

miR-491-5p 在原发免疫性血小板减少症患者中的表达及临床意义*

丁磊¹, 刘鹏², 叶辛², 邓安梅², 任永亚³, 吴天勤³, 钱铮³

(1. 苏州市吴中区中西医结合医院, 江苏苏州 215200;

2. 第二军医大学长海医院, 上海 200433; 3. 解放军 100 医院, 江苏苏州 215007)

摘要:目的 研究 miR-491-5p 在原发免疫性血小板减少症(primary immune thrombocytopenia, ITP)初发患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)中的表达水平及临床意义。方法 选取 2014 年 9 月~2015 年 9 月解放军第 100 医院血液科住院的初诊 ITP 患者 40 例(初诊组),经治疗后完全缓解者 22 例(完全缓解组),40 例健康体检者为对照组。采集外周静脉血 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-491-5p 的表达量;分析 miR-491-5p 与血小板计数之间的相关性。结果 初诊组(5.07 ± 1.70)与对照组(1.92 ± 0.95)外周血单个核细胞 miR-491-5p 的表达相比上调,差异有统计学意义($t=9.36, P<0.01$);治疗后完全缓解组(2.32 ± 1.07)与其初诊时(4.95 ± 0.83)外周血单个核细胞 miR-491-5p 的表达相比下调,差异有统计学意义($t=8.94, P<0.01$);ITP 患者外周血单个核细胞中 miR-491-5p 的表达量与血小板计数呈负相关($r=-0.7697, P<0.05$)。结论 miR-491-5p 在 ITP 初发患者外周血单个核细胞中高表达,表明其可能与 ITP 的发病相关,或成为未来 ITP 诊疗潜在的标志物。

关键词:原发免疫性血小板减少症;miR-491-5p;血小板计数;外周血单个核细胞

中图分类号:R558.2;R392.11 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2016)06-017-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.06.005

Expression and Clinical Significance of miR-491-5p in Patients with Primary Immune Thrombocytopenia

DING Lei¹, LIU Peng², YE Xin², DENG An-mei², REN Yong-ya³, WU Tian-qin³, QIAN Cheng³

(1. Wuzhong District Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Jiangsu Suzhou

215200, China; 2. Changhai Hospital, the Second Military Medical University,

Shanghai 200433, China; 3. 100th Hospital of PLA, Jiangsu Suzhou 215007, China)

Abstract: **Objective** To explore the expression and clinical significance of microRNA (miR-491-5p) in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of primary Immune Thrombocytopenia (ITP) patients. **Methods** 40 ITP patients (study group) and 40 healthy subjects (control group) were collected from the Department of Hematology, 100th Hospital of PLA Hospital. After treatment, 22 cases of complete remission as a complete remission. 2ml peripheral blood taken from them, PBMCs were separated and total RNA was extracted from the cells. cDNA was synthesized by reverse transcription, U6 for reference, then determined the expression of miR-491-5p with the real-time fluorescent quantitative PCR (real time PCR); To analyze the correlation between miR-491-5p and platelet count. **Results** Compared newly diagnosed group (5.07 ± 1.70) with control group (1.92 ± 0.95) expression in peripheral blood mononuclear cells up-regulated miR-491-5p compared, the difference was statistically significant ($t=9.36, P<0.01$). Compared complete remission group (2.32 ± 1.07) with their first visit (4.95 ± 0.83) the expression of miR-491-5p in peripheral blood mononuclear cells compared to cut, the difference was statistically significant ($t=8.94, P<0.01$). The miR-491-5p level in ITP patients was negative correlated with the platelet counts ($r=-0.7697, P<0.05$). **Conclusion** The miR-491-5p expression in ITP patients was significantly increased, which suggests that it may be related to the pathogenesis of ITP, or to be a potential marker for the diagnosis and treatment of ITP in the future.

Keywords: primary immune thrombocytopenia; miR-491-5p; platelet count; peripheral blood mononuclear cells

* 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(BWS14J023,12MA056,15ZD009),美捷登基金(MJR20150019)。

作者简介:丁磊(1988—),男,本科,检验技师,主要从事临床免疫学及免疫学检验研究,E-mail:dinglei_0126@126.com。

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

吴天勤,主任医师,E-mail:wtq100@vip.163.com,共同通讯作者。

miRNA 也称 microRNA, 是真核生物中广泛存在的一种长度为 21~23nt 的 RNA 分子, 可以通过诱发 mRNA 降解或抑制蛋白翻译的方式负调控靶基因^[1]。研究表明 miRNA 参与生物干细胞分化、信息传递、器官生长发育、肿瘤等多个过程, 因此 miRNA 的异常表达通常会导致疾病的发生^[2,3]。

免疫性血小板减少症 (primary immune thrombocytopenia, ITP), 旧称为特发性血小板减少性紫癜, 是一种自身免疫介导的以血小板下降为特征的出血性疾病^[4,5]。其发病原因尚不清楚, T 细胞、B 细胞、巨核细胞、抗原递呈细胞等在 ITP 的发病过程均发挥作用, 有文献报道 miRNA 与 ITP 之间存在着一定的联系^[6~8], 本研究通过实时定量 PCR 的方法检测患者外周血单个核细胞中 miR-491-5p 的表达水平, 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 材料与方法

1.1 研究对象 收集解放军第 100 医院血液科 2014 年 9 月~2015 年 9 月收治的 ITP 初发患者外周抗凝全血 40 例, 均未接受过相关治疗, 诊断符合国内标准^[9], 其中男性 22 例, 女性 18 例, 年龄 25~65 岁。其中经治疗后完全缓解者 22 例, 男性 12 例, 女性 10 例, 年龄 26~51 岁; 同期健康体检者 40 例作为对照组, 其中男性 21 例, 女性 19 例, 年龄 23~67 岁。每例标本大约 2 ml, 所有标本在 2 h 内处理完毕并保存在 -80℃ 冰箱待检。此项研究通过医院伦理委员会的批准, 受试者均已签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器 反转录试剂盒和 PCR 试剂盒购自 Takara 公司; Trizol 试剂 (Invitrogen life technologies)、淋巴细胞分离液、100 ml/dl 乙醇、氯仿、异丙醇均购自国药集团化学试剂有限公司; DEPC 水, 红细胞裂解液, 双蒸水, 200 μ l EP 管, 2 ml EP 管, 纯水仪, Centrifuge 5417 R 低温高速离心机; 紫外分光光度计 (ND-1000, Nanodrop Technologies)、梯度 PCR 仪 (ABI)、PCR 仪 (ABI7500) 均产自美国。

1.3 方法

1.3.1 ITP 患者治疗方案和疗效标准: ①糖皮质激素 (40 mg/天 \times 4 天)。②泼尼松 (30 mg/kg/天)。③ITP 的紧急治疗、不耐受肾上腺皮质激素、妊娠等患者可加用丙种球蛋白 (400 mg/kg/天 \times 5 天)。ITP 诊断及疗效标准参照国内专家共识^[9]。

1.3.2 初诊组 ITP 患者分组标准: 将初诊组 ITP 患者按上述方案治疗后, 血小板 $>100 \times 10^9/L$ 且

病情稳定的患者归完全缓解组, 共 22 例; 血小板 $<100 \times 10^9/L$ 的患者或治疗有效但复发的患者归未完全缓解组, 共 18 例。

1.3.3 外周血单个核细胞 (PBMC) 分离和总 RNA 提取: 所有患者在治疗前用 EDTA-K₂ 抗凝管采集空腹静脉血 2 ml, 对照组同样用 EDTA-K₂ 抗凝管采集空腹静脉血 2 ml。用淋巴细胞分离液从 2 ml 静脉血中分离 PBMC, 用 Trizol 法提取细胞的总 RNA, 用紫外分光光度计 (ND-1000, Nanodrop Technologies) 检测所提取 RNA 的浓度和纯度。

1.3.4 cDNA 的合成以及 real-timePCR 反应: miR-491-5P 和 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 (Takara 公司) 进行核酸扩增, 反转录和 PCR 条件及实验过程严格按照试剂盒说明书操作。

1.4 统计学分析 采用 GraphPad Prism 5 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。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ITP 患者各组外周血单个核细胞 miR-491-5P 的表达 初诊组 (5.07 ± 1.70) 与对照组 (1.92 ± 0.95) 外周血单个核细胞 miR-491-5P 的表达相比上调, 差异有统计学意义 ($t = 9.36, P < 0.01$); 治疗后完全缓解组 (2.32 ± 1.07) 与其初诊时 (4.95 ± 0.83) 外周血单个核细胞 miR-491-5P 的表达相比下调, 差异有统计学意义 ($t = 8.94, P < 0.01$)。

2.2 相关性分析 40 例 ITP 初发患者外周血单个核细胞 miR-491-5P 与血小板计数呈负相关 ($r = -0.7697, P < 0.01$)。

3 讨论 miRNA 是作为一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子, 人体中存在大量的 miRNA, 20%~30% 的 mRNA 是 miRNA 的作用靶点, 但目前对 miRNA 在免疫性疾病中发挥的功能还有待进一步深入研究, 如 miRNA 与 ITP 的发病与发展情况。

miR-491-5p 属于 miR-491 家族, 位于 9p21.3 脆性位点, 近年来国内外学者对其研究也逐渐增多。Gong 等^[10] 研究表明 miR-491-5p 通过作用 IGF2BP1 来抑制非小细胞肺癌细胞的迁移和侵袭, 与相应癌旁正常组织比较, miR-491-5p 在非小细胞肺癌组织中的表达显著下调; Zhao 等^[11] 研究表明 miR-491-5p 抑制宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 诱导细胞凋亡, 抑制肿瘤生长, 这些功能是通过作用于靶基因人端粒酶逆转录酶 (hTERT) 来发

挥的。与相应的癌旁正常组织相比, miR-491-5p 在宫颈癌组织中表达显著下调。Yuan 等^[12]研究表明: miR-491-5p 通过对 MMP-9 基因 3'-UTR rs1056629A→C 多态位点的结合, 导致 MMP-9 蛋白表达的增高, 从而增加了中国人动脉粥样硬化性脑梗死发病风险。Sheinerman 等^[13]研究表明 miR-491-5p 可作为轻度认知障碍的生物标志物之一。Yu 等^[14]研究数据表明了 miR-491 的过表达能抑制 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞增殖, 促进细胞凋亡, 抑制 CD8⁺ T 细胞产生 IFN- γ 。

本实验通过实时定量 PCR 的方法检测 ITP 初发患者外周血单个核细胞中 miR-491-5p 的表达水平, 与健康体检对照组相比, 在 ITP 初发患者中显著上调 ($P < 0.01$); 并且 miR-491-5p 的表达水平与 ITP 初发患者外周血血小板计数呈现负相关。这些均提示 miR-491-5p 可能参与 ITP 的发病过程, 并且与其严重程度相关。另外我们对 ITP 初发患者治疗后跟踪调查还发现, 完全缓解组经治疗后 miR-491-5p 的表达水平显著低于其初诊时 miR-491-5p 的表达水平, 而未完全缓解组 miR-491-5p 的表达水平则基本未改变, 这也提示 miR-491-5p 参与了 ITP 免疫功能的恢复及病情缓解。miRNA-491-5p 是如何参与 ITP 的发病机制, 通过作用于哪个靶基因及作用的具体通路有待于我们进一步研究。

我们的研究显示 miRNA-491-5p 在 ITP 初发病人中表达增高, 可作为 ITP 早期的诊断标志物, 并为后期 ITP 的诊断、治疗和预后提供新的突破口。

参考文献:

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] Zhang B, Wang Q, Pan X. MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants[J]. J Cell Physiol, 2007, 210(2): 279-289.
- [3] Gommans WM, Berezikov E. Controlling miRNA regulation in disease[J]. Methods Mol Biol, 2012(822): 1-18.
- [4] Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group[J]. Blood, 2009, 113(11): 2386-2393.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 中华医学会血液学分会止血与血栓学组. 成人原发性免疫性血小板减少症诊断与治疗中国专家共识 (2016 年版)[J]. 中华血液学杂志, 2016, 37(2): 89-93. Thrombosis and Hemostasis Group, Hematology Society, Chinese Medical Association. Consensus of Chinese experts on diagnosis and treatment of adult primary immune thrombocytopenia (version 2016) [J]. Chinese Journal of Hematology, 2016, 37(2): 89-93.
- [10] Gong F, Ren P, Zhang Y, et al. MicroRNAs-491-5p suppresses cell proliferation and invasion by inhibiting IGF2BP1 in non-small cell lung cancer[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(2): 485-495.
- [11] Zhao Q, Zhai YX, Liu HQ, et al. MicroRNA-491-5p suppresses cervical cancer cell growth by targeting hTERT[J]. Oncol Rep, 2015, 34(2): 979-986.
- [12] Yuan M, Zhan Q, Duan X, et al. A functional polymorphism at miR-491-5p binding site in the 3'-UTR of MMP-9 gene confers increased risk for atherosclerotic cerebral infarction in a Chinese population [J]. Atherosclerosis, 2013, 226(2): 447-452.
- [13] Sheinerman KS, Tsivinsky VG, Abdullah L, et al. Plasma microRNA biomarkers for detection of mild cognitive impairment: biomarker validation study [J]. Aging, 2013, 5(12): 925-938.
- [14] Yu T, Zuo QF, Gong L, et al. MicroRNA-491 regulates the proliferation and apoptosis of CD8(+) T cells[J]. Sci Rep, 2016(6): 30923.

收稿日期: 2016-09-08

修回日期: 2016-10-12