

· 论著 ·

4例软骨发育不全患者FGFR3基因突变检测*

1. 济南大学, 山东省医学科学院医学与生命科学学院 (山东 济南 250200)
2. 山东省罕见病重点实验室, 山东省医药生物技术研究中心, 山东省医学科学院
(山东 济南 250062)

尹小丽^{1,2} 鲁艳芹² 代运章^{1,2} 张 遥^{1,2} 马 翔^{1,2} 韩金祥²

【摘要】目的 对4例临床诊断为软骨发育不全(ACH)患者进行成纤维细胞因子受体3(FGFR3)基因突变检测。**方法** 提取4例患者及父母外周血DNA, 设计FGFR3基因外显子10的引物序列, 应用聚合酶链反应(PCR)扩增, 并对扩增产物进行测序, 通过Mutation Survey软件分析突变位点。**结果** 4例ACH患者均存在FGFR3基因第10外显子1138位点G>A碱基转换, 导致FGFR3的第380位氨基酸由甘氨酸(Gly)变为精氨酸(Arg)。**结论** FGFR3基因10号外显子c. 1138G>A的杂合突变是造成ACH的主要致病原因, FGFR3基因突变检测为产前基因诊断提供了实验依据。

【关键词】 软骨发育不全; 成纤维生长因子受体3(FGFR3); 基因突变

【中图分类号】 R681.3

【文献标识码】 A

【基金项目】 山东省重大关键技术 (2016ZDJS07A10)

DOI: 10.3969/j.issn.1009-3257.2018.02.001

Detection FGFR3 Gene Mutation in Four Achondroplasia Patients*

YIN Xiao-li, LU Yan-qin, DAI Yun-zhang, et al., School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan-Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250022, Shandong Province, China

[Abstract] **Objective** To detect the fibroblast growth factor receptor3(FGFR3) mutation in 4 patients with achondroplasia (ACH).

Methods Whole genomic DNA was extracted from peripheral blood of 4 ACH patients and their parents. Exon 10 of FGFR3 gene was amplified by PCR and then was sequenced by traditional Sanger sequencing. Sequencing results was analyzed by Mutation survey software. **Results** Substitution of c.1138 G>A (Gly 380Arg) in FGFR3 was found in all 4 ACH patients. **Conclusion** As reported, The G>A transition mutation at nucleotide position 1138 in exon 10 of FGFR3 gene is the main cause of achondroplasia. Mutation detection of FGFR3 gene provides an experimental basis for prenatal gene diagnosis.

[Key words] Achondroplasia; Fibroblast Growth Factor Receptor3 gene(FGFR3); Genetic Diagnosis

软骨发育不全(achondroplasia, ACH)是人类遗传性侏儒症中最常见的形式, 呈常染色体显性遗传, 外显率100%。该病患病率为1/15000~1/77000, 其中80%~90%的患者是散发病例, 为新生突变, 与父亲的年龄较大有关^[1]。ACH患者的临床表现特殊, 典型表现为不成比例的身材矮小, 四肢粗短, 头颅大, 前额与顶骨圆凸, 手指短小且呈“三叉戟”样, 面部发育不良, 腰椎前凸, 弓形腿, 但智力正常等^[2]。1994年ACH的致病基因被定位于染色体4p16.3^[3]; 随后Shaing与Rousseau等^[4-5]研究发现成纤维细胞生长因子受体3(Fibroblast growth factor receptor 3, FGFR3)基因跨膜区第10号外显子1138位核苷酸的突变是该病的主要致病原因。随着国内外对FGFR3基因突

变导致ACH的相关报道, 发现其中有超过95%的ACH患者存在FGFR3基因1138位核苷酸G→A的转换, 少数ACH患者为G→C的颠换, 这两种错义突变都导致FGFR3第380位甘氨酸由精氨酸取代(G380R), 使跨膜区结构发生改变, 引起FGFR3功能在无依赖配体情况下持续激活, 最终使软骨细胞增生分化受到抑制^[6]。本研究通过基因测序对4例ACH患者及其父母进行FGFR3基因突变分析, 进一步了解中国人群中ACH患者的基因突变情况。

1 资料与方法

1.1 研究对象 4例患者均来自天津市武清区人

民医院儿骨科, 其中3例男性, 1例女性, 年龄在2~3岁, 平均身高70cm, 体重11kg。4例患者的临床表现和X线检查均符合ACH诊断标准, 都属于散发病例, 其父母均为正常人, 没有家族遗传史。

1.2 全血基因组DNA提取与PCR扩增 在患者知情并同意的基础上, 经山东省医学科学院伦理委员会批准后, 抽取4例患者及父母外周血5ml。全血基因组DNA采用OMEGA试剂盒提取。FGFR3基因外显子10上下游引物序列分别为: 5'-TCACTGGCGTTACTGACTGC-3'和5'-ACCCTAGGCTCTACATGGTGA-3'。扩增产物长度为508bp。PCR扩增(TaKaRaTaqTM)反应体系为40ul, 其中包括10×PCR Buffer 4ul, 2.5mM dNTP 3.2ul, 5U/ulrTaq DNA聚合酶0.2ul, 上、下游引物各3.2ul, DNA模板100ng, 无菌水补足至40ul。PCR反应程序为95℃预变性5min; 94.5℃变性20s, 62℃退火20s, 72℃延伸40s, 此过程为40个循环; 最后72℃延伸5min。

1.3 PCR产物的凝胶电泳与序列分析 PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳, 获得目的带后, 交由北京华大基因公司测序。突变位点采用Chromos与Mutation Surveyor V4.0.6软件分析。

2 结果

PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果见图1, 4例患者均出现了单一目的条带508bp。FGFR3基因10号外显子c.1138G>A的杂合突变, 该突变导致380位的甘氨酸(Gly)转变为精氨酸(Arg), 而患者父母均未发现突变位点, 表明其父母为正常人(图2)。

3 讨论

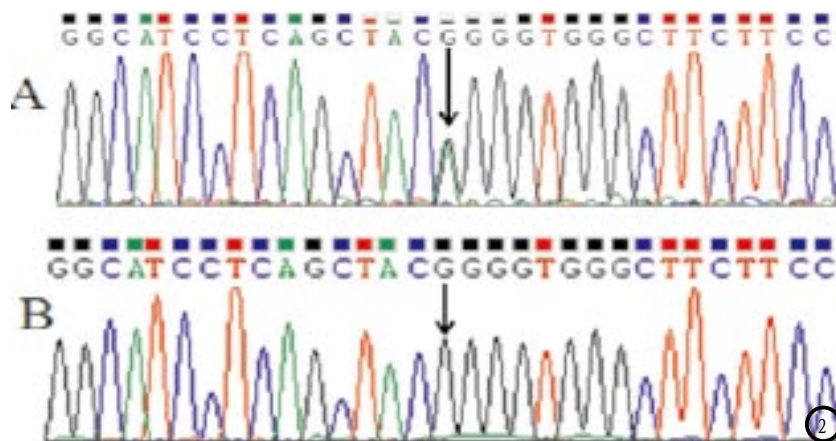
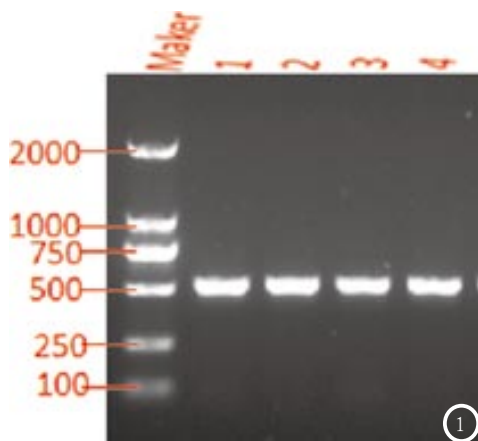


图1 9例ACH患者PCR扩增电泳图。图2 测序结果A图: 4例患者检测出FGFR3第10号外显子c.1138 G>A的杂合突变; B图: 正常人对照; 箭头所指为突变位点。

ACH是由于软骨内成骨缺陷而导致软骨发育异常的一种罕见疾病, 其临床诊断主要通过患者的临床特征、影像学检查以及家族遗传史等, 而FGFR3基因突变是导致ACH的主要致病原因。FGFR3属于成纤维细胞生长因子受体(Fibroblast growth factor receptors, FGFRs)家族成员之一, 基因全长约16.5kb, 包含有19个外显子, 编码806个氨基酸残基^[7], 其中第10号外显子编码疏水跨膜区。作为具有发育调节等功能的跨膜糖蛋白, FGFR3的结构由细胞外糖基化的配体结合区、疏水跨膜区和细胞内酪氨酸激酶催化区3个部分组成, 其中胞外区包含3个免疫球蛋白结构域(Ig I~III); 胞内区包括2个酪氨酸激酶功能域(TK1和TK2)^[1,8]。

FGFR3也是一种酪氨酸激酶受体, 主要在骨细胞、脑、肺和脊髓等部位表达, 是软骨内成骨生成的负性调节因子^[9]。FGFR3突变可以导致软骨发育不全(ACH)、季肋发育不全(HCH)、致死性骨发育不全(TD)、严重软骨发育不良伴发育迟缓和黑棘皮症(SADDAN)和Muenke颅缝早闭等多种骨骼缺陷性疾病, 其中95%以上的软骨发育不全患者由FGFR3的功能增强型突变引起^[10-11]; 而FGFR3的功能丧失会产生先天性指屈曲、高身材、脊柱侧凸和听力丧失综合征^[12]。Deng等通过FGFR3基因敲除小鼠(FGFR3^{-/-})和Chen等利用基因敲入技术模拟人ACH的FGFR3G369C/+突变小鼠模型的研究都提示FGFR3抑制软骨的形成, 是长骨软骨生成的负性调节因子, 其作用过程主要是通过影响软骨细胞的增生和分化来实现的, 这也进一步说明人类ACH是由于FGFR3激活突变引起的^[13]。目前认为, FGFR3主要通过STAT1和EPK-MAPK两条信号通路参与软骨细胞增殖和分化的调控, 但由于抑制这两条信号通路, 并不能完全缓解FGFR3突变所导致的侏儒表型,

提示尚其他的信号通路参与了对软骨发育异常的调控^[11, 14]。

迄今为止, 已经发现导致ACH的多种突变都位于FGFR3基因10号外显子的跨膜区, 其中95%以上的患者都存在1138位核苷酸G→A的转换, 少数为1138位核苷酸G→C的颠换, 这两种突变均使得380位密码子由甘氨酸变成精氨酸; 此外, 极个别为1123位G→T的颠换导致编码的第375位氨基酸由甘氨酸转变成半胱氨酸以及c. 1180A>T (p. Thr394Ser) 新的错义突变^[15], 这些点突变都会引起跨膜区结构发生变化, 进而引起FGFR3功能增强型突变抑制软骨细胞的增殖和分化, 长骨变短, 最终产生ACH表型。

ACH作为最常见的常染色体显性遗传侏儒症, 新生突变经常发生在父亲的等位基因上。如果夫妻双方均为ACH患者, 其后代中将有25%患有致死性纯合ACH的风险^[16]。本文通过对4例ACH患者进行FGFR3基因检测发现, 患者均存在1138位点G>A碱基转换, 导致FGFR3的第380位氨基酸由甘氨酸变为精氨酸, 而4例患者父母均为正常人且未检测出突变位点, 说明患者可能为新生突变或者由父亲精子细胞发生突变所致。该研究结果证实了中国人ACH患者基因突变与FGFR3基因1138位核苷酸G>A突变密切相关, 与国外文献报道的热点突变一致。ACH致病基因已基本明确, 而且存在极高频率的突变热点, 至今尚无有效的治疗方法。基因诊断是目前确定该疾病的重要方法, 不仅有助于ACH和疑似ACH患者做出明确诊断, 而且对于有ACH风险的胎儿可以通过产前基因诊断, 来降低患儿的出生, 实现优生的目的。

参考文献

- [1] Pehlivan S, Ozkinay F, Okutman O, et al. Achondroplasia in Turkey is defined by recurrent G380R mutation of the FGFR3 gene[J]. Turkish Journal of Pediatrics, 2003, 45(2): 99–101.
- [2] Aglan MS, Abdelaleem AK, Elkatoury AI, et al. Clinical, anthropometric, radiological and molecular characteristics of Egyptian achondroplasia patients[J]. Egyptian Journal of Medical Human Genetics, 2009, 10(1): 13–25.
- [3] Velinov M, Slaugenhaupt SA, Stoilov I, et al. The gene for achondroplasia maps to the telomeric region of chromosome 4p[J]. Nature genetics, 1994, 6(3): 314–317.
- [4] Bellus GA, Hefferon TW, Ortiz de Luna RI, et al. Achondroplasia is defined by recurrent G380R mutations of FGFR3[J]. American Journal of Human Genetics, 1995, 56(2): 368–373.
- [5] Rousseau F, Bonaventure J, Legeai-Mallet L, et al. Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia[J]. Nature, 1994, 371(6494): 252–254.
- [6] Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, et al. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia[J]. Cell, 1994, 78(2): 335–342.
- [7] Zhang SR, Zhou XQ, Ren X, et al. Ser217Cys mutation in the Ig II domain of FGFR3 in a Chinese family with autosomal dominant achondroplasia[J]. Chinese medical journal, 2007, 120(11): 1017–1019.
- [8] Perez-Castro AV, Wilson J, Altherr MR. Genomic Organization of the Human Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) Gene and Comparative Sequence Analysis with the Mouse Fgfr3 Gene[J]. Genomics, 1997, 41(1): 10–16.
- [9] Wang Y, Spatz MK, Kannan K, et al. A mouse model for achondroplasia produced by targeting fibroblast growth factor receptor 3[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(8): 4455–4460.
- [10] Reddy PL, Grewal RP. The G1138A mutation rate in the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) gene is increased in cells carrying the t (4; 14) translocation[J]. Genetics & Molecular Research Gmr, 2009, 8(2): 435–439.
- [11] 雷子贤. 软骨内PTEN基因特异性敲除对FGFR3功能增强型点突变所致软骨发育不全的影响及机制的初步研究[D]. 第三军医大学, 2009.
- [12] Xue Y, Sun A, Mekikian PB, et al. FGFR3 mutation frequency in 324 cases from the International Skeletal Dysplasia Registry[J]. Molecular genetics & genomic medicine, 2014, 2(6): 497–503.
- [13] 苏楠, 陈林. FGFR3在骨骼发育和疾病中作用的研究进展[J]. 国际遗传学杂志, 2006, 29(3): 222–225.
- [14] Murakami S, Balmes G, McKinney S, et al. Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype[J]. Genes & Development, 2004, 18(3): 290–305.
- [15] 李琳迪, 蓝丹, 杨湖, 等. 软骨发育不全与软骨发育低下家系的FGFR3基因突变分析[J]. 临床儿科杂志, 2014, 32(4): 384–387.
- [16] Satioglu-Tufan NL, Tufan AC, Semerci CN, et al. Accurate Diagnosis of a Homozygous G1138A Mutation in the Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Gene Responsible for Achondroplasia[J]. The Tohoku Journal of Experimental Medicine, 2006, 208(2): 103–107.