

MDS 患者血浆中 3 种 miRNA 表达水平及临床意义

王玉¹ 李超¹ 满其航¹

[摘要] 目的:探究骨髓增生异常综合征(MDS)患者血浆 miR-21、miR-155、miR-210 表达水平及其临床意义。方法:选择 2016 年 6 月—2020 年 6 月收治 83 例 MDS 患者作为研究组,同一时间体检 40 例健康者作为对照组,均测定血浆 miR-21、miR-155、miR-210 表达水平,分析 2 组 3 种 miRNA 差异及临床意义。研究组按照 WHO 分型、国际预后积分系统(IPSS)评分进行分组,比较不同 WHO 分型、IPSS 评分患者血浆 miRNA 水平,分析 3 种血浆 miRNA 表达水平与 WHO 分型、IPSS 评分之间相关性。结果:研究组患者血浆 miR-21、miR-155、miR-210 表达水平均显著高于对照组($P < 0.05$);ROC 曲线显示,血浆 miR-21、miR-155、miR-210 用于诊断 MDS 患者病情 AUC 值分别为 0.989、0.887、0.950;难治性贫血伴原始细胞增多型患者血浆 miR-21、miR-155、miR-210 表达水平显著高于难治性贫血型与难治性血细胞减少伴多系发育异常型($P < 0.05$);血浆 miR-21、miR-155、miR-210 表达水平与 WHO 分型呈正相关($r = 0.406, 0.519, 0.487; P < 0.05$);高危组患者血浆 miR-21、miR-155、miR-210 表达水平显著高于低危组与中危组($P < 0.05$),中危组患者血浆 3 种 miRNA 表达水平显著高于低危组($P < 0.05$);血浆 miR-21、miR-155、miR-210 表达水平与 IPSS 评分呈正相关($r = 0.612, 0.814, 0.553; P < 0.05$)。结论:血浆 miR-21、miR-155 以及 miR-210 表达水平可用于预测 MDS 发生,对于评估患者病情进展意义重大,可以为患者及时治疗提供临床依据。

[关键词] 骨髓增生异常综合征;miR-21;miR-155;miR-210

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2021.08.006

[中图分类号] R551.3 **[文献标志码]** A

Expression levels and clinical significance of three kinds of miRNAs in patients with MDS

WANG Yu LI Chao MAN Qihang

(Department of Hematology, Beijing Aerospace General Hospital, Beijing, 100076, China)

Abstract Objective: To explore the expression levels and clinical significance of plasma miR-21, miR-155 and miR-210 in patients with myelodysplastic syndrome(MDS). **Methods:** A total of 83 MDS patients(study group) admitted to the hospital from June 2016 to June 2020 and 40 healthy individuals(control group) receiving physical examination during the same period were enrolled as the research objects. The expression levels of plasma miR-21, miR-155 and miR-210 were measured. Differences in the three kinds of miRNA in the two groups and their clinical significance were analyzed. Patients in the study group were grouped according to WHO classification and the International Prognostic Scoring System(IPSS) score. The plasma miRNA levels of patients with different WHO classification and different IPSS scores were compared. Meanwhile, the relationship of expression levels of the three kinds of plasma miRNAs with WHO classification and IPSS score was analyzed. **Results:** The expression levels of plasma miR-21, miR-155 and miR-210 in study group were significantly higher than those in control group($P < 0.05$). ROC curves showed that AUC values of plasma miR-21, miR-155 and miR-210 for diagnosis of MDS were 0.989, 0.887 and 0.950, respectively. The expression levels of miR-21, miR-155 and miR-210 in patients with refractory anemia with excess of blasts were significantly higher than those with refractory anemia and refractory cytopenia with multilineage dysplasia($P < 0.05$). The expression levels of plasma miR-21, miR-155 and miR-210 were positively correlated with WHO classification($r = 0.406, 0.519, 0.487, P < 0.05$). The expression levels of plasma miR-21, miR-155 and miR-210 in high-risk group were significantly higher than those in low-risk group and moderate-risk group($P < 0.05$). The expression levels of their miRNA in moderate-risk group were significantly higher than those in low-risk group($P < 0.05$). The expression levels of plasma miR-21, miR-155 and miR-210 were positively correlated with IPSS score($r = 0.612, 0.814, 0.553, P < 0.05$). **Conclusion:** The expression levels of plasma miR-21, miR-155 and miR-210 can be applied to predict the occurrence of MDS, which may be of great significance for assessing the progression of patients' conditions, and can provide clinical evidence for timely treatment.

Key words myelodysplastic syndrome; miR-21; miR-155; miR-210

¹北京航天总医院血液科(北京,100076)

骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndrome, MDS) 为髓系细胞发育异常所致骨髓功能衰竭类疾病, 患者主要表现为出血、感染、贫血等, 由于缺乏典型症状, 临床医师对其诊断相对困难^[1]。研究显示 MDS 患者病情进展期间造血干细胞增殖水平差异导致患者骨髓造血能力不同, 患者若是不能及时接受对症治疗, 其病情将会进展为急性髓系白血病, 因此 MDS 患者及时诊断和治疗对于改善患者预后意义重大^[2-3]。微 RNA (MicroRNA, miRNA) 作为非编码单链小 RNA 能够影响机体血细胞分化, 其表达异常与机体血液疾病发生以及进展关系密切^[4]。miR-21、miR-155、miR-210 水平均在血液疾病发生以及发展中发挥重要作用, 基于此, 本研究探究了 miR-21、miR-155、miR-210 在 MDS 患者血浆中表达水平及其临床意义, 为后期 3 个指标在 MDS 患者诊断以及预测提供临床参考意见。

1 资料和方法

1.1 研究对象

选择 2016 年 6 月—2020 年 6 月我院收治 83 例 MDS 患者作为研究组, 其中男 43 例, 女 40 例; 年龄 21~83 岁, 平均 (53.19±11.46) 岁。同一时间体检 40 例健康者作为对照组, 其中男 23 例, 女 17 例; 年龄 24~85 岁, 平均 (55.26±12.33) 岁。纳入标准: ①患者病情诊断参照《血液病诊断与疗效标准》^[5] (2007 年第 3 版), 对照组无任何血液疾病; ②患者病情采用血常规、流式细胞免疫学分型、细胞形态学、组织化学染色以及骨髓病理等检查证实; ③所有研究参与者精神意识正常, 可以配合研究进行; ④所有参与研究者均对研究知情同意, 且研究进行获得医院伦理会批准同意。排除标准: ①并发其他恶性肿瘤或者严重器质性疾病者; ②精神意识异常者; ③存在其他非 MDS 类型血液疾病者; ④接受过全反式维甲酸以及雄激素治疗者; ⑤存在免疫系统疾病者。2 组患者一般资料比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 具有可比性。

1.2 方法

所有参与研究者均收集晨起空腹静脉血进行离心处理后获得下层沉淀物, 将其转移至另一个离心管中加入 TRIzol 溶液 (美国 Invitrogen 公司), 依据说明书进行总 RNA 抽提, 获得总 RNA 纯度以及浓度采用紫外分光光度计测定, 测定 A_{260}/A_{280} 比值范围为 1.8~2.0 为获得总 RNA 符合要求。反转录在 37℃ 环境下应用 miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒 (北京天根生化科技有限公司) 进行 60 min。引物序列见表 1。实时荧光定量 PCR 使用相关 miRNA 试剂盒 (北京天根生化科技有限公司) 进行测定, 引物序列均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司设计并合成, 实时荧光定

量 PCR 反应条件设置为: 94℃ 条件下进行 2 min, 94℃、60℃ 分别进行 20 s、34 s, 一共循环 40 次, 本研究中内参基因为 U6, 所有待测样本均需要设置 3 个对照, 应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法获得待测 miRNA 表达水平。

表 1 引物序列

指标	引物
miR-21	上游 5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-3'
	下游 5'-CUAUACAACCUACUACCUCAUU-3'
miR-155	上游 5'-GCCGCTTAATGCTAATCGTG-3'
	下游 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
miR-210	上游 5'-AGCCCCUGCCCACCGCACACUG-3'
	下游 5'-CUGUGCGUGUGACAGCGCUGA-3'
U6	上游 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'
	下游 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

1.3 观察指标

比较 2 组血浆 miRNA 水平, 分析 3 种血浆 miRNA 对于患者病情诊断价值, 比较不同 WHO 分型以及国际预后积分系统 (International Prognostic Scoring System, IPSS) 评分患者血浆 miRNA 水平, 分析 3 种血浆 miRNA 表达水平与 WHO 分型、IPSS 评分之间相关性。按照 WHO 标准^[6]中依据血细胞数目以及骨髓细胞异常情况将 MDS 患者分为难治性贫血型、难治性贫血减少伴多系发育异常型、难治性贫血伴原始细胞增多型。按照 IPSS 中标准将患者分为极低危组、中危组以及高危组^[7]。

1.4 统计学方法

研究中数据分析采用 SPSS 20.0 软件进行, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组之间比较采用 t 检验, 多组比较应用方差分析, 诊断预测价值应用 ROC 曲线分析, 相关性应用 Spearman 进行分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组血浆 miRNA 表达水平比较

研究组患者血浆 miR-21、miR-155 以及 miR-210 表达水平均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 2。

表 2 2 组血浆 miRNA 表达水平比较 $\bar{x}\pm s$

组别	例数	miR-21	miR-155	miR-210
研究组	83	2.96±0.84	6.52±2.87	2.85±1.12
对照组	40	1.03±0.32	2.65±0.94	0.89±0.33
t		14.024	8.301	10.823
P		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 3 种血浆 miRNA 对于患者病情诊断价值分析

ROC 曲线显示, 血浆 miR-21、miR-155 以及

miR-210 用于诊断 MDS 患者病情 AUC 值分别为 0.989、0.887、0.953,见表 3 和图 1。

表 3 3 种血浆 miRNA 对于患者病情诊断价值分析

指标	截断值	AUC	敏感度/%	特异度/%	95%CI	P
miR-21	1.78	0.989	97.3	95.2	0.971~1.000	<0.001
miR-155	4.18	0.887	84.3	94.5	0.827~0.948	<0.001
miR-210	1.26	0.953	90.6	94.6	0.914~0.991	<0.001

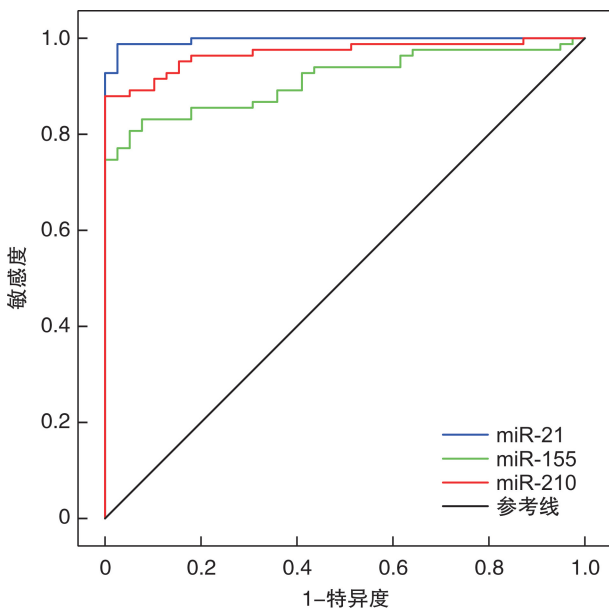


图 1 3 种血浆 miRNA 对于患者病情诊断价值分析 ROC 曲线

2.3 不同 WTO 分型患者血浆 3 种 miRNA 表达水平比较

83 例患者中难治性贫血型、难治性血细胞减少伴多系发育异常型、难治性贫血伴原始细胞增多型分别为 13 例、43 例、27 例,难治性贫血伴原始细胞增多型患者血浆 miR-21、miR-155 以及 miR-210 表达水平显著高于难治性贫血型与难治性血细胞减少伴多系发育异常型 ($P < 0.05$),而难治性贫血型与难治性血细胞减少伴多系发育异常型 3 种 miRNA 表达水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 4。

2.4 3 种 miRNA 表达水平与 WTO 分型相关性分析

Spearman 相关性分析结果显示,血浆 miR-21、miR-155 以及 miR-210 表达水平与 WTO 分型呈正相关 ($r = 0.406, 0.519, 0.487; P < 0.05$)。

2.5 不同 IPSS 评分患者血浆 3 种 miRNA 表达水平比较

83 例患者中低危组、中危组以及高危组分别 23 例、39 例以及 21 例,高危组患者血浆 miR-21、miR-155 以及 miR-210 表达水平显著高于低危组、中危组 ($P < 0.05$),中危组患者血浆 3 种 miRNA 表达水平显著高于低危组 ($P < 0.05$),见表 5。

2.6 3 种 miRNA 表达水平与 IPSS 评分相关性分析

Spearman 相关性分析结果显示,血浆 miR-21、miR-155 以及 miR-210 表达水平与 IPSS 评分呈正相关 ($r = 0.612, 0.814, 0.553; P < 0.05$)。

表 4 不同 WTO 分型患者血浆 3 种 miRNA 表达水平比较

组别	例数	miR-21	miR-155	miR-210
难治性贫血型	13	2.46 ± 0.81	6.09 ± 1.03	2.43 ± 0.66
难治性血细胞减少伴多系发育异常型	43	2.65 ± 0.74	6.21 ± 1.35	2.54 ± 0.82
难治性贫血伴原始细胞增多型	27	3.69 ± 1.03 ¹⁾²⁾	7.22 ± 1.24 ¹⁾²⁾	3.54 ± 0.96 ¹⁾²⁾
F		14.897	6.117	13.429
P		<0.001	<0.001	<0.001

与难治性贫血型比较,¹⁾ $P < 0.05$;与难治性血细胞减少伴多系发育异常型,²⁾ $P < 0.05$ 。

表 5 不同 IPSS 评分患者血浆 3 种 miRNA 表达水平比较

组别	例数	miR-21	miR-155	miR-210
低危组	23	2.06 ± 0.71	5.13 ± 1.06	2.06 ± 0.46
中危组	39	2.75 ± 0.69 ¹⁾	6.01 ± 1.24 ¹⁾	2.61 ± 0.74 ¹⁾
高危组	21	3.37 ± 1.13 ¹⁾²⁾	6.99 ± 1.08 ¹⁾²⁾	3.24 ± 0.83 ¹⁾²⁾
F		13.834	27.762	15.584
P		<0.001	<0.001	<0.001

与低危组比较,¹⁾ $P < 0.05$;与中危组比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

3 讨论

相对于健康体检者,MDS 患者血浆 miR-21、miR-155 以及 miR-210 表达水平显著上升,miR-21 经由下调 Samd7 水平导致红细胞形成减少,而经由抑制 miR-21 水平则可以有效恢复造血功能异常小鼠造血功能^[8];miR-155 可以导致负性调节因子 SHIP1 形成减少,SHIP1 可以抑制 AKt 磷酸化,抑制 PI3K 信号通路激活,影响机体造血功能^[9];miR-210 为典型缺氧性 miRNA,经由促进细胞周期蛋白 E2F3 表达而影响机体血液系统功能,在血液系统疾病如淋巴瘤发生中发挥重要作用^[10],因

此 miR-21、miR-155 以及 miR-210 水平在血液系统疾病如 MDS 中发挥重要作用。Li 等^[11] 研究显示下调 miR-21 水平导致急性髓系白血病细胞系 SKM-1 细胞增殖、诱导细胞凋亡作用被抑制,并导致 G1 期细胞周期阻滞,显示 miR-21 在血液疾病中发挥重要作用。另一项研究则发现 MDS 患者嗜中性粒细胞功能缺陷,而 miR-155 在其中发挥重要作用^[12]。ROC 曲线显示,血浆 miR-21、miR-155、miR-210 用于诊断 MDS 患者病情 AUC 值分别为 0.989、0.887、0.953,显示 3 种 miRNA 水平在诊断 MDS 发生上价值优异。胡应霞等^[13] 研究中将血浆 miR-21、miR-155、miR-210、miR-196a 水平用于患者病情诊断中,其 AUC 分别为 0.777、0.886、0.816、0.848 研究对象主要为胰腺癌患者,与本研究不同,但是依然表明 miRNA 对于患者病情诊断效能较高,独立诊断能力优异。

低危 MDS 患者骨髓内部主要为造血祖细胞大量凋亡,造血细胞数量减少,而高危 MDS 患者骨髓细胞异常增生,但是细胞凋亡逐渐减少,原始造血细胞异常增生导致机体骨髓造血功能衰竭,患者病情进展为急性白血病风险显著增加,因此需要评估患者病情分级^[14]。本研究中随着患者病情危险程度增加,患者血浆 miR-21、miR-155 以及 miR-210 表达水平逐渐升高,3 种 miRNA 水平与患者病情危险分级显示出极大相关性。国外研究者也发现低风险 MDS 患者 miR-155 转录水平显著低于较高风险 MDS 患者,且较高表达水平 miR-155 与较短总生存率关系密切^[15]。但是另一项研究中则认为虽然相对于健康者,血液疾病患者 miR-210 水平上升,但是其水平与患者无病生存率、整体生存率以及死亡发生率无显著相关性^[16]。本研究中依据 WHO 规定细胞形态以及细胞遗传学特点将患者分为难治性贫血型、难治性血细胞减少伴多系发育异常型、难治性贫血伴原始细胞增多型,MDS 患者分型与 3 种 miRNA 表达水平存在相关性,但是难治性贫血伴原始细胞增多型患者血浆 miR-21、miR-155 以及 miR-210 表达水平显著高于难治性贫血型、难治性血细胞减少伴多系发育异常型,而难治性贫血型与难治性血细胞减少伴多系发育异常型 3 种 miRNA 表达水平差异不大,提示 3 种 miRNA 与 MDS 患者分型关系密切,与 Huang 等^[17] 研究中对于不同分型 MDS 患者血清 HOXB-AS3 mRNA 表达水平一致,表明 3 种 miRNA 可能在患者病理分型中发挥重要作用,但是其具体作用机制尚需要进一步研究证实。

综上,MDS 患者血浆 miR-21、miR-155、miR-210 异常上升,三者水平用于患者病情诊断价值优异,且其水平与患者病理分型以及危险分层关系密切,可以作为患者治疗潜在靶点。但是本研究中纳

入对象有限,导致部分亚型患者例数较少,其可能会对最终结果有一定影响,后期仍需扩大样本量进行深入研究。

参考文献

- [1] 于修文,杨慧健. 原始细胞不增多骨髓增生异常综合征骨髓细胞发育异常特征分析[J]. 临床血液学杂志, 2019,32(6):418-422.
- [2] 王方方,杭筱,施青青,等. Tim3 在再生障碍性贫血和骨髓增生异常综合征鉴别诊断中的意义[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2020,40(3):403-408.
- [3] 邵明,汤平,吕先萍,等. ABO 血型基因启动子甲基化水平在成人白血病和骨髓增生异常综合征中的临床意义和预后分析[J]. 中华内科杂志,2018,57(11):816-823.
- [4] 崔佳奇,魏春梅,邓琳丽,等. miR-143 通过抑制 AF9 调控 SKM-1 细胞增殖和凋亡[J]. 第三军医大学学报,2018,40(20):1826-1832.
- [5] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2007:103-116.
- [6] 岳兰竹. 骨髓增生异常综合征诊断研究进展—维也纳诊断标准及 2008 WHO 诊断标准解读[J]. 国际输血及血液学杂志,2010,33(3):195-198.
- [7] Greenberg PL,Heinz L,Schanz L,et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. [J]. Blood,2012,120(12):2454-65.
- [8] Muench DE,Ferchen K, Velu CS, et al. SKI controls MDS-associated chronic TGF- β signaling, aberrant splicing, and stem cell fitness [J]. Blood, 2018, 132(21):24-34.
- [9] Bayraktar R, Van Roosbroeck K. miR-155 in cancer drug resistance and as target for miRNA-based therapeutics [J]. Cancer Metastasis Rev, 2018, 37(1): 33-44.
- [10] Wang S,Xu Z,Wang L. Shuanghuang Shengbai granule cures myelosuppression and suppresses lung cancer progression: mechanism and therapeutic targets from the aspect of microRNAs [J]. Oncotarget, 2017, 8(37):62154-62166.
- [11] Li G,Song Y,Li G, et al. Downregulation of microRNA-21 expression inhibits proliferation, and induces G1 arrest and apoptosis via the PTEN/AKT pathway in SKM1 cells [J]. Mol Med Rep, 2018, 18(3): 2771-2779.
- [12] Cao M,Shikama Y,Kimura H, et al. Mechanisms of Impaired Neutrophil Migration by MicroRNAs in Myelodysplastic Syndromes [J]. J Immunol, 2017, 198(5):1887-1899.
- [13] 胡应霞,张海蓉,石围,等. 血浆 miR-155, miR-196a, miR-21 和 miR-210 对胰腺癌的早期诊断价值 [J]. 肿瘤, 2016, 35(10):1135-1143.
- [14] 冀小波,何玮,朱文伟,等. 骨髓增生异常综合征西医危险度转化与中医脏腑传变的相关性研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2017, 479(4):673-676.

- [2] Yarur AJ, Quintero MA, Jain A, et al. Serum Amyloid A as a Surrogate Marker for Mucosal and Histologic Inflammation in Patients with Crohn's Disease[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2017, 23(1):158-164.
- [3] 陈文晓, 林海华, 陈仁聘, 等. 血淀粉样蛋白、CRP、降钙素在炎症性肠病小鼠模型中表达水平及其与疾病活动性的相关性研究[J]. *新医学*, 2017, 48(3):153-159.
- [4] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2018年·北京)[J]. *中华炎症肠病杂志*, 2018, 38(5):292-311.
- [5] Chen Y, Haines CJ, Gutcher I, et al. Foxp3+ regulatory T cells promote T helper 17 cell development in vivo through regulation of interleukin-2[J]. *Immunity*, 2011, 34(3):409-421.
- [6] Daniluk U, Daniluk J, Krasnodebska M, et al. The combination of fecal calprotectin with ESR, CRP and albumin discriminates more accurately children with Crohn's disease[J]. *Adv Med Sci*, 2019, 64(1):9-14.
- [7] 梁涛, 杨诚, 吴苏源, 等. 多项指标联合检测在细菌感染性疾病中的诊断价值[J]. *临床血液学杂志*, 2019, 32(12):905-912.
- [8] Ishihara S, Tada Y, Kawashima K, et al. Serum amyloid A level correlated with endoscopic findings in patients with Crohn's disease-possible biomarker for evaluating mucosal healing[J]. *Dig Liver Dis*, 2018, 50(6):553-558.
- [9] 姚萍, 陈玲, 孙健, 等. 外周血内 PCT、CRP、ESR、PLT 水平对炎症性肠病的预判价值分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(22):2762-2766.
- [10] 周正宇, 景丽玲, 宋珊珊, 等. 中性粒细胞与淋巴细胞比值、C反应蛋白、红细胞沉降率、粪便隐血联合检测在克罗恩病与肠易激综合征辅助鉴别中的意义[J]. *临床检验杂志*, 2019, 37(1):24-27.
- [11] 袁柏思, 金鑫鑫, 路又可, 等. 血清降钙素原检测在克罗恩病中的临床价值[J]. *胃肠病学与肝病学杂志*, 2017, 26(1):48-51.
- [12] Wakai M, Hayashi R, Tanaka S, et al. Serum amyloid A is a better predictive biomarker of mucosal healing than C-reactive protein in ulcerative colitis in clinical remission[J]. *BMC Gastroenterol*, 2020, 20(1):85.
- [13] Eckhardt ER, Witt J, Zhong J, et al. Intestinal epithelial serum amyloid A modulates bacterial growth in vitro and pro-inflammatory responses in mouse experimental colitis[J]. *BMC Gastroenterol*, 2010, 10:133.
- (收稿日期:2020-11-17)

(上接第 555 页)

- [15] Choi Y, Hur EH, Moon JH, et al. Expression and prognostic significance of microRNAs in Korean patients with myelodysplastic syndrome[J]. *Korean J Intern Med*, 2019, 34(2):390-400.
- [16] Hassan NM, Refaat LA, Ismail GN, et al. Diagnostic, prognostic and predictive values of miR-100 and miR-210 in pediatric acute lymphoblastic Leukemia[J]. *Hematology*, 2020, 25(1):405-413.
- [17] Huang HH, Chen FY, Chou WC, et al. Long non-coding RNA HOXB-AS3 promotes myeloid cell proliferation and its higher expression is an adverse prognostic marker in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):617.
- (收稿日期:2021-01-13)