DOI:10.16016/j.1000-5404.202101108

NFATc3 在恶性黑素瘤中的表达及其对细胞存活和转移的影响

张婉琪[1],沈潇潇[1],李红丽[2],鲁元刚[1] 400042 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)大坪医院整形美容科[1];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)基础医学院教学实验中心[2]

[摘要] **目的** 探讨 NFATc3 在不同恶性程度的恶性黑素瘤(malignant melanoma,MM)组织及细胞中的表达及意义。**方法** 收集转移(11 例)和未转移(20 例)MM 组织及癌旁组织(3 例)石蜡切片;对比不同恶性度 MM 细胞系,运用免疫组化染色、Crispr/Cas9 敲减技术并转染细胞,通过 qPCR、Western blot、CCK-8 及流式细胞学等方法观察 NFATc3 表达对 MM 细胞活性、增殖凋亡与侵袭迁移的影响。**结果** ①NFATc3 在转移性 MM 组织中呈高表达,在癌旁组织中几乎无表达($P<0.01$);在转移性 MM 细胞 Mel-RM 中,NFATc3 mRNA 和蛋白水平较原位来源 MM 细胞 A375 显著上调($P<0.01$);②敲减 NFATc3 后,敲减组的细胞存活率显著下降($P<0.01$),而 Caspase-3 阳性荧光细胞比例则显著升高($P<0.01$);流式细胞检测及 TUNEL 染色结果显示,敲减组中凋亡细胞比例增加($P<0.01$);Western blot 检测发现敲减组细胞中活化的 Caspase-3(17×10^3)和 Caspase-8(18×10^3)蛋白表达增高;③划痕实验及 Transwell 检测均表明敲减组中侵袭和迁移的细胞数目显著减少($P<0.01$)。**结论** NFATc3 在转移性 MM 中表达上调,且其表达水平与恶性程度相关。下调 NFATc3 能减少 MM 细胞存活、促进细胞凋亡并抑制细胞转移能力。

[关键词] 恶性黑素瘤;NFATc3;恶性程度;细胞存活与凋亡;转移
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R739.5 [文献标志码] A

Expression of NFATc3 in malignant melanoma and its effects on cell survival and metastasis

ZHANG Wanqi[1], SHEN Xiaoxiao[1], LI Hongli[2], LU Yuangang[1] [1]Department of Plastic and Cosmetic Surgery, Daping Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400042; [2]Teaching and Experimental Center, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression and significance of NFATc3 in different malignant melanoma (MM) tissues and cells. **Methods** The metastatic (11 cases) and non-metastatic (20 cases) MM tissues and adjacent tissues (3 cases) were collected in paraffin sections. MM cell lines with different malignancy were compared and transfected with Crispr/Cas9 knock-down plasmid. The effects of NFATc3 expression on the proliferation, apoptosis and invasion of MM cells were observed by immunohistochemical staining, qPCR, Western blotting, CCK-8 assay and flow cytometry. **Results** ① NFATc3 was highly expressed in MM tissues, but hardly seen in the adjacent tissues ($P<0.01$). Its expression at mRNA and protein levels was obviously up-regulated in the Mel-RM cells when compared with the A375 cells ($P<0.01$). ②After NFATc3 knock-down, the cell survival rate of NFATc3 knock-down group was significantly decreased ($P<0.05$). The proportion of Caspase-3 positive fluorescent cells was significantly

[基金项目] 陆军军医大学科技创新能力提升专项(2019XQY01)
[通信作者] 鲁元刚,E-mail:skin515@163.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

increased ($P<0.01$). Flow cytometry and TUNEL staining showed an increased proportion of apoptotic cells in the knock-down group ($P<0.05$), and further Western blot assay confirmed that the expression of activated Caspase-3 (17×10^3) and Caspase-8 (18×10^3) proteins were increased. ③The number of invaded and migrated cells in the knock-down group were significantly reduced by wound healing test and Transwell test ($P<0.01$). **Conclusion** NFATc3 is highly expressed in metastatic MM, and its expression level is correlated to the malignancy. NFATc3 knockdown can induce the apoptosis and inhibit the invasion and migration abilities of MM cells.

[**Key words**] malignant melanoma; NFATc3; malignancy; cell survival and apoptosis; metastasis

Supported by the Promotion Project of Scientific and Technological Innovation Abilities of Army Medical University (2019XQY01). Corresponding author: LU Yuangang, E-mail: skin515@163.com

恶性黑色素瘤(malignant melanoma,MM)是恶性程度最高的皮肤肿瘤,其发病率以每年3%的速度快速增长[1]。此前,除早期手术切除能获得相对较好的预后外,进展期MM,因对临床常规放化疗均不敏感,缺乏有效治疗手段,预后极差,尽管其发病率只占皮肤肿瘤4%,却占其死亡人数的75%[2]。近年来,针对丝/苏氨酸蛋白激酶BRAF的分子靶向治疗带来了突破性的进展,然而对于好发肢端型MM的亚洲人群而言,其应答率较低[3],且易出现获得性耐药[4],极大地限制了患者的临床获益。因此,探索MM新的分子治疗靶点及可能的作用机制对临床诊治意义重大。

NFATc3作为活化T细胞核因子(nuclear factor of activated T-cells,NFAT)家族成员之一,在食管癌[5]、三阴性乳腺癌[6]和恶性胶质瘤[7]等多种高恶性肿瘤的发生、发展中起着重要作用。近年研究提示,NFAT与MM的进展有相关性[8],但NFAT家族各亚型,尤其是NFATc3在MM中的表达与功能如何,目前尚不清楚。本研究探讨NFATc3在不同恶性程度黑素瘤组织及细胞中的表达及其与恶性度的关系,进一步通过Crispr/Cas9技术敲减NFATc3,验证NFATc3对MM发生、发展的影响,为临床治疗探索新的靶标提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要耗材和试剂

DMEM细胞培养基、胰蛋白酶、胎牛血清购自美国HyClone公司;脂质体转染试剂(Lipofectamine 3000)购自美国Invitrogen公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒、一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒购自中国碧云天生物技术研究所;CCK-8试剂盒及基质胶(Matrigel)购自北京索莱宝科技;AnnexinV-FITC/PI细胞凋亡双染试剂盒购自美国BD公司;TB Green Premix Ex TaqⅡ试剂盒、PrimeScript TM RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒购自日本TaKaRa公司。

1.2 临床标本

收集并筛选2014-2017年在陆军军医大学大坪医院手术后经病理证实的MM患者石蜡标本,其中未转移肿瘤组织标本20例,转移肿瘤组织标本11例。另选取癌旁组织标本3例作为对照。

1.3 Crispr/Cas9技术构建NFATc3敲减质粒

NFATc3敲减质粒的构建使用lentiCRISPRv2-puro(#98290)为载体,使用BSMB Ⅰ酶切后,插入设计合成的sgRNA序列3对,sgRNA1-NFATc3正义链:5′-caccgAAGTTCTTGAGCAGACCGCT-3′,反义链:5′-aaacAGCGGTCTGCTCAAGAACTTc-3′;sgRNA2-NFATc3正义链:5′-caccgGATCAAGCTGCCATACTACC-3′,反义链:5′-aaacGGTAGTATGGCAGCTTGATCc-3′;sgRNA3-NFATc3正义链:5′-caccgCATCATCTATTGAAGTCTCC-3′,反义链:5′-aaacGGAGACTTCAATAGATGATGc-3′。重组的lentiCRISPRv2-puro质粒使用*Hind*Ⅲ酶切及测序进行鉴定,转染293T细胞后使用Western blot检测在阴性对照组(转染sgRNA-NC)及敲减组(转染sgRNA-NFATc3)中NFATc3蛋白的表达。

1.4 细胞培养及转染

4种人MM细胞系(皮肤原位来源MM细胞系A375和MeWo、神经节转移来源MM细胞系Mel-RM和肺转移来源MM细胞系Malme-3M)和永生化正常人色素细胞系PIG1(作为对照)均购自美国ATCC。上述细胞接种于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基,37 ℃、5%CO_2的恒温恒湿培养箱中培养。待6孔板中细胞密度达到30%~40%时进行转染,sgRNA-NC及sgRNA-NFATc3转染用量为每孔3 μL,于转染48 h后收获细胞进行下一步实验。

1.5 免疫组化染色检测恶性黑素瘤组织的蛋白表达

病理石蜡块制作3 μm切片,依次进行脱蜡、水化、抗原修复、脱色素、灭活、封闭后,使用兔抗NFATc3抗体(美国CST,1∶200),4 ℃孵育过夜。二抗

(羊抗兔 HRP,美国 Jackson 公司),孵育 60 min。最后 DAB 显色,苏木精复染、封片。每张切片随机选取 5 个视野,按染色强度(无着色为 0 分、淡黄色为 1 分、棕黄色为 2 分、棕褐色为 3 分)及阳性细胞百分比(阳性细胞≤5%为 0 分、5%<1 分≤25%、25%<2 分≤50%、50%<3 分≤75%、4 分>75%)分别计分。最终以染色强度计分×阳性肿瘤细胞百分比=每视野评分,取平均分作为切片终评分。

细胞爬片染色时,BSA 封闭后,滴加稀释的一抗孵育液:鼠抗 PCNA 抗体(武汉博士德,1∶200)、兔抗 Caspase-3 抗体(美国 CST,1∶200),4 ℃孵育过夜。漂洗后,加二抗:羊抗鼠-cy3/抗兔-488(美国 Jackson,1∶200),孵育 60 min。DAPI(武汉博士德,1∶1 000)复染核后封片并保存。使用 Image Pro Plus(IPP)软件统计荧光染色阳性细胞比例。

1.6 qPCR 检测不同细胞系 NFATc3 mRNA 表达

设计 NFATc3 引物(Homo NFATc3 正义链:5′-CACATCTTCATTACCTCCACTA-3′,反义链:5′-CCTCGGCTACCTTCAGTT-3′,产物 123 bp)。TRIzol 法分别提取各组细胞的总 RNA 并逆转录成 cDNA。以 GAPDH(正义链:5′-CAACAGCCTCAAGATCATCAG-3′,反义链:5′-GAGTCCTTCCACGATACCAA-3′,产物 100 bp)为内参,SYBR Green 试剂盒进行扩增,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析结果。

1.7 Western blot 检测细胞中相关蛋白表达

提取体外培养各组细胞中的蛋白,BCA 蛋白定量后,每组样品加 20 μg,电泳后经湿转转膜仪将蛋白移至 PVDF 膜上。BSA 封闭 2 h,加 PBS 稀释的一抗:兔抗 NFATc3(#4998)/抗 Caspase-3(#9662)/抗 Cleaved Caspase-3(#9664)/兔抗 Caspase-8(#4790)、鼠抗 GAPDH(美国 CST,1∶1 000 稀释),4 ℃孵育过夜。TBST 洗膜 3 次后,加入二抗:羊抗兔/抗鼠 HRP(美国 Jackson,1∶5 000),室温孵育 2 h;超敏发光试剂盒显影并进行分析。使用 IPP 软件统计条带灰度值。

1.8 CCK-8 检测细胞存活

细胞以 3×10^3/孔接种在 96 孔板上,分为空白组和敲减组,每组 5 个复孔,在孵箱中培养 24 h 后,向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,孵育 3 h 后用酶标仪在波长 450 nm 处检测光密度值[D(450)]。

细胞存活率=[实验组 D(450)−空白孔 D(450)]/[对照组 D(450)−空白孔 D(450)]×100%

1.9 EdU 检测细胞增殖

细胞以 5×10^3/孔接种在 24 孔板上,培养 24 h。每孔加入 50 μmol/L EdU 溶液 100 μL,继续在孵箱中培养 2 h。随后每孔加入 200 μL Apollo 染色液,避光、37 ℃脱色摇床孵育 30 min 后,PBS 漂洗 2~3 次。使用 DAPI 复染核后,封片并保存。使用 IPP 软件统计 EdU 阳性细胞比例。

1.10 流式细胞学及 TUNEL 染色检测细胞凋亡

消化并收集细胞,2 000 r/min 离心 5 min,PBS 洗涤后加入 Binding Buffer 悬浮细胞,Annexin V-FITC 混匀避光孵育 15 min,上机前 5 min 加入 PI 染液并分析凋亡细胞所占百分比。细胞以 5×10^3/孔接种在 24 孔板上,培养 24 h 后,TUNEL 荧光染色液于 37 ℃避光孵育 1 h,DAPI 核复染,封片并保存。使用 IPP 软件统计 TUNEL 阳性细胞比例。

1.11 划痕实验检测细胞迁移能力

每孔接种约 5×10^5 个细胞于 6 孔板中,在细胞铺满后,以直尺定位,用 200 μL 移液器枪头保持力度均匀、垂直于横线做“一”字划痕,随后加入无血清培养基,镜下观察并拍照,记录为 0 h;置于细胞培养箱中培养 24 h 后在同一位置拍照。按公式计算细胞迁移率。

迁移率=(初始划痕面积−相应点划痕面积)/初始划痕面积×100%

1.12 Transwell 小室实验检测细胞侵袭

吸取 5 mg/mL 的 Matrigel 添加到孔径为 8 μm 的 Transwell 小室上室中,待胶体凝固后,用无血清培养基重悬饥饿 12 h 的细胞,调整浓度至 1×10^5/mL,各吸取 200 μL 分别添加至上室后,在下室添加 500 μL 含 15%血清的培养基,于培养箱中培养 24 h 后,0.1%结晶紫染色。

1.13 统计学分析

使用 SPSS 13.0 统计软件。计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,进行组间 t 检验,$P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。所有检测实验重复至少 3 次。

2 结果

2.1 NFATc3 在不同 MM 组织及细胞系中的表达

免疫组化染色显示,在转移灶癌组织($n=11$)中 NFATc3 强阳性信号大量分布于胞核与胞质;在未转移癌组织($n=20$)中可见散在分布的阳性信号;在癌旁组织几乎未见阳性信号($P<0.01$,图 1A、B)。qPCR 检测结果显示,NFATc3 mRNA 在 MM 细胞系和正常色素细胞系中均有表达,但在 MM 细胞系中高表达,并且转移灶来源的 Mel-RM 细胞系较原位来源的 A375 细胞系的高表达更为显著($P<0.01$,图 1C)。免疫荧

光染色观察到 NFATc3 在 Mel-RM 细胞中荧光强度明显高于 A375 细胞(图 1D)。以上结果提示,NFATc3 的表达与 MM 恶性程度有关。

2.2　构建 NFATc3 敲减质粒并转染 Mel-RM 细胞

将设计合成的 3 组质粒使用 *Hind* Ⅲ酶切后,与 sgRNA-NC 质粒(阴性对照)相比,重组质粒均缺失两个条带,长度分别为 1 227、848 bp(图 2A);转染 293T 细胞后,通过 Western blot 对比 3 组 sgRNA-NFATc3 质粒,其中 sgRNA3 转染后,NFATc3 表达较其他两组显著减低,表明 sgRNA3-NFATc3 能达到最优敲减效果(P<0.01,图 2B、C),将用于后续实验。

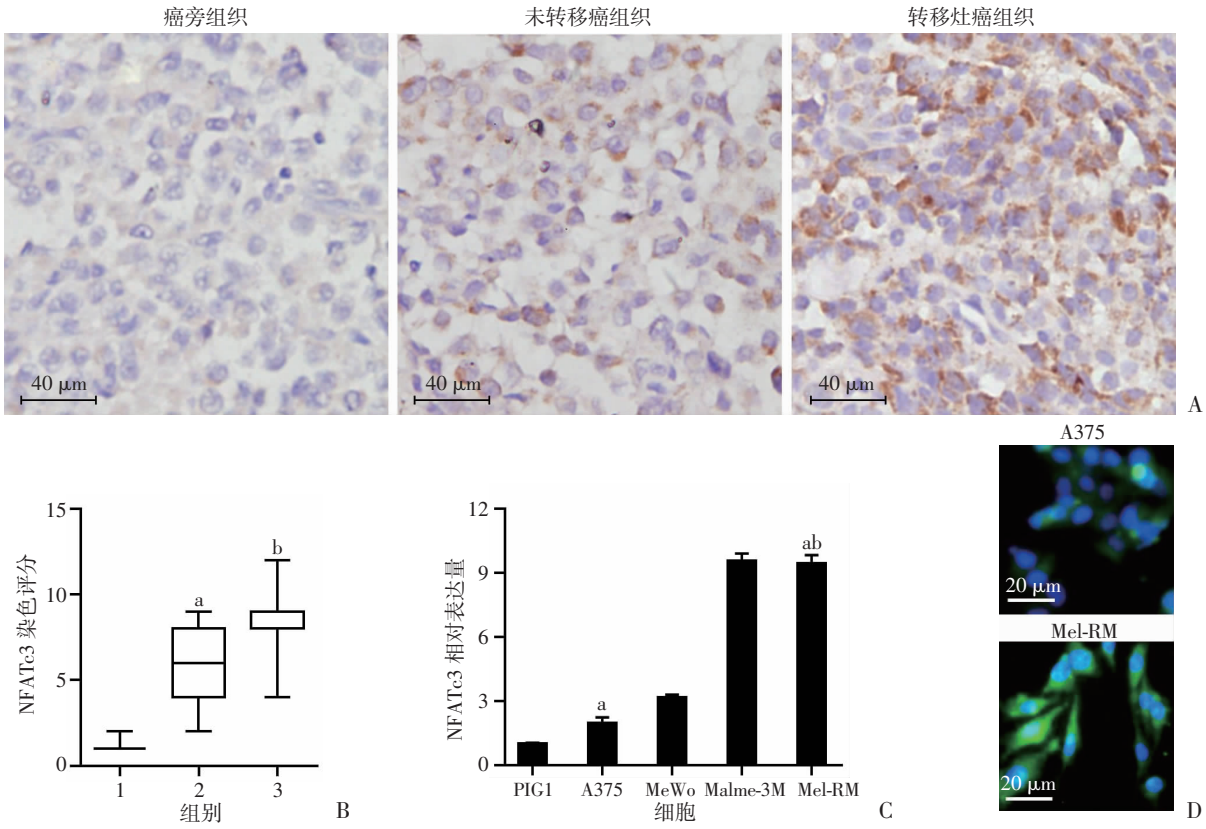
将 sgRNA3-NFATc3 敲减质粒和阴性对照质粒 sgRNA-NC 转染 Mel-RM 细胞,转染 48 h 后,Western blot 检测结果显示,敲减组细胞中 NFATc3 蛋白的表达显著低于对照组(P<0.01,图 2D、E),提示 sgRNA3-NFATc3 敲减的 Mel-RM 细胞构建成功。

2.3　敲减 NFATc3 对 MM 细胞活性的影响

转染 Mel-RM 细胞 48 h 后,CCK-8 检测结果显示,敲减组细胞活性(73.85±7.51)明显低于对照组(100.00±11.02)(P<0.01)。EdU 染色结果表明,敲减组 EdU 阳性细胞较对照组无明显差异(P>0.05,图 3);免疫荧光检测可观察到,敲减组 Mel-RM 细胞中总 Caspase-3 阳性荧光信号分布于胞质中,且阳性细胞比率较对照组明显升高(P<0.05),而增殖细胞核抗原 PCNA 阳性荧光细胞比率与对照组无明显差异(P>0.05,图 4)。提示抑制 NFATc3 的表达可能通过促进细胞凋亡而非影响细胞增殖从而降低细胞活性。

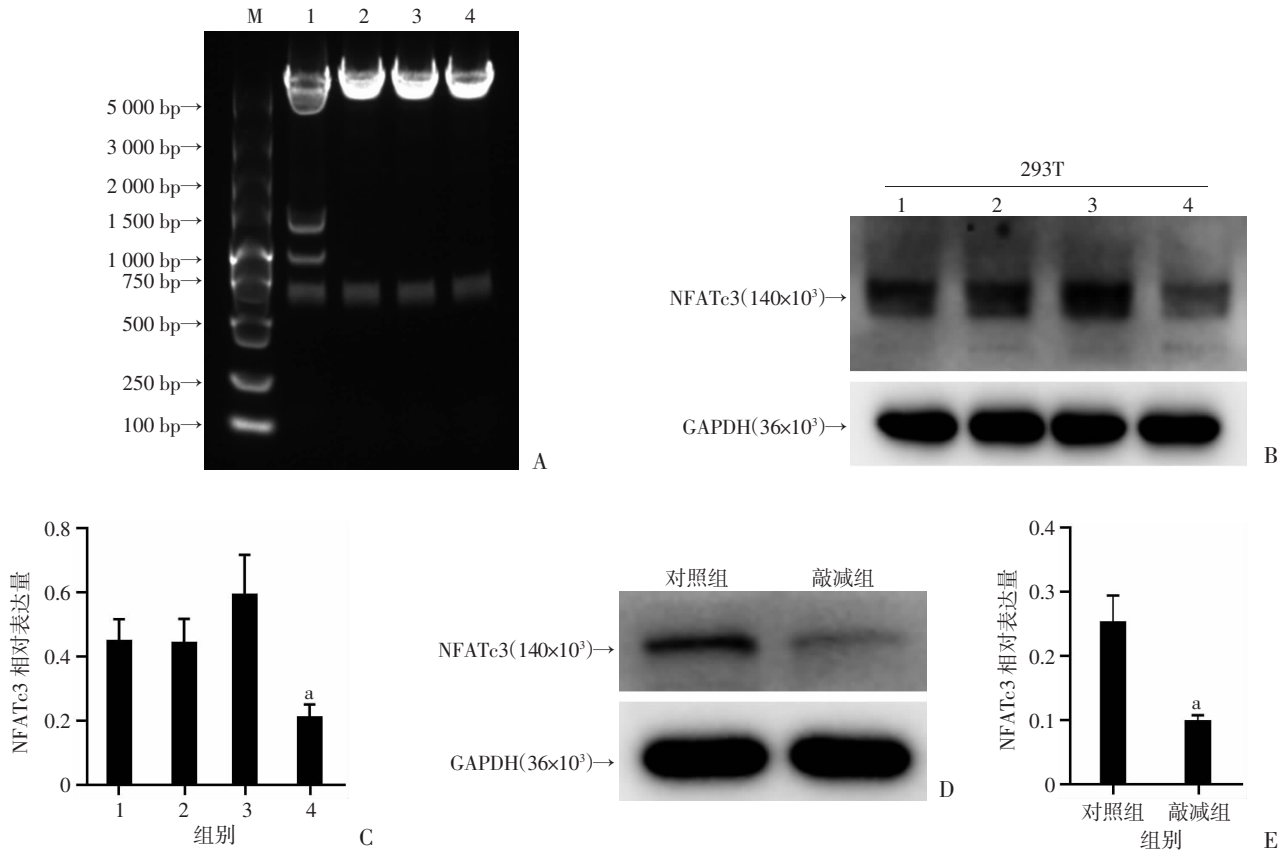
2.4　敲减 NFATc3 促进 MM 细胞凋亡

转染后 48 h,流式细胞学检测结果显示,敲减组凋亡细胞比率增加(P<0.01,图 5A、B);进一步采用 TUNEL 凋亡染色也发现,敲减组 TUNEL 阳性细胞较对照组明显增多(P<0.01,图 5C、D);Western blot 检测结果发现,敲减组可分别在 18×10^3 及 17×10^3 处观察到活化的 Caspase-8 及 Caspase-3 蛋白表达明显增加(图 6)。上述结果提示抑制 NFATc3 的表达能增强 Caspase-8、Caspase-3 活化,促进细胞凋亡的发生。



A:免疫组化(酶标染色)比较癌旁组织、未转移癌组织与转移灶癌组织 NFATc3 的表达;B:NFATc3 阳性强度统计 1:癌旁组织;2:未转移癌组织;3:转移灶癌组织;a:P<0.01,与癌旁组织比较;b:P<0.01,与未转移癌组织比较;C:qPCR 检测 NFATc3 在不同品系 MM 细胞系中的表达　a:P<0.01,与 PIG1 比较;b:P<0.01,与 A375 比较;D:免疫荧光检测 NFATc3 在不同恶性程度 MM 细胞中的表达

图 1　NFATc3 在 MM 组织和细胞系中的表达



M:标准;1:sgRNA-NC 组;2:sgRNA1-NFATc3 组;3:sgRNA2-NFATc3 组;4:sgRNA3-NFATc3 组

A:重组质粒经 *Hind* Ⅲ酶切后电泳图;B、C:Western blot 鉴定 4 组质粒转染 293T 细胞后 NFATc3 蛋白表达及半定量分析 a:$P<0.01$,与 sgRNA-NC 组比较; D、E:Western blot 检测转染 sgRNA3-NFATc3 后 Mel-RM 细胞中 NFATc3 蛋白表达及半定量分析 a:$P<0.01$,与对照组比较

图 2 sgRNA 质粒构建及转染 Mel-RM 后 NFATc3 蛋白的表达

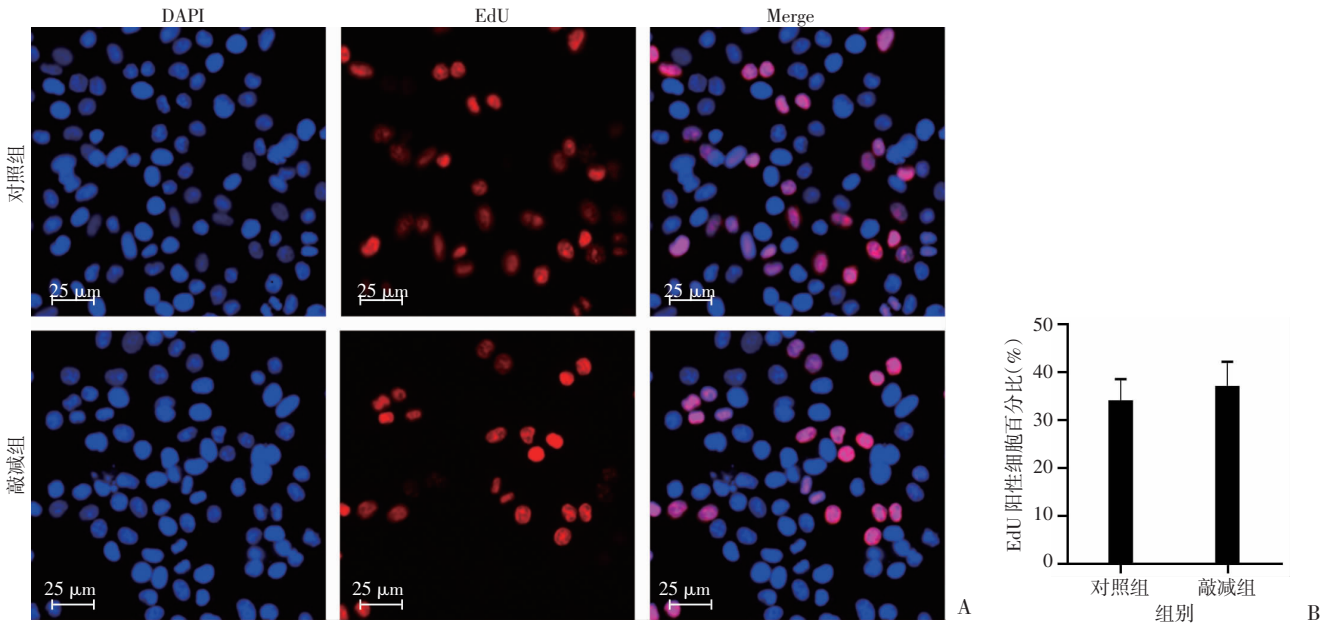
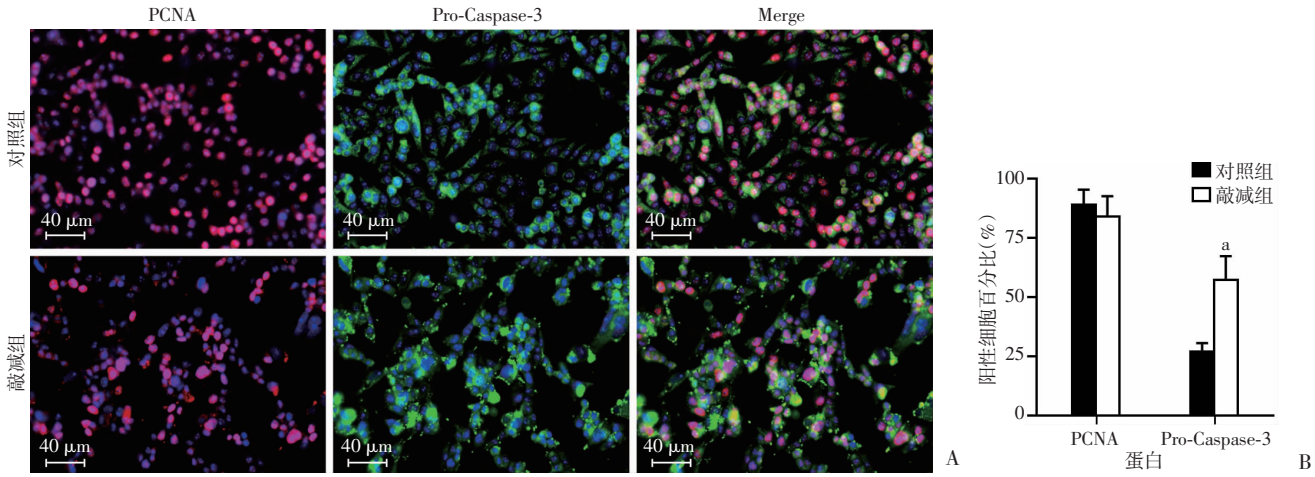
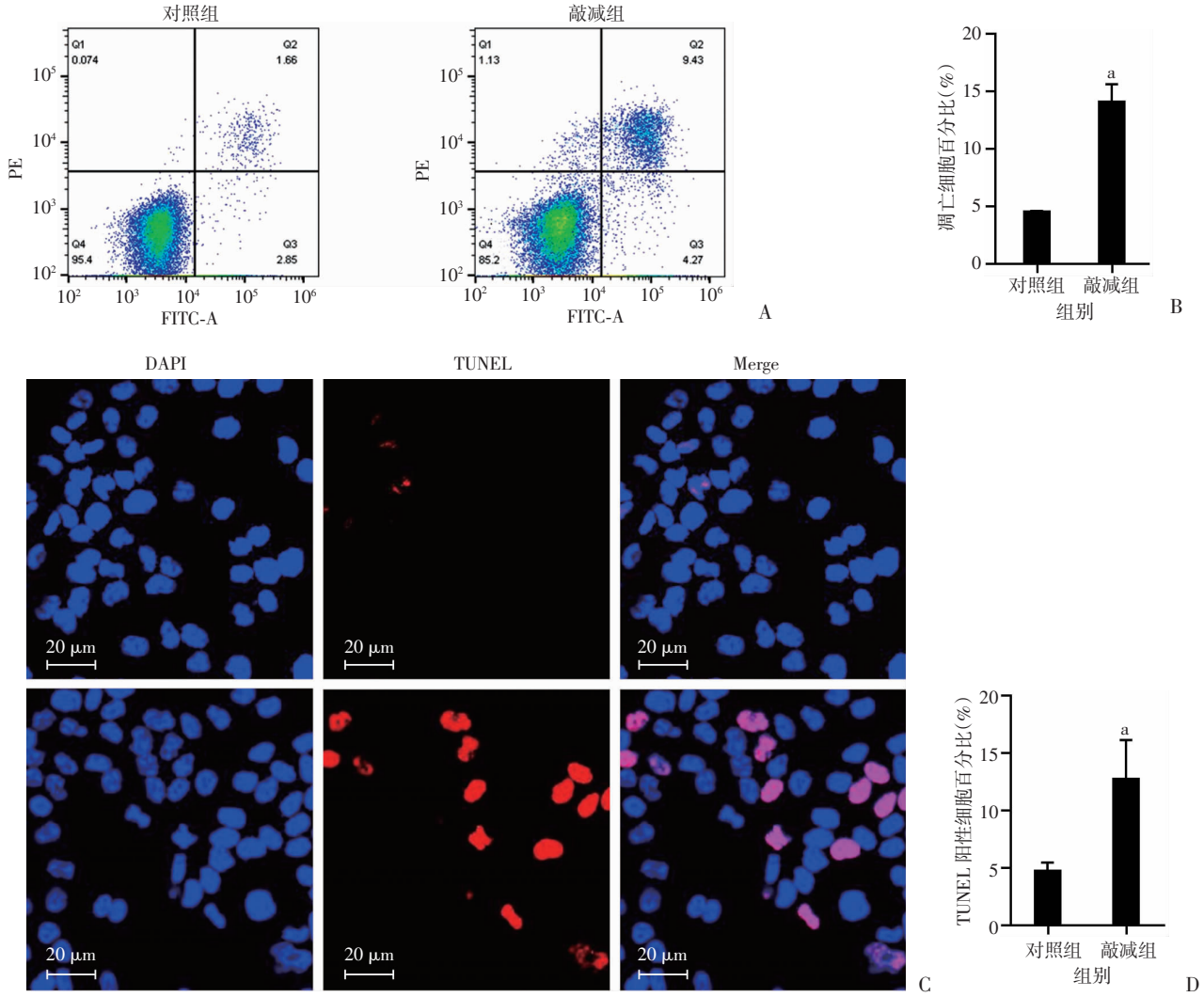


图 3 EdU 增殖染色观察 Mel-RM 细胞增殖情况(A)及定量分析(B)



a:$P<0.05$,与对照组比较

图 4　免疫荧光 PCNA/Caspase-3 双重染色(A)及定量分析(B)



A、B:流式细胞仪检测 NFATc3 敲减后细胞凋亡及定量分析　a:$P<0.01$,与对照组比较;C、D:TUNEL 凋亡染色观察 NFATc3 敲减后细胞凋亡情况及定量分析　a:$P<0.01$,与对照组比较

图 5　敲减 NFATc3 对 MM 细胞凋亡的影响

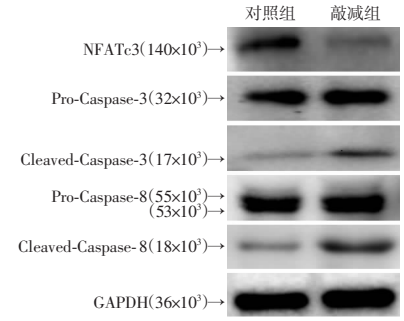
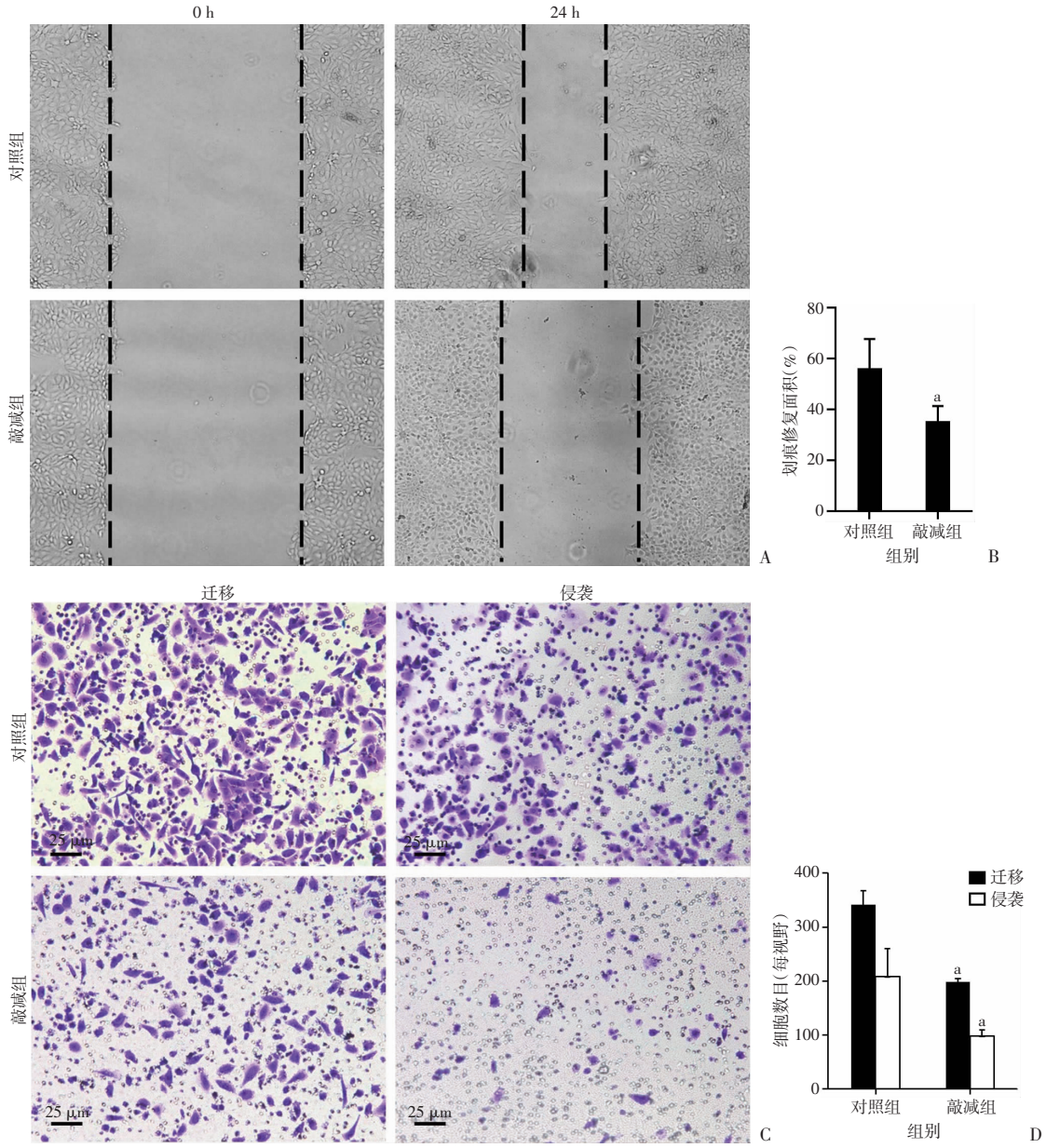


图 6　Western blot 检测 Mel-RM 细胞中 Caspase-8、Caspase-3 蛋白表达

2.5　敲减 NFATc3 抑制 MM 侵袭迁移能力

细胞划痕实验结果显示,敲减组细胞愈合百分比显著减小($P<0.01$,图 7A、B);Transwell 迁移实验结果表明,与对照组相比,敲减组细胞穿透小室的数量显著减少($P<0.01$,图 7C、D)。Transwell 侵袭实验观察到敲减组转染 24 h 后细胞穿透小室的数量较对照组显著减少($P<0.01$,图 7C、D)。上述结果提示,敲减 NFATc3 能抑制 Mel-RM 细胞迁移,并减弱其侵袭能力。



A、B:细胞划痕实验及细胞划痕修复面积比分析　a:$P<0.01$,与对照组比较;C、D:Transwell 小室实验观察细胞迁移、侵袭及统计分析　a:$P<0.01$,与对照组比较

图 7　敲减 NFATc3 抑制 MM 侵袭迁移能力

3 讨论

目前已报道的 NFAT 家族成员包含 5 个亚型,除 NFATc5 外,均受胞内高浓度[Ca^{2+}]信号激活,作为转录因子广泛调控多种细胞增殖、分化、迁移等生命活动[9-10]。近年来,有研究表明 NFAT 家族参与了多种肿瘤发生、发展[11-12]。其中,NFATc3 尽管已经被证实在多种恶性肿瘤中异常高表达[5,7],且与不良预后相关[13],但在 MM 中 NFATc3 的表达与功能尚不明确。本研究通过对临床转移灶 MM(11 例)与未转移 MM(20 例)进行石蜡切片染色证实,NFATc3 在癌旁组织几乎无表达,而在恶性程度不同的黑素瘤组织中均有表达,其中在转移性 MM 组织中表达呈现显著增强。采用不同恶性程度 MM 细胞系进行 qPCR 检测也证实,在神经节及肺转移来源的高恶性细胞系 Mel-RM 及 Malme-3M 中,NFATc3 的表达量较皮肤原位来源 MM 细胞 A375、MeWo 明显增加,提示 NFATc3 高表达与 MM 的转移性及高恶性程度有关。这一结果与 LIU 等[14]在结肠癌不良预后中观察到的 NFATc3 出现异常激活的结果相一致。此外,LAN 等[5]研究发现,在食管癌中, NFATc3 表达上调引起肿瘤细胞增殖和免疫逃逸,再次印证 NFATc3 的高表达与黑素瘤的恶性程度具有相关性。

为了进一步探究 NFATc3 对 MM 发生、发展的影响, 本研究采用 Crispr/Cas9 技术特异性敲减高表达 NFATc3 的 MM 细胞系 Mel-RM,发现敲减 NFATc3 虽对 Mel-RM 细胞增殖无明显作用,但能显著增加 Mel-RM 细胞的凋亡水平,降低 Mel-RM 细胞活性。在肿瘤细胞中,凋亡缺失一直是各类抗肿瘤药物的关注焦点,与疾病恶性程度、病情进展及治疗抵抗密切相关[15]。MM 作为对常规放化疗不敏感的典型代表,可能由其促凋亡效应因子失活、抗凋亡因子激活或生存途径强化共同作用所致[16]。进一步通过 Western blot 检测发现,降低 NFATc3 的表达后,Mel-RM 细胞中活化的 Caspase-8、Caspase-3 表达明显增多。其中,Caspase-8 对死亡受体诱导的细胞凋亡途径至关重要,当被募集到死亡受体复活物后发生构象改变,级联激活下游“凋亡执行者”Caspase-3 的表达,从而导致细胞凋亡的发生。说明敲减 NFATc3 能通过促进 Mel-RM 细胞凋亡相关蛋白 Caspase-8、Caspase-3 的活化发挥抗肿瘤作用。这一结论与 BUTTERICK 等[17]在辛伐他汀通过激活 NFATc3 与 Bcl-2 蛋白启动子结合,上调各类抗凋亡蛋白丰度,从而保护细胞不受凋亡因子影响的结果相互印证,提示 NFATc3 可能通过多种途径在细胞凋亡的调控中发挥重要作用。

此外,MM 细胞的侵袭、迁移能力也反映了其恶性程度高低,与肿瘤进展及不良预后密切相关。本研究采用细胞划痕实验及 Transwell 实验发现在敲减 NFATc3 培养 24 h 后,Mel-RM 细胞的划痕区细胞修复面积、穿膜细胞数目显著变少,提示其迁移能力和侵袭能力均明显降低。虽然目前尚缺乏 NFATc3 对 MM 细胞迁移侵袭能力机制的直接研究,但有研究在星形胶质瘤细胞中检测到 NFATc3 可上调基质金属蛋白酶-3(matrix metalloproteinase 3, MMP-3)表达[18]。MMP-3 可以引起细胞上皮间质转化(EMT)和恶性转化[19],在乳腺非典型导管增生向乳腺癌转变过程中也具有重要意义[20]。此外,在三阴性乳腺癌研究表明,高表达的 NFATc3 能通过 Notch 介导的通路促进肿瘤细胞迁移和侵袭[6]。结合本实验结果可以推测,降低 NFATc3 表达能明显抑制 MM 细胞侵袭迁移的能力。

总之,本研究通过实验证明 NFATc3 在 MM 中异常高表达,且与其恶性程度有关。敲减 NFATc3 能显著降低 MM 细胞侵袭迁移能力,并能通过增加活化的 Caspase-8、Caspase-3 表达促进 MM 细胞凋亡,从而抑制 MM 的发生、发展。表明 NFATc3 有望成为 MM 潜在的治疗靶点,其具体作用机制有待进一步深入探索。

参考文献:

[1] WHITEMAN D C, GREEN A C, OLSEN C M. The growing burden of invasive melanoma: projections of incidence rates and numbers of new cases in six susceptible populations through 2031[J]. J Invest Dermatol, 2016, 136(6): 1161-1171. DOI:10.1016/j.jid.2016.01.035.

[2] DAVIS L E, SHALIN S C, TACKETT A J. Current state of melanoma diagnosis and treatment[J]. Cancer Biol Ther, 2019, 20(11): 1366-1379. DOI: 10.1080/15384047.2019.1640032.

[3] NAMIKAWA K, YAMAZAKI N. Targeted therapy and immunotherapy for melanoma in Japan[J]. Curr Treat Options Oncol, 2019, 20(1): 7. DOI: 10.1007/s11864-019-0607-8.

[4] SOSMAN J A, KIM K B, SCHUCHTER L, *et al*. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib[J]. N Engl J Med, 2012, 366(8): 707-714. DOI:10.1056/nejmoa1112302.

[5] LAN X, ZHAO J, SONG C, *et al*. TRPM8 facilitates proliferation and immune evasion of esophageal cancer cells [J]. Biosci Rep, 2019,39(10):BSR20191878. DOI: 10.1042/BSR20191878.

[6] LIU X, WANG T, WANG Y, *et al*. Orai1 is critical for Notch-driven aggressiveness under hypoxic conditions in triple-negative breast cancers[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864(4 pt a): 975-986. DOI:10.1016/j.bbadis.2018.01.003.

[7] URSO K, FERNÁNDEZ A, VELASCO P, *et al*. NFATc3 controls tumour growth by regulating proliferation and migration of human astroglioma cells[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 9361. DOI:10.1038/s41598-019-45731-w.

[8] XIAO T, CHEN W C, WANG S F, *et al*. Tacrolimus and ascomycin inhibit melanoma cell growth, migration and invasion via targeting nuclear factor of activated T-cell 3[J]. Melanoma Res, 2020, 30(4): 325-335. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000663.

[9] MOGNOL G P, CARNEIRO F R, ROBBS B K, *et al*. Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player[J]. Cell Death Dis, 2016, 7: e2199. DOI:10.1038/cddis.2016.97.

[10] WANG G, WANG Y Z, YU Y, *et al*. The critical role of calcineurin/NFAT (C/N) pathways and effective antitumor prospect for colorectal cancers[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(12): 19254-19273. DOI:10.1002/jcb.29243.

[11] SHOU J, JING J, XIE J, *et al*. Nuclear factor of activated T cells in cancer development and treatment[J]. Cancer Lett, 2015, 361(2): 174-184. DOI:10.1016/j.canlet.2015.03.005.

[12] BUCHER P, ERDMANN T, GRONDONA P, *et al*. Targeting chronic NFAT activation with calcineurin inhibitors in diffuse large B-cell lymphoma[J]. Blood, 2020, 135(2): 121-132. DOI:10.1182/blood.2019001866.

[13] XIN B, JI K Q, LIU Y S, *et al*. Higher expression of calcineurin predicts poor prognosis in unique subtype of ovarian cancer[J]. J Ovarian Res, 2019, 12(1): 75. DOI:10.1186/s13048-019-0550-0.

[14] LIU X, WAN X, KAN H, *et al*. Hypoxia-induced upregulation of Orai1 drives colon cancer invasiveness and angiogenesis[J]. Eur J Pharmacol, 2018, 832: 1-10. DOI:10.1016/j.ejphar.2018.05.008.

[15] CARNEIRO B A, EL-DEIRY W S. Targeting apoptosis in cancer therapy[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2020, 17(7): 395-417. DOI:10.1038/s41571-020-0341-y.

[16] ZHAO B, XIE J, ZHOU X, *et al*. YAP activation in melanoma contributes to anoikis resistance and metastasis [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2020: 1535370220977101. DOI:10.1177/1535370220977101.

[17] BUTTERICK T A, IGBAVBOA U, ECKERT G P, *et al*. Simvastatin stimulates production of the antiapoptotic protein Bcl-2 *via* endothelin-1 and NFATc3 in SH-SY5Y cells[J]. Mol Neurobiol, 2010, 41(2/3): 384-391. DOI:10.1007/s12035-010-8122-8.

[18] NERIA F, DEL CARMEN SERRANO-PEREZ M, VELASCO P, *et al*. NFATc3 promotes Ca^{2+}-dependent MMP3 expression in astroglial cells [J]. Glia, 2013, 61(7):1052-1066. DOI:10.1002/glia.22494.

[19] SCHEAU C, BADARAU I A, COSTACHE R, *et al*. The role of matrix metalloproteinases in the epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma [J]. Anal Cell Pathol (Amst), 2019, 2019: 9423907. DOI:10.1155/2019/9423907.

[20] 袁媛, 费乐学, 刘岩, 等. 基质金属蛋白酶-3 与细胞外基质金属蛋白酶诱导因子在乳腺癌演变过程中的表达及意义[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(1): 10-13. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2008.01.004.
YUAN Y, FEI L X, LIU Y, *et al*. Expressions of matrix metalloproteinase-3 and extracellular matrix metalloproteinase inducer in the carcinogenesis of breast cancer and theirs significances[J]. J Pract Med, 2008, 24(1): 10-13. DOI:10.3969/j.issn.1006-5725.2008.01.004.

(**收稿**:2021-01-12;**修回**:2021-02-08)

(编辑 吴培红)