

# 两个遗传性蛋白 C 缺陷症家系的分子致病机制研究

温梦珍 芦一凡 刘媚娜 秦朗译 金艳慧 王明山 杨丽红

温州医科大学附属第一医院医学检验中心,浙江省检验诊断及转化研究重点实验室,温州 325015

通信作者:杨丽红,Email:ylh91@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.cn121090-20240628-00236

**【摘要】 目的** 探究两个遗传性蛋白 C(PC)缺陷症家系的分子致病机制。**方法** 两位先证者均因静脉血栓栓塞症(VTE)分别于 2021 年 6 月和 2022 年 10 月就诊于温州医科大学附属第一医院,收集先证者和家系成员临床资料及血样本,检测血浆蛋白 C 活性(PC:A)和抗原(PC:Ag)含量及其他相关凝血指标。以凝血酶生成试验(TGT)评估其抗凝能力。采用 DNA 直接测序法确定 PROC 基因突变位点。用生物信息学软件分析突变基因的保守性和致病性。用 PyMOL 软件分析蛋白质三维模型以及突变氨基酸之间的相互作用。构建野生型和两个突变型表达载体,并瞬时转染 HEK293T 细胞,提取阳性转染细胞内的细胞总 RNA 进行突变 PROC 基因转录水平的研究。采用 ELISA 法和 Western blot 和细胞免疫荧光实验进行 PC 突变蛋白翻译水平的研究。**结果** 家系 1、2 先证者的 PC:A 分别降至 35%、40%,PC:Ag 分别降至 44%、39%,D-二聚体分别升高至 4.42 mg/L、0.83 mg/L,其他相关凝血指标无明显异常。测序分析显示,家系 1、2 先证者的 PROC 基因第 9 外显子分别存在 c.833T>C(p.Leu278Pro)、c.1330T>C(p.Trp444Arg)杂合错义突变。凝血酶生成试验表明两位先证者及其携带以上 PROC 基因突变家系成员的抗凝功能均受损。保守性分析显示 Leu2278 和 Trp444 在同源物种间呈高度保守。致病性分析显示 p.Leu278Pro 和 p.Trp444Arg 均为有害突变。蛋白质模型分析显示该两种突变均能导致蛋白质结构发生改变。体外表达实验显示,与野生型相比,p.Leu278Pro 和 p.Trp444Arg 两种突变在 mRNA 表达层面没有明显差异,但两种突变导致细胞培养上清液 PC:Ag 含量和 PC 蛋白表达量明显低于野生型,而在细胞培养裂解液中高于野生型。**结论** PROC 基因第 9 外显子杂合错义突变 p.Leu278Pro 和 p.Trp444Arg 导致 PC 蛋白分泌障碍可能是遗传性 PC 缺陷症的分子致病机制。

**【关键词】** 蛋白 C; 基因突变; 体外表达; 血栓形成

**基金项目:**浙江省检验诊断及转化研究重点实验室(2022E10022);温州市基础性医疗卫生科技项目(Y20210111)

## Analysis of two cases of hereditary protein C deficiency causing venous thrombosis

Wen Mengzhen, Lu Yifan, Liu Meina, Qin Langyi, Jin Yanhui, Wang Mingshan, Yang Lihong

Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnosis and Translational Research of Zhejiang Province, Wenzhou 325015, China

Corresponding author: Yang Lihong, Email: ylh91@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the molecular pathogenic mechanism of venous thrombosis caused by heterozygous missense mutations in two protein C (PROC) genes through laboratory phenotype analysis, genetic mutation analysis, and in vitro expression experiments. **Methods** Two probands presented with venous thromboembolism at the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University. Clinical data and blood samples were collected from the probands and their family members to evaluate the plasma protein C (PC) activity (PC:A), PC antigen (PC:Ag) levels, and other relevant coagulation parameters. The anticoagulant capacity was assessed using the thrombin generation test (TGT). The mutation sites of the PROC gene were identified using direct DNA sequencing. Bioinformatics software was used to analyze the conservation and pathogenicity of the mutated gene. PyMOL software was used for the analysis of the protein three-dimensional models and interactions between mutated amino acids. Wild-

type and two mutant expression vectors were constructed and HEK293T cells were transiently transfected. Total cellular RNA was extracted from positively transfected cells to investigate the transcriptional levels of the mutant PROC gene. Enzyme-linked immunosorbent assay, Western blot, and cellular immunofluorescence assays were used to investigate the translation levels of the mutant PROC protein.

**Results** Proband 1 and 2 exhibited PC:A levels of 35% and 40% and PC:Ag levels of 44% and 39%, with increasing D-dimer levels to 4.42 mg/L and 0.83 mg/L, respectively. Meanwhile, other coagulation parameters revealed no significant abnormalities. TGT demonstrated impaired anticoagulant function in both proband witnesses and their familial PC carriers. Sequencing analysis revealed heterozygous missense mutations c.833T>C (p. Leu278Pro) in proband 1 and c.1330T>C (p. Trp444Arg) in proband 2 within exon 9 of the PROC gene. Conservation analysis revealed that Leu278 and Trp444 were highly conserved across homologous species. Pathogenicity analysis indicated that both p. Leu278Pro and p. Trp444Arg mutations are deleterious. Protein modeling analysis demonstrated that both mutations induce structural alterations in the protein. In vitro expression experiments revealed that compared with the wild-type, both p. Leu278Pro and p. Trp444Arg mutations showed no significant differences in the mRNA expression level of the PC protein. However, both mutations caused significantly lower PC:Ag content and protein expression levels in the cell culture supernatant compared with the wild-type, whereas higher levels were observed in the cell culture lysate. This indicates the association of both mutations with the secretion function of the PC protein. **Conclusion** The heterozygous missense mutations p. Leu278Pro and p. Trp444Arg in exon 9 of the PROC gene in both probands are associated with decreased PC levels.

**【Key words】** Protein C; Genetic mutation; In vitro expression; Thrombosis

**Fund program:** Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnosis and Translational Research of Zhejiang Province (2022E10022); Wenzhou Basic Medical and Health Science and Technology Project (Y20210111)

蛋白 C(PC)是一种由肝脏分泌的依赖维生素 K 单链糖蛋白,是机体 PC 抗凝系统的中心成分<sup>[1]</sup>。当凝血酶与内皮表面的血栓调节蛋白结合时,它会切割重链的 Arg12 与 Leu13 之间的激活肽,释放出 12 个氨基酸残基的小肽,暴露其活性中心,从而 PC 被激活为活化蛋白 C(APC),再由蛋白 S(PS)、钙离子和磷脂存在的条件下,APC 主要通过灭活活化凝血因子 V 和活化凝血因子 VIII 来减少凝血酶的产生发挥其抗凝、促纤溶和抗炎的作用<sup>[2-3]</sup>。遗传性 PC 缺陷症是由位于常染色体 2q13-q14 的 PROC 基因缺陷引起的常染色体显性或不完全显性遗传性疾病<sup>[4]</sup>。遗传性 PC 缺陷症患者静脉血栓栓塞症(VTE)的风险增高<sup>[5]</sup>,VTE 主要包括下肢深静脉血栓形成(DVT)和肺栓塞,后者是除冠心病和中风之外导致心血管疾病死亡的第三大原因<sup>[6]</sup>。遗传性 PC 缺陷症在静脉血栓患者中约占 8%<sup>[7]</sup>。本研究报告两个遗传性 PC 缺陷症家系并探讨其分子致病机制。

## 对象和方法

1. 研究对象:本研究纳入 2021 年 6 月和 2022 年 10 月在温州医科大学附属第一医院就诊的两例遗传性蛋白 C 缺陷症患者及其家系。其现病史和既往史。选择同期 100 名健康体检者作为对照组(女 45 名、男 55 名,年龄 22~56 岁),建立本研究实验室凝血指标的生物参考值。本研究通过本院伦理委

员会的审查(KY2022-R193)并取得所有受试者知情同意。

2. 标本采集与处理:两个家系所有患者均在抗凝治疗前采集其外周静脉血 2.7 ml,用 109 mmol/L 枸橼酸钠以 1:9 抗凝处理,2 000×g 离心 15 min,取上层乏血小板血浆用于检测凝血指标和凝血酶生成试验;下层血细胞用于提取 DNA,进行 PCR 扩增。

3. 血浆凝血指标检测:通过 Stago STA-R Max 全自动凝血仪采用发色底物法检测先证者及其家系成员的 PC 活性(PC:A)和抗凝血酶活性(AT:A),免疫比浊法检测 D-二聚体(D-D),凝固法检测 PS 活性(PS:A),试剂为 Stago 原装配套试剂盒。采用 ELISA 法检测 PC 抗原(PC:Ag)含量,试剂盒购自温州长风生物技术有限公司。

4. 凝血酶生成实验:使用 Stago 自动校正凝血酶曲线法(CAT)检测凝血酶生成,试剂为 Stago 配套的 FluoCa 试剂盒,20 μl ppp 试剂,用 1 pmol/L 组织因子启动凝血,绘制 60 min 内正常血浆和受试者血浆的凝血酶生成曲线,推导其内源性凝血酶生成潜力。

5. PCR 扩增:用酚-氯仿法提取先证者及其家系成员基因组 DNA,PCR 扩增仪为 ABI Thermalcycler 2720。所用引物序列参照文献[6],PCR 反应体系为 25 μl。提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司(TIANamp Genomic DNA Kit),按照说明书进

行操作。

6. PROC 基因测序:PCR 扩增产物送上海桑尼生物科技有限公司测序。用 Chromas 软件将测序结果与 GenBank 中的 PROC 序列进行比对,对可疑突变进行反向测序验证。明确突变位点后,检测家系其他成员相应的外显子片段。

7. 生物信息学分析:通过多序列比对软件 ClustalX-2.1-win 将突变氨基酸与另外几种同源物种的氨基酸序列进行比对,分析突变氨基酸在同源物种中的保守性(同源物种氨基酸序列来源:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>)。用 Mutation Taster、Polyphen-2、PROVEAN 及 FATHMM 在线生物信息学软件预测突变位点对 PC 结构的影响。采用 PyMOL 软件构建突变前后的蛋白结构模型,分析突变对蛋白质空间结构的改变以及影响,PC 的晶体结构数据来自蛋白质数据库(<http://www.rcsb.org/pdb/home.do>, PDB ID:1AUT)。

8. 构建突变表达载体、细胞培养和转染:PC 空载和野生型(PC-WT)质粒均购自南京擎科生物科技有限公司,选用 TK-PCDH-copGFP-T2A-Puro 构建 PC 表达质粒,采用定点诱变试剂盒(美国 STRATAGENE 公司产品)在 PC-WT 的基础上构建 p.Leu278Pro 突变型表达质粒(PC-L278P)和 p.Trp444Arg 突变型表达质粒(PC-W444R),对整个 PC 的 cDNA 进行全长测序,发现定点突变成功引入,且没有引入其他突变。HEK293T 细胞解冻复苏后转移至含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,于 37 °C、5% 二氧化碳环境中常规培养。利用转染试剂盒 Lipofectamine™ 3000 reagent(美国 Thermo Fisher 公司产品)将空载、野生型和突变型表达载体瞬时转染生长状态良好的 HEK293T 细胞,在荧光显微镜下观察转染效率。

9. PROC 基因转录水平检测:细胞转染 48 h 后采用 Trizol 试剂盒提取细胞裂解液中的总 RNA,采用 Prime Script 逆转录试剂盒,将 RNA 逆转录成 cDNA,根据 TB Green® Premix Ex Taq™ II FAST qPCR 试剂说明书通过实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测野生型和突变型 PC mRNA 的表达水平。PC 扩增引物序列:正向 5'-CCAGCTCCTCTTGACTCAGTG-3', 反向 5'-AGGAAGGAGTTGGCACGTTT-3'。内参基因 GAPDH 扩增引物序列:正向 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3', 反向 5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'。用 Bio-Rad CFX Manager 3.1 软件分析 PROC 基因和 GAPDH 的

Ct 值,采用比较 Ct 法( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )计算野生型和突变型 PROC 基因的 mRNA 相对表达量。

10. PROC 基因蛋白表达水平检测:收集转染阳性细胞,用含有蛋白酶降解抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解细胞,将变性后的细胞培养裂解液和上清液中的蛋白通过 10% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离转移至醋酸纤维膜上,通过封闭以及一抗和二抗孵育后显影检测。采用 ELISA 试剂盒(购自上海江莱科技有限公司)检测细胞培养上清液和细胞裂解液中野生型和突变型的 PC:Ag 水平。

11. 细胞免疫荧光:转染 48 h 后的细胞经 PBS 清洗后,依次用 4% 的多聚甲醛(上海碧云天公司产品)固定 20 min,加入 0.1% Triton X-100(上海碧云天公司产品)室温孵育 20 min 渗透破膜,之后加入 1:200 稀释的兔抗人 PC IgG 单克隆抗体(美国 Thermo Fisher 公司产品)在 4 °C 条件下孵育 12 h;采用 1:500 稀释的 Cy3 标记的山羊抗兔抗体(美国 Proteintech 公司产品)在 37 °C 条件下孵育 2 h。最后用一定量含 DAPI 的抗荧光淬灭剂(上海碧云天公司产品)进行封片。使用 Thunder 荧光显微镜成像系统(德国 Leica 公司产品)进行细胞免疫荧光成像。

## 结 果

1. 临床资料:家系 1 先证者,男,55 岁,货车司机,因左下肢发紫伴疼痛两周至我院血管外科就诊,以“左下肢 DVT”收住院。凝血检查示 D-D 4.42 mg/L(参考值 0~0.5 mg/L),PC:A、PC:Ag 分别降至 35%、44%,其弟弟、女儿、侄子的 PC:A 和 PC:Ag 均明显降低,其他相关凝血指标均正常。肝、肾功能正常。该家系共 3 代 9 人纳入本研究。经家系调查发现先证者父亲在 50 岁时出现脑静脉窦血栓,经抢救无效死亡。其余家庭成员无血栓栓塞史。家系图见图 1。家系成员凝血指标检测结果见表 1。

家系 2 先证者,男,63 岁,有吸烟史 40 余年,每天约 20 支,高血压 4 年,因摔倒后卧床 1 周出现心悸气促至我院急诊就诊,肺动脉造影显示:右肺动脉,左下肺动脉及部分分支多发栓塞。双下肢动静脉 B 超示:左下肢深静脉栓塞。凝血指标检查:D-D 轻度升高(0.83 mg/L),PC:A、PC:Ag 分别降至 40%、39%,其女儿和外孙 PC:A 和 PC:Ag 也有不同程度降低,其他相关凝血指标均正常,该家系 3 代 7 人纳入研究。该家系其他成员均否认血栓栓塞病史。该家系图见图 2,凝血指标检测结果见表 2。

2. 凝血酶生成实验结果:与正常对照相比,两



例先证者及其家系中 PROC 基因突变携带者的内源性凝血酶电位和峰高均升高,其中两位先证者升高较明显(图 3)。

3. 基因组 DNA 测序结果:家系 1 先证者及其弟弟、女儿和侄子的 PROC 基因第 9 号外显子均存在 c.833T>C 杂合错义突变(导致 p.Leu278Pro),该突变 2021 年由本课题组首次报道<sup>[8]</sup>。家系 2 先证者及其女儿、外孙 PROC 基因第 9 号外显子均存在 c.1330T>C 杂合错义突变(导致 p.Trp444Arg)。两个家系其他受检成员均为野生型。详见图 4。在千人基因组计划(<https://www.genome.gov/27528684/1000-genomes-projec>)中未发现 p.Trp444Arg,排除基因多态性的可能;查阅人类基因突变数据库 HGMD(<https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>)和国内外相关文献,未见 p.Trp444Arg 报道。

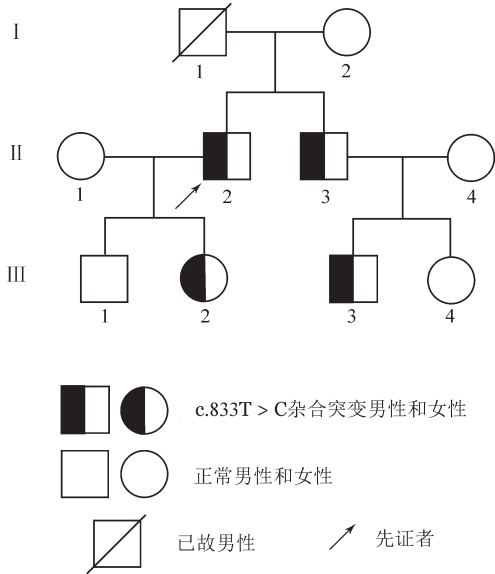


图 1 遗传性蛋白 C 缺陷症家系图(家系 1)

表 1 遗传性蛋白 C 缺陷症家系 1 凝血指标检测结果

家庭成员	年龄 (岁)	D-D (mg/L)	PS:A (%)	AT:A (%)	PC:A (%)	PC:Ag (%)
母亲(I 2)	79	0.41	78	98	94	104
先证者(II 2)	55	4.42	88	100	35	44
妻子(II 1)	52	0.24	87	103	111	105
弟弟(II 3)	51	0.58	96	99	47	51
弟媳(II 4)	50	0.31	91	113	107	110
儿子(III 1)	29	0.14	101	115	104	106
女儿(III 2)	25	0.46	92	102	46	52
侄子(III 3)	26	0.39	95	110	41	49
侄女(III 4)	22	0.31	88	107	108	105
参考值		0~0.5	70~130	98~118	70~130	70~135

注 D-D:D-二聚体;PS:A:蛋白 S 活性;AT:A:抗凝血酶活性;PC:A:蛋白 C 活性;PC:Ag:蛋白 C 抗原

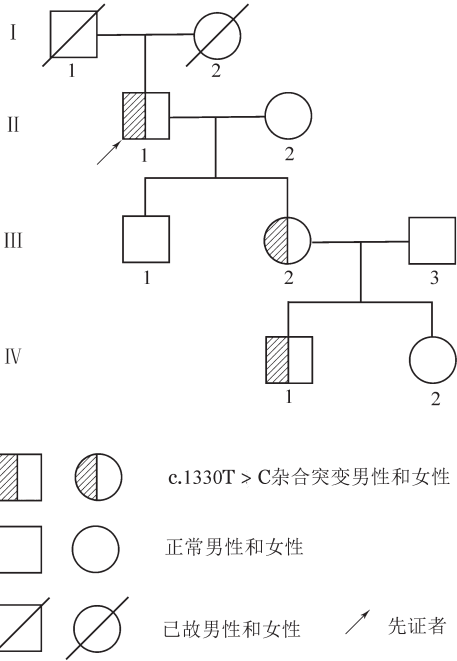


图 2 遗传性蛋白 C 缺陷症家系图(家系 2)

表 2 遗传性蛋白 C 缺陷症家系 2 凝血指标检测结果

家庭成员	年龄 (岁)	D-D (mg/L)	PS:A (%)	AT:A (%)	PC:A (%)	PC:Ag (%)
先证者(II 1)	63	0.83	92	98	40	39
妻子(II 2)	61	0.24	93	103	98	102
儿子(III 1)	33	0.24	89	114	94	97
女儿(III 2)	29	0.25	91	99	49	50
女婿(III 3)	32	0.31	85	105	95	101
外孙(IV 1)	4	0.26	90	108	43	42
外孙女(IV 2)	6	0.28	87	113	99	109
参考值		0~0.5	70~130	98~118	70~130	70~135

注 D-D:D-二聚体;PS:A:蛋白 S 活性;AT:A:抗凝血酶活性;PC:A:蛋白 C 活性;PC:Ag:蛋白 C 抗原

4. 生物信息学分析结果:保守性分析显示 Trp444 位点与其他 9 种同源物呈高度保守(图 5)。Mutation Taster、PROVEAN、Polyphen-2 和 FATHMM 在线生物信息学软件分析结果均提示 p.Trp444Arg 突变为有害突变。蛋白模型显示 p.Trp444Arg 突变导致苯环结构消失、侧链变长(图 6)。

5. 体外表达实验结果:转染野生型和突变型表达载体 48 h 后在同一视野下观察荧光显微镜下普通光镜视野和荧光视野结果如图 7 所示,野生型和突变型表达载体均转染成功,且转染效率基本一致,约为 85%。qRT-PCR 结果显示,转染 48 h 后的 HEK293T 细胞与 PC-WT 相比,PC-L278P 和 PC-W444R 的 mRNA 表达水平差异无统计学意义



( $P$  值分别为 0.938、0.182), 表明 p.Leu278Pro 和 p.Trp444Arg 两个位点的突变均不影响 PROC 基因转录(图 8)。ELISA 法检测转染后 HEK293T 细胞裂解液和上清的 PC:Ag 表达量(图 9), 以 PC-WT 表达载体转染的 HEK293T 细胞的细胞培养裂解液和上清液中的 PC:Ag 含量为 100%, PC-L278P 表达载体细胞培养裂解液和上清液中的 PC:Ag 含量分别为  $(118.1 \pm 1.9)\%$ 、 $(33.7 \pm 3.3)\%$  ( $P=0.003$ ), PC-W444R 表达载体细胞培养裂解液和上清液 PC:Ag 含量分别为  $(132.3 \pm 1.4)\%$ 、 $(5.7 \pm 0.45)\%$ 。Western blot 结果显示, PC-L278P 和 PC-W444R 表达载体的细胞裂解液中的含量明显高于野生型, 而在细胞上清液中 PC-L278P 表达量明显低于野生型, PC-W444R 表达量几乎为 0(图 10)。利用 Cy3 对转染质粒的 HEK293T 细胞中的 PC 蛋白进行染色。然后用免疫荧光显微镜观察细胞内是否存在残留/异常

的 PC 蛋白, 结果显示 PC-WT 蛋白均分布在细胞质中, PC-L278P 和 PC-W444R 蛋白均匀分布在细胞质核中, 少部分分泌到细胞质中, 但 PC-W444R 分泌至胞质的量较少, 在相同参数下荧光信号明显较弱(图 11)。

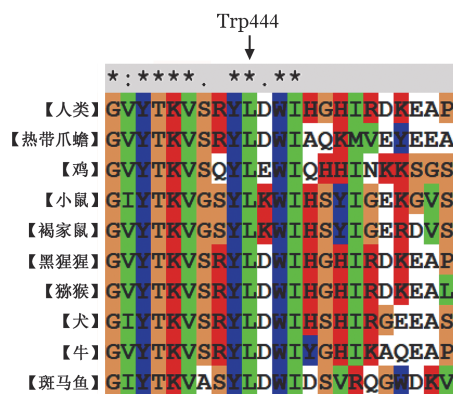


图 5 p.Trp444Arg PROC 基因序列的进化保守性分析

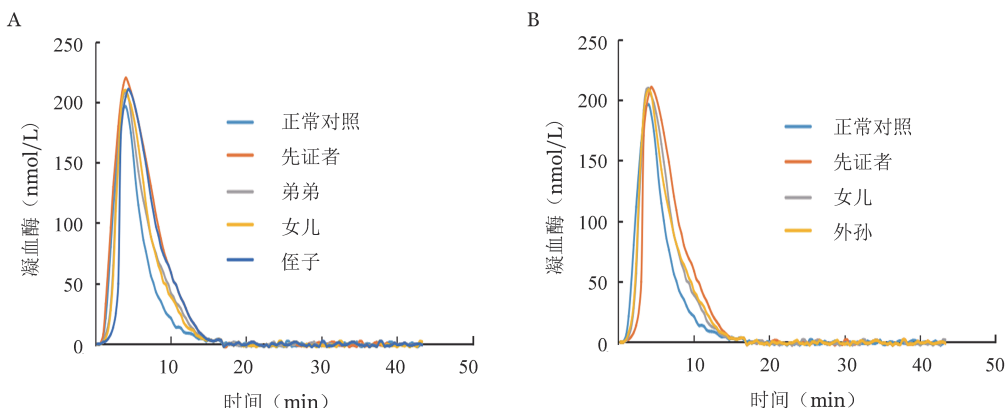


图 3 遗传性蛋白 C 缺陷症家系 1(A) 和家系 2(B) 凝血酶生成曲线

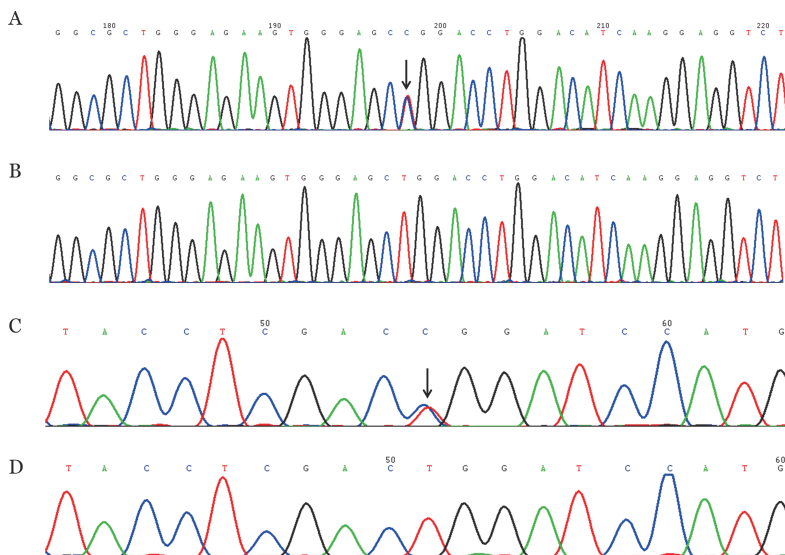


图 4 遗传性蛋白 C 缺陷症家系 PROC 基因第 9 号外显子测序结果 A c.833T>C 杂合错义突变; B c.833T>C 野生型; C c.1330T>C 杂合错义突变; D c.1330T>C 野生型

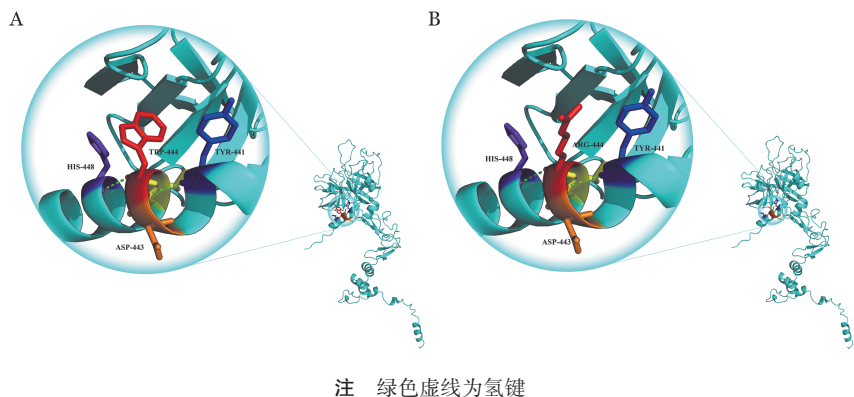


图 6 蛋白 C 蛋白模型分析图 A p.Trp444Arg 野生型;B p.Trp444Arg 突变型

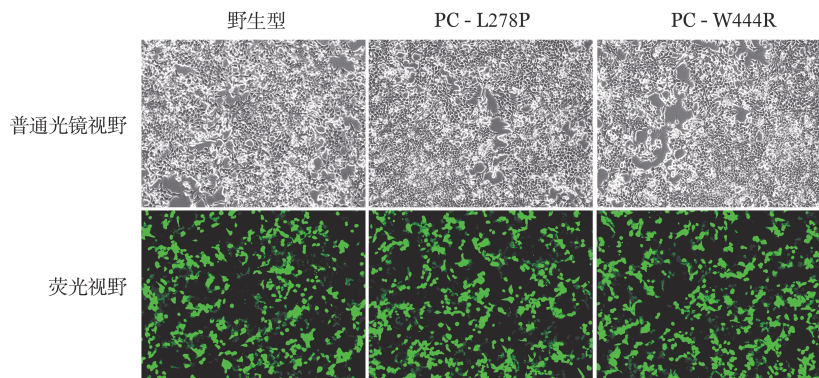


图 7 细胞转染图

讨 论

VTE 是由获得性因素(肥胖、制动、高龄、手术、妊娠、吸烟等)和遗传性易栓症共同作用造成<sup>[9]</sup>。亚洲人的 VTE 主要与 PC、PS 和抗凝血酶(AT)缺陷有关<sup>[10]</sup>。PC 缺陷症的诊断主要依靠实验室对 PC:A 和 PC:Ag 检测。根据 PC:A 水平和 PC:Ag 降低程度的不同,可将遗传性 PC 缺陷症分为 I 型和 II 型: I 型为 PC 分子合成减少,表现为 PC:A 水平和 PC:Ag 含量同步降低; II 型为合成异常的分子,表现为 PC:A 水平降低,但 PC:Ag 含量正常<sup>[11]</sup>。在本研究中,家系 1 先证者及弟弟、女儿、侄子 PC:A 水平和 PC:Ag 含量同步降低,家系 2 先证者及其女儿、外孙 PC:A 水平和 PC:Ag 含量同步降低,2 个家系均属于 I 型遗传性 PC 缺陷症。凝血酶生成试验表明两例先证者及其家系中 PROC 基因突变携带者的抗凝血活性均受损,其中两位先证者表现更明显。通过基因测序发现家系 1 先证者及其弟弟、女儿、侄子 PROC 基因第 9 外显子均存在 p.Leu278Pro 杂合错义突变,家系 2 先证者及其女儿、孙子第九外显子存在 p.Trp444Arg 杂合错义突变,排除肝肾疾病和其他导致 PC:A 水平和 PC:Ag 含量降低的因素,以上两种杂合错义突变可能分别与两个家系 PC 水平降低有关。

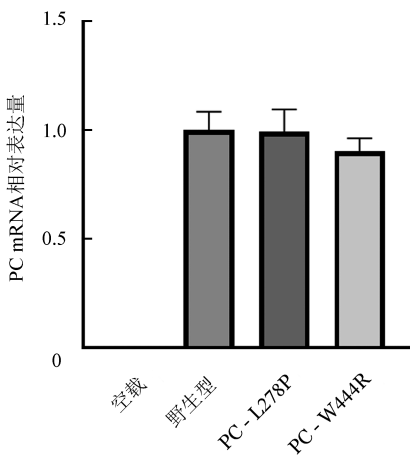


图 8 转染细胞内蛋白 C(PC)的 mRNA 表达水平

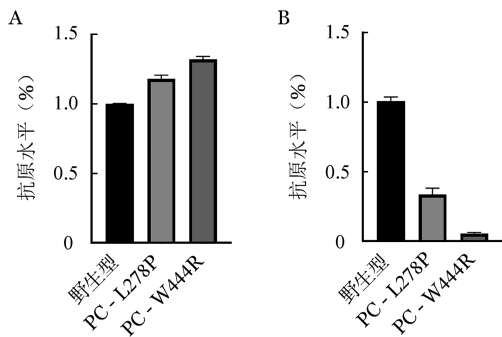


图 9 重组蛋白的 ELISA 结果 A 细胞裂解液蛋白 C 抗原水平; B 细胞上清液蛋白 C 抗原水平

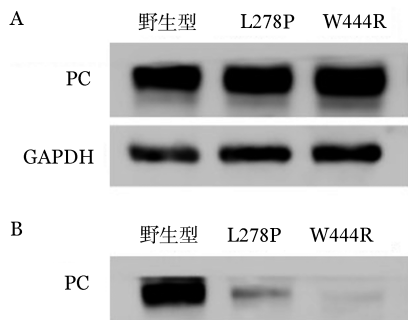


图 10 p.Leu278Pro 和 p.Trp444Arg 突变型蛋白免疫印迹分析结果 (A 细胞裂解液; B 培养上清液)

成熟 PC 蛋白由 419 个氨基酸组成,由一条 21kD 轻链与一条 41kD 重链经 Cys141 和 Cys277 之间的二硫键连接而成<sup>[12]</sup>。PC 轻链 N 末端的  $\gamma$ -羧基谷氨酸结构域是与  $\text{Ca}^{2+}$  结合的区域,为凝血酶-血栓调节蛋白复合物激活 PC 的必需区域;重链 C 末端的胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶结构域为 PC 的活性区域<sup>[13-14]</sup>。本研究的 p.Leu278Pro 和 p.Trp444Arg 均位于此活性区域。p.Leu278Pro 由 Xu 等<sup>[8]</sup>首次报道,其 PC 蛋白模型分析显示, p.Leu278Pro 突变导致 Pro278 和 Leu265 之氢键增加,形成新的苯环。同时, Huang 等<sup>[15]</sup>等通过对多种蛋白结构研究发现,带有芳香基团的氨基酸也可能作为蛋白质折叠反应的抑制剂。新的苯环形成可能会使得蛋白质的折

叠速率下降,从而影响蛋白空间结构;他们还发现蛋白质的折叠动力学也与残基的疏水特性显著相关,随着疏水氨基酸残基数量的增加,蛋白质折叠速率降低,因此,对于 p.Trp444Arg 而言,当带正电的极性氨基酸 Arg 取代非极性氨基酸 Trp 后,苯环结构消失,侧链变长,也可能会影响二级结构的稳定以及蛋白质的折叠。PC 的第 212 ~ 461 位的氨基酸组成了其催化结构域,APC 底物在切割之前必须与位于其中的底物结合区结合<sup>[16]</sup>。因此,位于此区域的 p.Leu278Pro 和 p.Trp444Arg 两个突变导致的空间结构改变可能也改变了 PC 的催化结构域稳定性,从而影响 PC 的催化效率及底物与蛋白酶的结合。

本研究构建了 PC-L278P 和 PC-W444R 表达载体瞬时转染 HEK293T 细胞,结果表明两个突变均不影响 PROC 基因的转录。为研究这两个突变对 PC 蛋白表达水平的影响,对两个突变载体转染后的 HEK293T 细胞裂解液和上清液进行 Western blot 试验分析,结果显示两个突变型 PC 蛋白在裂解液中的含量均高于野生型,而在上清液中的含量均低于野生型,表明 p.Leu278Pro 和 p.Trp444Arg 两种突变均能影响 PC 蛋白由细胞内向细胞外的分泌。同时,ELISA 和细胞免疫荧光结果也显示两个 PC 突变蛋白在细胞内含量较高,与 Western Blot 结果一致。

遗传性 PC 缺陷症大多是由于 PROC 单一位点

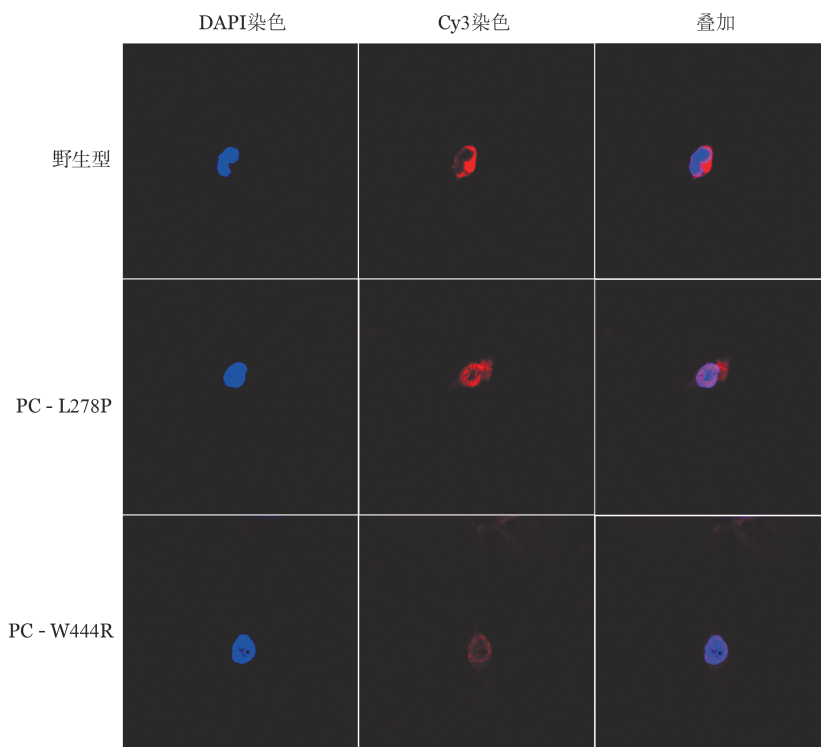


图 11 重组蛋白的细胞免疫荧光分析结果(细胞核用蓝色荧光显示,PC 蛋白用红色荧光显示)



的杂合突变所致,纯合和复合杂合突变较为罕见,纯合子患者的 PC 活性非常低或无法检测到(通常小于 1%)<sup>[17]</sup>,临床症状一般出现在出生后 2 h 到几个月,伴有危及生命的血栓并累及中枢神经系统、眼睛、肾脏和皮肤(暴发性紫癜)<sup>[18]</sup>。本研究两位先证者携带 PROC 基因突变杂合子,PC 水平约为正常人的 50%,家系 1 先证者下肢 DVT 可能与 p.Leu278Pro 杂合错义突变以及长期制动有关。家系 2 先证者发生严重 DVT 和 PE,可能与 p.Trp444Arg 杂合错义突变、长期吸烟、制动及高龄等易栓因素的共同作用有关。住院期间,家系 1 先证者连续 3 d 皮下注射那屈肝素钙抗凝治疗,之后改为口服利伐沙班 15 mg 每日 2 次,连续 20 d,复查双下肢血管 B 超显示双下肢深静脉血栓较前好转,出院后利伐沙班改为 20 mg/d,三个月后改为 10 mg/d。家系 2 先证者接受连续 8 d 皮下注射低分子肝素钙抗凝治疗后,影像学显示肺血栓栓塞无明显改善,遂改为口服利伐沙班 15 mg 每日 2 次,3 周后复查肺动脉造影示血栓较前好转,利伐沙班剂量调整为 20 mg/d,未再发生血栓事件。

综上所述,PROC 基因第 9 外显子杂合错义突变 p.Leu278Pro 和 p.Trp444Arg 导致 PC 蛋白分泌障碍可能是本研究两个遗传性 PC 缺陷症家系的分子致病机制。

**利益冲突** 所有作者声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 温梦珍:病例资料收集,文献检索与分析,论文撰写;杨丽红:研究设计及实施,论文审核;其他作者:参与研究

## 参考文献

- [1] Lu Y, Giri H, Villoutreix BO, et al. Gly197Arg mutation in protein C causes recurrent thrombosis in a heterozygous carrier[J]. J Thromb Haemost, 2020, 18 (5): 1141-1153. DOI: 10.1111/jth.14777.
- [2] Liu H, Wang HF, Tang L, et al. Compound heterozygous protein C deficiency in a family with venous thrombosis: Identification and in vitro study of p.Asp297His and p.Val420Leu mutations [J]. Gene, 2015, 563 (1): 35-40. DOI: 10.1016/j.gene.2015.03.002.
- [3] 曾蔓霖, 杨丽红, 邹安庆, 等. 两个遗传性蛋白 C 缺陷症家系的临床特征与基因突变分析[J]. 中华血液学杂志, 2023, 44(11): 952-955. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2023.11.013. Zeng ML, Yang LH, Zou AQ, et al. Clinical characteristics and gene mutation analysis of two families with hereditary protein C deficiency [J]. Chin J Hematol, 2023, 44 (11): 952-955. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2023.11.013.
- [4] Zou C, Li TY, Liu L, et al. Hereditary protein C deficiency with portal vein thrombosis in a Chinese male: A case report[J]. Exp Ther Med, 2022, 24(6): 751. DOI: 10.3892/etm.2022.11688.
- [5] Bakhsh E. The benefits and imperative of venous thromboembolism risk screening for hospitalized patients: a systematic review [J]. J Clin Med, 2023, 12 (22): 7009. DOI: 10.3390/jcm12227009.
- [6] Navarrete S, Solar C, Tapia R, et al. Pathophysiology of deep vein thrombosis[J]. Clin Exp Med, 2023, 23(3): 645-654. DOI: 10.1007/s10238-022-00829-w.
- [7] 徐琦煜, 杨丽红, 谢海啸, 等. 不同家系遗传性蛋白 C 缺陷症 12 例临床表型和基因突变分析[J]. 中华血液学杂志, 2020, 43 (1): 35-40. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2022.01.008. Xu QY, Yang LH, Xie HX, et al. Clinical phenotype and gene mutation analysis of 12 patients with hereditary protein C deficiency in different families [J]. Chin J Hematol, 2020, 43 (1): 35-40. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2022.01.008.
- [8] Xu Q, Wang M, Jin Y, et al. Two heterozygous mutations associated with type I protein C deficiency in two Chinese independent families[J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2021, 32(8): 596-602. DOI: 10.1097/MBC.0000000000001065.
- [9] Yao M, Ma J, Wu D, et al. Neutrophil extracellular traps mediate deep vein thrombosis: from mechanism to therapy[J]. Front. Immunol, 2023, 14: 1198952. DOI: 10.1007/s10238-022-00829-w.
- [10] Zhang Z, Yang Z, Chen M, et al. Compound heterozygous protein C deficiency with pulmonary embolism caused by a novel PROC gene mutation: Case report and literature review [J]. Medicine, 2022, 101 (42): e31221. DOI: 10.1097/MD.00000000000031221.
- [11] Yue Y, Liu S, Han X, et al. Pathogenic variants of PROC gene caused type I activity deficiency in a familial Chinese venous thrombosis [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23 (10): 7099-7104. DOI: 10.1111/jcmm.14563.
- [12] Zhao XY, Wilmen A, Wang DL, et al. Targeted inhibition of activated protein C by a non-active-site inhibitory antibody to treat hemophilia [J]. Nat Commun, 2020, 11 (1): 2992. DOI: 10.1038/s41467-020-16720-9.
- [13] Wildhagen KC, Lutgens E, Loubel ST, et al. The structure-function relationship of activated protein C: Lessons from natural and engineered mutations [J]. Thromb Haemost, 2011, 106 (6): 1034-1045. DOI: 10.1160/TH11-08-0522.
- [14] Stojanovski BM, Pelc LA, Di Cera E. Role of the activation peptide in the mechanism of protein C activation [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 11079. DOI: 10.1038/s41598-020-68078-z.
- [15] Huang JT, Xing DJ, Huang W, et al. Relationship between protein folding kinetics and amino acid properties [J]. Amino Acids, 2012, 43(2): 567-572. DOI: 10.1007/s00726-011-1189-3.
- [16] Yamamoto K, Matsushita T, Sugiura I, et al. Homozygous protein C deficiency: identification of a novel missense mutation that causes impaired secretion of the mutant protein C [J]. J Lab Clin Med, 1992, 119(6): 682-689.
- [17] Ghassemi F, Abdi F, Esfahani M. Ophthalmic manifestations of congenital protein C deficiency: a case report and mini review [J]. BMC Ophthalmol, 2020, 20(1): 282. DOI: 10.1186/s12886-020-01424-x.
- [18] Cherrabi H, Oukhouya MA, Smahi F, et al. Protein C deficiency in a child with inferior vena cava thrombosis following abdominal trauma [J]. Journal of Pediatric Surgery Case Reports, 2022, 86: 102449. DOI: 10.1016/j.epsc.2022.102449.

(收稿日期:2024-06-28)

(本文编辑:徐茂强)