|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 分类号 |  | 密级 |  |
| U D C |  | 编号 |  |



**博士学位论文**

**ATD 致粒细胞缺乏骨髓象及相关 miRNA 的初步研究**

|  |  |
| --- | --- |
| 研 究 生 姓 名： | 杨 靖 |
| 指导教师姓名、职称： | 文格波 教授 |
| 学 科、专 业 名 称： | 病理与病理生理学 |
| 研 究 方 向： | 甲状腺疾病的发病机制  与防治 |

2014 年 5 月

南华大学

2014 届博士学位论文

**ATD 致粒细胞缺乏骨髓象及相关 miRNA 的初步研究**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 研 究 生 姓 名 | ： | 杨靖 |
| 指导教师姓名、职称 | ： | 文格波 教授 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **论文评阅人** |  | |
|  | 黄菊芳 | （研究员、博导、中南大学基础医学院） |
|  | 杨惠玲 | （教授、博导、中山大学中山医学院） |
| **答辩委员会** | 张伟华 | （教授、博导、哈尔滨医科大学） |
| 答辩主席 | 周智广 | （教授、博导、中南大学湘雅二医院） |
| 答辩委员 | 肖志强 | （教授、博导、中南大学湘雅医院） |
|  | 姜志胜 | （教授、博导、南华大学医学院） |
|  | 吴移谋 | （教授、博导、南华大学医学院） |
|  | 贺修胜 | （教授、博导、南华大学医学院） |
|  | 唐朝克 | （教授、博导、南华大学医学院） |
|  | 尹卫东 | （教授、博导、南华大学医学院） |
| 答辩秘书 | 危当恒 | （教授、硕导、南华大学医学院） |

**南华大学学位论文原创性声明**

本人声明，所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了论文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得南华大学或其他单位的学位或证书而使用过的材料。与我共同工作的同志对本研究所作的贡献均已在论文中作了明确的说明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

作者签名： 年 月 日

**南华大学学位论文版权使用授权书**

本学位论文是本人在南华大学攻读 博 （博/硕）士学位期间在导师指导下完成的学位论文。本论文的研究成果归南华大学所有，本论文的研究内容不得以其它单位的名义发表。本人同意南华大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留学位论文，允许学位论文被查阅和借阅；学校可以公布学位论文的全部或部分内容，可以采用复印、缩印或其它手段保留学位论文；学校可根据国家或湖南省有关部门规定送交学位论文。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》，并按

《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定享受相关权益。同意授权中国科学信息技术研究所将本学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》，并通过网络向社会公众提供信息服务。对于涉密的学位论文，解密后适用该授权。

作者签名： 导师签名：

年 月 日 年 月 日

**基金资助**

**国家自然科学基金资助项目（No.81100560）**

目 录

[主要缩略语及英文索引](#_Toc686725758) 5

[中文摘要](#_Toc686725759) 10

[第一部分](#_Toc686725760) **[ATD](#_Toc686725760)**[导致粒细胞缺乏患者骨髓特点分析](#_Toc686725760) 10

[第二部分](#_Toc686725761) **[ATD](#_Toc686725761)**[导致粒细胞缺乏患者血浆差异表达](#_Toc686725761)**[miRNA](#_Toc686725761)** 10

[结论：](#_Toc686725762) 10

[1、 通过miRNA芯片筛选及qRT-PCR检测，成功获得ATD导致粒细胞缺乏发生相关的血浆miRNA谱。](#_Toc686725763) 10

[2、 ATD致粒细胞缺乏的miRNA表达变化与服用ATD类别及骨髓特点分类无明显相关。](#_Toc686725764) 10

[3、 粒细胞缺乏时差异低表达的hsa-miR-20a、hsa-miR-223、hsa-miR-106b、hsa-miR-19b](#_Toc686725765) 10

[第三部分](#_Toc686725766) **[Hsa-miR-20a](#_Toc686725766)**[对](#_Toc686725766)**[HL-60](#_Toc686725766)**[、](#_Toc686725766)**[U-937](#_Toc686725766)**[细胞Th物学性状的影响](#_Toc686725766) 10

**[Abstract](#_Toc686725767)** 11

[前言](#_Toc686725768) 13

**[2](#_Toc686725769)**[、 实验结果](#_Toc686725769) 17

[3、 讨 论](#_Toc686725770) 19

**[4](#_Toc686725771)**[、 小 结](#_Toc686725771) 21

[1、 ATD导致粒细胞缺乏患者骨髓象可以分为粒系再Th障碍型和成熟障碍型两类，以粒系再Th障碍型为主。](#_Toc686725772) 21

[2、 骨髓特点为成熟障碍型患者较再Th障碍型患者粒细胞恢复快，预后好。](#_Toc686725773) 21

**[1](#_Toc686725774)**[、 材料和方法](#_Toc686725774) 22

**[2](#_Toc686725775)**[、 实验结果](#_Toc686725775) 31

**[3](#_Toc686725776)**[、 讨 论](#_Toc686725776) 40

**[4](#_Toc686725777)**[、 小 结](#_Toc686725777) 41

[1、 成功获得ATD导致粒细胞缺乏发Th相关的血浆miRNA谱。](#_Toc686725778) 41

[2、 ATD导致粒细胞缺乏的血浆miRNA表达变化与服用ATD类别及骨髓特点分类无明显相关。](#_Toc686725779) 41

[3、 粒细胞缺乏时差异低表达的hsa-miR-20a、hsa-miR-223、hsa-miR-106b、hsa-miR-19b等均参与细胞凋亡的发Th，提示ATD导致粒细胞缺乏发Th可能与粒细胞凋亡有关。](#_Toc686725780) 41

**[1.](#_Toc686725781)** [材料和方法](#_Toc686725781) 42

**[2](#_Toc686725782)**[、 实验结果](#_Toc686725782) 53

**[3](#_Toc686725783)**[、 讨 论](#_Toc686725783) 60

**[4](#_Toc686725784)**[、 小 结](#_Toc686725784) 61

[1、 hsa-miR-20a 低表达及高表达慢病毒载体可以在HL-60、U-937 细胞中实现](#_Toc686725785) 61

[2、 hsa-miR-20a低表达可抑制HL-60、U-937细胞Th长，促进其凋亡。](#_Toc686725786) 61

[3、 hsa-miR-20a低表达对HL-60细胞Th长抑制及凋亡促进作用较U-937细胞更明显。](#_Toc686725787) 61

[第四部分](#_Toc686725788) 62

**[1](#_Toc686725789)**[、 材料和方法](#_Toc686725789) 62

**[2](#_Toc686725790)**[、 实验结果](#_Toc686725790) 72

**[3](#_Toc686725791)**[、 讨 论](#_Toc686725791) 83

**[4](#_Toc686725792)**[、 小 结](#_Toc686725792) 84

[结](#_Toc686725793)[论](#_Toc686725793) 85

[参考文献](#_Toc686725794) 86

[前 言](#_Toc686725795) 90

[参考文献](#_Toc686725796) 91

[攻读学位期间的主要科研成果](#_Toc686725797) 93

**II**

# 主要缩略语及英文索引

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英文缩写** | **英文全称** | **中文全称** |
| ANC | Absolute neutrophil count | 中性粒细胞计数 |
| ATD | Antithyroid drug | 抗甲状腺药物 |
| bp | Base pair | 碱基对 |
| cDNA | Complementary deoxyribonucleic acid | 互补脱氧核糖核酸 |
| Ct | Threshold value | 阈值 |
| ddH2O | Double distilled H2O | 双蒸水 |
| DEPC | Diethyl pyrocarbonate | 二乙基焦磷酰胺 |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide | 二甲亚砜 |
| dNTP | Deoxyribonucleoside Triphosphate | 脱氧核苷三磷酸 |
| EDTA | Ethylenediamine tetraacetic acid | 乙二胺四乙酸 |
| EST | Expression sequence tag | 表达序列标签 |
| FC | Fold change | 差异倍数 |
| FCS | Fetal calf serum | 胎牛血清 |
| M | Mol/l | 摩尔/升 |
| mA | Milliampere | 毫安 |
| MAPK | Mitogen-activated–protein kinases | 丝裂原激活的蛋白激酶 |
| mg | Milligram | 毫克 |
| min | Minute | 分钟 |
| miRNA | MicroRNA | 微小 RNA |
| ml | Milliliter | 毫升 |
| mM | mmol/l | 毫摩尔/升 |
| MMI | Methimazole | 甲巯咪唑 |
| MOI | Multiplicity of infection | 感染复数 |

**1**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英文缩写** | **英文全称** | **中文全称** |
| mRNA | mRNA | 信使核糖核酸 |
| Nt | Nucleotide | 核苷酸 |
| PBS | Phosphate buffered saline | 磷酸盐缓冲液 |
| pH | Power of hydrogen | 酸碱度 |
| PI | Propidium Iodide | 碘化丙啶 |
| pmol | Picomole | 皮摩尔 |
| PMN | Polymorphonuclear leukocyte | 中性粒细胞 |
| Pre-miRNA | Preliminary microRNA | 前体微小 RNA |
| Pri-miRNA | Primary microRNA | 微小 RNA 初始转录产物 |
| PTU | Propylthiouracil | 丙硫氧嘧啶 |
| qRT-PCR | Quantitative Real-Time polymerase chain reaction | 实时定量多聚酶链反应 |
| RISC | RNA-induced silencing complex | RNA 诱导沉默复合体 |
| RNA | Ribonucleic acid | 核糖核酸 |
| RNase | Ribonuclease | 核糖核酸酶 |
| RIN | RNA intergrity number | RNA 完整指数 |
| rpm | Revolutions per minute | 每分钟转数 |
| RT | Reverse transcription | 逆转录 |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate | 十二烷基磺酸钠 |
| SDS－PAGE | Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis | 十二烷基硫酸钠聚丙烯  酰胺凝胶电泳 |
| SSH | Suppression subtractive hybridization | 抑制性消减杂交 |
| 3'-UTR | 3'-untranslated region | 3'端非翻译区 |
| TAE | Tris/acetate electrophoresis buffer | 乙酸电泳缓冲液 |
| Taq | Thermus-aquaticus DNA polymerase | 耐热 DNA 聚合酶 |
| TBS | Tris buffered saline | 三羟甲基氨基甲烷缓冲  盐溶液 |

**2**

**ATD致粒细胞缺乏骨髓象及相关miRNA的初步研究**

|  |  |
| --- | --- |
| 研究生： | 杨 靖 |
| 导 师： | 文格波教授 |
| 专 业： | 病理学与病理生理学 |

# 中文摘要

# **第一部分** **ATD**导致粒细胞缺乏患者骨髓特点分析

**目的：**分析抗甲状腺药物（Antithyroid drug, ATD）治疗导致粒细胞缺乏症患者骨髓象特点及相关临床资料，探索骨髓象特点与粒细胞恢复情况及临床预后的关系。

**方法**：检索2008年1月～2011年12月南华大学附属第一医院、南华大学附属郴州医院、南华大学附属第二医院血液科及内分泌科收治的有完整诊疗过程记录及骨髓检查结果的住院病历，骨髓涂片提示取材不理想的病例予以剔除。确定33例为本研究的对象。总结分析其骨髓象特点、粒细胞恢复时间、热程长短等指标。

**结果**：ATD导致粒细胞缺乏患者骨髓特点可以分为粒系成熟障碍型及粒系再生障碍型两类。33 例粒缺患者中骨髓象为成熟障碍型13例(39.4%)、再生障碍型20 例

（60.6%），再生障碍型组骨髓增生活跃15例，增生减低5例。成熟障碍型组骨髓增生明显活跃3例，增生活跃10例。成熟障碍型患者粒细胞上升至正常平均（4.7±1.0）天，而再生障碍型为（8.0±2.8）天，两组比较差异有显著性（*P*＜0.01），发热天数在成熟障碍型组为（3.6±2.5）天，再生障碍型组为（8.6±3.1）天，成熟障碍型组热程明显短于再生障碍型组（*P*＜0.01），2例死亡患者骨髓检查为再生障碍型。

**结论**：1、ATD导致粒细胞缺乏患者骨髓象可以分为粒系再生障碍型和成熟障碍型两类，以粒系再生障碍型为主。2、骨髓象为成熟障碍型患者较再生障碍型患者粒细胞恢复快，发热时间短，预后好。

**关键词：** 抗甲状腺药物；粒细胞缺乏症；骨髓象

**3**

# **第二部分** **ATD**导致粒细胞缺乏患者血浆差异表达**miRNA**

**的筛选及鉴定**

**目的：**研究ATD 导致粒细胞缺乏患者粒细胞缺乏时及粒细胞恢复正常后血浆

miRNA表达谱的变化。

**方法：**选取年龄、性别、服用ATD类别及疗程基本匹配的5名ATD导致粒细胞缺乏患者，抽取粒细胞缺乏时及粒细胞恢复正常1周后的外周静脉血各2ml，分离血浆提取总RNA，应用Agilent human miRNA (8\*60K) V16.0芯片分析粒细胞缺乏时及粒细胞恢复正常后miRNA表达谱的差异。生物信息学分析表达差异明显的miRNA的靶基因及功能。qRT-PCR验证低表达hsa-miR-20a、hsa-miR-223、hsa-miR-106b、hsa-miR-19b在ATD导致粒细胞缺乏时及粒细胞恢复正常后及服用ATD 3月以上未出现粒细胞减少患者血浆中的表达情况。结合患者临床资料，分析hsa-miR-20a、hsa-miR-223、hsa-miR-106b、hsa-miR-19b表达变化与患者服用ATD类别及骨髓特点分类的关系。

**结果：**通过对芯片进行图像扫描和数据分析，筛选获得32个ATD导致粒细胞缺乏相关miRNA，其中9个表达上调(Fold change, FC≥2)，23个表达下调（FC≤0.5）；显著上调的有hsa-miR- 200、hsa-miR-756、hsa-miR-320a、hsa-miR-21、hsa-miR-30a、hsa-miR-483-5p、hsa- miR-320e (FC≥5)，显著下调的有hsa-miR-20a、hsa-miR-223、hsa-miR-106b、hsa-miR-19b、hsa-miR-1234、hsa-miR-342-3p、hsa-miR-15a、hsa-miR-197、hsa-miR-144（FC≤0.2）。生物信息学分析提示低表达的miRNA与细胞凋亡及细胞周期调控密切相关，高表达miRNA多参与基因转录调控、细胞增殖、炎症反应等过程。进一步对低表达hsa-miR-20a、hsa-miR- 223、hsa-miR-106b、hsa-miR-19b的qRT-PCR验证，证实了芯片结果可靠。qRT-PCR验证的4个miRNA表达变化在服用MMI和PTU两组患者间无明显差异（*p*＞0.05）。且4个低表达miRNA在骨髓分类为粒系再生障碍型和粒系成熟障碍型两组患者间差异不明显（*p*＞0.05）。

结论：

## 1、 通过miRNA芯片筛选及qRT-PCR检测，成功获得ATD导致粒细胞缺乏发生相关的血浆miRNA谱。

**4**

## 2、 ATD致粒细胞缺乏的miRNA表达变化与服用ATD类别及骨髓特点分类无明显相关。

## 3、 粒细胞缺乏时差异低表达的hsa-miR-20a、hsa-miR-223、hsa-miR-106b、hsa-miR-19b

等均与细胞凋亡相关，提示粒细胞凋亡增加可能是ATD致粒细胞缺乏发生的原因。**关键词：**抗甲状腺药物；粒细胞缺乏；miRNA芯片

# **第三部分** **Hsa-miR-20a**对**HL-60**、**U-937**细胞Th物学性状的影响

**目的：**选取miRNA芯片筛选获得的显著低表达的hsa-miR-20a作为研究对象，观察hsa-miR-20a表达变化对HL-60、U-937细胞生物学性状的影响。

**方法：**构建hsa-miR-20a低表达及高表达慢病毒载体，感染293T细胞，采用荧光检测法测定病毒的滴度。复苏培养HL-60、U-937细胞，实验分为三组：hsa-miR-20a高表达组（hsa-miR-20a up）、hsa-miR-20a低表达组（hsa-miR-20a down）、空载体对照转染组（control）。取对数生长期细胞根据病毒滴度及MOI值加入慢病毒感染，分别于感染后48h、72h镜下观察细胞形态改变，MTT及FCM检测各组细胞增殖及凋亡的情况。qRT-PCR检测各组细胞hsa-miR-20a表达变化情况。

**结果：**成功构建低表达及高表达hsa-miR-20a的慢病毒载体，hsa-miR-20a up慢病毒滴度为4×108TU/ml, hsa-miR-20a down慢病毒滴度为8×108TU/ml。两组病毒成功感染HL-60、U-937细胞，qRT-PCR证实了感染后各组细胞hsa-miR-20a表达水平的变化，低表达hsa-miR-20a可以抑制HL-60、U-937细胞生长，促进其凋亡。而且，hsa-miR-20a低表达对HL-60细胞生长抑制及凋亡促进作用较U-937细胞更加明显（*p*

＜0.05）。高表达hsa-miR-20a对两组细胞生长增殖及凋亡的影响与对照组无明显差异

（*p*＞0.05）。

**结论：**Hsa-miR-20a低表达及高表达慢病毒载体可以在HL-60、U-937细胞中实现hsa-miR-20a的低表达及高表达变化。Hsa-miR-20a低表达可抑制HL-60、U-937细胞生长，促进其凋亡。其对HL-60细胞生长抑制及凋亡促进作用较U-937细胞更加明显。

**关键词：** Hsa-miR-20a；慢病毒载体；凋亡

**5**

**第四部分Hsa-miR-20a调控粒细胞凋亡的机制研究**

**目的：**探索hsa-miR-20a调控HL-60细胞凋亡的靶向基因及其作用机制。

**方法：**生物信息学软件在线分析hsa-miR-20a的种子序列，与细胞凋亡相关的靶向基因及其3’UTR作用位点，位点结合自由能等生物信息。选取可能的靶向作用位点构建双荧光素酶报告基因载体，检测软件预测位点的有效性。RT-PCR及Western-blot检测hsa-miR-20a表达变化对靶向基因mRNA及蛋白表达的影响。并采用Western-blot检测靶向蛋白的下游调控蛋白表达水平变化情况。免疫组化检测ATD导致粒细胞缺乏患者骨髓粒细胞中相应靶向蛋白的表达情况。

**结果：**多生物信息学软件预测均发现hsa-miR-20a与PTEN 3'UTR有很好的作用位点及结合自由能。双荧光素酶报告基因检测发现转染hsa-miR-20a高表达能使psiCHECK™-2-PTEN-WT 3'UTR质粒的表达水平显著下降，而对psiCHECK™-2-PTEN-Mut3'UTR质粒的表达无影响。RT-PCR检测PTEN mRNA水平变化发现与对照组比较，hsa-miR-20a up能显著下调PTEN mRNA水平。Western-blot检测结果显示随着hsa-miR-20a表达的下降，HL-60细胞中PTEN蛋白的表达量较对照组显著上调，而PTEN下游调控蛋白p-Akt、Bcl-2表达水平下降，Bax表达升高。免疫组化检测发现粒系成熟障碍型患者骨髓粒细胞PTEN蛋白表达量较正常骨髓象有增加。

**结论：**PTEN是hsa-miR-20a调控粒细胞凋亡的靶向基因，PTEN通过影响线粒体凋亡信号p-Akt/Bcl-2/Bax通路在ATD导致粒细胞缺乏的发生过程中起作用。

**关键词：**生物信息学； hsa-miR-20a； PTEN；线粒体凋亡信号通路

**6**

**Study of myelogram characteristics and related miRNA of ATD-induced agranulocytosis**

**Abstract**

**PartⅠAnalysis of myelogram characteristics and clinical data of antithyroid drug induced agranulocytosis patients**

**Objective** Analysis of myelogram characteristics and some related clinical data to explore the relationship between bone marrow characteristics and clinical prognosis of antithyroid drugs induced agranulocytosis patients.

**Methods** From January 2008 to December 2011, 42 ATD-induced agranulocytosis patients were treated at three affiliated hospitals of South China university (The first affiliated hospital, The second affiliated hospital and Chenzhou affiliated hospital ).33 of them received a bone marrow examination during agranulocytosis. Medical records of 33 patients were reviewed for duration of the offending ATDs, clinical features, bone marrow characteristics and outcomes.

**Results** The bone marrow characteristics of ATD-induced agranulocytosis patients can be divided into two types as granulocytes aplastic type and dysmaturity type. There were 13 cases (39.4%) with myelogram charactered as dysmaturity and 20 cases (60.6%) as aregeneratory. The median duration of neutrophil recovery and fever were (4.7±1.0) and

(3.6±2.5 ) days in dysmaturity type while (8.0 ±2.8) and (8.6±3.1) days in aplastic type.

Two cases in aplastic type group died of infection.

**Conclusion** The myelogram charactered mainly as aplastic type in antithyroid drug induced agranulocytosis patients. Patients in dysmaturity type group are usually with good clinical prognosis for quickly increased neutrophil and short duration of fever.

**Keywords:** antithyroid drug; Agranulocytosis; Myelogram characteristics

**7**

**PartⅡScreening and identification of plasma differential expression miRNA in antithyroid drug induced agranulocytosis**

**Objective** To screen and identify the plasma miRNA differential expression profile in ATD induced agranulocytosis by the miRNA array technique.

**Methods** Ten plasma samples were obtained from 5 ATD induced agranulocytosis patients during agranulocytosis and after recovery of neutrophil count. The 5 patients were treated with same ATD and matched with gender, age and duration of drug administration. Total RNA was extracted from 10 plasma samples and labeled with fluorescence. The human miRNA Array (v.16.0) (Agilent) was used to screen the differentially expressed miRNA. Target genes and predicted function of the distinct miRNA were analysed by bioinformatic software online. Lower expressive hsa-miR-20a, hsa-miR-223, hsa-miR-106b and hsa-miR-19b were indentified by real-time quantitative PCR and the reliability of miRNA array results was comfirmed. The relationship between variation of these miRNA and the bone marrow characteristics classification was analysed as well.

**Results** Compared to neutrophil count recoveried group, 32 miRNA were differentially expressed in plasma samples during agranulocytosis, including 9 up-regulated miRNA (FC

≥2）and 23 down-regulated (FC≤0.5). The most significantly up-regulated miRNA were

Hsa-miR-200, hsa-miR-756, hsa-miR-320a, hsa-miR-21, hsa-miR-30a, hsa-miR-483-5p and hsa-miR-320e (FC≥5), while hsa-miR-20a, hsa-miR-223, hsa-miR-106b, hsa-miR-19b, hsa-miR-1234, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-15a, hsa-miR-19 and hsa-miR-144 were significantly down regulated (FC≤0.2). Bioinformatics analysis showed lower expressive

MiRNA was closely related to apoptosis and cell cycle regulation while higher expressive miRNA participate in the regulation of transcriptional, cell proliferation and inflammation. The expression level of hsa-miR-20a, hsa-miR-223, hsa-miR-106b and hsa-miR-19b was validated by qRT-PCR, which was confirmed to the result of miRNA chip array. There was no significant difference of 4 miRNA expression level between the two groups of patients taking PTU or MMI and two types of bone marrow characteristics (p> 0.05).

**8**

**Conclusion**

1、Plasma miRNA profile of ATD induced agranulocytosis was acquired by miRNA microarray .

2、The miRNA profile of ATD induced agranulocytosis was consistent in two drugs administration groups (PTU/MMI) and two types of bone marrow characteristics.

3、The lower expressive miRNA was associated with the procedure of cell apoptosis. This result prompted granulocyte apoptosis may be a cause of ATD-induced agranulocytosis.

**Keywords:** antithyroid drug; Agranulocytosis; MiRNA array

**PartⅢThe biological effects of hsa-miR-20a on HL-60、U-937 cells Objective** The significantly lower expressed hsa-miR-20a obtained from miRNA microarray was selected as the object for further study. A series of experiments were designed to observe the biological effects of hsa-miR-20a expression level change on

HL-60, U-937hceill.

Ku quan 20150721

**Methods** Construct a lentiviral expression vector to lower or over expression the level of hsa-miR-20a in the aimed cells. The titer of lentiviral was determined by fluorescence detection after infected 293T cells. HL-60 and U-937 were recovered and cultured in RPMI-1640 medium, Lentiviral was added to logarithmic growth phase cells according to MOI (multiplicity of infection) value in three groups, they are hsa-miR-20a over

Expressive group(hsa-miR-20a up), hsa-miR-20a lower expressive group(hsa-miR-20a

Down) and empty vector group (control). Changes in cell morphology were observed under the microscope and cell proliferation states were dectected by MTT, 48 and 72 hours after lentiviral infection, flow cytometry was used to detect cell apoptosis. Meanwhile, qRT-PCR was performed to detect the change of hsa-miR-20a level.

**Result** Hsa-miR-20a up/down lentiviral expression vectors were successfully constructed. The titer of hsa-miR-20a up lentiviral expression vectors was 4×108TU/ml while the value of hsa-miR-20a down was 8×108TU/ml. Three groups of lentiviral expression vectors

**9**

Were successfully infected HL-60, U-937 cells, the changes of hsa-miR-20a expression level in those cells was confirmed by qRT-PCR. Hsa-miR-20a down can inhibit HL-60, U-937 cell growth and promote apoptosis. Moreover, Cell growth inhibition and apoptosis level were more pronounced in HL-60 cells compared with U-937 cells (*p* <0.05). There was no significant difference of cell proliferation and apoptosis in hsa-miR-20a up group than control.

**Conclusion** Lentiviral expression vectors of hsa-miR-20a were successfully constructed. Lower expression of hsa-miR-20a can inhibit HL-60, U-937 cell growth and promote apoptosis. These biological effects were more obvious in HL-60 cells than in U-937 cells. **Keywords:** hsa-miR-20a; lentiviral expression vectors; apoptosis.

**PartⅣRegulatory mechanism of hsa-miR-20a on neutrophil apoptosis**

**Objective** To investigate the target genes of hsa-miR-20a and clarify the potential mechanismzinhtheioccurrenuce ofqagruanualocnytosis20150721

**Methods** The biological information of hsa-miR-20a such as seed sequence, apoptosis related target genes, targeting sites of 3'UTR and binding free energy with target sequence were analysed online by bioinformatics softwares. Dual luciferase reporter gene vector was constructed to detect the effectiveness of predicted sites. The mRNA and protein expression level of target gene were detected by RT-PCR and western-blot respectively, the change of related downstream proteins was detected as well. The protein expression level of target gene was also examined in bone marrow granulocytes of ATD induced agranulocytosis patients by immunohistochemical.

**Result** The prediction results of multiple bioinformatics software showed that hsa-miR-20a had a theoretical effect binding sites with PTEN 3'UTR. The data of dual luciferase reporter gene examination indicated that mRNA level of PTEN was significantly decreased while hsa-miR-20a up and psiCHECK™-2-PTEN-WT 3'UTR plasmid was cotransfected into 293T cells, but the effcet was not found in psiCHECK ™-2-PTEN-Mut3'UTR

**10**

Plasmid. The mRNA level of PTEN in cells of miR-20a up group was significantly reduced compared with control and the change trend of PTEN protein was consistent with the trend of mRNA. The expression level of p-Akt and Bcl-2 was decreased while Bax was increased according to the increase of PTEN protein.

**Conclusion** PTEN was the target gene of hsa-miR-20a, PTEN may play a major role in ATD induced agranulocytosis by regulating the mitochondrial apoptotic signal of p-Akt/Bcl-2/Bax pathway.

**Keywords** bioinformatics; Hsa-miR-20a; PTEN; Mitochondrial apoptotic signal pathway

**Jing Yang (Pathophysiology)**

**Directed by** Prof Gebo **Wen**

Zhi ku quan 20150721

**11**

前言

Graves病(Graves disease, GD)又称毒性弥漫性甲状腺肿，是临床上甲状腺功能亢进的最常见类型。抗甲状腺药物（Antithyorid drug, ATD）治疗是其主要的治疗方法。

ATD包括硫脲类和咪唑类，主要通过抑制过氧化物酶系统使摄入体内的碘不能活化，从而阻止甲状腺激素的合成。ATD的临床疗效确切，但治疗中常见而最严重的不良反应是导致粒细胞减少和粒细胞缺乏[1]。粒细胞减少的发病率为3%～12%，粒细胞缺乏的发病率为0.1%～0.6%[2]。而一旦发生严重的粒细胞缺乏往往会继发感染，导致脓毒症、多脏器功能不全、甲亢危象等，是GD致死的主要原因之一[3]。Pearce等[4]统计英国1981~2003年523万例使用ATD治疗的Graves病患者，部分患者出现死亡，其死亡原因49%是由粒细胞减少、缺乏所致。

目前，关于ATD导致粒细胞减少、缺乏的机制仍不清楚。有研究者认为ATD导致粒细胞减少、缺乏与免疫因素有关，他们认为ATD作为一种半抗原，与患者的白细胞本身蛋白质或附着的蛋白质结合而成为全抗原，可导致粒细胞破坏增多[5]。

Wang LH等观h察i到PTkUu可诱导q产u生a抗中性粒2细0胞胞浆5抗0体7(antineutrophil cytoplasm

antibody，ANCA）选择性抑制骨髓粒细胞分化和成熟，并可导致自身免疫性血管炎[6]。

Akamizu T等发现ANCA可能通过补体途径引起粒细胞缺乏，但具体机制还不清楚，

ANCA的抗原分子也还没明确[7]。临床研究发现ATD导致的粒细胞缺乏患者只有部分血浆ANCA呈现阳性。日本学者Tamai等也报道ATD引起粒细胞缺乏与HLA-

DRB1\*08032有关[8]。但这些结果尚无法解释ATD导致粒细胞缺乏的发生机理。临床研究发现，他巴唑引起粒细胞缺乏患者的骨髓象部分呈中幼粒以下显著减少。所以也有研究者认为是药物对骨髓直接的细胞毒作用导致粒细胞缺乏[9]。究竟是药物直接对骨髓的毒性还是免疫反应对骨髓的抑制以及其作用的机制依然不清楚。临床上

ATD导致粒细胞减少症的发生具有不可预见性，一旦发生则后果严重。因此，深入进行ATD导致GD患者粒细胞减少、缺乏发病机制的研究，对该并发症的预防和治疗具有十分重要的理论意义和临床应用价值。

同一药物治疗，有的患者疗效良好且无副作用，而有的患者却出现严重的副作用甚至致死，研究发现药物的药效和毒性存在个体差异的潜在原因除与致病原、疾病轻

**12**

重程度、药物相互作用、年龄、营养状况、肝肾功能、伴发疾病等因素有关外，这些差异大多源于某些基因的差异。ATD可能是通过影响敏感个体某些与粒细胞产生及凋亡相关的基因在体内表达水平的变化而导致粒细胞的缺乏。基于该研究思路，我们应用抑制性消减杂交（Suppression Subtractive Hybridization SSH）的方法，筛选获得

ATD介导GD患者粒细胞缺乏特异性高表达差异基因EST片段34条，特异性低表达

zhi ku quan 20150721

EST片段20条，高表达EST片段中有13条为已知基因片段，21条代表新的基因[10]。这些差异表达的EST片段有些和造血干细胞分化的转录调控以及细胞凋亡有密切关系。其中高表达的EST片段有1条与PTEN基因同源性100%，而PTEN为继P53后发现的“分子警察”，参与调控内源性细胞凋亡通路[11, 12, 13]。低表达基因片段有2 条与Fas相关磷酸酶-1（FAP-1）部分序列高度同源，FAP-1能够与Fas基因最后15个氨基酸中的死亡结合域结合而抑制凋亡，而FAP-1低表达就可能会使Fas基因活性增强，促进粒细胞凋亡[14, 15]。从我们前期的这些研究结果分析，我们认为ATD导致粒细胞缺乏可能与其导致敏感个体某些与粒细胞产生及凋亡相关基因（如PTEN、Fas、FAP-1等）的表达水平变化有关。而基因表达的调控主要是在转录及转录后水平，微小RNA (microRNA, 简称miRNA)可能在调控转录后基因的表达中有重要作用。

微小RNA是生物体内长度约为20～22个核苷酸的非编码小RNA，它通过与靶

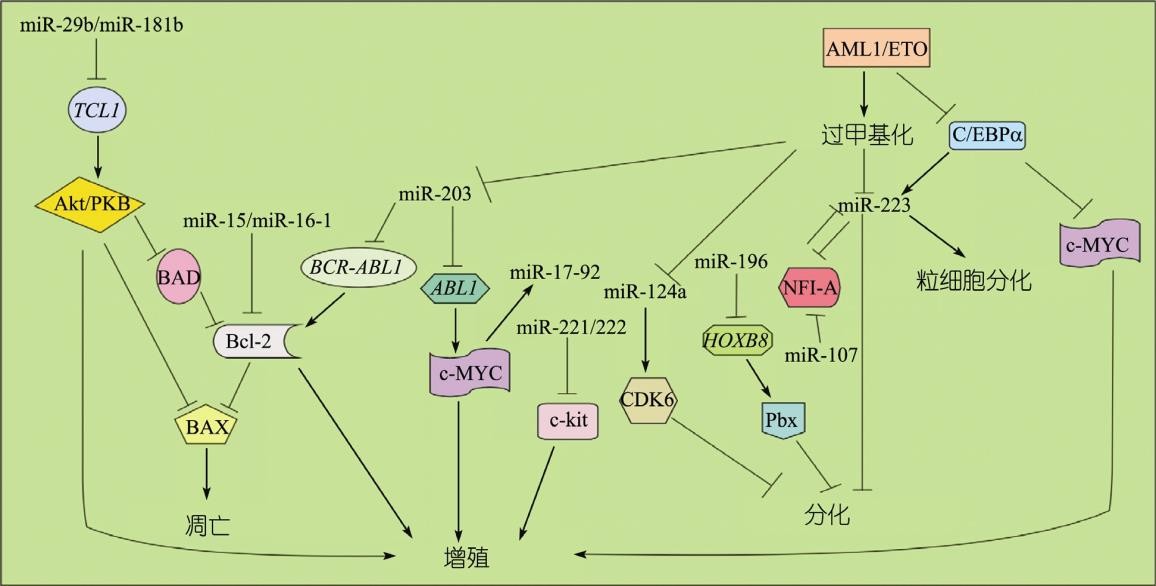
mRNA 的互补配对在转录后水平对基因的表达进行负调控。越来越多的证据表明，

miRNA是许多基本生命活动过程的关键调控因子。包括人类在内的大多数高等真核生物的基因组中都编码大量miRNA，它们通过降解mRNA或抑制其翻译两种方式参与了包括细胞的分化发育、增殖、凋亡和代谢等几乎所有生物过程[16]。一个miRNA可能调节200多个靶基因，人体内大约有三分之一的编码蛋白质的基因表达水平被miRNA调节[17]。

目前已有大量研究表明，在血液系统很多疾病的发病过程当中，miRNA都具有重要的作用。如在慢性粒细胞性白血病细胞中，miR-17-92、miR182、miR183表达明显上调，miR-15和miR-16在慢性淋巴细胞性白血病、套细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤中常常表达缺失[18, 19]。过表达的miR-15和miR-16-1可以抑制Bcl-2的表达水平进而导致细胞凋亡[19, 20]。而白血病细胞之所以能够逃避凋亡很有可能是由于这两种miRNA在细胞中表达缺失或低表达而造成Bcl-2过表达的主要原因。此外miR-203、miR-196、

**13**

miR-124a等在调控早幼粒细胞的增殖、分化中都具有重要的作用（见图1）[21,22]。miRNA在造血组织和血液肿瘤细胞中的特异性表达，提示miRNA通过对靶基因的



**图1** **miRNA调控粒细胞增殖、分化、凋亡图**

调控在血液系统疾病的发生中可能发挥重要的作用，而目前却尚无miRNA与粒细胞减少或缺乏z相h关i的文献报u道。q通过前a期n研究2及文献1研5读0，我们2推1测miRNA 可能在ATD导致Graves病患者粒细胞缺乏的发病过程中起着重要的调控作用，其可能的调

控机理是：ATD作用于敏感机体导致与粒细胞增殖、分化及凋亡相关的miRNA表达水平上调或下调，这些miRNA通过作用于其靶基因，抑制粒细胞的分化与增殖并促进其凋亡，从而导致粒细胞的减少或缺乏。

为了验证上述的设想，我们拟使用生物信息学、分子生物学等方法，鉴定与ATD致Graves病患者粒细胞缺乏密切相关的miRNA，发现miRNA作用的靶基因，探索miRNA对粒细胞增殖、分化及凋亡的影响及其作用机制。本实验拟从以下几个方面进行研究：（1）分析ATD导致粒细胞缺乏患者骨髓特点，明确粒细胞缺乏时患者骨髓造血情况及细胞学特点，并分析骨髓特点与临床预后的关系。（2）分离外周血浆，用miRNA芯片、qRT-PCR分析ATD致粒细胞缺乏患者粒细胞缺乏时及治疗粒细胞上升后miRNA表达水平的差异，生物信息学分析找到ATD致粒细胞缺乏相关的miRNA，选择其中的一个或数个作为我们进一步研究的对象，进行大样本的定量验证，结合临床资料，分析差异表达miRNA与ATD种类及骨髓特点的关系。（3）构建拟研究miRNA

**14**

的低表达（下调miRNA）和高表达（上调miRNA）慢病毒载体，改变体外培养HL-60/U-937细胞相关miRNA表达水平，观察细胞分化、增殖及凋亡情况；（4）构建双荧光素酶报告基因，检测差异表达miRNA的靶向基因并检测miRNA水平变化时其靶向基因的mRNA和蛋白表达的变化，并对靶向蛋白的细胞内信号通路进行初步探索。本实验通过研究miRNA与ATD导致粒细胞缺乏的关系，可望找到ATD导致粒细胞缺乏相关的血浆miRNA，初步阐明这些miRNA在粒细胞缺乏发生中的作用机制。

Zhi ku quan 20150721

**15**

**第一部分**

**ATD导致粒细胞缺乏患者骨髓特点分析**

**1、资料和方法**

### **1.1** 患者资料

检索2008年1月～2011年12月南华大学附属第一医院、南华大学附属第二医院、南华大学附属郴州医院内分泌及血液科收治的有完整诊疗过程记录及骨髓检查结果的住院病历，骨髓取材不理想的病例予以剔除。确定33例为本研究的对象，其中男性8例，女性25例，23例由甲巯咪唑所致，10例丙基硫氧嘧啶所致（以发生粒细胞缺乏之前1月内所服用的抗甲状腺药物为准。所有患者根据初诊时临床症状、体征、实验室及甲状腺B超检查确诊为甲状腺机能亢进症。接受ATD治疗前白细胞数均大于3.0

×109/L，中性粒细胞均大于1.5×109/L。既往无血液系统疾病史，无毒物、放射物接触史。总结分析其骨髓象特点并分析骨髓特点与患者年龄、性别、服用抗甲状腺药物

的剂量、粒z细h胞i恢复时k间u等指q标的u关a系n。

### **1.2** 检测方法及诊断标准

20150721

所有患者病历记录的骨髓穿刺部位均为髂后上棘。骨髓象和形态学特点诊断参照《血液病细胞形态学诊断图谱》[23]。血常规检查采用全自动血细胞分析仪。抗甲状腺药物致粒细胞缺乏诊断标准：外周血中性粒细胞绝对计数少于0.5×109/L，并排除其它原因所致粒细胞缺乏。

骨髓细胞增生程度分级是按照骨髓中红细胞与有核细胞数量比值进行诊断，具体分级标准如下：

|  |  |
| --- | --- |
| **骨髓细胞增生程度分级** | **红细胞与有核细胞数量比值** |
| 增生极度活跃 | （0.5～2.0）:1 |
| 增生明显活跃 | （5～12）:1 |
| 增生活跃 | （16～32）:1 |
| 增生减低 | （35～70）:1 |
| 增生极度减低 | （100～300）:1 |

**16**

### **1.3** 主要仪器设备及试剂

|  |  |
| --- | --- |
| **名称** | **生产公司** |
| 全自动血细胞分析仪 | 上海 ABX 公司 |
| 光学显微镜及摄像系统，BH-1 型 | 日本 Olympus 公司 |
| 瑞士染色试剂盒 | 南京森贝伽生物科技有限公司 |

### **1.4** 统计学处理

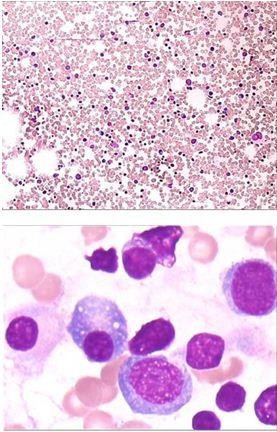
计量资料数据以均数±标准差（*x*±s）表示，用SPSS17.0软件进行统计。所有与数据都经过正态分布和方差齐性检验，方差齐性数据采用*t*检验，方差不齐数据采用近似*t*检验。显著性水平为α=0.05 。

**17**

## **2**、 实验结果

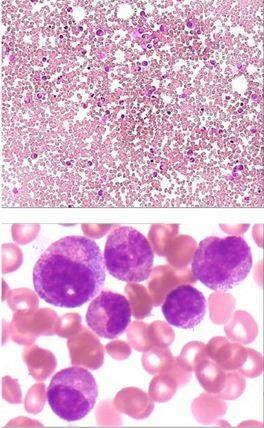
### **2.1** 骨髓象特点：

根据骨髓增生程度、粒系各阶段细胞数量、粒红细胞比值等指标，33例ATD导致粒细胞缺乏患者骨髓象诊断可分为粒系再生障碍型和粒系成熟障碍型两组（图2及文末附图1、2），其中粒系再生障碍型20例，成熟障碍型13例。再生障碍型骨髓特点表现为从原始粒细胞到晚幼粒及杆状、分叶核等粒细胞均明显减少，红系及浆系造血功能正常，而成熟障碍型表现为原始粒细胞到晚幼粒细胞数量正常或增高，但晚幼粒及杆状、分叶核等成熟细胞明显减少（表1）。粒系再生障碍型组骨髓增生活跃15例，减低5例。粒系成熟障碍型组骨髓增生明显活跃3例，增生活跃10例。两组均未见增生极度减低的报告。



a

c



b

d

**图2** **ATD导致粒细胞缺乏患者骨髓特点**

a：再生障碍型（Rui's 10×10）b：成熟障碍型（Rui's 10×10）

c：再生障碍型（Rui's 10×100）d：成熟障碍型（Rui's 10×100）

**18**

**表 1** **ATD导致粒细胞缺乏患者骨髓象结果分析**

再生障碍型（n=20）成熟障碍型(n=13)

*x*±s Min～Max *x*±s Min～Max

***P* value**

**粒系比例** 4.95±3.07 0～13 41.31±14.07 18.5～64.5 0.00

原＆早幼粒 0.55±0.36 0～1.5 2.04±0.85 0.50～3.00 0.00

中＆晚幼粒 0.95±0.69 0～5 25.54±9.64 12～44.5 0.00

杆状＆分叶核 3.45±2.50 0～9.5 13.04±5.22 5～20 0.00

**红系比例** 28.45±10.65 5～57.5 24.85±9.48 12.5～44.5 0.15

原＆早幼红 1.13±0.64 0～3 1.92±1.06 0.5～4 0.07

中＆晚幼红 29.02±11.17 5～54.5 22.92±8.73 11.5～40.5 0.12

**粒红比值** 0.25±0.12 0～2.17 2.13±1.09 0.46～4.30 0.00

淋巴＆单核 64.62±12.54 39～95 34.69±1 0.19 54～20.5 0.00

### **2.2** 相关临床资料分析：

如表2所示，33例患者年龄在19～62岁之间,平均(37.4±11.9)岁，病程2周～6年。成熟障碍型与再生障碍型2组患者发病年龄、服用ATD疗程、入院前服用MMI/PTU的剂量（以发生粒细胞缺乏之前1个月内所服用的药物为准）、入院时中性粒细胞计数（Absolute Neutrophil Count, ANC）无明显差异(*P*＞0.05)，而再生障碍型组粒细胞恢复时间及发热时间明显长于成熟障碍型组(*P*＜0.01 )。死亡患者2例骨髓象均为再生障碍型。

**表2** **ATD导致粒细胞缺乏患者临床资料分析**

再生障碍型成熟障碍型***P***

项目

*x*±s Min～Max *x*±s Min～Max **value**

年龄（岁）36.4±10.9 22～55 39.0±13.8 19～62 0.57

ATD疗程（周）7.3±3.9 1～20 8.2±3.6 3～15 0.59

粒缺发生时MMI

用量(mg/d)

19.1±5.5 10～30 17.9±6.4 10～30 0.32

**19**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 粒缺发生时PTU  用量(mg/d) | 187.5±47.9 | 150～250 | 166.7±40.8 | 100～300 | 0.41 |
| 入院时ANC（×  109/L) | 0.23±0.11 | 0～0.43 | 0.27±0.14 | 0～0.49 | 0.59 |
| 粒细胞恢复时间  （天） | 8.0±2.8 | 3～15 | 4.7±1.0 | 3～7 | 0.00 |
| 热程长短（天） | 8.6±3.1 | 5～17 | 3.6±2.5 | 0～9 | 0.00 |

以上结果表明，ATD导致粒细胞缺乏的骨髓分型与患者年龄、服用ATD的类别及疗程等无明显相关。但粒系再生障碍型患者较成熟障碍型患者其粒细胞恢复慢、发热时间长。

**20**

## 3、 讨 论

ATD治疗甲状腺机能亢进症已经有60余年，其最严重的不良反应是粒细胞缺乏，

ATD导致的粒细胞缺乏多发生在服药的前2～3个月之内，其死亡率可高达21.5%[9,24]，丙基硫氧嘧啶导致粒细胞缺乏的发生率为0.37%，甲巯咪唑为0.35%[3, 5]。目前，抗甲状腺药物导致粒细胞缺乏的发病机制主要有两种学说，即免疫损伤学说与药物毒性作用学说，前者认为药物作为半抗原与敏感患者体内粒细胞特异性膜蛋白结合形成全抗原，刺激机体产生相应抗体，产生的抗体导致粒细胞坏死或凋亡[3,5,25,26]。后者认为是药物进入骨髓后影响骨髓多能干细胞对葡萄糖及氧的利用导致直接的毒性作用所致

[27]. 但是，其确切发病机制目前尚未阐明，因此，深入研究ATD导致粒细胞缺乏患者

骨髓象特点可能对揭示其病因具有重要意义。

参照Benjawan等对粒细胞缺乏患者的骨髓象分型方法[28]，我们对33例ATD导致粒细胞缺乏患者骨髓象进行回顾性研究，我们发现这些患者骨髓象可以分为两类：即粒系再生障碍型和粒系成熟障碍型，以粒系再生障碍型为主，所有患者红系、巨核系及淋巴系骨髓细胞学检查未见明显异常。未见全血细胞再生障碍的患者。骨髓增生程度多为活跃，少数患者出现增生减低，未见增生极度减低的病例。在粒系再生障碍型组患者中从服药到出现粒细胞缺乏时间最短者为6天，最长20周。粒细胞缺乏的发生与药物剂量及服药疗程无必然联系。但是粒系再生障碍型较成熟障碍型患者其粒细胞恢复时间明显延长、发热时间长。本研究中2例成熟障碍型组患者因及时的诊断与治疗没有出现发热症状。有2例患者因脓毒症无法得到控制而死亡，二者骨髓象均为再生障碍型。这些结果给我们如下提示：

1、对于ATD导致的粒细胞缺乏患者及时行骨髓细胞学检查明确骨髓特点对其治疗和预后判断具有很强的指导意义，再生障碍型者恢复造血功能慢，感染的机会大且一旦感染往往难以得到有效控制。临床上对于粒系再生障碍型患者，尤其是合并高龄或其他感染高危因素的患者，应该予以特别重视和充分的风险评估。骨髓特点分析对患者是否需要及时入住层流病房、抗菌药物的选用以及粒系集落刺激因子的疗程都有一定的指导意义。同时，及时的骨髓检查也有利于与其他血液系统疾病进行鉴别，防止误诊误治。

**21**

2、ATD导致的粒细胞缺乏患者骨髓造血功能并没有被抑制，而且患者出现粒细胞缺乏与否与其服用药物剂量、疗程无明显相关。这就提示ATD导致的粒细胞缺乏不是药物对骨髓的直接毒性作用所致，而以免疫反应对粒系各阶段细胞损伤导致粒细胞坏死或凋亡的可能性大。通过分析两组骨髓特点的不同，我们推测，ATD对粒细胞的损伤对于粒系细胞损伤可能是“逆向”的，即最早期损伤的可能是分化成熟的粒细胞



（杆状核、分叶核粒细胞），再次是早幼粒细胞、中幼粒细胞，最后是原始粒细胞（如图3箭头所示）。这一“逆向”损伤的原因可能与不同分化阶段粒细胞表面ATD结合的某种特异蛋白的表达量不同有关，粒细胞越趋向分化成熟其表面ATD结合的某种特异蛋白的量越高，从而越容易受到损伤。这种“逆向”免疫损伤的严重程度可以解释为什么会存在再生障碍及成熟障碍两种不同类型的骨髓特点。而患者红细胞和血小板未受到损伤可能提示患者的红细胞及浆细胞表面或胞内缺乏相应特异蛋白的表达。当然，该假说是否成立，尚待进一步针对ATD导致粒细胞缺乏的分子机制进行深入研究。

**图3** **血细胞发育图(图中红色方框内细胞为骨髓的粒系，箭头所指方向提示ATD导致的粒细胞缺乏“逆向”损伤的假设。图片引自：袁毓贤主编《实用血液学细胞学图谱》第二版；辽宁科学技术出版社，2008)**

由于本研究为回顾性分析，我们无法观察到骨髓象分型在疾病转归过程中的变

**22**

化。且本组患者骨髓穿刺检查均为粒细胞缺乏阶段进行，经过停用ATD及升白细胞治疗，患者白细胞上升过程中及恢复正常后没有再复查骨髓象以观察其动态变化过程。但是尽管如此，我们的研究结果会对ATD导致的粒细胞缺乏的发病机制的阐明及临床诊疗与预后评估提供有力的理论依据。

**23**

## **4**、 小 结

## 1、 ATD导致粒细胞缺乏患者骨髓象可以分为粒系再Th障碍型和成熟障碍型两类，以粒系再Th障碍型为主。

## 2、 骨髓特点为成熟障碍型患者较再Th障碍型患者粒细胞恢复快，预后好。

**24**

**第二部分**

**ATD导致粒细胞缺乏患者血浆差异表达**

**miRNA的筛选及鉴定**

## **1**、 材料和方法

### **1.1** 标本及患者资料

收集2011年8月～2012年9月南华大学附属第一医院、南华大学附属第二医院、南华大学附属郴州医院、邵阳市中心医院内分泌及血液科收治的ATD导致粒细胞缺乏患者的全血，分离血浆。患者在粒细胞缺乏时及治疗后粒细胞上升至正常 1

周后各采血1次。本研究共收集到28例粒细胞缺乏患者的血样51份（粒细胞缺乏时

28份，粒细胞恢复正常后血样23份，有5名患者因地域原因或转院治疗而未获得粒细胞恢复正常后血样）。同时收集这些患者临床资料，包括：年龄、性别、服用抗甲状腺药物种类及疗程、骨髓特点等。本研究方案通过南华大学附属第一医院伦理委员会批准，所有患者采集血样前均签署知情同意书。

进行miRNA基因芯片筛查的5例ATD导致粒细胞缺乏患者的一般资料见表3。用于qRT-PCR验证的患者资料详见表4，其中ATD导致粒细胞缺乏组患者中有21名患者住院后接受了骨髓细胞学检查，13例诊断为粒系再生障碍型，7例为粒系成熟障碍型，1例骨髓取材稀释（考虑再生障碍型）未确诊。

**表3** **用于microRNA芯片筛查的患者资料**

临床资料

患者编号

年龄（岁）性别服用

药物

ATD 疗

程（周）

粒细胞恢复

时间（天）骨髓特点

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 患者 1 | 26 | 女 | MMI | 3 | 9 | 再生障碍 |
| 患者 2 | 38 | 女 | MMI | 5 | 12 | 再生障碍 |
| 患者 3 | 29 | 女 | MMI | 6 | 5 | 再生障碍 |
| 患者 4 | 41 | 女 | MMI | 6 | 10 | 再生障碍 |
| 患者 5 | 22 | 女 | MMI | 8 | 9 | 再生障碍 |

**25**

**表4** **用于qRT-PCR验证的患者临床资料**

| 实验分组 | | |
| --- | --- | --- |
| 临床资料 | 粒细胞缺乏组  （n=28） | 未发生粒细胞减少组  （n=32） |
| 年龄:( x ±s )岁 | 34.7±10.3 | 36.4±12.1 |
| 性别 男性 | 6 | 7 |
| 女性 | 22 | 25 |
| 服用 MMI 者 | 21 | 20 |
| 服用 PTU 者 | 7 | 12 |
| ATD 疗程:( x ±s )周 | 7.1±3.9 | 16±4.5 |
| 粒系再生障碍型 | 13 | —— |
| 粒系成熟障碍型 | 7 | —— |

### **1.2** 主要试剂

#### **1.2.1** 试剂

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂名称** | **Th产公司** |
| mirVanaTM PARISTM 血浆 miRNA 提取试剂盒 | 美国 Ambion 公司 |
| Agilent human miRNA (8\*60K) V16.0 芯片  （含 1205 条人 miRNA） | 美国 Agilent 公司 |
| MiRNA Complete Labeling and Hyb Kit | 美国 Agilent 公司 |
| Gene Expression Wash Buffer Kit | 美国 Agilent 公司 |
| miRcute miRNA 提取分离试剂盒 | 北京天根公司 |
| miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒 | 北京天根公司 |
| miRcute miRNA 荧光定量检测试剂盒 | 北京天根公司 |

**26**

#### **1.2.2** **qRT-PCR**引物

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **基因名** | **双向引物序列** | **退火温**  **度（℃）** | **产物长**  **度(bp)** |
| hsa-miR-20a-5p | GSP:5'GGGTAAAGTGCTTATAGTGC3'  R:5'TGCGTGTCGTGGAGTC3' | 60 | 63 |
| hsa-miR-19b-3p | GSP:5'ACCTGTGCAAATCCATG3'  R:5'TGCGTGTCGTGGAGTC3' | 60 | 63 |
| hsa-miR-93(内参) | GSP:5'GGCAAAGTGCTGTTCGTG3'  R:5'CAGTGCGTGTCGTGGAGT3' | 60 | 65 |
| hsa-miR-106b 及 hsa-miR-223 引物天根公司商业化引物 | |  |  |

### **1.3** 主要仪器及设备

|  |  |
| --- | --- |
| **仪器设备名称** | **Th产公司** |
| 低温高速离心机 | 珠海 Hema 医用仪器有限公司 |
| -80℃超低温冰箱 | 上海三洋 |
| Scotsman 制冰机 | Fisher 公司 |
| 微量移液器（10μL、100μL、1000μL） | 德国 Eppendorf 公司 |
| 全自动血细胞分析仪 | 上海 ABX 公司 |
| 芯片滚动杂交炉（Hybridization Oven） | 美国 Agilent 公司 |
| 芯片杂交洗缸（staining dishes） | 美国 Thermo Shandon 公司 |
| 芯 片 结 果 扫 描 （ Agilent Microarray Scanner） | 美国 Agilent 公司 |
| Real Time PCR 仪（LightCycler1.5） | 瑞士罗氏公司 |
| 分光光度仪 | 上海精密仪器厂 |
| Agilent Bioanalyzer 2100 | 美国 Agilent 公司 |

**27**

### **1.4** 实验方法

#### **1.4.1** 血浆的分离及实验分组

**1.4.1.1血浆的分离**

①、采集外周血2 mL（采血时间一般为早晨或上午），迅速转入EDTA抗凝管中，涡旋混匀；

②、在1小时（室温条件下）或2小时（4℃条件下）内进行如下操作：820g，4℃，离心

10分钟；

③、吸约1 mL上清转至洁净的1.5 mL离心管中，16000 g，4℃，离心10分钟，小心吸取上清到新的离心管中；

④、放入-80℃冰箱中保存。

**1.4.1.2实验分组**

①、miRNA芯片检测分组

选取临床资料基本匹配的5名患者（年龄在22～38岁之间，女性患者，服用抗甲状腺药物8周内出现粒细胞缺乏）的血浆样品进行miRNA芯片检测，实验分为两组，

A组为粒细胞缺乏时采集血样。B组为A组患者经过治疗粒细胞恢复正常后采集的血样。

②、qRT-PCR实验分组

qRT-PCR检测共分为3组，A组为粒细胞缺乏时采集的血样（n=28）；B组为A组患者经过治疗粒细胞恢复正常后采集的血样（n=23），其中5人因地域原因或转院治疗而未获得粒细胞恢复后血样。C组为同期服用抗甲状腺药物3月以上未出现粒细胞减少患者血样（n=32）

实时定量PCR时各样品加样量均为2µl，然而由于受RNA浓度定量误差和RNA逆转录效率误差等的影响，每个样品的2µl体积的cDNA其含量并不完全相同，为校正此差异，我们使用hsa-miR-93（不同样品间表达量基本恒定）作为内参。

#### **1.4.2** **miRNA**基因芯片实验

**1.4.2.1 RNA提取**

采用mirVanaTM PARISTM,根据试剂盒标准操作流程进行样品的total RNA抽提，

**28**

抽提所得total RNA经Agilent Bioanalyzer 2100电泳质检合格后备用。

①、在2×Denaturing Solution溶液中添加375µlβ-巯基乙醇，混匀后放置备用；在miRNA Wash Solution 1中添加21 mL无水乙醇，混匀后放置备用；在Wash Solution 2/3中添加40 mL无水乙醇，混匀后放置备用。

②、取适量的血浆（最多可抽625µl，不足100µl时，用Cell Disruption Buffer补至100µl），加入等量的2×Denaturing Solution，涡旋混匀，冰上放置5分钟。

③、添加与总体积等量的酚/氯仿，涡旋混匀30-60秒，室温，最高转速离心5分钟。

④、小心吸取上清到新的1.5 mL离心管中，添加1.25倍体积无水乙醇，涡旋混匀。

⑤、将洁净的离心柱放置到洁净的收集管中，吸取上一步的液体到柱子中，10000 g，室温离心30秒，弃流过液，将离心柱重新放置到收集管中。重复该步骤，直到所有的液体过柱。

⑥、吸取350µl miRNA Wash Solution 1到离心柱中，10000 g，室温离心15秒，弃流过液，将离心柱重新放置到收集管中。

⑦、混合10µl DNase I stock solution和70µl Buffer RDD QIAGEN 80µl加到离心柱中的膜上，25ºC放置15 min。

⑧、吸取350µl miRNA Wash Solution 1到离心柱中，10000 g，室温离心15秒，弃流过液，将离心柱重新放置到收集管中。

⑨、500µl Wash Solution 2/3过柱两次，空柱离心1分钟。将离心柱放置到新的收集管中，柱中心加入100µl 95℃预热的Elution Solution或nuclease-free水，室温最高转速离心20-30秒，收集管中的液体即为提取的Total RNA，可放置在-70℃保存。

用RNA完整指数( RNA intergrity number, RIN)来衡量总RNA的质量，从1～10分别反映样本的质量。RIN＜5.0表示样品质量差，RIN≥7表示为质量好，RIN≥5表示样品质量中等。

**1.4.2.2芯片实验**

①、样品RNA的标记

实验样品RNA采用Agilent miRNA芯片配套的试剂盒，miRNA Complete Labeling and Hyb Kit，按照标准操作流程的标记部分对样品中的miRNA分子进行荧光标记。

②、芯片杂交

**29**

按照Agilent miRNA芯片配套提供的标准操作流程和配套试剂盒，miRNA Complete Labeling and Hyb Kit的杂交部分，进行样品的杂交实验。在滚动杂交炉中，Hybridization Oven，55℃，20rpm，滚动杂交20小时。杂交完成后在洗缸staining dishes中洗片，洗片所用的试剂为Gene Expression Wash Buffer Kit。

③、结果扫描及数据分析

芯片结果采用Agilent Microarray Scanner进行扫描，用Feature Extraction software

10.7读取数据，软件设置Scan resolution=5μm, PMT 100%, 5%最后采用Gene Spring Software 11.0 进行归一化处理，数据经过均一化后以某一miRNA在粒细胞缺乏和粒细胞正常血浆中的表达差异倍数表示，以相差2倍及以上为阈值，统计在5例样品中一致性上调或下调的miRNA。以5例粒细胞缺乏血浆中均检出有效信号的miRNA数据经均一化后构建系统聚类分析，使用cluster 3.0进行分析，并以Treeview软件绘制聚类树。

#### **1.4.3** 靶基因预测

应用生物信息学软件（MiRanda: [http: //www. microrna. org/microrna/home. do](http://www.microrna.org/microrna/home.do)，

PicTar: [http: //pictar. bio. nyu. edu/](http://pictar.bio.nyu.edu/), miRBase Targets: [http: //www. mirbase. org/](http://www.mirbase.org/): 和

TargetScan: [http: //www. targetscan. org](http://www.targetscan.org/)）进行差异表达miRNA靶基因的预测，取至少2

个软件预测得到的基因作为靶基因。

#### **1.4.4** **miRNA qRT-PCR**验证

**1.4.4.1 miRNA提取分离**

①、每200μl血浆中加入等体积裂解液MZ，振荡器振荡30秒，室温放置5分钟。

②、室温12000rpm离心10分钟，取上清，转入新的无RNase离心管中。加入200μl

氯仿，振荡器振荡15秒，室温放置5分钟。

③、室温12000rpm离心15分钟，样品分成三层：黄色有机相，中间层和无色水相。转移水相到新的无RNase管中。

④、缓慢加入转移液1/3体积的无水乙醇，混匀。将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱miRspin，室温放置2分钟，室温12000rpm离心30秒。弃掉吸附柱，保留流出液。

⑤、量取流出液的体积，缓慢加入流出液2/3体积的无水乙醇，混匀，将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱miRelute，室温放置2分钟，室温12000rpm离心30秒，弃掉流出液，保留吸附柱miRelute。

**30**

⑥、向吸附柱miRelute中加入50μl去蛋白液MRD，室温静置2分钟，室温12000rpm

离心30秒，弃掉流出液。

⑦、向吸附柱miRelute中加入600μl漂洗液，室温静置2分钟，室温12000rpm离心

30秒，弃掉流出液。

⑧、将吸附柱miRelute放入2ml收集管，室温12000rpm离心60秒，去除残余液体。

⑨、将吸附柱miRelute转入新的1.5ml离心管，加入15-30μl RNase-free ddH2O,室温放置2分钟，室温12000rpm离心2分钟。

**1.4.4.2 miRNA cDNA第一链合成**

①、miRNA 3’端加尾处理：在冰预冷的RNase-free的反应管中加入以下试剂至总体积20μl。

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂组分** | **体积** |
| Total RNA | 3μl |
| E.coli poly(A) Polymerase(5U/μl) | 0.4μl |
| 10×poly(A) Polymerase Buffer | 2μl |
| 5×rATP Solution | 4μl |
| RNase-free ddH2O | 10.6μl |
| Total Volume | 20μl |

②、移液器轻轻混匀上述配置的反应液，短暂离心后37℃反应60分钟。

③、逆转录反应：按如下组分进行反应液的配制：

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂组分** | **体积** |
| Poly(A)反应液 | 2μl |
| 10×RT Primer（10μM） | 2μl |
| 10×RT Buffer | 2μl |
| Super Pure dNTP | 1μl |
| RNasin （40U/μl） | 1μl |
| Quant RTase | 0.5μl |
| RNase-Free ddH2O | 11.5μl |

**31**

|  |  |
| --- | --- |
| Total Volume | 20μl |

④、移液器轻轻混匀上述配置的反应液，短暂离心后在37℃反应60分钟。

**1.4.4.3 miRNA荧光定量检测**

①、室温融化2×miRcute miRNA Premix 和Reverse Primer。

②、反应体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂组分** | **体积** |
| 2×miRcute miRNA Premix（含 SYBR） | 10μl |
| Forward Primer | 0.5μl |
| Reverse Primer | 0.5μl |
| miRNA 第一链 cDNA | 2μl |
| ddH2O | 7μl |
| Total Volume | 20μl |

③、PCR反应程序

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **目的** | **循环数** | **温度** | **时间** |
| 预变性 | 1× | 94℃ | 2 分钟 |
| 变性 |  | 94℃ | 20 秒 |
|  | 40× |  |  |
| 退火延伸 |  | 60℃ | 34 秒 |
| 保存 | 1× | 4℃ |  |

#### **1.4.5** 统计学分析

**1.4.5.1芯片结果分析**

芯片筛选得到的差异miRNA其差异倍数（Foldchange, FC）是将待比较的两个标准化以后的信号相除所得的值，即Foldchange=SignalA/ SignalB。两组比值进行统计学t检验，计算显著性*p*值，*p* ＜0.05为显著性差异。

**1.4.5.2荧光定量结果分析**

反应结束后观察内参及待检测miRNA的扩增曲线、融解曲线，扩增曲线确认反

**32**

应体系试剂质量可靠，融解曲线确认反应产物特异。所有样本重复3次，试验设计为最多40次循环，达到能够检测到该基因的最小循环数即该miRNA的CT值。CT值代表了一种目的miRNA分子达到试验设计阈值所需要的PCR循环的次数。目的基因量=2一△△CT，2一△△CT表示的是实验组目的基因表达相对于对照组变化的倍数。在目的基因与内参基因扩增效率相同的情况下可以直接得到目的基因相对于内参基因的定量。△CT=CT目的-CT内参，△△CT=△CT实验-△CT对照，把所得到的CT值还原为目的基因的量。当△△CT绝对值大于2时，我们判断实验组和对照组之间的目的基因有显著性差异。如果在实验组目的基因检测不到或者CT值大于35，而对照组中CT值小于35，我们判断该基因下调，反之亦然。

**33**

## **2**、 实验结果

### **2.1** 血浆总**RNA**提取结果及**RNA**质控结果：

经Trizol提取ATD导致粒细胞缺乏患者血浆总RNA，通过紫外定量分析表明所提取的RNA无明显降解，RNA质量符合miRNA芯片检测的要求（见表5）

**表5** **芯片制备样品总RNA样本质检结果**

| No. | 样本编号 | 体积 (μL) | 浓度  （μg/μL） | 总量(μg) | A260/ A280 | RIN | 结果 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | A | 6.8 | 35 | 238.0 | 1.72 | 7.3 | 合格 |
| 2 | B | 8.6 | 35 | 301.0 | 1.81 | 7.5 | 合格 |
| 3 | C | 9.6 | 35 | 336.0 | 1.88 | 8.1 | 合格 |
| 4 | D | 8.2 | 40 | 328.0 | 1.77 | 6.9 | 合格 |
| 5 | E | 6.7 | 40 | 268.0 | 1.83 | 7.4 | 合格 |
| 6 | a | 7.8 | 40 | 312.0 | 1.86 | 7.6 | 合格 |
| 7 | b | 7.9 | 40 | 316.0 | 1.77 | 6.8 | 合格 |
| 8 | c | 10.9 | 35 | 381.5 | 1.85 | 7.2 | 合格 |
| 9 | d | 7.5 | 40 | 300.0 | 1.97 | 7.7 | 合格 |
| 10 | e | 8.9 | 40 | 356.0 | 1.95 | 7.1 | 合格 |

### **2.2** **miRNA**筛选结果

#### **2.2.1** 芯片杂交、扫描结果

经荧光标记、纯化、芯片杂交后采集图像，数据归一化处理后以荧光标记信号强度比值(Fold change)≤0.5或≥2为标准判定差异表达miRNA，本研究10张芯片血浆

miRNA检出率在10.79～13.72%间。组间变异系数CV均小于10%。对于血浆样品，这一芯片检出率和变异系数结果提示芯片杂交成功。具体芯片扫描如图4示：

**34**



**图 4** miRNA**芯片扫描截图**

A～E对应表3中的患者1～5的血浆样品

大小写字母分别代表粒细胞缺乏时及粒细胞恢复正常后

#### **2.2.2** 芯片检测结果火ft图及聚类图：

MiRNA 芯片筛选出一系列在粒细胞缺乏时及粒细胞恢复正常后差异表达的

miRNA。与粒细胞恢复正常后血浆样品相比，粒细胞缺乏时患者血浆中下调表达的

miRNA有23个，其中明显下调（Fold change≥5倍）的有9个（图5），包括hsa-miR-20a、hsa-miR-223、hsa-miR-106b、hsa-miR-19b、hsa-miR-1234、hsa-miR-342-3p、hsa-miR-15a、hsa-miR-197、hsa-miR-144，上调表达的miRNA有9个，其中7个Fold change≥5倍，分别是hsa-miR-200、hsa-miR-756、hsa-miR-320a、hsa-miR-21、hsa-miR-30a、hsa-miR-483-5p、hsa-miR-320e。

**35**



**图5 芯片结果分析火ft图**

X轴平行线：p-value=0.05；Y轴平行线：Fold change=2；红色区域：p-value＜0.05；Fold change≥2差异miRNA。



**图 6** **主要差异表达的miRNA聚类分析图**

样本位于列（A-E代表粒细胞缺乏组，a-e代表粒细胞恢复正常组），miRNA位于行，微小RNA 的群聚图位于右边，而样本的群聚图位于顶端。在图顶端的色差度说明了微小

RNA的相对表达水平：红色代表高表达，绿色代表低表达。

**36**

### **2.3** 差异表达**miRNA**靶基因的预测结果

通过靶点预测软件MiRanda，PicTar，miRBase Targets和TargetScan预测及结合文献报道，对芯片筛选得到部分低表达和高表达miRNA进行靶基因分析（表6、7）。

**表6 低表达miRNA主要相关靶基因**

| miRNA | 靶基因 | 靶基因具体名称 |
| --- | --- | --- |
| hsa-miR-20a | PDCD1LG2 | Programmed cell death 1 ligand 2 |
|  | PTEN | Phosphatase and tensin homolog |
|  | FAS | Fructose-6-phosphate aldolase |
|  | LRF | Leukemia/lymphoma Related Factor |
|  | E2F1 | E2F transcription factor1 |
|  | ASK1 | Apoptosis signal-regulating kinase 1 |
| hsa-miR-223 | SLC8A1 | Solute carrier family 8, member 1 |
|  | [FBXW7](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&amp;Cmd=ShowDetailView&amp;TermToSearch=55294) | F-box and WD repeat domain containing 7 |
|  | [FAT1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&amp;Cmd=ShowDetailView&amp;TermToSearch=2195) | FAT tumor suppressor homolog 1 |
|  | IGF-1R | Insulin-like growth factor receptor |
|  | STAT5A | Signal transducer and activator of transcription 5A |
| hsa-miR-106b | TGFβ | Transforming growth factor β |
|  | BIM | BCL2-like 11 |
|  | p21/CIP1 | Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A |
|  | MYC | Myelocytomatosis oncogene |
| hsa-miR-19b | E2F1 | E2F transcription factor1 |
|  | FGFR2 | Fibroblast growth factor receptor 2 |
|  | BIM | BCL2-like 11 |
| hsa-miR-15a | CCNE1 | Cyclin E1 |
|  | VEGF | Vascular endothelial growth factor |
|  | CCND1 | Cyclin D1 |
|  | BCL2 | B-cell CLL/lymphoma 2 |

**37**

**表7** **高表达miRNA主要相关靶基因**

| miRNA | 靶基因 | 靶基因具体名称 |
| --- | --- | --- |
| hsa-miR-320e | IRF6 | Interferon regulatory factor 6 |
|  | TCEAL8 | Transcription elongation factor A (SII)-like 8 |
|  | ZNF3 | Zinc finger protein 3 |
|  | MMP19 | Atrix metallopeptidase 19 |
| hsa-miR-320a | PBX3 | Pre-B-cell leukemia homeobox 3 |
|  | MAPK1 | Mitogen-activated protein kinase 1 |
|  | BANP | BTG3 associated nuclear protein |
|  | CKD13 | Cyclin-dependent kinase 13 |
|  | ITGB3 | Integrin, beta 3 |
| hsa-miR-483 | CDC25A | Cell division cycle 25A |
|  | MeCP2 | Methyl CpG-binding protein 2 |
|  | Aanat | Arylalkylamine N-acetyltransferase |
|  | ERK1 | Extracellular signal-regulated kinase 1 |
|  | Socs3 | Suppressor of cytokine signaling 3 |
| hsa-miR-30a | Eya2 | Eye absent proteins 2 |
|  | TGFβ1 | Transforming growth factor -beta1 |
|  | DLL4 | Delta-like 4 |
| hsa-miR-21 | FasL | Fas antigen ligand |
|  | PDCD4 | Programmed cell death 4 |
|  | ITGbeta4 | Integrin-beta4 |
|  | GRP64 | G protein-coupled receptor 64 |
|  | [GATAD2B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&amp;Cmd=ShowDetailView&amp;TermToSearch=57459) | GATA zinc finger domain containing 2B |
| hsa-miR-200 | ZEB1/ ZEB2 | Zinc finger E-box-binding homeobox1/2 |
|  | MT1-MMP | Membrane type-1 matrix metalloproteinase |
|  | EGFR | Epidermal growth factor receptor |

**38**

结果表明低表达的miRNA与细胞凋亡及细胞周期调控密切相关，高表达miRNA多参与细胞增殖、炎症反应、细胞凋亡及血管生成等过程的调控。通过对低表达

miRNA与之前SSH筛选得到的高表达EST片段[10]比对发现，hsa-miR-20a靶向调控的

PTEN基因，正是我们SSH筛选获得的高表达EST片段之一。

### **2.4** 部分低表达**miRNA**的**qRT-PCR**验证

#### **2.4.1** 低表达的**4**个**miRNA**在**3**组血浆样本间的表达差异

挑选miRNA芯片中低表达明显的hsa-miR-20a，hsa-miR-223, hsa-miR-106b，hsa-miR-19b进行qRT-PCR验证（实验分组见1.4.1.2）。研究发现：粒细胞缺乏时及粒细胞恢复正常后两组血浆中上述4个miRNA表达均存在明显差异（*P<*0.01），qRT-PCR检测结果与芯片结果基本一致。而其表达量在粒细胞恢复正常后与正常对照组血浆中差异无统计学意义（*P＞*0.05 图7）。



**图 7** **低表达miRNA的qRT-PCR验证**

注：*\*\**，*P<*0.01与同组粒细胞恢复正常后及粒细胞正常组比较。

#### **2.4.2** 低表达**miRNA**与在服用**MMI/PTU**两组间表达分析

ATD主要包含MMI和PTU两类，通过对本研究中MMI与PTU导致粒细胞缺乏患者血浆上述4个miRNA表达量分析发现（图8、9），粒细胞缺乏时及恢复正常后4个miRNA在MMI和PTU两种药物治疗组之间表达变化无明显差异（*p*＞0.05）

**39**



**图8** **粒细胞缺乏时MMI/PTU两组间各miRNA的表达情况**



**图9** **粒细胞恢复正常后MMI/PTU两组间各miRNA的表达情况**

**40**

#### **2.4.3** 低表达**miRNA**在两组骨髓特点分组间的表达分析

ATD导致粒细胞缺乏患者骨髓特点可以分为粒系再生障碍型和粒系成熟障碍型两组，通过分析粒细胞缺乏时患者血浆hsa-miR-20a，hsa-miR-223, hsa-miR-106b，hsa-miR-19b在两组骨髓分类之间的表达发现（图10），4个miRNA在骨髓分类两组之间表达变化无明显差异（*p*＞0.05）



**图10** **粒细胞缺乏时两组骨髓类别间各miRNA表达情况**

**41**

## **3**、 讨 论

ATD应用于临床已经有60多年的历史。其方便有效、价格便宜，绝大多数患者耐受良好。但是少数患者服药后出现粒细胞缺乏这一严重不良反应，部分患者因继发感染而导致死亡[29]。PTU导致粒细胞缺乏的发生率是0.37%, MMI发生率与其相当，为0.35%，女性患者发病是男性的3.7倍[5]。大多数患者粒细胞缺乏发生在服药的 3

个月内，发病最快者服药仅6天[30]，最长的服药11年后出现粒细胞缺乏[31]。目前关于ATD导致粒细胞缺乏的发病机制主要有免疫损伤学说及药物对骨髓的毒性作用学说。本文第一部分通过对粒细胞缺乏患者骨髓特点的分析，发现药物对骨髓的直接毒性作用并不是其主要发病原因。ATD介导的免疫反应对粒系各阶段细胞损伤导致粒细胞坏死或凋亡的可能是值得深入探索的研究方向。

大量研究表明miRNA在造血细胞增殖、分化等关键过程中起发挥着重要的调节作用。Chen等首先报道miRNA参与调控造血细胞生成，并在造血组织中发现miR-181、miR-223、miR-142三个miRNA存在不同程度表达；miR-181可促使B淋巴细胞在髓系细胞中的比例升高；miR-223高表达促使髓系前体细胞向粒细胞分化而单核细胞分化受阻；而miR-142在所有造血细胞中表达，其高表达可导致T淋巴细胞在髓系中比例升高

[32]. 此外，在急慢性白血病、巨幼细胞贫血等血液系统疾病的发生发展过程中也都有

miRNA在发挥着重要的作用[33,34,35,36]。可以认为miRNA在机体生理及病理造血过程当中都具有重要的调控作用。因此，探索疾病相关的差异表达miRNA及其作用机制成为近年来研究的热点。

而对于疾病相关miRNA筛选，自从在血清和血浆中鉴定出细胞外miRNA以来

[37]，到目前已有近1000篇文章报道这种血清/血浆内miRNA可以作为各种疾病的生物标志物。有研究甚至发现在尿液、唾液、乳汁等各种体液中也可以检测到

miRNA[38,39,40]，但血浆及体液中miRNA的来源以及影响因素尚不明确。在血清/血浆及体液中检测到的miRNA究竟是由于细胞破裂，还是细胞主动分泌出来的，这个问题到至今没有答案。目前公认的理论是，由于血液中存在大量血细胞，所以血清/血浆中的miRNA绝大部分可能来自于血细胞[41]。主要支持证据是只要血细胞的数量发生微小的波动甚至是溶血都会造成血清/血浆中miRNA含量发生变化[42]。有研究表

**42**

明，一些实体瘤相关的血浆miRNA在血细胞中含量很高，并且其表达水平也与血细胞数目相关[43, 44, 45]。这些结果都表明，血浆和血清中的miRNA可能主要来源于血细胞。ATD导致粒细胞缺乏患者发病后，血液中粒细胞数量明显下降甚至缺乏，我们推测在这一过程中血浆miRNA表达也会有相应的变化。

基于上述科学的推理，本研究采用miRNA芯片检测ATD导致粒细胞缺乏患者粒细胞缺乏时及粒细胞恢复正常后的血浆miRNA表达水平，通过Gene Spring Software 11.0分析获得32个粒细胞缺乏时差异表达的miRNA，其中23个表达下调，9个表达上调；显著上调的有hsa-miR-200、hsa-miR-756、hsa-miR-320a、hsa-miR-21、hsa-miR-30a、hsa-miR-483-5p、hsa-miR-320e，显著下调的有hsa-miR-20a、hsa-miR-223、hsa-miR-

106b、hsa-miR-19b、hsa-miR-1234、hsa-miR-342-3p、hsa-miR-15a、hsa-miR-197、hsa-miR-144. 通过生物信息学分析并结合近年相关的研究文献，我们发现低表达的

miRNA与细胞凋亡及细胞周期调控密切相关，其调控的靶向基因包括BCL-2、ASK1、

FAS、BIM、PDCD1LG2等凋亡相关的基因。而高表达miRNA多参与细胞增殖、炎症反应、细胞凋亡及血管生成等过程的调控。通过对低表达miRNA与之前SSH筛选得到的高表达EST片段[10]比对，我们惊喜的发现，生物信息学预测hsa- miR-20a靶向调控的PTEN基因，正是我们SSH筛选获得的高表达EST片段之一。

在此基础上，我们选择了对低表达的hsa-miR-20a、hsa-miR-223、hsa-miR-106b、hsa-miR-19b进qRT-PCR验证。验证的结果证实了芯片筛选结果与定量检测基本一致，说明芯片筛选血浆差异表达miRNA结果可靠。为了进一步明确上述miRNA表达变化与服用ATD的类别及患者骨髓特点分类之间的关系，我们分析了低表达hsa-miR-20a、hsa-miR-223、hsa-miR-106b、hsa-miR-19b在服用MMI组和PTU组之间的表达差异，我们发现，在粒细胞缺乏时及粒细胞恢复正常后两组血浆间上述

miRNA表达变化趋势基本一致。同时，通过对比粒细胞缺乏时上述4个miRNA在两组骨髓分类之间的变化趋势发现这些miRNA在两种骨髓分组之间的表达变化也无明显差异。这也就提示，MMI和PTU导致粒细胞缺乏的发生机理可能相同。同时也进一步佐证了我们关于骨髓损伤严重程度不同可能是由于粒系“逆向”免疫损伤严重程度不同的这一假说。

通过qRT-PCR证实的低表达最明显的hsa-miR-20a属于miR17-92家族成员之一

**43**

[46]，它们的表达与c-myc密切相关，c-myc能调控细胞周期转录因子E2F1的表达，c-myc-E2F1表达下降可抑制hsa-miR-20a的转录激活，从而促进细胞凋亡[47, 48]。目前已有的关于hsa-miR-20a的研究主要集中在肿瘤研究领域，hsa-miR-20a作为一个原癌基因，在前列腺癌[49]、胃癌[50]、胆囊癌[51]、宫颈及卵巢癌[52,53]等实体瘤以及血液系统肿瘤[54,55]的发病过程中都发挥着重要的作用。hsa-miR-20a在肿瘤组织高表达可以抑制抑癌基因或激活原癌基因而促进肿瘤细胞的增殖和转移，降低其表达可促进肿瘤细胞凋亡。而在ATD导致粒细胞缺乏患者血浆中明显低表达的hsa-miR-20a究竟具有怎样的生物学功能，其是否与粒细胞的凋亡亦有相关？作用的具体机制是什么？深入研究这些这些问题可能会为ATD导致粒细胞缺乏机制的阐明带来新的思路。

**44**

## **4**、 小 结

## 1、 成功获得ATD导致粒细胞缺乏发Th相关的血浆miRNA谱。

## 2、 ATD导致粒细胞缺乏的血浆miRNA表达变化与服用ATD类别及骨髓特点分类无明显相关。

## 3、 粒细胞缺乏时差异低表达的hsa-miR-20a、hsa-miR-223、hsa-miR-106b、hsa-miR-19b等均参与细胞凋亡的发Th，提示ATD导致粒细胞缺乏发Th可能与粒细胞凋亡有关。

**45**

**第三部分**

**hsa-miR-20a对HL-60、U-937细胞Th物学性状的影响**

## **1.** 材料和方法

### **1.1** 细胞及质粒

HL-60、U-937购自中国科学院细胞库，293T细胞为上海吉凯公司提供。

GV159载体、pHelper 1.0、pHelper 2.0载体购自Invitrogen公司。

### **1.2** 药品与试剂

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂名称** | **Th产公司** |
| RPMI-1640 培养基 | 美国 GibcoBRL 公司 |
| DMEM 培养基 | 美国 GibcoBRL 公司 |
| 胎牛血清 | 中国杭州四季清公司 |
| 四甲基偶氮唑蓝（MTT） | 美国 Amerson 公司 |
| 二甲基亚砜（DMSO） | 美国 Sigma 公司 |
| 250Bp DNA ladder Marker | 美国 Sigma 公司 |
| 琼脂糖 | 美国 Sigma 公司 |
| 1Kp DNA ladder Marker | 加拿大 Fermentas 公司 |
| 限制性内切酶 | 英国 NEB 公司 |
| In-Fusion PCR Cloning Kit | 美国 Clontech 公司 |
| 质粒抽提试剂盒 | 美国 promega 公司 |
| Trizol | 美国Invitrogen公司 |
| Lipofectamine 2000 | 美国 Invitrogen 公司 |
| MMLV 逆转录试剂盒 | 美国 promega 公司 |
| Rnase inhibitor | 美国 promega 公司 |
| SYBR Master Mixture | 大连宝生物公司 |
| 噻唑蓝( MTT) | 美国 Sigma 公司 |

**46**

### **1.3** 主要仪器设备

|  |  |
| --- | --- |
| **仪器设备名称** | **Th产公司** |
| CO2 培养箱 | 美国 Forma 公司 |
| 普通光学显微镜 | 日本 Nikon 公司 |
| 荧光倒置显微镜 | 日本 Olympus 公司 |
| 超净工作台 | 苏州安泰空气技术公司（SW-CJ-2FD） |
| 超纯水器 | 美国 PURELAB Maxima 公司 |
| 酶联免疫检测仪 | Bio-Tek 公司（ELX-800） |
| 流式细胞仪 | 德国 Beckman 公司 |
| －80℃超低温冰箱 | 日本三洋公司 |
| 电子分析天平 | 日本 SHIMadzu 公司（AY120 型） |
| 微量移液器 | 德国 Eppendorf 公司 |
| 凝胶成像分析系统 | 美国 Alpha Innotech 公司 |
| 微量离心机 | 美国 Genofuge 公司 |
| 高速低温离心机 | 德国 Eppendorf 公司 |
| 细菌摇床 | 华利达实验设备公司 |
| 细菌培养箱 | 上海一恒科技公司 |
| 稳压 DNA 电泳仪 | 美国 BioRad 公司 |
| 流式细胞仪 | 美国 BD 公司 |
| Real time PCR 仪器 | 日本 Takara 公司 |
| Nanodrop 分光光度计 | 美国 Thermo 公司 |

### **1.4** 主要实验方法

#### **1.4.1** **hsa-mir-20a**慢病毒载体构建

**1.4.1.1基因信息：**

**47**

|  |  |
| --- | --- |
| 基因名称 | hsa-miR-20a-5p |
| 物种 | Human (Accession number: MIMAT0000075) |
| Target sequence | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG |
| Hsa-miR-20a-5p down  oligo 制备引物 | Forward 5'-CCGGTCTACCTGCACTATAAGCACTTT ATTTTTG-3'  Reverse 5'-AATTCAAAAATAAAGTGCTTATAGTGC  AGGTAG-3' |
| Hsa-miR-20a-5p up  oligo 制备引物 | Forward 5'-AGCTGTACAAGTAAGTTTGTGTACTTTTAT TGTGTC-3'  Reverse5'-GGGAGAGGGGCTTAGTCACACAGCTGGAT  GCAAACC-3' |

**1.4.1.2工具载体**



**1.4.1.3载体酶切反应体系**

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂** | **体积** |
| ddH2O | 41µl |
| 10×buffer 1 | 5µl |
| 纯化的 DNA 质粒（1ug/μL） | 2µl |
| Age I （5 U/μL） | 1µl |
| EcoR I （20 U/μL） | 1µl |
| Total | 50µl |

**48**

酶切温度37℃，反应2小时。

**1.4.1.4 PCR扩增目的基因片段**

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂** | **体积（μL）** |
| ddH2O | 12.4 |
| 5×Taq buffer | 4 |
| dNTPs（2.5mM） | 1.6 |
| Primer Forward | 0.4 |
| Primer Reverse | 0.4 |
| Template | 1 |
| Taq polymerase | 0.2 |

**1.4.1.5重组克隆制备**

**（1）感受态制备**

①、从于37℃培养16小时的新鲜平板中挑取一个单菌落，转到一个含有100 ml LB

培养基得1 L烧瓶中。于37℃剧烈振摇培养3 小时；

②、在无菌条件下将细菌转移到一个无菌、一次性使用的、用冰预冷的50 ml聚丙烯管中，在冰上放置10分钟，使培养物冷却至0℃；

③、于4℃，以4000转/分离心10分钟，回收细胞；

④、倒出培养液，将管倒置1分钟，使最后残留的痕量培养液流尽；

⑤、以10ml用冰预冷的0.1mol/L CaCl2重悬每份沉淀，放置于冰浴上；

⑥、于4℃，以4000转/分离心10分钟，回收细胞；

⑦、倒出培养液，将管倒置1分钟，使最后残留的痕量培养液流尽；

⑧、每50ml初始培养物用2ml用冰预冷的0.1mol/L CaCl2重悬细胞沉淀；

⑨、将细胞分装成小份，放于-70oC冻存。

**（2）microRNA片段连接入线性化载体反应体系：**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **试剂** | **阳性对照（μL）** | **自连对照（μL）** | **连接组（μL）** |
| ddH2O | 5 | 10 | 5 |

**49**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 10×T4 buffer | 2 | 2 | 2 |
| 50% PEG4000 | 2 | 2 | 2 |
| 酶切载体DNA | 5 | 5 | 5 |
| 酶切的PCR产物 | 5 | - | 5 |
| T4 DNA Ligase | 1 | 1 | 1 |
| Total | 20 | 20 | 20 |

**（3）转化**

①、用冷却的无菌吸头从每种感受态细胞悬液中各取200μl转移到无菌的微量离心管中，每管加10μl连接液，轻轻旋转以混匀内容物，在冰中放置30分钟；

②、将管放到预加温到42℃的循环水浴中放好的EP管架上，恰恰放置90秒，不要摇动EP管架；

③、快速将管转移到冰浴中，使细胞冷却l~2分钟；

④、每管加800μl LB培养基。用水浴将培养基加温至37℃，然后将管转移到37℃摇床上，温育45分钟使细菌复苏；

⑤、将150μl转化的感受态细胞转移到AMP抗性（100ug/ml）的LB琼脂培养基上；

⑥、将平板置于室温直至液体被吸收；

⑦、倒置平皿，于37℃培养，16小时；

⑧、长出的克隆进行后续PCR鉴定；

**（4）阳性克隆的鉴定**

AMP抗性筛选得到的阳性克隆采用PCR扩增鉴定后送公司测序。PCR扩增引物及反应体系如下：Forward 5'-GGAAAGAATAGTAGACATAATAGC-3’；

Reverse 5'-CGCGTGGATAACCGTATTAC-3'

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂** | **体积（μL）** |
| ddH2O | 12.4 |
| 5×Taq buffer | 4 |
| dNTPs（2.5mM） | 1.6 |
| Primer Forward | 0.4 |

**50**

|  |  |
| --- | --- |
| Primer Reverse | 0.4 |
| Template | 1 |
| Taq polymerase | 0.2 |

**1.4.1.6慢病毒包装**

①、转染前24 h，用胰蛋白酶消化对数生长期的293T细胞，以含10%血清的培养基调整细胞密度为1.2×107细胞/20ml，重新接种于15cm细胞培养皿，37 ℃、5% CO2培养箱内培养。24 h待细胞密度达70%～80%时即可用于转染。

②、转染前2 h将细胞培养基更换为无血清培养基；

③、向一灭菌离心管中加入所制备的各DNA溶液(pGC-LV载体20μg, pHelper 1.0载体15μg, pHelper 2.0载体10μg)，与相应体积的Opti-MEM混合均匀，调整总体积为2.5 ml，在室温下温育5分钟；

④、将Lipofectamine 2000试剂轻柔摇匀，取100μl Lipofectamine 2000试剂在另一管中与2.4ml Opti-MEM混合，在室温下温育5分钟；

⑤、把稀释后的DNA不稀释后的Lipofectamine 2000进行混合，轻轻地颠倒混匀，不要振荡。必须在5分钟之内混合；

⑥、混合后，在室温下温育20分钟，以便形成DNA与Lipofectamine 2000稀释液的转染复合物；

⑦、将DNA与Lipofectamine 2000混合液转移至293T细胞的培养液中，混匀，于37℃，5% CO2细胞培养箱中培养；

⑧、培养8 h后倒去含有转染混和物的培养基，每瓶细胞加入20 ml的PBS液，轻轻左右晃动一下培养瓶以洗涤残余的转染混和物，然后倒去；

⑨、每瓶细胞中加入含10%血清的细胞培养基25 ml，于37℃、5% CO2培养箱内继续培养48小时。

**1.4.1.7病毒的收集与浓缩**

①、收集转染后48小时（转染即可为0小时计起）的293T细胞上清液；

②、于4 ℃，4000 g 离心10 min，除去细胞碎片；

**51**

③、以0.45μm滤器过滤上清液于40 ml超速离心管中；

④、把病毒粗提液样品加入到过滤杯中（最多19 ml），盖上盖子。将过滤杯插到滤过液收集管中；

⑤、组合好后，做好平衡，放在转头上；

⑥、在4000×g离心，至需要的病毒浓缩体积。通常需要的时间为10~15分钟；

⑦、离心结束后，取出离心装置，将过滤杯和下面的滤过液收集杯分开；

⑧、将过滤杯倒扣在样品收集杯上；

⑨、离心力不超过1000g，时间为2分钟。过高转速会导致样品损失。把过滤杯从样品收集杯上移开。样品收集杯中的即为病毒浓缩液；

⑩、将病毒浓缩液移出，分装后保存在病毒管中，-80度长期保存。取其中一支进行病毒生物学滴度测定。

**1.4.1.8慢病毒滴度测定**

采用荧光法测定病毒滴度

①、测定前一天，为测定滴度所需的细胞（293T细胞：贴壁生长）铺板，96孔板，每个孔加4×10 4个细胞，体积为100μl；

②、根据病毒的预期滴度，准备4~6个无菌的Ep管。在每个管中加入90μl的无血清培养基；

③、取待测定得病毒原液10μl加入到第一个管中，混匀后，取10μl加入到第二个管中。继续相同得操作直到最后一管；

④、选取所需得细胞孔，吸去90μl培养基，丢弃。加入90μl稀释好的病毒溶液。放入培养箱培养；

⑤、24小时后，加入完全培养基100μl。小心操作，不要吹起细胞；

⑥、3天后，观察荧光表达情况。荧光细胞数随稀释倍数的增加而减少；

⑦、根据荧光图片中GFP表达情况，比如，在加入1E-6μl病毒原液的孔中观察到2个带有荧光的细胞，说明该孔中至少有2个病毒颗粒感染了细胞，则该病毒的滴度等于带有荧光的细胞数除以病毒原液量，就是2/（1E-6）=2E+6，单位为TU/μl，也就等于2E+9 TU/ml。

**52**

#### **1.4.2** 细胞培养

HL-60、U-937细胞培养于含体积分数为10%胎牛血清、100U/ml青霉素和100

μg/ml链霉素的RPMI-1640完全培养基中。293T细胞培养于DMEM培养基（含10%胎牛血清）。于37℃、5%CO2条件下培养，每隔2天换一次液，3-4天传一次代。选取对数生长期细胞做实验。

#### **1.4.3** 目的细胞慢病毒感染及实验分组

**1.4.3.1目的细胞慢病毒感染**

①、处于对数生长期的目的细胞悬液（细胞数约为5×105）接种于12-well 中，

37℃5%CO2 培养箱培养待细胞融合度达到约30%；

②、根据细胞MOI值及病毒滴度，加入相应量的病毒；（注：HL-60及U-937细胞的MOI由上海吉凯公司提供）。

③、12小时后观察细胞状态：如果没有明显的细胞毒性作用，继续培养24小时后更换培养基；如果有明显的细胞毒性作用，立即更换培养基；

④、感染2天后观察慢病毒上报告基因GFP的表达情况，荧光率大于80%者，将细胞分成两分，一份分于12孔培养板中待长满后收集细胞用于RNA提取，一份分于12孔板中待长满后收集细胞用于蛋白提取；感染效率低于80%的实验组，重新进行感染实验；

**1.4.3.2慢病毒感染实验分组**

实验共分为3组，即空载体对照组（control），hsa-mir-20a低表达组（hsa-mir-20a down）, hsa-mir-20a高表达组（hsa-mir-20a up）。

#### **1.4.4** **hsa-mir-20a**表达的**qRT-PCR**检测

**1.4.4.1细胞总RNA抽提**

①、收集细胞，2000 rpm离心5分钟，去上清，细胞沉淀中加入1 ml Trizol，充分混匀后室温静置5分钟，然后转移至新的1.5 ml EP 管中；

②、每管加入200μl 氯仿，用手上下颠倒eppendorf管15秒，室温静置10分钟；

③、4℃，12800转/分钟，离心10分钟；

④、吸取上层液体移至新的1.5 ml EP 管，加入等体积预冷的异丙醇，混匀后4℃

**53**

静置10分钟；

⑤、4℃，12800转/分钟离心10分钟后，弃上清；

⑥、加入1 ml 75%乙醇（用DEPC水新鲜配制），洗涤沉淀；

⑦、4℃，11800转/分钟离心5分钟，弃去大部分上清；

⑧、4℃，11800转/分钟离心5分钟，弃去上清， 室温干燥；

⑨、待RNA沉淀基本透明时，加入RNase-free水（加入体积视RNA沉淀量而定）至完全溶解，分光光度计分析测定所抽提RNA的浓度及质量。

1.4.4.2 **RNA逆转录为cDNA**：

①、将1μl Oligo dT(0.5μg/μl)和2.0μg Total RNA加入到PCR小管中，补充RNase-Free H2O至10μl；混匀后离心，70℃温浴10分钟；之后立即置于冰水混合物中冰浴，使OligodT和模板退火；

②、按下表的比例配制反应体系（冰上进行），混匀，短暂离心

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂** | **体积（μL）** |
| 5× RT buffer | 4 |
| 10 mMdNTPs | 2 |
| Rnasin（40 U/μl） | 0.4 |
| M-MLV-RTase（200 U/μl） | 1 |
| RNase-Free H2O | 2.6 |
| Total | 10 |

③、上述体系在42℃水浴反应1小时，然后在70℃水浴10分钟使RT酶失活；

④、将得到的RT产物cDNA置于-80℃保存备用。

**1.4.4.3 qPCR检测**

按下列比例配置反应体系：

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂** | **体积（μL）** |
| SYBR premix ex taq | 10 |
| 上游引物（2.5 μM） | 0.5 |

**54**

|  |  |
| --- | --- |
| 下游引物（2.5 μM） | 0.5 |
| cDNA | 1.0 |
| RNase-Free H2O | 8 |
| Total | 20 |

PCR反应程序：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **目的** | **循环数** | **温度** | **时间** |
| 预变性 | 1× | 94℃ | 2 分钟 |
| 变性 |  | 94℃ | 20 秒 |
|  | 40× |  |  |
| 退火延伸 |  | 60℃ | 34 秒 |
| 保存 | 1× | 4℃ |  |

#### **1.4.5** 细胞增殖与凋亡检测

**1.4.5.1 MTT法检测细胞增殖**

取对数生长期的细胞，以5×104/孔细胞数接种于96孔培养板中，每孔体积200μl。在37℃、5%CO2条件下培养过夜，按分组要求给以不同处理，每组设12个平行孔。处理后培养24、48、72小时各时间点分别往每组4孔中加入5mg/ml MTT 20μl，继续培养4小时，去培养液，加DMSO 150μl /孔，室温下振荡10min，待甲臢完全溶解后，用酶联免疫仪调至波长570nm处读取吸光度（OD）。取4孔OD值的平均数按公式计算细胞存活率。细胞存活率%=实验孔OD均值/对照孔OD均值×100%。实验重复3次。

**1.4.5.2镜下观察细胞形态及荧光观察**

将对数生长期的HL-60、U-937按5×105/孔接种于24孔板，每孔体积800μl各实验组按要求给以不同处理因素作用48、72h后显微镜下观察细胞形态及荧光表达情况。

**1.4.5.3 PI染色流式细胞术(FCM)检测细胞凋亡**

各实验组细胞按要求处理48h、72小时后，收集细胞，1000转/分钟离心10分钟，弃去上清，PBS漂洗2次，沉淀中加入70%冰乙醇固定。1000转/分钟离心10分钟，弃去上清，PBS再次漂洗2次，调整细胞浓度为1×106/ml。加50μl RNase A至终浓度为1g/L，37℃温浴30分钟。加PI至终浓度5μg/ml，350目尼龙网滤膜过滤去除细胞团

**55**

块，4℃避光染色30分钟后，上流式细胞仪检测（激发波长：488nm；发射波长：610nm）各期细胞DNA的含量。测定数据按流式细胞仪所配置的软件进行数据处理，以象限散点图形式显示凋亡细胞的多少。

### **1.5** 统计学分析

荧光定量PCR检测结果分析同第二部分（1.4.5.2）；本部分基因扩增变化选择U6来进行校正。数据以（*x*±s）来表示，采用SPSS17.0统计软件进行数据分析，各组间比较采用单因素方差分析，*p*＜0.05为差异有统计学意义。

**56**

## **2**、 实验结果

### 2.1 病毒滴度检测

病毒以倍数稀释后不同浓度感染对数生长期的293T细胞，3天后，荧光显微镜下观察GFP荧光表达情况。结果图11、12及表8。

**1E+0μl** 1E-1μl 1E-2μl



**明视野**

**荧光视野**



**图11** **hsa-mir-20a down滴度荧光照片（10×10）1E+0μl** 1E-1μl 1E-2μl

**明视野**

**荧光视野**

**图14 hsa-mir-20a up滴度荧光照片（10×10）**

**57**

**表 8** **病毒滴度检测报告**

| 病毒名称 | 滴度(TU/mL) |
| --- | --- |
| LV-hsa-mir-20a down | 8E+8 |
| LV-hsa-mir-20a up | 4E+8 |

两组病毒滴度的检测结果提示病毒包装成功，病毒包装量可满足进一步研究要求。后续研究中病毒使用量根据细胞MOI值、细胞数量及病毒滴度计算决定。

### 2.2 HL-60、U-937细胞慢病毒感染效率的检测

采用倒置荧光显微镜下观察感染后24h、48h、72h、96h HL-60及U-937细胞中GFP荧光表达情况，评价细胞感染效率。如表9、10所示：两组细胞在慢病毒感染后24h到72h，感染效率逐渐增加，72h后呈下降趋势。后续试验可以选择48h、72h作为观察时间点进行研究。

**表9** HL-60**细胞感染率（%.** *x***±s ）**

| 分组 |  |  | 时间 |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 24h | 48h | 72h | 96h |
| Control | 41.5±7.3 | 63.5±3.9 | 84.5±2.7 | 64.0±2.6 |
| MiR-20a up | 42.8±9.1 | 60.8±2.9 | 82.5±4.3 | 62.6±2.2 |
| MiR-20a down | 49.6±7.3 | 58.8±7.2 | 77.3±9.1 | 51.9±7.5 |
| 表10 U-937细胞感染率（%. x ±s ） | | | | |
|  |  |  | 时间 |  |
| 分组 | 24h | 48h | 72h | 96h |
| Control | 36.3±5.1 | 62.2±4.7 | 80.6±7.0 | 55.6±5.2 |
| MiR-20a up | 41.0±4.4 | 57.6±6.9 | 81.5±2.7 | 59.4±7.6 |
| MiR-20a down | 39.5±5.2 | 62.8±5.4 | 77.8±5.3 | 55.1±4.3 |

**58**

### 2.3 hsa-miR-20a在HL-60、U-937细胞中的表达变化

根据上述感染效率检测结果，进一步观察慢病毒感染后48、72h各组细胞hsa-miR-20a表达量的变化。如图13、14示，在HL-60细胞中，低表达组hsa-miR-20a表达量在48、72h分别分别是对照组的0.51和0.47倍（*p*＜0.01）；高表达组其表达量是对照组的1.57和1.48倍（*p*＜0.01）。U-937细胞中，低表达组hsa-miR-20a表达量在48、72h分别是对照组的0.71和0.64倍（*p*＜0.05）；高表达组其表达量是对照组的1.31和1.36倍（*p*＜0.05）。



**图14** **慢病毒感染48、72h后各组HL-60细胞hsa-miR-20a的表达变化**

**注：\*\**P*＜0.01，与control比较；但miR-20a up和miR-20a down组内48、72h**

**比较差异均无显著性（*p*＞0.05）**



**图15** **慢病毒感染48、72h后各组U-937细胞hsa-miR-20a的表达变化**

**59**

**注：\**P*＜0.05，与control比较；但miR-20a up和miR-20a down组内48、72h比较差异均无显著性（*p*＞0.05）**

### 2.4 hsa-mir-20a表达变化对细胞Th物学性状的影响

#### 2.4.1 hsa-mir-20a表达变化对HL-60、U-937细胞增殖的影响

采用MTT比色法，观察HL-60、U-937细胞存活率的变化。病毒转染后24、48、

72h各组细胞与正常细胞组比较其存活率如表11、12及图16所示。HL-60、U-937两组中miR-20a-down 24h与control比较细胞增殖无明显差异，但48、72h细胞增殖明显被抑制。且miR-20a-down对HL-60细胞生长抑制作用较U-937细胞更加明显（p

＜0.05）。但是miR-20a-up 在24、48、72h个时间点与control比较细胞增殖无明显差异（*p*＞0.05）。

**表 11** **hsa-miR-20a表达变化对HL-60细胞增殖的影响**

| 组别 |  | 存活率( x ±s )% |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 0h | 24h 48h | 72h |
| Control | 98.14±1.06 | 93.32±2.53 94.24±3.17 | 92.08±3.43 |
| MiR-20a-up | 97.73±1.22 | 89.36±2.16# 102.83±5.64# | 96.32±4.93# |
| MiR-20a-down | 98.65±0.82 | 87.03±3.41# 73.22±7.03\* | 52.38±11.54\*\* |

**与control组比较，#*p*＞0.05,** **\**p*＜0.05, \*\**p*＜0.01；表12** hsa-miR-20a**表达变化对U-937细胞增殖的影响**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 组别 |  | 存活率( *x* ±s )% |  |
|  | 0h | 24h 48h | 72h |
| Control | 99.24±0.61 | 95.31±2.67 92.63±2.75 | 94.24±3.77 |
| MiR-20a-up | 98.37±0.79 | 91.43±2.05# 93.25±3.69# | 92.03±3.85# |
| MiR-20a-down | 96.44±2.10 | 90.23±1.46# 82.14±8.37\* | 74.14±8.71\*\* |

**与control组比较，#*p*＞0.05,** **\**p*＜0.05,** **\*\**p*＜0.01;**

**60**



**图 16** hsa-miR-20a**表达变化对HL-60及U-937细胞活性的影响注：与同种细胞control组比较，\**p*＜0.05；\*\**p*＜0.01**

#### 2.4.2 hsa-miR-20a表达变化对细胞形态的影响

2.4.2.1光镜下观察细胞形态变化

用普通光学显微镜观察细胞形态的变化。如图17，control及miR-20a-up组HL-60、U-937细胞呈圆形，胞核多居中，形态大小基本一致，折光性好。而miR-20a-down组处理72h后，细胞数量较对照组有所减少，部分细胞体积缩小，形态大小不一致，折光性减弱，胞核浓缩并偏向胞膜侧。

**Control** MiR-20a-up MiR-20a-down



HL-60

**61**

**Control** MiR-20a-up MiR-20a-down



U-937

**图 17** hsa-miR-20a**变化对细胞形态的影响（10×40）**

2.4.2.2荧光显微镜下观察细胞荧光表达的变化

病毒感染后72h观察发现各组细胞感染率均在80%左右：control及miR-20a-up组HL-60、U-937细胞形态大小基本一致，荧光表达强。而miR-20a-down组细胞形态大小不一致，荧光表达强度较control及miR-20a-up组弱（图18）。

**Control** MiR-20a-up MiR-20a-down



HL-60

U-937



**图18** **病毒载体转染后72h各组细胞荧光表达量的变化（10×40）**

**62**

#### 2.4.3 Hsa-mir-20a表达变化对细胞凋亡的影响

各组细胞处理后48h、72h收集，经PI染色后，用流式细胞仪进行凋亡检测。结果如图19,20所示，miR-20a-down可以促进HL-60、U-937细胞凋亡。而且，其对HL-60细胞凋亡促进作用较U-937细胞更加明显（*p*＜0.05）。miR-20a-up对两组细胞凋亡的影响与control比较无明显差异（*p*＞0.05）。

**Control** MiR-20a-up MiR-20a-down





HL-60 (48h)

HL-60 (72h)





U-937 (48h)





**63**

U-937 (72h)



**图19** **PI染色FCM检测HL-60、U-937细胞凋亡**



**图20** **hsa-miR-20a表达变化对HL-60、U-937细胞凋亡的影响**

**\*，*p*＜0.05，U-937细胞中miR-20a down与control比较**

**\*\*，*p*＜0.01，HL-60细胞中miR-20a down与control比较**

**#,** ***p*＜0.05，miR-20a down时HL-60与U-937细胞间比较**

**64**

## **3**、 讨 论

在本研究中，我们通过构建hsa-miR-20a高表达和低表达慢病毒表达载体，转染HL-60、U-937细胞观察miR-20a表达变化对两种细胞增殖、凋亡的影响。研究中我们之所以选择HL-60、U-937细胞是由于粒细胞是终末分化的细胞，已经不具有增殖分化的能力，分离培养甲亢患者外周血中性粒细胞培养不能满足本实验的要求。目前研究药物导致粒细胞缺乏的文献一致选用早幼粒细胞来源的HL-60细胞作为研究对象

[56,57,58,59,60]. 而由于在临床实践过程中我们发现ATD导致粒细胞缺乏患者其外周血淋

巴细胞可表现为正常或减少，严重时表现缺乏。因此为了观察hsa-miR-20a表达变化对淋巴细胞影响与粒细胞有无不同，本研究参照文献报道选择淋巴瘤来源的U-937细胞作为对照[56]。

目前改变细胞内miRNA表达的方法主要包括[61]：（1）按照成熟miRNA序列化学合成其模拟物（mimic）或抑制剂（inhibitor），mimic能够显著提高成熟miRNA的表达，而inhibitor能够竞争性与成熟miRNA结合，阻止其正常行使功能。（2）构建miRNA表达载体，通过表达载体在细胞内转录、剪切形成成熟的miRNA或干扰其形成，达到过表达或低表达的效果。其中，化学合成法相对比较方便、经济，可以较快的获得结果，但无法应用于一些转染效率比较低的原代细胞、悬浮细胞、干细胞中，也无法实现稳定表达。而应用慢病毒表达载体无需转染试剂，转染效率高，实验周期短；对分裂期和非分裂期细胞均有感染作用，可在短时间内获得稳定表达特定miRNA的细胞株；可以根据需要选择各种报告基因，亲和标签及筛选抗性基因融合[62, 63, 64]。本研究中HL-60、U-937细胞为悬浮细胞，化学合成物转染效率较低，因此选择后一种策略更为合适。

通过本研究，我们成功构建了低表达及高表达hsa-miR-20a的慢病毒载体。两组病毒载体成功转染HL-60、U-937细胞，qRT-PCR证实了感染后细胞hsa-miR-20a表达的变化。我们观察到，正常生长的HL-60、U-937细胞中hsa-miR-20a有表达，低表达hsa-miR-20a可以抑制HL-60、U-937细胞生长，促进其凋亡。而且，hsa-miR-20a低表达对HL-60细胞生长抑制及凋亡促进作用较对U-937细胞的影响更加明显。高表达hsa-miR-20a对两组细胞生长增殖及凋亡的影响与对照组无明显差异。我们的这

**65**

一研究结果提示ATD导致粒细胞缺乏患者其粒细胞缺乏的发生机制可能是由于粒细胞hsa-miR-20a表达水平的下降，导致粒细胞增殖被抑制而凋亡增加。hsa-miR-20a低表达对HL-60细胞生长抑制及凋亡促进作用较U-937细胞更加明显能从一定程度解释ATD导致粒细胞缺乏患者淋巴细胞不缺乏或减少不明显这一临床现象。hsa-miR-20a对粒细胞和淋巴细胞凋亡影响程度出现不同可能与hsa-miR-20a在两种细胞表达量的不同以及靶向调控蛋白不同有关，但是具体的机制尚待进一步研究阐明。在本研究中过表达hsa-miR-20a没有观察到明显促进增殖的作用，我们分析，这可能与我们选择的HL-60、U-937细胞本就是肿瘤化的细胞，细胞增殖快，qRT-PCR证实hsa-miR-20a在这些细胞中表达丰度本已较高，而过表达hsa-miR-20a虽然可以使其表达量进一步升高，但其促进细胞增殖的作用已经不太明显。

基于第二部分关于血浆及血清中miRNA来源的讨论，我们推测，ATD导致粒细胞缺乏患者血浆hsa-miR-20a（其他hsa-miR-223、hsa-miR-106b、hsa-miR-19b等也一样）可能来源于粒细胞，hsa-miR-20a的表达变化与粒细胞数量的变化有关。一定量的hsa-miR-20a表达能够维持粒细胞的正常增殖分化。而ATD导致粒细胞内hsa-miR-20a水平下降，继而粒细胞凋亡增加，细胞主动分泌至血浆的hsa-miR-20a减少，最后出现血浆hsa-miR-20a下降。但是，ATD导致粒细胞内hsa-miR-20a下降的机制及其对粒细胞生长抑制及凋亡促进作用的具体机理都有待深入研究。

**66**

## **4**、 小 结

## 1、 hsa-miR-20a 低表达及高表达慢病毒载体可以在HL-60、U-937 细胞中实现

hsa-miR-20a的低表达及高表达变化。

## 2、 hsa-miR-20a低表达可抑制HL-60、U-937细胞Th长，促进其凋亡。

## 3、 hsa-miR-20a低表达对HL-60细胞Th长抑制及凋亡促进作用较U-937细胞更明显。

**67**

# 第四部分

**hsa-miR-20a调控粒细胞凋亡的机制研究**

## **1**、 材料和方法

### **1.1** 细胞、质粒及骨髓标本来源

HL-60购自中国科学院细胞库，293T细胞为上海吉凯公司提供。psiCHECKTM-2载体购自美国Promega公司，DH5α菌株为本实验室保存。用于免疫组化检测的正常骨髓片（n=5）及ATD导致粒细胞缺乏骨髓片（n=8）均取自南华大学附一医院血液实验室。

**表14** **骨髓免疫组化检测的粒细胞缺乏患者资料**

| 患者编号 | 年龄（岁） | 性别 | 临床资料  服用药物 | 骨髓特点 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 患者 1 | 38 | 女 | MMI | 再生障碍型 |
| 患者 2 | 45 | 女 | MMI | 再生障碍型 |
| 患者 3 | 27 | 女 | PTU | 再生障碍型 |
| 患者 4 | 36 | 男 | MMI | 再生障碍型 |
| 患者 5 | 51 | 女 | MMI | 再生障碍型 |
| 患者 6 | 30 | 女 | MMI | 成熟障碍型 |
| 患者 7 | 29 | 女 | PTU | 成熟障碍型 |
| 患者 8 | 43 | 女 | MMI | 成熟障碍型 |

### **1.2** 药品与试剂

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂名称** | **Th产公司** |
| RPMI-1640 培养基 | 美国 GibcoBRL 公司 |
| OPTI-MEM 转染培养基 | 美国 Invitrogen 公司 |
| 胎牛血清 | 中国杭州四季清公司 |

**68**

|  |  |
| --- | --- |
| PTEN 引物序列 | 上海生工生物工程有限公司 |
| 限制性内切酶 XbaI、NotI | 大连宝生物公司 |
| T4 DNA 连接酶 | 大连宝生物公司 |
| 双荧光素酶报告基因检测试剂盒 | 碧云天生物技术研究所 |
| 低分子量蛋白标准 | 美国 promega 公司 |
| 质粒抽提试剂盒 | 美国 promega 公司 |
| MMLV 逆转录试剂盒 | 美国 promega 公司 |
| Trizol | 美国Invitrogen公司 |
| Lipofectamine 2000 | 美国Invitrogen公司 |
| BCL-2/BAX/p-Akt 一抗 | 美国 Sigma 公司 |
| 抗 PTEN 单克隆抗体 | 美国 Epitomics 公司 |
| SABC-AP 免疫组化试剂盒 | 博士德生物工程有限公司 |
| 辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗 | 博士德生物工程有限公司 |
| 内参 actin 一抗 | 博士德生物工程有限公司 |
| 高保真即用型 PCR 扩增试剂盒 | 大连宝生物公司 |
| 其它试剂均为国产分析纯。 |  |

### **1.2** 附**: Western-blot**用液配置

30%丙烯酰胺（100mL）

|  |  |
| --- | --- |
| 去离子水 | 60mL |
| 丙烯酰胺 | 29g |
| N,N-亚甲双丙烯酰胺 | 1g |

37℃水浴中溶解，加去离子水至100mL，过滤，调PH值＜7.0棕色瓶保存。

1.5M分离buffer

|  |  |
| --- | --- |
| 去离子水 | 50mL |
| Tris | 18.15g |

加去离子水补充至100mL，调PH值8.8，4℃保存。

**69**

1M浓缩buffer

|  |  |
| --- | --- |
| 去离子水 | 30mL |
| Tris | 6g |

加去离子水补充至50mL，调PH值6.8，4℃保存。

10%过硫酸胺

|  |  |
| --- | --- |
| 去离子水 | 10mL |
| 过硫酸胺 | 1g |

溶解后，放入4℃保存。10%SDS（50mL）

|  |  |
| --- | --- |
| 去离子水 | 30mL |
| 电泳级 SDS | 5g |

加去离子水定容至50mL，调PH值7.2，室温保存。Tris-Gly电泳缓冲液（1000mL）（5×贮存液）

|  |  |
| --- | --- |
| 去离子水 | 900mL |
| Tris | 15.1g |
| Gly | 94g |
| 10%SDS | 50mL |

定容至1000mL，电泳时稀释5倍转移缓冲液（1000mL）

|  |  |
| --- | --- |
| 甲醇 | 200mL |
| Tris | 5.8g |
| Gly | 2.9g |
| SDS | 0.37g |

加去离子水至1000mL

TBST缓冲液（1000mL）

|  |  |
| --- | --- |
| Tris | 2.42g |
| NaCl | 8g |

**70**

|  |  |
| --- | --- |
| Tween20 | 1.0mL |

加去离子水至1000mL，调PH值为7.6 10×丽春红贮存液

|  |  |
| --- | --- |
| 丽春红 | 2g |
| 三氯乙酸 | 30g |
| 磺基水杨酸 | 30g |

加去离子水至100mL，染色时稀释10 倍

10%SDS-PAGE分离胶（10mL）

|  |  |
| --- | --- |
| 30%丙烯酰胺 | 3.3mL |
| 1.5mol/Ltris（PH8.8） | 2.5mL |
| 10%SDS | 0.1mL |
| 10%过硫酸胺 | 0.1mL |
| TEMED | 0.004mL |
| 去离子水 | 4.0mL |

5%SDS-PAGE积层胶（4mL）

|  |  |
| --- | --- |
| 30%丙烯酰胺 | 0.67mL |
| 1.0mol/Ltris（PH6.8） | 0.5mL |
| 10%SDS | 0.04mL |
| 10%过硫酸胺 | 0.04mL |
| TEMED | 0.004mL |
| 去离子水 | 2.7mL |

### **1.3** 主要仪器设备

|  |  |
| --- | --- |
| **仪器设备名称** | **Th产公司** |
| CO2 培养箱 | 美国 Forma 公司 |
| 普通光学显微镜 | 日本 Nikon 公司 |
| 荧光倒置显微镜 | 日本 Olympus 公司 |

**71**

|  |  |
| --- | --- |
| 超净工作台 | 苏州安泰空气技术公司（SW-CJ-2FD） |
| 隔水式电热恒温细菌培养箱 | X75-BS 上海跃进医疗器械厂 |
| 超纯水器 | 美国 PURELAB Maxima 公司 |
| SDS 一 PAGE 电泳仪 | 美国 BioRad 公司 |
| 转移槽 | 美国 BioRad 公司 |
| Hema 凝胶图象分析仪 | 珠海 Hema 医用仪器有限公司 |
| －80℃超低温冰箱 | 日本三洋公司 |
| 电子分析天平 | 日本 SHIMadzu 公司（AY120 型） |
| PCR 仪 | 德国 Biometra 公司 |
| 细菌摇床 | 华利达实验设备公司 |
| 微量移液器 | 德国 Eppendorf 公司 |
| 凝胶成像分析系统 | 美国 Alpha Innotech 公司 |
| 微量离心机 | 美国 Genofuge 公司 |
| 高速低温离心机 | 德国 Eppendorf 公司 |

### **1.4** 主要实验方法

#### **1.4.1** Th物信息学分析

1.4.1.1 miRbase: microRNA分子数据库

该数据库收录的每一词条表示一预测的microRNA的转录发夹、基因定位和成熟序列等信息，并为已发布的microRNA 分子序列及其功能注释提供查询服务。可通过

microRNA的名称、关键词、参考文献和功能注释查询已收录的microRNA. 网址：[http: //www. mirbase. org/](http://www.mirbase.org/)

1.4.1.2 miRDB: microRNA靶标预测数据库

该数据库利用SVM 学习机制开发的MirTargets 生物信息学工具，预测和筛选

microRNA靶标基因并给出评分。该数据库收录了人、鼠、狗和鸡等物种的mRNA。网址：[http: //mirdb. org/miRDB/](http://mirdb.org/miRDB/)

1.4.1.3 miRanda: microRNA靶标预测数据库

**72**

该数据库收录人、鼠、果蝇、线虫等物种的microRNA 序列。既可为收录的

microRNA 预测靶标基因，也可为特定基因查询相关的microRNA。网址：

[http: //www. microrna. org/microrna/home. do](http://www.microrna.org/microrna/home.do)

1.4.1.4 miRNA Viewer: microRNA靶标预测数据库

该数据库可为待预测人/鼠蛋白查询可与其结合的microRNA，并且按照结合优先等级给出列表。同时，该数据库还可显示待预测蛋白的3’UTR与相应microRNA相结 合 的 位 点 及 具 体 结 合 情 况 。 网 址 ：

[http: //cbio. mskcc. org/cgi-bin/mirnaviewer/mirnaviewer. pl](http://cbio.mskcc.org/cgi-bin/%20mirnaviewer/mirnaviewer.pl)

1.4.1.5 TargetScan: microRNA结合靶标预测数据库

本数据库既可预测特定靶基因中与microRNA种子序列互补配对达7-8个位点的保守3’UTR，也可预测靶标基因中不保守的3’UTR。靶标基因3’UTR与microRNA结合的优先等级效率由本数据库给出的结合效率情景分数而定。此外还提供靶标基因

3'UTR 与microRNA 种子序列的结合位点及具体结合信息。网址：

[http: //www. targetscan. org/](http://www.targetscan.org/)

1.4.1.6 RNAhybrid: microRNA与靶标配对自由能预测数据库

RNAhybrid是基于microRNA和靶标基因二聚体二级结构的基础上开发出来的靶标基因预测数据库，其算法禁止形成二聚体，并根据结合自由能探测最佳的结合位点。网址：[http: //bibiserv. techfak. uni-bielefeld. de/rnahybrid/submission. html](http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/submission.html)

#### **1.4.2** 荧光素酶报告基因检测

**1.4.2.1**细胞培养**同第三部分**

1.4.2.2 PTEN 3'UTR片段的扩增与回收

①、HL-60细胞总RNA的提取**同第三部分**

②、RNA浓度和纯度检测：采用核酸蛋白微量定量仪对RNA浓度进行测定。

③、所需引物的设计与合成：

利用Primer 5.0软件设计针对PTEN 3'UTR的引物，上、下游引物分别引入限制性内切酶XhoI、NotI识别位点，序列为：

上游：5’-ccgctcg agcgg GCG TGC AGA TAATGACAAGG-3'（XhoI），下游：5’-ttgcggccgcaa TGGTCCAGAGTCCAGCATAA -3'（NotI）。

**73**

引物由上海生工生物工程有限公司合成。

④、RT-PCR 扩增反应体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| 2×PCR Master | 25μL |
| 上游引物 | 1μL |
| 下游引物 | 1μL |
| cDNA 模板 | 2μL |
| ddH2O | 21μL |
| Total volume: | 50μL |

以上PCR扩增条件均为：94℃预变性1分钟后，按以下参数进行30次循环：94℃变性30 秒，57℃退火30 秒，72℃延伸1 分钟。最后72℃延伸10 分钟。4℃保存扩增产物。

⑤、琼脂糖凝胶电泳：

取上述PCR产物于20g/L琼脂糖凝胶中进行电泳，电泳操作完毕后于凝胶成像系统中观察电泳后的结果。

⑥、PCR产物的回收

根据琼脂糖凝胶回收试剂盒的操作说明书要求进行PCR产物回收。

⑦、突变型PTEN 3'UTR 序列的合成

将PTEN 3'UTR结合hsa-miR-20a的seed sequence序列进行点突变如下：

|  |  |
| --- | --- |
| Hsa-miR-20a（WT） | C**UUUCACG**GUAGAAAUAAUUAGG |
| PTEN 3’UTR | U**AAAGUGC**UUAUAGUGCAGGUAG |
| Hsa-miR-20a（Mut） | C**UUGAGCC**GUAGAAAUAAUUAGG |

突变序列由上海生工生物工程有限公司制备。

⑧、重组质粒的构建与鉴定

将PTEN 3'UTR的PCR回收产物与载体以XhoI、NotI进行双酶切，用T4 DNA连接酶连接，构建野生型psiCHECKTM-2-PTEN-WT3'UTR和突变型psiCHECK™-2-PTEN-Mut 3'UTR重组质粒，酶切及测序鉴定重组质粒。

**74**



⑨、重组质粒的表达及检测

**图21** **psiCHECKTM-2 vector结构图**

按照Lipofectamine2000说明书将野生型psiCHECK™-2-PTEN-WT 3'UTR、突变型psiCHECK™-2-PTEN-Mut 3'UTR和hsa-miR-20a-up慢病毒载体共转染到对数生长期的293T细胞。转染48小时后裂解细胞，检测荧光素酶活性。每组设3个平行孔，以不进行转染的细胞作为空白对照，每组实验重复3次。

⑩、荧光素酶活性检测

根据双荧光素酶检测试剂盒说明书进行荧光素酶活性检测。将待测细胞用PBS洗涤后再用200μL的报告基因细胞裂解液裂解细胞15分钟，裂解物用化学发光检测仪检测。hRluc荧光素酶测定得的RLU值除以hluc（+）测定得的RLU值来表示报告基因的表达情况（图22）。



**图22** psiCHECK**TM-2 vector荧光检测原理图**

**75**

#### **1.4.3 RT-PCR**检测靶向基因**mRNA**的表达

1.4.3.1细胞总RNA抽提同第三部分

1.4.3.1 RNA逆转录同第三部分

1.4.3.2 PCR扩增：

(1) PCR引物

|  |  |
| --- | --- |
| GAPDH | **F:**5′-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3′ |
|  | **R:**5′-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3′ |
| PTEN | **F:**5′-AGGGAGTCACAATTCCCAGTC-3′ |
|  | **R:**5′-AGGTTTCCTCTGGTCCTGGTAT-3′ |

(2) PCR反应体系

|  |  |
| --- | --- |
| 2×PCR Master | 25μL |
| 上游引物 | 1μL |
| 下游引物 | 1μL |
| cDNA 模板 | 2μL |
| ddH2O | 21μL |
| Total volume: | 50μL |

PCR扩增条件：94℃预变性1分钟后，按94℃变性30秒，57℃退火30秒，72℃

延伸1分钟。进行30次循环后4℃保存。

#### **1.4.4** **Western**印迹法蛋白检测

①、不同处理因素处理细胞后，离心弃去培养液，加入4℃预冷的PBS洗涤细胞

3次（约1分钟/次），弃去洗液，将所获细胞置于冰上。

②、往细胞离心管加入1ml（含10ul的PMSF）裂解液，摇匀置于冰上裂解30

分钟。

③、裂解完后，用枪将细胞碎片和裂解液移至1.5ml 离心管中。

④、4℃下12000rpm离心5分钟，将离心后的上清分装，采用BCA蛋白定量试剂盒测定细胞蛋白浓度。

**76**

⑤、取提取的蛋白质样品加入适量5×SDS 上样缓冲液（含10%β-巯基乙醇，约

15μg总蛋白量/泳道），煮沸10分钟，10%SDS-PAGE电泳（积层胶和分离胶各为80V）

后电转移(150-200mA 2h)至PVDF膜上，丽春红染色观察蛋白质转移情况。

⑥、5%脱脂牛奶室温封闭4h，分别加入一抗4℃孵育过夜或常温4小时，TBST洗涤30分钟，每10分钟换液1次。

⑦、加入1∶1000辣根过氧化物酶标记的二抗，室温孵育4h或4℃冰箱过夜，TBST

洗涤30分钟，每10分钟换液1次。

⑧、用Western-blot荧光检测试剂盒显示于X光片。

⑨、用Labwork凝胶图像分析系统对胶片扫描，以对照组的面积灰度值为100%

与实验组进行比较和半定量分析。

#### **1.4.5** 免疫细胞化学检测

①、载玻片经防脱片剂处理（Poly-L-Lysine），骨髓涂片，室温风扇吹干。

②、4%多聚甲醛固定30分钟。

③、3%冰乙酸室温浸泡20分钟，以灭活内源性酶。蒸馏水洗1-2次。

④、滴加5%BSA封闭液，室温20分钟。甩去多余液体，不洗。

⑤、滴加稀释的PTEN一抗，4℃过夜。0.01 M TBS洗2分钟×3次。

⑥、滴加生物素化羊抗兔IgG,20-37℃20分钟。0.01 M TBS洗2分钟×3次。

⑦、滴加SABC—AP,20-37℃20分钟。0.01 M TBS洗5分钟×4次。

⑧、显色：BCIP/NBT用0.01M TBS(pH9.0-9.5)按1: 20的比例稀释，混匀后加至切片。20-37℃显色10-120分钟，镜下控制反应时间。蒸馏水洗涤，摄片。

所有免疫组化检测患者均进行了瑞士染色明确骨髓中粒系和红系的比例，并明确骨髓分型诊断。

### **1.5** 统计学分析

实验所得数据采用均数±标准差（*x*±s）表示。用SPSS 17.0进行统计处理，组间比较采用方差分析及*t*检验，以*P*＜0.05认为差异有统计学意义。

**77**

## **2**、 实验结果

### **2.1** Th物信息学分析结果

#### 2.1.1 miR-20a成熟序列和PTEN 3’UTR基因序列

利用miRBase数据库对hsa-miR-20a进行了基本信息分析。结果显示，hsa-miR-20a登录号为[MI0000076](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000074)，属于miR-17-92簇成员，定位于人类染色体13q31 -q32上。hsa- miR-20a-5p（[MIMAT0000075](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000074)）为主要表达产物（图23）。在miRBase数据库中获取多个物种的miR-20a成熟序列进行比较发现，miR-20a序列在各物种之间高度保守（表

13），**AAAGUGC**是其种子序列，这提示miR-20a在机体内起着重要的调控作用。



**图23** **hsa-miR-20a成熟序列**

**表13** **多物种的miR-20a的成熟序列**

| 物种名称 | hsa-miR-20a 成熟序列 |
| --- | --- |
| Human | UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG |
| Mouse | UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG |
| Rat | UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG |
| Pig | UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG |
| Chicken | UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG |

#### 2.1.2 PTEN 3’UTR基因序列

在GeneBank数据库查询人PTEN mRNA (NM\_000314)，结果发现PTEN 3'UTR

共3329bp，序列如下（红色序列为hsa-miR-20a主要结合位点，蓝色为次要结合位点）。1 ATTTTTTTTT ATCAAGAGGG ATAAAACACC ATGAAAATAA ACTTGAATAA ACTGAAAATG

61 GACCTTTTTT TTTTTAATGG CAATAGGACA TTGTGTCAGA TTACCAGTTA TAGGAACAAT

121 TCTCTTTTCC TGACCAATCT TGTTTTACCC TATACATCCA CAGGGTTTTG ACACTTGTTG

181 TCCAGTTGAA AAAAGGTTGT GTAGCTGTGT CATGTATATA CCTTTTTGTG TCAAAAGGAC

241 ATTTAAAATT CAATTAGGAT TAATAAAGAT G**GCACTTT**CC CGTTTTATTC CAGTTTTATA

301 AAAAGTGGAG ACAGACTGAT GTGTATACGT AGGAATTTTT TCCTTTTGTG TTCTGTCACC

361 AACTGAAGTG GCTAAAGAGC TTTGTGATAT ACTGGTTCAC ATCCTACCCC TTT**GCACTTG**

421 TGGCAACAGA TAAGTTTGCA GTTGGCTAAG AGAGGTTTCC GAAGGGTTTT GCTACATTCT

481 AATGCATGTA TTCGGGTTAG GGGAATGGAG GGAATGCTCA GAAAGGAAAT AATTTTATGC

541 TGGACTCTGG ACCATATACC ATCTCCAGCT ATTTACACAC ACCTTTCTTT AGCATGCTAC

**78**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 601 | AGTTATTAAT | CTGGACATTC | GAGGAATTGG | CCGCTGTCAC | TGCTTGTTGT | TTGCGCATTT |
| 661 | TTTTTTAAAG | CATATTGGTG | CTAGAAAAGG | CAGCTAAAGG | AAGTGAATCT | GTATTGGGGT |
| 721 | ACAGGAATGA | ACCTTCTGCA | ACATCTTAAG | ATCCACAAAT | GAAGGGATAT | AAAAATAATG |
| 781 | TCATAGGTAA | GAAACACAGC | AACAATGACT | TAACCATATA | AATGTGGAGG | CTATCAACAA |
| 841 | AGAATGGGCT | TGAAACATTA | TAAAAATTGA | CAATGATTTA | TTAAATATGT | TTTCTCAATT |
| 901 | GTAACGACTT | CTCCATCTCC | TGTGTAATCA | AGGCCAGTGC | TAAAATTCAG | ATGCTGTTAG |
| 961 | TACCTACATC | AGTCAACAAC | TTACACTTAT | TTTACTAGTT | TTCAATCATA | ATACCTGCTG |
| 1021 | TGGATGCTTC | ATGTGCTGCC | TGCAAGCTTC | TTTTTTCTCA | TTAAATATAA | AATATTTTGT |
| 1081 | AATGCTGCAC | AGAAATTTTC | AATTTGAGAT | TCTACAGTAA | GCGTTTTTTT | TCTTTGAAGA |
| 1141 | TTTATGATGC | ACTTATTCAA | TAGCTGTCAG | CCGTTCCACC | CTTTTGACCT | TACACATTCT |
| 1201 | ATTACAATGA | ATTTTGCAGT | TTTGCACATT | TTTTAAATGT | CATTAACTGT | TAGGGAATTT |
| 1261 | TACTTGAATA | CTGAATACAT | ATAATGTTTA | TATTAAAAAG | GACATTTGTG | TTAAAAAGGA |
| 1321 | AATTAGAGTT | GCAGTAAACT | TTCAATGCTG | CACACAAAAA | AAAGACATTT | GATTTTTCAG |
| 1381 | TAGAAATTGT | CCTACATGTG | CTTTATTGAT | TTGCTATTGA | AAGAATAGGG | TTTTTTTTTT |
| 1441 | TTTTTTTTTT | TTTTTTTTTA | AATGTGCAGT | GTTGAATCAT | TTCTTCATAG | TGCTCCCCCG |
| 1501 | AGTTGGGACT | AGGGCTTCAA | TTTCACTTCT | TAAAAAAAAT | CATCATATAT | TTGATATGCC |
| 1561 | CAGACTGCAT | ACGATTTTAA | GCGGAGTACA | ACTACTATTG | TAAAGCTAAT | GTGAAGATAT |
| 1621 | TATTAAAAAG | GTTTTTTTTT | CCAGAAATTT | GGTGTCTTCA | AATTATACCT | TCACCTTGAC |
| 1681 | ATTTGAATAT | CCAGCCATTT | TGTTTCTTAA | TGGTATAAAA | TTCCATTTTC | AATAACTTAT |
| 1741 | TGGTGCTGAA | ATTGTTCACT | AGCTGTGGTC | TGACCTAGTT | AATTTACAAA | TACAGATTGA |
| 1801 | ATAGGACCTA | CTAGAGCAGC | ATTTATAGAG | TTTGATGGCA | AATAGATTAG | GCAGAACTTC |
| 1861 | ATCTAAAATA | TTCTTAGTAA | ATAATGTTGA | CACGTTTTCC | ATACCTTGTC | AGTTTCATTC |
| 1921 | AACAATTTTT | AAATTTTTAA | CAAAGCTCTT | AGGATTTACA | CATTTATATT | TAAACATTGA |
| 1981 | TATATAGAGT | ATTGATTGAT | TGCTCATAAG | TTAAATTGGT | AAAGTTAGAG | ACAACTATTC |
| 2041 | TAACACCTCA | CCATTGAAAT | TTATATGCCA | CCTTGTCTTT | CATAAAAGCT | GAAAATTGTT |
| 2101 | ACCTAAAATG | AAAATCAACT | TCATGTTTTG | AAGATAGTTA | TAAATATTGT | TCTTTGTTAC |
| 2161 | AATTTCGGGC | ACCGCATATT | AAAACGTAAC | TTTATTGTTC | CAATATGTAA | CATGGAGGGC |
| 2221 | CAGGTCATAA | ATAATGACAT | TATAATGGGC | TTTTGCACTG | TTATTATTTT | TCCTTTGGAA |
| 2281 | TGTGAAGGTC | TGAATGAGGG | TTTTGATTTT | GAATGTTTCA | ATGTTTTTGA | GAAGCCTTGC |
| 2341 | TTACATTTTA | TGGTGTAGTC | ATTGGAAATG | GAAAAATGGC | ATTATATATA | TTATATATAT |
| 2401 | AAATATATAT | TATACATACT | CTCCTTACTT | TATTTCAGTT | ACCATCCCCA | TAGAATTTGA |
| 2461 | CAAGAATTGC | TATGACTGAA | AGGTTTTCGA | GTCCTAATTA | AAACTTTATT | TATGGCAGTA |
| 2521 | TTCATAATTA | GCCTGAAATG | CATTCTGTAG | GTAATCTCTG | AGTTTCTGGA | ATATTTTCTT |
| 2581 | AGACTTTTTG | GATGTGCAGC | AGCTTACATG | TCTGAAGTTA | CTTGAAGGCA | TCACTTTTAA |
| 2641 | GAAAGCTTAC | AGTTGGGCCC | TGTACCATCC | CAAGTCCTTT | GTAGCTCCTC | TTGAACATGT |
| 2701 | TTGCCATACT | TTTAAAAGGG | TAGTTGAATA | AATAGCATCA | CCATTCTTTG | CTGTGGCACA |
| 2761 | GGTTATAAAC | TTAAGTGGAG | TTTACCGGCA | GCATCAAATG | TTTCAGCTTT | AAAAAATAAA |
| 2821 | AGTAGGGTAC | AAGTTTAATG | TTTAGTTCTA | GAAATTTTGT | GCAATATGTT | CATAACGATG |
| 2881 | GCTGTGGTTG | CCACAAAGTG | CCTCGTTTAC | CTTTAAATAC | TGTTAATGTG | TCATGCATGC |
| 2941 | AGATGGAAGG | GGTGGAACTG | TGCACTAAAG | TGGGGGCTTT | AACTGTAGTA | TTTGGCAGAG |
| 3001 | TTGCCTTCTA | CCTGCCAGTT | CAAAAGTTCA | ACCTGTTTTC | ATATAGAATA | TATATACTAA |
| 3061 | AAAATTTCAG | TCTGTTAAAC | AGCCTTACTC | TGATTCAGCC | TCTTCAGATA | CTCTTGTGCT |
| 3121 | GTGCAGCAGT | GGCTCTGTGT | GTAAATGCTA | TGCACTGAGG | ATACACAAAA | ATACCAATAT |
| 3181 | GATGTGTACA | GGATAATGCC | TCATCCCAAT | CAGATGTCCA | TTTGTTATTG | TGTTTGTTAA |
| 3241 | CAACCCTTTA | TCTCTTAGTG | TTATAAACTC | CACTTAAAAC | TGATTAAAGT | CTCATTCTTG |
| 3301 | TCAAAAAAAA | AAAAAAAAAA | AAAAAAAAA |  |  |  |

#### 2.1.3 miR-20a靶标预测

利用miRDB与miRanda数据库查询miR-20a的靶基因，发现凋亡相关基因PTEN为miR-20a的靶标基因之一，查阅Target Detail发现miR-20a与PTEN 3'UTR主要位点发生结合，得分较高（图24）

**79**



**图24** **hsa-miR-20a靶标基因预测结果**

#### 2.1.4 hsa-miR-20a与PTEN 3’UTR结合茎环结构及自由能

在RNAhybrid输入hsa-miR-20a成熟序列及PTEN 3'UTR序列，结果显示两者结合局部的碱基配对较多，结合自由能结合为-15.0kal/mol 显著低于-10 kal/mol（图

25），提示hsa-miR-20a能与PTEN靶向结合。



mfe: -15.0kcal/mol

**图25** **hsa-miR-20a与PTEN 3’UTR结合茎环结构及自由能**

### **2.2** 荧光素酶报告基因结果

#### **2.2.1** 重组质粒的鉴定

重组质粒经XhoI、NotI 双酶切后琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察发现，在

psiCHECK™-2-PTEN-WT3'UTR和psiCHECK™-2-PTEN-Mut3'UTR均在846bp处见

特异性电泳条带，重组质粒构建成功（图26）。

**80**

**M 1 2**

**1000bp 500bp 300bp**



**846bp**

**图26** **psiCHECK™-2- PTEN -WT/Mut 3’UTR质粒酶切鉴定。M：DNA Marker；1：psiCHECK™-2-PTEN-WT 3’UTR；2：psiCHECK™-2-PTEN-Mut 3’UTR**

#### **2.2.2** **hsa-miR-20a**对荧光素酶报告基因表达水平的影响

分别将psiCHECK™-2-PTEN-WT 3'UTR、psiCHECK™-2-PTEN-Mut 3'UTR重组

质粒与hsa-miR-20a up共转染293T细胞，检测胞内相对荧光相对值。结果表明转染hsa-miR-20a up能使psiCHECK™-2-PTEN-WT 3'UTR质粒的表达水平显著下降，而对psiCHECK™-2-PTEN-Mut3'UTR质粒的表达无影响（图27），表明PTEN为hsa-miR-20a的靶标基因。



**图27双荧光素酶报告基因检测hsa-miR-20a对PTEN荧光素酶表达的影响注：\*，*P<*0.05与control比较；#，*P<*0.05与PTEN-Mut 3'UTR比较**

**81**

### **2.3** **hsa-miR-20a**对**PTEN mRNA**及蛋白表达的影响

#### 2.3.1 hsa-miR-20a对HL-60细胞PTEN mRNA的影响

采用RT-PCR检测转染慢病毒表达载体后48h, 72h HL-60细胞中PTEN mRNA

水平变化，结果显示与对照组比较，hsa-miR-20a-up能显著下调PTEN mRNA水平



（*P<*0.05），而hsa-miR-20a-down组PTEN mRNA表达增高（*P<*0.05）（图28）。但二者在48h, 72h时间点组内比较差异无显著性（*P＞*0.05）。

**图 28 RT-PCR检测HL-60细胞中PTEN mRNA水平变化注：\*，*P<*0.05与control比较；*#*，*P<*0.05与control比较**

#### 2.3.2 hsa-miR-20a对HL-60细胞PTEN蛋白表达的影响

采用western-blot检测转染慢病毒表达载体48h, 72h后HL-60细胞中PTEN蛋白水平变化，如图29所示随着hsa-miR-20a表达的下降，HL-60细胞中PTEN蛋白的表达量较对照组显著上调（*P*<0.01），hsa-miR-20a表达增高能显著降低PTEN 蛋白水平（*P*<0.05），PTEN下降水平在72h较48h更为明显（*P*<0.05），但72h时增高较48h无明显差异（*P*＞0.05）。

**82**



**图29** **Western-blot检测HL-60细胞中PTEN蛋白水平变化注：\*，*P<*0.05与control比较**

***#*, *P<*0.05与control比较**

### **2.4** **PTEN**下游**AKT/Bcl-2/Bax**信号通路的变化

Western-blot检测转染hsa-miR-20a down慢病毒载体72h后HL-60细胞中PTEN下游调控蛋白p-Akt/Bcl-2/Bax的变化，结果显示（图30），与对照组比较，hsa-miR-20a低表达后p-Akt、Bcl-2表达降低，Bax表达升高。



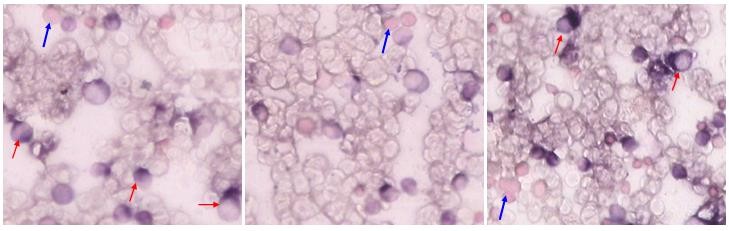
**图30** **Western-blot检测HL-60细胞中p-Akt/Bcl-2/Bax蛋白水平变化注：\*，*#*，*P<*0.05与control比较；**

**\*\*, *P<*0.01与control比较**

**83**

### **2.5** **ATD**导致粒细胞缺乏患者骨髓粒细胞中**PTEN**的表达检测

通过对骨髓检查诊断为成熟障碍型、再生障碍型的骨髓细胞PTEN蛋白的免疫组化检测发现，正常粒细胞中有少量PTEN蛋白表达（图31红色箭头所示），红系细胞无PTEN蛋白表达（蓝色箭头所示）。与正常骨髓象比较，粒系成熟障碍型患者骨髓粒细胞PTEN蛋白表达量有明显增加，再生障碍型患者骨髓中偶见粒系细胞。



a

b

C

**图31骨髓粒细胞中PTEN蛋白检测(SABC-AP, 10×40) a、正常骨髓象，粒红比为：2.1:1 b、粒系再生障碍型，粒红比为：0.41:1 c、粒系成熟障碍型，粒红比为：3.5:1**

**84**

## **3**、 讨 论

miRNA通过与靶mRNA分子的3’非编码区域(3'UTR)互补配对，抑制靶mRNA的翻译或者特异性地切割靶mRNA，从而实现对靶基因的调控。同一miRNA在不同的组织细胞中其表达量会有不同，而且由于基因表达的组织差异性，同一miRNA在不同组织细胞其调控的靶向基因也会有不同。就hsa-miR-20a而言，目前已有研究发现其在肝脏[65]、胃肠道[66]、胆囊[51]、前列腺[67]、卵巢[53]等器官以及血浆[66, 68]当中均有表达，在这些器官的肿瘤发生过程中发挥重要作用。而且，其在不同的器官组织中靶向调控的基因并不相同。而究竟hsa-miR-20a在粒细胞凋亡的发生过程中是通过靶向何种基因，并如何发挥生物学功能尚无研究报道。

我们通过多种生物信息学分析软件发现PTEN3'UTR存在hsa-miR-20a理论结合位点，而且二者结合自由能评分较高。而PTEN又正好是我们前期SSH筛选ATD导致粒细胞缺乏患者粒缺时高表达的EST片段之一[10]。我们进一步通过双荧光素酶报告基因检测发现，hsa-miR-20a高表达能使psiCHECK™-2-PTEN-WT 3'UTR质粒的表达水平显著下降，而对psiCHECK™-2-PTEN-Mut3'UTR质粒的表达无影响，这就证明PTEN是hsa-miR-20a的靶向基因。降低hsa-miR-20a表达后，HL-60细胞PTEN的mRNA及蛋白表达水平均有增高。理论分析和实验数据充分证实了hsa-miR-20a在粒细胞中对PTEN基因的表达调控。

PTEN是近年来新确定的唯一具有双重磷酸酶活性的肿瘤抑制基因，是p53后时代最重要的抑癌基因[69]。PTEN主要通过抑制PI3K/Akt细胞信号传导通路发挥其抑癌作用[69,70,71]。研究发现PTEN基因具有调节细胞周期、导致肿瘤细胞凋亡以及抑制肿瘤细胞生长、侵袭转移等功能，此外它还在细胞分化、细胞衰老与凋亡、维护免疫系统的稳定等多种生理活动中发挥重要作用[11,13,72]。PTEN可通过影响Akt磷酸化位点的活性促进Bad的磷酸化（Bad的活化形式是非磷酸化）,调控PTEN/Akt/ PKB/Bcl-2/Bax这线粒体细胞凋亡途径[12, 73, 74]。

本研究通过对凋亡相关蛋白p-Akt /Bcl-2/Bax的检测，发现hsa-miR -20a低表达后，PTEN mRNA及蛋白水平增高，PTEN下游调控蛋白p-Akt水平降低，抗凋亡蛋白Bcl-2水平下降而凋亡相关蛋白Bax表达明显增高，这些结果表明PTEN是通过线粒体凋亡信

**85**

号通路导致粒细胞HL-60的凋亡。进一步通过对ATD导致粒细胞缺乏患者骨髓细胞中PTEN蛋白的免疫组化检测我们发现与正常骨髓粒细胞中的PTEN表达相比较，成熟障碍型患者粒细胞中PTEN表达增加。由于骨髓特点为粒系再生障碍型患者的骨髓中粒细胞明显减少或是缺乏，因此，我们没有观察到再生障碍型的粒细胞PTEN蛋白表达变化。由于医学伦理原因我们也不能对成熟障碍型患者粒细胞恢复后再次行骨穿取骨髓检测以观察PTEN蛋白的动态变化。但尽管如此，研究结果已经表明hsa-miR-20a通过调控PTEN的表达介导线粒体细胞凋亡通路的激活在ATD导致粒细胞缺乏发生过程中具有重要的作用。



**图32** **ATD通过miR-20a调控粒细胞凋亡的可能机制**

至此，我们通过对ATD导致粒细胞缺乏患者骨髓特点分析、血浆差异表达miRNA筛选及差异低表达最明显的hsa-miR-20a功能研究，初步阐明ATD导致粒细胞缺乏发生与miRNA调控有关，低表达最为显著的hsa-miR-20a是通过对PTEN的调控，激活AKT/Bcl-2/Bax凋亡信号通路在ATD导致粒细胞缺乏的发生中发挥重要作用。而患者骨髓特点呈现出粒系再生障碍型和粒系成熟障碍型两种类型则可能是由于粒细胞凋亡的“逆向”损伤程度不同，即最早凋亡的可能是分化成熟的杆状核和分叶核粒细胞，最晚凋亡的是原始粒细胞（图32）。miRNA参与的粒细胞凋亡调控可能是ATD

**86**

导致粒细胞缺乏发生的早期细胞内生物学事件。全面进行这些差异表达miRNA 在

ATD导致粒细胞缺乏发生中的功能研究对深入阐明ATD导致粒细胞缺乏发生的机制具有重要意义。

当然，miRNA本身的表达变化也是受到严格的细胞内信号调控的，miRNA上游转录因子的基因或表遗传学改变都有可能会导致miRNA的表达变化[75, 76]。hsa-miR-20a的表达就受到c-Myc的调控, c-Myc结合到hsa-miR-20a的启动子区，通过催化组蛋白发生乙酰化修饰，最终导致hsa-miR-20a的表观遗传学沉默[77, 78]。而服用

ATD为什么会出现敏感个体内miRNA的表达变化以及哪些患者是ATD导致粒细胞缺乏的敏感个体这是临床和基础研究都渴望解决的难题，深入阐明这些问题将具有非常重大的临床意义。而如果以这些差异表达的miRNA为线索，进一步通过对其上游转录调控基因进行深入研究，探索上游转录调控基因变化与ATD之间的关系有可能会发现ATD导致粒细胞缺乏发生的早期筛选标志物，一旦这些特异的早期标志物应用于临床，对可能发生粒细胞缺乏的甲亢患者尽量避免使用ATD治疗，则有可能避免ATD导致粒细胞缺乏的发生，这将具有非常重大的科学意义。

**87**

## **4**、 小 结

1、PTEN是hsa-miR-20a的靶向调控基因。

2、hsa-miR-20a通过对PTEN的表达调控，影响AKT/Bcl-2/Bax凋亡信号通路导致粒细胞凋亡。这一作用机制在ATD导致粒细胞缺乏的发Th中具有重要作用。

**88**

结 **论**

1、ATD导致粒细胞缺乏患者骨髓特点可分为粒系再Th障碍型和粒系成熟障碍型两类，以粒系再Th障碍型为主。骨髓特点分类与患者临床预后相关。

2、成功获得ATD导致粒细胞缺乏发Th相关的血浆miRNA谱，其中hsa-miR-20a低表达最为显著。hsa-miR-20a通过对PTEN的调控，激活AKT/Bcl-2/Bax凋亡信号通路在ATD导致粒细胞缺乏的发Th中发挥重要作用。

**89**

参考文献

[1] Azizi F. The safety and efficacy of antithyroid drugs[J]. Expert Opin Drug Saf, 2006, 5(1): 107-116.

[2] Ibanez L, Vidal X, Ballarin E, et al. Population-based drug-induced agranulocytosis[J]. Arch Intern Med, 2005, 165(8): 869-874.

[3] Sun MT, Tsai CH, Shih KC. Antithyroid drug-induced agranulocytosis[J]. J Chin Med Assoc, 2009, 72(8): 438-441.

[4] Pearce SH. Spontaneous reporting of adverse reactions to carbimazole and propylthiouracil in the UK[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2004, 61(5): 589-594.

[5] Cooper DS. Antithyroid drugs[J]. N Engl J Med, 2005, 352(9): 905-917.

[6] Wang LH, Tsai MJ, Tsai WY, et al. Propylthiouracil-induced antineutrophil cytoplasm antibody-positive anaphylactoid purpura-like vasculitis--a case report[J]. J Formos Med Assoc, 2000, 99(8): 642-645.

[7] Akamizu T, Ozaki S, Hiratani H, et al. Drug-induced neutropenia associated with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): possible involvement of complement in granulocyte cytotoxicity[J]. Clin Exp Immunol, 2002, 127(1): 92-98.

[8] Tamai H, Sudo T, Kimura A, et al. Association between the DRB1\*08032 histocompatibility antigen and methimazole-induced agranulocytosis in Japanese patients with Graves disease[J]. Ann Intern Med, 1996, 124(5): 490-494.

[9] Julia A, Olona M, Bueno J, et al. Drug-induced agranulocytosis: prognostic factors in a series of 168 episodes[J]. Br J Haematol, 1991, 79(3): 366-371.

[10] 钟警, 杨靖, 周斌, et al. 抗甲状腺药物致Graves病患者粒细胞缺乏高表达基因的筛选与克隆研究[J]. 中国全科医学, 2010, 13(9B): 2921-2925.

[11] Luo L, Gong YQ, Qi X, et al. Effect of tumor suppressor PTEN gene on apoptosis and cell cycle of human airway smooth muscle cells[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 375(1-2): 1-9.**90**

[12] Luo H, Yang Y, Duan J, et al. PTEN-regulated AKT/FoxO3a/Bim signaling contributes to reactive oxygen species-mediated apoptosis in selenite-treated colorectal cancer cells[J]. Cell Death Dis, 2013, 4e481.

[13] Xu Z, Stokoe D, Kane LP, et al. The inducible expression of the tumor suppressor gene PTEN promotes apoptosis and decreases cell size by inhibiting the PI3K/Akt pathway in Jurkat T cells[J]. Cell Growth Differ, 2002, 13(7): 285-296.

[14] Ivanov VN, Ronai Z, Hei TK. Opposite roles of FAP-1 and dynamin in the regulation of Fas (CD95) translocation to the cell surface and susceptibility to Fas ligand-mediated apoptosis[J]. J Biol Chem, 2006, 281(3): 1840-1852.

[15] Foehr ED, Lorente G, Vincent V, et al. FAS associated phosphatase (FAP-1) blocks apoptosis of astrocytomas through dephosphorylation of FAS[J]. J Neurooncol, 2005, 74(3): 241-248.

[16] Slezak-Prochazka I, Durmus S, Kroesen BJ, et al. MicroRNAs, macrocontrol: regulation of miRNA processing[J]. RNA, 2010, 16(6): 1087-1095.

[17] Mendes ND, Freitas AT, Sagot MF. Current tools for the identification of miRNA genes and their targets[J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(8): 2419-2433.

[18] Venturini L, Battmer K, Castoldi M, et al. Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells[J]. Blood, 2007, 109(10): 4399-4405.

[19] Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(13): 5166-5171.

[20] Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(39): 13944-13949.

[21] Chim CS, Wong KY, Leung CY, et al. Epigenetic inactivation of the hsa-miR-203 in haematological malignancies[J]. J Cell Mol Med, 2011, 15(12): 2760-2767.

[22] Velu CS, Baktula AM, Grimes HL. Gfi1 regulates miR-21 and miR-196b to control myelopoiesis[J]. Blood, 2009, 113(19): 4720-4728.

[23] 袁毓贤, 李文成. 实用血液学细胞学图谱. 辽宁: 辽宁科学技术出版社, 2008.**91**

[24] Lehtihet M, Zedenius J, Hellden A, et al. [Antithyroid drug-induced agranulocytosis. A rare but dreaded condition] [J]. Lakartidningen, 2009, 106(41): 2607-2608, 2610-2601.

[25] Harper L, Chin L, Daykin J, et al. Propylthiouracil and carbimazole associated-antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in patients with Graves' disease[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2004, 60(6): 671-675.

[26] Tajiri J, Noguchi S, Murakami T, et al. Antithyroid drug-induced agranulocytosis. The usefulness of routine white blood cell count monitoring[J]. Arch Intern Med, 1990, 150(3): 621-624.

[27] Waldhauser L, Uetrecht J. Oxidation of propylthiouracil to reactive metabolites by activated neutrophils. Implications for agranulocytosis[J]. Drug Metab Dispos, 1991, 19(2): 354-359.

[28] Apinantriyo B, Lekhakula A, Rujirojindakul P. Incidence, etiology and bone marrow characteristics of non-chemotherapy-induced agranulocytosis[J]. Hematology, 2011, 16(1): 50-53.

[29] Nakamura H, Miyauchi A, Miyawaki N, et al. Analysis of 754 cases of antithyroid drug-induced agranulocytosis over 30 years in Japan[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98(12): 4776-4783.

[30] Yang J, Zhong J, Zhou LZ, et al. Sudden onset agranulocytosis and hepatotoxicity after taking methimazole[J]. Intern Med, 2012, 51(16): 2189-2192.

[31] Mutharasan P, Oatis W, Kwaan H, et al. Delayed anithyroid drug-induced agranulocytosis[J]. Endocr Pract, 2012, 18(4): e69-72.

[32] Chen CZ, Li L, Lodish HF, et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation[J]. Science, 2004, 303(5654): 83-86.

[33] Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, et al. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(13): 5078-5083.

[34] Bruchova H, Yoon D, Agarwal AM, et al. Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis[J]. Exp Hematol, 2007, 35(11):

**92**

1657-1667.

[35] Wong P, Iwasaki M, Somervaille TC, et al. The miR-17-92 microRNA polycistron regulates MLL leukemia stem cell potential by modulating p21 expression[J]. Cancer Res, 2010, 70(9): 3833-3842.

[36] Ademokun A, Turner M. Regulation of B-cell differentiation by microRNAs and RNA-binding proteins[J]. Biochem Soc Trans, 2008, 36(Pt 6): 1191-1193.

[37] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. Cell Res, 2008, 18(10): 997-1006.

[38] Park NJ, Zhou H, Elashoff D, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(17): 5473-5477.

[39] Wang G, Tam LS, Li EK, et al. Serum and urinary free microRNA level in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Lupus, 2011, 20(5): 493-500.

[40] Kosaka N, Izumi H, Sekine K, et al. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk[J]. Silence, 2010, 1(1): 7.

[41] Liang H, Gong F, Zhang S, et al. The origin, function, and diagnostic potential of extracellular microRNAs in human body fluids[J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2014, 5(2): 285-300.

[42] Cortez MA, Calin GA. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases[J]. Expert Opin Biol Ther, 2009, 9(6): 703-711.

[43] Duttagupta R, Jiang R, Gollub J, et al. Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures[J]. PLoS One, 2011, 6(6): e20769.

[44] McDonald JS, Milosevic D, Reddi HV, et al. Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges[J]. Clin Chem, 2011, 57(6): 833-840.

[45] Pritchard CC, Kroh E, Wood B, et al. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2012, 5(3): 492-497.**93**

[46] Sawera M, Gorodkin J, Cirera S, et al. Mapping and expression studies of the mir17-92 cluster on pig chromosome 11[J]. Mamm Genome, 2005, 16(8): 594-598.

[47] Trompeter HI, Abbad H, Iwaniuk KM, et al. MicroRNAs MiR-17, MiR-20a, and MiR-106b act in concert to modulate E2F activity on cell cycle arrest during neuronal lineage differentiation of USSC[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16138.

[48] Pickering MT, Stadler BM, Kowalik TF. miR-17 and miR-20a temper an E2F1-induced G1 checkpoint to regulate cell cycle progression[J]. Oncogene, 2009, 28(1): 140-145.

[49] Qiang XF, Zhang ZW, Liu Q, et al. miR-20a promotes Prostate cancer invasion and migration through targeting ABL2[J]. J Cell Biochem, 2014.

[50] Li X, Zhang Z, Yu M, et al. Involvement of miR-20a in promoting gastric cancer progression by targeting early growth response 2 (EGR2)[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(8): 16226-16239.

[51] Chang Y, Liu C, Yang J, et al. MiR-20a triggers metastasis of gallbladder carcinoma[J]. J Hepatol, 2013, 59(3): 518-527.

[52] Kang HW, Wang F, Wei Q, et al. miR-20a promotes migration and invasion by regulating TNKS2 in human cervical cancer cells[J]. FEBS Lett, 2012, 586(6): 897-904.

[53] Fan X, Liu Y, Jiang J, et al. miR-20a promotes proliferation and invasion by targeting APP in human ovarian cancer cells[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2010, 42(5): 318-324.

[54] Vasilatou D, Papageorgiou SG, Kontsioti F, et al. Expression analysis of mir-17-5p, mir-20a and let-7a microRNAs and their target proteins in CD34+ bone marrow cells of patients with myelodysplastic syndromes[J]. Leuk Res, 2013, 37(3): 251-258.

[55] Wu SQ, Xu ZZ, Lin J, et al. [Construction of miRNA sponge targeting miR-20a and stable expression in Jurkat leukemia cell line] [J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2012, 20(5): 1056-1062.**94**

[56] Jacobson A, Melhus H, Wadelius M. Can mutations in ELA2, neutrophil elastase expression or differential cell toxicity explain sulphasalazine-induced agranulocytosis[J]. BMCBloodDisord, 2004, 4(1): 5.

[57] Garcia-Martinez JM, Fresno Vara JA, Lastres P, et al. Effect of metamizol on promyelocytic and terminally differentiated granulocytic cells. Comparative analysis with acetylsalicylic acid and diclofenac[J]. Biochem Pharmacol, 2003, 65(2): 209-217.

[58] Gardner I, Zahid N, MacCrimmon D, et al. A comparison of the oxidation of clozapine and olanzapine to reactive metabolites and the toxicity of these metabolites to human leukocytes[J]. Mol Pharmacol, 1998, 53(6): 991-998.

[59] Henning U, Loffler S, Krieger K, et al. Uptake of clozapine into HL-60 promyelocytic leukaemia cells[J]. Pharmacopsychiatry, 2002, 35(3): 90-95.

[60] Siraki AG, Bonini MG, Jiang J, et al. Aminoglutethimide-induced protein free radical formation on myeloperoxidase: a potential mechanism of agranulocytosis[J]. Chem Res Toxicol, 2007, 20(7): 1038-1045.

[61] Rubio-Somoza I, Weigel D, Franco-Zorilla JM, et al. ceRNAs: miRNA target mimic mimics[J]. Cell, 2011, 147(7): 1431-1432.

[62] Furukawa N, Sakurai F, Katayama K, et al. Optimization of a microRNA expression vector for function analysis of microRNA[J]. J Control Release, 2011, 150(1): 94-101.

[63] Hu T, Fu Q, Chen P, et al. Construction of an artificial MicroRNA expression vector for simultaneous inhibition of multiple genes in mammalian cells[J]. Int J Mol Sci, 2009, 10(5): 2158-2168.

[64] Shin KJ, Wall EA, Zavzavadjian JR, et al. A single lentiviral vector platform for microRNA-based conditional RNA interference and coordinated transgene expression[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(37): 13759-13764.

[65] Shrivastava S, Petrone J, Steele R, et al. Up-regulation of circulating miR-20a is correlated with hepatitis C virus-mediated liver disease progression[J]. Hepatology,

**95**

2013, 58(3): 863-871.

[66] Wang M, Gu H, Wang S, et al. Circulating miR-17-5p and miR-20a: molecular markers for gastric cancer[J]. Mol Med Rep, 2012, 5(6): 1514-1520.

[67] Pesta M, Klecka J, Kulda V, et al. Importance of miR-20a expression in prostate cancer tissue[J]. Anticancer Res, 2010, 30(9): 3579-3583.

[68] Cox MB, Cairns MJ, Gandhi KS, et al. MicroRNAs miR-17 and miR-20a inhibit T cell activation genes and are under-expressed in MS whole blood[J]. PLoS One, 2010, 5(8): e12132.

[69] Leslie NR. PTEN: an intercellular peacekeeper[J]. SciSignal, 2012, 5(250): pe50.

[70] Sun C, Zhao J, Jin Y, et al. PTEN regulation of the proliferation and differentiation of auditory progenitors through the PTEN/PI3K/Akt-signaling pathway in mice[J]. Neuroreport, 2014, 25(3): 177-183.

[71] Blair PJ, Harvey J. PTEN: a new player controlling structural and functional synaptic plasticity[J]. J Physiol, 2012, 590(Pt 5): 1017.

[72] Stiles B, Gilman V, Khanzenzon N, et al. Essential role of AKT-1/protein kinase B alpha in PTEN-controlled tumorigenesis[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(11): 3842-3851.

[73] Huang H, Cheville JC, Pan Y, et al. PTEN induces chemosensitivity in PTEN-mutated prostate cancer cells by suppression of Bcl-2 expression[J]. J Biol Chem, 2001, 276(42): 38830-38836.

[74] Han Z, Hong L, Han Y, et al. Phospho Akt mediates multidrug resistance of gastric cancer cells through regulation of P-gp, Bcl-2 and Bax[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2007, 26(2): 261-268.

[75] Brueckner B, Stresemann C, Kuner R, et al. The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function[J]. Cancer Res, 2007, 67(4): 1419-1423.

[76] Dong YW, Wang R, Cai QQ, et al. Sulfatide Epigenetically Regulates miR-223 and Promotes the Migration of Human Hepatocellular Carcinoma Cells[J]. J Hepatol,

**96**

2013.

[77] Jung YJ, Kim JW, Park SJ, et al. c-Myc-mediated overexpression of miR-17-92 suppresses replication of hepatitis B virus in human hepatoma cells[J]. J Med Virol, 2013, 85(6): 969-978.

[78] O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, et al. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression[J]. Nature, 2005, 435(7043): 839-843.

**97**

**综述**

**抗甲状腺药物导致粒细胞缺乏的研究进展**

**杨靖综述文格波审校**

**摘要：**抗甲状腺药物（Antithyroid drug, ATD）是治疗甲状腺机能亢进症的主要方法之一。临床常用的药物是丙硫氧嘧啶（propylthiouracil, PTU）及甲巯咪唑（methimazole

MMI）。这类药物治疗甲亢疗效确切、价格便宜，但是少数患者服药后可能导致粒细胞缺乏这一不良反应，严重时可能危及生命。深入了解ATD导致粒细胞缺乏的临床特点、发生机制及治疗进展对临床诊疗具有很强的指导意义，因此本文就这些问题进行阐述。

前 言

甲状腺机能亢进症是内分泌系统的常见疾病，其中Graves病占全部甲亢的80%～

85%。其发病率报道在1.1%～1.6%之间，女性显著高发。目前尚不能对Graves病进行病因治疗[1,2]。针对甲亢主要有三种治疗方法，即抗甲状腺药物（ATD），131I 和手术治疗。ATD是治疗甲亢的主要手段，其应用于临床已经有70多年的历史。其方便有效、价格便宜，绝大多数患者耐受良好[3]。但是少数患者服药后出现严重不良反应如粒细胞缺乏、肝功能衰竭、再生障碍性贫血等[2, 3, 4]。其中粒细胞缺乏是ATD最常见的严重并发症，部分患者甚至因此导致死亡。本文就ATD导致粒细胞缺乏的临床特点、发生机制及治疗进展综述如下。

**1、ATD导致粒细胞缺乏的临床特点**

粒细胞缺乏症是ATD最严重的副作用。一项纳入30798例甲亢患者的大规模临床研究发现，丙硫氧嘧啶导致粒细胞缺乏的发生率是0.37%，甲巯咪唑的发生率与其相当，为0.35%[5]，女性患者发病是男性的3.7倍。关于服药疗程与粒细胞缺乏发生的关系，文献报道大多数患者粒细胞缺乏发生在服药的90天以内[3]，但是也有服药 6

天就发生的急性粒细胞缺乏症[6]，服药最长的患者11年后才发生的粒细胞缺乏[7]。老年患者发生粒细胞缺乏较年轻患者多见，而且，这些患者的死亡率往往较年轻患者高

[8]. 目前很少有16岁以下患者服用ATD后导致粒细胞缺乏的报道[3, 9]。

ATD 导致粒细胞缺乏最常见的临床表现是发热和咽痛，但是也有部分患者早期

**98**

没有任何临床症状，是通过常规的血常规检测发现粒细胞缺乏[10]。少数患者以突发寒战、高热、意识障碍甚至脓毒性休克起病，而无明显的上呼吸道感染症状，这些患者往往提示脓毒血症，病情凶险[1]。从粒细胞缺乏合并感染的部位分析，咽炎最为常见，其次是扁桃体炎、肺炎、泌尿系、肠道、皮肤软组织等部位的感染[11]。

常规白细胞计数在及时发现粒细胞缺乏中的价值曾经存在一定的争议[10, 12, 13]，因为有些患者粒细胞缺乏的发生起病急骤，没有出现粒细胞由正常到减少再到缺乏的一个逐步发展的过程。常规的每周或每两周监测一次外周血白细胞计数往往难以及时发现[14]。因此，对于一些服药后出现咽痛、发热等症状的患者应该特别提高警惕，及时监测血常规而不是等待到预先约定好的复查时间。目前，白细胞计数在监测粒细胞缺乏发生中的价值已经得到一致认可。甲亢药物治疗指南大都推荐在抗甲亢治疗的前

3个月内每1-2 周检测血常规一次[15, 16]，尤其是服药前或过程当中发现白细胞介于

3.0～3.9×109/L的患者[1, 16]。

关于ATD导致粒细胞缺乏与是否与服用药物剂量之间有明确的相关目前尚无结论，Cooper DS认为MMI的副作用呈剂量依赖性，而PTU导致粒细胞及其他副作用等与剂量无明显相关[3]。Kumiko T通过对514例ATD治疗的患者进行回顾性研究发现MMI高剂量组（30mg/d）比低剂量（15mg/d）更易导致粒细胞缺乏的发生，但是该研究纳入的样本数量有限，结论缺乏说服力[17]。Kazuna通过纳入2087例患者的恢复性研究也发现MMI 30mg/d组较15mg/d组粒细胞缺乏的发生率要增高[18]。而

Yang等发现一例患者服用MMI 20mg/d仅六天后即发生粒细胞缺乏，他们认为MMI导致粒细胞缺乏与服药剂量无明显相关[6]。Mezquita P等也认为MMI导致粒细胞缺乏与服用药物剂量无关而与药物暴露的次数有关[19]。

**2、ATD导致粒细胞缺乏发生机制**

目前关于ATD导致粒细胞缺乏的发病机制主要有免疫损伤学说及药物对骨髓的毒性作用学说。

**2.1免疫损伤学说**

目前很多的研究发现ATD 导致粒细胞缺乏与免疫因素有关，ATD可能作为一种半抗原，与患者的体内特异蛋白结合成为全抗原，刺激机体产生相应的抗体，而这一抗体可能通过与粒细胞表面或胞内某些蛋白结合，产生抗原抗体反应，导致粒细胞破

**99**

坏增多[3, 20, 21]。Douer研究组采用MMI、PTU以及MMI导致粒细胞缺乏患者的血浆分别加入体外培养的骨髓细胞，他们发现MMI及PTU药物本身不影响粒细胞集落形成，但是MMI导致粒细胞缺乏患者的血浆可以抑制粒细胞集落形成[21]。这一研究结果提示

ATD导致粒细胞缺乏可能是血浆中的抗体成分导致的免疫反应损伤不是药物的直接毒性作用。

关于免疫损伤在ATD导致粒细胞缺乏发生中的作用的研究主要有：Sato H等通过对51例童年起病的Graves病患者研究发现，这些患者服用PTU前MPO-ANCA阳性率是6.7%，服药（4.0±3.6）年后MPO-ANCA阳性率高达64%[22]，Harper L等在成人中的研究也得到相似的结果[23]。Akamizu T等研究发现PTU导致的粒细胞缺乏患者血浆抗中性粒细胞胞浆抗体（anti-neutrophil cytoplasma antibody ANCA）水平较未发生粒细胞缺乏的患者要高，ANCA可能通过补体依赖途径导致粒细胞缺乏发生[24]。Bux等发现卡比马唑（甲亢平）引起粒细胞缺乏可能与血小板内皮细胞黏附分子- 1( platelet endothelial cell adhesion molecule 1, PECAM- 1; CD31 )有关，并在患者血清中检测到Fc-γ受体的抗体[25]。而Mosyagin等则发现ATD导致的粒细胞缺乏与Fc-γ及其受体多态性无明显相关[26]。上述这些研究从不同的方面对ATD导致粒细胞缺乏发生的机制进行了分析，但是均未能得到阐明。

对于粒细胞缺乏患者的骨髓特点进行深入分析可能对阐明ATD导致粒细胞缺乏的机制有帮助。Yang等通过对33例ATD导致粒细胞缺乏患者骨髓象进行回顾性研究，发现这些患者骨髓象可分为两类，即粒系再生障碍型和成熟障碍型。以再生障碍型为主，骨髓增生程度多为活跃，少数患者出现增生减低，未见增生极度减低的病例。在粒系再生障碍型组患者中从服药到出现粒细胞缺乏时间最短者为6天，最长20周。这些结果表明ATD导致的粒细胞缺乏患者骨髓造血功能并没有被抑制，而且粒细胞缺乏的发生与药物剂量及服药时间无必然联系。这可能提示ATD导致的粒细胞缺乏以免疫反应对粒系各阶段细胞损伤可能性大，而不是药物对骨髓直接毒性作用所致[4]。

**2.2药物对骨髓的毒性作用学说**

部分临床病例报道提示ATD引起粒细胞缺乏患者的骨髓象呈粒系增生低下， 中幼粒以下显著减少，少数患者甚至出现再生障碍性全血细胞减少症[4, 27]。因此有研究者认为， 这可能是药物对骨髓直接的细胞毒作用[28]。Yamoto 等在应用甲硫咪唑治疗

**100**

GD时，有的患者发生再生障碍性贫血， 在这些患者中， 有严重的粒细胞缺乏， 却伴有浆细胞增多，骨髓检查发现增生低下，但有浆细胞增多，提示可能有免疫机制参与骨髓抑制[27]。Papadaki 等也在慢性特发性中性粒细胞减少症患者中， 发现活化的T淋巴细胞具有骨髓抑制的性质，其机制可能是在骨髓形成免疫反应所导致[29]。而也有学者认为ATD的骨髓抑制作用是由于药物进入骨髓后影响到粒细胞的氧利用及葡萄糖代谢所导致的[30]。从临床特点分析，药物对骨髓直接毒性作用应该呈现出药物剂量及浓度的依赖性特点[28]。

**2.3其他学说**

随着人们对疾病认识的不断深入， 研究发现药物的疗效和毒性作用存在个体差异的潜在原因，除与疾病严重程度、致病原、年龄、药物相互作用、营养状况、伴发疾病等因素有关外，基因的差异在其中也起着重要的作用。因此有研究提出药物基因组学说。药物基因组学说是基于药物反应的遗传多态性而提出的，主要是在基因及表遗传学水平研究药效的差异[31]。Graves病是一种多基因自身免疫性疾病。但ATD导致粒细胞缺乏的相关基因仍不太清楚，日本学者Tamai等报道ATD引起粒细胞缺乏与HLA-DRB1\* 08032有关，这些结果是依赖于已知与免疫反应有关基因来进行的研究，仅能说明二者有关联， 对揭示ATD导致粒细胞缺乏机制存在较大的局限性[32]。

**ATD导致粒细胞缺乏的治疗现状**

ATD导致粒细胞缺乏的治疗方法手段成熟，一旦诊断ATD导致粒细胞缺乏，患者必须立即停用抗甲状腺药物并接受规范化治疗，包括入住隔离病房、升白细胞、控制感染等综合治疗。对于甲亢毒性症状很重或严重脓毒症患者可能还会进行脏器功能支持及血液净化治疗。在此，我们就糖皮质激素、粒细胞集落刺激因子（G-CSF）及血液滤过在ATD导致粒细胞缺乏治疗中的应用总结如下：

ATD导致粒细胞缺乏患者接受糖皮质激素治疗可以升高粒细胞水平、控制炎症反应、抑制药物导致的抗原抗体反应以及控制甲亢危象的发生。因此，ATD导致粒细胞缺乏时正确使用糖皮质激素可以达到“一石多鸟”作用[33]。但是，粒细胞缺乏患者往往合并各种感染，如果在感染没有得到有效控制的情况下使用糖皮质激素会导致感染难以控制，严重时甚至导致生命危险[34]。而且，单纯以升高白细胞为目的去使用糖皮质激素往往收效甚微[9]。因此，糖皮质激素在ATD 导致粒细胞缺乏患者应

**101**

用时任是一把“双刃剑”。临床医师在这种情况下使用糖皮质激素一定要对患者病情进行综合而又全面的评估，不主张使用糖皮质激素用于单纯升白细胞治疗。

重组人粒细胞集落刺激因子（Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor, rhG-CSF）通过作用于造血祖细胞，促进其增殖和分化，其重要作用是刺激粒、单核巨噬细胞成熟，促进成熟细胞向外周血释放，并能促进巨噬细胞及噬酸性细胞的多种功能。G-CSF临床主要用于预防和治疗肿瘤放疗或化疗后引起的白细胞减少症、治疗骨髓造血机能障碍及骨髓增生异常综合征、预防白细胞减少可能潜在的感染并发症、以及使感染引起的中性粒细胞减少的恢复加快[35, 36, 37]。在ATD导致粒细胞缺乏患者中使用G-CSF升白细胞治疗得到大多数专家的认可，他们认为G-CSF可以缩短粒细胞恢复时间，减少住院周期，利于感染的控制[3, 38, 39]。但是，也有学者对G-CSF在ATD导致粒细胞缺乏患者治疗中的价值持怀疑态度，Fukata S等认为G-CSF治疗并不能改善ATD导致粒细胞缺乏患者的临床预后[40]。Tajiri等认为对于没有临床症状的粒细胞缺乏患者，G-CSF治疗有效，这些患者如果接受G-CSF治疗后4小时粒细胞上升到1.0×109/L 以上，往往提示预后良好，不需住院治疗。但是当白细胞低于

0.1×109/L且患者有粒细胞缺乏相关临床症状时，G-CSF治疗往往无效，这些患者应该收住院综合治疗[13, 39, 41]。尽管如此，目前几乎所有的国际指南仍然推荐ATD导致粒细胞缺乏患者使用G-CSF升白细胞[3, 16]。

血浆置换是现代生物医学工程领域中净化血液的重要手段之一。其基本原理是利用血细胞分离机，在体外将患者的血液分离成血浆和血细胞成分（红细胞、白细胞、血小板）。然后弃去含有害致病物质的血浆，用等量的置换液代替，血浆置换能减少血液中的有害物质，清除患者体内大分子量的蛋白质，比如异源性蛋白质、过敏原、自身抗体，以及脂溶性（或水溶性）药物、毒物等。在ATD导致粒细胞缺乏患者中已有很多采用血浆置换成功获救的报道[42, 43, 44]。这些患者接受血浆置换可以清除部分血浆中的甲状腺激素、降低药物浓度、降低甲状腺抗体水平。对于药物作为半抗原与敏感患者血浆特异成分结合后形成的全抗原也有清除作用[43]。患者接受血浆置换治疗后甲亢症状能够得到及时改善，粒细胞恢复快。为后续进一步手术或者131I治疗创造机会[45, 46]。尤其是一些甲亢合并严重肝功能损害的患者，血浆置换治疗还能够改善肝功能及凝血异常，降低住院死亡率[47]。因此，血浆置换是ATD导致严重粒细胞缺

**102**

乏患者救治的一种重要手段。**问题与展望**

ATD导致的粒细胞缺乏虽然少见，但患者病情往往相当为重，一些患者由于合并严重感染出现多器官功能衰竭，最后导致死亡。按目前报道的Graves病1.1%～1.6%发病率，ATD导致粒细胞缺乏发病率0.35%来计算[3, 5]，我国每年ATD导致粒细胞缺乏的患者人数在45万左右。目前ATD导致粒细胞缺乏患者的死亡率尚无文献报道，但由此导致的医疗支出及给患者及家庭带来的负担可见一斑。

目前关于ATD致Graves病患者粒细胞缺乏的主要问题还是在于其发生机制尚不明确，由于发病机制不明确，因此临床上也没有办法预先判断哪些患者可能会在服药后出现粒细胞缺乏，更不能针对病因进行有效的治疗。因此，深入阐明ATD导致粒细胞缺乏的发病机制具有重要的临床意义。在回顾分析近年来的相关文献的过程中，我们发现大多数的研究往往只是针对ATD中某一种药物进行研究，而且以临床研究为主。而常用的ATD 如PTU、MMI等均能导致粒细胞缺乏， 且临床上常见ATD 致

Graves病患者粒细胞缺乏在患者粒细胞恢复后换用另一种ATD治疗也出现粒细胞缺乏的情况，这提示各种ATD引起粒细胞缺乏有着某些共同的作用环节，有待于进一步系统、全面的研究。另外，随着药物基因组学的不断发展，人们发现药物的药效和毒性差异大多源于基因差异[48, 49]，因此筛选并构建ATD致Graves病患者粒细胞缺乏的差异表达基因谱，找出其差异表达蛋白，将为ATD致Graves病患者粒细胞缺乏的预测和治疗提供新的分子靶标。近年来，随着分子生物学技术的发展，人类基因组序列图谱、甲基化图谱已经完善，MiRNA在疾病发生中作用研究也得到不断深入[50]，相信在不远的将来，ATD致粒细胞缺乏的发生机制必将阐明，一旦ATD导致粒细胞缺乏的分子标志物被发现，临床医师在处方ATD之前将先对患者进行粒细胞缺乏相关标志物的检测，ATD导致粒细胞缺乏的发病率会明显下降。同时，针对发病机制相关环节的新的治疗药物也可能诞生，为ATD或其他药物导致的粒细胞缺乏提供新的治疗手段。

参考文献

[1] Nakamura H, Miyauchi A, Miyawaki N, et al. Analysis of 754 cases of antithyroid drug-induced agranulocytosis over 30 years in Japan[J]. J Clin Endocrinol Metab,

**103**

2013, 98(12): 4776-4783.

[2] Sun MT, Tsai CH, Shih KC. Antithyroid drug-induced agranulocytosis[J]. J Chin Med Assoc, 2009, 72(8): 438-441.

[3] Cooper DS. Antithyroid drugs[J]. N Engl J Med, 2005, 352(9): 905-917.

[4] Yang J, Zhong J, Xiao XH, et al. The relationship between bone marrow characteristics and the clinical prognosis of antithyroid drug-induced agranulocytosis[J]. Endocr J, 2013, 60(2): 185-189.

[5] Tajiri J, Noguchi S. Antithyroid drug-induced agranulocytosis: special reference to normal white blood cell count agranulocytosis[J]. Thyroid, 2004, 14(6): 459-462.

[6] Yang J, Zhong J, Zhou LZ, et al. Sudden onset agranulocytosis and hepatotoxicity after taking methimazole[J]. Intern Med, 2012, 51(16): 2189-2192.

[7] Mutharasan P, Oatis W, Kwaan H, et al. Delayed anithyroid drug-induced agranulocytosis[J]. Endocr Pract, 2012, 18(4): e69-72.

[8] Pearce SH. Spontaneous reporting of adverse reactions to carbimazole and propylthiouracil in the UK[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2004, 61(5): 589-594.

[9] Dai WX, Zhang JD, Zhan SW, et al. Retrospective analysis of 18 cases of antithyroid drug (ATD) -induced agranulocytosis[J]. Endocr J, 2002, 49(1): 29-33.

[10] Tajiri J, Noguchi S, Murakami T, et al. Antithyroid drug-induced agranulocytosis. The usefulness of routine white blood cell count monitoring[J]. Arch Intern Med, 1990, 150(3): 621-624.

[11] Sheng WH, Hung CC, Chen YC, et al. Antithyroid-drug-induced agranulocytosis complicated by life-threatening infections[J]. QJM, 1999, 92(8): 455-461.

[12] Asawa T, Arai M, Takeda T, et al. Antithyroid drug-induced agranulocytosis: is routine white blood cell count effective for the detection[J]. ArchInternMed, 1992, 152(1): 204, 207.

[13] Tajiri J, Noguchi S, Murakami N. Usefulness of granulocyte count measurement four hours after injection of granulocyte colony-stimulating factor for detecting recovery from antithyroid drug-induced granulocytopenia[J]. Thyroid, 1997, 7(4):

**104**

575-578.

[14] Cooper DS. Antithyroid drugs for the treatment of hyperthyroidism caused by Graves' disease[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 1998, 27(1): 225-247.

[15] Andres E, Zimmer J, Mecili M, et al. Clinical presentation and management of drug-induced agranulocytosis[J]. Expert Rev Hematol, 2011, 4(2): 143-151.

[16] Brent GA. Clinical practice. Graves' disease[J]. N Engl J Med, 2008, 358(24): 2594-2605.

[17] Tsuboi K, Ueshiba H, Shimojo M, et al. The relation of initial methimazole dose to the incidence of methimazole-induced agranulocytosis in patients with Graves' disease[J]. Endocr J, 2007, 54(1): 39-43.

[18] Takata K, Kubota S, Fukata S, et al. Methimazole-induced agranulocytosis in patients with Graves' disease is more frequent with an initial dose of 30 mg daily than with 15 mg daily[J]. Thyroid, 2009, 19(6): 559-563.

[19] Mezquita P, Luna V, Munoz-Torres M, et al. Methimazole-induced aplastic anemia in third exposure: successful treatment with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor[J]. Thyroid, 1998, 8(9): 791-794.

[20] Heimpel H. The potential immune mechanism in a case of methimazole-induced agranulocytosis[J]. Eur J Haematol, 1988, 41(3): 302.

[21] Douer D, Eisenstein Z. Methimazole-induced agranulocytosis: growth inhibition of myeloid progenitor cells by the patient's serum[J]. Eur J Haematol, 1988, 40(1): 91-94.

[22] Sato H, Hattori M, Fujieda M, et al. High prevalence of antineutrophil cytoplasmic antibody positivity in childhood onset Graves' disease treated with propylthiouracil[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(11): 4270-4273.

[23] Harper L, Chin L, Daykin J, et al. Propylthiouracil and carbimazole associated-antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in patients with Graves' disease[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2004, 60(6): 671-675.

[24] Akamizu T, Ozaki S, Hiratani H, et al. Drug-induced neutropenia associated with

**105**

Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): possible involvement of complement in granulocyte cytotoxicity[J]. Clin Exp Immunol, 2002, 127(1): 92-98.

[25] Bux J, Ernst-Schlegel M, Rothe B, et al. Neutropenia and anaemia due to carbimazole-dependent antibodies[J]. Br J Haematol, 2000, 109(1): 243-247.

[26] Mosyagin I, Cascorbi I, Schaub R, et al. Drug-induced agranulocytosis: impact of different fcgamma receptor polymorphisms[J]. JClinPsychopharmacol, 2005, 25(5): 435-440.

[27] Yamamoto A, Katayama Y, Tomiyama K, et al. Methimazole-induced aplastic anemia caused by hypocellular bone marrow with plasmacytosis[J]. Thyroid, 2004, 14(3): 231-235.

[28] Pisciotta AV. Immune and toxic mechanisms in drug-induced agranulocytosis[J]. Semin Hematol, 1973, 10(4): 279-310.

[29] Papadaki HA, Stamatopoulos K, Damianaki A, et al. Activated T-lymphocytes with myelosuppressive properties in patients with chronic idiopathic neutropenia[J]. Br J Haematol, 2005, 128(6): 863-876.

[30] Waldhauser L, Uetrecht J. Oxidation of propylthiouracil to reactive metabolites by activated neutrophils. Implications for agranulocytosis[J]. Drug Metab Dispos, 1991, 19(2): 354-359.

[31] Norton RM. Clinical pharmacogenomics: applications in pharmaceutical R&D[J]. Drug Discov Today, 2001, 6(4): 180-185.

[32] Tamai H, Sudo T, Kimura A, et al. Association between the DRB1\*08032 histocompatibility antigen and methimazole-induced agranulocytosis in Japanese patients with Graves disease[J]. Ann Intern Med, 1996, 124(5): 490-494.

[33] Jin JG, Gao XY, Zhang WL. Treatment of methimazole-induced agranulocytosis with low-dose prednisone and ciclosporin following failed treatment with colony-stimulating factors[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2010, 73(3): 422-424.

[34] Minamitani K, Oikawa J, Wataki K, et al. A Report of Three Girls with Antithyroid

**106**

Drug-Induced Agranulocytosis; Retrospective Analysis of 18 Cases Aged 15 Years or Younger Reported between 1995 and 2009[J]. Clin Pediatr Endocrinol, 2011, 20(2): 39-46.

[35] Nayeri F, Soheili H, Kaveh M, et al. Comparison of two regimens of RhG-CSF in neutropenic neonatal septicemia: a randomized clinical trial[J]. Acta Med Iran, 2011, 49(9): 575-578.

[36] Hacioglu S, Sari I, Dogu MH, et al. The effect of gradual increment in rhG-CSF dose on stem cell yields in patients with multiple myeloma mobilized with intermediate dose cyclophosphamide plus rhG-CSF[J]. Transfus Apher Sci, 2013.

[37] Khan TH, Shahidullah M, Mannan MA, et al. Effect of recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF) for the treatment of neonates in presumed sepsis with neutropenia[J]. Mymensingh Med J, 2012, 21(3): 469-474.

[38] Andres E, Kurtz JE, Perrin AE, et al. Haematopoietic growth factor in antithyroid-drug-induced agranulocytosis[J]. QJM, 2001, 94(8): 423-428.

[39] Andres E, Maloisel F. Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) Therapy in Antithyroid Drug-induced Agranulocytosis[J]. Endocr J, 2005, 52(3): 383.

[40] Hirsch D, Luboshitz J, Blum I. Treatment of antithyroid drug-induced agranulocytosis by granulocyte colony-stimulating factor: a case of primum non nocere[J]. Thyroid, 1999, 9(10): 1033-1035.

[41] Tajiri J, Noguchi S. Antithyroid drug-induced agranulocytosis: how has granulocyte colony-stimulating factor changed therapy[J]. Thyroid, 2005, 15(3): 292-297.

[42] Vyas AA, Vyas P, Fillipon NL, et al. Successful treatment of thyroid storm with plasmapheresis in a patient with methimazole-induced agranulocytosis[J]. Endocr Pract, 2010, 16(4): 673-676.

[43] Guvenc B, Unsal C, Gurkan E, et al. Plasmapheresis in the treatment of hyperthyroidism associated with agranulocytosis: A case report[J]. J Clin Apher, 2004, 19(3): 148-150.

[44] Lew WH, Chang CJ, Lin JD, et al. Successful preoperative treatment of a Graves'

**107**

Disease patient with agranulocytosis and hemophagocytosis using double filtration plasmapheresis[J]. J Clin Apher, 2011, 26(3): 159-161.

[45] Ashkar FS, Katims RB, Smoak WM, 3rd, et al. Thyroid storm treatment with blood exchange and plasmapheresis[J]. JAMA, 1970, 214(7): 1275-1279.

[46] Braithwaite SS, Brooks MH, Collins S, et al. Plasmapheresis: an adjunct to medical management of severe hyperthyroidism[J]. J Clin Apher, 1986, 3(2): 119-123.

[47] Aydemir S, Ustundag Y, Bayraktaroglu T, et al. Fulminant hepatic failure associated with propylthiouracil: a case report with treatment emphasis on the use of plasmapheresis[J]. J Clin Apher, 2005, 20(4): 235-238.

[48] Takahara Y, Kobayashi T, Takemoto K, et al. Pharmacogenomics of cardiovascular pharmacology: development of an informatics system for analysis of DNA microarray data with a focus on lipid metabolism[J]. J Pharmacol Sci, 2008, 107(1): 1-7.

[49] Yengi LG, Xiang Q, Shen L, et al. Application of pharmacogenomics in drug discovery and development: correlations between transcriptional modulation and preclinical safety observations[J]. Drug Metab Lett, 2007, 1(1): 41-48.

[50] Ackley A, Lenox A, Stapleton K, et al. An Algorithm for Generating Small RNAs Capable of Epigenetically Modulating Transcriptional Gene Silencing and Activation in Human Cells[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2013, 2: e104-108.

**108**

附图 1



**ATD导致粒细胞缺乏骨髓检查报告（粒系再生障碍型）**

**109**

附图 2



**ATD导致粒细胞缺乏骨髓检查报告（粒系成熟障碍型）**

**110**

# 攻读学位期间的主要科研成果

**发表学术论文：**

**[1] Jing Yang**, Jing Zhong, Ling-Zhi Zhou, Tao Hong, Xin-Hua Xiao, Ge-Bo Wen. Sudden Onset Agranulocytosis and Hepatotoxicity after Taking Methimazole, Internal medicine, 2012, 51(16): 2189-2192**.**

**[2] Jing Yang**, Jing Zhong, Xin-Hua Xiao, Ling-Zhi Zhou, Ya-Jun Chen, Jiang-Hua Liu, Ren-Xian Cao, Ge-Bo Wen. The relationship between bone marrow characteristics and the clinical prognosis of antithyroid drug-induced agranulocytosis. [J], Endocrine journal, 2013, 60 (2), 185-189**.**

[3] Zhong J, Cao RX, Hong T, **Yang J**, Zu XY, Xiao XH, Liu JH, Wen GB. Identification and expression analysis of a novel transcript of the human PRMT2 gene resulted from alternative polyadenylation in breast cancer. [J], Gene.2011,487(1):1-9.

[4] Zhong J, Cao RX, Zu XY, Hong T, **Yang J**, Liu L, Xiao XH, Ding WJ, Zhao Q, Liu JH, Wen GB. Identification and characterization of novel spliced variants of PRMT2 in breast carcinoma. [J], FEBS J. Jan 2012; 279(2): 316-35.

[5] J Zhong, R-X Cao, J-H Liu, Y-B Liu, J Wang, L-P Liu, Y-J Chen, **J Yang,** Q-H Zhang, Y Wu, W-J Ding, T Hong, X-H Xiao, X-Y Zu and G-B Wen. Nuclear loss of protein arginine N-methyltransferase 2 in breast carcinoma is associated with tumor grade and overexpression of cyclin D1 protein. Oncogene, (Epub, December 2013)

[6]**杨靖,** 钟警, 文格波. 甲状腺癌相关microRNA. [J], 国际病理科学与临床杂志, 2012, 32(1): 71-74.

[7]**杨靖,** 谢翠松, 陈亚军, 钟警, 洪涛, 文格波. 抗甲状腺药物致粒细胞缺乏患者

合并感染的临床特点研究。[J]，中国全科医学，2012，15(6A) 1844-1849. （中文核心）

[[8]**杨靖**](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e6%9d%a8%e9%9d%96&amp;code=08027310%3B11046690%3B25499861%3B10520783%3B19001097%3B)**，**[钟警](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e9%92%9f%e8%ad%a6&amp;code=08027310%3B11046690%3B25499861%3B10520783%3B19001097%3B)，[陈亚军](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e9%99%88%e4%ba%9a%e5%86%9b&amp;code=08027310%3B11046690%3B25499861%3B10520783%3B19001097%3B)，[肖新华](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e8%82%96%e6%96%b0%e5%8d%8e&amp;code=08027310%3B11046690%3B25499861%3B10520783%3B19001097%3B)，[文格波](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e6%96%87%e6%a0%bc%e6%b3%a2&amp;code=08027310%3B11046690%3B25499861%3B10520783%3B19001097%3B)。抗甲状腺药物治疗8周内出现粒细胞缺乏患者13例临床分析。[J]，中南医学科学杂志，2012, 40(5)：477-479.

[[9]**杨靖**](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e6%9d%a8%e9%9d%96&amp;code=08027310%3B11046690%3B25499861%3B10520783%3B19001097%3B)**，**周灵芝，[钟警](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e9%92%9f%e8%ad%a6&amp;code=08027310%3B11046690%3B25499861%3B10520783%3B19001097%3B)，[颜彬](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e9%99%88%e4%ba%9a%e5%86%9b&amp;code=08027310%3B11046690%3B25499861%3B10520783%3B19001097%3B)，刘畅，[肖新华](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e8%82%96%e6%96%b0%e5%8d%8e&amp;code=08027310%3B11046690%3B25499861%3B10520783%3B19001097%3B)，[文格波](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e6%96%87%e6%a0%bc%e6%b3%a2&amp;code=08027310%3B11046690%3B25499861%3B10520783%3B19001097%3B)。抗甲状腺药物导致粒细

**111**

胞缺乏与血浆抗中性粒细胞胞浆抗体和抗中性粒细胞抗体的相关性研究。[J]，中国全科医学，2013，16(11B) 3783-3785. （中文核心）

[10]刘应兰，**杨靖**，钟警，曹仁贤S100A13基因的高表达对HepG2细胞生物学性状影响的研究中国现代医学杂志，2011; 21: 1845-1848（中文核心）

[11]钟警，**杨靖，**周斌，刘江华，曹仁贤，文格波抗甲状腺药物致Graves病患者粒细胞缺乏高表达基因的筛选与克隆研究。中国全科医学，2010; 26: 2921-2925（中文核心）

**主持或参与的课题：**

1、抗甲状腺药物致Graves 病患者粒细胞缺乏相关miRNA 的鉴定及功能研究。

（No.81100560）国家自然科学基金（**主持**）

2、PRMT2B丝氨酸磷酸化抑制乳腺癌细胞生长增殖的机制研究。

（No.31200573）国家自然科学基金（**第四参与**）

3、PRMT2促进ERa阳性乳腺癌侵袭与转移的机制研究。

（No.81272906）国家自然科学基金（**第五参与**）

**读博期间获得的荣誉：**

1、2011年，衡阳市“青年岗位能手”（**授奖单位：共青团衡阳市委**）

2、2012年，湖南省17届内分泌年会“优秀论文奖”（**授奖单位：湖南省医学会内分**

**泌专业委员会**）

3、2012年，博士研究生国家奖学金（**授奖单位：教育部**）

4、2013年，优秀教师（**授奖单位：南华大学**）

**112**

致 **谢**

博士学位论文即将付梓，掩卷沉思，感慨万千。四年博士学习有如白驹过隙，期间虽有辛酸与无奈，却也不乏收获与喜悦。一路走来，得到许多师长、朋友、亲人的关爱与帮助，内心充满感激！

在此，首先衷心的感谢我的导师文格波教授。我的博士课题设计、实验实施、论文撰写以及国家自然科学基金申报等过程中都融入了恩师的谆谆教导与细致关怀，从硕士研究生到博士研究生多年来的学习生活中，导师教给了我科学的思维方法，培养了我严谨的科研态度，为我今后从事科学研究奠定了坚实的基础。导师严谨的治学风格，孜孜不倦的工作态度，是我终生学习的榜样！

感谢我的师母高明艳老师在工作与生活上给予的无微不至的关心，您的勉励和教诲是我一生的精神财富！

感谢南华大学附一医院的曹仁贤院长，刘江华副院长，临床研究所祖旭宇及各位老师在本研究工作中给予的关心与指导！

感谢南华大学附一医院内分泌科文芳主任、肖新华主任及全体同仁在工作中的协作与帮助，因为您们的帮助与理解我才有时间和精力去完成课题研究！

感谢南华大学吕运成博士、吴喜军博士、唐志晗博士、李素云博士给与的帮助以及我们同窗学习的美好时光！特别是吕运成博士为我课题实施、论文修改提供了诸多帮助和宝贵意见，和您一起探讨实验中的困惑是科研过程最大的乐趣！

感谢师兄钟警、洪涛，师姐谢翠松，师弟刘畅、周斌，师妹张熠、陈亚军、冉莉，在本研究标本收集、实验实施等过程给予的帮助。尤其是钟警师兄和张熠师妹在实验实施过程中做了大量的工作，在此深表感谢！

感谢南华大学血液实验室全体老师在本研究骨髓资料收集分析中给予的支持！感谢所有关心和帮助过我的领导、同学和朋友！

最后，感谢我的妻儿的支持和奉献，感谢母亲对我家庭悉心的照顾，您们是我完成学业的精神支柱和坚强后盾！

杨 靖

2014年5 月

**113**