

# 一个复合杂合突变导致的遗传性凝血因子V缺陷症家系

郭跃丽<sup>1</sup> 孔万仲<sup>1</sup> 万箐<sup>1</sup> 郑温洁莹<sup>1</sup> 奚经巧<sup>1</sup> 刘斯奇<sup>2</sup> 王明山<sup>2</sup> 金艳慧<sup>2</sup>

<sup>1</sup>温州市中医院检验科 325000; <sup>2</sup>温州医科大学附属第一医院医学检验中心 325015

通信作者:金艳慧, Email: jyh603@126.com

**【摘要】** 目的 探讨一个遗传性凝血因子V(FV)缺陷症家系的分子致病机制。方法 DNA直接测序法分析先证者F5的全部外显子、侧翼序列、5'和3'端非翻译区及家系成员(共3代11人)相应的突变位点区域。通过CAT法检测凝血酶生成量;用ClustalX软件分析突变位点的保守性;用MutationTaster、PolyPhen-2、PROVEAN、LRT和SIFT等在线生物信息学软件预测突变位点对蛋白质功能的影响;用Swiss-PdbViewer软件分析氨基酸突变前后蛋白模型及分子间作用力的变化。结果 先证者F5第8外显子存在c.1258G>T杂合错义突变(p.Gly392Cys)及第14外显子存在c.4797delG杂合缺失突变,导致框移并产生截断蛋白(p.Glu1572Lys fsX19);其祖父和父亲存在p.Gly392Cys杂合突变;其外祖母、母亲、小姨母和表妹均存在p.Glu1572Lys fsX19杂合突变。先证者凝血酶生成延迟和达峰时间比值明显增高。保守性分析结果表明,p.Gly392在10种同源物种中位于保守区域。五个在线生物信息学软件对p.Gly392Cys预测均显示为致病的突变,Mutation Taster对p.Glu1572Lys fsX19预测也显示为致病突变。蛋白模型分析显示,Gly392突变为Cys392后可导致原有氢键延长,并形成新的空间位阻,影响蛋白结构的稳定性。结论 该家系F5第8外显子c.1258G>T杂合错义突变及第14外显子c.4797delG杂合缺失突变可能与该家系FV水平降低有关。

**【关键词】** 凝血因子V缺陷症; 遗传性; 生物信息学

基金项目:温州市卫生健康委员会医药卫生科学研究项目计划(2015B06)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.02.008

## Analysis of a pedigree with inherited factor V deficiency caused by compound heterozygous mutation

Guo Yueli<sup>1</sup>, Kong Wanzhong<sup>1</sup>, Wan Jing<sup>1</sup>, Zheng Wenjieying<sup>1</sup>, Xi Jingqiao<sup>1</sup>, Liu Siqi<sup>2</sup>, Wang Mingshan<sup>2</sup>, Jin Yanhui<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory Department of Wenzhou Chinese Medicine Hospital, Wenzhou 325000, China; <sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325015, China

Corresponding author: Jin Yanhui, Email: jyh603@126.com

**【Abstract】** **Objective** To explore the molecular pathogenesis of a family with hereditary factor V (FV) deficiency. **Methods** All the exons, flanking sequences, 5' and 3' untranslated regions of the F5 of the proband, and the corresponding mutation sites of the family members were analyzed via direct DNA sequencing. The CAT measurement was used to detect the amount of thrombin produced. The ClustalX software was used to analyze the conservation of mutation sites. The online bioinformatics software, Mutation Taster, PolyPhen-2, PROVEAN, LRT, and SIFT were applied to predict the effects of mutation sites on protein function. The Swiss-PdbViewer software was used to analyze the changes in the protein model and intermolecular force before and after amino acid variation. **Results** The proband had a heterozygous missense mutation c.1258G>T (p.Gly392Cys) in exon 8 of the F5, and a heterozygous deletion mutation c.4797delG (p.Glu1572Lys fsX19) in exon 14, which results in a frameshift and produces a truncated protein. Her grandfather and father had p.Gly392Cys heterozygous variation, whereas her maternal grandmother, mother, little aunt, and cousin all had p.Glu1572LysfsX19 heterozygous variation. The ratio of proband's thrombin generation delay to peak time was significantly increased. Conservation analysis results showed that p.Gly392 was located in a conserved region among the 10 homologous species. Five online bioinformatics software predicted that p.Gly392Cys was pathogenic, and Mutation Taster also predicted p.Glu1572Lys fsX19 as a pathogenic variant. Protein model analysis showed that the replacement of Gly392 by Cys392 can lead to the extension of the original hydrogen bond and the

formation of a new steric hindrance, which affected the stability of the protein structure. **Conclusion** The c.1258G>T heterozygous missense mutation in exon 8 and the c.4797delG heterozygous deletion mutation in exon 14 of the F5 may be responsible for the decrease of FV levels in this family.

**【Key words】** Coagulation factor V deficiency; Hereditary; Bioinformatics

**Fund program:** Medical and Health Science Research Project Plan of Health Commission of Wenzhou (2015B06)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.02.008

遗传性凝血因子 V (FV) 缺陷症是一种罕见的常染色体隐性遗传性出血性疾病, 发病率约为 1/100 万<sup>[1-2]</sup>。主要表现为 FV 活性(FV:C)降低以及轻重不一的出血或血栓形成, 临床表现严重程度与 F5 基因突变的类型、数目、位点有关。轻至中度 FV 缺陷症一般由杂合突变引起, 通常无临床症状; 重度 FV 缺陷症一般由纯合子或复合杂合突变引起, 临床表现为程度不等的出血(皮肤瘀斑、鼻出血、月经量过多、术后出血等)<sup>[3]</sup>。因此, 分析 FV 基因突变对遗传性 FV 缺陷症具有重要意义。本文对 1 例遗传性 FV 缺陷症患者及家系成员进行实验室表型和基因分析, 初步探讨其分子发病机制。

## 对象与方法

1. 家系资料: 先证者, 女, 27 岁, 汉族, 浙江省瑞安市人, 因先兆流产于 2020 年 4 月入住于我院中医妇科病房行保胎治疗。凝血常规检查发现血浆凝血酶原时间(PT)34.6 s(参考值 12.5~14.5 s)、活化部分凝血活酶时间(APTT)103.9 s(参考值 27.0~41.0 s), FV:C 3%(参考值 86%~114%)、FV 抗原(FV:Ag)5%(参考值 70%~140%), 其他凝血指标无异常。先证者肝、肾功能正常, 无明显自发性出血症状。家系其他成员均无自发性出血症状。家系图见图 1。

2. 健康对照组: 选取 110 名体检健康者作为凝

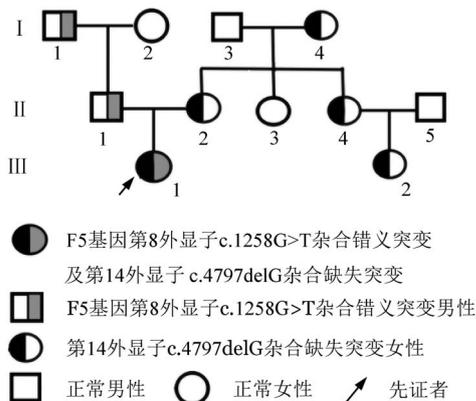


图 1 遗传性凝血因子 V 缺陷症家系图

血表型指标对照, 其中男 76 名, 女 34 名, 年龄 21~48 岁, 无肝、肾功能异常, 无出血及血栓史, 无抗凝剂用药史, 女性无口服避孕药。本研究通过本院伦理委员会批准(伦理 2012-17), 所有受试者均签署知情同意书。

3. 标本采集与处理: 采集研究对象外周静脉血 2.7 ml, 用 0.109 mol/L 枸橼酸钠溶液 1:9 抗凝, 3 000 r/min 离心 15 min 后, 取上层乏血小板血浆用于凝血指标检测, 下层血细胞用于基因组 DNA 提取。

4. 凝血指标检测: PT、APTT、纤维蛋白原(FIB)、FV:C、凝血因子 II 活性(FII:C)、凝血因子 VII 活性(FVII:C)和凝血因子 X 活性(FX:C)采用凝固法在法国 Stago STA-R 全自动血凝仪上测定(配套试剂由法国 STAGO 公司提供); FV:Ag 采用酶联免疫双抗体夹心法(纯化的 sheep anti-human FV IgG 由加拿大 Cedarlane Laboratories Limited 公司提供)。

5. 外周血基因组 DNA 提取: 选用酚-氯仿法提取先证者及家系成员的外周血基因组 DNA, 并用 DU800 核酸蛋白分析仪检测所提取基因组 DNA 的浓度和纯度(基因组 DNA 提取试剂盒由北京天根生化公司提供)。

6. 引物及 PCR 扩增: 根据 F5 基因序列(GenBank: AY364535), 用 Primer Premier 5.0 软件分别设计 31 对引物以覆盖 F5 基因的所有外显子、5' 和 3' 非翻译区序列、侧翼, 引物序列及 PCR 扩增条件参见文献[4], 引物由上海桑尼生物公司合成。

7. PCR 产物测序: PCR 产物割胶后送上海桑尼生物工程公司纯化后用 ABI3730XL 型测序仪(美国 Applied Biosystems 公司产品)测序。通过 Chromas 软件与美国 NCBI 基因库所公布的 FV 基因序列(GenBank: AY364535)进行比对, 查找基因突变的位点, 发现错义突变位点后用反向测序予以证实, 缺失突变用克隆测序证实。明确先证者基因突变的位点后, 再扩增其他家系成员相应突变位点区域并进行测序分析。

8. 凝血酶生成试验: 参照文献[5]方法。

9. 氨基酸突变位点保守性分析: 用 Clustal X-

2.1-win 软件对人类和NCBI 数据库中提供的其他9种同源物种:原鸡(Gallus gallus)、黑猩猩(Pan troglodytes)、猕猴(Macaca mulatta)、家犬(Canis lupus familiaris)、牛(Bos Taurus)、小家鼠(Mus musculus)、热带爪蟾(Xenopus tropicalis)、斑马鱼(Danio rerio)和褐家鼠(Rattus norvegicus)的氨基酸序列(https://www.ncbi.nih.gov/homologene/104)进行比对,分析突变氨基酸的保守性。

10. 生物信息学技术分析:采用MutationTaster、PolyPhen-2、PROVEAN、LRT 和 SIFT 在线软件分析氨基酸突变前后生物信息学特性;用 Swiss-pdb Viewer 软件分析 FV 蛋白模型野生型和突变型局部空间构型及分子间作用力的变化。

### 结 果

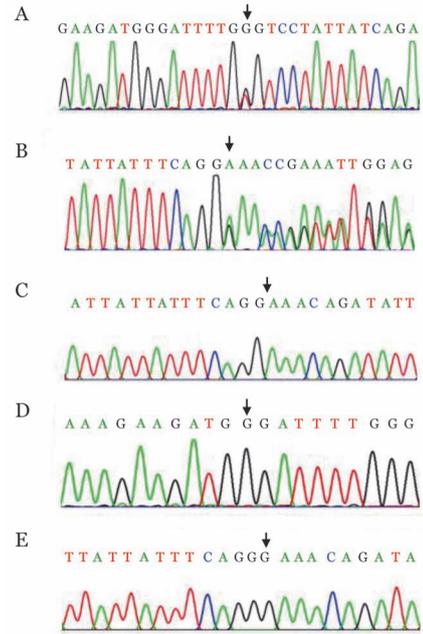
1. 先证者及家系成员表型检测结果:先证者 PT、APTT 明显延长;FV:C 和 FV:Ag 较正常对照显著降低。其祖父、外祖母、母亲、父亲、小姨母和表妹的 PT、APTT 均轻度延长;除表妹外,FV:C 和 FV:Ag 均下降至正常对照的一半左右,家系成员的其他凝血指标均无明显异常(表1)。

2. 先证者及家系成员基因分析结果:先证者检出 F5 基因第 8 外显子 c.1258G>T 杂合错义突变(p.Gly392Cys)、第 14 外显子 c.4797delG 杂合缺失突变(p.Glu1572Lys fsX19),导致 1572 位的谷氨酸变成赖氨酸后框移 19 个氨基酸并在 1591 位提前出现终止翻译,最终产生截断蛋白。其祖父和父亲检出 c.1258G>T 杂合错义突变,其外祖母、母亲、小姨母

和表妹均检出 c.4797delG 杂合缺失突变,其余家系成员均为野生型(表1、图2)。

3. 凝血酶生成试验结果:先证者的峰高明显降低,凝血酶生成潜力略微降低,峰高比值为 29.6%,显著降低;而其延迟时间(lag time)和达峰时间(tt peak)比值分别延长为 3.01 和 2.92;其父母上述指标也均发生不同程度变化(表2、图3)。

4. 保守性分析结果:ClustalX 软件的保守性



A:先证者 c.1258G>T 杂合错义突变;B:先证者 c.4797delG 缺失突变正向测序;C:c.4797delG 缺失突变克隆测序;D:第 8 外显子 c.1258 野生型;E:第 14 外显子野生型

图2 F5 基因第 8 和第 14 外显子测序结果

表1 先证者及家系成员主要凝血指标及基因检测结果

家系成员	年龄(岁)	PT(s)	APTT(s)	FIB(g/L)	FII:C(%)	FVII:C(%)	FX:C(%)	FV:C(%)	FV:Ag(%)	第8外显子 c.1258G>T	第14外显子 c.4797delG
先证者(III <sub>1</sub> )	33	34.6	103.9	4.20	97	93	89	3	5	杂合子	杂合子
祖父(I <sub>1</sub> )	79	15.3	42.7	3.91	95	113	98	57	58	杂合子	野生型
祖母(I <sub>2</sub> )	76	13.1	35.1	3.06	100	104	95	107	110	野生型	野生型
外祖父(I <sub>3</sub> )	78	12.9	33.3	3.65	98	114	111	110	124	野生型	野生型
外祖母(I <sub>4</sub> )	76	14.1	41.9	2.98	90	106	94	51	55	野生型	杂合子
父亲(II <sub>1</sub> )	56	14.9	45.4	2.73	102	112	97	49	54	杂合子	野生型
母亲(II <sub>2</sub> )	55	15.4	47.2	3.26	101	98	98	48	46	野生型	杂合子
二姨母(II <sub>3</sub> )	52	13.2	35.3	3.14	97	91	85	94	101	野生型	野生型
小姨母(II <sub>4</sub> )	50	15.1	45.6	2.84	87	104	89	50	54	野生型	杂合子
小姨夫(II <sub>5</sub> )	53	13.4	36.1	2.46	90	97	96	101	107	野生型	野生型
表妹(III <sub>2</sub> )	24	16.1	46.8	2.21	93	90	85	89	95	野生型	杂合子
参考值		12.5~14.5	27.0~41.0	2.00~4.00	86~116	86~120	80~120	86~115	70~130		

注:PT:凝血酶原时间;APTT:活化部分凝血酶时间;FIB:纤维蛋白原;FV:Ag:凝血因子V抗原;FII:C、FVII:C、FX:C、FV:C分别为凝血因子II、VII、X、V活性

分析结果表明, p.Gly392 在同源物种间高度保守(图 4)。

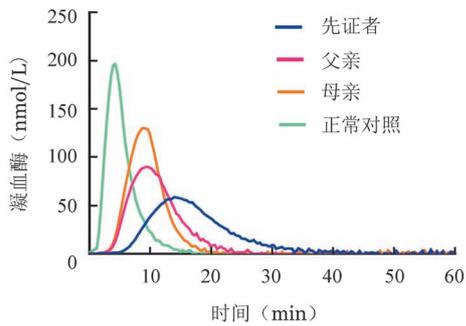


图 3 先证者及其父母的凝血酶生成试验曲线图

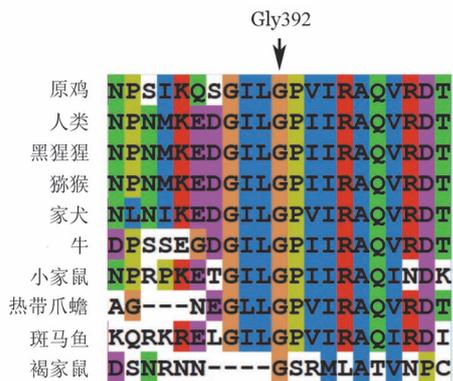


图 4 F5 基因 p.Gly392 在同源性物种多重序列比对结果

5. 在线生物信息学软件和蛋白结构模型分析结果: MutationTaster、PolyPhen-2、PROVEAN、LRT 和 SIFT 五个在线生物信息学软件对 p.Gly392Cys 预

测结果分别为 1.00 分、1.00 分、-7.67 分、0.00 分和 0.00 分, 均显示为可影响蛋白质功能的致病突变; MutationTaster 对 p.Glu1572Lys fsX19 预测结果为 1.00, 显示为可影响蛋白质功能的致病突变。突变蛋白质空间结构模型分析显示: 野生型 FV 蛋白的分子模型结构中 Gly392 与 Ile492 之间存在 1 条氢键, 当 Gly392 突变为 Cys392 时, 其分子之间的氢键明显延长, 并且 Cys392 与 Tyr368 之间产生了空间位阻, 使蛋白质结构发生改变, 可能导致蛋白质的稳定性下降(图 5)。

### 讨 论

FV 是一种单链糖蛋白, 在凝血途径和活化蛋白 C 介导的抗凝血途径中均起到重要的作用。遗传性 FV 缺陷症, 多数患者血浆 FV:Ag 水平和 FV:C 平行下降, 称为 I 型; 少数患者血浆 FV:Ag 水平正常或接近正常, 而 FV:C 明显下降, 即为 II 型<sup>[6]</sup>。本例患者血浆 FV:C 和 FV:Ag 平行下降, 属于 I 型。F5 基因位于染色体 1q21-25, 全长 80 kb, 包含 25 个外显子和 24 个内含子。其中, 第 1~12 外显子编码长 28 个氨基酸的信号肽和 A1-A2 区, 第 13 外显子编码完整的 B 区, 第 14~25 外显子编码 A3-C1-C2 区。成熟 FV 蛋白含有 2196 个氨基酸, FV 分子由 3 个 A 区、1 个 B 区及 2 个 C 区组成, 其排列顺序为 A1-A2-B-A3-C1-C2<sup>[7]</sup>, F5 基因改变将影响其结构和功能, 从而导致 FV 缺陷症。

表 2 遗传性凝血因子 V 缺陷症先证者及其父母凝血酶生成试验结果

受检者	凝血酶生成潜力比值 (%)	峰值比值 (%)	延迟时间比值	达峰时间比值
先证者 (III <sub>1</sub> )	90.9	29.6	3.01	2.92
父亲 (II <sub>1</sub> )	92.0	45.8	2.43	2.09
母亲 (II <sub>2</sub> )	98.4	67.0	2.34	1.98
参考值	86.9~113.1	85.3~114.7	0.88~1.28	0.87~1.15

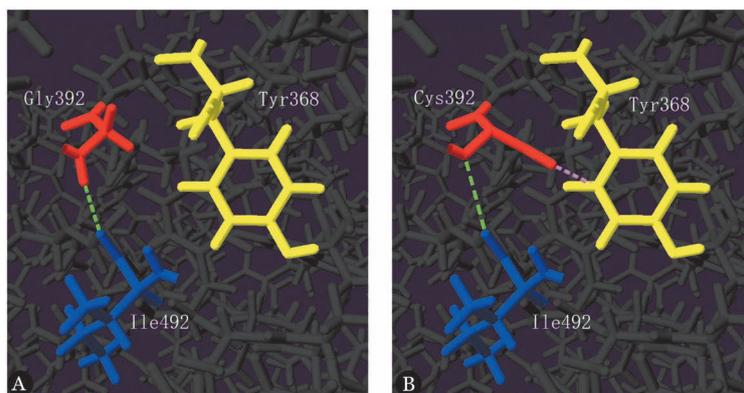


图 5 野生型 (A)、Gly392Cys 突变型 (B) 凝血因子 V 蛋白质模型图 (绿色虚线表示氢键, 粉色虚线表示空间位阻)

目前已发现了约160多种与FV缺陷症有关的基因突变,包括错义突变、无义突变及缺失、插入、剪切位点突变等。错义突变通常引起单个氨基酸置换,影响FV的折叠和构象改变,分泌途径的质量控制系统将其滞留在细胞内,导致细胞内降解和分泌障碍<sup>[8]</sup>。本研究发现先证者F5第8外显子存在p.Gly392Cys杂合错义突变及第14外显子存在p.Glu1572Lys fsX19杂合缺失突变的复合杂合突变;其祖父和父亲存在p.Gly392Cys杂合错义突变,其外祖母、母亲、小姨母和表妹均存在p.Glu1572Lys fsX19杂合缺失突变。存在不同位点单个杂合突变的家系成员,其FV:C和FV:Ag均下降至正常对照的一半左右。从凝血酶生成试验显示,携带单个杂合基因突变位点的家系成员,其凝血酶生成量和凝血酶生成速度均较正常人下降,尤其是同时携带这两个突变位点的先证者,表现为更明显,患者的凝血功能受到较大影响,一定程度上评估了出血风险。本研究中F5基因的p.Gly392Cys突变由傅启华等<sup>[9]</sup>首次报道,该突变使FV蛋白A2结构域的第392位甘氨酸突变为半胱氨酸。Chen等<sup>[10]</sup>曾报道,p.Gly392Cys突变会引起半胱氨酸残基的暴露,破坏A2结构域支架,干扰了A2结构域上其他半胱氨酸之间二硫键的形成,从而影响蛋白质结构的稳定性,导致FV蛋白质分泌或稳定性受损。

本研究通过Swiss-Pdb Viewer version 软件对p.Gly392Cys突变前后的蛋白结构进行模型分析显示:野生型FV蛋白的分子模型结构中Gly392与Ile492之间存在1条氢链,当Gly392突变为Cys392时,其分子之间的氢键明显延长,并且Cys392与Tyr368之间产生了空间位阻,导致蛋白质的稳定性下降,与上述的报道符合。本研究中的p.Glu1572Lys fsX19杂合缺失突变,使1572位的谷氨酸变成赖氨酸后框移19个氨基酸并在1591位提前出现终止翻译,产生截断蛋白,导致18个氨基酸(1572~1590)被替换和606个氨基酸(1591~2197)丢失,最终使完整的FV蛋白质组装受阻,功能障碍。有研究显示,基因突变后形成结构异常的蛋白质,将会被内质网或蛋白酶体降解途径提前降解,导致血浆中含量降低或活性异常,从而影响其生物学功能<sup>[11]</sup>。本研究还分析了p.Gly392Cys突变的生物学特性,发现p.Gly392Cys在同源物种间高度保守,说明该位点是FV分子的重要位点,在FV蛋白正常功能的发挥中起重要作用。五个在线生物信

息学软件对p.Gly392Cys预测均显示为致病的突变,MutationTaster对p.Glu1572Lys fsX19预测也显示为致病的突变,均可影响蛋白质功能,进一步证实了这两个位点野生型氨基酸在FV蛋白中的重要性。

综上所述,本FV缺陷症家系FV水平降低与p.Gly392Cys杂合错义突变和p.Glu1572Lys fsX19杂合缺失突变有关,其具体的致病机制有待体外表达等试验进一步的探讨。

#### 参考文献

- [1] Kanaji S, Kanaji T, Honda M, et al. Identification of four novel mutations in F5 associated with congenital factor V deficiency [J]. *Int J Hematol*, 2009, 89(1): 71-75. DOI: 10.1007/s12185-008-0210-4.
- [2] Asselta R, Peyvandi F. Factor V deficiency [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2009, 35(4): 382-389. DOI: 10.1055/s-0029-1225760.
- [3] HC Liu, MC Shen, HL Eng, et al. Asp68His mutation in the A1 domain of human factor V causes impaired secretion and ineffective translocation [J]. *Haemophilia*, 2014, 20(4): e318-e326. DOI:10.1111/hae.12476.
- [4] 谢耀胜, 张扬, 朱丽青, 等. 一个近亲结婚导致的遗传性凝血因子V缺陷症家系分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2013, 30(2): 161-164.
- [5] 金艳慧, 郝秀萍, 程晓丽, 等. 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[J]. *中华血液学杂志*, 2015, 36(5): 427-430. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.05.016.
- [6] 曹丽娟, 王兆钺, 李红, 等. 两例遗传性凝血因子V缺乏症的产前诊断[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2011, 28(6): 679-682. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2011.06.018.
- [7] Jamila Hirbawi, Michael Kalafatis. Spellbinding Effects of the Acidic COOH-Terminus of Factor Va Heavy Chain on Prothrombinase Activity and Function [J]. *ACS Omega*, 2017, 2(9): 5529-5537. DOI: 10.1021/acsomega.7b00769.
- [8] Liu HC, Lin TM, Eng HL, et al. Functional characterization of a novel missense mutation, His147Arg, in A1 domain of FV protein causing type II deficiency [J]. *Thromb Res*, 2014, 134(1): 153-159. DOI: 10.1016/j.thromres.2014.04.005.
- [9] 傅启华, 王鸿利, 王明山, 等. 2种新的凝血因子V基因突变导致的遗传性凝血因子V缺乏症[J]. *中华医学杂志*, 2003, 83(4): 312-315.
- [10] Chen TY, Lin TM, Chen HY, et al. Gly392Cys missense mutation in the A2 domain of factor V causing severe factor V deficiency: molecular characterization by expression of the recombinant protein [J]. *Thromb Haemost*, 2005, 93(3): 614-615.
- [11] 杨丽红, 金艳慧, 杨婷, 等. 两个遗传性蛋白C缺陷症家系表型与基因突变分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2017, 34(1): 10-14. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2017.01.003.

(收稿日期:2020-09-15)

(本文编辑:徐茂强)