

一例 T 细胞淋巴瘤白血病患者 A20 基因启动子和 3'UTR 区新突变的鉴定

周玲玲 罗更新 朱丽花 韦祁 魏永强 冯茹 李扬秋

【摘要】 目的 分析 T 细胞淋巴瘤白血病患者 A20 基因非编码区(UTR)突变情况,了解 A20 基因调控改变特点。方法 利用 PCR 和核苷酸序列分析方法检测 52 例 T 细胞白血病患者和 99 名健康对照者外周血单个核细胞中 A20 基因启动子区和 3'UTR 基因突变。结果 在 1 例 T 细胞淋巴瘤白血病患者中,发现其 A20 基因启动子区存在错义突变(c.-672T>G),该突变在基因库中已作为单核苷酸多态性登记(rs139054966),同时发现在 A20 基因 3'UTR mRNA 的 3916 位点存在核苷酸替换(C>G),而在其他 T 细胞白血病样本和健康对照组中均未发现这两种改变。结论 首次发现 T 细胞淋巴瘤中存在 A20 基因的 rs139054966(c.-672T>G)和 3916(C>G)改变,前者位于转录因子 P53 的结合区域,其具体意义有待进一步明确。

【关键词】 A20 基因; 3'非编码区; 启动子; T 细胞淋巴瘤白血病; 多态性,单核苷酸

基金项目: 广东省科技计划项目(2016A020215123、2015A050502029); 国家自然科学基金(91129720)

Detection of promoter and 3' UTR mutation in A20 gene of a case with T cell lymphoma cell leukemia Zhou Lingling, Luo Gengxin^{*}, Zhu Lihua, Wei Qi, Wei Yongqiang, Feng Ru, Li Yangqiu. ^{*}Department of Hematology, the First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510630, China
Corresponding author: Luo Gengxin, Email: jdluogx@163.com

【Abstract】 Objective To clarify the characteristics of the A20 regulatory changes by analyzing mutations in the non-coding region of the A20 gene in patients with T-cell lymphoma leukemia(T-LCL). **Methods** PCR and nucleotide sequence analysis were used to detect mutations in the non-coding region of the A20 gene, and DNA samples from PBMCs of 52 cases of T-LCL and 99 healthy controls. **Results** A missense mutation(c.-672T>G) was detected in the A20 gene promoter from one T-LCL patient, which has been registered as a SNP(rs139054966) in gene bank. Meanwhile, a new mutation was detected in the 3'UTR mRNA (3916(C>G)). These two mutations were absent in other T-LCL samples and controls. **Conclusion** The rs139054966 (c.-672T>G) and 3916(C>G) mutations in the A20 gene were detected in T-LCL patients for the first time. There was also rs139054966 located on the binding region of the transcription factor P53, and its significance remained to be further clarified.

【Key words】 A20 gene; 3'UTR; Promoter; T cell lymphoma cell leukemia; Polymorphism, single nucleotide

Fund program: Guangdong Provincial Science and Technology Plan Project (2016A020215123, 2015A050502029); National Natural Science Foundation of China (91129720)

T 细胞白血病/淋巴瘤(T cell leukemia/ lymphoma)是一类预后较差的血液肿瘤,T 细胞淋巴瘤白

血病(T cell lymphoma cell leukemia, T-LCL)是淋巴瘤白血病期,具有高度侵袭性,预后差^[1-2],这与其发病机制复杂和肿瘤异质性相关。涉及 T 细胞白血病发生的分子多数与 T 细胞活化信号通路相关,如 Notch1 等^[3]。近年来,有研究显示 NF-κB 的负调控因子 A20(又称肿瘤坏死因子α诱导蛋白, TNFAIP3)的异常表达和功能缺失与淋巴细胞肿瘤密切相关^[4-5]。也有研究显示 A20 基因的单核苷酸多态性(SNP)与一些自身免疫性疾病相关^[6]。我们在前期

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2018.10.012

作者单位:510515 广州,南方医科大学南方医院血液内科(周玲玲、韦祁、魏永强、冯茹);暨南大学附属第一医院血液科(罗更新);暨南大学附属第一医院风湿免疫科(朱丽花);暨南大学血液病研究所(李扬秋)

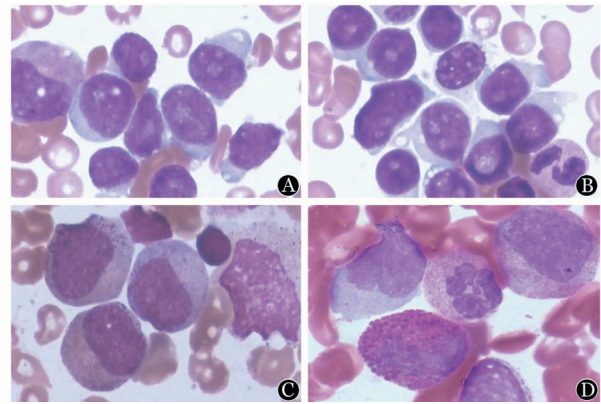
通信作者:罗更新,Email: jdluogx@163.com

研究中也发现T细胞肿瘤中存在A20基因的突变或SNP^[7],但有关A20基因非编码区(UTR)的SNP等改变并不清楚,后者涉及到A20的表现遗传调控。故本研究对A20基因启动子区和3'UTR核苷酸序列进行检测,并对1例T-LCL患者的A20基因进行突变检测,发现2个尚未报道的新突变,现报道如下。

病例与方法

1. 临床资料:患者,男,19岁,因颈部多发肿物就诊于外院,血常规示:WBC 4.64 ×10⁹/L,HGB 129 g/L,PLT 207×10⁹/L;淋巴结活检病理示:T淋巴细胞型淋巴瘤;免疫组化示:CD68(-),TdT(灶+),CD20(-),CD3(灶+),Ki-67 50%,CD21(-),CD10(灶+)。10 d后就诊于本院。查胸部CT示:右肺上叶前段少许炎症;双侧腋窝及纵隔内多发淋巴结肿大;前纵隔类圆形软组织密度影。脾脏体积增大。B超显示:左肾小结石;颈部双侧血管鞘、耳前、耳后、颌下见肿大淋巴结。骨髓细胞形态学检测显示淋巴瘤白血病可能性大(图1A、B)。骨髓免疫分型示:病态细胞组群占62.15%,呈CD45弱阳性,SSC较小。细胞表型:CD34(+),CD38(+),CD7(++),CD10(部分+),CD3(dim+),CD33(+),CD45RA(+),cTdT(+),cCD3(+).骨髓FISH示:未见异常杂交信号。确诊T淋巴瘤母细胞淋巴瘤IV期A。先后予Hyper-CVAD A+左旋门冬酰胺酶(L-Asp)、Hyper-CVAD B、VDCLP、EPOCH+培门冬酶(PEG-Asp)化疗方案后,骨髓细胞形态学显示T淋巴瘤母细胞白血病完全缓解(CR),幼稚淋巴细胞占0.020(图

1C、D)。开始予2个疗程EPOCH+PEG-Asp化疗,进行无关供者异基因造血干细胞移植。患者移植后+12 d粒系重建,+14 d巨核系重建。本研究的对照组包括51例T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)和99名健康人的外周血单个核细胞样本。



A、B:初诊时骨髓细胞形态学;C、D:移植时骨髓细胞形态学
图1 T细胞淋巴瘤白血病患者骨髓形态学结果(瑞氏-吉姆萨染色,×100)

2. 实验方法:收集患者和健康人EDTA抗凝外周血2 ml,按常规方法分离外周血单个核细胞和提取DNA,用于PCR检测。根据基因库所登记的A20基因的序列信息(NM_006290.3)确定A20基因启动子和3'UTR的位置和序列,利用Primer premier5.0软件设计7对引物,引物由上海英潍捷基生物有限公司合成(表1)^[8]。本研究使用Invitrogen公司的Platinum® Taq DNA聚合酶试剂盒,反应体系为20 μl:基因组DNA1 μl、Taq聚合酶0.2 μl、5×缓冲液4 μl、dNTP 2 μl、Mg²⁺ 2 μl、上下游引物各1 μl,

表1 用于PCR检测A20基因序列的引物

名称	序列(5'→3')	功能	产物大小(bp)
A20-P1-F	TTTACAAAGGAGCACCAGCAGGAGA	A20启动子	754
A20-P1-R	ATTACATTTAAGAATACTTGTCAGG		
A20-P2-F	AAGTGCCACCTCCATCC	A20启动子	681
A20-P2-R	AGCGGTGACAGCCTTTGG		
A20-P3-F	GGTGAGTGTGTTCTGATTC	A20启动子	634
A20-P3-R	TCACGTGACTCTCTGGGTCG		
A20-UTR1-F	CAACGGATACTGCAACGAAT	A20 3'UTR	512
A20-UTR1-R	CTCGCTGCCATGAGGATCT		
A20-UTR2-F	GAGAAGCCAGAGCCATTCCACCT	A20 3'UTR	516
A20-UTR2-R	GCTCATGCCCAACAACAACCA		
A20-UTR3-F	GCTGCCCTAGAAGTACAATA	A20 3'UTR	650
A20-UTR3-R	GACAGCAACCACAAAGCACAC		
A20-UTR4-F	CCCAGAGATAAAGGCTGCCAT	A20 3'UTR	450
A20-UTR4-R	GGAAGCACAGTCTTAATATC		

注:P:启动子;F:上游引物;R:下游引物;UTR:非编码区

以及超纯水 8.8 μl;扩增条件:首先 94 °C 5 min、94 °C 1 min、57 °C 1 min、72 °C 1 min 循环 30 次,最后 72 °C 10 min。扩增产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳。挑取阳性 PCR 扩增产物送 Invitrogen 公司测序。

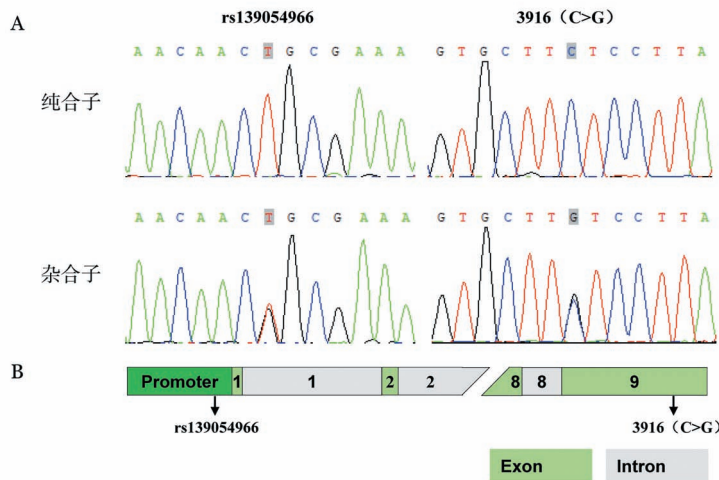
结 果

1. A20 基因启动子及 3'UTR 特点分析和扩增结果:根据 GeneBank 数据库([http:// www.ncbi.nlm.gov](http://www.ncbi.nlm.gov))中所登记的 A20 基因的序列信息,在 A20 翻译起始位点上游 2 kb 为启动子序列,设计 3 段引物扩增 A20 基因启动子;而 A20 3'UTR 全长共 1 995 bp,设计 4 段引物扩增 3'UTR。所扩增的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析,均可见扩增出相应大小的 DNA 片段的阳性产物,各片段大小分别见表 1。

2. 1 例 T-LCL 患者 A20 基因启动子和 3'UTR 测序结果:对各 PCR 产物进行核苷酸序列分析,结

果显示该患者 A20 基因启动子区存在错义突变 c.-672T>G,经检索,该位点为基因库登记的 SNP 改变,编号为 rs139054966(图 2A),同时发现在 3'UTR mRNA 的 3916 位点发现核苷酸替换(C>G)(图 2A),这两个突变在其他 51 例 T-ALL 患者和 99 名对照者中未发现。本研究所发现的 T-LCL 患者中 A20 基因座上突变/多态性位置如图 2B。

3. 靶突变位点功能预测及分析:通过 TargetScan、miRBase 等软件预测能与 A20 3'UTR 区域结合的 miRNA,发现 3916 C>G 位于 miRNA4428、miRNA3173-3p 和 miRNA4434 与 A20 3'UTR 结合区域内(图 3A)。通过 PROMO、GENECARDS 等数据库查找 A20 基因的转录因子,发现 A20 基因启动子检出的错义突变 rs139054966(c.-672T>G)位于 P53、SP3、Egr-1 和 E2F 等转录因子结合位点上(图 3B)。



A: A20 基因启动子 SNP(rs139054966)和 3'UTR 3916 位点核苷酸替换(C>G);B: A20 基因结构和突变位点示意图

图 2 T 细胞淋巴瘤白血病患者中 A20 基因单核苷酸多态性(SNP)和突变情况

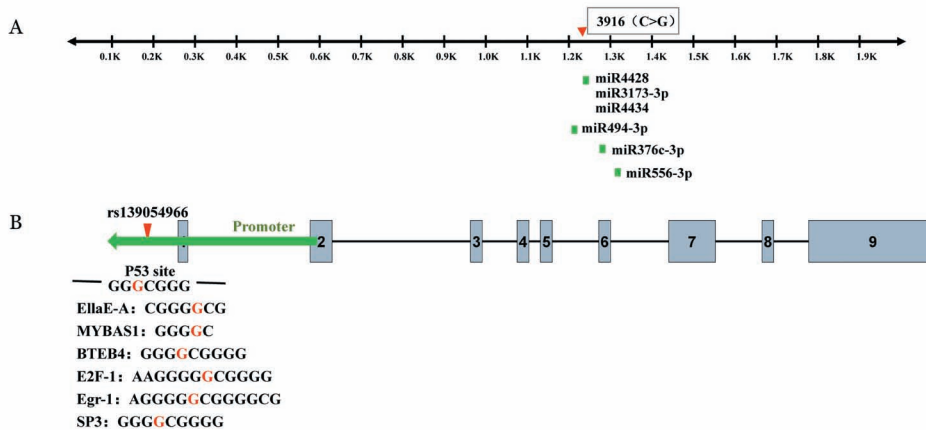


图 3 A20 基因 3916(C>G)(A)和 rs139054966 突变位点(B)功能预测示意图

讨 论

T-LCL为淋巴瘤细胞播散入血液及侵犯骨髓阶段,其肿瘤克隆的特点可能与T细胞白血病细胞有所差异,这些差异可能体现在遗传学和表观遗传学上的改变。基于A20在淋巴瘤尤其是B细胞淋巴瘤中的改变及其可能在肿瘤发生中的作用^[9],我们在前期研究中也发现了T-ALL和一例皮肤性T细胞淋巴瘤(Sezary综合征)患者的A20基因突变和SNP改变特点有所不同^[7,10]。本研究进一步比较分析了T-LCL的A20改变特点。结果发现其启动子和3'UTR检出的SNP是在其他T-ALL中未发现的改变。这些突变的意义还有待进一步通过功能验证进行明确。

对A20启动子特征分析发现其主要含有识别NF- κ B转录因子的 κ B元件,这是A20主要调控NF- κ B的依据。通过PROMO、GENECARDS等数据库查找A20基因的转录因子,发现本研究检出的A20启动子部位c.-672T>G(rs139054966)位于P53、SP3、Egr-1、E2F等转录因子结合位点上,这些转录因子尤其是P53在DNA修复和细胞凋亡等都具有重要作用。因此,该样本中所出现的A20 c.-672T>G可能涉及的影响值得我们进一步研究。

在miRNA靶基因结合位点上的基因突变,可以影响miRNA与靶基因mRNA的亲合力,miRNA与靶mRNA不完全互补,则在蛋白质翻译水平上抑制其表达。在A20基因的3'UTR中包含有4个“ATTTA”序列,“ATTTA”序列经常被发现于免疫应答炎症相关介质的3'UTR中,可以控制A20表达的瞬时性特性。通过TargetScan和miRBase等软件预测显示,本研究中所发现的A20 3916C>G位于与miRNA4428、miRNA3173-3p、miRNA4434的结合靶点,故该突变也可能通过影响这些miRNA与A20 3'UTR结合形成的空间构象而导致A20基因的异常表达^[11-12],还有待进一步通过克隆和转导突变型3'UTR来验证其功能。

综上所述,本研究通过核苷酸序列分析的方法检测一例T-LCL患者的A20基因的3'UTR和启动子区域,发现新突变3916(C>G)和SNP rs139054966,该研究补充了A20基因突变的数据,也丰富了T-LCL细胞分子遗传学改变的资料,为进一步分析疾病关联的A20基因3'UTR和启动子突变或多态性

提供基本资料。

参 考 文 献

- [1] 张景航,杨晓煜,李敏,等. MicroRNA-191在T淋巴瘤母细胞性白血病/淋巴瘤中的表达及其作用机制研究[J]. 中华血液学杂志, 2016, 37(4): 273-277. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.04.003.
- [2] 归微,赵志强,张宗,等. 淋巴瘤白血病的病理类型与临床特征分析[J]. 中华血液学杂志, 2009, 30(10): 662-666. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2009.10.005.
- [3] Valliyammai N, Nancy NK, Sagar TG, et al. Study of NOTCH1 and FBXW7 mutations and its prognostic significance in South Indian T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2018, 40(1): e1-e8. DOI: 10.1097/MPH.0000000000001006.
- [4] Kato M, Sanada M, Kato I, et al. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas [J]. Nature, 2009, 459(7247):712-716. DOI: 10.1038/nature07969.
- [5] Braun FC, Grabarczyk P, Möbs M, et al. Tumor suppressor TNFAIP3 (A20) is frequently deleted in Sézary syndrome [J]. Leukemia, 2011, 25(9):1494-1501. DOI: 10.1038/leu.2011.101.
- [6] Zhu L, Wang L, Wang X, et al. Characteristics of A20 gene polymorphisms and clinical significance in patients with rheumatoid arthritis [J]. J Transl Med, 2015, 13:215. DOI: 10.1186/s12967-015-0566-1.
- [7] Zhu L, Zhang F, Shen Q, et al. Characteristics of A20 gene polymorphisms in T-cell acute lymphocytic leukemia [J]. Hematology, 2014, 19(8): 448-454. DOI: 10.1179/1607845414Y.00000000160.
- [8] 周玲玲,朱丽花,陆帅,等. 健康人外周血中A20基因3'UTR突变与多态性分析[J].暨南大学学报:自然科学与医学版, 2016, 37(1):7-11. DOI:10.11778/j.jdx.2016.01.002.
- [9] Honma K, Tsuzuki S, Nakagawa M, et al. TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas [J]. Blood, 2009, 114(12):2467-2475. DOI: 10.1182/blood-2008-12-194852.
- [10] Zhou L, Zheng H, Huang X, et al. Different genetic alteration of A20 in a Sézary syndrome case with Va2-Ja22 T cell clone [J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2018, 14(2):e116-e123. DOI: 10.1111/ajco.12672.
- [11] Bittel DC, Kibiryeva N, Marshall JA, et al. MicroRNA-421 dysregulation is associated with tetralogy of fallot [J]. Cells, 2014, 3(3):713-723. DOI: 10.3390/cells3030713.
- [12] Hammer S, Toenjes M, Lange M, et al. Characterization of TBX20 in human hearts and its regulation by TFAP2 [J]. J Cell Biochem, 2008, 104(3):1022-1033. DOI:10.1002/jcb.21686

(收稿日期:2018-05-12)

(本文编辑:王叶青)