

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 09. 001

慢性免疫性血小板减少症患者 miR-491-5p 表达情况及临床意义^{*}

周 艳¹, 钱 琤^{2△}

(1. 安徽省滁州市第一人民医院检验科 239000; 2. 中国人民解放军第 904 医院检验科, 江苏苏州 215007)

摘 要:目的 研究 micro-RNA(miR)-491-5p 在慢性免疫性血小板减少症(ITP)患者外周血单个核细胞(PBMC)中的表达及临床意义。方法 收集滁州市第一人民医院健康体检者 38 例(健康对照组), 慢性 ITP 患者 38 例(慢性 ITP 组), 其中治疗后缓解组为 26 例, 未缓解组 12 例。所有研究对象均采集外周静脉血 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(RT-PCR)的方法检测 miR-491-5p 的表达量; 采用 Pearson 相关分析慢性 ITP 患者 miR-491-5p 与血小板计数之间的相关性。应用 ROC 曲线分析 miR-491-5p 分子标志物的诊断价值。结果 慢性 ITP 组与健康对照组相比, miR-491-5p 的表达增高; 治疗后与治疗前比较, PBMC 的 miR-491-5p 的表达下降; 慢性 ITP 患者 PBMC 中 miR-491-5p 的表达量与血小板计数呈负相关($r=-0.661\ 2, P<0.05$)。慢性 ITP 患者 PBMC 的 miR-491-5p ROC 曲线下面积为 0.929 4。结论 miR-491-5p 参与慢性 ITP 的发病过程, 有望成为慢性 ITP 诊断治疗、预后实时监测的标志物。

关键词:miR-491-5p; 外周血单个核细胞; 慢性免疫性血小板减少症

中图法分类号:R392.11

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)09-1153-03

Increasing expression of miR-491-5p in patients with primary immune thrombocytopenia and clinical significance^{*}

ZHOU Yan¹, QIAN Cheng^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Chuzhou First People's Hospital, Chuzhou, Anhui 239000, China;

2. Department of Clinical Laboratory, No. 904 Hospital of PLA, Suzhou, Jiangsu 215007, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of micro-RNA (miR)-491-5p in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of primary immune thrombocytopenia(ITP) patients, and further to explore its clinical significance. **Methods** From 2016 to 2018, 38 cases of ITP patients and 38 healthy subjects were collected from Chuzhou first people's hospital, after treatment, there were 26 cases in the remission group and 12 cases in the non-remission group. Peripheral blood were tested, PBMC were separated and total RNA was extracted from the cells, cDNA was synthesized by reverse transcription, U6 used as an internal reference, then the expression of miR-491-5p were tested by real-time fluorescent quantitative PCR (RT-PCR); Pearson correlation analysis was to measure the relation between miR-491-5p and platelet count. Receiver operator characteristic curves were used to confirm the performance of miR-491-5p. **Results** Compared with the healthy control group, the expression of miR-491-5p increased in PBMC of chronic ITP group. After treatment, the expression of miR-491-5p decreased. The miR-491-5p level in ITP patients was negatively correlated with the platelet counts ($r=-0.661\ 2, P<0.05$). The area under curve (AUC) for miR-491-5p in ITP patients was 0.929 4. **Conclusion** MiR-491-5p is involved in the pathogenesis of ITP, which would be a marker for the diagnosis, treatment and monitoring of ITP in the future.

Key words:miR-491-5p; peripheral blood mononuclear cells; primary immune thrombocytopenia

原发免疫性血小板减少症(ITP)是一种原因不明的获得性自身免疫病, 主要发病机制有两个方面: 一是由免疫介导的抗血小板抗体致敏的血小板被单核巨噬细胞系统破坏增多, 二是由于骨髓巨核细胞成熟

障碍, 产生的血小板减少。慢性 ITP 表现为血小板减少(血小板计数 $<100\times10^9/L$), 且持续超过 12 个月^[1]。其发病机制迄今尚未明确, 目前认为可能与机体免疫功能失调、血小板相关抗体产生、免疫细胞介

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81701608, 81501397, 81501398); 中国博士后科学基金资助项目(2017M623440); 军队重点科研基金资助项目(15ZD009)。

作者简介: 周艳, 女, 主管技师, 主要从事免疫学及免疫学检验方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: qiancheng824@163.com。

导的血小板凋亡等有关^[2]。

micro-RNA(miR)是广泛存在于真核生物中的一种长度为 21~23 个核苷酸的非编码 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^[3]。miR 参与生命过程中一系列的重要进程,包括早期发育、细胞增殖、细胞凋亡、细胞死亡、脂肪代谢和细胞分化。因此,在疾病状态下通常会有 miR 的异常表达^[4]。本研究通过对慢性 ITP 患者外周血单个核细胞(PBMC)中 miR-491-5p 在不同疾病状态表达水平的研究,分析其与血小板计数之间的相关性,通过 ROC 曲线评估 miR-491-5p 诊断慢性 ITP 的价值,为临床慢性 ITP 诊断和预后监测提供新的依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取滁州市第一人民医院血液科 2016—2018 年收治的慢性 ITP 患者 38 例(慢性 ITP 组),其中男 13 例,女 25 例,年龄 17~83 岁。诊断标准符合《成人原发免疫性血小板减少症诊断与治疗中国专家共识(2016 年版)》^[1],血小板减少持续超过 12 个月。其中经治疗后缓解 26 例,男 10 例,女 16 例,年龄 23~83 岁。同时选取 38 例体检中心健康体检者(健康对照组),男 15 例,女 23 例,年龄 24~76 岁。

1.2 仪器与试剂 逆转录试剂盒和 PCR 试剂盒购自 Takara 公司;Trizon 试剂(In-vitro gen 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 5417R 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。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 每例标本取抗凝血 2 mL,所有标本在 2 h 内处理完毕并保存在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱待检。PBMC 分离和总 RNA 提取:所有患者在治疗前用乙二胺四乙酸二钾(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。cDNA 的合成及实时荧光定量 PCR(RT-PCR)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,用逆转录试剂盒进行逆转录,采用 PCR 试剂盒(Takara 公司)进行核酸扩增,逆转录和 PCR 条件及试验过程严格按照试剂盒说明书作。

1.2.2 治疗方案 (1)大剂量地塞米松(40 mg/d $\times$ 4 d)。(2)泼尼松(1.0 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹)。(3)慢性 ITP

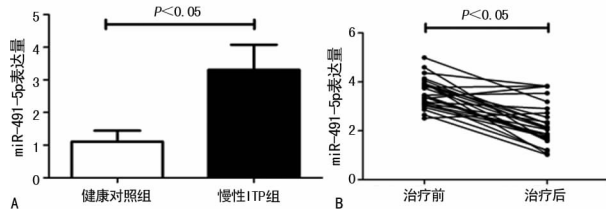
的紧急治疗、不耐受肾上腺糖皮质激素、脾切除术前准备、妊娠或分娩等患者可加用人免疫球蛋白(IVIG, 400 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹ $\times$ 5 d 或 1 000 mg/kg 给药 1 次)。

1.2.3 分组标准 将 38 例慢性 ITP 患者按上述方案治疗后,血小板 $\geq 100\times 10^9$ /L 且病情稳定的患者为缓解组,共 26 例;血小板 $<100\times 10^9$ /L 的患者或治疗有效但复发的患者为未缓解组,共 12 例。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5 进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用独立样本 *t* 检验,相关性分析采用 Pearson 相关分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 PBMC miR-491-5p 的表达 慢性 ITP 组与健康对照组 PBMC miR-491-5p 的表达比较增高,差异有统计学意义($P<0.05$);治疗后缓解组与未缓解组 PBMC miR-491-5p 的表达相比下降,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1。



注:A 为慢性 ITP 组与健康对照组比较;B 为慢性 ITP 组治疗前后的比较

图 1 各组 PBMC miR-491-5p 的表达

2.2 相关性分析 38 例慢性 ITP 患者 PBMC miR-491-5p 与血小板计数呈负相关($r=-0.661\ 2$, $P<0.05$),见图 2。

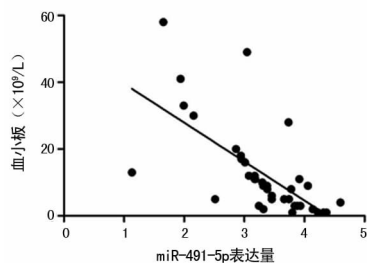


图 2 慢性 ITP 患者 PBMC miR-491-5p 与血小板计数相关分析

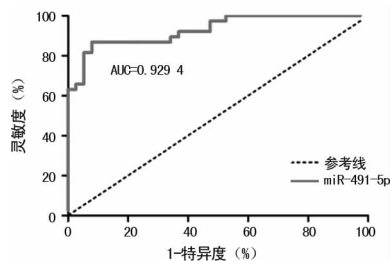


图 3 慢性 ITP 患者 PBMC miR-491-5p ROC 曲线

2.3 慢性 ITP 患者 PBMC miR-491-5p 表达的 ROC

曲线下面积 应用 ROC 曲线分析 miR-491-5p 水平对慢性 ITP 的诊断价值。在 76 例检测对象中,以慢性 ITP 患者为对象,利用 Graphpad 软件做出 ROC 曲线,并分析相关的各种参数。如图 3 所示,曲线下面积达到 0.929 4。利用约登指数最大的原则,判断出 miR-491-5p 的最佳临界值为 1.547,对应的灵敏度、特异度分别为 86.84% 和 92.11%。

3 讨论

ITP 既往被称为特发性血小板减少性紫癜,2009 年国际 ITP 工作组重新命名,明确了 ITP 的发病机制与免疫系统有关,并指出了其临床表现不一定都有紫癜和出血。临床上非免疫因素所致血小板减少和继发性免疫性血小板减少的疾病很多,但实验室检查缺乏特异性指标,故目前 ITP 的诊断主要依靠临床排除性诊断。

miR 是一种保守的小 RNA,miR 不仅在基因位置上保守,序列上也呈现出高度的同源性,miR 高度的保守性与其功能的重要性有着密切的关系。miR-491-5p 属于 miR-491 家族,位于 9p21.3 脆性位点。近年来,国内外越来越多的研究表明,miRNA 在众多疾病中表达异常,可能参与了疾病的发生、发展。QI 等^[5]研究发现,在多形性胶质母细胞瘤(GBM)细胞和组织中 miR-491 表达明显减少,miR-491 表达与 TRIM28 蛋白水平呈负相关,miR-491 通过靶向 TRIM28 调控胶质瘤细胞体外增殖。YU 等^[6]研究发现 miR-491 参与免疫系统调控,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 细胞产生干扰素- γ (IFN- γ)。miR-491 可以作为 T 淋巴细胞(尤其是 CD8⁺ T 细胞)在肿瘤环境中的负调控因子,可能是抗肿瘤免疫治疗的新靶点。XU 等^[7]研究发现,miR-491-5p 的表达抑制了前列腺癌(PCa)细胞的增殖、迁移和侵袭能力,miR-491-5p 直接靶向血小板衍生生长因子受体(PDGFR α),与 PDGFR α 表达呈负相关,作为 PCa 的抑癌基因,可作为 PCa 患者的治疗生物标志物。YU 等^[8]研究发现,与非癌组织相比,miR-491-5p 在胃癌(GC)组织中明显下降,且 miR-491-5p 低水平与肿瘤大小有关,通过对 SNAIL 和 FGFR4 的调控诱导上皮细胞-间充质转化(EMT),miR-491-5p 的下调促进了 GC 的转移,并 miR-491-5p 有望于作为 GC 治疗的潜在靶点。

本研究采用 RT-PCR 方法检测慢性 ITP 患者 PBMC 中 miR-491-5p 的表达水平,慢性 ITP 组患者与健康对照组相比,miR-491-5p 的表达增高,提示

miR-491-5 可能参与调控 ITP 的发生。此外,本研究发现慢性 ITP 患者 PBMC 中 miR-491-5p 的表达量与其血小板计数呈负相关。一般情况下,血小板计数越低,说明患者病情越严重。由此可见,miR-491-5p 可能参与了 ITP 疾病的发展,其表达水平一定程度上和疾病的严重程度相关。ITP 患者经过有效治疗后,PBMC miR-491-5p 的表达水平较治疗前明显下降,这证明了 miR-491-5p 与 ITP 的预后相关,可以用于 ITP 的病情监测。ROC 曲线分析,曲线下面积达到 0.929 4,灵敏度和特异度分别为 86.84% 和 92.11%,提示其具有很高的诊断价值。

综上所述,PBMC miR-491-5p 参与了 ITP 疾病的发生、发展及预后,为临床慢性 ITP 患者的临床诊断、病情监测及预后提供了新的方法和途径。对于 miR-491-5p 在 ITP 中作用的靶基因,以及 miR-491-5p 在 ITP 发病机制中的具体作用还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 中华医学会血液学分会止血与血栓学组. 成人原发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.
- [2] 郑敏,罗建明. 特发性血小板减少性紫癜 B 淋巴细胞异常研究进展[J]. 实用儿科临床杂志,2010,25(3):222-224.
- [3] BARTELL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell,2004,116(2):281-297.
- [4] WIENHOLDS E,PLASTERK R H. MicroRNA function in animal development[J]. FEBS Lett,2005,579(26):5911-5922.
- [5] QI Z X,CAI S Y,CAI J J,et al. miR-491 regulates glioma cells proliferation by targeting TRIM28 in vitro[J]. BMC Neurol,2016,16(1):248.
- [6] YU T,ZUO Q F,GONG L,et al. MicroRNA-491 regulates the proliferation and apoptosis of CD8(+) T cells[J]. Sci Rep,2016,6(6):30923.
- [7] XU Y J,HOU R,LU Q J,et al. MiR-491-5p negatively regulates cell proliferation and motility by targeting PDGFR α in prostate cancer[J]. Am J Cancer Res,2017,7(12):2545-2553.
- [8] YU T,WANG L N,LI W,et al. Downregulation of miR-491-5p promotes gastric cancer metastasis by regulating SNAIL and FGFR4[J]. Cancer Sci,2018,109(5):1393-1403.

(收稿日期:2018-08-22 修回日期:2018-12-18)