

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.19.021

肿瘤干细胞标记物 CD₁₃₃ 与 miR-429 在大肠癌组织中的表达及其相关性研究

郭 枫 钟 鸣[△] 杨乃林 卞正乾 赵 刚

(上海交通大学医学院附属仁济医院普外科 上海 200127)

摘要 目的:检测 CD₁₃₃ 不同亚群大肠癌细胞 HT-29 的 miR-429 表达情况,探讨 miR-429 及 CD₁₃₃ 的表达与肿瘤的发生发展之间的关系。方法:采用荧光活化细胞分选法(FACS)分选出 CD₁₃₃ 不同亚群细胞,实时荧光定量 PCR 分别检测两组细胞 miR-429 的表达,合成 miR-429 寡核苷酸和阴性对照 miRNA 并分别转染 CD₁₃₃⁺ 和 CD₁₃₃⁻ 两个亚群细胞。再将细胞种植于非肥胖糖尿病 / 严重联合免疫缺陷 (NOD/SCID) 小鼠体内构建移植瘤模型,不同时间测量肿瘤体积和重量,RT-PCR 及蛋白质印迹检测 CD₁₃₃⁺ 和 CD₁₃₃⁻ 两组肿瘤 CD₁₃₃ mRNA 和蛋白质表达。结果:血清检出 CD₁₃₃⁺ 细胞为 67.9%,miR-429 的表达量是 CD₁₃₃⁺ 细胞的 (1.83±0.91) 倍 (P<0.05),CD₁₃₃⁺ 比例与 miR-429 表达呈负相关 (r=0.591, P<0.05);miR-429+/CD₁₃₃⁺ 组的移植瘤体积及重量与对照组比较有统计学差异 (P<0.05),且 miR-429+/CD₁₃₃⁺ 组成瘤时间较对照组晚约 2 周,但 miR-429+/CD₁₃₃⁺ 组的移植瘤 CD₁₃₃ 表达量低,与阴性对照组比较无明显差异 (P>0.05)。结论:miR-429 可能作为 CD₁₃₃ 的负性调控因子,具有抑制肿瘤生长的作用,但 miR-429 与 CD₁₃₃ 在肿瘤发生、发展过程中的作用机制有待进一步研究阐明。

关键词: 肿瘤干细胞;CD₁₃₃;miR-429

中图分类号: R735.34 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)19-3684-03

Corelation and Expressions of CD₁₃₃ and miR-429 in the Tissues of Colorectal Carcinoma

GUO Feng, ZHONG Ming[△], YANG Nai-lin, BIAN Zheng-qian, ZHAO Gang

(General Surgery, Renji Affiliated Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200127, China)

ABSTRACT Objective: To detect the expressions of miR-429 in different CD₁₃₃ subgroups on the HT-29 cells in the colorectal cancer tissues of which to explore the corelation between the occurrence and progression of tumors. **Methods:** The different CD₁₃₃ subgroup cells were sorted out by fluorescence activated cell sorting (FACS); the expression of miR-429 was detected by Real-time PCR; synthetic oligonucleotides of miR-429 and the negative control of microRNA were transfected in CD₁₃₃⁺ and CD₁₃₃⁻ subgroups; the non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency mice (NOD/SCID) were planted the transfected cells to construct the transplanted tumor model; the tumor volume and weight were measured in different time; the expression of CD₁₃₃ mRNA and protein in these two groups were detected by RT-PCR and western blotting. **Results:** The proportion of CD₁₃₃⁺ cells was 67.9%; the expression of miR-429 in CD₁₃₃⁻ cell was (1.83±0.91) times of CD₁₃₃⁺ cells (P<0.05); the corelation of CD₁₃₃⁺ ratio and the expression of miR-429 was negative (r=0.591, P<0.05); there were statistically significant differences in the volume and weight of transplanted tumors in miR-429+/CD₁₃₃⁺ between the two groups (P<0.05); the tumorigenicity of miR-429+/CD₁₃₃⁺ group was two weeks later than that of the control group, while the CD₁₃₃ expression was lower with no significant difference than the negative control group (P>0.05). **Conclusion:** It is suggested that the miR-429 might be a negative regulatory factor of CD₁₃₃ which could inhibite the growth of tumor. However, the mechanism of miR-429 and CD₁₃₃ in process of tumor occurrence and development needs to be further studied and clarified.

Key words: Tumor stem cell; CD₁₃₃; MiR-429

Chinese Library Classification: R735.34 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)19-3684-03

前言

结肠癌、大肠癌等上皮来源肿瘤的发生可能是由肿瘤干细胞(CSC)始动^[1-3]。肿瘤干细胞具有无限增殖和自我更新的能力,这与肿瘤的发生、生长、侵袭和转移密切相关^[4]。因此,有效地杀

灭和消除肿瘤干细胞、抑制其增殖及转移是治疗大肠癌的关键。CD₁₃₃ 是肿瘤干细胞的新型标志物,在肝癌和宫颈癌等肿瘤干细胞中表达,虽然 CD₁₃₃ 的功能还未阐明,但是目前研究认为 CD₁₃₃ 的表达与激活细胞干性相关的信号通路和抗细胞凋亡有关。结肠癌中同样存在 CD₁₃₃ 阳性的肿瘤干细胞^[5-7]。miR-429 在内的 miRNA-200 家族是一类上皮细胞标记物,在胃癌、卵巢癌等多种肿瘤中已证实了 miR-429 的重要生物学作用,但 miR-429 在大肠癌中的作用国内鲜有报道,本研究就 miR-429 在大肠癌中的作用及与 CD₁₃₃ 的关系进行探讨,以进一步说明其在大肠癌发生、发展过程中扮演的重要角色。

作者简介:郭枫(1983-),男,住院医师,硕士,主要从事结直肠肿瘤方向研究

[△]通讯作者:钟鸣,主要从事结直肠肿瘤方向研究

(收稿日期:2013-12-10 接受日期:2013-12-30)

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂

RPMI-1640 培养基及胎牛血清(Hyclone 公司);荧光活化细胞分选标记抗体 PE-CD₁₃₃(Santa Cruz);SYBR Green 实时定量 PCR 试剂盒 (TianGEN 公司);阳离子脂质体 TM2000 (Biotech);蛋白质印迹 CD₁₃₃ 抗体(Santa Cruz)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HT-29 细胞株购于中国科学院细胞库。在含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中培养细胞,并置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中,约 2-3 天 PBS 液清洗并换液 1 次,约每 5 天传代 1 次,取对数期生长的细胞用于实验。

1.2.2 荧光活化细胞分选法 用细胞刷刮取约 10⁶ 个 HT-29 细胞并置于试管中,用约 1.5 mL 无血清培养基清洗细胞,离心弃上清后用 100 μL PBS 液重悬细胞,分别在两管中加入 10 μL PE-CD₁₃₃ 抗体及 PE-IgG1 对照抗体,充分混匀后冰上孵育 30 分钟,加入约 10 倍体积 PBS 液清洗细胞,离心后用 300 μL PBS 液重悬细胞,流式细胞仪分析 CD₁₃₃ 细胞比率。

1.2.3 实时定量 PCR 采用 TRIzol 试剂提取分选得到的不同亚群细胞的总 RNA,反转录后获得各组细胞的 cDNA,各组 cDNA 分别梯度稀释,采用实时定量试剂盒在 ABI 7300 Real-time PCR 仪上检测目的基因 miR-429 和内参基因 U6 snRNA 的表达水平。计算各组 3 个重复样品 miR-429 和 U6 snRNA 的平均 Ct 值后,应用 U6 snRNA 对各组进行校正(ΔCt),再取对数,比较各组样品 miR-429 的差异,然后把两组样品的 ΔCt 归一化处理(ΔΔCt),最后相对定量法(RQ=2^{-ΔΔCt})计算 CD₁₃₃⁻ 组相对于 CD₁₃₃⁺ 组细胞 miR-429 基因表达的差异。

1.2.4 miR-429 稳定转染细胞的构建 用在线设计软件设计 miR-429 寡核苷酸并进行同源性分析,从中筛选出 5 对单链寡核苷酸并交由武汉博士德有限公司合成;将合成的单链寡核苷酸溶解于双蒸水中,使其终浓度为 200 μM,取等量各对单链与退火缓冲液混合,于 95℃ 孵育 4 分钟后逐渐冷却至室温以进行退火反应,用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *NotI* 将其连接至质粒 pGEx-4T-1,将产物转化大肠杆菌,挑单菌落并提取目标质粒,扩增和双酶切鉴定后测序。用阳离子脂质体将 pGEx-4T-1-miR-429 转染 CD₁₃₃⁺ 细胞,而未装载 miR-429 寡核苷酸的 pGEx-4T-1 空质粒作为阴性对照转染 CD₁₃₃⁻ 细胞,最终获得稳定表达转染细胞株。

1.2.5 移植瘤模型构建、肿瘤生长和 CD₁₃₃ 表达情况 本研究已获本院动物实验管理委员会批准。将随机选取的 40 只 8 周龄 NOD/SCID 小鼠分为两组,每组 20 只,分别为与上述稳定转染细胞株相对应的 miR-429+/CD₁₃₃⁺ 组(实验组)和 miR-429-/CD₁₃₃⁻ 组(对照组),处理方法为各组小鼠均预先非致死量射线(350cGy)照射,然后在麻醉条件下,分别将相应的适量细胞悬液与基质成分混合后,采用多时间点注射方式注射接种于不同组别的小鼠肾被膜下,每次注射约 20 μL,每 2 天注射 1 次,共注射 6 次。从开始出现肉眼可见肿瘤起测量移植瘤的最长径和最短径,以计算肿瘤体积大小。肿瘤体积(V)=(Max×Min²)/2,每 1 周测量 1 次,直至第 16 周末结束。最后处死所有小鼠,手术切除肿瘤后称重和体积测量,并采用半定量

RT-PCR 及蛋白质印迹检测两组肿瘤组织细胞 CD₁₃₃ 的表达。

1.3 统计学方法

统计软件选用 SPSS 11.5.0,计数资料采用独立样本 t 检验;相关统计分析采用 Spearman 等级相关分析,P<0.05 的差异表示有统计学意义。

2 结果

2.1 大肠癌 HT-29 细胞分选和不同亚群 miR-429 表达情况

大肠癌细胞 HT-29 经 FACS 分选,CD₁₃₃⁺ 细胞比例为 67.9%;实时定量 PCR 分析结果显示:CD₁₃₃⁺ 细胞与 CD₁₃₃⁻ 细胞的 miR-429 表达灰度值分别为(41.21±10.76 和 24.98±8.42),两者有统计学差异(P<0.05),miR-429 在 CD₁₃₃⁻ 细胞的表达量是 CD₁₃₃⁺ 细胞的(1.83±0.91)倍。在 HT-29 细胞中,CD₁₃₃⁺ 细胞比例与 miR-429 表达呈负相关(r=0.591,P<0.05)。

2.2 小鼠移植瘤生长情况和 CD₁₃₃ 表达情况

两组均发现有移植瘤形成,成瘤率为 100%,且无小鼠死亡。在 16 周的观察期内,对照组的平均成瘤时间为 11±2 天,实验组移植瘤成瘤时间较对照组晚约 2 周;两组移植瘤体积测量结果比较,实验组小于对照组,且具有统计学差异(P<0.05)(图 1);16 周后实验组移植瘤重量和体积分别为(1.773±0.306)g 和 (1.234±0.259)cm³ 均较对照组的 (2.255±0.348)g 和 (1.791±0.214)cm³ 小,且差异有统计学差异(P<0.05);实验组移植瘤 CD₁₃₃ mRNA 和蛋白质表达量较低,但两组与内参的比值无明显差异(P>0.05)(图 2、3)。

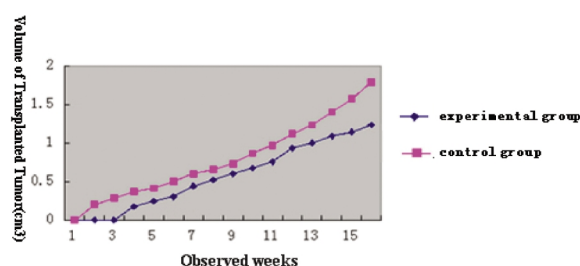


图 1 小鼠体内移植瘤体积变化(P<0.05)

Fig. 1 The change of tumor volume in mice (P<0.05)

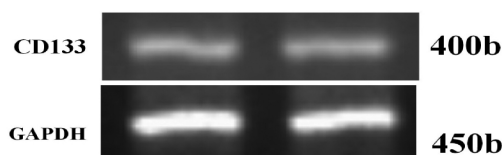


图 2 实验组与对照组移植瘤 CD₁₃₃ mRNA 表达(RT-PCR)

Fig. 2 Expression of CD₁₃₃ mRNA in the tissues of transplanted tumor between the experimental group and the control group(RT-PCR)

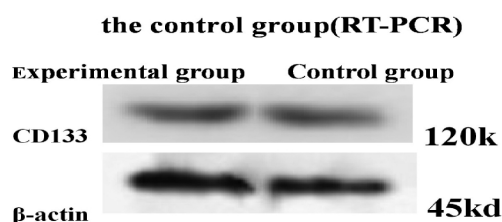


图 3 实验组与对照组移植瘤 CD₁₃₃ 蛋白表达(蛋白质免疫印迹)

Fig. 3 Expression of CD₁₃₃ protein in tumor tissues between the experimental group and the control group(Western blot)

3 讨论

近期研究证明,恶性肿瘤中存在一类异质性细胞,它有生成完整肿瘤,并且具有侵袭性和形成转移灶的能力,这些细胞可能是由成体干细胞转化而来,这类细胞就是肿瘤干细胞^[8-10]。并已从包括大肠癌在内的多种实体恶性肿瘤中分离出该细胞,他们同其他类型细胞一样,具有多个特异性细胞标记物,但在大肠癌中研究的最多的是 CD₁₃₃, 且被认为是多种干细胞的标志物之一^[11,12]。

本研究中,我们发现 HT-29 中大多数细胞(67.9%)为 CD₁₃₃ 阳性,在一定程度上验证了大肠癌的发生与肿瘤干细胞的始动作用存在密切关系^[13]。大量研究发现,miRNA 作为一个庞大的基因家族,可通过与 3' 端非翻译区(UTR)特异性结合来抑制蛋白翻译或导致靶 mRNA 降解的形式调节转录后的基因表达^[14,15],这与多种疾病的发生、发展和侵袭转移等相关。miR-429 作为 miR-200 家族基因中的一员,可能具有与原癌基因或者抑癌基因相类似的生物学作用。通过基因芯片技术发现,较癌旁组织和正常对照组,胃癌组织和细胞的 miR-429 表达均明显下调^[16]。miR-429 在内的多种 miR-200 家族基因可以通过减少乳腺癌细胞 c-myc 的表达而发挥其抑制肿瘤的作用^[17,18]。在大肠癌方面,虽然通过与正常组比较,大肠癌组织中 miR-429 高表达,表明了 miR-429 可能与大肠癌的发生呈正相关,但未就大肠癌的不同亚群细胞进行 CD₁₃₃ 等标志物的分选和体内移植瘤实验,所以未能充分说明 miR-429 在肿瘤干细胞相关肿瘤发生机制方面的作用^[19]。国内目前也未见对肿瘤干细胞标记物 CD₁₃₃ 与 miR-429 关系的研究报道。在本次研究中发现,CD₁₃₃ 分选后的大肠癌细胞出现了 miR-429 在 CD₁₃₃⁺ 细胞中富集的现象,并且呈负相关,我们推测 miR-429 可能是 CD₁₃₃ 的一种负性调控因子。此外,本实验也证实 miR-429 质粒转染 CD₁₃₃⁺ 细胞后出现了 CD₁₃₃ 表达明显减少的现象,并与 CD₁₃₃⁻ 细胞组无显著差异,所以 miR-429 可能具有负性调节 CD₁₃₃ 表达的作用。而有报道^[20]发现,CD₁₃₃⁻ 细胞在同等条件下并不能形成肿瘤,但在不同标本中,相同量的同一表型细胞群成瘤能力有较大差别,所以在本次实验中,我们推测 CD₁₃₃⁻ 细胞出现的成瘤现象可能与存在其他表型肿瘤干细胞有关。在本次小鼠移植瘤实验中,我们发现 miR-429 在降低 CD₁₃₃ 表达的同时,可能通过抑制 CD₁₃₃ 表达而抑制肿瘤的干性,从而出现肿瘤生长抑制的现象,相应表现为移植瘤出现时间较对照组晚,肿瘤体积和重量也较小,但是两者间的具体机制还有待进一步研究阐明。

参考文献(References)

- [1] Soltysova A, Altanerova V, Altanner C, et al. Cancer stem cells[J]. Neoplasma, 2005, 52(6): 435-440
- [2] Ricci Vitonti L, Lombardi DG, Pillozzi E, et al. Identification and expansion of human colon cancer initiating cells [J]. Nature, 2007, 445(7123): 111-115
- [3] Stin O J. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells[J]. Nature, 2006, 439(7079): 993-997
- [4] Dykxhoorn DM, Chowdhury D, Lieberman J. RNA interference and cancer: endogenous pathways and therapeutic approaches [J]. Adv Exp Med Biol, 2008, 615: 299-329
- [5] 邓黎莉, 乞宗泰, 黄欢, 等. 大肠癌组织及癌旁组织中 c-myc, COX-2 和 CD44v6 基因表达量差异的检测 [J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(5): 818-822, 831
- [6] Deng Li-li, Qi Zong-tai, Huang Huan, et al. Differential expression detection of c-myc, COX-2 and CD44v6 genes in colorectal cancer tissues and adjacent corresponding nonmalignant tissues [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(5): 818-822, 831
- [7] Cesi V, Casciati A, Sesti F, et al. TGFβ⁻ induced c-Myb affects the expression of EMT-associated genes and promotes invasion of ER+ breast cancer cells[J]. Cell Cycle, 2011, 10(23): 4149-4161
- [8] Li J, Du L, Yang Y, et al. MiR-429 is an independent prognostic factor in colorectal cancer and exerts its anti-apoptotic function by targeting SOX2[J]. Cancer Lett, 2013, 329(1): 84-90
- [9] Stratmann J, Wang CJ, Gnosa S, et al. Dicer and miRNA in relation to clinicopathological variables in colorectal cancer patients [J]. BMC Cancer, 2011, 11: 345
- [10] Zhang H, Li W, Nan F, et al. MicroRNA expression profile of colon cancer stem-like cells in HT29 adenocarcinoma cell line[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 404(1): 273-278
- [11] Colangelo T, Fucci A, Votino C, et al. MicroRNA-130b Promotes Tumor Development and Is Associated with Poor Prognosis in Colorectal Cancer[J]. Neoplasia, 2013, 15(10): 1218-1231
- [12] Cho KH, Park S, Lee KS, et al. A single measure of cancer burden in Korea from 1999 to 2010 [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(9): 5249-5255
- [13] Gharagozloo M, Mirzaei HR, Bagherpour B, et al. Cell cycle analysis of the CD₁₃₃⁺ and CD₁₃₃⁻ cells isolated from human colorectal cancer[J]. J Cancer Res Ther, 2012, 8(3): 399-403
- [14] Lu J, Ye X, Fan F, et al. Endothelial cells promote the colorectal cancer stem cell phenotype through a soluble form of Jagged-1 [J]. Cancer Cell, 2013, 23(2): 171-185
- [15] Lee HN, Park SH, Lee EK, et al. Proteomic profiling of tumor-initiating cells in HT-29 human colorectal cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 427(1): 171-177
- [16] Peickert S, Waurig J, Dittfeld C, et al. Rapid re-expression of CD133 protein in colorectal cancer cell lines in vitro and in vivo [J]. Lab Invest, 2012, 92(11): 1607-1622
- [17] Zvibel I, Wagner A, Pasmanik-Chor M, et al. Transcriptional profiling identifies genes induced by hepatocyte-derived extracellular matrix in metastatic human colorectal cancer cell lines [J]. Clin Exp Metastasis, 2013, 30(2): 189-200
- [18] Wang C, Xie J, Guo J, et al. Evaluation of CD44 and CD133 as cancer stem cell markers for colorectal cancer [J]. Oncol Rep, 2012, 28(4): 1301-1308
- [19] Chew MF, Teoh KH, Cheah PL. CD₁₃₃ marks for colorectal adenocarcinoma[J]. Malays J Pathol, 2012, 34(1): 25-28
- [20] 汪睿, 朱俊东. 围手术期免疫增强型肠内营养对大肠癌患者免疫功能的影响[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(20): 3876-3879
- [21] Wang Rui, Zhu Jun-dong. Effect of peri-operative immune-enhanced enteral diet on immunological function in colorectal carcinoma patient[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(20): 3876-3879
- [22] Yasuda H, Tanaka K, Okita Y, et al. CD133, OCT4, and NANOG in ulcerative colitis-associated colorectal cancer [J]. Oncol Lett, 2011, 2(6): 1065-1071