

MicroRNA-145 在急性髓系白血病患者中的表达及意义

朱荷艳¹, 李慧慧^{2△}

(1. 南昌大学医学院, 南昌 330006; 2. 南昌大学第二附属医院血液科, 南昌 330006)

[摘要] **目的** 探讨 MicroRNA-145(miR-145)在急性髓系白血病患者骨髓细胞中的表达情况,并分析其临床意义。**方法** 收集急性髓系白血病患者骨髓标本 70 例,其中初治组 46 例、缓解组 24 例,非血液肿瘤性疾病 14 例作为对照组。通过实时荧光定量 PCR 方法检测 miR-145 的相对表达水平。**结果** miR-145 在初治急性髓系白血病骨髓中表达水平明显低于缓解组及对照组($P < 0.01$);其中 9 例经化疗后缓解的急性髓系白血病患者骨髓 miR-145 表达水平较治疗前显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);且 miR-145 表达水平与初诊时原始细胞百分数及外周血白细胞数均无相关性($P = 0.456, 0.394$)。**结论** miR-145 在急性髓系白血病患者表达下调,提示 miR-145 的表达与白血病的发生、发展存在显著的关系。

[关键词] 急性病;骨髓细胞;白血病;微 RNAs;急性髓系白血病;miR-145

[中图分类号] R-33

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)03-0377-03

Expression and significance of miR-145 in acute myeloid leukemia

Zhu Heyan¹, Li Huihui^{2△}

(1. Medical College of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 2. Department of Hematology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective** To research the expression and clinical significance of miR-145 in the marrow of acute myeloid leukemia (AML). **Methods** A total of 70 cases of bone marrow samples were collected from AML patients, of which included 46 cases of new diagnosed patients (initial treatment group), 24 cases of AML patients in complete remission (remission group). Fourteen cases of non-neoplastic patients were used as controls (control group). The miR-145 relative expression level was detected by real-time quantitative PCR. **Results** The relative expression level of miR-145 in initial treatment group was less than those of control group and remission group ($P < 0.01$). Compared to before-chemotherapy patients, the expression level of miR-145 in the 9 case of AML patients with complete remission after chemotherapy increased significantly ($P < 0.05$). The relative expression of miR-145 showed no significantly correlation with the percentage of blasts cells in bone marrow and the percentage of peripheral blood leukocyte count ($P = 0.456, 0.394$). **Conclusion** The expression of miR-145 in bone marrow cells of AML patients is down-regulated, which suggested the development of acute leukemia.

[Key words] acute disease; bone marrow cells; leukemia; microRNAs; acute myeloid leukemia; miR-145

急性白血病(acute leukemia, AL)是一类起源于造血干细胞异常克隆的恶性疾病,异常克隆的干细胞失去进一步分化成熟能力,而停滞于细胞发育的不同阶段,造成骨髓或其他造血组织进行性、失控性地异常增生,抑制造血系统,严重威胁着人类的生存和健康,因此及早诊断并干预这类疾病对挽救生命具有非常重要的临床意义。目前 AL 的病因及发病机制仍未完全阐明,AL 的发病机制是多因素、多基因,甚至是多分子参与的复杂过程。大部分白血病是由于染色体的易位或遗传学异常,导致基因表达异常,引起细胞的增生、分化、凋亡发生异常,从而在正常造血干/祖细胞的恶性转化中发挥重要的作用。

随着人们对生命科学的认识不断加深,作为非编码 RNA 的重要代表 MicroRNA(miRNAs)受到越来越多的青睐。miRNAs 为一长度大约 22 个碱基的小 RNA 分子,它通过和编码蛋白质的 mRNA 互补结合,抑制其表达,从而起到调控细胞的分化、生长、发育、增殖、代谢、凋亡等功能^[1-4],并通过与靶 mRNA 3'端完全或不完全的互补结合,抑制靶 mRNA 翻译或诱导靶 mRNA 降解在转录后水平调控基因表达,影响细胞的增殖、分化和凋亡^[5-6],参与肿瘤的发生、发展及侵袭转移。miRNAs 不仅与人类多种肿瘤的发生、发展有关,且与肿瘤的

侵袭转移密不可分,因此 miRNAs 可能成为一类新的致癌基因或抑癌基因。miR-145 是 miRNA 家族中的成员之一,被认为是一种肿瘤抑制基因,可以靶向多个肿瘤相关基因,从而影响肿瘤的生长、侵袭转移,以及肿瘤血管的生成。目前,关于 miR-145 在急性髓系白血病(AML)中的表达情况研究甚少,本研究应用荧光定量 PCR 技术检测 miR-145 在 AML 患者中的表达情况,旨在揭示 miR-145 在 AML 中的表达特点并分析其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 所有病例为 2013 年 10 月至 2014 年 9 月在南昌大学第二附属医院血液科住院治疗的患者,参照张之南主编《血液病诊断及疗效标准(第三版)》^[7] 诊断标准确诊为 AML,共收集患者 46 例为初治组,男 24 例,女 22 例,年龄 16~70 岁,按 FAB 分型 M₁ 6 例, M₂ 11 例, M₃ 11 例, M₄ 7 例, M₅ 6 例, M₆ 5 例。缓解组 24 例,男 10 例,女 14 例,年龄 16~70 岁,按 FAB 分型 M₁ 1 例, M₂ 9 例, M₃ 6 例, M₄ 3 例, M₅ 2 例, M₆ 3 例。同期收集在该院治疗并进行骨髓穿刺检查的非血液系统肿瘤性疾病患者 14 例为对照组,男 8 例,女 6 例,年龄 20~55 岁。所有患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本处理 所有入选者在骨髓穿刺后,留取新鲜骨髓 2~4 mL,置于 EDTA 管中;提取单个核细胞,采用 Trizol 法提取 RNA,提取 RNA 后取 2 μ L 在核酸蛋白定量测定仪上侧光密度(OD)值,进行准确定量。

1.2.2 逆转录 按 TaKaRa 公司试剂盒 Code NO. RR718 提供的使用说明操作,20 μ L 的逆转录反应体系包括 2 \times miRNA Reaction Buffer Mix 10 μ L,0.1%BSA 2 μ L,miRNA PrimeScript RT Enzyme Mix 2 μ L,Total RNA 2 μ L,RNase Free dH₂O 4 μ L。反应条件为:37 $^{\circ}$ C 60 min,85 $^{\circ}$ C 5 s,4 $^{\circ}$ C 保持;反应产物于一 20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 引物设计与合成 运用引物设计软件 Premier 5.0 设计定量 PCR 引物,引物序列确定后交由上海生工工程股份有限公司合成。

1.2.4 实时定量 PCR 构建 miR-145 和 U6 的荧光定量 PCR 反应总体系为 25 μ L。包括 SYBR premix Ex Taq II 12.5 μ L,ROX Reference Dye II 0.5 μ L,cDNA 2 μ L,正向和反向引物各 1 μ L,RNase Free dH₂O 补足至 25 μ L。使用 ABI7300 全自动实时定量 PCR 仪进行检测,反应扩增条件:95 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 31 s,40 个循环。实时定量反应中,同时扩增 miR-145 和 U6 基因,每一样本的 miR-145 和 U6 基因检测重复 3 次,以保证其结果的准确性。采用比较 Ct 值方法定量 miR-145 表达水平的变化,将各样本的 miR-145 的 Ct 值与 U6 的 Ct 值相减,即 Δ Ct=miR-145 平均 Ct 值-U6 平均 Ct 值,取其均值,计算其相对表达 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,并比较其差异。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件处理数据。计量资料呈非正态分布或方差不齐,所有数据均采用中位数(范围)表示。采用 Mann-whitney U 秩和检验比较 3 组间 miR-145 表达水平的差异,并对 miR-145 表达水平与骨髓原始细胞比例、外周血白细胞水平相关性分析行 Spearman 相关性检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-145 的相对表达量在 3 组间的比较 miR-145 在 AML 各组相对表达水平呈偏态分布:初治组表达为 0.560(0.139,1.676)、缓解组表达为 5.712(2.951,11.286)、对照组表达为 14.547(6.223,30.012)。初治组 miR-145 表达水平明显低于缓解组及对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$);缓解组低于对照组,差异有统计学意义($P = 0.012$),见图 1。

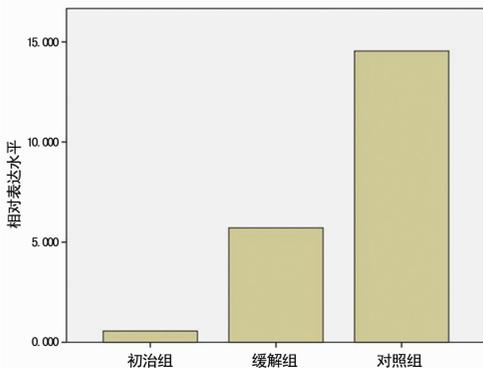


图 1 miR-145 相对表达水平组间比较对比图

2.2 miR-145 在亚型中表达的差异 46 例 AML 患者中 miR-145 的相对表达水平 M₃ 型表达为 0.639(0.311,1.296),非

M₃ 型表达为 0.545(0.135,1.884),差异无统计学意义($P = 0.887$)。

2.3 miR-145 与临床的相关性分析 初诊 AML 患者中 miR-145 表达水平与初诊时骨髓原始细胞百分数、初诊时外周血白细胞数均无相关性($r = -0.113, P = 0.456; r = -0.129, P = 0.394$)。

2.4 白血病患者缓解前后 miR-145 的表达水平 通过检测 9 例的初治白血病患者与其第 1 次缓解后骨髓中 miR-145 的表达水平发现,缓解后比初治时 miR-145 的表达水平明显上调($P < 0.05$)。

3 讨论

近年来,随着环境污染的加剧,白血病发病率呈逐年上升的趋势。白血病是一种由造血干细胞或祖细胞突变引起的造血系统恶性肿瘤,其发生、发展是一个多因素、多步骤的复杂过程。miRNAs 是一类短链 RNA 分子,由内源基因编码,主要功能是负性调节靶基因的表达。每一个 miRNA 可以有多个靶基因,一个基因也可以由几个 miRNAs 共同调控。生物信息学家预测 miRNAs 可能调控 50%~60% 的人类编码蛋白基因^[8-9]。部分 miRNAs 不仅具有肿瘤抑制基因功能,而且还具有肿瘤基因功能。miRNA 在正常细胞和恶性肿瘤细胞中表达不同,且几乎所有的肿瘤都存在 miRNA 的异常表达。miRNAs 异常表达与不同类型的肿瘤发生及进展密切相关^[8,10-14]。研究发现胃癌患者血浆中 miR-451 和 miR-486 的表达较健康人相比明显增高^[15],术后血浆中表达明显降低,因此 miR-451 和 miR-486 可以作为筛查胃癌的有用生物标志物。miRNAs 可能成为一类新的致癌基因或抑癌基因,其通过抑制靶 mRNA 翻译或诱导靶 mRNA 降解在转录后水平调控基因表达,参与肿瘤的发生、发展及侵袭转移。

miR-145 定位于 5 号染色体(5q32-33),在人类的胚胎发育过程中,起源于中胚层的组织或器官,其表达量较为丰富^[16]。其染色体附近的 5q31.1 是一个极为重要的脆性位点。脆性位点是部分抑制 DNA 的合成后,发生在中期染色体上的特异性缺口或断裂区域。脆性位点在体细胞中一般较稳定,而在大多肿瘤细胞中却经常出现缺失或重排的现象。miR-145 被认为是一种肿瘤抑制基因,其可能以通过与胰岛素受体底物-1(IRS-1)基因的 3'-UTR 的结合从而下调 IRS-1 蛋白达到抑制肿瘤细胞生长^[17],从而抑制肿瘤的作用;也可能通过直接作用于 c-Myc 基因使肿瘤细胞阻滞于 G₁ 期、细胞凋亡率增加,细胞生长受抑制,通过作用于促凋亡线粒体蛋白 BNIP-3 抑制肿瘤的发生、发展^[18],因此 miR-145 与癌症的发生关系密切。目前,国内外关于 miR-145 在血液肿瘤中的研究较少,二者的相关性有待于进一步的研究。

本试验通过对 46 例初发成人 AML 患者、24 例完全缓解期患者及 14 例对照组骨髓中 miR-145 的表达量进行检测,研究结果发现,miR-145 在不同分组间的表达水平不同,初诊 AML 患者 miR-145 表达水平明显低于缓解组及对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。其中检测 9 例的初治白血病患者与其第 1 次缓解后骨髓中 miR-145 的表达水平发现,经治疗后这些患者的 miR-145 的表达水平明显上调,但仍低于对照组。这些结果表明,miR-145 在 AML 中呈现低表达现象,且其表达水平与疾病状态可能有关。目前研究发现 miR-145 在多种肿瘤组织中表达下调,如乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌 B 细胞

淋巴瘤等^[19],与本研究结果相似,这可能是 miR-145 在白血病的发病过程中担任了抑癌基因的角色,一定程度上可以衡量疾病的进展程度,提示 miR-145 的表达水平可能与白血病的发生、发展及临床预后有关。

本研究通过比较发现,miR-145 表达水平与初诊时骨髓原始细胞百分数、初诊时外周血白细胞数及疾病分型均无相关性。初步揭示了 miR-145 的表达与 AML 的相关性,miR-145 在 AML 及健康人骨髓中呈现差异性表达,提示 miR-145 与白血病的发生、发展存在着非常密切的关系,然而产生的差异及作用机制有待于进一步的研究。随着研究的深入,miR-145 骨髓表达水平可能成为 AML 的诊断及化疗敏感性检测的一种生物标记物。

参考文献

- [1] Arner P. Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2005, 19(4): 471-482.
- [2] MacDougald OA, Burant CF. Obesity and metabolic perturbations after loss of aquaporin 7, the adipose glycerol transporter[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(31): 10759-10760.
- [3] Hibuse T, Maeda N, Funahashi T, et al. Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(31): 10993-10998.
- [4] Hara-Chikuma M, Sohara E, Rai T, et al. Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7-deficient mice; adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(16): 15493-15496.
- [5] Zeng Y. Principles of micro-RNA production and maturation[J]. *Oncogene*, 2006, 25(46): 6156-6162.
- [6] Volk N, Shomron N. Versatility of microRNA biogenesis [J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19391.
- [7] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 125-139.
- [8] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs[J]. *Genome Res*, 2009, 19(1): 92-105.
- [9] Berezikov E, Chung WJ, Willis J, et al. Mammalian mirtron genes[J]. *Mol Cell*, 2007(28): 328-336.
- [10] Wu W, Sun M, Zou GM, et al. MicroRNA and cancer: current status and prospective[J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(5): 953-960.
- [11] Brennecke J, Stark A, Russell RB, et al. Principles of microRNA-target recognition[J]. *PLoS Biol*, 2005, 3(3): e85.
- [12] Lewis BP, Burge CB, Burge DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. *Cell*, 2005, 120(1): 15-20.
- [13] Grimson A, Farh KK, Johnston WK, et al. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing[J]. *Mol Cell*, 2007, 27(1): 91-105.
- [14] Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation [J]. 2007, 318(5858): 1931-1934.
- [15] Konishi H, Ichikawa D, Komatsu S, et al. Detection of gastric cancer-associated microRNAs on microRNA microarray comparing pre- and post-operative plasma[J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(4): 740-747.
- [16] Du L, Pertsemidlis A. microRNAs and lung cancer: tumours and 22-mers[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2010, 29(1): 109-122.
- [17] Shi B, Sepp-Lorenzino L, Prisco M, et al. MicroRNA 145 targets the insulin receptor substrate-1 and inhibits the growth of colon cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(45): 32582-32590.
- [18] Chen X, Gong J, Zeng H, et al. MicroRNA145 targets BNIP5 and suppresses prostate cancer progression[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(7): 2728-2738.
- [19] Sachdeva M, Mo YY. miR-145-mediated suppression of cell growth, invasion and metastasis [J]. *Am J Transl Res*, 2010, 2(2): 170-180.

(收稿日期: 2015-08-28 修回日期: 2015-10-22)

(上接第 376 页)

- [4] Scott JE, Carlsson IB, Bavister BD, et al. Human ovarian tissue cultures: extracellular matrix composition, coating density and tissue dimensions[J]. *Reprod Biomed Online*, 2004, 9(3): 287-293.
- [5] Nawroth F, Rahimi G, Isachenko E, et al. Cryopreservation in assisted reproductive technology: new trends[J]. *Semin Reprod Med*, 2005, 23(4): 325-335.
- [6] Chi HJ, Koo JJ, Kim MY, et al. Cryopreservation of human embryos using ethylene glycol in controlled slow freezing[J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(8): 2146-2151.
- [7] Schubert BC. Human ovarian tissue from cortex surrounding

benign cysts: a model to study ovarian tissue cryopreservation [J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(7): 1786-1792.

- [8] Hovatta O. Cryopreservation and culture of human primordial and primary ovarian follicles[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 16(1): 95-97.
- [9] Kezele P, Skinner MK. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(8): 3329-3337.

(收稿日期: 2015-08-08 修回日期: 2015-10-16)