

多发性骨髓瘤 50 例患者 miRNA-21、miRNA-29、miRNA-15a 和 miRNA-16 水平

miRNA-21, miRNA-29, miRNA-15a and miRNA-16 Levels in 50 Cases with Multiple Myeloma

WANG Hui, GAO Jie

王 慧¹, 高 洁²

(1. 宝鸡市中医医院, 陕西 宝鸡 721001; 2. 西安市第一医院, 陕西 西安 710000)

摘 要: [目的] 探讨 miRNAs 在多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 的临床价值。 [方法] 选择 2014 年 1 月至 2016 年 1 月于宝鸡市中医医院收治的多发性骨髓瘤患者 50 例, 分别取其化疗前后的血清作为病例组, 另选择同期体检的 50 名健康志愿者血清作为对照组。分别检测受试者血清以及病例组患者化疗前后血清中 miRNAs 的表达含量。 [结果] 病例组患者的 miRNA-21 和 miRNA-29 的表达水平显著性高于对照组 ($P < 0.05$), miRNA-15a 以及 miRNA-16 等含量显著性低于对照组 ($P < 0.05$)。MM 患者经化疗后, 血清 miRNA-21 以及 miRNA-29 显著性降低 ($P < 0.05$), miRNA-15a 和 miRNA-16 的含量显著性升高 ($P < 0.05$), 且化疗疗效有效的患者血清中相应 miRNA 指标变化水平较化疗疗效无效患者明显 ($P < 0.05$)。 [结论] miRNAs 可能参与多发性骨髓瘤的发生发展, 其异常表达情况可能为该疾病的预测和预后评价提供临床价值。

关键词: 微小 RNA; 多发性骨髓瘤; 临床诊断

中图分类号: R733.3 **文献标识码:** B **文章编号:** 1671-170X(2017)07-0636-03

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.07.B016

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 属于常见的血液系统恶性肿瘤, 约占血液系统恶性肿瘤的 10%, 其发病率仅次于白血病, 高发于中老年人^[1]。近几年随着人口老龄化, MM 在我国的发病率逐年升高^[2]。虽然随着医疗技术的不断发展和相关化疗和靶向药物的不断突破和完善, MM 仍属于临床上无法根治的恶性肿瘤, 目前临床上以骨髓穿刺术以及组织活检为主要诊断手段, 通过检测血清中单克隆免疫球蛋白以及其他溶骨性改变分子诊断 MM^[3]。近几年, 研究表明诸多 miRNAs 在 MM 患者的血清或血浆中表达异常, 可能作为抑癌基因或促癌基因参与肿瘤的发生发展^[4], 且其可以稳定的形态在体液中循环, 在临床诊断中占据一定的优势, 可能作为 MM 的临床诊断及预后评价的生物标志物。本研究以在我院进行治疗的 MM 患者为研究对象, 对 miRNAs 在多发性骨髓瘤中的临床价值进行探讨。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择 2014 年 1 月至 2016 年 1 月于宝鸡市中医

通讯作者: 王慧, 主治医师, 硕士; 宝鸡市中医医院检验科, 陕西省宝鸡市金台区宝福路 43 号 (721001); E-mail: hanwei_9946@sina.com

收稿日期: 2017-01-20; 修回日期: 2017-03-03

医院进行的多发性骨髓瘤患者 50 例, IgG 型 25 例, IgA 型 18 例, IgM 型 3 例, IgD 型 1 例, 轻链型 3 例, 分别取其化疗前后的血清作为病例组, 另选择同期在我院进行体检的 50 名健康志愿者的血清作为对照组。病例组所有患者均符合《血液病诊断及疗效标准》中多发性骨髓瘤的诊断标准, 治疗期间均采用传统联合化疗方案, 包括 VAD 方案 (长春新碱, 阿霉素, 地塞米松) 和 MP 方案 (美法仑, 泼尼松)。排除标准: 患其他自身免疫疾病患者; 患其他恶性肿瘤患者; 患心、肝、肾等器官功能疾病患者等。所有患者及志愿者均对本研究知情, 且经医院伦理委员会同意。两组患者在性别、年龄等方面差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性 (Table 1)。

Table 1 Comparison of general conditions between two groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	MM group (n=50)	Control group (n=50)
Gender (F/M)	28/22	31/19
Age(years)	64.14±4.23	63.27±3.86

1.2 检测方法及指标

利用 Takara 公司购买的血液样本 RNA 抽提试剂盒提取两组受试者外周血的总 mRNA。分别设计逆转录引物将 miRNA 逆转录为 cDNA。分别设计 miRNA 特异性的上游引物: miRNA21: 5'-GT-

GCAGGGTCCGAGGT-3'; miR-15a: 5'-CGCCTAGCAGCACATAATGG-3'; miR-16: 5'-GCCGTAGCAGCAGTAATA-3'; miR-29: 5'-ACACTCCAGCTGGGACTGATTTCTTTTTGG-3'; miR-92a: 5'-ACACTCCAGCTGGG-TATTGCACTTGTCCCG-3'; 内参 U6: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 进行实时定量 PCR, 所有样品做 3 个浮空, 总反应体系为 20 μ l, PCR 设计参数为: 预变性: 95 $^{\circ}$ C, 10~15min, 变性: 95 $^{\circ}$ C, 5~20s, 退火: 55~60 $^{\circ}$ C, 30~45s, 40cycle。取 Ct 值, 分析不同样本 miRNA 的表达情况, 即 $2^{-\Delta\Delta C_t}$, $\Delta\Delta C_t = [MM \text{ 患者血清(目的基因-内参基因)} - \text{志愿者血清(目的基因-内参基因)}]$ 。

1.3 统计学处理

采用 SPSS18.0 统计分析软件对数据进行分析, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较采用 t 检验; 计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 miRNAs 表达水平的比较

病例组患者的 miRNA-21 以及 miRNA-29 的表达水平显著性高于对照组 ($P < 0.05$), 而病例组 miRNA-15a 以及 miRNA-16 等血清含量水平显著性低于对照组 ($P < 0.05$) (Table 2)。

2.2 病例组患者化疗前后血清中 miRNAs 表达水平的比较

T1 组为化疗有效患者, T2

组为化疗临床疗效无效患者, 由 Table 3 可见, 两组患者经化疗后血清中 miRNA-21 以及 miRNA-29 显著性下降 ($P < 0.05$), miRNA-15a 以及 miRNA-16 的含量则显著性上升 ($P < 0.05$), 且 T1 组患者 miRNAs 变化较 T2 组显著 ($P < 0.05$)。化疗前后血清中 miRNA-92 含量变化无统计学差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

多发性骨髓瘤 (MM) 是由骨髓恶性浆细胞发生异常增生所引起的免疫系统淋巴细胞恶性肿瘤, 临床特征表现为恶性浆细胞无限增殖并分泌大量的单克隆免疫球蛋白, 诱发溶骨病变、贫血、肾脏损害等严重并发症^[5]。目前该病的发病机制并不清楚, 且临床上尚无有效的治疗手段可以治愈该疾病。因此, 寻找合适的肿瘤标志物及时预测 MM 发病风险并监测患者治疗期间预后发展的情况具有重要的临床意义。

miRNAs 是由 19~25 个核苷酸组成的非编码 RNA, 具有高度的保守型、严格的时空性以及组织特异性, 参与机体的各种生命代谢活动^[6]。有研究报道, 生物界超过 50% 的蛋白质编码翻译时受到 miRNA 小分子的调控。近几年, 随着分子生物学技术的不断发展和成熟, 大量研究证实了 miRNA 作为

Table 2 Comparison of serum miRNAs levels between two groups ($\bar{x}\pm s$)

Group	N	miR-21	miR-15a	miR-16	miR-29	miR-92a
Control group	50	2.51 \pm 0.14	2.62 \pm 0.17	2.83 \pm 0.17	0.73 \pm 0.22	1.23 \pm 0.15
MM group	50	4.23 \pm 0.22	0.45 \pm 0.12	0.62 \pm 0.14	2.53 \pm 0.19	1.45 \pm 0.13
t	-	9.72	14.58	12.41	9.35	8.64
P	-	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

Table 3 Comparison of serum miRNAs levels before and after chemotherapy in MM patients ($\bar{x}\pm s$)

Group	N	miR-21	miR-15a	miR-16	miR-29	miR-92a	
T1	Pre-chemotherapy	38	4.93 \pm 0.42	0.56 \pm 0.22	0.73 \pm 0.34	2.94 \pm 0.35	1.72 \pm 0.32
	Post-chemotherapy		3.01 \pm 0.19	1.93 \pm 0.17	1.93 \pm 0.14	0.98 \pm 0.13	1.33 \pm 0.17
	t_1		8.13	11.27	10.85	11.97	7.08
	P_1		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05
T2	Pre-chemotherapy	12	4.08 \pm 0.36	0.39 \pm 0.16	0.51 \pm 0.24	2.03 \pm 0.22	1.41 \pm 0.24
	Post-chemotherapy		3.73 \pm 0.23	0.82 \pm 0.17	1.32 \pm 0.26	1.32 \pm 0.17	1.18 \pm 0.17
	t_2		9.58	10.97	11.82	13.87	8.95
	P_2		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05
	t_3		0.52	0.37	0.82	0.76	0.87
	P_3		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

Note: t_1, P_1 : compared pre-chemotherapy and post-chemotherapy in Group T1; t_2, P_2 : compared pre-chemotherapy and post-chemotherapy in Group T2; t_3, P_3 : compared Group T1 and Group T2 in post-chemotherapy.

抑癌基因或促癌基因在肿瘤的发生发展过程中扮演了重要角色,比如血液恶性肿瘤慢性 B 淋巴细胞白血病患者 miRNA-15 表达下调,弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者的 miRNA-21/155 等表达显著性上调^[7]。近几年关于 miRNAs 与多发性骨髓瘤的关系的研究逐渐成为热点,Loftier 等^[8]研究表明,MM 患者血浆中 miRNA-21 表达显著性高于正常浆细胞。GAO 等^[9]研究证实,浆细胞中高表达 miRNA15a 以及 miRNA-16-1 的骨髓瘤患者无进展生存期更短,预后较差。Sevcikova 等^[10]研究指出 miRNA-29a 在 MM 患者体内上升,诊断 MM 的敏感度为 88%,特异性为 70%,建议将其作为 MM 的临床诊断标志物。本研究通过比较 MM 患者血清与正常血清中 miRNAs 含量水平的变化,分析 MM 患者化疗前后相关 miRNAs 指标的变化情况,探讨 miRNAs 作为临床诊断标志物在 MM 发病以及预后评价中的临床价值。

病例组患者的 miRNA-21 以及 miRNA-29 的表达水平显著性高于对照组 ($P < 0.05$),而 miRNA-15a 以及 miRNA-16 等水平显著性低于对照组 ($P < 0.05$)。Roccaro 等^[11]研究证实 miRNA-15a 与 miRNA-16 在骨髓瘤中可能作为肿瘤抑制因子参与肿瘤的发生发展,在组织中表达较低。MM 患者血清中以上四种 miRNA 的变化与 Loffier^[8]、GAO^[9]、Sevcikova^[10]以及 Roccaro^[11]研究结果一致。

本研究进一步分析 MM 患者化疗前后 miRNA 的变化情况,患者经化疗后血清中 miRNA-21 以及 miRNA-29 显著性下降 ($P < 0.05$),而 miRNA-15a 以及 miRNA-16 的含量显著性上升 ($P < 0.05$),且化疗有效的患者血清中 miRNA 变化水平较化疗无效患者显著 ($P < 0.05$),miRNA-92 化疗前后血清中含量变化无统计学意义 ($P > 0.05$)。由此进一步说明 miRNA-21/29 以及 miRNA-15a/16 均参与肿瘤的发生发展,可作为评价患者治疗预后的标志物。

综上所述,miRNAs 可能参与疾病的发生发展,其异常表达可能为该疾病的预测和预后评价提供有意义的临床价值。

参考文献:

[1] Cheng WM. Progress of diagnosis and treatment of TCM and western medicine for multiple myeloma [J]. Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine, 2015, 31(5): 187-188. [程纬民. 多发性骨髓瘤骨病的中西医诊治进展[J].

湖南中医杂志, 2015, 31(5): 187-188.]

- [2] Zhuang BX, Liang H, Lu FG, et al. TCM pathogenesis analysis and clinical treatment experience of multiple myeloma [J]. Journal of Hunan University of CM, 2016, 36(8): 14-16. [庄步玺, 梁昊, 卢芳国, 等. 多发性骨髓瘤中医病机分析及证治思路 [J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(8): 14-16.]
- [3] Li YZ, Shi DY, Huang DS, et al. Diagnostic value of laboratory tests for monoclonal immunoglobulin in multiple myeloma [J]. Chinese Remedies & Clinics, 2016, 16(6): 798-801. [李玉珠, 史敦云, 黄德善, 等. 实验室检查在多发性骨髓瘤单克隆免疫球蛋白中的诊断价值[J]. 中国药物与临床, 2016, 16(6): 798-801.]
- [4] Liu C, Ge FM. Progress of miRNAs in multiple myeloma [J]. Hainan Medical Journal, 2016, 27(14): 2334-2336. [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(14): 2334-2336.]
- [5] Li W, Cornell RF, Lenihan D, et al. Cardiovascular complications of novel multiple myeloma treatments [J]. Circulation, 2016, 133(9): 908-912.
- [6] Shrestha S, Hsu SD, Huang WY, et al. A systematic review of microRNA expression profiling studies in human gastric cancer [J]. Cancer Medicine, 2014, 3(4): 878-888.
- [7] Lu J, Deng SS, Cheng DD, et al. The analysis of the relative expression in whole blood miR-155 of diffuse large B cell lymphoma [J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2016, 13(s1): 39-41. [卢杰, 邓珊珊, 程丹丹, 等. 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者全血 miR-155 的相对表达量分析[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(s1): 39-41.]
- [8] Loffier D, Brocke Heidrich K, Pfeifer G, et al. Interleukin 6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer [J]. Blood, 2007, 110(4): 1330-1333.
- [9] Gao X, Zhang R, Qu X, et al. MiR-15a, miR-16-1 and miR-17-92 cluster expression are linked to poor prognosis in multiple myeloma [J]. Leukemia Research, 2012, 36(12): 1505-1509.
- [10] Sevcikova S, Kubiczkova L, Sedlarikova L, et al. Serum miR-29a as a marker of multiple myeloma [J]. Leuk Lymphoma, 2013, 54(1): 189-191.
- [11] Roccaro AM, Sacco A, Tlompson B, et al. MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma [J]. Blood, 2009, 113(26): 6669-6680.