论著

文章编号:1000-5404(2012)09-0852-05

HepG2、Hep3B细胞中肿瘤干细胞相关标志分子的表达

贾 茜[1],高 建[1],张小丽[1],向 颖[1],邓 涛[2] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院消化内科[1];M5G 2M1 Toronto, Ontario, Canada , Toronto General Research Institute, University of Toronto[2])

[摘要] **目的** 富集培养肝癌干细胞,研究肝癌干细胞相关标志物CD90、CD133、八聚体4(Oct4)和ATP结合盒转运蛋白ABCG2在肝癌细胞HepG2、Hep3B中的表达,并初步分析其意义。**方法** 使用流式细胞仪从肝癌细胞(检测HepG2、Hep3B两种细胞系)中分选肝癌干细胞并行无血清成球培养。设肝癌细胞组为对照组。单细胞克隆形成实验检测细胞增殖能力。分别给予肝癌细胞及肝癌干细胞阿霉素处理,MTT法测阿霉素处理后各组细胞的存活率,Real-time PCR及Western blot分别检测各组细胞CD90、CD133、Oct4和ABCG2 mRNA及蛋白水平的表达。**结果** 肝癌干细胞单个细胞增殖能力强于肝癌细胞,克隆形成分析显示培养第14天克隆形成率Hep3B细胞组低于Hep3B CSCs组[8/27(30%)*vs* 12/23(52%),$P<0.05$];HepG2细胞组克隆形成率也低于HepG2 CSCs组[7/38(18%)*vs* 9/26(35%),$P<0.05$]。用阿霉素处理肝癌细胞及肝癌干细胞48 h后,MTT法测定结果显示肝癌干细胞组细胞活性显著高于对照组($P<0.05$);HepG2细胞组细胞活性为(38.17±6.92)%、HepG2 CSCs组为(69.88±5.43)%;Hep3B细胞组(50.16±4.89)%,Hep3B CSCs组为(78.53±7.86)%。Real-time PCR结果显示肝癌干细胞组中CD90、CD133、Oct4及ABCG2基因mRNA表达较亲代细胞组显著上调($P<0.05$)。Western blot结果显示肝癌干细胞组Oct4及ABCG2蛋白水平显著上调,与亲代细胞组间表达差异有显著性($P<0.05$)。**结论** 肝癌干细胞相关标志CD90、CD133、Oct4及ABCG2均高表达于肝癌干细胞,并且Oct4及ABCG2基因的高表达有可能与肝癌干细胞耐药性相关。

[关键词] 肝癌干细胞;CD90;CD133;Oct4;ABCG2;耐药性

[中图法分类号] R394.2; R730.23; R735.7 [文献标志码] A

Expression of cancer stem cell-associated markers in liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B

Jia Qian[1], Gao Jian[1], Zhang Xiaoli[1], Xiang Ying[1], Deng Tao[2] ([1]Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China; [2]Toronto General Research Institute, University of Toronto, M5G 2M1, Toronto, Ontario, Canada)

[**Abstract**] **Objective** To explore the expression of cancer stem cell (CSC)-associated markers CD90, CD133, octamer 4 (Oct4) and ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2) in liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B, and to preliminarily analyze the significance. **Methods** Liver CSCs were separated from the HepG2 and Hep3B cell lines by flow cytometry, and were cultured in serum-free medium to form spheres. The liver cancer cells were assigned as a control group. Cell proliferation capacity was examined by single-cell clone formation assay. Cell viability was detected by MTT assay after treated with doxorubicin. The mRNA and protein expression levels of CD90, CD133, Oct4 and ABCG2 were detected by real-time PCR and Western blotting, respectively. **Results** The single cell proliferation capacity of the liver CSCs was stronger than that of the liver cancer cells. The single-cell clone formation assay showed that the colony formation rate of the Hep3B cells was lower than that of the Hep3B CSCs after cultured for 14 d [8/27 (30%) *vs* 12/23 (52%), $P<0.05$], and the colony formation rate of the HepG2 cells was also lower than that of the HepG2 CSCs [7/38 (18%) *vs* 9/26 (35%), $P<0.05$]. MTT assay showed that the cell viability significantly increased in the liver CSCs compared with that in the liver cancer cells after treated with doxorubicin for 48 h [HepG2 cells (38.17±6.92)% *vs* HepG2 CSCs (69.88±5.43)%, $P<0.05$; Hep3B cells (50.16±4.89)% *vs* Hep3B CSCs (78.53±7.86)%, $P<0.05$]. The Real-time PCR results showed that the mRNA expression levels of CD90, CD133, Oct4 and ABCG2 were significantly increased in the liver CSCs compared with those in the parental

[基金项目] 重庆市医学科研计划重点项目(2011-1-055)

[通信作者] 高 建,E-mail:g6j6@sohu.com

cells ($P<0.05$). Western blotting results showed that the protein expression levels of Oct4 and ABCG2 significantly increased in the liver CSCs compared with those in the parental cells ($P<0.05$). **Conclusion** The CSC-associated markers CD90, CD133, Oct4 and ABCG2 are highly expressed in liver CSCs, and the high expression of Oct4 and ABCG2 may be closely associated with the CSCs drug resistance to chemotherapy.

[**Key words**] liver cancer stem cells; CD90; CD133; Oct4; ABCG2; drug resistance

Supported by the Key Project of Medical Science of Chongqing (2011-1-055). Corresponding author: Gao Jian, E-mail: g6j6@sohu.com

目前肝癌发病率日益增加,在肝癌治疗的基础研究中,肿瘤干细胞(cancer stem cells,CSCs)理论的提出为肝癌的治疗提供了新的思路[1]。CD133 为研究最多的干细胞(stem cell)和多种组织肿瘤干细胞表面独立表达的特异标记分子[2]。CD90 为近两年来新发现的较 CD133 更具特异性的肝癌干细胞标志物[3]。研究证实,CSCs 在肿瘤耐药中起重要作用,其耐药机制包含多方面的协同作用,ATP 结合盒(ATP-binding cassette, ABC)转运蛋白 ABCG2 对药物的外排作用[4]即是其中重要的一个耐药机制。八聚体 4(Oct4)属于 POU 转录因子家族,是调节胚胎干细胞多能性及自我更新能力的关键的转录因子,高表达于肿瘤干细胞中,是 CSCs 自我更新过程的重要调节基因[5]。本实验用 CD90 及 CD133 测定肝癌干细胞在肝癌细胞系 Hep3B 及 HepG2 中的表达量,使用目前肿瘤干细胞培养中普遍使用的无血清悬浮成球(sphere)培养的方法富集肝癌干细胞,并对 Oct4、ABCG2 在肝癌细胞及肝癌干细胞中的表达进行测定,初步研究肝癌干细胞相关标志分子的表达及其意义。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 细胞株 人肝癌细胞株(HepG2、Hep3B)购于中科院上海细胞所。

1.1.2 试剂与器材 胎牛血清(美国 Gibco 公司),白血病抑制因子 LIF(德国 millipore 公司),重组 EGF、重组 bFGF(peprotech 公司),B27(美国 Gibco 公司),流式分选抗体 CD133、CD90(德国 Miltenyi 公司),超低黏附培养板(美国 Corning 公司),MTT 试剂盒(南京凯基生物),总 RNA 抽提试剂盒(北京 Biotek 公司),RT-PCR 试剂盒(大连宝生物工程有限公司),Oct4、ABCG2、AFP、CD90、CD133、β-actin 引物(上海英骏生物公司),RIPA 裂解液、PMSF、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、BCA 浓度测定试剂盒、超敏 ECL 化学发光试剂盒(碧云天生物技术研究所),Oct4 鼠抗体(美国 CST 公司),鼠抗 BCRP/ABCG2 单克隆抗体(英国 Abcam 公司),辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG、鼠抗 β-actin 单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司)。GEL DOC XR 凝胶成像系统,CFX96 实时荧光定量 PCR 检测系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 HepG2、Hep3B 肝癌细胞培养于 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)高糖培养基中(含 10% 灭活胎牛血清,100 U/ml 青霉素,100 U/ml 链霉素),于 37 ℃恒温,相对湿度 90%,含 5% CO_2 的培养箱中培养。用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,取对数生长期的细胞进行实验。无血清培养液(serum-free medium,SFM)为含 20 ng/ml EGF,20 ng/ml bFGF,20 ng/ml LIF,2% B27,100 U/ml 青霉素,100 U/ml 链霉素的未加血清的 DMEM/F12 培养基。用 SFM 在超低黏附培养板中培养肝癌细胞,得到悬浮肝癌干细胞球(sphere)。纯化后取成球细胞进行下一步实验。

1.2.2 流式细胞仪分选 CD133、CD90 阳性肝癌细胞 肝癌细胞 HepG2 及 Hep3B 用 0.25% 胰酶消化后离心去上清,细胞计数,每 1×10^7 细胞中加入 100 μl PBS 缓冲液后加入 10 μl 流式分选抗体(FITC-CD90,PE-CD133),充分混匀,4 ℃避光孵育 30 min,用流式细胞仪分选 CD133 及 CD90 阳性肝癌细胞。

1.2.3 单细胞克隆形成性分析 用移液枪在 96 孔板每孔(除 A1 孔)中加入 100 μl 培养基,在 A1 孔中加入 200 μl 细胞悬液(细胞计数重悬后细胞密度为 5×10^4/ml),再用移液枪快速从第 1 个孔中转移 100 μl 细胞悬液 至 B1 孔,轻轻吹打混匀,避免产生气泡。使用相同的方法,重复 1∶2稀释整列,到 H1 孔时弃去 100 μl 使其与以上各孔体积相同。再用移液枪向第 1 列每孔中加入 100 μl 培养基使每孔液体体积为 200 μl。然后用移液枪快速从第 1 列各孔向其后每孔转移 100 μl 液体(从 A1 到 A12,H1 到 H12,以此类推),充分混匀并避免产生气泡。同样按 1∶2稀释整个孔板,弃去 A12 到 H12 各孔液体100 μl,使 96 孔板每孔细胞悬液体积为 100 μl。最后每孔加入 100 μl 培养基使得终体积为 200 μl。标记含单个细胞的孔,转入 6 孔板中培养,每日显微镜下观察细胞。培养 14 d 后计数细胞数大于 150 的克隆。

1.2.4 MTT 法细胞活性测定 将细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化,用培养基将其配制成单细胞悬液,以每孔 10^4 细胞接种于 96 孔板,每孔体积 200 μl,置 37 ℃,5% CO_2 细胞培养箱中培养 24 h 后,加入 1 mg/L 阿霉素处理,放入培养箱中培养 48 h 后,96 孔板中每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μl,37 ℃继续孵育 4 h 使 MTT 还原为甲臜(formazan),终止培养,小心吸弃上清,每孔加入二甲基亚砜(DMSO)150 μl,振荡 10 min 使甲臜充分溶解。选择 490 nm 波长,用酶联免疫检测仪测定各孔光密度值[D(490)]。设置对照细胞组(含细胞,MTT 溶液,未加阿霉素)及空白对照组(含培养基,MTT 溶液而未加细胞),各实验组设 3 复孔。

细胞存活率 = [加药细胞 D(490) − 空白对照 D(490)]/[对照细胞 D(490) − 空白对照 D(490)] × 100%

1.2.5 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测各基因 mRNA 水平的表达 使用总 RNA 抽提试剂盒分别提取

各组细胞的总RNA,经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定,并测定样品$D(260)/D(280)$值和浓度,确保比值介于1.8~2.0。用Oligd(T)引物将抽提的细胞总RNA逆转录成cDNA,以两步法行RT-PCR。扩增引物序列,CD90上游引物:5′-GACCCGTGAGACAAAGAAGC-3′,下游引物:5′-GCCCTCACACTTGACCAGTT-3′,扩增长度为235 bp;CD133上游引物:5′-TGGATGCAGAACTTGACAACGT-3′,下游引物:5′-ATACCTGCTACGACAGTCGTGGT-3′,扩增长度为133 bp;Oct4上游引物:5′-CTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAA-3′,下游引物:5′-CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA-3′,扩增长度为169 bp;ABCG2上游引物:5′-CACCTTATTGGCCTCAGGAA-3′,下游引物:5′-CCTGCTTGGAAGGCTCTATG-3′,扩增长度为206 bp;β-actin上游引物:5′-CATCCACGAAACTACCTTCAACTCC-3′,下游引物:5′-GAGCCGCCGATCCACACG-3′,扩增长度为213 bp。扩增条件为95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,60 ℃ 45 s,72 ℃ 45 s,40个循环;最后72 ℃延伸5 min。取15 μl扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳,UVP凝胶成像分析系统采集荧光信号,并使用系统软件分析光密度值,以PCR产物/β-actin的光密度值表示其相对表达量。

Real- time PCR时在反应液中加入1×SYBR Green Ⅰ,扩增条件为95 ℃ 1 min;95 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,40个循环。在Bio-Rad上进行扩增并采集荧光信号,表达量的比值用以下公式计算,表示肝癌干细胞CSCs组基因的mRNA含量与肝癌细胞组含量相比较的倍数。以表达量的比值≥2表示基因表达显著上调。

$$\triangle CT = CT_{目的基因} - CT_{\beta\text{-actin}}$$

$$\triangle\triangle CT = \triangle CT_{肝癌干细胞组} - \triangle CT_{肝癌细胞组}$$

$$表达量的比值 = 2^{-\triangle\triangle CT}$$

1.2.6 Western blot法检测各组细胞中Oct4、ABCG2蛋白含量

各组细胞提取蛋白,用BCA法测定样品蛋白浓度,变性后经10% SDS-PAGE转移至PVDF膜,TBST稀释的5%脱脂奶粉作为封闭液,室温封闭30 min至1 h,一抗Oct4鼠抗体(美国CST,1∶1 000),鼠抗BCRP/ABCG2单克隆抗体(英国Abcam,1∶1 000),内参抗体β-actin鼠抗(北京中杉,1∶1 000),4 ℃孵育过夜,TBST洗膜3次,每次10 min,二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(北京中杉,1∶3 000)室温孵育1 h,TBST洗膜,采用超敏ECL化学发光试剂盒(碧云天)显色,凝胶成像系统扫描后用Quantity One 4.6.2(Bio-Rad)软件进行半定量分析,目的蛋白灰度值与β-actin灰度值的比值表示其相对表达量。

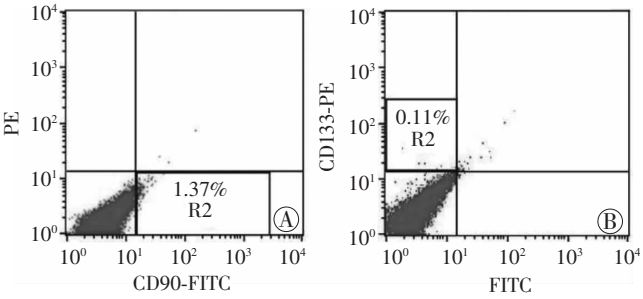
1.3 统计学分析

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 12.0统计软件,两样本均数间比较采用t检验。

2 结果

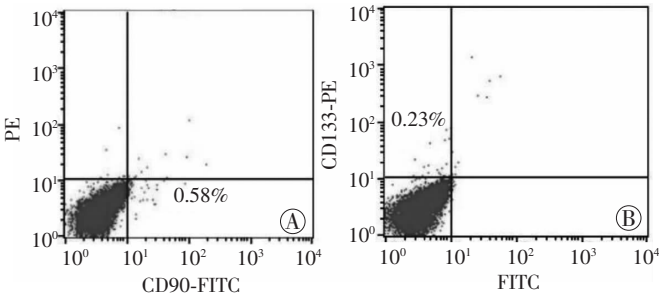
2.1 细胞表面标志物CD90及CD133在两种肝癌细胞系(HepG2、Hep3B)中的表达情况

以CD90及CD133抗体孵育HepG2及Hep3B细胞后,通过流式细胞仪分选测定CD90及CD133标记阳性的肝癌干细胞。流式细胞仪检测结果显示,CD90在肝癌细胞HepG2中表达阳性率约为1.37%,CD133在HepG2中表达阳性率约为0.11%(图1)。在Hep3B细胞中,CD90及CD133表达阳性率分别为0.58%和0.23%(图2)。CD90在肝癌细胞中的表达略高于CD133。检测CD90及CD133双阳性细胞含量,Hep3B细胞中双阳性表达率约为0.63%,HepG2细胞双阳性率约为0.49%(图3)。CD90及CD133作为公认的肝癌干细胞表面标志物,在肝癌细胞中均低表达,说明肝癌干细胞在肝癌细胞中占有极小的比例。



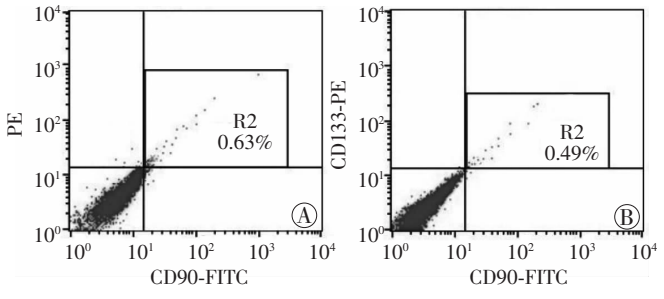
A: CD90的表达;B:CD133的表达

图1 CD90及CD133在肝癌细胞HepG2中的表达



A: CD90的表达;B: CD133的表达

图2 CD90及CD133在肝癌细胞Hep3B中的表达



A:Hep3B细胞系;B:HepG2细胞系

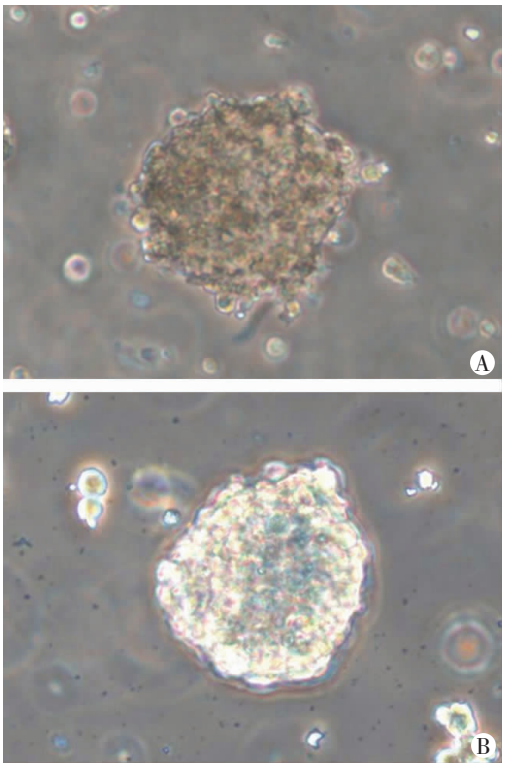
图3 两种肝癌细胞系中CD90及CD133双阳性细胞的表达

2.2 肝癌干细胞成球培养

用无血清DMEM/F12培养基培养Hep3B细胞,每日倒置显微镜下观察发现细胞随培养时间的增加开始集中生长,邻近细胞聚集,周围出现空隙,细胞大量死亡且生长缓慢。培养第8天左右开始出现细胞球,14 d肿瘤细胞球增大,密度增加(图4A)。HepG2细胞于无血清培养20 d左右形成肿瘤干细胞球(图4B)。

2.3 CD90、CD133在成球细胞与亲代肝癌细胞中的表达

Real-time PCR分析显示,CD90及CD133 mRNA的表达在Hep3B CSCs组显著高于Hep3B细胞组($P<0.05$),在HepG2 CSCs组较HepG2细胞组显著上调($P<0.05$,表1)。



A:Hep3B 细胞;B:HepG2 细胞

图 4　倒置显微镜观察两种肝癌细胞系无血清培养后形成的干细胞球

表 1　肝癌干细胞组与肝癌细胞组中 CD90 及 CD133 mRNA 表达（$n=3$, $\bar{x}\pm s$）

组别		肝癌干细胞组/肝癌细胞
Hep3B 细胞系	CD90	4.60 ± 0.12
	CD133	6.24 ± 0.23
HepG2 细胞系	CD90	5.30 ± 0.27
	CD133	3.60 ± 0.19

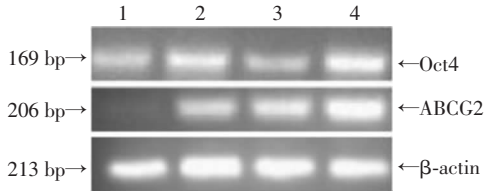
2.4　肝癌干细胞体外增殖能力及耐药性强于亲代肝癌细胞

为验证肝癌干细胞的自我更新及增殖能力，我们采用平板单细胞克隆形成实验来检测普通肝癌细胞和肝癌干细胞的克隆形成率。培养第 14 天，计数细胞数大于 150 个的克隆，Hep3B CSCs 的克隆形成率为 52%（12/23），Hep3B 细胞为 30%（8/27），二者差异具有显著性（$P<0.05$）；HepG2 CSCs 的克隆形成率为 35%（9/26），HepG2 细胞克隆形成率为 18%（7/38），二者差异有统计学意义（$P<0.05$）。由此看出，肝癌干细胞的自我更新及增殖能力明显强于普通肝癌细胞，证明了肿瘤的无限增殖是由肿瘤中极少数的肿瘤干细胞产生。

以 MTT 法测定阿霉素处理细胞后的细胞活性。阿霉素处理 Hep3B 细胞及其相应干细胞后 48 h 细胞活性分别为（50.16 ± 4.89）% 及（78.53 ± 7.86）%，HepG2 细胞组细胞活性为（38.17 ± 6.92）%，HepG2 CSCs 组为（69.88 ± 5.43）%，结果显示药物对肝癌干细胞的增殖抑制作用弱于亲代细胞 HepG2 组（$P<0.05$）。

2.5　RT-PCR 及 Real-time PCR 检测 Oct4、ABCG2 基因在各组细胞中 mRNA 水平表达

RT-PCR（图 5）及 Real-time PCR（表 2）结果显示 Hep3B CSCs 及 HepG2 CSCs 细胞组中，Oct4 及 ABCG2 在 mRNA 水平表达分别高于 Hep3B 细胞及 HepG2 细胞，Oct4 及 ABCG2 mRNA 在 Hep3B CSCs 及 HepG2 CSCs 细胞内表达显著上调，具有统计学意义（$P<0.05$）。Oct4 及 ABCG2 在肝癌干细胞中的高表达可能间接地反映了肝癌干细胞是肝癌耐药的重要原因。



1:Hep3B 细胞组;2:Hep3B CSCs 细胞组;3:HepG2 细胞组;4:HepG2 CSCs 细胞组

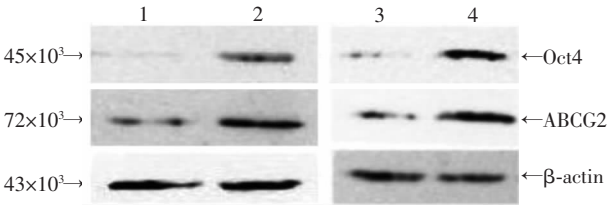
图 5　RT-PCR 检测各组细胞中 Oct4 和 ABCG2 mRNA 的表达

表 2　肝癌干细胞组与肝癌细胞组相比 Oct4 及 ABCG2 的 mRNA 水平（$n=3$, $\bar{x}\pm s$）

基因		表达量的比值
Hep3B 细胞系	Oct4	4.05 ± 0.21
	ABCG2	6.92 ± 0.19
HepG2 细胞系	Oct4	2.46 ± 0.37
	ABCG2	2.88 ± 0.15

2.6　Western blot 检测细胞 Oct4、ABCG2 蛋白的表达

Hep3B 细胞组 Oct4 相对表达量为（0.239 ± 0.014），Hep3B CSCs 组 Oct4 为（5.798 ± 0.039），在 Hep3B CSCs 中表达显著上调（$P<0.05$）。ABCG2 蛋白水平检测结果显示 Hep3B CSCs 组（3.224 ± 0.027），Hep3B 细胞组（0.728 ± 0.019），有统计学差异（$P<0.05$）。表明在 Hep3B CSCs 中 Oct4 及 ABCG2 的蛋白表达量高于 Hep3B 细胞组，Oct4 及 ABCG2 在肝癌干细胞中高表达。Oct4 相对表达量：HepG2 细胞组中为（0.386 ± 0.021），HepG2 CSCs 组为（6.528 ± 0.026），两组有统计学差异（$P<0.05$）。ABCG2 蛋白水平相对表达量：HepG2 细胞组为（0.654 ± 0.012），HepG2 CSCs 组为（7.968 ± 0.025），在 HepG2 CSCs 组中相对表达量显著上调（$P<0.05$）。见图 6。



1:Hep3B 细胞组;2:Hep3B CSCs 组;3:HepG2 细胞组;4:HepG2 CSCs 组

图 6　Western blot 检测 Oct4 及 ABCG2 蛋白水平的表达

3　讨论

近年来肝癌在我国的发病呈显著的上升趋势，针对目前常规放化疗、手术治疗及生物治疗等常规治疗手段，肝癌具有显著的耐放疗及抗化疗药性，且具有明显的复发趋势。研究证实，肝癌的耐药性与肝癌干细胞密切相关，其耐药性最终导致肝癌晚期治疗的失败。寻找新的有效的肝癌治疗方法，是当前基础、临床研究中亟须解决的问题。

CD90[6]和CD133[7]是目前公认的肝癌干细胞表面标志物,Oct4是胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)特异性基因[8],维持干细胞自我更新及全能分化性[9],敲除Oct4基因可诱导胚胎干细胞分化[10]。Oct4主要表达于胚胎干细胞与生殖细胞肿瘤,在非生殖细胞肿瘤如肝癌、乳腺癌、肺癌等中表达较少,有观点认为Oct4在非生殖细胞肿瘤的细胞系中的表达主要存在于肿瘤干细胞。ABC转运蛋白是一类特殊的膜转运蛋白,可泵出进入细胞的化疗药物,介导肿瘤细胞产生多药耐药(multidrug resistance, MDR)[11],肿瘤干细胞的多药耐药与ABC转运蛋白的高表达相关[12],对肿瘤干细胞模型的体外研究证实膜转运蛋白ABCG2/BCRP1能有效减少阿霉素等抗癌药物的细胞内浓度,使其产生耐药性。研究发现,Oct4基因在耐药株中表达上调,耐药细胞株侧群细胞特异性的增加依赖于药物外排通路ABCG2/BCRP和MDRI/Pgp的过表达[13],而敲除Oct4基因可降低肿瘤的耐药性[14],说明Oct4与ABCG2在肿瘤的耐药方面有潜在的相互作用。本研究发现,CD90及CD133表达阳性细胞在肝癌细胞中占极少比例(HepG2中CD90比例为0.51%~1.48%,CD133为0.11%~1.39%;Hep3B中CD90比例为0.49%~0.91%,CD133比例为0.18%~0.86%)。PCR结果显示CD90及CD133高表达于无血清悬浮培养所得肝癌干细胞,Hep3B细胞株的肝癌干细胞组CD90及CD133的mRNA水平显著高于Hep3B细胞组;HepG2 CSCs组与HepG2细胞组中表达亦有统计学差异($P<0.05$)。细胞活性实验显示在相同的药物浓度、处理时间及培养条件下,肝癌干细胞组的细胞活性明显高于肝癌细胞组,即肝癌干细胞对药物的敏感性减弱,耐药性增强。同时本实验结果表明肝癌干细胞14 d克隆形成率与肝癌细胞比较具有统计学差异($P<0.05$),RT-PCR及Real-time PCR结果显示Oct4及ABCG2基因在肝癌干细胞中高表达(表达量肝癌干细胞组>亲代肝癌细胞组,$P<0.05$),Western blot同样提示Oct4及ABCG2在蛋白水平高表达,与其在肝癌细胞组中表达量比较有统计学差异($P<0.05$)。说明CD90、CD133表达阳性的肝癌干细胞在肿瘤增殖、耐药机制中起重要作用,高表达于肝癌干细胞的Oct4及ABCG2则可能与肝癌干细胞的耐药增殖等特性相关,需进一步研究以阐明Oct4及ABCG2在肝癌干细胞中的作用及机制。

Oct4基因使细胞保持多潜能性,ABCG2基因则在耐药性中起重要作用,本研究发现Oct4基因及ABCG2基因均在肝癌干细胞中高表达,值得注意的是,Oct4基因与ABCG2在肝癌干细胞中具体的作用机制是什么?在维系肝癌干细胞的特性的过程中,是否有共同的相关联的信号传导通路?我们将进一步实验以研究证实干扰Oct4基因表达后ABCG2基因的表达是否相应下调,对肿瘤的增殖及耐药将有何影响;并探讨肝癌干细胞相关基因在肝癌干细胞的发生发展、侵袭转移与耐药性中具体的调控机制。本研究将为抑制肝癌自我更新、增加肝癌药物敏感性寻找有效的治疗靶点,为肝癌治疗提供新的研究方向。

参考文献:

[1] Ma S, Lee T K, Zheng B J, *et al*. CD133$^+$ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway[J]. Oncogene, 2008, 27(12): 1749-1758.

[2] Haraguchi N, Ohkuma M, Sakashita H, *et al*. CD133$^+$CD44$^+$ population efficiently enriches colon cancer initiating cells[J]. Ann Surg Oncol, 2008, 15(10): 2927-2933.

[3] Lingala S, Cui Y Y, Chen X, *et al*. Immunohistochemical staining of cancer stem cell markers in hepatocellular carcinoma[J]. Exp Mol Pathol, 2010, 89(1): 27-35.

[4] Hirschmann-Jax C, Foster A E, Wulf G G, *et al*. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(39): 14228-14233.

[5] Chen Y C, Hsu H S, Chen Y W, *et al*. Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells [J]. PLoS One, 2008, 3(7): e2637.

[6] Yang Z F, Ho D W, Ng M N, *et al*. Significance of CD90$^+$ cancer stem cells in human liver cancer[J]. Cancer Cell, 2008, 13(2): 153-166.

[7] Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, *et al*. Characterization of CD133$^+$ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 351(4): 820-824.

[8] Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, *et al*. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative[J]. Nat Biotechnol, 2007, 25(7): 803-816.

[9] Park I H, Zhao R, West J A, *et al*. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors[J]. Nature, 2008, 451 (7175): 141-146.

[10] Hay D C, Sutherland L, Clark J, *et al*. Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells[J]. Stem Cells, 2004, 22 (2): 225-235.

[11] Hu C, Li H, Li J, *et al*. Analysis of ABCG2 expression and side population identifies intrinsic drug efflux in the HCC cell line MHCC-97L and its modulation by Akt signaling[J]. Carcinogenesis, 2008, 29 (12): 2289-2297.

[12] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(4): 275-284.

[13] Linn D E, Yang X, Sun F, *et al*. A Role for OCT4 in Tumor Initiation of Drug-Resistant Prostate Cancer Cells[J]. Genes Cancer, 2010, 1(9): 908-916.

[14] Wang X Q, Ongkeko W M, Chen L, *et al*. Octamer 4 (Oct4) mediates chemotherapeutic drug resistance in liver cancer cells through a potential Oct4-AKT-ATP-binding cassette G2 pathway[J]. Hepatology, 2010, 52(2): 528-539.

(**收稿**:2011-12-30;**修回**:2012-02-27)

(编辑 汪勤俭)