

miR-221 和 miR-222 在急性髓细胞白血病初发患者中的表达研究

李宝青 薛向阳 夏轶姿 朱宝玲 何牧卿 李向阳 张丽芳

摘要 目的 探讨 miR-221 和 miR-222 在急性髓细胞白血病(AML)骨髓有核细胞中的表达及意义。方法 选择 16 例 AML 初发患者和 44 例非白血病患者骨髓标本,分离有核细胞,抽提总 RNA,以 U6 为内参,采用茎环 Realtime RT-PCR 法检测并比较 AML 和非白血病患者骨髓有核细胞中 miR-221 和 miR-222 的表达,同时比较这两种 miRNAs 在 AML 中 M3、M4 和 M5 三种亚型间的表达水平。结果 miR-221 和 miR-222 在 AML 初诊患者骨髓中相对表达量($N=2^{-\Delta Ct}$)明显高于非白血病患者组($P<0.05$);这两种 miRNAs 在 M5 型 AML 患者表达最高,但在 AML 三种亚型间表达水平未见显著的统计学意义($P>0.05$)。结论 miR-221 和 miR-222 有可能在为 AML 的诊断、治疗和预后上,提供一个新的标准和靶点指标。

关键词 miR-221 miR-222 急性髓细胞白血病

The Expression and Significance of miR-221 and miR-222 in the Acute Myeloid Leukemia. Li Baoqing, Xue Xiangyang, Xia Yizi, et al. The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Department of Microbiology and Immunology, Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To investigate the expression and clinical significance of miR-221 and miR-222 in the marrow of acute myeloid leukemia(AML). **Methods** Marrow tissues from 16 newly diagnosed AML patients and 44 non-leukemia (NL) patients were collected and mononucleated cell were separated. Total RNA from nucleated cells of these samples were extracted and analyzed for miR-221 and miR-222 expression by stem-loop real-time RT-PCR. The differences in subtypes M3, M4 and M5 patients and the change of miR-221 and miR-222 expression in newly diagnosed AML patients were further analyzed. **Results** Expression levels of miR-221 and miR-222 were significantly higher in marrow tissues of AML patients before chemotherapy than the levels in those of non-leukemia patients ($P<0.05$). Both miR-221 and miR-222 expression in the M5 of AML were the highest among them, but this difference in subtypes M3, M4 and M5 patients was not statistically significant($P>0.05$). **Conclusion** miR-221 and miR-222 may play an important role in the development and progression of AML and the level of miR-221 and miR-222 expression may be a potential target for the diagnosis, treatment and prognosis of AML.

Key words MicroRNA; miR-221; miR-222; Acute myeloid leukemia

微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类长度约为 18~24 个核苷酸的内源性非编码单链 RNA 小分子,由约 70nt 的前体 miRNA(pre-miRNA)经 Dicer 酶剪切而来^[1],可以在转录水平或转录后水平调节基因的表达,在生物功能的多样性方面扮演了重要的角色,包括细胞的分化、肿瘤的发生、凋亡和对应激的反应,通过上调或下调癌基因和抑癌基因,参与了肿瘤的发生^[2-4]。

目前,miRNA 与白血病的细胞遗传学以及临床治疗效果的有关表达已见相关报道,此外与白血病相

关的少数 miRNAs 功能的研究已被阐明^[4-6]。本研究拟通过茎环 Realtime RT-PCR 法检测 miR-221 和 miR-222 在急性髓细胞白血病初发患者(acute myeloid leukemia, AML)骨髓有核细胞中的表达,并比较各亚型间的差异,以期了解 miR-221 和 miR-222 在 AML 患者中的表达情况,为 AML 的诊断提供新的依据。

对象与方法

1. 对象:2008 年 10 月~2009 年 7 月,经温州医学院附属第二医院血液肿瘤科确诊的急性髓细胞白血病(AML)患者骨髓标本 16 例,男性 4 例,女性 7 例,年龄 27~69 岁,中位年龄 40 岁;AML 的分型参照 1986 年天津召开的白血病分类分型会议的标准,AML 被分为 M₁~M₇ 7 型,其中 M₂ 型 1 例、M₃ 型 4 例、M₄ 型 5 例、M₅ 型 5 例、M₇ 型 1 例。非白血病(NL)患者

作者单位:325000 温州医学院附属第二医院(李宝青、夏轶姿、朱宝玲、何牧卿、李向阳);325000 温州医学院微生物教研室(薛向阳、张丽芳)

骨髓标本 44 例,男性 19 例,女性 25 例,年龄 18 ~ 75 岁,中位年龄 42 岁,其中特发性血小板减少性紫癜(idiopathic thrombocytopenic prupura, ITP)15 例,原发性血小板增多症(essential thrombocythemia, ET)7 例,再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA)13 例,骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)9 例。以上病例均为初发患者。

2. 主要试剂与仪器:Trizol(美国 Invitrogen 公司),M - MLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、dNTPs、SYBR Mastermix(均为日本 Toyobo 公司)。ABI7500 荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司),分光光度仪(德国 EPPENDORF 公司)。

3. 骨髓标本有核细胞分离:取 EDTA - 2K 抗凝的骨髓标本 1.5ml 加入红细胞裂解液 5 ~ 8ml,充分混匀,静置 10min,直至红细胞完全破坏,1500r/min 离心,5min。弃去上清液,加入 10ml 生理盐水洗涤混匀,1500r/min 离心,5min,共洗涤 3 次。弃去上清液,充分混匀,加入 1ml Trizol 液,用移液器移入 EP 管中,置 - 80℃ 冰箱保存。

4. RNA 的提取:①取 1ml 骨髓有核细胞 Trizol 提取液解冻后,加氯仿 0.2ml,剧烈震荡后室温静置 3min,12000r/min 离心,4℃,15min;②取上清液约 300 ~ 500μl,移至另外 EP 管中;③加 500μl 异丙醇,混匀,碎冰中置 20min,12000r/min 离心, - 20℃,120min,去上清液,留沉淀;④加 1ml 75% 乙醇,倒转数下,7500r/min 离心,4℃,5min,吸去乙醇,shot spin 离心后再次吸尽乙醇,开盖,室温干燥约 5min;⑤加入 DEPC 处理过的水 20μl 溶解,震荡混匀;⑥采用德国 Eppendorf 公司分光光度仪(Biophotometer)检测 RNA 溶液 OD260/OD280 吸光值,计

算 RNA 浓度和纯度,OD260/OD280 比值 > 1.8 方可用于检测;⑦取 2 ~ 5μg 总 RNA 加入 6 × RNA loading buffer,以 1.2% 甲醛变性琼脂糖电泳分析 28S 和 18S 主带。高质量 RNA 的 28S 与 18S 条带亮度在凝胶中约 2:1。

5. miRNA 表达分析:以 U6 作为内参,分析 miR - 221 及 miR - 222 表达。RT - PCR 所用引物由上海英骏生物技术有限公司合成,其序列见表 1。1μg 总 RNA 以 miR - 221 和 miR - 222 茎环 RT 引物进行反转录。为准备定量 PCR 内参模板 cDNA,用相同的总 RNA 标本以 U6 RT 引物为反转录引物进行反转录。反转录反应体系为 1 μg 总 RNA、50nmol/L miRNA 茎环 RT 引物(或 U6 RT 引物)、2 U RNase inhibitor、5 U M - MLV 反转录酶、0.5μmol/L dNTP。反应条件为:16℃ 30min, 42℃ 30min,75℃ 15min,反应结束后 - 20℃ 保存。以 15μl 反应体系进行 Real - time 定量 PCR。Real - time 定量 PCR 检测反应体系包括:1μl RT 产物,1 × SYBR Green I Mastermix, 0.5μmol/L miRNA 特异前向引物、0.5μmol/L 通用的反向引物。Real - time 定量 PCR 条件为:95℃ 10min 后,95℃ 15s, 60℃ 1min,40 循环。Real - time 定量 PCR 使用 Applied Biosystems 7500 仪器进行。所有样品做 3 复孔。PCR 产物经 8% PAGE 电泳分析。记录每个反应管中的荧光信号到达所设定的域值时所经历的循环数即 Ct 值,以 U6 作为内参照,采用定量 PCR 中的相对定量法,以 $N = 2^{-\Delta Ct}$ 表示目的 miRNA 的表达相对于内参的变化倍数,其中 $\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{U6}$ 。为增加数据直观性,所有数据均放大 10^3 倍。

表 1 引物序列

基因	引物名称	序列(5'→3')	PCR 产物
miR - 221	茎环 RT 引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-	67bp
		TCGCACTGGATACGACGAAACCCA	
	正向引物	GTTTCGTGGGAGCTACATTGTCTGC	
	反向引物	GTGTCGTGGAGTCGGCAATTC	
miR - 222	茎环 RT 引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-	65bp
		TCGCACTGGATACGACACCCAGTA	
	正向引物	GTTTCGTGGGAGCTACATCTGGC	
	反向引物	GTGTCGTGGAGTCGGCAATTC	
U6	RT 引物	CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT	101bp
	正向引物	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT	
	反向引物	CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT	

6. 统计学处理:采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计处理和统计图表制作。由于 miR - 221 和 miR - 222 数据呈非正态分布,故表达数据以中位数和四分位数间距表示。*Mann - Whitney U* 检验(两组)和 *Kruskal - Wallis H* 检验(多组)进行统计处理, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

结 果

1. miR - 221 和 miR - 222 表达的茎环实时 RT - PCR 检测:如图 1 所示,miR - 221 和 miR - 222 及 U6

的 realtime PCR 产物溶解曲线均为单峰,8% PAGE 电泳显示 PCR 产物为单一条带(图 2)。

2. miR - 221 和 miR - 222 在 AML 及 NL 患者组骨髓有核细胞中的表达:AML 及 NL 患者骨髓的 miR - 221 和 miR - 222 的表达差异显著,AML 和 NL 患者 miR - 221 表达中位数分别 685.28 和 84.94; miR - 222 表达的中位数分别为 550.97 和 138.70,有显著性差异(P 值均为 0)。NL 组内的 ITP、ET、MDS

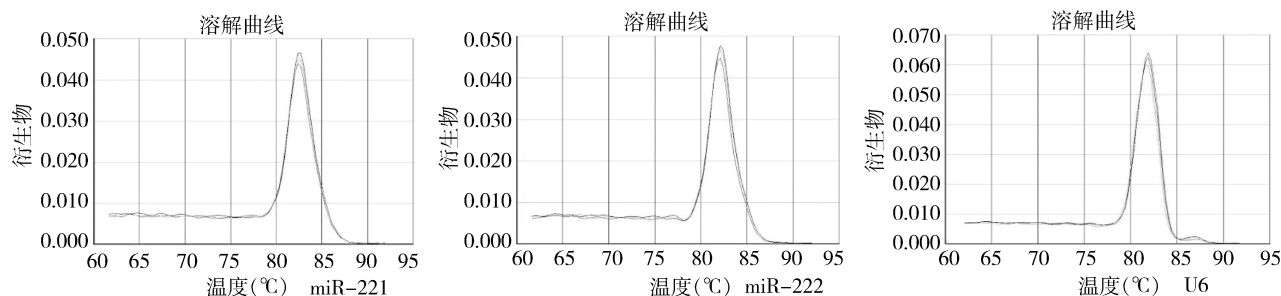
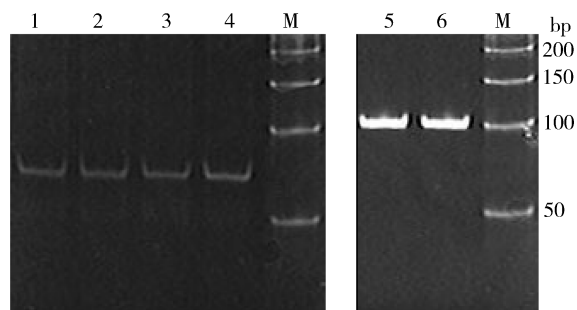


图1 miR-221和miR-222及U6内参实时PCR溶解曲线

图2 miR-221和miR-222及U6内参8%PAGE电泳
泳道1, 2. miR-221; 泳道3, 4. miR-222;
泳道5, 6. U6; M. 50bp DNA

及AA患者骨髓有核细胞miR-221的表达中位数分别为73.63、171.58、166.43和133.64,它们之间未见显著性差异($P=0.274$);miR-222的表达中位数分别为94.73、98.06、139.97及149.14,它们之间亦未见显著性差异($P=0.181$)(图3)。

3. miR-221和miR-222在3种AML亚型骨髓有核细胞中的表达:miR-221在 M_3 、 M_4 及 M_5 患者的骨髓标本表达存在差异,其的中位数分别为108.99、207.98及521.57;而miR-222的表达分别为95.92、148.68及213.76,未见显著性差异(P 值分别为0.166和0.518)(图4)。

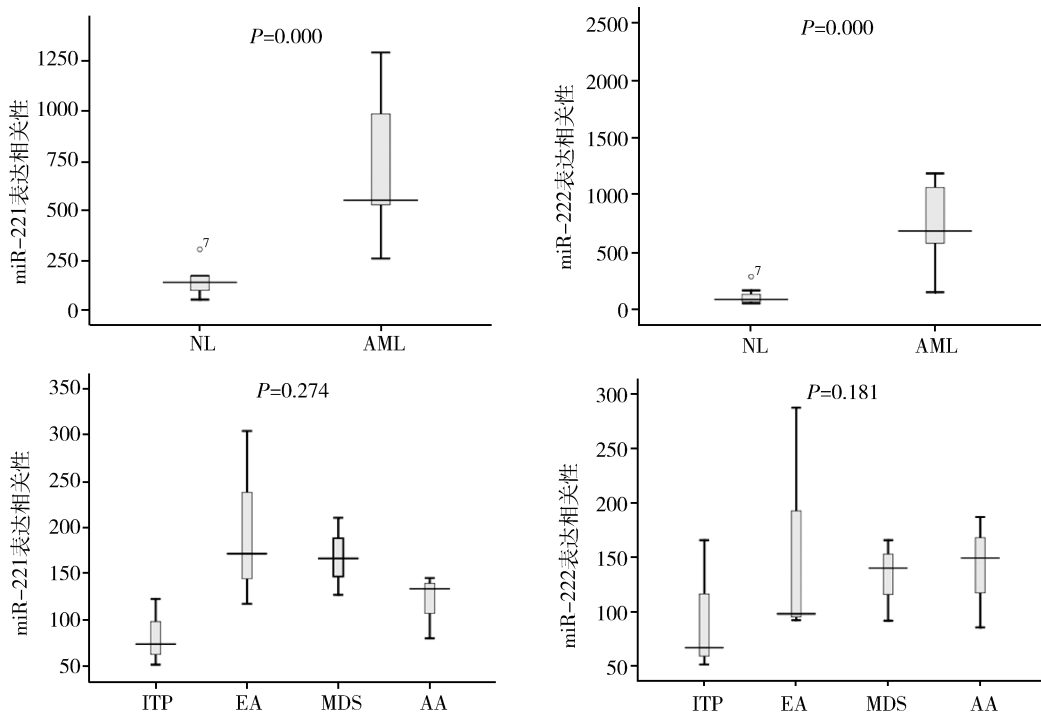


图3 初发AML与NL患者骨髓有核细胞中miR-221及miR-222的表达

讨 论

随着高通量miRNA芯片平台的建立和完善,miRNA与白血病的细胞遗传学以及临床治疗结果有关表达标签已见相关报道^[7-9]。此外与白血病相关的少数

miRNA功能的研究已被阐明,miRNAs在正常造血细胞和血液肿瘤的表达谱已逐步揭示^[10]。Garzon等^[11]的研究表明,在AML患者中有一部分miRNA表达失调,而这些miRNA跟细胞遗传学及治疗结果有关。

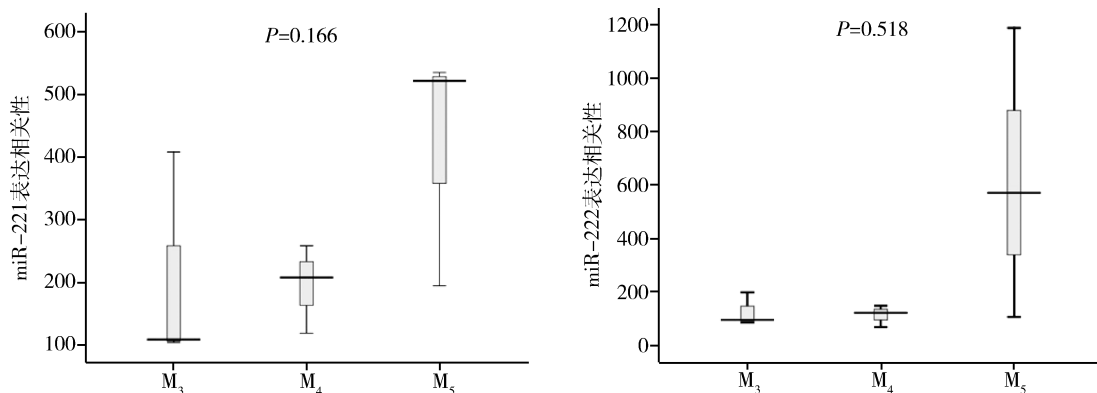


图 4 miR-221 及 miR-222 在 3 种 AML 亚型骨髓有核细胞中的表达水平

我们改进 Tang 等^[12]建立的茎环 RT-PCR miRNA 检测方法,把探针法改为 SYBR Green I 染料法,以 U6 为内参建立的茎环 RT-PCR 分析 miR-221 和 miR-222 表达^[13]。miR-221 和 miR-222 及 U6 的 realtime PCR 产物溶解曲线均为单峰,8% PAGE 电泳显示 PCR 产物为单一条带,说明茎环 RT-PCR 能特异扩增相应的 miRNA。

研究表明,在所收集的 NL 组中,ITP、ET、MDS 及 AA 患者骨髓有核细胞中 miR-221 和 miR-222,以及 miR-221/222 比值的表达水平未发现显著性差异,而 AML 组 miR-221 和 miR-222 的表达水平显著性高于 NL。结果说明,miR-221 和 miR-222 的过高表达可能参与了 AML 进程。研究发现,对于骨髓造血细胞,无论是正常的还是恶性的造血分化中,miR-221 和 miR-222 都被证实对于特定的靶 mRNA 具有一定的表达作用。miR-221 和 miR-222 在许多癌症病人的肿瘤细胞系中表现为共同上调。Ricardo 等通过对人 T98G 神经胶质细胞瘤的培养,发现维持低生理水平的 miR-221 和 miR-222 可以共同抑制 P57 和 P27 蛋白的表达,从而避免 T98G 细胞在静止期发生无序性的增殖。我们选取了 AML 中常见的 M₃、M₄ 和 M₅ 3 种亚型比较 miR-221 和 miR-222 的表达,未发现显著性差异,但存在趋势性现象,表现为逐步上调(M₃ < M₄ < M₅),是否提示 miR-221 和 miR-222 在不同亚型的 AML 中存在靶 mRNAs 的不同,而 M₄ 型由于同时兼具粒系单核系细胞的特征,而造成表达水平介于 M₃ 和 M₅ 两者之间,由于标本例数原因,这有待更多实验的论证。

综上所述,miR-221 和 miR-222 在 AML 初发患者中存在高水平的表达,这两种高水平表达的 miRNAs 可能在 AML 的发生和发展过程中发挥了重要作用。通过进一步深入的生物功能学研究,阐明其调控机制,

有望找到 AML 新的诊断和预后指标及治疗靶点。

参考文献

- 1 Meltzer P S. Cancer genomics;small RNAs with big impact s. *Nature*, 2005,435 (7043):745-746
- 2 Chen CZ, Li L, Lodish HF, *et al.* MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*,2004, 303(5654):83-86
- 3 Cheng A M, Byrom M W, Shelton J, *et al.* Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(4):1290-1297
- 4 Garzon R, Volinia S, Liu C G, *et al.* MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*, 2008,111(6):3183-3189
- 5 Garzon R, Garofalo M, Martelli M P, *et al.* Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(10):3945-3950
- 6 Jonken-Lavrencic M, Sun S M, Dijkstra M K, *et al.* MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood*, 2008, 111(10):5078-5085
- 7 Garzon R, Volinia S, Liu C G, *et al.* MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*, 2008, 111(6):3183-3189
- 8 Garzon R, Garofalo M, Martelli M P, *et al.* Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(10):3945-3950
- 9 Jonken-Lavrencic M, Sun S M, Dijkstra M K, *et al.* MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood*, 2008, 111(10):5078-5085
- 10 Ramiro Garzon, Carlo M, Croce. MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Current opinion in hematology*,2008,15(4):352-358
- 11 Garzon R, Volinia S, Liu C G, *et al.* MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*, 2008, 111(6):3183-3189
- 12 Tang F, Hajkova P, Barton SC, *et al.* MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(2):9
- 13 Xue X, Zhang Q, Huang Y. No miRNA were found in Plasmodium and the ones identified in erythrocytes could not be correlated with infection. *Malar J*, 2008,7(1):47

(收稿:2010-11-14)