

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520091152980

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

转录因子 Oct4 及 Nanog 在人乳腺癌干细胞
中的表达及意义

The expression and significance of transcription factors

Oct4 and Nanog in human breast cancer stem cells

罗维远

指导教师姓名: 罗 琪 教 授

专 业 名 称: 外 科 学

论文提交日期: 2012 年 5 月

论文答辩时间: 2012 年 5 月

学位授予日期: 2012 年 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(罗琪)课题(组)的研究成果,获得(抗癌研究中心)课题(组)经费或实验室的资助,在(颜江华)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名): 罗维远

2012 年 5 月 20 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）： 罗维远

2012 年 5 月 20 日

摘要

肿瘤干细胞理论认为肿瘤是由肿瘤干细胞异常增殖、分化而形成，常规化疗仅能消灭增殖期的非致瘤性肿瘤细胞，使肿瘤缩小甚至消失，然而，肿瘤干细胞和普通干细胞一样，对放化疗等方法具有较高的抵抗能力，当治疗停止后，肿瘤干细胞可再次增殖形成肿瘤。干细胞转录因子 Oct4 及 Nanog 参与胚胎干细胞和原始生殖细胞的自我更新，是维持细胞全能性所必须的转录因子，在分化或成熟的组织中其表达水平降低或消失。近来发现 Oct4 及 Nanog 在肿瘤组织中也有表达，且表达水平与肿瘤的恶性程度相关。这与肿瘤中存在肿瘤干细胞的理论相一致，其在肿瘤干细胞中的作用有待研究。目前已证实乳腺癌中存在乳腺癌干细胞，并且乳腺癌干细胞在乳腺癌的发生、发展中起着关键作用。本实验利用 RNA 干扰的方法研究转录因子 Oct4 及 Nanog 在乳腺癌干细胞中的作用。

我们首先通过无血清培养法从乳腺癌 MDAMB231 细胞中分离出乳腺癌干细胞。通过研究乳腺癌干细胞表面标志、抗化疗药紫杉醇的能力及在小鼠体内的致瘤能力，对其干细胞特性进行鉴定。其次，通过 Real-time PCR 及 Western Blot 等方法检测其 Oct4 及 Nanog 的表达情况。随后，我们利用 siRNA 分别下调乳腺癌干细胞中 Oct4 及 Nanog 的表达，并通过 Real-Time PCR 及 Western Blot 等方法检测干扰效果，探讨 Oct4 与 Nanog 在乳腺癌干细胞中的相互作用，并利用 CellTiter-Blue Cell Viability Assay 检测干扰后对乳腺癌干细胞抗化疗药紫杉醇能力的影响。

通过上述研究，我们发现在无血清培养基中存活下来的 MDAMB231 细胞比普通 MDAMB231 细胞具有较强的致瘤能力及抗化疗药紫杉醇的能力，具有乳腺癌干细胞的特性，下调乳腺癌干细胞中 Oct4 的表达会降低其 Nanog 的表达水平，同样，下调乳腺癌干细胞中 Nanog 的表达也会减少其 Oct4 的表达水平，Oct4 及 Nanog 的表达量减少均会导致乳腺癌干细胞的抗化疗药能力下降。本研究表明，转录因子 Oct4 及 Nanog 在乳腺癌干细胞中发挥作用，其表达水平影响乳腺癌干细胞对化疗药紫杉醇的耐药性。

关键词：转录因子；乳腺肿瘤；肿瘤干细胞

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

According to the tumor stem cells hypothesis, tumors originate in the proliferation and differentiation of tumorstem cells. Conventional radiotherapy and chemotherapy can only kill the non-tumorigenic tumor cells, causing tumors to shrink or even disappear. However, like the normal stem cells, cancer stem cells have higher ability to resist radiotherapy and chemotherapy. When the treatment stops, tumor stem cells are able to proliferation and induce neoplasia again. Transcription factor Oct4 and Nanog participate in the self-renewing of embryonic stem cells and primordial germ cells. They are both necessary for maintaining cell totipotency and their expression level will reduce or disappear in the differentiated or mature organization. However, in the recent research, Oct4 and Nanog are found expressing in the tumor tissue, and the expression level is correlated with tumor malignancy. This is consistent with the theory that tumor stem cells exist in tumors, and their function in tumor stem cells has to be studied further. It has been proved that there are cancer stem cells in breast cancer and breast cancer stem cells play a key role in the occurrence and development of breast cancer. We explored the expression and significance of Oct4 and Nanog in breast cancer stem cells by RNA interference in this study.

First, we isolated breast cancer stem cells from MDAMB231 cells by serum-free culturing technology and detected their stem cell properties through measuring the cell surface markers and study the resistance to paclitaxel and tumorigenicity in mouse. Second, we analysed the expression of Oct4 and Nanog in breast cancer stem cells by Real-Time PCR and Western Blot. After that, we down regulated the expression of Oct4 and Nanog respectively by siRNA and studied the interaction of Oct4 and Nanog in breast cancer stem cells. Finally, we determined the impact of resistance to chemotherapy drugs paclitaxel of breast cancer stem cells after Oct4 and Nanog being down-regulated respectively.

Through the above study, we found that some of the MDAMB231 cells that were able to survive in serum-free medium had higher tumorigenicity and stronger resistance to chemotherapy drugs than ordinary MDAMB231 cells. This cell subpopulation could be considered as breast cancer stem cells. When the expression of Oct4 in breast cancer stem cells was reduced, the Nanog expression became downward in response. Also, the Oct4 expression reduced when the Nanog was down regulated. Down-regulation of Oct4 and Nanog expression separately could decrease the capacity of breast cancer stem cells to resist chemotherapy drugs. Based on the above, We proved that the transcription factors Oct4 and Nanog play a role in breast cancer stem cells and are related to their chemotherapy drugs resistance.

Keywords: Transcription Factor; Breast Neoplasms; Tumor Stem Cells

目录

中文摘要	I
英文摘要	III
第一章 前言	1
1.1 乳腺癌干细胞的发现	2
1.2 乳腺癌干细胞的标记	2
1.3 乳腺癌干细胞的分离及鉴定	3
1.3.1 表面标志分选	3
1.3.2 侧群分选	3
1.3.3 无血清培养	3
1.4 转录因子 Oct4 及 Nanog	4
1.5 研究内容及意义	5
第二章 材料与amp;方法	6
2.1 主要材料	6
2.1.1 细胞株	6
2.1.2 主要仪器	6
2.1.3 主要试剂及耗材	7
2.1.4 主要试剂的配制	9
2.2 实验方法	11
2.2.1 细胞培养	11
2.2.2 乳腺癌干细胞的鉴定	12
2.2.3 RT-PCR	12
2.2.4 实时荧光定量 PCR (染料法)	15
2.2.5 Western Blot	16
2.2.6 RNA 干扰	18
2.2.7 抗紫杉醇实验	19

2.2.8 统计学方法	19
第三章 结果与分析	20
3.1 乳腺癌干细胞的培养	20
3.2 乳腺癌干细胞的鉴定	21
3.2.1 乳腺癌干细胞标志物的检测	21
3.2.2 动物体内成瘤试验	21
3.2.3 紫杉醇抑制实验	22
3.3 乳腺癌干细胞中 Oct4 及 Nanog 的表达	22
3.4 干扰试验	24
3.5 干扰 Oct4 及 Nanog 对乳腺癌干细胞耐药性的影响	26
第四章 讨论与结论	28
4.1 讨论	28
4.2 结论	30
第五章 总结与展望	31
参考文献	32
综述	466
致谢	4646

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Discovery of Breast Cancer Stem Cells	1
1.2 Markers of Breast Cancer Stem Cells	2
1.3 Isolation and Identification of Breast Cancer Stem Cells	3
1.3.1 Cell Surface Markers Sorting	3
1.3.2 Side Population Cells Sorting	3
1.3.3 Serum-free Culture.....	3
1.4 Transcription factor Oct4 and Nanog	4
1.5 Content and Significance of this Research	5
Chapter 2 Materials and Methods	6
2.1 Major Materials	6
2.1.1 Cell Lines.....	6
2.1.2 Major Instruments	6
2.1.3 Reagents and Materials	7
2.1.4 Reagents Preparation.....	9
2.2 Experimental methods	11
2.2.1 Cell Culture.....	11
2.2.2 Identification of Breast Cancer Stem Cells	12
2.2.3 RT-PCR.....	12
2.2.4 Real-time fluorescent quantitative PCR	15
2.2.5 Western Blot.....	16
2.2.6 RNA interference	18
2.2.7 Research of Resistance to Paclitaxel	19

2.2.8 Statistics.....	19
Chapter 3 Results and Analysis.....	20
3.1 Culture of Breast cancer stem cells	20
3.2 Identification of Breast cancer stem cells.....	21
3.2.1 Measuring cell surface markers of Breast cancer stem cells	21
3.2.2 Tumorigenicity Assay in vivo	21
3.2.3 Research of Resistance to Paclitaxel.....	22
3.3 Expression of Oct4 and Nanog in Breast Cancer Stem Cells.....	22
3.4 RNA interference	24
3.5 Resistance to Paclitaxel of Breast Cancer Stem Cells after RNAi	26
Chapter 4 Discussion and Conclusion.....	28
4.1 Discussion.....	28
4.2 Conclusion.....	30
Chapter 5 Summary and Prospect.....	31
Reference	32
Review.....	36
Acknowledgement.....	46

第一章 前言

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一，严重威胁患者的生命和影响患者的生存质量。近年来，尽管人类对乳腺癌细胞生物学和遗传学的认识已深入到分子生物学水平，新的治疗理念、治疗方法不断涌现，乳腺癌的治疗研究已经取得了相当大的进步，已有部分乳腺癌可以借助手术及药物等治疗而提高治愈率和延长生存期，然而其生活质量难以改善且整体治愈率依然低下。因此寻找新的治疗方法一直是恶性肿瘤治疗学研究的重要课题。

近年来，肿瘤干细胞理论为肿瘤研究提供了新的方向。该理论认为肿瘤是由肿瘤干细胞异常增殖、分化而形成，常规放化疗仅能消灭增殖期的非致瘤性肿瘤细胞，使肿瘤缩小甚至消失，然而，肿瘤干细胞和普通干细胞一样，对放化疗等方法具有较高的抵抗能力，当治疗停止后，肿瘤干细胞可再次增殖形成肿瘤^[1]。2006年美国癌症研究协会为肿瘤干细胞下了明确的定义：肿瘤干细胞是指在肿瘤组织中具有自我更新能力，并且能够产生该肿瘤中一系列异质性肿瘤细胞的细胞类群^[2]。转录因子 Oct4 及 Nanog 参与胚胎干细胞和原始生殖细胞的自我更新，是维持细胞全能性所必须的转录因子^[3]，也是细胞重编程的关键转录因子^[4-6]，在分化或成熟的组织中其表达水平降低或消失。然而，越来越多的研究显示 Oct4 及 Nanog 在肿瘤组织中也有表达，且表达水平与肿瘤的恶性程度相关。肿瘤组织中表达干细胞转录因子说明肿瘤中可能存在一种干细胞样肿瘤细胞，这与肿瘤中存在肿瘤干细胞的理论相一致。目前国内外对 Oct4 及 Nanog 的研究主要集中在胚胎干细胞方面，而在肿瘤干细胞中的作用研究罕见报道。近来，针对 Oct4 及 Nanog 等干细胞转录因子在肿瘤细胞尤其是肿瘤干细胞中的作用研究已成为肿瘤研究的热点之一。

目前研究已证实乳腺癌中存在乳腺癌干细胞^[7]，并且乳腺癌干细胞在乳腺癌的发生、发展中起着关键作用。针对 Oct4 及 Nanog 在乳腺癌干细胞中的作用研究具有重要意义。

1.1 乳腺癌干细胞

早在十几年前 Bonnet 等^[8]发现了急性髓细胞性白血病的起始细胞之后,就有学者^[9]认为除了造血系统肿瘤之外,在实体肿瘤组织中也可能存在肿瘤干细胞。2003年,Al-Hajj^[7]等经研究发现表面标志为 $CD44^+CD24^{-low}Lin^-$ 的乳腺癌细胞具有很强的致瘤能力,仅 100 个这种表型的乳腺癌细胞接种到非肥胖性糖尿病/重度联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠体内就能形成肿瘤,且其移植瘤的细胞组成与原发灶肿瘤相同,在经过多次传代后还具有较强的致瘤性,而其它的乳腺癌细亚群即使大量接种也难以复制出同类型的肿瘤组织。这表明 $CD44^+CD24^{-low}Lin^-$ 细胞亚群在乳腺癌中起着干细胞的作用,将其称为乳腺癌干细胞。目前乳腺癌干细胞的概念依旧停留在功能层面。对于乳腺癌干细胞的来源,目前主要有 2 种假说^[7,10]: (1)正常乳腺干细胞存活的时间相对较长,在细胞周期中可能累积足够多的导致其恶性转化的突变而转变为乳腺癌干细胞;(2)分化的细胞获得致癌突变及自我更新的能力,逆向转化为乳腺癌干细胞。

1.2 乳腺癌干细胞的标记

目前,乳腺癌干细胞的特异性标记尚未明确,有可能各乳腺癌细胞系之间的癌干细胞标志并不相同,甚至细胞系与原代细胞之间的癌干细胞标志可能也是不同的,因为细胞系在长期体外培养过程中,表面抗原标志有可能会发生改变。目前,比较公认的乳腺癌干细胞表面标记为 $CD44^+CD24^{-low}$ 。但是,乙醛脱氢酶-1 (ALDH-1) 高活性的乳腺癌细胞也被证实具有干细胞特性,并且与 $CD44^+CD24^{-low}$ 相比,由于检测的是 ALDH-1 的活性,所以 ALDH-1 不易像细胞表面标志一样受微环境等因素的影响,在识别和分离干细胞方面具有一定的优越性^[11]。另外,也有研究认为高表达 CD55 的乳腺癌细胞也可能是一群具有肿瘤干细胞样性质的细胞^[12], $Numb^{-low}$ 也有望成为原发性乳腺癌干细胞的表型^[13]。

1.3 乳腺癌干细胞的分离及鉴定

1.3.1 表面标志分选

表面标志分选是利用细胞表面标志与相应抗体相结合的原理通过流式细胞仪或磁珠分选出细胞的一种方法。目前, 研究已发现多种乳腺癌干细胞标志, 但对其认识还有分歧, 确定的标志物还有待进一步研究。其中, $CD44^+CD24^{-/low}$ 已成为比较公认的乳腺癌干细胞的表型。然而, 我们尚不能认定 $CD44^+CD24^{-/low}$ 的乳腺癌细胞即为乳腺癌干细胞, 而只能认为 $CD44^+CD24^{-/low}$ 的细胞中富含乳腺癌干细胞, 想要通过细胞表面标记来鉴定和分离完全的乳腺癌干细胞还需要更多的研究探索。

1.3.2 侧群分选

干细胞能将结合 DNA 的荧光染料 Hoechst33342 泵出细胞, 因此通过流式细胞仪可以将 Hoechst33342 淡染的干细胞筛选出来, 由于这部分细胞在流式细胞仪分析时分布于左下角, 所以被称为侧群 (side population, SP) 细胞。侧群分选最初是用于正常干细胞的研究, 近几年开始被应用于肿瘤干细胞的富集^[14]。但是, 有观点认为 Hoechst33342 对细胞有一定毒性, 用其分选出来的肿瘤干细胞的性质有可能会受到影响^[15]。所以, 侧群细胞分选富集乳腺癌干细胞的方法还具有一定的局限性, 还有待于进一步的研究。

1.3.3 无血清培养

在添加了表皮生长因子、成纤维细胞生长因子等的无血清培养基中, 分化细胞逐渐凋亡, 而未分化细胞能进行不对称分裂, 实现自我更新, 维持未分化状态, 并扩增形成由同一克隆起源的干细胞和祖细胞构成的细胞集落, 以细胞球的形式悬浮生长, 这种方法最早起源于 Dontu 等^[16]借鉴研究神经干细胞球的方法, 从乳腺上皮中培养出乳腺上皮干细胞的报道, 现已被部分研究者^[17, 18]用于富集乳腺癌干细胞。研究发现无血清培养法获得的乳腺癌细胞悬浮球富含 $CD44^+/CD24^{-/low}$ 的细胞, 不表达肌上皮、分化腔上皮等分化标志物, 而大量表达血管形成、细胞保护因子和干细胞标志物, 在分化条件下培养具有多系分化的能力, 并且在 NOD/SCID 小鼠中具有强致瘤性^[17]。近来, 无血清培养法已成为乳

腺癌干细胞体外培养的一种较常规方法，也为乳腺癌干细胞生物学特性的研究提供了可能。但是，这样培养的肿瘤干细胞往往不能在体外长期传代并保持未分化状态，如何让体外培养的肿瘤干细胞能长期存活保持未分化状态还需要更深入地研究。

上述方法虽然可以分离乳腺癌干细胞，但是严格意义上来说只是富集了乳腺癌干细胞，并不能用来对其做进一步的鉴定。Clarke 等^[2]曾提出，动物体内连续移植成瘤是鉴定肿瘤干细胞的金标准，虽然这种方法还存在一定的局限性，但其最能检测干细胞自我更新和分化能力，从而在功能上对肿瘤干细胞进行鉴定。因此，可以通过这种方法对乳腺癌干细胞进行鉴定。

1.4 转录因子 Oct4 及 Nanog

Oct4 是迄今人们发现最早也是最重要的维持胚胎干细胞多潜能性和自我更新的关键基因，也称为 Oct3、POU5F1、OTF3 或 OTF4。Oct4 含 352 个氨基酸，分子量 38kD，位于人染色体 6p21.3，是 POU 家族的第五类转录因子，由 pou5f1 编码产生，具有多个转录起始位点，转录不同的 mRNA 亚型(Isoform)。Oct4 Isoform1 是转录的主要亚型之一，具有 5 个外显子，4 个内含子，其翻译的蛋白质含有一个保守的 DNA 结合结构域——POU 结合域，能与含八聚体基序(octamer motif)的 DNA 结合从而调控下游靶基因的转录。目前关于 Oct4 基因的研究主要针对 Isoform1。Oct4 表达于胚胎和生殖细胞肿瘤中，在分化细胞中不表达。然而，近来研究发现，在非生殖系统肿瘤细胞和组织，如胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌等肿瘤细胞系中也检测到了 Oct4 的表达^[19,21]。

Nanog 基因是一种在内细胞团、原始生殖细胞以及胚胎干细胞中表达的新转录因子^[22,23]。Nanog 基因属于 ANTP 类，NK 家族基因，在人定位于 12 号染色体 12p13 ~31，编码 305 个氨基酸。Nanog 在胚胎干细胞、胚胎芽孢细胞和胚胎性癌细胞中表达，但在造血细胞、内胚层壁细胞、成纤维细胞、神经细胞、成熟组织等已分化的细胞中不表达^[24]。但研究^[25]表明，在乳腺癌、胶质瘤、膀胱癌等肿瘤中存在 Nanog 的表达，且肿瘤级别越高，表达越强，临床预后越差。

Oct4 和 Nanog 作为最重要的 2 个转录因子，是维持胚胎干细胞转录调控网

络的核心，主要通过阻断胚胎干细胞的分化维持其多能性，缺少任何一个，都会导致胚胎干细胞发生分化^[26,27]。非生殖系统肿瘤细胞中表达 Oct4 及 Nanog 与肿瘤中存在肿瘤干细胞的说法相一致。Gibbs 等^[28,29]在研究人骨肉瘤干细胞时发现：在无血清培养基中悬浮生长的肿瘤细胞球中高表达 Nanog，但是在那些贴壁生长的肿瘤细胞中则不表达或低表达 Nanog。Oct4 及 Nanog 在肿瘤干细胞当中的表达及作用，有待进一步研究和探讨。

1.5 研究内容及意义

本研究利用无血清培养的方法从乳腺癌 MDAMB231 细胞系中分离富集乳腺癌干细胞，对其进行鉴定，并检测乳腺癌干细胞中 Oct4 及 Nanog 的表达，然后利用 siRNA 分别干扰乳腺癌干细胞中 Oct4 及 Nanog 的表达，检测干扰效果并探讨 Oct4 与 Nanog 在乳腺癌干细胞中的相互作用及其对乳腺癌干细胞抗化疗药能力的影响，为针对乳腺癌干细胞的临床治疗提供理论指导。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库