

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.15.003

利用分子信标检测 microRNA 并成像肺癌干细胞的实验研究*

朱海振¹, 耿涛¹, 李雪涛², 林盛³, 韩静², 江飞龙², 陈光朋², 谭诗生^{1△}, 陈正堂^{2▲}

(1. 贵州省人民医院肿瘤科, 贵阳 550002; 2. 第三军医大学新桥医院全军肿瘤研究所, 重庆 400037; 3. 泸州医学院附属医院肿瘤科, 四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 利用 miR-155 分子信标(MB)检测 CD133⁺ CD326⁺ 肺癌干细胞(LCSCs)中高表达的 miR-155 并成像肺癌干细胞。 **方法** 采用对 A549 细胞逆向诱导及紫杉醇富集的方法, 通过流式细胞仪从 A549 细胞中分选出 CD133⁺ CD326⁺ 细胞, 并对其干性进行鉴定。以壳聚糖纳米(CS)作为载体转染 miR-155 MB, 激光共聚焦显微镜检测 miR-155 MB 对 LCSCs 中 miR-155 的识别功能并成像, 并采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)进一步验证。 **结果** 分选的 CD133⁺ CD326⁺ 细胞在干细胞培养基中成球生长, 干性相关基因 CD133、CD326、OCT-4、Nanog 表达为 A549 细胞的 3.27、3.39、6.01、3.42 倍($P < 0.05$), 在细胞数为 1×10^4 数量下仍具备成瘤能力。CS 转染 miR-155 MB 后在 A549 及 LCSCs 中均可看到较强的红色荧光, 以 LCSCs 中荧光信号最强($P < 0.05$), 且荧光信号强弱趋势与 qRT-PCR 检测的 miR-155 的表达趋势较一致。 **结论** 利用 miR-155 MB 能够检测 LCSCs 中高表达的 miR-155 并使其成像, 为监测并发现肺癌干细胞提供新思路。

[关键词] 肿瘤干细胞; 肺肿瘤; A549; 分子信标

[中图分类号] R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)15-2036-04

Using molecular beacon for detecting microRNA and imaging lung cancer stem cells research*

Zhu Haizhen¹, Geng Tao¹, Li Xuetao², Lin Sheng³, Han Jing², Jiang Feilong²,

Chen Guangpeng², Tan Shisheng^{1△}, Chen Zhengtang^{2▲}

(1. Department of Oncology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China;

2. Institute of Cancer, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China;

3. Department of Oncology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To detect the miR-155 in the CD133⁺ CD326⁺ cells(LCSCs) and imaging them by using the miR-155 molecular beacon (MB). **Methods** A549 cells were cultured in the serum-free stem cell medium and treated by paclitaxel until new spheroids emerged; then we sorted the CD133⁺ CD326⁺ cells by flow cytometry and identified their stem characteristics. Chitosan nanoparticles(CS) were adopted to deliver the miR-155 MB. The laser confocal microscopy was used to detect and image the miR-155 in LCSCs. The miR-155 expression level was verified by quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR). **Results** The LCSCs formed the sphere in stem cell culture medium, the stem genes (CD133, CD326, OCT-4, Nanog) expression levels were 3.27, 3.39, 6.01, 3.42 times higher than those of A549 cells($P < 0.05$). 1×10^4 cells formed the subcutaneous transplanted tumors. The red fluorescence was detected in the A549 and LCSCs when CS transfect the miR155 MB, and the fluorescent signal of LCSCs was the highest($P < 0.05$). The fluorescence intensity was proximately consistent with the level of miR-155 expression determined by qRT-PCR. **Conclusion** Using the miR-155 MB could detect the miR-155 in the LCSCs and image them. It might be a new idea for monitoring the lung cancer stem cell.

[Key words] neoplastic stem cell; lung neoplasms; A549; molecular beacon

近年来,我国肺癌发病率呈快速增长趋势^[1]。目前临床上尚缺乏特异的、敏感的肺癌早期诊断分子靶标。肿瘤干细胞被认为是肿瘤产生、发展、复发、转移的根源,寻找肺癌干细胞有可能成为早期诊断的新突破点^[2]。大量研究表明微小 RNA(miRNA)广泛参与了肿瘤的发生、发展、转移等,识别肺癌干细胞相关 miRNA 并使之成像有可能成为肺癌早期诊断的重要策略^[3]。分子信标(MB)是一种分子内互补形成发卡结构的荧光标记的寡核苷酸序列,是一个非常敏感的检测 DNA、RNA 和 miRNA 的方法,已被广泛用于基因定量分析、疾病诊断和活体成像等研究领域^[4]。因此,本研究拟利用 miR-155 MB 检测 CD133⁺ CD326⁺ 肺癌干细胞(LCSCs)中高表达的 miR-155 并成像 LCSCs,为监测并发现 LCSCs 提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 A549 肺腺癌细胞系购自美国典型菌种保藏中心(ATCC)。选择 6 周龄健康裸鼠,由第三军医大学新桥医院动物中心提供。主要试剂:PRMI-1640、DMEM/F12 培养基购自 Hyclone 公司;重组人胰岛素、重组人碱性成纤维生长因子(bFGF)、牛血清清蛋白(BSA)粉剂购自美国 Sigma 公司;重组人表皮生长因子(EGF)购自美国 Pepro Tech 公司;标准胎牛血清(FBS)购自天津灏洋;鼠抗人 CD133-PE、CD326-FITC 流式抗体购自德国美天旎;山羊抗人 CD326 一抗购自美国 Santa Cruz;兔抗人 CD133 购自美国 abcam;逆转录及实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;CD133、CD326、OCT-4、Nanog 引物,部分碱基经过锁核酸修饰的 miR-

* 基金项目:国家高技术发展研究计划“863”项目(2007AA02Z129);国家自然科学基金面上项目(81071786)。 作者简介:朱海振(1984—),住院医师,博士,主要从事肿瘤干细胞、miRNA 研究。 △ 通讯作者, E-mail: tssh18018@126.com; ▲ 共同通讯作者, E-mail: czt05@163.com。

155 MB, 阴性对照随机序列分子信标(RS MB)即不和任何基因序列结合的 RS MB 由上海生工合成; hsa-miR-155 引物购于广州锐博生物公司; 壳聚糖纳米(CS)由四川广汉恒宇新材料公司惠赠。

1.2 方法

1.2.1 CD133⁺CD326⁺ 细胞的分选及培养 CD133⁺CD326⁺ 细胞培养液 DMEM/F12 的配置: 500 mL 的 DMEM/F12 培养基内加入 2 g BSA, 500 μL (50 μg/μL) 重组人胰岛素, 500 μL (20 ng/μL) EGF, 500 μL (10 ng/μL) bFGF, 5 mL 青霉素-链霉素双抗。根据本课题组前期研究报道的分选干细胞^[2]的方法, 对 A549 细胞进行逆向诱导及紫杉醇富集, 富集后根据抗体说明书, 加入相对应的鼠抗人 CD133-PE 和 CD326-FITC 流式抗体, 浓度为 1:11, 37 °C 水浴锅内孵育 30 min, 无菌磷酸盐缓冲液(PBS)充分洗涤后, 避光流式细胞仪上机分选, 分选后置入干细胞培养液中培养并进行形态学观察。

1.2.2 免疫荧光 取成球生长的 CD133⁺CD326⁺ 细胞悬液, 滴在载玻片并进行甩片, 800 r/min, 离心 5 min, 4% 的多聚甲醛固定 10 min, 漂洗后滴加 0.1% 的聚乙二醇辛基苯基醚(Triton)液, 洗涤后滴加 5% BSA 封闭液, 37 °C 孵育 20 min, 加入 PBS 稀释的一抗兔抗人 CD133 和山羊抗人 CD326, 浓度均为 1:200, 于 4 °C 冰箱孵育过夜, 充分漂洗后加入羊抗兔 CD133-FITC 及驴抗山羊 CD326-CY3 二抗, 二抗的浓度均为 1:400, 37 °C 孵育 30 min, 漂洗后 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染细胞核, 抗荧光淬灭剂封片, 激光共聚焦显微镜观察 CD133 和 CD326 的表达并拍照。

1.2.3 干性基因检测 根据干细胞相关基因 Oct-4、Nanog、CD133、CD326 序列设计 qRT-PCR 引物, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参, 引物均由上海生工合成, 序列如下: GAPDH 上游 5'-CCA CTC CTC CAC CTT TGA C-3', 下游 5'-CCA CTC CTC CAC CTT TGA C-3'; CD326 上游 5'-AGT AAA AGT TTG CGG ACT GCA C-3', 下游 5'-CTG GAA ATA ACC AGC ACA ACA A-3'; CD133 上游 5'-TCT CTA TGT GGT ACA GCC G-3', 下游 5'-TGA TCC GGG TTC TTA CCT G-3'; Nanog 上游 5'-ATT TGC GGC CGC ATG AGT GTG GGT CTT C-3', 下游 5'-CGG GAT CCT CAT ATT TCA CCT GGT GGA G-3'; Oct-4 上游 5'-AAG CTG CTG AAA CAG AAG AGG-3', 下游 5'-ACA CGG TTC TCA ATG CTA GTC-3'。常规 Trizol 试剂提取 A549、CD133⁺CD326⁺ 细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA 及 qRT-PCR 操作均按照 Takara 试剂说明书操作。每个目的基因及内参做 3 个复孔。以 GAPDH 基因为内参基因, 以 CD133、CD326、Nanog、Oct-4 作为目的基因, 以 A549 细胞相对应的表达量为 1, 计算 CD133⁺CD326⁺ 细胞中干性相关基因的表达相对于 A549 细胞的倍数关系, 实验重复 3 次。

1.2.4 裸鼠成瘤实验 雄性裸鼠 18 只, 分为 6 组, 每组 3 只, 分别注射 A549 细胞数目为 1×10⁴、1×10⁵ 和 1×10⁶, 注射 CD133⁺CD326⁺ 细胞数目为 1×10³、1×10⁴ 和 1×10⁵。选取对数生长期生长状态良好且能传代的 A549 及 CD133⁺CD326⁺ 细胞, 无菌 PBS 充分洗涤后计数细胞数目, 于小鼠右下背部皮下注射相对应数目的 CD133⁺CD326⁺ 细胞及 A549 细胞, 每只总体积为 150 μL。随后每 3 天观察细胞成瘤情况。

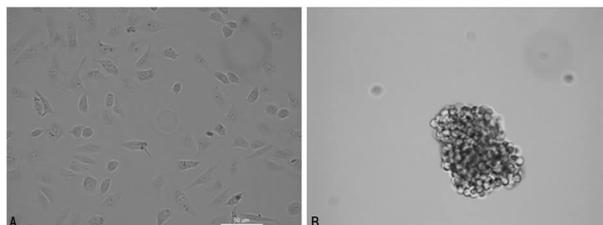
1.2.5 激光共聚焦检测对 miR-155 的识别成像功能及荧光强度分析 取对数生长期的 A549、LCSCs 种板于激光共聚焦专用培养皿内, 参考本课题组前期研究文献^[5]方法, 按照 W_{CS}:W_{MB} 质量比为 7:1 的比例将 MB 和 CS 混合, 漩涡震荡 60 s, 室温静置 30 min, 自组装方法合成 CS-mir-155 MB 及 CS-RS MB, miR-155 MB 和 RS MB 的终浓度为 200 nmol/L, 37 °C 细胞培养箱内孵育 120 min, 无菌 PBS 充分漂洗后加入 300 μL Hoechst 33342 染细胞核, 37 °C 20 min, 漂洗后加入 200 μL 无菌 PBS, 激光共聚焦显微镜观察并拍照。拍照后, 每个培养皿内加入 1 mL 细胞裂解液, 使细胞充分裂解。取 96 孔黑板, 每组加入 100 μL 细胞裂解液, 设置 6 个复孔, Varioskan Flash 多功能酶标仪检测各组 Cy5 的荧光强度。

1.2.6 qRT-PCR 验证 常规 Trizol 试剂提取 A549、LCSCs 总 RNA, 逆转录成 cDNA 及 qRT-PCR 操作均按照 Takara 试剂说明书操作。每个目的基因及内参做 3 个复孔。以 U6 基因为内参基因, 以 miR-155 作为目的基因, 以 A549 细胞 miR-155 表达量为 1, 计算 LCSCs 中 miR-155 的表达相对于 A549 细胞的倍数关系, 实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验; 计数资料用率表示, 组间采用 χ^2 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A549 及 CD133⁺CD326⁺ 细胞形态学观察 倒置显微镜下观察到普通 A549 细胞为贴壁生长状态, 细胞形态为多角形、梭形。分选的 CD133⁺CD326⁺ 细胞在干细胞培养基中培养后成球形生长, 每个细胞球可见到由几个到几十个细胞融合而成球, 细胞膜圆整, 细胞质折光度较好, 见图 1。



A: A549 细胞; B: CD133⁺CD326⁺ 细胞。

图 1 A549 细胞及 CD133⁺CD326⁺ 细胞形态学观察(×200)

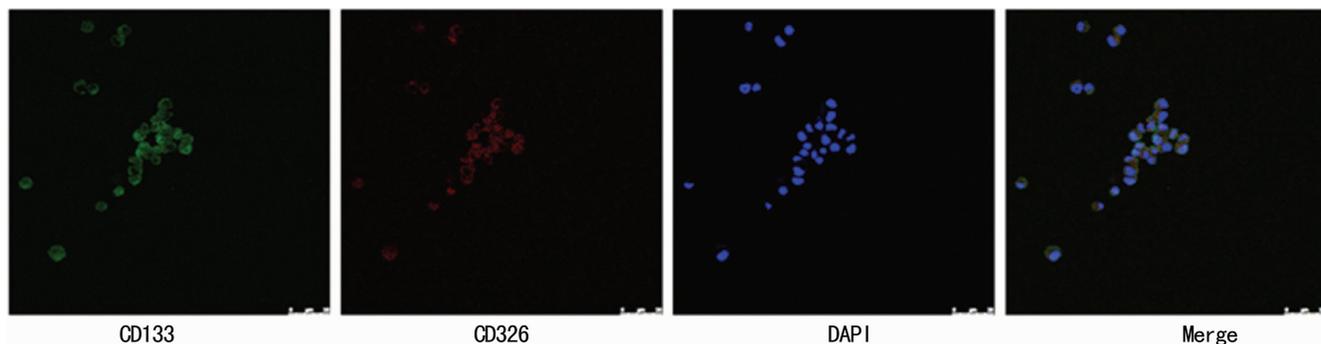
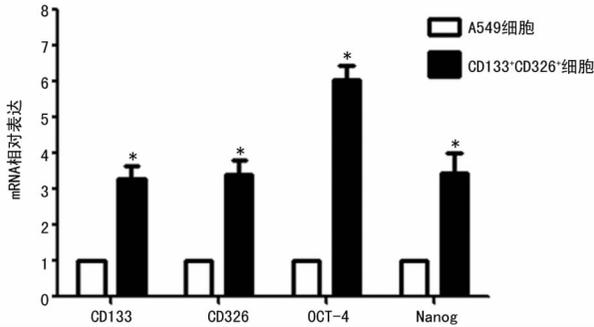


图 2 免疫荧光检测 CD133⁺CD326⁺ 细胞中 CD133 和 CD326 的表达(×400)

2.2 免疫荧光结果 分选的成球干细胞既有表达 CD133 的绿色荧光信号,又有表达 CD326 的红色荧光信号,二者在细胞膜和细胞质都有表达,蓝色表示细胞核染色,见图 2。

2.3 干性基因检测结果 成球生长的 CD133⁺CD326⁺ 细胞高表达干性基因 CD133、CD326、OCT-4 和 Nanog,为普通 A549 细胞的 3.27、3.39、6.01、3.42 倍,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),分选的 CD133⁺CD326⁺ 细胞具有干细胞特性,见图 3。



*: $P < 0.05$, 与 A549 细胞比较。

图 3 qRT-PCR 检测 A549 及 CD133⁺CD326⁺ 细胞中干性基因的表达

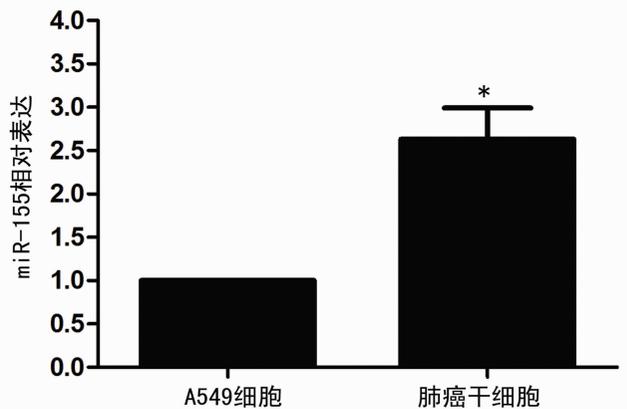
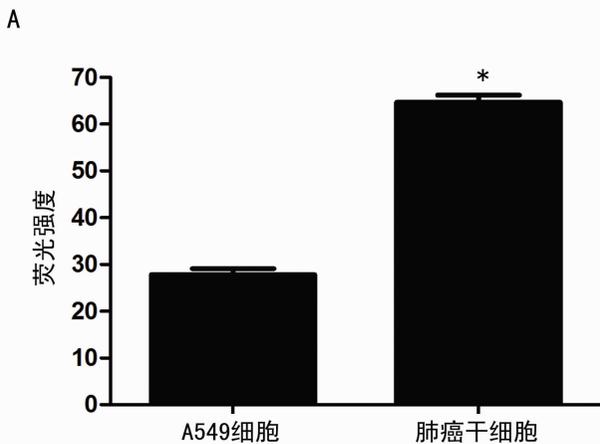
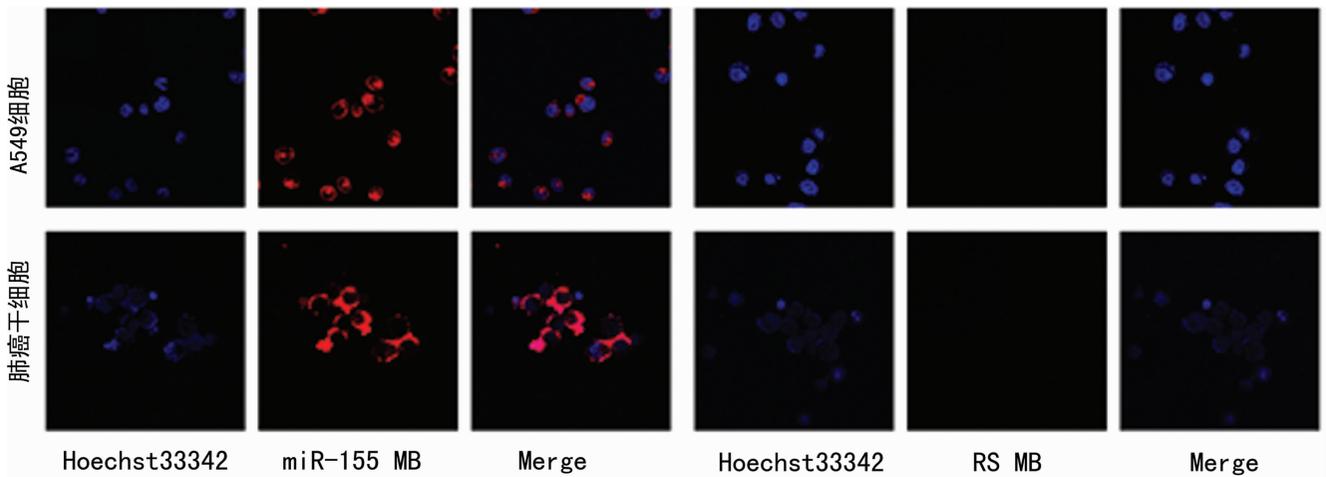
2.4 裸鼠成瘤实验 在注射皮下肿瘤细胞 15 d 后可看到皮下移植瘤的产生。CD133⁺CD326⁺ 细胞在细胞数为 1×10^5 的

数量下可以成瘤,进一步降低细胞数目为 1×10^4 数量下仍具备成瘤能力, 1×10^3 数量下细胞未能成瘤;而 A549 细胞能够成功致瘤所需细胞数目为 1×10^6 ,见表 1。

表 1 裸鼠皮下移植瘤成瘤实验

细胞类型	细胞数量			
	1×10^3	1×10^4	1×10^5	1×10^6
CD133 ⁺ CD326 ⁺ 细胞	0/3	3/3	3/3	
A549 细胞		0/3	0/3	3/3

2.5 miR-155MB 对 miR-155 的识别成像功能检测及 qRT-PCR 验证 在有 miR-155 MB 存在的条件下,各组细胞均可检测到较强的红色荧光信号,大部分定位在细胞质,少数定位在细胞核,其中 LCSCs 红色荧光强度最强。而在阴性对照 CS-RS MB 中未检测到明显红色荧光信号,见图 4A。A549、LCSCs 在 CS 转染 miR-155 MB 平均荧光强度分别为 27.78 和 64.64,比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 4B。qRT-PCR 检测发现 A549、LCSCs 中均有 miR-155 的表达,LCSCs 的 miR-155 的表达是 A549 细胞的 2.63 倍,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 4C。在荧光强度分析中,LCSCs 中 miR-155 的表达是 A549 细胞的 2.33 倍,荧光强弱趋势与 qRT-PCR 中 miR-155 的表达趋势较一致。



A: 激光共聚焦检测对 miR-155 的识别并成像 ($\times 800$); B: 荧光强度分析; C: qRT-PCR 检测。*: $P < 0.05$, 与 A549 细胞比较。

图 4 成像后荧光强度分析及 qRT-PCR 检测 miR-155 的表达

3 讨 论

目前我国肺癌发病率和病死率均居肿瘤首位,大多数患者确诊时已属ⅢB或Ⅳ期,失去了手术机会,5年生存率低于20%^[6]。肺癌的早期诊断可以使患者能够在早期得到合理地诊治,大大降低治疗成本及病死率,因此寻求早期诊断的生物学标志物是提高患者存活率的关键,也是当今肺癌研究的重要任务。

现有研究表明肿瘤干细胞是所有肿瘤产生、发展、复发的根源,研究发现多种实体瘤组织及肿瘤患者血液中存在肿瘤干细胞,这些肿瘤干细胞是肿瘤发生、发展、浸润、转移和复发的根源^[7]。因此寻找肺癌干细胞有可能成为早期诊断一个新的突破点,为肺癌的早期诊断提供新方法^[8]。如果能够直接携带荧光物质靶定肺癌干细胞,将有望达到早期诊断肺癌的目的。

CD133已被研究证实可以作为大多数实体瘤干细胞分离和鉴定的通用分子标记物,其主要特点是在干细胞样细胞中高表达,而在完全分化细胞中几乎不表达;但也有研究认为把CD133作为肺癌干细胞的分子标记并不确切,需要联合其他标记才有助于肺癌干细胞的检测,肺癌、结肠癌、乳腺癌等肿瘤干细胞中也高表达CD326分子,这些细胞特别容易引发肿瘤^[9-10]。因此,本研究基于以上研究背景,根据本课题组前期采用对A549细胞逆向诱导及紫杉醇富集的方法,从A549细胞系中分选出CD133⁺CD326⁺细胞,发现其在干细胞培养基中呈球形,悬浮生长。通过免疫荧光检测悬浮的成球细胞均有CD133和CD326的表达,为CD133⁺CD326⁺细胞。qRT-PCR结果表明CD133⁺CD326⁺细胞高表达干细胞相关基因Oct-4、Nanog、CD133、CD326,且较普通A549细胞表达高。裸鼠成瘤实验表明CD133⁺CD326⁺细胞致瘤能力更强,具有干细胞的特征。

miRNA是一类内源性、单链非编码小分子RNA,通过调控信号通路对肿瘤细胞的发生、增殖、凋亡、侵袭等重要生物学过程发挥作用^[11]。miR-155是miRNA中常见的一种小分子RNA,与肿瘤的增殖、凋亡、转移、不良预后等密切相关^[12]。现有研究表明,miR-155在肺癌组织中显著高表达,检测肺组织内的miR-155表达水平能区分肺癌患者与非肺癌患者,而且肺癌组织中miR-155高表达的患者,其生存期更短^[13]。表明肺癌细胞或肺癌干细胞中高表达的miR-155分子有可能成为肺癌早期诊断的分子靶标。本研究也发现miR-155在分选的CD133⁺CD326⁺肺癌干细胞中高表达。

MB是一个非常敏感的检测DNA、RNA和miRNA的方法,为通过识别基因分子并成像肿瘤细胞提供了可能。壳聚糖为一种天然阳离子多糖,而基因分子本身带有负电荷,二者可以通过静电作用自组装方式形成核壳结构,并被广泛用于介导质粒、siRNA等基因转染,CS已作为理想的基因载体广泛应用于细胞和动物水平实验^[14]。因此,本研究利用CS作为miR-155 MB载体,激光共聚焦检测表明在有miR-155 MB存在的条件下,A549、LCSCs中可检测到较强的红色荧光信号,且以LCSCs红色荧光强度最强,而阴性对照RS MB未检测到明显红色荧光信号。荧光强度分析表明以肺癌干细胞中荧光信号最强,同时通过qRT-PCR进一步检测表明用CS转染MB后的荧光强弱趋势与qRT-PCR中miR-155的表达趋势较一致,

表明可以利用miR-155 MB通过检测细胞高表达的miR-155并成像肺癌干细胞,可以有效地达到识别肿瘤干细胞的目的,从而为肺癌的早期诊断提供新思路、新方法。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
- [2] 林盛, 张振华, 饶明月, 等. A549 肺腺癌始动细胞的富集和鉴定[J]. 重庆医学, 2013, 42(34):4108-4111.
- [3] Jackstadt R, Hermeking H. MicroRNAs as regulators and mediators of c-MYC function[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1849(5):544-553.
- [4] Lee JH, Kim JA, Kwon MH, et al. In situ single step detection of exosome MicroRNA using molecular beacon[J]. Biomaterials, 2015, 54:116-125.
- [5] Zhu HZ, An JH, Yao Q, et al. Chitosan combined with molecular beacon for mir-155 detection and imaging in lung cancer[J]. Molecules, 2014, 19(9):14710-14722.
- [6] Zeng H, Zheng R, Guo Y, et al. Cancer survival in China, 2003-2005: a population-based study[J]. Int J Cancer, 2015, 136(8):1921-1930.
- [7] Banerjee J, Papu John AM, Schuller HM. Regulation of non-small-cell lung cancer stem cell like cells by neurotransmitters and opioid peptides[J]. Int J Cancer, 2015, 137(12):2815-2824.
- [8] Loureiro R, Mesquita KA, Oliveira PJ, et al. Mitochondria in cancer stem cells: a target for therapy[J]. Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov, 2013, 7(2):102-114.
- [9] Zhou X, Li D, Wang X, et al. Galectin-1 is overexpressed in CD133⁺ human lung adenocarcinoma cells and promotes their growth and invasiveness[J]. Oncotarget, 2015, 6(5):3111-3122.
- [10] Lin S, Sun JG, Wu JB, et al. Aberrant MicroRNAs expression in CD133⁺/CD326⁺ human lung adenocarcinoma initiating cells from A549[J]. Mol Cells, 2012, 33(3):277-283.
- [11] Piva R, Spandidos DA, Gambari R. From MicroRNA functions to MicroRNA therapeutics: novel targets and novel drugs in breast cancer research and treatment (Review)[J]. Int J Oncol, 2013, 43(4):985-994.
- [12] He J, Zhang F, Wu Y, et al. Prognostic role of MicroRNA-155 in various carcinomas: results from a meta-analysis[J]. Dis Markers, 2013, 34(6):379-386.
- [13] Geng Q, Fan T, Zhang B, et al. Five MicroRNAs in plasma as novel biomarkers for screening of early-stage non-small cell lung cancer[J]. Respir Res, 2014, 15(1):149.
- [14] Raftery R, O'Brien FJ, Cryan SA. Chitosan for gene delivery and orthopedic tissue engineering applications[J]. Molecules, 2013, 18(5):5611-5647.