

## · 实验研究 ·

# 骨硬化蛋白在葡萄膜黑色素瘤发生和发展中的作用及其生物学机制

王瀚庆 黄晓明 吴桐 史双双 万剑锋 赵思迪 唐东润 孙丰源

天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼视光医院 天津医科大学眼科研究所, 天津 300384

通信作者: 孙丰源, Email: eyesunfy@126.com

**【摘要】 目的** 探讨骨硬化蛋白(SOST)和 WNT/CTNNB1 信号通路对人葡萄膜黑色素瘤(UM)细胞周期、迁移和侵袭的影响及其相关机制。**方法** 分别收集 20 例上皮细胞型 UM 组织和 16 例梭形细胞型 UM 组织进行免疫组织化学染色检测 SOST、Wnt-1 和 Catenin beta-1 蛋白含量。选择 3 株人 UM 组织来源的细胞系 OCM-1(原发梭形)、Mum-2B(转移上皮型)和 Mum-2C(转移梭形),分为空白对照组、空质粒组和 SOST siRNA 组,其中空白对照组不转染质粒、空质粒组用 SOST 阴性对照质粒转染,SOST siRNA 组用含 SOST siRNA 转染。转染 24 h 后,采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 分别检测 SOST、CTNNB1、WNT 蛋白家族 1 (WNT1)、CCND1、基质金属蛋白酶(MMP)2 和 MMP9 的 mRNA 和相应蛋白表达水平;采用 Transwell 方法测定转染后细胞的侵袭和迁移能力;采用流式细胞术检测转染后各组细胞周期分布。取 BALB/c nude 雌性小鼠 9 只采用随机数字表法随机分为 OCM-1 组、OCM-1 空载体组和 SOST shRNA 组,分别接种未感染慢病毒的 OCM-1、感染空载体慢病毒的 OCM-1 以及感染 SOST shRNA 慢病毒的 OCM-1,观察 SOST 沉默对小鼠原位成瘤的影响。通过免疫共沉淀实验探讨 OCM-1 细胞 SOST 与低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP)-5/6 蛋白相互作用。**结果** 免疫组织化学染色结果发现恶性程度较低的梭形细胞型 UM 组织中 SOST 表达水平高于上皮细胞型 UM 组织,Wnt-1 和 Catenin beta-1 表达水平明显低于上皮细胞型 UM 组织,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。实时荧光定量 PCR 结果显示,各细胞系中 SOST siRNA 组 SOST mRNA 相对表达量明显低于相应空质粒组,CCND1、WNT1 及 MMP9 mRNA 相对表达量明显高于空质粒组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );OCM-1 和 Mum-2C 细胞系中,SOST siRNA 组 CTNNB1 mRNA 相对表达量明显高于空质粒组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。Western blot 结果显示,SOST siRNA 组 SOST 蛋白相对表达量低于空质粒组,Wnt-1、Catenin beta-1、cyclin-D1、MMP2、MMP9 蛋白相对表达量高于空质粒组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。Transwell 实验结果显示,各细胞系中 SOST siRNA 组的细胞侵袭和迁移能力明显强于空白对照组和空质粒组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。流式细胞术显示 SOST siRNA 组 G1 期细胞比例以及 G1/S 期比值均明显低于空白对照组和空质粒组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。OCM-1 组、OCM-1 空载体组和 SOST shRNA 组眼球体积分别为  $(42.7 \pm 4.6)$ 、 $(49.0 \pm 22.9)$  和  $(135.2 \pm 32.7) \text{ mm}^3$ ,总体比较差异有统计学意义( $F = 19.963, P < 0.01$ ),其中 SOST shRNA 组小鼠眼球较 OCM-1 组和 OCM-1 空载体组大,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。免疫共沉淀结果显示,SOST 可分别与 LRP-5 和 LRP-6 相互结合发生相互作用。**结论** 沉默 SOST 可促进 UM 细胞的侵袭和迁移,并使其处于分裂期的比例升高,可以促进肿瘤在裸鼠眼内的生长。SOST 可能是通过与膜上受体 LRP-5/LRP-6 相互作用进而调节 WNT/CTNNB1 信号通路来发挥这一功能。

**【关键词】** 骨硬化蛋白; 葡萄膜黑色素瘤; 发生和发展; 机制

**基金项目:** 天津市教委科研计划项目(2020KJ176);天津市临床重点学科(专科)建设项目(TJLZCDXKQ018);天津市视网膜功能与疾病重点实验室自主与开放课题(2020tjswmq002)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20211025-00582

## Role of sclerostin in the occurrence and development of uveal melanoma and its biological mechanism

Wang Hanqing, Huang Xiaoming, Wu Tong, Shi Shuangshuang, Wan Jianfeng, Zhao Sidi, Tang Dongrun, Sun Fengyuan

Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin Medical University Eye Institute, Tianjin Medical University School of Optometry and Ophthalmology, Tianjin 300384, China

Corresponding author: Sun Fengyuan, Email: eyesunfy@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of sclerostin (SOST) and WNT/CTNNB1 signaling pathway on the cell cycle, migration and invasion of human uveal melanoma (UM) cells and its related mechanism.

**Methods** UM tissues from 20 cases of epithelioid UM and 16 cases of spindle cell type UM were collected. The contents of SOST, Wnt-1 and Catenin beta-1 proteins in the collected tissues were detected by immunohistochemical staining. Three human UM tissue derived cell lines OCM-1 (primary spindle cell type), Mum-2B (metastatic epithelioid) and Mum-2C (metastatic spindle cell type) were selected and divided into three groups, blank control group not transfected, empty vector group transfected with SOST negative control vector and SOST siRNA group transfected with SOST siRNA. After 24-hour transfection, the mRNA and protein expression levels of SOST, CTNBN1, WNT protein family 1 (WNT1), CCND1, matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 were detected by real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot, respectively. The invasion and migration ability of the transfected cells were measured by transwell method, and the cell cycle distribution was detected by flow cytometry. Another 9 female BALB/c nude mice were selected and randomized into OCM-1 group, OCM-1 empty vector group and SOST shRNA group, inoculated with OCM-1 without lentivirus infection, OCM-1 with blank lentivirus infection and OCM-1 with SOST shRNA lentivirus infection, respectively. Six weeks after inoculation, the in situ formation of tumor was observed. The interaction between SOST and low density lipoprotein receptor related protein (LRP)-5/6 in OCM-1 cells was explored by co-immunoprecipitation assay. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Tianjin Medical University Eye Hospital (2018KY [L]-20).

**Results** Immunohistochemical staining results showed that the SOST expression level was higher and the expression levels of Wnt-1 and Catenin beta-1 were lower in spindle cell type UM tissues than in epithelioid UM tissues, and the differences were all statistically significant (all at  $P < 0.01$ ). The real-time fluorescence quantitative PCR results showed that the relative expression of SOST mRNA was significantly lower and the relative expressions of CCND1, WNT1 and MMP9 mRNA were significantly higher in SOST siRNA groups than in corresponding empty vector groups in the three cell lines (all at  $P < 0.05$ ). In OCM-1 and Mum-2C cell lines, the relative expressions of CTNBN1 mRNA were significantly higher in SOST siRNA groups than in empty vector groups (all at  $P < 0.01$ ). Western blot results showed that the relative expression of SOST protein was significantly lower and the relative expressions of Wnt-1, Catenin beta-1, cyclin-D1, MMP2 and MMP9 proteins were significantly higher in SOST siRNA groups than in empty vector groups (all at  $P < 0.01$ ). Transwell assay showed that the cell invasion and migration ability of SOST siRNA group was significantly higher than that of blank control group and empty vector group in the three cell lines (all at  $P < 0.01$ ). Flow cytometry showed that the proportion of G1-phase cells and the G1/S-phase ratio were significantly lower in SOST siRNA group than in blank control groups and empty vector groups (all at  $P < 0.01$ ). The eyeball volume of OCM-1 group, OCM-1 empty vector group and SOST shRNA group was  $(42.7 \pm 4.6)$ ,  $(49.0 \pm 22.9)$  and  $(135.2 \pm 32.7)$  mm<sup>3</sup>, respectively, showing a significant overall difference ( $F = 19.963$ ,  $P < 0.01$ ). The eyeball volume of SOST shRNA group was larger than that of OCM-1 group and OCM-1 empty vector group, and the differences were statistically significant (both at  $P < 0.05$ ). Co-immunoprecipitation results showed that SOST could interact with LRP-5 and LRP-6 by binding to them, respectively.

**Conclusions** Silencing SOST can promote the invasion and migration of UM cells, and increase the proportion of UM cells in the division phase. Silencing SOST can promote tumor growth in eyes of nude mice. SOST may play this function by interacting with the membrane receptor LRP-5/LRP-6 and then regulating the WNT/CTNBN1 signal pathway.

[Key words] Sclerostin; Uveal melanoma; Occurrence and development; Mechanism

**Fund program:** Scientific Research Project of Tianjin Education Commission (2020KJ176); Tianjin Key Clinical Discipline Construction Project (TJLCZDXKQ018); Autonomous and Open Project of Tianjin Key Laboratory of Retinal Function and Disease (2020tjswmq002)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20211025-00582

葡萄膜黑色素瘤 (uveal melanoma, UM) 是一种原发性眼内恶性肿瘤, 发病隐匿、发展速度快, 起源于眼内葡萄膜黑色素细胞, 是成人常见的眼内恶性肿瘤, 占眼黑色素瘤的 83%<sup>[1-3]</sup>。但目前临床上不能对肿瘤的侵袭和转移等预后进行准确和客观的预计, 并且相应有效治疗方法的缺乏是影响 UM 疗效和患者生存率的主要因素<sup>[4-5]</sup>。根据 1980 年 WHO 组织学类型分类标准, UM 可分为 4 类, 即梭形细胞型、上皮样细胞型、混

合细胞型及其他类型<sup>[6]</sup>, 其中梭形细胞在所有肿瘤细胞中所占的比例越高, 预后越好; 上皮样细胞所占比例越多, 预后越差<sup>[7]</sup>。因此对 UM 发生和促使肿瘤发生转移的分子机制进行深入研究具有重要意义。骨硬化蛋白 (sclerostin, SOST) 首先在硬化症及骨质疏松症中被发现, 在骨质形成过程中对成骨祖细胞增生和分化至关重要<sup>[8]</sup>。已有研究证实, SOST 对视网膜母细胞瘤的生长有负反馈调节作用<sup>[9]</sup>。SOST 主要是通过

WNT/CTNNB1 信号级联反应来发挥对大肠癌和子宫内膜癌等癌症的抑制作用<sup>[10]</sup>。WNT/CTNNB1 信号通路是黑色素瘤等众多肿瘤的经典通路<sup>[11]</sup>。而 Catenin beta-1 积聚或 Catenin beta-1 的破坏复合物形成异常均会导致 WNT/CTNNB1 信号通路的激活<sup>[12-13]</sup>。Catenin beta-1 在细胞内异常聚集和活化可促进恶性黑色素瘤细胞的增生,与黑色素瘤患者的预后呈负相关<sup>[14-15]</sup>。Widlund 等<sup>[16]</sup>也发现 WNT/CTNNB1 信号通路的激活增加了体外小鼠黑色素瘤细胞的增生和克隆数量。但也有研究表明在前列腺癌中 Catenin beta-1 通过影响转移抑制基因 *KAI1* 的转录,降低前列腺癌细胞转移潜力<sup>[17]</sup>。因此 Catenin beta-1 在不同肿瘤中的作用不是完全相同的。目前, SOST 在 UM 中的研究甚少,且其对于 WNT/CTNNB1 信号通路产生的调控作用以及其具体机制尚不清楚。因此,本研究旨在探讨 SOST 通过 WNT/CTNNB1 信号通路在 UM 发病中的作用机制, 以期为 UM 治疗提供一种新的作用靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 UM 组织标本、细胞及实验动物** (1) 组织标本来源 收集 2018 年 10 月至 2021 年 4 月于天津医科大学眼科医院行眼球摘除的单眼发病 UM 患者 36 例 36 眼的 UM 组织标本,根据 1980 年的 WHO 组织学类型分类标准对 UM 进行分类,其中上皮细胞型 UM 组织标本 20 例,梭形细胞型组织标本 16 例。纳入标准:①病理诊断明确为原发性 UM;②送检组织切片比较完整;③患者未患其他类型的癌症且没有接受过放射治疗或化学治疗。本研究所使用组织标本来源患者和/或其法定监护人知晓研究目的和方法并签署知情同意书。(2) 细胞来源 眼部原发灶的梭形细胞 UM 细胞系 OCM-1、转移灶的上皮型 UM 细胞系 Mum-2B 和转移灶的梭形 UM 细胞系 Mum-2C 均购自于中国科学院细胞库(上海);293T 细胞购自美国菌种保藏中心。(3) 动物来源 6~8 周龄 BALB/c nude 雌性小鼠 9 只,体质量(14±2)g,均购自北京维通利华公司。本研究方案经天津医科大学眼科医院伦理委员会审查批准[批文号:2018KY(L)-20]。

**1.1.2 主要试剂及仪器** DMEM 培养基、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、胎牛血清、青链霉素、胰蛋白酶-EDTA(美国 Gibco 公司);二甲基亚砜(美国 Sigma-Aldrich 公司);PCR 引物、RNATransMate 转染试剂、小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)、慢病毒(上海生工生物工程股份有限公司);

兔抗 SOST(ab264040)、Wnt-1(ab15251)、Catenin beta-1(ab32572)、cyclin-D1(ab16663)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP) 2(ab92536)、MMP9(ab76003)单克隆抗体(美国 Abcam 公司);山羊抗兔 IgG 二抗(美国 Jackson ImmunoResearch 公司);脱脂奶粉(美国 BD 公司);Lipofectamine 2000、Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒、2 倍浓缩实时定量 PCR 扩增混合液、BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo 公司);Amersham ECL prime 化学发光液(美国 GE Healthcare 公司)。Countess™ II 自动细胞计数仪(美国 Invitrogen 公司);iQ5 Real-Time PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司);Light Cycler 480 QRT-PCR 仪(美国 Roche 公司);CO<sub>2</sub> 恒温孵箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);自动酶标仪(美国 Promega 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 取 UM 细胞系,用 T25 培养瓶常温运输,培养瓶消毒后置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温孵箱,待细胞贴壁且达到 80% 融合时进行传代培养,弃去培养基, PBS 洗涤 2 次,并用 1 ml 的 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化,加入含有 100 U/ml(商品单位)青霉素、100 μg/ml 链霉素和 10% 胎牛血清的完全培养基终止消化,以 1 000 r/min(168×g)离心收集细胞,使用配置好的完全培养基重悬培养,用于后续实验。

**1.2.2 免疫组织化学染色法检测 UM 标本组织中 SOST、Wnt-1 和 Catenin beta-1 蛋白的表达** 将收集的 UM 组织标本置于中性甲醛中固定后石蜡包埋,依次进行切片(切片厚度 5 μm),脱蜡,抗原修复,封闭,孵育抗体(SOST、Wnt-1、Catenin beta-1 抗体稀释倍数分别为 1:10、1:100、1:500),DAB 染色,苏木素染核,返蓝,脱水封片。每张切片任意取 3 个视野(×100),人工评估染色强度:无黄色沉淀为 0 分,淡黄色沉淀为 1 分,棕黄色沉淀为 2 分,深棕黄色沉淀为 3 分,采用 ImageJ 软件手动计数阳性细胞数。免疫组织化学评分=染色强度评分×阳性细胞数占总细胞数的比值。

**1.2.3 细胞转染和分组** 由上海生工生物工程股份有限公司设计并合成靶向人 SOST(Gene ID:50964) mRNA 的 siRNA 及其阴性对照 siRNA, SOST siRNA 序列为 5'-GGCGTTCAAGAATGATGCCACGGAA-3'。将培养的 OCM-1、Mum-2B 和 Mum-2C 细胞系随机分为空白对照组(不转染)、空质粒组(用 SOST 阴性对照质粒转染)和 SOST siRNA 组(用含 SOST siRNA 质粒转染)。将处于对数生长期的细胞用 0.25% 胰蛋白酶-

EDTA 消化,并以 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,重悬于培养基中,用自动细胞计数仪进行细胞计数,每孔  $4 \times 10^5$  个细胞接种到 6 孔培养板中。当细胞融合度达到 50%~80%时,替换为不含血清和青链霉素的培养基,4 h 后使用 Lipofectamine 2000,将 SOST 阴性对照质粒和 SOST siRNA 质粒分别转染到各细胞系中,转染后 24 h,更换完全培养基进行传代培养。在倒置相差显微镜下观察细胞形态。

**1.2.4 实时荧光定量 PCR 测定 3 种细胞系中各目的基因表达** 根据 Trizol 试剂盒说明书操作步骤提取各组细胞的总 RNA,按照逆转录试剂盒说明书操作要求合成 cDNA;按照实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行 PCR 扩增,所需引物的设计先根据 NCBI 发布的基因序列,再将该基因序列输入到 PrimerBank 网站进行设计(表 1),并由上海生工生物工程股份有限公司合成。PCR 扩增条件:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 45 个循环。反应体系:Premix Ex Taq 或 SYBR Green Mix 10  $\mu$ l,正反向引物各 1  $\mu$ l,cDNA 模板 1  $\mu$ l,双蒸水补至 20  $\mu$ l。选择磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内部参照基因,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各目的基因相对表达量。

**1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期** 取各组转染 24 h 细胞,胰蛋白酶-EDTA 消化,1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞;无菌 PBS 漂洗细胞;加入预冷的体积分数为 70%乙醇 1 ml 重悬细胞,4 ℃ 固定过夜;PBS 漂洗细胞,去除乙醇溶液;每管加入 500  $\mu$ l PI 染色液,室温避光孵育 15 min,流式细胞仪检测细胞周期。

**1.2.6 Transwell 法检测细胞迁移与侵袭能力** (1)细胞侵袭 采用无血清 DMEM 以 8:1 稀释 Transwell Assay Matrigel,取 100  $\mu$ l 稀释的 Matrigel 添加到 Transwell 上

腔室中,整个过程需在冰上进行操作以防止其凝固,将其置于孵箱待其凝固,吸出培养板中残余液体。采用胰蛋白酶-EDTA 消化处于对数生长期的 3 个组细胞,重悬并调整浓度,在覆盖有 Matrigel 的 24 孔板 Transwell 上室中以  $1 \times 10^5$  个/孔的密度均匀接种,加入无血清 DMEM 进行培养,并在下室添加 600  $\mu$ l 含有 10% FBS 的完全培养基,过程中避免下层培养液与小室之间存在气泡。在恒温孵箱中培养 24 h,取出小室,PBS 淋洗 2 遍,用棉签轻轻擦去小室膜上层的细胞,用 4%多聚甲醛固定 30 min,加入结晶紫染色液染色 15 min,并用 PBS 冲洗。在倒置显微镜下观察通过基质胶侵袭的细胞。每组随机选择 3 个区域计算通过基质胶的侵袭细胞数目。(2)细胞迁移 除了不加入 Matrigel,实验步骤同细胞侵袭,在倒置显微镜下观察 3 种细胞系的空白组、对照组以及 si-SOST 组中通过小室膜的细胞。每组随机选择 3 个区域计算通过小室膜的迁移细胞数目。

**1.2.7 Western blot 法测定细胞中 SOST、Wnt-1、Catenin beta-1、cyclin-D1、MMP2 和 MMP9 蛋白的表达** 取转染 24 h 细胞,加入适量细胞裂解液 RIPA 裂解细胞,用 BCA 蛋白测定试剂盒测量总蛋白质浓度。取总蛋白质 20  $\mu$ g 进行 10% SDS-PAGE 电泳分离,采用湿转法转移到聚偏二氟乙烯膜上。将膜用质量分数 5%脱脂奶粉封闭 2 h,置于含 beta-tubulin (1:500)、SOST(1:50)、Wnt-1(1:20)、Catenin beta-1(1:5 000)、cyclin-D1(1:25)、MMP2(1:2 000)和 MMP9(1:1 000)抗体稀释液中 4 ℃ 孵育过夜;TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,置于山羊抗兔的二抗室温孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次;暗室下 ECL 显色。以 beta-tubulin 为内参照,计算各目的蛋白相对表达量。

**1.2.8 UM 动物模型的构建** 将用于动物实验的 OCM-1 细胞系进行慢病毒稳定转染,先进行 shRNA-SOST 质粒的构建,引物通过 ThermoFisher 网站进行设计,引物序列为 5'-AAA AGCAGGCGTTCAAGAATGATGCT TGGATCCAAGCATCATTTCTTGAA CGCCTGC-3',所使用的载体为 pENTR<sup>TM</sup> H1/TO,随即进行酶切、连接、转化等操作构建目的质粒,并进行质粒鉴定,以上步骤均由上海生工生物工程股份有限公司完成。使用 293T 细胞进行包装目的质粒和包装质粒并收集病毒,

表 1 目的基因 PCR 引物序列  
Table 1 Primer sequences of target genes

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	产物长度(bp)
SOST	TGAGACCAAAGACGTGTCGG	CTTGAGCTCCGACTGGTTGT	331
CTNNA1	ATGATGGTCTGCCAAGTGGG	TCCTGGCCATATCCACCAGA	875
WNT1	CGATGGTGGGTATTGTGAAC	CCGGATTTTGGCGTATCAGAC	133
CCND1	GCTGCGAAGTGAAAACCATC	CCTCCTTCTGCACACATTTGAA	135
MMP2	TACAGGATCATTGGCTACACACC	GGTCACATCGCTCCAGACT	90
MMP9	TGTACCGCTATGGTTACACTCG	GGCAGGGACAGTTGCTTCT	97
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTGTGCATACTTCTCATGG	197

注:SOST:骨硬化蛋白;WNT1:WNT 蛋白家族 1;MMP:基质金属蛋白酶;GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶  
Note: SOST: sclerostin; WNT1: WNT protein family 1; MMP: matrix metalloproteinase; GAPDH: glyceraldehyde phosphate dehydrogenase

在 OCM-1 细胞密度达到 40%~50% 时感染细胞,随后加药筛选构建 OCM-1 稳转细胞系备用。利用稳定敲低 SOST 的 OCM-1 细胞系构建小鼠眼部原位 UM,将小鼠按照随机数字表法分为 OCM-1 组、OCM-1 空载体组和 SOST shRNA 组,分别接种未感染慢病毒的 OCM-1、感染空载慢病毒的 OCM-1 以及感染 SOST shRNA 慢病毒的 OCM-1;细胞经胰蛋白酶-EDTA 消化,低速离心收集细胞,以  $1 \times 10^7$  个/ml 的浓度悬浮在 Hanks 平衡盐溶液中。通过腹腔内注射 4% 水合氯醛 ( $10 \mu\text{l/g}$ ) 麻醉小鼠,同时小鼠右眼点用丙美卡因滴眼液进行眼表麻醉,在手术显微镜下,用 30G 针头斜角穿过巩膜,穿透葡萄膜,但不穿透视网膜。然后将连接  $10 \mu\text{l}$  Hamilton 注射器的 34G 钝性针头插入视网膜下腔,斜角朝向内眼,缓慢注入  $5 \mu\text{l}$  ( $5 \times 10^4$  个) 细胞悬液。显微镜下观察小鼠眼底白色隆起表明注射成功。术眼涂妥布霉素眼药膏以减少感染的风险;注射后每周固定时间观察裸鼠生长状态及原位肿瘤生长情况,记录小鼠眼部成瘤时间。将小鼠未注射肿瘤细胞的对侧正常眼作为空白对照组,6 周后统一颈椎脱臼法处死小鼠,摘除眼球,并使用游标卡尺测量瘤体长和宽,并计算眼球体积 ( $\text{mm}^3$ ):  $V = \pi/6 \times L \times W^2$  ( $L$  为长,  $W$  为宽)。

**1.2.9 免疫共沉淀法检测 SOST 和 LRP-5/6 蛋白互作** 取 OCM-1 细胞系各组转染 24~48 h 的细胞,先用预冷 PBS 洗涤,随后加入预冷的 RIPA Buffer 裂解,提取细胞总蛋白;用 PBS 清洗 Protein A agarose 并配制成 50% 浓度,取  $100 \mu\text{l}$  加入 1 ml 总蛋白以去除非特异性杂蛋白;稀释总蛋白并加入兔抗 SOST (稀释倍数 1:50) 室温孵育 2 h, 然后加入  $100 \mu\text{l}$  琼脂糖珠捕获抗原抗体复合物,收集珠子清洗后沸水煮 4 min,  $3\ 000 \text{ r/min}$  离心 3 min, 收集上清进行 SDS-PAGE 电泳,分别检测加入低密度脂蛋白受体相关蛋白 (low density lipoprotein receptor related protein, LRP) 5、LRP6 抗体和未加抗体组的 SOST 蛋白条带灰度值。

**1.3 统计学方法**

采用 GraphPad Prism 8.0.1 和 SPSS 23.0 统计学软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间均数经 levene 检验证实方差齐。各组间检测指标总体差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- $t$  检验。  $P < 0.05$  为

差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 不同类型 UM 组织中 SOST、Wnt-1 和 Catenin beta-1 蛋白表达比较**

免疫组织化学染色结果显示,上皮细胞型 UM 组织中 SOST 蛋白棕黄色沉淀较少且以淡黄色为主,Wnt-1 和 Catenin beta-1 蛋白以深棕黄色沉淀为主。梭形细胞型 UM 组织中 SOST 蛋白染色较深、Catenin beta-1 蛋白以淡黄色为主且 Wnt-1 蛋白阳性细胞数较少。与梭形细胞型 UM 组织相比,上皮细胞型 UM 组织中 SOST 染色评分较低、Wnt-1 和 Catenin beta-1 染色评分较高,差异均有统计学意义 ( $t = 72.493, 58.991, 54.118$ , 均  $P < 0.01$ ) (图 1, 表 2)。

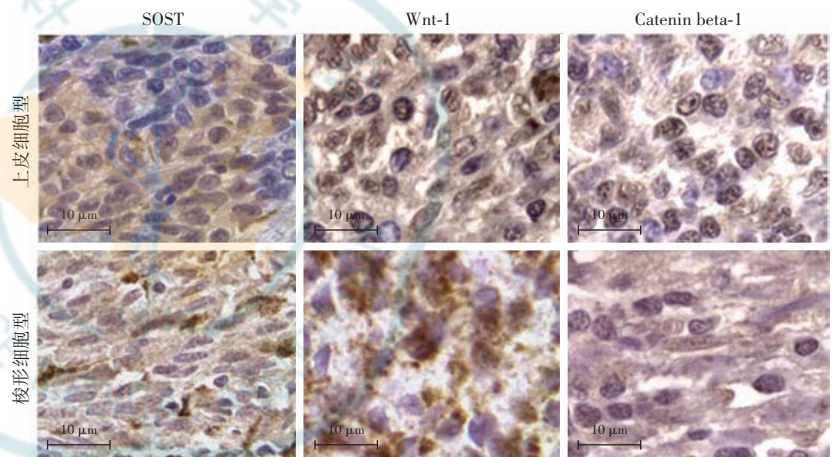


图 1 不同类型 UM 组织标本中 SOST、Wnt-1 和 Catenin beta-1 免疫组织化学染色 (DAB  $\times 100$ , 标尺 =  $10 \mu\text{m}$ ) 与梭形细胞型比较,上皮细胞型 UM 组织中 SOST 染色强度较低、Wnt-1 和 Catenin beta-1 染色强度较高 SOST:骨硬化蛋白;Wnt-1:WNT 蛋白家族 1  
Figure 1 Immunohistochemical staining of SOST, Wnt-1 and Catenin beta-1 proteins in tissue samples of two types of UM (DAB  $\times 100$ , bar =  $10 \mu\text{m}$ ) The staining intensity of SOST was lower and the staining intensity of Wnt-1 and Catenin beta-1 was higher in epithelioid UM tissues compared with spindle cell type SOST: sclerostin; Wnt-1: WNT protein family 1

表 2 不同类型 UM 组织中 SOST、Wnt-1 和 Catenin beta-1 蛋白免疫组织化学染色评分比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2 Comparison of immunohistochemical staining scores of SOST, Wnt-1 and Catenin beta-1 proteins between two types of UM tissues ( $\bar{x} \pm s$ )

UM 类型	样本量	SOST	Wnt-1	Catenin beta-1
上皮细胞型	20	0.30 $\pm$ 0.01	2.80 $\pm$ 0.07	2.59 $\pm$ 0.12
梭形细胞型	16	1.31 $\pm$ 0.06	1.30 $\pm$ 0.08	0.82 $\pm$ 0.05
$t$ 值		72.493	58.991	54.118
$P$ 值		<0.01	<0.01	<0.01

注:(独立样本  $t$  检验) UM:葡萄膜黑色素瘤;SOST:骨硬化蛋白;Wnt-1:WNT 家族成员 1  
Note: (Independent samples  $t$ -test) UM: uveal melanoma; SOST: sclerostin; Wnt-1: WNT protein family 1

## 2.2 各转染组细胞相关基因 mRNA 和蛋白表达水平比较

各细胞系中 SOST siRNA 组细胞 SOST mRNA 相对表达量明显低于相应空质粒组, CCND1、WNT1 及 MMP9 mRNA 相对表达量明显高于空质粒组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ); OCM-1 和 Mum-2C 细胞系中 SOST siRNA 组细胞 CTNNB1 mRNA 相对表达量明显高于空质粒组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ ); Mum-2B 细胞系中空质粒组与 SOST siRNA 组间 CTNNB1 mRNA 相对表达量比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); Mum-2C 细胞系中 SOST siRNA 组细胞中 MMP2 mRNA 相对表达量明显高于空质粒组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(表 3)。

3 种细胞系 SOST siRNA 组 SOST 蛋白表达条带均明显弱于相应空质粒组, Wnt-1、Catenin beta-1、cyclin-D1、MMP2 和 MMP9 蛋白表达条带均明显强于相应空质粒组(图 2)。各细胞系中空质粒组与 SOST siRNA 组各蛋白相对表达量比较, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )(表 4)。

## 2.3 各转染组细胞周期分布比较

与各自空白对照组和空质粒组相比, 3 种细胞系 SOST siRNA 组 G1 期细胞比例和 G1 期/S 期的比值均明显减小, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )(图 3, 表 5)。

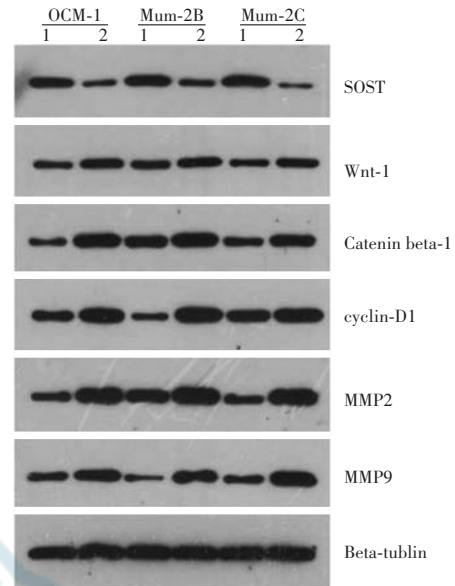


图 2 各细胞系不同组 SOST、Wnt-1、Catenin beta-1、cyclin-D1、MMP2 和 MMP9 蛋白表达电泳图 3 种细胞系 SOST siRNA 组 SOST 蛋白表达条带灰度较相应空质粒组弱, Wnt-1、Catenin beta-1、cyclin-D1、MMP2 和 MMP9 蛋白表达条带灰度均强于空质粒组 SOST: 骨硬化蛋白; Wnt-1: WNT 蛋白家族 1; MMP: 基质金属蛋白酶 1; 空质粒组; 2: SOST siRNA 组

Figure 2 Electrophoretogram of SOST, Wnt-1, Catenin beta-1, cyclin-D1, MMP2 and MMP9 proteins expressions in different groups of three cell lines In three cell lines, the grayscale values of SOST protein bands were weaker and the grayscale values of Wnt-1, Catenin beta-1, cyclin-D1, MMP2 and MMP9 proteins bands were stronger in SOST siRNA groups than in respective empty vector groups SOST: sclerostin; Wnt-1: WNT protein family 1; MMP: matrix metalloproteinase 1; empty vector group; 2: SOST siRNA group

表 3 各细胞系不同组间 SOST、CTNNB1、WNT1、CCND1、MMP2 和 MMP9 mRNA 相对表达量比较( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 3 Comparison of relative expression levels of SOST, CTNNB1, WNT1, CCND1, MMP2 and MMP9 mRNA in three UM cell lines between two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	OCM-1 细胞系各基因相对表达量					
		SOST	CTNNB1	WNT1	CCND1	MMP2	MMP9
空质粒组	3	1.01±0.13	1.00±0.10	1.00±0.06	1.00±0.05	1.01±0.19	1.01±0.22
SOST siRNA 组	3	0.39±0.02 <sup>a</sup>	1.46±0.02	1.34±0.09	1.48±0.08	1.26±0.20	1.64±0.16
t 值		68.006	65.737	30.932	79.621	2.391	16.532
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05	<0.05
组别	样本量	Mum-2B 细胞系各基因相对表达量					
		SOST	CTNNB1	WNT1	CCND1	MMP2	MMP9
空质粒组	3	1.00±0.07	1.00±0.05	1.00±0.06	1.00±0.06	1.00±0.11	1.00±0.08
SOST siRNA 组	3	0.36±0.08	1.09±0.06	1.31±0.13	1.54±0.04	1.18±0.24	1.88±0.15
t 值		104.873	4.194	14.914	173.389	1.360	82.911
P 值		<0.01	>0.05	<0.05	<0.01	>0.05	<0.01
组别	样本量	Mum-2C 细胞系各基因相对表达量					
		SOST	CTNNB1	WNT1	CCND1	MMP2	MMP9
空质粒组	3	1.00±0.04	1.00±0.01	1.00±0.07	1.00±0.05	1.01±0.13	1.00±0.12
SOST siRNA 组	3	0.36±0.04	1.38±0.10	1.44±0.17	1.38±0.06	1.48±0.14	1.31±0.07
t 值		353.893	46.472	16.467	69.923	18.368	13.859
P 值		<0.01	<0.01	<0.05	<0.01	<0.05	<0.05

注: (独立样本 t 检验) SOST: 骨硬化蛋白; WNT1: WNT 蛋白家族 1; MMP: 基质金属蛋白酶; siRNA: 小干扰 RNA

Note: (Independent samples t-test) SOST: sclerostin; WNT1: WNT protein family 1; MMP: matrix metalloproteinase; siRNA: small interfering RNA

**表 4 各细胞系不同组间 SOST、Wnt-1、Catenin beta-1、cyclin-D1、MMP2 和 MMP9 蛋白相对表达量比较( $\bar{x}\pm s$ )**  
**Table 4 Comparison of relative expression levels of SOST, Wnt-1, Catenin beta-1, cyclin-D1, MMP2 and MMP9 proteins in three UM cell lines between two groups ( $\bar{x}\pm s$ )**

组别	样本量	OCM-1 细胞系各蛋白相对表达量					
		SOST	Wnt-1	Catenin beta-1	cyclin-D1	MMP2	MMP9
空质粒组	3	0.54±0.03	0.40±0.02	0.27±0.02	0.68±0.03	0.41±0.03	0.35±0.03
SOST siRNA 组	3	0.12±0.01	0.69±0.04	0.93±0.01	1.04±0.05	1.05±0.04	0.59±0.02
<i>t</i> 值		549.490	104.677	1 695.613	95.452	471.018	127.693
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

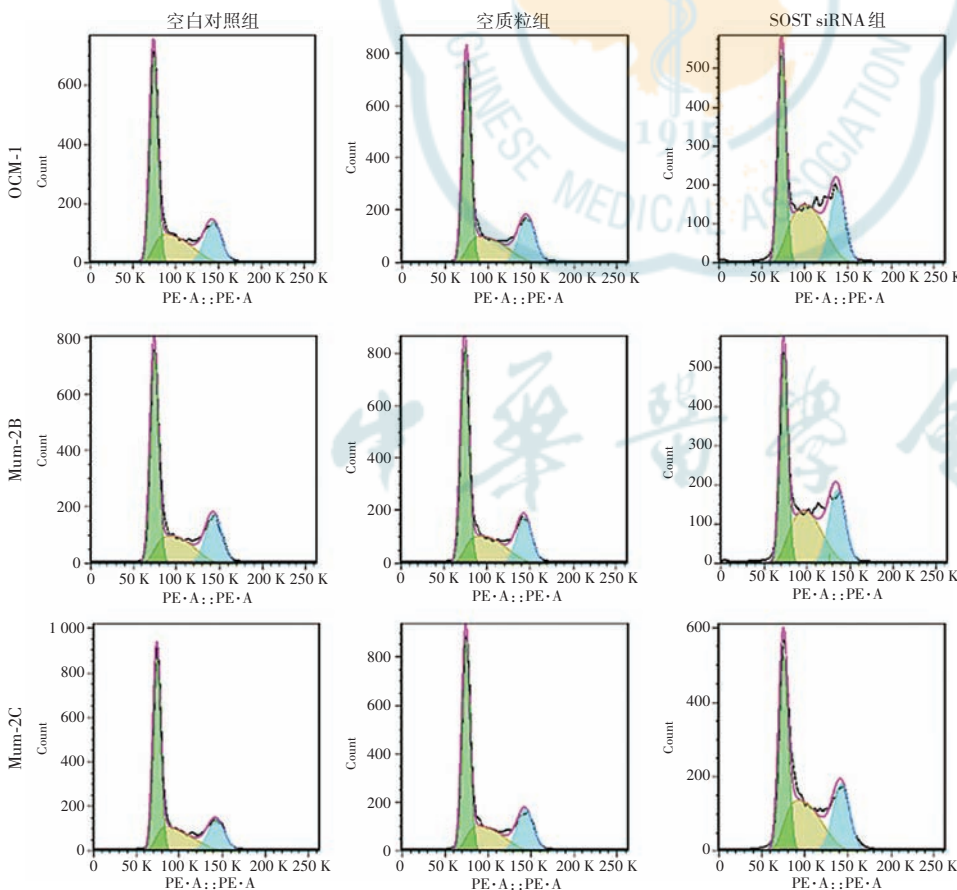
  

组别	样本量	Mum-2B 细胞系各蛋白相对表达量					
		SOST	Wnt-1	Catenin beta-1	cyclin-D1	MMP2	MMP9
空质粒组	3	0.58±0.03	0.18±0.01	0.55±0.02	0.36±0.01	0.74±0.05	0.44±0.02
SOST siRNA 组	3	0.20±0.01	0.67±0.02	0.94±0.02	1.14±0.02	1.14±0.03	0.61±0.02
<i>t</i> 值		466.994	1 127.656	482.650	2 573.084	140.224	83.386
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

组别	样本量	Mum-2C 细胞系各蛋白相对表达量					
		SOST	Wnt-1	Catenin beta-1	cyclin-D1	MMP2	MMP9
空质粒组	3	0.61±0.02	0.37±0.02	0.39±0.01	0.68±0.01	0.42±0.01	0.37±0.03
SOST siRNA 组	3	0.06±0.01	0.99±0.05	0.77±0.03	0.93±0.04	1.12±0.03	0.54±0.04
<i>t</i> 值		2 382.750	475.583	348.369	107.287	1 136.051	30.378
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: (独立样本 *t* 检验) SOST: 骨硬化蛋白; Wnt-1: WNT 蛋白家族 1; MMP: 基质金属蛋白酶; siRNA: 小干扰 RNA  
 Note: (Independent samples *t*-test) SOST: sclerostin; Wnt-1: WNT protein family 1; MMP: matrix metalloproteinase; siRNA: small interfering RNA



**图 3 流式细胞术检测各细胞系不同转染组细胞周期分布** 各细胞系 SOST siRNA 组的 G1 期细胞比例均较空白对照组和空质粒组明显减少 SOST: 骨硬化蛋白; siRNA: 小干扰 RNA

**Figure 3 Cell cycle distribution in different transfection groups of three cell lines by flow cytometry**

In three cell lines, the proportions of G1-phase cells in SOST siRNA groups were reduced in comparison with blank control groups and empty vector groups SOST: sclerostin; siRNA: small interfering RNA

#### 2.4 各细胞系不同转染组细胞迁移及侵袭能力比较

OCM-1、Mum-2B 和 Mum-2C 细胞系中, 以 SOST siRNA 组移行细胞数目最多; 各细胞系不同转染组间迁移细胞数总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 27.336、370.802、25.784$ , 均  $P < 0.01$ ); 与空白对照组和空质粒组相比, SOST siRNA 组迁移细胞数明显增多, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ) (图 4A, 表 5)。OCM-1、Mum-2B 和 Mum-2C 细胞系中, 以 SOST siRNA 组侵袭细胞数目最多; 各细胞系不同转染组间侵袭细胞数总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 24.000、52.705、108.525$ , 均  $P < 0.01$ ); 与空白对照组和空质粒组相比, SOST siRNA 组侵袭细胞数明显增多, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ) (图 4B, 表 5)。

2.5 各组模型鼠原位瘤生长情况比较

各组模型鼠瘤体均随着时间逐渐增大, OCM-1组、OCM-1空载体组和 SOST shRNA 组的眼球体积分别为(42.7±4.6)、(49.0±22.9)和(135.2±32.7)mm<sup>3</sup>, 总体比较差异有统计学意义(F=19.963, P<0.01)。SOST shRNA 组小鼠眼球体积较 OCM-1 组和 OCM-1空载体组大, 差异均有统计学意义(均 P<0.05); OCM-1

组与 OCM-1 空载体组眼球体积比较差异无统计学意义(P>0.05)(图5)。

2.6 各组细胞中 SOST 和 LRP-5/6 蛋白互作比较

单纯裂解样品、抗 LRP-5 和抗 LRP-6 蛋白抗体免疫共沉淀结果显示, SOST siRNA 组 SOST 蛋白表达条带均弱于空白对照组和空质粒组(图6)。各组免疫共沉淀 SOST 条带灰度值总体比较差异均有统计学意义

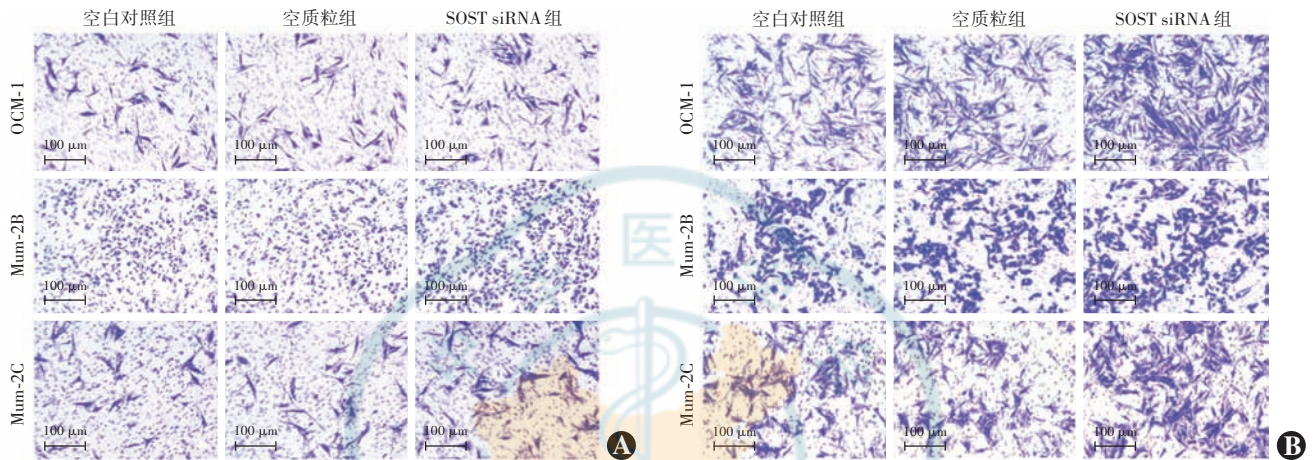


图4 Transwell 法测定各细胞系不同转染组间细胞迁移及侵袭能力(结晶紫染色×40, 标尺=100 μm) A:各细胞系不同组迁移细胞数 各细胞系中,以 SOST siRNA 组移行细胞数目最多 B:各细胞系不同组侵袭细胞数 各细胞系中,以 SOST siRNA 组侵袭细胞数目最多 SOST:骨硬化蛋白;siRNA:小干扰 RNA

Figure 4 Cell migration and invasion ability in different transfection groups of three UM cell lines by Transwell method (Crystal violet ×40, bar = 100 μm) A: Number of migrating cells In three cell lines, SOST siRNA groups had the most migrating cells B: Number of invading cells In three cell lines, SOST siRNA groups had the most invading cells SOST: sclerostin; siRNA: small interfering RNA

表5 各细胞系不同组间生物学行为相关指标比较(̄x±s)

Table 5 Comparison of biological behavior related indicators in three UM cell lines among different groups (̄x±s)

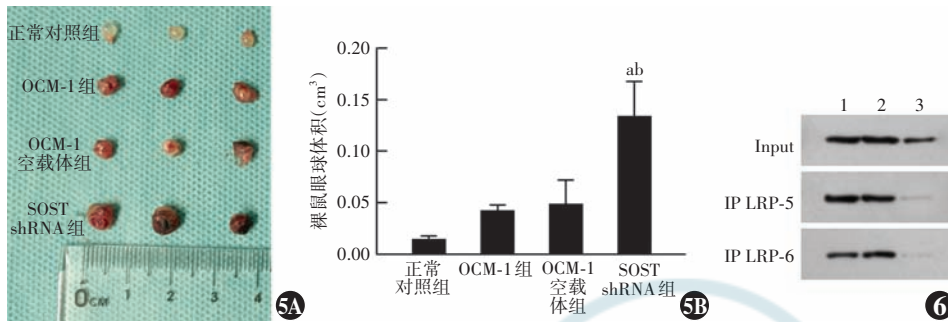
组别	样本量	OCM-1 细胞周期分布		OCM-1 迁移细胞数(个)	OCM-1 侵袭细胞数(个)
		G1 期比例(%)	G1/S 期比值		
空白对照组	3	48.93±0.44	1.63±0.04	48.67±4.16	136.67±6.81
空质粒组	3	48.65±0.33	1.72±0.03	51.67±3.06	148.67±5.51
SOST siRNA 组	3	34.33±0.45 <sup>ab</sup>	0.85±0.02 <sup>ab</sup>	69.00±3.61 <sup>ab</sup>	220.67±26.41 <sup>ab</sup>
F 值		1 226.084	726.837	27.336	24.000
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
组别	样本量	Mum-2B 细胞周期分布		Mum-2B 迁移细胞数(个)	Mum-2B 侵袭细胞数(个)
		G1 期比例(%)	G1/S 期比值		
空白对照组	3	49.17±0.38	1.80±0.04	194.00±8.19	175.33±12.06
空质粒组	3	50.19±0.30	1.80±0.02	214.67±9.61	198.00±12.12
SOST siRNA 组	3	35.05±0.47 <sup>ab</sup>	0.98±0.03 <sup>ab</sup>	373.33±8.62 <sup>ab</sup>	268.67±10.60 <sup>ab</sup>
F 值		1 403.065	709.407	370.802	52.705
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
组别	样本量	Mum-2C 细胞周期分布		Mum-2C 迁移细胞数(个)	Mum-2C 侵袭细胞数(个)
		G1 期比例(%)	G1/S 期比值		
空白对照组	3	51.14±0.28	1.80±0.04	37.00±2.65	148.33±5.03
空质粒组	3	51.20±0.29	1.97±0.02	40.33±4.73	144.33±7.37
SOST siRNA 组	3	37.52±0.44 <sup>ab</sup>	1.04±0.02 <sup>ab</sup>	56.67±3.06 <sup>ab</sup>	222.33±8.96 <sup>ab</sup>
F 值		1 559.207	1 080.066	25.784	108.525
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与各自空白对照组比较,<sup>a</sup>P<0.01;与各自空质粒组比较,<sup>b</sup>P<0.01(单因素方差分析,LSD-t 检验) SOST:骨硬化蛋白;siRNA:小干扰 RNA  
 Note:Compared with respective blank control group,<sup>a</sup>P<0.01;compared with respective empty vector group,<sup>b</sup>P<0.01 (One-way ANOVA, LSD-t test)  
 SOST: sclerostin; siRNA: small interfering RNA



( $F = 167.151, 6017.630, 3138.005$ , 均  $P < 0.01$ ), 其中 SOST siRNA 组 SOST 蛋白灰度值均明显低于空白对照组和空质粒组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ) (表 6)。

较低, 一旦发生转移治愈率较低, 1 年内总存活率为 50%<sup>[21]</sup>。目前治疗 UM 的手段包括手术治疗、放射治疗、化学疗法及肿瘤靶向治疗, 经过积极治疗后, UM 的局部控制率可高达 96.4%<sup>[22]</sup>。但近 50% 的 UM 患者会在最初诊断后 5 年内发展为转移性疾病, 且目前仍缺少有效控制转移的方法<sup>[23-24]</sup>。



**图 5 各组裸鼠眼部原位 UM 模型眼球比较** A: 各组模型鼠 6 周后眼球外观照 B: 各组眼球体积比较  $F = 19.963, P < 0.01$ 。与 OCM-1 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 OCM-1 空载体组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n = 3$ ) SOST: 骨硬化蛋白; siRNA: 小干扰 RNA **图 6 共免疫沉淀法蛋白相互作用电泳图** 蛋白表达条带显示的是各组 SOST 蛋白含量, SOST siRNA 组均弱于空白对照组和空质粒组 1: 空白对照组; 2: 空质粒组; 3: SOST siRNA 组 Input: 单纯裂解样品; IP: 免疫沉淀; LRP: 低密度脂蛋白受体相关蛋白

**Figure 5 Comparison of eyeballs of in situ UM model nude mice in different groups** A: Photographs of eyeball appearance of rats in different groups 6 weeks after modeling B: Comparison of eyeball volume  $F = 19.963, P < 0.01$ . Compared with OCM-1 group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; compared with OCM-1 empty vector group, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test,  $n = 3$ ) SOST: sclerostin; siRNA: small interfering RNA **Figure 6 Electrophoretogram of protein-protein interactions by co-immunoprecipitation method** The protein expression bands showed the content of SOST protein in various groups. The SOST protein band was weaker in SOST siRNA group than in blank control group and empty vector group 1: blank control group; 2: empty vector group; 3: SOST siRNA group Input: simple lysed samples; IP: immunoprecipitation; LRP: low density lipoprotein receptor related protein

本研究对 3 种 UM 细胞系进行细胞行为及周期等方面的验证, 通过瞬转质粒对 3 种细胞系的 SOST 进行沉默表达, 发现细胞中 WNT 与 CTNNB1 的 mRNA 和相应蛋白表达水平升高, 同时与肿瘤进展密切相关的 CCND1、MMP2 和 MMP9 表达水平均有不同程度的升高。目前, 多项研究已证实 CCND1、MMP2 和 MMP9 的表达上调与 UM 的生长和侵袭有密切关联。Zhou 等<sup>[25]</sup> 研究发现细胞周期蛋白 cyclin-D1 的表达与 UM 的病程相关。Hou 等<sup>[26]</sup> 证明 MMP2 是影响 UM 细胞转移的下游效应物。Chang 等<sup>[27]</sup> 在 UM 细胞系 M17 中验证表没食子儿茶素没食子酸酯可通过抑制 ERK1/2 磷酸化下调 MMP2 的活性, 从而抑制黑素瘤细胞的迁移。Cheng 等<sup>[28]</sup> 通过构建异种移植小鼠模型证明了 HMGA1 可以通过正调控 PI3K/Akt/MMP9 轴的活性来加速 UM 的进展。本研究中通过对细胞周期的检测发现, 沉默 SOST 减少了 G1 期的细胞比例, 同时降低了 G1/S 期的比值, 提高了处于细胞分裂间期的细胞比例, 促进了细胞增生; 细胞迁移和侵袭结果表明沉默 SOST 后 3 种细胞系的迁移和侵袭能力均有增强。以上研究结果表明, 沉默 SOST 在细胞水平能够通过激活 WNT 与 CTNNB1 信号通路来发挥促进 UM 细胞增生、迁移和侵袭的作用。

**表 6 各组免疫共沉淀 SOST 条带灰度值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**  
**Table 6 Comparison of grayscale values of immunoprecipitated SOST bands among different groups ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	样本量	SOST 蛋白条带灰度值		
		Input	IP LRP-5	IP LRP-6
空白对照组	3	41 556.08 ± 1 309.71	39 984.04 ± 569.96	34 139.91 ± 769.01
空质粒组	3	41 967.30 ± 1 030.64	37 664.67 ± 549.28	42 035.18 ± 823.40
SOST siRNA 组	3	28 120.01 ± 751.48 <sup>ab</sup>	3 327.37 ± 60.18 <sup>ab</sup>	2 029.64 ± 135.39 <sup>ab</sup>
<i>F</i> 值		167.151	6 017.630	3 138.005
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01

注: (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) 与空白对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与空质粒组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$  Input: 单纯裂解样品; IP: 免疫沉淀; SOST: 骨硬化蛋白; siRNA: 小干扰 RNA

Note: (One-way ANOVA, LSD-*t* test) Compared with blank control group, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; compared with empty vector group, <sup>b</sup> $P < 0.01$  Input: simple lysed sample; IP: immunoprecipitation; SOST: sclerostin; siRNA: small interfering RNA

### 3 讨论

UM 主要见于白种人, 发病率在欧洲为 4 例/百万人~7 例/百万人, 在美国为 5.1 例/百万人<sup>[18-19]</sup>。UM 在国内的发病率也较高, 仅次于视网膜母细胞瘤, 其主要起源于葡萄膜, 其次为睫状体和虹膜<sup>[20]</sup>。尽管同样起源于黑色素细胞, 相比于皮肤黑色素瘤, UM 突变负荷

为了进一步阐明 SOST 调控 WNT 信号通路的具

体机制,本研究对 SOST 与 LRP-5/6 进行免疫共沉淀分析,结果表明 SOST 能够直接与 LRP-5 和 LRP-6 结合发挥抑制 WNT/CTNNB1 信号通路的作用。Clevers 等<sup>[29]</sup>研究发现,Wnt 配体在卷曲蛋白的辅助下与 LRP-5(或 LRP-6)结合,稳定胞质中的 Catenin beta-1 蛋白并进入细胞核中,最终 Catenin beta-1 与核内转录辅助因子 TCF/LEF 结合激活靶基因的转录,因此 LRP-5 或 LRP-6 与卷曲蛋白形成复合物被认为是 Wnt 信号激活的第一步<sup>[30]</sup>。本研究结果显示,随着 SOST 蛋白表达水平降低,与 LRP-5 抗体和 LRP-6 抗体结合而被分离出的 SOST 蛋白含量也随之下调,表明 SOST 蛋白在细胞内自然条件下能够与 LRP-5/6 结合,因此推测 SOST 通过直接结合到膜上的 LRP-5/LRP-6 胞外段,使得 Wnt 不能与其结合,进而干扰信号向胞内段传导;相反,在 SOST 不存在时,Wnt 蛋白在卷曲蛋白的辅助下与 LRP-5/LRP-6 相结合,将信号传导至胞内,激活 WNT/CTNNB1 下游信号通路。

本研究中将 SOST 稳定敲低表达的人源 UM 细胞系 OCM-1 注射到 BALB/c nude 小鼠脉络膜下进行 UM 的原位造模,较好地模拟了 UM 体内生长环境,结果表明 SOST shRNA 组裸鼠眼部肿瘤生长更快,眼球体积更大,证明了沉默 SOST 能够促进动物体内 UM 的进展。

综上所述,沉默 SOST 在体内和体外均能够促进 UM 的增生、迁移和侵袭,其作用机制可能是通过抑制与 LRP-5/6 直接结合进而激活 WNT/CTNNB1 信号传导途径实现的。本研究的局限性在于,进行体外实验选用的人源 UM 细胞系 OCM-1 在离开体内环境进行传代培养的过程中生物学特性可能会发生改变。因此,为了更好地构建 UM 动物模型,本研究团队下一步计划构建多轮肿瘤细胞筛选模型,将裸鼠肿瘤取出进行原代培养后,再利用此细胞构建下一轮 UM 动物模型。为了进一步探索 UM 的发生、发展和转移的分子机制,未来将利用 CRISPR/Cas9 技术构建 UM 转移模型,以期抑制 UM 发生早期转移找到作用位点。本研究将 SOST 引入脉络膜黑色素瘤的研究领域,不仅可以进一步明确 UM 细胞的增生和侵袭机制,而且为抑制该肿瘤的进展找到可能的治疗靶点,提高 SOST 在 UM 患者中的表达量有望抑制 UM 细胞的增生和侵袭,为未来 UM 患者的病情控制和治疗提供了新的思路。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 王瀚庆:实验设计、实施研究、采集数据、分析/解释数据、文章撰写;黄晓明、吴桐:分析/解释数据、文章修改;史双双、万剑

锋、赵思迪:采集数据、分析/解释数据;唐东润、孙丰源:对文章的知识性内容作批评性审阅与指导

## 参考文献

- [1] Gru AA, Becker N, Dehner LP, et al. Mucosal melanoma: correlation of clinicopathologic, prognostic, and molecular features [J]. *Melanoma Res*, 2014, 24(4): 360-370. DOI:10.1097/CMR.000000000000082.
- [2] 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.
- [3] 张珂, 朱豫, 王丽丽, 等. 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 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2019, 37(5): 326-331. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.05.002. Zhang K, Zhu Y, Wang LL, et al. Inhibitory effect of miR-34a on biological behavior of uveal melanoma cells and its mechanism [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2019, 37(5): 326-331. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.05.002.
- [4] Diener-West M, Reynolds SM, Agugliaro DJ, et al. Screening for metastasis from choroidal melanoma: the Collaborative Ocular Melanoma Study Group Report 23 [J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(12): 2438-2444. DOI:10.1200/JCO.2004.08.194.
- [5] Kaliki S, Shields CL. Uveal melanoma: relatively rare but deadly cancer [J]. *Eye (Lond)*, 2017, 31(2): 241-257. DOI:10.1038/eye.2016.275.
- [6] 游志鹏, 姜德咏. E26 转录因子-1 在不同类型葡萄膜黑色素瘤中的表达及意义 [J]. *眼科新进展*, 2005, 25(1): 30-32. DOI:10.3969/j.issn.1003-5141.2005.01.010. You ZP, Jiang DY. Study on the expression of Ets-1 and its meaning in different types of uveal melanoma [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2005, 25(1): 30-32. DOI:10.3969/j.issn.1003-5141.2005.01.010.
- [7] 吕红彬, 罗清礼, 唐健, 等. 脉络膜黑色素瘤组织病理学分析 [J]. *中华眼底病杂志*, 2006, 22(3): 161-165. DOI:10.3760/j.issn.1005-1015.2006.03.005. Lyu HB, Luo QL, Tang J, et al. Histopathological analysis of choroidal melanoma [J]. *Chin J Ocul Fundus Dis*, 2006, 22(3): 161-165. DOI:10.3760/j.issn.1005-1015.2006.03.005.
- [8] Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer [J]. *Nature*, 2001, 411(6835): 342-348. DOI:10.1038/35077213.
- [9] Wu T, Wang LN, Tang DR, et al. SOST silencing promotes proliferation and invasion and reduces apoptosis of retinoblastoma cells by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. *Gene Ther*, 2017, 24(7): 399-407. DOI:10.1038/gt.2017.31.
- [10] Katoh M, Katoh M. Molecular genetics and targeted therapy of WNT-related human diseases (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(3): 587-606. DOI:10.3892/ijmm.2017.3071.
- [11] Shi Y, Shu B, Yang R, et al. Wnt and Notch signaling pathway involved in wound healing by targeting c-Myc and Hes1 separately [J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6(1): 120 [2022-05-22]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26076648>. DOI:10.1186/s13287-015-0103-4.
- [12] Korinek V, Barker N, Morin PJ, et al. Constitutive transcriptional activation by a  $\beta$ -catenin-Tcf complex in APC<sup>-/-</sup> colon carcinoma [J]. *Science*, 1997, 275(5307): 1784-1787. DOI:10.1126/science.275.5307.1784.
- [13] Kretzschmar K, Clevers H. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in adult mammalian epithelial stem cells [J]. *Dev Biol*, 2017, 428(2): 273-282. DOI:10.1016/j.ydbio.2017.05.015.
- [14] Vaid M, Singh T, Prasad R, et al. Therapeutic intervention of proanthocyanidins on the migration capacity of melanoma cells is mediated through PGE2 receptors and  $\beta$ -catenin signaling molecules [J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(11): 3325-3338.
- [15] Sinnberg T, Menzel M, Ewerth D, et al.  $\beta$ -Catenin signaling increases during melanoma progression and promotes tumor cell survival and chemoresistance [J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23429 [2022-05-26]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21858114>. DOI:10.1371/journal.pone.0023429.
- [16] Widlund HR, Horstmann MA, Price ER, et al. Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target microphthalmia-associated transcription factor [J]. *J Cell Biol*, 2002, 158(6): 1079-1087. DOI:10.1083/jcb.200202049.
- [17] Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of  $\beta$ -

catenin[J]. EMBO J, 2012, 31(12): 2714-2736. DOI: 10.1038/emboj.2012.150.

[18] Mallone S, De Vries E, Guzzo M, et al. Descriptive epidemiology of malignant mucosal and uveal melanomas and adnexal skin carcinomas in Europe[J]. Eur J Cancer, 2012, 48(8): 1167-1175. DOI: 10.1016/j.ejca.2011.10.004.

[19] 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.

[20] 明媚, 张劲, 罗钢, 等. HMGA1 在葡萄膜黑色素瘤中的表达及对细胞增殖和侵袭的影响[J]. 国际眼科杂志, 2021, 21(8): 1351-1355. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.8.08.

Ming M, Zhang J, Luo G, et al. Expression of HMGA1 in uveal melanoma and its effect on cell proliferation and invasion[J]. Int Eye Sci, 2021, 21(8): 1351-1355. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.8.08.

[21] Nathan P, Hassel JC, Rutkowski P, et al. Overall survival benefit with Tebentafusp in metastatic uveal melanoma[J]. N Engl J Med, 2021, 385(13): 1196-1206. DOI: 10.1056/NEJMoa2103485.

[22] Seibel I, Cordini D, Rehak M, et al. Local recurrence after primary proton beam therapy in uveal melanoma: risk factors, retreatment approaches, and outcome[J]. Am J Ophthalmol, 2015, 160(4): 628-636. DOI: 10.1016/j.ajo.2015.06.017.

[23] Kujala E, Mäkitie T, Kivelä T. Very long-term prognosis of patients with malignant uveal melanoma[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(11): 4651-4659. DOI: 10.1167/iovs.03-0538.

[24] Rietschel P, Panageas KS, Hanlon C, et al. Variates of survival in metastatic uveal melanoma[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(31): 8076-8080. DOI: 10.1200/JCO.2005.02.6534.

[25] Zhou Y, Zhang L, Fan J, et al. Let-7b overexpression leads to increased radiosensitivity of uveal melanoma cells[J]. Melanoma Res, 2015, 25(2): 119-126. DOI: 10.1097/CMR.000000000000140.

[26] Hou Q, Han S, Yang L, et al. The interplay of microRNA-34a, LGR4, EMT-associated factors, and MMP2 in regulating uveal melanoma cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2019, 60(13): 4503-4510. DOI: 10.1167/iovs.18-26477.

[27] Chang CW, Hsieh YH, Yang WE, et al. Epigallocatechingallate inhibits migration of human uveal melanoma cells via downregulation of matrix metalloproteinase-2 activity and ERK1/2 pathway[J/OL]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 141582[2022-06-12]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25184134. DOI: 10.1155/2014/141582.

[28] Cheng Y, Cheng T, Zhao Y, et al. HMGA1 exacerbates tumor progression by activating miR-222 through PI3K/Akt/MMP-9 signaling pathway in uveal melanoma[J]. Cell Signal, 2019, 63: 109386. DOI: 10.1016/j.cellsig.2019.109386.

[29] Clevers H, van de Wetering M. TCF/LEF factor earn their wings[J]. Trends Genet, 1997, 13(12): 485-489. DOI: 10.1016/s0168-9525(97)01305-x.

[30] Tamai K, Semenov M, Kato Y, et al. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction[J]. Nature, 2000, 407(6803): 530-535. DOI: 10.1038/35035117.

(收稿日期:2022-11-28 修回日期:2023-05-28)

(本文编辑:张宇 骆世平)

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:方差分析(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(fluorescein fundus 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- $\gamma$ : $\gamma$ 干扰素(interferon- $\gamma$ )
- 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:核转录因子(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:基础泪液分泌试验(Schirmer I test)
- shRNA:短发夹RNA(short hairpin RNA)
- siRNA:小干扰RNA(small interfering RNA)
- $\alpha$ -SMA: $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -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)