

HIV 感染相关性弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者组织中 miRNA 表达谱的初步研究

张琰琰 高波 段月勋 邓刚 杨倩 王霖 吴彭春 张林 孙晶晶 潘云

Preliminary study of microRNA expression profiles in HIV related diffuse large B-cell lymphoma Zhang Yanyan, Gao Bo, Duan Yuexun, Deng Gang, Yang Qian, Wang Lin, Wu Pengchun, Zhang Lin, Sun Jingjing, Pan Yun

Corresponding author: Pan Yun, Department of Pathology, Affiliated Hospital of Dali University, Dali 671000, China. Email: panyun09@163.com

艾滋病相关淋巴瘤(AIDS related lymphoma, ARL)是指与 HIV 感染有关、伴有严重获得性免疫缺陷的淋巴组织恶性肿瘤,包括霍奇金淋巴瘤(HIV-HL)和非霍奇金淋巴瘤(HIV-NHL)。有研究者发现虽然伴随高效抗逆转录病毒治疗(HAART)的广泛应用,HIV 的感染率得到有效控制,但由于 AIDS 患者病死率的明显下降和生存期的延长,ARL 的发病率并未出现明显减少^[1-2]。ARL 已取代 Kaposi 肉瘤成为与 AIDS 相关的最常见的恶性肿瘤^[3-4]。ARL 可发生在任何 HIV 感染情况下,包括儿童患者。据推测,ARL 发生率是普通人群的 60~200 倍^[5-6]。ARL 在病理分型上 90%以上以 B 细胞来源的淋巴瘤为主,其中 80%~90%为弥漫大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)^[7-8]。HIV-DLBCL 患者多在临床免疫缺陷进展期发病,其病程进展快,预后差,其发生、发展的分子机制尚不清楚。研究表明,miRNA 在多种肿瘤发生、发展的过程中发挥作用,其差异表达可作为肿瘤患者诊断和预后的指标及治疗的新靶点^[9]。在本研究中我们采用 miRNA 芯片技术研究 HIV-DLBCL 和 non-HIV-DLBCL 患者组织中 miRNA 表达谱的差异,旨在从分子水平对 HIV-DLBCL 的发病机制进行初步探讨。

病例和方法

1. 病例:以 2010 年 12 月至 2013 年 2 月云南省多家医院确诊的 6 例 HIV-DLBCL 患者的手术后石蜡包埋病理标本为实验组(exp1~6),以 4 例 non-HIV-DLBCL 患者标本为对照

组(con1~4)。10 例患者一般临床特征见表 1。

表 1 10 例 HIV 感染相关性弥漫大 B 细胞淋巴瘤(HIV-DLBCL)患者一般临床特征

例号	年龄(岁)	性别	术前诊断	取材部位
1	41	女	HIV-DLBCL	右腹股沟淋巴结
2	30	女	HIV-DLBCL	腹股沟淋巴结
3	35	女	HIV-DLBCL	结肠系膜淋巴结
4	39	女	HIV-DLBCL	右颈部淋巴结
5	40	女	HIV-DLBCL	左侧睾丸肿瘤
6	37	男	HIV-DLBCL	左侧颈部淋巴结
7	42	男	DLBCL	右大腿根部包块
8	59	男	DLBCL	右颈部淋巴结
9	27	男	DLBCL	左锁骨上淋巴结
10	72	女	DLBCL	后腹膜淋巴结

2. 石蜡包埋病理标本处理:EP 管经 0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)水浸泡过夜后,高温高压灭活 DEPC。制备厚度为 8 μm 的石蜡组织切片 8~10 张,置于 EP 管中保存。

3. 组织总 RNA 提取及质量检测:将石蜡组织标本进行脱蜡处理后,采用 TRIzol 法(试剂为美国 Invitrogen life Technologies 公司产品)提取总 RNA,异丙醇沉淀法浓缩 RNA,采用紫外分光光度计(美国 Nanodrop ND1000 公司产品)测定 RNA 的浓度和纯度,琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性。

4. miRNA 芯片技术检测患者组织中 miRNA 表达谱:按照 miRCURY™ Hy3™ 荧光标记试剂盒(丹麦 Exiqon 公司产品)说明书进行操作,利用 T4 RNA 连接酶对分离得到的 RNA 样品进行 Hy3 荧光标记。将标记好的 miRNA 与 miRCURY™ LNA Array(v.18.0)芯片(丹麦 Exiqon 公司产品)进行杂交。每一样本使用一张芯片,同一样本在每张芯片上重复 4 次检测。杂交后芯片采用试剂盒自带缓冲液进行洗片后甩干。采用美国 Axon 公司的 GenePix 4000B 芯片扫描仪对杂交后芯片进行图像扫描,采用 GenePix pro 6.0 软件进行原始数据分析。每个探针的绿色信号强度经过背景化后,将 4 个重复探针取平均值,并用中位数标准化方法对获得的数据进行标准化处理,标准值=(原始值-背景值)/中位数;选取实验中芯片修正值(原始值-背景值)均≥30 的非对照探针的中位数作为标准化因子,对整张芯片的点进行标准化处理。经过标准化后,通过 t 检验方法分析出差异表达的

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.04.017

基金项目:国家自然科学基金(81060191)

作者单位:671000 大理学院基础医学院(张琰琰);大理学院附属医院(临床医学院)病理科(高波、邓刚、孙晶晶、潘云);云南省传染病医院(段月勋);昆明市第一人民医院(杨倩);昆明市传染病医院(王霖);昆明金域医学检验中心有限公司(吴彭春、张林)

通信作者:潘云,Email:panyun09@163.com

miRNA。HIV-DLBCL 与 non-HIV-DLBCL 患者组织表达水平比值>2或<0.5即可认为存在显著性上调或下调趋势。最后使用MeV软件进行聚类分析。miRNA芯片杂交及数据分析均由上海康成生物工程有限公司完成。

5. 靶基因预测:应用生物信息学软件(MiRanda、miRBase Targets、TargetScan)进行差异表达miRNA的靶基因预测,取至少2个软件以上预测得到的交集基因作为靶基因。同时结合KEGG(Kyoto Encyclopedia of Gens and Genome)数据库分析交集靶基因参与的信号转导通路,进一步筛选出与免疫缺陷及HIV感染相关的靶基因。

结 果

1. 各标本的总RNA纯度和质量鉴定情况:紫外分光光度计检测的结果显示,两组样本的吸光度(A)₂₆₀/A₂₈₀值均在1.8~2.1之间。琼脂糖凝胶电泳结果显示样本28 s、18 s rRNA两条带清晰,未见明显DNA和蛋白质污染,表明各样本RNA质量合格,符合miRNA芯片检测的要求。

2. 芯片杂交质量及样品性质比较:相关系数R(Correlation coefficient R-value)表明重复样本之间相关性的高低或者是不同组的样本间的差别大小,重复性越好R值越大,差异越大R值越小。两样本差异越大,其散点图距离X=Y这条直线越远,分散程度越大。结果显示实验组与对照组患者标本的杂交信号相关性较低,但组内相关性较高(表2、3)。

3. HIV-DLBCL 与 non-HIV-DLBCL 患者组织中差异表达的miRNA:采用含有3 100个捕获探针的芯片对样本进行检测,芯片杂交后扫描图像显示,所有芯片信号和背景清晰,扫描软件显示信噪比高。使用Hy3™单色荧光基团标记,光点清晰,可重复性好。数据分析结果显示共得到108个表达差异大于2倍的miRNA,其中HIV-DLBCL患者组织中表达增高的miRNA有64个,表达降低的miRNA有44个。经t检验筛选出23个与HIV-DLBCL相关的miRNA,其中上调的miRNA有6个,下调的miRNA有17个(表4)。

4. 靶基因预测:结果显示筛选出4个与免疫缺陷相关的miRNA靶基因,分别为受miR-185-3p靶向调节的T细胞受体Zeta链相关蛋白激酶(ZAP70)、肿瘤坏死因子受体超家族

表3 非HIV感染相关性弥漫大B细胞淋巴瘤患者miRNA芯片间相关系数R矩阵表

标本编号	con1	con2	con3	con4
con1	1	0.810	0.713	0.942
con2		1	0.971	0.898
con3			1	0.819
con4				1

注:con:对照组

表4 23个与HIV感染相关性弥漫大B细胞淋巴瘤相关的miRNA

miRNA名称	倍性变化比值	P值
上调miRNA		
ebv-miR-BART8-5p	248.155	0.001
miR-185-3p	3.016	0.032
miR-1469	2.413	0.046
miR-744-5p	2.402	0.029
miR-4505	2.079	0.030
miR-4497	2.391	0.038
下调miRNA		
miR-664a-5p	0.197	0.006
miR-502-3p	0.245	0.036
miR-660-5p	0.258	0.039
miR-96-5p	0.349	0.004
miR-29a-5p	0.421	0.001
miR-182-5p	0.422	0.009
miR-769-5p	0.447	0.022
miR-129-2-3p	0.446	0.008
miR-532-5p	0.253	0.038
miR-664b-5p	0.419	0.016
miR-320a	0.402	0.029
miR-891a-5p	0.478	0.041
miR-30b-5p	0.337	0.012
miR-30d-5p	0.360	0.008
miR-3607-3p	0.384	0.014
miR-3653	0.161	0.047
miR-32-3p	0.465	0.044

表2 HIV感染相关性弥漫大B细胞淋巴瘤患者miRNA芯片间相关系数R矩阵表

标本编号	exp1	exp2	exp3	exp4	exp5	exp6
exp1	1	0.971	0.742	0.921	0.697	0.952
exp2		1	0.792	0.924	0.751	0.934
exp3			1	0.831	0.979	0.777
exp4				1	0.754	0.969
exp5					1	0.712
exp6						1

注:exp:实验组

成员 13 c (TNFRSF13C)、免疫球蛋白 lambda 样多肽 1 (IGLL1) 和受 miR-744-5p 靶向调节的 CD79A。

讨 论

近年研究表明,miRNA 作为生物体内一种重要的基因调控分子,与多种人类肿瘤密切相关。在已发现的人类 miRNA 中,50%以上定位于染色体上与肿瘤发生相关的脆性位点^[10]。一种 miRNA 具有多个蛋白表达调控靶点,一个基因也可能受多种 miRNA 的共同作用,因此 miRNA 的整体调控网络极其复杂。目前,miRNA 表达谱已成为肿瘤学研究的热点。各种类型或不同组织来源的肿瘤都具有各自特殊的 miRNA 表达模式,提示肿瘤的 miRNA 表达谱可能具有特异性^[11-12]。筛选不同肿瘤中差异表达的 miRNA 及靶基因,明确其作用机制,将为肿瘤诊断、治疗和预后提供新的突破口。在免疫缺陷基础上发生的肿瘤,尤其是淋巴瘤,在发病机制、遗传学、免疫表型和临床表现等方面均可能不同于免疫功能正常的同类肿瘤,因此,对 ARL 的 miRNA 表达谱的研究具有重要意义。

在本研究中我们采用 miRNA 芯片技术对比 HIV-DLBCL 和 non-HIV-DLBCL 患者组织的 miRNA 表达谱,共筛选出 23 个表达存在显著性差异的 miRNA,其中在 HIV-DLBCL 患者组织中上调的 miRNA 有 6 个,下调的 miRNA 有 17 个。通过分析,进一步筛选出 4 个与免疫缺陷相关的 miRNA 靶基因,分别为受 miR-185-3p 靶向调节的 ZAP70、TNFRSF13C、IGLL1 以及受 miR-744-5p 靶向调节的 CD79A。我们的研究结果提示 miR-185-3p 和 miR-744-5p 很可能参与调控 HIV 的感染和 HIV-DLBCL 患者的疾病进展过程,有望成为 HIV-DLBCL 的分子标志物。

已有研究证实 miR-185 和 miR-744 的表达上调均能促进部分肿瘤的发生、发展。Akçakaya 等^[13]发现 miR-185 的高表达与结肠癌患者肿瘤细胞转移和疾病、复发呈正相关,而与其生存时间呈负相关。Song 等^[14]采用实时定量 PCR 筛选胃癌患者和正常人群血清中表达水平具有差异的 miRNA,证实 miR-744 在早期胃癌患者血清中水平上调,且在胃癌的进展过程中也继续呈现增长趋势。在本研究中我们筛选出的 miR-185-3p 和 miR-744-5p 在 HIV-DLBCL 患者组织中表达均较 non-HIV-DLBCL 组织上调 2 倍以上,推测很可能与加速 HIV-DLBCL 患者的病程进展有关。

人体感染 HIV 后,CD4⁺ T 淋巴细胞受 HIV 病毒攻击,数量不断减少,发生机会感染和恶性肿瘤的概率大大增加。研究证实 HIV 合并恶性肿瘤患者的 CD4⁺ T 淋巴细胞数显著低于非 HIV 恶性肿瘤患者,提示免疫力下降是 HIV 合并恶性肿瘤的关键因素之一。非 HIV 人群和 HIV 感染人群常见恶性肿瘤的差异可能与 HIV/AIDS 患者细胞免疫功能下降、易发生多种致癌病毒持续感染有关^[15]。

根据信号通路分析结果,我们发现 ZAP70、TNFRSF13C、IGLL1 和 CD79A 与 HIV-DLBCL 患者的免疫缺陷相关,可导致机体抗感染能力、免疫功能、免疫监控能力

下降,引发各种病症。ZAP70 是一种酪氨酸激酶,广泛表达于 T 细胞和 NK 细胞中,ZAP70 的缺失或突变均可导致重症联合免疫缺陷病^[16-17]。B 淋巴细胞活化因子(BAFF)是肿瘤坏死因子超家族成员之一,在 B 淋巴细胞生长、分化、发育及自身免疫性疾病中具有重要作用,而 TNFRSF13C 是 BAFF 的一种细胞表面受体(BAFF-R),BAFF 和 BAFF-R 缺陷小鼠的免疫反应严重减弱,而在多种自身免疫性疾病小鼠模型体内应用 BAFF 的可溶性诱饵受体,可以有效减缓疾病的进程^[18]。X 连锁无丙种球蛋白血症是由人类 B 细胞发育障碍引起的原发性免疫缺陷病,存在包括 IGLL1 和 CD79A 在内的多基因缺陷^[19]。此外,Capello 等^[20]在免疫缺陷相关的 NHL 中也发现了 CD79A 的突变。通过靶基因分析,我们推测 miR-185-3p 和 miR-744-5p 的上调将抑制靶基因 ZAP70、TNFRSF13C、IGLL1 和 CD79A 的表达,导致免疫缺陷,增强机体对 HIV 的易感性和 HIV-DLBCL 的发生率。

综上所述,在本研究中我们采用芯片技术,对 HIV-DLBCL 和 non-HIV-DLBCL 患者组织的 miRNA 表达谱进行初步研究,与后者比较,前者存在一系列上调和下调的 miRNA;靶基因预测及功能分析提示 miR-185-3p 和 miR-744-5p 可能通过调控 ZAP70、TNFRSF13C、IGLL1、CD79A 参与 HIV-DLBCL 的发生、发展。在后续研究中,我们将在大量样本中验证差异表达的 miRNA 在 HIV-DLBCL 中的生物学功能及其靶基因的效应。

参 考 文 献

- [1] Tran H, Nourse J, Hall S, et al. Immunodeficiency-associated lymphomas[J]. Blood Rev, 2008, 22(5): 261-281.
- [2] Besson C, Goubar A, Gabarre J, et al. Changes in AIDS-related lymphoma since the era of highly active antiretroviral therapy [J]. Blood, 2001, 98(8): 2339-2344.
- [3] Lewden C, Salmon D, Morlat P, et al. Causes of death among human immunodeficiency virus (HIV)-infected adults in the era of potent antiretroviral therapy: emerging role of hepatitis and cancers, persistent role of AIDS [J]. Int J Epidemiol, 2005, 34 (1): 121-130.
- [4] Mahe E, Ross C, Sur M. Lymphoproliferative lesions in the setting of HIV infection: a five-year retrospective case series and review[J]. Patholog Res Int, 2011, 2011: 618760.
- [5] Goedert JJ. The epidemiology of acquired immunodeficiency syndrome malignancies [J]. Semin Oncol, 2000, 27 (4): 390-401.
- [6] El-Salem M, Raghunath PN, Marzec M, et al. Activation of mTORC1 signaling pathway in AIDS-related lymphomas [J]. Am J Pathol, 2009, 175(2): 817-824.
- [7] Carbone A, Cesarman E, Spina M, et al. HIV-associated lymphomas and gamma-herpesviruses [J]. Blood, 2009, 113(6): 1213-1224.
- [8] Mounier N, Spina M, Gabarre J, et al. AIDS-related non-Hodgkin lymphoma [J]. Blood, 2006, 107(10):3832.

[9] Fukata S, Inoue K, Kamada M, et al. Levels of angiogenesis and expression of angiogenesis-related genes are prognostic for organ-specific metastasis of renal cell carcinoma [J]. *Cancer*, 2005, 103(5):931-942.

[10] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(9): 2999-3004.

[11] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 834-838.

[12] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(7): 2257-2261.

[13] Akçakaya P, Ekelund S, Kolosenko I, et al. miR-185 and miR-133b deregulation is associated with overall survival and metastasis in colorectal cancer [J]. *Int J Oncol*, 2011, 39(2): 311-318.

[14] Song MY, Pan KF, Su HJ, et al. Identification of serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for early detection of gastric cancer [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33608.

[15] 张永喜, 桂希恩, 钟亚华, 等. 艾滋病病毒感染者人群中恶性肿瘤的常见类型及其生存分析 [J]. *肿瘤研究与临床*, 2010, 22(11): 764-766.

[16] Karaca E, Karakoc-Aydiner E, Bayrak OF, et al. Identification of a novel mutation in ZAP70 and prenatal diagnosis in a Turkish family with severe combined immunodeficiency disorder [J]. *Gene*, 2012, 512(2): 189-193.

[17] Isakov N. ZAP70-Related SCID: Non-Redundant Dual Functions of the ZAP70 Catalytic and Scaffolding Regions [J]. *J Clin Case Reports*, 2012, 2: e113.

[18] Reyes S LI, León B F, Rozas V MF, et al. BAFF: A regulatory cytokine of B lymphocytes involved in autoimmunity and lymphoid cancer [J]. *Rev Med Chil*, 2006, 134(9): 1175-1184.

[19] Notarangelo LD, Sorensen R. Is it necessary to identify molecular defects in primary immunodeficiency disease? [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 122(6): 1069-1073.

[20] Capello D, Gloghini A, Martini M, et al. Mutations of CD79A, CD79B and EZH2 genes in immunodeficiency-related non-Hodgkin lymphomas [J]. *Br J Haematol*, 2011, 152(6): 777-780.

(收稿日期:2014-10-20)
(本文编辑:刘志红)

PDD与PAD方案治疗初治多发性骨髓瘤患者的疗效和安全性比较

马玲 傅琤琤 刘辉 金松 顾斌 颜霜 王攀峰
徐云 薛胜利 李渭阳 孙爱宁 吴德沛

Retrospective study of the efficacy and safety of treatment with PDD vs PAD in de novo patients with multiple myeloma Ma Ling, Fu Chengcheng, Liu Hui, Jin Song, Gu Bin, Yan Shuang, Wang Panfeng, Xu Yun, Xue Shengli, Li Weiyang, Sun Aining, Wu Depei
Corresponding author: Fu Chengcheng, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China. Email: zhenzhenfu@hotmail.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.04.018

基金项目:江苏省医学重点人才项目(RC2007074);苏州市科技计划(YJS0914);卫生公益性行业科研专项(201202017);江苏省临床医学科技专项(BL2012005);江苏省科教兴卫工程-临床医学中心(ZX201102);江苏省高校优势学科建设工程

作者单位:215006 苏州大学附属第一医院血液科,江苏省血液研究所,卫生部血栓与止血重点实验室

通信作者:傅琤琤,Email:zhenzhenfu@hotmail.com

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)患者通常对很多细胞毒性药物敏感,但疗效比较短暂。近年来,随着新药的应用,大大提高了MM患者总体反应率和生存时间^[1-3]。2013年NCCN指南中,将PAD(硼替佐米、阿霉素及地塞米松)方案列为适合移植治疗的MM患者的一类推荐主要治疗方案^[4]。NCCN MM专家组将硼替佐米联合聚乙二醇化脂质体阿霉素方案列为复发/难治性MM患者的一类推荐补救治疗。为了解在初治MM患者中,PAD方案中的阿霉素(A)与脂质体阿霉素(D)的区别,我们对此进行了单中心回顾性研究。

病例和方法

1. 病例:以2012年1月至2014年7月于我院行PDD(硼替佐米、脂质体阿霉素及地塞米松)方案和PAD方案治疗的58例初治MM患者为研究对象,既往接受至少2个疗程的化