

MITF在葡萄膜黑色素瘤细胞中的功能研究

徐微微 陈伟伟 王丽花*

(温州医科大学附属眼视光医院, 省部共建眼视光学和视觉科学国家重点实验室, 温州 325027)

摘要 该研究首先通过qRT-PCR和Western blot发现, MITF在人葡萄膜黑色素瘤细胞中的RNA水平及蛋白水平都显著高于葡萄膜黑色素细胞中的水平。通过RNA干扰技术下调葡萄膜黑色素瘤细胞中的MITF的表达, 采用MTS实验、细胞平板克隆实验发现, MITF下调后葡萄膜黑色素瘤细胞的增殖能力被显著抑制。利用流式细胞术及Hoechst染色、Caspase 3/7活性检测发现其细胞周期受到阻滞, 且凋亡水平增加。通过RTCA xCELLigence DP检测系统定量检测发现, si-MITF能抑制葡萄膜黑色素瘤细胞的迁移及侵袭能力。Western blot检测发现, MITF下调后葡萄膜黑色素瘤细胞中细胞周期相关蛋白p-Rb(retinoblastoma)、CDK2(cyclin-dependent kinase 2)、CDK6、细胞周期蛋白D2(Cyclin D2)以及CyclinE2的表达水平下调, 与增殖及迁移侵袭密切相关的FAK(focal adhesion kinase)及ERK(extracellular signal-regulated protein kinases)蛋白的磷酸化水平降低。该研究表明, 在葡萄膜黑色素瘤细胞中下调MITF的表达后, 细胞内部分周期相关蛋白、细胞增殖及迁移侵袭相关蛋白的表达均有下调, 导致细胞发生G₁期阻滞, 使细胞的增殖、迁移及侵袭能力受到抑制, 同时也促使细胞发生凋亡。

关键词 葡萄膜黑色素瘤; MITF; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞侵袭

The Functional Study of MITF in Uveal Melanoma Cells

XU Weiwei, CHEN Weiwei, WANG Lihua*

(State Key Laboratory of Optometry and Visual Science, Department of Optometry,
Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China)

Abstract In this study, qRT-PCR and Western blot were used to find that the RNA level and protein level of MITF in human uveal melanoma cells were significantly higher than those in uveal melanocytes. The expression of MITF in uveal melanoma cells was down-regulated by RNA interference technique. MTS assay and cell plate cloning experiments showed that the proliferative ability of uveal melanoma cells were significantly inhibited after MITF down-regulation. Flow cytometry, hoechst staining and Caspase 3/7 activity test showed that the cell cycle was blocked and the level of apoptosis increased. Quantitative detection by RTCA xCELLigence DP detection system found that si-MITF could inhibit the migration and invasion of uveal melanoma cells. The expression levels of cell cycle-associated proteins p-Rb (retinoblastoma), CDK2 (cyclin-dependent kinase 2), CDK6, Cyclin D2 and Cyclin E2 in uveal melanoma cells were down-regulated by Western blot. The phosphorylation levels of FAK (focal adhesion kinase) and ERK (extracellular signal-regulated protein kinases) proteins, which are closely related to proliferation and migration decreased. This study shows that si-MITF can lead to G₁ phase arrest of uveal melanoma cells, inhibiting cell proliferation, migration and invasion, and also promote cell apoptosis.

收稿日期: 2019-11-21 接受日期: 2020-04-03

浙江省自然科学基金(批准号: LQ15H160014、LQ17H120009)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13676735901, Email: wlh0369@aliyun.com

Received: November 21, 2019 Accepted: April 3, 2020

This work was supported by Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China Grant (Grant No.LQ15H160014, LQ17H120009)

*Corresponding author. Tel: +86-13676735901, E-mail: wlh0369@aliyun.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5249>

Keywords uveal melanoma cell; MITF; cell proliferation; cell apoptosis; cell invasion

小眼畸形相关转录因子MITF(microphthalmia-associated transcription factor)是一种具有螺旋-环-螺旋-亮氨酸拉链结构的转录因子,它是黑色素细胞中主要的调控因子,在黑色素细胞的发育、分化、功能调节等过程中发挥着重要作用^[1-5]。MITF除了在正常黑色素细胞中发挥调节功能外,还在黑色素瘤中发挥着至关重要的作用,它控制着黑色素瘤细胞的增殖、侵袭和转移^[5-8]。在黑色素瘤中,MITF已被证明是一种癌基因,在5%~20%人类黑色素瘤中存在基因扩增现象,且与黑色素瘤患者5年存活率下降有关^[7]。

葡萄膜黑色素瘤是一种起源于葡萄膜黑色素细胞的恶性肿瘤,是成年人眼内最常见的原发性恶性肿瘤^[9-10],其恶性程度高、预后差、且易发生全身转移,极大地威胁着人类的生命健康。虽然现有的治疗方法已使一些患者的眼球和视力得以保存,但是由于对葡萄膜黑色素瘤的发生机制尚不清楚,使得该病近几十年来的五年相对生存率(81.6%)保持不变^[11]。研究发现,在眼内由神经嵴发育而来的黑色素细胞在分化过程中受MITF的调控^[12]。CHEN等^[13]发现,miR-137(microRNA-137)是通过下调靶基因MITF和周期蛋白依赖性激酶6(cyclin dependent kinase 6, CDK6)的表达,显著抑制葡萄膜黑色素瘤细胞的增殖。YAN等^[14]发现,miR-182是通过下调靶基因MITF、B细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, BCL2)和细胞周期素D2(Cyclin D2)的表达,从而显著抑制葡萄膜黑色素瘤细胞的增殖,促进细胞的凋亡。因此,MITF在葡萄膜黑色素瘤的形成和发展过程中发挥了重要的调控作用,其中的分子机制有待于进一步深入研究。

本研究首先通过qRT-PCR和Western blot技术确定人葡萄膜黑色素细胞UM90与人葡萄膜黑色素瘤细胞系OCM290、C918中MITF基因与蛋白的表达差异情况。随后,利用si-MITF干扰技术下调OCM290和C918中MITF的表达量,通过体外细胞实验及分子生物学技术研究MITF对葡萄膜黑色素瘤细胞功能的影响以及相关的分子机制,为葡萄膜黑色素瘤的治疗提供新靶点和新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人眼葡萄膜黑色素细胞UM90及人眼葡萄膜黑

色素瘤细胞系OCM-290、C918均由美国纽约大学附属眼耳医院胡诞宁教授惠赠。

1.2 实验试剂和仪器

DMEM(dulbecco's modified eagle medium)培养基、F12(F-12+GlutaMAX-1 Nutrient Mixture[Ham])培养基、Trypsin-EDTA(0.05%)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、Lipofectamine[®] 2000 Reagent转染试剂、RIPA裂解液购于美国Invitrogen公司; si-MITF和随机序列寡核苷酸链均购于美国Ambion公司; MTS细胞增殖分析试剂盒及Caspase-Glo[®]3/7 Assay Systems购于美国Promega公司; Cycletest Plus DNA Reagent试剂盒及Matrigel购于美国BD公司; Hoechst试剂盒购于碧云天生物技术有限公司; 硝酸纤维素膜购于德国GE Healthcare公司; 抗体购于美国Cell Signaling Technology公司; SpectraMax M5酶标仪购于美国Molecular Devices公司; 7500型荧光实时定量PCR仪购于美国ABI公司; RTCA xCELLigence DP系统购于美国Agilent。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 人眼葡萄膜黑色素细胞UM90用含10% FBS、碱性成纤维细胞生长因子20 ng/mL、异丁甲基黄嘌呤20 μg/mL、霍乱毒素10 ng/mL的F12培养基,人眼葡萄膜黑色素瘤细胞系OCM-290和C918均采用含10% FBS的DMEM培养基,置37 °C、含5% CO₂的培养箱中培养,采用0.05%胰蛋白酶消化传代。

1.3.2 脂质体转染 将OCM-290和C918根据实验需求接种于相应的多孔培养板中,参照Lipofectamine[®] 2000 Reagent转染说明书配置转染液。将si-MITF和lipo2000按比例混匀,室温静止15 min后加入实验组细胞(终浓度50 nmol/L),以相同方法将阴性对照(Negative control, si-NC)加入对照组细胞,置37 °C、5% CO₂培养箱中培养。

1.3.3 qRT-PCR实验 人眼葡萄膜黑色素细胞UM90及人眼葡萄膜黑色素瘤细胞系OCM-290、C918细胞总RNA由Trizol试剂法提取。各取1 μg RNA进行RNase-Free DNase I处理,取5 μL经RNase-Free DNase I处理后的RNA进行逆转录。逆转录后取5 μL cDNA,采用SYBR Green荧光标记法进行实时荧光定量PCR反应检测MITF的相对水平,以GAPDH为内参。qPCR反应体系为20 μL,扩增条

件为: 50 °C 2 min; 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 共40个循环。扩增完毕后, 进行熔解曲线分析, 95 °C 1 min, 65 °C 1 min, 以每个循环0.10 °C的速度升温到95 °C, 连续监测荧光变化。

1.3.4 细胞增殖实验 取对数生长期的OCM-290和C918细胞, 以 2×10^3 个/孔均匀接种到96孔板中培养24 h后转染si-MITF或si-NC, 每组设6个复孔。转染1~5天后, 将细胞培养液换成无血清培养液80 μ L/孔, 加入20 μ L MTS混合液(PMS:MTS=1:20), 37 °C孵育2 h后, 用酶标仪在490 nm波长下读取吸光度(D)值。将1~5天的D值绘制成生长曲线。

1.3.5 细胞平板克隆实验 用胰蛋白酶消化已转染si-MITF或si-NC 24 h后的OCM-290和C918细胞。计数后各取1 000细胞接种于6孔板中, 分布均匀, 继续培养10天。待出现肉眼可见的细胞克隆后终止培养。弃培养液, 加4%甲醛固定20 min, PBS洗3次后, 用结晶紫染色5 min, PBS洗后晾干, 拍照记录。

1.3.6 流式细胞术检测细胞周期 OCM-290和C918细胞转染si-MITF或si-NC 48 h后用0.05%胰蛋白酶消化并收集。细胞用预冷的70%乙醇固定过夜, 再用碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色后, 进行流式细胞术检测, 每个样本收集 3×10^4 个细胞, 应用Modifit软件分析细胞周期各时期的百分率。

1.3.7 Hoechst检测细胞凋亡水平 将OCM-290和C918细胞以 2×10^4 个/孔接种到48孔板中, 培养24 h后转染si-MITF或si-NC。48 h后, 用4%多聚甲醛固定细胞20 min; 弃固定液, 用PBS洗3次, 加Hoechst染色液, 室温染色10 min后吸尽染液; 用PBS洗3遍, 清洗后每孔加入适量的荧光淬灭剂, 在荧光倒置显微镜下观察、拍照、计数统计。

1.3.8 Caspase 3/7法检测细胞凋亡水平 将对数期细胞接种于96孔板中, 转染48 h后, 加入70 μ L Caspase-3/7反应混合液, 另设2个空白对照; 将96孔板置于-80 °C冰箱中, 冰冻20 min后取出孔板, 室温避光融化; 用移液枪反复吸打使细胞破碎; 取100 μ L已破碎的细胞液于不透明的荧光检测微孔板中, 室温避光反应2 h; 检测499 nm~521 nm波长下的荧光值。

1.3.9 Western blot检测细胞内相关蛋白的表达水平 将OCM-290和C918细胞按上述方法转染si-MITF或si-NC 48 h后, 用RIPA裂解液裂解细胞, 提取实验组及对照组细胞的总蛋白。应用SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 再将蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 用

5%脱脂奶粉-PBST封闭液室温封闭2 h后, 用一抗(1:1 000)于4 °C孵育过夜, 经PBS洗脱后再用带有荧光基团标记的二抗(1:5 000)室温孵育2 h, 洗膜后在暗室进行显影曝光, 分析结果。

1.3.10 RTCA xCELLigence DP检测细胞迁移能力 收集转染了si-MITF或si-NC 24 h后的OCM-290和C918细胞, 用无血清培养液调至浓度为 4×10^5 个/mL的细胞悬液。在CIM-Plate的下室加入165 μ L培养液, 上室加入30 μ L无血清培养液, 37 °C平衡30 min后检测基线。向CIM-Plate上室加入100 μ L细胞悬液, 每孔细胞数为 4×10^4 , 室温静置30 min后放入RTCA DP检测台开始进行细胞迁移的实时动态检测。

1.3.11 RTCA xCELLigence DP检测细胞侵袭能力 用无血清培养基将matrigel按1:10稀释后, 取20 μ L matrigel包被CIM-Plate上室, 置于37 °C至其凝固待用。其余实验步骤同细胞迁移检测。

1.3.12 统计学方法 实验均重复3次, 数据采用SPSS 16.0软件进行统计学分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两两比较采用独立样本t检验, 以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 MITF在葡萄膜黑色素瘤细胞中的mRNA和蛋白水平均较高

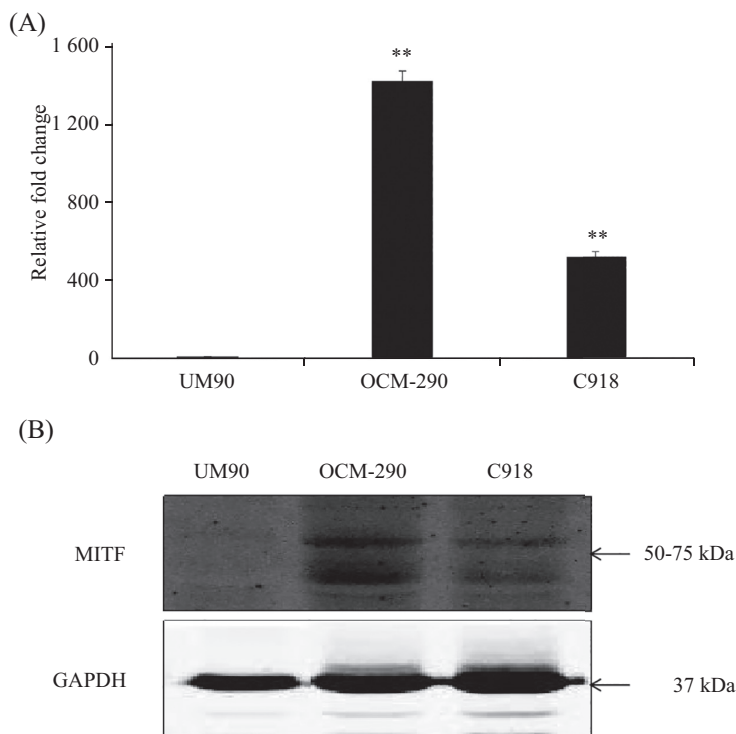
提取人眼葡萄膜黑色素细胞UM90及人眼葡萄膜黑色素瘤细胞系OCM-290、C918细胞总RNA和总蛋白, 分别进行qRT-PCR和Western blot检测, 分析细胞中MITF的mRNA和蛋白水平。结果(图1A和图1B)显示, OCM-290、C918细胞中MITF的mRNA和蛋白水平均显著高于UM90细胞内的表达水平。

2.2 转染si-MITF后MITF在葡萄膜黑色素瘤细胞中的表达水平显著降低

为了明确si-MITF的干扰效率, 我们首先通过Western blot技术检测了转染si-MITF或si-NC 48 h后OCM-290和C918细胞内MITF的表达情况。结果(图2)显示, si-MITF组细胞内MITF的表达量明显低于空白组Mock和阴性对照组si-NC, 说明si-MITF的干扰效率较高。

2.3 转染si-MITF对葡萄膜黑色素瘤细胞增殖能力的影响

与阴性对照si-NC对比, 转染si-MITF后, OCM-290和C918细胞的增殖能力受到明显抑制(图3)。



A: qRT-PCR实验检测UM90、OCM290和C918细胞内MITF mRNA水平; B: Western blot实验检测UM90、OCM290和C918细胞内MITF蛋白水平。
** $P < 0.01$, 与UM90组比较。

A: qRT-PCR assay displays MITF mRNA in UM90, OCM290 and C918 cells. B: Western blot assay reveals the expression of MITF protein in UM90, OCM290 and C918 cells. ** $P < 0.01$ vs UM90 group.

图1 MITF在葡萄膜黑色素瘤细胞中的mRNA和蛋白水平均较高

Fig.1 The mRNA and protein levels of MITF in uveal melanoma cells were higher

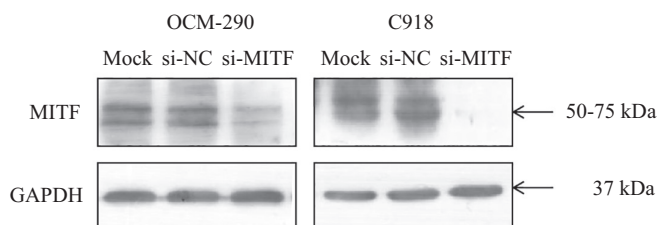


图2 Western blot实验检测转染si-MITF后OCM-290和C918细胞内MITF蛋白表达水平

Fig.2 The expression of MITF protein in OCM-290 and C918 cells transfected with si-MITF were detected by Western blot

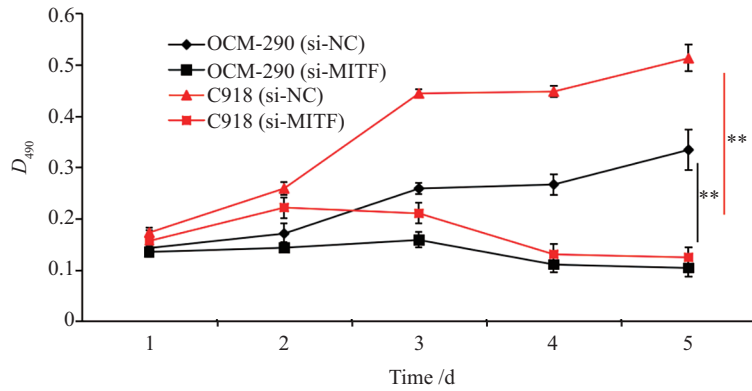
MTS法检测细胞转染si-MITF或si-NC 1~5天后的 D 值, 绘制1~5天的细胞生长曲线发现, 下调MITF的表达能显著抑制OCM-290和C918细胞的增殖能力, 从第3天起出现统计学差异, 且第5天的抑制率(OCM-290: 抑制率=69%, C918: 抑制率=76%)最明显。

2.4 转染si-MITF对葡萄膜黑色素瘤细胞平板克隆形成能力的影响

与转染si-NC组相比, 转染si-MITF后OCM-290和C918细胞克隆数明显减少, 且克隆大小明显减小。因此, 下调MITF的表达水平能明显抑制葡萄膜黑色素瘤细胞的克隆形成能力(图4)。

2.5 转染si-MITF对葡萄膜黑色素瘤细胞周期的影响

通过流式细胞技术检测转染si-MITF或si-NC后, OCM-290和C918细胞周期各时期的分布情况, 结果(图5A和图5B)显示, 下调MITF后OCM-290细胞处于 G_1 期细胞数量比例为76.11%, 显著高于si-NC组的57.09%, 且具有统计学差异($P < 0.01$)。下调MITF后C918细胞处于 G_1 期细胞数量比例为61.42%, 明显高于si-NC组的50.86%, 均有统计学意义($P < 0.01$)。这一结果表明, 下调MITF能促使葡萄膜黑色素瘤细胞发生 G_1 期阻滞, 使细胞不能顺利进展到下个阶段, 从而抑制细胞增殖。



** $P < 0.01$.

图3 MTS方法检测转染si-MITF 1~5天后对OCM-290和C918细胞增殖能力的影响

Fig.3 MTS cell proliferation assay shows 1-5 day after transfection of si-MITF affected the proliferation of OCM-290 and C918 cells

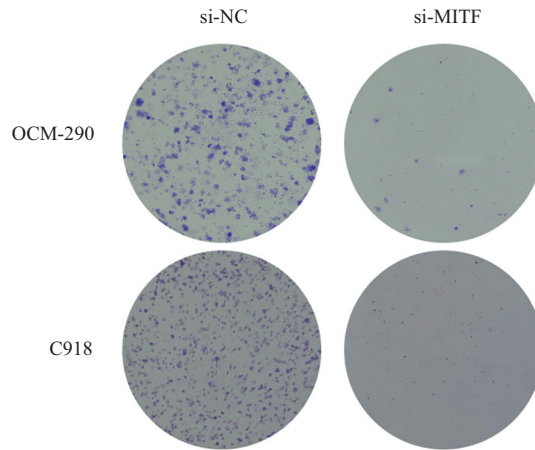
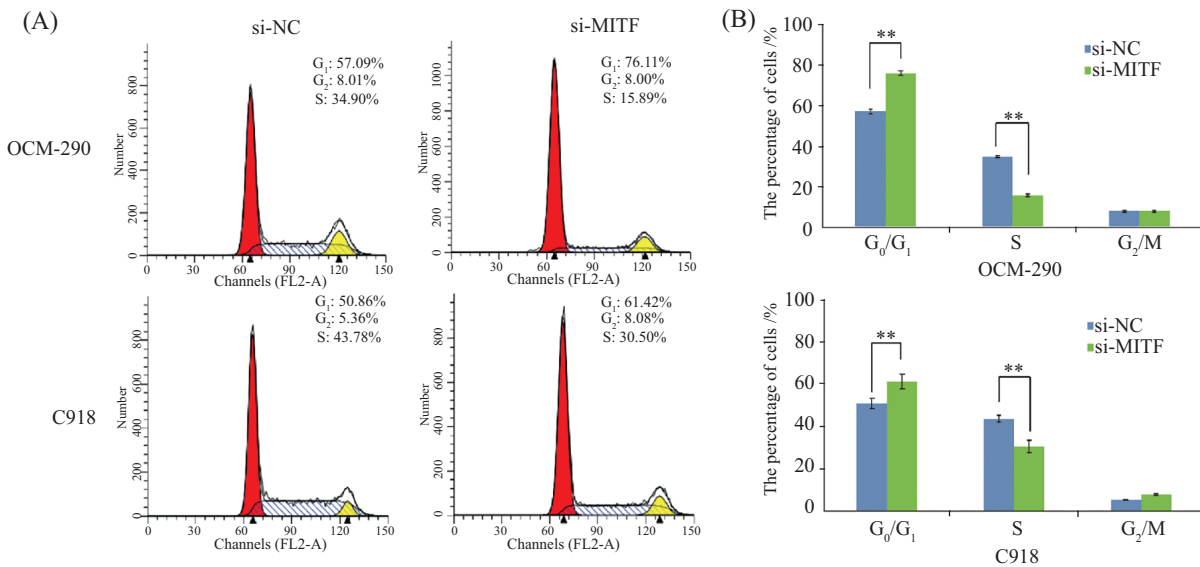


图4 转染si-MITF后对OCM-290和C918细胞克隆形成能力的影响

Fig.4 The effect of si-MITF transfection on the colony formation of OCM-290 and C918 cells



A: 流式细胞技术检测转染si-MITF后对OCM-290和C918细胞周期的影响; B: 细胞在各周期的比例统计分析。 ** $P < 0.01$, 与阴性对照组比较。

A: flow cytometry assay shows transfection of si-MITF affected the cell cycle of OCM-290 and C918 cells; B: statistical analysis of the proportion of cells in each phase of cell cycle. ** $P < 0.01$ vs si-NC group.

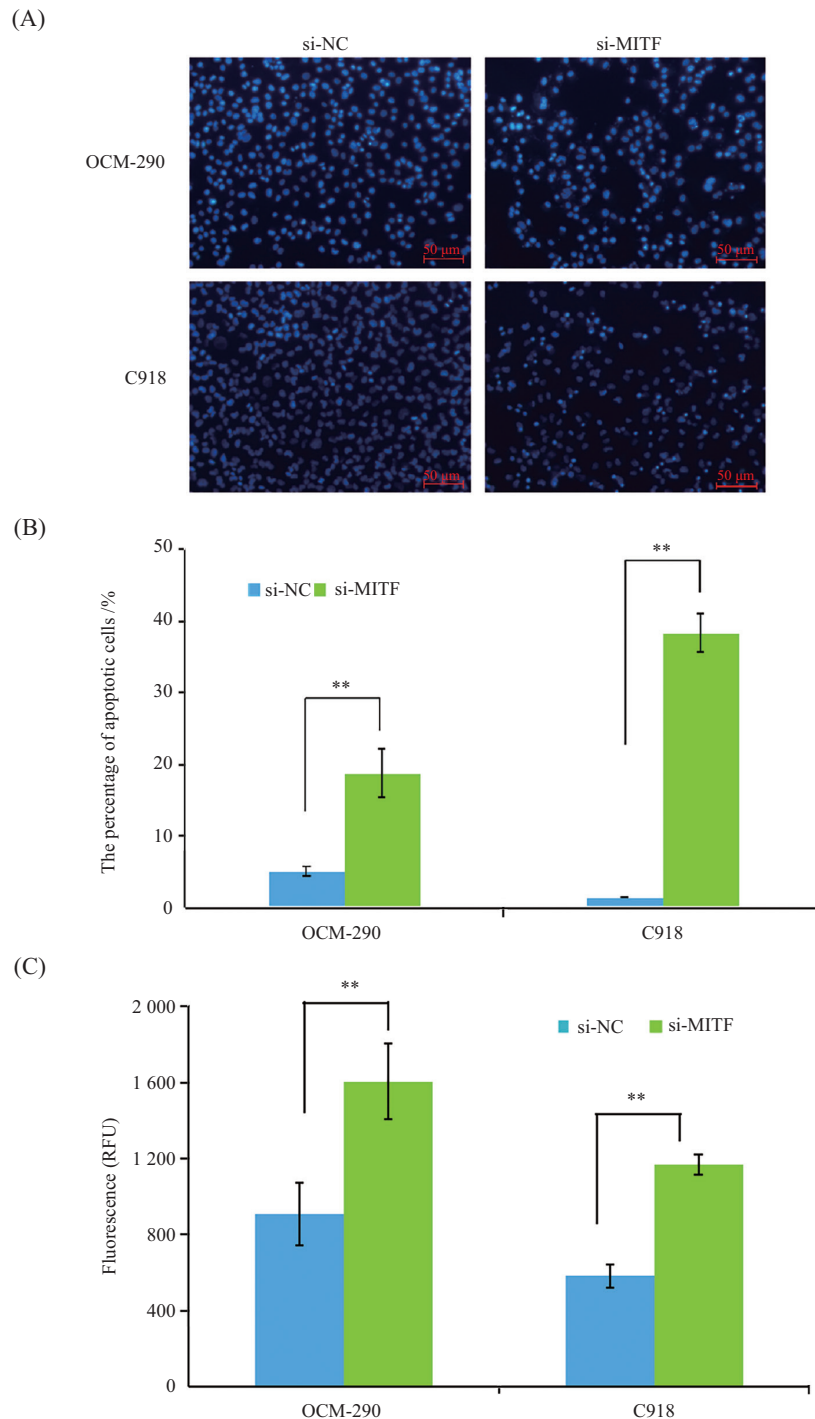
图5 转染si-MITF后对OCM-290和C918细胞周期的影响

Fig.5 The effect of si-MITF transfection on the cell cycle of OCM-290 and C918 cells

2.6 转染si-MITF对葡萄膜黑色素瘤细胞凋亡水平的影响

通过Hoechst染料对转染si-MITF或si-NC 48 h后的OCM-290和C918细胞进行染色分析。当细胞

发生凋亡时,细胞核或细胞质内会出现浓染致密的荧光颗粒物,Hoechst结果(图6A和图6B)显示,与阴性对照相比,转染si-MITF后OCM-290和C918细胞出现凋亡的细胞数显著上升,且具有统计学意义



A: Hoechst荧光染色检测转染si-MITF后OCM-290和C918细胞凋亡情况; B: 凋亡细胞的量化统计; C: Caspase 3/7活性检测转染si-MITF后OCM-290和C918细胞凋亡情况。** $P < 0.01$ 。

A: Hoechst fluorescence staining assay shows transfection of si-MITF affected the apoptosis of OCM-290 and C918 cells; B: quantitative statistics of decomposed cells; C: Caspase 3/7 activity detection of apoptosis of OCM-290 and C918 cells after transfection with si-MITF. ** $P < 0.01$.

图6 下调MITF促进葡萄膜黑色素瘤细胞发生凋亡

Fig.6 Down-regulation of MITF promotes apoptosis of uveal melanoma cells

($P < 0.01$)。

Caspase 3和Caspase 7是凋亡信号通路中的关键效应因子。在凋亡的细胞中, Caspase 3/7活性增强, 将试剂中的肽底物C末端序列剪切, 产生荧光信号, 该信号强度与Caspase 3/7的活性成正比。我们对转染si-MITF 48 h的OCM-290和C918进行Caspase 3/7活性检测发现, 与转染了si-NC比, 细胞液的荧光强度增强(图6C), 即转染了si-MITF的细胞其Caspase 3/7活性增强, 这一实验结果也表明, si-MITF可以促进OCM-290和C918细胞的凋亡, 且具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.7 转染si-MITF对葡萄膜黑色素瘤细胞迁移及侵袭能力的影响

葡萄膜黑色素瘤细胞具有很强的迁移及侵袭能力。本实验中使用含10% FBS的细胞完全培养基作为细胞迁移诱导因子, 使用RTCA xCELLigence DP实时检测OCM-290和C918细胞的动态迁移及侵袭情况。图7A展示了RTCA获得的细胞迁移实时检测结果, 转染了si-MITF的OCM-290和C918细胞较转染了si-NC的细胞, CI值明显降低, 且具有明显的统计学差异($P < 0.01$)。图7B显示转染了si-MITF的OCM-290和C918细胞, 其穿透基质胶的能力减弱, 说明其侵袭能力受到抑制, 且具有明显的统计学差异($P < 0.01$)。

2.8 转染si-MITF对葡萄膜黑色素瘤细胞内相关蛋白表达水平的影响

下调MITF后, 葡萄膜黑色素瘤细胞的增殖能力受到显著抑制, 并且细胞发生G₁期阻滞。因此, 推测转染后细胞内周期相关蛋白的表达水平应该会随MITF的下调而改变。通过Western blot检测发现, 与阴性对照组相比, 转染 si-MITF后 OCM-290和C918细胞内 p-FAK、p-ERK、p-Rb、CDK2、CDK6、Cyclin D2及Cyclin E2的蛋白表达水平都有不同程度的下调(图8)。

3 讨论

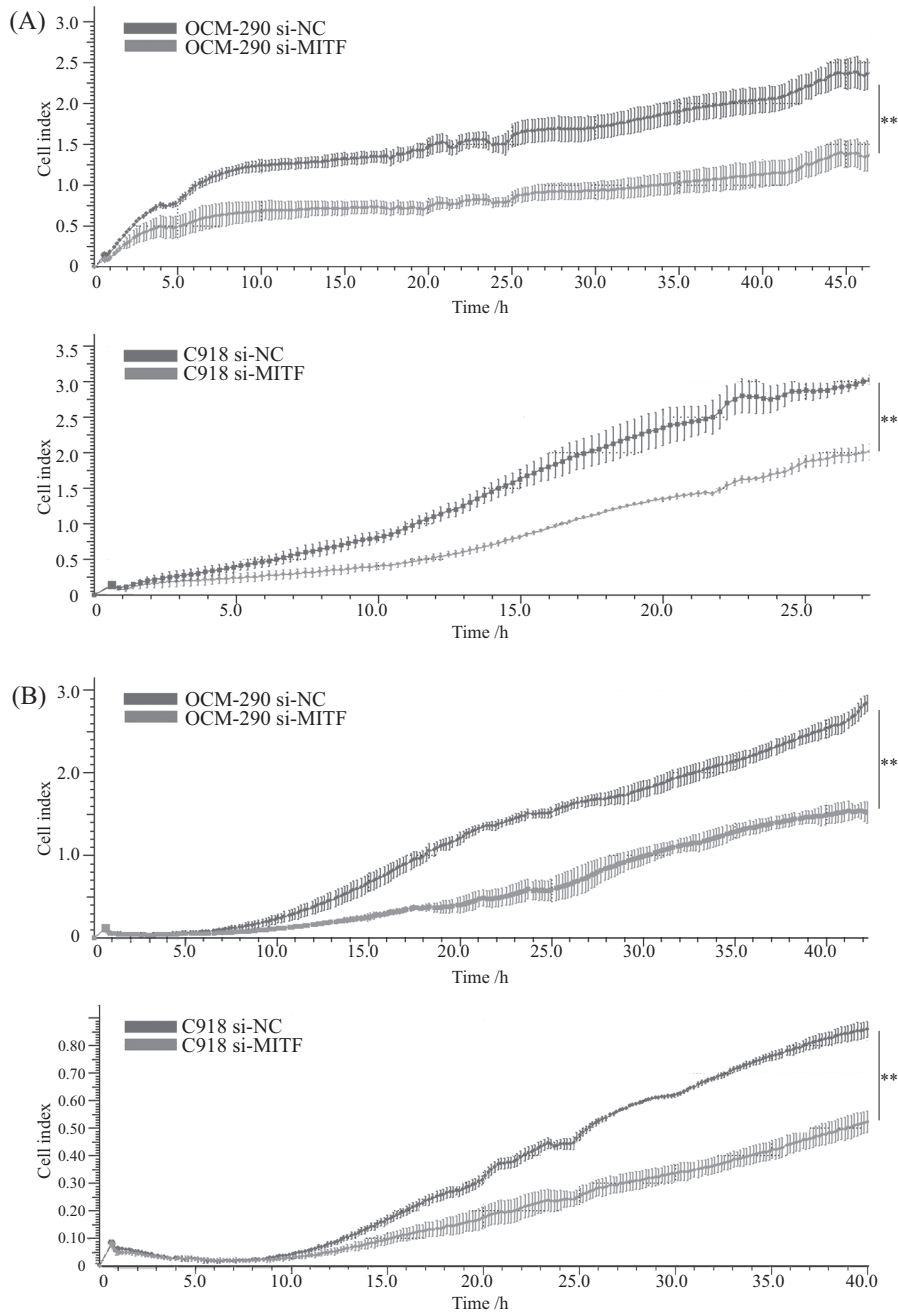
*mitf*基因最早是由HERTWIG等在放射诱导的突变小鼠中发现的, 该基因突变后会导致小鼠小眼畸形、早发性耳聋、皮毛色素及虹膜色素异常等现象。由于突变基因存在于小鼠*mi*位点, 因此被命名为*mi*基因^[15-16]。人类的MITF基因位于3号染色体上, 属于bHLH转录因子家族, 由至少10个亚型组成^[17]。

MITF参与了生物体生长、发育、分化和功能调节等各个方面, 它不仅影响黑色素细胞, 还会影响破骨细胞、肥大细胞、视网膜色素上皮细胞以及心肌细胞和β细胞, 该基因的缺失将会导致一系列的表型异常^[18-21]。

MITF除了在正常黑色素细胞中发挥调节功能外, 还在黑色素瘤中发挥着至关重要的作用。它通过直接调控一系列广泛的基因控制着黑色素瘤细胞的增殖、侵袭和转移, 这些基因表达后的蛋白包含细胞周期调控因子[BRCA1(breast cancer 1)、PPARGC1A(peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha)、CDK2、CDKN1A(cyclin-dependent kinase inhibitor 1A)、CAKN2A(cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)等, 凋亡、分化、转移相关蛋白(BCL2、BCL2A1、c-Met)等^[22-27]。葡萄膜黑色素瘤是一种起源于葡萄膜黑色素细胞的恶性肿瘤, 是成年人眼内最常见的原发性恶性肿瘤, 它的特点是恶性程度高, 且易发生转移。本研究通过qRT-PCR和Western blot技术分析发现葡萄膜黑色素瘤细胞内MITF的mRNA水平和蛋白水平都明显高于葡萄膜黑色素细胞。这表明, 在葡萄膜黑色素瘤的形成过程中, MITF发挥着癌基因的作用。

si-RNA干扰技术下调葡萄膜黑色素瘤细胞内MITF的表达水平, 可以显著抑制葡萄膜黑色素瘤细胞的增殖和克隆形成能力, 并且使细胞周期发生G₁期阻滞。细胞增殖是活细胞的重要生理功能之一, 是生物体生长、发育、繁殖以及遗传的基础。人类体细胞进行有丝分裂是有周期性的, 也就是具有细胞周期。细胞周期是指连续分裂的细胞从一次有丝分裂结束开始到下一次有丝分裂完成所经历的整个过程, 这个过程分为四个时期: G₁、S、G₂、M, 细胞周期时间的长短主要由G₁期决定^[28-29]。本研究表明, MITF可能是通过调控细胞周期的进程从而影响肿瘤细胞的增殖能力。

通过Western blot技术分析发现下调了MITF蛋白后, 葡萄膜黑色素瘤细胞内周期相关蛋白Rb蛋白的磷酸化水平明显下调, CDK2、CDK6、Cyclin D2、Cyclin E2也出现不同程度的下调。对各种真核生物的研究结果表明, 细胞分裂周期的进展是由CDK通过使特异底物磷酸化调节的, CDK的活性依赖与细胞周期素(cyclin)结合形成复合物。CDK2主



A: RTCA实时监测转染si-MITF后OCM-290及C918细胞迁移能力的改变情况; B: RTCA实时监测转染si-MITF后OCM-290及C918细胞侵袭能力的改变情况。 ** $P < 0.01$, 与阴性对照组比较。

A: RTCA monitored the changes in the migration ability of ocm-290 and C918 cells after transfection with si-MITF in real time; B: RTCA monitored the invasion ability of ocm-290 and C918 cells after transfection of si-MITF in real time. ** $P < 0.01$ vs si-NC group.

图7 下调MITF抑制葡萄膜黑色素瘤细胞的迁移及侵袭

Fig.7 Down-regulation of MITF inhibits migration and invasion of uveal melanoma cells

要功能是与Cyclin A、E、D等结合调节 G_1/S 转换。CDK6的主要功能是与Cyclin D形成复合物控制 G_0/G_1 和 G_1/S 的转换^[28-29]。DU等^[26]发现在一系列黑色素瘤细胞系和黑色素瘤样本中, MITF和CDK2的表达水平是紧密相关的, 且CDK2是MITF直接作用的重要的靶基因。本研究结果表明, MITF可能通过直接

或间接的方式调控下游周期相关蛋白的表达从而影响葡萄膜黑色素瘤细胞的增殖能力。

通过Hoechst染色发现, MITF下调后可以促使葡萄膜黑色素瘤细胞发生凋亡。Caspase3/7活性检测发现, MITF下调后可以促使葡萄膜黑色素瘤细胞的Caspase3/7活性增强。MCGILL等^[6]通过染色质免

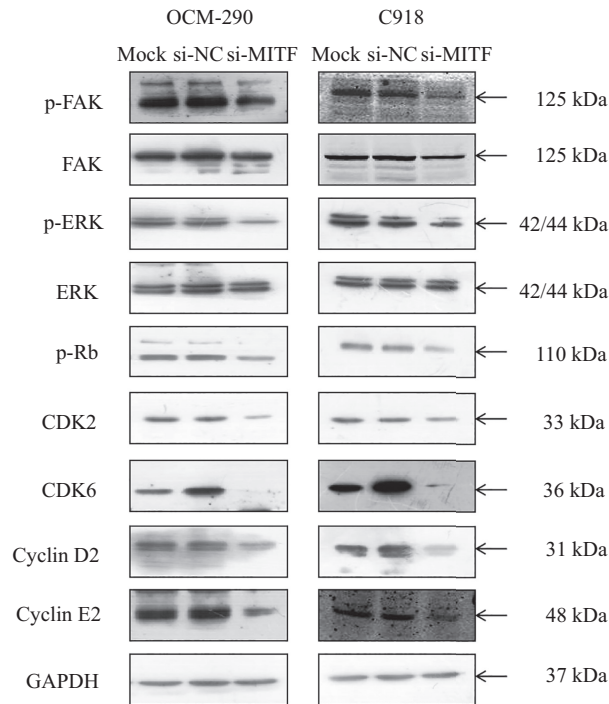


图8 转染si-MITF对OCM-290和C918细胞周期、增殖及迁移相关蛋白水平的影响

Fig.8 The effect of transfection of si-MITF on the proliferation and migration-related protein levels of OCM-290 and C918 cells

疫共沉淀法证实,在黑色素细胞和黑色素瘤细胞中BCL2受MITF直接调控。干扰MITF的表达后将会引发黑色素瘤细胞凋亡,而过表达BCL2可以部分挽救凋亡的发生。HAQ等^[30]发现,抗凋亡的BCL2家族成员BCL2A1在30%的黑色素瘤中明显扩增,同时BCL2A1的表达水平受黑色素瘤基因MITF的直接转录调控且这种现象仅限发生于黑色素瘤中。

通过RTCA xCELLigence DP检测系统发现,MITF下调后还可以抑制葡萄膜黑色素瘤细胞的迁移及侵袭能力。YING等^[31]发现,miR-21通过靶向p53及其下游蛋白影响葡萄膜黑色素瘤细胞OCM-1、M619及MuM-2B的迁移及侵袭能力。MITF与黑色素瘤的肿瘤微环境关系密切^[32],上调MITF的表达会促进黑色素瘤发生发展^[33],BEMIS等^[34]发现,通过增加miR-137的表达量,能显著下调MITF,因而可将miR-137作为MITF的调节子。

FAK与ERK是MAPK/ERK信号通路中的重要因子,而该级联激活是多种信号通路的中心,是接收膜受体转换与传递的信号并将其带入细胞核内的一类重要分子,在许多细胞增殖及迁移相关信号通路中具有关键作用。在未受刺激的细胞内,MAPK处于静止状态。细胞受到生长因子或其他因素刺激后,MAPK

接收活化信号被激活,表现为逐级磷酸化^[35-37]。本研究发现,下调MITF后,OCM-290和C918细胞中p-FAK和p-ERK1/2的表达水平都降低。该结果表明,MITF可能通过影响MAPK/ERK信号通路影响葡萄膜黑色素瘤细胞的增殖、迁移及侵袭能力。

综上所述,在葡萄膜黑色素瘤中下调MITF的表达水平可以抑制瘤细胞的增殖能力,使细胞发生G₁期阻滞,同时促使细胞发生凋亡。MITF可能通过调控细胞周期调控因子,影响MAPK/ERK信号通路,从而在葡萄膜黑色素瘤的发生发展过程中发挥重要作用。深入研究探讨MITF参与调控葡萄膜黑色素瘤的分子机制,将为该疾病的靶向治疗提供新的理论依据。

参考文献 (References)

- [1] GODING C R. Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(14): 1712-28.
- [2] GODING C R. Melanocyte development and malignant melanoma [J]. *Forum (Genova)*, 2000, 10(3): 176-87.
- [3] CHELI Y, OHANNA M, BALLOTTI R, et al. Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2010, 23 (1): 27-40.
- [4] SHIBAHARA S, TAKEDA K, YASUMOTO K, et al. Microph-

- thalmia-associated transcription factor (MITF): multiplicity in structure, function, and regulation [J]. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2001, 6(1): 99-104.
- [5] KAWAKAMI A, FISHER D E. The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology [J]. *Lab Invest*, 2017, 97(6): 649-56.
- [6] MCGILL G G, HORSTMANN M, WIDLUND H R, et al. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability [J]. *Cell*, 2002, 109(6): 707-18.
- [7] GARRAWAY L A, WIDLUND H R, RUBIN M A, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma [J]. *Nature*, 2005, 436(7047): 117-22.
- [8] GOODALL J, CARREIRA S, DENAT L, et al. Brn-2 represses microphthalmia-associated transcription factor expression and marks a distinct subpopulation of microphthalmia-associated transcription factor-negative melanoma cells [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(19): 7788-94.
- [9] SINGH A D, BERGMAN L, SEREGARD S. Uveal melanoma: epidemiologic aspects [J]. *Ophthalmol Clin North Am*, 2005, 18(1): 75-84.
- [10] KALIKI S, SHIELDS C L. Uveal melanoma: relatively rare but deadly cancer [J]. *Eye (Lond)*, 2017, 31(2): 241-57.
- [11] SINGH A D, TURELL M E, TOPHAM A K. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival [J]. *Ophthalmology*, 2011, 118(9): 1881-5.
- [12] LEVY C, FISHER D E. Dual roles of lineage restricted transcription factors: the case of MITF in melanocytes [J]. *Transcription*, 2011, 2(1): 19-22.
- [13] CHEN X, WANG J, SHEN H, et al. Epigenetics, microRNAs, and carcinogenesis: functional role of microRNA-137 in uveal melanoma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(3): 1193-9.
- [14] YAN D, DONG X D, CHEN X, et al. Role of microRNA-182 in posterior uveal melanoma: regulation of tumor development through MITF, BCL2 and cyclin D2 [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40967.
- [15] TACHIBANA M. MITF: a stream flowing for pigment cells [J]. *Pigment Cell Res*, 2000, 13(4): 230-40.
- [16] ARNHEITER H. The discovery of the microphthalmia locus and its gene, Mitf [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2010, 23(6): 729-35.
- [17] HEMESATH T J, STEINGRIMSSON E, MCGILL G, et al. microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family [J]. *Genes Dev*, 1994, 8(22): 2770-80.
- [18] STEINGRIMSSON E, MOORE K J, LAMOREUX M L, et al. Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences [J]. *Nat Genet*, 1994, 8(3): 256-63.
- [19] STEINGRIMSSON E, COPELAND N G, JENKINS N A. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network [J]. *Annu Rev Genet*, 2004, 38: 365-411.
- [20] TSHORI S, GILON D, BEERI R, et al. Transcription factor MITF regulates cardiac growth and hypertrophy [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(10): 2673-81.
- [21] MAZUR M A, WINKLER M, GANIC E, et al. Microphthalmia transcription factor regulates pancreatic beta-cell function [J]. *Diabetes*, 2013, 62(8): 2834-42.
- [22] HERSHEY C L, FISHER D E. Genomic analysis of the Microphthalmia locus and identification of the MITF-J/Mitf-J isoform [J]. *Gene*, 2005, 347(1): 73-82.
- [23] HOEK K S, SCHLEGEL N C, EICHHOFF O M, et al. Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2008, 21(6): 665-76.
- [24] STRUB T, GIULIANO S, YE T, et al. Essential role of microphthalmia transcription factor for DNA replication, mitosis and genomic stability in melanoma [J]. *Oncogene*, 2011, 30(20): 2319-32.
- [25] LEVY C, KHALED M, ROBINSON K C, et al. Lineage-specific transcriptional regulation of DICER by MITF in melanocytes [J]. *Cell*, 2010, 141(6): 994-1005.
- [26] DU J, WIDLUND H R, HORSTMANN M A, et al. Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF [J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(6): 565-76.
- [27] MCGILL G G, HAQ R, NISHIMURA E K, et al. c-Met expression is regulated by Mitf in the melanocyte lineage [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(15): 10365-73.
- [28] SCHAFER K A. The cell cycle: a review [J]. *Vet Pathol*, 1998, 35(6): 461-78.
- [29] VERMEULEN K, VAN BOCKSTAELE D R, BERNEMAN Z N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer [J]. *Cell Prolif*, 2003, 36(3): 131-49.
- [30] HAQ R, YOKOYAMA S, HAWRYLUK E B, et al. BCL2A1 is a lineage-specific antiapoptotic melanoma oncogene that confers resistance to BRAF inhibition [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(11): 4321-6.
- [31] WANG Y C, YANG X, WEI W B, et al. Role of microRNA-21 in uveal melanoma cell invasion and metastasis by regulating p53 and its downstream protein [J]. *Int J Ophthalmol*, 2018, 11(8): 1258-68.
- [32] HARTMAN M L, TALAR B, GAJOS-MICHNIEWICZ A, et al. MCL-1, BCL-XL and MITF are diversely employed in adaptive response of melanoma cells to changes in microenvironment [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e128796.
- [33] MARGUE C, PHILIPPIDOU D, REINSBACH S E, et al. New target genes of MITF-induced microRNA-211 contribute to melanoma cell invasion [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73473.
- [34] BEMIS L T, CHEN R, AMATO C M, et al. MicroRNA-137 targets microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cell lines [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(5): 1362-8.
- [35] PARSONS J T, MARTIN K H, SLACK J K, et al. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement [J]. *Oncogene*, 2000, 19(49): 5606-13.
- [36] KIM E K, CHOI E J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(4): 396-405.
- [37] DE LUCA A, MAIELLO M R, D'ALESSIO A, et al. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, doi: 10.1517/14728222.2011.639361.