



论文

脉络膜黑色素瘤 miRNA 表达谱的初步研究

杨承勋, 魏文斌*

首都医科大学附属北京同仁医院同仁眼科中心, 北京 100730

* 联系人, E-mail: drwbwei@gmail.com

收稿日期: 2009-08-09; 接受日期: 2009-08-30

国家自然科学基金(批准号: 30571988)和北京市自然科学基金(批准号: 7072019)资助项目

摘要 初步建立人脉络膜黑色素瘤的 miRNA 表达谱, 并探讨相应的 miRNA 在该疾病中的功能, 为阐明脉络膜黑色素瘤发病机制寻求有效的治疗途径提供理论和实验依据. 利用 miRNA 微芯片技术检测脉络膜黑色素瘤的 has-miRNA 表达谱, 将 4 例人脉络膜黑色素瘤组织总 RNA 分别与 4 例健康人脉络膜组织对比, 筛选 has-miRNA 表达情况. 根据生物信息学的有关方法处理芯片实验数据, 筛选出共同差异表达的候选 has-miRNA. 采用实时定量 PCR 的方法, 验证各候选 has-miRNA 的表达情况. 将芯片和 RT-PCR 两种方法结论一致的候选 has-miRNA 确定为有意义的共同差异表达 has-miRNA. 运用 miRNA 芯片技术, 发现人脉络膜黑色素瘤组织中 miRNA-20a, miRNA-106a, miRNA-17, miRNA-21, miRNA-34a 明显上调表达, miRNA-145 和 miRNA-204 明显下调表达. 在 4 例脉络膜黑色素瘤中, miRNA-20a, miRNA-106a, miRNA-17, miRNA-21, miRNA-34a 明显表达上调, miRNA-145 和 miRNA-204 明显表达下调. 脉络膜黑色素瘤有差异表达的 miRNA 为研究肿瘤的发生机制研究提供了诊断和治疗的新思路.

关键词脉络膜黑色素瘤
miRNA
肿瘤标志物

脉络膜黑色素瘤是成人最常见的原发性眼内恶性肿瘤, 约占全身原发性黑色素瘤的 5%~6%^[1]. 其发病年龄、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均与预后有关. 肿瘤细胞主要来源于脉络膜黑色素细胞, 其特点是肿瘤恶性程度高, 易于转移. 主要致死原因是肝脏转移. 一旦确诊肿瘤转移, 预后极差, 数月内多数患者死亡, 生存期 2~7 个月, 仅 13% 存活期 > 1 年. 目前在临床治疗中, 包括光凝治疗、放射治疗、肿瘤局部切除和眼球摘除等方法, 但均未明显提高患者生存率. 原因在于, 人们对脉络膜黑色素瘤的病因及发病机制

还不清楚, 无法提高对脉络膜黑色素瘤及其转移的早期诊断水平.

小 RNA 分子是非编码的 RNA 分子(noncoding RNA, ncRNA), 在真核细胞中控制着许多功能, 例如影响基因的表达、细胞周期和个体发育等多种行为^[2]. 小 RNA 中包括小干扰 RNA(short interfering RNA, siRNA)以及微小 RNA(microRNA, miRNA)两种类型^[3], 其中 miRNA 成为继小干扰 RNA 之后新的研究热点之一. miRNA 的出现为研究脉络膜黑色素瘤致病基因提供了新的途径. miRNA(微小 RNA, microRNA), 是一些 5'端带磷酸基团、3'端带羟基, 长度为 22 核苷

英文版见: Yang C X, Wei W B. An initial study of the miRNA expression profile of uveal melanoma. *Sci China Life Sci*, 2010, 53, in press

酸左右的非编码调控 RNA 家族. 超过 1/3 的人类基因都受 miRNA 的调控. miRNA 具有使细胞异常分化的能力, 而细胞的异常分化是肿瘤形成的关键, 因此 miRNA 的表达很可能意味着恶性肿瘤的发生. 研究人类肿瘤的发生及转化, miRNA 基因扮演了重要的角色. 本研究拟应用基因芯片技术对脉络膜黑色素瘤中的 miRNA 基因进行筛查, 找出特异的基因.

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集在北京同仁医院进行眼内肿瘤局部切除并经组织学证实为脉络膜黑色素瘤的瘤组织标本 4 例(其中 3 例为梭型细胞型脉络膜黑色素瘤, 1 例为以梭型细胞型为主的混合型脉络膜黑色素瘤), 以及死于其他原因的捐献眼球脉络膜组织标本 4 例. 所有患者均自愿签署了知情同意书.

1.2 标本处理

所得标本平均分为两份, 一份保存于 4% 甲醛溶液中, 石蜡切片, HE 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, 后转至 -80°C 冰箱内, 用于提取 miRNA.

1.3 实验步骤

(1) HE 染色及免疫组织化学染色. 选取证实为脉络膜黑色素瘤的组织标本.

(2) 提取总 RNA. 采用 Trizol 一步法提取组织块或细胞中的总 RNA, 通过异丙醇沉淀法浓缩 RNA, 用分光光度计定量, 甲醛变性胶电泳质检总 RNA 的质量. 对电泳检查符合标准的 RNA 进行纯化并标记.

(3) 分离 miRNA. 取 40.0 μg 总 RNA 用 PEG 方法分离 miRNA. 剩余总 RNA 置于 DEPC 水中 -80°C 保存, 以备进行 RT-PCR 验证.

(4) miRNA 样品的去磷酸化及荧光标记. 利用小牛肠碱性磷酸酶进行 miRNA 样品的去磷酸化. 然后使用 T₄ RNA 连接酶标记方法分别标记 CU-cy3 和 CU-cy5, 分离纯化标记产物.

(5) 杂交与清洗. 将 RNA 溶于 20 μL 杂交液中 (15% 甲酰胺, 0.2% SDS, 3×SSC, 5×Denhardt's), 于 42°C 杂交过夜. 杂交结束后, 先在 42°C 左右含 0.2% SDS, 2×SSC 的液体中洗 4 min, 而后在 0.2×SSC 液体

中室温洗 4 min.

(6) 芯片扫描. 将上述玻片甩干后, 用 LuxScan 10K/A 双通道激光扫描仪(CapitalBio 公司)进行扫描.

1.4 芯片图像的采集与数据分析

(1) 提取芯片数据采用 LuxScan 3.0 图像分析软件(CapitalBio 公司)对芯片图像进行分析, 把图像信号转化为数字信号.

(2) 数据分析. 首先对各芯片进行校正并归一化, 然后根据信号强度和图像质量对 miRNA 进行标记, 删除不符合条件的数据, 并用软件 Significance analysis of Microarrays(SAM)进行分析, FDR 控制在 5%, 再以 2 倍以上筛选出差异常表达基因, 再对上述数据进行分类、整理.

1.5 RT-PCR 验证

(1) 设计并合成引物. 针对要检测的 miRNA 设计一条带茎环结构的逆转录引物以及相应的 PCR 引物.

(2) 逆转录 cDNA. 取出上述置于 DEPC 水中 -80°C 保存的总 RNA 0.05 μg, 逆转录形成 1st-cDNA. 逆转录程序: 16°C 30 min, 37°C 30 min, 70°C 10 min, 4°C 持续.

(3) RT-PCR. 以 1st-cDNA 为模板优化 PCR 体系并确定引物条件. 再以 1st-cDNA 为模板和优化后的实验体系进行 RT-PCR 扩增, MgCl₂ 1.6 μL, 引物浓度 10 μmol/L, 退火温度 60°C. 95°C 酶激活 10 min, 95°C 变性 15 s, 60°C 退火, 延伸 30 s, 74°C 荧光检测 3 s, 重复 40 个循环; 75~95°C 绘制溶解曲线.

(4) 电泳检测 PCR 扩增情况.

(5) 数据分析.

2 结果

2.1 样品状态

进行 miRNA 芯片检测前, 先将放置在 -80°C 冰箱的组织移至液氮中研磨, 提取总 RNA, 经异丙醇沉淀法浓缩 RNA, 用分光光度计定量检测 RNA 总量, 然后甲醛变性胶电泳检测总 RNA 的质量(表 1).

2.2 电泳图

标本按上述分组, 经 1.5% 甲醛变性胶电泳检测, 大部分 RNA 样品电泳条带清晰(图 1), 28S : 18S rRNA

表 1 miRNA 芯片分析

样品编号	样品状态	A ₂₆₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	浓度/μg·μL ⁻¹	总量/μg	电泳结果
N2	组织在干冰中	39.174	1.65	1.06	1.567	235.05	RNA 可用
T1	组织在干冰中	95.332	1.78	1.45	3.81	762.66	RNA 可用
T2	组织在干冰中	71.814	1.80	1.28	2.87	574.51	RNA 可用
N1	组织在干冰中	33.354	1.78	1.25	1.33	266.83	RNA 可用
N3	组织在干冰中	20.805	1.64	0.99	0.83	166.44	RNA 可用
T3	组织在干冰中	79.01	1.79	1.38	3.95	592.5	RNA 可用
N4	组织在干冰中	7.32	1.56	1.09	0.37	37.0	RNA 可用
T4	组织在干冰中	36.48	1.83	1.64	1.82	182	RNA 可用

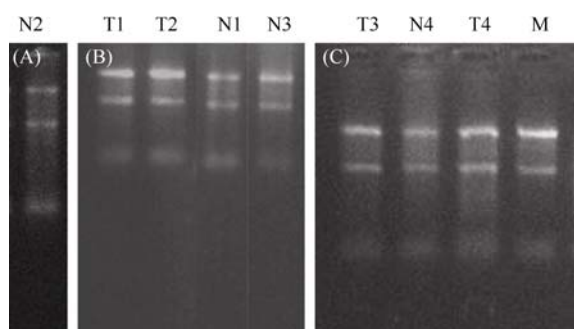


图 1 总 RNA 电泳图

M: HeLa 细胞 RNA. RNA 电泳条带清晰, 28S : 18S rRNA 条带亮度接近 2 : 1, 符合实验要求, 可以进行芯片实验

亮度接近于 2 : 1, 符合实验要求.

2.3 芯片扫描

哺乳动物 microRNA 芯片 V3.0 针对人 677(包含 Xie 等人^[4]预测的有 122 个)、大鼠 292、小鼠 461 个成熟 microRNA, 由于人、大鼠和小鼠的 miRNA 三者具有共同的序列, 取三者的交集, 共设计了 924 条探针(数据来自 Sanger miRNA 数据库: miRBase10.0,2007 年 8 月). 把这些探针用芯片点样仪 SmartArrayTM (CapitalBio Corp., Beijing, China)点制在一张 75 mm×25 mm、经过化学修饰的载玻片上. 点制在芯片上的样品还包括人的 U6, tRNA 作为内标; 8 个人工制备的 30 个碱基长度 RNA 对应的探针作为芯片的外标 (Zip5, Zip13, Zip15, Zip21, Zip23, Zip25, Y2, Y3), Hex 作为点样阳性对照, 50%DMSO 作为杂交阴性对照. 整个点阵分成 8 个亚阵, 每个亚阵有 22 行, 21 列, 点间距为 245 μm, 点的直径约为 150 μm. 每条探针重复 3 次.

进行分离 miRNA 后, 利用小牛肠碱性磷酸酶进行 miRNA 样品的去磷酸化, 然后使用 T4 RNA 连接酶标记方法分别标记 CU-cy3 和 CU-cy5, 分离纯化标记产物. 标记好的 miRNA 分为肿瘤组织组和正常人脉络膜组织组, 按上述分组配对进行 miRNA 微阵列芯片的检测(图 2).

2.4 筛选 2 倍以上差异表达的 miRNA

以下所列数据为芯片 Cy3 与 Cy5 标准化后信号之比值. *q*-value(%)为该 miRNA 被判断差异 miRNA 时的错误发现率, 类似于 *p*-value, 差异越显著, *q*-value 越小. 差异性表达倍数最高的 miRNA, 上调的 miRNA: miRNA-20a 为 75.8 倍; miRNA-106a 为 38.9 倍; miRNA-34a 为 37.8 倍; miRNA-21 为 27.3 倍; miRNA-17 为 18.8 倍. 下调的 miRNA: miRNA-145 为 25 倍; miRNA-204 为 50 倍(表 2).

3 RT-PCR 验证结果

3.1 电泳图

虽然 miRNA 芯片提供了快速准确的检测方法, 但是 RT-PCR 仍是检测 miRNA 丰度的金标准. 将芯片检测结果进一步进行 RT-PCR 检测. 取 PCR 产物 2 μL 经 1.5%非变性琼脂糖凝胶电泳, 每个样本特异扩增产物及内参 U6 的扩增产物大小均为 2000 bp(图 3). 根据电泳结果, 各 miRNA 表达特异性良好.

3.2 RT-PCR 结果

has-miRNA-20a 在脉络膜黑色素瘤组的表达要高于正常人组约 4.5 倍, *has-miRNA-106a* 的表达约 4.5

倍, *has-miRNA-21* 的表达约 2 倍, *has-miRNA-17* 的表达约 2.8 倍, *has-miRNA-34a* 的表达约为 6.6 倍; 而 *has-miRNA-145* 和 *has-miRNA-204* 在脉络膜黑色素瘤组的表达要低于正常人 30.4 和 42.5 倍(表 3, 图 4). 经过验证, 发现 RT-PCR 结果与芯片结果基本吻合.

4 讨论

肿瘤的发生是由细胞增殖的失控和不能正常死亡的受损细胞引起的在细胞周期中. 有几种保护措施, 保证在发育过程中和成体中的细胞通过一系列协调的机制, 进行正常的分裂、分化和死亡. 细胞分裂和分化是由多种调控因子通过基因表达的开关来调节. 被称为肿瘤的抑制基因和癌基因表达失调则导致机体肿瘤的发生. 大多数肿瘤抑制基因和癌基

因都是从 DNA 转录成 RNA, 然后翻译成蛋白质, 进而行使其生物学功能. 近来许多研究表明, 被称为 miRNAs (microRNAs) 的非编码蛋白的 RNA 分子, 其突变或者异位表达可能与多种人类癌症相关, miRNAs 可以起到肿瘤抑制基因或者癌基因的功能. 研究表明, miRNAs 可以抑制重要的肿瘤相关基因的表达, 对癌症的诊断和治疗可能有重要作用^[5]. miRNAs 作为高效的基因表达调控因子, 可为脉络膜黑色素瘤的诊断和治疗提供一个新的思路. Lori 等人^[6]利用 miRNA 的微阵列芯片(microarray)在脉络膜黑色素瘤转移性的研究中, 检测其 miRNA 的表达谱, 发现在脉络膜黑色素瘤中, *let-7b* 和 *miRNA-199a* 对于转移性高的脉络膜黑色素瘤的区分有高度的灵敏性和特异性. 本实验利用 miRNA 微阵列芯片, 通过肿瘤组织及与病人年龄相仿的正常人眼脉络膜组织做比较,

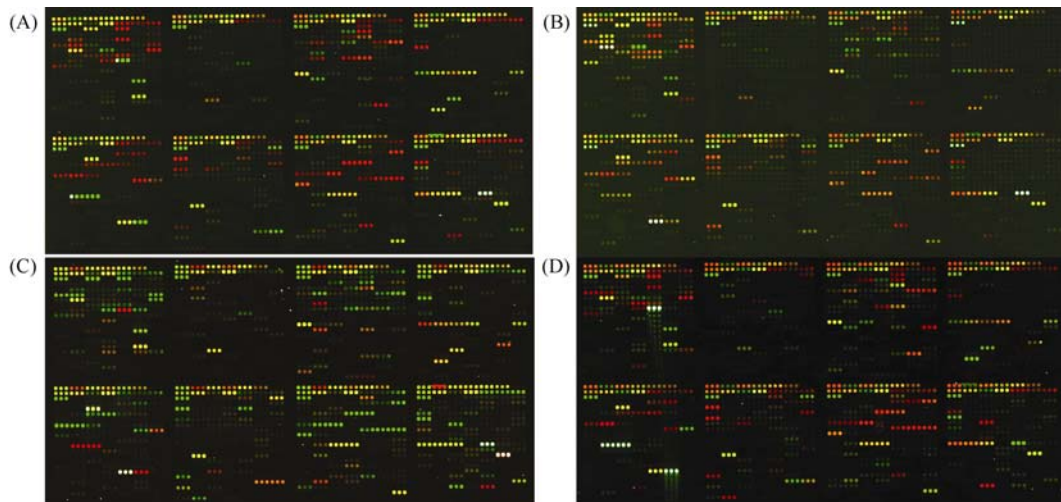


图 2 芯片杂交伪色图

Cy5 用红色表示, Cy3 用绿色表示. 对于某一点的信号来讲, 若 Cy3 信号较强, 该点多显绿色; 若 Cy5 信号较强, 该点多显红色; 如果强度相似, 即显黄色. (A) N3+T4 配对; (B) N4+T3 配对; (C) T1+N2 配对; (D) N1+T2 配对

表 2 miRNA 芯片检测结果

miRNA	统计量	表达倍数	q-value(%)
<i>hsa-miRNA-20a</i>	5.012620087	75.82706562	0
<i>hsa-miRNA-106a</i>	4.732876113	38.87530331	0
<i>hsa-miRNA-34a</i>	4.476309259	37.80551415	0
<i>hsa-miRNA-21</i>	4.202857018	27.26023726	0
<i>hsa-miRNA-17</i>	4.28246958	18.79736037	0
<i>hsa-miRNA-145</i>	-4.7663363	0.040018046	0
<i>hsa-miRNA-204</i>	-3.62941478	0.024397614	0

对比寻找特异性上调或下调的 miRNA, 并对各型脉络膜黑色素瘤进行比较, 找出各型 miRNA 差异, 辅助脉络膜黑色素瘤的诊断, 如特异性 miRNA 为高表达, 则有癌基因作用, 如为低或无表达, 则有抑癌基因的作用. 未来期望使用反义核苷酸方法, 能够对脉络膜黑色素瘤诊断和治疗提供了一个有效的方法.

因为基因芯片有快速检验和高通量的优势, 采用微小 RNA 芯片进行脉络膜黑色素瘤微小 RNA 表达谱的研究. 通过博奥生物有限公司的 miRNA 芯片,

初步建立了人类脉络膜黑色素瘤的 miRNA 表达谱, 这在已发表的文章中, 是第一项针对人类脉络膜黑色素瘤的 miRNA 表达谱所进行的实验. 在已知的基因中, 脉络膜黑色素瘤上调的基因主要有 *has-miRNA-20a*, *has-miRNA-106a*, *has-miRNA-34a*, *has-miRNA-17*, *has-miRNA-21*. 下调的基因有 *has-miRNA-145* 和 *has-miRNA-204*, 在脉络膜黑色素瘤组的表达要低于正常人. 以下主要针对在脉络膜黑色素瘤和正常人脉络膜组织中有较大差异的各个 miRNA 进行探讨.

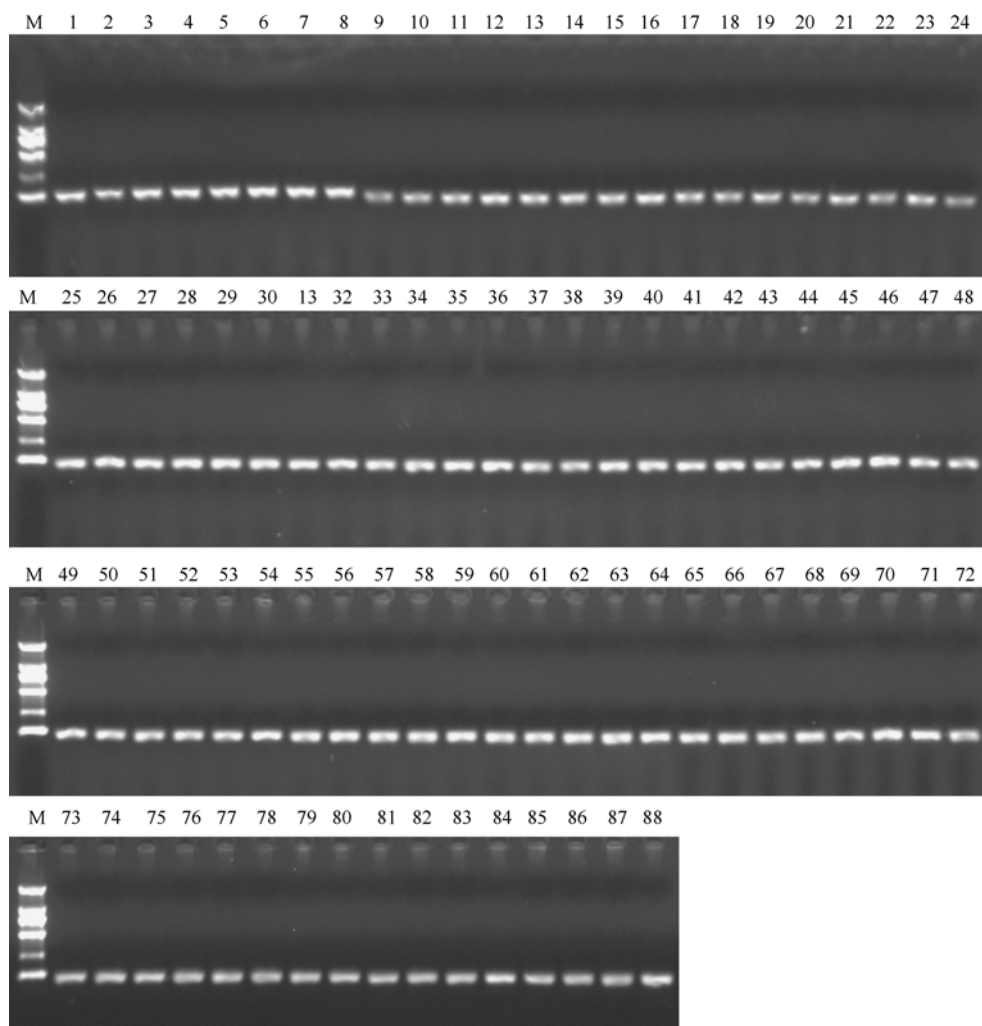


图3 以 N4, N1, N3, N2, T3, T1, T3 和 T4 样品的 1st-cDNA 为模板对各 miRNA 基因检测

泳道 1~8: *U6* 基因; 泳道 9~16: *has-miRNA-20a* 基因; 泳道 17~24: *has-miRNA-106a* 基因; 泳道 25~32: *has-miRNA-21* 基因; 泳道 33~40: *has-miRNA-17* 基因; 泳道 41~48: *has-miRNA-29a* 基因; 泳道 49~56: *has-miRNA-143* 基因; 泳道 57~64: *has-miRNA-145* 基因; 泳道 65~72: *has-miRNA-204* 基因; 泳道 73~80: *has-miRNA-let-7g* 基因; 泳道 81~88: *has-miRNA-34a* 基因. Marker: DL2000; 条带从下往上: 100, 250, 500, 750, 1000 及 2000 bp

表3 RT-PCR 检测结果^{a)}

反应编号	各样本及基因信息	实时荧光强度	扩增效率	对照和检测样品 CP 值差值	标准化后对照与检测样品基 因表达量的差异比值
1	N4-U6	18.75			
2	N1-U6	19.42	1.805	-0.67	
3	N3-U6	19.58		-0.83	
4	N2-U6	20.16		-1.41	
5	T3-U6	19.99		-1.24	
6	T1-U6	20.07		-1.32	
7	T2-U6	19.44		-0.69	
8	T4-U6	20.41		-1.66	
9	N4-20a	23.34			
10	N1-20a	23.87	1.797	-0.53	1.088752706
11	N3-20a	24.2		-0.86	0.986199402
12	N2-20a	24.04		-0.7	1.525629953
13	T3-20a	22.76		0.58	2.921928742
14	T1-20a	21.87		1.47	5.161020517
15	T2-20a	20.74		2.6	6.899129116
16	T4-20a	22.73		0.61	3.810890669
17	N4-106a	25.69			
18	N1-106a	26.27	1.816	-0.58	1.050878577
19	N3-106a	26.65		-0.96	0.920714263
20	N2-106a	26.85		-1.16	1.150955365
21	T3-106a	25.2		0.49	2.786111542
22	T1-106a	24.53		1.16	4.356365314
23	T2-106a	22.99		2.7	7.526309119
24	T4-106a	25.23		0.46	3.507078207
25	N4-21	21.45			
26	N1-21	22.12	1.81	-0.67	0.998148327
27	N3-21	22.43		-0.98	0.912748395
28	N2-21	22.48		-1.03	1.24802685
29	T3-21	21.75		-0.3	1.74071697
30	T1-21	21		0.45	2.847772363
31	T2-21	21.15		0.3	1.795861519
32	T4-21	21.46		-0.01	2.649569871
33	N4-17	23.88			
34	N1-17	24.01	1.802	-0.13	1.375915002
35	N3-17	24.61		-0.73	1.062123669
36	N2-17	24.43		-0.55	1.663289049
37	T3-17	23.58		0.3	2.481750807
38	T1-17	22.93		0.95	3.815196926
39	T2-17	21.83		2.05	5.026510394
40	T4-17	23.71		0.17	2.945984626
41	N4-34a	27.08			

续表 3

反应编号	各样本及基因信息	实时荧光强度	扩增效率	对照和检测样品 CP 值差值	标准化后对照与检测样品基因 表达量的差异比值
42	N1-34a	27.9	1.801	-0.82	0.916892634
43	N3-34a	27.86		-0.78	1.031752156
44	N2-34a	28.16		-1.08	1.218086278
45	T3-34a	24.76		2.32	8.143733431
46	T1-34a	25.86		1.22	4.469682164
47	T2-34a	24.85		2.23	5.581678937
48	T4-34a	24.93		2.15	9.442927274
49	N4-145	19.38			
50	N1-145	21.28	1.803	-1.9	0.484671907
51	N3-145	20.55		-1.17	0.819145559
52	N2-145	20.53		-1.15	1.167448617
53	T3-145	27.08		-7.7	0.02222617
54	T1-145	27.55		-8.17	0.017663014
55	T2-145	26.45		-7.07	0.023285174
56	T4-145	26.07		-6.69	0.051658376
57	N4-204	16.31			
58	N1-204	18.69	1.811	-2.38	0.361404717
59	N3-204	17.94		-1.63	0.620110389
60	N2-204	17.94		-1.63	0.873425338
61	T3-204	24.88		-8.57	0.012813584
62	T1-204	25.97		-9.66	0.007031657
63	T2-204	27.25		-10.94	0.002266425
64	T4-204	23.17		-6.86	0.045334788

a) *has-miRNA-20a*, *has-miRNA-106a*, *has-miRNA-21*, *has-miRNA-17*, *has-miRNA-34a* 在脉络膜黑色素瘤组的表达要高于正常人组; 而 *has-miRNA-145*, *has-miRNA-204* 在脉络膜黑色素瘤组的表达要低于正常人组. 经过验证, 发现 RT-PCR 结果与芯片结果基本吻合

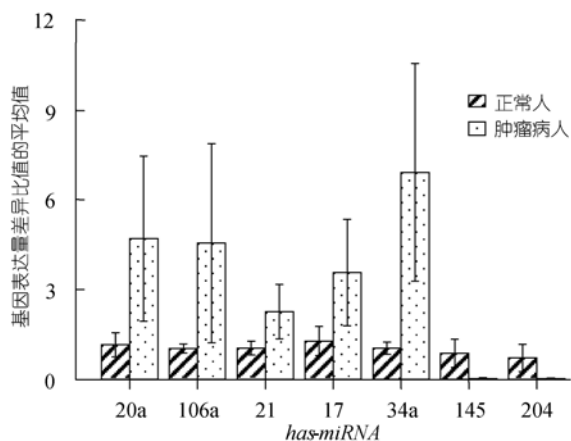


图 4 正常人脉络膜组织和脉络膜黑色素瘤组织 miRNA RT-PCR 结果比较

has-miRNA-20a, *has-miRNA-106a*, *has-miRNA-17*, *has-miRNA-21* 明显上调表达, *has-miRNA-145* 和 *has-miRNA-204* 明显下调表达

He 等人^[7]发表的文章描述了 miRNAs, Myc 和癌症之间的关系. 在散布的 B 细胞淋巴瘤、滤泡型淋巴瘤、套细胞淋巴瘤等肿瘤中发现了 13q31 位点的扩增, 在该扩增区域唯一的基因就是 *C13orf25*, 一个非编码蛋白的 RNA, 其转录本编码了 *miRNA-17-92* 基因簇. 他们还发现, 在 65% 的 B 细胞淋巴瘤细胞样品中, *miRNA-17-92* 的前体分子表达增加. 因此推断, 这个基因簇的过表达与肿瘤形成有关. 而在 Guil 等人^[8]对 *miRNA-17-92* 基因簇的研究中发现. 这些 miRNA 是 RNA 内(intronic RNAs)表达的一部分, 其中包括了 *miRNA-17*, *miRNA-18a*, *miRNA-19a*, *miRNA-20a*, *miRNA-19b-1* 和 *miRNA-92*, 这些 miRNAs 被认为具有原癌基因的潜力.

O'Donnell 等人^[9]的研究指出, 肿瘤抑制基因 *miRNA-20a*, 具有减少其靶基因 *E2F1* 的作用. 他们在淋巴瘤的实验中发现, *Myc* 和 *miRNA-17-19-b1* 基

因簇同时有过量表达和单有过量表达*Myc*的肿瘤相比较, 具有更强的增殖能力且细胞死亡率更低. 但*E2F1*可以正反馈调节*Myc*. 他们还发现, 在一株子宫癌细胞株中的miRNA-17-5p和miRNA-20a抑制其表达可以显著提高*E2F1*的表达, 在此过程中并不影响其mRNA的含量, 这是miRNA介导的基因抑制的特点. 在*Myc*存在的情况下, miRNA-17-92基因簇中的miRNAs限制了*E2F1*的活性, 经由阻断*Myc*和*E2F1*的正反馈循环, 减弱了*Myc*对于细胞增殖的影响. 在他们的实验中, miRNA-17-92基因簇表现为抑癌基因的作用, 这与He等人的发现相反. 而与该模型一致的, 编码miRNA-17-92的13q31位点在肝癌中丢失. 虽然*E2F1*可以促进细胞增殖, 但*E2F1*的表达水平超过一定值, 也可以引起细胞的凋亡. 在这一情形下, miRNAs可能是通过阻断*E2F1*诱导凋亡活性来达成负调控, 进而促进*Myc*介导的细胞增殖, 这与He等人提出的模型一致. miRNA-17-92基因簇拥有抑癌基因和癌基因的双向功能, 表明肿瘤发生的复杂性.

Tanzer 和 Stadler^[10]指出, miRNA-106a 与 miRNA-17 为同源的原癌基因, 所以推算 miRNA-106a 也是一种肿瘤基因, 在人类实体瘤(solid tumors), 如结肠癌、胰腺癌和前列腺癌中, miRNA-106a 表达增加, 而 miRNA-92-2 在胰腺癌、前列腺癌和胃癌中表达上调. Xiao 等人^[11]在胃癌的研究中发现, 癌组织中 miRNA-106a 的水平高于正常组织, 并且明显和肿瘤的大小分化、淋巴转移、浸润侵袭有关. miRNA-106a 在结肠癌对无癌生存率的实验中, Raquel 等人^[12]对经肿瘤切除后的病人生存率的研究中, 发现 miRNA-106a 的表达越低, 其患者的生存率就越低, 这和 Feng^[13]对星形细胞瘤的研究结果相似, 切除了星形细胞瘤后, 病人的生存率跟 miRNA-106a 成正相关. 可见 miRNA-106a 在肿瘤发生过程中, 不仅只扮演了促进肿瘤生长的角色, 但 miRNA-106a 详细的调控过程仍需进一步探讨.

许多文章指出, miRNA-21 在多种肿瘤中异常表达. Volinia 等人^[14]对 540 例人类样本进行了 miRNA 芯片筛查, 其中 363 份来源于 6 大实体瘤: 肺癌、乳腺癌、胃癌、前列腺癌、结肠癌和胰腺癌. 研究发现, miRNA-21 与各种肿瘤发生存在密切的联系, 在不同肿瘤中, miRNA-21 的异常高表达是一种普遍现象. 而后在慢性淋巴细胞性白血病、肝癌、头颈部肿瘤和人骨肉瘤等肿瘤中, 都发现了异常高表达的 miRNA-21.

Kunz 等人^[15]在转移性黑色素瘤患者的研究中发现, 与非治疗组对比, 在经过了各种不同的治疗后, miRNA-21 表现为下调. 该研究首次发现, miRNA 对化疗发生了应答, 在黑色素瘤的发病机制中可能有重要的影响. 陈旧^[16]对神经胶质瘤的研究中也发现, 过表达的异源 miRNA-21, 能直接抑制其靶基因位点 PCDC4 的翻译, 而 PCDC4 的蛋白水平能调控神经胶质瘤的凋亡. 结合国内外对 miRNA-21 的研究, 微小 RNA 开始在对抗肿瘤的方法上有了崭新的一页, 这在以后针对脉络膜黑色素瘤的基因治疗研究中, 提供了一个很好的思路.

Yan 等人^[17]发现, 脉络膜黑色素瘤细胞系中, miRNA-34a 下调 C-MET, 然后经由 HGF 依赖的 Akt 信号转导通路来抑制细胞的增殖和转移. 而 miRNA-34a 在结肠癌、胰腺癌和成神经瘤细胞中也能抑制细胞增殖. 这与本实验结果不符, 有可能因为他们选用脉络膜黑色素瘤细胞系来进行实验, 而本实验是对人的脉络膜黑色素瘤和正常人脉络膜组织进行 miRNA 检测. Zanatte 等人^[18]对 CLL 进行 miRNA 表达谱检测时, 发现 miRNA-34a 表达上调, 可以推测在对不同种类的肿瘤中, miRNA 对靶基因的调节方式可能大不相同, 即可通过不同的信号路径, 也可通过同一信号路径的不同环节来完成, 所以同一 miRNA 对不同的肿瘤中的基因可能会有不同的调节方式, 这需要进一步实验验证.

目前研究显示, miRNA-145 在乳腺癌、结肠癌和淋巴瘤细胞中表达都是下调的. Michael 等人^[19]发现, miRNA-143 和 miRNA-145 在结肠直肠癌中低表达. 而结肠直肠癌中, 成熟的 miRNA-145 水平显著下降, 但这些 miRNAs 前体转录体在正常组织和肿瘤中检测到的数目并没有太大差别, 显示 miRNA-145 在肿瘤形成的过程中有成熟障碍. 张晴等人^[20]对乳腺癌和乳腺良性病变(包括 21 例纤维腺瘤, 17 例乳腺腺病)的研究发现, miRNA-45 在乳腺癌中表达明显下调, 而且与乳腺癌的转移有关. 目前对于 miRNA-204 的研究很少, Deo 等人^[21]在哺乳动物的脉络丛中发现有 miRNA-204 的表达. 而 Wu 等人^[22]在子宫内膜样腺瘤中发现 miRNA-204 的表达下调.

由本实验可见, 上调的基因为 *has-miRNA-20a*, *has-miRNA-106a*, *has-miRNA-34a*, *has-miRNA-17*, *has-miRNA-21*, 而下调的基因有 *has-miRNA-145* 和 *has-miRNA-204*, 在大多数针对肿瘤的研究中, miRNA-

20a, miRNA-106a 和 miRNA-17 都是特异性上调, miRNA-145 和 miRNA-204 则为特异性下调, 这些 miRNA 在肿瘤的作用中, 起了肿瘤异常增殖的功能, 说明脉络膜黑色素瘤也是由异常增殖的组织而来。而 miRNA-21 与脉络膜黑色素瘤的转移有着重要的关系。本实验中, 有 3 例为转移性较低的梭形细胞型和一例以梭形细胞为主的混合型脉络膜黑色素瘤, 它们 miRNA-21 的表达并不高, 这符合国外文献报导的结果^[23], 在恶性度和转移性较高的肿瘤中, 而且肿瘤的病理学分级越高(恶性度越高), miRNA-21 的表达就越高。能否从抑制 miRNA-21 的表达来降低脉络膜黑色素瘤的转移能力, 还有待进一步地研究。

根据目前对各种肿瘤 miRNA 的研究结果, miRNA 具有重要的肿瘤抑制基因功能, 可能在肿瘤的基因治疗上提供很大的帮助。类似于上面比较肿瘤和正常组织的 miRNA 水平的方式, 进行大范围的 miRNA 表达谱检测, 可以鉴定肿瘤有关的新的 miRNA。放眼未来, 使用与 miRNA 互补的合成反义寡聚核苷酸“抗 miRNA 寡聚核苷酸(AMOs)”可以有效地灭活肿瘤中有促癌作用 miRNAs, 从而抑制肿瘤

生长进而导致其死亡。这些技术在某些特异的启动子控制下, 使 pre-miRNA 及其两侧序列表达, 并且促使内源性的 miRNA 加工, 产生有效的 miRNA 去抑制癌基因的表达。但这些方法, 却有可能因为免疫反应的作用阻挡 RNA 的有效运送, 从而使抑制癌基因表达的作用受到限制。miRNA 的治疗从实验室到临床应用, 还需要进一步研究, 此方面的研究也将为脉络膜黑色素瘤的治疗提供途径。

5 结论

本实验对 4 例脉络膜黑色素瘤和 4 例正常人脉络膜组织 miRNA 表达水平进行了比较, 初步取得了脉络膜黑色素瘤有差异性表达的 miRNA 结果。遗憾的是, 由于脉络膜黑色素瘤和正常人眼脉络膜组织取得不易, 本实验并未对脉络膜黑色素瘤进行分型研究, 只是对近期收集行局部切除手术的病例进行初步的研究。未来在增加例数和对各型脉络膜黑色素瘤的分析上, 进行更深入地研究, 探讨其发病机制及导入基因治疗的思路, 为临床治疗提供更方便有效的治疗手段。

参考文献

- 1 Bedikian A Y. Metastatic uveal melanoma therapy: current options. *Int Ophthalmol Clin*, 2006, 46: 151—166
- 2 He L, Thomson J M, Hemann M T, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 2005, 435: 823—833
- 3 Zamore P D, Haley B. Ribo2genome: the big world of small RNAs. *Science*, 2005, 309: 1519—1524
- 4 Xie X, Lu J, Kulbokas E J, et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*, 2005, 434: 338—345
- 5 Calin G A, Dumitru C D, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 15524—15529
- 6 Lori A W, Meghan D L, Michael D O, et al. micro-RNAs associated with metastasis in uveal melanoma identified by multiplexed microarray profiling. *Melanoma Res*, 2008, 18: 184—190
- 7 He L, Thomson J M, Hemann M T, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 2005, 435: 828—833
- 8 Guil S, Cáceres J F. The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miRNA-18a. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14: 591—596
- 9 O'Donnell K A, Wentzel E A, Zeller K I, et al. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 2005, 435: 839—843
- 10 Tanzer A, Stadler P F. Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol*, 2004, 339: 327—335
- 11 Xiao B, Guo J, Miao Y, et al. Detection of miRNA-106a in gastric carcinoma and its clinical significance. *Clin Chim Acta*, 2009, 400: 97—102
- 12 Díaz R, Silva J, García J M, et al. Deregulated expression of miRNA-106a predicts survival in human colon cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer*, 2008, 47: 794—802
- 13 Zhi F, Chen X, Wang S, et al. The use of hsa-miRNA-21, hsa-miRNA-181b and hsa-miRNA-106a as prognostic indicators of astrocytoma. *Eur J Cancer*, 2010, 46: 1640—1649
- 14 Volinia S, Calin G A, Liu C G, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad*

- Sci USA, 2006, 103: 2257—2261
- 15 Kunz M, Schultz J, Ibrahim S. Role of microRNA in melanoma progression. *Melanoma Res*, 2006, 16: 553—554
 - 16 陈旧. miRNA-21 靶向 PDCD4 影响神经胶质瘤细胞的凋亡. 博士学位论文. 北京: 中国协和医科大学, 2008
 - 17 Yan D, Zhou X, Chen X, et al. microRNA-34a inhibits uveal melanoma cell proliferation and migration through downregulation of c-Met. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50: 1559—1565
 - 18 Zanette D L, Rivadavia F, Molfetta G A, et al. miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. *Braz J Med Biol Res*, 2007, 40: 1435—1440
 - 19 Michael M Z, O'Connor S M, van Holst Pellekaan N G, et al. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*, 2003, 1: 882—891
 - 20 张晴, 吴正升, 张瑰红. miRNA-145 在乳腺癌中表达及意义. *临床与实验病理学杂志*, 2009, 25: 9—11
 - 21 Deo M, Yu J Y, Chung K H, et al. Detection of mammalian microRNA expression by in situ hybridization with RNA oligonucleotides. *Dev Dynam*, 2006, 235: 2538—2548
 - 22 Wu W, Lin Z, Zhuang Z, et al. Expression profile of mammalian microRNAs in endometrioid adenocarcinoma. *Eur J Cancer Prev*, 2009, 18: 50—55
 - 23 Bandrés E, Cubedo E, Agirre X, et al. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer*, 2006, 5: 29