

一个遗传性凝血因子XI缺陷症家系基因分析

李阳阳¹ 许锴¹ 赵秘胜¹ 童郁¹ 苏看看¹ 王明山²

¹温州市人民医院检验科 305000; ²温州医科大学附属第一医院 325000

通信作者:王明山, Email: wywms@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.05.011

Gene analysis of a family with hereditary coagulation factor XI deficiency

Li Yangyang¹, Xu Kai¹, Zhao Misheng¹, Tong Yu¹, Su Kankan¹, Wang Mingshan²

¹Department of Clinical Laboratory, Wenzhou People's Hospital, Wenzhou 305000, China; ²The First

Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China

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

凝血因子XI(FXI)是一种丝氨酸蛋白酶原,由肝细胞和巨核细胞合成。可通过活化的凝血因子XII(FXIIa)、凝血酶或自身裂解所激活,生成活化的FXI(FXIa),进而激活凝血因子IX(FIX),参与凝血过程的发生。FXI的编码基因F11位于4号染色体长臂(4q35),长度为23 kb,含15个外显子和14个内含子^[1]。遗传性FXI缺陷症曾被称为血友病C,为常染色体隐性遗传性疾病,男女均可发病。患者临床出血表现轻重不一,主要表现为创伤或手术后出血增多,自发性出血少见,且FXI活性(FXI:C)水平高低与出血程度不相关^[2]。目前认为,该疾病的发生与F11基因突变有关^[3]。笔者报告1个由复合杂合性F11基因突变导致的遗传性FXI缺陷症家系并初步探讨其分子发病机制。

对象与方法

一、对象

1. 家系资料:先证者,男,28岁,腮腺良性肿瘤术前凝血常规检查发现活化部分凝血活酶时间(APTT)为84.2 s, FXI:C 3%, FXI抗原(FXI:Ag)8.6%,其他相关凝血指标均无明显异常,肝、肾功能正常,初步诊断为FXI缺陷症。先证者及其父母均无自发性出血症状,先证者父母非近亲结婚。

2. 健康对照组:选择100名健康体检者设立健康对照组,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,无肝、肾功能异常,且无其他基础性疾病。所有受试者在参与实验前均签署知情同意书。

二、主要仪器与材料

1. 仪器:STA-R全自动凝血仪(法国Stago公司)、电泳仪(北京市六一仪器公司)、PCR扩增仪(ABI Thermal cycler 2720)、凝胶成像系统(北京市六一仪器公司)。

2. 引物:根据人类F11基因序列(GenBank AY191837),应用 primer 5.0 软件共设计13对引物以覆盖F11基因的15个外显子区域及其侧翼序列。引物由上海桑尼基因技术

有限公司合成。

3. 试剂:APTT、FXI:C检测试剂由法国Stago公司配套提供;FXI:Ag检测试剂盒购自上海羽朵生物科技有限公司;PCR试剂盒(MasterMix)由北京天根生化科技有限公司提供。

三、方法

1. 标本采集和处理:在征求患者及其家属的知情同意后,采集各成员外周静脉血2.7 ml,以0.109 mol/L枸橼酸钠1:9抗凝,3 000 r/min离心10 min,上层乏血小板血浆用于凝血指标检测,下层血细胞用于提取基因组DNA,并进行PCR扩增及测序。

2. 血浆凝血指标检测:APTT、凝血酶原时间(PT)、纤维蛋白原(FIB)、FXI:C、FVIII活性(FVIII:C)、FIX活性(FIX:C)、FXII活性(FXII:C)等凝血指标采用一期凝固法检测,FXI:Ag测定采用酶联免疫吸附测定法。所有操作步骤均严格按照试剂说明书进行。

3. DNA抽提:采用非离心柱型基因组DNA抽提试剂盒抽提先证者及家系成员的外周血基因组DNA。

4. PCR扩增:PCR体系为50 μl,扩增体系包括Taq PCR Mastermix 25 μl、ddH₂O 18 μl、DNA模板3 μl、正向引物2 μl、反向引物2 μl。PCR反应条件如下:95℃预变性5 min,94℃变性30 s,53~60℃退火30 s,72℃延伸1 min,共30个循环;72℃再延伸10 min。

5. 电泳:5 μl PCR产物采用Goldview标记,在1%琼脂糖凝胶上进行电泳。

6. DNA测序及分析:PCR产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定,阳性标本纯化后进行测序(上海桑尼生物科技有限公司)。将测序结果与Genbank数据库中F11基因序列(NG_008051.1)比对,发现突变位点后,反向测序予以证实,发现杂合的缺失突变则进行克隆测序证实。先扩增先证者F11基因各外显子、侧翼序列以及5'端、3'端非翻译区,发现突变位点后再扩增其他家系成员相应外显子片段。

7. PCR产物进行克隆测序:普通PCR扩增突变位点所

在外显子基因片段,将扩增好的PCR产物切胶纯化回收,将切胶回收后的DNA片段与pMD18-T Vector进行连接,将连接上目的DNA片段的pMD18-T Vector转化进入感受态DH-5α,将振荡培养后的菌液,用pMD18-T载体通用引物,进行PCR扩增反应,挑选阳性菌液,送北京六合华大基因科技有限公司上海分公司进行克隆测序。

8. 生物信息学技术分析:用ClustalX-2.1-win软件将突变氨基酸与其他同源物种:黑猩猩(*Pan troglodytes*)、猕猴(*Macaca mulatta*)、犬(*Canis lupus familiaris*)、牛(*Bos Taurus*)、家鼠(*musculus*)、小家鼠(*Mus musculus*)、褐鼠(*Rattus norvegicus*)、原鸡(*Gallus gallus*)、热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*) (同源物种氨基酸序列见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>)的氨基酸序列进行比对,分析突变氨基酸在物种进化过程中的保守性。用MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org>) (蛋白质参考ID:P00747;蛋白质参考转录本ID:ENST00000308192)在线生物信息学软件,通过评分结果预测基因突变对蛋白质功能的影响。根据已知的FXI蛋白质结构模型,构建突变后模型,针对突变位点用Swiss-PdbViewer软件分析F11基因突变前后由氨基酸变化引起的蛋白质空间结构的改变。

结 果

1. 凝血指标检测结果:先证者APTT 84.2 s,明显延长,其FXI:C和FXI:Ag均明显下降,分别为3%、8.6%,家系成员中,其父亲和母亲的FXI:C和FXI:Ag均下降至正常对照的一半左右,其母亲的APTT为45.6 s。其他凝血指标均无明显异常,详见表1。

2. 先证者及家系成员基因分析结果:先证者F11基因第7号外显子检出c.738G>A杂合无义突变导致p.Trp228stop (图1),第12号外显子检出c.1325delT杂合缺失突变导致p.L424CfsX8并经克隆测序证实(图2)。在健康对照组中未检出c.1325delT缺失突变,可排除基因多态性。查阅国内外文献及相关网站,该突变位点鲜见报道。其母亲检出杂合p.Trp228stop突变,其父亲检出p.L424CfsX8杂合突变。先证者F11基因其它外显子及侧翼区和5'、3'端非翻译区均未发现其他突变。

3. 同源性分析结果:ClustalX-2.1-win软件保守性分析结果表明,Leu424在同源物种间呈高度保守(图3)。

4. 突变对蛋白影响力评估:Mutation Taster对p.L424CfsX8的评分结果为1.000分,预示此突变可引起相关疾病。

5. 模型分析结果:Swiss-PdbViewer软件对FXI蛋白质进行模型分析发现,在野生型FXI蛋白质中,非极性疏水性的Leu424与Pro421之间有一个氢键连接;当突变为极性亲水性的Cys424后,原有的氢键没有改变,但与Pro421的同一部位又多了一条氢键连接,导致蛋白结构发生改变(图4)。

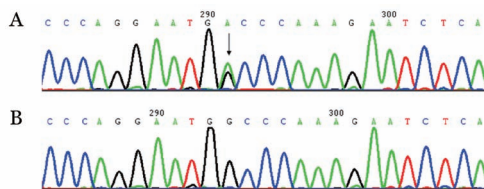


图1 遗传性凝血因子XI缺陷症家系F11基因第7号外显子c.738G>A杂合突变(A)及野生型(B)(箭头示突变位点)

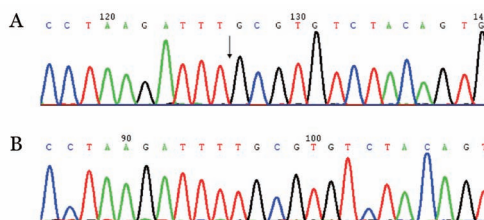


图2 遗传性凝血因子XI缺陷症家系F11基因第12号外显子c.1325delT杂合缺失突变(A)及野生型(B)(箭头示突变位点)

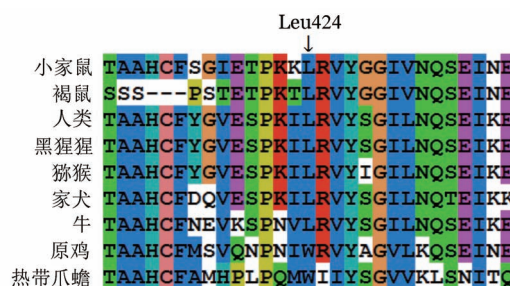
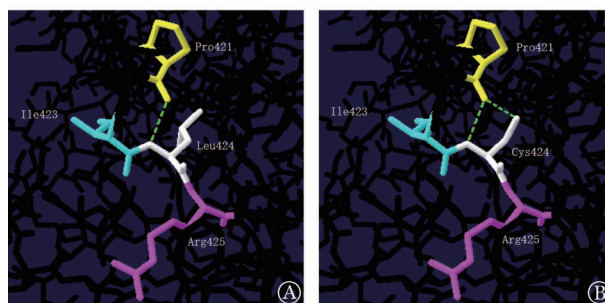


图3 Leu424同源性分析结果图



A:野生型;B:突变型(绿色虚线为氢键)

图4 凝血因子XI蛋白质模型图

表1 遗传性凝血因子XI缺陷症先证者及家系成员凝血指标及基因分析结果

家系成员	PT(s)	APTT (s)	FIB (g/L)	FXI:C (%)	FXI:Ag (%)	突变碱基 c.738G>A	突变碱基 c.1325delT	基因型
先证者	13.1	84.2	2.03	3	8.6	+	+	复合杂合
父亲	13.3	42.7	2.83	60	63.4	-	+	杂合
母亲	12.9	45.6	3.22	51	54.4	+	-	杂合
参考值	12.6~14.4	29.0~43.0	2.00~4.00	82~118	90.0~110.0			

注:PT:凝血酶原时间;APTT:活化部分凝血活酶时间;FIB:纤维蛋白原;FXI:C:凝血因子XI活性;FXI:Ag:凝血因子XI抗原

讨 论

成熟的FXI分子由两条多肽链通过二硫键连接形成的同源二聚体,FXI单链羧基端是丝氨酸蛋白酶结构域(SP),氨基端由苹果状结构域(AP)组成。遗传性凝血因子XI缺陷症主要与F11基因突变有关,突变分布于F11基因的各结构域,SP区的突变相对集中。1953年Rosenthal等^[4]首次报告FXI缺陷症在一般人群中的发病率为1/100万~1/10万。近期的数据显示:轻度FXI缺陷症的发病率比预期的要高^[5]。人类基因突变数据库(HGMD)共收录F11基因突变240余种(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/a11.php>),其中78.3%为错义突变和无义突变,9.8%为剪切位点突变,7.4%为小片段缺失,其他类型突变占4.5%。

遗传性FXI缺陷症分为交叉反应物质(CRM)阴性型(FXI:Ag和FXI:C同步下降)和交叉反应物质阳性型(FXI:C降低,FXI:Ag正常)。本家系共检出2个F11基因突变,分别为c.738G>A无义突变和c.1325delT缺失突变。先证者F11基因第7号外显子存在c.738G>A杂合无义突变导致p.Trp228stop,还有第12号外显子c.1325delT缺失突变导致p.L424CfsX8,其母亲存在p.Trp228stop突变杂合子,其父亲存在p.L424CfsX8突变杂合子,先证者的p.Trp228stop杂合突变遗传自其母亲,p.L424CfsX8杂合突变遗传自其父亲。双重杂合突变导致其抗原与活性水平同步下降,属于交叉反应物质阴性型。

2003年武文漫等^[4]首次报道F11基因的c.738G>A杂合无义突变(p.Trp228stop)。Shao等^[6]发现该突变在57个中国FXI缺陷症家系最为常见,是中国人群FXI缺陷症的热点突变,且为中国人所特有。p.Trp228stop突变翻译而成的是截短型蛋白,高度不稳定并迅速被降解^[7]。但也有研究认为,该无义突变产生的含有提前终止密码子的mRNA可被一种称之为无义介导衰变的mRNA监视系统迅速降解,使得循环中FXI减少^[8]。

Leu424位于第12号外显子SP区域,经同源序列比对,Leu424在同源物种间具有较高的保守性,说明该位点的重要性和功能特异性。Mutation Taster软件对p.L424CfsX8的评分结果为1.000分,预示此突变可引起相关疾病。通过构建氨基酸突变前后结构模型,发现在野生型FXI蛋白质中,非极性疏水性的Leu424与Pro421之间有一个氢键连接,当突变为极性亲水性的Cys424后,原有的氢键没有改变,但与Pro421的同一部位又多了一条氢键连接,导致蛋白结构发生改变。c.1325delT即1325号位置的T碱基缺失导致424后所有的氨基酸发生移码突变,424位Leu被Cys所替代并且在431位出现终止密码子,导致编码蛋白翻译提前终止,而产生截短蛋白,该蛋白因缺失部分结构域,高度不稳定,功能域的缺失及不稳定性的增强影响了催化活性区^[7],这可能是导致FXI:C及FXI:Ag下降的致病机制,但具体原因还有待进一步研究。

在本家系中,部分具有杂合子基因型的家庭成员也出现

FXI:C及FXI:Ag的下降,这是由于突变与正常等位基因的翻译产物形成同源二聚体。成熟的FXI蛋白是由两条相同的肽链所组成的二聚体,因此,如果突变没有导致蛋白表达完全丧失,则在杂合子中可能形成由翻译自突变等位基因的肽链与翻译自正常等位基因的肽链共同形成的同源二聚体,进一步降低FXI的水平。该机制同样可以解释部分FXI家系表现出不完全遵从隐性遗传规律,而是出现不完全隐性遗传甚至显性遗传特点的原因^[9]。以往研究显示遗传性FXI缺陷症的单一纯合突变和双重杂合突变都可导致血浆FXI:C下降至15%以下,单一杂合突变的下降程度为15%~70%^[10],与本家系中有基因缺陷的家系成员FXI:C下降程度一致。

参 考 文 献

- [1] 王静,傅启华,李稻,等.遗传性凝血因子XI缺陷症一例家系基因缺陷研究[J].中华检验医学杂志,2009,32(7):794-797. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2009.07.016.
- [2] Santoro C, Di Mauro R, Baldacci E, et al. Bleeding phenotype and correlation with factor XI (FXI) activity in congenital FXI deficiency: results of a retrospective study from a single centre [J]. Haemophilia, 2015, 21 (4): 496-501. DOI: 10.1111/hae.12628.
- [3] 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.
- [4] 武文漫,王鸿利,王学锋,等.两种新的无义突变Trp228stop和Trp383stop导致的遗传性凝血因子XI缺陷症[J].中华血液学杂志,2003,24(3):126-128. DOI: 10.3760/j.issn:0253-2727.2003.03.005.
- [5] Zadra G, Asselta R, Tenchini ML, et al. Simultaneous genotyping of coagulation factor XI type II and type III mutations by multiplex real-time polymerase chain reaction to determine their prevalence in healthy and factor XI-deficient Italians [J]. Haematologica, 2008, 93 (5): 715-721. DOI: 10.3324/haematol.12180.
- [6] Shao Y, Cao Y, Lu Y, et al. Clinical Manifestations and Mutation Spectrum of 57 Subjects With Congenital Factor XI Deficiency in China [J]. Blood Cells Mol Dis, 2016, 58 (5): 29-34. DOI: 10.1016/j.bcmd.2016.01.004.
- [7] 叶佳佳,杨丽红,郝秀萍,等.一例遗传性凝血因子XI缺陷症患者表型诊断及基因分析[J].温州医科大学学报,2017,47(5):356-360. DOI: 10.3969/j.issn.2095-9400.2017.05.009.
- [8] Brogna S, Wen J. Nonsense-mediated mRNA Decay (NMD) Mechanisms [J]. Nat Struct Mol Biol, 16(2): 107-113. DOI: 10.1038/nsmb.1550.
- [9] 武文漫,王鸿利,王学锋,等.错义突变Gly400Val导致的凝血因子XI缺陷症[J].上海医学,2003,26(12):913-915. DOI: 10.3969/j.issn.0253-9934.2003.12.014.
- [10] Quélin F, Mathonnet F, Potentini-Esnault C, et al. Identification of five novel mutations in the factor XI gene (f11) of patients with factor XI deficiency [J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 17(1), 69-73. DOI: 10.1097/01.mbc.0000198054.50257.96.

(收稿日期:2020-02-03)

(本文编辑:徐茂强)