

一个血友病A家系的凝血因子Ⅷ基因突变分析

李栋梁 李博伦 赵志丹 曹玮

Analysis of factor VIII gene mutations in a family with hemophilia A Li Dongliang, Li Bolun, Zhao Zhidan, Cao Wei
Corresponding author: Li Dongliang, Bethune International Peace Hospital of PLA, Shijiazhuang 050082, China. Email: ldle2008@sina.com

血友病A是由凝血因子Ⅷ(FⅧ)基因突变导致的一种X连锁隐性遗传性出血性疾病,通常是由无症状的女性携带者传递给其儿子,男性患病率为1/5 000~10 000^[1]。血友病A的发病机制复杂多样,其突变位点覆盖整个FⅧ基因,主要包括内含子22及1倒位、无义突变、错义突变、插入及缺失等,其中约45%的重型血友病A是由内含子22倒位引起,而轻型和中间型血友病A最常见的突变类型是错义突变^[2]。我们对一个血友病A家系进行凝血功能检测和基因分析,报告如下。

对象与方法

1. 研究对象:先证者:男,38岁,自幼反复发作膝关节及肌肉自发出血,通过APTT与FⅧ活性(FⅧ:C)检测确诊为重型血友病A,平时以FⅧ制剂、冷沉淀或新鲜血浆间断替代治疗。先证者父母非近亲结婚,家系其他成员均无出血病史,家系图见图1。以50名健康男性志愿者作为对照排除基因多态性。本研究经医院伦理委员会批准,并征得患者及家属知情同意。

2. 标本采集和基因组DNA提取:采集受检者外周静脉血3 ml(EDTA抗凝),测定凝血指标并采用Wizard® Genomic DNA Purification Kit(美国Promega公司产品)提取外周血基因组DNA,-80℃冻存备用。

3. 凝血功能检测:应用法国STA-R全自动凝血仪检测凝血酶原时间(PT)、APTT、纤维蛋白原(FIB)、凝血酶时间(TT)及凝血因子Ⅱ、Ⅴ、Ⅶ、Ⅷ、Ⅸ、Ⅹ、Ⅺ促凝活性,加正常血浆作凝血延长的纠正试验;采用ELISA法测定血管性血友病因子抗原(VWF:Ag)水平。

4. 引物设计与合成:根据FⅧ基因序列(GenBank编号CM000685.1),参考文献[3-4]设计引物用于FⅧ基因内含子1及22倒位检测;应用Primer 5软件,参考文献[5-7]设计38

对引物,覆盖FⅧ基因所有外显子、启动子以及曾有报道发生突变的内含子9、13、16、18、25区域。

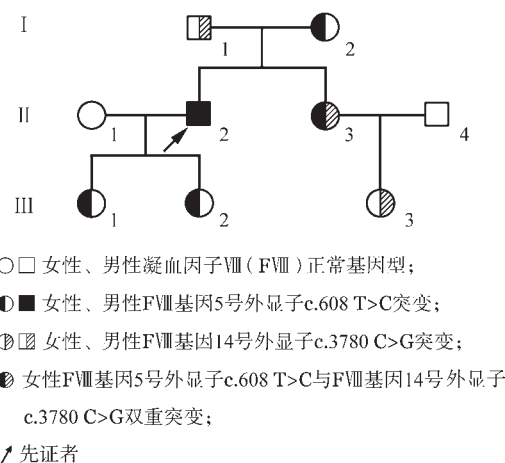


图1 血友病A家系图

5. PCR扩增、产物纯化及Sanger测序:采用倒位PCR法检测FⅧ基因内含子1及22倒位^[4];PCR扩增FⅧ基因所有外显子、启动子及内含子9、13、16、18、25区域,参照HAMSTERS数据库(<http://hadb.org.uk/>)设计引物和反应条件。扩增产物用12 g/L琼脂糖凝胶电泳并割胶纯化,制备测序模板,由武汉康圣达医学检验所采用Sanger法完成测序(ABI3730测序仪)。

6. 数据信息处理及突变分析:参照文献[3-4]对内含子1及22测序结果进行分析。通过网站(<http://www.factorviii-db.org/>)查询FⅧ结构和HAMSTERS数据库,应用Chromas软件将测序结果与Mutation Surveyor及NCBI基因库的FⅧ基因序列进行比对,发现基因突变的序列则反向测序进行验证。应用PolyPhen-2与Mutation Taster软件在线预测突变对蛋白功能的影响。

结果

1. 病例资料及表型检测:先证者无明显皮肤黏膜出血倾向,右膝关节轻度畸形。APTT 101.5 s(正常参考值25.4~38.4 s),能被正常血浆纠正,FⅧ:C 1.1%(正常参考值50.0%~150.0%),凝血因子Ⅱ、Ⅴ、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ、Ⅺ促凝活性及VWF:Ag含量均正常。其他家系成员上述凝血指标均正常。

2. 基因分析:倒位PCR未检出先证者FⅧ基因内含子1及22倒位。Sanger测序在启动子及内含子9、13、16、18、25区域均未检出突变,而在5号外显子检出c.608T>C(Leu203Pro)错义突变(导致第203位上的核苷酸由亮氨酸

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.08.015

作者单位:050082 石家庄,白求恩国际和平医院血液科(李栋梁、曹玮);广东医科大学研究生院(李博伦);武汉康圣达医学检验所有限公司(赵志丹)

通信作者:李栋梁,Email:ldle2008@sina.com

变为脯氨酸)(图2A)。对6名其他家系成员进行相应位点检测发现,先证者的父亲及外甥女均检出14号外显子c.3780C>G(p.Asp1260Glu)错义突变(导致第1260位上的核苷酸由天门冬氨酸变为谷氨酸)(图2B),其母亲及2个女儿均携带c.608T>C(Leu203Pro)杂合突变,妹妹携带c.608T>C和c.3780C>G双重突变。另外,先证者及其母亲、妹妹与2个女儿均检出14号外显子c.3864A>C(p.Ser1288Ser)同义突变。经PolyPhen-2与Mutation Taster软件预测,c.608T>C(Leu203Pro)突变对蛋白功能的影响均为有害,而c.3864A>C(p.Ser1288Ser)突变为单核苷酸多态性位点(无致病性)。在50名健康对照者中未发现上述FVIII基因突变。

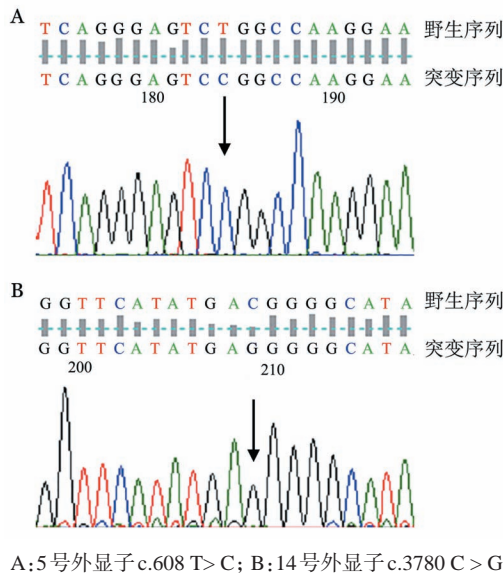


图2 凝血因子VIII基因5、14号外显子测序结果

讨 论

FVIII基因位于染色体Xq28,全长186 kb,包含26个外显子和25个内含子,编码约9 kb的mRNA。FVIII主要在肝脏合成,是2332个氨基酸残基组成的单链糖蛋白,由3个A区、1个B区、2个C区及3个短的富含带负电荷的氨基酸残基a区组成A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2结构^[8]。A区与FVIII的蛋白质合成及其活化密切相关,B区通过调节FVIII的分泌影响其活性。FVIII蛋白活性主要取决于FVIII氨基酸残基组成和结构的完整性,突变可引起FVIII部分氨基酸残基缺失、替换及蛋白质构象改变进而影响FVIII蛋白发挥正常功能。人类突变数据库的最新统计数据显示,目前已发现2517种FVIII基因突变,无义突变、大片段缺失、内含子22及1倒位常引起FVIII蛋白大部分缺失而致重型血友病A,错义突变、小片段缺失及插入常引起个别氨基酸残基替换而导致轻/之间型血友病A,其中80%以上为错义突变。

FVIII基因内含子22倒位是一个最常见的突变,可造成FVIII基因中断而导致重型血友病A;内含子1倒位较为罕见,约5%的重型血友病发病机制与其有关^[9],FVIII基因启动子区域位点突变与轻型血友病发病有关^[10]。另有文献报道,在FVIII基因内含子9、13、16、18及25分别检出IVS9+326A>G、

IVS13+1152delA、IVS16-93C>T、IVS18-277G>A、IVS25+4104A>T突变^[6-7]。本家系的所有成员均未检出FVIII基因内含子及启动子区域的突变。在先证者及其母亲、妹妹与2个女儿均检出14号外显子c.3864A>C同义突变,经PolyPhen-2和Mutation Taster软件检索该突变为无致病性的单核苷酸多态性位点,与该家系血友病A的发病无关。

14号外显子处于FVIII基因序列2110~5220碱基的位置,编码A2、B及A3区的685~1721位氨基酸^[11],其结构在转录、翻译以及剪切为有活性的FVIII方面均具有重要作用。通过切割B区的大部分氨基酸单链将FVIII转变为活性形式,其余部分构成A2和A3区,因此FVIII基因B区的错义突变较少^[12],多数可能为基因多态性或非致病性突变^[13]。但也有研究发现,在120例血友病A中有2个家系的3例重型患者存在位于B区的c.3780C>G(p.Asp1260Glu)错义突变^[2],该突变可导致FVIII:C降低^[14-15]。有学者研究了该突变对FVIII:C的影响,发现p.Asp1260Glu的核苷酸多态性呈现HT1、HT3及HT5三种不同的单倍型,只有HT1型的男性患者FVIII:C降低,女性携带者不影响FVIII:C,而HT3、HT5亚型所占比例很低,亦不影响FVIII:C^[16]。本家系先证者父亲FVIII:C正常,推测可能为HT3或HT5亚型突变所致;先证者妹妹及外甥女FVIII:C正常,可能与她们携带的c.3780C>G突变不影响FVIII:C有关。

本家系先证者检出FVIII基因5号外显子c.608T>C突变,其母亲、妹妹及2个女儿均携带c.608T>C杂合突变。通过查询相关网站数据库及文献检索,表明该突变为首次报道。FVIII基因4~7号外显子编码FVIII蛋白A1亚基的第111~317位氨基酸,与FVIII合成及其活化密切相关。本家系检出的5号外显子c.608T>C(p.Leu203Pro)突变位于此区域内,可能影响了FVIII蛋白构象而导致FVIII:C降低^[17],并且PolyPhen-2与Mutation Taster软件预测蛋白功能均为有害,因此推测新发现的c.608T>C突变是该血友病A家系的致病突变。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组,中国血友病协作组. 血友病诊断与治疗中国专家共识(2013年版)[J]. 中华血液学杂志, 2013, 34(5):461-463. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727. 2013.05.020.
- [2] Repessé Y, Slaoui M, Ferrandiz D, et al. Factor VIII (FVIII) gene mutations in 120 patients with hemophilia A: detection of 26 novel mutations and correlation with FVIII inhibitor development [J]. J Thromb Haemost, 2007, 5(7):1469-1476. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02591.x.
- [3] Keeney S, Mitchell M, Goodeve A. The molecular analysis of haemophilia A: a guideline from the UK haemophilia centre doctors' organization haemophilia genetics laboratory network [J]. Haemophilia, 2005, 11(4):387-397. doi: 10.1111/j.1365-2516.2005.01111.x.
- [4] Odnoczeko E, Stefańska-Windyga E, Baran B, et al. Detection of inversion mutations (INV22 and INV1) in F8 gene using

- IS-PCR method in Polish patients with severe hemophilia A [J]. *Acta Haematologica Polonica*, 2015, 46 (5):372- 377. doi: 10.1016/j.achaem.2015.09.001.
- [5] Boekhorst J, Verbruggen B, Lavergne JM, et al. Thirteen novel mutations in the factor VIII gene in the Nijmegen haemophilia A patient population [J]. *Br J Haematol*, 2005, 131 (1):109- 117. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05737.x.
- [6] Castaman G, Giacomelli SH, Mancuso ME, et al. Deep intronic variations may cause mild hemophilia A [J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 9 (8):1541- 1548. doi: 10.1111/j.1538- 7836. 2011.04408.x.
- [7] Green PM, Bagnall RD, Waseem NH, et al. Haemophilia A mutations in the UK: results of screening one- third of the population [J]. *Br J Haematol*, 2008, 143 (1):115- 128. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07310.x.
- [8] Fay PJ, Jenkins PV. Mutating factor VIII: lessons from structure to function [J]. *Blood Rev*, 2005, 19 (1):15- 27. doi:10.1016/j. blre.2004.02.003.
- [9] Andrikovics H, Klein I, Bors A, et al. Analysis of large structural changes of the factor VIII gene, involving intron 1 and 22, in severe hemophilia A [J]. *Haematologica*, 2003, 88(7):778-784.
- [10] Riccardi F, Rivolta GF, Franchini M, et al. Characterization of a novel mutation in the F8 promoter region associated with mild hemophilia A and resistance to DDAVP therapy [J]. *J Thromb Haemost*, 2009, 7 (7):1234- 1235. doi: 10.1111/j.1538- 7836. 2009.03468.x.
- [11] Wood WI, Capon DJ, Simonsen CC, et al. Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones [J]. *Nature*, 1984, 312(5992):330-337.
- [12] Santacroce R, Acquila M, Belvini D, et al. Identification of 217 unreported mutations in the F8 gene in a group of 1,410 unselected Italian patients with hemophilia A [J]. *J Hum Genet*, 2008, 53(3):275-284. doi: 10.1007/s10038-007-0238-y.
- [13] Ogata K, Selvaraj SR, Miao HZ, et al. Most factor VIII B domain missense mutations are unlikely to be causative mutations for severe hemophilia A: implications for genotyping [J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 9(6):1183- 1190. doi: 10.1111/ j.1538-7836.2011.04268.x.
- [14] Scanavini D, Legnani C, Lunghi B, et al. The factor VIII D1241E polymorphism is associated with decreased factor VIII activity and not with activated protein C resistance levels [J]. *Thromb Haemost*, 2005, 93(3):453-456. doi: 10.1160/TH04-09- 0629.
- [15] Nossent AY, Eikenboom JC, Tanis BC, et al. Haplotypes encoding the factor VIII 1241Glu variation and the risk of myocardial infarction [J]. *J Thromb Haemost*, 2007, 5(3):619-621.
- [16] Nossent AY, Eikenboom JC, Vos HL, et al. Haplotypes encoding the factor VIII 1241 Glu variation, factor VIII levels and the risk of venous thrombosis [J]. *Thromb Haemost*, 2006, 95 (6):942- 948. doi: 10.1160/TH06-01-0024.
- [17] Guillet B, Lambert T, d'Oiron R, et al. Detection of 95 novel mutations in coagulation factor VIII gene F8 responsible for hemophilia A: results from a single institution [J]. *Hum Mutat*, 2006, 27(7):676-685. doi: 10.1002/humu.20345.

(收稿日期:2016-01-21)

(本文编辑:徐茂强)

第五届血液病理诊断高峰论坛会议通知

为推动我国血液病诊疗领域的发展,中国医学科学院血液病医院(血液学研究所)和美国 Mayo Clinic(梅奥诊所)将于2016年10月13日-15日在天津联合举办“第五届血液病理高峰论坛”。

本次会议邀请 Mayo Clinic 病理系主任、WHO 血液肿瘤系列编委和 CAP 专业委员会主委等专家,通过专题报告和病例讨论等方式介绍淋巴瘤、白血病、血红蛋白异常、出凝血障碍等血液疾病的诊断、检测以及分子病理研究领域的最新进展和前景展望。同时,本次会议还设立临床与形态、淋巴瘤病理、流式细胞学、遗传学和分子生物学等分会场的病例讨论,并对优秀讲者进行表彰。

我们热诚邀请全国各地医院的血液科、肿瘤科、病理科、检验科的专家和同仁参会交流。与会代表可获得国家级 I 类继续医学教育学分 10 分。

会议费用:本次会议免收注册费。住宿及交通费用自理。

联系人:田瑞芳,电话:13752251478,Email:xysblzx@163.com。

会议地点:天津唐拉雅秀酒店(天津市和平区南京路219号)

中国医学科学院血液病医院(血液学研究所)