

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.36.025 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

谭三勤, 王光平, 崔亚娟, 谢熠, 谭宇婷, 陈方平. 微小RNA-128b与-181a和-223在急性白血病患者中的表达[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(36):6790-6794.

微小RNA-128b与-181a和-223在急性白血病患者中的表达*☆

谭三勤^{1,2}, 王光平¹, 崔亚娟¹, 谢熠³, 谭宇婷², 陈方平¹

¹ 中南大学湘雅医院血液科, 湖南省长沙市 410008;
² 湖南师范大学医学院, 湖南省长沙市 410013;
³ 长沙市中心医院肿瘤科, 湖南省长沙市 410004

谭三勤☆, 女, 1970年生, 湖南省株洲市人, 汉族, 2010年中南大学毕业, 博士, 副教授, 主要从事血液方面的研究。
tsqsghtz@yahoo.com.cn

通讯作者: 陈方平, 硕士, 教授, 中南大学湘雅医院血液科, 湖南省长沙市 410008
xychenfp@2118.cn

中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2012)36-06790-05

收稿日期:2011-12-01
修回日期:2011-12-16
(20110910005/M·S)

文章亮点: 微小RNA-128b, -181a和-223在非白血病中的表达不同于急性白血病的表达, 且在急性非淋巴细胞白血病和急性淋巴细胞白血病患者中也存在不同的表达。说明可通过分析微小RNA-128b, -181a和-223的表达及其组合表达用于急性白血病的诊断与分类。与mRNA表达分析相比, 微小RNA具有更加稳定以及需要较少样品的优点。

关键词: 微小RNA; 急性白血病; 表达; 骨髓单个核细胞; PCR

缩略语: 急性淋巴细胞白血病: acute lymphoblastic leukemia, ALL; 急性非淋巴细胞白血病: acute non-lymphoblastic leukemia, ANLL

摘要

背景: 微小RNA是一类内源性非编码RNA。新近研究认为微小RNA可用作肿瘤标记物, 对肿瘤进行分类。

目的: 分析微小RNA-181a、微小RNA-128b和微小RNA-223在急性白血病患者中的表达差异。

方法: 提取初治急性白血病患者及对照受试者骨髓单个核细胞总RNA, 经微小RNA特异性引物反转录后, 采用实时定量PCR分析各微小RNA的表达。

结果与结论: 与对照受试者相比, 无论是急性非淋巴细胞白血病还是急性淋巴细胞白血病患者骨髓单个核细胞的微小RNA-128b, 微小RNA-181a和微小RNA-223表达均降低; 统计学分析显示, 急性非淋巴细胞白血病和急性白血病患者微小RNA-128b和微小RNA-181a表达与对照受试者比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 但急性淋巴细胞白血病患者与对照受试者比较差异无显著性意义($P > 0.05$); 微小RNA-128b, -181a和-223的表达在急性非淋巴细胞白血病与急性淋巴细胞白血病患者之间差异无显著性意义($P > 0.05$)。结果显示微小RNA-128b, -181a和-223有可能是急性白血病诊断与分型的生物标记物。

Expression of microRNA-128b, -181 a and -223 in patients with acute leukemia

Tan San-qin^{1,2}, Wang Guang-ping¹, Cui Ya-juan¹, Xie Yi³, Tan Yu-ting², Chen Fang-ping¹

Abstract

BACKGROUND: MicroRNA (miR) is a kind of endogenous non-coding RNA. Current studies have demonstrated that miR can be used as tumor marker for tumor categorization.

OBJECTIVE: To investigate the expressions of microRNA-181a, miR-128b and miR-223 and their significance in the plasma of patients with acute leukemia.

METHODS: The plasma RNAs were extracted from acute leukemia patients and normal control subjects, and were reverse transcribed with miR-specific primer into cDNA. The expressions of miR-181a, miR-128b and miR-223 were measured by real-time PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with control subjects, the expression of miR-181a, miR-128b and miR-223 was decreased in acute non-lymphocytic leukemia and acute lymphoblastic leukemia patients. Statistical analysis indicated that the expression of miR-128b and miR-181 was significantly different between acute non-lymphocytic leukemia and acute leukemia patients and control subjects ($P < 0.05$), but its expression was not significantly different between acute lymphoblastic leukemia patients and control subjects ($P > 0.05$). Compared with acute lymphoblastic leukemia patients, the expression of miR-223 was increased in acute non-lymphocytic leukemia patients, while miR-128b and miR-181a expressions were decreased. The expression of miR-181a, miR-128b and miR-223 was not significantly different between acute non-lymphocytic leukemia and acute lymphoblastic leukemia patients ($P > 0.05$). These findings suggest that miR-128b, miR-181a and miR-223 may be the novel biomarkers for the diagnosis of typing of acute leukemia.

Tan SQ, Wang GP, Cui YJ, Xie Y, Tan YT, Chen FP. Expression of microRNA-128b, -181 a and -223 in patients with acute leukemia. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(36): 6790-6794.

0 引言

MicroRNA(miR), 即微小RNA, 是一类长度为21-23个核苷酸的内源性非编码RNA, 通过降解mRNA或抑制mRNA翻译, 在转录后水平调节靶基因的表达^[1-2]。miR不仅在细胞的分化发育、增殖和凋亡等多种生理过程中发挥重要作用, 而且其异常表达可能与肿瘤有关。例如, 在人乳腺癌高表达的miR-21, 被认为起肿瘤基因的作用^[3]。B细胞慢性淋巴细胞白血病中miR-15和miR-16常常缺乏或表达下调^[4]。miR的表达具有高度的保守性、时序性和组织特异性, miR被认为可用作肿瘤检测的标记物, 对肿瘤进行诊断与分类^[5-6]。Calin等^[7]报道miR可用来区别B细胞慢性淋巴瘤与正常细胞, 并依据miR表达谱对其分型; 在急性白血病与正常对照之间, 急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)与急性非淋巴细胞白血病(acute non-lymphoblastic leukemia, ANLL)之间也存在不同的miR表达^[8]。然而, 有关miR-128b, -181a和-223在急性白血病患者中的表达情况及其可能的意义在国内报道较少。为此, 本实验采用实时定量PCR技术, 分析它们在中国急性白血病患者中的表达及其意义。

1 对象和方法

设计: 观察对比实验。

时间及地点: 于2009-01/11在中南大学湘雅医院血液科实验室完成。

对象: 22例急性白血病患者均为就诊于中南大学湘雅医院血液科的初治患者, 平均37.0岁。其中, ANLL患者13例, 男6例, 女7例, 平均41.5岁。ALL患者9例, 男5例, 女4例, 平均30.3岁。7例非白血病患者作为对照组, 包括贫血患者4例, 血小板减少患者3例, 男5例, 女2例, 平均40.4岁。

诊断标准: 符合中国白血病诊断标准^[9]。

纳入标准: ①骨髓原始细胞占全部骨髓有核细胞 $\geq 30\%$ 诊断为急性白血病。②M2b以异常中性中幼粒细胞为主。③M3以异常的早幼粒细

胞为主。④初治成人白血病患者。

排除标准: 合并严重慢性消耗性疾病者。

方法:

样本采集: 治疗前采集白血病患者及对照患者的骨髓液标本2.0 mL, 用乙二胺四乙酸二钠抗凝, 加PBS将全血稀释至4.0 mL, 将稀释后的血液缓缓加在含有淋巴细胞分离液的试管内, 室温下以2 000 r/min离心20 min, 吸取离心后的单个核细胞到另一离心管中, 用PBS洗涤3次, 弃上清液后备用。

引物: 依据miRBase序列库(hht/www.microna.sanger.ac.uk)提供的miR序列, 按照参考文献[10]-[11], 设计miR以及GAPDH内参引物, 所有引物均由上海生工生物工程生物公司合成。各引物序列为:

RT-miR-128b: 5'-tgt cag gca acc gta ttc acc gtg agt ggt aaa gag-3';

RT-miR-181a: 5'-tgt cag gca acc gta ttc acc gtg agt ggt act cac-3';

RT-miR-223: 5'-tgt cag gca acc gta ttc acc gtg agt ggt tgg ggt-3';

Short-miR-128b: 5'-cgt cag atg tcc gag tag agg ggg aac ggc gtc aca gtg aac cgg t-3';

Short-miR-181a: 5'-cgt cag atg tcc gag tag agg ggg aac ggc gaa cat tca acg ctg tcg gtg a-3';

Short-miR-223: 5'-cgt cag atg tcc gag tag agg ggg aac ggc gtg tca gtt tgt caa at-3';

MP-fw: 5'-tgt cag gca acc gta ttc acc-3';

MP-rev: 5'-cgt cag atg tcc gag tag agg-3';

GAPDH-p1: 5'-ccc tca acg acc act ttg tca-3';

GAPDH-p2: 5'-ttc ctc ttg tgc tct tgc tgg-3'。

细胞总RNA提取: 采用TRizol试剂(Invitrogen)提取细胞总RNA, 即用PBS洗涤淋巴细胞分离液分离的骨髓单个核细胞并加入1 mL的Trizol试剂, 充分混匀, 溶解细胞后再加入0.2 mL的氯仿, 混匀, 于4 °C经17 770 \times g离心15 min, 将上清液加入到另一新的试管内。在该试管内加入约1 mL的异丙醇溶液轻轻上下颠倒试管后将其置于-20 °C冰箱内。次日,

¹Department of Hematology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China; ²Medical College of Hunan Normal University, Changsha 410013, Hunan Province, China; ³Department of Oncology, Changsha Central Hospital, Changsha 410004, Hunan Province, China

Tan San-qin^{*}, M.D., Associate professor, Department of Hematology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China; Medical College of Hunan Normal University, Changsha 410013, Hunan Province, China
tsqsghtz@yahoo.com.cn

Corresponding author: Chen Fang-ping, Master, Professor, Department of Hematology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China
xychenfp@2118.cn

Supported by: General Program of Science and Technology Development of Hunan Province, No. 2009JT3011*

Received: 2011-12-01
Accepted: 2011-12-16

于4 °C下17 770×g离心15 min并弃去上清液,用4 °C预冷的体积分数为70%乙醇洗涤沉淀物并于4 °C下17 770×g离心2 min后,在沉淀物中加入20 μL的DEPC水溶解,通过紫外分光光度计测定其含量。

反转录:取500 ng的总RNA,于70 °C温育5 min后,将其加入到含有1×反转录缓冲液,1 mmol/L dNTP,20 U RiboLock RNA酶抑制剂(Fermentas),200 U M-MLV反转录酶(Promega)和250 fmol RT6-miR-128b或RT6-miR-181a或RT6-miR-223或2 μL GAPDH-p2引物(10 μmol/L),总体积为10 μL的反应体系中并于37 °C温育1 h。随后,经95 °C作用5 min灭活反转录酶后,置于4 °C保存。

定量PCR:采用SYBR Green Realtime PCR Master Mix试剂盒(Toyobo)进行实时荧光定量PCR,即在一试管内加入SYBR Green Realtime PCR Master Mix溶液12.5 μL,1 μmol/L的MP-fw、MP-rev引物各2.5 μL或10 μmol/L的GAPDH-p1、GAPDH-p2引物各1 μL,反转录产物2 μL,在miR扩增管内加入100 nmol/L的Short-miR-128b或Short-miR-181a或Short-miR-223引物1 μL,补充无菌双蒸馏水使总体积为25 μL,混匀后于Mx3000 p实时荧光定量PCR仪(Stratagene)进行扩增。PCR扩增条件为95 °C 2 min后,再按95 °C 15 s,60 °C 10 s,72 °C 20 s程序扩增40个循环。随后,采用95 °C 0 s,60 °C 30 s,95 °C 30 s(0.1 °C/s)程序进行熔解曲线分析。其中, $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$ 。

主要观察指标:急性白血病患者和对照者miR-128b, -181a和-223的表达水平。

统计学分析:将原始Ct值换算成 $2^{-Ct[11]}$,并标化(2^{-Ct} 目的基因/ 2^{-Ct} 内参基因)后,采用SPSS 13.0软件包行Mann-Whitney检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 目标片段特异性检测 按照参考文献[12]建立的方法检测急性白血病患者白血病细胞miR-181a, miR-128b, miR-223和内参照GAPDH的表达,溶解曲线显示为单一溶解峰,见图1,说明该方法能扩增相应的目的基因。

2.2 miR-181a, miR-128b, miR-223在非白血病患者与急性白血病患者之间的表达 荧光定量PCR检测miR-128b, miR-181a和miR-223在急性白血病、ANLL、ALL和对照受试者的 ΔCt 值见表1。检测的Ct值越小,模

板的起始拷贝数越多,表达量也就越高,因此,miR-128b、miR -181a和miR -223在ANLL, ALL和急性白血病患者骨髓单个核细胞表达均低于对照组受试者,见表1。统计学分析结果显示,相比于对照组受试者,ANLL和急性白血病患者骨髓单个核细胞miR-128b表达差异有显著性意义($P < 0.05$),但ALL患者与对照组受试者之间表达差异无显著性意义($P > 0.05$)。

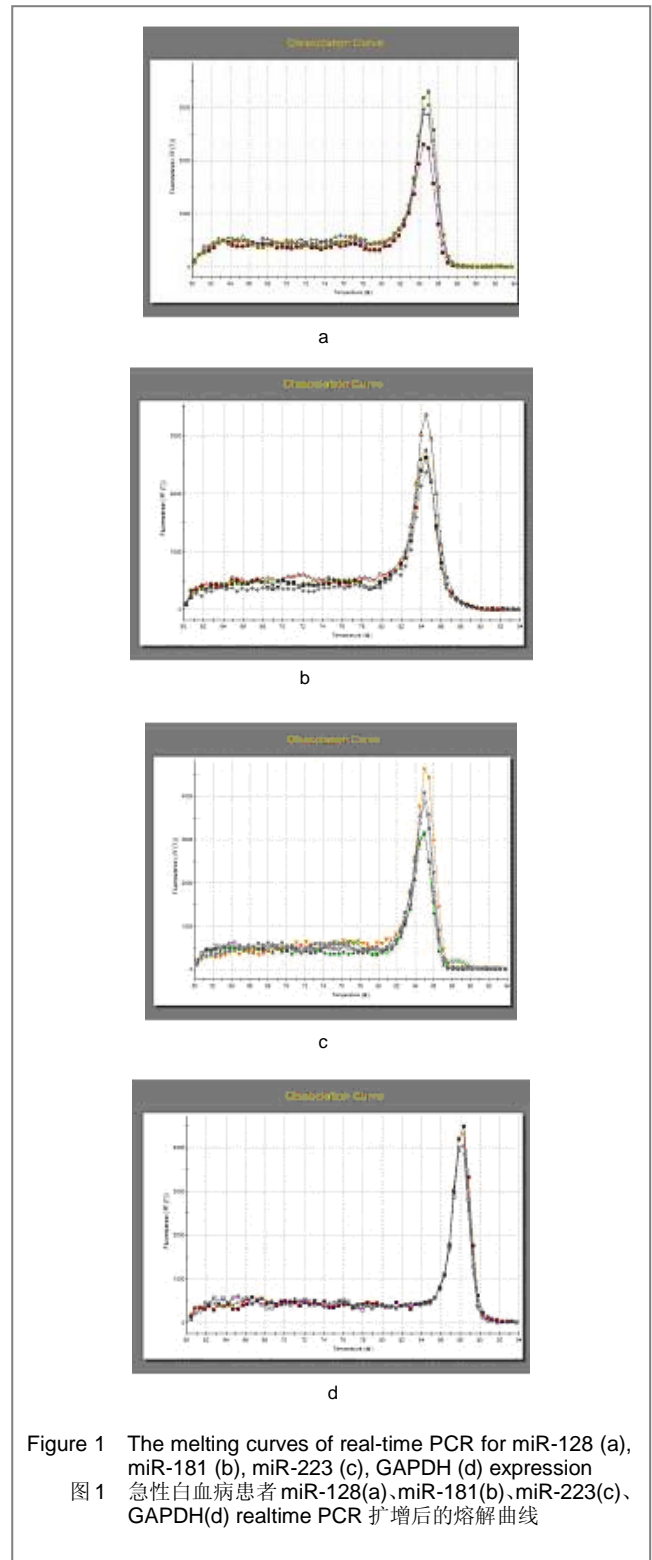


Figure 1 The melting curves of real-time PCR for miR-128 (a), miR-181 (b), miR-223 (c), GAPDH (d) expression
图1 急性白血病患者 miR-128(a)、miR-181(b)、miR-223(c)、GAPDH(d) realtime PCR 扩增后的溶解曲线

2.3 miR-181a, miR-128b, miR-223在ANLL与ALL患者之间的表达 相对于ALL患者骨髓单个核细胞而言, miR-128b和-181a在ANLL患者的表达低于ALL患者, 但miR-223在ANLL患者的表达高于ALL患者, 见表1。

表1 miR-128, miR-181, miR-223在急性白血病患者与对照受试者之间的表达水平
Table 1 Comparison of miR-128, miR-181, miR-223 expression between acute leukemia and matched non-leukemia patients ($\bar{x} \pm s$, Δ Ct)

Group	n	miR-128b	miR-181a	miR-223
Acute leukemia	22	10.33±3.33 ^a	9.72±3.24	4.68±2.28
Acute non-lymphocytic leukemia	13	11.13±2.75 ^a	9.92±3.38	4.03±1.79
Acute lymphocytic leukemia	9	8.86±2.85	9.31±3.10	6.18±2.10
Control	7	4.18±2.71	8.31±1.98	3.00±2.24

^a $P < 0.05$, vs. control group

统计学分析结果显示, miR-128b、miR-181a和miR-223在ANLL与ALL患者之间表达的差异无显著性意义($P > 0.05$)。

3 讨论

急性白血病是血液系统常见的恶性疾病, 其有效治疗取决于对其正确诊断, 尤其是ANLL与ALL的鉴别诊断, 因为ANLL与ALL的治疗和预后是不同的。尽管形态学和免疫学方法等可对ANLL与ALL进行区别, 但它们需要有经验的操作人员, 而且其中任何单一的方法均不能对ANLL与ALL进行有效诊断^[8]。因此, 非常有必要寻找其他新的方法。应用DNA芯片技术, Golub等^[13]在ANLL与ALL之间发现了约1 100个不同表达的基因。其中, 50个基因表达差异明显, 可用于ALL和ANLL的分类, 其准确率达到100%。随后, Lu等^[14]发现, miR表达谱能够准确用于肿瘤分类, 并优于mRNA分析。Mi等^[8]进一步研究显示, 在ANLL与ALL之间存在27个不同表达的miR, 能够区别ALL和ANLL, 其准确性高达97%–99%。其中, miR-128a, -128b, let-7b和-223中任一两种组合可以使ANLL与ALL诊断的准确率高高于95%。然而, 有关miR-128b, -181a和-223等在急性白血病患者中的表达情况及其可能的意义在国内报道较少。

本实验应用实时荧光PCR技术分析了miR-128b, -181a和miR-223在ANLL和ALL患者中的表达, 并发现miR-128b, -181a和-223在ANLL和ALL患者的表达均低于非白血病对照受试者, miR-128b和-181a在ALL的表达高于ANLL患者, 而miR-223在ANLL患者的表达高于ALL, 这与其他报道结果相似。例如, 有研究显示,

miR-128b在ALL显著高表达, miR-223显著低表达^[8]。相对于ANLL, miR-223在ALL显著低表达^[15]。在骨髓CD34⁺细胞和T细胞可检测到miR-181a表达, 在HEL细胞(红细胞白血病)、K562细胞、MV4-11、THP-1和U937(单核细胞白血病)细胞、Meg-01(巨核细胞白血病)细胞、HL-60细胞高表达miR-223, Jurkat细胞、CCRF-CEM(ALL)细胞低表达miR-223, 在D1.1(T-ALL)和MOLT-3(ALL)细胞弱表达miR-223, Raji和Ramou(Burkitt淋巴瘤)细胞以及RS4; 11和Reh(ALL)细胞不表达miR-223^[16-17]。在实验中, miR-223在ANLL和ALL患者与对照组受试者以及ANLL与ALL患者之间的差异无显著性意义, 可能与样本数不多有关。

在实验中, miR-128b, -181a和-223在非白血病中的表达不同于急性白血病的表达, 且miR-128b, -181a和-223在ANLL和ALL患者中也存在不同的表达。这些结果表明, 通过分析miR-128b, -181a和-223的表达及其组合表达可用于急性白血病的诊断与分类。与mRNA表达分析相比, miR具有更加稳定以及需要较少样品的优点^[8]。同时, 在不同的急性白血病中具有不同的表达谱。因此, miR有可能是急性白血病诊断及鉴别诊断的新标记物, 通过分析miR的表达谱及其不同组合的表达将会是未来急性白血病诊断的新方法。

4 参考文献

- [1] Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005;433(7027):769-773.
- [2] Zimmerman AL, Wu S. MicroRNAs, cancer and cancer stem cells. *Cancer Lett*. 2011;300(1):10-19.
- [3] Si ML, Zhu S, Wu H, et al. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 2007;26(19):2799-2803.
- [4] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-15529.
- [5] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10513-10518.
- [6] Tanaka M, Oikawa K, Takanashi M, et al. Down-Regulation of miR-92 in Human Plasma Is a Novel Marker for Acute Leukemia Patients. *PLoS ONE*. 2009; 4(5): e5532.
- [7] Calin GA, Liu CG, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(32):11755-11760.
- [8] Mi S, Lu J, Sun M, et al. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(50):19971-19976.

- [9] Zhang ZN.Beijing:Science Press.1998:373-380.
张之南.血液诊断及疗效标准[M]. 2版.北京:科学出版社, 1998: 373-380.
- [10] Sharbati-Tehrani S, Kutz-Lohroff B, Bergbauer R,et al. miR-Q: a novel quantitative RT-PCR approach for the expression profiling of small RNA molecules such as miRNAs in a complex sample.BMC Mol Biol. 2008;9:34.
- [11] Wang GP,Wang K,Xin HY,et al.Zhongguo Shiyen Xueyexue Zazhi. 2011;19(2):332-336.
王光平,王凯,信红亚,等. Ad5F35嵌合腺病毒载体介导的突变性 κ B α 对白血病细胞凋亡的诱导[J]. 中国实验血液学杂志, 2011, 19(2):332-336.
- [12] Livak KJ, Schmittgen TD.Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4):402-408.
- [13] Golub TR, Slonim DK, Tamayo P,et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science. 1999;286(5439):531-537.
- [14] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers.Nature. 2005;435(7043):834-838.
- [15] Fazi F, Racanicchi S, Zardo G,et al. Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein. Cancer Cell. 2007;12(5):457-466.
- [16] Chen CZ, Li L, Lodish HF,et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. Science. 2004;303(5654): 83-86.
- [17] Ramkissoon SH, Mainwaring LA, Ogasawara Y, et al. Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. Leuk Res. 2006;30(5):643-647.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 湖南省科技计划一般项目(2009JT3011)资助。

作者贡献: 实验设计为王光平、陈方平, 实验实施为谭三勤、王光平, 实验评估为王光平, 资料收集为崔亚娟、谢熠、谭宇婷。谭三勤成文, 陈方平审校, 谭三勤对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 急性白血病患者及对照受试者完全知情同意将骨髓标本用于本研究。

本文创新性: 与国内外同类研究水平比较, 本研究用 miR-Q 方法检测急性白血病患者 miR-128b, miR-181a 和 miR-223 的表达, 具有经济廉价的优点。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

SCI 收录的 *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (《分子与细胞心脏病学杂志》) 介绍

<p>英文刊名: <i>Journal of Molecular and Cellular Cardiology</i> 中文刊名: 《分子与细胞心脏病学杂志》 ISSN: 0022-2828 2011 年影响因子: 5.166 出版周期: 12 期/年 出版数据: 231 篇/年 出版单位(或出版地): ACADEMIC PRESS LTD- ELSEVIER SCIENCE LTD 收录数据库: Science Citation Index Science Citation Index Expanded Current Contents - Life Sciences BIOSIS Previews 期刊网址: http://www.journals.elsevier.com/journal-of-molecular-and-cellular-cardiology/</p>	<p>英文简介: The <i>Journal of Molecular and Cellular Cardiology</i> publishes work advancing knowledge of the mechanisms responsible for both normal and diseased cardiovascular function. To this end papers are published in all relevant areas. These include (but are not limited to): structural biology; genetics; proteomics; morphology; stem cells; molecular biology; metabolism; biophysics; electrophysiology; pharmacology and physiology. Papers are encouraged with both basic and translational approaches. The journal is directed not only to basic scientists but also to clinical cardiologists who wish to follow the rapidly advancing frontiers of basic knowledge of the heart and circulation. 中文简介: 《分子与细胞心脏病学杂志》刊载心脏与心血管系统及其疾病研究原著、评论、简讯等文章, 内容偏重于代谢病理、药理、心肌的结构与功能、临床心脏病学、生物技术、生化与遗传学等方面的研究。</p>
---	--