

# 一个遗传性凝血因子XIII缺陷症家系的基因诊断

许冠群 梁茜 张利伟 沈韵 丁秋兰 王学锋 王鸿利

**【摘要】目的** 对1个遗传性凝血因子XIII(FXIII)缺陷症家系进行表型诊断、基因诊断和产前诊断,并进行文献回顾。**方法** 用尿素溶解法以及REA-chrom FXIII试剂盒检测患者及其家系成员血浆FXIII活性(FXIII:C),用双抗体夹心法检测FXIII抗原(FXIII:Ag),采用血栓弹力图(TEG)对先证者凝血功能进行评估。PCR扩增F13A1基因的15个外显子及其侧翼序列,PCR产物纯化后直接测序,并对家系成员F13A1基因相应的突变序列进行检测。**结果** 先证者FXIII尿素溶解试验阳性,FXIII:Ag<1%,FXIII:C低于检测下限(<3%)。基因检测发现先证者F13A1基因14号外显子存在双杂合突变(p.Arg662\*和p.Trp665\*),先证者母亲及父亲均存在相应位点的单杂合突变,胎儿携带与先证者相同的双杂合突变。**结论** 加强对FXIII结构与功能的了解,开展相关实验室诊断和基因诊断,可使患者得到及时的诊断和治疗。

**【关键词】** 血液凝集障碍, 遗传性; 因子XIII; 基因检测; 产前诊断

**Identification of genetic defects in a Chinese pedigree with factor XIII deficiency: case report and literature review** Xu Guanqun, Liang Qian, Zhang Liwei, Shen Yun, Ding Qiulan, Wang Xuefeng\*, Wang Hongli. \*Department of Laboratory Medicine, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Corresponding author: Wang Xuefeng, Email: wangxuefeng6336@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To perform phenotypic diagnosis, genetic diagnosis and prenatal diagnosis of inherited coagulation factor XIII (FXIII) deficiency in a Chinese family also provide a review of inherited coagulation F XIII deficiency. **Methods** The activity levels of F XIII (F XIII : C) of proband and family members were measured by clot solubility test and REA-chrom F XIII kit. The antigen levels of F XIII (F XIII : Ag) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Thrombelastography (TEG) test was used to make a comprehensive evaluation of coagulation status in the proband. All 15 exons and exon-intron boundaries of the F13A1 gene were amplified by PCR, and DNA sequencing was performed then. The mutation identified in the proband was screened in the family members. Furthermore, the related literatures were reviewed to provide a profile of clinical manifestation, gene mutations, the relationship between the mutations and phenotype, and treatments of inherited coagulation F XIII deficient cases. **Results** The clot solubility test was positive in the proband. The F XIII : Ag level of the proband was less than 1% and the F XIII : C level was below the lower limit of detection (<3%). Two compound heterozygous missense mutations (p.Arg662\* and p.Trp665\*) were identified in the proband. Family study showed that the two mutations were both inherited from the parents. The fetus also carried two compound heterozygous mutations, the same as the proband, and was diagnosed with severe F XIII deficiency. As reported in the literatures, most mutations were missense mutations and nonsense mutations, and no hot spot was found. The clinical pattern of F XIII deficiency varied among patients, with potentially fatal consequences from severe bleeding complications. **Conclusions** Better understanding of F XIII biochemical properties and function and developing of FXIII laboratory assays and genetic detection could prevent missed diagnosis, and patients might benefit from better care.

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.10.008

基金项目:国家自然科学基金(81400100、81401726)

作者单位:200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院临床检验科(许冠群、梁茜、张利伟、沈韵、丁秋兰、王学锋);上海血液学研究所、医学基因组学国家重点实验室(王鸿利)

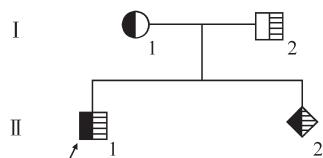
通信作者:王学锋,Email:wangxuefeng6336@hotmail.com

**【Key words】** Blood coagulation disorders, inherited; Factor XIII; Genetic testing; Prenatal diagnosis

凝血因子 XIII (FXIII) 又称纤维蛋白稳定因子, 作用于凝血过程的最后环节, 被凝血酶激活后, 在  $\text{Ca}^{2+}$  的作用下使可溶性纤维蛋白单体交联聚合成不溶性的纤维蛋白, 增加了纤维蛋白凝块的稳定性。FXIII 由 2 个 A 亚基 (FXIII A) 和 2 个 B 亚基 (FXIII B) 组成, A 亚基为酶活性中心, B 亚基作为载体保护 A 亚基不被过快降解, 以四聚体的形式存在于血浆、血小板和单核细胞中。遗传性 FXIII 缺陷症是一种较为罕见的常染色体隐性遗传病, 发病率为 1/200 万~1/100 万, 占罕见出血性疾病的 6%<sup>[1]</sup>, 患者可表现为终身出血倾向、脐带出血、伤口愈合不良、习惯性流产等。基因突变可位于 A 亚基基因 (F13A1) 或 B 亚基基因 (F13B)。本研究中, 我们对一个遗传性 FXIII 缺陷症家系进行了表型和基因诊断。

### 对象和方法

1. 家系: 先证者为 13 岁男性, 出生时脐带残端出血难止, 经外科手术缝合止血。于 2、6、11 岁时各发生 1 次颅内出血, 每次均予以血浆输注及对症治疗。因颅内出血后遗症, 现患者左上肢运动障碍。其父母非近亲婚配, 家族史阴性, 家系图见图 1。先证者于 2007 年在中国医学科学院血液病医院诊断为遗传性 FXIII 缺陷症, 现母亲再次怀孕, 欲行产前诊断。



■: 遗传性 FXIII 缺陷症先证者; ◆: 遗传性 FXIII 缺陷症胎儿;  
●: Trp665\* 杂合子; □: Arg662\* 杂合子; /: 先证者

图 1 遗传性凝血因子 XIII (FXIII) 缺陷症家系图

2. 标本采集和制备: 征得患者及其家系成员知情同意后, 采集外周静脉血, 0.109 mol/L 枸橼酸钠 (9:1) 抗凝。立即于 4 °C 3 000 r/min 离心 15 min, 分离乏血小板血浆, 用于表型检测, 其余血浆于 -80 °C 冻存。

3. 凝血指标检测: 采用日本 Sysmex CA7000 全自动凝血仪进行活化部分凝血活酶时间 (APTT)、

凝血酶原时间 (PT)、凝血酶时间 (TT) 和纤维蛋白原 (Fg) 检测, 试剂为德国 Dade 公司产品。

4. FXIII 定性试验、FXIII 活性 (FXIII:C) 及抗原水平检测: 取先证者新鲜血浆 100  $\mu\text{l}$ , 加入 0.025 mol/L 氯化钙 100  $\mu\text{l}$ , 混匀后置 37 °C 水浴 30 min 使凝块形成。加入 5 mol/L 尿素溶液 3 ml, 每 5 min 观察 1 次, 2 h 后每 2~4 h 观察 1 次, 持续 24 h, 测定凝块溶解时间。FXIII:C 用 REA-chrom FXIII 试剂盒检测 (匈牙利 Reanal-ker 公司产品)。兔抗人 FXIII A 和 FXIII B 抗血清购自法国 Stago 公司, 采用正辛酸法从抗血清中纯化和浓缩 FXIII A 和 FXIII B 抗体, 用 HRP 进行标记。采用双抗体夹心法检测先证者及家系成员血浆中 FXIII A 亚基和 B 亚基的抗原水平 (FXIII A: Ag 和 FXIII B: Ag), 具体操作方法见文献 [2]。

5. FXIII 抑制物检测: 将患者血浆和正常人血浆分别以 1:9、1:1 和 9:1 混合, 37 °C 孵育 1 h, 按上述方法进行凝块溶解时间测定, 检测患者血浆中是否有 FXIII 抑制物。

6. 血栓弹力图 (TEG) 测定: 取 1 ml 枸橼酸钠抗凝全血标本置于含有高岭土试剂的塑料管中 (美国 Haemoscope 公司产品), 颠倒混匀, 取 340  $\mu\text{l}$  置于检测杯中, 加入 0.2 mol/L 氯化钙 20  $\mu\text{l}$  后开始检测。标本采集后 2 h 内完成。其中 R 时间指血样在 TEG 分析仪中第 1 个纤维蛋白凝块形成前的时间, 使用抗凝剂或凝血因子缺乏时 R 时间延长, 血液呈高凝状态时 R 时间缩短。K 时间指评估血凝块强度达到某一水平的速率, 反映血小板功能及 Fg 水平。Angle 为血凝块形成点至描记图最大曲线弧度处切线与水平线的夹角, 影响因素与 K 时间相似。MA 值反映正在形成的血凝块的最大强度或硬度及血凝块形成的稳定性, 主要受 Fg 及血小板两个因素的影响, 其中血小板的作用要比 Fg 大。CI 值为凝血综合参数, <-3.0 为低凝, >3.0 为高凝。EPL 及 LY30 均为纤溶指标, 分别为 30 min 内血凝块幅度减少速率及血凝块将要溶解的百分比。

7. DNA 样本制备: 采用德国 Qiagen 公司 DNA 抽提试剂盒抽提先证者及家系成员的外周血基因组 DNA。采集先证者母亲羊水 10~15 ml, 采用北京天根生物公司微量样品基因组 DNA 提取试剂盒抽提羊水 DNA。

8. F13A1 基因直接测序:以先证者的基因组 DNA 为模板扩增 F13A1 基因的 15 个外显子和侧翼序列, F13A1 基因的扩增引物及 PCR 反应条件参见文献[3]。首先将先证者 PCR 产物进行直接测序分析寻找致病突变, 针对发现的突变位点, 重扩 PCR 并反向测序证实。若为未报道过的新突变, 筛查 100 名健康献血者的相应位点以排除基因多态性。在确定先证者 FⅢ基因突变位点后, 扩增家系成员及羊水基因组的相应片段。

9. 文献回顾: 在人类基因突变数据库 (the human gene mutation database, HGMD) 搜索历年来发表的关于遗传性 FⅢ缺陷症的文献报道, 并对相关基因突变类型、患者临床表现以及相应治疗措施进行总结。

### 结 果

1. 凝血指标及 FⅢ检测结果: 先证者的 APTT、PT 及 TT 均在正常范围内, 其纤维蛋白凝块在 5 mol/L 尿素溶液内的溶解时间为 0.5 h。FⅢA:Ag 及 FⅢ:C 水平均低于检测下限 (FⅢA:Ag < 1.0%, FⅢ:C < 3.0%)。FⅢB:Ag 水平正常。先证者及其家系成员的凝血功能检测结果见表 1。

2. TEG 检测结果: 先证者 TEG 检测结果仅显示出轻度的出血倾向, 其 R 值 8.0 min (正常参考值 5~10 min), K 值 3.2 min (正常参考值 1~3 min), CI 值

-3.4 (正常参考值 -3.0~3.0), MA 值 51.2 mm (正常参考值 50.0~70.0 mm), 纤溶指标 EPL 2.2% (正常参考值 0~15.0%), LY30 2.2% (正常参考值 0~8.0%)。可见 TEG 检测结果并不能很好地预测该遗传性 FⅢ缺陷症患者的出血严重程度。

3. 基因检测结果: 与 Gene Bank 中序列进行比对后 (NG\_008107.1), 发现先证者 F13A1 基因 14 号外显子存在双杂合突变 (图 2): 第 173 828 位核苷酸由 G 变为 A, 导致无义突变 (p.Trp665\*); 第 173 818 位核苷酸由 C 变为 T, 导致终止密码子提前出现 (p.Arg662\*); 两种突变均曾被报道过。先证者母亲及父亲均存在相同位点的单杂合突变 (分别为 p.Trp665\* 和 p.Arg662\* 突变), 胎儿为双杂合突变。因此, 胎儿确诊为重型遗传性 FⅢ缺陷症。

4. 文献回顾: 目前在 HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) 登记的 F13A1 基因突变总共 107 种 (其中错义突变/无义突变 65 种、剪切位点突变 10 种、小片段插入或缺失突变 27 种、大片段缺失突变及重组 5 种), F13B 基因突变共 19 种 (错义突变/无义突变 9 种、剪切位点突变 3 种、小片段插入或缺失突变 7 种)。两者均无相关热点突变<sup>[4]</sup>, 其中相对发生率较高的突变有 IVS5-1 G>A、Arg661X、c.2045G>A、Arg77Cys、Arg77His、Arg326 Gln 等<sup>[5]</sup>。由于国际上目前尚不能对低水平的 FⅢ (<5%) 准确定量, 且大部分患者接受预防治疗, 对于基因型与

表 1 遗传性凝血因子Ⅲ(FⅢ)缺陷症家系成员凝血功能检测结果

家系成员	APTT (s)	PT (s)	TT (s)	FⅢ定性试验	FⅢ抑制物	FⅢA:Ag (%)	FⅢB:Ag (%)	FⅢ:C (%)
I-1	31.2	11.5	18.1	阴性	阴性	48.2	91.2	47.6
I-2	30.5	10.9	17.5	阴性	阴性	51.3	85.9	52.7
II-1*	33.8	12.7	17.3	阳性	阴性	<1.0	78.4	<3.0
参考值	27.2~41.0	10.0~16.0	14.0~21.0	阴性	阴性	50.0~150.0	50.0~150.0	50.0~150.0

注: a: 先证者; APTT: 活化部分凝血活酶时间; PT: 凝血酶原时间; TT: 凝血酶时间; FⅢA:Ag: FⅢ A 亚基抗原; FⅢB:Ag: FⅢ B 亚基抗原; FⅢ:C: FⅢ活性

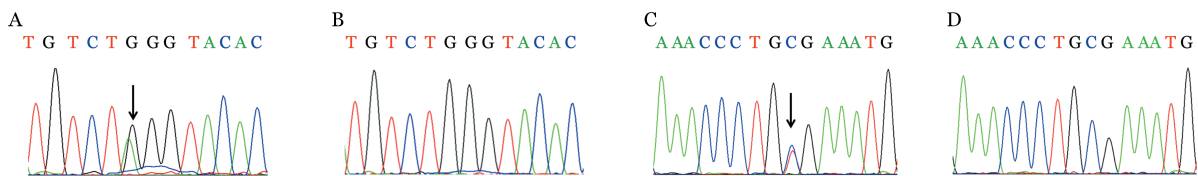


图 2 先证者及正常人 F13A1 基因 14 号外显子测序结果 (箭头所示为突变位点)

图 2 先证者及正常人 F13A1 基因 14 号外显子测序结果 (箭头所示为突变位点)

临床表型间关联性的研究很少。其中仅报道 1 种非经典剪切位点突变(IVS3+6T>C)与轻型出血症状相关<sup>[6]</sup>。

## 讨 论

遗传性 FⅢ缺陷症属于常染色体隐性遗传, A 亚基及 B 亚基上的基因突变均可致病, 但 B 亚基上的突变报道较少, 且出血倾向较轻<sup>[7]</sup>。FⅢ:C<5% 为重型, FⅢ:C 5%~10% 为中型, FⅢ:C>10% 为轻型。通常只有纯合突变或双杂合突变的患者才有显著的出血表现。患者若不经治疗, FⅢ缺乏可导致致命的出血事件(如颅内出血)。通常情况下, 脐带出血是最先出现的临床症状。本例患者表现为脐带出血和反复发生颅内出血。此外, 患者还可表现为肌肉出血以及皮下软组织出血等。遗传性 FⅢ缺陷症还与伤口愈合延迟有关, 并可导致孕妇流产<sup>[8-14]</sup>。一项在欧洲开展的罕见出血性疾病的临床研究表明, 遗传性 FⅢ缺陷症患者个体间出血部位以及出血严重程度差异非常大<sup>[8]</sup>。其中, 48.5% 的患者有 3 级出血(包括自发性肌肉出血、关节出血、中枢神经系统出血、胃肠道出血、脐带出血等), 6.1% 的患者表现为 2 级出血(包括自发性鼻出血、口腔黏膜出血、皮肤易瘀青及月经过多等), 6.1% 的患者表现为 1 级出血(包括创伤后出血、服用抗血小板药或抗凝治疗后出血等), 而 39.3% 的患者无任何出血表现。国际血栓与止血协会(ISTH)对 104 例(女 56 例、男 48 例)遗传性 FⅢ缺陷症患者的统计资料显示, 52% 的患者表现为重度出血, 35% 的患者表现为中度出血, 10% 的患者表现为轻度出血, 3% 的患者没有出血症状, 56% 的患者有脐带出血, 49% 的患者有肌肉出血, 36% 的患者有关节出血, 34% 的患者有中枢神经系统出血 [[http://www.f13-database.de/\(xhgmobrswxgori45zk5jre45\)/content.aspx?menu=1,7,30](http://www.f13-database.de/(xhgmobrswxgori45zk5jre45)/content.aspx?menu=1,7,30)]。FⅢ缺陷症患者临床表现的异质性增加了其诊断难度。

通常筛选试验(如 PT、APTT、TT 及血小板功能试验等)并不能诊断 FⅢ缺陷症, FⅢ缺陷症的实验室诊断依赖于 FⅢ:C 及 FⅢ:Ag 水平的检测。FⅢ相关实验室检测指标的低敏感性、非标准化以及低普及性是该类疾病诊断的一大难题。本例患者筛选试验结果均正常, 但 FⅢ定性试验阳性。因此, 我

们后续进行了 FⅢ:C 定量检测以及 FⅢ:Ag 水平检测, 进而将其确诊为先天性 FⅢ缺陷症。有研究表明 TEG 可作为 FⅢ缺陷症的筛查试验<sup>[15]</sup>, 但本例 FⅢ缺陷症患者 TEG 检测结果未见明显异常, 仅表现为 CI 值轻度下降。目前 FⅢ:C 定量检测主要基于氨释放法, 虽然较快速且操作可自动化, 但敏感性较低(REA-chrom FⅢ检测下限为 3%, Berichrom FⅢ检测下限为 5%)。FⅢ定性试验无需特殊试剂及仪器, 较易在普通实验室开展, 虽然其敏感性较低, 但对于重型 FⅢ缺陷症的检出非常有应用价值。

大部分患者属于 1 型 FⅢ A 亚基缺陷(A 亚基量的缺乏, 突变导致 FⅢ蛋白折叠或三维结构组装异常)。虽然遗传性 FⅢ缺陷症患者出血部位不同、出血严重程度不同、首次出血时间及出血情况不同, 但一般认为患者的临床表型与基因型之间无显著关联, 而更可能与个体情况相关(创伤的部位、FⅢ预防治疗情况以及机体止血能力等)<sup>[16]</sup>。但对不同位点基因突变分子发病机制的研究可增加我们对 FⅢ蛋白结构与功能的认识。

新鲜冰冻血浆和冷沉淀中 FⅢ含量为 1~3 U/ml, 是遗传性 FⅢ缺陷症患者较常用的治疗方法。虽然血浆制品较易获得, 但其输注存在病毒传播的风险。经巴氏消毒过的 FⅢ制品相对较安全, 且 FⅢ的效价更高(约 240 U/瓶)<sup>[4, 17-18]</sup>。另外, 市场上还有经过 3 期临床试验的重组 FⅢ A 亚基制品, 对 A 亚基基因突变的患者有较好疗效<sup>[19]</sup>。由于 FⅢ的血浆半衰期较长(11~14 d), 而且正常止血过程仅需要较低的 FⅢ浓度(3%~5%), 因此建议对遗传性 FⅢ缺陷症患者进行预防治疗。对于重度出血患者, 建议每 4~6 周输注 10~20 U/kg 的 FⅢ制剂以预防自发性致命性出血的发生<sup>[20]</sup>。对于急性出血患者, 给予 10~30 U/kg FⅢ制剂治疗<sup>[21]</sup>。如患者需要进行大手术, 建议维持血浆中 FⅢ:C>5% 直至伤口完全愈合。考虑到 FⅢ缺乏可导致流产的发生, 建议孕妇尽量在怀孕早期(妊娠 5~6 周)开始预防性输注<sup>[7]</sup>。在孕期<22 周建议每周给予 250 U, 使 FⅢ:C 维持在 10% 以上<sup>[22]</sup>。怀孕晚期建议每周给予 500 U, 分娩时给予 1000 U 使 FⅢ:C 维持在 30% 以上防止产后大出血<sup>[10]</sup>。

由于遗传性 FⅢ缺陷症发病率较低, 临床医生

对其认识不足、患者临床表现差异大、实验室诊断手段缺乏等因素,FⅢ缺陷症的诊断仍然是罕见出血性疾病中的难题。增加对FⅢ结构与功能的了解,开展相关实验室诊断和基因诊断等,可帮助患者明确诊断并得到及时适当的治疗,有效防止重型患者严重出血事件的发生,显著改善其生活质量。

#### 参考文献

- [1] Peyvandi F, Palla R, Menegatti M, et al. Introduction. Rare bleeding disorders: general aspects of clinical features, diagnosis, and management[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2009, 35:349-355.
- [2] 段宝华, 王鸿利, 王学锋, 等. 血浆凝血因子XIII抗原及活性的测定[J]. *临床检验杂志*, 2004, 22(6):437-439.
- [3] Duan B, Wang X, Chu H, et al. Deficiency of factor XIII gene in Chinese: 3 novel mutations[J]. *Int J Hematol*, 2003, 78(3):251-255.
- [4] Karimi M, Berezky Z, Cohan N, et al. Factor XIII Deficiency [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2009, 35(4):426-438.
- [5] Ivaskevicius V, Seitz R, Kohler HP, et al. International registry on factor XIII deficiency: a basis formed mostly on European data[J]. *Thromb Haemost*, 2007, 97(6):914-921.
- [6] Mikkola H, Muszbek L, Laiho E, et al. Molecular mechanism of a mild phenotype in coagulation factor XIII (FXIII) deficiency: a splicing mutation permitting partial correct splicing of FXIII A-subunit mRNA[J]. *Blood*, 1997, 89(4):1279-1287.
- [7] Ichinose A. Physiopathology and regulation of factor XIII [J]. *Thromb Haemost*, 2001, 86(1):57-65.
- [8] Peyvandi F, Palla R, Menegatti M, et al. Coagulation factor activity and clinical bleeding severity in rare bleeding disorders: results from the European Network of Rare Bleeding Disorders [J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10(4):615-621.
- [9] Perez DL, Diamond EL, Castro CM, et al. Factor XIII deficiency related recurrent spontaneous intracerebral hemorrhage: a case and literature review[J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2011, 113(2):142-145.
- [10] Ichinose A, Asahina T, and Kobayashi T. Congenital blood coagulation factor XIII deficiency and perinatal management [J]. *Curr Drug Targets*, 2005, 6(5):541-549.
- [11] Anwar R, Minford A, Gallivan L, et al. Delayed umbilical bleeding--a presenting feature for factor XIII deficiency: clinical features, genetics, and management [J]. *Pediatrics*, 2002, 109(2):E32.
- [12] Board PG, Losowsky MS, Miloszewski KJ. Factor XIII: inherited and acquired deficiency [J]. *Blood Rev*, 1993, 7(4):229-242.
- [13] Anwar R, Miloszewski KJ. Factor XIII deficiency [J]. *Br J Haematol*, 1999, 107(3):468-484.
- [14] Lak M, Peyvandi F, Ali Sharifian A, et al. Pattern of symptoms in 93 Iranian patients with severe factor XIII deficiency [J]. *J Thromb Haemost*, 2003, 1(8):1852-1853.
- [15] Schroeder V, Durrer D, Meili E, et al. Congenital factor XIII deficiency in Switzerland: from the worldwide first case in 1960 to its molecular characterisation in 2005 [J]. *Swiss Med Wkly*, 2007, 137(19-20):272-278.
- [16] Schroeder V, Kohler HP. Factor XIII deficiency: an update [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2013, 39(6):632-641.
- [17] Ichinose A. Hemorrhagic acquired factor XIII (13) deficiency and acquired hemorrhophilia 13 revisited [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2011, 37(4):382-388.
- [18] Caudill JS, Nichols WL, Plumhoff EA, et al. Comparison of coagulation factor XIII content and concentration in cryoprecipitate and fresh-frozen plasma [J]. *Transfusion*, 2009, 49(4):765-770.
- [19] Inbal A, Oldenburg J, Carcao M, et al. Recombinant factor XIII: a safe and novel treatment for congenital factor XIII deficiency [J]. *Blood*, 2012, 119(22):5111-5117.
- [20] Lorand L, Jeong JM, Radek JT, et al. Human plasma factor XIII: subunit interactions and activation of zymogen [J]. *Methods Enzymol*, 1993, 222:22-35.
- [21] Tahlan AI, Ahluwalia J. Factor XIII: congenital deficiency factor XIII, acquired deficiency, factor XIII A- subunit, and factor XIII B-subunit [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2014, 138(2):278-281.
- [22] Asahina T, Kobayashi T, Takeuchi K, et al. Congenital blood coagulation factor XIII deficiency and successful deliveries: a review of the literature [J]. *Obstet Gynecol Surv*, 2007, 62(4):255-260.

(收稿日期:2015-05-26)

(本文编辑:徐茂强)