

端粒及端粒酶与再生障碍性贫血免疫抑制治疗疗效的关系

宋佳音 邝丽萍 王洋 李勇华 吴九龙 张航 李力 王耀春 蒋祖军 肖扬

【摘要】 目的 观察再生障碍性贫血(AA)患者外周血单个核细胞(PBMNC)端粒长度及端粒酶活性与免疫抑制治疗(IST)疗效的关系,探讨AA发病机制及端粒长度对于评估IST疗效的意义。方法 选取2010年9月至2013年3月71例AA患者,于初诊未接受治疗时留取外周血标本3 ml。采用流式-荧光原位杂交法(flow-FISH)检测PBMNC端粒长度,采用端粒重复序列扩增-PCR-酶联免疫吸附测定法检测端粒酶活性。结果 各组PBMNC端粒长度均随患者年龄增长而缩短($b=-0.387, P=0.001$)。去掉年龄对PBMNC端粒长度影响,非重型AA(NSAA)组PBMNC端粒长度(30.957 ± 4.502)与重型AA+极重型AA组(29.510 ± 5.911)比较差异无统计学意义($P=0.573$),均短于正常对照组(51.086 ± 10.844)(P 值均 <0.01)。IST无效组患者初始PBMNC端粒长度(25.357 ± 4.848)低于正常对照组(51.086 ± 10.844),差异有统计学意义($P=0.005$),而部分有效组(30.334 ± 4.464)、完全有效组(32.808 ± 4.685)与正常对照组比较差异均无统计学意义($P=0.517, P=0.254$)。当AA患者PBMNC端粒长度低于界值点(29.21%)时,IST无效的可能性更大。PBMNC端粒酶活性NSAA组(0.234 ± 0.175)、SAA+VSAA组(0.324 ± 0.178)均高于正常对照组(0.107 ± 0.083),差异有统计学意义(P 值均 <0.01)。结论 部分AA患者PBMNC端粒长度较同龄正常人缩短、端粒酶活性相对增高,此类患者IST可能无效,应尽早调整治疗方案。端粒或可成为预测AA患者IST疗效的指标。

【关键词】 贫血,再生障碍性; 端粒; 外周血单个核细胞; 免疫抑制治疗

The relationship of telomere and telomerase activity with outcome of aplastic anemia after immunosuppressive therapy SONG Jia-yin, KUANG Li-ping, WANG Yang, LI Yong-hua, WU Jiu-long, ZHANG Hang, LI Li, WANG Yao-chun, JIANG Zu-jun, XIAO Yang. Department of Hematology, General Hospital of Guangzhou Military Command of PLA, Guangzhou 510010, China
Corresponding author: XIAO Yang, Email: jdxiao111@163.com

【Abstract】 Objective To observe the changes of telomere length and telomerase activity in patients with aplastic anemia (AA), and relationship with immunosuppressive therapy (IST) efficacy, to explore the pathogenesis of AA and the role of telomere length in evaluating immunosuppressive therapy efficacy. **Method** 71 cases of AA patients between September 2010 and March 2013 were enrolled into this study. 3 ml peripheral blood specimens from this cohort of patients were collected to test the telomere length in peripheral blood mononuclear cell (PBMNC) with flow-FISH and detect telomerase activity with TRAP-PCR-ELISA method. **Results** Telomere length and age showed negative correlation ($b=-0.387, P=0.001$) in normal control, NSAA and SAA + VSAA groups, telomere length became shorter with the growth of age, and normal control group telomere length decreased along with the age growth slightly greater than the other two groups (NSAA, SAA+VSAA). Besides the effect of age on telomere length, no significant difference was observed between NSAA and SAA+VSAA groups ($P=0.573$), and NSAA, SAA+VSAA ($30.957\pm 4.502, 29.510\pm 5.911$) groups were significantly shorter than normal control group (51.086 ± 10.844) ($P<0.01$). Telomere length in NR group (25.357 ± 4.848) was significantly lower than normal control group (51.086 ± 10.844) ($P=0.005$), telomere length in CR (32.808 ± 4.685)/PR groups (30.334 ± 4.464) compared with normal control group had no significant difference ($P=0.517, P=0.254$). Telomere length below 29.21% obviously decreased outcomes of IST. Telomerase activity had significant

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2013.09.008

基金项目:国家自然科学基金(81101471/H1602);全军医学科学技术研究“十二五”重点课题(BWS11J071)

作者单位:510010 广东,广州军区广州总医院血液科

通信作者:肖扬, Email: jdxiao111@163.com

difference ($\chi^2=20.385, P<0.01$). The telomerase activity had no significant difference in terms of age and gender in three groups, multiple comparison found that telomerase activities in SAA+VSAA (0.324 ± 0.178) ($P<0.01$), and NSAA (0.234 ± 0.175) groups ($P=0.002$) were significantly higher than normal control group (0.107 ± 0.083). **Conclusion** Telomere length of PBMNC in AA patients was significantly shortened than normal control group with telomerase activity increased, and telomere shortened more apparently in NR group, these patients should adjust the treatment as early as possible. Telomeres could predict the curative effect of IST.

【Key words】 Anemia, aplastic; Telomere; Mononuclear cell, peripheral blood; Immunosuppression

端粒是真核细胞线性染色体的末端,由DNA 3'端的6个核苷酸短串联重复序列(5'-TTAGGG-3')及其互补序列构成。端粒为非结构基因,不编码蛋白质,是细胞进化过程中一段高度保守的序列,可保护染色体不被核酸酶降解、防止染色体末端相互融合、维持染色体完整^[1-5]。端粒长度缩短和端粒酶相关基因突变可以导致造血干细胞衰老,是骨髓衰竭性疾病的发病原因之一^[3]。

再生障碍性贫血(AA)是最常见的骨髓衰竭性疾病,主要表现为骨髓造血功能低下、全血细胞减少和“贫血、出血、感染”征候群^[6]。AA病因及发病机制极为复杂,呈现高度异质性,传统观点认为其发病机制可以归纳为“种子、土壤、虫子”学说即造血干细胞质和量的异常、造血微环境的异常以及免疫功能紊乱,但三者是否存在相关性,哪一个主要的病因,目前并没有确定的结论^[7-9]。近年来主流观点认为AA是一种以造血干细胞为靶向的自身免疫性疾病,主要为T细胞的功能异常^[6,9-12]。对于重型AA(SAA)、极重型AA(VSAA)患者,若无合适的同胞供者则应以免疫抑制治疗(IST)为主,约70%的患者经IST获得改善^[6,10-11],治疗有效的患者5年生存率达到80%~90%^[8,10]。而仍有约30%的患者IST无效,这部分患者发病机制可能另有原因^[9,13]。近年来研究发现AA的发病表现出一定的宿主遗传易感性^[7],特别是端粒长度缩短、端粒酶相关基因突变与AA的关系已逐渐受到人们关注^[14]。我们对71例AA患者外周血单个核细胞(PBMNC)端粒长度及端粒酶活性进行了检测,观察其变化及与IST疗效的关系,现报道如下。

病例和方法

1. 病例:2010年9月至2013年3月我院及广州市第一人民医院、广州市第十二人民医院、广东药学院第一附属医院、中山大学附属第一医院等多家医院血液科确诊的71例AA患者,男36例,女35例,

中位年龄33(12~82)岁。诊断标准及分型符合2009年英国AA诊疗指南^[15],其中非重型AA(NSAA)组35例,SAA+VSAA组36例(SAA组26例,VSAA组10例)。于初诊未治疗时留取外周血标本3 ml(EDTA抗凝)。正常对照组为性别及年龄相匹配的34名健康志愿者,男17名,女17名,中位年龄42.5(10.0~73.0)岁,留取外周血标本3 ml(EDTA抗凝)。本研究征得患者本人或家属知情同意。

2. IST治疗方案及疗效标准:兔抗人胸腺细胞球蛋白(ATG)联合环孢素(CsA):ATG $3.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 5 \text{ d}$,静脉滴注;CsA $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,分2次口服,连续6个月,并定期监测CsA血药浓度,根据血药浓度及不良反应调整剂量。患者接受IST3个月后评估疗效。根据英国AA诊疗指南^[15],IST疗效分为:完全有效(CR)、部分有效(PR)、无效(NR)。

3. 主要试剂及仪器:MACS Quant流式细胞仪购于德国Miltenyi公司;Telomere PNA试剂盒/FITC for Flow Cytometry试剂盒为丹麦DAKO公司产品;人类急性淋巴母细胞白血病细胞株MOLT-4细胞购于中国医学科学院肿瘤医院, P3代;淋巴细胞分离液Ficoll购于天津灏洋生物制品公司;FBS、RPMI 1640均购于美国Gibco公司;端粒重复序列扩增-PCR-酶联免疫吸附测定(TRAP-PCR-ELISA)试剂盒为美国Roche公司产品。

4. 流式-荧光原位杂交法(flow-FISH)检测细胞端粒长度:密度梯度离心法分离PBMNC,加PBS重悬,调整细胞密度为 $2 \times 10^6/\text{ml}$,为样本细胞。取MOLT-4细胞悬液,调整细胞密度为 $2 \times 10^6/\text{ml}$,为内对照细胞。按照Telomere PNA试剂盒/FITC for Flow Cytometry试剂盒说明书进行操作,计算相对端粒长度(relative telomere length, RTL)。

5. TRAP-PCR-ELISA法检测端粒酶活性:端粒酶能够以自身RNA为模板,逆转录合成TTAGGG序列,采用PCR法进行端粒重复序列扩增(TRAP): $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 min, 1个循环; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min, 1个循环; $94 \text{ }^\circ\text{C}$

30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 90 s, 共30个循环; 72 °C 10 min, 1个循环。生成特异的6核苷酸产物。将产物变性与地高辛标记的端粒特异探针杂交固定, 与抗地高辛过氧化物酶结合, TMB显色, 酶标仪检测450 nm波长处吸光度(A)值。当阴性对照相对端粒酶活性(relative telomerase activity, RTA) < 0.25, 阳性对照(人肾癌细胞株293)RTA > 1.5认为反应体系合理, RTA > 0.2为端粒酶阳性。按照试剂盒说明书计算样品RTA计算。

6. 统计学处理: 应用SPSS16.0软件统计分析数据, 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多因素分析应用线性回归; 多组间比较采用单因素方差分析, 当方差不齐时采用近似F检验Welch法; 多重比较时方差齐采用LSD法, 方差不齐采用Dunnett' T3检验。计数资料以百分率表示, 组间比较采用卡方检验或Fisher精确概率检验。检验水准 $\alpha=0.05$, 双侧检验。

结 果

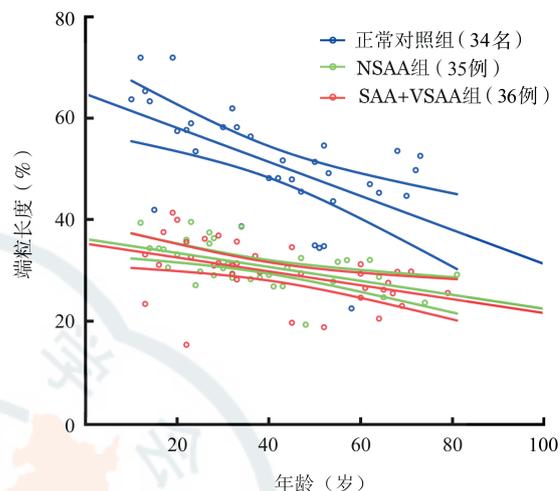
1. 端粒长度与相关因素(年龄、性别、诊断)的关系: 不同性别患者PBMNC端粒长度差异无统计学意义($t=0.548, P=0.585$); 端粒长度与患者年龄呈负相关($b=-0.387, P=0.001$)。正常对照组端粒长度随年龄增长下降幅度均大于NSAA组(截距: $F=152.182, P<0.01$; 斜率: $F=4.730, P=0.033$)和SAA+VSAA组(截距: $F=142.585, P<0.01$; 斜率: $F=4.731, P=0.033$), 差异均有统计学意义。NSAA组与SAA+VSAA组的变化趋势一致, 差异无统计学意义(截距: $F=0.642, P=0.426$; 斜率: $F=0.000, P=0.991$) (表1、图1)。多重比较发现NSAA、SAA+VSAA组PBMNC端粒长度均短于正常对照组, 差异均有统计学意义(P 值均<0.01), NSAA与SAA+VSAA组比较差异无统计学意义($P=0.573$) (表2)。

2. AA患者端粒长度与IST疗效的关系: 35例

表1 71例再生障碍性贫血患者外周血单个核细胞相关因素与端粒长度的线性回归分析

变量	回归系数	标准误	t值	P值
诊断	13.165	3.486	3.777	0.000
性别	2.313	4.217	0.548	0.585
性别*诊断	1.134	1.956	0.580	0.563
年龄*诊断	0.103	0.051	2.015	0.047
年龄(岁)	0.387	0.112	3.450	0.001

注: 性别*诊断: 表示性别与诊断的交互作用; 年龄*诊断: 表示年龄与诊断的交互作用



NSAA: 非重型AA; SAA: 重型AA; VSAA: 极重型AA

图1 再生障碍性贫血(AA)患者外周血单个核细胞相对端粒长度与患者年龄关系的散点图

表2 不同组再生障碍性贫血(AA)患者外周血单个核细胞端粒长度的多重比较(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	相对端粒长度
正常对照组	34	51.086±10.844
NSAA组	35	30.957±4.502 ^a
SAA+VSAA组	36	29.510±5.911 ^a

注: 与正常对照组相比, ^a $P<0.01$; NSAA: 非重型AA; SAA: 重型AA; VSAA: 极重型AA

NSAA患者中CR 14例(40.0%), PR 16例(45.7%), NR 5例(14.3%); 36例SAA+VSAA患者中CR 11例(30.6%), PR 16例(44.4%), NR 9例(25.0%), 不同性别患者间的疗效差异无统计学意义($\chi^2=2.398, P=0.302$), NSAA组与SAA+VSAA组间疗效差异无统计学意义($\chi^2=1.489, P=0.475$)。患者年龄对疗效有影响, 差异有统计学意义($F=3.138, P=0.050$), 调整了年龄对端粒长度的影响, 不同疗效组与对照组间端粒长度差异有统计学意义($F=4.615, P=0.003$), NR组端粒长度低于正常对照组、PR组及CR组(P 值均<0.01), 差异均有统计学意义; PR组、CR组与正常对照组比较差异均无统计学意义($P=0.517, P=0.254$), PR、CR组端粒长度比较差异无统计学意义($P=0.595$) (表3)。采用ROC曲线法寻找端粒长度界值点来预测IST无效的可能性, 结果显示AA患者外周血端粒长度界值点为29.21%(灵敏度为71.9%, 特异度为85.7%), ROC曲线下面积为0.832(95% CI 0.727~0.937, $P<0.01$) (图2)。

3. 不同诊断组PBMNC端粒酶活性的比较: 随

表 3 不同疗效再生障碍性贫血(AA)患者外周血单个核细胞端粒长度的组间比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	相对端粒长度(%)	
		调整年龄前	调整年龄后
正常对照组	34	51.086±10.844	0±8.773
AA 患者	71	30.224±5.277	0±4.576
无效	14	25.357±4.848	-4.914±5.109 ^a
部分有效	32	30.334±4.464	0.869±3.480
完全有效	25	32.808±4.685	1.639±3.662
F 值			4.615
P 值			0.003

注: ^a与正常对照组比较, $P<0.05$

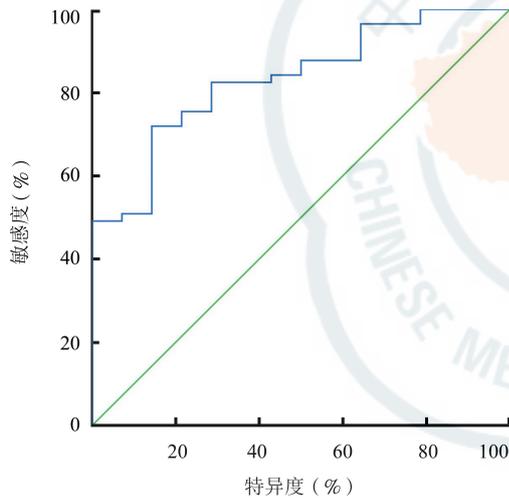


图 2 根据细胞端粒长度预测再生障碍性贫血患者 IST 疗效的 ROC 曲线图

机选取 NSAA 患者 23 例、SAA+VSAA 患者 28 以及例正常对照 34 名,检测端粒酶活性,各组年龄和性别差异均无统计学意义 ($F=0.605, P=0.548; F=0.0522, P=0.770$)。正常对照组中阳性 6 例(17.6%), NSAA 组中阳性 11 例(47.8%), SAA+VSAA 组中阳性 21 例(75.0%)。部分正常人 PBMNC 虽然有端粒酶活性表达,但是表达的水平较低(0.107 ± 0.083),处于所用试剂盒检测的临界水平。多重比较显示各组之间 PBMNC 的端粒酶阳性率差异有统计学意义($\chi^2=20.555, P<0.01$),而且端粒酶活性差异亦有统计学意义($F=20.385, P<0.01$)。SAA+VSAA 组($P<0.01$)、NSAA 组($P=0.002$)端粒酶活性均高于正常对照组,为正常对照组的 2~3 倍(表 4)。

讨 论

1998 年 Ball 等^[13]采用末端限制片段长度(TRF)检测法,发现正常人外周血白细胞端粒随年龄增长

表 4 不同组再生障碍性贫血(AA)患者间外周血单个核细胞端粒酶活性的多重比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	端粒酶活性	端粒酶阳性	端粒酶阴性
			[例(%)]	[例(%)]
正常对照组	34	0.107±0.083	6(17.6)	28(82.4)
NSAA 组	23	0.234±0.175 ^a	11(47.8) ^a	12(52.2)
SAA+VSAA 组	28	0.324±0.178 ^a	21(75.0) ^a	7(25.0)
F/ χ^2 值		20.385	20.555	
P 值		< 0.01	< 0.01	

注:与正常对照组相比, ^a $P<0.01$; NSAA:非重型 AA; SAA:重型 AA; VSAA:极重型 AA

逐渐缩短,约 216 bp/岁,而 AA 患者的外周血白细胞端粒长度在此基础上较同年龄对照组缩短更加明显。Calado 等^[1, 16]采用 qPCR 法检测发现 AA 患者多伴有外周血白细胞端粒显著缩短,部分端粒缩短的患者存在端粒酶相关基因突变, TERT 基因突变约占 4%、TERC 基因突变约占 4%,这类存在基因突变的患者更易发生恶性克隆性疾病。2009 年英国 AA 诊断治疗指南也提到,若临床表现特殊或对免疫抑制治疗无效,患者应行外周血先天性角化不良基因突变的分析,如 DKC1、TERC、TERT^[15]。但目前突变检测费用高,阳性率极低,文献报道检测 210 例 AA 患者有 3 例 TERC 突变^[14],检测 124 例 AA 中有 5 例 TERT 突变^[17]。且有研究发现即使存在端粒酶复合体相关基因突变也不一定会导致 AA 发生,很多例 AA 患者亲属也有 TERC、TERT 或其他基因突变,但没有 AA 的临床症状,而表现为肺纤维化、肝硬化或先天性角化不良^[18]。

既往 AA 患者的检测标本多为外周血白细胞或粒细胞,刘博等^[19]应用 flow-FISH 法发现骨髓衰竭患者不同白细胞亚群间端粒缩短存在差异。由于标本选取及测量方法不同,报道结果也不尽相同。AA 患者粒细胞大多缺乏,因此我们选取 PBMNC 作为标本。既往端粒长度检测方法多为 Southern blot 法^[13],结果为端粒 TRF,它代表了患者外周血中所有有核细胞端粒长度的平均值,包含了所有染色体端粒的长度外,还包括部分亚端粒区长度,因此 TRF 法不能提供端粒的实际长度,已逐渐被其他方法代替。本研究中我们选取近年来新发展的 flow-FISH 法检测端粒长度,它是一种利用端粒特异性探针,与 Southern blot、qPCR 等有很好的相关性,且所需样品量少(细胞数少于 10^5 个),灵敏度高,可以检测出小于 3 kb 的端粒长度,操作快捷,特异性强,重复性好,且加入了内对照细胞,使内对照细胞与待

测细胞在同一流式管中,全程经过相同处理,弥补因G₀/G₁期细胞DNA指数不同在杂交时对结果产生的影响,大大提高了flow-FISH检测端粒长度的准确性^[20]。

本研究中我们发现AA患者PBMNC端粒长度与对照组相比显著缩短,患者初诊时不同疾病程度比较端粒长度差异无统计学意义,IST后按疗效分组,再次比较初诊时的端粒长度发现,NR组患者端粒长度显著短于对照组,亦显著低于PR、CR组。本组病例IST后3个月时疗效达80%;已接近文献报道的IST平均水平^[9-10],因部分AA患者疗效可能在6个月后显现并且部分患者IST后存在复发可能^[21],如果延长随访观察时间,其疗效可能有一定程度变化,但由于端粒并非IST作用靶点,端粒长度主要受端粒延长机制及端粒旁路机制调解^[2-4, 22],有文献报道以端粒酶为靶点抑制白血病细胞端粒酶活性,推测可能影响端粒长度^[23-24]。但尚无文献证实IST可以改变端粒长度。因此可推测IST后端粒长度变化可能性较小,本研究中我们观察不同端粒水平的AA患者对IST的反应,结果提示IST疗效可能受其AA端粒长度的影响,即AA患者端粒长度可能与IST疗效相关,可作为预测IST疗效的指标。也有研究者发现端粒长度较短的AA患者IST治疗后容易复发,提示端粒长度可作为IST治疗AA后预测复发的指标^[16, 21]。

另外,随年龄增长各组端粒长度均逐渐缩短,我们观察发现,NSAA、SAA+VSAA组端粒长度随年龄增长下降幅度要低于正常对照组,推测可能与AA患者端粒酶活性增高有关。众所周知,人类大多数成熟体细胞缺乏端粒酶活性,端粒酶阳性主要表达在:①特殊的生殖细胞系;②胚胎和成体干细胞(包括造血干细胞);③高度增殖的细胞,如上皮细胞、活化的淋巴细胞、月经期的子宫内膜组织;④绝大多数肿瘤细胞^[25]。高度增殖的恶性肿瘤细胞端粒酶活性增高,而AA是一种骨髓衰竭性疾病,其骨髓增生能力显著降低,为何AA患者细胞端粒酶活性不低反高,这与其低增生状态并不一致。国外研究发现,正常人T、B淋巴细胞有低水平的端粒酶活性,意义在于维持免疫反应细胞的无限增殖能力^[26]。抗原刺激后,淋巴细胞的端粒酶活性也有一定程度的升高^[27-28]。有研究应用TRAP-银染法对儿童AA骨髓单个核细胞端粒酶活性检测发现增高至正常对照组的2倍^[29]。本研究中我们发现正常人PBMNC中亦有端粒酶活性表达,只是表达的水平

较低,处于试剂盒检测临界值,AA患者端粒酶活性为正常对照组的2~3倍。结合以上研究,我们推测AA患者端粒酶活性增加可能与以下三种机制有关:①负反馈调节作用:正常骨髓造血干细胞生存期寿命有限,虽然端粒长度随细胞分裂而逐渐缩短,但属于生理范围的缩短,端粒酶处于生理性抑制状态,端粒酶只保持较低活性状态^[5]。若端粒缩短加速,端粒酶则会通过提高自身活性以补充端粒的额外丢失,维持端粒长度的平衡状态^[30]。②骨髓的生理代偿机制:造血干细胞中,除G₀期CD34⁺细胞的端粒酶阴性外,其余的干细胞均为阳性,CD34⁺CD38⁺细胞端粒酶活性高于CD34⁺CD38⁻细胞,当细胞G₀期进入S期时端粒酶活性被激活。AA患者CD34⁺造血干细胞减少,代偿机制使端粒酶活性升高,促进干细胞的增殖分化^[26, 31]。③机体免疫激活状态,AA患者免疫功能紊乱^[32],T、B淋巴细胞增殖活跃,PBMNC的端粒酶活性随之增高。

综上所述,部分AA患者PBMNC端粒长度明显缩短,此类患者IST可能无效,应尽早调整治疗方案;临床可通过检测AA患者端粒长度、有条件时进行端粒突变检测,来选择适合IST的患者;端粒长度可作为预测IST疗效的指标。

参考文献

- [1] Calado RT. Telomeres and marrow failure. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2009:338-343.
- [2] Grandin N, Charbonneau M. Protection against chromosome degradation at the telomeres. *Biochimie*, 2008, 90:41-59.
- [3] Calado RT, Young NS. Telomere maintenance and human bone marrow failure. *Blood*, 2008, 111:4446-4455.
- [4] Gilson E, Géli V. How telomeres are replicated. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8:825-838.
- [5] Lansdorff PM, Poon S, Chavez E, et al. Telomeres in the haemopoietic system. *Ciba Found Symp*, 1997, 211: 209-218; discussion 219-222.
- [6] Young NS, Scheinberg P, Calado RT. Aplastic anemia. *Curr Opin Hematol*, 2008, 15: 162-168.
- [7] 赵馨, 张凤奎. 获得性再生障碍性贫血免疫发病机制研究进展. *中华血液学杂志*, 2008, 29:353-356.
- [8] Young NS. Acquired aplastic anemia. *Ann Intern Med*, 2002, 136:534-546.
- [9] Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood*, 2006, 108:2509-2519.
- [10] Risitano AM, Perna F. Aplastic anemia: immunosuppressive therapy in 2010. *Pediatr Rep*, 2011, 3 Suppl 2:e7.
- [11] Kojima S, Frickhofen N, Deeg HJ, et al. Aplastic anemia. *Int J*

- Hematol, 2005, 82: 408-411.
- [12] Brümmendorf TH, Maciejewski JP, Mak J, et al. Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia. *Blood*, 2001, 97: 895-900.
- [13] Ball SE, Gibson FM, Rizzo S, et al. Progressive telomere shortening in aplastic anemia. *Blood*, 1998, 91: 3582-3592.
- [14] Yamaguchi H, Baerlocher GM, Lansdorp PM, et al. Mutations of the human telomerase RNA gene (TERC) in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood*, 2003, 102: 916-918.
- [15] Marsh JC, Ball SE, Cavenagh J, et al. Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anaemia. *Br J Haematol*, 2009, 147: 43-70.
- [16] Calado RT, Cooper JN, Padilla-Nash HM, et al. Short telomeres result in chromosomal instability in hematopoietic cells and precede malignant evolution in human aplastic anemia. *Leukemia*, 2012, 26: 700-707.
- [17] Yamaguchi H, Calado RT, Ly H, et al. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *N Engl J Med*, 2005, 352: 1413-1424.
- [18] Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 2007, 356: 1317-1326.
- [19] 刘博, 韩冰, 汪玄, 等. 中国北方人群获得性骨髓衰竭综合征患者端粒酶基因突变的研究. *中华血液学杂志*, 2009, 30: 808-811.
- [20] Kakazu N, Kito K, Hitomi T, et al. Characterization of complex chromosomal abnormalities in B-cell lymphoma by a combined spectral karyotyping (SKY) analysis and fluorescence in situ hybridization (FISH) using a 14q telomere probe. *Am J Hematol*, 2000, 65: 291-297.
- [21] Scheinberg P, Cooper JN, Sloand EM, et al. Association of telomere length of peripheral blood leukocytes with hematopoietic relapse, malignant transformation, and survival in severe aplastic anemia. *JAMA*, 2010, 304: 1358-1364.
- [22] Ducrest AL, Szutorisz H, Lingner J, et al. Regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Oncogene*, 2002, 21: 541-552.
- [23] 肖扬, 张涇, 何冬梅. hTR反义寡核苷酸对急性白血病原代细胞端粒酶活性及凋亡的影响. *广东医学*, 2004, 25: 1379-1381.
- [24] 肖扬, 张涇. 端粒酶hTR反义寡核苷酸对K562细胞端粒酶活性的影响. *临床血液学杂志*, 2003, 16: 23-25.
- [25] Greider CW. Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 90-92.
- [26] Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, et al. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol*, 1995, 155: 3711-3715.
- [27] Suzu S, Yanai N, Sato-Somoto Y, et al. Characterization of macrophage colony-stimulating factor in body fluids by immunoblot analysis. *Blood*, 1991, 77: 2160-2165.
- [28] Motoyoshi K, Yoshida K, Hatake K, et al. Recombinant and native human urinary colony-stimulating factor directly augments granulocytic and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production of human peripheral blood monocytes. *Exp Hematol*, 1989, 17: 68-71.
- [29] 申建宾, 汤静燕, 赵金彩, 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. *中华血液学杂志*, 2001, 22: 543-545.
- [30] Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Telomere dynamics and cytogenetic changes in human hematologic neoplasias: a working hypothesis. *Cancer Genet Cytogenet*, 1997, 94: 67-72.
- [31] Engelhardt M, Kumar R, Albanell J, et al. Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells. *Blood*, 1997, 90: 182-193.
- [32] 赵艳明, 张强. 骨髓造血干/祖细胞及CD4⁺/CD8⁺比值联合测定在再生障碍性贫血患者诊疗中的价值. *实用医学杂志*, 2011, 27: 1347-1349.

(收稿日期:2013-03-30)

(本文编辑:刘爽)

读者·作者·编者

本刊对图表的要求

作者投稿时,原稿中若有图(表),每幅图表应随内容排入相应段落,并另外将图表中附于文后1份,分别按其在正文中出现的先后次序连续编码。每幅图表应冠有图(表)题。说明性的文字应置于图(表)下方注释中,并在注释中标明图表中使用的全部非公知公用的缩写下词汇的全称。线条图高宽比例以5:7为宜。以计算机制图提供激光打印图样。照片图要求有良好的清晰度和对比度;图中需标注的符号(包括箭头)请用另纸标上,不要直接标注在照片上。每幅图的背面应贴上标签,注明图号、方向及作者姓名。若刊用人像,应征得本人的书面同意,或遮盖其能被辨认出系何人的部分。大体标本照片在图内应有尺度标记。病理照片要求注明染色方法和放大倍数。图表中如有引自他刊者,应注明出处。电子版投稿中图片建议采用JPG格式。

关于表格,建议采用三横线表(顶线、表头线、底线),如遇有合计和统计学处理内容(如 t 值、 P 值等),则在此此行上面加一条分界横线;表内数据要求同一指标有效位数一致,一般按标准差的1/3确定有效位数,统计数据要有样本数。

本刊编辑部