

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.10.009

# 低氧诱导U251细胞中miRNA-210的表达及对肿瘤转移的影响

黄建国, 王勇强, 董雅璐, 卢宁, 赵晓伟, 戴强

**Expression of miRNA-210 Induced by Hypoxia in U251 Cells and Effect on Metastasis**

HUANG Jianguo, WANG Yongqiang, DONG Yalu, LU Ning, ZHAO Xiaowei, DAI Qiang

Department of Oncology, Urumqi General Hospital of Lanzhou Command PLA, Urumuqi 830000, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of hypoxia on expression of miRNA-210 and U251 cell metastasis. **Methods** Human glioma U251 cell line was induced by hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for different hours. The level of Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in U251 cells was detected by western blot and the expression of miRNA-210 was tested by real time PCR. The effects of miRNA-210 on U251 cells metastasis were tested by tumor invasion assay using Transwell. The expression of Vmp1 was tested by western blot. **Results** The level of HIF-1 $\alpha$  in U251 cells were significantly increased in time-dependent manner when induced for 6h, 12h, and 24h by hypoxia, and the expression of miRNA-210 was increased with HIF-1 $\alpha$  level. The expression of miRNA-210 was suppressed by 2-ME2, HIF-1 $\alpha$  inhibitor. The metastasis capability of U251 cells induced by hypoxia was increased, and was inhibited by miRNA210 inhibitor antagonist miR210. The expression of Vmp1 in U251 cells induced by hypoxia was increased and reversed by antagonist miR210. **Conclusion** miRNA-210 could be induced by hypoxia via HIF-1 $\alpha$ . miRNA-210 could promote U251 cells metastasis and down-regulate Vmp1 expression.

**Key words:** Hypoxia; Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ); miR-210; Vacuole membrane protein 1 (Vmp1); Glioma; Metastasis

**摘要:目的** 研究低氧条件下胶质瘤细胞系U251细胞中miRNA-210的表达以及对肿瘤转移能力的影响。**方法** 低氧条件(1% O<sub>2</sub>)培养胶质瘤细胞系U251, 利用Western blot检测不同诱导时间HIF-1 $\alpha$ 水平变化, 利用 real time PCR检测低氧不同诱导时间miRNA-210表达变化, 通过Transwell小室检测U251细胞侵袭能力, 利用Western blot检测低氧条件下Vmp1表达变化。**结果** 低氧诱导U251细胞6、12和24h, 可检测到HIF-1 $\alpha$ 水平随着诱导时间而增加; 在低氧诱导的不同时间点可检测到miRNA-210表达逐渐增加, 给予HIF-1 $\alpha$ 抑制剂2-甲氧雌二醇(2-methoxyestradiol, 2-ME2)后miRNA-210的表达受到抑制; 低氧条件下U251细胞侵袭转移能力增强, 在miRNA-210抑制剂antagonist miR210转染后, U251细胞转移能力受到抑制, 低氧条件下U251细胞中Vmp1蛋白表达下降, antagonist miR210转染可以逆转Vmp1的表达。**结论** 低氧可以通过HIF-1 $\alpha$ 诱导miRNA-210表达增加, miRNA-210具有促进U251细胞转移的作用, miRNA-210可能通过调节Vmp1表达发挥作用。

**关键词:** 低氧; 低氧诱导因子; miRNA-210; 空泡膜蛋白1; 胶质瘤; 肿瘤转移

中图分类号: R739.41 文献标识码: A

## 0 引言

胶质细胞瘤是脑肿瘤中发病率最高的肿瘤, 占全部脑肿瘤的40.49%, 肿瘤生长快、易早期转移, 恶性程度高, 患者预后差<sup>[1]</sup>。肿瘤细胞的快速生长需要机体提供更多的氧气和营养供应, 但是随着实

体瘤体积变大, 新生血管生长滞后于肿瘤细胞生长且多数结构异常, 导致实体瘤内部得不到充分的氧气供应, 肿瘤组织内氧分压低于正常组织<sup>[2-3]</sup>。在缺氧环境下, 肿瘤细胞会激活一系列相关分子信号转导途径来适应缺氧环境<sup>[4]</sup>。低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)是介导肿瘤细胞缺氧适应的关键性转录调控因子, 缺氧导致HIF-1激活, 促进多种靶基因的转录, 从能量代谢、肿瘤血管生成、肿瘤细胞增殖和转移等多方面适应缺氧环境, 促进肿瘤细胞存活<sup>[5-6]</sup>。

miRNA是一类由细胞产生的长约22nt的非编

收稿日期: 2012-11-07; 修回日期: 2013-02-21

作者单位: 830000乌鲁木齐, 兰州军区乌鲁木齐总医院肿瘤科

作者简介: 黄建国(1965-), 男, 硕士, 主任医师, 主要从事肿瘤诊断与治疗的研究

小分子RNA, 广泛存在于从植物、线虫到人类的细胞内, 截止目前, 已经发现1400多种人源性miRNA<sup>[7-8]</sup>。这类小分子RNA可以以碱基互补配对原则与靶基因mRNA的3'非翻译区(3' untranslated region, 3'UTR)结合, 阻止蛋白质翻译, 是一种转录后基因沉默机制。miRNA具有广泛的生物学功能, 参与生物体发育过程中细胞分化、增殖、凋亡等多种生理病理途径的调控<sup>[9-10]</sup>。随着对肿瘤侵袭转移分子机制理解的深入, 越来越多的实验证明miRNA分子参与调控肿瘤细胞黏附、侵袭和转移过程<sup>[11]</sup>。miRNA分子本身的表达受到包括缺氧在内的多种因素调控, miRNA-210是受缺氧诱导的miRNA分子之一<sup>[12-13]</sup>。

我们的前期研究工作表明miRNA-210在临床切除的胶质瘤标本中表达显著升高, 但是其具体功能还有待进一步研究。本研究以人脑间质瘤细胞系U251为研究对象, 探讨低氧环境下miRNA-210表达的变化以及与肿瘤转移侵袭能力的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人脑胶质瘤细胞系U251细胞由第四军医大学免疫学教研室惠赠, 胎牛血清购自杭州四季青公司, DMEM培养液为Gibco公司产品。兔抗人HIF-1 $\alpha$ 多克隆抗体(Catalog Number: sc-10790)购自Santa cruz公司, 兔抗Vmp1多克隆抗体(Catalogue Number: ABC66)购自Millipore公司, HRP标记的羊抗兔IgG二抗购自武汉博士德公司, HIF-1 $\alpha$ 抑制剂2-甲氧雌二醇(2-methoxyestradiol, 2-ME2)为Sigma-aldrich公司产品, 使用时溶解于含1% DMSO的0.01M PBS溶液中。MiRvana miRNA提取试剂盒为Ambion公司产品、实时定量PCR仪为ABI公司7300, miRNA抑制剂antagonist miR210 购自广州锐博生物科技有限公司。H35型低氧细胞工作站为英国DWS公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养和转染** 用含10%胎牛血清的DMEM培养液常规培养细胞, 细胞置于5% CO<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub>、37℃培养箱中培养、传代。实验前调整细胞密度约为60%。低氧(1% O<sub>2</sub>)诱导时细胞放置于H35型低氧细胞工作站培养, 基因转染依照说明书进行。

**1.2.2 蛋白提取和 Western blot方法** 分别取不同时间点的细胞, 每组细胞量约为2 $\times$ 10<sup>6</sup>个。用RIPA裂解液裂解细胞, 用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。每孔上样量20  $\mu$ g, 经5%~10%梯度胶电泳, 4℃、30 V恒压转膜过夜, 用含5%脱脂奶粉PBST封闭室温

1h, 加抗HIF-1 $\alpha$ 多克隆抗体(1:500)或者Vmp1抗体(1:1 000)4℃孵育过夜, PBST洗3遍, 加HRP标记的羊抗兔二抗(1:2000)室温孵育2 h。PBST洗3遍。ECL发光液暗室发光,  $\beta$ -actin作为内参照, 实验独立重复3次。

### 1.2.3 RNA提取、反转录和 real time PCR方法

收集每组2 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞, 用Trizol试剂裂解细胞, 用miRvana miRNA提取试剂盒提取RNA, 具体操作依据说明书进行。用紫外分光光度仪对各组RNA进行定量。用real time PCR分析 miRNA-210 的表达, 取5 ng总RNA, 用TaqMan microRNA特异性引物和TaqMan miRNA反转录试剂盒进行反转录产生cDNA。各组取1 $\mu$ l反转录产物进行real time PCR, 各组之间miRNA表达变化用2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup>方法表示, 实验重复3次。

### 1.2.4 细胞侵袭和转移实验

用无血清DMEM培养液悬浮各组细胞, 调整细胞密度为2 $\times$ 10<sup>5</sup> /ml。将200  $\mu$ l细胞悬液接种到Transwell小室的上层。小室下层加入含10% 胎牛血清的DMEM培养液作为化学趋化物质。24 h后, 用棉花拭子小心除去没有侵袭到深面的细胞, 4%甲醛溶液室温固定10 min, 0.5% 结晶紫染色10 min, 自来水冲洗, 在显微镜下计数, 实验独立重复3次。

## 1.3 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件进行统计分析。所有数据均以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )形式表示。各组数据之间差异用 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 低氧条件下HIF-1 $\alpha$ 的表达

分别取低氧诱导不同时间的U251细胞, 进行SDS-PAGE分析及Western blot检测。结果发现, 在1% O<sub>2</sub>条件下培养6 h即可检测到HIF-1 $\alpha$ 水平增加, 随着低氧诱导时间的延长可观察到HIF-1 $\alpha$ 水平进一步增加, 说明低氧可以诱导U251细胞中HIF-1 $\alpha$ 水平增加, 见图1。

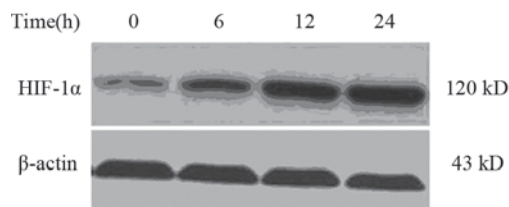
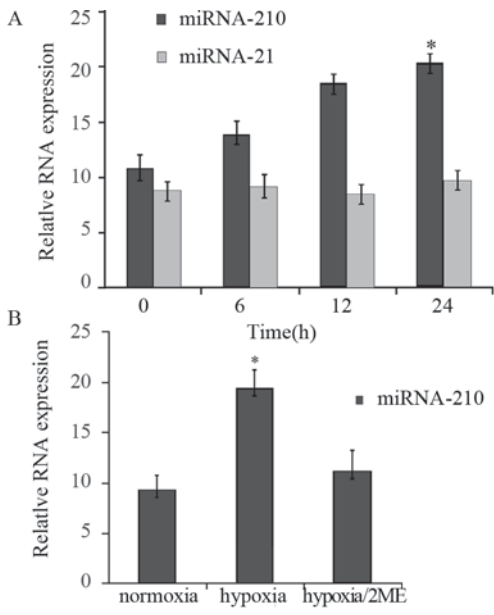


图1 低氧条件下U251细胞中HIF-1 $\alpha$ 水平变化  
Figure 1 The level of HIF-1 $\alpha$  in U251 under hypoxia

### 2.2 低氧条件下miRNA-210的表达

取低氧诱导不同时间的细胞, 用real time PCR方法检测miRNA-210表达水平。结果发现随着低氧



A: the relative expression of miRNA-210 and miRNA-21 in hypoxia for different time, \*:  $P=0.01$ ; B: the relative expression of miRNA-210 in normoxia, hypoxia and hypoxia/2ME respectively; \*:  $P=0.03$

图2 低氧条件下U251细胞中miRNA-210表达变化

Figure 2 The expression of miRNA-210 in U251 under

诱导时间延长, U251细胞中miRNA-210表达水平逐渐升高( $P=0.01$ ), 见图2A。为了排除低氧造成miRNA非特异性变化的可能, 我们检测了另外一种miRNA-21分子, 已知该miRNA分子不受低氧调节。结果发现, 无论在氧分压正常组还是低氧诱导组, miRNA-21的表达差异都没有统计学意义。另外, 我们在低氧诱导的同时培养液中加入终浓度为1.00

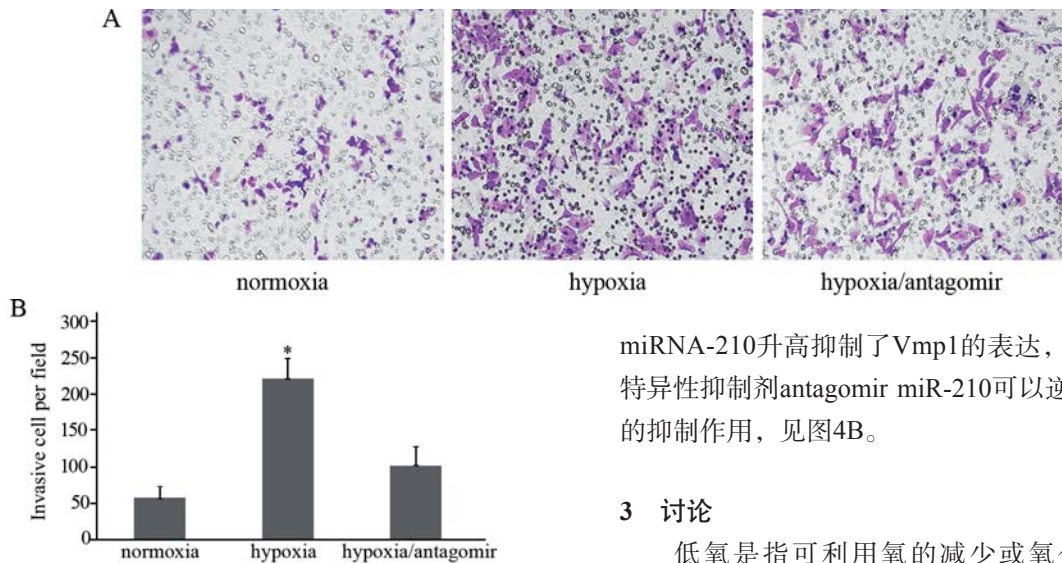
$\mu\text{mol/L}$ 的HIF-1 $\alpha$ 抑制剂2-ME<sup>[11]</sup>, 结果表明在抑制剂2-ME存在条件下miRNA-210表达没有增加, 说明在低氧环境中miRNA-210的表达增加是由于HIF-1 $\alpha$ 所介导的, 见图2B。

### 2.3 miRNA-210表达对细胞侵袭的影响

我们利用Transwell方法检测低氧条件和正常氧分压条件下U251细胞转移能力, 发现低氧条件下培养的U251细胞转移能力增强, 见图3。为了检测U251转移能力增强是否与miRNA-210的表达增加有关, 利用miRNA-210特异性抑制剂antagomir miR-210转染U251细胞。结果发现在miRNA-210抑制后U251细胞转移能力下降( $P=0.03$ ), 见图3。提示在低氧条件下U251细胞转移能力与miRNA-210的表达有关。

### 2.4 miRNA-120通过抑制Vmp1表达对细胞侵袭的影响

miRNA通过转录后基因沉默的机制调控多种基因的表达, 为了进一步探讨miRNA-120表达升高促进胶质瘤细胞侵袭转移的机制, 我们对miRNA-210的靶基因进行生物信息学分析。根据文献报道并对miRBase数据库检索发现空泡膜蛋白1(vacuole membrane protein 1, Vmp1)基因是miRNA-210的其中一个靶基因, 具有抑制肿瘤细胞转移的作用<sup>[12]</sup>, 见图4A。因此我们检测了低氧条件下Vmp1蛋白的表达, 结果发现在低氧条件下Vmp1表达降低, 而在转染miRNA-210特异性抑制剂antagomir miR-210后继续低氧条件培养, Vmp1表达没有明显变化, 这就提示



Transwell migration ( $\times 200$ ) (A) and invasion (B) Assays of U251 cells were performed in normoxia, hypoxia and hypoxia/antagomir respectively; \*:  $P=0.03$

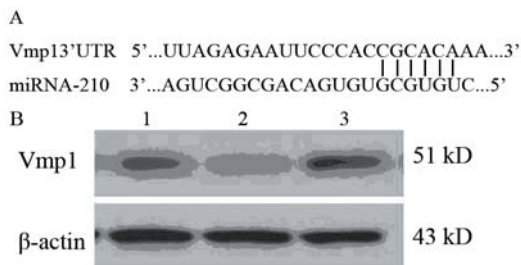
图3 miRNA-210对U251细胞转移能力的影响

Figure 3 The effects of miRNA-210 on U251 cells metastasis

miRNA-210升高抑制了Vmp1的表达, 而miRNA-210特异性抑制剂antagomir miR-210可以逆转miRNA-210的抑制作用, 见图4B。

## 3 讨论

低氧是指可利用氧的减少或氧分压降至临界值以下的状态, 在实体肿瘤中低氧是一种普遍的现象, 是肿瘤细胞快速增殖与血液供应相对滞后的结果。肿瘤细胞为了适应这种低氧环境, 会发生一系列变化。HIF-1就是在低氧环境下表达增加的一种转录因子, 由 $\alpha$ 、 $\beta$ 两个亚基构成,  $\alpha$ 亚基是HIF-1的调节



A: sketch of the Vmp1 3'-UTR and miRNA-210; B: the expression of Vmp1 in normoxia, hypoxia and hypoxia/antagomir respectively

1: normoxia; 2: hypoxia; 3: hypoxia+antagomir

图4 miRNA-210对Vmp1表达的影响

Figure 4 The effects of miRNA-210 on Vmp1 expression

和活性亚基, 氧对HIF-1活性的调节主要通过该亚基在正常氧分压的条件下, HIF-1 $\alpha$ 亚基容易通过泛素-蛋白酶途径所降解, 缺氧时, HIF-1 $\alpha$ 降解减少, 细胞内HIF-1 $\alpha$ 蛋白的水平大大提高, 使HIF-1的促转录活性大大地增加, 促进多种靶基因表达。 $\beta$ 亚基是HIF-1的结构性亚基, 在细胞内的表达水平相对稳定<sup>[3-6]</sup>。

HIF-1 $\alpha$ 可以通过促进一系列基因的表达使肿瘤细胞适应低氧环境, 这些基因包括: (1)与物质代谢有关的基因: 丙酮酸激酶(pyruvate kinase muscle, PKM)、葡萄糖转运体1(glucose transporter, GluT)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)等多种糖酵解酶类及转运体; (2)与新生血管形成有关的基因: 如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其受体的表达。(3)其他基因: 凋亡相关基因、增殖相关基因以及miRNA分子等<sup>[5,14]</sup>。

miRNA是细胞本身产生的非编码小分子RNA, 主要依靠转录后基因沉默的方式调节靶基因表达, 其本身与靶基因的关系不是单一的, 即一个miRNA分子可以调控多种靶基因的表达, 而某一基因的3'UTR区可以结合有不同的miRNA分子, 某一基因表达水平是各种调控miRNA作用的总和。在本实验中, 我们观察到miRNA-210表达增加后促进了U251细胞的转移, 其作用机制很可能是miRNA-210抑制了某一肿瘤转移抑制基因的表达, 从而使得肿瘤细胞转移能力增强。Ying等<sup>[12]</sup>研究表明, Vmp1 mRNA的3'-UTR可与miRNA-210的种子区(seed region)结合, 并抑制Vmp1蛋白表达, 从而促进肝癌细胞转移。然而另外一项研究认为在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中肿瘤转移相关基因1(metastasis-associated gene 1, MTA1)受到miRNA-210调控, MTA1抑制后NSCLC转移能力也降低<sup>[15]</sup>。因此, miRNA-210作用机制复杂, 在不同肿瘤类型中可能有所不同。

总之, 我们在实验中观察到低氧可以通过HIF-1 $\alpha$ 诱导miRNA-210的表达, miRNA-210的升高促进了人脑胶质瘤细胞系U251细胞的转移, Vmp1

作为miRNA-210潜在的靶分子, 低氧诱导后表达降低, 其变化趋势与miRNA-210正好相反。提示miRNA-210通过调控Vmp1的表达促进胶质瘤细胞侵袭转移。对其中的具体分子机制进行深入研究, 有可能深入理解脑胶质瘤侵袭转移的发生机制, 为寻找肿瘤治疗策略提供线索。

参考文献:

- [1] Mendichovszky I, Jackson A. Imaging hypoxia in gliomas [J]. Br J Radiol, 2011, 84 (2): S145-58.
- [2] Marx J. Cell biology: how cells endure low oxygen [J]. Science, 2004, 303 (5663): 1454-6.
- [3] Kunz M, Ibrahim SM. Molecular responses to hypoxia in tumor cells [J]. Mol Cancer, 2003, 2: 23.
- [4] Du KM, Chen GQ, Chen Z. Regulation of Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$  expression [J]. Ai Zheng, 2004, 23(9): 1098-102. [杜可明, 陈国强, 陈竺. 低氧诱导因子HIF-1 $\alpha$ 的表达调控[J]. 癌症, 2004, 23(9): 1098-102.]
- [5] Zhou ML, Lu XZ, Zhang LZ, et al. Effect of hypoxia and HIF-1 $\alpha$  on epithelial-mesenchymal transition, invasion and proliferation in colorectal cancer [J]. Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu, 2012, 39(10): 1170-5. [周明利, 卢先州, 张留柱, 等. 缺氧及HIF-1 $\alpha$ 对结肠直肠癌上皮-间质转化及侵袭增殖的影响 [J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(10): 1170-5.]
- [6] Altun M, Zhao B, Velasco K, et al. Ubiquitin-specific protease 19 (USP19) regulates hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) during hypoxia [J]. J Biol Chem, 2012, 287(3): 1962-9.
- [7] Sartor GC, St Laurent G 3rd, Wahlestedt C, et al. The emerging role of non-coding RNAs in drug addiction [J]. Front Genet, 2012, 3: 106.
- [8] Ang C, O'Reilly EM, Abou-Alfa GV. MicroRNA, hypoxic stress and hepatocellular carcinoma: future directions [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26(11): 1586-8.
- [9] Liu F, Wu Y, Lou YL, et al. Effects of renal ischemia on microRNAs and VEGF-NOTCH signal molecular in mice [J]. Zhonghua Ji Zhen Yi Xue Za Zhi, 2011, 20(4): 380-4. [刘芬, 吴珏, 娄远雷, 等. 肾缺血对缺氧诱导microRNAs及VEGF-NOTCH信号分子的影响 [J]. 中华急诊医学杂志, 2011, 20(4): 380-4.]
- [10] Xu L, Guo CY. Research advances of microRNAs in gastric cancer [J]. Zhonghua Zhong Liu Fang Zhi Za Zhi, 2010, 17(21): 1792-4. [徐凌, 郭传勇. MicroRNAs在胃癌中的研究进展 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(21): 1792-4.]
- [11] Mabeesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, et al. 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF [J]. Cancer Cell, 2003, 3(4): 363-75.
- [12] Ying Q, Liang L, Guo W, et al. Hypoxia-inducible microRNA-210 augments the metastatic potential of tumor cells by targeting vacuole membrane protein 1 in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2011, 54(6): 2064-75.
- [13] Yang W, Sun T, Cao J, et al. Downregulation of miR-210 expression inhibits proliferation, induces apoptosis and enhances radiosensitivity in hypoxic human hepatoma cells in vitro [J]. Exp Cell Res, 2012, 318(8): 944-54.
- [14] Mo JH, Choi IJ, Jeong WJ, et al. HIF-1 $\alpha$  and HSP90: target molecules selected from a tumorigenic papillary thyroid carcinoma cell line [J]. Cancer Sci, 2012, 103(3): 464-71.
- [15] Zhu X, Zhang X, Wang H, et al. MTA1 gene silencing inhibits invasion and alters the microRNA expression profile of human lung cancer cells [J]. Oncol Rep, 2012, 28(1): 218-24.

[编辑校对: 周永红]