论著·临床研究

# 多发性骨髓瘤中 miRNA-16 相对表达量与 Mayo 危险分层的关系*

苏良焱[1,2]，何海源[3]，陶诗诗[1]，梁国梅[1]，邱莫灿[1]，王　科[1]，罗顺蓉[1]，杨日荣[1△]
（1. 广西医科大学基础医学院，南宁 530021；2. 广西医科大学第一附属医院血液内科，南宁 530021；
3. 广西中医药大学第一附属医院介入科，南宁 530021）

**摘　要：目的**　研究多发性骨髓瘤（MM）患者 miRNA-16（简称 miR-16）表达水平的变化及与危险分层、预后判断的关系。**方法**　收集 2016 年 8 月至 2017 年 1 月于广西医科大学附属第一医院血液内科住院治疗的 31 例 MM 患者的骨髓标本各 10 mL，并取 5 例健康骨髓捐献者的骨髓标本作为健康对照。利用实时荧光定量聚合酶链反应技术（qRT-PCR）分析 miR-16 相对表达量变化。同时利用荧光原位杂交技术（iFISH）检测异常基因。统计学分析 miR-16 相对表达量与以 iFISH 为基础的 Mayo 危险分层的关系，和患者自身治疗前后 miR-16 的相对表达量差异。**结果**　miR-16 在 MM 患者中相对表达量升高，与 Mayo 危险分层呈正相关。同时病程进展后的 MM 患者，miR-16 相对表达量上升。**结论**　miR-16 可作为临床判断 MM 疾病复发或进展恶化的指标，根据其表达量变化指导临床个体化治疗。

**关键词：**多发性骨髓瘤；　miRNA-16；　Mayo 危险分层
**DOI：**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.01.007　　**中图法分类号：**R446.61
**文章编号：**1673-4130（2018）01-0025-03　　**文献标识码：**A

## Relationship of miRNA-16 relative expression level and Mayo risk stratification in multiple myeloma*

*SU Liangyan*[1,2], *HE Haiyuan*[3], *TAO Shishi*[1], *LIANG Guomei*[1], *QIU Mocan*[1], *WANG Ke*[1], *LUO Shunrong*[1], *YANG Rirong*[1△]
（1. *College of Basic Medicine, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi* 530021, *China*; 2. *Department of Hematology, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi* 530021, *China*; 3. *Department of Intervention, First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi* 530021, *China*）

**Abstract: Objective**　To explore the change of miRNA-16 (miR-16) level in the patients with multiple myeloma (MM) and its relationship with the Mayo risk stratification and prognosis judgment. **Methods**　Each 10 mL of bone marrow samples was collected from 31 cases of MM in the hematology department of the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University from August 2016 to January 2017, and each 5 mL of bone marrow sample was collected from 5 healthy bone marrow donors as the healthy control. The real time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to analyze relative the change of miR-16 relative expression level and fluorescence in situ hybridization (iFISH) was used to detect the abnormal gene. Then the relationship between miR-16 relative expression level with Mayo based risk stratification, and the difference of miR-16 relative expression level between before and after self treatment were statistically analyzed. **Results**　The miR-16 relative expression level in MM patients was increased and positively correlated with the Mayo risk stratification. Meanwhile in the MM patients with disease progression, the miR-16 expression was increased. **Conclusion**　miR-16may serve as the indicator for judging the recurrence or progression of MM, and guides the clinical personalized therapy of MM according to its expression level change.

**Key words:** multiple myeloma;　miRNA-16;　Mayo risk stratification

miRNAs 是一类内生的且长度约为 18～24 个核苷酸大小的小 RNA[1]，近年来国内外学者通过大量实验证明了 miRNAs 在转录后水平调控基因表达，调控免疫系统的发生、成熟、凋亡、耐药等[2]，尤其在人类肿瘤发病机制及预后中有着无法估量的价值[3]。如 2013 年有研究者曾建议 miRNAs 用于分子诊断，

*　**基金项目：**国家自然科学基金资助项目（81360312、81402306）；广西壮族自治区自然科学基金项目（2014GXNSFBA118158）；广西壮族自治区高校科学研究项目（YB2014080）。

**作者简介：**苏良焱，女，主管技师，主要从事血液免疫研究。　△　**通信作者**，E-mail：520yrr@163.com。

**本文引用格式：**苏良焱，何海源，陶诗诗，等. 多发性骨髓瘤中 miRNA-16 相对表达量与 Mayo 危险分层的关系[J]. 国际检验医学杂志，2018，39（1）：25-27.

进而完善多发性骨髓瘤(MM)的 Mayo 危险分层，甚至认为其可以成为 MM 确诊或病程进展的重要指标[4-5]。Mayo 危险分层是基于异常基因的检测，是目前国际上认可度比较高的 MM 危险分层及预后指标，包含高危基因如 P53、MAF、MAFB；中危基因如 FGFR3；标危基因如 CCND3、CCND1[6-7]。MM 复发率很高，复发后病情恶化及引起的相关并发症严重影响患者总生存期，一般需要根据 Mayo 危险分层评估患者的预后风险，然后制定相应的治疗方案降低复发风险，提高患者生存期[8]。miRNA-16(简称 miR-16)已经被证实是 MM 中调节细胞增生、分化、凋亡、耐药的重要因子，它的表达模式对于 MM 患者的预后诊断却仍存争议[9]。因此本研究针对 miR-16 在患者体内的相对表达水平与 MM 病程进展及危险分层进行相关统计学分析，探讨其在 MM 预后诊断中的价值。

## 1　资料与方法

**1.1**　一般资料　收集 2016 年 8 月至 2017 年 1 月就诊于广西医科大学附属第一医院血液内科 31 例 MM 患者，其中男 18 例，女 13 例，年龄 39～72 岁，中位年龄 51 岁，其中 22 例为初治，3 例为治疗后，6 例为病情复发。根据 iFISH 的检测结果把 31 例标本分为高危组、中危组、标危组，另外收集 5 例骨髓移植捐献供者骨髓各 5 mL 作健康对照组的标本。各组研究对象在年龄、性别构成上比较，差异无统计学意义($P>0.05$)，具有可比性，并根据伦理委员会要求标本采集前均与患者及志愿者签署知情同意书。

**1.2**　仪器与试剂　奥林巴斯有限公司提供 BX-UCB 荧光显微镜；美国赛默飞世尔科技有限公司提供 Thermal Cycler 2720 逆转录仪；罗氏公司提供 Light Cycler 480 Ⅱ PCR 仪等。北京金菩嘉医疗科技有限公司提供荧光原位杂交技术(FISH)探针(CCND1、P53、FGFR3、MAF)；英国 Cytocell 公司提供 FISH 探针(MAFB、CCND3)；德国美天妮公司提供 CD138 磁珠分选试剂盒；宝生物科技有限公司提供 TaKaRa 逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应技术(qRT-PCR)试剂盒。

**1.3**　方法

**1.3.1**　总 RNA 提取及质控　提取总 RNA 后进行 1%琼脂糖凝胶电泳示 28S、18S、5S 条带清晰，且 28S 亮度约为 18S 两倍，说明总 RNA 质量合格，没有降解，可用于后续 qRT-PCR 检测 miR-16 的相对表达量[10]。

**1.3.2**　荧光原位杂交及质控　患者标本中浆细胞比例低，FISH 对阳性检测率低，易造成假阴性。因此，对浆细胞进行纯化，通过 CD138 磁珠分选间期浆细胞后再进行荧光原位杂交(iFISH)，可减少假阴性的判读[11]。

**1.3.3**　qRT-PCR　上机反应程序为 94 ℃ 2 min 预变性、94 ℃ 10 s 变性，60 ℃ 50 s 退火延伸，72 ℃ 1 s 采集信号(40 个循环)、72～94 ℃ 熔解曲线、25 ℃ 1 min冷却。

**1.4**　统计学处理　本研究 qRT-PCR 检测的 miR-16 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析，iFISH 检测结果进行 Mayo 危险度分组，二者经过 SPSS17.0 软件比对分析，3 组及以上数据采用方差分析，两组数据间比较采用 SNK-$q$ 检验进行分析，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2　结　　果

**2.1**　iFISH 检测结果比较　31 例 MM 标本中 4 例患者 P53 阳性(13.0%)，5 例患者 FGFR3 阳性(16.0%)，1 例患者 CCND1 阳性(3.2%)，4 例患者 CCND3 阳性(12.9%)，16 例患者无检测基因异常(51.6%)，3 例两个基因双阳性(9.7%)。根据 Mayo 分层，4 例患者处于高危组(13.0%)，5 例处于中危组(16.0%)，21 例处于标危组(68.0%)。综合其他病历资料显示 6 例标危组患者属于复发阶段。见表 1。

**表 1**　iFISH 检测结果比较

| 项目 | 指标 | $n$ | 百分比(%) |
|---|---|---|---|
| 性别 | 男 | 18 | 58.0 |
| | 女 | 13 | 42.0 |
| 高危组 | P53(+) | 4 | 13.0 |
| | 两个基因异常 | 3 | 9.7 |
| 中危组 | FGFR3(+) | 5 | 16.0 |
| 标危组 | CCND1(+) | 1 | 3.2 |
| | CCND3(+) | 4 | 12.9 |
| | 无基因异常 | 16 | 51.6 |
| 临床进程 | 初治 | 22 | 71.0 |
| | 治疗后 | 3 | 9.7 |
| | 复发 | 6 | 19.3 |

**2.2**　qRT-PCR 检测结果比较　MM 初诊患者 miR-16 相对表达量在健康对照组、标危组、中危组、高危组比较，差异有统计学意义($F=5.11$，$P=0.0087$)。标危组与中危组 miR-16 相对表达量比较，差异有统计学意义($t=2.363$，$P=0.0358$)；中危组与高危组 miR-16 相对表达量比较，差异有统计学意义($t=7.537$，$P=0.0172$)，但健康对照组与标危组 miR-16 相对表达量比较，差异无统计学意义($t=1.052$，$P=0.3094$)。见图 1。miR-16 相对表达量与以 iFISH 为基础的 Mayo 危险分层呈正相关($r=0.4339$)。说明 miR-16 相对表达量虽然尚不能作为 MM 的临床诊断指标，但是可以区分 Mayo 危险分层、判断预后，指导临床个性化治疗。

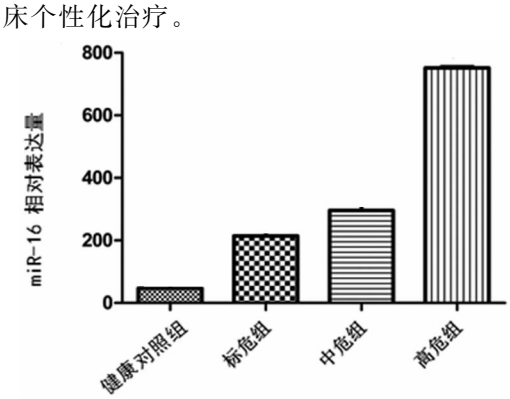


**图 1**　各组 MM 中 miR-16 相对量的比较

**2.3** 各组 MM 患者间 miRNA-16 相对表达量比较　本研究 21 例标危组，其中 6 例为复发返院化疗，其余为初治患者，标危组复发 MM 患者相对初治患者的 miR-16 相对表达量呈上升趋势，差异有统计学意义（$t=5.497$，$P<0.05$）。见图 2。中危组 5 例患者中 2 例为已治疗后患者，3 例为未治疗过的初诊患者，中危组患者治疗前 miRNA-16 相对表达量与治疗后比较，差异无统计学意义（$t=1.138$，$P=0.337\ 6$），见图 3。虽然 miR-16 相对表达量未能被证明作为 MM 治疗疗效的观察指标，但可作为 MM 病程进展、复发的重要监测指标，及时提示病程恶化、指导临床干预。

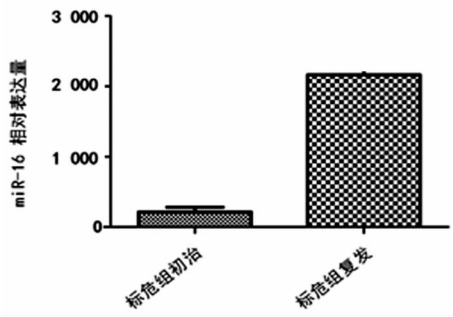


**图 2**　MM 初治与复发组间

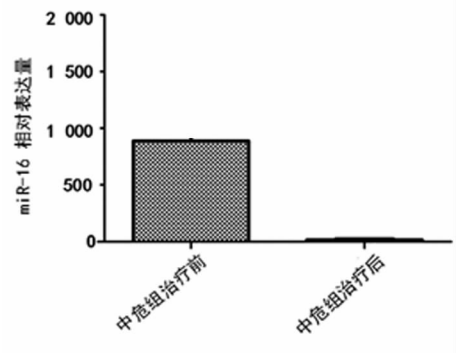


**图 3**　MM 治疗前与治疗后组

## 3 讨　论

MM 的预后判断依赖于形态学和各种生化检测指标，但 MM 的 Mayo 危险分层、病程进展的检测仍存在争议，对从事血液学研究的众多医学工作者来说细胞遗传学异常的异质性是很大的[12]，涉及每一对染色体上的基因，但 iFISH 技术只能用已知特异性的探针检测已知的基因位点，甚至出现仍未能解释的异常[13]。本研究 31 例标本中，有 2 例检测出未知基因异常，其中 1 例是 14 号染色体荧光标记位点基因的缺失，1 例是 14 号染色体标记位点的扩增。可见 iFISH 技术仍然存在未知的异常或不能检测出的异常，有理由怀疑 iFISH 检测中没有检测出异常基因的标本中仍存在未知的异常基因，这些极有可能影响 MM 的预后、耐药、复发、进阶成浆细胞白血病等。MM 中存在多种复杂的染色体异常，通过 FISH 检测和 qRT-PCR 对 miRNAs 的检测结果比对，可以明确多数染色体异常是由相应的 miRNAs 调控的，且本研究也显示了 qRT-PCR 检测 miR-16 相对表达量与 MM 患者的 Mayo 危险分层呈正相关，且差异有统计学意义（$P<0.05$）。可见 miR-16 的相对表达量可作为对 MM 危险分层的有效评估。总之，qRT-PCR 同 iFISH 技术一样敏感、直观，虽然目前仍不能完全取代 Mayo 危险分层地位，但可以作为 MM 基因检测预后方面重要的补充，甚至由于 iFISH 检测成本昂贵[14]，在大多数不能开展 iFISH 检测的中小型医院，可以开展 qRT-PCR 代替 iFISH 作为 MM 初步分层、评估、预后判断的重要指标，指导临床治疗，最终达到更为有效的个体化靶向治疗。

## 参考文献

[1] WU P, AGNELLI L, WALKER BA, et al. Improved risk stratification in myeloma using a microRNA-based classifier[J]. Br J Haematol, 2013, 162(3): 348-359.

[2] 黄晓军，路瑾. 中国多发性骨髓瘤诊治指南（2015 年修订）[J]. 中华内科杂志，2015，54(12)：1066-1070.

[3] LI F, XU Y, DENG S, et al. MicroRNA-15a/16-1 cluster located at chromosome 13q14 is down-regulated but displays different expression pattern and prognostic significance in multiple myeloma[J]. Oncotarget, 2015, 6(35): 38270-38282.

[4] CHNG W J, DISPENZIERI A, CHIM C S, et al. IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma[J]. Leukemia, 2014, 28(2): 269-277.

[5] SUN C Y, SHE X M, QIN Y, et al. miR-15a and miR-16 affect the angiogenesis of multiple myeloma by targeting VEGF[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(2): 426-435.

[6] HUANG E, LIU R, CHU Y. miRNA-15a/16: as tumor suppressors and more[J]. Future Oncol, 2015, 11(16): 2351-2363.

[7] TUNG Y T, HUANG P W, CHOU Y C, et al. Lung tumorigenesis induced by human vascular endothelial growth factor (hVEGF)-A165 overexpression in transgenic mice and amelioration of tumor formation by miR-16 [J]. Oncotarget, 2015, 6(12): 10222-10238.

[8] 边春景，刘铁刚，刘霞，等. microRNAs 在动物体内的功能[J]. 医学分子生物学杂志，2005，22(5)：359-362.

[9] 赵宁，严冬雪. 多发性骨髓瘤病发生机制及诊疗研究进展[J]. 中国临床新医学，2014，20(6)：568-572.

[10] 曹鹏飞，陈方平，谭倩，等. FISH 技术检测 122 例 MM 的异常基因及其与浆细胞克隆演进的相关性分析[J]. 临床血液学杂志，2016，29(5)：385-388.

[11] 张之南，沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京：科学出版社，2007：232-235.

[12] CHI J, BALLABIO E, CHEN X H, et al. MicroRNA expression in multiple myeloma is associated with genetic subtype, isotype and survival[J]. Biol Direct, 2011, 6(1): 23.

[13] 刘聪，葛繁梅. 微小 RNA 在多发性骨髓瘤中作用的研究进展[J]. 海南医学，2016，27(7)：14.

[14] 王秀红，吴胜军，刘艳艳，等. 多发性骨髓瘤轻链型与非轻链型实验室检查结果比较[J]. 中国卫生检验杂志，2016，26(15)：2144-2146.

（收稿日期：2017-06-24　修回日期：2017-10-11）