

• 综 述 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 01. 040

长链非编码 RNA 在急性髓系白血病中的研究进展

段秋婷,尹 冶 综述,王玉明[△] 审校

(昆明医科大学第二附属医院检验科,昆明 650000)

关键词:长链非编码 RNA; 急性髓系白血病; 基因表达

中图分类号:R733.71

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)01-0116-04

急性髓系白血病(AML)是起源于造血系统髓系原始细胞的克隆性恶性疾病,由于绝大多数患者被诊断为 AML 时,已经病情重且预后差,总体生存率低,因此寻找早期且敏感的生物标记物、探索积极有效的治疗手段尤为重要。长链非编码 RNA(lncRNA)是近年来分子生物学领域的新研究热点,已经发现其在多种肿瘤中表达异常,并且该异常表达与肿瘤的发生发展、转移、预后、复发等密切联系。表达特异的 lncRNA 有望为 AML 的诊断和治疗提供新检测方法,并对临床预后提供指导。现将 lncRNA 在 AML 中的作用及研究进展作一综述。

1 概 述

1.1 AML AML 是一类高度异质性的髓系造血干/祖细胞异常克隆性增生的恶性肿瘤,以髓系起源的白血病细胞在血液、骨髓及其他组织中克隆性增殖为主要特征,是急性白血病尤其在成年人最常见的类型,其进展快,发病率随年龄的增长而增加,常见于老年人(>60 岁),通常预后不佳,因其一般情况稍差,无法耐受常规化疗引起的不良反应,所以中位生存期仅为 5~10 个月^[1]。有研究显示,AML 在全球范围发病率为 1.62/100 000,而近年来我国 AML 的发病率也呈上升趋势^[2]。据统计,至 2015 年我国白血病发病例数约为 75 300 例/年,且病死例数约为 53 400 例/年。由于多数病例在诊断为 AML 时病情已经危重,且预后凶险,如不及时治疗常可危及生命,现临床治疗常使用诱导化疗及造血干细胞移植,然而患者的长期预后仍不理想,因此针对其更为有效的早期诊断和靶向治疗急需建立。

1.2 lncRNA lncRNA 是一类由 RNA 聚合酶 II 转录的长度超过 200 个核苷酸(nt)的 RNA 分子,因缺乏明显的开放阅读框,本身不具有或极少具有编码蛋白功能,起初常被认为是基因转录的“噪音”,但近年来因发现其对细胞有重要的调节作用而越来越受到研究者的关注。依据其与蛋白编码基因的相对位置关系,大致可分为 5 类:反义长非编码 RNA(antisense lncRNA)、内含子长非编码 RNA(intronic lncRNA)、基因间长非编码 RNA(intergenic lncRNA)、启动子

相关长非编码 RNA(promoter-associated lncRNA)及非翻译区长非编码 RNA(UTR-associated lncRNA)^[3]。

2 lncRNA 的作用机制及其在肿瘤中的异常表达

2.1 lncRNA 的作用机制 lncRNA 虽不直接参与蛋白质的编码功能,但能以 RNA 的形式在表观遗传学、转录,以及转录后水平等多种层面上调控基因的表达水平,并在广泛的细胞生物学进程中起关键作用,包括调控基因表达、基因组印迹、染色质的修饰与重塑、转录和翻译后加工等^[4-5]。随研究的深入,越来越多的研究表明,lncRNA 具有的多种生物学特点及功能,对肿瘤发生、发展特性的相关机制研究也是一个重要的突破口,对进一步揭示肿瘤的相关性状、机制,以及找到新的治疗靶点带来希望^[6]。

2.2 lncRNA 在肿瘤中的异常表达 目前,关于 lncRNA 功能相关研究中,最深入的便是其在肿瘤中的作用。大量研究表明,lncRNA 在许多疾病尤其是肿瘤中存在特定的表达异常现象。2012 年美国相关研究人员进行了首个大型的癌症 lncRNA 表达谱,发现在已知的 1 065 种 lncRNA 种类中,约有数百种在肿瘤中异常表达^[7]。lncRNA 在肿瘤形成中的作用具有两面性,有的 lncRNA 在某些肿瘤中低表达,起到了类似“抑癌基因”的作用,可以抑制肿瘤的发生、发展;而有的 lncRNA 在肿瘤中呈现过表达状态,可作为“癌基因”在不同层面启动肿瘤的形成,促进肿瘤的发生、发展。已证明多种 lncRNA 在不同肿瘤组织中表达水平呈显著差异,具有特异性,这些 lncRNA 分子有望成为新的肿瘤标志物或治疗靶点^[8]。

3 lncRNA 与 AML 发生发展的研究进展

3.1 致癌型 lncRNA 与 AML

3.1.1 同源异型框基因反义基因间 RNA(HOTAIR) HOTAIR 定位于人类染色体 12q13.13 区域,是从 12 号染色体同源框 C 基因座反义链中转录而来的长为 2 158 bp 的 lncRNA,并与染色质修饰酶协同调节相关基因的沉默。HOTAIR 的生物学功能广泛,在细胞的增殖、分化、凋亡,以及肿瘤的转移、抗药等方面都有非常重要的意义^[9]。大量研究表明,ln-

[△] 通信作者,E-mail:wangym992011@163.com。

cRNA HOTAIR 参与许多肿瘤的发生、发展过程。最近有研究证实, HOTAIR 在初诊 AML 患者中表达显著上调, 并且与白血病细胞负荷、无复发生存期 (DFS)、总生存期 (OS) 有关^[10-11]。体外实验证实, 敲减 HOTAIR 后可显著抑制白血病细胞的增殖。随后, CHEN 等^[12]发现 lncRNA HOTAIR 在初发 AML 患者外周血中高表达, 且经化疗得到完全缓解后其表达水平又有所下降, lncRNA HOTAIR 高表达的 AML 患者完全缓解率低, OS 短, 且预后更差。这些研究表明, HOTAIR 可能作为 AML 的一个致癌基因存在, 其在 AML 中高表达与较差的临床病理预后分层有关, 提示 HOTAIR 可能成为 AML 治疗的潜在预后判断指标及治疗靶点。

3.1.2 结肠癌转录因子 1 (CCAT 1) CCAT 1 最初由 MARINA 等^[13]在结肠癌中发现的一种新型 lncRNA, 长度为 2 628 nt, 定位于人类染色体组 8q24. 21 上。随后的研究发现 CCAT 1 在多种肿瘤中异常高表达, 且能促进肿瘤的发生与发展^[14]。有研究证实, 相比于正常对照组, CCAT 1 在 AML 的表达明显升高, 其中以 M4 型与 M5 型升高最为显著^[15]。有研究还表明, 抑制 CCAT 1 表达可降低细胞增殖水平, 而其过表达则可明显促进 HL-60 细胞株的生长。此外, 有研究还证实了 miR-155 在 AML 中作为肿瘤抑制物, 可抑制细胞增殖及促进髓系细胞分化, 而 CCAT 1 可作为一种竞争性、内源性 RNA 抑制 miR-155 的表达, 进而对 miR-155 的靶基因 c-myc 进行调控, 促进 AML 的发生及发展。

3.1.3 HOXA 转录本反义 RNA 髓系特异性 1 (HOTAIRM 1) HOTAIRM 1 是由 RNA 聚合酶 II 反义转录产生的位于 HOXA 基因组簇中的一个 lncRNA, HOTAIRM 1 是一种髓系特异性表达的 lncRNA, 通过维甲酸诱导从而调节髓系分化相关基因的表达^[16]。有研究发现在全反式维甲酸 (ATRA) 诱导的急性早幼粒细胞白血病 (APL) NB4 细胞株粒系分化过程中, lncRNA HOXAIRM1 的表达水平显著升高, 而 HOXAIRM1 经基因敲减后可抑制 ATRA 诱导的 NB4 细胞株粒系分化, 以及解除对细胞周期 G1/S 期的阻滞作用, 同时伴随整合素 ITGA 4 (CD 49d) 基因表达水平的持续升高, 以及 ITGAX (CD11c) 基因表达的下调, 揭示了 HOXAIRM1 可通过影响这些整合素基因的表达水平而调节髓系细胞的成熟^[17-18]。

3.1.4 浆细胞瘤多样异位基因 1 (PVT 1) PVT 1 位于人类染色体 8q24 区, 在肿瘤细胞中, 染色体 8q24 区也是 DNA 拷贝数扩增的最高靶点, 其异常扩增常提示肿瘤发病的风险高^[19]。有研究结果显示, PVT 1 参与调控 MYC, 证实了其在癌症方面发挥的重要作用^[20]。此外, MYC 蛋白作为 PVT 1 的一个转录激活

因子, 在 APL 中表达增强。有学者研究发现, 敲减 c-myc 基因后导致 PVT 1 表达下调, 抑制 PVT 1 表达致使 APL 细胞分化能力减弱, 表明 PVT 1 在 APL 的发展进程中有重要作用, 此外 PVT 1 表达上调还参与了 APL 细胞的增殖过程。

3.1.5 尿路上皮癌胚抗原 1 (UCA 1) UCA 1 作为一种长链非编码 RNA, 表现为原癌基因的功能, 已被证实在多种肿瘤中高表达。有学者发现携带双等位基因 CEBPA 突变的 AML 病例中 lncRNA UCA 1 表达特异性上调。此外, 该研究进一步证实了 UCA 1 通过抑制细胞周期调节物 p27kip1 的表达而维持 AML 细胞的增殖, 表明其在 AML 细胞生长和增殖中的作用。

3.2 抑癌型 LncRNA 与 AML

3.2.1 LLEST 有研究发现, LLEST 在初治 AML 患者中表达量很低甚至不表达, 经过诱导化疗达到缓解后表达又呈不同水平的升高, 并且其表达量与患者的病情发展及预后具有相关性, 表达量越高的患者病情越轻、预后越好^[21]。此外, 体外细胞株试验发现 LLEST 使 AML 细胞周期阻滞在 G2/M 期, 并能促进细胞凋亡、加速分化, 此时促凋亡基因 caspase9 表达显著上升而抗凋亡基因 Bcl-2 的表达呈下降趋势, 揭示了其可能通过线粒体凋亡途径诱导细胞凋亡从而发挥抗肿瘤作用。有学者通过实时荧光定量 PCR 观测到 AML 中 LLEST 表达量与肿瘤负荷呈反比, 骨髓中原始细胞比例越高, LLEST 表达量越低; 同时通过随访观察还发现 LLEST 表达水平的高低与疾病的复发也具有相关性, 说明 LLEST 与 AML 发生、发展、预后具有相关性。

3.2.2 核富含丰富的转录本 1 (NEAT 1) NEAT 1 是在核小体旁斑形成起关键作用的调控因子, 在 APL 中的表达水平显著降低, 而 NEAT 1 的表达又受 PML-RAR α 的抑制, 敲除 PML-RAR α 及用全反式维甲酸 (ATRA) 治疗后, NEAT 1 表达水平明显上调, 提示 NEAT 1 是 APL 中导致白血病细胞分化阻滞的重要原因, 说明 NEAT 1 参与了 APL 细胞髓系分化的重要进程^[22]。

3.2.3 母系表达基因 3 (MEG 3) MEG 3 在肿瘤细胞中的缺失机制包括基因的丢失, 启动子区域的高甲基化及基因间区域的高甲基化等。而 DNA 甲基化是 AML 重要的表观遗传学修饰方式, MEG 3 启动子区域的高甲基化这一表观遗传学调控过程, 在 AML 的发生、发展过程中具有重要意义。有学者通过观察 42 例 AML 患者 MEG 3 启动子区域异常甲基化, 发现高甲基化在 AML 患者中高达 47. 6%, 且这些患者的 OS 明显缩短。有学者应用焦磷酸测序法检测了 54 例初诊 AML 患者骨髓细胞标本中 MEG 3 基因的甲

甲基化状态,发现 MEG 3 在 AML 患者中高度甲基化,而健康者无高甲基化,该研究也证实了这一点。

3.2.4 IRAIN lncRNA IRAIN 来源于胰岛素样生长因子 I 型受体(IGF1R)印记位点,IGF1R 通常在实体瘤和造血系统恶性肿瘤中过表达,参与癌细胞增殖、存活、代谢、转移的调控,在 AML 细胞中,IGF1R 是磷酸化的酪氨酸激酶中最丰富的一种。有学者在 IGF1R 基因座中发现了 lncRNA IRAIN,它是从反义启动子中反义的方向转录,并且发现 IRAIN 在 AML 低危组表达量高,而在白血病细胞系和高危型 AML 患者的血液中均存在下降趋势,同时高危组患者 IGF1R 呈高表达趋势。有研究报道,在 AML 患者细胞中的 IGF- I 和 IGF- II 能通过 IGF1R 受体介导的 PIK3/Akt 信号通路促进细胞的生长和存活,推测 IRAIN 可能作为一个抑癌基因来抑制肿瘤细胞 IGF1R 基因的表达^[23]。有学者发现 AML 细胞系在采用化疗诱导及去甲基化药物处理后,IRAIN 的表达水平有增高趋势,提示 IRAIN 有望成为白血病治疗和疗效监测指标,以及随访观察指标。

4 展 望

AML 中有些 lncRNA 过表达,有些低表达甚至不表达。相关研究也初步揭示,引起 lncRNA 在 AML 中异常表达的机制,以及 lncRNA 异常表达对 AML 发生、发展影响的机制,但更具体的机制还有待于更进一步的研究。随着高通量转录组测序等技术的飞速发展,通过对 lncRNA 在 AML 中作用机制的研究,提示其可能成为 AML 诊断、治疗、预后的分子靶标。然而 lncRNA 在 AML 研究领域尚处于初级阶段,同时由于 lncRNA 本身的特殊性,其种类繁多,作用机制复杂,而不同疾病间的 lncRNA 致病机制相差甚远,借鉴程度不高,因此投入更多的精力来研究参与 AML 相关的 lncRNA 具有重要的意义。随着人们对各类 lncRNA 研究的不断深入,寻找与 AML 相关的差异表达的 lncRNA,深入研究其在 AML 中的作用机制,可能为 AML 的临床诊治开辟新的途径,带来重大突破。

参考文献

- [1] ESTEY E, DOHNER H. Acute myeloid leukemia[J]. *Lancet*, 2016, 368(9550): 1894-1907.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *Ca Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] 王婷梅, 曲丽娜, 李莹辉. lncRNA 的结构、功能及其与疾病的关系[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2015, 31(7): 659-666.
- [4] ISIN M, DALAY N. lncRNAs and neoplasia[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 44(4): 280-288.
- [5] 尹艳桃, 倪亚光, 覃丽. lncRNA 在肿瘤中的表达及作用机制[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2015, 31(4): 352-359.
- [6] 马玲, 田孝东, 刘笑然, 等. 长链非编码 RNA 在胰腺癌中的研究进展[J]. *中华胰腺病杂志*, 2014, 14(5): 347-350.
- [7] ZHU H, LU Z, AN C, et al. Onco-lncRNA HOTAIR and its functional genetic variants in papillary thyroid carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(8): 1-7.
- [8] SHENGHAO W U, ZHENG C, CHEN S, et al. Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts a poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(4): 2410.
- [9] HAO S, SHAO Z. HOTAIR is upregulated in acute myeloid leukemia and that indicates a poor prognosis[J]. *Int J Clin Exper Pathol*, 2015, 8(6): 7223.
- [10] 郑转珍, 贡荣, 李国霞, 等. 长链非编码 RNA HOTAIR 在急性髓系白血病患者外周血中的表达变化及意义[J]. *山东医药*, 2018, 31(5): 25-28.
- [11] 赵占学, 李帅. 长链非编码 RNA CCAT 1 与肿瘤关系的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(19): 3201-3204.
- [12] CHEN L, WANG W, CAO L, et al. Long non-coding RNA CCAT 1 acts as a competing endogenous RNA to regulate cell growth and differentiation in acute myeloid leukemia[J]. *Mol Cells*, 2016, 39(4): 330-336.
- [13] MARINA D B, SALUT B, JOSEP N, et al. The lincRNA-HOTAIRM 1, located in the HOXA genomic region, is expressed in acute myeloid leukemia, impacts prognosis in patients in the intermediate-risk cytogenetic category, and is associated with a distinctive microRNA signature[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(31): 31613-31627.
- [14] DIAZBEYA M, BRUNET S, NOMDEDEU J, et al. The lincRNA HOTAIRM 1, located in the HOXA genomic region, is expressed in acute myeloid leukemia, impacts prognosis in patients in the intermediate-risk cytogenetic category, and is associated with a distinctive microRNA signature[J]. *Oncotarget*, 2015, 31(6): 31613.
- [15] ZHANG X, WEISSMAN S M, NEWBURGER P E. Long intergenic non-coding RNA HOTAIRM 1 regulates cell cycle progression during myeloid maturation in NB4 human promyelocytic leukemia cells[J]. *RNA Biol*, 2014, 11(6): 777-787.
- [16] TSENG Y Y, MORIARITY B S, GONG W, et al. PVT 1 dependence in cancer with MYC copy-number increase[J]. *Nature*, 2014, 512(7512): 82-86.
- [17] ZENG C, YU X, LAI J, et al. Overexpression of the long non-coding RNA PVT 1 is correlated with leukemic cell proliferation in acute promyelocytic leukemia[J]. *J Hematol Oncol*, 2015, 8(1): 126.
- [18] 王锋, 杨勇涛, 杨宏宇. 尿路上皮癌胚抗原 1 在肿瘤中作用的研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2018, 14(2): 204-209.
- [19] HUGHES J M, LEGNINI I, SALVATORI B, et al. C/

- EBP α -p30 protein induces expression of the oncogenic long non-coding RNA UCA 1 in acute myeloid leukemia [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(21):18534-18544.
- [20] ZENG C, XU Y, XU L, et al. Inhibition of long non-coding RNA NEAT 1 impairs myeloid differentiation in acute promyelocytic leukemia cells [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(1):693.
- [21] PARK B R, LEE S A, MOON S M, et al. Anthriscin induced caspase dependent apoptosis through IGF1R/PI3K/AKT pathway inhibition in A549 human non small lung cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(9):2769-2776.
- [22] SUN J, LI W, SUN Y, et al. A novel antisense long non-coding RNA within the IGF1R gene locus is imprinted in hematopoietic malignancies [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(15):9588-9601.
- [23] KARMALI R, LARSON M L, SHAMMO J M, et al. Impact of insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor binding proteins on outcomes in acute myeloid leukemia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2015, 56(11):3135-3142.

(收稿日期:2018-06-29 修回日期:2018-09-28)

• 综述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.01.041

男性不育精液诊断技术的新进展

张富勋¹, 吴侃¹综述, 卢一平^{2△}审核

(四川大学华西医院泌尿外科, 成都 610041)

关键词: 男性不育; 精液分析; 生殖; 诊断; 专用检测**中图分类号:** R698.2**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2019)01-0119-07

不孕不育影响约 15% 的夫妇。在不孕不育患者中, 因男性因素所致者约占 50%。男性不育症的检查, 包括完整的病史、详细的体格检查、精液分析、特异性精液检测, 以及基因和相关激素水平的检测。传统是将精液分析作为男性不育症的首选检查, 其地位十分重要。然而, 随检验技术的进步, 精液分析这一传统检查项目也进一步发展、细分, 形成对多方面指标的特异性检测项目。现对近年来出现的男性不育精液诊断技术进行综述, 探讨诊断男性不育症的新检测手段及发展趋势。

1 精子相关检测进展

对部分患者而言, 标准的精液分析并不能发现与生育能力有关的精子功能缺陷。据估计, 约 40% 男性存在生育能力低下。因此, 目前已经开发出多种用于评估精子功能的专用检测技术。随着对男性不育症认识的不断提高, 这些检测技术在男性不育症的诊断和治疗中的作用也日益显现出来。

1.1 活性氧自由基测定 近年来, 精子功能受损常与过量的活性氧自由基 (ROS) 产生的氧化应激相关^[1]。人类精子对 ROS 损伤高度敏感, 尽管低水平的 ROS 对精子获能是必需的, 但 ROS 水平过高, 往往导致精子细胞膜脂质过氧化、精子活动力下降、脱氧核糖核酸 (DNA) 完整性受损、体外受精能力受损的自然孕率下降^[2]。ROS 诱导的 DNA 损伤还可能加速生殖细胞凋亡进程, 导致精子数量减少。在 25%~40% 不育男性精液中, 可以检测到 ROS 水平升高^[1]。目前, 为了评估氧化应激对精子形态和功能的影响,

已经开发了化学发光测定法, 使用对氧化还原反应敏感探针 (如光泽精和鲁米诺) 可以检测到受累精子发出的信号, 该信号强度不仅与精子功能呈负相关, 还与体外受精时精子的受精能力呈负相关^[3]。表明 ROS 的水平与不育症男性自然生育的概率及体外受精成功率呈负相关。检测出高水平 ROS 的男性, 应给予抗氧化药物治疗, 如维生素 A、C、E 等, 可以改善精液质量, 提高妊娠率和卵胞浆内单精子显微注射技术 (ICSI) 后的着床率^[4]。

1.2 精子 DNA 损伤检测 DNA 损伤预示细胞发生凋亡, 因此, 可以通过检测精子 DNA 获取精子参数并对其受精潜力进行预测。当精子 DNA 损伤超过某一阈值, 即可导致妊娠和胚胎发育受损。研究已经发现, 不育症男性精子 DNA 损伤较健康者更多见。

1.2.1 流式细胞术与彗星试验 使用流式细胞术检测精子 DNA, 可以区分成熟单倍体和异常二倍体精子、细胞碎片和未成熟的生殖细胞^[5]。彗星试验, 即末端脱氧核苷酸转移酶介导的脱氧尿苷三磷酸 (dUTP) 缺口末端标记 (TUNEL) 试验, 可直接评估 DNA 损伤或 DNA 氧化。使用精子染色质结构分析 (SCSA) 或精子染色质扩散分析 (SCDA) 均可间接测定精子的 DNA 损伤^[6]。使用 SCDA 检测精子 DNA 损伤的试剂盒称为 SCDA Halosperm VR G2 试剂盒 (Halotech DNA SL)。由于所使用的测量系统不同, 不同检测方法得到的结果之间可能存在一定的矛盾和差异。目前, 彗星试验 (TUNEL 试验) 和 SCSA 不能提供一致的结果, 从而限制了其常规应用。