

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.27.007

文章编号: 1005-8982(2017)27-0032-05

临床研究·论著

急性单核细胞白血病全基因组 微小 RNA 的表达谱分析*

林小聪¹, 李宁², 符伟玉¹, 兰柳波¹, 张海涛¹, 张宇明²

(1. 广东医科大学 生物化学与分子生物学研究所, 广东 湛江 524023;

2. 广东医科大学附属医院 血液科, 广东 湛江 524001)

摘要:目的 研究急性单核细胞白血病(AMoL)全基因组的微小 RNA(miRNA)表达谱。**方法** 应用 Illumina 高通量测序技术对 10 例 AMoL 患者和 10 例非恶性血液病患者骨髓样本的 miRNA 表达水平进行检测,分析两者的表达差异,并通过茎环引物实时荧光定量 PCR(Stem-loop qPCR)技术对部分 Illumina 测序结果进行验证。**结果** 两组样本共发现差异表达的 miRNA 285 个,其中,199 个 miRNA 在 AMoL 组呈表达上调,86 个 miRNA 呈表达下调。6 个 miRNA 的 Stem-loop qPCR 验证结果与其测序结果具有相同的变化趋势。**结论** miR-126-3p 和 miR-29b-3p 可作为潜在的分子靶点用于 AMoL 发病机制的进一步研究。

关键词: 急性单核细胞白血病;微小 RNA;测序

中图分类号: R394.3

文献标识码: A

Whole-genome analysis profile of MicroRNA in acute monocytic leukemia*

Xiao-cong Lin¹, Ning Li², Wei-yu Fu¹, Liu-bo Lan¹, Hai-tao Zhang¹, Yu-ming Zhang²

(1. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong 524023, China; 2. Department of Hematology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong 524001, China)

Abstract: Objective To investigate the whole-genome MicroRNA (miRNA) profile in acute monocytic leukemia (AMoL). **Methods** Illumina high-throughput sequencing technology was utilized to screen differentially expressed miRNA in bone marrow samples of 10 AMoL patients as well as 10 patients with non-malignant hematologic diseases. Stem-loop primer-based real-time quantitative polymerase chain reaction (Stem-loop qPCR) was carried out to validate the sequencing data. **Results** In total of 285 differentially expressed miRNAs, 199 up-regulated and 86 down-regulated miRNAs were identified in AMoL patients compared with the control group. Further stem-loop qPCR results confirmed similar expression of 6 miRNAs identified by sequencing. **Conclusions** MiR-126-3p and miR-29b-3p can be potential targets for further study of AMoL.

Keywords: acute monocytic leukemia; micro ribonucleic acid; sequencing

急性单核细胞白血病(acute monocytic leukemia, AMoL)为急性髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML)最常见的亚型之一;其病例数约占

AML 20%~30%,在各种 AML 亚型中居第 2 位^[1]。相比于其他的 AML 亚型,AMoL 高白细胞血症、髓外浸润以及不良染色体核型的发生率更高,常规化疗完全

收稿日期:2017-05-21

* 基金项目:广东省自然科学基金(No:2016A030313677);广东省医学科学技术研究基金(No:A2016193)

[通信作者] 张宇明, E-mail: 13670982222@163.com

缓解率低、容易复发及预后不佳^[1-2]。目前,AMoL 的发病机制仍未完全明确,可能与电离辐射、染色体异常及基因突变等多种因素有关^[3]。为寻找新的治疗靶点,迫切需要对 AMoL 的发病机制进行进一步研究。微小 RNA(micro ribonucleic acid, miRNA)是一类内源性、具有基因表达调控功能的小分子单链非编码 RNA,长度约为 18~25 个核苷酸(nt)^[4]。研究表明,miRNA 与白血病发生、发展密切相关,可能成为白血病潜在的治疗靶点^[5]。为阐明 AMoL 的 miRNA 表达谱,本研究应用 Illumina 高通量测序技术对 AMoL 与对照组骨髓样本的 miRNA 表达水平进行对比分析,为研究 AMoL 相关发病机制和寻找新型的分子靶点提供新的线索。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集来自于广东医科大学附属第一医院血液科 10 例 AMoL 患者(男性 6 例,女性 4 例;年龄 14~64 岁,平均 41.2 岁)和 10 例非恶性血液病对照者(骨髓象正常的贫血或发热查因患者,男性 6 例,女性 4 例;年龄 10~73 岁,平均 39.0 岁)的骨髓样本。所有 AMoL 患者均为初发病例,在采样前均未接受放疗或化疗,且符合 AMoL 的诊断标准。本研究已获得广东医科大学附属第一医院伦理学委员会审核批准,并取得所有患者的知情同意。

1.2 主要试剂

无 RNase 的 Dnase I (购自美国 Promega 公司), Trizol 试剂 (购自美国 Invitrogen 公司), Small RNA 测序接头、TruSeq Rapid SR cluster 试剂盒以及 TruSeq Rapid SBS 试剂盒 (美国 Illumina 公司产品), Superscript™ III 逆转录酶 (购自美国 Invitrogen 公司), 2×SYBR Green PCR 混合液 (美国 Applied Biosystems 公司)。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 样品的提取 根据 Trizol 试剂说明书抽提组织总 RNA,以无 RNase 的 Dnase I 消化以去除基因组 DNA 污染。20 例 RNA 样品分别以 AMoL 组和对照组为组单位等质量混合,在 230、260 及 280 nm 波长以 Nano Drop ND-1000 型分光光度计测定其吸光度(A)值,计算 RNA 样品的浓度并分析其纯度,通过琼脂糖凝胶电泳评估 RNA 的完整性。

1.3.2 Small RNAs 文库构建和 Illumina 测序 RNA 样品在 T4RNA 连接酶的催化下加上 3',5'

small RNA 测序接头,所得产物经逆转录 PCR 扩增及聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化生成 Small RNAs 文库。以 Agilent 2100 型生物分析仪对 Small RNAs 文库进行定量分析。应用 Illumina cBot 簇生成系统,按照 TruSeq Rapid SR cluster 试剂盒说明书,对文库进行克隆扩增;然后根据 TruSeq Rapid SBS 试剂盒说明书,在 Illumina HiSeq 2000 测序系统上行高通量深度测序。

1.3.3 测序数据的处理和注释 以 Off-Line Base-caller 软件对高通量测序所生成的原始图像进行分析,读取碱基序列信息并转换为相应的数据。然后,经去接头、去冗余、去低质量以及去污染等处理,获得 16~30 nt 长度的高质量干净序列并进行序列长度分布分析。将干净序列分别与 RefSeq 数据库、Rfam 数据库以及 RepBase 数据库进行序列比对和分类注释,去除 mRNA、重复序列、tRNA、rRNA、snRNA 以及 sRNA 等序列;余下序列再与 miRBase 数据库中已知的人类 pre-miRNA 进行序列比对和注释,获取两样本 miRNA 的表达丰度和染色体分布等信息。

1.3.4 miRNA 的差异表达分析 首先对两样本 miRNA 的表达丰度进行标准化处理 [公式:miRNA 的标准化表达丰度(normalization of the calculation of transcript parts per million,TPM)=miRNA 的表达丰度/样本 miRNA 的总表达丰度×10⁶],然后再计算两样本的 miRNA 差异表达比值 [公式:miRNA 的差异表达比值=(AMoL 组 miRNA 标准化表达丰度值+10TPM)/(对照组 miRNA 标准化表达丰度值+10TPM)]。如果差异表达比值≤0.5 或≥2.0,则为差异有统计学意义;如果 0.5<比值<2.0 则为差异无统计学意义。

1.3.5 茎环引物实时荧光定量 PCR (stem-loop primer-based quantitative real-time polymerase chain reaction, Stem-loop, qRT-PCR) 利用 miRNA 的茎环(Stem-loop)逆转录引物,根据 Superscript™ III 反转录酶说明书进行逆转录反应。应用 ABI 公司 Prism®7500 型 qRT-PCR 仪,参照 2×SYBR Green PCR 混合液说明书,以 U6 snRNA 作为内参照进行 qRT-PCR。反应参数为:95℃预反应 10 min,使模板完全解链。然后 95℃变性 10 s,60℃退火及延伸 60 s,重复 40 个循环。检测结果计算采用常规的 2^{-ΔΔCt} 法。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 16.0 统计软件,计量资料以

均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表达,比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 总 RNA 的质量分析

提取的组织 RNA 样品分别以 AMoL 组和对照组为组单位等量混合后,对其进行纯度分析(见表 1)和 RNA 完整性分析(见图 1)。结果表明,其 A260/A280 比值都在 1.8 ~ 2.0,且 A260/A230 比值都 >1.8,提示样本 RNA 的纯度较高、质量良好。电泳结果显示两组总 RNA 均可见 18 和 28 S 2 条清晰的条带,而 5 S 的条带则比较模糊(见图 1);提示 RNA 的完整性好。上述结果表明,总 RNA 的质量符合实验要求,可用于后续 Small RNAs 文库的构建。

2.2 Small RNAs 文库的质量评估

以 Agilent 2100 型生物分析仪对 Small RNAs 文库进行质量分析(见表 2)。结果表明,两样本 Small RNAs 文库的片段长度峰值均在 130 ~ 155 nt 且其摩尔数 >1 fmol,提示 Small RNAs 文库的质量良好,可用于后续的克隆扩增和测序分析。

2.3 Small RNA 干净序列的长度分布和分类注释

Small RNA 干净序列(16 ~ 30 nt)的长度分布分析表明,对照组及 AMoL 组的干净序列均大致呈正态分布在 22 nt 序列两侧(见图 2)。其中,符合 miRNA

片段长度(18 ~ 25 nt)的干净序列所占的比例最高,其在对照组与 AMoL 组分别占 93.70%和 82.31%。干净序列的序列比对和分类注释表明,miRNA 在对照组(占 80.05%)及 AMoL 组(占 54.44%)所占的比例最高,两者均 >50%(见图 3)。上述数据初步验证 Illumina 测序结果的有效性。

2.4 miRNA 的差异表达谱分析

两组样本发现差异表达的 miRNA 285 个。其中,199 个 miRNA 在 AMoL 组呈表达上调,86 个 miRNA 呈表达下调。hsa-miR-122-5p 在 AMoL 组表达上调最显著,而 hsa-miR-941 则表达下调最明显。见表 3。

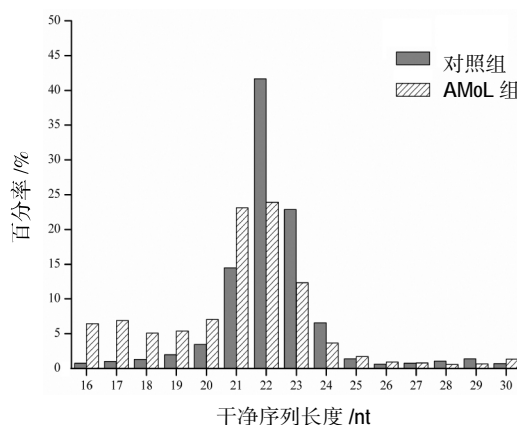


图 2 Small RNA 干净序列的长度分布

表 1 总 RNA 的纯度分析

样本	A260/A280 比值	A260/A230 比值	浓度 / (ng/μl)	体积 / μl	质量 / ng
对照组	1.98	2.28	427.53	10	4 275.3
AMoL 组	1.94	2.15	382.34	10	3 823.4

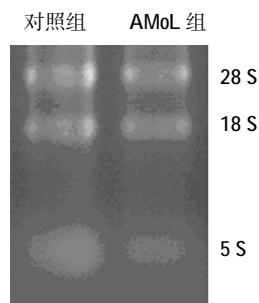


图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

表 2 Small RNAs 文库的定量分析

样本	片段长度峰值 / nt	摩尔浓度 / (nmol/L)	体积 / μl	摩尔数 / fmol
对照组	130	3.4	10	34
AMoL 组	131	6.0	10	60

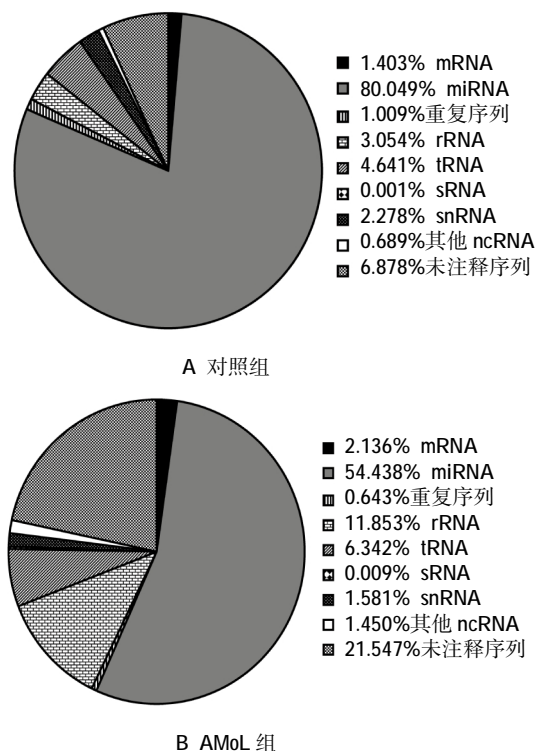


图 3 匹配的干净序列的分类注释

表 3 前 10 个表达上调和下调 miRNA 的差异

miRNA ID 号	TPM		差异表达比值	表达类型	miRNA ID 号	TPM		差异表达比值	表达类型
	对照组	AMoL 组	AMoL 组 / 对照组			对照组	AMoL 组	AMoL 组 / 对照组	
hsa-miRNA-122-5p	12	11 919	542.227	上调	hsa-miRNA-941	1 832	4	0.008	下调
hsa-miRNA-31-5p	367	176 374	467.862	上调	hsa-miRNA-106b-5p	36 218	288	0.008	下调
hsa-miRNA-9-5p	94	18 156	174.673	上调	hsa-miRNA-29b-3p	971	3	0.013	下调
hsa-miRNA-219-2-3p	0	826	83.600	上调	hsa-miRNA-98-5p	1 016	4	0.014	下调
hsa-miRNA-486-5p	50	4 577	76.450	上调	hsa-miRNA-18a-5p	3 884	50	0.015	下调
hsa-miRNA-124-3p	3	835	65.000	上调	hsa-miRNA-223-3p	32 296	776	0.024	下调
hsa-miRNA-107	2	726	61.333	上调	hsa-miRNA-28-5p	447	3	0.028	下调
hsa-miRNA-30a-5p	74	4 916	58.643	上调	hsa-miRNA-941	277	0	0.035	下调
hsa-miRNA-378c	4	709	51.357	上调	hsa-miRNA-374b-3p	302	1	0.035	下调
hsa-miRNA-378d	4	709	51.357	上调	hsa-miRNA-342-3p	284	2	0.041	下调

2.5 Stem-loop qRT-PCR 验证结果

为验证 Illumina 测序结果的可靠性,笔者选择 2 个表达上调(miRNA-155-5p 和 miRNA-221-3p)、2 个表达下调(miRNA-106b-5p 和 miRNA-142-3p)以及 2 个表达差异无统计学意义 miRNA(miRNA-

532-5p 和 miRNA-423-5p)进行 Stem-loop qRT-PCR 验证。结果表明,上述 6 个 miRNA 在两组样本中的变化趋势与 Illumina 测序结果一致(见表 4),说明 Illumina 测序结果可靠、有效。

表 4 Illumina 测序结果的 Stem-loop qRT-PCR 验证

miRNA ID 号	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		t 值	P 值	表达类型
	对照组	AMoL 组			
hsa-miRNA-155-5p	1.000 ± 0.048	5.141 ± 0.239	-29.459	0.000	上调
hsa-miRNA-221-3p	1.000 ± 0.073	8.372 ± 1.812	-7.040	0.019	上调
hsa-miRNA-106b-5p	1.000 ± 0.111	0.346 ± 0.020	10.085	0.008	下调
hsa-miRNA-142-3p	1.000 ± 0.147	0.172 ± 0.006	9.812	0.011	下调
hsa-miRNA-532-5p	1.000 ± 0.053	1.207 ± 0.155	-2.174	0.095	
hsa-miRNA-423-5p	1.000 ± 0.021	1.108 ± 0.069	-2.600	0.060	

3 讨论

作为一种具有基因表达调控功能的内源性小片段单链 RNA,miRNA 与白血病关系密切。研究表明,>60%的 miRNA 基因存在于白血病相关的染色体易位区,多种 miRNA 可通过调节细胞增殖、分化及凋亡与耐药等相关基因的表达在白血病发生、发展过程中发挥关键作用,可能成为白血病潜在的诊断标志物和分子靶点^[6-7]。但目前尚无通过 Illumina 高通量测序技术在 AMoL 患者临床样本中系统性研究 miRNA 表达谱的报道。本结果表明,两者的 miRNA 表达谱存在较大的差异,两组样本共鉴定差异表达的 miRNA 285 个,其中,199 个 miRNA 在 AMoL 组呈表达上调,86 个 miRNA 呈表达下调。笔者随后选取 6 个 miRNA,应用 Stem-loop qRT-PCR

技术证实 Illumina 测序结果的可靠性。

miRNA-29b-3p 是一种基因定位于染色体 7q32 和 1q32 的 miRNA 分子,在胃癌、前列腺癌及肺癌等多种实体瘤以及 AML 中呈低表达;在 AML 中,染色体 7q 缺失或 CEBPA 基因功能障碍可导致 miRNA-29b-3p 表达下调^[8]。GONG 等^[9]报道,miRNA-29b-3p 可通过作用于其靶基因 CCND2 和 AKT2,抑制 AMoL 细胞系 THP1 增殖并诱导细胞凋亡。本研究表明,miRNA-29b-3p 在 AMoL 患者骨髓样本中表达呈下调,与文献报道基本相符,提示 miRNA-29b-3p 在 AMoL 发病机制中可能起一定的作用。相比于其他的 AML 亚型,miRNA-199b-5p 在 AMoL 临床样本中呈异常低表达,并与 AMoL 患者预后呈正相关;组蛋白脱乙酰基酶抑制剂 AR-42 和 Panobinostat 可

通过上调 hsa-miRNA-199b-5p 表达诱导 THP-1 细胞凋亡^[10]。笔者研究发现, miRNA-199b-5p 在 AMoL 样本中也呈低表达, 与文献报道一致, 提示 miRNA-199b-5p 可能与 AMoL 发病机制相关。

miRNA-126 基因在染色体上定位于 9q34.3, 其转录产物为 miRNA-126-5p 和 miRNA-126-3p。研究表明, miRNA-126-5p 和 miRNA-126-3p 在 AML 中均呈高表达并与患者预后呈负相关^[11]。LEEuw 等^[12]发现, 沉默 miRNA-126-3p 表达可抑制 THP1 细胞增殖、诱导细胞凋亡并抑制 NOD/SCID 小鼠移植瘤的生长。提示 miRNA-126-3p 在 AMoL 中可能具有潜在的癌基因活性。本组 miRNA-126 基因的转录产物 miRNA-126-5p 和 miRNA-126-3p 在 AMoL 中均呈表达上调, 与文献报道基本相符。HO 等^[13]报道, miRNA-135b-5p 在依托泊甙以及替尼泊甙耐药的白血病细胞中呈表达上调, 其过表达可诱导白血病细胞对依托泊甙以及替尼泊甙产生耐药性。此外, miRNA-135b-5p 在 AMoL 细胞系 U937 以及 THP-1 中过表达均可下调 Ppm1e 并激活 AMPK^[14]。研究表明, AMPK 激活在 AMoL 细胞凋亡过程中起重要作用; 骨髓脂肪细胞 β -氧化所介导 AMPK 的激活可抑制 AMoL 细胞凋亡并促进细胞增殖^[5]。本组 miRNA-135b-5p 在 AMoL 样本中也呈高表达, 与文献报道基本相符, 提示 miRNA-135b-5p 在 AMoL 细胞凋亡过程中可能起一定的抑制作用, 具有潜在的研究价值。

综上所述, AMoL 患者与非恶性血液病对照者骨髓样本的 miRNA 表达谱存在较大的差异。根据其差异表达趋势与文献报道的符合程度, 笔者得到 5 个与 AMoL 发病机制有密切关系的 miRNA (包括 miRNA-29b-3p、miRNA-199b-5p、miRNA-126-3p、miRNA-126-5p 及 miRNA-135b-5p)。其中, miRNA-126-3p 的差异表达比值最大, 呈明显的表达上调; 而 miRNA-29b-3p 的差异表达比值最小, 呈明显的表达下调; 再加上已有文献证实两者在 AMoL 细胞增殖和凋亡过程中具有重要作用。因此, miRNA-126-3p 和 miRNA-29b-3p 可作为潜在的分子靶点用于 AMoL 发病机制的进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] 胡映歆, 仇红霞. 急性单核细胞白血病预后因素研究进展[J]. 国际输血及血液学杂志, 2012, 35(1): 62-65.
- [2] 张静, 秦铁军, 秘营昌, 等. 急性单核细胞白血病的临床研究[J]. 临床血液学杂志, 2010, 23(9): 536-539.
- [3] 程译帆, 金洁. 急性粒-单核及单核细胞白血病研究进展[J]. 国际输血及血液学杂志, 2008, 31(3): 243-246.
- [4] THOMSON D W, BRACKEN C P, GOODALL G J. Experimental strategies for microRNA target identification [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(16): 6845-6853.
- [5] 何冬梅, 吴红, 高杨军, 等. MicroRNA 在白血病中的研究新进展[J]. 暨南大学学报(医学版), 2011, 32(4): 362-368.
- [6] 王梓, 李善妮, 刘静. microRNA 在急性淋巴细胞白血病中的作用[J]. 生命科学研究, 2012, 16(2): 172-180.
- [7] 杨洋, 王莉莉, 于力. 表观遗传调控在白血病发生中作用的研究进展 -MicroRNA 与白血病 [J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(2): 520-524.
- [8] LIU H, WANG B, LIN J, et al. microRNA-29b: an emerging player in human cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(21): 9059-9064.
- [9] GONG J N, YU J, LIN H S, et al. The role, mechanism and potentially therapeutic application of microRNA-29 family in acute myeloid leukemia[J]. Cell Death Differ, 2014, 21(1): 100-112.
- [10] FAVREAU A J, MCGLAUFILIN R E, DUARTE C W, et al. MiR-199b, a novel tumor suppressor miRNA in acute myeloid leukemia with prognostic implications [J]. Exp Hematol Oncol, 2016, 5(1): 4.
- [11] SHIBAYAMA Y, KONDO T, OHYA H, et al. Upregulation of microRNA-126-5p is associated with drug resistance to cytarabine and poor prognosis in AML patients[J]. Oncol Rep, 2015, 33(5): 2176-2182.
- [12] de LEEUW D C, DENKERS F, OLTHOF M C, et al. Attenuation of microRNA-126 expression that drives CD34⁺38⁺ stem/progenitor cells in acute myeloid leukemia leads to tumor eradication[J]. Cancer Res, 2014, 74(7): 2094-2105.
- [13] HO T T, HE X, MO Y Y, et al. Transient resistance to DNA damaging agents is associated with expression of microRNAs-135b and-196b in human leukemia cell lines[J]. Int J Biochem Mol Biol, 2016, 7(2): 27-47.
- [14] LI P, FAN J B, GAO Y, et al. miR-135b-5p inhibits LPS-induced TNF- α production via silencing AMPK phosphatase Ppm1e[J]. Oncotarget, 2016, 7(47): 77978-77986.
- [15] TABE Y, YAMAMOTO S, SAITOH K, et al. Bone marrow adipocytes facilitate fatty acid oxidation activating AMPK and a transcriptional network supporting survival of acute monocytic leukemia cells[J]. Cancer Res, 2017, 77(6): 1453-1464.

(王荣兵 编辑)