

文章编号:1000-5404(2014)07-0655-04

论著

干性基因 Nanog 在膀胱癌组织中的表达及其对膀胱癌细胞增殖与耐药的作用

王志¹, 张艺¹, 黄亚琴¹, 余瑾¹, 石家仲¹, 陈志文², 杨劲¹ (400038 重庆, 第三军医大学: 基础医学部细胞生物学教研室¹, 西南医院全军泌尿外科研究所²)

[摘要] 目的 探讨胚胎干细胞关键转录因子 Nanog 在膀胱癌组织中的表达及在膀胱癌 5637 细胞中的作用。方法 采用免疫组化方法检测 Nanog 蛋白在 46 例膀胱癌组织中的表达。应用慢病毒载体上调 5637 细胞中 Nanog 的表达, 通过克隆形成实验检测细胞增殖, 通过 MTT 法检测细胞对化疗药物顺铂的敏感性。结果 膀胱癌组织中 Nanog 的阳性率为 50%, 且其表达与组织的病理分级呈正相关, 相关系数为 0.989 ($P < 0.05$); Real-time PCR 和 Western blot 结果表明感染慢病毒 LV-Nanog 的 5637 细胞株中 Nanog mRNA 和蛋白的表达明显高于感染慢病毒 LV-Con 的对照组细胞株。5637-C 和 5637-Nanog 的克隆形成率分别为 $(4.6 \pm 0.9)\%$ 和 $(9.0 \pm 1.0)\%$, 显示过表达 Nanog 的 5637 细胞克隆形成率上升 ($P < 0.01$)。以 5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理细胞 72 h, 对照组 5637-C 的存活率分别为 $(64.5 \pm 4.9)\%$ 、 $(53.1 \pm 4.6)\%$ 、 $(43.4 \pm 3.9)\%$ 和 $(21.0 \pm 2.7)\%$, 5637-Nanog 的存活率分别为 $(80.9 \pm 5.6)\%$ 、 $(68.5 \pm 4.2)\%$ 、 $(47.9 \pm 5.1)\%$ 和 $(25.2 \pm 4.2)\%$, 在浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 时 5637-Nanog 对顺铂的敏感性降低。结论 Nanog 的表达增高与膀胱癌病理分级相关, Nanog 基因的表达升高能增强膀胱癌细胞的增殖能力, 降低对顺铂化疗药物的敏感性。

[关键词] Nanog; 膀胱癌; 增殖; 顺铂; 5637

[中图分类号] R394.2; R730.23; R737.14

[文献标志码] A

Expression of Nanog in bladder cancer and its role in proliferation and drug resistance of bladder cancer cells

Wang Zhi¹, Zhang Yi¹, Huang Yaqin¹, Yu Jin¹, Shi Jiazhong¹, Chen Zhiwen², Yang Jin¹ (¹Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, ²Institute of Urinary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To determine the expression of embryonic stem cells key transcription factor Nanog in bladder cancer tissues and its role in human bladder cancer cell line 5637. **Methods** Immunohistochemical assay were performed to detect the expression of Nanog gene in 46 tissue samples of bladder cancer. Nanog was over-expressed through lentivirus vector LV-Nanog in 5637 cells. Plate colony formation assay and MTT assay were used to evaluate the effects of Nanog over-expression on the proliferation and chemo-sensitivity in 5637 cells. **Results** The positive rate of Nanog was 50% in bladder cancer tissues, and increased expression of Nanog in bladder cancer was significantly associated with pathological grade (correlation coefficient = 0.989, $P < 0.05$). Real-time PCR and Western blotting showed that the Nanog expression was obviously higher in the 5637 cells infected with LV-Nanog than those infected with LV-Con lentivirus. The colony formation rate of 5637-C cells and 5637-Nanog cells was $(4.6 \pm 0.9)\%$ and $(9.0 \pm 1.0)\%$, respectively, indicating that over-expression Nanog can increase colony formation rate in 5637 cells ($P < 0.01$). After cisplatin treatment at 5, 10, 20 and 40 $\mu\text{mol/L}$ for 72 h, the survival rate of 5637-C cells was $(64.5 \pm 4.9)\%$, $(53.1 \pm 4.6)\%$, $(43.4 \pm 3.9)\%$ and $(21.0 \pm 2.7)\%$ respectively, while the 5637-Nanog cells was $(80.9 \pm 5.6)\%$, $(68.5 \pm 4.2)\%$, $(47.9 \pm 5.1)\%$ and $(25.2 \pm 4.2)\%$, respectively. The chemo-sensitivity assay showed exogenous Nanog expression was significantly decreased the chemo-sensitivity of 5637 cells to cisplatin (5 and 10 $\mu\text{mol/L}$) compared with the control cells. **Conclusion** Nanog protein expression

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划, 2010CB529402); 国家自然科学基金(81272822)

[通信作者] 杨劲, 电话: (023)68752260, E-mail: zhiwen@hotmail.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140126.1052.015.html> (2014-01-26)

is significantly correlated with the histological grade. Over-expression of Nanog increases the proliferation and decreases the cisplatin sensitivity in 5637 cells.

[Key words] Nanog; bladder cancer; proliferation; cisplatin; 5637 cells

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2010CB529402) and the National Natural Science Foundation of China(81272822). Corresponding author: Yang Jin, Tel:86-23-68752260, E-mail: zhiwen@hotmail.com

膀胱癌是我国男性泌尿生殖系统发病率最高的恶性肿瘤,且呈逐年上升趋势,是严重影响人们健康的恶性疾病,具有易复发、高转移、耐药、异质性强等特点^[1]。近年来逐步在多种肿瘤中均发现异质性的极少量细胞,这些细胞具有自我更新能力和多向分化潜能,同时具备某些胚胎样干细胞特征,即肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)。研究显示,肿瘤治疗效果不佳,预后不好的原因可能为肿瘤中存在数量较少、传统治疗难以彻底清除的肿瘤干细胞,这些数量较少的肿瘤干细胞具有自我更新、无限增殖等特点,是维持和促进肿瘤生长、转移、复发的根本原因^[2-4]。因此,通过深入研究肿瘤干细胞自我更新与干性维持的机制,并探索基于杀伤或抑制肿瘤干细胞的治疗新策略是目前肿瘤研究的新思路。干细胞自我更新与干性维持有赖于干性基因表达,如 OCT4、Nanog、SOX2 等。新近研究发现,胚胎样干性基因表达与肿瘤的发生、发展密切相关,其机制可能在维持肿瘤干细胞自我更新与干性维持中发挥关键作用^[5-6]。鉴于干性基因在膀胱肿瘤及膀胱肿瘤干细胞中的作用与机制尚不得知,本研究探讨干性基因 Nanog 在膀胱癌发生、发展中的作用及其对膀胱癌临床化疗药物顺铂化疗效果的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织、细胞和质粒 人膀胱癌组织取自第三军医大学西南医院泌尿外科 2006-2010 年手术切除标本,共 46 例,按 WHO(2004)病理分级:低度恶性倾向尿路上皮乳头状瘤(PUN-LMP)19 例,低分级乳头状尿路上皮癌(LGPUC)12 例,高分级乳头状尿路上皮癌(HGPUC)15 例。293T 细胞和膀胱癌细胞株 5637 为本室保存。慢病毒包装辅助质粒 psPAX2 和 pMD2. G 为 Addgene 产品,慢病毒空载体 PLJM-C 和载有 Nanog 基因的重组载体 PLJM-Nanog 购自上海杰李生物技术公司。

1.1.2 主要试剂 抗免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物公司,DMEM 高糖培养基、1640 培养基、胰酶和胎牛血清购自 HyClone 公司,聚凝胺(polybrene)、嘌呤霉素、MTT 和顺铂(CIS)购自 Sigma 公司,Lipofectamin2000 和 Trizol 为 Invitrogen 公司产品,cDNA 逆转录试剂盒 iScriptTM cDNA Synthesis Kit、SYBR premix、ECL 发光液和 PVDF 膜购自 Bio-Rad 公司,兔抗 Nanog 单克隆抗体购自 Abcam 公司,鼠抗 tubulin 单克隆抗体和 RIPA 强蛋白裂解液购自碧云天公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 和羊抗鼠 IgG 购自上海生工生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化检测膀胱癌组织中 Nanog 的表达 病理组织标本经固定,脱水,浸蜡后包埋,连续切片。兔抗 Nanog 单抗 1:100 稀释,组织经抗原修复,两步法进行免疫组化染色,设置阴性对照,DAB 显色后梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,光学显微镜下观察。免疫组化染色结果按细胞染色强度和阳性细胞比例两方面判定。细胞染色强度记分:无染色 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;按阳性细胞所占的百分比记分:<10% 为 0 分,10%~29% 为 1 分,30%~60% 为 2 分,>60% 为 3 分;两者相加,<3 分为阴性,≥3 分为阳性^[7]。

1.2.2 慢病毒的包装与浓缩 依据 Lipofectamin2000 使用说明,将载有 Nanog 基因的重组载体 PLJM-Nanog 和病毒包装辅助载体(psPAX2 和 pMD2. G)共转染 293T 细胞,以空载体 PLJM-C 为对照。转染 4 h 后,加入含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基继续培养。48 h 后收集含病毒颗粒的上清,经 0.45 μm 滤器过滤后,4 ℃,70 000 ×g 离心 2 h,用 PBS 重悬病毒颗粒,获得重组慢病毒 LV-Nanog 和对照慢病毒 LV-Con,并用孔稀释法测定病毒滴度,-80 ℃ 保存备用。

1.2.3 慢病毒感染 5637 细胞及筛选 用离心收集所得的慢病毒感染 5637 细胞,根据病毒的滴度,采用感染复数 MOI = 10,将慢病毒 LV-Nanog 和对照慢病毒 LV-Con 分别感染 5637 细胞,并加入 8 μg/mL 的聚凝胺(polybrene)促进感染,感染 8 h 后换液。感染 72 h 后,在细胞培养液中加入嘌呤霉素(1 μg/mL)筛选稳定表达株,命名为 5637-Nanog(实验组)和 5637-C(对照组)。

1.2.4 Real-time PCR 检测感染 5637 细胞后 Nanog mRNA 表达 采用 Trizol 法提取细胞的总 mRNA,按照逆转录试剂盒说明进行逆转录得到 cDNA,然后依荧光定量试剂说明配制反应体系,每组各设 3 个复孔,利用 Bio-Rad 公司的 CFX96 实时定量 PCR 仪检测 Nanog 基因的表达。PCR 引物:Nanog 上游引物 5'-CTAAGAGGTGGCAGAAAAACA-3',下游引物 5'-CTGGTG-GTAGGAAGAGTAAAGG-3',片段大小为 101 bp;GAPDH 上游引物 5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3',下游引物 5'-TCTA-GACGGCAGGTCAGGTC-3',片段大小为 200 bp。采用两步法反应,条件为 95 ℃ 3 min;(95 ℃ 10 s,62 ℃ 30 s)×40 个循环,反应结束后立即进行溶解曲线分析,条件为 65~95 ℃,每 5 秒上升 0.5 ℃。

1.2.5 Western blot 检测感染 5637 细胞后 Nanog 的蛋白表达 胰酶消化细胞并用 PBS 洗涤,用 RIPA 强细胞裂解液于冰上裂解 10 min。4 ℃,12 000 r/min 离心 10 min,取上清并用 Lowry 法测定蛋白浓度,经浓度标准化后进行 Western blot 检测。取 40 μg 总蛋白,经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,将蛋白电转至 PVDF 膜上。用 5% BSA 常温封闭 1 h,以 1:1 000

稀释 Nanog 抗体,以 1:4 000 稀释 tubulin 抗体,加于 PVDF 膜上,4 °C 孵育过夜。用含 0.1% Tween20 的 PBST 洗膜 3 次,每次 15 min,以 1:10 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗常温孵育 1 h,PBST 洗涤 3 次,每次 15 min,ECL 试剂发光,显影,用 Quantity One 软件进行分析。

1.2.6 平板克隆形成实验 以 1 000/孔细胞接种 6 孔板,接种 3 孔,置于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱内培养,每 3~4 天换液,培养 2 周后结晶紫染色,倒置显微镜下观察,以多于 50 个细胞的细胞团作为克隆计数。克隆形成率 = 平均克隆数/接种细胞数 × 100%。

1.2.7 MTT 法检测感染细胞对顺铂的敏感性 收集实验组和对照组细胞,按每孔 100 μL 培养基 5 × 10³ 细胞接种于 96 孔板中,设 3 个复孔,并设调零孔。2 组细胞过夜培养后加入不同浓度的顺铂(0、5、10、20、40 μmol/L)处理细胞,4 h 后换液,继续培养 68 h,每孔加入 MTT(5 mg/mL)20 μL,37 °C 孵育 4 h 后吸去培养基,加入 150 μL DMSO,震荡 10 min 后酶标仪检测 D(570) 值。细胞存活率 = [D(570) 细胞孔 - D(570) 调零孔] / [D(570) 0 μmol/L 顺铂处理细胞孔 - D(570) 调零孔] × 100%。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 SPSS 17.0 统计软件,均值比较采用两独立样本 *t* 检验,免疫组化各组间的阳性率比较采用 χ^2 检验,相关性分析采用 Pearson 相关分析。

2 结果

2.1 Nanog 在膀胱癌组织中高表达且与病理分级呈正相关

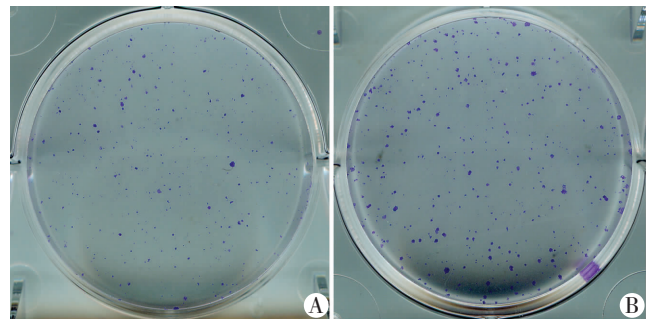
Nanog 的表达主要定位在细胞核,低级别膀胱癌组织阳性细胞较少且染色较浅,高级别膀胱癌组织细胞阳性率高且染色较深。如图 1 所示,Nanog 在膀胱癌组织中高表达。病理分级:19 例低度恶性倾向尿路上皮乳头状瘤(PUNLMP)中 Nanog 阳性表达 4 例(21.1%),12 例低分级乳头状尿路上皮癌(LGPUC)中 Nanog 阳性表达 7 例(58.3%),15 例高分级乳头状尿路上皮癌(HGPUC)中 Nanog 阳性表达 12 例(80.0%),可见 Nanog 阳性表达与组织的病理分级呈正相关($r=0.989, P<0.05$)。

2.2 高表达外源 Nanog 的膀胱癌 5637 细胞模型的建立为探讨 Nanog 在膀胱癌中的作用,我们利用慢病毒载体,

将外源基因 Nanog 导入膀胱癌 5637 细胞中,构建高表达 Nanog 的膀胱癌 5637 细胞模型,同时设置感染空载体对照组。分别用 Real-time PCR 和 Western blot 检测感染细胞 Nanog 的表达,结果显示,对照组的 mRNA 相对表达量为 1.0 ± 0.1 ,感染重组慢病毒 LV-Nanog 的 5637 细胞中 Nanog 的 mRNA 相对表达量为 483.6 ± 16.7 ,说明 5637-Nanog 细胞的 Nanog RNA 水平表达明显高于对照组($P<0.01$)。进一步用 Western blot 检测,结果表明与感染空载体慢病毒 LV-Con 对照组相比,感染重组慢病毒 LV-Nanog 的 5637 细胞中 Nanog 表达明显增高。

2.3 高表达 Nanog 能够促进膀胱癌 5637 细胞克隆形成能力

为了探讨 Nanog 对细胞增殖能力的影响,我们采用克隆形成实验检测高表达 Nanog 的 5637 细胞增殖能力,其中对照组细胞 5637-C 的克隆形成率为 $(4.6 \pm 0.9)\%$,实验组 5637-Nanog 的克隆形成率为 $(9.0 \pm 1.0)\%$,结果表明高表达 Nanog 的 5637 细胞克隆形成能力较对照组更强($P<0.01$,图 2),显示其增殖能力升高。

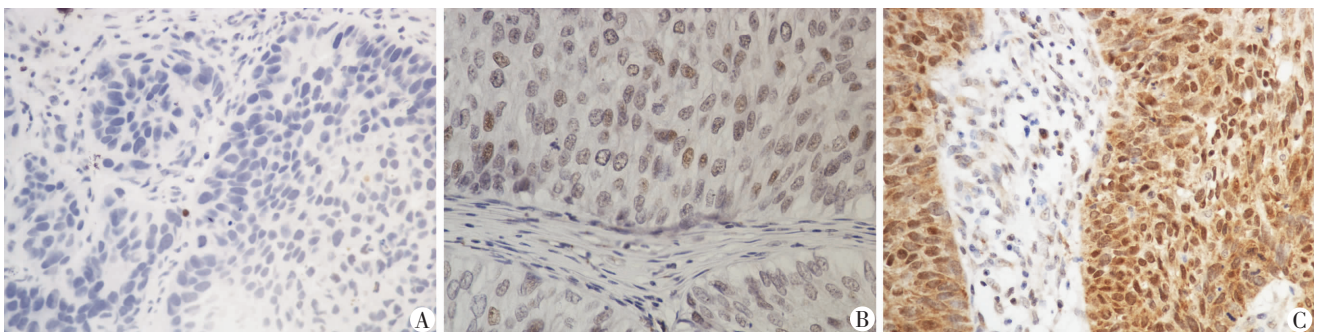


A: 对照组; B: 实验组

图 2 倒置显微镜观察感染 5637 细胞后的克隆形成能力 (结晶紫)

2.4 高表达 Nanog 能够降低膀胱癌 5637 细胞对顺铂的敏感性

通过 MTT 法检测高表达 Nanog 的膀胱癌 5637 细胞对顺铂的敏感性,发现在顺铂浓度为 5 μmol/L 时,5637-Nanog 细胞的存活率为 $(80.9 \pm 5.6)\%$,对照 5637-C 细胞的存活率为 $(64.5 \pm 4.9)\%$;顺铂浓度为 10 μmol/L 时,5637-Nanog 细胞的存活率为 $(68.5 \pm 4.2)\%$,对照 5637-C 细胞的存活率为 $(53.1 \pm 4.6)\%$;相应浓度顺铂处理后,2 种细胞的存活率差异有统计学意义($P<0.05$)。在顺铂浓度为 20 μmol/L 时,5637-Nanog 细胞的存活率为 $(47.9 \pm 5.1)\%$,对照 5637-C 细胞的存活率为



A: 低度恶性倾向尿路上皮乳头状瘤; B: 低分级乳头状尿路上皮癌; C: 高分级乳头状尿路上皮癌

图 1 膀胱癌组织中 Nanog 的表达 (二步法 × 400)

(43.4 ± 3.9)%; 顺铂浓度为 40 μmol/L 时, 5637-Nanog 细胞的存活率为 (25.2 ± 4.2)%, 对照 5637-C 细胞的存活率为 (21.0 ± 2.7)%; 相应浓度顺铂处理后, 2 种细胞的存活率差异无统计学意义。比较于对照组, 高表达 Nanog 的 5637 细胞在顺铂浓度为 5 μmol/L 和 10 μmol/L 时对其敏感性降低, 表现出对顺铂的耐受。

3 讨论

干性基因在干细胞干性维持与自我更新中发挥极其关键的作用。其中, 干性基因 Nanog 基因最早是在胚胎干细胞内发现的转录因子^[8-9], 它属于 ANTP 类 NK 家族基因, 位于人体第 12 号染色体, cDNA 包含 2 184 个核苷酸, 编码 305 个氨基酸, 对 ES 细胞进行自我更新决定簇的筛查显示 Nanog 的表达对 ES 细胞的自我更新具有决定性的作用, 而在多数分化细胞中未检测到其表达。用 siRNA 下调 ES 细胞中 Nanog 的表达后可以诱导 ES 细胞向胚胎外细胞谱系的分化^[10], 说明 Nanog 是维持胚胎多能性的关键因子, 同时其作为干细胞的分子标记和基因产物在维持干细胞干性中发挥重要作用。

随着肿瘤干细胞的发现与深入研究, 目前发现多个干细胞维持因子如 Nanog、Oct4、Sox2 等在肿瘤及肿瘤干细胞的发生、发展中起着重要的作用^[11-13], 不仅这些干细胞标记物的表达与肿瘤的分化程度、预后相关, 同时 Nanog 可促进多种肿瘤的增生、侵袭和转移^[14-15]; 但是, Nanog 促进肿瘤发生、发展的分子机制目前尚不得知, 同时 Nanog 在膀胱肿瘤发生、发展或化疗耐药中的角色也少见报道。为探讨 Nanog 在膀胱癌发生、发展中是否发挥重要作用, 我们首先检测 46 例膀胱癌病理组织中 Nanog 的表达, 免疫组化检测发现, Nanog 在膀胱癌病理组织中高表达, 并且与病理分级呈正相关, 提示 Nanog 在膀胱癌的发生、发展中起重要作用。进一步采用膀胱肿瘤细胞系 5637, 利用慢病毒载体, 建立过表达外源 Nanog 膀胱癌细胞模型, 通过克隆形成实验检测细胞的增殖能力, 发现过表达 Nanog 的 5637 细胞的克隆形成能力更强, 说明 Nanog 的高表达与膀胱癌细胞的增殖和自我更新相关, 表现出肿瘤干细胞样特性; 通过 MTT 检测细胞对化疗药物顺铂的敏感性, 显示在顺铂浓度为 5 μmol/L 和 10 μmol/L 时过表达 Nanog 的 5637 细胞对其敏感性降低, 表现出对顺铂的耐受, 提示 Nanog 在膀胱肿瘤中的异常表达可促进肿瘤的耐药, 在膀胱肿瘤的演进中起重要作用。上述研究结果初步显示干性基因 Nanog 高表达促进膀胱肿瘤发生与发展, 提示其机制可能与维持及促进肿瘤干细胞中自我更新相关。本研究存在组织样本量偏

少和细胞系单一等不足, 下一步研究将增加组织样本量和采用多种细胞系, 并着重探讨 Nanog 在膀胱肿瘤耐药以及膀胱肿瘤干细胞干性维持中的分子机制。

参考文献:

- [1] Logan C, Brown M, Hayne D, *et al.* Intravesical therapies for bladder cancer-indications and limitations[J]. *BJU Int*, 2012, 110(Suppl 4): 12-21.
- [2] Zhang Y, Wang Z, Yu J, *et al.* Cancer stem-like cells contribute to cisplatin resistance and progression in bladder cancer[J]. *Cancer Lett*, 2012, 322(1): 70-77.
- [3] Rosen J M, Jordan C T. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm[J]. *Science*, 2009, 324(5935): 1670-1673.
- [4] Ricci E, Mattei E, Dumontet C, *et al.* Increased expression of putative cancer stem cell markers in the bone marrow of prostate cancer patients is associated with bone metastasis progression[J]. *Prostate*, 2013, 73(16): 1738-1746.
- [5] Chiou S H, Wang M L, Chou Y T, *et al.* Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(24): 10433-10444.
- [6] Leis O, Eguirra A, Lopez-Arribillaga E, *et al.* Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells[J]. *Oncogene*, 2012, 31(11): 1354-1365.
- [7] Tadin T, Krpina K, Stifter S, *et al.* Lower cyclooxygenase-2 expression is associated with recurrence of solitary non-muscle invasive bladder carcinoma[J]. *Diagn Pathol*, 2012, 7: 152.
- [8] Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, *et al.* The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells [J]. *Cell*, 2003, 113(5): 631-642.
- [9] Chambers I, Colby D, Robertson M, *et al.* Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells [J]. *Cell*, 2003, 113(5): 643-655.
- [10] Hyslop L, Stojkovic M, Armstrong L, *et al.* Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages[J]. *Stem Cells*, 2005, 23(8): 1035-1043.
- [11] Noh K H, Kim B W, Song K H, *et al.* Nanog signaling in cancer promotes stem-like phenotype and immune evasion[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(11): 4077-4093.
- [12] Kumar S M, Liu S, Lu H, *et al.* Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation[J]. *Oncogene*, 2012, 31(47): 4898-4911.
- [13] Rudin C M, Durinck S, Stawiski E W, *et al.* Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer[J]. *Nat Genet*, 2012, 44(10): 1111-1116.
- [14] Pan G, Thomson J A. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency[J]. *Cell Res*, 2007, 17(1): 42-49.
- [15] Xiao Y, Ye Y, Yearsley K, *et al.* The lymphovascular embolus of inflammatory breast cancer expresses a stem cell-like phenotype[J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(2): 561-574.

(收稿:2013-11-25;修回:2013-12-05)

(编辑 龙亮)