论著

文章编号:1000-5404(2011)06-0604-04

特发性矮小SHOX基因异常X线骨骼特征

解 芳,朱 岷,曹艳丽,熊 丰 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院内分泌科)

【摘要】 **目的** 研究特发性矮小(idiopathic short stature,ISS)中矮小同源盒基因(short stature homeobox-containing gene,SHOX)缺失和突变与X线骨骼特征指标的关系。**方法** 采用微卫星分析及外显子测序对354例矮小症患者进行SHOX基因分析,对检测出的SHOX基因异常患者进行X线骨骼指标统计学分析。**结果** 354例矮小症患者中发现SHOX基因异常35例(9.9%,35/354),其中外显子突变3例(8.6%,3/35),SHOX基因缺失32例(91.4%,32/35)。X线骨骼特征指标:SHOX基因异常组与正常组相比有轻微马德隆畸形改变,其中最突出的是SHOX异常组尺桡骨远端关节内侧面夹角明显减小($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** SHOX基因异常者X线骨骼指标的改变有尺桡骨远端关节内侧面夹角减小、桡骨垂高增加、和尺桡骨远端高度差增加等,女性较男性改变更为明显,且有随年龄增长骨骼表现更为明显的趋势。

【关键词】 ISS;SHOX;矮小;X线

【中图法分类号】 R725.8;R394.3;R816.8 【文献标志码】 A

Correlation of SHOX gene deficiency and mutation with skeleton X-ray characteristics of idiopathic short stature patients

Xie Fang, Zhu Min, Cao Yanli, Xiong Feng (Department of Endocrinology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the correlation of short stature homeobox-containing gene (SHOX) deficiency and mutation with skeleton X-ray characteristics of idiopathic short stature (ISS) patients. **Methods** Microsatellite analysis and exon sequence analysis were adopted to test SHOX deficiency and mutation in 354 ISS patients, and the results were compared with 196 controls with normal height. The ISS patients with SHOX deficiency and mutation were subjected to statistical analysis of skeleton X-ray characteristics. **Results** In the 354 ISS patients, abnormal SHOX were found in 35 cases (9.9%, 35/354), including 3 with exon mutation (8.6%, 3/35) and 32 with SHOX deficiency (91.4%, 32/35). As compared with the controls, the skeleton X-ray characteristics of the 35 ISS patients included slight Madelung deformity and obvious reduction of the included angle between the distal joint medial surfaces of the ulna and radius ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** The skeleton X-ray characteristics of the ISS patients with abnormal SHOX gene include the reduction of the included angle between the distal joint medial surfaces of the ulna and radius, the vertical height increase of the radius, the increase of the distal height difference between the ulna and radius, *etc*. These characteristics are more serious in females than males and are more obvious with the increase of age.

【**Key words**】 idiopathic short stature; short stature homeobox-containing gene; skeleton X-ray characteristics

Supported by the Paediatric Endocrinology Research Foundation for Young peditrician From *Chinese Journal of Practical Pediatrics* and GeneScience Pharmaceutical Co.,Ltd (200905005). Corresponding author: Zhu Min, E-mail: zhumin323@hotmail.com

人的线性生长是遗传和环境的多因素共同调控和作用的结果。在最终决定儿童身高的因素中,基因因素显得尤为重要。其中,SHOX基因编码蛋白作为转录激活因子在促进生长和软骨发育中起重要调控作用。

SHOX基因存在于人类性染色体Xp22和Yp11.3的拟常染色体区域(pseudoautosomal region,PAR1),全长35 kb。SHOX基因中含有1段由180 bp组成的高度保守的DNA序列,称同源框或同源异形盒。SHOX基因有6个外显子,编码两种蛋白质:292个氨基酸组

【基金项目】 《中国实用儿科学杂志》金赛儿科内分泌中青年医师科研基金(200905005)

【通信作者】 朱 岷,E-mail:zhumin323@hotmail.com

成的SHOXa和255个氨基酸组成的SHOXb。SHOX基因自人胚胎12周起,直至青春期持续在发育中的肢体生长软骨板处表达,尤其是肱骨、桡骨、尺骨远侧端和一些腕骨中,并在第4、5掌骨和第1、2咽弓有高表达。SHOX基因主要表达于增生和肥大软骨细胞和骨髓成纤维细胞,促进四肢骨远端软骨细胞增生分化和成熟,调节细胞增殖与凋亡间平衡,而且还可抑制雌激素的加速生长板成熟的作用,从而有利于骨骼和身高增长。SHOX基因异常的表型异质性大,可表现为严重的骨骼发育障碍,即一种以肢中部不成比例的短小为主要特征的矮身材,如Langer肢中部骨发育不良(Langer mesomelic dysplasia,LMD);也可表现为无明显骨骼畸形的矮身材[1]。上述严重的骨骼特征主要在Leri-Weill软骨发育异常(Leri-Weilldyschondrosteosis,LWD)和部分Turner综合征(Turner syndrome,TS)患者中被发现,主要表现为前臂弓形弯曲和短小腿、肘外翻、马德隆畸形或尺骨在腕关节和肘关节的部分转位、第4掌骨短小、高颚弓等[2-3]。马德隆畸形以放射片上桡骨短和弯曲,桡骨骨骺三角形为主要特征。马德隆畸形是由于桡骨骨骺生长异常导致桡骨弯曲,骨骺提前融合,以及阻碍了尺骨和桡骨骨骺掌侧面的发育。这些改变导致桡骨关节面掌侧和尺侧移位、手和腕部向掌侧移位、尺骨背侧脱位、楔形腕骨等[4]。目前研究认为短前臂或短下肢、马德隆畸形和肌肉肥大在SHOX异常中表现明显,肢中部发育不良和肌肉肥大是SHOX基因异常最明显的特征[5]。本研究着重于总结SHOX基因异常的特发性矮小(idiopathic short stature,ISS)患者X线骨骼测量指标的改变,旨在为临床筛查SHOX基因异常提供依据。

1 对象与方法

1.1 标本收集

2008年7月至2010年7月从重庆医科大学附属儿童医院门诊收集ISS的患者。筛选标准:①无宫内发育迟缓;②无慢性疾病;③无心理、情感障碍;④染色体检查正常;⑤生长激素激发试验除外生长激素缺乏症,T_3、T_4、TSH正常;⑥排除软骨发育低下等骨骼疾病;⑦所有患者未接受生长激素治疗;⑧身高标准参照文献[6];⑨有报道表明在青春期前或者青春早期时,某些SHOX异常的儿童身高可能 > -2SD。故本研究将家族中有成年男性身高 < 160 cm,成年女性身高 < 150 cm的患者,虽身高在-1 ~ -2SD,仍将其纳入筛查范围。共收集ISS患者354例,其中男性203例,女性151例,年龄(9.62 ± 3.39)岁,其身高标准差范围是(-2.86 ± 1.32)SD。征得患者和家长的同意后,抽取3 ml抗凝血;同时收集同年龄、同性别、身高正常儿童的血液196例为对照。

1.2 试验方法

1.2.1 微卫星分析PCR 选用5个常规的微卫星位点筛查SHOX基因缺失。分别为CA-SHOX、GA-SHOX(DXYS10092)、CT-SHOX(DXYS10093)、DXYS233、DXYS234。其中,CT-SHOX位于SHOX基因内部,CA-SHOX和GA-SHOX位于SHOX基因上游PAR1区域,DXYS233和DXYS234位于下游PAR1区域。

1.2.2 SHOX基因2-6外显子PCR扩增 产物测序由ABI 3100 DNA测序仪测定,进一步检测SHOX基因外显子突变。外显子PCR扩增的上下游引物分别为:外显子2 5′-GAGACGCGCGCATCCACCA-3′, 5′-GAGGCGCCGAACCCCAGGAG-3′;外显子3 5′-GCCACGTTGCGCAAAACCTC-3′,5′-CCCGAGGACCAGGCGATG-3′;外显子4-5 5′-TCTCTCTCTGCTTCTCCCCA-3′,5′-CAGGTCCCTAGGGATCTTCA-3′;外显子6 5′-TTCACCATGTTAGCCAGGAA-3′, 5′-ATCACCTGAGGTCAGGAGTT-3′。选用TIANGEN Hot Master *Taq* DNA酶,20 μl的PCR体系,94 ℃变性,72 ℃延伸,扩增25个循环。

1.3 分析方法

测量左前臂正位和左腕部X线正位片的指标:①腕骨角,分别从舟、月两骨及三角骨、月骨两骨的近侧缘各划一线,两线的夹角平均值为130°,马德隆畸形时此角度变小;②桡骨垂高,反映桡骨的弯曲程度,桡骨弦长是指桡骨骨干突出弧度之长,桡骨垂高指桡骨骨干弧度最突出点至弦长垂线,桡骨弯曲时,垂高增大;③腕尺距离比,反映腕骨尺侧移位程度,腕尺距离L_2是尺骨纵轴线到腕关节旋转轴的距离,腕尺距离比是指L_2与第3掌骨长度L_1之比,腕骨尺侧移位时腕尺距离比减小;④尺倾角,腕关节正位像,桡骨远端关节面与桡骨纵轴垂线的夹角,正常为20° ~ 35°,反映桡骨远端内侧面提前融合程度;⑤尺桡骨远端内侧面夹角(尺骨远端内侧面切线与桡骨远端内侧面切线之间所成角度),反映桡骨内侧面提前融合程度。

经过微卫星分析和外显子直接测序方法筛查出SHOX基因缺失和突变者,定为SHOX异常组(35例)。将收集身高正常且经上述方法检测无SHOX基因异常者,定为正常对照组(196例)。两组年龄和性别构成比均相同。考虑到雌激素对SHOX基因异常骨骼改变的协同作用,将每组按性别又分为男女两组,再按年龄(3 ~ 8岁女性和8岁 < 年龄 < 16岁女性组;3 ~ 9岁男性组和9岁 < 年龄 < 16岁男性组)分别比较SHOX基因改变各年龄段不同性别X线骨骼指标的差异。

1.4 统计学方法

使用SPSS 17.0统计软件,两组间比较行t检验。

2 结果

SHOX基因异常的频率为9.9%(35/354),男性17例,女性18例。其中缺失32例(91.4%,32/35),外显子突变3例(8.6%,3/35),3例外显子突变分别为外显子2(115T > G)、外显子3(1171-1172insA,VQV161-163CAG)、外显子3(996A > T,E102V),突变均为男性患儿。另外,身高虽在-1 ~ -2SD之间,但家族中有成年男性身高 < 160 cm,成年女性身高 < 150 cm的患者有66例,其中检测出SHOX基因缺失7例,未检测出突变,SHOX基因异常频率为10.6%(7/66)。

2.1 X线骨骼指标

①各年龄、性别SHOX基因异常组与正常组比较,腕骨角、腕尺距离比和尺倾角此3个指标均无明显差异($P > 0.05$);②2

组女性3~8岁和男性3~9岁时只有尺桡骨远端内侧平面夹角与正常相比有明显差异($P<0.05$,$P<0.01$,表1、2);③在9岁<年龄<16岁男性SHOX异常组与正常相比有两个指标有明显差异($P<0.05$,$P<0.01$,表3),分别为桡骨垂高和尺桡骨远端内侧平面夹角,然而8岁<年龄<16岁女性SHOX基因异常组骨骼改变较男性明显,3个指标与正常相比有统计学差异($P<0.05$,$P<0.01$,表4),分别为桡骨垂高、尺桡骨远端内侧平面夹角、尺桡骨远端高度差。

表1 3~8岁女性SHOX基因异常组与正常组X线骨骼指标比较

组别	n	桡骨垂高(mm)	尺桡骨远端高度差(mm)	腕尺距离比	尺桡骨远端关节面夹角(°)
SHOX异常组	5	3.20±0.48	8.10±0.50	0.30±0.03	146.25±8.81
正常组	28	2.44±0.61	8.33±0.82	0.31±0.05	161.00±2.24
P值		0.080	0.630	0.580	0.008

尺倾角和腕骨角因年龄太小无法测量

表2 3~9岁男性SHOX基因异常组与正常组X线骨骼指标比较

组别	n	桡骨垂高(mm)	尺桡骨远端高度差(mm)	腕尺距离比	尺桡骨远端关节面夹角(°)
SHOX异常组	9	2.25±0.59	9.33±1.48	0.33±0.05	143.67±10.97
正常组	48	2.23±0.57	9.29±1.68	0.34±0.04	161.0±10.24
P值		0.960	0.970	0.770	0.010

尺倾角和腕骨角因年龄太小无法测量

2.2 难量化的X线骨骼指标

对难以量化的X线骨骼特征总结分析,发现SHOX基因异常的患者中,第4掌骨短8例(22.9%,8/35);桡骨骨骺三角形11例(31.4%,11/35);桡骨远端尺侧缘透光7例(20.0%,7/35);提示在X线腕关节正位和左前臂正侧位片有些细微的马德隆畸形的改变。35例SHOX基因异常患者中有7例无第4短掌骨、桡骨远端尺侧缘透光、桡骨骨骺三角形、提携角增大等X线骨骼改变,推测其原因可能为年龄偏小[(6.54±2.26)岁],青春前期的SHOX基因异常引起的骨骼改变尚不明显。提示SHOX基因异常表型异质性较大,可能与基因的调控和雌激素的作用有关。

3 讨论

至今已有较多的临床研究报道生长激素治疗SHOX基因异常效果显著[7-8],目前美国已将SHOX基因异常纳入生长激素治疗的适应证中。相关研究认为在青春期开始时给予SHOX基因异常患者生长激素治疗可有效避免青春期身高生长潜力的丢失[9]。ISS发病率较高,有调查显示在所有矮小儿童中,ISS比例占34.0%左右[10],且缺乏特异性表现,对每例ISS患者进行SHOX基因诊断耗时、耗力。因此总结SHOX基因异常在ISS中的相关表型指标的改变,可为临床筛查SHOX基因异常提供依据。

本研究用微卫星分析和外显子直接测序方法从354例ISS矮小患者中检测出SHOX基因缺失和突变,并对其X线骨骼相关指标进行总结。目前,国外研究发现ISS患者中SHOX基因异常发生率2.0%~15.0%[5,11]。本研究检测出SHOX基因异常率为9.9%,频率相对偏高,考虑原因可能为:①我们纳入的病例多为家族性矮小;②本研究样本男性所占比例偏高(57.0%),男性矮小患者骨骼表现不明显,较易诊断为ISS;③本研究354例中包含66例身高在-1~-2SD,但家族中有成年男性身高<160 cm,成年女性身高<150 cm的患者,因SHOX基因家族遗传倾向,故我们将其纳入筛查范围。然而,其筛查结果十分有趣,SHOX基因缺失患者(7/66),频率为10.6%,可能为导致本研究SHOX异常频率稍高的原因之一。此结果提示对于家族中有成年男性身高<160 cm,成年女性身高<150 cm的患者,虽然当前身高仍在正常范围,我们仍要提高警惕其可能有SHOX基因异常。

前阶段的研究工作我们着重SHOX基因异常患者体表指标的研究,对骨骼特征的研究因为病例数较少的原因未发现差异性[12]。因此,通过扩大病例数和选取与马德隆畸形有关的X线骨骼指标,我们发现SHOX基因异常的ISS患者X线骨骼特征改变的趋势:青春期女性表现比男性严重,而且青春期表现比青

表3 9岁<年龄<16岁男性SHOX基因异常组与正常组X线骨骼特征指标比较

组别	n	腕骨角(°)	尺倾角(°)	桡骨垂高(mm)	尺桡骨远端高度差(mm)	腕尺距离比	尺桡骨远端关节面夹角(°)
SHOX异常组	8	130.53±7.84	20.35±3.81	3.38±0.99	7.19±2.41	0.29±0.06	141.73±9.99
正常组	66	134.58±9.21	22.58±4.90	2.58±0.34	7.34±2.82	0.27±0.06	156.43±8.46
P值		0.238	0.243	0.044	0.894	0.553	0.005

表4 8岁<年龄<16岁女性SHOX基因异常组与正常组X线骨骼特征指标比较

组别	n	腕骨角(°)	尺倾角(°)	桡骨垂高(mm)	尺桡骨远端高度差(mm)	腕尺距离比	尺桡骨远端关节面夹角(°)
SHOX异常组	13	129.13±6.60	19.14±4.57	3.70±1.08	8.68±1.80	0.30±0.03	140.89±9.05
正常组	54	130.34±6.44	20.79±3.31	2.6±0.86	6.83±1.34	0.31±0.05	158.86±7.36
P值		0.669	0.273	0.033	0.004	0.578	0.001

春前期更为明显,这可能证明了雌激素在SHOX单倍性剂量不足时可引起骨骼的不平衡提前融合[13]。值得注意的是,不论青春期还是青春前期,不论男性还是女性,均有一个指标与正常对照相比有差异性,即尺桡骨远端关节内侧面夹角减小,推断此角度可反映SHOX异常患者桡骨内侧面提前融合的趋势,且出现年龄较早,受性别影响较小。腕骨角、腕尺距离比和尺倾角在各年龄、各性别的SHOX基因异常与正常比较中均未发现明显差异,推测此3个指标在SHOX基因异常患者中改变较不明显,也可能与本研究SHOX异常病例数仍不多有关,尚需进一步的研究总结。青春期桡骨垂高和尺桡骨远端高度差SHOX基因异常与正常相比有差异性,然而青春期前无差异,推测可能与雌激素促进桡骨远端内侧面提前融合导致桡骨弯曲有关。通过本研究我们可以认为尺桡骨远端关节内侧面夹角减小、桡骨垂高增加和尺桡骨远端高度差增加这些轻微的马德隆畸形可以为筛查和早期诊断SHOX基因异常提供依据。

3例外显子突变,其突变例数较少,无法统计其与SHOX基因缺失的表现有无统计学差异。另外对35例SHOX基因异常患者进行相关难以量化的X线骨骼特征分析,我们发现X线片有轻微的马德隆畸形改变如:桡骨远端尺侧缘透光、桡骨骨骺三角形等,尚需大量样本研究总结。7例SHOX异常患者[年龄(6.54±2.26)岁,身高(-2.39±0.83)SD]无上述改变,推测其原因可能为年龄偏小,青春前期的SHOX基因异常引起的骨骼改变尚不明显。关于SHOX基因缺陷的骨骼特征表现1个有趣的现象是,SHOX基因单倍性剂量骨骼异常的患病率有随年龄增长而增高的趋势。Rappold等[14]随访了1例SHOX异常的患者,其7岁时并无骨骼特征改变,而4年后即青春后期出现了边缘肘外翻和马德隆畸形。推测是性腺激素的不平衡加剧了SHOX基因单倍性剂量不足患者的生长板过早融合形所致。

综上所述,SHOX基因异常者X线骨骼指标的改变有尺桡骨远端关节内侧面夹角减小、桡骨垂高增加和尺桡骨远端高度差增加,其中较为明显的指标为尺桡骨远端关节内侧面夹角,在青春期前即有差异性表现。我们还发现SHOX基因异常具有某些难以量化的轻微马德隆畸形的骨骼特征,如:第4短掌骨、桡骨远端尺侧缘透光、桡骨骨骺三角形、提携角增大等。总之,我们认为腕关节和左前臂正侧位X线片的某些骨骼指标改变对于临床上从矮小中筛检出SHOX异常患者有一定的临床价值。然而,目前研究样本仍较少,某些相关指标的相关性尚不明显,SHOX基因异常有关指标的改变趋势仍需多中心大样本的研究总结。

参考文献:

[1] Ogata T, Onigata K, Hotsubo T, *et al*. Growth hormone and gonadotropin-releasing hormone analog therapy in haploinsufficiency of SHOX [J]. Endocr J, 2009, 48(3): 317-322.

[2] Ross J L, Kowal K, Quigley C A, *et al*. The phenotype of short stature homeobox gene (SHOX) deficiency in childhood: contrasting children with Leri-Weill dyschondrosteosis and Turner syndrome[J]. J Pediatr, 2005, 147(4): 499-507.

[3] Binder G, Renz A, Martinez A, *et al*. SHOX haploinsufficiency and Leri-Weill dyschondrosteosis: prevalence and growth failure in relation to mutation, sex, and degree of wrist deformity [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(9): 4403-4408

[4] Zebala L P, Manske P R, Goldfarb C A. Madelung's deformity: a spectrum of presentation[J]. J Hand Surg Am, 2007, 32(9): 1393-1401.

[5] Rappold G, Blum W F, Shavrikova E P, *et al*. Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency[J]. J Med Genet, 2007, 44(5): 306-313.

[6] 李辉, 季成叶, 宗心南, 等. 中国0-18岁儿童、青少年身高、体重的标准化生长曲线[J]. 中华儿科杂志, 2009, 47(7): 487-492.

[7] Blum W F, Crowe B J, Quigley C A, *et al*. Growth hormone is effective in treatment of short stature associated with short stature homeobox-containing gene deficiency: Two-year results of a randomized, controlled, multicenter trial[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92(1): 219-228.

[8] Blum W F, Cao D, Hesse V, *et al*. Height gains in response to growth hormone treatment to final height are similar in patients with SHOX deficiency and Turner syndrome[J]. Horm Res, 2009, 71(3): 167-172.

[9] Scalco R C, Melo S S, Pugliese-Pires P N, *et al*. Effectiveness of the combined recombinant human growth hormone and gonadotropin-releasing hormone analog therapy in pubertal patients with short stature due to SHOX deficiency[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(1): 328-332.

[10] 韩蓓, 朱子阳, 石星, 等. 矮小儿童309例的常见病因[J]. 实用儿科临床杂志, 2008, 23(8): 604-605, 620.

[11] Binder G, Ranke M B, Martin D D. Auxology is a valuable instrument for the clinical diagnosis of SHOX haploinsufficiency in school-age children with unexplained short stature[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(10): 4891-4896.

[12] 曹艳丽, 朱岷, 解芳, 等. SHOX基因异常及其表型特征的研究[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(6): 853-856.

[13] Kosho T, Muroya K, Nagai T, *et al*. Skeletal features and growth patterns in 14 patients with haploinsufficiency of SHOX: implications for the development of Turner syndrome[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84(12): 4613-4621.

[14] Rappold G, Fukami M, Niesler B, *et al*. Deletions of the homeobox gene SHOX (short stature homeobox) are an important cause of growth failure in children with short stature[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(3): 1402-1406.

(收稿 2010-11-10 修回 2010-12-21)

(编辑 王小宴)