

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.01.004

· 基础研究 ·

lncRNA CDKN2B-AS1对黑色素瘤B16-F10细胞恶性生物学行为的影响

邓利丽¹, 孙素姣², 刘艳¹, 陈燕³, 陈星³(1. 成都市第二人民医院 皮肤科, 四川 成都 610017; 2. 大理大学第一附属医院 美容科, 云南 大理 671099; 3. 川北医学院附属医院 皮肤科, 四川 南充 637000)

[摘要] **目的:**探讨长链非编码RNA CDKN2B反义RNA1(long non-coding RNA CDKN2B-antisense RNA 1, lncRNA CDKN2B-AS1)通过靶向miR-7-5p影响黑色素瘤B16-F10细胞的恶性生物学行为的影响。**方法:**选用黑色素瘤B16-F10细胞,构建shRNA CDKN2B-AS1载体并转染到B16-F10细胞,实验分为对照组、sh-CDKN2B-AS1组、miR-7-5p mimics组、miR-7-5p inhibitor组。用RT-PCR检测转染后B16-F10细胞中CDKN2B-AS1表达水平,用克隆形成实验和MTT法检测克隆形成数及细胞的增殖能力,用划痕愈合实验和Transwell实验检测细胞的迁移和侵袭能力。用荧光素酶报告基因实验验证CDKN2B-AS1和miR-7-5p相互间靶向关系。用RT-PCR和Western blotting检测转染miR-7-5p mimics、inhibitor后B16-F10细胞中miR-7-5p和Ki67、cleaved caspase-3、上皮钙黏蛋白(E-cadherin)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)、Twist1蛋白的表达水平。**结果:**与对照组比较,sh-CDKN2B-AS1组B16-F10细胞中CDKN2B-AS1表达水平显著下调($P<0.01$),细胞的增殖、迁移及侵袭能力显著下降(均 $P<0.01$)。荧光素酶报告基因实验证明CDKN2B-AS1与miR-7-5p存在靶向作用关系。sh-CDKN2B-AS1组与miR-7-5p mimics组细胞中miR-7-5p和cleaved caspase-3、E-cadherin水平均明显上调(均 $P<0.05$),Ki67、N-cadherin、Twist1水平明显下调(均 $P<0.05$)。**结论:**CDKN2B-AS1通过靶向miR-7-5p促进黑色素瘤发展,干扰CDKN2B-AS1可抑制黑色素瘤B16-F10细胞的恶性生物学行为。

[关键词] 长链非编码RNA CDKN2B-AS1; miR-7-5p; 黑色素瘤; B16-F10细胞; 增殖; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R730.2; R739.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)01-0025-06

Effect of lncRNA CDKN2B-AS1 on malignant biological behaviors of melanoma B16-F10 cells

DENG Lili¹, SUN Sujiao², LIU Yan¹, CHEN Yan³, CHEN Xing³(1. Department of Dermatology, Chengdu Second People's Hospital, Chengdu 610017, Sichuan, China; 2. Department of Aesthetics, the First Affiliated Hospital of Dali University, Dali 671099, Yunnan, China; 3. Department of Dermatology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of long non-coding RNA CDKN2B antisense RNA 1 (CDKN2B-AS1) on malignant biological behaviors of melanoma B16-F10 cells by targeting miR-7-5p. **Methods:** Melanoma B16-F10 cells were chosen for this study. shRNA CDKN2B-AS1 vector was constructed and transfected into B16-F10 cells. The experimental cells were divided into control group, sh-CDKN2B-AS1 group, miR-7-5p mimic group and miR-7-5p inhibitor group. The expression level of CDKN2B-AS1 mRNA in the transfected B16-F10 cells was detected by RT-PCR; the number of clone formation and the proliferation ability of the cells were detected by Clone formation assay and MTT assay; and the migration and invasion ability of the cells were detected by Scratch-healing assay and Transwell assay. The targeting relationship between CDKN2B-AS1 and miR-7-5p was detected by Luciferase reporter gene assay. The mRNA expression of miR-7-5p and protein expressions of Ki67, cleaved caspase-3, E-cadherin, N-cadherin and Twist1 in B16-F10 cells after transfection with miR-7-5p mimics/inhibitor were detected by RT-PCR and Western blotting, respectively. **Results:** Compared with the control group, the expression level of CDKN2B-AS1 mRNA in B16-F10 cells of sh-CDKN2B-AS1 group was significantly decreased ($P<0.01$); the proliferation, migration and invasion ability of cells were significantly decreased (all $P<0.01$). Luciferase reporter gene assay showed that CDKN2B-AS1 directly targeted miR-7-5p. The mRNA expression of miR-7-5p, and protein expressions of cleaved caspase-3 and E-cadherin in sh-CDKN2B-AS1 group and miR-7-5p mimic group were significantly up-regulated (all $P<0.05$), while the protein expressions of Ki67, N-cadherin, and Twist1 were significantly down-regulated (all $P<0.05$). **Conclusion:** CDKN2B-AS1 targets miR-7-5p to promote the development of melanoma, and interfering with CDKN2B-AS1 can inhibit the malignant biological behaviors of melanoma B16-F10 cells.

[Key words] lncRNA CDKN2B-AS1; miR-7-5p; melanoma; B16-F10 cell; proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(1): 25-30. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.01.004]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81560697)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81560697)

[作者简介] 邓利丽(1982-),女,硕士,主治医师,主要从事皮肤病肿瘤的研究,E-mail:670059750@qq.com

[通信作者] 邓利丽(DENG Lili, corresponding author)

黑色素瘤(melanoma)是最具攻击性的皮肤癌,占皮肤癌相关死亡的80%以上^[1]。中国每年新发黑色素瘤病例约为2万例,且亚洲黑色素瘤主要以肢端和黏膜亚型为主,与西方白种人黑色素瘤发病特点存在较大差异。通过早期检测,原发性黑色素瘤可通过手术治愈,但是转移性黑色素瘤常对化疗和放疗具有抗性^[2]。尽管在分子靶向和免疫疗法方面有新的进展,但黑色素瘤的预后仍然很差^[3]。因此,迫切需要开发治疗黑色素瘤的新方法。长链非编码RNA CDKN2B 反义 RNA1 (long non-coding RNA CDKN2B-antisense RNA 1, lncRNA CDKN2B-AS1) 基因是 PASMANT 等^[4]鉴定的 lncRNA 基因,是乳腺癌、前列腺癌和宫颈癌等的致癌基因。微小 RNA (microRNA, miRNA) 正在成为黑色素瘤的潜在非侵入性生物标志物,miR-7-5p 是多种肿瘤中的抑制因子^[5]。已有研究^[6]表明,miR-7-5p 过表达抑制体外黑色素瘤细胞的迁移与侵袭。本课题旨在探讨 CDKN2B-AS1 通过靶向 miR-7-5p 对黑色素瘤 B16-F10 细胞增殖、迁移和上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

黑色素瘤细胞株 B16-F10 来源于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。细胞培养于 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的高糖 DMEM 培养基中,置于在 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。每 2~3 d 更换培养基 1 次,当需要收集细胞时,用 0.25% 胰蛋白酶消化。实验用细胞为对数生长期细胞。

DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、青-链霉素均购自美国 Gibco 公司, Transwell 小室购自美国 Corning 公司, MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 荧光素酶购自 Solarbio 公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术研究所, Ki67、cleaved caspase-3、上皮钙黏蛋白(E-cadherin)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)、Twist1 抗体和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔二抗均购自美国 Abcam 公司。

1.2 细胞转染及分组

构建 shRNACDKN2B-AS1 和 NC-shRNACDKN2B-AS1 载体, 将 B16-F10 细胞接种到 6 孔板, 接种细胞密度为 3×10^5 /ml。待细胞汇合度达 90% 时, 将细胞随机分为 2 组: 对照组和 sh-CDKN2B-AS1 组。对照组转染 NC-shRNA CDKN2B-AS1 质粒, sh-CDKN2B-AS1 组转染 shRNA CDKN2B-AS1 质粒。

1.3 RT-PCR 检测转染后 B16-F10 细胞中 CDKN2B-AS1 mRNA 的表达

用 TRIzol 法从转染后各组黑色素瘤细胞 B16-F10 中提取总 RNA, 用 Nanodrop 分光光度计测定光密度(D_{260}/D_{280})值, 按照试剂盒说明书进行 cDNA 的合成和 PCR 的扩增。引物序列: CDKN2B-AS1 F 为 5'-TGTACTTAACCACTGGACTACCTGCC-3', R 为 5'-CATTCTGATTCAACAGCAGAGATCAAAG-3'; miR-7-5p F 为 5'-GTG-GAAGACTAGTGATTTTGTGTGT-3', R 为 5'-CGCAGGGTCCGAGGTATTC-3'; GAPDH F 为 5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3', R 为 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 延长 10 min。存储在 4 °C 条件下。反应产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离。以 GAPDH 基因作为内参照, 将条带 CDKN2B-AS1 和 miR-7-5p 与 GAPDH 灰度值的比值作为其 mRNA 表达水平的相对值, 计算各条带的灰度值。

1.4 克隆形成实验检测 B16-F10 细胞的克隆形成能力
在培养皿中培养转染后各组细胞至大约 30% 汇合度, 继续培养 4 d, 吹散为单个细胞, 用 6 孔板培养 (5×10^2 个细胞/孔)。培养 14 d 时, 弃掉培养基, 用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 后用 0.5% 结晶紫染色 15 min, 用去离子水漂洗, 晾干后, 进行拍照观察。大于 50 个细胞的集落计为 1 个克隆。克隆形成率 = 形成克隆细胞数目/接种细胞数目 $\times 100\%$ 。

1.5 MTT 实验检测 B16-F10 细胞的增殖能力

将密度为 1×10^4 的转染后各组细胞悬液接种于 96 孔板 (100 μ l/孔), 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h, 每孔加入 50 μ l MTT 溶液, 孵育 4 h, 吸出上清液, 每孔加 150 μ l DMSO 培养基, 用平板摇床摇匀, 用酶标仪在波长 570 nm 处检测各组细胞的 D 值。细胞增殖率 = (实验组 D 值 - 调零孔 D 值) / (空白组 D 值 - 调零孔 D 值) $\times 100\%$ 。

1.6 划痕愈合实验检测 B16-F10 细胞的迁移能力

用标记笔在细胞培养板背面画横线, 横线需穿过板孔, 相邻两横线间隔 0.8 cm 左右, 每孔至少含有 5 条横线。然后在画线后的细胞培养板中培养 B16-F10 细胞, 待细胞铺满时, 利用枪头垂直于所画横线进行划痕。用 PBS 洗涤细胞培养板, 再加入无血清的培养液继续培养细胞。于 0 和 24 h 取样并拍照。划痕愈合率 = (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度 $\times 100\%$ 。

1.7 Transwell 实验检测 B16-F10 细胞的侵袭能力

取 300 μ l 无血清培养基, 4 °C 下加入 60 μ l 人工合

成基质胶,混匀后铺于上小室基底膜,于 37 °C 培养箱中孵育 5 h,加入 100 μ l 密度为 1×10^6 的细胞;下室中加入 600 μ l 含有 20%FBS 的培养基,置于 37 °C 培养箱中孵育 24 h。取出 Transwell 小室用 PBS 洗 2 遍,5% 戊二醛固定 10 min,0.1% 结晶紫染色 30 min 后在荧光显微镜下观察、统计穿膜细胞数。

1.8 荧光素酶报告基因实验验证 miR-7-5p 与 CDKN2B-AS1 的靶向关系

取对数生长期细胞用 PBS 清洗后,加入 1 \times 通用裂解液,在微型振荡器中混匀 5 min,按照试剂盒说明书的方法:取 20 μ l 样品加入测量管底部,将 100 μ l F assay Reagent I 加入管底部,轻轻敲击管壁 3~5 次混匀,放入发光测定仪中测定,记录发光值为萤光素酶活性的发光单位 (RLU),然后取 100 μ l F assay Reagent II 加入管底部,混匀后放入仪器中立即测定萤光素酶活性。

1.9 Western blotting (WB) 检测 B16-F10 细胞中相关蛋白的表达

选择黑色素瘤 B16-F10 细胞转染 sh-CDKN2B-AS1、miR-7-5p mimics 和 miR-7-5p inhibitor,将细胞分为对照组、sh-CDKN2B-AS1 组、miR-7-5p mimics 组、miR-7-5p inhibitor 组。收集各组细胞并在冰上溶解 25 min。1 200 \times g 离心 10 min,加入细胞裂解液提取总蛋白,用 BCA 试剂盒测定蛋白含量。提取 20 μ g 蛋白样品,在 100 °C 条件下变性 5 min 后,进行 SDS-

PAGE 且转 PVDF 膜,加入 Ki67 (1:1 000)、cleaved caspase-3 (1:500)、E-cadherin (1:500)、N-cadherin (1:2 000)、Twist1 (1:1 000) 一抗,4 °C 孵育过夜。次日,用 PBS-T 清洗 3 次后,加入 HRP 标记的羊抗兔二抗 (1:5 000),4 °C 下孵育 2 h 后,加入化学发光液曝光。用 Image J 软件统计处理蛋白条带的灰度值。

1.10 统计学处理

RT-PCR、克隆形成、MTT、划痕愈合、Transwell、WB 等实验均重复 3 次。实验数据用 SPSS18.0 统计学软件进行处理。正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 *t* 检验,多组间比较采用 Dunnett *t* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染 shRNA CDKN2B-AS1 后可显著抑制 B16-F10 细胞中 CDKN2B-AS1 mRNA 表达及细胞增殖

转染 shRNA CDKN2B-AS1 后,RT-PCR 检测结果 (图 1A) 显示,与对照组比较,sh-CDKN2B-AS1 组 B16-F10 细胞中 CDKN2B-AS1 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$);克隆形成实验结果 (图 1B) 显示,细胞的克隆形成数目显著减少 ($P < 0.01$);MTT 实验结果 (图 1C) 显示,细胞增殖率显著下降 ($P < 0.01$)。结果表明,敲减 CDKN2B-AS1 可使 B16-F10 细胞的增殖能力明显下降。

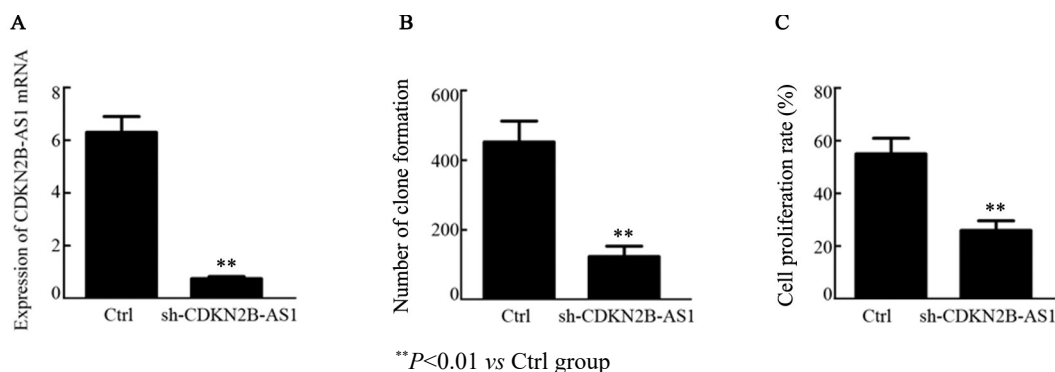


图1 转染 shRNA CDKN2B-AS1 对 B16-F10 细胞中 CDKN2B-AS1 mRNA 表达(A)及细胞增殖(B、C)的影响

Fig.1 Effects of shRNA CDKN2B-AS1 transfection on expression of CDKN2B-AS1 mRNA (A) and proliferation (B, C) in B16-F10 cells

2.2 敲减 CDKN2B-AS1 可抑制 B16-F10 细胞的迁移及侵袭

转染 sh-CDKN2B-AS1 24 h 时,划痕愈合实验结果 (图 2A) 显示,sh-CDKN2B-AS1 组 B16-F10 细胞迁移率显著下降 ($P < 0.01$);Transwell 侵袭实验结果 (图 2B) 显示,sh-CDKN2B-AS1 组 B16-F10 细胞的侵袭数显著低于对照组 ($P < 0.01$)。结果表明,CDKN2B-AS1 显著降低 B16-F10 细胞的迁移与侵袭能力。

2.3 CDKN2B-AS1 与 miR-7-5p 存在靶向关系

为明确 miR-7-5p 对 CDKN2B-AS1 的靶向关系,利用搜索 NCBI 数据库获得 CDKN2B-AS1 3' UTR 序列如图 3A 所示。荧光素酶报告基因实验结果 (图 3B) 显示,CDKN2B-AS1 Wt 转染 miR-7-5p mimics 后,细胞的荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.01$),而转染 CDKN2B-AS1 Mut 细胞的荧光素酶活性无显著变化 ($P > 0.05$)。结果表明,CDKN2B-AS1 和 miR-7-5p 之

间存在直接的靶向作用关系。

2.4 过表达或抑制 miR-7-5p 对 B16-F10 细胞中相关 mRNA 和蛋白表达的影响

转染 miR-7-5p mimics 和 miR-7-5p inhibitor 后, 与对照组比较: (1) RT-PCR 检测结果 (图 4A) 显示, sh-CDKN2B-AS1 和 miR-7 mimics 组 B16-F10 细胞中 miR-7-5p mRNA 表达水平显著高于对照组和 miR-7 inhibitor 组 (均 $P < 0.01$)。 (2) WB 实验结果 (图 4B~G) 显示, sh-CDKN2B-AS1 组 cleaved caspase-

3、E-cadherin 水平显著升高 (均 $P < 0.05$), Ki67、N-cadherin、Twist1 水平显著降低 (均 $P < 0.05$); miR-7-5p inhibitor 组 cleaved caspase-3、E-cadherin 水平显著降低 (均 $P < 0.05$), Ki67、N-cadherin、Twist1 水平显著升高 (均 $P < 0.05$); miR-7-5p mimics 组 cleaved caspase-3 水平显著升高 ($P < 0.01$), E-cadherin 水平显著升高 ($P < 0.05$), Ki67、N-cadherin、Twist1 蛋白水平显著降低 (均 $P < 0.05$)。上述结果表明, CDKN2B-AS1 显著抑制 B16-F10 细胞 EMT。

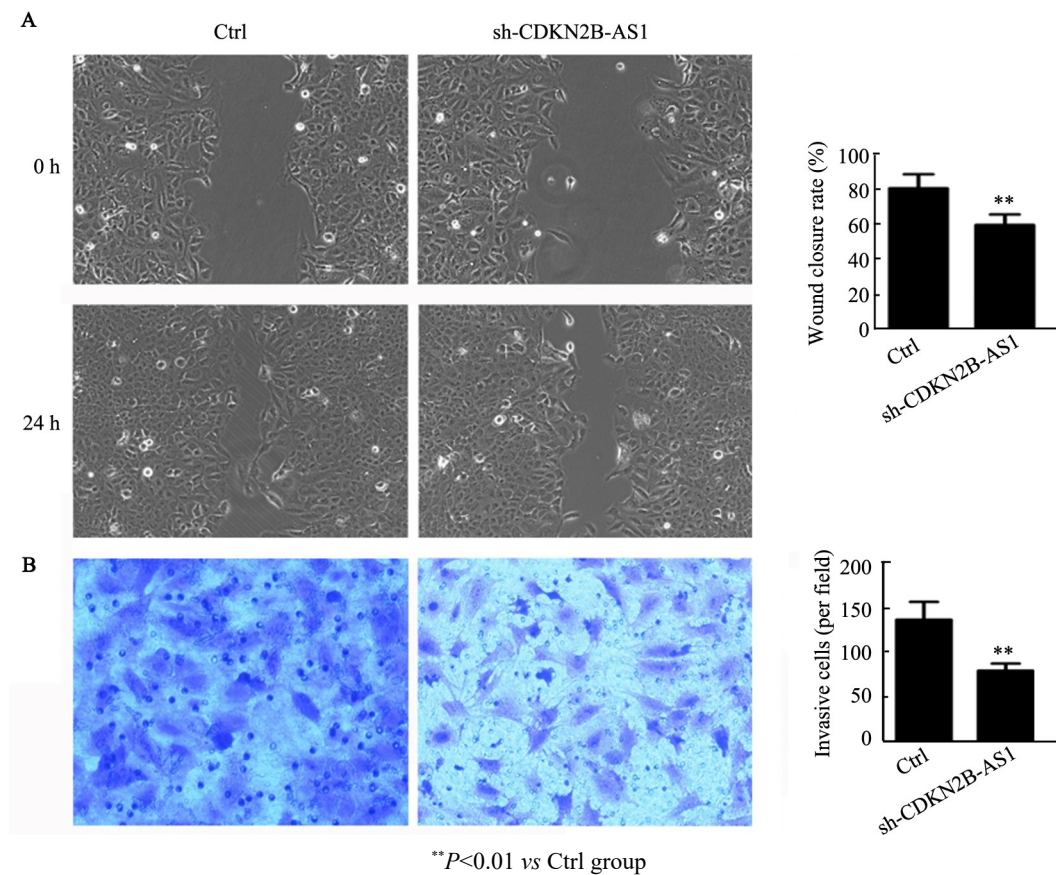
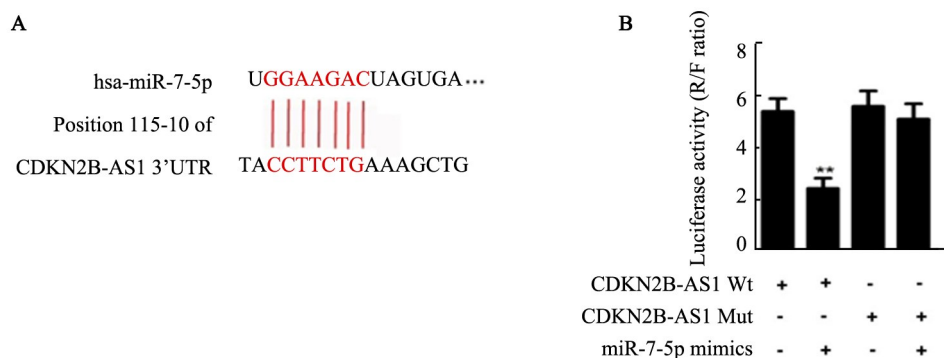


图2 敲降 CDKN2B-AS1 对 B16-F10 细胞迁移(A, $\times 200$)及侵袭(B, $\times 400$)的影响

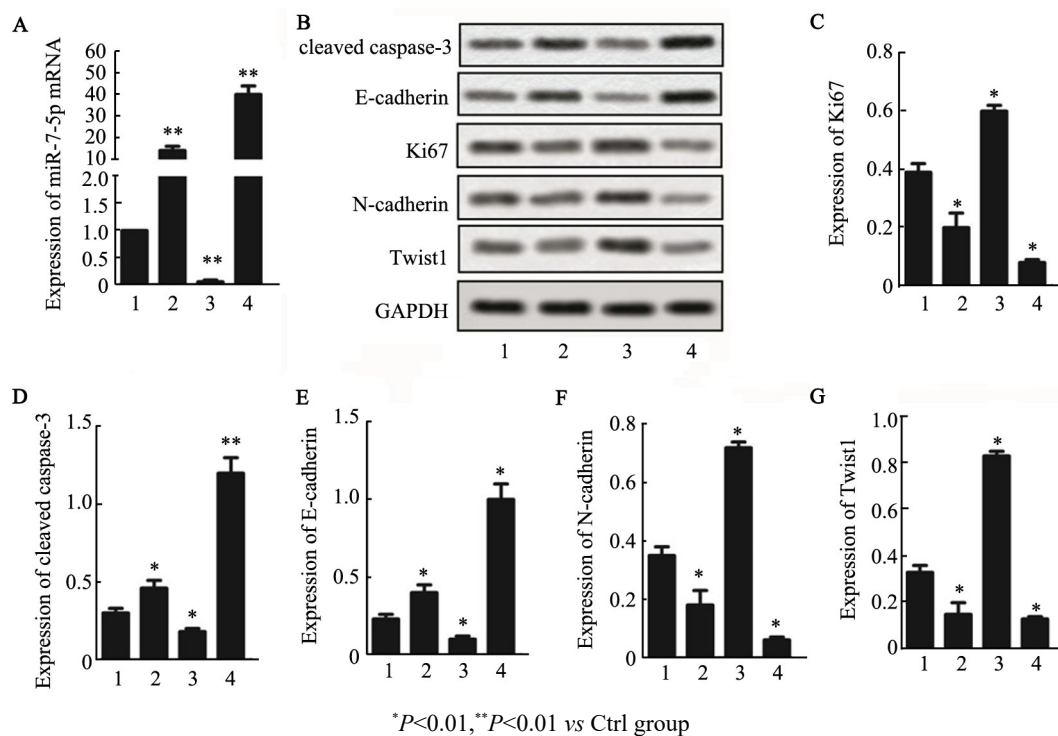
Fig.2 Effect of down-regulating CDKN2B-AS1 on migration (A, $\times 200$) and invasion (B, $\times 400$) of B16-F10 cells



A: Bioinformatics prediction; B: Luciferase reporter gene experiment

图3 miR-7-5p 与 CDKN2B-AS1 的靶向关系

Fig.3 Targeting relationship between miR-7-5p and CDKN2B-AS1



* $P < 0.01$, ** $P < 0.01$ vs Ctrl group

1: Ctrl group; 2: sh-CDKN2B-AS1 group; 3: miR-7-5p inhibitor group; 4: miR-7-5p mimic group

图4 过表达或敲降 miR-7-5p 对 B16-F10 细胞中相关 mRNA(A)和蛋白(B-G)表达的影响

Fig.4 Effects of over-expression or knockdown of miR-7-5p on mRNA (A) and protein (B-G) expressions in B16-F10 cells

3 讨论

黑色素瘤曾被称为“随着太阳升起的癌症”^[7],其起源于黑色素细胞,由于分子和生化水平的异常变化而转变为癌细胞^[8]。转移性黑色素瘤患者的5年生存率仅为5%~10%,而非转移性黑色素瘤的生存率约为90%。目前黑色素瘤的治疗方法仅适用于一部分患者,但对晚期黑色素瘤的治疗选择仍然非常有限^[9]。为了探索新的治疗方法,必须确定黑色素瘤发生和转移的潜在机制,以研发新的预后指标和治疗靶标。

近年来,lncRNA 已经成为生命科学研究的热点,特别是在肿瘤学中,lncRNA 与 miRNA 可能是预测和诊断肿瘤的生物标志物,且可作为治疗的靶点^[10-11]。CDKN2B-AS1 在黑色素瘤-神经系统肿瘤家族的遗传研究中,也被称作 INK4 基因座中反义非编码 RNA^[4],并充当部分肿瘤的致癌基因。miRNA 常被作为生物标志物用于肿瘤的诊断和治疗^[12]。miR-7-5p 已被确认为黑色素瘤的肿瘤抑制因子^[13];GILES 等^[14]发现,miR-7-5p 显著抑制黑色素瘤细胞的增殖、迁移和侵袭,并抑制黑色素瘤肺转移。本研究结果表明,敲减 CDKN2B-AS1 可抑制黑色素瘤 B16-F10 细胞的增殖、侵袭,下调 cleaved caspase-3 蛋白表达,上调 Ki67 蛋白表达。CDKN2B-AS1 与 miR-7-5p 存在直接靶向作用关系。

E-cadherin 和 N-cadherin 是钙黏蛋白家族的成

员,其在细胞胚胎发育期和在细胞黏附调控形态发生中起重要作用^[15]。E-cadherin 由大多数正常上皮组织表达^[16],而 N-cadherin 通常由间充质细胞表达。HSU 等^[17]研究发现,黑色素瘤细胞中 E-cadherin 表达能够恢复角质形成细胞介导的生长控制并下调侵袭相关黏附受体的表达。E-box 转录因子 Twist1 对于发育中的神经嵴中的 EMT 和细胞迁移是必需的^[18]。有研究^[19]发现, Twist1 在绝大多数黑色素瘤组织和细胞系中表达上调,并且与黑色素瘤患者的生存期相关。CIOLCZYK-WIERZBICKA 等^[20]研究发现,在人黑色素瘤细胞系中通过 siRNA 沉默 N-cadherin 抑制细胞增殖。本研究结果与上述研究结果一致,表明 CDKN2B-AS1 上调 E-cadherin 表达,下调 N-cadherin、Twist1 蛋白表达;miR-7-5p 上调 E-cadherin 表达,下调 N-cadherin、Twist1 蛋白表达。

EMT 是发生在伤口愈合和致癌过程中的生物学过程。在伤口愈合中,受损的上皮促进角质形成细胞和成纤维细胞^[21]。在致癌过程中,将原位黑色素瘤转化为侵袭性转移、黑色素瘤,同时,经历 EMT 的细胞通过增加间充质蛋白表达和降低维持上皮完整性的蛋白质的表达而获得间充质特征^[22]。这些变化增强细胞迁移及侵袭能力,并下调细胞凋亡。多种信号通路和细胞微环境之间的复杂作用使原位黑色素瘤向侵袭性黑色素瘤转变^[23]。在本研

究中,敲减 CDKN2B-AS1 可抑制黑色素瘤 B16-F10 细胞增殖、迁移和侵袭。通过促进 E-cadherin 表达和抑制 N-cadherin、Twist1 蛋白表达来抑制 EMT 进程。

总之,本研究揭示了 lncRNA CDKN2B-AS1 对黑色素瘤 B16-F10 细胞增殖、迁移和 EMT 的影响:敲减 CDKN2B-AS1 可抑制黑色素瘤 B16-F10 细胞增殖、迁移及侵袭,促进 EMT 进程,miR-7-5p mimics 明显上调 cleaved caspase-3、E-cadherin 水平,明显下调 Ki67、N-cadherin、Twist1 水平。说明 CDKN2B-AS1 促进黑色素瘤发展可能是通过靶向 miR-7-5p 实现的。因此,调控 lncRNA CDKN2B-AS1 在黑色素瘤中的表达作为预防黑色素瘤转移是有价值的。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2015[J]. *CA: Cancer J Clin*, 2015, 65(1): 5-29. DOI:10.3322/caac.21254.
- [2] 曹艳娇,张维红,杜伟娇,等.术前高血小板和淋巴细胞比值是早期恶性黑色素瘤患者的不良预后因素[J].*中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(5): 509-514. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2018.05.012.
- [3] IIDA Y, CIECHANOVER A, MARZESE D M, et al. Epigenetic regulation of KPC1 ubiquitin ligase affects the NF- κ B pathway in melanoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(16): 4831-4842. DOI:10.1158/1078-0432.ccr-17-0146.
- [4] PASMANT E, LAURENDEAU I, HÉRON D, et al. Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(8): 3963-3969. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-06-2004.
- [5] HORSHAM J L, GANDA C, KALINOWSKI F C, et al. MicroRNA-7: a miRNA with expanding roles in development and disease[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 69: 215-224. DOI:10.1016/j.biocel.2015.11.001.
- [6] GILES K M, BROWN R A, EPIS M R, et al. MiRNA-7-5p inhibits melanoma cell migration and invasion[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 430(2): 706-710. DOI:10.1016/j.bbrc.2012.11.086.
- [7] HOLMES D. The cancer that rises with the sun[J]. *Nature*, 2014, 515(7527): S110-S111. DOI:10.1038/515S110a.
- [8] CORICOVAC D, DEHELEAN C, MOACA E A, et al. Cutaneous melanoma-A long road from experimental models to clinical outcome: a review[J/OL]. *Int J MolSci*, 2018, 19(6): E1566[2019-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6032347/>. DOI: 10.3390/ijms19061566.
- [9] SUN L D, GUAN Z G, WEI S S, et al. Identification of long non-coding and messenger RNAs differentially expressed between primary and metastatic melanoma[J/OL]. *Front Genet*, 2019, 10: 292[2019-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6459964/>. DOI: 10.3389/fgene.2019.00292.
- [10] 麦碧,陈永秀,胡桂英,等.长链非编码 RNALINC00393 在子宫内膜癌临床预后判断中的意义[J].*分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(3): 198-203. DOI:10.3969/j.issn.1674-6929.2019.03.009.
- [11] 黄佳欣,邵婷如,陈跃川,等.长链非编码 RNA 在口腔鳞状细胞癌中的研究进展[J].*分子诊断与治疗杂志*, 2018, 10(2): 120-124. DOI:10.3969/j.issn.1674-6929.2018.02.010.
- [12] 王志鹏,邓利红,潘雄峰,等. miR-29 家族对恶性肿瘤诊断价值的 Meta 分析[J].*中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(4): 445-453. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.04.012.
- [13] DONG M J, XIE Y Y, XU Y D. MiR-7-5p regulates the proliferation and migration of colorectal cancer cells by negatively regulating the expression of Krüppel-like factor 4[J/OL]. *Oncol Lett*, 2019, 17(3): 3241-3246[2019-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6396112/>. DOI:10.3892/ol.2019.10001.
- [14] GILES K M, BROWN R A, GANDA C, et al. MicroRNA-7-5p inhibits melanoma cell proliferation and metastasis by suppressing RelA/NF- κ B[J/OL]. *Oncotarget*, 2016, 7(22): 31663-31680[2019-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5077967/>. DOI:10.18632/oncotarget.9421.
- [15] HALBLEIB J M, NELSON W J. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(23): 3199-3214. DOI:10.1101/gad.1486806.
- [16] LEE J M, DEDHAR S, KALLURI R, et al. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease[J/OL]. *J Cell Biol*, 2006, 172(7): 973-981[2019-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2063755/>. DOI: 10.1083/jcb.200601018.
- [17] HSU M Y, MEIER F E, NESBIT M, et al. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors[J/OL]. *Am J Pathol*, 2000, 156(5): 1515-1525[2019-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1876923/>. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65023-7.
- [18] WEISS M B, ABEL E V, MAYBERRY M M, et al. TWIST1 is an ERK1/2 effector that promotes invasion and regulates MMP-1 expression in human melanoma cells[J/OL]. *Cancer Res*, 2012, 72(24): 6382-6392[2019-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3531871/>. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-12-1033.
- [19] ANSIEAU S, BASTID J, DOREAU A, et al. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence[J]. *Cancer Cell*, 2008, 14(1): 79-89. DOI: 10.1016/j.ccr.2008.06.005.
- [20] CIOŁCZYK-WIERZBICKA D, GIL D, LAIDLER P. The inhibition of cell proliferation using silencing of N-cadherin gene by siRNA process in human melanoma cell lines[J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19(1): 145-151. DOI:10.2174/092986712803414006.
- [21] THIERY J P, SLEEMAN J P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(2): 131-142. DOI:10.1038/nrm1835.
- [22] KALLURI R, WEINBERG R A. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(5): 1786. DOI: 10.1172/jci39104c1.
- [23] LIN K, BARITAKI S, MILITELLO L, et al. The role of B-RAF mutations in melanoma and the induction of EMT via dysregulation of the NF- κ B/snail/RKIP/PTEN circuit[J/OL]. *Genes Cancer*, 2010, 1(5): 409-420[2019-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2933925/>. DOI:10.1177/1947601910373795.

[收稿日期] 2019-08-06

[修回日期] 2019-11-12

[本文编辑] 党瑞山