

蛋白酶活化受体 2 在葡萄膜黑色素瘤中的表达及对细胞增殖和侵袭的影响

明 媚¹, 罗 文¹, 高 峰²

基金项目:2014 年河南省科技发展计划(No. 142102310429)

作者单位:¹(435000)中国湖北省黄石市,鄂东医疗集团黄石市中心医院眼科;²(450000)中国河南省郑州市,河南省眼科研究所 河南省立眼科医院

作者简介:明媚,硕士,主治医师,研究方向:玻璃体视网膜膜疾病。

通讯作者:罗文,硕士,主治医师,研究方向:眼底病。274796471

@qq.com

收稿日期:2018-07-31 修回日期:2018-11-02

Expression of protease-activated receptor 2 in uveal melanoma and its effect on cell proliferation and invasion

Mei Ming¹, Wen Luo¹, Feng Gao²

Foundation item: Henan Science and Technology Development Plan Project (No. 142102310429)

¹Department of Ophthalmology, Huangshi Central Hospital, Edong Healthcare, Huangshi 435000, Hubei Province, China; ²Henan Institute of Ophthalmology; Henan Provincial Eye Hospital, Zhengzhou 450000, Henan Province, China

Correspondence to: Wen Luo. Department of Ophthalmology, Huangshi Central Hospital, Edong Healthcare, Huangshi 435000, Hubei Province, China. 274796471@qq.com

Received:2018-07-31 Accepted:2018-11-02

Abstract

• **AIM:** To investigate the expression of protease-activated receptor 2 (PAR2) in uveal melanoma (UM), and the effects of silencing the expression of PAR2 gene on proliferation and invasion of human UM cell line M23.

• **METHODS:** A total of 45 patients (45 eyes) with UM who underwent surgical treatment with complete information in our hospital were selected from February 2012 to December 2017. In the same period, 30 patients (30 eyes) who underwent eyeball removal due to ocular trauma and most of the uvea were normal were selected. Real-time quantitative PCR was used to detect the expressions of PAR2 gene in UM and normal choroidal tissues. M23 cells were cultured and divided into PAR2 interference group, negative control sequence group and blank group. Real-time quantitative PCR was used to detect the expression of PAR2 gene in cells. MTT assay was used to detect cell proliferation, and transwell assay was used to detect cell migration and invasion.

• **RESULTS:** The relative expression level of PAR2 mRNA

was 1.73 ± 0.13 in UM tissues, and 1.06 ± 0.10 in normal choroid tissues ($t = 23.732$, $P < 0.001$). The relative expression level of PAR2 mRNA in UM tissues was associated with pathological type, scleral invasion, optic disc involvement and extraocular growth ($P < 0.05$). The relative expression level of PAR2 mRNA in PAR2 interference group was lower than that in negative control sequence group and blank group ($P < 0.05$). The absorbance A values at 24h, 48h, 72h and 96h in the PAR2 interference group cells were lower than those in negative control sequence group and blank group ($P < 0.05$). The number of migrated cells and the number of invasive cells in PAR2 interference group were lower than those in negative control sequence group and blank group ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** PAR2 was highly expressed in UM tissues and was associated with high risk of tumor metastasis. Specific silencing of PAR2 gene expression in M23 cells could effectively inhibit cell proliferation, migration and invasion.

• **KEYWORDS:** uveal melanoma; protease-activated receptor 2; cell proliferation; cell invasion

Citation: Ming M, Luo W, Gao F. Expression of protease-activated receptor 2 in uveal melanoma and its effect on cell proliferation and invasion. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018; 18(12):2137-2141

摘要

目的:探讨蛋白酶活化受体2(protease-activated receptor 2, PAR2)在葡萄膜黑色素瘤(uveal melanoma, UM)中的表达,以及沉默人 UM 细胞系 M23 中 PAR2 基因对细胞增殖和侵袭的影响。

方法:选取 2012-02/2017-12 在我院行手术治疗且资料完整的 UM 患者 45 例 45 眼,选取同期因眼部外伤行眼球摘除且葡萄膜正常的患者 30 例 30 眼,实时荧光定量 PCR 术检测 UM 和正常脉络膜组织中 PAR2 基因表达,培养 M23 细胞并分为 PAR2 干扰组、阴性对照序列组和空白组,实时荧光定量 PCR 技术检测细胞中 PAR2 基因表达,MTT 法检测细胞增殖能力,Transwell 法检测细胞迁移和侵袭能力。

结果:UM 组织中 PAR2 mRNA 相对表达量为 1.73 ± 0.13 ,正常脉络膜组织中 PAR2 mRNA 相对表达量为 1.06 ± 0.10 ,差异有统计学意义($t = 23.732$, $P < 0.01$);UM 组织中 PAR2 mRNA 相对表达量与病理学类型、巩膜浸润、视盘受累和眼外生长有关,差异有统计学意义($P < 0.05$);

PAR2 干扰组细胞中 PAR2 mRNA 相对表达量低于阴性对照序列和空白组,差异有统计学意义($P<0.05$);PAR2 干扰组细胞 24、48、72 和 96h 时吸光度 A 值低于阴性对照序列和空白组,差异有统计学意义($P<0.05$);PAR2 干扰组迁移细胞数和侵袭细胞数低于阴性对照序列组和空白组($P<0.05$)。

结论:PAR2 在 UM 组织中呈高表达,且与肿瘤高转移风险有关,特异性沉默 M23 细胞中 PAR2 基因表达可有效抑制细胞增殖、迁移及侵袭。

关键词:葡萄膜黑色素瘤;蛋白酶活化受体 2;细胞增殖;细胞侵袭

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.12.04

引用:明媚,罗文,高峰.蛋白酶活化受体 2 在葡萄膜黑色素瘤中的表达及对细胞增殖和侵袭的影响.国际眼科杂志 2018;18(12):2137-2141

0 引言

葡萄膜黑色素瘤(uveal melanoma, UM)作为眼科成人最常见的原发性恶性肿瘤,起源于葡萄膜黑色素细胞,近年来发病率呈快速增长趋势^[1],尽管治疗方法不断改善,但患者总体治疗效果不佳,生存率改善有限^[2]。研究表明^[3],易转移是导致 UM 患者难治疗及死亡的主要因素。约 95% 的患者死于肝转移,一旦发生肝转移,生存期在 6mo 左右,很少有患者超过 1a^[4]。因此,积极探讨影响 UM 转移机制及敏感基因对指导患者治疗及研发新药具有重要意义。蛋白酶活化受体 2(protease-activated receptor 2, PAR2)作为 G 蛋白偶联受体家族成员,广泛存在于机体细胞中,在细胞增殖、分化、蛋白产生及释放等过程中发挥重要作用^[5],近年来研究发现^[6],PAR2 表达与肿瘤侵袭转移密切相关。本研究分析 UM 组织中 PAR2 基因表达,探讨其与临床指标相关性,并利用小分子干扰 RNA(small interference RNA, siRNA)技术特异性沉默人 UM 细胞系 M23 中 PAR2 基因,观察其对细胞增殖、迁移和侵袭的影响,以期对 UM 机制研究提供基础资料。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2012-02/2017-12 在我院行手术治疗且资料完整的 UM 患者 45 例 45 眼,均经病理学检查确诊。其中男 25 例 25 眼,女 20 例 20 眼,年龄 27~78(平均 48.7±13.4)岁,左眼 20 眼,右眼 25 眼;病理学类型:上皮细胞型 16 眼,混合细胞型 8 眼,梭形细胞型 21 眼;肿瘤部位:脉络膜 31 眼,睫状体 14 眼;发生巩膜浸润 20 眼。所有患者摘除眼球后,将眼球切开,剥离 UM 组织,液氮速冻后,置于 -80℃ 低温冰箱保存以备提取 RNA。同期,选取因眼部外伤行眼球摘除且葡萄膜正常的患者 30 例 30 眼,其中,男 18 例 18 眼,女 12 例 12 眼,年龄 25~76(平均 47.5±14.8)岁,左眼 13 眼,右眼 17 眼,均排除 UM 及其他肿瘤,均留取脉络膜组织,液氮速冻后,置于 -80℃ 低温冰箱保存以备提取 RNA。两组患者在性别、年龄、左右眼分布差异无统计学意义($P>0.05$),均衡可比。本研究通过医院伦理委员会批准,所有患者均知情同意。

1.2 方法 主要试剂和设备:Trizol 总 RNA 提取试剂盒

及 Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司,逆转录和 PCR 扩增试剂盒购自德国 Qiagen 公司,PAR2 和内参引物由上海生工生物公司设计合成,M23 细胞购自中科院生化与细胞所,RPMI-1640 培养液、胰蛋白酶和胎牛血清购自美国 Gibco 公司,噻唑蓝(MTT)液及二甲亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司,Transwell 小室及 Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司,PAR2 干扰序列和阴性对照序列由上海吉玛制药技术有限公司设计合成,CFX96 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2.1 实时荧光定量 PCR 术检测 UM 和正常脉络膜组织中 PAR2 基因表达 取 UM 和正常脉络膜组织,切碎研磨,加入细胞裂解液,按 Trizol 总 RNA 提取试剂盒说明提取总 RNA,使用紫外分光光度计检测总 RNA 纯度,以 $A_{260}/A_{280} \geq 1.80$ 为合格。将 RNA 按逆转录试剂盒说明逆转录为 cDNA,利用实时荧光定量 PCR 仪按扩增试剂盒说明对引物进行扩增。引物序列:PAR2:上游:5'-ACTCCAGGAAGAAGGCAAACA-3',下游:5'-TGGTCTGCTTCACGACATACA-3',长度:98bp; β -actin:上游:5'-TGTTTGAGACCTCAACACCC-3',下游:5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAGG-3',长度:540bp。反应条件:94℃ 3min,92℃ 30s,92℃ 30s,60℃ 30s,74℃ 30s,连续循环 36 次。每个样品设 6 个平行反应复孔。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法获得 UM 和正常脉络膜组织中 PAR2 mRNA 相对表达量。

1.2.2 细胞培养及处理 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液对 M23 细胞培养,培养条件:饱和湿度、5% CO_2 及 37℃。24h 后胰酶消化,传代培养。待细胞融合度在 80% 以上时,按转染试剂盒说明转染:(1) PAR2 干扰组:转染 PAR2 的 siRNA 序列:5'-UCAACCACUGUUAAGACCUCCUAUU-3';(2) 阴性对照序列组:转染阴性对照序列:5'-UAAGAAAGCUUCCAACCUUCAGAGA-3';(3) 空白组:不作任何处理。各组细胞继续培养 48h 完成后续实验。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 技术检测细胞中 PAR2 基因表达 取各组转染后培养 48h 细胞,加入裂解液,按试剂盒说明提取总 RNA,其余步骤同 1.2.1。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖能力 取各组细胞,胰酶消化,接种于 96 孔板,密度 2×10^4 /孔,继续恒温培养。分别于培养 12、24、48、72 和 96h 时,向各孔加入 MTT 液(5mg/mL)40 μ L,孵育 5h,向各孔加入 DMSO 液 200 μ L,充分震荡摇匀使沉淀溶解,用酶标仪取 490nm 波长处对各孔吸光度 A 值检测,以 A 值反映各孔细胞增殖能力。

1.2.5 Transwell 法检测细胞迁移能力 取各组转染后培养 48h 细胞,胰酶消化,离心取细胞沉淀,用无血清培养液重悬细胞,密度 5×10^5 /mL,取 200 μ L 加入 Transwell 小室上室,取 600 μ L 含 20% 胎牛血清的培养液加入下室,继续恒温培养 24h,取出小室,PBS 冲洗 3 次,4% 甲醛固定,结晶紫染色 15min,用棉签轻轻将散落细胞拭去,镜下观察,随机取 5 个高倍视野($\times 400$),计数穿膜细胞数。

1.2.6 Transwell 法检测细胞侵袭能力 用细胞培养液对 Matrigel 基质胶进行稀释,平铺于 Transwell 小室上室,过夜风干备用。其余步骤同 1.2.5。

统计学分析:使用 SPSS 21.0 统计软件分析,计量资

表 1 UM 组织中 PAR2 基因表达与临床指标间相关性

指标	眼数	PAR2 mRNA 相对表达量 [$M(P_{25}, P_{75})$]	Z	P
年龄(岁)				
≥50	19	1.70(1.62,1.78)	1.150	0.250
<50	26	1.73(1.65,1.81)		
眼别				
左眼	20	1.72(1.66,1.81)	0.835	0.404
右眼	25	1.71(1.62,1.78)		
肿瘤高度(mm)				
>8	16	1.73(1.63,1.91)	0.498	0.617
≤8	29	1.72(1.64,1.79)		
病理学类型				
上皮细胞型	16	1.81(1.73,1.97)	15.715	<0.01
混合细胞型	8	1.67(1.59,1.75) ^a		
梭形细胞型	21	1.68(1.61,1.73) ^a		
肿瘤部位				
脉络膜	31	1.72(1.62,1.80)	0.405	0.686
睫状体	14	1.72(1.67,1.81)		
巩膜浸润				
是	20	1.79(1.75,1.92)	3.944	<0.01
否	25	1.68(1.60,1.72)		
视盘受累				
是	30	1.75(1.70,1.82)	2.772	0.006
否	15	1.64(1.59,1.72)		
视网膜脱离				
是	32	1.72(1.62,1.80)	0.627	0.531
否	13	1.72(1.65,1.92)		
眼外生长				
是	31	1.75(1.70,1.85)	3.031	0.002
否	14	1.63(1.59,1.71)		

注:^a $P<0.05$ vs 上皮细胞型。

表 2 三组细胞增殖能力比较

组别	12h	24h	48h	72h	96h	$\bar{x} \pm s$
PAR2 干扰组	0.25±0.04	0.32±0.10	0.49±0.06	0.55±0.03	0.70±0.06	
阴性对照序列组	0.26±0.05	0.41±0.07 ^a	0.64±0.07 ^a	0.74±0.07 ^a	0.83±0.08 ^a	
空白组	0.22±0.03	0.46±0.05 ^a	0.58±0.05 ^a	0.76±0.06 ^a	0.89±0.06 ^a	

注:^a $P<0.05$ vs PAR2 干扰组。

料经正态性检验,符合正态分布资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析和 LSD- t 检验,重复资料比较采用重复测量资料方差分析,不符合正态分布资料采用中位数(P_{25}, P_{75}),组间比较采用非参数检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UM 和正常脉络膜组织中 PAR2 基因表达 UM 组织中 PAR2 mRNA 相对表达量为 1.73 ± 0.13 ,正常脉络膜组织中 PAR2 mRNA 相对表达量为 1.06 ± 0.10 ,差异有统计学意义($t=23.732, P<0.01$)。

2.2 UM 组织中 PAR2 基因表达与临床指标间相关性

UM 组织中 PAR2 mRNA 相对表达量与年龄、眼别、肿瘤高度、肿瘤部位和视网膜脱离无关($P>0.05$),而与病理学类型、巩膜浸润、视盘受累和眼外生长有关($P<0.05$),见表 1。

2.3 三组细胞中 PAR2 基因表达 PAR2 干扰组、阴性对照序列组和空白组细胞中 PAR2 mRNA 相对表达量分别为 0.26 ± 0.08 、 0.96 ± 0.1 和 1.03 ± 0.05 ,差异有统计学意义($F=168.984, P<0.001$);阴性对照序列和空白组细胞中 PAR2 mRNA 相对表达量比较差异无统计学($P=0.167$),PAR2 干扰组细胞中 PAR2 mRNA 相对表达量低于阴性对照序列和空白组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 三组细胞增殖能力比较 三组细胞增殖能力比较差异有统计学意义($F_{\text{时间}}=276.880, P_{\text{时间}}<0.01; F_{\text{组间}}=27.541, P_{\text{组间}}<0.01; F_{\text{组间} \times \text{时间}}=4.572, P_{\text{组间} \times \text{时间}}<0.01$)。PAR2 干扰组细胞 24、48、72 和 96h 时吸光度 A 值低于阴性对照序列组和空白组,差异有统计学意义($P<0.05$),阴性对照序列组细胞 24、48、72 和 96h 时吸光度 A 值与空白组差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

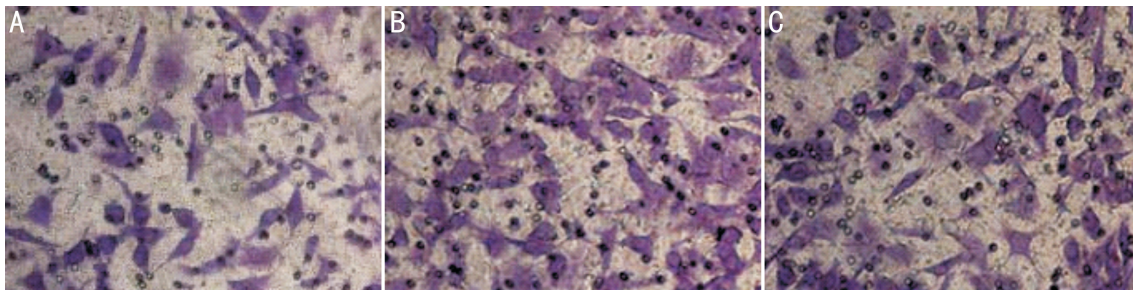


图1 Transwell法检测三组细胞迁移能力(结晶紫染色×400) A:PAR2干扰组;B:阴性对照序列组;C:空白组。

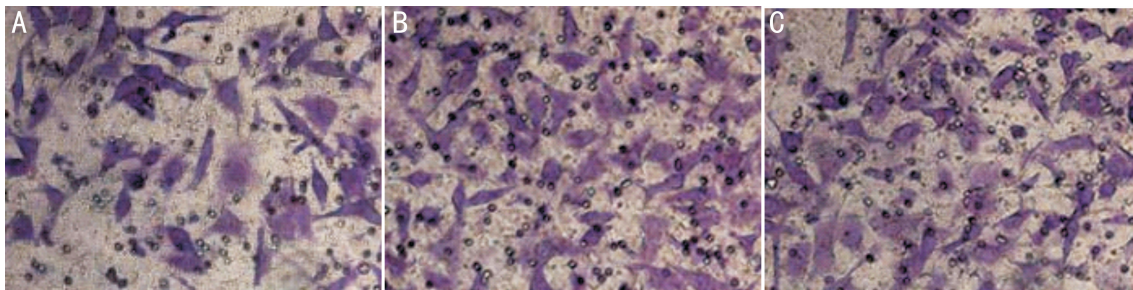


图2 Transwell法检测三组细胞侵袭能力(结晶紫染色×400) A:PAR2干扰组;B:阴性对照序列组;C:空白组。

表3 三组细胞迁移和侵袭能力比较 ($\bar{x} \pm s$, 个)

组别	迁移细胞数	侵袭细胞数
PAR2 干扰组	91.63±3.50 ^{a,c}	105.12±4.00 ^{a,c}
阴性对照序列组	123.98±5.79	134.05±10.83
空白组	125.60±7.45	127.60±8.52
F	20.190	65.291
P	<0.001	<0.001

注:^aP<0.05 vs 空白组;^cP<0.05 vs 阴性对照序列组。

2.5 三组细胞迁移和侵袭能力比较 PAR2 干扰组迁移细胞数和侵袭细胞数低于阴性对照序列组和空白组,差异有统计学意义($P < 0.05$),阴性对照序列组迁移细胞数和侵袭细胞与空白组差异无统计学意义($P > 0.05$),见表3、图1和图2。

3 讨论

UM 是一种常见的黑色素细胞瘤,高增殖活性及高侵袭、转移性是其特点^[7],同时,UM 患者转移较为隐匿,早期即可出现转移,一旦瘤细胞侵犯及突破巩膜出现眼眶扩散,则预后不佳,死亡率在50%以上^[8]。有研究指出^[9],UM 患者预后与临床病理特征、染色体畸变、基因突变、基因谱表达等有关,可评估患者潜在转移风险及生存率,且基因表达谱是独立的、目前较为可靠的评估指标。研究表明^[10],肿瘤微环境中存在大量的丝氨酸蛋白酶、组织因子、胰蛋白酶等,可通过激活细胞膜上的PARs而在肿瘤转移、侵袭等多种生物学功能中发挥重要作用。PAR2是PARs重要成员,广泛存在于机体中,在抗炎及肿瘤发生、进展、转移等过程中发挥重要作用^[11]。本研究结果显示,UM组织中PAR2 mRNA相对表达量高于正常脉络膜组织,说明PAR2在UM组织中呈高表达,可能参与了UM发生过程。本研究结果显示,UM组织中PAR2 mRNA相对表达量与病理学类型、巩膜浸润、视盘受累和眼外生长有关,病理学类型上皮细胞型、发生巩膜浸润、视盘受累及眼外生长的UM组织中PAR2

mRNA相对表达量升高,说明PAR2可能参与了UM恶性化及侵袭转移过程,提示PAR2高表达可能与患者高转移风险有关。

本研究利用siRNA技术特异性沉默M23中PAR2基因,结果显示,PAR2干扰组细胞中PAR2 mRNA相对表达量低于阴性对照序列组和空白组,说明M23中PAR2基因被成功沉默。有研究指出^[12],PAR2参与了结直肠癌细胞恶性增殖过程。本研究结果显示,PAR2干扰组细胞24、48、72和96h时吸光度A值低于阴性对照序列组和空白组,说明特异性沉默PAR2基因可有效抑制M23细胞增殖,提示PAR2基因可能参与了M23细胞增殖过程。有研究指出^[13],沉默PAR2基因后可抑制食管癌EC109细胞侵袭和迁移能力,可能是治疗食管癌的潜在靶标。本研究结果显示,PAR2干扰组迁移细胞数和侵袭细胞数低于阴性对照序列组和空白组,说明特异性沉默PAR2基因可减少M23细胞迁移和侵袭,提示PAR2可能参与了M23细胞侵袭转移过程。

综上所述,PAR2在UM组织中呈高表达,且与肿瘤高转移风险有关,特异性沉默M23细胞中PAR2基因表达可有效抑制细胞增殖、迁移及侵袭,有望成为UM临床诊疗及预后判定的潜在生物学靶点。

参考文献

- 1 Kaliki S, Shields CL. Uveal melanoma: relatively rare but deadly cancer. *Eye (Lond)* 2017; 31(2):241-257
- 2 郑磊,温佳敏,张国明. 葡萄膜黑色素瘤的药物治疗研究现状. *眼科新进展* 2018;38(2):188-192
- 3 Moschos MM, Dettoraki M, Androudi S, et al. The role of histone deacetylase inhibitors in uveal melanoma: current evidence. *Anticancer Res* 2018; 38(7):3817-3824
- 4 Mariani P, Almubarak MM, Kollen M, et al. Radiofrequency ablation and surgical resection of liver metastases from uveal melanoma. *Eur J Surg Oncol* 2016; 42(5):706-712
- 5 张萌,司军强. 蛋白酶活化受体2在疼痛中的作用研究进展. *医学*

综述 2017; 23(6):1100-1103
 6 Yang L, Ma Y, Han W, *et al.* Proteinase – activated receptor 2 promotes cancer cell migration through RNA methylation – mediated repression of miR-125b. *J Biol Chem* 2015; 290(44):26627-26637
 7 Süsskind D, Hurst J, Rohrbach JM, *et al.* Novel mouse model for primary uveal melanoma; a pilot study. *Clin Exp Ophthalmol* 2017; 45(2):192-200
 8 杜葵芳, 项晓琳, 李洋, 等. 人葡萄膜黑色素瘤组织中差异表达基因及相关代谢通路的分析. *中华实验眼科杂志* 2015;33(11):996-1003
 9 毛英, 白海霞, 李彬. 葡萄膜黑色素瘤预后因素的研究. *国际眼科纵览* 2017; 41(6):385-389

10 杨旭, 杨澜, 马怡茗, 等. PAR2 与小鼠结肠肿瘤局部进展的相关性分析. *中国医学前沿杂志(电子版)* 2017; 9(4):17-21
 11 Mrozkova P, Palecek J, Spicarova D. The role of protease-activated receptor type 2 in nociceptive signaling and pain. *Physiol Res* 2016; 65(3):357-367
 12 Wu Y, Wang J, Zhou H, *et al.* Effects of calcium signaling on coagulation factor VIIa-induced proliferation and migration of the SW620 colon cancer cell line. *Mol Med Rep* 2014; 10(6):3021-3026
 13 Chen J, Xie L, Zheng Y, *et al.* Effects of silenced PAR-2 on cell proliferation, invasion and metastasis of esophageal cancer. *Oncol Lett* 2017; 14(4):4115-4121

最新中国科技核心期刊眼科学类期刊主要指标及排名

刊名	核心总被引频次		核心影响因子		综合评价总分	
	数值	排名	数值	排名	数值	排名
中华眼科杂志	2040(3435)	2(2)	0.953(1.073)	1(4)	78.4	1
眼科新进展	1273(545)	3(4)	0.690(1.344)	4(3)	60.5	2
国际眼科杂志	2446(5519)	1(1)	0.667(1.412)	5(2)	57.2	3
中华眼底病杂志	865	5	0.878	2	54.3	4
中华实验眼科杂志	1018	4	0.692	3	46.2	5
临床眼科杂志	513	7	0.523	6	38.5	6
眼科	387	8	0.398	8	27.1	7
中华眼视光与视觉科学杂志	528	6	0.390	9	25.5	8
中国斜视与小儿眼科杂志	256	9	0.470	7	10.1	9
9种期刊平均值	1036		0.629			

摘编自 2018 版《中国科技期刊引证报告》核心版和扩展版(括号里面为扩展版的统计指标)