



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.03.009
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.03.009
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(3):352-356.

· 基础研究 ·

microRNA-200c 在胰腺癌干细胞中的表达及作用

马超, 黄涛, 丁月起, 王谦, 余伟, 蒙博

(郑州大学附属肿瘤医院肝胆胰外科, 河南 郑州 450008)

摘要

目的: 探讨 microRNA-200c (miRNA-200c) 在胰腺癌干细胞中的表达及作用。

方法: 应用流式细胞术在人胰腺癌 PANC-1 细胞中以 CD24⁺CD44⁺ESA⁺ 为标记物分选胰腺癌干细胞, 并通过 NOD/SCID 小鼠移植瘤实验验证其肿瘤干细胞特性; 分别用 RFQ-PCR 法 Transwell 试验检测 PANC-1 细胞、胰腺癌干细胞以及转染 miRNA-200c 前体片段或阴性对照序列的胰腺癌干细胞的 miRNA-200c 表达与侵袭能力。

结果: PANC-1 细胞中分选出 CD24⁺CD44⁺ESA⁺ 细胞 (占 0.8%) 具有肿瘤干细胞特性, 其在小鼠皮下移植后的移植瘤体积明显大于同期移植的 PANC-1 细胞 [(1 725.14 ± 261.29) mm³ vs. (479.65 ± 99.67) mm³, P<0.05]; 胰腺癌干细胞中 miRNA-200c 的表达量明显低于 PANC-1 细胞 (0.15 ± 0.01 vs. 1.00 ± 0.09, P<0.05), 平均穿膜细胞数明显多于 PANC-1 细胞 [(321 ± 7.62) 个 vs. (70 ± 16.47) 个, P<0.05], 但转染 miRNA-200c 前体片段后, 胰腺癌干细胞中 miRNA-200c 表达量明显升高, 平均穿膜细胞数明显减少 (P<0.05)。

结论: 胰腺癌干细胞中 miRNA-200c 的表达降低, miRNA-200c 具有抑制胰腺癌干细胞生长及侵袭力的作用。

关键词

胰腺肿瘤; 肿瘤干细胞; 微 RNAs

中图分类号: R735.9

Expression of microRNA-200c in pancreatic cancer stem cells and its significance

MA Chao, HUANG Tao, DING Yuechao, WANG Qian, YU Wei, MENG Bo

(Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, the Affiliated Tumor Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China)

Abstract

Objective: To investigate the expression and action of microRNA-200c (miRNA-200c) in pancreatic cancer stem cells.

Methods: Pancreatic cancer stem cells were sorted from human pancreatic cancer PANC-1 cells by FACS using CD24⁺CD44⁺ESA⁺ as marker, and their stem cell properties were assessed by xenograft tumor assay in NOD/SCID mice. The miRNA-200c expression and invasion ability in PANC-1 cells, pancreatic cancer stem cells and pancreatic cancer stem cells transfected with miRNA-200c precursor sequence or negative control sequence were determined by RFQ-PCR method and Transwell invasion assay, respectively.

Results: The CD24⁺CD44⁺ESA⁺ cells (accounting for 0.8%) sorted from PANC-1 cells presented tumor stem cell properties, and the volume of the xenograft tumor after their subcutaneous transplantation in mice was significantly larger than that after PANC-1 cells transplanted at the same time [(1 725.14±261.29) mm³ vs.

收稿日期: 2015-01-10; 修订日期: 2015-05-22。

作者简介: 马超, 郑州大学附属肿瘤医院主治医师, 主要从事肝胆胰方面的研究。

通信作者: 黄涛, Email: hbht68@163.com

(479.65±99.67) mm³, $P<0.05$]. In pancreatic cancer stem cells compared with PANC-1 cells, the miRNA-200c expression level was significantly decreased (0.15 ± 0.01 vs. 1.00 ± 0.09 , $P<0.05$), and transmembrane cell number was significantly increased (321 ± 7.62 vs. 70 ± 16.47 , $P<0.05$), but the miRNA-200c expression level was significantly increased and transmembrane cell number was significantly decreased in pancreatic cancer stem cells after transfection with miRNA-200c precursor sequence (both $P<0.05$).

Conclusion: MiRNA-200c expression is reduced in pancreatic cancer stem cells, and miRNA-200c has inhibitory effect on growth and invasiveness of pancreatic cancer stem cells.

Key words Pancreatic Neoplasms; Neoplastic Stem Cells; MicroRNAs

CLC number: R735.9

microRNA (miRNA) 在一系列重要的生理、病理过程中发挥核心调控作用^[1-2]。研究证实多种肿瘤组织存在miRNA表达谱的异常改变, miRNA与肿瘤的发生、发展和预后有着密切的联系^[3-4]。miRNA-200c属于miRNA-200家族,在肿瘤侵袭性方面有重要调控作用^[5-6]。胰腺癌由于侵袭性强导致其预后极差^[7]。肿瘤干细胞理论认为,肿瘤的侵袭转移与肿瘤干细胞关系密切,干细胞可能是恶性肿瘤侵袭转移的内在原因^[8]。胰腺癌干细胞的侵袭能力是否与miRNA-200c相关并受其调控,目前未见研究报道。本研究分选胰腺癌干细胞,研究其侵袭性以及miRNA-200c的表达。进一步将miRNA-200c前体转染到胰腺癌干细胞中,观察miRNA-200c表达的改变以及对胰腺干细胞侵袭能力的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人胰腺癌细胞株PANC-1购自上海中国科学院细胞库。NOD/SCID鼠购自北京协和医科大学动物实验中心。Transwell小室美国购自MERK公司。流式分选抗体抗人CD44-APC、CD24-PE、ESA-FITC流式荧光抗体购自美国Abcam公司。流式细胞仪(FACS Aria II)为BD公司产品。荧光定量PCR仪为ABI公司。PCR试剂盒购自Fermentas公司。Annexin V-FITC/PI试剂盒美国MERK公司。Matrigel购自美国BD公司。微量RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒、Trizol总RNA提取试剂盒均购自Invitrogen公司。SiPORT™ Neof'x™ Transfection Agent转染试剂购自美国Ambion公司。

1.2 肿瘤干细胞的分选

取对数生长期的PANC-1细胞,用胰酶消化

后离心5 min。以DMEM培养液重悬,调整浓度为 1×10^6 个/mL。每1 mL细胞悬液加入20 μL抗人CD24-PE、抗人CD44-APC和抗人ESA-FITC抗体,室温、避光孵育30 min后离心5 min,弃去上清液。磷酸缓冲盐溶液(PBS)清洗细胞2次后加入含培养液重新制成单细胞悬液。用流式细胞仪检测CD24⁺CD44⁺ESA⁺细胞比例,并分选。每次细胞分选后重复上机1次,保证分选后的干细胞纯度>95%。

1.3 异种移植成瘤能力分析

将6~7周的雌性NOD/SCID小鼠随机分成2组,每组8只。将新鲜分选的CD24⁺CD44⁺ESA⁺细胞、PANC-1细胞进行活细胞计数备用,按每只小鼠 5×10^5 个细胞数分别接种于两组小鼠皮下。观察在同样环境下两组小鼠的生存情况及成瘤能力的差异。

1.4 细胞转染

按siPORT™ Neof'x™ Transfection Agent说明书的方法将miRNA-200c前体片段和阴性对照片段分别转染到干细胞中。

1.5 RFQ-PCR法检测细胞中miRNA-200c的表达

收集新分选的PANC-1细胞、胰腺癌干细胞及转染miRNA-200c前体片段后的胰腺癌干细胞,用TRIzol试剂提取细胞总RNA,将其反转录成cDNA。cDNA合成过程中采用miRNA-200c RT特异性引物构建反转录体系,miRNA-200c RT引物序列为:5'-GTC GTA TCC AGT GCG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TGC ACT GGA TAC GAC TCC ATC-3';内参照U6 RT引物序列为:5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT-3'。以cDNA为模板,利用miRNA-200c特异性引物和染料分子Sybergreen I进行PCR扩增。miRNA-200c正向引物序列为:5'-GGT AAT ACT GCC GGG TAA T-3',

反向引物序列为：5'-CAG TGC GTG TCG TGG AGT-3'；内参照U6正向引物序列为：5'-GCT CGG CAG CAC ATA TAC TAA AAT-3'，反向引物序列为：5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT-3'。PCR反应条件为：95 ℃反应5 min灭活酶，94 ℃变性20 s，55 ℃退火20 s，72 ℃延伸20 s执行40个循环，循环结束后进行融点曲线分析，于60~95 ℃之间进行测定。通过Applied Biosystems Viiia7实时荧光定量PCR仪自带的实时荧光定量PCR分析程序分析Ct值，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析所得PCR结果。

1.6 Transewell 试验检测细胞的体外侵袭能力

将分选后的PANC-1细胞、胰腺癌干细胞及转染miRNA-200c前体片段后的胰腺癌干细胞重悬浮于含5%牛血清白蛋白（BSA）的培养液中，分别接种于铺被基质胶（matrigel）的Transewell小室中，孵箱中孵育24 h后移除matrigel，100%甲醇固定

后HE染色，干燥后切取微孔聚碳酸酯膜，封片后显微镜观察计数细胞，分析各组细胞的侵袭能力。

1.7 统计学处理

应用SPSS 18.0统计软件分析。计量资料以均值 \pm 标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，组间比较采用t检验。

2 结果

2.1 胰腺癌干细胞的分选及鉴定

在PANC-1细胞中分选出以CD24⁺CD44⁺ESA⁺作为标记物的干细胞，比例为0.8%。NOD/SCID小鼠异种移植成瘤实验显示，接种CD24⁺CD44⁺ESA⁺细胞组小鼠生长38 d后，皮下移植瘤体积为（1 725.14 \pm 261.29）mm³，明显大于同期生长的接种PANC-1细胞组小鼠（479.65 \pm 99.67）mm³（ $P<0.05$ ）（图1），两组小鼠的移植瘤生长曲线见图2。



图1 两组小鼠皮下移植瘤情况 A: PANC-1 细胞移植; B: CD24⁺CD44⁺ESA⁺ 细胞移植

Figure 1 The xenograft tumors in the two groups of mice

A: Transplantation with PANC-1 cells; B: Transplantation with

CD24⁺CD44⁺ESA⁺ cells

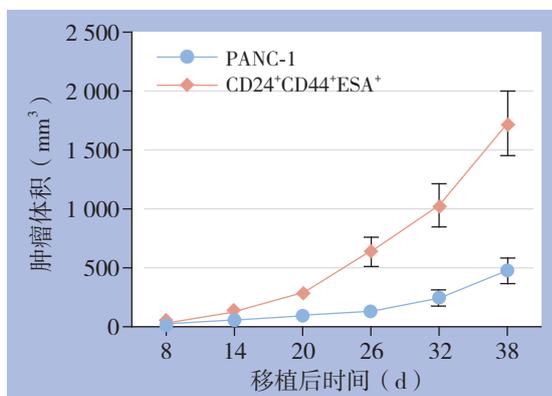


图2 两组小鼠移植瘤生长曲线

Figure 2 Growth curves of the xenograft tumors in the two groups of mice

2.2 miRNA-200c 的表达

RFQ-PCR检测结果显示，胰腺癌干细胞中miRNA-200c的相对表达水平（0.15 \pm 0.01）明显低于PANC-1细胞（1.00 \pm 0.09）（ $P<0.05$ ）。转染miRNA-200c前体片段24 h后，胰腺癌干细胞中miRNA-200c的相对表达值为3.70 \pm 0.42，明显高于转染阴性对照片段的胰腺癌干细胞（0.22 \pm 0.21）（ $P<0.05$ ）（图3）。

2.3 细胞的体外侵袭能力

胰腺癌干细胞中穿透基质胶到达下室侧滤膜表面的细胞数明显多于PANC-1细胞 [(321 \pm 7.62) 个 vs. (70 \pm 16.47) 个, $P<0.05$];

转染miRNA-200c前体片段后的胰腺癌干细胞的穿膜细胞数明显少于转染阴性对照片段的干细胞

[(80 ± 5.35) 个 vs. (310 ± 19.41) 个, $P < 0.05$] (图4)。

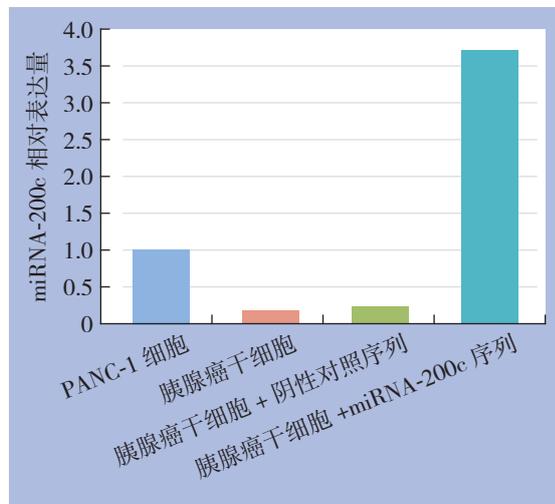


图3 各组细胞中 miRNA-200c 的相对表达量

Figure 3 Relative expression levels of miRNA-200c in each group of cells

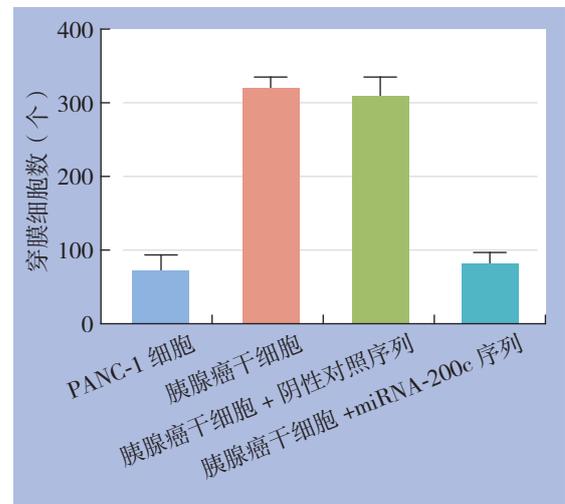


图4 各组细胞的穿膜细胞数

Figure 4 Transmembrane cell number in each group of cells

3 讨论

胰腺癌是消化系统高度恶性肿瘤, 5年生存率不足4%^[9]。胰腺癌的高致命性是由于胰腺癌细胞侵袭性强, 能够迅速播散到淋巴系统和远处器官^[10]。控制胰腺癌侵袭、转移尤为重要, 但目前对其侵袭、转移机制的研究仍然较少。肿瘤干细胞理论认为, 肿瘤干细胞是恶性肿瘤发生侵袭、转移的根源^[8]。2007年Li等^[11]第1次成功分离出以CD24⁺CD44⁺ESA⁺为标记的人胰腺癌肿瘤干细胞。黄鹏等^[12]也发现CD44⁺CD24⁺亚群细胞具有肿瘤干细胞的初步特征。Hermann等^[13]发现CD133⁺/CXCR4⁺胰腺癌干细胞具有高度转移性。本实验通过FACS技术在人胰腺癌细胞系PANC-1中分选出以CD24⁺CD44⁺ESA⁺细胞, 并通过异种移植成瘤试验证实其为胰腺癌干细胞。通过Transwell实验发现胰腺癌干细胞的侵袭能力显著高于PANC-1细胞, 提示胰腺癌干细胞可能参与了胰腺癌的侵袭与转移。

近年来研究发现, miRNA在肿瘤的发生发展中发挥重要的调控作用^[14-15]。肿瘤组织存在广泛的miRNA异常表达^[16]。赵雪琰等^[17]研究发现miR-214能促进胃癌细胞侵袭和转移。Ji等^[18]发现miR-34通过直接调控目标基因Notch和Bcl-2参与了胰腺癌干细胞自我更新。近年来miR-200c在肿瘤方面的影响越来越受到瞩目, 许多研究显示miR-200c

具有广泛的肿瘤抑制效应^[19]。miRNA-200c是间质-上皮转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT) 的主要调节者, 能通过直接抑制锌指E盒结合蛋白1 (zinc finger E-box binding protein 1, ZEB1) 表达, 并间接上调上皮细胞钙黏蛋白 (E-cadherin) 表达而抑制肿瘤侵袭转移^[20]。Li等^[21]发现吉西他滨耐药的胰腺癌细胞miR-200c表达显著下调, 表现出典型的EMT特征。

胰腺癌干细胞的侵袭能力是否与miRNA-200c相关并受其调控, 目前未见研究报道。本实验通过RFQ-PCR检测结果显示, 与PANC-1细胞相比, 具有高侵袭性的胰腺癌干细胞中的miRNA-200c明显处于低表达, 提示miRNA-200c可能与胰腺癌干细胞的高侵袭能力有关。为进一步观察miRNA-200c对胰腺癌干细胞侵袭性的可能作用, 本研究将miRNA-200c前体片段转染入胰腺癌干细胞。转染后胰腺癌干细胞中的miRNA-200c明显处于高表达, 同时其侵袭能力也明显减弱, 提示miRNA-200c能够抑制胰腺癌干细胞的侵袭能力, 在逆转胰腺癌干细胞侵袭性过程中发挥着重要作用。

参考文献

- [1] Liang Y, Ridzon D, Wong L, et al. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues[J]. BMC Genomics,

- 2007, 8:166.
- [2] Anglicheau D, Sharma VK, Ding R, et al. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(13): 5330-5335.
- [3] Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors[J]. N Engl J Med, 2005, 353(17):1768-1771.
- [4] Pritchard CC, Kroh E, Wood B, et al. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2012, 5(3):492-497.
- [5] Adam L, Zhong M, Choi W, et al. miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(16): 5060-5072.
- [6] Tryndyak VP, Beland FA, Pogribny IP. E-cadherin transcriptional down-regulation by epigenetic and microRNA-200 family alterations is related to mesenchymal and drug-resistant phenotypes in human breast cancer cells[J]. Int J Cancer, 2010, 126(11):2575-2583.
- [7] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009[J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4):225-249.
- [8] Tirino V, Desiderio V, Paino F, et al. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization[J]. FASEB J, 2013, 27(1):13-24.
- [9] 吕丽红, 张波, 曾庆东, 等. 5-LOXmRNA和VEGFmRNA在胰腺癌中的表达及其临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(11):813-816.
- [10] Klein AP. Identifying people at a high risk of developing pancreatic cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(1):66-74.
- [11] Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells[J]. Cancer Res, 2007, 67(3):1030-1037.
- [12] 黄鹏, 王春友, 吴河水, 等. 胰腺癌细胞株PANC-1中肿瘤干细胞生物学行为的研究[J]. 中国普通外科杂志, 2008, 17(9): 865-869.
- [13] Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer[J]. Cell Stem Cell, 2007, 1(3):313-323.
- [14] Zimmerman AL, Wu S. MicroRNAs, cancer and cancer stem cells[J]. Cancer Lett, 2011, 300(1):10-19.
- [15] 谢黎明, 贺荣芳, 张志伟, 等. miR-124通过靶向调控DNMT3B抑制胃癌细胞增殖[J]. 中南医学科学杂志, 2013, 41(1):10-12.
- [16] Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease[J]. Physiol Rev, 2011, 91(3): 827-887.
- [17] 赵雪琰, 郑长黎. miR-214对胃癌细胞SGC7901侵袭和转移能力的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2012, 21(4): 421-426.
- [18] Ji Q, Hao X, Zhang M, et al. MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells[J]. PLoS One, 2009, 4(8):e6816.
- [19] Feng X, Wang Z, Fillmore R, et al. MiR-200, a new star miRNA in human cancer[J]. Cancer Lett, 2013, 344(2):166-173.
- [20] Mongroo PS, Rustgi AK. The role of the miRNA-200 family in epithelial-mesenchymal transition[J]. Cancer Biol Ther, 2010, 10(3):219-222.
- [21] Li Y, VandenBoom TG, Kong D, et al. Up-regulation of miR-200 and let-7 by natural agents leads to the reversal of epithelial-to-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells[J]. Cancer research, 2009, 69(16):6704-6712.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 马超, 黄涛, 丁月超, 等. microRNA-200c在胰腺癌干细胞中的表达及作用[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(3):352-356. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.03.009

Cite this article as: MA C, HUANG T, DING YC, et al. Expression of microRNA-200c in pancreatic cancer stem cells and its significance[J]. Chin J Gen Surg, 2015, 24(3):352-356. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.03.009