

血浆外泌体 miR-214-3p 作为葡萄膜黑色素瘤诊断及预后评估生物标志物的研究

周文达 邵蕾 董力 史绪晗 张瑞恒 李赫妍 吴昊天 魏文斌

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 医学人工智能研究与验证工信部重点实验室, 北京
100730

通信作者: 魏文斌, Email: weiwenbintr@163.com

【摘要】 目的 探讨微小 RNA (miR)-214-3p 在不同类型葡萄膜黑色素瘤 (UM) 患者血浆外泌体中的差异性表达, 评估其是否可作为 UM 诊疗的新型分子生物标志物。方法 收集 2015 年 12 月至 2019 年 10 月于北京同仁医院行眼球摘除术并确诊为 UM 的患者 25 例, 其中原位梭形细胞型 UM 组和原位类上皮细胞型 UM 组各 10 例, 转移型 UM 组 5 例 (包括 1 例梭形细胞型 UM 患者和 4 例类上皮细胞型 UM 患者); 同期收集 10 例健康对照者作为健康对照组, 抽取所有受试者血液样本, 提取血浆外泌体, 透射电子显微镜下观察外泌体形态, 分析外泌体粒径, Western blot 法鉴定外泌体标记蛋白, 采用实时荧光定量 PCR 法测定各组患者血浆外泌体 miR-214-3p 表达水平。采用差异性检验比较 UM 患者与健康对照者和不同类型 UM 患者间血浆外泌体 miR-214-3p 的差异表达; 通过受试者工作特征 (ROC) 曲线评价血浆外泌体 miR-214-3p 对 UM 的诊断及分型效能。结果 透射电子显微镜下可见, 所提取外泌体呈一侧凹陷的半球形结构, 直径约 100 nm。囊泡粒径大小为 (82.0 ± 2.7) nm。Western blot 结果显示外泌体特异性标记蛋白 TSG101 条带均为阳性, 阴性标记蛋白 Calnexin 均呈阴性。健康对照组、原位 UM 组和转移型 UM 组血浆外泌体 miR-214-3p 相对表达量分别为 0.86 (0.57, 1.49)、0.24 (0.10, 0.67) 和 0.43 (0.23, 0.56), 原位 UM 组血浆外泌体 miR-214-3p 相对表达量较健康对照组明显降低, 差异有统计学意义 ($Z = 2.62, P < 0.01$); ROC 曲线对血浆外泌体中 miR-214-3p 的诊断效能分析显示, 血浆外泌体 miR-214-3p 的 AUC 为 0.795。转移型 UM 组血浆外泌体 miR-214-3p 相对表达量较健康对照组明显降低, 差异有统计学意义 ($Z = 2.08, P < 0.05$); 原位梭形细胞型 UM 组和原位类上皮细胞型 UM 组血浆外泌体 miR-214-3p 相对表达量分别为 0.11 (0.07, 0.64) 和 0.46 (0.14, 0.91), 2 个组间以及转移型 UM 组与原位类上皮型 UM 组间患者血浆外泌体 miR-214-3p 相对表达量比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。结论 血浆外泌体 miR-214-3p 在原位 UM 患者及转移型 UM 患者中均显著下降, 循环 miR-214-3p 具有作为 UM 诊断生物标志物的潜力, 但血浆外泌体 miR-214-3p 缺乏对 UM 分型的评估能力。

【关键词】 葡萄膜黑色素瘤; 循环微小 RNA; 生物标志物; 外泌体; 早期诊断; 预后评估

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82141128); 首都卫生发展科研专项项目 (首发 2020-1-2052); 北京市科委科技计划项目 (Z201100005520045, Z181100001818003); 北京市优秀人才项目青年骨干基金项目 (2018000021469G207); 首都医科大学附属北京同仁医院青年拔尖人才项目 (2018-YJJ-ZZL-045)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20220321-00110

Evaluation of plasma exosomal miR-214-3p as a potential biomarker for diagnosis and prognosis of uveal melanoma

Zhou Wenda, Shao Lei, Dong Li, Shi Xuhan, Zhang Ruiheng, Li Heyan, Wu Haotian, Wei Wenbin

Beijing Tongren Eye Center, Beijing Key Laboratory of Intraocular Tumor Diagnosis and Treatment, Beijing Ophthalmology & Visual Sciences Key Laboratory, Medical Artificial Intelligence Research and Verification Laboratory of the Ministry of Industry and Information Technology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China

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

【Abstract】 Objective To investigate the differential expression of microRNA (miR)-214-3p in plasma exosomes in different types of uveal melanoma (UM) and evaluate whether miR-214-3p is a potential molecular biomarker for the diagnosis and prognosis of UM. **Methods** Twenty-five UM in situ patients who received the

enucleation of eyeball were enrolled at Beijing Tongren Hospital from December 2015 to October 2019, including 10 with epithelioid cell melanoma and 10 with spindle cell melanoma as well as 5 metastatic UM patients (1 with spindle cell-like melanoma and 4 with epithelioid cell-like melanoma) and 10 healthy subjects were enrolled during the same period. Blood sample was collected from all the subjects for the isolation of plasma exosomes. The morphology of exosomes was examined under the electron microscope. The exosomal marker proteins were identified by Western blot. The expression level of miR-214-3p in plasma exosomes was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The differential expression of miR-214-3p among different types of UM patients and healthy controls was compared. The diagnostic and classification performance of exosomal miR-214-3p was evaluated using receiver operating characteristic curve. Written informed consent was obtained from each subject prior to entering the study cohort. This study protocol was approved by an Ethics Committee of Capital Medical University (No. TRECKY2018-056). **Results** The isolated exosomes were hemispherical in shape with a concavity on one side. The diameter of the exosomes was about 100 nm and the particle diameter of vesicles from samples was (82.0 ± 2.7) nm. TSG101 protein was detectable and Calnexin protein was not found in the exosomes. The relative expression levels of plasma exosomal miR-214-3p in healthy control group, in situ UM group and metastatic UM group were 0.86 (0.57, 1.49), 0.24 (0.10, 0.67), and 0.43 (0.23, 0.56), respectively. The miR-214-3p relative expression level in plasma exosomes of in situ UM patients and metastatic UM patients was significantly lower than that of healthy controls, and the differences were statistically significant ($Z = 2.62, P < 0.01$; $Z = 2.08, P < 0.05$). The relative expression levels of exosomal miR-214-3p in spindle cell-like UM group and epithelioid cell-like UM group were 0.11 (0.07, 0.64) and 0.46 (0.14, 0.91), respectively, and no significant difference was found in the expression level of plasma exosomal miR-214-3p among different types of UM (all at $P > 0.05$). The area under the curve of plasma exosomal miR-214-3p for UM diagnosis was 0.795.

Conclusions Plasma exosomal miR-214-3p level is significantly reduced in both in situ UM patients and metastatic UM patients. Plasma exosomal miR-214-3p is a new potential diagnostic biomarker for UM, but the exosomal miR-214-3p appears to not be able to distinguish the types of UM.

[Key words] Uveal melanoma; Circulating microRNA; Biomarkers; Exosomes; Early diagnosis; Prognostic evaluation

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82141128); Capital Health Research and Development of Special (2020-1-2052); Science & Technology Project of Beijing Municipal Science & Technology Commission (Z201100005520045, Z181100001818003); Beijing Outstanding Talent Project Youth Backbone Foundation (2018000021469G207); The Priming Scientific Research Foundation for the Junior Researcher in Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University (2018-YJJ-ZZL-045)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20220321-00110

葡萄膜黑色素瘤 (uveal melanoma, UM) 是成人眼内常见的恶性肿瘤, 临床工作中主要依靠有经验的眼科医生采用检眼镜联合眼部超声、头颅 MRI 等影像学检查来确诊^[1-2], 缺乏客观量化指标, 术后组织病理学检查仍然是诊断 UM 的金标准。虽然病理诊断的准确性高, 但需要摘除眼球, 对患者创伤大, 而且随着巩膜外放射敷贴等局部治疗方法的出现, 大多数患者已经不需要行眼球摘除术, 限制了病理学诊断方法的应用。因此寻找一种无创、简便并且可以量化的新型 UM 诊断指标具有重要意义。UM 有发生血源性远处转移的倾向, 即使对眼内原发病灶进行治疗, 也有超过 50% 的患者会发生全身转移^[3-4], 而已经发生转移的 UM 尚缺乏有效的治疗方法^[5], 尽早对高风险的 UM 进行治疗可能会减少转移风险^[6], 因此早期对 UM 的预后进行评估具有重要意义。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一种长度为 20~24 个核苷酸的非编码单链

小分子 RNA, 其可促进或抑制靶向 mRNA 的表达, 在大多数肿瘤的发生和发展过程中扮演重要角色^[7]。许多分泌型 miRNA 在不同类型肿瘤患者的体液中被发现, 如血浆、唾液、尿液、泪液等, 肿瘤源性的 miRNA 可以稳定存在于患者血液中, 是一种理想的生物标志物^[8]。本课题组先前的研究发现了多个有望成为 UM 诊断及预后评估生物标志物的 miRNA, 如血浆 miR-199a-3p 对 UM 诊断的效能最强, 血浆 miR-21-5p、miR-214-3p 等具有成为 UM 诊断和预后评估分子标志物的潜力^[9]。MiRNA 的分子生物学通路比较复杂, 同一 miRNA 可以拥有多个靶标, 关于 miR-21-5p 的分子生物学机制研究比较全面, 其在胃癌、肺癌和结肠癌中均发挥了促进癌症发生和发展的作用^[10-12]。目前的研究显示其在 UM 中也发挥促癌作用^[13], 其分子通路可能是抑制 p53 基因表达, 进而增加 LASP1 蛋白表达, 促进 UM 的增生与侵袭^[14]。与 miR-21-5p 不同, 除本

课题组外,目前尚无 miR-214-3p 在 UM 发生和发展中作用的研究,本课题组之前的研究显示 miR-214-3p 在 UM 肿瘤组织中显著下降^[15],血浆 miR-214-3p 在 UM 患者中也显著下降,这提示 miR-214-3p 可能在 UM 中发挥抑癌作用。但我们比较不同类型 UM 患者的血浆 miR-214-3p 水平后发现,虽然梭形细胞型 UM 和类上皮细胞型 UM 患者的血浆 miR-214-3p 水平均显著下降,但梭形细胞型 UM 患者下降更明显,这似乎又对 miR-214-3p 在 UM 中的机制提出了新的疑问。外泌体是一种直径为 40~100 nm 的细胞外囊泡,由真核细胞主动分泌,其存在于包括血浆在内的几乎所有体液中^[16-18]。本研究选择 miR-214-3p 作为候选 miRNA,测定其在 UM 患者血浆外泌体中的表达水平,拟探讨其作为 UM 生物标志物的潜力,并为其在 UM 中作用机制研究提供新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料

采用横断面研究方法,收集 2015 年 12 月至 2019 年 10 月于北京同仁医院行眼球摘除术并确诊为 UM 的患者 25 例,其中原位梭形细胞型 UM 组和原位类上皮细胞型 UM 组各 10 例,转移型 UM 组 5 例(包括 1 例梭形细胞型 UM 患者和 4 例类上皮细胞型 UM 患者);同期收集 10 名健康对照者作为健康对照组。所有健康对照者均确认无肿瘤病史及长期服用药物史。4 个组患者年龄比较差异有统计学意义($F = 3.70, P < 0.05$),其中转移型 UM 组年龄明显大于其他 3 个组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。4 个组间患者性别比例比较差异无统计学意义($P = 1.00$);原位梭形细胞型 UM 组、原位类上皮细胞型 UM 组和转移型 UM 组肿瘤直径、肿瘤高度比较差异均无统计学意义($F = 1.12, P = 0.35; F = 1.13, P = 0.34$);多数病例肿瘤均位于脉络膜,3 个组间不同部位肿瘤的眼数分布比较差异无统计学意义($P = 1.00$);3 个组肿瘤均未侵犯到巩膜外(表 1)。所有肿瘤患者及健康对照者均知晓研究目的和方法并自愿签署知情同意书,本研究方案经首都医科大学伦理委员会审查批准(批文号: TRECKY2018-056)。

表 1 各组受检者基线资料比较

Table 1 Comparison of demographic characteristics among different groups

组别	样本量	年龄 [#] ($\bar{x} \pm s$, 岁)	性别* (男/女, <i>n</i>)	肿瘤直径 [#] ($\bar{x} \pm s$, mm)	肿瘤高度 [#] ($\bar{x} \pm s$, mm)	不同部位肿瘤眼数*	
						脉络膜	睫状体
健康对照组	10	41.0 ± 5.2 ^a	5/5	-	-	-	-
原位梭形细胞型 UM 组	10	44.7 ± 4.5 ^a	5/5	10.9 ± 6.2	8.2 ± 3.3	9	1
原位类上皮细胞型 UM 组	10	40.9 ± 7.8 ^a	5/5	10.7 ± 6.8	9.4 ± 5.7	8	2
转移型 UM 组	5	52.8 ± 12.6	4/1	15.3 ± 3.7	11.7 ± 2.0	5	0
<i>F/t</i> 值		3.70	-	1.12	1.13	-	-
<i>P</i> 值		0.02	1.00	0.35	0.34	1.00	1.00

注:与转移型 UM 组比较,^a $P < 0.05$ (#:单因素方差分析,LSD-*t* 检验;* :Fisher 精确概率法) UM: 葡萄膜黑色素瘤

Note: Compared with metastatic UM group, ^a $P < 0.05$ (#: One-way ANOVA, LSD-*t* test; * : Fisher exact test) UM: uveal melanoma

1.2 方法

1.2.1 血浆标本采集及处理 UM 患者所有血液样本均在确诊后未行任何治疗时采集。抽取患者和健康对照者空腹静脉血,将血液样本置于真空管中,常温下静置 30 min,台式低速离心机(80-2 型,上海医疗器械股份有限公司)离心半径 10 cm,4 °C 下 1 200 r/min 离心 15 min,收集血浆样本置于-80 °C 保存供后续试验使用。纳入患者抽取血液样本后均于北京同仁医院行眼球摘除术,摘除眼球样本由北京同仁医院眼科病理室行组织病理学检查,明确肿瘤的组织病理学类型、位置、肿瘤高度、最大直径及局部侵袭范围。

1.2.2 血浆外泌体的提取 37 °C 速融血浆样本并移至新的离心管,用超速离心机 CP100MX(日本日立有限公司)在 4 °C 下 2 000×*g* 离心 30 min;将上清液移至新的离心管,10 000×*g* 再次离心 45 min,以去除较大囊泡,取上清,经 0.45 μm 滤膜过滤,收集过滤液。将过滤液移至新的离心管,选择超速转子,100 000×*g* 离心 70 min,去除上清,用 10 ml 预冷的 1 倍磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)重悬后,再次离心 70 min,去除上清,用 150 μl 预冷 1 倍 PBS 重悬。外泌体于-80 °C 保存。

1.2.3 透射电子显微镜下观察外泌体形态 从健康对照组、原位梭形细胞型 UM 组、原位类上皮细胞型 UM 组以及转移型 UM 组中随机抽取 1 例受试者的外泌体样本行透射电子显微镜(HT-7700 型,日本日立有限公司)观察。吸取样品 10 μl 滴加于铜网上沉淀 1 min,滤纸吸去浮液。醋酸双氧铀 10 μl 滴加于铜网上沉淀 1 min,滤纸吸去浮液。常温干燥数分钟。100 kV 进行电子显微镜检测成像。

1.2.4 外泌体粒径分析 从健康对照组、原位梭形细

胞型 UM 组、原位类上皮细胞型 UM 组以及转移型 UM 组中随机抽取 2 例受试者,取外泌体样本 10 μ l,用 PBS 稀释至 30 μ l,采用粒径分析仪 N30E(厦门福流生物科技有限公司)进行外泌体粒径分析。在外泌体样品上样前,先用标准品进行仪器性能测试,合格后上样,获得仪器检测外泌体的粒径和浓度信息。

1.2.5 Western blot 法鉴定外泌体标记蛋白 从健康对照组、原位梭形细胞型 UM 组、原位类上皮细胞型 UM 组以及转移型 UM 组中随机抽取 2 例受试者,提取外泌体蛋白,在 37 $^{\circ}$ C 中速融外泌体,并迅速加入 6 倍 RIPA 裂解液,混匀后在冰上裂解 30 min,期间混匀,BCA 法测定蛋白浓度,蛋白变性,SDS PAGE 凝胶电泳,80 V 跑胶至样品跑出浓缩胶,转 100 V 跑胶至溴酚蓝至胶底部,电泳完毕后取出电泳胶,将蛋白转印至 PVDF 膜,将膜按蛋白面朝上浸泡于质量分数 5% 脱脂牛奶 TBST 中封闭 1 h。将膜浸泡于配制好的 TSG101 (ab125011) 及 Calnexin (ab22595) 一抗溶液 [抗体稀释比例均为 1:1 000,艾博抗(上海)贸易有限公司]中,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜后在相应二抗(稀释比例 1:5 000)溶液中室温孵育约 1 h,洗膜后将 ECL 发光液滴加到膜上避光反应 5 min,采用化学发光凝胶成像系统 ChemiScope 3000mini(上海勤翔科学仪器有限公司)曝光,保存图片。

1.2.6 血浆外泌体 RNA 的提取 取各组受试者血浆外泌体于 EP 管中,加入 900 μ l 裂解液 MZA,剧烈振荡 30 s,室温放置 5 min,使核酸蛋白复合物完全分离;加入氯仿 0.2 ml,剧烈震荡 15 s,室温放置 5 min,离心半径 10 cm,12 000 r/min 离心 10 min,将水相转移至新管,加入 2 倍体积无水乙醇,混匀后加入吸附柱,静置 2 min,12 000 r/min 离心 1 min,弃废液;加 700 μ l MRD 去蛋白液于吸附柱中,静置 2 min,12 000 r/min 离心 1 min,弃废液;向吸附柱中加入 500 μ l 漂洗液 RW,静置 2 min,12 000 r/min 离心 1 min,弃废液,重复上述步骤;12 000 r/min 离心 2 min,弃掉收集管,放置吸附柱 10 min,将吸附柱中残余的漂洗液去除;将吸附柱放入新管中,向膜中央滴加 15 μ l RNase Free ddH₂O,室温放置 5 min,12 000 r/min,离心 2 min,得到 RNA。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 法检测血浆外泌体 miR-214-3p 表达水平 以 11 μ l 模板 RNA 为基础,以 U6 作为内参基因,配置 15 μ l 残存基因组 DNA 去除体系孵育后使用通用逆转录试剂盒(11141ES60)[中国翊圣生物科技(上海)股份有限公司]获取模板 cDNA,随后配置实时荧光定量 PCR 反应体系,包括实时 PCR

荧光定量试剂盒(11201ES08)[中国翊圣生物科技(上海)股份有限公司]试剂 10 μ l,引物 1 μ l,模板 cDNA 5 μ l,加无菌超纯水至 20 μ l。引物序列见表 2。使用实时荧光定量 PCR 仪 MA-6000(苏州雅睿生物技术股份有限公司),95 $^{\circ}$ C 下预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s,共 40 个循环。所有反应分样进行 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miRNAs 相对表达水平。

表 2 逆转录及实时荧光定量 PCR 引物序列
Table 2 Primer sequences for reverse transcription and real-time fluorescence quantitative PCR

引物	引物序列
逆转录	
miR-214-3p	5'-GTCGTATCCAGTGCCTGTCGTGGAGTCGGC AATTGCACTGGATACGACACTGCCTG-3'
U6	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
实时荧光定量 PCR	
miR-214-3p	正向:5'-ACAGCAGGCACAGACAGG-3' 反向:5'-CAGTGCCTGTCGTGGAGT-3'
U6	正向:5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3' 反向:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

注:PCR:聚合酶链式反应;miR:微小 RNA

Note:PCR:polymerase chain reaction;miR:microRNA

1.3 统计学方法

采用 IBM SPSS 25 统计学软件对数据进行统计分析。计量资料数据采用 Shapiro-wilk 法进行正态分布检验,满足或接近正态分布的数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间总体差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验;呈偏态分布的计量资料数据以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示,各组间总体差异比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验,组间两两比较采用 Mann-Whitney *U* 检验;计数资料以频数和百分比表示,组间评估指标差异比较采用 Fisher 精确概率法。采用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线评估循环 miRNA 诊断和鉴别的特异性与敏感性,采用血浆外泌体 miR-214-3p 相对表达水平评估对 UM 诊断的 ROC 曲线及不同病理类型 UM 鉴别的 ROC 曲线。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆外泌体的鉴定

透射电子显微镜观察结果显示,所提取外泌体外形呈一侧凹陷的半球形结构,直径约 100 nm。所有样本的囊泡粒径分布符合外泌体粒径范围,所有样本平均粒径大小为 (82.0 ± 2.7) nm。Western blot 结果显示,外泌体特异性标记蛋白 TSG101 条带均为阳性,阴性标记蛋白 Calnexin 均呈阴性(图 1)。

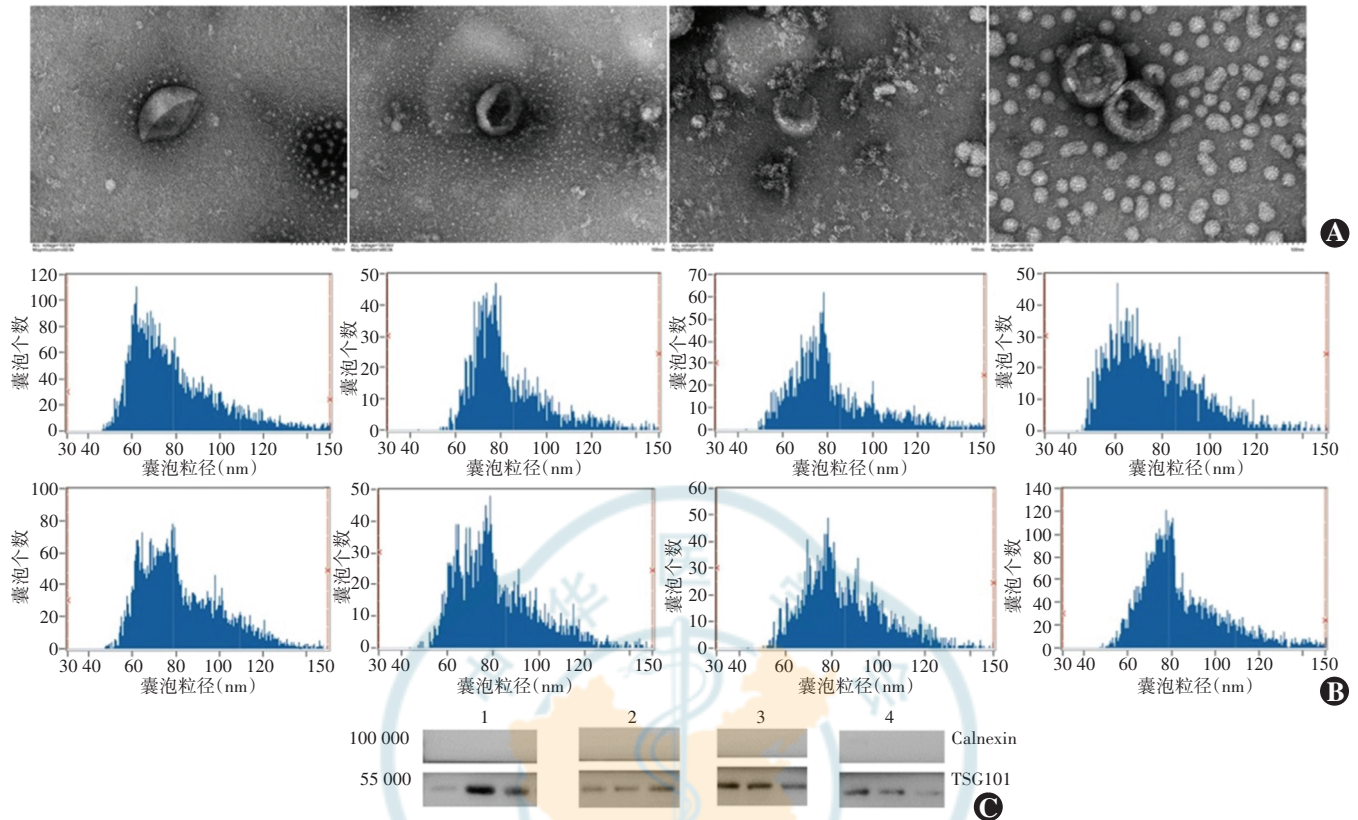


图 1 血浆外泌体的鉴定 A:透射电子显微镜观察($\times 60\ 000$,标尺=100 nm) 可见 4 个样本囊泡形态均完整,呈一侧凹陷的半球形外观,直径约 100 nm B:粒径分析 8 个样本囊泡的平均粒径均在 79~84 nm C:Western blot 检测 所有样本中外泌体标志蛋白 TSG101 显示条带,外泌体阴性标志蛋白 Calnexin 均未显示条带 1:健康对照组;2:原位梭形细胞型 UM 组;3:原位类上皮细胞型 UM 组;4:转移型 UM 组

Figure 1 Identification of plasma exosomes A:Electron microscopy images ($\times 60\ 000$,bar=100 nm) The vesicle morphology of four samples was integrated,hemispherical,with a concavity and had a diameter of 100 nm B:Particle diameter analysis result Vesicles of eight selected samples had a diameter from 79 to 84 nm C:Western blot result Exosomal marker protein TSG101 was detected in all samples and non-exosomal marker Calnexin was not detected 1:healthy control group;2:in situ spindle cell-like UM group;3:in situ epithelioid cell-like UM group;4:metastatic UM group

2.2 各组血浆外泌体 miR-214-3p 相对表达量比较

健康对照组、原位梭形细胞型 UM 组、原位类上皮细胞型 UM 组和转移型 UM 组血浆外泌体 miR-214-3p 相对表达量总体比较,差异有统计学意义($H=9.93, P=0.02$),其中健康对照组 miR-214-3p 相对表达量均高于其他 3 个组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(表 3)。

表 3 各组血浆外泌体 miR-214-3p 相对表达量比较 $[M(Q_1, Q_3)]$
Table 3 Comparison of the relative expression level of plasma exosome miR-214-3p among different groups $(M[Q_1, Q_3])$

组别	样本量	miR-214-3p 相对表达量
健康对照组	10	0.86(0.57,1.49)
原位梭形细胞型 UM 组	10	0.11(0.07,0.64) ^a
原位类上皮细胞型 UM 组	10	0.46(0.14,0.91) ^a
转移型 UM 组	5	0.43(0.23,0.56) ^a
H 值		9.93
P 值		0.02

注:与健康对照组比较,^a $P<0.05$ (Kruskal-Wallis H 检验, Mann-Whitney U 检验) miR:微小 RNA;UM:葡萄膜黑色素瘤

Note: Compared with healthy control group,^a $P<0.05$ (Kruskal-Wallis H test, Mann-Whitney U test) miR:microRNA;UM:uveal melanoma

2.2.1 血浆外泌体 miR-214-3p 对 UM 的诊断效能

原位 UM 组(包括原位梭形细胞型 UM 组和原位类上皮细胞型 UM 组患者)血浆外泌体中 miR-214-3p 相对表达水平为 0.24(0.10,0.67),较健康对照组的 0.86(0.57,1.49)明显降低,差异有统计学意义($Z=2.62, P<0.01$)。使用 ROC 曲线对血浆外泌体 miR-214-3p 的诊断效能进一步分析,结果显示血浆外泌体 miR-214-3p 的 AUC 为 0.795(图 2)。进一步比较结果显示,转移型 UM 组血浆外泌体 miR-214-3p 的相对表达量明显低于健康对照组,差异有统计学意义($Z=2.08, P<0.05$)。

2.2.2 血浆外泌体 miR-214-3p 对 UM 的预后评估效能

原位梭形细胞型 UM 组和原位类上皮细胞型 UM 组血浆外泌体 miR-214-3p 的相对表达量差异无统计学意义($Z=1.66, P=0.09$)。进一步对比转移型 UM 组和原位类上皮细胞型 UM 组血浆外泌体 miR-214-3p 表达水平,结果显示 2 个组间差异亦无统计学意义($Z=0.84, P=0.80$)。

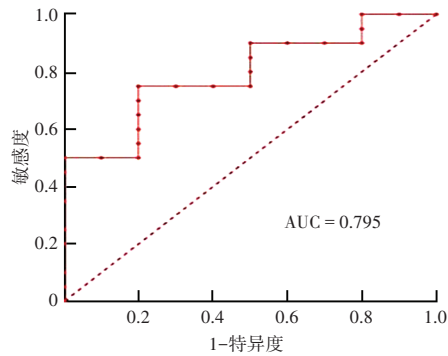


图 2 ROC 曲线评估血浆外泌体 miR-214-3p 对 UM 的诊断效能
AUC: 曲线下面积

Figure 2 Result of ROC analysis of plasma exosome miR-214-3p
AUC: area under the curve

3 讨论

MiRNA 作为一种非编码 RNA, 通过负向调节特定 mRNA 来发挥生物学作用, 参与多种细胞功能的调节, 与包括癌症在内的多种疾病的发生和发展有关^[19]。MiRNA 除了存在于细胞质中, 还分布于包括血液在内的所有体液中, 这种存在于血液中的 miRNA 称为循环 miRNA, 其能够稳定存在于血浆中, 是一种极具潜力的生物标志物^[20]。循环 miRNA 存在的形式主要包括与蛋白结合形成核酸蛋白复合物, 与脂蛋白结合形成脂蛋白核酸复合物以及存在于以外泌体为代表的细胞外囊泡中^[21-23]。外泌体中的 miRNA 由囊膜包裹, 可以稳定存在于血液中, 避免被核酸酶分解, 有望成为一种新型、无创、可以量化的肿瘤生物标志物。此外, 外泌体由肿瘤细胞主动分泌并分泌, 参与细胞间信息传导, 影响肿瘤细胞生长微环境, 对肿瘤的发生和发展起到重要作用^[18]。研究外泌体 miRNA 的差异表达对肿瘤分子生物机制研究同样有重要价值。

在先前的研究中, miR-214-3p 含量在梭形细胞型和原位类上皮细胞型 UM 肿瘤组织中较正常葡萄膜组织均显著下降, 但在不同类型的 UM 肿瘤组织间无显著差异^[15]。但 miR-214-3p 在 UM 患者的血浆中显著下降, 其对 UM 的诊断效能为 0.775, 原位梭形细胞型 UM 患者血浆中 miR-214-3p 下降较原位类上皮细胞型 UM 患者更加明显, 血浆 miR-214-3p 对 UM 病理类型的鉴别效能可达 0.930^[9]。本研究基于课题组先前的研究, 选定 miR-214-3p 作为候选 miRNA, 进一步验证了其在血浆外泌体中的表达水平。

本研究结果显示, miR-214-3p 在 UM 患者的血浆外泌体中显著下降, 而且血浆外泌体 miR-214-3p 的诊断效能高于血浆 miR-214-3p, 这与我们先前的研究结果相符^[9]。相比于血浆 miRNA, 外泌体 miRNA 能够

更好地抵抗核酸酶的分解, 稳定性更强, 此外由于其为细胞主动分泌, 可以防止来自人体其他细胞裂解过程中被动进入循环的 miRNA 混淆。因此, 外泌体 miRNA 是一种更加理想的生物标志物。本研究也证实了外泌体 miR-214-3p 具有更好的诊断效能, 为循环 miR-214-3p 在 UM 临床诊断上的应用提供了基础。

UM 的组织病理学主要分为梭形细胞型、混合细胞型及类上皮细胞型 3 种, 本研究根据病理类型分组, 分为预后较好的梭形细胞型 UM 及预后较差的类上皮细胞型 UM, 探讨了外泌体 miR-214-3p 与预后的关系。

本课题组先前的研究显示, 血浆 miR-214-3p 在类上皮细胞型 UM 患者中表达水平显著高于梭形细胞型 UM 患者^[9]。有研究认为, 在细胞中起到抑癌作用的 miRNA 会被选择性地分泌到肿瘤细胞外, 以抑制肿瘤细胞增生^[24]。基于 miR-214-3p 在多种肿瘤的发生和发展过程中起到抑癌作用^[25-26], 推测类上皮细胞型 UM 细胞主动分泌 miR-214-3p 的能力强于梭形细胞型 UM 细胞, 从而抑制肿瘤细胞的增生发育。本研究结果显示, 外泌体 miR-214-3p 的表达水平在 2 种不同病理类型 UM 患者的血液中差异无统计学意义, 这一结果与本课题组先前在肿瘤组织中的验证结果一致, 即不同病理类型间 miR-214-3p 的表达水平无明显差异。实际上循环 miRNA 的主要来源是血细胞, 而且在肿瘤患者的血液中, 免疫系统来源的 miRNA 也占很大比例, 其不一定完全反映肿瘤组织 miRNA 的表达水平^[24], 但外泌体由细胞主动分泌, 理论上其特异性要高于血浆 miRNA^[27]。同一 miRNA 作用的靶标 mRNA 通常有上百个, miR-214-3p 不仅参与肿瘤的发生和发展, 也参与炎症等其他病理生理过程^[28-29], 血浆 miRNA 中的差异可能是由于其他细胞来源的 miR-214-3p 干扰导致, 循环 miR-214-3p 与 UM 预后可能无关。本研究结果显示, 转移型 UM 患者的血浆外泌体 miR-21-5p 表达水平较正常对照组显著下降, 但与原位类上皮细胞型 UM 间差异无统计学意义。再次证明循环外泌体 miR-21-5p 可能对 UM 患者的预后缺乏评估能力。需要明确的是, 除了外泌体 miRNA, 细胞也能主动分泌以蛋白核酸复合物和脂蛋白核酸复合物形式存在的 miRNA, 参与生理病理过程的调节^[21-22], 本研究结果并不能完全否定血浆 miR-214-3p 对 UM 预后的评估能力。

本研究测定了不同病理类型 UM 患者的循环 miR-214-3p 表达水平, 发现其具有成为 UM 早期诊断分子生物学标志物的潜力, 但其对 UM 的预后评估能力仍需进一步验证。此外, 循环 miRNA 作为重要的

细胞间通讯手段,对于 UM 发生和发展机制的研究也具有重要意义。现已经发现 miR-214-3p 在多种肿瘤中具有抑癌作用,但也有研究发现其可促进肿瘤的进展^[25-26,30-32]。基于本研究结果,miR-214-3p 可能在 UM 中发挥抑癌作用,其在肿瘤细胞内及细胞外的降低可能是 UM 发生的机制之一,这也为 UM 的治疗提供了潜在的靶点。本研究主要收集患者的血浆样本,未对患者预后进行长期随访,有限的随访时间内无患者出现终点事件,无法进一步进行生存分析。此外,未对患者治疗后的循环 miR-214-3p 表达水平进一步分析,且纳入样本量相对较小,未来仍需要在多样本、多中心、包含不同种族的队列中进一步研究验证循环 miR-214-3p 对 UM 诊断及预后的评估能力。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 周文达:直接参与选题、酝酿和设计试验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草文章;邵蕾、董力:直接参与选题、酝酿和设计试验、实施研究、采集数据、分析/解释数据;史绪哈、张瑞恒、李赫妍、吴昊天:实施研究、采集数据、分析/解释数据;魏文斌:直接参与选题、酝酿和设计试验、对文章知识性内容的审阅和智力性内容的修改及定稿

参考文献

- Fallico M, Raciti G, Longo A, et al. Current molecular and clinical insights into uveal melanoma (review) [J/OL]. *Int J Oncol*, 2021, 58(4): 10 [2022-03-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33649778/>. DOI:10.3892/ijo.2021.5190.
- Foti PV, Travali M, Farina R, et al. Diagnostic methods and therapeutic options of uveal melanoma with emphasis on MR imaging-Part I: MR imaging with pathologic correlation and technical considerations [J/OL]. *Insights Imaging*, 2021, 12(1): 66 [2022-03-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34080069/>. DOI:10.1186/s13244-021-01000-x.
- Kujala E, Mäkitie T, Kivelä T. Very long-term prognosis of patients with malignant uveal melanoma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(11): 4651-4659. DOI:10.1167/iov.03-0538.
- Jensen OA. Malignant melanomas of the human uvea; 25-year follow-up of cases in Denmark, 1943-1952 [J]. *Acta Ophthalmol (Copenh)*, 1982, 60(2): 161-82. DOI:10.1111/j.1755-3768.1982.tb08371.x.
- Branisteau DC, Bogdanici CM, Branisteau DE, et al. Uveal melanoma diagnosis and current treatment options (review) [J/OL]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(6): 1428 [2022-03-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34707709/>. DOI:10.3892/etm.2021.10863.
- Damato B. Ocular treatment of choroidal melanoma in relation to the prevention of metastatic death—a personal view [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2018, 66: 187-199. DOI:10.1016/j.preteyeres.2018.03.004.
- Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(11): 857-866. DOI:10.1038/nrc1997.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(30): 10513-10518 [2022-03-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18663219/>. DOI:10.1073/pnas.0804549105.
- Zhou WD, Shao L, Dong L, et al. Circulating microRNAs as quantitative biomarkers for diagnosis and prognosis of uveal melanoma [J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 854253 [2022-03-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35433428/>. DOI:10.3389/fonc.2022.854253.
- Li Q, Li B, Li Q, et al. Exosomal miR-21-5p derived from gastric cancer promotes peritoneal metastasis via mesothelial-to-mesenchymal transition [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(9): 854 [2022-03-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30154401/>. DOI:10.1038/s41419-018-0928-8.
- Ren W, Hou J, Yang C, et al. Extracellular vesicles secreted by hypoxia pre-challenged mesenchymal stem cells promote non-small cell lung cancer cell growth and mobility as well as macrophage M2 polarization via miR-21-5p delivery [J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 62 [2022-03-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30736829/>. DOI:10.1186/s13046-019-1027-0.
- Jin XH, Lu S, Wang AF. Expression and clinical significance of miR-4516 and miR-21-5p in serum of patients with colorectal cancer [J/OL]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 241 [2022-03-04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32293319/>. DOI:10.1186/s12885-020-06715-6.
- Smit KN, Chang J, Derks K, et al. Aberrant microRNA expression and its implications for uveal melanoma metastasis [J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(6): 815 [2022-03-04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31212861/>. DOI:10.3390/cancers11060815.
- Wang YC, Yang X, Wei WB, et al. Role of microRNA-21 in uveal melanoma cell invasion and metastasis by regulating p53 and its downstream protein [J]. *Int J Ophthalmol*, 2018, 11(8): 1258-1268. DOI:10.18240/ijo.2018.08.03.
- 刘忆南, 邵蕾. 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 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2017, 35(9): 778-785. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.09.003.
- Liu YN, Shao L. Differential expression profile of microRNAs in different types of uveal melanoma [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2017, 35(9): 778-785. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.09.003.
- Simons M, Raposo G. Exosomes—vesicular carriers for intercellular communication [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(4): 575-581. DOI:10.1016/j.ceb.2009.03.007.
- Zhang J, Li S, Li L, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2015, 13(1): 17-24. DOI:10.1016/j.gpb.2015.02.001.
- Bhagirath D, Yang TL, Bucay N, et al. microRNA-1246 is an exosomal biomarker for aggressive prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(7): 1833-1844. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-17-2069.
- Xi Y, Nakajima G, Gavin E, et al. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples [J]. *RNA*, 2007, 13(10): 1668-1674. DOI:10.1261/ma.642907.
- Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, et al. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011, 8(8): 467-477. DOI:10.1038/nrc10nc.2011.76.
- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(12): 5003-5008. DOI:10.1073/pnas.1019055108.
- Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, et al. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(4): 423-433. DOI:10.1038/ncb2210.
- Valihrach L, Androvic P, Kubista M. Circulating miRNA analysis for cancer diagnostics and therapy [J/OL]. *Mol Aspects Med*, 2020, 72: 100825 [2022-03-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31635843/>. DOI:10.1016/j.mam.2019.10.002.
- Ragusa M, Barbagallo C, Ciriigliaro M, et al. Asymmetric RNA distribution among cells and their secreted exosomes; biomedical meaning and considerations on diagnostic applications [J/OL]. *Front Mol Biosci*, 2017, 4: 66 [2022-03-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29046875/>. DOI:10.3389/fmolb.2017.00066.
- Fang YY, Tan MR, Zhou J, et al. miR-214-3p inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of endometrial cancer cells by targeting TWIST1 [J]. *Oncotargets Ther*, 2019, 12: 9449-9458. DOI:10.2147/OTT.S181037.
- Zhou Z, Wu L, Liu Z, et al. MicroRNA-214-3p targets the PLAGL2-MYH9 axis to suppress tumor proliferation and metastasis in human colorectal cancer [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(10): 9633-9657. DOI:10.18632/aging.103233.
- Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(8): 569-579. DOI:10.1038/nri855.
- Zhao J, Wang F, Tian Q, et al. Involvement of miR-214-3p/FOXM1 axis during the progression of psoriasis [J]. *Inflammation*, 2022, 45(1): 267-278. DOI:10.1007/s10753-021-01544-6.



- [29] Li D, Liu J, Guo B, et al. Osteoclast-derived exosomal miR-214-3p inhibits osteoblastic bone formation [J/OL]. Nat Commun, 2016, 7: 10872 [2022-03-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26947250/>. DOI:10.1038/ncomms10872.
- [30] Tao W, Cao C, Ren G, et al. Circular RNA circCPA4 promotes tumorigenesis by regulating miR-214-3p/TGIF2 in lung cancer [J]. Thorac Cancer, 2021, 12(24): 3356-3369. DOI:10.1111/1759-7714.14210.
- [31] Cagle P, Smith N, Adekoya TO, et al. Knockdown of microRNA-214-3p promotes tumor growth and epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer [J/OL]. Cancers (Basel), 2021, 13(23): 5875 [2022-03-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34884984/>. DOI:10.3390/cancers13235875.
- [32] Hu S, Chang J, Ruan H, et al. Cantharidin inhibits osteosarcoma proliferation and metastasis by directly targeting miR-214-3p/DKK3 axis to inactivate β -catenin nuclear translocation and LEF1 translation [J]. Int J Biol Sci, 2021, 17(10): 2504-2522. DOI:10.7150/ijbs.51638.

(收稿日期:2022-03-21 修回日期:2022-07-07)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

· 临床经验 ·

青少年 FEVR 并发孔源性视网膜脱离裂孔特征与手术治疗

李翔 郭浩轶 李蕴随 王志立 郭希让

河南省人民医院眼科 河南省立眼科医院 河南省眼科研究所, 郑州 450003

通信作者:郭浩轶, Email:haoyiguo2000@aliyun.com

Surgical strategies based on characteristics of retinal breaks in juvenile familial exudative vitreoretinopathy-associated rhegmatogenous retinal detachment

Li Xiang, Guo Haoyi, Li Yunsui, Wang Zhili, Guo Xirang

Department of Ophthalmology, Henan Provincial People's Hospital, Henan Eye Hospital, Henan Eye Institute, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Guo Haoyi, Email:haoyiguo2000@aliyun.com

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200706-00479

家族性渗出性玻璃体视网膜病变 (familial exudative vitreoretinopathy, FEVR) 是一种常染色体显性遗传病, 典型表现为周边视网膜血管分化异常、伴周边无血管区以及局部纤维组织增生, 进而牵拉形成视网膜皱襞。FEVR 活动期视网膜常出现新生血管、水肿及渗出, 严重者可并发玻璃体积血、视网膜脱离等。FEVR 并发孔源性视网膜脱离 (rhegmatogenous retinal detachment, RRD) 是青少年视网膜脱离常见病因之一。基于 FEVR 病变表现的多样性, 视网膜裂孔的发生及进展对手术治疗效果带来较大影响, 本研究拟分析青少年 FEVR 并发 RRD 时视网膜裂孔性状与视网膜脱离复位术疗效间的关系, 为临床上 FEVR 并发 RRD 患者的手术选择及预后评估提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采用系列病例观察研究, 收集 2017 年 1 月至 2019 年 1 月在河南省立眼科医院诊断为 FEVR 并发 RRD 的患者 29 例 31 眼。所有患者均足月顺产, 无吸氧史、手术史、外伤史、系统性疾病或其他眼部疾病史, 均否认家族史。29 例患者中男 20 例 22 眼, 女 9 例 9 眼; 单眼患病 27 例, 双眼患病 2 例; 初诊时年龄 12~33 岁, 中位年龄 21.5 岁; 患眼视力下降 2~8 周, 术眼屈光度为 -3.0~-8.0 D。患者均行最佳矫正视力、眼压、眼部超声、全景眼底照相及荧光素眼底血管造影 (fluorescein fundus angiography, FFA) 检查。FEVR 诊断参照文献 [1] 中的标准, 依据 Pendergast 分期 [2] 对 FEVR 病变程度、视网膜脱离范围进行分期, 其中 3B 期为次全视网膜脱离, 未累及黄斑, 牵引为主, 占 41.9% (13/31); 4B 期为次全视网膜脱离, 累及黄斑中心凹, 牵引为主, 占 58.1% (18/31)。本研究经河南省

立眼科医院伦理委员会审核批准 [批文号: HNEECKY-2020 (24)], 研究过程遵循《赫尔辛基宣言》, 纳入研究前患者均知晓本研究目的和方法, 并自愿签署知情同意书。

1.2 手术治疗及随访 (1) 巩膜外扣带或环扎术 手术指征为视网膜萎缩性或牵拉性裂孔位于视网膜周边部。视网膜无血管区和/或裂孔在 2 个象限以内行巩膜外垫压术, 超过 2 个象限行巩膜外环扎术。术中确定裂孔位置并予以巩膜外冷冻, 巩膜穿刺放出视网膜下液, 巩膜嵴尽可能覆盖全部无血管区。(2) 玻璃体切割术 手术指征为视网膜牵拉性裂孔位于视网膜中周部。术中诱导玻璃体后脱离后, 彻底清除玻璃体及视网膜前膜, 松解裂孔周围牵引, 对裂孔行激光或冷冻治疗并填充硅油。(3) 玻璃体切割联合巩膜环扎术 手术指征为视网膜牵拉性裂孔位于眼底中周部, 并伴有视网膜皱襞形成、黄斑移位。术中只解除裂孔周围牵引, 不强求彻底清除周边视网膜无血管区表面的玻璃体, 避免形成医源性裂孔。完成玻璃体手术后, 行巩膜外环扎术以松解视网膜牵引。患者术后每 1~2 个月复诊 1 次, 随访时间 ≥ 6 个月, 观察指标包括最佳矫正视力、眼压、视网膜复位情况, 以末次随访 (术后 12 个月或术眼出现视网膜脱离复发) 时视网膜复位情况作为主要评价指标来评估手术效果。

2 结果

2.1 视网膜裂孔检出情况及分布 FEVR 并发 RRD 的 31 眼中, 萎缩型裂孔 11 眼, 占 35.5%, 裂孔呈圆形, 边缘锐利清晰; 牵拉性裂孔 20 眼, 占 64.5%, 裂孔呈梭形缝隙状, 边缘欠清晰 (图 1)。29 眼裂孔位于颞侧, 2 眼裂孔位于鼻上象限。11 眼裂孔位于 FEVR 视网膜无血管区, 9 眼为萎缩性裂孔; 20 眼裂