

# 移码突变 L442Cfs\*8 导致的凝血因子 XI 缺陷症家系表型及基因型分析

朱光俊 张钦怡 苏正仙 金先富 张慧斐 毕晓洁

**【摘要】** 目的 研究一个遗传性凝血因子 XI(FXI)缺陷症家系的表型和基因型,探讨其分子致病机制。方法 抽取先证者及家系,共 3 代 5 人外周血,上层血浆检测凝血相关指标;PCR 扩增 *F11* 的 15 个外显子,进行测序分析,发现突变位点后,反向测序验证;采用 3 种生物信息学软件(PolyPhen-2、Mutation Taster 和 SIFT)分析突变位点对蛋白质的影响。结果 先证者及其父亲活化部分凝血活酶时间分别为 92.9s、44.7s,FXI 活性分别为 2%、23%,FXI 抗原分别为 3.6%、5%,其他家系成员各项凝血指标均在正常参考范围内。先证者以及父亲 *F11* 的 11 号外显子发生了 c.1677\_1677delT 杂合突变,导致 L442Cfs\*8 杂合突变。生物信息学软件预测表明,该突变可影响蛋白质功能并导致相应疾病的发生。结论 *F11* 存在 L442Cfs\*8 杂合突变,可能是导致患者 FXI 活性下降的原因,该突变在国际上也为首次发现。

**【关键词】** 凝血因子 XI 缺陷症 表型 基因型 分子机制

遗传性凝血因子 XI(FXI)缺陷症为罕见的常染色体隐性遗传病,于 1953 年首次被 Rosenthal 等<sup>[1]</sup>报道,目前,突变类型已超过 200 多种(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=F11>),国外统计其发病率为 1/500000~1/1000000,且存在种族差异<sup>[2]</sup>。目前我国对于遗传性 FXI 缺陷症的报道较少,具体的致病机制也不是很明确。笔者对 1 例遗传性 FXI 缺陷症进行表型和基因型研究,研究其分子致病机制,现报道如下。

## 1 资料和方法

**1.1 一般资料** 该家系共 5 人,包括先证者及父亲、儿子、妻子,家系谱见图 1。先证者,男,32 岁。因“反复牙龈出血”于 2018 年 3 月 5 日来我院检查。实验室常规凝血功能检查发现:活化部分凝血活酶时间(APTT)显著延长,FXI 活性(FXI:C)极低,D-二聚体轻度增高,其余指标均在正常参考范围内。先证者肝肾功能正常,未使用抗凝药物。先证者父亲偶有痔疮出血,父母非近亲结婚,其他家系成员均无自发出血或血栓形成病史。

### 1.2 方法

**1.2.1 仪器与试剂** 仪器:STA-R MAX 全自动血凝仪

(法国 STAGO 公司)、全自动生化分析仪 AU5830(美国雅培公司)、PCR 扩增仪 ABI Thermal cycler 2720(美国 ABI 公司)、核酸蛋白分析仪(美国 Beckman 公司)、电泳仪(美国 Bio-rad 公司)、凝胶成像系统(上海天能公司)。试剂:凝血项目检测试剂盒(法国 STAGO 公司)、DNA 提取试剂盒、抗原检测试剂盒、PCR 扩增试剂盒(上海西塘生物科技技术公司)。

**1.2.2 引物** 引物序列参考文献[3],由华大基因生物公司合成。

**1.2.3 标本采集和处理** 采集所有受试者外周血 2.7ml,用 0.109mol/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项目检测;下层血细胞用于提取 DNA(血样),提取完成后放置于-20℃冰箱保存待用。

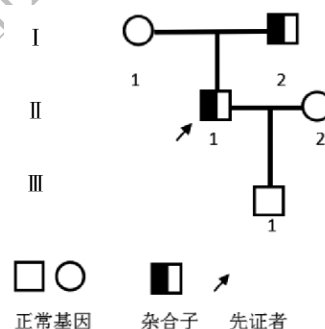


图 1 遗传性凝血因子 XI 缺陷症家系图

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.16.2018-1957

作者单位:317000 浙江省台州医院检验科

通信作者:毕晓洁,E-mail:bixj@enzemed.com

1.2.4 凝血项目检测 在全自动凝血分析仪上采用一期凝固法检测 PT、APTT、FIB、TT、凝血因子 II 活性(F II:C)、凝血因子 V 活性(FV:C)、凝血因子 VII 活性(F VII:C)、凝血因子 VIII 活性(F VIII:C)、凝血因子 IX 活性(F XI:C)、凝血因子 X 活性(FX:C)、FXI 活性(FXI:C)及凝血因子 XII 活性(F XII:C);免疫比浊法检测纤维蛋白(原)降解产物(FDP)、D-二聚体;采用 ELISA 法检测 FXI 抗原(FXI:Ag)含量。

1.2.5 基因测序 使用 DNA 提取试剂盒提取所有成员外周血基因组 DNA,经 PCR 扩增后外送上海华大基因检测公司进行测序,测序结果采用 Chromas 软件与美国

NCBI 基因库(GenBank)所公布的基因序列进行比对,发现突变后进行反向测序予以证实。

1.2.6 生物学信息软件分析 采用 Mutation Taster(<http://www.mutationtaster.org>)、PolyPhen-2(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>)和 SIFT(<http://sift.jcvi.org>)3 个在线生物信息软件,通过评分预测突变位点对蛋白质功能的影响。

## 2 结果

2.1 先证者以及家系成员凝血功能检测结果 见表 1。

表 1 先证者及家系成员凝血指标检测结果

家系成员	PT(s)	APTT(s)	FXI:C(%)	FXI:Ag(%)	TT(s)	D-二聚体(mg/L)	FDP(mg/L)
先证者(II 1)	15.2	92.9	2	3.6	37.7	0.85	0.34
父亲(I 1)	13.0	44.7	23	5	16.5	0.35	0.34
母亲(I 2)	13.5	40.8	95	99	17.6	0.25	1.23
妻子(II 2)	13.8	41.7	98	100	15.8	0.23	2.34
儿子(III 1)	14.0	36.4	99	100	16.8	0.50	1.3
参考范围	11.0~14.5	28.0~42.0	80~120	80~120	14.0~21.0	0.0~0.5	0.0~5.0

2.2 基因分析结果 先证者 *F11* 的 11 号外显子存在 L442Cfs\*8 杂合突变。先证者父亲在该位点的测序结果与先证者一致,除此以外所有其它的基因测序结果都显示为正常。见图 2、3。

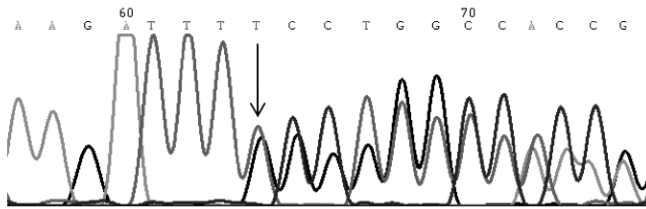


图 2 先证者及父亲 *F11* 基因 11 号外显子 L442Cfs\*8 突变

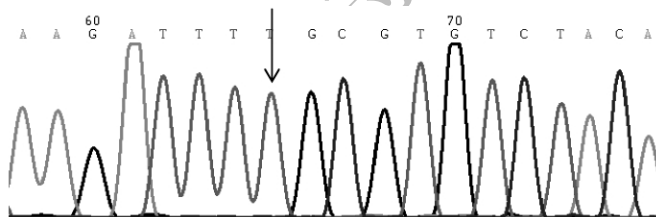


图 3 *F11* 基因 11 号外显子野生基因型

2.3 生物学信息软件分析结果 PolyPhen-2 评分结果为 1.00 分,预示突变为有害突变;Mutation Taster 评分结果为 disease causing,预示此突变可引起疾病;SIFT 评分结果为 0.10 分,预示此突变引起蛋白质功能改变。

## 3 讨论

FXI 是一种丝氨酸蛋白酶原,在血浆中它主要与高分子量激肽原(HWMK)结合形成复合物<sup>[4]</sup>。编码 FXI 的基因 *F11* 位于 4q35,共含有 15 个外显子和 14 个内含子,全长 23kb<sup>[5]</sup>,1 号外显子编码的是 5' 端非转录区,2 号外显子编码前导肽链,3-15 号外显子共编码 607 个氨基酸分子,形成的 FXI 包括含有 4 个 Apple 结构域的重链以及一个胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶催化区(SP)的轻链。成熟的 FXI 分子含有两个相同单体,由两个残基 Cys321 形成二硫键组成<sup>[6]</sup>。

FXI 在内源性凝血途径发挥重要作用,通过一系列的凝血因子逐级活化过程,最终激活纤维蛋白原,形成纤维蛋白网,使血小板形成的团块更加牢固<sup>[4,7]</sup>。遗传性 FXI 缺陷症临床表现多样,突变基因杂合子为正常的 30%~70%,而纯合子的血浆 FXI 水平仅为正常的 0~20%<sup>[8]</sup>,该病患者无性别差异,且一般无自发性出血<sup>[9]</sup>,因此疾病的诊断和治疗都存在多变性。推测原因是 FXI 参与凝血过程的放大阶段而不是影响凝血的起始阶段,并且活化的血小板颗粒含有 FXI,总活性得到一定的补偿,因此 FXI 缺陷的患者多数是在手术、创伤后才会表现出止血障碍<sup>[10]</sup>。出血的严重程度常与累及的组织部位有关,原因是 FXI 可促进凝血酶激活的纤溶抑制物(TAFI)的产生,从而可以稳定已经形成的凝血块在纤

溶活性高的部位更容易出血,常见于口腔黏膜<sup>[1]</sup>。

本文中先证者 APTT 为 92.9s,查 FXI 活性 2%,凝血因子抗原 3.6%,活性与抗原成等比例下降,呈交叉反应物质阴性特点。基因测序结果显示,先证者 *F11* 的 11 号外显子存在 L442Cfs\*8 杂合突变,其父亲同样携带该突变基因,可以诊断为遗传性 FXI 缺陷症。根据 Mutation Taster 分析显示,L442Cfs\*8 属于移码突变,突变位点编码的亮氨酸(Leu)变成半胱氨酸(Cys),并且其相对应的 mRNA 在突变位点之后的第 8 个密码子变成终止密码,使得编码氨基酸翻译提前终止,形成截断蛋白,分子链变短,结构完整性受到影响,因此突变后 FXI 抗原和活性均下降。另外两个生物信息学软件均指出 L442Cfs\*8 杂合突变会导致蛋白质的功能发生改变,与疾病有关。同时,L442 位于轻链的丝氨酸蛋白酶催化区,Leu 突变成 Cys 后蛋白的结构发生改变,FXI 酶原活化的过程同时受到抑制。本文中先证者与其父亲携带相同的突变基因,但先证者 FXI 活性和抗原均明显降低,且出现反复自发性牙龈出血,而其父亲却仅有偶发痔疮出血,推测其原因是,先证者 8 号外显子同时存在 c.935A>C 多态性,导致 K312T 突变,根据 Mutation Taster 分析,8 号外显子编码 FXI 的 A3 结构域,是 FXI 的重要结合部位<sup>[2]</sup>,该多态性会造成蛋白质的功能发生改变,具体机制还有待进一步研究。

综上所述,该遗传性凝血因子 XI 缺陷症家系先证者及其父亲 *F11* 基因 11 号外显子均携带有 L442Cfs\*8 杂合突变,此突变是导致患者 FXI:C 明显下降的主要原因。但具体作用机制尚有待于更进一步体外表达实验加以证实。

#### 4 参考文献

[1] Rosenthal RL, Dreskin OH, Rosenthd N. New hemophilia like disease caused by deficiency of a third plasma thmboplastin

factor[J]. Pmc soc Exp Biol Med, 1953, 82(1):171-174. DOI:10.3181/00379727-82-20057.

- [2] de Haan HG, van Hylckama Vlieg A, Lotta LA. Targeted sequencing to identify novel genetic risk factors for deep vein thrombosis: a study of 734 genes[J]. J Thromb Haemost, 2018; 16(12):2432-2441. DOI: 10.1111/jth.14279.
- [3] Guéguen P, Chauvin A, Quémener-Redon S, et al. Revisiting the molecular epidemiology of factor XI deficiency: nine new mutations and an original large 4qTer deletion in western Brittany (France)[J]. Thromb Haemost, 2012, 107:44-50. DOI:10.1160/TH11-06-0415.
- [4] Liu H, Wang HF, Tang L, et al. Genetic analysis in Factor XI deficient patients from central China: Identification of one novel and seven recurrent mutations[J]. Gene, 2015, 561(1):101-106. DOI: 10.1016/j.gene.2015.02.021.
- [5] Astrid DG, Pierre H. Coagulation factor XI: a database of mutations and polymorphisms associated with factor XI deficiency[J]. Blood coagul Fibrinolysis, 2005, 16(4):231-238.
- [6] 舒旷怡、许锴、李帆帆,等. p.Gly400Val 和 p.Arg532Ter 导致遗传性 FXI 缺陷症的表型与基因分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2018, 35(4): 522-526. DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2018.04.014.
- [7] 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.
- [8] 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):345-348.
- [9] Emsley J, Mcewan PA, Gailani D. Structure and function of factor XI[J]. Blood, 2010, 115(13):2569-2577.
- [10] Bicocchi MP, Marotta F, Banov L. Molecular analysis of severe factor XI deficiency in three[J]. Haemophilia, 2011, 17: 831-848. DOI:10.1111/j.1365-2516.2011.02576.x.
- [11] Anwar A, Michael M, Meera S, et al. Identification of a novel mutation in a non Jewish factor XI deficient kindred[J]. Br J Haematol, 1999, 104(1):44-49.
- [12] Tomaiuolo M, Favuzzi G, Cappucci F. Factor XI deficiency: two novel mutations in asymptomatic[J]. Haemophilia, 2010, 16:767-770.

(收稿日期:2018-08-01)

(本文编辑:严玮雯)