

磁性分选肺腺癌始动细胞的异常 miRNAs 验证

张振华 杨红茹 周杰 邓曦 吴敬波 林盛

【摘要】 目的 利用磁性活细胞分选法(magnetic activated cell sorting, MACS)从人A549肺腺癌细胞中分离得到CD133⁺标记细胞,通过CD133/CD326双阳性检测探讨分离效果,初步分析差异表达miRNAs对该亚群细胞的调控功能。方法 将对数生长期的A549细胞离心收集,重悬于无血清培养基中,培养至第二代后利用CD133磁珠标记后分选,流式细胞术及免疫荧光验证分选后细胞的CD133/CD326双阳性率;结合前期实验miRNA芯片结果,挑选兴趣分子进行定量PCR验证。结果 利用CD133磁珠分选得到的阳性细胞亚群高表达CD133/CD326分子,结合前期miRNA芯片结果,选出在CD133⁺/CD326⁺细胞亚群中表达上调的miR-663, miR-183, miR-125a-5p, miR-127, miR-520h及表达下调的miR-18b, miR-29ab, miR-17和miR-155行定量PCR检测证实miR-29ab, miR-155, miR-183, miR-127-3p及miR-17的表达趋势与芯片结果相符。结论 利用磁珠分选方式能获得CD133⁺/CD326⁺高表达肺腺癌始动细胞亚群且包括miR-183等在内的6条分子与芯片结果一致,可能在肺腺癌始动细胞生物学行为的调控中发挥重要作用。

【关键词】 微RNAs; 磁性活细胞分选; 肿瘤始动细胞

Aberrant miRNA validation in lung adenocarcinoma initiating cells spared by magnetic bead from A549
ZHANG Zhen-hua, YANG Hong-ru, ZHOU Jie, DENG Xi, WU Jing-bo, LIN Sheng. Oncology Department, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China
Corresponding author: LIN Sheng, Email: lslinsheng@163.com

【Abstract】 Objective To validate magnetic activated cell sorting (MACS) is another means in enriching lung adenocarcinoma initiating cells from normal A549 cells and based on quantitative RT-PCR to analyze regulatory roles of this subpopulation. **Methods** After obtaining the lung adenocarcinoma initiating cells by MACS, we utilize flow cytometry analysis and immunofluorescence to verify CD133/CD326 expression of this subpopulation and choose 10 miRNAs to perform quantitative RT-PCR. **Results** We obtained CD133/CD326 high expression subpopulation by MACS. 10 miRNAs chose for quantitative RT-PCR and 6 miRNAs expression trend were consist with array data including miR-29ab, miR-155, miR-183, miR-127-3p, miR-17. **Conclusion** MACS can enrich CD133⁺/CD326⁺ subpopulation and 6 miRNAs expression trend were consist with array data, which may play important roles in regulating the biobehavior of lung adenocarcinoma initiating cells.

【Key words】 MicroRNAs; Magnetic activated cell sorting; Tumor initiating cells

近年来,随着诊断水平的提高和治疗技术的改进,肺癌患者有所获益,但总的5年生存率改善并不明显^[1]。干细胞理论认为肿瘤组织中存在着极少数的细胞即肿瘤干细胞或肿瘤始动细胞:具备较普通肿瘤细胞更强的自我增殖更新能力、侵袭及治疗抗拒特性,是肿瘤复发和转移的根源。本课题组前期研究采用紫杉醇联合无血清逆向诱导的方法从A549细胞株中富集得到

CD133⁺/CD326⁺细胞亚群,证实其具备干细胞特性,通过microRNA芯片分析得到CD133⁺/CD326⁺细胞亚群和A549普通细胞的差异表达miRNA谱并行定量PCR验证^[2]。本实验采用磁性活细胞联合无血清培养获得CD133⁺/CD326⁺细胞亚群并进一步验证前期芯片的数据结果,为后期研究兴趣miRNAs在肿瘤始动细胞中的生物学特性夯实基础。

材料与方

1. 细胞来源: A549 人肺腺癌细胞株, 购自美国 ATCC 中心。
2. 主要试剂和仪器: 重组人碱性成纤维细胞生长

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.20.040

基金项目: 国家自然科学基金(81201682)

作者单位: 646000 四川省, 泸州医学院附属医院肿瘤科

通讯作者: 林盛, Email: lslinsheng@163.com

因子(bFGF)、重组人表皮生长因子(EGF)购自 Pepro Tech 公司, 重组人胰岛素、牛血清白蛋白(BSA)粉剂购自 Sigma 公司, DMEM/F-12 培养基、DMEM 高糖培养基购自 HyClone 公司, 鼠抗人 CD133 购自 Abcam 公司, 羊抗人 CD326 购自 Santa Cruz 公司, FITC-山羊抗兔 IgG 购自 Beyotime 公司, CY3-驴抗山羊 IgG 购自 Biologin 公司, DAPI 工作液、抗荧光淬灭封片液、Trizol 总 RNA 提取试剂、红细胞裂解液购自 Beyotime 公司, MACS 分选柱、CD133 免疫磁珠试剂盒、鼠抗人 CD133/2-PE 流式抗体、鼠源同型 IgG 购自 Miltenyi Biotec 公司。倒置相差显微镜、流式细胞仪、激光共聚焦、定量 PCR 仪、MACS 磁珠分选仪均由泸州医学院中心实验室提供。

3. 磁性活细胞分选: 对数生长期贴壁细胞, 胰酶消化后离心收集, 重悬于无血清培养基中(DMEM/F-12 培养基+重组人 bFGF、重组人 EGF、BSA), 至第二代, 吹散细胞球, 离心收集细胞, 用 300 μ l 的 PBS 重悬细胞, 加入 100 μ l 的 CD133 磁珠, 100 μ l 的 FcR 阻断液, 混匀后置于冰中孵育 25 min; PBS 洗涤三次, 细胞沉淀用 500 μ l 的 PBS 重悬, 过磁珠分选仪, 将分选柱移离分选仪磁场, 对分选柱中细胞进行洗脱即得到所要的 CD133⁺细胞, 将其用于细胞培养基悬浮后置入培养箱。

4. CD133/CD326 流式细胞检测: 收集分选后第四代悬浮细胞, 离心后用 PBS 洗涤 2 次; 设置同型和待检组, 按照使用说明分别加入相应的 CD133/CD326 流式抗体及同型(浓度为 1:11)孵育 30 min; PBS 洗涤三次后样本避光送检。

5. 细胞 CD133/CD326 的免疫荧光检测: 收集分选后第四代悬浮细胞, 吸取细胞悬液至载玻片, 涂片离心机, 800 r/min, 离心 5 min 后浸入 4% 多聚甲醛固定 20 min; 0.1% 的 Triton 作用 3 min 后 PBS 洗涤; 滴加 5% 的 BSA 作用 10 min 后用吸水纸吸净。滴加 1:300 的兔抗人 CD133 和山羊抗人 CD326 一抗, 4 $^{\circ}$ C 冰箱避光孵育过夜。次日, 将玻片常温放置 30 min, PBS 洗涤三次, 滴加 1:400 的羊抗兔-FITC-CD133, 驴抗山羊-CY3-CD326 荧光二抗, 避光孵育 30 min 后 PBS 洗涤三次; 滴加 DAPI 工作液, 复染细胞核 4 min, PBS 洗涤三次, 抗荧光淬灭剂封片后送检。

6. miRNAs 的定量 PCR 验证: miRNA 逆转录反应体系设置, 定量 PCR 检测体系设置及茎环状引物合成均来自 Invitrogen 公司; 反转录反应条件: 16 $^{\circ}$ C, 10 min; 37 $^{\circ}$ C, 30 min; 65 $^{\circ}$ C, 5 min; 定量 PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C, 10 min; 95 $^{\circ}$ C, 15 s, 60 $^{\circ}$ C, 1 min, 共 40 个循环。所有样本均以 U6 基因作为内参, 数据

分析依据 Ct 模式, Δ Ct 值=样品组 Ct 值-内参组 Ct 值; $\Delta\Delta$ Ct 值= Δ Ct(待测组)- Δ Ct(对照组); $2^{-\Delta\Delta$ Ct} 即该数值即相对于参照样品的表达倍数, 由 Applied Bio systems 系统提供进行统计分析。

结 果

1. CD133⁺分选细胞的 CD133/CD326 流式检测: 对 CD133 分子标记行磁性分选后的第四代成球细胞做 CD133/CD326 分子流式检测显示双阳性率在 80%~90% 之间, 证实分选细胞亚群高表达 CD133 和 CD326 分子, 见图 1。

2. 分选细胞的 CD133/CD326 激光共聚焦检测: 对分选后第四代成球细胞进行免疫荧光检测, 在共聚焦显微镜下可以看到细胞呈球形生长, 成球细胞中绝大多数的细胞均表达 CD133(绿色荧光)和 CD326(红色荧光), 荧光主要分布在细胞膜上, 部分位于胞质, 见图 2。

3. miRNAs 的定量 PCR 验证: 基于课题组的研究方向和前期芯片结果, 挑选出 10 个 miRNAs 进行定量 PCR 的验证: 包括表达上调的 miR-663, miR-183, miR-125a-5p, miR-127, miR-520h 及表达下调的 miR-18b, miR-29a, miR-29b, miR-17 和 miR-155; 这些分子与细胞的分化, 细胞周期调控, 上皮间质转化及侵袭转移等细胞的生理、病理过程可能相关。结果显示 miR-29a, miR-29b, miR-155, miR-183, miR-127-3p, miR-17 的趋势与芯片结果一致(表 1, 图 3)。

表 1 CD133⁺/CD326⁺细胞 miRNAs 的定量 PCR 验证结果

miRNAs	芯片	细胞株
上调		
hsa-miR-183	2.69	1.76
hsa-miR-125a-5p	2.51	0.51
hsa-miR-127-3p	2.57	1.91
hsa-miR-520h	1.11	0.43
hsa-miR-663	19.6	0.96
下调		
hsa-miR-18b	0.49	1.08
hsa-miR-155	0.33	0.24
hsa-miR-29a	0.47	0.28
hsa-miR-29b	0.40	0.16
hsa-miR-17	0.32	0.25

讨 论

癌干细胞(或肿瘤始动细胞)是存在于实体瘤中的极少数细胞, 具有始动肿瘤发生、维持自我更新、

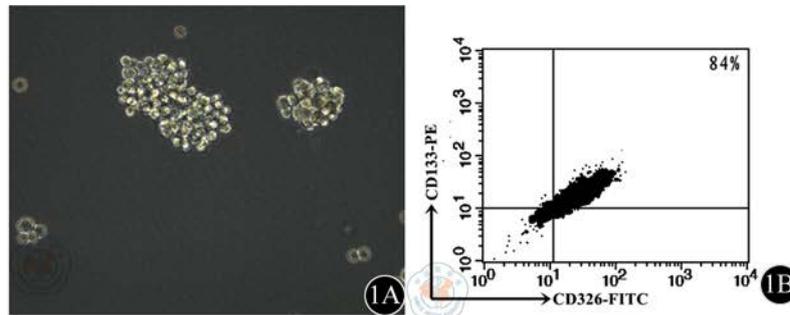


图1 CD133⁺分选细胞生长状态及CD133/CD326流式结果。1A: 细胞球生长状态(×200); 1B: 富集细胞的CD133/CD326双阳性率

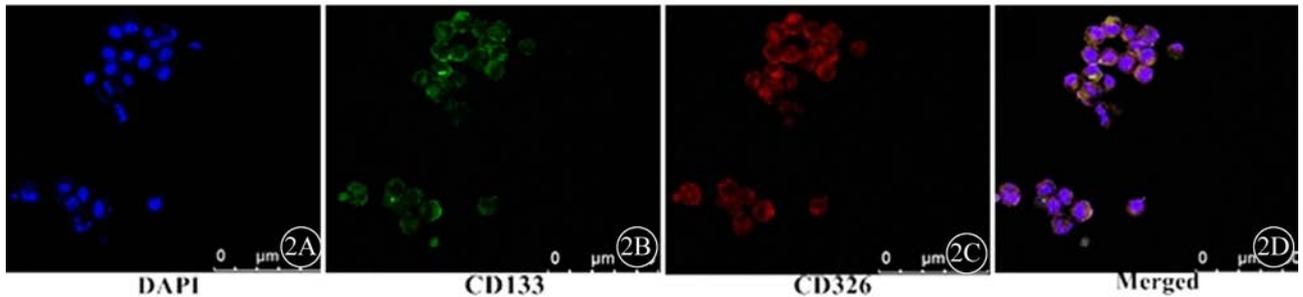


图2 球细胞的免疫荧光共聚焦检测。2A: DAPI染色显示细胞核呈现蓝色; 2B: CD133表达呈绿色荧光; 2C: CD326的表达呈红色荧光; 2D: CD133/CD326的共表达呈橙色荧光(×400)

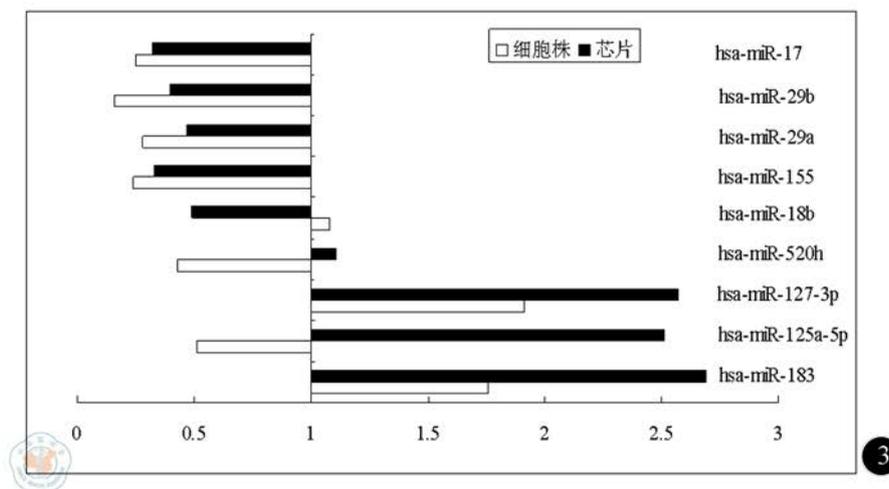


图3 CD133⁺/CD326⁺细胞miRNAs的定量PCR验证结果

治疗抗拒、更强的侵袭和致瘤能力,是肿瘤治疗后局部复发和转移的根源。大量研究证实肿瘤干细胞能以某些表面分子作为特定标记如胶质瘤^[3]、前列腺癌^[4]、卵巢癌^[5]、肝癌^[6]、胰腺癌^[7]以及结肠癌^[8]等均以CD133⁺作为干细胞的分子标记。然而,对于肺癌干细胞的分子标记存在一些争议。Meng等^[9]通过磁性活细胞分选,得到CD133⁺和CD133⁻细胞亚群,经体内和体外实验证实CD133⁺和CD133⁻细胞亚群中含有等量的干细胞样细胞,说明至少在肺癌细胞株A549和H446上,CD133不能单独作为干细胞的分子标记物;Tirino等^[10]通过体外和体内相关实验也证实在肺癌组织中CD34⁺/CD326⁺或者CD133⁺/CD326⁺细胞亚群具备干细胞特性,但在肺癌细胞株包括A549仅CD133⁺

/CD326⁺细胞亚群才具备干细胞特性。

miRNA是内源性的、由19~23个核苷酸构成的非编码RNA。miRNA在体内高度保守,虽然不具备编码功能,但可以通过与完全互补或者部分互补的方式与目标信使RNA的3'UTR区结合从而形成转录后抑制或降解靶RNA,最终实现对靶基因的调控作用。大量研究通过对临床肿瘤患者miRNA谱的筛查证实一些miRNA的异常表达与肿瘤的分期,预后以及疗效密切相关,说明miRNA具备癌基因或抑癌基因的功能,在肿瘤的发生以及演进过程中发挥着重要的作用^[11-16]。也有研究证实miRNAs对不同的肿瘤干细胞具备调控功能。过表达的miR-181族是EPCAM⁺肝癌干细胞维持干性的重要调控分子^[17];在乳腺癌干细胞和正常干

细胞中下调 miR-200 家族出现了相似的调控效应, 说明癌干细胞和正常干细胞有一定程度的同一性^[18]; 在胶质瘤干细胞的研究中发现过表达 miR-128 可以通过作用于 Bim-1 而使干细胞的增殖能力受到明显抑制, 揭示其有可能成为胶质瘤干细胞的潜在治疗性靶点^[19]。以上研究均证实 miRNA 广泛参与了对不同肿瘤干细胞生物学行为的调控, 但就肺癌干细胞而言, 还缺乏系统和深入的研究报道。

基于以上的研究背景, 课题组在前期实验中选择药物筛选联合无血清培养逆向诱导富集 A549 始动细胞, 证实富集细胞亚群高表达 CD133/CD326 分子及相关胚胎干细胞基因, 在体外具备连续传代及定向分化能力, 成瘤能力较普通细胞更强, 具备干细胞相关特性; 继之, 做了该亚群细胞与普通 A549 细胞之间的 miRNA 芯片谱, 筛选出了差异表达 miRNA 分子并进行了验证^[2]。本实验目的是想通过另一种方式对之前的 miRNA 芯片结果进行再次验证, 以利于更坚定兴趣分子的后续生物学研究。在实验前我们没有考虑对普通 A549 细胞进行直接分选, 原因在于干细胞培养基本本身对干细胞就有逆向富集作用, 而磁珠分选不易达到 100%, 这也解释了 Meng 等将 CD133⁺/CD133⁻ 分别养在干细胞培养基中后阴性细胞亚群也具备和阳性细胞亚群相似特征的原因。实验是在逆向诱导至第二代时用 CD133 磁珠进行分选, 传代后用免疫荧光及流式方法测定分选细胞亚群的 CD133/CD326 双阳性率在 80% 以上, 可以视为干细胞样亚群进行后续的生物功能实验。选择 miRNA 分子包括 miR-183, miR-127, miR-17 等 6 个分子进行定量 PCR 验证也与用之前的药物联合逆向诱导富集细胞亚群的结果一致, 说明了 CD133⁺/CD326⁺ 细胞亚群作为 A549 细胞的始动细胞是稳定的, 后续我们将主要围绕 miR-183 和 miR-17 分子进行前期的功能研究。

有研究对不同的肿瘤类型包括滑膜肉瘤、横纹肌肉瘤和结肠癌发现 miR-183 可以通过影响 EGR1 和 PTEN 的表达而促进肿瘤的形成及侵袭, 说明在这些肿瘤模型中 miR-183 扮演了原癌基因的角色^[20]; 与上述结论相悖的是, 在癌细胞株 801D 的研究中发现 miR-183 的表达下调, 外源性过表达后发现 miR-183 可以通过影响 Ezrin (VIL2) 的表达而抑制肺癌细胞的迁移侵袭能力, 说明其具备抑制肿瘤的功能^[21]。miRNA 分子是一个复杂的调控网络, 在不同肿瘤组织细胞中可以作用不同靶基因而发挥截然不同的生物学效应, 正是这种不确定性使 miRNAs 的研究富有挑战性。

综上所述, 我们利用无血清培养联合磁性活细胞

分选技术获得了 CD133⁺/CD326⁺ 始动细胞亚群并进一步证实前期实验异常 miRNA 分子的表达情况, 为后续研究这些 miRNA 分子功能和揭示其相关调控机制奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics. 2013. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63: 11-30.
- [2] Lin S, Sun J, Wu J, et al. Aberrant microRNAs expression in CD133⁺/CD326⁺ human lung adenocarcinoma initiating cells from A549. *Mol Cells*, 2012, 33: 277-283.
- [3] Lee C, Dunn SE, Yip S. Stem cells in brain tumour development and therapy-two-sides of the same coin. *Can J Neurol Sci*, 2012, 39: 145-156.
- [4] Mateo F, Fernandez PL, Thomson TM. Stem cells in prostate cancer. *Archivos Espanoles de Urologia*, 2013, 66: 475-486.
- [5] Zhang S, Balch C, Chan MW, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res*, 2008, 68: 4311-4320.
- [6] Ma S, Tang KH, Chan YP, et al. miR-130b Promotes CD133⁺ liver tumor-initiating cell growth and self-renewal via tumor protein 53-induced nuclear protein1. *Cell Stem Cell*, 2010, 7: 694-707.
- [7] Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 2007, 1: 313-323.
- [8] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 2007, 445: 111-115.
- [9] Meng X, Li M, Wang X, et al. Both CD133⁺ and CD133⁻ sub populations of A549 and H446 cells contain cancer-initiating cells. *Cancer Sci*, 2009, 100: 1040-1046.
- [10] Tirino V, Camerlingo R, Franco R, et al. The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour initiating cells in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2009, 36: 446-453.
- [11] Plaisier CL, Pan M, Baliga NS. A miRNA-regulatory network explains how dysregulated miRNAs perturb oncogenic processes across diverse cancers. *Genome Res*, 2012, 22: 2302-2314.
- [12] Wu Y, Crawford M, Mao Y, et al. Therapeutic delivery of MicroRNA-29b by cationic lipoplexes for lung cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013, 2: e84.
- [13] Rothschild SI, Tschan MP, Federzoni EA, et al. MicroRNA-29b is involved in the Src-ID1 signaling pathway and is dysregulated in human lung adenocarcinoma. *Oncogene*, 2012, 31: 4221-4232.
- [14] Lee JH, Voortman J, Dingemans AM, et al. MicroRNA expression and clinical outcome of small cell lung cancer. *PLoS One*, 2011, 6: e21300.
- [15] Voortman J, Goto A, Mendiboure J, et al. MicroRNA expression and clinical outcomes in patients treated with adjuvant chemotherapy after complete resection of non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res*, 2010, 70: 8288-8298.
- [16] Xu Y, Luo S, Liu Y, et al. Integrated gene network analysis and text mining revealing PIK3R1 regulated by miR-127 in human bladder cancer. *Eur J Med Res*, 2013, 18: 29.
- [17] Ji J, Yamashita T, Budhu A, et al. Identification of microRNA-181 by genome-wide screening as a critical player in EpCAM-positive hepatic cancer stem cells. *Hepatology*, 2009, 50: 472-480.
- [18] Shimono Y, Zabala M, Cho RW, et al. Down-regulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell*, 2009, 138: 592-603.
- [19] Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz S, et al. Targeting of the Bmi-1

- oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res*, 2008, 68: 9125-9130.
- [20] Saver AL, Li LH, Subramanian S, et al. MicroRNA miR-183 functions as an oncogene by targeting the transcriptionfactor EGR1 and promoting tumor cell migration. *Cancer Res*, 2010, 70: 9570-9580.
- [21] Wang GF, Mao WM, Zheng S. MicroRNA-183 regulates Ezrin expression in lung cancer cells. *FEBS Lett*, 2008, 582: 3663-3668.

(收稿日期: 2013-10-05)

(本文编辑: 戚红丹)

张振华, 杨红茹, 周杰, 等. 磁性分选胰腺癌始动细胞的异常 miRNAs 验证 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(20): 9182-9186.



中华医学会