文章编号:1000-5404(2014)01-0029-04

论著

应用 Lv-pNanog-GFP 慢病毒载体探讨 Nanog 在调控结直肠癌细胞的自我更新与转移能力中的作用

朱传琳[1],姚 超[2],钱 程[2],徐先林[1],欧刚卫[1] (310018 贵州 遵义,遵义医学院生物化学与分子生物学教研室[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院全军病理学研究所[2])

[摘要] **目的** 探讨干细胞标记物 Nanog 对结直肠癌细胞的自我更新以及转移能力的影响。**方法** 将本实验室已构建的 Nanog 启动子携带绿色荧光蛋白的慢病毒载体 Lv-pNanog-GFP 感染人结直肠癌细胞系 HCT116,并经流式分选得到 GFP 表达阳性和阴性的细胞,通过 Western blot 检测病毒的有效性,克隆形成实验和成球实验检测肿瘤细胞的自我更新能力,Transwell 实验检测肿瘤细胞的转移能力。**结果** 细胞系在感染病毒 12 h 后,倒置荧光显微镜下可观察到 GFP 的荧光表达,说明病毒 Lv-pNanog-GFP 可稳定感染人结直肠癌细胞 HCT116,且 GFP 的阳性率为 5.9%。Western blot 结果显示,根据 GFP 所分选出的细胞能准确的对应 Nanog 的表达量。Nanog 阳性细胞的克隆形成率[(56.3±2.87)%]显著大于 Nanog 阴性细胞的克隆形成率[(19±2.16)%]($P<0.05$)。Nanog 阳性细胞所形成的干细胞球体积明显增大且成球率[(34±4)%]显著大于 Nanog 阴性细胞[(10.67±6.43)%]($P<0.05$),说明 Nanog 阳性细胞具有更强的自我更新能力。Nanog 阳性细胞穿过 Transwell 小室的细胞数(175.8±12.89)比 Nanog 阴性细胞(74.6±16.55)显著增多($P<0.05$),说明 Nanog 阳性细胞具有更强的转移能力。**结论** 在结直肠癌细胞中 Nanog 调控肿瘤细胞的自我更新以及转移能力。

[关键词] 结直肠癌;Nanog;肿瘤干细胞
[中图法分类号] R394.3; R73-37; R735.35 [文献标志码] A

Role of Nanog on self-renewal and metastasis in colorectal cancer cells by Lv-pNanog-GFP lentiviral vector

Zhu Chuanlin[1], Yao Chao[2], Qian Cheng[2], Xu Xianlin[1], Ou Gangwei[1] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province, 310018; [2]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical university, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the role of the stem cell marker, Nanog, in the self-renewal and metastasis of colorectal cancer cells. **Methods** The constructed Nanog lentiviral vector Lv-pNanog-GFP that carrying green fluorescent protein (GFP) was used to infect human colorectal cancer cell line HCT116, and the cells with positive and negative expression of GFP were sorted by flow cytometry. Western blotting was employed to detect the effectiveness of the virus infection. Clone formation and sphere formation were applied to determine self-renewal capacity. Metastatic ability of tumor cells were detected by Transwell assay. **Results** After 12 h of the cells infected with the virus, inverted fluorescence microscopy indicated that the expression of GFP fluorescence, suggesting that the virus Lv-pNanog-GFP stably infected HCT116 cells, with a GFP positive rate of 5.9%. Western blotting results showed that GFP sorting the cells expressed exactly the amount of corresponding Nanog. Clone formation rate of Nanog positive cells [(56.3±2.87)%] was significantly higher than that of Nanog negative cells [(19±2.16)%, $P<0.05$]. Sphere volume of Nanog positive cells was increased significantly and the sphere formation rate [(34±4)%] was significantly greater than Nanog negative cells [(10.67±6.43)%, $P<0.05$]. We demonstrated that Nanog positive cells exhibited enhanced ability of self-renewal. The number of Nanog positive cells through the Transwell cells (175.8±12.89) was significantly larger than that of Nanog negative cells (74.6±16.55, $P<0.05$). Nanog positive cells exhibited enhanced ability of metastasis. **Conclusion** Nanog regulates self-renewal and metastasis in colorectal cancer cells.

[**Key words**] colorectal cancer; Nanog; cancer stem cells

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2004CB518804). Corresponding author: Ou Gangwei, Tel: 86-852-8609705, E-mail: gangwei.ou@zmc.edu.cn

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划("973"计划,2004CB518804)
[通信作者] 欧刚卫,电话:(0852)8609705,E-mail:gangwei.ou@zmc.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131107.1613.004.html(2013-11-07)

近年来,肿瘤干细胞(cancer stem cells,CSCs)理论[1]成为肿瘤学领域中的研究热点,为肿瘤的临床研究治疗提供了新的思路。肿瘤干细胞较之肿瘤组织中的其他细胞具有更强的自我更新和侵袭转移能力。世界各地的科学家们从白血病[2]、乳腺癌[3]、肝癌[4]、结直肠癌[5]、胃癌[6]等实体肿瘤中成功地分离出肿瘤干细胞,为肿瘤干细胞学说提供了有力的科学依据。本实验通过构建出Nanog启动子携带绿色荧光蛋白的慢病毒载体Lv-pNanog-GFP,感染结直肠癌细胞系HCT116后分离出Nanog阳性细胞,研究Nanog对HCT116细胞系的自我更新以及转移的影响,进而证明在结直肠癌细胞中Nanog阳性细胞具有肿瘤干细胞的特征。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用菌株 *E. coli* DH5α、Top10、甲基化酶缺失菌株GM2163,克隆质粒pRRLSIN. cPPT. PGK/GFP. WPRE、包装质粒pMD2. G、pMDLg. pRRE和pRSV. Rev均为本实验室保存。Lv-pNanog-GFP由本实验室构建保存;人结直肠癌细胞系HCT116由本实验室保存;DMEM、胎牛血清、胰酶及相关培养试剂购自Gibco公司;Transwell小室购自MILLIPORE公司;用于Western blot实验的抗体购自MILLIPORE公司。其他设备BBG16uV151L二氧化碳培养箱,IX71-22FL/PH荧光倒置显微镜,酶标仪TECAN DNA export分别购自Thermo、Olympus和TECAN公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人结直肠癌细胞系HCT116培养于10%胎牛血清的DMEM(含青链霉素)培养液中,在温度为37℃,5% 的CO_2浓度的培养箱中孵育,待细胞成长度达到70% ~80%进行胰酶消化传代。本实验所用细胞为生长对数期长势良好的细胞。

1.2.2 慢病毒Lv-pNanog-GFP对结直肠癌细胞系HCT116的感染 收集纯化已构建好的慢病毒,采用实时定量PCR测定病毒转导单位滴度后,分装冻存。转染前将结直肠癌细胞系HCT116接种至24孔板中,1×10^5个细胞每孔,待培养细胞达到70% ~80%的密度,去除24孔板内的培养液,将含10 MOI病毒的完全培养液加入细胞培养孔中,同时加入工作液浓度为5 μg/μL的聚凝胺(polybrene)以增加感染效率,感染12 h后去除含病毒的培养液,更换为完全培养基继续培养。

1.2.3 Western blot检测荧光报告系统的有效性 流式细胞仪分选出Nanog阴性细胞和Nanog阳性细胞后,细胞离心后加入蛋白裂解液,将细胞裂解物进行BCA定量后使用。每孔加入20 μL目的蛋白样品,SDS-PAGE电泳后湿转法转移到PVDF膜上。BSA孵育封闭2 h,加入一抗孵育过夜,PBST洗涤3次,加入对应的含荧光标记的二抗孵育2 h,PBST洗涤后进行显影拍照。

1.2.4 克隆形成实验 克隆形成率可以反映细胞群体依赖性和增殖能力。流式分选HCT116细胞系的Nanog阴性细胞和Nanog阳性细胞铺入24孔板,每孔铺50个细胞,每组设3个复孔,铺于含37℃温育过的DMEM/FBS培养液的培养板中,轻轻摇动24孔板使细胞分布均匀。于温度37 ℃,5%的CO_2及饱和湿度的培养箱中培养2周后终止细胞的培养。固定细胞,每孔加入4%的多聚甲醛固定30 min。然后吸取多聚甲醛后PBS洗涤3次,将孔板烘干后用结晶紫染色液染30 min,于烘箱中干燥孔板。在显微镜计数大于10个细胞的克隆数。最后计算克隆形成率。

克隆形成率 = 克隆数/接种细胞数 ×100%

1.2.5 成球实验 在非贴的24孔板中每孔添加500 μL成球培养液(成分为10 ng/mL EGF、10 ng/mL bFGF、20 mg/mL B27的无血清DMEM/F12培养液),然后流式细胞仪计数,每孔加入细胞数为200个,Nanog阳性组和Nanog阴性组各做3个复孔的重复,再放入培养箱静置约两周时间,在培养过程必须添加少许DMEM/F12培液,两周后可以用倒置荧光显微镜观察每孔细胞球的大小及数目,计数后并计算出成球率。

成球率 = 每孔细胞球数目总和/每孔加入的细胞数 ×100%

1.2.6 Transwell转移实验 流式分选Nanog阴性和Nanog阳性的HCT116细胞各5×10^4个,离心后加入200 μL无血清的DMEM培养液重悬混匀。24孔板中加入含20% FBS的DMEM 1.2 mL,Transwell小室轻轻置于24孔板内,小心向小室中加入重悬的细胞悬液,37 ℃ 5% CO_2培养24 h后,将小室取出,吸出多余的培液,用PBS洗涤两遍,应小心清洗,防止细胞脱落,待清洗后置于4%的多聚甲醛中固定20 min,然后将其取出PBS洗涤两遍,加入0.1%的结晶紫染色约20 min,清水洗涤,用棉签擦去上室细胞,将其置于正置显微镜下任取5个视野拍照,每组实验重复3次。

1.3 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件的单因素方差分析。

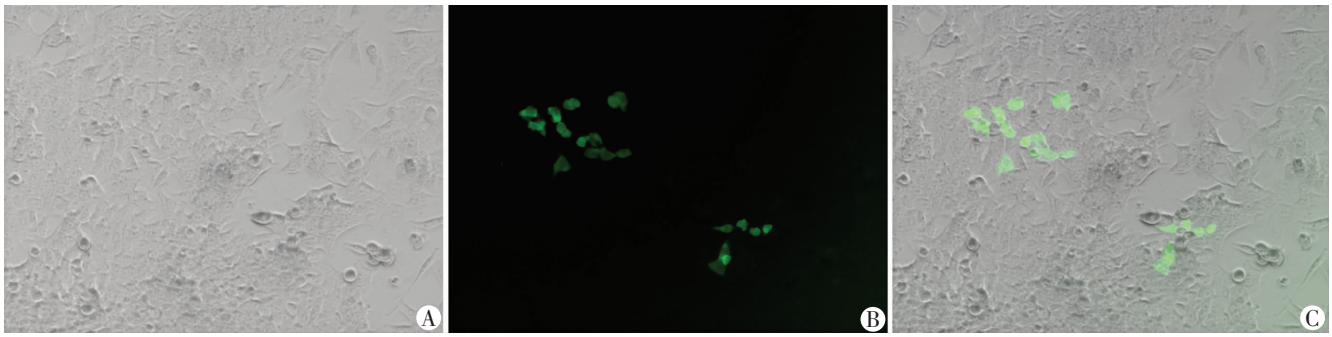
2 结果

2.1 慢病毒Lv-pNanog-GFP感染结直肠癌细胞系HCT116

细胞感染12 h时后继续培养24 h,倒置荧光显微镜观察细胞形态以及荧光表达情况:在随机挑选的每个视野下均可见绿色荧光GFP的表达(图1),由于GFP是由Nanog作为启动子来启动表达的,这些有GFP表达的细胞即为Nanog阳性细胞。结果表明病毒Lv-pNanog-GFP成功感染了HCT116细胞。

2.2 Western blot鉴定

以未感染病毒的细胞为对照,将感染病毒的细胞,经流式细胞仪检测GFP的阳性率为5.9%(图2),说明在HCT116细胞系中表达Nanog的细胞只占少数部分。流式细胞仪分选出Nanog阴性细胞和Nanog阳性细胞,提取蛋白。Western blot结果说明,根据GFP所分选出的细胞能很好的对应Nanog的表达量(图3)。



A:白光视野;B:GFP 荧光视野;C:融合视野

图 1 Lv-pNanog-GFP 感染结直肠癌细胞系 HCT116 情况 (倒置荧光显微镜×100)

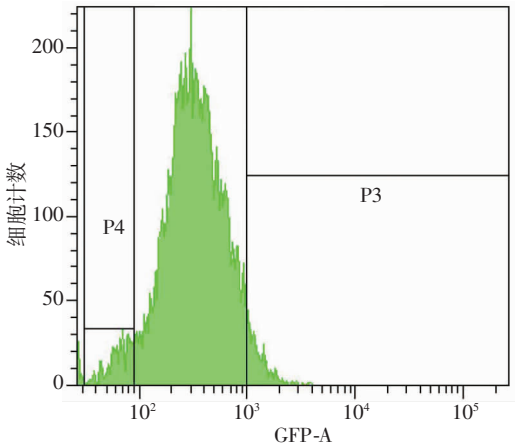
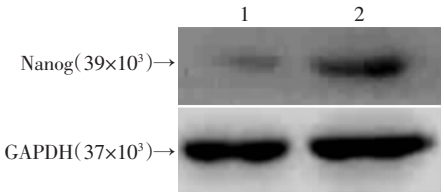


图 2 流式细胞仪分选 Nanog 阴性和阳性的 HCT116 细胞

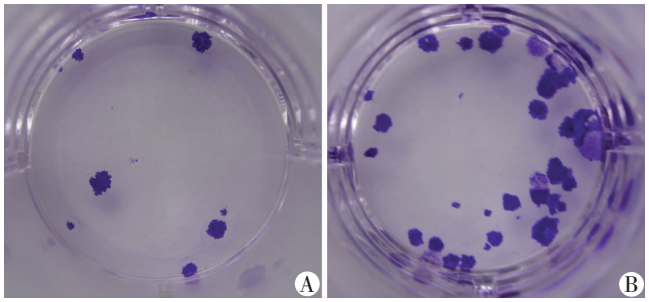


1:GFP - 细胞;2:GFP + 细胞

图 3 Western blot 检测 Nanog 的表达

2.3 克隆形成实验

克隆形成的结果显示(图 4),HCT116 细胞系的 Nanog 阳性细胞的克隆形成率为(56.3 ± 2.87)%,显著大于 Nanog 阴性细胞的克隆形成率[(19 ± 2.16)%]。两者的差异具有统计学意义(P < 0.05)。

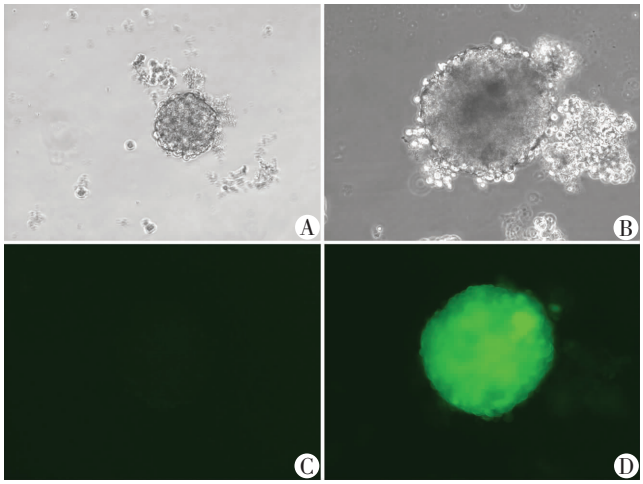


A:Nanog 阴性细胞;B:Nanog 阳性细胞

图 4 HCT116 细胞克隆形成实验结果 (结晶紫)

2.4 成球实验

成球实验的结果显示(图 5),Nanog 阳性细胞所成的干细胞球的体积要明显大于 Nanog 阳性细胞的干细胞球,并且二者的成球率存在差异。Nanog 阳性细胞的成球率为[(34 ± 4)%],Nanog 阴性细胞的成球率为[(10.67 ± 6.43)%],两者的差异具有统计学意义(P < 0.05)。

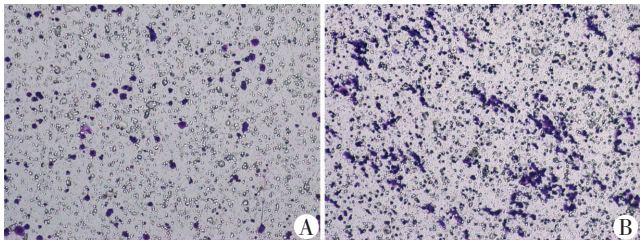


A:Nanog 阴性细胞;B:Nanog 阳性细胞;C:Nanog 阴性细胞 GFP 荧光视野;D:Nanog 阳性细胞 GFP 荧光视野

图 5 HCT116 细胞成球实验结果 (倒置荧光显微镜×40)

2.5 Transwell 转移实验

为了研究分选出来的 Nanog 阴性和 Nanog 阳性的转移能力差异,利用 Transwell 法检测细胞转移能力(图 6)。Nanog 阳性细胞穿过 Transwell 小室的细胞数(175.8 ± 12.89)比 Nanog 阴性细胞(74.6 ± 16.55)显著增多(P < 0.05),说明 Nanog 阳性细胞具有更强的转移能力。



A:Nanog 阴性细胞;B: Nanog 阳性细胞

图 6 Transwell 检测 HCT116 细胞的转移能力 (结晶紫×20)

3 讨论

目前肿瘤干细胞的鉴定分离方法尚未成熟,由于CSCs又是肿瘤细胞里的少数群体,所以无法从形态学上鉴别,而只能用对CSCs的自我更新能力、分化潜能以及侵袭转移能力这些生物学特征进行评价,因此科学家们正试图寻找CSCs特征性的"标记物"[7-9]。

自我更新和分化能力是胚胎干细胞以及成体干细胞所共同的特点,然而这一共同特点也是肿瘤细胞中的部分癌细胞所拥有的[10],所以有学者认为肿瘤是一种干细胞突变的疾病[11]。Yu等利用反转录病毒将Nanog、Oct4、Sox2和LIN28四个基因导入人成纤维细胞中,成功获得了诱导多功能干细胞即iPS细胞。可见Nanog基因在维持iPS细胞的全能性中发挥了至关重要的作用[12-14]。

同时干细胞的调控因子Nanog在低分化肿瘤中会有更频繁的激活表达[15-16]。在口腔癌和大肠癌中Nanog的过表达预测着肿瘤的高度转移和患者的预后差,这表明转录因子Nanog可能是调节肿瘤的发生、发展的一个关键性因素[17-18]。在人的绒毛膜癌中Nanog的高表达有明显的抗凋亡作用和维持干性的特性。干扰Nanog的表达则降低肿瘤细胞的侵袭转移能力,同时,Nanog的低表达会导致基质金属蛋白酶MMP-2和MMP-9的下调表达,这提示着Nanog可能与肿瘤细胞的侵袭转移有关[19]。

正是基于这些理论基础,我们构建了以Nanog为启动子的绿色荧光蛋白GFP慢病毒表达载体Lv-pNanog-GFP,通过流式细胞仪从结直肠癌细胞系HCT116中分离出Nanog阳性细胞和Nanog阴性细胞。通过克隆形成、成球和Transwell这些功能实验比较Nanog阳性细胞和Nanog阴性细胞在自我更新和侵袭转移方面的差异,发现Nanog可以调控结直肠癌细胞的自我更新以及侵袭转移能力。综上所述,本实验结果提示着Nanog阳性细胞是具有肿瘤干细胞特征的,Nanog是可以作为结直肠癌干细胞的"标记物"的,这为我们下一步建立结直肠癌肿瘤干细胞研究平台提供实验基础。

参考文献:

[1] Magee J A, Piskounova E, Morrison S J. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty[J]. Cancer Cell, 2012, 21(3): 283-296.

[2] Sarry J E, Murphy K, Perry R, *et al*. Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2Rgammac-deficient mice[J]. J Clin Invest, 2011, 121(1): 384-395.

[3] Velasco-Velazquez M A, Homsi N, De-La-Fuente M, *et al*. Breast cancer stem cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(4): 573-577.

[4] Cao L, Zhou Y, Zhai B, *et al*. Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines[J]. BMC Gastroenterol, 2011, 11: 71.

[5] Li Y F, Xiao B, Tu S F, *et al*. Cultivation and identification of colon cancer stem cell-derived spheres from the Colo205 cell line[J]. Braz J Med Biol Res, 2012, 45(3): 197-204.

[6] Han M E, Oh S O. Gastric stem cells and gastric cancer stem cells[J]. Anat Cell Biol, 2013, 46(1): 8-18.

[7] Tirino V, Desiderio V, Paino F, *et al*. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization[J]. FASEB J, 2013, 27(1): 13-24.

[8] Yu Z, Pestell T G, Lisanti M P, *et al*. Cancer stem cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(12): 2144-2151.

[9] Ren F, Sheng W Q, Du X. CD133: a cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(17): 2603-2611.

[10] Clarke M F, Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve[J]. Cell, 2006, 124(6): 1111-1115.

[11] Egeblad M, Nakasone E S, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism[J]. Dev Cell, 2010, 18(6): 884-901.

[12] Yu J, Vodyanik M A, Smuga-Otto K, *et al*. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. Science, 2007, 318(5858): 1917-1920.

[13] Silva J, Nichols J, Theunissen T W, *et al*. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state[J]. Cell, 2009, 138(4): 722-737.

[14] Alvarez C V, Garcia-Lavandeira M, Garcia-Rendueles M E, *et al*. Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells[J]. J Mol Endocrinol, 2012, 49(2): R89-R111.

[15] Chiou S H, Yu C C, Huang C Y, *et al*. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(13): 4085-4095.

[16] Schoenhals M, Kassambara A, De-Vos J, *et al*. Embryonic stem cell markers expression in cancers[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 383(2): 157-162.

[17] Meng H M, Zheng P, Wang X Y, *et al*. Overexpression of nanog predicts tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2010, 9(4): 295-302.

[18] Jeter C R, Badeaux M, Choy G, *et al*. Functional evidence that the self-renewal gene NANOG regulates human tumor development[J]. Stem Cells, 2009, 27(5): 993-1005.

[19] Siu M K, Wong E S, Chan H Y, *et al*. Overexpression of NANOG in gestational trophoblastic diseases: effect on apoptosis, cell invasion, and clinical outcome[J]. Am J Pathol, 2008, 173(4): 1165-1172.

(收稿:2013-06-13;修回:2013-10-15)

(编辑 郭建秀)