

## miR-639在骨髓增生异常综合征中的表达及其靶基因预测

张绪萍 黄莹 李虹颖 文静 邓东红 程鹏 赵卫华 罗军 赖永榕 刘振芳

**Identification of miR-639 expression in myelodysplastic syndrome and its target gene prediction** Zhang Xupai, Huang Ying, Li Hongying, Wen Jing, Deng Donghong, Cheng Peng, Zhao Weihua, Luo Jun, Lai Yongrong, Liu Zhenfang  
Corresponding author: Liu Zhenfang, Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China. Email: liulizhenfang@126.com

miRNA是一类长为20~28个核苷酸的非编码小RNA,在细胞增殖、凋亡、分化等过程中起重要作用<sup>[1]</sup>。本课题组前期研究显示miR-639在骨髓增生异常综合征(MDS)患者骨髓中呈特异性低表达。为了进一步验证该结论,本研究中我们扩大临床样本,利用RT-PCR检测MDS患者骨髓单个核细胞miR-639的表达情况,分析其与MDS临床特征的相关性,并利用生物信息学预测miR-639在MDS中的潜在靶基因。

### 病例与方法

1. 临床资料:病例选自2011年至2014年在广西医科大学第一附属医院血液内科诊治的70例MDS患者(男44例,女26例,中位年龄55.0岁),其中18例MDS患者转化为急性髓系白血病(AML)。MDS的诊断参照“骨髓增生异常综合征诊断与治疗中国专家共识(2014版)”,患者均为初诊或者入选前未进行放、化疗,未合并其他血液肿瘤及严重的消耗性疾病,同时我们收集患者的临床资料(包括血常规、骨髓原始细胞比例、染色体核型)。染色体重复、易位、缺失、复杂核型定义为异常核型,70例患者中正常核型42例,异常核型28例。正常对照组选取同期性别、年龄相匹配的19名健康志愿者及异基因造血干细胞供者(男11名,女8名,中位年龄43.0岁)。对照组均符合正常献血员的标准。本研究经我院伦理委员会批准,标本的获得均经研究对象知情同意并签署知情同意书。

2. RT-PCR检测miR-639表达:取MDS患者和正常对照组骨髓后分离单个核细胞,用TRIzol试剂(美国Invitrogen公

司产品)提取总RNA并验证RNA浓度和纯度。取检测合格的700 ng RNA样本,按照使用说明书分别加入dNTP 2  $\mu$ l、10 $\times$ Buffer 2  $\mu$ l、PCR特异性引物(上海百力格生物技术有限公司产品)0.3  $\mu$ l、M-MLV逆转录酶0.2  $\mu$ l、RNA酶抑制剂0.3  $\mu$ l,加入无RNA酶水至20  $\mu$ l配制成PCR混合反应液,然后在Gene Amp 9700 PCR仪(美国Applied Biosystems公司产品)进行反应。将逆转录成的cDNA在ViiA 7 RT-PCR仪(美国Applied Biosystems公司产品)上完成PCR反应。反应体系如下:2 $\times$ Master Mix 5  $\mu$ l,上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各0.5  $\mu$ l,加双蒸水至总体积为8  $\mu$ l。其中PCR特异引物(GSP)由Primer 5.0设计完成(U6:上游引物:5'-GCTTCGGCAGCA-CATATACTAAAAT-3',下游引物:5'-CGCTTCACGAATTT-GCGTGTGCAT-3';miR-639:GSP:5'-CGCTGCGGTTGCGAG-3',下游引物:5'-GTGCGTGTGCTGGAGTCG-3')。反应条件:95  $^{\circ}$ C 10 min;95  $^{\circ}$ C 10 s,60  $^{\circ}$ C 60 s,40个循环;95  $^{\circ}$ C 10 s,60  $^{\circ}$ C 60 s,95  $^{\circ}$ C 15 s,并从60  $^{\circ}$ C缓慢加热至99  $^{\circ}$ C。每组样本设3个复孔,取平均Ct值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-639的相对表达量。

3. miR-639靶基因的预测:运用Microcosm (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/>)、Miranda (<http://www.microna.org/microna/>)和Targetscan (<http://www.targetscan.org/>)三种在线软件预测miR-639的靶基因,取三者交集作为潜在的靶基因。

4. 靶基因的功能分析:Gene Ontology分析(GO)采用Cytoscape (<http://www.cytoscape.org>)及其插件BiNGO对miR-639潜在靶基因进行功能分析。根据GO注释中分子功能、生物学过程、细胞组分进行GO注释层次分类和富集分析,并用BiNGO对相应的GO注释进行显著性分析。采用KEGG公共数据库(<http://www.genome.jp/>)对潜在的靶基因进行信号转导通路分析。

5. 统计学处理:采用SPSS 17.0对数据进行统计分析。均数间的比较用 $t$ 检验(符合正态分布),分类资料间的比较用 $\chi^2$ 检验。miR-639的表达量与临床特征的相关性采用Spearman秩相关及列联表相关性分析。GO分析和KEGG信号转导通路分析中用Fisher确切概率计算。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 结果

1. miR-639在MDS中的相对表达量:相对于对照组,miR-639在MDS组骨髓中表达水平平均降低( $0.61 \pm 0.31$ 对 $0.95 \pm 0.30$ , $t = -4.125$ , $P < 0.001$ )。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.02.014

基金项目:国家自然科学基金(81160072、81560028);广西省自然科学基金(2010GXNSFB013064)

作者单位:530021 南宁,广西医科大学第一附属医院血液内科(张绪萍、黄莹、文静、邓东红、程鹏、赵卫华、罗军、赖永榕、刘振芳);南宁市第一人民医院血液内科(李虹颖)

通信作者:刘振芳,Email:liulizhenfang@126.com

2. miR-639 相对表达量与 MDS 患者临床特征的相关性分析: MDS 患者染色体情况与 miR-639 的相对表达量有相关性( $C=0.378, P=0.010$ ), 并且染色体异常组 miR-639 的相对表达量低于正常组( $0.54 \pm 0.29$  对  $0.79 \pm 0.31, t=-2.500, P=0.015$ )。MDS 患者外周血常规与 miR-639 表达量之间均无明显相关性(ANC:  $r=0.033, P=0.829$ ; HGB:  $r=-0.036, P=0.809$ ; PLT:  $r=-0.148, P=0.326$ ), 骨髓原始细胞比例与 miR-639 的相对表达量呈负相关( $r=-0.527, P<0.001$ )。

3. miR-639 靶基因的预测: Microcosm、Miranda 和 Targetscan 三种在线软件进行 miR-639 靶基因预测分别有 847、868、15 个候选靶基因, 取三者的交集得到共同的 4 个潜在靶基因, 分别为 IRX1 (ID: 79192)、KIAA1267 (ID: 284058)、POU2F2 (ID: 5452)、TBR1 (ID: 10716)。

4. 潜在靶基因的功能分析: 针对以上预测的 miR-639 的 4 个潜在靶基因进行 GO 分析以探究其生物学功能, 并投射到分子功能、生物学过程和细胞组分三大功能上, 结果显示潜在靶基因在分子功能上主要富集于有机环化合物、DNA、核酸等的结合和特定序列 DNA、核酸结合转录因子的活性(表 1), 在生物学过程上主要富集于 RNA 生物合成过程、转录过程等的调控(表 2), 在细胞组分上主要富集于细胞核、胞内膜结合细胞器等(表 3)。利用 KEGG 公共数据库对潜在靶基因进行信号转导通路富集分析, 尚未得到相关信号转导通路。

### 讨 论

研究表明 miR-639 在多种肿瘤中表达异常, 参与了肿瘤

表 1 miR-639 潜在靶基因 GO 分析分子功能分类结果(部分)

GO 编号	分子功能	基因
0043565	结合特定序列 DNA	IRX1 POU2F2 TBR1
1901363	结合杂环化合物	IRX1 POU2F2 TBR1
0097159	结合有机环化合物	IRX1 POU2F2 TBR1
0003677	结合 DNA	IRX1 POU2F2 TBR1
0003676	结合核苷酸	IRX1 POU2F2 TBR1
0003700	特定序列 DNA 结合转录因子活性	POU2F2 TBR1
0001071	核酸结合转录因子活性	POU2F2 TBR1

表 2 miR-639 潜在靶基因 GO 分析生物学过程分类结果(部分)

GO 编号	生物学过程	基因
0051252	RNA 代谢过程的调控	IRX1 POU2F2 TBR1
2001141	RNA 生物合成过程的调控	IRX1 POU2F2 TBR1
0006355	DNA 模板转录的调控	IRX1 POU2F2 TBR1
0006351	DNA 模板转录	IRX1 POU2F2 TBR1
0060255	大分子代谢过程的调控	IRX1 POU2F2 TBR1
0032774	RNA 生物合成	IRX1 POU2F2 TBR1
0016070	RNA 代谢	IRX1 POU2F2 TBR1

表 3 miR-639 潜在靶基因 GO 分析细胞组分分类结果(部分)

GO 编号	细胞组分	基因
0005634	细胞核	IRX1 POU2F2 TBR1
0043231	胞内膜结合细胞器	IRX1 POU2F2 TBR1
0043227	膜结合细胞器	IRX1 POU2F2 TBR1
0043226	细胞器	IRX1 POU2F2 TBR1
0043229	胞内细胞器	IRX1 POU2F2 TBR1
0044424	胞内成分	IRX1 POU2F2 TBR1
0044464	细胞成分	IRX1 POU2F2 TBR1

的发生、发展。其中, 在舌鳞状细胞癌系中显著低表达, 并与肿瘤的转移及患者的低生存率有关<sup>[2]</sup>, 在膀胱癌组织中出现表达上调并后续验证在患者血清中同样出现表达升高<sup>[3]</sup>, 在转移型乳腺癌组织和细胞系中呈现高表达且促进肿瘤的转移及侵袭<sup>[4]</sup>。但 miR-639 在白血病、淋巴瘤等血液系统恶性肿瘤中的研究尚未见文献报道。本研究我们发现 miR-639 在 MDS 患者中表达明显下调。目前, MDS 的危险度评分主要依赖于外周血常规、骨髓原始细胞比例及染色体情况。因此我们将 miR-639 的表达量与这些临床资料做相关性分析, 结果发现 MDS 患者染色体异常与否与 miR-639 的相对表达量有相关性, 并且染色体异常组相比于正常组 miR-639 的相对表达量低, MDS 患者外周血常规与其表达量之间无明显相关性, 但骨髓原始细胞比例与 miR-639 的相对表达量呈负相关。由此可见, miR-639 的表达水平可能与 MDS 骨髓病态造血有关。临床上我们常根据这些临床病理特征评估 MDS 患者疾病的状态, 但仅通过以上指标有一定的局限性。由于 miR-639 的表达量与骨髓原始细胞比例呈负相关及与染色体核型异常有关, 提示 miR-639 可以协助外周血、骨髓原始细胞比例等运用于临床, 指导 MDS 早期诊断及治疗。

另外, 我们对 miR-639 的靶基因进行预测, 为了减少假阳性率, 取预测靶基因的交集, 得到 4 个潜在靶基因。对 miR-639 潜在靶基因相关文献进行分析, IRX1 作为抑癌基因在胃癌和头颈部鳞状细胞癌中低表达, 其抑癌作用主要表现在抑制肿瘤侵袭及增殖<sup>[5-6]</sup>。TBR1 主要参与神经干细胞的发生过程, 其编码的转录因子主要表达于大脑皮层、海马及嗅球<sup>[7-8]</sup>。POU2F2 在转移型胃癌细胞系、胃癌、胰腺癌<sup>[9]</sup>和培养的霍奇金/R-S 细胞中表达上调。由 POU2F2 编码的 OCT2 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中起到致癌因子的作用<sup>[10]</sup>。KIAA1267(KANSL1) 主要与 17q21.31 缺失综合征有关, 同时存在 KIAA1267 表达水平的降低<sup>[11]</sup>。KIAA1267 参与抑癌基因 TP53 的乙酰化<sup>[12]</sup>, KIAA1267 突变破坏 TP53 的功能而导致白血病。根据 miRNA 对靶基因的负调控, 在 MDS 患者中表达下调的 miR-639, 其靶基因表达上调及致癌作用。通过靶基因功能分析及相关文献分析总结, 最终得出 POU2F2 可能为 miR-639 在参与 MDS 病理过程中的直接靶基因。

POU2F2 是一种 B 细胞特异性转录因子, 其正常表达于

B 细胞中,参与免疫球蛋白、B 细胞增殖及分化基因的表达<sup>[13]</sup>。在转移型胃癌细胞系及胃癌患者中 POU2F2 表达上调,并促进癌细胞的转移;在胰腺癌<sup>[9]</sup>和培养的霍奇金/R-S 细胞中 POU2F2 表达上调;由 POU2F2 编码的 OCT2 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中起到致癌因子作用<sup>[10]</sup>。POU2F2 可以直接引起 ROBO1 的转录,ROBO1 作为一种单通道膜受体与 SLIT 家族配体相互作用致肿瘤细胞的转移。在发现的三种 SLIT 蛋白(SLIT1-3)中,SLIT1 特异表达于脑组织中<sup>[14]</sup>,SLIT3 在胃癌组织中表达下调,因此我们推测 POU2F2 可能通过 SLIT2/ROBO1 信号通路参与肿瘤的病理过程。研究表明在 MDS 发病中存在 ROBO1 突变及 SLIT2/ROBO1 信号通路在 MDS 疾病进展中起到重要的作用<sup>[15]</sup>。上调表达的 POU2F2 使膜受体 ROBO1 表达升高,从而增加了 ROBO1 突变的概率。ROBO1 纤连蛋白和细胞内区域的突变不再起到促进凋亡、抑制增殖的作用,破坏 SLIT2/ROBO1 信号通路致使细胞增殖与凋亡失衡,从而加速 MDS 的进展。同时,在胃癌患者细胞中 POU2F2 的高表达与 NF- $\kappa$ B 的过度激活有关,在培养的霍奇金/R-S 细胞中 POU2F2 和 NF- $\kappa$ B 高表达。因此我们推测 POU2F2 在肿瘤中高表达与 NF- $\kappa$ B 的激活有关。NF- $\kappa$ B 是一种调控凋亡的重要因子,活化的 NF- $\kappa$ B 诱导抗凋亡蛋白的表达,从而抑制细胞凋亡导致细胞无限增殖。通过对 NF- $\kappa$ B 的活化,IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  会诱导 MDS 原始细胞表达 B7-H1 并与 PD-1 结合导致 MDS 原始细胞增殖<sup>[16]</sup>。因此,我们推测低表达的 miR-639 通过负调控使 POU2F2 表达升高,可能通过破坏 SLIT2/ROBO1 信号通路和激活 NF- $\kappa$ B 参与 MDS 的病理过程。

本研究我们通过检测 MDS 患者骨髓中 miR-639 的表达情况,并通过对 miR-639 靶基因进行预测并结合文献报道,推测 POU2F2 可能作为 miR-639 的直接靶基因参与 MDS 病理过程。但目前关于预测 miRNA 靶基因的数据库仍不够完善,预测结果可能存在假阳性。因此,后续仍需对 miR-639 靶基因进行验证。

### 参考文献

- [1] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. *Nature*, 2004, 431(7006):350-355. DOI: 10.1038/nature02871.
- [2] Lin Z, Sun L, Chen W, et al. miR-639 regulates transforming growth factor beta-induced epithelial-mesenchymal transition in human tongue cancer cells by targeting FOXC1 [J]. *Cancer Sci*, 2014, 105(10):1288-1298. DOI: 10.1111/cas.12499.
- [3] Scheffer AR, Holdenrieder S, Kristiansen G, et al. Circulating microRNAs in serum: novel biomarkers for patients with bladder cancer? [J]. *World J Urol*, 2014, 32(2):353-358. DOI: 10.1007/s00345-012-1010-2.
- [4] Li L, Qiu XG, Lv PW, et al. miR-639 promotes the proliferation and invasion of breast cancer cell in vitro [J]. *Cancer Cell Int*, 2014, 14:39. DOI: 10.1186/1475-2867-14-39.
- [5] Guo X, Liu W, Pan Y, et al. Homeobox gene IRX1 is a tumor suppressor gene in gastric carcinoma [J]. *Oncogene*, 2010, 29(27):3908-3920. DOI: 10.1038/onc.2010.143.
- [6] Bennett KL, Karpenko M, Lin MT, et al. Frequently methylated tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(12):4494-4499. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6509.
- [7] Bulfone A, Smiga SM, Shimamura K, et al. T-brain-1: a homolog of Brachyury whose expression defines molecularly distinct domains within the cerebral cortex [J]. *Neuron*, 1995, 15(1):63-78.
- [8] Puelles L, Kuwana E, Puelles E, et al. Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1* [J]. *J Comp Neurol*, 2000, 424(3):409-438.
- [9] Marin-Muller C, Li D, Bharadwaj U, et al. A tumorigenic factor interactome connected through tumor suppressor microRNA-198 in human pancreatic cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(21):5901-5913. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3776.
- [10] Hodson DJ, Shaffer AL, Xiao W, et al. Regulation of normal B-cell differentiation and malignant B-cell survival by OCT2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(14):E2039-2046. DOI: 10.1073/pnas.1600557113.
- [11] Moreno-Igoa M, Hernández-Charro B, Bengoa-Alonso A, et al. KANSL1 gene disruption associated with the full clinical spectrum of 17q21.31 microdeletion syndrome [J]. *BMC Med Genet*, 2015, 16:68. DOI: 10.1186/s12881-015-0211-0.
- [12] Li X, Wu L, Corsa CA, et al. Two mammalian MOF complexes regulate transcription activation by distinct mechanisms [J]. *Mol Cell*, 2009, 36(2):290-301. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.07.031.
- [13] Friedl EM, Matthias P. Transcriptional activation and repression, two properties of the lymphoid-specific transcription factor Oct-2a [J]. *Eur J Biochem*, 1995, 234(1):308-316.
- [14] Wu JY, Feng L, Park HT, et al. The neuronal repellent Slit inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors [J]. *Nature*, 2001, 410(6831):948-952. DOI: 10.1038/35073616.
- [15] Xu F, Wu LY, Chang CK, et al. Whole-exome and targeted sequencing identify ROBO1 and ROBO2 mutations as progression-related drivers in myelodysplastic syndromes [J]. *Nat Commun*, 2015, 6:8806. DOI: 10.1038/ncomms9806.
- [16] Ishibashi M, Tamura H, Ogata K. Disease progression mechanism in myelodysplastic syndromes: insight into the role of the microenvironment [J]. *Leuk Res*, 2011, 35(11):1449-1452. DOI: 10.1016/j.leukres.2011.06.022.

(收稿日期:2016-07-08)

(本文编辑:刘爽)