

# 鼻咽癌相关成纤维细胞 miRNA 表达差异

花永虹, 胡巧英, 朴永锋, 唐 秋  
(浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022)

**摘要:** [目的] 研究人鼻咽癌微环境癌相关成纤维细胞(CAF)与正常成纤维细胞(NF) miRNA 表达的差异。 [方法] 运用 1 型胶原酶消化法处理正常鼻咽黏膜组织标本, 原代分离培养 NF 细胞, 与 TGF- $\beta$ 1 共孵育后获得鼻咽癌 CAF 细胞; 利用 Transwell 实验比较 CAF 与 NF 细胞的侵袭能力; 利用 miRNA 芯片分析 CAF 与 NF 细胞 miRNA 表达的差异。 [结果] 成功分离得到原代培养的 CAF 与 NF 细胞, 与 NF 细胞相比, CAF 细胞的侵袭能力明显增强; miRNA 芯片分析结果显示, CAF 有 13 个异常表达 miRNA ( $P < 0.05$ ), 其中 miR-221-5p、miR-155、miR-210 上调表达, 10 个下调表达(miR-205、miR-200b、miR-342-3p、miR-329、miR-487a、miR-455-3p、miR-301a、miR-652、miR-432、let-7g)。 [结论] 人鼻咽癌微环境 CAF 的 miRNA 表达谱发生显著变化。

**关键词:** 鼻咽癌; 肿瘤相关成纤维细胞; miRNA

中图分类号: R739.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2016)06-0472-04  
doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2016.06.A014

## Expression of miRNA in Nasopharyngeal Carcinoma-Associated Fibroblasts

HUA Yong-hong, HU Qiao-ying, PIAO Yong-feng, et al.  
(Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

**Abstract:** [Purpose] To investigate the differential expression of miRNAs between nasopharyngeal carcinoma-associated fibroblasts(CAF) and normal fibroblasts(NF). [Methods] The primary NF cells were isolated from nasopharyngeal epithelial tissue by collagenase digestion method, and CAF cells were obtained from nasopharyngeal carcinoma specimen after incubation with TGF  $\beta$ -1. Cell invasion ability was examined by transwell assay, and the expression of miRNAs was detected by microarray analysis. [Results] The primary cultures of CAF and NF cells were successfully isolated. Compared with NF cells, the invasion ability of CAF cells was markedly increased. MicroRNA microarray analysis showed that 13 miRNAs were expressed differentially between NF and CAF cells ( $P < 0.05$ ), of which 3 were up-regulated(miR-221-5p, miR-155, miR-210) and 10 were down-regulated (miR-205, miR-200b, miR-342-3p, miR-329, miR-487a, miR-455-3p, miR-652, miR-432, let-7g). [Conclusion] The expression profile of miRNAs in human nasopharyngeal carcinoma-associated fibroblasts is significantly changed.

**Key words:** nasopharyngeal cancer; cancer-associated fibroblasts; microRNA

肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAF)是肿瘤基质的重要组成部分,在肿瘤细胞的生长、侵袭和转移等方面发挥重要作用<sup>[1,2]</sup>。小RNA(microRNA, miRNA)是由 22 个内源性核苷酸组成的 RNA 序列,在转录后水平调控靶基因的表达,

可以通过对 5'-非编码区的相互作用来增强靶基因 mRNA 的翻译,也能通过不完全碱基配对与 3'-非翻译区(3'-untranslated regions, 3'-UTR)结合,抑制靶基因 mRNA 的表达<sup>[3,4]</sup>。CAF 和正常成纤维细胞(normal fibroblasts, NF)之间的差异通过细胞因子、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)等体现。NF 向 CAF 的转化,从根本上是一种细胞的再分化。本实验对人鼻咽肿瘤微环境 CAF 表达谱进行了研

收稿日期: 2016-01-26; 修回日期: 2016-03-25  
基金项目: 浙江卫生医药基金(2012KYB036)  
E-mail: yonghonghua@163.com

究,提供上游信息,确认 CAF 与 NF 细胞 miRNA 表达谱的差异,以进一步研究鼻咽癌细胞分化、黏附、迁移、增殖、分泌及细胞间的相互作用,为鼻咽癌的浸润和转移提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 组织样本

人鼻咽组织取自浙江省肿瘤医院放疗科。正常鼻咽组织在离体后 30min 内分离并冷藏保存在含有 100ml/L FBS 和 100 $\mu$ g/ml 青霉素—链霉素的 RPMI-1640 培养基中,立即运送到实验室。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 成纤维细胞的分离和培养

组织在含有 100 $\mu$ g/ml 青霉素和 100 $\mu$ g/ml 链霉素的 PBS 中洗涤 3 次,然后切碎成小块,在含有 100ml/L FBS 和 0.5mg/ml 胶原酶 1 的 RPMI-1640 中,37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 8h。离心分离并用 PBS 洗涤后,细胞团块重新悬浮于含 100ml/L FBS 的 RPMI-1640 中,再将其转入 60mm 的组织培养皿中,并置于 37 $^{\circ}$ C 含 50 ml/L CO<sub>2</sub> 的条件培养箱中培养。

#### 1.2.2 CAF 细胞的制备

利用上一步研究获得的鼻咽癌 NF 细胞,与 0,1,2,4,8ng/ml 浓度的 TGF- $\beta$ 1 共孵育 48h 后观察其细胞形态学变化,NFs 为典型的细长梭状,当受到 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 刺激 48h 后细胞体积变大、形态呈胖索状或星形。

#### 1.2.3 蛋白免疫印迹法鉴定 CAF 和 NF

NF 和 CAF 细胞生长 24h 后,用冰冷 PBS 洗 3 次,加入细胞裂解液提取蛋白,用蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。取样品用 SDS-PAGE 分离,然后将蛋白转移至 PVDF 膜上,再用 5%脱脂奶粉室温封闭 1h,加入一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,用 TBST 洗涤 3 次,每次 5min,加入二抗,37 $^{\circ}$ C 下孵育 1h,用 TBST 洗涤 3 次,每次 5min。在化学发光仪上显色,结果用灰度扫描仪分析并计算灰度值。以目的条带与内参照条带  $\beta$ -actin 的比值代表目的蛋白的表达水平。实验重复 3 次。

#### 1.2.4 细胞侵袭实验细胞侵袭实验

采用 Transwell 小室进行测试。上室底部滤膜预先铺盖 Matrigel 模拟基膜和细胞外基质(extracellular matrix,ECM),将处于对数生长期的鼻咽癌 CNE-

2 细胞以浓度为 2 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/ml 等量接种于凝胶上;下室分别加入 NF 细胞或 CAF 细胞,24h 后装配上、下室,继续培养 24h 后改无血清培养液继续培养 24h;之后用棉签小心拭去上室的非侵袭细胞和凝胶,移去 Transwell 小室倒置风干,风干后将其置于 0.1% 的结晶紫中,30min 后 PBS 清洗风干,显微镜下计数上下左中右 5 个视野的穿膜细胞数,取均值进行统计学分析。

#### 1.2.5 miRNA 芯片结果分析

按照 miR-Vana<sup>TM</sup> miRNA 分离试剂盒说明书的操作步骤提取 CAF 和 NF 细胞总 RNA。利用凝胶电泳和安捷伦 2100 分析仪测定 RNA 浓度和纯度。利用 miRNA 标记和杂交试剂盒来标记 mRNA 后,加样到安捷伦人 miRNA 基因芯片。安捷伦专用芯片扫描仪扫描杂交芯片获得高精度图像,安捷伦特征提取软件 V9.5 获得杂交图像信息的原始数据并储存在 NCBI 的 GEO 数据库(Gene Expression Omnibus)。采用 GeneSpring GX V 10.0 和 R 统计软件包(R V 2.14.0)分析芯片结果。

### 1.3 统计学处理

应用 SPSS16.0 软件对数据进行统计学分析,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 CAF 和 NF 的鉴定

采用蛋白免疫印迹法检测成纤维细胞分泌蛋白(fibroblast secretory protein,FSP)特异标志物的表达,以此来鉴定判断 CAF、NF 及其纯度。实验结果显示,CAF 中成纤维细胞分泌蛋白 FSP 的表达强阳性,NF 为弱表达(Figure 1)。因此,成功提取了鼻咽癌 NF 细胞,并制备高纯度的 CAF 细胞。

### 2.2 鼻咽癌 CAF 对 CNE-2 细胞侵袭性的影响

以阴性对照组相比,NF 细胞能增强 CNE-2 细胞的侵袭能力,但 CAF 细胞在促进 CNE-2 细胞侵袭方面具更强的能力,三组比较有统计学上差异(Table 1)。

### 2.3 CAF 和 NF miRNA 芯片检测

利用人 Agilent miRNA 芯片技术,检测 CAF 和 NF miRNA 的表达谱。对芯片原始数据中位数标准化处理和配对 SAM 检验后,发现 CAF 与 NF 之间

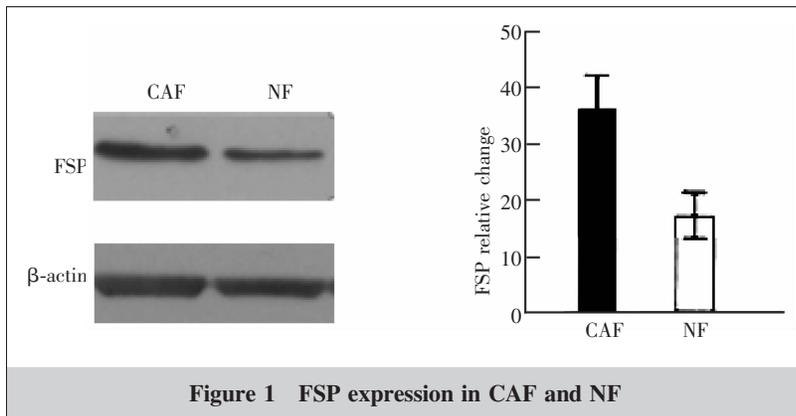


Table 1 Invasion of CNE-2 cells in Transwell test

Group	Fields of vision	$\bar{x} \pm s$	P
CNE-2	20	12.33±2.19	
NF+CNE-2	20	28.45±1.63	0.021
CAF+CNE-2	20	50.6±4.77	0.003

Table 2 The imbalance of miRNA in CAF

miRNA	Up/down regulation	Location	Time
has-miR-221-5p	up	Xp11.30	12.70
has-miR-155	up	21p3	4.54
has-miR-210	up	11p15.5	3.89
has-miR-205	down	1q32.20	0.465
has-miR-200b	down	1p36.33	0.434
has-miR-342-3p	down	14q32.2	0.431
has-miR-329	down	14q32.31	0.379
has-miR-487a	down	14q32.31	0.364
has-let-7g	down	3q21.10	0.321
has-miR-455-3p	down	9q32	0.289
has-miR-301a	down	17q22	0.273
has-miR-652	down	Xq23	0.252
has-miR-432	down	14q32.2	0.199

变化倍数>2.0的有3个上调和10个下调表达的miRNA( $P<0.05$ )(Table 2)。

### 3 讨论

相关研究表明,CAF与NF相比在mRNA和蛋白水平有很多差异<sup>[5]</sup>,一方面归因于DNA不同,另一方面也可以从基因转录和转录后调节的水平寻找原因。本研究从正常鼻咽组织中提取鼻咽NF,将其与TGF-β1共孵育形成鼻咽癌CAF。实验中观察到鼻咽癌CAF细胞形态学异型明显,由典型的细长梭形变为胖梭形、星形等,应用蛋白免疫印迹法检测两

者在FSP蛋白表达上存在差异,鼻咽CAF细胞在形态结构特点、蛋白表达方面发生变化,可能是影响肿瘤增殖、浸润、转移的生物学基础<sup>[6]</sup>。

侵袭是恶性肿瘤细胞的重要生物学特征。在肿瘤侵袭过程中,其侵袭能力与其诱导产生蛋白酶降解ECM的能力密切相关<sup>[6]</sup>。本研究采用Transwell小室实验检测CAF细胞对CNE-2侵袭性的影响,研究发现CAF具有促进CNE-2侵袭、迁移的能力,CNE-2细胞

分别在空白细胞培养液、NF细胞和CAF细胞作用下,穿透Matrigel到达滤膜下方,三组细胞数差异有统计学意义,以后组为最,显示CAF培养液中确实存在活性物质,从而促进CNE-2细胞的透膜行为。

应用miRNA芯片技术检测不同肿瘤相关成纤维细胞,我们发现不同的肿瘤学类型有其独特的miRNA表达谱。研究者从卵巢癌和膀胱癌分离的肿瘤相关成纤维细胞miRNA表达谱均有显著性差别,有研究分析结直肠癌CAF miRNA表达谱,发现12个miRNA出现上调,28个miRNA出现下调。对这些差异miRNA的下游信号进行研究可以寻找CAF影响肿瘤侵袭、浸润能力的分子途径<sup>[7]</sup>,另一方面,miRNA表达水平也可能对肿瘤的预后提出预测,Schepeler等<sup>[8]</sup>对37例结直肠癌病例进行随访,发现miR-320和miR-498低表达者,生存期显著性短于高表达者。本研究运用芯片系统地对比鼻咽癌成纤维细胞miRNA表达谱进行分析,发现13个异常表达的miRNA,其中3个为上调,10个为下调。

在本研究发现的13个差异microRNA当中,miR-205和miR-200显著性下调。既往研究表明,这些miRNA可通过靶向E-cadherin转录抑制物ZEB1和SIP1,从而调控EMT转化和肿瘤细胞的迁移<sup>[9]</sup>。本研究还发现miR-155表达上调,苏娇娇等<sup>[10]</sup>在胰腺癌CAF的研究中发现,miR-155、miR-221、miR-375等12种miRNAs表达升高,检测在共培养前后NFs中这些miRNAs含量的变化,结果显示miR-155含量在共培养之后明显升高,提示miR-155可能通过某种特殊方式从胰腺癌细胞进入基质成纤维细胞,并且在其中发挥作用促进NFs活化。

综上所述,本研究建立了鼻咽癌NF和CAF细

胞模型, 细胞侵袭实验证实 CAF 确能促进鼻咽癌 CNE-2 细胞的侵袭和迁移能力, 运用 miRNA 芯片分析人鼻咽癌 CAF 和 NF 之间的差异 miRNA, 共检测到 13 个 miRNA 的表达有显著性差异。这些异常表达 miRNA 可能与 CAF 促进肿瘤发展密切相关。本研究结果对进一步探讨 CAF 与 NF 之间差异 miRNA 下游的信号通路提供了良好的基础, 有助于解析鼻咽癌侵袭行为, 为临床治疗提供思路。

## 参考文献:

- [1] Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type [J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(15): 1597-1601.
- [2] Micke P, Ostman A. Tumour-stroma interaction; cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy [J]. *Lung Cancer*, 2004, 45(s2): S163-S175.
- [3] Zammarchi F, Boutsalis G, Cartegni L. 5' UTR control of native ERG and of Tmprss2: ERG variants activity in prostate cancer [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e49721.
- [4] Lee I, Ajay SS, Yook JI, et al. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites [J]. *Genome Res*, 2009, 19(7): 1175-1183.
- [5] Aboussekhra A. Role of cancer-associated fibroblasts in breast cancer development and prognosis [J]. *Int J Dev Biol*, 2011, 55(7-9): 841-849.
- [6] Mao Y, Keller ET, Garfield DH, et al. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2013, 32(1-2): 303-315.
- [7] Wang SW, Wang ZH, Xu KL, et al. miRNA expression analysis of cancer-associated fibroblasts and normal fibroblasts in colorectal cancer [J]. *Journal of Modern Oncology*, 2013, 21(9): 1918-1922. [王善伟, 王展怀, 徐佩伦, 等. 结直肠癌相关成纤维细胞的 microRNA 的差异表达谱 [J]. *现代肿瘤医学*, 2013, 21(9): 1918-1922.]
- [8] Schepeler T, Reinert JT, Ostfeld MS, et al. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(15): 6416-6424.
- [9] Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(5): 593-601.
- [10] Su JJ, Feng H, Yao WY, et al. The interaction between pancreatic cancer cells and fibroblasts [J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2015, 50(4): 427-431. [苏娇娇, 冯慧, 姚玮艳, 等. 胰腺癌细胞与其基质成纤维细胞相互影响的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(4): 427-431.]

