

· 综述 ·

多发性骨髓瘤的分子遗传学研究进展

韩富秋 综述, 段建敏, 董海荣 审校

(呼和浩特市第一医院检验科, 内蒙古呼和浩特 010030)

关键词: 小分子核糖核酸; 多发性骨髓瘤; 免疫表型

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.03.032

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)03-0373-03

多发性骨髓瘤(MM)是特征性的骨髓中恶性浆细胞异常增殖, 通常它先于恶性的单克隆丙种球蛋白出现^[1]。MM 代表了大约 10% 的血液系统恶性肿瘤, 特征是出现相关临床症状和器官损害指征, 可以危及生命或严重影响生活质量^[2]。MM 发生发展可能是由于 B 细胞克隆, 有别于在自由的骨髓微环境中的恶性浆细胞^[3]。研究者认为小分子核糖核酸(miRNAs)参与了 MM 的病理学过程, 并且最新的临床研究就是以 miRNAs 作为药物或靶目标而成为治疗 MM 的潜在的新疗法。

1 miRNAs 与 MM 的相关性

1.1 miRNAs 的生物学概述 miRNAs 属于短的非编码 RNA 家族, 长度为 18~24 nt, 以 miRNAs 的 3'-非编码区为目标, 抑制蛋白翻译, 在不同物种的非编码基因序列大约占到 1%。miRNAs 共享同一种属序列的表达可能是不同的并且是组织特异地^[4]。成熟的 miRNAs 来自一个复杂的过程, 在这个过程中, pri-miRNA (70~100 nt 长度) 由 RNA 聚合酶 II 转录并且由核糖核酸酶在细胞核内剪切成一个 60~70 nt 长度的 pri-miRNAs, 后者被输出到细胞浆然后经历一个由 RNA 聚合酶 III 家族成员 DICER 二次剪切的过程, 变成一个成熟的 18~24 nt 长度的 miRNAs 双倍体。

1.2 miRNA 在 MM 中的反常现象 早期的研究评估了 miRNA 在健康人群、未明的单克隆丙球病(MGUS)和 MM 患者中的表达。从健康人群、MGUS 至 MM 患者, 显示 miRNAs 失调是逐步进展^[5-6]。对于 MGUS 和 MM 患者, 特异性的 miRNAs 有鲜明的特征。有研究显示, miRNAs 调节参与 MGUS 至 MM 的转变中^[7]。Lionetti 等^[8] 调查显示, 不同 miRNAs 表达可能部分与存在复杂的染色体异常有关, miRNAs 可能作为一个分类工具把 MM 患者分成不同危险级别。

在 MGUS/MM 中单一的 miRNAs 可能直接参与恶性浆细胞的关键性功能, 例如细胞周期调控、DNA 修复和细胞成分与周围微环境的交互作用。事实上, 细胞周期调控点蛋白, 例如 miR-221/222 的上调会抑制 p27Kip1 和 p57Kip2, 而 p53 则处于 miR-181a/b 的负调控之下, miR-106b-25、miR-32 和 miR-21 的转录取决于骨髓间充质干细胞的 IL-6 的信号。IL-6 的表达受 SOCS-1 的负调控, 后者以 MM 中的 miR-19a/b 为目标。miRNA 功能的主要调节者也显示在 MM 中的严重失调。事实上, Argonaut-2 protein (AGO-2) 参与 miRNAs 进程的大部分时期, 直到成熟的 miRNAs 释放到 RISC 中, 后者在高危的 MM 患者中是上调的。miRNAs 进程中的另一个组分 DICER, 相比于 MGUS 是逐步下调的, 并且它与聚合硫酸铁下降相关。总之, 这些发现支持这样的临床论断, 即 miRNAs 的调节与 MM 的病理过程相关。

1.3 miRNAs 对于 MM 和相关的骨髓微环境组分的治疗效果 如果 miRNAs 在 MM 进展及侵袭过程中起至关重要的作用, 那么它们的表达可以作为对抗肿瘤克隆和 MM 依赖的骨髓微环境的一个治疗工具^[9-13]。事实上, miRNAs 的多效性作用使之成为适合设计新型治疗策略的工具。以 miRNAs 作为治疗手段的观点首先由 Duchaine 等^[14] 提出, 他建议通过用抑制性的 miRNAs 作为替代来简便的控制 miRNAs 的活性, 或者通过抑制上调 miRNAs 的活性。事实上, 有几个细胞内途径在调节 MM 细胞存活和增殖方面很重要。磷脂酰肌醇-3-羟激酶(PI3K)/蛋白激酶(AKT) 和 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK) 途径在人类癌症发生时是激活的并且在 MM 发生和进展过程中起核心作用。另一方面, miRNAs 可能受信号分子如 P53 和 表皮生长因子受体(EGFR) 调节, 显示了它们在进行细胞内调节活动的复杂性^[15-16]。

通常的实验研究设计以确定 miRNAs 为基础作为治疗手段来作为目的, 这和种治疗手段依赖于所选择的 miRNAs 的水平, 来确定支持 MM 克隆和 MM 微环境的重要靶目标, 并最终通过模拟测试或展示它们在体内体外的活性来显示它们的抗肿瘤活性。

1.4 miRNAs 替代疗法 先前的研究已经证实 miRNAs 的下调替代疗法能够抑制 MM 细胞的增值。miR-15 和 miR-16 最初在慢性淋巴细胞白血病中发现^[17], 被发现在 ch13 缺失的 MM 患者中是下调的。在 MM 细胞中, pre-miR-15 和 pre-miR-16 的转染抑制了 DNA 的合成, 大约减少 60%。细胞周期调节者如细胞周期素 D1、D2 和 CDC25A 被 miR-15 和 miR-16 的转染而抑制。在 MM 细胞中, miRNAs 是下调的并且它的复原会导致细胞周期缩短及诱导细胞凋亡^[18-19]。在人类肿瘤中, miR-145 是一种假定的抑制物, 它能干扰细胞增殖、迁移和侵袭^[20-21]。miR-137 和 miR-197 也与抗 MM 效应有关^[22]。

1.5 miRNAs 与 MM 的相关性总结 自从 1993 年在新杆状线虫中发现 miRNAs 以来, 对这些分子所起的作用的理解也飞速进展^[23]。科学家推断 miRNAs 分子系统进一步提升了细胞内和细胞间途径的复杂性的水平, 有助于理解疾病的病理生理学原因, 像其他癌症类型, miRNAs 的描述有助于理解 MM 的表现及其环境。利用这些发现, 研究者提供了吸引人的见解, 即利用 miRNAs 成为一个很有前途的治疗工具。MM 是不可治愈的, 目前的研究已经显著地提升了治疗的创新性, 这种治疗就是以 MM 细胞和它们的骨髓微环境为目标。这些研究的成果为临床医生提供了一个很有希望的前景, 提供了一个新的抗肿瘤替代疗法, 并且把毒副作用降到最低。

2 利用流式细胞术进行 MM 的免疫表型的检测

目前与 MM 相关的实验室检查研究主要围绕诊断、鉴别诊断、判断预后、监测疗效这几方面进行, 而利用流式细胞术进行免疫表型检测则更精准。从血细胞中鉴别出恶性浆细胞主要依靠 CD38、CD138 这两个标记。虽然 CD38 广泛表达于造血细胞上, 但其在恶性浆细胞上的表达强度要远远强于在其他

细胞上的表达,这个强表达性使其在鉴别恶性浆细胞方面具有特异度,而骨髓瘤细胞CD38表达强度低于正常恶性浆细胞^[24]。尽管目前也有报道CD138在恶性浆细胞上低表达及外周血中存在CD138⁻恶性浆细胞,但CD138恶性浆细胞上表达的特异度是公认的,它不表达于其他造血细胞^[25-26]。有研究显示,CD56在约60%MM患者的瘤细胞上表达,它介导了瘤细胞的归巢,在疾病治疗过程中CD56表达可上调或下调^[27]。CD117在约1/3MM患者的恶性浆细胞上表达。CD13、CD33在约1/4MM患者的恶性浆细胞上表达^[28]。CD40、CD28分别在约70%、40%MM患者的恶性浆细胞上表达^[29]。目前,骨髓瘤细胞与正常恶性浆细胞的鉴别,主要依靠CD19、CD56、CD38这几个标记。骨髓瘤细胞相对于正常恶性浆细胞,CD38的表达强度相对地弱些,同时骨髓瘤细胞高表达CD56,缺乏CD19、CD45;而正常恶性浆细胞免疫表型为CD38⁺⁺⁺、CD56⁻、CD19⁺⁺、CD45⁻。

今后,若能够采用流式细胞术进行MM的诊断和预后评估将会有更大的应用前景。

参考文献

- [1] Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance[J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(8): 564-569.
- [2] Morabito F, Recchia AG, Mazzone C, et al. Targeted therapy of multiple myeloma: the changing paradigm at the beginning of the new millennium[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2012, 12(7): 743-756.
- [3] Basak GW, Carrier E. The search for multiple myeloma stem cells: the long and winding road[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010, 16(5): 587-594.
- [4] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [5] Pichiorri F, Suh SS, Ladetto M, et al. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(35): 12885-12890.
- [6] Zhou Y, Chen L, Barlogie B, et al. High-risk myeloma is associated with global elevation of miRNAs and overexpression of EIF2C2/AGO2[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(17): 7904-7909.
- [7] Roccaro AM, Sacco A, Thompson B, et al. MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma[J]. *Blood*, 2009, 113(26): 6669-6680.
- [8] Lionetti M, Biasiolo M, Agnelli L, et al. Identification of microRNA expression patterns and definition of a microRNA/mRNA regulatory network in distinct molecular groups of multiple myeloma[J]. *Blood*, 2009, 114(25): 20-26.
- [9] Rossi M, Amodio N, Di Martino MT, et al. MicroRNA and multiple myeloma: from laboratory findings to translational therapeutic approaches[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2014, 15(5): 459-467.
- [10] Rossi M, Amodio N, Di Martino MT, et al. From target therapy to miRNA therapeutics of human multiple myeloma: theoretical and technological issues in the evolving scenario[J]. *Curr Drug Targets*, 2013, 14(10): 1144-1149.
- [11] Amodio N, Di Martino MT, Neri A, et al. Non-coding RNA: a novel opportunity for the personalized treatment of multiple myeloma[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2013, 13(Suppl 1): 125-137.
- [12] Lionetti M, Agnelli L, Lombardi L, et al. MicroRNAs in the pathobiology of multiple myeloma[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2012, 12(7): 823-837.
- [13] Di Martino MT, Amodio N, Tassone P, et al. Functional Analysis of microRNA in Multiple Myeloma[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 30(4): 831-833.
- [14] Duchaine TF, Slack FJ. RNA interference and micro RNA-oriented therapy in cancer: rationales, promises, and challenges[J]. *Curr Oncol*, 2009, 16(4): 61-66.
- [15] Sachdeva M, Zhu S, Wu F, et al. p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(9): 3207-3212.
- [16] Zou CD, Zhao WM, Wang XN, et al. MicroRNA-107: a novel promoter of tumor progression that targets the CPEB3/EGFR axis in human hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2015, 22(4): 121-123.
- [17] Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(13): 5166-5171.
- [18] Amodio N, Di Martino MT, Foresta U, et al. miR-29b sensitizes multiple myeloma cells to bortezomib-induced apoptosis through the activation of a feedback loop with the transcription factor Sp1[J]. *Cell Death Dis*, 2012, 20(3): 436.
- [19] Zhang YK, Wang H, Leng Y, et al. Overexpression of microRNA-29b induces apoptosis of multiple myeloma cells through down regulating Mcl-1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 414(1): 233-239.
- [20] Bandopadhyay M, Banerjee A, Sarkar N, et al. Tumor suppressor micro RNA miR-145 and onco micro RNAs miR-21 and miR-222 expressions are differentially modulated by hepatitis B virus X protein in malignant hepatocytes[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(1): 721.
- [21] Wang Y, Hu C, Cheng J, et al. MicroRNA-145 suppresses hepatocellular carcinoma by targeting IRS1 and its downstream Akt signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 446(4): 1255-1260.
- [22] Yang Y, Li F, Saha MN, et al. miR-137 and miR-197 induce apoptosis and suppress tumorigenicity by targeting MCL-1 in multiple myeloma[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(10): 2399-2411.
- [23] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. *Cell*, 1993, 75(1): 843-854.
- [24] Raja KR, Kovarova L, Hajek R. Review of phenotypic markers used in flow cytometric analysis of MGUS and MM, and applicability of flow cytometry in other plasma cell disorders[J]. *Br J Haematol*, 2010, 149(3): 334-351.
- [25] Gertz MA, Buadi FK. Utility of immunophenotyping of

- plasma cells in multiple myeloma[J]. Leuk Lymphoma, 2015, 113(1):1-2.
- [26] Caraux A, Klein B, Paiva B, et al. Circulating human B and plasma cells[J]. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138⁻ and CD138⁺ plasmacells[J]. Haematologica, 2010, 95(6):1016-1020.
- [27] Gupta R, Bhaskar A, Kumar L, et al. Flow cytometric immunophenotyping and minimal residual disease analysis in multiple myeloma[J]. Am J Clin Pathol, 2009, 132(5):

728-732.

- [28] Bataille R, Pellan-Deceunynck C, Robillard N, et al. CD117 (c-kit) is aberrantly expressed in a subset of MGUS and multiple myeloma with unexpectedly good prognosis[J]. Leuk Res, 2008, 32(3):379-382.
- [29] Mateo G, Castellanos M, Rasillo A, et al. Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(10):3661-3667.

(收稿日期:2016-09-18 修回日期:2016-11-18)

• 综述 •

丙型肝炎病毒感染实验室筛查试验 S/CO 值与真阳性的相关性

吴士及 综述, 孙自镛 审校

(华中科技大学同济医学院附属同济医院检验科, 武汉 430030)

关键词:丙型肝炎病毒; 实验室; 感染

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.03.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)03-0375-03

丙型肝炎病毒(HCV)是病毒性肝炎常见的病原体之一,也是急性肝炎及肝硬化、肝癌等慢性肝病主要的致病因子。1989年被研究者发现以来,全球约有1.7亿慢性HCV感染患者。约80%的新发HCV感染者转为慢性感染,其中10%~20%将进展为肝硬化,长期持续的慢性HCV感染患者中1%~5%进展为肝癌^[1]。因此HCV感染的准确诊断对于临床治疗以及患者心理影响等尤为重要。临床实验室检测HCV感染主要分为筛查试验和补充确认试验。

1 HCV 感染筛查试验

临床实验室检测HCV感染最常用的筛查方法是酶联免疫吸附法(ELISA)或化学发光法(CLIA)检测患者血清中的抗HCV抗体。自1990年美国食品药品管理局(FDA)批准了第一代酶联免疫吸附法(ELISA)抗HCV检测试剂以来,抗HCV抗体的检测试剂已发展到了第三代,使用的抗原逐代增加。第一代试剂仅包被了一个HCV抗原片段,即融合蛋白C100-3(来自HCV非结构区NS4),第二代试剂主要以来自HCV核心区的合成肽c22p和来自非结构区NS3的重组抗原为主,第三代试剂又加入了第四种重组抗原(来自非结构区NS5抗原),因此试剂的敏感性和特异性逐步提高。并且20多年来其检测性能有了显著的提高,第三代检测试剂的敏感度和特异度均可达到99%以上。我国自20世纪90年代,抗HCV抗体检测试剂已经广泛应用于临床诊断和无症状人群的筛查,并有效地减少了输血后感染HCV的风险^[2]。然而抗HCV抗体筛查试验的假阳性问题一直较为突出,尤其是在低流行率(<10%)的人群筛查时更为显著^[3]。国外的大量研究表明^[3-6],在无偿献血员、现役或退役军人、普通人群、卫生保健从业人员等HCV低流行率人群中进行抗HCV抗体筛查时,假阳性率高达35%(15%~60%)。即便是在免疫力减低的人群(如血液透析患者)中筛查,假阳性率平均比例也有15%^[7]。国内的研究也得出了相同的结论^[8-9]。抗HCV抗体筛查试验产生假阳性的主要原因有:(1)内源性干扰物质的影响,如类风湿因子(RF),类风湿性关节炎患者血清或血浆中的RF可非特异性地吸附到固相载体上或包被的抗原上造成假阳性^[10];由于抗HCV检测试剂原理均为间接法ELISA,采用酶标记的抗人IgG抗体作为酶结合物参与反应,故样本中的免疫球蛋白

IgG水平较高时可能造成非特异性的IgG吸附在固相载体上或包被的抗原上造成假阳性;由于c33c和NS5抗原可以与人超氧化物歧化酶(hSOD)形成融合蛋白,样本中hSOD较高亦可造成抗HCV抗体的假阳性结果。(2)外源性的干扰因素:由于目前用于制造抗HCV检测试剂的丙肝抗原主要用基因工程表达和多肽合成方法得到。丙肝病毒抗原蛋白的纯度,天然生物活性,各种抗原合适的比例的选择等都会影响其检测性能,若抗原成分不纯则可能造成假阳性^[2],另外反应体系中的酶结合物的浓度同样会影响检测结果的准确性^[11]。再者样本质量(如溶血、纤维蛋白原以及混入血细胞等)也可能导致假阳性结果。

2 HCV 感染确认试验

由于上述原因,所以不能单独依靠初筛试验阳性结果来判断一个人是否感染HCV,初筛试验阳性的标本还需应用具有更高特异性的补充确认实验进行确认分析。对抗HCV筛查阳性结果的确认可减少初筛检测假阳性人群不必要的就医和心理伤害,同时也可确保医疗咨询、转诊及相应诊疗措施能针对血清学证实HCV感染的患者。早在1998年,美国疾病预防与控制中心(CDC)即出版了《预防控制HCV感染及HCV相关慢性疾病指南》^[12],要求对抗HCV筛查阳性结果应使用具有更高特异性的补充确认实验进行确认。该指南还明确推荐使用重组免疫印迹法(Chiron RIBA HCV 3.0 SIA)检测抗HCV抗体,以及RT-PCR法定性或定量检测(AMPLICOR HCV Test Version2.0或COBAS AMPLICOR HCV Test Version2.0)HCV-RNA作为抗HCV筛查阳性结果的确认补充实验。然而,由于确认试验费用昂贵,核酸检测对实验室条件以及操作人员要求较高,且实验室及临床医生对抗HCV确认结果和筛查结果的解释理解有差异等原因,大多数临床实验室并没有应用更特异的血清学实验或核酸试验证实抗HCV筛查阳性的结果,而报告阳性结果仅仅基于一次初筛阳性的实验结果。

3 HCV 感染筛查试验 S/CO 值结果与确认真阳性的相关性

虽然个别研究结果显示筛查试验的S/CO值与真阳性率之间没有相关性^[13],然而过去的十年中,国内外大量的研究^[1,8-9,13-16]表明筛查试验的S/CO值与真阳性是明确相关的。