

miR-21在成人急性B淋巴细胞白血病患者中的表达及临床意义

王田园,蔡安季,郝亚军,刘诗诗,李钢,谭文,郑宝

深圳市南山区人民医院检验科,广东 深圳 518052

【摘要】 目的 探讨miR-21在成人急性B淋巴细胞白血病(B-ALL)患者中的表达特点,分析其与临床治疗、预后的关系。方法 选择2016年1月至2018年12月深圳市南山区人民医院血液科收治的48例B-ALL患者纳入研究组,并选择40例骨髓正常的非造血系统疾病患者作为对照组,所有受试者均采集骨髓标本采用实时荧光定量PCR法检测骨髓单核细胞(BMMCs)中miR-21表达情况并进行比较。研究组患者均接受VDLP方案化疗2个疗程共2个月,比较高危组及标危组患者的miR-21表达的差异,根据化疗结果将患者分为耐药组和敏感组,比较组间miR-21表达差异,分析miR-21表达与B-ALL患者微小残留病(MRD)的相关性。**结果** 研究组患者的miR-21表达量为 7.02 ± 0.53 ,明显高于对照组的 2.43 ± 0.27 ,差异有统计学意义($P<0.05$);高危组患者的miR-21表达量为 8.72 ± 0.67 ,明显高于标危组的 5.62 ± 0.41 ,差异有统计学意义($P<0.05$);治疗后研究组患者miR-21表达量为 5.03 ± 0.35 ,较治疗前明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$),其中敏感组患者的miR-21表达量为 4.24 ± 0.27 ,明显低于耐药组的 6.33 ± 0.38 ,差异有统计学意义($P<0.05$);相关性分析结果显示miR-21相对表达量与MRD呈负相关($r=-0.432$, $P<0.05$)。**结论** 成人B-ALL患者miR-21表达明显升高,miR-21表达与患者的临床治疗疗效、预后有着密切的关系。

【关键词】 miR-21;急性B淋巴细胞白血病;预后;实时定量PCR;白血病;微小残留病

【中图分类号】 R733.71 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2019)11—1375—04

Expression and clinical significance of microRNA-21 in patients with acute B-lymphoblastic leukemia. WANG Tian-yuan, CAI An-ji, HAO Ya-jun, LIU Shi-shi, LI Gang, TAN Wen, ZHENG Bao. Department of Laboratory, Nanshan People's Hospital, Shenzhen 518052, Guangdong, CHINA

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression of microRNA-21 in adult patients with acute B-lymphoblastic leukemia (B-ALL), and to analyze its relationship with clinical treatment and prognosis. **Methods** From January 2016 to December 2018, 48 patients with B-ALL admitted to Department of Hematology, Nanshan People's Hospital were selected as the study group, and 40 patients with normal and non-hematopoietic diseases of bone marrow were selected as control group. Bone marrow samples were collected from all subjects and the expression of microRNA-21 in bone marrow mononuclear cells (BMMCs) was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The expression of microRNA-21 between high-risk group and standard-risk group were compared. Patients with B-ALL were treated with VDLP regimen for two courses (2 months). According to the results of chemotherapy, patients were divided into drug-resistant group and sensitive group. The expression of microRNA-21 was compared between the two groups, and the correlation between microresidual disease (MRD) and the expression of microRNA-21 was analyzed. **Results** The expression of microRNA-21 in the study group was 7.02 ± 0.53 , which was significantly higher than 2.43 ± 0.27 in the control group ($P<0.05$). The expression of microRNA-21 in high-risk group was 8.72 ± 0.67 , which was significantly higher than 5.62 ± 0.41 in standard-risk group ($P<0.05$). After treatment, the expression of microRNA-21 in B-ALL patients was 5.03 ± 0.35 , which was significantly lower than that before treatment ($P<0.05$). The expression of microRNA-21 in B-ALL patients in sensitive group was 4.24 ± 0.27 , which was significantly lower than 6.33 ± 0.38 in the drug-resistant group ($P<0.05$). The correlation analysis showed that the relative expression of microRNA-21 was negatively correlated with MRD ($r=-0.432$, $P<0.05$). **Conclusion** The expression of microRNA-21 in adult B-ALL patients is significantly increased. The expression of microRNA-21 is closely related to the clinical efficacy and prognosis of B-ALL.

【Key words】 microRNA-21; Acute B-lymphocytic leukemia; Prognosis; RT-PCR; Leukemia; Microresidual disease

白血病是临床常见的血液系统恶性肿瘤,好发于儿童和中青年人,急性B淋巴细胞白血病(B-ALL)是最为常见的白血病类型,儿童B-ALL无病生存率可达80.00%以上,但是成人B-ALL治疗缓解率较低,无病生存率不到40.00%^[1],因此探寻与成人B-ALL临床治疗、预后相关的标志物对于指导临床治疗、预后分析

均有重要的意义。微小RNA是内源性小分子非编码单链RNA,由20~25个核苷酸组成,主要作用为与mRNA结合,阻断蛋白编码基因表达^[2],在结直肠癌等多种肿瘤发生发展过程中起关键作用^[3]。microRNA-21(miR-21)在肿瘤组织中可通过调控不同基因表达起致癌基因作用,现有研究显示miR-21在T淋巴

通讯作者:王田园,E-mail:wtyuannscc@163.com

细胞白血病、自然杀伤(NK)细胞白血病^[4]、前B细胞淋巴瘤^[5]中高表达,且与其发病密切相关。本研究以成人B-ALL患者为研究对象,探讨其miR-21表达特点,分析其与患者临床治疗、预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2016年1月至2018年12月深圳市南山区人民医院血液科收治且符合以下纳入和排除标准的48例B-ALL患者作为研究组,其中男性29例,女性19例;年龄19~42岁,平均(26.35±5.91)岁;高危型21例,标危型27例。另选择同期性别、年龄与之相匹配的40例骨髓正常非造血系统疾病患者作为对照组,其中男性27例,女性13例;年龄21~49岁,平均(27.01±6.23)岁;疾病类型:缺铁性贫血13例、过敏性紫癜25例、其他2例。两组患者的性别和年龄比较差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经医学伦理委员会批准,向所有患者及其家属介绍研究目的、方法及注意事项,并均签署知情同意书。

1.2 病例选择 纳入标准:①经临床确诊为B-ALL;②年龄18岁以上;③临床资料完整;④患者知情同意。排除标准:①合并其他部位恶性肿瘤;②急性髓系白血病、淋巴瘤等其他血液系统肿瘤;③年龄<18岁;④临床资料缺失;⑤抵触本研究。

1.3 检测方法 (1)经血源性子宫内膜间充质干细胞(BMMCs)分离:分别于化疗前及化疗后第2周末采集骨髓5 mL,以乙二胺乙酸(EDKA)抗凝,生理盐水稀释后加入Ficoll淋巴细胞分离液,2 000 r/min离心15 min后取界面层获得骨髓单核细胞(BMMCs),将BMMCs以 $2\times10^6/L$ 密度接种于 RPMI-1640培养液(美国Gibco-BRL公司)中培养。RNA提取:取BMMCs加1 mL TRIzol试剂(美国Invitrogen公司),经离心处理后取无色水相层,加入异丙醇沉淀水相中RNA,离心,75%乙醇洗涤RNA沉淀,离心弃上清,室温放置沉淀物至干燥获得细胞总RNA,紫外分光光度法检测总RNA浓度,溶液吸光度(A)值,A260/A280>1.8可用于检测。(2)RNA反转录反应和实时定量PCR(RT-PCR):采用Reverse Transcription Kit(美国GIBCOL公司)并严格按照试剂盒说明将mRNA逆转录为cDNA,利用实时定量PCR系统(美国ABI公司)进行RT-PCR反应,以制备cDNA为模板,U6内参为对照,Primer Premier 5.0软件设计引物序列,miR-21引物序列:上游5'-UGAG-GUAGUAGGUUGUAUAGUU-3',下游5'-CUAUACA-ACCUACUACCUCAUU-3',扩增片段长度182 bp;U6引物序列:上游5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3',下游5'-AACGCTTCACGAATTGCGT-3',扩增片段长度169 bp。反应体系20 μL,反应条件:95℃预变性30 s,95℃变性15 s,55℃退火5 s,72℃延伸15 s,共45个循环,样品重复实验3次,每次3个复孔, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式法计算miR-21相对表达量。 $\Delta Ct=Ct_{miRNA}-Ct_{U6}$ (Ct值为每个反应管内荧光信号到达设定域值所

经历的循环数)。

1.4 临床治疗疗效判断 所有患者均给予VDP(长春新碱+泼尼松+柔红霉素)或VDLP(VDP+左旋门冬酰胺酶)方案化疗两个疗程,共2个月。化疗后达到完全缓解者为敏感;未完全缓解者,根据公式[骨髓白血病细胞下降指数(MBDI)=(化疗前骨髓白血病细胞比例-化疗后骨髓白血病细胞比例)/化疗前骨髓白血病细胞比例×100.00%]计算MBDI,若 $MBDI\geq60.00\%$ 为敏感,<60.00%为耐药。根据化疗结果将患者分为敏感组和耐药组。

1.5 微小残留病(MRD) 于治疗前后行骨髓穿刺术,流式细胞术(FCM)检测骨髓原始幼稚细胞数。根据骨髓原始幼稚细胞数将患者分为 $MRD<10^{-4}$ 组、 $MRD\geq10^{-4}$ 组。

1.6 统计学方法 采用SPSS25.0软件进行数据分析,人口学资料采用一般统计学描述,miR-21表达数据经Kolmogorov-Smirnov(K-S)检验符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用独立样本t检验,治疗前后差异采用配对t检验,性别构成采用率(%)表示,采用 χ^2 检验。Pearson相关系数描述miR-21表达量与MRD的相关性,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者BMMCs中miR-21表达量比较 研究组患者的miR-21表达量为 7.02 ± 0.53 ,明显高于对照组的 2.43 ± 0.27 ,差异有统计学意义($t=49.636$, $P<0.05$)。其中高危组miR-21表达量为 8.72 ± 0.67 ,标危组miR-21表达量为 5.62 ± 0.41 ,两组比较差异有统计学意义($t=19.779$, $P<0.05$),见图1。

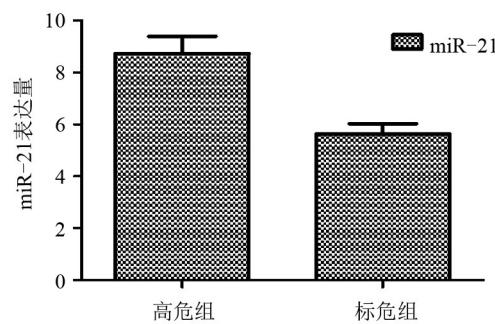


图1 高危组和标危组miR-21表达量对比图

2.2 治疗前后研究组患者BMMCs中miR-21表达量比较 治疗后研究组患者miR-21表达量为 5.03 ± 0.35 ,明显低于治疗前,差异有统计学意义($t=21.707$, $P<0.05$)。本组治疗后耐药19例,敏感29例,敏感组患者的miR-21表达量为 4.24 ± 0.27 ,耐药组患者的miR-21表达量为 6.33 ± 0.38 ,组间比较差异有统计学意义($t=20.753$, $P<0.05$),见图2。

2.3 研究组患者miR-21相对表达量与MRD的关系 治疗前研究组患者 $MRD<10^{-4}$ 组(13例)miR-21相对表达量为 6.05 ± 0.31 , $MRD\geq10^{-4}$ 组(35例)为 8.18 ± 0.56 ,两者比较差异有统计学意义($t=12.939$, $P<0.05$)。

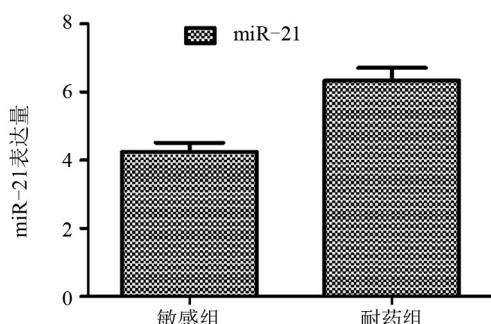


图2 敏感组和耐药组miR-21表达量对比图

治疗后研究组患者 $MRD < 10^{-4}$ 组(29例) miR-21 相对表达量为 4.34 ± 0.22 , $MRD \geq 10^{-4}$ 组(21例)为 6.89 ± 0.42 , 两者比较差异有统计学意义($t=27.902, P<0.05$)。Pearson 相关分析显示 miR-21 与 MRD 呈负相关($r=-0.315, P<0.05$), 见图3。

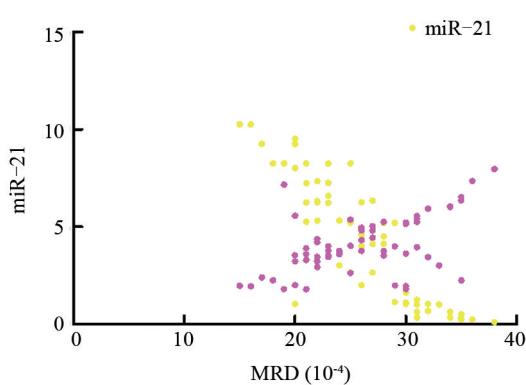


图3 miR-21与MRD散点图

3 讨论

白血病有造血干细胞恶性增殖、分化障碍、凋亡受阻等生物学特点, 骨髓和其他造血组织中异常原始细胞及幼稚细胞大量增殖, 抑制正常造血, 导致患者外周血细胞数量和比例严重异常。其中造血细胞恶性增殖、凋亡受抑决定着白血病患者临床预后^[6], 目前普遍认为 miRNA 与肿瘤细胞增殖密切相关, miRNA 是一类小非编码 RNA, 在肿瘤中作为一个癌基因或抑癌基因发挥作用。miR-21 是人类组织和细胞中发现较早且在人体组织广泛存在的 miRNAs 之一。现已发现 miR-21 在肺癌、乳腺癌、胃癌、肝癌等实体肿瘤以及血液肿瘤组织中均有高水平的表达^[7]。

现有研究发现白血病、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤, 以及多种实体肿瘤患者 miR-21 均出现过度表达, 且其表达水平与肿瘤增殖、转移和预后密切相关^[4-5, 8], miR-21 在儿童 B-ALL 患者中呈明显高度表达, 与儿童 B-ALL 的发病、发展有着密切的关系^[9]。本研究以成人 B-ALL 患者为研究对象, 分析 miR-21 在成人 B-ALL 群体中的表达特点, 结果显示成人 B-ALL 患者骨髓单核细胞中 miR-21 表达明显高于骨髓正常的非造血疾病患者, 高危组患者 miR-21 表达水平高于标危组, 提示 miR-21 与 B-ALL 发病、发展均有

关, 可能是 B-ALL 的致癌基因之一。抑癌基因程序性细胞死亡因子 4 (PDCD4) 是 miR-21 靶基因, miR-21 通过与 PDCD4 信使 RNA 3' 非翻译区 (UTR) 特异性结合, 使信使 RNA 降解转录, 降低 PDCD4 表达, 抑制肿瘤细胞凋亡, 促进肿瘤细胞分化、增殖, 并诱导肿瘤细胞侵袭、血管浸润和转移^[10], 同时 miR-21 含独立启动子, 因此其表达水平不受重叠蛋白编码基因启动子调控^[11]。本研究显示化疗后 B-ALL 患者 miR-21 表达明显下降, 且化疗敏感组患者 miR-21 表达低于化疗耐药组患者, 说明 miR-21 可能是肿瘤耐药的关键因素, miR-21 过度表达预示着患者对化疗方案的不敏感, 提示 miR-21 表达可作为 B-ALL 临床治疗疗效的判断指标, 临床应尽早调整化疗方案, 早期干预。

白血病作为高度异质性肿瘤, 治疗前对患者进行准确分型及预后分析对于制定个性化治疗方案、改善患者预后、保证患者长期生存有着重要意义。年龄、免疫分型、染色体异常、基因异常、早期治疗反应、MRD 等均是影响白血病患者预后的重要因素。近年来, 成人白血病及实体瘤研究指出 miRNA 对肿瘤诊断、分型、预后判断有重要价值, miR-21 过表达与 B-ALL 肿瘤细胞增殖、转移密切相关。本研究显示 miR-21 与 MRD 存在一定的关系, 治疗后 $MRD \geq 10^{-4}$ 组 miR-21 表达量明显高于 $MRD < 10^{-4}$ 组, 相关性分析显示 miR-21 表达与 MRD 呈明显负相关, 说明 miR-21 表达越高, 骨髓原始幼稚细胞数增多, 病灶微小残留越高, 提示 miR-21 高度表达预示患者预后不良, 因此 miR-21 可作为成人 B-ALL 患者预后预测的指标。相关研究同样显示 miR-21 表达水平与肿瘤预后密切相关, 抑制 miR-21 表达可明显抑制肿瘤细胞增殖, 并增加肿瘤细胞对化疗敏感性, 分析其机制为 miR-21 可靶向作用于 PTEN 基因, PTEN 蛋白具有磷酸酯酶活性, 通过拮抗酪氨酸激酶等磷酸化酶活性, 抑制肿瘤细胞生长、侵袭, miR-21 过度表达导致 PTEN 蛋白表达下调, 磷酸酯酶活性增加, 导致肿瘤细胞增殖, 同时与 miR-21 抑制 PI3K 信号通路活化有关^[12-13]。

综上所述, B-ALL 患者 miR-21 表达明显上调, miR-21 表达与 B-ALL 发病、临床分型、疗效有着密切关系, 提示 miR-21 可作为 B-ALL 患者诊断、疗效判断、预后预测的有效指标。miR-21 靶向药物治疗可能成为未来白血病治疗的行之有效的方法。本研究局限之处在于样本例数较少, 可能导致统计学偏倚, 影响研究结果的可靠性, 其次仅选择了 MRD 作为评价 miR-21 对 B-ALL 患者预后影响的指标, 未能进行长期随访统计远期生存率, 因此存在一定局限性, 希望在以后研究中继续扩大样本量, 延长随访时间, 增加影响 B-ALL 患者预后的指标, 并与 miR-21 表达进行相关性分析, 以获得更加可靠的结果, 为成人 B-ALL 个体化治疗提供新的途径和方向。

降钙素在治疗骨质疏松伴腰椎管狭窄症中的应用价值

黎佩珍¹,翁阳华¹,伊莉¹,张洪亮¹,李忠辉¹,杨宏栋²

东莞市虎门医院康复科¹、骨科²,广东 东莞 523900

【摘要】目的 探讨降钙素治疗骨质疏松伴腰椎管狭窄症的临床疗效。**方法** 选择2013年1月至2018年6月期间东莞市虎门医院收治的68例骨质疏松合并腰椎管狭窄症患者为研究对象,根据随机数表法分为观察组($n=34$)和对照组($n=34$),对照组患者予钙尔奇D+洛索洛芬钠治疗,观察组患者在此基础上联合鲑鱼降钙素治疗,疗程均为4周。比较两组患者的临床疗效,以及治疗后疼痛程度[视觉模拟评分法(VAS)]、腰椎功能[日本骨科协会评估治疗分数(JOA)]的变化。**结果** 治疗后,观察组患者的治疗有效率为85.29%,明显高于对照组的61.76%,差异有统计学意义($P<0.05$);治疗前,两组患者的VAS评分及腰椎JOA评分比较差异均无统计学意义($P>0.05$);治疗后观察组患者的VAS评分为(3.44±1.31)分,明显低于对照组的(4.82±1.39)分,JOA评分为(19.72±5.14)分,明显高于对照组的(17.04±4.42)分,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 降钙素治疗骨质疏松伴腰椎管狭窄症可以缓解患者的疼痛症状,改善腰椎功能,提高临床疗效。

【关键词】 骨质疏松;腰椎管狭窄;降钙素;腰椎功能;疗效

【中图分类号】 R681 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2019)11—1378—03

Application value of calcitonin in the treatment of osteoporosis with lumbar spinal stenosis. LI Pei-zhen¹, WENG Yang-hua¹, YI Li¹, ZHANG Hong-liang¹, LI Zhong-hui¹, YANG Hong-dong². Department of Rehabilitation¹, Department of Orthopedics², Dongguan Humen Hospital, Dongguan 523900, Guangdong, CHINA

[Abstract] **Objective** To investigate the clinical effect of calcitonin in the treatment of osteoporosis with lumbar spinal stenosis. **Methods** Sixty-eight patients with osteoporosis complicated with lumbar spinal stenosis treated in Dongguan Humen Hospital from January 2013 to June 2018 were selected as the research objects. According to the random number table method, they were divided into observation group ($n=34$) and control group ($n=34$). The patients of control group were treated with Calcium D+Losoprofen Sodium, and those in the observation group were treated with salmon calcitonin on this basis of the treatment in the control group. The course of treatment was 4 weeks. The clinical efficacy, pain degree (Visual Analogue Scale [VAS]) and lumbar vertebral function (JOA) were compared between the two groups. **Results** After treatment, the effective rate of the observation group was 85.29%, which was significantly higher than 61.76% of the control group ($P<0.05$). Before treatment, there was no significant difference in VAS score and JOA score between the two groups ($P>0.05$). The VAS score of the observation group were 3.44±1.31, which were

基金项目:2017年广东省东莞市社会科技发展(一般)项目(编号:201750715020219)

通讯作者:黎佩珍,E-mail:lpzieihe@163.com

参考文献

- [1] 张国君,刘卓刚. microRNA-103b在急性淋巴细胞白血病患者中的表达及意义[J]. 河北医药, 2016, 38(9): 1289-1291.
- [2] TURNER ML, SCHNORFEL FM, BROCKER T. Micro-RNAs regulate dendritic cell differentiation and function [J]. Journal of Immunology, 2011, 187(8): 3911-3917.
- [3] SAYED D, ABDELLATIF M. MicroRNAs in development and disease [J]. Physiological Reviews, 2011, 91(3): 827-887.
- [4] VAN DER FITSL, VAN KESTER MS, QIN YJ, et al. MicroRNA-21 expression in CD4⁺T cells is regulated by STAT3 and is pathologically involved in Sezary syndrome [J]. The Journal of Investigative Dermatology, 2011, 131(3): 762-768.
- [5] 李丽,杨一飞,杨俊超,等. miRNA-21在黏膜相关淋巴样组织结外边缘区淋巴瘤中的表达及与CHOP方案疗效的关系[J]. 白血病·淋巴瘤, 2018, 27(12): 740-743.
- [6] 韩波,王海霞,邵纬,等. 成人急性淋巴细胞白血病骨髓中miR-34a的表达及其在细胞耐药中的意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(2): 336-340.
- [7] 张保贵,刘炳亚,燕敏. miR-21与肿瘤的研究进展[J]. 国际外科学杂志, 2011, 38(4): 262-267.
- [8] GU J, ZHU X, LI Y, et al. miRNA-21 regulates arsenic-induced anti-leukemia activity in myelogenous cell lines [J]. Med Oncol, 2011, 28(1): 211-218.
- [9] 刘秀琴,于树红,孙立荣. 急性B淋巴细胞白血病患儿miR-21表达及意义[J]. 齐鲁医学杂志, 2014, 29(1): 1-2, 5.
- [10] ASANGANI IA, RASHEED SA, NIKOLOVA DA, et al. MacroRNA-21 post-transcriptionally downregulates tumor suppressor PDCD4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer [J]. Oncogene, 2008, 27(15): 2128-2136.
- [11] 高顺利,王立忠,刘海英,等. miR-141在儿童急性B淋巴细胞白血病中的表达及意义[J]. 中国癌症杂志, 2014, 24(3): 166-169.
- [12] 严匡华,陈龙,严风梦. 下调miR-21抑制PI3K/AKT信号通路对白血病细胞增殖凋亡的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(3): 441-445.
- [13] 罗婷. miR-21影响B淋巴细胞白血病Nalm-6细胞生长及相关机制的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2017.

(收稿日期:2019-02-18)