

miR-34a 对葡萄膜黑色素瘤细胞生物学行为的抑制作用及其机制

张珂 朱豫 王丽丽 王婧

郑州大学第一附属医院眼科, 郑州 450052

通信作者: 朱豫, Email: 13673666718@163.com

【摘要】 目的 研究微小 RNA-34a(miR-34a)对葡萄膜黑色素瘤细胞生物学行为的影响及其机制。 **方法** 采用葡萄膜黑色素瘤 M23 细胞作为研究对象,在细胞中分别转染 miR-34a mimics 和 mimics 阴性对照,分别记作 miR-34a 转染组和阴性对照组,设置不转染的细胞为正常对照组。采用 real-time PCR 法检测转染后 miR-34a 过表达效果,MTT 法检测细胞增殖情况,Transwell 小室试验检测细胞侵袭和迁移。靶基因预测库预测 miR-34a 的靶基因,荧光素酶报告载体鉴定靶基因,real-time PCR 和 Western blot 法检测靶基因的 mRNA 和蛋白表达。在 M23 细胞中共转染 miR-34a mimics 和小眼畸形相关转录因子(MITF)过表达载体,采用 MTT 法和 Transwell 小室试验分别检测细胞增殖、侵袭和迁移能力变化,real-time PCR 和 Western blot 法检测 MITF mRNA 和蛋白表达。 **结果** 转染 miR-34a mimics 后的 M23 细胞中 miR-34a 表达水平升高。正常对照组、阴性对照组和 miR-34a 转染组间细胞增殖值、侵袭细胞数目和迁移细胞数目总体比较,差异均有统计学意义 ($F=18.000, P=0.003; F=20.345, P=0.002; F=15.717, P=0.004$),其中 miR-34a 转染组较正常对照组、阴性对照组细胞增殖值减小,侵袭细胞数目和迁移细胞数目减少,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。靶基因预测库及荧光素酶活性报告基因载体显示,MITF 为 miR-34a 的靶基因。miR-34a 转染组 MITF mRNA 和 MITF 蛋白的相对表达量分别为 0.45 ± 0.06 和 0.36 ± 0.04 ,阴性对照组分别为 0.99 ± 0.11 和 0.62 ± 0.05 ,正常对照组分别为 1.00 ± 0.07 和 0.63 ± 0.08 ,miR-34a 转染组 MITF mRNA 和蛋白表达水平明显低于阴性对照组和正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。miR-34a+MITF 组细胞增殖值(A_{570})、侵袭细胞数目和迁移细胞数目分别为 0.35 ± 0.02 、 (29.48 ± 3.20) 个和 (41.87 ± 5.82) 个,明显高于 miR-34a+Vector 组的 0.26 ± 0.03 、 (18.53 ± 1.47) 个和 (27.64 ± 2.45) 个,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。 **结论** miR-34a 具有抑制葡萄膜黑色素瘤细胞恶性表型的作用,其作用机制与抑制靶基因 MITF 的表达有关。

【关键词】 微小 RNA; 葡萄膜黑色素瘤; 侵袭; 迁移; 小眼畸形相关转录因子; miR-34a

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.05.002

Inhibitory effect of miR-34a on biological behavior of uveal melanoma cells and its mechanism

Zhang Ke, Zhu Yu, Wang Lili, Wang Jing

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Corresponding author: Zhu Yu, Email: 13673666718@163.com

[Abstract] Objective To study the effect of microRNA-34a(miR-34a) on the biological behavior of uveal melanoma cells and its mechanism. **Methods** Uveal melanoma M23 cells were used as research objects, miR-34a mimics and mimics negative control were transfected into the cells respectively as miR-34a transfection group and the negative control group, and the non-transfected cells served as the normal control group. The overexpression effect was validated by real-time PCR. MTT assay was used to detect cell proliferation. Cell invasion and migration were detected by Transwell test. Target gene prediction library predicted target genes of miR-34a, and the target gene was identified by luciferase activity report. Real-time PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression of target genes. MiR-34a mimics and microphthalmia-associated transcription factor (MITF) overexpression vectors were cotransfected into M23 cells. Cell proliferation, invasion and migration abilities were detected by MTT assay and Transwell test, respectively. The mRNA and protein expressions of MITF were detected by real-time PCR and Western blot. **Results** The expression of miR-34a in M23 cells transfected with miR-34a mimics increased. The cell proliferation (A_{570}), number of invasive cells and migrating cells were significantly different among the miR-34a

transfection group, negative control group and normal control group ($F=18.000, P=0.003; F=20.345, P=0.002; F=15.717, P=0.004$). The proliferation, invasion and migration ability of M23 cells in the miR-34a transfection group were significantly decreased compared with the negative control group and normal control group (all at $P<0.05$). Target gene prediction library and luciferase activity report showed that MITF was the target gene of miR-34a. The relative expression levels of MITF mRNA and protein were 0.45 ± 0.06 and 0.36 ± 0.04 in the miR-34a transfection group, 0.99 ± 0.11 and 0.62 ± 0.05 in the negative control group, 1.00 ± 0.07 and 0.63 ± 0.08 in the normal control group, respectively, and compared with the negative control group and normal control group, the expression of MITF in miR-34a transfection group were significantly decreased (all at $P<0.05$). Cell proliferation (A_{570}), the number of invaded cells and the number of migrated cells were $0.35 \pm 0.02, 29.48 \pm 3.20$ and 41.87 ± 5.82 in the miR-34a+MITF group, $0.26 \pm 0.03, 18.53 \pm 1.47$ and 27.64 ± 2.45 in the miR-34a+Vector group, respectively, the proliferation, invasion and migration ability of the cells in the miR-34a+MITF group was significantly higher than that in the miR-34a+Vector group (all at $P<0.05$). **Conclusions** miR-34a can inhibit the malignant phenotype of uveal melanoma cells by inhibiting the expression of the target gene *MITF*.

[Key words] Micro RNA; Uveal melanoma; Invasion; Migration; Microphthalmia-associated transcription factor; miR-34a

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.05.002

葡萄膜黑色素瘤是一种原发性眼内恶性肿瘤,发病较隐匿、发展速度快,其起源于葡萄膜黑色素细胞,探讨其发病机制对于肿瘤的治疗具有重要意义。miRNA 是一类广泛存在于人体组织中的非编码 RNA,其可以通过靶向调控下游靶基因的表达发挥生物学功能^[1-2]。微小 RNA-34a(micro RNA-34a, miR-34a)是一种具有肿瘤抑制作用的 miRNA,其在肿瘤组织中表达下调^[3]。研究显示,过表达 miR-34a 能够抑制前列腺癌、乳腺癌、胃癌等肿瘤组织中肿瘤细胞的生长和转移^[4-6]。研究显示,miR-34a 在葡萄膜黑色素瘤细胞和组织中表达下调,其表达水平的高低与肿瘤的转移有关^[7]。目前对于 miR-34a 在葡萄膜黑色素瘤细胞生长和迁移中的作用和机制尚不明确。本研究探讨 miR-34a 对葡萄膜黑色素瘤细胞生长和迁移的影响,为明确葡萄膜黑色素瘤的分子机制提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 葡萄膜黑色素瘤 M23 细胞购自美国 ATCC 细胞库,细胞用含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液、体积分数 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养。细胞密度生长至 80% 以上时,用 PBS 将细胞洗涤 2 次,添加质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化 2 min, $1\ 000 \times g$ 离心 10 min,吸除上清,添加细胞培养液,接种到细胞培养瓶中继续培养。

1.1.2 主要试剂及仪器 miR-34a mimics、mimics 阴性对照(上海吉玛生物科技有限公司); TaqMan miRNA 逆转录试剂(美国 Applied Biosystems 公司);

SYBR Premix EX Taq (大连 TaKaRa 公司); Lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司); sc-515925 小眼畸形相关转录因子(microphthalmia-associated transcription factor, MITF) 抗体(D-9)(美国 Santa Cruz 公司); MITF 过表达载体(pcDNA 3.1-MITF)、对照载体 pcDNA(上海和元生物技术股份有限公司); miR-34a 上游引物为 5'-ATTGCGGTGGCAGTGTCTTAGCT-3', 下游引物 5'-GGGAAATCGTGCCTGACATTAAGG-3'。MITF 上游引物为 5'-CGGGTCTCTGCTCTCCAGA-3', 下游引物 5'-CCGGCTGCTTGTGTTTGGAA-3'。引物均交由上海生工合成; Applied Biosystems 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司); EnVision Xcite/HTS 酶标仪(美国 PerkinElmer 公司); ECLIPSE Ti 倒置显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2 miR-34a mimics 转染与否 M23 细胞生物学行为评估

1.2.1 miR-34a mimics 转染 M23 细胞 将 M23 细胞种植到 6 孔板中,待细胞生长至对数生长期细胞密度为 60% 时,用 opti-MEM 分别将 miR-34a mimics、mimics 阴性对照和 Lipofectamine 2000 稀释,室温下孵育 5 min,将 miR-34a mimics 或 mimics 阴性对照稀释液与 Lipofectamine 2000 稀释液混合置于室温中孵育 15 min,分别加入 miR-34a 转染组和阴性对照组,培养后 6 h 换液。设置不转染的细胞为正常对照组。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 评估转染效果 转染后 24 h,取正常对照组、阴性对照组和 miR-34a 转染组 M23 细胞,用 Trizol 试剂提取细胞中的 RNA,用 TaqMan miRNA 逆转录试剂进行逆转录反应,以 SYBR

Premix EX Taq 进行定量 PCR。PCR 反应条件:95 °C 预变性 30 s;95 °C 反应 5 s,60 °C 反应 30 s,共 40 个循环。以 U6 为内参,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-34a mRNA 的表达水平。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.3 MTT 法评估各组细胞增生情况 取正常对照组、阴性对照组和 miR-34a 转染组转染后 24 h M23 细胞,接种至 96 孔板内,每孔添加 5 000 个细胞,培养 24 h 后,每孔添加 MTT 溶液 10 μ l,孵育 4 h。吸弃孔内液体,添加 150 μ l DMSO 溶液孵育 10 min,用酶标仪检测每孔波长 570 nm 处吸光度(A)值。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.4 Transwell 小室试验评估各组细胞侵袭和迁移情况 细胞侵袭试验前用基质胶将小室湿化。取正常对照组、阴性对照组和 miR-34a 转染组转染后 24 h M23 细胞,将细胞悬浮于含 1% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,添加至 Transwell 小室上室中,上室中添加 5×10^4 个细胞,Transwell 小室下室添加含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液,培养后 24 h,将 Transwell 小室取出,置于质量分数 4% 多聚甲醛中固定 15 min,用 PBS 洗涤 1 次,置于结晶紫染液中染色 5 min。甲醇固定,结晶紫染色,在 200 倍显微镜下观察视野中细胞迁移数目,任意选取 5 个视野,取平均值。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.5 靶基因预测和鉴定 采用靶基因预测库 PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>)、TargetScan (<http://www.targetscan.org/>)、The miRBase (<http://www.mirbase.org/>) 预测 miR-34a 靶基因为 MITF,将 MITF 与 miR-34a 结合互补区突变并构建荧光素酶报告载体,将没有突变的 MITF 记为野生型,把突变的 MITF 记为突变型,野生型和突变型分别与 miR-34a mimics、mimics 阴性对照共转染到 M23 细胞中,继续培养 48 h,根据荧光素酶检测试剂盒检测 MITF 荧光素酶活性的变化。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 法检测各组细胞中 MITF mRNA 表达 取正常对照组、阴性对照组和 miR-34a 转染组转染后 24 h M23 细胞,用 Trizol 试剂提取细胞中的 RNA,用 cDNA 合成试剂盒进行逆转录,以 SYBR Premix EX Taq 进行定量 PCR。PCR 反应条件:95 °C 预反应 30 s;95 °C 变性 5 s,58 °C 退火及延伸 30 s,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 MITF mRNA 的表达水平。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.7 Western blot 法检测各组细胞中 MITF 蛋白表达 取正常对照组、阴性对照组和 miR-34a 转染组转染后 24 h M23 细胞,用含 PMSF 的 RIPA 蛋白裂解液

提取细胞总 RNA,把蛋白与上样缓冲液混合后煮沸 5 min,将蛋白添加至质量分数 10% SDS-PAGE 凝胶孔中,100 V 恒压电泳约 2.5 h 后,溴酚蓝进入到凝胶底部,停止电泳。在 80 V 电压条件下转膜,蛋白转至硝酸纤维素膜。以含 5% 牛血清白蛋白的封闭液将非特异性结合位点封闭后,置于兔抗 MITF 人一抗(1:800)反应液中 4 °C 过夜,置于 HRP 标记的山羊抗兔二抗(1:4 000)反应液中孵育 2 h,ECL 发光。分析条带的灰度值,以各组 GAPDH 的灰度值作为内参照,分析目的条带的表达水平。实验重复 3 次,取平均值。

1.3 MITF 转染与否 M23 细胞生物学行为评估

采用 Lipofectamine 2000 分别在 M23 细胞中共转染 miR-34a mimics + pcDNA 3.1-MITF、miR-34a mimics + pcDNA 3.1,分别记作 miR-34a+MITF 组和 miR-34a+Vector 组。将培养至对数期的 M23 细胞接种到 6 孔板中,用 opti-MEM 将 miR-34a mimics+pcDNA 3.1-MITF 或 miR-34a mimics+pcDNA 3.1 分别与 Lipofectamine 2000 稀释,室温下孵育 5 min,上述 2 种稀释液混合置于室温中孵育 15 min,添加到细胞密度为 60% 的培养板中,培养后 6 h 换液。MTT 法测定细胞在波长 570 nm 处 A 值,实验步骤同 1.2.3;Transwell 小室试验检测细胞侵袭和迁移情况,实验步骤同 1.2.4;实时荧光定量 PCR 法测定 MITF mRNA 的表达,实验步骤同 1.2.6;Western blot 法测定 MITF 蛋白水平,实验步骤同 1.2.7。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行统计分析。本研究检测指标的计量资料经 W 检验证实呈正态分布,以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,正常对照组、阴性对照组和 miR-34a 转染组 miR-34a mRNA 相对表达量、细胞增生值、侵袭细胞数目和迁移细胞数目、MITF mRNA 和蛋白相对表达量的比较均采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验;miR-34a 转染组与阴性对照组野生型和突变型 MITF M23 细胞荧光素酶活性比较,miR-34a+Vector 组和 miR-34a+MITF 组细胞 MITF mRNA 及其蛋白相对表达量、细胞增生值、侵袭细胞数目和迁移细胞数目比较均采用独立 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-34a mimics 转染与否 M23 细胞生物学行为评估

2.1.1 各组细胞中 miR-34a mRNA 相对表达量比较 正常对照组、阴性对照组和 miR-34a 转染组间细胞中 miR-34a mRNA 相对表达量总体比较,差异有统计

学意义 ($F = 49.679, P = 0.000$), 其中 miR-34a 转染组细胞中 miR-34a mRNA 相对表达量高于阴性对照组和正常对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 1)。

表 1 各组细胞中 miR-34a mRNA 相对表达量比较 (mean±SD)

组别	样本量	miR-34a mRNA 相对表达量
正常对照组	3	1.00±0.00 ^a
阴性对照组	3	0.97±0.12 ^a
miR-34a 转染组	3	2.15±0.26
<i>F</i> 值		49.679
<i>P</i> 值		0.000

注: 与 miR-34a 转染组比较, ^a $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) miR-34a: 微小 RNA-34a

2.1.2 各组细胞增生、侵袭和迁移能力比较 正常对照组、阴性对照组和 miR-34a 转染组间细胞增值值、侵袭细胞数目和迁移细胞数目总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 18.000, P = 0.003; F = 20.345, P = 0.002; F = 15.717, P = 0.004$), 其中 miR-34a 转染组较正常对照组和阴性对照组细胞增值值减小, 侵袭细胞数目和迁移细胞数目减少, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

表 2 各组细胞增值值、侵袭细胞数目和迁移细胞数目比较 (mean±SD)

组别	样本量	细胞增值值 (A_{570})	侵袭细胞数目 (个)	迁移细胞数目 (个)
正常对照组	3	0.37±0.03 ^a	32.58±4.72 ^a	46.27±5.84 ^a
阴性对照组	3	0.39±0.05 ^a	31.96±3.65 ^a	45.93±5.80 ^a
miR-34a 转染组	3	0.23±0.02	16.43±1.20	26.51±2.35
<i>F</i> 值		18.000	20.345	15.717
<i>P</i> 值		0.003	0.002	0.004

注: 与 miR-34a 转染组比较, ^a $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) miR-34a: 微小 RNA-34a

2.1.3 野生型和突变型 MITF 荧光素酶活性比较 miR-34a 的靶基因为 *MITF* (图 1)。miR-34a 转染组较阴性对照组野生型 MITF M23 细胞荧光素酶活性降低, 差异有统计学意义 ($t = 5.605, P = 0.005$); miR-34a 转染组与阴性对照组突变型 MITF M23 细胞荧光素酶活性比较, 差异无统计学意义 ($t = 0.294, P = 0.784$) (表 3)。

Position 2215-2221 of MITF 3' UTR 5' UGUUAGUUUCCUUAGCUGAUUU
hsa-miR-34a 3' UCCCCUCAUAUGAACGACUAAC

图 1 miR-34a 靶基因预测结果 miR-34a 的靶基因为 *MITF* miR-34a: 微小 RNA-34a

表 3 各组野生型和突变型 MITF M23 细胞荧光素酶活性比较 (mean±SD)

组别	样本量	不同类型 MITF M23 细胞荧光素酶活性	
		野生型	突变型
阴性对照组	3	1.00±0.09	1.00±0.13
miR-34a 转染组	3	0.65±0.06	1.03±0.12
<i>t</i> 值		5.605	0.294
<i>P</i> 值		0.005	0.784

注: 与阴性对照组比较, ^a $P < 0.05$ (独立样本 *t* 检验) MITF: 小眼畸形相关转录因子; miR-34a: 微小 RNA-34a

2.1.4 各组细胞中 MITF 表达比较 正常对照组和阴性对照组细胞中 MITF 蛋白表达条带强于 miR-34a 转染组 (图 2)。阴性对照组、正常对照组和 miR-34a 转染组细胞中 MITF mRNA 及其蛋白相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 43.267, P = 0.000; F = 20.086, P = 0.002$), 其中 miR-34a 转染组细胞中 MITF mRNA 和蛋白相对表达量较阴性对照组和正常对照组降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 4)。

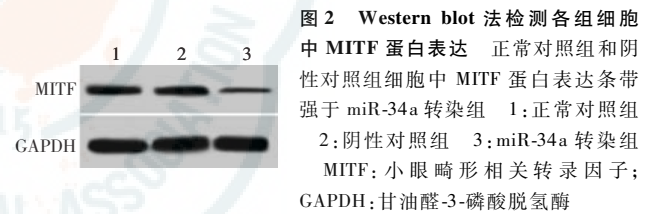


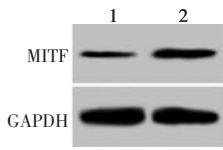
表 4 miR-34a 转染与否各组细胞中 MITF mRNA 和蛋白相对表达量比较 (mean±SD)

组别	样本量	MITF mRNA	MITF 蛋白
正常对照组	3	1.00±0.07 ^a	0.63±0.08 ^a
阴性对照组	3	0.99±0.11 ^a	0.62±0.05 ^a
miR-34a 转染组	3	0.45±0.06	0.36±0.04
<i>F</i> 值		43.267	20.086
<i>P</i> 值		0.000	0.002

注: 与 miR-34a 转染组比较, ^a $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) miR-34a: 微小 RNA-34a; MITF: 小眼畸形相关转录因子

2.2 MITF 转染与否 M23 细胞生物学行为评估

miR-34a+MITF 转染组细胞中 MITF 蛋白表达条带较 miR-34a+Vector 转染组明显增强 (图 3)。miR-34a+MITF 转染组较 miR-34a+Vector 转染组细胞中 MITF mRNA 及其蛋白相对表达量、侵袭细胞数目和迁移细胞数目明显增多, 细胞增值值明显增大, 差异均有统计学意义 ($t = 11.969, P = 0.000; t = 10.046, P = 0.001; t = 5.386, P = 0.006; t = 3.903, P = 0.018; t = 4.324, P = 0.012$) (表 5)。



**图 3 Western blot 法检测 MITF 转染与
否细胞中 MITF 蛋白表达** miR-34a +
MITF 转染组细胞中 MITF 蛋白表达条带
较 miR-34a + Vector 转染组明显增强
1: miR-34a + Vector 组 2: miR-34a + MITF
组 MITF: 小眼畸形相关转录因子;
GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

**表 5 各组细胞 MITF mRNA 及其蛋白相对表达量、细胞
增殖值、侵袭细胞数目和迁移细胞数目比较 (mean±SD)**

组别	样本量	MITF mRNA 相对表达量	MITF 蛋白 相对表达量	细胞增殖值 (A ₅₇₀)	侵袭细胞 数目(个)	迁移细胞 数目(个)
miR-34a+Vector 组	3	1.00±0.07	0.39±0.04	0.26±0.03	18.53±1.47	27.64±2.45
miR-34a+MITF 组	3	1.96±0.12	0.68±0.03	0.35±0.02	29.48±3.20	41.87±5.82
t 值		11.969	10.046	4.324	5.386	3.903
P 值		0.000	0.001	0.012	0.006	0.018

注: MITF: 小眼畸形相关转录因子; miR-34a: 微小 RNA-34a (独立样本 t 检验)

3 讨论

葡萄膜黑色素瘤是一种常见的眼内肿瘤,其可以发生于葡萄膜的任何部位,多数会生长压迫周围眼内组织,引起视力下降、视物变形、疼痛等^[8]。葡萄膜黑色素瘤恶性程度极高,发现时常已存在较为隐匿的微转移灶,探究葡萄膜黑色素瘤的转移机制具有重要意义^[9]。

miRNA 是一含有 18 ~ 24 个核苷酸高度保守的单链 RNA,其能够通过识别靶基因 3'非翻译区调控靶基因的表达,miRNA 可以在转录水平调节靶基因蛋白合成^[10]。目前的研究显示,miRNA 具有多种生物学功能,其可以调控人体内近 90% 的基因,在干细胞分化、细胞运动、细胞生长、能量代谢等方面发挥调节作用^[11]。目前,已发现多种 miRNA 与人类肿瘤的发生有关,miR-34a 是其中研究较早的 miRNA。miR-34a 编码基因定位于 1 号染色体短臂上,miR-34a 编码基因缺失或其启动子甲基化后诱导 miR-34a 表达水平下降,从而发挥抗细胞侵袭、迁移等作用,抑制肿瘤生长^[12-14]。研究显示,miR-34a 在消化系统、生殖系统、神经系统肿瘤中表达下调,并且具有抑制结肠癌、卵巢癌等多种肿瘤细胞转移的作用^[15-17]。前期研究表明,miR-34a 在葡萄膜黑色素瘤组织和细胞中的表达水平下调,其在葡萄膜黑色素瘤中可能发挥抑癌基因的作用^[18]。本研究表明,miR-34a 转染后的葡萄膜黑色素瘤细胞的增殖能力降低,细胞侵袭和迁移能力下降,miR-34a 具有抑制葡萄膜黑色素瘤的作用。

MITF 基因是一种与小眼畸形、虹膜色素减退等有关转录调控因子,其编码的蛋白质属于 Myc 转录因

子蛋白家族,其含有螺旋-环-螺旋结构,能够特异性地形成同源或者异源二聚体,参与调控细胞的生长等生理学过程^[19]。研究发现,MITF 与黑色素瘤细胞的增生和浸润有关,MITF 高表达意味着细胞具有较强的增生和浸润能力,MITF 在黑色素瘤转移灶中的表达水平明显升高^[20-21]。本研究结果显示,miR-34a 的靶基因为 MITF,并且 miR-34a 具有负调控 MITF 的作用,MITF 过表达可以减轻 miR-34a 对葡萄膜黑色素瘤细胞增生、侵袭、迁移的抑制作用,miR-34a 可以通过负调控 MITF 来抑制葡萄膜黑色素瘤细胞的增生、侵袭和迁移。

综上所述,miR-34a 具有抑制葡萄膜黑色素瘤细胞恶性表型的作用,其作用机制与抑制靶基因 MITF 的表达有关,为探讨葡萄膜黑色素瘤发病的分子机制奠定了基础。本研究仅在 1 株葡萄膜黑色素瘤细胞中进行了体外实验,后续会在体内和多株细胞中进行验证。

参考文献

- [1] Joshi P, Kooshki M, Aldrich W, et al. Expression of natural killer cell regulatory microRNA by uveal melanoma cancer stem cells [J]. Clin Exp Metastasis, 2016, 33 (8) : 829-838. DOI: 10. 1007/s10585-016-9815-9.
- [2] 刘艳霞, 张璐玉, 崔艳艳, 等. miRNA 在食管鳞癌发病和治疗中的作用机制 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2018, 53 (2) : 137-142. DOI: 10. 13705/j. issn. 1671-6825. 2017. 04. 054.
- [3] Shi H, Zhou S, Liu J, et al. miR-34a inhibits the in vitro cell proliferation and migration in human esophageal cancer [J]. Pathol Res Pract, 2016, 212 (5) : 444-449. DOI: 10. 1016/j. prp. 2016. 02. 019.
- [4] Ma C, Fan R, Ahmad H, et al. A clinical microchip for evaluation of single immune cells reveals high functional heterogeneity in phenotypically similar T cells [J]. Nat Med, 2011, 17 (6) : 738-743. DOI: 10. 1038/nm. 2375.
- [5] Zheng G, Li N, Jia X, et al. MYCN-mediated miR-21 overexpression enhances chemo-resistance via targeting CADM1 in tongue cancer [J]. J Mol Med (Berl), 2016, 94 (10) : 1129-1141. DOI: 10. 1007/s00109-016-1417-0.
- [6] Cao W, Yang W, Fan R, et al. miR-34a regulates cisplatin-induced gastric cancer cell death by modulating PI3K/AKT/survivin pathway [J]. Tumour Biol, 2014, 35 (2) : 1287-1295. DOI: 10. 1007/s13277-013-1171-7.
- [7] 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/iov. 08-2681.
- [8] Kottschade LA, McWilliams RR, Markovic SN, et al. The use of pembrolizumab for the treatment of metastatic uveal melanoma [J]. Melanoma Res, 2016, 26 (3) : 300-303. DOI: 10. 1097/CMR. 000000000000242.
- [9] Yavuzigitoglu S, Koopmans AE, Verdijk RM, et al. Uveal melanomas with SF3B1 mutations: a distinct subclass associated with late-onset metastases [J]. Ophthalmology, 2016, 123 (5) : 1118-1128. DOI: 10. 1016/j. ophtha. 2016. 01. 023.
- [10] Kurihara H, Maruyama R, Ishiguro K, et al. The relationship between EZH2 expression and microRNA-31 in colorectal cancer and the role in evolution of the serrated pathway [J]. Oncotarget, 2016, 7 (11) : 12704-12717. DOI: 10. 18632/oncotarget. 7260.
- [11] 石瑛, 王云凤, 路璐, 等. 转染 miRNA-129-5p 对 MCF-7 细胞化疗敏

- 感性及 ABCB1 表达的影响 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2018, 53(2): 155-159. DOI: 10.13705/j.issn.1671-6825.2017.06.077.
- Shi Y, Wang YF, Lu L, et al. miRNA-129-5p transfection improves Taxol sensitivity on MCF-7 cells by regulating ABCB1 expression [J]. J Zhengzhou Univer Med Sci, 2018, 53(2): 155-159. DOI: 10.13705/j.issn.1671-6825.2017.06.077.
- [12] Lu G, Sun Y, An S, et al. MicroRNA-34a targets FMNL2 and E2F5 and suppresses the progression of colorectal cancer [J]. Exp Mol Pathol, 2015, 99(1): 173-179. DOI: 10.1016/j.yexmp.2015.06.014.
- [13] Lv H, Pei J, Liu H, et al. A polymorphism site in the pre-miR-34a coding region reduces miR-34a expression and promotes osteosarcoma cell proliferation and migration [J]. Mol Med Rep, 2014, 10(6): 2912-2916. DOI: 10.3892/mmr.2014.2582.
- [14] 刘宇亭, 沈祥国, 苏长青, 等. 联合使用 miR-34a 及 miR-let7 对胰腺癌细胞生物学特性的影响 [J]. 中华胰腺病杂志, 2016, 16(2): 87-92. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-1935.2016.02.004.
- Liu YT, Shen XG, Su CQ, et al. Effect of the combination of miR-34a and miR-let7 on the biological properties of pancreatic cancer cells [J]. Chin J Pancreatol, 2016, 16(2): 87-92. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-1935.2016.02.004.
- [15] Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, et al. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(39): 15472-15477. DOI: 10.1073/pnas.0707351104.
- [16] Vogt M, Munding J, Grüner M, et al. Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial, and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas [J]. Virchows Arch, 2011, 458(3): 313-322. DOI: 10.1007/s00428-010-1030-5.
- [17] Gao H, Zhao H, Xiang W. Expression level of human miR-34a correlates with glioma grade and prognosis [J]. J Neurooncol, 2013, 113(2): 221-228. DOI: 10.1007/s11060-013-1119-1.
- [18] 刘忆南, 邵蕾, 魏文斌. 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, Wei WB. 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.
- [19] Porstner M, Winkelmann R, Daum P, et al. miR-148a promotes plasma cell differentiation and targets the germinal center transcription factors Mitf and Bach2 [J]. Eur J Immunol, 2015, 45(4): 1206-1215. DOI: 10.1002/eji.201444637.
- [20] Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma [J]. Nature, 2005, 436(7047): 117-122. DOI: 10.1038/nature03664.
- [21] Miller AJ, Du J, Rowan S, et al. Transcriptional regulation of the melanoma prognostic marker melastatin (TRPM1) by MITF in melanocytes and melanoma [J]. Cancer Res, 2004, 64(2): 509-516.

(收稿日期: 2018-12-29 修回日期: 2019-03-21)

(本文编辑: 刘艳)

读者 · 作者 · 编者

眼科常用英文缩略语名词解释

- AMD: 年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration)
- ANOVA: 单因素方差分析 (one-way analysis of variance)
- BUT: 泪膜破裂时间 (breakup time of tear film)
- DR: 糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy)
- EAU: 实验性自身免疫性葡萄膜炎 (experimental autoimmune uveitis)
- EGF: 表皮生长因子 (epidermal growth factor)
- ELISA: 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay)
- ERG: 视网膜电图 (electroretinogram)
- FFA: 荧光素眼底血管造影 (fundus fluorescein angiography)
- FGF: 成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor)
- GFP: 绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein)
- IFN- γ : γ 干扰素 (interferon- γ)
- IL: 白细胞介素 (interleukin)
- IOL: 人工晶状体 (intraocular lens)
- IRBP: 光间受体视黄类物质结合蛋白 (interphotoreceptor retinoid binding protein)
- LASIK: 准分子激光角膜原位磨镶术 (laser in situ keratomileusis)
- ICGA: 吲哚菁绿血管造影 (indocyanine green angiography)
- LECs: 晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells)
- miRNA: 微小 RNA (microRNA)
- MMP: 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase)
- mTOR: 哺乳动物类雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin)
- MTT: 四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium)
- NF: 核因子 (nuclear factor)
- OCT: 光相干断层扫描 (optical coherence tomography)
- OR: 优势比 (odds ratio)
- PACG: 原发性闭角型青光眼 (primary angle-closure glaucoma)
- PCR: 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction)
- RGCs: 视网膜节细胞 (retinal ganglion cells)
- POAG: 原发性开角型青光眼 (primary open angle glaucoma)
- RB: 视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma)
- RPE: 视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium)
- RNV: 视网膜新生血管 (retinal neovascularization)
- RP: 视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa)
- S I t: 泪液分泌试验 I (Schirmer I test)
- shRNA: 小发夹 RNA (short hairpin RNA)
- siRNA: 小干扰 RNA (small interfering RNA)
- α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin)
- TAO: 甲状腺相关眼病 (thyroid-associated ophthalmopathy)
- TGF: 转化生长因子 (transforming growth factor)
- TNF: 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor)
- UBM: 超声生物显微镜 (ultrasound biomicroscope)
- VEGF: 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor)
- VEP: 视觉诱发电位 (visual evoked potential)

(本刊编辑部)