

# 十例遗传性凝血因子XI缺陷症患者的临床特征与基因突变分析

李少禧 金艳慧 杨丽红 徐琦煜 李小龙 王明山

温州医科大学附属第一医院医学检验中心 325015

基金项目:浙江省科技厅公益技术研究计划基金(LGF18H080003)

通信作者:王明山, Email: wywms@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.12.013

## Analysis of the molecular pathogenesis and clinical phenotypes of 10 patients with inherited coagulation factor XI deficiency

Li Shaoxi, Jin Yanhui, Yang Lihong, Xu Qiyu, Li Xiaolong, Wang Mingshan

Medical Laboratory Center, 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出血性疾病,为常染色体隐性遗传性疾病,患者血浆中FXI促凝活性(FXI:C)降低,但患者少有发生自发性出血,临床表现有较大的异质性<sup>[1]</sup>。目前关于遗传性FXI缺陷症的临床出血程度与FXI:C及基因突变类型和数量的相关性研究较少。我们对10例遗传性FXI缺陷症患者的F11基因进行了检测,以探讨其分子发病机制与临床表现的关系。

### 病例与方法

1. 家系资料:10例无亲缘关系的遗传性FXI缺陷症家系中先证者(男1例,女9例),年龄20~64岁,3例长辈存在近亲婚配关系。1例先证者平素在无明显诱因下易出现齿龈出血,以“牙龈出血难止”来我院就诊;1例先证者有术后出血难止史;1例先证者有产后出血增多;9例先证者因术前检查因活化部分凝血活酶时间(APTT)明显延长而确诊。

150名正常对照为我院健康体检者,男81名,女69名,中位年龄32(18~60)岁,均无肝肾功能疾病,无出血和血栓史。所有受试者均知情同意。

2. 标本采集:征得患者及其家属同意后,采集患者及其家属成员的外周静脉血标本,以0.109 mol/L枸橼酸钠1:9抗凝。标本分2份,一份用于凝血指标检测,2 h内检测完毕;另一份用于DNA提取, -40 °C冻存待检。

3. 凝血指标检测:凝血酶原时间(PT)、APTT、FVIII促凝活性(FVIII:C)、FIX促凝活性(FIX:C)、FXI:C和FXII促凝活性(FXII:C)等指标采用一期凝固法在法国Stago STA-R全自动血凝仪上测定(配套试剂由法国Stago公司提供);FXI:Ag采用ELISA法测定。所有操作均按照试剂说明书进行。

4. DNA提取及PCR扩增:采用酚-氯仿法抽提受试者的外周血基因组DNA,参照文献[2]设计PCR引物,由上海桑尼生物科技有限公司合成。PCR扩增:反应体积共50 μl,包括Taq PCR Mastermix 25 μl、ddH<sub>2</sub>O 18 μl、DNA模板3 μl、正向引物2 μl、反向引物2 μl。反应条件:95 °C预变性5 min, 95 °C变性30 s,根据不同引物以相应退火温度(60~64 °C)退火30 s,72 °C延伸45 s(共35个循环),72 °C延伸10 min。取扩增产物5 μl经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

5. DNA序列分析:PCR扩增产物纯化后送上海桑尼生物工程有限公司直接测序,所用测序仪为ABI PRISM 3730。测序结果用Chromas软件与美国NCBI基因库所公布的F11基因序列(Genbank M17262)进行比对,寻找基因突变位点。发现基因突变的序列则反向测序予以证实,再扩增其他家系成员相应外显子片段。对150名健康对照组人群相应的区域进行PCR扩增、测序,用于排除基因多态性。

6. pMD18-TTA克隆载体:将含有缺失突变的序列克隆入pMD18-TTA克隆载体中,分别对克隆入载体的单条染色体上的F11基因序列进行测序。

### 结 果

1. 凝血指标检测结果:所有先证者的APTT均延长、FXI:C降低,9例先证者FXI:Ag 1.6%~29%,家系其他成员的APTT正常或延长,FXI:C、FXI:Ag正常或降低,先证者及家系成员的PT、FVIII:C、FIX:C、FXII:C均在正常范围内。10例先证者的临床资料见表1。

2. F11基因突变特性:以基因组GENEBANK所公布的M17262序列作为标准,通过对10例遗传性FXI缺陷症先证者的F11基因外显子及侧翼,5'、3'端非编码区测序共发现

表 1 10 例遗传性凝血因子 XI 缺陷症家系先证者的临床资料

例号	性别	年龄 (岁)	APTT (s)	FXI:C (%)	FXI:Ag (%)	临床表现
1	女	20	50.0	22.5	29.0	无症状
2	女	39	60.0	4.0	6.8	轻型
3	女	32	78.4	2.0	17.6	轻型
4	女	64	59.3	13.0	76.0	无症状
5	女	51	69.6	6.0	10.7	无症状
6	女	25	75.7	2.0	8.0	无症状
7	女	30	49.4	17.0	19.0	无症状
8	女	46	54.7	3.0	1.6	中型
9	男	28	94.2	1.0	1.3	无症状
10	女	32	84.2	3.0	8.6	无症状

注: APTT: 活化部分凝血活酶时间, 参考值 29.0 ~ 43.0 s; FXI:C: 凝血因子 XI 促凝活性, 参考值 82.0% ~ 118.0%; FXI:Ag: 凝血因子 XI 抗原, 参考值 90.0% ~ 110.0%

9 种类型共 15 个基因突变(表 2), 其中 13 外显子 c.1562A>G (Tyr503Cys)、12 外显子 c.1325delT (Leu424Cys) 2 种突变为首次发现(图 1); 9 种基因突变均发生在外显子区, 其中 1 种为缺失突变 c.1325delT (Leu424Cys), 3 种无义突变 (Gln263stop、Trp228stop、Trp501stop), 余 5 种为错义突变; 有 6 种突变发生在丝氨酸蛋白酶催化域(SP)、其余 3 种发生在非催化域(AP3、AP4); 各有 3 例存在 Gln263stop 和 Trp228stop 纯合或杂合突变, 这两种突变在无亲缘关系的家系中重复出现。先证者 1 为 Gln263stop 杂合突变, 先证者 2、6 为 Gln263stop 纯合突变, 先证者 7 为 Val498Met 杂合突变, 先证者 3、5、8、9、10 分别为 Trp228stop 和 Cys482Trp、Trp228stop 和 Trp501Ser、Gln263stop 和 Val498Met、Gly350Glu 和 Trp501stop、Trp228stop 和 Leu424Cys 双杂合突变, 表现为交叉反应物质阴性(CRM)阴性; 先证者 4 为 Tyr503Cys 纯合突变, 表现为 CRM 阳性; 对家系成员分析发现, 先证者的基因突变均遗传其父亲和(或)母亲, 其中 3 个家系(先证者 2、4、6)存在近亲婚配关系。

### 讨 论

F11 基因位于 4 号染色体的长臂末端 4q35, 全长 23 kb, 含 15 个外显子和 14 个内含子。成熟的 FXI 由两条相同分子量的多肽链通过二硫键连接形成二聚体。该同源二聚体形成了 4 个盘状结构的 AP 结构域和一个催化域: AP1 含有凝血酶结合位点, AP2 含有 HMWK 结合位点, AP3 含有肝素、FIX、血小板膜糖蛋白 Ib 结合位点, AP4 第 321 位半胱氨酸(Cys321)是两个 FXI 单体通过二硫键形成二聚体的部位<sup>[3]</sup>。遗传性 FXI 缺陷症主要与 F11 基因突变有关, 1953 年由 Rosenthal 等<sup>[2]</sup>发现。FXI 缺陷症的发病率与基因突变类型具有种族差异<sup>[4]</sup>。据最新的 F11 基因突变数据库统计, 引起遗传性 FXI 缺陷症的突变有 200 余种, 突变类型主要包括错义突变、无义突变、剪切突变、小片段缺失及小部分其他类型突

表 2 10 例遗传性凝血因子 XI 缺陷症家系先证者的 F11 基因检测结果

例号	核苷酸突变	氨基酸变化	外显子	功能区	突变类型
1	c.841C>T	Gln263stop	8	Ap3	杂合
2	c.841C>T	Gln263stop	8	Ap3	纯合
3	c.738G>A	Trp228stop	7	Ap3	双杂合
	c.1500C>G	Cys482Trp	12	SP	
4	c.1562A>G	Tyr503Cys	13	SP	纯合
5	c.738G>A	Trp228stop	7	AP3	双杂合
	c.1556G>C	Trp501Ser	13	SP	
6	c.841C>T	Gln263stop	8	AP3	纯合
7	c.1546G>A	Val498Met	13	SP	杂合
8	c.841C>T	Gln263stop	8	AP3	双杂合
	c.1546G>A	Val498Met	13	SP	
9	c.1103G>A	Gly350Glu	10	AP4	双杂合
	c.1556G>A	Trp501stop	13	SP	
10	c.738G>A	Trp228stop	7	AP3	双杂合
	c.1325delT	Leu424Cys	12	SP	

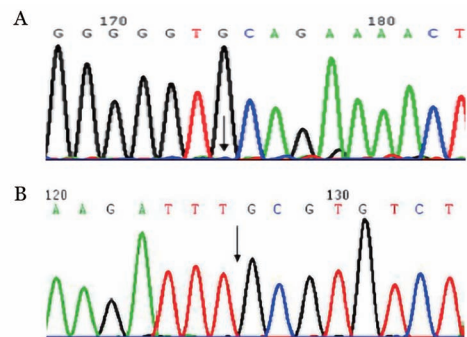


图 1 F11 基因 13 外显子 c.1562A>G 纯合突变(A)和 12 外显子 c.1325delT 双杂合突变测序图(B)

变。由于 F11 基因的突变导致其产生、聚合、分泌及功能方面受影响, FXI 水平降低。遗传性 FXI 缺陷症的表型突变可分为两种: CRM 阴性, FXI:C 和 FXI:Ag 水平均降低; CRM 阳性, FXI:C 降低, FXI:Ag 正常。本研究中我们发现 10 例遗传性 FXI 缺陷症患者存在 9 种类型的 F11 基因突变, 其中 13 外显子 c.1562A>G (Tyr503Cys)、12 外显子 c.1325delT (Leu424Cys) 2 种突变为新突变, 突变类型包括错义突变、无义突变和缺失突变。各突变位点均发生在外显子区, 其中 6 种突变发生在 SP 区, 3 种突变发生在 AP3-AP4 区, 可见这些区域可能是本地区 F11 基因较易发生突变及导致 FXI 功能异常的主要区域, 并且还发现了本地区人群中存在导致遗传性 FXI 缺陷的突变热点: 有 3 例含有 Gln263stop 和 Trp228stop 纯合或杂合突变, 这两种突变在无亲缘关系的家系中重复出现。Shao 等<sup>[5]</sup>发现这两个突变是中国人群 FXI 缺陷的热点突变。Quélin 等<sup>[6]</sup>指出遗传性 FXI 缺陷症基因突变的纯合子和复合杂合子可致血浆 FXI:C 降至 15% 以下; 单一点位突变杂合子为 15% ~ 70%。本研究中基因突变家系先证者和家系成员的 FXI:C 水平与此相符。

FXI 缺陷症在创伤和手术相关的出血增多是最常见的出血表型,而自发性出血则较少见<sup>[5]</sup>。本研究中我们发现 3 例纯合突变的先证者,临床表型分别为轻型和无症状;不同的复合杂合突变临床表型有较大差异:表现为轻型、中型、无症状,但是纯合和复合杂合突变的临床出血症状占比较单一杂合性突变高,单一杂合突变均表现为无症状。本研究还发现 10 例先证者 FXI:C 均小于 23%,其中 7 例先证者的 FXI:C 水平小于 6%,9 例 FXI:Ag 明显降低。Guéguen 等<sup>[7]</sup>发现 FXI:C 无法预测临床出血风险及严重程度,严重的出血倾向也不一定显示出较低的 FXI:C 水平。这也表明遗传性 FXI 缺陷症患者的临床出血表现与 FXI:C 下降程度、基因突变类型无明显相关性。本研究通过家系分析发现,先证者的基因突变均遗传自父亲和(或)母亲,3 个家系存在近亲婚配,均表现为纯合突变,表明近亲结婚容易导致遗传性 FXI 缺陷者患者基因纯合突变。

除了基因突变的数量,基因突变的位点对 FXI 的影响同样重要。我们共发现 7 种已报道的突变:Gln263stop、Trp228stop、Cys482Trp、Trp501Ser、Val498Met、Gly350Glu 和 Trp501stop。王静等<sup>[8]</sup>对 Gln263stop 的研究发现,该无义突变使得编码 263 位的氨基酸提前出现终止密码,形成缺失部分结构域的短截型蛋白,该蛋白高度不稳定,并伴细胞内迅速降解。武文漫等<sup>[9]</sup>对 Trp228stop 的研究发现,Trp228 残基位于 AP3 结构域,该无义突变产生的短截蛋白缺失 AP4 及催化活性区,从而使蛋白的结构完整性和功能受到影响。刁戈等<sup>[10]</sup>对 Cys482Trp 的研究发现,Cys482 残基位于 SP 区,当 Trp 取代 Cys 后,其会与 His267 之间形成空间位阻,与 Cys362 之间的二硫键连接也受到影响,从而导致蛋白结构改变。刘媚娜等<sup>[11]</sup>对 Trp501Ser 的研究发现,Trp501 突变为 Ser501 后原有苯环消失,氢键增加,蛋白结构改变,将会被内质网或蛋白酶体降解途径提前降解,导致血浆中含量减低或活性异常。Kwon 等<sup>[12]</sup>对 Val498Met 研究发现,Val498 被 Met498 取代后催化域结构改变,产生功能异常的异二聚体,导致 FXI 分泌障碍,该突变可致 FXI:C 下降为 1%。Kravtsov 等<sup>[13]</sup>对 Gly350Glu 的研究发现,该突变可导致 FXI 两个单体不能在细胞内聚合形成二聚体,而无法分泌到细胞外,使得血浆中 FXI:C 水平极低甚至检测不到。董雷鸣等<sup>[14]</sup>对 Trp501stop 的研究发现,Trp501 位于 SP 区,突变后产生短截蛋白,部分功能催化域缺失,蛋白结构高度不稳定而被迅速降解,导致循环中 FXI:C 减低。本研究中新发现的导致遗传性 FXI 缺陷症的突变位点 Tyr503Cys、Leu424Cys 对 FXI 功能的影响有待于进一步研究。

#### 参考文献

[1] Meijers JC, Tekelenburg WL, Bouma BN, et al. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis[J]. *N Engl J Med*, 2000, 342 (10): 696-701. DOI: 10.1056/NEJM200003093421004.

- [2] 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.
- [3] Gailani D, Smith SB. Structural and functional features of factor XI[J]. *J Thromb Haemost*, 2009, 7 Suppl 1 (Suppl 1): 75-78. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03414.x.
- [4] Shpilberg O, Peretz H, Zivelin A, et al. One of the two common mutations causing factor XI deficiency in Ashkenazi Jews (type II) is also prevalent in Iraqi Jews, who represent the ancient gene pool of Jews[J]. *Blood*, 1995, 85(2):429-432.
- [5] Shao YY, Cao YN, Lu YL, et al. Clinical manifestations and mutation spectrum of 57 subjects with congenital factor XI deficiency in China[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2016, 58: 29-34. DOI: 10.1016/j.bcmd.2016.01.004.
- [6] 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*, 2006, 17(1): 69-73. DOI: 10.1097/01.mbc.0000198054.50257.96.
- [7] Guéguen P, Galinat H, Blouch MT, et al. Biological determinants of bleeding in patients with heterozygous factor XI deficiency[J]. *Br J Haematol*, 2012, 156 (2): 245-251. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2011.08945.x.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 刁戈,马莉,林方昭,等. 1 例凝血因子 XI 缺陷症的基因突变研究[J]. *中国输血杂志*, 2012, 25(2):142-144.
- [11] 刘媚娜,李小龙,周星星,等. 复合杂合性 F11 基因突变导致的遗传性凝血因子 XI 缺陷症家系分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2019, 36(4): 363-367. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2019.04.018.
- [12] Kwon MJ, Kim HJ, Bang SH, et al. Severe factor XI deficiency in a Korean woman with a novel missense mutation (Val498Met) and duplication G mutation in exon 13 of the F11 gene[J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2008, 19 (7): 679-683. DOI: 10.1097/MBC.0b013e32830ef8f9.
- [13] Kravtsov DV, Wu W, Meijers JCM, 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.
- [14] 董雷鸣,丁秋兰,武文漫,等. 遗传性凝血因子 XI 缺陷症家系的凝血因子 XI 基因突变分析[J]. *中华检验医学杂志*, 2009, 32 (8): 915-919. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2009.08.017.

(收稿日期:2020-06-22)

(本文编辑:徐茂强)