

NFATc4 在不同恶性黑色素瘤亚型中的表达与功能研究

饶 玮^{1,2}, 冯靖懿³, 王祎琳², 杜治民^{1,2}, 马冠毅^{1,2}, 苏 清^{1,2}, 赵 华²

¹解放军医学院, 北京 100853; ²解放军总医院第一医学中心皮肤科, 北京 100853; ³首都医科大学中医药学院, 北京 100069

摘要: 背景 研究表明活化 T 细胞核因子 c4(nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 4, NFATc4) 的激活表达可促进恶性黑色素瘤的发生发展, 但 NFATc4 在黑色素瘤中的靶向分子及其在不同类型黑色素瘤中的表达尚不明确。目的 探讨 NFATc4 及其靶标 MMP2、COX2 在黑色素瘤细胞及不同黑色素瘤亚型中的表达水平及其与临床病理特征的关系。方法 建立 NFATc4 过表达的黑色素瘤细胞系, 检测 NFATc4 的功能及其与 MMP2 和 COX2 的表达相关性; 利用免疫组织化学法检测皮肤肢端黑色素瘤、皮肤非肢端黑色素瘤、鼻腔黏膜黑色素瘤石蜡组织和色素痣石蜡组织样本中 NFATc4、MMP2、COX2 的表达情况, 并分析 NFATc4、MMP2、COX2 与不同类型恶性黑色素瘤临床病理特征的关系。免疫组化实验分为对照组(色素痣组)和实验组(皮肤肢端黑色素瘤组、皮肤非肢端黑色素瘤组、鼻腔黏膜黑色素瘤组)。结果 NFATc4 促进黑色素瘤细胞的迁移和侵袭, 其表达与 MMP2 和 COX2 呈正相关。这 3 种分子在 3 种恶性黑色素瘤亚型组织中的表达均高于皮内痣 ($P < 0.01$); 在肢端和黏膜黑色素瘤中的表达均高于非肢端黑色素瘤 ($P < 0.05$); NFATc4 与 MMP2、COX2 表达水平呈正相关 ($P < 0.01$)。结论 NFATc4 可能通过调控 MMP2、COX2 参与肢端及黏膜黑色素瘤的发生及发展。

关键词: 黑色素瘤; 痣; NFATc4; 基质金属蛋白酶 2; 环氧化酶 2

中图分类号: R739.5

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2024)08-0891-07

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.2024.095

引用本文: 饶玮, 冯靖懿, 王祎琳, 等. NFATc4 在不同恶性黑色素瘤亚型中的表达与功能研究 [J]. 解放军医学院学报, 2024, 45 (8) : 891-897.

Function and mechanism of NFATc4 in malignant melanoma with different subtypes

RAO Wei^{1,2}, FENG Jingyi³, WANG Yilin², DU Zhimin^{1,2}, MA Guanyi^{1,2}, SU Qing^{1,2}, ZHAO Hua²

¹Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China; ²Department of Dermatology, the First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ³School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: ZHAO Hua. Email: hualuck301@163.com

Abstract: Background Studies have demonstrated that the activated expression of nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 4 (NFATc4) can promote the progression of malignant melanoma with different subtypes. However, the target molecules of NFATc4 in melanoma and its expression across different types of melanoma remain unclear. **Objective** To investigate the expression levels of NFATc4 and its targets MMP2 and COX2 in melanoma cells and various melanoma subtypes, as well as their correlation with clinicopathologic features. **Methods** Melanoma cell lines with NFATc4 overexpression were established to assess NFATc4 function and its association with MMP2 and COX2 expression. The expressions of NFATc4, MMP2, and COX2 were examined using immunohistochemical methods in 11 cases of cutaneous acral melanomas, 10 cases of cutaneous non-acral melanomas, 15 cases of nasal mucosal melanoma, and 10 cases of pigmentation nevus. The correlation between NFATc4, MMP2, COX2, and clinicopathological features of different types of malignant melanoma was analyzed. **Results** NFATc4 was found to promote the migration and invasion of melanoma cells, with MMP2 and COX2 expression showing a positive correlation. The expression of these three molecules in the three subtypes of malignant melanoma was significantly higher than that in pigmentation nevus ($P < 0.01$). Furthermore, the expression levels of melanomas in acral and mucosa were higher than those in non-acral melanomas ($P < 0.05$), and NFATc4 was positively correlated with the expression levels of MMP2 and COX2 ($P < 0.01$). **Conclusion** These findings suggest that NFATc4, MMP2, and COX2 may play roles in the initiation and progression of acral and mucosal melanoma. However, further investigation is required to elucidate the specific mechanism of action.

Keywords: melanoma; nevus; NFATc4; matrix metalloproteinase 2; cyclooxygenase 2

Cited as: Rao W, Feng JY, Wang YL, et al. Function and mechanism of NFATc4 in malignant melanoma with different subtypes [J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2024, 45 (8) : 891-897.

收稿日期: 2023-12-19

作者简介: 饶玮, 女, 在读硕士, 主治医师。研究方向: 皮肤肿瘤。Email: rw752307191@163.com

通信作者: 赵华, 女, 博士, 主任医师。Email: hualuck301@163.com

恶性黑色素瘤 (malignant melanoma, MM) 多发于皮肤和黏膜, 其中肢端和黏膜黑色素瘤在我国和其他亚洲国家高发^[1]。近年来, 黑色素瘤的诊疗技术有极大进展, 但肢端和黏膜黑色素瘤患者

从目前的治疗中获益较少^[1]。基因组学及生物学信息学技术的不断发展，为恶性肿瘤等复杂疾病的机制研究提供了有力工具。

本课题组之前对于肢端黑色素瘤的单细胞转录组学研究发现，活性 T 细胞核因子 c4 (nuclear factor of activated T cells, NFATc4) 在肢端黑色素瘤细胞中高表达，提示该因子可能在肢端黑色素瘤的发生发展中起关键作用^[2]。文献报道 NFATc4 在肿瘤中的高表达通常与一些肿瘤的侵袭、转移、耐药性以及患者预后不良相关，即 NFATc4 高表达的肿瘤患者往往预后较差^[3-4]，NFATc4 可能是一种重要的肿瘤标志物，可以作为评估肿瘤恶性程度和预后的重要参考指标。与其他 NFAT 蛋白相比，NFATc4 的研究相对较少。环氧化酶 2 (cyclooxygenase 2, COX2) 是一种诱导酶，在炎症中参与前列腺素和血栓素的产生，可能参与恶性上皮肿瘤的发生发展^[5]；基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase 2, MMP2) 是 MMP 家族中的重要成员之一，在恶性肿瘤的发生及转移中起重要作用。在膀胱癌细胞中，抑制 NFAT 可导致 MMP2 的表达活性降低，细胞凋亡增加^[6]。既往研究表明 NFATc4、COX2、MMP2 在黑色素瘤中均表达上调^[7-8]。NFATc4、MMP2、COX2 在不同类型恶性黑色素瘤中的表达情况尚未见报道。

本研究拟在肢端黑色素瘤组织 (acral melanoma, AM)、非肢端黑色素瘤组织 (non-acral melanomas, NAM)、黏膜黑色素瘤组织 (sinonasal mucosal melanoma, SNMM) 及人源原位黑色素瘤细胞系 A375 中检测 MMP2、COX2 及其转录调节因子 NFATc4 的表达水平，并初步探讨其作用机制和临床意义。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

人源原位黑色素瘤细胞系 A375 购自美国模式培养物保藏所 (ATCC)，DMEM 培养基 (Invitrogen 公司，C11965500BT)；胎牛血清 (Gibco 公司，19042772)；链霉素双抗 (Life Technologies 公司，15140122)，基质胶 (BD 公司，356234)，鼠抗人 NFATc4 单抗 (Santa Cruz Biotechnology, sc-271597)、鼠抗人 MMP-2 单抗 (Abcam, ab86607)、兔抗人 COX-2 单抗 (Abcam, ab179800)、免疫组化染色试剂盒 (PV-9001/PV9002)、EDTA 修复液 pH 8.0 (ZLI-9067)、DAB kit (ZLI-9018)、中性树胶 (ZLI-9555) 均购自北京中杉金桥公司。逆转录试剂

盒 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (RR047A) 购自日本 Takara 公司。KAPA SYBR FAST Universal qPCR Kit 通用型 (KK4601) 购自美国 KAPA 公司。

1.2 临床标本

收集并筛选解放军总医院 2013 年 1 月—2023 年 1 月黑色素瘤患者的石蜡组织标本，皮肤肢端黑色素瘤组织 11 例、皮肤非肢端黑色素瘤组织 10 例、鼻腔黏膜黑色素瘤组织 15 例、皮内痣组织 10 例。本研究经解放军总医院医学伦理委员会审查备案，审批号：S2021-626-01。所有患者均签署知情同意书。患者临床资料见表 1。

1.3 细胞培养

人源原位黑色素瘤细胞系 A375 使用含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗 (青霉素和链霉素) 的 DMEM 培养基置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养，每隔 2~3 d 传代换液。

1.4 免疫组化染色

实验分为对照组 (色素痣组织) 和实验组 (皮肤肢端黑色素瘤组织、皮肤非肢端黑色素瘤组织、鼻腔黏膜黑色素瘤组织)，切取厚约 5 μm 的石蜡组

表 1 NFATc4、MMP2、COX2 在不同类型黑色素瘤中表达强度与不同临床特点之间的关系 (n=36, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 NFATc4, MMP2 and COX2 expression intensity in different types of melanoma and their relationship between different clinical features (n=36, $\bar{x} \pm s$)

指标	例数/例	NFATc4表达强度	MMP2表达强度	COX2表达强度
年龄				
≤60岁	15	2.73 ± 3.26	7.44 ± 2.87	1.27 ± 1.99
>60岁	21	4.22 ± 2.90	8.30 ± 3.18	1.79 ± 1.66
t值		-1.444	-0.830	-0.865
P值		0.158	0.412	0.393
性别				
男	16	3.58 ± 3.77	7.52 ± 3.41	1.40 ± 1.73
女	20	3.62 ± 2.54	8.28 ± 2.75	1.72 ± 1.88
t值		-0.033	-0.743	-0.526
P值		0.974	0.463	0.602
不同类型				
肢端	11	2.48 ± 0.05	7.30 ± 0.14	1.67 ± 0.05
非肢端	10	1.75 ± 0.05	6.54 ± 0.18	1.33 ± 0.05
黏膜	15	5.55 ± 0.11	8.91 ± 0.17	1.60 ± 0.07
F值		2178	166.5	28.23
P值		<0.0001	<0.0001	0.0009
有无色素				
有	16	4.10 ± 3.39	8.17 ± 3.55	2.15 ± 2.14
无	20	3.20 ± 2.87	7.77 ± 2.65	1.12 ± 1.36
t值		0.850	0.387	1.758
P值		0.402	0.701	0.088

织,经脱蜡、水化、抗原修复(加入8% EDTA 修复液高压修复)、脱色素(分别加入4%多聚甲醛、0.1%高锰酸钾溶、1%草酸溶液),直至玻片无明显黑色或褐色,加入3%过氧化氢室温孵育10 min; PBS 溶液洗3 min,共3次;再加入0.05% Triton-100 孵育15 min, PBS 溶液洗3 min,共3次,加入5% BSA 封闭1 h,后加入适当稀释的一抗,在4℃冰箱过夜(时间≥12 h), PBS 溶液代替一抗作为阴性对照,室温复温30 min。PBS 溶液洗3 min,共3次;加入适当稀释的二抗,室温孵育20 min; PBS 溶液洗3 min,共3次。显色:用蒸馏水稀释DAB染色液,配置成1:50的工作液,滴加显色(30 s~10 min),观察载玻片变为棕黄色,蒸馏水洗5 min;复染:苏木素1 min,盐酸乙醇1 s,氨水反蓝1 s,蒸馏水洗5 min,共3次;脱水、透明:乙醇I、II、III各3 min,二甲苯I、II各5 min;自动封片机封片,显微镜观察染色情况。

1.5 免疫组化结果判定

通过人工计数法确定组织细胞中阳性细胞的染色强度及阳性细胞百分比来进行判读^[9]。无染色为0分,淡黄色(弱染色)为1分,棕黄色(中染色)为2分,棕褐色(强染色)为3分;阳性细胞所占百分比≤10%为1分,11%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分。免疫组化结果由两名皮肤科病理医师采用双盲法独立阅片,每张切片随机选取5个高倍视野(400×),每个高倍视野计数50个肿瘤细胞、痣细胞或普通细胞,观察阳性细胞染色强度,计数阳性细胞百分比,表达强度为所计的分数相乘得出的积分,再取2个样本得分的平均值。<3分为阴性,≥3分为阳性。

1.6 慢病毒感染人源原位黑色素瘤细胞 A375

A375 细胞以 1×10^5 /孔接种于 12 孔板中,用含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基培养过夜。将 40 μL NFATc4 或对照 Phage 重组慢病毒浓缩液加入培养基中,轻轻混匀,并加入终浓度为 8 μg/mL 的 Polybrene 提高感染效率。同时建立对照组。感染 24 h 后换回常规培养基继续培养,72 h 后于荧光倒置显微镜下观察转染效率,用流式细胞分选术分选出含 GFP 荧光的细胞,认定为稳定表达 NFATc4 的细胞株。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测 A375 细胞中 MMP2 及 COX2 表达

使用 Trizol 裂解细胞(A375-NFATc4, A375-phage),加入氯仿和异丙醇提取细胞总 RNA 并进

行浓度测定和质量检测,经反转录合成 cDNA。采用 CFX96 实时荧光定量 PCR 检测系统进行基因表达分析(所有基因的引物序列见表 2)。

1.8 Transwell 迁移与侵袭实验

用预冷的无血清基础培养基将基质胶配制成相应浓度的工作胶(6:1),每个 Transwell 小室孔加入 100 μL 工作胶(迁移实验为常规操作),收集消化好的 A375-phage 和 A375-NFATc4 细胞,用无血清 DMEM 基础培养基重悬,以 2×10^4 /孔的细胞密度接种到 Transwell 小室的上腔室中,下腔室中加入含有 20% 血清的 DMEM 完全培养基。培养 24 h 后,弃去旧培养基,4% 多聚甲醛室温固定 15 min 后,吸弃, PBS 缓冲液清洗 1~2 次,室温下用 0.1% 结晶紫染液对迁移侵袭细胞瞬时染色, PBS 缓冲液清洗 1~2 次,棉签轻轻擦去上腔室膜上的细胞并用倒置显微镜观察迁移到上腔膜下的细胞,拍照记录。

1.9 统计学分析

使用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 8 软件处理数据。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数的比较采用 *t* 检验,多组间均数的比较采用方差分析,各变量表达强度的相关性采用 Spearman 相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NFATc4 在肢端黑色素瘤组织中的表达

对临床样本进行免疫组化染色发现,11 例肢端黑色素瘤和 15 例黏膜黑色素瘤组织中 NFATc4 呈强阳性表达,细胞核与细胞质均有分布;而在 10 例非肢端黑色素瘤中呈散在阳性分布;色素痣组织中几乎未见阳性($P < 0.05$)。见图 1A、图 1B、表 1。

2.2 NFATc4 稳定表达的黑色素瘤细胞株的建立及 NFATc4 对黑色素瘤细胞迁移与侵袭能力的作用

为研究 NFATc4 与恶性黑色素瘤发生发展的相关性,本研究采用慢病毒感染的方法在黑色素

表 2 引物序列
Tab. 2 Primer sequence

基因	引物序列
NFATc4	F: 5'-ACCCTACAGATGTTTCATCGGC-3' R: 5'-ATTCCCGCGCAGTCAATGT-3'
MMP-2	F: 5'-CGTCGCCCATCATCAAGTTC-3' R: 5'-GTCTGGGGCAGTCCAAAGAA-3'
COX-2	F: 5'-GCTGTCCCCACATTAGGCTT-3' R: 5'-GCTGTCCCCACATTAGGCTT-3'
Actin	F: 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3' R: 5'-CTCCTTAATGTACGACAGAT-3'

瘤细胞 A375 中构建 NFATc4 稳定过表达细胞株并进行转录水平和蛋白质水平的鉴定。结果证实 A375 NFATc4 稳定过表达细胞株构建成功, 见图 2A 和图 2B。Transwell 迁移与侵袭实验结果显示, 相比对照组, NFATc4 过表达组细胞迁移与侵袭能力增加 ($P < 0.05$), 见图 2C 和图 2D。

2.3 NFATc4 在恶性黑色素瘤细胞中的作用及与 MMP2、COX2 的表达相关性

利用 qPCR 技术检测 A375 细胞中 NFATc4、MMP2 和 COX2 的表达水平。结果显示, 过表达 NFATc4 后 A375 细胞中 MMP2 和 COX2 的表达水平均较对照组上升 (图 3A: $P < 0.01$; 图 3B: $P < 0.05$)。

2.4 MMP2 和 COX2 在肢端黑色素瘤组织中的表达

利用免疫组化染色法研究肢端黑色素瘤、黏膜黑色素瘤、非肢端黑色素瘤和色素痣组织中 MMP2、COX2 的表达情况。结果显示, 在肢端黑色素瘤组织 ($n=11$) 及黏膜黑色素瘤组织 ($n=15$) 中, MMP2 强阳性信号大量分布于细胞质和细胞膜, 呈棕黄色; 在非肢端黑色素瘤组织 ($n=10$) 中可见散在分布的阳性信号, 在痣细胞组织中几乎无表达 ($P < 0.05$), 见图 4A 和图 4B。COX2 在肢端黑色素瘤组织和黏膜黑色素瘤组织中呈阳性表达, 在非肢端黑色素瘤组织中呈弱阳性表达, 定位于细胞质, 呈淡黄色; 在痣细胞组织中无明显表达, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4C 和图 4D。这说明 MMP2 和 COX2 在恶性黑色素瘤中的表达高于色素痣, 在肢端黑色素瘤和黏膜黑

色素瘤中的表达高于非肢端黑色素瘤, 见表 1。

2.5 NFATc4、MMP2、COX2 与 3 种黑色素瘤亚型的临床特征相关性

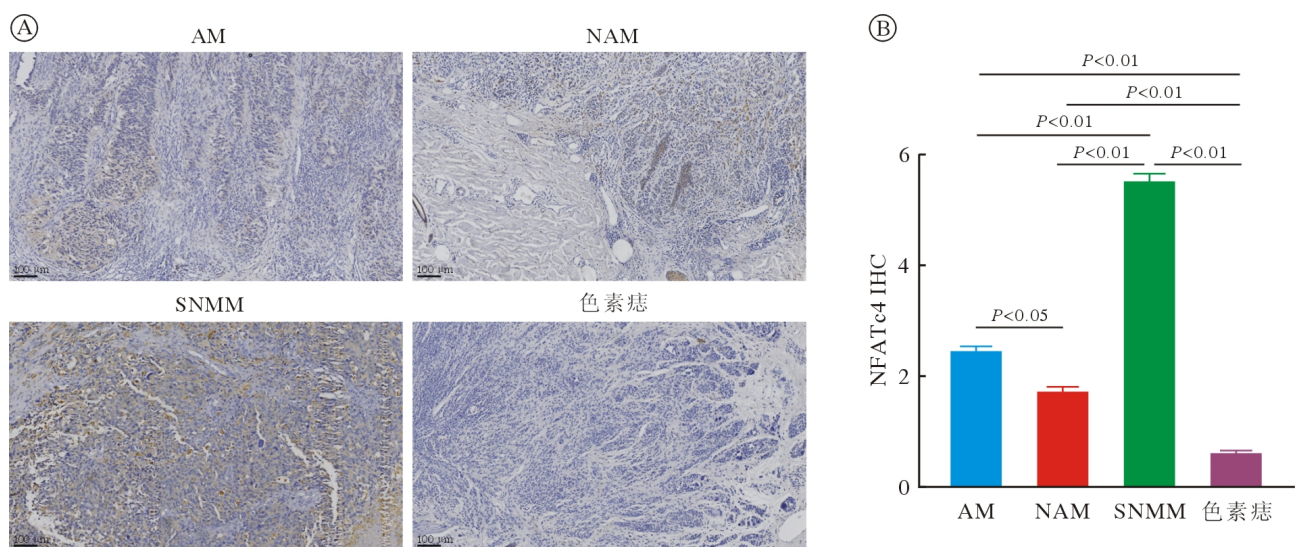
恶性黑色素瘤中, NFATc4 的表达与黑色素瘤的亚型有关, 在肢端黑色素瘤和黏膜黑色素瘤中的表达强于非肢端黑色素瘤 ($P < 0.05$), 与患者的性别、年龄、皮损处有无色素沉着等因素无显著相关性 ($P > 0.05$); MMP2 和 COX2 同样在肢端和黏膜黑色素瘤中的表达强于非肢端黑色素瘤 ($P < 0.05$), 与患者的性别、年龄、发病部位、皮损处有无色素等因素无显著相关性 ($P > 0.05$), 见表 1。

Spearman 相关性分析结果显示, NFATc4 与 MMP2 在 MM 组织中的表达强度呈正相关 ($r=0.797$, $P < 0.001$), 见图 5A; NFATc4 与 COX2 在 MM 组织中的表达强度呈正相关 ($r=0.508$, $P=0.002$), 见图 5B。

3 讨论

肢端和黏膜黑色素瘤有许多共同的临床病理特征, 包括侵袭性表型、广泛的放射状生长阶段、显著的雀斑样生长以及预后不良, 但缺乏其他黑色素瘤亚型中常见的驱动突变。尽管近年来黑色素瘤的治疗方面取得了一些进展, 但这些方案和方法对肢端和黏膜黑色素瘤患者的疗效有限^[1], 因此探索不同类型黑色素瘤的发病机制对肢端和黏膜黑色素瘤患者的生存结果至关重要。

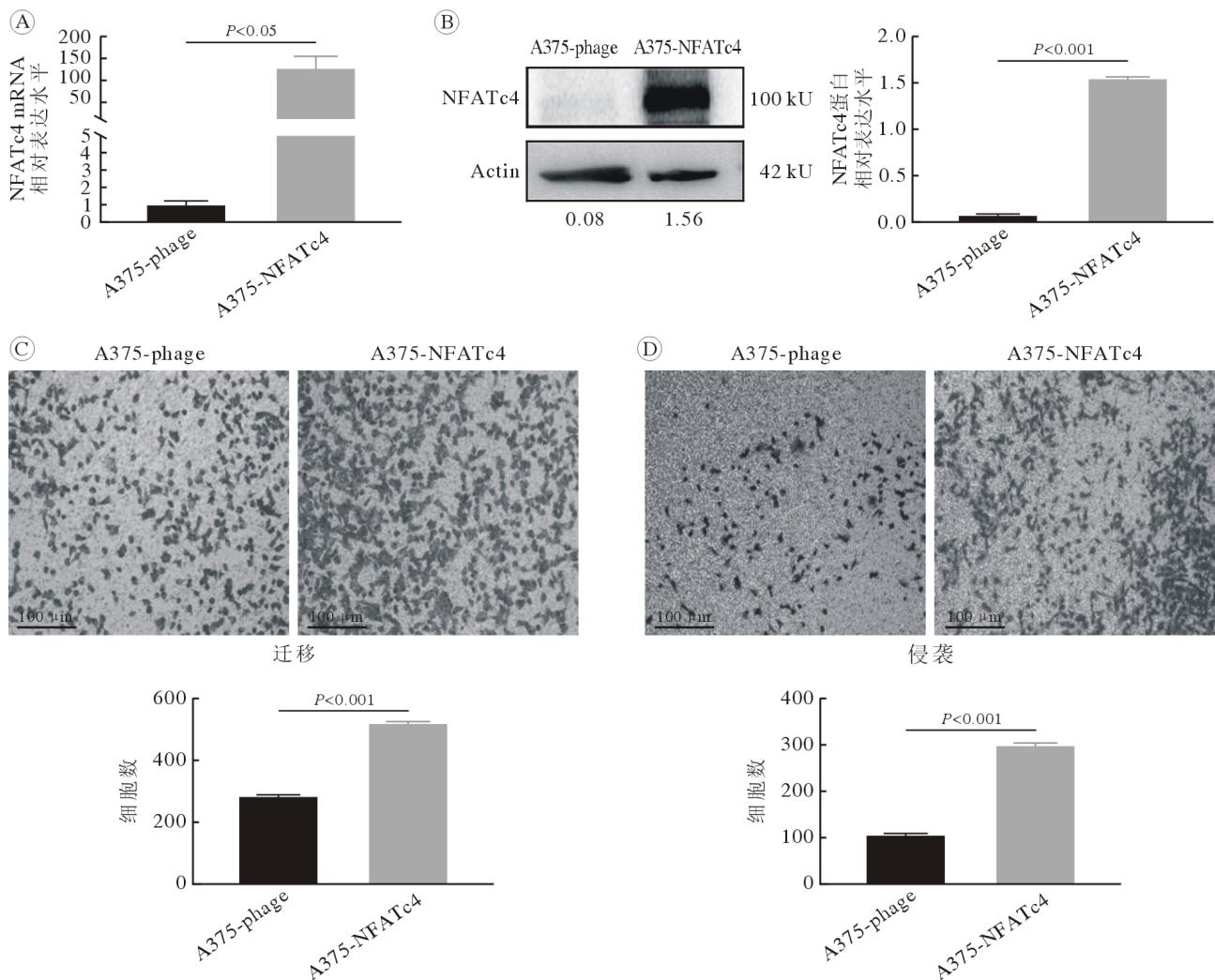
NFATc4 为 NFAT 家族的转录因子之一, 受到 Ca^{2+} /钙调磷酸酶信号激活。越来越多的研究表明, 异常激活的 NFATc4 参与并调控了多种肿



NFATc4 在肢端黑色素瘤组织、非肢端黑色素瘤组织、黏膜黑色素瘤组织、色素痣组织的免疫组化染色结果 (A, 400 ×) 及评判得分 (B)。

图 1 NFATc4 在肢端黑色素瘤中高表达

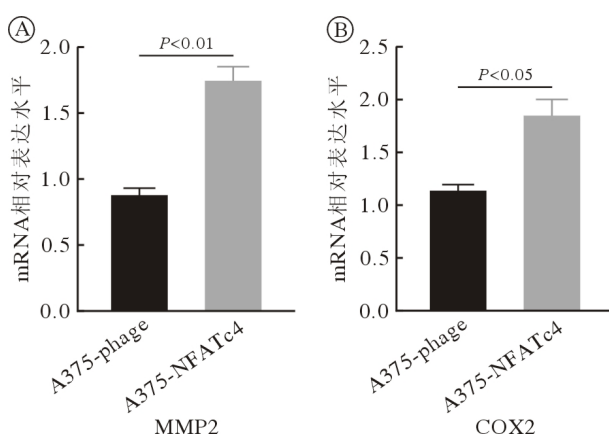
Fig.1 NFATc4 was highly expressed in acral melanomas



A: A375 稳定株 NFATc4 的 mRNA 表达水平; B: A375 稳定株 NFATc4 的蛋白表达水平; C: Transwell 小室迁移实验检测 NFATc4 对 A375 细胞迁移能力的影响 (400 ×); D: Transwell 小室侵袭实验检测 NFATc4 对 A375 细胞侵袭能力的影响 (400 ×)。

图 2 NFATc4 过表达细胞株建立验证及 NFATc4 对黑色素瘤细胞迁移与侵袭的影响

Fig.2 Verification of the establishment of NFATc4 overexpression A375 cell, the effect of NFATc4 on melanoma cell migration and invasion

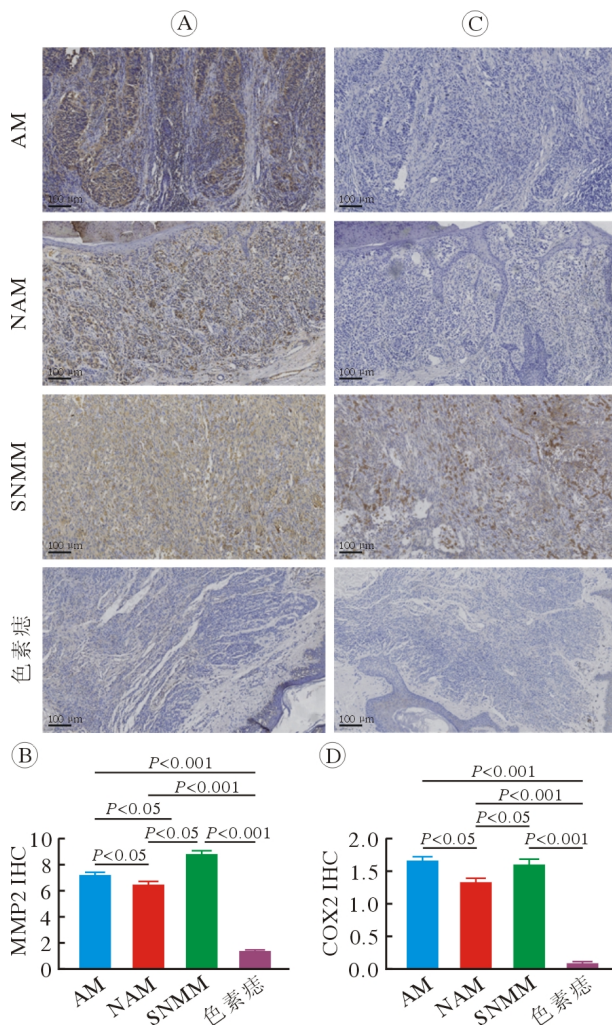


A: MMP2 在过表达 NFATc4 的 A375 稳定株中的 mRNA 表达水平; B: COX2 在过表达 NFATc4 的 A375 稳定株中的 mRNA 表达水平。

图 3 过表达 NFATc4 恶性黑色素瘤细胞 A375 与对照组 MMP2、COX2 的表达

Fig.3 Expressions levels of MMP2 and COX2 in NFATc4 overexpression A375 malignant melanoma cells versus control

瘤, 包括但不限于肺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、胶质瘤、急性髓细胞白血病的发生、增殖、侵袭和转移^[3,10-11]。与其他 NFAT 蛋白相比, NFATc4 在黑色素瘤中的表达和功能目前仅有 1 篇报道——Xiao 等^[8]利用免疫荧光等方法检测到 NFATc4 在皮肤鳞状细胞癌、基底细胞癌、黑色素瘤等皮肤癌组织中高表达, 在正常皮肤及色素痣组织中低表达, NFATc4 抑制剂在黑色素瘤细胞中具有抗增殖、抗转移的作用。本研究发现 NFATc4 在肢端及黏膜黑色素瘤中的阳性表达率高于非肢端黑色素瘤, 因此 NFATc4 在侵袭性更强及预后更差的黑色素瘤类型中表达更高。上述结果都提示 NFATc4 在黑色素瘤中高表达, 其表达程度与恶性程度具有相关性。NFATc4 有望成为肢端和黏膜黑色素瘤新的诊断和治疗靶点。

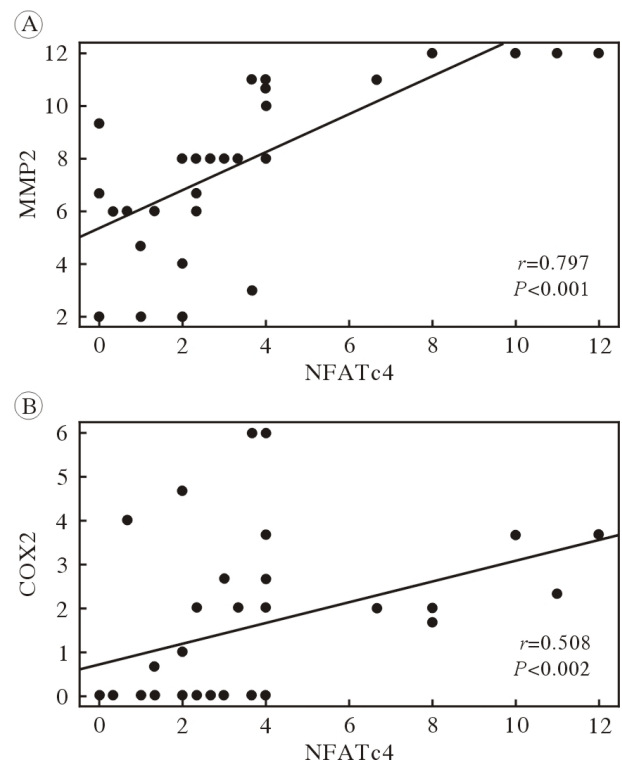


A, B: MMP2 在肢端黑色素瘤组织、非肢端黑色素瘤组织、黏膜黑色素瘤组织、色素痣组织免疫组化染色结果及评判得分 (400 ×); C, D: COX2 在肢端黑色素瘤组织、非肢端黑色素瘤组织、黏膜黑色素瘤组织、色素痣组织免疫组化染色结果及评判得分 (400 ×)。

图 4 MMP2 及 COX2 在肢端黑色素瘤细胞中高表达

Fig.4 MMP2 and COX2 are highly expressed in acral melanoma cells

Transwell 迁移与侵袭实验表明, NFATc4 的过表达显著增强了黑色素瘤细胞系 A375 的迁移和侵袭能力, 提示 NFATc4 可能通过促进肿瘤细胞的迁移和侵袭来发挥其生物学功能。本研究中关注的另外两个分子 MMP2 和 COX2 都与肿瘤转移相关, MMPs 在肺癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌和前列腺癌等恶性肿瘤中高表达, 且与肿瘤的转移和不良预后密切相关^[12-16]。MMP2 不仅可以降解细胞外基质促进肿瘤细胞扩散, 还能通过新生毛细血管促进肿瘤侵袭与转移^[17-18]; COX2 在肺癌^[19]、胃肠癌^[20]和乳腺癌^[21]中高度表达并促进了肿瘤的发生发展。在小鼠和人类黑色素瘤模型中也能检测到高水平的 COX2 异构体^[22]。COX2 在肿瘤细胞中的功能可能与刺激血管生成、抑制



A: 在黑色素瘤组织中 NFATc4 与 MMP2 的表达强度呈正相关; B: 在黑色素瘤组织中 NFATc4 与 COX2 的表达强度呈正相关。

图 5 NFATc4、MMP2、COX2 在恶性黑色素瘤组织中表达强度的相关性分析

Fig.5 Correlation analysis of expression intensity of NFATc4, MMP2 and COX2 in malignant melanoma tissues

凋亡、增加细胞增殖、细胞侵袭性、免疫抑制和诱变剂的产生有关^[23]。其中, COX2 对前列腺素 E2 (PGE2) 具有重要的介导作用, 而 PGE2 已被发现可通过干扰恶性黑色素瘤的侵袭和进展, 在癌变过程中发挥关键作用^[24]。本研究中, MMP2 和 COX2 在肢端及黏膜黑色素瘤等侵袭性更强的亚型中的表达强于非肢端黑色素瘤, 并与 NFATc4 的表达强度呈正相关。为进一步验证, 设计体外实验, 在过表达 NFATc4 的 A375 细胞中, MMP2 和 COX2 表达量也随之增加。这些结果表明 NFATc4 可能通过调控 MMP2 和 COX2 促进肿瘤细胞的侵袭与迁移功能, 从而发挥其生物学作用。

本研究通过实验证明, NFATc4、MMP2、COX2 在恶性黑色素瘤中高表达。过表达 NFATc4 可显著提高 MM 细胞迁移与侵袭能力; MMP2 和 COX2 的表达也随着 NFATc4 过表达而升高。为了深入阐明 NFATc4 在恶性黑色素瘤中的分子作用机制, 本课题组未来将结合已有的肢端黑色素瘤的单细胞转录组数据和本研究中建立的 A375-NFATc4 稳定表达细胞模型, 通过生信技术分析 NFATc4 在恶性黑色素瘤细胞中的上、下游分子

调控通路,并在细胞水平和荷瘤小鼠模型中完成验证。

作者贡献 饶玮:细胞与分子学实验,文章撰写,数据分析;赵华:实验设计与指导;冯靖懿、王祎琳:文章修改与校正;杜治民、马冠毅、苏清:文献收集和整理。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明 本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取,Email:rw752307191@163.com。

参考文献

- 1 Mao LL, Qi ZH, Zhang L, et al. Immunotherapy in acral and mucosal melanoma: current status and future directions [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 680407.
- 2 He Z, Xin ZJ, Yang Q, et al. Mapping the single-cell landscape of acral melanoma and analysis of the molecular regulatory network of the tumor microenvironments [J]. *Elife*, 2022, 11: e78616.
- 3 Zhong QH, Zha SW, Lau ATY, et al. Recent knowledge of NFATc4 in oncogenesis and cancer prognosis [J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22 (1): 212.
- 4 Giri PS, Dwivedi M, Laddha NC, et al. Altered expression of nuclear factor of activated T cells, forkhead box P3, and immune-suppressive genes in regulatory T cells of generalized vitiligo patients [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2020, 33 (4): 566-578.
- 5 Rohini M, Vairamani M, Selvamurugan N. TGF- β 1-stimulation of NFATc2 and ATF3 proteins and their interaction for matrix metalloproteinase 13 expression in human breast cancer cells [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 192: 1325-1330.
- 6 Wang G, Wang YZ, Yu Y, et al. Inhibitory ASIC2-mediated calcineurin/NFAT against colorectal cancer by triterpenoids extracted from *Rhus chinensis* Mill [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 235: 255-267.
- 7 Tudor DV, Bâldea I, Lupu, et al. COX-2 as a potential biomarker and therapeutic target in melanoma [J]. *Cancer Biol Med*, 2020, 17 (1): 20-31.
- 8 Xiao T, Zhu JJ, Huang S, et al. Phosphorylation of NFAT3 by CDK3 induces cell transformation and promotes tumor growth in skin cancer [J]. *Oncogene*, 2017, 36 (20): 2835-2845.
- 9 Hattori A, Ohta E, Nagai M, et al. A new approach to analysis of intracellular proteins and subcellular localization using cellprofiler and imageJ in combination [J]. *Methods*, 2022, 203: 233-241.
- 10 Peng L, Tao YH, Wu R, et al. NFAT as a biomarker and therapeutic target in non-small cell lung cancer-related brain metastasis [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 781150.
- 11 Xiao T, Chen WC, Wang SF, et al. Tacrolimus and ascomycin inhibit melanoma cell growth, migration and invasion via targeting nuclear factor of activated T-cell 3 [J]. *Melanoma Res*, 2020, 30 (4): 325-335.
- 12 Asgari R, Vaisi-Raygani A, Aleagha MSE, et al. CD147 and MMPs as key factors in physiological and pathological processes [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2023, 157: 113983.
- 13 Anchan A, Finlay G, Angel CE, et al. Melanoma mediated disruption of brain endothelial barrier integrity is not prevented by the inhibition of matrix metalloproteinases and proteases [J]. *Biosensors*, 2022, 12 (8): 660.
- 14 Wu DM, Deng SH, Liu T, et al. TGF- β -mediated exosomal lnc-MMP2-2 regulates migration and invasion of lung cancer cells to the vasculature by promoting MMP2 expression [J]. *Cancer Med*, 2018, 7 (10): 5118-5129.
- 15 Wang XF, Chang XY, He CY, et al. ATP5B promotes the metastasis and growth of gastric cancer by activating the FAK/AKT/MMP2 pathway [J]. *FASEB J*, 2021, 35 (4): e20649.
- 16 Buttacavoli M, Di Cara G, Roz E, et al. Integrated multi-omics investigations of metalloproteinases in colon cancer: focus on MMP2 and MMP9 [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (22): 12389.
- 17 Jia YS, Wang YJ, Zhang CC, et al. Upregulated CBX8 promotes cancer metastasis via the WNK2/MMP2 pathway [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2020, 19: 188-196.
- 18 Jia L, Lei B, Gao HJ, et al. miR-130b suppresses the invasion and migration of prostate cancer via inhibiting DLL1 and regulating the PI3K/Akt pathways [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 23 (1): 98.
- 19 Cecil DL, Gad EA, Corulli LR, et al. COX-2 inhibitors decrease expression of PD-L1 in colon tumors and increase the influx of type I tumor-infiltrating lymphocytes [J]. *Cancer Prev Res*, 2022, 15 (4): 225-231.
- 20 Ayiomamitis GD, Notas G, Vasilakaki T, et al. Understanding the interplay between COX-2 and hTERT in colorectal cancer using a multi-omics analysis [J]. *Cancers*, 2019, 11 (10): 1536.
- 21 Tian J, Wang V, Wang N, et al. Identification of MFG8 and KLK5/7 as mediators of breast tumorigenesis and resistance to COX-2 inhibition [J]. *Breast Cancer Res*, 2021, 23 (1): 23.
- 22 Silveira TL, Pang LY, di Domenico A, et al. COX-2 silencing in canine malignant melanoma inhibits malignant behaviour [J]. *Front Vet Sci*, 2021, 8: 633170.
- 23 Chen T, Huang Y, Hong JX, et al. Preparation, COX-2 inhibition and anticancer activity of sclerotiorin derivatives [J]. *Mar Drugs*, 2020, 19 (1): 12.
- 24 Kim SH, Roszik J, Cho SN, et al. The COX2 effector microsomal PGE2 synthase 1 is a regulator of immunosuppression in cutaneous melanoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25 (5): 1650-1663.

(责任编辑:孟晓彤)