基础研究 文章编号:0253-3626(2009)04-0409-04

胚胎干细胞关键因子 Nanog 在膀胱癌中的表达及与肿瘤干细胞的关系

王卫生,唐 伟
(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:检测胚胎干细胞(Embnyonic stem cell,ES)自我更新的关键调节因子 Nanog 在人膀胱癌组织中的表达,探讨 Nanog 的表达在膀胱癌发生发展中的意义及与肿瘤干细胞的关系。方法:采用半定量 RT-PCR 检察 32 例膀胱癌 Nanog 的表达,32 例癌旁非癌膀胱组织,用免疫组织化学方法在蛋白质水平检测 Nanog 的表达。结果:Nanog 在膀胱癌中的表达率为 84.38%(27/32),而在非癌膀胱组织低水平($P<0.01$)表达(5/32),免疫组织化学方法分析结果显示:Nanog 主要的集中在肿瘤组织的细胞胞核,在非癌组织中没有或低免疫反应性,Nanog 表达的阳性细胞率及强度与膀胱癌的分级、复发和转移无明显相关性($P>0.05$)。结论:膀胱癌中有少量细胞表达全能干细胞标志物 Nanog,这些细胞很可能是膀胱癌干细胞,这将为揭示膀胱肿瘤干细胞的存在并分离和鉴定膀胱肿瘤干细胞提供依据,Nanog 在膀胱癌中的表达表明胚胎基因与肿瘤的发生发展关系密切。

【关键词】Nanog;膀胱肿瘤;肿瘤干细胞
【中国图书分类法分类号】R737.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-11-04

Expression of embryonic stem cells key transcription factor Nanog in bladder cancer and its relationship with cancer stem cells

WANG Wei-sheng, et al
(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expression of nanog in human bladder cancer tissue, and demonstrate its significance in bladder cancer formation and relationship with bladder cancer stem cells. *Methods*: The expression of nanog was examined in the pathological specimens from 32 cases of bladder cancers, 15 apparently nontumor tissues taken from the margin of tumors and 10 normal urothelial tissues by using semiquantitative RT-PCR and immunohistochemistry respectively. *Results*: The expression rate of nanog in bladder cancers was 84.38%(27/32) but at much lower level ($P<0.001$) in some nonneoplastic samples(5/32), According to immunohistochemical (IHC) results, nanog is primarily localized in the nuclei of tumor cells, with no or low immunoreactivity in nontumor cells.the positive rate and intensity of the nanog expression had no obvious relationship with the grade, recurrence or metastasis of bladder cancer ($P>0.05$). *Conclusion*: The expression of nanog showed there might exist bladder cancer stem cells.This has significant aplications to uncover the existence of CSC and to isolate and identificate bladder cancer stem cells.The rate and level of nanog expression in bladder cancer showed there might exist significant correlation between embryonic gene and occurrence and development of tumor.

【Key words】Nanog; Bladder cancer; Cancer stem cells

Nanog 是 2003 年 Chambers 等[1]和 Mitsui 等[2]发现的新的多能干细胞标志因子,特异性地表达于植入前或早期植入后的胚胎多能干细胞、原始生殖细胞、体外培养的胚胎干细胞(Embryonic stem cell, ES)、胚胎生殖细胞(Embryonic germ cell,EG)和胚胎癌细胞(Embryonic carcinoma cell,EC)并促进细胞增殖,而在已分化的 ES 中不表达,是目前发育生物学中的新兴研究热点,它在维持干细胞细胞自我更新和保持全能性中发挥重要作用。近年发展起来的肿瘤干细胞理论认为肿瘤是一种干细胞疾病[3]。基于这个理论,我们通过对 32 例膀胱癌标本为研究对象,探讨膀胱癌中是否存在表达Nanog 的干细胞样细胞,进一步探讨 Nanog 的表达是否和肿瘤的病理类型、分期、转移、复发有关。

作者介绍:王卫生(1980-),男,硕士,
研究方向:膀胱肿瘤。
通讯作者:唐 伟,男,教授,E-mail:2060tanwei@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 标本来源

取 2007 年 9 月～2008 年 5 月重庆医科大学附属第一医院泌尿外科膀胱肿瘤开放手术切除标本，术后经病理证实均为膀胱移行细胞癌。男性 26例，女性 6 例。年龄介于 47～78 岁，平均为 57.6 岁。临床病理分级Ⅰ级 10 例，Ⅱ级 16 例，Ⅲ级 6 例。13 例非肿瘤膀胱组织标本取自远离肿瘤 5 cm 以上，术后病理检查证实均为正常膀胱移行上皮组织。手术切除标本后，迅速置入液氮中，再转入 -80℃保存。临床 TNM 分期：Ta 期 4 例，T_1 期 6 例，T_2～T_4 期 22 例。

1.2 实验试剂

兔源性 Nanog 多克隆抗体购自 Santa cruz 公司，FITC 标记的鼠抗兔二抗，SP 免疫组织化学试剂盒均购自北京中杉技术公司，本实验所用 PCR 引物均由上海英骏生物技术公司合成。Taq 酶、*DNase* Ⅰ（RNase free）购自 TaKaRa 公司，RNA 提取试剂 Tripure reagent 为 ROCHE 公司产品，M-Mulv Reverse Transcriptase 购自 Promega 公司，其余均为国产分析纯试剂。

1.3 实验方法

1.3.1 组织免疫化学 组织用 4%多聚甲醛固定，常规石蜡包埋、切片，切片厚 4～5 mm。免疫组织化学采用链霉素抗生物素一过氧化物酶（SP）法，简述如下：切片脱蜡、水化。水浴法进行抗原修复，修复后的切片用 3%H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶活性。正常血清孵育，滴加 Oct4 多克隆抗体（工作浓度为 1:200），4℃过夜。二抗采用抗兔 SP 试剂盒。DAB 显色，苏木精复染，封片。PBS 代替一抗作为空白对照，正常膀胱癌旁组织作为阴性对照。光镜下观察，Nanog 抗原阳性反应为位于细胞核内的棕黄色均匀细颗粒。随机选择 5～10 个高倍视野，计数 1 000 个瘤细胞中阳性染色细胞，阳性细胞率 =（阳性表达瘤细胞数 /1 000）× 100%，采用 HMIA，2000 型全自动彩色图像分析系统进行平均吸光度分析。

1.3.2 逆转录（RT）-PCR Trizol 法提取组织总 RNA，以 20 μl DEPC 水溶解，RNA 定量为 1 g/L 在紫外分光光度计下测得波长为 260、280 nm 处的吸光度（A），其 A 值均在 1.8～2.0。逆转录合成 cDNA 第一链，逆转录反应体系（40 μl）如下：Oligo（dT）（10 μmol/l）1 μl、总 RNA 5 μl、DEPC 水 20 μl、5 × 反应缓冲液 8 μl、dNTP Mixture（10 μmol/l）5 μl、RNA 酶抑制剂 1 μl、逆转录酶 Mulv 1 μl，反应条件：将 Oligo、总 RNA 混合物于 65℃加热 10 min，置于冰上 2～3 min。冰浴条件下加入其他剩余试剂稍微离心后，立即置于 37℃温育 90 min 合成第一链 cDNA，然后在 65℃加热 5 min，终止反应。Nanog 引物：上游：F:5'-GTCCCAAAGGCAAACAACCC-3' 下游：5'-GGCCTTCCCCAGCAGCTTCC-3'，产物 609 bp。内参照引物 β-Actin：上游：5'-CAACTGGGACGACATGGAG-3'，下游：5-CATCTGCTGGAAGGTGGAC-3'，产物 835 bp。PCR 反应体系（50 μl）：cDNA 模板 2 μl、上下游引物（10 μmol/l）各 1 μl、Taq 聚合酶 0.5 μl、dNTP Mix（2.5 μmol/l）1 μl、First-Strand cDNA 1 μl、10 × PCR Buffer 5 μl 94℃预变性 3 min 后，目的基因：94℃预变性 3 min；94℃ 30 s，57℃ 30 s，72℃ 40 s；循环 35 圈。72℃延伸 10 min。β-actin94℃ 30 s，53℃30 s，72℃40 s，28 个循环，72℃延伸 8 min。1.0%琼脂糖电泳鉴定产物，数码照相并行灰度值分析（Gel2Pro Analyzer4.0 分析软件）。

1.4 统计学方法

采用 SPSS16.0 软件分析各种因素与 Nanog 表达的关系，计量资料的比较采用 t 检验；计数资料比较采用 χ^2 检验。$P<0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结 果

2.1 RT-PCR 检测膀胱癌组织中 Nanog 的表达

Nanog 和 β-actin 预期扩增片段的大小分别为 609、835 bp。各分级膀胱癌组织目的基因 Nanog 相应片断大小的位置出现条带，Nanog 的条带强度均比 β-actin 条带的强度明显要弱，极少数正常膀胱癌旁组织发现 Nanog 弱表达的条带。Nanog 在膀胱癌组织和癌旁组织中的灰度值分别为：0.420 9±1.658 3、0.046 2±0.284 9，经 t 检验，两组间差异有统计学意义（$P<0.05$）。而Ⅰ级、Ⅱ级和Ⅲ级的灰度值分别为：0.384 3±0.107 83、0.339 4±0.140 95、0.398 3±0.225 16，经 t 检验，各组间差异没有统计学意义（$P>0.05$）（图 1）。



M. MARKER(DL2000)；1、2、3、5. 膀胱移行细胞癌组织中 Nanog 基因阳性表达：2、4、6. 相应癌旁组织中 Nanog 弱阳性或阴性表达

图 1 Nanog 基因的表达情况

2.2 免疫组化检测 Nanog 在膀胱癌中的表达

2.2.1 Nanog 在正常膀胱组织、膀胱癌中的表达情况：Nanog 基因蛋白产物阳性反应呈棕黄色颗粒，棕黄色颗粒（Nanog 蛋白）主要位于癌细胞核部位，

Nanog 在膀胱癌和正常膀胱组织的阳性表达率分别为 84.38%(27/32)、15.6%(5/32)，经 χ^2 检验两组间差异有统计学意义($P<0.01$)(见图 2)。膀胱癌和正常膀胱组织的平均吸光度分别为 0.182 9±0.042 42、0.107 0±0.032 52，经 t 检验两组间差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2.2 Nanog 的表达与膀胱癌的病理分级、复发和淋巴转移的关系：Nanog 在膀胱癌Ⅰ级、Ⅱ级、Ⅲ级的阳性表达率分别为 80%(8/10)、81%(13/16)、83%(5/6)，经检验各组之间差异无统计学意义($P>0.05$)；Nanog 阳性细胞率分别为 0.4%、0.6%和 3.0%，Ⅲ期膀胱癌略高于Ⅰ级、Ⅱ级；平均吸光度分别为0.166 3±0.040 00、0.181 1±0.039 14 和 0.215 3±0.043 08，经 t 检验，各组之间差异没有统计学意义($P>0.05$)。Nanog 阳性率在原发性膀胱癌和复发性膀胱癌分别为 83.3% (10/12)、85%(17/20)，在有转移和无转移分别为 80%(4/5)和 85.2%(23/27)，经 χ^2 检验各组之间差异没有统计学意义($P>0.05$)。平均吸光度原发和复发分别为 0.174 7±0.036 04、0.187 8±0.045 99；在有转移和无转移分别为 0.207 6±0.042 46、0.178 3±0.041 58，经 t 检验，各组之间差异没有统计学意义($P>0.05$)。

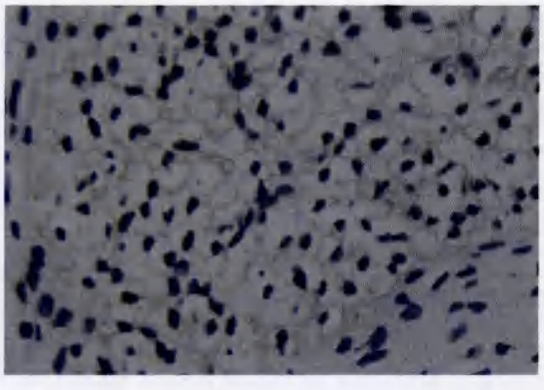


图 2 Nanog 在膀胱癌中的表达(SP 染色×200)，细胞核中见棕黄色染色

3 讨 论

Nanog 基因(说明：Chambers 等为纪念凯而特(Celtic)传说中的地名 Tir nan og，意为生命绿洲、永不枯竭的象征，将该基因命名为 Nanog)。Mitsuik 和 Chambers 等[1]在 ES 内新发现一种重要基因，可促使干细胞不断再生并分化为不同的组织细胞，可能是一个主导性的基因，让 ES 得以发育从而使得干细胞长生不衰。现在学者用 Nanog 这个词代表干细胞的青春能力。

Nanog 属于 ANTP 类 NK 家族基因，在人定位于 12 号染色体 12p13 区，大小为 7.84 Mb。Nanog 的cDNA 由 2 184 个核苷酸组成，包含一个开放阅读框，编码 305 个氨基酸。分为 3 个区域：homeodomain 发挥蛋白之间相互作用及 DNA 结合的作用；氨基末端富含丝氨酸和苏氨酸，可能与磷酸化作用有关；羧基末端包含明显的 w 重复序列。氨基末端和羧基末端尽管没有明显的转录基序但均有转录活性，羧基末端结构域的活性是氨基末端的 7 倍。通过 EST 确认 Nanog 基因有 4 个外显子，所有的结合位点均遵从GT.AG 供受原则。同源盒位于外显子 2 和外显子 3，44 号和 45 号 homeodomain 残基之间。Nanog 在全能或多能干细胞中表达，是维持 ES 细胞多能性的关键因子，能够使 ES 细胞独立于 LIF(Leukaemia inhibitory factor)途径自我更新并维持其多能性。Nanog 的缺失引起早期胚胎的死亡。其组成型表达可以自动引起 ES 的自我更新，Nanog 也因此被认为是多能性转录系统的核心元素，是干细胞增殖同时保持其分化潜能所必需的。Nanog 在早期卵裂阶段没有明显表达，首先能检测到其 mRNA 的时期是晚期桑椹胚，早期囊胚 ICM(内细胞团)和晚期囊胚上胚层，但随着上胚层细胞下陷分化形成胚内中胚层前体细胞，Nanog 表达迅速减少。这恰好与分离 ES 细胞的时期重合，它总是维持 ES 细胞多能性，阻止向任何方向分化。SiRNA 敲除 Nanog 基因可诱导出不同胚层的分化标志，如内胚层标志 AFP、GATA4 和GATA6；外胚层标志 CDX2，因此 Nanog 可看作 ES 的守门人[4]。最近的研究表明它不但能在生殖细胞系及生殖细胞来源的恶性肿瘤的未分化或低分化细胞中阳性表达，在生殖系统以外的某些实体肿瘤(口腔鳞癌、视网膜母细胞瘤、乳腺癌、前列腺癌)中也有表达[5-9]。最近一系列的证据表明尿道上皮肿瘤的同源性特点，认为这些肿瘤起源于祖细胞的转变[10]。基于最新的干细胞理论认为最初的突变细胞可能来源于干细胞和早期祖细胞的转变，这种自我更新能力的失调产生能向各种肿瘤细胞表型转化的肿瘤干细胞[11]。几种实体肿瘤(如：白血病、乳腺癌、脑胶质瘤、前列腺癌)肿瘤干细胞分离鉴定的成功为这种理论提供了合理的解释[12-15]，而这种理论认为恶性肿瘤中数量极少的肿瘤干细胞具有无限增殖、自我更新及分化的能力，在肿瘤形成和生长中起着决定性的

作用,并表达相似的分子标记和基因产物[12,14,16],这也恰好符合 Paget 提出的肿瘤"种子理论"。这种新的理论将改变我们以往对肿瘤发生和发展的理解。因此对导致肿瘤产生的干细胞自我调节基因的检测就显得尤为重要。本实验在对 32 例膀胱癌病理组织标本中 Nanog 表达的研究表明:绝大多数标本有 0.6%左右的 Nanog 阳性细胞,这一比例和乳腺癌、胶质瘤、口腔癌中肿瘤干细胞所占比例极少的观点相符。Nanog 表达与否,表达强弱与肿瘤的分期和病理分型无明显相关,说明肿瘤的恶性程度很可能并非是由 Nanog 阳性细胞的数量决定的,而是由发生恶变的干细胞所处的细胞分化阶段决定的。在我们的研究中有 3 例标本并没有 Nanog 的表达,这可能与标本的保留,染色方法或表达过弱等因素有关。半定量 RT-PCR 也证实膀胱癌组织中存在 Nanog mRNA 的表达,Nanog 的表达远比内参 β-actin 的表达低,这也能说明肿瘤中 Nanog 阳性细胞所占比例较低;各分期和分型的膀胱癌细胞的目的条带亮度相近,说明各分期和分型的 Nanog mRNA 表达无明显差异;膀胱癌组织和癌旁组织目的条带亮度差异显著,除了在 2 例癌旁正常组织中发现 Nanog 弱表达外,其余均未见表达。本实验结果发现极少数膀胱癌旁组织中弱表达 Nanog,这可能是由于正常膀胱组织中存在少许能对组织进行自我修复的成体多能干细胞,但其 Nanog 表达量仅为多能性细胞的 1/1 000,表明低水平的 Nanog 表达在成体多能性干细胞中起重要作用,能自我修复来维持干细胞多能性。这个实验首次报导了 Nanog 在膀胱癌中的表达,还需要对多功能因子 Nanog 在生物学过程中的主要作用如胚胎的发育、控制细胞分化、干细胞为基础的致癌作用等进行更多的研究。Nanog 在膀胱肿瘤中的表达证明存在一种干细胞样肿瘤细胞,当然不能就此断定表达 Nanog 的阳性细胞就是膀胱癌干细胞,还需要更多的证据来证明肿瘤的干细胞起源;更多的研究从膀胱癌中分离纯化肿瘤干细胞并描述它的特点,阐明 Nanog 在癌症发生中的作用。因此,我们的研究为膀胱肿瘤的起源和生物学行为提供一条有价值的线索。提供一种以肿瘤干细胞为靶基因治疗肿瘤的复发和转移的方法。

参 考 文 献

[1] 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.

[2] Mitsui K,Tokuzawa Y,Itoh H,et al. The humeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells[J]. Cell,2003,113(5):631-642.

[3] Huntly JP,Gilliland DG. Summing up cancer stem cells[J]. Nature, 2005,435(7046):1169-1170.

[4] Yasuda SY,Tsuneyoshi N,Sumi T,NANOG maintains self-renewal of primate ES cells in the absence of a feeder layer[J]. Genes to Cells, 2006,11(9):1115-1123.

[5] Shih-Hwa Chiou,Cheng-ChiaYu,Chi-Yang Huang,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.

[6] Seigel GM,Hackam AS,Ganguly A,et al. Human embryonic and neuronal stem cell markers in retinoblastoma[J]. MolVis,2007,13(8): 823-832.

[7] Santagata S,Ligon KL,Hornick JL. Embryonic stem cell transcription factor signatures in the diagnosis of primary and metastatic germ cell tumors[J]. Am J SurgPathol,2007,31(6):836-845.

[8] Gu G,Yuan J,Wills M,Kasper S. Prostate cancer cells with stem cell characteristics reconstitute the original human tumor in vivo[J]. Cancer Res 2007,67(10):4807-4815.

[9] Freberg CT,Dahl JA,Timoskainen S,et al. Epigenetic reprogram ming of OCT4 and NANOGregulatory regions by embryonal carcinoma cell extract[J]. Mol Biol Cell,2007,18(5):1543-1553.

[10] Junker K,Wolf M,Schubert J. Molecular clonal analysis of recurrent bladder cancer[J]. Oncol Rep,2005,14(2):319-323.

[11] Al-Hajj M,Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells [J]. Oncogene,2004,23(43):7274-7282.

[12] Lapidot T,Sirard C,Varmoor J,et al. A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice [J]. Nature,1994,367 (6464):645-648.

[13] Dick JE. Breast cancer stem cells revealed[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2003,100(7):3547-3549.

[14] Singh S,Clark I,Terasaki M,et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. Cancer Research,2004,63(18):5821-5828.

[15] Collins AT,Berry PA,Hyde C,et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells[J]. Cancer Res,2005,65(23): 10946-10951.

[16] Al-Hajj M,Wicha MS,Benito-hernandez A,et al. Prospective identifi. cation of tumorgenic breast cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003,100(7):3983-3988.

(责任编辑:关蕴良)