

HGF调控葡萄膜黑色素瘤细胞迁移的分子机制研究

朱鲜 郑丹丹 侯强*

(温州医科大学眼视光学院/附属眼视光医院, 温州 325000)

摘要 肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)对葡萄膜黑色素瘤(uveal melanoma, UM)的进展发挥着重要作用, 该文旨在研究HGF调控UM细胞迁移的分子机制。通过基因芯片分析, 筛选了一系列受HGF调控且与迁移相关的基因; 定量PCR、Western blot实验验证基因芯片结果, 发现HGF抑制了神经纤维瘤蛋白(NF2)和金属蛋白酶3组织抑制剂(TIMP3)基因编码的mRNA和蛋白水平; 使用siRNA转染UM细胞, 干扰候选基因NF2和TIMP3的表达, 检测其对UM细胞迁移能力的影响, 细胞迁移实验发现了下调NF2和TIMP3基因的表达增强了UM细胞的迁移能力。这些结果说明HGF通过影响NF2和TIMP3基因编码的蛋白表达来介导UM细胞的迁移。

关键词 葡萄膜黑色素瘤; HGF; 迁移; NF2; TIMP3

Molecular Mechanism of HGF Mediating Cell Migration in Uveal Melanoma

ZHU Xian, ZHENG Dandan, HOU Qiang*

(School of Ophthalmology and Optometry, Eye Hospital, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

Abstract HGF (hepatocyte growth factor) plays an important role in the progression of UM (uveal melanoma). This study aimed to investigate the molecular mechanism by which HGF regulates UM cell migration. A series of migration-related genes regulated by HGF were screened by microarray analysis. Quantitative PCR and Western blot experiments verified the results of gene microarray, and it was found that HGF inhibited the levels of mRNAs and proteins encoded by *NF2* (neurofibromatoprotein) and *TIMP3* (tissue inhibitor of metalloproteinase 3) genes. UM cells were transfected with siRNA to interfere with the expression of candidate genes *NF2* and *TIMP3*, and their effects on the migration ability of UM cells were detected. Cell migration experiments showed that down-regulating the expression of *NF2* and *TIMP3* genes enhanced the migration ability of UM cells. These results suggest that HGF mediates UM cell migration by influencing the expression of proteins encoded by the *NF2* and *TIMP3* genes.

Keywords uveal melanoma; HGF; migration; *NF2*; *TIMP3*

葡萄膜黑色素瘤(uveal melanoma, UM)由眼内的黑色素细胞恶变引起, 是成人眼内最常见的原发性肿瘤^[1], 约一半的患者会通过血液发生转移, 90%的病例累及肝脏, 在黑色素瘤中居第二位, 仅次于皮肤黑色素瘤^[2-3]。目前, 眼球保守治疗对原位癌患者效果理想, 但是对于转移性UM患者尚没有较好的治

疗方案。近年来有研究表明, 肿瘤细胞的迁移、侵袭和转移过程与肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)有关^[4]。HGF是一种可调节多种细胞生长、运动和形态发生的多功能因子^[5], UM主要转移至肝脏, 与HGF密不可分^[6]。在体内, HGF与其特异酪氨酸激酶受体c-Met结合, 从而传递信号发挥生物

收稿日期: 2024-11-20

接受日期: 2025-01-13

浙江省自然科学基金探索项目(批准号: LY21H120006)资助的课题

*通信作者。Tel: 13676513563, E-mail: houqiang@wmu.edu.cn

Received: November 20, 2024

Accepted: January 13, 2025

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province of China (Grant No. LY21H120006)

*Corresponding author. Tel: +86-13676513563, E-mail: houqiang@wmu.edu.cn

学功能^[7], HGF/c-Met信号轴促进了UM细胞的迁移和侵袭, 并且c-Met抑制剂PHA665752可以抑制这一现象^[8], 也有研究发现, 曲美替尼处理UM细胞, 显著降低了其增殖和活力, 而HGF可以阻断该作用^[9]。这说明对于UM的发生发展, HGF/c-Met起着至关重要的作用, 但是对该信号轴促进UM细胞转移的分子机制还不清楚。本研究通过基因芯片分析, 筛选出了受HGF调控的基因, 并且通过干扰这些基因编码的蛋白, 研究了其对UM的影响, 初步阐明了HGF影响UM细胞迁移的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人眼UM细胞系M17和SP6.5均来源于高加索病人, 分别由美国纽约大学附属眼耳医院胡诞宁教授和加拿大魁北克免疫研究中心GUY PEL-LETIER惠赠。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、0.25%胰酶和DMEM培养基购自美国Gibco公司; 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、结晶紫染液和30%丙烯酰胺购自美国Sigma公司; BCA蛋白浓度测定试剂盒购自美国ThermoFisher Scientific公司; Power SYBR[®] Green PCR Master Mix购自英国Applied Biosystems公司; TaKaRa EX Taq[®] DNA Polymerase购自大连宝生物工程有限公司; Transwell小室购自美国Costar公司; Merlin(1:1 000, 羊抗兔, 货号12888T)、TIMP3(1:500, 羊抗兔, 货号5673T)、 α -E-Catenin(1:1 000, 羊抗兔, 货号36611T)和VEGFR-3(1:1 000, 羊抗兔, 货号33566T)抗体购自Cell Signaling Technology公司; GPR54(1:2 000, 羊抗兔, 货号ab100896)和MMP10(1:2 000, 羊抗兔, 货号ab38930)抗体购自Abcam公司; HGF、 β -actin(1:4 000, 羊抗鼠, 货号MAB8969-SP)购自R&D Systems公司; 辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000)均购自Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 差异基因的表达检测 将UM细胞系SP6.5和M17使用HGF处理0、1和24 h, Trizol裂解细胞, 提取RNA, 再逆转录为cDNA, 标记cDNA; 将标记的cDNA与基因芯片杂交, 之后洗涤芯片, 使用芯片扫描仪进行扫描, 获取荧光信号强度, 对扫描得到的结果进行基因差异表达筛选。

1.2.2 定量PCR 将细胞密度为30%的UM细胞

系SP6.5和M17接种于6孔板中, 第二天饥饿细胞12 h, 使用HGF处理24 h, Trizol裂解细胞, 4 °C下提取RNA, 再逆转录为cDNA, 按照反应体系2× SYBR Green PCR缓冲液(10 μ L)+Primer 1(0.5 μ L)+Primer 2(0.5 μ L)+cDNA(0.6 μ L)+NFH₂O(定量至20 μ L)进行cDNA扩增, 反应程序: 95 °C预变性15 min; 95 °C变性15 s; 60 °C退火1 min; 75 °C延伸1 min, 循环40次。根据扩增结果, 计算出Ct值, 最后使用ABI PRISM7500 SDS Software做相对定量分析。引物对应序列为NF2: Forward 5'-CAA GAC GTT CAC CGT GAGGA-3', Reverse 5'-ATT TTG AGC CAG GCC ACT GT-3'; TIMP3: Forward 5'-TTC TGC AAC TCC GAC ATC GT-3', Reverse 5'-CAT CTT GGT GAA GCC TCG GT-3'; CTNNA1: Forward 5'-CTA CTG CCA CCA GCT GAA CA-3', Reverse 5'-TTG GTA GAG GCG ACG TAG GA-3'; GPR54: Forward 5'-GAC CGT GAC CAA CTT CTA C-3', Reverse 5'-CGA GAC CTG CTG GAT GTA-3'; FLT4: Forward 5'-CGT CAT CGC TGT CTT CTT-3', Reverse 5'-GGT ATT CGC ATT GCT CCT-3'; MMP10: Forward 5'-TAT CCA AGA GGC ATC CAT AC-3', Reverse 5'-TCA ACC TTA GGC TCA ACT C-3'; GAPDH: Forward 5'-TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT-3', Reverse 5'-CAT GTG GGC CAT GAG TCC ACC AC-3'。

1.2.3 Western blot实验 于6孔板中铺入细胞密度为30%的UM细胞, 隔天饥饿细胞12 h, 再使用40 ng/mL HGF处理24 h, SDS裂解液裂解细胞, 收集蛋白。将蛋白在0 °C下超声, 功率300 W, 超声8 s, 间隔5 s, 超声2次, 至溶液无黏稠状为止, BCA法测定蛋白浓度, 绘制标准曲线并求出待测样品浓度, 将蛋白样品放在100 °C的容器上煮5 min使蛋白质变性, 将处理好的蛋白样品加入上样孔, 使用8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白质并将其印迹到NC膜上, 使用丽春红染料将NC膜染色, 裁取需要的条带, 洗去丽春红染液, 常温封闭2 h, 孵育需要检测的一抗(稀释比例TIMP3: 1:500; Merlin: 1:1 000; α -E-Catenin: 1:1 000; GPR54: 1:2 000; MMP10: 1:2 000; VEGFR-3: 1:1 000; β -actin: 1:4 000), 4 °C过夜, 用PBST洗3次, 10 min/次, 孵育相应二抗(兔和鼠二抗稀释比例均为1:2 000), 室温孵育2 h, 用PBST洗3次, 10 min/次, 并通过ECL化学发光底物试剂盒检测免疫反应。

1.2.4 细胞转染 将密度为10%的UM细胞接种于6

孔板内,于37℃、5% CO₂培养箱中培养,24 h后开始转染。先配制转染液,A管:将10 μL siRNA或NC溶于250 μL Opti-mem无血清培养基中;B管:将4 μL Lipo 2000溶于250 μL Opti-mem无血清培养基中,混匀室温放置5 min,最后将A和B管混合,室温放置20 min。将孔板中的培养基换成1 500 μL无血清的DMEM,最后将配好的转染液加入孔板内,放于37℃、5% CO₂培养箱中培养。

1.2.5 细胞迁移实验 按30%~40%的密度将细胞接种于6孔板中,于37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h后,饥饿细胞24 h,再相应处理一定时间。下室为在24孔板中加入含药物的DMEM共600 μL,Transwell小室放于该孔板上,将200 μL含2×10⁴个细胞的细胞悬液加入上室中,继续培养24 h,取出小室,弃去上室液体。在常温下,使用4%多聚甲醛溶液固定30 min、结晶紫溶液染色10 min,清水洗去多余染色液,100 μL枪头轻轻刮去小室上室中的细胞,并用湿润的棉签轻轻擦拭干净,用显微镜观察小室下层细胞,随机选取5个视野拍照并计数。

1.3 统计学分析

实验数据用均值±标准误(mean±SD)表示,所有实验对象至少3个样本,经正态性检验后,两组独立样本间采用*t*检验,以*P*<0.05代表统计学有意义。

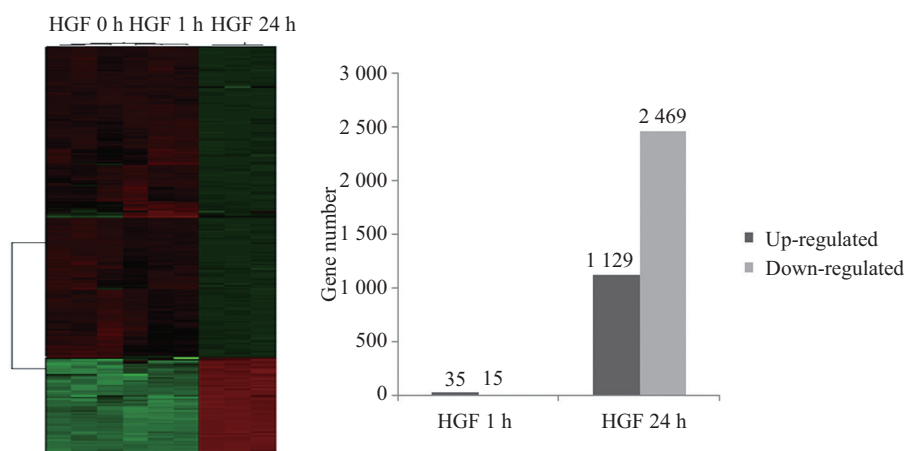
2 结果

2.1 基因芯片分析筛选出了相关基因

有研究表明,UM主要转移至肝脏,与HGF和胰

岛素样生长因子1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)有关^[6]。另外,也有研究报道HGF通过过度激活ARF6促进UM的侵袭^[10]。为了进一步研究HGF对UM迁移和侵袭的分子机制,我们进行了基因芯片的检测和分析。将细胞系SP6.5和M17通过HGF处理0、1和24 h后,提取RNA,进行基因芯片分析各组mRNA表达谱的差异。基因芯片微阵列检测显示,与对照组相比,经HGF处理1 h的UM细胞差异表达上调基因只有35个,下调基因只有15个;而经HGF处理24 h的UM细胞差异表达上调基因有1 129个,下调基因有2 469个(图1)。由此,我们推断在HGF作用1 h的时候,下游的一些基因可能处于一种活化状态,并未呈现出差异表达的情况,在HGF作用24 h后,才呈现差异表达。

因此,我们从HGF处理24 h组别中,根据探针在所有芯片间的讯号最大值与讯号最小值的差异[log₂(ratio)≥1和*P*-value(differentially expressed)<0.05]筛选出前50个基因探针进行生物学分析。首先进行GO分析,即从细胞组分、分子功能及生物学过程方面对以上差异基因进行分类。在细胞组分中差异基因在细胞膜(membrane-enclosed lumen)、细胞器(organelle lumen)、胞内细胞器(intracellular organelle lumen)及染色体(chromosome)中的变化比较显著(图2A);在分子功能分类中,差异基因分布最高的为核苷酸结合位点(nucleotide binding)(图2B);在生物学过程中,差异基因富集于细胞周期(cell cycle)、有丝分裂(mitosis)、细胞器裂变(organelle fission)、核



A: 差异表达基因mRNA的聚类分析。B: 差异基因的表达情况。

A: cluster analysis of differentially expressed gene mRNA. B: the expression of differential genes.

图1 基因芯片中差异表达基因

Fig.1 Differentially expressed genes in gene chip

分裂(nuclear division)等(图2C)。结合KEGG数据库,对基因芯片中250个差异表达的基因进行Pathway分析,发现参与的信号通路主要涉及癌症途径(pathways in cancer)、细胞周期(cell cycle)、胶质瘤(glioma)通路、小细胞肺癌(small cell lung cancer)通路、p53信号通路(p53 signaling pathway)和DNA复制(DNA replication)等(图2D)。

2.2 HGF抑制NF2和TIMP3基因编码的mRNA表达

根据以上差异表达基因涉及的不同功能,我们选择6个感兴趣的差异表达基因(*NF2*、*TIMP3*、*CTNNA1*、*FLT4*、*GPR54*、*MMP10*)进行定量PCR验证,根据各自mRNA序列设计引物,以*GAPDH*作为内参,通过定量PCR结果显示:经HGF处理以后,*CTNNA1*、*NF2*、*TIMP3*和*FLT4*这4个基因的mRNA表达下降;*GPR54*和*MMP10*这2个基因的mRNA表达

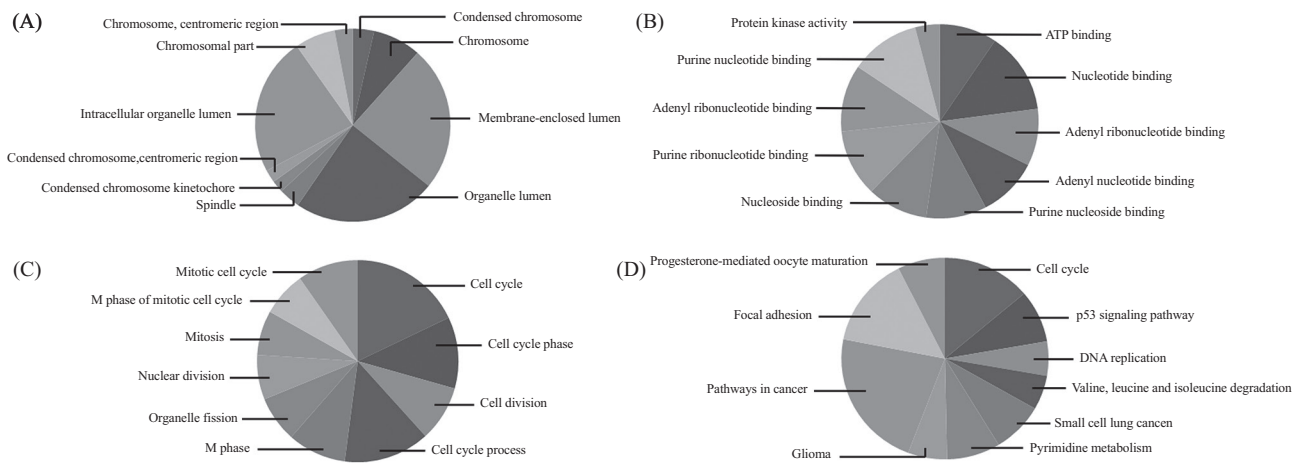
水平上升(图3),与芯片检测结果相符。

2.3 HGF抑制NF2和TIMP3基因编码的蛋白表达

此外,为进一步验证芯片结果,我们又进行了Western blot实验,结果显示:*NF2*和*TIMP3*基因编码的Merlin和TIMP3蛋白表达量随着HGF浓度的增加下降显著,而HGF不影响其他基因编码的蛋白(图4)。

2.4 干扰NF2和TIMP3促进UM细胞的迁移

*NF2*最初发现于家族性癌症综合征II型神经纤维瘤病^[11],属于抑癌基因,编码蛋白为Merlin^[12]。我们的芯片结果显示*NF2*与UM相关,并且HGF能抑制*NF2*基因编码蛋白的表达。因此,为了更深入地研究*NF2*在UM细胞中的作用,我们合成了3段siRNA序列,分别将这3段序列转染UM细胞,之后收集蛋白,通过Western blot实验结果显示:3段siRNA序列



A: 差异基因的CC分类; B: 差异基因的MF分类; C: 差异基因的BP分类; D: 差异基因参与的信号通路。

A: CC classification of differentially expressed genes; B: MF classification of differential genes; C: BP classification of differential genes; D: signaling pathway involving differential genes.

图2 对差异表达基因GO功能和KEGG信号路径富集分析

Fig.2 Enrichment analysis of GO function and KEGG signal path of differentially expressed genes

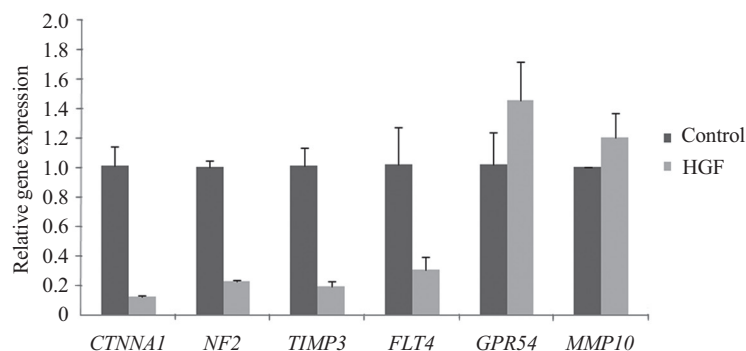


图3 定量PCR检测差异表达基因的mRNA表达水平

Fig.3 Real-time PCR was used to detect the mRNA expression levels of differentially expressed genes

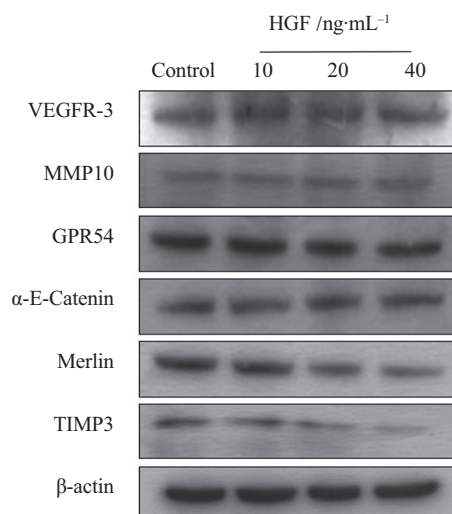
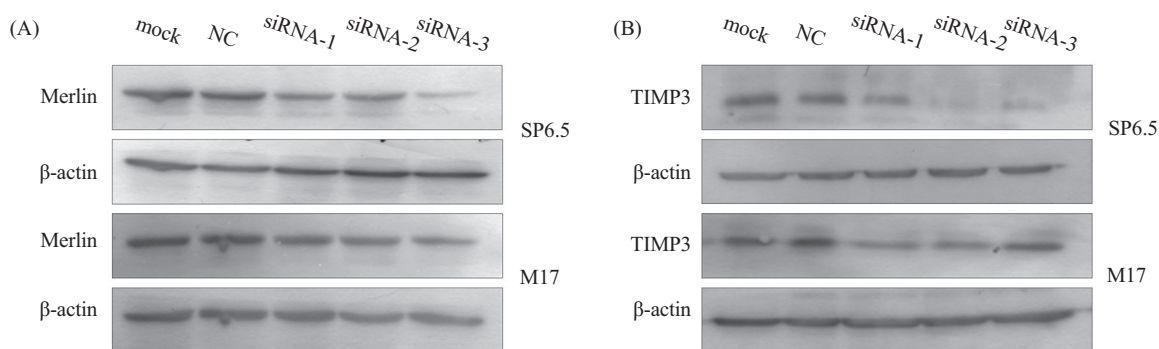


图4 Western blot 检测差异表达基因的蛋白表达水平

Fig.4 Western blot detection of protein expression levels of differentially expressed genes



A: NF2的siRNA干扰效果, 以siRNA-3干扰效果最显著; B: TIMP3的siRNA干扰效果, 以siRNA-2干扰效果最显著。

A: the siRNA interference effect of NF2 is the most obvious, and siRNA-3 interference effect is the most obvious; B: the siRNA interference effect of TIMP3 was the most obvious in siRNA-2.

图5 Western blot检测NF2、TIMP3基因siRNA干扰效果

Fig.5 Western blot detection of siRNA interference effect of NF2 and TIMP3 genes

都可以干扰Merlin的表达, 其中3号siRNA的干扰效果最显著(图5A)。

金属蛋白酶3组织抑制剂(TIMP3)是一组具有抑制基质金属蛋白酶(MMPs)活性的细胞外基质结合蛋白, 在肿瘤侵袭、转移和血管生成中起着重要作用, 并被认为是与UM的进展有关^[13], 但是HGF对UM细胞迁移和侵袭的影响是否与TIMP3有关尚且未知。因此, 为了研究TIMP3在UM细胞中的作用, 我们合成了3段siRNA序列, 分别将这3段序列转染UM细胞, 之后收集蛋白, Western blot实验结果表明3段siRNA都能抑制TIMP3的表达, 其中2号siRNA的效果最显著(图5B)。

根据上述结果, 我们分别用最有效的siRNA-3和siRNA-2来干扰NF2和TIMP3基因的表达, 以此作

为实验组, 转染NC片段作为阴性对照组, 不做任何处理的mock作为空白对照组。通过细胞迁移实验研究NF2和TIMP3对UM细胞迁移的影响。如图6所示, 与阴性对照组相比, 干扰NF2和TIMP3后, 穿过小室的M17和SP6.5细胞数明显增多。这表明, 干扰NF2和TIMP3基因能够促进UM细胞的迁移。

3 讨论

UM发生在脉络膜、睫状体和虹膜, 是成年人最常见的原发性恶性肿瘤^[14], 其危险因素、治疗方法、分子机制和对全身治疗的反应不同于常见的皮肤黑色素瘤^[15]。据报道, 患有脉络膜痣、发育不良痣综合征和太田痣的患者更容易患UM^[16]。患者一般不会感觉到疼痛, 但是会有视力丧失或视物变形,

较大的肿瘤通常会导致浆液性视网膜脱离^[17]。对于转移性UM目前没有较好的治疗方案,且患者一般在一年内死亡^[18]。

HGF作用于各种上皮细胞,调节损伤器官的细胞生长、运动和形态发生以及组织再生^[19]。当肝脏因各种原因损伤时,HGF与其特异性受体c-Met(细胞间充质-上皮转化)结合将信号传递到细胞内,激发c-Met的内在激酶活性^[4]。研究发现,HGF/c-Met信号轴通过诱导PI3K/Akt通路的激活参与细胞黏附分子E-cadherin和 β -catenin的下调,抑制细胞间黏附,从而促进UM细胞的迁移和侵袭^[20]。另外,HGF/c-Met信号轴也被证明直接或间接导致UM对免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitors, ICIs)治疗的耐药性^[21]。由此可见,HGF在UM的迁移和侵袭过程中发挥着重要作用,因此为了深入探究HGF影响UM发生发展的其他分子机制,我们进行了基因芯片分析。

使用HGF分别处理SP6.5和M17细胞系不同时间,之后进行基因芯片分析和筛选,发现处理24 h的

基因表达差异显著。因此,我们从HGF处理24 h组别中,筛选出250个差异表达基因进行生物学分析,发现在细胞组分中,差异基因在细胞膜、细胞器及染色体中的变化比较显著;在分子功能中,差异基因在核苷酸结合中分布最高;在生物学过程中,差异基因富集于细胞周期、有丝分裂和细胞器裂变等过程。结合KEGG数据库,进行Pathway分析,发现差异表达基因参与的信号通路主要涉及癌症途径、细胞周期、胶质瘤通路、小细胞肺癌通路、p53信号通路和DNA复制等。

在得到以上基因芯片的结果后,我们通过定量PCR实验和Western blot实验进行了验证,结果显示,经HGF处理以后,NF2和TIMP3基因的mRNA和蛋白表达水平均下降,CTNNA1和FLT4基因的mRNA表达水平下降,GPR54和MMP10基因的mRNA表达水平上升,但CTNNA1、FLT4、GPR54和MMP10基因编码的蛋白不受影响,与基因芯片的结果一样,我们认为HGF对mRNA和蛋白水平的影响不同,可能

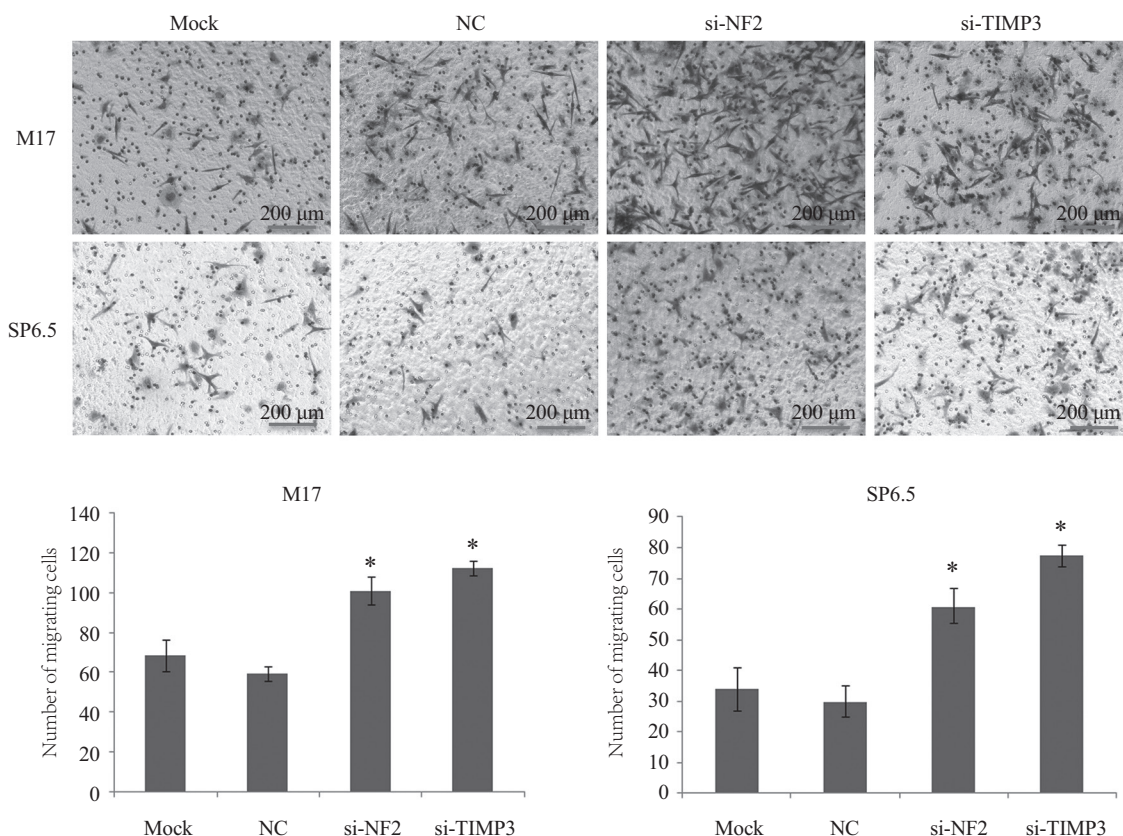


图6 细胞迁移实验检测葡萄膜黑色素瘤细胞的迁移能力

Fig.6 The migration ability of uveal melanoma cells was detected by cell migration assay

与这些基因编码的 mRNA 翻译率、翻译率调控和蛋白质的半衰期有关。在明确 HGF 可以抑制 *NF2* 和 *TIMP3* 基因编码的 Merlin 和 *TIMP3* 蛋白表达后, 我们又确定了 *NF2* 和 *TIMP3* 对 UM 的影响, 发现干扰 *NF2* 和 *TIMP3* 促进了 UM 细胞的迁移。

综上所述, HGF 能够抑制 *NF2* 和 *TIMP3* 基因编码的 mRNA 和蛋白表达; 干扰 *NF2* 和 *TIMP3* 促进了 UM 细胞的迁移。因此我们认为 HGF 可以通过调控 *NF2* 和 *TIMP3* 基因编码的 Merlin 和 *TIMP3* 蛋白表达影响 UM 细胞的迁移。我们的研究表明, *NF2* 和 *TIMP3* 基因编码的蛋白可能成为治疗转移性 UM 的新靶点。

参考文献 (References)

- [1] KALIKI S, SHIELDS C L. Uveal melanoma: relatively rare but deadly cancer [J]. *Eye*, 2016, 31(2): 241-57.
- [2] WESPISER M, NEIDHARDT E, NEGRIER S. Uveal melanoma: in the era of new treatments [J]. *Cancer Treat Rev*, 2023, doi: 10.1016/j.ctrv.2023.102599.
- [3] BUSTAMANTE P, PIQUET L, LANDREVILLE S, et al. Uveal melanoma pathobiology: metastasis to the liver [J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 71: 65-85.
- [4] ZHAO Y, YE W, WANG Y D, et al. HGF/c-Met: a key promoter in liver regeneration [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 808855.
- [5] 黄牧坤, 南祥, 王秋旭, 等. 靶向 c-Met 的 I 型小分子抑制剂的研究进展 [J]. *中国细胞生物学学报* (HUANG M K, NAN X, WANG Q X, et al. Research progress of small molecule type I inhibitors targeting c-Met [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2021, 43(11): 2268-76.
- [6] TANAKA R, TERA I M, LONDIN E, et al. The role of HGF/MET signaling in metastatic uveal melanoma [J]. *Cancers*, 2021, 13(21): 5457.
- [7] CZYZ M. HGF/c-MET signaling in melanocytes and melanoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12): 3844.
- [8] WANG Z, HE C, LIU L, et al. PHA665752 inhibits the HGF-stimulated migration and invasion of cells by blocking PI3K/AKT pathway in uveal melanoma [J]. *Neoplasma*, 2017, 64(3): 377-88.
- [9] CHENG H, TERA I M, KAGEYAMA K, et al. Paracrine effect of NRG1 and HGF drives resistance to MEK inhibitors in metastatic uveal melanoma [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(13): 2737-48.
- [10] RICHARDS J R, SHIN D, PRYOR R, et al. Activation of NFAT by HGF and IGF-1 via ARF6 and its effector ASAP1 promotes uveal melanoma metastasis [J]. *Oncogene*, 2023, 42(35): 2629-40.
- [11] ROULEAU G A, MEREL P, LUTCHMAN M, et al. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2 [J]. *Nature*, 1993, 363(6429): 515-21.
- [12] SEKIDO Y, SATO T. NF2 alteration in mesothelioma [J]. *Front Toxicol*, 2023, 5: 1161995.
- [13] CASAGRANDE V, FEDERICI M, MENGHINI R. TIMP3 involvement and potentiality in the diagnosis, prognosis and treatment of diabetic nephropathy [J]. *Acta Diabetol*, 2021, 58(12): 1587-94.
- [14] 徐微微, 陈伟伟, 王丽花. MITF 在葡萄膜黑色素瘤细胞中的功能研究 [J]. *中国细胞生物学学报* (XU W W, CHEN W W, WANG L H. Function of MITF in uveal melanoma cells [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2020, 42(5): 858-67.
- [15] CHATTOPADHYAY C, KIM D W, GOMBOS D S, et al. Uveal melanoma: from diagnosis to treatment and the science in between [J]. *Cancer*, 2016, 122(15): 2299-312.
- [16] HAMMER H, OLÁH J, TÓTH-MOLNÁR E. Dysplastic nevi are a risk factor for uveal melanoma [J]. *Eur J Ophthalmol*, 1996, 6(4): 472-4.
- [17] ESKELIN S, KIVELÄ T. Mode of presentation and time to treatment of uveal melanoma in Finland [J]. *BJO*, 2002, 86(3): 333-8.
- [18] JAGER M J, SHIELDS C L, CEBULLA C M, et al. Uveal melanoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1): 24.
- [19] JANGPHATTANANONT N, SATO H, IMAMURA R, et al. Distinct localization of mature HGF from its precursor form in developing and repairing the stomach [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12): 2955.
- [20] YE M, HU D, TU L, et al. Involvement of PI3K/Akt signaling pathway in hepatocyte growth factor-induced migration of uveal melanoma cells [J]. *Invest Ophthalm Vis Sci*, 2008, 49(2): 497-504.
- [21] MACHIRAJU D, HASSEL J C. Targeting the cMET pathway to enhance immunotherapeutic approaches for mUM patients [J]. *Front Oncol*, 2023, 12: 1068029.