

MiR-217 对小鼠胰腺成体干细胞增殖的调控作用

吴琼, 卢洲, 马东慎, 邢芸, 金亮*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘要 为了进一步研究 miR-217 在小鼠胰腺成体干细胞生长过程中的调控作用, 在培养的胰腺成体干细胞中过表达 miR-217, 用 Western blot 和免疫荧光的方法检测 miR-217 对细胞增殖的影响。结果显示, miR-217 能够明显抑制胰腺成体干细胞增殖相关蛋白 Cyclin D1 和 Ki-67 的表达。使用生物信息学软件预测 miR-217 的靶基因, 并通过双荧光素酶报告基因的方法验证了 miR-217 对靶点的靶向性, 实验结果表明, miR-217 能够抑制 PMIR-REPORT-Sirt1-3'UTR 荧光素酶活性。进一步在二维培养的胰腺成体干细胞中, 过表达 miR-217 检测 Sirt1 的表达变化, qPCR 和 Western blot 表明在胰腺成体干细胞中 miR-217 能够抑制 Sirt1 的蛋白水平的表达, 但对 mRNA 水平没有影响。在胰腺成体干细胞中分别加入 Sirt1 的抑制剂尼克酰胺和激动剂白藜芦醇, 尼克酰胺能够抑制胰腺成体干细胞的增殖, 而白藜芦醇促进了胰腺成体干细胞的增殖。以上结果说明, miR-217 通过 Sirt1 调控胰腺成体干细胞的生长, 低表达的 miR-217 有助于维持胰腺成体干细胞的增殖。

关键词 miR-217; 胰腺成体干细胞; Sirt1; Cyclin D1; Ki-67; 增殖

中图分类号 R735 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2018)02-0247-06
doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20180216

引用本文 吴琼, 卢洲, 马东慎, 等. MiR-217 对小鼠胰腺成体干细胞增殖的调控作用 [J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(2):247–252.
Cite this article as: WU Qiong, LU Zhou, MA Dongshen, et al. Regulation of miR-217 on the proliferation of mouse adult pancreatic stem cells [J]. J China Pharm Univ, 2018, 49(2):247–252.

Regulation of miR-217 on the proliferation of mouse adult pancreatic stem cells

WU Qiong, LU Zhou, MA Dongshen, XING Yun, JIN Liang*

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract To further evaluate the effect of miR-217 in the proliferation of mouse adult pancreatic stem cells, we firstly transfected adult pancreatic stem cells with miR-217 mimics and studied the effect of miR-217 on proliferation through Western blot and immunofluorescence. Results showed that during the proliferation of adult pancreatic stem cells, miR-217 inhibited the protein expression of Ki-67 and Cyclin D1, which are related to cell propagation. As well as that, to investigate the target genes of miR-217 and their conserved sites bound by the seed region of miR-217, we used bioinformatic algorithms to find a potential target of miR-217 and verified by dual-luciferase activity assay. Surprisingly, dual-luciferase activity assay revealed that miR-217 could decrease PMIR-REPORT-Sirt1-3'UTR luciferase activity and Sirt1 is a direct target of miR-217. Finally, we verified the function of Sirt1 in the proliferation of pancreatic stem cells. Overexpression of miR-217 in pancreatic stem cells inhibited the level of Sirt1 in protein level but not in mRNA level. Furthermore, activator of Sirt1 played positive effect on colony formation ability and cell proliferation and inhibitor of Sirt1 showed the opposite function. In conclusion, miR-217 inhibits the proliferation of mouse adult pancreatic stem cells through Sirt1 and decreased expression of miR-217 to contribute to the pancreatic stem cells development.

Key words miR-217; mouse adult pancreatic stem cells; Sirt1; Cyclin D1; Ki-67; proliferation

This study was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, No.

收稿日期 2018-01-30 *通信作者 Tel:18761874536 E-mail:liangjin1975@cpu.edu.cn

基金项目 国家高技术研究发展计划(“八六三”计划)资助项目(No.2015AA020314);国家自然科学基金资助项目(No.81570696);江苏省高校“青蓝工程”资助项目;高等学校学科创新引智计划(“111计划”);江苏省高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

2015AA020314); the National Natural Science Foundation of China (No. 81570696); Qing Lan Project; grants from the ‘111’ Project (B16046); and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD)

胰岛移植是一种新的有效控制 1 型糖尿病的方法,然而胰岛来源有限,移植免疫排斥等问题限制了胰岛移植的发展^[1]。现代科学技术能够成功地体外培养胰腺成体干细胞,这一技术有望解决胰岛缺失这一难题^[2-4],众多的信号通路在胰腺干细胞的生长发育过程中有着广泛的调节作用^[5-8],但其生长机制尚不完全明确。

MicroRNA 是一种长度为 18~24 个核苷酸组成的短链非编码 RNA, 在细胞的增殖、凋亡、侵袭和迁移等过程中扮演重要角色^[9-12]。miR-217 是一种已知的具有抑制细胞增殖的 microRNA, 在多种细胞的生长发育过程中发挥重要的调控作用。在人胰腺导管腺肿瘤中, miR-217 通过靶向 Tpd52l2、Kras 和 E2F3 等靶基因抑制细胞的增殖、侵袭和迁移^[13-15]。在肝细胞癌中, miR-217 靶向 DKK1 调控 WNT 信号通路进而影响肿瘤干细胞的干性^[16]。但其在胰腺成体干细胞方面的研究尚未见报道。

本课题组前期对小鼠胰腺成体干细胞的高通量测序结果表明,与胰腺组织相比,在胰腺成体干细胞中 miR-217 的表达明显降低^[17]。本研究通过探索 miR-217 对胰腺成体干细胞增殖的调控作用,为胰腺成体干细胞的进一步研究提供参考依据。

1 材 料

1.1 试 剂

DMEM/F12、DMEM 高糖培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司); Lipo2000(美国 Thermo Fisher 公司); 0.25% 胰酶细胞消化液、双荧光素酶试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); miR-217 mimics(上海吉玛制药技术有限公司); Western blot 电泳设备(美国 Bio-Rad 公司); 兔抗-Cyclin D1 抗体(美国 Selleck 公司); Ki-67 抗体、小鼠抗 Sirt1 抗体、兔抗-GAPDH 抗体、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 和 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体[艾博抗(上海)贸易有限公司]; DAPI(南京凯基生物科技发展有限公司); qPCR 试剂(南京爱必梦生物材料有限公司和上海吉玛制药技术有限公司); 其他试剂均为市售分析纯。qPCR 过程中所使用的引物和双

荧光素酶报告基因载体构建中靶位点序列由苏州金唯智公司合成。

1.2 仪 器

480 II 实时荧光定量 PCR 系统(上海罗氏制药有限公司); 细胞培养箱、离心机(美国 Thermo Fisher 公司); TS2R 倒置荧光显微镜(日本尼康公司)。

1.3 动 物 和 细 胞

6~8 周龄的 C57BL/6 清洁级小鼠购自扬州大学比较医学中心, 许可证号为 SCXK(苏)2017-0007, 所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。HEK293T 细胞保存于本实验室。

2 方 法

2.1 细胞培养与转染

二维体系培养的小鼠胰腺成体干细胞的培养方法参照文献[17], 先用三维半固体体系培养胰腺成体干细胞的单克隆球, 在无菌条件下用 10 μL 枪头将其挑出, 用 0.25% 胰酶将其消化成单细胞, 按每孔 1×10^5 个细胞的密度铺于包被有 matrigel 胶的 12 孔细胞培养板中。HEK293T 细胞使用 DMEM 高糖培养基(含 100 U/mL 青霉素, 100 μg/mL 链霉素)培养。

当胰腺成体干细胞在细胞培养板中的融合度达到 80% 后, 将培养基换成不含抗生素和血清的培养基 300 μL, 将 Lipo2000 1 μL 与 miR-217 mimics (20 μmol/L) 5 μL 加入到不含血清和抗生素的培养基 100 μL 中, 在室温下孵育 15 min 后, 将转染混合物加入到二维培养的胰腺成体干细胞中。转染后 3 h, 将培养基更换成完全培养基, 继续培养 36 h。

2.2 免疫荧光技术检测 Ki-67 的表达

将培养的细胞先用 4% 多聚甲醛在室温固定 15 min, 加入配制好的 0.2% Tritonx-100 破膜液, 使其能够充分浸润细胞, 在室温下破膜作用 30 min。每孔加入 PBST + 1% BSA 溶液 300 μL 使其封闭, 根据待检测一抗说明书按比例稀释一抗溶液, 于 4 °C 孵育过夜。用 PBST 清洗后加入相应的按比例稀释的二抗溶液, 于 37 °C 避光孵育染色 1 h。DAPI 复染后用 PBST 充分洗净后在倒置荧光显微镜下拍照。

此实验中每个步骤结束后均用 PBST 清洗细胞 3 次。

2.3 Western blot 法检测 Cyclin D1、Sirt1 蛋白的表达

在细胞中加入 RIPA 裂解液(含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂)使细胞充分裂解,加入 $5 \times$ 上样缓冲液溶液和 PBS 调整蛋白浓度为 $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$,于 100 ℃ 金属浴中煮沸 10 min。10% 分离胶和 5% 浓缩胶电泳,电压为 160 V,电泳持续约 45 min。使用半干转的方法将蛋白转移到 PVDF 膜上,于 5% 脱脂牛奶中室温封闭 1 h。分别加入相应的按 1:1 000 稀释的一抗: rabbit anti-Cyclin D1, rabbit anti-GAPDH, mouse anti-Sirt1 抗体, 在 4 ℃ 冰箱中过夜孵育。洗膜 3 次后加入相对应的二抗避光孵育 1 h,继续洗膜 3 次后于曝光仪中曝光。

2.4 RNA 的提取和 qPCR

在每个细胞样本中加入 Trizol 裂解液 1 mL 将

Table 2 Sequence used for luciferase report assay

Primer	Sequence(5' to 3')
Sirt1-F	CTAGTTGGCTACACTAAAGAACATGCAGTATTTAGTTCCATTGCGATGATGTGTTA
Sirt1-R	AGCTTAACACATCATGCAATGAAAACATAATACTGCATTCTTACTGTAGCCAAA
Maf-F	CTAGTTGTTAGAACGCTAATAAAATTATGCCAGTTATAACTGCATAAATTATTAGCGTTCTAACAA
Maf-R	AGCTTCTGTGCAAGTAATGCCATTATAACTGCATAAATTATTAGCGTTCTAACAA
Pena-F	CTAGTTCATCAATGATCTTGACGCTAAATGCCAGTTAAAGAAATATTGTCATTAA
Pena-R	AGCTTAAATTGAACAATATTCTTAAACTGCATTAGCGTCAAGATCATTGATGAAA

将合成的单链退火,使用 T_4 -DNA 连接酶将退火产物与酶切后的 PMIR-REPORT 质粒进行连接重组,并将其转化进大肠埃希菌中,提取质粒。microRNA 与 PMIR-REPORT 重组质粒、海肾质粒共转染到 HEK293T 细胞:提前将 HEK293T 细胞均匀铺到 24 孔板中,转染 3 种质粒,每种设置 3 个平行孔。HEK293T 铺板密度为每孔 2×10^5 个,体系 500 μL ,转染前将 24 孔板中细胞换成 400 μL 不含抗生素和血清的培养基,4~6 h 后开始转染。转染结束后 36 h 使用双荧光素酶报告试剂盒对其荧光值进行检测。

2.6 统计学处理

实验数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,平均值对比分析采用双因素方差分析(Two-Way ANOVA),单因素方差分析(One-Way ANOVA)和 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 Sirt1 在胰腺成体干细胞中的表达

提取三维半固体体系培养的胰腺成体干细胞

细胞充分裂解后提取细胞 RNA,使用 qPCR 试剂盒,分别将 RNA 反转录成普通 cDNA 和 miR-217 的 cDNA,将其加到 96 孔 qPCR 板中,进行实时定量 PCR。qPCR 过程中所使用的引物序列如表 1 所示。

Table 1 Primers used for qPCR

Primer	Sequence(5' to 3')
Sirt1-Forward	GCTGACGACTTCGACGACG
Sirt1-Reverse	TCGGTCAACAGGAGGTTGTCT
GAPDH-F	AGGTGGTGTGAACGGATTG
GAPDH-R	TGTAGACCAGTAGTTGAGGTCA
CyclinD1-F	GCGTACCTGACACCAATCTC
CyclinD1-R	CTCCTCTCGCACTCTGCTC

2.5 双荧光素酶检测实验

根据 TargetScan 网站预测 miR-217 的 3 个潜在的靶基因,并合成包含酶切位点和目的片段 3'-UTR 种子序列的 59 bp 的片段。片段序列如表 2 所示。

和小鼠胰腺组织的 RNA,将其反转录成 cDNA,qPCR 方法检测胰腺成体干细胞中 Sirt1 mRNA 的表达水平。结果如图 1 所示,在 mRNA 水平,Sirt1 的表达没有明显变化。

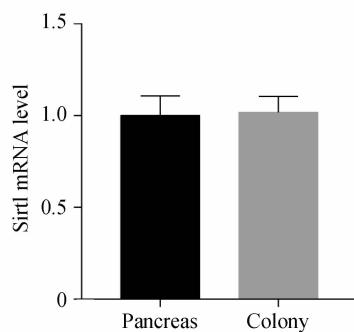


Figure 1 Expression of Sirt1 in mouse adult pancreatic stem cells detected by qPCR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

提取小鼠胰腺成体干细胞和胰腺组织的蛋白质,验证胰腺成体干细胞中 Sirt1 蛋白的表达差异。实验结果显示(图 2),在胰腺成体干细胞中 Sirt1 的蛋白表达明显升高。

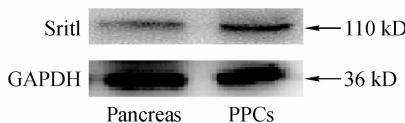


Figure 2 Expression of Sirt1 in mouse adult pancreatic stem cells (PPCs) detected by Western blot

3.2 miR-217 mimics 转染的过表达效率

将三维体系培养的胰腺成体干细胞转到二维体系后, 转染 miR-217 mimics 使 miR-217 过表达, 其过表达效率如图 3 所示, 与对照组相比, miR-217 mimics 转染组中 miR-217 的表达显著上调, 比对照组增高 50 倍。结果表明 miR-217 mimics 可以作为上调 miR-217 的有效工具。

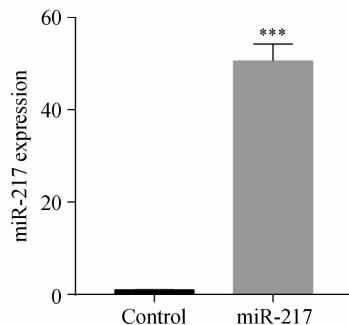


Figure 3 Expression of miR-217 in miR-217 mimics-transfected mouse adult pancreatic stem cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

*** $P < 0.001$ vs control group

3.3 miR-217 对细胞增殖的影响

为了验证 miR-217 对细胞增殖的影响, 在二维体系中培养的胰腺成体干细胞中过表达 miR-217, 观察 miR-217 对增殖的影响。通过 Western blot 方法检测细胞增殖相关蛋白 Cyclin D1 的表达, 实验结果如图 4 所示, 通过转染 miR-217 mimics 使 miR-217 的表达上调后, 与对照细胞相比, miR-217 能够降低细胞增殖相关蛋白 Cyclin D1 的表达。

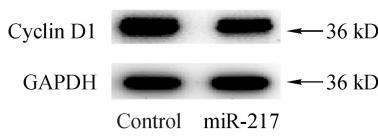


Figure 4 Protein expression level of Cyclin D1 in miR-217 mimics-transfected mouse adult pancreatic stem cells

免疫荧光实验(图 5)也表明在二维体系培养的胰腺成体干细胞中过表达 miR-217 后增殖相关蛋白 Ki-67 的表达也明显降低, 这些结果一致说明 miR-217 能够明显抑制胰腺成体干细胞的增殖。

3.4 双荧光素酶报告基因筛选 miR-217 的靶基因

使用生物信息学的软件筛选 miR-217 的潜在靶基因, 通过 TargetScan 软件预测出 3 个潜在靶基因:Sirt1、Maf 和 PcnA, 并将其潜在靶基因的包含种子序列的 3'-UTR 序列构建在 PMIR-REPORT 质粒载体的萤火虫荧光素酶报告基因下游的 MCS 区。双荧光素酶报告基因结果显示(图 6), 只有 Sirt1 萤火虫荧光素酶的相对荧光值能够被 miR-217 抑制, 而 Maf 和 PcnA 的萤火虫荧光素酶相对荧光值没有影响。实验结果说明 Sirt1 是 miR-217 的靶基因。

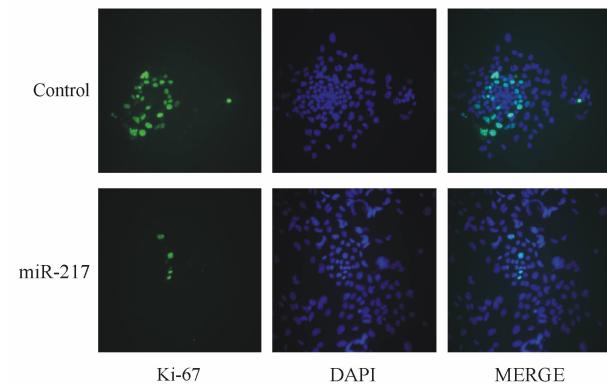


Figure 5 Ki-67 expression in miR-217 mimics-transfected mouse adult pancreatic stem cells ($\times 200$)

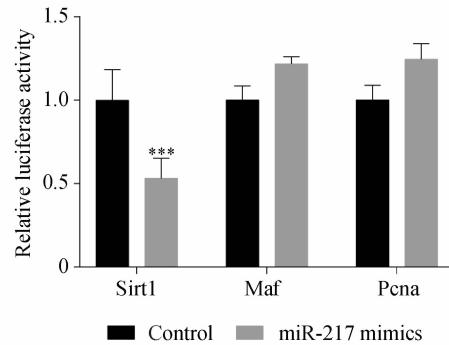


Figure 6 miR-217 directly targeting 3' UTR of Sirt1, but not Maf or PcnA, evaluated by dual-luciferase activity assay ($\bar{x} \pm s, n=3$)

*** $P < 0.001$ vs control group

3.5 miR-217 对 Sirt1 的靶向调控作用

为了进一步验证 miR-217 对 Sirt1 的直接靶向调控作用, 通过 qPCR 和 Western blot 的方法验证 miR-217 对靶基因的调控作用, 如图 7 中的 qPCR 结果显示, 在胰腺成体干细胞中过表达 miR-217 后, 其靶点的 mRNA 水平没有明显变化, 表明 miR-217 对 Sirt1 的 mRNA 水平没有明显作用。然而,

与对照组相比较,胰腺成体干细胞在过表达 miR-217 后 Sirt1 的蛋白表达明显被抑制,说明在胰腺成体干细胞中 miR-217 通过抑制 Sirt1 的蛋白表达来发挥对下游的调控作用。

3.6 Sirt1 对细胞增殖的影响

为了验证 Sirt1 对胰腺成体干细胞增殖的作用,使用 Sirt1 的激动剂白藜芦醇(Res, 10 $\mu\text{mol/L}$)和 Sirt1 的抑制剂尼克酰胺(NAM, 40 mmol/L)来验证 Sirt1 对胰腺成体干细胞中 Cyclin D1 表达的影响。实验结果如图 8 所示,白藜芦醇能够在蛋白水平和 mRNA 水平促进 Cyclin D1 的影响,而尼克酰胺对其具有抑制作用。

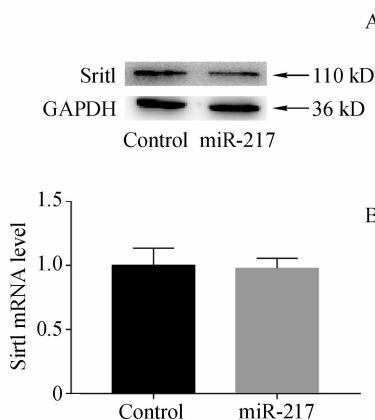


Figure 7 Sirt1 expression after transfected with miR-217 mimics detected with Western blot(A) and qPCR(B) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

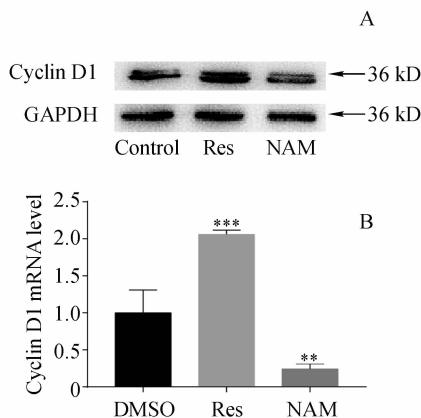


Figure 8 Proliferation rate of adult pancreatic stem cells. Cyclin D1 expression after treated with resveratrol (Res) or niacinamide (NAM) detected with Western blot(A) and qPCR(B) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

* * $P < 0.01$, * * * $P < 0.001$ vs DMSO group

为了进一步验证 Sirt1 对胰腺成体干细胞成球能力的影响,在三维半固体培养体系中加入 Sirt1 的激动剂白藜芦醇和抑制剂尼克酰胺,实验结果如

图 9 所示,加入白藜芦醇能够促进胰腺成体干细胞的成球能力,而当尼克酰胺的使用浓度为 40 mmol/L 时,能够明显抑制胰腺成体干细胞的成球能力。综上所述,促进 Sirt1 能够促进胰腺成体干细胞的增殖能力,而抑制 Sirt1 能够抑制胰腺成体干细胞的增殖。

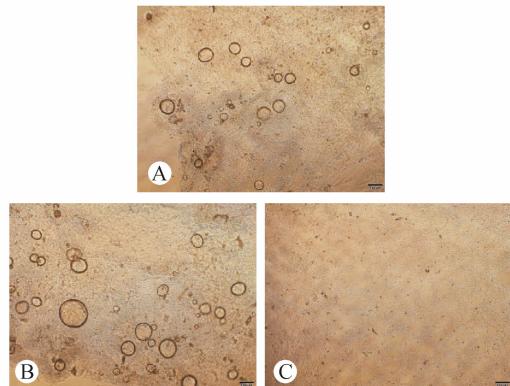


Figure 9 Colony formation ability of pancreas resulted from Res and NAM, respectively ($\times 40$). (A) control; (B) Res 10 $\mu\text{mol/L}$; (C) NAM 40 mmol/L

4 讨 论

为了寻找胰岛移植的替代物,人们通过培养胚胎干细胞成功将其诱导为能够分泌胰岛素的细胞,但其来源缺乏以及存在伦理等问题,胚胎干细胞的运用受到局限。对成体胰腺干细胞的体外培养已经稳定地建立起来,这对胰岛移植的治疗具有一定促进作用。

为了探索胰腺成体干细胞生长发育过程中的调控作用,本研究以前期的高通量测序结果为参考,以 miR-217 为研究对象。MicroRNA 的调控是一个极其庞大又复杂的网络,本研究中过表达 miR-217 后能够明显抑制细胞增殖相关蛋白 Cyclin D1 和 Ki-67 的表达,说明 miR-217 能够抑制胰腺成体干细胞的增殖,在其发育过程中低表达的 miR-217 有助于维持其细胞增殖。为了进一步探索 miR-217 对胰腺成体干细胞增殖的抑制作用,通过 Targetscan 网站预测了 miR-217 的潜在靶基因,筛选出 3 个和胰腺成体干细胞发育存在相关性的基因。利用双荧光素酶报告基因实验验证 miR-217 与其潜在靶点的直接相关性,验证了 Sirt1 是 miR-217 的一个靶基因。同时在胰腺成体干细胞中过表达 miR-217 后发现其靶点的蛋白水平的表

达显著降低,说明miR-217通过靶向调控Sirt1来调控胰腺成体干细胞的增殖。

Sirt1是一种NAD⁺依赖的蛋白去乙酰化酶,在调节基因沉默、细胞衰老、细胞代谢等方面发挥重要的作用^[18]。白藜芦醇是Sirt1的激动剂,能够缓和成体干细胞的衰退^[19]。在猪胎胰腺干细胞中,白藜芦醇通过调节Sirt1的表达,明显促进了胰腺干细胞的增殖^[20]。本研究使用Sirt1抑制剂尼克酰胺和激动剂白藜芦醇来探索Sirt1在胰腺成体干细胞发育过程中对细胞增殖的影响,发现抑制Sirt1的表达后胰腺成体干细胞的成球能力和增殖被抑制,而提高Sirt1的表达后促进了胰腺成体干细胞的增殖。说明miR-217能够通过Sirt1信号通路来调节胰腺成体干细胞的增殖,然而,Sirt1是如何调控胰腺成体干细胞的增殖还需要进一步探索。

总之,本研究考察了miR-217对胰腺成体干细胞增殖的影响,初步探讨了其调控机制,为胰腺成体干细胞和糖尿病等胰腺疾病的治疗奠定了一定的理论基础。

参考文献

- [1] Movahedi B, Keymeulen B, Lauwers MH, et al. Laparoscopic approach for human islet transplantation into a defined liver segment in type-1 diabetic patients [J]. *Transpl Int*, 2003, **16**(3):186–190.
- [2] Jin L, Feng T, Shih HP, et al. Colony-forming cells in the adult mouse pancreas are expandable in Matrigel and form endocrine/acinar colonies in laminin hydrogel [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, **110**(10):3907–3912.
- [3] Jin L, Feng T, Zerda R, et al. *In vitro* multilineage differentiation and self-renewal of single pancreatic colony-forming cells from adult C57BL/6 mice [J]. *Stem Cells Dev*, 2014, **23**(8):899–909.
- [4] Fu X, Jin L, Wang X, et al. MicroRNA-26a targets ten eleven translocation enzymes and is regulated during pancreatic cell differentiation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, **110**(44):17892–17897.
- [5] Li X, Zhang Z, Li Y, et al. miR-18a counteracts AKT and ERK activation to inhibit the proliferation of pancreatic progenitor cells [J]. *Sci Rep*, 2017, **7**:45002.
- [6] Gnatenko DA, Kopantzev EP, Sverdlov ED. Fibroblast growth factors and their effects in pancreas organogenesis [J]. *Biomed Khim*, 2017, **63**(3):211–218.
- [7] Zhang Z, Rankin SA, Zorn AM. Syndecan4 coordinates Wnt/JNK and BMP signaling to regulate foregut progenitor development [J]. *Dev Biol*, 2016, **416**(1):187–199.
- [8] Li XY, Zhai WJ, Teng CB. Notch Signaling in Pancreatic Development [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, **17**(1):48.
- [9] Gu Y, Li XM, Zheng LF, et al. MicroRNA-10b regulates proliferation, cell cycle and apoptosis in human breast cancer cells [J]. *J China Pharm Univ(中国药科大学学报)*, 2015, **46**(2):242–249.
- [10] Wu BW, Wu MS, Guo JD. Effects of microRNA-10a on synapse remodeling in hippocampal neurons and neuronal cell proliferation and apoptosis through the BDNF signaling pathway in a rat model of Alzheimer's disease [J]. *J Cell Physiol*, 2017. doi:10.1002/jcp.26328.
- [11] Liu P, Chang F, Zhang T, et al. Downregulation of microRNA-125a is involved in intervertebral disc degeneration by targeting pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2017, **20**(11):1260–1267.
- [12] Koh H, Park H, Chandimali N, et al. MicroRNA-128 suppresses paclitaxel-resistant lung cancer by inhibiting MUC1-C and BMI-1 in cancer stem cells [J]. *Oncotarget*, 2017, **8**(66):110540–110551.
- [13] Chen Q, Wang P, Fu Y, et al. MicroRNA-217 inhibits cell proliferation, invasion and migration by targeting Tpd52l2 in human pancreatic adenocarcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2017, **38**(6):3567–3573.
- [14] Zhao WG, Yu SN, Lu ZH, et al. The miR-217 microRNA functions as a potential tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting KRAS [J]. *Carcinogenesis*, 2010, **31**(10):1726–1733.
- [15] Yang J, Zhang HF, Qin CF. MicroRNA-217 functions as a prognosis predictor and inhibits pancreatic cancer cell proliferation and invasion via targeting E2F3 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, **21**(18):4050–4057.
- [16] Jiang C, Yu M, Xie X, et al. miR-217 targeting DKK1 promotes cancer stem cell properties via activation of the Wnt signaling pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2017, **38**(4):2351–2359.
- [17] Ma D, Tang S, Song J, et al. Culturing and transcriptome profiling of progenitor-like colonies derived from adult mouse pancreas [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, **8**(1):172.
- [18] Lu SP, Lin SJ. Regulation of yeast sirtuins by NAD(+) metabolism and calorie restriction [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, **1804**(8):1567–1575.
- [19] Liu B, Ghosh S, Yang X, et al. Resveratrol rescues SIRT1-dependent adult stem cell decline and alleviates progeroid features in laminopathy-based progeria [J]. *Cell Metab*, 2012, **16**(6):738–750.
- [20] Xu S, Sun F, Ren L, et al. Resveratrol controlled the fate of porcine pancreatic stem cells through the Wnt/beta-catenin signaling pathway mediated by Sirt1 [J]. *PLoS One*, 2017, **12**(10):e0187159.