

· 临床研究 ·

Nanog 在多种癌组织中的表达及临床意义*

韩敬华 张 飞 武 冰 张海端 王宇晴 田 然 宋伟杰 牛瑞芳

摘要 目的:分析 Nanog 在非小细胞肺癌(NSCLC)、胃腺癌、食管鳞状细胞癌中的表达特点及规律,探讨 Nanog 的表达在肿瘤发生、发展中的意义及其与肿瘤干细胞的关系。**方法:**采用实时荧光定量PCR法分别检测78例NSCLC及其中10例肺癌患者的癌旁组织、39例胃腺癌及其中10例胃腺癌患者的癌旁组织和35例食管鳞癌及其中10例食管鳞癌患者的癌旁组织中 Nanog 的相对表达情况。**结果:**NSCLC、胃腺癌和食管鳞癌组织中 Nanog 相对表达量明显高于对应的癌旁组织,且肺癌和胃腺癌与其对应的癌旁组织之间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。肺癌中 Nanog 的相对表达量与患者的临床分期和肿瘤组织学类型有关($P < 0.05$);胃腺癌组织中,Nanog 的相对表达量与胃腺癌的临床分期、性别有关($P < 0.05$);食管鳞癌组织中,Nanog 的相对表达量与淋巴结转移、临床分期有关($P < 0.05$)。**结论:**在肿瘤进展过程中,Nanog 的表达与肿瘤的临床分期和淋巴结转移有关,提示 Nanog 的表达在腺癌的发生、发展中可能具有一定意义。

关键词 Nanog 非小细胞肺癌 胃腺癌 食管鳞癌 实时荧光定量PCR

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.01.003

Expression and Clinical Significance of Nanog in Tissue of Several Cancer Types

Jinghua HAN, Fei ZHANG, Bing WU, Haichang ZHANG, Yuqing WANG, Ran TIAN, Weijie SONG, Ruifang NIU

Corresponding author: Ruifang NIU; Email: niurf1982@yahoo.com.cn

Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Key Laboratory of Cancer Prevention and Treatment of Tianjin City, Tianjin 300060, China

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant 81071731) and by the Changjiang Scholars and Innovative Research Team Development Plan of the Ministry of Education (No. IRT1076)

Abstract Objective: The current work aims to analyze the Nanog expression in tissue of several cancer types, explore its significance in the formation and development of tumor, and demonstrate its relationship with cancer stem cells. **Methods:** Nanog was detected via real-time PCR in 78 non-small-cell lung cancer (NSCLC) tissue samples and 10 tissue samples adjacent to lung cancer, 39 gastric adenocarcinoma tissue samples and 10 tissue samples adjacent to gastric adenocarcinoma, and 35 of esophageal squamous cell carcinoma tissue samples and 10 tissue samples adjacent to esophageal carcinoma. **Results:** The Nanog expression was significantly higher in NSCLC, gastric adenocarcinoma, and esophageal squamous cell carcinoma tissue, with significant difference in NSCLC and gastric adenocarcinoma ($P < 0.05$). The Nanog expression was related with the clinical stage and tumor histological classification in NSCLC ($P < 0.05$), with the clinical stage and age in gastric adenocarcinoma ($P < 0.05$), and with the clinical stage and lymph-node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma ($P < 0.05$). **Conclusion:** The Nanog expression was related with clinical stage, lymph-node metastasis, and tumor histological classification, suggesting that it might be associated with the formation and development of adenocarcinoma.

Keywords Nanog; Non-small-cell lung cancer (NSCLC); Gastric adenocarcinoma; Esophageal squamous cell carcinoma; Real-time PCR

据美国国家癌症研究所介绍,2010年大约有150万美国人被诊断出癌症,其中三分之一最终被癌症夺去了生命。癌细胞多呈低度分化,其生长和分裂速度高于正常细胞,且往往可转移到其他组织,破坏组织、器官的结构和功能,最终导致器官功能衰竭而死亡。胚胎干细胞具有多向分化潜能和无限增殖的能力,由此可见肿瘤细胞在一定程度上具有胚胎干

细胞的某些特性。大量研究显示,肿瘤组织由异质性的细胞群体组成,其中只有很少部分细胞具有自我更新、增殖克隆、分化潜能、迁移侵袭性、高致瘤性、耐药性和对放射线抵抗性等干细胞特性^[1]。肿瘤干细胞是肿瘤中具有干细胞特性的一类细胞,既具备高度增殖能力与自我更新能力,也具备多向分化的潜能,是形成不同分化程度肿瘤细胞和影响肿瘤

作者单位:天津医科大学附属肿瘤医院肿瘤研究所,天津市肿瘤防治重点实验室(天津市300060)

* 本文课题受国家自然科学基金(编号:81071731)和教育部“长江学者和创新团队发展计划”项目(编号:IRT1076)资助

通信作者:牛瑞芳 niurf1982@yahoo.com.cn

生长及复发、抵抗放疗和化疗的根源^[2-4]。因此识别并控制肿瘤干细胞对于肿瘤的预防、早期发现、诊断和治疗都具有重要意义。

Nanog是在2003年被发现的,Chambers等和Mitsui等几乎同时报道了一种在囊胚内细胞群(inner cell mass, ICM)、原始生殖细胞以及ESCs表达的新转录因子,命名为Nanog^[4]。最近的研究发现Nanog不仅在胚胎干细胞、生殖系干细胞和胚胎生殖细胞肿瘤中表达^[5],在一些癌细胞中也有表达(精原细胞瘤、乳腺癌、生殖细胞肿瘤、神经胶质瘤)^[6-8]。鉴于癌细胞与ES细胞均有无限增殖及保持低分化状态的特征,提示Nanog可能是调节细胞全能性与自我更新的关键因子。本研究将探讨Nanog在NSCLC、胃腺癌、食管鳞癌的表达情况,分析其相对表达量与临床病理特征之间的关系,探讨Nanog的表达在肿瘤细胞的发生、发展过程中可能起到的作用。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集我院2003年4月至2010年1月初诊并手术的NSCLC 78例,其中男56例,女22例,年龄26~80岁,平均年龄60.0岁。组织病理分型:鳞癌40例、腺癌38例。临床分期:I期20例、II期32例、III期22例、IV期4例。有淋巴结转移的41例,无淋巴结转移的37例。从78例NSCLC中随机取10例肺癌患者癌旁组织为对照组。胃腺癌39例,其中男29例,女10例。年龄33~79岁,平均年龄59.7岁。临床分期:I、II 9例,III、IV 30例。有淋巴结转移的33例,无淋巴结转移的6例。从39例胃腺癌中随机取10例胃腺癌患者癌旁组织为对照组。食管鳞状细胞癌35例,其中男28例,女7例,年龄36~79岁,平均年龄61.6岁。临床分期:I、II 18例,III、IV 17例。有淋巴结转移的20例,无淋巴结转移的15例。从35例食管鳞癌中随机取10例食管鳞癌患者癌旁组织为对照组。

1.2 实时定量RT-PCR反应

分别将182例mRNA(肺88例,胃49例,食管45例)先进行琼脂糖凝胶电泳进行完整性检测,然后取1 μg RNA进行逆转录反应。逆转录反应条件如下:按20 μL体系采用Prime Script逆转录酶在42℃进行逆转录反应45 min,70℃保温10 min灭活逆转录酶后置冰上冷却。合成后的cDNA置-20℃备用。根据Gene bank数据库中Nanog参考序列设计用于Real-time PCR的引物,并采用BLAST程序比对确定引物的特异性,以β-actin作为内参照。引物序列:Nanog F: 5'-ATGCCTGCAGTTTTTCATCC-3'; R: 5'-GAGGCAGGTCCTCAGAGGAA-3'其长度为189bp;

β-actin F: 5'-CAGAGCAAGAGAGGCATCC-3'; R: 5'-CTGGGCTGTTGAAGGTCTC-3'其长度为217 bp。在PCR反应管中配置反应体系如下:2×SYBR Premix Ex Tag 10 μL, Nanog, β-actin上下游引物各0.4 μL, cDNA模板2 μl,加入灭菌水至总体积为20 μL。Real-time PCR扩增采用SYBR Green I染料法在荧光定量全自动PCR仪ABI 7500 Real-Time PCR System进行,采用两步法扩增,设定退火温度为58℃,共进行39个循环。反应结束后,由电脑自动设置阈值,并记录相应的Ct值。以β-actin Ct值为参照,按公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算Nanog相对表达量。

1.3 统计学分析

采用SPSS13.0完成统计分析,比较各组间Nanog的相对表达水平采用Nonparametric test统计法,应用GraphPadPrism5软件完成作图,取 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同癌组织中Nanog的表达及其与癌旁组织之间的关系

在NSCLC、胃腺癌与食管鳞癌组织中,Nanog的相对表达量明显高于各自癌旁组织,且NSCLC与胃腺癌中Nanog相对表达量与其癌旁组织相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 各种癌组织及其癌旁组织中Nanog相对表达量

Table 1 Relative expression of Nanog in tissue of several cancer types and corresponding adjacent tissue

组织	分组	n	相对表达量 ± SD	P
肺	癌旁	10	0.35 ± 0.29	0.031*
	癌	78	1.58 ± 2.60	
胃	癌旁	10	2.89 ± 4.82	0.010*
	癌	39	6.19 ± 9.57	
食管	癌旁	10	1.28 ± 0.93	0.545
	癌	35	2.17 ± 2.83	

* $P < 0.05$, 差异有统计学意义

2.2 肺腺癌与肺鳞癌中Nanog的表达与临床病理特征之间的关系

在肺腺癌与鳞癌组织中,Nanog相对表达量与患者的临床分期有关。临床分期越高,Nanog的相对表达量就越高($P < 0.05$)。从表2中还可以看出Nanog的相对表达量在肺腺癌中有明显高于肺鳞癌的趋势。NSCLC中Nanog相对表达量与临床各病理特征之间的关系见表2、表3。

2.3 胃腺癌中Nanog的表达与临床病理特征之间的关系

在胃腺癌组织中,肿瘤临床分期越高,Nanog的

相对表达量就越高($P<0.05$);男性患者中Nanog相对表达量明显高于女性患者($P<0.05$);Nanog相对表达量在有淋巴结转移组有高于无淋巴结转移组的趋势,本组标本显示无统计学意义($P>0.05$)。胃腺癌中Nanog相对表达量与临床各病理特征之间的关系,见表4。

表2 肺癌组织中Nanog相对表达量与临床病理特征之间的关系

Table 2 Relationship between Nanog expression and clinicopathologic features of NSCLC

组织学分型	项目	N	相对表达量 ± SD	P	
肺腺癌	性别	男	21	3.39 ± 4.76	0.728
		女	17	2.19 ± 2.39	
	年龄(岁)	<60	19	2.45 ± 3.46	0.931
		≥60	19	3.15 ± 4.34	
	临床分期	I、II	24	1.39 ± 1.86	0.005*
		III、IV	14	5.21 ± 5.19	
淋巴结转移	有	21	3.29 ± 4.19	0.294	
	无	17	2.19 ± 3.49		
肺鳞癌	性别	男	35	0.90 ± 1.00	0.086
		女	5	0.45 ± 0.73	
	年龄(岁)	<60	15	0.60 ± 0.69	0.133
		≥60	25	0.98 ± 1.10	
	临床分期	I、II	28	0.56 ± 0.73	0.003*
		III、IV	12	1.49 ± 1.19	
淋巴结转移	有	20	1.16 ± 1.21	0.114	
	无	20	0.52 ± 0.53		

* $P<0.05$,差异有统计学意义

表3 肺癌不同临床分期中Nanog相对表达量与癌旁组织之间的差异

Table 3 Relative expression of Nanog among NSCLC and adjacent tissue of different clinical stages

分组	n	相对表达量 ± SD	P
癌旁	10	0.35 ± 0.29	
I	20	1.39 ± 1.97	0.159
II	32	1.45 ± 2.36	0.048*
III	22	2.55 ± 4.09	0.043*
IV	4	2.40 ± 1.79	0.034*

* $P<0.05$,差异有统计学意义

2.4 食管鳞癌中Nanog的表达与临床病理特征之间的关系

在食管鳞癌组织中,Nanog相对表达量与患者的临床分期及淋巴结转移相关。即临床分期越高,Nanog的相对表达量就越高($P<0.05$);有淋巴结转移组Nanog相对表达量明显高于无淋巴结转移组($P<0.05$)。食管鳞癌中Nanog相对表达量与临床各病理特征之间的关系,见表5。

2.5 不同癌组织及其对应癌旁组织中Nanog相对表达量

将38例肺腺癌、40例肺鳞癌、39例胃腺癌、35例食管鳞癌分别与其对应的癌旁组织作比较。统计学分析发现,肺腺癌中Nanog相对表达量为2.80,肺鳞癌中Nanog相对表达量为0.84,二者之间差异显著($P<0.05$)。胃腺癌中Nanog相对表达量显著高于相应癌旁组织($P<0.05$);肺鳞癌中Nanog相对表达量高于癌旁组织,本组资料显示统计学差异不明显($P>0.05$);食管鳞癌中Nanog相对表达量高于癌旁组织,本组资料显示统计学差异不明显($P>0.05$)。

表4 胃腺癌组织中Nanog相对表达量与临床病理特征之间的关系

Table 4 Relationship between Nanog expression and clinicopathologic features of gastric adenocarcinoma

项目	n	相对表达量 ± SD	P	
性别	男	29	7.15 ± 11.10	0.018*
	女	10	2.60 ± 2.43	
年龄(岁)	<60	21	4.50 ± 5.41	0.245
	≥60	18	7.82 ± 12.85	
淋巴结转移	阳性	33	6.31 ± 10.20	0.985
	阴性	6	5.52 ± 5.42	
临床分级	I、II	9	2.87 ± 3.33	0.023*
	III、IV	30	7.19 ± 10.61	

* $P<0.05$,差异有统计学意义

表5 食管鳞癌组织中Nanog相对表达量与临床病理特征之间的关系

Table 5 Relationship between Nanog expression and clinicopathologic features of esophageal squamous cell carcinoma

项目	n	相对表达量 ± SD	P	
性别	男	28	2.30 ± 3.12	0.702
	女	7	1.62 ± 0.97	
年龄	<60	14	1.69 ± 1.49	0.752
	≥60	21	2.48 ± 3.45	
淋巴结转移	阳性	20	3.16 ± 3.39	0.001*
	阴性	15	0.84 ± 0.63	
临床分级	I、II	18	0.98 ± 1.02	0.001*
	III、IV	17	3.42 ± 3.55	

* $P<0.05$,差异有统计学意义

3 讨论

近年来人们发现肿瘤细胞与胚胎干细胞存在很多相似之处,例如都具有自我更新和分裂增殖的能力,都具有wnt、SHH、Notch等共同的细胞信号通路,都具有端粒酶活性及端粒重复序列等^[9]。肿瘤的发展类似于异常胚胎的发生过程, Lee等报道称Nanog

的表达在肝癌细胞中能驱使细胞的自我更新与肿瘤的起始^[10],但其是否作为肿瘤发展的病因现在仍不清楚。在众多研究中表明Nanog基因在培养的肿瘤细胞、异体移植物和人类原发的前列腺肿瘤细胞中都存在不同程度的表达。大量的功能缺失研究结果显示采用RNA干扰技术敲除Nanog基因将抑制肿瘤的发展,表明Nanog基因在肿瘤细胞中起非常重要的作用^[11]。

Nanog基因属于ANTP同源基因家族成员,位于染色体12p13.31,全长6661bp,由4个外显子和3个内含子构成。其mRNA翻译后产物为305个氨基酸残基的蛋白^[12,13]。它是由3个结构域组成的蛋白-N-末端、同源结构域、C-末端。N-末端含有96个氨基酸残基,并含有丰富的丝氨酸,C-末端含有50个色氨酸重复序列。Nanog同源结构域位于96号氨基酸残基和155号氨基酸残基之间,同源结构域通过蛋白之间相互作用及与DNA结合的作用,来控制下游基因的表达。越来越多研究显示,在体细胞肿瘤中也发现Nanog的阳性表达,如乳腺癌、前列腺癌、肝癌等组织,有报道报道Nanog在前列腺癌的发生和促进肿瘤细胞的干细胞特性方面具有重要的作用。

本组资料显示NSCLC、胃腺癌组织中Nanog相对表达量均高于相应癌旁组织,且其差异有统计学意义($P<0.05$)。食管鳞癌中Nanog相对表达量有高于其癌旁组织的趋势,本组资料显示统计学差异不显著($P>0.05$)。Nanog相对表达量的高低与肿瘤的临床分期、淋巴结转移及肿瘤的组织学类型密切相关。在肺腺癌、肺鳞癌、胃腺癌和食管鳞癌中Nanog相对表达量随临床分期的不同而不同,肿瘤临床分级越高,其Nanog表达量越高($P<0.05$)。三种癌组织中有淋巴结转移者较无淋巴结转移者Nanog相对表达量有明显增高的趋势,且在食管鳞癌组织中差异有统计学意义($P<0.05$)。说明肿瘤的临床分期越高,Nanog表达越高,肿瘤细胞的活力及增殖能力越强,而这些细胞通过自我更新和多向分化越易导致患者肿瘤的复发和远处转移,也提示了Nanog的表达增高可能参与并促进肿瘤细胞的干细胞特性增强。三组癌组织中性别差异显示,男性患者Nanog相对表达量有高于女性患者的趋势,胃腺癌患者中此差异具有统计学意义($P<0.05$),此现象原因暂不明确。综上所述提示Nanog可能对不同临床分期、不同淋巴结转移情况、不同性别的肿瘤患者的诊断具有一定意义。

肺癌患者中,38例腺癌中Nanog相对表达量明显高于40例鳞癌($P<0.05$);39例胃腺癌组织中Nanog相对表达量显著高于其相应癌旁组织($P<0.05$),因此我们推断Nanog在腺癌中表达更敏感。35例食管鳞

癌患者中Nanog相对表达量相对于10例食管癌旁组织有升高的趋势,本组标本显示统计学意义不明显($P>0.05$),所以该研究进一步提示Nanog在腺癌中表达的意义。目前,肿瘤标志物的研究飞速发展,单个肿瘤标志物应用于肿瘤诊断时可能具有一定的局限性,而多个指标联合可以提高诊断的特异性及灵敏度,Nanog的表达水平可能是评价肿瘤的发生、发展和临床生物学行为的有用指标,特别是对腺癌的诊断、临床分期与鉴定提供一定的帮助,但尚需进一步实验验证。

参考文献

- 1 邹爱梅,吴爱兵,黄维甄,等.肺癌A549细胞株中ALDH1+细胞的生物学功能研究[J].中国肿瘤临床,2011,38(14):817-821.
- 2 Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells[J]. N Engl J Med, 2006, 355(12): 1253-1261.
- 3 Lobo NA, Shimono Y, Qian D, et al. The biology of cancer stem cells[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007, 23: 675-699.
- 4 Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea—a paradigm shift[J]. Cancer Res, 2006, 66(4):1883-1890; discussion 1895-1896.
- 5 Looijenga LH, Stoop H, de Leeuw HP, et al. POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors [J]. Cancer Res, 2003, 63(9): 2244-2250.
- 6 Ezech UI, Turek PJ, Reijo RA, et al. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma[J]. Cancer, 2005, 104(10): 2255-2265.
- 7 Hoci-Hansen CE, Almstrup K, Nielsen JE, et al. Stem cell pluripotency factor NANOG is expressed in human fetal gonocytes, testicular carcinoma in situ and germ cell tumours[J]. Histopathology, 2005, 47(1): 48-56.
- 8 Zbinden M, Duquet A, Lorente-Trigos A, et al. NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53[J]. EMBO, 2010, 29(15): 2659-2674.
- 9 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. Nature, 2001, 414(6859): 105-111.
- 10 Lee TK, Castilho A, Cheung VC, et al. CD24(+) liver tumor-initiating cells drive self-renewal and tumor initiation through STAT3-mediated NANOG regulation[J]. Cell Stem Cell, 2011, 9(1):50-63.
- 11 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.
- 12 Wang SH, Tsai MS, Chiang MF, et al. A novel NK-type homeobox gene, ENK (early embryo specific NK), preferentially expressed in embryonic stem cells[J]. Gene Expr Patterns, 2003, 3(1): 99-103.
- 13 柳霞,龙梅,蒋晖,等.人Nanog基因的克隆及其在COS-7L细胞中的表达[J].细胞与分子免疫学杂志,2004,20(4):495-498.

(2011-10-18收稿)

(2011-12-14修回)

(王展宏校对)