

· 实验研究 ·

miR-375 对缺氧诱导的人视网膜微血管内皮细胞功能的抑制作用及其机制

朱江 任梅 许治国

710004 陕西省眼科诊疗中心 西安市第四医院眼科 西安交通大学医学院附属广仁医院眼科

通信作者:许治国, Email: zhiguoxu54@sina.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.08.005

【摘要】 背景 研究表明 miR-375 抑制肿瘤细胞的增生、凋亡、迁移和黏附,并对肿瘤组织中血管内皮生长因子(VEGF)含量的变化进行调控,进而影响血管的生成,但 miR-375 是否干预视网膜新生血管的形成鲜见报道。**目的** 探讨 miR-375 对缺氧诱导的人视网膜微血管内皮细胞(HRCECs)功能的影响及其可能的作用机制。**方法** 用 IMDM 完全培养液培养 HRCECs,并将细胞分为正常对照组、CoCl₂ 处理组、CoCl₂+miR-375 拟似剂组、CoCl₂+miR-375 拟似剂对照组、CoCl₂+miR-375 抑制剂组和 CoCl₂+miR-375 抑制剂对照组,待细胞生长至对数生长期后用 200 μmol/L CoCl₂ 处理 HRCECs 以制备缺氧细胞模型;制备终浓度为 50 nmol/L 的 miRNA-脂质体复合物和小干扰 RNA(siRNA)-脂质体复合物将 miR-375 和卷曲蛋白 4(FZD4) siRNA 转染各组细胞 48 h。采用 MTT 法检测各组细胞的增殖情况(A 值)并计算增殖倍数;采用 Transwell 小室法检测各组迁移的细胞数目;采用 ELISA 法检测细胞培养液中 VEGF 和血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin)含量;采用实时荧光定量 PCR 法检测细胞中 miR-375 mRNA 和 FZD4 mRNA 的相对表达量变化;采用 Western blot 法分析细胞中 Wnt 通路相关蛋白的相对表达量变化;采用 Matrigel 小管形成实验检测细胞的体外形成血管的长度。将培养的细胞分为正常对照组、CoCl₂ 处理组、CoCl₂+mock 组和 CoCl₂+FZD4 siRNA 组,采用荧光素酶报告基因法探测 miR-375 靶基因 FZD4 的表达。**结果** miR-375 处理组 miR-375 mRNA 相对表达量明显高于正常对照组,miR-375 拟似剂组细胞中 miR-375 mRNA 相对表达量明显高于 miR-375 拟似剂对照组,miR-375 抑制剂组细胞中 miR-375 mRNA 相对表达量明显低于 miR-375 抑制剂对照组,差异均有统计学意义($t = -19.237, 8.764$, 均 $P < 0.01$),提示 miR-375 的转染效率较高。正常对照组、CoCl₂ 处理组、CoCl₂+miR-375 拟似剂组、CoCl₂+miR-375 拟似剂对照组、CoCl₂+miR-375 抑制剂组、CoCl₂+miR-375 抑制剂对照组间细胞增殖倍数、迁移细胞数、细胞培养液中 VEGF 和 VE-cadherin 含量以及体外小管形成长度的总体比较差异均有统计学意义($F = 24.324, 26.776, 14.113, 19.225, 15.040$, 均 $P < 0.001$),CoCl₂+miR-375 拟似剂组细胞增殖倍数、迁移细胞数体外小管形成长度及细胞分泌 VEGF 和 VE-cadherin 量均较 CoCl₂+miR-375 拟似剂对照组明显减少,而 CoCl₂+miR-375 抑制剂组较 CoCl₂+miR-375 抑制剂对照组明显增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。正常对照组、CoCl₂ 处理组、CoCl₂+miR-375 拟似剂组、CoCl₂+miR-375 拟似剂对照组、CoCl₂+miR-375 抑制剂组、CoCl₂+miR-375 抑制剂对照组细胞中 β -catenin、cyclinD1、MMP2 和 VEGF 蛋白表达量的总体比较差异均有统计学意义($F = 11.753, 13.283, 16.770, 10.334$, 均 $P < 0.001$),CoCl₂+miR-375 拟似剂组细胞中 β -catenin、cyclinD1、MMP2、VEGF 蛋白表达量较 CoCl₂+miR-375 拟似剂对照组均明显下降,CoCl₂+miR-375 抑制剂组较 CoCl₂+miR-375 抑制剂对照组明显增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。CoCl₂ 处理组和 CoCl₂+mock 组细胞增殖倍数、迁移细胞数和小管形成长度均较正常对照组明显增加,CoCl₂+FZD4 siRNA 组细胞增殖倍数、迁移细胞数和小管形成长度均明显低于 CoCl₂+mock 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** miR-375 抑制缺氧条件下 HRCECs 的增殖、迁移以及血管形成能力,其作用机制与 miR-375 直接靶向 FZD4 调控 Wnt 通路活性有关。

【关键词】 微小 RNA/生理;视网膜;血管内皮细胞;病理性新生血管形成;信号转导/生理;Wnt 相关蛋白/代谢;细胞增殖/药物作用;基因表达调控

Inhibitory effects of microRNA-375 on biological behaviour of human retinal capillary endothelial cells induced by hypoxia Zhu Jiang, Ren Mei, Xu Zhiguo

Shaanxi Ophthalmic Medical Center, Department of Ophthalmology, Xi'an No. 4 Hospital, Affiliated Guangren Hospital to School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China

Corresponding author: Xu Zhiguo, Email: zhiguoxu54@sina.com

[Abstract] Background Studies showed that microRNA (miR)-375 suppresses the growth, apoptosis, migration and adhesion of tumor cells, and it plays a regulation to the changes of vascular endothelial growth factor (VEGF) in tumor tissue to arrest neovascularization. However, whether miR-375 intervenes the formation of new blood

vessel in eyes is unelucidated. **Objective** This study was to explore the effects of miR-375 on human retinal capillary endothelial cells (HRCECs) function induced by hypoxia. **Methods** HRCECs were cultured using IMDM and divided into normal control group, CoCl₂ model group, CoCl₂+miR-375 mimic group, CoCl₂+miR-375 mimic control group, CoCl₂+miR-375 inhibitor group and CoCl₂+miR-375 inhibitor control group, and hypoxia cell models were created by adding 200 μmol/L CoCl₂. MiR-375 and frizzled 4 (FZD4) small interfering RNA (siRNA) were transfected into the cells by 50 nmol/L miRNA liposome for 48 hours. The proliferation of the cells was detected by MTT assay; migrated number of the cells was examined by Transwell chamber assay; ELISA was employed to detect the concentrations of VEGF and VE-cadherin in the medium; the expression of β-catenin, cyclinD1, matrix metalloproteinase-2 (MMP2) and VEGF proteins were analyzed by Western blot; tube length of vessel formation was evaluated by Matrigel assay. Cultured cells were divided into normal control group, CoCl₂ model group, CoCl₂+mock group and CoCl₂+FZD4 siRNA group, the relative expression of FZD4, a miR-375 targeted gene, was detected by luciferase reporter. **Results** The relative expression of miR-375 mRNA was significantly increased in the CoCl₂+miR-375 mimic group compared with the CoCl₂+miR-375 mimic control group and reduced in the CoCl₂+miR-375 inhibitor group compared with the CoCl₂+miR-375 inhibitor control group ($t = -19.237, 8.764$, both at $P < 0.01$), with a higher transfected efficacy for miR-375. The cell proliferative fold, migrated cell number, VEGF and VE-Cadherin contents in the medium and the tube length were significantly different among the CoCl₂ model group, CoCl₂+miR-375 mimic group, CoCl₂+miR-375 mimic control group, CoCl₂+miR-375 inhibitor group and CoCl₂+miR-375 inhibitor control group ($F = 24.324, 26.776, 14.113, 19.225, 15.040$, all at $P < 0.001$), and those in the CoCl₂+miR-375 mimic group were evidently reduced in the CoCl₂+miR-375 mimic group compared with the CoCl₂+miR-375 mimic control group, while those in the CoCl₂+miR-375 inhibitor group were considerably elevated in comparison with the CoCl₂+miR-375 inhibitor control group (all at $P < 0.01$). The expressions of β-catenin, cyclinD1, MMP2 and VEGF protein were significantly different among the normal control group, CoCl₂ model group, CoCl₂+miR-375 mimic group, CoCl₂+miR-375 mimic control group, CoCl₂+miR-375 inhibitor group and CoCl₂+miR-375 inhibitor control group ($F = 11.753, 13.283, 16.770, 10.334$, all at $P < 0.001$). In addition, the cell proliferative fold, migrated cell number and the tube length were significantly increased in the CoCl₂ model group and CoCl₂+mock group, and those in the CoCl₂+FZD4 siRNA group were decreased in comparison with the CoCl₂+mock group (all at $P < 0.05$). **Conclusions** MiR-375 inhibits the growth, migration and tube formation ability of HRCECs in hypoxic status probably by regulating the activation of Wnt pathway via directly targeting FZD4.

[Key words] MicroRNAs/physiology; Retina; Endothelium, vascular; Neovascularization, pathologic; Signal transduction/physiology; Wnt proteins/metabolism; Cell proliferation /drug effects; Gene expression regulation

视网膜新生血管是视网膜血液循环障碍及视网膜缺血、缺氧而引起的病理改变,许多视网膜血管性疾病均可引起视网膜新生血管生成,如视网膜静脉阻塞、眼缺血综合征、增生性糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR) 等,严重影响患者的生活质量,抑制视网膜新生血管生长是治疗此类疾病的关键^[1]。目前,抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 为视网膜新生血管提供了有效的治疗方法,但存在治疗费用高、长期使用抗 VEGF 药物有一定不良反应及部分患者对抗 VEGF 药物不应答等缺点,因此寻找新的治疗靶点仍是目前的研究热点。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是近年来发现的内源性非编码小分子 RNA,可在细胞转录后水平对细胞的增生、分化、凋亡、分裂及器官的发育发挥调控作用^[2-3]。研究表明,miR-375 参与多种肿瘤细胞的增生、凋亡、迁移和黏附过程,并可通过对 VEGF 的调控影响肿瘤血管的生成^[4-7],但 miR-375 在视网膜新生血管的形成中是否发挥相同的作用鲜见报道。本研究拟探讨 miR-375 对缺氧诱导的人视网膜微血管内皮细胞 (human retinal capillary endothelial cells, HRCECs) 生

物学行为和功能的影响及其可能的作用机制,为 miR-375 治疗视网膜新生血管提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

HRCECs (中科院上海细胞库); 人胚肾 HEK293T 细胞 (中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库); IMDM 培养液 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (杭州四季青公司); MTT、Trizol、兔抗人 VEGF (SAB1306008)、兔抗人 β-catenin (SAB5600086)、cyclinD (C7464)、兔抗人基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP2) (HPA001939)、兔抗人 β-actin 单克隆抗体 (SAB5500001)、兔抗人卷曲蛋白 4 (frizzled 4, FZD4) 多克隆抗体 (SAB4503265) (美国 Sigma 公司); HRP 标记的山羊抗兔二抗 (M21002, 美国 Abmart 公司); RNA 提取试剂盒 (德国 Qiagen 公司); 逆转录反应试剂盒 (美国 Fermentas 公司); 脂质体 Lipofetamine™ 2000 (美国 Invitrogen 公司); Diff-Quik® (深圳市博锐德生物科技有限公司); 逆转录酶、Taq 酶、pRL-TK、pmirGLO (pGLO) 载体 (美国 Promega 公司)。

SpectraMax M5 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。

1.2 方法

1.2.1 HRCECs 的培养 采用快速融化法复苏 HRCECs,用含体积分数 10% 胎牛血清、100 U(商品单位)/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素的 IMDM 完全培养液将细胞配成 2×10^6 /ml 悬浮液并置于 6 孔板中,每孔 2 ml,于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 培养箱中常规培养。

1.2.2 实验分组 应用 miRBase 数据库获取 miR-375、FZD4 序列,由德国 Qiagen 公司设计相应的 FZD4 小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)序列后,交由广州锐博生物科技有限公司合成 miR-375 拟似剂、miR-375 抑制剂、拟似剂对照、抑制剂对照以及 FZD4 siRNA。制备终浓度为 50 nmol/L 的 miRNA-脂质体复合物和 siRNA-脂质体复合物。正常对照组细胞常规培养; CoCl_2 处理组细胞于实验开始前以 10 μl 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 CoCl_2 预处理细胞 1 h; CoCl_2 + miR-375 拟似剂组、 CoCl_2 + miR-375 拟似剂对照组、 CoCl_2 + miR-375 抑制剂组、 CoCl_2 + miR-375 抑制剂对照组分别以 20 pmol/L miR-375 拟似剂-脂质体复合物、miR-375 拟似剂对照-脂质体复合物、miR-375 抑制剂-脂质体复合物、miR-375 抑制剂对照-脂质体复合物转染细胞 48 h 后再给予 CoCl_2 预处理 1 h; CoCl_2 + mock 组和 CoCl_2 + FZD4 siRNA 组分别以 100 pmol/L FZD4 mock-脂质体复合物和 FZD4 siRNA-脂质体复合物转染细胞 48 h 后再给予 CoCl_2 预处理 1 h。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测各组细胞中 miR-375 mRNA 和 FZD4 mRNA 的表达 取正常对照组和 CoCl_2 处理组培养后 24、48、72、96 和 120 h 细胞,正常对照组、 CoCl_2 + miR-375 拟似剂组、 CoCl_2 + miR-375 拟似剂对照组、 CoCl_2 + miR-375 抑制剂组、 CoCl_2 + miR-375 抑制剂对照组细胞用于检测 miR-375 mRNA 的表达,取 miR-375 拟似剂组与 miR-375 拟似剂对照组细胞用于检测 FZD4 mRNA 的表达。用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,按照逆转录反应试剂盒说明进行 PCR 扩增,采用引物在线软件设计并检测分析,并由上海生物工程有限公司合成引物,以 β -actin 作为内参照。miR-375 引物为:5'-TTTGTTCGTTCCGGCTCGCGTGA-3'; U6 引物为:5'-CGCAAGGATGACACGCAAATTC-3'; FZD4 上游引物:5'-GCTGACAACCTTTCACACCGCTC-3',下游引物:5'-AAGGGCACCTCTTCATCACCTG-3'; β -actin 上游引物:5'-CTGGGACGACATGGAGAAAA-3',下游引物:5'-AAGGAAG GCTGGAAGAGTGC-3'。反应条件:95 ℃ 变性 3 min; 95 ℃ 作用 5 s, 62 ℃ 作用 35 s, 共 40 个循环。各目的基因相对表达量 = $2^{-(\Delta\text{Ct sample} - \Delta\text{Ct control})}$ 。每个

样本检测均重复 3 次,取平均值。

1.2.4 MTT 法检测细胞增生情况 收集正常对照组、 CoCl_2 处理组、 CoCl_2 + miR-375 拟似剂组、 CoCl_2 + miR-375 拟似剂对照组、 CoCl_2 + miR-375 抑制剂组、 CoCl_2 + miR-375 抑制剂对照组细胞,接种于 96 孔板,每孔 200 μl 且含 2×10^4 个细胞,置于细胞培养箱中分别培养 0、24、48、72、96 和 120 h,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml) 10 μl ,孵育 4 h,弃上清,每孔加 DMSO 至 100 μl ,振荡 10 min,用 SpectraMax M5 酶标仪于波长 490 nm 处读取吸光度(A)值,计算细胞增生倍数。细胞增生倍数 = 处理组 A 值/对照组 A 值。绘制细胞增生曲线。每组设 5 个复孔。

1.2.5 Transwell 小室法检测细胞迁移能力 取各组细胞于转染后 48 h,以质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁细胞,收集细胞悬液,离心半径 40 cm,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入含体积分数 1% FBS 的培养基并计数细胞。将 2×10^4 个 RF/6A 细胞悬浮在 50 μl 培养基中并加入 Transwell 小室上室,将 25 μl 含 10% FBS 的培养基和 CoCl_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 加入孔径 8.0 μm 的 Transwell 小室下室,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。刮去滤膜上层的未移动细胞,用甲醇固定,采用 Giemsa 染色法,任意选择 5 个 200 倍视野以计数迁移到下室中的细胞,取平均值。

1.2.6 ELISA 法检测细胞培养液中 VEGF、VE-cadherin 质量浓度 收集各组细胞上清培养液。采用 ELISA 试剂盒检测细胞培养液中 VEGF 和 VE-cadherin 含量,具体操作步骤依据试剂盒说明书进行,采用 SpectraMax M5 酶标仪在波长 450 nm 处测定 A 值,依据标准曲线计算 VEGF 和 VE-cadherin 含量,并以正常对照组为对照,计算其余各组的相对质量浓度。每个样本重复检测 2 次。

1.2.7 Matrigel 小管形成实验检测细胞的血管形成能力 从 -20 ℃ 冰箱中取出 Matrigel,使其自然升温到室温,将 Matrigel 胶加至 48 孔板,每孔 100 μl ,37 ℃ 孵育 60 min。收集各组细胞并用 0.25% 胰蛋白酶消化,调整每孔细胞数至约 5×10^4 个,37 ℃ 孵育 24 h,Diff-Quik® 染色法染色,PBS 清洗 3 次,光学显微镜下观察 4 个不同视野,Image J 软件分析血管生成情况以及小管形成长度,取平均值。

1.2.8 Western blot 法分析细胞中 Wnt 通路相关蛋白表达 取各组细胞用 0.05% 胰蛋白酶消化,PBS 洗涤 3 次;加入 450 μl 蛋白裂解液,常规方法裂解细胞,SDS-PAGE 蛋白电泳;将蛋白转印至硝酸纤维素膜,用质量分数 5% 脱脂奶粉封闭,常规加入兔抗人 VEGF

(1:1 000)、 β -catenin(1:2 000)、cyclinD1(1:2 000)、MMP2(1:1 500)、 β -actin(1:2 000)、FZD4(1:3 000)抗体,PBS 漂洗;添加 HRP 标记的山羊抗兔二抗,ECL 显影,采用 Scion Image 图像分析系统对相应蛋白表达条带进行分析,蛋白相对表达量=目的蛋白表达条带 A 值/ β -actin 条带 A 值。

1.2.9 生物信息学预测差异表达显著的 miRNA 靶基因 用 3 个权威生物信息学软件 microRNA.org (<http://www.microrna.org>)、TargetScan 5.1 (<http://www.targetscan.org>) 和 EIMMomiRNA target prediction server(<http://www.mirz.unibas.ch/EIMMo3>) 共同预测差异表达显著的 miRNA 靶基因。

1.2.10 荧光素酶报告基因法探测 miR-375 靶基因 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 HEK293T 细胞。依据处理方法的不同,将细胞分为 miR-375 拟似剂+pGLO-FZD4 组、miR-375 拟似剂对照+pGLO-FZD4 组、miR-375 拟似剂+pGLO-mut 组和 miR-375 拟似剂+pGLO 组。将含有 miR-375 结合位点的 FZD4 3'-UTR cDNA 片段插入 pGLO 载体,通过点突变法构建结合位点突变的 FZD4 3'-UTR 的 cDNA 片段,插入 pGLO 载体,并经测序验证插入序列正确。采用脂质体转染法,将 pGLO-FZD4 或 pGLO-mut FZD4 重组载体与 miR-375 拟似剂及其对照剂共转染于 HEK293T 细胞,孵育培养 48 h,收集细胞并裂解。取 100 μ l 裂解液上清,加入 100 μ l 海肾萤光素酶。取 100 μ l 裂解液上清,加入 100 μ l 萤火虫萤光素酶检测试剂,混匀。应用 SpectraMax M5 多功能酶标仪分别检测海肾萤光素酶活性和萤火虫萤光素酶活性,间隔时间设为 2 s,测定时间为 10 s。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件(美国 SPSS 公司)进行统计分析,本研究中检测指标的数据资料经 W 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用均衡分组单因素干预多水平研究设计,正常对照组、CoCl₂+miR-375 拟似剂组、CoCl₂+miR-375 拟似剂对照组、CoCl₂+miR-375 抑制剂组和 CoCl₂+miR-375 抑制剂对照组间 HRCECs 中 miR-375 mRNA 相对表达量的总体差异比较,正常对照组、CoCl₂处理组、CoCl₂+miR-375 拟似剂组、CoCl₂+miR-375 拟似剂对照组、CoCl₂+miR-375 抑制剂组、CoCl₂+miR-375 抑制剂对照组间细胞增殖倍数、迁移细胞数、小管形成长度、细胞培养液中 VEGF 和 VE-cadherin 含量、Wnt 通路下游蛋白表达的总差异比较以及正常对照组、CoCl₂处理组、CoCl₂+mock 组和 CoCl₂+FZD4 siRNA 组间细胞增殖倍数、迁移细胞数目

和小管形成长度的总体差异比较均采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD-t 检验;正常对照组与 CoCl₂处理组在不同时间点间细胞增殖倍数和细胞中 miR-375 mRNA 的差异比较采用两因素方差分析,多重比较采用 LSD-t 检验;miR-375 拟似剂组与 miR-375 拟似剂对照组细胞中 FZD4 mRNA 表达量的差异比较采用独立样本 t 检验。采用双侧检验法,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组 HRCECs 中 miR-375 mRNA 相对表达量比较 正常对照组、CoCl₂+miR-375 拟似剂组、CoCl₂+miR-375 抑制剂组、CoCl₂+miR-375 拟似剂对照组、CoCl₂+miR-375 抑制剂对照组细胞中 miR-375 mRNA 相对表达量分别为 1.00 ± 0.07 、 3.61 ± 0.21 、 0.21 ± 0.09 、 1.02 ± 0.10 、 1.01 ± 0.13 ,总体比较差异有统计学意义($F=210.788$, $P=0.000$),CoCl₂+miR-375 拟似剂组 miR-375 mRNA 相对表达量明显高于 CoCl₂+miR-375 拟似剂对照组,CoCl₂+miR-375 抑制剂组 miR-375 mRNA 相对表达量明显低于 CoCl₂+miR-375 抑制剂对照组,差异均有统计学意义($t=-19.237$ 、 8.764 ,均 $P<0.01$)(图 1)。正常对照组与 CoCl₂处理组细胞培养 24、48、72、96 和 120 h HRCECs 中 miR-375 相对表达量的总体差异比较均有统计学意义($F_{\text{组别}}=7.923$, $P=0.048$; $F_{\text{时间}}=0.635$, $P=0.665$),正常对照组和 CoCl₂处理组随着培养时间的延长细胞中 miR-375 mRNA 相对表达量均逐渐下降。与正常对照组细胞比较,CoCl₂处理组细胞在培养后 72、96、120 h miR-375 相对表达量均显著下降,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(表 1)。

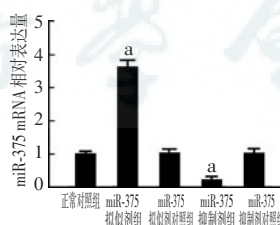


图 1 各组 HRCECs 中 miR-375 mRNA 相对表达量变化 各组 miR-375 转染效率量化比较 $F=210.788$, $P=0.000$ 。与正常对照组比较, $^aP<0.01$ (单因素方差分析, LSD-t 检验, $n=6$) miR:微小 RNA

表 1 正常对照组与 CoCl₂处理组不同时间点 HRCECs 中 miR-375 mRNA 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同时间点 miR-375 mRNA 相对表达量				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
正常对照组	6	1.03 ± 0.12	1.05 ± 0.11	1.01 ± 0.10	1.07 ± 0.13	1.10 ± 0.15
CoCl ₂ 处理组	6	1.04 ± 0.11	0.92 ± 0.10	0.64 ± 0.11^a	0.53 ± 0.10^a	0.37 ± 0.09^a

注: $F_{\text{组别}}=7.923$, $P=0.048$; $F_{\text{时间}}=0.635$, $P=0.665$ 。与各自时间点正常对照组比较, $^aP<0.05$ (两因素方差分析, LSD-t 检验) CoCl₂:氯化钴;HRCECs:人视网膜微血管内皮细胞;miR:微小 RNA

2.2 各组 HRCECs 增生倍数和细胞迁移数量比较

正常对照组、CoCl₂处理组、CoCl₂+miR-375 拟似剂组、CoCl₂+miR-375 拟似剂对照组、CoCl₂+miR-375 抑制剂组、CoCl₂+miR-375 抑制剂对照组间细胞增生倍数和迁移细胞数总体比较差异均有统计学意义 ($F = 24.324, 26.776$, 均 $P < 0.001$)。CoCl₂处理组、CoCl₂+miR-375 拟似剂组、CoCl₂+miR-375 拟似剂对照组、CoCl₂+miR-375 抑制剂组、CoCl₂+miR-375 抑制剂对照组细胞增生倍数和迁移细胞数较正常对照组均明显增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),CoCl₂+miR-375 拟似剂组细胞增生倍数和迁移细胞数较 CoCl₂+miR-375 拟似剂对照组明显减少,CoCl₂+miR-375 抑制剂组细胞增生倍数和迁移细胞数较 CoCl₂+miR-375 抑制剂对照组均明显增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 2)。正常对照组与 CoCl₂处理组细胞培养 24、48、72、96 和 120 h 增生倍数总体比较,差异均有统计学意义($F_{\text{组别}} = 9.801, P = 0.035; F_{\text{时间}} = 16.315, P = 0.010$)。与正常对照组比较,CoCl₂处理组细胞在培养后 72、96 和 120 h 增生倍数均明显增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 3)。

表 2 各组细胞增生倍数和细胞迁移数的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	细胞增生倍数(%)	迁移细胞数(个)
正常对照组	6	100±12	10±3
CoCl ₂ 处理组	6	171±17 ^a	39±7 ^a
CoCl ₂ +miR-375 拟似剂组	6	125±14 ^{ab}	24±5 ^{ab}
CoCl ₂ +miR-375 拟似剂对照组	6	175±11 ^a	37±6 ^a
CoCl ₂ +miR-375 抑制剂组	6	214±18 ^{ac}	65±9 ^{ac}
CoCl ₂ +miR-375 抑制剂对照组	6	172±12 ^a	38±5 ^a
F 值		24.324	26.776
P 值		<0.001	<0.001

注:与各自正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与各自的 CoCl₂+miR-375 拟似剂对照组比较,^b $P < 0.05$;与各自的 CoCl₂+miR-375 抑制剂对照组比较,^c $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) CoCl₂:氯化钴;miR:微小 RNA

表 3 正常对照组与 CoCl₂处理组培养后不同时间点 HRCECs 增生倍数的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同时间点 HRCECs 增生倍数				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
正常对照组	6	1.57±0.24	2.73±0.23	4.35±0.29	4.72±0.38	5.21±0.34
CoCl ₂ 处理组	6	1.69±0.21	3.28±0.25	5.77±0.38 ^a	6.98±0.40 ^a	7.54±0.47 ^a

注: $F_{\text{组别}} = 9.801, P = 0.035; F_{\text{时间}} = 16.315, P = 0.010$ 。与各自时间点正常对照组比较,^a $P < 0.05$ (两因素方差分析,LSD- t 检验) CoCl₂:氯化钴;HRCECs:人视网膜微血管内皮细胞

2.3 各组 HRCECs 细胞分泌血管生成相关因子及体外小管形成长度的比较

正常对照组、CoCl₂处理组、CoCl₂+miR-375 拟似剂组、CoCl₂+miR-375 拟似剂对照组、CoCl₂+miR-375 抑制剂组、CoCl₂+miR-375 抑制剂对照组间小管形成长度和细胞上清液中 VEGF 含量、VE-Cadherin 含量的总体比较差异均有统计学意义 ($F = 15.040, 14.113, 19.225$, 均 $P < 0.001$)。与正常对照组比较,CoCl₂处理组、CoCl₂+miR-375 拟似剂对照组、CoCl₂+miR-375 抑制剂组、CoCl₂+miR-375 抑制剂对照组 VEGF 含量、VE-Cadherin 含量及小管形成长度均明显增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与 CoCl₂+miR-375 拟似剂对照组比较,CoCl₂+miR-375 拟似剂组细胞上清液中 VEGF 和 VE-Cadherin 含量以及小管形成长度均减少,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 4)

表 4 各组 VEGF 含量、VE-Cadherin 含量和小管形成长度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	VEGF 含量(%)	VE-Cadherin 含量(%)	小管长度(mm)
正常对照组	6	100±15	100±10	3.7±1.1
CoCl ₂ 处理组	6	173±19 ^a	180±17 ^a	8.5±1.3 ^a
CoCl ₂ +miR-375 拟似剂组	6	121±13 ^b	134±15 ^{ab}	5.9±1.0 ^{ab}
CoCl ₂ +miR-375 拟似剂对照组	6	169±21 ^a	178±20 ^a	8.4±1.1 ^a
CoCl ₂ +miR-375 抑制剂组	6	215±20 ^{ac}	223±21 ^{ac}	12.5±1.8 ^{ac}
CoCl ₂ +miR-375 抑制剂对照组	6	170±17 ^a	179±16 ^a	8.7±1.2 ^a
F 值		14.113	19.225	15.040
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与各自的正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与各自的 CoCl₂+miR-375 拟似剂对照组比较,^b $P < 0.05$;与各自的 CoCl₂+miR-375 抑制剂对照组比较,^c $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) VEGF:血管内皮生长因子;VE-Cadherin:血管内皮钙黏蛋白;CoCl₂:氯化钴;miR:微小 RNA

2.4 各组 HRCECs Wnt 通路下游蛋白表达变化

正常对照组、CoCl₂处理组、CoCl₂+miR-375 拟似剂组、CoCl₂+miR-375 拟似剂对照组、CoCl₂+miR-375 抑制剂组、CoCl₂+miR-375 抑制剂对照组细胞中 β -catenin、cyclinD1、MMP2 和 VEGF 蛋白表达量的总体比较差异均有统计学意义 ($F = 11.753, 13.283, 16.770, 10.334$, 均 $P < 0.001$)。CoCl₂处理组、CoCl₂+miR-375 拟似剂组、CoCl₂+miR-375 拟似剂对照组、CoCl₂+miR-375 抑制剂组、CoCl₂+miR-375 抑制剂对照组细胞中 β -catenin、cyclinD1、MMP2、VEGF 蛋白表达量较正常对照组均明显增加,CoCl₂+miR-375 拟似剂组细胞中 β -catenin、cyclinD1、MMP2、VEGF 蛋白表达量较 CoCl₂+miR-375 拟似剂对照组均明显下降,CoCl₂+miR-375 抑制剂组细胞中 β -catenin、cyclinD1、MMP2 和 VEGF 蛋白表达量较 CoCl₂+miR-375 抑制剂对照组明显增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)(图 2,表 5)。

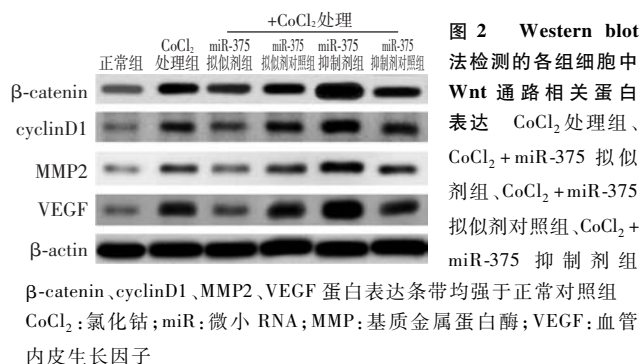


表 5 各组 HRCECs 细胞 Wnt 通路下游蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$, A 值)

组别	样本量	β-catenin	cyclinD1	MMP2	VEGF
正常对照组	6	0.58 ± 0.14	0.52 ± 0.10	0.36 ± 0.05	0.53 ± 0.11
CoCl ₂ 处理组	6	0.95 ± 0.11 ^a	0.86 ± 0.09 ^a	0.69 ± 0.12 ^a	0.86 ± 0.15 ^a
CoCl ₂ + miR-375 拟似剂组	6	0.75 ± 0.08 ^b	0.70 ± 0.07 ^b	0.49 ± 0.05 ^{ab}	0.67 ± 0.07 ^b
CoCl ₂ + miR-375 拟似剂对照组	6	0.96 ± 0.09 ^a	0.89 ± 0.08 ^a	0.73 ± 0.08 ^a	0.89 ± 0.10 ^a
CoCl ₂ + miR-375 抑制剂组	6	1.23 ± 0.15 ^{ac}	1.17 ± 0.14 ^{ac}	0.91 ± 0.08 ^{ac}	1.12 ± 0.10 ^{ac}
CoCl ₂ + miR-375 抑制剂对照组	6	0.92 ± 0.07 ^a	0.86 ± 0.12 ^a	0.70 ± 0.09 ^a	0.87 ± 0.11 ^a
F 值		11.753	13.283	16.770	10.334
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与各自的正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与各自的 CoCl₂ + miR-375 拟似剂对照组比较,^b $P < 0.05$;CoCl₂ + miR-375 抑制剂对照组比较,^c $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) HRCECs:人视网膜血管内皮细胞;MMP:基质金属蛋白酶;VEGF:血管内皮生长因子;CoCl₂:氯化钴;miR:微小 RNA

2.5 miR-375 直接靶向调控 FZD4

生物信息学数据库分析结果显示,Wnt 信号通路关键分子 FZD4 是 miR-375 的靶基因之一(图 3A)。miR-375 拟似剂组细胞中 FZD4 mRNA 和蛋白相对表达量均明显低于 miR-375 拟似剂对照组,差异均有统计学意义(mRNA:0.24 ± 0.07 与 0.81 ± 0.09, $t = 8.659$, $P = 0.001$;蛋白:0.21 ± 0.05 与 0.98 ± 0.11, $t = 11.038$, $P < 0.001$)(图 3B,C);荧光素酶报告基因结果显示,miR-375 拟似剂组荧光素酶活性明显低于 miR-375 拟似剂对照组,差异有统计学意义(0.58 ± 0.09 和 1.01 ± 0.11, $t = 5.240$, $P = 0.006$),而将 FZD4 3'-UTR 与 miR-375 结合位点突变后,miR-375 拟似剂组与 miR-375 拟似剂对照组间细胞中荧光素酶活性的差异无统计学意义(0.92 ± 0.13 和 1.01 ± 0.11, $t = 0.915$, $P = 0.412$)(图 3D)。

转染 FZD4 siRNA 构建 FZD4 沉默的细胞模型,结果显示 CoCl₂ + FZD4 siRNA 组细胞的增殖倍数、迁移细胞数以及体外小管形成能力均明显下降,与 CoCl₂ + mock 组比较差异均有统计学意义($t = 3.013$, $P = 0.039$; $t = 3.652$, $P = 0.022$; $t = 3.311$, $P = 0.030$)(表 6)。

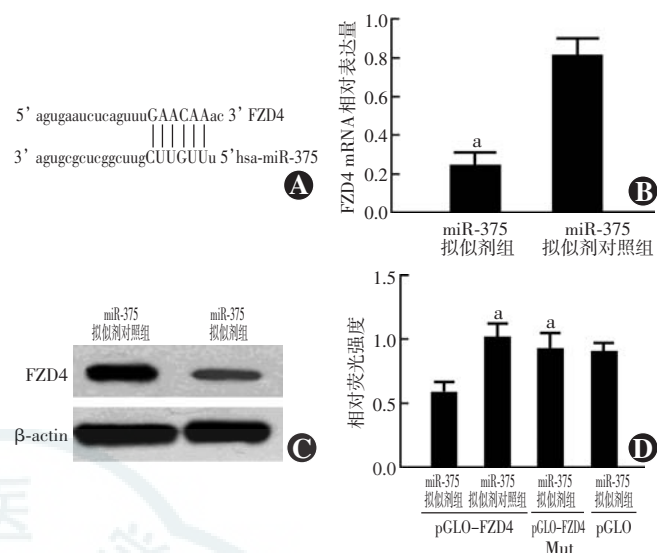


表 6 不同组间细胞生物学行为相关指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	细胞增殖倍数 (%)	迁移细胞数 (个)	小管形成长度 (mm)
正常对照组	6	100 ± 12	11 ± 4	3.6 ± 0.9
CoCl ₂ 处理组	6	183 ± 20 ^a	37 ± 5 ^a	8.2 ± 1.3 ^a
CoCl ₂ + mock 组	6	179 ± 21 ^a	39 ± 7 ^a	8.1 ± 1.1 ^a
CoCl ₂ + FZD4 siRNA 组	6	132 ± 17 ^{ab}	22 ± 4 ^{ab}	5.5 ± 0.8 ^{ab}
F 值		14.898	19.802	13.582
P 值		0.001	<0.001	<0.001

注:与各自的正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与各自的 CoCl₂ + mock 组比较,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) CoCl₂:氯化钴;FZD:卷曲蛋白

3 讨论

新生血管的病理改变是新的血管形成或在原有毛细血管或微静脉上以芽生或非芽生的形式生成新的血管^[8]。血管新生既是机体生长发育、创伤修复和生殖的基础,又与某些疾病的病理过程密切相关。视网膜新生血管的生成常导致出血和组织纤维化等病理改变,损伤眼部相关组织的正常结构和功能,导致患眼的视力障碍^[9]。因此,抑制眼部组织新生血管的生成对于提高病理性血管新生引起的视网膜疾病的治疗效果至关重要。

研究表明,miR-375 参与肿瘤的发生和肿瘤血管的形成过程^[10-11]。临床研究发现,有 miR-375 表达异常的胃癌患者临床治疗预后较差,肿瘤容易复发和发

生转移,患者的生存率较低^[12]。体外实验证明,提高细胞内 miR-375 水平能明显抑制黑色素瘤细胞的增生、侵袭和迁移^[10]。在胃癌细胞中,miR-375 的过表达可通过靶向调节 JAK2 癌基因而抑制肿瘤细胞的增生^[13]。此外,miR-375 在胃癌中还参与了肿瘤抑制蛋白 53、丝裂原活化蛋白激酶、Wnt 和 VEGF 等信号转导通路的调控,影响肿瘤组织中血管的生成^[14],但迄今关于 miR-375 对非肿瘤组织中细胞增生、迁移和血管生成的影响尚未阐明。本研究结果显示,HRCECs 随着缺氧时间的延长,miR-375 表达水平逐渐下降,同时细胞增生、迁移能力和体外血管形成能力均增强,miR-375 过表达可抑制这一现象,而 miR-375 基因的沉默作用恰好相反,提示 miR-375 可能对缺氧条件下的 HRCECs 功能产生影响。

人体内涉及血管内皮细胞增生和血管新生的信号通路有多种,其中 Wnt 信号通路在细胞增生、分化、凋亡以及血管新生的生理和病理过程的调控中扮演着十分重要的角色,而作为经典 Wnt 信号通路的下游分子,β-catenin 在血管发生的生理进程中起着关键作用。研究发现,Wnt 通路相关因子可能通过调控 β-catenin 的表达来调节血管内皮细胞的信号传导^[15]。本研究中进一步分析 miR-375 对 HRCECs 功能进行调控的作用机制,发现缺氧条件下细胞中 β-catenin 表达明显升高,miR-375 过表达可抑制 β-catenin 的表达,提示 miR-375 可能是通过抑制 Wnt 信号通路的激活对缺氧条件下的细胞功能发挥抑制作用。

FZD4 是 Wnt 信号通路中一个重要的受体分子,在 Wnt 信号中起到传导信号的作用。经典的 Wnt 信号通路中,Wnt 蛋白与细胞表面 FZD 受体家族相结合,激活 Dishevelled 受体家族蛋白,使糖原合成激酶 3β(glycogen synthesis kinase3 beta,GSK3β)磷酸化,导致 β-catenin 在细胞质内聚集并进入细胞核,与核内的 TCF/LEF 转录因子家族作用并促进特定基因的表达^[16]。FZD4 为 7 次跨膜的膜蛋白,属于 G 蛋白偶联受体超家族,其异常高表达与 Wnt 信号通路的激活密切相关^[17]。研究发现胶质瘤中 FZD4 与干细胞的自我更新相关^[18]。FZD4 基因的突变与家族性渗出性玻璃体视网膜病变密切相关^[19]。本研究中通过生物信息学分析发现 FZD4 是 miR-375 的靶基因之一。基于此,本研究提出假设,miR-375 可以通过抑制人视网膜血管内皮细胞中 FZD4 的表达来抑制 Wnt 信号通路,从而抑制缺氧条件下的视网膜血管内皮细胞功能,结果显示 FZD4 基因沉默可有效抑制缺氧条件下 HRCECs 的增生、迁移和体外血管的形成能力,提示此

假设具有合理性。

综上所述,miR-375 可能通过直接靶向作用于 FZD4 并通过调控其在 HRCECs 中的表达而抑制 Wnt 信号通路的异常激活,从而抑制缺氧条件下 HRCECs 的增生、迁移以及血管形成能力,提示 miR-375 可能是一个新的治疗视网膜血管新生的潜在靶标分子。

参考文献

- [1] Kirsch S, Iroku-Malize T. Eye conditions in older adults: diabetic retinopathy [J]. FP Essent, 2016, 445 : 29-39.
- [2] 黄俊,毛新帮.微小 RNA 在糖尿病视网膜病变新生血管生成中的研究进展 [J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35 (5) : 478-480. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2017. 05. 020.
Huang J, Mao XB. Recent advances of micro RNA in neovascularization formation of diabetic retinopathy [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35 (5) : 478-480. DOI: 10. 3760 /cma. j. issn. 2095-0160. 2017. 05. 020.
- [3] 张媛,陈晓隆.微小 RNAs 与眼内恶性肿瘤 [J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32 (4) : 376-379. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2014. 04. 021.
Zhang Y, Chen XL. MicroRNAs and intraocular cancer [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32 (4) : 376-379. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2014. 04. 021.
- [4] 刘宝龙,吴斌文,黄素军,等. miR-375 对人结肠癌细胞株 HCT116 活性、细胞周期及凋亡的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31 (4) : 609-614. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-4718. 2015. 04. 006.
Liu BL, Wu BW, Huang SJ, et al. Effect of miR-375 on viability, cell cycle and apoptosis of colon cancer HCT116 cells [J]. Chin J Pathophysiol, 2015, 31 (4) : 609-614. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-4718. 2015. 04. 006.
- [5] 叶文蔚,李甫钊,叶夏斌,等. miR-375 在子宫内膜癌 HEC-1-B 细胞中的生物学功能 [J]. 实用医学杂志, 2013, 29 (2) : 177-180. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-5725. 2013. 02. 005.
Ye WW, Li FY, Ye XB, et al. The biological function of miR-375 in endometrial carcinoma HEC-1-B cells [J]. J Pract Med, 2013, 29 (2) : 177-180. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-5725. 2013. 02. 005.
- [6] Pickl JM, Tichy D, Kuryshv VY, et al. Ago-RIP-Seq identifies polycomb repressive complex I member CBX7 as a major target of miR-375 in prostate cancer progression [J]. Oncotarget, 2016, 7 (37) : 59589-59603. DOI: 10. 18632/oncotarget. 10729.
- [7] Hudcova K, Raudenska M, Gumulec J, et al. Expression profiles of miR-29c, miR-200b and miR-375 in tumour and tumour-adjacent tissues of head and neck cancers [J]. Tumour Biol, 2016, 37 (9) : 12627-12633. DOI: 10. 1007/s13277-016-5147-2.
- [8] Dejana E. The role of wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis [J]. Circ Res, 2010, 107 (8) : 943-952. DOI: 10. 1161/CIRCRESAHA. 110. 223750.
- [9] Enslow R, Bhuvanagiri S, Vegunta S, et al. Association of anti-VEGF injections with progression of geographic atrophy [J]. Ophthalmol Eye Dis, 2016, 8 : 31-32. DOI: 10. 4137/OED. S38863.
- [10] 吴一波,余星,郭俊明.微小 RNA-375 的抑癌机制 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28 (3) : 217-221.
Wu YB, Yu X, Guo JM. MiR-375 in cancers inhibition [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2012, 28 (3) : 217-221.
- [11] 魏明辉,张宗敏,李琳,等.喉鳞癌及癌旁正常组织 miRNA 差异表达分析 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21 (7) : 506-508, 513. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-5269. 2014. 07. 005.

- Wei MH, Zhang ZM, Li L, et al. Analysis of differential miRNA expression in squamous cell carcinoma of the larynx and adjacent normal tissues[J]. Chin J Cancer Prev Treat, 2014, 21 (7): 506-508, 513. DOI:10.3969/j.issn.1673-5269.2014.07.005.
- [12] Šmíd D, Kubačková D, Doležal J, et al. Predictive and prognostic factors of gastric cancer[J]. Rozhl Chir, 2016, 95(4): 156-161.
- [13] Ding L, Xu Y, Zhang W, et al. MiR-375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2[J]. Cell Res, 2010, 20(7): 784-793. DOI:10.1038/cr.2010.79.
- [14] Zhang X, Yan Z, Zhang J, et al. Combination of hsa-miR-375 and hsa-miR-142-5p as a predictor for recurrence risk in gastric cancer patients following surgical resection[J]. Ann Oncol, 2011, 22(10): 2257-2266. DOI:10.1093/annonc/mdq758.
- [15] Masckauchán TN, Shawber CJ, Funahashi Y, et al. Wnt/beta-catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells[J]. Angiogenesis, 2005, 8(1): 43-51. DOI: 10.1007/s10456-005-5612-9.
- [16] 倪露露, 李雁, 任宏丽. Wnt 信号通路和肿瘤干细胞在肿瘤复发转移中作用机制的研究述评[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(6): 1341-1344.
- [17] 陈星星, 贺修胜, 卢小敏. 卷曲蛋白受体与肿瘤的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(7): 1385-1388.
- Chen XX, He XS, Lu XM. Frizzled receptor proteins in tumors[J]. Prog Mod Biomed, 2013, 13(7): 1385-1388.
- [18] 高兴春, 郭娜, 闫爱丽, 等. RNA 干扰 FZD4 基因表达对人胶质瘤干细胞自我更新能力的抑制作用[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2015, 41(4): 701-705, 后插 2. DOI:10.13481/j.1671-587x.20150406.
- Gao XC, Guo N, Yan AL, et al. Inhibitory effect of RNA silencing FZD4 expression on self-renewal ability of glioma stem cells[J]. J Jilin Univer (Med Edit), 2015, 41(4): 701-705, after inset 2. DOI:10.13481/j.1671-587x.20150406.
- [19] 贾力蕴, 张风, 黎晓新. FZD4 基因与家族性渗出性玻璃体视网膜病变关系的研究[J]. 眼科, 2013, 22(4): 224-229.
- Jia LY, Zhang F, Li XX. Novel frizzled-4 gene mutations in Chinese patients with familial exudative vitreoretinopathy[J]. Ophthalmol CHN, 2013, 22(4): 224-229.

(收稿日期: 2017-02-01)

(本文编辑: 尹卫靖 刘艳)

· 临床经验 ·

超声生物显微镜在虹膜睫状体肿瘤影像诊断中的价值

王兆瑞

457000 濮阳市第三人民医院超声科

通信作者: 王兆瑞, Email: syck6699@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.08.006

常见的前节肿瘤包括上皮囊肿、虹膜睫状体黑色素瘤和转移性肿瘤。在大多数情况下,可以通过仔细的临床病史询问和眼部检查进行诊断^[1],其中超声检查已成为用于确定肿瘤大小及其周围结构改变不可或缺的工具。结合荧光素眼底血管造影和 CT,超声检查还可确定恶性肿瘤斑块放射治疗的范围。眼科超声生物显微镜(ultrasound biomicroscopy, UBM)是一种在高分辨率下可对眼前节组织结构进行一定深度检查的新型成像技术^[2-3],具有实时、定量、不受不透光组织影响等优点,该方法已广泛用于许多眼科疾病的诊断,特别是对眼前节肿瘤大小测量、定位和连续监测肿瘤的变化规律等方面取得了许多进展^[4-8]。眼前节 OCT 的出现又为眼前节成像提供了一种新的工具^[9]。眼前节 OCT 可在 125 ms 内对低分辨率图像进行 256A 扫描,或者使用近红外光在 250 ms 内对高分辨率图像进行 512A 扫描,实现了轴向约 18 μm 和横向约 60 μm 的分辨率,可以根据扫描类型达到 3~6 mm 的穿透深度,这种方法最近已被用于虹膜肿瘤的成像^[10]。本研究探讨 UBM 检查在虹膜睫状体肿瘤影像诊断中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采用前瞻性研究设计,连续收集 2010 年 11 月 1 日至 2016 年 11 月 30 日于濮阳市第三

人民医院确诊的虹膜睫状体肿瘤患者 20 例 20 眼行 UBM 检



图 1 睫状体囊肿患者的 UBM 图像 睫状体处显示卵圆形囊样结构 图 2 虹膜睫状体恶性黑色素瘤患眼表现 A:裂隙灯显微镜下可见前房团块状黑色隆起,瞳孔扭曲变形 B:UBM 下可见一侧前房内实体团块反射 图 3 睫状体色素上皮腺瘤患眼的表现 A:裂隙灯显微镜下可见接近前房角处轻微团块状黑色隆起,瞳孔轻微变形 B:UBM 下可见睫状体增厚,反射增强 图 4 胃癌睫状体转移癌患眼表现 A:裂隙灯显微镜下可见扩瞳后 4:00~7:00 处虹膜后方有一突出的半透明隆起 B:UBM 下可见虹膜后方反射增强,虹膜结构向前房隆起