

血友病基因诊断的现状思考

戴菁 王学锋

[关键词] 基因诊断; 血友病 A; 血友病 B

血友病是常见的遗传性出血性疾病,分为 A(HA)和 B(HB)两型,其发病原因是凝血因子Ⅷ(FⅧ)基因(F8)或Ⅸ(FⅨ)基因(F9)缺陷导致蛋白的合成缺陷或质的异常,或两者兼有。根据国际血友病联盟(WFH)的统计,男性 HA 发生率为 1/5 000,HB 约为 HA 的 1/5,且疾病的发生与地域、种族无关^[1]。我国人口众多,血友病患者的绝对人数较多,据中国血友病协作组统计,自我国开展血友病患者信息登记工作以来,目前共登记的 HA 患者例数为 23 000 例,HB 患者为 3 600 例^[2]。近年来,随着实验室筛查和检测方法的不断改进,对轻型血友病患者的诊断率提高,发病率有所上升。

一、血友病的发病机制

F8 基因位于 Xq28,全长 186 kb,由 26 个外显子和 25 个内含子组成,FⅧ mRNA 全长约为 9 kb,编码由 2 351 个氨基酸残基组成的多肽链,其中包括 1 条 19 个氨基酸组成的信号肽,成熟的肽链由 2 332 个氨基酸以 A1-A2-B-A3-C1-C2 的方式排列,FⅧ蛋白分泌入血后,在血液中与血管性血友病因子(vWF)结合,以 FⅧ/vWF 复合物形式存在,后者可稳定 FⅧ,防止其过早降解。F8 基因结构庞大,且导致 HA 的基因突变种类繁多,其中基因内含子 22 倒位突变引起的 FⅧ蛋白缺乏占重型 HA 分子发病机制的 42%^[3];而内含子 1 倒位的发生率约占重型 HA 的 2%~5%^[4],其余

几乎每个家系都有不同的突变。目前,F8 基因突变数据库报道了 2 015 种不同的突变^[5],包括点突变、基因缺失、基因插入、无义突变、剪接突变等,从而提示 F8 基因异常具有高度的异质性;中型和轻型血友病中,86% 为错义突变。上海瑞金医院分别对 933 例有家族史的 HA 患者及 393 例散发 HA 患者的基因突变谱进行整理分析(图 1),各突变类型与突变数据库的报道结果类似^[6]。

F9 基因片段较小,相对于 F8 结构较为简单,长约 34 kb,含 8 个外显子,FⅨ mRNA 长约 2.8 kb,编码由 461 个氨基酸组成的多肽链前体,经信号肽酶和蛋白酶切除信号肽和原肽,并经过糖基化、二硫键形成、氨基端 12 个氨基酸羧基化及第 I 类表皮生长因子区第 64 位天冬氨酸 β 羟化等一系列化学修饰后形成含 415 个氨基酸的成熟 FⅨ。FⅨ基因突变包括缺失、插入和点突变,目前 F9 突变数据库收录的突变位点有 1 094 种,其中约 80% 为单个碱基突变^[7]。

二、血友病基因诊断

通过基因诊断可以更精准地为血友病患者及其家属开展优生优育指导,尤其是对家族中有生育希望及可能的女性进行携带者基因检测,对优生优育有重要价值^[8-11]。同时,对血友病患者进行明确的基因诊断有利于接受预防治疗的患者更明确地知晓导致疾病的

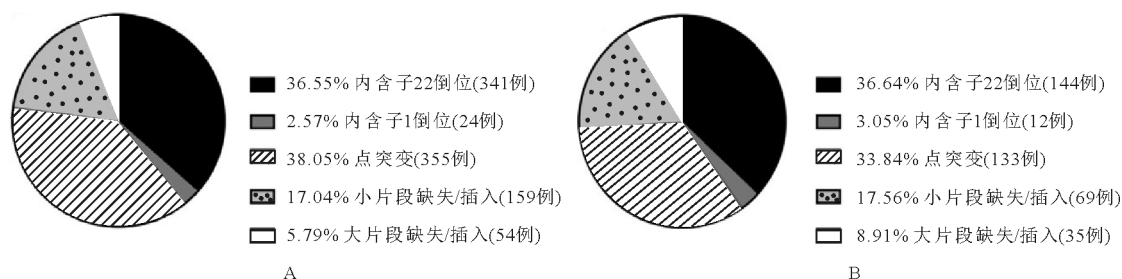


图 1 基因突变谱整理分析结果(A:933 例有家族史的 HA 患者基因突变谱;B:393 例散发 HA 患者基因突变谱)

基因类型。越来越多的研究提示某些特殊的基因突变位点与抑制物的发生相关^[12-14],针对不同突变位点采取不同治疗方案的措施也在逐步探索中,有望在未来实现对血友病患者的个体化治疗^[15]。我们现对目前常用的基因诊断策略及基因诊断存在的问题作一简要评述。

1. HA 基因诊断常规流程

(1)内含子倒位的检测:内含子 22 倒位是 20% HA 患者的致病突变,是 45% 重型 HA 患者的致病突变。内含子 22 倒位是 F8 基因第 22 内含子内的 Int22h 序列与基因外的两个与之高度同源的序列(Int22h-2、Int22h-3)之一发生染色体内的同源重组(图 2A),导致 F8 基因在外显子 1~22 与 23~26 间发生断裂,不能合成正常的凝血因子 FⅧ,导致重型 HA。内含子 1 倒位是继内含子 22 倒位后被发现的另一导致 HA 的重要发病机制,系内含子 1 内的 Int1h-1 与基因外的高度同源的序列 Int1h-2 发生染色体内的同源重组(图 2B),导致 FⅧ蛋白不能正常合成。因此,首先需要对 HA 患者的 F8 基因内含子 22 倒位和内含子 1 倒位进行检测。用于检测内含子 22 倒位的经典方法是 Southern Blot 法,但该方法费时费力,且需要使用荧光标记物,不利于实验室开展^[16];长链 PCR(LD-PCR)方法是由 Steve Sommer 设计的一种简便的内含子 22 倒位检测方法,但由于需要扩增的片段长度分别为 11 kb 和 12 kb,因此该检测方法对技术要求比较高^[17];Rossetti 等^[18]用反转转移 PCR(IS-PCR)的方法进行内含子 22 倒位的检测,虽然可将扩增片段缩小,但由于其要求大量的 DNA(1~2 μg)及很多步骤的酶切、自连接过程,使用起来也不是很方便;我们团队建立了一种结合 LD-PCR 和 AccuCopy 技术定量的方法对内含子 22 倒位进行检测^[19],能准确地区分各种不同类型的倒位组合,使得内含子 22 倒位检测的便利性和准确性得到了很大提升。当内含子 22 倒位或内含子 1 倒位检测结果为阴性时,我们需要对 F8 基因的编码序列进行检测。

(2)F8 基因 26 个外显子及其侧翼序列的基因检测:分别针对 F8 基因的共 26 个外显子及 5' 端和 3' 端非编码区设计特异性引物,运用 PCR 的方法将上述目的片段进行扩增,随后采用 Sanger 法进行基因序列的检测。使用该方法可以检测出绝大部分的 F8 基因突变位点,包括小片段的缺失、插入、点突变(无义突变和错义突变)、剪切位点突变等。F8 基因的第 14 号外显子是最大的外显子片段,该外显子编码 FⅧ蛋白的 B 区,约占总编码区的 43%,有研究^[20]显示,21% 的点突变可发生在该外显子区段,但更多的是小片段的缺

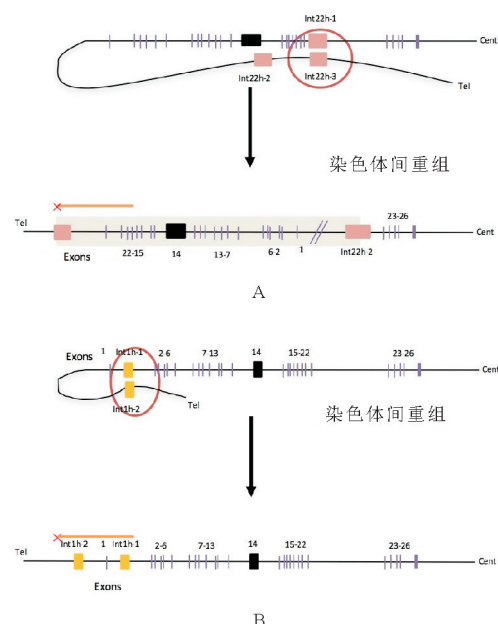


图 2 内含子 22 倒位和 1 倒位示意图(A:内含子 22 倒位; B:内含子 1 倒位)

失和插入(约占 47%),虽然 B 区在 FⅧ蛋白成熟过程中会被剪切,但发生在该区段的基因改变仍可影响 FⅧ蛋白的分泌效率^[21-22]。

(3)间接基因诊断:对于 HA 患者,由于 F8 基因不仅庞大且结构复杂,直接查找突变费时费力,故可以采用结合遗传连锁分析的间接诊断方法进行 HA 的携带者与产前诊断,发掘高信息量的多态性位点并通过遗传连锁分析的方法可以定位致病基因所在的染色体,但这些多态性位点的信息量在各个人群中存在差异性,如在欧美地区有高诊断信息量的常用位点(STR、CA12、CA22、BclI)在我国人群的信息量仅为 27%^[23],我们先后开发了适合中国人群的二代、三代连锁分析位点结合性别位点,利用多重 PCR 一次扩增,累计识别能力达到 99% 以上^[24],很好地弥补了直接诊断的短板,但由于基因的复杂性,遗传连锁分析所选择的位点并不能完全避免基因重组的发生对结果的干扰和误判。

2. HB 基因诊断流程

由于 F9 基因较小,可采用直接的核酸测序方法进行基因突变检测;F9 基因外的 6 个多态性位点经过多重 PCR 扩增可用于 HB 的遗传连锁分析,但也无法排除基因重组的发生对其结果的干扰。

3. 特殊血友病患者的基因检测方法

(1)拷贝数检测:运用上述基因诊断策略基本能对 90% 以上的 HA 患者作出明确的基因诊断,但仍有 10% 左右的患者未能找到明确的突变位点,需要用其他的技术进行诊断。基因拷贝数变化也是导致蛋白异

常表达的一种基因改变,但应用常规的测序技术并不能检出,多重连接依赖式探针扩增技术 (MLPA) 可用于检测基因拷贝数的变化,如双重拷贝、三重拷贝等异常^[25-26]。AccuCopy 是一种在多重竞争性 PCR 扩增的基础上进行拷贝数变异性检测的技术^[27],利用该技术可以对目的基因片段中的拷贝数情况进行检测。我们对 10 例利用常规方法未找到基因异常位点的 HA 患者进行了 AccuCopy 拷贝数检测^[28],均明确了拷贝数异常的位点,为 HA 基因诊断提供了可靠的补充检测手段。

(2) NGS (Next-Generation Sequencing) 检测: NGS 又称二代测序^[29],其相对于 Sanger 一代测序而言,是近几年发展起来的一种高效率的基因测序方法,其检测深度和广度、高通量等特性使其在临床上得到了广泛应用,如肿瘤筛查等。Sanger 法测序需要事先知道目的基因的序列,但 NGS 则无此要求,从而使 NGS 方法可以发现更多未知的致病基因,例如在儿科,多种先天性疾病之前无法明确致病基因,但随着 NGS 方法的运用,越来越多的先天性疾病得到了明确的基因诊断。由于 NGS 方法获得的数据信息量很大,如何从海量的信息中捕获具有疾病诊断意义的异常基因需要经验丰富的科研人员进行筛选。Jose 等^[30]建立了一种针对 F8、F9 和 vWF 基因的 NGS 检测组合,对 102 份标本 (97 例 HA/HB 患者和 5 例女性携带者) 进行了检测,其诊断率可达到 99%;应用 NGS 方法对 F8 基因进行检测还可以发现内含子深部的位点变异,这种类型的变异往往可导致轻型或中型血友病的发生,这也是为何轻型或中型血友病用常规基因检测方法未能找到基因异常的原因。

(2) 女性 HA 的基因诊断: 女性 HA 十分罕见,首先需要注意和血管性血友病在表型上进行鉴别;在对 F8 基因进行检测后,若能发现基因缺陷,则对确立女性血友病的诊断具有重要价值。上海瑞金医院诊断的 3 例女性 HA 患者中的 2 例分别是内含子 22 倒位和内含子 1 倒位导致的重型 HA,其另一条 X 染色体非随机灭活;另 1 例女性患者存在双杂合突变导致重型血友病 A 的发生^[31]。

(4) 散发家系: 根据文献报道,大约 1/3 的 HA 家系为无家族史的散发家系,对于这些家系,目前主要通过直接诊断和间接诊断相结合的策略。但是散发家系的诊断需要考虑细胞嵌合现象的存在,本课题组对 2005~2016 年来院就诊的 393 个散发 HA 家系的基因突变进行分析发现,大部分散发 HA 患者的母亲为携带者,其致病基因的来源可追溯到患者的外公 (60%) 或母亲 (12%),28% 的散发患者为自发突变,体细胞

嵌合现象在散发家系中存在的比例较高^[6]。

三、血友病基因诊断存在的问题

由于基因诊断是近十几年来逐渐在临床上推广应用的新技术,对于疾病与基因之间的关系也随着越来越多研究工作的开展而逐渐揭开了神秘的面纱,我们所面临的问题也越来越清晰、明确。

(1) 技术问题: 以 F8 基因内含子 22 倒位检测为例,从最早发明该突变热点的检测技术以来,检测方法不断更新换代,从 Southern Blot、LD-PCR、IS-PCR 到 AQ-PLP 等技术,使得对内含子 22 倒位的检测方法灵敏度和准确度均得到较好改善,各种非经典的内含子 22 倒位类型不断被发现,细胞嵌合标本的最低检测率可达到 2%,有效提高了散发家系基因突变的检出率。我们利用 AQ-PLP 技术对 1 例无家族史的 HA 家系进行内含子 22 倒位检测^[32],发生该先证者 F8 基因存在一种新型的 22 倒位模式 (Int22h-2、Int22h-3、Int22h-2/-1),并通过对其母亲的各种体细胞嵌合率检测结果分析,认为其母亲为嵌合携带者,且突变发生在胚胎发育早期。

F8 和 F9 基因结构异常也是影响基因检测的一个重要因素,常规技术对基因结构异常无法检出。据统计,在重型 HA 和 HB 患者中存在结构异常的概率分别为 6% 和 10%^[33]。结构异常合并突变位点同时存在的案例也有报道^[34],进一步体现了血友病基因诊断的复杂性。

(2) 患者家族对基因诊断的认识: 2012 年美国一项针对血友病基因检测患者的调查结果显示^[35-36],仅有 20% 的血友病患者进行了基因检测,分析其原因,一部分是由于检测费用高昂,无法由保险支付;另一个重要原因就是缺乏可靠的检测技术手段。目前所有的检测技术由于各种原因限制及基因突变复杂性、异质性等特点的影响,均无法达到 100% 的检测准确率。加拿大的一项对 10 年间全国血友病基因检测的研究数据表明,HA 和 HB 的基因检测可诊断率分别为 91% 和 94%^[20]。随着检测技术的不断发展,即使是最新的 NGS 技术用于血友病的基因检测,仍有患者无法得到明确的基因结果^[37-38],利用最新的 NGS 技术结合 MIP 分子检测策略,HA 和 HB 的可诊断率分别达到了 98.1% 和 99.3%^[39],但仍然有血友病患者在所有能使用的基因检测方法后还是无法明确基因异常位点。

综上所述,血友病基因检测所面临的问题和挑战并存,对于血友病患者来说,他们需要正确认识血友病基因诊断在疾病的治疗、优生优育及抑制物产生的指导作用,以及基因诊断的现状;医务科研工作者需要不断地改进基因检测技术及分析基因诊断结果与患者临

床表现的相关性,梳理基因与疾病的关系,更好地为血友病的基因治疗、个体化治疗探索基因宝库。

参 考 文 献

- [1] Keeney S, Mitchell M, Goodeve A, et al. 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.
- [2] 中华医学会血液学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(2017 年版)[J]. 中华血液学杂志, 2017, 38(5): 264-370.
- [3] Lakich D, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, et al. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A[J]. Nat Genet, 1993, 5(3): 236-241.
- [4] 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.
- [5] Factor VIII Gene(F8) Variant Database[EB/OL]. <http://www.factor-viii-db.org/>.
- [6] Lu Y, Xin Y, Dai J, et al. Spectrum and origin of mutations in sporadic cases of haemophilia A in China[J]. Haemophilia, 2018, 24(2): 291-298.
- [7] Lu Y, Wu X, Dai J, et al. The characteristics and spectrum of F9 mutations in Chinese sporadic haemophilia B pedigrees[J]. Haemophilia, 2019, 25(2): 316-323.
- [8] Chalmers E, Williams M, Brennand J, et al. Paediatric Working Party of United Kingdom Haemophilia Doctors' Organization. Guideline on the management of haemophilia in the fetus and neonate[J]. Br J Haematol, 2011, 154(2): 208-215.
- [9] Gouw SC, van den Berg HM, Oldenburg J, et al. F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis[J]. Blood, 2012, 119(12): 2922-2934.
- [10] Carcao MD, van den Berg HM, Ljung R, et al. Correlation between phenotype and genotype in a large unselected cohort of children with severe hemophilia A[J]. Blood, 2013, 121(19): 3946-3952.
- [11] Swystun LL, James P. Using genetic diagnostics in hemophilia and von Willebrand disease[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2015, 2015: 152-159.
- [12] Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX[J]. Haemophilia, 2006, 12(suppl 6): 15-22.
- [13] DiMichele D. Inhibitor development in haemophilia B: an orphan disease in need of attention[J]. Br J Haematol, 2007, 138(3): 305-315.
- [14] Eckhardt CL, van Velzen AS, Peters M, et al. Factor VIII gene(F8) mutation and risk of inhibitor development in nonsevere hemophilia A[J]. Blood, 2013, 122(11): 1954-1962.
- [15] James PD, Raut S, Rivard GE, et al. Aminoglycoside suppression of nonsense mutations in severe hemophilia[J]. Blood, 2005, 106(9): 3043-3048.
- [16] Naylor JA, Buck D, Green P, et al. Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions[J]. Hum Mol Genet, 1995, 4(7): 1217-1224.
- [17] Liu Q, Thorland EC, Heit JA, et al. Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: a rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes[J]. Genome Res, 1997, 7(4): 389-398.
- [18] Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, et al. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR[J]. Clin Chem, 2005, 51(7): 1154-1158.
- [19] Ding Q, Wu X, Lu Y, et al. AccuCopy quantification combined with pre-amplification of long-distance PCR for fast analysis of intron 22 inversion in haemophilia A[J]. Clin Chim Acta, 2016, 458: 78-83.
- [20] Rydz N, Leggo J, Tinlin S, et al. The Canadian "National Program for hemophilia mutation testing" database: A ten-year review[J]. Am J Hematol, 2013, 88(12): 1030-1034.
- [21] Pittman DD, Alderman EM, Tomkinson KN, et al. Biochemical, immunological, and in vivo functional characterization of B-domain-deleted factor VIII[J]. Blood, 1993, 81(11): 2925-2935.
- [22] Miao HZ, Sirachainan N, Palmer L, et al. Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion[J]. Blood, 2004, 103(9): 3412-3419.
- [23] 王学锋, 刘元昉, 李广志, 等. 血友病 A 携带者检测与产前诊断[J]. 中华血液学杂志, 2001, 22(3): 117-120.
- [24] Ding QL, Lu YL, Dai J, et al. Characterisation and validation of a novel panel of the six short tandem repeats for genetic counselling in Chinese haemophilia A pedigrees[J]. Haemophilia, 2012, 18(4): 621-625.
- [25] Rost S, Löffler S, Pavlova A, et al. Detection of large duplications within the factor VIII gene by MLPA[J]. J Thromb Haemost, 2008, 6(11): 1996-1999.
- [26] Acquila M, Pasino M, Di Duca M, et al. MLPA assay in F8 gene mutation Screening[J]. Haemophilia, 2008, 14(3): 625-627.
- [27] Du R, Lu C, Jiang Z, et al. Efficient typing of copy number variations in a segmental duplication-mediated rearrangement hotspot using multiplex competitive amplification[J]. J Hum Genet, 2012, 57(8): 545-551.
- [28] You GL, Ding QL, Lu YL, et al. Characterization of large deletions in the F8 gene using multiple competitive amplification and the genome walking technique[J]. J Thromb Haemost, 2013, 11(6): 1103-1110.
- [29] Hardwick SA, Deveson IW, Mercer TR. Reference standards for next-generation sequencing[J]. Nat Rev Genet, 2017, 18(8): 473-484.
- [30] Jose MB, Jose RG, Cristina J, et al. Application of molecular diagnostic algorithm for haemophilia A and B using next-generation sequencing of entire F8, F9 and VWF genes[J]. Thromb Haemost, 2017, 117(1): 66-74.
- [31] Wang X, Lu Y, Ding Q, et al. Haemophilia A in two unrelated females due to F8 gene inversions combined with skewed X-inactivation of X chromosome[J]. Thromb Haemost, 2009, 101(4): 775-778.
- [32] Chen C, Xie X, Wu X, et al. Complex recombination with deletion in the F8 and duplication in the TMLHE mediated by int22h copies during early embryogenesis[J]. Thromb Haemost, 2017, 117(8): 1478-1485.
- [33] Miller CH, Benson J, Ellingsen D, et al. Hemophilia Inhibitor Research Study Investigators. F8 and F9 mutations in US haemophilia patients: correlation with history of inhibitor and race/ethnicity[J]. Haemophilia, 2012, 18(3): 375-382.
- [34] Shetty S, Bhavne M, Ghosh K. Challenges of multiple mutations in individual patients with haemophilia[J]. Eur J Haematol, 2011, 86(3): 185-190.
- [35] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). CDC Hemophilia A Mutation Project (CHAMP)[EB/OL]. <http://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/champs.html>.
- [36] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). CDC Hemophilia B Mutation Project (CHBMP)[EB/OL]. <http://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/champs.html>.
- [37] Simeoni I, Stephens JC, Hu F, et al. A high-throughput sequencing test for diagnosing inherited bleeding, thrombotic, and platelet disorders[J]. Blood, 2016, 127(23): 2791-2803.
- [38] Bastida JM, Del Rey M, Lozano ML, et al. Design and application of a 23-gene panel by next-generation sequencing for inherited coagulation bleeding disorders[J]. Haemophilia, 2016, 22(4): 590-597.
- [39] Johnsen JM, Fletcher SN, Huston H, et al. Novel approach to genetic analysis and results in 3000 hemophilia patients enrolled in the My Life, Our Future initiative[J]. Blood Adv, 2017, 13(1): 824-834.

(收稿日期:2019-12-23)

(本文编辑:张一冰)