

DOI:10.19296/j.cnki.1008-2409.2023-05-001

· 专家论坛 ·

· EXPERT FORUM ·

儿童早老症家系端粒损耗与 *TERT* 基因表达^①

孙向荣^②, 张瑀欣, 郭爽, 张明智, 徐健^③, 舒伟^③

(桂林医学院智能医学与生物技术学院, 广西高校医药生物技术与转化医学重点实验室,
广西桂林 541199)

专家简介 舒伟, 理学博士, 教授, 硕士研究生导师, 美国耶鲁大学医学院遗传系访问学者。研究领域为遗传病分子诊断、致病机制和肿瘤基因治疗。主持国家自然科学基金3项、广西自然科学基金2项, 参与省部级以上课题10余项。以第一作者或者通信作者在 *J Cell Mol Med*、*Mol Bio Cell* 和 *Exp Dermatol* 等期刊发表研究论文20余篇, 获得国家发明专利1项, 实用新型专利1项, 主编教材1部, 获得省级教学和科研奖励多项。



摘要 目的: 分析儿童早老症患者及其家系成员外周血白细胞的端粒相对长度和 RNA 测序(RNA-seq)结果, 探究儿童早老症端粒损耗及致病分子机制。方法: 采集广西壮族自治区贺州地区1个 *LMNA* R527C 突变型早老症家系(3名患者和23名正常家系成员)的外周血样本, 分离白细胞。提取白细胞DNA, 实时荧光定量PCR分析家系成员的端粒相对长度, 同时对白细胞进行RNA-seq, 并进行生物信息学分析。结果: 该家系患者的端粒相对长度短于家系同龄成员, 端粒相对长度与年龄呈负相关, 家系中早老症患者外周血白细胞端粒酶逆转录酶(*TERT*)基因表达下调, *c-Fos*基因表达上调。结论: 外周血 *TERT* 基因表达下调可能与早老症患者的端粒损耗相关, *c-Fos* 基因表达上调可能在早老症致病的分子机制中起重要作用。

关键词: 儿童早老症; *LMNA*; 端粒; 端粒酶逆转录酶

中图分类号: R339.3

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2023)05-0001-06

Relative telomere attrition and gene expression of

TERT in progeria syndrome^①

SUN Xiangrong^②, ZHANG Yuxin, GUO Shuang, ZHANG Mingzhi, XU Jian^③, SHU Wei^③

(School of Intelligent Medicine and Biotechnology, Key Laboratory of Medicine Biotechnology and Translational Medicine, Education Department of Guangxi Autonomous Region, Guilin Medical University, Guilin 541199, China)

① 基金项目: 国家自然科学基金项目(32060157); 国家级大学生创新创业训练计划项目(202210601048)。

② 第一作者简介: 孙向荣, 桂林医学院在读硕士研究生, 研究方向为生物医学工程。

③ 通信作者: 徐健, E-mail: guilin.xuj@163.com; 舒伟, E-mail: shuwei7866@126.com。

Abstract Objective: To investigate the relative telomere length and RNA sequencing (RNA-seq) of peripheral blood leukocytes from a family with progeria, and to explore the molecular mechanism of this disease as well as its telomere attribution. Methods: The peripheral blood samples were collected from a *LMNA* R527C mutant family with progeria (3 patients and 23 normal family members) in Hezhou, Guangxi Zhuang Autonomous Region. White blood cells were isolated and its DNA were extracted. The relative telomere length of the family members was analyzed using real-time fluorescence quantitative PCR. At the same time, the RNA-seq on white blood cells from patients were performed, its data were analyzed by bioinformatics. Results: The relative telomere length of the three patients was shorter than that of its peers, and there was a negative correlation between the relative telomere length and the age of the family members. The gene expression of telomerase reverse transcriptase (*TERT*) was down-regulated, while the *c-Fos* gene expression was up-regulated. Conclusion: The down-regulation of *TERT* gene expression may be related to telomere attrition in the peripheral blood leukocytes of patients with progeria, but the up-regulation of *c-Fos* gene expression might play an important role in the molecular mechanism of progeria.

Keywords: progeria syndrome; *LMNA*; telomere; telomerase reverse transcriptase

儿童早老症,又称早老病,是一种极为罕见的遗传因素导致的过早老化性疾病^[1]。经典的汉氏儿童早老综合征(Hutchinson-Gilford progeria syndrome, HGPS, OMIM 数据库编号:176670)是由于编码 A/C 型核纤层蛋白的 *LMNA* 基因发生点突变引起,突变基因表达产物为早老蛋白,它在细胞内异常蓄积而引起核变形、基因表达失调、DNA 修复缺陷、端粒缩短和基因组不稳定等,从而导致细胞衰老,并引起一系列过早老化的临床病症^[2-3]。HGPS 为第 11 号外显子中 *LMNA* 基因一个等位基因发生单核苷酸碱基置换(G608G:GGC→GGT),造成 mRNA 剪切位点改变,形成一个截短的突变的早老蛋白(progerin)。研究发现,*LMNA* 基因上其他位点的突变,如 R527C、R471M 和 G608S(lamin A 蛋白第 527、471 和 608 分别发生错义突变)等位点突变同样能引起早老症^[4-5]。研究表明,端粒长度与细胞衰老表型关系密切,早老症是一种快速的病理性衰老。研究发现,早老蛋白过表达的成纤维细胞,端粒会加速缩短。此外,还发现端粒酶的重新表达能促进细胞增殖,并能延长 HGPS 患者的细胞寿命^[6-7]。由此可见,端粒损耗与早老症的发生发展密切相关,然而其发病机制有待进一步研究。

本文就在广西发现的一个 *LMNA* R527C 纯合突变型儿童早老症家系进行调查^[8-9],对其病理特征、家系成员的白细胞端粒长度、端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, *TERT*)的表达等进行分析,并利用生物信息学方法探究早老症患者端粒损

耗的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

广西壮族自治区贺州地区的一早老症家系,先证者为 7 岁女孩,2009 年就诊于广西医科大学第一附属医院皮肤科^[1]。随后,征得患者及家属同意,并签署知情同意书后,调查了先证者整个家系。本研究的实施符合医学伦理规范要求,获得广西医科大学医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 基因突变位点分析 采集先证者父系和母系两个家族中的 3 名患者和 24 名正常成员的外周血各 6 mL,分离白细胞,提取基因组 DNA 进行 *LMNA* 基因突变位点分析。

1.2.2 端粒相对长度的检测 用酚-氯仿法提取外周血全基因组 DNA, NanoDrop 2000 微量紫外分光光度计测定其纯度及浓度。Real-time PCR 检测端粒相对长度,反应体系为 20 μ L,其中 Mix 反应缓冲液 10 μ L,上下游引物终浓度为 300 nM, DNA 模板 1 μ L,用双蒸灭菌水补足体积至 20 μ L。PCR 反应在 Realplex4 荧光定量 PCR 仪(德国 Eppendorf 产品)上进行。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。引物由北京六合华大基因科技有限公司合成, *TERT* 上游引物: 5'-CGGTTTGTGTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTT-3'; *TERT* 下游引物: 5'-GGCTTGCCCTTACCCTTACC

CTTACCCTTACCCTTACCCT-3'。

1.2.3 相对端粒长度分析 端粒相对长度 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 取 3 次测量结果的均值作统计分析,采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析。相对端粒长度与调查年龄的关系用线性回归方程分析。

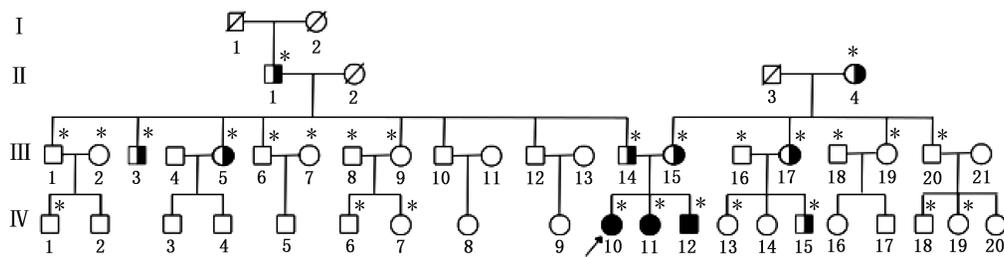
1.2.4 RNA-seq 分析 采集 3 名患者及 3 名家系同龄正常儿童血样各 4 mL(抗凝全血),将 3 名家系同龄正常儿童血样混合作为对照,分离白细胞。将 4 个样本送往深圳华大基因科技服务有限公司进行 RNA 测序(RNA-seq)分析。从 RNA-seq 结果中分析 3 例早老患者及对照 *TERT* 基因的 mRNA 表达差异。

1.2.5 *TERT* 关联基因分析 在 genecard 网站上以“*TERT*”为关键词搜索受它其表达调控和与之相互作用的蛋白。

2 结果

2.1 *LMNA* 基因突变

先证者家系 DNA 检测、分析显示,IV 10、IV 11、IV 12 为 3 位儿童早老症患者,其 *LMNA* 基因为 R527C 突变纯合子,其父母为 *LMNA* 基因 R527C 突变杂合子携带者,见图 1。

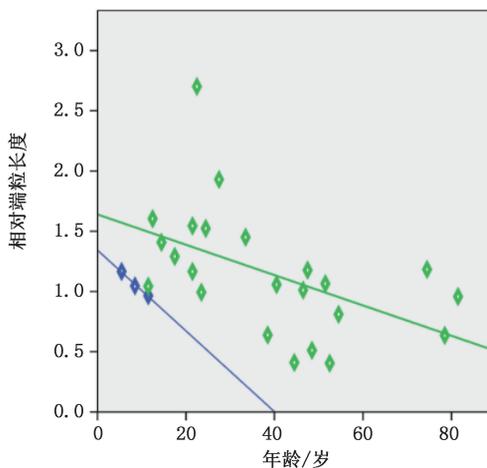


箭头所指为家系中早老症先证者,另有两名同胞患病(黑色填充),患者父母为致病基因携带者(黑色半填充)。*表示采到血样的家系成员。

图 1 早老症患者家系 *LMNA* 基因图谱

2.2 端粒相对长度与年龄的关系

家系正常成员的端粒相对长度和年龄呈负相关,相关系数为 0.99。患者的端粒相对长度短于家系正常儿童,见图 2。



蓝色表示患者;绿色表示家系正常成员。

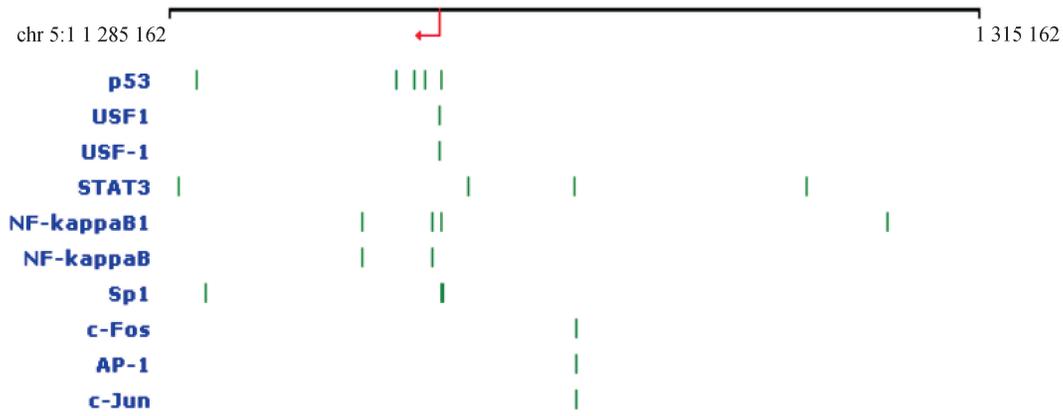
图 2 早老症家系端粒相对长度与年龄的相关性分析

2.3 *TERT* 基因表达

对照的 *TERT* 基因在外周血白细胞中的 mRNA 检测值为 45,而 3 名 HGPS 患者的 *TERT* 基因在外周血白细胞中的 mRNA 检测值分别为 29、12 和 19,患者的 *TERT* 基因 mRNA 的检测值显著低于对照。

2.4 *TERT* 基因启动子区转录因子结合位点

利用 P-Match 1.0 程序,输入 *TERT* 基因上游至 5'侧翼 3 000 bp 的序列,搜索 TRANSFAC 5.0 数据库中人类转录因子结合元件,分别对 *TERT* 基因的正义链、负义链转录因子结合元件进行分析。结果显示,保守区域有多个转录因子结合位点,见图 3。



箭头表示转录起始位点,竖线表示转录因子结合位点。

图 3 TERT 基因启动子区转录因子结合位点预测

2.5 TERT 基因表达的调控基因

RNA-seq 与生物信息学分析显示, c-Fos、P53、USF1 和 STAT3 等转录因子可能参与了 TERT 基因的表达调控。

2.6 TERT 蛋白与其他蛋白的相互作用

利用 NCBI 网站上的蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 分析软件分析,发现 TERT 蛋白与 TP53、UBC、XRCC5 等蛋白之间存在相互作用,见图 4。

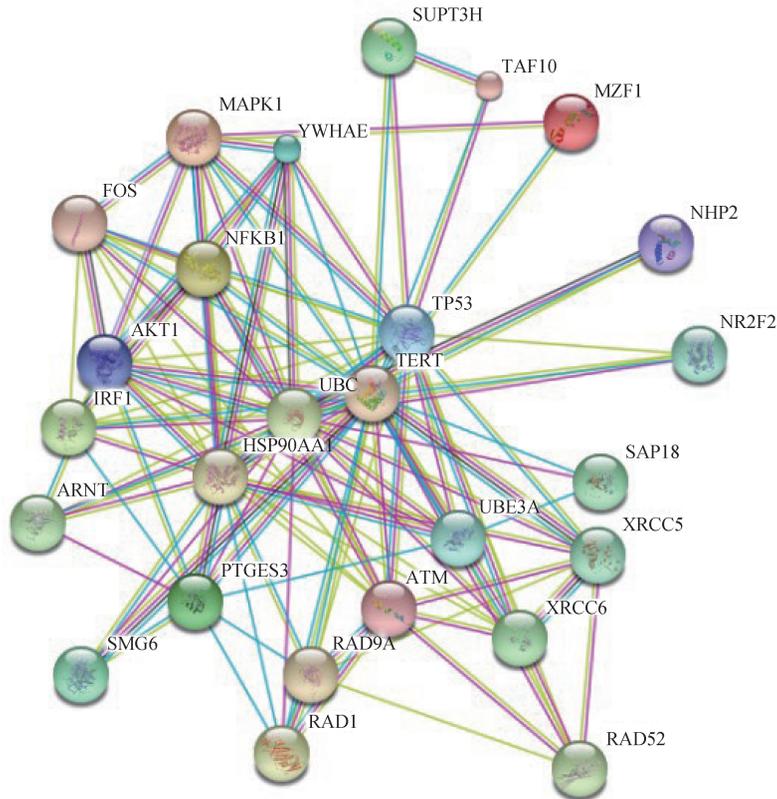


图 4 TERT 蛋白与其他蛋白相互作用的网络图

3 讨论

儿童早老症家系非常罕见,是宝贵的遗传资源,医学科学工作者通过这个疾病模型可以认识人类生理性衰老和病理性衰老的众多科学问题。本研究调查、分析在中国广西壮族自治区发现的1个早老症家系,家系中的3位早老症患者在7岁之前就存在不同程度的端粒缩短,白细胞 *TERT* 基因表达下调,提示该家系患者存在端粒损耗。这为早老症的诊断和治疗提供了线索,并为深入探索早衰的分子机制提供了基础。

儿童早老症是一种快速进行性病理性衰老,可以作为研究生理衰老机制的模型^[10]。端粒是人类染色体末端一种维持染色体稳定性的特殊结构,随细胞的分裂而缩短,真核细胞每分裂1次,端粒会缩短50~100 bp。当端粒长度缩短至某一程度时,端粒对基因组的稳定性就起不到保护作用,从而造成细胞的老化、凋亡或恶变^[11-13]。维持端粒长度的主要机制是端粒酶对端粒重复序列的延伸。端粒酶是一种具有逆转录酶活性的核糖核蛋白复合体,以端粒酶 RNA 为模板,以端粒酶逆转录酶(*TERT*)为催化亚单位,以端粒的3'末端结构为引物,利用逆转录方式合成端粒重复序列(TTAGGG),来延长细胞分裂时丢失的端粒结构,从而恢复端粒功能,使细胞获得增殖能力。端粒功能障碍是导致衰老细胞基因组不稳定性的主要原因之一。研究表明,高加索人群HGPS患者的端粒较短,可能与其衰老过早相关^[14]。本研究通过实时荧光定量PCR分析,发现3名HGPS患者均有不同程度的端粒损耗,且端粒损耗与年龄呈正相关。说明HGPS患者特有的早老表型与端粒损耗密切相关。Gonzalo等^[15]研究发现,体外培养HGPS患者的成纤维细胞在增殖过程中,端粒损耗比正常人成纤维细胞快,从而导致DNA损伤和过早进入衰老状态,端粒酶的表达能削弱早老蛋白诱导的DNA损伤信号和抑制P53、Rb活化途径,从而促进细胞增殖,延长HGPS患者的细胞寿命。

TERT 只在干细胞和肿瘤细胞中表达,在已经分化了的正常体细胞中几乎不表达。本研究通过RNA-seq分析发现,3名HGPS患者外周血白细胞中的*TERT* 基因 mRNA 表达均下调,提示外周血白血

胞中端粒损耗与 *TERT* 基因表达下调之间有关联。推测骨髓来源的造血干细胞本身可能由于存在 *LMNA* 基因突变,导致染色质重构和广泛的基因改变,最后影响了 *TERT* 基因的表达。*TERT* 基因表达下调后,干细胞的端粒在分裂复制过程中的损耗得不到 *TERT* 的修复,从而导致其端粒较正常干细胞短。

TERT 基因启动子区有端粒酶表达最重要的调控元件,许多转录因子都参与对 *TERT* 基因表达的调控。已被证实的能直接或间接调节人类 *TERT* 基因的转录因子包括转录激活因子(*c-Myc*、*SP1*、*HIF-1*、*AP2*、*ER*、*ETS*、*USFs* 等)和阻遏物(*P53*、*WT1*、*Menin* 等)^[16-18]。本研究利用 GENECARDS 数据库,预测 *TERT* 基因启动子区有多个转录因子结合位点。根据预测的位点再分析患者 RNA-seq 数据,发现3名HGPS患者白细胞中,*c-Fos* 表达明显上调,*P53*、*USF1* 和 *STAT3* 有不同程度的下调。

c-Fos 是一个表达丰度较高的转录因子,本研究对象系患者中的 *c-Fos* 表达丰度是家系正常对照的4倍以上。*c-Fos* 编码一种核蛋白转录因子,可在多种刺激下即刻产生,调控下游基因转录,启动细胞增殖、分化和凋亡等过程^[19]。*P53*、*USF1* 和 *STAT3* 在衰老症患者中有不同程度的表达下调,但不具有统计学意义,可能是因为观察的样本数较少,还有待深入探究。

c-Fos 基因高度保守,调控多种基因转录,是转录激活因子-1(*AP-1*)的组成成分,可在机械应力等多种刺激下表达增强^[20]。核纤层蛋白A基因突变导致细胞核核纤层结构受损,从而导致细胞核对机械应力反应异常可能是 *c-Fos* 表达上调的重要原因,*c-Fos* 转录因子表达异常可能在儿童早老症致病机制中起到重要作用。

参考文献:

- [1] BURTNER C R, KENNEDY B K. Progeria syndromes and ageing: what is the connection? [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(8):567-578.
- [2] TALUKDER P, SAHA A, ROY S, et al. Progeria-a rare genetic condition with accelerated ageing process[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2023, 195(4):2587-2596.

- [3] ERIKSSON M, BROWN W T, GORDON L B, et al. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome [J]. *Nature*, 2003, 423(6937):293-298.
- [4] HO C Y, LAMMERDING J. Lamins at a glance[J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 9):2087-2093.
- [5] GORDON L B, SHAPPELL H, MASSARO J, et al. Association of lonafamib treatment vs no treatment with mortality rate in patients with Hutchinson-Gilford progeria syndrome [J]. *JAMA*, 2018, 319(16):1687-1695.
- [6] LI Y H, ZHOU G, BRUNO I G, et al. Telomerase mRNA reverses senescence in progeria cells [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 70(6):804-805.
- [7] LI Y H, ZHOU G, BRUNO I G, et al. Transient introduction of human telomerase mRNA improves hallmarks of progeria cells[J]. *Aging cell*, 2019, 18(4):e12979.
- [8] 覃霞,罗彦彦,袁广之,等.一个儿童早老症家系临床特征分析和致病基因研究[J]. *中华皮肤科杂志*, 2015, 48(3):184-186.
- [9] 朱兰玉,刘恒,李东明,等.儿童早老症四例临床特征及基因变异分析[J]. *中华儿科杂志*, 2019, 57(8):636-638.
- [10] BATISTA N J, DESAI S G, PEREZ A M, et al. The molecular and cellular basis of Hutchinson-Gilford progeria syndrome and potential treatments [J]. *Genes (Basel)*, 2023, 14(3):602.
- [11] WOOD A M, LASTER K, RICE E L, et al. A beginning of the end: new insights into the functional organization of telomeres[J]. *Nucleus*, 2015, 6(3):172-178.
- [12] XU Q, MOJIRI A, BOULAHOUACHE L, et al. Vascular senescence in progeria: role of endothelial dysfunction[J]. *Eur Heart J Open*, 2022, 2(4):oeac047.
- [13] REY-MILLET M, POUSSE M, SOITHONG C, et al. Senescence-associated transcriptional derepression in subtelomeres is determined in a chromosome-end-specific manner[J]. *Aging Cell*, 2023, 22(5):e13804.
- [14] CAO K, BLAIR C D, FADDAH D A, et al. Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(7):2833-2844.
- [15] GONZALO S, KREIENKAMP R, ASKJAER P. Hutchinson-Gilford progeria syndrome: a premature aging disease caused by LMNA gene mutations [J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 33:18-29.
- [16] WOOD A M, LASTER K, RICE E L, et al. A beginning of the end: new insights into the functional organization of telomeres[J]. *Nucleus*, 2015, 6(3):172-178.
- [17] TRANI J P, CHEVALIER R, CARON L, et al. Mesenchymal stem cells derived from patients with premature aging syndromes display hallmarks of physiological aging[J]. *Life Sci Alliance*, 2022, 5(12):e202201501.
- [18] LIU H, LI D M, ZHOU L, et al. LMNA functions as an oncogene in hepatocellular carcinoma by regulating the proliferation and migration ability [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(20):12008-12019.
- [19] VAN SCHAIK T, VOS M, PERIC-HUPKES D, et al. Cell cycle dynamics of lamina-associated DNA [J]. *EMBO Rep*, 2020, 21(11):e50636.
- [20] ZHOU L L, XUE C J, CHEN Z Y, et al. c-Fos is a mechanosensor that regulates inflammatory responses and lung barrier dysfunction during ventilator-induced acute lung injury[J]. *BMC Pulm Med*, 2022, 22(1):9.

[收稿日期:2023-06-20]

[责任编辑:涂剑,向秋 英文编辑:李佳睿]