论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201412034

miR-125b 对肝癌干细胞自我更新能力的调控作用

彭 维[1*],赵湘湘[2*],苏 立[1],钱 程[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军临床病理学研究所[1];310018 杭州,浙江理工大学生命科学学院[2])

[摘要] **目的** 观察 miR-125b 对肝癌干细胞(liver cancer stem cells,LCSCs)成球、克隆形成、增殖、凋亡、迁移的作用,探讨 miR-125b 对肝癌干细胞自我更新能力的调控作用。**方法** 获取肝癌干细胞;包装表达 miR-125b 的慢病毒并感染肝癌干细胞;光镜计数法检测 miR-125b 对肝癌干细胞成球率及克隆形成率的影响;CCK-8 法检测 miR-125b 对肝癌干细胞增殖能力的影响;DAPI 染色观察 miR-125b 对肝癌干细胞凋亡的影响;Transwell 实验检测 miR-125b 对肝癌干细胞迁移能力的影响。**结果** 与对照组比较,miR-125b 显著降低 LCSCs 的成球率(对照组 27.7%,实验组 0.0%,$P<0.01$)以及抑制其克隆形成能力(对照组 29%,实验组 6%,$P<0.01$);同时 miR-125b 可促进 LCSCs 的凋亡,抑制 LCSCs 的迁移能力($P<0.01$)。**结论** miR-125b 对 LCSCs 的成球能力、克隆形成能力具有明显的抑制作用,表明 miR-125b 对 LCSCs 的自我更新能力具有负向调控作用。miR-125b 也能抑制 LCSCs 的迁移,对 LCSCs 的凋亡具有促进作用。

[关键词] miR-125b;肝癌干细胞;自我更新
[中图法分类号] R73-354; R730.23; R735.7 [文献标志码] A

miR-125b regulates self-renewal in liver cancer stem cells

Peng Wei[1], Zhao Xiangxiang[2], Su Li[1], Qian Cheng[1] ([1]Institute of Clinical Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou, Zhejiang Province, 310018, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of miR-125b on the sphere formation, clone formation, proliferation, apoptosis and migration of liver cancer stem cells (LCSCs), and investigate the regulative role of miR-125b on the self-renewal capacity of LCSCs. **Methods** The lentivirus expressing miR-125b was used to infect obtained LCSCs. Light microscope counting was employed to measure the sphere formation and clone formation in the infected LCSCs. CCK-8 assay was used to detect the effect of miR-125b on the proliferation of LCSCs. DAPI staining and transwell chamber test was used to observe the effect of miR-125b on the cell apoptosis and migration. **Results** Compared with the control cells, miR-125b significant decreased sphere formation (0.0% *vs* 27.7%, $P<0.01$), inhibited the colony formation (6% *vs* 29%, $P<0.01$), promoted the cell apoptosis, and inhibited the migration ability in LCSCs after lentivirus infection ($P<0.01$). **Conclusion** miR-125b exerts significant inhibitory effect on sphere and clone formation of LCSCs, indicating its negative role in the regulation of self-renewal capacity of the stem cells. It also can inhibit the migration and promote the apoptosis of LCSCs.

[**Key words**] miR-125b; liver cancer stem cells; self-renewal

Supported by the National Science Foundation for Young Scholars of China (81301959). Peng Wei and Zhao Xiangxiang are co-first authors who contributed equally to this article. Corresponding author: Qian Cheng, E-mail: cqian8634@gmail.com

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81301959)
* 同等贡献者
[通信作者] 钱 程,E-mail:cqian8634@gmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150319.0952.005.html(2015-03-19)

肝癌大多数情况下为原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC),其在世界最常见癌症中排名第五,且病死率居第三[1]。研究证实肝癌干细胞(liver cancer stem cells,LCSCs)存在于肝癌组织中,且与肝癌的复发、转移以及肝癌患者的预后差有重要关系[2]。因此,靶向肝癌干细胞的治疗策略成为肝癌治疗的研究热点。微小RNA(microRNAs, miRNA)是新近发现的内源性高度保守的非蛋白质编码长约22核苷酸单链小分子RNA[3]。miR-125b是一种非编码、多功能的小RNA分子,通过下调靶基因或在转录水平抑制其表达,在细胞的增殖、分化、凋亡等多个过程中扮演着重要角色[4]。研究显示,miR-125b与肝癌[5]、乳腺癌[6]、肺癌[7]、前列腺癌[8]、结直肠癌[9]、口腔鳞癌[10]、胶质瘤[11]、白血病[12]等多种肿瘤的发生、发展有关。miR-125b既可上调发挥癌基因作用,也可下调发挥抑癌基因作用。近年来研究发现miR-125b参与肝癌细胞的增殖凋亡[13]、肝癌细胞的侵袭转移[14]、肝癌细胞的耐药[15],但其对肝癌干细胞的作用尚不清楚。本研究通过表达miR-125b的慢病毒感染肝癌干细胞,探讨miR-125b对肝癌干细胞成球与克隆形成、增殖、凋亡、迁移等生物学行为的影响,揭示miR-125b对肝癌干细胞自我更新能力的调控作用,旨在为肝癌干细胞的研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

慢病毒质粒:pLKO. 1-miR125b-FP635,pLKO. 1-Scr-FP635以及3个包装质粒(pMD2. G、pMdlg/pRRE及pRSV-Rev)由本实验室保存。HEK-293FT细胞、稳定表达Nanog-GFP的Huh7细胞株由本实验室保存。恒温CO_2培养箱(美国Thermo公司)、多功能酶标仪(美国Thermo公司)、流式细胞仪(美国BD公司)均由第三军医大学西南医院全军临床病理学研究所提供。

1.2 主要试剂

DMEM/F12培养基、DMEM培养基均购自美国Gibco公司,胎牛血清(fetal bovine serum,FBS,以色列BI公司),胰蛋白酶、polybrene均购自美国Sigma公司,细胞因子bFGF、EGF、HGF均购自美国PeproTech公司,B27(美国Gibco公司),谷氨酰胺即L-G(上海生工),青、链霉素(华北制药)。完全培养基:DMEM培养基添加10%(体积比)胎牛血清、青霉素与链霉素(100 U/mL、100 μg/mL);成球培养基:DMEM/F12培养基、bFGF(20 ng/mL)、EGF(20 ng/mL)、HGF(10 ng/mL)、B27(50×)、L-G(2 mmol/L)、青霉素与链霉素(100 U/mL、100 μg/mL)。质粒转染试剂盒Effectene Transfection Reagent(Qiagene公司),CCK-8试剂盒(碧云天公司),DAPI试剂盒(碧云天公司),Transwell细胞小室(德国Merck Millipore公司)。

1.3 测序鉴定miR-125b基因片段

将慢病毒质粒pLKO. 1-miR125b-FP635送测序,鉴定miR-125b基因片段,测序结果与已知的miR-125b序列 5′-CCGGTGTGCGCTCCTCTCAGTCCCTGAGACCCTA-ACTTGTGATGTTTACCGTTTAAATCCACGGGTTAGGCT-CTTGGGAGCTGCGAGTCGTGCTATTT-3′一致。

1.4 获取肝癌干细胞

将本实验室保存的稳定感染Lv-P_{Nanog}-GFP慢病毒的Huh7细胞扩大培养后,胰酶消化细胞,培养基终止消化,离心收集细胞,PBS重悬细胞,细胞悬液过200目筛网后,流式细胞仪分选GFP阳性细胞,这群Huh7-$Nanog^{pos}$细胞为肝癌干细胞[2]。

1.5 脂质体转染法包装慢病毒并感染LCSCs

常规脂质体转染法包装慢病毒,简言之,将HEK-293FT细胞以1×10^5/mL铺6孔细胞培养板,每孔2 mL完全培养基,于37 ℃、5% CO_2培养箱培养,12 h后细胞完全贴壁,将上述慢病毒质粒及包装质粒在1.5 mL EP管中按(1∶1∶1∶1)比例混合好;按质粒转染试剂盒说明书操作步骤:加入3.2 μL Enhancer buffer,涡旋1 s,短暂离心收集管盖上液体,室温静置5 min,加入effectene 10 μL,涡旋10 s,室温静置10 min,这期间将6孔板中培养液换成1.6 mL新鲜的5% FBS的DMEM培养液,向混合后的溶液中加入600 μL完全培养液,用移液枪混匀后逐滴覆盖加入6孔板细胞中,于37 ℃、5% CO_2培养箱培养。转染12 h后更换2 mL/孔的完全培养基,继续培养。转染48 h后收集上清,PEG6000纯化后,过滤除菌,滴度测定后分装-80 ℃保存。将Huh7-$Nanog^{pos}$细胞以1×10^5/mL的密度铺6孔细胞培养板,待细胞贴壁后,换成含有4 mg/mL polybrene的完全培养基,并加入10 MOI的慢病毒,于37 ℃、5% CO_2培养箱培养,8~10 h后换新鲜的完全培养基继续培养。根据加入的不同慢病毒分组:空白组(不加病毒组)、对照组(Lv-Scr-FP635组)和实验组(Lv-miR-125b组)。根据FP635阳性比例,流式细胞仪检测不同慢病毒感染LCSCs的效率。

1.6 miR-125b对LCSCs的成球率的影响

感染48 h后2组细胞均用常规方法收集:胰酶消化细胞,培养基终止消化,离心,PBS重悬细胞,然后对照组和实验组流式分选FP635阳性细胞。2组细胞均用流式细胞仪以20个/孔的密度接种于低黏附96孔细胞培养板,每组12个重复孔,孔板中预先加入100 μL成球培养基,于37 ℃、5% CO_2培养箱培养,3 d后补充1次成球培养基100 μL,再培养7 d后,显微镜下计数

不同组细胞成球个数并计算其成球率[16]。

成球率=(平均细胞球数/接种细胞数)×100%

1.7 miR-125b对LCSCs的克隆形成能力的影响

感染48 h后2组细胞均用常规方法收集:胰酶消化细胞,培养液终止消化,离心,PBS重悬细胞,然后对照组和实验组流式分选FP635阳性细胞。2组细胞均用流式细胞仪以细胞数50/孔接种于24孔细胞培养板,每组24个重复孔,每孔预先加入1 mL完全培养基,于37 ℃、5% CO_2培养箱培养,每3天更换一次完全培养基1 mL,培养14 d后,吸去培养基,用PBS洗1遍,用4%多聚甲醛固定30 min后吸去,0.4%结晶紫溶液染色5 min后吸去,用水轻柔洗净多余结晶紫溶液,自然风干,计数不同组≥50个细胞的克隆并计算其克隆形成率。

克隆形成率=(平均克隆形成个数/接种细胞数)×100%

1.8 miR-125b对LCSCs的增殖能力的影响

感染48 h后2组细胞均用常规方法收集:胰酶消化细胞,培养液终止消化,离心,PBS重悬细胞,然后对照组和实验组流式分选FP635阳性细胞。2组细胞均以2 000个/孔的密度接种于96孔细胞培养板,每组21个重复孔,每孔预先加入100 μL完全培养基,于37 ℃、5% CO_2培养箱培养。待细胞贴壁后,每孔加入10 μL CCK-8溶液,混匀后在细胞培养箱继续培养2 h,于多功能酶标仪检测波长450 nm处光密度值[$D(450)$],每组每天检测3个复孔,连续检测7 d,分析不同组细胞增殖情况。

1.9 miR-125b对LCSCs的凋亡的影响

将Huh7-Nanog^{pos}细胞以5×10^4/mL的密度铺24孔细胞培养板,孔板内已预先放入细胞爬片,每孔500 μL,于37℃、5% CO_2培养箱培养。待细胞贴壁后加入终浓度4 mg/mL的polybrene,再分别加入两种慢病毒,混匀后于37 ℃、5% CO_2培养箱培养,8~10 h后换新鲜的完全培养基继续培养。2 d后,吸去培养液,用PBS洗2遍,4%多聚甲醛固定30 min,再用PBS洗2遍,每孔加入300 μL DAPI染色液,覆盖住细胞爬片即可,室温放置5~10 min,吸去DAPI染色液,用PBS洗1遍,50%甘油封片,荧光显微镜下观察分析不同组细胞凋亡情况。

1.10 miR-125b对LCSCs的迁移能力的影响

感染48 h后2组细胞均用常规方法收集:胰酶消化细胞,培养液终止消化,离心,PBS重悬细胞,然后对照组和实验组流式分选FP635阳性细胞。细胞用无FBS的DMEM培养基重悬,密度为5×10^5/mL,将Transwell细胞小室置于24孔细胞培养板中,向小室中加入1×10^5的细胞即200 μL,而24孔细胞培养板中加入20% FBS的DMEM培养基直至细胞小室内外液面齐平,于37 ℃、5% CO_2培养箱培养。1~2 d后,吸去培养液,用PBS洗2遍,4%多聚甲醛固定30 min,吸去固定液,将小室适当风干,0.1%结晶紫染色20 min,吸去结晶紫染色液,用PBS轻柔洗涤,再用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞,显微镜下随机5个视野观察细胞并计数,分析不同组细胞迁移情况。

1.11 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 19.0统计软件进行方差分析及t检验。

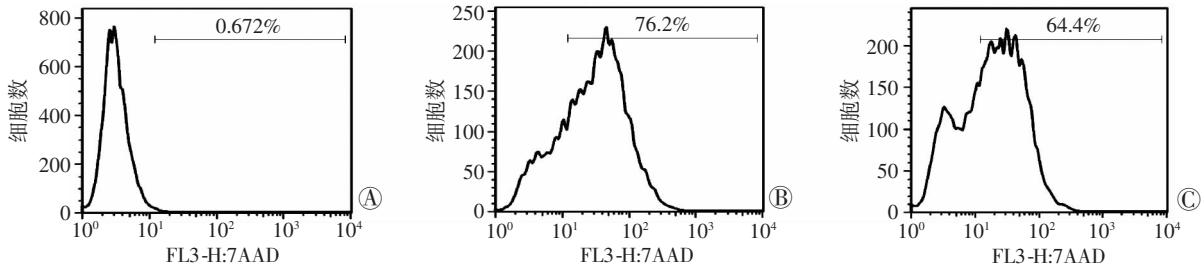
2 结果

2.1 慢病毒感染LCSCs的效率

慢病毒感染LCSCs后第3天,收集细胞,细胞悬液过200目筛网后,流式细胞仪检测FP635阳性细胞比例,确定两种慢病毒感染效率。结果显示:Lv-Scr-FP635和Lv-miR-125b感染Huh7-Nanog^{pos}细胞的效率分别为76.2%和64.4%(图1)。

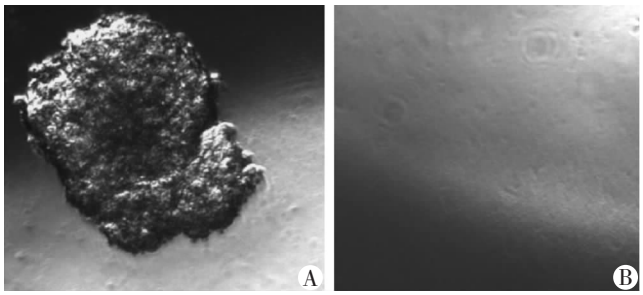
2.2 miR-125b降低LCSCs成球率

显微镜下统计结果显示:对照组(Lv-Scr-FP635组)的成球数为(6±1)个/孔,其成球率达到27.7%;而实验组(Lv-miR-125b组)各孔均未成球,其成球率为0.0%。感染了Lv-miR-125b病毒的实验组Huh7-Nanog^{pos}细胞,其成球率较对照组(感染Lv-Scr-FP635)而言,呈显著的下降趋势($P<0.01$,图2)。这提示miR-125b可以明显下调LCSCs的成球能力。



A:空白组;B:对照组;C:实验组

图1 流式细胞仪检测3组Huh7-Nanog^{pos}细胞的FP635阳性比例

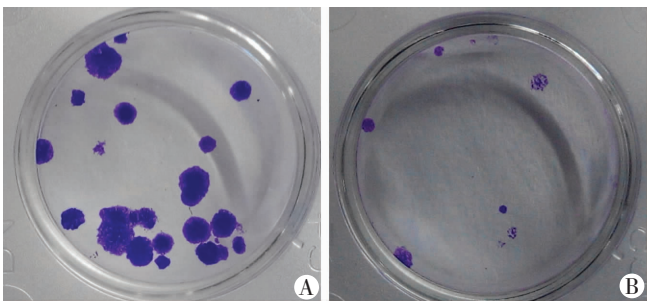


A：对照组；B：实验组

图 2　miR-125b 对 LCSCs 的成球能力的影响　（×100）

2.3　miR-125b 抑制 LCSCs 克隆形成能力

观察各组细胞克隆形成情况，细胞培养过程中空白组 Huh7-Nanog^{pos} 细胞和感染 Lv-Scr-FP635 病毒的对照组 Huh7-Nanog^{pos} 细胞可在早期出现克隆，并逐渐增大及增多，而感染 Lv-miR-125b 病毒的实验组 Huh7-Nanog^{pos} 细胞克隆形成出现比较晚，克隆较小且数目少。2 周后染色可见 Lv-miR-125b 组的克隆比 Lv-Scr-FP63 组小且少。显微镜下观察结果显示：实验组（Lv-miR-125b 组）克隆形成数为（3 ± 3）个/孔，其克隆形成率只有 6%；而对照组（Lv-Scr-FP635 组）克隆形成数为（14 ± 3）个/孔，其克隆形成率达到 29%（$P < 0.01$，图 3）。过表达 miR-125b 的 Huh7-Nanog^{pos} 细胞的克隆形成能力明显下调。这说明 miR-125b 可抑制 LCSCs 克隆形成能力。



A：对照组；B：实验组

图 3　miR-125b 对 LCSCs 的克隆形成能力的影响

2.4　过表达 miR-125b 对 LCSCs 的增殖能力无影响

CCK-8 检测 miR-125b 对 LCSCs 增殖的影响，其结果显示：与对照组相比，Huh7-Nanog^{pos} 细胞过表达 miR-125b 后，其增殖能力无明显变化（图 4）。

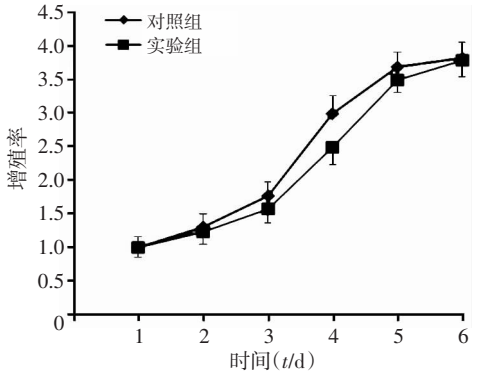


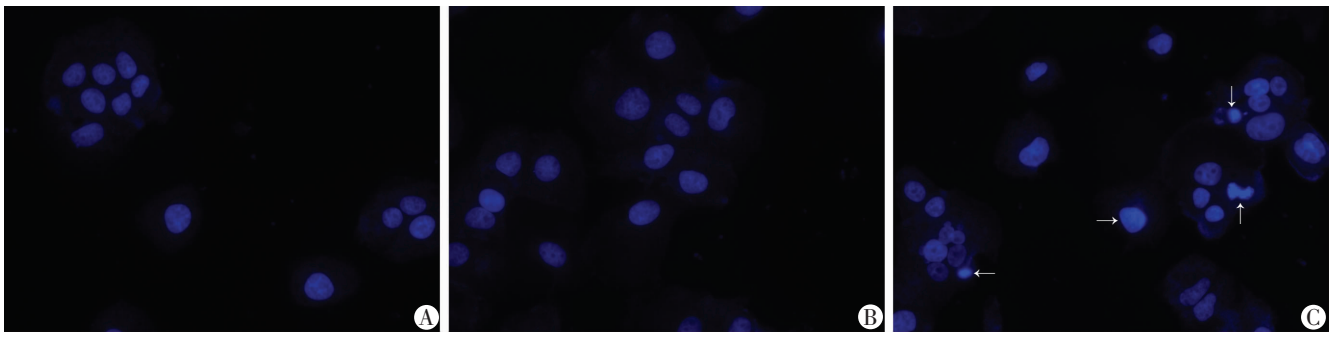
图 4　miR-125b 对 LCSCs 的增殖能力的影响

2.5　miR-125b 促进 LCSCs 的凋亡

荧光显微镜下观察各组细胞 DAPI 染色情况。可见未感染慢病毒的 Huh7-Nanog^{pos} 细胞的细胞核呈均匀染色，几乎看不到凋亡细胞。感染 Lv-Scr-FP635 的 Huh7-Nanog^{pos} 细胞同样染色比较均匀，与未感染慢病毒组的情况类似。而感染 Lv-miR-125b 的 Huh7-Nanog^{pos} 细胞可见细胞核固缩变的致密浓染高亮的凋亡细胞，而且有些可见核碎裂，甚至凋亡晚期出现的向胞核外突出的凋亡小体（图 5）。结果表明 miR-125b 可促进 LCSCs 的凋亡。

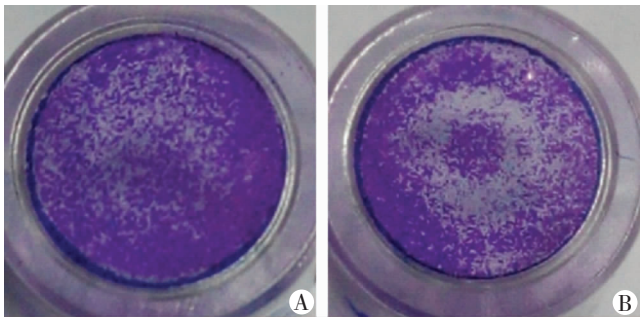
2.6　miR-125b 抑制 LCSCs 的迁移能力

利用 LCSCs 向高浓度血清环境迁移的特点，采用 Transwell 研究 miR-125b 对 LCSCs 迁移的作用，400 × 高倍视野观察结果显示，与感染了 Lv-Scr-FP635 的对照组[（208 ± 18）个/高倍视野]相比，Lv-miR-125b 组[（158 ± 26）个/高倍视野]的细胞向外迁移能力弱（$P < 0.01$，图 6）。这提示 miR-125b 对 LCSCs 的迁移具有负向调节能力。



A：空白组；B：对照组；C：实验组　↑：示细胞凋亡

图 5　荧光显微镜下观察 miR-125b 对 LCSCs 的凋亡的影响　（DAPI ×100）



A：对照组；B：实验组

图6 miR-125b对LCSCs的迁移能力的影响

3 讨论

miR-125b作为抑制基因表达的非编码小RNA，在肝癌细胞的增殖与凋亡、侵袭转移、耐药等方面发挥作用。但是，miR-125b对在肝癌发生发展过程中起重要作用的肝癌干细胞的作用尚未可知。

本研究发现miR-125b对肝癌干细胞的成球能力发挥着明显的抑制作用。另外，在克隆形成方面，miR-125b同样有着显著的抑制性。这些研究结果证实了我们的猜想，miR-125b不仅对肝癌细胞发挥作用，更重要的是其对肝癌干细胞也发挥明显的抑制作用，负向调控肝癌干细胞的自我更新能力。而这一点或许是miR-125b抑制肝癌发生、发展的主要原因。我们进一步研究发现，miR-125b促进肝癌干细胞的凋亡，但是对肝癌干细胞的增殖没有影响。此外，本研究结果显示，miR-125b对肝癌干细胞的迁移能力也有影响，具有一定的抑制作用。因此，我们相信miR-125b在肝癌干细胞中扮演着重要角色。

虽然本研究结果显示miR-125b对肝癌干细胞的自我更新能力及迁移能力具有抑制作用，但是，其发挥作用的作用方式及其作用机制有待进一步探讨。我们也正在进行这方面的研究，miR-125b也许通过Nanog调控肝癌干细胞的自我更新，也许通过ZEB1影响肝癌干细胞的侵袭转移，这些都需要进一步研究去明确。而本研究结果也为接下来的研究工作奠定了实验室基础，为肝癌干细胞的研究提供新的实验数据。

参考文献：

[1] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al*. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69 - 90.

[2] Shan J, Shen J, Liu L, *et al*. Nanog regulates self-renewal of cancer stem cells through the insulin-like growth factor pathway in human hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2012, 56(3): 1004 - 1014.

[3] 姜飞洲，万小平，陈晓悦，等. MiR-125b在肿瘤发生发展中作用的研究进展[J]. 现代生物医学进展，2010，10(8)：1570 - 1572.

[4] Huang K, Dong S, Li W, *et al*. The expression and regulation of microRNA-125b in cancers[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2013, 45(10): 803 - 805.

[5] Tsang F H, Au V, Lu W J, *et al*. Prognostic marker microRNA-125b inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells via suppressing tumorigenic molecule eIF5A2 [J]. Dig Dis Sci, 2014, 59(10): 2477 - 2487.

[6] Feliciano A, Castellvi J, Artero-Castro A, *et al*. miR-125b acts as a tumor suppressor in breast tumorigenesis via its novel direct targets ENPEP, CK2 - alpha, CCNJ, and MEGF9[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76247.

[7] Li Y, Chao Y, Fang Y, *et al*. MTA1 promotes the invasion and migration of non - small cell lung cancer cells by downregulating miR-125b[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2013, 32: 33.

[8] Shi X B, Xue L, Ma A H, *et al*. miR-125b promotes growth of prostate cancer xenograft tumor through targeting pro - apoptotic genes[J]. Prostate, 2011, 71(5): 538 - 549.

[9] 张益，周总光，王玲，等. miR-21和miR-125在结直肠癌中的表达及其与临床病理指标的关系[J]. 中华胃肠外科杂志，2009，12(6)：623 - 626.

[10] Shiiba M, Shinozuka K, Saito K, *et al*. MicroRNA-125b regulates proliferation and radioresistance of oral squamous cell carcinoma [J]. Br J Cancer, 2013, 108(9): 1817 - 1821.

[11] Wu N, Lin X, Zhao X, *et al*. MiR-125b acts as an oncogene in glioblastoma cells and inhibits cell apoptosis through p53 and p38MAPK-independent pathways[J]. Br J Cancer, 2013, 109(11): 2853 - 2863.

[12] Bousquet M, Harris M H, Zhou B, *et al*. MicroRNA miR-125b causes leukemia [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(50): 21558 - 21563.

[13] Jia H Y, Wang Y X, Yan W T, *et al*. MicroRNA-125b Functions as a Tumor Suppressor in Hepatocellular Carcinoma Cells[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(7): 8762 - 8774.

[14] Liang L, Wong C M, Ying Q, *et al*. MicroRNA-125b suppressesed human liver cancer cell proliferation and metastasis by directly targeting oncogene LIN28B2 [J]. Hepatology, 2010, 52(5): 1731 - 1740.

[15] Jiang J X, Gao S, Pan Y Z, *et al*. Overexpression of microRNA-125b sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to 5-fluorouracil through inhibition of glycolysis by targeting hexokinase Ⅱ[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(2): 995 - 1002.

[16] Misuno K, Liu X, Feng S, *et al*. Quantitative proteomic analysis of sphere-forming stem-like oral cancer cells [J]. Stem Cell Res Ther, 2013, 4(6): 156.

（收稿：2014-12-04；修回：2014-12-30）

（编辑 汪勤俭）