

进行性骨化性纤维增殖不良症临床及基因突变分析*

张伟 潘懿 朱晓晓 张克勤[△]

(南京医科大学第一附属医院 江苏 南京 210029)

摘要 目的:研究一例具有超经典型临床特征的 FOP 患者,并对其 ACVR1/ALK2 基因进行分析。**方法:**根据患者的大脚趾畸形和进行性异位骨化等表现进行临床诊断,确诊为 FOP。经患者及家属同意,采集患者、父母外周血,提取 DNA,通过 PCR 扩增并直接测序测定 ACVR1 基因全部外显子序列,以此来确定突变位点。**结果:**患者具有超经典型 FOP 的临床表现:先天性大脚趾畸形,先天性双手拇指、食指远端关节僵直和进行性异位骨化,父母无 FOP 的相关临床表现。基因测序分析该患者在 ACVR1 第七外显子发现存在 c.1067 G>A (p.G356D)杂合错义突变,而其父母无此杂合突变。**结论:**该患者在 ACVR1 的 c.1067 G>A (p.G356D)发生杂合错义突变,这有助于我们更好地理解认识中国 FOP 患者的临床表现和发病机制。

关键词:进行性骨化性纤维增殖不良症;骨形态发生蛋白;异位骨化;突变

中图分类号:R589.9,R68 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)04-707-04

Novel Mutation G356D in ACVR1 in Fibrodysplasia Ossificans Progressive: Analysis of one case*

ZHANG Wei, PAN Yi, ZHU Xiao-xiao, ZHANG Ke-qin[△]

(Department of Endocrinology and Osteoporosis Center, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Guangzhou Road No.300, Gulou District, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the ACVR1/ALK2 gene of one FOP patient. **Methods:** Clinical diagnosis was based on clinical and radiological findings. For mutation detection, the blood samples from the FOP patient and his parents were collected with informed consent. Genomic DNA was isolated from peripheral lymphocytes and all the exons of ACVR1 were amplified by PCR. The PCR products were sequenced. **Results:** The patient had congenital malformations of the great toes and congenital ankylosis of the thumbs and index fingers with both hands. Heterotopic ossification was proved by radiographic evidence of at the time of evaluation. The patient had a heterozygous mutation, c.1067 G>A (p.G356D), which is located in the kinase domain of ACVR1, while the parents had no such mutation. **Conclusions:** The patient had a novel mutation (c.1067G>A) in ACVR1, which was confirmed by direct sequencing. As the first case reported in a Chinese patient with such de novo mutation, these results were useful to understand the clinical symptoms and pathogenesis of FOP in Chinese patients.

Key words: Fibrodysplasia ossificans progressive; Bone morphogenetic protein; Heterotopic ossification; Mutation

Chinese Library Classification (CLC): R589.9, R68 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)04-707-04

前言

进行性骨化性纤维增殖不良症(FOP; OMIM135100)是罕见的高度致残的常染色体显性遗传病之一,以自发产生的肌肉炎症或肌肉受损诱导的进行性异位骨化为特征,并导致关节融合和活动障碍。FOP 发病率约为 1/200 万^[1],无种族、性别、地域等差异^[2]。约 300 年前就曾有患者被描述为“枯树枝样人”,于 1868 年首次被命名为进行性骨化性纤维增殖不良症^[3]。患者生存的平均年龄约为 45 岁,死亡原因多为胸部机能不全综合征(TIS)导致的并发症^[4],目前此病尚无有效的治疗方法。

2006 年 Shore 等^[5]通过对典型 FOP 患者家系进行基因组连锁分析,证明了 FOP 表型基因定位于 2q23-24,在 D2S1399 至 D2S1238 之间,并发现骨形态发生蛋白(BMP)I 型受体的亚

型 ACVR1 的甘氨酸-丝氨酸(GS)活化区域发生了等位杂合错义突变(c.617G>A,p.R206H)。此后,在超经典型 FOP 和变异型 FOP 患者中已发现 c.619 C>G、c.982 G>A、c.982 G>C、c.982 G>T、c.1124 G>C、c.590-592 del CTT^[6]、c.983 G>A^[7]、c.605G>T^[7]、c.1067 G>A^[8]等突变。

本文中我们报道一例具有超经典型临床表现的中国 FOP 患者,其在 c.1067 G>A 发生杂合错义突变。

1 材料和方法

1.1 研究对象

患者,女,9 岁,具有先天性双脚趾畸形、先天性双手拇指、食指远端关节僵直和进行性异位骨化。患者 3 岁时,左肩无诱因出现微红、硬的肿块,肿块消退逐渐缩小并变硬,以后颈、背

* 基金项目:院引进人才基金(NO.NA05)

作者简介:张伟(1983),硕士研究生;研究方向:骨质疏松;电话:15105164667;E-mail: zhangweisme@163.com

△通信作者:张克勤(1964),主任医师;研究方向:骨质疏松;电话:13621798084;E-mail: keqzhang2007@126.com

(收稿日期:2010-11-10 接受日期:2010-12-06)

部等出现包块,病理示"侵袭性纤维瘤"。现颈、肩、肘、髋等活动受限。她的父母没有以上 FOP 的临床表现。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 用 TIANamp Genomic DNA Kit(离心柱型,目录号:DP304)提取患者外周静脉血中基因组 DNA,并测其 OD 值和浓度。合成引物:根据 Shore^[5]合成 ACVR1 基因全部外显子的上、下游引物(由上海 Invitrogen 公司合成)。

1.2.2 PCR 扩增 在 200 ul 的 PCR 管中,加入 2× Taq premix (上海申能博彩生物公司)缓冲液 25 ul,上、下游引物各 2 ul(浓度为 10 umol/L),模板 DNA 200 ug,加双蒸水至总体积为 50 ul。在美国 PTC-200 热循环仪上进行 PCR,反应条件为 95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 45 s,35

个循环;72 °C 延伸 10 min。
1.2.3 PCR 产物鉴定及纯化 PCR 产物经 2 % 的琼脂糖凝胶电泳鉴定,用华舜公司柱式易抽型胶回收试剂盒进行纯化回收,并把纯化的 PCR 产物送至上海 Invitrogen 公司进行正向测序以明确其突变位点。

2 结果

2.1 临床表现

患者具有进行性异位骨化、先天性双侧大脚趾畸形、先天性双手拇指、食指远端关节僵直及颈、肩、肘、髋关节强直。通过其病史、体检、影像确证其为 FOP。其父母无相关的临床表现。

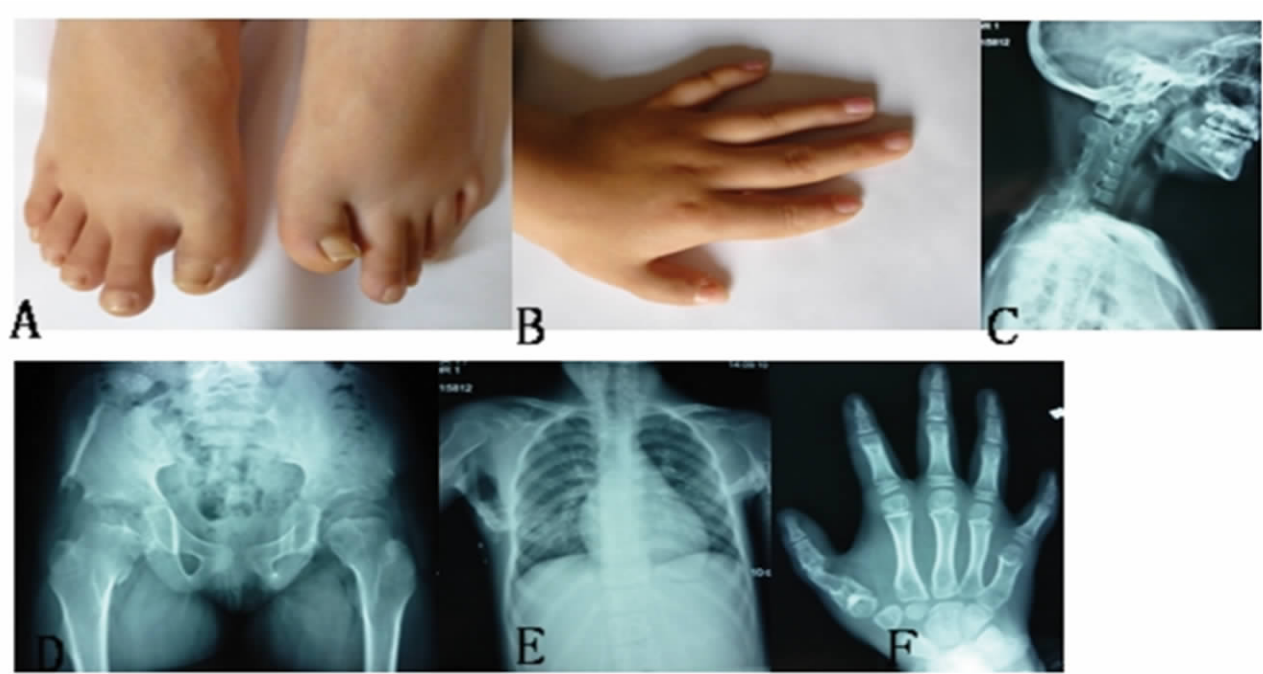


图 1 患者的临床表现:A 示患者脚趾后缩畸形;B 示双手双手拇指、食指远端关节僵直,无法屈曲。C: X 线示颈椎椎小关节间隙消失,背侧见条块状钙化;D 腰椎及臀部见块状钙化;E 胸片示双侧肩关节片状钙化影;F 手部 X 线示拇指掌指关节间隙变窄近乎消失。
Fig.1 Clinical manifestations of patient. A: Shortened great toe of the patient, B: Ankylosis of the thumbs and index fingers with both hands. C-E: X-ray evidence of ossified soft tissue in its posterior aspect of the thoracic body, lumbar vertebra, hip and the bilateral shoulder. F: The hand X-ray shows the space of the metacarpophalangeal joint is narrowing.

2.2 测序结果

该患者在 ACVR1 的第七外显子 c.1067 G>A(G356D)发现

杂合错义突变,其余外显子未发现有意突变。其父母无此杂合突变。其峰图如下:

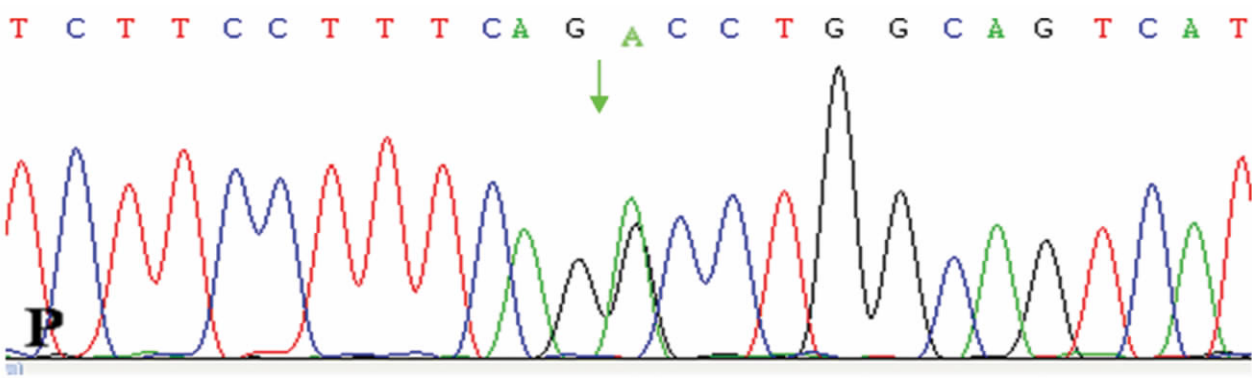


图 2 患者 ACVR1 第七外显子通过基因测序证实存在 c.1067 G>A(绿色箭头所示)错义突变。P 代表患者本人
Fig.2 DNA sequencing of the ACVR1 gene, demonstrating the heterozygous mutation c.1067 G> A in the patient with FOP.

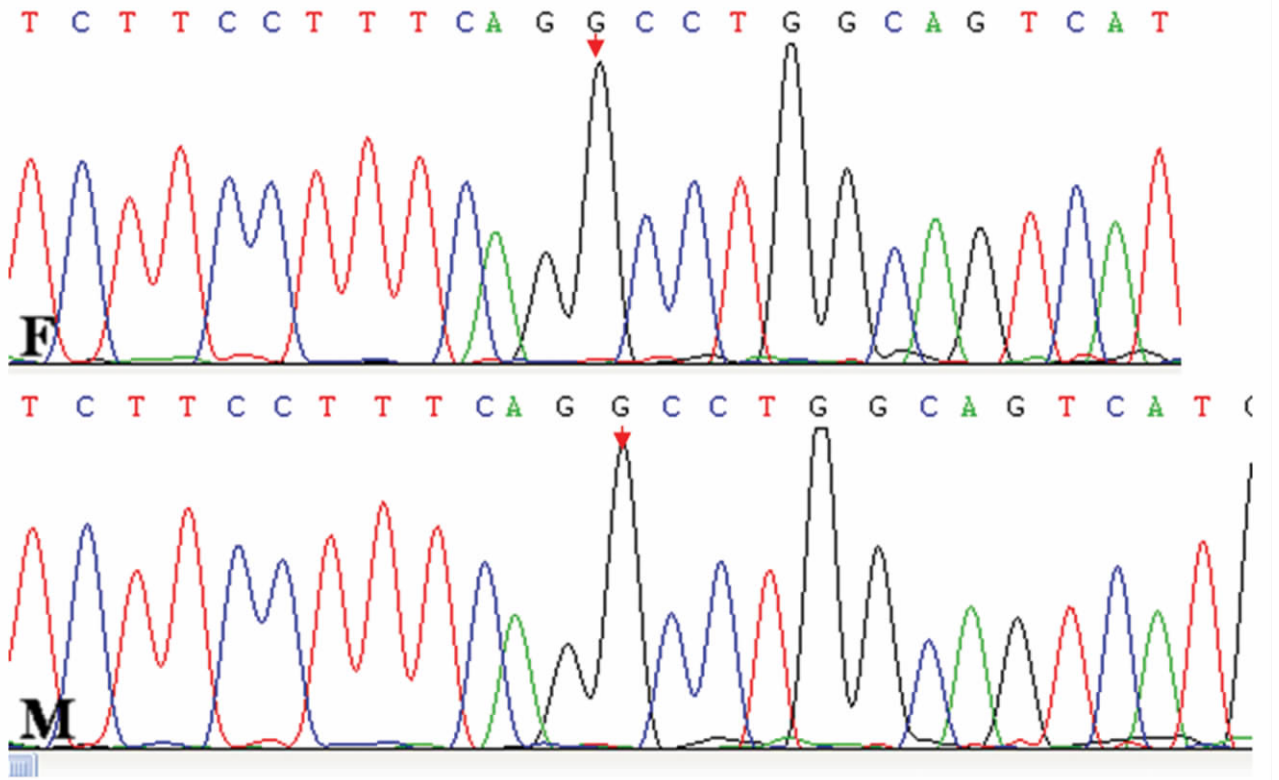


图3 患者的父母在第七外显子 c.1067 未发现突变位点(红色箭头所示)。F 代表患者父亲;M 代表患者母亲

Fig.3 The result of DNA sequencing for the parents shows that there are not c.1067 G> A mutation. M indicates mother of the patient. F indicates father of the patient

3 讨论

Kaplan^[9]等定义经典型 FOP 的基本表现是:先天性大脚趾畸形和进行性异位骨化;超经典型 FOP 主要特征是:经典型 FOP 两个基本特征及一个或多个非经典型症状;变异型 FOP 特征表现为经典型 FOP 两个基本特征中一个或两个发生明显变异。本研究中患者是第一例在中国 FOP 患者中被发现的 c.1067 G>A(G356D)杂合错义突变,该患者具有呈超经典型 FOP 表现:先天性大脚趾畸形,先天性双手拇指、食指远端关节僵直和进行性异位骨化。这些与典型 FOP 不同的临床表现很可能是该特殊突变引起。

ACVR1/ALK2 是 BMP 的 I 型受体的亚型之一,通过以下方式影响 BMP 的表达。BMP II 型受体与配体结合后,结构性活化的 II 型受体使 I 型受体的 GS 区域磷酸化,进而导致 I 型受体激酶活化;然后,激活的 I 型 BMP 受体磷酸活化细胞内信号通道蛋白(Smad,p38 MAPK 等),继而通过以上通道蛋白调控细胞转录的活性。而 FKBP12 可结合于未磷酸活化的 GS 环构象转变为抑制性楔形,形成一 "close" 结构并能稳定该结构进而抑制激酶活性;GS 磷酸活化使 FKBP12 与 T β R-I 结合位点关闭,并刺激其形成 Smad 等底物的结合位点,该构象改变使激酶能结合 ATP,形成一 "open" 结构激活 ACVR1 本身的活性^[9-11]。GS 是否磷酸活化对该激酶活性起着极其关键的作用。典型 FOP 患者其 ACVR1 突变位点(c.617G>A, p.R206H)位于 GS 区内,其突变可导致 GS 磷酸活化失衡,FKBP12 结合 GS 环上形成 "close" 结构作用减弱,而 GS 区结构性激活可促使其

与 Smad,p38 MAPK 等信号通道结合,刺激 ACVR1 表达,导致 BMP 异常过度活跃,而 BMP 具有促进骨骼发育和产生的作用,因而可促进异位骨化的发生。Olmsted EA 等已证实 BMP-4 mRNA 的表达量和 BMP-4 蛋白含量在 FOP 患者淋巴细胞和受损细胞中与正常对照组相比明显升高^[12]。p.G356D 定位于 ACVR1 的 kinase 区,蛋白质三维模拟模型分析发现该突变使 Lys235 和 Glu248 之间的离子对发生改变,进而影响其邻近的 α C 螺旋空间构象调节酶的活性^[13],可能是通过重新形成了新的离子对(Asp356)影响上述 close 和 open 之间的平衡,使 ACVR1 处于 open 状态不断激活,导致 ACVR1 活性改变并表现为 FOP 的临床表型。

目前尚无有效的预防和治疗 FOP 的方案,但发现 FOP 病因对诊断和治疗有重要价值。现主要预防措施是早期诊断及避免诱发异位骨化加重的刺激因素,如流感病毒感染、跌倒、局麻、活检和肌注等。手术虽可解除关节活动障碍,但可形成新的异位骨化,因此应避免手术。

FOP 发作早期有炎症浸润现象,可在发作 24 小时内应用皮质激素类药物,有助于减少早期阶段的炎症反应和组织肿胀,但停药后往往快速复发,亦无法阻止病变进展和新病灶出现^[14]。FOP 突发导致的肌肉水肿、纤维增生和血管形成等与肥大细胞中存储的化学物质释放有着密切关系,因此,可用肥大细胞抑制剂治疗。此外,还可用环氧合酶 2 抑制剂和非甾体抗炎药等治疗。二磷酸盐类药物具有抑制破骨细胞活性和减少破骨细胞寿命的功能,有文献报道其还有抑制病灶内血管生成、促进成骨细胞凋亡和抑制骨小结形成等功能^[15],可用于治疗

FOP。张克勤^[6]等用阿伦膦酸钠治疗经典型 FOP 一个月后全身疼痛和浮肿逐渐消退,治疗 6 个月后双手掌指关节、指间关节、双膝关节和双腕关节活动度有不同程度的好转,腹部皮下包块不断缩小。上述方法因绝大部分未设立对照而缺乏统计学说服力,疗效亦不肯定。

FOP 由错义杂合突变导致 ACVR1/ALK2 结构功能改变,这为治疗提供了一个特定的药物靶标和可干预的关键信号通路。Yu PB 等^[7]已证实抑制小鼠 BMP I 型受体能减少异位骨化和功能损害。因此,抑制 RNA 转录、ACVR1/ALK2 的单克隆抗体直接拮抗和 ACVR1/ALK2 的选择性小分子信号转导抑制剂(STIs)可能成为治疗 FOP 的有效方法。

总之,本论文报道国内一例新型的 ACVR1 突变(p.G356D)导致 FOP 的病例。该突变可能是与 p.R206H 突变导致的典型 FOP 的临床表现不同的主要原因。此新突变的发现对我们进一步认清该病、早期确诊、后续预防及治疗、临床遗传咨询等可提供一定的帮助。

参考文献(References)

- [1] Groppe JC, Shore EM, Kaplan FS. Functional modeling of the ACVR1 (R206H) mutation in FOP [J]. Clin Orthop Relat Res, 2007, 462: 87-92
- [2] Shore EM, Feldman GJ, Xu M, et al. The genetics of fibrodysplasia ossificans progressive [J]. Clin Rev Bone Miner Metab, 2005, 3: 201-204
- [3] Reining JW, Hill SC, Fang M, et al. Fibrodysplasia ossificans progressive [J]. Radiology, 1986, 159:153-157
- [4] Kaplan FS, Glaser DL. Thoracic insufficiency syndrome in patients with fibrodysplasia ossificans progressive [J]. Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism, 2005, 3:213-216
- [5] Shore EM, Xu M, Feldman GJ, et al. A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressive [J]. Nat Genet, 2006, 38:525-527
- [6] Kaplan FS, Xu M, Seemann P, et al. Classic and atypical fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) phenotypes are caused by mutations in the bone morphogenetic protein (BMP) type I receptor ACVR1 [J]. Hum Mutat, 2009, 30 (3):379-390
- [7] Petrie KA, Lee WH, Bullock AN, et al. Novel Mutations in ACVR1 Result in Atypical Features in Two Fibrodysplasia Ossificans Progressiva Patients [J]. PLoS ONE, 2009, 4(3): 5005
- [8] Furuya H, Ikezoe K, Wang L, et al. A unique case of fibrodysplasia ossificans progressiva with an ACVR1 mutation, G356D, other than the common mutation (R206H) [J]. Am J Med Genet A, 2008, 146: 459-463
- [9] Chen YG, Liu F, Massague' J. Mechanism of TGF- β receptor inhibition by FKBP12 [J]. EMBO J, 1997, 16: 3866-3876
- [10] Huse M, Muir TW, Xu L, et al. The TGF- β receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch [J]. Mol Cell, 2001, 8: 671-682
- [11] Yamaguchi T, Kurisaki A, Yamakawa N, et al. FKBP12 functions as an adaptor of the Smad7-Smur1 complex on activin type I receptor [J]. J Mol Endocrinol, 2006, 36: 569-579
- [12] Olmsted EA, Kaplan FS, Shore EM. Bone morphogenetic protein-4 regulation in fibrodysplasia ossificans progressive [J]. Clinical Orthopaedics and Related Research, 2003, 408:331-343
- [13] Huse M, Kuriyan J. The conformational plasticity of protein kinases [J]. Cell, 2002, 109:275-282
- [14] Kaplan FS, Shore EM, Glaser DL, et al. The medical management of fibrodysplasia ossificans progressiva: current treatment considerations [J]. Clin Proc Intl Clin Consort FOP, 2003, 1 (2):1-72
- [15] Idris AI, Rojas J, Greig IR, et al. Aminobisphosphonates cause osteoblast apoptosis and inhibit bone nodule formation in vitro [J]. Calcif Tissue Int, 2008, 82: 191-201
- [16] 张克勤,张伟,张晓乐,等.阿伦膦酸钠治疗进行性骨化性肌炎一例报告[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2010, 3(1): 23-27
Zhang Ke-qin, Zhang Wei, Zhang Xiao-le. A case of fibrodysplasia ossificans progressiva treated by alendronate [J]. Chinese Journal of Osteoporosis and Bone Mineral Research, 2010, 3(1): 23-27
- [17] Yu PB, Deng DY, Lai CS, Hong CC, Cuny GD, et al. BMP type I receptor inhibition reduces heterotopic ossification [J]. Nat Med, 2008, 14:1363-1369