

儿童血液系统疾病端粒酶催化亚基基因序列分析*

王红旭¹, 张鹏辉², 邹琳^{3△} (1. 重庆医科大学附属第一医院检验科 400016; 重庆医科大学附属儿童医院; 2. 临检中心; 3. 分子中心 400014)

【摘要】 目的 分析人类端粒酶逆转录酶(htert)基因部分外显子突变序列在不同儿童血液系统疾病的特征与关系。**方法** 对 71 例血液科住院患儿(含 46 例急性白血病和 25 例非白血病患者)的外周血标本,成人急性髓系白血病(AML)高发突变的 htert 基因 15 号外显子区域进行测序,分析序列特征、突变与疾病的关系。**结果** 71 例血液系统疾病患儿 htert 基因 15 号外显子序列分析中,46 例急性白血病患者未发现该区域的突变。25 例非白血病患者中,2 例再生障碍性贫血患儿发现 5 号染色体 1254714 位置碱基 C 杂合突变为 A,该位点距离 htert 基因 15 号外显子转录起始位点上游 91 bp。**结论** 成人 AML 患者 htert 基因高突变区在儿童急性白血病中突变率低; htert 基因杂合突变可能与端粒相关的再生障碍性贫血有关,值得进一步研究。

【关键词】 再生障碍性贫血; 急性白血病; 人类端粒酶逆转录酶; 基因突变

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.23.018 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)23-3125-02

The gene mutation of catalytic subunit of telomerase in children's hematological diseases* WANG Hong-xu¹, ZHANG Peng-hui², ZOU Lin^{3△} (1. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Clinical Inspection Center; 3. Molecular Center, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

【Abstract】 Objective To study the gene mutation of catalytic subunit of human telomerase reverse transcriptase(htert) in children's hematological diseases, and gain a further insight about the relationship between htert and hematological diseases in children. **Methods** The peripheral blood samples from 71 hematological kids including 46 cases with acute leukemic and 25 non-leukemic cases were collected. The 15th exon of htert reported of high mutational rate in adult acute myeloid leukemia(AML) was sequenced. The association of htert mutation and hematological diseases was further evaluated. **Results** Among the 25 non-leukemic cases, there were 2 aplastic anemia patients carried with C-A mutation on the 1254714 site of 5th chromosome which lies 91bp upstream away from the 15th exon of htert. However, none mutations of this region were detected in 46 acute leukemic patients. **Conclusion** The 2 aplastic anemia patients carried with the same mutation in the 1254714 site of chromosome 5, suggesting this mutation might correlate with aplastic anemia and deserve further study. There are differences between childhood and adult acute leukemia considering gene mutations of htert, which is of high mutational rate in adult but with low mutation rate in children's acute leukemia.

【Key words】 aplastic anemia; acute leukemia; human telomerase reverse transcriptase; gene mutation

儿童造血干细胞疾病常见的有急性白血病和再生障碍性贫血,前者为造血干细胞水平的恶性克隆增殖性疾病,后者为累及造血干细胞的骨髓造血衰竭^[1-2]。端粒酶对维持造血干细胞正常功能有重要作用^[3]。端粒相关疾病在造血系统的表现主要包括再生障碍性贫血和急性白血病,二者均累及造血干细胞。文献[4]报道成人急性髓系白血病(AML)患者人类端粒酶逆转录酶(htert)的 15 号外显子是高突变区,但该高突变区在儿童急性白血病及其他血液系统疾病患儿中的突变情况仍不清楚。本研究进一步探索了 htert 基因 15 号外显子区在儿童血液系统疾病患者中的突变情况,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2011 年 1~12 月重庆医科大学附属儿童医院血液内科住院的血液系统疾病患儿 71 例,获得患儿家长知情同意后,抽取 1~2 mL 外周血标本,经 109 mmol/L 的枸橼酸钠抗凝。

1.2 htert 基因突变检测 (1)外周血基因组 DNA 的提取:按

照 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司产品)操作步骤进行。(2)DNA 浓度检测及保存:DNA 在 A₂₆₀ 处有明显吸收峰, A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值为 1.8, DNA 于 -20 ℃ 保存。(3)引物设计与合成:据文献[5]经 Primer5.0 软件检测,由北京华大基因公司合成。引物序列正向:GGA AAT TTC ACC TGG AGA AGC;反向:CCA GCG TTT AAT CAC ATA GGG, DNA 长度 481 bp, 50 ℃。(4)聚合酶链反应(PCR)扩增目的片段:PCR 反应体系和 50 μL 反应体系分别为 2×pruTaq PCR Master mix, 25 μL;上下游引物(20 μmol)各 1 μL;模板 DNA 1 μL; ddH₂O 22 μL。PCR 反应条件:94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 50 ℃ 30 s, 72 ℃ 45 s, 循环 35 次; 72 ℃ 5 min。DNA 扩增序列:chr5 为 1254319-1254799 5'-GGA AAT TTC ACC TGG AGA AGC CGA AGA AAA CAT TTC TGT CGT GAC TCC TGC GGT GCT TGG GTC GGG ACA GCC AGA GAT GGA GCC ACC CCG CAG ACC GTC GGG TGT GGG CAG CTT TCC GGT GTC TCC TGG GAG GGG AGC TGG GCT GGG CCT GTG

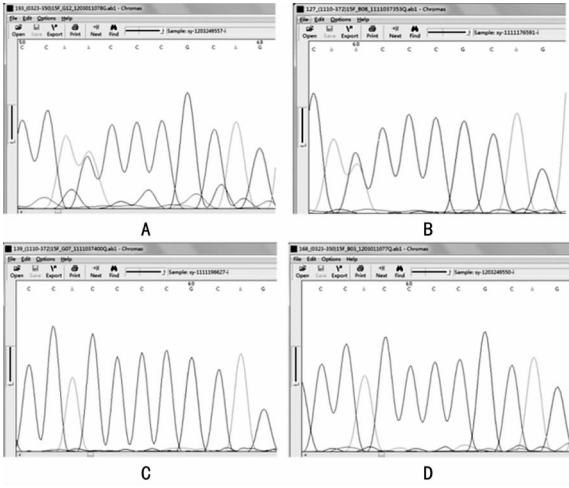
* 基金项目:重庆市卫生局科研课题(2009-2-267);国家临床重点专科建设项目(财社[2010]305 号)。△ 通讯作者, E-mail: zoulin_74@yahoo.com.cn。

ACT CCT CAG CCT CTG TTT TCC CCC AGG GAT GTC
GCT GGG GGC CA GGG CGC CGC C(1062Ala)GGC CCT
CTG CCC TCC GAG GCC GTG CAG TGG CTG TGC CAC
CAA GCA TTC CTG CTC AAG CTG ACT CGA CAC CGT
GTC ACC TAC GTG CCA CTC CTG GGG TCA CTC AGG
ACA GGC AAG TGT GGG TGG AGG CCA GTG CGG GCC
CCA CCT GCC CAG GGG TCA TCC TTG AAC GCC CTG
TGT GGG GCG AGC AGC CTC AGA TGC TGC TGA AGT
GCA GAC GCC CCC GGG CCT GAC CCT GGG GGC CTG
GAG CCA CGC TGG CAG CCC TAT GTG ATT AAA CGC
TGG-3'(下划线部分为 15 号外显子序列)。(5)2.0%凝胶电泳检测目的条带:应用 Gel DOC XR 系统在紫外光下成像,检测 PCR 扩增产物为 481 bp,且无杂带。(6)基因测序:由北京华大基因公司测序,测序引物为 PCR 扩增引物,测序方法为 Sanger 测序法,仪器为 ABI 公司的 3730XL 测序仪。(7)序列突变分析:用 Chromas 软件进行峰图分析,然后通过 NCBI 和 UCSC Genome Bioinformatics 数据库进行序列比对。

2 结 果

2.1 患者临床及实验室特点 71 例血液病患儿中,有 46 例急性白血病患者,其中 AML 8 例,B 淋巴细胞白血病(B-ALL)31 例,T 系急性淋巴细胞白血病(T-ALL)7 例;25 例非白血病患者中,再生障碍性贫血(AA)2 例,血小板减少性紫癜(ITP)11 例,缺铁性贫血 3 例,珠蛋白生成障碍性贫血 2 例,其他血液疾病 7 例。

2.2 htert 基因 15 号外显子序列分析结果 (1)非白血病患者中,2 例 AA 患者 5 号染色体 1254714 位置碱基发生相同的杂合突变,C 杂合突变为 A(图 1),该位点位于 htert 基因 15 号外显子转录起始位点上游 91 bp。2 例 AA 患儿均为男性重型 AA 患儿;年龄 5 个月零 3 d 和 9 岁零 9 个月;以严重贫血和出血为主要临床表现。(2)46 例急性白血病患者中,8 例 AML 患儿及 38 例 ALL 患儿均未发现 htert 基因 15 号外显子突变;未发现文献报道的成人 AML 热点突变,同时也未发现本研究中 2 例 AA 患儿 1254714 位点的 C>A 突变。



注:A 和 C 为 1254714 号位 C>A 杂合突变;B 和 D 为对照。

图 1 2 例 AA 患儿 5 号染色体 1254714 位置碱基发生 C>A 杂合突变

3 讨 论

端粒是位于线性染色体末端的一种染色体保护结构,由 TTA GGG 重复序列的 DNA 和相关蛋白质组成,端粒随着

DNA 复制逐渐缩短^[6]。端粒酶是一种具有逆转录活性的由 RNA 和蛋白质组成的核糖核蛋白复合体,以自身 RNA 为模板逆转录延长端粒 DNA^[4]。端粒酶复合体相关基因突变使端粒缩短,基因组稳定性下降,并导致一系列端粒-端粒酶相关疾病,累及诸多脏器,包括先天性角化不良、骨髓衰竭、AA、白血病、肺纤维化等,被称为端粒综合征^[7-8]。功能正常的端粒酶-端粒对维持造血干细胞存活起重要作用,htert 的突变使端粒酶活性降低,端粒长度缩短,造血干细胞易发生衰老、凋亡;另一方面,缩短的端粒抑制 DNA 损伤反应,从而携带 DNA 修复缺陷及生长优势突变表型的细胞可能被选择,细胞易癌变。

本研究中 2 例重型 AA 患者均在同一位点(5 号染色体 1254714)检测到相同的基因突变(C>A),该突变位点及型别均未被报道。AA 是端粒相关疾病的重要组成部分之一,其中 1 例患儿年龄仅 5 个月零 3 d。故该位点突变的意义需进行进一步实验研究。

儿童与成人急性白血病存在较大差异,儿童急性白血病以 ALL 为主,且多数 ALL 对泼尼松敏感,儿童 ALL 的预后较成人好。对成人 AML 患者 htert 基因序列分析发现,htert 的 15 号外显子区是高突变区,且以 1062 位点的 G-A 突变为主;然而在对儿童急性白血病的研究中,AML 和 ALL 患儿均未发现 htert 基因 15 号外显子突变。本次研究结果也提示儿童与成人急性白血病存在遗传异质性。

参考文献

[1] Hills M, Lansdorp PM. Short telomeres resulting from heritable mutations in the telomerase reverse transcriptase gene predispose for a variety of malignancies [J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1176: 178-190.
[2] Calado RT, Regal JA, Hills M, et al. Constitutional hypomorphic telomerase mutations in patients with acute myeloid leukemia [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106 (4): 1187-1192.
[3] Testa U. Leukemia stem cells [J]. Ann Hematol, 2011, 90 (3): 245-271.
[4] Young NS, Bacigalupo A, Marsh JC. Aplastic anemia: pathophysiology and treatment [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2010, 16(1 Suppl): 119-125.
[5] Du HY, Pumbo E, Manley P, et al. Complex inheritance pattern of dyskeratosis congenita in two families with 2 different mutations in the telomerase reverse transcriptase gene [J]. Blood, 2008, 111(3): 1128-1130.
[6] Daniel M, Peek GW, Tollefsbol TO. Regulation of the human catalytic subunit of telomerase(hTERT) [J]. Gene, 2012, 498(2): 135-146.
[7] Calado RT. Telomeres and marrow failure [J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009, 10 (1): 338-343.
[8] Pepper C, Baird DM. Shortened telomeres: a driving force behind leukemia [J]. Future Oncol, 2010, 6 (11): 1681-1686.