

· 临床研究 ·

31 例 B 型血友病患者凝血因子 IX 基因突变研究

刘丹娟¹, 李莉艳^{2#}, 李强³, 孙竞⁴, 钟梅², 罗深秋^{1△}

(南方医科大学: 1. 细胞生物学教研室/骨与软骨再生重点实验室; 2. 南方医院妇产科; 3. 南方医院检验科; 4. 南方医院血液科, 广州 510515)

摘要:目的 研究 B 型血友病患者的凝血因子(F)IX 基因的突变类型与分布。方法 采集 31 例血友病 B 患者外周静脉血, 提取 DNA, 对 F IX 基因的 8 个外显子及其侧翼序列进行 PCR 扩增并测序。结果 31 例血友病 B 患者共检出 34 种突变, 其中 1 例为三重突变, 6 例为双重突变, 另外发现新突变 13 种。结论 B 型血友病的 F IX 基因突变分散, 呈高度异质性。31 例 B 型血友病患者的 F IX 基因上均发现有序列改变, 为 B 型血友病患者基因缺陷的分子机制提供了证据, 发现了 13 种新突变, 丰富了 F IX 基因突变谱。

关键词:血友病 B; 因子 IX; 基因突变

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.12.009

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)12-1168-03

Study on gene mutations of factor IX gene in 31 hemophilia B patients

Liu Danjuan¹, Li Liyan^{2#}, Li Qiang³, Sun Jing⁴, Zhong Mei², Luo Shenqiu^{1△}

(1. Department of Cytobiology/Key Laboratory of Bone and Cartilage Regeneration, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, Nanfang Hospital, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 3. Department of Laboratory Medicine, Nanfang Hospital, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 4. department of hematology, Nanfang Hospital, Guangzhou, Guangdong 510515, China.)

Abstract: Objective To study the mutation types and distribution of F IX gene in hemophilia B (HB) patients. **Methods** Peripheral blood samples were collected from 31 HB patients, and genomic DNA extracted was amplified by PCR to do the gene sequencing, including 8 exons and their flanks sequence. **Results** Thirty-four independent mutations were detected and identified in these 31 HB patients, with 1 triple-mutations sample and 6 double-mutations samples. Among these thirteen mutations were novel and never reported before. **Conclusion** Mutations of F IX gene in HB patients presented a high heterogeneity for dispersibility. Each of 31 HB patients has the sequence changes provided some evidences for the molecular mechanism of genetic flaw in HB patients. The 13 new-founded mutations enrich the F IX gene mutations spectrum.

Key words: hemophilia B; factor IX; mutation

血友病是一组 X 连锁隐性遗传的出血性疾病, 临床上常见的有 A 型血友病(HA)和 B 型血友病(HB)两型, 分别是由于凝血因子(F) VIII 和 F IX 基因突变所引起。在男性血友病患者中, HA 占 80%~85%, 而 HB 仅占 15%~20%, 在男性中的发病率大约为 1/30 000^[1], 女性患者罕见。HB 基因突变具有明显的异质性, 可发生在 F IX 基因外显子、内含子、启动子及其侧翼序列的任何位置^[2]。目前已知的 F IX 基因突变类型包括点突变、缺失、插入等。

本研究利用 PCR 法及 DNA 测序技术对 31 例 HB 患者进行 F IX 基因突变检测, 对于明确 F IX 基因突变机制有重要意义, 且丰富了 F IX 基因突变谱。

1 资料与方法

1.1 一般资料 31 例 HB 患者均来自本院血液科及妇产科门诊, F IX 活性测定均小于 5%。

1.2 研究方法 采集 HB 患者外周血 2 mL, 以乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝, 采用外周血 DNA 提取试剂盒(美国 Life 公司)提取 DNA。根据 F IX 基因序列(Gene Bank K02402), 参照文献^[3]设计并合成 8 对扩增引物(表 1), 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

PCR 反应总体积为 50 μ L, 加入上游和下游引物各 5 pmol(终浓度为 0.1 μ mol/L), 4 种 dNTP 各 5 nmol(终浓度为 0.1

mmol/L), 5 μ L 10 \times Taq PCR Buffer(100 mmol/L Tris-HCl, 15 mmol/L MgCl₂ 和 500 mmol/L KCl, pH 8.3), 2 U Taq DNA 聚合酶(TAKARA 公司), 基因组 DNA 50~200 ng。PCR 反应在美国 PE 公司的 9700 型热循环仪上进行。测序工作由上海英骏生物技术有限公司完成。

表 1 引物序列

外显子	引物名称	序列
Exon1	HB1F	5'-CCCATTCTCTCACTTGTCC-3'
	HB1R	5'-CCTAGCTAACAAAGAACAGT-3'
Exon2&3	HB2F	5'-AGAGATGTAAAATTTTCATGATGTT-3'
	HB2R	5'-GCAGAAAAACCCACATAAT-3'
Exon4	HB3F	5'-CTACAGGGGAGGACCGGGCAITCTA-3'
	HB3R	5'-AGTTTCAACTTGTTTCAGAGGGAA-3'
Exon5	HB4F	5'-CATGAGTCAGTAGTTCATGTACTTT-3'
	HB4R	5'-TGTAGGTTTGTTAAAATGCTGAAGTT-3'
Exon6	HB5F	5'-TTTAAATACTGATGGGCTG-3'
	HB5R	5'-GTTAGTGCTGAAACTTGCCT-3'
Exon7	HB6F	5'-AAGCTCACATTTCCAGAAAC-3'
	HB6R	5'-TGGGTTCTGAAAATATGA-3'

△ 通讯作者, Tel: (020)61648208; E-mail: Luoshen888@163.com.

共同第一作者。

续表 1 引物序列

外显子	引物名称	序列
Exon8-1	HB7F	5'-TAAGAAATGAGATCTTTAACA -3'
	HB7R	5'-CTAAGGTAGTGAAGAACTAA -3'
Exon8-2	HB8F	5'-GAAGAGTCTTCCACAAAGGG-3'
	HB8R	5'-AAGATGGGAAAGTGATTAGTTA -3'

2 结 果

31 例 HB 患者通过 DNA 测序均检测到了突变位点。检测结果显示, FⅨ基因的突变位点分散无热点区, 突变类型也不同。本研究中共发现了 34 种突变, 其中 1 例为三重突变, 6 例为双重突变, 此外还发现 13 种新突变。31 例 HB 患者均发现基因突变, 其基因突变发生的碱基改变、具体部位(基因碱基序列编号采用 Yoshitake 方法^[4])、引起的氨基酸变化和是否为 CpG 突变热点见表 2。

表 2 31 例 HB 患者 FⅨ 基因突变

序号	突变部位	位置	氨基酸变化	CpG
1	6364. C>T	Exon2. -4	CGG-TGG(R-W)	Y
	192. A>G	Ivs1. 75	Polymorphism	
2	6374. G>A	Exon2. -1	AGG-AAG(R-K)	
3	30939. T>A [#]	Exon8. CD817	CTG-CAG(L-Q)	
4	17764. C>T	Exon5. 117	CTT-TTT(L-F)	
	6320. T>A [#]	Ivs1. 6202	Acceptor Splice	
5	30917. T>G [#]	Exon8. CD810	TAC-GAC(Y-D)	
6	10454. T>C [#]	Exon4. CD113	TCC-CCC(S-P)	
7	31133. C>T	Exon8. 338	CGA-TGA(R-Stop)	Y
8	20519. G>A	Exon6. 180	CGG-CAG(R-Q)	Y
9	31152. T>C	Exon8. 344	ATC-ACC(I-T)	
10	17698. T>C	Exon5. 95	TGC-CGC(C-R)	
11	6375. G>T	Exon2. -1	AGG-AGT(R-S)	
12	30150. G>A	Exon7. 233	GCA-ACA(A-T)	Y
13	17677. T>C	Exon5. 88	TGT-CGT(C-R)	
	6828. C>T [#]	Ivs3. 126	Polymorphism?	
14	20461. -	Exon6. CD205	Fs	
	GCTGAAACCA [#]			
15	-6. G>C	Exon1. -35	None/Promoter	Y
	6640. G>A [#]	Ivs2. 151	Polymorphism?	
	29753. A>G [#]	Ivs6. 9187	Polymorphism?	
16	30961. -	Exon8. CD825	Fs	
	GCTAAACA [#]			
17	6443. G>A	Exon2. 23	TGT-TAT (C-Y)	
	30321. G>T [#]	Ivs7. 168	Polymorphism?	
18	192. A>G	Ivs1. 75	Polymorphism	
19	192. A>G	Ivs1. 75	Polymorphism	
20	10470. G>T	Exon4. 73	TGT-TTT(C-F)	
21	6392. T>C	Exon2. 6	TTG-TCG(L-S)	
22	31278. G>T	Exon8. 386	GGT-GTT(G-V)	
23	Ⅸ 缺乏		Whole gene deletion	

续表 2 31 例 HB 患者 FⅨ 基因突变

序号	突变部位	位置	氨基酸变化	CpG
24	31277. G>A	Exon8. 386	GGT-AGT(G-S)	
25	30975. T>G [#]	Exon8. CD830	GTT-GGT(V-G)	
	17517. T>G [#]	Ivs4. 7011	Polymorphism?	
26	30961. -	Exon8. CD825	Fs	
	GCTAAACA [#]	Ivs1. 75	Polymorphism	
27	17741. G>T	Exon5. 109	TGC-TTC(C-F)	Y
28	20519. G>A	Exon6. 180	CGG-CAG(R-Q)	Y
29	6332. -T	Exon2. CD81	Fs	
30	6653. -ATTT [#]	Ivs2. 163	Splice	
31	20557. C>T	Exon6. 193	CCT-TCT(P-S)	

Del: 缺失; Exon: 外显子; Ivs: 内含子; #: 为本研究首次报道的新突变; Fs: 阅读框架移位; Polymorphism: 多态性; Splice: 剪切位点; ?: 未确定; Y: 确定。

3 讨 论

FⅨ基因定位于 Xq27. 1, 基因全长约 33. 5kb, 由 8 个外显子、7 个内含子及其侧翼序列中的调控区所组成^[5], mRNA 全长 2 804 bp。FⅨ基因任意位置的缺陷引起蛋白结构功能和数量的改变, 均可导致 HB 的发生。

HB 基因突变类型种类繁多, 以点突变、短片段的缺失(少于 30 bp)和插入突变多见, 其中 80% 左右为单个碱基的突变^[6]。不同于 HA, HB 的散发率可达 30%~50%^[7]。1990 年 Brownlee 首次建立了 HB 突变数据库。随着病例数目的积累, 新的缺陷正不断地被发现。从已报道的突变分布看, 包括 polyA 信号在内的 FⅨ基因所有区域均有突变发生。本研究除外 6 例缺失(一例全基因缺失和 5 例短片段缺失), 其余均为点突变, 占 80. 6%。由于编码与 Ca²⁺ 结合的 EGF 区及催化区, 外显子 4 和 8 的突变发生率较高^[8]。本研究中的 31 例患者, 有 11 例发生于外显子 4 和 8, 占 35. 5%。而外显子 1、6、7 中突变较少, 共占 19. 4%。

CpG 双核苷酸区域被认为是突变热点^[9-10], 刘敬忠等^[11]采用 PCR 法和 GAWTS 技术也进一步证实了 CpG 确系突变热点, 主要是(C→T/A)。研究中有 7 例发生在 CpG 热点上, 类型为(C→T), (G→A)和(G→T), 占 22. 6%。

Toyozumi 等^[12]确定了内含子 1 的第 192 核苷酸(FⅨ 192)为二核苷酸多态性位点, 存在于健康日本人中。王宁遂等^[13]发现并计算出中国人 FⅨ-192A 和 G 的基因频率分别为 0. 81 和 0. 19。本研究中有 4 例患者的突变发生于此处, 进一步验证了该基因此位置的多态性。2 例患者只检测出此惟一多态性位点需进一步检测未测序列, 以确定致病突变位点。

经过最新的血友病 B 数据库资料查询, 本研究共发现 13 种新突变, 为国际上首次报道。其中 4 种为发生在外显子的错义突变, 氨基酸改变分别为 L-Q、Y-D、S-P 和 V-G。除了-T 为已报道的导致阅读框架移位的突变点外, 其余 3 种均为新发现的缺失突变类型, 其中-GCTGAAACCA 和-GCTAAACA 引起阅读框架移位, 根据剪切位点的位置判断^[14], -ATTT 为剪接位点缺失。此外, T6320A、C6828T、G6640A、A29753G、G30321T 和 T17517G 等 6 种突变发生于内含子部位, 已知 6320 为剪切位点, 可确定 T6320A 为致病突变, 其余 5 种突变是否为一种新的多态性或者为致病突变, 则需要进一步研究。

本文报道了 31 例 HB 患者 FⅨ 基因突变的研究,对临床进行 HB 携带者筛查及产前基因诊断具有重要的参考和指导意义。而 FⅨ 基因新突变的发现,在丰富 HB 基因突变谱的同时,还有助于进一步了解 FⅨ 基因中某些氨基酸残基对于 FⅨ 凝血活性的重要性,为明确 HB 的分子致病机制提供了实验数据。

参考文献:

- [1] Giannelli F, Green PM, High KA, et al. Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions-third edition[J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20(Suppl):2027-2063.
- [2] 段宝华. 血友病 B 患者及其携带者基因诊断新进展[J]. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2002, 23(3):133-134.
- [3] Vidal F, Farssac E, Altisent C, et al. Factor Ⅸ gene sequencing by a simple and sensitive 15-hour procedure for haemophilia B diagnosis: identification of two novel mutations[J]. *British J Haematol*, 2000, 111(21):549-551.
- [4] Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, et al. Nucleotide sequence of the gene for human factor(antihemophilic factor B) [J]. *Biochemistry*, 1985, 24(3):3736-3750.
- [5] Bowen D. Haemophilia A and haemophilia B; molecular insight[J]. *Mol Pathol*, 2002, 55(2):127-144.
- [6] Garmen E, Pilar C, Satumino H, et al. Molecular analysis in hemophilia B families: identification of six new mutations in factor Ⅸ gene[J]. *Haematologica*, 2003, 88(10):235-236.

- [7] Mukherjee S, Mukhopadhyay A, Chaudhuri K, et al. Analysis of haemophilia B database and strategies for identification of common point mutations in the factor Ⅸ gene [J]. *Haemophilia*, 2003, 9(13):187-192.
- [8] 张媛, 杨林花, 陆晔玲, 等. 应用 DNA 测序技术检测血友病 B 患者 FⅨ 基因突变[J]. *中国实验血液学杂志*, 2009, 17(2):476-478.
- [9] 刘敬忠, 向华, 刘亮, 等. 应用基因扩增转录技术诊断乙型血友病[J]. *中华医学杂志*, 1995, 75(10):599-601.
- [10] 王宁遂, 邓兵, 朱静. 应用多聚酶链反应和双链 DNA 循环测序对 FⅨ 基因点突变的研究[J]. *中华血液学杂志*, 1995, 16(5):227-228.
- [11] 刘敬忠, 张纪平, 陈怀华, 等. 27 例乙型血友病患者 Ⅸ 因子基因突变研究[J]. *高技术通讯*, 1994, 4(3):29-32.
- [12] Toyozumi H, Kojima T, Matsushita T, et al. Diagnosis of hemophilia B carriers using two novel dinucleotide polymorphisms and HhaI RFLP of the factor Ⅸ gene in Japanese subjects[J]. *Thromb Haemost*, 1995, 74(4):1009-1014.
- [13] 王宁遂, 邓兵, 朱静. 一种 FⅨ 基因多态性在我国人群中的检出[J]. *中华医学遗传学杂志*, 1994, 11(4):217-218.
- [14] Ketterling RP, Drost JB, Scaring WA, et al. Reported in vivo splice-site mutations in the factor Ⅸ gene severity of splicing defects and a hypothesis for predicting deleterious splice donor mutation[J]. *Human Mutation*, 1999, 13(7):221-231.

(收稿日期:2011-12-08 修回日期:2012-01-15)

(上接第 1167 页)

莫地平后的安全性问题,尚需大样本的观察研究。

综上所述,醒脑静联合尼莫地平能有效提高治疗急性脑梗死的疗效,尤其能显著改善轻度脑梗死患者的预后,且未发现安全性问题,因此,值得在临床中推广。

参考文献:

- [1] 王德新. 神经病学[M]. 北京:人民军医出版社, 2001:253.
- [2] 陈皆能. 醒脑静注射液治疗急性脑梗死 30 例临床疗效观察[J]. *中国当代医药*, 2011, 18(7):76-79.
- [3] 张志彬, 王旭, 王平. 尼莫地平注射液治疗蛛网膜下腔出血疗效观察[J]. *中国误诊学杂志*, 2011, 11(24):5852.
- [4] 张永利, 郝国, 张杰. 尼莫地平防治蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛临床观察[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2011, 14(11):91-92.
- [5] 中华神经科学会, 中华神经外科学会. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. *中华神经科杂志*, 1996, 29(6):379.
- [6] 中华医学会全国第四届脑血管病学术会议. 脑卒中患者临床神经功能损伤程度评分标准(1995)[J]. *中华神经科杂志*, 1996, 29(6):381-383.
- [7] 陈兵, 孟祥红, 耿晓非, 等. 急性脑梗死患者血超敏 C 反应蛋白和 D-二聚体含量的改变及其临床意义[J]. *临床神经*

病学杂志, 2008, 21(2):142-143.

- [8] 魏江磊, 邵念方. 醒脑静注射液治疗急性缺血性脑卒中临床疗效的研究[J]. *中西医结合实用临床急救*, 1999, 6(5):197.
- [9] 张健莉. 依达拉奉联合醒脑静治疗急性脑梗死的临床疗效观察[J]. *中国现代医生*, 2011, 49(1):27-28.
- [10] Okten AI, Gezerean Y, Ergun R. Traumatic subarachnoid hemorrhage: a prospective study of 58 cases [J] *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 2006, 12(2):107-114.
- [11] 陈新谦, 金有豫, 汤光. 新编药理学[M]. 14 版. 北京:人民卫生出版社, 2011:366.
- [12] 曹启富, 刘军, 仇长刘. 尼莫地平改善急性脑梗死脑缺血缺氧的临床研究[J]. *中国现代医药杂志*, 2004, 6(5):15-16.
- [13] 唐胜文, 沈为林. 尼莫地平治疗急性脑梗死疗效观察[J]. *现代中西医结合杂志*, 2011, 20(2):181-182.
- [14] 郭国际, 李淮玉, 丁小灵, 等. 急危重症脑卒中[M]. 安徽:安徽科学技术出版社, 2009:133.
- [15] 王卫平. 尼莫地平在脑出血的应用[J]. *四川医学*, 2010, 31(7):950-952.

(收稿日期:2011-12-02 修回日期:2012-01-05)