

重型 β -珠蛋白生成障碍性贫血患儿 hTERT 基因表达的研究

李熙鸿,唐军,郭文俊,屈艺,于凡,王晓阳,汪凤兰,母得志

(四川大学华西第二医院儿科,四川 成都 610041)

[摘要] 目的 骨髓人类端粒酶催化亚单位(hTERT)是控制人细胞端粒酶活性的限速成分,决定了细胞寿命。该研究初步探讨重型 β -珠蛋白生成障碍性贫血 hTERT 表达的变化及其与外周血红蛋白水平的关系。方法 多重等位基因特异聚合酶链反应(MASPCR)分析重型 β -珠蛋白生成障碍性贫血患儿的基因类型,半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测重型 β -珠蛋白生成障碍性贫血和粒细胞减少症患者骨髓和阳性对照 K562 细胞株的 hTERT 相对表达水平,常规检测患儿外周血血红蛋白水平。Spearman 直线相关分析 hTERT 表达与外周血血红蛋白水平的关系。结果 重型 β -珠蛋白生成障碍性贫血患儿组骨髓 hTERT 相对表达水平高于粒细胞减少症患者组(0.2928 ± 0.0838 vs 0.0993 ± 0.0336 , $P < 0.01$),但明显低于 K562 细胞株(0.8291 ± 0.0908 , $P < 0.01$)。重型 β -珠蛋白生成障碍性贫血患儿组骨髓 hTERT 表达与其外周血血红蛋白水平呈负相关($r = -0.841$, $P < 0.01$)。结论 重型 β -珠蛋白生成障碍性贫血患儿慢性溶血时,低水平血红蛋白可能在一定范围内上调骨髓 hTERT 基因表达水平。

[中国当代儿科杂志,2009,11(6):449-452]

[关键词] β -珠蛋白生成障碍性贫血;人类端粒酶催化亚单位;突变;儿童
[中图分类号] R556.6⁺1 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)06-0449-04

hTERT gene expression in children with β -thalassemia major

LI Xi-Hong, TANG Jun, GUO Wen-Jun, QU Yi, YU Fan, WANG Xiao-Yang, WANG Feng-Lan, MU De-Zhi. Department of Pediatrics, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China (Guo W-J, Email: hilixihong@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a rate-limiting enzyme which dictates the activity of human telomerase and thus decides the life span of cells. The aim of this study was to explore the expression of hTERT in bone marrow from children with β -thalassemia major and the relationship between the expression of hTERT and hemoglobin levels. **Methods** Multiple allele specific polymerase chain reaction (MASPCR) was used for targeted DNA amplification and gene mutation analysis of β -thalassemia. hTERT mRNA expression in bone marrow was examined using real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in 29 children with β -thalassemia major, in 10 children with agranulocytosis and in K562 cell line. The hemoglobin levels in peripheral blood were measured. The relationship between hTERT expression and hemoglobin levels was evaluated by the Spearman test in the β -thalassemia major group. **Results** hTERT mRNA expression significantly increased in bone marrow from children with β -thalassemia major compared with that from children with agranulocytosis (0.2928 ± 0.0838 vs 0.0993 ± 0.0336 ; $P < 0.01$), but was significantly lower than that in K562 cell line (0.8291 ± 0.0908) ($P < 0.01$). A significantly inverse correlation was found between hTERT mRNA expression and hemoglobin levels ($r = -0.841$, $P < 0.01$). **Conclusions** A low hemoglobin concentration might contribute to the up-regulation of marrow hTERT expression in children with β -thalassemia major.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (6):449-452]

Key words: β -thalassemia; Human telomerase reverse transcriptase; Mutation; Child
端粒酶由人类端粒酶催化亚单位(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)、人类端粒酶 RNA 和端粒酶相关蛋白三部分组成, hTERT 是控制人细胞端粒酶活性的限速成分^[1, 2]。在慢性 B 淋巴细胞白血病^[3]、急性淋巴细胞白血病^[4]、子宫颈癌^[5]、肺癌^[6]等恶性肿瘤研究中表明, hTERT 表达水平明显上调, 端粒酶主要是通过 hTERT 在肿瘤形成和发展中起作用的。在正常的骨髓干细胞和间充质干细胞中 hTERT 亦表现出低的表达水平^[7-9], 其表达水平明显低于血液系统恶性肿瘤细胞的水平。

[收稿日期] 2008-12-16; [修回日期] 2009-02-01
[基金项目] 国家自然科学基金(30500544); 四川省科技厅科研项目(05JY029-027-1); 四川省卫生厅科学研究基金(040037, 080032)。
[作者简介] 李熙鸿, 男, 博士, 副教授。主攻方向: 小儿遗传性疾病。
[通讯作者] 郭文俊, 女, 教授, 四川大学华西第二医院儿科, 邮编: 610041。

但是,造血干细胞在增生活跃时,hTERT 表达水平的变化及其调节机制目前并不清楚。

重型 β -珠蛋白生成障碍性贫血是一种致死性的遗传性溶血性疾病。患者骨髓处于代偿增生活跃状态。本研究以重型 β -珠蛋白生成障碍性贫血患儿骨髓为研究对象,研究其 hTERT 基因表达水平的变化及其与血红蛋白水平的关系,初步阐明 hTERT 对造血干细胞的可能调节机制。现将结果报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象

1998 年 12 月至 2003 年 9 月在我院就诊的重型 β -珠蛋白生成障碍性贫血患儿 29 例,均进行血液学检查及基因检测确诊^[10]。男 18 例,女 11 例;年龄 1.5~16.3 岁,中位年龄 7.2 岁。选择随访确诊为上呼吸道感染所致的粒细胞减少症、骨髓检查正常患儿 10 例为粒细胞减少症组,男 7 例,女 3 例,年龄 4.3~9 岁,中位年龄 7 岁。两组年龄及性别分布差异无显著性意义($P>0.05$)。选择 K562 细胞 4 株为阳性对照。

1.2 主要试剂和仪器

全自动血液分析仪 XE2100 (SYSMEX 公司)、含肝素钠真空采血管 (BD 公司)、二硫苏糖醇 (Merck 公司)、三磷酸脱氧核苷 (Promega 公司)、总 RNA 试剂盒 (GIBCO/BRL 公司)、M-MLV 逆转录盒 (GIBCO/BRL 公司)、Taq 酶 (Promega 公司)、全自动生化检测仪 H 7600 (Hitachi 公司)、ggenAmp PCR system 2400 (PE 公司)、GDS 8000 凝胶成像分析系统 (UVP 公司)、用于重型 β -珠蛋白生成障碍性贫血基因检测的 PCR 引物 (上海生工生物制品有限公司)、hTERT 引物 (GIBCO/BRL 公司)、 β -actin 引物 (GIBCO/BRL 公司)、K562 细胞株由本校分子生物学研究室提供。

1.3 实验方法

1.3.1 血液学检查 醋酸纤维膜电泳比色法测定血红蛋白 A2 (HbA2),碱变性法测定抗碱血红蛋白 (Hb),红细胞渗透脆性试验测定红细胞脆性,氰化血红蛋白法测定血红蛋白。证实有 HbF 及或 HbA2 升高后,抽取患儿及双亲的外周血各 3 mL,采用低渗法裂解红细胞后,2 500 r/min,离心 5 min,弃上清,取沉淀 -20℃ 保存,为基因检测备用。

1.3.2 β -珠蛋白生成障碍性贫血基因突变检测 多重等位基因特异聚合酶链反应 (multiple allele specific polymerase chain reaction, MASPCR) 检测 β -

珠蛋白生成障碍性贫血的突变基因类型,具体方法参见文献^[11]。

1.3.3 端粒酶催化亚单位基因表达的检测

①总 RNA 的提取:抽取重型 β -珠蛋白生成障碍性贫血患儿及粒细胞减少症组儿童的骨髓 2~4 mL,无菌肝素抗凝;一步快速热酚提取总 RNA,10 g/L 琼脂糖电泳检查总 RNA 质量。②逆转录合成 cDNA 在 25 μ L 体系中加入 5 $\times$ 缓冲液 5.0 μ L,0.1 mol/L DTT 2.5 μ L,2.5 mmol/L dNTP 5.0 μ L,250 μ g/mL 随机引物 2.0 μ L,总 RNA 2.5 μ g。对照管用 TE 缓冲液代替 RNA。95℃ 变性 3 min,4℃ 3 min。加入 200 U/ μ L M-MLV 逆转录酶 1.0 μ L。37℃ 孵育 60 min,70℃ 延伸 15 min。③PCR 扩增 hTERT 和 β -actin 引物 (GIBCO/BRL 公司) 的核苷酸序列分别如下:hTERT:上游 5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3',下游 5'-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3',扩增产物为 145 bp; β -actin:上游 5'-GGGAATTCAAACTGCAACG-GTGAAGG-3',下游 5'-GGAAGCTTATCAAAGTCCTCG-GCCACA-3',扩增产物为 98 bp。取 2 μ L 逆转录产物进行 PCR 扩增。25 μ L 扩增体系中加入 10 $\times$ Taq 缓冲液 2.5 μ L,25 mmol/L $MgCl_2$ 3.0 μ L,2.5 mmol/L dNTP 2.5 μ L,25 μ mol/L hTERT 引物各 1.0 μ L,5 U/ μ L Taq 酶 0.5 μ L 和逆转录产物 2 μ L。在内对照反应体系中,加入 25 μ mol/L β -actin 引物各 1.0 μ L。94℃ 预热 90 s 后,进入 PCR 循环:95℃ 30 s,68℃ 20 s,72℃ 40 s,33 个循环后,72℃ 延伸 7 min。PCR 产物行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳。④扩增产物分析 凝胶成像分析系统扫描,计算 hTERT/ β -actin 灰度比值表示 hTERT 基因相对表达量。

1.4 统计学分析

用 SPSS 10.0 软件进行统计分析。首先进行正态性检验。数据符合正态分布,则以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间比较采用 t 检验,hTERT 表达量与外周血血红蛋白量的关系采用 Spearman 直线相关分析,均为双侧检验, $P<0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 重型 β -珠蛋白生成障碍性贫血患儿与粒细胞减少症患儿骨髓 hTERT 表达

重型 β -珠蛋白生成障碍性贫血组 hTERT 表达水平为 0.2928 ± 0.0838 ,明显高于上呼吸道感染所致粒细胞减少症组 ($P<0.01$),但低于 K562 株的 0.8291 ± 0.0908 ($P<0.01$),见图 1,2。

2.2 重型 β-珠蛋白生成障碍性贫血患儿骨髓 hTERT 表达水平与外周血血红蛋白量的关系

为了明确重型 β-珠蛋白生成障碍性贫血患儿骨髓 hTERT 表达与外周血血红蛋白的关系,我们进行了 hTERT 表达水平与外周血血红蛋白量 Spearman 直线相关分析,结果表明 hTERT 表达水平与外周血血红蛋白量呈负相关($r = -0.841$, $P < 0.01$,图3),回归方程:hTERT 表达相对水平 = $0.623 - 0.005 \times \text{Hb}$ 。

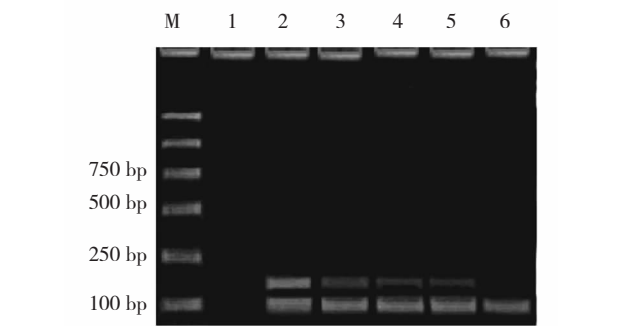


图1 不同组别细胞 hTERT mRNA 的 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析结果 M: 标准参照物 DL 2000;1: 阴性对照;2: K562 细胞株;3,4: 重型 β-珠蛋白生成障碍性贫血;5: hTERT 阳性粒细胞减少症;6: hTERT 阴性粒细胞减少症

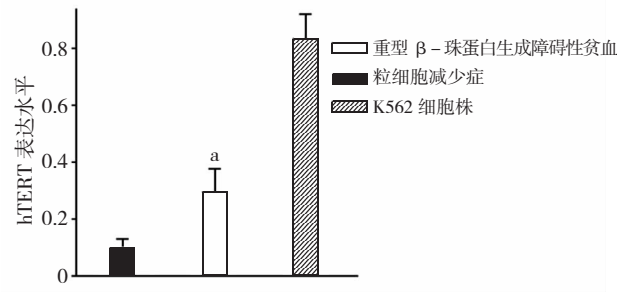


图2 重型 β-珠蛋白生成障碍性贫血与粒细胞减少症患者骨髓 hTERT 表达水平 a: 与粒细胞减少症组及 K562 细胞株比较,均 $P < 0.01$ 。

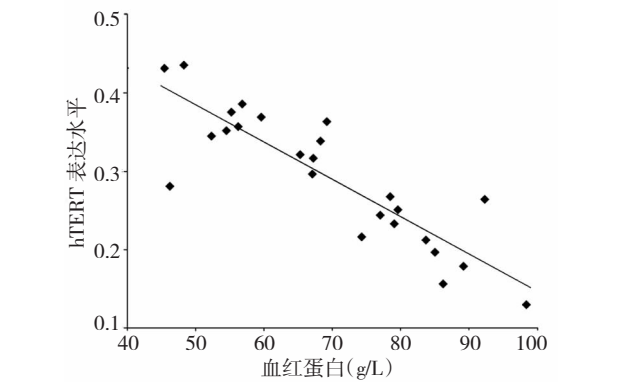


图3 重型 β-珠蛋白生成障碍性贫血患儿血红蛋白水平与 hTERT 表达的关系

3 讨论

端粒酶是一种维持和平衡端粒长度的逆转录酶,能以自身 RNA 为模板,合成(TTAGGG)_n 重复序列补充端粒在细胞分裂中的消耗,使肿瘤细胞逃脱衰老、死亡,成为永生细胞,获得无限增殖的能力。在急性白血病、神经母细胞瘤等恶性肿瘤研究中已经证明端粒酶在肿瘤形成和发展中起重要作用^[12]。值得注意的是分裂旺盛的一些正常组织细胞,如正常的干细胞,表达低的端粒酶活性,主要是部分补偿有丝分裂时染色体末端复制问题造成的端粒缩短^[13~16]。

在干细胞体外实验研究中发现^[17],干细胞快速增殖分裂阶段,端粒酶活性上调。而细胞因子如集落刺激因子、血小板生成素,可以上调端粒酶活性和 hTERT 表达水平,促进 G₀/G₁ 期干细胞进入 S 和 G₂/M 期^[17]。但对于机体在应激状态下,如重型 β-珠蛋白生成障碍性贫血导致骨髓增生时,骨髓 hTERT 表达水平是否有变化,如何变化,机体如何调节 hTERT 表达,目前仍不清楚。本研究选择重型 β-珠蛋白生成障碍性贫血和上呼吸道感染所致的粒细胞减少症患者为研究对象,半定量 RT-PCR 检测骨髓 hTERT 表达水平,结果表明重型 β-珠蛋白生成障碍性贫血患儿 hTERT 表达水平轻度上调,并且 hTERT 表达水平上调的程度与贫血的严重程度呈负相关($r = -0.841$, $P < 0.01$)。其机制可能是溶血时,低水平的血红蛋白刺激,加速肾脏促红细胞生成素的分泌;促红细胞生成素促进干细胞的增殖,即 G₀/G₁ 期干细胞进入 S 和 G₂/M 期,同时,向红系的分化,加速红细胞的生成。由于进入增殖分裂期干细胞增多,为了部分补偿有丝分裂时染色体末端复制问题造成的端粒缩短,端粒酶活性上调, hTERT 表达水平上调。另一方面,上呼吸道感染导致粒细胞减少症,粒细胞减少是由于病毒感染等原因在一定程度上抑制了骨髓的造血所致,此时,骨髓中造血干细胞进入增殖分裂期的细胞较少,端粒酶活性相对下调, hTERT 表达水平明显低于骨髓处于增生活跃的急性溶血性贫血患儿。

综上所述,我们认为机体在应激状态下,机体干细胞可以在一定程度上调节端粒酶活性和 hTERT 表达水平,以便适应内外环境的需要。同时,由于本研究未对急性溶血性贫血和粒细胞减少症患儿的 hTERT 表达与患儿骨髓增生情况的变化进行随访研究,未检测干细胞的增殖指标,因此,只能从现象上说明,确切的机制仍需要进一步研究证明。

[参 考 文 献]

[1] Kim CM, Oh YJ, Cho SH, Chung DJ, Hwang JY, Park KH, et al. Increased telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase mRNA expression in the endometrium of patients with endometriosis[J]. Hum Reprod, 2007, 22(3):843-849.

[2] Zhou C, Bae-Jump VL, Whang YE, Whang YE, Gehrig PA, Boggess JF. The PTEN tumor suppressor inhibits telomerase activity in endometrial cancer cells by decreasing hTERT mRNA levels[J]. Gynecol Oncol, 2006, 101(2):305-310.

[3] Terrin L, Trentin L, Degan M, Corradini I, Bertorelle R, Carli P, et al. Telomerase expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia predicts survival and delineates subgroups of patients with the same igVH mutation status and different outcome[J]. Leukemia, 2007, 21(5):965-972.

[4] Nowak T, Januszkiewicz D, Zawada M, Pernak M, Lewandowski K, Rembowska J, et al. Amplification of hTERT and hTERC genes in leukemic cells with high expression and activity of telomerase[J]. Oncol Rep, 2006, 16(2):301-305.

[5] Wang PH, Chen GD, Chang H, Yang SF, Han CP, Lin LY, et al. High expression of human telomerase reverse transcriptase in high-grade intraepithelial neoplasia and carcinoma of uterine cervix and its correlation with human papillomavirus infection[J]. Reproductive Science, 2007, 14(4):338-348.

[6] Lantuejoul S, Soria JC, Moro-Sibilot D, Morat L, Veyrenc S, Lorimier P, et al. Differential expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in lung tumours[J]. Br J Cancer, 2004, 90(6):1222-1229.

[7] Zimmermann S, Glaser S, Ketteler R, Waller CF, Klingmüller U, Martens UM. Effects of telomerase modulation in human hematopoietic progenitor cells[J]. Stem Cells, 2004, 22(5):741-749.

[8] Abdallah 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 [corrected] extensive proliferation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 326(3):527-538.

[9] Li XH, Qu Y, Mao M, Yu F, Li Q, Hua YM, et al. Expression of human telomerase reverse transcriptase in bone marrow CD34+ cells from patients with β -thalassemia major[J]. Transfusion, 2008, 48(8):1627-1633.

[10] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京: 科学出版社, 2007:29-35.

[11] 李熙鸿, 汪凤兰, 孙冰, 李钦伯, 李强, 王晓阳. 多重等位基因特异聚合酶链反应产前基因诊断在 β -珠蛋白合成障碍性贫血中的应用[J]. 实用儿科临床杂志, 2002, 19(6):584-586.

[12] Wang SL, Chen WT, Li SH, Li SW, Yang SF, Chai CY. Expression of human telomerase reverse transcriptase and cyclin-D1 in olfactory neuroblastoma[J]. APMIS, 2007, 115(1):17-21.

[13] Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue[J]. J Cell Biochem, 2006, 99(5):1285-1297.

[14] Yanada S, Ochi M, Kojima K, Sharman P, Yasunaga Y, Hiyama E. Possibility of selection of chondrogenic progenitor cells by telomere length in FGF-2-expanded mesenchymal[J]. Cell Prolif, 2006, 39(6):575-584.

[15] Brummendorf TH, Balabanov S. Telomere length dynamics in normal hematopoiesis and in disease states characterized by increased stem cell[J]. Leukemia, 2006, 20(10):1706-1716.

[16] Gammaitoni L, Weisel KC, Gunetti M, Wu KD, Bruno S, Pinelli S, et al. Elevated telomerase activity and minimal telomere loss in cord blood long-term cultures with extensive stem cell replication[J]. Blood, 2004, 103(12):4440-4448.

[17] Wright WE, Shay JW. Telomere biology in aging and cancer[J]. J Am Geriatr Soc, 2005, 53(9s):S292-S294.

(本文编辑:吉耕中)