

## 细胞免疫荧光检测人胰腺癌干细胞 Oct4、Nanog 基因的表达

陈锦鹏<sup>1,2</sup>, 王志伟<sup>1</sup>, 陆玉华<sup>1</sup>, 陆俊杰<sup>1</sup>, 钱海鑫<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>南通大学附属医院普外科, 江苏 南通 225001; <sup>2</sup>苏州大学附属第一医院普外科, 江苏 苏州 215001)

**[摘要]** 目的:研究胚胎干细胞相关基因 Oct4 和 Nanog 在人胰腺癌肿瘤干细胞和普通肿瘤细胞中表达的差异。方法:用流式细胞仪在人胰腺癌 Panc-1 细胞系中分选肿瘤干细胞, 细胞免疫荧光法检测 2 种肿瘤干细胞和 Panc-1 细胞中 Oct4、Nanog 基因的表达情况。结果:Oct4 及 Nanog 基因在 2 种分选出的细胞中表达均高于未分选细胞。结论:干细胞相关基因 Oct4、Nanog 在胰腺癌 Panc-1 肿瘤干细胞中的表达高于普通胰腺癌细胞。

**[关键词]** 胰腺癌; 肿瘤干细胞; Nanog; Oct4

**[中图分类号]** R735.9

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)11-1524-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20131108

## The expression of Oct4 and Nanog gene in human pancreatic cancer stem cells detected by immunofluorescence

Chen Jinpeng<sup>1,2</sup>, Wang Zhiwei<sup>1</sup>, Lu Yuhua<sup>1</sup>, Lu Junjie<sup>1</sup>, Qian Haixin<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 225001; <sup>2</sup>Department of General Surgery, the First Affiliated of Soochow University, Suzhou 215001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study and compare the gene expression of Oct4 and Nanog in human pancreatic cancer stem cell. **Methods:** FCM was used to isolate pancreatic cancer stem cells of CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> and CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>ESA<sup>+</sup> phenotypes by a FACS Aria II in human cell line Panc-1. Immunofluorescence was used to detect the expression of Oct4 and Nanog gene in Panc-1 cell and two kinds of cancer stem cell-like cells. **Results:** Oct4 and Nanog genes have a higher expression in CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>ESA<sup>+</sup> cells and CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> cells than Panc-1 cells. **Conclusion:** Oct4 and Nanog gene perform a higher expression in pancreatic cancer stem cells than in Panc-1 cells.

**[Key words]** pancreatic cancer; cancer stem cell; Oct4; Nanog

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(11):1524-1528]

胰腺癌在癌症致死病因中排在第 4~5 位, 其 5 年生生存率不足 5%, 中位生存期仅 6 个月<sup>[1]</sup>。胰腺癌对传统治疗手段普遍耐受<sup>[2-3]</sup>, 很多研究发现, 在接受传统放疗化疗之后胰腺癌开始变得耐药, 使预后变差<sup>[4]</sup>。目前人们对胰腺癌的传统治疗无法改变这一现状, 而基于胰腺癌手术标本和细胞系的基因型和蛋白表达方面的研究<sup>[5]</sup>也未取得令人满意的结

果。研究者们希望通过胰腺癌干细胞的研究, 发现干细胞特有的标记物, 从而特异性地杀灭肿瘤干细胞。一系列的研究指向了可能存在并发挥关键作用的胰腺癌干细胞, 胰腺癌干细胞属于肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)<sup>[6]</sup>, 它们能自我更新和多向分化<sup>[7-8]</sup>, 并且还有强大的侵袭、转移和耐药的能力<sup>[9-12]</sup>。本研究利用细胞免疫荧光法探索干细胞相关基因 Oct4、Nanog 在胰腺癌干细胞中的表达。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

人胰腺癌细胞系 Panc-1(ATCC 来源, 上海中科院细胞库)。DMEN 高糖培养基、DMEM/F12 培养基

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81101615); 江苏省自然科学基金(BK2010276); 江苏省高校自然科学基金(11KJB320009)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: qianhaixin1@hotmail.com

(Hyclone 公司,美国);成纤维细胞生长因子(FGF)、表皮细胞生长因子(EGF,Prospec 公司,以色列);Faststart SYBR Green Master ROX (Roche 公司,瑞士);抗人 CD44-APC、CD24-PE、ESA-FITC 流式荧光抗体(BD 公司,美国);羊抗兔 FITC 二抗(Jackson 公司,美国);流式细胞分选仪(FACS Aria II, BD 公司,美国);Hoechst 及碘化丙啶(PI,Sigma/Aldrich 公司,美国);GoldenView 核酸染料(上海赛百盛公司)。兔抗人 Oct4、Nanog 一抗(Abcam 公司,英国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 人胰腺癌细胞的培养和胰腺癌干细胞的获得

将人胰腺癌细胞株 Panc-1 细胞接种于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基、青霉素( $1 \times 10^5$  U/L)和链霉素(100 mg/L)组成的培养基中,5%CO<sub>2</sub>,饱和湿度,恒温 37℃培养,达到对数生长期后,用 0.25%胰酶消化,完全培养基重悬,离心弃去上清后,PBS 液重悬细胞并计数。每  $1 \times 10^6$  个细胞分别加入 20 μl 抗人 CD24-PE、抗人 CD44-APC 和抗人 ESA-FITC 抗体,室温避光孵育 30 min,对照组不加抗体。应用流式细胞仪进行检测及分选。每次细胞分选后重复上机 1 次,保证分选后的干细胞纯度 > 95%。将分选得到 CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>双阳性细胞和 CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>ESA<sup>+</sup>三阳性细胞,分别种于无血清细胞培养基中(DMEM/F12 培养基+10 ng/ml 成纤维细胞生长因子+20 ng/ml 上皮生长因子+ITS+ $1 \times 10^5$  U/L 青霉素+100 mg/L 链霉素),培养在 5%CO<sub>2</sub>,饱和湿度,恒

温 37℃培养箱内。

### 1.2.2 细胞免疫荧光测 Oct4、Nanog 基因的表达

24 孔板用多聚赖氨酸预包被,将悬浮生长的细胞种在 24 孔板内,细胞贴壁爬片后吸去培养基,预温的 0.01 mol/L PBS 轻轻洗涤 3 次。4%多聚甲醛室温固定 30 min。0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,每次 10 min。加入封闭液,37℃,60 min,倾去封闭液后分别加 Oct4 和 Nanog 一抗(1:200),4℃过夜。设立不加一抗的空白对照。0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,每次 10 min。加入 Oct4 和 Nanog 二抗(1:50)室温 2 h 后加入 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,每次 10 min。0.5 μg/ml Hoechst 33342 室温标记 10 min。0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,每次 10 min。荧光封片液封片后观察,重复 3 次。

## 2 结果

### 2.1 胰腺癌细胞的培养和干细胞的获得

普通胰腺癌 Panc-1 细胞在含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基呈梭形,贴壁生长,增殖较快,约 2~3 d 传代(图 1)。分选出的 CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>细胞和 CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>ESA<sup>+</sup>细胞在含有生长因子的无血清培养基中均为悬浮,呈球状生长,增殖速度较慢。

以 CD24、CD44 为标记物,在人胰腺癌 Panc-1 细胞中分选 CSC,阳性的细胞比例在 1%~3%,以 CD24、CD44、ESA 为标记物,在人胰腺癌 Panc-1 细胞中分选 CSC,阳性细胞比例在 0.1%~0.8%。



A:Panc-1;B:CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>;C:CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>ESA<sup>+</sup>。

图 1 人胰腺癌细胞株 Panc-1 细胞、CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>细胞和 CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>ESA<sup>+</sup>细胞(×200)

Figure 1 Human PANC-1 cell and CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>,CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>ESA<sup>+</sup> phenotypes cells (×200)

### 2.2 细胞免疫荧光测 Oct4、Nanog 基因的表达

采用细胞免疫荧光法原位检测 Oct4 和 Nanog 蛋白在人胰腺癌细胞株 Panc-1 中的表达,分选后的 CD24<sup>+</sup>CD44<sup>de</sup> 细胞和 CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>ESA<sup>+</sup>细胞均较未分细胞 Oct4 和 Nanog 蛋白高表达,主要集中于细胞核(图 2,3)。

## 3 讨论

肿瘤干细胞的研究,是当今的科研热点。国内外学者相继报道,已从多种恶性肿瘤中分离出干细胞,而基于肿瘤干细胞理论的胰腺癌研究则刚刚处于起步阶段。在 2007 年 Li 等<sup>[13]</sup>首次成功的分离出了胰

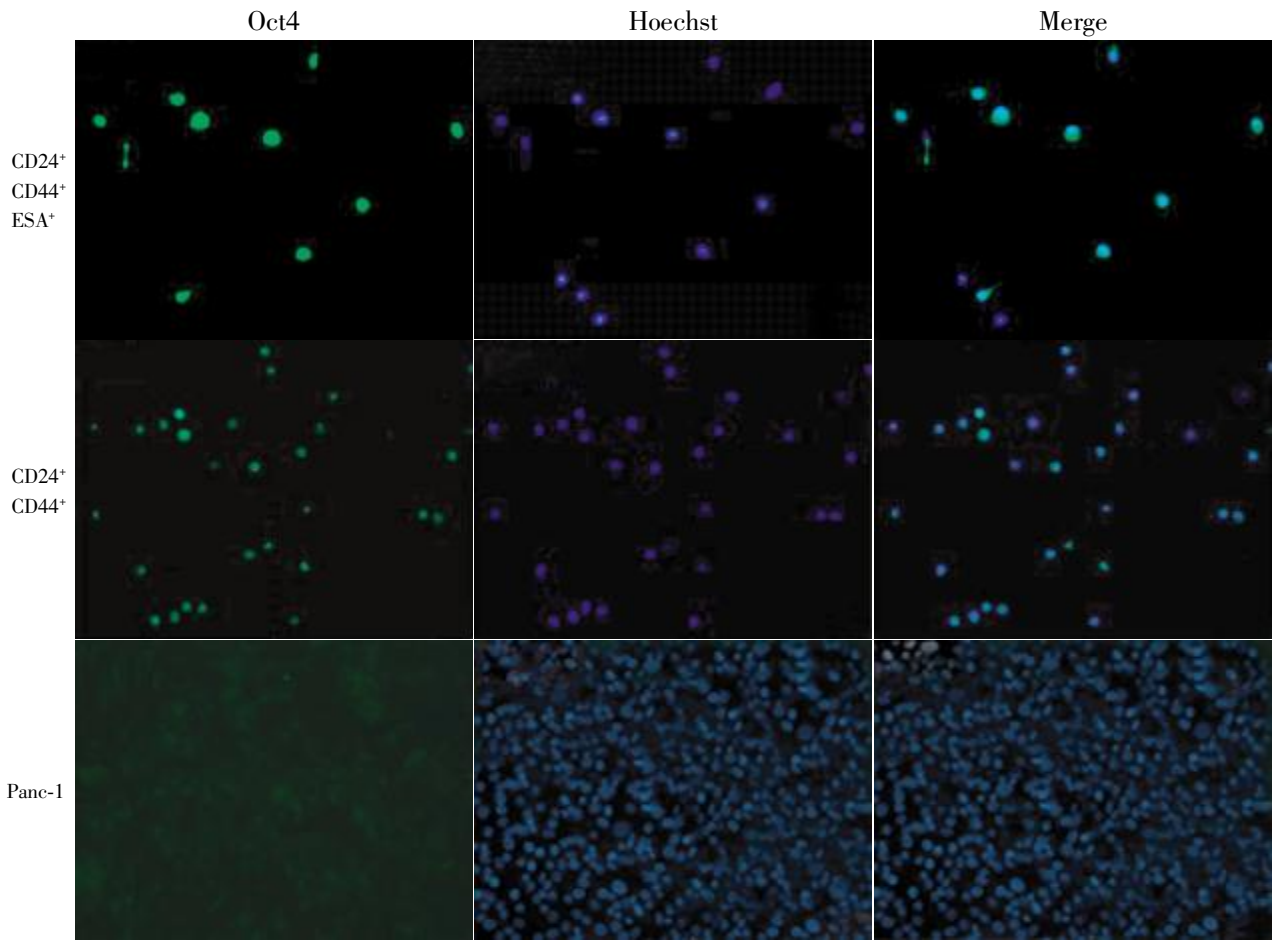


图2 Oct4在胰腺癌CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>ESA<sup>+</sup>细胞、CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>细胞与普通Panc-1细胞中的表达(×200)

Figure 2 Expression of Oct4 gene in CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>ESA<sup>+</sup> phenotypes cells, CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> phenotypes cells and human Panc-1 cells (×200)

腺癌CSC,他们发现以CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>ESA<sup>+</sup>为表面标记的胰腺癌细胞数量仅占胰腺癌细胞的0.2%~0.8%,但其形成转移瘤的效率是普通肿瘤细胞的100倍以上,只需要注入100个细胞就可以使NOD/SCID小鼠成瘤。2008年黄鹏等<sup>[14]</sup>以CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>为标记分选胰腺癌干细胞,并对肿瘤干细胞生物学行为方面的研究,证实了Li等的观点,认为以这种表面标记分选出的肿瘤干细胞具有缓慢生长,高致瘤能力的肿瘤干细胞特征。Oct4是参与调控胚胎干细胞自我更新和维持其全能性的最为重要的转录因子之一,它能够促使ICM形成、维持ESC未分化状态并促进其增殖<sup>[15]</sup>。因此,Oct4对于胚胎干细胞干性的建立是至关重要的。Nanog因子作为一种同源结构蛋白在多潜能ESC和胚胎生殖细胞中表达,当细胞发生分化时表达下调。Nanog蛋白质在细胞获得全能性的一系列复杂过程中发挥着非常关键的作用,协调着一系列基因和蛋白质在各自正确的位置上发挥作用,如果没有它,胚胎干细胞将不会发育,而诱导多功能肝细胞的过程中也会失败,因此Nanog被称为

胚胎具有发育成各种类型细胞能力的“总开关”<sup>[16]</sup>。

2008年国内学者直接以Oct4基因作为标记,通过流式细胞仪分选出肿瘤干细胞,然后通过RNA干扰的方法,沉默肿瘤干细胞中Oct4基因的表达,使肿瘤细胞凋亡,抑制了肿瘤生长<sup>[17]</sup>。

本研究通过流式细胞仪分选出CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>细胞和CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>ESA<sup>+</sup>细胞,于无血清培养基中呈干细胞球样生长,这与文献报道的CSC的干细胞样特征相符合,说明胰腺癌干细胞的确存在。通过细胞免疫荧光实验,本研究发现Oct4和Nanog在CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>ESA<sup>+</sup>细胞要高于CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>细胞中的表达,其在CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>细胞中较未分选细胞高表达。这种正相关趋势提示了:①CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>ESA<sup>+</sup>细胞较CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>细胞具有更强的干细胞特征;②Oct4和Nanog基因这2种胚胎干细胞干性相关基因,与胰腺癌干细胞存在重要联系。因此本文提出这样的猜想:①Oct4和Nanog基因的表达会使正常细胞逆分化为诱导多能干细胞,他们是否同样会使肿瘤细胞逆分化为肿瘤干细胞,或者他们是维持肿瘤干细胞

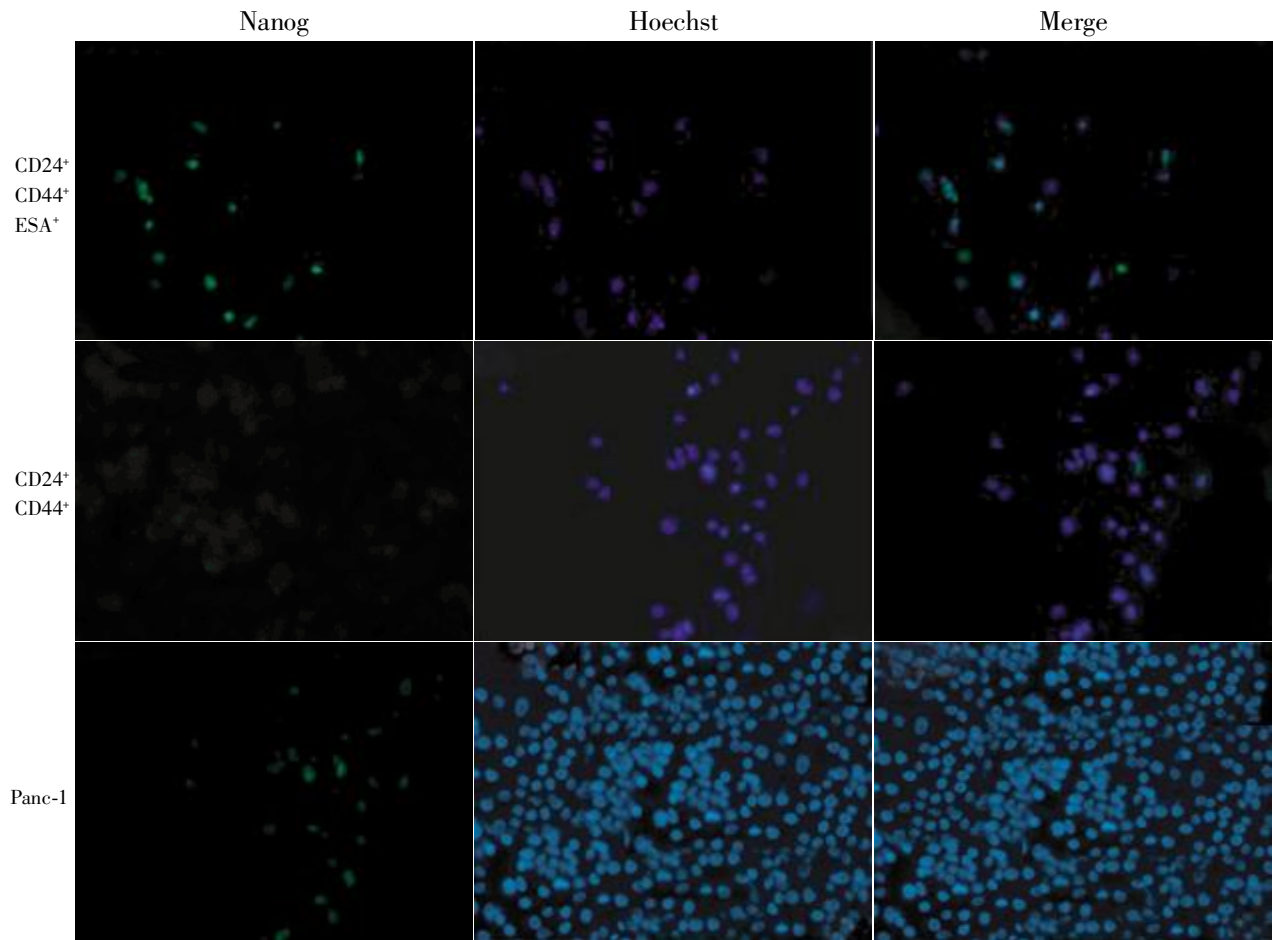


图 3 Nanog 在胰腺癌 CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>ESA<sup>+</sup>细胞、CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>细胞与普通 Panc-1 细胞中的表达 (×200)

Figure 3 Expression of Nanog gene in CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>ESA<sup>+</sup> phenotypes cells, CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> phenotypes cells and human Panc-1 cells (×200)

多向分化能力的关键因子,并进一步导致肿瘤的耐药、转移与复发,希望通过体内外实验,进一步观察 Oct4 和 Nanog 基因对胰腺 CSC 功能学方面的影响,认清其在肿瘤的起始、维持、转移和耐药方面的作用;②推测这 2 种基因在胰腺 CSC 中高表达,在细胞分化后表达消失,但是其在维持 CSC 多潜能性和自我更新能力的过程中,分别在什么时期,起到怎样的调控作用,这 2 种基因于胰腺癌 CSC 相关信号通路之间有什么联系,这需要在表观遗传学和信号通路方面的进一步研究。

胰腺癌干细胞的研究为胰腺癌临床治疗带来了新希望,杀灭肿瘤组织中的干细胞就能从根本上消除胰腺癌复发、耐药、转移等一系列问题,达到临床治愈。但是目前对肿瘤干细胞理论还存在很多问题,需要更深一步的研究。

#### [参考文献]

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71-96  
[2] Ho MM, Ng AV, Lam S, et al. Side population in human

lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells [J]. Cancer Res, 2007, 67 (10): 4827-4833  
[3] Ma S, Lee TK, Zheng BJ, 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  
[4] Ischenko I, Camaj P, Seeliger H, et al. Inhibition of Src tyrosine kinase reverts chemoresistance toward 5-fluorouracil in human pancreatic carcinoma cells; an involvement of epidermal growth factor receptor signaling [J]. Oncogene, 2008, 27(57): 7212-7222  
[5] Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, et al. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Genes Dev, 2006, 20(10): 1218-1249  
[6] Marotta LLC, Polyak K. Cancer stem cells: a model in the making [J]. Curr Opin Genet Dev, 2009, 19(1): 1-7  
[7] Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells [J]. Cancer Res, 2007, 67 (3): 1030-1037  
[8] Lee CJ, Dosch J, Simeone DM. Pancreatic cancer stem

- cells[J]. *J Clin Oncol*,2008,26(17):2806-2812
- [9] Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer [J]. *Cell Stem Cell*,2007,1(3):313-323
- [10] Yu Y, Ramena G, Elble RC, The role of cancer stem cells in relapse of solid tumors [J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2012,4:1528-1541
- [11] Grotenhuis BA, Wijnhoven BP, van Lanschot JJ. Cancer stem cells and their potential implications for the treatment of solid tumors[J]. *J Surg Oncol*,2012,106(2):209-215
- [12] Adams JM, Strasser A. Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? [J]*Cancer Res*, 2008,68(11):4018-4021
- [13] Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells [J]. *Cancer Res*,2007,67(3):1030-1037
- [14] 黄鹏,王春友,吴河水,等. 胰腺癌细胞株 PANC-1 中肿瘤干细胞生物学行为的研究 [J]. *中国普通外科杂志*,2008,17(9):865-869
- [15] Pardo M, Lang B, Yu L, et al. An expanded Oct4 interaction network: Implications for stem cell biology, development, and disease [J]. *Cell Stem Cell*,2010,6(4):382-395
- [16] Silva J, Nichols J, Theunissen TW, et al. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state [J]. *Cell*,2009,138(4):722-737
- [17] Hu T, Liu S, Breiter DR, et al. Octamer-4 small Interfering RNA result in cancer stem cell-like cell apoptosis[J]. *Cancer Res*,2008,68(16):6533-6540

[收稿日期] 2013-05-09

(上接第 1523 页)

- [7] Cowan CW, Shao YR, Sahin M, et al. Vav family GEF link activated Ephs to endocytosis and axon guidance[J]. *Neuron*,2005,46(2):205-217
- [8] Bush JO, Soriano P. Eph/ephrin signaling: genetic, phosphoproteomic, and transcriptomic approaches [J]. *Semin Cell Dev Biol*,2012,23(1):26-34
- [9] Kamitori K, Tanaka M, Okuno-Hirasawa T, et al. Receptor related to tyrosine kinase RYK regulates cell migration during cortical development [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2005,330(2):446-453
- [10] Akaneya Y, Sohya K, Kitamura A, et al. Ephrin-A5 and EphA5 interaction induces synaptogenesis during early hippocampal development [J]. *PLoS ONE*,2010,5(8):e12486
- [11] Cooper MA, Crockett DP, Nowakowski RS, et al. Distribution of EphA5 receptor protein in the developing and adult mouse nervous system [J]. *J Comp Neurol*, 2009,514(4):310-328
- [12] Abdual-Aziz NM, Turmaine M, Greene ND. EphrinA-EphA receptor interactions in mouse spinal neurulation: implications for neural fold fusion [J]. *Int J Dev Biol*,2009,53(4):559-568
- [13] Momeni HR, Jarahzadeh M. Effects of a voltage sensitive calcium channel blocker and a sodium-calcium exchanger inhibitor on apoptosis of motor neurons in adult spinal cord slices[J]. *Cell J*,2012,14(3):171-176
- [14] Song J, Lee JH, Lee SH, et al. TRPV1 activation in primary cortical neurons induces calcium-dependent programmed cell death[J]. *Exp Neurobiol*,2013,22(1):51-57
- [15] Bi C, Yue X, Zhou R, et al. EphA activation overrides the presynaptic actions of BDNF [J]. *J Neurophysiol*,2011,105(5):2364-2374
- [16] Aoto J, Chen L. Bidirectional ephrin/Eph signaling in synaptic functions[J]. *Brain Res*,2007,1184(1):72-80

[收稿日期] 2013-04-29