

• 临床检验研究论著 •

免疫性血小板减少性紫癜患者单个核细胞中 microRNA-30a 表达增高及其意义^{*}

叶 辛¹, 张 蕾^{2#}, 石 磊², 谷明莉², 张薇薇², 张建荣², 秦 琴², 钱宝华^{1△}, 邓安梅²

(第二军医大学长海医院: 1. 输血科; 2. 实验诊断科, 上海 200433)

摘要:目的 探讨 microRNA-30a 是否参与了免疫性血小板减少性紫癜(ITP)的发病机制。方法 采用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(FQ-RT-PCR)技术检测 38 例 ITP 患者及 35 例健康者外周血单个核细胞(PBMC)中 microRNA-30a 和 Lyn mRNA 的相对表达量, 并进行统计分析。结果 ITP 患者外周血 PBMC 中 microRNA-30a 表达较健康对照组明显增高($P < 0.01$), 且与血小板计数呈负相关($r^2 = 0.42, P < 0.05$); ITP 患者外周血 PBMC 中 Lyn mRNA 表达较健康对照组明显降低($P < 0.01$), 且与 microRNA-30a 呈负相关($r^2 = 0.33, P < 0.01$)。结论 microRNA-30a 可能通过 Lyn 参与了 ITP 的发病机制。

关键词:免疫性血小板减少性紫癜; microRNA-30a; 实时荧光定量逆转录 PCR

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.24.017

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)24-3308-02

Upregulation of microRNA-30a in peripheral blood mononuclear cells from patients with immune thrombocytopenic purpura and its clinical significance^{*}

Ye Xin¹, Zhang Lei^{2#}, Shi Lei², Gu Mingli², Zhang Weiwei², Zhang Jianrong², Qin Qin², Qian Baohua^{1△}, Deng Anmei²

(1. Department of Transfusion; 2. Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital,

Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract:Objective To investigate whether microRNA-30a may play a role in the pathogenesis of immune thrombocytopenic purpura(ITP). **Methods** The expression of microRNA-30a in the peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) in 38 ITP patients and 35 healthy individuals were detected by RT-PCR. The confirmed target expression of microRNA-30a and Lyn mRNA were detected. The association between microRNA-30a and platelet count of ITP was analyzed. **Results** The expression of microRNA-30a in PBMCs from patients with ITP was increased significantly in contrast to the healthy controls($P < 0.01$), and was negatively correlated with platelet count. The expression of Lyn mRNA was significantly reduced, compared to control subjects($P < 0.01$), and was negatively associated with microRNA-30a. **Conclusion** MicroRNA-30a may play a role in the pathogenesis of ITP and was a potential marker for it.

Key words: immune thrombocytopenic purpura; microRNA-30a; RT-PCR

免疫性血小板减少性紫癜(ITP)是一种以血小板计数下降为特征, 伴或不伴有皮肤黏膜出血的获得性自身免疫性疾病^[1]。迄今为止, 关于 ITP 的发病机制并没有明确的结论, 但是可以肯定免疫因素在其中起主导地位^[2]。研究表明, ITP 中 B 淋巴细胞功能亢进, 产生针对血小板抗原的自身反应性抗体, 导致血小板的破坏增加和生成减少^[3], 但其分子机制还有待进一步阐明。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一种长度在 23 个碱基左右的小分子 RNA, 可通过与靶基因的 3' 非编码区(UTR)结合而对靶基因的表达发挥负向调节作用^[4-5]。近年来研究表明, microRNA 在自身免疫性疾病的发生和发展中发挥着重要作用, 比如 miR-146a、miR-155 等^[6-8]。Liu 等^[9]在系统性红斑狼疮(SLE)患者中发现, miR-30a 可以通过直接作用于靶基因 Lyn, 使得 B 淋巴细胞功能亢进, 提示其可能参与了 SLE 的发病机制。但其在其他自身免疫性疾病中的作用尚不明确。本研究旨在分析 ITP 患者外周血单个核细胞(PBMC)中 microRNA-30a 的相对表达量, 以及与靶基因 Lyn 的表达量和 PLT 计数的相关性, 以初步明确其是否参与了 ITP 的发病机制, 为以后临床治疗提供可能的潜在靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究纳入第二军医大学长海医院和上海同济医院血液科 ITP 患者 38 例, 其诊断标准参照中华医学会血液学会血栓与止血学组 2011 年制定的诊断标准^[10]。其中, 男 12 例, 女 26 例; 平均年龄(45 ± 8)岁。另从同期来院体检者中选择 35 例健康者作为对照组, 男女构成比为 10 : 25, 平均年龄为(43 ± 11)岁。实验组和对照组在年龄和性别构成比上的差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究经过第二军医大学长海医院和上海同济医院伦理委员会批准, 所有受试对象均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 血标本的采集与 PBMC 的分离 对所有纳入的研究对象, 采集空腹静脉血 5 mL, 置于枸橼酸抗凝管中。使用密度梯度离心法分离 PBMCs(Ficoll 分离液购自北京鼎国生物技术有限公司)。

1.2.2 RNA 抽提与反转录 采用 Trizol 法抽提细胞总 RNA, 再反转录为 cDNA, 然后置于 -80°C 冰箱备用。细胞总 RNA 抽提试剂盒及逆转录试剂盒购自北京 Invitrogen 公司。

^{*} 基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2013CB531606); 国家自然科学基金资助项目(81273282, 81202353, 30972730); 上海科委基金资助项目(11JC1410902); 吴阶平基金资助项目(320.6750.13147); 上海杨浦区人才发展资金资助项目(鼎元资金); 长海医院基金资助项目(CH125530300)。作者简介: 叶辛, 男, 在读研究生, 主要从事血液免疫、输血治疗研究。 # 共同第一作者。 △ 通讯作者, E-mail: qianbh1963@163.com。

1.2.3 PCR 扩增 定量 PCR 采用荧光染料 SYBGreen, 以 GAPDH 为内参将逆转录得到的 cDNA 模板进行 PCR 扩增。microRNA-30a 和 Lyn 引物参考文献[9]。内参 GAPDH 引物序列为: 5'-AAA TGG TGA AGG TCG GTG TGA-3'(f), 5'-CCG TTG AAT TTG CCG TGA GTG-3'(r)。引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应条件为: 95 ℃ 5 min 随后 95 ℃ 15 s, 59 ℃ 30 s 循环 40 次。读取每个定量 PCR 反应的阈循环(Ct)值后, 根据公式 $\Delta Ct = [Ct(\text{目的基因})] - [Ct(\text{内参基因})]$ 和 $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct(\text{研究组})] - [\Delta Ct(\text{对照组})]$, 将定量 PCR 结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

1.2.4 实验室资料的获取 患者和对照组的血小板计数均在 Sysmex XE-2100 上完成。

1.3 统计学处理 两组之间比较采用 Mann-Whitney U 检验, 相关性分析采用 Spearman 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有统计都在 SPSS17.0 统计软件中完成。

2 结 果

2.1 microRNA-30a 以及其靶基因 Lyn 在 ITP 患者 PBMC 中的表达 与健康对照相比, ITP 患者中 miR-30a 的相对表达量增高了 2.9 倍, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); Lyn mRNA 的相对表达量下降了 3 倍, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 1。

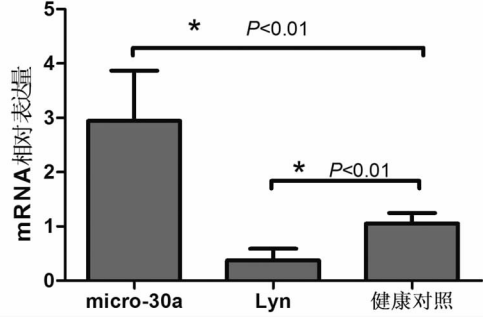


图 1 ITP 患者 PBMC 中 miR-30a 和 Lyn mRNA 相对表达量与健康个体的比较

2.2 ITP 患者 PBMC 中 microRNA-30a 的表达与血小板计数的相关性 miR-30a 与血小板计数呈负相关 ($r^2 = 0.42$, $P < 0.01$), 见图 2。

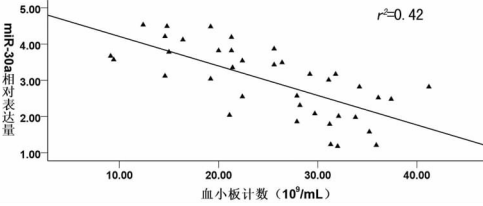


图 2 ITP 患者 PBMC 中 miR-30a 相对表达量与血小板计数的关系

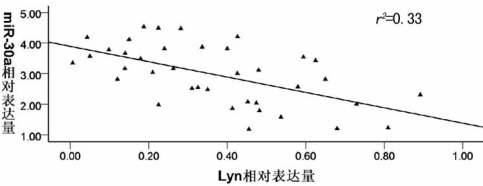


图 3 ITP 患者 PBMC 中 miR-30a 与 Lyn mRNA 相对表达量的关系

2.3 ITP 患者外周血 PBMC 中 microRNA-30a 表达与 Lyn

mRNA 表达的相关性 miR-30a 与其靶基因 Lyn mRNA 表达水平呈负相关 ($r^2 = 0.33$, $P < 0.01$), 见图 3。

3 讨 论

ITP 的发病机制尚未完全阐明, 目前研究均表明细胞免疫功能紊乱起到了关键性作用。在 ITP 患者中, 常发现有自体反应性的 B 细胞功能亢进, 并产生针对血小板的自身抗体, 大部分患者的自身抗体都是对 GPIIb/IIIa 或 GPIb/IX 有特异性[1], 它不仅可以通过网状内皮系统损伤血小板[11], 也可以抑制血小板的产生[12-13]。目前, 针对 ITP 患者的治疗手段还十分有限, 其原因是对于发病机制认识的不足。miRNAs 是一类存在于许多生物体内的短链非编码 RNAs, 近年研究发现, miRNAs 作为一类新型免疫调节分子, 在免疫细胞分化, 免疫耐受建立和许多自身免疫性疾病的发生发展中有重要作用[14-15]。

Lyn 是非受体酪氨酸激酶中 Src 家族中的一种, 主要在 B 细胞内表达, 和许多细胞表面受体有关, 包括 B 细胞抗原受体。Lyn 可以通过抑制性受体, 酶的磷酸化作用, 负向调控信号通路来调控 B 细胞的功能。同时, 它也是许多 B 细胞活化通路的一个重要介质, 诸如 CD19 和 CD180 通路。此外, Lyn 也参与细胞的基础生命活动调节, 包括细胞周期、分化、增殖和凋亡[16]。Lyn 缺陷的小鼠会发生自身免疫性疾病, 血清中会产生自身抗体。另有研究发现, SLE 中 miR-30a 可以通过直接作用于 Lyn mRNA 的 3'UTR, 阻止 B 细胞中 Lyn 的表达, 影响 B 细胞功能, 导致自身免疫疾病的产生。

本研究发现, 在 ITP 患者 PBMC 中 miR-30a 表达增高, 其靶基因 Lyn 表达下降, 并与 miR-30a 呈负相关, 提示 miR-30a 可能通过调节 B 细胞功能亢进参与 ITP 的发病机制。进一步研究其分子机制, 可以为未来治疗提供新的选择。

参考文献

[1] Cines DB, Blanchette VS. Immune thrombocytopenic purpura[J]. N Engl J Med, 2002, 346(13): 995-1008.
[2] Barnard D, Woloski M, Feeny D, et al. Development of disease-specific health-related quality-of-life instruments for children with immune thrombocytopenic purpura and their parents[J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2003, 5(1): 56-62.
[3] Psaila B, Bussell JB. Immune thrombocytopenic purpura[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2007, 21(4): 743-759.
[4] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233.
[5] Kasinski AL, Slack FJ. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(12): 849-864.
[6] Pauley KM, Cha S, Chan EK. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases[J]. J Autoimmun, 2009, 32(3): 189-194.
[7] O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, et al. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder[J]. J Exp Med, 2008, 205(3): 585-594.
[8] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(33): 12481-12486.
[9] Liu Y, Dong J, Mu R, et al. MicroRNA-30a promotes B cell hyperactivity in patients with systemic lupus erythematosus by direct interaction with Lyn[J]. Arthritis Rheum, 2013, (下转第 3311 页)

2.2 患者血清 RBP 与 CysC、Cr 及 Ccr 的相关性 统计学研究表明,在 CysC、Cr 和 Cc 异常的患者组,血清 RBP 与 CysC、Cr 及 Cc 均有明显的相关性(相关系数分别为 0.773、0.778、-0.822);结果表明,血液中 RBP 的变化与 Cc、Cr 和 CysC 反映肾小球滤过功能的指标有明显的相关性,测定血液中 RBP 的水平能在一定程度上反映肾小球滤过功能。

3 讨 论

肾小球滤过功能是肾脏主要功能之一,当肾小球病变导致滤过面积减少、滤过膜损伤,或肾血流量减少,肾小球滤过率可明显下降。作为传统反映肾小球滤过功能的指标,Cr 的灵敏性较差。因为肾脏有强大的储备能力,在肾脏损伤不严重的情况下,余下的肾单位仍能排出日常机体所产生的肌酐等代谢产物,血浆中这些物质浓度变化并不大。只有当肾小球滤过率下降到正常的 50% 以下时,才会引起血清肌酐的升高,说明测定肾小球滤过率比测定肌酐含量更为灵敏。

GFR 的测定是目前临床上用以判断肾排泄功能的重要参数。目前用于测定 GFR 的物质分为外源性和内源性,前者包括菊粉和一些放射性核物质,后者包括 Cr、BUN、UA 和 β 2-MG、RBP 等相对低分子质量蛋白质。菊粉清除率为测定 GFR 的金标准,但测定复杂不适用于临床应用,临床常用内生肌酐清除率。内源性肌酐是肌肉组织的肌酸代谢的终产物,对于具体的个体而言,肌肉质量是恒定的,在膳食中不含肌酐的情况下,血浆肌酐排除了受外源因素的影响,其含量相对恒定并且方法简单。

CysC 能在所有有核细胞表达,其在体内的代谢有稳定的生成速度及循环水平,不受其病理状态的影响;能自由通过肾小球滤过,不被肾小管重吸收和分泌^[2-4]。由于肾脏是清除循环中 CysC 的惟一器官,故血清 CysC 浓度主要由 GFR 决定,即血清 CysC 可准确反映 GFR 变化,当 GFR 下降时,CysC 水平随之上升,且不受炎症、胆红素、溶血、三酰甘油等影响,并与性别、年龄、肌肉量无关。已有研究证明^[5],CysC 的肾清除率与核素⁹⁹Tc DTPA 清除率相同。因此,CysC 是评估肾小球滤过功能的一种敏感性好、特异性高的指标。

RBP 可自由滤过肾小球,近来的研究发现,血液中 RBP 的变化也能在一定程度上反映肾小球的滤过功能^[6-7]。在本研究

中,通过对 114 例临床明确诊断有肾功能损伤的患者和 126 例健康对照血液中 RBP、Ccr、Cr 与 CysC 的测定值进行统计学分析,发现患者血液中 RBP 的含量与血液中 Cr、CysC 和 Ccr 的变化均有明显的相关性,患者组的 RBP、Cr 和 CysC 的测定均值明显的高于健康对照组,Ccr 明显低于健康对照组,差异均具有显著性($P < 0.01$)。结果表明血液中 RBP 的检测是监测肾小球滤过功能损伤的良好指标。但是也应该注意到,血液中 RBP 的水平受肝功能及营养状态的影响,RBP 是由肝细胞粗面内质网合成的蛋白质,当肝细胞损伤时,RBP 的合成受到抑制;RBP 在机体营养不良或应激反应时可迅速下降。因此在判断是否存在肾功能受损时,一定要结合其他的指标进行综合分析判断。

参考文献

- [1] 戴翔,于波,蔡伦.视黄醇结合蛋白检测在观察高血压及糖尿病早期肾脏改变中的应用[J].检验医学,2006,21(3):304-305.
- [2] 罗敏琪,尹小菁,宋志兴,等.联合检测血清胱抑素 C 与尿微量白蛋白/肌酐比值对早期肾损害的诊断价值[J].广东医学,2010,31(3):358-360.
- [3] 魏宇鹏,张季,杨金萍.血胱抑素 C 和尿中 4 种蛋白联合检测对早期糖尿病肾病的诊断价值[J].中国临床研究,2011,24(8):722.
- [4] 关悦,乔虹.同型半胱氨酸与糖尿病肾病的相关性研究[J].医学研究学报,2011,24(5):547-549.
- [5] Coll E, Botey A, Alvarez L, et al. Serum cystatin C as a new marker for noninvasive estimation of glomerular filtration rate and as a marker for early renal impairment[J]. Am J Kidney Dis, 2000, 36(1):29-34.
- [6] Chu CH, Lam HC, Lee JK, et al. Elevated serum retinol-binding protein 4 concentrations are associated with chronic kidney disease but not with the higher carotid intima-media thickness in type 2 diabetic subjects[J]. Endocr J, 2011, 58(10):841-847.
- [7] Akbay E, Muslu N, Nayir E, et al. Serum retinol binding protein 4 level is related with renal functions in type 2 diabetes[J]. J Endocrinol Invest, 2010, 33(10):725-729.

(收稿日期:2013-08-10)

(上接第 3309 页)

65(6):1603-1611.

- [10] 中华医学会血液学会血栓与止血学组.成人原发免疫性血小板减少症诊治的中外专家共识(修订版)[J].中华血液学杂志,2011,32(3):214-216.
- [11] McMillan R, Wang L, Tani P. Prospective evaluation of the immunobead assay for the diagnosis of adult chronic immune thrombocytopenic purpura (ITP)[J]. J Thromb Haemost, 2003, 1(3):485-491.
- [12] Chang M, Nakagawa PA, Williams SA, et al. Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro [J]. Blood, 2003, 102(3):887-895.

- [13] McMillan R, Wang L, Tomer A, et al. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult chronic ITP patients[J]. Blood, 2004, 103(4):1364-1369.
- [14] Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles[J]. Cell, 2009, 136(1):26-36.
- [15] Inui M, Martello G, Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11(4):252-263.
- [16] DeFranco AL, Chan VW, Lowell CA. Positive and negative roles of the tyrosine kinase Lyn in B cell function[J]. Semin Immunol, 1998, 10(4):299-307.

(收稿日期:2013-09-04)