

引文格式:凌峰,张勇,辛向阳. 纺锤体动粒相关复合体-1(SKA1)促进葡萄膜黑色素瘤细胞增殖的分子机制研究[J].

眼科新进展,2021,41(8):727-731. doi:10.13389/j.cnki.rao.2021.0151

【实验研究】

纺锤体动粒相关复合体-1(SKA1)促进葡萄膜黑色素瘤细胞增殖的分子机制研究[△]

凌峰 张勇 辛向阳

作者简介:凌峰(ORCID:0000-0001-5705-3734),男,1993年11月出生,内蒙古通辽人,硕士,内蒙古自治区第10批次草原英才团队成员。主要研究方向:白内障、眼底病。E-mail:1092293505@qq.com

通信作者:辛向阳(ORCID:0000-0002-0619-5318),男,1972年8月出生,内蒙古包头人,博士,主任医师,教授,内蒙古自治区第10批次草原英才团队负责人,内蒙古医学会眼科学分会副主任委员,内蒙古自治区“西部之光”访问学者。主要研究方向:眼底病。E-mail:xinxiangyang_2006@163.com

收稿日期:2021-03-21

修回日期:2021-05-30

本文编辑:盛丽娜

△基金项目:内蒙古自治区自然科学基金资助(编号:2020MS08094)

作者单位:014010 内蒙古自治区包头市,内蒙古医科大学第三附属医院(内蒙古包钢医院)眼科(凌峰,辛向阳);010000 内蒙古自治区呼和浩特市,内蒙古自治区人民医院肿瘤科(张勇)

【摘要】 目的 研究纺锤体动粒相关复合体-1(SKA1)促进葡萄膜黑色素瘤(UM)细胞增殖的分子机制。方法 利用SKA1敲减及空载体慢病毒感染MUM-2B细胞分别作为SKA1敲减组和对照组,再以MTT法、流式细胞术及Caspase-3/7法检测各组细胞增殖、凋亡表型的变化;利用基因表达谱芯片筛选差异基因,KEGG富集分析探寻SKA1促进UM发生发展的潜在信号通路,再以Western blot检测信号通路中关键蛋白的表达变化;利用TCGA数据库UM样本RNA测序及随访数据,分析SKA1表达与预后的关系。结果 与对照组相比,SKA1敲减组细胞培养3 d、4 d、5 d的光密度均显著降低(均为 $P < 0.01$),而凋亡细胞比例及Caspase-3/7活性均显著增加(均为 $P < 0.01$)。KEGG富集分析显示,差异基因富集于P53信号通路。Western blot检测结果证实,SKA1敲减后,P53通路中胰岛素样生长因子结合蛋白-3(IGFBP3)的表达显著下降($P < 0.05$)。SKA1高表达患者总生存率下降($P = 0.021$, HR = 2.55, 95% CI: 0.92 ~ 7.05)。结论 SKA1通过P53/IGFBP3信号通路促进UM细胞增殖,而且SKA1高表达是影响UM患者预后的危险因素。

【关键词】 纺锤体动粒相关复合体-1;葡萄膜黑色素瘤;胰岛素样生长因子结合蛋白-3;细胞增殖;细胞凋亡

【中图分类号】 R773

葡萄膜黑色素瘤(UM)是成人最常见的原发性眼内恶性肿瘤,恶性程度高、易转移、预后差^[1-2]。UM患者尽管以手术为主的综合治疗局部控制良好,但复发、转移仍是术后面临的主要问题^[3],目前转移后治疗尚无一致意见,且效果差。针对癌基因设计靶向药物是治疗肿瘤的重要途径之一,因此,深入研究UM发生发展的分子机制、寻找新型肿瘤转移标志物及治疗靶点具有重要的科学意义和临床价值。

纺锤体动粒相关复合体-1(SKA1)是纺锤体和动粒相关复合物(SKA)的重要组成部分(或称亚基),参与有丝分裂的调控。破坏SKA1的灵活性,或其微管蛋白结合位点,都能扰乱有丝分裂的正常进程,使有丝分裂阻滞于分裂中期,无法进入后期^[4-5]。有文献报道,SKA1在胃癌、肝细胞癌、非小细胞肺癌等恶性肿瘤发生发展过程中发挥重要作用^[6-7],然而,SKA1在UM组织及细胞中的表达、作用及分子机制目前尚不清楚。本研究首次探讨了SKA1在UM发生发展过程中的作用,并通过基因表达谱芯片联合生物信息学分析探寻SKA1的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株和细胞培养 A-375、MUM-2B和MUM-2C细胞株由天津医科大学眼科医院孙丰源教授惠赠。

细胞培养使用含体积分数10%胎牛血清(FBS)的高糖DMEM培养液(美国Gibco公司),并加入 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 青链霉素预防细菌污染,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、含体积分数5% CO_2 培养箱中,间隔2~3 d更换培养基。

1.2 筛选SKA1敲减的稳转细胞株 重悬A-375、MUM-2B和MUM-2C细胞,细胞浓度均调整为 $4 \times 10^4 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$,各吸取2 mL细胞悬液,接种于6孔板,继续培养,细胞汇合度达30%~40%时,吸去培养液,以2 mL含体积分数10% FBS的培养液稀释慢病毒(购自上海吉凯),包括靶向SKA1敲减慢病毒[shSKA1;敲减靶点序列分别为5'-GGAGATGAGAT-CATTGTAA-3'(shSKA1-1)、5'-GGATACCAAAGGTCGT-TATTT-3'(shSKA1-2)、5'-CAATGCTGCAGACCCTA-ATAA-3'(shSKA1-3)]以及空载体慢病毒(shCtrl),加入助转剂聚凝胺(Polybrene, $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),混匀后加入相应孔中。感染慢病毒48~72 h后,换含嘌呤霉素($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)的培养基进行抗性筛选,计算细胞存活率即阳性感染率,最终筛选出SKA1敲减的稳转细胞株作为SKA1敲减组用于后续实验。

1.3 实时荧光定量PCR、Western blot检测 使用Trizol试剂分别提取A-375、MUM-2B和MUM-2C细胞总RNA,依据说明书逆转录成cDNA,实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测,反应体系:SYBR premix

Taq 6.0 μL 、上下游引物各 0.5 μL 、cDNA 模板 1.0 μL 、RNase-Free H_2O 4.0 μL ，以 GAPDH 作为内参，SKA1 相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 或 ΔCt 计算获得。

RIPA 细胞裂解液提取 SKA1 敲减组、对照组 (转染 shCtrl) 的 MUM-2B 细胞总蛋白，以 BCA 试剂盒测定蛋白浓度，取 30 μg 总蛋白上样于 SDS-PAGE 凝胶，电泳后电转至 PVDF 膜，分别与 SKA1 抗体 (1:1000, 北京博奥森) 和 GAPDH (1:500, Santa Cruz Biotechnology 公司, 美国) 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜，漂洗后与 HRP 标记的二抗 (1:2000, Santa Cruz Biotechnology 公司, 美国) 室温孵育 2 h，化学发光试剂显影，然后采用 Quantity one 扫描软件分析。

1.4 MTT 检测细胞增殖 取对数生长期的 SKA1 敲减组和对照组 MUM-2B 细胞，于 96 孔板中按每孔 3000 个细胞铺板，在培养后不同时间点 (1 d、2 d、3 d、4 d、5 d) 加入 20 μL 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT 试剂于孔中，反应 4 h，持续振荡 6 min，酶标仪检测 490 nm/570 nm 处光密度。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡 慢病毒转染 MUM-2B 细胞 48 h 后，用 2.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶消化离心 SKA1 敲减组和对照组 MUM-2B 细胞，制成单细胞悬液，细胞浓度为 2×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。800 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min，弃上清，加 5 mL PBS 重悬细胞，重复 2 次后离心，弃上清，最后重悬细胞于 0.5 mL PBS 中。用低速振荡器边振荡边加入 5 mL 预冷的含体积分数 70% 乙醇，4 $^\circ\text{C}$ 过夜。第二日将固定好的细胞以 1000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min，弃上清，PBS 清洗后重悬细胞。加入 5 μL (10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 RNaseA，37 $^\circ\text{C}$ 消化 1 h，加入终浓度 50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 碘化丙啶，4 $^\circ\text{C}$ 避光染色过夜，使用流式细胞仪分析软件 Guava InCyte 分析。

1.6 Caspase-3/7 法检测细胞凋亡 SKA1 敲减组、对照组细胞计数后，按每孔 1×10^4 个细胞加入 96 孔板，细胞继续培养 2 d，每孔中加入 Caspase-Glo 反应液 100 μL ，500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min，再室温孵育 1 h，酶标仪检测仪器测定信号强度。

1.7 基因表达谱芯片分析 提取 SKA1 敲减组和对照组 MUM-2B 细胞的 RNA，反转录成 cDNA，进行表达谱芯片检测。再采用 R limma 包筛选差异表达基因，并对差异基因进行 GO (Gene Ontology) 和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 富集分析，初步探索 SKA1 促进 UM 细胞增殖的分子机制。

1.8 SKA1 生存分析 从 TCGA GDC 网站 (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) 分别下载 UM 转录组、临床数据文件，利用定制化 perl 脚本将下载的 UM 样本文件整理成基因转录组矩阵文件、临床文件；再将转录组、临床文件合并，采用 R “survminer” 和 “survival” 包，绘制 Kaplan-Meier 生存曲线图。依据 SKA1 表达中位值将 UM 样本分为 SKA1 高、低表达组，利用基因集富集分析 (Gene set enrichment analysis) 软件，解析与 SKA1 表达水平与各信号通路状态

(激活、抑制或无变化) 的关系。

1.9 统计学方法 使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用 t 检验，计数资料采用 χ^2 检验。检验水准： $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 SKA1 敲减序列的筛选 以 qRT-PCR 检测 SKA1 在不同黑色素瘤细胞株中的表达，相对表达量以 $-\Delta Ct$ 表示，结果显示，SKA1 在 A-375、MUM-2B 和 MUM-2C 细胞株的表达丰度均高 (图 1A)，但在细胞培养过程中，A-375、MUM-2C 生长状态差，经检验为支原体污染，遂采用 MUM-2B 细胞用于后续实验。qRT-PCR 检测 MUM-2B 各处理组 SKA1 表达，结果显示，与 shCtrl 组相比，SKA1 敲减组表达显著降低 ($P < 0.01$)，shSKA1-1、shSKA1-2、shSKA1-3 各敲减组的敲减效率分别为 78.86%、62.71%、57.83%。因此，shSKA1-1 用于后续细胞表型功能实验 (图 1B)。

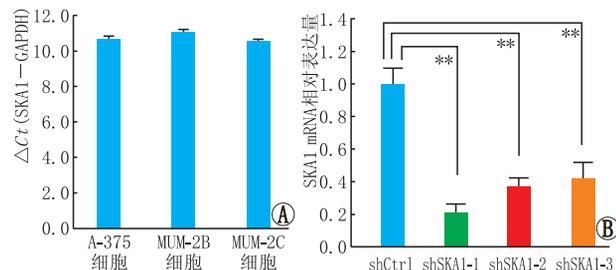


图 1 SKA1 在三种细胞株的表达丰度及靶向 SKA1 敲减序列的筛选 A:SKA1 在三种细胞株中的表达丰度;B:SKA1 不同敲减靶点的敲减率 (** $P < 0.01$)。

2.2 SKA1 对 MUM-2B 细胞增殖的影响 MTT 检测结果显示，对照组 MUM-2B 细胞培养 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d 时光密度分别为 0.20 ± 0.00 、 0.36 ± 0.01 、 0.61 ± 0.02 、 0.98 ± 0.02 、 1.25 ± 0.03 ；SKA1 敲减组 MUM-2B 细胞培养 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d 时光密度分别为 0.15 ± 0.00 、 0.20 ± 0.04 、 0.25 ± 0.02 、 0.37 ± 0.01 、 0.41 ± 0.05 ；与对照组相比，SKA1 敲减组 MUM-2B 细胞培养 3 d、4 d、5 d 的光密度均显著降低 (均为 $P < 0.01$)，说明 SKA1 敲减后 MUM-2B 细胞增殖活性被显著抑制 (图 2)。

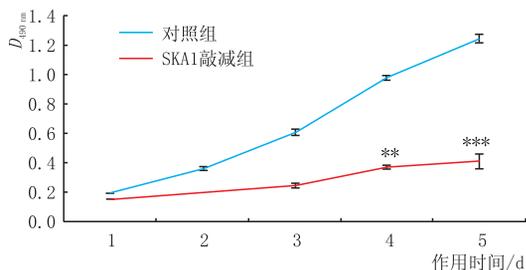


图 2 对照组、SKA1 敲减组 MUM-2B 细胞 MTT 生长曲线 注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

2.3 SKA1 对 MUM-2B 细胞凋亡的影响 流式细胞仪检测结果显示,对照组细胞凋亡率为 $5.30\% \pm 0.45\%$, SKA1 敲减组细胞凋亡率为 $12.63\% \pm 0.04\%$, SKA1 敲减组细胞凋亡率显著高于对照组 ($P < 0.01$)。采用 Caspase-3/7 法检测 Caspase-3/7 活性,结果显示,与对照组相比,SKA1 敲减组细胞 Caspase-3/7 活性显著增强 ($P < 0.001$),与流式细胞仪检测的细胞凋亡情况一致(图 3)。

2.4 SKA1 促进 UM 细胞增殖的分子机制 分别提取对照组和 SKA1 敲减组 MUM-2B 细胞的 RNA,反转录成 cDNA,进行基因表达谱芯片检测(图 4)。采用 R“limma”包筛选差异表达基因,共筛选出差异表达基因 362 个,其中高表达 176 个,低表达 186 个,高、低表达组分别选取差异最显著的前 15 个基因,以热图展示(图 4A);并对所有基因及后续富集通路中的基因以火山图展示(图 4B)。经 GO 和 KEGG 通路富集分析显示,362 个差异基因显著富集于 P53

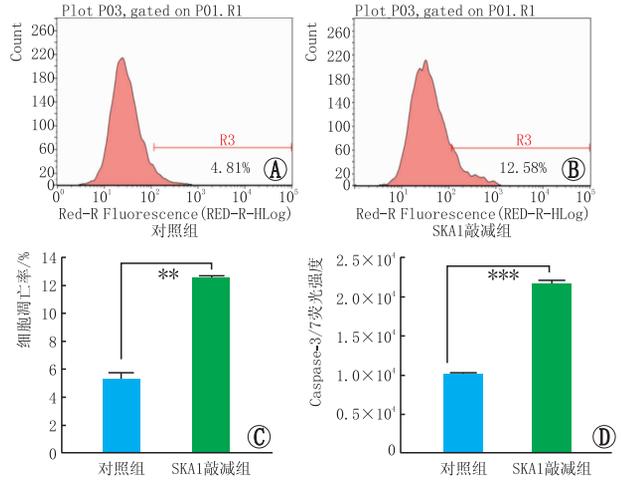


图 3 对照组、SKA1 敲减组 MUM-2B 细胞凋亡比例图 A:对照组细胞流式凋亡图;B:SKA1 敲减组细胞流式凋亡图;C:两组细胞凋亡统计图;D:两组细胞 Caspase-3/7 荧光强度统计图。注: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

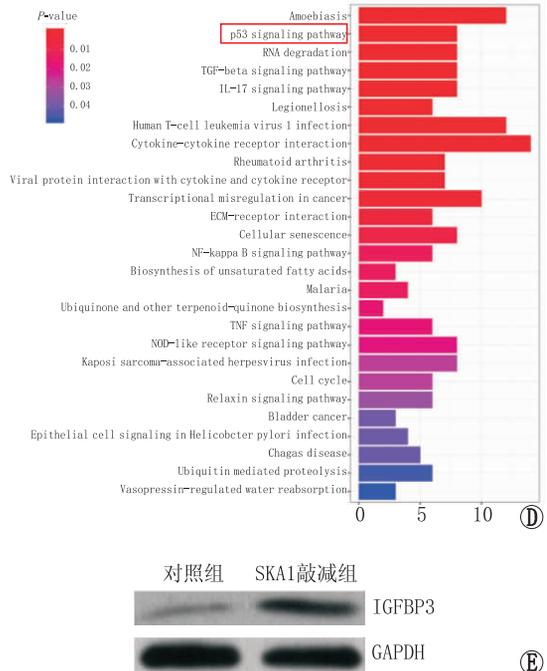
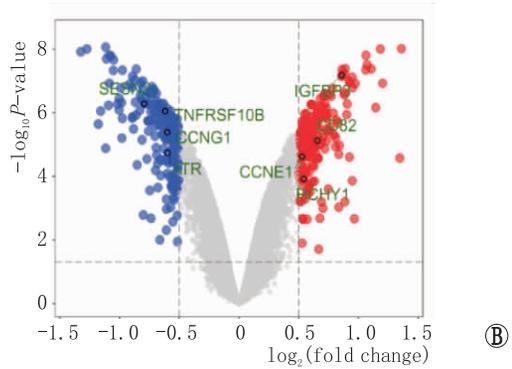
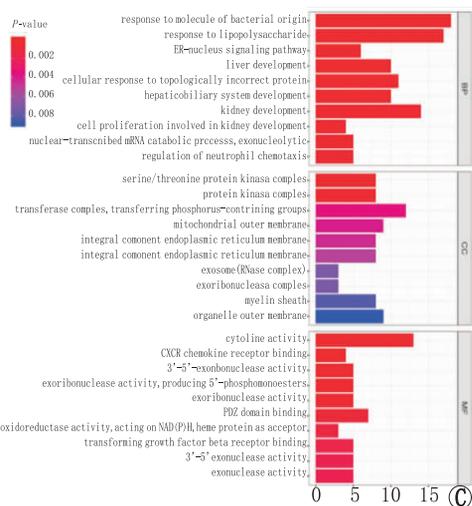
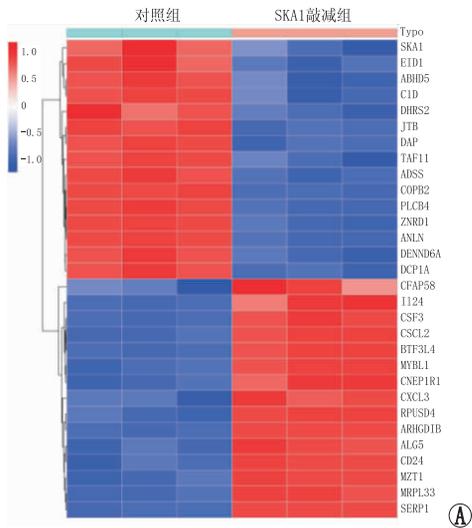


图 4 SKA1 敲减组、对照组全基因表达谱测序热图、火山图、富集分析柱状图以及相应细胞 Western blot 图 A:高、低表达组中差异最显著的前 15 个基因的热图; B:全部基因包含 P53 信号通路 8 个差异基因的火山图; C:差异基因 GO 柱状图; D:差异基因 KEGG 富集分析柱状图;E:各组 IGF1R-3 表达 Western blot 图。

信号通路(图4C、图4D),富集在此通路的基因包括胰岛素样生长因子结合蛋白-3(IGFBP3)、SESN2、TNFRSF10B、CCNG1、CD82、ATR、CCNE、RCHY1。为验证生物信息学的分析结果,分别提取 SKA1 敲减组及对照组细胞总蛋白,Western blot 检测结果显示(图4E),SKA1 敲减组 IGFBP3 表达下调,提示 SKA1 通过负调控 IGFBP3 抑制 P53 信号通路,从而促进 UM 细胞的增殖。

2.5 SKA1 的高、低相对表达对 UM 患者生存期的影响 将 TCGA 数据库 UM 样本按 SKA1 表达(FPKM)最佳阈值(Best cutoff = 0.64)分为高、低表达患者,绘制 Kaplan-Meier 生存曲线,结果显示,SKA1 高表达患者生存率显著下降($P < 0.05$; HR = 2.55, 95% CI: 0.92 ~ 7.05)(图5)。

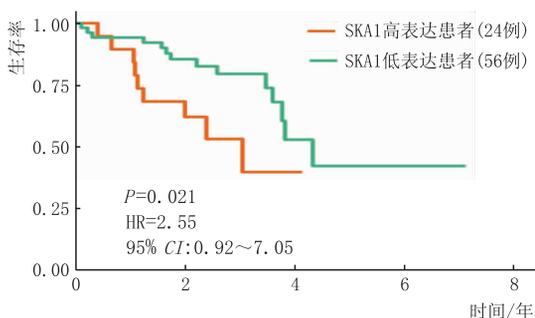


图5 SKA1 的不同表达水平在 UM 患者中 Kaplan-Meier 生存曲线图

3 讨论

UM 是成人最常见的眼内原发性恶性肿瘤,对于高危患者,可采用的有效治疗方案不足 1%^[8],手术患者约 50% 以上出现血行转移,大部分累及肝脏,最终致肝衰竭而死亡。手术切除既没明显改善患者的生活质量,又没达到根治肿瘤的效果。因此,深入研究 UM 发生及转移的分子机制、寻找肿瘤分子标志物及治疗新靶点具有重要意义和临床应用价值。

有文献报道,SKA1 参与胃癌、肝细胞癌、口腔鳞癌、涎腺腺样囊性癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、前列腺癌、神经胶质瘤、甲状腺乳头状癌、骨肉瘤等恶性肿瘤的转移^[9-14]。然而,SKA1 在 UM 发生发展过程中的作用及分子机制目前尚不清楚。本研究首次发现 SKA1 通过 P53/IGFBP3 促进 UM 细胞增殖,抑制其凋亡,具有潜在的临床应用价值。

SKA1 介导的信号通路在不同肿瘤中影响不同表型。Li 等^[15]通过体外实验发现,SKA1 除了在有丝分裂中富集于纺锤体微管和动粒外层,也会在培养细胞的中心体富集。在 SKA1 转基因裸鼠中,敲除 SKA1 导致中心体复制障碍,而 SKA1 过表达导致前列腺上皮细胞的中心体过度扩增,出现多个中心体,导致裸鼠的肿瘤发生概率增高。Zhang 等^[16]发现,SKA1 敲减后,口腔鳞状细胞癌 CAL-27 细胞的增殖、

克隆形成能力下降,凋亡增加,细胞周期被阻滞于 G2/M 期。Shi 等^[17]研究发现,SKA1 敲减后,A172、U251 神经胶质瘤细胞增殖、侵袭能力减弱等。为进一步研究 SKA1 在 UM 的发生发展中是否发挥了促进细胞增殖、抑制细胞凋亡的作用,我们利用 qRT-PCR 检测三种 UM 细胞株中 SKA1 表达,并筛选出最有效的敲减序列 shSKA1,用于后续的 MTT 实验及流式细胞技术、Caspase-3/7 法检测。结果发现,敲减了 SKA1 的 MUM-2B 细胞增殖活性显著低于对照组,而细胞凋亡速度显著高于对照组。间接证明了 SKA1 在 UM 的发生发展中发挥促进增殖、抑制凋亡的作用,这与其他文献^[16-17]所报道结果相一致。

IGFBP3 是胰岛素样生长因子(IGFs)系统中的六种高亲和力蛋白 IGFBPs 中作用最主要的调节蛋白,其主要功能是结合循环中的 IGFs,从而控制它们的生物利用率^[18]。研究发现,IGFBP3 可以通过控制 IGFs 对胰岛素样生长因子受体(IGF1R)的作用,从而发挥其抑制增殖和抗凋亡的作用^[19]。Yang 等^[20]在体内外实验中均证实,IGFBP3 的过表达均能抑制胶质瘤肿瘤细胞增殖,进而抑制肿瘤生长。有研究表明,IGFBP3 是 P53 调控的靶基因,其表达随野生型 P53 的增加而增加,并与 IGFBP3 启动子中的 DNA 反应元件结合^[21]。P53 诱导 IGFBP3 表达已被证明与细胞凋亡增加和增殖减少有关^[22]。这些都证明 IGFBP3 蛋白在肿瘤发生发展过程中发挥抑癌基因的作用。为探索 SKA1 影响 UM 的潜在通路,我们利用 KEGG 富集分析发现,SKA1 可能通过 P53 信号通路发挥作用,Western blot 检测结果显示,SKA1 敲减后 P53 通路中关键分子 IGFBP3 表达随之下降,提示 SKA1 可能通过 P53/IGFBP3 来影响 UM 细胞的增殖及凋亡。

同时,我们还分析了 TCGA 数据库 UM 样本中 SKA1 表达与临床及预后的相关性。由于 TCGA 数据库没有 UM 癌旁正常组织,我们分析 SKA1 的表达差异,只能分析其与临床及预后的关系。结果显示,SKA1 高表达的患者总生存率明显降低,这与 Dong 等^[23]提出的 SKA1 是影响甲状腺乳头状癌预后的独立危险因素一致。

综上所述,本研究发现 SKA1 是影响 UM 预后的独立危险因素,通过 P53/IGFBP3 信号通路促进 UM 细胞增殖,抑制细胞凋亡。因此,SKA1 增殖可能成为 UM 分子治疗的潜在靶点,然而,SKA1 直接作用机制,包括与 SKA1 结合的上、下游蛋白分子及功能域尚不明确,有待进一步研究。

参考文献

- [1] HARBOUR J W, CHAO D L. A molecular revolution in uveal melanoma: implications for patient care and targeted therapy [J]. *Ophthalmology*, 2014, 121(6): 1281-1288.
- [2] 曹琼洁,董菁,李丽,陈晓燕,王教,闫东升. microRNA-127 抑制葡萄膜黑色素瘤细胞增殖的表观遗传调控研究[J]. *中华眼视光学与视觉科学杂志*, 2018, 20(9): 546-551, 565.

- CAO Q J, DONG J, LI L, CHEN X Y, WANG J, YAN D S. Epigenetic regulation of microRNA-127 in the inhibition of uveal melanoma cell proliferation [J]. *Chin J Optom Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 20(9):546-551, 565.
- [3] CARVAJAL R D, SCHWARTZ G K, TEZEL T, MARR B, FRANCIS J H, NATHAN P D. Metastatic disease from uveal melanoma: treatment options and future prospects [J]. *Br J Ophthalmol*, 2017, 101(1):38-44.
- [4] HANISCH A, SILLJÉ H H, NIGG E A. Timely anaphase onset requires a novel spindle and kinetochore complex comprising SKA1 and SKA2 [J]. *EMBO J*, 2006, 25(23):5504-5515.
- [5] ZHANG Q, SIVAKUMAR S, CHEN Y, GAO H, YANG L, YUAN Z, et al. SKA3 phosphorylated by CDK1 binds NDC80 and recruits SKA to kinetochores to promote mitotic progression [J]. *Curr Biol*, 2017, 27(10):1477-1484.
- [6] SUN W, YAO L, JIANG B, LIN G, QIANG W. Spindle and kinetochore-associated protein 1 is overexpressed in gastric cancer and modulates cell growth [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 391(1/2):167-174.
- [7] SCHMIDT J C, ARTHANARI H, BOESZOERMENYI A A, WILSON-KUBALEK E M, MONNIER N, MARKUS M, et al. The kinetochore-bound SKA1 complex tracks depolymerizing microtubules and binds to curved protofilaments [J]. *Dev Cell*, 2012, 23(5):968-980.
- [8] RODRIGUES M, KONING L, COUPLAND S E, JOCHEMSEN A G, MARAIS R, STERN M H, et al. So close, yet so far: discrepancies between uveal and other melanomas. A position paper from UM cure 2020 [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(7):1032.
- [9] QIN X H, YUAN B, XU X T, HUANG H, LIU Y. Effects of short interfering RNA-mediated gene silencing of SKA1 on proliferation of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2013, 48(11):1324-1332.
- [10] GE J C, WANG Y X, CHEN Z B, CHEN D F. Integrin alpha 7 correlates with poor clinical outcomes, and it regulates cell proliferation, apoptosis and stemness via PTK2-P13K-Akt signaling pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Signal*, 2020, 66:109465.
- [11] CHEN Y, ZHAO J, JIAO Z, WANG W, WANG D, YU X, et al. SKA1 overexpression is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1):1240.
- [12] ZHAO L J, YANG H L, LI K Y, GAO Y H, DONG K, LIU Z H, et al. Knockdown of SKA1 gene inhibits cell proliferation and metastasis in human adenoid cystic carcinoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90:8-14.
- [13] YIP P Y. Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin (PI3K-Akt-mTOR) signaling pathway in non-small cell lung cancer [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2015, 4(2):165-176.
- [14] AMARO A, GANGEMI R, PIAGGIO F, ANGELINI G, BARISSONE G, FERRINI S, et al. The biology of uveal melanoma [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2017, 36(1):109-140.
- [15] LI J, XUAN J W, KHATAMIANFAR V, VALIYEVA F, MOUSSA M, SADEK A, et al. SKA1 over-expression promotes centriole over-duplication, centrosome amplification and prostate tumorigenesis [J]. *J Pathol*, 2014, 234(2):178-189.
- [16] ZHANG B, LI K Y, CHEN H Y, PAN S D, JIANG L C, WU Y P, et al. Spindle and kinetochore associated complex subunit 1 regulates the proliferation of oral adenosquamous carcinoma CAL-27 cells in vitro [J]. *Cancer Cell Int*, 2013, 13(1):83.
- [17] SHI X J, CHEN X Z, PENG H, SONG E, ZHANG T, ZHANG J X, et al. Lentivirus-mediated silencing of spindle and kinetochore-associated protein 1 inhibits the proliferation and invasion of neuronal glioblastoma cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(5):3533-3538.
- [18] JOHNSON M A, FIRTH S M. IGFBP-3, a cell fate pivot in cancer and disease [J]. *Growth Horm IGF Res*, 2014, 24(5):164-173.
- [19] JOGIE-BRAHIM S, FELDMAN D, OH Y. Unraveling insulin-like growth factor binding protein-3 actions in human disease [J]. *Endocr Rev*, 2009, 30(5):417-437.
- [20] YANG C H, YUE J, PFEFFER S R, FAN M, PAULUS E, HOSNI-AHMED A, et al. MicroRNA-21 promotes glioblastoma tumorigenesis by down-regulating insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP3) [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(36):25079-25087.
- [21] BURTNES B. Projections: novel therapies for HPV-Negative cancers of the head and neck [M]. New York: Springer, 2014.
- [22] 张玉洁, 孙怡琳, 朱苹, 郑雁飞, 张倩, 马晓丽. 非小细胞肺癌中 IGFBP-3、P53、Ki-67 的表达及临床意义 [J]. *贵州医药*, 2020, 44(1):6-9, 16.
- ZHANG Y J, SUN Y L, ZHU P, JIA Y F, ZHANG Q, MA X L. Expression and clinical significance of IGFBP-3, P53, Ki-67 in non-small cell lung cancer [J]. *Guizhou Med J*, 2020, 44(1):6-9, 16.
- [23] DONG C, WANG X L, MA B L. Expression of spindle and kinetochore-associated protein 1 is associated with poor prognosis in papillary thyroid carcinoma [J]. *Dis Markers*, 2015, 2015:616541.

Molecular mechanism of spindle and kinetochore associated complex -1 in promoting the proliferation of uveal melanoma cells

LING Feng¹, ZHANG Yong², XIN Xiangyang¹

1. Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University (Inner Mongolia Baogang Hospital), Baotou 014010, Inner Mongolia Autonomous Region, China
2. Department of Oncology, Inner Mongolia Autonomous Region People's Hospital, Huhehaote 010000, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Corresponding author: XIN Xiangyang, E-mail: xinxiangyang_2006@163.com

[Abstract] Objective To investigate the molecular mechanism of spindle and kinetochore associated complex-1 (SKA1) in promoting uveal melanoma (UM) cell proliferation. **Methods** MUM-2B cells were infected by lentivirus through SKA1 knockdown (SKA1 group) and empty vector (control group). Cell proliferation and apoptotic phenotype were detected by MTT assay, flow cytometry and Caspase-3/7 assay. Gene expression microarray was used to screen differential genes, KEGG enrichment analysis was performed to explore the potential signaling pathways through which SKA1 promotes the development of UM, and Western blot was used to detect the changes of key proteins in the signaling pathways. The relationship between SKA1 expression and prognosis was analyzed using UM RNA-Seq and follow-up data from TCGA database. **Results** Compared with the control group, the optical density of the SKA1 group was significantly reduced at day 3, 4 and 5 after the cell culture (all $P < 0.01$), while the cell apoptosis rate and Caspase-3/7 activity were significantly increased (all $P < 0.01$). KEGG enrichment analysis results showed that the differential genes were enriched in the P53 signaling pathway. Western blot confirmed that the expression of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) in the P53 pathway was significantly decreased after SKA1 knockdown ($P < 0.05$). The overall survival of patients with high SKA1 expression decreased ($P = 0.021$, HR = 2.55, 95% CI: 0.92 - 7.05). **Conclusion** SKA1 promotes the proliferation of UM cells through the P53/IGFBP-3 signaling pathway, and the high SKA1 expression is a risk factor for the prognosis of UM patients.

[Key words] spindle and kinetochore associated complex-1; uveal melanoma; insulin-like growth factor-binding protein-3; cell proliferation; cell apoptosis