

## 不同迁移能力肝癌细胞中干细胞相关基因 Nanog、Sox2 和 Oct4 的表达\*

王寒琪<sup>1\*\*</sup>, 王晋星<sup>1</sup>, 陈林<sup>2</sup>, 陈妮<sup>1</sup>, 陈我婵<sup>1</sup>, 潘娅<sup>2</sup>, 洪阳<sup>3\*\*\*</sup>, 陈腾祥<sup>2\*\*\*</sup>

(1. 贵阳医学院附院 消化内科, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院 生理学教研室, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵阳市卫生局, 贵州 贵阳 550001)

**[摘要]** 目的: 观察 Nanog、Sox2 和 Oct4 干细胞相关基因在四株不同迁移能力肝癌细胞系中的表达。方法: 常规细胞培养无迁移能力的 HepG2 细胞、低迁移能力的 MHCC97-L 细胞、中迁移能力的 LM3 细胞及高迁移能力的 MHCC97-H 细胞, 采用免疫荧光组织化学方法观察四株肝癌细胞系中肝癌干细胞相关基因 Nanog、Sox2 和 Oct4 的表达。结果: 干细胞相关基因 Nanog、Oct4 和 Sox2 在四株迁移能力不同的肝癌细胞系中不同程度表达, 且在细胞膜、细胞核、细胞浆中的表达量亦不同; Nanog 在细胞核表达, 并随着细胞迁移能力增强而呈递增趋势; Sox2 在不同迁移能力肿瘤细胞中表达无明显规律, 而 Oct4 在高迁移能力肝癌细胞的细胞浆及核中高表达。结论: Nanog、Sox2 和 Oct4 在不同迁移能力肝癌细胞系中均有表达, 但无明显规律, 推测肝癌干细胞与肝癌的发生可能有密切关系。

**[关键词]** 干细胞基因; 肝癌细胞; 肝癌干细胞; Nanog; Sox2; Oct

**[中图分类号]** R363.21; R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2013)03-0226-05

### Expression of Stem Cell Related Genes Nanog, Sox2 and Oct4 in Liver Cancer Cells with Different Migration Abilities

WANG Hanqi<sup>1</sup>, WANG Jinxingyi<sup>2</sup>, CHEN Ning<sup>2</sup>, CHEN Ni<sup>1</sup>, CHEN Wochan<sup>2</sup>,  
PAN Ya<sup>2</sup>, HONG Yang<sup>3</sup>, CHEN Tengxiang<sup>2</sup>

(1. Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of physiology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Health Bureau of Guiyang City, Guiyang 550001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the expression of stem cell related genes Nanog, Sox2 and Oct4 in 4 hepatoma cell lines with different migration abilities. **Methods:** HepG2 (no migration ability), MHCC97-L (lowly migratory), LM3 (moderately migratory), and MHCC97-H (highly migratory) respectively were routinely cultured. Immunofluorescent cytochemical technique was employed to observe the expression of liver cancer stem cell related genes Nanog, Sox2 and Oct4 in 4 liver cancer cell lines. **Results:** Nanog, Sox2 and Oct4 expressed in 4 cell lines in different degrees, and the expression levels in the cell membrane, nucleus, cytoplasm were different. The expression of Nanog showed an increasing trend in the nucleus with the increase of cell migration abilities. Sox2 expression had no obvious rule in the 4 cell lines. Oct4 highly expressed in cytoplasm and nucleus of cells with high migration abilities. **Conclusions:** The expressions of Nanog, Sox2 and Oct4 have no obvious rule in the 4 hepatoma cell lines with different migration abilities. However, Nanog, Sox2 and Oct4 are all detectable in the

\*[基金项目] 贵州省科技厅自然科学基金项目[2008] 2280 号, 贵州省教育厅自然科学研究项目(2008)022 号, 贵阳市科技局社发攻关项目(2010)1 号。

\*\* 贵阳医学院附院消化内科 2010 级硕士研究生, 现工作单位贵州省电力职工医院。

\*\*\* 通信作者 E-mail: Hyang1121@sina.com; 371251826@qq.com

4 cell lines, suggesting that liver cancer stem cells is closely related to the occurrence of liver cancer.

[Key words] Stem cell gene; hepatoma cells; liver cancer stem cells; Nanog; Sox2; Oct4

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)在我国发病人数约为全球的 55%,死亡数位居第二位,仅次于肺癌<sup>[1-2]</sup>。研究证明肝癌干细胞起源于肝干细胞<sup>[3]</sup>,肝癌可由多种不同阶段的肝干细胞分化而来<sup>[4]</sup>,它被认为不仅是一种基因病,还可能是一种成体干细胞疾病,提示肝癌干细胞在肝癌的发生发展、转移复发、多药耐药等方面发挥着关键性作用。本实验于 2012 年 10 月~2013 年 5 月通过对干细胞相关基因 Nanog、Sox2 和 Oct4 在肝癌细胞系中的表达进行研究,为肝癌发生的分子机制提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与设备** 人肝癌细胞株 HepG2、MHCC97-L、LM3、MHCC97-H 购自中国博慧斯生物医药科技有限公司,DMEM 培养基和胎牛血清(FBS)购自美国 invitrogen 公司,尼氏染色剂购自上海碧云天公司,Nanog、Sox2 和 Oct4 抗体购自美国 Cell signaling technology 公司,其他试剂均为国产货进口分析纯试剂。激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司),倒置显微镜(CKX41,日本 Olympus 公司)超净工作台(SW-CJ-2FD,苏州净化设备有限公司),恒温 CO<sub>2</sub> 培养箱(Model 310,美国 Thermo 公司),超低温冰箱(MDF-382E,日本 SANYO 公司)。

**1.2 细胞培养** 人肝癌细胞株 HepG2、MHCC97-L、LM3、MHCC97-H 用 10% 胎牛血清(FBS)+1% 青霉素+DMEM 培养基混合液,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。用 0.25% 胰酶消化液消化并吹打制成单细胞悬液适当稀释,枪头吸取少量滴在计数板边缘,静置 2~3 min,显微镜下观察并计算 16 格×25 格内的细胞数。

**1.3 免疫荧光细胞化学方法** 将四株肝癌细胞按  $5 \times 10^5$  个细胞种植到激光共聚焦专用皿中,细胞贴壁后 4% 多聚甲醛溶液室温固定 20 min,冷 0.1% NaBH<sub>4</sub> 处理 10 min 消除荧光背景,进行第 1 轮标记检测 Nanog 基因表达,加入 I 抗 Nanog(D73G4) XP<sup>®</sup> Rabbit mAb 4℃ 孵育过夜后,II 抗 DyLight 649 标记山羊抗兔 IgG(H+L)室温孵育 2 h,DAPI 染核,孵箱内 37℃ 孵育 15 min, PBS 清洗后激光共聚焦显微镜下观察。按上述方法检测

Sox2 及 Oct4 基因表达,分别加入 Sox2 相关抗体:I 抗为 Sox2(D6D9) XP<sup>®</sup> Rabbit mAb, II 抗为 DyLight 549 标记山羊抗兔 IgG(H+L)。Oct4 相关抗体:I 抗为 Oct-4 Antibody, II 抗为 DyLight 649 标记山羊抗兔 IgG(H+L)。

**1.4 统计学处理** 实验重复 3 次,每次扫描 10 个视野,利用激光共聚焦扫描显微镜专用分析软件(FV10-ASW 3.1 Viewer)进行荧光强度(fluorescence intensity, FI)计数,分别检测细胞膜、细胞质和细胞核内的标记荧光强度,以 HepG2 细胞的标记荧光强度作为分母,计算相对荧光强度(relative fluorescence intensity, RFI),绘制柱状图,SPSS16.0 进行方差统计分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Nanog 表达** 如图 1 所示,在无迁移能力的 HepG2 细胞膜、细胞浆中 Nanog 基因几乎未见表达,在细胞核中仅有少量表达。在低迁移力 MHCC97-L 中, Nanog 基因在细胞膜、细胞浆、细胞核中表达较 HepG2 稍增强;在 LM3 细胞中, Nanog 基因在细胞膜及细胞浆中少量表达,在细胞核中表达较前两种细胞增强;在迁移能力最高的 MHCC97-H 细胞中可见 Nanog 基因在细胞膜、细胞浆及细胞核中的表达较前三种细胞明显增强,在细胞核中表现最显著。经分析 Nanog 在四株肝癌细胞浆、核中相对的荧光强度(RFI)提示 Nanog 在细胞浆中无明显趋势,在细胞核中表达随着细胞迁移能力增强而呈递增趋势。

**2.2 Sox2 表达** 如图 2 所示,在无迁移能力的 HepG2 细胞膜、细胞浆中 Sox2 基因呈强阳性表达,在细胞核中表达亦较强。在低迁移力细胞 MHCC97-L 中, Sox2 基因在细胞膜、细胞浆、细胞核中几乎未见表达。在 LM3 细胞中, Sox2 基因在细胞膜及细胞浆中表达较强,但较 HepG2 较弱,在细胞核中可见少量表达。在迁移能力最高的 MHCC97-H 细胞中可见 Sox2 基因在细胞膜、细胞浆中表达较 HepG2 及 LM3 减弱,但在细胞核中表达较 LM3 增强。分析 Sox2 在细胞膜、浆、核中的相对荧光强度(RFI), Sox2 在不同迁移能力肝癌细胞中表达无明显规律。

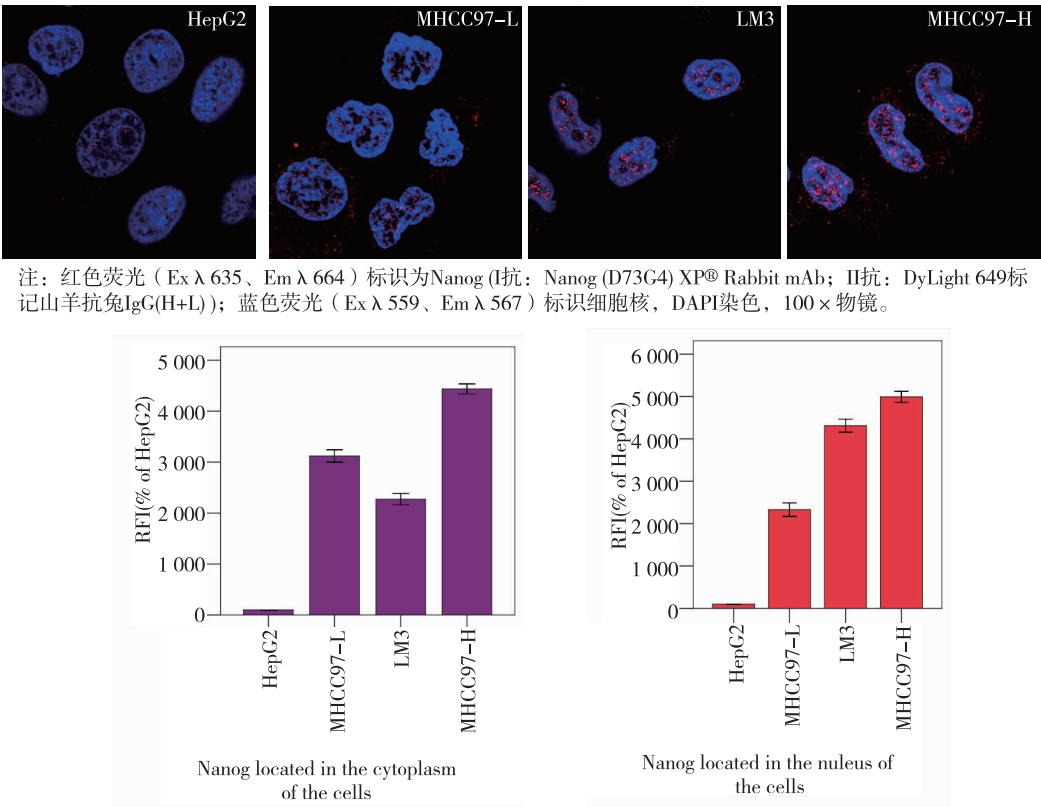


图 1 Nanog 在不同转移能力肝癌细胞中的表达

Fig. 1 Nanog expression in liver cancer cell lines with different migration abilities

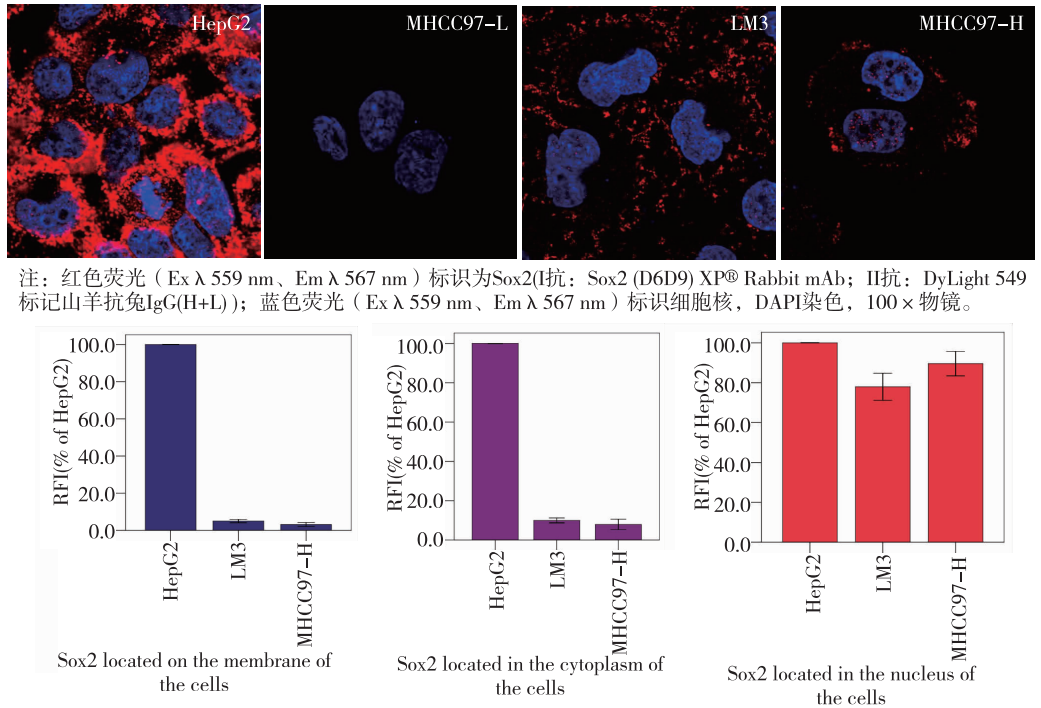
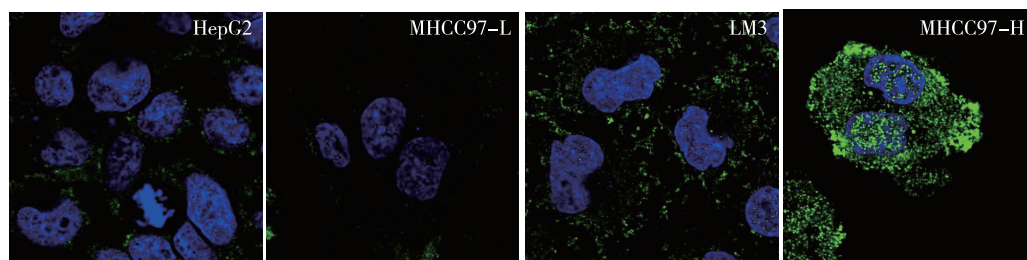


图 2 Sox2 在不同转移能力肝癌细胞中的表达

Fig. 2 Sox2 expression in liver cancer cell lines with different migration abilities

**2.3 Oct4 表达** 如图 3 所示,在无迁移能力的 HepG2 细胞膜和细胞浆中 Oct4 基因少量表达,在细胞核中未见明显表达。在低迁移力 MHCC97-L 中,Oct4 基因在细胞膜、细胞浆及细胞核中均未见明显表达。在 LM3 细胞中,Oct4 基因在细胞膜及

细胞浆中表达增强,在细胞核中少量表达。在迁移能力最高的 MHCC97-H 细胞中可见 Oct4 基因在细胞核、细胞膜、细胞浆中表达均明显增强。分析 Oct4 在细胞浆、核中相对荧光强度显示其在高迁移能力肝癌细胞中高表达。



注: 绿色荧光 (Ex  $\lambda$  635、Em  $\lambda$  664) 标识为 Oct4 (I 抗: Oct-4 Antibody; II 抗: DyLight 649 标记山羊抗兔 IgG(H+L)); 蓝色荧光 (Ex  $\lambda$  559、Em  $\lambda$  567) 标识细胞核, DAPI 染色, 100 $\times$  物镜。

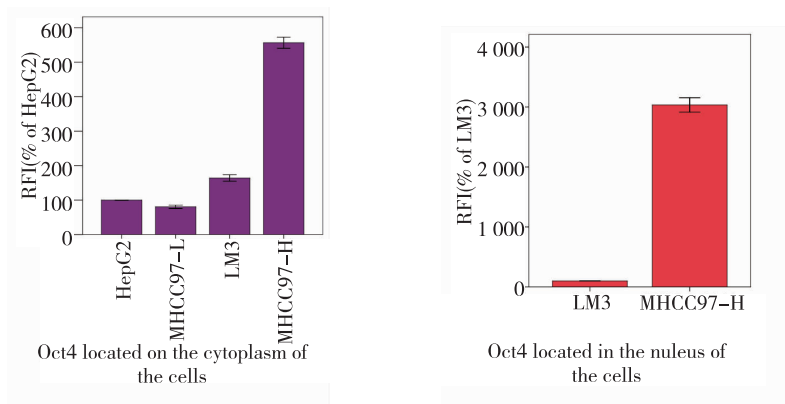


图 3 Oct4 在不同转移能力肝癌细胞中的表达

Fig. 3 Oct4 expression in liver cancer cell lines with different migration abilities

### 3 讨论

干细胞是存在于胚胎和成体中的一类具有自我更新、增殖分化能力的原始细胞。1983 年 Mackillop<sup>[5]</sup>等提出“肿瘤干细胞假说”,即在所有的肿瘤中都可能存在着一小部分细胞具有类似干细胞的特殊功能,这部分肿瘤细胞具有自我更新、无限增殖能力、多向分化潜能且高致瘤性特点,在肿瘤形成、生长和转移中起决定性作用,被称作肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs),肝干细胞的突变可能产生肝癌干细胞。许多实体瘤中也相继鉴定出肿瘤干细胞的存在,如乳腺癌、结肠癌、胰腺癌等<sup>[6-7]</sup>,进一步证实了肿瘤干细胞假说。

目前尚未有公认的肝癌干细胞标志物,因此对肝癌干细胞的研究主要集中在干细胞标记物的研究上,其中有三个代表性的基因 Nanog、Oct4 和 Sox2 对干细胞多潜能性和自我更新的能力具有关

键性调控作用。Nanog 基因是 2003 年由 Chambers 和 Mitsui 等<sup>[8]</sup>在胚胎细胞内发现新的转录因子,它是维持干细胞自我增殖和多向分化的关键性基因,在神经胶质瘤、乳腺癌、膀胱癌等实体肿瘤中也可以表达,且表达强度与肿瘤级别呈正相关。在本实验中观察到 Nanog 基因虽然在不同迁移能力肝癌细胞膜的表达没有显示出明显的规律,但是就 Nanog 基因在细胞核的表达随着迁移能力增强而出现增加的趋势。Oct4 基因主要表达于胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)和生殖细胞肿瘤,能维持 ESC 正常的未分化状态并促进其增殖,若细胞发生分化,Oct4 表达通常会降低或消失<sup>[9]</sup>。近来在人乳腺癌的研究中发现 Oct4 基因异常表达可能会使正常细胞向恶性转化,Oct4 基因还可能通过激活和上调其下游靶基因的表达,导致多种肿瘤的发生,可以说是干细胞致癌的证据之一。本研究显示 Sox2 基因在四株肝癌细胞细胞膜、细胞浆、细胞核中表达的差异提示,肝癌迁移能力是一个与多

种因素、多基因参与的复杂过程, Sox2 基因在肝癌细胞的迁移过程中的作用还值得商榷。 Sox2 基因在早期胚胎发生中有关键作用, 其异常表达和许多肿瘤的发生发展有密切关系, 在部分分化程度低的乳腺癌细胞中, 可见 Sox2 表达, 胃癌中 Sox2 表达下调, 结肠癌中表达则上调<sup>[10-12]</sup>。本研究显示, 虽然 Oct4 在不同迁移能力肝癌细胞膜的表达没有显示出明显的规律, 但是就 Oct4 在细胞核的表达随着迁移能力增强而出现增加的趋势。

本实验观察到干细胞相关基因 Nanog、Oct4 和 Sox2 在 4 株迁移能力不同的肝癌细胞系中不同程度表达, 且在细胞膜、细胞核、细胞浆中的表达量亦不同。 Nanog、Oct4 在细胞膜、细胞浆中的表达与迁移能力增强无明显规律, 但在细胞核的表达随着迁移能力增强而出现增加的趋势。但 Sox2 基因无论是在细胞膜、细胞浆、细胞核中的表达均与肝癌细胞迁移能力无明显相关性, 就其表达调控的差异可能与生物学特性不同有关。

综上所述, Nanog、Oct4 和 Sox2 三个干细胞基因在肝癌细胞中的表达, 支持了“肿瘤干细胞理论”, 推测其可能与肝癌的发生发展有关, 有可能成为评价肝癌临床生物学行为的有用指标。干细胞相关基因为指导肝癌临床诊断及靶向治疗提供了新的策略, 但就其具体作用机制还有待进一步研究。

## 4 参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2011(2): 69-90.
- [2] Center M M, Jemal A. International trends in liver cancer incidence rates[J]. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2011(11): 2362-2368.
- [3] Sell S. On the stem cell origin of cancer[J]. The American journal of pathology, 2010(6): 2584-2594.
- [4] Ma S, Chan KW, Hu L, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells[J]. Gastroenterology, 2007(132): 2542-2556.
- [5] Mackillop W J, Ciampi A, Till J E, et al. A stem cell model of human tumor growth, implications for tumor cell clonogenic assays[J]. Journal of the National Cancer Institute, 1983(70): 9-16.
- [6] Ricci-Vitiani L, Lombardi D G, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon cancer initiating cells[J]. Nature, 2007(7123): 111-115.
- [7] Li C, Heidt D G, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer cell[J]s. Cancer Research, 2007(67): 1030-1037.
- [8] Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells[J]. Cell, 2003(5): 643-655.
- [9] 周春辉, 廖德贵. Oct-4 在非小细胞肺癌组织中的表达及意义[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2011(8): 1204-1206.
- [10] Rodriguez-Pinilla SM, Sarrio D, Moreno-Bueno G, et al. Sox2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer[J]. Mod Pathol, 2007(4): 474-481.
- [11] Otsubo T, Akiyama Y, Yanagihara K, et al. SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell-cycle arrest and apoptosis[J]. Br J Cancer, 2008(4): 824-831.
- [12] Park ET, Gum JR, Kakar S, et al. Aberrant expression of SOX2 up-regulates MUC5AC gastric foveolar mucin in mucinous cancers of the colorectum and related lesions[J]. Int J Cancer, 2008(6): 1253-1260.

(2013-05-09 收稿, 2013-05-14 修回)

编辑: 文箫颖