

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2015.09.003

论著·临床研究

7个血友病A家系基因型与临床表型分析

梁伟玲¹ 韦红英¹ 廖宁¹ 周竣荔²

(1. 广西医科大学第一附属医院儿科, 广西南宁 530021;
2. 南华大学第二附属医院, 湖南衡阳 421000)

[摘要] **目的** 确定各家系凝血因子Ⅷ(FⅧ)基因突变类型,了解基因突变与临床表型的关系。**方法** 对7个家系患者进行活化部分凝血酶原时间(APTT)及凝血因子Ⅷ凝血活性(FⅧ:C)检测,再采用PCR方法对7个血友病A家系患者进行内含子22、内含子1倒位检测,对检测结果阴性患者采用直接测序法确定基因突变类型,并对家系相关成员进行相应位点的扩增与测序。**结果** 8例血友病A患者APTT为91.6~131 s, FⅧ:C为0.8%~2%,基因检测结果显示8例患者中未检出内含子22倒位,仅检出1例内含子1倒位。余7例血友病A患者中,共检出5种基因型,其中6例位于外显子14,1例位于外显子23,均为单碱基突变;有1例检出基因型为p.His1202LeufsX16(c.3666delA),经检索为新突变。**结论** FⅧ突变热点区域位于外显子14,新突变p.His1202LeufsX16的发现丰富了FⅧ基因突变数据库。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(9): 903-907]

[关键词] 血友病A; 基因型; 临床表型

Relationship between genotypes and clinical phenotypes in patients from 7 hemophilia A families

LIANG Wei-Ling, WEI Hong-Ying, LIAO Ning, ZHOU Jun-Li. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China (Wei H-Y, Email: whylhr@qq.com)

Abstract: Objective To study the mutation types of factor VIII (FVIII) gene in patients from 7 hemophilia A (HA) families and the relationship between FVIII gene mutations and clinical phenotypes. **Methods** A total of 8 patients from 7 HA families were recruited. The activated partial thromboplastin time (APTT) and factor VIII coagulant activity (VIII:C) in these patients were measured. Polymerase chain reaction (PCR) was performed to analyze FVIII gene intron 1 and 22 inversions. For patients without the FVIII intron inversions, direct sequencing was performed to determine their mutation types and other related members of their families were also tested by PCR and sequencing to analyze the corresponding mutation sites. **Results** The ranges of APTT and VIII:C of the 8 patients were 91.6-131 seconds and 0.8%-2%, respectively. FVIII gene intron 22 inversion was not detected, while intron 1 inversion was detected in one patient. There were 5 types of mutations in FVIII gene detected in the remaining 7 patients, including 6 patients with mutations in exon 14 and 1 patient with mutation in exon 23; all of the 5 types of mutations were single nucleotide mutations. Among the detected mutations in FVIII gene, p.His1202LeufsX16 (c.3666delA) detected in one patient was found to be a previously unreported mutation in FVIII gene. **Conclusions** FVIII gene exon 14 is a hot-spot mutation region and p.His1202LeufsX16 is found to be a novel mutation in FVIII gene.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(9): 903-907]

Key words: Hemophilia A; Genotype; Clinical phenotype

血友病A(Hemophilia A, HA)是一种X连锁隐性遗传性凝血功能障碍性疾病,患病率为

1/5000~10000^[1-3]。血浆中凝血因子Ⅷ(factor Ⅷ, FⅧ)缺乏或者功能缺陷是该病的发病机制,临床

[收稿日期] 2015-01-09; [接受日期] 2015-03-08

[基金项目] 广西科教委立项项目(201204X052)。

[作者简介] 梁伟玲,女,硕士研究生,主治医师。现工作单位:香港大学深圳医院儿科,邮编:518041。

[通信作者] 韦红英,女,主任医师。

表现为出血或出血倾向。根据临床症状及FⅧ凝血活性(factorⅧ clotting activity, FⅧ:C)可将血友病A分为重型(FⅧ:C<1%)、中型(FⅧ:C 1%~5%)和轻型(FⅧ:C>5%~25%)。轻型血友病A患者多表现为自发或外伤后皮下出血及鼻衄,中、重型患者会有关节出血甚或重要脏器出血而危及生命。该病目前尚无有效根治措施,因此采用直接或间接基因诊断^[4],准确检测出携带者、进行产前诊断可阻断致病基因传递,是防止患儿出生、降低本病发病率的主要措施。本研究就7个血友病A家系进行基因类型及临床表型分析,初步探讨血友病A的分子机制,以期应用于血友病A携带者诊断及产前诊断。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2009年10月至2012年10月于广西医科大学第一附属医院确诊为血友病A的8例患者及其家系为研究对象,8例血友病A患者来自于7个家系,均为男性,年龄范围3~11岁,所有患者的诊断均符合张之南等^[5]主编的《血液病学》,10名家系成员(女)肝功能均正常,近期未曾使用抗凝剂。

1.2 标本采集

在获得所有患者及其家系成员的知情同意后,抽取外周静脉血4 mL,其中2 mL用于DNA提取,另2 mL送广西医科大学第一附属医院检验科用于FⅧ:C和凝血功能的测定。

1.3 引物设计

参考文献^[6-7]设计引物用于内含子22、内含子1倒位检测,参考文献^[8-9]合成引物28对,覆盖了FⅧ基因所有外显子及启动子序列,用于FⅧ基因测序。以上引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4 内含子倒位检测

采用长链PCR(long distance PCR, LD-PCR)法及双管双重PCR法,分别对所有血友病A患者进行FⅧ内含子22倒位及内含子1倒位检测,检测阳性者进行相应家系检测。

1.5 FⅧ基因测序

采用DNA直接测序法对内含子22和内含子

1倒位检测阴性的患者进行FⅧ基因突变检测。通过chromas软件分析测序图,与已知的FⅧ基因序列NG_011403.1比对得出FⅧ基因突变类型,查询FⅧ结构和突变位点数据库(Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site, HAMSTeRS)(<http://hadb.org.uk/WebPages/Main/intrquiz.htm>)、人类基因突变数据库(http://www.hgmd.cf.ac.uk/docs/new_back.html)以及美国国立生物技术信息中心(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进一步了解是否为新突变,检出新突变位点后进行反向测序证实,并以50例正常男性作为对照除外基因多态性。

2 结果

2.1 血友病A患者临床资料分析

患者临床分型及常见出血部位见表1,8例患者中,重型2例,就诊时表现为皮肤、黏膜等部位的轻微出血;中型6例,其中5例有关节出血,1例仅有皮肤瘀斑。

2.2 内含子22及内含子1倒位检测结果

本研究未检测出内含子22倒位患者,仅检测到1例内含子1倒位患者,对其家系成员进行相应检测,发现其母亲及姨妈均为内含子1倒位携带者,结果见图1。

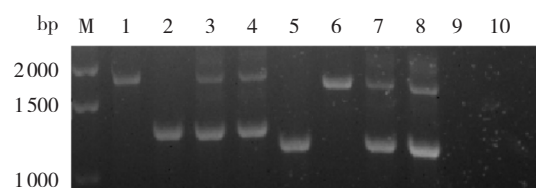


图1 双管双重PCR法检测内含子1倒位电泳图

泳道2、6分别为8号患者Int1h-1、Int1h-2电泳结果,显示条带为1.3 kb和1.7 kb,为FⅧ内含子1倒位;泳道3、7为其母亲Int1h-1、Int1h-2电泳结果,显示条带为1.3 kb、1.9 kb和1.1 kb、1.7 kb,为FⅧ内含子1倒位携带者;泳道4、8为其姨妈Int1h-1、Int1h-2电泳结果,同样为内含子1倒位携带者;泳道1、5为阴性对照;泳道9、10为空白对照。

2.3 测序结果

经测序筛选出基因突变患儿7例,分别位于FⅧ基因外显子14和23,其中6例突变位于外显子14,1例位于外显子23。检出5种基因

型,均为单碱基变异,其中错义突变 2 例(c.2161 A>G),缺失突变 3 例(c.4379delA 和 c.3666delA),插入突变 1 例(c.4379_4380dupA),无义突变 1 例(c.6496 C>T)(表 1)。患儿 6 检出基因型 p.His1202LeufsX16(c.3666delA),其母亲为杂合子(图 2),该基因型在 HAMSTeRS、人类基因突变数据库以及美国国立生物技术信息中心等数据

库中均未能检索到,50 例正常男性中亦未检测到相同基因变异,NCBI 数据库未检索到多态性基因记录,提示为新突变类型。

2.4 携带者检测

7 家系中,共有 10 名女性家系成员接受携带者检测,其中有 5 名女性家系成员携带血友病 A 基因。见图 3。

表 1 8 例血友病 A 患者 FⅧ基因型、临床分型及出血表现

家系	患者编号	性别	年龄(岁)	APTT(s)	FⅧ:C(%)	临床分型	出血部位	突变位置	突变区域	碱基改变	基因型
I	1	男	10	99.9	1.35	中型	关节、鼻黏膜	Exon14	B	c.2161 A>G	p.Met721Val
	2	男	7	94.3	1.8	中型	关节	Exon14	B	c.2161 A>G	p.Met721Val
II	3	男	8	100.5	1.12	中型	皮肤	Exon14	B	c.4379delA	p.Asn1460IlefsX5
III	4	男	11	91.6	2	中型	关节、鼻黏膜	Exon14	B	c.4379delA	p.Asn1460IlefsX5
IV	5	男	3	122.8	1.1	中型	关节	Exon23	C1	c.6496 C>T	p.Arg2166X
V	6	男	7	92.6	1.8	中型	关节	Exon14	B	c.3666delA	p.His1202LeufsX16
VI	7	男	5	103.6	0.8	重型	皮肤、鼻黏膜	Exon14	B	c.4379_4380dupA	p.Asn1460LysfsX1
VII	8	男	4	131	0.8	重型	皮肤	Intro 1	内含子 1 倒位		

注:APTT:活化部分凝血酶原时间;FⅧ:C:凝血因子Ⅷ凝结活性。

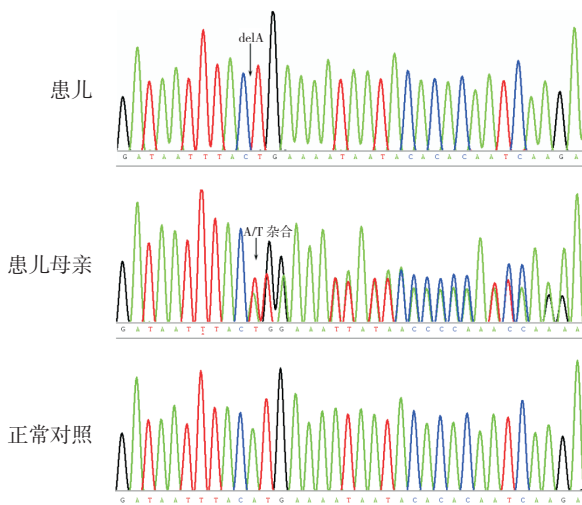


图 2 患儿 6 基因测序结果 患儿为 c.3666delA 纯合突变;患儿母亲为 c.3666delA 杂合突变。

3 讨论

FⅧ基因定位于染色体 Xq28,全长 186 kb,由 26 个外显子和 25 个内含子组成,编码包含 2332 个氨基酸残基的多肽链,以 A1-A2-B-A3-C1-C2 的顺序排列,A 区与 FⅧ的蛋白质合成及其活化密切相关,B 区与 FⅧ发挥活性无关,但能

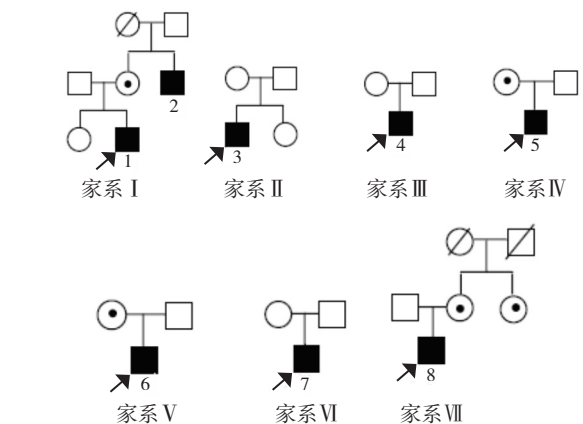


图 3 7 个血友病 A 家系图 1~8 为患者编号 □为健康男性;○为健康女性;▣为死亡男性;◊为死亡女性;■为男性患者;●为女性携带者;箭头所指为先证者。

够调节 FⅧ的分泌,该区单碱基缺失或插入会引起读码框移,进而影响正常剪切或转录的进行。FⅧ基因结构庞大,突变种类繁多,存在着高度异质性,目前已发现 2517 种基因突变注册在 HGMD 网站,包括错义/无义突变、缺失、插入突变和重复突变等,其中近 60% 为错义/无义突变,重复突变在国内未见相关报道。血友病 A 中重型患者

大约45%为FⅧ内含子22倒位,3%~5%为FⅧ内含子1倒位^[10],而在中型或轻型患者当中多见的是新发和散发的点突变、小的插入或缺失等^[11]。

FⅧ内含子22或内含子1倒位多致重型血友病A^[12]。本研究8例患者通过LD-PCR均未检测出内含子22倒位,可能与检测样本数较少有关。患者8临床分型为重型,经双管多重PCR检出内含子1倒位,其母亲及姨妈均为倒位携带者。

目前认为,外显子14是FⅧ基因突变热点区域,截至2013年3月HAMSTeRS数据显示,发生于FⅧ外显子14的突变类型多达395种,为总突变类型的18.7%,由于多数突变位于外显子14,目前该外显子已成为FⅧ基因突变研究的热点^[13]。本研究发现5种基因型,有4种位于外显子14。7个家系中,有3个家系患者突变位于外显子14的一个A8区域(c.4372-4379):A8区域的单碱基A插入或缺失均使得终止密码TAA或TAG提前出现,导致FⅧ发生截断突变。既往研究认为,FⅧ基因复制过程中,在单碱基连续的区域容易发生滑动,因而导致插入/缺失事件发生,其中A连续的区域最多见,多数表型为重型^[14]。本文3例突变发生于A8区域的患者均为散发病例,临床表型为中型或重型,多有关节出血等严重出血表现,与文献一致。患者1、2为同一家系,基因型p.Met721Val,基因变异发生于B区域,两者FⅧ:C均小于2%,临床上均有关节出血表现,推测其基因突变可能影响到复合物构象结构的稳定,既往曾有报道,但致病机制尚未十分明确^[15]。

患者6突变位于B区,基因型p.His1202LeufsX16,其母亲为杂合子,该基因型在HAMSTeRS、HGMD及NCBI等数据库中未能检索到。对50名正常男性在相应碱基位置进行直接测序均未发现同样碱基改变,提示该突变为新突变类型。推测单碱基A的缺失导致框移突变,终止密码提前出现,最终造成FⅧ的截断,从而影响FⅧ的功能。

患者5的FⅧ基因突变位于外显子23,基因型p.Arg2166X,发生在C1区的无义突变将导致表达产物FⅧ缺少C2区,将严重影响FⅧ与vWF的结合,使FⅧ在体内不能正常循环代谢^[16]。受累患者为3岁男孩,临床诊断为中型,并出现关节出血症状。

7个家系中,有4个家系共5名女性成员携带血友病A基因(图3),其余散发病例的FⅧ基因变异均发生于多聚A序列的单碱基插入或缺失,显示多聚A在复制过程中容易发生滑动而导致基因突变,且多为非遗传性。

既往认为,血友病A患者的FⅧ基因型与临床表型有着较好的相关性,通过明确基因型可以预测患者的临床出血程度,但是研究发现,这种相关性并不多见,仅体现于大片段缺失、无义突变等基因型^[17]。本研究发现无义突变1例,为中型,表现为皮肤、关节出血;错义突变2例,均为中型,伴有关节出血;框移突变后发生FⅧ蛋白截断1例,亦为中型,亦有关节出血。值得一提的是,患者7基因型为p.Asn14061LysfsX1,患者8为内含子1倒位,临床均归为重型,但仅有皮肤、黏膜等较为轻微的出血表现;可见FⅧ:C或FⅧ基因型并不是决定患者临床表型的唯一因素,可能还存在其他影响FⅧ功能的调节机制。新基因型p.His1202LeufsX16,其患者临床分型为中型,但有关节出血等较严重的出血表现,该基因变异对于FⅧ凝血功能的影响机制值得进一步探究。

[参 考 文 献]

- [1] 中华医学会血液学会分会血栓与止血学组,中国血友病协作组.血友病诊断与治疗中国专家共识(2013版)[J].中华血液学杂志,2013,34(5):461-463.
- [2] Keeney S, Mitchell M, Goodeve A. The molecular analysis of haemophilia A: a guideline from the UK haemophilia centre doctors, organization haemophilia genetics laboratory network[J]. Haemophilia, 2005, 11(4): 387-397.
- [3] 梁燕,赵耘,王战勇,等.血友病甲基因分析技术的改进及其在产前诊断中的应用[J].中华医学遗传学杂志,2007,24(4):437-439.
- [4] 周竣嘉,韦红英,吴华,等.STR遗传标记在广西地区血友病A携带者诊断中的运用[J].中国当代儿科杂志,2012,14(14):951-955.
- [5] 张之南,杨天楹,郝玉书.血液病学[M].北京:人民卫生出版社,2003:1724-1725.
- [6] Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A[J]. Blood, 1998, 92(4): 1458-1459.
- [7] 李坦,戴菁,吴竞生,等.血友病A患者凝血因子Ⅷ基因内含子1及22倒位分析[J].中华血液学杂志,2009,30(3):150-153.
- [8] Viel KR, Machiah DK, Warren DM, et al. A sequence variation scan of the coagulation factor VIII (FVIII) structural gene and associations with plasma FVIII activity levels[J]. Blood, 2007, 109(9): 3713-3724.

- [9] Lin SY, Su YN, Hung CC, et al. Mutation spectrum of 122 hemophilia A families from Taiwanese population by LD-PCR, DHPLC, multiplex PCR and evaluating the clinical application of HRM[J]. BMC Med Genet, 2008, 9: 53.
- [10] Bagnall RD, Waseem N, Green PM, et al. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A[J]. Blood, 2002, 99(1): 168-174.
- [11] Nadja B, Ameni M, Reswith E, et al. Spectmm of molecular defects and mutation deteetion rate in patients with mild and moderate hemophilia A[J]. Hum Mutat, 2007, 28(1): 54-60.
- [12] Zimmermann MA, Oldenburg J, Müller CR, et al. Unusual genomic rearrangements in introns 1 and 22 of the F8 gene[J]. Hamostaseologie, 2011, 31 Suppl 1: S69-S73.
- [13] Bogdanova N, Markoff A, Pollmann H, et al. Prevalence of small rearrangements in the factor VIII gene F8C among patients with severe hemophilia A[J]. Hum Mutat, 2002, 20(3): 236-237.
- [14] Pelak K, Shianna KV, Ge D, et al. The characterization of twenty sequenced human genomes[J]. PLoS Genet, 2010, 6(9): e1001111.
- [15] Santacroce R, Acquila M, Belvini D, et al. Identification of 217 unreported mutations in the F8 gene in a group of 1,410 unselected Italian patients with hemophilia A[J]. J Hum Genet, 2008, 53(3): 275-284.
- [16] 李汶, 胡晓, 高伯笛, 等. 10 个甲型血友病家系 F VIII 基因突变分析 [J]. 中华遗传学杂志, 2011, 28(2): 127-132.
- [17] Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights[J]. Mol Pathol, 2002, 55(1): 1-18.

(本文编辑: 万静)

· 消息 ·

儿童心理保健与心理障碍新进展培训班通知

随着医学的发展和环境的变化, 儿童心理卫生遇到了前所未有的机遇和挑战。国家卫计委《儿童心理保健技术规范》适时出台, 对医务工作者提出了更高的要求。对儿童行为偏离、异常、障碍的识别、鉴别转诊与咨询、干预、治疗等, 需要儿童精神神经、心理咨询专业技术的支撑。中南大学湘雅二医院儿童医学中心是湖南省重点学科、博士点, 多年来与精神科合作, 集监测、干预、行为治疗于一体; 中南大学湘雅二医院精神科是卫生部临床重点专科。本次培训班由以上两部门共同举办。将于 2015 年 11 月 6~8 日在长沙举办。

培训班课程: 发展心理学、0~6 岁言语评定、问题行为的功能判断、制定干预计划、行为治疗常用技术、言语行为治疗(孤独症等)、DSM-5 中儿童精神障碍的诊断、孤独谱系障碍的早期诊断与标准化评估工具、家庭治疗在儿童心理障碍的应用、儿童心理咨询案例分析等。以基础理论为引导, 重操作技能培训, 为工作提供技术支持。

培训对象: 儿童保健、发育行为、心理咨询师及相关专业人员。获取《通知书》的邮箱 luoxm0506@163.com 或 min127910@sina.com; 短信 13974931816。联系人: 罗老师。

中南大学湘雅二医院
2015 年 6 月 30 日