

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.05.005

miR-186 对 HL-60 细胞增殖、迁移的调控及机制研究*

刘 洋¹,高长俊²

1. 河北省保定市第二中心医院检验科,河北保定 072650;2. 河北省唐山市
妇幼保健院小儿血液科,河北唐山 063000

摘 要:**目的** 探讨过表达微小 RNA-186(miR-186)对人原髓细胞白血病 HL-60 细胞上皮间质转化(EMT)、增殖、迁移及磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/丝苏氨酸蛋白激酶(AKT)信号通路的调控作用。**方法** 选取体外培养 HL-60 细胞,按照不同的转染方式分为对照组、mimic NC 组、miR-186 组、miR-186+抑制剂组、miR-186+激活剂组。采用实时荧光定量聚合酶链反应、5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷(EdU)、Transwell 小室法及蛋白免疫印迹法检测 miR-186 相对表达水平、增殖率、迁移率、EMT 相关因子及其信使 RNA(mRNA)相对表达水平并进行比较、分析。**结果** 与 mimic NC 组相比,miR-186 组 HL-60 细胞 miR-186 相对表达水平、E-钙黏蛋白(E-cadherin)及其 mRNA 表达水平升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),而增殖率、迁移率、磷酸化(p)-PI3K、p-AKT、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、纤维粘连蛋白(FN)及其 mRNA 表达水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 miR-186 组相比,miR-186+抑制剂组 HL-60 细胞 E-cadherin 及其 mRNA 表达水平升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),而增殖率、迁移率、p-PI3K、p-AKT、N-cadherin、Vimentin、FN 及其 mRNA 表达水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 miR-186 组相比,miR-186+激活剂组 HL-60 细胞 E-cadherin 及其 mRNA 表达水平下降,差异均有统计学意义($P<0.05$),而增殖率、迁移率、p-PI3K、p-AKT、N-cadherin、Vimentin、FN 及其 mRNA 表达水平升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 过表达 miR-186 通过阻遏 PI3K/AKT 信号通路抑制 HL-60 细胞 EMT,进而抑制 HL-60 细胞增殖和迁移。

关键词:微小 RNA-186; 人原髓细胞白血病; HL-60 细胞; 磷脂酰肌醇 3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶信号通路; 增殖; 迁移

中图法分类号:R733.71 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2024)05-0596-07

Regulation and mechanism of miR-186 on proliferation and migration of HL-60 cells*

LIU Yang¹,GAO Changjun²

1. Department of Clinical Laboratory,the Second Central Hospital of Baoding in Hebei Province, Baoding, Hebei 072650,China;2. Department of Pediatric Hematology,Tangshan Maternal and Child Health Hospital in Hebei Province,Tangshan, Hebei 063000,China

Abstract: Objective To explore the regulatory effects of overexpression of microRNA-186 (miR-186) on epithelial mesenchymal transformation (EMT),proliferation,migration and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/seronine protein kinase (AKT) signaling pathway of human promyelocytic leukemia HL-60 cells.
Methods HL-60 cells cultured in vitro were divided into control group,mimic NC group,miR-186 group,miR-186+inhibitor group and miR-186+activator group according to different transfection contents. Real-time fluorescence quantitative PCR,5-acetyney-2'deoxyuracil nucleoside (EdU),Transwell and Western blotting were used to analyze the miR-186 relative expression level,proliferation rate,mobility and EMT-related factors relative expression levels. **Results** Compared with mimic NC group,the relative expression levels of miR-186,E-cadherin and its mRNA in HL-60 cells of miR-186 group were increased,and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Proliferation rate,mobility,phosphorylation (p)-PI3K,p-AKT,N-cadherin,Vimentin,fibronectin (FN) and their messenger RNA (mRNA) expression levels were decreased,and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with miR-186 group,the expression levels of E-cadherin and its mRNA of HL-60 cells in miR-186+ inhibitor group was increased,and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Proliferation rate,mobility,p-PI3K,p-AKT,N-cadherin,Vimentin,FN and their mRNA expression levels were decreased,and the differences were statistically significant ($P<0.05$).

* 基金项目:国家卫生健康委员会“十四五”规划全国重点课题(YYWS4359)。
作者简介:刘洋,女,主管技师,主要从事临床检验学方向研究。

Compared with miR-186 group, the expression levels of E-cadherin and its mRNA of HL-60 cells in miR-186+ activator group decreased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Proliferation rate, mobility, p-PI3K, p-AKT, N-cadherin, Vimentin, FN and their mRNA expression levels were increased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of miR-186 inhibits EMT in HL-60 cells by repressing PI3K/AKT signaling pathway, thereby inhibiting cell proliferation and migration.

Key words: microRNA-186; human promyeloid leukemia; HL-60 cell; phosphatidylinositol 3-kinase/seronine protein kinase signaling pathway; proliferation; migration

急性髓系白血病发病时原始髓样细胞出现异常增生,抑制了正常细胞的造血功能,其发病率呈逐年上升趋势^[1]。临床上通常采用化疗的方法来治疗急性髓系白血病,但存在药物的不良反应及药物耐药等问题。因此,探索安全、有效的新方法对治疗急性髓系白血病的意义重大。

微小 RNA(miRNA)是一种小分子 RNA,有多项研究在宫颈癌、前列腺癌等多种癌细胞中均发现 miRNA 家族在细胞增殖和转移等生物学行为过程中发挥重要调控作用^[2-6]。研究表明 miRNA 能够影响血液系统肿瘤的发生、发展,在调控人体造血过程中具有非常重要的作用^[7-8]。现已证实 miRNA 在包括急性髓系白血病在内的血液肿瘤中具有原癌基因或抑癌基因的作用。磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)通过磷酸化激活丝苏氨酸蛋白激酶(AKT)进而对下游的多种靶分子的活性产生影响。PI3K/AKT 通路参与多种肿瘤细胞的增殖和迁移等过程^[9]。关于 PI3K/AKT 通路介导急性髓系白血病前人也有研究^[10]。有文献报道,在肺腺癌中,miRNA-186(miR-186)参与肿瘤细胞的增殖和迁移是通过介导 PI3K/AKT 通路完成的^[11-12]。但关于 miR-186 介导 PI3K/AKT 通路调控人原髓细胞白血病 HL-60 细胞增殖、迁移等过程的作用机制尚未明确。因此,本研究通过研究 miR-186 调控 PI3K/AKT 通路在 HL-60 细胞增殖、迁移及上皮间质转化(EMT)过程中的作用,为研究急性髓系白血病提供新的理论依据,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 HL-60 细胞购自北纳生物;PI3K/AKT 通路抑制剂(LY294002)、PI3K/AKT 通路激活剂(SC79)购自上海源叶生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$,货号为 S43088、S80614;miR-186、阴性对照片段(mimic NC)由上海生工公司进行设计并合成;Lipofectamine 2000 阳离子脂质体购自美国 Invitrogen 公司,货号为 C0075S;5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(EdU)细胞增殖检测试剂盒购自上海碧云天公司,货号为 P0013B;SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司,货号为 RR820A;鼠抗人磷酸化(p)-PI3K 购自上海户实公司,货号为 HK5745;鼠抗人 PI3K 货号为 10017175,鼠抗人 AKT 货号为 10022173,p-AKT 货号为 10022023,N-

钙黏蛋白(N-cadherin)货号为 10010628,E-钙黏蛋白(E-cadherin)货号为 1004426,波形蛋白(Vimentin)货号为 10017978,纤维粘连蛋白(FN)货号为 10016772,肌动蛋白(β -actin)货号为 10021787,辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠免疫球蛋白(IgG)货号为 20000425 且均购自武汉三鹰生物技术有限公司。HF151 型 CO₂ 培养箱购自武汉益普生物科技有限公司;DMI1 型光学显微镜系统购自德国 Leica 公司;Multiskan Ascent 型酶标仪购自美国 Thermo 公司;ZF-288 型凝胶成像系统购自上海金鹏分析仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 HL-60 细胞培养 HL-60 细胞株大鼠心肌细胞(H9C2)接种于含 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI-1640 培养基中,并置于湿度为 70%~80%,温度为 37℃,含 5% CO₂ 的环境下进行培养,更换培养液间隔时间为 2 d,选取对数期生长细胞用于实验。

1.2.2 分组及细胞转染 选取对数期生长的 HL-60 细胞,按照不同干预内容分为 5 组(对照组、mimic NC 组、miR-186 组、miR-186+抑制剂组、miR-186+激活剂组)。对照组不做处理;mimic NC 组采用脂质体转染法将 mimic NC 转染于 HL-60 细胞(转染后培养 24 h);miR-186 组将 miR-186 转染于 HL-60 细胞(转染后培养 24 h);miR-186+抑制剂组和 miR-186+激活剂组细胞处理方法为转染 miR-186 于 HL-60 细胞(转染后培养 24 h)后,分别加入 LY294002 和 SC79,使其最终水平平均达到 10 μ mol/L,干预 24 h,每组设置 3 个复孔。

1.2.3 检测 miR-186 及 EMT 相关因子相对表达水平 采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 HL-60 细胞中 miR-186 相对表达水平及 EMT 相关因子(E-cadherin、Vimentin、N-cadherin、FN)信使核糖核酸(mRNA)相对表达水平,参照试剂盒的说明书,提取总 RNA,并进行反转录,随后进行 RT-qPCR 检测。测定 miR-186 相对表达水平时以 U6 作为管家基因,测定 EMT 相关因子 mRNA 相对表达水平时以 GAPDH 作为管家基因。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对目的基因相对表达水平进行计算。引物序列见表 1。

1.2.4 EdU 法测定 HL-60 细胞的增殖率 将转染 24 h 后的 HL-60 细胞进行 EdU 孵育 2 h,固定 30 min,加入 0.3% TritonX-100 表面活性剂透化 10

min; 在每孔中加入 100 μ L Click 反应液避光孵育 30 min, 再进行常规的 Hoechst 复染; 装片后, 观察并采集在荧光显微镜下的 EdU 红色荧光信号和 Hoechst 33342 蓝色荧光信号, 采用 ImageJ V1. 8. 0 软件确定细胞数目。细胞增殖率为 EdU 阳性染色细胞(红色) 占总细胞(蓝色) 的百分比。

表 1 miR-186 及 EMT 相关因子的引物序列	
基因名称	引物序列
U6	正向: 5'-CTCGCTTCGCGACACACA-3'
	反向: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
GAPDH	正向: 5'-TGACTTCAACAGCGACACCA-3'
	反向: 5'-CACCTGTTGCTGTAGCCAAA-3'
miR-186	正向: 5'-CGGCGCAAAGAATTCCTT-3'
	反向: 5'-GTGCAGGTCGAGGT-3'
E-cadherin	正向: 5'-CGAGAGCTACACGTTACGG-3'
	反向: 5'-GGGTGTCGAGGAAAAATAGG-3'
Vimentin	正向: 5'-GCGTGACGTACGTACGAATATGA-3'
	反向: 5'-GTTCCAGGACTCATTTGCTTCTT-3'
N-cadherin	正向: 5'-AGAGGAAGACCAGGACTATGACTTGAG-3'
	反向: 5'-TACTGTGGCTCAGCGTGGATAGG-3'
FN	正向: 5'-TGGAGGAAGCCGAGGTTT-3'
	反向: 5'-CAGCGTTTTCGATGGTA-3'

1. 2. 5 Transwell 小室法测定 HL-60 细胞的迁移能力 将转染后的 HL-60 细胞接种到 24 孔板 Transwell 小室中, 加入无血清的细胞悬液, 并在下室中加入含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基。培养 24 h 后, 收集下室悬液, 细胞浓缩计数, 然后置于显微镜下随机选取 3 个视野, 用细胞计数板计算细胞数, 迁移率=(迁移终点细胞数-迁移起点细胞数)/迁移起点细胞数 $\times$ 100%。

1. 2. 6 蛋白免疫印迹法检测 HL-60 细胞中 PI3K/ AKT 信号通路及 EMT 相关因子及表达水平 转染 HL-60 细胞 24 h 后, 采用 RIPA 裂解液重悬并裂解; 在 4 $^{\circ}$ C 条件下, 以 12 000 r/min 离心 10 min, 然后收集上清液, 即总蛋白样品。将蛋白样品进行凝胶电泳(80~120 V 恒压法), 再采用电泳法(300 mA 恒流法)进行蛋白转膜, 利用脱脂牛奶法进行膜封闭, 在 4 $^{\circ}$ C 条件下进行一抗孵育过夜; 室温二抗孵育 2 h。封闭、一抗孵育、二抗孵育和显影之间分别用 Tris 洗膜缓冲液进行 3~5 次膜洗涤。在凝胶成像系统中进行图片采集, 并用 ImageJ V1. 8. 0 软件进行蛋白灰度分析, 内部参考为 β -actin, 并进行目的蛋白相对表达水平的计算。

1. 3 统计学处理 采用 GraphPad Prism V8. 0 作图软件进行绘图, 采用 SPSS26. 0 软件分析数据。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0. 05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2. 1 5 组 miR-186 相对表达水平比较 对照组、mimic NC 组、miR-186 组、miR-186+抑制剂组、miR-186+激活剂组的 miR-186 相对表达水平分别为 $1. 00 \pm 0. 17$ 、 $1. 01 \pm 0. 19$ 、 $1. 85 \pm 0. 14$ 、 $1. 85 \pm 0. 14$ 、 $1. 82 \pm 0. 15$ 。5 组间 miR-186 相对表达水平比较, 差异有统计学意义($F = 24. 783, P < 0. 05$); 与 mimic NC 组相比, miR-186 组 miR-186 表达水平升高($t = 6. 463, P < 0. 05$)。miR-186 组与 miR-186+抑制剂组和 miR-186+激活剂组的 miR-186 相对表达水平比较, 差异均无统计学意义($t = 0. 023, 0. 231, P > 0. 05$)。见图 1。

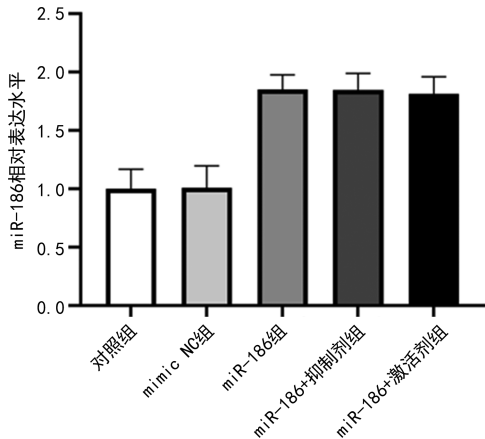


图 1 5 组 miR-186 相对表达水平

2. 2 5 组 HL-60 细胞的增殖率比较 对照组、mimic NC 组、miR-186 组、miR-186+抑制剂组、miR-186+激活剂组细胞增殖率分别为 $(58. 63 \pm 3. 36)\%$ 、 $(59. 07 \pm 3. 69)\%$ 、 $(34. 6 \pm 2. 23)\%$ 、 $(20. 53 \pm 1. 86)\%$ 、 $(57. 5 \pm 2. 91)\%$ 。5 组 HL-60 细胞的增殖率比较, 差异有统计学意义($F = 111. 339, P < 0. 05$)。与 mimic NC 组相比, miR-186 组细胞增殖率降低($t = 10. 364, P < 0. 05$)。与 miR-186 组相比, miR-186+抑制剂组细胞增殖率降低($t = 5. 959, P < 0. 05$), 而 miR-186+激活剂组细胞增殖率升高($t = 9. 699, P < 0. 05$)。见图 2、3。

2. 3 5 组 HL-60 细胞的迁移率比较 对照组、mimic NC 组、miR-186 组、miR-186+抑制剂组、miR-186+激活剂组细胞迁移率分别为 $(21. 00 \pm 2. 09)\%$ 、 $(20. 88 \pm 2. 53)\%$ 、 $(9. 73 \pm 0. 44)\%$ 、 $(6. 03 \pm 0. 45)\%$ 、 $(20. 88 \pm 2. 43)\%$ 。5 组 HL-60 细胞的迁移率比较, 差异有统计学意义($F = 46. 332, P < 0. 05$)。与 mimic NC 组相比, miR-186 组细胞迁移率降低($t = 7. 391, P < 0. 05$)。与 miR-186 组相比, miR-186+抑制剂组细胞迁移率降低($t = 2. 453, P < 0. 05$), 而 miR-186+激活剂组细胞迁移率升高($t = 7. 391, P < 0. 05$)。见图 4。

2. 4 5 组 HL-60 细胞中 EMT 相关因子及其 mRNA 相对表达水平比较 5 组 HL-60 细胞中 EMT 相关因子及其 mRNA 相对表达水平比较, 差异有统计学意

义($P<0.05$)。与 mimic NC 组相比,miR-186 组 E-cadherin 及其 mRNA 表达水平升高,差异均有统计
学意义($P<0.05$),N-cadherin、Vimentin、FN 及其
mRNA 表达水平降低,差异均有统计
学意义($P<0.05$)。与 miR-186 组相比,miR-186+抑制剂组 E-
cadherin 及其 mRNA 表达水平升高,差异均有统计
学意义($P<0.05$),N-cadherin、Vimentin、FN 及其

mRNA 表达水平降低,差异均有统计
学意义($P<0.05$);与 miR-186 组相比,miR-186+激活剂组 E-
cadherin 及其 mRNA 表达水平降低,差异均有统计
学意义($P<0.05$),N-cadherin、Vimentin、FN 及其
mRNA 表达水平升高,差异均有统计
学意义($P<0.05$)。见图 5、表 2、3。

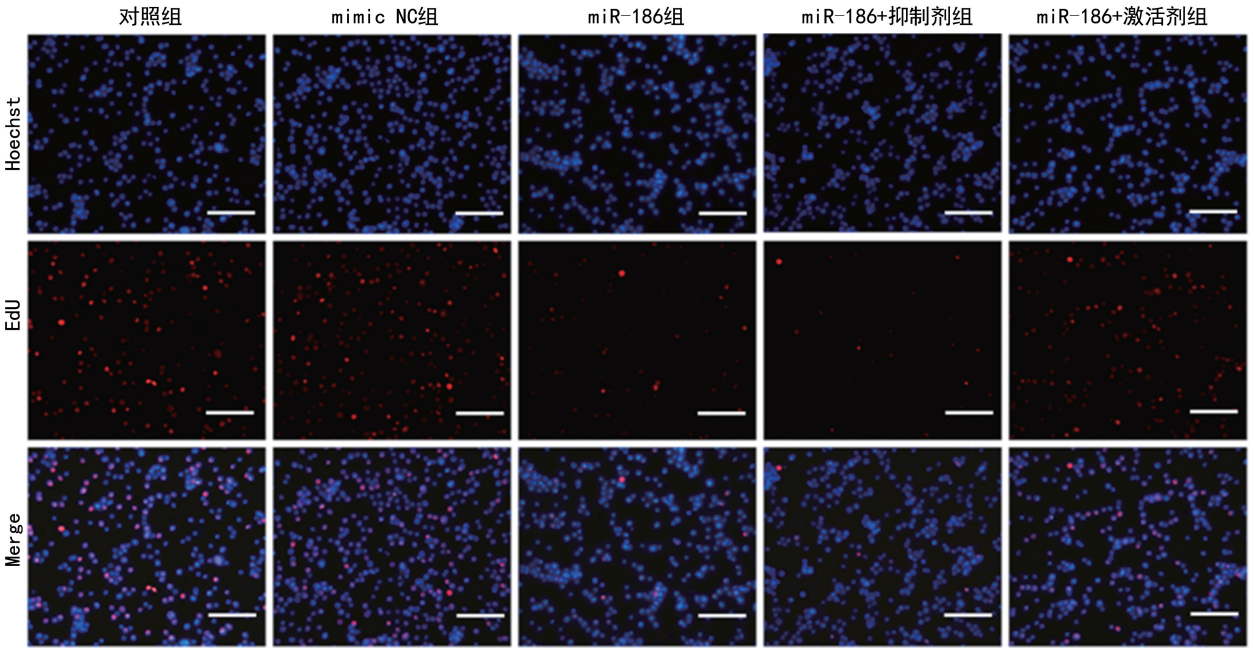


图 2 5 组 HL-60 细胞增殖情况

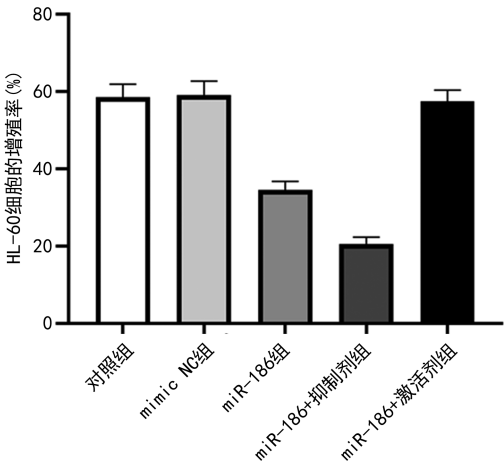


图 3 5 组 HL-60 细胞增殖率

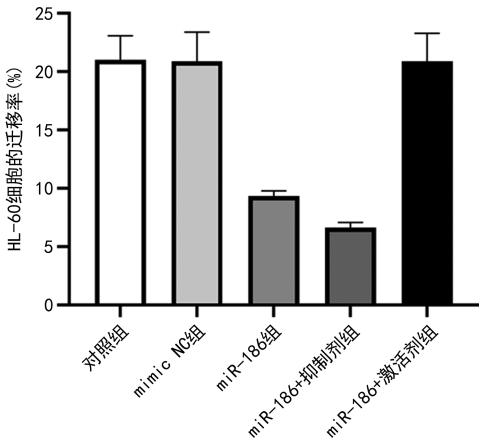


图 4 5 组 HL-60 细胞迁移率

2.5 5 组 HL-60 细胞中 PI3K/AKT 信号通路蛋白表达水平比较 5 组 HL-60 细胞中 PI3K/AKT 信号
通路 p-PI3K、p-AKT 蛋白表达水平比较,差异有统计
学意义($P<0.05$)。与 mimic NC 组相比,miR-186
组 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白表达水平降低,差异均有统
计学意义($P<0.05$)。与 miR-186 组相比,miR-186+
抑制剂组 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白表达水平降低,差异
均有统计学意义($P<0.05$);miR-186+激活剂组 p-
PI3K 和 p-AKT 蛋白表达升高,差异均有统计
学意义($P<0.05$)。见表 4、图 6。

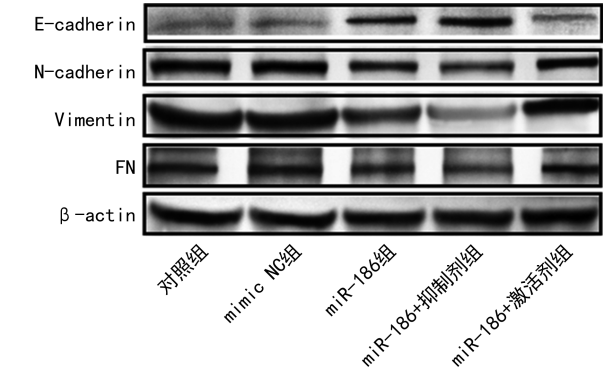


图 5 HL-60 细胞中 EMT 相关因子的表达

表 2 5 组 HL-60 细胞中 EMT 相关因子相对表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	E-cadherin	N-cadherin	Vimentin	FN
对照组	0.10±0.01	1.10±0.11	1.84±0.08	0.90±0.04
mimic NC 组	0.10±0.01	1.10±0.15	1.81±0.09	0.90±0.03
miR-186 组	0.50±0.02 [*]	0.65±0.03 [*]	0.85±0.03 [*]	0.66±0.03 [*]
miR-186+抑制剂组	0.80±0.04 [#]	0.30±0.02 [#]	0.22±0.06 [#]	0.35±0.03 [#]
miR-186+激活剂组	0.20±0.01 [#]	0.90±0.04 [#]	1.21±0.05 [#]	0.88±0.04 [#]
F	606.522	46.200	325.067	145.729
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 mimic NC 组相比,^{*} $P<0.05$;与 miR-186 组相比,[#] $P<0.05$ 。

表 3 5 组 HL-60 细胞中 EMT 相关因子 mRNA 相对表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	E-cadherin	N-cadherin	Vimentin	FN
对照组	1.00±0.07	1.00±0.10	1.00±0.09	1.00±0.10
mimic NC 组	1.04±0.06	0.97±0.02	1.00±0.08	1.00±0.11
miR-186 组	1.34±0.12 [*]	0.66±0.04 [*]	0.74±0.05 [*]	0.67±0.04 [*]
miR-186+抑制剂组	1.70±0.05 [#]	0.36±0.03 [#]	0.48±0.04 [#]	0.39±0.05 [#]
miR-186+激活剂组	1.15±0.09 [#]	0.94±0.03 [#]	0.94±0.08 [#]	0.91±0.06 [#]
F	36.618	81.717	30.072	34.847
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 mimic NC 组相比,^{*} $P<0.05$;与 miR-186 组相比,[#] $P<0.05$ 。

表 4 5 组 HL-60 细胞中 PI3K/AKT 信号通路蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	PI3K	p-PI3K	AKT	p-AKT
对照组	0.20±0.02	0.91±0.04	0.20±0.02	0.89±0.06
mimic NC 组	0.21±0.01	0.90±0.05	0.21±0.03	0.91±0.05
miR-186 组	0.20±0.02	0.71±0.03 [*]	0.21±0.03	0.51±0.03 [*]
miR-186+抑制剂组	0.20±0.03	0.41±0.03 [#]	0.20±0.02	0.31±0.02 [#]
miR-186+激活剂组	0.21±0.02	0.91±0.04 [#]	0.20±0.01	0.81±0.02 [#]
F	0.205	94.640	0.167	134.385
P	0.930	<0.001	0.951	<0.001

注:与 mimic NC 组相比,^{*} $P<0.05$;与 miR-186 组相比,[#] $P<0.05$ 。

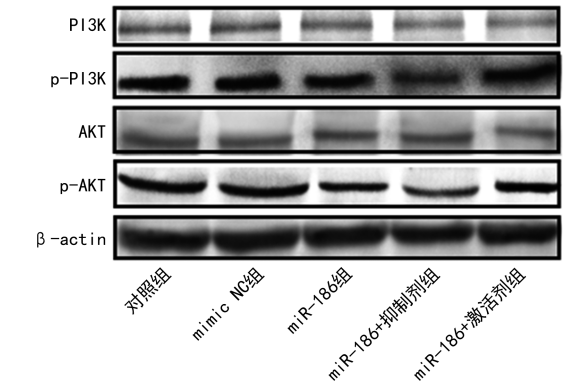


图 6 HL-60 细胞 PI3K/AKT 通路相关蛋白的表达

3 讨 论

急性髓系白血病属于髓系增生性肿瘤,具有克隆性髓系祖细胞分化为成熟血细胞过程中受抑制及多

系细胞减少的典型特征,特点是高异质性、高病死率。因而研究急性髓系白血病相关分子机制对该疾病治疗意义重大^[13-14]。miRNA 参与多种肿瘤细胞生长、分化和转移等生物学行为过程。在真核生物中由于 miRNA 表达水平稳定且易检测,越来越多的 miRNA 逐渐成为判断急性髓系白血病发生、发展和预后等方面的标志物。有研究表明,miRNA 家族成员之一的 miR-186,参与靶向调控多种基因,在胃癌、非小细胞肺癌和前列腺癌等不同肿瘤中 miR-186 表达水平均下降,miR-186 参与抑制细胞增殖、迁移和侵袭等过程^[15-17]。CUI 等^[18]研究表明,miR-186 能够在非小细胞肺癌的增殖和转移过程中起到抑制作用。在慢性淋巴细胞白血病、急性髓系白血病患者中 miR-186 表达水平下降^[19]。但具体关于 miR-186 与急性髓系白

血病作用机制的报道较少见。本研究结果显示,miR-186 组 HL-60 细胞增殖率和迁移率低于 mimic NC 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),提示 miR-186 对 HL-60 细胞有抑制增殖和迁移的作用,说明 miR-186 可有效抑制急性髓系白血病的发生、发展,这一结果也与 miR-186 在前列腺癌中的表达结果相似^[20]。

PI3K/AKT 通路在肿瘤细胞发生进程中具有重要调控作用,激活 PI3K/AKT 通路,可以促进细胞的增殖与转移。DONG 等^[15]在软骨细胞中的研究显示 miR-186 可以调控 PI3K/AKT 信号通路,付民等^[11]在肺腺癌中的研究也同样显示肿瘤细胞的增殖与迁移受 miR-186 激活 PI3K/AKT 通路的影响。本研究结果发现,miR-186 组 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白表达水平低于 mimic NC 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),提示 miR-186 过表达可以显著降低 HL-60 细胞 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白表达水平,这与高平章等^[21]对 PI3K/AKT 通路 with HL-60 细胞的研究结果相似。本研究发现,miR-186+抑制剂组 HL-60 细胞增殖率、迁移率、p-PI3K 和 p-AKT 蛋白表达水平低于 miR-186 组,miR-186+激活剂组 HL-60 细胞增殖率、迁移率、p-PI3K 和 p-AKT 蛋白表达水平高于 miR-186 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),提示随着 PI3K/AKT 通路抑制剂的加入,HL-60 细胞增殖率、迁移率、p-PI3K 和 p-AKT 蛋白表达水平降低,而加入 PI3K/AKT 通路激活剂后,则与抑制剂组有相反的趋势,表明 HL-60 细胞进程受抑制的作用机制与 miR-186 对 PI3K/AKT 通路的阻遏有关。

肿瘤细胞经过 EMT 获得间质表型进而具备转移能力等参与肿瘤进程^[22],EMT 的调控是一个复杂的网络机制,多种信号通路涉及其中,如核转录因子- κ B (NF- κ B)、PI3K/AKT、Janus 激酶 2 (JAK2)/信号转导及转录激活因子 3 (STAT3) 等。miRNA 在肿瘤的发生及转移中起重要作用。李京辉等^[23]在对胰腺癌细胞的研究中发现 miR-490-3p 可以通过抑制 EMT 进程,进而影响肿瘤细胞的发生、发展。ZHOU 等^[24]研究表明,miR-148a-3p 可以通过调控 EMT 进而抑制急性髓系白血病的进程。肿瘤细胞恶性增殖及迁移是肿瘤转移的重要原因,而肿瘤细胞 EMT 则是肿瘤转移的早期标志。本研究中,miR-186 组 E-cadherin 及其 mRNA 表达水平高于 mimic NC 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),N-cadherin、Vimentin、FN 及其 mRNA 表达水平低于 mimic NC 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);miR-186+抑制剂组 E-cadherin 及其 mRNA 表达水平高于 miR-186 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),N-cadherin、Vimentin、FN 及其 mRNA 表达水平低于 miR-186 组,差异均有统计

意义($P < 0.05$);miR-186+激活剂组 E-cadherin 及其 mRNA 表达水平低于 miR-186 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),N-cadherin、Vimentin、FN 及其 mRNA 表达水平高于 miR-186 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。以上结果提示 miR-186 抑制了 HL-60 细胞 EMT 进程,在加入 PI3K/AKT 信号通路抑制剂后,E-cadherin 及其 mRNA 表达水平进一步升高,N-cadherin、Vimentin、FN 及其 mRNA 表达水平降低,而激活剂组则与抑制剂组有相反的趋势。这说明 miR-186 通过阻遏 PI3K/AKT 信号通路抑制 HL-60 细胞 EMT 进程,从而影响 HL-60 细胞的增殖与迁移,这与付民等^[11]在肺腺癌中的研究结果相似,揭示 miR-186 能够通过阻遏 PI3K/AKT 通路来抑制肿瘤细胞的 EMT,进而抑制细胞增殖和迁移。

综上所述,miR-186 过表达可通过阻遏 PI3K/AKT 信号通路,抑制 HL-60 细胞 EMT,进而抑制 HL-60 细胞增殖和迁移,本研究为以 miR-186 为靶点开发新药治疗急性髓系白血病提供理论基础,但 miR-186 对 HL-60 细胞的增殖、迁移及 EMT 进程影响是否与其他机制有关需进一步深入研究。

参考文献

- [1] SWAMINATHAN M, WANG E S. Novel therapies for AML: a round-up for clinicians[J]. Expert Rev Clin Pharmacol, 2020, 13(12): 1389-1400.
- [2] WAN Q, TANG M, SUN S L, et al. SNHG3 promotes migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through the miR-186-5p/ZEB1 axis[J]. Am J Transl Res, 2021, 13(2): 585-600.
- [3] PAN G T, LIU Y H, SHANG L R, et al. EMT-associated microRNAs and their roles in cancer stemness and drug resistance[J]. Cancer Commun (Lond), 2021, 41(3): 199-217.
- [4] 谢惠君, RASHED N, 宁勇, 等. 循环 microRNA 作为肝细胞癌标志物的研究现状[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(2): 448-451.
- [5] 丁昊, 高振华, 郑云. microRNA 在前列腺癌诊断和治疗方面的研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2022, 27(6): 696-708.
- [6] NEVIANI P, WISE P M, MURTADHA M, et al. Natural killer-derived exosomal miR-186 inhibits neuroblastoma growth and immune escape mechanisms[J]. Cancer Res, 2019, 79(6): 1151-1164.
- [7] UNDI R B, KANDI R, GUTTI R K. microRNAs as haematopoiesis regulators [J]. Adv Hematol, 2013, 2013: 695754.
- [8] 王玉姣, 苏楠, 李艳, 等. miR-126 在急性髓系白血病中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(22): 4036-4040.
- [9] 雷静, 何平, 蔡文琳, 等. 冬虫夏草提取物通过抑制 PI3K/

Akt 通路抑制 HBx 诱导的系膜细胞增殖和细胞外基质沉积[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2022, 27(11): 1247-1254.

[10] NEPSTAD I, HATFIELD K J, GRØNNINGSAETER I S, et al. The PI3K-AKT-mTOR signaling pathway in human acute myeloid leukemia (AML) cells[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(8): 2907.

[11] 付民, 尹星, 常欢, 等. miR-186 通过 Shp2 和 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对肺腺癌细胞的抑制作用[J]. 实用癌症杂志, 2022, 37(3): 349-354.

[12] HILL M, TRAN N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer [J]. Dis Model Mech, 2021, 14(4): dmm047662.

[13] 刘硕, 周征, 翟文静, 等. 急性髓系白血病患者异基因造血干细胞移植后 aGVHD 的发生与移植物中免疫细胞成分的关系[J]. 中国实验血液学杂志, 2023, 31(2): 539-545.

[14] 党庆秀, 李洋, 郭嫣婷, 等. 基于基因表达数据库的急性髓系白血病细胞焦亡预后分析及 GZMB 调节机制研究[J]. 现代肿瘤医学, 2023, 31(18): 3376-3383.

[15] DONG Y, JIN X, SUN Z, et al. miR-186 inhibited migration of NSCLC via targeting cdc42 and effecting EMT process[J]. Mol Cells, 2017, 40(3): 195-201.

[16] HUA X, XIAO Y, PAN W, et al. miR-186 inhibits cell proliferation of prostate cancer by targeting GOLPH3 [J]. Am J Cancer Res, 2016, 6(8): 1650-1660.

[17] CAO C, SUN D, ZHANG L, et al. miR-186 affects the proliferation, invasion and migration of human gastric cancer by inhibition of Twist1 [J]. Oncotarget, 2016, 7(48): 79956-79963.

[18] CUI G, CUI M, LI Y, et al. miR-186 targets ROCK1 to suppress the growth and metastasis of NSCLC cells [J]. Tumour Biol, 2014, 35(9): 8933-8937.

[19] ZHANG T J, WANG Y X, YANG D Q, et al. Down-regulation of miR-186 correlates with poor survival in de novo acute myeloid leukemia[J]. Clin Lab, 2016, 62(1/2): 113-120.

[20] ZHAO X, WANG Y, DENG R, et al. miR186 suppresses prostate cancer progression by targeting twist1[J]. Oncotarget, 2016, 7(22): 33136-33151.

[21] 高平章, 韩旭花, 白赛赛, 等. 汉黄芩素抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路影响急性白血病 HL-60 细胞增殖[J]. 泉州师范学院学报, 2017, 35(6): 1-5.

[22] LAMBERT A W, WEINBERG R A. Linking EMT programmes to normal and neoplastic epithelial stem cells [J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(5): 325-338.

[23] 李京辉, 朱明, 曲海, 等. miR-490-3p 调控 SW1990 胰腺癌细胞上皮间充质转化[J]. 昆明医科大学学报, 2021, 42(3): 10-17.

[24] ZHOU H, JIA X, YANG F, et al. miR-148a-3p suppresses the progression of acute myeloid leukemia via targeting cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 4508-4519.

(收稿日期: 2023-08-30 修回日期: 2023-12-03)

(上接第 595 页)

[10] VINUESA C G, TANGYE S G, MOSER B, et al. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(11): 853-865.

[11] 许颢, 高建莉. $\gamma\delta$ T 细胞及其治疗感染性疾病的研究进展[J]. 中华细胞与干细胞杂志, 2021, 11(3): 179-183.

[12] 刘玉霞, 张彩. $\gamma\delta$ T 细胞对肿瘤发生、发展的影响及其在肿瘤免疫治疗中的应用[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(13): 1637-1642.

[13] 韩燕英. $\gamma\delta$ T 细胞在自身免疫病发病中的作用[J]. 江西医药, 2019, 54(8): 988-992.

[14] DUNNE P J, MAHER C O, FREELEY M, et al. CD3e expression defines functionally distinct subsets of V δ 1 T cells in patients with human immunodeficiency virus infection[J]. Front Immunol, 2018, 9: 940.

[15] 刘红利, 毛羽飞, 许铖铖, 等. 桥本甲状腺炎患者 $\gamma\delta$ T 细胞表面共刺激分子的表达及意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(2): 245-249.

[16] 吴啟洪, 朱婷婷, 冯婷等. $\gamma\delta$ T 细胞的分类及其功能特质研究的新进展[J]. 医学综述, 2016, 22(13): 2497-2501.

[17] LI H, PAUZA C D. Rapamycin increases the yield and effector function of human $\gamma\delta$ T cells stimulated in vitro [J]. Cancer Immunol Immunother, 2011, 60(3): 361-370.

[18] CONTI L, CASETTI R, CARDONE M, et al. Reciprocal activating interaction between dendritic cells and pamidonate stimulated gammadelta T cells: role of CD86 and inflammatory cytokines [J]. J Immunol, 2005, 174(1): 252-260.

[19] HU C Y, QIAN L, MIAO Y, et al. Antigen-presenting effects of effector memory V γ 9V δ 2 T cells in rheumatoid arthritis[J]. Cell Mol Immunol, 2012, 9(3): 245-254.

[20] XUE X H, SOROOSH P, LEON-TABALDO A D, et al. Pharmacologic modulation of ROR γ t translates to efficacy in preclinical and translational models of psoriasis and inflammatory arthritis[J]. Sci Rep, 2016, 6: 37977.

(收稿日期: 2023-09-13 修回日期: 2023-11-30)