

再生障碍性贫血患者端粒酶基因突变的研究

张慧敏 袁丽倩 高习华 史奎竹 马传宝 谢清清 王荣孝 张玉娜

[关键词] 再生障碍性贫血; 端粒; 端粒酶基因突变

再生障碍性贫血(AA)是一种因骨髓造血功能不良而导致外周血全血细胞减少的骨髓衰竭综合征,免疫异常为其主要发病机制。最近研究表明,端粒酶基因突变、端粒缩短也参与了AA的发病^[1]。端粒是位于染色体末端、保护染色体完整的重复DNA序列。端粒随细胞分裂逐渐缩短,当缩短到一定程度时会导致细胞衰老或凋亡。端粒酶可修复磨损的端粒。端粒酶基因突变会使端粒缩短或功能障碍,导致基因组不稳定。目前AA被认为是一种端粒相关疾病,在本疾病中,抗原驱动、自身免疫失调和T细胞稳态失衡参与造血干细胞损伤,端粒酶功能缺陷在某些情况下也发挥作用。本研究旨在探讨AA患者外周血白细胞端粒酶逆转录酶(TERT)和端粒酶核糖核酸组分(TERC)基因突变情况及其临床意义。

对象与方法

1. 对象:纳入2017年3月~2018年3月于我科就诊的初诊获得性AA患者30例,其中男14例,女16例,年龄24~69岁,平均年龄(35.66±10.30)岁。纳入同期于我院健康体检者15例,其中男7例,女8例,年龄25~69岁,平均年龄(36.28±9.82)岁。所有AA患者均无血液系统疾病家族史,均符合《血液病诊断及疗效标准》(第4版)推荐的AA诊断标准。排除标准:(1)先天性AA;(2)年龄<14岁;(3)妊娠或哺乳期。本研究经我院伦理委员会审核批准,所有受试者均签署知情同意书。

2. 方法

(1)标本采集:抽取受试者外周血2ml,采用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,加入红细胞裂解液,以1700r/min离心8min。去除上清红细胞,留取白细胞。

(2)检测方法:①设计引物(TERT第1外显子1对;TERT第2外显子4对;TERC外显子2对):TERT1-F:CCCTCCCTTCCTTTCCG;TERT1-R:CTGGTGGTGAAGCCCTCG;TERT2-1F:CAGTGCCTGGTGTGCGTG;TERT2-1R:AGACTTCGGCTGGCACTG;TERT2-2F:AACCATAGCGTCAGGGAGG;TERT2-2R:CGCCTGAGGAGTAGAGGAAG;TERT2-3F:CACTCCCACCATCCGTG;TERT2-3R:GTCTGTGTCTCTCTCTCG;TERT2-4F:TGCTCTCAAGACGCACTG;TERT2-4R:ATTCAGCTCTGGGCCTG。TERC-1F:CTTTATAAGCCGACTCGCCC;TERC-1R:ACTCGCTCCGTTCTCTTC;TERC-2F:GCCTTCCACCGTTCATTCTA;TERC-2R:ATTCATTTTGGCCGACTTTG。②采用台湾芮宝生医股份有限公司的核酸提取仪(MagCore)及核酸提取试剂盒(MagCore Genomic

DNA Whole Blood Kit)提取所有受试者白细胞基因组DNA。③采用杭州博日LifePro基因扩增仪进行聚合酶链反应(PCR)反应。反应体系:2×Vazyme LAmp Master Mix(上海信裕生物科技有限公司)5μl,ddH₂O 3μl,引物1μl,DNA模板1μl。④采用北京鼎国昌盛DG-600C电泳仪和美国BIO-RAD ChemiDocXRS和凝胶成像系统进行琼脂糖凝胶电泳分析。⑤采用TaKaRa公司Alkaline Phosphatase(Shrimp)酶解试剂进行PCR产物酶解消化。⑥测序反应操作。⑦乙醇沉淀纯化。⑧采用美国Life Technologies ABI3500XL基因分析仪进行基因测序。

(3)结果判断:通过Mutation Surveyor软件对TERT和TERC序列进行对比和分析。参考美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库,筛选软件指出的测序结果与参考序列不一致之处,再结合临床信息得到各外显子的突变信息。

3. 统计学处理:计数资料以例和百分比表示。

结 果

所有受试者TERT、TERC基因突变及单核苷酸多态性(SNP)结果:30例AA患者中仅有1例(3.3%)TERC突变(n.389C→T),测序结果见图1、2,未发现TERT第1、2外显子突变。15例对照组受试者中未发现TERC及TERT第1、2外显子突变。30例AA患者中有11例(36.7%)存在TERT第2外显子SNP(n.915G→A),19例(63.3%)存在TERC外显子SNP(n.514G→A);15例对照组中有8例(53.3%)存在TERT第2外显子SNP(n.915G→A),11例(73.3%)存在TERC外显子SNP(n.514G→A)。

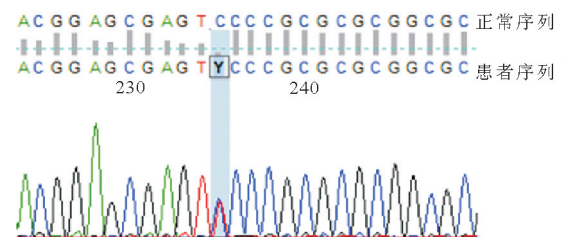


图1 AA患者TERC外显子测序结果(正向测序)

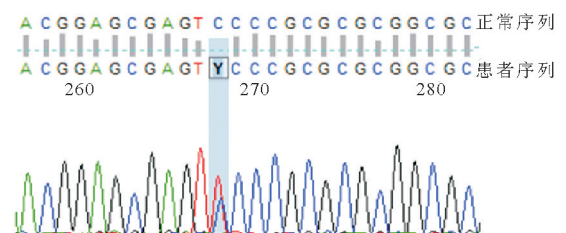


图2 AA患者TERC外显子测序结果(反向测序)

讨 论

AA 是以造血干细胞为靶器官的自身免疫性疾病,免疫抑制治疗(IST)效果显著,但仍有 1/3 的患者无效,其中部分应用雄激素治疗有效,这些患者可能存在端粒酶基因突变和端粒缩短^[2]。端粒能够保护染色体不受损害,端粒缩短会导致基因组不稳定,引发骨髓衰竭或肿瘤。端粒长度的维持主要依靠端粒酶。端粒酶主要由 TERT、TERC 及端粒酶相关蛋白组成。端粒酶以 TERC 为模板、TERT 为催化亚基逆转录合成端粒 DNA 以弥补端粒损耗。端粒酶主要在干细胞和高度增殖的细胞(如淋巴细胞、癌细胞)中表达,在大多数成熟细胞中不表达。端粒酶活性主要受 TERT 基因表达的调控,TERT 启动子含有雌激素受体,雌激素和雄激素对端粒酶的表达和活性起重要调节作用。正常的端粒酶活性和端粒长度对细胞行使正常功能至关重要,端粒缩短会阻碍干细胞的再生潜能。端粒缩短在遗传性 AA(如先天性角化不良、Fanconi 贫血)中普遍存在,原因是编码端粒酶的基因[如 TERT、TERC、Dyskerin 假尿苷合成酶 1(DK1)]发生突变。约 1/3 的获得性 AA 患者存在端粒缩短,某些情况下亦与 TERT 或 TERC 突变有关。尤其是致病性 TERT 启动子突变对于端粒酶功能障碍性疾病具有特异性^[3]。这些突变使端粒酶活性降低、端粒缩短加快、造血干细胞增殖能力下降,临床上均可导致骨髓衰竭。

国外报道虽有 1/3 AA 患者有端粒缩短,但存在端粒酶基因突变的患者不足 10%,其中 TERT 和 TERC 的突变率各占 4%,这些患者端粒酶活性减低、端粒缩短,对 IST 反应差,与克隆转化相关^[4]。本研究 30 例 AA 患者中仅发现 1 例 TERC 突变(n. 389C→T),TERC 突变率为 3.3%,与国外报道相近,但此突变位点在获得性 AA 中未见报道。Vulliamy 等^[5]报道获得性 AA 与 TERC 突变之间的关联,他们在 17 例获得性 AA 患者中发现 2 例 TERC 突变(n. 58G→A),然而,在 4%~10%的健康非洲受试者中也发现这种突变,但对端粒酶活性没有影响,被证明是非洲人常见的 SNP(指基因组 DNA 序列中单个核苷酸变异而引起的物种多态性,一般不影响基因功能)。后续研究表明,少数 AA 患者存在 TERC 的真正致病性突变,这些患者缺乏先天性 AA 的疾病特征和家族史,且在大量健康对照组受试者中未观察到这些突变。Han 等^[6]在中国北方地区 66 例 AA 患者中检测出 2 例(3.0%)TERC 杂合突变(n. 37N→G, n. 66G→C)均无血液系统疾病家族史,对 IST 也无反应。本研究中 TERC 突变的患者无家族史,且临床症状较重,对 IST 无反应。

TERT 突变与获得性 AA 的关系也已被证实,突变可能发生在酶的任何区域。值得注意的是,携带 TERT 或 TERC 突变的患者,其健康亲属也可能存在端粒酶突变、端粒缩短。如果选择了受影响的同胞供者进行造血干细胞移植,可能会导致移植失败。一项研究在 96 例日本 AA 患儿中发现了 2 例(2.1%)杂合 TERT 突变,但未发现 TERC 突变,其中 1 例女孩(TERT 第 6 外显子:n. 2177C→T)端粒很短、对 IST 无反应。该女孩的父亲无相关临床症状,也存在此突变,但他的端粒却没有缩短^[7]。该研究在患儿及对照组中均检测到高频率的 TERT、TERC 基因的 SNP,与本研究结果相符,但本研究未对 TERC 突变的 AA 患者家属进行端粒酶基因及端粒长度检测。王西阁等^[8]在 69 例

AA 患儿中未检测到 TERT、TERC 基因的任何突变。本研究也未发现 TERT 突变,可能因为地域差异或仅检测了突变常发生的第 1、2 外显子,但并不排除 TERT 突变在 AA 发病中的可能作用。最近研究发现 TERT 突变会破坏其与核酸底物结合,导致端粒酶全酶无法正确组装核酸底物,端粒酶活性丧失,不能完整延伸端粒,从而导致端粒缩短^[9]。虽然亚洲人群 AA 发病率高于西方人群,但亚洲人群 TERT、TERC 突变率并不高。端粒酶基因突变率远低于端粒缩短率,说明端粒酶基因突变不是唯一导致端粒缩短的因素,还可能存在其他因素,如氧化应激、慢性炎症、药物暴露等,端粒酶基因突变更可能作为遗传高危因素而不是遗传决定因素。

雄激素很早即用于治疗 AA,其作用靶点可能是端粒酶,作用机制是雄激素在体内转化为雌激素,与 TERT 上的雌激素受体结合,上调造血细胞 TERT 基因表达和端粒酶活性,使端粒延长、造血功能恢复。应用雄激素治疗的 AA 患者端粒酶活性明显升高,同时血液学指标改善^[10],而且,端粒酶激活可能并不会导致细胞永久增殖而致癌。Muñoz-Lorente 等^[11]将携带端粒酶基因的病毒载体转染至 AA 小鼠中激活端粒酶,显示出其疗效和安全性,即使 TERT 过表达也未观察到致癌倾向。端粒缩短的 AA 患者选择雄激素治疗可能效果更佳,检测端粒酶基因突变有助于选择合适的造血干细胞移植家属供者。

端粒酶基因和功能的研究开启了人们利用端粒酶激活作为 AA 等端粒相关疾病治疗靶点的新思路。但以端粒酶为靶点的治疗策略仍存在进步空间和巨大挑战,随着这一领域的深入探索,端粒酶将会在防治 AA 等端粒相关疾病的临床应用方面发挥作用。

参 考 文 献

- [1] 张慧敏,张娟娟,陶朝欣,等.端粒异常与获得性骨髓衰竭综合征的研究进展[J].临床内科杂志,2018,35(4):282-283.
- [2] Liu C, Sun Y, Shao Z. Current Concepts of the Pathogenesis of Aplastic Anemia[J]. Curr Pharm Des, 2019, 25(3):236-241.
- [3] Gutierrez-Rodriguez F, Donaires FS, Pinto A, et al. Pathogenic TERT promoter variants in telomere diseases[J]. Genet Med, 2019, 21(7):1594-1602.
- [4] Calado RT, Young NS. Telomere maintenance and human bone marrow failure[J]. Blood, 2008, 111(9):4446-4455.
- [5] Vulliamy T, Walne A, Baskaradas A, et al. Dokal I. Mutations in the reverse transcriptase component of telomerase (TERT) in patients with bone marrow failure[J]. Blood Cell Mol Dis, 2005, 34(3):257-263.
- [6] Han B, Liu B, Cui W, et al. Telomerase gene mutation screening in Chinese patients with aplastic anemia[J]. Leuk Res, 2010, 34(2):258-260.
- [7] Gramatges MM, Bertuch AA. Short telomeres: from dyskeratosis congenita to sporadic aplastic anemia and malignancy[J]. Transl Res, 2013, 162(6):353-363.
- [8] 王西阁,王璇,刘松,等.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[J].中国当代儿科杂志,2014,16(4):375-379.
- [9] Hoffman H, Rice C, Skordalakes E, et al. Structural Analysis Reveals the Deleterious Effects of Telomerase Mutations in Bone Marrow Failure Syndromes[J]. J Biol Chem, 2017, 292(11):4593-4601.
- [10] 张慧敏,李晓云,张少飞,等.雄激素对再生障碍性贫血患者端粒酶活性的影响[J].临床内科杂志,2019,36(7):447-450.
- [11] Muñoz-Lorente MA, Martínez P, Tejera Á, et al. AAV9-mediated telomerase activation does not accelerate tumorigenesis in the context of oncogenic K-Ras-induced lung cancer[J]. PLoS Genet, 2018, 14(8):e1007562.

(收稿时间:2019-08-08)

(本文编辑:余晓曼)