

· 论 著 ·

miR-22 和 miR-156 在多发性骨髓瘤中的表达分析及临床意义

汪方园, 孙岩[△], 张维, 武杰, 银广悦

(河北中石油中心医院检验科, 河北廊坊 065000)

摘要:目的 分析 miR-22、miR-156 与骨髓瘤细胞中 DNA 连接酶 III (LIG3) 之间的相关性, 探讨 miR-22、miR-156 在多发性骨髓瘤 (MM) 发生、发展中可能的调控作用及临床意义。方法 选取 2017 年 9 月至 2019 年 4 月在该院血液内科确诊并治疗的 MM 患者 105 例, 参照欧洲骨髓移植协作组标准将其分为初治组 (32 例)、难治组 (43 例)、缓解组 (30) 例, 并征集门诊诊断为非恶性血液病的患者 30 例为对照组, 收取所有患者的骨髓液标本, 检测患者骨髓液中 miR-22、miR-156 的表达水平, 以及 LIG3 的 mRNA 和蛋白表达水平。对检测结果进行统计学处理, 分析 LIG3 mRNA、miR-22、miR-156 表达水平与 MM 临床病理特征的相关性, 以及 miR-22、miR-156 的表达水平与骨髓瘤细胞中 LIG3 mRNA 表达水平的相关性。结果 在 MM 难治组患者中 miR-22 和 miR-156 的表达水平低于初治组、缓解组及对照组 ($P < 0.05$)。MM 患者中 LIG3 的 mRNA 表达水平高于对照组 ($P < 0.05$), 难治组 LIG3 的蛋白表达水平最高。MM 中 LIG3 的表达水平与病理分级呈正相关, 而 miR-22、miR-156 的表达水平与病理分级呈负相关。MM 中 miR-22 的表达水平与 LIG3 的表达水平呈负相关, 而 miR-156 的表达水平与 LIG3 的表达水平无相关性。结论 miR-22 表达水平与 MM 患者病理分级相关, 表达水平越低说明病情越严重。

关键词: miR-22; miR-156; 多发性骨髓瘤; 表达

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.23.019

中图法分类号: R733.3

文章编号: 1673-4130(2020)23-2904-04

文献标识码: A

Expression analysis and clinical significance of miR-22 and miR-156 in multiple myeloma

WANG Fangyuan, SUN Yan[△], ZHANG Wei, WU Jie, YIN Guangyue

(Department of Clinical Laboratory, Hebei Petro China Central

Hospital, Langfang Hebei 065000, China)

Abstract: Objective Analyze the correlation between miR-22, miR-156 and DNA ligase III (LIG3) in myeloma cells, and explore the possible regulatory role of miR-22 and miR-156 in the occurrence and development of multiple myeloma (MM) And clinical significance. **Methods** A total of 105 patients with MM who were diagnosed and treated in the Department of Hematology of the hospital from September 2017 to April 2019 were selected. According to the standards of the European Bone Marrow Transplantation cooperation group, they were divided into initial treatment group (32 cases), refractory group (43 cases) and remission group (30) cases, and 30 patients diagnosed as non malignant hematological diseases were recruited as control group. Bone marrow fluid samples were collected from all patients, the expression levels of miR-22 and miR-156 in the bone marrow fluid of patients, as well as the mRNA and protein expression levels of LIG3 were detected. The test results were statistically processed to analyze the correlation between the expression levels of LIG3 mRNA, miR-22, miR-156 and the clinicopathological characteristics of MM, and the correlation between the expression levels of miR-22, miR-156 and the expression level of LIG3 mRNA in myeloma cells. **Results** The expression levels of miR-22 and miR-156 in the MM refractory group were lower than those in the initial treatment group, remission group and control group ($P < 0.05$). The mRNA expression level of LIG3 in MM patients was higher than that in the control group ($P < 0.05$), and the protein expression level of LIG3 in the refractory group was the highest. The expression level of LIG3 in MM was positively correlated with pathological grade, while the expression levels of miR-22 and miR-156 were negatively correlated with pathological grade. There was a negative correlation between the expression of miR-22 and the expression level of LIG3 in MM, but there was no correlation between the expression levels of miR-156 and the expression of LIG3. **Conclusion** The expression level of miR-22 is related to the pathological grade of MM patients. The lower the expression, the more serious the condition.

作者简介:汪方园,男,主管技师,主要从事临床免疫学检验方面的相关研究。 [△] 通信作者, E-mail: 13784123353@163.com。

本文引用格式:汪方园,孙岩,张维,等. miR-22 和 miR-156 在多发性骨髓瘤中的表达分析及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(23):

Key words: miR-22; miR-156; multiple myeloma; expression

癌症是由渐进性的基因组畸变产生的,最终赋予癌细胞疯狂生长的优势^[1-2]。多发性骨髓瘤(MM)是一种血液系统恶性肿瘤性疾病,MM 约占血液恶性肿瘤的 10%,随着老龄化加重,MM 发病人数逐渐增加^[3-4]。肿瘤细胞中的 DNA 损伤修复机制的改变可能与疾病的发展和进展有关^[5]。DNA 连接酶 III (LIG3)基因编码多种 DNA 连接酶亚型,细菌特异性 LIG3 可变剪接机制生成 LIG3 β 参与减数分裂重组和(或)单倍体精子中 DNA 的修复,体内和体外的试验已证明,敲除 LIG3 会影响 MM 细胞的生存能力,可见肿瘤细胞依赖于 LIG3-driven 修复^[6]。近期研究发现,microRNAs(miRNAs)参与了骨髓瘤细胞生长和生存的调节作用^[7],主要在转录后水平负性调控靶基因的表达。miRNA 与肿瘤的发生也密切相关,很可能是一类潜在的癌基因^[8-9]或抑癌基因^[10]。

miRNA 在 MM 中研究的文献报道甚少。本研究探讨 miR-22、miR-156 在 MM 发生、发展中可能的调控作用及临床意义,为发现新的 MM 预后指标及进一步研究 miRNA 在 MM 发病机制中的作用打下基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 征集 2017 年 9 月至 2019 年 4 月经本院血液内科诊断及治疗并自愿参试的 MM 患者 105 例。纳入标准:(1)经常规检查、骨髓细胞学检查、骨 ECT、骨髓象分析等确诊为 MM;(2)首发患者;(3)年龄超过 65 岁。排除标准:(1)临床资料不全;(2)合并其他肿瘤患者或自身免疫疾病或重要器官衰竭患者;(3)接受过放化疗患者。依据欧洲骨髓移植协作组标准,将 MM 患者分为:完全缓解(血液、尿液的免疫固定电泳 M 蛋白为阴性,浆细胞水平 < 5%,发生溶骨性病变的数目和大小没有继续增加,细胞瘤消失)、接近完全缓解(免疫固定电泳可检测到 M 蛋白,其余指标同完全缓解)、部分缓解(血清中 M 蛋白减少 > 50%,24 h 尿轻链降至 200 mg,软组织浆细胞瘤大小减少幅度 > 50%,发生溶骨性病变的数量和大小没有继续增加)、微小缓解(血清 M 蛋白水平减少 25%~49%,24 h 尿轻链水平大于 200 mg)、无变化(介于微小缓解与病情进展之间)及病情进展(血、尿 M 蛋白水平上升幅度 > 25%)。MM 患者根据治疗情况分为 3 组:初治组(32 例,男 15 例,女 17 例,年龄 65~72 岁)、难治组(43 例,包括微小缓解、无变化及病情进展的患者,其中男 21 例,女 22 例,年龄 65~72 岁)、缓解组(30 例,包括完全缓解、接近完全缓解、部分缓解的患者,其中男 16 例,女 14 例,年龄 65~72 岁)。同时,征集门诊诊断为非恶性血液病患者 30 例作为对照组,其中男 13 例,女 17 例,年龄 65~72 岁。对照组排除:急、慢性白血病患者,MM 患者,巨球蛋白血症患者,淋巴瘤患者,骨髓增生性疾病患者(骨髓

增生异常综合征、原发性血小板增多症、真性红细胞增多症、原发性骨髓纤维化症)。4 组患者性别、年龄对比差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究参照张之南等^[11]主编的《血液病诊断及疗效标准》(第三版)判定疗效。

1.2 仪器与试剂 Trizol 试剂购自开根生化科技(北京)有限公司,反转录试剂盒购自江苏科晶公司,实时荧光定量 PCR(qPCR)仪购自北京科宇科技公司,cDNA 合成试剂盒购自 ThermoFisher 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞总 RNA 提取及 cDNA 的合成 收取以上各组患者的骨髓液,参照天根试剂盒中方法步骤提取总的 RNA,参照 ThermoFisher 公司 cDNA 合成试剂盒中的方法将 miRNA 和 mRNA 反转成 cDNA 后冻存,用于检测 miR-22 (F: GGCTGAGCCGCAGTAGTTCT; R: GTGCAGGGTCCGAGGT) 和 miR-156 (F: TTACCGTGCTCACTCTCTT; R: GTGCAGGGTCCGAGGT) 及 LIG3 的表达水平。

1.3.2 miRNA 定量引物的设计 miRNAs 序列较短,大约有 22 个 bp,miRNA 的前体往往会有一段颈环结构,其序列为 GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC^[12],可以根据这一结构将 miRNA 反转成 cDNA,在 qPCR 检测 miRNA 时,上游引物为 miR 序列,下游引物互补环部序列,可以通用。表达内参用 U6RNA,内参检测引物序列如下, F: CTCGCTTCGGCAGCACACA; R: AACGCTTCACGAATTTGCGT。

1.3.3 定量分析 参照 qPCR 试剂盒说明书完成 qPCR 体系的配置,体系如下:2 μ L 的 miRNA 第一链 cDNA,25 μ L 的 2 \times miRNA qPCR premix,浓度为 10 mol/L 的正向引物、反向引物分别加入 5 μ L,利用 RNase-Free Water 补齐到 50 μ L,在 qPCR 仪上进行扩增和荧光信号检测。根据反应后的扩增曲线和溶解曲线来判断反应质量,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-22, miR-156 的表达水平,Ct 值为扩增产物量达到临界阈值时所需的循环数,并进行统计分析。

1.3.4 蛋白免疫印迹(Western blot) 利用 Western blot 技术检测各组患者骨髓中 LIG3 蛋白水平。

1.3.5 荧光素酶报告基因检测 LIG3 原始启动子(WT)和突变启动子(MT)与双荧光素酶链接,再将这两种质粒分别与 miR-22 和 miR-NC(阴性对照)共同转染 HEK293T 细胞,每组设 15 个重复。转染 48 h 后,按照 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 公司)的说明书进行双荧光素酶的检测。按照如下计算公式计算标准荧光素酶活性:标准荧光素酶活性 = 萤火虫荧光值/海肾荧光值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检

验,多组比较采用单因素方差分析,随后采用 Dunnett'*t* 或 LSD 再进行两两比较;相关性比较采用 Pearson 相关性分析。以 $\alpha=0.05$ 为显著性检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

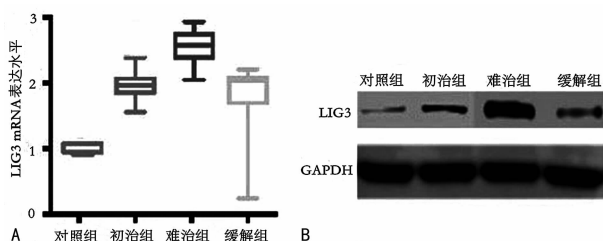
2.1 4 组 miR-22、miR-156 表达水平比较 对照组、初治组、难治组、缓解组的 miR-22 表达水平两两比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。miR-156 表达水平比较,初治组、难治组与对照组,难治组、缓解组与初治组,缓解组与难治组之间的差异均有统计学意义($P<0.05$),而缓解组与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 4 组 miR-22、miR-156 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	miR-22	miR-156
对照组	30	1.00±0.07	1.00±0.03
初治组	32	0.25±0.05 ^a	0.39±0.05 ^a
难治组	43	0.19±0.05 ^{ab}	0.23±0.05 ^{ab}
缓解组	30	0.72±0.07 ^{abc}	0.91±0.07 ^{bc}

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与初治组比较,^b $P<0.05$;与难治组比较,^c $P<0.05$ 。

2.2 4 组患者骨髓液细胞中 LIG3 的 mRNA 及蛋白表达水平比较 MM 患者中 LIG3 mRNA 的表达水平高于对照组($P<0.05$),难治组中 LIG3 mRNA (2.60 ± 0.28)及蛋白表达水平在 4 组患者中最高。见图 1。



注:A 为 4 组细胞中 LIG3 mRNA 的表达水平;B 为 4 组细胞中 LIG3 蛋白表达水平。

图 1 4 组细胞中 LIG3 的 mRNA 及蛋白表达水平比较

2.3 LIG3 mRNA、miR-22、miR-156 的表达水平与 MM 临床病理特征的相关性分析 MM 患者骨髓中 LIG3 mRNA、miR-22、miR-156 的表达水平与病理分级有相关性($P<0.05$),LIG3 mRNA 的表达水平与 MM 病理分级呈正相关,miR-22、miR-156 表达水平与 MM 病理分级呈负相关,而 LIG3 mRNA、miR-22、miR-156 表达水平与性别、年龄无相关性。见表 2。

2.4 miR-22、miR-156 表达水平与 LIG3 mRNA 表达水平的相关性分析 miR-22 的表达水平与 LIG3 mRNA 的表达水平呈负相关,miR-156 的表达水平与 LIG3 mRNA 的表达水平无相关性。见图 2。

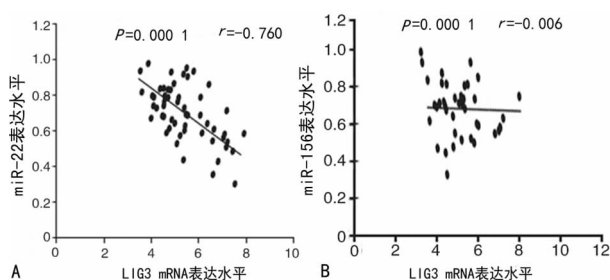
2.5 miR-22 表达水平对 LIG3 转录水平的影响 利用体外荧光素酶分析系统分析 miR-22 表达水平对 LIG3 转录水平的影响可见,在正常 LIG3 的启动子

中,miR-22 抑制了 LIG3 的表达;但是将 LIG3 启动子突变后,miR-22 对 LIG3 的表达没有影响。见图 3。

表 2 LIG3、miR-22、miR-156 的表达水平与 MM 临床病理特征的相关性($\bar{x}\pm s$)

临床特征	<i>n</i>	LIG3	miR-22	miR-156
年龄(岁)				
<70	62	6.68±1.61	0.60±0.24	0.67±0.34
≥70	43	6.35±1.46	0.54±0.26	0.75±0.33
性别				
男	52	6.55±1.62	0.61±0.22	0.65±0.32
女	53	6.54±1.49	0.54±0.27	0.76±0.34
病理分级				
低度恶性	48	5.26±1.12	0.80±0.12	1.00±0.19
高度恶性	57	7.63±0.88 [*]	0.39±0.16 [*]	0.45±0.18 [*]

注:与低度恶性患者比较,^{*} $P<0.05$ 。



注:A 为 miR-22 与 LIG3 mRNA 表达水平的相关性;B 为 miR-156 与 LIG3 mRNA 表达水平的相关性。

图 2 miR-22、miR156 表达水平和 LIG3 mRNA 表达水平的相关性分析

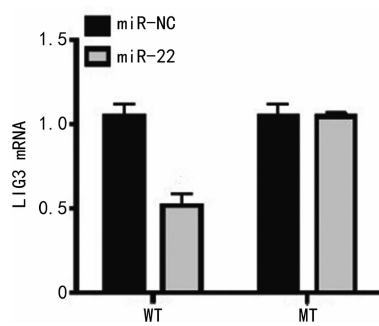


图 3 miR-22 对 LIG3 转录的影响

3 讨 论

MM 的发病率为 10%~15%,属于造血系统的恶性肿瘤^[13],目前对其发病机制的认知较少,认为遗传学改变和细胞因子会引起 MM 的发生。

肿瘤细胞有一个很明显的特征,深部基因组不稳定,这一点会造成恶性浆细胞的异常增殖^[14]。基因组的不稳定会导致 DNA 受损,所以癌细胞中的 DNA 损伤修复机制非常重要,DNA 损伤修复机制的改变可能与疾病的发展和进展有关。本研究考察了患者的临床病理特征,检测了患者体内 LIG3 mRNA 及蛋白的表达量,通过相关性分析发现,LIG3 在高度恶性的患者体内表达水平最高,说明 LIG3 的蛋白水平是

由 mRNA 决定的,同时 LIG3 的表达水平与病情有一定的相关性。LIG3 可以作为一个判定 MM 病理情况的一个指标。

miRNA 是一种基因组编码长度约 20~23 个核苷酸的非编码 mRNA,在生物体内不编码蛋白,它有多种靶基因,参与了基因的转录水平的调控,可能是骨髓瘤的致病因子。生物体内的 miRNA 具有多种负性调控基因表达的作用,与靶基因的 mRNA 的 3'端(非编码区)UTR 区不完全配对,改变了 mRNA 的表达水平^[15]。miRNA 参与了细胞生长发育不同阶段的时序调控、细胞增殖、细胞分化和代谢等多方面。近年来有研究发现,miRNA 和肿瘤的发生有一定的相关性^[8],已有研究发现乳腺癌患者的 miR-21 水平与乳癌转移密切相关^[12],说明 miRNA 的表达量与生物体癌症的发生有着密切的关系。本研究发现,MM 细胞中,抑制了 miR-22 的表达量,从而促进 LIG3 的表达翻译,保证了 MM 细胞基因组的稳定性,有利于其分裂生长。MM 组织中 miR-22、miR-156 的表达量与病理分级呈负相关,而 miR-22 能够结合 LIG3 的启动子降低 LIG3 的表达;低表达量的 miR-22 确保了骨髓瘤细胞中 LIG3 的表达量,有利于 MM 的增殖。由此可见,miR-22 能够结合 LIG3 的启动子调控 LIG3 的转录,从而影响骨髓瘤的发展。

4 结 论

miR-22、miR-156 的低表达和 MM 的发生有关。miR-22 通过调控 LIG3 的表达影响骨髓瘤的增殖,而 miR156 与 LIG3 之间没有相关性,它可能通过调控其他因子影响骨髓瘤的增殖。本研究对 miRNA 在 MM 中的作用机制研究尚不够深入,但 miR-22 有可能作为治疗 MM 的靶标基因在临床上应用。

参考文献

- [1] 郑海艺,王国栋,张元民. MiR-145 传导通路与肿瘤的研究进展[J]. 中国临床实用医学,2019,10(5):74-77.
- [2] 王强. miR-126、EGF1-7 在婴幼儿血管瘤组织中的表达及意义[D]. 济南:山东大学,2015.
- [3] 郑伟,陆捷,郝爱军,等. 5 例双克隆型多发性骨髓瘤的实验室检测结果分析[J]. 检验医学,2019,34(8):710-716.
- [4] 苑冬阳,廖爱军. 老年多发性骨髓瘤治疗研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2019,33(4):403-405.
- [5] 倪晓博,王焱,朱传升. 多发性骨髓瘤与 DNA 甲基化的研究进展[J]. 国际输血及血液学杂志,2017,40(4):336-339.
- [6] 王晶,周永安,苏丽萍,等. 初发多发性骨髓瘤患者线粒体 DNA 突变情况研究[J]. 白血病·淋巴瘤,2019,28(2):88-90.
- [7] 王欢,李静,刘艳春,等. miR-373 在老年多发性骨髓瘤中的作用机制及其临床意义[J]. 中国实验血液学杂志,2018,26(3):829-835.
- [8] 王健,谷文光,董志伟. microRNA 在癌细胞与肿瘤微环境之间的作用[J]. 中国矫形外科杂志,2016,24(17):1597-1599.
- [9] 冯强,刘涛. miR-184 在肾癌组织中的表达及其对癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 肿瘤学杂志,2019,25(10):890-895.
- [10] 胡珊珊,宋彦,罗玉明,等. microRNA-191-5 p 靶向 PL-CD1 调控食管癌细胞顺铂耐药机制研究[J]. 东南大学学报(医学版),2019,38(3):477-480.
- [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] CARACCILO D, DI MARTINO M T, AMODIO N, et al. miR-22 suppresses DNA ligase III addiction in multiple myeloma[J]. Leukemia,2019,33(2):487-498.
- [13] 崔思远,解荣燕,于丽明,等. 三氧化二砷对人多发性骨髓瘤 KM3 细胞凋亡和染色体区域稳定蛋白 mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2019,34(6):2407-2411.
- [14] 苟阳,唐永杰,杨程,等. 305 例髓系肿瘤的基因突变图谱比较分析[J]. 第三军医大学学报,2019,41(21):2069-2073.
- [15] 谢飞,曾俊义,张婉,等. 双荧光素酶报告基因技术验证 miR-31 对 LATS2 的靶向调控作用[J]. 检验医学与临床,2019,16(15):2113-2116.

(收稿日期:2020-02-18 修回日期:2020-06-21)

(上接第 2903 页)

- [13] ROLFE R D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health[J]. J Nutr,2000,130(2S Suppl):396S-402S.
- [14] GUGLIEMOTTI D M, MARCÓ M B, GOLOWCZYC M, et al. Probiotic potential of Lactobacillus delbrueckii strains and their phage resistant mutants[J]. Int Dairy J, 2007,17(8):916-925.
- [15] ŠUŠKOVIC J, KOS B, BEGANOVIC J, et al. Antimicrobial activity-the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria[J]. Food Technol Biotechnol, 2010,48(3):296-307.
- [16] PERAL M C, MARTINEZ M A, VALDEZ J C. Bacteriotherapy with Lactobacillus plantarum in burns [J]. Int Wound J,2009,6(1):73-81.
- [17] JEBUR M S H. Therapeutic efficacy of Lactobacillus acidophilus against bacterial isolates from burn wounds[J]. N Am J Med Sci,2010,2(12):586-591.
- [18] ARIEF I I, BUDIMAN C, JENIE B S L, et al. Plantaricin IIA-1A5 from Lactobacillus plantarum IIA-1A5 displays bactericidal activity against Staphylococcus aureus[J]. Benef Microbes,2015,6(4):603-613.
- [19] RUÍZ F O, PASCUAL L, GIORDANO W, et al. Bacteriocins and other bioactive substances of probiotic lactobacilli as biological weapons against Neisseria gonorrhoeae [J]. Pathog Dis,2015,73(3):1-10.

(收稿日期:2020-02-22 修回日期:2020-09-10)