增加 5.7 倍发病风险, 具有一定的性别依赖性^[27]。Grice 等^[28]构建了 MCS+9.7 (rs2506004、rs2435357、rs2506005) 调节的 lacZ 报告基因载体, 并构建转基因鼠, 结果发现 MCS+9.7 对 LacZ 基因表达的调节可以模拟 RET 基因在胚胎发育中的表达情况, 提示 MCS+9.7 对 RET 基因的表达具有调节作用。

与所有的复杂疾病一样, HSCR 的表型不仅与易感基因的风险单倍体型有关, 也与“保护性”等位基因相关。这里的保护性等位基因指在正常人群中表达较多的, 可能具有抵抗其他疾病易感因子作用的等

位基因。有研究认为, RET 基因 SNP 位点 rs1800862 C>T 可能是 HSCR 中起保护性作用的等位基因, 该位点在高加索 HSCR 人群中表现频率很低, 其中意大利人 8.2%, 西班牙人 6.2%, 德国人 3.6%, 而中国 HSCR 人群中完全缺失^[20,29]。RET 基因 3' UTR 区域连锁不平衡现象及与 rs1800862C>T 单倍型相关的 3' 端 RET 不同的产物(RET9, RET51)的存在都说明 RET 3' UTR 可能存在功能保护性突变^[17,29]。此外, Griseri^[30]等发现 RET 基因 3' UTR 的 SNP 位点 rs3026785 T>C 与 rs1800862 紧密相关, rs3026785 T>C 等位基因可以降低人神经母细胞瘤中 RET 基因 mRNA 的降解水平, 导致 RET 基因转录产物的增加, 可能通过增加细胞膜上 RET 总量降低 HSCR 的发病风险。

3 RET 基因编码区突变和非编码区突变在 HSCR 中的特点

尽管目前对 RET 非编码区突变的功能尚不清楚, 但它们在 HSCR 发病中发挥一定的作用是毋庸置疑的。由于 RET 基因 5' UTR 相关单倍型存在于占患病人群大多数的男性患者、散发性和 S-HSCR 患者中, 而 RET 编码区突变主要存在于占患病人群少数的女性患者、家族性以及 L-HSCR 中^[8,26], 说明 RET 调节区突变可能在 HSCR 易感性上起主要作用, 编码区突变和非编码区突变在 HSCR 发生中具有不同的作用。

不同的患者可以根据几个重要的因素划分 HSCR 的患病风险。这里简单总结如下: 性别——HSCR 有性别偏向, 男性患病风险明显高于女性; 家族性——大多数病人都是散发性的; 病变肠段长度——多数患者都是 S-HSCR。根据这些不同角度的分类, 对相应的 CDS 突变和增强子突变进行比较, 可以揭示不同的突变类型对患病风险种类的影响。总体来说, CDS 突变发生频率(小于 1%)小于调节性突变(大约 24%)。由于 CDS 突变对 RET 基因的功能影响较大, 主要与表型比较严重的、不常见的 HSCR 患病类型有关。因此, 病变肠段越长, CDS 突变越多。CDS 突变在复杂的家族性 HSCR 以及 L-HSCR 中比较常见。

在 HSCR 中, 性别偏向与突变类型和表型的严重性具有相关性。女性患者比男性患者的 CDS 突变比例高。另外 L-HSCR 和 TCA 在女性患者中也较多。反之, 增强子突变在男性 S-HSCR 患者中较多。在不同的患病风险类型中, 5' RET 基因单倍型分布频率也存在差异, 在男性 S-HSCR 患者和散发性 HSCR 患者

中较大, 在女性、表型严重的 HSCR (L-HSCR 和 TCA) 患者和复杂的家族性患者中较小。

在 HSCR 发生过程中, 除了目前认为比较重要的 RET 基因 5' UTR 的增强子突变外, 在基因组的其他区域可能还存在着相当数量的类似的调节性突变。这些易感位点共同作用, 导致 HSCR 的发生。究竟有多少个基因参与这个过程尚不可知, 目前唯一可以确定的是不同遗传背景下相关调节基因的表现程度是有显著差异的。对未知易感位点及其功能的探索必将有助于更好的理解 HSCR 发生的分子遗传学机制, 为探索新的临床治疗途径提供理论基础。

参考文献(References)

- [1] Passarge E. *N Engl J Med*, 1967, **276**: 138
- [2] Holschneider AM. *Med Welt*, 1982, **33**: 210
- [3] Garver KL et al. *Clin Genet*, 1985, **28**: 503
- [4] Brooks AS et al. *Clin Genet*, 2005, **67**: 6
- [5] Badner JA et al. *Am J Hum Genet*, 1990, **46**: 568
- [6] Torfs CP et al. *Am J Med Genet*, 1998, **77**: 431
- [7] Gabriel SB et al. *Nat Genet*, 2002, **31**: 89
- [8] Emison ES et al. *Nature*, 2005, **434**: 857
- [9] Garcia-Barceló MM et al. *Ann Hum Genet*, 2007, **71**: 746
- [10] Heanue TA et al. *Nat Rev Neurosci*, 2007, **8**: 466
- [11] Attié T et al. *Hum Mol Genet*, 1995, **4**: 1381
- [12] Hofstra RM et al. *Hum Mutat*, 2000, **15**: 418
- [13] Kusafuka T et al. *Hum Mol Genet*, 1996, **5**: 347
- [14] Amiel J et al. *J Med Genet*, 2001, **38**: 729
- [15] Brooks AS et al. *Am J Hum Genet*, 2005, **77**: 120
- [16] Bolk S et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 268
- [17] Carrasquillo MM et al. *Nat Genet*, 2002, **32**: 237
- [18] Brooks AS et al. *J Med Genet*, 2006, **43**: e35
- [19] Guan T et al. *World J Gastroenterol*, 2005, **11**: 275
- [20] Burzynski GM et al. *Eur J Hum Genet*, 2004, **12**: 604
- [21] Fernandez RM et al. *J Med Genet*, 2005, **42**: 322
- [22] Griseri P et al. *Hum Mut*, 2005, **25**: 189
- [23] Pelet A et al. *J Med Genet*, 2005, **42**: e18
- [24] Garcia-Barcelo M et al. *Hum Mol Genet*, 2005, **14**: 191
- [25] Fitze G et al. *Lancet*, 2002, **359**: 1200
- [26] Burzynski GM et al. *Am J Hum Genet*, 2005, **76**: 850
- [27] Zhang XN et al. *Biochem Genet*, 2007, **45**: 523
- [28] Grice EA et al. *Hum Mol Genet*, 2005, **14**: 3837
- [29] Griseri P et al. *Am J Hum Genet*, 2002, **71**: 969
- [30] Griseri P et al. *Hum Mutat*, 2007, **28**: 168

The Progress of Molecular Genetic Study on the Correlation between RET Proto-oncogene and Hirschsprung Disease

Cui-Ping Liu, Ji-Cheng Li*

(Institute of Cell Biology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Hirschsprung disease (HSCR) is a common congenital malformation, which also named congenital aganglionsis. Until now mutations in 11 genes and allele sharing with 5 loci have been identified as risk factors in HSCR. Of the above genes, RET proto-oncogene (*RET*) was proved to be the major genetic risk factor. In the common simplex cases, however, no more than 15% of patients possess *RET* coding mutations, but most patients do show haplotype sharing at the *RET* locus. Recently, it was indicated that the possible presence of the mutations in the *RET* untranslated regions or in its regulatory sequences may play an important role in HSCR. This review focused on progress on the correlation between *RET* and HSCR.

Key words RET proto-oncogene; non-coding mutation; hirschsprung disease

Received: August 13, 2007 Accepted: November 16, 2007

This work was supported by the Medical Science Fund of Zhejiang Province (No.2002A027)

*Corresponding author. Tel: 86-571-88208088, Fax: 86-571-88208094, E-mail: lijichen@zju.edu.cn