

miR-15b 在恶性黑色素瘤 A375 细胞中的表达及其对细胞转移和侵袭的影响

金 丹 周 烈 刘启祥 吴明勇 全柳霞 叶夏潮 刘旭阳 肖修兰

摘 要 **目的** 研究微小 RNA-15b(microRNA-15b, miR-15b)在恶性黑色素瘤 A375 细胞中的表达,以及 miR-15b 对恶性黑色素瘤细胞转移和侵袭能力的影响。**方法** 应用荧光实时定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)方法检测恶性黑色素瘤 A375 细胞与正常黑素细胞 HM 中 miR-15b 的表达水平。沉默恶性黑色素瘤 A375 细胞中 miR-15b 的表达后,应用划痕实验检测 miR-15b 对恶性黑色素瘤 A375 细胞迁移距离的影响,应用 Transwell 实验检测 miR-15b 对恶性黑色素瘤 A375 细胞转移和侵袭能力的影响。**结果** miR-15b 恶性黑色素瘤 A375 细胞中的表达水平显著高于正常黑素细胞。沉默恶性黑色素瘤细胞中 miR-15b 的表达后,细胞迁移距离、细胞转移和侵袭能力均受到显著抑制。**结论** miR-15b 在恶性黑色素瘤 A375 细胞中表达显著升高并可促进恶性黑色素瘤 A375 细胞转移和侵袭。

关键词 miR-15b 黑色素瘤 转移 侵袭

中图分类号 R739.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.07.039

Expression of MIR-15B in Malignant Melanoma and Its Effects on Cell Migration and Invasion. Jin Dan, Zhou Lie, Liu Qixiang, et al. Department of Oncology, Chongqing City State District People's Hospital, Chongqing 405400, China

Abstract **Objective** To investigate the expression of miR-15b in malignant melanoma cell line A375, and further investigate the effects of miR-15b on cell migration and invasion of A375 cells. **Methods** The expression of miR-15b in A375 cells and human melanocyte cell lines HM was detected by qRT-PCR. After silencing the expression of miR-15b in A375 cells, we detected the effects of miR-15b on cell migrating distance by wound healing assays, we also detected the effects of miR-15b on cell migration and invasion ability by Transwell assays. **Results** The expression of miR-15b was significantly upregulated in A375 cells than HM cells. After silencing the expression of miR-15b in A375 cells, the cell migrating distance, cell migration and cell invasion was significantly inhibited. **Conclusion** miR-15B was upregulated in malignant melanoma cell line A375, and could promote the migration and invasion of A375 cells.

Key words miR-15b; Melanoma; Migration; Invasion

恶性黑色素瘤是侵袭性非常高的皮肤肿瘤,每年发病的皮肤相关恶性肿瘤中,其发病例数可占 80% 以上^[1,2]。在美国,恶性黑色素瘤发生率以每年 3.1% 的速度增长,其增长速度远远超过其他肿瘤^[3]。2013 年,约有 76790 例新增病例,9480 例新增死亡^[4]。根治性手术可使 92%~99% I A/B 期黑色素瘤患者获得 5 年生存率。然而,对于就诊时或复查时发生转移的患者,其 5 年生存率低于 10%。细胞毒性化学治疗仅在 20% 的恶性黑色素瘤患者中可起效^[5]。靶向治疗是恶性黑色素瘤极具潜能的治疗手

段,但是随着病程进展而出现的药物抵抗也是不可忽视的问题^[6]。深入研究恶性黑色素瘤的分子机制,将有助于发现其诊断和治疗的潜在分子靶点。

microRNA(miRNA)是一类非编码的 RNA,可导致 mRNA 的降解或通过与靶向 mRNA 的 3'-UTR 区结合而抑制蛋白的翻译^[7]。MiRNA 可通过调控其靶基因的表达而参与多种生理过程,如细胞增殖、分化、生存、凋亡、侵袭和转移^[8]。既往研究显示,miR-15b 在多种肿瘤中可发挥促癌基因的作用。在肝细胞癌中,miR-15b 可通过靶向 FUT2 的表达而促进肝细胞癌的增殖^[9]。在恶性黑色素瘤血清和组织中,miR-15b 表达同样异常升高,且可作为判断患者预后及脑转移的重要分子指标^[10,11]。然而,miR-15b 在恶性黑色素瘤细胞侵袭和转移中的作用,鲜有相关研究报道。本研究拟通过 qRT-PCR、细胞划痕

作者单位:405400 重庆市开州区人民医院肿瘤科(金丹、吴明勇、全柳霞、叶夏潮、刘旭阳),设备科(周烈、肖修兰),泌尿外科(刘启祥)

通讯作者:刘启祥,电子邮箱:liuqixiang2005@163.com

及 Transwell 等实验检测 miR-15b 在恶性黑色素瘤 A375 细胞中的表达及其对 A375 细胞侵袭和转移的影响。

材料与方法

1. 材料: RPMI 1640 培养基购自美国 HyClone 公司, 青霉素-链霉素双抗购自美国 HyClone 公司, 胎牛血清购自美国 Gibco 公司。RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、Real Master qRT-PCR 试剂盒均购自天根生化科技有限公司。Transwell 小室购自美国 Millipore 公司, 基质胶购自美国 BD 公司。细胞培养箱购自美国 Thermo 公司, ABI 7900 型 PCR 仪购自美国 ABI 公司。恶性黑色素瘤 A375 细胞和人正常表皮色素细胞 HM 均购自中国科学院上海细胞库。

2. 方法: (1) 细胞培养: 人表皮黑素细胞 HM 细胞与恶性黑色素瘤细胞 A375 细胞用浓度为 10% 胎牛血清及 1% 青霉素-链霉素双抗的 RPMI 1640 培养基培养, 培养箱细胞孵育条件为 37℃ 和 5% CO₂。(2) RNA 提取及 qRT-PCR: TRIzol 裂解恶性黑色素瘤细胞, 离心后, 吸取水相层, 而后加入等体积的异丙醇溶液。离心后, 弃去上清, 所得胶状沉淀即为细胞总 RNA。将所得 RNA 2μl 加入 miR-15b 上下游引物 0.2μl、dNTP0.1μl、去离子水 5μl, 混合液 70℃ 干浴 3min, 加入反转录酶 0.5μl, 37℃ 水浴 60min, 95℃ 干浴 3min, 所得产物即为 miR-15b cDNA。而后加入 125μl 的 20 × SYBR 溶液至 1.0ml 2.5 × Real Master Mix 中, 所得溶液作为混合液。实验采用 20μl 体系, 内含有混合液为 9μl, 20 × ROX Reference Dye 为 1μl, 正向引物及反向引物分别为 1μl, cDNA 模板 2μl, 去离子水 6μl。qRT-PCR 的反应条件为: 95℃ 2min; 95℃ 20s, 60℃ 20s, 72℃ 30s, 第二部分设置 35 个循环。miR-15b 正向引物序列为: 5'-ATGAACCTTCTCTGTCTTGG-3'; 负向引物序列为: 5'-TCACCG CCTCGGCTTGTCACA-3'。(3) 细胞转染: miR-15b inhibitors 与 miR-15b NC 均由吉凯科技有限公司合成。序列为, miR-15b NC, 5'-AUUCAGGUCGGUGCAAUG-3'; miR-15b inhibitor, 5'-ACAGGUUUCGCAAGGUUG-3'。2 × 10⁵ 细胞接种至 6 孔板, 培养 12h。miR-15b NC 与 inhibitors 分别与 Lipofectamine 2000 制备成转染复合物, 而后加入至 A375 细胞中, 无血清培养基培养 8h 后, 更换为正常培养基继续培养 48h。(4) 细胞迁移实验: 在预先接种已转染后 miR-15b NC 及 inhibitors 培养 56h 后 A375 细胞的 6 孔板中, 用枪头均匀

地在培养皿中划痕, PBS 冲洗两次, 更换为无血清培养基培养 0h 及 24h 分别利用显微镜下拍照, 根据 3 次实验迁移距离数据进行统计分析。(5) 侵袭和转移: 细胞转移实验, Transwell 小室内加入密度为 100μl 密度为 10⁵/ml 的转染 miR-15b NC 及 inhibitors 培养 56h 后的无血清的肿瘤细胞悬液。下室加入 500μl 含 10% 浓度胎牛血清的 RPMI 1640 培养基。24h 后, 甲醇固定, 结晶紫染色, 切下 Transwell 膜, 封片。细胞侵袭实验采用预先铺基质胶 Transwell 小室, 余步骤同细胞转移实验。

3. 统计学方法: 所得数据采用 SPSS22.0 软件进行统计分析, 计数资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间的数据差异比较采用 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. miR-15b 在恶性黑色素瘤细胞系 A375 中的表达: miR-15b 在人正常黑素细胞 HM 中的相对表达水平为 1.000 ± 0.059, 在人恶性黑色素瘤细胞系 A375 细胞中的相对表达水平为 3.274 ± 0.117, miR-15b 在两者系中的表达差异具有统计学意义 (*t* = 3.198, *P* = 0.027, 图 1A), miR-15b 在人恶性黑色素瘤细胞系 A375 中的表达水平显著高于人正常黑素细胞 HM。本研究进一步研究了 miR-15b 在恶性黑色素瘤中作为致癌分子的可能性, 以及沉默 miR-15b 的表达对 A375 细胞侵袭和转移能力的影响。结果显示, 转染 miR-15b NC 的 A375 细胞中 miR-15b 的相对表达量为 1.000 ± 0.050, 转染 miR-15b inhibitors 的 A375 细胞中 miR-15b 的相对表达量为 0.247 ± 0.043, 两者表达比较差异有统计学意义 (*t* = 1.894, *P* = 0.033, 图 1B), miR-15b inhibitors 可有效沉默 A375 细胞中 miR-15b 的表达。

2. miR-15b 对恶性黑色素瘤细胞 A375 迁移距离的影响: 转染 24h 后, NC 组细胞迁移距离为 83.413 ± 3.917μm, miR-15b inhibitors 组细胞迁移距离为 42.194 ± 4.185μm, 两组细胞迁移距离比较差异有统计学意义 (*t* = 3.593, *P* = 0.024, 图 2), miR-15b inhibitors 组的细胞迁移距离显著低于 NC 组。

3. miR-15b 对恶性黑色素瘤细胞 A375 转移能力的影响: 转染 miR-15b NC 组的 A375 细胞转移细胞数目为 88.715 ± 8.913, 转染 miR-15b inhibitors 组的 A375 细胞转移细胞数目为 23.518 ± 4.137, 两组间转移细胞数目的差异有统计学意义 (*t* = 3.337,

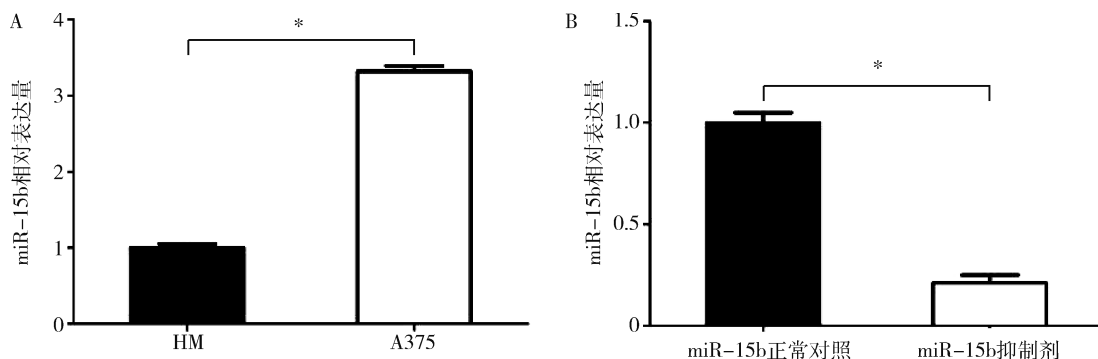


图1 miR-15b在恶性黑色素瘤细胞系A375中的表达

A. miR-15b在人正常黑素细胞及恶性黑色素瘤细胞系A375中的表达;B. miR-15b inhibitors对A375细胞中miR-15b表达的沉默效率;* $P < 0.05$

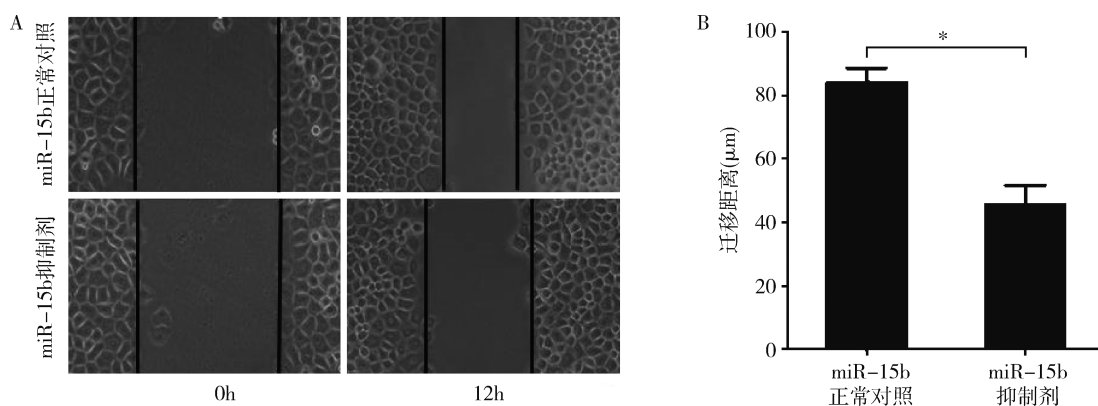


图2 miR-15b对恶性黑色素瘤细胞A375迁移距离的影响

* $P < 0.05$

$P = 0.021$, 图3), miR-15b inhibitors组的转移细胞数目显著低于NC组。

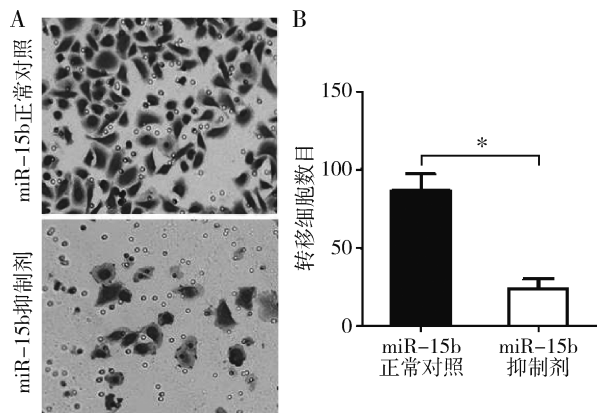


图3 miR-15b对恶性黑色素瘤细胞A375转移能力的影响

* $P < 0.05$

细胞数目为 94.317 ± 8.534 , 转染 miR-15b inhibitors组的A375细胞的侵袭细胞数目为 41.328 ± 3.164 , 两组间侵袭细胞数目的比较差异有统计学意义 ($t = 2.197$, $P = 0.036$, 图4), miR-15b inhibitors组的侵袭细胞数目显著低于NC组。

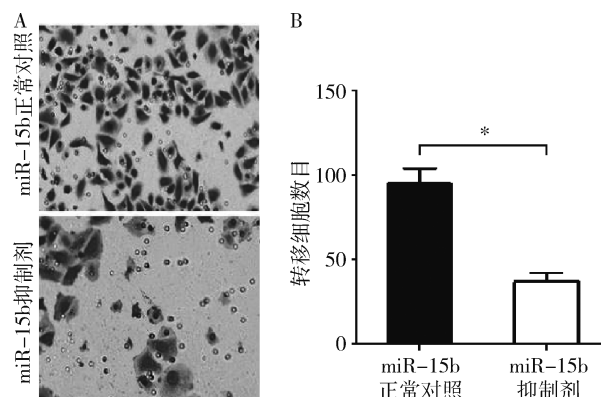


图4 miR-15b对恶性黑色素瘤细胞系A375侵袭能力的影响

* $P < 0.05$

4. miR-15b对恶性黑色素瘤细胞A375侵袭能力的影响:转染 miR-15b NC组的A375细胞的侵袭

讨 论

本研究发现, miR - 15b 恶性黑色素瘤 A375 细胞中的表达水平显著高于正常黑素细胞。沉默恶性黑色素瘤细胞中 miR - 15b 的表达后, 细胞迁移距离、细胞转移和侵袭能力均受到显著抑制。既往研究显示, miR - 15b 在多种恶性黑色素瘤细胞及组织中的表达均显著高于正常黑素细胞及黑素细胞痣^[12]。但该项研究并未检测 miR - 15b 在高度侵袭性的恶性黑色素瘤 A375 细胞及正常黑素细胞间的表达差异。本研究结果与该项研究结果相符, miR - 15b 在 A375 细胞中的表达显著高于正常黑素细胞。MiR - 15b 在全反式维甲酸治疗的急性早幼粒白血病细胞及宫颈癌细胞及中均表达显著上调, 在结肠癌组织及细胞中 miR - 15b 的表达亦显著高于正常结肠组织及细胞系^[13~15]。在恶性黑色素瘤中, 研究显示 miR - 15b 定位的 3q26.1 区域在恶性黑色素瘤细胞系中异常扩增。因此, miR - 15b 在恶性黑色素瘤中的表达显著高于正常黑素细胞。

本研究进一步检测了 miR - 15b 对 A375 细胞侵袭和转移的影响, 研究显示, 转染 miR - 15b inhibitors 的 A375 细胞, 其细胞迁移距离、转移细胞数目和侵袭细胞数目均较转染 miR - 15b NC 的 A375 细胞显著降低。在胃癌细胞中, miR - 15b 可通过靶向抑制 BCL - 2 的表达而调控多重耐药。然而, 另有研究报道, 在脑胶质瘤中, 下调 miR - 15b 的表达水平可促进肿瘤细胞增殖。在恶性黑色素瘤中, 抑制 miR - 15b 的表达可阻滞恶性黑色素瘤 MEWO 及 WM1205 细胞周期于 G₁ 期^[12]。本研究显示, 抑制 miR - 15b 的表达可抑制恶性黑色素瘤 A375 细胞的侵袭和转移。结合本研究结果及既往研究, 本研究认为 miR - 15b 在恶性黑色素瘤中可能发挥着促癌分子的作用, 更为详尽的分子机制需进一步的研究去探索。

综上所述, 本研究检测了 miR - 15b 在恶性黑色素瘤 A375 细胞及正常黑素细胞 HM 细胞中的表达差异, 并检测了 miR - 15b 对 A375 细胞侵袭和转移的影响。结果显示 miR - 15b 在 A375 细胞中表达显著高于 HM 细胞, 并可促进 A375 细胞的转移和侵袭能力。本研究为进一步研究恶性黑色素瘤发生、发展的分子机制奠定了必要的前期基础, 并有助于确定新的诊断和治疗分子靶点。

参考文献

- 1 Trotter SC, Sroa N, Winkelman RR, *et al.* A Global Review of Melanoma Follow - up Guidelines[J]. J Clin Aesthet Dermatol, 2013, 6 (9): 18 - 26
- 2 Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, *et al.* Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification[J]. In Vivo, 2014, 28 (6): 1005 - 1011
- 3 Linos E, Swetter SM, Cockburn MG, *et al.* Increasing burden of melanoma in the United States[J]. J Invest Dermatol, 2009, 129 (7): 1666 - 1674
- 4 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63 (1): 11 - 30
- 5 Martin del Campo SE, Latchana N, Levine KM, *et al.* MiR - 21 enhances melanoma invasiveness via inhibition of tissue inhibitor of metalloproteinases 3 expression: in vivo effects of MiR - 21 inhibitor[J]. PLoS One, 2015, 10 (1): e0115919
- 6 Coit DG, Andtbacka R, Anker CJ, *et al.* Melanoma[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2012, 10 (3): 366 - 400
- 7 Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004, 431 (7006): 350 - 355
- 8 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116 (2): 281 - 297
- 9 Wu CS, Yen CJ, Chou RH, *et al.* Downregulation of microRNA - 15b by hepatitis B virus X enhances hepatocellular carcinoma proliferation via fucosyltransferase 2 - induced Globo H expression[J]. Int J Cancer, 2014, 134 (7): 1638 - 1647
- 10 Fleming NH, Zhong J, da Silva IP, *et al.* Serum - based miRNAs in the prediction and detection of recurrence in melanoma patients[J]. Cancer, 2015, 121 (1): 51 - 59
- 11 Hanniford D, Zhong J, Koetz L, *et al.* A miRNA - based signature detected in primary melanoma tissue predicts development of brain metastasis[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21 (21): 4903 - 4912
- 12 Satzger I, Mattern A, Kuettler U, *et al.* MicroRNA - 15b represents an independent prognostic parameter and is correlated with tumor cell proliferation and apoptosis in malignant melanoma[J]. Int J Cancer, 2010, 126 (11): 2553 - 2562
- 13 Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, *et al.* MicroRNA gene expression during retinoic acid - induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia[J]. Oncogene, 2007, 26 (28): 4148 - 4157
- 14 Wang X, Tang S, Le SY, *et al.* Aberrant expression of oncogenic and tumor - suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth[J]. PLoS One, 2008, 3 (7): e2557
- 15 Li J, Chen Y, Guo X, *et al.* Inhibition of miR - 15b decreases cell migration and metastasis in colorectal cancer[J]. Tumour Biol, 2016, 37 (7): 8765 - 8773

(收稿日期: 2016 - 11 - 01)

(修回日期: 2016 - 11 - 28)