

一个复合杂合突变导致的遗传性凝血因子 XI 缺陷症家系

郑晓勇 金艳慧 徐瑶瑶 杨丽红 朱丽青 王欢欢 蒋淑婷 王明山

温州医科大学附属第一医院医学检验中心,温州 325015

通信作者:王明山,Email:wywms@126.com

基金项目:温州市科技局项目(Y2020110)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.08.014

A family with hereditary FXI deficiency caused by compound heterozygous mutation

Zheng Xiaoyong, Jin Yanhui, Xu Yaoyao, Yang Lihong, Zhu Liqing, Wang Huanhuan, Jiang Shuting, Wang

Mingshan

The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325015, China

Corresponding author: Wang Mingshan, Email: wywms@126.com

遗传性凝血因子 XI (FXI) 缺陷症是一种罕见的常染色体遗传病,全球年发病率约为百万分之一,在德系犹太人中高达 1/450^[1]。其主要临床表现为创伤或手术后出血难止,尤其是在口腔、泌尿道等高纤溶部位较为多见,自发性出血少见,无性别差异^[2-3]。本文报告一个遗传性 FXI 缺陷症家系凝血表型和 F11 基因检测结果并初步探讨其分子致病机制。

对象与方法

1. 家系资料:先证者,女,44 岁,既往体健,肝肾功能正常,因突发性耳聋拟行溶栓治疗,查凝血功能指标显示活化部分凝血活酶时间 (APTT) 为 93.9 s (参考值 29.0~43.0 s) 且能被正常血浆纠正,FXI 活性 (FXI:C) 2%,FXI 抗原 (FXI:Ag) 4.5%,其他凝血功能指标均正常。其家系成员 (共 3 代 5 人) 均无出血及血栓病史,先证者父母非近亲婚配。家系遗传图见图 1。

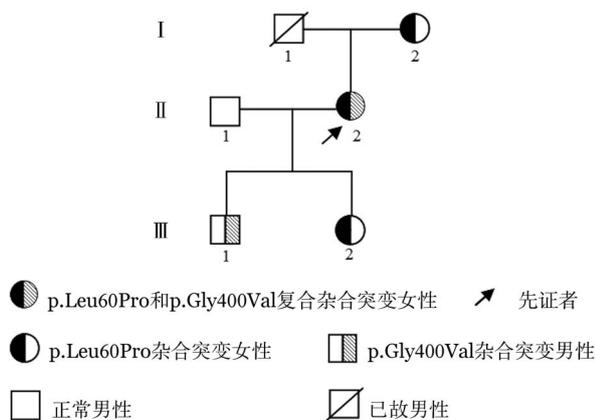


图 1 凝血因子 XI 缺陷症家系图

2. 健康对照组:正常对照为 100 名我院健康体检者,以建立本实验室凝血指标生物参考值及用于排除基因多态

性。男 53 名,女 47 名,年龄 22~56 岁,均无肝、肾功能疾病,且无其他基础性疾病。所有受试者均知情同意。

3. 标本采集和处理:采集所有受试者外周血 2.7 ml,109 mmol/L 枸橼酸钠 1:9 抗凝,分离乏血小板血浆、血细胞,分别用于临床表型检测、基因组 DNA 提取。

4. 实验室凝血指标检测:采用 Stago-STA-R 全自动血凝仪 (法国 Stago 公司产品及配套试剂) 一期凝固法检测凝血酶原时间 (PT)、APTT、纤维蛋白原 (FIB)、凝血酶时间 (TT)、凝血因子 VIII 活性 (FVIII:C)、凝血因子 IX 活性 (FIX:C)、FXI:C、凝血因子 XII 活性 (FXII:C) 和狼疮抗凝物。免疫比浊法检测 D-二聚体 (D-D)。采用 ELISA 法测定 FXI:Ag。

5. 全血基因组 DNA 提取及 PCR 扩增:使用北京天根生化科技有限公司提供血液样本基因组 DNA 提取试剂盒提取全血基因组 DNA。PCR 引物由上海桑尼生物科技有限公司合成,引物序列参见文献 [4]。PCR 反应体系 25 μ l,其中 Taq PCR Mastermix 12.5 μ l,DNA 模板 2 μ l,正向引物 1 μ l,反向引物 1 μ l,ddH₂O 8.5 μ l。PCR 反应步骤:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s;扩增 30 个循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增结束后,取 PCR 产物 5 μ l 经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定,用 Goldview I 标记 PCR 产物大小。

6. F11 基因测序:将 PCR 扩增产物送上海桑尼生物工程有限公司进行测序。用 Chromas 软件将测序结果与美国 NCBI 基因库公布的 F11 基因序列 (GenBank AY191837) 比对,寻找突变位点,再通过反向测序进行验证。待明确突变位点后,再做其家系成员相应位点的 PCR 扩增及测序。

7. 生物信息学特性分析:用 ClustalX-2.1-win 软件将人类 FXI 突变氨基酸与其同源物种小家鼠 (Mus musculus)、黑猩猩 (Pan troglodytes)、家犬 (Canis lupus familiaris)、牛 (Bos Taurus) 和西方爪蟾 (Xenopus tropicalis) (同源物种氨基酸序列来源:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene) 的氨基酸

序列进行比对,分析氨基酸的保守性;采用 MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org>)、PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>)、PROVEAN 和 SIFT (<http://provean.jcvi.org/index.php>) 评估突变氨基酸对蛋白功能的影响(蛋白质参考 ID P03951,蛋白质参考转录本 ID ENST00000403665);使用 Swiss-PdbViewer4.0.1 软件分析 FXI 蛋白模型突变前后氨基酸结构和次级键的改变(FXI 蛋白模型文件 pdb:2f83)。

结 果

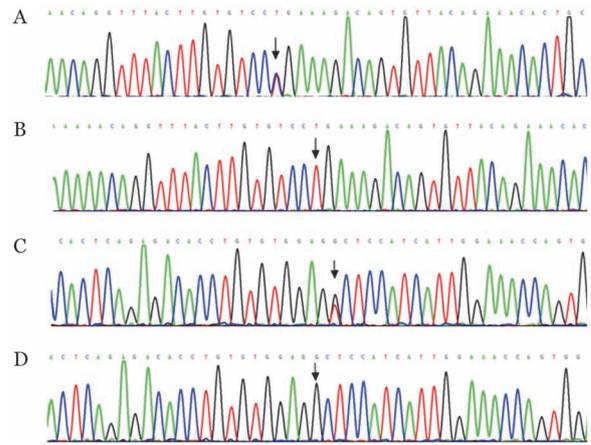
1. 先证者及家系成员凝血指标结果:先证者 APTT 延长为 93.9 s,FXI:C 和 FXI:Ag 分别为 2% 和 4.5%;先证者母亲、儿子、女儿 APTT 稍延长,FXI:C 和 FXI:Ag 明显降低,先证者及家系成员的其他凝血指标均在正常参考范围内,详见表 1。

2. F11 基因测序结果:F11 基因分析发现先证者存在 2 个突变基因位点:位于 4 号外显子上的 c.233T>C (p.Leu60Pro) 杂合错义突变和 11 号外显子上的 c.1253G>T (p.Gly400Val) 杂合错义突变。母亲和女儿检出 p.Leu60Pro 杂合子,儿子检出 p.Gly400Val 杂合子,丈夫为野生型(图 2)。p.Leu60Pro 突变在 100 名健康体检者中未检出,从而排除了基因多态性。查阅国内外文献及相关网站,未见 p.Leu60Pro 突变位点的报道。

3. 突变氨基酸保守性分析:用 ClustalX-2.1-win 软件对人类和 5 个同源物种(黑猩猩、家犬、牛、小家鼠、西方爪蟾)的 F11 基因氨基酸序列进行多重比对,结果显示 Leu60 在物种间保持高度保守(图 3)。

4. 突变蛋白功能预测评分:四个在线生物信息软件 MutationTaster 为 1.00 分、PolyPhen-2 为 1.000 分、PROVEAN 为 -3.04 分、SIFT 为 0.001 分,均显示 p.Leu60Pro 突变为有害的,可能影响蛋白质的功能,有一定致病性。

5. 蛋白模型分析:分析 p.Leu60Pro 突变前后模型,在野生型中,Leu60 主链与 Ile17 主链、Thr18 主链各形成一条氢键,当 Leu60 突变为 Pro60 时,其氢键没有改变,但增加了一个苯环,使蛋白质的结构发生了改变。见图 4。



A: c.233T>C 杂合突变型; B: c.233T>C 野生型; C: c.1253G>T 杂合突变型; D: c.1253G>T 野生型

图 2 F11 基因第 4 号、11 号外显子测序图

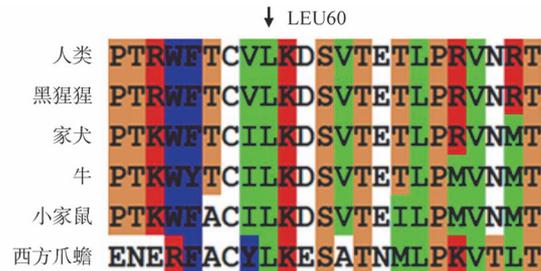


图 3 F11 基因 Leu60 位点保守性分析结果

讨 论

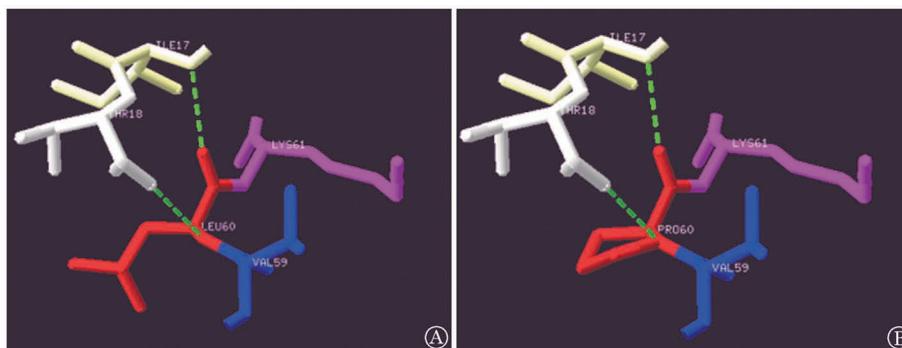
FXI 主要是以丝氨酸蛋白酶原形式存在于血液中,与高分子量激肽原(HMWK)以非共价键结合形成复合物^[5],总分子量 160×10³。FXI 由两个相同的包含 607 个氨基酸的单体亚基组成,在 Cys321 通过二硫键连接形成同源二聚体结构,每个亚基包含 4 个 AP 域: AP1 结合凝血酶, AP2 结合 HMWK, AP3 结合凝血因子 IX (FIX)、血小板膜糖蛋白 I b (GP I b) 和肝素, AP4 是两个 FXI 单体在 Cys321 通过二硫键结合形成二聚体的部位^[6-7]。

本例先证者 APTT 明显延长(93.9 s),FXI:C 和 FXI:Ag

表 1 先证者及家系成员凝血表型指标结果

家系成员	PT (s)	APTT (s)	FIB (g/L)	TT (s)	D-D (mg/L)	FVIII:C (%)	FIX:C (%)	FVII:C (%)	FXI:C (%)	FXI:Ag (%)
先证者(Ⅱ ₂)	14.1	93.9	3.86	14.2	0.23	98	96	97	2	4.5
母亲(Ⅰ ₂)	13.6	48.2	3.45	16.7	0.14	110	104	106	46	55.0
丈夫(Ⅱ ₁)	13.1	34.4	3.29	18.2	0.11	120	110	112	105	101.0
儿子(Ⅲ ₁)	13.9	51.6	2.06	15.2	0.20	114	101	103	32	43.0
女儿(Ⅲ ₂)	14.3	53.3	2.27	16.1	0.16	106	99	101	31	41.0
参考值	11.6~14.6	29.0~43.0	2.00~4.00	14.0~20.0	<0.50	86~125	86~114	82~118	82~118	90.0~110.0

注:PT:凝血酶原时间;TT:凝血酶时间;APTT:活化部分凝血活酶时间;FIB:纤维蛋白原;D-D:D-二聚体;FXI:Ag:凝血因子 XI 抗原;FVIII:C、FIX:C、FXI:C、FVII:C 分别为凝血因子 VIII、IX、XI、VII 活性



A:野生型;B:突变型。绿色虚线代表氢键

图4 p.Leu60Pro突变型及野生型蛋白质模型分析图

均明显降低,诊断为I型遗传性FXI缺陷症。基因分析发现先证者存在F11基因4号外显子p.Leu60Pro杂合错义突变和11号外显子p.Gly400Val杂合错义突变,母亲和女儿存在p.Leu60Pro杂合错义突变,儿子存在p.Gly400Val杂合错义突变。根据遗传家系图可见p.Leu60Pro突变来源于母亲,p.Gly400Val应该来源于先证者已故的父亲。Gly400位于FXI高度保守的组氨酸环催化结构域附近,被Val取代后,可能改变了蛋白质结构和功能。有研究显示,在转染的细胞培养基中几乎检测不到p.Gly400Val的FXI蛋白质,并且在p.Gly400Val的细胞内FXI蛋白质水平较野生型降低22.2%~53.5%^[8],这表明该蛋白的降解速度比野生型FXI更快,该突变是导致FXI水平降低的原因之一。

Leu60位于AP1的裸露环中,参与形成复杂的弯曲反向平行的 β -折叠。同源性分析显示Leu60在6种物种间保持高度保守,表明该位点在蛋白中起到重要的作用。四个在线生物信息软件均显示p.Leu60Pro突变为有害突变,可能会影响FXI蛋白的结构和功能。有研究显示,同在AP1结构域内的p.Thr33Pro突变不会影响FXI蛋白合成,但会导致FXI蛋白分泌减少,可能是由于 α -螺旋结构的破坏引起AP1结构域折叠的改变^[9-10]。p.Leu60Pro突变可能也会有与p.Thr33Pro突变相似的分子致病机理。本研究氨基酸突变模型分析显示,Leu60主链与Ile17、Thr18主链之间各自存在一条氢键,当亮氨酸被脯氨酸取代后,其氢键并没有改变,但侧链增加了一个苯环。这种从中等大小的中性氨基酸到带苯环的酸性氨基酸变化产生了位阻效应,可能影响蛋白质局部构象和静电的改变。

综上,p.Gly400Val和p.Leu60Pro复合杂合错义突变是导致本家系先证者FXI降低的主要原因,p.Leu60Pro杂合错义突变为鲜见报道的基因突变位点,但其确切分子致病机制有待进一步研究。

参考文献

[1] Duga S, Salomon O. Factor XI Deficiency [J]. Semin Thromb Hemost, 2009, 35(4): 416-425. DOI: 10.1055/s-0029-1225764.

- [2] 李阳阳, 许锴, 赵秘胜, 等. 一个遗传性凝血因子XI缺陷症家系基因分析[J]. 中华血液学杂志, 2020, 41(5): 422-424. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.05.011.
- [3] Preis M, Hirsch J, Kotler A, et al. Factor XI deficiency is associated with lower risk for cardiovascular and venous thromboembolism events [J]. Blood, 2017, 129(9): 1210-1215. DOI: 10.1182/blood-2016-09-742262.
- [4] 戴利亚, 张德亭, 谢海啸, 等. 一个遗传性凝血因子XI缺陷症家系的基因分析[J]. 温州医科大学学报, 2015, 45(5): 376-380. DOI: 10.3969/j.issn.2095-9400.2015.05.014.
- [5] Gomez K, Bolton-Maggs P. Factor XI deficiency [J]. Haemophilia, 2008, 14(6): 1183-1189. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2008.01667.x.
- [6] Colakoglu S, Bayhan T, Tavil B, et al. Molecular genetic analysis of the F11 gene in 14 Turkish patients with factor XI deficiency: identification of novel and recurrent mutations and their inheritance within families [J]. Blood Transfus, 2018, 16(1): 105-113. DOI: 10.2450/2016.0098-16.
- [7] Jin L, Pandey P, Babine RE, et al. Crystal structures of the FXIa catalytic domain in complex with ecotin mutants reveal substrate-like interactions [J]. J Biol Chem, 2005, 280(6): 4704-4712. DOI: 10.1074/jbc.M411309200.
- [8] Kravtsov DV, Wu W, Meijers JC, et al. Dominant factor XI deficiency caused by mutations in the factor XI catalytic domain [J]. Blood, 2004, 104(1): 128-134. DOI: 10.1182/blood-2003-10-3530.
- [9] Berber E, Rimoldi V, Usluer, S, et al. Characterization of the genetic basis of FXI deficiency in two Turkish patients [J]. Haemophilia, 2010, 16(3): 564-566. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2009.02152.x.
- [10] Dai L, Rangarajan S, Mitchell M. Three dominant-negative mutations in factor XI-deficient patients [J]. Haemophilia, 2011, 17(5): e919-922. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2011.02519.x.

(收稿日期:2021-02-02)

(本文编辑:徐茂强)