论著

文章编号:1000-5404(2012)19-1944-05

唐氏综合征胎儿脐带血单个核细胞 microRNA 差异表达研究

李武县[1],徐 勇[1,2],李紫微[1],乔王敏[1],曾 君[3],戴 勇[1,3],涂植光[1] (400016 重庆,重庆医科大学:检验医学院教育部临床检验诊断学重点实验室[1];518118 广东 深圳,深圳市坪山新区人民医院临床医学研究中心[2];518020 广东 深圳,深圳市人民医院临床医学研究中心[3])

[摘要] **目的** 检测唐氏综合征(Down syndrome,DS)胎儿和正常胎儿脐带血单个核细胞全基因组 microRNA(miRNA)的差异表达。**方法** 运用 Solexa 高通量测序技术对6例 DS 胎儿(DS 组)和6例正常胎儿(对照组)脐带血单个核细胞 miRNA 表达水平进行检测,比较分析2组 miRNA 表达的差异,并用 Stem-loop qRT-PCR 对 Solexa 测序结果进行验证。**结果** 2组样本显著性差异表达 miRNA 有167种,8种 miRNA 在 DS 组样本中表达上调,159种 miRNA 表达下调;还有38种和139种 miRNA 分别特异性表达于 DS 组和对照组样本中;21号染色体上5个 miRNA,除 miR-802 在 DS 组中高表达外,miR-99a、let-7c、miR-125b 和 miR-155 均低表达。**结论** DS 胎儿和健康胎儿脐带血单个核细胞 miRNA 的表达差异显著,可能与 DS 胎儿免疫系统的发育缺陷及 DS 胎儿循环 T、B 淋巴细胞数目的减少有关;差异显著和特异性表达的 miRNA 可作为 DS 胎儿潜在的产前筛查诊断指标。

[关键词] 微 RNAs;唐氏综合征;胎血;Solexa 测序

[中图法分类号] R394-33; R596.1; R714.55 [文献标志码] A

microRNA expression profiles of mononuclear cells from Down syndrome fetal cord blood

Li Wuxian[1], Xu Yong[1,2], Li Ziwei[1], Qiao Wangmin[1], Zeng Jun[3], Dai Yong[1,3], Tu Zhiguang[1] ([1]Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqiong Medical University, Chongqing, 400016; [2]Clinical Medical Research Center, Pingshan People's Hospital, Shenzhen, Guangdong Province, 518118; [3]Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, Guangdong Province, 518020, China)

[**Abstract**] **Objective** To detect the differentially expressed miRNAs in mononuclear cells from Down syndrome (DS) fetal cord blood. **Methods** Solexa high-throughput sequencing technology was conducted to evaluate the miRNA expression in 6 pairs of fetal cord blood mononuclear cells samples from DS fetuses (DS group) and normal fetuses (control group). Stem-loop qRT-PCR was performed to verify the results of Solexa sequencing. **Results** A total of 167 miRNAs were found significantly dysregulated expression in the DS fetal cord blood mononuclear cells compared to the controls. And there were 8 up-regulated miRNAs and 159 down-regulated miRNAs in DS group. Moreover, 38 miRNAs and 139 miRNAs were specifically expressed in the DS group and control group, respectively. For the 5 miRNAs encoded by 21 chromosome, with the exception of miR-802, which was up-regulated in DS group, the other 4 Hsa21-derived miRNAs (*i. e.*, hsa-miR-99a, let-7c, miR-125b, and miR-155) displayed reduced expression. **Conclusion** These results suggested that there is a significant difference between the expression patterns of miRNAs in the DS group and control group, which may be related to the immune deficiency of DS fetus, and the decrease of T/B lymphocytes in DS fetal circulation. The significantly dysregulated and specifically expressed miRNAs are potential prenatal diagnosis biomarkers for DS fetus.

[**Key words**] microRNA; Down syndrome; fetal blood; Solexa sequencing

Supported by the Sci & Tech Project of Guangdong Province (2012B032000008) and the Key Sci & Tech Project of Shenzhen City(201001006). Corresponding author: Tu Zhiguang, Tel: 86-23-68485797, E-mail: tuzhiguang@yahoo.com.cn

[基金项目] 广东省科技计划(2012B032000008);深圳市重点科技计划(201001006)

[通信作者] 涂植光,电话:(023)68485797,E-mail:tuzhiguang@yahoo.com.cn

唐氏综合征(Down syndrome, DS),又名21-三体(Trisomy 21, Ts21)综合征,其发病率与孕妇的年龄有关,约700个新生儿中就有1例,且随着孕妇年龄的增加而升高[1]。与健康者相比,DS患者更易患自身免疫性疾病、肿瘤、白血病和感染性疾病,其中感染性疾病是导致DS患者死亡的主要因素之一[2]。这可能与DS患者免疫系统的异常有关,包括胸腺先天性发育不良,T、B淋巴细胞和粒细胞功能异常,免疫球蛋白及循环T、B淋巴细胞和NK细胞与健康人相比明显降低等[3],而这些差异导致DS患者免疫系统的缺陷被认为与21号三染色体基因剂量不平衡有关,从而使DS患者患感染性疾病、自身免疫性疾病和恶性肿瘤的概率增加,但具体的免疫缺陷分子病理学机制仍不清楚。

微小RNA(microRNA,miRNA)被证明在多种生物学过程中具有重要调节作用,包括免疫细胞的增殖、分化、成熟,以及维持体内免疫平衡和正常免疫功能等[4]。研究表明,固有免疫和适应性免疫细胞均具有其特定的miRNA表达谱,miRNA的异常表达与免疫系统缺陷性疾病的发生、发展密切相关,如癌症、自身免疫性疾病等[5]。识别各种免疫缺陷性疾病特定的miRNA表达谱,不但有助于我们全面解析特定条件下疾病的发病机制和分子病理学机制,也可对疾病的早期诊断和干预治疗提供新的靶点和方法。为研究DS胎儿和健康胎儿血细胞免疫系统miRNA表达的差异,本研究运用第二代高通量Solexa深度测序技术对DS胎儿和正常胎儿脐带血单个核细胞全基因组miRNA表达谱进行研究,为进一步研究DS患者免疫系统缺陷形成机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象

脐带血标本由深圳市人民医院临床医学研究中心遗传室提供,包括经常规G显带染色体核型分析确诊为标准型DS胎儿的脐带血标本6例(2男4女)和健康胎儿脐带血标本6例(2男4女),分别为DS组和对照组。该研究经深圳市人民医院伦理委员会批准,且征得所有孕妇知情同意。

1.2 样本的收集和处理

行产前诊断时,在超声引导下抽取18~22孕周胎儿脐带血3 ml于EDTA抗凝管中(BD公司)。先取0.6 ml脐带血经细胞培养用于G显带染色体核型分析;然后运用淋巴细胞分离液(Invitrogen公司)分离提取剩余脐带血单个核细胞,溶入1 ml TRIzol试剂(Invitrogen公司)混合均匀,分成2份置于冻存管中,冻存于-80 ℃备用。

1.3 总RNA提取

将冻存样本常温下解冻,按照TRIzol试剂盒说明书提取总RNA,并用DNase I试剂(Ambion公司)进行处理,去除基因组DNA污染。然后通过Agilent 2000 Bioanalyzer分析提取RNA质量,以RIN≥7.0和28S/18S>0.7为RNA质量完好,可用于small RNAs建库Solexa测序分析。

1.4 small RNAs文库构建和Solexa测序

分别等量混合DS胎儿和健康胎儿脐带血单个核细胞RNA(总量≥10 μg),用于构建small RNAs文库。总RNA经15% PAGE变性胶电泳分离,再切胶纯化回收18~30 nt长的small RNAs分子。在T_4 RNA连接酶作用下,给small RNAs分子加上3′、5′接头,所得产物经10%的tri-borate-EDTA尿素聚丙烯胺凝胶电泳纯化后,由RT-PCR扩增生成small RNAs文库,然后运用Illumina/Solexa HiSeq™ 2000测序仪进行深度测序。文库的构建和测序均在深圳华大基因研究院的协助下完成。

1.5 small RNAs数据处理和信息分析

对Solexa测序所得序列进行去接头、去低质量、去污染、去冗余等处理,获得18~30 nt高质量序列并进行长度分布分析;然后运用SOAP2.0软件将高质量序列与人基因组序列(http://genome.ucsc.edu/)进行比对分析(最多允许2个碱基的错配),再将匹配序列分别与基因组重复序列、GenBank数据库、Rfam(10.0)数据库、UCSC数据库和piRNA数据库进行比对,尽可能去除rRNA、scRNA、snoRNA、snRNA、tRNA、piRNA非编码序列和mRNA降解片段;余下序列与miRNA数据库(miRBase 17.0)进行比对分析,然后再按照rRNAetc > known miRNA > repeat > exon > intron的优先级顺序对small RNAs分子进行分类注释,没有注释的匹配small RNAs序列用“Unanno”表示。由于rRNAetc是由NCBI GenBank和Rfam两个数据库比对所得,规定这两个数据库间的优先级为GenBank > Rfam。

1.6 两样本miRNA差异比较

首先对两样本中表达的miRNA进行归一化处理,使每个miRNA的表达量处于同一个量级(公式:归一化表达量 = miRNA表达量/样品总表达量 × 10^6),再利用Audic and Claverie test统计学方法比较2组样本miRNA的表达差异,并计算P值[6]。若miRNA在两样本间的倍比值≥2且P<0.001,则认为该miRNA在两样本间的表达差异显著;若miRNA归一化后在两样本中的表达量都<1,则该miRNA不参与差异表达分析。

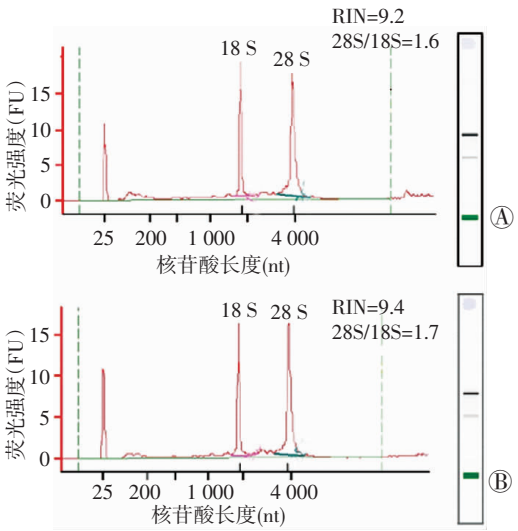
1.7 Stem-loop qRT-PCR验证

为验证Solexa测序结构的准确性,我们运用SYBR Green Real-time PCR对Solexa测序的small RNAs混合样本进行分析。miRNA茎环逆转录引物和PCR扩增引物分别由上海吉玛制药技术有限公司和上海生工生物工程有限公司提供,以rRNA U6为内参,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算PCR检测结果。miRNA逆转录采用M-MLV反转录试剂盒(Promega公司)。在去RNase的PCR管中加入5×RT buffer 4 μl,逆转录混合液3.5 μl,miRNA逆转录引物0.5 μl,总RNA 1 μg,然后用RNase-free水补充至20 μl,轻轻混匀,在42 ℃ 60 min,85 ℃ 10 min条件下进行逆转录反应。Real-time PCR反应采用SYBR Green Real-time PCR Kit(Toyobo公司)在ABI PRISM® 7500 PCR仪上进行。采用20 μl反应体系:cDNA(1∶20)5.0 μl,上下游引物各0.5 μl,2×SYBR Green Mix 10 μl,RNase-free水4 μl。在95 ℃预反应5 min,94 ℃ 15 s、60 ℃ 15 s、72 ℃ 32 s条件下,运行40个循环,重复3次。

2 结果

2.1 RNA质量检测结果

通过TRIzol分离试剂盒提取和纯化RNA后，运用Agilent 2000 Bioanalyzer检测样本质量，然后将2组中合格样本分别等量混合，结果显示2组样本提取的质量完好，可用于small RNAs建库进行Solexa测序分析（图1）。



A：DS胎儿脐带血混合样本；B：正常胎儿脐带血混合样本

图1 2组混合RNA样本质量检测结果

2.2 small RNAs序列分布和分类注释

将两样本Solexa HiSeq™ 2000测序所得small RNAs序列进行去接头、去低质量、去污染等处理，保留长度为18～30 nt的序列。DS组和对照组分别获得序列20 438 775和16 629 268条，主要分布在22 nt长度周围（图2）。将所得序列与全基因组序列进行比对（碱基错配≤2），DS组和对照组分别获得匹配序列8 087 250和12 536 630条，随后将匹配序列与各small RNAs数据库进行比对，分类注释（表1）。2组样本中总共检测到miRNA/miRNA*（miRNA*：miRNA功能单链的互补链）395种，其中DS组有243种（218种miRNA和25种miRNA*），总表达量为2 208 096（占27.3%）；对照组有349种（295种miRNA和54种miRNA*），总表达量为6 369 123（50.8%）。在2组样本中都有表达的miRNA和miRNA*分别有178种和19种。

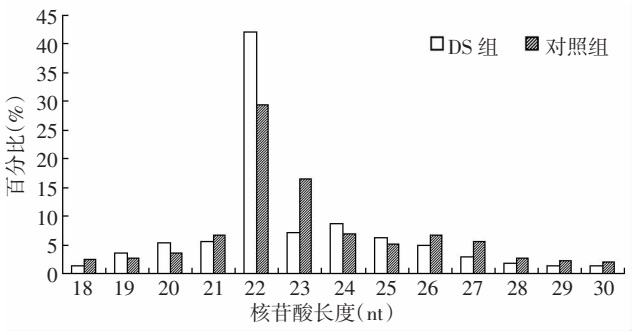


图2 DS组和对照组序列长度分布图

表1 DS组和对照组匹配序列分类注释表

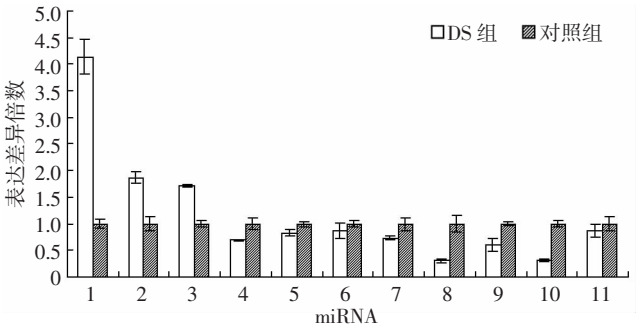
RNA类别	DS组		对照组	
	表达量	比例(%)	表达量	比例(%)
匹配序列	8 087 250	100	12 536 630	100
微小RNA（miRNA）	2 208 096	27.30	6 369 123	50.80
核蛋白RNA（rRNA）	1 406 904	17.40	2 932 922	23.39
转运RNA（tRNA）	3 715 086	45.94	913 076	7.28
信使RNA降解片段	54 787	0.68	386 416	3.08
核内/核仁小分子RNA（sn/snoRNA）	83 154	1.03	361 617	2.88
胞质/信号识别颗粒小分子RNA（sc/srpRNA）	413 918	5.12	881 823	7.03
其他小RNA分子	165 631	2.04	470 819	3.78
未注释序列（Unanno）	39 674	0.49	220 834	1.76

2.3 2组样本间miRNAs差异表达分析

经归一化处理后，DS组和对照组样本可参与差异表达分析的miRNA/miRNA*分别有233种（209种miRNA和24种miRNA*）和334种（282种miRNA和52种miRNA*）。在2组样本中显著差异表达的miRNA共有167种，其中有8种miRNA在DS组样本中表达上调，159种miRNA表达下调；在这些差异表达的miRNA中有32种miRNA的倍比变化超过了100倍甚至是1 000倍，其中有些miRNA已被证明与免疫细胞的增殖分化有关，如miR-196b、miR-21、miR-223、miR-146a、miR-150等。此外，还有38种和139种miRNA分别只在DS组和对照组中特异性表达。见表2。这些特异性表达的miRNA可能在DS胎儿的异常发育中具有潜在的作用，可作为DS胎儿潜在的产前筛查指标。而21号染色体上已注释的5种miRNA（miR-99a、let-7c、miR-125b、miR-155和miR-802），在本次Solexa测序中只检测到4种（miR-99a、let-7c、miR-125b和miR-155），miR-802在2组样本中均未检测到，这将在后面进一步做PCR验证。

2.4 Stem-loop qRT-PCR验证结果

为验证Solexa技术测序结果的有效性，我们随机选择了6种显著差异表达的miRNA（miR-196b、miR-92b*、miR-16、miR-126、miR-21和miR-223）和21号染色体上已注释的5种miRNA（miR-99a、let-7c、miR-125b、miR-155和miR-802）进行qRT-PCR验证。与对照组相比，miR-802在DS组中表达上调>1.5倍（图3）。其余各miRNA在2组样本中的变化趋势与Solexa测序结果一致，说明Solexa技术检测结果可靠、有效。



1：miR-196b；2：miR-92b*；3：miR-802；4：let-7c；5：miR-99a；6：miR-125b；7：miR-155；8：miR-126；9：miR-16；10：miR-21；11：miR-223

图3 Stem-loop qRT-PCR验证2组差异表达miRNA/miRNA*

表 2 DS 组和对照组样本差异表达 >100 倍及相关的 miRNA/miRNA*

miRNA	归一化表达量		倍比值	miRNA	归一化表达量		倍比值
	DS 组	对照组			DS 组	对照组	
hsa-miR-196b	261.82	0.92	286.08	hsa-miR-27a	0.18	35.87	195.24
hsa-miR-483-5p	55.95	4.75	11.78	hsa-miR-4286	0.73	218.80	297.72
hsa-miR-4732-5p	241.01	21.85	11.03	hsa-miR-93*	0.05	14.76	321.53
hsa-miR-1255a	3.03	1.09	2.79	hsa-miR-10b	0.05	15.73	342.71
hsa-miR-320b	159.71	61.72	2.59	hsa-miR-376a	0.05	17.79	387.57
hsa-miR-486-5p	11 160.35	4357.89	2.56	hsa-miR-30a	0.05	19.05	414.99
hsa-miR-92b*	129.35	55.43	2.33	hsa-miR-134	0.55	309.40	561.32
hsa-miR-1255b	9.23	4.46	2.07	hsa-miR-150	6.61	3 988.65	603.03
hsa-miR-125b	8.13	22.88	2.81	hsa-miR-431	0.05	33.52	730.28
hsa-miR-99a	4.82	16.93	3.51	hsa-miR-1193	0.05	57.72	1 257.43
hsa-let-7c	986.14	4 134.17	4.19	hsa-miR-99b	0.09	121.90	1 326.40
hsa-miR-16	752.20	3 215.80	4.28	hsa-miR-139-3p	0.09	126.01	1371.21
hsa-miR-20a	7.58	45.02	5.94	hsa-miR-493*	0.09	137.05	1 491.34
hsa-miR-17	22.05	172.75	7.84	hsa-miR-154	0.05	77.45	1 687.38
hsa-miR-126	1.42	39.70	27.88	hsa-miR-664	0.05	94.38	2 056.26
hsa-miR-19b	0.55	20.99	38.09	hsa-miR-224	0.05	98.44	2 144.74
hsa-miR-409-5p	0.37	37.47	101.95	hsa-miR-146a	0.09	211.70	2 303.62
hsa-miR-1260b	0.09	10.70	116.39	hsa-miR-543	0.05	123.67	2 694.32
hsa-miR-23a	24.11	2 889.24	119.81	hsa-miR-410	0.05	126.36	2 752.89
hsa-miR-495	20.76	2 568.23	123.70	hsa-miR-376c	0.05	157.88	3 439.56
hsa-miR-21	7.30	950.34	130.12	hsa-miR-452	0.09	370.84	4 035.22
hsa-miR-27b	0.18	24.25	132.03	hsa-miR-424	0.05	195.97	4 269.54
hsa-miR-223	5.42	862.20	159.07	hsa-miR-487b	0.05	204.09	4 446.50
hsa-miR-29a	2.66	458.87	172.24				

2 组各 miRNA 归化表达量间比较：$P<0.01$

3 讨论

miRNA 是一类内源性单链短序列非编码小 RNA，其编码基因主要位于蛋白编码基因的内含子和基因间区，有的 miRNA 还有其独立的启动子和增强子，能够独自完成自身的转录过程，其表达具有时空特异性，近来被证明在免疫组织细胞的发育过程中具有重要调控作用[7]。DS 患者的免疫缺陷是产前和产后因素共同作用的结果，而 21 号染色体上基因的过表达引起二倍体基因的表达失衡则被认为是导致 DS 患者各种临床症状产生的主要原因[8]。

已有研究证明，21 号染色体上 5 种 miRNA（miR-99a，let-7c，miR-125b，miR-155 和 miR-802）的过表达与 DS 患者智力低下、心脏缺陷、儿童白血病和免疫缺陷等临床症状有关[8]。研究发现，21 号染色体上 5 种 miRNA 在唐氏胎儿脑和心脏组织中均高表达，超过 1.5 倍[9]；miR-155 和 miR-802 可通过抑制其靶基因 CPG-岛甲基化结合蛋白（methyl-CpG-binding protein，MeCP2）的表达，导致 DS 患者神经发育障碍，造成智力低下[10]；而 miR-155 在 DS 患者纤维母细胞中的高表达可能与其临床低血压有关[11]。在本实验中，相对于对照组，21 号染色体上 5 种 miRNA，除了 miR-802，其余 4 种 miRNA 在 DS 胎儿脐带血单个核细胞中的表达并未出现预想中 1.5 倍以上的升高，反而降低。这种现象也存在于 DS 患者其他组织细胞关于 21 号染色体基因差异表达研究中[12]，说明 miRNA 的表达具有时间和组织特异性。而 Solexa 测序中未检测到 miR-802 的表达则可能与建库过程中逆转录引物的低特异性有关，这与 Kuhn 等[9] 的研究结果一致。此外，Solexa 检测结果中显著差异表达 miRNA，在 qRT-PCR 的检测结果中差异较小（如 miR-99a，miR-125b，miR-223），可能与两种检测技术的实验原理以及对检测结果统计学方法的不同有关[13]。

研究表明，miRNA 在先天性免疫和适应性免疫细

胞的发育和功能维持中具有重要作用[14]。在先天性免疫系统发育过程中,miR-223可通过对靶基因Mef2c的调节,负向调控粒细胞的增殖、分化,维持中性粒细胞的功能;缺乏miR-233的粒细胞高度成熟,对真菌感染具有高敏感性[15];miR-196b对粒细胞的生成具有负向调控作用,其高表达可抑制G-CSF诱导粒细胞的生成[16];miR-21的低表达可抑制单核细胞的生成以及树突状细胞(DC)的分化,使DC的生成减少,吞噬功能受抑[14, 16];而miR-155的缺乏会进一步损害DC细胞抗原呈递能力,对抗原的刺激不能有效活化T-细胞[14]。在脂多糖(LPS)刺激的巨噬细胞中,miR-125b低表达,可促进TNF-α的生成,增强巨噬细胞的炎症反应能力,在维持巨噬细胞对微生物刺激产生适度炎症反应具有重要作用[17]。

除了对固有免疫具有调节作用外,miRNA对适应性免疫T/B淋巴细胞的分化、发育以及抗体的生成过程也具有重要的调控作用[14]。miR-155对$CD4^+$T细胞的分化具有选择性调控作用:miR-155缺乏可诱导$CD4^+$T细胞向Th2细胞分化,介导体液免疫;反之,可诱导$CD4^+$T细胞向Th1细胞分化,促进细胞免疫的发展。然而miR-155的缺乏可导致生发中心B淋巴细胞和滤泡型B淋巴细胞的生成减少,抑制B淋巴细胞向浆细胞分化,使抗体类型的转换发生障碍,不能产生高亲和力抗体,致体液免疫力降低[17-18]。miR-17~92集簇(包括miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1和miR-92-1)在pro-B中高表达,随着B细胞的成熟而逐渐降低,与细胞的增殖、发育和Ig重塑有关;通过负向调控Pten和Bim的表达,抑制pro-B向pre-B细胞分化,使B淋巴细胞的生成降低;miR-17~92的缺失或低表达使胸腺和外围T淋巴细胞的生成减少[17]。

综上所述,基于本实验的研究结果和miRNA与免疫细胞增殖、分化、成熟和功能调控的关系,我们认为DS胎儿宫内发育期间miRNA的差异表达可能与DS胎儿免疫系统的发育缺陷及DS胎儿循环T、B淋巴细胞数目减少有关;差异显著和特异表达的miRNAs可作为DS胎儿潜在的产前筛查诊断指标。

参考文献:

[1] Sommer C A, Henrique-Silva F. Trisomy 21 and Down syndrome: a short review[J]. Braz J Biol, 2008, 68(2): 447-452.

[2] Kusters M A, Verstegen R H, Gemen E F, *et al*. Intrinsic defect of the immune system in children with Down syndrome: a review[J]. Clin Exp Immunol, 2009, 156(2): 189-193.

[3] Ram G, Chinen J. Infections and immunodeficiency in Down syndrome[J]. Clin Exp Immunol, 2011, 164(1): 9-16.

[4] Dai R, Ahmed S A. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases[J]. Transl Res, 2011, 157(4): 163-179.

[5] O'Connell R M, Rao D S, Chaudhuri A A, *et al*. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(2): 111-122.

[6] Audic S, Claverie J M. The significance of digital gene expression profiles[J]. Genome Res, 1997, 7(10): 986-995.

[7] Gracias D T, Katsikis P D. MicroRNAs: key components of immune regulation[J]. Adv Exp Med Biol, 2011, 780: 15-26.

[8] Elton T S, Sansom S E, Martin M M. Trisomy-21 gene dosage overexpression of miRNAs results in the haploinsufficiency of specific target proteins[J]. RNA Biol, 2010, 7(5): 540-547.

[9] Kuhn D E, Nuovo G J, Martin M M, *et al*. Human chromosome 21-derived miRNAs are overexpressed in down syndrome brains and hearts[J]. Biochem Biophys Res Commun 2008, 370(3): 473-477.

[10] Kuhn D E, Nuovo G J, Terry A V Jr, *et al*. Chromosome 21-derived microRNAs provide an etiological basis for aberrant protein expression in human Down syndrome brains[J]. J Biol Chem, 2010, 285(2): 1529-1543.

[11] Sethupathy P, Borel C, Gagnebin M, *et al*. Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes[J]. Am J Hum Genet, 2007, 81(2): 405-413.

[12] Sommer C A, Pavarino-Bertelli E C, Goloni-Bertollo E M, *et al*. Identification of dysregulated genes in lymphocytes from children with Down syndrome[J]. Genome, 2008, 51(1): 19-29.

[13] Pradervand S, Weber J, Lemoine F, *et al*. Concordance among digital gene expression, microarrays, and qPCR when measuring differential expression of microRNAs[J]. Biotechniques, 2010, 48(3): 219-222.

[14] Lu L F, Liston A. MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system[J]. Immunology, 2009, 127(3): 291-298.

[15] Johnnidis J B, Harris M H, Wheeler R T, *et al*. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223[J]. Nature, 2008, 451(7182): 1125-1129.

[16] Velu C S, Baktula A M, Grimes H L. Gfi1 regulates miR-21 and miR-196b to control myelopoiesis[J]. Blood, 2009, 113(19): 4720-4728.

[17] Fernando T R, Rodriguez-Malave N I, Rao D S. MicroRNAs in B cell development and malignancy[J]. J Hematol Oncol, 2012, 5: 7.

[18] Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, *et al*. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function[J]. Science, 2007, 316(5824): 608-611.

(**收稿**:2012-03-30;**修回**:2012-05-04)

(编辑 吴培红)