

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.04.013

论著·临床研究

## 慢性再生障碍性贫血患儿端粒长度及端粒酶基因突变的研究

王西阁<sup>1</sup> 王璇<sup>1</sup> 刘松<sup>2</sup> 周玉洁<sup>1</sup> 王丹凤<sup>3</sup>

(1. 郑州大学第三附属医院儿内科, 河南 郑州 450052;  
2. 郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450052; 3. 洛阳市中心医院, 河南 洛阳 471000)

**[摘要]** **目的** 探讨慢性再生障碍性贫血(CAA)患儿外周血白细胞端粒长度变化及端粒酶 TERC、TERT 基因突变。**方法** 将 69 例 CAA 患儿分为未经免疫抑制治疗(IST)组( $n=24$ )、IST 有效组( $n=36$ )和 IST 无效组( $n=9$ ),另选取 35 例健康儿童为对照组,采用实时荧光定量 PCR 方法分别检测 4 组儿童外周血白细胞端粒长度相对 T/S 比率;PCR 法对 69 例患儿进行端粒酶 TERT 及 TERC 基因突变筛查。**结果** 未经 IST 组及 IST 无效组端粒长度相对 T/S 比率较对照组和 IST 有效组小(均  $P<0.01$ ),IST 有效组端粒长度相对 T/S 比率与对照组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),所有患儿均未发现 TERC 及 TERT 常见基因突变位点的突变。**结论** CAA 患儿端粒长度的改变可能与其发病及发展过程有关;端粒检测在 CAA 患儿中可能可以成为一种评价预后的指标。  
[中国当代儿科杂志, 2014, 16(4): 375-379]

**[关键词]** 再生障碍性贫血;端粒;端粒酶;突变;儿童

### Telomere length and telomerase mutations in peripheral blood leukocytes of children with chronic aplastic anemia

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

**Abstract: Objective** To investigate the change in telomere length and TERC and TERT mutations in peripheral blood leukocytes of children with chronic aplastic anemia (CAA). **Methods** Sixty-nine children with CAA were divided into untreated group ( $n=24$ ) who did not receive immunosuppressive therapy (IST), response group ( $n=36$ ) who showed response to IST, and non-response group ( $n=9$ ) who showed no response to IST; another 35 healthy children matched for age and sex were selected as the control group. The telomere-to-single copy gene (T/S) ratio in peripheral blood leukocytes was measured by real-time PCR in all groups. PCR was performed to detect TERC and TERT mutations in all children with CAA. **Results** The untreated and non-response groups had significantly lower T/S ratios than the control and response groups ( $P<0.01$ ), whereas there was no significant difference in T/S ratio between the response and control groups ( $P>0.05$ ). TERC and TERT mutations were not found in all children with CAA. **Conclusions** The change in telomere length in children with CAA may be related to the development and progression of disease. Telomere length measurement may be used as a prognostic indicator in children with CAA.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(4): 375-379]

**Key words:** Aplastic anemia; Telomere; Telomerase; Mutation; Child

近年来,端粒、端粒酶与细胞衰老、癌变及 DNA 修复的密切关系逐渐引起国内外学者的关注。再生障碍性贫血(简称再障)是常见的骨髓衰竭性疾病,既往研究表明,携带端粒酶基因突变的

再障患者端粒酶活性下降,外周血单个核细胞端粒长度缩短<sup>[1]</sup>。而儿童造血骨髓容量相对多于成人,且骨髓造血功能代偿能力较强,实验显示,再障患儿骨髓造血干细胞端粒酶活性升高<sup>[2]</sup>,那么其有

无端粒酶基因突变,外周血端粒长度的变化如何,本文拟就此进行初步研究,旨在探讨再障患儿端粒长度变化及意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选取2011年6月至2013年6月于郑州大学第一附属医院及第三附属医院就诊的慢性再障患儿69例为研究对象,其中初次确诊且未接受免疫抑制治疗(immunosuppressive therapy, IST)者24例(未经IST组),男10例,女14例,年龄3~13岁,平均年龄 $7.7 \pm 2.8$ 岁;接受IST后基本治愈、缓解及明显进步患儿36例(IST有效组),男19例,女17例,年龄4~16岁,平均年龄 $7.9 \pm 2.6$ 岁,中位随访时间16个月(6~33个月);接受IST后无效(一般指经1年以上治疗无明显进步)者9例(IST无效组),男5例,女4例,年龄5~14岁,平均年龄 $8.2 \pm 2.9$ 岁,中位随访时间18个月(8~36个月)。诊断标准及疗效标准参考《小儿再生障碍性贫血诊疗建议》<sup>[3]</sup>,3组患儿在性别、年龄、病程、血象等方面比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$ ),具有可比性。随机选择同期于郑州大学第三附属医院进行体检的年龄及性别匹配的健康儿童35例为对照组,男19例,女16例,年龄3~16岁,平均年龄 $7.4 \pm 3.1$ 岁。所有研究对象取外周静脉血2 mL, EDTA抗凝,置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

### 1.2 治疗方案

本研究中患儿采用的治疗方案为免疫抑制剂(环孢素A)与雄激素(司坦唑醇)联合治疗,用药方法如下:环孢素A(田可) $3\sim 5\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ ,分2次口服,定期监测血药浓度,维持在 $200\sim 400\text{ ng/L}$ ;司坦唑醇(康力龙) $0.1\sim 0.3\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ ,分2次口服。有出血倾向的患儿给予醋酸泼尼松 $0.5\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ ,分2~3次口服。治疗期间定期复查血常规、网织红细胞、肝肾功能,对有感染、严重贫血或出血者酌情应用抗生素,输注红细胞或血小板。IST有效组1例患儿治疗中曾接受免疫抗人胸腺细胞免疫球蛋白针(ATG)(即复宁)治疗,剂量为 $0.25\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ ,连续应用5 d。

### 1.3 主要试剂及仪器

Blood Genome DNA Extraction 试剂盒和SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 试剂盒均购自大连 TaKaRa 有限公司;  $2\times$  Taq PCR Master Mix 购自上海莱枫生物科技有限公司;引物由上海 invitrogen 生物技术有限公司设计合成;  $1\times$  TE buffer (pH=8.0)、异丙醇、乙醇由实验室提供。实时荧光定量PCR仪为ABI Prism<sup>®</sup>7500型荧光定量PCR仪(应用系统生物公司,美国)。

### 1.4 端粒长度检测

#### 1.4.1 外周血基因组DNA提取及标准品制备

取EDTA抗凝血2 mL,严格按照试剂盒步骤提取外周血基因组DNA,利用Nanodrop1000分光光度计测定DNA浓度及纯度,所有样品OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>在1.6~1.9之间,取任一正常组DNA作为标准品,按2倍浓度比依次稀释为 $100\text{ ng}/\mu\text{L}$ 、 $50\text{ ng}/\mu\text{L}$ 、 $25\text{ ng}/\mu\text{L}$ 、 $12.5\text{ ng}/\mu\text{L}$ 、 $6.25\text{ ng}/\mu\text{L}$ 五个系列<sup>[4]</sup>,采用 $1\times$  TE buffer将其余样品DNA浓度调整至 $10\text{ ng}/\mu\text{L}$ ,所有DNA样本放入 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待测。

#### 1.4.2 端粒长度的测量

利用实时荧光定量PCR(Real-Time-PCR)测定相对端粒长度,PCR反应分为两部分,分别检测样品端粒(tel)及内参36B4基因PCR扩增的Ct值。每次反应均设标准曲线,每样品设3个复孔。参照文献<sup>[5]</sup>设计引物序列如下:tel-F: 5'-CGGTTTGGT-TTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT-3', tel-R: 5'-GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT-3', 产物片段长度: 76 bp; 36B4-F: 5'-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3', 36B4-R: 5'-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3', 产物片段长度: 63 bp。反应体系为 $20\text{ }\mu\text{L}$ :  $2\times$  SYBR Premix Ex Taq  $10\text{ }\mu\text{L}$ , ROX Reference Dye  $0.4\text{ }\mu\text{L}$ , 样品DNA  $3\text{ }\mu\text{L}$ , 端粒长度扩增引物( $10\text{ }\mu\text{M}$ ): tel-F  $0.6\text{ }\mu\text{L}$ , tel-R  $1\text{ }\mu\text{L}$ ; 内参基因上下游引物( $10\text{ }\mu\text{M}$ )均为 $0.4\text{ }\mu\text{L}$ , 用去离子水调整终体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件:  $95^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s;  $95^{\circ}\text{C}$ 变性5 s,  $60^{\circ}\text{C}$ 退火34 s, 40个循环。

采用荧光定量PCR仪配套软件,分别确定样品端粒及内参36B4基因PCR扩增的Ct值,在定量PCR中端粒(T)重复拷贝的比率同单拷贝基因(S)的比率即T/S是确定的, T/S比率同端粒长度

成正比例关系，端粒长度就可以根据 T/S 来测定。 $\Delta Ct = Ct^{tel} - Ct^{36B4}$ ，相对 T/S 比率 =  $2^{- (\Delta Ct1 - \Delta Ct2)} = 2^{- \Delta \Delta Ct}$ ， $\Delta Ct1$  为每个样品 T/S 比率， $\Delta Ct2$  为参考 DNA 的 T/S 比率，根据此公式可计算出每个样本的相对 T/S 值，该值与样品 DNA 的相对端粒长度对应。

### 1.5 端粒酶基因突变检测

利用 PCR 方法扩增文献报道中发生突变率较高的 TERC 基因及 TERT 基因第 1、2 外显子，PCR 反应体系 20  $\mu$ L：2  $\times$  Taq PCR Master Mix 10  $\mu$ L，样品 DNA 2  $\mu$ L，上下游引物（10  $\mu$ M）各 0.5  $\mu$ L，DMSO 0.8  $\mu$ L，ddH<sub>2</sub>O 6.2  $\mu$ L。参照文献<sup>[6-7]</sup>设计引物序列如下：TERC-F：5'-TCATGGCCGGAAATGGA ACT-3'，TERC-R：5'-GGGTGACGGATGCGCAGGAT-3'，产物片段长度：1182 bp；TERT1-F：5'-GAGTTTCAGGCAGCG-CTGCGTC-3'，TERT1-R：5'-CTTGTGCGCTGAGG-AGTAGAG-3'，产物片段长度：999 bp；TERT2-F：5'-CAGGACGCGTGGACCGAGTGACC-3'，

TERT2-R：5'-GTGAACCTCGTAAGTTTATGC-3'，产物片段长度：653 bp。反应条件：96  $^{\circ}$ C 预变性 5 min；96  $^{\circ}$ C 变性 35 s，63  $^{\circ}$ C 退火 30 s，72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min，共 35 个循环；72  $^{\circ}$ C 再延伸 3 min。将 PCR 产物送至南京金瑞斯生物科技有限公司进行纯化测序。测序结果应用 DNASTar 进行序列分析，并与 Pubmed BLAST 中正常 TERC、TERT1、TERT2 基因序列进行比对。

### 1.6 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行统计学分析，计量资料采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 SNK-*q* 检验， $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 端粒及内参 36B4 基因 Real-Time PCR 结果

端粒及内参 36B4 基因 Real-Time PCR 扩增产物特异，适合定量，见图 1~2。

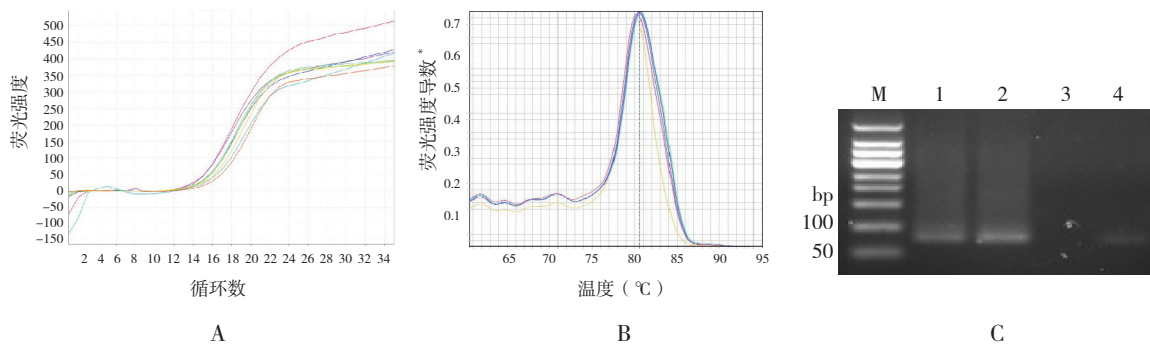


图1 端粒 Real-Time PCR 结果 A: 端粒基因扩增曲线; B: 端粒基因融解曲线, \* 为荧光强度对温度的一阶负导数; C: 端粒基因 PCR 产物 2.5% 琼脂糖凝胶电泳图, M: marker; 1~2: 端粒 PCR 产物; 3: 无引物对照; 4: 无模板对照。

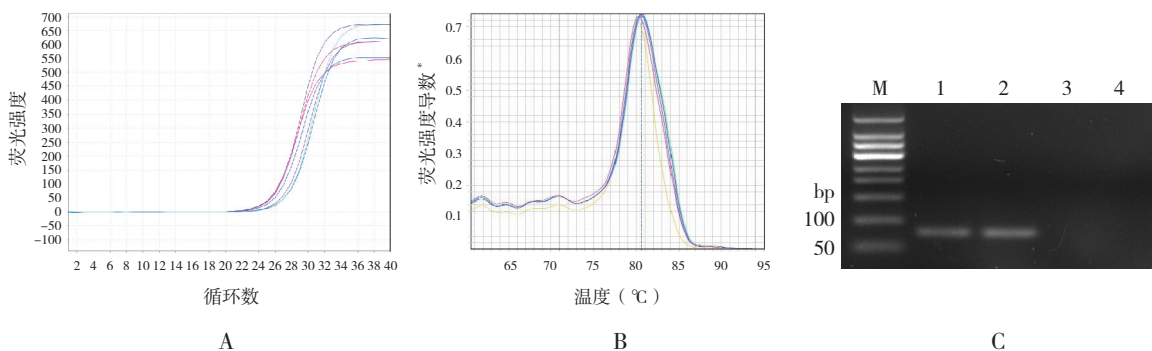


图2 36B4 基因 Real-Time PCR 结果 A: 36B4 基因扩增曲线; B: 36B4 基因融解曲线, \* 为荧光强度对温度的一阶负导数; C: 36B4 基因 PCR 产物 2.5% 琼脂糖凝胶电泳图, M: marker; 1~2: 36B4 基因 PCR 产物; 3: 无引物对照; 4: 无模板对照。

## 2.2 各组端粒长度相对 T/S 比率比较结果

各组儿童端粒长度相对 T/S 比率比较差异有统计学意义 ( $F=6.142, P=0.001$ )。未经 IST 组 ( $0.64 \pm 0.22$ )、IST 无效组 ( $0.61 \pm 0.26$ ) 端粒长度相对 T/S 比率小于正常对照组 ( $0.98 \pm 0.37$ ) 和 IST 有效组 ( $0.88 \pm 0.40$ ) (均  $P < 0.01$ )，IST 有效组端粒长度相对 T/S 比率同正常对照组相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

## 2.3 端粒酶基因测序结果

根据 PCR 检测结果，69 例患儿均未发现 TERC、TERT1、TERT2 基因突变。

## 3 讨论

再障是由多种病因、多种机制引起的一种骨髓造血功能减低或衰竭，导致全血细胞减少的综合征，目前认为 T 淋巴细胞异常活化、功能亢进造成骨髓损伤、造血细胞凋亡和造血功能衰竭在获得性再障发病机制中占主要地位。外界因素，如药物、射线、化学物质等也可以诱发疾病的发生，但是在同样的暴露条件下，并非每个人都发病，提示基因的个体差异影响其疾病的易感性。随着生物科学技术的进步，越来越多的研究表明，端粒和端粒酶与细胞的寿命、衰老、死亡密不可分<sup>[8]</sup>。再障作为一种骨髓衰竭性疾病，其发生与发展过程中端粒及端粒酶的作用就引起越来越多学者的关注。

端粒是真核细胞内线性染色体末端的一种特殊“帽状”结构，人类的端粒由重复序列 (TTAGGG)<sub>n</sub> 及端粒结合蛋白组成，长约 5~15 kb，其功能是保护染色体的完整性和维持细胞的复制能力。细胞分裂一次其端粒 DNA 丢失约 30~200 bp，端粒长度随细胞的复制和分裂而进行性缩短，达到一定程度 (2~4 kb)，细胞走向衰老死亡。端粒的维持和延长有赖于端粒酶的活性，端粒酶通过引物特异识别位点，以自身 RNA 为模板，在染色体末端合成端粒 DNA，使端粒得以延长。人类端粒酶主要由三种组分构成，即端粒酶 RNA 组分 (telomerase RNA component, TERC)，逆转录酶组分 (telomerase reverse transcriptase, TERT) 和端粒酶相关蛋白 (telomerase associated protein, TP)<sup>[9]</sup>。

国外研究显示，有 10% 的再障患者中检测出端粒酶基因突变，其中 TERC、TERT 基因突变各占约 4%，而另一小部分患者则有编码端粒结合蛋白基因的突变，这些患者外周血白细胞端粒均较同龄健康对照组缩短，并且端粒酶活性降低<sup>[10]</sup>，提示这些基因突变均与端粒异常缩短有关。但 Field 等<sup>[11]</sup>研究了 284 例血液病患儿 TERC 基因突变，其中 109 例再障患儿中未发现有意义的 TERC 基因突变。日本研究者 Liang 等<sup>[12]</sup>分析了 96 例儿童再障患者的 TERC 以及 TERT 突变，仅有 2 例患者存在 TERT 基因突变。这些研究表明端粒酶基因的表达在成人和儿童再障中存在差异。由于样本量的限制，本研究未能对 TRET 所有外显子进行基因突变检测，在已检测的 TERC 及 TERT 基因序列中尚未发现突变，端粒酶基因在儿童再障中的表达情况还需进一步的研究。

研究中未经 IST 及 IST 无效的再障患儿端粒长度较正常儿童显著缩短，而接受 IST 后血象恢复的患儿端粒长度与正常组比无明显缩短，提示在再障患儿疾病初期，由于各种原因引起骨髓造血衰竭，造血干/祖细胞出现量和(或)质的缺陷，从而导致剩余细胞大量复制，过度代偿造血而导致继发性端粒缩短<sup>[13]</sup>，端粒缩短加速后，端粒酶活性升高来维持正常的端粒长度。由于儿童有较强造血功能代偿能力，经免疫抑制治疗后，造血干细胞造血能力恢复，端粒酶活性的增高可以进一步促使端粒延长<sup>[14]</sup>，使之恢复至正常年龄水平。而端粒酶基因突变使端粒酶活性不足以代偿端粒缩短现象，导致造血干细胞自我更新及增生潜能下降，端粒持续缩短至关键长度，细胞死亡，因而有基因突变的患者预后较差。在本研究中，在对免疫抑制及治疗无效患儿中，未发现端粒酶基因突变，仍有端粒长度缩短。一方面其它如氧化应激、感染等因素都会对端粒长度产生影响<sup>[15]</sup>；另一方面，可能有研究尚未发现的端粒及端粒酶相关蛋白基因改变。对再障患儿端粒长度缩短的机制有待进一步深入研究。

目前认为，免疫异常在再障发病中起重要作用，大部分再障患儿经免疫抑制治疗后获得长期生存<sup>[16]</sup>，但经随访观察，发现部分患儿疾病出现不同转归，有一部分发展为骨髓异常增生综合征 (MDS) 和急性白血病等，即使骨髓移植后也有

一定比例的基因病发生率<sup>[17]</sup>。这提示对免疫抑制剂治疗无效的患儿,有必要检测其外周血或骨髓有核细胞的端粒长度及端粒酶活性,对于有端粒酶基因突变或者端粒明显缩短的再障患者,应尽早行造血干细胞移植。同时有研究发现突变患者的亲属也具有造血障碍,揭示了基因突变的家族倾向<sup>[18]</sup>。因此端粒长度及端粒酶基因突变的检测也有助于捐献者选择。

综上所述,端粒和端粒酶与儿童再障的发生发展有一定的相关性,但两者是否具有一定的因果关系,端粒的异常是疾病的始发因素还是中间环节,患儿端粒的改变能否用于评估预后及指导治疗,都需要更加深入的探索发现。

#### [参 考 文 献]

- [1] Calado RT. Telomeres and marrow failure[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009, 2009(1): 338-343.
- [2] 王西阁,周玉洁,王丹凤,等.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[J].中国当代儿科杂志,2013,15(1): 25-28.
- [3] 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.
- [4] 郭令军,张七一.实时定量PCR分析外周血白细胞的端粒长度[J].中外医疗,2008,27(21): 1-2.
- [5] Gil ME, Coetzer TL. Real-time quantitative PCR of telomere length[J]. Mol biotechnol, 2004, 27(2): 169-172.
- [6] Vulliamy T, Marrone A, Dokal I, et al. Association between aplastic anaemia and mutations in telomerase RNA[J]. Lancet, 2002, 359(9324): 2168-2170.
- [7] Yamaguchi H, Calado RT, Ly H, et al. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia[J]. N Engl J Med, 2005, 352(14): 1413-1424.
- [8] Georjgin-Lavialle S, Aouba A, Mouthon L, et al. The telomere/telomerase system in autoimmune and systemic immune-mediated diseases[J]. Autoimmun Rev, 2010, 9(10): 646-651.
- [9] Fleisig HB, Wong JMY. Telomerase as a clinical target: current strategies and potential applications[J]. Exp Gerontol, 2007, 42(1): 102-112.
- [10] 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[J]. JAMA, 2010, 304(12): 1358-1364.
- [11] Field JJ, Mason PJ, An P, et al. Low frequency of telomerase RNA mutations among children with aplastic anemia or myelodysplastic syndrome[J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2006, 28(7): 450-453.
- [12] Liang J, Yagasaki H, Kamachi Y, et al. Mutations in telomerase catalytic protein in Japanese children with aplastic anemia[J]. Haematologica, 2006, 91(5): 656-658.
- [13] 李英梅,杨舟,郑以州.再生障碍性贫血造血干/祖细胞缺陷新认识[J].国际输血及血液学杂志,2008,31(1): 29-32.
- [14] Zhao YM, Li JY, Lan JP, 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.
- [15] Bekaert S, De Meyer T, Rietzschel ER, et al. Telomere length and cardiovascular risk factors in a middle-aged population free of overt cardiovascular disease[J]. Aging cell, 2007, 6(5): 639-647.
- [16] 赵芬英,徐晓军,宋华,等.儿童再生障碍性贫血免疫抑制剂治疗疗效及相关因素分析[J].中国当代儿科杂志,2012,14(8): 567-570.
- [17] 葛美丽,郑以州.再生障碍性贫血造血干/祖细胞克隆性演变的病理生理机制研究现状[J].中华血液学杂志,2010,31(11): 784-786.
- [18] Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia[J]. Blood, 2006, 108(8): 2509-2519.

( 本文编辑: 万静 )