甲状腺激素及其类似物在制备治疗α-地中海贫血中的应用

技术领域

本发明属于地中海贫血技术领域，具体涉及甲状腺激素及其类似物在制备治疗α-地中海贫血中的应用。

背景技术

地中海贫血是世界范围内最常见的、对人类健康影响极大的单基因遗传疾病之一。其病因是由于珠蛋白基因（globin）的缺失或突变导致珠蛋白链合成障碍，从而引起血红蛋白（hemoglobin）组成比例失衡，最终导致红细胞被破坏而引发的溶血性贫血。根据受累珠蛋白链类型分类，最常见的是α-地中海贫血和β-地中海贫血。α-珠蛋白合成减少即为α-地中海贫血，β-珠蛋白合成减少即为β-地中海贫血。虽然α-地中海贫血基因携带者人数高于β-地中海贫血，并且我国的中间型α-地中海贫血（又称为HbH病）和重型 α-地中海贫血（又称Bart's胎儿水肿综合征）患者人数远高于世界其它国家和地区，是名副其实的“重灾区”，但是，到目前为止对此类疾病还未有比较成熟有效的治疗方法。因此，α-地中海贫血患者面临着巨大未满足的医疗需求。

α-地中海贫血是由于 α-珠蛋白链合成减少导致红细胞被破坏而引发的溶血性贫血。根据α-珠蛋白基因缺失或突变数量不同可分为4 种类型：（1）静止型α-地中海贫血；（2）轻型α-地中海贫血；（3）中间型α-地中海贫血（又称为HbH病）；（4）重型 α-地中海贫血（又称Bart's 胎儿水肿综合征）。其中静止型α-地中海贫血和轻型α-地中海贫血患者并不需特殊治疗；而部分贫血严重的中间型 α-地中海贫血（HbH 病）患者需要输血治疗；对于重型 α-地中海贫血（Bart's 胎儿水肿综合征）患儿，个别医院报道子宫内输血可以缓解其症状，除此以外，到目前为止还未有任何有效的治疗方法。

然而，输血治疗会带来以下问题：

1.输血会引起严重的母婴并发症，并导致患者体内铁过载进而引起多个器官损伤，主要受影响的包括心脏、肝脏、胰脏和各个内分泌器官，危及母婴生命安全。

2.输血会引起发热、发冷和出红疹等不良反应，较严重时会导致急性溶血、气管收缩和血压下降等。

3.输血可能面临经血液感染传染病的风险。

4.子宫内输血技术要求高，难度大，很难广泛应用。

5.输血费用高，特别是对需要终身输血的患者造成了巨大的经济负担。

ζ-珠蛋白是一种仅在胚胎期表达的类 α-珠蛋白，同样具有载氧功能，且编码该蛋白的基因在大部分 α-地中海贫血患者中保存完好，伴随胚胎发育进行，其表达逐渐被关闭。有研究证明，在 α-珠蛋白基因缺失的小鼠中，通过转基因方法重新表达 ζ-珠蛋白能够完全恢复 α-地中海贫血疾病小鼠的正常发育。因此，重新激活患者体内沉默的 ζ-珠蛋白基因来代偿缺损的 α-珠蛋白有望成为治疗 α-地中海贫血的一种有效方法。然而，到目前为止，还未有任何激活 ζ-珠蛋白基因表达的药物出现。

发明内容

针对现有技术中的不足，本发明的首要目的是提供甲状腺激素及其类似物在制备治疗 α-地中海贫血中的应用。

本发明的第二个目的是提供甲状腺激素及其类似物在调控 ζ-珠蛋白基因表达中的应用。

为达到上述首要目的，本发明的解决方案是：

甲状腺激素及其类似物可以在制备治疗 α-地中海贫血中得以应用。

为达到上述第二个目的，本发明的解决方案是：

甲状腺激素及其类似物可以在调控 ζ-珠蛋白基因表达中得以应用。

具体地，甲状腺激素及其类似物能够特异性上调 ζ-珠蛋白基因的表达。

Triac（也称为 Tiratricol 或 3,3',5-triiodothyroacetic acid）（化学名称：2-[4-(4-Hydroxy-3-iodophenoxy)-3,5-diiodophenyl]acetic acid，分子式：$C_{14}H_9I_3O_4$）是一种甲状腺激素类似物，用于治疗甲状腺激素抵抗综合征（Thyroid hormone resistance syndrome）、高脂血症（hyperlipidemia）、局限性脂肪代谢障碍（localized lipodystrophy）和肥胖（obesity）。另外，Triac 目前也被用于研究治疗 Allan-Herndon-Dudley 综合征的临床试验。

发明人研究发现，在 K562 细胞分化过程中，Triac 能特异显著性上调 ζ-珠蛋白基因（HBZ）的表达，并且在模式动物斑马鱼胚胎中经 Triac 处理后，ζ-珠蛋白基因（hbae5）的表达也能被特异性上调，而其它珠蛋白基因表达则没有明显上调。此外，发明人研究发现甲状腺激素（3,3',5-Triiodo-L-thyronine，简称 T3 或 3,3',5,5'-tetraiodothyronine，简称 T4）也具有类似的功能。因此，发明人首次发现甲状腺激素类似物 Triac 以及甲状腺激素（T3 或 T4）在细胞和动物水平能特异性激活 ζ-珠蛋白基因的表达，从而成为首类特异性激活 ζ-珠蛋白基因表达的小分子化合物，其将会在治疗 α-地中海贫血中发挥重要作用。

具体地，Triac 购买自美国 Selleck 生物科技有限公司，T3（3,3',5-Triiodo-L-thyronine）购买自 Sigma 公司，T4（3,3',5,5'-tetraiodothyronine）购买自生工生物工程（上海）股份有限公司。

由于采用上述方案，本发明的有益效果是：

本发明采用甲状腺激素及其类似物能够特异性激活 ζ-珠蛋白基因的表达，即通过重新激活 α-地中海贫血患者体内沉默的 ζ-珠蛋白基因来抑制红细胞被破坏，从而成为一种制备治疗 α-地中海贫血药物的方法，特别是在中间型 α-地中海贫血（HbH 病）和重型 α-地中海贫血（Bart's 胎儿水肿综合征）中的应用，这为 α-地中海贫血的治疗提供了一种经济、安全、有效的方法，并可以广泛推广使用。

附图说明

图 1 为本发明的实施例 1 中人类的 K562 细胞分化过程中各个基因的表达情况示意图（纵坐标 Relative Expression 为相对表达）。

图 2 为本发明的实施例 2 中斑马鱼胚胎经 Triac、T3 和 T4 处理后的 ζ-珠蛋白基因（hbae5）的表达情况示意图。

图 3 为本发明的实施例 3 中斑马鱼胚胎经 Triac、T3 和 T4 处理后各个基因的表达情况示意图（纵坐标 Relative Expression 为相对表达）。

具体实施方式

本发明提供了甲状腺激素及其类似物在制备治疗 α-地中海贫血中的应用。

实验材料：

K562 细胞培养于含 10%胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）的 1640 培养基中；氯化血红素（Hemin）溶解于 0.2mol/L NaOH 溶液中，处理 K562 细胞的工作浓度为 20μmol/L；Triac、T3 和 T4 溶解于二甲基亚砜（DMSO）中，处理 K562 细胞的工作浓度为 20μmol/L，处理斑马鱼胚胎的工作浓度为 5μmol/L。

以下结合实施例对本发明作进一步的说明。

实施例 1：

在 K562 细胞中，Triac 特异性激活 ζ-珠蛋白基因（HBZ）的表达过程为：

在 K562 细胞分化过程中，其分别经 hemin 或 hemin+Triac 处理 72 小时后，2000rpm 离心 5 分钟收集细胞，使用 TRIzol 试剂（Invitrogen）抽提总 RNA，然后使用逆转录试剂盒（ReverTra Ace，TOYOBO）合成 cDNA，最后使用 SYBRGreen Realtime PCR Master Mix（TOYOBO）试剂进行定量 PCR 检测基因表达水平。

定量 PCR 反应体系为：

2×SYBR Green PCR Master Mix	5ul
F-Primer（10μmol/L）	0.6ul
R-Primer（10μmol/L）	0.6ul
cDNA	1ul

ddH2O	2.8ul
Total volume	10ul

定量 PCR 反应条件为：

热启动：95℃，10 分钟；

变 性： 95℃，10 秒；

退火/延伸：60℃，30 秒。

40 个循环。

溶解曲线分析。

如图 1 所示，K562 经 Triac 处理 72 小时后，定量 PCR 结果显示 ζ-珠蛋白基因（HBZ）的表达上调 50.9 倍。

实际上，人类 ζ-珠蛋白基因（HBZ）（NM_005332.3）序列（SEQ ID NO.1）如下：

ATGTCTCTGACCAAGACTGAGAGGACCATCATTGTGTCCATGTGGGCCAAGATCTCCACG
CAGGCCGACACCATCGGCACCGAGACTCTGGAGAGGCTCTTCCTCAGCCACCCGCAGACC
AAGACCTACTTCCCGCACTTCGACCTGCACCCGGGGTCCGCGCAGTTGCGCGCGCACGGC
TCCAAGGTGGTGGCCGCCGTGGGCGACGCGGTGAAGAGCATCGACGACATCGGCGGCGCC
CTGTCCAAGCTGAGCGAGCTGCACGCCTACATCCTGCGCGTGGACCCGGTCAACTTCAAG
CTCCTGTCCCACTGCCTGCTGGTCACCCTGGCCGCGCGCTTCCCCGCCGACTTCACGGCC
GAGGCCCACGCCGCCTGGGACAAGTTCCTATCGGTCGTATCCTCTGTCCTGACCGAGAAG
TACCGCTGA。

其中，Realtime PCR 引物如下：

Human-β-actin-F	CCAACCGCGAGAAGATGA（SEQ ID NO.2）
Human-β-actin-R	CCAGAGGCGTACAGGGATAG（SEQ ID NO.3）
Human-HBA1/2-F	AAGGTCGGCGCGCACGC（SEQ ID NO.4）
Human-HBA1/2-R	CTCAGGTCGAAGTGCGGG（SEQ ID NO.5）
Human-HBZ-F	GGACCATCATTGTGTCCATGT（SEQ ID NO.6）
Human-HBZ-R	GGGAAGTAGGTCTTGGTCTGC（SEQ ID NO.7）
Human-HBE1-F	TGCATGTGGATCCTGAGAAC（SEQ ID NO.8）
Human-HBE1-R	CGACAGCAGACACCAGCTT（SEQ ID NO.9）
Human-HBG1/2-F	AGCACCTGGATGATCTCAAG（SEQ ID NO.10）
Human-HBG1/2-R	AAACGGTCACCAGCACATTT（SEQ ID NO.11）
Human-HBD-F	GATGCAGTTGGTGGTGAGG（SEQ ID NO.12）
Human-HBD-R	GGGTTGCCCATAACAGCAT（SEQ ID NO.13）
Human-HBB-F	GCACGTGGATCCTGAGAACT（SEQ ID NO.14）

Human-HBB-R CACTGGTGGGGTGAATTCTT（SEQ ID NO.15）。

实施例 2：

在斑马鱼胚胎发育过程中，斑马鱼胚胎受精 96 小时后开始加入 Triac、T3 和 T4，经 Triac、T3 和 T4 分别处理 24 小时后，使用 4%多聚甲醛固定胚胎，通过全胚胎原位杂交技术检测 ζ-珠蛋白基因（hbae5）的表达。

如图 2 所示，在斑马鱼胚胎中，Triac、T3 和 T4 显著激活 ζ-珠蛋白基因（hbae5）的表达，即显著上调。

实施例 3：

在斑马鱼胚胎发育过程中，斑马鱼胚胎受精 96 小时后开始加入 Triac、T3 和 T4，处理 24 小时后，收集胚胎，使用 TRIzol 试剂（Invitrogen）抽提总 RNA，然后使用逆转录试剂盒（ReverTra Ace，TOYOBO）合成 cDNA，最后使用 SYBRGreen Realtime PCR Master Mix （TOYOBO）试剂进行定量 PCR 检测基因表达水平。

定量 PCR 反应体系为：

2×SYBR Green PCR Master Mix	5ul
F-Primer（10μmol/L）	0.6ul
R-Primer（10μmol/L）	0.6ul
cDNA	1ul
ddH2O	2.8ul
Total volume	10ul

定量 PCR 反应条件为：

热启动：95℃，10 分钟；

变 性： 95℃，10 秒；

退火/延伸：60℃，30 秒。

40 个循环。

溶解曲线分析。

如图 3 所示，在斑马鱼胚胎中，Triac、T3 和 T4 显著激活 ζ-珠蛋白基因（hbae5）的表达，即定量 PCR 结果显示 ζ-珠蛋白基因（hbae5）的表达分别上调 76 倍、31 倍和 41 倍。

实际上，斑马鱼 ζ-珠蛋白基因（hbae5）（NM_001326701.1）序列（SEQ ID NO.16）如下：

ATGAGTCTTTCTGCTAAAGACAAGGCCGCCGTGAGGGGCTTCTGGGCCAAGATTGCCCCA

AAGGGAGAGCAAATTGGTAACGAGGCGTTTTCCAGATTGCTTTTGGTGTACCCTCAGACC

AAGACCTACTTCTCCCACTGGAACGATCTGGCCCCCGGCTCTCCCTCTGTGAAGAAGCAG

GGAAAGAAGATCGTCGGTGGACTCGGTCTGGCTGTTGATAAAATCGACGACCTTTTCAAC

GGCCTGCTGAACCTCAGTGAATTGCACGCCTTTCAGCTGAGAGTCGACCCTGCTAACTTC

AAGCTCCTGTCTCACTGTCTGCTGGTGGTGTTCGCCATGCTCTTCCCTGATGACTTCACC
GCTGAGGTCCATCTGGCCATCGACAAGTTCCTGGCAAGAGTGGCTTTGGCTCTGTCTGAC
AAATATCGTTAA。

其中，Realtime PCR 引物如下：

Zebrafish-β-actin-F	TGCTGTTTTCCCCTCCATTG（SEQ ID NO.17）
Zebrafish-β-actin-R	TTCTGTCCCATGCCAACCA（SEQ ID NO.18）
Zebrafish-hbae1-F	CTGAGGCTGTCAGCAAAATCG（SEQ ID NO.19）
Zebrafish-hbae1-R	GAACAAAGTGGCCAGAACCAC（SEQ ID NO.20）
Zebrafish-hbae3-F	GCTGATGGATGACCTGAAGGG（SEQ ID NO.21）
Zebrafish-hbae3-R	CTCAGGAGTGAAGTCGTCTGG（SEQ ID NO.22）
Zebrafish-hbae5-F	TGCTGAACCTCAGTGAATTGC（SEQ ID NO.23）
Zebrafish-hbae5-R	GGAACTTGTCGATGGCCAGAT（SEQ ID NO.24）
Zebrafish-hbbe1-F	TCCACGTAGATCCCGACAAC（SEQ ID NO.25）
Zebrafish-hbbe1-R	TACTGTCTTCCCAGAGCGGA（SEQ ID NO.26）
Zebrafish-hbbe2-F	GGACTGGACAGAGCCATGAAG（SEQ ID NO.27）
Zebrafish-hbbe2-R	GAGGCAATCACGATTGTCAGG（SEQ ID NO.28）
Zebrafish-hbbe3-F	TTGTGTGGACAGCTGAGGAG（SEQ ID NO.29）
Zebrafish-hbbe3-R	ACGGATAGACGACCAAGCAT（SEQ ID NO.30）。

上述对实施例的描述是为了便于该技术领域的普通技术人员能理解和使用本发明。熟悉本领域技术人员显然可以容易的对这些实施例做出各种修改，并把在此说明的一般原理应用到其他实施例中，而不必经过创造性的劳动。因此，本发明不限于上述实施例。本领域技术人员根据本发明的原理，不脱离本发明的范畴所做出的改进和修改都应该在本发明的保护范围之内。