

【应用研究】

[12] HAO G S, HU B D, LIU Z S, ZENG L, LIU Q, MAO K. Changes of corneal thickness and corneal posterior surface Elevation[J]. *J Clin Ophthalmol*, 2015, 23(6): 524-527.

因素。AMD 根据病理类型分为干性 AMD 和湿性 AMD,湿性 AMD 的病理变化是形成脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV)^[1]。目前临床上主要通过玻璃体内注射抗血管内皮生长因子治疗湿性 AMD,虽然有一定疗效,但是无法有效治愈^[2]。AMD 患者主要依据症状、眼底照相、光学相干断层扫描 (optical coherence tomography, OCT) 以及荧光素眼底血管造影 (fundus fluorescein angiography, FFA) 明确诊断^[3],而干性 AMD 患者早期不出现明显的视力下降,很难在早期诊断并进行有效的治疗,约 10% 的患者会进展到湿性 AMD。目前,尚没有研究发现如何预防干性 AMD 发展成湿性 AMD,因此,如何早期发现进展的干性 AMD,并及时阻断疾病进展,显得尤为重要。

微小核糖核酸 (microribonucleic acid, miRNA) 是一类长度为 21 ~ 25 个核苷酸的非编码核苷酸 (ribonucleic acid, RNA)^[4],通过剪辑互补原则结合到靶信使核糖核酸 (messenger ribonucleic acid, mRNA) 3' 非翻译区 (3' untranslated region, 3' UTR),诱导 mRNA 降解或阻止其翻译进行,从而调控目的基因的表达。越来越多的研究表明,miRNA 参与细胞增殖,凋亡、死亡和细胞分化等一系列生物学进程。Karali 等^[5]研究发现,miRNA 参与调控视网膜的发育和视网膜疾病的进展^[6],并且 miRNA 表达异常与 AMD 病程相关^[7]。多项研究也证明了外周循环血中 miRNA 对于疾病的早期诊断具有重要的作用^[8-9]。本研究通过基因芯片技术检测 AMD 患者外周血中 miRNA 表达水平与 AMD 病程进展的相关性,并采用实时定量逆转录聚合酶链式反应 (real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR) 的方法定量分析 AMD 患者血液中的 miRNA 表达水平,旨在发现对于早期诊断 AMD 具有参考价值的 miRNA。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 1 月至 2016 年 11 月同济大学附属第十人民医院眼科门诊就诊的 6 例 AMD 患者作为试验组,其中男 4 例,女 2 例,年龄 (68.5 ± 7.8) 岁。AMD 诊断依据为年龄 > 50 岁,眼底散在玻璃膜疣、视网膜脉络膜萎缩、出血伴新生血管,经 OCT 以及 FFA 确诊^[10]。同期选取 6 名年龄和性别与之相匹配的正常老年人作为对照组,其中男 4 人,女 2 人,年龄 (65.7 ± 6.9) 岁,两组年龄差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。扩大样本的病例对照研究中纳入了 126 例 AMD 患者和 140 名健康受试者,AMD 组男 67 例,女 59 例,年龄 (58.4 ± 11.2) 岁,其中包括 72 例干性 AMD 患者及 54 例湿性 AMD 患者;健康受试组男 74 人,女 66 人,年龄 (54.9 ± 10.7) 岁。两组性别与年龄差异均无统计学意义 (均为 $P > 0.05$)。

1.2 纳入与排除标准 纳入标准^[10]: (1) 眼底彩色照相有融合的边界不清的玻璃膜疣,黄斑区视网膜下出血; (2) OCT 表现为视网膜色素上皮/脉络膜毛细血管层的红色反射光带,局限性增厚; (3) FFA 呈现透见荧光时,表现为视网膜色素上皮萎缩,色素沉着处可有遮蔽荧光,后期有荧光素渗漏。排除标准^[11]: (1) 高度近视,近期诊断为结膜炎、角膜炎或葡萄膜炎; (2) 黄斑裂孔患者、黄斑水肿、视网膜血管闭塞或中心性浆液性脉络膜视网膜病变; (3) 近期确诊的感染、高血压、糖尿病、癌症、阿尔茨海默病、中风、自身免疫性疾病等器质性病变; (4) 任何未完成相关检查或调查的患者。

1.3 方法

1.3.1 RNA 提取 用肝素抗凝管分别采集试验组及对照组外周静脉血 0.5 mL,加入 TRIzol 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA, 美国) 1 mL。室温放置 5 min,转移至灭菌的 2 mL 离心管中, $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃沉淀,加入 0.2 mL 氯仿,混匀后室温放置 15 min。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,吸上层水相加入另一离心管,加入 0.5 mL 异丙醇,混匀后室温放置 5 ~ 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, RNA 沉于管底,弃上清,加入 1 mL 体积分数为 75% 乙醇悬浮沉淀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $8\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,尽量弃上清,空气干燥沉淀,溶解于 20 μL DEPC 水中,留样 2 μL 定量,其余 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。使用 NanodropND-2000 分光光度计 (Thermo Scientific, Worcester, MA, 美国) 测定 RNA 的纯度。

1.3.2 基因芯片技术分析 通过 miRCURYTM Hy3TM/Hy5TM 标记试剂盒将经过质量检测的两组全血样本总 RNA 进行靶标制备,与 miRCURYTM 核苷酸芯片进行芯片杂交。清理基因芯片后,用分析系统 (genepix Pro 6.0 软件, Axon) 分析所有芯片,选取每张芯片上修正值都 ≥ 30 的非对照探针做标准化,以这部分探针中值 (median, M) 作为标准化因子对整张芯片的点做标准化处理,即各个 miRNA 修正值/M = 标准值。

1.3.3 RT-PCR 分析 用 Taqman miRNA 检测方法检测两组全血样品中 miRNA 的表达。使用 Applied Biosystem (Foster City, CA, USA) 逆转录试剂盒中的试剂、引物和探针。取 12 份全血总 RNA (120 ng) 分别加入含有逆转录混合物和引物的 15 μL 反应体系中。混匀后 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行 20 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行 34 s。所有实验均使用 Mx3005P qPCR 系统 (Agilent, Santa Clara, CA, 美国) 进行。用 18 S RNA 作内参数据,通过比较循环阈值 ($2^{-\Delta\Delta CT}$) 计算 miRNA 的相对表达量。使用线性模型微阵列数据分析来自微阵列或转录组测序技术的基因表达数据^[12]。

1.3.4 生物信息学分析 通过 miRBase (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/tar>

gets/v5/Microcosm)、Miranda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do> hg19, Miranda) 和 targetscan (http://www.targetscan.org/vert_60/)等基因库预测 miRNA 的目的基因。使用 GO 条目、“京都基因和基因组百科全书”分析绘制基因本体注释图,并标注目的基因。

1.3.5 数据分析 使用 SPSS 16.0 进行数据分析。通过双尾测验分析试验组与对照组之间外周血中 miRNA 的表达量差异。数据以均数 ± 标准差表示。通过受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic, ROC)分析验证多种 miRNA(尤其是上述三种表达量明显差异的 miRNA)的诊断效果,并计算灵敏度和特异度。检验水准: $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 miRNA 表达量差异 基因芯片分析结果显示,与对照组相比,试验组中 216 个外周血 miRNA 的表达水平存在差异,其中 111 个 miRNA 表达量上升,105 个 miRNA 表达量下降,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。由于表达量不同的 miRNA 数量较多,将 P 值设定为小于 0.05,且差异倍数大于两倍作下一步分析。在此条件下共筛选出 35 个差异表达的 miRNA,其中 15 个 miRNA 表达量上升,20 个 miRNA 表达量下降,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。见表 1。

2.2 生物信息学分析 GO 分析了调控不同信号通路的相关靶基因,与生物过程相比,调控细胞过程、单一生物过程和代谢过程相关通路的基因表达量显著改变,这意味着表达量异常的 miRNA 主要参与调控上述的生物学过程。为了明确具体通路,进行了 miRNAs 靶基因的通路分析(数据库:<http://www.kegg.jp/>)。结果显示,细胞周期通路 AMD 的相关性最高,相关程度明显高于其他相关通路。这表明细胞周期失调可能参与 AMD 疾病发展过程。

2.3 扩展性病例研究结果 对照试验从微阵列测量结果中选取 10 个 miRNA(miR-152、miR-27a-3p、miR-28-5p、miR-195-5p、miR-559、miR-25-3p、miR-29b-3p、has-let-7c、miR-328 和 miR-584-5p)进行对比。与健康受试组相比,AMD 组中 miR-27a-3p、miR-29b-3p 和 miR-195-5p 的表达明显增加,分别增加(2.68 ± 1.00)倍、(3.53 ± 1.78)倍和(4.23 ± 3.08)倍。而其他 miRNA 两组差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。见图 1。

2.4 miRNA 的表达量差异与 AMD 病程相关性 进一步验证上述 3 种 miRNA 的表达量,在湿性 AMD 患者中 miR-27a 表达量比干性 AMD 患者中更高,而 miR-29b-3p 和 miR-195-5p 表达量两组差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。见图 2。

表 1 基因芯片技术分析得出 miRNA 表达量差异

名称	表达水平差异	倍率
hsa-miR-644b-5p	上升	4.92
hsa-miR-559	上升	3.71
hsa-miR-152	上升	3.66
hsa-miR-195-5p	上升	3.41
hsa-miR-27a-3p	上升	2.63
hsa-miR-126-5p	上升	2.51
hsa-miR-4638-5p	上升	2.43
hsa-miR-28-5p	上升	2.34
hsa-let-7c	上升	2.33
hsa-miR-5189	上升	2.29
hsa-miR-1273f	上升	2.15
hsa-miR-513b	上升	2.08
hsa-miR-25-3p	上升	2.07
hsa-miR-149-3p	上升	2.01
hsa-miR-29b-3p	上升	2.00
hsa-miR-513c-3p	下降	0.47
hsv2-miR-H9-3p	下降	0.46
hsa-miR-30c-1-3p	下降	0.46
hsa-miR-4723-3p	下降	0.46
hsa-miR-3614-3p	下降	0.45
hsa-miR-3195	下降	0.45
hsa-miR-4305	下降	0.45
hsa-miR-328	下降	0.44
hsa-miR-4324	下降	0.41
hsa-miR-4658	下降	0.41
hsa-miR-584-5p	下降	0.38
hsa-miR-2114-5p	下降	0.38
hsa-miR-186-3p	下降	0.38
hsa-miR-5571-5p	下降	0.38
hsa-miR-18b-3p	下降	0.36
hsa-miR-4667-3p	下降	0.34
hsa-miR-4436b-5p	下降	0.33
hsa-miR-4653-3p	下降	0.31
hsv1-miR-H14-3p	下降	0.29
hsa-miR-1470	下降	0.13

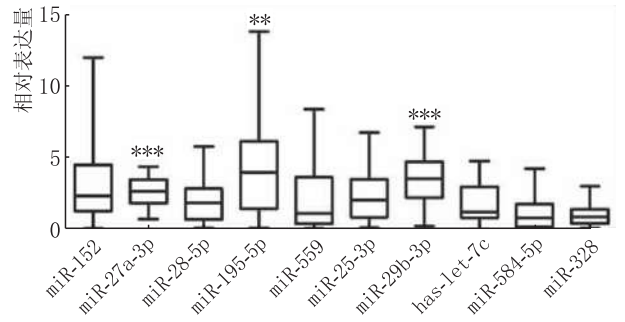


图 1 AMD 组与对照组血清中差异表达的 miRNA。* $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.5 miRNA 表达量差异的诊断效果 用 ROC 进一步分析了 126 例 AMD 患者和 140 名健康受试者样本中 3 种 miRNA 表达量差异的诊断效果。通过 RT-PCR 方法检测每个参与者的 miR-27a-3p、miR-

29b-3p 和 miR-195-5p 表达水平,将数据输入 SPSS 软件,用 ROC 曲线表示表达量不同的 miRNA 的诊断效果。根据 ROC 曲线分析发现,3 种 miRNA 都可以作为 AMD 的诊断标记物。miR-27a-3p (图 3A)、miR-29b-3p (图 3B) 和 miR-195-5p (图 3C) 的 ROC 面积分别为 0.925 (95% CI = 0.892 ~ 0.963) 和 0.757 (95% CI = 0.679 ~ 0.832) 和 0.766 (95% CI = 0.672 ~ 0.813)。该结果显示,外周血中的 miR-27a-3p、miR-29b-3p 和 miR-195-5p 具有作为 AMD 诊断的生物标志物的可能性。当 miR-27a-3p ≥ 12.0 时,灵敏度为 0.825,特异性为 0.728;当 miR-29b-3p ≥ 10.6 时,灵敏度为 0.688,特异性为 0.718;当 miR-195-5p ≥ 10.2 时灵敏度为 0.726,特异性为 0.596。

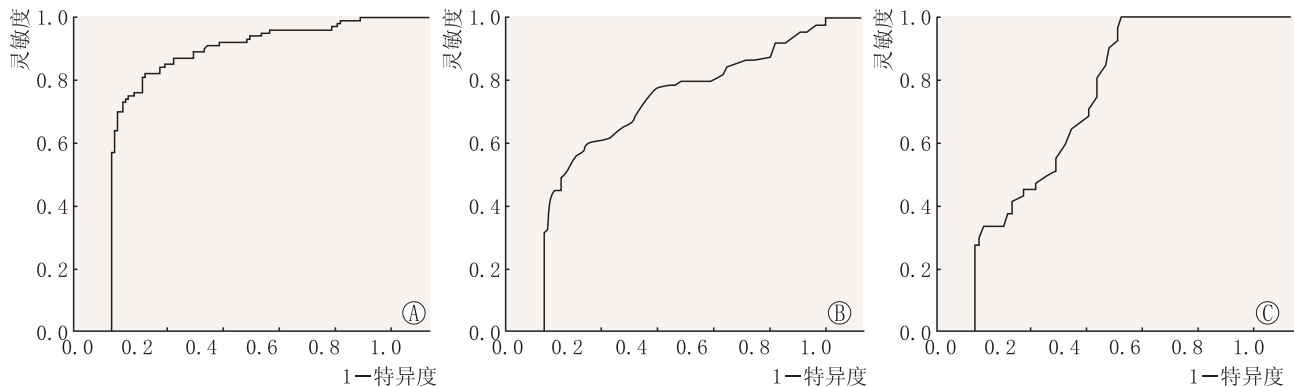


图2 miR-27a、miR-29b-3p 和 miR-195-5p 在干性 AMD、湿性 AMD 与对照组中的表达

图3 miR-27a-3p、miR-29b-3p 和 miR-195-5p 诊断 AMD 的 ROC 曲线。A:miR-27a-3p 的 ROC 曲线;B:miR-29b-3p 的 ROC 曲线;C:miR-195-5p 的 ROC 曲线

3 讨论

AMD 是 50 岁以上人群不可逆视力丧失最主要的原因之一。干性 AMD 患者早期仅出现轻度症状,但进展为湿性 AMD 时,患者的视力严重受损。目前,针对湿性 AMD 主要是通过抗 VEGF 药物治疗,而对于干性 AMD,多使用抗氧化剂延缓其症状发展,因此寻找 AMD 早期诊断和预后的有效指标尤为重要^[13]。本研究发现,miR-27a-3p、miR-195-5p 和 miR-29b-3p 在 AMD 患者中的表达量存在明显差异,因此,外周血中 miRNA 可能成为湿性 AMD 早期诊断的生物标志物。本研究还弥补了 AMD 病例中外周血 miRNA 高通量分析的缺失,发现 AMD 患者中 miRNA 水平的变化情况,对于 AMD 生物标志物的研究具有重要的作用。

目前已发现 miRNA 调节多种细胞功能并参与多种细胞通路。视网膜细胞功能紊乱是导致 AMD 疾病进展的关键因素。近期的研究表明,miRNA,如 miR-17、miR-21、miR-27、miR-132、miR-204、miR-210、miR-296、miR-378、miR-519c 和 miR-15/107 等都与 AMD 的病程发展有关^[14-15]。眼内 miRNA 的失调可能同时导致血液中 miRNA 表达量的差异。因此,研究外周血中 miRNA 在 AMD 患者中的表达量差异对

于发现 AMD 疾病的无创生物标志物具有重要意义。本研究利用基因芯片技术显示,AMD 组与对照组中外周血 miRNA 的表达量差异,共检测到 35 种变化倍率大于 2 的 miRNA (15 种 miRNA 表达量上调和 20 种 miRNA 表达下调),考虑到 miRNA 表达的个体化差异,从中选择 10 个表达量水平显著且稳定的 miRNA,其余 miRNA 有待进一步验证。生物形态学分析表明,外周血中 miRNA 表达量差异主要与细胞进程,生物调控和代谢过程有关,同时表明细胞功能失调是 AMD 的主要发病机制。此外,靶基因的功能富集分析表明,细胞周期通路在 AMD 发病机制中百分比最大。通路分析的结果证实了 AMD 患者中的细胞功能失调。然而,目前尚无一项完整的关于 AMD 进展与细胞周期功能障碍的研究。因此,本研究的结果将为 AMD 疾病研究进展提供新的方向。

尽管微阵列谱具有快速、稳定和高通量结果的优点,但其包含的样本容量较少。因此,我们进行了扩大样本的病例对照试验进行验证。从基因芯片分析结果中选出 10 个 miRNA (miR-152、miR-27a-3p、miR-28-5p、miR-195-5p、miR-559、miR-25-3p、miR-29b-3p、has-let-7c、miR-328 和 miR-584-5p) 用于进一步验证,发现其验证结果与 miRNA 基因芯片试验结果相一致。在 10 个选定的 miRNA 中,三个 miRNA

检测到统计学差异。与健康受试组相比,AMD 组中 miR-27a-3p、miR-29b-3p 和 miR-195-5p 表达量分别为 2.68、3.53 和 4.23 倍。其中 miR-27a-3p 在干性和湿性 AMD 组之间同样表现出表达量水平差异,提示 miR-27a-3p 更具有作为 AMD 疾病进展生物标志物的潜力。3 种 miRNAs 的 ROC 曲线分析也显示这 3 种 miRNAs 可以作为 AMD 的生物标志物。同时 miR-27a-3p 也表现出最高的灵敏度(0.825)和最高的特异性(0.728)。

目前尚没有研究发现 miR-27a-3p、miR-29b-3p 和 miR-195-5p 在 AMD 的发病中发挥作用。本研究发现湿性 AMD 中 miR-27a-3p 的表达高于干性 AMD,miR-27a-3p 表达量上调可能与湿性 AMD 的 CNV 生成有关。miR-29-3p 和 miR-195-5p 分别位于染色体 18 和 17 上,这两种 miRNA 参与细胞分化和肿瘤形成^[16],在多种疾病的诊断与治疗中发挥作用^[17]。后续试验将重点研究上述三种基因与 AMD 病程之间的关系。

本研究尚有一些不足之处。首先,样本量较小;其次,本研究缺乏长期的随访资料,很难确定循环 miRNA 在 AMD 疾病发展中的预后效应;第三,尽管本研究中发现了几种具有潜在作用的特异性 miRNA,但详细的机制还有待进一步研究。考虑到本研究的数据是基于 AMD 患者的全血样本,外周血中 miRNA 含量的变化可能不完全符合局部变化,在进行进一步的体外研究之前应进行更多的分析。因此,在后续的研究中将扩大样本量,并进行组织和血样中 miRNA 表达量的比较,进一步研究 miRNAs 在 AMD 发病机制中的确切作用。

参考文献

[1] LUTTRULL J K,MARGOLIS B W. Functionally guided retinal protective therapy for dry age-related macular and inherited retinal degenerations; A pilot study [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2016,57(1):265-275.

[2] EANDI C M,ALOVISI C,DE SANCTIS U,GRIGNOLO F M. Treatment for neovascular age related macular degeneration; The state of the art[J]. *Eur J Pharmacol*,2016,787:78-83.

[3] VAN LOOKEREN CAMPAGNE M,STRAUSS E C,YASBAN B L. Age-related macular degeneration; Complement in action [J]. *Immunobiology*,2016,221(6):733-739.

[4] ZUO K,ZHI K,ZHANG X,LU C,WANG S,LI M,et al. A dys-

regulated microRNA-26a/EphA2 axis impairs endothelial progenitor cell function via the p38 MAPK/VEGF pathway[J]. *Cell Pysiol Biochem*,2015,35(2):477-88.

[5] KARALI M,PERSICO M,MUTARELLI M,CARISSIMO A,PIZZO M,SINGH MARWAH V,et al. High-resolution analysis of the human retina miRNome reveals isomiR variations and novel microRNAs [J]. *Nucleic Acids Res*,2016,44(4):1525-1540.

[6] WU J,WANG R,YE Z,SUN X,CHEN Z,XIA F,et al. Protective effects of methane-rich saline on diabetic retinopathy via anti-inflammation in a streptozotocin-induced diabetic rat model[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2015,466(2):155-161.

[7] BHATTACHARJEE S,ZHAO Y,DUA P,ROGAEV E I,LUKIW W J. microRNA-34a-mediated down-regulation of the microglial-enriched triggering receptor and phagocytosis-sensor TREM2 in age-related macular degeneration[J]. *PLoS One*,2016,11(3):e0150211.

[8] SUN Y,LIU Y,COGDELL D,CALIN G A,SUN B,KOPETZ S,et al. Examining plasma microRNA markers for colorectal cancer at different stages[J]. *Oncotarget*,2016,7(10):11434-11449.

[9] CHANG P Y,CHEN C C,CHANG Y S, TSAI W S,YOU J F,LIN G P,CHEN T W,et al. MiRNA-223 and microRNA-92a in stool and plasma samples act as complementary biomarkers to increase colorectal cancer detection[J]. *Oncotarget*,2016,7(9):10663-10675.

[10] LAURENCE S L,PAUL M,JOHANNA M S,FRANK G H,TIEN Y W. Age-related macular degeneration[J]. *Lancet*,2012,379(9827):1728-1738.

[11] REN X. Image characteristics of wet age-related macular degeneration by optical coherence tomography angiography [J]. *Cont Med*,2018,24(26):149-151.
任旋. 湿性老年性黄斑变性光相断层扫描血管成像图像特征研究[J]. 当代医学,2018,24(26):149-151.

[12] SMYTH G K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments [J]. *Stat Appl Genet Mol Biol*,2004,3:Article3.

[13] SINGH N,SRINIVASAN S,MURALIDHARAN V,ROY R,V J, RAMAN R. Prevention of age-related macular degeneration [J]. *Asia Pac J Ophthalmol(Phila)*,2017,6(6):520-526.

[14] MACHALINSKA A,KAWA M P,MARLICZ W,MACHALINSKI B. Complement system activation and endothelial dysfunction in patients with age-related macular degeneration (AMD): possible relationship between AMD and atherosclerosis[J]. *Acta Ophthalmol*,2012,90(8):695-703.

[15] WANG S,KOSTER K M,HE Y,ZHOU Q. miRNAs as potential therapeutic targets for age-related macular degeneration [J]. *Future Med Chem*,2012,4(3):277-287.

[16] ZHANG Y,ZHANG D,WANG F,XU D, GUO Y,CUI W. Serum miRNAs panel (miR-16-2*, miR-195, miR-2861, miR-497) as novel non-invasive biomarkers for detection of cervical cancer[J]. *Sci Rep*,2015,5:17942.

[17] CHEN X,SHI K,WANG Y,SONG M,ZHOU W,TU H,et al. Clinical value of integrated-signature miRNAs in colorectal cancer:miRNA expression profiling analysis and experimental validation[J]. *Oncotarget*,2015,6(35):37544-37556.