

## 干扰黑色素瘤细胞A375中miR-210的表达 对细胞转移及金属基质蛋白酶相关分子的影响

梁艳,牟宽厚,韩丹,黄知平

(西安交通大学第一附属医院皮肤性病科,陕西 西安 710061)

**【摘要】目的** 探究黑色素瘤中微小RNA-210 (miR-210)的表达情况及干扰人黑色素瘤细胞A375中miR-210的表达对细胞转移能力及金属基质蛋白酶(MMP)表达的影响。**方法** 收集西安交通大学第一附属医院病理科2016年3月1日至2017年5月31日的37例皮肤恶性黑色素瘤组织,17例交界痣组织及30例正常皮肤组织,荧光定量链式聚合酶反应(qPCR)检测组织中miR-210的表达情况。体外培养A375细胞,慢病毒转染空白载体及小干扰RNA(siRNA)介导的干扰miR-210载体于A375细胞中,分别作为对照组及干扰组细胞,qPCR检测两组细胞miR-210、MMP-2及MMP-9 mRNA表达水平,Western blot实验检测两组细胞MMP-2、MMP-9蛋白表达水平,Transwell侵袭实验检测两组细胞侵袭能力,Transwell迁移实验检测两组细胞迁移能力。**结果** 与交界痣及正常皮肤组织相比,黑色素瘤组织miR-210表达显著增高[( $0.165\pm0.060$ ) vs ( $0.076\pm0.033$ )及( $0.048\pm0.046$ )],差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );与对照组细胞相比,干扰组细胞miR-210 [( $0.153\pm0.037$ ) vs ( $0.372\pm0.041$ )]、MMP-2 mRNA [ $(0.175\pm0.053)$  vs ( $0.424\pm0.038$ )]及MMP-9 mRNA [ $(0.323\pm0.068)$  vs ( $0.610\pm0.102$ )]表达水平显著下调,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );与对照组细胞相比,干扰组细胞MMP-2 [ $(0.114\pm0.016)$  vs ( $0.356\pm0.047$ )]及MMP-9 [ $(0.263\pm0.030)$  vs ( $0.571\pm0.084$ )]蛋白表达水平显著下调,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );与对照组细胞相比,干扰组细胞侵袭细胞数显著减少[( $36.9\pm8.7$ )个 vs ( $72.3\pm10.5$ )个],干扰组细胞迁移细胞数也显著减少[( $45.3\pm9.4$ )个 vs ( $78.3\pm12.6$ )个],差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 恶性黑色素瘤中miR-210存在高表达,体外干扰A375细胞miR-210的表达可介导MMP分子表达下调,进而抑制细胞转移能力,是潜在的分子靶向治疗位点。

**【关键词】** 黑色素瘤;微小RNA-210;细胞转移;金属基质蛋白酶

**【中图分类号】** R739.5   **【文献标识码】** A   **【文章编号】** 1003—6350(2018)05—0596—04

**Effect of interfering the expression of miR-210 on cell metastasis and MMP related molecules in melanoma cell line A375.** LIANG Yan, MAO Kuan-hou, HAN Dan, HUANG Zhi-ping. Department of Dermatology and Sexually Transmitted Diseases, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi, CHINA

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression level of miR-210 in melanoma tissues and the effect of interfering the expression of microRNA-210 (miR-210) on the ability of cell metastasis and the expression of metal matrix protease (MMP) in human melanoma cell line A375. **Methods** A total of 37 cases of malignant melanoma of the skin, including 17 cases of junctional nevus and 30 cases of normal skin tissues, were collected from Department of Dermatology and Sexually Transmitted Diseases of the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University from March 1, 2016 to May 31, 2017. Fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to detect the expression of miR-210 in each tissue. A375 cells were cultured and transfected with empty lentivirus vector and miR-210 lentivirus small interference RNA vector, respectively, as the control group and interference group. qPCR was used to detect the expression of miR-210, MMP-2 and MMP-9 mRNA in two groups of cells. Western blot assay was used to detect the expressions of MMP-2 and MMP-9 protein in two groups of cells. Transwell invasion assay was used to detect the ability of cell invasion, and Transwell migration assay was applied to detect the ability of cell migration. **Results** Compared with junctional nevus and normal skin tissue, the expression of miR-210 in melanoma tissue was significantly increased, ( $0.165\pm0.060$ ) vs ( $0.076\pm0.033$ ) and ( $0.048\pm0.046$ ), and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, the expression of miR-210 ( $0.153\pm0.037$ ) vs ( $0.372\pm0.041$ ), MMP-2 ( $0.175\pm0.053$ ) vs ( $0.424\pm0.038$ ) and MMP-9 ( $0.323\pm0.068$ ) vs ( $0.610\pm0.102$ ) mRNA in interference group were significantly decreased, and the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, the expressions of MMP-2 ( $0.114\pm0.016$ ) vs ( $0.356\pm0.047$ ) and MMP-9 ( $0.263\pm0.030$ ) vs ( $0.571\pm0.084$ ) protein in interference group were significantly decreased, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, the number of cell invasion in interference group was significantly decreased ( $36.9\pm8.7$ ) vs ( $72.3\pm10.5$ ), and the number of cell migration was significantly decreased ( $45.3\pm9.4$ ) vs ( $78.3\pm12.6$ ), and the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). **Conclusion** High expression of miR-210 is found in malignant melanoma. The interference of miR-210 in A375 cells *in vitro* can down-regulate the expression of MMP and inhibit cell metastasis, which is a potential molecular targeted therapeutic site.

**【Key words】** Melanoma; miR-210; Cell metastasis; Metal matrix protease

通讯作者:黄知平。E-mail:191060635@qq.com

黑色素瘤在皮肤肿瘤中恶性程度最高,其侵袭转移能力强,易发生远处转移<sup>[1]</sup>,因此明确黑色素瘤细胞侵袭转移的机制对黑色素瘤早期诊断及靶向治疗具有重要意义。微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是大小为21~25 nt的内源性非编码RNA分子,其可调控真核细胞基因表达,影响细胞的生长及分化<sup>[2]</sup>。microRNA-210(miR-210)是机体内重要的缺氧调控因子,可通过调节缺氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α,Hif-1α),参与细胞的缺氧适应<sup>[3]</sup>。而缺氧微环境是实体肿瘤的重要特征<sup>[4]</sup>,miR-210也被发现参与非小细胞肺癌、乳腺癌及胃癌等多种恶性肿瘤的发生发展<sup>[5]</sup>。但目前尚未开展miR-210与黑色素瘤的相关工作。本研究通过体外实验的手段,干扰人黑色素瘤细胞A375中miR-210的表达,检测其对细胞转移能力及金属基质蛋白酶2/9(metal matrix protease-2/-9,MMP-2/-9)的影响,为明确miR-210在黑色素瘤中的生物学作用及黑色素瘤临床诊治工作提供新的方向。

## 1 材料与方法

**1.1 临床组织标本** 收集西安交通大学第一附属医院病理科2016年3月1日至2017年5月31日的37例皮肤恶性黑色素瘤组织,患者男性15例,女性22例;年龄33~75岁,平均(53.9±10.9)岁;淋巴结转移11例,无淋巴结转移26例;浸润深度:I级(表皮及附属器)9例;II~III级(真皮乳头层)13例,IV级(真皮网状层)10例,V级(皮下组织)5例。患者术前均未行任何形式的抗肿瘤治疗。收集同期17例交界痣组织及30例整形外科收集的正常皮肤组织作为对照,交界痣患者中男性7例,女性10例;年龄38~67岁,平均(47.2±11.6)岁。正常皮肤组织人群中男性13例,女性17例;年龄24~68岁,平均(46.9±12.4)岁。三组人群均未合并其他严重皮肤及器质性疾病,且性别及年龄比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。

**1.2 实验细胞** 人黑色素瘤细胞A375及人胚肾细胞HEK293来自美国模式菌种收集中心。

**1.3 实验试剂及主要材料** DMEM高糖培养液、RPMI-1640培养液及胎牛血清(美国Gibco公司),胰蛋白酶(美国Sigma公司);Lipofectamine 2000脂质体(美国Thermo Scientific公司)、阳离子聚合物Sofast(厦门太阳马生物工程公司)、病毒包装载体pLP-gag/pol,pLP-Rev和pLP-VSVG(美国Addgene公司)、嘌呤霉素Puromycin(美国Sigma公司)、空白载体及小干扰RNA(siRNA)介导的干扰miR-210载体(上海吉凯基因公司);RNA提取试剂盒(RNAiso Reagent)、逆转录试剂盒、SYBR Green核酸荧光染料(日本TaKaRa公司);ECL发光液(美国Invitrogen公司)、抗体(美国Cell Signaling Technology公司):MMP-2(#D8N9Y)、MMP-9(#D6O3H)、GAPDH(#14C10);Matri-gel基质胶(美国Corning公司)。

**1.4 实验仪器** 超净工作台(美国Thermo Scientific公司),CO<sub>2</sub>培养箱(上海智城公司),CX31光学显微镜(日本Olympus公司),3-16 KL冷冻离心机(德国Sigma公司),Nanodrop2000c超微量分光光度计(美国Thermo Scientific公司),Mastercycler nexus X2 PCR仪(德国Eppendorf公司),ABI 7500 qPCR仪(美国Applied Biosystems公司),电泳仪、小型垂直电泳槽、转印槽及ChemiDoc凝胶成像分析仪(美国Bio-Rad)。

**1.5 细胞培养及慢病毒转染干扰miR-210的表达** A375细胞使用RPMI-1640培养液+10%胎牛血清,HEK293细胞使用DMEM高糖培养液+10%胎牛血清,均在37℃,5%CO<sub>2</sub>环境下培养。慢病毒转染:将HEK293细胞分为两组,均加入10 μL脂质体及转染病毒包装载体(1 μg pLP-gag/pol、0.3 μg pLP-Rev和0.7 μg pLP-VSVG),分别转染2 μg空白载体及siRNA介导的干扰miR-210载体,无血清处理细胞6 h,常规培养细胞48 h后收集细胞上清液,0.45 μm滤器过滤后得到两组病毒悬液。将病毒悬液与RPMI-1640培养液+10%胎牛血清1:2混合培养细胞3 d,同时加入1 μg/mL Sofast,嘌呤霉素筛选细胞6 d以上,得到对照组(转入空白载体)及干扰组(转入干扰miR-210载体)细胞。

**1.6 qPCR检测组织miR-210及细胞miR-210、MMP-2及MMP-9 mRNA的表达水平** 取30 mg左右待测组织或2×10<sup>5</sup>个待测细胞, RNAiso Reagent抽提总RNA,逆转录试剂盒行总RNA逆转录,得到cDNA稀释至500 μL,分别将miR-210、MMP-2、MMP-9、内参基因GAPDH引物及cDNA、SYBR Green核酸荧光染料按体系混合,行qPCR检测,2<sup>-△△CT</sup>法计算miR-210、MMP-2及MMP-9的相对表达水平。引物情况如下:miR-210正向:5'-GGAGATCTGAC-CAGGTCATT-3',反向:5'-GGGAATTGATATGAC CACA-3';MMP-2正向:5'-ATCCCCAACCTTAC CA-3',反向:5'-TCAGAACCGACCCTACAA-3';MMP-9正向:5'-GCGGAGATTGGAACCGAGCTGT A-3',反向:5'-GACGCGCCTGTGTACACCCACA-3';GAPDH正向:5'-AGAAGGCTGGGCTCATTTG-3',反向:5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'。

**1.7 Western blot检测细胞MMP-2及MMP-9蛋白表达水平** 收集1×10<sup>6</sup>以上个待测细胞,200 μL Ripa裂解液+1 μg蛋白酶抑制剂重悬细胞并冰上裂解1 h,BCA法检测蛋白浓度,取50 μg蛋白进行10%聚丙烯酰胺凝胶电泳,湿转至PVDF膜,脱脂牛奶封闭2 h,1:1 000 MMP-2、MMP-9及GAPDH抗体室温孵育2 h,1:2 000二抗室温孵育1 h,ECL发光液孵育30 s,ChemiDoc发光系统进行曝光显影,扫描条带灰度值,将MMP-2及MMP-9灰度值与内参基因GAPDH灰度值的比值作为蛋白相对表达量。

1.8 Transwell侵袭及迁移实验检测细胞转移能力 取50 μg Matrigel基质胶与300 μL无血清RPMI-1640培养液混合均匀,平均加入两支Transwell上小室,37℃孵育6 h,制备两组待测细胞的细胞悬液,以无血清RPMI-1640培养液重悬,细胞计数后每组取 $1\times 10^5$ 个细胞加入铺好胶的Transwell小室作为Transwell侵袭实验模型,另取 $1\times 10^5$ 个细胞加入未铺胶的Transwell小室作为Transwell迁移实验模型,下小室加入500 μL RPMI-1640培养液+10%胎牛血清,37℃,5% CO<sub>2</sub>培养24 h后,5%戊二醇固定,棉球擦去上室面细胞,0.1%结晶紫染色10 min,显微镜下观察中间和四周5个视野,求平均细胞数及标准差。

1.9 统计学方法 应用SPSS18.0软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间比较采用两独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用SNK-q法,以P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 临床组织标本miR-210的表达情况比较 皮肤恶性黑色素瘤组织中miR-210的相对表达水平为(0.165±0.060),显著高于正常皮肤组织的(0.048±0.046)及交界痣的(0.076±0.033),差异具有统计学意义( $F=8.617, P<0.05$ ),见图1。

2.2 两组细胞miR-210、MMP-2及MMP-9 mRNA的表达水平比较 干扰组细胞miR-210相对表达量为(0.153±0.037),显著低于对照组细胞的

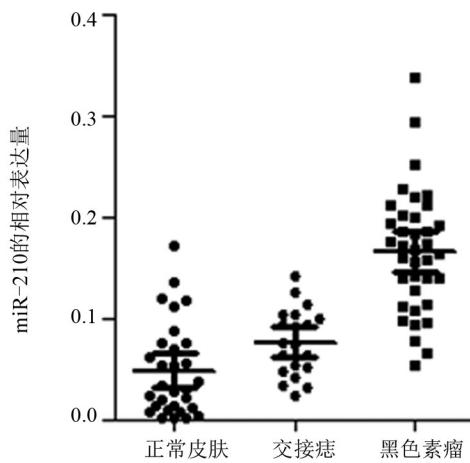


图1 临床组织标本miR-210的表达情况及比较

( $0.372\pm 0.041$ ),差异具有统计学意义( $t=7.004, P<0.05$ );干扰组细胞MMP-2 mRNA相对表达量为( $0.175\pm 0.053$ ),显著低于对照组细胞的( $0.424\pm 0.038$ ),差异具有统计学意义( $t=6.613, P<0.05$ );干扰组细胞MMP-9 mRNA相对表达量为( $0.323\pm 0.068$ ),显著低于对照组细胞的( $0.610\pm 0.102$ ),差异具有统计学意义( $t=4.055, P<0.05$ )。

2.3 两组细胞侵袭及迁移能力比较 干扰组细胞侵袭细胞数为( $36.9\pm 8.7$ )个,显著低于对照组细胞的( $72.3\pm 10.5$ )个,差异具有统计学意义( $t=4.855, P<0.05$ );干扰组细胞迁移细胞数为( $45.3\pm 9.4$ )个,显著低于对照组细胞的( $78.3\pm 12.6$ )个,差异具有统计学意义( $t=3.637, P<0.05$ ),见图2。

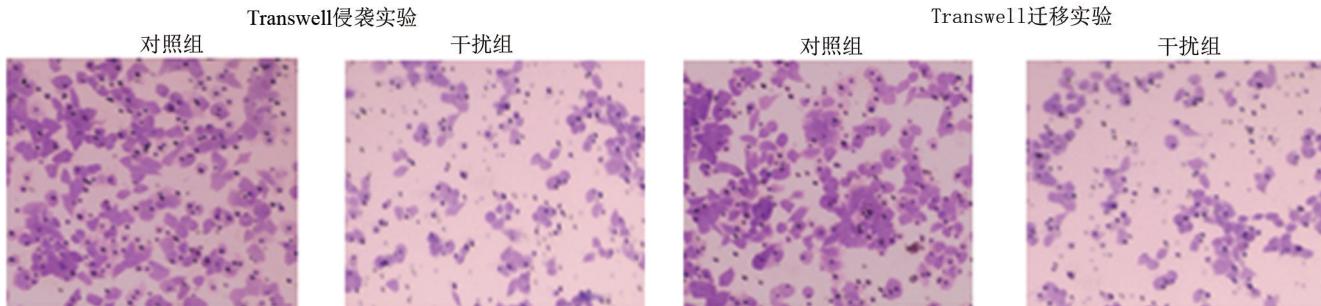


图2 两组细胞侵袭及迁移能力的比较(100×)

2.4 两组细胞MMP-2及MMP-9蛋白的表达水平比较 干扰组细胞MMP-2蛋白相对表达量为( $0.114\pm 0.016$ ),显著低于对照组细胞的( $0.356\pm 0.047$ ),差异具有统计学意义( $t=8.302, P<0.05$ );干扰组细胞MMP-9蛋白相对表达量为( $0.263\pm 0.030$ ),显著低于对照组细胞的( $0.571\pm 0.084$ ),差异具有统计学意义( $t=5.981, P<0.05$ )。

## 3 讨论

miR-210基因位于染色体11p15.5上,在机体缺氧状态下表达上调,其可促进血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及受体酪氨酸

酸激酶配体EpfrinA3的表达,促进人脐静脉内皮细胞分化毛细血管结构及迁移能力,并抑制干细胞分化及Fas信号通路介导的细胞凋亡,维持间充质干细胞的生存能力,同时参与促进缺氧状态下线粒体的糖酵解<sup>[6-7]</sup>。缺氧是实体肿瘤特征性的微环境,肿瘤组织在快速生长过程中往往伴随局部组织的缺氧状态,多种缺氧因子参与肿瘤细胞增殖、转移、血管生成及能量代谢<sup>[8]</sup>,miR-210作为重要的缺氧调控因子,也被发现在多种恶性肿瘤中表达异常,并参与肿瘤细胞的恶性转化及恶性行为:  
① miR-210被发现在胃癌组织中高表达,且其表达与患者预后不良显著正相

关,miR-210在体外可促进细胞侵袭及迁移能力,但机制尚不完全明确<sup>[9]</sup>;②乳腺癌患者血清及肿瘤组织miR-210均表达上调,且其表达与患者淋巴结转移及不良预后相关<sup>[10-11]</sup>,miR-210还可在体外介导乳腺癌细胞BT474曲妥珠单抗敏感性降低,影响人类表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2, Her-2)靶向治疗疗效<sup>[11]</sup>;③miR-210是影响结直肠癌患者预后的独立危险因素,其表达与患者肿瘤大小、淋巴结转移均显著相关,体外实验显示上调结直肠癌细胞miR-210的表达后细胞转移能力显著增强,其机制与上调细胞液泡膜蛋白1(vacuole membrane protein 1, VMP1)的表达有关<sup>[12]</sup>;④非小细胞肺癌中miR-210的高表达同样预示着患者的不良预后<sup>[13]</sup>,同时miR-210参与促进非小细胞肺癌的放疗抵抗<sup>[14]</sup>;⑤miR-210还可通过调控食管癌细胞周期,促进细胞增殖能力,并通过介导食管癌干细胞特性的维持,导致细胞放疗抵抗的发生<sup>[15-16]</sup>;⑥miR-210对脑胶质瘤患者的预后也具有重要的预测作用,可作为潜在的血清及组织的诊断标志物<sup>[17-18]</sup>,下调脑胶质瘤细胞miR-210的表达后可抑制其干细胞特性及放疗抵抗能力<sup>[19]</sup>。目前针对miR-210与黑色素瘤的相关研究仍为空白,本研究通过qPCR等实验技术明确了miR-210在黑色素瘤中的表达特征及其对细胞侵袭迁移能力的影响,并对可能的相关机制进行了探究。

本研究结果显示,恶性黑色素瘤组织中miR-210的表达水平显著高于交界痣及正常皮肤组织,提示miR-210可能在恶性黑色素瘤发生发展中发挥一定促进作用,通过慢病毒转染干扰miR-210载体,外源性下调了人黑色素瘤细胞A375中miR-210的表达,Transwell侵袭及迁移实验结果显示,miR-210干扰后细胞侵袭及迁移能力显著下调,提示miR-210对A375细胞转移的促进作用。MMP是一类蛋白水解酶,其主要功能为降解细胞外基质,可介导肿瘤的浸润与转移,MMP-2及MMP-9作为重要的MMP成员,在多种恶性肿瘤中表达上调,并促进肿瘤细胞的体内外转移能力<sup>[20]</sup>。本研究发现干扰miR-210表达后,A375细胞MMP-2及MMP-9表达水平均显著下调,表明miR-210可通过介导MMP-2及MMP-9的表达促进恶性黑色素瘤细胞转移。笔者将在接下来的实验中对miR-210调节MMP-2及MMP-9的具体机制进行进一步探究,并寻找可能的相互作用分子,为miR-210的黑色素瘤诊断试剂盒及靶向药物的开发提供实验依据。

#### 参 考 文 献

- [1] 周帆,朱颐申,邹巧根,等. gp100:209-217(210M)疫苗的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(1): 142-144.
- [2] 王思念,吕进,张巧云,等. miRNA与肿瘤侵袭转移[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(3): 485-487.
- [3] 杨巍. 乏氧调控因子miR-210的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(4): 813-816.
- [4] 秦承东,任正刚,汤钊猷. 缺氧微环境在肿瘤进展中的作用[J]. 肿瘤, 2016, 36(1): 96-102.
- [5] Hong L, Han Y, Zhang H, et al. miR-210: a therapeutic target in cancer [J]. Expert Opin Ther Targets, 2013, 17(1): 21-28.
- [6] Ivan M, Huang X. miR-210: fine-tuning the hypoxic response [J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 772: 205-227.
- [7] Ren CX, Leng RX, Fan YG, et al. MicroRNA-210 and its theranostic potential [J]. Expert Opin Ther Targets, 2016, 20(11): 1325-1338.
- [8] Qin Q, Furong W, Baosheng L. Multiple functions of hypoxia-regulated miR-210 in cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2014, 33: 50.
- [9] Zhang C, Tian W, Meng L, et al. PRL-3 promotes gastric cancer migration and invasion through a NF-κB-HIF-1α-miR-210 axis [J]. J Mol Med (Berl), 2016, 94(4): 401-415.
- [10] Tang Y, Zhou X, Ji J, et al. High expression levels of miR-21 and miR-210 predict unfavorable survival in breast cancer: a systemic review and meta-analysis [J]. Int J Biol Markers, 2015, 30(4): e347-e358.
- [11] Jung EJ, Santarpia L, Kim J, et al. Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients [J]. Cancer, 2012, 118(10): 2603-2614.
- [12] Qu A, Du L, Yang Y, et al. Hypoxia-inducible MiR-210 is an independent prognostic factor and contributes to metastasis in colorectal cancer [J]. PloS One, 2014, 9(3): e90952.
- [13] Eilertsen M, Andersen S, Al-Saad S, et al. Positive prognostic impact of miR-210 in non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2014, 83(2): 272-278.
- [14] Gross S, Doyen J, Parks SK, et al. MiR-210 promotes a hypoxic phenotype and increases radioresistance in human lung cancer cell lines [J]. Cell Death Dis, 2013, 4: e544.
- [15] Li C, Zhou X, Wang Y, et al. miR-210 regulates esophageal cancer cell proliferation by inducing G2/M phase cell cycle arrest through targeting PLK1 [J]. Mol Med Rep, 2014, 10(4): 2099-2104.
- [16] Chen X, Guo J, Xi RX, et al. MiR-210 expression reverses radioresistance of stem-like cells of oesophageal squamous cell carcinoma [J]. World J Clin Oncol, 2014, 5(5): 1068-1077.
- [17] Lai NS, Dong QS, Ding H, et al. MicroRNA-210 overexpression predicts poorer prognosis in glioma patients [J]. J Clin Neurosci, 2014, 21(5): 755-760.
- [18] Lai NS, Wu DG, Fang XG, et al. Serum microRNA-210 as a potential noninvasive biomarker for the diagnosis and prognosis of glioma [J]. Br J Cancer, 2015, 112(7): 1241-1246.
- [19] Yang W, Wei J, Guo T, et al. Knockdown of miR-210 decreases hypoxic glioma stem cells stemness and radioresistance [J]. Exp Cell Res, 2014, 326(1): 22-35.
- [20] Li L, Li H. Role of microRNA-mediated MMP regulation in the treatment and diagnosis of malignant tumors [J]. Cancer Biol Ther, 2013, 14(9): 796-805.

(收稿日期:2017-10-12)