

刘艳,许路,邵阿末,等. miR-186 通过负调控 Smad6 对胶质瘤细胞迁移和上皮间质转化的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(9): 25-31.

Liu Y, Xu L, Shao AM, et al. miR-186 inhibits the migration and epithelial-mesenchymal transition of human glioma cell lines by targeting Smad6 [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(9): 25-31.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.09.005

miR-186 通过负调控 Smad6 对胶质瘤细胞迁移和 上皮间质转化的影响

刘艳¹, 许路¹, 邵阿末¹, 曾金艳¹, 杨国青^{2*}

(1. 无锡卫生高等职业技术学校, 江苏 无锡 214028; 2. 西安市中心医院病理科, 西安 710003)

【摘要】 目的 研究 miR-186 通过负调控 Smad6 对人胶质瘤细胞迁移和上皮间质转化的影响。方法 qRT-PCR 检测星形胶质细胞及胶质瘤细胞中 miR-186 和 Smad6 的表达, Western blot 检测 Smad6 蛋白的表达水平; 细胞分四组: 空白对照组 (U251)、模拟物组 (miR-186 mimics)、质粒组 (pc-Smad6)、共转染组 (miR-186 mimics + pc-Smad6)。Western blot 检测各组细胞 Smad6、上皮间质转化相关蛋白 E-cadherin 和 Vimentin 的表达水平; 划痕实验检测各组细胞的迁移情况。**结果** 与正常星形胶质细胞比, 人胶质瘤细胞系 U251 中 miR-186 表达明显降低, 而 Smad6 表达明显升高 ($P < 0.05$)。较对照组, Smad6 蛋白在 miR-186 mimics 组细胞中的表达显著下降, 而在 pc-Smad6 组细胞中的表达则明显增加 ($P < 0.05$); miR-186 mimics 组细胞迁移能力显著降低, 而 pc-Smad6 组明显增强 ($P < 0.05$); miR-186 mimics 组 E-cadherin 蛋白的表达显著升高, 而 Vimentin 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$), 在 pc-Smad6 组中两种分子的表达情况相反 ($P < 0.05$)。对比 pc-Smad6 组, miR-186 mimics + pc-Smad6 组 Smad6 蛋白的表达水平明显降低 ($P < 0.05$); miR-186 mimics + pc-Smad6 组细胞的迁移能力明显降低 ($P < 0.05$); miR-186 mimics + pc-Smad6 组 Vimentin 表达明显降低, 而 E-cadherin 的表达显著升高 ($P < 0.05$)。**结论** miR-186 可通过调控 Smad6 的表达而抑制人胶质瘤细胞迁移和上皮间质转化。

【关键词】 人胶质瘤; miR-186; Smad6; 迁移; 上皮间质转化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)09-0025-07

miR-186 inhibits the migration and epithelial-mesenchymal transition of human glioma cell lines by targeting Smad6

LIU Yan^{1*}, XU Lu¹, SHAO Amo¹, ZENG Jinyan¹, YANG Guoqing^{2*}

(1. Wuxi Higher Health Vocational Technology School, Wuxi 214028, China. 2. Department of Pathology, Xi'an Central Hospital, Xi'an 710003)

【Abstract】 Objective We investigated the effect of miR-186 on the migration and epithelial-mesenchymal transition of human glioma cell lines by targeting microRNA-186 (miR-186). **Methods** The expression of miR-186 and Smad6 at the mRNA and protein level (for Smad6) was determined by RT-qPCR and/or Western blot in astrocytes and glioma cells. The cells were divided into four groups: a blank control group (U251), a mimic group (miR-186 mimics), a plasmid group (pc-smad6), and a co-transfection group (miR-186 mimics

【基金项目】 江苏省无锡市卫生计生委科研面上项目 (MS201765)。

【作者简介】 刘艳 (1982—), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 肿瘤的发病机制。E-mail: liuyan20051031@163.com

【通信作者】 杨国青 (1977—), 女, 硕士, 研究方向: 肿瘤分子病理机制。E-mail: yangguoqing0328@163.com

+ pc-smad6). The expression of Smad6, E-cadherin, and Vimentin at the mRNA and protein level was determined by RT-qPCR and Western blot in each group. Migration ability was measured using a wound healing experiment. **Results** Compared with astrocytes, the expression of miR-186 in human glioma cell line U251 decreased significantly, while the expression of Smad6 mRNA increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression level of the Smad6 protein in the miR-186 mimic group decreased significantly, while the level of the Smad6 protein in the pc-smad6 group increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the pc-smad6 group, the expression level of the Smad6 protein in the miR-186 mimics + pc-smad6 group significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the control group, the migration ability of the miR-186 mimics group decreased significantly, while the pc-smad6 group's migration ability was enhanced. Compared with the pc-smad6 group, the migration ability of the miR-186 mimics + pc-Smad6 group decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with the control group, E-cadherin expression in the miR-186 mimics group increased significantly, while Vimentin protein expression decreased significantly ($P < 0.05$). The expression of the two molecules in the pc-smad6 group was the opposite ($P < 0.05$). Compared with the pc-smad6 group, vimentin expression in the miR-186 mimics + pc-smad6 group decreased significantly, while E-cadherin expression increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusions** miR-186 may regulate migration and epithelial-mesenchymal transition of glioma cells by targeting Smad6.

【Keywords】 glioma; miR-186; Smad6; migration; epithelial-mesenchymal transition

胶质瘤起源于脑神经胶质细胞,约占颅脑肿瘤的 40%~50%,该肿瘤弥漫浸润生长、侵袭性强。临床上采取手术、放化疗结合的方法治疗,虽然取得一些进展,但预后整体不理想,复发率高、生存期短。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一种小分子单链 RNA,不具有编码功能,长为 20~25 个碱基,序列高度保守。研究表明 miRNA 的表达改变与多种肿瘤的进程密切相关,它们可能具有肿瘤激活和肿瘤抑制的功能^[1-2]。miR-186 在胶质瘤中表达降低,功能实验表明其具有抑癌作用^[3]。课题组前期研究表明 miR-186 通过靶向调节 Smad6 对脑胶质瘤细胞增殖有一定作用^[4],但是否会影响到迁移和上皮间质转化尚不清楚,本研究对此进行探讨。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

人脑胶质瘤细胞 U251 细胞株购自中国科学院北京细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

培养基、青霉素、链霉素购自 HyClone 公司;转染试剂 Lipofectamine TM2000、TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司;DNA 聚合酶、MMLV 逆转录酶和缓冲体系购自 Promega 公司;dNTP 及相关引物均由北京生工生物工程技术有限公司合成;凝胶配置相关产品购自北京碧云天生物技术研究所;血清购自 Biological Industries 公司;E-cadherin、Vimentin、 β -actin 等抗体购自美国 Abcam 公司;PDTC 为 Sigma 公司产品;PVDF 膜、化学发光底物 ECL 来自美国

Millipore 公司;HF160W 型水套式二氧化碳培养箱购自上海力申科学仪器有限公司;BioPhotometer plus 核酸蛋白测定仪购自 Eppendorf 公司;电泳设备购自美国 BIO-RAD 公司;FR-200A 凝胶分析系统购自上海普诺森生物科技有限公司;Lighter Cycler2.0 实时荧光定量 PCR 扩增仪购自 Roche 公司;PE9600PCR 扩增仪购自 PE 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

人脑胶质瘤细胞系 U251 用含 10% 胎牛血清、青-链霉素混合液的 DMEM 培养基进行培养,放于 5% CO₂、37℃ 的培养箱内传代培养,每天观察细胞生长情况,及时进行换液。选生长状态良好的细胞作为实验用细胞。

1.3.2 实验分组和试剂转染

细胞分组为对照组(U251)、模拟物组(miR-186 mimics)、质粒组(pc-Smad6)和共转染组(miR-186 mimics + pc-Smad6)。根据说明书制备 miR-186 mimics 或 pc-Smad6 和 Lipofectamine TM2000 脂质体复合物。实验组加入 miR-186 mimics 和(或) pc-Smad6 脂质体复合物。

1.3.3 基因检测(RT-qPCR)

收集细胞,TRIzol 裂解、提取总 RNA。测定各组的总 RNA 浓度,然后取适量总 RNA 进行反转录,最后取 cDNA 模板于反应体系中进行 RT-qPCR。miRNA-186 上游引物 5'-GCCGCCAAAGAATTCTCCTTT-3',下游引物 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'; Smad6 上游引物 5'-CTGGAGTTGTTGAGCAGCC-3',下游引物 5'-GTGCGTCTTCTTGTTTTGTCC-3'; β -

actin 上游引物 5'-CCCATGTTTCGTCATGGGTGT-3', 下游引物 5'-TGTCATGAGTCCTTCCACGATA-3' 扩增条件为 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 40 s, 共 40 个循环。重复 3 次实验, 收集数据, 计算基因的相对表达量。

1.3.4 Western blot 检测各组细胞的蛋白

胰酶消化并收集四组细胞, PBS 清洗细胞数次, 然后 RIPA 裂解液裂解细胞, 取上清液, BCA 法测各组蛋白浓度, 每组取 10 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 然后并将其转移至 PVDF 膜, 用含有脱脂奶粉的 TBST 封闭液封闭 1 h, 加入兔抗人多克隆抗体, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 遍, 每次 5 min, 加入辣根过氧化物酶体 HRP 标记的二抗 24 °C 孵育 2 h, TBST 避光洗膜 3 遍, 每次 15 min。最后加发光夜于仪器中曝光拍照, 计算蛋白的相对表达量。

1.3.5 划痕实验

将接种至 6 孔板中, 待细胞汇合至 85% 左右时, 有 20 μL 枪头划痕, PBS 洗去脱落的细胞, 显微镜观

察并拍照, 24 h 后继续观察显微镜观察细胞的迁移情况并拍照。计算细胞迁移率以判断细胞的迁移能力。实验均重复 3 次。

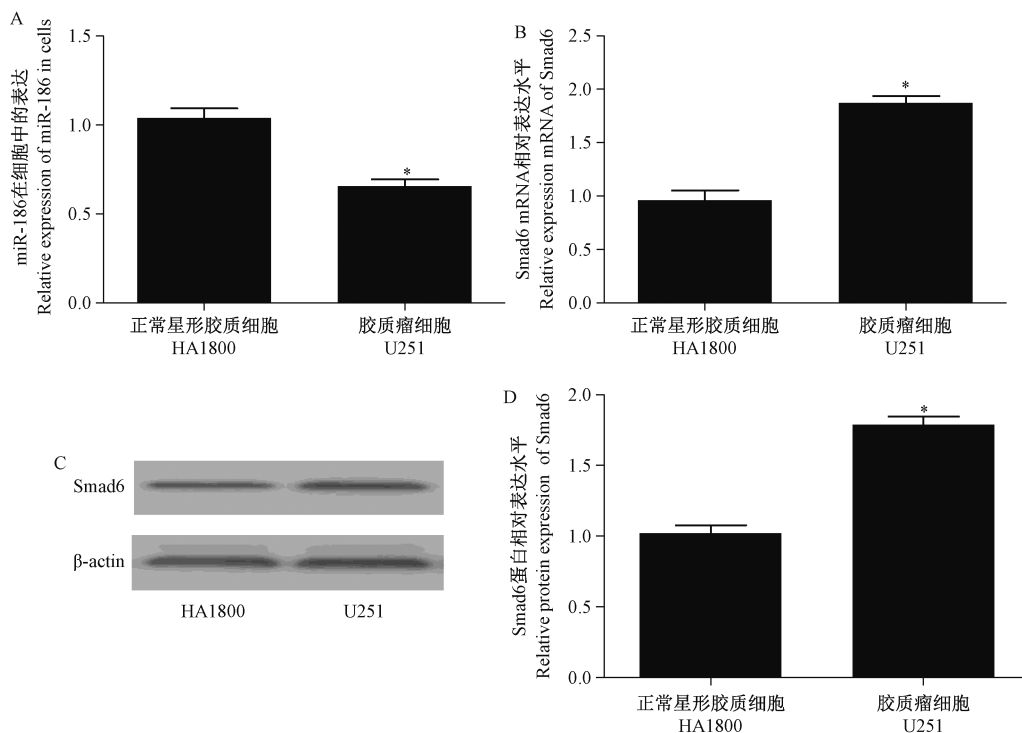
1.4 统计学方法

使用 SPSS 20.0 软件进行统计学处理, 数据采用平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-186 和 Smad6 在正常星形胶质细胞和胶质瘤细胞 U251 中的表达

如图 1 所示, RT-qPCR 和 Western blot 实验结果表明, 与正常星形胶质细胞相比, miR-186 在胶质瘤细胞 U251 中表达明显降低, 而 Smad6 的基因和蛋白表达水平均显著增高, 两者呈反相关系。该结果提示在胶质瘤细胞 U251 中 miR-186 可能发挥抑癌作用, 而 Smad6 则发挥的是促癌作用。



注: A、B: 基因表达量的统计分析; C: 蛋白条带; D: 蛋白表达量的统计分析。与正常胶质细胞相比, * $P < 0.05$ 。

图 1 RT-qPCR 和 Western blot 检测细胞中 miR-186 和 Smad6 的表达

Note. A/B, Statistical analysis of gene expression. C, Protein bands. D, Statistical analysis of protein expression. Compared with normal glial cells, * $P < 0.05$.

Figure 1 RT-qPCR and Western blot detection of miR-186 and Smad6 expression in cells

2.2 转染 miR-186 mimics 和 (或) pc-Smad6 后, 各组 U251 细胞中 Smad6 的表达变化

如图 2 所示, 本实验的 RT-qPCR 和 Western blot 结果表明, 将 miR-186 mimics 转染入胶质瘤细胞 U251 后, Smad6 的表达显著降低, 而转染 Smad6 质粒后, 其表达水平明显升高。与 Smad6 质粒组相比, 共转染 miR-186 mimics 和 Smad6 质粒组 Smad6 的表达显著降低。该结果说明 miR-186 可负向调控 Smad6 的表达。

2.3 miR-186 调控 Smad6 对胶质瘤细胞迁移的影响

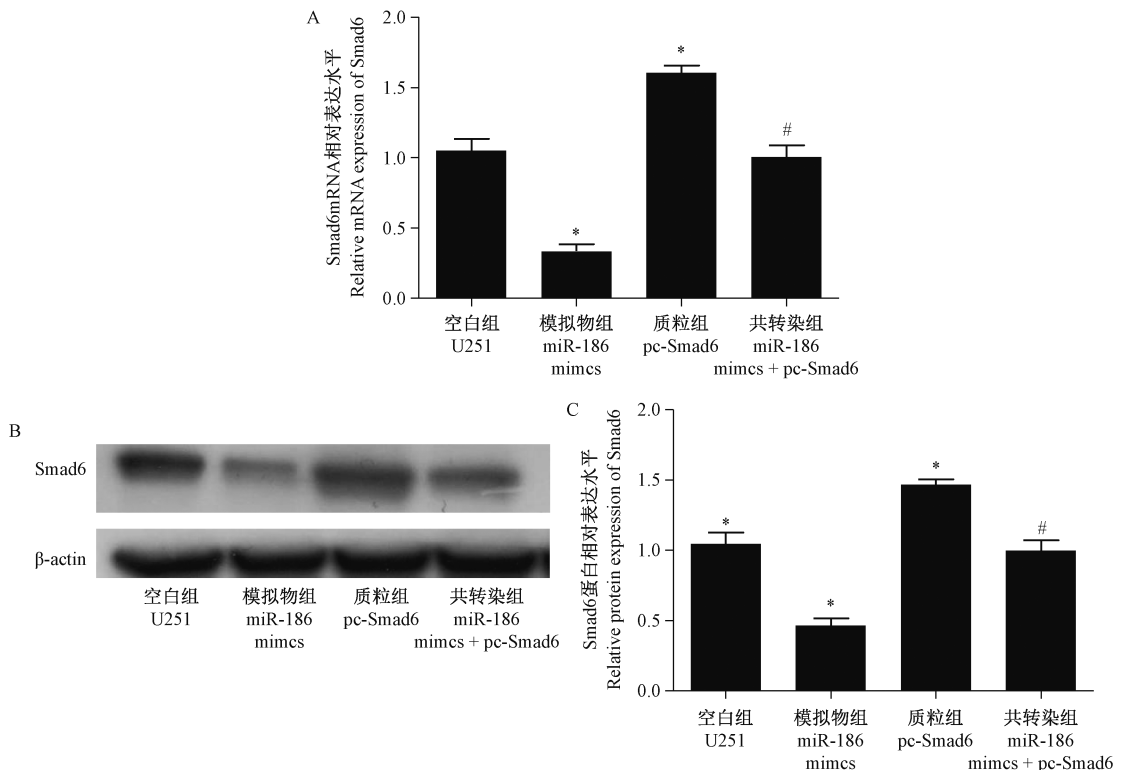
图 3 迁移实验显示, 与空白组相比, miR-186 mimics 组 U251 细胞的迁移率明显降低, 而 pc-Smad6 组的迁移率则显著升高 ($P < 0.05$); 与 Smad6 质粒组相比, 共转染 miR-186 mimics 和 Smad6 质粒组细胞迁移率显著升高 ($P < 0.05$)。上述结果表明, miR-186 能抑制 U251 细胞迁移的作用, 这种作用可被 Smad6 过表达所逆转。

2.4 miR-186 调控 Smad6 对胶质瘤细胞 EMT 的影响

由图 4 可知, 与对照组相比, miR-186 mimics 组上皮细胞黏附分子 E-cadherin 的表达显著升高, 而间质细胞黏附分子 Vimentin 的表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。在 pc-Smad6 组中两种分子的表达情况相反 ($P < 0.05$)。与 pc-Smad6 组相比, miR-186 mimics + pc-Smad6 组 Vimentin 的表达水平明显降低, 而 E-cadherin 的表达水平显著升高。由此可见, miR-186 过表达可通过作用于 Smad6 改变细胞上皮间质转化相关蛋白 E-cadherin 和 Vimentin 的表达情况。

3 讨论

胶质瘤是起源于神经外胚层的肿瘤, 浸润性生长、失控性增殖, 恶性程度高, 治疗难度大、易复发, 其机制尚不明确^[5-6]。故从分子水平寻求治疗靶点是目前胶质瘤研究的重要方向之一。miRNA 可通

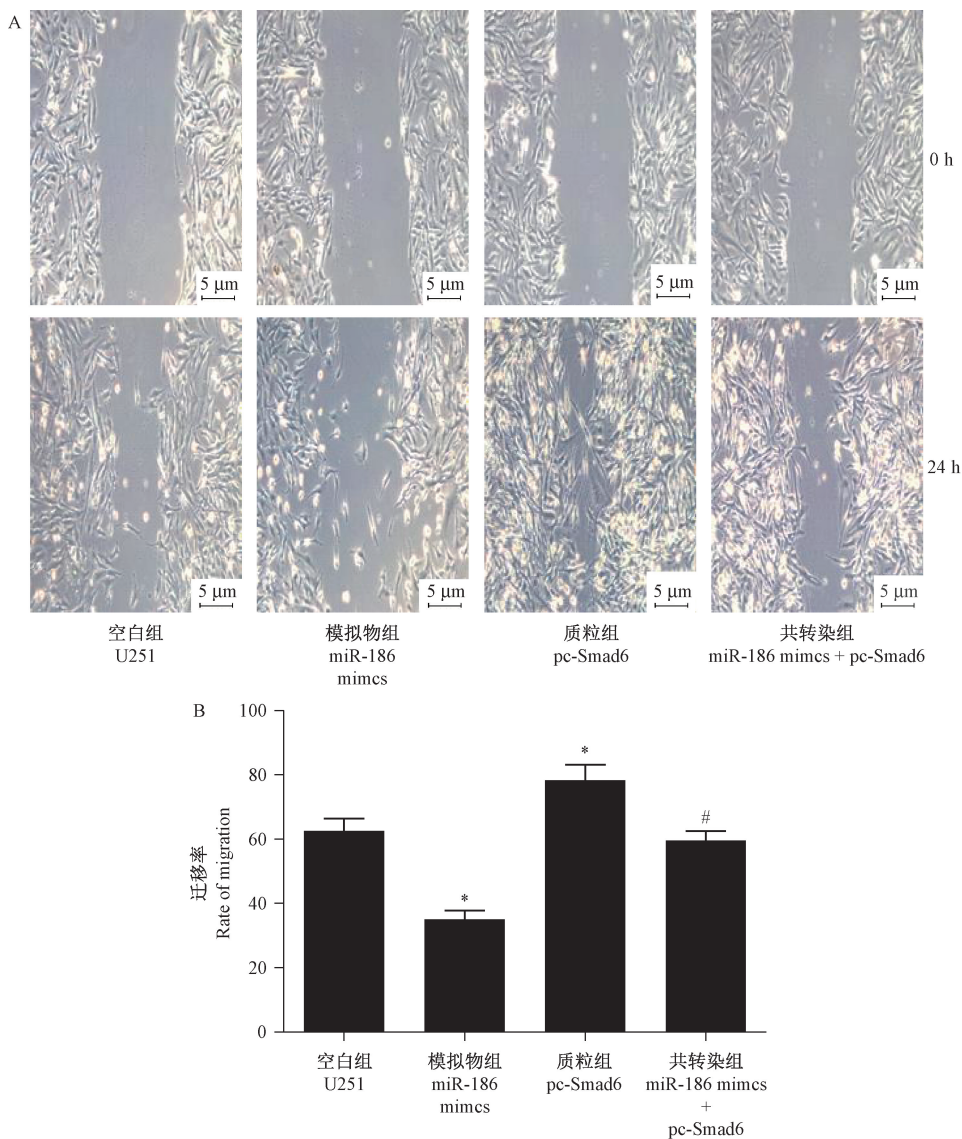


注: A: 基因表达量的统计分析; B: 蛋白条带; C: 蛋白表达量的统计分析。与空白组相比, * $P < 0.05$; 与质粒组相比, # $P < 0.05$ 。

图 2 RT-qPCR 和 Western blot 检测各组细胞中 Smad6 的表达

Note. A, Statistical analysis of gene expression. B, Protein bands. C, Statistical analysis of protein expression. Compared with the U251 group, * $P < 0.05$. Compared with the pc-Smad6 group, # $P < 0.05$.

Figure 2 RT-qPCR and Western blot detection of Smad6 expression in each group cells



注:A:迁移图;B:迁移率的统计。与空白组相比,* $P < 0.05$;与质粒组相比,# $P < 0.05$ 。

图3 划痕实验检测各组细胞的迁移情况

Note. A, The migration figure. B, Migration rate statistics. Compared with the U251 group, * $P < 0.05$. Compared with the pc-Smad6 group, # $P < 0.05$.

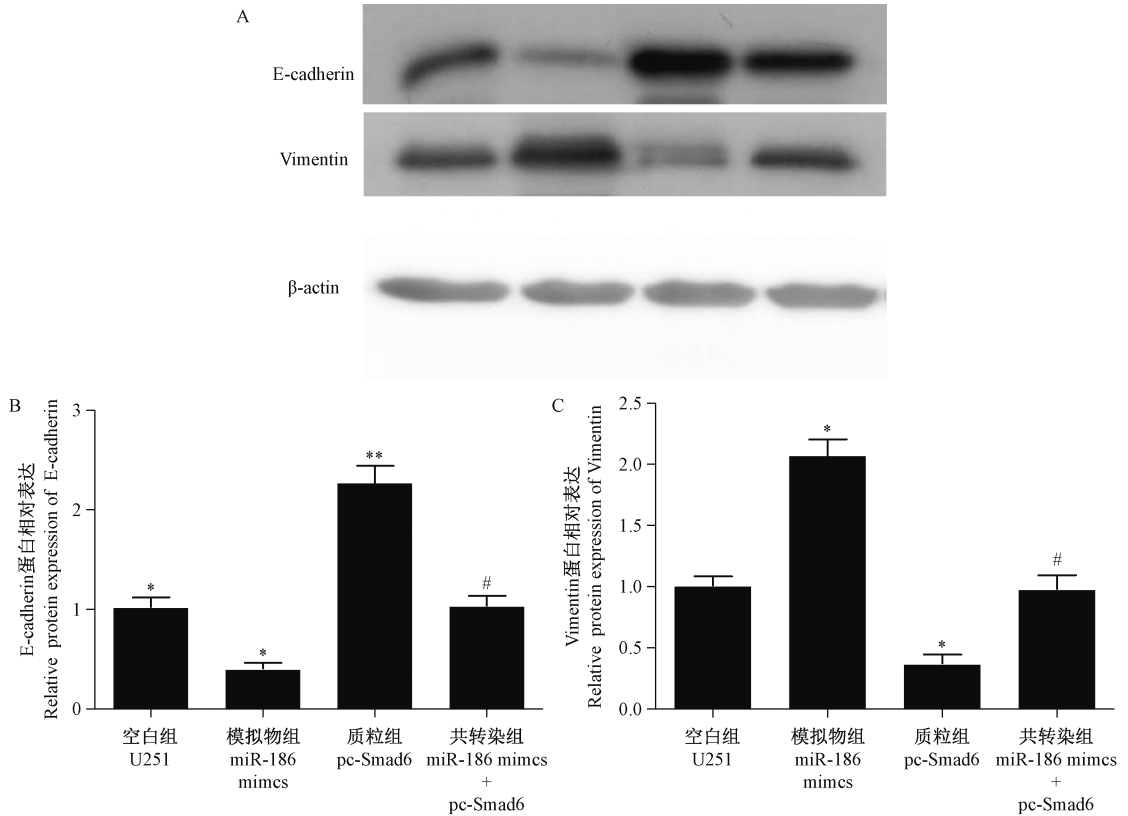
Figure 3 Wound healing assay analysis of cell migration

过调控某些重要基因的表达而影响肿瘤的发生、发展过程^[7]。

研究发现 miR-186 在多种肿瘤中表达异常,某些报道表明该基因在个别肿瘤中高表达,发挥促癌基因的功能^[8-9]。但更多的研究报道显示 miR-186 在较多肿瘤中发挥的为抑癌基因的作用,其中 miR-186 在胃癌中低表达,与该肿瘤的进展与转移有关^[10]。miR-186 在胆管癌和乳腺癌中低表达,可通过靶向调节 Twist1 的表达影响癌细胞的增殖、迁移、侵袭及上皮间质转化^[11-12]。Niinuma 等^[13]的研究表明 miR-186 的表达下调与胃肠道间质瘤的转移

复发有关。Ruan 等^[14]研究表明 miR-186 在肺癌中发挥抑癌作用,通过靶向 SIRT6 抑制肺癌进展。另有研究表明该基因在胶质瘤中也是低表达,发挥抑癌功能,但是具体的机制并不明确^[15]。

Smad6 基因位于 15q21-22,属于抑制性 Smad 蛋白,可调控 TGF- β (Transformation growth factor- β) 信号通路。TGF- β 具有促进血管生成、抑制免疫、和刺激细胞外基质形成等作用,故有利于肿瘤生长、扩散和转移^[16]。研究发现 Smad6 在小细胞肺癌、肝癌中均存在表达增加的现象^[17]。本课题组前期研究表明 Smad6 在胶质瘤细胞中亦高表达。其表达



注:A:蛋白条带;B、C:基因表达量的统计分析。与空白组相比, * $P < 0.05$;与质粒组相比,# $P < 0.05$ 。

图4 Western blot 检测各组细胞中 Smad6 的表达

Note.A, Protein bands. B/C, Statistical analysis of protein expression. Compared with the U251 group, * $P < 0.05$. Compared with the pc-Smad6 group, # $P < 0.05$.

Figure 4 Western blot detection of Smad6 expression in each group cells

增加受 miRNA-186 直接调控,并影响了肿瘤细胞的增殖^[4]。但是否会影响胶质瘤细胞的迁移和上皮间质转化尚不明确,本研究对此进行证实。

上皮间质转化是指上皮细胞向间质细胞转变,该变化可引起肿瘤细胞迁移和侵袭能力明显增加^[18-19],从而促进了恶性肿瘤的浸润生长和远处转移,降低了患者的生存质量甚至危及生命。在上皮间质发生过程中,上皮细胞标志分子 E-cadherin 等表达下降,而间质细胞标志分子 Vimentin、N-cadherin 等的表达明显增加。研究表明 miRNA 可通过调控某些基因而影响恶性肿瘤的迁移和侵袭。如王小明等^[20]研究表明 miR-206 通过调节 VEGFA 对人肝癌细胞的侵袭和迁移具有抑制作用。亦有研究表明 miR-186 可调节靶基因而影响恶性肿瘤的侵袭转移及上皮间质转化的发生^[11-12]。

本研究结果再次证实了在胶质瘤细胞 U251 中,miR-186 低表达,而 Smad6 高表达,两者呈反向关系。通过实验进一步验证了 miR-186 过表达后,胶质瘤细胞的迁移能力降低,E-cadherin 表达降低,

Vimentin 的表达升高,Smad6 的表达降低;转染 Smad6 质粒后,胶质瘤细胞的迁移能力增强,E-cadherin 表达升高,而 Vimentin 的表达降低;与转染质粒 Smad6 组比,共转染 miR-186 模拟物和质粒 Smad6 组胶质瘤细胞的迁移能力降低,E-cadherin 表达降低,Vimentin 的表达升高,Smad6 的表达亦降低。故该结果表明 miR-186 可通过调节 Smad6 抑制细胞迁移,减弱上皮间质转化相关蛋白 Vimentin 表达,增加 E-cadherin 蛋白表达。但 miR-186 是否会结合其他靶基因共同调控胶质瘤的迁移与上皮间质转化目前尚不清楚,需要我们进一步的研究。

参考文献:

- [1] 魏顺英,王春梅,王烈宏. miR-145 在上皮性卵巢癌组织中的表达及临床意义 [J]. 实用医学杂志, 2013, 29(22): 3724-3726.
- [2] 黄应龙,王海峰,王剑松. 泌尿系肿瘤中 microRNA 的相关研究进展 [J]. 实用医学杂志, 2019, 35(3): 492-495.
- [3] Jiang J, Wang W, Fang D, et al. microRNA186 targets IGF1R and exerts tumorsuppressing functions in glioma [J]. Mol Med

- Rep, 2017, 16(5): 7821-7828.
- [4] 刘艳, 邵阿末, 曾金艳. miR-186 通过靶向调控 Smad6 抑制人胶质瘤细胞系增殖 [J]. 重庆医学杂志, 2019, 48(16): 2718-2722.
- [5] Taylor LP. Diagnosis, treatment, and prognosis of glioma: five new things [J]. 2010, 75(18): S28-S32.
- [6] 周德君, 袁洁. 白藜芦醇治疗胶质瘤研究进展 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2019, 46(2): 229-233.
- [7] Wang J, Xu X, Mo S, et al. Involvement of microRNA-1297, a new regulator of HMGAI1, in the regulation of glioma cell growth *in vivo* and *in vitro* [J]. Am J Transl Res, 2016, 8(5): 2149-2158.
- [8] Hu X, Liu Y, Ai P, et al. microRNA-186 promotes cell proliferation and inhibits cell apoptosis in cutaneous squamous cell carcinoma by targeting RETREG1 [J]. Exp Ther Med, 2019, 17(3): 1930-1938.
- [9] Tian J, Shen R, Yan Y, et al. miR-186 promotes tumor growth in cutaneous squamous cell carcinoma by inhibiting apoptotic protease activating factor-1 [J]. Exp Ther Med, 2018, 16(5): 4010-4018.
- [10] Zare A, Alipoor B, Omrani MD, et al. Decreased miR-155-5p, miR-15a, and miR-186 expression in gastric cancer is associated with advanced tumor grade and metastasis [J]. Iran Biomed J, 2019, 23(5): 338-343.
- [11] Zhang M, Shi B, Zhang K. miR-186 suppresses the progression of cholangiocarcinoma cells through inhibition of Twist1 [J]. Oncol Res, 2019, 27(9): 1061-1068.
- [12] Sun WJ, Zhang YN, Xue P. miR-186 inhibits proliferation, migration, and epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells by targeting Twist1 [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(6): 10001-10009.
- [13] Niinuma T, Kai M, Kitajima H, et al. Downregulation of miR-186 is associated with metastatic recurrence of gastrointestinal stromal tumors [J]. Oncol Lett, 2017, 14(5): 5703-5710.
- [14] Ruan L, Chen J, Ruan L, et al. microRNA-186 suppresses lung cancer progression by targeting SIRT6 [J]. Cancer Biomark, 2018, 21(2): 415-423.
- [15] Zheng J, Li XD, Wang P, et al. CRNDE affects the malignant biological characteristics of human glioma stem cells by negatively regulating miR-186 [J]. Oncotarget, 2015, 6(28): 25339-25355.
- [16] Hyo-Sung Jeon, Tatiana Dracheva, Sei-Hoon Yang, et al. SMAD6 contributes to patient survival in non-Small cell lung cancer and its knockdown reestablishes TGF- β homeostasis in lung cancer cells [J]. Cancer Res, 2008, 68(23): 9686-9692.
- [17] Zhang L, Sun H, Zhao F, et al. BMP₄ administration induces differentiation of CD133⁺ hepatic cancer stem cells, blocking their contributions to hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Res, 2012, 72(16): 4276-4285.
- [18] Yihnaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion [J]. Cancer Metastasis Rev, 2009, 28(1-2): 15-33.
- [19] 曾志华, 鲁雄兵. 上皮间质转化与肿瘤微环境对肿瘤细胞转移机制的研究进展 [J]. 现代泌尿外科杂志, 2019, 24(11): 959-962.
- [20] 王小明, 余珊, 赵晓姬. miR-206 过表达靶向 VEGFA 对人肝癌细胞侵袭和迁移具有抑制作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(8): 95-100.

[收稿日期] 2020-01-15