

急性淋巴细胞白血病血浆 miR-34a 表达水平与预后的相关性

孙莹¹

[摘要] 目的:分析急性淋巴细胞白血病(ALL)血浆微小核糖核酸-34a(miR-34a)表达水平与预后的相关性。方法:回顾性分析 2016 年 12 月—2018 年 12 月收治的 112 例 ALL 患者资料,作为观察组,同时根据疗效标准分为完全缓解(CR)组 40 例、部分缓解(PR)组 55 例和未缓解(NR)组 17 例,并选取同期进行体检的健康者 100 例作为对照组,检测血浆 miR-34a 表达水平,比较不同临床特征及疗效患者的血浆 miR-34a 水平,并采用 Kaplan-Meier 法及多因素 Cox 回归模型分析血浆 miR-34a 水平与 ALL 患者预后的相关性。结果:观察组血浆 miR-34a 水平低于对照组($P < 0.05$);miR-34a 低表达的 ALL 患者白细胞、乳酸脱氢酶、骨髓母细胞比例及危险度分型高于 miR-34a 高表达的 ALL 患者($P < 0.05$);CR 组血浆 miR-34a 水平与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),PR 组血浆 miR-34a 水平低于 CR 组及对照组($P < 0.05$),NR 组血浆 miR-34a 水平低于其余各组($P < 0.05$);miR-34a 低表达的 ALL 患者总生存率低于高表达患者($P < 0.05$);多因素 Cox 回归分析显示,白细胞、骨髓原始细胞、危险度分型及 miR-34a 是总生存率的主要危险因素($P < 0.05$)。结论:ALL 患者血浆 miR-34a 水平呈低表达,且与预后密切相关。

[关键词] 急性淋巴细胞白血病;血浆微小核糖核酸-34a;预后;相关性

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2021.10.007

[中图分类号] R733.71 **[文献标志码]** A

Correlation between expression level of plasma miR-34a and prognosis of acute lymphoblastic leukemia

SUN Ying

(Department of Hematology, Yuncheng Central Hospital, Yuncheng, 044000, China)

Abstract Objective: To analyze the correlation between the expression level of plasma microribonucleic acid-34a(miR-34a) and prognosis of acute lymphoblastic leukemia(ALL). **Methods:** A retrospective analysis was performed on the clinical data of 112 patients with ALL(observation group) admitted to the hospital between December 2016 and December 2018. The patients were divided into complete remission(CR) group($n=40$), partial remission(PR) group($n=55$) and non-remission(NR) group($n=17$) according to the criterion of therapeutic effect. Meanwhile, 100 healthy individuals were selected as the control group. The expression level of plasma miR-34a was detected, and the plasma miR-34a levels of patients with different clinical characteristics and different curative effects were compared. Kaplan-Meier method and multivariate Cox regression model were used to analyze the correlation between plasma miR-34a level and the prognosis of patients with ALL. **Results:** The plasma miR-34a level in observation group was lower than that in the control group($P < 0.05$). The white blood cell, lactic dehydrogenase, bone marrow blast cell ratio and risk classification of ALL patients with low miR-34a expression were higher than those of ALL patients with high miR-34a expression($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in plasma miR-34a level between CR group and the control group($P > 0.05$). PR group had lower plasma miR-34a levels than CR group and the control group($P < 0.05$), and NR group had lower plasma miR-34a levels than the other groups($P < 0.05$). The overall survival rate of ALL patients with low miR-34a expression was lower than that of patients with high expression($P < 0.05$). Multivariate Cox regression analysis showed that the white blood cell, bone marrow initial cells, risk classification and miR-34a were main risk factors influencing overall survival($P < 0.05$). **Conclusion:** Plasma miR-34a level is low in patients with ALL, and it might be closely related to the prognosis.

Key words acute lymphoblastic leukemia; plasma microribonucleic acid-34a; prognosis; correlation

急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)是骨髓内异常增生的恶性肿瘤,表现为贫血、发热及出血^[1]。据相关报道显示,ALL 发病率约为 0.67/10 万^[2]。目前大约 30%的成年

人可以实现长期无病生存,但仍有部分患者治疗预后较差,因此探寻有效的诊断和预后标志物为 ALL 早期选择最佳质量方案提供依据^[3]。miRNA 是内源性非编码 RNA 分子,可调节基因表达,在肿瘤中具有重要作用^[4]。研究表明,miRNA 在急

¹山西省运城市中心医院血液内科(山西运城,044000)

性髓细胞白血病(AML)发生发展、治疗及预后中具有重要作用^[5]。微小核糖核酸-34a(miR-34a)是 miRNA 的重要类型,在体外可抑制肿瘤细胞增殖、侵袭和转移,促进肿瘤细胞凋亡,可作为肿瘤治疗和预后的标志物^[6]。有研究指出 miR-34a 可作为多发性骨髓瘤患者临床预后指标^[7]。亦有研究发现,miR-34a 在结肠癌、弥漫大 B 细胞淋巴瘤等恶性肿瘤中表达异常^[8]。目前,其与 ALL 预后的关系研究较少,因此本研究分析 miR-34a 表达与 ALL 临床特征及预后的关系,以提高 ALL 临床疗效。

1 资料与方法

1.1 对象

回顾性分析 2016 年 12 月—2018 年 12 月我院收治的 112 例 ALL 患者的临床资料,作为观察组,其中男 62 例,女 50 例;年龄 20~60 岁,平均(39.56±7.12)岁;淋巴细胞分型:B 细胞型 82 例,T 细胞型 30 例;危险度分型:低危型 40 例,中危型 35 例,高危型 37 例。根据疗效标准分为完全缓解(CR)组 40 例、部分缓解(PR)组 55 例和未缓解(NR)组 17 例。纳入标准:①符合《血液病诊断及疗效标准》中 AML 诊断,并经病理学确诊^[9];②年龄 20~60 岁;③临床资料完整。排除标准:①心肝肾脏功能不全者;②合并其他恶性肿瘤者及中枢神经系统白血病;③临床资料不完整者;④化疗耐药者;⑤成熟淋巴细胞白血病;⑥严重感染及自身免疫系统疾病者。选择同期于我院进行体检的健康者 100 例为对照组,男 57 例,女 43 例;年龄 21~58 岁,平均(38.22±6.97)岁。2 组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

1.2.1 单个核细胞的分离 抽取清晨空腹外周静脉血 5 mL 于抗凝管中,加入淋巴细胞分离液 Ficoll,在 2000×g 离心 10 min,用巴斯德吸管吸取第 1、2 层间的薄膜,并置于离心管,用 Hank 液清洗 2 遍后,调整单个核细胞浓度为 1×10^7 /mL,在无菌 1.5 mL EP 管中加入 100 μ L 单个核细胞悬液,分别加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 HLR-DR 抗体,4℃培养 30 min,-20℃保存。

1.2.2 样本细胞中 miR-34a 水平的 RT-PCR 检测 采用 TRIzol 提取单个核细胞总 RNA 并采用分光光度法评估 RNA 质量,通过反转录反应合成 cDNA,逆转录反应条件为:50℃ 15 min 92℃ 2 min 后置于一 20℃ 保存。以 U6 作为内参基因,采用 Prime 6.0 软件设计 miR-429 和 U6 引物,miR-429 引物:上游 5'-CTGACGTCAGTCATG-CAC-3',下游 5'-GACTGCACTGACAGTCACTGC-3';U6 引物:上游 5'-CTGACGTCACGTCACTGC-3',下游 5'-TGACCACGTGCACGT-CAC-3'。反应条件设置为:95℃ 预变性 5 min,95℃

变性 15 s,56℃ 复性 20 s,72℃ 延伸 45 s。从变性至延伸进行 32 个循环,通过 OOCT2-COOCT 法检测 miR-34a 表达水平。

1.3 观察指标

①疗效标准^[10]:CR:临床症状消失,原始细胞+幼稚淋巴细胞比例 $<5\%$;PR:临床症状缓解,骨髓中原始细胞+幼稚淋巴细胞比例为 $5\% \sim 20\%$;NR:骨髓中原始细胞+幼稚淋巴细胞 $>20\%$ 。②预后:对 ALL 患者进行 2 年随访,随访时间至 2021 年 1 月,平均(12.30±2.84)个月,记录血浆 miR-34a 水平低表达和高表达的生存情况。

1.4 统计学方法

使用过 SPSS 20.0 统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,计数资料以 % 表示,采用 χ^2 检验,并采用 Kaplan-Meier 法及多因素 Cox 回归模型分析血浆 miR-34a 水平与 ALL 患者预后的相关性,所有统计分析均以按照检验水准 $\alpha=0.05$ 标准进行统计学判别。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组血浆 miR-34a 水平比较

观察组血浆 miR-34a 表达水平为 3.27 ± 0.36 ,对照组血浆 miR-34a 表达水平为 7.37 ± 2.23 ,观察组血浆 miR-34a 水平低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 观察组患者临床指标与血浆 miR-34a 水平的关系

miR-34a 低表达和高表达患者性别、年龄、血红蛋白(Hb)、血小板(PLT)、免疫分型比较差异无统计学意义($P>0.05$),miR-34a 低表达患者白细胞计数(WBC)、乳酸脱氢酶(LDH)、骨髓母细胞比例及危险度分型高于 miR-34a 高表达患者($P<0.05$),见表 1。

2.3 观察组血浆 miR-34a 表达水平与疗效的关系

CR 组血浆 miR-34a 表达水平为 7.18 ± 2.17 ,PR 组血浆 miR-34a 表达水平为 5.62 ± 1.70 ,NR 组血浆 miR-34a 表达水平为 3.17 ± 1.04 ,对照组血浆 miR-34a 表达水平为 7.37 ± 2.23 ;CR 组血浆 miR-34a 水平与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);PR 组血浆 miR-34a 水平低于 CR 患者及对照组($P<0.05$);NR 组血浆 miR-34a 水平低于其余各组($P<0.05$)。

2.4 观察组血浆 miR-34a 表达水平与预后的关系

对 112 例 ALL 患者进行 2 年随访,随访时间至 2021 年 1 月,平均(12.30±2.84)个月,随访期间均无失访。miR-34a 低表达患者中 30 例死亡,总生存率 42.31%(22/52);miR-34a 高表达患者中 20 例死亡,总生存率 66.67%(40/60);miR-34a 低表达 ALL 患者的总生存率低于高表达患者($P<$

0.05), 见图 1。

表 1 观察组患者临床指标与血浆 miR-34a 水平的相关性

例(%), $\bar{x} \pm s$

项目	miR-34a 低表达(52 例)	miR-34a 高表达(60 例)	χ^2/t	<i>P</i>
性别				
男	30(57.69)	32(53.33)	0.214	0.644
女	22(42.31)	28(46.67)		
年龄/岁				
<40	25(48.08)	30(50.00)	0.041	0.839
≥40	27(51.92)	30(50.00)		
WBC/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	55.78±10.34	41.15±7.46	8.665	<0.001
Hb/(g · L ⁻¹)	76.23±15.52	74.86±14.65	0.464	0.644
LDH/(U · L ⁻¹)	275.69±20.63	218.14±16.59	16.355	<0.001
PLT/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	75.30±13.04	73.92±12.11	0.580	0.563
骨髓母细胞比例/%	77.51±16.02	68.21±13.20	3.368	0.001
危险度分型				
低危	10(19.23)	30(50.00)	14.100	<0.001
中危	17(32.69)	18(30.00)		
高危	25(48.08)	12(20.00)		
免疫分型				
B-ALL	26(50.00)	31(51.67)	0.066	1.000
T-ALL	12(23.08)	13(21.67)		
TB-ALL	10(19.23)	11(18.33)		
Ph ⁺ ALL	4(7.69)	5(8.33)		

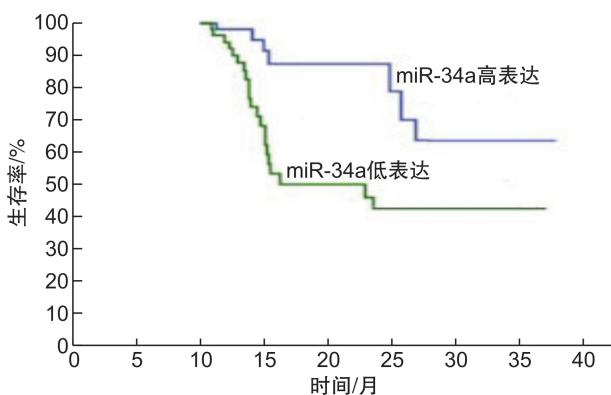


图 1 血浆 miR-34a 表达水平与预后的关系

2.5 影响 ALL 患者总生存率的多因素分析

将表 1 单因素分析中有统计学意义 ($P < 0.05$) 的影响因素设为变量进行赋值 (WBC $\geq 48 \times 10^9/L = 1, < 48 \times 10^9/L = 0$; LDH $\geq 250 U/L = 1, < 250 U/L = 0$; 骨髓母细胞比例 $\geq 72\% = 1, < 72\% = 0$; 危险度分型为高危 = 1、低、中危 = 0; miR-34a 低表达 = 1, 高表达 = 0) 多因素 Cox 回归分析显示, WBC、骨髓原始细胞、危险度分型及 miR-34a 是总生存率的危险因素 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 影响 ALL 患者总生存率的多因素分析

变量	β	SE	Wald χ^2	<i>P</i>	OR	95%CI
WBC	0.356	0.112	10.103	0.002	1.428	1.146~1.778
LDH	0.371	0.123	9.098	0.003	1.449	1.139~1.844
骨髓母细胞	0.339	0.106	10.228	0.001	1.404	1.140~1.728
危险度分型	0.328	0.109	9.055	0.003	1.388	1.121~1.719
miR-34a	0.386	0.112	11.878	0.001	1.471	1.181~1.832

3 讨论

ALL 是血液系统恶性肿瘤, 占急性白血病的 70% 以上。临床常采用化疗治疗, 但长期化疗可能会对肝肾功能、血液和神经系统造成不良反应, 并增加死亡率^[10]。miRNA 是非编码小分子 RNA,

能够结合靶基因序列, 介导细胞增殖、分化; 还发挥肿瘤抑制作用。miR-34a 属于 miRNA 家族中的一员, 位于人类染色体 1p36.22, 近年来已有不少研究观察到其在 AML 中表达异常, 并参与 ALL 的发生和发展, 可辅助诊断并评估预后^[11-12]。

本研究结果显示,观察组血浆 miR-34a 水平低于对照组,说明 miR-34a 参与 ALL 发生发展,高表达的血浆 miR-34a 水平可抑制细胞分化和迁移,并抑制肿瘤生长和转移,可能与染色体易位有关。同时本研究进一步分析不同病理特征的血浆 miR-34a 水平表达的差异,结果显示 miR-34a 低表达患者 WBC、LDH、骨髓母细胞比例及危险分级高于 miR-34a 高表达患者,提示 miR-34a 可在一定程度反映患者的疾病程度,进一步说明血浆 miR-34a 水平与 WBC、LDH、骨髓母细胞比例及危险分级具有相关性,可能是由于 miR-34a 水平可促使 ALL 患者骨髓原始细胞比例提升癌细胞恶性程度,使危险分级上升;并损害免疫功能,从而影响 WBC 水平、LDH 及骨髓母细胞比例。本研究发现,PR 组血浆 miR-34a 水平低于 CR 组及对照组, NR 组血浆 miR-34a 水平低于其余各组,提示血浆高表达可以预测老年 ALL 患者具有较高的治疗反应率,且 miR-34a 低表达的总生存率低于高表达患者,与李晖等^[13]报道一致,说明血浆 miR-34a 水平对 ALL 患者具有一定的预测价值,血浆 miR-34a 水平越高, ALL 生存期越好,这可能是因为 miR-34a 的高表达通过调控多个靶基因抑制细胞生长和转移,从而使疾病严重程度较低,生存时间较长。并可促进细胞对化疗药物的敏感性,从而提高患者的生存期,且多因素 Cox 回归分析显示, WBC、骨髓原始细胞、危险度分型及 miR-34a 是总生存率的危险因素,进一步证实血浆 miR-34a 水平与预后具有相关性,因此临床应监测血浆 miR-34a 水平,并进行针对性干预,以提高治疗效果并改善预后。本研究还存在不足,纳入样本量较少,且未分析 WBC、骨髓原始细胞、危险度分型与生存率关系,下一步研究将扩大样本量进一步论证。

综上所述,血浆 miR-34a 表达水平与 ALL 患者疗效与预后密切相关,血浆 miR-34a 水平越高患者疗效及预后较好,值得临床进一步推广应用。

参考文献

- [1] 江倩,李宗儒. 微小残留病在急性淋巴细胞白血病中的意义[J]. 临床血液学杂志, 2020, 33(1): 6-11.
- [2] Sun Y, Zhu H, Song J, et al. Expression of Leukocytic Syncytin-1 in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia and Acute Myeloid Leukemia Patients[J]. Clin Lab, 2017, 63(10): 1567-1574.
- [3] 何旭,杨昆,胡银山,等. 急性淋巴细胞白血病患者血浆 miR150、miR155、miR233 水平变化及其意义[J]. 山东医药, 2018, 58(19): 72-74.
- [4] 侯秋苹,任妍,付敏,等. 微小 RNA-34a 调控儿童急性淋巴细胞白血病细胞 CEM/C1 生长和迁移的分子机制研究[J]. 安徽医药, 2020, 24(12): 2512-2515.
- [5] Jiang Q, Wu C, Zhang Q. microRNA-34a participates in lipopolysaccharide mediated sepsis related renal function impairment via Kruppel-like factor 4 [J]. Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue, 2018, 30(4): 351-354.
- [6] Muangpaisarn P, Jampoka K, Payungporn S, et al. Serum microRNA-34a is potential biomarker for inflammation in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Nephron Clin Pract, 2017, 10(2): 163-171.
- [7] 陈海敏,韦苇,彭嵘,等. R-ISS 分期系统在初发 412 例多发性骨髓瘤中的临床应用[J]. 中国实验血液学杂志, 2019, 27(1): 110-114.
- [8] 刘宜平,胡宏,许芳,等. miR-34a 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的表达与临床预后的关系[J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25(2): 455-459.
- [9] 杨春华,迟永生,沈志鸿,等. 复方丹参注射液联合伊马替尼对急性淋巴细胞白血病患者 P-糖蛋白、P53 蛋白水平及心血管功能的影响[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(2): 425-428.
- [10] Sun Y, Zhu H, Song J, et al. Expression of Leukocytic Syncytin-1 in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia and Acute Myeloid Leukemia Patients[J]. Clin Lab, 2017, 63(10): 1567-1574.
- [11] Li FY, Fan TY, Zhang H, et al. Demethylation of miR-34a upregulates expression of membrane palmitoylated proteins and promotes the apoptosis of liver cancer cells[J]. World J Gastroenterol, 2021, 27(6): 470-486.
- [12] 邓晶,王敏,谢环. 宫颈癌患者组织和血液 miR-21 和 miR-34a 表达及诊断意义[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2019, 33(6): 566-568.
- [13] 李晖,陈开澜,蔡玮. 急性髓系白血病患者骨髓中 miR-34 表达变化及其与预后的关系[J]. 山东医药, 2018, 58(5): 73-75.

(收稿日期:2021-03-02)