

## miR-205 在 ITP 患者外周血单个核细胞中的表达及意义\*

邓顺江<sup>1</sup>, 黄韦华<sup>1</sup>, 吴林洪<sup>2</sup>, 张 蕾<sup>3</sup>, 叶 辛<sup>1</sup>, 刘 鹏<sup>1</sup>, 李腾达<sup>1</sup>, 龙曙萍<sup>1</sup>, 钱 珍<sup>4</sup>, 邓安梅<sup>1</sup>

(1. 第二军医大学附属长海医院, 上海 200433; 2. 第二军医大学, 上海 200433;

3. 第二军医大学附属长征医院, 上海 200003; 4. 解放军第 100 医院, 江苏苏州 215007)

**摘要:**目的 研究 micro-RNA(miR-205)在原发性免疫性血小板减少症(primary immune thrombocytopenia, ITP)患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)中的表达和意义。方法 收集 43 例 ITP 患者和 38 例健康人的外周静脉血 2 ml, 分离 PBMC, 提取细胞总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 以 U6 为内参, 应用实时荧光定量 PCR(Real time PCR)的方法检测 miR-205 的表达量; 分析 miR-205 与血小板计数结果之间的相关性。结果 ITP 初诊患者(Naive ITP) PBMC miR-205 的表达水平与健康对照组相比上调( $1.81 \pm 0.48$  vs  $0.92 \pm 0.25$ ,  $t=10.31$ ,  $P<0.01$ ); 治疗后不完全缓解组(incomplete remission group, IR group)和初诊患者相比, miR-205 的表达水平差异无统计学意义( $P=0.112$ ), 和正常对照组相比, 则表达升高( $1.63 \pm 0.65$  vs  $0.92 \pm 0.25$ ,  $t=7.2$ ,  $P<0.01$ ); 14 例治疗后完全缓解组(complete remission group, CR group)治疗后(After treatment) PBMC miR-205 的表达低于治疗前(before treatment)的表达水平( $1.07 \pm 0.43$  vs  $1.91 \pm 0.34$ ,  $t=5.68$ ,  $P<0.01$ ); ITP 患者 PBMC 中 miR-205 的表达量与血小板计数呈负相关( $r=-0.0696$ ,  $P<0.05$ )。结论 miR-205 在 ITP 初诊患者 PBMC 中高表达, 而治疗完全缓解后表达水平又降低, 并且表达水平与血小板数量呈负相关, 表明其可能与 ITP 的发生发展相关, 或许会成为 ITP 诊疗新的标志物。

**关键词:** 血小板减少; 外周血单个核细胞; miR-205; 血小板计数

**中图分类号:** R558.2; R392.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2016)06-010-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.06.003

### Expression of miR-205 in the Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Primary Immune Thrombocytopenia

DENG Shun-jiang<sup>1</sup>, HUANG Wei-hua<sup>1</sup>, WU Lin-hong<sup>2</sup>, ZHANG Lei<sup>3</sup>, YE Xin<sup>1</sup>,

LIU Peng<sup>1</sup>, LI Teng-da<sup>1</sup>, LONG Shu-ping<sup>1</sup>, QIAN Cheng<sup>4</sup>, DENG An-mei<sup>1</sup>

(1. Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

2. the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

3. Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China;

4. NO. 100 Hospital of PLA, Jiangsu Suzhou 215007, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression and clinical significance of microRNA (miR-205) in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of Primary Immune Thrombocytopenia (ITP) patients. **Methods** The real-time fluorescent quantitative PCR (real time PCR) was used to determine the expression of miR-205 in the peripheral blood of 43 ITP patients and 38 healthy controls. The correlations between the expression of miR-205 and platelet counts was analysed. **Results**

The relative expression levels of miR-205 in health controls ( $0.92 \pm 0.25$ ) were significantly lower than that in naive ITP ( $1.81 \pm 0.48$ ) and incomplete remission group ( $1.63 \pm 0.65$ ) (all  $P<0.01$ ). The difference of miR-205 level between incomplete remission group and naive ITP group did not reach statistical significance ( $P=0.112$ ). Expression of miR-205 after complete remission in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was lower than its level at diagnosis expression of miR-205 ( $1.07 \pm 0.43$  vs  $1.91 \pm 0.34$ ,  $t=5.68$ ,  $P<0.01$ ). In addition, the miR-205 level in ITP patients was negatively correlated with the platelet counts ( $r=-0.0696$ ,  $P<0.05$ ). **Conclusion** The miR-205 expression in ITP patients was significantly increased, indicating miR-205 play an important role in the pathogenesis of ITP, may become a new potential diagnosis and treatment target of ITP.

**Keywords:** thrombocytopenia; peripheral blood mononuclear cells; miR-205; platelet count

\* 基金项目: 973 计划(2013CB531606), 国家自然科学基金(81471605, 81401358, 81501397, 31500721, 81501398, 81302579, 81273282, 81202353), 上海申康基金(SHDC22014014), 上海科学教育基金(D14017), 军队科研基金(BWS14J023, 12MA056, 5ZD009, 15XD007), 美捷登基金(MJR20150019)。

作者简介: 邓顺江(1993-), 男, 本科, 检验技师, E-mail: 1114008320@qq.com。

黄韦华(1991-), 女, 在读硕士研究生, E-mail: huangweitina@163.com, 共同第一作者。

通讯作者: 钱 珍, 主治医师, E-mail: qiancheng824@163.com。

邓安梅, 教授, E-mail: amdeng70@163.com, 共同通讯作者。

原发性免疫性血小板减少症(primary immune thrombocytopenia, ITP)被认为是一种由自身抗体介导的血小板破坏增加以及生成减少引起的疾病,临床上以血小板计数减少和皮肤黏膜出血为特点<sup>[1]</sup>。但研究发现其发病机制非常复杂,目前认为ITP的发病是一个多步骤的过程,各种免疫细胞包括T、B细胞、抗原递呈细胞以及相关的细胞因子在ITP的发病中发挥重要作用<sup>[2~6]</sup>。

Micro-RNA(miRNA)是一种长度大约为22个核苷酸的微小非编码RNA,它在转录后水平调控基因的表达<sup>[7]</sup>,因而参与体内多种生理病理过程。miRNA与多种疾病的发生发展密切相关,最近有研究发现,miRNA在ITP的发病中也发挥了重要的作用<sup>[8~10]</sup>。例如,miR-155在ITP患者的外周血单个核细胞(PBMC)中表达上调,而在治疗后表达下调<sup>[11]</sup>;miR-302c-3p,miR-483-5p等miRNA在ITP儿童患者的血浆中表达水平升高。然而,ITP患者中具体有哪些miRNA表达异常目前还有待进一步研究,miRNA在ITP的发生发展中的具体作用机制至今还未阐明。

我们前期通过基因芯片的实验发现miR-205在ITP患者中表达明显上调,此次研究通过实时定量PCR的方法检测患者PBMC中miR-205的表达水平,并分析其与患者血小板计数之间的相关性,为后续研究提供新线索。

## 1 材料和方法

1.1 标本来源 选取长海医院2014~2015年收治的ITP患者外周抗凝全血43例,其中男性21例,女性22例,年龄为22~63岁,诊断标准符合“成人原发免疫性血小板减少症诊治的中国专家共识(修订版)”<sup>[12]</sup>,且均未接受过相关治疗。同时选取体检中心健康对照组38例,其中男性20例,女性18例,年龄为20~62岁,每例标本大约2 ml。ITP组和健康对照组在年龄和性别上差异无统计学意义( $P>0.05$ )。此研究通过医院伦理委员会的批准,受试者均签署知情同意书。

1.2 试剂和仪器 反转录试剂盒,PCR试剂盒(购自takara公司);Trizo试剂(Invitrogen life technologies);淋巴细胞分离液,氯仿(国药集团化学试剂有限公司);无水乙醇,异丙醇(国药集团化学试剂有限公司);DEPC水,dd水,红细胞裂解液,2 ml EP管,200  $\mu$ l EP管,Centrifuge 5417 R低温高速离心机,纯水仪,紫外分光光度计(ND-1000, Nanodrop Technologies),梯度PCR仪(ABI),PCR仪(ABI7500)。

1.3 检测方法 外周血PBMC的分离和总RNA的提取:用淋巴细胞分离液从EDTA-K<sub>2</sub>抗凝的2

ml静脉中分离PBMC,用Trizol提取细胞的总RNA,用紫外分光光度计(ND-1000, Nanodrop Technologies)检测所提取RNA的浓度及纯度。

CDNA的合成以及Real-timePCR反应 miR-205以及U6的特异引物由上海赛百胜公司设计和合成,用反转录试剂盒进行反转录,用定量PCR试剂盒进行核酸扩增,试剂盒购自Takara公司,反转录和PCR条件严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.4 ITP患者分组标准 选取的未经治疗的ITP患者归为初诊组( naive ITP group),ITP患者的治疗符合国内标准<sup>[12]</sup>,经过标准治疗后:血小板 $>100\times 10^9/L$ 且病情稳定的患者归完全缓解组(Complete remission group, CR group),共14例;血小板 $<100\times 10^9/L$ 的患者或治疗有效但复发的患者归不完全缓解组(incmplete remission group, IR group),共29例。

1.5 统计学分析 采用GraphPad Prism6进行统计分析,组间均值比较采用独立样本 $t$ 检验(Student  $t$  tests),相关性分析采用Pearson相关。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 ITP患者外周血单个核细胞(PBMC)miR-205的表达 与38例正常对照组相比,43例ITP初诊患者(Naive ITP)PBMC miR-205的表达水平更高( $1.81\pm 0.48$  vs  $0.92\pm 0.25$ ),差异有统计学意义( $t=10.31$ ,  $P<0.01$ );治疗后不完全缓解组(IR group)和初诊患者相比,miR-205的表达水平差异无统计学意义( $P=0.112$ ),与正常对照组相比,则表达升高( $1.63\pm 0.65$  vs  $0.92\pm 0.25$ ),差异有统计学意义( $t=7.2$ ,  $P<0.01$ );14例治疗后完全缓解组(CR group)治疗后(After treatment)PBMC miR-205的表达低于治疗前(Before treatment)的表达水平( $1.07\pm 0.43$  vs  $1.91\pm 0.34$ ),差异有统计学意义( $t=5.68$ ,  $P<0.01$ )。

2.2 相关性分析 ITP患者PBMC miR-205与血小板计数的相关性分析结果显示,ITP患者PBMC miR-205与血小板计数呈负相关( $r=-0.0696$ ,  $P<0.05$ ),见图1。

3 讨论 MicroRNA是一种微小(19~23个核苷酸)的单链非编码RNA,通过结合mRNA的3'非翻译序列区(3' untranslated sequence region, 3'-UTR)而使mRNA降解或者抑制相关蛋白质的翻译,从而在转录后水平对基因的表达进行调控,一个microRNA可能结合多个mRNA,一个mRNA也可能被多个microRNA所调节<sup>[13]</sup>。研究发现microRNA在多种疾病状态下存在异常的表达,提示其参与了人体的发病过程。miR-205的编码基

因 LOC642587 定位于染色体 1q32.2 区, miR-205 的前体位于 LOC642587 的第二个内含子和第三个

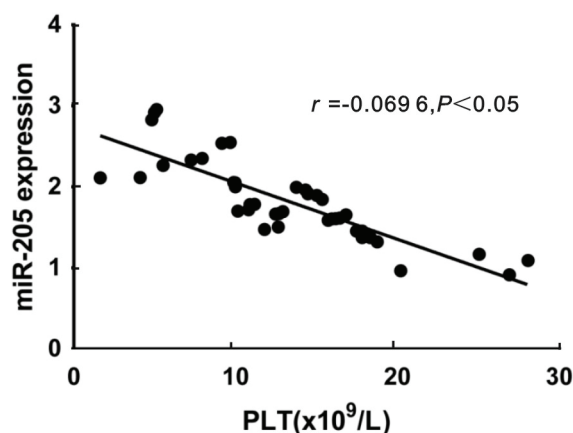


图1 原发性血小板减少症(ITP)患者 PBMC miR-205 表达水平与血小板计数结果的相关性

外显子链接的区域,是一个高度保守的 microRNA,在多种疾病中都表现出异常的表达,比如 Du-an 等<sup>[14]</sup> 研究发现, miR-205 通过调节其靶基因 SMAD2 而抑制了神经胶质瘤细胞的侵袭能力,在神经胶质瘤组织中, miR-205 的表达低于癌旁组织。有研究<sup>[15,16]</sup> 发现 miR-205 抑制其靶基因 MLL-AF4 的 mRNA 和蛋白质的表达,而 MLL-AF4 是一种可以引起急性白血病的致癌基因, miR-205 高表达的最终结果是抑制细胞的增殖,这给急性白血病的治疗找到了新的突破口。Hu 等<sup>[17]</sup> 的研究发现,高表达的 miR-205 通过抑制其靶基因 VEGFA 和 FGF2 从而增加了乳腺癌细胞对化疗药物的敏感度。

ITP 是临床上常见的由血小板减少和破坏增多而引起的自身免疫性血液系统疾病。血小板的数量在一定程度上反映了 ITP 的严重程度,患者血小板计数结果越低,表明患者病情越重,反之则病情相对较轻。本次研究通过实时荧光定量 PCR 的方法,发现 ITP 患者 PBMC 中 miR-205 表达显著高于健康对照组,并且 miR-205 的表达水平与患者外周血血小板计数呈负相关,这提示 miR-205 可能参与了 ITP 的发病,并且可能与 ITP 的严重程度密切相关,症状越严重的患者,其 miR-205 的表达水平也越高。另外我们对 43 例 ITP 初诊患者进行了跟踪调查,发现 29 例未完全缓解组 miR-205 的表达水平和初诊时相比基本未改变,而 14 例完全缓解组治疗后 miR-205 的表达水平与治疗前相比,显著降低,这也提示了 miR-205 与 ITP 的发生发展及预后密切相关。但 miR-205 是如何影响血小板的数量的,是作用于哪个靶基因以及通过

什么信号通路而参与到 ITP 的发病与预后还有待进一步探索。

#### 参考文献:

- [1] Wang T, Wang Z, Yang R. Thrombopoietic growth factors in the treatment of immune thrombocytopenic purpura[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2011, 77(3): 172-183.
- [2] Hu Y, Li H, Zhang L, et al. Elevated profiles of Th22 cells and correlations with Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia[J]. Hum Immunol, 2012, 73(6): 629-635.
- [3] Cao J, Chen C, Li L, et al. Effects of high-dose dexamethasone on regulating interleukin-22 production and correcting Th1 and Th22 polarization in immune thrombocytopenia[J]. J Clin Immunol, 2012, 32(3): 523-529.
- [4] Wang T, Zhao H, Ren H, et al. Type 1 and type 2 T-cell profiles in idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. Haematologica, 2005, 90(7): 914-923.
- [5] Li X, Zhong H, Bao W, et al. Defective regulatory B-cell compartment in patients with immune thrombocytopenia[J]. Blood, 2012, 120(16): 3318-3325.
- [6] 叶辛, 石磊, 谷明莉, 等. 原发性免疫性血小板减少症患者颗粒溶素、颗粒酶 B、穿孔素的表达及临床意义[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(1): 20-23.  
Ye X, Shi L, Gu ML, et al. Expression of granzyme B, granulysin and perforin from patients with primary immune thrombocytopenia [J]. J Mod Lab Med, 2014, 29(1): 20-23.
- [7] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [8] Sui T, Ma L, Li X, et al. Plasma microRNA profile in immune thrombocytopenia: screening and verification [J]. National Medical Journal of China, 2014, 94(14): 1083-1086.
- [9] Bay A, Coskun E, Oztuzcu S, et al. Plasma microRNA profiling of pediatric patients with immune thrombocytopenic purpura [J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2014, 25(4): 379-383.
- [10] Jernás M, Nookaew I, Wadenvik H, et al. MicroRNA regulate immunological pathways in T-cells in immune thrombocytopenia (ITP) [J]. Blood, 2013, 121(11): 2095-2098.
- [11] Qian BH, Ye X, Zhang L, et al. Increased miR-155 expression in peripheral blood mononuclear cells of primary immune thrombocytopenia patients was correlated with serum cytokine profiles [J]. Acta Haematol, 2015, 133(3): 257-263.
- [12] 中华医学会血液分会血栓与止血学组. 成人原发性免疫性血小板减少症诊治的中国专家共识(修订版) [J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(3): 214-216.  
Hemostasis and Thrombosis Group, Hematology Society, Chinese Medical Association. Consensus of Chinese experts on diagnosis and treatment of adult primary immune thrombocytopenia [J]. Chinese Journal of Hematology, 2011, 32(3): 214-216.

(下转 16 页)

## 参考文献:

- [1] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南 2010[J]. 中华心血管病, 2011, 39(7): 579-616.  
Writing Group of 2010 Chinese Guidelines for the Management of Hypertension. 2010 Chinese guidelines for the management of hypertension[J]. Chinese Journal of Cardiology, 2011, 39(7): 579-616.
- [2] 龙本栋, 区丽明, 陈 剑, 等. 原发性高血压合并焦虑抑郁障碍现状调查[J]. 临床心身疾病杂志, 2010, 16(2): 144-146.  
Long BD, Qu LM, Chen J, et al. A survey on anxious and depressive disorders in essential hypertension patients[J]. J Clin Psychosom Dis, 2010, 16(2): 144-146.
- [3] 吕云利, 付学峰, 姚向荣, 等. 急性脑出血患者 24h 不同时点血浆促肾上腺皮质激素和皮质醇变化的临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(17): 2674-2676, 2679.  
Lü YL, Fu XF, Yao XR, et al. Change of plasma ACTH and cortisol levels at 3 different time in 24 hours on acute cerebral hemorrhages[J]. China Journal of Modern Medicine, 2006, 16(17): 2674-2676, 2679.
- [4] Lesperance F, Frasura SN, Theroux P, et al. The association between major depression and levels of soluble intercellular adhesion molecule1, interleukin 6, and C-reactive protein in patients with recent acute coronary syndromes[J]. Am J Psychiatry, 2004, 161(2): 271-277.
- [5] 胡荣权, 苏伟青. 老年高血压合并心力衰竭患者血清神经内分泌激素水平的表达及与心力衰竭严重程度的相关性研究[J]. 中国医药导报, 2013, 10(15): 60-62.  
Hu RQ, Su WQ. Relevant research on the expression of neuroendocrine hormone levels and the severity degree of heart failure in patients with hypertension combined with cardiac failure[J]. China Medical Herald, 2013, 10(15): 60-62.
- [6] Martins LC, Conceicao FL, Muxfeldt ES, et al. Prevalence and associated factors of subclinical hypercortisolism in patients with resistant hypertension[J]. J Hypertens, 2012, 30(5): 967-973.
- [7] Carstea D, Trasca DM, Carstea AP, et al. Study on the dynamics of cortisol secretions in hypertensive elderly patients[J]. Int J Hypertens, 2012(2012): 791412.
- [8] 吴 俊, 王东霞, 顾 平. 老年高血压患者血浆皮质醇节律的变化[J]. 中华高血压杂志, 2013(5): 469-472.  
Wu J, Wang DX, Gu P. Plasma cortisol rhythm changes in elderly patients with hypertension[J]. Chinese Journal of Hypertension, 2013(5): 469-472.
- [9] 杜 娟, 凌昌全, 易婷娇. 健康年轻男性外周血单个核细胞糖皮质激素受体及相关激素节律的探讨[J]. 现代检验医学杂志, 2009, 24(1): 1-5.  
Du J, Ling CQ, Yi TJ. Circadian rhythm of glucocorticoid receptor and serum cortisol adrenocorticotrophic hormone, and corticotropin releasing hormone concentrations in peripheral blood of healthy young men[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2009, 24(1): 1-5.
- [10] 马 荣, 郭英全, 贾建平. 急性脑血管病应激状态下外周血皮质醇、淋巴细胞和 T 细胞亚群的变化[J]. 吉林大学学报(医学版), 2005, 31(4): 580-583.  
Ma R, Wu YQ, Jia JP. Change of peripheral blood cortisol lymphocytes and T lymphocytes subsets in patients with acute cerebrovascular diseases in state of stress[J]. Journal of Jilin University(Medicine Edition), 2005, 31(4): 580-583.
- [11] 吴晨娟. 急性脑梗死胰岛素抵抗和皮质醇变化的临床意义探讨[J]. 浙江临床医学, 2003, 5(11): 808-809.  
Wu CJ. To explore the clinical significance of insulin resistance and hydrocortisone changes in acute cerebral infarct[J]. Zhejiang Clinical Medicine Journal, 2003, 5(11): 808-809.
- [12] 耿 直, 张朝东. 脑卒中后抑郁患者血浆皮质醇变化的初步观察[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2006, 6(4): 310-311.
- [13] 周志菁, 符尚林, 王 丰, 等. 不同时间点测定血浆促肾上腺皮质激素和皮质醇对急性脑梗死的临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(2): 159-160.  
Zhou ZJ, Fu SL, Wang F, et al. Clinical significance of plasma adrenocorticotrophic hormone and cortisol of patients with acute cerebral infarction at different time[J]. Int J Lab Med, 2014, 35(2): 159-160.
- [14] Alehagen U, Dahlström U, Rehfeld JF, et al. Association of copeptin and N-terminal proBNP concentrations with risk of cardiovascular death in older patients with symptoms of heart failure[J]. JAMA, 2011, 305(20): 2088-2095.  
收稿日期: 2015-05-16 16 修回日期: 2016-09-07
- (上接 12 页)
- [13] Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, et al. miRBase: tools for microRNA genomics[J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(Database issue): D154-158.
- [14] Duan Y, Chen Q. TGF-beta1 regulating miR-205/miR-195 expression affects the TGF-beta signal pathway by respectively targeting SMAD2/SMAD7[J]. Oncology Reports, 2016, 36(4): 1837-1844.
- [15] Dou L, Li J, Zheng D, et al. MicroRNA-205 down-regulates mixed-lineage-AF4 oncogene expression in acute lymphoblastic leukemia[J]. Onco Targets and Therapy, 2013, 6(1): 1153-1160.
- [16] Dou L, Zheng D, Li J, et al. Methylation-mediated repression of microRNA-143 enhances MLL-AF4 oncogene expression[J]. Oncogene, 2012, 31(4): 507-517.
- [17] Hu Y, Qiu Y, Yague E, et al. miRNA-205 targets VEGFA and FGF2 and regulates resistance to chemotherapeutics in breast cancer[J]. Cell Death & Disease, 2016, 7(6): e2291.  
收稿日期: 2016-07-25  
修回日期: 2016-09-22