

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.02.002

人肝癌 PLC/PRF-5 细胞中干细胞样细胞的分离及其特异性 miRNAs 的筛选

郑秋红¹, 许扬梅¹, 魏植强¹, 龚福生¹, 杨建伟², 谢云青¹, 应敏刚³ (1. 福建医科大学附属教学医院 福建省肿瘤医院 肿瘤分子生物学研究室, 福建 福州 350014; 2. 福建医科大学附属教学医院 福建省肿瘤医院 肿瘤内科, 福建 福州 350014; 3. 福建医科大学附属教学医院 福建省肿瘤医院 肿瘤外科, 福建 福州 350014)

专家点评 肝癌在我国是一种发病率很高的恶性肿瘤。由于原发性肝癌早期症状不明显, 发现时已多为晚期, 因此肝癌患者的病死率也很高。提高肝癌的临床诊断水平, 改善肝癌的临床治疗措施是我国肿瘤研究面临的一项重要任务。

近年来, 尽管存着巨大分歧, 肿瘤干细胞理论已成为肿瘤研究的一大热点。该理论认为, 肿瘤中存在一种具有高度增殖能力与自我更新能力的特殊类型干细胞。尽管肿瘤干细胞数量极少, 但对肿瘤发生、发展和转移起着决定性和支配性的作用。因此, 分离和鉴定肿瘤干细胞, 将极大地促进肿瘤的临床诊断; 靶向肿瘤干细胞的治疗方案将有效地提高肿瘤治疗的疗效。

本期刊登了郑秋红等人关于分离和鉴定肝癌肿瘤干细胞的论文。作者使用免疫磁珠成功地从人肝癌细胞 PLC/PRF-5 中分选出表达 ABCG2 的细胞群; 进一步研究表明, 表达 ABCG2 的 PLC/PRF-5 细胞群克隆形成能力和小鼠体内成瘤能力都显著增强, 证实了表达 ABCG2 的 PLC/PRF-5 肝癌细胞群具有肿瘤干细胞的特性。这项研究是分离和鉴定肝癌肿瘤干细胞的一次非常有意义的探索和尝试。

MicroRNA (miRNA) 是长约 20 bp 的非编码单链 RNA, 具有重要的基因表达调节功能。本文作者还应用基因芯片技术, 在具有肝癌肿瘤干细胞特征的 ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞群中鉴定了 20 个差异表达的 miRNAs。肿瘤特异性的 miRNAs, 特别是肿瘤干细胞特异性的 miRNAs, 是肿瘤靶向性治疗的又一类有巨大潜力的靶点。进一步研究这些在肝癌干细胞样细胞中特异表达的 miRNAs, 很可能对肝癌的基础和临床研究产生重要影响。

Department of Immunology and Infectious Diseases,
Harvard School of Public Health, USA
《中国肿瘤生物治疗杂志》特邀国际审稿专家



[摘要] 目的: 分选及鉴定人肝癌 PLC/PRF-5 细胞中的肝癌干细胞样细胞, 研究其 microRNAs (miRNAs) 表达谱。方法: 以 ABCG2 为表面标志, 免疫磁珠法分选、流式细胞术检测 ABCG2⁺ 和 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞, 观察 ABCG2⁺ 与 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞的琼脂克隆形成能力和接种 NOD/SCID 小鼠的成瘤能力。应用 miRNA 芯片筛选 ABCG2⁺ 和 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞差异表达的 miRNAs, real-time PCR 验证部分差异表达的 miRNAs。结果: 免疫磁珠分选的 ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞纯度可达 (84.20 ± 4.52)%。ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞比 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞形成更多、更大的克隆集落 (47.17 ± 10.50 vs 23.33 ± 7.31, $P < 0.05$); NOD/SCID 小鼠接种 1×10^4 个 ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞即可成瘤, 而 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞至少需要 5×10^5 个才可成瘤; 5×10^5 个细胞时, ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞组的肿瘤体积显著大于 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞组 [(3.73 ± 1.19) cm³ vs (0.72 ± 0.57) cm³, $P < 0.01$]。ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞和 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞差异表达的 miRNAs 有 20 个: 上调的 13 个, 下调的 7 个; real-time PCR 验证其中的 hsa-miR-30a 和 hsa-miR-630 的差异表达, 其结果与 miRNA 芯片结果基本一致。结论: 人肝癌细胞系 PLC/PRF-5 中 ABCG2⁺ 细胞具有肿瘤干细胞的特性; ABCG2⁺ 和 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞差异表达的 miRNAs 有 20 个, 它们在肝癌发病中可能起重要的调控作用。

[关键词] 肝癌; 肝癌干细胞; microRNA; 表达谱; 免疫磁珠分选

[中图分类号] Q279; R392.12

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)02-0126-07

[基金项目] 福建省自然科学基金资助项目 (No. 2008J0077)。Project supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2008J0077)

[作者简介] 郑秋红 (1962 -), 女, 山东省日照市人, 硕士生导师, 主任医师, 主要从事肿瘤免疫及肿瘤疫苗方面的研究。E-mail: zhengqiu hong@csc.org.cn

[通信作者] 应敏刚 (YING Min-gang, corresponding author), E-mail: yingmg@163.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110412.1807.002.html>

Isolation of stem-like cells from human hepatocellular carcinoma PLC/PRF-5 cells and screening for their specific miRNAs

ZHENG Qiu-hong¹, XU Yang-mei¹, WEI Zhi-qiang¹, GONG Fu-sheng¹, YANG Jian-wei², XIE Yun-qing¹, YING Ming-gang³(1. Department of Molecular Biology of Tumor, Affiliated Teaching Hospital of Fujian Medical University, Tumor Hospital of Fujian Province, Fuzhou 350014, Fujian, China; 2. Department of Internal Oncology, Affiliated Teaching Hospital of Fujian Medical University, Tumor Hospital of Fujian Province, Fuzhou 350014, Fujian, China; 3. Department of Surgical Oncology, Affiliated Teaching Hospital of Fujian Medical University, Tumor Hospital of Fujian Province, Fuzhou 350014, Fujian, China)

[**Abstract**] **Objective:** To isolate stem-like cells from hepatocellular carcinoma cell line PLC/PRF-5 and to study their miRNA profile. **Methods:** ABCG2⁺ and ABCG2⁻ PLC/PRF-5 cells were isolated from the PLC/PRF-5 cell line by magnetic activated cell sorting (MACS) method, and further identified by flow cytometry. The colony formation ability in soft agar and tumor formation ability in NOD/SCID mice of ABCG2⁺ and ABCG2⁻ PLC/PRF-5 cells were observed. miRNA chip was adopted to screen the differentially expressed miRNAs between ABCG2⁺ and ABCG2⁻ PLC/PRF-5 cells; and real-time PCR assay was used to confirm the results of miRNA chip. **Results:** The purity of ABCG2⁺ PLC/PRF-5 cells isolated by MACS method was (84.20 ± 4.52)%. The colony number and size formed by ABCG2⁺ PLC/PRF-5 cells were more and larger than those formed by ABCG2⁻ cells (47.17 ± 10.50 vs 23.33 ± 7.31, $P < 0.05$). 1×10^4 ABCG2⁺ cells could form tumors with at least 5×10^5 cells needed for ABCG2⁻ cells. The size of tumors generated by 5×10^5 ABCG2⁺ cells was larger than that by the ABCG2⁻ cells ($[3.73 \pm 1.19]$ cm³ vs $[0.72 \pm 0.57]$ cm³, $P < 0.01$). There are 20 miRNAs differentially expressed between ABCG2⁺ and ABCG2⁻ cells, with 13 up-regulated and 7 down-regulated. Real-time PCR assay was applied to further verify the differential expression of hsa-miR-30a and hsa-miR-630, and the results were in accordance with those of miRNA chip. **Conclusion:** ABCG2⁺ PLC/PRF-5 cells in hepatocellular carcinoma cell line PLC/PRF-5 have the properties of cancer stem cells. Twenty miRNAs are differentially expressed between ABCG2⁺ and ABCG2⁻ PLC/PRF-5 cells, which might play important roles in the carcinogenesis of hepatocellular carcinoma.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; hepatocellular carcinoma stem cell; microRNA profile; magnetic activated cell sorting

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(2): 126-132]

肝癌是常见的癌症,其发生机制尚不十分明确^[1]。根据肿瘤干细胞学说,推测肿瘤干细胞也存在于肝癌中,可能是肝癌治疗的新靶点^[2]。但是不同学者对于肝癌干细胞的表面标志有不同的见解。颜政等^[3]认为 CD34⁻、CK7⁺ 和 c-kit⁺ 可能是人肝癌干细胞的表面标记。Yang 等^[4]发现,OV6⁺ 肝癌细胞比 OV6⁻ 细胞具有更强的成瘤性。Suetsugu 等^[5]发现,肝癌细胞系 Huh-7 中 CD133⁺ 细胞比 CD133⁻ 细胞有更高的增殖和成瘤能力。Yang 等^[6-7]分选出的 CD90⁺ CD44⁺ 肝癌细胞具有自我更新、多向分化和高致瘤性。Chiba 等^[8]在 Huh7 和 PLC/PRF/5 细胞系中发现有 SP 细胞(side population cell)的存在。Kamohara 等^[9]认为 Huh7 中处于 G₀ 期细胞具有肝癌干细胞特征。赵璇等^[10]以 CD133⁺、CD90⁺ 为标志,采用特殊的培养方法从人肝癌组织中成功分离肝癌干细胞样细胞。Haraguchi 等^[11]认为 CD13 是

人肝癌干细胞的一个治疗目标。Yoh^[12]等、钟艳萍等^[13]和奚忠等^[14]分别在不同的肝癌细胞系或原发性肝癌细胞中发现 ABCG2⁺ (ABCG2 也称乳腺癌耐药蛋白 BCRP1,属于 ABC 转运蛋白超家族的成员)细胞具有肿瘤干细胞特征。本实验主要探讨肝癌细胞系 PLC/PRF-5 中 ABCG2⁺ 细胞是否具有肿瘤干细胞的特征,以及筛选肝癌干细胞相关 miRNA 的表达谱,为进一步研究 miRNAs 在肝癌发病中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

人肝癌细胞系 PLC/PRF-5 购自中国科学院上海药物研究所,在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,0.25% 胰酶消化传代,使用前锥虫蓝染色计数。含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基购自 Hyclone

公司, PE 标记的小鼠抗人 ABCG2 抗体、PE 标记的小鼠抗人 IgG2b 同型对照抗体均购于 eBioscience 公司, 抗 PE 免疫磁珠购于 Miltenyi 公司。MiScript SYBR Green PCR Kit 购于 Qiagen 公司。

NOD/SCID 小鼠, 雄性, 5 周龄, 体质量为 20 ~ 23 g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司(实验动物合格证号为 No. 2007000501459), 严格饲养在恒温、恒湿、无特定病原体的空气洁净层流架内。

1.2 流式细胞术检测 PLC/PRF-5 细胞中 ABCG2 的表达

取 2×10^6 个 PLC/PRF-5 细胞重悬于 160 μ l PBS 缓冲液中, 分装于两试管, 每管 80 μ l。其中一管加入 PE 标记的小鼠抗人 ABCG2 抗体 20 μ l, 另一管加入 PE 标记的小鼠抗人 PE IgG2b 同型对照抗体 20 μ l, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 20 min。每管加入 1 ml PBS 缓冲液后 $1\ 000 \times g$ 离心 10 min, 弃上清液, 调整细胞密度至 1×10^6 /ml, 然后流式细胞仪检测。

1.3 免疫磁珠法分选 ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞

取 1×10^7 个 PLC/PRF-5 细胞重悬于 85 μ l PBS 缓冲液中, 然后加入 PE-ABCG2 抗体 25 μ l, 混合好后 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 min。加入 PBS 缓冲液, $1\ 000 \times g$ 离心 10 min, 重复清洗步骤。将 1×10^7 个 PLC/PRF-5 细胞重悬于 80 μ l PBS 缓冲液中, 加入抗 PE 免疫磁珠 20 μ l, 混合后 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min, $1\ 000 \times g$ 离心 10 min, 弃上清液, 用 500 μ l PBS 缓冲液重悬 1×10^7 个 PLC/PRF-5 细胞。将 MS 柱置于 MACS 系统, 加 MACS PBS 缓冲液 500 μ l 润湿 MS 柱, 再加入上述经 PE-ABCG2 抗体和间接免疫磁珠标记的 PLC/PRF-5 细胞悬液, 待其自然流下, 即为 ABCG2⁻ 细胞。500 μ l PBS 缓冲液洗柱 3 次, 收集所有流出液体, 仍为 ABCG2⁻ 细胞。收集柱内细胞, 即为 ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞。

1.4 软琼脂法检测 PLC/PRF-5 细胞克隆形成能力

配制 3% 的琼脂, 然后取 10 ml 保存于 42 $^{\circ}$ C 中的溶化 3% 琼脂, 加入 40 $^{\circ}$ C 的含 15% 胎牛血清 DMEM 培养液 50 ml, 两者混匀, 即为 0.5% 的底层培养基。将其铺于 6 孔板, 1.5 ml/孔。分别取免疫磁珠分离得到的 ABCG2⁺ 和 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞, 制成 1×10^5 /ml 的细胞悬液。取 9 ml 预温的培养液加至试管, 然后分别加入 100 μ l 细胞悬液, 混匀; 加 1 ml 3% 琼脂, 混匀; 每孔加入 2 ml 0.3% 上层琼脂培养基, 即 2×10^3 /孔。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 2 周, 在倒置显微镜下观察含 50 个细胞以上的克隆, 计数克隆形成数。每组同时做 6 个复孔。

1.5 NOD/SCID 小鼠皮下成瘤实验

将免疫磁珠分离后得到的 ABCG2⁺ 或 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞分别配成密度为 2.5×10^4 /ml、 5×10^4 /ml、 2.5×10^5 /ml、 2.5×10^6 /ml 的细胞悬液。将 20 只 NOD/SCID 鼠随机分为 4 组, 每组 5 只。在小鼠左右腋窝皮下分别注射不同浓度的 ABCG2⁻ 和 ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞悬液各 0.2 ml, 即分别含 5×10^3 、 1×10^4 、 5×10^4 和 5×10^5 个细胞。观察 NOD/SCID 鼠的生活状况及局部肿瘤生长情况。接种 6 周后颈部脱臼处死 NOD/SCID 鼠, 解剖并观察肿瘤的数目和大小。肿瘤体积计算公式: $V = 1/6 \pi ab^2$ (a 为肿瘤长径, b 为肿瘤短径)。

1.6 Agilent miRNA 芯片检测 ABCG2⁺ 和 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞 miRNA 表达的差异

分别取 1×10^6 个 ABCG2⁺ 或 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞, 用 mirVanaTM RNA Isolation Kit 提取总 RNA, 按 Agilent miRNA 基因芯片操作要求进行标本杂交、探针标记和洗片。用 Agilent Scan Control Software Version A.7.0 扫描图像并进行数据分析。筛选原则是差异倍数大于或等于 2 为差异表达。

1.7 荧光实时定量 PCR 验证部分 ABCG2⁺ 和 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞差异表达的 miRNAs

在芯片检测的差异表达 miRNAs 中, 随机挑选了 2 个 miRNAs, 采用 SYBR Green 法检测成熟 miRNA 的表达水平。miRNA 引物由特异性引物及通用引物构成, 其中 miRNA 特异性引物由上海伯豪生物技术有限公司合成(表 1), 通用引物为 miScript SYBR Green PCR Kit 自带。选用 U6snRNA (GenBank Entrez: M14486) 作为内参。逆转录反应合成 cDNA 条件: 37 $^{\circ}$ C 60 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 产物 -20 $^{\circ}$ C 保存。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预反应 15 min, 94 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 34 s, 共 40 个循环。将检测结果进行分析。

1.8 统计学处理

计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 SPSS11.5 统计软件处理, 两组间的比较采用配对样本的 t 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

表 1 实时定量 PCR 使用的引物

Tab. 1 Primer sequences for real-time PCR

miRNA	Primer sequences(5'→ 3')
U6	TTCGTGAAGCGTTCCATATTTT
hsa-miR-30a	TGTAAACATCCTCGACTGGAAG
hsa-miR-630	AGTATTCTGTACCAGGGAAGGT

2 结果

2.1 免疫磁珠分选前后肝癌 PLC/PRF-5 细胞中 ABCG2 的表达

流式术分析结果表明, ABCG2 蛋白在肝癌细胞系 PLC/PRF-5 中低表达, ABCG2⁺ 细胞百分比为 (7.45 ± 1.34)%。PLC/PRF-5 细胞抗体磁珠标记后, 置于 MS 柱内, 在磁场作用下, 将 ABCG2⁺ 细胞滞留于柱内。取出 MS 柱, 用 PBS 将滞留细胞冲洗下来并收集进行流式分析, 结果显示, 纯化后 ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞的百分比可达 84.20 ± 4.52%(图 1)。

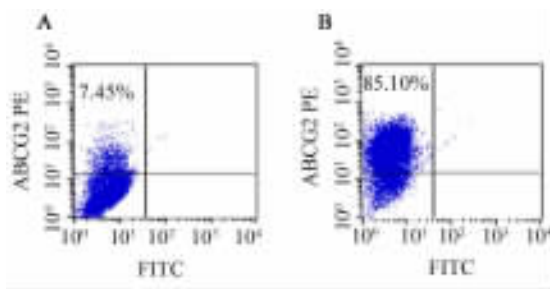


图 1 免疫磁珠分选前(A)后(B)PLC/PRF-5 细胞中 ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞的比例

Fig. 1 Percentages of ABCG2⁺ PLC/PRF-5 cells in PLC/PRF-5 cells before (A) and after (B) MACS

2.2 ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞的克隆形成能力明显增强

ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞在软琼脂培养基中培养 2 周后, 大部分细胞形成了细胞克隆; 而 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞未能形成明显的细胞克隆, 大部分细胞趋于凋亡和崩解。在倒置显微镜下计数, ABCG2⁺ 和 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞克隆数分别为 (47.17 ± 10.50) 个和 (23.33 ± 7.31) 个 (*P* < 0.05)。

2.3 ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞接种 NOD/SCID 小鼠的成瘤能力增强

分别将 ABCG2⁺ 和 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞按 5 × 10³、1 × 10⁴、5 × 10⁴、5 × 10⁵ 的数量接种于 NOD/SCID 小鼠右侧和左侧腋窝, 6 周时解剖确认腋窝肿瘤形成情况, 发现 ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞在接种 1 × 10⁴ 个时即可形成肿瘤, 而 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞需接种 5 × 10⁵ 个才可形成肿瘤, 且形成肿瘤的个数与肿块体积均少于和小于 ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞(图 2, 表 2)。

5 × 10⁵ 个细胞接种第 6 周时的肿瘤体积, ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞组为 (3.73 ± 1.19) cm³, ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞组为 (0.72 ± 0.57) cm³ (*P* < 0.01)。

CG2⁻ PLC/PRF-5 细胞组为 (0.72 ± 0.57) cm³ (*P* < 0.01)。

表 2 ABCG2⁺ 和 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞接种 NOD/SCID 鼠的成瘤能力

Tab. 2 Tumor formation ability of ABCG2⁺ and ABCG2⁻ PLC/PRF-5 cells in NOD/SCID mice

Group	Transplanted cells			
	5 × 10 ³	1 × 10 ⁴	5 × 10 ⁴	5 × 10 ⁵
ABCG2 ⁺ PLC/PRF-5	0/5	3/5	4/5	5/5
ABCG2 ⁻ PLC/PRF-5	0/5	0/5	0/5	5/5

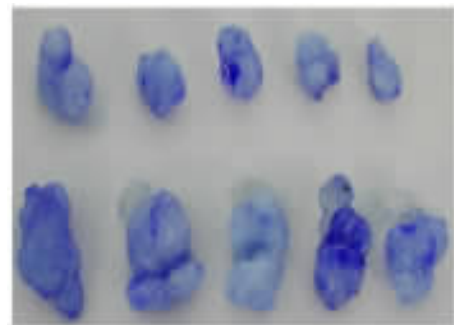


图 2 5 × 10⁵ 个 ABCG2⁺ 和 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞接种第 6 周时肿瘤大小的对比

Fig. 2 Tumors formed at the 6th week by 5 × 10⁵ ABCG2⁺ or ABCG2⁻ PLC/PRF-5 cells in mice

Up: By ABCG2⁻ PLC/PRF-5 cells;
Down: By ABCG2⁺ PLC/PRF-5 cells

2.4 ABCG2⁺ 和 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞被筛选出 20 个差异表达的 miRNAs

Agilent miRNA 芯片共覆盖 866 个人类相关 miRNAs。芯片分析结果显示, ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞较 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞表达上调的 miRNAs 有 13 个, 下调的 miRNAs 有 7 个; 两种细胞的 miRNAs 表达最高差异倍数达 7 倍(图 3, 表 3)。根据 miRNAs 的命名规则, miRNAs 前体的 2 个臂分别产生 1 个 miRNAs。根据克隆实验, 主要的成熟产物不带 * 号, 次要的产物带 * 号。在这 20 个差异表达的 miRNAs 中, 12 个是带 * 号的 miRNAs, 它们是相应的不带 * 号的 miRNAs 的匹配序列。

2.5 差异表达的 hsa-miR-30a 和 hsa-miR-630 的 real-time PCR 验证

随机选取差异表达的 2 个 miRNAs (hsa-miR-30a、hsa-miR-630), 采用 real-time PCR 技术对芯片

结果进行验证。结果(图4)显示, ABCG2⁺细胞和 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞表达差异 miRNAs 的倍数, hsa-miR-30a 为 3.43, hsa-miR-630 为 3.53, 而芯片检测结果的倍数分别为 2.72 和 2.44。real-time PCR 验证结果提示, miRNA 芯片与 real-time PCR 的检测结果基本一致。

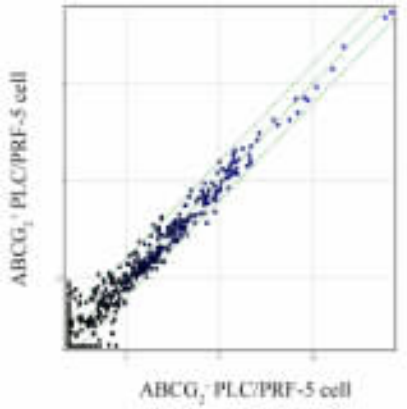


图3 ABCG2⁺和 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞 miRNA 芯片散点图

Fig. 3 miRNA array scatter plot of ABCG2⁺ and ABCG2⁻ PLC/PRF-5 cells

ABCG2 作为表面标志, 研究其在肝癌细胞系 PLC/PRF-5 中是否具有肿瘤干细胞特征。

表3 ABCG2⁺与 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞差异表达的 miRNAs

Tab. 3 Differentially expressed miRNAs between ABCG2⁺ and ABCG2⁻ PLC/PRF-5 cells

Systematic name	Regulation	Plus - flag ^①	Minus - flag
hsa-miR-135a	+2.371 059	P	P
hsa-let-7f-2*	-5.604 639	A	P
hsa-miR-16-2*	+2.244 129	P	A
hsa-miR-186*	+4.979 567	P	A
hsa-miR-194*	+2.068 672	P	A
hsa-miR-30a	+2.724 451	P	P
hsa-miR-122*	-2.260 146	P	P
hsa-miR-374b*	+7.092 441	P	A
hsa-miR-23a*	-2.192 501	P	P
hsa-miR-199a-3p	+2.046 295	P	P
hsa-miR-548d-5p	+2.113 890	P	A
hsa-miR-30a*	-2.169 696	P	P
hsa-miR-20a*	-2.273 341	P	A
hsa-miR-340*	+3.192 083	P	A
hsa-miR-183*	+2.716 013	P	A
hsa-miR-630	-2.435 398	P	P
hsa-miR-378	-2.022 635	P	P
hsa-miR-431*	-2.271 167	P	P
hsa-miR-590-5p	+2.254 201	P	P
hsa-miR-222	-2.500 542	P	P

①: P is short for present, meaning the signals are detectable; A is short for absent, meaning the signals are undetectable

3 讨论

本课题组前期实验^[15]检测肝癌细胞系 PLC/PRF-5 是否表达 3 个已报道的肿瘤干细胞表面标志 CD133、CD44 和 ABCG2, 结果发现, CD133 在 PLC/PRF-5 细胞中高表达, 其含量为 96.95%; 而 CD44 基本不表达; ABCG2 则低水平表达。ABCG2 也称乳腺癌耐药蛋白, 属于 ABC 转运蛋白超家族的成员, 被认为是侧群细胞的表型, 是一种潜在的干细胞分子标志^[16-17], 与肿瘤多药耐药有关。本实验以

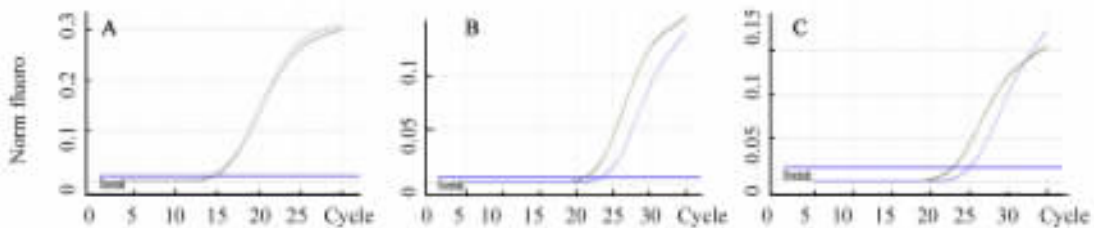


图4 Real-time PCR 检测 ABCG2⁺和 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞中 U6 (A)、hsa-miR-30a (B)、hsa-miR-630 (C) 的表达

Fig. 4 Real-time PCR in detection of U6 (A), hsa-miR-30a (B), and hsa-miR-630 (C) expressions in ABCG2⁺ and ABCG2⁻ PLC/PRF-5 cells

实验首先采用免疫磁珠分选 PLC/PRF-5 细胞中的 ABCG2⁺ 细胞,分选后的 ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞纯度可达(84.20 ± 4.52)%。然后进一步对 ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞进行小鼠致瘤性的研究,主要包括两个实验:一是体外克隆形成实验,即观察肿瘤干细胞在软琼脂形成克隆数及其大小;二是观察 ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞在 NOD/SCID 小鼠体内肿瘤形成能力。克隆实验结果显示,ABCG2⁺ 和 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞克隆数分别为(47.17 ± 10.50)个和(23.33 ± 7.31)个($P < 0.05$)。NOD/SCID 小鼠皮下成瘤实验结果显示,当接种细胞数量为 1×10^4 个时,ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞能在小鼠(3/5)皮下形成肿瘤,而 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 不能在小鼠(0/5)皮下形成肿瘤,直到接种数量达 5×10^5 个 ABCG2⁻ 细胞时才能形成肿瘤,而且肿瘤体积比同数量级的 ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞成瘤的都要小。这些结果显示,ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞为肝癌细胞系 PLC/PRF-5 中的主要致瘤细胞,即具备肿瘤干细胞特征。

miRNAs 是一类由长约 20 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,主要作为基因表达的负调控因子^[18]。Caldas 等^[19]发现,miRNAs 在多种恶性肿瘤中表达异常,可能起到原癌基因或抑癌基因的作用。目前已知 miRNAs 可调节人类近 30% 的基因,近 50% miRNAs 在基因组上定位于与肿瘤相关的区域或脆性位点。因此肿瘤特异性 miRNA 可能是肿瘤基因治疗的新靶点。肝癌有其特异性的 miRNAs^[20],干细胞也有其特异性的 miRNAs^[21]。筛选肝癌干细胞相关 miRNAs 表达谱,探讨 miRNAs 参与肿瘤干细胞形成的分子机制,具有重要的意义。本研究以 Agilent miRNA 芯片技术筛选发现,具有肝癌干细胞特征的 ABCG2⁺ PLC/PRF-5 细胞较 ABCG2⁻ PLC/PRF-5 细胞表达差异的 miRNAs 共有 20 个,其中上调的 13 个,下调的 7 个。实时荧光定量 PCR 验证随机选取的 hsa-miR-30a 和 hsa-miR-630 的表达情况,其表达差异水平与 miRNA 芯片检测水平基本一致,证明了筛选实验的可靠性。利用 Target Scan 软件预测差异 miRNA 调控的所有靶基因,其中 12 个带 * 号的 miRNAs 检测不出靶基因,它们是相应 miRNAs 的副产物;其余 8 个可以检测出靶基因,其中 hsa-miR-30a 调控 236 个靶基因,hsa-miR-222 调控 78 个靶基因,hsa-miR-590-5p 调控 57 个靶基因,hsa-miR-135a 调控 130 个靶基因,hsa-miR-199a-3p 调控 86 个靶基因,hsa-miR-548d-5p 调控 109 个靶基因,hsa-miR-378 调控 27 个靶基因,hsa-miR-630

调控 30 个靶基因。应用 SAS 系统分析靶基因的 GO 和 Pathway 信息,发现有些靶基因参与 Wnt, Notch 和 hedgehog 等干细胞信号通路,如 NFAT5, CSNK1E, CSNK1G2, CSNK1G, JAG1, FZD7 等(详细数据未列出)。课题组下一步将从这些靶基因中进一步分析,挑选功能缺失后可能调控某些靶基因干细胞信号通路的 miRNA,并对其功能学研究,为探索肝癌生物治疗新的靶点寻找有力的实验依据。

[参考文献]

- [1] Chen X, Cheung ST, So S, et al. Gene expression patterns in human liver cancers [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(6): 1929-1939.
- [2] Lee TK, Castilho A, Ma S, Ng IO. Liver cancer stem cells: Implications for a new therapeutic target [J]. *Liver Int*, 2009, 29(7): 955-965.
- [3] 颜政,方驰华,高鹏. 人原发性肝癌干细胞表面标志的初步研究 [J]. *南方医科大学学报*, 2006, 26(9): 1304-1306.
- [4] Yang W, Yan HX, Chen L, et al. Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(11): 4287-4295.
- [5] Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, et al. Characterization of CD133⁺ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351(4): 820-824.
- [6] Yang ZF, Ngai P, Ho DW, et al. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer [J]. *Hepatology*, 2008, 47(3): 919-928.
- [7] Yang ZF, Ho DW, Ng MN, et al. Significance of CD90⁺ cancer stem cells in human liver cancer [J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(2): 153-166.
- [8] Chiba T, Kita K, Zheng YW, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties [J]. *Hepatology*, 2006, 44(1): 240-251.
- [9] Kamohara Y, Haraguchi N, Mimori K, et al. The search for cancer stem cells in hepatocellular carcinoma [J]. *Surgery*, 2008, 144(2): 119-124.
- [10] 赵璇,冉宇靓,遇珑,等. 人肝癌组织中肿瘤干细胞样细胞的分离培养及鉴定 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(5): 436-441.
- [11] Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, et al. CD133 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(9): 3326-3339.
- [12] Zen Y, Fujii T, Yoshikawa S, et al. Histological and culture studies with respect to ABCG2 expression support the existence of a cancer cell hierarchy in human hepatocellular carcinoma [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(5): 1750-1762.
- [13] 钟艳萍,张松灵,毕丽荣,等. 人原发性肝癌细胞 ABCG2⁺ 表型检测、分离及其生物学特性的初步研究 [J]. *中国实验诊断学*, 2008, 12(3): 324-327.
- [14] 奚忠,江春平,丁义涛. ABCG2 在肝细胞性肝癌组织和肝癌

- 细胞株中的表达意义 [J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(3): 247-252.
- [15] Goodell MA, Brose K, Paradis G, et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo* [J]. J Exp Med, 1996, 183(4): 1797-1806.
- [16] Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype [J]. Nat Med, 2001, 7(9): 1028-1034.
- [17] Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors [J]. Blood, 2002, 99(2): 507-512.
- [18] Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [19] Caldas C, Brenton JD. Sizing up miRNAs as cancer genes [J]. Nat Med, 2005, 11(3): 712-714.
- [20] Mott JL. MicroRNAs involved in tumor suppressor and oncogene pathways: Implications for hepatobiliary neoplasia [J]. Hepatology, 2009, 50(2): 630-637.
- [21] Nimmo RA, Slack FJ. An elegant miRor: MicroRNAs in stem cells, developmental timing and cancer [J]. Chromosoma, 2009, 118(4): 405-418.
- [收稿日期] 2011-01-23 [修回日期] 2011-03-25
[本文编辑] 王莹

· 科技动态 ·

转录因子 MafB 负向调控抗病毒免疫反应

I 型干扰素是感染早期最重要的抗病毒细胞因子,几乎所有的有核细胞在遭受病毒感染之后都能够分泌 I 型干扰素。在抵抗病毒感染的同时, I 型干扰素在一些自身免疫性疾病的病理过程中也发挥一定的作用。机体全身或局部的干扰素慢性积聚,则会对机体造成病理损伤,这种损伤主要是由自身过度活化细胞毒性 T 淋巴细胞导致的。因此,对 I 型干扰素产生调节机制的研究将有助于阐明病毒诱导自身免疫疾病的发病机制。Kim 等发现,转录因子 MafB 既能够作为一个活化分子,又能够作为一个共激活抑制分子,调控 I 型干扰素的表达。

Maf 家族的分子都含有亮氨酸拉链结构,通常以二聚体的形式参与众多生理过程的转录调控,包括胰岛 α 、 β 细胞的发育、胰高血糖素与胰岛素的表达调控、单核巨噬细胞的发育、T 淋巴细胞的发育、血小板形成以及氧化应激反应等。Maf 分子参与转录调控分为两种形式: MARE(Maf-recognition element, MARE) 依赖和 MARE 非依赖。本研究探讨的 MafB 调控 I 型干扰素表达为 MARE 非依赖型。

通过双荧光素酶报告基因分析发现, MafB 在细胞未受刺激的静息状态下能够促进 IFN β 1 的转录活性;经 poly(I:C) 刺激、NDV 感染、及转染活化型 RIG-I、Mda5 之后, MafB 能够显著抑制 I 型干扰素的转录。由于 MafB^{-/-} 小鼠在围产期死亡,作者采用 poly(I:C) 刺激及 NDV 感染 MafB^{-/-} 小鼠胚胎成纤维细胞,发现 MafB 缺陷能够促进 I 型干扰素的产生,从而有利于病毒的复制。通过构建包含 IFN β 1 上游调控序列中不同 DNA 基序的荧光素酶报告质粒进行报告基因分析,发现 MafB 的活化作用与 AP-1 结合序列有关,抑制作用则与 IRF3、IRF7 结合序列有关。利用免疫共沉淀、电泳迁移率变动分析、Ch-IP 等技术,作者发现 MafB 与 IRF3、IRF7 直接结合,并且这种有效结合依赖于 MafB 分子 C 端的亮氨酸拉链结构。进一步的实验证明, MafB 通过结合 IRF3,阻碍了转录共激活分子 CBP 与 IRF3 的结合,增强子复合物的形成受阻,从而抑制了 IFN β 1 的转录活性。发现 MafB 分子的表达水平与 I 型干扰素的表达水平负相关。病毒感染可能通过上调 MafB 的表达抑制 I 型干扰素反应。

作者又进一步探讨了 MafB 与肠道病毒感染胰岛 β 细胞的关系。利用微阵列分析的方法比较了人不同组织 MafB 的表达情况,发现 MafB 在人胰岛 β 细胞中的表达水平较高,而肠道病毒特异性地感染胰腺内分泌部的胰岛细胞。病毒感染是 I 型糖尿病的一个诱因,因此 MafB 的表达可能与人类对该疾病的易感性有关。

作者同时发现, MafB 的调节作用不仅限于 I 型干扰素,例如 RANTES, 该现象值得进一步探讨。MafB 的研究很可能为临床清除胰岛病毒感染提供新的治疗策略。MafB 与 Maf 家族其他分子之间可能存在的相互作用, MafB 基因多态性与 I 型糖尿病的易感与发病, 靶向 MafB 的治疗性分子的设计等这些问题仍需深入研究。这些问题的解决将很有可能为自身免疫疾病的预防和治疗提供新的视角。

[温明岳 摘译, 安华章 审阅. Kim H, Seed B. Nat Immunol, 2010, 11(8): 743-750.]