

shRNA 干扰富含亮氨酸重复序列 G-蛋白偶联受体 5 对结直肠癌肿瘤干细胞恶性行为的影响及其作用机制

石刚 肖云峰 王斯斯 刘佳嘉 石国露 侯松林 李敬东 冷政伟

【摘要】 目的 探讨 shRNA 干扰富含亮氨酸重复序列 G-蛋白偶联受体 5(Lgr5) 的表达对结直肠癌肿瘤干细胞(CSCs)恶性行为的影响及其作用机制。**方法** 采用实验研究方法。流式细胞术分选 Lgr5⁺ 结直肠癌 CSCs, 转染 shLgr5 慢病毒载体设为实验组; 转染相应对照病毒, 设为对照组。流式细胞术检测 Lgr5⁺ 细胞比例, 荧光定量 PCR(qRT-PCR) 检测 Lgr5 mRNA 的相对表达量; 成球实验检测细胞自我更新能力变化; 平板克隆形成实验及裸鼠皮下成瘤实验分别检测体内成瘤能力变化; qRT-PCR 检测细胞中干细胞基因(Oct4、Sox2、Nanog、KLF4)、CSCs 基因(CD133、CD44、ALDH)及 Wnt/ β -catenin 信号通路关键基因(Axin2、Wnt5a、Wnt3a、Fzd3、c-myc、VEGF、Ascl2、claudin-1)mRNA 表达变化。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。**结果** (1)shRNA 慢病毒介导转染效率, 流式细胞术检测结果显示: 实验组 Lgr5⁺ 细胞为 $6.8\% \pm 1.0\%$, 对照组为 $92.7\% \pm 3.3\%$, 两组比较, 差异有统计学意义($t = 43.148, P < 0.05$)。qRT-PCR 检测两组 CSCs 中 Lgr5 mRNA 相对表达量: 实验组和对照组分别为 0.168 ± 0.057 和 1.148 ± 0.004 , 两组比较, 差异有统计学意义($t = 28.778, P < 0.05$)。(2)Lgr5 下调对结直肠癌 CSCs 成球和成瘤能力的影响, 成球实验结果显示: 实验组和对照组成球数量分别为 (29 ± 6) 个和 (410 ± 10) 个, 两组比较, 差异有统计学意义($t = 41.070, P < 0.05$)。平板克隆成瘤实验结果显示: 实验组和对照组克隆成瘤数量分别为 (72 ± 4) 个和 (412 ± 19) 个, 两组比较, 差异有统计学意义($t = 31.433, P < 0.05$)。裸鼠皮下成瘤实验结果显示: 实验组和对照组裸鼠肿瘤体积分别为 $(81 \pm 15) \text{ mm}^3$ 和 $(328 \pm 24) \text{ mm}^3$, 两组比较, 差异有统计学意义($t = 11.304, P < 0.05$)。(3)Lgr5 下调对相关基因的影响, qRT-PCR 检测结果显示: ①实验组结直肠癌 CSCs 中干细胞基因 Oct4、Sox2、Nanog、KLF4 mRNA 的相对表达量分别为 0.377 ± 0.093 、 0.662 ± 0.104 、 3.591 ± 0.300 、 0.425 ± 0.091 ; 对照组结直肠癌 CSCs 中上述基因 mRNA 的相对表达量分别为 1.957 ± 0.026 、 2.137 ± 0.015 、 5.831 ± 0.165 、 1.536 ± 0.014 ; 两组上述指标比较, 差异均有统计学意义($t = 23.079, 22.261, 8.446, 19.186, P < 0.05$)。②实验组结直肠癌 CSCs 中 CSCs 基因 CD133、CD44、ALDH mRNA 相对表达量分别为 1.490 ± 0.155 、 5.535 ± 0.487 、 1.640 ± 0.039 ; 对照组结直肠癌 CSCs 中上述基因 mRNA 的相对表达量分别为 2.488 ± 0.061 、 9.908 ± 0.332 、 5.718 ± 0.292 ; 两组上述指标比较, 差异均有统计学意义($t = 8.170, 9.667, 27.849, P < 0.05$)。③实验组结直肠癌 CSCs 中 Wnt/ β -catenin 通路相关基因 Axin2、Wnt5a、Wnt3a、Fzd3、c-myc、VEGF、Ascl2、claudin-1 mRNA 相对表达量分别为 1.592 ± 0.267 、 0.528 ± 0.138 、 2.153 ± 0.078 、 1.480 ± 0.064 、 0.248 ± 0.128 、 1.492 ± 0.025 、 0.658 ± 0.095 、 1.647 ± 0.087 ; 对照组结直肠癌 CSCs 中上述基因 mRNA 的相对表达量分别为 3.651 ± 0.224 、 2.570 ± 0.093 、 2.301 ± 0.157 、 1.636 ± 0.058 、 1.415 ± 0.080 、 2.610 ± 0.159 、 2.480 ± 0.123 、 3.432 ± 0.273 ; 两组结直肠癌 CSCs 中 Axin2、Wnt5a、c-myc、VEGF、Ascl2、claudin-1 比较, 差异均有统计学意义($t = 7.316, 15.332, 12.649, 12.320, 14.831, 9.063, P < 0.05$)。两组结直肠癌 CSCs 中 Wnt3a、Fzd3 比较, 差异均无统计学意义($t = 2.887, 2.242, P > 0.05$)。**结论** shRNA 干扰结直肠癌 CSCs 中 Lgr5 表达后, 细胞的恶性行为受到抑制, 这种作用可能是通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路活性发挥生物学效应。

【关键词】 结直肠肿瘤; 肿瘤干细胞; 自我更新; Wnt/ β -catenin 通路

基金项目: 国家自然科学基金(81402444); 四川省教育厅重点项目(16ZA0226)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2017.12.013

作者单位: 637000 南充, 川北医学院肝胆胰肠疾病研究所消化系统肿瘤研究中心(石刚、肖云峰、王斯斯、刘佳嘉、石国露、侯松林、李敬东); 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科(冷政伟)

通信作者: 冷政伟, Email: lengzhengwei@163.com

Effects and mechanisms of shRNA interfered with expression of leucine-rich repeat containing G-protein coupled receptor 5 on the malignant behaviors of colorectal cancer stem cells

Shi Gang*, Xiao Yunfeng, Wang Sisi, Liu Jiajia, Shi Guolu, Hou Songlin, Li Jingdong, Leng Zhengwei. * Digestive System Cancer Research Center, Hepatobiliary, Pancreatic and Intestinal Diseases Research Institute, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China

Corresponding author: Leng Zhengwei, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China, Email: lengzhengwei@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects and mechanisms of shRNA interfered with expression of leucine-rich repeat containing G-protein coupled receptor 5 (Lgr5) on the malignant behaviors of colorectal cancer stem cells (CSCs). **Methods** The experimental study was conducted. The CSCs expressing Lgr5⁺ were sorted by fluorescence activated cell sorting. Lgr5⁺ cells that were transfected with Lgr5-shRNA lentiviral vector and non-target shRNA lentiviral vector were respectively allocated into the experimental group and control group. The percentage of Lgr5⁺ cells was analyzed by flow cytometry. The relative expression of Lgr5 mRNA was detected by fluorescence quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The capacity of self-renewal was detected by sphere forming assay. The tumorigenesis *in vitro* and *in vivo* were respectively measured by colony formation assay and xenografting experiment. The mRNA expressions of stem cells related genes (Oct4, Sox2, Nanog, KLF4), CSCs genes (CD133, CD44, ALDH) and Wnt/ β -catenin pathway key genes (Axin2, Wnt5a, Wnt3a, Fzd3, c-myc, VEGF, Ascl2, claudin-1) were detected by qRT-PCR. Measurement data with normal distribution were represented as $\bar{x} \pm s$. Comparison between groups was analyzed using the *t* test. **Results** (1) Transfection efficiency of shRNA lentiviral vector induced Lgr5 by flow cytometry was respectively $6.8\% \pm 1.0\%$ in the experimental group and $92.7\% \pm 3.3\%$ in the control group, with a statistically significant difference ($t = 43.148, P < 0.05$). The relative expression of Lgr5 mRNA measured by qRT-PCR was respectively 0.168 ± 0.057 in the experimental group and 1.148 ± 0.004 in the control group, with a statistically significant difference ($t = 28.778, P < 0.05$). (2) The capacity of self-renewal was detected by sphere forming assay. The results of sphere forming assay: the number of spheres was 29 ± 6 in the experimental group and 410 ± 10 in the control group, with a statistically significant difference ($t = 41.070, P < 0.05$). The results of colony formation assay: the numbers of colonies in the experimental group and control group were respectively 72 ± 4 and 412 ± 19 , showing a statistically significant difference ($t = 31.433, P < 0.05$). The results of tumorigenesis: the volumes of tumors in the experimental group and control group were respectively $(81 \pm 15) \text{ mm}^3$ and $(328 \pm 24) \text{ mm}^3$, with a statistically significant difference ($t = 11.304, P < 0.05$). (3) The effects of Lgr5 down-regulation on related genes, results of qRT-PCR detection: ① The mRNA relative expressions of Oct4, Sox2, Nanog and KLF4 (stem cells related genes) were $0.377 \pm 0.093, 0.662 \pm 0.104, 3.591 \pm 0.300, 0.425 \pm 0.091$ in the experimental group and $1.957 \pm 0.026, 2.137 \pm 0.015, 5.831 \pm 0.165, 1.536 \pm 0.014$ in the control group, with statistically significant differences ($t = 23.079, 22.261, 8.446, 19.186, P < 0.05$). ② The mRNA relative expressions of CD133, CD44 and ALDH (CSCs genes) were $1.490 \pm 0.155, 5.535 \pm 0.487, 1.640 \pm 0.039$ in the experimental group and $2.488 \pm 0.061, 9.908 \pm 0.332, 5.718 \pm 0.292$ in the control group, with statistically significant differences ($t = 8.170, 9.667, 27.849, P < 0.05$). ③ The mRNA relative expressions of Axin2, Wnt5a, Wnt3a, Fzd3, c-myc, VEGF, Ascl2 and claudin-1 genes in the Wnt/ β -catenin pathway were respectively $1.592 \pm 0.267, 0.528 \pm 0.138, 2.153 \pm 0.078, 1.480 \pm 0.064, 0.248 \pm 0.128, 1.492 \pm 0.025, 0.658 \pm 0.095, 1.647 \pm 0.087$ in the experimental group and $3.651 \pm 0.224, 2.570 \pm 0.093, 2.301 \pm 0.157, 1.636 \pm 0.058, 1.415 \pm 0.080, 2.610 \pm 0.159, 2.480 \pm 0.123, 3.432 \pm 0.273$ in the control group. There were statistically significant differences in the mRNA relative expressions of Axin2, Wnt5a, c-myc, VEGF, Ascl2 and claudin-1 genes between the 2 groups ($t = 7.316, 15.332, 12.649, 12.320, 14.831, 9.063, P < 0.05$), and no statistically significant difference in the mRNA relative expressions of Wnt3a and Fzd3 between the 2 groups ($t = 2.887, 2.242, P > 0.05$). **Conclusion** The malignant behaviors of colorectal CSCs are suppressed after shRNA lentivirus interfered with expression of Lgr5, and its mechanism is related to inhibiting activity of Wnt/ β -catenin pathway.

【Key words】 Colorectal neoplasms; Cancer stem cells; Self-renewal; Wnt/ β -catenin pathway

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81402444); Key Program of Education Department of Sichuan Province (16ZA0226)

结直肠癌发病率和病死率在我国恶性肿瘤中排名第 5 位;在美国已跃居第 3 位,居消化系统肿瘤第 1 位;肿瘤耐药、转移复发是结直肠癌的主要死因^[1-4]。已有的研究结果证实:肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)介导了肿瘤的转移复发^[5-7]。因

此,CSCs 已经成为治疗肿瘤重要的靶点之一^[5,8-10]。目前通过标记 CD133、CD44、CD166、上皮细胞黏附分子、富含亮氨酸重复序列 G-蛋白偶联受体 5(leucine-rich repeat containing G-protein coupled receptor 5, Lgr5)、乙醛脱氢酶等标志物分选结直肠癌 CSCs,

也可运用 CSCs 排除 Hoechst33342 染料特征获得侧群细胞^[11-17]。Lgr5 属于 G 蛋白偶联受体超家族成员。已有的研究表明:Lgr5 的高表达与结直肠癌恶性行为密切相关,但 Lgr5 的作用及分子机制不明^[14]。本研究以纯化的 Lgr5⁺结直肠癌 CSCs 为研究对象,探讨 Lgr5 表达对结直肠癌 CSCs 恶性行为的影响及其作用机制。

1 材料与方法

采用实验研究方法。

1.1 材料

人结直肠癌 HCT116 细胞购自美国 ATCC 公司,McCoy's 5A 培养基、DMEM/F12 培养基及胎牛血清购自美国 Gibco 公司,胰岛素及 7-氨基-放线菌素 D(7-aminoactinomycin D, 7-AAD)购自美国 Sigma 公司,表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、重组成纤维细胞生长因子(recombinant fibroblast growth factor, bFGF)购自美国 PeproTech 公司, B27 购自美国 Invitrogen 公司,牛血清白蛋白购自美国 Amresco 公司, Lgr5-FITC 及同型对照流式细胞术抗体、Human Fc Receptor Binding inhibitor buffer 均购自美国 eBioscience 公司, shRNA 慢病毒购自上海吉凯基因,所有引物由美国 Invitrogen 公司合成。裸鼠购自北京华富康公司,实验动物生产许可证号 SCXK(京)2015-0004,实验动物使用许可证号 SYXK(鄂)2015-0057。本研究通过华中科技大学伦理学委员会审批,批号为 S255。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞术分选 Lgr5⁺结直肠癌 CSCs: 1×10^6 个细胞加入 1 mL 封闭液(含 20% FBS 和 0.4% BSA 的 PBS 液)4 °C 孵育 2 h,离心弃上清液,细胞悬浮于 10 μ L Human Fc Receptor Binding inhibitor buffer 及 40 μ L 封闭液,室温作用 15 min 后加入相应 Lgr5-FITC 及同型对照抗体,4 °C 避光孵育 30 min,离心弃上清液后细胞悬浮于 1 mL 冷 PBS 中,分选前加入 7-AAD(终浓度 2 μ g/mL)室温染色 5 min 以利分选时去除死细胞,上机分选(BD FACS Aria Fusion)获得 Lgr5⁺结直肠癌 CSCs。

1.2.2 慢病毒转染及分组:将 Lgr5⁺结直肠癌 CSCs 悬浮培养于含有 5 mg/mL 胰岛素、0.4% BSA、2% B27、10 ng/mL EGF、10 ng/mL bFGF 的 DMEM/F12 培养基中培养 48 h 后,以感染复数为 20(感染复数=病毒活性单位数/细胞数)的比例加入慢病毒,转染 12 h。转染 shLgr5 慢病毒载体设为实验组;转染相

应对照病毒,设为对照组。收集两组细胞悬浮培养于上述 DMEM/F12 培养基中,7 d 后进行后续实验。shLgr5 干扰序列为 5'-GCAGAAUAAUCAGCUAAG-ATT-3'。

1.2.3 shRNA 慢病毒介导转染效率:流式细胞术检测 Lgr5⁺细胞比例。荧光定量 PCR(real-time PCR, qRT-PCR)检测 Lgr5 mRNA 的相对表达量。基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示。

1.2.4 成球实验:取 500 个 Lgr5⁺结直肠癌 CSCs,用 6 mL 上述 DMEM/F12 培养基悬浮培养,参照文献[17]的方法,15 d 后显微镜下计数细胞球数量。

1.2.5 平板克隆形成实验:取 500 个 Lgr5⁺结直肠癌 CSCs,2 mL 添加 10% FBS 的 McCoy's 5A 培养基培养于 24 孔板中,参照文献[17]的方法,15 d 后结晶紫酒精溶液染色、计数克隆数量。

1.2.6 裸鼠皮下成瘤实验:参照文献[12]的方法,取 4~6 周龄裸鼠, 1×10^6 个细胞悬浮于 100 μ L 冷 PBS 中,耳后颈部脂肪垫中注射,当肿瘤直径达到 2 cm 或注射后 60 d,4 mg/g 水合氯醛处死裸鼠,测量瘤体大小(体积=长 $\times$ 宽² $\times$ 0.5),进行后续分析。

1.2.7 qRT-PCR 实验:参照文献[12]的方法,检测干细胞基因(Oct4、Sox2、Nanog、KLF4)、CSCs 基因(CD133、CD44、ALDH)及 Wnt/ β -catenin 信号通路关键基因(Axin2、Wnt5a、Wnt3a、Fzd3、c-myc、VEGF、Ascl2、claudin-1)mRNA 表达变化。基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 shRNA 慢病毒介导转染效率

流式细胞术检测结果显示:实验组 Lgr5⁺细胞为 $6.8\% \pm 1.0\%$,对照组为 $92.7\% \pm 3.3\%$,两组比较,差异有统计学意义($t = 43.148, P < 0.05$)。见图 1。

qRT-PCR 检测两组 CSCs 中 Lgr5 mRNA 相对表达量:实验组和对照组分别为 0.168 ± 0.057 和 1.148 ± 0.004 ,两组比较,差异有统计学意义($t = 28.778, P < 0.05$)。

2.2 Lgr5 下调对结直肠癌 CSCs 成球和成瘤能力的影响

成球实验结果显示:实验组和对照组成球数量分别为 (29 ± 6) 个和 (410 ± 10) 个,两组比较,差异有

统计学意义($t=41.070, P<0.05$)。见图 2。

平板克隆成瘤实验结果显示:实验组和对照组克隆成瘤数量分别为(72±4)个和(412±19)个,两组比较,差异有统计学意义($t=31.433, P<0.05$)。见图 3。

裸鼠皮下成瘤实验结果显示:实验组和对照组裸鼠皮下肿瘤体积分别为(81±15) mm³和(328±24) mm³,两组比较,差异有统计学意义($t=11.304, P<0.05$)。见图 4。

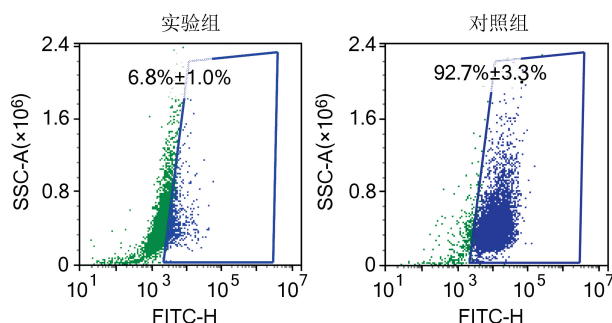


图 1 流式细胞术检测 Lgr5⁺肿瘤干细胞的比例
注:Lgr5:富含亮氨酸重复序列 G-蛋白偶联受体 5

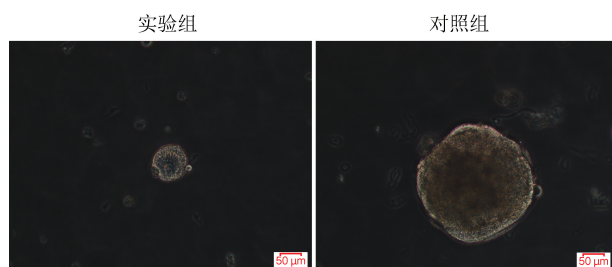


图 2 成球实验检测肿瘤干细胞自我更新能力

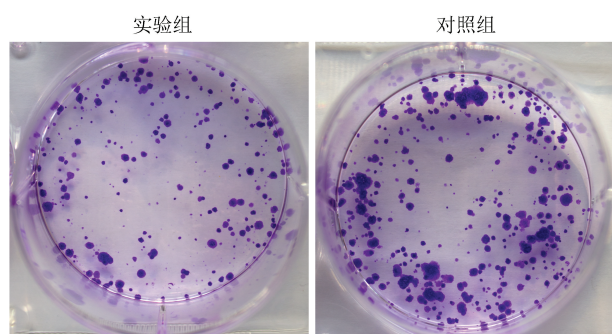


图 3 平板克隆形成实验检测肿瘤干细胞体外成瘤能力



图 4 裸鼠皮下成瘤实验检测肿瘤干细胞体内成瘤能力

2.3 Lgr5 下调对相关基因的影响

qRT-PCR 检测结果显示:实验组结直肠癌 CSCs

中干细胞基因 Oct4、Sox2、Nanog、KLF4 mRNA 的相对表达量分别为 0.377 ± 0.093 、 0.662 ± 0.104 、 3.591 ± 0.300 、 0.425 ± 0.091 ;对照组结直肠癌 CSCs 中上述基因 mRNA 的相对表达量分别为 1.957 ± 0.026 、 2.137 ± 0.015 、 5.831 ± 0.165 、 1.536 ± 0.014 ;两组上述指标比较,差异均有统计学意义($t=23.079, 22.261, 8.446, 19.186, P<0.05$)。

实验组结直肠癌 CSCs 中 CSCs 基因 CD133、CD44、ALDH mRNA 相对表达量分别为 1.490 ± 0.155 、 5.535 ± 0.487 、 1.640 ± 0.039 ;对照组结直肠癌 CSCs 中上述基因 mRNA 的相对表达量分别为 2.488 ± 0.061 、 9.908 ± 0.332 、 5.718 ± 0.292 ;两组上述指标比较,差异均有统计学意义($t=8.170, 9.667, 27.849, P<0.05$)。

实验组结直肠癌 CSCs 中 Wnt/ β -catenin 通路相关基因 Axin2、Wnt5a、Wnt3a、Fzd3、c-myc、VEGF、Ascl2、claudin-1 mRNA 相对表达量分别为 1.592 ± 0.267 、 0.528 ± 0.138 、 2.153 ± 0.078 、 1.480 ± 0.064 、 0.248 ± 0.128 、 1.492 ± 0.025 、 0.658 ± 0.095 、 1.647 ± 0.087 ;对照组结直肠癌 CSCs 中上述基因 mRNA 的相对表达量分别为 3.651 ± 0.224 、 2.570 ± 0.093 、 2.301 ± 0.157 、 1.636 ± 0.058 、 1.415 ± 0.080 、 2.610 ± 0.159 、 2.480 ± 0.123 、 3.432 ± 0.273 。两组结直肠癌 CSCs 中 Axin2、Wnt5a、c-myc、VEGF、Ascl2、claudin-1 比较,差异均有统计学意义($t=7.316, 15.332, 12.649, 12.320, 14.831, 9.063, P<0.05$)。两组结直肠癌 CSCs 中 Wnt3a、Fzd3 比较,差异均无统计学意义($t=2.887, 2.242, P>0.05$)。

3 讨论

结直肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤,结直肠癌患者 40%~50% 在初诊时已有远处转移,即使施行了根治性手术和规范放化疗,最终仍然有>50% 的患者出现转移复发;肿瘤耐药、转移复发是结直肠癌的主要死因^[18-22]。CSCs 强大的自我更新能力是介导肿瘤耐药、转移复发的根源^[5-7]。因此,维持 CSCs 自我更新能力的分子机制已经成为肿瘤研究的热点^[8-10]。目前标识分选结直肠癌 CSCs 的标志物较多^[11-12, 16]。其中 Lgr5 被认为是可靠的结直肠癌 CSCs 标识, Kemper 等^[23]的研究结果证实:Lgr5⁺癌细胞表现出更强的自我更新及成瘤能力,外源性高表达 Lgr5 后,肿瘤细胞克隆能力明显增加,下调 Lgr5 表达后细胞完全失去克隆能力。新近的研究结果显示:Lgr5 可能参与调控 Wnt/ β -catenin 通路活

性,而 Wnt/ β -catenin 通路在维持 CSCs 自我更新及成瘤能力过程中发挥重要作用^[24-25]。故本研究采用 Lgr5 分选结直肠癌的 CSCs,并干预其表达,研究模型可靠。

CSCs 通过自我更新介导的对称或不对称分裂产生至少 1 个保留干细胞特征的子代细胞,以维持其干细胞潜能和肿瘤的增殖,CSCs 介导肿瘤耐药、转移复发的根源即为其强大的自我更新能力。本研究首先通过流式细胞术检测证实 Lgr5 下调后 CSCs 比例出现明显下降。这提示 CSCs 自我更新能力受到抑制;同时成球实验也证实 Lgr5 下调后 CSCs 的自我更新能力受到抑制;进一步研究结果发现:其体内、体外成瘤能力被削弱。

qRT-PCR 检测结果显示:结直肠癌 CSCs 基因 CD133、CD44、ALDH 的 mRNA 表达下降,CSCs 中干细胞基因 Oct4、Sox2、Nanog、KLF4 的 mRNA 表达下降。干细胞基因 Oct4、Sox2、Nanog、KLF4 在维持正常干细胞及 CSCs 自我更新过程中发挥重要作用。笔者团队前期研究结果证实:富集结直肠癌 CSCs 的细胞球中下调 KLF4 后,细胞球中 CD133⁺ CSCs 比例明显下降,细胞的自我更新能力、体内外成瘤能力均被削弱^[7]。多项研究结果也证明:Oct4、Sox2、Nanog、KLF4 维持正常干细胞及 CSCs“干性”特征中发挥关键作用^[26-28]。CSCs 中干细胞基因 Oct4、Sox2、Nanog、KLF4 表达下降,上述基因在维持细胞干性及自我更新过程中发挥关键作用。这提示 Lgr5 下调后结直肠癌 CSCs 自我更新能力被削弱。

Wnt/ β -catenin 通路肿瘤的发生、发展密切相关,此通路的活性增强可激活其下游靶基因,如 c-myc、VEGF、Ascl2 等,从而影响肿瘤细胞恶性行为^[29-30]。本研究检测了 Wnt/ β -catenin 通路基因表达变化,结果显示:除 Wnt3a、Fzd3 的 mRNA 表达无明显变化外,Wnt5a、Axin2、c-myc、VEGF、Ascl2、claudin-1 基因的 mRNA 表达明显下调。这提示 Lgr5 下调后结直肠癌 CSCs 中 Wnt/ β -catenin 通路活性可能受到抑制。

综上,Lgr5 在维持结直肠癌 CSCs 自我更新、体内外成瘤能力中发挥重要作用,其机制可能与调控 Wnt/ β -catenin 通路活性相关。但由于 CSCs 数量稀少(本研究中 Lgr5⁺ 比例为 0.5%),获取大量 CSCs 非常困难,故本研究中无法获得大量细胞同时进行蛋白印迹实验以检测蛋白质表达变化;证实翻译水平 Lgr5 对 CSCs 的调控作用,还需要进一步深入研究。

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. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30. DOI: 10.3322/caac.21332.
- [3] Chiou GY, Yang TW, Huang CC, et al. Musashi-1 promotes a cancer stem cell lineage and chemoresistance in colorectal cancer cells[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 2172. DOI: 10.1038/s41598-017-02057-9.
- [4] Liu X, Fu Q, Du Y, et al. MicroRNA as Regulators of Cancer Stem Cells and Chemoresistance in Colorectal Cancer[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2016, 16(9): 738-754. DOI: 10.2174/1568009616666151118114759.
- [5] Fesler A, Guo S, Liu H, et al. Overcoming chemoresistance in cancer stem cells with the help of microRNAs in colorectal cancer[J]. Epigenomics, 2017, 9(6): 793-796. DOI: 10.2217/epi-2017-0041.
- [6] Du L, Li YJ, Fakih M, et al. Role of SUMO activating enzyme in cancer stem cell maintenance and self-renewal[J]. Nature Communications, 2016, 7: 12326. DOI: 10.1038/ncomms12326.
- [7] Zeuner A, Todaro M, Stassi G, et al. Colorectal cancer stem cells: from the crypt to the clinic[J]. Cell Stem Cell, 2014, 15(6): 692-705. DOI: 10.1016/j.stem.2014.11.012.
- [8] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [9] Ishizawa K, Rasheed ZA, Karisch R, et al. Tumor-initiating cells are rare in many human tumors[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(3): 279-282. DOI: 10.1016/j.stem.2010.08.009.
- [10] Duan JJ, Cai J, Guo YF, et al. ALDH1A3, a metabolic target for cancer diagnosis and therapy[J]. Int J Cancer, 2016, 139(5): 965-975. DOI: 10.1002/ijc.30091.
- [11] Zhou JY, Chen M, Ma L, et al. Role of CD44 (high)/CD133 (high) HCT-116 cells in the tumorigenesis of colon cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(7): 7657-7666. DOI: 10.18632/oncotarget.7084.
- [12] Leng Z, Tao K, Xia Q, et al. Krüppel-like factor 4 acts as an oncogene in colon cancer stem cell-enriched spheroid cells[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56082. DOI: 10.1371/journal.pone.0056082.
- [13] Sansone P, Ceccarelli C, Berishaj M, et al. Self-renewal of CD133 (hi) cells by IL6/Notch3 signalling regulates endocrine resistance in metastatic breast cancer[J]. Nat Commun, 2016, 7: 10442. DOI: 10.1038/ncomms10442.
- [14] Jiang Y, Li W, He X, et al. Lgr5 expression is a valuable prognostic factor for colorectal cancer: evidence from a meta-analysis[J]. BMC Cancer, 2016, 16: 12. DOI: 10.1186/s12885-015-1986-2.
- [15] Dotse E, Bian Y. Isolation of colorectal cancer stem-like cells[J]. Cytotechnology, 2016, 68(4): 609-619. DOI: 10.1007/s10616-014-9806-0.
- [16] Wahab SMR, Islam F, Gopalan V, et al. The Identifications and Clinical Implications of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer[J]. Clin Colorectal Cancer, 2017, 16(2): 93-102. DOI: 10.1016/j.clcc.2017.01.011.
- [17] 冷政伟, 钟晓蓉, 熊永福, 等. 结肠癌 DLD-1 细胞肿瘤干细胞富集模型的比较[J]. 中华消化外科杂志, 2016, 15(2): 168-172. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2016.02.011.
- [18] 汤颖, 展瑞, 李艳青, 等. Gli1 蛋白高表达与结直肠癌复发转移的相关性研究[J]. 肿瘤研究与临床, 2017, 29(4): 227-230. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-9801.2017.04.003.
- [19] 王林娜, 张清泉, 侯素平, 等. RegIV、EGFR 和 survivin 在结直肠癌组织中的表达及临床意义[J]. 解放军医药杂志, 2016, 28(6): 45-48. DOI: 10.3969/j.issn.2095-140X.2016.06.011.
- [20] 马敏星, 周瑞, 张嘉刚, 等. 结直肠癌中 CD44 和上皮细胞黏附

- 分子相关基因与通路的生物信息学研究[J]. 中华消化杂志, 2016, 36(3): 182-187. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1432.2016.03.008.
- [21] 倪阵, 陈虹彬, 刘炼炼, 等. 内镜下黏膜剥离术和内镜下黏膜切除术治疗 153 例结肠癌前病变和早期癌的疗效对比[J]. 中华消化杂志, 2016, 36(2): 122-124. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1432.2016.02.011.
- [22] 陈治明, 周克, 吴平, 等. 早期肠内肠外营养支持对结肠癌患者术后影响[J]. 局解手术学杂志, 2015, 24(1): 85-86, 87. DOI: 10.11659/jjssx.10E014056.
- [23] Kemper K, Prasetyanti PR, De Lau W, et al. Monoclonal antibodies against Lgr5 identify human colorectal cancer stem cells[J]. Stem Cells, 2012, 30(11): 2378-2386. DOI: 10.1002/stem.1233.
- [24] Ordóñez-Morín P, Dafflon C, Imajo M, et al. HOXA5 Counteracts Stem Cell Traits by Inhibiting Wnt Signaling in Colorectal Cancer[J]. Cancer Cell, 2015, 28(6): 815-829. DOI: 10.1016/j.ccell.2015.11.001.
- [25] Basu S, Haase G, Ben-Ze'ev A. Wnt signaling in cancer stem cells and colon cancer metastasis[J]. F1000 Res, 2016, 5(F1000 Faculty Rev): 699. DOI: 10.12688/f1000research.7579.1.
- [26] Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, et al. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells[J]. Cell, 2009, 137(4): 647-658. DOI: 10.1016/j.cell.2009.02.038.
- [27] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors[J]. Cell, 2006, 126(4): 663-676. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- [28] Wang ML, Chiou SH, Wu CW. Targeting cancer stem cells: emerging role of Nanog transcription factor[J]. Onco Targets Ther, 2013, 6: 1207-1220. DOI: 10.2147/OTT.S38114.
- [29] Chen J, Zhao J, Chen X, et al. Hyper activation of β -catenin signalling induced by IKK ϵ inhibition thwarts colorectal cancer cell proliferation[J]. Cell Prolif, 2017, 50(4): e12350. DOI: 10.1111/cpr.12350.
- [30] Rahmani F, Avan A, Hashemy SI, et al. Role of Wnt/ β -catenin signaling regulatory microRNAs in the pathogenesis of colorectal cancer[J]. J Cell Physiol, 2017[Epub ahead of print]. DOI: 10.1002/jcp.25897.

(收稿日期: 2017-10-23)

(本文编辑: 赵蕾)

本文引用格式

石刚, 肖云峰, 王斯斯, 等. shRNA 干扰富含亮氨酸重复序列 G-蛋白偶联受体 5 对结肠癌肿瘤干细胞恶性行为的影响及其作用机制[J]. 中华消化外科杂志, 2017, 16(12): 1236-1241. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2017.12.013.

Shi Gang, Xiao Yunfeng, Wang Sisi, et al. Effects and mechanisms of shRNA interfered with expression of leucine-rich repeat containing G-protein coupled receptor 5 on the malignant behaviors of colorectal cancer stem cells[J]. Chin J Dig Surg, 2017, 16(12): 1236-1241. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2017.12.013.

• 读者 • 作者 • 编者 •

中华医学会系列杂志论文作者署名规范

一、作者署名

中华医学会系列杂志论文作者姓名在提名下按序排列, 排序应在投稿前由全体作者共同讨论确定, 投稿后不应再作改动, 确需要改动时必须出示单位证明以及所有作者亲笔签名的署名无异议书面证明。

作者应同时具有以下 4 项条件: (1) 参与论文选题和设计, 或参与资料分析与解释。 (2) 起草或修改论文中关键性理论或其他主要内容。 (3) 能按编辑部的修改意见进行核修, 对学术问题进行解答。 (4) 除了负责本人的研究贡献外, 同意对研究工作各方面的诚信问题负责。 仅参与获得资金或收集资料者不能列为作者, 仅对科研小组进行一般管理者也不宜列为作者。

二、通信作者

每篇论文均需确定一位能对该论文全面负责的通信作者。通信作者应在投稿时确定, 如在来稿中未特殊标明, 则视第一作者为通信作者。集体署名的论文应将对该文负责的关键人物列为通信作者。规范的多中心或多科学临床随机对照研究, 如主要责任者确实超过一位的, 可酌情增加通信作者。无论包含几位作者, 均需标注通信作者, 并注明其 Email 地址。

三、同等贡献作者

不建议著录同等贡献作者, 需确定论文主要责任者。

确需著录同等贡献作者时, 可在脚注作者项后另起一行著录“前 X 位作者对本文有同等贡献”, 英文为“XX and XX contributed equally to the article”。英文摘要中如同等贡献者为第一作者且属不同单位, 均需注录其单位, 以 *、#、△、※等顺序标注。

同一单位同一科室作者不宜著录同等贡献。作者申请著录同等贡献时需提交全部作者的贡献声明, 期刊编辑委员会进行核查, 必要时可将作者贡献声明刊登在论文结尾处。

四、致谢

对给予实质性帮助但不符合作者条件的单位或个人可在文后给予志谢, 但必须征得志谢人的书面同意。被志谢者包括: (1) 对研究提供资助的单位和个人、合作单位; (2) 协助完成研究工作和提供便利条件的组织和个人; (3) 协助诊断和提出重要建议的人; (4) 给予转载和引用权的资料、图片、文献、研究思想和设想的所有者; (5) 做出贡献又不能成为作者的人, 提供技术帮助和给予财力、物力支持的人, 此时应阐明其支援的性质; (6) 其他。不宜将应被志谢人在作者的位置上, 混淆作者和被志谢者的权利和义务。

中华医学会杂志社

2014 年 10 月 9 日