

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<sup>1</sup>, 李宁<sup>2</sup>, 符伟玉<sup>1</sup>, 兰柳波<sup>1</sup>, 张海涛<sup>1</sup>, 张宇明<sup>2</sup>

(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 Lin<sup>1</sup>, Ning Li<sup>2</sup>, Wei-yu Fu<sup>1</sup>, Liu-bo Lan<sup>1</sup>, Hai-tao Zhang<sup>1</sup>, Yu-ming Zhang<sup>2</sup>

(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<sup>[1]</sup>。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<sup>[1-2]</sup>。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<sup>[3]</sup>。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)<sup>[4]</sup>。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<sup>[5]</sup>。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×10<sup>6</sup>],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<sup>-ΔΔCt</sup> 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。

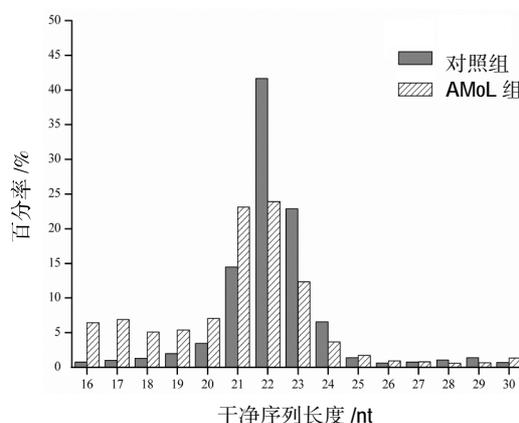


图 2 Small RNA 干净序列的长度分布

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

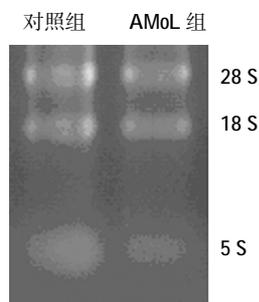


图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

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

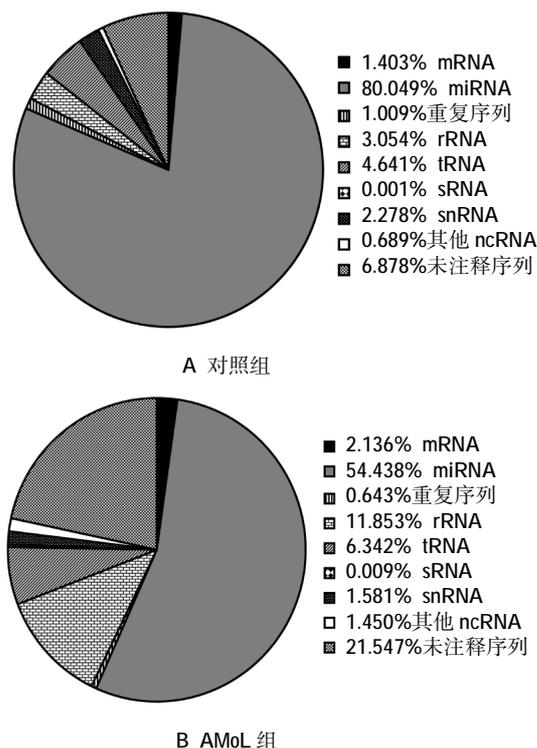


图 3 匹配的干净序列的分类注释

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 <sup>-ΔΔCt</sup>		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<sup>[6-7]</sup>。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<sup>[8]</sup>。GONG 等<sup>[9]</sup>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<sup>[10]</sup>。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<sup>[11]</sup>。LEEuw 等<sup>[12]</sup>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<sup>[13]</sup>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<sup>[14]</sup>。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  $\beta$ -氧化所介导 AMPK 的激活可抑制 AMoL 细胞凋亡并促进细胞增殖<sup>[5]</sup>。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<sup>+</sup>38<sup>+</sup> 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- $\alpha$  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)