

• 论 著 •

重型 β 地贫患儿珠蛋白肽链失衡的调控研究^{*}

伍昌林, 李 岚, 朱 奕, 党鑫堂, 薛俭成

(广东省深圳市第二人民医院输血科 518035)

摘要:目的 研究重型 β 地贫患儿外周血珠蛋白 α 、 β 、 γ mRNA 比例变化及 miR-144 基因对其平衡的调控作用。方法 分离培养患者外周血早红细胞, 真核表达质粒 PmiR-144-luc 转染后培养 72 h, 运用 RT-PCR 分别检测重型 β 地贫患儿空白组、基因转染组与健康对照组外周血 α 、 β 、 γ mRNA 的比率变化。结果 与健康对照组比较, 重型 β 地贫患儿外周血珠蛋白 α/β 、 $\alpha/\beta+\gamma$ 、 $\gamma/\beta+\gamma$ mRNA 的比例水平均升高, 差别有统计学意义; 与重型 β 地贫患儿空白组比较, 基因转染组珠蛋白 α/β 、 $\alpha/\beta+\gamma$ mRNA 的比例水平均降低, 差别有统计学意义; 而 $\gamma/\beta+\gamma$ mRNA 的比例水平变化无统计意义。结论 miR-144 基因可能调控重型 β 地贫患儿珠蛋白 α 、 β 、 γ mRNA 基因比例的变化, 将为重型 β 地贫的基因调节治疗提供新的实验依据。

关键词: β 地中海贫血; 珠蛋白基因; 微小 RNA-144

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.03.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)03-0274-02

Regulation research on globin peptide imbalance in children with severe β -thalassemia^{*}

Wu Changlin, Li Lian, Zhu Yi, Dang Xintang, Xue Jiancheng

(Department of Transfusion Medicine, the Second People's Hospital of Shenzhen City, Shenzhen Guangdong 518035, China)

Abstract: Objective To detect mRNA expression levels of globin peptide α , β and γ in the peripheral blood of children with severe β -thalassemia, and analyze the relationship between miR-144 gene and the changes of globin ratio. **Methods** The early red blood cells were isolated from children with severe β -thalassemia and in vitro cultured, and changes of the ratio of α , β and γ mRNA were detected by quantitative RT-PCR for β thalassemia group, miR-144 gene transfection group and the healthy control group, 72 hours after the transfection of eukaryotic expression plasmids PmiR-144-luc into the isolated early red blood cells. **Results** Compared with the healthy control group, the ratios of globin α/β , $\alpha/\beta+\gamma$ and $\gamma/\beta+\gamma$ mRNA in peripheral blood of children with severe β thalassemia were elevated, with statistical significance. Compared with β thalassemia control group, the ratios of α/β and $\alpha/\beta+\gamma$ mRNA in gene transfection group were reduced, with statistical difference, but the ratio of $\gamma/\beta+\gamma$ mRNA was not with any statistical difference. **Conclusion** miR-144 might take part in the regulation of the ratio of α , β and γ globin gene expression in children with severe β -thalassemia, and this finding might provide a new experimental basis for gene regulation treatment of severe β -thalassemia.

Key words: beta-thalassemia; globin gene; miRNA-144

微小 RNA 是大小约 22 nt 的一类非编码 RNA, 具有调节基因表达活性的功能。它们参与细胞分化、细胞增殖与凋亡、肿瘤形成等各种过程^[1-3], 对其进行深入的研究, 有助于我们对多种疾病发病机制的理解, 并最终为疾病的诊断和治疗提供新的思路和理论基础。本文将研究重型 β 地贫患儿外周血 miR-144 基因对珠蛋白基因 α 、 β 、 γ 比率变化的调节作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2009 年 8 月至 2011 年 3 月共收 20 例重型 β 地贫患儿, 均经本院血液研究所基因检测确诊, 并输血治疗多次, 均符合重型 β 地贫的诊断标准。另设年龄、性别匹配的健康体检者 20 例作为对照组, 排除了其他相关疾病。

1.2 仪器与试剂 Trizol 试剂 (GIBCO 公司), 聚合酶链反应 (PCR) 试剂购自 ABI 公司; TaqDNA 聚合酶、真核表达质粒 PmiR-144-luc, PCR 引物设计由上海卓康生物公司合成; 淋巴细胞分离液, Lipofectamine[®] 2000 转染试剂 (达科为公司)。

1.3 方法 (1) 红系细胞分离与培养: 先分别取一定量健康人与重型 β 地贫患者的新鲜抗凝外周血, 经淋巴细胞分离液分

单个核细胞, 用 IMDM 培养基洗 2 次。然后将细胞以 2×10^6 /mL 的细胞浓度加入 IMDM 培养基中, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 6 d。然后, 取出不贴壁细胞, IMDM 洗 2 次后, 以 5×10^5 /mL 细胞浓度加入 IMDM 中, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 7 d, 备用。(2) 实验分组: 将上述体外分离培养的患者的红系细胞分为: 未处理组, 空载体组, 质粒 PmiR-144-luc 基因转染组。应用细胞转染技术, 于转染后 72 h 借助 FCM 分析转染率, 并取细胞进行后继实验。(3) 总 RNA 的提取: 收集上述各组分离培养的细胞, 洗涤 3 次后备用。运用异硫氰酸胍一步法提取 RNA, 取 2 μ g 进行逆转录, 合成 DNA。(4) PCR 检测^[4]: 在反应体系中, 加入缓冲液 10 μ L, 上下游引物各 1 μ L, Taq 酶 1 μ L, DNA 5 μ L, 然后加双蒸水至总体积 50 μ L。94 °C 预变性 3 min, 然后 72 °C 45 s, 55 °C 1 min, 40 个循环。对 PCR 结果进行电泳, 将凝胶电泳结果进行软件分析, 基因表达强度以 α 、 β 、 γ 珠蛋白基因与内参 GAPDH 的比值表示。

1.4 统计学处理 全部数据均经统计软件 SPSS14.0 分析, 计算各组均数与标准差, 组间差异的显著性用 *t* 检验分析。以

* 基金项目: 广东省深圳市科技计划项目 (No. 200902054)。

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 重型 β 地贫患儿与健康对照组珠蛋白肽链 α 、 β 、 γ mRNA 的表达 与健康对照组比较, 重型 β 地贫患儿外周血 α/β 、 $\alpha/\beta+\gamma$ 比率水平均升高, 差别有统计学意义, 见表 1。

表 1 重型 β 地贫患儿与健康对照组珠蛋白肽链 α 、 β 、 γ mRNA 的检测

组别	n	α/β	$\alpha/\beta+\gamma$	$\gamma/\beta+\gamma$
重型 β 地贫组	20	5.36 ± 1.24 *	2.32 ± 0.84 *	0.89 ± 0.16 *
健康对照组	20	1.05 ± 0.21	1.14 ± 0.32	0.10 ± 0.08

*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.2 重型 β 地贫患儿外周血经 miR-144 基因转染后珠蛋白肽链 α 、 β 、 γ mRNA 的表达 与重型 β 地贫患儿空白对照组比较, miR-144 基因转染组 α/β 、 $\alpha/\beta+\gamma$ 比率水平均降低, 差别有统计学意义; 但 $\gamma/\beta+\gamma$ 的比率变化无统计学意义, 见表 2。

表 2 重型 β 地贫患儿外周血经 miR-144 基因转染后珠蛋白肽链 α 、 β 、 γ mRNA 的检测

组别	n	α/β	$\alpha/\beta+\gamma$	$\gamma/\beta+\gamma$
基因转染组	20	2.68 ± 1.31 *	1.72 ± 0.79 *	0.90 ± 0.08
空白对照组	20	6.35 ± 1.24	2.94 ± 0.86	0.97 ± 0.06

*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

3 讨 论

微小 RNA 可通过与靶 mRNA 的互补配对而在转录后水平上对基因的表达进行负调控。Fu 等^[5]利用斑马鱼作为模式生物, 发现 miR-144 在红系祖细胞内特异性表达, 它通过与其靶基因 Klfd 的 3' 非翻译区特异性相互作用来抑制 Klfd 的功能, 从而阻止红细胞内产生过量的 α -珠蛋白, 维持红细胞发育过程中 α -珠蛋白水平的稳定, 该研究可能对地贫的临床调节治疗发挥重要作用。笔者在前期的研究中也发现重型地贫患者外周血中 miR-144 的表达异常, 并 α -珠蛋白的表达呈负相关性, 但它如何调控珠蛋白的平衡状态尚不明确。

重型 β 地贫的分子遗传学基础是 β 珠蛋白基因的缺失或缺陷使 β 珠蛋白链合成受抑制。笔者运用 RT-PCR 法检测重型 β 地贫患儿珠蛋白基因表达情况, 结果提示重型 β 地贫患儿中, α/β 、 $\alpha/\beta+\gamma$ 的 mRNA 比值均显著升高。证明重型 β 地贫患儿造成类 α 链与类 β 链合成的不平衡状态是 α 珠蛋白链相对过剩。因此 β 地贫根本的病理基础就是和珠蛋白链的不平衡程度及过多的 α 链相关^[6]。 α 链大量过剩加之 α 链很不稳定, 容易发生沉淀, 在幼红细胞及红细胞中形成包涵体, 红细胞渗透脆性增加, 变形性差, 部分红细胞未成熟即在骨髓内被破坏, 造成无效造血。

近年来, 基因治疗靶向首选的是调控 β 珠蛋白基因, 其次是减少 α/β 珠蛋白链的不平衡。基因导入最理想的模式是将 β 地贫患者的造血干细胞取出, 在体外导入并整合正常的 β 珠蛋白基因后再植入患者体内^[7]。多项研究已证明这一方法的有

效性, 但直接导入 β 珠蛋白基因需要全部或大部分造血干细胞得到基因矫正后才能达到治疗水平, 且目前还存在基因载体导入率低, 外源基因在体细胞内表达水平不高, 达不到治疗水平等难题, 使这一治疗在临幊上应用仍很遙远^[8-10]。笔者对重型 β 地贫患儿外周血早红细胞经 miR-144 基因转染后珠蛋白肽链 α 、 β 、 γ mRNA 的表达情况分析发现: 与重型 β 地贫患儿空白对照组比较, 基因转染组 α/β 、 $\alpha/\beta+\gamma$ 比率水平均降低, 差别有统计学意义, 但 $\gamma/\beta+\gamma$ 的比率变化无统计学意义。因此减少 α 珠蛋白链的合成, 改善 α 与非 α 链珠蛋白的合成失衡, 减少红细胞内包涵体的形成, 减少溶血, 改善 β 地贫症状, 这一新的治疗方式将有助于重型地贫患者的康复, miR-144 基因可能成为一种新调节靶点。

因此, 笔者研究认为, 适当下调内源性 α 珠蛋白基因表达, 减少 α 珠蛋白肽链合成可能比增加 β 珠蛋白肽链生成更有助于改善重型 β 地贫患者症状, 调节重型 β 地贫患者内源性 miR-144 基因的表达, 通过体内生物调节来改善患者珠蛋白基因 $\alpha/\beta+\gamma$ 的比例失衡, 将为重型 β 地贫的临床治疗提供新靶点与新手段, 同时为临床相关红细胞疾病的发病机制提供新的理论依据。

参考文献

- Shivdasani RA. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation[J]. Blood, 2006, 108(12): 3646-3653.
- Bradai M, Abad MT, Pssard S, et al. Hydroxyurea can eliminate transfuse requirements in children with severe beta-thalassaemia [J]. Blood, 2003, 102(7): 1529-1530.
- Dore LC, Amigo JD, Dos Santos CO, et al. A GATA-1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008; 105(9): 3333-3338.
- 周东升, 潘晓龙, 王传发. 耐亚胺培南鲍曼不动杆菌产碳青霉烯酶基因型研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(7): 631-633.
- Fu YF, Du TT, Dong M, et al. Mir-144 selectively regulates embryonic $\{\alpha\}$ -hemoglobin synthesis during primitive erythropoiesis[J]. Blood, 2009, 113(6): 1340-1349.
- Lisowski L, Sadelain M. Current status of globin gene therapy for the treatment of beta-thalassaemia[J]. Br J Haematol, 2008, 141(3): 335-345.
- 梁玉全, 吴素芹, 谢健敏, 等. 广东顺德地区 α 和 β 地中海贫血的分子流行病学调查[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(7): 629-630.
- 刘容容, 赖永榕, 马吉. 脂质体转染反义脱氧寡核苷酸对 K562 细胞 α 珠蛋白基因表达及细胞增殖的影响[J]. 中华实验血液学杂志, 2007, 15(5): 1065-1069.
- Putthenveetil G, Scholes J, Carbonell D, et al. Successful correction of the human beta-thalassemia major phenotype using a lentiviral vector[J]. Blood, 2004, 104(12): 3445-3453.
- Sadelain M, Boulad F, Lisowski L, et al. Stem cell engineering for the treatment of severe Hemoglobinopathies[J]. Curr Mol Med, 2008, 8(7): 690-697.

(收稿日期: 2011-10-09)