

Sec23a基因对人乳腺癌类肿瘤干细胞的干性抑制作用研究

周仕霞 孙志卫 王健宇* 邢若曦*

(重庆医科大学生命科学研究院, 重庆 400016)

摘要 该文使用新型悬浮细胞连续培养法从人乳腺癌细胞MDA-MB-435中分离出类肿瘤干细胞株(MDA-435-spheroid enrichment, MDA-435-SE), 并通过流式细胞术检测细胞表面标志物以及裸鼠皮下成瘤实验, 对MDA-435-SE细胞的类肿瘤干细胞特性进行了验证。然后对MDA-435-SE细胞进行慢病毒感染, 建立了稳定敲低Sec23a基因表达的细胞株MDA-435-SE-shSec23a和阴性对照细胞株MDA-435-SE-LV3NC, 通过Cell Counting Kit-8增殖实验、96孔板单克隆成球实验和裸鼠皮下成瘤实验探索Sec23a基因对乳腺癌类肿瘤干细胞MDA-435-SE的干性调控作用。在乳腺癌类肿瘤干细胞MDA-435-SE中敲低Sec23a基因后, 细胞的增殖曲线和倍增时间并没有明显改变, 但细胞的体外成球直径和单细胞克隆效率均显著增强。动物实验表明, Sec23a基因的敲低可以显著提高乳腺癌类肿瘤干细胞MDA-435-SE的体内成瘤能力。该研究使用新型悬浮细胞连续培养的方法获得来源于人乳腺癌的类肿瘤干细胞株, 并使用体内和体外干性相关实验验证了敲低Sec23a基因后, 可以显著提高乳腺癌类肿瘤干细胞MDA-435-SE的干性, 对肿瘤干细胞的研究具有重要的参考意义。

关键词 人乳腺癌类肿瘤干细胞; 悬浮聚球; Sec23a

Sec23a Inhibits the Stemness of Human Breast Cancer Stem-Like Cells

Zhou Shixia, Sun Zhiwei, Wang Jianyu*, Xing Ruoxi*

(Life Sciences Institute, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The MDA-435-spheroid enrichment (MDA-435-SE) cells were isolated from human breast cancer cell line MDA-MB-435 through continuous spheroid-enrichment cell culture. Then the MDA-435-SE-shSec23a cell line in which the Sec23a was knocked down and the negative control cell line MDA-435-SE-LV3NC was established through lentivirus infection. Cell Counting Kit-8 proliferation assay, 96-wells plate single cell cloning assay and nude mice subcutaneous tumor formation assay were conducted to figure out the effects of Sec23a stable knockdown on the stemness of MDA-435-SE cells. The results showed that Sec23a stable knockdown did not affect the cell proliferation rate of MDA-435-SE cells, but significantly enhanced the single cell cloning ability and tumorigenic ability of MDA-435-SE cells *in vivo*. This study illustrates that the stable knockdown of Sec23a enhances the stemness of human breast cancer stem-like cells.

Keywords human breast cancer stem-like cells; spheroid enrichment; Sec23a

乳腺癌是全世界女性最常见的癌症之一^[1-3], 由于其病因复杂以及对治疗反应差, 已成为全球性的

公共卫生问题^[4-8]。最近的研究表明, 乳腺癌的转移、耐药和复发与乳腺癌肿瘤干细胞有关^[9-13]。肿瘤干

收稿日期: 2017-12-06 接受日期: 2018-02-27

国家自然科学基金(批准号: 81602596、81672908)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68812290, E-mail: wjy2003123@163.com; Tel: 023-68486602, E-mail: xinglab310@163.com

Received: December 6, 2017 Accepted: February 27, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81602596, 81672908)

*Corresponding authors. Tel: +86-23-68812290, E-mail: wjy2003123@163.com; Tel: +86-23-68486602, E-mail: xinglab310@163.com

网络出版时间: 2018-05-21 16:28:12

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180521.1628.004.html>

细胞是存在于肿瘤组织中的一小部分具有干细胞性质的,具有无限增殖能力、自我更新能力和多向分化潜能的细胞,是形成不同分化程度肿瘤细胞和肿瘤不断生长的根源^[14-17]。因此,研究肿瘤干细胞的生物学特性及其干性调控对攻克肿瘤难题具有重要意义。

肿瘤干细胞的自我更新机制一直是近年来的研究热点,除一些重要转录因子外,微环境对肿瘤干细胞的干性调控也愈发吸引人们的注意。分泌蛋白是影响微环境的一类重要因素,目前分泌蛋白对肿瘤干细胞的影响研究多集中于血液系统。例如,有研究表明,分泌蛋白S100A8可以在白血病细胞中通过促进自噬增加耐药性^[18-19];趋化因子CXCL家族在淋巴瘤细胞中通过调控炎症反应增强免疫逃逸^[20-21];IL-6也可以通过作用于多能性造血干细胞提高慢性髓性白血病的发生^[22-23]。但是,分泌蛋白在实体肿瘤干细胞中自我更新的调控机制仍没有被阐述明确。为了探讨分泌蛋白对乳腺癌类干细胞的自我更新的影响,本研究从经典的蛋白质分泌途径着手,即从内质网-高尔基体-细胞膜途径进行研究。在此途径中,*Sec23a*基因编码的SEC23A蛋白质是一个重要的因子,它是构成细胞内运输小泡衣壳蛋白COPII(coat protein complex II)的重要成分^[24-25],COPII主要负责分泌蛋白从内质网到高尔基体的运输^[26-27]。当SEC23A蛋白质的合成减少时,COPII的形成受到影响,从而影响细胞的蛋白质分泌功能,进一步影响细胞生长的微环境。

本研究运用新型悬浮细胞连续培养法^[28],从人乳腺癌细胞MDA-MB-435中分离出乳腺癌类肿瘤干细胞MDA-435-SE,并对其肿瘤干细胞特性进行了验证。然后从微环境对肿瘤干细胞的干性调控出发,以影响肿瘤细胞微环境的运输蛋白质SEC23A为研究对象,结合体内和体外肿瘤干细胞干性标志实验,初步探索了*Sec23a*基因通过影响肿瘤细胞蛋白质分泌功能、改变肿瘤细胞的生长微环境,从而对肿瘤干细胞的干性调控作用,为肿瘤干细胞的干性机制研究提供了重要参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 本研究所用人乳腺癌细胞MDA-MB-435从美国标准培养物保藏所(American Type

Culture Collection, ATCC)购买。乳腺癌细胞MDA-MB-435用含10%胎牛血清、1%双抗和1%两性霉素B的DMEM培养基,于37 °C、5% CO₂,湿度为95%的细胞培养箱内培养。乳腺癌细胞MDA-MB-435绝大部分呈贴壁,梭形分化,克隆性聚集生长,极少数细胞悬浮生长,悬浮生长的细胞多为单个细胞,偶尔可见两两成对细胞。

1.1.2 实验试剂与仪器 本研究所用胎牛血清购自ExCell Bio公司;PBS、双抗、两性霉素B、DMEM培养基均购自Gibco公司;*Sec23a*慢病毒载体和LV3NC阴性对照载体由生工生物工程(上海)股份有限公司提供,该质粒由生工利用购自System Biosciences公司的干扰穿梭质粒进行改造而成。SYBR染料法荧光定量PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司;荧光定量PCR扩增引物由生工设计和合成;Trizol试剂购自Invitrogen公司;cDNA第一链合成试剂盒购自日本TaKaRa公司。Western blot一抗购自Abcam公司;二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司。CCK-8(Cell Counting Kit-8)试剂盒购自日本同仁化学研究所;Matrigel胶购自Invitrogen公司;37 °C细胞培养箱和荧光显微镜均购自Olympus公司;荧光定量PCR仪购自BD公司;4 °C离心机购自ThermoFisher公司。

1.1.3 实验动物 本研究所用BALB/cA-nu裸鼠由重庆医科大学动物实验中心购于北京华阜康生物科技股份有限公司,且所有实验动物均通过中国医学科学院医学实验动物研究所的质量检测。动物实验方案经动物伦理委员会批准,符合动物保护、动物福利和伦理原则,符合国家实验动物福利伦理的相关规定。

1.2 方法

1.2.1 MDA-435-SE(MDA-435-spheroid enrichment)细胞株的建立及培养 MDA-MB-435在含10%胎牛血清、1%双抗和1%两性霉素B的DMEM培养基中生长至细胞汇合度达80%时,收集细胞培养液。按照1 000 r/min的速度离心5 min,弃上清。将离心管中细胞沉淀重悬后全部接种于新的培养皿中,继续使用含10%胎牛血清、1%双抗和1%两性霉素B的DMEM培养基进行细胞培养。待细胞增殖至较多数量时,再次收集悬浮细胞,按照同样方法再次接种于新培养皿中。重复收集、培养悬浮细胞8次后,培养皿内绝大部分细胞均呈悬浮聚集成球生长,将球

的细胞移至含5%胎牛血清、1%双抗和1%两性霉素B的DMEM培养基中进行连续传代、培养,平均4天进行一次传代。

1.2.2 MDA-435-SE细胞的慢病毒感染和流式细胞术分选 在MDA-435-SE细胞进入对数生长期时,使用包含抑制*Sec23a*基因表达质粒的慢病毒及其对照质粒的慢病毒,进行慢病毒感染。感染复数(multiplicity of infection, MOI)设置为50,凝聚胺工作浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。细胞感染72 h后使用荧光显微镜确认感染效率达到80%后,进行流式细胞GFP荧光表达分选,培养分选后纯化的细胞。

1.2.3 Real-time荧光定量PCR(RT-PCR)检测mRNA水平 离心、收集细胞沉淀后,使用Trizol提取细胞总RNA,保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,然后使用cDNA第一链合成试剂盒(TaKaRa公司, PrimeScript RT Master Mix, RR036A)进行逆转录合成。逆转录合成反应条件为: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应15 min, $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应5 s, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。使用SYBR染料法荧光定量PCR试剂盒(TaKaRa公司, SYBR Premix Ex Taq II, RR820A)进行目的基因*Sec23a*和内参基因*GAPDH*的荧光定量PCR扩增。*Sec23a*基因引物序列如下。上游引物: 5'-AGT GGC GGA AGT CAG GAT AC-3'; 下游引物: 5'-GGC ATT GGA AAT CTG GAG TG-3'。*GAPDH*基因引物序列如下。上游引物: 5'-AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG-3'; 下游引物: 5'-AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC-3'。荧光定量PCR反应条件为: 第一步 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应30 s; 第二步 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应5 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应30 s, 共40个循环。荧光定量PCR结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。

1.2.4 Western blot检测蛋白质水平 按照10%和5%的浓度配制电泳所需浓缩胶和分离胶,总蛋白上样量为每孔30 μg 。细胞总蛋白提取方法: 向离心、收集的细胞沉淀中加入适量蛋白质裂解液,冰上震荡10 min(震荡30 s后冰上放置15 s, 重复进行), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以12 000 r/min的速度离心5 min, 收集离心管内上清, 并与样品缓冲液均匀混合, 煮沸5 min后将制好的细胞总蛋白样品置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。120 V恒压电泳60 min后进行350 mA恒流电转60 min。一抗按照1:2 000的稀释比例使用, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜孵育一抗; 二抗按照1:5 000的稀释比例使用, 避光孵育1 h。内参蛋白质使用Tubulin。运用ImageJ软件对Western blot的曝光条带进行相对灰度分析。

1.2.5 CCK-8检测细胞生长和倍增时间 在96孔板

中, 细胞初始数量设置为1 000个/孔, 每个时间点设置5个细胞复孔和1个空白培养基孔。进行吸光度测定时, 每孔先加入CCK-8试剂10 μL , 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱内培养2 h后, 使用酶标仪测定450 nm处吸光度(D)值, 连续测定5天。按照 $D_{\text{真实}}=D_{\text{测}}-D_{\text{空白}}$ 计算出每天相应的真实 D 值(取5个复孔的平均值), 使用连续5天测得的真实 D 值绘制细胞生长曲线。生长曲线对数生长期内取两时间点, 计算细胞倍增时间(doubling time, DT), 公式 $\text{DT}=t\times\lg 2\div(\lg N_t-\lg N_0)$, 其中 t 为所选两时间点的时间间隔, N_0 为第一个时间点的 D 值, N_t 为对数生长期内第二个时间点的 D 值。

1.2.6 96孔板单细胞克隆成球实验 离心、收集细胞并重悬、吹散成细胞单悬液, 使用血小球计数板计数后, 利用梯度10 \times 稀释的方法, 制成10个/mL培养基浓度的细胞单悬液。在96孔板内, 每孔加入100 μL 制成的细胞单悬液, 显微镜下逐个检验并统计成功接种1个细胞的孔数, 将96孔板置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养10天, 显微镜下逐个检验并统计长出大于50个细胞的克隆球的孔数。96孔板单细胞克隆成球率=(克隆球的孔数/成功接种的孔数) $\times 100\%$, 得到细胞96孔板单细胞克隆成球率。

1.2.7 裸鼠皮下成瘤实验 离心、收集细胞, 使用PBS缓冲液将细胞制成特定浓度的细胞单悬液, 将细胞单悬液与Matrigel 1:1等比例均匀混合, 冰上放置。进行裸鼠注射时, 左手固定小鼠, 右手持注射器在裸鼠左右两侧大腿后窝处轻轻刺入皮下, 切勿刺入腹腔内, 每侧注入100 μL 含Matrigel的细胞悬液。轻轻拔出针头, 避免液体漏出。1周后每天观察裸鼠成瘤情况, 待裸鼠皮下平均成瘤体积达到1 cm^3 时解剖裸鼠。

1.2.8 统计方法 使用SPSS 22.0软件进行统计分析, 计数资料以 $\text{mean}\pm\text{S.D.}$ 表示, 使用 t 检验的分析方法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MDA-435-SE细胞株的建立

在连续8次悬浮细胞收集、培养过程中, 可见新移入10%胎牛血清、1%双抗和1%两性霉素B的DMEM培养基中的MDA-MB-435细胞中, 越来越多的细胞呈梭形分化贴壁生长, 越来越多的细胞呈悬浮成球聚集生长。待完成8次悬浮细胞收集后, 培养皿内基本已无贴壁生长的细胞, 基本全部为成球富

集的MDA-435-SE细胞,置于含5%胎牛血清、1%双抗和1%两性霉素B的DMEM培养基中进行连续传代、培养(图1)。

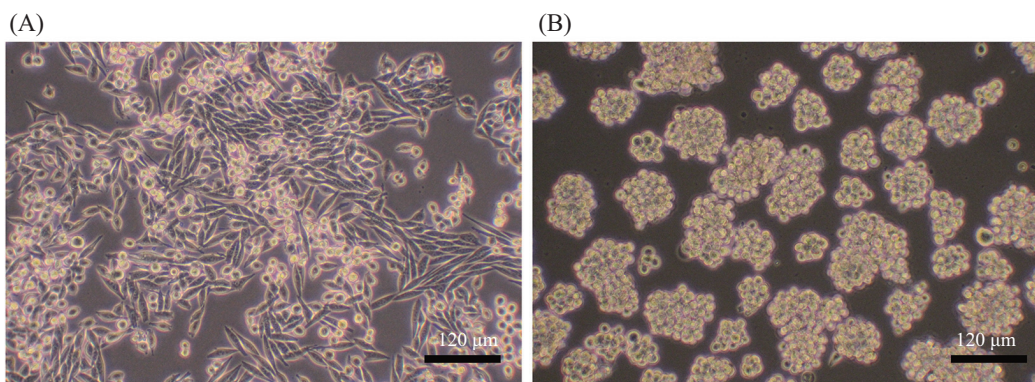
2.2 MDA-MB-435和MDA-435-SE细胞中CD44和CD24的表达

CD44高表达并且CD24低表达是乳腺癌肿瘤干细胞的标志。我们使用流式细胞术检测MDA-MB-435和MDA-435-SE细胞中CD44和CD24的表达。如图2所示,在MDA-MB-435细胞中,CD44高表达与CD24低表达的细胞亚群比例为7.94%,而在MDA-435-SE细胞中,其比例为17.18%。此结果说明,采用的新型悬浮细胞连续培养法可以显著提高乳腺癌

细胞中肿瘤干细胞亚群的比例,同时说明MDA-435-SE细胞相对于MDA-MB-435细胞具有类肿瘤干细胞的特性。

2.3 MDA-MB-435和MDA-435-SE细胞的裸鼠皮下成瘤能力比较

为了进一步验证MDA-435-SE细胞相对于MDA-MB-435细胞是否具有类肿瘤干细胞的特性,我们设置了1 000个细胞剂量的裸鼠皮下成瘤实验。如图3所示,实验结果表明,MDA-MB-435细胞不具有裸鼠皮下成瘤能力,而通过新型悬浮细胞连续培养法获得的MDA-435-SE细胞具有很强的裸鼠皮下成瘤能力,说明MDA-435-SE细胞具有类肿瘤干细

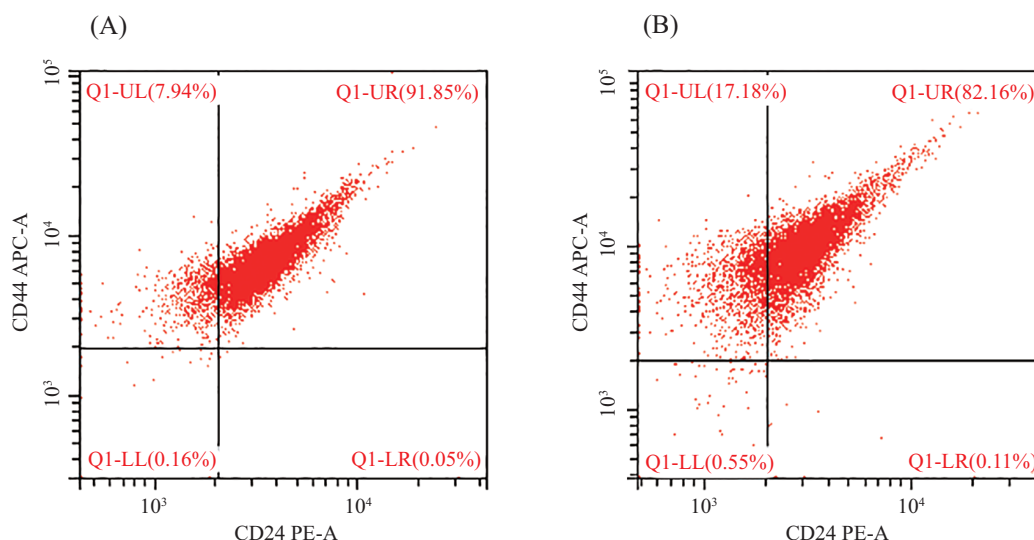


A: 呈梭形分化贴壁生长的MDA-MB-435细胞; B: 呈悬浮成球聚集生长的MDA-435-SE细胞。

A: image of fusiform adherent MDA-MB-435 cells; B: image of suspending spherical MDA-435-SE cells.

图1 MDA-MB-435和MDA-435-SE细胞的不同生长形态

Fig.1 Different growth morphologies of MDA-MB-435 and MDA-435-SE cells



A: MDA-MB-435细胞中CD44和CD24的检测; B: MDA-435-SE细胞中CD44和CD24的检测。

A: flow cytometry of CD44 and CD24 in MDA-MB-435 cells; B: flow cytometry of CD44 and CD24 in MDA-435-SE cells.

图2 流式细胞术检测MDA-MB-435和MDA-435-SE细胞中CD44和CD24的表达

Fig.2 Determination of CD44 and CD24 in MDA-MB-435 and MDA-435-SE cells by flow cytometry

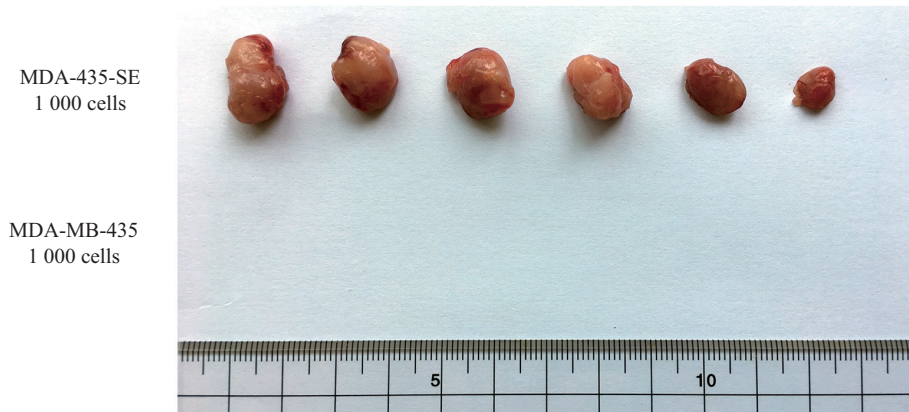
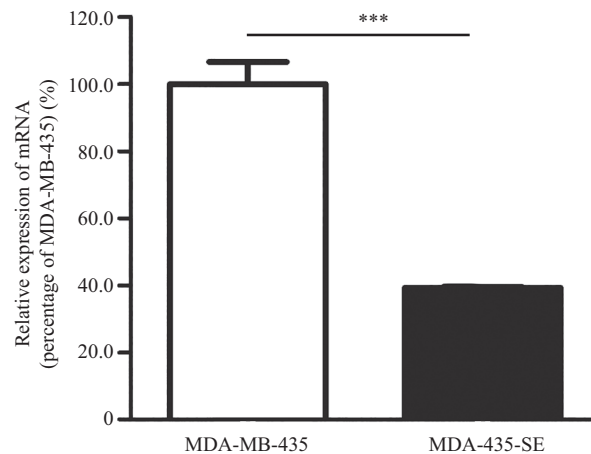


图3 MDA-MB-435和MDA-435-SE细胞的裸鼠皮下成瘤检测

Fig.3 Tumorigenicities in the nude mice of MDA-MB-435 and MDA-435-SE cells



*** $P < 0.001$.

图4 RT-PCR检测MDA-MB-435和MDA-435-SE细胞中*Sec23a* mRNA水平

Fig.4 The relative level of *Sec23a* mRNA in MDA-MB-435 and MDA-435-SE cells measured by RT-PCR

胞的特性。

2.4 MDA-MB-435和MDA-435-SE细胞中*Sec23a* 基因的表达

RT-PCR结果显示,在MDA-MB-435细胞和MDA-435-SE细胞中,*Sec23a*基因的表达显著不同。MDA-435-SE细胞中*Sec23a*基因的mRNA水平为MDA-MB-435细胞的(39.04±0.02)%,说明在梭形分化贴壁生长的细胞亚群和悬浮聚集成球生长的细胞亚群之间,*Sec23a*基因的表达具有显著差异(图4, $P < 0.001$)。

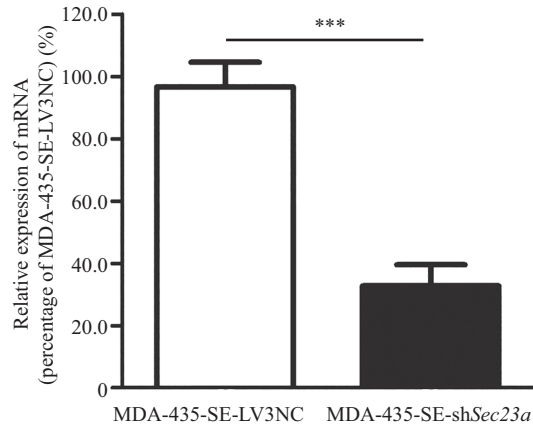
2.5 在mRNA和蛋白质水平验证慢病毒感染后*Sec23a*基因的表达

在慢病毒感染MDA-435-SE细胞和流式分选完成后,使用RT-PCR和Western blot验证*Sec23a*基因在MDA-435-SE-LV3NC和MDA-435-SE-sh*Sec23a*细胞中的表达。RT-PCR结果显示,MDA-435-SE-sh*Sec23a*细胞中*Sec23a* mRNA水平是其在MDA-

435-SE-LV3NC细胞中的(36.05±0.38)%,说明慢病毒感染有效敲低了*Sec23a* mRNA水平(图5, $P < 0.001$)。Western blot结果显示,MDA-435-SE-sh*Sec23a*细胞中SEC23A蛋白质水平显著低于MDA-435-SE-LV3NC细胞,说明慢病毒感染有效敲低了SEC23A蛋白质水平(图6, $P < 0.001$)。

2.6 敲低*Sec23a*基因对MDA-435-SE细胞体外增殖特性的影响

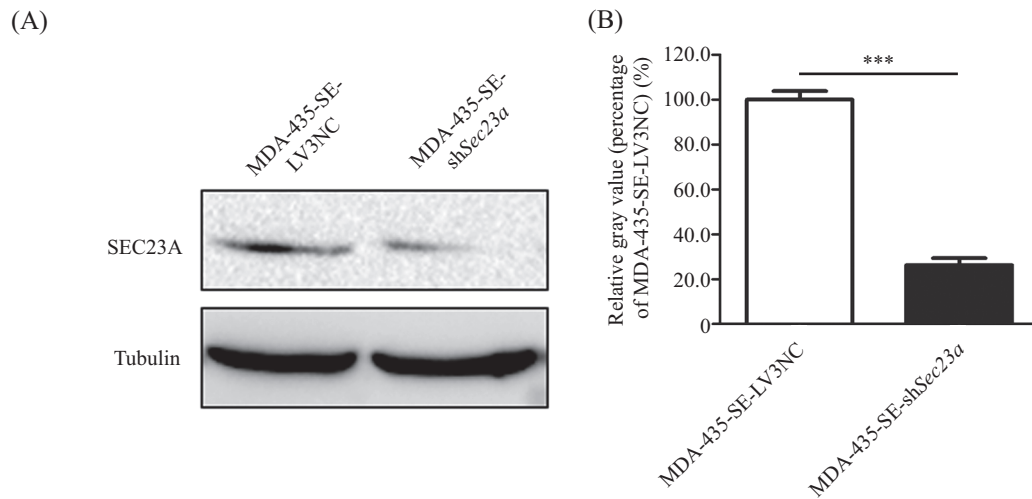
使用CCK-8检测法检测MDA-435-SE-LV3NC和MDA-435-SE-sh*Sec23a*细胞的增殖特性,绘制生长曲线并计算细胞倍增时间。实验结果表明,MDA-435-SE-LV3NC和MDA-435-SE-sh*Sec23a*细胞的生长曲线趋势十分一致,两者倍增时间分别为26.95 h和26.04 h,并无显著差异(图7, $P > 0.05$)。这说明,敲低*Sec23a*的表达并未影响MDA-435-SE细胞的增殖特性。



*** $P < 0.001$.

图5 RT-PCR检测慢病毒感染后*Sec23a* mRNA水平

Fig.5 The relative level of *Sec23a* mRNA after the lentivirus infections measured by RT-PCR



A: Western blot检测慢病毒感染后SEC23A蛋白质水平; B: Western blot检测结果的相对灰度分析, *** $P < 0.001$ 。

A: the relative level of SEC23A protein after the lentivirus infections measured by Western blot; B: the relative grayscale analysis of the results of Western blot, *** $P < 0.001$.

图6 Western blot检测慢病毒感染后SEC23A蛋白质水平

Fig.6 The relative level of SEC23A protein after the lentivirus infections measured by Western blot

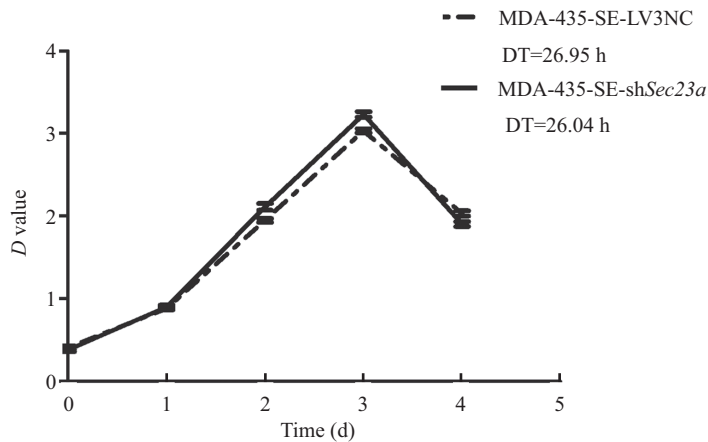


图7 CCK-8检测细胞增殖特性

Fig.7 The proliferation characteristics measured by CCK-8 assay

2.7 敲低*Sec23a*基因对MDA-435-SE细胞成球直径的影响

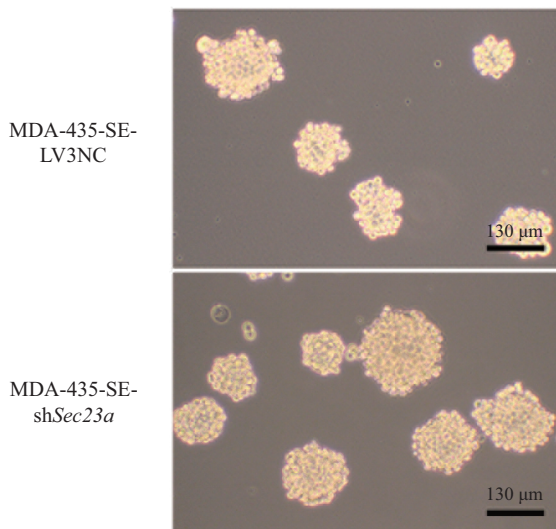
在MDA-435-SE-LV3NC和MDA-435-SE-sh*Sec23a*细胞均生长72 h后,在显微镜下观察两种细胞成球直径的不同。随机在两种细胞内各选取30个悬浮细胞球,拍照并测量其直径大小。然后统计数据进行分析,比较MDA-435-SE-LV3NC和MDA-435-SE-sh*Sec23a*细胞成球直径的不同。实验结果表明,MDA-435-SE-sh*Sec23a*细胞的成球直径大于MDA-435-SE-LV3NC细胞,直径是其(1.34±0.06)倍,说明敲低*Sec23a*基因后可显著提高MDA-435-SE细胞的

成球直径(图8, $P<0.001$)。

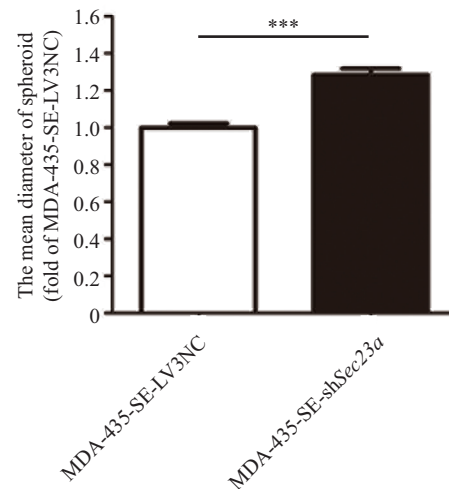
2.8 敲低*Sec23a*基因对MDA-435-SE细胞单细胞成球能力的影响

为进一步检测敲低*Sec23a*基因对MDA-435-SE细胞干性的影响,使用96孔板单细胞成球实验检测敲低*Sec23a*基因后MDA-435-SE细胞的单细胞成球能力的变化。实验结果表明,MDA-435-SE-sh*Sec23a*细胞的单细胞成球能力显著高于MDA-435-SE-LV3NC细胞,是其(2.43±0.04)倍,说明敲低*Sec23a*基因可以显著提高MDA-435-SE细胞的单细胞克隆成球能力,提高MDA-435-SE细胞的干性(图9, $P<0.01$)。

(A)



(B)

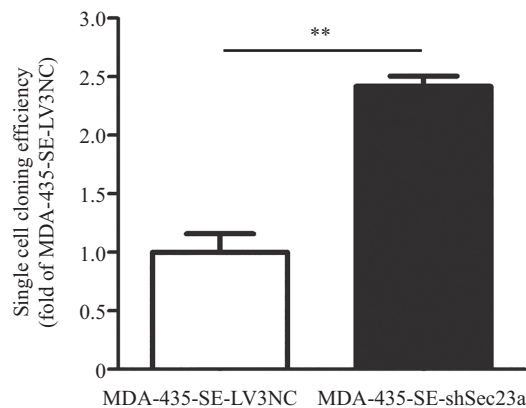


A: 同一时间点的MDA-435-SE-LV3NC和MDA-435-SE-sh*Sec23a*细胞成球拍照; B: 同一时间点的MDA-435-SE-LV3NC和MDA-435-SE-sh*Sec23a*细胞成球直径测量, *** $P<0.001$ 。

A: images of the spheroids of MDA-435-SE-LV3NC and MDA-435-SE-sh*Sec23a* cells at the same time point; B: diameter measurements of the spheroids of MDA-435-SE-LV3NC and MDA-435-SE-sh*Sec23a* cells at the same time point, *** $P<0.001$.

图8 MDA-435-SE-LV3NC和MDA-435-SE-sh*Sec23a*细胞的成球直径差异

Fig.8 Diameter measurements of the spheroids of MDA-435-SE-LV3NC and MDA-435-SE-sh*Sec23a* cells



** $P<0.01$.

图9 MDA-435-SE-LV3NC和MDA-435-SE-sh*Sec23a*细胞的单细胞克隆成球检测

Fig.9 The single cell cloning efficiencies of MDA-435-SE-LV3NC and MDA-435-SE-sh*Sec23a* cells

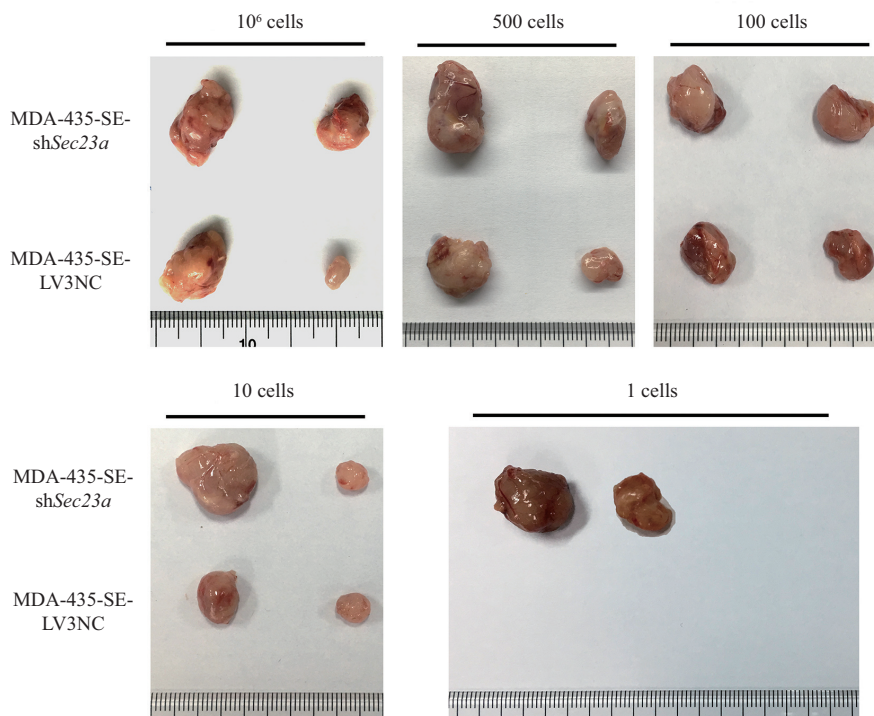
图10 MDA-435-SE-sh*Sec23a*和MDA-435-SE-LV3NC细胞的裸鼠皮下成瘤检测Fig.10 Tumorigenicities in the nude mice of MDA-435-SE-sh*Sec23a* and MDA-435-SE-LV3NC cells

表1 不同细胞浓度的裸鼠皮下成瘤体积测量

Table 1 The subdermal tumorigenesis of different cell amounts

细胞数量 Cell amount	细胞种类 Cell line	成瘤效率 Tumor formation rate	成瘤体积(cm ³) Tumor volume (cm ³)
10 ⁶	MDA-435-SE-sh <i>Sec23a</i>	2/2	2.567/1.283
	MDA-435-SE-LV3NC	2/2	1.574/0.389
500	MDA-435-SE-sh <i>Sec23a</i>	2/2	2.980/1.291
	MDA-435-SE-LV3NC	2/2	1.535/0.814
100	MDA-435-SE-sh <i>Sec23a</i>	2/2	1.900/1.464
	MDA-435-SE-LV3NC	2/2	1.420/1.086
10	MDA-435-SE-sh <i>Sec23a</i>	2/2	3.050/0.503
	MDA-435-SE-LV3NC	2/2	1.185/0.499
1	MDA-435-SE-sh <i>Sec23a</i>	2/10	2.917/1.450
	MDA-435-SE-LV3NC	0/10	0

2.9 敲低*Sec23a*基因对MDA-435-SE细胞裸鼠皮下成瘤能力的影响

裸鼠皮下成瘤实验是验证细胞干性的经典动物模型,为了验证敲低*Sec23a*基因后,MDA-435-SE细胞的干性变化,我们设置了不同细胞剂量的裸鼠皮下成瘤实验。从实验结果来看,敲低*Sec23a*基因可以提高MDA-435-SE细胞的干性,且当皮下成瘤实验中种植的植物数量越低时,MDA-435-SE-sh*Sec23a*细胞与MDA-435-SE-LV3NC细胞表现出来的干性差异越明显。值得注意的是,当我们采用口

吸管制备细胞悬液的方法,准确地在裸鼠皮下种植一个细胞时,只有MDA-435-SE-sh*Sec23a*细胞组才有皮下成瘤的产生。这表明,MDA-435-SE-sh*Sec23a*细胞在单细胞水平具有皮下成瘤的能力,充分说明了*Sec23a*基因表达下调可以提高MDA-435-SE细胞的裸鼠皮下成瘤能力,提高其细胞干性(图10和表1)。

3 讨论

肿瘤干细胞广泛地参与了肿瘤的发生、存活、增殖、转移及复发的全部病理过程^[9]。本质上讲,肿

瘤细胞及肿瘤组织生命力都是依靠肿瘤干细胞通过自我更新和无限增殖来维持的^[10-11]。因此, 针对靶向肿瘤干细胞成为了可能治愈癌症的途径之一^[12-15]。本文针对内质网-高尔基体经典蛋白质分泌途径中的运输蛋白SEC23A对乳腺癌干细胞的干性调控作用进行了初步探索。本研究利用实验室之前报道的新型悬浮细胞连续培养法, 从正常贴壁生长的乳腺癌细胞系MDA-MB-435中富集得到悬浮聚集成球生长的具有类肿瘤干细胞特性的特殊细胞亚群(MDA-435-SE)。首先, 在MDA-435-SE中*Sec23a*的表达显著性地低于其来源细胞系MDA-MB-435。随后, 在MDA-435-SE稳定干扰*Sec23a*后, 其成球直径, 单细胞成球率和体内成瘤率均得到显著提升。最令人兴奋的是, 稳定干扰*Sec23a*表达的MDA-435-SE, 一个细胞也能裸鼠皮下成瘤, 这是乳腺癌干细胞中第一次报道单细胞成瘤。因此, 我们认为*Sec23a*抑制了乳腺癌干细胞的致瘤性。

SEC23A是SEC23家族的重要成员, 它与SEC24C、SEC16A和SEC16B相互作用形成异二聚体, 共同组装成COPII的外被结构蛋白质^[24-25]。COPII可以包裹内质网的蛋白质分泌小泡形成COPII被膜小泡, 负责分泌蛋白小泡从内质网到高尔基体的运输^[26-27]。当*Sec23a*表达被抑制后, 其蛋白质翻译水平降低, 从而影响COPII的组装, 进一步影响肿瘤细胞的蛋白质分泌功能, 最终重新塑造肿瘤细胞微环境。*Sec23a*基因参与了不同类型肿瘤的转移调控, 但其在肿瘤干细胞的干性调控方面的研究较少。在血液系统中, 有文献报道, 分泌蛋白确实能够影响肿瘤干细胞的自我更新^[20-23]。但在实体瘤中, 研究人员更多关注的是肿瘤干细胞与其他细胞建立的微环境^[8,29-32], 其自分泌的作用鲜有报道。本研究探讨了乳腺癌干细胞自分泌作用在其干性调控中的作用的可能性, 这也是本研究值得进一步探究的方向, 后续对SEC23A是否真的对肿瘤干细胞微环境有影响的相关实验正在进行中。正常干细胞核质比较大, 相对于普通体细胞而言, 可能需要更为简单的外界环境。肿瘤干细胞很可能套用此种机制, 复杂的外界环境可能会诱导其分化, 因此, 通过分泌蛋白的减少达到维持其干性的目的。

本研究虽然首次报道SEC23A在乳腺癌干细胞干性调控中的作用, 但对其下游分泌蛋白并没有进行更多地研究。文献表明, 通过COPII转运的分泌

蛋白有上千种^[33-37], 但是具体是哪种或者哪几种蛋白是对乳腺癌干细胞的干性调控是关键, 还需要继续探索。最近有研究表明, 某些炎症因子对于肿瘤干细胞的干性具有调控作用^[38-40], 而炎症因子通常是经典分泌蛋白途径进行分泌的, 这可能是一个潜在的靶位点。某些自噬调控相关蛋白质也具有自分泌调控作用, 而自噬已被报道可能对肿瘤干细胞干性具有正向调控作用^[41-43]。此外, 一些细胞外基质蛋白质具有加强肿瘤干细胞间联系的作用^[44-46]。因此, 从哪条途径研究分泌蛋白对乳腺癌干细胞干性的调控, 可能需要从大数据进行分析, 例如分泌蛋白质谱。

综上所述, 本研究探讨了SEC23A在乳腺癌干细胞干性调控中的作用, 为肿瘤微环境参与肿瘤干细胞干性调控这一观点提供了可能的理论支持, 对进一步研究肿瘤干细胞的干性调控机制具有重要的参考意义。

参考文献 (Reference)

- 1 Bae JM, Kim EH. Breast density and risk of breast cancer in Asian women: a meta-analysis of observational studies. *J Prev Med Public Health* 2016; 49(6): 367-75.
- 2 Ruddy KJ, Gelber S, Tamimi RM, Schapira L, Come SE, Meyer ME, *et al.* Breast cancer presentation and diagnostic delays in young women. *Cancer* 2014; 120(1): 20-5.
- 3 Ruddy KJ, Winer EP. Male breast cancer: risk factors, biology, diagnosis, treatment, and survivorship. *Ann Oncol* 2013; 24(6): 1434-43.
- 4 Castells X, Domingo L, Corominas JM, Tora-Rocamora I, Quintana MJ, Bare M, *et al.* Breast cancer risk after diagnosis by screening mammography of nonproliferative or proliferative benign breast disease: a study from a population-based screening program. *Breast Cancer Res Treat* 2015; 149(1): 237-44.
- 5 Luctkar-Flude M, Aiken A, McColl MA, Tranmer J. A comprehensive framework and key guideline recommendations for the provision of evidence-based breast cancer survivorship care within the primary care setting. *Fam Pract* 2015; 32(2): 129-40.
- 6 Ormseth SR, Wellisch DK, Arechiga AE, Draper TL. Predicting reattendance at a high-risk breast cancer clinic. *Palliat Support Care* 2015; 13(5): 1441-8.
- 7 Redig AJ, McAllister SS. Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. *J Intern Med* 2013; 274(2): 113-26.
- 8 Soysal SD, Tzankov A, Muenst SE. Role of the tumor micro-environment in breast cancer. *Pathobiology* 2015; 82(3/4): 142-52.
- 9 Chiotaki R, Polioudaki H, Theodoropoulos PA. Cancer stem cells in solid and liquid tissues of breast cancer patients: characterization and therapeutic perspectives. *Curr Cancer Drug Targets* 2015; 15(3): 256-69.
- 10 Guo W. Concise review: breast cancer stem cells: regulatory networks, stem cell niches, and disease relevance. *Stem Cells Transl Med* 2014; 3(8): 942-8.
- 11 Volinia S, Nuovo G, Drusco A, Costinean S, Abujaour R, Despons C, *et al.* Pluripotent stem cell miRNAs and metastasis

- in invasive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106(12): pii: dju324.
- 12 Kotiyal S, Bhattacharya S. Breast cancer stem cells, EMT and therapeutic targets. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 453(1): 112-6.
- 13 Geng SQ, Alexandrou AT, Li JJ. Breast cancer stem cells: multiple capacities in tumor metastasis. *Cancer Lett* 2014; 349(1): 1-7.
- 14 Vlashi E, Pajonk F. Cancer stem cells, cancer cell plasticity and radiation therapy. *Semin Cancer Biol* 2015; 31: 28-35.
- 15 Dawood S, Austin L, Cristofanilli M. Cancer stem cells: implications for cancer therapy. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 2014; 28(12): 1101-7, 10.
- 16 Beck B, Blanpain C. Unravelling cancer stem cell potential. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(10): 727-38.
- 17 Allegra A, Alonci A, Penna G, Innao V, Gerace D, Rotondo F, *et al.* The cancer stem cell hypothesis: a guide to potential molecular targets. *Cancer Invest* 2014; 32(9): 470-95.
- 18 Yang M, Zeng P, Kang R, Yu Y, Yang L, Tang D, *et al.* S100A8 contributes to drug resistance by promoting autophagy in leukemia cells. *PLoS One* 2014; 9(5): e97242.
- 19 Ghavami S, Eshragi M, Ande SR, Chazin WJ, Klonsch T, Halayko AJ, *et al.* S100A8/A9 induces autophagy and apoptosis via ROS-mediated cross-talk between mitochondria and lysosomes that involves BNIP3. *Cell Res* 2010; 20(3): 314-31.
- 20 Kalwitz G, Andreas K, Endres M, Neumann K, Notter M, Ringe J, *et al.* Chemokine profile of human serum from whole blood: migratory effects of CXCL-10 and CXCL-11 on human mesenchymal stem cells. *Connect Tissue Res* 2010; 51(2): 113-22.
- 21 Staudt ND, Aicher WK, Kalbacher H, Stevanovic S, Carmona AK, Bogyo M, *et al.* Cathepsin X is secreted by human osteoblasts, digests CXCL-12 and impairs adhesion of hematopoietic stem and progenitor cells to osteoblasts. *Haematologica* 2010; 95(9): 1452-60.
- 22 Reynaud D, Pietras E, Barry-Holson K, Mir A, Binnewies M, Jeanne M, *et al.* IL-6 controls leukemic multipotent progenitor cell fate and contributes to chronic myelogenous leukemia development. *Cancer Cell* 2011; 20(5): 661-73.
- 23 Cszaszar E, Wang W, Usenko T, Qiao W, Delaney C, Bernstein ID, *et al.* Blood stem cell fate regulation by Delta-1-mediated rewiring of IL-6 paracrine signaling. *Blood* 2014; 123(5): 650-8.
- 24 Fromme JC, Orci L, Schekman R. Coordination of COPII vesicle trafficking by Sec23. *Trends Cell Biol* 2008; 18(7): 330-6.
- 25 Pagano A, Letourneur F, Garcia-Estefania D, Carpentier JL, Orci L, Paccaud JP. Sec24 proteins and sorting at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1999; 274(12): 7833-40.
- 26 Hughes H, Stephens DJ. Assembly, organization, and function of the COPII coat. *Histochem Cell Biol* 2008; 129(2): 129-51.
- 27 Lee MC, Miller EA. Molecular mechanisms of COPII vesicle formation. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18(4): 424-34.
- 28 刘永利, 孔亮盛, 孙志卫, 王健宇, 邢若曦. 新型悬浮细胞连续培养法分离小鼠Lewis肺癌干细胞及鉴定. *中国细胞生物学学报* (Liu Yongli, Kong Liangsheng, Sun Zhiwei, Wang Jianyu, Xing Ruoxi. Isolation of Lewis lung carcinoma cancer stem cells by consecutive spheroid enrichment and characterization of their stem cell properties. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2017; 39(1): 35-43.
- 29 Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett* 2015; 368(1): 7-13.
- 30 Jung HY, Fattet L, Yang J. Molecular pathways: linking tumor microenvironment to epithelial-mesenchymal transition in metastasis. *Clin Cancer Res* 2015; 21(5): 962-8.
- 31 Casey SC, Amedei A, Aquilano K, Azmi AS, Benencia F, Bhakta D, *et al.* Cancer prevention and therapy through the modulation of the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol* 2015; 35 Suppl: S199-223.
- 32 Bolouri H. Network dynamics in the tumor microenvironment. *Seminars Cancer Biol* 2015; 30: 52-9.
- 33 Gianfelice A, Le PH, Rigano LA, Saila S, Dowd GC, McDivitt T, *et al.* Host endoplasmic reticulum COPII proteins control cell-to-cell spread of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. *Cellular Microbiol* 2015; 17(6): 876-92.
- 34 Fang J, Liu M, Zhang X, Sakamoto T, Taatjes DJ, Jena BP, *et al.* COPII-dependent ER export: a critical component of insulin biogenesis and beta-cell ER homeostasis. *Mol Endocrinol* 2015; 29(8): 1156-69.
- 35 Johnson A, Bhattacharya N, Hanna M, Pennington JG, Schuh AL, Wang L, *et al.* TFG clusters COPII-coated transport carriers and promotes early secretory pathway organization. *EMBO J* 2015; 3(6)4: 811-27.
- 36 Viotti C. ER to Golgi-dependent protein secretion: the conventional pathway. *Methods Mol Biol* 2016; 1459: 3-29.
- 37 Lord C, Ferro-Novick S, Miller EA. The highly conserved COPII coat complex sorts cargo from the endoplasmic reticulum and targets it to the golgi. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 2013; 5(2): pii: a013367.
- 38 Hirsch HA, Iliopoulos D, Struhl K. Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancer stem cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(3): 972-7.
- 39 Yamamoto M, Taguchi Y, Ito-Kureha T, Semba K, Yamaguchi N, Inoue J. NF-kappaB non-cell-autonomously regulates cancer stem cell populations in the basal-like breast cancer subtype. *Nat Commun* 2013; 4: 2299.
- 40 Jinushi M. Role of cancer stem cell-associated inflammation in creating pro-inflammatory tumorigenic microenvironments. *Oncoimmunology* 2014; 3: e28862.
- 41 Yang MC, Wang HC, Hou YC, Tung HL, Chiu TJ, Shan YS. Blockade of autophagy reduces pancreatic cancer stem cell activity and potentiates the tumoricidal effect of gemcitabine. *Mol Cancer* 2015; 14: 179.
- 42 Maycotte P, Jones KL, Goodall ML, Thorburn J, Thorburn A. Autophagy supports breast cancer stem cell maintenance by regulating IL6 secretion. *Mol Cancer Res* 2015; 13(4): 651-8.
- 43 Wei MF, Chen MW, Chen KC, Lou PJ, Lin SY, Hung SC, *et al.* Autophagy promotes resistance to photodynamic therapy-induced apoptosis selectively in colorectal cancer stem-like cells. *Autophagy* 2014; 10(7): 1179-92.
- 44 Liu Y, Singh SR, Zeng X, Zhao J, Hou SX. The nuclear matrix protein megator regulates stem cell asymmetric division through the mitotic checkpoint complex in *Drosophila* testes. *PLoS Genet* 2015; 11(12): e1005750.
- 45 Farahani E, Patra HK, Jangamreddy JR, Rashedi I, Kawalec M, Rao Pariti RK, *et al.* Cell adhesion molecules and their relation to (cancer) cell stemness. *Carcinogenesis* 2014; 35(4): 747-59.
- 46 Justilien V, Regala RP, Tseng IC, Walsh MP, Batra J, Radisky ES, *et al.* Matrix metalloproteinase-10 is required for lung cancer stem cell maintenance, tumor initiation and metastatic potential. *PLoS One* 2012; 7(4): e35040.