

遗传性凝血因子V缺乏症九例基因分析

张冬雷 薛峰 窦雪晴 刘晓帆 付荣凤 陈云飞 刘葳 贾玉娇 王玉华
肖志坚 张磊 杨仁池

中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所),实验血液学国家重点实验室,国家血液系统疾病临床医学研究中心,天津 300020

通信作者:杨仁池,Email:rcyang@ihcams.ac.cn

【摘要】 目的 分析9例遗传性凝血因子V(FV)缺乏症患者的临床表现及分子致病机制。方法 对1999年4月至2019年9月就诊于中国医学科学院血液病医院的9例遗传性FV缺乏症患者进行回顾性分析:应用活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)及FV促凝活性(FV:C)测定进行表型诊断;使用高通量靶向测序筛查F5基因变异,Sanger测序验证并分析双亲携带情况;Swiss-model进行三维结构分析,ClustalX-2.1软件进行同源保守性分析。结果 9例患者的FV:C为0.1~10.6 U/dl,其中8例患者有出血病史,以皮肤/黏膜出血最为多见(3例),其余1例未发生出血事件。所有患者中纯合子5例,复合杂合子4例,共检测到12个致病或疑似致病F5基因突变,其中c.6100C>A/p.Pro2034Thr、c.6575T>C/p.Phe2192Ser、c.1600_1601delinsTG/p.Gln534*、c.4713C>A/p.Tyr1571*和c.952+5G>C为首次报道。结论 该研究新发现的基因突变丰富了与遗传性FV缺乏症相关F5基因突变谱,高通量测序方法可以有效检测F5基因突变。

【关键词】 凝血因子V; F5基因; 突变; 高通量测序

基金项目:国家自然科学基金(81700115、81670118、81970121);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2016-I2M-1-002);天津市人才发展特殊支持计划(R018)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.04.006

Clinical and genetic analyses of hereditary factor V deficiency cases

Zhang Donglei, Xue Feng, Dou Xueqing, Liu Xiaofan, Fu Rongfeng, Chen Yunfei, Liu Wei, Jia Yujiao, Wang Yuhua, Xiao Zhijian, Zhang Lei, Yang Renchi

State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China

Corresponding author: Yang Renchi, Email: rcyang@ihcams.ac.cn

【Abstract】 Objective To analyze the clinical phenotype and molecular pathogenesis of nine patients with hereditary factor V (FV) deficiency. **Methods** Nine patients with hereditary FV deficiency who were admitted to the Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital from April 1999 to September 2019 were analyzed. The activated partial thromboplastin time, prothrombin time, and FV procoagulant activity (FV:C) were measured for phenotypic diagnosis. High-throughput sequencing was employed for the F5 gene mutation screening, Sanger sequencing was adopted to confirm candidate variants and parental carrying status, Swiss-model was used for three-dimensional structure analysis, and ClustalX v.2.1 was used for homologous analysis. **Results** The FV:C of the nine patients ranged from 0.1 to 10.6. Among them, eight had a hemorrhage history, with skin/mucosal bleeding as the most common symptom (three cases, 37.5%), whereas one case had no bleeding symptom. There were five homozygotes and four compound heterozygotes. A total of 12 pathogenic or likely pathogenic mutations were detected, of which c.6100C>A/p.Pro2034Thr, c.6575T>C/p.Phe2192Ser, c.1600_1601delinsTG/p.Gln534*, c.4713C>A/p.Tyr1571*, and c.952+5G>C were reported for the first time. **Conclusion** The newly discovered gene mutations enriched the F5 gene mutation spectrum associated with hereditary FV deficiency. High-throughput sequencing could be an effective method to detect F5 gene mutations.

【Key words】 Coagulation factor V; F5 gene; Mutation; High-throughput sequencing

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81700115, 81670118, 81970121);

CAMS Initiative Fund for Medical Sciences (2016-I2M-1-002); Tianjin Special Support Program for Talent Development (R018)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.04.006

人凝血因子V (FV)是一种由F5基因编码的高相对分子质量(约 330×10^3)单链糖蛋白,主要在肝脏合成。F5基因跨越大约80 kb,包含25个外显子,其cDNA长度约为6.9 kb,编码的前体蛋白切除28个氨基酸残基前导肽后形成2196个氨基酸组成的FV成熟蛋白,包含A1-A2-B-A3-C1-C2结构域^[1-2]。大约80%的FV蛋白作为可溶性蛋白存在于血浆中,浓度约为7 mg/L,约20%存在于血小板中^[3]。在正常凝血过程中,FV几乎没有内在促凝血活性,可以被凝血酶或活化FX (FXa)切割Arg709-Ser710、Arg1018-Thr1019和Arg1545-Ser1546三个肽键去除B结构域,转化为由105 kDa的重链(A1-A2结构域)和74 kDa(或71 kDa)的轻链(A3-C1-C2结构域)组成的活化FV (FVa)^[1,4]。FVa与FXa通过单个钙离子结合并组装在磷脂膜上形成凝血酶原复合物,催化凝血酶原转化为凝血酶,并且使凝血酶原的活化速率提高了近30万倍,FV缺乏会导致活化部分凝血时间(APTT)和凝血酶原时间(PT)均显著延长^[5]。

遗传性FV缺乏症由挪威血液学家Paul Owren于1947年首次报道^[6],是一种罕见的常染色体隐性遗传的出血性疾病,年发病率约为百万分之一^[7],常见临床表现为偶有鼻出血、易瘀伤、术后出血及女性月经过多,约有1/4的患者发生关节出血和血肿,而胃肠道出血和中枢神经系统出血相对罕见^[8]。1995年Murray等首次报道遗传性FV缺乏症的分子机制是由于定位于染色体1q24.2的F5基因发生突变^[9]。迄今为止,已有200多例FV缺乏症的病例报道,人类基因突变数据库(human gene mutation database, HGMD)共记录184个F5基因变异,其中以点突变导致的错义或无义突变最为多见,其次为小片段缺失和剪接突变。在本研究中,我们对9例遗传性FV缺乏症患者的临床表现和F5基因检测结果进行回顾性分析。

病例与方法

1. 病例:本研究纳入2017年4月至2019年5月就诊于中国医学科学院血液病医院的9例遗传性FV缺乏症患者(均为首次报道)。患者及家系成员均知情同意。

2. 凝血系统项目检测:APTT、PT、凝血酶时间

(TT)以及凝血因子活性于Sysmex CS5100全自动凝血分析仪上采用配套检测试剂盒(日本希森美康公司产品)进行检测。FV抑制物参照经典Bethesda法进行检测。

3. 基因测序:留取患者及父母静脉血液标本3~5 ml,采用DNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司产品)提取有核细胞基因组DNA,在Ion Torrent™ 测序平台(美国赛默飞世尔科技公司产品)完成高通量测序,过程如下:在Ion ampliseq™ designer平台设计76个基因扩增引物,F5基因覆盖度为100%;使用Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0试剂盒进行文库构建,然后在Ion OneTouch™ 2系统进行模板制备,最后在Ion proton测序仪完成测序;靶向区域平均测序深度>400×,其中测序深度≥100×的读段(reads)比例>90%。测序数据使用Torrent Suite Software v5.0分析,与人类参考基因组hg19进行比对后,采用人群数据库(1000Genome、gnomAD v2.1、ESP6500SI-V2和实验室自建数据库等)、功能性预测数据库(Mutation Taster、PolyPhen-2和SIFT等)以及疾病数据库(HGMD专业版、ClinVar)进行注释;根据2015年版美国医学遗传学与基因组学学会(ACMG)指南筛选致病变异或可能致病变异,并使用Sanger测序进行验证。

4. 生物信息学分析:使用ClustalX 2.1软件对人(NP_000121.2)、家鼠(NP_032002.1)、猕猴(XP_014980454.1)、犬(XP_005622605.1)、猪(NP_999285.1)、马(XP_023496283.1)、牛(NP_776304.1)、黑猩猩(XP_016787540.2)的FV蛋白进行同源比对,分析不同物种间氨基酸序列保守性;使用Swiss-Pdb Viewer v4.0.1软件分析突变前后由氨基酸变化引起FV蛋白模型(PDB ID:1Y61)空间结构的改变。

结 果

1. 一般资料及临床表现:9例患者中,男3例,女6例,中位年龄31(1~64)岁,FV活性(FV:C)0.1~10.6 U/dl,其他凝血因子活性正常,APTT和PT均显著延长。就诊前9例患者中,1例为体检时发现凝血异常,未发生出血事件。8例患者有出血病史(男3例,女5例),出血事件包括:皮肤/黏膜出血3例,齿

龈出血2例,拔牙后出血1例,鼻出血1例,女性月经过多1例。9例患者一般资料及临床表现见表1。各家系之间无血缘关系,所有患者的其他家庭成员均无临床出血或血栓形成等症状,其中例3、例5父母为近亲婚配,例3祖母与外祖母为同父异母姐妹,例5祖父与外祖母为同胞兄妹,其余患者父母均无血缘关系。

2. F5基因突变分析:9个家系共24位成员的F5基因检测结果见表2。9例患者均在2个F5等位基因检测到突变,其中纯合子5例,复合杂合子4例;共检出12个突变位点,包括:8个错义突变(c.286G>C/p.Asp96His、c.1059C>G/p.Phe353Leu、c.1258G>T/p.Gly420Cys、c.2032A>G/p.Arg678Glu、c.6100C>A/p.Pro2034Thr、c.6575T>C/p.Phe2192Ser和c.6305G>A/p.Arg2102His),2个无义突变(c.1600_1601delinsTG/p.Gln534*和c.4713C>A/p.Tyr1571*),2个剪接位点突变(c.952+5G>C和c.1297-2A>G),其中5个基因突变(c.6100C>A/p.Pro2034Thr、c.6575T>C/p.Phe2192Ser、c.1600_

1601delinsTG/p.Gln534*、c.4713C>A/p.Tyr1571*和c.952+5G>C)为首次报道。

3. 新发现F5基因突变位点分析:错义突变:在不同物种间,FV前体蛋白Pro2034和Phe2192均高度保守(图1),提示F5基因突变可能对FV蛋白结构和功能产生影响。FV前体蛋白p.Pro2034Thr和p.Phe2192Ser变异分别对应成熟FV蛋白p.Pro2006Thr和p.Phe2164Ser变异。FV Pro2006位于C1结构域(图2A),野生型蛋白结构模型中FV Pro2006与FV Ile2008之间存在氢键相互作用,发生FV p.Pro2006Thr突变后预测模型显示FV Thr2006与FV Ile2008之间的氢键仍然存在,但是由非极性氨基酸Pro变异成极性氨基酸Thr可能导致蛋白表面亲水性改变从而影响蛋白功能(图2B)。FV Phe2164位于C2结构域(图2A),野生型蛋白结构模型中FV Phe2164与FV Ile2105之间存在氢键相互作用,预测模型显示发生p.Phe2164Ser突变后FV Ser2164与FV Ile2105之间形成2个氢键,并且FV Ser2164与FV Thr2106

表1 9例遗传性凝血因子V缺乏症患者的一般资料及凝血指标检测结果

例号	性别	年龄(岁)	临床表现	APTT(s)	PT(s)	FV:C(U/dl)
1	男	1	皮肤瘀斑、脐带出血	160.0	87.7	<1.0
2	男	25	拔牙后出血	34.9	21.7	4.9
3	女	49	外伤后出血	49.3	19.4	10.6
4	女	9	皮肤瘀斑,鼻出血	66.9	42.6	1.2
5	男	64	皮肤瘀斑	45.2	29.1	3.4
6	女	45	无	52.5	29.6	3.4
7	女	25	月经过多	136.0	77.6	<1.0
8	女	46	齿龈出血	44.0	29.9	3.7
9	女	37	齿龈出血	62.1	37.2	1.2

注:APTT:活化凝血酶原时间;PT:凝血酶原时间;FV:C:凝血因子V促凝活性

表2 9例遗传性凝血因子FV缺乏症患者F5基因检测结果

例号	性别	年龄(岁)	突变位置/结构域	突变位点 (核苷酸改变/氨基酸改变)	成熟蛋白改变	突变类型/状态	突变来源
1	男	1	Exon25/C2	c.6575T>C/p.Phe2192Ser	p.Phe2164Ser	错义/纯合	父亲/母亲
2	男	25	Exon23/C1	c.6305G>A/p.Arg2102His	p.Arg2074His	错义/纯合	父亲/母亲
3	女	49	Exon7/A1	c.1059C>G/p.Phe353Leu	p.Phe325Leu	错义/纯合	父亲/--
4	女	9	Exon13/B	c.4713C>A/p.Tyr1571*	p.Tyr1543*	无义/杂合	父亲
			Exon8/A2	c.1258G>T/p.Gly420Cys	p.Gly392Cys	错义/杂合	母亲
5	男	64	Exon3/A1	c.286G>C/p.Asp96His	p.Asp68His	错义/纯合	--/--
6	女	45	Intron8	c.1297-2A>G/--	--	剪接位点/杂合	父亲
			Exon3/A1	c.286G>C/p.Asp96His	p.Asp68His	错义/杂合	母亲
7	女	25	Intron6	c.952+5G>C/--	--	剪接/纯合	父亲/母亲
8	女	46	Exon25/C2	c.6575T>C/p.Phe2192Ser	p.Phe2164Ser	错义/杂合	父亲
			Exon22/C1	c.6100C>A/p.Pro2034Thr	p.Pro2006Thr	错义/杂合	母亲
9	女	37	Exon10/A2	c.1600_1601delinsTG/p.Gln534*	p.Gln506*	无义/杂合	父亲
			Exon8/A2	c.1258G>T/p.Gly420Cys	p.Gly392Cys	错义/杂合	母亲

之间形成了1个新的氢键,氢键数量的位置的变化很有可能影响蛋白功能(图2C);此外,由非极性氨基酸Phe变异成极性氨基酸Thr可能导致蛋白表面亲水性改变从而影响蛋白功能。无义突变F5基因c.1600_1601delinsTG变异为核苷酸的缺失插入导致了FV前体蛋白p.Gln534*突变,对应成熟FV蛋白p.Gln506*变异;F5基因c.4713C>A突变为单核苷酸的颠换导致FV前体蛋白p.Tyr1571*突变,对应成熟FV蛋白p.Tyr1543*变异。FV p.Gln506*和p.Tyr1543*突变分别位于A2和B结构域,除了可能通过无义介导的mRNA降解(NMD)途径降解含有提前终止密码子(PTC)的转录产物之外^[10],还有可能因为表达的截短蛋白存在结构的缺失影响蛋白功能(图2D、图2E)。

剪接位点c.952+5G>C突变位于F5基因6号内含子的供体位点+5位(图3),由于6号外显子和6号内含子之间的供体位点是非经典的GC双核苷酸,供体位点-2至+6位(供体位点第1个核苷酸视为+1位)相对保守^[11],提示发生变异很可能影响

mRNA剪接,造成外显子跳跃从而影响蛋白功能。

讨论

遗传性FV缺乏症是一种常染色体隐性遗传的出血性疾病,发病无显著的性别倾向。患者临床出血表现异质性较大,可从无出血表现到终生性出血,最常见的临床特征是黏膜出血(鼻出血、口腔出血和女性月经过多),其次是术后出血;约25%的患者可出现血肿和关节血肿,而中枢神经系统出血、消化道出血等危及生命的出血较少出现^[12]。FV缺乏症可分为轻型(FV:C>10%)、中间型(FV:C1%~10%)和重型(FV:C<1%)^[13]。尽管FV:C较低的患者似乎有更大的出血风险,但残余FV:C与出血表型之间的相关性仍然有限,因此FV:C低且无出血表型的患者数量众多。本研究中1例患儿表现为出生后脐带残端出血,1例患者为外伤后出血不止,其余均为轻度或中度出血表现。FV缺乏症患者很少发生危及生命出血的原因,一方面是由于微量的FV(<1%以下)可以产生部分凝血酶,另一

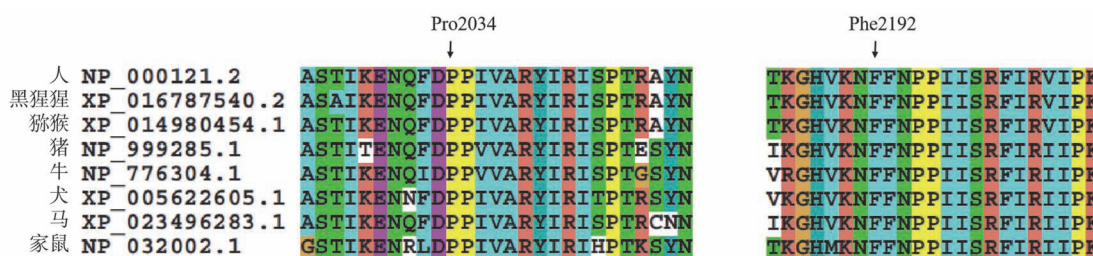
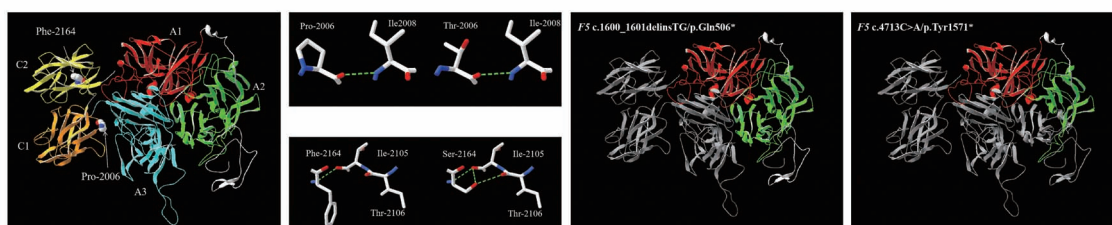


图1 人FV前体蛋白的Pro2034和Phe2192在不同物种间的保守性分析



A:凝血因子V(FV)成熟蛋白Pro2006和Phe2164在蛋白模型(PDB ID:1Y61)中的位置;B:FV p.Pro2006Thr突变前后的空间结构预测;C:FV p.Phe2164Ser突变前后的空间结构预测;D:F5基因c.1600_1601delinsTG/p.Gln534*突变对蛋白结构的影响,灰色部分代表缺失的氨基酸;E:F5基因c.4713C>A/p.Tyr1571*突变对蛋白结构的影响

图2 新发现错义突变和无义突变对凝血因子V蛋白空间结构的影响

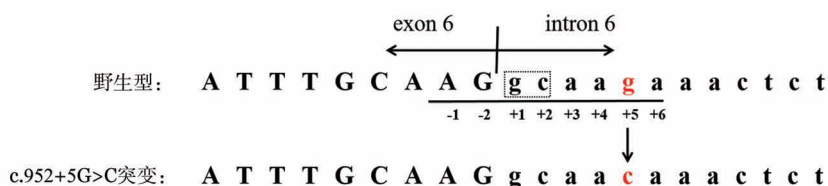


图3 F5基因c.952+5G>C突变与野生型F5序列比较(红色代表改变的碱基,方框中代表内含子剪接位点供体的经典双核苷酸)

方面是由于FV缺乏症患者的组织因子途径抑制物(TFPI)水平较低,从而导致凝血酶生成需求量显著减少^[14]。

高通量测序目前是针对孟德尔单基因遗传病进行基因检测的重要方法之一,尤其适用于以点突变或小片段缺失插入为主要变异形式的疾病。本研究通过靶向测序的方法在9例患者的2个F5等位基因中均检测到致病变异或者疑似致病变异,其中2例纯合子患者父母为近亲婚配,其余3例纯合子和4例复合杂合子患者父母均无血缘关系,符合常染色体隐性遗传规律。

本研究中检测到的F5基因突变多为错义突变,其次是无义突变和剪接位点突变。在大多数情况下,F5基因的错义突变可能导致蛋白分子折叠功能受损和/或构象改变,表达的FV突变蛋白多与分泌功能障碍或是细胞内降解有关。FV p.Asp68His(F5: c.286G > C/p.Asp96His)突变后仍有残存的FV活性,曹丽娟等之前报道了一例携带FV p.Asp68His纯合突变的儿童患者出血症状极轻^[15],本研究中携带此纯合突变的老年患者也仅表现为偶尔发作的皮肤瘀斑。FV p.Phe325Leu(F5: c.1059C > G/p.Phe353Leu)突变会导致FV a Phe325苯基的丢失,影响原有的FV a Phe325与FX a Lys351之间的阳离子- π 相互作用^[16-17],干扰FV a的辅因子活性;体外实验也证实,FV p.Phe325Leu可以被运输至高尔基体,但会错误转运至溶酶体中被降解从而导致蛋白的分泌受损^[18]。FV p.Arg2074His(F5: c.6305G > A/p.Arg2102His)突变引起FV Arg2074与Asp 2051之间的盐桥缺失从而导致C2结构域的稳定性受损^[19]。在2例女性患者中检测到了FV p.Gly392Cys(F5: c.1258G > T/p.Gly420Cys)杂合变异,该变异引入的Cys干扰FV重链A2结构域上其他4个Cys之间的原始二硫键形成,导致变异型FV蛋白可溶性表达受损且更易于降解^[20]。FV p.Pro2006Thr(F5: c.6100C > A/p.Pro2034Thr)和FV p.Phe2164Ser(F5: c.6575T > C/p.Phe2192Ser)2个错义突变为本研究首次报道,二者所在氨基酸位置均在物种间高度保守。FV p.Pro2006Thr位于C1结构域,该结构域spik-3区域顶端的芳香侧链和疏水侧链有助于FV a与磷酸酰丝氨酸(PS)的结合和凝血酶原复合物的组装^[21],在相同位置的纯合FV p.Pro2006Ala变异在一例FV缺乏症患者中有过报道^[22]。FV p.Phe2164Ser位于突变C2结构域,突变前后两种氨基酸的疏水性不同,并且突变后改变了野生型

FV Phe2164氢键的数量,因此FV p.Phe2164Ser突变很可能干扰FV a蛋白C2单体之间的二聚体晶型连接,影响C2结构域的稳定性^[23]。

我们在本组病例中发现了FV p.Gln506*(F5: c.1600_1601delinsTG/p.Gln534*)和FV p.Tyr1543*(F5: c.4713C > A/p.Tyr1571*)两个新的无义突变。无义突变会导致PTC的产生,当PTC距离mRNA剪接产物最后一个外显子与外显子连接点(exon-exon junction,EEJ) $\geq 50 \sim 55$ 个核苷酸时,即有可能触发NMD,从而防止具有潜在危害的C-末端截短蛋白的产生^[24];而当PTC位于距离翻译起始位点较近的区域时,容易产生NMD逃逸的转录本,从而产生截短蛋白,而这种临近翻译起始位点的截短蛋白通常缺失氨基酸数量较多,因此功能可能会严重受损^[25]。

剪接位点变异通常会破坏原有的剪接方式导致外显子跳跃,在极为罕见的情况下会激活隐秘的剪接位点。在本研究中检测到c.1297-2A > G突变会消除8号内含子和9号外显子之间的经典剪接位点,导致生理性剪接位点上游24 bp的隐匿受体剪接位点的激活^[26]。在本研究中,我们首次报道位于F5基因6号内含子供体位点+5位的c.952+5G > C突变。在哺乳动物中,约99%的内含子剪接位点序列具有典型的GT-AG碱基特征,而GC-AG型的内含子数量不足1%^[11],F5基因的6号内含子就是非经典的GC-AG型内含子^[11]。真核细胞生物的基因在转录生成前体RNA之后,GT-AG型内含子和GC-AG型内含子都是通过U2剪接体进行去除^[27],但是GC-AG型内含子供体位点+2位的C碱基与U2剪接体的U1 snRNA之间存在错配,因此,与GT-AG型内含子相比,GC-AG型内含子供体位点-2至+6位的其他碱基相对非常保守,才能保证前体RNA与U1 snRNA之间的紧密结合以及正常的RNA剪接^[28]。因此,c.952+5G > C突变很有可能影响F5基因mRNA剪接效率,从而导致异常蛋白的产生。

综上所述,本研究报道了9例遗传性FV缺乏症病例的临床表现及F5基因突变检测结果,丰富了遗传性FV缺乏症的基因突变谱。新发现基因突变的致病分子机制尚需继续研究。

参考文献

- [1] Cripe L, Moore K, Kane W. Structure of the gene for human coagulation factor V [J]. *Biochemistry*, 1992, 31 (15): 3777-3785. DOI: 10.1021/bi00130a007.

- [2] Jenny R, Pittman D, Toole J, et al. Complete cDNA and derived amino acid sequence of human factor V [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84 (14): 4846- 4850. DOI: 10.1073/pnas.84.14.4846.
- [3] Duga S, Asselta R, Tenchini M. Coagulation factor V [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36 (8): 1393- 1399. DOI: 10.1016/j.biocel.2003.08.002.
- [4] Nicolaes G A, Dahlback B. Factor V and thrombotic disease: description of a janus- faced protein [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22 (4): 530- 538. DOI: 10.1161/01.atv.0000012665.51263.b7.
- [5] Mann K, Kalafatis M. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde [J]. *Blood*, 2003, 101 (1): 20-30. DOI: 10.1182/blood-2002-01-0290.
- [6] Stormorken H. The discovery of factor V: a tricky clotting factor [J]. *J Thromb Haemost*, 2003, 1 (2): 206- 213. DOI: 10.1046/j.1538-7836.2003.00043.x.
- [7] Mannucci P, Duga S, Peyvandi F. Recessively inherited coagulation disorders [J]. *Blood*, 2004, 104 (5): 1243- 1252. DOI: 10.1182/blood-2004-02-0595.
- [8] Asselta R, Peyvandi F. Factor V deficiency [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2009, 35 (4): 382-389. DOI: 10.1055/s-0029-1225760.
- [9] Murray JM, Rand MD, Egan JO, et al. Factor V_{New Brunswick}: Ala₂₂₁-to- Val substitution results in reduced cofactor activity [J]. *Blood*, 1995, 86 (5): 1820- 1827. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.V86.5.1820.bloodjournal8651820>.
- [10] Frischmeyer P, Dietz H. Nonsense- mediated mRNA decay in health and disease [J]. *Hum Mol Genet*, 1999, 8 (10): 1893- 1900. DOI: 10.1093/hmg/8.10.1893.
- [11] Bursat M, Seledtsov I, Solovyev V. Analysis of canonical and non- canonical splice sites in mammalian genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28 (21): 4364- 4375. DOI: 10.1093/nar/28.21.4364.
- [12] Dorgalaleh A, Alavi S, Tabibian S, et al. Diagnosis, clinical manifestations and management of rare bleeding disorders in Iran [J]. *Hematology*, 2017, 22 (4): 224- 230. DOI: 10.1080/10245332.2016.1263007.
- [13] Lippi G, Pasalic L, Favaloro E. Detection of mild inherited disorders of blood coagulation: current options and personal recommendations [J]. *Expert Rev Hematol*, 2015, 8 (4): 527- 542. DOI: 10.1586/17474086.2015.1039978.
- [14] Duckers C, Simioni P, Spiezia L, et al. Low plasma levels of tissue factor pathway inhibitor in patients with congenital factor V deficiency [J]. *Blood*, 2008, 112 (9): 3615- 3623. DOI: 10.1182/blood-2008-06-162453.
- [15] 曹丽娟, 王兆钺, 苏燕华, 等. 五例遗传性凝血因子V缺陷症的基因分析 [J]. *中华血液学杂志*, 2008, 29 (3): 145-148.
- [16] Kalafatis M, Beck D. Identification of a binding site for blood coagulation factor Xa on the heavy chain of factor Va. Amino acid residues 323- 331 of factor V represent an interactive site for activated factor X [J]. *Biochemistry*, 2002, 41 (42): 12715- 12728. DOI: 10.1021/bi026208+.
- [17] Lee C J, Lin P, Chandrasekaran V, et al. Proposed structural models of human factor Va and prothrombinase [J]. *J Thromb Haemost*, 2008, 6 (1): 83- 89. DOI: 10.1111/j.1538- 7836.2007.02821.x.
- [18] Cai X, Wang X, Ding Q, et al. Factor V C1149G and 5609-10IN-SCGTGGTT causing factor V deficiency: molecular characterization by in- vitro expression [J]. *Thromb Haemost*, 2007, 98 (3): 683-685.
- [19] Schrijver I, Houissa- Kastally R, Jones C, et al. Novel factor V C2- domain mutation (R2074H) in two families with factor V deficiency and bleeding [J]. *Thromb Haemost*, 2002, 87 (2): 294-299.
- [20] Fu Q, Wu W, Ding Q, et al. Type I coagulation factor V deficiency caused by compound heterozygous mutation of F5 gene [J]. *Haemophilia*, 2003, 9 (5): 646- 649. DOI: 10.1046/j.1365- 2516.2003.00800.x.
- [21] Saleh M, Peng W, Quinn- Allen M, et al. The factor V C1 domain is involved in membrane binding: identification of functionally important amino acid residues within the C1 domain of factor V using alanine scanning mutagenesis [J]. *Thromb Haemost*, 2004, 91 (1): 16-27. DOI: 10.1160/TH03-04- 0222.
- [22] 黄丹丹, 王学锋, 陈华云, 等. 四个遗传性凝血因子V缺陷症家系临床表型和基因型变化的研究 [J]. *中华血液学杂志*, 2010, 31 (3): 149- 153. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253- 2727.2010.03.002.
- [23] Kim S W, Quinn- Allen M, Camp J, et al. Identification of functionally important amino acid residues within the C2- domain of human factor V using alanine- scanning mutagenesis [J]. *Biochemistry*, 2000, 39 (8): 1951- 1958. DOI: 10.1021/bi992256r.
- [24] Nagy E, Maquat L. A rule for termination- codon position within intron- containing genes: when nonsense affects RNA abundance [J]. *Trends Biochem Sci*, 1998, 23 (6): 198-199. DOI: 10.1016/s0968-0004(98)01208-0.
- [25] Pereira F, Teixeira A, Kong J, et al. Resistance of mRNAs with AUG- proximal nonsense mutations to nonsense- mediated decay reflects variables of mRNA structure and translational activity [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43 (13): 6528- 6544. DOI: 10.1093/nar/gkv588.
- [26] 傅卫军, 侯健, 王东星, 等. 凝血因子V基因的一种新突变的发现与确证 [J]. *中华医学杂志*, 2003, 83 (1): 24- 26. DOI: 10.3760/j.issn:0376-2491.2003.01.008.
- [27] Mount S. Genomic sequence, splicing, and gene annotation [J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 67 (4): 788-792. DOI: 10.1086/303098.
- [28] Thanaraj T, Clark F. Human GC- AG alternative intron isoforms with weak donor sites show enhanced consensus at acceptor exon positions [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29 (12): 2581- 2593. DOI: 10.1093/nar/29.12.2581

(收稿日期:2020-12-21)

(本文编辑:徐茂强)