



# microRNA-146a 通过靶向 *MAPK4* 和 *Myosin Va* 基因调控羊驼黑色素细胞增殖、迁移

刘学贤, 杜斌, 郭湘, 薛骥轩, 于雷涛, 范瑞文\*

(山西农业大学动物医学学院, 太谷 030801)

**摘要:** 旨在研究 microRNA-146a(miR-146a)对羊驼黑色素细胞增殖和迁移的调控及其分子机制。本研究使用双荧光素酶试验验证 *MAPK4* 和 *Myosin Va* 是 miR-146a 的靶基因;利用荧光定量 PCR 和蛋白质免疫印迹试验检测在羊驼黑色素细胞中过表达 miR-146a 对相关下游基因表达的影响;利用 CCK8 和 Transwell 检测 miR-146a 过表达对羊驼黑色素细胞增殖和迁移的影响。结果显示,与对照组相比,将 miR-146a 和 *MAPK4* 或 *Myosin Va* 共转染 293T 细胞,双荧光素酶活性分别极显著下降 36% 和 30% ( $P < 0.001$ );*MAPK4* 和 *Myosin Va* 基因转录水平分别极显著下调 67% 和 47% ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ );蛋白质水平的表达量分别显著或极显著下调 38% 和 69% ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );增殖和迁移相关的基因 *CREB*、*MITF*、*MLPH* 和 *Rab27a* 在转录水平和蛋白水平的表达均极显著下调 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ );CCK8 和 Transwell 结果显示,过表达 miR-146a 使羊驼黑色素细胞的增殖和迁移能力极显著下调 ( $P < 0.01$ )。综上所述,miR-146a 通过靶向调控 *MAPK4* 和 *Myosin Va*, 使增殖和迁移相关的基因 *MEK1*、*CREB*、*MITF*、*MLPH* 和 *Rab27a* 的表达下调,从而对羊驼黑色素细胞的增殖和迁移起抑制作用。

**关键词:** miR-146a; *MAPK4*; *Myosin Va*; 增殖; 迁移

中图分类号: S813.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2021)04-0967-09

## microRNA-146a Regulates the Proliferation and Migration of Alpaca Melanocytes by Targeting *MAPK4* and *Myosin Va* Genes

LIU Xuexian, DU Bin, GUO Xiang, XUE Jixuan, YU Leitao, FAN Ruiwen\*

(College of Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

**Abstract:** This study aimed to explore the regulatory role of miR-146a on the proliferation and migration of alpaca melanocytes and its molecular mechanism. The dual luciferase assay was used to verify that *MAPK4* and *Myosin Va* were the target genes of miR-146a by co-transfection with *MAPK4* or *Myosin Va* in 293T cells; Quantitative real-time PCR and Western blotting were used to detect the expression of downstream genes in alpaca melanocytes after overexpressing miR-146a; CCK8 and Transwell were used to detect the proliferation and migration of alpaca melanocytes after overexpressing miR-146a. The results showed that, compared to the negative control, dual luciferase activity extremely significantly decreased by 36% or 30% in 293T cells co-transfected with miR-146a and *MAPK4* or *Myosin Va*, respectively ( $P < 0.001$ ); In alpaca melanocytes, with the overexpression of miR-146a, the mRNA expression of *MAPK4* and *Myosin Va* were extremely significantly down-regulated by 67% and 47% ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ), and the

收稿日期: 2020-06-18

基金项目: 山西省研究生创新项目(2019BY064); 山西省“青年三晋学者”人才专项; 山西省回国留学人员科研资助(2017-072)

作者简介: 刘学贤(1992-), 男, 山西朔州人, 博士生, 主要从事羊驼纳米抗体研究与应用, E-mail: liuxuexian\_1992@163.com

\* 通信作者: 范瑞文, 主要从事羊驼毛色形成机理及羊驼纳米抗体研究与应用, E-mail: ruiwenfan@163.com

protein expression of MAPK4 and Myosin Va were significantly down-regulated by 38% and 69% ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), respectively; The expression of genes related to proliferation and migration (CREB, MITF, MLPH, Rab27a) were extremely significantly down-regulated at the transcriptional and translational levels ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ); CCK8 and Transwell results showed that overexpression of miR-146a extremely significantly down-regulated the proliferation and migration ability of alpaca melanocytes ( $P < 0.01$ ). In summary, miR-146a targeting MAPK4 and Myosin Va inhibited the proliferation and migration of alpaca melanocytes through downregulating the expression of MEK1, CREB, MITF, MLPH, Rab27a.

**Key words:** miR-146a; MAPK4; Myosin Va; proliferation; migration

\* **Corresponding author:** FAN Ruiwen, E-mail: ruiwenfan@163.com

microRNA (miRNAs) 是一种非编码小 RNA 分子,对动植物的发育生理等相关基因的表达有调节作用<sup>[1-2]</sup>。miRNAs 在哺乳动物如小鼠、山羊和绵羊以及羊驼皮肤中具有多种调控作用,可以通过调节色素颗粒的合成参与毛发颜色的调控<sup>[3-6]</sup>。先前的研究表明,miR-146a 靶向酪氨酸相关蛋白 1 (tyrosinase related protein 1, TYRP1) 抑制小鼠黑色素细胞黑色素的生成<sup>[7]</sup>。有研究表明,miR-146a 对小鼠自身免疫、骨髓增生和癌症具有显著的抑制作用<sup>[8]</sup>。此外,miR-146a 对胰腺癌细胞的生长和转移有不同的影响<sup>[9]</sup>。

羊驼是重要的毛用型经济动物,毛纤维具有 22 种天然色,是研究毛色形成分子机制的理想模型。在黑色素细胞中,miRNAs 的功能是多样性的,虽然已发现 miR-146a 可以抑制小鼠黑色素的生成,但是否对其他生物学功能起调控作用还未见报道。本研究通过生物信息学软件预测丝裂原活化蛋白激酶 4 (mitogen-activated protein kinase 4, MAPK4) 和肌浆球蛋白 Va (Myosin Va) 也是 miR-146a 的靶基因,其中,MAPK4 是丝裂原活化蛋白激酶激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 家族的典型成员 (也称 ERK4, p63 MAPK),参与了很多疾病包括肿瘤转移等的发生过程<sup>[10-11]</sup>。MAPK 信号通路涉及很多生物进程,也是影响细胞增殖的通路之一,同时也参与细胞的增殖、分化等生理过程<sup>[12]</sup>。当 MAPK 被激活后可相应地激活一些下游因子,如 cAMP 反应元件结合蛋白 (cAMP-responsive-element binding protein, CREB) 和丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen activated protein kinase kinase 1, MEK1),活化的 CREB 可调控小眼畸形转录因子 MITF (microphthalmia-associated transcription factor) 的转录<sup>[13]</sup>,当 MAPK 信号通路被激活后,

MEK1 可被磷酸化,磷酸化的 MEK1 可调控细胞的增殖和分化<sup>[14-15]</sup>。Myosin Va 属于 V 类肌凝蛋白,在细胞内囊泡沿肌动蛋白丝运输到膜对接点的过程中起重要作用<sup>[16]</sup>。在黑色素细胞的黑色素运输和神经内分泌细胞的颗粒分泌中,Myosin Va 已被证明是至关重要的<sup>[17-18]</sup>,是黑色素小体转运机制的重要组成部分<sup>[19]</sup>,且被认为是与突出结合蛋白黑色素亲和素 (melanophilin, MLPH) 和 ras 相关蛋白结合 27a (Ras-related protein binding 27a, Rab27a) 形成复合体的关键蛋白,在捕获和短距离传递黑色素体到黑色素细胞外周的过程中起重要作用<sup>[20-23]</sup>。因此,为了探求 miR-146a 在羊驼黑色素细胞中通过与其靶基因 MAPK4 和 Myosin Va 靶向结合后可能调控其下游基因并影响羊驼黑色素细胞的增殖和迁移的功能。本试验通过在羊驼黑色素细胞中脂质体转染 miR-146a,从而揭示 miR-146a 对羊驼黑色素细胞增殖和迁移的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

羊驼黑色素细胞和 293T 细胞由山西农业大学羊驼生物工程实验室提供。miR-146a mimic、inhibitor 和 NC (大小为 20 bp 的置位序列,与其他 miRNA 没有同源性)由广州锐博生物科技有限公司合成。Nhe I、Xba I、Xho I (TaKaRa 公司), pmir-GL0-luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega, 美国), Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega, 美国), 胶回收试剂盒 (康为世纪), 兔抗 MAPK4、Myosin Va、MEK1、p-MEK1、CREB、MITF、MLPH、Rab27a 多克隆抗体 (北京博奥森), 抗兔、抗鼠二抗 (武汉博士德), Trizol (Invitrogen, 美国), 氨苄霉素、转染试剂 (Invitrogen, 美

国), SYBR Prime Script TMRT PCR KIT(TaKaRa 公司), 蛋白 marker(Thermo, 美国), Cell Counting Kit-8(上海生工生物工程有限公司)。

## 1.2 试验方法

1.2.1 pmirGL0-MAPK4-3' UTR 和 pmirGL0-Myosin Va-3' UTR 双荧光报告载体的构建 从羊驼黑色素细胞中提取总 RNA, 以反转录 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 扩增纯化产物和 pmirGL0 载体分别用 *Nhe* I、*Xba* I 和 *Nhe* I、*Xho* I 于 37 °C 双酶切 3 h, 产物 4 °C 连接后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑取菌斑, 摇菌后提取质粒测序。

1.2.2 293T 和羊驼黑色素细胞的转染 将 293T 细胞和羊驼黑色素细胞从液氮中取出置于 37 °C 水浴复苏, 完全融化后放在低速离心机 4 °C 离心 10 min, 接种于 6 孔板(每孔  $1 \times 10^6$  个细胞), 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。细胞密度达到 75% 左右时, 用 miR-146a mimic、inhibitor 和 NC 转染细胞, 每组设置 3 个重复。

1.2.3 双荧光素酶活性试验检测 miR-146a 与

MAPK4、Myosin Va 的靶向关系 终止转染 72 h 的羊驼黑色素细胞用 PBS 洗涤 3 次, 按照先前检测双荧光素酶的步骤<sup>[6]</sup> 检测荧光素酶活性: 每孔加 100  $\mu$ L 的 PLB 置于混匀仪上 15 min, 在 96 孔加样孔中每孔加入 50  $\mu$ L 上述所得溶液, 加入 100  $\mu$ L LAR- II 试剂读取萤火虫荧光素酶反应强度值, 然后再加入 100  $\mu$ L Stop&Glo 试剂, 最后读取海肾萤火虫荧光素酶反应强度值。结果用萤火虫萤光素酶值/海肾萤光素酶值来表示。

1.2.4 qPCR 检测相关基因的表达 转染的细胞收样后, Trizol 法提取细胞总 RNA。测定浓度后使用 TaKaRa 反转录试剂盒进行反转录, 反应条件: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。通过 Premier Premier 5.0 软件设计相关基因的荧光定量引物, 送北京华大基因公司合成。引物序列见表 1。

按照 AceQ<sup>®</sup> qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒说明书进行荧光定量 PCR, 通过  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法计算目的基因的相对表达量变化。

表 1 引物序列及作用

Table 1 The sequences and application of primers

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence	应用 Application
MAPK4-mut-F	CTAGCTAGCGCAGACTGGTTTGGGTAAGTCATCTAAGGGAGCTGGT	PCR
MAPK4-mut-R	GCTCTAGAACCAGTCCCTTAGATGACTTACCCAAACCAGTCTGC	PCR
MAPK4-wt-F	GCTCTAGAACTGCATTGCCAGTGTCTAC	PCR
MAPK4-wt-R	CCGCTCGAGGTAGACACTGGCAATGCAGT	PCR
Myosin Va-mut-F	CTAGCTAGCCACAGCCCTCAGCTATCACATTGAGCCTGCTGTGCT	PCR
Myosin Va-mut-R	GCTCTAGAAGCACAGCAGGCTCAATGTGATAGCTGAGGGCTGTG	PCR
Myosin Va-wt-F	CCGCTCGAGGCTCTAGAAGAAATCAGAACCGATGGAA	PCR
Myosin Va-wt-R	TCTACAGGCTGCCGAAAA	PCR
MEK1-F	TCTTGCCCTCTTGGTGGT	Real-time PCR
MEK1-R	AGTCGGCTCCAAATTCCT	Real-time PCR
CREB-F	TCTACAGGCTGCCGAAAA	Real-time PCR
CREB-R	CTCAAAGTCAACCTTTGA	Real-time PCR
MITF-F	GTCTGACTCACAGGCACTC	Real-time PCR
MITF-R	GTCTGACTCACAGGCACTC	Real-time PCR
MLPH-F	ATACTTCTTCCCCGGCTTGT	Real-time PCR
MLPH-R	CTGTTGGGGTTCCCTCTCTGTGT	Real-time PCR
Rab27a-F	TCACGACAGTCGGCATTG	Real-time PCR
Rab27a-R	GCTCTGGCTTCTTCCTCT	Real-time PCR
18S-F	GAAGGGCACCACCAGGAGT	Real-time PCR
18S-R	CAGACAAATCACTCCACCAA	Real-time PCR

### 1.2.5 Western blotting 检测相关基因的蛋白表达

获取转染细胞的总蛋白,计算上样浓度,进行 SDS-PAGE 电泳。37 °C 孵育 1 h(所有一抗稀释比例均为 1:3 000)。回收一抗,室温孵育二抗(二抗稀释比例为 1:30 000)1 h。ECL 发光试剂盒显色后获得图像。

### 1.2.6 CCK8 检测羊驼黑色素细胞增殖能力

以每孔 2 000 个细胞接种在 96 孔细胞培养板上。待细胞贴壁后,每孔加入 10  $\mu$ L Cell Counting Kit-8 (CCK8)试剂后,分别于 0、12、24、36、48、60、72 h 在酶标仪 450 nm 处检测细胞增殖情况。

### 1.2.7 Transwell 检测羊驼黑色素细胞侵袭能力

每孔  $1 \times 10^5$  个细胞种植于 Transwell 24 孔板小室中,设立 3 个重复组,培养 24 h。取出小室,清除小室内侧的细胞后甲醇固定 30 min,结晶紫染色 30 min,自来水洗涤。显微镜观察迁移细胞数,随机挑选 5 个视野计数,计算细胞平均数。

## 1.3 统计学方法

实时荧光定量 PCR、Western blotting 等结果以“平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)”表示,用 Graph-Pad Prism 8.0 软件分析数据,采用 One-Way ANOVA 进行单因素方差分析,并采取 Duncan's 法进行多重比较。

## 2 结果

### 2.1 miR-146a 与 MAPK4、Myosin Va 靶关系的验证

利用 miRBase、Targetscan 软件进行生物信息学分析,发现 MAPK4 和 Myosin Va mRNA 存在 miR-146a 的潜在靶点(图 1A)。与野生型 3' UTR 相比,MAPK4-wt+miR-146a 组双荧光素酶活性极显著降低 36% ( $P < 0.001$ ),而 Myosin Va-wt+miR-146a 组极显著降低 30% ( $P < 0.001$ ),突变组的双荧光素酶活性无明显变化(图 1B、C)。

### 2.2 过表达 miR-146a 对 MAPK4、Myosin Va mRNA 和蛋白表达水平的影响

实时荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹法检测过表达 miR-146a 的羊驼黑色素细胞中 MAPK4、Myosin Va 基因 mRNA 和蛋白的表达水平。结果显示,转染 miR-146a mimic 后,羊驼黑色素细胞中 MAPK4、Myosin Va 基因在转录水平上的表达量比 NC 组分别极显著或显著下调 67% 和 47% ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ , 图 2A),蛋白质水平的表达量分别显著或极显著下调 38% 和 69% ( $P < 0.05$ ;  $P <$

0.01, 图 2B、2C)。

### 2.3 过表达 miR-146a 对相关基因 mRNA 和蛋白质表达水平的影响

实时荧光定量 PCR 和免疫印迹蛋白质检测结果显示,过表达 miR-146a 后,CREB、MITF、MLPH 和 Rab27a 较 NC 组 mRNA 和蛋白质水平表达量均显著降低(图 3A-C),其中 CREB 蛋白质水平降低最为显著,达 70% ( $P < 0.001$ ),抑制组则相反。在羊驼黑色素细胞中过表达 miR-146a 使 CREB、MITF、MLPH 和 Rab27a 基因在 mRNA 和蛋白质水平表达量均极显著降低 ( $P < 0.01$ )。

### 2.4 miR-146a 对羊驼黑色素细胞增殖能力的影响

miR-146a mimic 转染黑色素细胞后,CCK8 试验用分光光度计(450 nm)分别在 0、12、24、36、48、60、72 h 检测细胞增殖,结果显示,miR-146a 转染组的 OD 值在 72 h 前明显低于 NC 组和 Inhibitor 组(图 4)。

### 2.5 miR-146a 对羊驼黑色素细胞迁移能力的影响

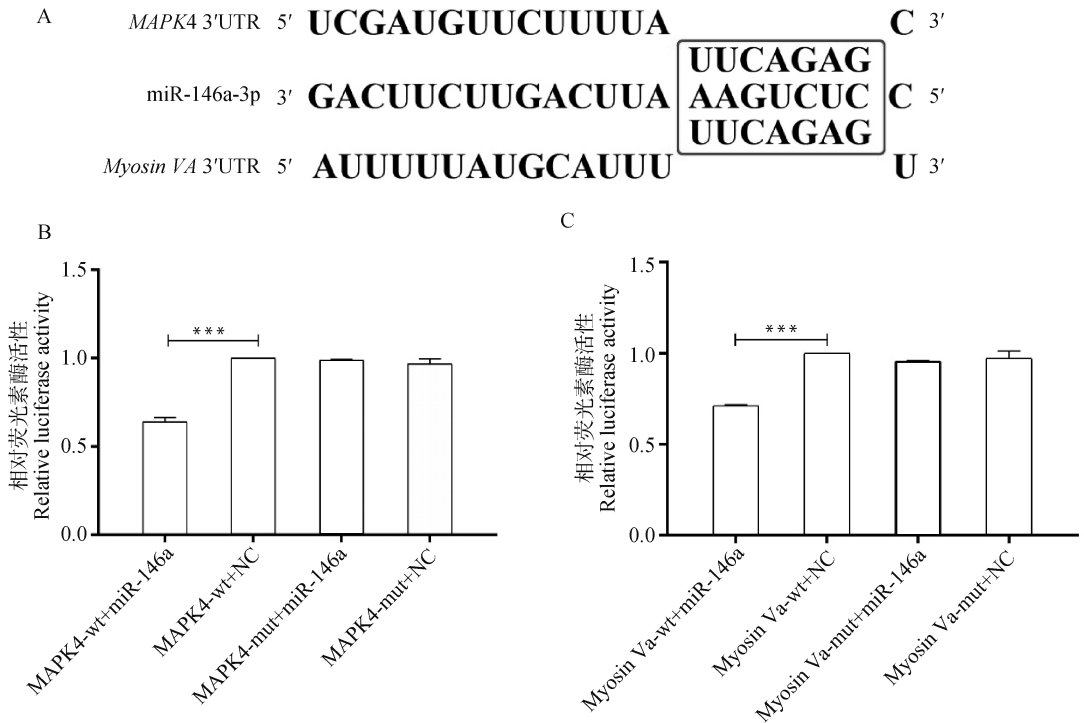
通过 Transwell 小室培养法检测羊驼黑色素细胞迁移能力,结果显示,miR-146a mimic 转染黑色素细胞后,穿膜细胞数以及迁移能力极显著低于对照组 ( $P < 0.01$ );而 miR-146a Inhibitor 转染黑色素细胞后,穿膜细胞数以及迁移能力极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ , 图 5)。

## 3 讨论

miRNA 是重要的细胞调节因子,在细胞分化、增殖和重编程过程中都发挥至关重要的作用<sup>[24]</sup>。在黑色素细胞中,越来越多的 miRNAs 参与多个分子通路以调控黑色素细胞的生物学过程<sup>[25-26]</sup>。miR-146a 通过抑制酪氨酸酶家族基因的表达而对小鼠黑色素细胞中黑色素的生成起调控作用<sup>[7]</sup>。在进一步挖掘 miR-146a 的功能时发现,MAPK4 和 Myosin Va 是其靶基因,且有关报道显示,miR-146a 对癌细胞的增殖有影响<sup>[8-9]</sup>,因此,miR-146a 可能参与羊驼黑色素细胞的增殖等生物学过程。

本研究通过双荧光素报告基因发现,miR-146a 以序列特异性的方式与 MAPK4 和 Myosin Va 的 3' UTR 结合,在羊驼黑色素细胞中过表达 miR-146a 使 MAPK4、Myosin Va 基因在 mRNA 和蛋白质水平的表达量下调,结果验证了羊驼 MAPK4 和 Myosin Va 是 miR-146a 的靶基因。

MAPK4 是 MAPK 家族的一种丝裂原激活的

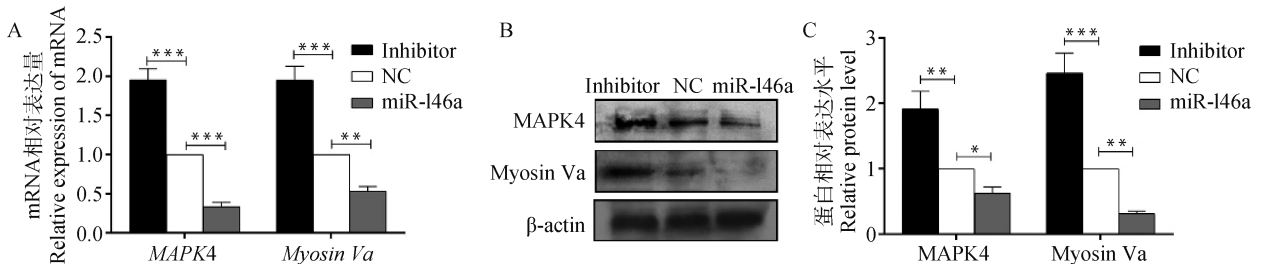


A. miR-146a 与 MAPK4、Myosin Va 的 3'UTR 结合位点(方框标注);B、C. 与 NC 相比,与 miR-146a + MAPK4 3'UTR (wt)和 miR-146a + Myosin Va -3'UTR (wt)或 MAPK4 -3'UTR (mut)、Myosin Va -3'UTR (mut)共转染 36 h 的 293T 细胞的荧光素酶活性。\* .  $P < 0.05$ ; \* \* .  $P < 0.01$ ; \* \* \* .  $P < 0.001$ ,下同

A. The 3'UTR binding sites of miR-146a with MAPK4 and Myosin Va (marked with box); B. C. The luciferase activity in 293T cells co-transfected with miR-146a + MAPK4 3'UTR (wt) and miR-146a + Myosin Va -3'UTR (wt) or MAPK4 -3'UTR (mut), Myosin Va -3'UTR (mut) for 36 h, compared to NC. \* .  $P < 0.05$ ; \* \* .  $P < 0.01$ ; \* \* \* .  $P < 0.001$ , the same as below

### 图 1 MAPK4、Myosin Va 与 miR-146a 靶标关系的验证

Fig. 1 The verification of target relationship of miR-146a with MAPK4 and Myosin Va



A. inhibitor、NC 和 miR-146a 质粒转染羊驼黑色素细胞后 MAPK4 和 Myosin Va mRNA 表达水平;B. 蛋白印迹检测 MAPK4、Myosin Va 的蛋白表达水平;C. 灰度值分析 inhibitor 组、NC 组和 miR-146a 组中 MAPK4 和 Myosin Va 相对蛋白水平

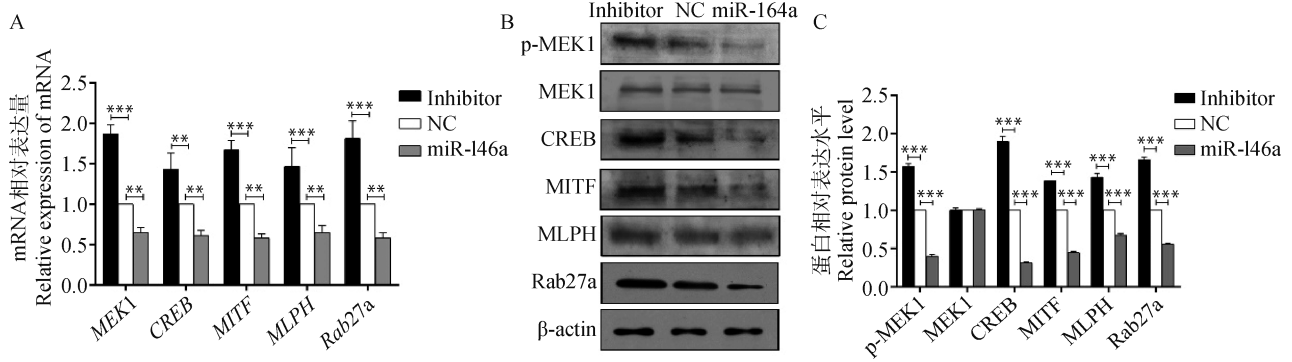
A. The mRNA expression levels of MAPK4 and Myosin Va in melanocytes transfected with inhibitor, NC and miR-146a plasmids; B. Western blotting detection of protein expression levels of MAPK4 and Myosin Va; C. The relative protein levels of MAPK4 and Myosin Va in inhibitor, NC and miR-146a groups by gray analysis

### 图 2 过表达 miR-146a 对 MAPK4 和 Myosin Va mRNA 和蛋白表达的影响

Fig. 2 The effect of overexpressing miR-146a on the mRNA and protein of MAPK4 and Myosin Va

蛋白激酶, MAPK 信号通路参与多种生化级联反应<sup>[12]</sup>,将信号由胞内传递到核内开始启动级联反应,从而激活相关转录因子,进一步调控下游

MEK1、CREB、MITF 等级联反应通路上重要基因的表达<sup>[27]</sup>。本研究发现,miR-146a 过表达使 p-MEK1 下调,而 MEK1 未发生变化,由此可见,



A. 在 inhibitor、NC 和 miR-146a 质粒转染的黑素细胞中 *MEK1*、*CREB*、*MITF*、*MLPH*、*Rab27a* 的 mRNA 表达水平；B. 蛋白印迹检测 p-MEK1、MEK1、CREB、MITF、MLPH 和 Rab27a 的蛋白表达水平；C. 灰度分析 inhibitor 组、NC 组和 miR-146a 组中 p-MEK1、MEK1、CREB、MITF、MLPH 和 Rab27a 的相对蛋白水平。mRNA 和蛋白表达分别以 18S rRNA 和  $\beta$ -actin 为内参

A. The mRNA expression levels of *MEK1*, *CREB*, *MITF*, *MLPH* and *Rab27a* in melanocytes transfected by inhibitor, NC and miR-146a plasmids; B. Western blotting detection of protein expression levels of p-MEK1, MEK1, CREB, MITF, MLPH and Rab27a; C. The relative protein levels of p-MEK1, MEK1, CREB, MITF, MLPH and Rab27a in inhibitor, NC and miR-146a groups by gray analysis. The abundance of mRNAs was normalized to 18S rRNA, the level of protein expression was normalized to  $\beta$ -actin

图 3 过表达 miR-146a 对 *MEK1*、*CREB*、*MITF*、*MLPH* 和 *Rab27a* mRNA 和蛋白表达的影响

Fig. 3 The effect of overexpressing miR-146a on mRNA and protein levels of *MEK1*, *CREB*, *MITF*, *MLPH* and *Rab27a* in melanocytes

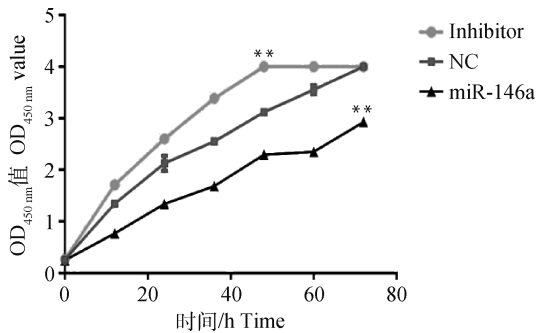


图 4 miR-146a 对羊驼黑色素细胞增殖的影响

Fig. 4 Effect of miR-146a on the proliferation of alpaca melanocytes

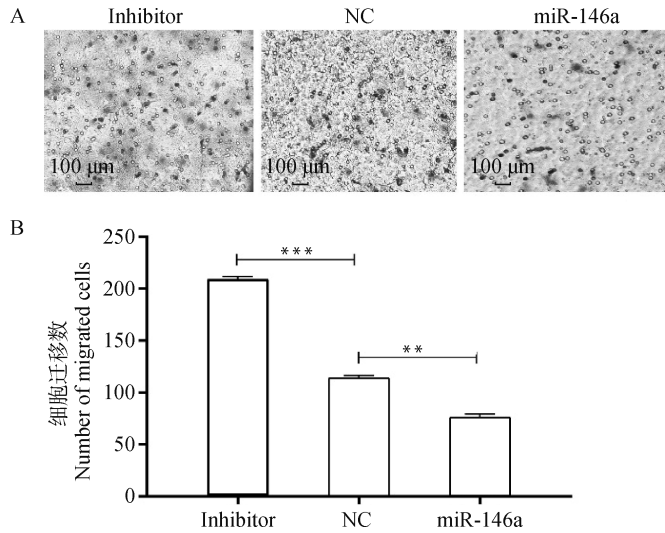
MAPK4 通过催化 MEK1 磷酸化而发生了级联反应,通过 MITF 调节参与黑色素合成基因的表达<sup>[28]</sup>,而 MITF 在黑色素细胞和黑素瘤细胞中的发育、维持、存活、色素沉积、细胞浸润、细胞周期以及细胞增殖中起着不可或缺的作用<sup>[29]</sup>。MITF 是很多级联反应通路重要的枢纽<sup>[30-31]</sup>,其转录、翻译以及翻译后修饰等不同水平的表达和功能调控与 MEK 路径密切相关,抑制 MEK 可以降低 MITF 的转录<sup>[32]</sup>。MEK 路径激活后可调节人黑色素细胞 CREB<sup>[33]</sup>,本研究也发现,miR-146a 过表达可下调 CREB 的表达,CREB 是 MEK 路径下游的主要调控因子,可以诱导 MITF 的表达<sup>[34]</sup>。由此可见,

miR-146a 靶向调控 MAPK4 后通过磷酸化 MEK1 而调节 CREB,从而抑制 MITF 的表达。

在黑色素细胞中产生的黑色素颗粒需运输到树突尖部,Myosin Va、Rab27a 和 MLPH 三者形成的三元复合物在此过程起协同作用<sup>[35]</sup>。Rab27a 是膜转运的重要调控因子<sup>[36]</sup>,Myosin Va 需要同时与黑色素体上含有 Rab27a 和 MLPH 复合物的多个组分相互作用<sup>[37]</sup>。然而,还有研究表明,Myosin Va 促进黑色素瘤黏附、锚定、迁移和体外侵袭,其上调可能是促进肿瘤恶性发展的机制<sup>[38]</sup>。结合本试验对迁移试验的结果分析,在羊驼黑色素细胞中 miR-146a 靶向抑制 Myosin Va 的同时,其复合物的其他两个成员 Rab27a 和 MLPH 的表达也受到抑制,说明 miR-146a 在调控黑色素细胞迁移时,Myosin Va 可能仍以复合物的形式发挥其功能。综上所述,miR-146a 对羊驼黑色素细胞增殖和迁移的调控可得出,miR-146a 抑制其靶基因 MAPK4 和 Myosin Va 的表达,从而影响 MAPK 级联路径中重要因子和 Myosin Va/Rab27a/MLPH 复合物,进而调控羊驼黑色素细胞的增殖和迁移能力。

## 4 结论

本研究结果表明,miR-146a 通过靶向调控 MAPK4 和 Myosin Va,使增殖和迁移相关基因



A. 不同转染组的穿膜细胞; B. 不同转染组迁移细胞的数量

A. The cells transmitted through membrane of transwell; B. The number of migrating cells

图 5 miR-146a 对羊驼黑色素细胞迁移的影响

Fig. 5 Effect of miR-146a on migration of alpaca melanocytes

MEK1、CREB、MITF、MLPH、Rab27a 的表达下调, 从而对羊驼黑色素细胞的增殖和迁移起抑制作用。

#### 参考文献 (References):

- [1] BARTEL D P. Metazoan MicroRNAs[J]. *Cell*, 2018, 173(1):20-51.
- [2] 包黎娟, 刘育含, 马毅, 等. miR-92a 对奶山羊乳腺上皮细胞增殖及凋亡的调控分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(1):137-149.
- BAO L J, LIU Y H, MA Y, et al. The Regulatory of MiR-92a on proliferation and apoptosis of dairy goat mammary epithelial cells [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2020, 51(1): 137-149. (in Chinese)
- [3] 张利环, 马悦悦, 刘文艳, 等. microRNA-96-5p 靶向调控羊驼黑色素细胞中 MITF 基因的表达[J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(6): 1229-1237.
- ZHANG L H, MA Y Y, LIU W Y, et al. microRNA-96-5p targets MITF gene in alpaca melanocytes[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2020, 51(6): 1229-1237. (in Chinese)
- [4] WANG J, QU J W, LI Y J, et al. miR-149-5p regulates goat hair follicle stem cell proliferation and apoptosis by targeting the CMTM3/AR axis during superior-quality brush hair formation [J]. *Front Genet*, 2020, 11:529757.
- [5] YANG S S, FAN R W, SHI Z Q, et al. Identification

of a novel microRNA important for melanogenesis in alpaca (*Vicugna pacos*) [J]. *J Anim Sci*, 2015, 93(4): 1622-1631.

- [6] CORDERO R J B, CASADEVALL A. Melanin [J]. *Curr Biol*, 2020, 30(4):R142-R143.
- [7] 杜斌, 许冬梅, 张亚玲, 等. miR-146a 抑制酪氨酸酶基因家族在小鼠黑色素细胞中表达[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2017, 33(1):81-87.
- DU B, XU D M, ZHANG Y L, et al. miR-146a inhibits the expression of tyrosinase gene family in mouse melanocytes cells [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 33(1): 81-87. (in Chinese)
- [8] ZHANG Y P, DING S, YANG J, et al. Identification of miR-146a is associated with the aggressiveness and suppresses proliferation via targeting CDKN2A in breast cancer [J]. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26(1): 245-251.
- [9] LI Y W, VANDENBOOM II T G, WANG Z W, et al. miR-146a suppresses invasion of pancreatic cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(4):1486-1495.
- [10] BERRIRI S, GARCIA A V, FREIDITFREY N, et al. Constitutively active mitogen-activated protein kinase versions reveal functions of *Arabidopsis* MPK4 in pathogen defense signaling [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(10):4281-4293.
- [11] EL-AARAG S A, MAHMOUD A, HASHEM M H, et al. In silico identification of potential key regulatory

- factors in smoking-induced lung cancer[J]. *BMC Med Genomics*, 2017, 10(1):40.
- [12] REZATABAR S, KARIMIAN A, RAMESHKANIA V, et al. RAS/MAPK signaling functions in oxidative stress, DNA damage response and cancer progression [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(9):14951-14965.
- [13] CHEN T Z, ZHAO B L, LIU Y, et al. MITF-M regulates melanogenesis in mouse melanocytes [J]. *J Dermatol Sci*, 2018, 90(3): 253-262.
- [14] ROSKOSKI JR R. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation [J]. *Pharmacol Res*, 2012, 66(2):105-143.
- [15] GUSTEMS M, WOELLMER A, ROTHBAUER U, et al. c-Jun/c-Fos heterodimers regulate cellular genes via a newly identified class of methylated DNA sequence motifs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(5): 3059-3072.
- [16] LANGFORD G M. Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport [J]. *Traffic*, 2002, 3(12):859-865.
- [17] WU X F, BOWERS B, RAO K, et al. Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function *In vivo* [J]. *Cell Biol*, 1998, 143(7):1899-1918.
- [18] RUDOLF R, KÖGEL T, KUZNETSOV S A, et al. Myosin Va facilitates the distribution of secretory granules in the F-actin rich cortex of PC12 cells [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(7):1339-1348.
- [19] FUKUDA M, KURODA T S, MIKOSHIBA K. Slac2-a/melanophilin, the missing link between Rab27 and myosin Va; implications of a tripartite protein complex for melanosome transport [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(14):12432-12436.
- [20] MATESIC L E, YIP R, REUSS A E, et al. Mutations in *Mlph*, encoding a member of the Rab effector family, cause the melanosome transport defects observed in *leaden* mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(18):10238-10243.
- [21] KURODA T S, ARIGA H, FUKUDA M. The actin-binding domain of Slac2-a/melanophilin is required for melanosome distribution in melanocytes [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(15):5245-5255.
- [22] NAGASHIMA K, TORII S, YI Z H, et al. Melanophilin directly links Rab27a and myosin Va through its distinct coiled-coil regions [J]. *FEBS Lett*, 2002, 517(1-3):233-238.
- [23] DA SILVA BIZARIO J C, DA CUNHA NASCIMENTO A A, CASALETTO L, et al. Expression of constructs of the neuronal isoform of myosin-Va interferes with the distribution of melanosomes and other vesicles in melanoma cells [J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2002, 51(2):57-75.
- [24] CORDES K R, SHEEHY N T, WHITE M P, et al. mir-145 and mir-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity [J]. *Nature*, 2009, 460(7256):705-710.
- [25] KUNZ M. MicroRNAs in melanoma biology [M]//SCHMITZ U, WOLKENHAUER O, VERA J. MicroRNA Cancer Regulation. Advances in Experimental Medicine and Biology. Dordrecht: Springer, 2013, 774:103-120.
- [26] MIONE M, BOSSERHOFF A. MicroRNAs in melanocyte and melanoma biology [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2015, 28(3): 340-354.
- [27] WANG W, GAO Y, ZHENG W W, et al. Phenobarbital inhibits osteoclast differentiation and function through NF- $\kappa$ B and MAPKs signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 69: 118-125.
- [28] WELLBROCK C, AROZARENA I. Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2015, 28(4):390-406.
- [29] KAWAKAMI A, FISHER D E. The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology [J]. *Lab Invest*, 2017, 97(6):649-656.
- [30] STEINGRÍMSSON E, COPELAND N G, JENKINS N A. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network [J]. *Annu Rev Genet*, 2004, 38(1):365-411.
- [31] LIM J, NAM S, JEONG J H, et al. Kazinol U inhibits melanogenesis through the inhibition of tyrosinase-related proteins *via* AMP kinase activation [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(5):737-750.
- [32] WU M, HEMESATH T J, TAKEMOTO C M, et al. c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(3):301-312.
- [33] LIU Y L, LAI F, WILMOTT J S, et al. Noxa upregulation by oncogenic activation of MEK/ERK through CREB promotes autophagy in human melanoma cells [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(22):11237-11251.
- [34] HUBER W E, PRICE E R, WIDLUND H R, et al. A



- tissue-restricted cAMP transcriptional response; SOX10 modulates  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone-triggered expression of microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(46):45224-45230.
- [35] CHANG H, CHOI H, JOO K M, et al. Manassantin B inhibits melanosome transport in melanocytes by disrupting the melanophilin-myosin Va interaction [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2012, 25(6): 765-772.
- [36] ZERIAL M, MCBRIDE H. Rab proteins as membrane organizers[J]. *Nat Rev Mol cell Biol*, 2001, 2(2): 107-117.
- [37] HUME A N, COLLINSON L M, HOPKINS C R, et al. The *leaden* gene product is required with Rab27a to recruit myosin Va to melanosomes in melanocytes [J]. *Traffic*, 2002, 3(3):193-202.
- [38] ALVES C P, MORAES M H, SOUSA J F, et al. Myosin-Va contributes to manifestation of malignant-related properties in melanoma cells [J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(12):2809-2812.

(编辑 郭云雁)