

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

明 娟, 张 劲, 罗 钢, 蔡丽英, 梅 雪

引用: 明娟, 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. 国际眼科杂志 2021; 21(8): 1351-1355

作者单位: (435000) 中国湖北省黄石市, 鄂东医疗集团黄石鄂东医疗集团中心医院眼科

作者简介: 明娟, 毕业于武汉大学, 硕士, 主治医师, 研究方向: 玻璃体视网膜疾病。

通讯作者: 张劲, 毕业于咸宁医学院, 本科, 副主任医师, 研究方向: 眼外伤、泪器疾病. zjingde666@163.com

收稿日期: 2020-04-16 修回日期: 2021-06-30

摘要

目的: 探讨高迁移率族蛋白 A1 (HMGA1) 蛋白在葡萄膜黑色素瘤 (UM) 组织中的表达, 以及抑制该基因表达对细胞增殖和侵袭的影响。

方法: 选取 2014-02/2019-08 在我院接受手术治疗的 UM 患者 53 例 53 眼, 同期留取因外伤摘除眼球的正常葡萄膜组织 34 例 34 眼。采用免疫组织化学法检测组织中 HMGA1 蛋白表达。将体外培养的人 UM 细胞系 M23 分为 HMGA1 下调组、阴性对照组和空白组, 分别转染 HMGA1 干扰序列、阴性对照序列和不做任何处理, 采用实时荧光定量 PCR 术检测 HMGA1 mRNA 表达, CCK-8 法检测细胞增殖能力, Transwell 法检测细胞迁移和侵袭能力。

结果: UM 组织中 HMGA1 蛋白阳性表达率为 77%, 高于正常葡萄膜组织中的 29% ($P < 0.001$); 与未发生巩膜浸润、未累及睫状体和未发生眼外生长相比, HMGA1 蛋白在发生巩膜浸润、累及睫状体和发生眼外生长的组织中阳性表达率升高 (均 $P < 0.05$)。与阴性对照组和空白组相比, HMGA1 mRNA 在 HMGA1 下调组细胞中相对表达量降低, 且 HMGA1 下调组细胞培养 24、48、72、96h 时吸光度 OD 值降低, 迁移细胞数和侵袭细胞数均明显减少 (均 $P < 0.05$)。

结论: UM 组织中 HMGA1 蛋白阳性表达率升高, 下调 M23 细胞中 HMGA1 表达可减少细胞增殖, 抑制细胞迁移和侵袭。

关键词: 葡萄膜黑色素瘤; HMGA1; 临床病理指标; 细胞迁移; 细胞侵袭

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.8.08

Expression of HMGA1 in uveal melanoma and its effect on cell proliferation and invasion

Mei Ming, Jin Zhang, Gang Luo, Li-Ying Cai, Xue Mei

Department of Ophthalmology, Edong Medical Group Huangshi

Edong Medical Group Central Hospital, Huangshi 435000, Hubei Province, China

Correspondence to: Jin Zhang, Department of Ophthalmology, Edong Medical Group Huangshi Edong Medical Group Central Hospital, Huangshi 435000, Hubei Province, China. zjingde666@163.com

Received: 2020-04-16 Accepted: 2021-06-30

Abstract

• **AIM:** To investigate the expression of high mobility group A1 (HMGA1) protein in uveal melanoma (UM) tissues, and the effect of inhibiting the expression of HMGA1 on cell proliferation and invasion.

• **METHODS:** A total of 53 cases (53 eyes) of UM patients who underwent surgical treatment in our hospital from February 2014 to August 2019 were selected. In the same period, 34 cases (34 eyes) of normal uveal tissues removed from the eye due to trauma were selected. The expression of HMGA1 protein in tissues was detected by immunohistochemistry. The human UM cell line M23 was cultured and divided into HMGA1 downregulation group, negative control group and blank group, respectively, transfected with HMGA1 interference sequence, negative control sequence and without any treatment. The expression of HMGA1 was detected by real-time quantitative PCR. The cell proliferation ability was detected by CCK-8 method, and the cell migration and invasion abilities were detected by Transwell method.

• **RESULTS:** The positive expression rate of HMGA1 protein in UM tissue was 77%, which was higher than that in the normal uveal tissue, which was 29% ($P < 0.001$). Compared with the no scleral occurring infiltration, no ciliary body involving, and no extraocular growth, the positive expression rates of HMGA1 proteins in the scleral infiltration, ciliary body involving, and extraocular growth occurring tissues were increased (all $P < 0.05$). The relative expression level of HMGA1 mRNA in cells in the HMGA1 downregulation group was lower than that in the negative control group and the blank group. Compared with the negative control group and the blank group, the absorbance OD values of cells in the HMGA1 downregulation group at 24, 48, 72 and 96h were decreased ($P < 0.05$). The number of migrating cells and the number of invading cells in the HMGA1 downregulation group was significantly less than those in the negative control group and the blank group ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** The positive expression rate of HMGA1 protein in UM tissue is increased. Down regulation the expression of HMGA1 in M23 cells can reduce cell

proliferation and inhibit cell migration and invasion.

• KEYWORDS: uveal melanoma; HMGA1; clinicopathological indicators; cell migration; cell invasion

Citation: Ming M, Zhang J, Luo G, et al. Expression of HMGA1 in uveal melanoma and its effect on cell proliferation and invasion. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021;21(8):1351-1355

0 引言

葡萄膜黑色素瘤(uveal melanoma, UM)作为成人眼部最为常见的起源于葡萄膜的恶性肿瘤,发病率高居眼部肿瘤的第二位,且近年来呈上升趋势^[1]。尽管现有诊疗手段不断进步,但患者总体生存率依然较低,预后不佳^[2]。研究发现,高增殖活性及易发生眼外转移是导致该肿瘤诊疗困难及死亡率高的主要原因,有超过90%的患者死于肝转移^[3]。高迁移率族蛋白A1(high mobility group A1, HMGA1)作为一种核蛋白,在细胞分化、转移、胚胎形成及调控基因转录中发挥重要作用^[4],研究发现HMGA1蛋白在多种恶性肿瘤组织中呈高表达^[5]。亦有研究指出, HMGA1参与了肿瘤细胞增殖及侵袭过程^[6],但其在UM中的作用鲜有报道。本研究分析UM组织中HMGA1蛋白表达,并观察其与人UM细胞系M23增殖、迁移和侵袭的相关性,以期为UM的病理机制研究提供基础资料。

1 对象和方法

1.1 对象 选取2014-02/2019-08在我院接受手术治疗的UM患者53例53眼,其中男29例29眼,女24例24眼;年龄28~76(平均48.36±11.14)岁;眼别:左眼25例,右眼28例;发生部位:睫状体18眼,脉络膜35眼;病理学类型:上皮细胞型19眼,梭形细胞型25眼,混合型9眼;35眼出现巩膜浸润。所有患者术前未行放化疗治疗,均行病理学检查确诊,于眼球摘除后,剥离肿瘤组织,甲醛固定,石蜡包埋保存。同期,留取因外伤摘除眼球的正常葡萄膜组织34例34眼,其中男20例,女14例,年龄26~77(平均48.07±10.92)岁;眼别:右眼19例,左眼15例。所有患者排除UM和其他肿瘤。两组患者性别、年龄、眼别差异均无统计学意义($P>0.05$),均衡可比。本研究通过医院伦理委员会批准,入选对象均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂和设备 免疫组织化学试剂盒及试剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司,兔抗人HMGA1多克隆抗体购自英国Abcam公司,人UM细胞系M23购自上海恒雅生物科技有限公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司,RPMI1640培养液、青霉素-链霉素购自美国Gibco公司, HMGA1干扰序列和阴性对照序列由上海美轩生物科技有限公司提供, HMGA1和内参引物由上海生工生物公司设计合成, Trizol总RNA提取试剂盒和转染试剂盒购自美国Invitrogen公司,逆转录和PCR试剂盒购自大连宝生物工程有限公司, CCK-8试剂购自武汉博士德生物工程有限公司, Transwell小室购自上海夏夷实业有限公司, Matrigel基质胶购自美国BD公司, StepOnePlus实时荧光定量PCR仪购自美国ABI公司。

1.2.2 免疫组织化学法检测组织中HMGA1蛋白表达 取组织石蜡标本,按4μm厚度连续切片,脱蜡、水化,浸入枸橼酸盐缓冲液行加热处理, PBS冲洗3次,浸入3%过氧化氢溶液, PBS冲洗3次,将一抗兔抗人HMGA1多克隆抗体

1:400稀释后加入,过夜孵育(4℃), PBS冲洗3次,加入HRP标记二抗,室温反应60min, PBS冲洗3次,经显色、复染、脱水、封片,显微镜下观察,高倍镜下随机取5个视野,根据染色情况和阳性细胞比例进行判定^[7]: (1)染色情况:不染色0分,淡黄色1分,棕黄色2分,黄褐色3分; (2)阳性细胞比例:≤5% 0分, 6%~25% 1分, 26%~50% 2分, 51%~75% 3分, ≥76% 4分; (3)将(1)和(2)评分相乘, ≤3分为阴性(-), >3分为阳性(+).

1.2.3 细胞培养和处理 用含10%胎牛血清的RPMI1640培养液培养细胞。5% CO₂ 37℃、饱和湿度培养24h,胰酶消化,传代。待细胞融合度达到90%时,按照转染试剂盒说明进行分组转染, HMGA1下调组转染HMGA1干扰序列(5'-GAGTCAGAAAGAGCCAGT-3');阴性对照组转染阴性对照序列(5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3');空白组不作处理。各组转染后按上述条件继续培养48h。

1.2.4 实时荧光定量PCR术检测HMGA1 mRNA表达 取细胞,加入裂解液,提取总RNA并检测浓度,用逆转录试剂盒进行逆转录获得cDNA,使用实时荧光定量PCR仪按扩增试剂盒说明进行扩增,引物序列: HMGA1:上游: 5'-GC AGGAAAAGGATGGGACTG - 3', 下游: 5'-AGC AGGGCTTCCAGTCCCAG - 3'; GAPDH: 上游: 5'-CTT CTTTTCGCTCGCCAGCCGA - 3', 下游: 5'-ACCA GCGGCCAATACGACCAA - 3'。反应条件: 95℃ 3min, 95℃ 30s, 60℃ 30s, 74℃ 30s, 连续36个循环。用2^{-ΔΔCt}法计算HMGA1 mRNA表达量。

1.2.5 CCK-8法检测细胞增殖能力 取各组细胞,胰酶消化,制备细胞悬液,接种于96孔板, 5×10⁴/孔,继续培养,分别在0、24、48、72、96h时,向各孔加入CCK-8液20μL,利用酶标仪取450nm波长下对各孔检测,记录吸光度值(OD),重复实验3次,每次设置6个复孔。

1.2.6 Transwell法检测细胞迁移能力 取各组细胞,胰酶消化,用无血清培养液制备单细胞悬液,密度为5×10⁵/mL,取200μL加入Transwell小室上室,将含有20%胎牛血清的培养液加入小室下室,继续培养24h,将小室取出, PBS冲洗,甲醛固定,结晶紫染色,将散落细胞拭去,镜下观察,随机取5个高倍视野,对穿膜细胞进行计数^[8]。

1.2.7 Transwell法检测细胞侵袭能力 将Matrigel基质胶用培养液稀释后,在Transwell小室上室内进行均匀平铺,过夜风干。其余步骤同1.2.5中Transwell实验操作步骤。

统计学分析:利用SPSS 21.0软件分析数据。计数资料采用率表示,组间比较采用 χ^2 检验。计量资料采用均数±标准差($\bar{x}±s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-t检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UM和正常葡萄膜组织中HMGA1蛋白表达 UM组织中HMGA1蛋白阳性表达率为77%(41/53),高于正常葡萄膜组织中的29%(10/34),差异有统计学意义($\chi^2=19.630, P<0.001$),见图1。

2.2 UM患者肿瘤组织中HMGA1蛋白表达情况 HMGA1蛋白阳性表达率在不同年龄、性别、眼别、发生部位、视盘受累、继发视网膜脱落、肿瘤高度和病理学类型患者中差异均无统计学意义($P>0.05$),但与未发生巩膜浸润、

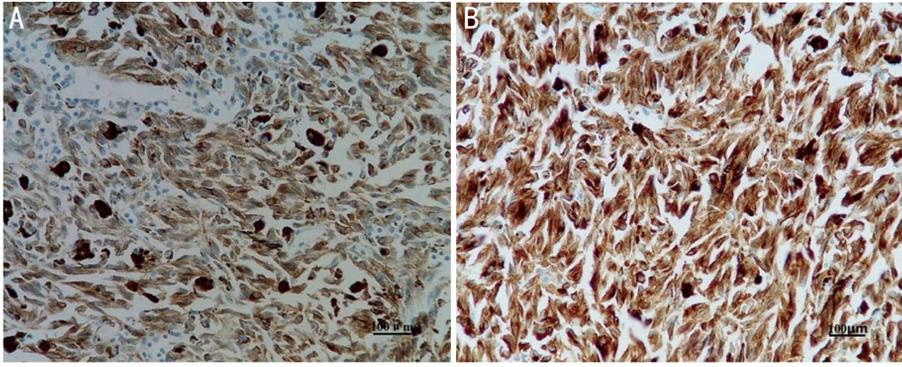


图1 免疫组织法检测 UM 和正常葡萄膜组织中 HMGA1 蛋白表达(SP) A:正常葡萄膜组织中 HMGA1 蛋白呈低表达;B:UM 组织中 HMGA1 蛋白呈高表达。

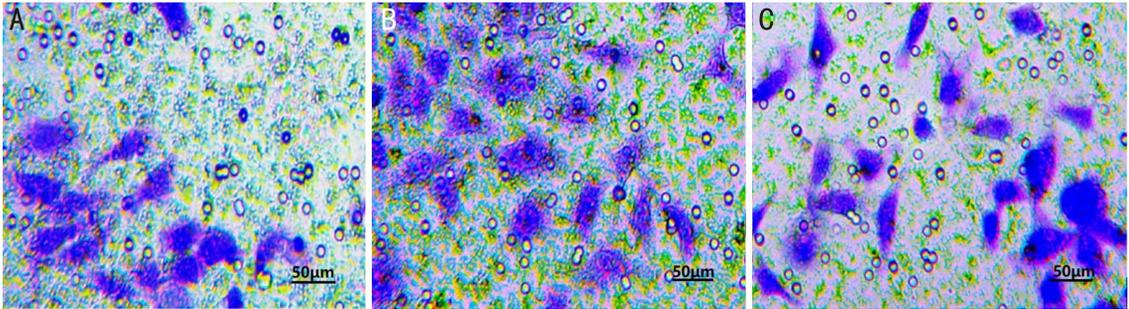


图2 Transwell 法检测各组细胞迁移能力 A:HMGA1 下调组;B:阴性对照组;C:空白组。

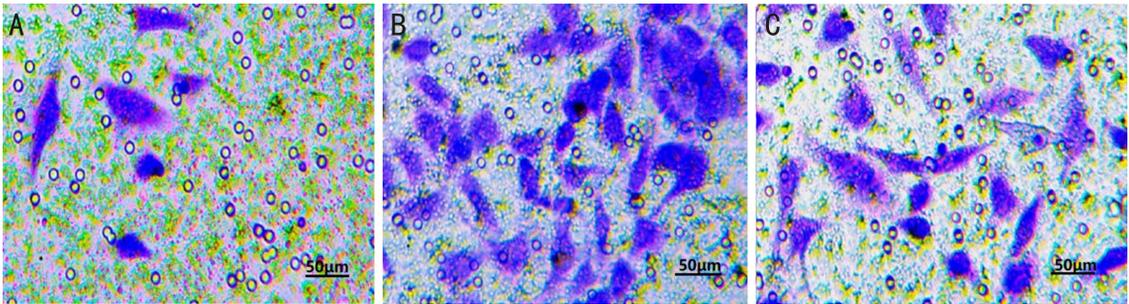


图3 Transwell 法检测各组细胞侵袭能力 A:HMGA1 下调组;B:阴性对照组;C:空白组。

未累及睫状体和未发生眼外生长的患者相比, HMGA1 蛋白在发生巩膜浸润、累及睫状体和发生眼外生长的患者肿瘤组织中阳性表达率升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.3 各组细胞中 HMGA1 表达 HMGA1 下调组、阴性对照组和空白组细胞中 HMGA1 mRNA 相对表达量分别为 0.29 ± 0.08 , 0.98 ± 0.07 和 1.01 ± 0.06 , 差异有统计学意义 ($F = 193.400, P < 0.001$), HMGA1 mRNA 在阴性对照组和空白组细胞中相对表达量差异无统计学意义 ($P = 0.431$), HMGA1 mRNA 在 HMGA1 下调组细胞中相对表达量低于阴性对照组和空白组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 各组细胞增殖能力 与阴性对照组和空白组相比, HMGA1 下调组细胞培养 24、48、72、96h 时吸光度 OD 值降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.5 各组细胞迁移能力 各细胞迁移能力相比, 阴性对照组和空白组迁移细胞数差异无统计学意义 ($P > 0.05$), HMGA1 下调组迁移细胞数明显少于阴性对照组和空白组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2, 表 3。

2.6 各组细胞侵袭能力 各组细胞侵袭能力相比, 阴性对照组和空白组侵袭细胞数差异无统计学意义 ($P > 0.05$), HMGA1 下调组侵袭细胞数明显少于阴性对照组和空白组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3, 表 3。

3 讨论

UM 作为眼内常见的恶性肿瘤, 发病率仅次于视网膜母细胞瘤, 且恶性程度高、增殖力和侵袭力强, 早期便可发生转移^[9], 有研究指出, 转移特别是突破眼眶的远处转移, 是导致患者死亡的重要原因^[10]。因此, 积极寻找与 UM 转移相关的敏感基因对患者诊疗及改善预后具有重要意义。HMGA1 定位于人染色体 6q21, 在胚胎期高表达, 但在成人正常组织中普遍低表达, 可通过调控多条途径而在细胞生长、分化、细胞周期、基因转录及 DNA 复制修复中发挥重要作用^[11]。近年研究发现, HMGA1 蛋白高表达于多种恶性肿瘤组织^[12-13]。研究表明, HMGA1 高表达可促进乳腺癌 MCF7 和 T47D 细胞增殖^[4], HMGA1 参与调控肾透明细胞癌转移^[11], 其可作为一种靶基因在细胞侵袭和迁移中发挥重要作用^[14]。本研究结果显示, UM 组织中 HMGA1 蛋白阳性表达率高于正常葡萄膜组织, 说明 HMGA1 蛋白在 UM 组织中呈高表达, 可能与该肿瘤的发生有关。同时, 本研究发现 HMGA1 蛋白阳性表达率与巩膜浸润、累及睫状体和眼外生长相关, 表明 HMGA1 蛋白可能参与了 UM 侵袭和转移过程。

本研究利用基因干扰技术特异性沉默 M23 细胞中 HMGA1 表达, 结果显示, HMGA1 mRNA 在 HMGA1 下调组细胞中相对表达量低于阴性对照组和空白组, 表明 HMGA1

表1 UM患者肿瘤组织中HMGA1蛋白表达情况

眼(%)

指标	眼数	HMGA1 蛋白		χ^2	P
		+	-		
年龄(岁)					
>48	24	19(79)	5(21)	0.082	0.775
≤48	29	22(76)	7(24)		
性别				1.066	0.302
男	29	24(83)	5(17)		
女	24	17(71)	7(29)		
眼别				0.776	0.378
左眼	25	18(72)	7(28)		
右眼	28	23(82)	5(18)		
发生部位				0.556	0.456
睫状体	18	15(83)	3(17)		
脉络膜	35	26(74)	9(26)		
视盘受累				3.410	0.065
是	34	29(85)	5(15)		
否	19	12(63)	7(37)		
继发视网膜脱落				0.049	0.824
是	41	32(78.05)	9(21.95)		
否	12	9(75.00)	3(25.00)		
肿瘤高度(mm)				0.228	0.633
≤8	34	27(79)	7(21)		
>8	19	14(74)	5(26)		
病理学类型				2.843	0.241
上皮细胞型	19	17(89)	2(11)		
梭形细胞型	25	17(68)	8(32)		
混合型	9	7(78)	2(22)		
巩膜浸润				4.108	0.043
是	35	30(86)	5(14)		
否	18	11(61)	7(39)		
累及睫状体				5.127	0.024
是	24	22(92)	2(8)		
否	29	19(66)	10(34)		
眼外生长				6.894	0.009
是	38	33(87)	5(13)		
否	15	8(53)	7(46)		

表2 各组细胞不同时间点吸光度 OD 值比较

$\bar{x} \pm s$

组别	0h	24h	48h	72h	96h
HMGA1 下调组	0.26±0.09	0.35±0.08 ^{a,c}	0.41±0.10 ^{a,c}	0.48±0.03 ^{a,c}	0.58±0.04 ^{a,c}
阴性对照组	0.28±0.10	0.43±0.06	0.58±0.05	0.68±0.13	0.85±0.05
空白组	0.21±0.07	0.49±0.04	0.55±0.06	0.72±0.14	0.81±0.09
F	1.024	7.740	9.288	8.061	29.993
P	0.383	0.005	0.002	0.004	<0.001

注:^aP<0.05 vs 阴性对照组;^cP<0.05 vs 空白组。

下调组细胞中 HMGA1 mRNA 表达被成功抑制。有研究指出,miR-424 可靶向调控 HMGA1 阻滞细胞周期 G1 期进而影响宫颈癌细胞的增殖^[15]。本研究结果显示,与阴性对照组和空白组相比, HMGA1 下调组细胞培养 24、48、72、96h 时吸光度 OD 值降低,说明下调 HMGA1 表达可有效抑制 M23 细胞增殖,提示 HMGA1 可能参与了细胞增殖过

程。另有研究指出, HMGA1 可加速子宫颈癌的迁移和侵袭^[16]。本研究结果显示, HMGA1 下调组迁移细胞数和侵袭细胞数均明显少于阴性对照组和空白组,说明 HMGA1 可能参与了 M23 细胞迁移和侵袭过程,可能是调控细胞迁移和侵袭的重要基因之一,但具体调控机制尚待进一步研究明确。

表3 各组迁移细胞数和侵袭细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$, 个)

组别	迁移细胞数	侵袭细胞数
HMGA1 下调组	93.00±10.68 ^{a,c}	84.33±9.33 ^{a,c}
阴性对照组	135.00±9.74	121.33±12.75
空白组	129.67±14.40	123.00±11.93
F	22.607	21.933
P	<0.001	0.005

注:^a $P < 0.05$ vs 阴性对照组;^c $P < 0.05$ vs 空白组。

综上所述,UM 组织中 HMGA1 蛋白阳性表达率升高,且与肿瘤恶性进展指标有关,下调 M23 细胞中 HMGA1 表达可减少细胞增殖,抑制细胞迁移和侵袭,有望为 UM 机制研究及临床诊疗提供新的潜在靶基因。

参考文献

- Luan WK, Zhou Z, Ni X, *et al.* Long non-coding RNA H19 promotes glucose metabolism and cell growth in malignant melanoma via miR-106a-5p/E2F3 axis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2018; 144(3): 531-542
- Wang F, Wang Q, Li N, *et al.* OSuvm; an interactive online consensus survival tool for uveal melanoma prognosis analysis. *Mol Carcinog* 2020; 59(1): 56-61
- Xu LT, Funchain PF, Bena JF, *et al.* Uveal melanoma metastatic to the liver; treatment trends and outcomes. *Ocular Oncol Pathol* 2019; 5(5): 323-332
- 胡芳琳, 钟小林, 陈亚军, 等. 乳腺癌细胞 HMGA1 稳定株构建及对细胞增殖的影响. *安徽医科大学学报* 2019; 54(11): 1729-1734
- Wang Y, Hu L, Zheng Y, *et al.* HMGA1 in cancer: Cancer classification by location. *J Cell Mol Med* 2019; 23(4): 2293-2302
- 蒋娟莉, 喻良, 刘爱东, 等. RNA 干扰 HMGA1 基因表达对神经胶

质瘤细胞增殖凋亡的影响及机制. *实用预防医学* 2018; 25(4): 458-462

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. *眼科新进展* 2018; 38(2): 121-125

8 陈源, 黄正如. 上皮细胞型与混合型葡萄膜黑色素瘤的生物信息学分析. *国际眼科杂志* 2020; 20(2): 300-306

9 Londin E, Magee R, Shields CL, *et al.* IsomiRs and tRNA-derived fragments are associated with metastasis and patient survival in uveal melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2020; 33(1): 52-62

10 Lorenzo D, Piulats JM, Ochoa M, *et al.* Clinical predictors of survival in metastatic uveal melanoma. *Jpn J Ophthalmol* 2019; 63(2): 197-209

11 Chi XG, Meng XX, Ding DL, *et al.* HMGA1-mediated miR-671-5p targets APC to promote metastasis of clear cell renal cell carcinoma through Wnt signaling. *Neoplasia* 2020; 67(1): 46-53

12 Zhang W, Zhao H, Chen K, *et al.* Overexpressing of POU2F2 accelerates fracture healing via regulating HMGA1/Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Biosci Biotechnol Biochem* 2020; 84(3): 491-499

13 秦明明, 刘夏, 刘小岑, 等. 乳腺浸润性导管癌中 HMGA1 和 CXCR4 的表达及临床意义. *临床与实验病理学杂志* 2018; 34(2): 178-182

14 Yan SM, Li H, Shu Q, *et al.* LncRNA SNHG1 exerts a protective role in cardiomyocytes hypertrophy via targeting miR-15a-5p/HMGA1 axis. *Cell Biol Int* 2020; 44(4): 1009-1019

15 任蓉, 于国新, 益华, 等. MiR-424 靶向高迁移率族蛋白 A1 参与宫颈癌细胞周期阻滞的研究. *中国妇幼保健* 2019; 34(21): 5027-5032

16 Fu F, Wang T, Wu Z, *et al.* HMGA1 exacerbates tumor growth through regulating the cell cycle and accelerates migration/invasion via targeting miR-221/222 in cervical cancer. *Cell Death Dis* 2018; 9(6): 594-611