microRNA抑制黑色素瘤 VEGF 基因表达及对细胞增殖和侵袭能力的影响

蒋 源[1], 韩永智[1], 孙 建[2*]
(广东省人民医院//广东省医学科学院 1.皮肤科,2.普通外科,广东 广州 510080)

摘 要:【目的】研究外源性靶向 microRNA 对恶性黑色素瘤细胞血管内皮生长因子(VEGF)基因表达的抑制作用,以及对癌细胞增殖和侵袭迁移能力的影响。【方法】根据 VEGF 基因序列人工设计合成 4 对 microRNA 干扰片段,构建质粒真核表达载体,分别为:X-26-1-3、X-26-2n-1、X-26-3-2 和 X-26-4-4,测序分析鉴定插入序列的完整性;脂质体法将该四个重组表达载体转染黑色素瘤细胞株 SKmel-28,RT-PCR 检测转染细胞中 VEGF 基因的 mRNA 表达变化,Western Blot 检测 microRNA 对 VEGF 蛋白表达水平的调控效应,明确抑制效果最为显著的 microRNA 干扰序列。MTS 和 EDU 法分别检测靶向 VEGF 的 microRNA 对 SKmel-28 生长的抑制作用, 流式细胞仪观察转染对肿瘤细胞凋亡的影响,Transwell 检测细胞侵袭和迁移能力变化。【结果】测序分析证实 4 个重组体插入片段的碱基序列均完全正确,成功转染 SKmel-28 细胞后,均能显著抑制肿瘤细胞 VEGF mRNA 和蛋白的表达,与对照组相比有统计学差异($P < 0.05$)。抑制效应最强的重组载体是 X-26-2n-1;MTS 和 EDU 检测显示,SKmel-28 细胞转染 X-26-2n-1 后,细胞增殖受到明显抑制,与对照组相比有统计学差异($P < 0.05$),增殖抑制效应具有时间依赖性,细胞侵袭和迁移能力也显著减弱($P < 0.01$);流式细胞仪检测显示肿瘤细胞早期凋亡率、晚期凋亡率、总凋亡率也显著高于对照组 ($P < 0.01$)。【结论】 外源性靶向 VEGF 的 microRNA 能够显著降低黑色素瘤细胞 SKmel-28 VEGF 基因和蛋白的表达水平,诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞的体外增殖和侵袭迁移能力。

关键词:黑色素瘤;microRNA; 血管内皮生长因子;基因治疗
中图分类号:R739.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1672-3554(2014)02-0207-08

Inhibition of VEGF Expression and Suppression of Tumor Proliferation and Invasion in Malignant Melanoma Cells by Target microRNA

JIANG Yuan[1], HAN Yongzhi[1], SUN Jian[2*]
(1.Department of Dermatology, 2.Department of General Surgery, Guangdong General Hospital // Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】 To explore the inhibitory effect of target microRNA (miRNA) on VEGF expression and on cell proliferation and invasion in malignant melanoma(MM) cells SKmel-28.【Method】We constructed the recombination miRNA plasmid vectors which target VEGF gene and plasmids were transfected into SKmel-28 cells by using Lipofectamine 2000 Reagent. The integrity of the insert fragment was detected using colony PCR and sequencing analysis. The VEGF mRNA and VEGF protein expression in SKmel-28 cells were detected by RT-PCR and Western blot respectively. MTS and EDU assay were used to determine the inhibitory effect of target miRNA on SKmel-28 cells proliferation. Transwell assay was used to determine the invasion and migration ability of SKmel-28 cells, and the apoptosis of SKmel-28 cells were also detected.【Results】After the transfection of target miRNA, the expressions of VEGF mRNA and VEGF protein in SKmel-28 cells were down regulated significantly ($P < 0.05$), especially in the recombinant miRNA X-26-2n-1 with a higher inhibitory rate. Whereas, SKmel-28 cells proliferation were also suppressed by target miRNA in vivo ($P < 0.05$), and tumor cells growth were reduced gradually with the elapse of time. The invasion and migration ability in SKmel-28 cells after transfection of miRNA X-26-2n-1 were also inhibited significantly compared with

收稿日期:2013-12-02
基金项目:广东省科技计划项目(2010B080701022,2010B080701021)
作者简介:蒋源,主治医师,研究方向为皮肤病治疗,E-mail: 1302186442@qq.com; *通信作者,孙建,医学博士,主任医师,研究方向为恶性肿瘤基因治疗,E-mail: akeyman@163.com

control group ($P < 0.01$). The early apoptosis rate, late apoptosis rate and the overall apoptosis rate of SKmel-28 cells were also higher than control group significantly ($P < 0.01$). 【Conclusion】 Target miRNA constructed artificially can effectively interfere MM cells SKmel-28 by down regulating the expressions of VEGF gene. It also can inhibit the cells proliferation and invasion, and induce tumor cells apoptosis in vivo.

Key words: malignant melanoma; microRNA; vascular endothelial growth factor (VEGF); gene therapy

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(2): 207-214]

恶性黑色素瘤(malignant melanoma, MM)是一种恶性程度高、预后差的皮肤肿瘤,血管内皮生长因子(VEGF)在恶性黑素瘤中过高表达,可以直接促进恶性黑素瘤细胞侵袭和转移,而抑制VEGF的表达则可以减少黑色素瘤的新生血管生成,抑制其增殖和侵袭[1-2]。近年来,随着RNAi在肿瘤基因治疗的应用,microRNA逐渐引起研究者重视;microRNA调控基因表达的功能与来源无关,因此成为继siRNA之后RNA干扰领域一种重要的研究手段和实验工具[3]。鉴于此,本研究设计构建了靶向VEGF基因的microRNA真核表达载体并转染黑色素瘤细胞,观察其对VEGF基因表达的调控效应,以及对黑色素瘤细胞增殖和侵袭迁移能力的影响,探讨应用microRNA靶向VEGF的MM基因治疗的新途径。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

线性化microRNA表达载体pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR,Lipofectamine 2000 Reagent购自Invitrogen公司;DMEN培养液、Opti-MEM I Reduced Serum Medium、新生牛血清购自GIBCO公司;Anti-VEGF antibody购自Abcam(ab1316),质粒提取试剂盒购自TIANGEN公司,Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自Keygen(KGA106),Cell Titer96AQ单溶液细胞增殖检测试剂盒购自Promega (Cat.No.G3582),Edu溶剂购自广州锐博生物科技有限公司 (C10314),Transwell细胞培养板购自BD(REF353097)。

1.2 microRNA的设计合成

从GenBank上搜索获得人VEGF基因mRNA序列(NM_001025366),使用在线设计软件RNA I designer (http://www.invitrogen.com/ rnaidesigner)根据基因序列设计4对针对VEGF基因的pre-microRNA寡核苷酸序列作为干扰片段,并得到其互补序列,经NCB I Blast排除其非特异同源性,4对pre-microRNA寡核苷酸序列均由Invitrogen公司合成。

1.3 质粒重组载体的构建和测序鉴定

将设计合成的前体序列与质粒pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR进行体外连接,转化大肠杆菌并转化至DH5α感受态大肠杆菌,重组体分别命名为X-26-1-3、X-26-2n-1、X-26-3-2、X-26-4-4,阴性对照质粒X-26-hega由Invitrogen公司提供。挑取单菌落接种于壮观霉素抗性液体LB试管中,37 ℃摇床培养过夜,挑取LB平板上的阳性克隆菌落,提取质粒后,由Invitrogen公司使用反向测序引物microRNA reverse sequencing primer (Catalog No. K4936-00, 5'-CTC TAG ATC AAC CAC TTT GT-3')进行测序。

1.4 细胞培养和转染

人MM细胞株SKmel-28和SKmel-110购自广州莱德尔生物科技有限公司,由广东省人民医院中心实验室保存培养,实验选取指数生长期细胞。RT-PCR、Western blot分别检测SKmel-28、SKmel-110细胞VEGF基因和蛋白基础表达量。选择基础表达量高的MM细胞株进行后续实验,第1~5组分别用X-26-1-3、X-26-2n-1、X-26-3-2、X-26-4-4,阴性对照质粒X-26-hega以脂质体法转染MM细胞,第6组为直接以PBS处理。细胞汇合度达到90%~95%时,采用Lipofectamine® 2000进行转染,转染时使用Opti-MEM培养基,转染质粒浓度为0.4 μg/mL。分别于转染24、48、72 h后,取出6孔板,直接在倒置荧光显微镜下进行观察。

1.5 RT-PCR检测microRNA转染后VEGF mRNA的表达

转染48 h后收集各组黑色素瘤细胞,采用Trizol一步法提取细胞总RNA,用紫外分光光度计定量,取少量用于RNA含量及纯度测定。总RNA先用RNase H处理后,用FQ-PCR试剂盒进行cDNA的合成及PCR反应。PCR引物序列见表1,

表 1　PCR 引物序列

Table 1　Sequence of the PCR primers

Primer	Sequence(5′→ 3′)
VEGFA -F	AGACAGATCACAGGTACAGG
VEGFA -R	AGCAGGTGAGAGTAAGCGA
18S-F	CCTGGATACCGCAGCTAGGA
18S-R	GCGGCGCAATACGAATGCCCC

PCR产物经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定,紫外灯下拍照,每个标本重复测量 3 次,采用标准曲线法分析 VEGF mRNA 的表达量。

1.6　Western blot 检测 microRNA 转染后 VEGF 蛋白质的表达

收集各组转染后 48 h 的黑色素瘤细胞,PBS 洗涤 2 遍,提取细胞总蛋白,BCA 法初步测定蛋白浓度。进行 10%SDS-PAGE 电泳,每孔上样量 30 μg，样品分离后转移至 PVDF 膜,100 V 恒压 1~2 h,TBST 洗膜。分别加入抗 VEGF 的一抗(ab1316) 37 ℃孵育 2 h,TBST 洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗 37 ℃孵育 1 h,TBS 洗膜、蒸馏水漂洗后,ECL 显影,暗室压片。以 GAPDH 为内参对照。选择转染后抑制效果最为显著的质粒作为实验组(VEGFAsh 组)进行后续的细胞增殖、侵袭迁移等能力检测,设置阴性对照(NCsh 组)和空白对照(blank 组)。

1.7　细胞生长曲线检测、流式细胞仪检测细胞凋亡

收集 3 组转染后各个时间点的黑色素瘤细胞(0、24、48、72 h),在 0.2 mL 台盼蓝中加 0.2 mL 细胞悬液,没有活性的细胞被染成蓝色;立即用微量巴斯德吸管混匀后，吸足量细胞悬液从血细胞计数室的两边加样，进行细胞计数并绘制各组细胞生长曲线。收集 3 组转染后继续培养 72 h 的黑色素瘤细胞,PBS 洗涤、70%冰乙醇固定,碘化丙啶染色,流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

1.8　MTS、EDU 检测细胞增殖

收集 3 组转染后各个时间点的黑色素瘤细胞(0、24、48、72 h)加入 MTS,比例为 1/10,即 100 μL 培养液加入 10 μL 检测液;孵育 4 h 后,酶标仪读板,MTS 检测读取吸光度 A_{490} 数据。制备 50 μL EDU 培养基,各组转染后 72 h 细胞培养至汇合度 80% ~ 90%时，每孔加入 100 μL 50 μmol/L EDU 培养基孵育 2 h,PBS 冲洗后,进行细胞固定化,每孔依次加入 100 μL 的 1X Apollo® 染色反应液和 100 μL 1X Hoechst 33342 反应液，进行细胞核染色和 EDU 检测,倒置荧光显微镜观察和摄片。

1.9　Transwell 检测细胞侵袭和迁移能力

收集 3 组转染后继续培养 48 h 的黑色素瘤细胞,计数 1×10^5 个细胞,用 100 μL 无血清培养基重悬,加入 Transwell 细胞培养板的小室上室,在下室加入 600 μL 完全培养基;在 37°C,体积分数为 5%CO_2 孵育 12 ~ 48 h 后,取出小室用棉签擦去上室的 Matrigel 和细胞,多聚甲醛溶液固定、结晶紫染色、PBS 洗涤，显微镜下观察细胞是否穿过小孔,并拍照统计。

1.10　统计方法

计数资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理;多组间均数比较用单因素方差分析和 LSD-t 法,$P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2　结　果

2.1　SKmel-28 和 SKmel-110　VEGF 基因和蛋白基础表达量测定

RT-PCR、Western blot 检测显示,SKmel-28 细胞的 VEGF 基因和蛋白基础表达量均显著高于 SKmel-110 ($P < 0.01$,图 1、2),因此选取 SKmel-28 进行后续的实验。

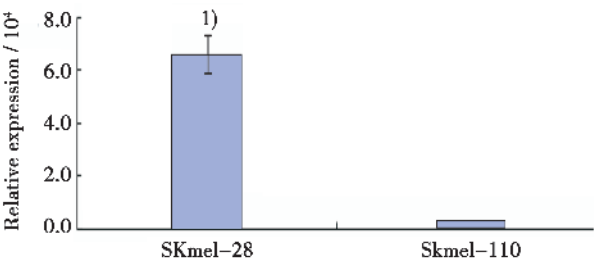


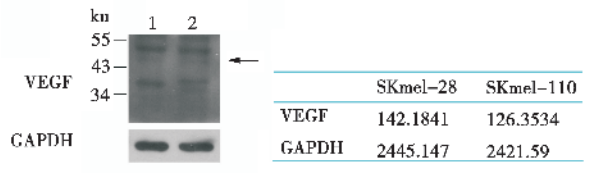
图 1　RT-PCR 检测 SKmel-28 和 SKmel-110 VEGF mRNA 的表达水平

Fig.1　The expression of VEGF mRNA in SKmel-28 and SKmel-110 detected by Western blot

1)The expression of VEGF mRNA in SKmel-28 compared with SKmel-110, $P < 0.01$

2.2　靶向 microRNA 对 SKmel-28 细胞 VEGF mRNA 和蛋白质表达的抑制作用

测序分析证实 4 个 microRNA 重组体中目的



	SKmel-28	SKmel-110
VEGF	142.1841	126.3534
GAPDH	2445.147	2421.59

图 2 Western blot 检测 SKmel-28 和 SKmel-110 VEGF 蛋白的表达水平

Fig.2 The expression of VEGF protein in SKmel-28 and SKmel-110 detected by Western blot

1: SKmel-28, 2: SKmel-110. The expression of VEGF protein in SKmel-28 compared with SKmel-110, $P < 0.01$

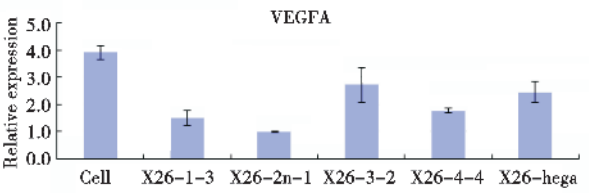


图 3 RT-PCR 检测各组重组载体转染后 SKmel-28 VEGF mRNA 的表达水平

Fig.3 The expression of VEGF mRNA in SKmel-28 detected by RT-PCR after recombinant transfection

X26-2n-1 vs cell, X26-2n-1 vs X26-hega: $P < 0.01$; X-26-1-3, X-26-4-4 vs X26-hega: $P < 0.05$; X-26-1-3, X-26-3-2, X-26-4-4 vs cell: $P < 0.05$

片段的插入位置分别位于 63 ~ 126、68 ~ 131、61 ~ 124、63 ~ 126 bp 之间,碱基序列完整。X-26-1-3, X-26-2n-1, X-26-3-2, X-26-4-4 四组重组质粒成功转染 SKmel-28 后,其 VEGF mRNA 表达水平和蛋白表达量均较阴性对照组 X-26-hega 和空白组 cell 均显著降低, 四组中以质粒 X-26-2n-1 抑制效果最为显著($P < 0.05$,图 3,4)。将使用该载体进行后续试验,并用 VEGFAsh 表示。

2.3 靶向 microRNA 对 SKmel-28 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示,转染 VEGFAsh 组与阴性对照组 (NCsh) 和空白组 (blank) 比较, SKmel-28 细胞发生明显凋亡 (图 5)。转染 VEGFAsh 组早期凋亡率(LR)为(34.22 ± 0.93)%, 晚期凋亡率(UR)为(21.02 ± 0.4)%,总凋亡率(LR + UR)为(55.24 ± 0.99)%,与阴性对照组(NCsh)和空白组(blank)比较差异均有统计学意义(表 2, $P < 0.05$)。

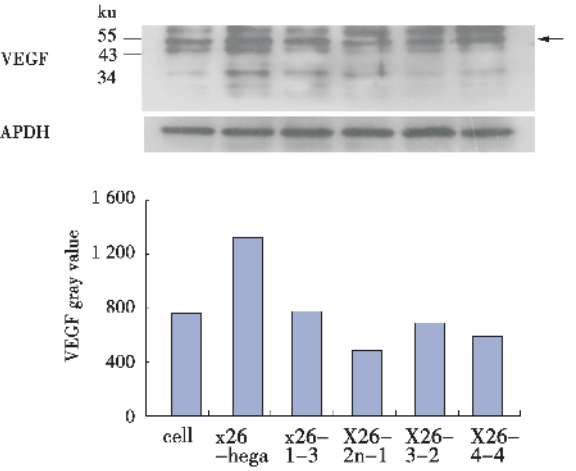


图 4 Western blot 检测各组重组载体转染后 SKmel-28 VEGF 蛋白的表达水平

Fig.4 The expression of VEGF protein in SKmel-28 detected by Western blot after recombinant transfection

X26-2n-1 vs cell, X26-2n-1 vs X26-hega: $P < 0.01$; X-26-1-3, X-26-3-2, X-26-4-4 vs X26-hega: $P < 0.01$

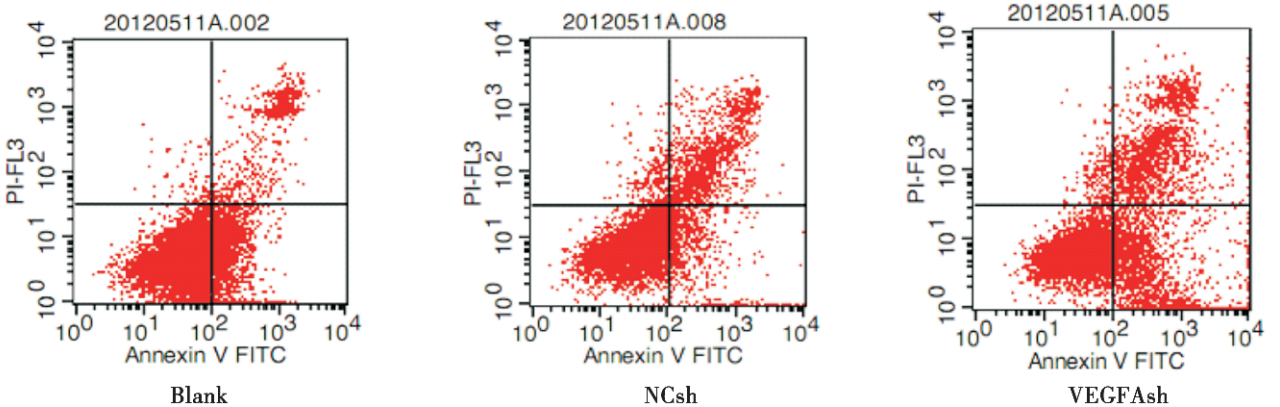


图 5 流式细胞仪检测各组 SKmel-28 细胞凋亡

Fig.5 The apoptosis of SKmel-28 cells detected by flow cytometry after recombinant transfection

表 2　流式细胞仪检测比较各组 SKmel-28 细胞早期、晚期以及总凋亡情况

Table 2　The apoptosis rate of SKmel-28 cells detected by flow cytometry after recombinant transfection

Sample	Quad	1	2	3	$\bar{x} \pm s$	$P_{vs\ VEGFAsh}$
Blank	UL	1.00	0.78	0.88	0.89 ± 0.11	< 0.01
	UR	6.65	6.93	6.58	6.72 ± 0.19	< 0.001
	LL	73.81	73.98	74.18	73.99 ± 0.19	< 0.001
	LR	18.53	18.30	18.35	18.39 ± 0.12	< 0.01
	UR+LR	25.18	25.23	24.93	25.11 ± 0.16	< 0.001
NCsh	UL	3.49	3.67	3.61	3.59 ± 0.09	0.029
	UR	17.82	18.56	17.26	17.88 ± 0.65	0.011
	LL	68.79	67.21	69.06	68.35 ± 1.00	< 0.001
	LR	9.90	10.56	10.07	10.18 ± 0.34	< 0.001
	UR+LR	27.72	29.12	27.33	28.06 ± 0.94	< 0.001
VEGFAsh	UL	2.61	2.31	2.81	2.58 ± 0.25	
	UR	21.40	21.05	20.61	21.02 ± 0.40	
	LL	42.42	41.35	42.75	42.17 ± 0.73	
	LR	33.56	35.29	33.82	34.22 ± 0.93	
	UR+LR	54.96	56.34	54.43	55.24 ± 0.99	

UL：up left；UR：up right；LL：low left；LR：low right

LR：VEGFAsh vs blank，VEGFAsh vs NCsh：$P < 0.01$；UR：VEGFAsh vs NCsh $P < 0.05$，VEGFAsh vs blank $P < 0.01$；LR +UR：VEGFAsh vs NCsh，VEGFAsh vs blank $P < 0.01$

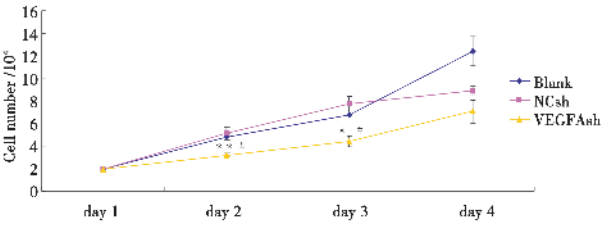


图 6　各组 SKmel-28 转染前后生长曲线比较

Fig.6　The comparison of growth curve in SKmel-28 cells after different recombinant transfection

Day2，day3：VEGFAsh vs NCsh，VEGFAsh vs blank：$P < 0.01$

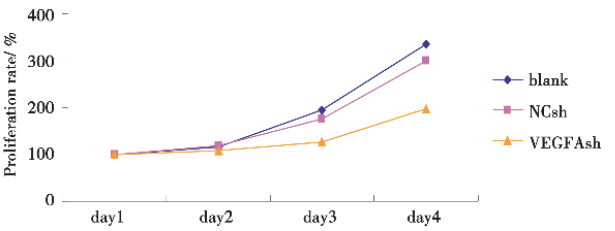


图 7　转染后各组 SKmel-28 细胞增殖率比较

Fig.7　The comparison of proliferation rate of SKmel-28 cells after recombinant transfection

Day3，day4：VEGFAsh compared with NCsh：$P < 0.01$；VEGFAsh compared with blank：$P < 0.05$

2.4　靶向 microRNA 对 SKmel-28 细胞增殖的抑制

转染后第 2、3 天，VEGFAsh 组 SKmel-28 细胞生长较阴性对照组（NCsh）和空白组（blank）相比受到抑制，有统计学差异（$P < 0.01$）；在转染后第 4 天，VEGFAsh 组和阴性对照组（NCsh）细胞生长情况逐渐接近（图 6）。

MTS 检测结果显示，转染阴性对照组（NCsh）SKmel-28 细胞增殖抑制不明显，与空白组（blank）无显著差异，转染 VEGFAsh 组 SKmel-28 细胞生长受到明显抑制；并且转染 VEGFAsh 12、24、48 及 72 h 后，SKmel-28 细胞的增殖抑制率随时间的延长而增加，说明增殖抑制效应具有时间依赖性（图 7）。

EDU 检测显示空白组（blank）和阴性对照组（NCsh）相比，SKmel-28 细胞增殖无明显差异（图 8），但是 VEGFAsh 组细胞增殖明显受到抑制（图 8）。

2.5　靶向 microRNA 对 SKmel-28 细胞侵袭和迁移能力的影响

Transwell 检测结果显示：转染 VEGFAsh 组 SKmel-28 细胞侵袭和迁移能力显著减弱，与阴性对照组（NCsh）和空白组（blank）比较，均有统计学差异（$P < 0.01$，图 9、10）。图 11 显示空白组（blank）和阴性对照组（NCsh）相比，SKmel-28 细胞侵袭和迁移无显著差别，但是 VEGFAsh 组细胞显著稀少。

3　讨　论

VEGF 是目前已知活性最强、专属性最高的促血管内皮生长因子，其他血管生长因子大都通过增强 VEGF 的表达产生促进血管生成的作用，国内外肿瘤研究中提出的抗肿瘤血管生成治疗策略很自然地将 VEGF 作为主要的靶标之一[4]。

研究表明，在不典型增生的色素痣以及恶性黑色素瘤中 VEGF 的表达强度明显高于良性黑色素痣，垂直侵袭性生长的黑色素瘤中的 VEGF 表达也明显高于水平扩散的黑色素瘤[5-6]。自行高表达或

外界刺激诱发高表达 VEGF 的黑色素瘤具有更强的侵袭性[7],而抑制 VEGF 的表达则可以减少黑色素瘤的新生血管生成，抑制其增殖和侵袭，因此 VEGF 可能是恶性黑色素瘤靶向治疗的一个很好的靶基因或蛋白[8]。

既往的研究多利用 RNAi 干扰技术抑制黑色素瘤细胞 VEGF 的表达[9-10]。microRNA 属于调控 RNA 家族一员，主要通过与靶基因序列不完全互补的 microRNA 抑制 mRNA 的翻译,而与靶序列完全互补的 microRNA 引起靶基因 mRNA 的裂解，

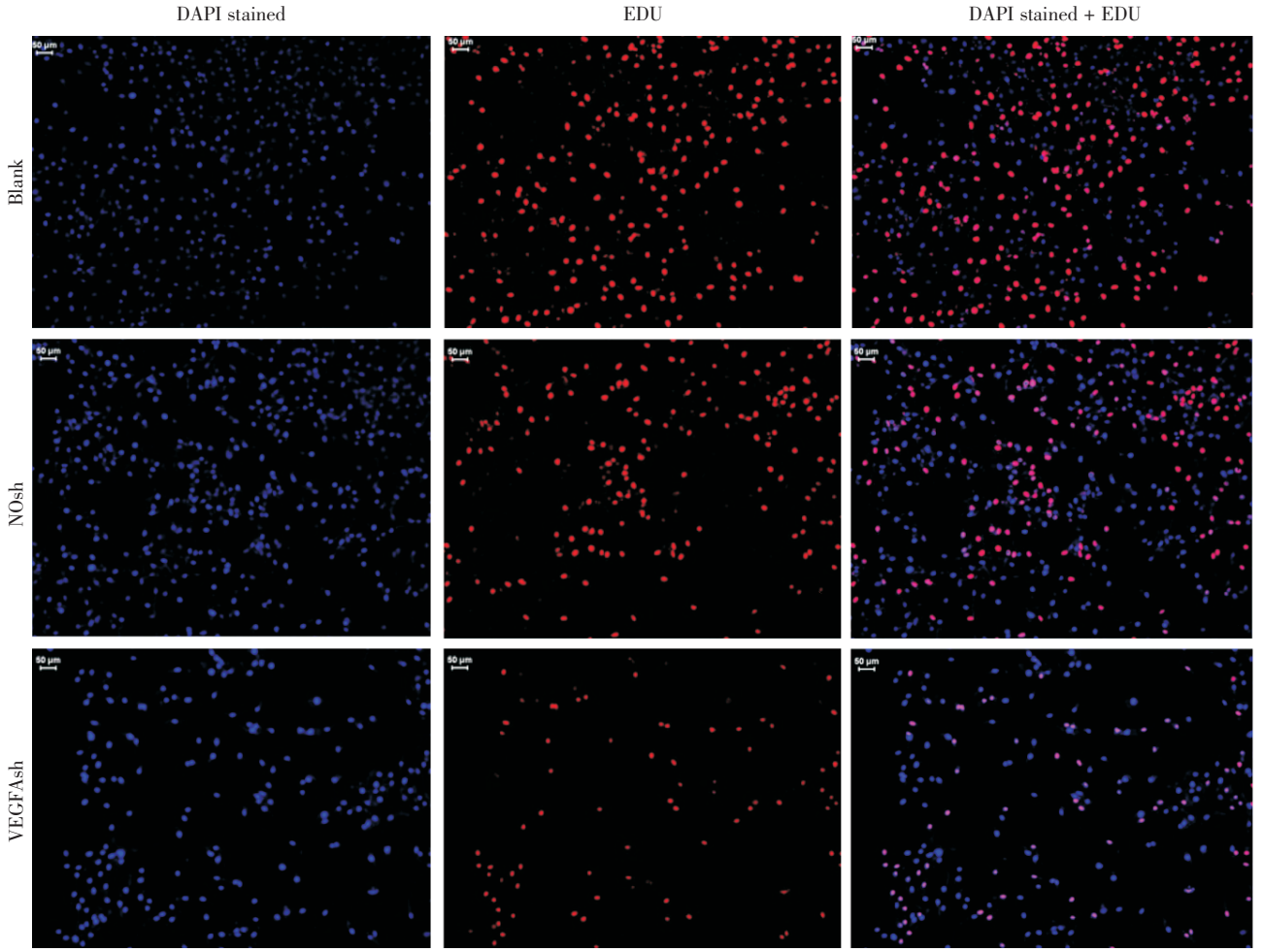


图 8　EDU 检测空白组、阴性对照组和转染 VEGFAsh 组细胞增殖情况

Fig.8　The proliferation of SKmel-28 cells detected by EDU in blank, NCsh, and VEGFAsh group

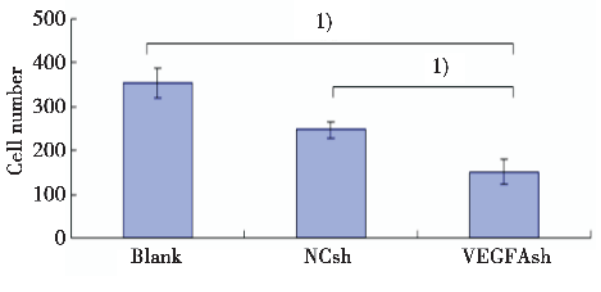


图 9　Transwell 检测比较各组细胞侵袭能力

Fig.9　The comparison of invasion ability in SKmel-28 cells detected by Transwell after recombinant transfection

1) $P < 0.01$, VEGFAsh vs NCsh, VEGFAsh vs blank

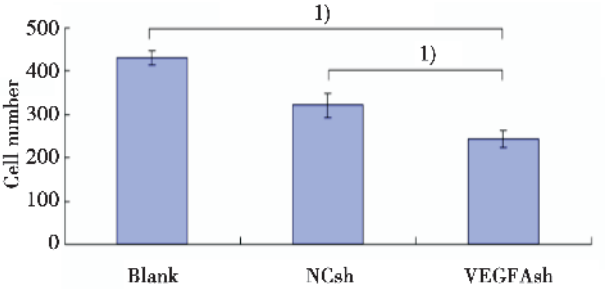


图 10　Transwell 检测比较各组细胞迁移能力

Fig.10　The comparison of migration ability in SKmel-28 cells detected by Transwell after recombinant transfection

1) $P < 0.01$, VEGFAsh vs NCsh, VEGFAsh vs blank

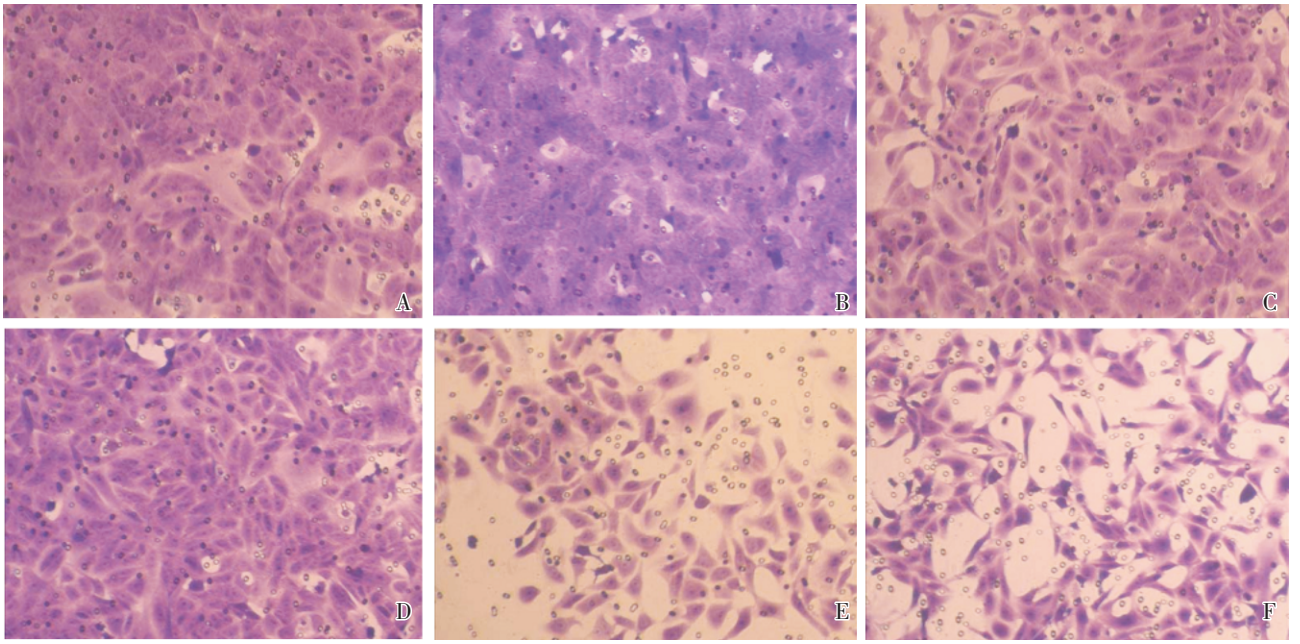


图 11　Transwell 检测比较各组细胞侵袭和迁移能力

Fig.11　The comparison of invasion and migration ability in SKmel-28 cells detected by Transwell after recombinant transfection

A, B, C represent the invasion ability of SKmel-28 cells in blank group, NCsh group, and VEGFAsh group individually. D, E, F represent the migration ability of SKmel-28 cells in blank group, NCsh group, and VEGFAsh group individually. 100 ×

即RNA干扰[11]。最近还发现了第 3 种方式，即 microRNA 会指导其靶向的 mRNA 快速脱腺苷化，进而导致 mRNA 的快速衰减和表达水平的降低[12]。

本研究通过模拟天然 microRNA，人工设计合成靶向 VEGF 的 pre-microRNA 寡核苷酸序列作为干扰片段，并构建真核表达载体，尝试在黑色素瘤细胞 SKmel-28 内实现对 VEGF 基因表达的调控，探索黑色素瘤基因治疗和抗血管生成治疗的新思路。实验结果证实，人工设计合成的靶向 VEGF 的 microRNA 能够显著降低 SKmel-28 细胞 VEGF 基因和蛋白的表达水平，也证明了此种与靶基因 mRNA 序列互补的 microRNA 是通过对 mRNA 的降解达到抑制基因表达的作用。通过不同序列之间抑制效果的比较，我们还成功获得了一个有效下调黑色素瘤细胞 VEGF 基因的质粒和有效位点，该质粒将作为下一步更全面的体内实验及探查其作用机制的有效工具。

目前已经证实，VEGF 可以经旁分泌机制促进肿瘤新生血管的生成及增加新生血管通透性，从而促进肿瘤的浸润和转移。但是近期已经有报道，靶向 VEGF 的体外实验可以观察到 VEGF 对乳腺癌、结肠癌体外培养细胞的生长、迁徙、侵袭能力的直接影响[4]。本研究中，经流式细胞仪检测，瞬时转染靶向 VEGF 的 microRNA 能诱导 SKmel-28 细胞发生明显凋亡，VEGFAsh 组总凋亡率（UR+LR）为(55.24 ± 0.99)%，其早期凋亡率、晚期凋亡率、总凋亡率与阴性对照组（NCsh）和空白组(blank)比较，均有显著性差异；这项发现与既往研究结果相一致，认为可能与肿瘤凋亡基因启动有关[8]。

目前认为，除了旁分泌途经之外，黑色素瘤细胞可能存在 VEGF 的自分泌机制，即肿瘤细胞分泌的 VEGF 可直接作用于肿瘤细胞表面的 VEGF 受体，从而促进黑色素瘤细胞增殖[13-14]，本研究结果同样也支持这个观点。VEGFAsh 组 SKmel-28 细胞生长较阴性对照组(NCsh)和空白组(blank)相比受到抑制，有显著性差异，增殖抑制率随时间的延长而增加，组间比较差异具有显著性，说明增殖抑制效应具有时间依赖性。

VEGF 也可能可以通过自分泌的方式，直接作用于黑色素瘤细胞影响其侵袭和迁移能力；本研究结果显示，转染 VEGFAsh 组 SKmel-28 细胞侵

袭和迁移能力显著减弱,与阴性对照组(NCsh)和空白组(blank)比较,均有显著性差异。其具体机制可能与VEGF调节肿瘤细胞整合素、组织因子、MMPs等有关[15],但也可能与microRNA在非完全互补配对的情况下影响了其它侵袭和转移相关基因的表达有关,具体信号转导通路尚需进一步的深入研究。

microRNA已经成为目前广受重视的一种新的基因治疗策略。本研究构建靶向VEGF的microRNA真核表达载体,成功转染黑色素瘤细胞SKmel-28,能显著降低VEGF基因和蛋白的表达水平,诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞的体外增殖和侵袭迁移能力,为黑色素瘤的基因治疗提供了新的思路和方法。

参考文献:

[1] Kim HN, Kim H, Kong JM, et al. Vitamin C down-regulates VEGF production in B16 F10 murine melanoma cells via the suppression of p42 /44 MAPK activation[J]. J Cell Biochem, 2011, 112(3): 894-901.

[2] Trapp V, Parmakhtiar B, Papazian V, et al. Anti-angiogenic effects of resveratrol mediated by decreased VEGF and increased TSP1 expression in melanoma-endothelial cell co-culture[J]. Angiogenesis, 2010, 13(4): 305-315.

[3] Ross JS, Carlson JA, Brock G. miRNA: the new silence[J]. Am J Clin Pathol, 2007, 128(5): 830-836.

[4] Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF targeted therapy: mechanisms of anti tumour activity[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(8): 579-591.

[5] Einspahr JG, Thomas TL, Saboda K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in early cutaneous melanocytic lesion progression[J]. Cancer, 2007, 110(11): 2519-2527.

[6] 方木平, 刘汉忠, 刘永桥. VEGF-C及其受体在皮肤恶性黑素瘤中的表达及其临床意义[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2007, 23(5): 379-381.
Fang MP, Liu HZ, Liu YQ. Clinicopathological expression of vascular endothelial growth factor C and its receptor in malignant melanoma [J]. Chin J Lepr Skin Dis, 2007, 23(5): 379-381.

[7] Crosby MB, Yang H, Gao W, et al. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels correlate with number and location of mi-crometastases in a murine model of uveal melanoma[J]. Br J Ophthalmol, 2011, 95(1): 112-117.

[8] 涂亚庭, 陶 娟, 黄长征, 等. 血管内皮生长因子-siRNA对恶性黑素瘤细胞生长的抑制作用[J]. 中华皮肤科杂志, 2005, 38(5): 306-308.
Tu YT, Tao J, Huang CZ, et al. Inhibition of Malignant Melanoma Cell Growth Through Blocking Expression of VEGF by RNA Interference[J]. Chin J Dermatol, 2005, 38(5): 306-308.

[9] Filleur S, Courtin A, Ait-Si-Ali S, et al. SiRNA-mediated inhibition of vascular endothelial growth factor severely limits tumor resistance to antiangiogenic thrombospondin-1 and slows tumor vascularization and growth[J]. Cancer Res, 2003, 63(14): 3919-3922.

[10] Qiu JF, Zhang ZQ, Wang Y, et al. Lentivirus-mediated RNAi knockdown of VEGFA in RKO colorectal cancer cells decreases tumor formation and growth in vitro and in vivo[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2012, 5(4): 290-298.

[11] Vriens MR, Weng J, Suh I, et al. MicroRNA expression profiling is a potential diagnostic tool for thyroid cancer[J]. Cancer, 2011, 10(7): 144-148.

[12] Wu L, Fan J, Belasco JG.. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(11): 4034-4039.

[13] Liu W, Xu J, Wang M, et al. Tumor-derived vascular endothelial growth factor (VEGF)-A facilitates tumor metastasis through the VEGF-VEGFR1 signaling pathway[J]. Int J Oncol, 2011, 39(5): 1213-1220.

[14] Ruffini F, Failla CM, Orecchia A, et al. Expression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in cutaneous melanoma: role in tumour progression[J]. Br J Dermatol, 2011, 164(5): 1061-1070.

[15] Schoenfeld J, Jinushi M, Nakazaki Y, et al. Active immunotherapy induces antibody responses that target tumor angiogenesis[J]. Cancer Res, 2010, 70(24): 10150-10160.

(编辑 徐 杰)