



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.01.012
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.01.012
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(1):77-82.

· 基础研究 ·

下调 CD133 表达对肝癌细胞恶性生物学行为的影响

牛坚, 朱乐乐, 王月, 刘斌

(江苏省徐州医学院附属医院 普通外科, 江苏 徐州 221002)

摘要

目的: 探讨下调 CD133 基因的表达对肝癌细胞生物学行为的影响。

方法: 将合成的 CD133 小干扰核糖核酸分子 (siRNA) 转染至肝癌 SMMC7721 细胞并检测转染效率; 分别以无转染与转染随机 siRNA 序列的 SMMC7721 细胞为空白对照和阴性对照, 观察 CD133 siRNA 转染后 CD133 基因沉默效果, 以及 SMMC7721 细胞主要生物学行为的变化。

结果: 转染 24 h 后, 转染效率可达到 $(80.8 \pm 9.1)\%$; 与空白对照组比较, CD133 siRNA 转染后的 SMMC7721 细胞 CD133 mRNA 及蛋白表达量分别降至空白对照组的 10% 与 35%、细胞增殖活性明显降低、细胞凋亡率明显增加 (41.3% vs. 25.3%) 并出现明显的 S 期阻滞, 集落形成能力明显降低 (均 $P < 0.05$)。阴性对照组与空白对照组各指标无统计学差异 (均 $P > 0.05$)。

结论: CD133 在肝癌细胞中可能起了癌基因作用, 下调其表达能抑制肝癌的恶性生物学行为。

关键词

癌, 肝细胞; 肿瘤干细胞; CD133
中图分类号: R735.7

Impact of CD133 expression down-regulation on malignant biological behaviors of liver cancer cells

NIU Jian, ZHU Lele, WANG Yue, LIU Bin

(Department of General Surgery, Affiliated Hospital, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract

Objective: To investigate the influence of downregulating CD133 gene expression on biological behaviors of human liver cancer cells.

Methods: Liver cancer SMMC7721 cells were transfected with the synthesized CD133 siRNA and then transfection efficiency was determined. Using SMMC7721 cells without transfection or transfected with scrambled siRNA sequence as blank control and negative control respectively, the effect of CD133 gene silencing, and changes in the main biological behaviors in SMMC7721 cells after CD133 siRNA transfection were observed.

Results: The transfection efficiency reached $(80.8 \pm 9.1)\%$ at 24 h after transfection. Compared with blank control group, in SMMC7721 cells after CD133 siRNA transfection, the expression level of CD133 mRNA and protein was reduced to 10% and 35% of the level in blank control group respectively, the proliferative activity was significantly decreased, apoptosis rate was significantly increased with a marked S-phase arrest, and colony-forming ability was significantly decreased (all $P < 0.05$). All indexes did not show any significant difference between negative control

基金项目: 江苏省 333 人才基金项目资助 (III-2290); 天晴甘美基金项目资助 (CFHPC20132020)。

收稿日期: 2015-10-09; 修订日期: 2015-12-15。

作者简介: 牛坚, 江苏省徐州医学院附属医院副教授, 主要从事肝癌的临床和基础方面的研究。

通信作者: 牛坚, Email: njn_001@163.com

group and blank control group (all $P > 0.05$).

Conclusion: CD133 gene may play an oncogene role in liver cancer cells and down-regulating its expression can suppress the malignant activity of liver cancer.

Key words Carcinoma, Hepatocellular; Neoplastic Stem Cells; CD133

CLC number: R735.7

肝癌是一种恶性肿瘤，在全球和我国都有着极高的发病率和病死率。但是，其发病原因和发病机制目前仍不清楚，肿瘤干细胞（cancer stem cells, CSC）学说为研究肝癌病因和机制提供了一个全新的研究方向^[1-2]。CD133作为肿瘤干细胞特征性的表面标志物之一，在肝癌的发生和发展上有重要意义，在研究中已得到初步证实^[3-5]。本研究为了探讨CD133与肝癌细胞生物学特性之间的关系，通过小干扰RNA（small interfering RNA, siRNA）抑制SMMC7721肝癌细胞CD133的表达，来观察其对细胞增殖、凋亡和细胞周期等影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

鼠抗人单克隆抗体CD133购自于Sigma公司；脂质体（Lipofectamin2000）、AnnexinV/PI试剂盒：Invitrogen公司；CCK-8试剂盒：DOJINDO公司。

1.2 CD133 小干扰 RNAsiRNA 的设计与合成

通过siDESIGN Center网站的siRNA设计软件，设计针对CD133的特异性siRNA片段，正义链为5'-GUC CUU CCU AUA GAA CAA U-3'，反义链：为5'-CAG GAA GGA UAC UUG UUA-3'。同时设计并合成阴性对照siRNA序列，正义链为ATA CGG ATC ATA AGT TGAG -3'，反义链：为5'-CTC AAC TTA TGA TCC GTA T-3'。由上海吉玛生物工程公司合成。

1.3 实验方法

1.3.1 siRNA 片段转染效率的测定 通过Lipofectamine 2000将相应的siRNA转染至细胞内，24 h后撤离转染液，换为无血清的DMEM培养基。利用荧光标记的siRNA（FAM-siRNA）对细胞进行转染，通过共聚焦显微镜荧光计数检测其转染效率。

1.3.2 RNA 干扰 CD133 效率的评估 (1) RT-

PCR 检测 CD133 mRNA 水平的变化：TRIzol 法提取各组细胞的总 RNA，逆转录反应使用随机引物 OligdT_s 合成第一链（严格按照厂家说明书进行），在 20 μL 反应体系中加入 2 μg 总 RNA。PCR 引物序列为：CD133 上游 5'-TGC CAG AAC TTC ATC ACA AAC AAT-3'，下游 5'-TAG GAC AAT ACT GTT CGG GTA GTGT-3'，扩增产物为 425 bp；内参照 β-actin 上游 5'-GTG AAG GTG ACA GCA GTC GGT T-3'，下游 5'-CAG TGT ACA GGT AAG CCC TG-3'。退火温度均为 55 °C。在同一条件下，每次 PCR 以 β-actin 为内参照，PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像仪扫描成像，表达丰度以特异基因条带亮度与内参照的比值表示。

(2) Western blot 检测 CD133 蛋白水平的变化：取 40 μg 细胞裂解液与上样缓冲液混合，煮沸 10 min 后上样，进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳条件：60 V, 30 min; 160 V, 1.5 h。电泳结束后转膜，甲醇固定，用含 5% 脱脂奶粉的封闭液 4 °C 孵育过夜。一抗 10 mL（1:1 500 稀释）室温孵育 2 h，二抗 10 mL（1:5 000 稀释）室温孵育 2 h 后，PVDF 膜用 ECL 化学发光试剂盒处理并在暗室显影。

1.3.3 细胞培养及分组 细胞用含 10% 的小牛血清 DMEM 常规培养，实验所用细胞均处在对数生长期。根据实验要求分为：(1) 空白对照组，无处理 SMMC7721 细胞；(2) 阴性对照组，SMMC7721 细胞转染 CD133 随机序列；(3) CD133 干扰组，SMMC7721 细胞转染 CD133 siRNA。

1.3.4 CD133 对 SMMC7721 细胞增殖的影响 参照 DOJINDO 的 Cell Counting Kit-8，具体操作见参考文献^[6]。每孔设 3 个复孔。

1.3.5 细胞凋亡检测 转染 24 h 后，收集各组细胞后加入 20 ng/mL EGF 及 10 ng/mL bFGF 的无血清 DMEM 培养液，培养 96 h 后，用 AnnexinV/FITC 和 PI 染色，样品用流式细胞仪分析检测细胞凋亡情况。

1.3.6 细胞周期检测 各组细胞经 PBS 离心冲洗

2次,以70%乙醇固定30 min,离心去固定液,PBS洗1次,1×PBS重悬细胞,加入碘化丙啶染液和Rnase,37℃避光30 min,流式细胞仪分析细胞周期。数据分析用Multicycles软件分析结果。

1.3.7 平板集落形成实验 转染24 h后,各组细胞经G418(800 μg/mL)筛选培养3周后得到抗药性克隆。经考马斯亮兰染色拍照。

1.4 统计学处理

使用SAS 6.12软件进行统计学分析,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差

分析及LSD-*t*检验进行多组间均数的比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染效率

用Lipofectamin2000转染siRNA片段于细胞24 h后,大部分细胞带有绿色荧光,转染效率可达到(80.8±9.1)% (图1)。

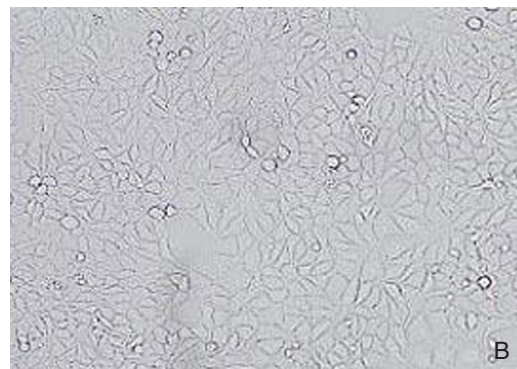
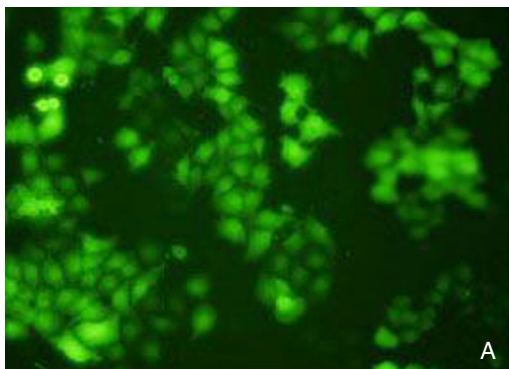


图1 荧光标记siRNA转染(×100) A:明视野;B:暗视野

Figure 1 Immunofluorescence staining for siRNA transfection (×100) A: Bright field; B: Dark field

2.2 RT-PCR 结果

RT-PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳,可见一特异性条带,定量分析显示,CD133干扰组CD133 mRNA的表达量为空白对照组的10% ($P=0.001$)、阴性对照组的12% ($P=0.001$);阴性对照组与空白对照组间CD133 mRNA表达量差异无统计学意义($P > 0.05$) (图2)

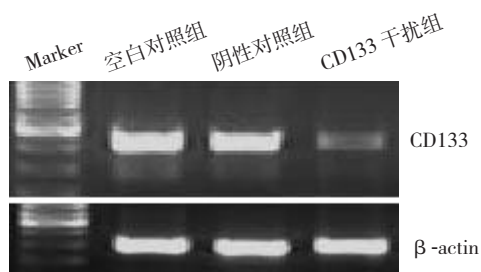


图2 RT-PCR检测CD133 mRNA表达

Figure 2 RT-PCR detection of CD133 mRNA expression

2.3 Western blot 结果

CD133干扰组CD133蛋白的表达明显低于空白对照组和阴性对照组(图3),经灰度扫描分析,

其蛋白表达量为空白对照组的35% ($P=0.002$)和阴性对照组的33% ($P=0.001$);阴性对照组与空白对照间CD133蛋白表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。

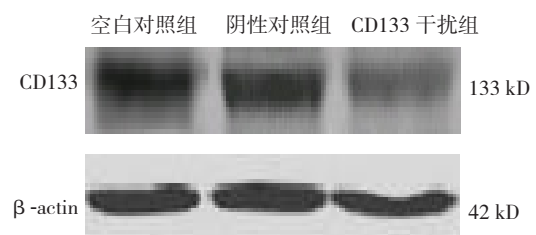


图3 Western blot检测CD133蛋白表达

Figure 3 Western blot analysis of CD133 protein expression

2.4 细胞增殖检测结果

实验结果显示,CD133干扰组在3、4、5、6、7 d时OD值均低于各自时间点的空白对照组与阴性对照组,并随时间推移差异逐渐增大,均有统计学意义(均 $P < 0.05$),而阴性对照组与空白对照组在各时间点的细胞增殖能力没有明显差异(均 $P > 0.05$) (图4)。

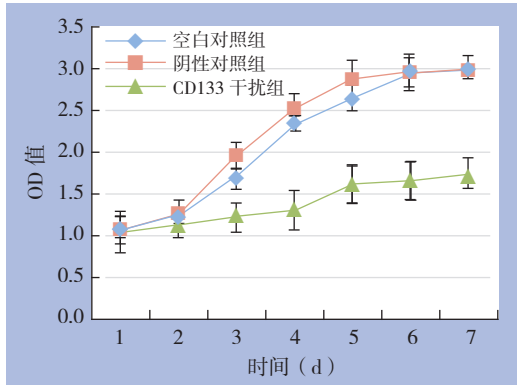


图 4 细胞生长曲线
Figure 4 Cell growth curves

2.5 细胞凋亡检测结果

采用AnnexinV/PI染色分析细胞凋亡情况,结果显示,CD133干扰组细胞AnnexinV阳性凋亡细胞比例(41.3%)比例较空白对照组(25.3%)、阴性对照组(24.3%)明显增加(均 $P < 0.05$);后两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)(图5)。

2.6 细胞周期分布检测结果

CD133干扰组 $G_0 \sim G_1$ 期比例较空白对照组、阴性对照组降低,但差异无统计学意义(均 $P > 0.05$);CD133干扰组S期比例较空白对照组($P = 0.002$)、阴性对照组($P = 0.002$)增高,差异有统计学意义(表1)。

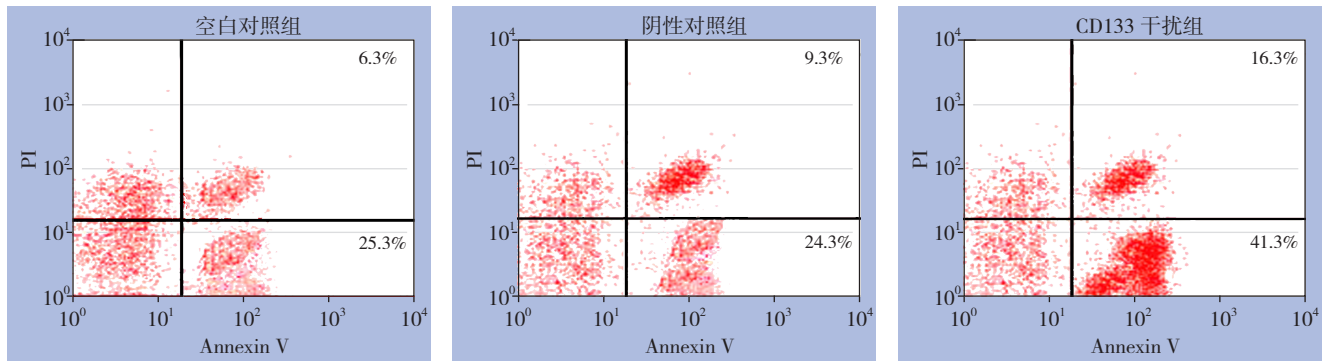


图 5 AnnexinV/PI 检测细胞凋亡
Figure 5 AnnexinV/PI analysis of cell apoptosis

表 1 各组细胞周期分布 (%)

Table 1 Cell cycle distributions in each group of cells (%)

组别	G_0/G_1	G_2/M	S
空白对照组	65.43	17.19	17.38
阴性对照组	64.59	18.24	17.17
CD133 干扰组	60.12	12.14	29.74

2.7 集落形成实验

以直径 >1 mm细胞团算一个集落形成,结果显示,CD133干扰组其集落密度明显低于空白对照组和阴性对照组(126 vs. 349),差异有统计学意义($P < 0.05$);阴性对照组与空白对照组间无明显差异(367 vs. 349)($P > 0.05$)(图6)。

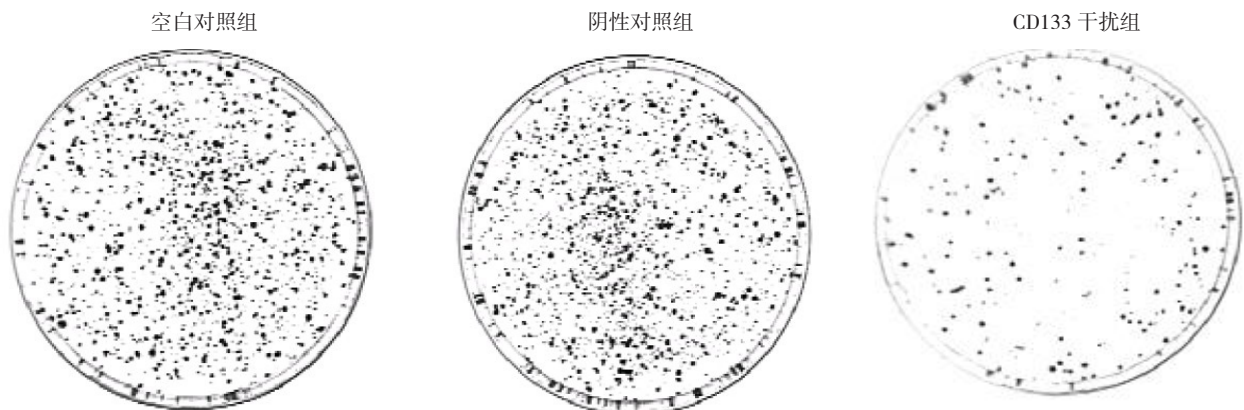


图 6 集落形成实验
Figure 6 Colony formation assay

3 讨论

肿瘤干细胞学说的观点是:肿瘤的形成、发展、转移及复发的关键是由少数具有自我更新,无限增殖及多向分化潜能的细胞导致的。在乳腺癌、脑胶质瘤、结肠癌等实体瘤中都发现了肿瘤干细胞,实验室中已经成功分离这些肿瘤干细胞,研究这些分离得到的肿瘤干细胞的体外和体内的生物学性状都进一步证实了肿瘤干细胞学说的可靠性^[7-9]。

CD133是1997年发现于人胚胎、骨髓及外周血中的造血干细胞的特异性表面标记物,是最重要的肿瘤干细胞标记物,CD133分子作为肿瘤干细胞的标记已在胰腺癌^[10-11]、肝细胞肝癌^[12-13]及结直肠癌^[14-15]等肿瘤组织中得到证实,研究^[16-19]认为CD133参与形成和维持细胞膜突起部的不同形态,通过细胞膜突起的改变,可能影响细胞的极性、迁移及其与相邻细胞的作用。

研究^[4, 20-21]发现,CD133⁺细胞存在于肝癌细胞系SMMC7721、肝硬化组织和原发性肝癌组织中,并且CD133⁺肝癌细胞系在裸鼠中具有高成瘤性。很多研究支持CD133信号和肿瘤发展有密切联系,使人们对肿瘤治疗靶点CD133的研究产生更加浓厚的兴趣。

本研究通过利用RNA干扰封闭肝癌SMMC7721细胞的CD133的表达,发现表达CD133低表达时,CD133干扰组细胞生长曲线比空白对照组、阴性对照组明显下降;用流式细胞术分析细胞周期发现,CD133干扰组与空白对照组、阴性对照组比较,G₀~G₁期比例均降低,但差异无统计学意义(P>0.05);而CD133干扰组S期比例明显增高,差异有统计学意义(P<0.05);通过AnnexinV/PI染色分析发现CD133干扰组细胞AnnexinV阳性凋亡细胞比例比空白对照组、阴性对照组显著增加,这与其他恶性肿瘤的研究结果相符^[22]。

肿瘤干细胞的另一个显著特性是具有较强的细胞集落形成能力。本研究发现,抑制肝癌细胞CD133表达时细胞集落形成率能力显著降低。而在结肠癌研究中发现^[23-24],CD133阳性结肠癌细胞的细胞集落形成能力显著高于CD133阴性细胞,进一步说明了CD133具有促进细胞集落形成的能力。

细胞周期是细胞生命活动的基本过程,细

胞在周期时相的变迁中进入增殖、分化、衰老和死亡等生理状态。肿瘤干细胞具有和干细胞相似的特性,干细胞是处于相对静止的一群细胞,具有慢周期的特点^[25],干细胞的这种特点虽有利于防止体内未成熟细胞的消耗,也可能是传统治疗无法彻底杀灭肿瘤干细胞,成为复发转移的根源。本研究结果显示,CD133干扰组细胞中S期细胞占29.74%,而对空白对照组和阴性对照组S期细胞占17.38%和17.17%,差异有统计学意义(P<0.05)。CD133干扰组的G₀~G₁期比例有所下降,虽然与对照组比较差异不具统计学意义,但需要注意,该结果仅能说明CD133干扰组对整体SMMC7721细胞群的影响。众所周知,肿瘤干细胞常处于G₀~G₁期,笔者推测,CD133功能可能并非与细胞周期直接相关,但抑制CD133表达却可能影响到SMMC7721细胞中肿瘤干细胞的状态,导致其细胞周期分布产生变化,从G₀~G₁期进入S期,而由于肿瘤干细胞在恶性肿瘤中只占少部分,因此这样的变化对整体CD133干扰组细胞群的细胞周期分布影响并不很明显。而且由于G₀~G₁期细胞总数比S期多,因此这部分细胞从G₀~G₁期进入S期仅引起了S期比例变化。若将研究对象从全部肝癌细胞变为其中的肿瘤干细胞,分析CD133对这部分肿瘤干细胞细胞周期的影响,应该能得到更为显著的结果。

综上所述,CD133 siRNA成功转染并抑制SMMC7721细胞CD133基因的表达,CD133基因表达被抑制以后,细胞的增殖活性和细胞集落球形成能力等恶性表型显著降低,其机制有待深入研究。针对CD133靶向治疗是肝癌生物治疗是一个值得关注的研究方向。

参考文献

- [1] Hu M, Xiang FX, He YF. Are cancer stem cells the sole source of tumor?[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2014, 34(5):621-625.
- [2] Michishita M, Ezaki S, Ogihara K, et al. Identification of tumor-initiating cells in a canine hepatocellular carcinoma cell line[J]. Res Vet Sci, 2014, 96(2):315-322.
- [3] Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, et al. Cancer stem cells: an evolving concept[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(2):133-143.
- [4] Romano M, De Francesco F, Pirozzi G, et al. Expression of cancer stem cell biomarkers as a tool for a correct therapeutic approach to

- hepatocellular carcinoma[J]. *Oncoscience*, 2015, 2(5):443-456.
- [5] Ji J, Wang XW. Clinical implications of cancer stem cell biology in hepatocellular carcinoma[J]. *Semin Oncol*, 2012, 39(4):461-472.
- [6] 周密, 汤成泳, 张国庆, 等. 上调miR-101对肝细胞癌生物学行为的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(7):963-969.
- Zhou M, Tang CY, Zhang GQ, et al. Impact of upregulating miR-101 on biological behavior of hepatocellular carcinoma[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2015, 24(7):963-969.
- [7] Schulenburg A, Blatt K, Cerny-Reiterer S, et al. Cancer stem cells in basic science and in translational oncology: can we translate into clinical application?[J]. *J Hematol Oncol*, 2015, 8:16. doi: 10.1186/s13045-015-0113-9.
- [8] Liao WT, Ye YP, Deng YJ, et al. Metastatic cancer stem cells: from the concept to therapeutics[J]. *Am J Stem Cells*, 2014, 3(2):46-62.
- [9] Mertins SD. Cancer stem cells: a systems biology view of their role in prognosis and therapy[J]. *Anticancer Drugs*, 2014, 25(4):353-367.
- [10] 朱建伟, 熊力, 马望, 等. 胰腺癌干细胞研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(9):1304-1309.
- Zhu JW, Xiong L, Ma W, et al. Research progress of pancreatic cancer stem cells[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2015, 24(9):1304-1309.
- [11] Tang SC, Chen YC. Novel therapeutic targets for pancreatic cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(31):10825-10844.
- [12] 程康文, 詹勇强, 王成友, 等. 肝癌干细胞标志物研究的进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(1):110-115.
- Cheng KW, Zhan YQ, Wang CY, et al. Advances in research of liver cancer stem cell markers[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2015, 24(1):110-115.
- [13] Tu T, Budzinska MA, Maczurek AE, et al. Novel aspects of the liver microenvironment in hepatocellular carcinoma pathogenesis and development[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(6):9422-9458.
- [14] Ren F, Sheng WQ, Du X. CD133: a cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(17):2603-2611.
- [15] Grunt TW, Hebar A, Laffer S, et al. Prominin-1 (CD133, AC133) and dipeptidyl-peptidase IV (CD26) are indicators of infinite growth in colon cancer cells[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(2):560-574.
- [16] Irollo E, Pirozzi G. CD133: to be or not to be, is this the real question?[J]. *Am J Transl Res*, 2013, 5(6):563-581.
- [17] Gaedcke S, Braun F, Prasad S, et al. Noninvasive positron emission tomography and fluorescence imaging of CD133+ tumor stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(6):E692-701.
- [18] Rappa G, Mercapide J, Anzanello F, et al. Wnt Interaction and extracellular release of prominin-1/CD133 in human malignant melanoma cells[J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(6):810-819.
- [19] Polacheck WJ, Zervantonakis IK, Kamm RD. Tumor cell migration in complex microenvironments[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(8):1335-1356.
- [20] Sukowati CH, Anfuso B, Crocè LS, et al. The role of multipotent cancer associated fibroblasts in hepatocarcinogenesis[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15:188. doi: 10.1186/s12885-015-1196-y.
- [21] Bahnassy AA, Fawzy M, El-Wakil M, et al. Aberrant expression of cancer stem cell markers (CD44, CD90, and CD133) contributes to disease progression and reduced survival in hepatoblastoma patients: 4-year survival data[J]. *Transl Res*, 2015, 165(3):396-406.
- [22] Liu A, Feng B, Gu W, et al. The CD133+ subpopulation of the SW982 human synovial sarcoma cell line exhibits cancer stem-like characteristics[J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(4):1399-1407.
- [23] Atashpour S, Fouladdel S, Movahhed TK, et al. Quercetin induces cell cycle arrest and apoptosis in CD133(+) cancer stem cells of human colorectal HT29 cancer cell line and enhances anticancer effects of doxorubicin[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2015, 18(7):635-643.
- [24] Colvin H, Mori M. Colorectal cancer: Back to the stroma--the real villain in colorectal cancer?[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 12(5):256-258.
- [25] Takahashi S, Lee J, Kohda T, et al. Induction of the G2/M transition stabilizes haploid embryonic stem cells[J]. *Development*, 2014, 141(20):3842-3847.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 牛坚, 朱乐乐, 王月, 等. 下调CD133表达对肝癌细胞恶性生物学行为的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(1):77-82. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.01.012

Cite this article as: NIU J, ZHU LL, WANG Y, et al. Impact of CD133 expression down-regulation on malignant biological behaviors of liver cancer cells[J]. *Chin J Gen Surg*, 2016, 25(1):77-82. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.01.012