

α 1抗胰蛋白酶Pittsburg突变： 同一家系二例报告

曹丽娟 白霞 余自强 张威 苏健 王兆钺 阮长耿

【摘要】 目的 分析2例 α 1抗胰蛋白酶(α 1-AT)Pittsburg突变患者的临床和实验室特点。方法 采用凝固法或发色底物法分别检测凝血时间及凝血因子活性;比浊法测定血小板聚集功能;采用毛细管电泳法测定血清蛋白;PCR扩增目的DNA片段并测序检测突变。结果 先证者,女,34岁,多次术后出血及黄体破裂出血;女儿,10岁,无出血表现。两例患者APTT、凝血酶时间均明显延长且正常人混和血浆1:1不能纠正,凝血因子IX、X、XI、XII活性明显降低,蛋白C、蛋白S活性均为0,1 U/ml凝血酶诱导的血小板聚集降低,4 U/ml凝血酶诱导的血小板聚集为48%;血清 α 1球蛋白电泳条带异常;DNA测序结果显示两例患者的 α 1-AT基因(NG_008290.1)均存在g.T17132G(p.Met358Arg)杂合突变。结论 α 1-AT Pittsburg突变患者表现出明显的凝血异常,临床出血表现有较大的差异性,黄体破裂出血可能是女性患者的一个明显特征。

【关键词】 出血; 凝血异常; α 1抗胰蛋白酶; 基因; Pittsburg突变

α 1-antitrypsin Pittsburg mutations: report of two cases in the same family Cao Lijuan, Bai Xia, Yu Ziqiang, Zhang Wei, Su Jian, Wang Zhaoyue, Ruan Changgeng. Jiangsu Institute of Hematology, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China
Corresponding author: Wang Zhaoyue. Email: zwang11@sina.com

【Abstract】 Objective To analyze the clinical and laboratory abnormalities of two patients with α 1-antitrypsin (α 1-AT) Pittsburg in a family and review the literatures. **Methods** Both plasma clotting time and factor activities were performed using clotting or substrate methods. Platelet aggregation was evaluated using an optical aggregometer. The serum protein electrophoresis was performed on Sebia HYDRASYS by using Agarose gel. The exons of α 1-AT were amplified by using polymerase chain reaction (PCR) and then sequenced and compared with NCBI GenBank records. **Results** The proband had several ruptures of corpus luteum and bleeding after operation, while her daughter had no bleeding history. Both of them showed prolonged coagulation tests which could not be corrected by mixing with the normal plasma. They also showed low levels of plasma coagulation factors, undetected protein C and S activity and abnormal bands of α 1-globulin. The results of gene sequencing demonstrated that they were heterozygous for g.T17132G (p.Met358Arg) mutation of α 1- antitrypsin gene (NG_008290.1). **Conclusions** Comparing with the data of previously reported cases, our results confirmed the obvious abnormality of coagulation test and the discrepancy of bleeding tendency of α 1- antitrypsin Pittsburg patients, and suggested that the rupture of corpus luteum would be a specific characteristic in women of child-bearing age.

【Key words】 Bleeding; Abnormal coagulation; α 1-antitrypsin; Gene; Pittsburg mutation

正常凝血过程受到凝血-抗凝-纤溶系统的精细调节。凝血-纤溶系统中多数酶原以及某些其他酶

原都属于丝氨酸蛋白酶,血液中同时存在相应的丝氨酸蛋白酶抑制剂 serpins,后者为一类结构上同源的超家族,其中的活性中心能结合并灭活相应的丝氨酸蛋白酶^[1]。在 serpins 超家族中,抗凝血酶是机体抗凝系统的主要成分,反应中心为精氨酸393-丝氨酸,灭活凝血酶和活化因子X(FXa)、FIXa与FXIa^[2]。而 α 1抗胰蛋白酶(α 1-AT)的反应中心为甲

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.11.014

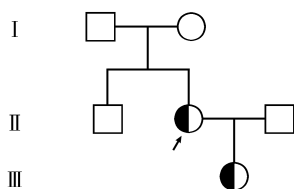
作者单位:215006 苏州大学附属第一医院、江苏省血液研究所

通信作者:王兆钺,Email:zwang11@sina.com

硫氨酸358-丝氨酸,能抑制弹性蛋白酶、胰蛋白酶等多种丝氨酸蛋白酶的活性,其主要功能是对抗由多形核白细胞吞噬作用时释放的溶酶体蛋白水解酶^[3]。 α 1-AT与抗凝血酶具有serpin的共同结构,但作用底物及功能不同^[4]。当 α 1-AT活性中心358位上的丝氨酸(Ser)被精氨酸(Arg)取代后, α 1-AT的抗蛋白酶活性丧失,表现为强烈的抗凝血酶活性而导致出血倾向,称为 α 1-AT Pittsburg突变^[5-6]。 α 1-AT Pittsburg突变极为罕见,至今国际上仅报道了5个家系的6例患者^[5,7-10]。患者的出血程度有明显差异,凝血改变复杂,很容易误诊或漏诊。笔者报道同一家系的2例 α 1-AT Pittsburg突变患者,并对有关文献进行复习。

病例资料

1. 病例资料:先证者,女,34岁,幼时偶有齿龈出血,12岁时左腿曾出现血肿,经“止血药物”处理后血肿消退,24岁行剖宫产手术,术后出血不止,经输血后行子宫切除术,术后2个月切口愈合。27岁时因黄体破裂致腹腔出血,经输血后手术切除。其后又两次发生黄体破裂出血,经血浆输注与注射重组人凝血因子VIIa后得到控制。患者肝肾功能正常,抗核抗体、抗磷脂抗体阴性,无消化道出血史,月经量不多。患者10岁女儿生长发育正常,无出血性疾病既往史。家系图见图1。



○ 正常女性; □ 正常男性; ● 女性患者; / 先证者

图1 患者家系图

2. 凝血指标检测:先证者及其女儿APTT及凝血酶时间(TT)明显延长,PT轻度延长,不能被正常血浆、血小板磷脂、甲苯胺蓝及鱼精蛋白纠正。内源性凝血因子VIII、IX、X、XI、XII活性降低,而凝血因子II、V活性及纤维蛋白原浓度均异常,VWF抗原含量正常,蛋白C、蛋白S活性明显降低(表1),而先证者父母及兄长无凝血检测正常。腺苷二磷酸(ADP)、胶原、瑞斯托霉素及U46619诱导的血小板聚集正常(80%~90%),1 U/ml凝血酶诱导的血小板聚集降低,但凝血酶浓度增加至4 U/ml时,血小板聚集恢复至48%。

3. 血清蛋白电泳:先证者及其女儿血清蛋白电泳 α 1蛋白总量分别为2.6%和3.1%(正常参考值1.0%~3.2%)。但电泳图见明显异常:血清白蛋白后有拖尾条带, α 1球蛋白条带较弱且模糊分散,扫描峰图可见 α 1球蛋白峰平缓(图2)。

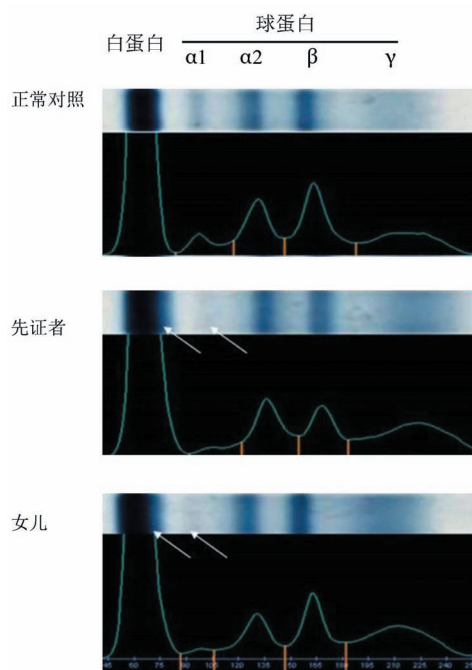


图2 α 1-抗胰蛋白酶Pittsburg突变患者血清蛋白电泳检测结果

表1 同一家系2例 α 1抗胰蛋白酶Pittsburg突变患者凝血指标检测结果

受试者	APTT (s)	PT (s)	TT (s)	Fig (g/L)	FII:C (%)	FIII:C (%)	FVIII:C (%)	FIX:C (%)	FX:C (%)	FV:C (%)	FVII:C (%)	FII:C (%)	VWF (%)	PC (%)	PS (%)
先证者	120	20.4	120	2.90	13.6	2.1	39.1	6.0	12.5	89.4	64.2	36.5	185	0	0
女儿	120	18.4	120	4.39	19.0	2.3	34.0	7.3	15.0	88.0	61.0	51.0	146	0	0
正常参考值	28~40	11.0~14.5	14~21	2.00~5.00	50.0~150.0	50.0~150.0	50.0~150.0	50.0~150.0	50.0~150.0	50.0~150.0	50.0~150.0	50.0~150.0	50~150	50~150	50~150

注:APTT:部分激活的凝血活酶时间;PT:凝血酶原时间;TT:凝血酶时间;Fig:纤维蛋白原;VWF:血管病性血友病因子;PC:蛋白C;PS:蛋白S。FII:C、FV:C、FVII:C、FVIII:C、FIX:C、FX:C、FXI:C、FXII:C分别为凝血因子II、V、VII、VIII、IX、X、XI、XII活性

4. $\alpha 1$ -AT 基因测序:提取患者及家属的外周血细胞基因组 DNA,双脱氧链终止法测序分析。结果显示患者及其女儿的 $\alpha 1$ -AT 基因(NG_008290.1)均存在 g.T17132G(p.Met358Arg)杂合突变,突变导致 358 位 Met 突变为 Arg(图 3),先证者父母及兄长未检测到该基因突变。

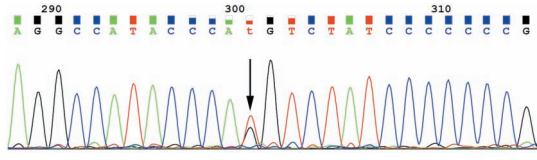


图3 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶基因 g.T17132G(p.Met358Arg)杂合突变

讨论及文献复习

本家系先证者有原因不明的血肿、术后出血不止和多次黄体破裂病史,凝血检查发现 APTT、TT 明显延长,PT 轻度延长,诊断时需与纤维蛋白原异常相鉴别。后者亦有出血病史,APTT、TT 及 PT 均有延长,但可被正常人血浆 1:1 纠正,进一步检查可发现纤维蛋白原含量降低。而本家系先证者纤维蛋白原含量正常,APTT、TT 延长并不被正常血浆纠正,说明血浆中存在抑制物。另一需要鉴别的情况是肝素的影响,肝素也可引起 APTT 与 TT 延长,正常血浆不能纠正,但患者无肝素用药史。在少数恶性浆细胞病患者中肝素类物质增多,导致出血及 APTT 与 PT 延长^[11],这种可能性亦可排除。此外,血浆中未检测到抗核抗体、抗磷脂抗体,可排除获得性抑制物存在。凝血因子 XII、XI、IX、X 活性均低于 20% (尤其凝血因子 XI 活性只有 2%)。ADP、胶原、瑞斯托霉素及 U46619 诱导的血小板聚集功能正常,1 U/ml 凝血酶诱导的血小板聚集功能降低,但凝血酶浓度增加至 4 U/ml 时,血小板功能恢复至 48%。血清蛋白电泳 $\alpha 1$ 球蛋白含量虽正常,但条带极弱且模糊分散,血清白蛋白后有拖尾条带。测序分析发现患者 $\alpha 1$ -AT 基因均存在 g.T17132G (p.Met358Arg),致使 $\alpha 1$ -AT 蛋白具有强烈的抗凝血酶活性。所有这些证据均支持先证者 $\alpha 1$ -AT Pittsburg 突变诊断。

患者女儿也具有同样的凝血异常,检测 $\alpha 1$ -AT 基因证实也具有 g.T17132G(p.Met358Arg)突变,这些异常说明女儿亦为 $\alpha 1$ -AT Pittsburg 突变。而先证者父母具有正常的凝血表型,亦不携带有基因突变。说明致病突变自然发生于先证者出生前的胚胎形成早期,而后遗传于女儿,符合染色体显性遗传规律。

我们在血清蛋白电泳分析中未见文献报道的 $\alpha 1$ 球蛋白条带分为 A、B、C 三个条带^[6],可能与检测方法不同有关。

$\alpha 1$ -AT Pittsburg 突变极为罕见,至今国内外仅有 4 例男性和 2 例女性报道。1978 年 Lewis 等^[6]首次发现 $\alpha 1$ -AT 358 位上的甲硫氨酸突变为精氨酸后,其抗凝血酶活性增强 1 000 倍,与肝素辅助下的抗凝血酶作用效果相同^[12],患者自幼反复大出血 50 余次,并在 14 岁时死于腹腔大出血^[5],该病被命名为 $\alpha 1$ -AT Pittsburg 突变。1992 年 Vidaud 等^[7]报告第 2 例患者,与首例不同的是该患者出血不明显且具有较低的蛋白 C 活性,因 $\alpha 1$ -AT Pittsburg 突变蛋白结合和清除蛋白 C 的能力增强 4 400 倍^[13],导致蛋白 C 抗凝活性的相对缺乏而减轻出血倾向,由此认为患者出血的异质性主要是血浆蛋白 C 水平不同所致^[14]。2009 年北京协和医院报告了同患该病的父女患者^[8]。结合本组 2 例母女患者,直接证实了该病为常染色体显性遗传,不受性别的影响。最近国内外相继报道了 2 例患者出血倾向差异性很大,8 岁男性患儿反复发现皮肤关节出血,而女性患儿只表现为 1 次外伤后血肿^[9-10]。

综合本组 2 例患者病例资料并复习以往文献报道,该病临床特征如下:①所有患者的凝血检测结果极其相似,APTT 及 TT 明显延长,PT 轻度延长,不能被正常血浆纠正,内源性凝血因子活性均降低。研究证实 $\alpha 1$ -AT Pittsburg 突变能抑制前激肽酶、凝血因子 XI 及 XII 活性^[15],而凝血因子 VIII、IX 及 X 活性测定是通过内源性途径凝固时间测定,故其活性也相应降低。②除 Lewis 等^[6]报告的第 1 例患者外,其他病例的蛋白 C 活性均极低,而患者的出血情况差异很大,因此我们推测可能有其他原因影响出血的发生。如最近文献报道突变的 $\alpha 1$ -AT Pittsburg 突变蛋白能抑制组织型纤溶酶原激活物及纤溶酶活性^[10],可能维持凝血系统在较低的水平保持平衡,使患者不易发生出血。

此外,本例先证者与文献^[8]报道的 1 例女性育龄期患者都发生反复黄体破裂出血。 $\alpha 1$ -AT 是一个急性反应蛋白,在炎症和创伤时该蛋白浓度明显升高^[16]。有文献曾报道 $\alpha 1$ -AT 浓度在女性排卵期升高,并在黄体期达到顶峰^[17]。这可能增加 $\alpha 1$ -AT Pittsburg 突变女性患者育龄期黄体破裂的风险。血浆 $\alpha 1$ -AT 怀孕时开始增加,分娩前达到高峰,并持续到产后^[18]。

总之, $\alpha 1$ -AT Pittsburgh 突变患者临床极其少见, 很容易造成误诊和漏诊, 应注意排除肝素类物质对凝血的影响。对于经常血肿形成尤其是伴有黄体破裂的女性, 如发现明显的凝血异常、血清蛋白电泳可见 $\alpha 1$ 条带弥散, 需进行 $\alpha 1$ -AT 基因检测, 以明确诊断。目前对于 $\alpha 1$ -AT Pittsburgh 突变患者治疗手段有限, 应避免外伤和有创性操作, 急性出血期可进行血浆输注、血浆置换, 也可给予抗纤溶药物或重组人凝血因子 VIIa。

参考文献

- [1] van Gent D, Sharp P, Morgan K, et al. Serpins: structure, function and molecular evolution[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35(11):1536-1547. DOI: 10.1016/S1357-2725(03)00134-1.
- [2] Huntington JA. Thrombin inhibition by the serpins [J]. *J Thromb Haemost*, 2013, 11 Suppl 1:254-264. DOI: 10.1111/jth.12252.
- [3] Kalsheker N. Alpha 1-antitrypsin: structure, function and molecular biology of the gene [J]. *Biosci Rep*, 1989, 9(2):129-138. DOI: 10.1007/BF01115992.
- [4] Gettins PG. Serpin structure, mechanism, and function [J]. *Chem Rev*, 2002, 102(12):4751-4804. DOI: 10.1021/cr010170+.
- [5] Owen MC, Brennan SO, Lewis JH, et al. Mutation of antitrypsin to antithrombin. alpha 1-antitrypsin Pittsburgh (358 Met leads to Arg), a fatal bleeding disorder [J]. *N Engl J Med*, 1983, 309(12):694-698. DOI: 10.1056/NEJM198309223091203.
- [6] Lewis JH, Iammarino RM, Spero JA, et al. Antithrombin Pittsburgh: an alpha1-antitrypsin variant causing hemorrhagic disease [J]. *Blood*, 1978, 51(1):129-137.
- [7] Vidaud D, Emmerich J, Alhenc-Gelas M, et al. Met 358 to Arg mutation of alpha 1-antitrypsin associated with protein C deficiency in a patient with mild bleeding tendency [J]. *J Clin Invest*, 1992, 89(5):1537-1543. DOI: 10.1172/JCI115746.
- [8] Hua B, Fan L, Liang Y, et al. Alpha1-antitrypsin Pittsburgh in a family with bleeding tendency [J]. *Haematologica*, 2009, 94(6):881-884. DOI: 10.3324/haematol.2008.004739.
- [9] 王龙飞, 胡春辉, 王欢. $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶基因 Pittsburgh 突变致反复出血性疾病一例 [J]. *中华儿科杂志*, 2015, 53(11):860-861. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2015.11.013.
- [10] Henneuse A, Suchon P, Chambost H, et al. $\alpha 1$ -antitrypsin Pittsburgh and plasmin-mediated proteolysis [J]. *J Thromb Haemost*, 2016, 14(10):2023-2026. DOI: 10.1111/jth.13426.
- [11] Torjeman L, Guermazi S, Ladeb S, et al. Heparin-like anticoagulant associated with multiple myeloma and neutralized with protamine sulfate [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2007, 18(3):279-281. DOI: 10.1097/MBC.0b013e32809cc946.
- [12] Llamas P, Outeiriño J, Espinoza J, et al. Report of three cases of circulating heparin-like anticoagulants [J]. *Am J Hematol*, 2001, 67(4):256-258. DOI: 10.1002/ajh.1126.
- [13] Heeb MJ, Bischoff R, Courtney M, et al. Inhibition of activated protein C by recombinant alpha 1-antitrypsin variants with substitution of arginine or leucine for methionine358 [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(4):2365-2369.
- [14] Emmerich J. Alpha1-antitrypsin and the maintenance of hemostatic balance [J]. *Haematologica*, 2009, 94(6):762-763. DOI: 10.3324/haematol.2009.006882.
- [15] Scott CF, Carrell RW, Glaser CB, et al. Alpha-1-antitrypsin-Pittsburgh. A potent inhibitor of human plasma factor XIa, kallikrein, and factor XIIIf [J]. *J Clin Invest*, 1986, 77(2):631-634. DOI: 10.1172/JCI112346.
- [16] Guttman O, Baranovski BM, Schuster R, et al. Acute-phase protein $\alpha 1$ -anti-trypsin: diverting injurious innate and adaptive immune responses from non-authentic threats [J]. *Clin Exp Immunol*, 2015, 179(2):161-172. DOI: 10.1111/cei.12476.
- [17] Bouckaert PX, Evers JL, Doesburg WH, et al. Patterns of changes in proteins in the peritoneal fluid of women during the periovulatory phase of the menstrual cycle [J]. *J Reprod Fertil*, 1986, 77(2):329-336. DOI: 10.1530/jrf.0.0770329.
- [18] Larsson A, Palm M, Hansson LO, et al. Reference values for alpha1-acid glycoprotein, alpha1-antitrypsin, albumin, haptoglobin, C-reactive protein, IgA, IgG and IgM during pregnancy [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2008, 87(10):1084-1088. DOI: 10.1080/00016340802428146.

(收稿日期:2017-03-17)

(本文编辑:徐茂强)