

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002557

miR-503 靶向调控 CXCL9 抑制黑色素瘤细胞的迁移及侵袭

王一丞, 白利容

(武警重庆总队医院皮肤科, 重庆 400061)

【摘要】目的:研究 miR-503 对人皮肤黑色素瘤细胞 A375 迁移、侵袭能力的影响及相关机制。**方法:**实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)检测黑色素瘤组织及细胞系中 miR-503 的表达水平;将 miR-503 模拟物(miR-503 mimics)或 miR-503 抑制物(miR-503 inhibitors)瞬时转染 A375 细胞, Transwell 实验检测转染后细胞迁移及侵袭能力的变化;生物信息学预测 miR-503 与 CXCL9 的结合位点, 双荧光素酶报告基因实验检测其靶向结合关系;将 CXCL9 单独转染或与 miR-503 共转染 A375 细胞后, 检测细胞迁移及侵袭能力的变化。**结果:**黑色素瘤组织中 miR-503 的表达明显低于癌旁组织($t=6.602, P=0.000$), 且黑色素瘤细胞(A375、SK-MEL-1 及 SK-MEL-5)中 miR-503 的表达也均明显低于人表皮黑色素细胞 HEM($F=19.445, P=0.000$);A375 细胞转染 miR-503 mimics 后迁移及侵袭能力明显受到抑制($P=0.017, P=0.049$), 而转染 miR-503 inhibitors 后迁移及侵袭能力明显增强($P=0.004, P=0.000$);CXCL9 是 miR-503 的直接靶基因;CXCL9 能促进 A375 细胞的迁移和侵袭($P=0.000, P=0.009$), 但其作用效果能被 miR-503 逆转。**结论:**miR-503 通过靶向调控 CXCL9 而抑制黑色素瘤细胞的迁移及侵袭。

【关键词】黑色素瘤; miR-503; 迁移; 侵袭; CXCL9**【中图分类号】**R739.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2020-02-28

The miR-503 suppresses migration and invasion of melanoma cells by targeted-regulating CXCL9

Wang Yicheng, Bai Lirong

(Department of Dermatology, Chongqing Municipal Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Force)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of miR-503 on migration and invasion in human melanoma cells A375 and its mechanism. **Methods:** The real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression level of miR-503 in melanoma tissues and cell lines; miR-503 mimics or miR-503 inhibitors were used to perform transient transfection to A375 cells, and Transwell assay was used to test cell migration and invasion abilities. The potential binding site of miR-503 on the CXCL9 was predicted by using on-line bioinformatic databases, and the result was verified by double luciferase assay. The migration and invasive ability of A375 cells were detected after transfected with CXCL9 alone or in combination with miR-503. **Results:** Expression of miR-503 was significantly downregulated in melanoma tissues when compared with adjacent normal tissues ($t=6.602, P=0.000$). In addition, expression of miR-503 in the three melanoma cell lines (A375, SK-MEL-1 and SK-MEL-5) was significantly lower than that in the HEM cells ($F=19.445, P=0.000$). Migration and invasion abilities in A375 cells after transfection of miR-503 mimics were significantly inhibited ($P=0.017, P=0.049$), while in A375 cells after transfection of miR-503 inhibitors were promoted ($P=0.004, P=0.000$). CXCL9 was the direct target gene of miR-503 and promoted the migration and invasion of A375 cells ($P=0.000, P=0.009$), of which effectiveness was able to be reversed by miR-503. **Conclusion:** The miR-503 suppresses migration and invasion of melanoma cells by targeted-regulating CXCL9.

【Key words】melanoma; miR-503; migration; invasion; CXCL9

黑色素瘤是一种好发于皮肤的常见恶性肿瘤, 患者平均生存期仅 2.5 年左右^[1-2]。我国每年新发黑

色素瘤患者约 2 万例, 且以 3%~5% 的速度呈逐年上升趋势^[3]。即使患者积极进行手术、放化疗及生物治疗等措施, 但每年由此死亡的人数也超过 0.4 万例^[4]。黑色素瘤向脑、肺及骨骼的快速侵袭转移是导致患者死亡的最主要原因, 因此探寻黑色素瘤转移机制, 寻找可能干预的靶位点具有重要的临床意

作者介绍: 王一丞, Email: chengcheng18918@163.com,

研究方向: 皮肤癌诊断及治疗。

通信作者: 白利容, Email: 182362329@qq.com。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200618.1550.024.html>

(2020-06-19)

义^[5]。相关研究表明,miR-503 在多种肿瘤的侵袭及转移过程中发挥重要作用,但在黑色素瘤中的功能机制还不清楚^[6]。本研究主要探讨 miR-503 在调控黑色素瘤迁移侵袭中的作用及可能机制,为寻找黑色素瘤的分子治疗靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集 2018 年 5 月至 2019 年 4 月在重庆武警总队医院皮肤科收入治疗的 26 例皮肤黑色素瘤患者,其中男性 13 例、女性 13 例,平均年龄(47.2 ± 8.5)岁,所有患者均由病理确诊,术前未进行放化疗。手术切取瘤体区域及瘤旁组织,并迅速置于液氮罐中临时存储,随后转移至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。本研究符合本单位人体试验伦理委员会所制定的伦理学标准,且所有患者均签署知情同意书。

1.2 细胞及试剂

人皮肤黑色素瘤细胞 A375、SK-MEL-1 及 SK-MEL-5 均购自中国科学院上海细胞库,人表皮黑色素细胞 HEM 购自上海中桥新舟生物科技有限公司。细胞裂解液购自日本 Takara 公司,miRNA 反转录、qRT-PCR 试剂盒购自北京天根生物科技公司,Transwell 小室购自 Corning 公司,Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司,双荧光素报告基因检测试剂盒自美国 Promega 公司,兔抗人 CXCL9 单克隆抗体、兔抗人 GAPDH 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司,miR-503 mimics、miR-503 inhibitors 及 miR-503 对照物(miR-NC)由上海吉玛生物科技公司设计及合成。

1.3 qRT-PCR 实验

Trizol 法提取组织或细胞的总 RNA,按照 miRNA 反转录试剂盒步骤进行反转录反应合成 miRNA cDNA。随后进行 qRT-PCR 分析,PCR 条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 热启动 10 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 35 个循环;至 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 结束。采用 U6 RNA 作为内参,每个检验指标做 3 个复孔,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量分析。miR-503 引物序列为:正向引物 5'-CCTATTTCCCATGATTCCTCATA-3',反向引物 5'-GT-AATACGGTTATCCACGCG-3'。U6 引物序列为:5'-GCTTC-GGCAGCATCATATACTAAA-3',反向引物 5'-CGTTCACG-AATTTGCGTGTGCAT-3'。

1.4 细胞培养及转染

所有细胞均采用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,并在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中进行培养。待 A375 细胞生长融合到 70%时,采用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂分别将 miR-503 mimics、miR-503 inhibitors 及 miR-NC 转染到细胞中,8 h 后更换新鲜培养基,48 h 后收集细胞用于后续实验。

1.5 Transwell 迁移及侵袭实验

分别采用无基质胶 Transwell 小室及预铺基质胶的 Transwell 小室进行细胞迁移及侵袭实验。将细胞用无血清 DMEM 培养基制备细胞悬液(1.0×10^5 个细胞/mL),在上室加入 150 μL 细胞悬液,下室加入 500 μL 含血清的 DMEM 培养基,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h 后,用棉签轻轻擦掉上层细胞并用 PBS 反复清洗,4%多聚甲醛固定 5 min,0.1%结晶紫染色 5 min。将小室放入显微镜下,随机选取 5 个视野计数。

1.6 双荧光素酶报告基因检测

利用生物信息学软件预测 miR-503 与 CXCL9 3' UTR 区的结合位点序列,并将包含野生型(WT)和突变型(Mut)的 CXCL9 3' UTR 区域构建至荧光素酶报告载体中。将野生型或突变型的 CXCL9 3' UTR 荧光素酶报告基因质粒与 miR-503 mimics 共转染至 A375 细胞,并设置共转染 miR-NC 为阴性对照。转染 6 h 后更换完全培养基,48 h 后进行荧光素酶检测实验。

1.7 Western blot 检测

RIPA 裂解液冰上裂解细胞 30 min,离心后取上清并进行蛋白定量测定。取 30 μg 蛋白样品,经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后,常规湿法将蛋白转移至 PVDF 膜。5%的脱脂奶粉室温封闭 2 h 后加入 CXCL9(1:1 000)、GAPDH(1:1 000)一抗, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。TBST 漂洗后加入对应二抗(1:2 000)室温孵育 2 h,随后进行 ECL 化学发光检测成像。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析。计量数据采用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间样本比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 方法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 miR-503 在黑色素瘤组织及细胞中表达降低

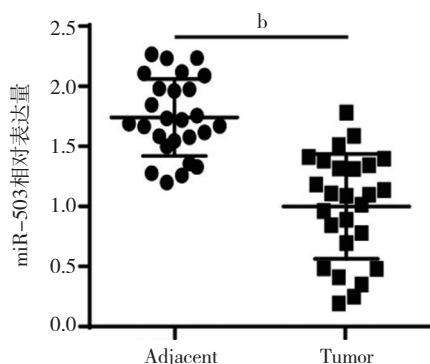
qRT-PCR 结果表明,与瘤旁组织中 miR-503 相对表达量(1.741 ± 0.320)相比,黑色素瘤组织中 miR-503 的表达水平(1.000 ± 0.437)明显降低($t=6.602, P=0.000$)(图 1A)。与人表皮黑色素细胞 HEM 中 miR-503 相对表达量(1.000 ± 0.065)相比,3 种黑色素瘤细胞(A375、SK-MEL-1、SK-MEL-5)中 miR-503 的表达量($0.505 \pm 0.075, 0.669 \pm 0.106, 0.508 \pm 0.111$)均明显降低($F=19.445, P=0.000$)(图 1B)。

2.2 miR-503 抑制 A375 细胞迁移及侵袭

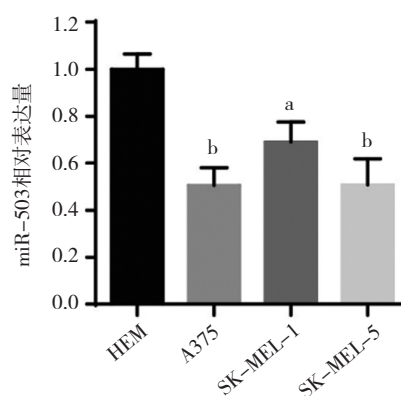
细胞迁移结果表明,miR-NC 转染组、miR-503 mimics 转染组、miR-503 inhibitors 转染组的 A375 细胞迁移数量差异具有统计学意义($F=20.060, P=0.000$);相对于 miR-NC 转染组细胞迁移数量(31.400 ± 6.025),miR-503 mimics 转染组

细胞的迁移数量(18.400 ± 3.578)明显减少($P=0.017$),而miR-503 inhibitors 转染组细胞的迁移数量(48.000 ± 10.747)明显增加($P=0.004$)(图 2A、B)。细胞侵袭结果表明,miR-NC 转染组、miR-503 mimics 转染组、miR-503 inhibitors 转染组的 A375 细胞侵袭数量差异具有统计学意义($F=27.025$, $P=$

0.000);相对于 miR-NC 转染组细胞侵袭数量(26.400 ± 5.319),miR-503 mimics 转染组细胞的侵袭数量(19.200 ± 3.899)明显减少($P=0.049$),而 miR-503 inhibitors 转染组细胞的侵袭数量(42.800 ± 6.140)明显增加($P=0.000$)(图 2A、C)。



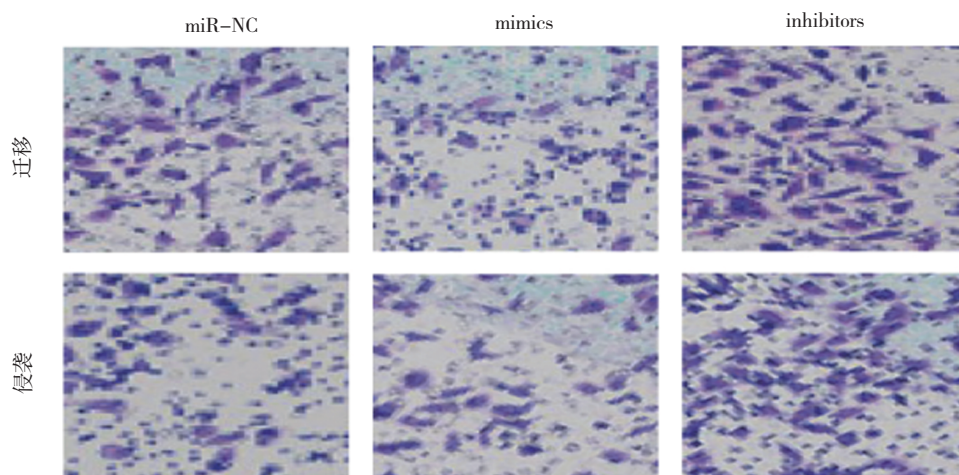
A. 黑色素瘤组织中 miR-503 相对表达水平



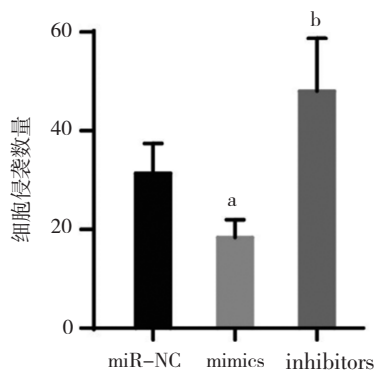
B. 黑色素瘤细胞系中 miR-503 相对表达水平($n=3$)

注:a, $P < 0.01$; b: $P < 0.001$

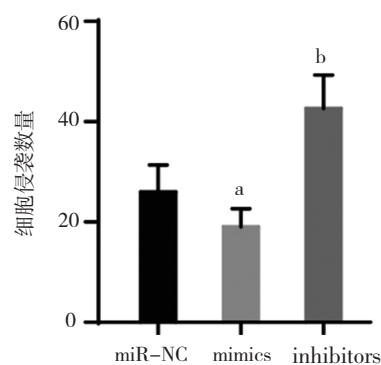
图 1 miR-503 在黑色素瘤组织及细胞系中相对表达水平



A. Transwell 实验检测 A375 细胞迁移及侵袭($200 \times$)



B. A375 细胞迁移数量($n=5$)



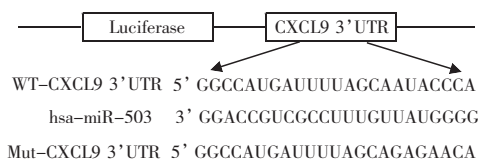
C. A375 细胞侵袭数量($n=5$)

注:a, $P < 0.05$; b: $P < 0.01$

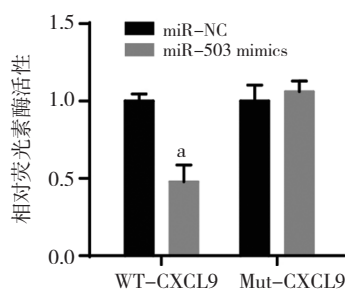
图 2 miR-503 抑制 A375 细胞的迁移和侵袭

2.3 CXCL9 是 miR-503 直接调控的靶基因

miR-503 与 CXCL9 mRNA 的 3'UTR 存在相互结合位点(图 3A)。双荧光素酶报告实验结果表明,在 WT-CXCL9 组中,相对于转染 miR-NC 后相对荧光素酶活性(1.000 ± 0.075),转染 miR-503 mimics 后相对荧光素酶活性(0.479 ± 0.109)明显降低($t=7.645, P=0.002$)。而在 Mut-CXCL9 组中,相对于转染 miR-NC 后相对荧光素酶活性(1.000 ± 0.103),转染 miR-503 mimics 后相对荧光素酶活性(1.060 ± 0.069)没有明显变化($t=0.838, P=0.449$)(图 3B)。此外,转染 miR-503 mimics 后能降低 A375 细胞中 CXCL9 的蛋白表达水平(图 3C)。

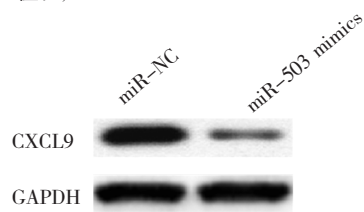


A. miR-503 与 CXCL9 3' UTR 的结合位点



B. 相对荧光素酶活性($n=3$)

注:a, $P < 0.01$



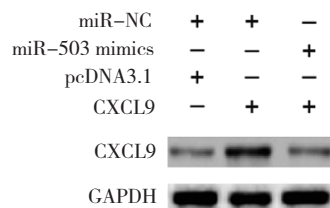
C. A375 细胞中 CXCL9 蛋白表达水平

图 3 CXCL9 是 miR-503 直接调控的靶基因

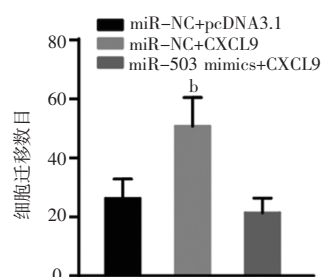
2.4 miR-503 通过调控 CXCL9 而抑制 A375 细胞的迁移及侵袭

研究表明,CXCL9 与黑色素瘤的迁移及侵袭有关,为证明其迁移和侵袭作用受 miR-503 调控,本研究将 miR-503 mimics 和 CXCL9 共转染到 A375 细胞并检测 CXCL9 蛋白表达(图 4A)。细胞迁移结果表明,对照组、CXCL9 转染组、miR-503 mimics 和 CXCL9 联合转染组的 A375 细胞迁移数量差异具有统计学意义($F=22.864, P=0.000$);相对于对照组细胞迁移数量(26.200 ± 6.611),CXCL9 转染组细胞的迁移数量(50.800 ± 9.731)明显增加($P=0.000$),而 miR-503 mimics 和 CXCL9 联合转染组细胞的迁移数量(21.400 ± 4.979)没有明

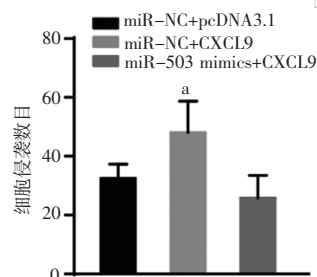
显变化($P=0.324$)(图 4B)。细胞侵袭结果表明,对照组、CXCL9 转染组、miR-503 mimics 和 CXCL9 联合转染组的 A375 细胞侵袭数量差异具有统计学意义($F=9.651, P=0.003$);相对于对照组细胞侵袭数量(31.400 ± 6.025),CXCL9 转染组细胞的侵袭数量(48.000 ± 10.747)明显增加($P=0.009$),而 miR-503 mimics 和 CXCL9 联合转染组细胞的侵袭数量(25.200 ± 8.012)没有明显变化($P=0.270$)(图 4C)。



A. CXCL9 蛋白表达水平



B. A375 细胞迁移数量($n=5$)



C. A375 细胞侵袭数量($n=5$)

注:a, $P < 0.01$; b: $P < 0.001$

图 4 miR-503 通过调控 CXCL9 而抑制 A375 细胞的迁移及侵袭

3 讨论

黑色素瘤发病率在我国逐年攀高,但目前其治疗效果并不理想,其发病隐匿及快速转移是预后不良的重要原因。现在人们普遍认为 miRNA 可以通过调控原癌基因或抑癌基因的表达,从而调节黑色素瘤发育过程中的生物学行为,包括细胞增殖、凋亡、血管生成和转移。因此,研究与黑色素瘤相关的 miRNA 分子对探讨黑色素瘤的发生发展机制及寻

找有效的治疗靶点具有重要意义^[7-8]。

研究表明,miR-503 能够作为一种抑癌基因参与多种肿瘤的发生过程,例如 miR-503 能够抑制非小细胞肺癌上皮间质转化、淋巴管浸润及远处转移,可以作为非小细胞肺癌患者生存期限的独立预后因素^[9]。miR-503 也能够抑制肝癌细胞生长,导致 G₁ 期停滞,并且抑制肝癌细胞的迁移、侵袭及血管生成^[10-11]。此外,miR-503 还能够抑制乳腺癌、结肠癌、前列腺癌及胶质母细胞瘤的转移^[12-15],然而 miR-503 在黑色素瘤中的表达情况及其对肿瘤细胞迁移转移作用尚未见报道。本研究发现,miR-503 在皮肤黑色素瘤组织及细胞中表达降低,且过表达 miR-503 可以明显抑制黑色素瘤细胞 A375 的迁移和侵袭能力,抑制 miR-503 的表达则起到相反的作用,提示 miR-503 在黑色素瘤中发挥抑癌基因的作用。

为了明确 miR-503 在调节黑色素瘤迁移及侵袭的具体分子机制,本研究对 miR-503 的相关靶基因进行了生物信息学预测分析,并从中选取和肿瘤细胞迁移侵袭密切相关的多个靶基因进行实验验证,最终发现 miR-503 能够特异性调控基因 CXCL9。CXCL9 又称 MIG,位于人染色体 4q21 上,属于干扰素 γ 诱导的 CXC 趋化因子家族重要成员。CXCL9 可以趋化 CXCR3⁺ 的单核细胞、T 细胞及 NK 细胞分泌相关细胞因子,从而调节细胞增殖、凋亡、迁移及介导血管稳定性等作用^[16]。研究表明,CXCL9 在肝癌、肺癌、乳腺癌、淋巴瘤及头颈部肿瘤中高表达,并且能促进肿瘤细胞的转移及降低患者预后生存时间^[16-17]。此外,CXCL9 也被证实在黑色素瘤中高表达,从而导致皮肤内皮屏障的破坏,加速黑色素瘤细胞的侵袭转移^[18]。本研究发现,过表达 CXCL9 确实会增强 A375 细胞的迁移及侵袭能力,但当共转染 miR-503 时会明显抑制 CXCL9 增强细胞迁移及侵袭能力。这些结果表明 miR-503 能够通过抑制 CXCL9 的表达从而调控黑色素瘤细胞的迁移及侵袭,所以可将 miR-503/CXCL9 调控轴作为黑色素瘤临床干预的一个重要靶点。

参 考 文 献

[1] Schadendorf D, Van Akkooi ACJ, Berking C, et al. Melanoma[J]. Lancet, 2018, 392(10151): 971-984.
[2] Read J, Wadt KA, Hayward NK. Melanoma genetics[J]. J Med Genet, 2016, 53(1): 1-14.

[3] Guo J, Qin S, Liang J, et al. Chinese guidelines on the diagnosis and treatment of melanoma(2015 edition) [J]. Ann Transl Med, 2015, 3(21): 322-367.
[4] Chen W, Sun K, Zheng R, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2014[J]. Chin J Cancer Res, 2018, 30(1): 1-12.
[5] Maverakis E, Cornelius LA, Bowen GM, et al. Metastatic melanoma—a review of current and future treatment options[J]. Acta Derm Venereol, 2015, 95(5): 516-527.
[6] Fu Y, Meng Y, Gu X, et al. miR-503 expression is downregulated in cervical cancer and suppresses tumor growth by targeting AKT2[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(5): 8177-8184.
[7] Mannavola F, Tucci M, Felici C, et al. miRNAs in melanoma: a defined role in tumor progression and metastasis[J]. Expert Rev Clin Immunol, 2016, 12(1): 79-89.
[8] Mirzaei H, Gholamin S, Shahidsales S, et al. MicroRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma[J]. Eur J Cancer, 2016, 53: 25-32.
[9] Sun Y, Li L, Xing S, et al. miR-503-3p induces apoptosis of lung cancer cells by regulating p21 and CDK4 expression[J]. Cancer Biomark, 2017, 20(4): 597-608.
[10] Yang X, Zang J, Pan X, et al. miR-503 inhibits proliferation making human hepatocellular carcinoma cells susceptible to 5-fluorouracil by targeting EIF4E[J]. Oncol Rep, 2017, 37(1): 563-570.
[11] Li B, Liu L, Li X, et al. miR-503 suppresses metastasis of hepatocellular carcinoma cell by targeting PRMT1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 464(4): 982-987.
[12] Guo J, Liu X, Wang M. miR-503 suppresses tumor cell proliferation and metastasis by directly targeting RNF31 in prostate cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 464(4): 1302-1308.
[13] Chang SW, Yue J, Wang BC, et al. miR-503 inhibits cell proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer cells by targeting E2F3[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(10): 12853-12860.
[14] Guo P, Yu Y, Li H, et al. TGF- α 1-induced miR-503 controls cell growth and apoptosis by targeting PDCD4 in glioblastoma cells[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 11569-11579.
[15] Long J, Ou C, Xia H, et al. miR-503 inhibited cell proliferation of human breast cancer cells by suppressing CCND1 expression[J]. Tumor Biol, 2015, 36(11): 8697-8702.
[16] Ding Q, Lu P, Xia Y, et al. CXCL9: evidence and contradictions for its role in tumor progression[J]. Cancer Med, 2016, 5(11): 3246-3259.
[17] Tokunaga R, Zhang W, Naseem M, et al. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation—a target for novel cancer therapy[J]. Cancer Treat Rev, 2018, 63: 40-47.
[18] Amatschek S, Lucas R, Eger A, et al. CXCL9 induces chemotaxis, chemorepulsion and endothelial barrier disruption through CXCR3-mediated activation of melanoma cells[J]. Br J Cancer, 2011, 104(3): 469-479.

(责任编辑:冉明会)