

· 临床研究 ·

miRNA-600 在急性髓系白血病中的表达及意义

胡秀娟, 徐晓东

1. 池州市人民医院血液科, 安徽 池州 247100; 2. 池州市人民医院心血管内科, 安徽 池州 247100

摘要: **目的** 探讨微小核糖核酸-600(miRNA-600, miR-600)在急性髓系白血病(AML)中的表达及意义。**方法** 选取池州市人民医院血液科 2010 年 1 月至 2018 年 6 月收治并明确为 AML 的患者 80 例作为 AML 组,采集同期非恶性血液病患者标本 25 例作为对照组,用 qRT-PCR 检测两组骨髓标本中 miR-600 表达水平,进行随访,分析 miR-600 表达水平与临床特征及预后的关系。**结果** AML 组 miR-600 相对表达量低于对照组($P < 0.01$)。以 miR-600 相对表达水平的截断值 0.0054 作为分界,将 80 例 AML 患者分为低表达组(33 例)和高表达组(47 例)。miR-600 低表达患者 WBC 计数高于高表达患者($P = 0.021$),Fms 样酪氨酸激酶 3 (FLT3)/内部串联重复(ITD)突变发生率明显高于 miR-600 高表达患者($P = 0.044$),其他临床特征和基因突变类型两组间无差异(P 均 > 0.05)。对 70 例非 M3 型 AML 患者进行随访,miR-600 低表达组的完全缓解率稍低于 miR-600 高表达组,但差异无统计学意义($P = 0.112$);总生存期(中位生存期 7 个月)明显低于 miR-600 高表达组(中位生存期 13 个月)($P = 0.019$)。多变量分析发现,在非 M3 AML 患者中,miR-600 低表达($P = 0.006$)、高龄($P = 0.012$)和 FLT3/ITD 突变($P = 0.003$)是不良预后的独立影响因素。**结论** miR-600 在 AML 患者中表达水平低于对照组,并且与不良的临床结果有关。

关键词: 微小核糖核酸-600; 急性髓系白血病; Fms 样酪氨酸激酶 3 (FLT3)/内部串联重复 (ITD) 突变; 年龄; 预后

中图分类号: R 733.71 文献标识码: B 文章编号: 1674-8182(2020)01-0069-04

Expression and significance of miRNA-600 in acute myeloid leukemia

HU Xiu-juan, XU Xiao-dong

Department of Hematology, the People's Hospital of Chizhou, Chizhou, Anhui 247100, China

Abstract: Objective To investigate the expression of microRNA-600(miR-600) in acute myeloid leukemia(AML) and its significance. **Methods** Eighty patients with AML confirmed and treated from January 2010 to June 2018 were selected as AML group, and 25 patients with non-malignant hematological diseases at the same period were served as control group. Using qRT-PCR, the expression level of miR-600 in bone marrow samples of two groups was detected, and the associations of miR-600 expression level with clinical characteristics and prognosis were analyzed in AML patients. **Results**

The relative expression level of miR-600 in AML group was statistically lower than that in control group ($P < 0.01$). As the cut-off value of miR-600 expression level was 0.0054, 80 AML patients were divided into low expression group ($n = 33$) and high expression group ($n = 47$). WBC count and the incidence of FLT3/ITD mutation in low expression group were significantly higher than those in high expression group ($P = 0.021, P = 0.044$). There were no statistical differences in other clinical features and gene mutation types between two groups (all $P > 0.05$). Follow-up for 70 patients with non-M3 AML showed that the complete remission (CR) rate in low-expression group was slightly lower than that in high-expression group ($P = 0.112$), and the overall survival (OS) time (median OS, 7 months vs 13 months, $P = 0.019$) in low-expression group was significantly lower than that in high expression group. Multivariate analysis showed that in non-M3 AML patients, low expression of miR-600 ($P = 0.006$), old age ($P = 0.012$) and FLT3/ITD mutation ($P = 0.003$) were the independent influencing factors of poor prognosis. **Conclusion** The expression level of miR-600 in AML patients is lower than that in control group, and is related to poor clinical outcomes.

Key words: MicroRNA-600; Acute myeloid leukemia; Fms-like tyrosine kinase 3 internal tandem duplication mutation; Age; Prognosis

Fund program: Cultivation Fund for Key Scientific Research Projects of Wannan Medical College (WK2013ZH01)

急性髓系白血病(AML)是成人最常见的白血病类型,由骨髓祖细胞恶性转化引起的血液学恶性肿瘤,其特点是骨髓细胞自我更新增强、分化阻滞和恶性增殖增加,凋亡受阻,而停滞在细胞发育的不同阶段^[1-2]。AML 的分类考虑了细胞形态、染色体畸变和常见的遗传变化^[3]。然而,对于大多缺乏特征性细胞遗传学或分子病变的 AML 患者,很难评估其治疗反应、生存和预后。因此,迫切需要探索更有价值的生物标志物,以帮助我们对 AML 患者预后进行评估。目前已知,与造血、癌症和疾病相关的微小核糖核酸(miRNA, miR)表达模式比信使 RNA(mRNA)表达标记更能有效地表征肿瘤的发生发展方向,可作为诊断和预后判断的有效工具^[4]。miRNA 是一类小的非编码 RNA,是转录后水平上基因表达的关键调控因子,参与多种生物过程,包括细胞增殖、分化、生存和凋亡^[5]。有研究已表明 miR-600 在直肠癌中与肿瘤细胞迁移和侵袭相关^[6]。此外,miR-600 的低表达在宫颈癌和弥漫性大 B 细胞淋巴瘤被发现^[7-8]。这些结果提示 miR-600 可能是一种致癌的 miRNA。本研究旨在探讨 miR-600 在 AML 患者中的表达及其临床意义。

1 对象与方法

1.1 研究对象 收集我院血液科 2010 年 1 月至 2018 年 6 月收治并明确为 AML 患者 80 例的骨髓标本作为 AML 组,其中男 33 例,女 47 例;中位年龄 45 (18~67)岁。所有 AML 患者均为初治患者,未接受过任何抗肿瘤药物治疗,无其他恶性肿瘤和严重心、肝、肾疾病。根据法美英(FAB)分型标准和免疫表型及细胞遗传学分析,进行临床及血常规、骨髓象和免疫组织化学染色确诊、染色体核型分析和基因突变类型检测,建立 AML 患者的诊断和分类。采集我院同期非恶性血液病患者 25 例的骨髓标本作为对照组,其中男 6 例,女 19 例;中位年龄 44 (18~61)岁。所有 AML 患者均按照成人 AML (非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南标准方案^[9]第一次化疗(28 d)结束后进行疗效评估。进行 1~90 个月随访。本研究获得医院医学伦理学委员会批准,患者及家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 相关定义 完全缓解(CR)定义为骨髓象原始细胞加早幼阶段细胞(或幼稚细胞) $<5\%$,白细胞正常或减低,无其他髓外残留病灶。总生存期(OS)定义为从确诊到死亡的时间。

1.3 主要试剂和仪器 人淋巴细胞分离液(上海博升生物科技);Trizol (美国 Invitrogen 公司);RNA 反

转录试剂盒(大连 TaKaRa 公司);RQ-CRP 试剂盒(中国 Transgen 公司);miR-600 和 U6snRNA 大连 TaKaRa 公司设计并合成,引物编号:miR-216b (002215-PN4426784)、U6snRNA (001973-PN4427975);NanoDrop2000c 型蛋白核酸检测仪(美国 Thermo 公司);实时荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司)。

1.4 qRT-PCR 检测 miR-600 表达水平 所有采集的骨髓立即用人淋巴细胞分离液分离骨髓单个核细胞,再加入 1 ml Trizol, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。根据 Trizol 提取试剂盒操作说明书进行总 RNA 提取,根据反转录试剂盒说明合成 cDNA,制备 20 μl 反应体系进行扩增。PCR 扩增反应条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $93\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 s, 40 个循环, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时采集荧光,以 U6snRNA 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 miR-600 相对表达量。

1.5 统计学分析 用 SPSS 19.0 进行统计学分析。定量数据因不符合正态分布,用中位值(最小值~最大值)描述,采用秩和检验;定性数据用例数表示,采用 χ^2 检验或 χ^2 检验的校正;绘制 ROC 曲线,分析 miR-600 低、高表达对 AML 的诊断效能;用 Kaplan-Meier 法行生存分析,并用 Cox 模型逐步回归法行多因素生存分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组对象 miR-600 相对表达量的比较 AML 组 miR-600 相对表达水平的中位值为 0.009 (0.000~3.720),低于对照组的 0.019 (0.007~1.000),差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1。

2.2 miR-600 表达对 AML 诊断效能的 ROC 分析 根据 ROC 分析,以 0.0054 为 miR-600 表达水平的截断值,其诊断 AML 的敏感性和特异性分别为 42% 和 100%,见图 2。以此作为分界,将 80 例 AML 患者分为低表达组(33 例)和高表达组(47 例)。

2.3 miR-600 低表达组和高表达组患者临床特征比较 两组患者的临床特征包括性别、年龄、血红蛋白、血小板计数、FAB 分型和染色体核型差异无统计学意义(P 均 > 0.05);miR-600 低表达组患者 WBC 计数高于高表达组患者($P = 0.021$)。在 9 个基因突变类型中,miR-600 低表达 AML 患者 Fms 样酪氨酸激酶 3 (FLT3)/内部串联重复 (ITD) 突变发生率明显高于 miR-600 高表达患者($P = 0.044$),其他基因突变类型的发生率在 miR-600 低、高表达组间均无统计学差异(P 均 > 0.05)。见表 1。

2.4 miR-600 表达水平与 AML 临床预后的关系 由于 M3 型 AML 整体预后较好,因此仅对除 M3 型外其他类型的 AML 患者进行预后分析。对 70 例非 M3

型 AML 患者进行随访, miR-600 低表达组的 CR 率 27.58% (8/29) 稍低于 miR-600 高表达组的 46.34% (19/41), 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 2.52, P = 0.112$); miR-600 低表达组的 OS (中位 OS 7 个月) 明显低于 miR-600 高表达组 (中位 OS 为 13 个月), 差异有统计学意义 ($P = 0.019$) (图 3)。

2.5 70 例非 M3 型 AML 患者 OS 预后因素的多变量分析 结果发现, 在非 M3 AML 患者中, miR-600 低表达 ($P = 0.006$)、高龄 ($P = 0.012$) 和 FLT3/ITD 突变 ($P = 0.003$) 是不良预后的独立影响因素。

3 讨论

到目前为止, AML 的诊断、预后和治疗涉及到许多指标, 如核型、FLT3、c-Kit、NPM1 和 C/EBPA 基因突变^[10]。然而, AML 患者中基因突变的频率相对较低, 对于大多数 AML 患者, 尤其是那些未被相关的细胞遗传学所诊断的患者, 评估其生存和预后仍然困难^[11]。由于新型治疗方法的发展滞后, 迫切需要新的诊断和预后标志物, 提高对白血病生物学的认识, 识别出预后较差的人群, 优化治疗策略。

目前, 在识别、表征和应用新的分子标记方面取得了相当大的进展, 包括已知的在肿瘤发生过程中中失

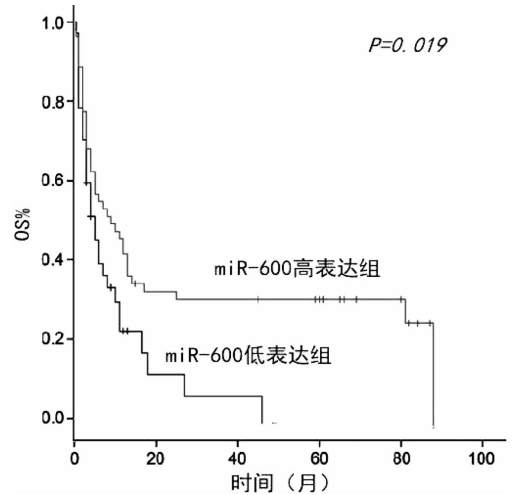


图 3 70 例非 M3 型 AML 患者中 miR-600 低表达组和高表达组的 OS 比较

表 1 miR-600 低表达组和高表达组患者临床特征的比较

临床特征	低表达组 (n=33)	高表达组 (n=47)	P 值
男/女 (例)	21/12	25/22	0.352
年龄 (岁) ^a	58 (18 ~ 86)	62 (19 ~ 89)	0.736
WBC 计数 ($\times 10^9/L$) ^a	18.40 (2.41 ~ 193.13)	5.64 (0.34 ~ 528.44)	0.021
血红蛋白 (g/L) ^a	79.25 (38.53 ~ 135.73)	73.54 (34.19 ~ 150.96)	0.157
血小板计数 ($\times 10^9/L$) ^a	27.37 (4.25 ~ 386.12)	40.06 (6.84 ~ 417.26)	0.089
骨髓原始细胞比例 (%) ^a	42.57 (1.94 ~ 95.95)	49.67 (3.83 ~ 97.18)	0.693
FAB 分型 (例)			
M0	1	1	
M1	3	5	
M2	15	23	
M3	4	6	0.571
M4	7	8	
M5	3	3	
M6	0	1	
基因突变类型 (例)			
DNMT3A (+/-)	5/28	10/37	0.490
FLT3/ITD (+/-)	8/25	3/44	0.044
c-Kit (+/-)	2/31	2/45	0.876
NPM1 (+/-)	4/29	6/41	0.797
IDH1/2 (+/-)	3/30	2/45	0.681
U2AF1 (+/-)	1/32	4/43	0.600
C/EBPA (+/-)	3/30	9/38	0.356
CR (+/-)	9/24	12/35	0.862
NRAS or KRAS (+/-)	2/31	4/43	0.983
染色体核型 (例)			
正常核型	17	21	
无分裂相	1	2	
t 型	10	12	0.769
复杂核型	2	7	
其他类型	3	5	

注: ^a 为中位值 (最小值 ~ 最大值)。

表 2 70 例非 M3 型 AML 患者 OS 预后因素的多变量分析

影响因素	比值比 (95%)	P 值
年龄 (>60/≤60 岁)	1.988 (1.191 ~ 3.320)	0.012
WBC (<30/≥30 $\times 10^9/L$)	1.044 (0.604 ~ 1.804)	0.846
FLT3/ITD (+/-)	2.309 (1.085 ~ 4.800)	0.003
miR-600 表达水平 (低/高)	4.261 (1.578 ~ 11.506)	0.006

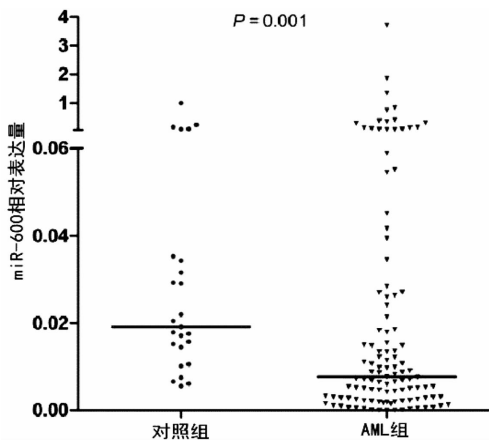


图 1 两组研究对象 miR-600 相对表达量的比较

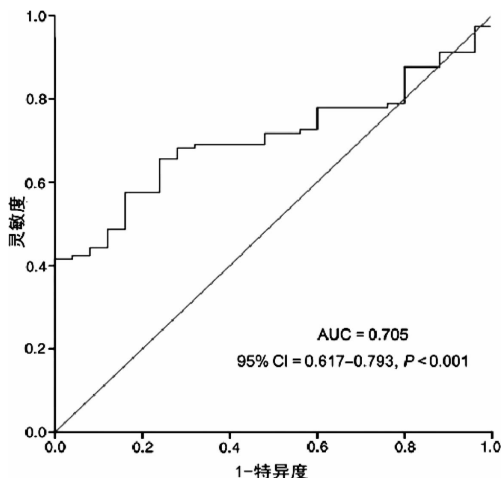


图 2 miR-600 表达水平对 AML 诊断效能的 ROC 曲线

调的 miRNA。与其他生物标志物相比,循环 miRNA 水平的变化可能在特异性肿瘤检测方面具有高度敏感性。同时,由于其易于检测和降解较少的优点,越来越多的 miRNA 被报道为参与肿瘤进展、诊断和预后的生物标志物^[12]。本研究关注 miR-600。miR-600 被确认为是一种肿瘤调控 miRNA,可以调控许多基因。上调 miR-600 通过靶向调控结肠癌中的 BMI1 基因,导致克隆原性降低,介导细胞周期的抑制^[13];通过靶向 SIP1/ZEB2 和 MMP3 降低肾细胞癌中的细胞迁移和侵袭^[14];通过靶向 XIAP 增加非小细胞肺癌细胞的增殖^[15]。同时,miR-600 的上调也可以在胃癌、宫颈癌、肝癌等研究中观察到。这些数据可能反映 miR-600 在许多具有特定组织起源的癌症中发挥了作用。此外,大量报道发现 miR-600 的表达与多种癌症的临床结局相关。miR-600 低表达与结肠癌预后不良相关^[6];miR-600 表达降低是乳腺癌中一个消极的预后生物标志物^[16];miR-600 表达下调是白血病的不良预后因素^[8]。miR-600 的表达在许多实体肿瘤中的预后意义已被揭示,提示其可作为预后生物标志物的潜在作用。

此外,一些 miRNA 已被报道与 FLT3/ITD 发生关联。如 miR-155 过表达参与 FLT3/ITD 突变的发病机制^[17]。miR-16 的抑制可能参与 Pim-1 癌基因的上调,Pim-1 癌基因是 FLT3/ITD 表达过程中的一种调节因子^[18]。本研究表明,miR-600 低表达患者 FLT3/ITD 突变发生率较高。但 miR-600 下调与 FLT3/ITD 突变的确切关系还需要进一步研究。

本研究结果表明,miR-600 表达下调是 AML 中常见的事件,miR-600 低表达与非 M3 型 AML 患者 OS 较短有关,是非 M3 型 AML 患者预后不良的影响因素;多变量分析提示,miR-600 可以作为非 M3 型 AML 的重要独立预测因子。同时,本研究仍存在一些局限性,如患者例数少,使用的截断值可能不适用,基因突变数据缺失等。笔者将在后续研究中增加样本量,探讨 miR-600 在 AML 中更准确的临床意义。

综上所述,AML 患者中 miR-600 表达下调,并且与其不良的临床结果有关。miR-600 低表达患者 OS 低于高表达者,提示预后不良;miR-600 可能作为非 M3 型 AML 患者中与临床预后相关的生物标志物,但其调控机制及生物学功能需做进一步研究。

参考文献

[1] 徐敏,吴晓.老年急性髓系白血病诱导治疗疗效与预后分析[J].中国临床研究,2019,32(3):367-370.
[2] Dombret H, Gardin C. An update of current treatments for adult a-

cute myeloid leukemia[J]. Blood,2016,127(1):53-61.

- [3] Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia[J]. N Engl J Med, 2016,374(23):2209-2221.
- [4] Luo DY, Wilson JM, Harvel N, et al. A systematic evaluation of miRNA:mRNA interactions involved in the migration and invasion of breast cancer cells[J]. J Transl Med,2013,11:57.
- [5] Rupaimoole R, Calin GA, Lopez-Berestein G, et al. MiRNA deregulation in cancer cells and the tumor microenvironment[J]. Cancer Discov,2016,6(3):235-246.
- [6] Zhang PL, Zuo Z, Wu AH, et al. MiR-600 inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting p53 in mutant p53-expressing human colorectal cancer cell lines[J]. Oncol Lett,2017,13(3):1789-1796.
- [7] Zeng Y, Wang KX, Xu H, et al. Integrative miRNA analysis identifies hsa-miR-3154, hsa-miR-7-3, and hsa-miR-600 as potential prognostic biomarker for cervical cancer[J]. J Cell Biochem,2018,119(2):1558-1566.
- [8] Li HY, Xing CY, Zhou B, et al. A regulatory circuitry between miR-193a/miR-600 and WT1 enhances leukemogenesis in acute myeloid leukemia[J]. Exp Hematol,2018,61:59-68. e5.
- [9] 中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组.成人急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南(2017年版)[J].中华血液学杂志,2017,38(3):177-182.
- [10] 邹萍.急性髓系白血病的规范化诊治[J].中国实用内科杂志,2007,27(14):1110-1112.
- [11] 师锦宁,朱雨,洪鸣,等.急性髓系白血病患者基于遗传学突变的预后分析[J].中华医学遗传学杂志,2017,34(6):806-811.
- [12] Jin XC, Chen YF, Chen HB, et al. Evaluation of tumor-derived exosomal miRNA as potential diagnostic biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer using next-generation sequencing[J]. Clin Cancer Res,2017,23(17):5311-5319.
- [13] Zhang ZF, Bu XL, Chen H, et al. Bmi-1 promotes the invasion and migration of colon cancer stem cells through the downregulation of E-cadherin[J]. Int J Mol Med,2016,38(4):1199-1207.
- [14] Menuchin-Lasowski Y, Oren-Giladi P, Xie Q, et al. Sip1 regulates the generation of the inner nuclear layer retinal cell lineages in mammals[J]. Development,2016,143(15):2829-2841.
- [15] Ye LG, Wang H, Liu BG. miR-211 promotes non-small cell lung cancer proliferation by targeting SRCIN1[J]. Tumour Biol,2016,37(1):1151-1157.
- [16] El Helou R, Pinna G, Cabaud O, et al. miR-600 acts as a bimodal switch that regulates breast cancer stem cell fate through WNT signaling[J]. Cell Rep,2017,18(9):2256-2268.
- [17] Wallace JA, Kagele DA, Eiring AM, et al. miR-155 promotes FLT3-ITD-induced myeloproliferative disease through inhibition of the interferon response[J]. Blood,2017,129(23):3074-3086.
- [18] Kim KT, Carroll AP, Mashkani B, et al. MicroRNA-16 is down-regulated in mutated FLT3 expressing murine myeloid FDC-P1 cells and interacts with Pim-1[J]. PLoS One,2012,7(9):e44546.