

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

杜葵芳 项晓琳 李洋 王盈之 魏文斌

【摘要】 **背景** 人葡萄膜黑色素瘤(UM)组织与正常组织中存在差异表达基因,但国外不同文献报道的结果不尽一致,而国内对人 UM 基因表达的改变及其相关的作用通路的研究较少。**目的** 应用基因芯片技术探讨人 UM 中差异表达的基因,分析差异基因参与的重要信号通路。**方法** 收集在北京同仁医院因原发性 UM 行眼球摘除并经组织病理学证实为梭形细胞型 UM 的组织标本 4 例,以正常供体葡萄膜组织作为对照组。利用 Human Genome U133 Plus 2.0 芯片技术筛查 2 种组织中基因表达的差异,并使用 GOEAST 富集分析软件对差异基因的重要生物学功能及参与的通路进行分析。**结果** 与正常的葡萄膜组织对比,人 UM 中有 4 165 个差异基因,占 12.50%,其中包含 1 236 个上调基因和 2 929 个下调基因,分别占 3.71% 和 8.79%。人 UM 组织中上调 5 倍或以上基因为 113 个,下调 50% 的基因为 1 053 个;上调 10 倍或以上的基因为 21 个,下调 90% 或以上的基因为 422 个;上调 50 倍或以上的基因为 1 个,下调 98% 或以上的基因为 33 个;上调 100 倍或以上的基因为 1 个,下调 99% 或以上的基因为 5 个。按功能学分类表明,差异表达基因中包括细胞分化与增生基因、发育相关基因、细胞黏附相关基因、免疫应答基因、调节转录基因、信号转导相关基因、凋亡以及抗凋亡相关基因等;差异表达基因参与的代谢通路涉及血管形成过程的代谢通路、细胞周期相关的蛋白激酶通路以及 B 淋巴细胞或 T 淋巴细胞的代谢通路等。**结论** 人 UM 组织与正常人葡萄膜组织中基因表达谱明显不同,这些差异表达的基因除参与血管生成、激酶通路等已知的 UM 发育有关的代谢通路外,还涉及免疫系统的变化。人 UM 的发生和进展是多种基因、多种通路共同作用的结果。

【关键词】 黑色素瘤/基因; 葡萄膜肿瘤; 基因表达谱; 肿瘤基因表达调控; 基因组学/方法; 聚类分析; 表达谱芯片; 人

Analysis of differentially expressed genes and metabolic pathways in human uveal melanoma Du Kuifang, Xu Xiaolin, Li Yang, Wang Yingzhi, Wei Wenbin. Department of Ophthalmology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: Wei Wenbin, Email: tr-weiben@163.com

[Abstract] **Background** Studies showed that there exists differential gene expression in human uveal melanoma (UM). However, the researching results are somewhat inconsistently abroad, while relevant literature is still less in China. Few domestic researches have reported the abnormalities of gene transcription level or the pathways of these genes. **Objective** This study was to compare the gene expression profiles between human UM and normal uvea tissues and analyze the metabolic pathways involved in these differentially expressed genes. **Methods** Four human UM samples were collected in Beijing Tongren Eye Center, and 4 pieces of normal uveal tissues from 4 donors served as controls. The expression of genes was detected with Human Genome U133 Plus 2.0 chip, and the expression profiles were compared between two groups. The biological functions and active pathways of the genes were analyzed by Gene Ontology Enrichment Analysis Software Toolkit (GOEAST). **Results** Compared with the normal controls, 4 165 differential genes were screened in human UM (12.50%), including 1 236 up-regulated genes (3.71%) and 2 929 down-regulated genes (8.79%), in which the genes of raised more than 5-, 10-, 50- and 100-fold were 113, 21, 1 and 1, respectively, and the genes of reduced by 50%, 90%, 98% and 99% were 1 053, 422, 33 and 5, respectively. The functions of these differentially expressed genes were associated with cellular differentiation and growth, development, cell adhesion, immun response, transcriptional control, signal transduction and anti-apoptosis. The metabolic pathways of differentially expressed genes included angiogenesis pathway, cell-cycle related protein kinase pathway and immune regulatory pathway (involving B lymphocytes and T lymphocytes). **Conclusions**

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.11.008

基金项目:国家自然科学基金项目(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);北京市医院管理局临床医学发展专项经费项目(ZYLX201307)

作者单位:100069 北京,首都医科大学附属北京同仁医院眼科(杜葵芳,现在北京佑安医院眼科);100730 北京,首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 北京市眼科学与视觉科学重点实验室(项晓琳、李洋、王盈之、魏文斌)

通信作者:魏文斌,Email:tr-weiben@163.com

Gene expression profiles are evidently different between human UM and normal uveal tissue. The variation of the gene profiles in human UM leads to the changes of multiple biological functions including angiogenesis and kinase pathway even immun system. It is implied that the pathogenesis of human UM is a comprehensive effect of multiple genes and biological pathways.

[Key words] Melanoma/genetics; Uveal neoplasms; Gene expression profile; Gene expression regulation, neoplastic; Genomics/methods; Cluster analysis; Expression profiling microarray; Humans

葡萄膜黑色素瘤 (uveal melanoma, UM) 是成人常见的原发性眼内恶性肿瘤。UM 主要见于脉络膜组织, 少部分见于虹膜和睫状体组织, 肿瘤细胞来源于原发组织的黑色素细胞, 好发于 50 ~ 80 岁人群^[1], 其恶性程度高, 易发生转移, 主要致死原因是肝脏转移。一项美国的随访研究发现, UM 的发病率在 1973—2008 年无明显改变, 放射治疗或其他保留眼球的疗法逐渐成为主要手段, 但患者的 5 年生存率并无明显改善, 提示 UM 的预后与治疗方法无关^[2]。近年来随着分子生物学的迅速发展, 已经发现在 UM 组织中有较多的突变基因, 包括癌基因 (如 *GANQ*、*BRAF*^[3-5])、抑癌基因 (如 *BAP1*^[6]) 和肿瘤转移抑制基因 (如 *LZTS1*^[7]) 等, 但是这些基因的突变是否引起其他基因表达变化还不清楚。研究者根据原发性 UM 基因表达谱的差异将原发性 UM 分为低风险转移型 (1 型) 和高风险转移型 (2 型)^[8], 进一步研究证实 UM 瘤体底部、顶部及周边的基因表达谱无明显异质性, 并从基因表达谱中选出少数显著差异基因及稳定的正常基因, 研发基于 PCR 技术的 15 个基因集合检测, 以准确将肿瘤组织进行分型及预后评估^[9], 但其使用的芯片是以往由美国 Affymetrix 公司制作的较老版本。本研究中利用美国 Affymetrix 公司最新的 Human Genome U133 Plus 2.0 基因表达谱芯片, 以正常脉络膜组织为对照, 对 UM 的基因表达谱进行研究, 筛选相关差异基因, 并采用基因本体学 (gene ontology, GO) 分析对基因组或转录组数据进行大规模的功能研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源及处理 收集在北京同仁医院因原发性 UM 行眼球摘除并经组织病理学证实为梭形细胞型 UM 的组织标本 4 例以及死于其他原因的供体脉络膜组织标本 4 例。所得标本平均分为 2 份, 一份保存于甲醛固定液中, 石蜡切片, 采用苏木精-伊红染色和免疫组织化学染色以明确组织性质; 另一份立即保存于液氮中, 然后转至 -80 °C 冰箱内保存。

1.1.2 芯片选择 Human Genome U133 Plus 2.0 芯片操作及信息处理系统 (美国 Affymetrix 公司)。

1.2 方法

Affymetrix mRNA 表达谱芯片的检测以待检测样品的总 RNA 为起始, 进行体外扩增和生物素标记, 标记过程采用 Ambion #1792 cRNA 扩增标记试剂盒 (图 1)。

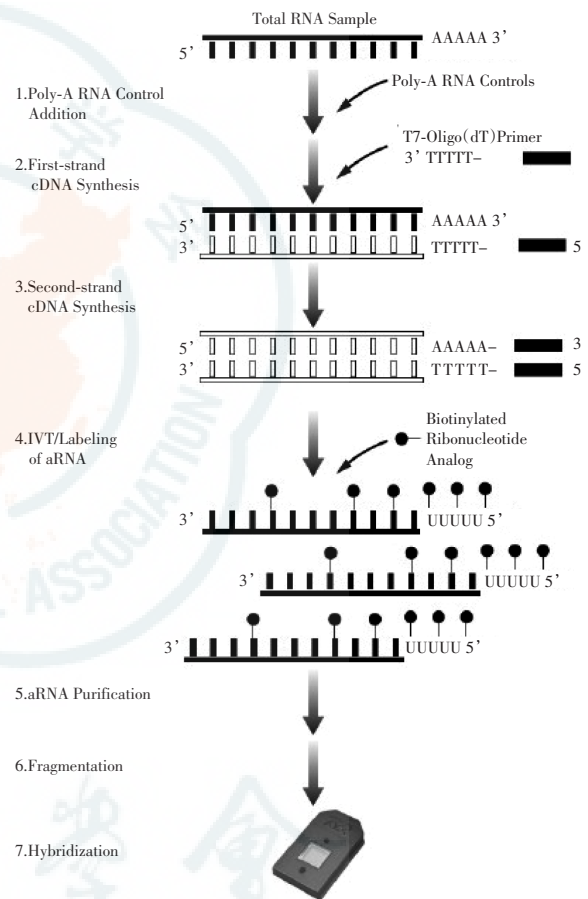


图 1 实验流程示意图

1.2.1 RNA 的提取 对每份样品单独进行 RNA 提取, 采用 mirVanamiRNA Isolation Kit (美国 Ambion 公司) 提取并纯化, 然后用分光光度计进行定量, 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。所抽提的总 RNA 经分光光度计检测波长为 260、280 和 230 nm 处的吸光度 (A) 值, 确定样品浓度和总量。运用甲醛变性胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.2.2 RNA 的标记 经检测合格后的总 RNA, 先后采用 First-Strand cDNA Synthesis 和 Second-Strand cDNA Synthesis 逆转录合成双链 cDNA, 然后利用配制的 IVT Master Mix 将双链 cDNA 进行体外转录合成生

物素标记的 aRNA 探针。将 aRNA 产物进行纯化、质量检测 and 片段化。

1.2.3 芯片的杂交、清洗、染色和扫描 将芯片拿出,平衡至室温。采用 Pre-Hybridization Mix 对芯片预杂交 10 min,条件为 45 °C,转速为 60 r/min。配制杂交液,将其置于恒温金属浴上,99 °C 温育 5 min,然后 45 °C 温育 5 min。从恒温金属浴上取出杂交液后,利用微型离心机除去杂交混合液中的不溶性物质。从杂交炉中取出芯片,吸出 Pre-Hybridization Mix,然后注入相应的杂交液。将芯片放置于杂交炉中,45 °C、60 r/min 旋转杂交 16 h。杂交结束后吸除杂交液,注入相应容积的清洗缓冲液 A。使用 AGCC 软件 (Affymetrix® GeneChip® Command Console® Software) 把杂交好的芯片进行清洗、染色,然后进行芯片扫描。

1.2.4 数据提取及分析 将芯片的荧光扫描图像保存成 DAT 文件。使用 AGCC 软件将 DAT 文件从图像信号转化为数字信号,即 CEL 文件,并记录探针水平的荧光信号强度。利用 RMA 算法进行数据预处理,包括背景校正、将探针信号整合为探针组信号和片断归一化去除非生物学因素带来的样本间变异。差异表达基因分析:本实验设计为 4 次生物学重复,采用芯片显著性分析 (significance analysis of microarray, SAM) R 程序包根据统计学 *t* 检验分析差异基因的显著性。将 4 例梭形细胞型 UM 组织各生物标志物 mRNA 表达量分别与正常组进行对比后的结果进行叠加,差异基因筛选的主要参数是 *q*-value 和 Fold Change, *q*-value (%) 为该基因被判断差异表达基因时的错误发现率,类似于 *p*-value,差异越显著, *q*-value (%) 越小; Fold Change 指信号差异倍数。归一化后的表达差异倍数大于 2 倍或小于二分之一选为显著差异表达的基因,用于后续的生物信息学分析。

1.2.5 生物信息学分析 包括对正常脉络膜组织与梭形细胞型 UM 组织间表达差异基因的聚类分析和代谢通路分析。聚类分析采用系统聚类法软件及其分析结果可视化 Treeview 软件。另外,GO 分析采用 GOEAST (Gene Ontology Enrichment Analysis Software Toolkit) 软件进行分析,将分析得到的差异基因分成上调和下调 2 个组,使用代谢通路富集分析软件 GOEAST 进行代谢通路富集分析,分析参数选择 FDR 校正的 $P < 0.01$ 的代谢通路被认定是显著富集通路^[10]。通过调用这些 GO 关键词所包含的差异基因 ID,从芯片数据中得到其结果,主要关注这些差异基因 ID 对应的平均信号值、差异倍数和数值。

1.2.6 荧光实时定量 PCR 法检测标本中各生物标志

物的基因表达 采用荧光实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测 8 份实验组织样本 (4 个对照组样品及 4 个肿瘤组织样品) 中各生物标志物的基因表达,对 8 份样本重新进行 RNA 抽提,测定总的 RNA 浓度和总量。将各样本逆转录得到 cDNA, -20 °C 保存,逆转录引物信息见表 1。采用 SYBR GREEN I 方法进行 qRT-PCR 扩增,将 PCR 体系置于 95 °C 预变性 2 min,然后进入 40 个循环,熔解曲线使用 60 ~ 95 °C 温度梯度,荧光信号急剧增加时 (扩增曲线急剧上升) 的 PCR 循环数为 Ct,比较不同基因的 Ct 值。按照目的基因在肿瘤与对照样本中表达水平的差异进行数据分析。

表 1 扩增引物信息

引物 (片段)	引物序列	片段长度 (bp)	检测分析
ACTB (bp695C)	5'-GCCGTGGTGGTGAAGCTGT-3'	134	内参基因
ACTB (bp562)	5'-ACCCACACTGTGCCCATCTA-3'		
CCNG1 (bp948)	5'-GACCTTCTGGGAAGAGCTGT-3'	122	+
CCNG1 (bp1069C)	5'-GCTTCAATTGCCGTGCACTA-3'		
CDKN1A (bp931)	5'-TCATGCCAGCTACTTCTCTCT-3'	115	+
CDKN1A (bp1045C)	5'-GTCCAGGAAAGGGGGTGAAT-3'		
KPN α 2 (bp1002C)	5'-CACACCACATGCCAATTCGT-3'	108	+
KPN α 2 (bp895)	5'-ACCTTAGTTCGGCTCTGTCAT-3'		
SEMA3C (bp2463C)	5'-TGAACAGAGCGGATCAGGAGT-3'	117	+
SEMA3C (bp2347)	5'-GTCTCCGAGGCACTATCA-3'		
ENG (bp1284)	5'-GCTTCAAGTCCCAGACACA-3'	147	+
ENG (bp1430C)	5'-GTGAGGTCTGACGCTACCA-3'		
ANGPT1 (bp1734C)	5'-ACCGTGAAGATCAGGCTGCT-3'	122	+
ANGPT1 (bp1613)	5'-GGAACCGAGCCTATTACAGT-3'		
CKS2-F (bp334)	5'-GAAGTTTATCTGGGGATCGTCA-3'	134	+
CKS2-R (bp477C)	5'-TGAGCTCTGTGCTGGAAGAAT-3'		
CDK5R1 (bp429C)	5'-GCTGCACCTTCTTGAGTCT-3'	125	+
CDK5R1 (bp305)	5'-GGCCGTACAGAAGCAAGA-3'		
PTENP1 (bp1275)	5'-CCAGTCAGAGCGCTATGTGT-3'	127	+
PTENP1 (bp1401C)	5'-CAAGTTCGCCACTGAACAT-3'		
DHX32F (bp1643)	5'-GGCAGAGATACGCAAGCAGAT-3'	130	+
DHX32R (bp1772C)	5'-TGTTAGGTTGGCTTCTGTCAT-3'		
SAG (bp596)	5'-CGCTATGGCCAAGAGGACAT-3'		
SAG (bp739C)	5'-GCTCCCAGCTTTTAAAGCA-3'	170	+
RHO (bp685C)	5'-TCCGGCTTGAGCGTGTAGT-3'		
RHO (bp564)	5'-GTTGCCTTACCTGGGTCAT-3'	122	+
BMP2 (bp1463C)	5'-GAATCCATGTTGGCGTGC-3'		
BMP2 (bp1359)	5'-TTGGACACCAGTTGCTGAA-3'	103	+

注: ACTB: 肌动蛋白 β ; CCNG1: 细胞周期蛋白 G1; CDKN1A: 细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制剂 1A; KPN α 2: 亲核素 α 2; SEMA3C: 脑信号蛋白 3C; ENG: 内皮糖蛋白; ANGPT1: 血管形成素 1; CKS2: CDC28 蛋白激酶酶调节亚基 2; CDK5R1: 细胞周期蛋白依赖性激酶 5 调节亚基 1; PTENP1: PTEN 同源假基因; DHX32: DEAH 盒多肽 32; SAG: 抑制蛋白; RHO: 视紫红质; BMP2: 骨形成蛋白 2; +: 表达阳性

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析。采用单因素方差分析和独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因芯片样品总 RNA 的质量鉴定

提取的 RNA 结果显示,所有标本 RNA 样品电泳条带清晰,28S:18S rRNA 条带亮度大于或接近 1:1,质量基本符合 mRNA 芯片实验要求,可以进行芯片实验。通过对差异表达基因的聚类分析,同样证实了芯片数据的可靠性(图 2)。

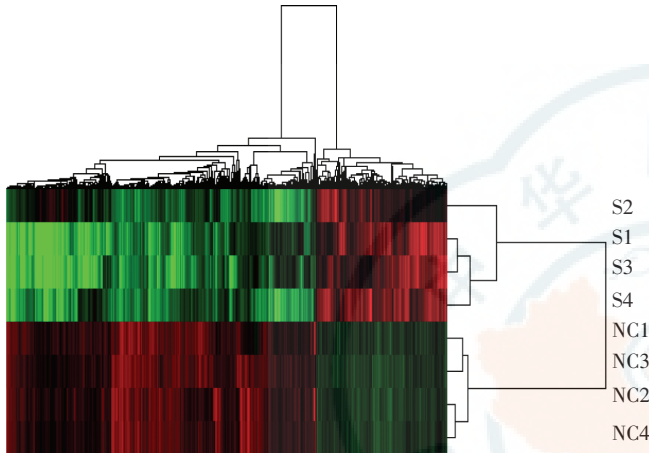


图 2 差异基因的聚类分析图 红色为上调基因,绿色为下调基因,黑色为表达无差异基因 S:梭形细胞型 UM 组织;NC:正常对照葡萄膜组织

2.2 梭形细胞型 UM 组织差异表达基因筛查

从表达谱基因芯片的 33 310 个候选基因中,按 $q\text{-value} \leq 5\%$ 、上调基因 $\text{Fold Change} \geq 2$ 和下调基因 ≤ 0.5 的标准,筛选出 4 165 个差异基因,占 12.50%,其中包含 1 236 个上调基因和 2 929 个下调基因,分别占 3.71% 和 8.79%,下调基因多于上调基因。上调 5 倍或以上的基因为 113 个,下调 50% 或以上的基因为 1 053 个,上调 10 倍或以上的基因为 21 个,下调 90% 或以上的基因为 422 个,上调 50 倍或以上的基因为 1 个,下调 98% 或以上的基因为 33 个,上调 100 倍或以上的基因为 1 个,下调 99% 或以上的基因为 5 个。人 UM 组织中与正常葡萄膜组织中差异表达超过 100 倍的基因及其相关的生物学功能情况见表 2。

2.3 表达差异基因的代谢通路分析

代谢通路的分析内容包括分子功能、生物学过程和细胞组成 3 个部分。对 GOEAST 分析得到的原始结果进行进一步的筛查,选出在生物学过程分类中处于富集通路的末端的 GO 关键词(表 3,4)。结合芯片数据和代谢通路的生物学意义,发现涉及血管形成过程的代谢通路在高调组和低调组的基因中均有出现,其中还有涉及 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞代谢通路的免疫机制及细胞周期相关的蛋白激酶通路(图 3~6)。

表 2 梭形细胞型 UM 100 倍或以上差异表达的基因

基因库 ID	基因名称	基因缩写	差异倍数	生物学过程
NM_000329	RPE special protein 65 000	RPE65	0.004 7	维生素 A 代谢
AV700059	Osteoglycin	OGN	0.005 7	负调节平滑细胞增生
AI802118	solute carrier family 6 (neuro-transmitter transporter, GABA), member13	SLC6A13	0.007 8	神经递质运输
AA736604	ermin, ERM-like protein	ERMN	0.007 8	分支形态发生
NM_015507	EGF-like-domain, multiple	EGFL6	0.007 9	细胞周期
NM_002159	histatin 1	HTN1	117.484 7	杀死异体微生物

注:RPE65:视网膜色素上皮特异蛋白 65;OGN:骨甘氨酸;SLC6A13:溶质运载蛋白家族 6 成员 13;ERMN:ERM 样蛋白;EGFL6:表皮生长因子样域蛋白 6;HTN1:富组蛋白 1;UM:葡萄膜黑色素瘤

表 3 上调基因生物学过程富集通路末端的 GO 关键词表

关键词	P
DNA 复制	9.78×10^{-8}
调节细胞周期相关蛋白质的丝氨酸/苏氨酸激酶活性	1.68×10^{-5}
有丝分裂姐妹染色单体分离	2.97×10^{-5}
着丝粒联合	3.15×10^{-5}
正调控中性粒细胞凋亡过程	2.34×10^{-4}
巨噬细胞融合	2.34×10^{-4}
磷脂酰肌醇信号通路	5.34×10^{-4}
有丝分裂细胞周期的 G ₂ 期	8.80×10^{-4}
血管成熟	3.43×10^{-3}
着丝粒的蛋白质定位	3.90×10^{-3}
调节未成熟 T 淋巴细胞增生	3.90×10^{-3}
调节有丝分裂细胞周期 G ₂ 期到 M 期的过渡	6.67×10^{-3}
有丝分裂纺锤体联合点	7.28×10^{-3}
正调节丝氨酸胺基磷酸化	9.00×10^{-3}

注:GO:基因本体学

表 4 下调基因生物学过程富集通路末端的 GO 关键词表

关键词	P
血管形成	1.98×10^{-7}
转化生长因子 β 受体的信号通路	2.41×10^{-7}
B 细胞受体运输到膜筏	4.31×10^{-5}
趋化因子受体运输出膜筏	4.31×10^{-5}
负调节红细胞清除	4.31×10^{-5}
负调节红细胞聚集	4.31×10^{-5}
正调节 T 淋巴细胞的稳定增生	4.31×10^{-5}
负调节 T 淋巴细胞的稳定增生	4.31×10^{-5}
心脏上皮细胞的间充质化	2.29×10^{-4}
唾液腺的分支形态发生的终末分支	6.24×10^{-4}
正调节血管内皮细胞的迁移	1.15×10^{-3}
出芽式血管生成	1.25×10^{-3}
皮质醇应激反应	1.96×10^{-3}
瘦素介导的信号转导通路	1.96×10^{-3}
淋巴内皮细胞分化	1.96×10^{-3}
肾小球基底膜的形成	2.28×10^{-3}
光传导	3.91×10^{-3}
正调节 B 淋巴细胞凋亡过程	3.91×10^{-3}
前 B 淋巴细胞分化	7.31×10^{-3}
光感受器细胞的形成	7.37×10^{-3}

注:P<0.05 表示该通路富集的可能性大 GO:基因本体学

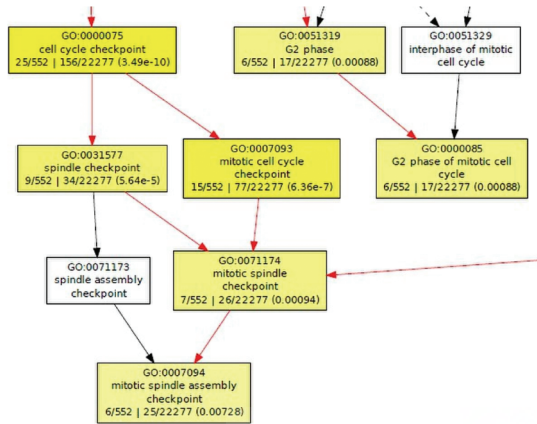


图 3 细胞分裂相关通路末端的 GO 关键词放大图

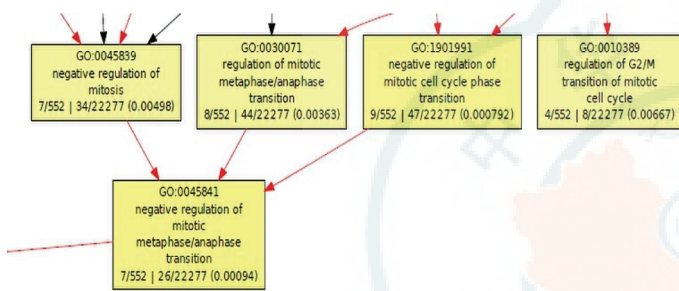


图 4 细胞周期相关通路末端的 GO 关键词放大图

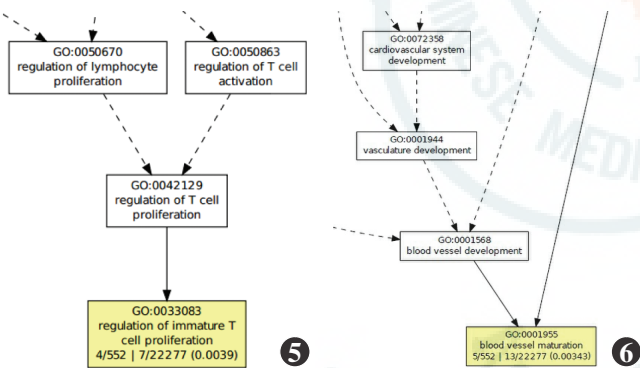
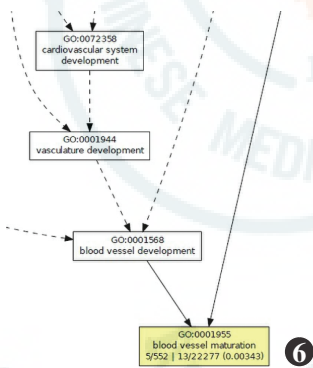


图 5 免疫相关通路末端的 GO 关键词放大图 图 6 血管形成相关通路末端的 GO 关键词放大图



2.4 qRT-PCR 验证

在分析得到的差异基因中,上调基因涉及 15 个富集 GO 通路,下调基因涉及 20 个 GO 通路,多数富集的通路都是已报道的与肿瘤相关的通路,例如血管生成、细胞周期等。从中选定的一些重要代谢通路涉及的基因家族或表达差异倍数相对较高的芯片数据进行 qRT-PCR 验证,7 个通路中所涉及的 13 个基因进行 qRT-PCR 验证。本研究的 8 例样本经验证发现,所有基因的变化趋势与芯片基本吻合,其中 3 个基因 (*CKS₂*, *CCNG₁* 和 *SAG*) mRNA 的相对表达差异均无统计学意义 ($P=0.109, 0.063, 0.061$),包括 2 个上调基因 (*CKS₂* 和 *CCNG₁*) 和 1 个下调基因 (*SAG*),另有 10

个基因 (*CDK5R₁*, *CDKN1A*, *PTENP*, *DHX32*, *KPNA₂*, *RHO*, *SEMA3C*, *ENG*, *ANGPT1* 和 *BMP2*) 在 2 种组织中的表达的差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (图 7)。

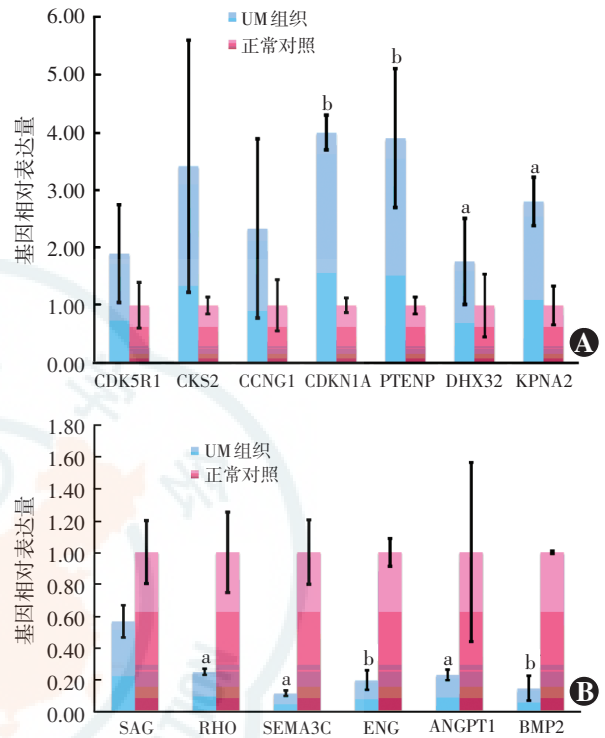


图 7 UM 组织中 13 个目的基因的相对表达丰度与正常组织的比较 每个基因在正常对照组织中的表达丰度定义为 1,内参基因为 *ACTb* A:7 个 UM 组织上调基因的 qRT-PCR 验证结果 与正常组织比较, $aP<0.05, bP<0.01$ B:UM 组织中 6 个下调基因的 qRT-PCR 验证结果 与正常组织比较, $aP<0.05, bP<0.01$ (独立样本 *t* 检验, $n=4$) UM:葡萄膜黑色素瘤;SAG:抑制蛋白;RHO:视紫红质;SEMA3C:脑信号蛋白 3C;ENG:内皮糖蛋白;ANGPT1:血管形成素 1;BMP2:骨形成蛋白 2;CDKN1A:细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制剂 1A

3 讨论

3.1 差异表达基因分析

本研究中纳入的 4 例梭形细胞型 UM 组织的组织病理学诊断是依据改良 Callender 分型系统进行分类的^[11]。研究发现,梭形细胞型 UM 预后较好,而类上皮细胞型 UM 预后不良^[12]。Onken 等^[8]对 25 例人 UM 组织进行基因表达谱分析,根据基因表达谱的差异,并结合患者临床随访的存活期,最终将肿瘤组织分为 2 种类型,其中 1 型恶性程度低,不易发生转移,主要表现为分化良好的、神经嵴来源黑色素细胞样的梭形细胞,而 2 型恶性程度高且易发生转移。本研究中根据病理检查分出的梭形细胞型 UM 特点与 1 型 UM 相近。Onken 等^[9]从基因表达谱中筛选出 12 个显著差异基因和 3 个内源性对照基因,研发出一种基于 PCR 技术的 15 个基因集合检测,并利用大量样本组织

证实了这种检测对肿瘤分型及预后评估比根据临床表现、病理特征或染色体分析更准确、可靠,其中 12 个差异表达基因包括在 1 型肿瘤组织中相对下调的基因 (*HTR2B*、*ECM1*、*RAB31*、*CDH1*) 和相对上调的基因 (*FXR1*、*LTA4H*、*EIF1B*、*ID2*、*ROBO1*、*LMCD1*、*SATB1*、*MTUS1*)。Onken 等^[13]在人类 UM 细胞系和动物模型实验中还发现,通过去除 ID2 的表达可使 E-cadherin 的表达上调,刺激细胞生长和转移,最终导致 1 型 UM 转化为 2 型 UM。本研究中通过梭形细胞型 UM 与正常脉络膜组织的基因表达谱对比,发现上述 12 个基因在梭形细胞型 UM 中的表达情况存在很大差异,如 *ROBO1*、*LMCD1*、*SATB1*、*MTUS1* 等在梭形细胞型 UM 中表达无差异,而 ID2 在梭形细胞型 UM 中表达下调。分析其原因主要可能是本研究中采用的临床病理分型方法与其基因表达谱分型方法并不完全一致,其间存在差异;也可能是不同人种患者的基因型原本存在差异,有待大样本研究的验证。Zuidervaart 等^[14]应用 Human Cancer Atlas 1.2 filters 技术将 UM 细胞系的基因表达谱与正常眼黑色素细胞系比较,并筛选出基因表达率差异最明显的 4 个基因,Endothelin 2 (*ET2*)、Laminin Receptor 1 (*LAMR1*)、Von Hippel Lindau Binding protein 1 (*VBPI*) 和 Cullin 2 (*CUL2*),进一步采用聚类分析将原发性 UM 组织分成 *ET2*、*LAMR1*、*CUL2* 和 *VBPI* 基因表达上调组和下调组。本研究的梭形细胞型 UM 组织中,上述 4 个基因均未见差异表达或无表达。考虑这些实验结果的差异可能与实验材料的差异或实验芯片的不同有关。

BRAF 基因是一种在 UM 中研究较多的基因,作为一种致癌基因,其翻译的蛋白质参与 MAPK/ERK 信号通路,在 UM 细胞系及原发性 UM 组织中均存在基因突变^[4-5],在 *BRAF* 基因突变的人黑色素瘤中,该基因明显表达上调,调节肿瘤转移相关的基因,从而保持黑色素瘤细胞良好的迁移能力;此外,在 *BANCR* 敲除后能显著降低黑色素瘤细胞的迁移能力^[15]。此外,对于野生型 *BRAF* 基因的 UM 细胞系,研究发现热休克蛋白 90 抑制剂相关的抗肿瘤药物通过下调 *BRAF* 基因的表达而抑制其肿瘤细胞增生^[16]。目前的研究认为,基因突变更倾向发生于表达频率更高和表达量更高的基因中,基因突变率与其表达水平呈正相关。本研究中 *BRAF* 基因同样在梭形细胞型 UM 中表达上调,基本符合上述理论结果。

GNAQ 和 *GNAI1* (*GNAQ* 的同种异型基因) 基因均是人类癌基因,已有研究发现人 UM 组织中存在 *GNAQ* 或 *GNAI1* 基因的突变^[3,17-19],其中 *GNAQ* 基因

的突变可同时见于原发性 UM 及其肝脏转移灶中,可见在人 UM 生长的早期即出现 *GNAQ* 的突变^[3]。本研究中发现 *GNAQ* 和 *GNAI1* 基因在梭形细胞型 UM 中表达无差异,并不符合基因突变率与其表达水平呈正相关的理论,其基因突变与其 mRNA 表达水平的关系有待进一步研究。

本研究中 100 以上差异表达的基因仅有 6 个,仅占有差异表达基因的 0.14%,认为这些表达差异倍数异常大的基因很有可能是由于实验因素影响或患者之间的个体差异导致,其中 *RPE65*、*OGN*、*SLC6A13*、*ERMN* 及 *EGFL6* 均显著下调,而 *HTN1* 基因显著上调。*RPE65* 基因的突变与 Leber 先天性黑朦和视网膜色素变性有关。Amann 等^[20]发现 RPE65 蛋白参与维持正常的维生素 A 代谢,而其代谢的异常可能与黑色素瘤的形成有关。*OGN* 编码的蛋白参与负调节平滑肌细胞的增生和黏多糖的代谢等过程。实验研究发现,*OGN* 编码的骨甘氨酸蛋白质的下调是动脉血管生成的重要条件^[21]。*SLC6A13*、*ERMN*、*EGFL6* 及 *HTN1* 基因与 UM 的确切联系不详,在 UM 的发生和进展过程中可能并不是单独发挥作用,而是与其他基因共同参与某些信号通路来影响肿瘤的发生和发展,在这些复杂调节通路中的下游发生了显著变化。

3.2 代谢通路的分析

本研究中将差异表达的基因进行 GO 功能分析,发现细胞分化与增生基因、发育相关基因、细胞黏附相关基因、免疫应答基因、调节转录的基因、信号转导相关基因、凋亡以及抗凋亡相关基因等发生了显著的差异表达,与 Onken 等^[13]的研究吻合。差异表达基因参与的信号通路有细胞黏附分子相关通路、抗原加工递呈通路、酪氨酸代谢通路、转化生长因子- β 信号通路、MAPK 信号通路、细胞外基质受体相互作用通路等。这些分析证实了 UM 的发生和发展不是某一个基因的作用,而是常涉及多个基因共同参与到多个复杂的生物过程,这些差异表达的基因及其参与的生物过程对蛋白质表达水平的影响可为后期进一步研究提供基础。

目前已知 UM 中存在特殊微循环结构,称为血管生成拟态 (vasculogenic mimicry, VM),是恶性黑色素瘤细胞模拟血管内皮细胞形成类似血管腔样的通道,该血管生成拟态可为肿瘤组织的生长增强氧气和血液供应,并有助于肿瘤细胞进行血行扩散^[22]。多种研究将 VM 作为 UM 的治疗靶点^[23]。本研究中发现,在表达上调和下调的基因中均有大量基因参与了血管发育和成熟过程,如 *CD44* 基因在梭形细胞型 UM 中表达上调,参与血管系统的形成过程。

肿瘤的发生与细胞增生和细胞凋亡之间的动态平衡被打破密切相关,当细胞无限增生或细胞凋亡受阻时,可导致肿瘤发生。在 UM 中存在相应的抗凋亡基因,亦有大量基因参与细胞周期调节的基因^[24]。本研究中大量基因参与了细胞周期的调节过程,如表达上调的 *GTSE1* 基因参与调节细胞有丝分裂周期的 G₂ 期,上调的 *CDK5RI* 基因参与细胞周期蛋白依赖性蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性的调节。此外,本研究中证实差异基因参与 MAPK 信号通路,与国外研究一致。该通路参与调控多种细胞生理过程,如细胞运动、凋亡、分化及生长增生等。已有研究发现,UM 存在 MAPK 信号通路异常活化,如上述 *BRAF* 基因在 UM 中亦可能通过激活的 MAPK 信号通路发挥作用^[5,25]。

多种恶性肿瘤组织局部存在免疫异常,这些免疫功能的紊乱参与到肿瘤的发生及肿瘤的转移过程,与肿瘤的恶性程度及临床预后密切相关。在 UM 中,免疫异常主要表现为不同类型淋巴细胞和巨噬细胞的增加以及人类白细胞抗原 I 类和 II 类基因的表达增强,这些改变与预后较差密切相关^[26]。目前关于 UM 中免疫机制异常相关的基因表达水平的研究相对较少,本研究中证实部分差异表达基因参与了免疫相关通路,如 *RIPK2*、*CDKN2A* 和 *CD24*,其中 *RIPK2* 和 *CDKN2A* 基因在梭形细胞型 UM 中明显表达上调,在信号通路中调节成熟 T 淋巴细胞的增生。*RIPK2* 基因编码的蛋白质是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶受体相互作用蛋白 (receptor-interacting protein, RIP) 家族的一员,参与 T 淋巴细胞受体信号传导,负调节细胞凋亡过程,在膀胱移行细胞癌中该基因与淋巴结转移密切相关^[27]; *CDKN2A* (细胞周期依赖性激酶抑制基因) 的突变常见于各种肿瘤,是一种抑癌基因,在人乳腺癌早期表达上调,而随着肿瘤的进展表现为表达下调^[28],该基因在本研究梭形细胞型 UM 中表达上调,而在类上皮细胞型中的表达差异情况可做进一步研究。*CD24* 基因明显表达下调,其编码的唾液酸糖蛋白见于成熟粒细胞及 B 淋巴细胞,主要作用是促进 B 淋巴细胞的凋亡过程。有研究发现在骨肉瘤组织中,*CD24* 基因明显表达上调,且与肿瘤的侵袭性及转移密切相关^[29],实验干预使胃癌的 *CD24* 基因表达下调,可明显抑制肿瘤的增生及侵袭性,并促进细胞凋亡,加强化学疗治疗的敏感性^[30]。由上述差异表达的基因可推测在 UM 的免疫异常涉及多个基因,其中即有负调节和正调节的作用,这些基因的表达异常共同导致了 UM 的免疫异常,最终表现为局部免疫细胞的浸润及抗原表达增强。

另外,本研究中还发现光信号传导通路相关的基

因,如 *SAG*、*RHO* 和 *ABCA4* 基因,在 UM 中均表达下调,参与了视网膜光信号的传导,同时也参与了多种其他信号通路,并与许多视网膜病变,如视网膜色素变性、Stargardt 病和小口氏先天性夜盲症相关并且这些基因在 UM 中差异表达的准确性还有待确认,有可能是本研究中患者间的个体差异导致,因为 *SAG* 基因在 PCR 验证结果中是不显著的。

本研究中采用 Human Genome U133 Plus 2.0 芯片操作及信息处理系统,该芯片包含了 38 500 个定性清晰的人类基因,具有强有力的探针集,能提供最大的准确性和重复性,结果发现 UM 中有大量的差异表达基因,其涉及到多种不同的代谢通路。回顾既往各种关于 UM 差异表达基因的研究结果,发现不同研究发现的相关基因都有不同,首先考虑可能与不同的实验方案、实验芯片或不同人种的基因组差异有关;UM 的基因表达谱在培养人 UM 细胞系与人 UM 组织标本之间可能存在差异,进而导致不同研究的结果不同;另外,从 mRNA 到蛋白表达还要经过 microRNA 调控、翻译调控、翻译后修饰(如糖基化和磷酸化等)、蛋白运输等一系列的调控过程,mRNA 表达水平和蛋白表达水平之间往往不具有线性关系,也就是 mRNA 差异的改变不一定意味着蛋白表达量的改变,故关于 UM 中同一基因的 mRNA、microRNA 和蛋白质表达水平之间的关系分析也可开展新的研究。

本研究在分析过程中也发现了目前遇到的一些困难:(1) 由于类上皮细胞型 UM 在临床上相对少见,尤其是未接受任何术前治疗(如巩膜外敷贴放射治疗)的标本,故本研究中仅获得梭形细胞型 UM 组织标本,未对类上皮细胞型 UM 进行分析,不能对这 2 种类型 UM 的基因表达谱进行比较。(2) 由于研究中所有的 UM 组织标本来自于近 2 年以内的患者,故现在无法了解相关患者的预后或对其生存率进行分析。(3) 由于正常脉络膜组织标本均来自于供体眼球,缺乏相应的临床信息资料,故未能对 2 个组患者的性别、年龄等情况进行比较。这也为今后的研究提供了方向:(1) 对不同肿瘤类型的表达基因进行对比分析。(2) 将差异表达的基因及其信号通路与患者预后、转移率或生存率之间的关系进行分析。(3) 选择某一特定代谢通路进行深入研究,对其中个别基因进行简单的敲除或过表达实验,或对其进行蛋白质水平检测,以发现潜在的药物作用靶点,为 UM 的治疗提供新思路。

本研究中将 4 例梭形细胞型 UM 与 4 例正常的脉络膜组织 mRNA 表达水平进行了比较,同时对梭形细胞型 UM 的差异表达基因进行功能分析。取得了梭形

细胞型 UM 的基因表达库, 并发现 UM 与正常脉络膜组织表达基因之间存在大量差异表达的基因。另外, 本研究中还分析了这些众多差异表达的基因可能参与的生物过程及信号通路, 如血管生成、激酶通路和细胞周期相关通路, 尤其是免疫系统(T 淋巴细胞与 B 淋巴细胞)相关通路。后期还可进行更深入地结合分析 microRNA 的调控、蛋白质的表达, 或在预测的通路中选择个别基因进行简单的敲除或过表达实验, 以证实其在 UM 发生和发展中所起到的作用。

参考文献

- [1] McLaughlin CC, Wu XC, Jemal A, et al. Incidence of noncutaneous melanomas in the U. S. [J]. *Cancer*, 2005, 103(5): 1000-1007. doi: 10.1002/cncr.20866.
- [2] Singh AD, Turell ME, Topham AK. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival [J]. *Ophthalmology*, 2011, 118(9): 1881-1885. doi:10.1016/j.ophtha.2011.01.040.
- [3] Dratviman-Storobinsky O, Cohen Y, Frenkel S, et al. Lack of oncogenic GNAQ mutations in melanocytic lesions of the conjunctiva as compared to uveal melanoma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(12): 6180-6182. doi:10.1167/iovs.10-5677.
- [4] Malaponte G, Libra M, Gangemi P, et al. Detection of BRAF gene mutation in primary choroidal melanoma tissue [J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(2): 225-227.
- [5] Maat W, Kilic E, Luyten GP, et al. Pyrophosphorolysis detects B-RAF mutations in primary uveal melanoma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(1): 23-27. doi:10.1167/iovs.07-0722.
- [6] Abdel-Rahman MH, Pilarski R, Cebulla CM, et al. Germline BAP1 mutation predisposes to uveal melanoma, lung adenocarcinoma, meningioma, and other cancers [J]. *J Med Genet*, 2011, 48(12): 856-859. doi:10.1136/jmedgenet-2011-100156.
- [7] Onken MD, Worley LA, Harbour JW. A metastasis modifier locus on human chromosome 8p in uveal melanoma identified by integrative genomic analysis [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(12): 3737-3745. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-5144.
- [8] Onken MD, Worley LA, Ehlers JP, et al. Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(20): 7205-7209. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1750.
- [9] Onken MD, Worley LA, Tuscan MD, et al. An accurate, clinically feasible multi-gene expression assay for predicting metastasis in uveal melanoma [J]. *J Mol Diagn*, 2010, 12(4): 461-468. doi:10.2353/jmoldx.2010.090220.
- [10] Zheng Q, Wang XJ. GOEAST: a web-based software toolkit for Gene Ontology enrichment analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(Web Server issue): W358-363. doi:10.1093/nar/gkn276.
- [11] Zimmerman LE, Sobin LH. Histologic typing of tumors of the eye and its adnexa [S]. Geneva: World Health Organization, 1980: 112-116.
- [12] 赵晓娟, 李彬, 王文峰, 等. 232 例葡萄膜黑色素瘤临床特征与组织病理学分析 [J]. *中国实用眼科杂志*, 2005, 23(4): 406-409. doi: 10.3760/cma.j.issn.1006-4443.2005.04.025.
- [13] Onken MD, Ehlers JP, Worley LA, et al. Functional gene expression analysis uncovers phenotypic switch in aggressive uveal melanomas [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(9): 4602-4609. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4196.
- [14] Zuidervaart W, van der Velden PA, Hurks MH, et al. Gene expression profiling identifies tumour markers potentially playing a role in uveal melanoma development [J]. *Br J Cancer*, 2003, 89(10): 1914-1919. doi:10.1038/sj.bjc.6601374.
- [15] Flockhart RJ, Webster DE, Qu K, et al. BRAFV600E remodels the melanocyte transcriptome and induces BANC1 to regulate melanoma cell migration [J]. *Genome Res*, 2012, 22(6): 1006-1014. doi:10.1101/gr.140061.112.
- [16] Babchia N, Calipel A, Mouriaux F, et al. 17-AAG and 17-DMAG-induced inhibition of cell proliferation through B-Raf downregulation in WT B-Raf-expressing uveal melanoma cell lines [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(6): 2348-2356. doi:10.1167/iovs.07-1305.
- [17] Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, et al. Mutations in GNA11 in uveal melanoma [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(23): 2191-2199. doi:10.1056/NEJMoA1000584.
- [18] Pópulo H, Vinagre J, Lopes JM, et al. Analysis of GNAQ mutations, proliferation and MAPK pathway activation in uveal melanomas [J]. *Br J Ophthalmol*, 2011, 95(5): 715-719. doi:10.1136/bjo.2009.174417.
- [19] Onken MD, Worley LA, Long MD, et al. Oncogenic mutations in GNAQ occur early in uveal melanoma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(12): 5230-5234. doi:10.1167/iovs.08-2145.
- [20] Amann PM, Luo C, Owen RW, et al. Vitamin A metabolism in benign and malignant melanocytic skin cells; importance of lecithin/retinol acyltransferase and RPE65 [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(2): 718-728. doi:10.1002/jcp.22779.
- [21] Kampmann A, Fernández B, Deindl E, et al. The proteoglycan osteoglycin/mimcan is correlated with arteriogenesis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 322(1-2): 15-23. doi:10.1007/s11010-008-9935-x.
- [22] Chen L, Zhang S, Li X, et al. A pilot study of vasculogenic mimicry immunohistochemical expression in intraocular melanoma model [J]. *Oncol Rep*, 2009, 21(4): 989-994. doi:10.3892/or.00000313.
- [23] Zhang S, Zhang D, Sun B. Vasculogenic mimicry: current status and future prospects [J]. *Cancer Lett*, 2007, 254(2): 157-164.
- [24] de Lange J, Teunisse AF, Vries MV, et al. High levels of Hdmx promote cell growth in a subset of uveal melanomas [J]. *Am J Cancer Res*, 2012, 2(5): 492-507.
- [25] Zuidervaart W, van Nieuwpoort F, Stark M, et al. Activation of the MAPK pathway is a common event in uveal melanomas although it rarely occurs through mutation of BRAF or RAS [J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(11): 2032-2038. doi:10.1038/sj.bjc.6602598.
- [26] Bronkhorst IH, Jager MJ. Inflammation in uveal melanoma [J]. *Eye*, 2013, 27(2): 217-223. doi:10.1038/eye.2012.253.
- [27] Guirado M, Gil H, Saenz-Lopez P, et al. Association between C13ORF31, NOD2, RIPK2 and TLR10 polymorphisms and urothelial bladder cancer [J]. *Hum Immunol*, 2012, 73(6): 668-672. doi:10.1016/j.humimm.2012.03.006.
- [28] Wazir U, Jiang WG, Yasaei H, et al. P14ARF is down-regulated during tumour progression and predicts the clinical outcome in human breast cancer [J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(5): 2185-2189.
- [29] Tang J, Cai H, Lin L, et al. Increased expression of CD24 is associated with tumor progression and prognosis in patients suffering osteosarcoma [J]. *Clin Transl Oncol*, 2013, 15(7): 541-547. doi:10.1007/s12094-012-0961-5.
- [30] Jiao XL, Zhao C, Niu M, et al. Downregulation of CD24 inhibits invasive growth, facilitates apoptosis and enhances chemosensitivity in gastric cancer AGS cells [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(13): 1709-1715.

(收稿日期: 2015-08-11)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)