

急性髓性白血病全基因组 miRNA 表达谱研究*

徐 勇¹, 林小聪², 文锦丽³, 李 宁⁴, 张宇明⁴, 陈文标³, 喻祥琪³, 戴 勇^{3△} (1. 广东省深圳市坪山新区人民医院 518118; 2. 广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 广东湛江 524023; 3. 广东省深圳市人民医院临床医学研究中心 518020; 4. 广东医学院附属医院血液科, 广东湛江 524001)

【摘要】 目的 通过比较微小 RNA(miRNA)在急性髓性白血病(AML)与对照组骨髓样本中的表达情况,发现在 AML 中异常表达的 miRNA。方法 提取骨髓样本总 RNA,应用 Illumina 高通量测序技术对 15 例 AML 患者(AML 组)和 10 例骨髓象正常的贫血或发热原因待查患者(对照组)骨髓样本中的 miRNA 表达水平进行检测,分析比较二者 miRNA 表达的差异。结果 AML 样本与对照样本间差异表达的 miRNA 共 307 种,其中 232 种 miRNA 在 AML 组呈表达上调,75 种 miRNA 呈表达下调。结论 多种 miRNA 在 AML 患者的骨髓样本中异常表达,提示它们可能在 AML 发生和发展过程中起重要调控作用。

【关键词】 急性髓性白血病; 微小 RNA; Illumina 测序; 表达谱

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.03.007 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)03-0304-04

Whole-genome microRNA expression research in acute myeloid leukemia* XU Yong¹, LIN Xiao-cong², WEN Jin-li³, LI Ning⁴, ZHANG Yu-ming⁴, CHENG Wen-biao³, YU Xiang-qi³, DAI Yong^{3△} (1. Shenzhen Pingshan People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518118, China; 2. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524023, China; 3. Clinical Medical Research Center, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518020, China; 4. Department of Hematology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524001, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the differentially expressed microRNA (miRNA) of bone marrow samples between the patients with acute myeloid leukemia (AML) and their controls. **Methods** Total RNAs were extracted from the bone marrow samples of 15 acute myeloid leukemia patients (AML group) and 10 unexplained anemia or fever patients with normal bone marrow morphology(control group), then were applied to perform global miRNA expression analyses by Illumina deep sequencing technology. **Results** In total, 307 differentially expressed miRNAs including 232 up-regulated and 75 down-regulated miRNAs were indentified in AML group compared with control group according to the high-throughput sequencing data. **Conclusion** The altered expression profile of miRNA in bone marrow samples of AML patients implies that differentially expressed miRNAs maybe plays roles in the pathogenesis of AML.

【Key words】 acute myeloid leukemia; microRNA; Illumina sequencing; expression profile

急性髓性白血病(AML)是一类髓系造血干/祖细胞起源的克隆增生性急性血液系统恶性肿瘤,其病死率在血液系统恶性肿瘤中居于首位^[1]。AML 病因复杂,发病机制尚不完全清楚,其预后在最近 30 年无明显改善^[2-3]。因此,迫切需要寻找新的分子靶点和治疗方法。微小 RNA(miRNA)是一类长度为 18~25 个核苷酸的内源性单链小片段非编码 RNA 分子^[4]。miRNA 可在转录水平或转录后水平调节基因表达,属于广义的表现遗传学范围^[5]。miRNA 与 AML 关系密切,可能成为 AML 潜在的治疗靶点^[6-7]。目前少有通过 miRNA 测序技术在 AML 患者骨髓样本中系统性研究 miRNA 表达谱的报道。因此,本文通过 Illumina 高通量测序技术对 AML 患者全基因组 miRNA 表达谱进行差异表达分析,为探讨 AML 相

关发病机制及寻找新型的 AML 治疗靶点奠定良好的基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 15 例 AML 患者的骨髓标本(AML 组)来自深圳市人民医院 2012 年 8 月至 2014 年 2 月的住院患者,其中男 9 例,女 6 例,年龄 18~77 岁,平均 40 岁。全部 AML 患者均符合 FAB 国际分型的诊断标准,且均为初发病例,在采样前均未接受化疗或放疗。10 例骨髓象正常的贫血或发热原因待查患者的骨髓标本(对照组)收集自广东医学院附属医院 2012 年 3 月至 2014 年 1 月的住院患者,其中男 6 例,女 4 例,年龄 10~73 岁,平均 39 岁。

1.2 材料 红细胞裂解液和乙二胺四乙酸抗凝管购自 BD 公司;无 RNase 的 DNase I 为 Promega 公司产品;TRIzol 试剂购自

* 基金项目:深圳市知识创新计划基础研究项目(JCYJ20130401093116731)。

作者简介:徐勇,男,博士,主任技师、研究员、教授,主要从事基础医学与检验医学研究。

△ 通讯作者, E-mail: daiyong2222@gmail.com。

Invitrogen 公司;3'与 5' small RNA 测序接头、反转录引物、聚合酶链反应(PCR)扩增引物、TruSeq Rapid SR cluster 试剂盒及 TruSeq Rapid SBS 试剂盒均为 Illumina 公司产品。

1.3 样本采集和保存 患者行骨髓穿刺采集 2 mL 骨髓样本于乙二胺四乙酸抗凝管中,加入 2 mL 细胞裂解液,混匀,静置 7 min,1 200 r/min 离心 4 min,弃去上层红色上清液,收集沉淀部分;加入灭菌磷酸盐缓冲液(PBS)2 mL 溶解后转移至另一灭菌 1.5 mL 的 EP 管中。1 200 r/min 离心 4 min,弃上清液,沉淀中加入灭菌 PBS 2 mL 稍微混匀,1 200 r/min 离心 4 min,弃上清液,收集沉淀,-80 °C 保存。

1.4 方法

1.4.1 总 RNA 提取 骨髓样本的预处理是将骨髓样品加入 2 mL 的 TRIzol 试剂,用电动匀浆器进行匀浆。然后按 TRIzol 说明书提取组织总 RNA,并加入无 RNase 的 DNase I 进行处理以去除基因组 DNA 的污染。NanoDrop ND-1000 全波长紫外分光光度计在 230、260 及 280 nm 波长分别测定吸光度(A)值,计算 RNA 样品的浓度并分析其纯度。琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。

1.4.2 测序文库的构建及质量评估 总 RNA 在 T₄ RNA 连接酶的作用下加上 3'、5' small RNA 测序接头,所得产物经 RT-PCR 扩增及聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化生成 small RNAs 文库,然后通过 Agilent 2000 Bioanalyzer 对文库进行定量和质量分析。以片段长度峰值在 130~155 nt 且定量大于或等于 1 fmol 为文库质量完好,可用于测序文库的簇生成及 Illumina 测序分析。

1.4.3 DNA 簇生成和 Illumina 测序 将 small RNAs 文库样品稀释至 8 pmol,使用 Illumina cBot 簇生成系统按 TruSeq Rapid SR cluster 试剂盒说明书进行测序文库的克隆扩增,然后在 Illumina HiSeq 2000 测序仪上按照 TruSeq Rapid SBS 试剂盒说明书进行高通量深度测序。Small RNAs 文库的构建、DNA 簇生成及测序均在康成生物公司的协助下完成。

1.4.4 Small RNA 测序数据的处理 Illumina HiSeq 2000 测序所得的扫描图像输入 Off-Line Basecaller 软件进行图像分析、读取碱基序列,获得原始数据;并进行去接头、去污染、去低质量、去冗余等处理,获得高质量的干净序列(序列长度为 16~30 nt)并进行序列长度分布分析。随后利用 Novoalign program 软件将干净序列与 miRBase 数据库中已知的人类 pre-miRNA 进行序列比对(碱基错配小于或等于 1),获取两组样本已知的 miRNA 表达丰度等信息。

1.4.5 样品间 miRNA 差异表达 为了使各样本所有的 miRNA 表达水平都处于同一个量级,首先对 miRNA 的表达丰度进行标准化处理[公式:标准化表达丰度(TPM) = miRNA 表达丰度/样品中全部 miRNA 的总表达丰度 × 10⁶]。差异表达比较时,为了过滤掉两组样本中表达水平均比较低的 miRNA,并使某一组样本中标准化表达丰度为 0 的 miRNA 也能参与计算,本文参考了 Creighton 等^[7]的方法,在每一个 miRNA 的标准化表达丰度值中都加入了 10TPM 来计算差异表达比值。计算公式为:miRNA 差异表达比值 = (AML 组 miRNA 的标准化表达丰度值 + 10TPM) / (对照组 miRNA 的标准化表达丰度值 + 10TPM)。若 miRNA 在两组样本间差异表达比值大于或等于 2.0 或小于或等于 0.5,则认为该 miRNA 在两组样本间具有明显的表达差异;比值大于 0.5 但小于 2.0 则为表达差

异不显著。若 miRNA 在两组样本中的标准化表达丰度都小于 1 TPM,则该 miRNA 不参与差异表达分析。

2 结果

2.1 样本总 RNA 的质量检测结果 组织样本经 TRIzol 试剂分离、提取总 RNA 后,应用 NanoDrop ND-1000 分光光度计对样本总 RNA 进行质量分析(表 1)。结果表明,样本总 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值均在 1.8~2.0, A₂₆₀/A₂₃₀ 比值均大于 1.6,提示总 RNA 纯度较高、质量良好。此外,琼脂糖凝胶电泳结果(图 1)显示两组样品总 RNA 均可观察到 2 条清晰的 28 s 和 18 s 电泳条带,表明提取的样本总 RNA 完整性良好,可用于测序文库的构建。

表 1 样本总 RNA 质量分析

样本	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	浓度(ng/μL)	体积(μL)	质量(ng)
对照组	1.98	2.28	427.53	10	4 275.3
AML 组	1.99	2.19	282.58	10	2 825.8

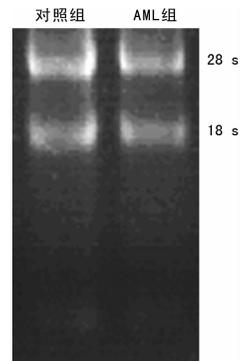


图 1 样本总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

2.2 测序文库的质量评估 small RNAs 文库经聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化生成后,应用 Agilent 2000 Bioanalyzer 对文库进行定量(表 2)和质量分析。结果表明,对照组与 AML 组其 small RNAs 文库的摩尔浓度均超过 1 fmol/L,其片段长度均在 130~155 nt,提示文库质量完好,可用于测序文库的簇生成及 Illumina 测序分析。

表 2 测序文库定量分析

样本	片段长度 (nt)	浓度 (ng/μL)	摩尔浓度 (nmol/L)
低相对分子质量标准	15	4.20	424.20
高相对分子质量标准	1 500	2.10	2.10
对照组	130	0.29	3.40
AML 组	131	0.38	4.40

2.3 两样本 small RNA 的序列长度分布 Illumina HiSeq 2000 测序所得的 small RNA 序列经去接头、去污染、去低质量、去冗余等处理。对照组和 AML 组分别获得 1 104 855 与 1 828 670 条高质量的干净序列(序列长度为 16~30 nt),均呈正态分布于 22 nt 序列两侧(图 2)。其中 20~24 nt 序列所占比例最高,其在对照组与 AML 组分别占 88.99% 和 75.03%,提示 small RNA 序列可以用于后续的 miRBase 数据库序列比对和表达分析。

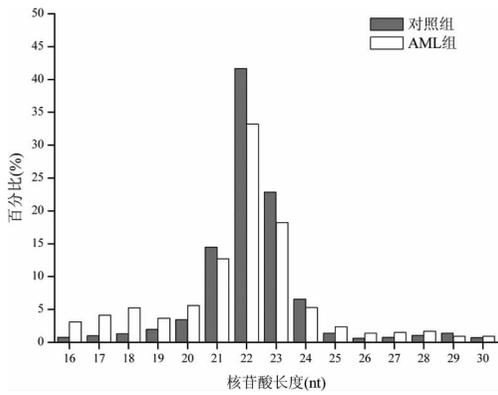


图 2 两组样本 small RNA 文库的序列长度分布

2.4 miRNA 的差异表达分析 将干净序列与 miRBase 数据库中已知的人类 pre-miRNA 全基因组序列进行序列比对, 获得已知的 miRNA 表达丰度, 再进行标准化和 miRNA 差异表达比值计算。结果表明, 两样本共检出 307 种具有明显差异表达的 miRNA, 其中 232 种 miRNA 呈表达上调, 75 种 miRNA 呈表达下调, 上调和下调差异最显著的前 10 种 miRNA 见表 3。上调 miRNA 的差异表达比值范围为 2~1 144, 其中表达比值最高的 miRNA 为 miR-206。而下调 miRNA 的差异表达比值范围为 0.005~0.500, 其中表达比值最低的 miRNA 为 miR-941。

表 3 表达上调和下调差异最显著的前 10 种 miRNA

miRNA ID 号	TPM		差异表达 比值	表达类型
	AML 组	对照组		
hsa-miR-206	11 430	0	1 144.00	上调
hsa-miR-1	3 323	2	277.75	上调
hsa-miR-126-5p	2 821	18	101.11	上调
hsa-miR-181a-3p	5 304	44	98.41	上调
hsa-miR-19b-3p	30 538	310	95.46	上调
hsa-miR-224-5p	882	2	74.33	上调
hsa-miR-9-5p	7 280	94	70.10	上调
hsa-miR-379-5p	2 304	24	68.06	上调
hsa-miR-100-5p	6 785	111	56.16	上调
hsa-miR-181b-5p	6 621	110	55.26	上调
hsa-miR-941	0	1 832	0.005 4	下调
hsa-miR-106b-5p	425	36 218	0.012 0	下调
hsa-miR-582-5p	40	3 150	0.015 8	下调
hsa-miR-18a-5p	71	3 884	0.020 8	下调
hsa-miR-148a-3p	3 378	104 478	0.032 4	下调
hsa-miR-223-3p	1 148	32 296	0.035 8	下调
hsa-miR-454-3p	2	307	0.037 9	下调
hsa-miR-301a-3p	2	169	0.0670	下调
hsa-miR-20a-5p	74	1 182	0.070 5	下调
hsa-miR-556-5p	0	107	0.085 5	下调

3 讨 论

AML 是老年人中最常见的一种急性血液系统恶性肿瘤, 其预后差, 病死率高。随着近年来对 AML 发病机制研究的不断深入, 发现了一些具有价值的诊断标志物和治疗的分子靶

点, 同时也提出了一些更有针对性的治疗方案且取得了一定效果。但对于老年 AML 患者, 包括化疗、自体外周血干细胞移植等多种方法都不能提高总体疗效, 迫切需要寻找新的分子靶点和治疗方法。

miRNA 是一类内源性小片段单链非编码 RNA 分子, 其基因在基因组上主要定位于基因间隔区及内含子区, 具有独立的启动子、增强子等表达调控元件, 可独立完成自身基因的转录过程。miRNA 可通过诱导靶 mRNA 降解或干扰其翻译来调节靶基因表达, 在个体生长发育、细胞分化、细胞凋亡、机体代谢及肿瘤形成等过程中发挥重要的调控作用^[8]。

研究表明, 多种 miRNA 在 AML 中呈高表达并可作为原癌基因促进肿瘤细胞增殖。miR-125b 在 AML 中呈高表达, 它可以通过作用于其靶基因 p53 及前凋亡蛋白基因 Bak1 和 Bmf 等多种方式抑制细胞凋亡, 促进肿瘤发生^[9]。O'connell 等^[10]研究发现, 在骨髓造血干细胞中过表达 miR-125b 然后移植小鼠可导致小鼠产生 AML, 提示 miR-125b 在 AML 中起癌基因的功能。有研究表明, miR-155 过表达的转基因小鼠最初在脾脏和骨髓中显示出白血病前期的前 B 细胞增殖迹象, 然后出现明显的 B 细胞增殖, 表明 miR-155 能促进多克隆扩增并具有癌基因功能。随后的研究发现, miR-155 在 AML 患者骨髓样本中呈高表达, 而在小鼠的骨髓造血干细胞中过表达 miR-155 可促进粒细胞和单核细胞的增殖并呈现 AML 的特征^[11]。在本研究中, 与对照组相比, miR-125b-5p、miR-125b-2-3p 和 miR-125b-1-3p 3 个 miR-125b 家族的成员及 miR-155-5p 均呈明显表达上调, 其差异表达比值分别为 26.3、6.9、6.5 和 16.5, 提示这些 miRNA 可能与 AML 相关, 具有潜在的研究价值。

某些 miRNA 在 AML 中呈低表达, 并可通过激活抑癌基因或诱导粒细胞向成熟细胞分化, 进一步发挥其抗肿瘤作用。Garzon 等^[12]的研究表明, miR-29b 可通过作用于其靶基因 DNA 甲基转移酶 DNMT3A 和 DNMT3B, 下调 DNMT3A 和 DNMT3B 表达; 亦可通过作用于 DNA 甲基转移酶 DNMT1 的转录因子 Sp1 间接下调 DNMT1 的表达, 从而引起 DNA 甲基化水平下降并导致抑癌基因 p15 激活, 提示 miR-29b 具有潜在的抑癌活性。Gong 等^[13]研究发现, 与健康对照组相比, miR-29 家族(包括 miR-29a、miR-29b 和 miR-29c)在 AML 患者外周血单个核细胞和骨髓细胞中均呈显著低表达, 而在 AML 细胞中过表达 miR-29a、miR-29b 和 miR-29c 均可通过作用于其共同的靶基因 AKT2 及 CCND2 抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡。Fazi 等观察到反式维甲酸可通过诱导转录因子 C/EBP α 结合于 miR-223 的启动子, 上调 miRNA-223 表达, 诱导早幼粒细胞向成熟粒细胞分化, 从而发挥其抗白血病作用。而在 AML 细胞 NB4 中通过慢病毒载体过表达 miR-223 亦可取得同样的效果, 表明 miR-223 在反式维甲酸诱导早幼粒细胞向成熟粒细胞分化过程中具有重要作用。随后的研究证实, miR-223 在 AML 骨髓样本中呈低表达, 而在 AML 细胞中过表达 miR-223 可通过作用于其靶基因核转录因子 E2F1 促进细胞增殖及诱导细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期^[14]。本研究中 miR-29b 家族的成员 miR-29b-3p 及 miR-233 的家族成员 miR-223-3p 在 AML 组均呈显著低表达, 其差异表达比值分别为 0.125 和 0.036, 提示这些 miRNA 可能与 AML 相关, 亦具有潜在的研究价值。

本文还发现来自于同一个 miR-183 基因簇(包括 miR-182、miR-96 和 miR-183)的 3 个 miRNA,其调控方式并不一致,其中 miR-183-5p 及 miR-182-5p 呈表达上调,而 miR-96-5p 呈表达下调。由此提示同一 miRNA 基因簇中不同的 miRNA 可能存在各自不同的调控方式。

综上所述,本研究应用高通量测序技术对 AML 全基因组 miRNA 的表达谱进行了研究,初步探讨了 miRNA 表达紊乱与 AML 之间的关系。发现了多种差异显著的 miRNA 可能与 AML 相关,可作为 AML 潜在的分子靶点,但其在 AML 中的作用及其相关分子机制仍有待进一步研究。

参考文献

[1] Zaidi SK, Trombly DJ, Dowdy CR, et al. Epigenetic mechanisms in leukemia[J]. *Adv Biol Regul*, 2012, 52(3): 369-376.

[2] Estey EH. Treatment of acute myeloid leukemia [J]. *Haematologica*, 2009, 94(1): 10-16.

[3] Subramanian S, Kartha RV. MicroRNA-mediated gene regulations in human sarcomas [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(21): 3571-3585.

[4] Thomson DW, Bracken CP, Goodall GJ. Experimental strategies for microRNA target identification [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(16): 6845-6853.

[5] Pigazzi M, Manara E, Baron E, et al. miR-34b targets cyclic AMP-responsive element binding protein in acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(6): 2471-2478.

[6] Bousquet M, Harris MH, Zhou B, et al. MicroRNA miR-125b causes leukemia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(50): 21558-21563.

[7] Creighton CJ, Reid JG, Gunaratne PH. Expression profiling of microRNAs by deep sequencing [J]. *Brief Bioinform*, 2009, 10(5): 490-497.

[8] 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: 自然科学与医学版*, 2011, 32(4): 362-368.

[9] Gefen N, Binder V, Zaliouva M, et al. Hsa-mir-125b-2 is highly expressed in childhood ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) leukemias and confers survival advantage to growth inhibitory signals Independent of p53 [J]. *Leukemia*, 2010, 24(1): 89-96.

[10] O'connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, et al. MicroRNAs enriched in hematopoietic stem cells differentially regulate long-term hematopoietic output [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(32): 14235-14240.

[11] O'connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, et al. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder [J]. *J Exp Med*, 2008, 205(3): 585-594.

[12] Garzon R, Liu S, Fabbri M, et al. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1 [J]. *Blood*, 2009, 113(25): 6411-6418.

[13] Gong JN, Yu J, Lin HS, 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.

[14] Pulikkan JA, Dengler V, Peramangalam PS, et al. Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2010, 115(9): 1768-1778.

(收稿日期: 2014-07-06 修回日期: 2014-10-19)

(上接第 303 页)

Stroke, 2014, 45(4): 1007-1011

[3] Kerti L, Witte AV, Winkler A, et al. Higher glucose levels associated with lower memory and reduced hippocampal microstructure [J]. *Neurology*, 2013, 81(20): 1746-1752.

[4] Salat D, Penalba A, García-Berrocso T, et al. Immunological biomarkers improve the accuracy of clinical risk models of infection in the acute phase of ischemic stroke [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2013, 35(3): 220-227.

[5] Luan H, Kan Z, Xu Y, et al. Rosmarinic acid protects against experimental diabetes with cerebral ischemia: relation to inflammation response [J]. *J Neuroinflammation*, 2013, 17(10): 28-32.

[6] Masztalewicz M, Nowacki P, Turowska-Kowalska J, et al. Peripheral blood indicators of inflammatory response dur-

ing the first twenty-four hours of ischemic stroke [J]. *Ann Acad Med Stetin*, 2010, 56(1): 36-40.

[7] Lavallée PC, Labreuche J, Faille D, et al. Circulating markers of endothelial dysfunction and platelet activation in patients with severe symptomatic cerebral small vessel disease [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2013, 36(2): 131-138.

[8] Wu XQ, Ding J, Ge AY, et al. Acute phase homocysteine related to severity and outcome of atherothrombotic stroke [J]. *Eur J Intern Med*, 2013, 24(4): 362-369.

[9] Naess H, Nyland H, Idicula T, et al. C-reactive protein and homocysteine predict long-term mortality in young ischemic stroke patients [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2013, 22(8): e435-e440.

(收稿日期: 2014-07-26 修回日期: 2014-10-31)