

不同病理类型的葡萄膜黑色素瘤中微小 RNA 差异表达谱分析

刘忆南 邵蕾 魏文斌

100621 北京首都国际机场医院 北京首都国际机场急救中心(刘忆南);100730 首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心(邵蕾);100730 首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 眼内肿瘤诊治研究北京市重点实验室 北京市眼科学与视觉科学重点实验室(魏文斌)

通信作者:魏文斌,Email:weiwenbintr@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.09.003

【摘要】 背景 目前研究证实微小 RNA(miRNA)参与大多数人类肿瘤疾病的发生和发展,其作用类似于抑癌基因或癌基因。葡萄膜黑色素瘤(UM)是成人常见的眼部恶性肿瘤,其发生和转移机制仍未完全阐明。探讨 UM 组织中 miRNA 的差异表达情况有望为 UM 的靶向治疗提供依据。**目的** 筛选不同病理类型的 UM 组织中特异性 miRNA 表达谱。**方法** 收集于 2013 年 3 月至 2015 年 10 月在北京同仁医院手术局部切除并经常规组织病理学和免疫组织化学检测证实为梭形细胞型 UM 的标本 4 例和上皮细胞型 UM 标本 4 例,采用 miRNA 芯片分别检测 2 种 UM 组织中 miRNA 的表达,收集同期死于非肿瘤疾病的 8 个供体眼的正常葡萄膜组织作为对照,利用组间差异倍数筛选出差异 ≥ 2 倍差异表达的 miRNA;用在线软件预测差异表达 miRNA 的靶基因,采用生物信息学方法分析靶基因参与的信号功能通路。采用实时定量 PCR 法验证芯片检测结果。**结果** 收集的梭形细胞型和上皮细胞型 UM 标本经组织病理学检查均得到确诊,免疫组织化学检测梭形细胞型及上皮细胞型 UM 组织中 HMB45、黑色素-A 和 S-100 均呈阳性反应。与正常葡萄膜组织比较,在梭形细胞型 UM 组织中差异表达的 miRNA 有 109 个,其中 29 个上调,80 个下调,上调的 miRNA 包括 miR-146a-5p、miR-25-3p 和 miR-29b-1-5p,下调的 miRNA 包括 miR-126-5p、miR-183-5p 和 miR-96-5p;上皮细胞型 UM 中差异表达的 miRNA 有 50 个,其中 23 个上调,27 个下调,上调的 miRNA 包括 miR-155-5p、miR-210 和 miR-378a-5p;下调的 miRNA 包括 miR-199a-5p、miR-143-3p 和 miR-143-5p。在梭形细胞型和上皮细胞型 UM 组织中共同上调的 miRNA 为 miR-132-3p、miR-21-5p、miR-34a-5p 和 miR-34b-5p,共同下调的 miRNA 为 miR-125b-2-3p、miR-126-3p、miR-199a-3p 和 miR-214-3p。梭形细胞型和上皮细胞型 UM 组织中差异表达的 miRNA 所预测的靶基因分别参与癌症通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、Wnt 信号通路、细胞间黏附、胞吞作用、前列腺癌通路、结直肠癌通路和细胞黏附通路。**结论** 与正常葡萄膜组织相比,梭形细胞型 UM 和上皮细胞型 UM 组织中存在多种 miRNA 的差异表达,梭形细胞型 UM 和上皮细胞型 UM 组织之间也存在明显的 miRNA 差异表达,这些差异表达的 miRNA 可通过不同的信号转导通路参与调控 UM 的生物学行为。

【关键词】 葡萄膜黑色素瘤/病理;微小 RNA;信号转导通路;差异表达谱

基金项目: 国家自然科学基金项目(81570891、81272981);北京市自然科学基金项目(7151003);北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划项目(2014-2-003);北京市医院管理局“登峰”人才培养计划项目(DFL20150201);北京市医院管理局临床医学发展专项项目(扬帆计划)(ZYLX201307);恶性葡萄膜黑色素瘤综合诊断及治疗策略研究项目(首发 2016-1-2051);眼内肿瘤诊治研究北京市重点实验室 2015 年度科技创新基地培育与发展专项项目(Z151100001615052)

Differential expression profile of microRNAs in different types of uveal melanoma Liu Yinan, Shao Lei, Wei Wenbin

Hospital of Capital International Airport, First-Aid of Capital International Airport, Beijing 100621, China (Liu YN);

Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China (Shao L); Beijing Tongren Eye Center, Beijing Key Laboratory of Intraocular Tumor Diagnosis and Treatment, Beijing Ophthalmology & Visual Sciences Key Laboratory, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China (Wei WB)

Corresponding author: Wei Wenbin, Email: weiwbintr@163.com

[Abstract] **Background** Researches showed that microRNA (miRNA) is involved in the pathogenesis and development of many tumors and plays a cancer-suppressing-gene like role or cancer-gene like action. Uveal melanoma (UM) is a common ocular malignant tumor in adult, and the mechanism of UM pathogenesis and metastasis is still not elucidated. Understanding the differential expression of miRNAs in UM is expected to provide a basis for targeting treatment of UM. **Objective** This study was to screen and compare the expression profiles of miRNAs in epithelial type and spindle type of UM. **Methods** The use of specimens of UM and donor eyes was approved by Ethic Commission of Capital Medical University. The specimens of epithelial type (4 specimens) and spindle type (4 specimens) of UM confirmed by histopathology and immunochemistry were collected in Beijing Tongren Hospital from March 2013 to October 2015. The expression profile of miRNA was assayed by miRNA array. Normal uveal specimens were obtained from 8 donors as controls. The differentially expressing miRNAs were screened by intergroup differential folds of ≥ 2 . The genes targeting differentially expressed miRNAs were predicted using multiples online software and the potential signal pathway was further analyzed by bioinformatics method. The microarray outcomes were validated by real-time quantitative PCR. **Results** Spindle cell type and epithelial cell type of UMs were verified by hematoxylin and eosin staining. Immunochemistry showed that HMB45, melanin-A and S-100 were positively expressed in the two types of UM. Compared with the normal uveal tissue, 109 differentially expressed miRNAs, including 29 up-regulated and 80 down-regulated miRNAs were seen in the spindle cell type of UM, and in the epithelial cell type of UM, 50 differentially expressed miRNAs were found, including 23 up-regulated and 27 down-regulated miRNAs. In spindle cell type of UM, the up-regulated miRNAs were miR-146a-5p, miR-25-3p and miR-29b-1-5p, and down-regulated ones were miR-126-5p, miR-183-5p and miR-96-5p. In epithelial cell type of UM, the up-regulated miRNAs were miR-155-5p, miR-210 and miR-378a-5p, and down-regulated ones were miR-199a-5p, miR-143-3p and miR-143-5p. In addition, the mutual up-regulated miRNA in both spindle cell type of UM and epithelial cell type of UM were miR-132-3p, miR-21-5p, miR-34a-5p and miR-34b-5p, and mutual down-regulated ones were miR-125b-2-3p, miR-126-3p, miR-199a-3p and miR-214-3p. Bioinformatics analysis showed that the targeting genes predicted by differentially expressed miRNAs participated in a number of biological pathways, including cancer-related pathway, mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, Wnt signal pathway and intercellular adhesion, endocytosis, prostatic cancer, colorectal cancer pathways. **Conclusions** Many differentially expressed miRNAs exist among spindle cell type of UM, epithelial cell type of UM and normal uveal tissue. These miRNAs participate in or regulate the biological behaviour of UM via different signal pathways.

[Key words] Uveal melanoma/pathology; Micro RNA; Signal transduction pathway; Differential expression profiles

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81570891, 81272981); Beijing Natural Science Foundation (7151003); Advanced Health Care Professionals Development Project of Beijing Municipal Health Bureau (2014-2-003); Beijing Municipal Administration of Hospitals' Ascent Plan (DFL20150201); Beijing Municipal Administration of Hospitals Clinical Medicine Development of Special Funding Support (ZYLX201307); Study on Individual Diagnosis and Therapy Strategy for Malignant Uveal Melanoma (2016-1-2051); Science & Technology Project of Beijing Municipal Science & Technology Commission (Z151100001615052)

葡萄膜黑色素瘤 (uveal melanoma, UM) 是成人常见的眼部恶性肿瘤, 其特点是恶性度高及易发生转移, 其预后与患者的发病年龄、病理学分型、瘤体直径、巩

膜浸润深度、发生部位和瘤细胞的核分裂指数等因素有关^[1]。梭形细胞型 UM 预后好于上皮细胞型 UM, 但相关机制目前尚未完全阐明。2002 年十大科技突

破的微小 RNA (microRNA, miRNA) 研究已成为生物学研究的焦点。miRNA 是一类长度为 20 ~ 24 nt 的非编码调控单链小分子 RNA, 约占整个基因组的 1% [2], 研究认为人类基因组中约 1/3 受 miRNA 调控 [3]。miRNA 参与人类大多数肿瘤疾病的发生和发展, 其作用类似于抑癌基因或癌基因, 目前相关研究主要集中于乳腺癌、肺肿瘤、肝癌、前列腺癌和白血病, 但其与眼部肿瘤的关系研究较少。本研究中利用 miRNA 芯片技术检测梭形细胞型和上皮细胞型 UM 组织与正常葡萄膜组织 miRNA 表达谱的差异, 为不同类型 UM 发生和发展的机制研究提供新的线索, 为 UM 的早期诊断和病理分型提供依据, 并为 UM 的治疗提供潜在靶点。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 组织标本来源 收集 2013 年 3 月至 2015 年 10 月在北京同仁医院手术局部切除并经组织病理学证实为 UM 的瘤体标本 8 例, 包括梭形细胞型 UM 4 例和上皮细胞型 UM 4 例, 以 2013 年 3 月至 2015 年 10 月死于非肿瘤的供体眼脉络膜组织标本 8 例作为对照, 其中 4 例为作为梭形细胞型 UM 对照组, 另 4 例作为上皮细胞型 UM 对照组。所有标本眼及患者临床信息见表 1。所有肿瘤患者对研究目的知情并签署知情同意书, 本研究方案通过首都医科大学伦理委员会审查 (TRECKY2015-017)。

表 1 标本来源的临床资料

组别	例数	性别 (n)		年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)
		男	女	
梭形细胞型 UM 组	4	2	2	51.00 ± 6.41
上皮细胞型 UM 组	4	2	2	51.75 ± 10.06
梭形细胞型 UM 对照组	4	2	2	51.00 ± 6.71
上皮细胞型 UM 对照组	4	1	3	51.25 ± 8.73

注: UM: 葡萄膜黑色素瘤

1.1.2 主要试剂及仪器 鼠抗人 S-100 单克隆抗体原液 (Kit-0007)、鼠抗人 HMB45 单克隆抗体 (MAB-0360)、Melan-A 鼠抗人单克隆抗体 (MAB-0275) (福州迈新生物技术开发有限公司); miRNA 完全标记和杂交试剂盒 (美国 Agilent 公司); 基因表达洗涤缓冲液试剂盒、TaqMan[®] MicroRNA 检测试剂盒、TaqMan[®] MicroRNA 逆转录试剂盒、TaqMan 通用 PCR 反应混合液 II (美国 ThermoFisher 公司); MicroBioSpin 6 Columns (美国 Bio-Rad 公司); miRNeasy Mini 试剂盒 (德国 Qiagen 公司); mirVana RNA 分离试剂盒 (美国 Applied

Biosystem 公司); mirVana[™] PARIS[™]、RecoverAll[™] Total Nucleic Acid Isolation (美国 NBI 公司)。无色杂交小室、杂交小室垫片、芯片/盖玻片、55 °C 混合烤箱、芯片扫描仪、生物分析仪 (美国 Agilent 公司); 1.5 ml 无核酸酶离心管 (美国 Axygen 公司); 磁力搅拌棒、磁力搅拌盘 (美国 Corning 公司); 微型离心机 (美国 ThermoFisher 公司); 染色盘和滑架 (×3) (英国 Thermo Shandon 公司); NanoDrop ND-2000 紫外分光光度计 (美国 Thermo 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 UM 标本处理 所有标本平均分为 2 份, 1 份保存于体积分数 4% 甲醛溶液中, 制备石蜡切片, 采用苏木精-伊红染色法和免疫组织化学法以明确标本的组织性质; 另 1 份立即保存于液氮中, 然后转至 -80 °C 冰箱内, 用于提取 miRNA。

1.2.2 免疫组织化学检测组织标本中 HMB45、黑色素-A 和 S-100 的表达 石蜡切片脱蜡和水化后加入柠檬酸组织抗原修复液, 置于电磁炉上大功率加热至沸腾, 加盖后高压加热至喷气后 2 min, 自然冷却至室温, 蒸馏水冲洗 2 次, 每次 3 min; PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min; 添加 100 μl 内源性过氧化物酶阻断剂, 室温下孵育 10 min; 加 100 μl 鼠抗人 S-100 单克隆抗体原液或鼠抗人 HMB45 单克隆抗体或 Melan-A 鼠抗人单克隆抗体, 室温下孵育 60 min; 加 100 μl 酶标羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物, 室温下孵育 15 min; 加 100 ~ 200 μl 新鲜配制的 DAB 显色液, 孵育 3 ~ 5 min, 光学显微镜下观察染色结果; 自来水冲洗, 加 100 ~ 200 μl 苏木素体细胞染色液孵育 10 ~ 30 s; PBS 或自来水冲洗返蓝; 体积分数 85% 乙醇和 95% 乙醇分别浸泡 3 min, 无水乙醇浸泡 3 min 脱水, 二甲苯透明, 中性树胶和盖玻片封片。

1.2.3 提取总 RNA 每 50 ~ 100 mg 组织用 1 ml Trizol 试剂对组织进行裂解, 将上述裂解液转入 EP 管中, 室温下静置 5 min; 每 1 ml Trizol 加 0.2 ml 氯仿后振荡 15 s, 室温静置 2 ~ 3 min, 2 ~ 8 °C 条件下 12 000 ×g 离心 15 min; 收集上层水相置于新 EP 管中, 每 1 ml Trizol 加 0.5 ml 异丙醇, 室温下静置 10 min, 12 000 ×g 离心 10 min; 弃上清, 每 1 ml Trizol 加 1 ml 75% 乙醇进行洗涤, 涡旋混合, 7 500 ×g 离心 5 min, 弃上清; 让沉淀的 RNA 在室温下自然干燥。无核酶水中溶解 RNA 沉淀, 采用分光光度计检测波长为 260、280 和 230 nm 处所抽提的总 RNA 中的吸光度 (A) 值, 确定样品浓度和总量。采用甲醛变性胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.2.4 芯片的杂交、清洗、扫描及分析 采用 Agilent 2100 Bioanalyzer 对芯片样品 RNA 进行检测分析, 以

2100 RIN ≥ 7.0 , 且 28S/18S ≥ 0.7 为质检合格标准。取 100 ng 纯化的总 RNA 进行实验。采用 miRNA Hyb Kit 对总 RNA 标记反应体系,将抽干的样品再次溶解在无核酶水中,加入 Hi-RPM 杂交缓冲液,轻微涡旋混匀,100 °C 金属浴中加热 5 min,反应结束后迅速转至冰水浴中冷却 5 min。以逆转录的 cDNA 产物为模板,加入引物 Random Primer 及 Klenow Fragment 酶,轻微涡旋混匀,100 °C 金属浴中加热 5 min,合成 cDNA 互补链并掺入带有荧光基团的 Cy3-dCTP 或 Cy5-dCTP,反应结束后迅速转至冰水浴中冷却 5 min。离心后收集反应液并配置杂交混合液,将其放置在杂交炉的架子上,温度为 55 °C,离心半径为 7 cm,20 r/min 杂交 20 h,吸出杂交液,加入相应容积的清洗缓冲液 1 清洗芯片,用 Agilent 扫描软件进行扫描。用 Agilent Feature Extraction (v10.7) 软件提取杂交图片的数据;用 GeneSpring11.5 软件对 miRNA 表达谱数据进行均一化,然后进行组间差异基因的筛选,采用 FC (abs),即组间差异倍数绝对值表示差异倍数,要求 FC (abs) ≥ 2 且 $P < 0.05$ 。用 Cluster3.0 软件进行聚类分析。

1.2.5 miRNA 差异表达谱的生物信息学分析 利用 5 个在线软件 (TargetScan、MiRanda、miRDB、PicTar、RNA22) 预测差异表达 miRNA 的靶基因,挑选同时被上述数据库中 4 个或 4 个以上数据库预测为阳性结果的靶基因,采用 Pathway 通路富集等生物信息学方法分析预测靶基因参与的信号通路。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 验证 目前,miR-21、miR-34、miR-145、miR-137、miR-125b、miR-214、miR-375、miR-221、miR-222、miR-33 等是肿瘤研究的热点,并综合分析芯片实验中各组 miRNA 差异表达倍数的排序^[4-5]。选取 20 个目的 miRNA 进行验证。采用 TaqMan[®] MicroRNA 逆转录试剂盒和 TaqMan[®] MicroRNA Assays 试剂盒对上述芯片结果进行验证。收集 10 ng 总 RNA,用 5 倍逆转录引物和 5 倍逆转录预混液配制 15 μ l 反应体系,混匀后放置冰上 5 min,16 °C 下反应 30 min,42 °C 下反应 30 min,85 °C 下反应 5 min 完成逆转录;将针对不同靶标 miRNA 的逆转录产物 4.80 μ l 和 3.60 μ l 对应的 20 倍 TaqMan[®] MicroRNA Assay 缓冲液、36.00 μ l 2 倍 TaqMan[®] Universal PCR Master Mix II、无 UNG 预混液和 27.61 μ l 去离子水进行混合,制备成 72.01 μ l 的定量 PCR 反应体系,分装在 3 个管中用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪进行实时定量 PCR 反应,采用配套软件进行分析。定量 PCR 探针设计引物序列见表 2。

表 2 定量 PCR 探针目标序列

miRNA 名称	TaqMan 探针目标序列 (5' -3')
Hsa-miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
Hsa-miR-25	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA
Hsa-miR-29b	GCUGGUUUCUAUUGGUGUUUAGA
Hsa-miR-34a	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU
Hsa-miR-34b	UAGGCAGUGUCAUUAGCUGAUUG
Hsa-miR-96	UUUGGCACUAGCACAUUUUUGCU
Hsa-miR-125b	UCACAAGUCAGGCUCUUGGGAC
Hsa-miR-126-5p	CAUUAUUACUUUUGGUACGGC
Hsa-miR-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGC
Hsa-miR-132	UACAGUCUACAGCCAUGGUCG
Hsa-miR-143-5p	GGUCAGUCUGCAUCUCUGGU
Hsa-miR-143-3p	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC
Hsa-miR-146a	UGAGAACUGAAUUCUUGGGUU
Hsa-miR-155	UUAUUGCUAAUCGUGAUAGGGG
Hsa-miR-183	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACUG
Hsa-miR-199a	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC
Hsa-miR-199a-3p	UACAGUAGUCUGCACAUUGGUU
Hsa-miR-210	CUGUGCGUGUGACAGCGGCGUA
Hsa-miR-214	ACAGCAGGCACAGACAGGCAG
Hsa-miR-378a	CUCCUGACUCCAGGUCCUGUGU

注:miRNA:微小 RNA

1.3 统计学方法

采用 GeneSpringGX 基因分析统计学软件进行统计分析。对芯片上所有样品归一化后的荧光信号值进行 K-S 检验,验证数据资料是否符合正态分布。归一化后的信号值相减得到的以 2 为底的对数记为 LogFC,以 2 为底,LogFC 的绝对值为幂得到的数值记为 FC (abs),即 2 个组样本的差异倍数。归一化后信号值的比较采用 Fisher 精确概率法和 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,且以 FC (abs) ≥ 2 的标准进行筛选。

2 结果

2.1 UM 标本的组织病理学表现

梭型细胞型 UM 的组织病理学检查显示,瘤细胞呈长梭形,细胞膜界限不清,细胞核小而细长,细胞核内染色质均匀,病理性核分裂相罕见。上皮细胞型 UM 的组织病理学检查显示,瘤细胞体积较大,呈圆形或多边形,形状和大小均不一致,细胞膜界限清楚,细胞质嗜酸,细胞核较大,核内有一大而深染的核仁,病理性核分裂相多见。免疫组织化学法检测显示,2 种类型 UM 组织中 HMB45、黑色素-A 和 S-100 均呈阳性反应 (图 1,2)。

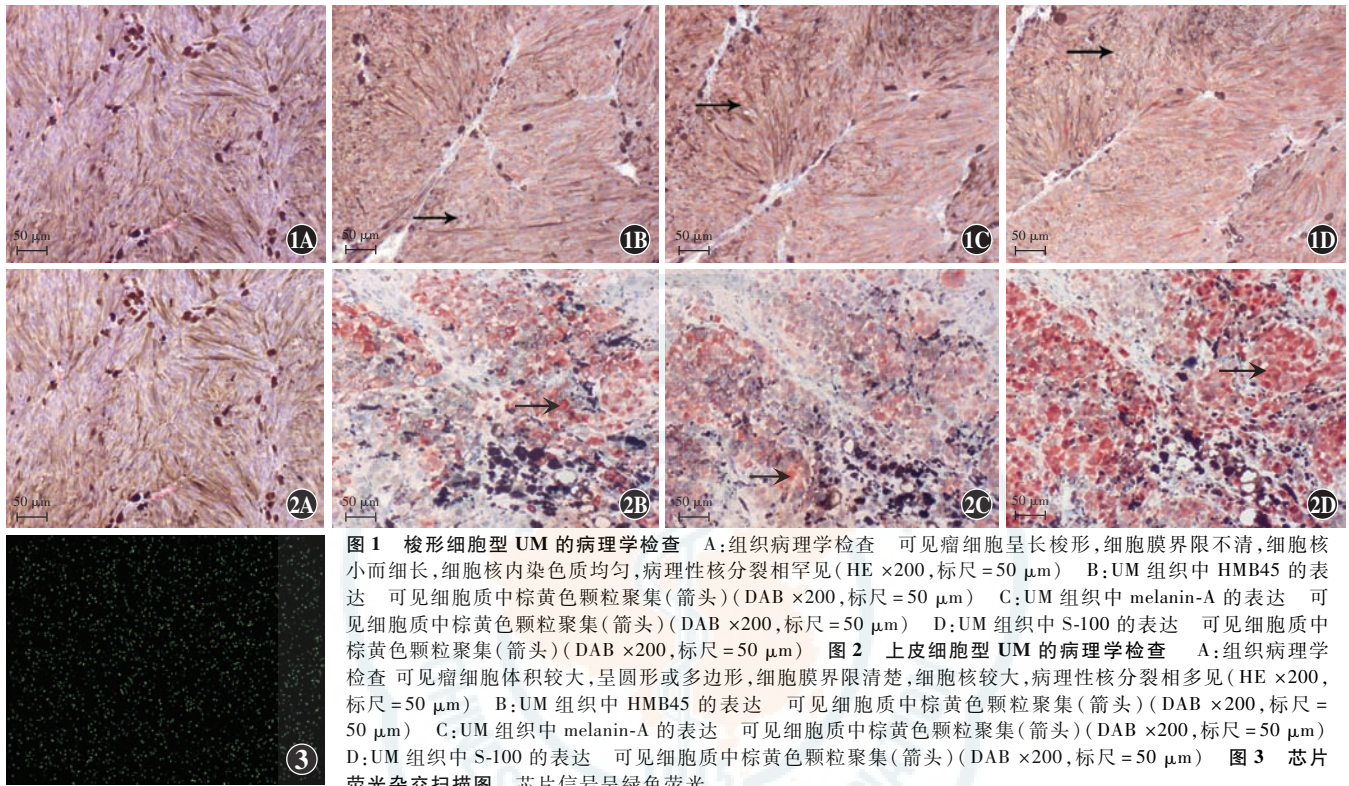
2.2 组织标本的 miRNA 芯片质控分析

2.2.1 芯片样品 RNA 质检 本研究的 16 个标本均满足 2100 RIN ≥ 7.0 , 且 28S/18S ≥ 0.7 , 质检合格。

2.2.2 芯片扫描采集杂交图像 Agilent Human

miRNA(8 * 60K) V18.0 芯片由 Agilent G2565BA 荧光扫描仪扫描后,16 张 miRNA 表达谱芯片上均可见密集

过饱和现象,背景均一,提示采集到的芯片信号一致性较好,灵敏度较强(图 3)。



2.3 miRNA 芯片聚类分析

用 cluster3.0 在线软件对各组样本 miRNA 数据分别做梭形细胞型 UM/对照 1 组和上皮细胞型 UM/对照 2 组聚类热分析,各组样本依次聚在一起,说明芯片结果具有较好的组间重复性(图 4)。

2.4 正常葡萄膜组织与不同类型 UM 组织中 miRNA 表达谱的差异表达

2.4.1 不同葡萄膜组织中 miRNA 的差异筛选 与正常葡萄膜组织相比,梭形细胞型 UM 中差异表达的 miRNA 有 109 个,其中 29 个 miRNA 上调,80 个 miRNA 下调;上皮细胞型 UM 中差异表达的 miRNA 有 50 个,其中 23 个 miRNA 上调,27 个 miRNA 下调。经过归一化分析,梭形细胞型 UM 对照组和上皮细胞型 UM 对照样本之间相关性好 (r = 0.978、0.966、0.974、0.968),表明梭形细胞型 UM 组和上皮细胞型 UM 组的 miRNA 表达谱有可比性。仅在梭形细胞型 UM 组织中上调的 miRNA 有 21 个,其中 miR-3149 上调 33 倍,miR-378a-5p 上调 24 倍;下调的 miRNA 有 69 个,其中 miR-204-3p 下调了 99.7%,miR-145-3p 下调了 99.4%;仅在上皮细胞型 UM 组织中上调的 miRNA 有 15 个,其中 miR-29b-1-5p 上调 90 倍,miR-532-5p 上

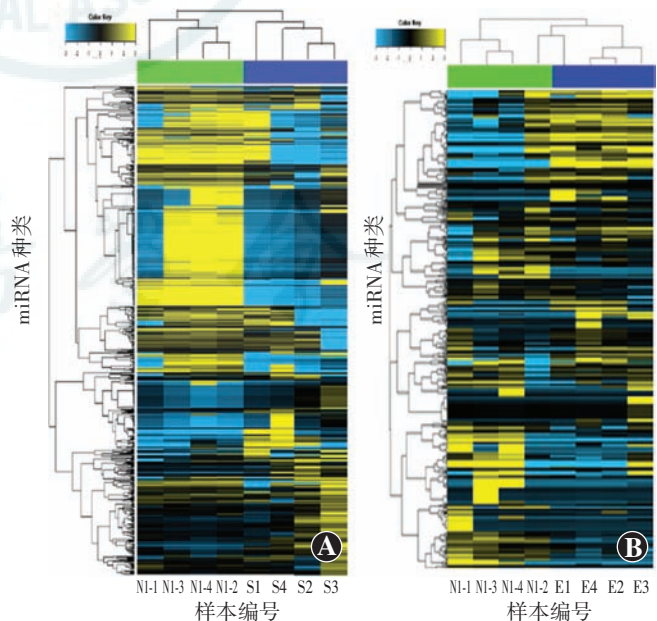


图 4 miRNA 芯片聚类分析图 蓝色代表低表达,黄色代表高表达,黑色代表表达无差异或阴性 A:梭形细胞型 UM 组织与其对照组 miRNA 芯片聚类分析图 N1:梭形细胞型 UM 对照组;S:梭形细胞型 UM B:上皮细胞型 UM 组织与其对照组 miRNA 芯片聚类分析图 N2:上皮细胞型 UM 对照组;E:上皮细胞型 UM miRNA:微小 RNA

调 15 倍,下调的 miRNA 有 16 个,其中 miR-144-3p 下调了 99.5%,miR-3692-5p 下调了 99.2%;在梭形细胞型 UM 组织和上皮细胞型 UM 组织中共同上调的 miRNA 有 8 个,其中 hsa-miR-34b-5p 在梭形细胞型 UM 组织中上调 3 倍,在上皮细胞型 UM 组织中上调 10 倍,hsa-miR-34a-5p 在梭形细胞型 UM 组织中上调 8 倍,在上皮细胞型 UM 组织中上调 9 倍;共同下调的 miRNA 有 11 个,其中 hsa-miR-214-3p 在梭形细胞型 UM 组织中下调了 99.6%,在上皮细胞型 UM 组织中下调了 87.5%,hsa-miR-125b-2-3p 在梭形细胞型 UM 组织中下调了 98.7%,在上皮细胞型 UM 组织中下调了 97.1%,这些 miRNA 与 UM 组织的病理类型无关,为 UM 病理类型非特异性的公共 miRNA。

2.4.2 差异 miRNA 对不同类型 UM 的靶基因预测

仅在梭形细胞型 UM 上调 miRNA 预测到的靶基因有 379 个,下调 miRNA 预测到的靶基因有 1 148 个;仅在上皮细胞型 UM 上调 miRNA 预测到的靶基因有 1 227 个,下调 miRNA 预测到的靶基因有 681 个;在梭形细胞型和上皮细胞型 UM 中共同上调的 miRNA 预测到的靶基因有 277 个,共同下调的 miRNA 预测到的靶基因有 593 个。

2.4.3 差异 miRNA 靶基因信号通路分析 仅在梭形细胞型 UM 中上调 miRNA 预测的靶基因未富集到信号通路,下调 miRNA 预测的靶基因参与 6 条信号通路,包括癌症通路、MAPK 信号通路、Wnt 信号通路、神经营养因子信号通路、胰岛素信号通路、泛素介导的蛋白水解通路。仅在上皮细胞型 UM 中上调 miRNA 预测的靶基因参与 5 条信号通路,包括癌症通路、细胞间黏附、胞吞作用、小细胞肺癌、细胞外基质受体相互作用,下调 miRNA 预测的靶基因参与癌症通路。在 2 种类型 UM 中共同上调 miRNA 预测的靶基因参与前列腺癌通路、结直肠癌通路和细胞黏附通路,下调 miRNA 预测的靶基因未富集到信号通路(图 5)。靶基因广泛参与癌症信号通路,包括酪氨酸激酶/信号转录通路(Janus kinase/signal transcription, JAK/STAT)、p53、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、磷脂酰肌醇 3 激酶-丝/苏氨酸激酶(phosphatidylinositol 3 kinase-serine/threonine kinase, PI3K-Akt)、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和 Wnt 等信号通路。

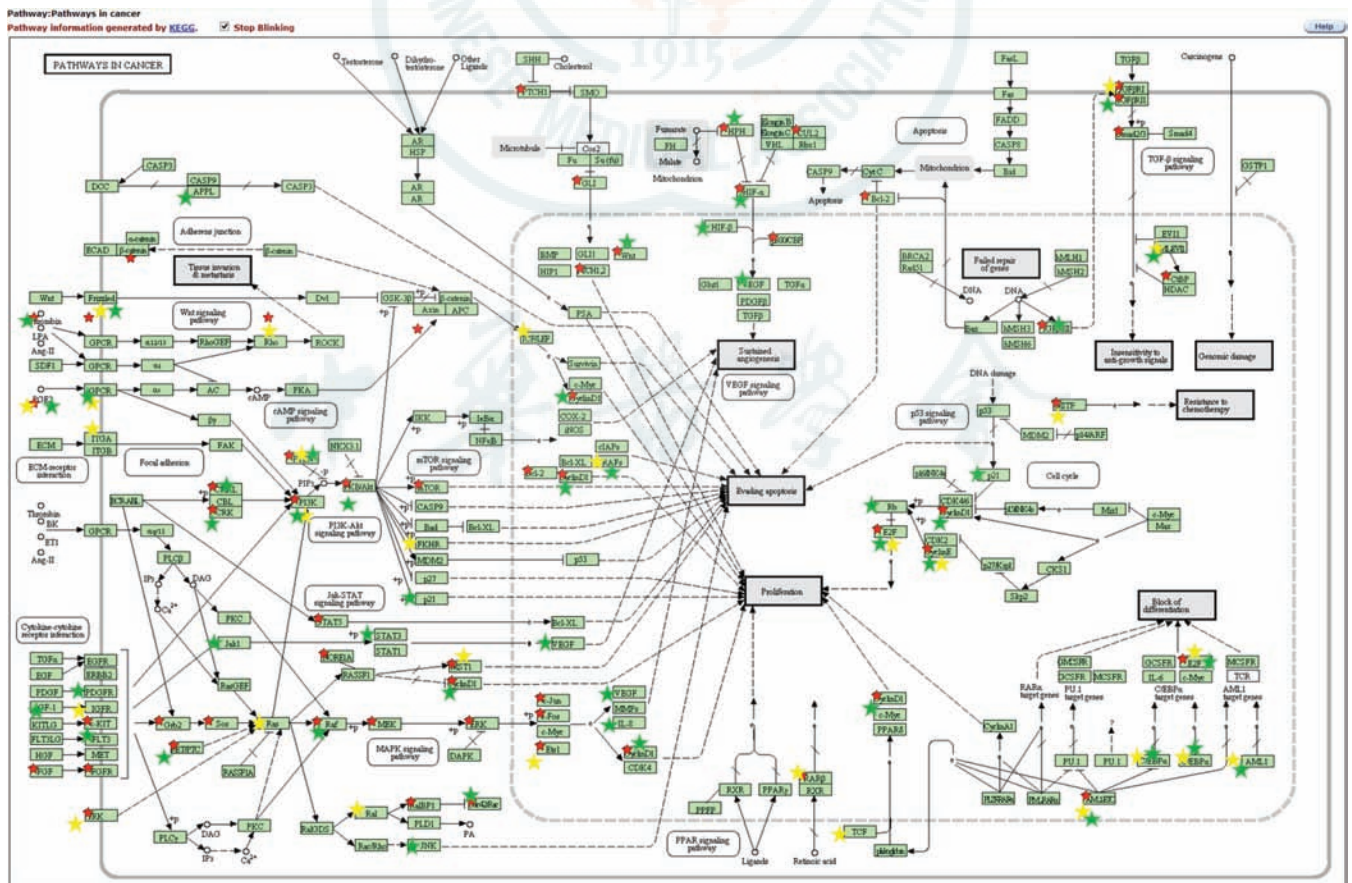


图 5 差异 miRNA 靶基因信号癌症通路 红星表示仅在梭形细胞型 UM 组下调 miRNA 预测的靶基因,绿星表示仅在上皮细胞型 UM 组上调 miRNA 预测的靶基因,黄星表示仅在上皮细胞型 UM 组下调 miRNA 预测的靶基因

2.5 与 UM 发生和发展相关的 miRNA 验证

选取仅在上皮细胞型 UM 组织中上调的 miR-146a-5p、miR-25-3p 和 miR-29b-1-5p 及下调的 miR-126-5p、miR-183-5p 和 miR-96-5p, 仅在梭形细胞型 UM 组织中上调的 miR-155-5p、miR-210 和 miR-378a-5p 及下调的 miR-199a-5p、miR-143-3p 和 miR-143-5p, 在 2 种类型 UM 中共同上调的 miR-132-3p、miR-21-5p、miR-34a-5p 和 miR-34b-5p 及下调的 miR-125b-2-3p、miR-126-3p、miR-199a-3p 和 miR-214-3p 等 20 个目标 miRNA 进行验证, 用实时荧光定量 PCR 进行芯片验证, 结果符合本研究中的检测结果 (图 6)。

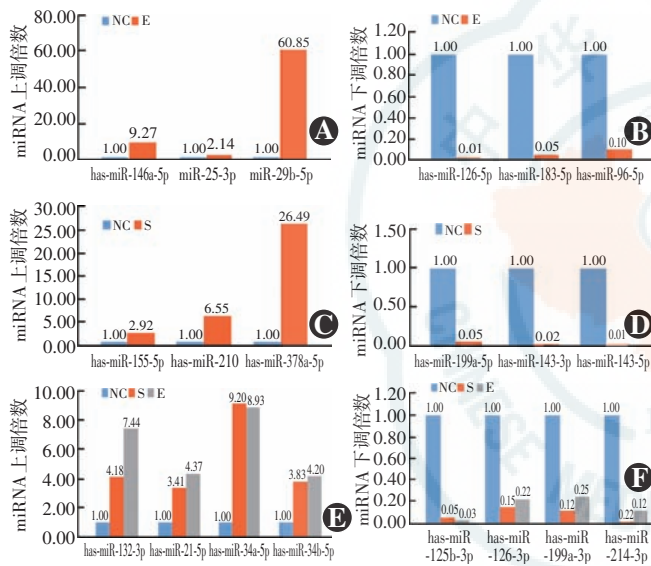


图 6 不同类型 UM 中 miRNA 差异表达的实时定量 PCR 验证 A: 仅在上皮细胞型 UM 中表达上调的 miR-146a-5p、miR-25-3p 和 miR-29b-1-5p B: 仅在上皮细胞型 UM 中表达下调的 miR-126-5p、miR-183-5p 和 miR-96-5p C: 仅在梭形细胞型 UM 中表达上调的 miR-155-5p、miR-210 和 miR-378a-5p D: 仅在梭形细胞型 UM 中表达下调的 miR-199a-5p、miR-143-3p 和 miR-143-5p E: 在 2 种类型 UM 中均表达上调的 miR-132-3p、miR-21-5p、miR-34a-5p 和 miR-34b-5p F: 在 2 种类型 UM 中均表达下调的 miR-125b-2-3p、miR-126-3p、miR-199a-3p 和 miR-214-3p miRNA: 微小 RNA; NC: 正常对照; S: 梭形细胞型 UM; E: 上皮细胞型 UM

3 讨论

既往 UM 的研究多基于基因水平或蛋白水平, 新近研究表明, 表达失调的 miRNA 与恶性肿瘤的发生和发展密切相关。miRNA 可能调节人类 1/3 的编码基因, 因此找出与 UM 发生和发展相关的关键 miRNA, 并研究这些 miRNA 与其靶基因的调控关系, 可为 UM 发生和发展机制的研究奠定基础。基因芯片技术简化了 miRNA 的表达谱检测, 为相关科研工作提供了极大便利。基因芯片技术虽能提供海量信息, 但也存在一定缺陷, 比如难以避免的假阳性率, 基因芯片的分析结

论数据则是基于这种存在假阳性结论的基础上的, 因此通过芯片技术所筛选出的差异表达基因必须采用相应的方法进一步验证, 以确定差异 miRNA 的准确性, 从而提高实验的可靠性。此外, 芯片分析技术提供的差异 miRNA 的信息数据过多, 应该结合有关资料进行综合分析, 然后有选择性地对芯片结果进行验证^[6-7]。

本研究中用 miRNA 芯片筛选出 UM 与正常葡萄膜组织中存在的差异表达的 miRNA, 这些差异表达的 miRNA 与既往发表的研究结果有一致者, 也有相反者。Gao 等^[8]在非小细胞肺癌铂类耐药的研究中发现, 过表达 miR-21 的肺癌细胞对铂类药物的抗性明显增加, 而低表达 miR-21 的肺癌细胞对铂类药物抗性下降。体外研究提示, 过表达 miR-21 可能降低人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因 (phosphatase and tension homolog deleted on chromosome ten, PTEN) 的表达和增加 bcl-2 蛋白, 提出可通过监测非小细胞肺癌患者肿瘤组织和血浆 miR-21 的表达水平来预测癌细胞对铂类药物的反应及患者的生存率, miR-21 有望成为治疗对铂类耐药的癌症患者的新靶点。Farazi 等^[9]乳腺癌 miRNA 测序表明, miR-21 在 ER 阳性的乳腺癌中明显上调, 认为上调的 miR-21 既可以直接抑制靶基因的表达, 也可以通过下调有抑癌基因作用的 miRNA 的表达而促进乳腺癌的发生。本研究中发现 miR-21 在不同病理类型的 UM 组织中均上调, 与既往 miR-21 与其他肿瘤关系的研究相一致。

miR-34 家族在肿瘤发生和发展过程中起重要作用。Yan 等^[10]研究发现, UM 细胞中 miR-34a 的表达水平明显低于正常葡萄膜黑色素细胞, 其靶基因是 *c-Met*, 下调的 miR-34 可以使丝氨酸激酶和细胞周期蛋白磷酸化。Dong 等^[11]研究发现, miR-34b/c 在 UM 组织中显著下调, 而阿霉素可以逆转其作用, 将 miR-34b/c 转染 UM 细胞中可以显著抑制 UM 细胞增生和转移。miR-34b/c 可以导致细胞周期 G₁ 期的停滞, 而不是诱导细胞凋亡。既往研究发现的 UM 细胞中 miR-34 下调是与正常葡萄膜黑色素细胞比较而言, 而本研究中得出的在梭形细胞型 UM 和上皮细胞型 UM 组织中 miRNA-34a/b 的上调则是与正常葡萄膜组织比较而言, 因此这 2 个研究结果不具有直接可比性。

本研究中 miRNA 差异表达谱中也存在与既往报道相反者, 比如本研究中提示 miR-146-3p/5p 和 miR-199a-5p 在梭形细胞型 UM 中明显下调, 梭形细胞型和上皮形细胞型 UM 中 miR-199a-3p 均明显下调, 而 Worley 等^[12]分析了 24 例原发性 UM 中差异 miRNA 的表达, 发现 let-7b、miR-199a、miR-199a、miR-143、

miR-193b 和 miR-652 在 UM 中上调, let-7b 和 miR-199a 的上调极为明显。

本研究中采用多个 miRNA 靶基因预测软件分别预测 UM 组织中上调和下调 miRNA 分别对应的靶基因。KEGG 通路分析结果显示, 靶基因广泛参与癌症信号通路。研究表明, JAK/STAT、MAPK 和 Wnt 信号通路参与了肿瘤的生长和转移, 而 p53 和 TGF- β 信号通路则在肿瘤凋亡、抑制肿瘤生长中发挥作用^[13], 差异表达的 miRNA 可能通过调控相关靶基因参与同肿瘤发生和发展相关信号通路而发挥网络调节作用。用不同病理类型的 UM 差异表达 miRNA 预测到的靶基因参与的信号通路不尽相同, 可能与 UM 不同病理类型的形成和功能有关, 也是针对不同病理类型肿瘤设计药物的靶点。

本研究存在的不足之处在于: (1) 收集的标本少, 容易造成信息的遗漏; (2) 本研究中采用的研究方法较简单, 采用倍数分析对基因表达情况进行简单的统计学推断方法可比性稍差; (3) 本研究中研究结果未进行免疫组织化学、Western blot 法的验证, 也未进行体外、体内研究进行验证; (4) 由于实验所有的 UM 标本均来自近 2 年内的手术患者, 现在还无法了解相关患者的预后, 也未对其生存率进行分析。进一步的研究拟改进相关研究不足, 为 UM 的诊断、治疗和预后研究提供新的思路。

参考文献

- [1] 杜蕊芳, 项晓琳, 李洋, 等. 人葡萄膜黑色素瘤组织中差异表达基因及相关代谢通路的分析[J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(11): 996-1003. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.11.008. Du KF, Xu XX, Li Y, et al. Analysis of differentially expressed genes and metabolic pathways in human uveal melanoma[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33(11): 996-1003. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.11.008.
- [2] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. Elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993, 75(5): 843-854.
- [3] Lin SY, Johnson SM, Abraham M, et al. The C elegans hunchback homolog, hbl-1, controls temporal patterning and is a probable microRNA target[J]. Dev Cell, 2003, 4(5): 639-650.
- [4] Yang C, Wei W. The miRNA expression profile of the uveal melanoma[J]. Sci China Life Sci, 2011, 54(4): 351-358. DOI:10.1007/s11427-011-4149-y.
- [5] Ragusa M, Barbagallo C, Statello L, et al. MiRNA profiling in vitreous humor, vitreal exosomes and serum from uveal melanoma patients: pathological and diagnostic implications[J]. Cancer Biol Ther, 2015, 16(9): 1387-1396. DOI:10.1080/15384047.2015.1046021.
- [6] 史传兵, 郑杰. MicroRNA 研究进展[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(6): 575-577. Shi CB, Zheng J. Progress in microRNA[J]. Chin J Cell Bio, 2004, 26(6): 575-577.
- [7] Li Z, Yu X, Shen J, et al. MicroRNA dysregulation in uveal melanoma; a new player enters the game[J]. Oncotarget, 2015, 6(7): 4562-4568. DOI:10.18632/oncotarget.2923.
- [8] Gao W, Lu X, Liu L, et al. MiRNA-21: a biomarker predictive for platinum-based adjuvant chemotherapy response in patients with non-small cell lung cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2012, 13(5): 330-340. DOI:10.4161/cbt.19073.
- [9] Farazi TA, Horlings HM, Ten HJJ, et al. MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing[J]. Cancer Res, 2011, 71(13): 4443-4453. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-11-0608.
- [10] Yan D, Zhou X, Chen X, et al. MicroRNA-34a inhibits uveal melanoma cell proliferation and migration through downregulation of c-Met[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(4): 1559-1565. DOI:10.1167/iovs.08-2681.
- [11] Dong F, Lou D. MicroRNA-34b/c suppresses uveal melanoma cell proliferation and migration through multiple targets[J]. Mol Vis, 2012, 18: 537-546.
- [12] Worley LA, Long MD, Onken MD, et al. Micro-RNAs associated with metastasis in uveal melanoma identified by multiplexed microarray profiling[J]. Melanoma Res, 2008, 18(3): 184-190. DOI:10.1097/CMR.0b013e3282feeac6.
- [13] Ashton-Beaucage D, Therrien M. How genetics has helped piece together the MAPK signaling pathway[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1487: 1-21. DOI:10.1007/978-1-4939-6424-6_1.

(收稿日期: 2016-11-25)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)

读者 · 作者 · 编者

本刊对来稿中作者署名的著录要求

作者向本刊投稿时署名应符合以下条件: (1) 参与课题的选题和实验设计, 参与实验资料的收集、分析和论证。 (2) 参与论文的起草或能够对论文中的方法学或关键部分进行修改。 (3) 能对审稿专家和编辑提出的修改意见进行核修, 能够答辩并承担责任。 仅参与筹得资金或收集资料者以及仅对科研小组进行一般管理者均不宜署名为作者。 文中如有外籍作者, 应附外籍作者亲笔签名在本刊发表的同意函。 集体署名的文章应于题名下列出署名单位, 于文末列出论文整理者的姓名, 并须明确该文的主要责任者。

作者署名的名次应按对论文贡献大小顺序排列于文题下方, 每篇论文须列出通信作者 1 名。 如无特殊约定, 则视第一作者为通信作者。 作者(包括通信作者)的署名及其排序应在投稿前由所有研究者共同讨论确定, 在编排过程中不宜变更或增减, 尤其是通信作者和前三名作者, 若确需变动者须提供所有署名作者的签名同意函并出示单位证明。 有英文文题的论著和综述应有全部作者姓名的汉语拼音, 列于英文文题之下。

(本刊编辑部)