

·论著·

# 蛋白C缺陷症四例报告及基因分析

高波 周荣富 欧阳建 陈兵 徐勇 李萍

**【摘要】** 目的 探讨蛋白C缺陷症的分子发病机制。方法 对4例蛋白C缺陷症患者进行常规诊断和基因分析。结果 ①例1,女,40岁。临床诊断:左下肢深静脉血栓形成。蛋白C活性(PC:C)48%,蛋白S活性(PS:C)26.3%,抗凝血酶活性(AT:C)75.6%。基因检测结果:蛋白C基因(PROC)启动子C5156T杂合突变、2号外显子区域存在A6578T杂合突变。给予抗凝、溶栓、滤器植入等治疗,症状好转出院。②例2,女,32岁。临床诊断:双下肢深静脉血栓,双上、下肢缺血,双下肢皮肤软组织感染。PC:C 27%,PS:C 22.9%,AT:C 86.7%。基因检测结果:PROC基因启动子C5156T杂合突变、A5045T杂合突变。给予抗凝、抗感染等治疗,因呼吸衰竭、感染性休克、DIC死亡。③例3,女,28岁。临床诊断:右髂静脉及股深静脉血栓。PC:C 58%,PS:C 57.3%,AT:C 80.8%。基因检测结果:PROC启动子C4867T杂合突变,7号外显子12702-12704 AGA(Arg192)或12705-12707 AGA(Arg193)杂合缺失,9号外显子G15240A杂合突变。给予抗凝、溶栓、滤器植入等治疗,症状好转出院。④例4,男,30岁。临床诊断:左下肢深静脉血栓,双下肺动脉栓塞伴双下肺梗死。PC:C 50%,PS:C 75.0%,AT:C 89.1%。基因检测结果:PROC启动子C4867T纯合突变、G4880A纯合突变和A5045T杂合突变,2号外显子T6589C杂合突变。给予抗凝、溶栓、滤器植入等相关治疗,症状好转出院。⑤多态性分析:PROC基因启动子C4867T杂合突变、G4880A纯合突变、C5156T杂合突变为PROC启动子多态性位点。**结论** PROC启动子多态性位点G4880A、C4867T、C5156T,错义突变A5045T、A6578T、G15240A,缺失突变AGA12702-12704del或12705-12707del可能与蛋白C缺陷症有关。PROC启动子错义突变A5045T、A6578T、G15240A,缺失突变AGA12702-12704del或12705-12706del是国际首次报告。

**【关键词】** 蛋白质C缺乏; 静脉血栓形成; 基因检测; 多态性,单核苷酸

基金项目:江苏省卫生厅135开放课题(K0605);江苏省科技厅临床医学科技专项(BL20122005)

**Gene diagnosis of four patients with protein C deficiency** Gao Bo, Zhou Rongfu, Ouyang Jian, Chen bing, Xu Yong, Li Ping. Department of Hematology, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China  
Corresponding author: Zhou Rongfu, Email: rfzhou@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the molecular etiology of protein C (PC) deficiency. **Methods** Routine diagnosis and genetic analysis were performed on four probands with PC deficiency. **Results** ①Case 1, female, 40 years old, diagnosed of deep vein thrombosis in left lower limb. PC activity (PC: C) was 48%, PS activity (PS: C) was 26.3%, AT activity (AT: C) was 75.6%. Genetic analysis discovered heterozygous mutation C5156T on promoter of PC gene, together with heterozygous mutation A6578T on Exon2 of PC gene. After anticoagulant, thrombolysis and filter implantation therapies, the patient went home with improvement. ②Case 2, female, 32 years old, diagnosed of deep vein thrombosis in both lower limb, ischemia in both lower and upper limb, and skin infection in both lower limb. PC: C 27%, PS: C 22.9%, AT: C 86.7%. Genetic analysis identified heterozygous mutation C5156T, together with heterozygous mutation A5045T on promoter of PC gene. After anticoagulant and anti-infection therapy, the patient died of respiratory failure, septic shock and DIC. ③Case 3, female, 28 years old, diagnosed of vein thrombosis in right iliac and femoral vein. PC: C 58%, PS: C 57.3%, AT: C 80.8%. Genetic analysis disclosed heterozygous mutation C4867T on promoter of PC gene, AGA 12702- 12704del or 12705-12707del on Exon7, the latter one lead to Arg192 or 193del. Heterozygous mutation G15240A on Exon9 was also found. After anticoagulant, thrombolysis and filter implantation therapies, the patient went home

with improvement. ④ Case 4, male, 30 years old, diagnosed of vein thrombosis in right iliac and femoral vein. PC:C 50%, PS:C 75.0%, AT:C 89.1%. Genetic analysis found homozygous mutation C4867T and G4880A on promoter of PC gene, heterozygous mutation A5045T on promoter and heterozygous mutation T6589C on Exon2. After anticoagulant, thrombolysis and filter implantation therapies, the patient went home with improvement. ⑤ Polymorphism analysis revealed that heterozygous mutation C4867T, homozygous mutation G4880A, and heterozygous mutation C5156T were polymorphism sites of PC gene.

**Conclusions** Polymorphism sites (G4880A, C4867T, C5156T), missense mutation A5045T, A6578T, G15240A, and deletion mutation AGA12702-12704del, 12705-12707del may be related to deficiency of PC. Missense mutation A5045T, A6578T, G15240A, and deletion mutation AGA12702-12704, 12705-12707del were first reported worldwide.

**[Key words]** Protein C deficiency; Venous thrombosis; Genetic testing; Polymorphism, single nucleotide

**Fund program:** The Health Department of Jiangsu Province 135 Open Project (K0605); Jiangsu Province Science and Technology Department of Clinical Medical Science and Technology (BL20122005)

蛋白C缺陷症是一种常染色体显性遗传性疾病,1981年由Griffin等<sup>[1]</sup>首次报道。蛋白C是一种由肝脏产生的维生素K依赖性血浆蛋白,人类蛋白C基因(PROC)位于第2号染色体2q(4,6),基因组DNA全长11 kb,有9个外显子(1 790 bp)。蛋白C的体内半寿期约6 h,明显低于凝血因子Ⅱ(FⅡ)、FIX、FX这些维生素K依赖性凝血因子<sup>[2]</sup>。蛋白C在凝血酶或凝血酶-血栓调节蛋白复合物的作用下转变为活化蛋白C(APC)<sup>[3]</sup>,APC与其辅因子蛋白S形成复合物,灭活活化FⅤ(FⅤa)和活化FⅧ(FⅧa)并增强纤溶活性,因此具有抗凝作用。当蛋白C缺乏时,FⅤa和FⅧa灭活减少、血循环纤溶能力降低,致使纤维蛋白形成过多而发生血栓<sup>[4]</sup>。截至目前,已发现300多种PROC基因突变,但只有少数涉及亚洲人群<sup>[4-6]</sup>。

## 病例与方法

1. 病例资料:例1:女,40岁。因“左下肢肿胀1周”入院。查体:双下肢感觉、活动正常,左下肢凹陷性水肿,未见下肢浅静脉曲张及皮肤色素沉着,Neuhof征(+),Homans征(+),右下肢无肿胀,双侧股动脉、腘动脉、足背动脉搏动可及。蛋白C活性(PC:C)48%(正常参考值60%~140%),蛋白S活性(PS:C)26.3%(正常参考值59.0%~118.0%),抗凝血酶活性(AT:C)75.6%(正常参考值103.2%~113.8%)。彩色多普勒血管超声:左下肢深静脉血栓形成。患者既往无特殊病史,无血栓病史,否认近亲婚配史,家族成员中无其他严重血栓病例。患者籍贯浙江,家属拒绝来院行家系筛查。给予抗凝、溶栓、滤器植入等治疗,症状好转出院。

例2:女,32岁。因“双下肢渐进性肿痛瘀紫

1个月余、加重伴皮肤破溃2 d”入院。查体:双侧股动脉及足背动脉搏动未触及,小腿遍布张力性水疱,局部破溃渗出,异味明显,双下肢可轻度屈曲,抬起无力。双腕至远端皮肤呈暗紫色,皮温下降,感觉减退,活动无障碍。PT、APTT均不凝(已接受抗凝治疗),D-二聚体6 350 μg/L,HGB 62 g/L。PC:C 27%,PS:C 22.9%,AT:C 86.7%。彩色多普勒血管超声:双下肢深静脉血栓形成,动脉狭窄。否认既往特殊病史,否认血栓病史,否认近亲婚配,家庭其他成员血栓史不详。给予抗凝、抗感染等治疗,因呼吸衰竭、感染性休克、DIC死亡。

例3:女,28岁,因“右下肢肿胀、疼痛2周”入院。查体:双下肢感觉、活动正常,右下肢肿胀,Neuhof征(+),Homans征(+). PC:C 58%,PS:C 57.3%,AT:C 80.8%。彩色多普勒血管超声:右侧髂静脉及股深静脉血栓。既往否认特殊病史,否认严重血栓病史,否认近亲婚配,家族成员中无其他血栓病例。家族成员拒绝来院筛查。给予抗凝、溶栓、滤器植入等治疗,症状好转出院。

例4:男,30岁,因“左下肢肿胀、疼痛1周”入院。查体:双下肢感觉、活动正常,左下肢肿胀(以左大腿明显),无凹陷性水肿,无浅静脉曲张和皮肤色素沉着,Neuhof征(+),Homans征(+),右下肢无肿胀,双侧股动脉、腘动脉及足背动脉搏动可及。PC:C 50%,PS:C 75.0%,AT:C 89.1%。彩色多普勒血管超声:左下肢股浅、腘、胫后静脉血栓形成。肺血管造影:双下肺动脉栓塞伴双下肺梗死。给予抗凝、溶栓、滤器植入等治疗,症状好转出院。

2. 基因分析方法:采用E.Z.N.A. SE Blood DNA Kit(上海索莱宝生物科技有限公司产品)提取基因组DNA并用PCR法扩增DNA,PCR扩增引物

参照文献[7]设计。PCR产物纯化后采用双脱氧链终止法在 ABI 3130 测序仪上进行测序(上海美吉生物医药科技有限公司),用 Chromas 软件和 Lasergene 软件将测序结果与美国 NCBI 基因库(GeneBank)所公布的 PC 基因序列(NG\_016323.1, NP\_000303.1)进行比对以寻找基因突变位点。检出的突变位点均反向测序证实。

3. 基因多态性分析:抽提 50 名健康人外周血 DNA,针对 4 例蛋白 C 缺陷症患者检出的 PROC 基因突变结果进行相应突变位点 PCR 扩增。

## 结 果

1. 基因分析结果:①例 1 检出 PROC 基因启动子 C5156T 杂合突变、2 号外显子 A6578T 杂合突变。②例 2 检出 PROC 基因启动子 C5156T 杂合突变和 A5045T 杂合突变。③例 3 检出 PROC 基因启动子 C4867T 杂合突变、7 号外显子区 12702-12704 AGA(Arg192) 或 12705-12707 AGA(Arg193) 杂合缺失、9 号外显子 G15240A 杂合突变(Arg 370 His)。④例 4 检出 PROC 启动子 C4867T 纯合突变、G4880A 纯合突变,2 号外显子 T6589C 杂合突变。

经查阅 Pubmed 文献数据库,PROC 基因启动子错义突变 A5045T(图 1)、A6578T(图 2)、G15240A(图 3)以及缺失突变 AGA12702-12704del 或 12705-12707del(图 4)为国际首次报告。

2. 基因多态性分析:取 50 名健康人血液标本抽提 DNA,针对 4 例蛋白 C 缺陷症患者检出的突变位点进行相应外显子部位 PCR 扩增。结果表明,PROC 基因启动子 C4867T 纯/杂合突变、G4880A 纯合突变,C5156T 杂合突变为 PROC 基因多态性。

4 例蛋白 C 缺陷症患者 PROC 启动子三个多态性位点(G4880A、C4867T、C5156T)见表 1,PROC 基

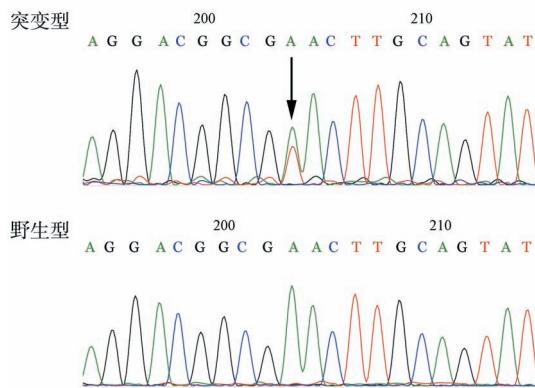


图 1 例 2 蛋白 C 基因启动子 A5045T 杂合突变(箭头所示为突变位点)

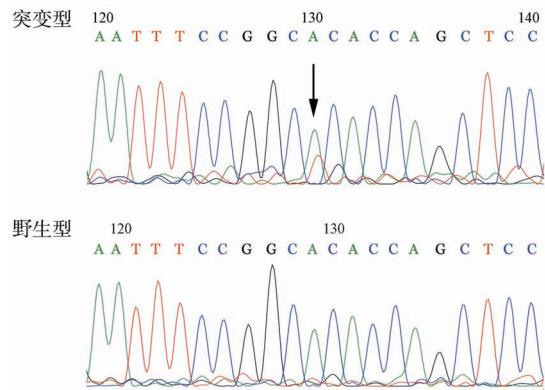


图 2 例 1 蛋白 C 基因 2 号外显子 A6578T 杂合突变(箭头所示为突变位点)

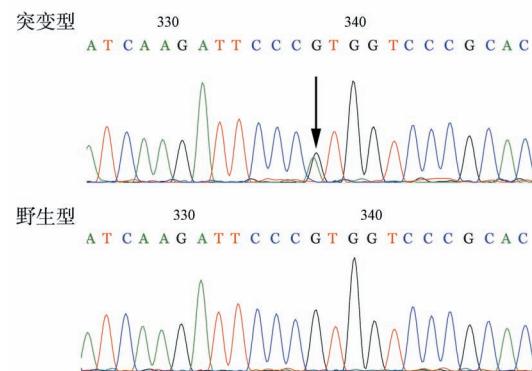


图 3 例 3 蛋白 C 基因 9 号外显子 G15240A 杂合突变(箭头所示为突变位点)

因分析结果详见表 2。

## 讨 论

蛋白 C 缺乏在正常人群中的检出率为 0.2%~0.4%,在静脉血栓栓塞症(VTE)患者的检出率为 2.3%~3.3%<sup>[8]</sup>。我国蛋白 C 缺乏检出率为 2.26%<sup>[9]</sup>。由于部分患者临床表现轻微甚至无明显临床表现,蛋白 C 缺陷症的实际患病率资料难以获得。本组 4 例患者年龄 28~40 岁,与文献[10]报道的杂合突变个体血栓事件多发生于 30~40 岁、很少在 20 岁之前发病的结果相符。在本研究中,未发现文献[4]报道的中国人 PROC 基因突变热点 Arg147Trp 和 Lys150del。

PROC 基因有 9 个外显子,其中 8 个编码氨基酸,1 号外显子不翻译,2 号外显子编码信号肽,3 号外显子编码前肽和羧基谷氨酸结构域,4 号外显子主要与结合部位相关,5、6 号外显子编码 EGF 样结构域,7 号外显子编码连接肽(Lys156-Arg157)和活化肽,8 号外显子编码活化中心的 His211,9 号外显子编码活化中心的 Asp257 和 Ser360<sup>[11]</sup>。本研究中,

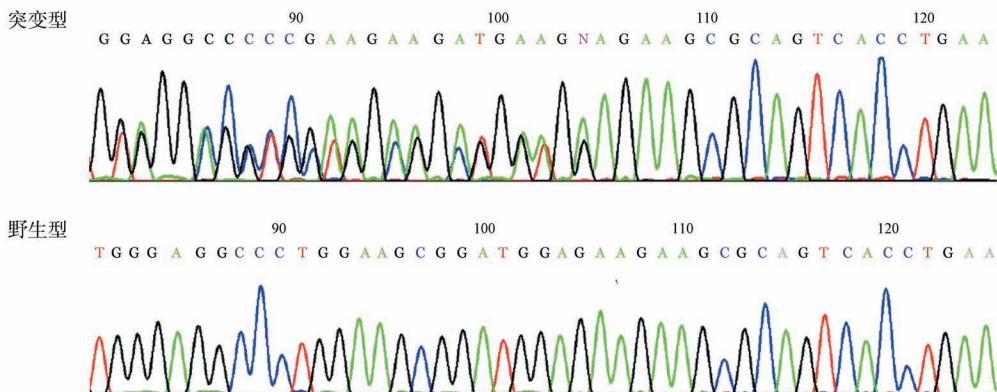


图4 例3蛋白C基因7号外显子12702-12704 AGA(Arg192)或12705-12707 AGA(Arg193)杂合缺失

表1 4例蛋白C缺陷症患者蛋白C基因启动子多态性位点

例号	4867C/T	4880G/A	5156C/T
1	C/C	G/G	C/T
2	C/C	G/G	C/T
3	C/T	G/G	C/C
4	T/T	A/A	C/C

例1 PROC基因启动子存在多态性位点C5156T,2号外显子存在A6578T导致的Thr18Ser改变,通过影响信号肽区域改变蛋白活性,是其PC:C降低的主要原因;例2存在启动子多态性C5156T和突变A5045T,虽然不直接编码氨基酸,但可影响剪接过程,对蛋白活性造成影响;例3 PROC基因存在启动子C4867T多态性位点,7号外显子存在缺失突变,影响编码链接肽和活化肽过程,对蛋白活性产生影响,9号外显子G15240A杂合突变(导致氨基酸改变)影响蛋白结构中的两个活化三角区域,从而影响蛋白活性;例4存在PROC基因启动子多态性位点G4880A纯合突变和C4867T纯合突变,后者杂合型为多态性位点,纯合型则不是。启动子不编码氨基酸,但可影响转录水平,对蛋白功能有轻微影响,该启动子多态性位点可使PC:C降低<sup>[11]</sup>。

研究表明,启动子多态性位点可导致PC:C降低<sup>[12]</sup>。本研究4例患者PROC基因启动子突变分别为C4867T、G4880A、A5054T、C5156T,均为PROC基因的多态性位点,可能是导致这些患者PC:C下降的原因。正常人群中也可出现此类突变,但并不表现为PC:C降低或出现血栓症状,提示遗传性蛋白C缺陷症患者血栓形成多种因素所致。体内其他抗凝蛋白活性水平和患者手术、卧床等一般状态也可导致血栓形成。

遗传性蛋白C缺陷症杂合子与正常人的血浆PC:C水平可有重叠,所以依据血浆PC:C诊断该疾病有一定的困难。以往的研究证实,PROC基因启动子第4867、4880、5054位分别存在C/T、A/G、A/T多态性,其中基因型纯合CC/GG/TT者血浆PC:C较纯合TT/AA/AA者低22%,而且前者的杂合患者发生静脉血栓的危险性更高<sup>[8,13-16]</sup>。本研究中,4例蛋白C缺陷患者PROC基因启动子区域存在相同的多态性位点,例1、2为CC/GG/TT纯合型,例3为杂合型,推测是导致PC:C降低的主要原因。

## 参考文献

- [1] Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, et al. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease [J]. J Clin Invest, 1981, 68 (5): 1370-1373. doi: 10.1172/JCI110385.
- [2] Reitsma PH, Bernardi F, Doig RG, et al. Protein C deficiency: a database of mutations, 1995 update. On behalf of the Subcommittee on Plasma Coagulation Inhibitors of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH [J]. Thromb Haemost, 1995, 73(5):876-889.
- [3] Kottke-Marchant K, Comp P. Laboratory issues in diagnosing abnormalities of protein C, thrombomodulin, and endothelial cell protein C receptor [J]. Arch Pathol Lab Med, 2002, 126 (11):1337-1348.
- [4] Ding Q, Shen W, Ye X, et al. Clinical and genetic features of protein C deficiency in 23 unrelated Chinese patients [J]. Blood Cells Mol Dis, 2013, 50 (1):53-58. doi: 10.1016/j.bcmd.2012.08.004.
- [5] Reitsma PH, Poort SR, Allaart CF, et al. The spectrum of genetic defects in a panel of 40 Dutch families with symptomatic protein C deficiency type I: heterogeneity and founder effects [J]. Blood, 1991, 78(4):890-894.
- [6] Ohga S, Kang D, Kinjo T, et al. Paediatric presentation and outcome of congenital protein C deficiency in Japan [J]. Haemophilia, 2013, 19(3):378-384. doi: 10.1111/hae.12097.

表2 4例蛋白C缺陷症患者蛋白C基因分析结果

例号	性别	年龄(岁)	突变位置	突变位点	多态性位点	氨基酸改变
1	女	40	2号外显子	A6578T杂合(错义突变)	否	Thr18Ser
			启动子	C5156T杂合突变		
2	女	32	启动子	C5156T杂合突变	是	无
			启动子	A5045T 杂合突变		
3	女	28	启动子	C4867T杂合突变	否	无
			7号外显子	AGA12702-12704del或12705-12707del(缺失突变)		
			9号外显子	A15240G杂合(错义突变)	是	Arg192del或Arg193del
4	男	30	启动子	C4867T纯合突变	否	His370Arg
			启动子	G4880A纯合突变		
			2号外显子	T6589C杂合(同义突变)	是	Pro22Pro

- [7] Tatewaki H, Iida H, Nakahara M, et al. A novel splice acceptor site mutation which produces multiple splicing abnormalities resulting in protein S deficiency type I [J]. Thromb Haemost, 1999, 82(1):65-71.
- [8] Middeldorp S, Levi M. Thrombophilia: an update [J]. Semin Thromb Hemost, 2007, 33 (6):563- 572. doi: 10.1055/s-2007-985752.
- [9] 闫振宇, 华宝来, 马西虎, 等. 672例静脉血栓栓塞症相关危险因素分析 [J]. 中华血液学杂志, 2007, 28 (9):579- 582. doi: 10.3760/j.issn:0253-2727.2007.09.002.
- [10] Lensen RP, Rosendaal FR, Koster T, et al. Apparent different thrombotic tendency in patients with factor V Leiden and protein C deficiency due to selection of patients [J]. Blood, 1996, 88(11):4205-4208.
- [11] Dávid M, Losonczy H, Sas G, et al. Identification of mutations in 15 Hungarian families with hereditary protein C deficiency [J]. Br J Haematol, 2000, 111(1):129-135. doi: 10.1111/j.1365-2141.2000.02324.x.
- [12] Aiach M, Nicaud V, Alhenc-Gelas M, et al. Complex association of protein C gene promoter polymorphism with circulating

protein C levels and thrombotic risk [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19 (6):1573- 1576. doi: 10.1161/01.ATV.19.6.1573.

- [13] De Stefano V, Rossi E, Za T, et al. Prophylaxis and treatment of venous thromboembolism in individuals with inherited thrombophilia [J]. Semin Thromb Hemost, 2006, 32 (8):767- 780. doi: 10.1055/s-2006-955459.
- [14] Lu D, Bovill EG, Long GL. Molecular mechanism for familial protein C deficiency and thrombosis in protein C<sub>Vermont</sub> (Glu<sup>20</sup>→Ala and Val<sup>34</sup>→Met) [J]. J Biol Chem. 1994, 269 (46):29032-29038.
- [15] James AH. Thromboembolism in pregnancy: recurrence risks, prevention and management [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2008, 20(6):550-556. doi: 10.1097/GCO.0b013e328317a427.
- [16] Bauer KA. Management of thrombophilia [J]. J Thromb Haemost, 2003, 1 (7):1429- 1434. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00274.x.

(收稿日期:2016-04-12)

(本文编辑:徐茂强)

## ·读者·作者·编者·

### 关于非法网站冒用《中华血液学杂志》名义进行征稿的特别提醒

近期我们发现一些网站冒用《中华血液学杂志》名义征稿,并承诺“职称论文权威快速代发”。为此,我刊特别提醒各位作者,向《中华血液学杂志》投稿,一定要登录中华医学会官方网站首页(<http://www.cma.org.cn/>),进入“业务中心”,在“杂志社远程稿件管理系统”中投稿,或通过本刊官方网站(<http://www.hematoline.com>)进行投稿,以免造成不必要的损失。本刊编辑部联系电话:022-27304167。

本刊编辑部