doi:10.11659/jjssx.03E022103

·基础研究·

miR-92b-3p/USF2/DNA 损伤轴调节葡萄膜黑色素瘤增殖和侵袭

郝雅楠,陈妍鹏,仝真真,袁 沣,赵晓敏 (河北北方学院附属第一医院眼科,河北 张家口 075000)

[摘 要] **目的** 探讨 miR-92b-3p 对葡萄膜黑色素瘤(UM)增殖和侵袭的影响。**方法** 将 UM 细胞(OCM-1A 和 MUM-213)分成 Vector 组、USF2 组、miR-NC 组、miR-92b-3p 组和 miR-92b-3p + USF2 组。生物信息学分析 USF2 和 miR-92b-3p 在 UM 细胞中的表达,USF2 和 miR-92b-3p 差异表达与 UM 临床恶性表型的关系,并预测两者之间的靶向关系。RT-PCR 检测 miR-92b-3p 在 APRE-19、OCM-1A 和 MUM-213 细胞中的表达。CCK-8 检测细胞增殖能力。细胞侵袭实验检测细胞侵袭能力。乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒检测细胞 LDH 活性。裸鼠移植瘤实验检测瘤体重量、体积。免疫组化染色检测肿瘤组织中 USF2 表达。Western blot 实验检测 USF2、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)和增殖相关抗原 Ki67 蛋白表达。双荧光素酶报告基因实验验证 miR-92b-3p 和 USF2 的靶标关系。**结果** USF2 在 UM 细胞中低表达,miR-92b-3p 在 UM 细胞中高表达,且均与 UM 临床恶性表型有关,USF2 可能促进 DNA 损伤。USF2 过表达抑制 UM 细胞增殖、侵袭,增加 LDH 活性,上调 Bax 蛋白表达,下调 Ki67 和 Bcl-2 蛋白表达。上调 USF2 表达抑制裸鼠移植瘤生长。数据库 StarBase v2 预测和双荧光素酶报告基因实验证实 USF2 是 miR-92b-3p 的作用靶点。不同浓度 H_2O_2 对 MUM-213 和 OCM-1A 细胞增殖具有抑制作用,与 Vector 组相比,H_2O_2 组和 H_2O_2 + USF2 组磷酸化组蛋白 H2AX(γH2AX)蛋白表达增加,H_2O_2 + USF2 组 γH2AX 蛋白表达高于 H_2O_2 组($P<0.05$)。不同浓度的司美替尼处理细胞后,UM 细胞活性逐渐下降,USF2 组细胞活性下降幅度大于 Vector 组($P<0.05$)。miR-92b-3p 靶向结合 USF2 抑制 UM 细胞增殖和侵袭。**结论** miR-92b-3p 可能通过调控 USF2/DNA 损伤轴抑制 UM 细胞增殖和侵袭。

[关键词] miR-92b-3p;上游刺激因子 2;DNA;葡萄膜黑色素瘤

[中图分类号] R739.7 + 2 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-03-24

miR-92b-3p/USF2/DNA damage axis regulates the proliferation and invasion of uveal melanoma

HAO Ya-nan, CHEN Yan-peng, TONG Zhen-zhen, YUAN Fen, ZHAO Xiao-min (Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou Hebei 075000, China)

Abstract: Objective To explore the effects of miR-92b-3p on the proliferation and invasion of uveal melanoma (UM). **Methods** The UM cells (OCM-1A and MUM-213) were divided into the Vector group, the USF2 group, the miR-NC group, the miR-92b-3p group and the miR-92b-3p + USF2 group. Bioinformatics was used to analyze the expressions of USF2 and miR-92b-3p in UM cells, and the relationship between the differential expression of USF2 and miR-92b-3p and clinical malignant phenotypes of UM, and the targeted relationship between USF2 and miR-92b-3p was predicted. The expression of miR-92b-3p in APRE-19, OCM-1A and MUM-213 cells was detected by RT-PCR. The cells proliferation ability was detected by CCK-8. The cell invasion ability was detected by cell invasion assay. The lactate dehydrogenase (LDH) kit was used to detect the LDH activity of the cells. The weight and volume of tumors were detected by xenografts experiment in nude mice. The expression of USF2 in tumor tissues was detected by immunohistochemistry. The expressions of USF2, Bcl-2 related X protein (Bax), B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) and proliferation-related antigen Ki67 were detected by Western blot. The targeted relationship between miR-92b-3p and USF2 was verified by dual luciferase reporter gene assay. **Results** USF2 was low expressed in UM cells, while miR-92b-3p was high expressed in UM cells, and both were related to the clinical malignant phenotypes of UM. USF2 might promote DNA damage. Overexpression of USF2 inhibited the proliferation and invasion of UM cells, increased the LDH activity, up-regulated the Bax protein expression, and down-regulated the expressions of Ki67 and Bcl-2 protein. Up-regulating the expression of USF2 could inhibit the growth of xenografts in nude mice. It was predicted by StarBase v2 database and verified by dual luciferase reporter gene assay that USF2 was the action target of miR-92b-3p. Different concentrations of H_2O_2 could inhibit the proliferation of MUM-213 and OCM-1A cells. Compared with the Vector group, the expression of phosphorylated H2AX (γH2AX) protein in the H_2O_2 group and the H_2O_2 + USF2 group were increased, while the expression of γH2AX protein in the H_2O_2 + USF2 group was higher than that in the H_2O_2 group ($P<0.05$). After the cells were treated with different concentrations of selumetinib, the activity of UM cells decreased gradually, and the decrease of cell activity in the USF2 group was greater than that in the Vector group ($P<0.05$). The miR-92b-3p could inhibit the proliferation and invasion of UM cells by targeting USF2. **Conclusion** miR-92b-3p can inhibit the proliferation and invasion of UM cells by regulating USF2/DNA damage axis.

Keywords: miR-92b-3p;upstream stimulatory factor 2;DNA;uveal melanoma

[基金项目] 河北省 2021 年度医学科学研究课题计划(20211086)

[通信作者] 陈妍鹏,E-mail:chenyanpeng1984@126.com

葡萄膜黑色素瘤(uveal melanoma,UM)是成人中常见的原发性眼内恶性肿瘤,为起源于虹膜、睫状体和脉络膜内的黑色素细胞,发病率高,患者预后差[1]。UM 早期症状无明显特异性,多数患者确诊时已处于中晚期,且 UM 具有极高的转移特性,多以肝转移为主,发生肝转移的患者生存率较低[2]。因此,探讨 UM 的发病机制对于该病的诊断和治疗有重要意义。微小 RNA(microRNA,miRNA)是一种由 20 多个核苷酸组成的非编码单链小分子 RNA,研究显示,miRNA 在包括 UM 在内的多种人类恶性肿瘤中发挥促癌或抑癌作用[3-5]。既往研究显示,miR-26a 在 UM 中低表达,上调 miR-26a 的表达可抑制 UM 细胞增殖、迁移和侵袭,并诱导凋亡,表明 miRNA 在 UM 恶性行为学中发挥重要作用[6]。miR-92b-3p 属于 miR-25 家族,可调控细胞生长周期,促进肿瘤细胞增殖,有研究显示,miR-92b-3p 可通过调节下游靶基因促进结直肠癌细胞增殖[7]。然而目前对于 miR-92b-3p 与 UM 的关系尚不清楚。上游刺激因子 2(upstream stimulatory factor 2,USF2)是一种多功能的转录因子,在真核生物中广泛表达[8]。目前关于 miR-92b-3p 是否可通过靶向 USF2 调控 UM 细胞增殖和侵袭尚未可知。本研究初步探讨 miR-92b-3p 对 UM 细胞增殖和侵袭的影响,并初步分析其可能的作用机制,以期为临床治疗 UM 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器

APRE-19、OCM-1A 和 MUM-213 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;RNA 提取试剂 TRIzol 及转染试剂 Lipofectamine™ 2000 均购自南京森贝伽生物科技有限公司;TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit 逆转录试剂盒购自上海妍琦生物科技有限公司;PCR 试剂盒 QuantiFast SYBR Green PCR kit 购自武汉极捷生物科技有限公司;Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒购自深圳市纽邦生物技术有限公司;RPMI 1640 培养基购自上海经科化学科技有限公司;胎牛血清购自爱必信(上海)生物科技有限公司;二喹啉甲酸(bisquinolinecarboxylic acid,BCA)蛋白浓度测定试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒均购自北京伊塔生物科技有限公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)试剂盒购自上海吉至生化科技有限公司;免疫组化染色试剂盒购自上海沪峥生物科技有限公司;司美替尼和 H_2O_2 溶液购自美国 Sigma 公司;磷酸化组蛋白 H2AX(phosphorylated H2AX,γH2AX)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 related X protein,Bax)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2,Bcl-2)、USF2 和 Ki67 多克隆抗体以及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白 G 二抗均购自上海科敏生物科技有限公司;DMEM 高糖培养基购自上海李记生物科技有限公司;双荧光素酶报告基因系统试剂盒购自成都安森盛源科技有限公司;ST-360 型酶标仪购自上海晚成医疗器械有限公司。

1.2 生物信息学分析

通过 TCGA 数据库下载 UM 临床样本数据,比较 miR-92b-3p 和 USF2 在 UM 患者不同临床病理特征间的表达情况。根据 USF2 在 UM 患者中的中位表达水平将 UM 患者分为 USF2 高表达患者和 USF2 低表达患者,并进行基因富集分析(gene set enrichment analysis,GSEA),以 FDR q val<25% 和/或 nom P val<0.01 的富集结果为差异有统计学意义。使用 Kaplan-Meier 数据库分析 miR-92b-3p 和 USF2 基因 mRNA 水平对 UM 患者生存期的影响。利用在线预测靶基因数据库 StarBase v2 数据库预测 miR-92b-3p 的靶基因。

1.3 细胞培养

将 APRE、OCM-1A 和 MUM-213 细胞接种至含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,在 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度条件下培养,细胞为贴壁生长,待胰酶消化液消化后传代培养,实验取对数生长期细胞。

1.4 构建 USF2 过表达细胞模型

取处于对数生长期的 OCM-1A 和 MUM-213 细胞构建 USF2 过表达模型,将 OCM-1A 和 MUM-213 细胞分为 Vector 组和 USF2 组,根据 Lipofectamine 2000 说明书将 USF2 NC 质粒转染至 Vector 组细胞,将 USF2 mimic 质粒转染至 USF2 组细胞,24 h 后更换为完全培养基。采用 Western blot 检测 USF2 蛋白表达水平,评估转染效率。将 OCM-1A 和 MUM-213 细胞分成 miR-NC 组、miR-92b-3p 组和 miR-92b-3p + USF2 组;miR-NC 组细胞转染 miR-NC 质粒,miR-92b-3p 组转染 miR-92b-3p mimic 质粒,miR-92b-3p + USF2 组转染 miR-92b-3p mimic 和 USF2 mimic 质粒。

1.5 RT-PCR 检测细胞 miR-92b-3p mRNA 表达

采用 TRIzol 法提取 APRE-19、OCM-1A 和 MUM-213 细胞中总 RNA,采用紫外分光光度计法测定 RNA 的浓度。按照 TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit 逆转录试剂盒说明书以 RNA 为模板进行逆转录获得 cDNA,4 ℃保存,进行荧光定量 PCR 扩增,置于 PCR 仪中测定,设置反应条件:95 ℃预变性 10 min,95 ℃变性 15 s,60 ℃退火 45 s,65 ℃延伸 1 min,4 ℃

扩增 10 min,40 个循环。以 β-actin 为内参,引物序列如下:miR-92b-3p 上游引物序列 5'-GTCCGCTATTGCACTCGTCCCGGCCTCC-3',下游引物序列 5'-GTGCGTGTCGTGGAGTC-3';β-actin 上游引物序列 5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3',下游引物序列 5'-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 miR-92b-3p mRNA 的相对表达水平。

1.6 CCK-8 检测细胞增殖

将转染 48 h 后的 OCM-1A 和 MUM-213 细胞消化离心(3 000 r/min,10 min)重悬,细胞以 5×10^3/孔的密度接种于 96 孔板。采用 Lipofectamine™ 2000 进行转染后将细胞置于 CO_2 培养箱中培养 24 h,于 0 d、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d 检测细胞增殖。每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,于 37 ℃孵育 2 h,采用酶标仪于 450 nm 波长下检测细胞吸光度,以检测细胞增殖能力。

1.7 Transwell 实验检测细胞侵袭

将 OCM-1A 和 MUM-213 细胞悬液接种于内铺 Matrigel 胶的 Transwell 小室中,下层添加含 10% 胎牛血清的培养基,于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 48 h,去除 Transwell 小室并倒去 24 孔板中的培养基,4% 多聚甲醛固定 10 min,结晶紫染色 15 min,PBS 洗 3 次,用无菌棉签移除未侵袭细胞,于倒置显微镜下观察,拍照并统计细胞数量。实验平行重复 3 次,取平均值。

1.8 CCK-8 检测 H_2O_2 干预细胞后对细胞活性的影响

将 OCM-1A 和 MUM-213 细胞以 5×10^3/孔的密度接种于 96 孔板,待细胞贴壁后,MUM-213 细胞加入不同浓度(0 μmol/L、200 μmol/L、400 μmol/L、600 μmol/L和 800 μmol/L)的 H_2O_2,OCM-1A 细胞加入不同浓度(0 μmol/L、250 μmol/L、500 μmol/L、750 μmol/L和 1 000 μmol/L)的 H_2O_2,37 ℃培养 24 h,随后每孔加入 10 μL CCK-8 和 90 μL DMEM 培养基,于 37 ℃孵化 2 h。采用酶标仪于 450 nm 波长下测定 OD 值,计算细胞存活率。

1.9 CCK-8 检测细胞转染 USF2 后对司美替尼化疗的敏感性

取处于对数生长期的 OCM-1A 和 MUM-213 细胞,待 Vector 组、USF2 组细胞贴壁后,加入不同浓度(0 μmol/L、0.5 μmol/L、1 μmol/L、2 μmol/L、4 μmol/L 和 8 μmol/L)的司美替尼。各组细胞处理完后采用 CCK-8 检测细胞活性,详细步骤见 1.8。

1.10 LDH 活性检测

将细胞以 2×10^5/mL 的密度接种于 6 孔板,待细胞密度为 60% ~ 70% 时,弃原培养基,消化离心(1 000 r/min,5 min),加入裂解液后离心(13 000 r/min,5 min)取上清液。按照 LDH 试剂盒说明书分别进行加样后,用酶联免疫检测仪在 440 nm 波长下测定 OD 值,计算 LDH 活性。

1.11 裸鼠移植瘤实验

10 只裸鼠购自四川省医学科学院/四川省人民医院实验动物研究所,许可证号:SCXK(川)2018-15,饲养于 20 ~ 25 ℃、相对湿度 50% ~ 60% 的环境中,自由饮食饮水,光照/黑暗周期为 12 h/12 h。将小鼠分为 Vector 组和 USF2 组,每组 5 只,分别于小鼠右侧腹股沟皮下接种 0.2 mL 转染 USF2-NC 的 UM 细胞和转染 USF2 的 UM 细胞,每 2 d 用微米级卡尺测量肿瘤体积,于第 14 天处死小鼠,剥离移植瘤并称重。

1.12 免疫组化染色

处死裸鼠后取出肿瘤组织,常规石蜡切片,烤片、脱蜡水化,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;微波修复 15 min,切片用过氧化酶抑制剂室温处理 10 min,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;滴加 CBL 抗体(1∶100),4 ℃孵育过夜;PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;滴加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白 G,室温孵育 10 min;PBS 充分淋洗后,滴加 H_2O_2-DAB 显色液显色;复染,脱水透明,封片。阴性对照用 PBS 代替一抗。于显微镜下观察并拍照。

1.13 双荧光素酶报告基因实验

构建野生型报告基因载体 USF2-WT 与突变型报告基因载体 USF2-MUT,分别与 miR-NC 或 miR-92b-3p 共转染到 UM 细胞中。置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 48 h,用荧光素酶检测试剂盒测量各组细胞中的荧光素酶活性。

1.14 Western blot 检测 Ki67、Bax、Bcl-2 和 USF2 蛋白表达

将各组处于对数生长期的 OCM-1A 和 MUM-213 细胞加入 SDS Loading buffer,沸水浴中煮沸 10 min,电压设置为 60 V,溴酚蓝前端进入分离胶后,电压调整到 120 V,溴酚蓝迁移到凝胶底部后,取出凝胶。将凝胶浸泡于转膜缓冲液中 10 min,PVDF 膜放在甲醇中平衡 5 min,以 200 mA 的恒流转膜 1 h。电转结束后取出 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h。加入封闭液稀释的抗体(1∶5 000),4 ℃孵育过夜。次日 PBST 洗涤 6 min,重复 3 次,然后加入封闭液稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1∶1 000),室温孵育 60 min,PBST 洗涤 6 min,重复 3 次,ECL 化学发光液显影,以 β-actin 作为内参,利用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度,具体操作参照试剂盒说明书。

1.15 Western blot 检测 γH2AX 蛋白表达

取处于对数生长期的 OCM-1A 和 MUM-213 细胞，将细胞分为 Vector 组、USF2 组、H_2O_2 组和 USF2 + H_2O_2 组，Vector 组不作处理，即正常培养；USF2 组转染 USF2 mimic 质粒；H_2O_2 组中 MUM-213 细胞以 600 μmol/L H_2O_2 处理，OCM-1A 细胞以 750 μmol/L H_2O_2 处理；USF2 + H_2O_2 组中 MUM-213 细胞转染 USF2 mimic 质粒 + 600 μmol/L H_2O_2 处理，OCM-1A 细胞转染 USF2 mimic 质粒 + 750 μmol/L H_2O_2 处理。采用 Western blot 检测各组细胞 γH2AX 蛋白表达，详细步骤见 1.14。

1.16 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件处理数据，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，组间差异采用 t 检验，采用单因素方差分析检验各组细胞增殖数和侵袭差异的显著性。*Kaplan-Meier* 生存曲线分析患者总生存期和无病生存期。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 USF2 在 UM 细胞中低表达，且抑制 UM 细胞增殖并诱导凋亡

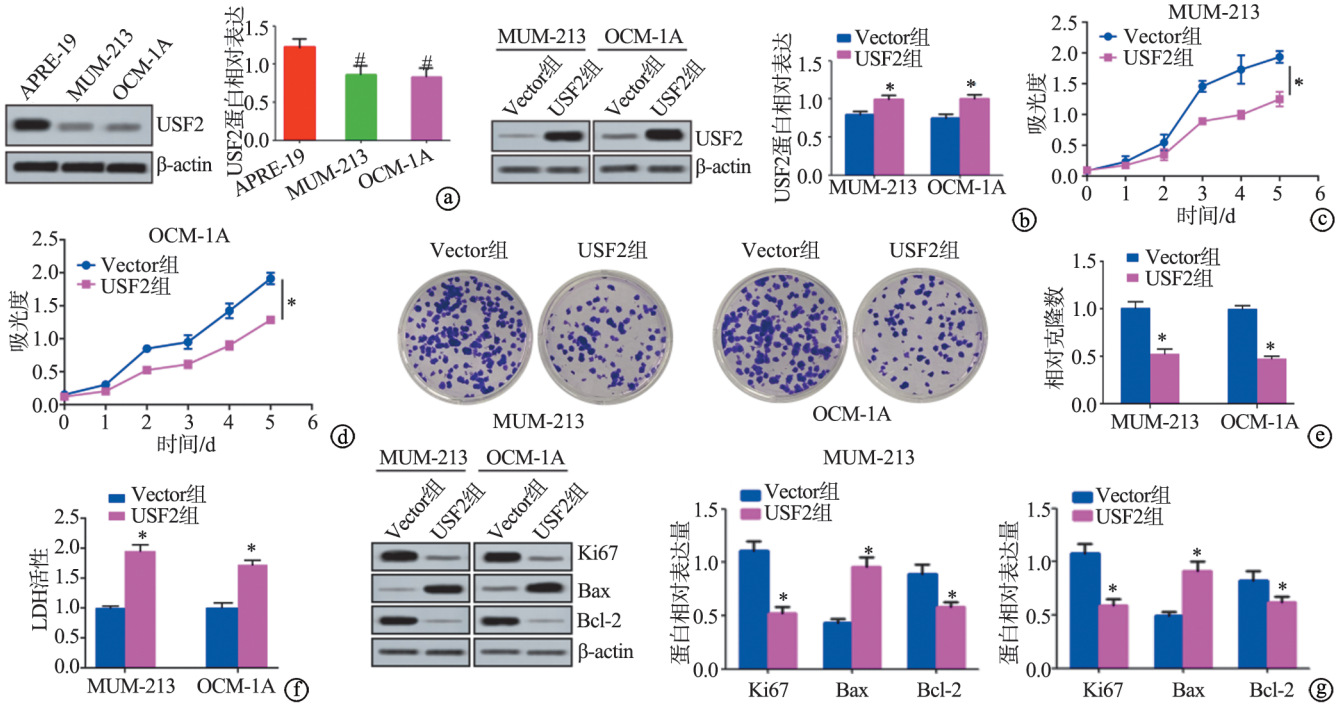
Western blot 实验结果显示，MUM-213 和 OCM-1A 细胞中 USF2 表达明显低于 APRE-19 细胞（$P<0.05$）；与 Vector 组相比，USF2 组中 USF2 表达明显增加（$P<0.05$）。细胞增殖实验结果显示，与 Vector 组相比，USF2 组中细胞吸光度明显降低（$P<0.05$）。细胞侵袭实验结果显示，与 Vector 组相比，USF2 组中侵袭细胞数明显减少（$P<0.05$）。与 Vector 组相比，USF2 组中细胞 LDH 活性明显增加（$P<0.05$）。Western blot 实验结果显示，与 Vector 组相比，USF2 组中 Ki67 和 Bcl-2 蛋白表达明显降低（$P<0.05$），Bax 蛋白表达明显增加（$P<0.05$），见图 1。

2.2 USF2 差异表达与 UM 恶性程度相关

TCGA 数据库分析结果显示，复发患者中 USF2 表达低于非复发患者（$P<0.05$）；M1 期（远处转移）患者 USF2 表达低于 M0 期（非远处转移）患者（$P<0.05$）；N1 期（淋巴结转移）患者 USF2 表达低于 N0 期（非淋巴结转移）患者（$P<0.05$）；USF2 低表达患者无病生存期低于 USF2 高表达患者（$P<0.05$），见图 2。

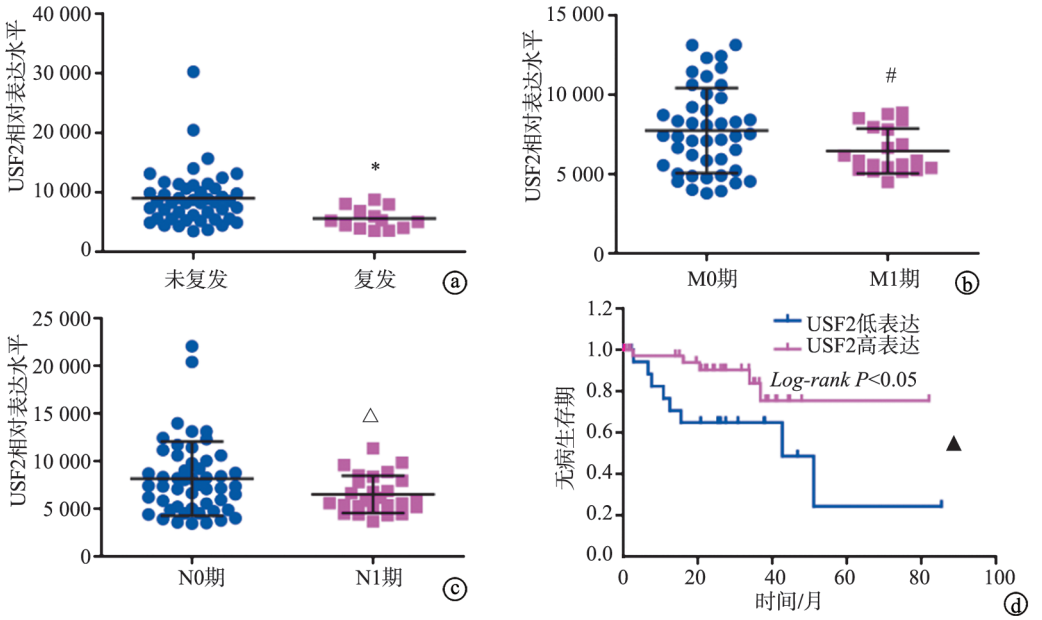
2.3 USF2 高表达在体内抑制 UM 细胞增殖

采用裸鼠移植瘤实验进一步验证 USF2 高表达在 UM 中的抑制作用，结果显示，USF2 组移植瘤体积和质量明显小于 Vector 组（$P<0.05$）。随着时间的推移，移植瘤体积不断增大，但 USF2 组的增长速度明显小于 Vector 组（$P<0.05$）。免疫组化染色显示，USF2 组中 USF2 蛋白表达明显高于 Vector 组（$P<0.05$），见图 3。



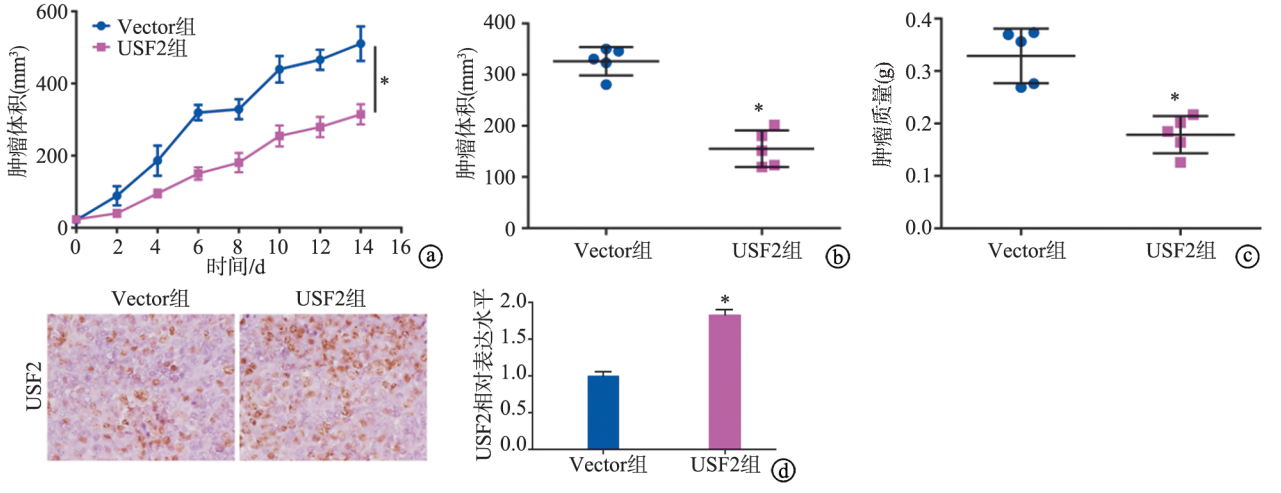
a：USF2 在不同 UM 细胞中的表达；b：Western blot 检测 MUM-213 和 OCM-1A 细胞中 USF2 蛋白表达；c：MUM-213 细胞增殖实验；d：OCM-1A细胞增殖实验；e：MUM-213 和 OCM-1A 细胞侵袭实验；f：MUM-213 和 OCM-1A 细胞 LDH 活性；g：Western blot 检测 MUM-213和 OCM-1A 细胞相关凋亡蛋白表达 *：与 Vector 组相比，$P<0.05$；#：与 APRE-19 细胞相比，$P<0.05$

图 1 USF2 在 UM 细胞中低表达，且抑制 UM 细胞增殖并诱导凋亡



a:USF2 在复发和非复发 UM 患者中的差异表达;b:USF2 在 M1 期(远处转移)与 M0 期(非远处转移)UM 患者中的差异表达;c:USF2在 N1 期(淋巴结转移)与 N0 期(非淋巴结转移)UM 患者中的差异表达;d:USF2 差异表达对 UM 患者无病生存期的影响 *:与非复发患者相比,$P<0.05$;#:与 M0 期患者相比,$P<0.05$;△:与 N0 期患者相比,$P<0.05$;▲:与 USF2 高表达患者相比,$P<0.05$

图 2 USF2 差异表达与 UM 恶性程度相关



a:移植瘤体积随时间的变化;b:移植瘤瘤体体积;c:移植瘤瘤体质量;d:免疫组化染色检测 UM 组织中 USF2 表达(×200) *:与 Vector 组相比,$P<0.05$

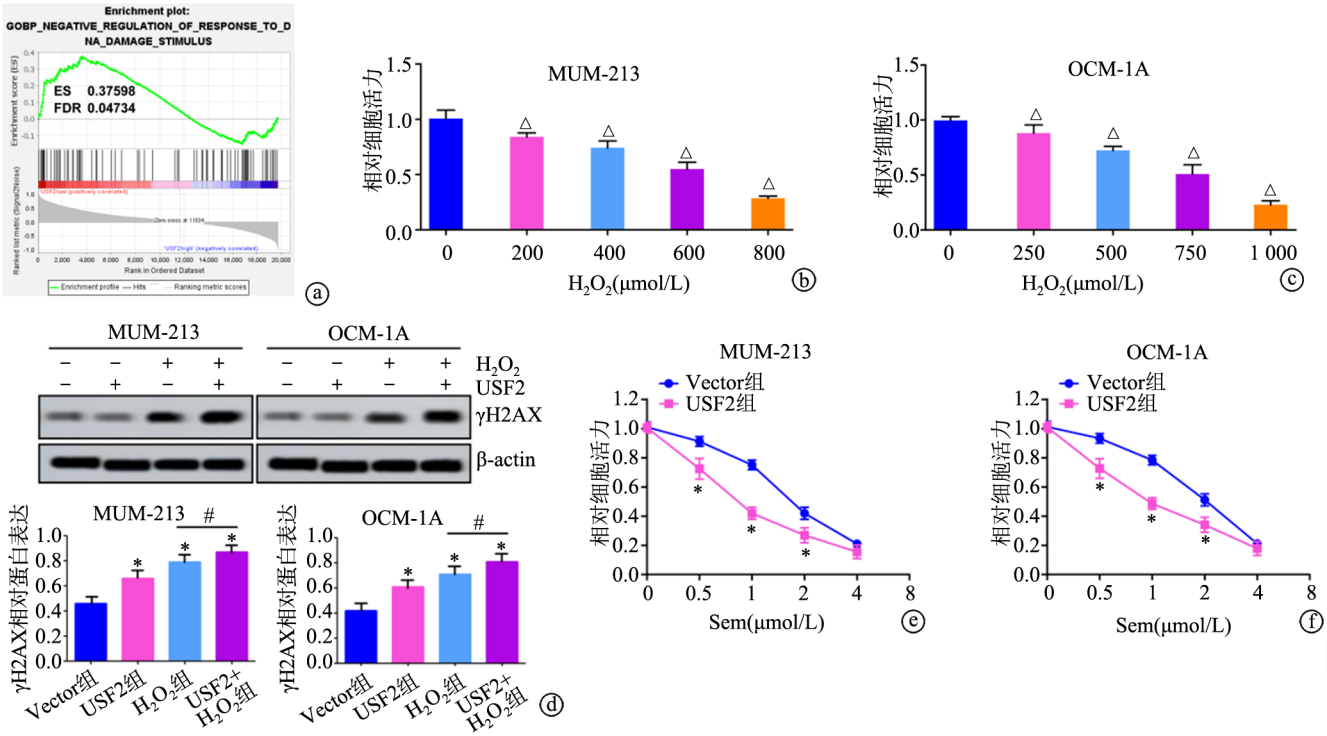
图 3 USF2 高表达在体内抑制 UM 细胞增殖

2.4 USF2 促进 DNA 损伤和增强 UM 细胞对司美替尼化疗的敏感性

GSEA 结果显示,USF2 差异表达水平与 DNA 损伤有关。不同浓度 H_2O_2 对 MUM-213 和 OCM-1A 细胞增殖具有抑制作用,相对细胞活力随着 H_2O_2 浓度增加而降低。Western blot 实验结果显示,与 Vector 组相比,USF2 组、H_2O_2 组和 H_2O_2 + USF2 组 γH2AX 蛋白表达明显增加($P<0.05$),H_2O_2 + USF2 组 γH2AX 蛋白表达明显高于 H_2O_2 组($P<0.05$)。用不同浓度的司美替尼处理细胞后,UM 细胞活性逐渐下降,在浓度为 0.5 μmol/L、1 μmol/L、2 μmol/L 时 USF2 组细胞活性小于 Vector 组($P<0.05$),见图 4。

2.5 miR-92b-3p 可靶向结合 USF2 抑制 USF2 表达

RT-PCR 实验结果显示,MUM-213 和 OCM-1A 细胞中 miR-92b-3p mRNA 表达高于 APRE-19 细胞($P<0.05$)。TCGA 数据库分析结果显示,与肿瘤分期Ⅱ期患者相比,肿瘤分期Ⅲ~Ⅳ期患者中 miR-92b-3p 高表达($P<0.05$);与T2~T3期患者相比,T4期患者



a:USF2 差异表达与 DNA 损伤有关;b:不同浓度 H_2O_2 抑制 MUM-213 细胞活性;c:不同浓度 H_2O_2 抑制 OCM-1A 细胞活性;d:Western blot 检测 DNA 损伤标记物;e:RT-PCR 检测不同浓度司美替尼作用后 MUM-213 细胞活性;f:RT-PCR 检测不同浓度司美替尼作用后 OCM-1A 细胞活性 ＊:与 Vector 组相比,$P<0.05$;#:与 H_2O_2 组相比,$P<0.05$;△:与 0 μmol/L H_2O_2 相比,$P<0.05$

图 4 USF2 促进 DNA 损伤和增强 UM 细胞对司美替尼化疗的敏感性

中 miR-92b-3p 高表达($P<0.05$);与非复发患者相比,复发患者中 miR-92b-3p 高表达($P<0.05$);与 miR-92b-3p 低表达患者相比,miR-92b-3p 高表达患者总生存期明显较短($P<0.05$)。生物信息学分析结果表明,miR-92b-3p 序列 3'-UTR 区与 USF2 存在结合位点。双荧光素酶报告基因实验显示,miR-92b-3p mimic 与 USF2-WT 共转染致荧光素酶活性降低($P<0.05$)。在 OCM-1A 和 MUM-213 细胞中,RT-PCR 实验结果显示,与 Vector 组相比,USF2 组中 USF2 mRNA 表达明显降低($P<0.05$)。Western blot 实验结果显示,与 Vector 组相比,USF2 组中 USF2 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$),见图 5。

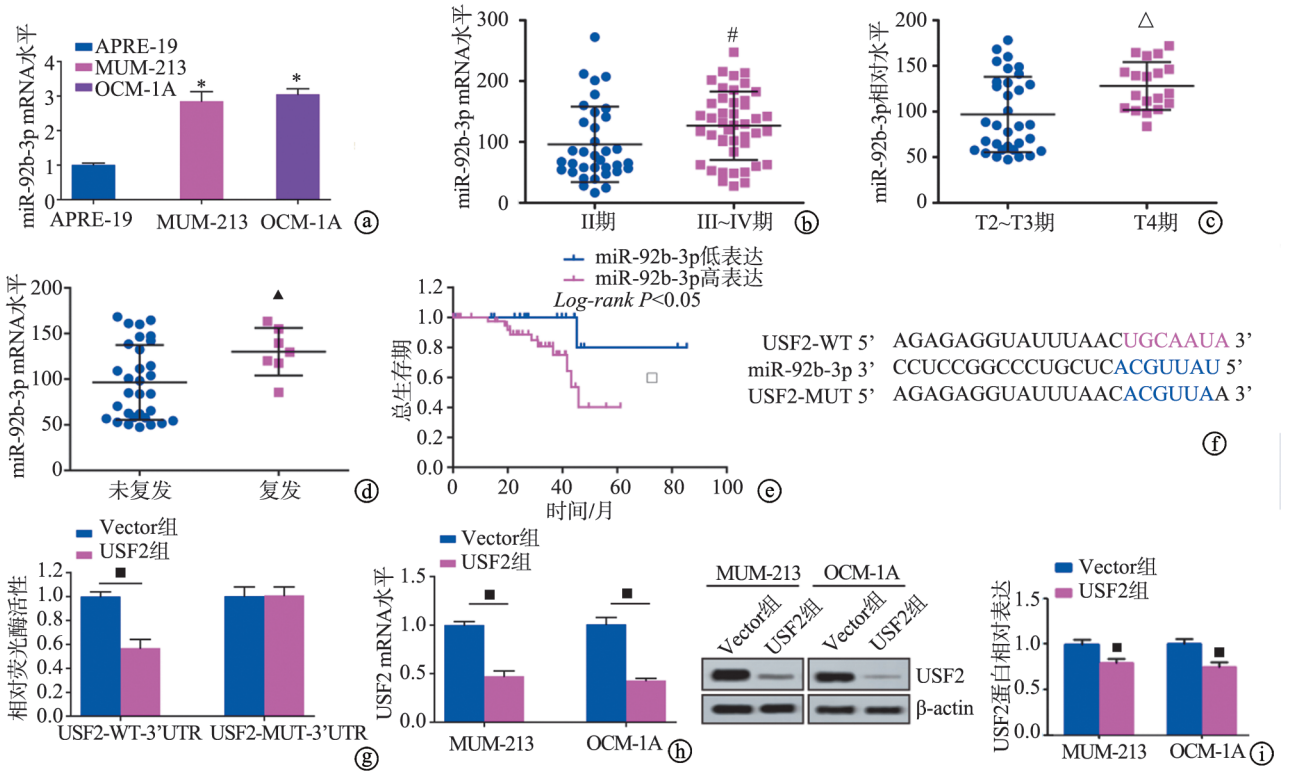
2.6 miR-92b-3p 靶向结合 USF2 抑制 UM 细胞增殖和侵袭

在 OCM-1A 和 MUM-213 细胞中,Western blot 实验结果显示,与 miR-NC 组相比,miR-92b-3p 组中 USF2 蛋白表达明显降低($P<0.05$),miR-92b-3p + USF2 组中 USF2 蛋白表达无明显差异($P>0.05$)。细胞增殖实验结果显示,与 miR-NC 组相比,miR-92b-3p 组中细胞吸光度明显增加($P<0.05$),miR-92b-3p + USF2 组中细胞吸光度无明显差异($P>0.05$)。细胞侵袭实验结果显示,与 miR-NC 组相比,miR-92b-3p 组中侵袭细胞数明显增加($P<0.05$),miR-92b-3p + USF2 组中侵袭细胞数无明显差异($P>0.05$)。细胞 LDH 活性检测结果显示,与 miR-NC 组相比,miR-92b-3p 组中细胞 LDH 活性明显降低($P<0.05$),miR-92b-3p + USF2 组中细胞 LDH 活性无明显差异($P>0.05$),见图 6。

3 讨论

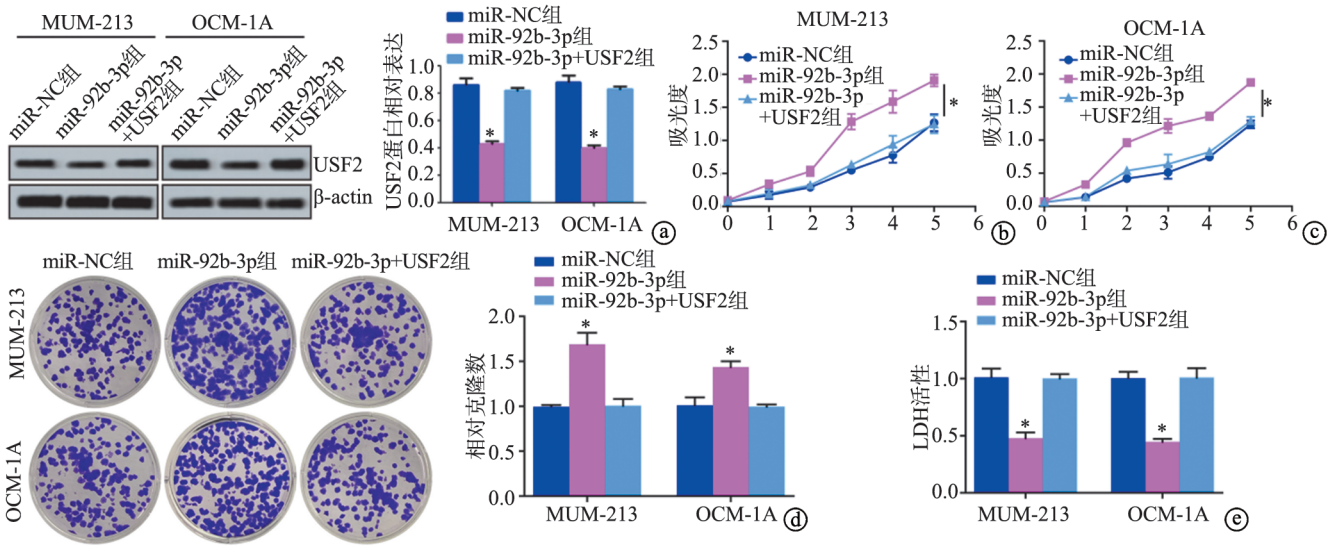
UM 是发生于眼球的疾病,具有转移速度快、恶性程度高、患病率高以及预后不良等特点,严重影响患者生活和生命健康[9]。目前对于 UM 转移的风险尚不清楚,且早期转移无明显症状,当患者被发现出现转移时临床干预效果不理想,导致患者病死率高[10]。因此,研究 UM 的发病机制并寻找有效的生物靶点对临床治疗 UM 意义重大。

本研究通过生物信息学分析发现,USF2 在复发 UM 患者中的表达低于非复发患者,且 USF2 差异表达与 UM 临床恶性程度相关。Western blot 实验结果显示,UM 细胞(MUM-213 和 OCM-1A 细胞)中 USF2 表达明显低于 APRE-19 细胞,表明 USF2 在 UM 细胞中低表达。因此,本研究构建 USF2 过表达细胞模型进行体外试验,分析 USF2 在 UM 细胞中的作用。细胞增殖实验显示,USF2过表达抑制细胞增殖;细胞侵袭



a:miR-92b-3p mRNA 在 UM 细胞中高表达;b:miR-92b-3p mRNA 在 UM 不同分期中的差异表达;c:miR-92b-3p 差异表达与 UM 侵犯其他组织进展;d:miR-92b-3p 在复发和非复发患者中差异表达;e:miR-92b-3p 差异表达对患者总生存期的影响;f:miR-92b-3p 与 USF2 的靶标关系;g:双荧光素酶报告基因实验验证 miR-92b-3p 与 USF2 的靶标关系;h:USF2 mRNA 相对表达水平;i:USF2 蛋白相对表达水平 ＊:与 APRE-19 细胞相比,$P<0.05$;#:与Ⅱ期患者相比,$P<0.05$;△:与 T2~T3 期患者相比,$P<0.05$;▲:与非复发患者相比,$P<0.05$;□:与 miR-92b-3p 低表达患者相比,$P<0.05$;■:与 Vector 组相比,$P<0.05$

图 5 miR-92b-3p 可靶向结合 USF2 抑制 USF2 表达



a:USF2 蛋白表达;b:MUM-213 细胞增殖实验;c:OCM-1A 细胞增殖实验;d:OCM-1A 和 MUM-213 细胞侵袭实验;e:OCM-1A 和 MUM-213 细胞 LDH 活性 ＊:与 miR-NC 组相比,$P<0.05$

图 6 miR-92b-3p 靶向结合 USF2 抑制 UM 细胞增殖和侵袭

实验结果显示,USF2 过表达抑制细胞侵袭。细胞 LDH 活性检测结果显示,USF2过表达增加细胞LDH 活性;Western blot 实验结果显示,USF2 过表达下调 Ki67 和 Bcl-2 蛋白表达,上调 Bax 蛋白表达。LDH 是含有锌离子的金属蛋白,是一种糖酵解酶,参与机体的糖代谢过程[11]。LDH 在体内分布广泛,主要存在于细

胞质中,当细胞出现损伤时,胞质中的 LDH 释放到血液中导致 LDH 水平异常升高,是临床常用的检测细胞损伤的指标,可作为癌症诊断和预后的重要标志物[12]。既往研究显示,乳腺癌患者治疗后 LDH 水平与治疗后肿瘤复发转移具有一定相关性[13],提示 LDH 水平与肿瘤发展进程具有一定相关性。Ki67 表达可以反映肿瘤细胞有丝分裂增殖情况,与肿瘤的分化程度、分型以及淋巴结转移均有关,是公认的增殖因子[14]。既往研究显示,Ki67 可作为前列腺癌预后的危险因素[15]。抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 均为 Bcl-2 家族成员,二者协同作用调控机体细胞凋亡[16]。既往研究显示,miR-93 可能通过调节 Bcl-2、Bax 表达参与胃癌细胞凋亡过程[17],结合本研究结果推测 USF2 可能通过调节 Bcl-2、Bax 表达影响 UM 发展进程。本研究结果显示,USF2 过表达可抑制 UM 细胞增殖、侵袭,增加 LDH 活性,通过上调促凋亡蛋白 Bax 表达,下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达,进而诱导 UM 细胞凋亡。

为进一步验证 USF2 过表达在 UM 细胞中发挥的抑制作用,我们进行裸鼠移植瘤实验,结果显示,USF2 组移植瘤体积和质量明显小于 Vector 组,随着时间的推移,移植瘤体积不断增大,在 14 d 时,USF2 组瘤体体积明显小于 Vector 组;免疫组化结果显示,USF2 组中 USF2 表达明显高于 Vector 组,提示 USF2 过表达可在体内抑制 UM 肿瘤生长。本研究通过生物信息学分析发现,USF2 可能促进 DNA 损伤。本研究发现,在 H_2O_2 处理后,UM 细胞吸光度随着其浓度增加而降低,说明 H_2O_2 浓度越大对 UM 细胞活力的抑制程度越强;不同浓度的司美替尼处理细胞后,UM 细胞活性逐渐下降,USF2 组细胞活性下降幅度大于 Vector 组,说明司美替尼浓度越大 UM 对化疗药的敏感性越强;此外,USF2 过表达 UM 细胞经 H_2O_2 干预后,γH2AX 蛋白表达明显增加。H2AX 是组蛋白 H2A 家族成员之一,在 DNA 双链断裂的早期,H2AX 迅速磷酸化生产 γH2AX,募集其他 DNA 修复蛋白至损伤点,可作为检测 DNA 双链断裂的一个强有力的新标志物[18-19]。既往研究显示,在 H_2O_2 导致肺正常上皮细胞的氧化损伤中,γH2AX 可作为 DNA 氧化损伤标志物[20]。此外,本研究还发现 miR-92b-3p 在 UM 细胞中高表达,且与细胞临床病理特征有关;双荧光素酶报告基因实验证实 miR-92b-3p 可与 USF2 靶向结合,下调 USF2 蛋白表达。系列功能实验表明恢复 USF2 表达可以逆转 miR-92b-3p 促癌作用。提示 miR-92b-3p 可通过 USF2/DNA 损伤轴抑制 UM 的发展进程。

综上所述,本研究发现 USF2 在 UM 细胞中低表达,miR-92b-3p 在 UM 细胞中高表达,生物信息学分析发现,miR-92b-3p 存在与 USF2 靶向结合的位点。上调 USF2 可以抑制 UM 细胞增殖、侵袭并诱导凋亡,参与 DNA 损伤过程,裸鼠移植瘤实验证实 USF2 过表达可以抑制移植瘤的生长,其作用机制可能是通过 miR-92b-3p/USF2/DNA 损伤轴调节 UM 的发展进程。

[参考文献]

[1] Heiferman MJ, Mahajan VB, Mruthyunjaya P. Proteomics in uveal melanoma[J]. Curr Opin Ophthalmo, 2022, 33(3): 202 - 210. doi: 10.1097/ICU.0000000000000835.

[2] Abdel-Aty A, Linderman WL, Kombo N, et al. Necrotic uveal melanoma mimics orbital cellulitis: a review[J]. Ocul Oncol Pathol, 2022, 8(1): 1 - 8. doi: 10.1159/000515558.

[3] Wang S, Talukder A, Cha M, et al. Computational annotation of miRNA transcription start sites[J]. Brief Bioinform, 2021, 22(1): 380 - 392. doi: 10.1093/bib/bbz178.

[4] Farshbaf-Khalili A, Farajnia S, Pourzeinali S, et al. The effect of nanomicelle curcumin supplementation and Nigella sativa oil on the expression level of miRNA-21, miRNA-422a, and miRNA-503 gene in postmenopausal women with low bone mass density: a randomized, triple-blind, placebo-controlled clinical trial with factorial design[J]. Phytother Res, 2021, 35(11): 6216 - 6227. doi: 10.1002/ptr.7259.

[5] Taghizadeh M, Kargarfard M, Braune S, et al. Long-term aerobic exercise training in type two diabetic patients alters the expression of miRNA-223 and its corresponding target, the P2RY12 receptor, attenuating platelet function[J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2022, 80(2): 107 - 116. doi: 10.3233/CH - 211209.

[6] 李 娜,曹 娟,郁继国,等. miR-26a 对葡萄膜黑色素瘤细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响及机制研究[J]. 眼科新进展, 2017, 37(7): 619 - 622. doi: 10.13389/j.cnki.rao.2017.0157.

[7] Muñoz ER, Caccese JB, Wilson BE, et al. Effects of purposeful soccer heading on circulating small extracellular vesicle concentration and cargo[J]. J Sport Health Sci, 2021, 10(2): 122 - 130. doi: 10.1016/j.jshs.2020.11.006.

[8] Liu F, Wang X, Zheng B, et al. USF2 enhances the osteogenic differentiation of PDLCs by promoting ATF4 transcriptional activities[J]. J Periodontal Res, 2020, 55(1): 68 - 76. doi: 10.1111/jre.12689.

[9] Nathan P, Hassel JC, Rutkowski P, et al. Overall survival benefit with tebentafusp in metastatic uveal melanoma[J]. N Engl J Med, 2021, 385(13): 1196 - 1206. doi: 10.1056/NEJMoa2103485.

[10] Pelster MS, Gruschkus SK, Bassett R, et al. Nivolumab and ipilimumab in metastatic uveal melanoma: results from a single-arm phase Ⅱ study[J]. J Clin Oncol, 2021, 39(6): 599 - 607. doi: 10.1200/JCO.20.00605.

[11] Wu L, Zhou X, Wan G, et al. Novel hierarchical CuNiAl LDH nanotubes with excellent peroxidase-like activity for wide-range detection of glucose[J]. Dalton Trans, 2021, 50(1): 95 - 102. doi: 10.1039/d0dt03288c.

[12] 吴明月,黄紫霞,许 锋,等. 扁塑藤素对 LPS 诱导的 HUVEC 细胞功能损伤和焦亡的作用[J]. 中南医学科学杂志, 2022, 50(2): 175 - 178. doi: 10.15972/j.cnki.43 - 1509/r.2022.02.005.

doi:10.11659/jjssx.04E022109

·基础研究·

miR-1225-5p 过表达对宫颈癌 Hela 细胞的影响

赵晓燕[1],石克威[2],马春星[1],张 娟[1],许文强[2] (1.河北北方学院附属第一医院妇科,河北 张家口 075000;2.河北北方学院附属第一医院产科,河北 张家口 075000)

[摘 要] **目的** 探讨 miR-1225-5p 过表达对宫颈癌 Hela 细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移的影响。**方法** qRT-PCR 检测 20 例宫颈癌患者癌旁正常组织和癌组织及 Etc1/E6E7、Caski、Hela、SiHa、C4-1 细胞系中 miR-1225-5p 的表达。选择宫颈癌 Hela 细胞进行研究。用 Lipofectamine 2000 将 miR-1225-5p mimic 和 miR-NC 转染到 Hela 细胞。采用 CCK-8、细胞克隆形成实验、流式细胞术、Transwell实验和细胞划痕实验分别检测 Hela 细胞的增殖、凋亡、侵袭和迁移;Western blot 检测 Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9、E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平。**结果** 宫颈癌组织中 miR-1225-5p 的表达水平低于癌旁正常组织($P<0.01$),宫颈癌细胞系中 miR-1225-5p 的表达水平降低($P<0.05$)。过表达 miR-1225-5p 后 Hela 细胞增殖能力、克隆形成率、侵袭细胞数和划痕愈合率降低($P<0.01$),Hela 细胞凋亡率升高($P<0.01$),Bax/Bcl-2 比值、cleaved caspase-3/caspase-3、cleaved caspase-9/caspase-9 和 E-cadherin 蛋白表达水平上调($P<0.01$),N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平下调($P<0.01$)。**结论** miR-1225-5p过表达能抑制 Hela 细胞增殖、侵袭和迁移,并诱导细胞凋亡。

[关键词] miR-1225-5p;宫颈癌;细胞增殖;凋亡;侵袭;迁移

[中图分类号] R737.33 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-04-25

Effect of overexpression of miR-1225-5p on Hela cells of cervical cancer

ZHAO Xiao-yan[1], SHI Ke-wei[2], MA Chun-xing[1], ZHANG Juan[1], XU Wen-qiang[2] (1. Department of Gynaecology, First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou Hebei 075000, China; 2. Department of Obstetrics, First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou Hebei 075000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of overexpression of miR-1225-5p on the proliferation, apoptosis, invasion and migration of Hela cells of cervical cancer. **Methods** qRT-PCR was used to detect the expression of miR-1225-5p in adjacent normal tissues in 20 cervical cancer patients and cancer tissues and Etc1/E6E7, Caski, Hela, SiHa and C4-1 cell lines. The Hela cells of cervical cancer were selected for study. miR-1225-5p mimic and miR-NC were transfected into Hela cells with Lipofectamine 2000. CCK-8, cell clone formation assay, flow cytometry, Transwall assay and cell scratch wound healing assay were used to detect the proliferation, apoptosis, invasion and migration of Hela cells. The protein expression levels of Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3, cleaved caspase-9, E-cadherin, N-cadherin and Vimentin were

[基金项目] 2019 年度张家口科技计划项目(1921027D)

[通信作者] 赵晓燕,E-mail:XYZ2407409578@163.com

[13] 黄 芬.血清碱性磷酸酶、乳酸脱氢酶对乳腺癌患者生存预后的评估价值[J].实用癌症杂志,2019,34(6):905-907.doi:10.3969/j.issn.1001-5930.2019.06.010.

[14] 王理槐,孙银辉,张领兄,等.基于 Wnt/β-catenin 信号通路探讨血府逐瘀汤在非小细胞肺癌 EGFR-TKI 获得性耐药中的作用[J].陕西中医,2022,43(4):427-431.doi:10.3969/j.issn.1000-7369.2022.04.004.

[15] 黄 婷,刘佳佳,张家伟,等.Ki67 在预测前列腺癌预后中的作用[J].中华男科学杂志,2019,25(12):1088-1092.doi:10.13263/j.cnki.nja.2019.12.005.

[16] Cahyadi A, Ugrasena IDG, Andarsini MR, et al. Relationship between Bax and Bcl-2 protein expression and outcome of induction phase chemotherapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2022, 23(5): 1679-1685. doi: 10.31557/APJCP.2022.23.5.1679.

[17] 李光曙,寇继光,钟碧波,等.miR-93 通过调节 Bax/Bcl-2 的表达活性对胃癌细胞增殖、迁移及凋亡的影响[J].现代消化及介入诊疗,2021,26(6):718-722.doi:10.3969/j.issn.1672-2159.2021.06.013.

[18] GuerreroLlobet S, Bhattacharya A, Everts M, et al. An mRNA expression-based signature for oncogene-induced replication-stress[J]. Oncogene, 2022, 41(8): 1216-1224. doi: 10.1038/s41388-021-02162-0.

[19] Chen LJ, Zhang NN, Zhou CX, et al. Gm364 coordinates MIB2/DLL3/Notch2 to regulate female fertility through AKT activation[J]. Cell Death Differ, 2022, 29(2): 366-380. doi: 10.1038/s41418-021-00861-5.

[20] 乔婷婷,葛淑静,罗 渊,等.H_2AX 磷酸化抑制肺癌细胞发生上皮-间质转化的作用机制[J].中国癌症杂志,2021,31(4):277-284.doi:10.19401/j.cnki.1007-3639.2021.04.006.

(编辑:贺绍梅)