

miR-375 表达对脉络膜黑色素瘤细胞增殖和侵袭的影响

刘松涛¹, 刘向玲², 蒋乐文¹

引用:刘松涛,刘向玲,蒋乐文. miR-375 表达对脉络膜黑色素瘤细胞增殖和侵袭的影响. 国际眼科杂志 2023; 23(8): 1260-1263

基金项目:河南省科技攻关计划联合项目(No.LHGJ20190192)
作者单位:¹(454000)中国河南省焦作市,焦作煤业(集团)有限责任公司中央医院眼科;²(453000)中国河南省新乡市,新乡医学院第三附属医院眼科
作者简介:刘松涛,男,硕士,副主任医师,研究方向:眼底病。
通讯作者:刘松涛. 3081217747@qq.com
收稿日期:2022-10-22 修回日期:2023-07-12

¹Department of Ophthalmology, Central Hospital of Jiaozuo Coal Industry (Group) Co., Ltd., Jiaozuo 454000, Henan Province, China; ²Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, Henan Province, China

Correspondence to: Song-Tao Liu. Department of Ophthalmology, Central Hospital of Jiaozuo Coal Industry (Group) Co., Ltd., Jiaozuo 454000, Henan Province, China. 3081217747@qq.com
Received:2022-10-22 Accepted:2023-07-12

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of the expression of miR-375 on the proliferation and invasion of choroidal melanoma (CM) MUM-2B cells.

• **METHODS:** MUM-2B cells were cultured and were transfected with miR-375 mimic sequence (mimic group), miR-375 inhibitor sequence (inhibitor group), negative control group and no treatment (blank group). The qRT-PCR, CCK-8, apoptosis and Transwell experiments were used respectively to detect the expression of miR-375, cell proliferation activity, apoptosis, cell migration and invasion.

• **RESULTS:** Compared with the negative control group (1.01 ± 0.10) and the blank group (1.03 ± 0.07), the expression level of miR-375 in the cells of the mimic group (2.65 ± 0.15) was increased, while the expression level of miR-375 in the cells of the inhibitor group (0.28 ± 0.06) was decreased ($P < 0.05$). Compared with the blank group and negative control group, the OD values of the cells in the mimic group at 24, 48, 72, and 96h were decreased ($P < 0.05$), while the OD values of the cells in the inhibitor group at 24, 48, 72, and 96h were increased ($P < 0.05$). Compared with the apoptosis rates in the blank group and negative control group, which were (20.54 ± 4.01)% and (22.80 ± 4.28)%, the apoptosis rate in the mimic group (39.11 ± 3.37)% was increased ($P < 0.05$), while it was decreased in the inhibitor group (10.13 ± 2.17)% ($P < 0.05$). Compared with the blank group and negative control group, the number of migration cell and the number of invasion cell in the mimic group were decreased ($P < 0.05$), while the number of migration cell and the number of invasion cell in the inhibitor group were increased ($P < 0.05$).

• **CONCLUSIONS:** Up-regulating the expression of miR-375 in MUM-2B cells can reduce cell proliferation activity, accelerate cell apoptosis, and inhibit cell migration and invasion, while down-regulating the expression of miR-375 has the opposite effect. It indicates that miR-375 may play the function of tumor suppressor in the course of CM.

摘要

目的:探讨 miR-375 表达对脉络膜黑色素瘤 MUM-2B 细胞增殖和侵袭的影响。

方法:培养 MUM-2B 细胞,分别转染 miR-375 模拟物序列(模拟物组)、miR-375 抑制物序列(抑制物组)、阴性对照序列(阴性对照组)和不做任何处理(空白组),分别采用 qRT-PCR 实验、CCK-8 实验、细胞凋亡实验、Transwell 实验检测细胞中 miR-375、细胞增殖活性、细胞凋亡情况、细胞迁移和侵袭情况。

结果:相比于阴性对照组(1.01 ± 0.10)和空白组(1.03 ± 0.07),模拟物组细胞中 miR-375 表达量(2.65 ± 0.15)升高,而抑制物组细胞中 miR-375 表达量(0.28 ± 0.06)降低($P < 0.05$);与空白组和阴性对照组比较,模拟物组细胞 24、48、72 和 96h 时 OD 值均降低($P < 0.05$),而抑制物组细胞 24、48、72 和 96h 时 OD 值均升高($P < 0.05$);与空白组细胞凋亡率(20.54 ± 4.01)%和阴性对照组细胞凋亡率(22.80 ± 4.28)%比较,模拟物组细胞凋亡率(39.11 ± 3.37)%升高($P < 0.05$),而抑制物组细胞凋亡率(10.13 ± 2.17)%降低($P < 0.05$);与空白组和阴性对照组比较,模拟物组细胞迁移数和细胞侵袭数均降低($P < 0.05$),而抑制物组细胞迁移数和细胞侵袭数均升高($P < 0.05$)。

结论:上调 MUM-2B 细胞中 miR-375 表达可降低细胞增殖活性,加速细胞凋亡,抑制细胞迁移和侵袭,下调 miR-375 表达则发挥相反的作用,表明 miR-375 可能在脉络膜黑色素瘤病程中发挥抑癌功能。

关键词:脉络膜黑色素瘤;MUM-2B 细胞;miR-375;RNA 干扰;细胞生物学行为

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.8.04

Effects of the expression of miR-375 on the proliferation and invasion of choroidal melanoma cells

Song-Tao Liu¹, Xiang-Ling Liu², Le-Wen Jiang¹

Foundation item: Science and Technology Research Program Joint Project of Henan Province (No.LHGJ20190192)

• KEYWORDS: choroidal melanoma; MUM - 2B cells; miR-375; RNA interference; cell biological behavior

Citation: Liu ST, Liu XL, Jiang LW. Effects of the expression of miR-375 on the proliferation and invasion of choroidal melanoma cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2023;23(8):1260-1263

0 引言

脉络膜黑色素瘤(choroidal melanoma, CM)是常见的眼内恶性肿瘤,病因不明,病情进展快,早期便可出现转移,有超过2/3的患者发生肝转移,总体生存时间短、预后差^[1]。有研究指出,恶性增殖和转移是影响CM患者预后的关键性因素,发生转移的患者在12mo内病死率在80%以上^[2]。微小RNA(microRNA, miRNA)是长度约为22nt的非编码RNA,可通过调控靶基因mRNA转录或降解而广泛参与机体多项生理、病理过程^[3],近年来研究表明,miRNA与肿瘤细胞恶性增殖、侵袭等生物学行为关系密切^[4]。有研究指出,miR-375参与了宫颈癌HeLa细胞增殖、侵袭和迁移^[5]。Li等^[6]指出miR-375可抑制胶质母细胞瘤的增殖和侵袭。本研究观察了人脉络膜黑色素瘤MUM-2B细胞中miR-375表达对细胞生物学特性的影响,以期CM机制研究及诊疗提供参考资料。

1 材料和方法

1.1 材料 MUM-2B细胞购自上海斯信生物公司,胎牛血清、DMEM培养液、青-链霉素购自美国Gibco公司,总RNA提取试剂盒和Lipofectamine 2000转染试剂购自美国Invitrogen公司,PrimeScript II 1st strand cDNA synthesis kit和扩增试剂盒购自大连宝生物公司,miR-375和U6购自上海生工生物公司,miR-375模拟物(mimics)、抑制物(inhibitor)及阴性对照序列购自上海吉玛公司,CCK-8试剂盒购自上海索宝生物公司,Annexin V-FITC/PI细胞凋亡试剂及流式细胞仪购自美国BD公司,Transwell小室和基质胶购自美国Corning公司,CFX96实时荧光定量PCR仪购自美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含10%胎牛血清的DMEM培养液在含5%CO₂、37℃条件下培养MUM-2B细胞,待细胞生长覆盖率达到90%时,传代。将对数生长期细胞根据处理方式不同分成:(1)模拟物组:用Lipofectamine 2000转染试剂转染miR-375模拟物序列:5'-UUUGUUCGUUCG-GCUCGCGUUA-3';(2)抑制物组:转染miR-375抑制物序列:5'-UCACGCGAGCCGAACGAA CAAA-3';(3)阴性对照组:转染阴性对照序列:5'-GGUUCGUACGUACACU-GUUCA-3';(4)空白组:不作任何处理。各组转染完毕,继续培养48h。

1.2.2 qRT-PCR实验 取各组处理培养细胞,按照总RNA提取试剂盒操作提取总RNA,用紫外分光光度计检测纯度,合格标准为A₂₆₀/A₂₈₀ ≥ 1.80。取总RNA,按PrimeScript II 1st strand cDNA synthesis kit试剂盒说明逆转录为cDNA,用实时荧光定量PCR仪按扩增试剂盒操作扩增引物。引物序列:miR-375:上游:5'-CACAAAA TTTGTTTCGTTCCGCT-3',下游:5'-GTGCAGGGTCCC

AGGTATTC-3';U6:上游:5'-CAAATTCGTGAAG CGTCCATAT-3',下游:5'-GCTTCACGAATTTGCCGTGTCATCCTTGC-3'。反应条件:94℃ 2min,94℃ 30s,60℃ 30s,70℃ 30s,36次循环。用2^{-ΔΔCt}法计算细胞中miR-375表达量。

1.2.3 CCK-8实验 取各组对数生长细胞,以每孔2.5×10⁴个接种在96孔板,每组设复孔5个,分别于12、24、48、72和96h时,除培养液,加入CCK-8液10μL,室温孵育3h,用酶标仪在490nm处测定各孔光密度值(OD),重复实验3次取均值。

1.2.4 细胞凋亡 实验取各组处理培养细胞,用预冷磷酸盐缓冲液冲洗细胞,离心、重悬,调整细胞浓度在5×10⁵/mL,取约1×10⁵个细胞液加入到离心管内,分别将5μL的Annexin V-FITC及5μL的PI加入,摇匀,25℃避光孵育12min,分别加入400μL的结合缓冲液,60min内上机检测细胞凋亡率,重复实验3次取均值。

1.2.5 Transwell实验 (1)迁移能力:转染培养48h后,用无血清培养液制备浓度为5×10⁴/mL的细胞悬液,取200μL加入到Transwell小室上室,将含10%胎牛血清的培养液600μL加入到下室,室温培养24h,取出小室,并将小室内微孔膜上散落细胞除去,滴加多聚甲醛作用12min,0.1%结晶紫染色15min,PBS冲洗后,倒置显微镜下观察,计数穿膜细胞数量,以反映细胞迁移能力;(2)侵袭能力:用无血清培养液对基质胶稀释后,平铺在Transwell小室上室,静置固定6h,其余步骤同迁移能力方法。

统计学分析:采用SPSS 21.0统计软件分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组资料比较使用单因素方差分析,两两比较使用LSD-*t*检验,*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 四组细胞中miR-375表达量比较 模拟物组、抑制物组、阴性对照组和空白组细胞中miR-375表达量分别为2.65±0.15、0.28±0.06、1.01±0.10和1.03±0.07,差异有统计学意义(*F* = 585.180, *P* < 0.001)。阴性对照组细胞中miR-375表达量和空白组比较差异无统计学意义(*P* > 0.05),模拟物组细胞中miR-375表达量高于抑制物组,差异有统计学意义(*P* < 0.05),模拟物组细胞中miR-375表达量较阴性对照组和空白组升高,而抑制物组细胞中miR-375表达量较阴性对照组和空白组降低,差异均有统计学意义(均*P* < 0.05)。

2.2 四组细胞增殖活性比较 四组细胞培养12h OD值比较差异无统计学意义(*P* = 0.317),24、48、72和96h OD值比较差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。进一步两两比较结果见表1。

2.3 四组细胞凋亡情况比较 四组细胞凋亡率比较差异有统计学意义(*F* = 68.218, *P* < 0.001),进一步两两比较结果见表2,图1。

2.4 四组细胞迁移和侵袭情况 四组细胞细胞迁移数和细胞侵袭数比较差异均有统计学意义(*P* < 0.05),进一步两两比较结果见表2,图2、3。

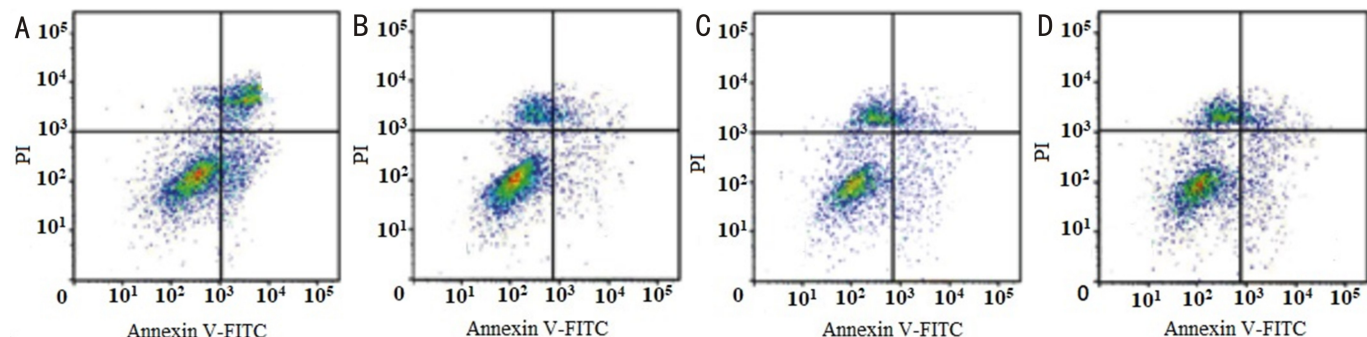


图1 流式细胞术检测四组细胞凋亡情况 A:模拟物组;B:抑制物组;C:阴性对照组;D:空白组。

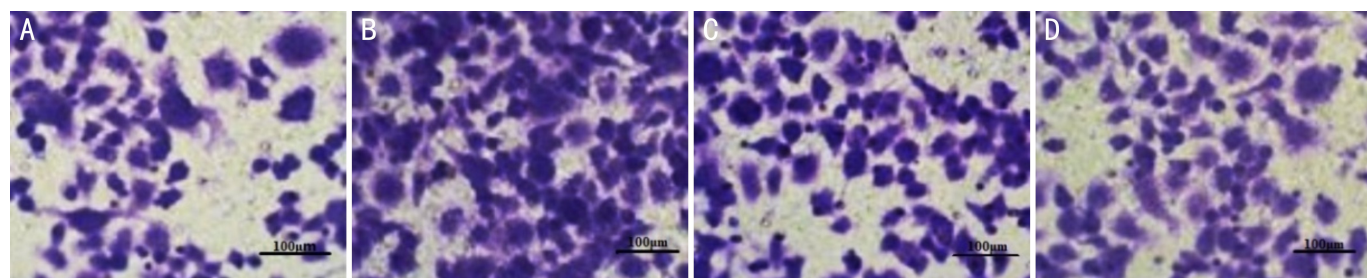


图2 Transwell 法检测四组细胞迁移情况 A:模拟物组;B:抑制物组;C:阴性对照组;D:空白组。

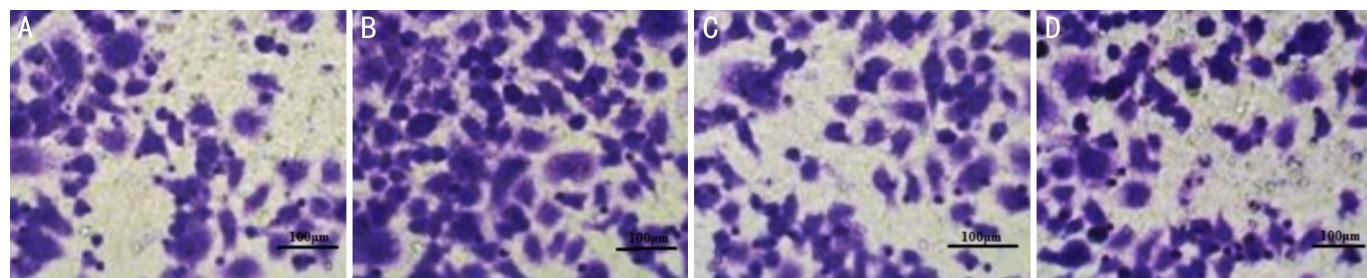


图3 Transwell 法检测四组细胞侵袭情况 A:模拟物组;B:抑制物组;C:阴性对照组;D:空白组。

表1 四组细胞增殖活性比较

组别	12h	24h	48h	72h	96h
模拟物组	0.21±0.07	0.27±0.07 ^{a,c,e}	0.36±0.06 ^{a,c,e}	0.55±0.13 ^{a,c,e}	0.71±0.07 ^{a,c,e}
抑制物组	0.24±0.05	0.52±0.09 ^{a,c}	0.70±0.08 ^{a,c}	0.92±0.08 ^{a,c}	1.17±0.04 ^{a,c}
阴性对照组	0.17±0.05	0.39±0.08	0.54±0.09	0.75±0.12	0.93±0.09
空白组	0.19±0.06	0.41±0.05	0.50±0.07	0.71±0.07	0.91±0.11
<i>F</i>	1.255	11.466	19.066	13.094	32.994
<i>P</i>	0.317	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:^a*P*<0.05 vs 空白组;^c*P*<0.05 vs 阴性对照组;^e*P*<0.05 vs 抑制物组。

表2 四组细胞迁移和侵袭情况及凋亡率比较

组别	细胞迁移(个)	细胞侵袭(个)	凋亡率(%)
模拟物组	90.33±9.40 ^{a,c,e}	80.33±11.72 ^{a,c,e}	39.11±3.37 ^{a,c,e}
抑制物组	143.33±9.61 ^{a,c}	135.17±14.93 ^{a,c}	10.13±2.17 ^{a,c}
阴性对照组	115.50±9.29	108.33±11.54	22.80±4.28
空白组	114.00±10.95	103.00±11.01	20.54±4.01
<i>F</i>	29.159	19.807	68.218
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:^a*P*<0.05 vs 空白组;^c*P*<0.05 vs 阴性对照组;^e*P*<0.05 vs 抑制物组。

3 讨论

CM起病隐匿,进展迅速,易转移,且治疗后复发率高,总体预后较差^[7],严重威胁患者生存质量和生命安全。

研究发现,CM发病涉及的机制复杂,诸多的基因和染色体异常参与其中,同时,伴有众多的信号通路被异常活化^[8]。miRNA作为一类稳定存在于生物体内短链RNA,

其异常表达可通过反向调控其靶基因表达而参与了疾病和肿瘤的发生^[3],且与肿瘤细胞恶性增殖及侵袭关系密切^[9]。研究表明,CM患者组织中存在 miRNAs 表达异常^[10]。miR-375 作为一种 miRNA,低表达于食管鳞癌组织中^[11],参与调控了口腔鳞癌细胞增殖和侵袭^[12],可通过靶向调控肝细胞核因子-1 β 抑制喉鳞状细胞癌进展^[13]。

本研究以 MUM-2B 细胞为实验对象,通过转染 miR-375 模拟物和抑制物的方式,观察 miR-375 不同表达水平对 CM 细胞生物学特性的影响,结果表明,转移 miR-375 模拟物的细胞中 miR-375 表达量显著升高,而转染抑制物的细胞中 miR-375 表达量明显降低,提示细胞转染有效。有研究指出,细胞增殖和凋亡失衡在恶性肿瘤病程中发挥关键性的作用^[14]。本研究结果显示,与空白组和阴性对照组比较,模拟物组细胞不同时间点增殖活性明显降低,而细胞凋亡率显著增加,抑制物组则不同时间点细胞增殖活性明显升高,而细胞凋亡率显著下降,说明增加 MUM-2B 细胞中 miR-375 表达可抑制细胞增殖加速细胞凋亡,而下调细胞中该基因表达则可促进细胞增殖抑制细胞凋亡。桂玉敏等^[15]在对 miR-375 对人视网膜母细胞瘤细胞增殖和凋亡的影响研究中亦发现,miR-375 靶向 Pax6 基因抑制视网膜母细胞瘤 Y79 细胞凋亡,诱导细胞凋亡。这些研究结果表明,miR-375 可能在眼科恶性肿瘤进程中发挥抑癌基因的功能。

本研究结果表明,与空白组和阴性对照组比较,模拟物组细胞迁移数和细胞侵袭数均降低,而抑制物组细胞迁移数和细胞侵袭数均升高,说明 miR-375 可能发挥抑癌基因的作用参与了 MUM-2B 细胞迁移和侵袭过程。Liu 等^[16]研究发现,miR-375 通过抑制 MAPK1/MAPK3 信号通路抑制视网膜母细胞瘤细胞迁移和侵袭。这些研究进一步表明,miR-375 作为抑癌基因参与了眼科恶性肿瘤侵袭进展。

综上所述,上调 MUM-2B 细胞中 miR-375 表达可降低细胞增殖活性,加速细胞凋亡,抑制细胞迁移和侵袭,下调 miR-375 表达则发挥相反的作用,表明 miR-375 可能在 CM 病程中发挥抑癌基因的功能,但其如何在 CM 起病中发挥作用的及可能涉及的信号通路有待进一步开展研究明确。

参考文献

1 宋慧,王英豪,李霞. 渥曼青霉素抑制脉络膜黑色素瘤细胞生物学

- 行为的分子机制研究. 遵义医科大学学报 2020;43(1):32-37
- 2 刘然,应曼曼,张晓楠,等. MiR-147a 靶向 MCM3 抑制脉络膜黑色素瘤细胞增殖、迁移和侵袭. 现代肿瘤医学 2021;29(12):2024-2029
- 3 Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, et al. An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol* 2019;234(5):5451-5465
- 4 Chen PS, Lin SC, Tsai SJ. Complexity in regulating microRNA biogenesis in cancer. *Exp Biol Med (Maywood)* 2020;245(5):395-401
- 5 Xu JY, Song W, Lu FF, et al. MiR-375 inhibits the proliferation and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells by suppressing PDK1. *Biomed Res Int* 2020;2020:970424
- 6 Li GF, Cheng YY, Li BJ, et al. MiR-375 inhibits the proliferation and invasion of glioblastoma by regulating Wnt5a. *Neoplasma* 2019;66(3):350-356
- 7 燕玉清,赵红. 脉络膜黑色素瘤的病理特点与预后. 眼科新进展 2019;39(1):75-78
- 8 任耘,蔡明高,霍鸣. 胰岛素样生长因子 1 受体(IGF-1R)基因表达对脉络膜黑色素瘤细胞增殖、凋亡及 STAT3 信号通路的调控作用. 眼科新进展 2018;38(11):1024-1027
- 9 陈情. miRNA 在肿瘤治疗相关心脏毒性中的研究进展. 中国肿瘤临床 2021;48(12):644-648
- 10 Amaro A, Croce M, Ferrini S, et al. Potential onco-suppressive role of miR122 and miR144 in uveal melanoma through ADAM10 and C-met inhibition. *Cancers (Basel)* 2020;12(6):1468
- 11 Liu ZH, Chen LD, He YB, et al. Study of expression levels and clinical significance of miR-503 and miR-375 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019;23(9):3799-3805
- 12 Wu YD, Sun XJ, Song B, et al. MiR-375/SLC7A11 axis regulates oral squamous cell carcinoma proliferation and invasion. *Cancer Med* 2017;6(7):1686-1697
- 13 Chang KP, Wei ZX, Cao H. miR-375-3p inhibits the progression of laryngeal squamous cell carcinoma by targeting hepatocyte nuclear factor-1 β . *Oncol Lett* 2020;20(4):80
- 14 赵砚之,罗洪亮. miRNA-34 a 与恶性肿瘤的相关研究进展. 中国老年学杂志 2021;41(18):4152-4156
- 15 桂玉敏,彭建军,郭敬. MiR-375 靶向 Pax6 基因调控视网膜母细胞瘤 Y79 细胞增殖凋亡的分子机制. 河北医药 2020;42(8):1156-1159
- 16 Liu L, Xiao CL, Sun QY. MiRNA-375 inhibits retinoblastoma progression through targeting ERBB2 and inhibiting MAPK1/MAPK3 signalling pathway. *Cutan Ocular Toxicol* 2022;41(1):1-10