

血浆 miRNA 表达与儿童急性淋巴细胞白血病风险的关联研究

袁冬妹 吴思英 黄素丽 蒋伟超 柯跃斌

518055 深圳市疾病预防控制中心医学分子生物学重点实验室(袁冬妹、黄素丽、蒋伟超、柯跃斌); 350108 福州, 福建医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系(袁冬妹), 环境因素与肿瘤福建省重点实验室(吴思英)

袁冬妹、吴思英同为第一作者

通信作者: 柯跃斌, Email: keyke@szu.edu.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2017.09.022

【摘要】 目的 探讨 miRNA 在儿童急性淋巴细胞白血病(cALL)病例血浆中的表达分布特征, 分析其与 cALL 发病风险之间的关系, 并判断 miRNA 作为 cALL 诊断标记物的可行性。方法 采用病例对照方法, 收集 2015 年 1 月至 2016 年 11 月在深圳市儿童医院确诊初发 cALL 和骨折病例作为对照各 111 例, 按性别相同和年龄(± 1 岁)进行 1:1 匹配, 并从中选择 4 对 cALL 病例和对照进行 LNATM miRNA 表达谱芯片检测。采用实时定量 PCR 验证 miRNA 表达水平, 利用条件 logistic 回归分析 miRNA 与 cALL 发病风险之间的关系, 以受试者工作特征曲线(ROC)和重新分类方法分析 miRNA 作为 cALL 生物标志物的可行性。结果 芯片筛选出 204 个差异表达的 miRNA。根据入选条件, 纳入 let-7f-5p、miR-5100、miR-25-3p 和 miR-3654 进行实时定量 PCR。病例组 let-7f-5p、miR-5100 和 miR-25-3p 的表达水平低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。在调整混杂因素后, 这 3 个 miRNA 仍然与 cALL 的发生存在关联[OR 值和 95%CI 分别为 0.84(0.76 ~ 0.92)、0.81(0.73 ~ 0.90)、0.81(0.74 ~ 0.89)]。ROC 和重新分类法结果显示与传统危险因素模型相比, 加入 1 个或 ≥ 2 个 miRNA 均增加曲线下面积($P < 0.05$), 且模型诊断均有增加价值作用($P < 0.01$)。结论 let-7f-5p、miR-5100、miR-25-3p 的表达水平与 cALL 的发生关联, 可作为 cALL 的生物标志物。

【关键词】 儿童急性淋巴细胞白血病; 生物标志物

基金项目: 国家自然科学基金(81072323)

Association between expression of plasma miRNA and the risk of childhood acute lymphocytic leukemia

Yuan Dongmei, Wu Siying, Huang Suli, Jiang Weichao, Ke Yuebin

Key Laboratory of Genetics and Molecular Medicine of Shenzhen, Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China (Yuan DM, Huang SL, Jiang WC, Ke YB); Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health (Yuan DM), Fujian Provincial Key Laboratory of Environment Factors and Cancer (Wu SY), Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China
Yuan Dongmei and Wu Siying are the first authors who contributed equally to the article.

Corresponding author: Ke Yuebin, Email: keyke@szu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the characteristics of distribution and expression profiles of plasma miRNA in childhood acute lymphocytic leukemia (cALL) patients; the association between cALL incidence risk and plasma miRNA levels; the feasibility of plasma miRNA serving as cALL diagnostic biomarker. **Methods** A total of 111 pairs of newly diagnosed cALL patients and patients with fractures were collected from Shenzhen Children's Hospital, China, between January 2015 and November 2016. Age and sex of the cases and controls were 1:1 matched and LNATM miRNA microarray was performed using 4 pairs of cALL and controls selected from the sample population. The expression level of miRNA was validated by real time quantitative PCR. Conditional logistic regression analysis was applied to evaluate the association between miRNA expression levels and the incidence risk of cALL. The receiver operating characteristic curve (ROC) and reclassification analysis were conducted to assess the feasibility of miRNAs serving as biomarkers for cALL. **Results** A total

of 204 differentially expressed miRNA were screened out and let-7f-5p, miR-5100, miR-25-3p and miR-3654 were selected for validation identified according to the inclusion criteria. The expression levels of let-7f-5p, miR-5100 and miR-25-3p in the cALL patients were significantly lower than those of the controls ($P < 0.01$). After adjusting for confounding factors, 3 miRNAs remained significantly associated with the risk of cALL (*OR* and 95%*CI* were 0.84 (0.76–0.92), 0.81 (0.73–0.90) and 0.81 (0.74–0.89), respectively. Results from both the ROC analysis and reclassification analysis showed that introduction of one or more miRNA to traditional risk factors improved the area under the curve ($P < 0.05$) and provided additional values to diagnosis ($P < 0.01$). **Conclusion** The expression levels of let-7f-5p, miR-5100 and miR-25-3p were significantly associated with the incidence rate of cALL, and these miRNAs might serve as promising biomarkers for cALL.

【Key words】 Childhood acute lymphocytic leukemia; Biomarker

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81072323)

白血病死亡率位居儿童恶性肿瘤第1位^[1],其中78%为急性淋巴细胞白血病(ALL)^[2]。14岁以下儿童ALL(cALL)占恶性肿瘤的23%~30%,而2~5岁为ALL发病高峰期^[3]。有研究发现表观遗传学改变会使与细胞生长、凋亡和细胞周期调控等相关基因的表达发生变化,并最终参与白血病的发病进程^[4]。MicroRNA(miRNA)是表观遗传修饰重要组成部分,为一种内源性含有19~22个核苷酸的非编码短链RNA,主要通过影响蛋白质翻译过程和mRNA的稳定性而发挥作用^[5]。诸多研究表明,在一些类型癌症如肝癌^[6]、白血病^[5]中miRNA异常表达,可以作为癌症的生物标志物。本课题组通过LNATM miRNA表达谱芯片检测按相同性别和年龄(± 1 岁)1:1匹配的初发cALL和骨折患儿血浆miRNA的表达情况,筛选出一系列具有差异表达的miRNA,并选择部分miRNA进行实时定量PCR验证,旨在探讨miRNA与cALL发病风险及临床特征之间的关系,判断miRNA作为cALL的生物标志物的可行性,为评估miRNA成为cALL的诊断、治疗的生物标志物提供理论依据。

对象与方法

1. 研究对象:收集2015年1月至2016年11月在深圳市儿童医院确诊的初发cALL患儿和骨折患儿各111例,根据病例确诊年龄,分别按照性别相同和年龄(± 1 岁)1:1进行匹配,并从该人群中选择近期入院及血浆标本符合芯片送检标准的4对匹配的cALL和对照进行芯片检测。cALL(病例组)纳入标准:经细胞形态学、免疫学、遗传及分子生物学分型诊断^[7],其中细胞形态学分型:淋巴细胞型按FAB分型标准分为L1、L2、L3型;细胞遗传学改变:与ALL预后有利的核型有TEL-AML1融合基因、与ALL预后不利的核型有BCR-ABL1融合基因、MLL基因重排及其他等;临床危险度分型分为3型:低

危、中危、高危;免疫表型分为T、B型。排除合并其他血液病或肿瘤以及HIV感染的<14周岁疑似ALL患儿。对照组为因意外(伤害、坠落)导致外伤的<14周岁的患儿,并排除HIV感染、先天异常、有肿瘤史及其他造血系统疾病(如营养不良性贫血和骨髓炎)或其他非意外伤。采用问卷调查获取儿童的基本信息以及环境化学物暴露等资料。入院后采集两组患儿首管EDTA抗凝血液,离心后分装200 μ l血浆至Eppendorf管中,用于提取血浆总RNA。所有样本的采集均获得患儿家长或其监护人的知情同意,本研究获得深圳市CDC伦理委员会的批准。

2. 血浆总RNA提取及检测:按AM1556试剂盒(美国Life Technologies公司)提取RNA。采用Taq Man MicroRNA Reverse Transcription Kit试剂盒的说明书操作(美国Life Technologies公司)进行miRNA反转录,各反应体系成分:100 mmol/ml dNTPs (0.05 μ l)、反转录酶(50 U/ μ l) (0.33 μ l)、10 \times 反转录缓冲液(0.5 μ l)、反转录酶抑制剂(20 U/ μ l, 0.063 μ l)、5 \times 反转录引物(1 μ l)、RNA(1 μ l)、无RNA酶水(2.057 μ l)。采用Taq Man MicroRNA Assays反应试剂盒(美国Life Technologies公司)进行实时定量PCR。在反转录反应产物中加入20 μ l无RNA酶水稀释。PCR反应体系:2 \times Taq Man通用PCR反应液(5 μ l),20 \times Taq Man miRNA探针(0.5 μ l),反转录产物(4.5 μ l)。以 $-\Delta$ Ct法计算miRNA的相对表达量, Δ Ct=Ct_{miRNA} - Ct_{cel-miR-39},其中以cel-miR-39为内对照。

3. miRNA表达谱芯片技术:采用Exiqon公司LNATM miRNA表达谱芯片分析4对匹配病例组和对照组患儿血浆总RNA(交由康成生物工程有限公司完成)。采用miRCURYTM Array Power标记试剂盒获得荧光探针,在标准条件下使用MAUI杂交仪将标记好的探针和miRCURYTM芯片杂交。

4. 统计学分析:采用 EpiData 3.1 软件录入数据,应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析。正态分布的资料采用 *t* 检验,非正态的计量资料用秩和检验进行比较,定性资料采用 χ^2 检验。将单因素分析差异有统计学意义的指标作为混杂因素进行调整,采用多因素条件 logistic 回归模型分析 miRNA 相对表达量与 cALL 发病风险的关联,利用受试者工作特征曲线(ROC)分析 miRNA 作为 cALL 分子标志物的曲线下面积(AUC),应用 Medcalc 软件比较不同模型的曲线下面积,采用重新分类方法分析 miRNA 的净重分类指数(net reclassification index, NRI)和综合判别指数(integrated discrimination improvement, IDI)。其中 NRI 值 >0 为正向改善, <0 为负向改善, 0 则无改善^[8]。IDI 值则反映随新变量加入,模型对于预测区分结果事件和非结果事件风险概率的增加值^[9]。用 Pearson 或 Spearman 相关分析 miRNA 表达水平与各变量的相关性。统计分析均采用双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 基本情况:发现阶段为 4 对病例组和对照组,其中均为男童 3 人,女童 1 人。验证阶段为病例组和对照组 111 对,两组中各有男童 69 人(62.2%),女童 42 人(37.8%)。发现阶段两组患儿各变量间的差异均无

统计学意义($P > 0.05$)。验证阶段两组在年龄、性别、胎次、孕龄、母亲孕期杀虫剂接触史和居家附近有加油站的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。病例组中 28 人(25.2%)有儿童杀虫剂接触史、35 人(31.5%)居住于新刷油漆居所和 24 人(21.6%)有家族肿瘤史,高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

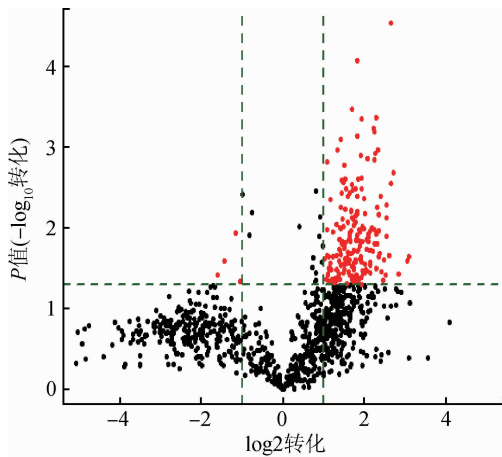
2. miRNA 表达谱芯片结果:以芯片表达水平 30 为阈值, ≥ 30 为有表达, < 30 为无表达,芯片结果显示病例组中有 195 个 miRNA 表达水平 > 30 , 对照组有 120 个 miRNA 表达水平 > 30 , 其中有 120 个 miRNA 在两组中均可检出。共筛选出 204 个差异表达的 miRNA, 其中上调 200 个、下调 4 个(图 1)。

3. 选择 miRNA 进行人群验证:miRNA 选择标准为:①根据在病例组或对照组至少一组中 miRNA 的表达水平 ≥ 30 , $P < 0.05$ 和两组样本间的表达差异倍数 > 2 ; ②通过 targetScanHuman 7.0(靶基因预测软件)、DAVID Bioinformatics Resources 6.8(生物功能注释信息平台)发现靶基因通路与癌症或 ALL 相关的 miRNA; ③文献报道可能与癌症或 ALL 相关的 miRNA。同时满足上述条件 1, 并且满足条件 2 或者条件 3 的 miRNA, 最后纳入 let-7f-5p、miR-5100、miR-25-3p 和 miR-3654, 其在芯片中的表达见表 2, 即 let-7f-5p、miR-25-3p 和 miR-3654 表达为上调,

表 1 急性淋巴细胞白血病病例组与对照组发现阶段和验证阶段基本特征

变量	发现阶段(4对)				验证阶段(111对)			
	病例组	对照组	统计值	P值	病例组	对照组	统计值	P值
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	4.0 ± 2.9	4.0 ± 2.9	0.00 ^a	1.000	5.2 ± 3.2	5.1 ± 3.2	0.25 ^a	0.801
性别(男/女)	3/1	3/1	0.00	1.000	69/42	69/42	0.00	1.000
胎次			0.00	1.000			3.18	0.204
1	2(50.0)	2(50.0)			66(59.5)	69(62.2)		
2	2(50.0)	2(50.0)			33(29.7)	37(33.3)		
≥ 3	0(0.0)	0(0.0)			12(10.8)	5(4.5)		
母亲孕龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	27.0 ± 5.9	30.0 ± 5.4	0.69 ^a	0.514	26.9 ± 6.2	26.9 ± 5.7	0.01 ^a	0.996
母亲孕期杀虫剂接触史			0.00	1.000			0.74	0.391
否	4(100.0)	4(100.0)			103(92.8)	106(95.5)		
是	0(0.0)	0(0.0)			8(7.2)	5(4.5)		
儿童杀虫剂接触史			0.00	1.000			7.81	0.005
否	4(100.0)	4(100.0)			83(74.8)	99(89.2)		
是	0(0.0)	0(0.0)			28(25.2)	12(10.8)		
居家附近有加油站			0.00	1.000			0.12	0.734
否	4(100.0)	4(100.0)			106(95.5)	107(96.4)		
是	0(0.0)	0(0.0)			5(4.5)	4(3.6)		
居住于新刷油漆居所			0.00	1.000			11.55	0.001
否	3(75.0)	3(75.0)			76(68.5)	97(87.4)		
是	1(25.0)	1(25.0)			35(31.5)	14(12.6)		
家族肿瘤史			0.00	1.000			9.35	0.002
否	3(75.0)	3(75.0)			87(78.4)	103(92.8)		
是	1(25.0)	1(25.0)			24(21.6)	8(7.2)		

注:括号外数据为例数,括号内数据为构成比(%);^a为 *t* 值,其他为 χ^2 值



注:横轴代表病例组和对照组间 miRNA 表达倍数的变化(log2 转化),纵轴代表相应的 P 值(-log₁₀转化);纵绿线分别对应 1.5 倍的上调(右)和下调(左),绿平行线对应 0.05 的 P 值;红点代表在不同样品中差异有统计学意义的 miRNA

图1 急性淋巴细胞白血病病例组与对照组 miRNA 表达谱芯片的差异表达

表2 miRNA 在芯片中的表达情况

miRNA	标准值均值		差异倍数	P 值
	对照组	病例组		
let-7f-5p	0.86	4.19	4.87	0.031
miR-5100	18.41	2.88	0.16	0.016
miR-25-3p	1.66	5.89	3.55	0.006
miR-3654	1.50	4.99	3.32	0.027

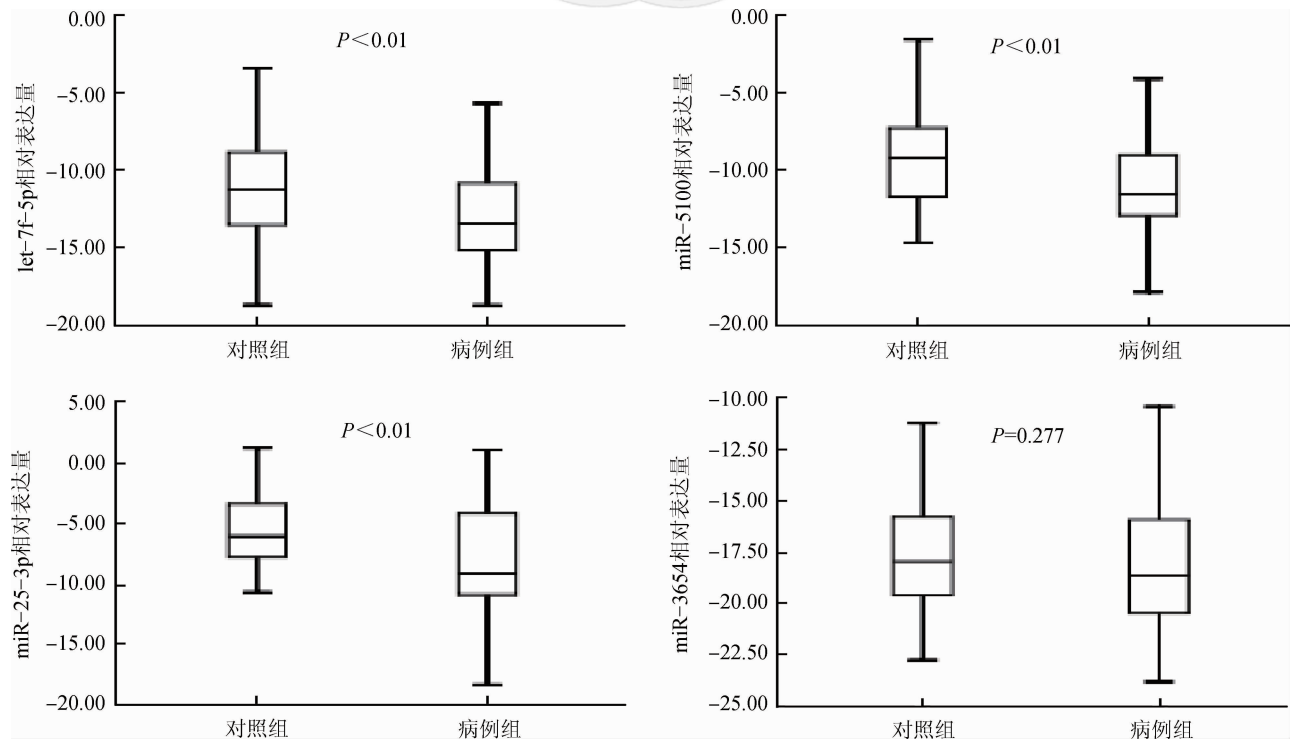
注:标准值为各 miRNA 的表达水平除以各张芯片的中位数作为标准化后的数值;差异倍数为标准值病例组/标准值对照组

miR-5100 表达为下调。

4. 病例组与对照组中 miRNA 表达水平的比较: miRNA 的相对表达量见图 2。在病例组和对照组中 let-7f-5p、miR-5100、miR-25-3p 相对表达量分别为 -12.78 ± 0.30 和 -11.10 ± 0.32 、 -10.80 ± 0.26 和 -8.99 ± 0.31 、 -7.75 ± 0.38 和 -5.40 ± 0.28 , 病例组表达水平均低于对照组, 差异均有统计学意义 ($t=3.86, t=4.42, t=4.92$, 均 $P<0.01$)。miR-3654 在病例组和对照组中的相对表达量分别为 -18.06 ± 0.32 和 -17.63 ± 0.28 , 差异无统计学意义 ($t=1.08, P=0.277$)。

5. miRNA 与 cALL 发病风险的关联性: 采用条件 logistic 回归分析 miRNA 与 cALL 发病之间的关联性。结果显示 let-7f-5p、miR-5100 和 miR-25-3p 表达水平上升与 cALL 发病风险下降有关, 调整混杂因素后, 上述 3 个 miRNA 仍然与 cALL 的发生存在关联(表 3)。

6. miRNA 作为 cALL 分子生物标志物的分析: 采用 ROC 分析 let-7f-5p、miR-5100 和 miR-25-3p 作为 cALL 分子标记物的可行性(表 4), 结果显示传统危险因素的 AUC 及其 95% CI 为 0.72 (0.66 ~ 0.78)。let-7f-5p、miR-5100 和 miR-25-3p 的 AUC 及其 95% CI 分别为 0.65 (0.58 ~ 0.72)、0.66 (0.59 ~



注:miRNA 相对表达量是经 log 转换后的数据,框图中间的线为中位数,方框为四分位数间距的范围,上下两个细线之间的距离为 1.5 倍四分位数间距

图2 急性淋巴细胞白血病病例组与对照组中 miRNA 的表达水平

表 3 miRNA 与儿童急性淋巴细胞白血病关联性的条件 logistic 回归模型分析

miRNA	模型 1		模型 2	
	OR 值(95%CI)	P 值	OR 值(95%CI)	P 值
let-7f-5p	0.85(0.78 ~ 0.93)	<0.01	0.84(0.76 ~ 0.92)	<0.01
miR-5100	0.82(0.75 ~ 0.90)	<0.01	0.81(0.73 ~ 0.90)	<0.01
miR-25-3p	0.83(0.76 ~ 0.90)	<0.01	0.81(0.74 ~ 0.89)	<0.01

注:模型 1 自变量为 miRNA; 模型 2 自变量纳入 miRNA, 包括 let-7f-5p、miR-5100、miR-25-3p 和调整因素, 调整因素为儿童杀虫剂暴露史、居住于新刷油漆的居所、家族肿瘤史

0.73) 和 0.69(0.62 ~ 0.77)。在传统危险因素的基础上纳入单个 miRNA 后, AUC 及其 95%CI 分别上升至 0.77(0.71 ~ 0.82)、0.78(0.72 ~ 0.83) 和 0.78(0.72 ~ 0.83), 与传统危险因素模型相比差异均有统计学意义(P 值分别为 0.026、0.010 和 0.028)。另外, 纳入 2 或 3 个 miRNA 的 AUC 及其 95%CI 分别为 0.78(0.72 ~ 0.83)、0.78(0.72 ~ 0.83)、0.78(0.72 ~ 0.83)、0.78(0.72 ~ 0.84), 大于传统危险因素, 差异均有统计学意义(P 值分别为 0.009、0.023、0.013 和 0.012)。

重新分类分析方法结果显示, 在传统危险因素基础上加入单个 miRNA 后, NRI 及其 95%CI 分别为 0.56(0.31 ~ 0.81)、0.41(0.16 ~ 0.67) 和 0.49(0.23 ~ 0.74), 而 IDI 及其 95%CI 分别为 0.06(0.03 ~ 0.09)、0.07(0.04 ~ 0.11)、0.09(0.05 ~ 0.13), 与传统危险因素模型相比差异均有统计学意义(P < 0.01)。在传统危险因素基础上加入 2 或 3 个的 miRNA, NRI 及其 95%CI 分别为 0.38(0.12 ~ 0.64)、0.41(0.16 ~ 0.67) 和 0.51(0.25 ~ 0.76)、0.54(0.29 ~ 0.79), 而 IDI 及其 95%CI 分别为 0.07(0.04 ~ 0.11)、0.09(0.05 ~ 0.13)、0.10(0.06 ~ 0.13) 和 0.10(0.06 ~ 0.14), 与传统危险因素模型相比差异均有统计学意义(P < 0.01)。

7. miRNA 在临床诊断分型中的表达: miRNA 表达在初发 cALL 中危险度分层、FAB 分型、免疫分

型、融合基因中的表达情况见表 5。let-7f-5p、miR-5100 和 miR-25-3p 在各变量组中的相对表达量的差异均无统计学意义(P > 0.05)。

8. miRNA 与初发 cALL 一般情况的相关性分析: 在初发 cALL 人群中, 对 miRNA 与各变量之间的相关性分析显示, let-7f-5p 和 miR-5100 均与血小板计数存在负相关(r = -0.24, P = 0.012)。miR-25-3p 与各变量无相关性(表 6)。

讨 论

目前 cALL 病因和发病机制尚未明确, 故及早诊断和临床治疗对降低病死率具有重要公共卫生学意义。本研究通过 miRNA 表达谱芯片技术检测 4 对匹配的 cALL 病例和对照, 筛选出一系列具有差异表达的 miRNA, 并挑选出 let-7f-5p、miR-5100、miR-25-3p 和 miR-3654 进行人群验证, 发现初发 cALL 患者血浆中 let-7f-5p、miR-5100、miR-25-3p 表达水平低于对照组, 且高水平表达的 let-7f-5p、miR-5100、miR-25-3p 与 cALL 患儿发病风险下降有关。此外, 在传统危险因素基础上引入 let-7f-5p、miR-5100、miR-25-3p 增加了诊断的准确性。因此, 初步推测, 血浆中 let-7f-5p、miR-5100、miR-25-3p 可作为 cALL 的生物标志物。目前, let-7 家族调控 mRNA 的作用机制尚不清楚, 可能在多种肿瘤中表达水平均表现为下调, 起着抑癌基因的作用^[10-11]。研究表明, let-7b 是 MLL 重排型 ALL 中显著下调的 miRNA 之一, 而高表达的 let-7b 会抑制白血病细胞增长^[12], 也有研究提示 let-7f 在难治性急性髓性白血病细胞中低表达^[13]。有研究表明 let-7f-5p 可作为卵巢癌^[14]和结直肠癌^[15]的早期诊断生物标志物。但对 miR-5100 与疾病之间关联的研究较少, 有研究发现 miR-5100 在肺癌组织中高表达^[16], 而高表达的 miR-5100 可促进癌细胞的扩增。

表 4 miRNA 的 AUC、NRI 和 IDI 及其 95%CI

miRNA	模型 1 AUC	模型 2 AUC	模型 3 AUC	P 值	NRI	IDI
let-7f-5p	0.72(0.66 ~ 0.78)	0.65(0.58 ~ 0.72)	0.77(0.71 ~ 0.82)	0.026	0.56(0.31 ~ 0.81)	0.06(0.03 ~ 0.09)
miR-5100	0.72(0.66 ~ 0.78)	0.66(0.59 ~ 0.73)	0.78(0.72 ~ 0.83)	0.010	0.41(0.16 ~ 0.67)	0.07(0.04 ~ 0.11)
miR-25-3p	0.72(0.66 ~ 0.78)	0.69(0.62 ~ 0.77)	0.78(0.72 ~ 0.83)	0.028	0.49(0.23 ~ 0.74)	0.09(0.05 ~ 0.13)
let-7f-5p+miR-5100	0.72(0.66 ~ 0.78)	0.66(0.59 ~ 0.72)	0.78(0.72 ~ 0.83)	0.009	0.38(0.12 ~ 0.64)	0.07(0.04 ~ 0.11)
let-7f-5p+miR-25-3p	0.72(0.66 ~ 0.78)	0.70(0.63 ~ 0.76)	0.78(0.72 ~ 0.83)	0.023	0.41(0.16 ~ 0.67)	0.09(0.05 ~ 0.13)
miR-5100+miR-25-3p	0.72(0.66 ~ 0.78)	0.70(0.64 ~ 0.76)	0.78(0.72 ~ 0.83)	0.013	0.51(0.25 ~ 0.76)	0.10(0.06 ~ 0.13)
let-7f-5p+miR-5100+miR-25-3p	0.72(0.66 ~ 0.78)	0.70(0.64 ~ 0.76)	0.78(0.72 ~ 0.84)	0.012	0.54(0.29 ~ 0.79)	0.10(0.06 ~ 0.14)

注: AUC 为曲线下面积; NRI 为净重分类指数; IDI 为综合判别指数; 模型 1 的自变量为传统危险因素, 包括年龄、性别、胎次、孕龄、母亲孕期杀虫剂暴露史、儿童杀虫剂暴露史、儿童居家附近有加油站、居住于新刷油漆居所和家族肿瘤史; 模型 2 的自变量为 miRNA (let-7f-5p、miR-5100、miR-25-3p); 模型 3 的自变量为模型 1 和 2 的自变量之和, 即包括传统危险因素和 miRNA; NRI 和 IDI 的计算纳入了年龄、性别、胎次、孕龄、母亲孕期杀虫剂暴露史、儿童杀虫剂暴露史、儿童居家附近有加油站、居住于新刷油漆居所、家族肿瘤史和 miRNA

表5 miRNA在临床分型诊断的表达

变量	病例数 (构成比,%)	let-7f-5p		miR-5100		miR-25-3p		
		F值	P值	F值	P值	F值	P值	
危险分层	未知	2(1.8)	1.87	0.139	0.92	0.433	2.23	0.089
	低危	27(24.3)						
	中危	50(45.1)						
	高危	32(28.8)						
FAB分型	未知	27(24.3)	0.64	0.527	1.48	0.232	1.89	0.156
	L1型	80(72.1)						
	L2型	4(3.6)						
	L3型	0(0.0)						
免疫表型	未知	3(2.7)	0.71	0.495	0.52	0.597	0.78	0.462
	B型	100(90.1)						
	T型	8(7.2)						
融合基因 ^a	未知	23(20.7)	1.29	0.270	0.42	0.830	0.73	0.600
	阴性	59(53.2)						
	BCR-ABL1阳性	6(5.4)	0.959		0.763		1.000	
	TEL-AML1阳性	15(13.5)	0.505		0.993		0.981	
	MLL重排阳性	5(4.5)	1.000		1.000		0.785	
	其他	3(2.7)	1.000		0.999		0.996	

注:^a融合基因部分为采用Dunnnett法进行融合基因阳性组与融合基因阴性组的比较(分别为BCR-ABL1阳性、TEL-AML1阳性、MLL重排阳性、其他与融合基因阴性比较的结果),其余为F值

表6 miRNA与儿童急性淋巴细胞白血病各变量之间相关性分析

变量	let-7f-5p		miR-5100		miR-25-3p	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	-0.04	0.511 ^a	-0.05	0.940	0.01	0.830 ^a
性别(男/女)	-0.06	0.400	-0.07	0.298	-0.12	0.700
胎次	0.01	0.926	0.01	0.914	0.01	0.910
孕龄	0.02	0.740 ^a	0.01	0.900	-0.01	0.899 ^a
母亲孕期杀虫剂接触史	0.04	0.578	0.02	0.775	0.01	0.833
儿童杀虫剂接触史	-0.02	0.768	-0.04	0.547	-0.09	0.178
居家附近有加油站	0.00	0.989	0.00	0.977	-0.02	0.729
居住于新刷油漆居所	0.05	0.489	0.00	0.960	0.05	0.489
家族肿瘤史	-0.10	0.126	-0.04	0.539	-0.11	0.115
白细胞计数	0.05	0.608 ^a	0.03	0.760	0.03	0.769 ^a
血红蛋白	-0.09	0.360 ^a	-0.09	0.367	-0.04	0.715 ^a
血小板计数	-0.24	0.012 ^a	-0.24	0.012	-0.18	0.058 ^a

注:^a为Pearson相关分析,其他均为Spearman秩和相关分析

另外研究表明miR-25可以抑制肿瘤细胞凋亡^[17],并在多种癌症中均有异常表达,如miR-25-3p可作为早期诊断甲状腺乳头状癌^[18]和结直肠癌^[19]的生物标志物,但到目前为止尚缺乏对cALL的研究。国内有研究报道miR-25与成年人急性髓性白血病患者整体生存率相关^[20],但也有研究发现miR-25与对照组相比在急性髓性白血病患者中未发现明显的差异表达^[21]。

本研究选取let-7f-5p、miR-5100、miR-25-3p可较好区分病例组与对照组的疾病状态,并用ROC分析了血浆miRNA诊断cALL的效能。结果显示3个miRNA作为cALL生物标记物具有较好的准确度(AUC>0.65)。在传统危险因素的基础上纳

入1或≥2个miRNA均能增加诊断的准确性(AUC>0.77)。重新分类分析结果显示与传统危险因素模型相比,加入1或≥2个miRNA后,模型诊断均可增加其应用价值(P<0.01)。因此,初步推测血浆let-7f-5p、miR-5100、miR-25-3p结合传统危险因素可作为诊断cALL的生物标志物。有研究表明miRNA表达与特定的细胞遗传学变化相关^[22],白血病患者细胞若含TEL-AML1融合基因,则提示对治疗反应好、预后佳,而如果含MLL基因重排和BCR-ABL1融合基因则提示预后不良。本研究发现3种miRNA在融合基因阳性组与阴性组中表达均无差异。在危险度分层、FAB分型和免疫表型识别方面,3种miRNA在初发cALL患者不同亚型中的表达水平差异无统计学意义(P>0.05)。无法通过这3种miRNA的表达水平来区分cALL患者的危险度分层、FAB分型和免疫表型。本文显示let-7f-5p、miR-5100与血小板有相关性,提示该2种miRNA可能与血小板的生成有关,其机制有待进一步研究。

环境化学物暴露可通过基因组的表观遗传变异产生潜在的毒理学作用,导致可遗传的表型改变和环境相关疾病的发生^[23]。一项研究发现苯作业工人let-7f-5p表达水平明显高于对照组^[24]。本研究相关分析并未得到let-7f-5p与环境化学物暴露相关的结论,可能是暴露方式不一致。一项对儿童急性白血病发病影响因素的病例对照研究发现,DNA甲基化与环境因素暴露在儿童急性白血病发病过程中存在交互作用^[25],然而对miRNA与环境化学物暴露在cALL中可能存在的交互作用的报道较少。

本研究存在不足。如对照组为新入院的骨折创伤患儿,而动物模型显示^[26],大鼠骨折时其miR-29b-3p的表达可促进骨折愈合和机械性能的改善,但目前尚无人群资料支持;此外,本研究结果是基于回顾性的问卷调查,可能存在回忆偏倚。

综上所述,let-7f-5p、miR-5100、miR-25-3p表达水平上升可使cALL的发病风险下降,有可能作为诊断cALL的生物标志物。本课题组前期发现,苯等多种环境化学物暴露可能增加cALL的发病风险^[27]。下一步计划从环境-表观遗传角度,探讨环境化学物暴露与miRNA及其在cALL发病中的交互作

用,为其病因预防提供理论依据。

志谢 感谢深圳市儿童医院在研究中给予的支持与帮助
利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Coebergh JWW, Reedijk AMJ, de Vries E, et al. Leukaemia incidence and survival in children and adolescents in Europe during 1978–1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System Project [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42 (13): 2019–2036. DOI: 10.1016/j.ejca.2006.06.005.
- [2] Zhang H, Yang JH, Zheng YS, et al. Genome-wide analysis of small RNA and novel microRNA discovery in human acute lymphoblastic leukemia based on extensive sequencing approach [J]. *PLoS One*, 2009, 4 (9): e6849. DOI: 10.1371/journal.pone.0006849.
- [3] Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia [J]. *Lancet*, 2008, 371(9617): 1030–1043. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60457-2.
- [4] Garcia-Manero G, Yang H, Kuang SQ, et al. Epigenetics of acute lymphocytic leukemia [J]. *Semin Hematol*, 2009, 46(1): 24–32. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2008.09.008.
- [5] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. *Nature*, 2005, 435 (7043): 834–838. DOI: 10.1038/nature03702.
- [6] Qi JH, Wang J, Katayama H, et al. Circulating microRNAs (cmRNAs) as novel potential biomarkers for hepatocellular carcinoma [J]. *Neoplasma*, 2013, 60(2): 135–142. DOI: 10.4149/neo_2013_018.
- [7] 吴敏媛, 李志刚. “儿童急性淋巴细胞白血病诊疗建议(第四次修订)”解读 [J]. *中华儿科杂志*, 2014, 52(9): 645–648. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2014.09.002.
Wu MY, Li ZG. Diagnosis and treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia (Fourth Revision) [J]. *Chin J Pediatr*, 2014, 52(9): 645–648. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2014.09.002.
- [8] Pencina MJ, D’Agostino RB, Pencina KM, et al. Interpreting incremental value of markers added to risk prediction models [J]. *Am J Epidemiol*, 2012, 176 (6): 473–481. DOI: 10.1093/aje/kws207.
- [9] Kerr KF, McClelland RL, Brown ER, et al. Evaluating the incremental value of new biomarkers with integrated discrimination improvement [J]. *Am J Epidemiol*, 2011, 174(3): 364–374. DOI: 10.1093/aje/kwr086.
- [10] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the *let-7* microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(11): 3753–3756. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0637.
- [11] Torrisani J, Bourmet B, du Rieu MC, et al. *Let-7* microRNA transfer in pancreatic cancer-derived cells inhibits *in vitro* cell proliferation but fails to alter tumor progression [J]. *Hum Gene Ther*, 2009, 20(8): 831–844. DOI: 10.1089/hum.2008.134.
- [12] Nishi M, Eguchi-Ishimae M, Wu Z, et al. Suppression of the *let-7b* microRNA pathway by DNA hypermethylation in infant acute lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangements [J]. *Leukemia*, 2012, 27 (2): 389–397. DOI: 10.1038/leu.2012.242.
- [13] Dai CW, Bai QW, Zhang GS, et al. MicroRNA *let-7f* is down-regulated in patients with refractory acute myeloid leukemia and is involved in chemotherapy resistance of adriamycin-resistant leukemic cells [J]. *Leuk Lymphoma*, 2014, 55 (7): 1645–1648. DOI: 10.3109/10428194.2013.847936.
- [14] Zheng H, Zhang LN, Zhao YR, et al. Plasma miRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers for ovarian cancer [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (11): e77853. DOI: 10.1371/journal.pone.0077853.
- [15] Ghanbari R, Mosakhani N, Sarhadi VK, et al. Simultaneous underexpression of *let-7a-5p* and *let-7f-5p* microRNAs in plasma and stool samples from early stage colorectal carcinoma [J]. *Biomark Cancer*, 2015, 7 Suppl 1: S39–48. DOI: 10.4137/BIC.S25252.
- [16] Huang HL, Jiang Y, Wang YH, et al. miR-5100 promotes tumor growth in lung cancer by targeting *Rab6* [J]. *Cancer Lett*, 2015, 362(1): 15–24. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.03.004.
- [17] Zhang HY, Zuo Z, Lu X, et al. MiR-25 regulates apoptosis by targeting *Bim* in human ovarian cancer [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27 (2): 594–598. DOI: 10.3892/or.2011.1530.
- [18] Li M, Song QB, Li H, et al. Correction: circulating miR-25-3p and miR-451a may be potential biomarkers for the diagnosis of papillary thyroid carcinoma [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (8): e0135549. DOI: 10.1371/journal.pone.0135549.
- [19] Zhu C, Ren C, Han J, et al. A five-microRNA panel in plasma was identified as potential biomarker for early detection of gastric cancer [J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(9): 2291–2299. DOI: 10.1038/bjc.2014.119.
- [20] Wang YG, Li ZJ, He CJ, et al. MicroRNAs expression signatures are associated with lineage and survival in acute leukemias [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2010, 44 (3): 191–197. DOI: 10.1016/j.bcmd.2009.12.010.
- [21] 徐丽华. 儿童急性髓性白血病(AML)诊断相关miRNAs标记物的表达及功能研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2016.
Xu LH. The expressions and functions of miRNAs related to diagnosis of pediatric acute myeloid leukemia [D]. Suzhou: Soochow University, 2016.
- [22] Organista-Nava J, Gómez-Gómez Y, Illades-Aguar B, et al. Regulation of the miRNA expression by TEL/AML1, BCR/ABL, MLL/AF4 and TCF3/PBX1 oncoproteins in acute lymphoblastic leukemia (Review) [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36 (3): 1226–1232. DOI: 10.3892/or.2016.4948.
- [23] Vaiserman AM. Hormesis and epigenetics: is there a link? [J]. *Ageing Res Rev*, 2011, 10(4): 413–421. DOI: 10.1016/j.arr.2011.01.004.
- [24] 刘洋, 张恒东, 陈献文, 等. 苯作业工人血浆差异表达微小RNA的初步筛选与分析 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2014, 32 (7): 511–515. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9391.2014.07.006.
Liu Y, Zhang HD, Chen XW, et al. Screening and analysis of plasma microRNA profile in benzene exposed workers [J]. *Chin J Ind Hyg Occup Dis*, 2014, 32(7): 511–515. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9391.2014.07.006.
- [25] 张妍, 陈迪迪, 施蓉, 等. 化学物暴露与白血病发病相关基因DNA甲基化对儿童急性白血病发病的影响 [J]. *中华预防医学杂志*, 2015, 49(9): 800–809. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2015.09.008.
Zhang Y, Chen DD, Shi R, et al. Chemical exposure, leukemia related DNA methylation changes and childhood acute leukemia [J]. *Chin J Prev Med*, 2015, 49(9): 800–809. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2015.09.008.
- [26] Lee WY, Li N, Lin SE, et al. miRNA-29b improves bone healing in mouse fracture model [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 430: 97–107. DOI: 10.1016/j.mce.2016.04.014.
- [27] 蒋伟超, 吴思英, 柯跃斌. 环境化学物暴露与儿童急性淋巴细胞白血病风险的关联研究 [J]. *中华预防医学杂志*, 2016, 50(10): 893–899. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2016.10.011.
Jiang WC, Wu SY, Ke YB. Association of exposure to environmental chemicals with risk of childhood acute lymphocytic leukemia [J]. *Chin J Prev Med*, 2016, 50 (10): 893–899. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2016.10.011.

(收稿日期: 2016-12-26)

(本文编辑: 张林东)