

· 基础研究 ·

miR-19b 在儿童急性淋巴细胞白血病中的表达及临床意义*

陈 飞¹, 宪 莹¹, 苏庸春¹, 温贤浩¹, 肖剑文¹, 罗 庆², 梁绍燕², 于 洁^{1△}

(1. 重庆医科大学附属儿童医院血液科 400014; 2 儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室/儿科学重庆市重点实验室/重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

摘要:目的 研究 miR-19b 在儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)中的表达及其与 ALL 临床特征和 PTEN mRNA 表达的相关性。方法 采用实时定量 PCR 的方法检测 67 例儿童 ALL(初诊组 38 例、完全缓解组 20 例、难治复发组 9 例)骨髓单个核细胞(BMMNC)中 miR-19b 的表达,分析其表达与临床特征及 PTEN mRNA 表达水平的关系。以 15 例原发性免疫性血小板减少症(ITP)患儿作为对照组。结果 miR-19b 在初诊组和难治复发组的表达量显著高于完全缓解组和对照组($P < 0.01$)。动态观察 6 例 ALL 患儿发现完全缓解后 miR-19b 表达量较初诊时显著降低($P < 0.05$)。miR-19b 高表达与外周血高 WBC 计数($\geq 50 \times 10^9/L$)、危险度分型(中、高危)、脾肿大、BCR-ABL 融合基因阳性有相关性($P < 0.05$),与发病年龄、性别、免疫分型、形态学分型、MLL-AF4 融合基因、肝及淋巴结肿大、早期泼尼松反应等因素无相关性($P > 0.05$)。miR-19b 与 PTEN mRNA 表达量无相关性($r = 0.107, P > 0.05$)。结论 miR-19b 可能在儿童 ALL 发生、发展及不良预后中发挥一定作用,未发现 miR-19b 表达量同 PTEN mRNA 的表达量存在相关性。

关键词: miR-19b; 微 RNAs; PTEN; 急性淋巴细胞白血病; 儿童

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.33.016

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)33-3501-03

Expression and clinical significance of miR-19b in children with acute lymphoblastic leukemia^{*}Chen Fei¹, Xian Ying¹, Su Yongchun¹, Wen Xianhao¹, Xiao Jianwen¹, Luo Qing², Liang Shaoyan², Yu Jie^{1△}

(1. Department of Hematology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China;

2. Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders/Key

Laboratory of Pediatrics in Chongqing/Chongqing International Science and Technology Cooperation

Center for Child Development and Disorders, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and clinical significance of miR-19b in children with acute lymphoblastic leukemia(ALL), and its relationship with PTEN mRNA. **Methods** The expression levels of miR-19b in 67 patients with ALL(including 38 newly diagnosed ALL, 20 ALL in complete remission(CR) and 9 relapsed/refractory ALL) and 15 children with idiopathic thrombocytopenic purpura(ITP)(as normal controls) were assayed by qRT-PCR. Its relativity with clinical characters and PTEN mRNA was analyzed. **Results** The expressions of miR-19b in the newly diagnosed group and relapsed/refractory group were higher than those in CR and control groups($P < 0.01$). By sequential observation of miR-19b expression in different stages of ALL in 6 cases, miR-19b expression in CR stage was significantly lower than that in newly diagnosed stage($P < 0.05$). The increased level of miR-19b had a positive correlation with high white blood cell(WBC)($\geq 50 \times 10^9/L$), risk classification(intermedium-risk and the high-risk group), splenomegaly and BCR-ABL positive($P < 0.05$). miR-19b was not associated with age, gender, FAB phenotype, immunophenotype, hepatomegaly, lymphadenectasis and the response to prednisone ($P > 0.05$). There was no correlation between miR-19b and the expression of PTEN mRNA($r = 0.107, P > 0.05$). **Conclusion** miR-19b might play an important role in the pathogenesis and poor prognosis of childhood ALL. As an oncogene the regulation of miR-19b to PTEN mRNA was not detected in ALL bone marrow cells.

Key words: miR-19b; microRNAs; PTEN; acute lymphoblastic leukemia; children

儿童急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)占儿童白血病的 80%,若放弃治疗患儿常于 6 个月内死亡,目前已发现一些和儿童 ALL 相关的分子遗传学异常,如原癌基因 c-Myc 高表达,BCR-ABL、MLL-AF4 融合基因阳性等,但是并未能完全阐明儿童 ALL 发生机制和部分标中危患儿也存在复发难治的原因,深入探究儿童 ALL 发生机制和预后不好的相关危险因素显得极为重要。微小 RNA(miRNA)通过调控靶基因的表达,影响细胞增殖、分化、衰老和凋亡,扮演着癌基因与抑癌基因的角色,在肿瘤的发生、发展中发挥重要作用^[1-2]。基础实验验证了在小鼠胚胎成纤维细胞(3T3 细胞)、小鼠前 B 淋巴细胞(FL5.12 细胞)及非洲蟾蜍的胚胎中 miR-

19b 通过抑制肿瘤抑制因子 PTEN 的表达发挥其致癌作用^[3-4],但 miR-19b 是否参与了儿童 ALL 的发生、发展及其在儿童 ALL 骨髓中对 PTEN mRNA 的作用少见报道。本研究通过实时定量 PCR 方法对儿童 ALL 骨髓中 miR-19b 的表达进行检测,分析其与儿童 ALL 临床特征及 PTEN mRNA 表达量的关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 骨髓标本来源于 2009 年 9 月至 2011 年 10 月重庆医科大学附属儿童医院血液科收治的 67 例 ALL 患儿。其中包括初诊 38 例,完全缓解 20 例(其中 6 例收到初诊标本),难治复发 9 例;初诊 ALL 患儿中男 22 例,女 16 例,中位年龄 4

(1~14)岁,所有病例均经临床、形态学、免疫学、细胞遗传学及分子生物学确诊。入组 ALL 患儿的诊治严格按照 CCLG-ALL2008 方案的标准进行。15 例原发性免疫性血小板减少症 (ITP) 患儿作为对照组,其中男 8 例,女 7 例,中位年龄 4.5(2~12)岁。研究已取得本院伦理委员会的批准及家长的知情同意。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及骨髓单个核细胞(BMMNC)分离 取患儿骨髓 1~2 mL,存于 EDTA 抗凝管中,人淋巴细胞分离液分离 BMMNC,PBS 洗涤 2 次。

1.2.2 总 RNA 的提取及鉴定 按 TRIzol 试剂盒(Cat 15596-026, invitrogen 公司)说明书提取 BMMNC 总 RNA,甲醛变性胶电泳检测 RNA 质量,分光光度计检测 RNA 浓度及纯度, A260/A280=1.8~2.2 可认为合格。

1.2.3 cDNA 的合成 miRNA 的逆转录采用 PolyA 加尾法,按照 miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒(天根公司)说明书合成 miRNA cDNA。PTEN 基因的逆转录按照 Prime-Script RT reagent Kit With gDNA Eraser(宝生物工程有限公

司)进行。
1.2.4 实时定量 PCR 检测 miRNA 及下游靶基因的表达 采用 hsnR-U6 作为 miRNA 内参,miR-19b(Cat # HmiRQP0295)及 hsnR-U6(Cat # HmiRQP9001)上游引物购于 GeneCopoeia 有限公司,下游通用引物及荧光定量检测试剂采用 miRcute miRNA 荧光定量检测试剂盒(SYBR)(天根公司);20 μ L PCR 反应体系,PCR 扩增反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,94 $^{\circ}$ C 变性 20 s,60 $^{\circ}$ C 退火、延伸 34 s,循环 40 次。采用 primer5.0 设计普通基因引物,PTEN 上游引物序列:5'-TTG AAG ACC ATA ACC CAC CAC AG-3',下游引物序列:5'-CAT TAC ACC AGT TCG TCC CTT TC-3',扩增片段长度 134 bp;内参对照 β -actin 上游序列:5'-GGA TGC AGA AGG AGA TCA CTG-3',下游序列:5'-CGA TCC ACA CGG AGT ACT TG-3',扩增片段长度 90 bp。荧光定量检测采用 SYBR Premix Ex Taq TM II(宝生物工程有限公

司)。25 μ L PCR 反应体系,PCR 扩增反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火、延伸 34 s,循环 40 次。在 Bio-Rad CFX96 仪器上进行反应,首先绘制标准曲线,采用^{2- $\Delta\Delta$} CT 方法将与对照组对应的每一个基因进行分析,实验重复 3 次,包括无模板的空白对照(NTC)。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件进行数据整理及分析。因数据非正态分布,进行平方根转换变为正态分布后采用独立样本 *t* 检验及单因素方差分析,数据结果经平方转换回后以 $\bar{x}\pm s$ 表示。miR-19b 表达量与 PTEN 基因表达量的关系采用 spearman 相关分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-19b 在各组患儿骨髓中的表达 miR-19b 在 ALL 初诊组和难治复发组的表达量显著高于完全缓解组和对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),ALL 初诊组与对照组相比上调大于 6 倍($P<0.01$),与完全缓解组相比上调大于 4 倍($P<0.01$)。难治复发组与初诊组相比上调接近 2 倍($P<0.05$),与对照组相比上调超过 12 倍($P<0.01$)。而完全缓解组与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

2.2 miR-19b 表达的动态变化 20 例完全缓解患儿中,本研究收到了其中 6 例患儿的初诊标本。动态观察这 6 例 ALL 患儿初诊及化疗获得完全缓解后 BMMNC 中 miR-19b 的表达变化。miR-19b 初诊时表达量为 2.24 ± 0.21 ,完全缓解后表达量降低为 0.77 ± 0.06 ,初诊时 miR-19b 表达量显著高于完全缓解组,差异有统计学意义($P=0.021$)。

2.3 miR-19b 与 ALL 患儿临床指标间的相关性 miR-19b

高表达与外周血高 WBC 计数($\geq 50\times 10^9/L$)、危险度分型(中、高危)、脾肿大有关性($P<0.05$),与发病性别、年龄、形态学分型、免疫学分型、肝及淋巴结肿大及早期泼尼松反应无相关性($P>0.05$)。见表 2。

表 1 miR-19b 在各组中的表达情况

组别	<i>n</i>	miR-19b 表达量($\bar{x}\pm s$)
初诊组	38	3.29 \pm 0.51 ^a
完全缓解组	20	0.81 \pm 0.14 ^c
难治复发组	9	6.24 \pm 0.79 ^{bd}
对照组	15	0.49 \pm 0.07

^a: $P<0.01$,与对照组比较;^b: $P<0.05$;^c: $P<0.01$,与初诊组比较;^d: $P<0.01$,与完全缓解组比较。

表 2 38 例 ALL 初诊患儿临床资料及 miR-19b 表达量与临床特征的关系

项目	<i>n</i>	表达量($\bar{x}\pm s$)	<i>P</i>
性别			
男	21	2.92 \pm 0.57	
女	17	3.78 \pm 0.44	0.323
年龄(岁)			
1~10	32	3.14 \pm 0.46	
≥ 10	6	4.17 \pm 0.84	0.403
外周血 WBC 计数			
$\geq 50\times 10^9/L$	15	4.81 \pm 0.69	
$< 50\times 10^9/L$	23	2.46 \pm 0.25	0.007
FAB 分型			
L ₁	20	2.76 \pm 0.41	
L ₂	18	3.94 \pm 0.59	0.166
免疫分型			
T 细胞型	7	4.92 \pm 0.72	
前 B 细胞型	31	2.97 \pm 0.44	0.099
危险度分型			
标危	13	2.02 \pm 0.30	
中危	10	4.33 \pm 0.41	0.015
高危	15	3.91 \pm 0.60	0.041
肝肿大情况			
肝肿大	34	3.34 \pm 0.56	
肝不肿大	4	2.91 \pm 0.14	0.750
脾肿大情况			
脾肿大	26	4.34 \pm 0.38	
脾不肿大	12	1.51 \pm 0.13	0.000
淋巴结肿大情况			
淋巴结肿大	33	3.22 \pm 0.57	
淋巴结不肿大	5	3.77 \pm 0.15	0.675
泼尼松诱导反应			
不敏感	6	3.66 \pm 1.15	
敏感	32	3.22 \pm 0.42	0.714

2.4 miR-19b 与儿童 ALL 分子遗传学特征的关系 38 例 ALL 初诊患儿中 4 例 BCR-ABL 融合基因阳性患儿 miR-19b 表达量(5.85 \pm 0.38)与剩余 34 例融合基因阴性者(2.78 \pm 0.44)相比显著上调,差异有统计学意义($P<0.05$),但并没有在 2 例 MLL-AF4 融合基因阳性的 ALL 患儿中发现 miR-19b(4.91 \pm 0.05)明显上调($P>0.05$)。

2.5 miR-19b 与 PTEN mRNA 表达量的相关性分析 PTEN mRNA 在 ALL 初诊组的表达量为 2.19 \pm 1.56,在 ITP 对照组的表达量为 1.13 \pm 0.34,PTEN mRNA 表达量在 ALL 初诊组显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。采用 spearman 相关检验检测 miR-19b 表达量与 PTEN mRNA 表

达量的相关性,发现二者无相关性($r=0.107, P>0.05$)。

3 讨 论

miR-19b 来源于 miR-17-92 基因簇,研究发现 miR-17-92 基因簇在伯基特淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、肺癌、膀胱癌等多种实体肿瘤中存在基因的扩增和高表达^[3,5-6]。Ventura 等^[7]研究发现 miR-17-92 基因簇具有调节 B 细胞发育的作用,敲除小鼠 miR-17-92 后 pro-B 到 pre-B 细胞的转变受到明显抑制。O'Donneu 等^[8]使用逆转录病毒介导 miR-17-92 基因簇过表达,促进了原癌基因 c-Myc 诱导的淋巴瘤发生,而 miR-19 是 miR-17-92 基因簇中最关键的致癌因子^[3]。2010 年 Mavrakis 等^[4]研究发现同来源于扁桃体的淋巴细胞相比 miR-19 在 T 系 ALL 中的表达有着 5~17 倍的升高,在 B 系 ALL 和侵袭性淋巴瘤中也有高表达,同时证实 miR-19 可以促进 Notch1 导致的 T 系 ALL 的发生,而且可以促进 c-Myc 导致的 B 系淋巴瘤的发生。儿童 ALL 发生、发展同这些致癌因子在 T 细胞和 B 细胞在分化发育中的协同作用密不可分,已有研究表明,miRNA 特异性表达在儿童白血病发生发展中的重要作用,但是 miR-19 在儿童 ALL 中的表达情况及作用目前很少有报道。

本研究发现,miR-19b 在初诊组中表达量显著高于完全缓解组和对照组,较对照组表达量上调大于 6 倍,这与 Mavrakis 等^[4]的研究结果一致。动态观察 6 例 ALL 患儿初诊及完全缓解后 miR-19b 表达量的变化,发现完全缓解后 miR-19b 表达量较初诊时显著降低。miR-19b 在难治复发组表达量大于初诊组,显著大于完全缓解组和对照组。由此推测 miR-19b 主要是表达于骨髓的原始幼稚细胞中,可能参与了白血病细胞的恶性增殖过程,随着完全缓解后原始幼稚细胞数的降低,miR-19b 表达量呈现出下降的趋势,而在难治复发组中仍然呈现出高表达的状态,因此,miR-19b 很可能参与了儿童 ALL 的发生、发展。本研究发现脾肿大 ALL 患儿骨髓中存在 miR-19b 表达量的显著上调,同时发现 miR-19b 表达量在外周血高 WBC 计数($\geq 50 \times 10^9/L$)者及危险度分型——中、高危者显著升高,提示 miR-19b 表达量与部分提示儿童 ALL 预后不良的危险因素具有相关性,这使其可能成为 ALL 预后危险因素的又一参考指标。miR-19b 表达量在其他提示预后不良的年龄大于或等于 10 岁、T 系 ALL、早期泼尼松诱导不敏感者表达量较高,虽然差异无统计学意义,但是需要引起重视,待进一步扩大样本例数研究分析。

Venturini 等^[9]研究发现,BCR-ABL 融合基因可以促进慢性粒细胞白血病(CML)细胞中 miR-17-92 基因簇表达上调,并通过 BCR-ABL-c-Myc-miR-17-92 通路促进瘤细胞的增殖。Mi 等^[10]研究发现,在 MLL 基因重排的急性非淋巴细胞白血病和 ALL 患者白血病细胞中也存在 miR-17-92 基因的扩增和高表达,主要通过 MLL 融合基因直接作用于 miR-17-92 基因簇的启动子区促使其表达上调,二者协同作用促进瘤细胞增殖,而抑制瘤细胞的分化和凋亡。本研究发现,miR-19b 表达量在 4 例 BCR-ABL 阳性的 ALL 患儿中明显上调;在 2 例 MLL-AF4 阳性的患儿中表达量也有上调,但差异无统计学意义。BCR-ABL、MLL-AF4 可能分别与 miR-19b 协同作用,促进 ALL 发生并导致 ALL 预后不良,但本研究中 BCR-ABL、MLL 融合基因阳性的 ALL 临床发病率较低,标本收集例数较少,有待于扩大临床样本量进行更深入研究。

PTEN 是磷酸酶家族中发现的首个抑癌基因,通过阻断促肿瘤因子介导的 PI3K/Akt 信号通路抑制肿瘤细胞生长、侵袭和转移,促进肿瘤细胞凋亡^[11]。有研究表明,PTEN 基因的缺失、低表达等与白血病的发生、发展密切相关^[12]。本研究没有发现 PTEN 基因在 ALL 初诊组中低表达,也没有发现 miR-

19b 与 PTEN mRNA 的表达水平在儿童 ALL BMMNC 中存在负性相关关系,由此说明 miR-19b 对 PTEN 的作用可能是转录后水平或是翻译水平的调控,且 miRNA 的表达具有组织特异性,其调控网络比较复杂,一个 miRNA 调控数百个下游靶基因,一个靶基因同时可能受多个 miRNA 调控,在儿童 ALL 骨髓细胞中 miR-19b 是否通过作用于其他下游基因导致白血病的发生和发展还需要进一步探索。

参考文献:

- [1] Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, et al. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(4): 1290-1297.
- [2] Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers[J]. *Mol Cancer*, 2007, 6: 60.
- [3] Olive V, Bennett MJ, Walker JC, et al. miR-19 is a key oncogenic component of miR-17-92[J]. *Genes Dev*, 2009, 23(24): 2839-2849.
- [4] Mavrakis KJ, Wolfe AL, Oricchio E, et al. Genome-wide RNA-mediated interference screen identifies miR-19 targets in Notch-induced T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(4): 372-379.
- [5] Tagawa H, Karube K, Tsuzuki S, et al. Synergistic action of the microRNA-17 polycistron and Myc in aggressive cancer development[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(9): 1482-1490.
- [6] Rinaldi A, Poretti G, Kwee I, et al. Concomitant MYC and microRNA cluster miR-17-92 (C13 or f25) amplification in human mantle cell lymphoma[J]. *Leuk Lymphoma*, 2007, 48(2): 410-412.
- [7] Ventura A, Young AG, Winslow MM, et al. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters[J]. *Cell*, 2008, 132(5): 875-886.
- [8] O'Donneu KA, Wentzel EA, Zeller KI, et al. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression[J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 839-843.
- [9] Venturini L, Battmer K, Castoldi M, et al. Expression of the miR-17-92-polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD 34+ cells[J]. *Blood*, 2007, 109(10): 4399-4405.
- [10] Mi S, Li Z, Chen P, et al. Aberrant overexpression and function of the miR-17-92 cluster in MLL-rearranged acute leukemia[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(8): 3710-3715.
- [11] Uddin S, Hussain A, Al-Hussein K, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3'-kinase induces preferentially killing of PTEN-null T leukemias through AKT pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320(3): 932-938.
- [12] Romn-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Castillejo JA, et al. Promoter hypomethylation of cancer-related genes: a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia[J]. *Blood*, 2004, 104(8): 2492-2498.