

抑制 NANOG 表达对人食管鳞癌 Eca-109 干细胞增殖的影响

邓丽 向小聪 张若兰 刘康 冯刚

【摘要】 目的 采用 NANOG 短发夹 RNA (shRNA) 转染 CD133+Eca-109 食管鳞癌肿瘤干细胞, 观察细胞增殖能力的变化, 及 NANOG 对食管鳞癌干细胞的基因治疗效果。方法 采用无血清培养基悬浮培养法分离食管鳞癌干细胞并通过 RT-PCR 和 Western-Blot 法检测分选效果。采用针对 NANOG 不同 mRNA 序列的两个 shRNA 分别转染食管鳞癌干细胞设为 sh-N1 组和 sh-N2 组, 同时将转染不针对任何 mRNA 序列的质粒设为对照 NC 组。采用 RT-PCR 和 Western-Blot 法检测细胞 NANOG 表达水平。采用 CCK-8 法检测细胞增殖能力。采用活死细胞染色检测细胞存活情况。采用无血清培养基悬浮培养并通过计数检测细胞成球能力。NANOG 表达水平、CCK-8 实验测得数据的比较采用单因素方差分析。结果 RT-PCR 结果显示, 正常培养的 Eca-109 食管鳞癌细胞 CD133、CD44 的表达水平 1.03 ± 0.02 , 1.02 ± 0.02 明显低于悬浮培养分离后肿瘤干细胞球中的表达 10.12 ± 0.19 , 9.21 ± 0.26 , ($t = -79.952$, -57.919 ; P 均 < 0.01)。Western-Blot 方法检测所得 CD133、CD44 表达结果与 RT-PCR 一致。shRNA 转染食管鳞癌干细胞后, CCK-8 实验结果显示, sh-N1 组和 sh-N2 组细胞于 24、48、96 h 测得的 A 值分别为 $(0.33 \pm 0.02, 0.52 \pm 0.04, 0.61 \pm 0.04, 0.81 \pm 0.03)$, $(0.33 \pm 0.02, 0.45 \pm 0.04, 0.53 \pm 0.04, 0.72 \pm 0.07)$, 较对照 NC 组 $(0.9 \pm 0.01, 1.41 \pm 0.01, 2.31 \pm 0.02, 3.12 \pm 0.07)$ 下调 ($F = 1121.33, 525.73, 1022.16, 1198.29$; P 均 < 0.01), 但并未出现细胞凋亡; 在无血清培养条件下, 细胞球计数结果显示, sh-N1 组和 sh-N2 组 $(12 \pm 1, 16 \pm 2)$ 细胞形成肿瘤干细胞球的能力较 NC 组 (80 ± 3) 降低 ($P < 0.01$)。结论 NANOG 敲低对食管鳞癌干细胞的增殖具有明显的抑制效果, 有望成为针对食管鳞癌的有效靶向性治疗手段。

【关键词】 食管癌; 肿瘤干细胞; NANOG; CD133

Influence of NANOG on the vitro proliferation of esophageal squamous cancer stem cells Deng Li, Xiang Xiaocong, Zhang Ruolan, Liu Kang, Feng Gang. Institute of Tissue Engineering and Stem Cells, the Second Clinical Medical College of North Sichuan Medical College, Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, China

Corresponding author: Feng Gang, Email: fenggangncch@163.com

【Abstract】 Objective NANOG-shRNA was transfected into CD133⁺ Eca-109 cells to observe the changes of proliferation, and the effect of NANOG as gene therapy of esophageal cancer stem cells was evaluated. **Methods** CD133⁺ Eca-109 cancer stem cells were sorted using serum-free suspension culture, and cell purity was evaluated using RT-PCR and Western blotting methods. shRNA were transfected into CD133⁺ Eca-109 in targeted different sequence in NANOG (sh-N1 group or sh-N2 group). The blank control group (NC) was not targeted any sequence. The expression levels of NANOG were evaluated by RT-PCR and Western blotting methods. The cell proliferation was evaluated by CCK-8 method. The cell surviving was detected by Calcein-AM and PI staining. The capacity of tumor spheres formation was evaluated by serum-free suspension culture. **Results** The CD133 expression level of Eca-109 was significantly lower than the Eca-109 tumor spheres, and the

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2017.06.006

基金项目: 四川省教育厅自然科学重点科研项目(16ZA0235); 四川省卫生和计划生育委员会普及应用科研项目(17PJ503); 南充市科技局应用技术与开发项目(16YFZJ0031); 川北医学院校级重点项目(CBY15-A-ZD06)

作者单位: 637000 南充市中心医院 川北医学院第二临床医学院组织工程与干细胞研究所

通信作者: 冯刚, Email: fenggangncch@163.com

difference was statistically significant ($10.12 \pm 0.19, 9.21 \pm 0.26, t = -79.952, -57.919; P < 0.01$). The results of Western blotting were in accordance with those of RT-PCR. After NANOG shRNA being transfected into Eca-109, CCK-8 assay showed that the A values of sh-N1 and sh-N2 groups ($0.33 \pm 0.02, 0.52 \pm 0.04, 0.61 \pm 0.04, 0.81 \pm 0.03$), ($0.33 \pm 0.02, 0.45 \pm 0.04, 0.53 \pm 0.04, 0.72 \pm 0.07$), lower than those in the NC group ($0.9 \pm 0.01, 1.41 \pm 0.01, 2.31 \pm 0.02, 3.12 \pm 0.07$), and the difference was statistically significant ($F = 1121.33, 525.73, 1022.16, 1198.29; P < 0.01$), but the cells were not dead. Serum-free suspension culture assay showed that the capacity of tumor spheres formation in sh-N1 and sh-N2 groups ($12 \pm 1, 16 \pm 2$), lower than those in the NC group (80 ± 3), and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Knockdown of NANOG has obviously inhibitory effect on the proliferation of CD133⁺ Eca-109 esophageal squamous carcinoma stem cells, and is expected to be an effective targeted therapy for esophageal cancer.

【Key words】 Esophageal carcinoma; Cancer stem cells; NANOG; CD133

我国是食管癌的高发区,年平均死亡人数约15万,占全国肿瘤死亡率21.8%^[1],由于细胞侵袭、转移及耐药的产生使目前该病的主要治疗方法,即联合性的综合治疗,疗效不甚乐观,食管癌的死亡率处于很高的水平^[2-4]。因此,探寻食管癌的发生机制、寻找其早期肿瘤标志物对于提高该病的早期诊断及治疗具有重要意义。肿瘤干细胞作为肿瘤细胞群体中数量极少且特殊的一部分细胞,它们有完成细胞自我更新及分化、成瘤性强和抗凋亡等特性,在肿瘤的发生、侵袭及转移中发挥重要作用^[5]。肿瘤干细胞对临床上常用的放化疗极为敏感且耐受性强,因此它们是引起肿瘤复发及耐药性形成的重要原因之一,也是导致治疗最终失败的重要因素,因而如果能提出针对食管癌干细胞的基因治疗手段,就有望实现对食管癌的控制。

胚胎干细胞转录调控因子 OCT3/4、SOX2 以及 NANOG 等是维持干细胞自我更新、调控细胞分化的关键因素^[6]。大量的实验数据表明,转录因子 NANOG 在乳腺癌等多种肿瘤干细胞中高表达,同时各功能性实验也证明了在多种肿瘤组织中 NANOG 的异常表达与肿瘤浸润、侵袭及转移密切相关^[7-8],但截至目前为止,它与食管癌干细胞自我更新的关系还未见详细报道。因此,本研究拟通过悬浮培养法分离培养食管癌干细胞,并通过基因沉默技术研究 NANOG 的表达与食管癌干细胞增殖间的关系。

材料与方法

一、材料

NANOG1、2、NC-shRNA 购自上海吉凯基因化学技术有限公司, NANOG、GAPDH、CD133 等引物均由成都豪乙生物科技有限公司合成,免疫印迹蛋白实验(Western-Blot)中相关试剂均购自美国

Thermo 公司,嘌呤霉素、Lipofectamine 2000、RNA 提取试剂 Trizol、M-MLV 逆转录试剂、qPCR Mix 均购自美国 Invitrogen 公司,活死细胞染色试剂购自美国 AAT Bioquest 公司,细胞因子 β -FGF、EGF 购自美国 PeproTech 公司, DMEM/F12、细胞生长添加成分 B27 购自美国 Gibco 公司,胎牛血清、高糖 DMEM 培养基、100X 双抗添加剂、0.25% 胰蛋白酶均购自美国 HyClone 公司, NANOG、GAPDH 抗体购自美国 SANTA CRUZ 公司, CD133 抗体购自英国 Abcam 公司,人食管鳞癌细胞系 Eca-109 为川北医学院基础医学实验中心冻存。

二、方法

1. 悬浮培养法分离食管鳞癌干细胞并检测:复苏培养 Eca-109 食管鳞癌细胞,以含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基常规培养。待细胞处于对数生长期,将其消化传代并以无血清培养基(serum-free medium, SFM)重悬, $1 \times 10^5/\text{ml}$ 密度接种于低黏附性 10 cm 培养板中,待食管鳞癌肿瘤干细胞增殖形成肿瘤干细胞球,6~8 d 后,将其收集并机械吹打成单细胞悬液,重悬于 SFM,按 1:5 比例传代于 10 cm 培养板中,继续培养、进一步纯化形成食管鳞癌肿瘤干细胞球。SFM 培养基成分:DMEM/F12 为基础培养基,添加 B27 (1:50)、EGF (20 ng/ml)、 β -FGF (20 ng/ml) 生长因子。

分别提取成球前后细胞总 RNA (逆转录合成 cDNA) 和蛋白,进行 RT-PCR 和 Western-Blot 检测细胞中肿瘤干细胞标志物 CD133、CD44 分子及蛋白水平的表达。mRNA 表达量,实验结果以 GAPDH 作为内参照,实验测得数据用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析法进行分析计算。CD133 上游引物序列:5'-ACAA TTCACCAGCAACGAGTCC-3'; CD133 下游引物序列:5'-GACGCTTTGGTATAGAGTGCTCAG-3'; CD44 上游引物序列:5'-AGACAACCACAAGGA TGACTGATG-3'; CD44 下游引物序列:5'-TCCAG

TTCCTTCATAAGCAGTGG-3'; GAPDH 上游引物: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'; GAPDH 下游引物: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'。Western-Blot 法检测蛋白表达: 提取总蛋白并进行蛋白定量。聚丙烯酰胺凝胶电泳法进行蛋白分离。PVDF 膜电转移后, 封闭 45 min, 加入 CD133、CD44 和 GAPDH 一抗抗体, 4 °C 过夜后洗涤, 加辣根过氧化物酶标记的二抗抗体。增强化学发光显色, 胶片曝光检查蛋白表达水平, 以 GAPDH 作为内参照。每组实验重复 3 次。

2. 细胞转染和分组培养: 悬浮培养得到的食管鳞癌干细胞分为如下 3 组, 按照说明书要求, 以脂质体 2000 作为基因载体进行转染: (1) 无靶向 mRNA 的对照(NC) 组; (2) 靶向沉默 NANOG 的 1 号质粒(sh-N1) 组; (3) 靶向沉默 NANOG 的 2 号质粒(sh-N2) 组。Sh-N1 靶向序列: 5'-TAAACTAC TCCATGAACAT-3'; sh-N2 靶向序列: 5'-TGGAACA GTCCCTTCTATA-3'。各组转染后, 培养 24 h 后用含 2.5 μg/ml 嘌呤霉素的筛选培养基培养 48 ~ 72 h 用于后续实验。

3. NANOG 基因沉默及 CD133、CD44 表达检测: 提取方法 2 中转染并筛选培养后细胞的总 RNA (逆转录合成 cDNA) 和蛋白, 进行 RT-PCR 和 Western-Blot 检测 NANOG 的表达是否被有效敲低。并进一步检测肿瘤干细胞标志物 CD133、CD44 的表达变化。实验结果以 GAPDH 作为内参照, 实验测得数据用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析法进行分析计算。NANOG 上游引物: 5'-ACCTATGCCTGTGATTTGTGG-3'; 下游引物: 5'-AGTGGTTGTTTGCCTTTGG-3'。Western-Blot 方法同 1, 一抗抗体分别为 NANOG 和 CD133。

4. 细胞增殖能力检测: 取方法 2 中各组转染并筛选后的细胞, 各实验组以 2×10^4 个细胞 / 孔重悬于 200 μl 培养基中, 接种于 96 孔板。分组继续培养 24, 48, 72 和 96 h 后分别加入 CCK-8 溶液, 继续培养 4 h 后, 酶标仪测量 450 nm 波长的各孔吸光度 (A) 值。所有实验重复 3 次。

5. 活死细胞染色: 取方法 2 中各组转染并筛选后的细胞以及 75% 酒精(EtOH) 孵育 30 min 的凋亡对照组细胞, 消化、重悬将细胞接种于六孔板中, 培养 24 h 后, 弃培养基, 用 PBS 洗涤细胞 3 ~ 5 次, 配置终浓度为 1 μmol/L 和 2 μmol/L 的 Calcein-AM 和 PI 染色液, 500 μl 染色液 / 孔加入细胞中, 置于 37 °C 培养箱孵育 15 min, 显微镜下观察并拍照记录。

6. 肿瘤干细胞球形成能力检测: 取方法 2 中各组转染并筛选后的细胞, 将其消化传代并重悬于 SFM, 同方法 1 中步骤进行肿瘤干细胞成球培养。拍照并对形成的细胞球计数, 整理数据比较 NANOG 表达水平的高低与食管鳞癌肿瘤干细胞成球间的关系。

三、统计学分析方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件进行数据分析。RT-PCR 表达水平、CCK-8 实验测得 A 值、肿瘤干细胞球形成数量实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析和 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

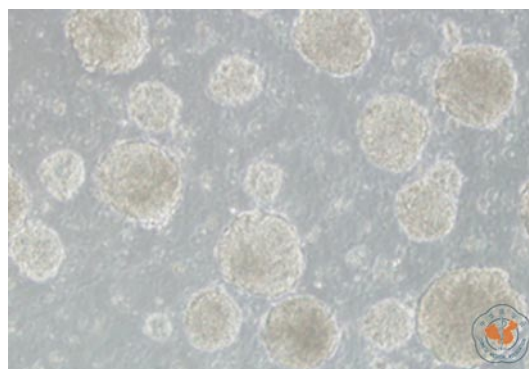
一、悬浮培养法富集 Eca-109 肿瘤干细胞球

以无血清的 DMEM/F12 作为基础培养基, 添加 EGF、β-FGF、B27 生长因子, 并辅以低黏细胞培养板降低食管鳞癌细胞的贴壁性。利用该条件从 Eca-109 食管鳞癌细胞系中成功获得悬浮生长的肿瘤干细胞球, 并可以连续传代, 如图 1。RT-PCR 实验结果显示, 与未分离的贴壁细胞相比 (1.03 ± 0.02 , 1.02 ± 0.02), Eca-109 干细胞球的肿瘤干细胞标志物 CD133、CD44 表达明显增强 (10.12 ± 0.19 , 9.21 ± 0.26), 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。Western-Blot 实验与 RT-PCR 结果一致。结果如表 1、图 2。

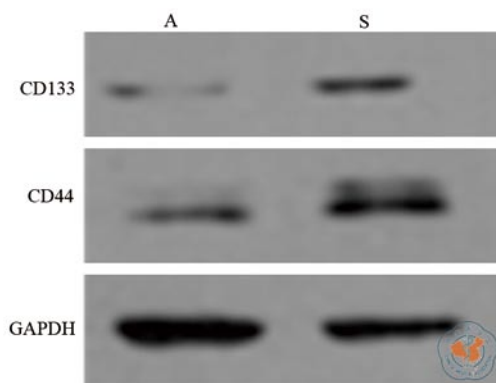
表 1 两组 Eca-109 细胞 CD133、CD44 表达量 ($\bar{x} \pm s$)

分组	CD133	CD44
贴壁组	1.03 ± 0.02	1.02 ± 0.02
悬浮组	10.12 ± 0.19	9.21 ± 0.26
t 值	-79.952	-57.919
P 值	< 0.01	< 0.01

注: 实验重复 3 次



注: Eca-109 食管鳞癌细胞系在无血清悬浮培养条件下培养, 具有肿瘤干细胞特性的细胞悬浮生长, 培养 12 ~ 18 d 后自我更新形成肿瘤干细胞球
图 1 光学显微镜下观察悬浮培养法获得的 Eca-109 肿瘤干细胞球 ($\times 100$)



注: A 为未分离贴壁生长的 Eca-109 细胞, S 为悬浮培养富集的 Eca-109 干细胞球。如图所示, 富集后的 Eca-109 干细胞球中肿瘤标志物 CD133、CD44 表达水平明显高于富集前的 Eca-109 细胞

图 2 Western Blot 检测 Eca-109 干细胞分离前后 CD133、CD44 蛋白表达水平

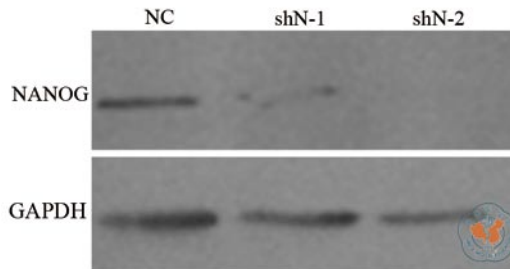
二、三组食管鳞癌肿瘤干细胞中 NANOG 表达水平比较

RT-PCR 实验检测发现, NANOG 沉默质粒转染组(sh-N1、sh-N2) 食管鳞癌肿瘤干细胞中 NANOG 的相对表达水平($0.18 \pm 0.01, 0.23 \pm 0.01$) 较对照(NC) 组(1.03 ± 0.02) 下调, 即 NANOG shRNA 有效沉默其 mRNA 表达, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。Western-Blot 检测与 RT-PCR 结果一致, NANOG shRNA 有效沉默了 NANOG 蛋白水平的表达, 如图 3 所示。

三、NANOG 敲低抑制食管鳞癌肿瘤干细胞增殖

CCK-8 实验结果发现, sh-N1、sh-N2 组 Eca-109 干细胞于 24、48、72、96 h 测得的 A 值分别为($0.33 \pm 0.02, 0.52 \pm 0.04, 0.61 \pm 0.06, 0.81 \pm 0.03$), ($0.33 \pm 0.02, 0.45 \pm 0.04, 0.53 \pm 0.04, 0.72 \pm 0.07$), 增殖能力低于 NC 组($0.90 \pm 0.01, 1.41 \pm 0.01, 2.31 \pm 0.02, 3.12 \pm 0.07$), 差异具有统计学意义($P < 0.01$, 表 2)。同时, 以酒精处理为阳性对照组的活死细胞染色实验结果表明, NANOG 敲低并未引起细胞凋亡, 如图 4 所示。结果提示: NANOG 敲低使 Eca-109 肿瘤干细胞增殖能力明显降低。

四、NANOG 敲低抑制食管鳞癌细胞干细胞球



注: sh-N1、sh-N2 为靶向敲低 NANOG 不同序列的实验组, NC 为不靶向任何序列的对照组。结果表明, NANOG shRNA 有效敲低了细胞中 NANOG 的表达

图 3 Western Blot 检测 NANOG shRNA 转染 Eca-109 干细胞后 NANOG 的蛋白表达水平

形成能力

对 Eca-109 肿瘤干细胞进行 NANOG 敲低操作后, 在悬浮培养的条件下, sh-N1、sh-N2 组富集肿瘤干细胞、形成肿瘤干细胞球的能力($12 \pm 1, 16 \pm 2$) 低于对照 NC 组(80 ± 3), 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

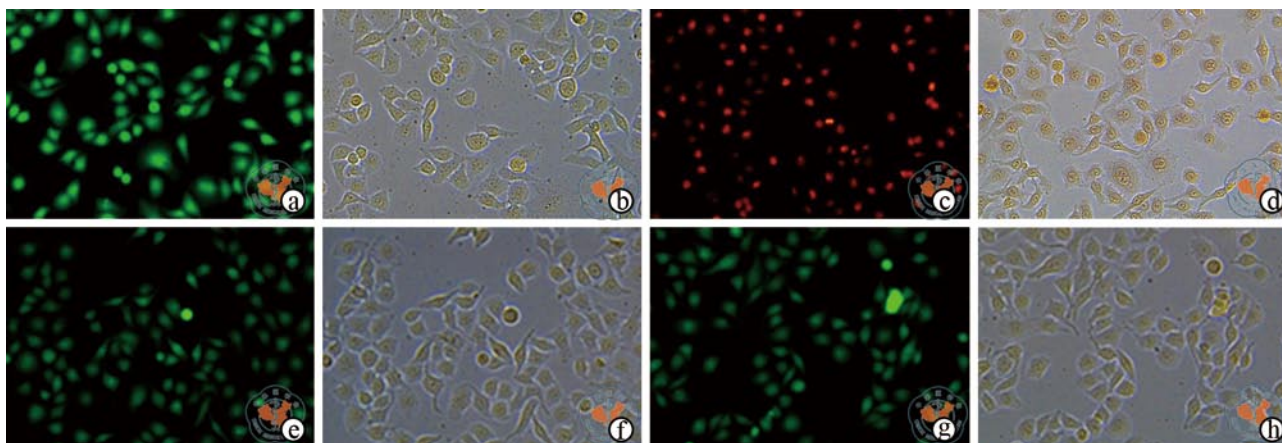
讨 论

食管癌在世界范围内是常见性的恶性肿瘤, 并且仍在持续蔓延。据统计, 其 5 年生存率仅 20% 左右, 中国年发患者数占全球总发病的 60%^[9-10]。目前, 临床上治疗食管癌以根治性手术、放疗、化疗以及中医药治疗为主要治疗手段, 并已取得了一定的治疗效果, 然而化疗后细胞耐药性出现, 并进一步导致肿瘤复发等现象极为常见, 这与肿瘤干细胞的存在密切相关。越来越多的研究在乳腺癌、前列腺癌、脑神经瘤等恶性肿瘤中分离得到肿瘤干细胞, 并证实它们参与了肿瘤的发生、发展^[11-13]。随着对肿瘤干细胞认识的深入, 针对肿瘤干细胞进行治疗以抑制肿瘤复发、转移的治疗模式越来越受到重视。目前, 对肿瘤干细胞的鉴定多依赖其表面标志物, CD133、CD44 是两种被广泛认可的人肿瘤干细胞标志物^[14-16]。本研究采用悬浮培养的方法分离 Eca-109 食管鳞癌干细胞, 经过流式细胞术测定, 培

表 2 三组 Eca-109 干细胞 CCK-8 实验测得的(A) 值比较($\bar{x} \pm s$)

分组	24 h	48 h	72 h	96 h
NC 组	0.90 ± 0.01	1.41 ± 0.01	2.31 ± 0.02	3.12 ± 0.07
sh-N1 组	0.33 ± 0.02	0.52 ± 0.04	0.61 ± 0.04	0.81 ± 0.03
sh-N2 组	0.33 ± 0.02	0.45 ± 0.04	0.53 ± 0.04	0.72 ± 0.07
F 值	1121.33	525.73	1022.16	1198.29
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

注: 实验重复 3 次



注: a 图为转染对照 NC 组未发生凋亡, 染色显示为绿色荧光 - 活细胞; c 图为 EtOH 处理组, 细胞发生凋亡, 染色显示为红色荧光 - 凋亡细胞; e、g 分别为 sh-N1、sh-N2 组存活状态细胞荧光图, 未发生凋亡, 染色显示为绿色荧光 - 活细胞。b、d、f、h 分别为图 a、c、e、g 对应明场中细胞表型图。绿色荧光为 Calcein-AM 阳性代表活细胞, 红色荧光为 PI 阳性代表死细胞, 白光为样品对应的细胞表型图片, 以 EtOH 为凋亡阳性对照组为参照, NANOG 敲低未导致细胞凋亡(NC、sh-N1、sh-N2 组为绿色荧光活细胞)

图 4 荧光显微镜下观察 NANOG 敲低后细胞存活及凋亡情况(Calcein-AM/PI 活死细胞染色, $\times 100$)

养所形成的肿瘤干细胞球 CD44、CD133 的阳性率高达 85.2% 和 91%, 表明该方法高效地分离出食管鳞癌干细胞。

NANOG 是维持胚胎干细胞自我更新最为灵敏的转录调控因子之一, 被视为胚胎干细胞重要的“看门人”, 其表达量一旦下调就会导致细胞分化^[17-19]。肿瘤细胞, 尤其是低分化肿瘤细胞, 与干细胞相似, 具有自我更新和分化增殖的能力, 在多种恶性肿瘤的研究中均发现 NANOG 参与肿瘤干细胞调控, 并在肿瘤的侵袭、迁移及耐药中发挥重要作用^[19]。研究者发现 NANOG 在食管癌等多种恶性肿瘤细胞中高表达, 同样, 在食管鳞癌中也分离出得到肿瘤干细胞^{[8][20]}, 但 NANOG 在食管鳞癌干细胞中的作用尚不明确。本研究利用 RNA 干扰技术, 将 NANOG 作为靶点对食管鳞癌干细胞的功能进行干预。

本研究采用 NANOG 短发夹 RNA (shRNA) 转染 Eca-109 食管鳞癌干细胞, 以探究它对食管鳞癌干细胞增殖的影响。笔者首先通过 RT-PCR 和 Western-Blot 实验检测转染后各组细胞中 NANOG 的 mRNA 及蛋白表达水平, 发现与对照 (NC 组) 相比, 所采用的 NANOG shRNA 有效的降低了细胞中 NANOG 的表达水平。基于此, 本研究进一步采用 CCK-8 实验检测食管鳞癌干细胞增殖能力, 同时采用悬浮培养方法检测细胞成球能力。实验结果表明, 与对照 (NC 组) 相比, 转染 NANOG shRNA 后的食管鳞癌干细胞增殖和成球能力明显减弱。既往研究也表明, NANOG 在胶质细胞瘤等多种恶性肿瘤中高表达, 并在肿瘤的发生、发展过程

中发挥重要的积极作用^{[8][21-22]}。

综上所述, 敲低 NANOG 对 Eca-109 食管鳞癌干细胞的增殖具有明显的抑制效果, 有望成为针对食管鳞癌的有效靶向性治疗靶点, 提高食管鳞癌基因治疗效果。

参 考 文 献

- 1 Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
- 2 Xu M, Huang H, Xiong Y, et al. Combined chemotherapy plus endostar with sequential stereotactic radiotherapy as salvage treatment for recurrent esophageal cancer with severe dyspnea: A case report and review of the literature[J]. Oncol Lett, 2014, 8(1):291-294.
- 3 孙志强, 于静萍, 张志明, 等. 重组人血管内皮抑素对食管癌细胞的放射增敏作用及其机制[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2013, 33(4):346-350.
- 4 Zhang X, Komaki R, Wang L, et al. Treatment of radioresistant stem-like esophageal cancer cells by an apoptotic gene-armed, telomerase-specific oncolytic adenovirus[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(9):2813-2823.
- 5 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(7):3983-3988.
- 6 Rajasekhar VK, Vemuri MC. Regulatory Networks in Stem Cells[M]. Humana Press, America, 2009.
- 7 Amini S, Fathi F, Mobalegi J, et al. The expressions of stem cell markers: Oct4, Nanog, Sox2, nucleostemin, Bmi, Zfx, Tcl1, Tbx3, Dppa4, and Esrrb in bladder, colon, and prostate cancer, and certain cancer cell lines[J]. Anat Cell Biol, 2014, 47(1):1-11.
- 8 Jeter CR, Badaux 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.
- 9 Napier KJ, Scheerer M, Misra S. Esophageal cancer: A Review of epidemiology, pathogenesis, staging workup and treatment modalities[J]. World J Gastrointest Oncol, 2014, 6(5):112-120.

- 10 冯飞跃, 郑健, 姜岚, 等. MKK4基因启动子区-1304T > G 多态与食管癌易感性研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012 (2):88-91.
- 11 Chen R, Xiao W, Li D, et al. Combination of simvastatin and imatinib sensitizes the CD34⁺ cells in K562 to cell death[J]. Med Oncol, 2011, 28(2):528-531.
- 12 Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. Neurosurgery, 2003, 53(2):487-488.
- 13 Gu GY, Yuan JL, Wils M, et al. Prostate cancer cells with stem cell characteristics reconstitute the original human tumor *in vivo*[J]. Cancer Res, 2007, 67(10):4807-4815.
- 14 Mccord AM, Jamal M, Williams ES, et al. CD133⁺ glioblastoma stem-like cells are radiosensitive with a defective DNA damage response compared with established cell lines[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(16):5145-5153.
- 15 López J, Poitevin A, Mendoza-Martínez V, et al. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance[J]. BMC Cancer, 2012, 12:48.
- 16 Filipovic A, Stebbing J, Giamas G. Cancer stem cells:therapeutic targeting or therapy?[J]. Lancet Oncol, 2013, 14(7):579-580.
- 17 Yasuda SY, Tsuneyoshi N, Sumi T, et al. NANOG maintains self-renewal of Primate ES cells in the absence of a feeder layer[J]. Genes Cells, 2006, 11(9):1115-1123.
- 18 Bourguignon LY, Peyrollier K, Xia W, et al. Hyaluronan-CD44 interaction activates stem cell marker Nanog, Stat-3-mediated MDR1 gene expression, and ankyrin-regulated multidrug efflux in breast and ovarian tumor cells[J]. J Biol Chem, 2008, 283(25):17635-17651.
- 19 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.
- 20 Zhang G, Ma L, Xie YK, et al. Esophageal cancer tumorspheres involve cancer stem-like populations with elevated aldehyde dehydrogenase enzymatic activity[J]. Mol Med Rep, 2012, 6(3):519-524.
- 21 Zbinden M, Duquet A, Lorente-Trigos A, et al. NANOG regulates glioma stem cells and is essential *in vivo* acting in a cross-functional network with GLI1 and p53[J]. EMBO J, 2010, 29(15):2659-2674.
- 22 Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors[J]. Nat Genet, 2008, 40(5):499-507.

(收稿日期: 2017-03-29)

(本文编辑: 李少婷)

邓丽, 向小聪, 张若兰, 等. 抑制 NANOG 表达对人食管鳞癌 Eca-109 干细胞增殖的影响 [J/CD]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2017, 7 (6): 345-350.

CHINESE MEDICAL ASSOCIATION
1915
中 华 医 学 会