

microRNAs 在恶性黑色素瘤 B16F0 和 B16F10 细胞中的差异表达

张彬彬,张亚平,丁琼琼,杨海杰,马建,冯志伟,王磊*

(新乡医学院生命科学技术学院,河南 新乡 453003)

[摘要] 目的:探讨及分析黑色素瘤细胞 B16F0 和 B16F10 中 microRNAs(miRNAs)表达差异性,筛选与恶性黑色素瘤增殖、迁移和侵袭相关的 miRNAs。方法:通过体内和体外实验分别验证 B16F0 和 B16F10 细胞的差异,并通过 RiboArray™miDETECT™Mouse Array 分析小鼠黑色素瘤 B16F0 和 B16F10 细胞中 miRNAs 表达的差异性,筛选出与恶性黑色素瘤相关的 miRNAs,并应用 real-time PCR 验证筛选结果的可信性。结果:B16F10 细胞比 B16F0 具有更强的迁移和增殖能力,芯片结果显示,与黑色素瘤 B16F0 细胞相比,在 B16F10 细胞中有 38 个 miRNAs 存在表达差异,其中 15 个 miRNAs 表达上调,23 个 miRNAs 表达下调,差异均具有统计学意义。Real-time PCR 对部分 miRNAs 进行验证,结果与芯片分析一致,其中 miR-26a-1-3p、miR-28b、miR-29b-3p、miR-24-2-5p 表达显著上调,而 miR-763、miR-431-5p、miR-205-5p、let-7c-2-3p 表达显著下调。结论:差异表达的 miRNAs 与恶性黑色素瘤的发生、发展可能存在密切相关,可能为恶性黑色素瘤的早期诊断及治疗提供有力的靶向依据。

[关键词] 恶性黑色素瘤;microRNAs;表达谱;real-time PCR

[中图分类号] Q28

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)07-823-07

doi:10.7655/NYDXBNS20170708

Identification of microRNAs differentially expressed in malignant melanoma B16F0 and B16F10 cells by microRNAs microarray

Zhang Binbin, Zhang Yaping, Ding Qiongqiong, Yang Haijie, Ma Jian, Feng Zhiwei, Wang Lei*

(College of Life Science and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the differential expression profile of microRNAs in murine melanoma B16F0 and B16F10 cells, and to isolate the microRNAs related to the proliferation and metastasis of malignant melanoma. **Methods:** We verified the difference of B16F10 and B16F0 cell *in vivo* and *in vitro*. And then RiboArray™ miDETECT™ Mouse Array was adopted to compare the microRNAs expressed in murine melanoma B16F0 and B16F10 cells. The differentially expressed microRNAs were further confirmed by real time PCR. **Results:** B16F10 cells had stronger abilities of migration and proliferation *in vivo* and *in vitro*. Further more, compared with B16F0 cells, a total number of 38 microRNAs were statically differently expressed in B16F10 cells, with 15 upregulated and 23 downregulated. Consistent with RiboArray results, the expressions of miR-26a-1-3p, miR-28b, miR-29b-3p, and miR-24-2-5p were significantly upregulated and the expressions of miR-763, miR-431-5p, miR-205-5p, and let-7c-2-3p were markedly downregulated revealed by real time PCR. **Conclusion:** Our findings suggest that the differentially expressed microRNAs were related to the occurrence and development of malignant melanoma, and might serve as novel targets for early diagnosis and treatment of melanoma.

[Key words] malignant melanoma; microRNAs; profiles; real-time PCR

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(07): 823-829]

恶性黑色素瘤(malignant melanoma, MM)是由来源于神经脊的黑色素细胞异常增生而产生的恶性皮

肤肿瘤,具有易侵袭、易转移、预后差的特点。作为人类恶性肿瘤之一,恶性黑色素瘤在皮肤肿瘤中只占4%,但致死率却高达74%^[1]。近年来黑色素瘤在我国的发病率成倍增长,2000年发病率统计仅为0.2/10万,2005—2007年我国发病率约1/10万,每年新发病例约2万人,已经成为严重危及我国人民

[基金项目] NSFC-河南联合基金(U1604166);新乡医学院研究生科研创新支持计划(YJSCX201517Y)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lwang0522@163.com

健康的疾病之一^[2]。虽然在黑色素瘤的发病早期,可以通过手术切除来治疗,但是一旦发展到转移阶段,目前还没有有效的治疗手段^[3-4]。

microRNAs(miRNAs)是一类长度为 21~25 nt 的内源性非编码单链 RNA,它们通过与靶基因 mRNA 的非编码区(3'UTR)或编码区的特异性结合,从而调控靶基因的表达^[5]。已有研究证明 miRNAs 广泛参与多种细胞生命活动的调控,包括胚胎发育、器官形成、信号转导和细胞的增殖、分化、凋亡,表明在高等生物的基因表达调控中 miRNAs 起到重要的作用。miRNAs 与肿瘤的发生、发展和转移之间也存在着复杂的关系,大约一半的 miRNAs 基因位于脆性位点和与肿瘤相关的基因组区域^[6]。Eiring 等^[7]发现 miRNAs 具有类似抑癌基因或癌基因的功能,与肿瘤的发生有密切的关联。根据来源的不同,恶性肿瘤的 miRNAs 表达谱系也具有明显的差异,比如 miR-17 在肺癌、甲状腺未分化癌、胃癌、淋巴瘤等多种肿瘤中高表达^[8-9]。Guo 等^[10]指出,miR-16 的变化对恶性黑色素瘤的发生、发展、预后等起着重要的作用,并可作为潜在的生物标志物。因此 miRNAs 可成为恶性黑色素瘤早期诊断、早期治疗和预后的标志物及潜在生物治疗靶分子,在恶性黑色素瘤的诊断和治疗中起重要作用。

目前,已有研究证实,B61F10 细胞的增殖、侵袭、迁移和致死率均高于 B16F0 细胞,两者之间有很明确的差异性^[11]。Gallina 等^[12]指出转移性的恶性黑色素瘤患者中位生存期仅 6~8 个月,5 年生存率在 5%以下,表明恶性黑色素瘤的致死率与细胞的侵袭和迁移有密切关系。为了筛选与黑色素瘤增殖、侵袭和迁移相关的 miRNAs,本研究通过芯片分析对 B16F0 和 B16F10 细胞 miRNAs 差异性进行了检测,并通过 real-time PCR 进行了验证。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠黑色素瘤 B16F0 和 B16F10 细胞为本实验室保存,培养于 37 °C、5%CO₂ 条件下,10%胎牛血清(FBS)的 DEME(Gibco 公司,美国)培养液中。总 RNA 提取试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。PrimeScript™ RT Reagent Kit(Perfect Real Time, TaKaRa 公司,日本)。EvaGreen qPCR MasterMix-low Rox 试剂(ABM 公司,加拿大)。Real-time PCR 引物由武汉金开瑞生物工程有限公司合成。C57BL/6 小鼠(北京维通利华)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠皮下注射

挑选 6~8 周的 C57BL/6 小鼠,分别皮下注射 B16F10 和 B16F0 细胞,每只小鼠注射 8×10⁵ 个细胞,观察小鼠状态,2~3 周处死小鼠,取小鼠肿块并称量。

1.2.2 MTT 实验

细胞接种于 96 孔板,每孔加 1 000 个细胞,根据设定时间采用 MTT 法进行细胞增殖检测。检测前取出培养板,每孔加入含 10%MTT 的培养液 200 μL,避光孵育 4 h,弃上清,每孔加入 150 μL DMSO,室温震荡 5~10 min,测量 490 nm 处吸光值。

1.2.3 细胞迁移

B16F10 和 B16F0 以 1×10⁶ 个/mL 密度接种于 6 孔板上,静置 24 h,用 200 μL 枪头进行划痕,再用生理盐水清洗漂浮的细胞,更换无血清 DMEM,37 °C 培养,定时观测并照相。

1.2.4 总 RNA 的提取

按照总 RNA 提取试剂盒说明书操作提取细胞总 RNA,测定 RNA 的浓度和纯度。操作步骤:细胞加入 TRIzol 后室温放置 10 min;12 000 r/min,5 min;按氯仿:TRIzol(1:5)加入氯仿,振荡混匀,室温放置 15 min;4 °C,12 000 r/min,15 min;吸取上层水相至另一离心管并加入 500 μL 的异丙醇,室温放置 30 min;4 °C,12 000 r/min,10 min,弃上清;按 75%乙醇:TRIzol(1:1)加入 75%乙醇,振荡重悬沉淀;4 °C,12 000 r/min,10 min,弃上清,真空干燥 5 min,用 DEPC 水溶解 RNA。

1.2.5 miRNAs 芯片检测

用 RiboArray™miDETECT™Mouse Array 1×12K 进行 miRNAs 芯片分析,用 ULS 标记法将 3 组不同代 B16F0 和 B16F10 细胞 0.5~2.0 μg 总 RNA 标记上 Cy3,通过紫外分光光度计测得 $D(260\text{ nm})/D(550\text{ nm})$,根据实验报告所列公式计算标记率(DOL);预杂交:芯片在无菌去离子水中 65 °C 孵育 10 min,换预杂交液 37 °C 孵育 1 h;将 Cy3 标记的 RNA 全部用于配制杂交液,杂交液 95 °C 变性 3 min,冰上孵育 20 s;杂交:将芯片预杂交液吸出,换杂交液,37 °C 杂交 16 h;芯片取出后依次用 6×SSPET、3×SSPET、0.5×SSPET、0.5×SSPET 洗 1 遍,去除非特异性杂交背景;加显影液及盖玻片于杂交区域,进行扫描,扫描后所得图片提取数据,进行生物信息学分析(RNA 荧光标记、芯片杂交、洗染和扫描由广州市锐博生物科技有限公司协助完成)。

1.2.6 cDNA 的合成

采取茎环法设计合成 miRNAs 特异性引物,以 U6 作为内参,引物序列见表 1。取 2 个去 RNase 的 PCR 管,其中一个管中先加入所有 miRNAs 的逆转录特异性引物,再加入总 RNA,用水补齐 12.5 μ L,混匀后 85 $^{\circ}$ C 孵育 5 min,随后放置冰上;另一无 RNase 的 PCR 管按照实际说明书上加入其余的试剂,两管混匀。按照试剂盒反转录合成 cDNA,反应程序:42 $^{\circ}$ C,15 min;85 $^{\circ}$ C,5 s;4 $^{\circ}$ C 保存,至此合成

cDNA 第一链,实验重复 3 次。

1.2.7 Real-time PCR

选取 8 个变化显著的 miRNA 作为主要的研究对象,进行 real-time PCR 检测 miRNAs 的表达,引物序列见表 1。反应条件:95 $^{\circ}$ C,10 min;95 $^{\circ}$ C,15 s;60 $^{\circ}$ C,60 s;95 $^{\circ}$ C,15 s;60 $^{\circ}$ C,60 s;95 $^{\circ}$ C,15 s,共 40 个循环。待反应结束后,依据各反应管循环阈值 Ct 计算相对表达量,每个样品设 4 个复管,以 U6 作为内参,进行归一化分析,实验重复 3 次。

表 1 引物序列表

Table 1 Primer sequences

miRNAs	引物类型	引物序列(5'→3')
miR-29b-3p	逆转录	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAACACTGA
	正向	ACACTCCAGCTGGGTAGCACCATTTGAAATC
miR-205-5p	逆转录	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCAGACTCC
	正向	ACACTCCAGCTGGGTCTTCATTCCACCGG
miR-431-5p	逆转录	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTGCATGAC
	正向	ACACTCCAGCTGGGTGTCTTGCAGGCCGT
miR-763	逆转录	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGCCACTGG
	正向	ACACTCCAGCTGGGCCAGCTGGGAAGAACC
let-7c-2-3p	逆转录	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGGAAAGAC
	正向	ACACTCCAGCTGGG CTATACAATCTACTGT
miR-24-2-5p	逆转录	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACTGTTTC
	正向	ACACTCCAGCTGGGGTGCCTACTGAGCTGA
miR-26a-1-3p	逆转录	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCGTGCAAG
	正向	ACACTCCAGCTGGGCCTATTCTTGTTACT
miR-28b	逆转录	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCTAAATAG
	正向	ACACTCCAGCTGGGAGGAGCTCACAATCT
U6	正向	CTCGCTTCGGCAGCACA
	反向	AACGCTTCACGAATTTGCGT
miRNA 通用反向引物		TGGTGTCTGGAGTCCG

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件进行数据统计学分析。计量资料进行正态性检测,以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,样本均数比较采用单因素方差分析,Levene 法检验方差齐性,方差齐性时采用 LSD-*t* 检验,方差不齐时采用 Dunnett *t* 检验, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

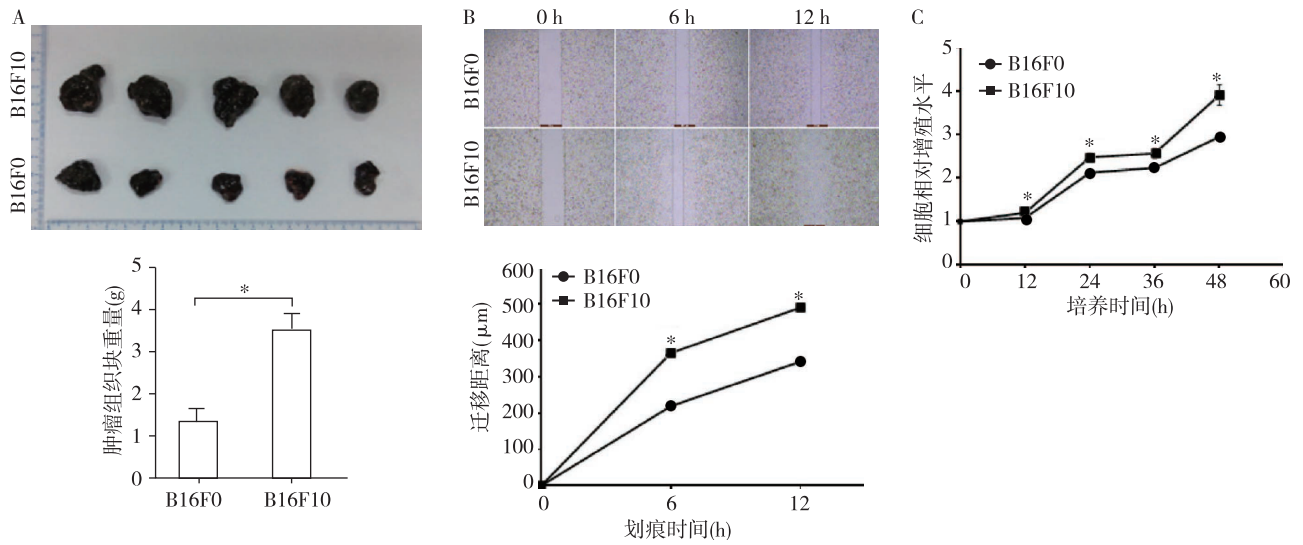
2.1 B16F10 与 B16F0 细胞相比具有更强的增殖、迁移和侵袭能力

将 B16F0 与 B16F10 细胞系分别注射小鼠皮下,2~3 周后取出肿瘤组织,统计学分析显示 B16F10 细胞比 B16F0 细胞成瘤能力更强(图 1A)。细胞划痕实验显示 B16F10 细胞在 6 h 和 12 h 都比

B16F0 细胞迁移更快,并对划痕宽度进行了分析,差异具有统计学意义(图 1B)。分别消化 B16F0 和 B16F10 细胞,细胞计数铺 96 孔板,在设定时间内测吸光度值,统计学分析显示 B16F10 细胞增殖能力比 B16F0 细胞更强(图 1C)。提示 B16F10 细胞的增殖、迁移和侵袭能力比 B16F0 细胞更强,两者之间具有明显的差异性。

2.2 芯片结果

应用 RiboArrayTMmiDETECTTMMouse Array 1 \times 12K 进行 miRNAs 表达谱芯片分析,平均归一化芯片结果,以 B16F0 作为对照,得出恶性肿瘤 B16F10 与 B16F0 细胞系的 miRNAs 差异表达谱系(图 2),并对芯片进行数据分析,统计出差异常表达的 miRNAs (表 2)。结果显示,表达差异显著的 miRNAs 有 38



A:分别注射 B16F10 和 B16F0 细胞 2 周后小鼠肿瘤组织块大小, $n=5$; B: B16F10 和 B16F0 细胞划痕实验显示在不同时间段细胞迁移的距离, $n=4$; C: MTT 法分析细胞体外增殖, 与 B16F0 细胞比较, $n=4$, $*P<0.001$ 。

图 1 B16F10 细胞的增殖、迁移和侵袭能力与 B16F0 细胞具有明显的差异性

Figure 1 Difference of B16F10 cell proliferation, migration and invasion compared with the B16F0 cell

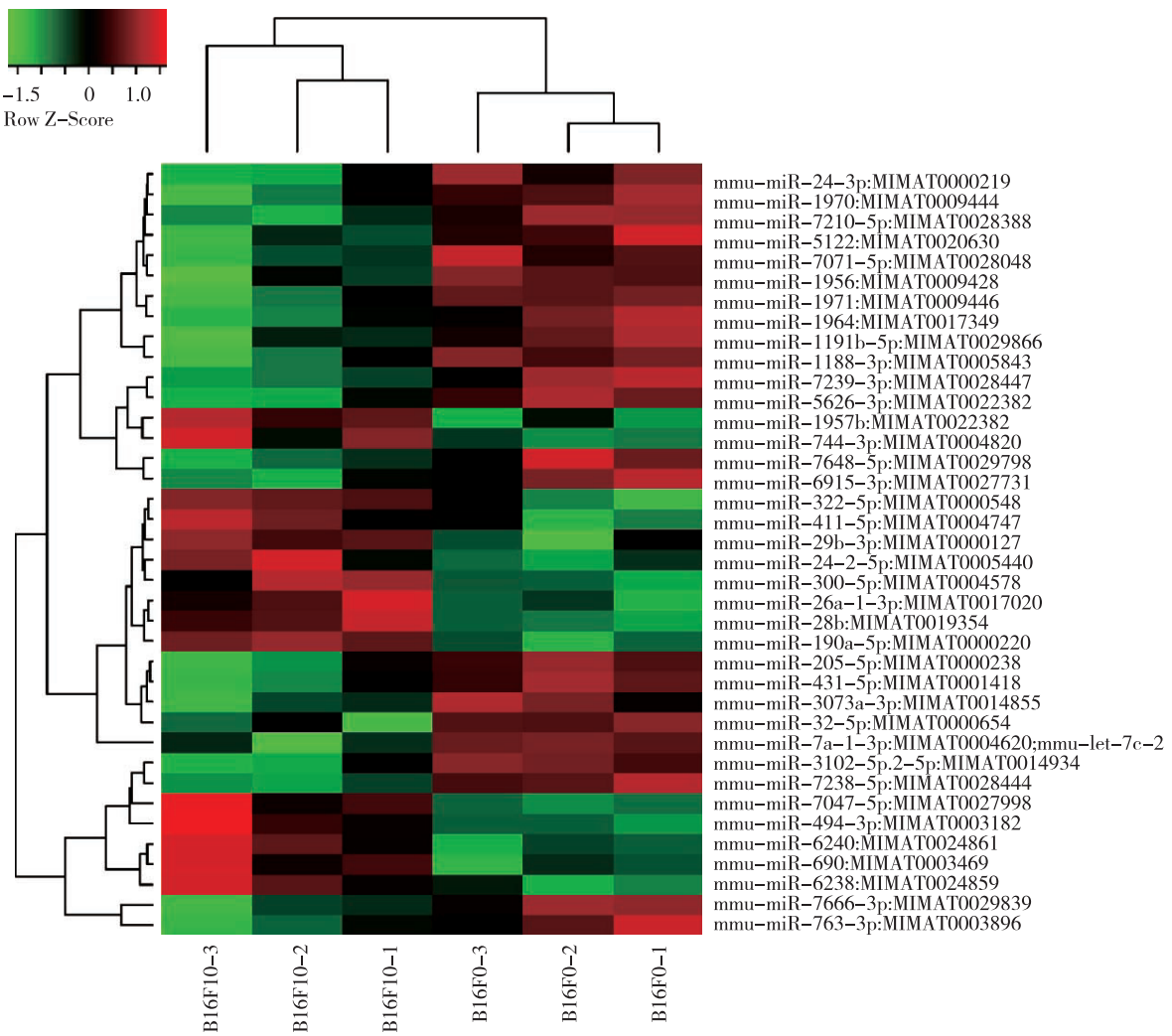


图 2 B16F10 和 B16F0 的 miRNAs 聚类分析图谱

Figure 2 miRNAs hierarchical cluster analysis of B16F10 and B16F0 cell

个,其中 15 个上调,23 个下调。选取组内差异小、杂交信号强、表达差异明显的 miR-763、miR-431-5p、

miR-205-5p、let-7C-2-3p、miR-26a-1-3p、miR-28b、miR-29b-3p、miR-24-2-5p 进行后续试验。

表 2 B16F10 细胞相对于 B16F0 细胞 miRNAs 的相对表达

Table 2 Relative expression of B16F10 cell miRNAs compared with B16F0 cell miRNAs by hierarchical cluster analysis

miRNAs	相对表达量	P 值	miRNAs	相对表达量	P 值
miR-6240	2.305	0.022	let-7c-2-3p	0.277	0.021
miR-300-5p	1.893	0.014	miR-7666-3p	0.380	0.027
miR-690	1.857	0.032	miR-763	0.391	0.044
miR-26a-1-3p	1.755	0.023	miR-1188-5p	0.446	0.020
miR-6238	1.709	0.029	miR-1964-5p	0.504	0.032
miR-28b	1.685	0.004	miR-7210-5p	0.505	0.009
miR-411-5p	1.651	0.040	miR-431-5p	0.508	0.026
miR-322-5p	1.644	0.024	miR-7239-3p	0.558	0.029
miR-190a-5p	1.642	0.002	miR-7071-5p	0.561	0.020
miR-29b-3p	1.583	0.037	miR-205-5p	0.564	0.050
miR-1957b	1.572	0.014	miR-3073a-3p	0.579	0.026
miR-7047-5p	1.538	0.016	miR-1191b-5p	0.598	0.037
miR-24-2-5p	1.521	0.044	miR-7238-5p	0.600	0.003
miR-744-3p	1.511	0.044	miR-5122	0.623	0.031
miR-494-3p	1.502	0.027	miR-7648-5p	0.628	0.030
miR-32-5p	0.649	0.034	miR-1971	0.631	0.029
miR-6915-3p	0.660	0.039	miR-1970	0.637	0.043
miR-1956	0.663	0.035	miR-5626-3p	0.644	0.015
miR-3102-5p	0.665	0.016	miR-24-3p	0.649	0.030

2.3 Real-time PCR 验证结果

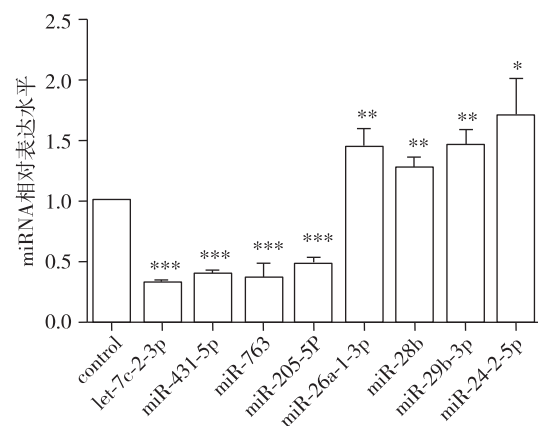
用 real-time PCR 的方法对具有显著差异的 8 种 miRNAs 进行验证。与 B16F0 相比,B16F10 细胞中 miR-763、miR-431-5p、miR-205-5p、let-7C-2-3p 表达显著下调,而 miR-26a-1-3p、miR-28b、miR-29b-3p、miR-24-2-5p 的表达上调,差异具有统计学意义($P<0.05$)。Real-time PCR 验证结果与芯片分析结果一致(图 3)。

2.4 靶基因预测

本研究利用生物信息学在 TargetScan、miRanda、miRDB 和 Clip-seq 数据库中对 miR-763、miR-431-5p、miR-205-5p、let-7C-2-3p、miR-26a-1-3p、miR-28b、miR-29b-3p 和 miR-24-2-5p 进行了靶基因预测,共筛选出 12 365 个靶基因。为了进一步确定 B16F10 和 B16F0 细胞在增殖、迁移和侵袭方面的差异性由哪些 miRNAs 的靶基因决定,本研究利用 TargetScan、miRDB、Cllip-seq 和 miRanda 数据库筛选出与本研究方向相关靶基因(表 4)。

3 讨论

本研究采用高通量原位合成技术分析 miRNAs



与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图 3 Real-time PCR 分析 B16F10 细胞 miRNAs 相对于 B16F0 细胞的表达水平

Figure 3 Real-time PCR analysis of miRNAs levels of B16F10 cells compared with B16F0 cells

的差异性表达,建立 miRNAs 表达谱,研究同种细胞系不同细胞类型之间的差异,针对该差异再缩小范围深入研究,并用 real-time PCR 验证芯片筛选结果的可信性,以期恶性黑色素瘤的早期诊断和治疗提供准确的靶向治疗依据,为深入探讨恶性黑色素

表4 TargetScan、miRDB、Clipp-seq 和 miRanda 预测 miRNAs 的相关靶基因

Table 4 Correlative target genes of miRNAs predicted by TargetScan, miRDB, Clipp-seq and miRanda algorithms

miRNAs	相关基因
miR-431-5p	Map2k4; Slc2a1; Smad4; Lamc2
miR-205-5p	Acs11; Gng12; Il1r1; Ptprr; Angpt2; Gng12; Ets2; Ippk; Zfyve16; Dlg2; Cldn11; Cldn8; Cadm1; Ezr; Calcr1
let-7c-2-3p	Acvr1; Ifnar1; Pten; Pi4k2b; Cdc14b; Cpeb3; Rrm2; Col4a1; Col1a2; Col24a1; Zfyve16; Pten; Snai1; Epb4.1l1; Limk2
miR-763	Cpt1b; Cacnb4; Fos; Grb2; Srf; Map2k7; Mapk8; Dusp16; Camk2g; Grb2; Pak7; Map2k7; Mapk8; Gsk3b; Rab5b; Cxcr5; Bmp2; Tnfrsf19; Tnfrsf1b; Il4ra; Il15ra; Ptgs2; Fbxw11; Ppp1cb; Bbc3; Bcl2l11; Il4ra; Itga5; Sgk1; Creb3l2; Tcf7; Daam2; Csnk1a1; Notch4; Bmp2; Smurf1; Ctgf; Bbc3; Sav1; Pak7; Cd4; L1cam; Neo1; Cntnap1; Pvr11; Mpzl1; Ntng1; Cish; Il15ra; Il4ra; Socs7; Fos; Ptgs2; Creb3l2; Pak7; Arhgef6; Cyfip2
miR-29b-3p	Dusp2; Gng12; Akt3; Camk2g; Pik3r1; Calm3; Igf1; Tiam1; Il1rap; Lep; Arnt; Eif4e2; Pten; Ccnd2; Cdc7; Stag2; Ywhae; Ppm1d; Col11a1; Col3a1; Col4a1; Col4a2; Col4a3; Col5a1; Col5a2; Lamc1; Eif4e2; Frat2; Ncor2; Dlg2; Vcl; Lamc1; Cd276; Cldn1; Nlgn3; Shroom2; Tubb2a; Ccnd2; Lep; Spry1
miR-26a-1-3p	EXOC5; NUP50; USP53; TET1; COL10A1; DNAL1; KBTBD8; MAPK6; G3BP2; NHS
miR-28b	Rap1b; Map3k3; Map3k14; Pla2g5; Il10ra; Itpkb; Amot1; Socs7
miR-24-2-5p	Eda2r; Traf3; Ulk2

瘤的发病和调控机制打下基础。通过芯片检测,发现了38种miRNAs的表达异常,高表达的有15种,其余的23种为低表达。通过real-time PCR验证了8种miRNAs的差异性表达,发现miR-763、miR-431-5p、miR-205-5p、let-7c-2-3p表达显著下调,而miR-26a-1-3p、miR-28b、miR-29b-3p、miR-24-2-5p的表达上调,与miRNAs芯片检测的结果相一致,说明miRNAs芯片结果准确可靠。miR-29b可以通过直接下调DNMT3a、DNMT3b以及通过sp1间接下调DNMT1,从而导致大部分DNA去甲基化,进而使急性白血病细胞中多种肿瘤抑制基因得以重新表达^[13-14]。miR-26a可增强急性髓系白血病细胞的增殖能力,促进白血病细胞增殖^[15]。Tanaka等^[16]研究发现在RSA细胞中,人IFN- β 诱导的miR-431表达可能下调IGF1R和IRS2的表达,从而通过抑制MAPK信号通路抑制细胞增殖。Zhao等^[17]的研究表明在高迁移性细胞中let-7c通过降解ITGB3和MAP4K3抑制非小细胞肺癌迁移和侵袭。Schneider等^[18]认为miR-28可以通过直接靶向基因上调MYC抑制MYC诱导转化。在伯基特淋巴瘤(BL)中miR-28担任肿瘤抑制因子,并且通过MYC基因有助于B细胞淋巴瘤的形成。研究发现喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous carcinoma, LSCC)Hep2中,miR-24可结合到S100A8基因的3'UTR,在转录后水平上负性调控S100A8基因的表达,从而抑制Hep2细胞侵袭^[19]。Su等^[20]的研究表明miR-205通过靶向调节雌激素相关受体 γ (ESRRG)从而促进人子宫内膜样癌细胞的增殖,迁移和侵袭。Liu等^[21]认为IL-17

体外刺激小鼠星形胶质细胞后,A20蛋白水平显著下调,过表达miR-763能明显抑制A20的表达。依此,我们推测miRNAs与恶性黑色素瘤之间的关系错综复杂,某些异常表达的miRNAs可能成为恶性黑色素瘤早期诊断的潜在生物标志物,也可能间接或直接影响恶性黑色素瘤的发生和发展。

miRNAs的异常表达与恶性黑色素瘤的发生、发展和预后有关。Wang等^[22]发现,miR-573可以抑制恶性黑色素瘤的增殖和侵袭能力,但细胞内的黏附分子却可以减弱miR-573的抑制作用。Margue等^[23]发现,miR-211的表达可以抑制恶性黑色素瘤的分化和增殖。Glies等^[24]在2012年首次证实与原代黑色素瘤细胞相比,转移性黑色素瘤细胞中的miR-7-5P表达低下,miR-7-5P通过调控靶基因胰岛素受体底物蛋白2减弱PKB的功能,从而降低恶性黑色素瘤的侵袭和转移,过表达miR-7-5p能显著抑制肿瘤的转移。因此,miRNAs的异常表达为探索恶性黑色素瘤发病机制,寻找基因诊断和治疗新靶点提供了理论依据。虽然本研究对恶性黑色素瘤的miRNAs表达谱系做了初步鉴定并验证,但是对其在恶性黑色素瘤中的功能仍处于初级阶段,miRNAs是如何影响恶性黑色素瘤的发生和发展仍需要进一步的探索和研究。

[参考文献]

- [1] Streicher KL, Zhu W, Lehmann KP, et al. A novel oncogenic role for the miRNA-506-514 cluster in initiating melanocyte transformation and promoting melanoma growth[J]. *Oncogene*, 2012, 31(12): 1558-1570

- [2] CSCO 黑色素瘤专家委员会. 中国黑色素瘤诊治指南 2011 版(修改版)[J]. 临床肿瘤学杂志,2012,17(2): 159-171
- [3] Gray-Schopfer V,Wellbrock C,Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy[J]. Nature,2007,445(7130): 851-857
- [4] Vidwans SJ,Flaherty KT,Fisher DE,et al. A melanoma molecular disease model[J]. PLoS One,2011,6(3):e18257
- [5] Zeng Y,Cullen BR. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells[J]. RNA,2003,9 (1):112-123
- [6] Calin GA,Sevignani C,Dumitru CD,et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2004,101(9):2999-3004
- [7] Eiring AM,Harb JG,Neviani P,et al. miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts[J]. Cell,2010,140 (5):652-665
- [8] Hayashita Y,Osada H,Tatematsu Y,et al. A polycistronic microRNA cluster,miR-17-92,is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation[J]. Cancer Res,2005,65(21):9628-9632
- [9] Chen HC,Chen GH,Chen YH,et al. MicroRNA deregulation and pathway alterations in nasopharyngeal carcinoma[J]. Br J Cancer,2009,100(6):1002-1011
- [10] Guo S,Guo W,Li S,et al. Serum miR-16: A potential biomarker for predicting melanoma prognosis[J]. J Invest Dermatol,2016,136(5):985-993
- [11] 赵军,李辰,狄静芳,等. 小鼠眼内移植三种 B16 黑色素瘤细胞系的比较研究[J]. 中国病理生理杂志,2003, 19(7):914-916
- [12] Gallina G,Dolcetti L,Serafini P,et al. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells[J]. J Clin Invest,2006,116 (10):2777-2790
- [13] Garzon R,Liu S,Fabbri M,et al. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1[J]. Blood, 2009,113(25):6411-6418
- [14] Griffiths EA,Micromna GS. miR-ly regulators of DNMT? [J]. Blood,2009,113(25):6269-6270
- [15] 谭丽,刘文丹,谭获. MicroRNAs-26a 的表达对急性髓系白血病细胞增殖的影响[J]. 基础医学与临床, 2012,32(6):650-655
- [16] Tanaka T,Sugaya S,Kita K,et al. Inhibition of cell viability by human IFN- β is mediated by microRNA-431[J]. Int J Oncol,2012,40(5):1470-1476
- [17] Zhao B,Han H,Chen J,et al. MicroRNA let-7c inhibits migration and invasion of human non-small cell lung cancer by targeting ITGB3 and MAP4K3[J]. Cancer Lett, 2014,342(1):43-51
- [18] Schneider C,Setty M,Holmes AB,et al. microRNA 28 controls cell proliferation and is down-regulated in b-cell lymphomas [J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2014,111(22): 8185-8190
- [19] 郭艳,富伟能,陈洪,等. miRNA-24 下调 S100A8 蛋白表达能够抑制人喉鳞癌 Hep2 细胞侵袭[J]. 现代肿瘤医学,2011,19(12):2389-2393
- [20] Su N,Qiu H,Chen Y,et al. miR-205 promotes tumor proliferation and invasion through targeting ESRRG in endometrial carcinoma [J]. Oncol Rep,2013,29(6):2297- 2302
- [21] Liu X,He F,Pang R,et al. Interleukin-17(IL-17)-induced microRNA 873 (miR-873)contributes to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis by targeting A20 ubiquitin-editing enzyme[J]. J Biol Chem,2014, 289(42):28971-28986
- [22] Wang HF,Chen H,Ma MW,et al. miR-573 regulates melanoma progression by targeting the melanoma cell adhesion molecule[J]. Oncol Rep,2013,30(1):520-526
- [23] Margue C,Philippidou D,Reinsbach SE,et al. New target genes of MITF-induced microRNA-211 contribute to melanoma cell invasion[J]. PLoS One,2013,8(9):e73473
- [24] Giles KM,Brown RA,Epis MR,et al. miRNA-7-5p inhibits melanoma cell migration and invasion[J]. Biochem Biophys Res Commun,2013,430(2):706-710

[收稿日期] 2016-11-16

本刊邮发代号 28-61

网址: <http://jnmn.njmu.edu.cn>