

再生障碍性贫血患儿骨髓造血干细胞端粒酶活性及相关基因表达的研究

王西阁 周玉洁 王丹凤 王璇

(郑州大学第三附属医院儿内科,河南 郑州 450052)

[摘 要] **目的** 探讨再生障碍性贫血(简称再障)患儿骨髓造血干细胞端粒酶活性及端粒酶逆转录酶(hTERT)基因和端粒酶 RNA 组分(hTERC)基因的表达变化和关系。**方法** 用重复序列扩增(TRAP)银染法和实时荧光定量 RT-PCR 法分别检测 52 例慢性再障患儿(CAA 组)、13 例急性再障患儿(SAA 组)和 21 例骨髓造血正常儿童(对照组)端粒酶活性及 hTERT 和 hTERC mRNA 的表达。**结果** CAA 组、SAA 组端粒酶活性和 hTERT mRNA 水平均高于对照组 ($P < 0. 01$),且 CAA 组端粒酶活性和 hTERT mRNA 水平较 SAA 组升高 ($P < 0. 05$); hTERC mRNA 在各组间表达差异无统计学意义 ($P = 0. 812$);hTERTmRNA 的表达水平与端粒酶活性呈正相关 ($r = 0. 660, P < 0. 01$)。**结论** 端粒酶活性的表达变化与儿童再障发病及发展过程有关,hTERT 表达在端粒酶活性调节过程中起重要作用。

[中国当代儿科杂志,2013,15(1):25-28]

[关 键 词] 再生障碍性贫血;端粒酶;骨髓造血干细胞;儿童

Expression of telomerase activity and its related genes in the marrow hemopoietic stem cells of children with aplastic anemia

WANG Xi-Ge, ZHOU Yu-Jie, WANG Dan-Feng, WANG Xuan. Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Email: xigewang1962@sina.com)

Abstract: Objective To explore the relationship of telomerase RNA component (hTERC) and the telomerase reverse transcriptase (hTERT) with telomerase activity in the marrow hemopoietic stem cells of children with aplastic anemia(AA). **Methods** Fifty-two children with chronic AA, 13 children with acute AA and 21 normal controls were enrolled in the study. Telomerase activity and the expression of mRNA of hTERT and hTERC were detected by Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) with silver staining and real-time Q-PCR respectively. **Results** Levels of telomerase activity in both the chronic and acute AA groups were higher than in the control group ($P < 0. 01$). The AA groups had significantly higher expression of hTERT mRNA than the control group ($P < 0. 01$). The chronic AA group had higher expression of hTERT mRNA and telomerase activity than the acute AA group ($P < 0. 05$). There was no significant difference in the expression of hTERC mRNA among the three groups ($P = 0. 812$). There was a significant correlation between the expression of hTERT mRNA and telomerase activity ($r = 0. 660, P < 0. 01$). **Conclusions** Expression of telomerase activity may be involved in the pathophysiology and development of AA, and hTERT plays a crucial role in expression of telomerase activity.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(1):25-28]

Key words: Aplastic anemia; Telomerase; Marrow hemopoietic stem cell; Child

既往许多学者认为再生障碍性贫血(简称再障)是一种免疫介导的骨髓衰竭性疾病,然而近年来也有研究发现再障的发病与宿主遗传易感性相关。端粒酶是一种能够以自 RNA 组分为模板在染色体末端添加端粒重复序列的核酸蛋白复合体酶,主要由端粒酶 RNA 组分(hTERC)与端粒酶逆转录酶(hTERT)构成,在维持端粒长度和稳定性方面发

挥重要作用。有研究表明全血细胞减少患者外周血粒细胞端粒长度缩短,且缩短程度与患者疾病持续时间存在相关性^[1]。那么,关于再障患儿骨髓造血干细胞端粒酶活性水平如何,是否随端粒长度改变而变化以及与上述两个基因的表达是否相关尚未见研究报道,因此本研究对此进行了初步探讨。

[收稿日期]2012-07-24;[修回日期]2012-10-15
[作者简介]王西阁,女,本科,教授。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集2011年6月至2012年6月郑州大学第三及第一附属医院经临床和实验室初次确诊的再障患儿65例为病例组,诊断标准参考《小儿再障诊疗建议》^[2],其中慢性再障(CAA)52例,男28例,女24例,中位年龄7.2岁(1~15岁);急性再障(SAA)13例,男8例,女5例,中位年龄5.3岁(2~13岁)。随机选择于郑州大学第三附属医院就诊并排除血液系统疾病及其他重大恶性肿瘤患儿21例为对照组,其中男13例,女8例,中位年龄7.6岁(1~14岁)。3组患儿既往均未给予输血及免疫抑制剂治疗,且年龄、性别在3组间差异无统计学意义。

1.2 主要试剂及仪器

TRAP-PCR银染法端粒酶活性检测试剂盒购自南京凯基公司;Trizol试剂购自美国MRC公司;逆转录试剂盒及荧光定量PCR试剂盒购自北京康为世纪公司;引物由上海生工生物工程公司设计合成。骨髓造血干细胞分离液和重悬液均购自天津灏洋试剂公司。

1.3 端粒酶活性检测

1.3.1 骨髓造血干细胞的分离及端粒酶的提取

取新鲜抗凝骨髓3 mL,用骨髓造血干细胞重悬液和分离液重悬并分离造血干细胞,按试剂盒说明提取造血干细胞端粒酶。用Bradford法测端粒酶提取蛋白浓度,并根据结果用Lysis buffer将浓度调至1 μg/μL,-80℃冻存备用。

1.3.2 TRAP-PCR银染法测端粒酶活性

参照试剂盒说明书,反应体系共50 μL,包括5 μL 10×TRAP buffer,1.5 μL dNTPs,1 μL端粒酶TS引物,1 μL端粒酶CX引物,1 μL内参模板,1 μL内参引物,0.5 μL Taq-DNA聚合酶,2 μL端粒酶提取物,然后加入双蒸水至50 μL。反应条件:PCR扩增仪上30℃保温30 min,95℃预变性5 min;94℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸60 s,共35个循环;最后72℃,延伸10 min。取9 μL PCR产物加上1 μL 10×上样缓冲液,在电压17.5 V/cm,10%非变性聚丙烯酰胺凝胶上垂直电泳1 h,电泳缓冲0.5×TBE。电泳后的凝胶立即按试剂盒说明书进行硝酸银染色。显影用GELOGIC200 IMAGINE SYSTEM进行扫描并以Multi-Analyst软件计算条带面积的吸光度(A)值。端粒酶活性以TPG^[3]表示:TPG=[(x-x0)/cx]/[(r-r0)/cr]×100,其中x、x0、r、r0、cx、cr

分别为标本端粒酶条带、标本热灭活后端粒酶条带、阳性对照、空白对照、内参照和阳性对照内参照的A值。其中标本热灭活即标本经85℃10 min灭活端粒酶,空白对照即不向反应体系中添加提取液,阳性对照为购买试剂盒时所配。

1.4 hTERT及hTERC mRNA表达检测

采取Trizol裂解法提取细胞总RNA,按照反转录试剂盒说明书,将提取的20 μL总mRNA反转录成cDNA,并将反应产物进行荧光定量PCR反应。PCR反应体系总体积为50 μL,包括2×UltraSYBR Mixture(With ROX)25 μL,上下游引物(10 μM)各1 μL,模板2 μL,DEPC水19 μL。反应条件为94℃预变性10 min;94℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸60 s,共35个循环;最后72℃延伸10 min。目的基因引物序列如下所示,hTERT上游:5'-GCCTTCCACCGTTCATTCTA-3',下游:5'-ACTCGCTCCGTTCCTCTTC-3',片段长度96 bp;hTERC上游:5'-GCCTTCCACCGTTCATTCTA-3',下游:5'-ACTCGCTCCGTTCCTCTTC-3',片段长度246 bp;内参GAPDH上游:5'-TCGTGGAAGGACTCATGACC-3',下游:5'-AGGATGATGTTCTGGAGAG-3',片段长度116 bp。结果以CT值输出,采用相对定量法2^{-ΔΔCT}计算。

1.5 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件对数据进行统计学分析,定量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用LSD法,关联分析用线性相关分析,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 端粒酶活性、hTERT及hTERC mRNA表达结果

CAA组、SAA组端粒酶活性和hTERT mRNA表达水平均高于对照组(P<0.01),且CAA组端粒酶活性和hTERT mRNA表达水平较SAA组升高(P<0.05)。而3组间hTERC mRNA表达水平差异无统计学意义(P=0.812)。见图1和表1。

2.2 端粒酶活性、hTERT及hTERC mRNA表达相关性分析

hTERT mRNA的表达与端粒酶活性呈正相关(r=0.660,P<0.01),hTERC mRNA的表达与端粒酶活性及hTERT mRNA表达均无明显相关性(分别P=0.193和0.746)。见图2。

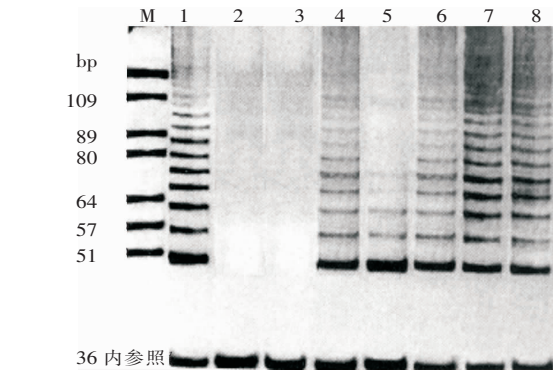


图1 端粒酶活性银染条带图 M:Marker; 1:阳性对照; 2:标本热灭活后对照; 3:空白对照; 4~5:对照组; 6:SAA 组; 7~8:CAA 组。

表 1 3 组端粒酶活性、hTERT 及 hTERC mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	hTERC	hTERT	端粒酶活性
对照组	21	1.2 ± 0.6	1.2 ± 0.7	23.5 ± 9.1
CAA 组	52	1.1 ± 0.5	9.9 ± 1.1 ^a	41.3 ± 10.3 ^a
SAA 组	13	1.2 ± 0.5	5.1 ± 0.9 ^{a,c}	31.9 ± 8.5 ^{a,b}
F 值		0.209	605.940	26.010
P 值		0.812	<0.01	<0.01

a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与 CAA 组比较, $P < 0.05$; c: 与 CAA 组比较, $P < 0.01$

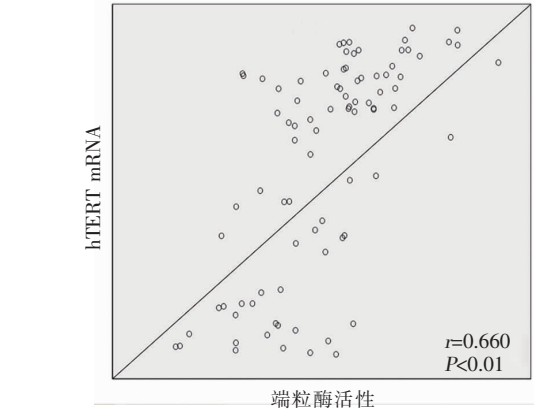


图2 hTERTmRNA 的表达与端粒酶活性相关关系图 ($n = 86$)

3 讨论

再障病因和发病机制复杂,但目前认为造血干细胞的损伤是其病理生理学改变的主要原因,表现为骨髓增生能力降低,全血细胞减少。既往研究提示 T 细胞介导的骨髓特异性自身免疫反应是其主要发病机制,如免疫调节细胞的异常^[4-5]、细胞活化信号的异常^[6]等,然而近年研究发现再障的发病表现出一定的宿主遗传易感性^[7],特别是端粒酶活性

及其相关基因表达与再障的发病机制的关系,受到越来越多研究者的关注。

端粒是真核细胞染色体末端富含 G 的 DNA 重复序列,由 DNA 及其相关蛋白组成,其功能是完成染色体末端的复制,使染色体免遭融合、重组和降解,在稳定染色体方面发挥重要作用。端粒酶是一种能延长端粒末端的核酸蛋白酶,人类端粒酶主要由 RNA 成分(hTERC)、端粒酶逆转录酶(hTERT)和相关蛋白 1(hTEP1)三部分组成,它以其自身的内源性 RNA 为模板,向端粒末端添加(qTAGGG)_n 序列,维持端粒的长度与结构完整。hTERT 作为 RNA 依赖的 DNA 聚合酶,以其 RNA 组分的碱基为模板与端粒重复序列进行碱基互补配对,在合成、延伸碱基序列中起催化作用。hTERT 只有在有端粒酶活性的细胞中,如生殖细胞、各种具有分裂增殖能力的细胞和绝大多数肿瘤细胞中表达,并与端粒酶活性呈正相关,是端粒酶起作用的关键结构和主要调控亚单位^[8]。本研究结果提示 hTERT 的表达水平与端粒酶活性高低一致,而 hTERC 的表达高低与端粒酶活性无明显相关性,说明在端粒酶的自身表达调节过程中,hTERT 和 hTERC 可能独立发挥功能,其中 hTERT 表达水平是决定端粒酶活性高低的限速步骤。

造血干细胞在表达端粒酶的情况下,随着年龄的增长其端粒仍然会丢失。因此,伴随器官的老化,端粒缩短,而端粒酶的功能缺失突变又会加剧端粒缩短。患有先天性角化不良(DC)、特发性肺纤维化(IPF)和再障的病人其端粒酶发生突变最终导致端粒缩短加速,组织器官更新能力过早丧失,其寿命也因此缩短^[9]。这些现象表明端粒长度和端粒酶活性直接影响干细胞的分化和自我更新的能力。Ball 等^[1]和 Brummendorf 等^[10]运用流式细胞术及荧光原位杂交等技术分析了再障患者外周血粒细胞和淋巴细胞的端粒长度,都发现再障患者外周血粒细胞的端粒长度较对照组明显缩短。Yamaguchi 等^[11]对 205 例再障患者外周血粒细胞的 TERT、角化不良蛋白 1 基因、非组蛋白染色体蛋白 2 基因、核仁蛋白 10 基因进行测序,提出 hTERT 杂合子突变可能通过单倍剂量不足引起端粒酶功能下降,致使端粒缩短,造血干细胞造血功能缺陷。而儿童年龄较小,造血干细胞自我更新和增生潜能较成人高,其端粒缩短程度不明显,那么再障儿童端粒酶活性及相关基因的表达水平究竟如何?

再障患者骨髓处于低增生状态,本研究结果中再障患儿骨髓端粒酶活性及 hTERT 的表达均高于

对照组。分析原因可能是:正常骨髓造血干细胞寿命一定,虽然端粒在细胞分裂过程中会不断缩短,但属于生理范围的缩短,因此端粒酶只保持较低活性状态,即所谓的生理性抑制状态。因此研究中对照组骨髓端粒酶活性处于低水平状态。但端粒若缩短加速,端粒酶则会通过提高自身活性来维持端粒长度的平衡状态^[12]。本研究中再障患儿骨髓造血干细胞端粒酶活性升高,也与端粒和端粒酶之间的这种类似“负反馈”的机制相一致。而 Ball 等^[1]研究提示端粒缩短与患者疾病持续时间存在相关性,因此再障患儿端粒酶活性则可能通过上述的负反馈机制,在自身可调控的范围内,与疾病持续时间成正相关,本研究结果也显示 CAA 患儿骨髓的平均端粒酶活性高于 SAA 患儿,考虑正是因为 CAA 患儿病程较 SAA 患儿持续长,继而端粒酶活性也有更充足的时间进行代偿性升高所致。

另外有研究显示端粒酶活性与干细胞的细胞周期密切相关,在不同细胞周期中也表现不同活性程度,其活性在细胞从 G0 期进入 S 期时被激活,在 S 期的酶活性高于 G1 及 G0/M 期^[13]。当再障患儿骨髓造血功能降低时,机体可能在一定范围通过一系列生理代偿调节机制刺激骨髓造血干细胞增殖分化,例如 B 细胞和 T 细胞的激活能上调端粒酶的活性,有可能会促使 G0/M 期细胞进入 S 期,而使测得的端粒酶活性增高,端粒酶活性增高又进一步刺激骨髓造血干细胞造血功能提高,从而减少端粒的侵蚀甚至使端粒延长^[13-14]。而也有研究证实,富集后的再障组和正常组造血干细胞进行体外集落培养,两组的集落形成无显著性差异,对造血生长因子的反应性基本相同,提示再障的前体细胞增殖分化功能与正常者相比并无显著异常^[15]。通过以上分析,提示大部分再障患儿骨髓造血干细胞端粒酶活性升高可能尚属于机体能调节的范畴。但若存在基因缺陷,随病程时间进一步延长,病情恶化而超出机体生理调节范畴,其端粒酶活性和相关基因表达如何仍值得深入研究与探索。

本研究发现再障患儿骨髓造血干细胞端粒酶活性和 hTERT mRNA 表达水平在不同分型中表现不同,提示两者可能成为反映骨髓增殖能力的指标,这对判断儿童再障临床分型及疾病转归有一定参考意义。目前再障治疗主要措施仍是免疫抑制治疗和骨髓移植,虽然随着相关科学和技术的进步,其疗效肯定^[16],但与之相关的药物毒性以及移植相关并发症却不容忽视。端粒酶活性的负反馈调节机制提示在寻找新的再障治疗方法时,可以从怎样提高端粒酶活

性的基因水平进行进一步研究,为其如何提供更安全有效的治疗路径打开新的思路。今后如何结合再障患儿骨髓的造血微环境、免疫学异常及细胞遗传学改变等,深入探讨端粒酶及其相关基因在其发病与演变中的意义,将为其进一步研究带来新的发现。

[参 考 文 献]

[1] Ball SE, Gibson FM, Rizzo S, Tooze JA, Marsh JC, Gordon-Smith EC. Progressive telomere shortening in aplastic anemia [J]. Blood, 1998, 91(10): 3582-3592.

[2] 中国小儿血液与肿瘤杂志编辑委员会. 小儿再生障碍性贫血诊疗建议[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2007, 12(5): 236-240.

[3] 申建宾, 汤静燕, 赵金彩, 潘慈, 陈静, 薛惠良, 等. 再生障碍性贫血患者骨髓造血干细胞端粒酶活性异常及其意义的初步研究[J]. 中华血液学杂志, 2001, 22(10): 543-545.

[4] Kamikozuru K, Fukunaga K, Hirota S, Hida N, Ohda Y, Yoshida K, et al. The expression profile of functional regulatory T cells, CD4⁺CD25^{high}+/forkhead box protein P3⁺, in patients with ulcerative colitis during active and quiescent disease[J]. Clin Exp Immunol, 2009, 156(2): 320-327.

[5] 王西阁, 曹伟明, 王晓格. CD4⁺CD25^{int/high}CD127^{low}调节性 T 细胞在再生障碍性贫血患儿中的检测及意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(4): 292-293.

[7] 张剑, 付蓉, 邵宗鸿. 获得性再生障碍性贫血患者遗传易感性研究进展[J]. 中华血液学杂志, 2010, 31(11): 787-789.

[8] Abdellah BM, Haack-Sorensen M, Burns JS, Elsnab B, Jakob F, Hokland P, et al. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite extensive proliferation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 326(3): 527-538.

[9] Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenital [J]. Nature, 1999, 402(6761): 551-555.

[10] Brummendorf TH, Maciejewski JP, Mak J, Young NS, Lansdorp PM. Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia [J]. Blood, 2001, 97(4): 895-900.

[11] Yamaguchi H, Calado RT, Ly H, Kajigaya S, Baerlocher JM, Chanock SJ, et al. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia [J]. N Engl J Med, 2005, 352(14): 1413-1424.

[12] Lansdorp PM. Telomeres, stem cells, and hematology [J]. Blood, 2008, 111(4): 1759-1766.

[13] Zhao YM, Li JY, Lan JP, Lai XY, Luo Y, Sun J, et al. Cell cycle dependent telomere regulation by telomerase in human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 369(4): 1114-1119.

[14] Zimmermann S, Martens UM. Telomeres, senescence, and hematopoietic stem cells [J]. Cell Tissue Res, 2008, 331(1): 79-90.

[15] 陈桂彬, 邵宗鸿, 贾海蓉, 张益枝, 郑以州, 孙娟, 等. 再生障碍性贫血患者骨髓造血干/祖细胞体外增殖分化特征的研究 [J]. 中华血液学杂志, 1999, 10: 529-531.

[16] 王西阁, 王檬, 刘松, 王晓格, 乔俊英, 曹伟明, 等. 环孢素对慢性再生障碍性贫血患儿外周血 T 调节细胞及 Foxp3 表达的影响 [J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(12): 936-939.

(本文编辑: 万静)