

一个遗传性凝血因子Ⅶ缺陷症家系的临床特征和基因分析

金艳慧 郝秀萍 程晓丽 杨丽红 刘欢乐 王明山

Analysis of clinical features and genotype in an inherited coagulation factor VII deficiency pedigree Jin Yanhui, Hao Xiuping, Cheng Xiaoli, Yang Lihong, Liu Huanle, Wang Mingshan

Corresponding author: Wang Mingshan, Laboratory Medicine Center of the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China. Email: wywms@126.com

遗传性凝血因子Ⅶ(FⅦ)缺陷症是由位于人类染色体13q34的FⅦ基因突变所致的罕见常染色体隐性遗传性疾病,临床表现为不同程度的出血倾向^[1]。遗传性FⅦ缺陷症患者的临床表现与FⅦ活性(FⅦ:C)并不相关,其出血严重程度主要取决于基因突变的数量、突变位点对FⅦ功能的影响程度和基因多态性^[2-3]。因此,采用自动校正凝血酶曲线法(calibrated automated thrombogram, CAT)凝血酶生成试验全面评估凝血状态,鉴定FⅦ基因突变类型对临床诊断和治疗具有重要意义。我们对1个遗传性FⅦ缺陷症家系成员进行凝血指标与基因分析,探讨其基因突变与表型的关系。

对象和方法

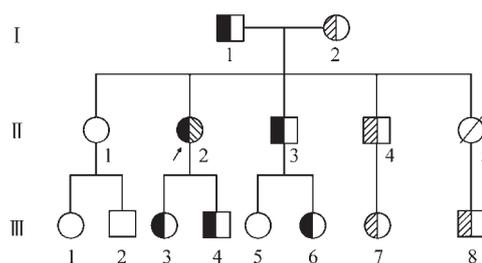
一、家系资料

遗传性FⅦ缺陷症家系来自浙江省苍南县,家系图见图1。先证者(Ⅱ₂):女,42岁,2013年9月因“齿龈出血原因待查”来我院血液科门诊就诊。凝血指标检测发现凝血酶原时间(PT)34.8 s, FⅦ:C 3%, FⅦ抗原(FⅦ:Ag)38%, APTT等其他凝血指标及肝肾功能正常。先证者表现为无明显诱因出现反复发作皮肤瘀斑和齿龈出血,月经量正常,2次分娩过程中出血量无明显增多。家系其他成员均无自发出血症状。

以120名正常健康体检者作为凝血指标正常对照,其中男66名、女54名,中位年龄34(24~55)岁。均无肝肾功能疾病,无血栓或出血史。14名家系成员均知情同意。

二、实验方法

1. 标本采集:采集14名家系成员的外周静脉血标本各2份(0.109 mol/L枸橼酸钠1:9抗凝),一份用于各项凝血指标



- □ 女性、男性正常基因型;
- ◐ ◑ 女性、男性g.11459 A > G杂合突变;
- ■ 女性、男性nt27del CT杂合突变;
- ◕ ◖ g.11459 A > G和nt27delCT双杂合突变;
- / 先证者; / 已故

图1 遗传性凝血因子Ⅶ缺陷症家系图

及凝血酶生成试验的检测;另一份用于基因组DNA提取和PCR扩增。

2. 血浆凝血指标检测:采用一期凝固法测定PT、APTT、纤维蛋白原(FIB)、FⅦ:C、凝血因子Ⅱ活性(FⅡ:C)、凝血因子Ⅴ活性(FⅤ:C)、凝血因子Ⅹ活性(FⅩ:C)等凝血指标(法国STAGO STA-R全自动血凝仪及配套试剂)。FⅦ:Ag检测采用ELISA法,纯化的羊抗人FⅦ IgG由加拿大Cedarlane Laboratories公司提供。所有操作步骤均按照试剂说明书进行。

3. 凝血酶生成试验:用Fluoroskan Ascent FL荧光读数仪(美国Thermo Eletron and Fisher Scientific公司产品)通过CAT法^[4]检测凝血酶生成量。试剂盒及分析软件由荷兰Thrombinoscope BV公司提供,每个标本及凝血酶校正剂(calibrator)各设3个复孔。按试剂盒说明书操作,由上海交通大学附属瑞金医院血栓与止血实验室进行检测。

4. 外周血基因组DNA提取:应用酚-氯仿法抽提先证者及家系成员外周血基因组DNA(试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司),应用核酸蛋白分析仪DU800(美国Beckman公司产品)检测所提取基因组DNA的浓度和纯度。

5. PCR扩增:根据F7基因序列(GenBank J02933),应用Primer Premier 5.0软件分别设计11对引物以覆盖F7基因的所有外显子及侧翼、5'和3'非翻译区序列(由上海交通大学附属瑞金医院王学锋教授馈赠),引物序列见文献^[5],由上海桑尼生物科技有限公司合成。PCR试剂为2×Taq PCR MasterMix(含染料),购自天根生化科技(北京)有限公司。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.05.016

基金项目:温州市科技计划(Y20100284)

作者单位:325000 温州医科大学附属第一医院医学检验中心

通信作者:王明山, Email: wywms@126.com

PCR 总体系 50 μl, 包括 PCR 扩增预混合溶液 (Taq PCR MasterMix)、DNA 模板、引物对和双蒸水。扩增产物用 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

6. DNA 序列分析: PCR 产物割胶后送上海桑尼生物工程有限公司纯化后测序, 测序仪为 ABI PRISM 3730。用 Chromas 软件将测序结果与美国 NCBI GenBank 所公布的 F7 基因序列 J02933 进行比对, 找寻突变位点, 并对含有基因突变的序列进行反向测序确认。首先扩增先证者 F7 所有外显子及侧翼序列, 突变位点确定后进行其他家系成员相应片段测序。

7. 分子模型构建与分析: 采用 SWISS-MODEL 软件构建 p.Lys341Glu 突变蛋白空间模型, 并利用 PIC (Protein Interactions Calculator, <http://pic.mbu.iisc.ernet.in/>) 对 F VII 蛋白内氨基酸的相互作用进行系统分析, 分析基因突变影响 F VII 蛋白功能的可能机制。

结 果

1. 凝血指标: 先证者 PT 明显延长, F VII : C 明显降低; 先证者父亲、母亲、大弟弟、小弟弟、女儿、儿子、二侄女、小侄女和小外甥的 PT 稍延长、F VII : C 均稍低于正常对照水平; 先证者及父亲、大弟弟、女儿、儿子和二侄女的 F VII : Ag 均为正常对照的一半左右。先证者及家庭成员其他凝血指标均无明显异常。详见表 1。

2. 基因分析: 先证者及其母亲、小弟弟、小侄女和小外甥检出 F7 基因第 8 外显子的 g.11459 A>G 杂合突变 (图 2); 先证者父亲、大弟弟、女儿、儿子和二侄女均检出 F7 基因第 1 外

显子 nt27delCT 杂合突变 (图 3), 导致读码框发生移位, 编码与原来氨基酸完全不同的 15 个氨基酸后出现终止信号, 产生只有 24 个氨基酸组成的截短型蛋白。F7 基因的其他外显子及侧翼、5' 和 3' 非翻译区未发现突变。家系其他成员为正常基因型 (表 1)。

3. 凝血酶生成试验: 先证者的凝血酶生成潜力 (ETP) 比值和峰值 (peak height) 比值均明显降低, 分别为 26.6% 和 15.6%, 而其延迟时间 (lag time) 比值和达峰时间 (tpeak) 比值分别升高为 5.50 和 3.69; 先证者父亲 (nt27delCT 杂合突变) 和母亲 (Lys341Glu 杂合突变) 的 ETP 比值和 peak height 比值稍高于正常对照的一半 (图 4)。

4. 分子模型分析: 正常 F VII 分子模型分析显示, 341Lys

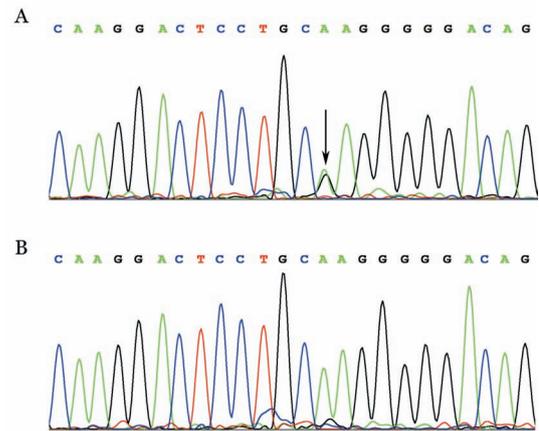


图 2 遗传性凝血因子 VII 缺陷症家系 F7 基因第 8 外显子 g.11459 A>G 杂合突变 (A) 及野生型 (B) (箭头所示为突变位点)

表 1 遗传性凝血因子 VII 缺陷症家系主要凝血指标及基因分析结果

家系成员	年龄 (岁)	PT (s)	APTT (s)	FIB (g/L)	F II : C (%)	F V : C (%)	F VII : C (%)	F X : C (%)	F VII : Ag (%)	基因突变	
										nt27delCT	g.11459 A>G
I ₁	69	14.5	33.8	2.84	86	113	51	107	49	+	-
I ₂	67	15.5	35.4	3.40	103	105	57	101	92	-	+
II ₁	47	13.3	35.0	2.43	87	93	102	97	100	-	-
II ₂ ^a	42	34.8	31.6	2.24	89	98	3	95	38	+	+
II ₃	40	14.8	37.4	2.79	93	107	58	107	52	+	-
II ₄	38	14.9	40.2	3.10	98	102	52	100	89	-	+
III ₁	21	13.7	37.7	2.37	88	99	104	99	95	-	-
III ₂	18	13.2	38.2	2.44	88	102	100	96	101	-	-
III ₃	19	14.4	36.1	2.55	87	89	55	103	56	+	-
III ₄	18	15.0	32.1	2.04	93	91	57	90	48	+	-
III ₅	15	13.0	34.8	3.28	103	110	92	103	102	-	-
III ₆	13	15.0	36.4	2.20	96	94	54	101	52	+	-
III ₇	8	15.1	40.2	2.39	91	111	46	96	100	-	+
III ₈	14	15.1	36.8	2.20	92	109	52	96	98	-	+
正常值范围		12.5~13.8	27.0~41.0	2.04~3.82	86~116	86~114	86~120	90~114	83~112		

注: 所有突变基因型均为突变杂合型; PT: 凝血酶原时间; FIB: 纤维蛋白原; F VII : Ag: 凝血因子 VII 抗原; F II : C、F V : C、F VII : C、F X : C 分别为凝血因子 II、V、VII、X 活性; +: 存在突变; -: 不存在突变; a: 先证者

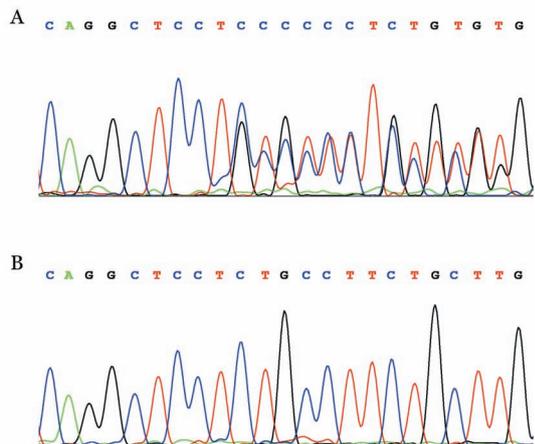


图3 遗传性凝血因子Ⅶ缺陷症家系F7基因第1外显子的nt27delCT杂合突变(A)及野生型(B)

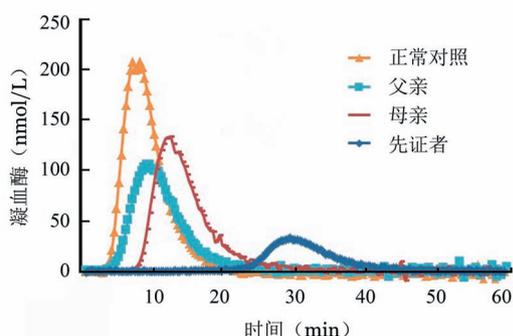
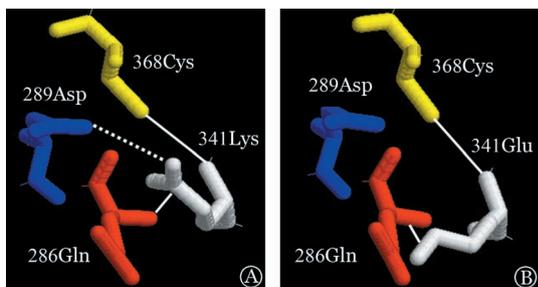


图4 遗传性凝血因子Ⅶ缺陷症家系先证者及其父母的凝血酶生成试验

与368Cys和286Gln以氢键连接,与289Asp以离子键相连接。但发生341Glu突变后,341Lys与289Asp的离子键发生断裂(图5)。



A: 正常FⅦ的341Lys分子模型;B: Lys341Glu突变后分子模型
图5 凝血因子Ⅶ(FⅦ)蛋白Lys341Glu的分子模型分析图

讨 论

人类基因突变数据库2014年2月公布的F7基因突变有283种(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>),包括180种错义与无义突变、39种剪切位点突变、33种小插入或缺失突变等。本研究的FⅦ缺陷症家系中先证者自幼即有出血倾向,FⅦ:C 3%,FⅦ:Ag亦低于正常对照水平,F7基因分析发现

先证者存在p.Lys341Glu杂合错义突变和nt27delCT杂合缺失突变,且分别遗传自存在杂合突变的母亲和父亲。家系分析发现,先证者的小弟弟、小侄女和小外甥为g.11459 A>G杂合突变,大弟弟、女儿、儿子和二侄女为nt27delCT杂合突变,27/28 CT两个碱基的缺失致使阅读框改变,编码与原来完全不同的15个氨基酸后出现终止信号,在ProFⅦ蛋白25位提前终止,产生只有24个氨基酸组成的截短型蛋白。查阅突变数据库和相关文献资料,Lys341Glu突变于2009年由Herrmann等^[3]首次报道,迄今未见其他文献报道;但nt27delCT突变在国内外已有多次报道^[2,6-8],尤其在中国汉族人群中发生频率较高,可能为中国汉族人群F7基因突变热点之一。

FⅦ缺陷症患者临床表现与血浆FⅦ:C无明显相关性,重症患者多为影响基因结构和功能的纯合或者复合杂合性突变所致,其FⅦ:C通常低于2%;而单一杂合性突变患者的FⅦ:C一般不低于30%,几乎无临床症状^[2,4-9]。Peyvandi等^[6]首次报道nt27delCT纯合突变,先证者有严重出血倾向,FⅦ:C与FⅦ:Ag同时降低;江明华等^[8]报道1例nt27delCT纯合突变,先证者血浆FⅦ:C明显减低,但FⅦ:Ag为252.78 ng/ml(正常参考值500~2 000 ng/ml),表现为严重出血倾向。本家系中检出nt27delCT杂合突变者FⅦ:C与FⅦ:Ag均为正常对照的50%左右,存在Lys341Glu和nt27delCT双杂合突变的先证者,临床表现为轻度出血倾向。凝血酶生成试验显示,携带有基因突变的家系成员的其凝血酶生成量和ETP都较正常人下降,同时携带两个突变的先证者,其ETP明显下降,表现出轻度出血倾向。

Herrmann等^[3]于2009年首次报道FⅦ催化蛋白区的Lys341Glu突变,其具体致病机制目前仍不清楚。人类FⅦ的Lys341在不同物种间同源序列比对发现其具有高度保守性,但FⅦ与依赖维生素K的高度同源蛋白(FⅡ、FX、FIX、蛋白C和蛋白S)序列比对发现Lys341在这些蛋白间并不保守,该位点毗邻于FⅦ丝氨酸蛋白酶活性中心之一(Ser344)附近,推测该位点与FⅦ催化区结构域的糜蛋白酶活性和特异性密切相关。Lys341位于FⅦ结构高度保守的氧负离子洞(oxyanion hole)^[10-11],带负电荷的谷氨酸取代带正电荷的赖氨酸后,不仅导致341Lys与289Asp的离子键发生断裂,正、负电荷改变可能使氧负离子洞空间结构发生改变,从而进一步影响酶与FX底物的结合而导致FⅦ催化功能异常^[11]。本研究中存在Lys341Glu单个杂合突变家系成员的FⅦ:C降低而FⅦ:Ag基本正常,因此我们推测Lys341与FⅦ催化功能密切相关,其具体机制有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 邢志芳,王学锋,戴菁,等. 一个遗传性凝血因子Ⅶ缺陷症家系两种新的基因突变[J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(3):158-162.
[2] 金艳慧,王明山,郑芳秀,等. 九例遗传性凝血因子Ⅶ缺陷症患者的分子发病机制与临床特性[J]. 中华医学遗传学杂志,

2012, 29(4):404-407.

[3] Herrmann FH, Wulff K, Auerswald G, et al. Factor VII deficiency: clinical manifestation of 717 subjects from Europe and Latin America with mutations in the factor 7 gene [J]. Haemophilia, 2009, 15(1):267-280.

[4] Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma [J]. Pathophysiol Haemost Thromb, 2003, 33(1):4-15.

[5] 金艳慧, 王明山, 牛真珍, 等. 纯合子 His348G1n 导致的遗传性凝血因子 VII 缺乏症家系分析 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2011, 28(1):10-13.

[6] Peyvandi F, Mannucci PM, Jenkins PV, et al. Homozygous 2bp deletion in the human factor VII gene: a non-lethal mutation that is associated with a complete absence of circulating factor VII [J]. Thromb Haemost, 2000, 84(4):635-637.

[7] Shen MC, Lin JS, Lin SW, et al. Novel mutations in the Factor VII gene of Taiwanese Factor VII-deficient patients [J]. Br J Haematol, 2001, 112(3):566-571.

[8] 江明华, 王兆钺, 余自强, 等. 四个遗传性凝血因子 VII 缺陷症家系的基因与表型分析 [J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(3): 147-152.

[9] McVey JH, Boswell E, Mumford AD, et al. Factor VII deficiency and the F VII mutation database [J]. Hum Mutat, 2001, 17(1): 3-17.

[10] Warshel A, Naray-Szabo G, Sussman F, et al. How do serine proteases really work? [J]. Biochemistry, 1989, 28(9):3629-3637.

[11] Bernardi F, Liney DL, Patracchini P, et al. Molecular defects in CRM+ factor VII deficiencies: modelling of missense mutations in the catalytic domain of F VII [J]. Br J Haematol, 1994, 86(3): 610-618.

(收稿日期: 2014-11-24)
(本文编辑: 徐茂强)

原发肠道 CD20 阴性弥漫大 B 细胞淋巴瘤一例及文献复习

卢月 高雪 方美云

CD20- negative primary intestinal diffuse large B- cell lymphoma: a case report and literature review Lu Yue, Gao Xue, Fang Meiyun

Correspondence author: Fang Meiyun, Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China. Email: fangmeiyun@aliyun.com

弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) 在西方国家占成人非霍奇金淋巴瘤的 25%~30%, 在日本占 33%, 在中国占 50.18%^[1-2]。DLBCL 肿瘤细胞表面广泛表达 CD20 抗原, 极少部分表现为 CD20 阴性^[3]。我院收治 1 例原发肠道 CD20 阴性的 DLBCL 患者, 现报道如下并进行相关文献复习。

病例资料

患者, 女, 44 岁, 2013 年 11 月无意中发现左侧腹部包块, 约 5 cm×5 cm 大小, 质韧, 活动性差, 伴钝痛, 无他处放射, 排便后腹痛略有减轻, 大便时有干结, 无里急后重。1 个月后患者上述症状逐渐加重, 排稀水样便伴呕吐胃内容物, 就诊于我院胃肠外科, 术前检查考虑降结肠癌可能, 术中所见肿块位于降结肠, 约 10 cm×6 cm 大小, 距肛门约 30 cm, 已浸润至浆膜层, 与后方腰大肌浸润粘连固定, 周围可触及肿大淋巴结, 于 2013 年 12 月 27 日行降结肠肿物部分切除术及结肠断端吻合术。术后病理学检查结果: 肿物大小为 9 cm×4 cm×4 cm, 镜下见结肠黏膜固有层至浆膜层大量淋巴样细胞弥漫浸润并见多灶大片坏死, 细胞为大细胞, 核型不整, 核增大, 胞质嗜双色或嗜碱, 核中央或周围有 1~3 个嗜酸性核仁, 核染色质增粗, 少许肿瘤细胞核巨大、多核为瘤巨细胞, 核分裂多见并见病理性核分裂, 间质血管增生明显; 免疫组化: Bcl-2(+), Bcl-6(+/-), CD10(-), CD20(-), CD3(-), CD43(+), CD5(-), MUM-1(-), Ki-67(约 80%+), CK(-), CD56(NK-1)(±), CD79a(±), PAX-5(+), CD45(-), CD23(-), CD138(-), ALK(-); 病理诊断: (降) 结肠 DLBCL, 非生发中

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.05.017

作者单位: 116011 大连医科大学附属第一医院血液科(卢月、方美云), 病理科(高雪)

通信作者: 方美云, Email: fangmeiyun@aliyun.com