

进行性骨化性纤维增殖不良症临床及 ACVR1 基因 c.774G>C 突变分析

张菀姣,张 伟,张克勤*

(南京医科大学第一附属医院内分泌科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究 1 例具有非典型临床特征的进行性骨化性纤维增殖不良症(fibrodysplasia ossificans progressiva,FOP)患者,并对其致病基因活化蛋白/促激蛋白 A 受体 1 (activin A type 1 receptor,ACVR1)进行突变分析。方法:根据患者大脚趾轻微畸形和进行性异位骨化等临床表现,结合骨骼系统放射线检查、骨 ECT 和相关血液生化检查进行临床诊断。采集患者、患者父母和 60 位正常人外周血,提取基因组 DNA,对 ACVR1 基因全部外显子进行聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)扩增和序列分析;对突变后的蛋白质结构进行分子模拟以便评估其突变后的功能改变。结果:患者具有非典型的临床表现:先天性大脚趾轻微畸形和进行性非经典顺序的异位骨化,其父母无 FOP 相关临床表现。患者的 ACVR1 第 5 外显子存在 c.774 G>C (R258S)杂合突变,而其父母和正常对照组均无此杂合突变。此外,患者和所有正常人都存在 c.690 G>A(E230E),此为无意义突变。三维蛋白质分子模拟发现 R258 与高度保守的甘氨酸-丝氨酸(glycine-serine,GS)活化区邻近,该突变可能导致 ACVR1 与 ACVR1 的抑制蛋白 FK506 结合蛋白 12(FK506 binding protein 12,FKBP12)结合的亲和力降低,进而对 ACVR1 抑制作用降低。结论:典型 FOP 均在 ACVR1 之 GS 区发生突变,而本例 FOP 在 ACVR1 激酶区发生突变,这可能是该患者在临床表现呈非典型的原因。该结果有助于我们更好地去理解 FOP 表型和基因型之间的关系。

[关键词] 进行性骨化性纤维增殖不良症;活化蛋白/促激蛋白 A 受体 1;异位骨化;突变

[中图分类号] Q754

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)01-062-05

A novel mutation c.774G>C in the ACVR1 gene causes fibrodysplasia ossificans progressiva in one Chinese patient

ZHANG Wan-jiao,ZHANG Wei,ZHANG Ke-qin*

(Department of Endocrinology,the First Affiliated Hospital of NJMU,Nanjing 210029,China)

[Abstract] **Objective:** Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) is a rare and disabling genetic condition of congenital skeletal malformations and progressive heterotopic ossification (HO), associated with the mutation in the activin A type 1 receptor / activin-like kinase 2 (ACVR1/ALK2) gene. The purpose of this study was to report one FOP patient with atypical clinical findings and to identify the genetic entity. **Methods:** Clinical diagnosis was based on physical examination, radiological findings and biochemical tests. For mutation detection, the blood samples from the FOP patient, his parents and 60 normal controls 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 sequenced directly with the cycle sequencing methods. Then we generated the three-dimensional model of protein structure for the cytoplasmic domain of the R258S in ACVR1 to evaluate its receptor function. **Results:** The patient had congenital minimal malformations of the great toes and radiographic evidence of heterotopic ossification at the time of evaluation. The process of heterotopic bone formation was a mild course and did not follow the typical temporal and spatial patterns. Analysis of ACVR1 gene revealed that the patient had a heterozygous missense mutation, c.774 G>C(R258S), which is located in the kinase domain of ACVR1. We also find that all the people, including the patient, the parents and 60 normal controls, occurred nonsense mutation, c.690 G>A(E230E). In the protein modeling, ARG258 and SER194 can form the H-bonds. When the ARG258 is substituted by SER, the H-bonds are lost, so the α GS1 and the α C helix conformations do shift and make ACVR1 into an "open" conformation and constitutively activated. **Conclusion:** Most patients showing typical FOP phenotypes have the heterozygous c.617G>A(R206H) mutation belonging to the GS domain of ACVR1. Our report describes a patient affected with FOP showing mild progressive symptoms, and these atypical FOP phenotypes

[基金项目] 医院引进人才基金(303070060NA05)

*通讯作者, E-mail: keqzhang2007@126.com

may associate with a novel mutation (c.774 G>C), affecting a conserved residue of the ACVR1 kinase domain. Our findings make the relations between phenotypes and genotypes of FOP better understood.

[Key words] fibrodysplasia ossificans progressiva; activin A type 1 receptor gene; heterotopic bone formation; mutation

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(1): 062-066]

进行性骨化性纤维增殖不良症 (fibrodysplasia ossificans progressiva, FOP), 亦称进行性骨化性肌炎, 是一种最罕见的散发性先天性疾病或常染色体显性遗传病, 特征为筋膜、韧带、肌腱、关节囊及骨骼肌间隙中结缔组织进行性骨化, 导致关节活动受限、功能丧失, 多合并特殊骨骼畸形 (主要是拇趾短而大、外翻)。其发病率约为 1/200 万, 无种族、性别、地域等差异^[1-2]。

2006 年 Shore 等^[3]成功地将 FOP 致病基因定位于 2q23-24, 典型患者系骨形态发生蛋白 (Bone morphogenetic protein, BMP) I 型受体亚型 ACVR1 基因发生了 C.617G>A 突变 (206 位精氨酸 R→组氨酸 H), 该位点位于高度保守的甘氨酸-丝氨酸 (glycine-serine, GS) 活化区。随后 Kaplan FS 等^[4]通过 DNA 序列分析研究 104 位散发性 FOP 患者, 其中所有经典型 FOP (84 人) 和大多数超经典型 FOP (6 人) 都存在 ACVR1 的 GS 区杂合性突变 (R206H; CGC→CAC), 致使精氨酸突变为组氨酸。少数超经典型 FOP (2 人) 和全部变异型 FOP (12 人) 杂合突变位于 ACVR1 其他位点, 但所有 FOP 患者的突变位点都定位于或邻近 GS 调节区域或激酶活性部位。到目前为止, 在 FOP 患者中已发现 c.605G>T, c.619 C>G, c.982 G>A, c.982 G>C, c.982 G>T, c.983 G>A, c.1067 G>A, c.1124 G>C, c.590-592 del CTT 等突变^[4-6]。

本文报道 1 例具有非典型临床表现的中国 FOP 患者, 其在 ACVR1 第 5 外显子 c.774 G>C 发生杂合错义突变, 该突变为国内第 1 次报道。我们对其临床表现、基因突变及蛋白质分子模型进行了分析。

1 对象和方法

1.1 对象

患者, 男, 20 岁, 汉族, 中国浙江人, 具有先天性双踝趾轻微畸形和进行性异位骨化。家族成员无 FOP 相关临床表现。患者 7 岁时自觉两侧膝盖疼痛, X 线示双侧膝盖内有软骨瘤, 并行右膝手术治疗。手术后右膝关节固定活动受限, 左膝关节活动不受影响。患者 14 岁时摔伤后背部出现肿块, 红、热、痛稍有消退后, 肿块逐渐变硬。现在患者颈部、

右膝、双髋关节活动均受限, 背部遗留下硬团块。根据患者临床表现, 病史及相关检查, 我们确诊其为 FOP。所有的检查在完成前已获患者及其家属的知情同意。

1.2 方法

1.2.1 常规辅助检查

血清钙、磷检测用全自动生化分析仪 Olympus AU5400 (Olympus 公司, 日本); 全分子甲状旁腺素 (parathyroid hormone, PTH) 检测用 Unicel DXI800 (Bechman Coulter 公司, 美国); 氨基端中段骨钙素 (N-terminal middle osteocalcin, N-med OC) 检测用 Roche E170 (Roche 公司, 美国); 骨骼系统 X 线片检查用 KODAK DirectView DR7500 System (KODAK 公司, 美国)。

1.2.2 DNA 提取

用 TIANamp Genomic DNA Kit (离心柱型, 目录号: DP304) 提取患者及其父母外周静脉血中基因组 DNA, 并测其光密度值和浓度。合成引物: 根据 Shore^[3] 合成 ACVR1 基因全部外显子的上、下游引物 (由上海 Invitrogen 公司合成)。

1.2.3 基因扩增

反应体系包括 2×Taq premix (上海申能博彩生物公司) 缓冲液 25 μl, 上、下游引物 (由上海 Invitrogen 公司合成) 各 2 μl, 模板 DNA 200 μg, 加双蒸水至总体积为 50 μl。在美国 PTC-200 热循环仪上进行 PCR。反应条件为: 预变性 95℃ 5 min, 变性 95℃ 30 s, 退火 (第 1、4 外显子 58℃; 第 2 外显子 56℃; 第 3 外显子 68℃; 第 5、7 外显子 57℃; 第 6 外显子 64℃; 第 8、9 外显子 53℃ 30 s), 72℃ 延伸 45 s, 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min。

1.2.4 PCR 产物鉴定及纯化

PCR 产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定, 用上海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 Invitrogen 公司进行正向和反向测序。然后将所得测序结果与正常序列进行对比, 为了确保该突变是特异性存在的, 我们亦对 60 位非 FOP 正常对照的基因进行测序分析。

1.2.5 蛋白质分子模拟

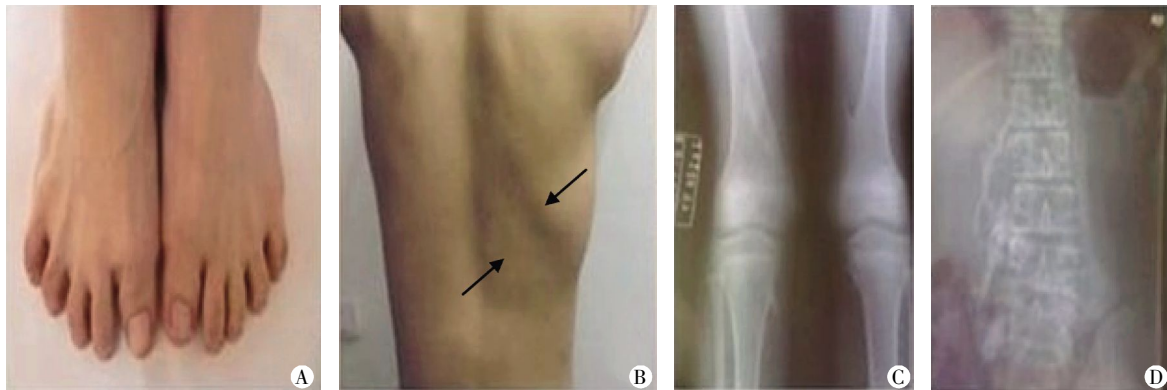
同源蛋白质分子模板来自于结合 FK506 结合蛋白 12 (FK506 binding protein 12,FKBP12) 的 TGFβ(transforming growth factor β) I 型受体激酶 (PDBID:3H9R),这个 TGFβ 受体区与 ACVR1 具有相同的调节机制和相似的基因序列 (66%同源),且二者进行序列对比是没有插入或缺失碱基。由此创建该突变模型,然后用 Swiss Model program^[7]进行能量最小化和 PYMOL^[8]进行结构可视化分析,并对该

突变及其邻近的残基侧链异构体进行了优化。

2 结果

2.1 常规辅助检查结果

体格检查发现患者先天性双踝趾轻微缩短,但无外翻畸形,其背部存留两处团块状硬结,颈部、右膝、双髋关节活动均受限。股骨及脊柱 X 线片提示广泛异位骨化形成(图 1)。



A: 双踝趾轻微缩短,无外翻畸形;B: 背部硬结(箭头所示);C: 股骨 X 线检查示异位骨化;D: 脊柱 X 线检查示广泛异位骨化。

图 1 患者的临床表现

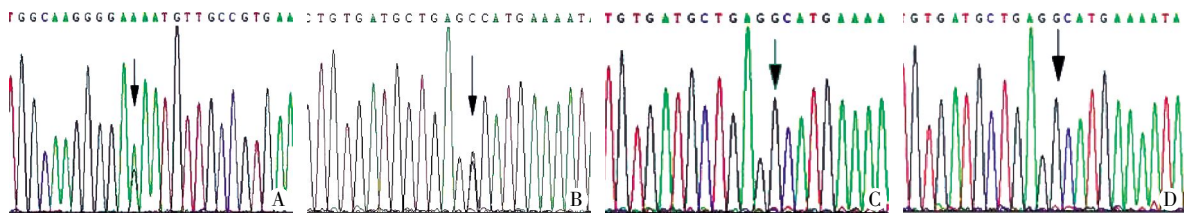
Figure 1 Clinical manifestations of patient

患者血生化结果:血清总钙、磷、甲状旁腺素、骨钙素均在正常范围值,碱性磷酸酶稍高于正常水平,具体数值如下:N-mid OC:36.4 μg/L (11~43 μg/L),钙:2.62 mmol/L(2.15~2.65 mmol/L),磷:1.32 mmol/L(0.86~1.86 mmol/L),甲状旁腺素:57.6 pg/ml(10~88 pg/ml),血沉:8 mm/h(0~20 mm/h),C 反应蛋白:3.19 mg/L(0~10 mg/L),谷丙转氨酶:24.6 U/L(0~45 U/L),谷草转氨酶:24.6 U/L(0~45 U/L),碱性磷酸酶:220 U/L(40.0~150.0 U/L),尿素氮:4.19 mmol/L(2.9~7.2

mmol/L),肌酐:54.4 mmol/L(44~136 mmol/L),白蛋白:46.5 g/L(35~50 g/L),球蛋白:25.4 g/L(25~40 g/L)。

2.2 测序结果

患者及其父母和对照组仅在 ACVR1 第 5 外显子发现突变,其余外显子未发现突变。三者在 ACVR1 第 5 外显子 c.690 G>A (E230E)发生无意义突变;但患者在 c.774 G>C (R258S)还存在一个杂合突变,而其父母和对照组无此杂合突变(图 2)。



患者 ACVR1 第 5 外显子通过基因测序证实存在(A)c.690 G>A 和(B)c.774 G>C 杂合突变。患者父母(C和D)ACVR1 第 5 外显子 c.774 未发现突变位点。

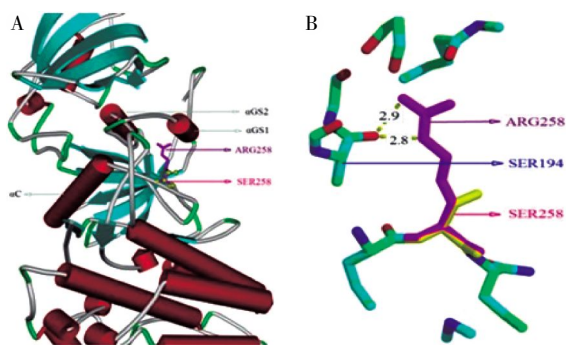
图 2 患者及患者父母 ACVR1 第五外显子基因测序结果

Figure 2 DNA sequencing of the ACVR1 gene in the patient and patient's parents

2.3 蛋白分子模拟

ACVR1 和 TGFβI 型受体是同源蛋白,晶体结构高度相似。ARG258 残基紧邻 αGS1 和 αC 螺旋,且 ARG258 与 SER194 残基之间形成氢键,发生突变(R258S)时,SER258 取代 ARG258,氢键消失(图

3)。患者的突变位点(E230E 和 R258S)位于 ACVR1 的激酶区,而传统的突变位点(R206H)位于 GS 区(图 4)。同源对比分析表明 ACVR1 之 R258 残基在脊椎动物中为高度保守氨基酸(图 5)。



A: 突变的 ACVR1 三维模型与 TGFβ I 型受体激酶 (PD BID: 3H9R) 结构相似, 粉色表示 ARG258 残基, 黄色表示 SER258 突变区; B: 图 A 的局部放大。ARG258 与 SER194 之间形成两个氢键, 发生突变后, ARG258 (粉色) 被 SER258 (黄色) 取代, 氢键消失。

图 3 ACVR1 蛋白局部三维模拟图

Figure 3 The three-dimensional model structure of the ACVR1 protein

3 讨论

这是国内第 1 例报道存在 c.774 G>C (R258S) 杂合突变的 FOP 患者, 其临床表现与典型 FOP 有所不同。典型 FOP 患者具有两个基本特征: 先天性双跖趾畸形和进行性异位骨化^[3], 即患者在出生时即有双侧拇趾的缩短和外翻; 异位骨化常呈自发性, 按从上到下、背部到腹侧、从中轴到四周发展, 并进行性加重^[9]。而该患者不典型的临床表现有: 双侧跖趾无外翻, 仅有轻度缩短, 病程中没有明显的自发性包块出现, 临床进展较缓慢, 而且全身肿块发生的顺序也与典型病例不符, 该患者首先是双膝内发生异位骨化。这些与典型 FOP 不同的临床表现很可能是由该特殊突变引起的。由于患者病程中没

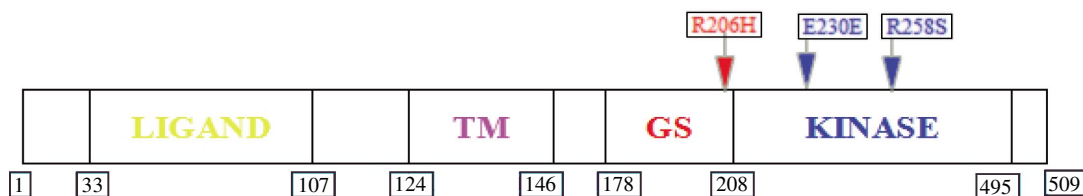


图 4 ACVR1 蛋白主要结构区

Figure 4 A schematic of ACVR1 domain organization

R258S	241	DEKSWFRETELYNTVMLR	HENILGF	IASDM	TSRHS	STQL	WL	LITHY	HEMGS	LYD	293
<i>Homo sapiens</i>		DEKSWFRETELYNTVMLR	HENILGF	IASDM	TSRHS	STQL	WL	LITHY	HEMGS	LYD	
<i>Mus musculus</i>		DEKSWFRETELYNTVMLR	HENILGF	IASDM	TSRHS	STQL	WL	LITHY	HEMGS	LYD	
<i>R. Norvegicus</i>		DEKSWFRETELYNTVMLR	HENILGF	IASDM	TSRHS	STQL	WL	LITHY	HEMGS	LYD	
<i>M. Mulatta</i>		DEKSWFRETELYNTVMLR	HENILGF	IASDM	TSRHS	STQL	WL	LITHY	HEMGS	LYD	
<i>C. Familiaris</i>		DEKSWFRETELYNTVMLR	HENILGF	IASDM	TSRHS	STQL	WL	LITHY	HEMGS	LYD	
<i>B. Taurus</i>		DEKSWFRETELYNTVMLR	HENILGF	IASDM	TSRHS	STQL	WL	LITHY	HEMGS	LYD	
<i>G. Gallus</i>		DEKSWFRETELYNTVLLR	HENILGF	IASDM	TSRNS	STQL	WL	LITHY	HENGSL	LYD	
<i>Danio rerio</i>		DEKSWFRETEIYNTVLLR	HENILGF	IASDM	TSRNS	STQL	WL	LITHY	HENGSL	LYD	
<i>F. Rubripes</i>		DEKSWFRETEIYNTVLLR	HENILGF	IASDM	TSRNS	STQL	WL	LITHY	FQEMGS	LYD	
<i>C. elegans</i>		DEPAFHKETEIFETRMLR	HPNVL	RYIG	SDRVD	TG	FTLV	TEYHP	SGSL	LHD	

图 5 ACVR1 的同源对比分析结果

Figure 5 Orthology comparison of ACVR1 among vertebrate species

有自发性炎症包块出现, 临床上很难与创伤后骨化性肌炎鉴别, 所以对本例患者的基因分析具有确诊价值。

ACVR1/ALK2 是 BMP 的 I 型受体的亚型之一, 与 TGFβ I 型受体激酶为同源蛋白, 分子结构高度相似。ACVR1 共分 4 部分, 即配体区、TM、GS、激酶区, 其中 GS 区是磷酸活化位点并呈螺旋状样结构, 而传统突变位点 R206 正位于 ACVR1 的 GS 区。未磷酸活化的 GS 可与 FKBP12 结合, 形成一“close”结构, 并能稳定该结构进而抑制激酶活性。当发生 R206H 突变时, 磷酸活化的 GS 使 FKBP12 的结合位点关闭, 并形成一“open”结构, 这一构象的

改变可使激酶结合 ATP, 继而活化细胞内信号通道蛋白 (Smad, p38 MAPK 等), 通过以上通道蛋白调控细胞转录的活性最终影响 BMP 表达^[10-14], 所以 R206H 突变可能通过以上途径直接持续性激活 ACVR1/ALK2 的活性。本文中新的突变位点 R258S 位于 ACVR1 激酶区, 其作用机制与 R206H 不同, 不太可能直接影响 GS 环而发挥作用。在蛋白质三维模拟模型中, R258S 突变位点与 GS 环邻近, 尤其是 αGS1 (图 3A), 且 R258 未突变前其与 SER194 形成氢键 (图 3B), 而当此位点发生突变 (R258S) 时, 氢键会消失, 进而使 αGS1 和 αC 螺旋之间的一系列局部电位发生改变, 这些改变可能降低 GS 与

FKBP12 的亲合力,使 ACVR1 形成一“open”结构持续被激活。因此,以上两种突变通过不同机制引起了 ACVR1 这一受体活动的异常改变,故而可能导致 FOP 不同的临床表现。同源对比分析表明各脊椎动物的 ACVR1 都具有 R258 氨基酸,这些证明 R258 为高度保守氨基酸。以上高度提示 R258S 是该病的致病原因。

目前尚无治疗 FOP 的特效方法。主要采取的预防措施是早期诊断和避免导致异常骨化加重的刺激因素,如流感样病毒感染、跌倒、局麻、活检、肌注和手术。糖皮质激素可缓解急性期疼痛、组织肿胀等炎症反应,但不能长期服用,亦无法阻止病变进展和新病灶出现^[15]。近年来发现二膦酸盐类药物具有抑制 BMP,促进成骨细胞凋亡和抑制病灶内血管生成和骨小结形成等功能^[16],可用于治疗 FOP。此外,还有基因治疗、骨髓干细胞移植、肥大细胞抑制剂、环氧化酶抑制剂联合 NsAIDs、BMP 拮抗剂等治疗方法也曾被用于试验性治疗 FOP,但绝大部分未设立对照而缺乏统计学说服力,疗效也不肯定。

FOP 患者因基因突变导致 ACVR1/ALK2 结构、功能发生改变,以及 BMP 信号转导途径异常,这为今后的治疗提供了新的靶点。因此,抑制 ACVR1/ALK2 基因的 RNA 转录和蛋白表达,或应用特异性信号转导抑制剂可能成为治疗 FOP 的有效方法。

总之,本文报道了国内第 1 例 ACVR1 新型突变 R258S 导致 FOP 的病例,该特殊的突变位点可能是其发生不典型异位骨化和轻微的踇趾畸形这种非典型临床表现的原因。该新突变的发现为进一步了解 FOP 的病因、发病机制及临床早期诊断和治疗提供了帮助。

[参考文献]

[1] Shore EM,Feldman GJ,Xu M,et al. The genetics of fibrodysplasia ossificans progressive [J]. Clin Rev Bone Miner Metab,2005,3:201-204
 [2] Reining JW,Hill SC,Fang M,et al. Fibrodysplasia ossificans progressive [J]. Radiology,1986,159:153-157
 [3] 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(5):525-527
 [4] 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
 [5] 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
 [6] 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(4):459-463
 [7] Eswar N, Eramian D, Webb B, et al. Protein structure modeling with MODELLER. [J]. Methods Mol Biol, 2008, 426:145-159
 [8] Seeliger D, De Groot B.L. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vin [J]. Comp. Aided Mol. Des, 2010, 24(5):417-422
 [9] Kaplan FS, Xu M, Glaser DL, et al. Early Diagnosis of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva [J]. Pediatrics, 2008, 121(5):e1295-300
 [10] Fukuda T, Kohda M, Kanomata K, et al. Constitutively activated ALK2 and increased smad1/5 cooperatively induce BMP signaling in fibrodysplasia ossificans progressiva. [J]. Biol Chem, 2009, 284(11):7149-7156
 [11] Fiori J L, Billings PC, Pena LS, et al. Dysregulation of the BMP p38 MAPK signaling pathway in cells from patients with fibrodysPlasia ossificans progressive (FOP)[J]. Bone Miner Res, 2006, 21(6):902-909
 [12] Song G.A, Kim H.J, Woo K.M, et al. Molecular consequences of the ACVR1R206H mutation of fibrodysplasia ossificans progressiva [J] J Biol Chem, 2010, 285(29):22542-22553
 [13] Groppe JC, Wu J, Shore EM, et al. In vitro analyses of the dysregulated R206H ALK2 kinase-FKBP12 interaction associated with heterotopic ossification in FOP [J] Cells Tissues Organs, 2011, 194(2-4):291-295
 [14] Groppe JC, Shore EM, Kaplan FS. Functional Modeling of the ACVR1 (R206H) Mutation in FOP [J]. Clin Orthop Relat Res, 2007, 462:87-92
 [15] 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, 2001, 2:1-72
 [16] 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(3):191-201

[收稿日期] 2011-09-13