

慢病毒介导星形胶质细胞活化基因-1 沉默对葡萄膜黑色素瘤生物学行为的影响

毛英 白海霞 畅颖 李彬

100005 北京,首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 北京市眼科研究所 眼科学与视觉科学北京市重点实验室

通信作者:李彬,Email:libin43_99@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.10.003

【摘要】 目的 探讨星形胶质细胞活化基因-1(AEG-1)对葡萄膜黑色素瘤(UM)生物学行为的影响。

方法 培养不同侵袭转移潜能的 MUM-2B 和 MUM-2C 细胞系,根据 AEG-1 基因序列设计出有效 RNA 干扰(RNAi)靶点序列及 RNAi 阴性对照 scramble 序列进行慢病毒载体的制备和病毒包装。在 2 株细胞系中,经 AEG-1-RNAi 慢病毒感染的细胞作为慢病毒感染组,空白慢病毒载体感染的细胞作为阴性对照组,未处理的细胞作为正常对照组。采用 Real-time PCR、Western blot 法分别检测各组细胞中 AEG-1 转录水平和蛋白表达水平;采用 MTT 法、Annexin V-APC 法、细胞侵袭试验和细胞 Transwell 试验检测慢病毒介导 AEG-1 沉默对人 UM 细胞系生物学行为的影响。**结果** 成功制备 RNAi 慢病毒载体而进行病毒包装,然后分别转染对数生长期的 MUM-2B、MUM-2C 细胞系,2 株细胞系中的正常对照组、阴性对照组和慢病毒感染组间细胞中 AEG-1 mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F = 130.02, P < 0.01$; $F = 144.17, P < 0.01$)。在 MUM-2B 细胞系中和 MUM-2C 细胞系中,染组较阴性对照组 AEG-1 mRNA 相对表达量分别下降约 77.1% 和 79.8%,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);正常对照组与阴性对照组细胞中 AEG-1 mRNA 相对表达量比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。Western blot 法检测结果显示,AEG-1 蛋白表达水平在 2 株细胞系中的各组比较,差异均有统计学意义($F = 146.17, P < 0.01$; $F = 156.79, P < 0.01$),其中慢病毒感染组较阴性对照组蛋白相对表达均显示下调,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。MTT 法检测发现,2 株细胞系实验第 2~5 天,慢病毒感染组细胞增生倍数较阴性对照组明显下降,差异均有统计学意义($t = 5.78, 30.68, 23.99, 29.40$, 均 $P < 0.01$; $t = 7.88, 7.09, 5.56, 6.60$, 均 $P < 0.01$);Annexin V-APC 法检测发现,2 株细胞系中慢病毒感染组凋亡率明显高于阴性对照组,差异均有统计学意义($t = 54.34, P < 0.01$; $t = 11.68, P < 0.01$);细胞侵袭试验发现,在 2 株细胞系中慢病毒感染组侵袭倍数明显低于阴性对照组,差异均有统计学意义($t = 16.04, P < 0.01$; $t = 13.98, P < 0.01$);细胞 Transwell 试验发现,在 2 株细胞系中慢病毒感染组转移倍数均明显低于阴性对照组,差异均有统计学意义($t = 12.04, P < 0.01$; $t = 22.43, P < 0.01$)。**结论** 慢病毒介导 AEG-1 沉默后,通过抑制 UM 细胞 AEG-1 的转录水平和蛋白表达水平,从而改变 UM 细胞的生物学行为,一定程度上减缓细胞增生,促进细胞凋亡并降低细胞侵袭和转移的能力。

【关键词】 葡萄膜黑色素瘤;星形胶质细胞活化基因-1;慢病毒载体;细胞增生;凋亡;侵袭;转移

基金项目:北京市自然科学基金项目(7162036);北京市眼科研究所重点学科引领计划项目(201505)

Effects of lentivirus-mediated knockdown of astrocyte elevated gene-1 on the biological behavior of uveal melanoma Mao Ying, Bai Haixia, Chang Ying, Li Bin

Beijing Institute of Ophthalmology, Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing Ophthalmology & Visual Sciences Key Laboratory, Beijing 100005, China

Corresponding author: Li Bin, Email: libin43_99@163.com

[Abstract] Objective To investigate the effects of lentivirus-mediated knockdown of astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) on the biological behavior of uveal melanoma (UM). **Methods** MUM-2B and MUM-2C cell lines with different invasiveness and metastasis potential were cultured. Based on AEG-1 sequence that designed the effective

(RNA interference) RNAi target sequence and the RNAi negative control scramble sequence, and then performed the preparation of the lentiviral vector and viral packaging. In these two kinds of cell lines, the cells infected by *AEG-1*-RNAi lentivirus were used as lentiviral infection group, the cells of the RNAi negative control of the blank lentivirus infected cells were used as negative control group, and the cells without any processing were used as normal control group. Real-time PCR and Western blot were used to detect the change of *AEG-1* transcription and protein expression levels in these two kinds of cell lines' groups, as well as by MTT method, Annexin V-APC method, cell invasion assay, and Transwell cell migration assay that to investigate the effect of lentivirus transfection induced knockdown of *AEG-1* on the biological behavior of human UM cell lines. **Results** The successful preparation of RNAi lentivirus vector and its viral package were transfected to MUM-2B, MUM-2C cell lines of logarithmic growth phase, respectively. The relative expressions of *AEG-1* mRNA in normal control groups, negative control groups and lentiviral infection groups were statistically significant ($F = 130.02, P < 0.01; F = 144.17, P < 0.01$). The relative expression of *AEG-1* mRNA in lentiviral infection groups were lower than that in the negative control groups, and the *AEG-1* gene knockout rates were 77.1% and 79.8%, respectively, the differences were statistically significant (both at $P < 0.01$). There were no significant differences in the relative expression of *AEG-1* mRNA between normal control groups and negative control groups (all at $P > 0.05$). Western blot showed that no significant changes were found in the *AEG-1* proteins expression levels between normal control groups and negative control groups in the two kinds of cell lines ($F = 146.17, P < 0.01; F = 156.79, P < 0.01$). The expression levels of *AEG-1* protein in the lentiviral infection groups were significantly lower than that in negative control groups (all at $P < 0.01$). The proliferation of both cells lines in lentiviral infection groups were significantly lower than that in negative control groups from the second day to the fifth day, the differences were statistically significant ($t = 5.78, 30.68, 23.99, 29.40$, all at $P < 0.01; t = 7.88, 7.09, 5.56, 6.60$, all at $P < 0.01$). In both cell lines, the apoptosis rate of lentiviral infection groups were significantly higher than those in the negative control groups, the differences were statistically significant ($t = 54.34, P < 0.01; t = 11.68, P < 0.01$). In both cell lines, the multiple of invasions in lentiviral infection groups were significantly lower than those in negative control groups, and the differences were statistically significant ($t = 16.04, P < 0.01; t = 13.98, P < 0.01$); In both cell lines, the multiple of transfer in lentiviral infection groups were significantly lower than those in negative control groups, and the differences were statistically significant ($t = 12.04, P < 0.01; t = 22.43, P < 0.01$). **Conclusions** Lentivirus transfection inducing knockdown of *AEG-1* inhibits the transcription and protein expression level of *AEG-1* in the melanoma cells, which changes the biological behaviors of UM, like slowing down cell proliferation, promoting apoptosis, and reducing the abilities of cells' invasion and metastasis.

[Key words] Uveal melanoma; Astrocyte elevated gene-1; Lentiviral vector; Cell proliferation; Apoptosis; Invasion; Metastasis

Fund program: Beijing Municipal Natural Science Foundation (7162036); Beijing Institute of Ophthalmology Leading Discipline Program (201505)

葡萄膜黑色素瘤(uveal melanoma, UM)是成人常见的眼内原发性恶性肿瘤,预后差,转移死亡率高,约占全身黑色素瘤的4.7%^[1-2]。UM的发生是多种基因及信号传导共同作用的结果^[3],近年来发现原癌基因星形胶质细胞活化基因-1(astrocyte elevated gene-1, *AEG-1*)与多种恶性肿瘤的发生和发展显著相关^[4]。本研究组前期研究证实,*AEG-1*在UM中呈高表达,提示患者预后差,死亡率高,但目前尚不清楚*AEG-1*对UM的影响机制。本研究通过慢病毒感染人UM细胞系,观察细胞的增生、凋亡以及侵袭转移能力,探讨*AEG-1*对UM生物学行为的影响及其作用机制。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 细胞系来源 具有不同侵袭转移潜能的人UM细胞系MUM-2B和MUM-2C由美国伊利诺州芝加哥美国西北大学芬伯格医学院(Northwestern University, Feinberg School of Medicine, Chicago, Illinois, USA) Richard E. B Seftor教授惠赠。

1.1.2 主要试剂及仪器 兔抗人MTDH(*AEG-1*)多克隆抗体(ab45338, 1:500)(美国Abcam公司);鼠抗人GAPDH单克隆抗体(SC-32233, 1:4000)、羊抗兔IgG(sc-2004, 1:5000)、羊抗鼠IgG(sc-2005, 1:5000)(美国Santa Cruz公司);M-MLV逆转录酶、dNTPs、RNase抑制剂(美国Promega公司);胎牛血清(上海微科生化试剂有限公司);质量分数0.5%结晶紫水溶液(上海源叶生物科技有限公司);GIEMSA染色液(日本Sigma公司);Trizol RNA提取试剂盒(美国Invitrogen公司);凋亡试剂盒(美国eBioscience公

司);MTT 试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司);侵袭试剂盒、Transwell 试剂盒(美国 Corning 公司)。倒置相差显微镜(上海蔡康光学仪器有限公司);流式细胞仪(美国 Millipore 公司);荧光显微镜[日本奥林巴斯(中国)有限公司];细胞培养箱(日本 SANYO 公司)。

1.2 方法

1.2.1 UM 细胞系培养

将 MUM-2B 和 MUM-2C 细胞系分别置于 37 °C、体积分数 5% CO₂、饱和湿度培养箱中,用含质量分数为 10% 胎牛血清、质量分数 1% 青霉素链霉素双抗的 RPMI/1640 培养液下培养,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 RNA 干扰慢病毒载体的制备和病毒包装

参照文献[5]的方法设计 *AEG-1* 的有效 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)靶点序列 AAGTCAAATACCAAGCAA, 合成单链 DNA 引物 5'-CCGGCCAAGTCAAATACCAAGCAAAGTTCGAGTTTGCTTGGTATTTGACTTGGTTTTT-3', 退火形成双链 DNA 并经 PCR 技术扩增,与 GV 慢病毒载体系列 GV115 载体(元件顺序:Hu6-MCS-CMV-EGFP)上的酶切位点相连转化培养,PCR 鉴定阳性菌落进行测序。测序成功的 *AEG-1* 病毒质粒载体抽提,并与病毒辅助质粒载体(Helper 1.0、Helper 2.0)包装。共转染于 293T 细胞,病毒收获、浓缩纯化。以上步骤行实验中公认 RNAi 阴性对照的 Scramble 序列 TTCTCCGAACGTGTCACGT 的空白慢病毒的制备(上海吉凯基因化学技术有限公司辅助完成)。

1.2.3 慢病毒感染效率检测

将 MUM-2B 和 MUM-2C 细胞系冻存管取出解冻,离心半径 7.6 cm, 1 300 r/min 离心 3 min,吸弃冻存液上清后进行传代培养。取处于对数生长期的细胞用胰蛋白酶进行消化,制成密度为 3×10⁴~5×10⁴ 个/ml 的细胞悬液并铺板,用 *AEG-1*-RNAi 慢病毒分别感染 2 株细胞系作为慢病毒感染组,用空白慢病毒载体感染作为阴性对照组,未干预的细胞作为正常对照组。感染后 3 d 用荧光显微镜观察细胞中绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)表达情况,收集荧光率达 80% 以上的细胞进行后续实验。

1.2.4 实时定量 PCR 法检测细胞中 *AEG-1* mRNA 表达

分别取 2 株细胞系的慢病毒感染组、阴性对照组和正常对照组细胞约 5×10⁶ 个,离心半径 8.4 cm, 2 000 r/min 离心 5 min,弃上清。以 Trizol 试剂盒提取 RNA,加入 RNase-free 水溶解, Nanodrop 2000/2000C 分光光度计分析测定所抽提的 RNA 浓度及质量。以 M-MLV 试剂盒将总 RNA 加入 PCR 小管中,离心后温

浴及冰浴,使逆转录引物和模板退火,逆转录获得 cDNA。加入引物序列(表 1),建立反应体系,反应过程:95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火延伸 30 s,共 45 个循环。在每次延伸阶段读取吸光度(A)值,制作溶解曲线,以 2^{-ΔΔCt} 法行 *AEG-1* mRNA 相对定量分析,以 GAPDH 为内参照。

表 1 实时定量 PCR 目的基因与内参基因引物序列

引物	引物序列	扩增片段大小(bp)
AEG-1	F:5'-AAGCAGTGC AAAACAGTTCACG-3'	121
	R:5'-GCACCTTATCAGCTTACGCT-3'	
GAPDH	F:5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3'	111
	R:5'-CACCTGTGCTGTAGCCAAA-3'	

注:AEG:星形胶质细胞活化基因

1.2.5 Western blot 法检测各组细胞中细胞中 *AEG-1* 蛋白表达

PBS 洗涤 2 株细胞系慢病毒感染组、阴性对照组和正常对照组细胞 2 次,裂解,移入 EP 管中超声破碎(200 W,共 4 次,每次 5 s,间隔 2 s),2 000 r/min 离心 5 min,取上清,以 BCA 法测定蛋白浓度。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,将蛋白转移到 PVDF 膜上。用封闭液(含 5% 脱脂牛奶 TBST 溶液)室温封闭 PVDF 膜 1 h。用封闭液稀释兔抗人 MTDH(*AEG-1*)多克隆抗体和鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体,室温下孵育 2 h,用 TBST 洗膜 4 次,每次 8 min。用封闭液稀释相应二抗,室温孵育 1.5 h,用 TBST 洗膜 4 次,每次 8 min。将混合液均匀滴加在平铺好的 PVDF 膜上,避光后将膜取出,放入暗盒。X 射线曝光 1~2 min,显影定影后取出 X 射线片晾干,应用图像处理系统 TotalLab 得到 *AEG-1* 在各标本中的相对表达量。以 GAPDH 作为内参照。

1.2.6 MTT 法检测敲减 *AEG-1* 基因对细胞增生的影响

将 2 株细胞系中慢病毒感染组和阴性对照组对数生长期细胞用胰蛋白酶消化,制备细胞悬液。铺 5 张 96 孔板,铺板每孔细胞约 2 000 个。每组重复 4 次,检测 5 d,铺板后第 2 天开始,培养终止前 4 h 加 20 μl 5 mg/ml 的 MTT 于孔中,4 h 后吸去培养液,加入 100 μl DMSO 溶解甲瓩颗粒,振荡 2~5 min,用酶校仪测定波长 490 nm 处的吸光度(A)值,即 A₄₉₀,计算 2 株细胞系中各组细胞较第 1 天的增生倍数,绘制细胞增生曲线。

1.2.7 Annexin V-APC 法检测敲减 *AEG-1* 基因对细胞凋亡的影响

收集 2 株细胞系中慢病毒感染组和阴性对照组对数生长期细胞,分别置于 5 ml 离心管中。每组设 3 个复孔,1 300 r/min 离心 5 min,弃上清。洗涤细胞沉淀后再离心沉淀,加 10 μl Annexin V-APC 染

色,避光孵育 10 ~ 15 min,转移至流式上机管中,进行检测,测出各组凋亡细胞率。

1.2.8 侵袭小室试验检测敲减 AEG-1 基因对细胞侵袭能力的影响 将侵袭试剂盒所需数目的小室置于新的 24 孔板,上、下小室各加入 500 μ l 无血清培养基,37 $^{\circ}$ C 培养箱放置 2 h 使 Matrigel 基质层再水化,将小室全部转移至新孔板。上室加入 500 μ l 细胞悬液,下室加入 750 μ l 质量分数 30% 的胎牛血清培养基,培养 24 h。用吸水纸去除培养基,用棉拭子去除小室内非侵袭细胞,滴加 0.5% 结晶紫水溶液至膜下表面染色 5 min,浸泡、冲洗 3 次,晾干后在各小室拍照。200 倍镜下计算各组中可分泌基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs)、将 Matrigel 基质层降解并黏附于聚碳酸酯膜底部的侵袭细胞数,按照下列公式计算侵袭倍数。侵袭倍数 = 慢病毒感染组侵袭细胞数/阴性对照组侵袭细胞数。

1.2.9 Transwell 试验检测敲减 AEG-1 基因对细胞转移能力的影响 取出 Transwell 试剂盒,将所需数目的小室放置于新 24 孔板中,上室加 100 μ l 无血清培养基,在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中放置 1 h。去上室中培养基,加入 100 μ l 细胞悬液,下室加入 600 μ l 体称分数 30% 的胎牛血清培养基。培养 20 h 后倒扣小室,用吸水纸去除培养基,再用棉拭子移去小室内的非转移细胞后,将小室移置于质量分数 4% 多聚甲醛固定液中固定 30 min。吸干小室的表面固定液,滴加 1 ~ 2 滴染色液,1 ~ 3 min 后将小室冲洗 3 次,空气晾干显微镜在 Transwell 小室拍照。200 倍镜下计算各组中向下室血清培养基转移细胞数,按照下列公式计算转移倍数:移动倍数 = 慢病毒感染组的转移细胞数/阴性对照组转移细胞数。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件(美国 IBM 公司)进行统计分析。本研究各项检测指标的数据资料经 Kolmogorov-Smirnov 检验均呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用均衡分组单因素干预三水平研究设计,2 株细胞系中各组 AEG-1 mRNA 相对表达量及 AEG-1 蛋白相对表达量的总体比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。慢病毒感染组和阴性对照组细胞增殖值、细胞凋亡率、细胞侵袭倍数的差异比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养细胞的形态

2 株人 UM 细胞系 MUM-2B 和 MUM-2C 均贴壁生长,在倒置相差显微镜下可见 MUM-2B 细胞呈上波

样,大小不一,边界清晰,核呈圆形。MUM-2C 细胞呈梭形,细胞核呈椭圆形(图 1)。

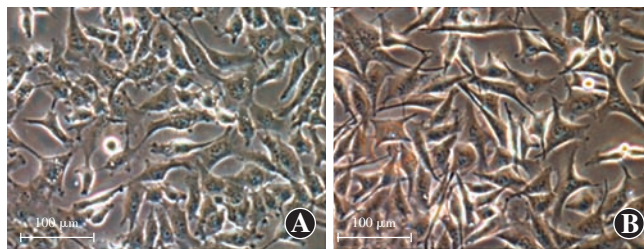


图 1 2 株细胞系生长状况 A: MUM-2B 细胞呈上皮样,圆或多边形,形状大小不一,核仁圆,细胞呈贴壁密集生长($\times 200$,标尺 = 100 μ m) B: MUM-2C 细胞为梭型,体积稍大,界限清楚,核呈长椭圆,核仁圆,呈贴壁密集生长($\times 200$,标尺 = 100 μ m)

2.2 RNAi 慢病毒载体的制备和病毒包装

根据 RNAi 靶点序列设计合成具有干扰 AEG-1 作用的慢病毒载体进行阳性克隆测序。阳性菌落与目的基因干扰靶点序列比对分析进行测序,测序结果中的 5'-CCGGCCAAGTCAAATACCAAGCAAACCTCGAGTTTCTTGATTTGACTTGTTT-3' 与 RNAi 靶点序列合成的单链 DNA 引物序列 5'-CCGGCCAAGTCAAATACCAAGCAAATCGAGTTTGTCTTGATTTGACTTGTTT-3' 一致,进行慢病毒的收获、浓缩、纯化,最后进行慢病毒质量的检测,其经荧光法测定的滴度结果为 $5E+8$ (TU/ml)。

2.3 慢病毒感染 UM 细胞效率的评估

慢病毒感染细胞后 3 d, MUM-2B 和 MUM-2C 细胞阴性对照组和慢病毒感染组荧光表达率均达约 80%, 2 株细胞正常对照组均不表达 GFP, 2 株细胞系正常对照组和阴性对照组在普通光源下无明显差异,病毒感染不影响细胞生长(图 2)。

2.4 2 株细胞系中各组 AEG-1 mRNA 相对表达量比较

MUM-2B 细胞系中,正常对照组、阴性对照组和慢病毒感染组 AEG-1 mRNA 相对表达量比较差异有统计学意义 ($F = 130.02, P < 0.01$),其中正常对照组与阴性对照组 AEG-1 mRNA 表达量差异无统计学意义 ($P = 0.11$);慢病毒感染组比阴性对照组 AEG-1 mRNA 相对表达量下降约 77.1%,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。MUM-2C 细胞系中,正常对照组、阴性对照组和慢病毒感染组 AEG-1 mRNA 相对表达量比较差异有统计学意义 ($F = 144.17, P < 0.01$),其中正常对照组与阴性对照组 AEG-1 mRNA 相对表达量比较,差异无统计学意义 ($P = 0.22$);慢病毒感染组比阴性对照组 AEG-1 mRNA 相对表达量下降约 79.8%,差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (表 2)。

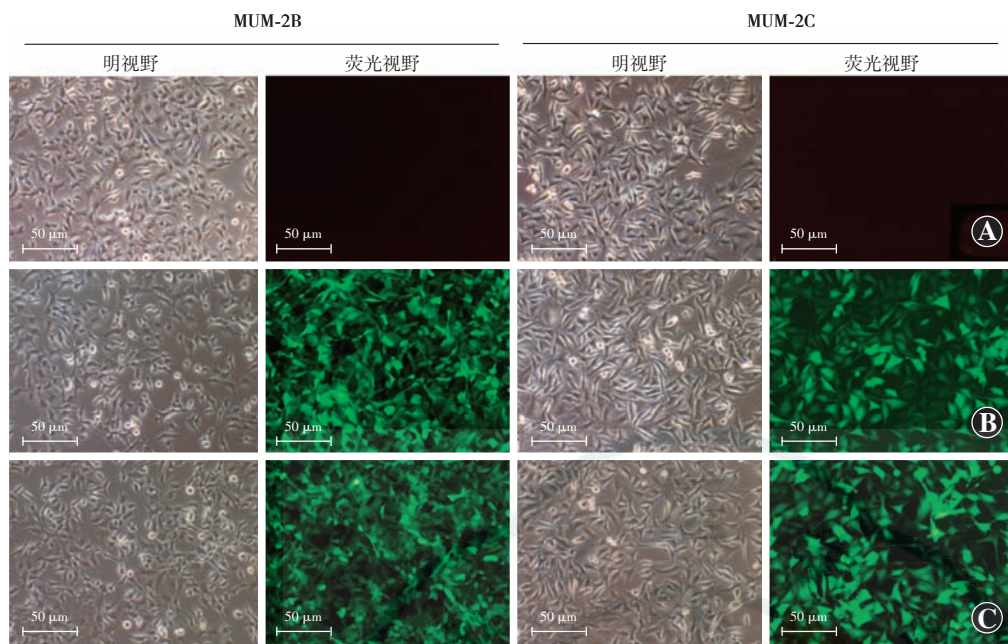


图 2 2 株细胞系各组荧光蛋白表达情况(×100, 标尺=50 μm) A:2 株细胞系的正常对照组光学显微镜下细胞均呈贴壁生长,因均不表达 GFP,即荧光显微镜下无法检测到荧光 B:2 株细胞系的阴性对照组光学显微镜下细胞均呈贴壁生长,荧光显微镜下荧光表达率均可达约 80% C:2 株细胞系的慢病毒感染组光学显微镜下细胞均呈贴壁生长,荧光显微镜下荧光表达率均可达约 80%

表 2 2 株细胞系中各组 AEG-1 mRNA 相对表达量比较(̄x±s)

组别	样本量	AEG-1 mRNA 相对表达量(MUM-2B)	AEG-1 mRNA 相对表达量(MUM-2C)
正常对照组	5	1.12±0.02	0.93±0.09
阴性对照组	5	1.01±0.13	1.00±0.06
慢病毒感染组	5	0.23±0.01 ^a	0.20±0.01 ^a
<i>F</i> 值		130.015	144.171
<i>P</i> 值		0.000	0.000

注:与阴性对照组比较,^a*P*<0.01(单因素方差分析,LSD-*t* 检验)
AEG:星形胶质细胞活化基因

2.5 2 株细胞系中各组 AEG-1 蛋白的表达比较

在 MUM-2B 细胞系中,正常对照组、阴性对照组和慢病毒感染组中 AEG-1 蛋白相对表达量分别为 0.92±0.06、0.89±0.05 和 0.23±0.06,总体比较差异有统计学意义(*F*=146.17,*P*<0.01),其中正常对照组比较与阴性对照组间 AEG-1 蛋白相对表达量差异无统计学意义(*P*=0.45);慢病毒感染组间与阴性对照组 AEG-1 蛋白相对表达量差异有统计学意义(*P*<0.01)。在 MUM-2C 细胞系,正常对照组、阴性对照组和慢病毒感染组中 AEG-1 蛋白相对表达量分别为 0.84±0.06、0.83±0.07 和 0.17±0.01,总体比较差异有统计学意义(*F*=156.76,*P*<0.01),其中正常对照组与阴性对照组间 AEG-1 蛋白表达水平,差异无统计学意义(*P*=0.73);慢病毒感染组 AEG-1 蛋白相对表达量低于阴性对照组差异有统计学意义(*P*<0.01)(图 3)。

2.6 各组细胞增生情况

MUM-2B 细胞系实验第 2~5 天,慢病毒感染组 *A*₄₉₀/fold 值分别为 1.53±0.11、2.38±0.05、3.48±0.13 和 4.48±0.12,与阴性对照组的 1.90±0.06、3.74±0.09、5.51±0.06 和 7.85±0.22 比较明显下降,差异均有统计学意义(*t*=5.78、30.68、23.99、9.40,均 *P*≤0.01)。MUM-2C 细胞系实验第 2~5 天,慢病毒感染组 *A*₄₉₀/fold 值分别为 1.45±0.10、2.16±0.08、2.80±0.10 和 3.11±0.13,明显低于阴性对照组的 1.85±

0.07、2.58±0.04、3.20±0.07 和 3.59±0.02,差异均有统计学意义(*t*=7.88、7.09、5.56、6.60,均 *P*<0.01)(图 4)。

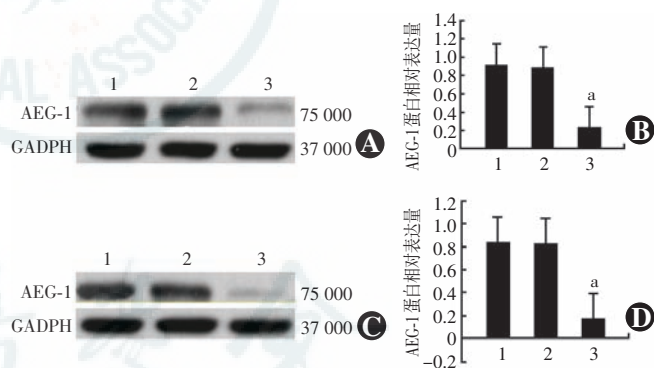


图 3 MUM-2B 和 MUM-2C 细胞系各组中 AEG-1 蛋白相对表达量比较 A:Western blot 法检测显示 MUM-2B 细胞系中各组 AEG-1 蛋白表达条带 1:正常对照组 2:阴性对照组 3:慢病毒感染组 B:各组 AEG-1 蛋白相对表达量比较 *F*=146.17,*P*<0.01. 与阴性对照组比较,^a*P*<0.01(单因素方差分析,LSD-*t* 检验) C:Western blot 法检测显示 MUM-2C 细胞系中各组 AEG-1 蛋白表达条带 1:正常对照组 2:阴性对照组 3:慢病毒感染组 D:各组 AEG-1 蛋白表达量比较 *F*=156.76,*P*<0.01. 与阴性对照组比较,^a*P*<0.01(单因素方差分析,LSD-*t* 检验) AEG:星形胶质细胞活化基因;GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶

2.7 各组细胞凋亡情况

在 MUM-2B 细胞系中,慢病毒感染组凋亡率平均为(11.16±0.28)%,明显高于阴性对照组的(6.18±0.36)%,差异有统计学意义(*t*=54.34,*P*<0.01);在

MUM-2C 细胞系中,慢病毒感染组凋亡率平均为 $(14.54 \pm 0.67)\%$,明显高于阴性对照组的 $(7.71 \pm 0.04)\%$,差异有统计学意义 ($t=11.68, P<0.01$) (图 5,6)。

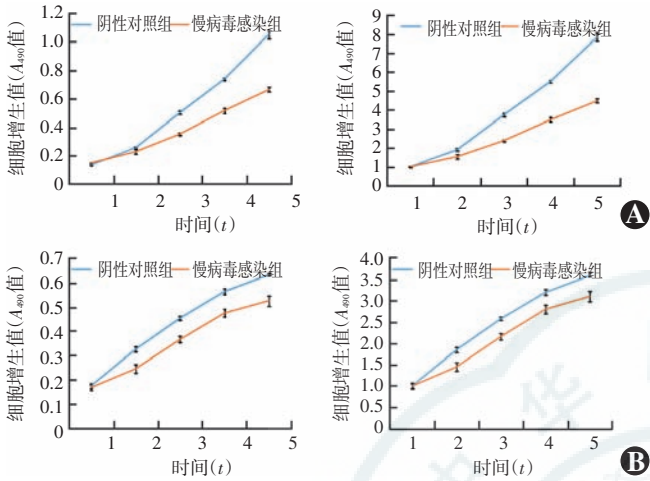


图 4 MUM-2B 和 MUM-2C 细胞系中慢病毒感染组和阴性对照组 5 d 内 A_{490} 值变化 A: 实验后第 2 天开始, MUM-2B 细胞系中慢病毒感染组较阴性对照组细胞增值值均呈明显下降 ($t=5.78、30.68、23.99、9.40$, 均 $P \leq 0.01$) (独立样本 t 检验, $n=4$) B: 实验后第 2 天开始 MUM-2C 细胞系中慢病毒感染组较阴性对照组细胞增值值均明显下降 ($t=7.88、7.09、5.56、6.60$, 均 $P<0.01$) (独立样本 t 检验, $n=4$)

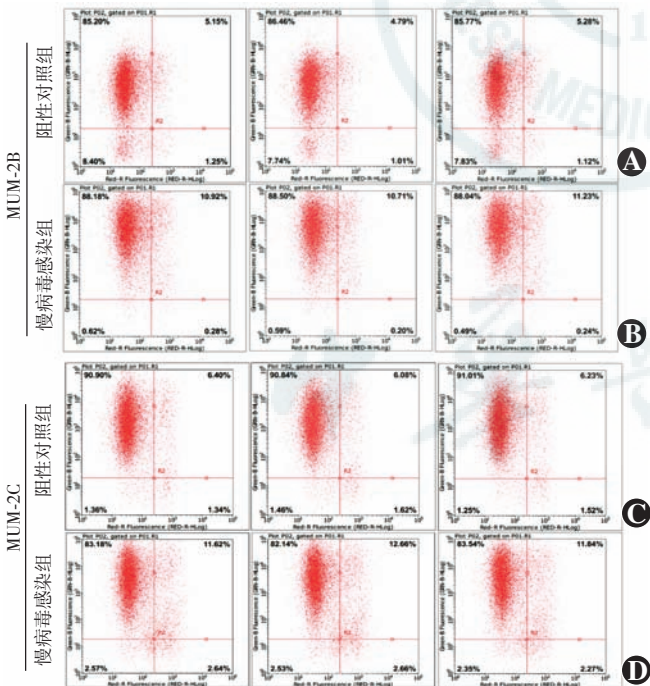


图 5 流式细胞仪检测 2 株细胞系中的阴性对照组和慢病毒感染组凋亡情况 A: MUM-2B 细胞系中, 阴性对照组 3 个复孔的凋亡细胞数量百分比分别为 6.40%、5.76% 和 6.38% B: MUM-2B 细胞系中, 慢病毒感染组 3 个复孔的凋亡细胞数量百分比分别为 11.20%、10.86% 和 11.42% C: MUM-2C 细胞系中, 阴性对照组 3 个复孔的凋亡细胞数量百分比分别为 7.73%、7.67% 和 7.73% D: MUM-2C 细胞系中, 慢病毒感染组 3 个复孔的凋亡细胞数量百分比分别为 14.23%、15.31% 和 14.07%

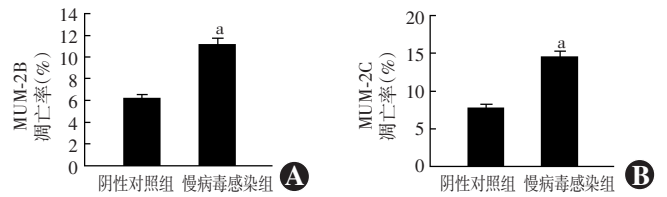


图 6 2 株细胞系中阴性对照组和慢病毒感染组凋亡率的比较 A: MUM-2B 细胞系中, 与阴性对照组凋亡率比较, $^a P<0.01$ (独立样本 t 检验, $n=3$) B: MUM-2C 细胞系中, 与阴性对照组凋亡率比较, $^a P<0.01$ (独立样本 t 检验, $n=3$)

2.8 各组细胞侵袭能力比较

在 MUM-2B 细胞系中,慢病毒感染组侵袭倍数为 $(0.50 \pm 0.03)\%$,明显低于阴性对照组的 $(1.00 \pm 0.06)\%$,差异有统计学意义 ($t=16.04, P<0.01$);在 MUM-2C 细胞系中,慢病毒感染组侵袭倍数为 $(0.51 \pm 0.02)\%$,明显低于阴性对照组的 $(1.00 \pm 0.06)\%$,差异有统计学意义 ($t=13.98, P<0.01$) (图 7),慢病毒感染组较阴性对照组的细胞侵袭倍数明显降低 (图 8)。

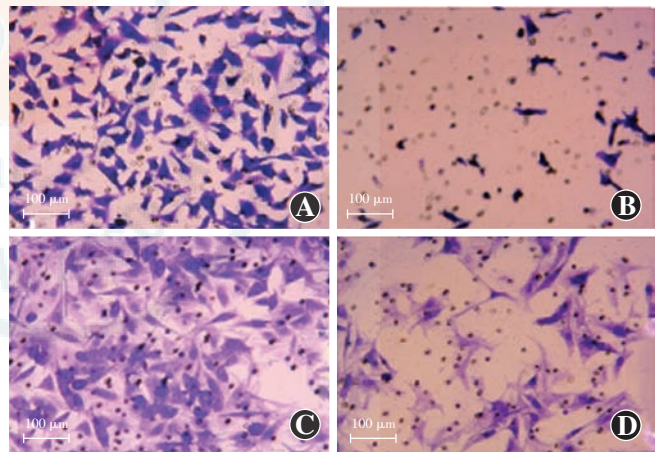


图 7 细胞侵袭试验检测 2 株细胞系细胞侵袭情况 (结晶紫 $\times 200$, 标尺 = $100 \mu\text{m}$) A: MUM-2B 细胞系中, 阴性对照组侵袭至聚碳酸酯膜的上皮样型 UM 细胞分布密集 B: MUM-2B 细胞系中, 慢病毒感染组侵袭至聚碳酸酯膜的上皮样型 UM 细胞分布稀疏, 细胞数明显少于阴性对照组 C: MUM-2C 细胞系中, 阴性对照组侵袭至聚碳酸酯膜的梭型细胞型 UM 细胞分布密集 D: MUM-2C 细胞系中, 慢病毒感染组梭型细胞型 UM 细胞分布稀疏, 细胞数明显少于阴性对照组

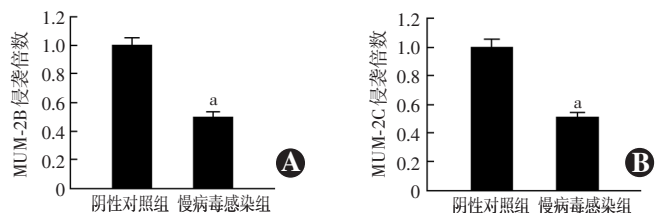


图 8 2 株细胞系慢病毒感染组与阴性对照组侵袭倍数比较 A: MUM-2B 细胞系与阴性对照组比较, $^a P<0.01$ (独立样本 t 检验, $n=9$) B: 在 MUM-2C 细胞系与阴性对照组比较, $^a P<0.01$ (独立样本 t 检验, $n=9$)

2.9 敲减 AEG-1 对细胞转移能力的影响

在 MUM-2B 细胞系中,慢病毒感染组转移倍数为 $(0.49 \pm 0.02)\%$,明显低于阴性对照组的 $(1.00 \pm 0.06)\%$,差异有统计学意义 ($t = 12.04, P < 0.01$);在 MUM-2C 细胞系中,慢病毒感染组转移倍数为 $(0.29 \pm 0.01)\%$,明显低于阴性对照组的 $(1.00 \pm 0.06)\%$,差异有统计学意义 ($t = 22.43, P < 0.01$) (图 9)。慢病毒转染组较阴性对照组的转移倍数明显降低 (图 10)。

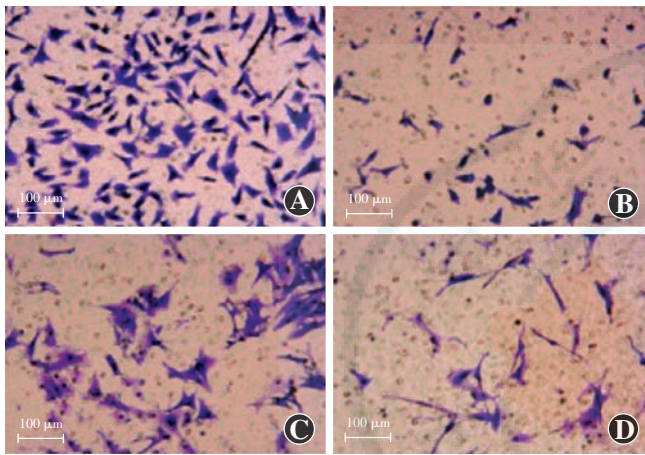


图 9 Transwell 试验检测 2 株细胞系中各组细胞转移情况 (结晶紫染色 $\times 200$, 标尺 = $100 \mu\text{m}$) A: MUM-2B 细胞系中, 阴性对照组在转移至聚碳酸酯膜的上皮样型 UM 细胞分布密集 B: MUM-2B 细胞系中, 慢病毒感染组转移至聚碳酸酯膜的上皮样型 UM 细胞分布稀疏, 细胞数明显少于阴性对照组 C: MUM-2C 细胞系中, 阴性对照组转移至聚碳酸酯膜的梭型细胞型 UM 细胞分布密集 D: MUM-2C 细胞系中, 慢病毒感染组转移至聚碳酸酯膜的梭型细胞型 UM 细胞分布稀疏, 细胞数明显少于阴性对照组

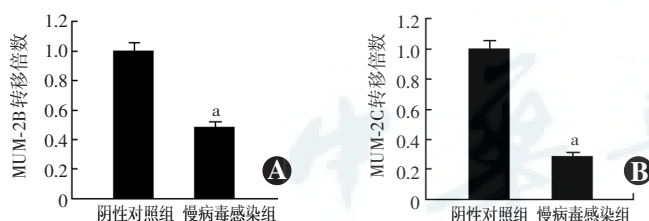


图 10 2 株细胞系在 Transwell 小室中慢病毒感染组与阴性对照组的转移倍数比较 A: MUM-2B 细胞系 与阴性对照组比较, $^a P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 9$) B: 在 MUM-2C 细胞系 与阴性对照组比较, $^a P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 9$)

3 讨论

AEG-1 基因在人类多种恶性肿瘤的发生和发展中起到关键作用, 是重要的致癌基因^[6]。本研究组前期研究发现 AEG-1 在 UM 临床组织标本中的表达及其与临床组织病理学的关系, 发现 AEG-1 在正常葡萄膜组织中未见表达, 在 UM 组织中呈高表达。且 AEG-1 高表达与 UM 临床组织病理学多种高危因素, 如侵犯

睫状体、虹膜新生血管生成、基底直径 $> 16 \text{ mm}$ 、肿瘤高度 $> 8 \text{ mm}$ 、细胞形态为上皮样细胞型或混合细胞型及肿瘤球外生长均显著相关。提示 AEG-1 高表达有可能成为判断 UM 患者预后差、转移率高的重要指标之一^[7]。

研究表明, 肿瘤的发生和发展是由不受控制的永生化细胞驱动, 与细胞增生、细胞凋亡以及稳定遗传基因的改变有关。UM 与皮肤黑色素瘤中常见的 BAP1、NRAS、KIT 及 NF1 等致病分子机制显著不同^[8], 其中 BAP1、SF3B1、EIF1AX、GNAQ 和 GNAI1 基因突变在 UM 患者中多见^[9-10]。UM 患者 GNAQ/GNAI1 基因突变阻碍了 α 亚单位恢复静息状态, 导致 MAPK/PKC/PI3K/YAP 等信号通路异常激活, 使细胞发生持续生长, 导致 UM 细胞增生^[11-13]。尽管从基因水平对 UM 的诊断和治疗有了很大进展, 但结局仍然很差, 需要继续探索发病机制及药物靶点, 提高 UM 患者生存率。AEG-1 参与肿瘤发生和发展的多种信号网络以及作为多种重要相互作用的配偶体, 处于癌基因 Ha-Ras 的下游, Ras 通路通过介导 PI3K/Akt 激活 c-Myc 时, c-Myc 作为转录因子与下游靶分子 AEG-1 基因启动子 E-box 结合, 从而提高 AEG-1 的转录水平, 促进协调正常细胞到永生化细胞的转化^[14-15]。AEG-1 表达水平的提高也协同 Ras 基因调节 PI3K/Akt 信号途径的下游基因, 从而起到调控肿瘤细胞增生与抗凋亡作用^[16]。AEG-1 也可活化 MAPK 信号通路, 激活 ERK 和 p38, 促进肿瘤的侵袭及锚定依赖性生长^[17]。AEG-1 参与肿瘤细胞增生和侵袭的各种信号传导通路, 与 UM 常见基因畸变调控肿瘤发生和发展的多种信号传导通路有重叠。

本研究从细胞水平进行探讨, 依据 UM 病理细胞形态将其分为上皮样细胞型、梭形细胞型、混合细胞型和其他类型 (包括簇状型、坏死型或气球样细胞型等)^[18]。各细胞类型 UM 患者预后有所不同, 其中梭形细胞型 UM 预后最好, 上皮样细胞型 UM 预后最差^[19]。基于 2 种人 UM 细胞系侵袭转移性及预后生存期有所差异, 从而考虑到 2 株细胞系肿瘤发生和发展所参与的信号传导通路也有所不同。本实验选取肝转移来源高侵袭性的上皮样细胞型 MUM-2B 细胞系和肺转移来源低侵袭性的梭形细胞型 MUM-2C 细胞系进行生物学行为研究, 明确 AEG-1 在 UM 发生和发展相关信号通路中的重要性^[20]。实验表明, 空白慢病毒不影响瘤细胞的生长, 经 AEG-1-RNAi 慢病毒感染 2 株细胞系后 AEG-1 基因敲减率分别达 77.1% 和 79.8%, UM 细胞系 AEG-1 基因表达水平均受到抑制。

在 2 株细胞系的各实验组中,经慢病毒介导 AEG-1 沉默的慢病毒感染组较阴性对照组瘤细胞增生数下降,细胞凋亡率增加,UM 细胞系的侵袭转移能力下降,明显改变了不同侵袭转移潜能的 UM 细胞系的生物学行为。

综上所述,AEG-1 基因参与 UM 多种重要信号传导通路网络,减缓细胞增生速率,促进细胞凋亡,降低细胞侵袭和转移能力。但是本研究仅为体外细胞学研究,今后应开展相关动物实验研究,进一步验证 AEG-1 基因沉默对 UM 生长的抑制作用,并通过分子生物学实验证实相关信号传导通路和级联反应对 UM 的生物学行为造成的影响,以达到降低 AEG-1 表达而抑制 UM 发生和发展目的,为 UM 发病机制、药物靶点研究提供新的思路和切入点。

参考文献

- [1] Singh AD, Bergman L, Seregard S. Uveal melanoma: epidemiologic aspects [J]. *Ophthalmol Clin North Am*, 2005, 18 (1) : 75-84. DOI: 10.1016/j.ohc.2004.07.002.
- [2] Krantz BA, Dave N, Komatsubara KM, et al. Uveal melanoma: epidemiology, etiology, and treatment of primary disease [J]. *Clin Ophthalmol*, 2017, 11 : 279-289. DOI:10.2147/OPHT.S89591.
- [3] Yavuziyigitoglu S, Drabarek W, Smit KN, et al. Correlation of gene mutation status with copy number profile in uveal melanoma [J]. *Ophthalmology*, 2017, 124 (4) : 573-575. DOI: 10.1016/j.ophtha.2016.10.039.
- [4] Zhang Y, Li ZY, Hou XX, et al. Clinical significance and effect of AEG-1 on the proliferation, invasion, and migration of NSCLC: a study based on immunohistochemistry, TCGA, bioinformatics, *in vitro* and *in vivo* verification [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (10) : 16531-16552. DOI: 10.18632/oncotarget.14972.
- [5] Emdad L, Sarkar D, Lee SG, et al. Astrocyte elevated gene-1: a novel target for human glioma therapy [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9 (1) : 79-88. DOI:10.1158/1535-7163.MCT-09-0752.
- [6] Emdad L, Das SK, Dasgupta S, et al. AEG-1/MTDH/LYRIC: signaling pathways, downstream genes, interacting proteins, and regulation of tumor angiogenesis [J]. *Adv Cancer Res*, 2013, 120 : 75-111. DOI:10.1016/B978-0-12-401676-7.00003-6.
- [7] 毛英,白海霞,畅颖,等.星形胶质细胞活化基因-1(AEG-1)在葡萄膜黑色素瘤中的表达及其与临床组织病理学的关系[J].*眼科新进展*, 2018, 38(2) : 121-125. DOI:10.13389/j.cnki.rao.2018.0026. Mao Y, Bai HX, Chang Y, et al. Expression of astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) in uveal melanoma and its relationship with clinical histopathology [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2018, 38 (2) : 121-125. DOI:10.13389/j.cnki.rao.2018.0026.
- [8] Yilmaz I, Gamsizkan M, Kucukodaci Z, et al. *BRAF*, *KIT*, *NRAS*, *GNAQ* and *GNA11* mutation analysis in cutaneous melanomas in Turkish population [J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2015, 58 (3) : 279-284. DOI:10.4103/0377-4929.162831.
- [9] Dono M, Angelini G, Cecconi M, et al. Mutation frequencies of *GNAQ*, *GNA11*, *BAP1*, *SF3B1*, *EIF1AX* and *TERT* in uveal melanoma: detection of an activating mutation in the *TERT* gene promoter in a single case of uveal melanoma [J]. *Br J Cancer*, 2014, 110 (4) : 1058-1065. DOI:10.1038/bjc.2013.804.
- [10] Johnson CP, Kim IK, Esmali B, et al. Systematic genomic and translational efficiency studies of uveal melanoma [J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12 (6) : e0178189 [2018-02-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28594900>. DOI:10.1371/journal.pone.0178189.
- [11] 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.
- [12] Shoushtari AN, Carvajal RD. *GNAQ* and *GNA11* mutations in uveal melanoma [J]. *Melanoma Res*, 2014, 24 (6) : 525-534. DOI:10.1097/CMR.000000000000121.
- [13] Chen X, Wu Q, Depeille P, et al. RasGRP3 mediates MAPK pathway activation in *GNAQ* mutant uveal melanoma [J]. *Cancer Cell*, 2017, 31 (5) : 685-696. DOI:10.1016/j.ccell.2017.04.002.
- [14] Wang J, Chen X, Tong M. Knockdown of astrocyte elevated gene-1 inhibited cell growth and induced apoptosis and suppressed invasion in ovarian cancer cells [J]. *Gene*, 2017, 616 : 8-15. DOI: 10.1016/j.gene.2017.03.024.
- [15] Srivastava J, Siddiq A, Gredler R, et al. Astrocyte elevated gene-1 and c-Myc cooperate to promote hepatocarcinogenesis in mice [J]. *Hepatology*, 2015, 61 (3) : 915-929. DOI:10.1002/hep.27339.
- [16] Yin X, Ren M, Jiang H, et al. Downregulated AEG-1 together with inhibited PI3K/Akt pathway is associated with reduced viability of motor neurons in an ALS model [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2015, 68 : 303-313. DOI:10.1016/j.mcn.2015.08.009.
- [17] Chang Y, Li B, Xu X, et al. Lentivirus-mediated knockdown of astrocyte elevated gene-1 inhibits growth and induces apoptosis through MAPK pathways in human retinoblastoma cells [J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11 (2) : e0148763 [2018-02-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26894431>. DOI:10.1371/journal.pone.0148763.
- [18] Shields CL, Kaliki S, Furuta M, et al. American Joint Committee on Cancer classification of posterior uveal melanoma (tumor size category) predicts prognosis in 7731 patients [J]. *Ophthalmology*, 2013, 120 (10) : 2066-2071. DOI:10.1016/j.ophtha.2013.03.012.
- [19] Andreoli MT, Mieler WF, Leiderman YI. Epidemiological trends in uveal melanoma [J]. *Br J Ophthalmol*, 2015, 99 (11) : 1550-1553. DOI:10.1136/bjophthalmol-2015-306810.
- [20] Mo J, Sun B, Zhao X, et al. The *in-vitro* spheroid culture induces a more highly differentiated but tumorigenic population from melanoma cell lines [J]. *Melanoma Res*, 2013, 23 (4) : 254-263. DOI: 10.1097/CMR.0b013e32836314e3.

(收稿日期:2018-03-21 修回日期:2018-09-12)

(本文编辑:杜娟)

读者·作者·编者

本刊对来稿中组织病理学彩色图片及电子显微镜图片中标尺的要求

如果作者稿件中包含有组织病理图、免疫荧光染色图、免疫组织化学图、电子显微镜图片,为了反映组织标本大小的最精确尺度,请在电子版图片的左下方附注标尺。

(本刊编辑部)