

研究论文

靶向 TTF-1 转录因子诱导人肺腺癌干细胞表型分化

李 焱 薛明明 亓雪莲 耿 沁 徐慧莉 董强刚*

(上海交通大学肿瘤研究所, 肿瘤干细胞实验室, 上海 200032)

摘要 肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSC)的典型特征是能够自我更新并分化形成肿瘤内各类癌细胞,但其分子调控机制还不清楚。本实验采用微纳米介导的小 RNA(microRNA)基因沉默技术,探讨了选择性灭活甲状腺转录因子-1(thyroid transcription factor-1, TTF-1)对肺腺癌 CSC 分化的影响。结果显示,肺腺癌 CSC 属于具有胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)样表型的原始未分化细胞,此类癌细胞表达 ESC 自我更新核心调控环(OCT4、Nanog 和 Sox2)以及细支气管肺泡干细胞(bronchioalveolar stem cells)标志 CCSP 和 SP-C、I 型肺泡细胞标志 AQP5、纤毛细胞标志 Foxj1 和肺发育相关转录因子 TTF-1 及 GATA6,而 TTF-1 灭活细胞仅表达 SP-C 和 GATA6,此类细胞经培养后具有 SP-C⁺AQP5⁺I 型肺泡细胞样表型。上述结果表明, TTF-1 是维持肺腺癌 CSC 生物学特性的关键基因,靶向该基因将迫使其表型分化。

关键词 肿瘤干细胞; 肺腺癌; TTF-1; 表达沉默; 分化

肺腺癌是肺癌的常见组织类型之一,其临床表现为易早期转移、对细胞毒化疗药物耐受和预后差^[1]。按照肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSC)学说,这种转移耐药特性可归因于癌细胞群体中的 CSC^[2,3],而最近的基因组学研究结果也证实,肺腺癌中是否存在胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)样基因表达谱与药物疗效及患者预后存在密切关联性,提示表达此类基因的癌细胞可能是肺腺癌的 CSC^[4]。

肺腺癌多发生于外周肺,其起源细胞系位于呼吸性细支气管与肺泡导管连接处(bronchioalveolar duct junction, BADJ)的细支气管肺泡干细胞(bronchioalveolar stem cells, BASC)^[5]。此类肺干细胞同时表达 II 型肺泡细胞标志 SP-C(C 型肺泡活性蛋白, surfactant protein-C)和非纤毛柱状(Clara)细胞标志 CCSP(Clara 细胞分泌蛋白, Clara cell secretory proteins)^[6]。而上述标志表达受甲状腺转录因子-1(thyroid transcription factor-1, TTF-1)及其他肺转录因子如 GATA6 等的协同调控^[7]。

TTF-1 由 *Nkx2.1* 基因编码,属于 Homeodomain 家族转录因子^[8]。*Nkx2.1* 位于第 14 号染色体长臂 14q13.3 区,该基因附近还存在若干控制肺脏发育的转录因子基因,其中 *Nkx2-8* 与 *Nkx2.1* 同处于一个长

度为 413 Kb 的放大子(amplicon)核心区(core region)。在肺腺癌细胞中,上述基因同时过表达对顺铂(Cisplatin)、紫杉醇(Taxanes)、健择(Gemcitabine)和长春瑞滨(Vinorelbine)等药物高度耐受,此类患者预后差^[9]。

以上资料提示,靶向(targeting)TTF-1 使其表达沉默(silencing)将迫使肺腺癌 CSC 分化,从而消除其转移耐药特性,这种 CSC 靶向治疗新技术具有潜在的临床价值。本文采用小 RNA(microRNA)介导的基因沉默技术,从细胞表型特征的角度探讨了 TTF-1 表达下调对人肺腺癌 CSC 分化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

胎牛血清购自奥地利 PAA Laboratories GmbH 公司,DMEM 及 DMEM/F12 培养基分别购自 HyClone 公司和 Gibco 公司。

收稿日期: 2010-09-29 接受日期: 2010-12-01

国家自然科学基金(No.30872952),上海市科委科研基金(No.09411961700),上海市科委纳米科技专项基金(No.0582nm5800)和上海市卫生局科研基金(No.2009198)资助项目

* 通讯作者: Tel: 021-64437181, Fax: 021-64046615, E-mail: qgdong@shsci.org

实验所用免疫荧光检测抗体(Santa Cruz 公司): 羊抗人 TTF-1 多克隆抗体, 兔抗人 GATA6 多克隆抗体, 鼠抗人 CCSP 单克隆抗体, 兔抗人 SP-C 多克隆抗体, 羊抗人 SP-B 多克隆抗体, 鼠抗人 Foxj1 单克隆抗体, 羊抗人 AQP5 多克隆抗体, 羊抗人 OCT4 多克隆抗体, 兔抗人 Sox2 多克隆抗体, 羊抗人 Nanog 多克隆抗体, 荧光素 Rhodamine 标记的驴抗兔多克隆抗体, 荧光素 Rhodamine 标记的驴抗羊多克隆抗体, 荧光素 Rhodamine 标记的驴抗鼠多克隆抗体。

磁珠偶联抗体: 鼠抗人 CD221 抗体(BD 公司), 羊抗鼠 IgG 免疫磁珠(Miltenyi 公司)。

生长因子及酪氨酸激酶抑制剂: IGF-1(insulin-like growth factor-1)(Serotec 公司), EGF (epidermal growth factor)(Serotec 公司), p38 MAPK 抑制剂 SB239063 (Sigma 公司), 糖原合成酶 -3(GSK-3)抑制剂 BIO(Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 肺腺癌 SPC-A1 细胞购自中科院上海生科院细胞库, 培养基为含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM, 培养条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂。细胞传代和收集均采用 0.25% 胰酶消化。

1.2.2 肺腺癌 CSC 的分选与培养 收集对数生长期的 SPC-A1 细胞, 离心后重悬于 500 μ l PBS 中, 按 2 μ g 抗体/10⁶ 细胞比例加入鼠抗人 CD221 抗体, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min 后用 PBS 离心洗涤, 细胞重悬于 500 μ l PBS 中, 加入羊抗鼠 IgG 磁珠 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, PBS 离心洗涤后用 MS 磁性分选柱分离获得 CD221⁺ 细胞(按生产商提供的分离方法操作)。分选后的 CD221⁺ 细胞在 SMC(stemness-maintaining combinations)特种培养基中传代培养。SMC 配方: DMEM

培养基、10% 胎牛血清、IGF-1(20 ng/ml)、EGF (20 ng/ml)、SB239063 (5 μ mol/L)和 BIO (1 μ mol/L)。

1.2.3 表达载体构建 应用计算机软件筛查人 *Nkx2.1* 基因的 4 个潜在干扰序列(表 1 划线部分), 根据此序列设计并合成 4 对 miRNA oligo, 退火成双链后用载体构建试剂盒 BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP (Invitrogen 公司)进行重组克隆, 分别插入到该公司 miRNA 表达载体 pcDNA™ 6.2-GW/EmGFPmiR 中(图 1)。

1.2.4 基因转染 6 孔板(Costa 公司)内每孔种植 2.0 $\times$ 10⁵ CD221⁺ 细胞(1.8 ml 含血清培养基), 培养 24 h。将 Exgen500 微纳米转染试剂(Fermentas 公司)与 4 种 TTF1 表达质粒(各 1 μ g)混合温育 10 min 后, 每孔加入 200 μ l 配制的转染试剂(按生产商提供的方法操作), 培养 48 h 后分选转染细胞。

1.2.5 流式细胞分选 miRNA 转染后的 CD221⁺ 细胞用 0.25% 胰酶消化成单细胞, 离心去上清, 重悬细胞于含 10% 胎牛血清的 PBS 中, 无菌尼龙膜过滤, 用流式细胞仪(BD 公司, FACS Aria II)分选收集绿色荧光蛋白 GFP⁺ 及 GFP⁻ 细胞。

1.2.6 免疫荧光检测 将细胞离心至载玻片上, 室温干燥 30 min 后经 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 3 次, 0.25% Triton 通透 15 min, 5% 脱脂奶粉封闭 3 h, PBS 洗 3 次后加入一抗(1:100 稀释), 设阴性对照(用 PBS 代替一抗), 4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 洗 3 次去除非结合抗体后加二抗(1:100 稀释), 室温避光 1 h, PBS 洗 3 次, 滴加 Hoechst33342(1:50 稀释)染核 5 min, PBS 洗 2 次, 加封片剂于 Olypus IX51 型荧光显微镜下观察。

1.2.7 集落形成实验 6 孔板内每孔加入 100 个细胞及 3 ml 含 10% 胎牛血清的培养基, 每周更换培养基, 培养 3 周后甲醇固定, 结晶紫染色计数集落。

表 1 TTF-1 miRNA 序列
Table 1 TTF-1 miRNA sequences

名称 miRNA	序列 (5'-3') Sequences (5'-3')
SR116-1F	TGC TGA GTC CGA GCC CGA GGA GTT CAG TTT TGG CCA CTG ACT GAC <u>TGA ACT CCG GGC TCG GAC T</u>
SR116-1R	CCT GAG TCC GAG CCC GGA GTT CAG TCA GTC AGT GGC CAA AAC TGA ACT CCT CGG GCT CGG ACT C
SR116-2F	TGC TGT AGC AAG GTG GAG CAG GAC ATG TTT TGG CCA CTG ACT GAC <u>ATG TCC TGC CAC CTT GCT A</u>
SR116-2R	CCT GTA GCA AGG TGG CAG GAC ATG TCA GTC AGT GGC CAA AAC ATG TCC TGC TCC ACC TTG CTA C
SR116-3F	TGC TGT CCT CAT GGT GTC CTG GTA CGG TTT TGG CCA CTG ACT GAC <u>CGT ACC AGC ACC ATG AGG A</u>
SR116-3R	CCT GTC CTC ATG GTG CTG GTA CGG TCA GTC AGT GGC CAA AAC CGT ACC AGG ACA CCA TGA GGA C
SR116-4F	TGC TGA TGC CGC TCA TGT TCA TGC CGG TTT TGG CCA CTG ACT GAC <u>CGG CAT GAA TGA GCG GCA T</u>
SR116-4R	CCT GAT GCC GCT CAT TCA TGC CGG TCA GTC AGT GGC CAA AAC CGG CAT GAA CAT GAG CGG CAT C

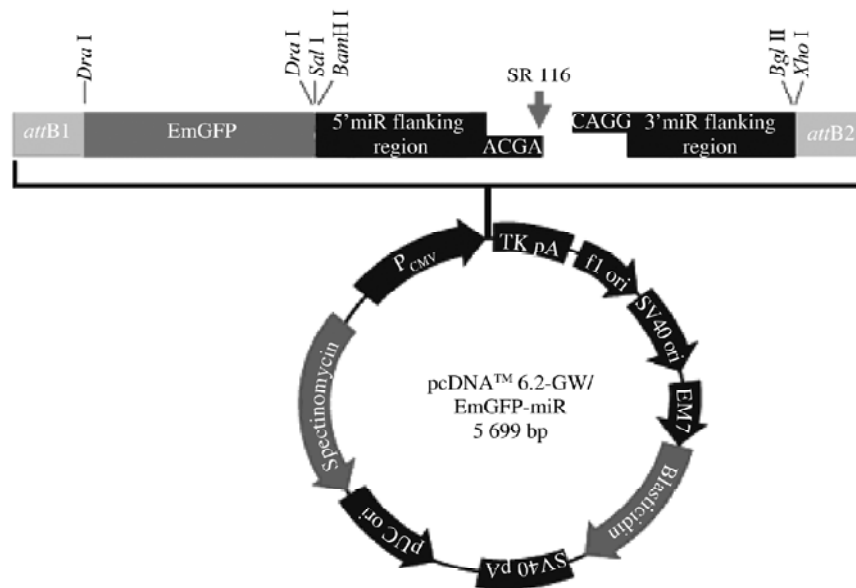


图 1 miRNA 干扰序列表达质粒载体构建图示

Fig.1 Scheme of cloning miRNA sequence into the expression vector

1.2.8 凋亡分析 将分选后的 GFP^+ 细胞培养在 6 孔板内 (3×10^5 细胞/孔, 2 ml 培养基), 间隔 24 h 在荧光显微镜下检测, 以观察到凋亡小体作为判定细胞凋亡的标准。

2 结果

2.1 靶向 *TTF-1* 下调 CCSP 和 SP-B 表达

前文作者报道^[14], SPC-A1 细胞株中的 CD221^+ 细胞亚群具有高致瘤性, 此类癌细胞表达 OCT4、SP-C 和 CCSP 的特异性 mRNA。为了证实 CD221^+ 细胞具有 BASC 表型, 我们采用流式细胞仪分选了此类癌细胞 (得率 0.4%), 免疫荧光检测显示 CD221^+ 细胞表达 OCT4、SP-C 及 CCSP 蛋白 (图 2A)。此类 CD221^+ 肺腺癌 CSC 在 SMC 特殊培养基中可以传代培养并保持表型稳定 (图 2C 和图 4)。

基于上述平台, 我们筛选并合成 *Nkx2.1* 基因的 4 个潜在 miRNA 干扰序列, 然后插入到表达质粒 pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR 中 (图 1), 采用微纳米介导的基因转染技术使肺腺癌 CSC 表达上述 miRNA。FCM 检测显示转染率 (GFP^+ 比例) 为 27% (图 2B)。分选获得 GFP^+ 和 GFP^- 细胞群后进行免疫荧光检测, 证明未转染的 GFP^- 细胞表达 *TTF-1* 及其调控靶基因 CCSP、SP-C 和 SP-B。而 miRNA 转染的 GFP^+ 细胞仅表达 SP-C, 其余标志表达已被显著下

调 (图 2C)。

2.1 靶向 *TTF-1* 诱导细胞凋亡并抑制集落生长

将分选获得的 GFP^+ 细胞连续培养 4 天, 每天检测细胞凋亡, 发现在培养 48~72 h 时 GFP^{High} 细胞出现明显凋亡, 表现为细胞膜出现空泡并形成凋亡小体 (图 3A)。将分选的 GFP^+ 和 GFP^- 细胞培养在 6 孔板 (100 个细胞/孔) 中 3 周后检测集落形成能力, 发现靶向 *TTF-1* 后集落数量降低了 55.5% (图 3B)。

然而, 尽管靶向 *TTF-1* 引起了 GFP^{High} 细胞凋亡, 但 GFP^{Low} 细胞仍能生存, 后者在常规含血清条件下可以传代培养。

2.2 *TTF-1* 表达沉默促使细胞表型分化

据肺干细胞的层级 (Hierarchy) 学说, BASC 分化后形成 Clara 细胞和 II 型肺泡细胞, 此二类祖细胞 (progenitors) 能进一步分化成为纤毛柱状细胞和 I 型肺泡细胞^[10], 其中纤毛柱状细胞分化受控于 Homeo-domain 转录因子 Sox2, 而 I 型肺泡细胞分化受控于锌指蛋白转录因子 GATA6^[11,12]。为了评估靶向 *TTF-1* 后 OCT4^+ BASC 的分化命运, 我们检测了 BASC 标志 CCSP 和 SP-C、I 型肺泡细胞标志 AQP5 (aquaporin 5)、胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESC) 自我更新的核心调控环 (即 OCT4、Nanog 和 Sox2) 以及肺上皮细胞转录因子 (*TTF-1*、GATA6 和 Foxj1) 的表达。图 4 结果显示, TTF-1^+ GFP^- 细胞同时表达上述

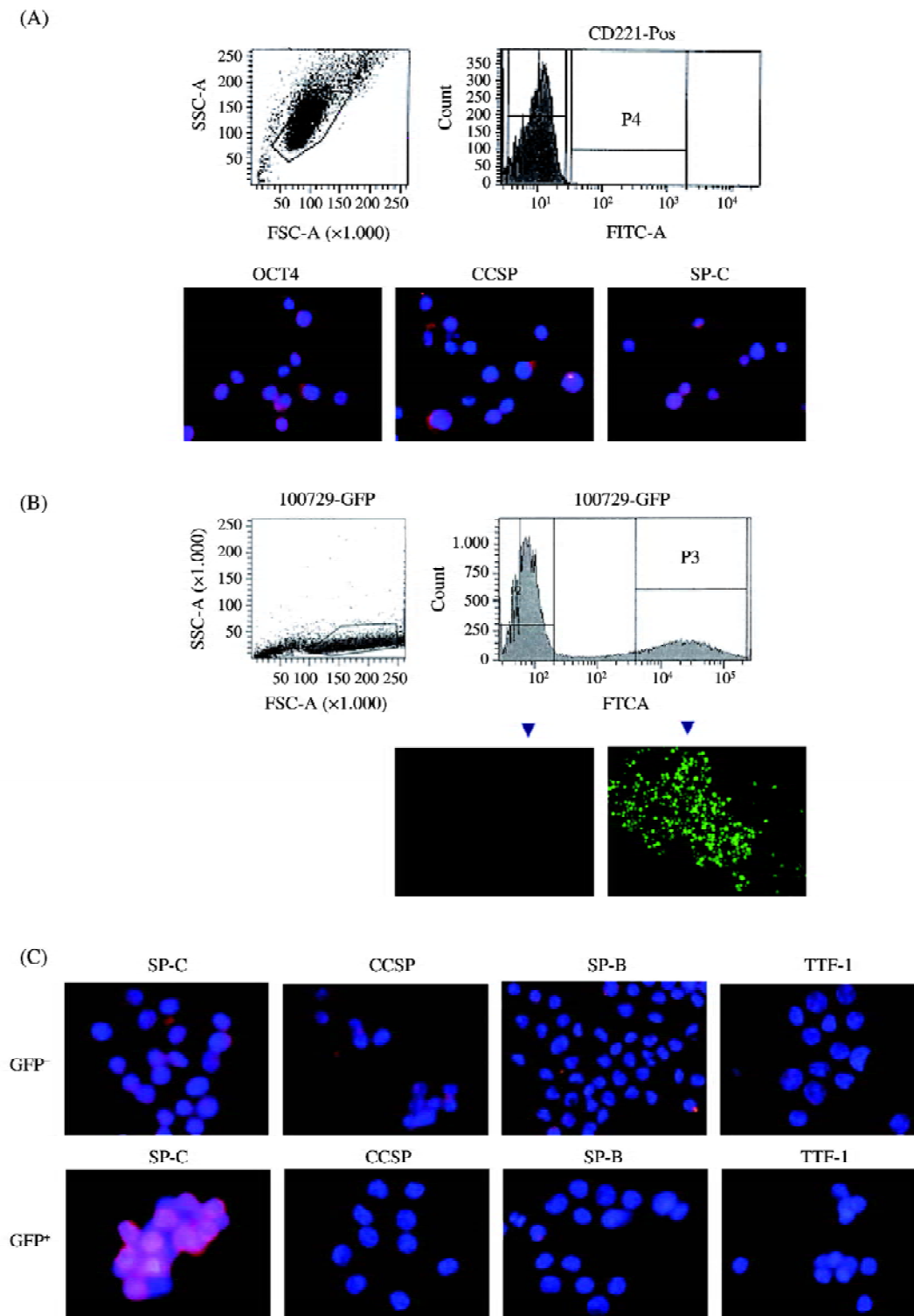


图2 靶向 *TTF-1* 下调 CCSP 和 SP-B 表达

A: 流式细胞仪分选 SPC-A1 细胞中的 CD221⁺ 细胞, 免疫荧光检测 CD221⁺ 细胞亚群中 OCT4、CCSP、SP-C 蛋白表达; B: 转染 *TTF-1* 特异性 miRNA 后, 流式细胞仪分选 CD221⁺ SPC-A1 细胞中的 GFP⁺(右)和 GFP⁻(左) 细胞亚群; C: 免疫荧光检测 GFP⁺ 和 GFP⁻ 细胞中 SP-C、CCSP、SP-B 及 TTF-1 蛋白表达。

Fig.2 CCSP and SP-B down-regulation after targeting *TTF-1*

A: the CD221⁺ cell subtype was sorted by flow cytometry from SPC-A1 cells and was subjected for immunostaining of OCT4, CCSP and SP-C proteins; B: after transduction with *TTF-1*-specific miRNA, the GFP⁺ (right) and GFP⁻ (left) cell subtypes were sorted by flow cytometry from the CD221⁺ SPC-A1 cells; C: immunostaining for SP-C, CCSP, SP-B and TTF-1 expression in sorted GFP⁻ and GFP⁺ subtypes.

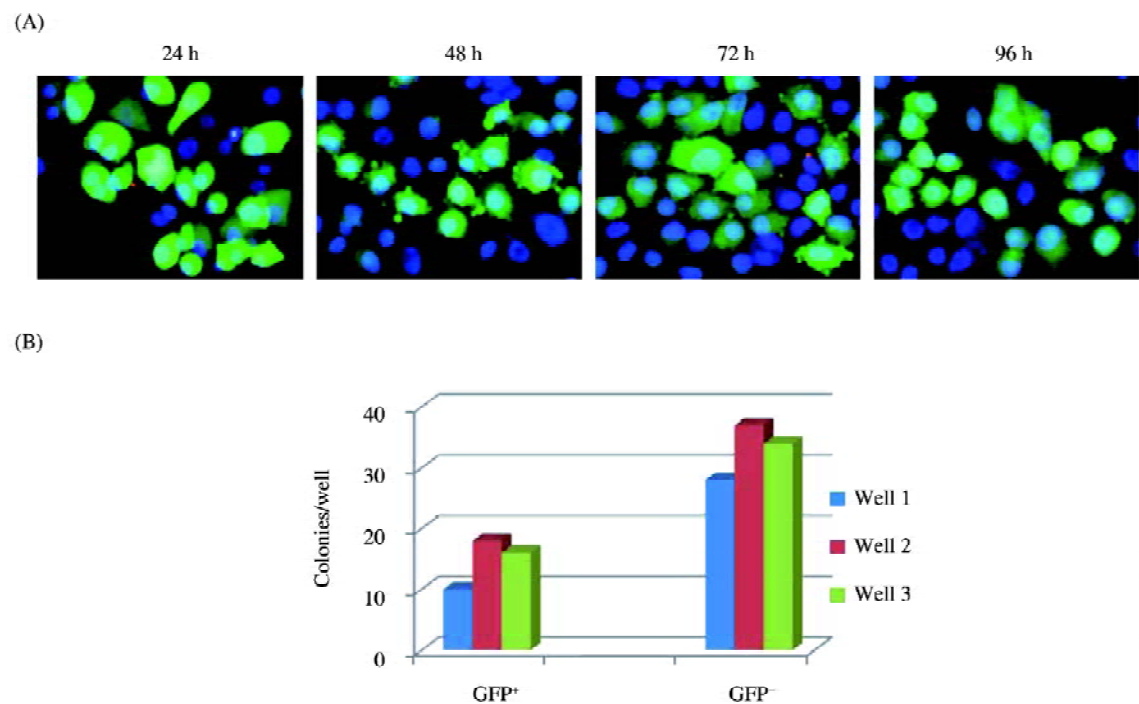


图3 TTF-1 表达沉默诱导细胞凋亡及生长抑制

A: 分选获得的 GFP⁺ 细胞连续培养 4 天, 每天检测细胞凋亡; B: GFP⁺ 和 GFP⁻ 细胞培养三周后分别检测集落形成能力。

Fig.3 Apoptosis and growth inhibition after silencing TTF-1 expression

A: the sorted GFP⁺ cells were cultured for 4 days, apoptosis was detected each day; B: the sorted GFP⁺ and GFP⁻ cells were cultured *in vitro* for 3 weeks and the colonies formation were then measured.

表 2 GFP⁺ 及 GFP⁻ 细胞的集落形成

Table 2 GFP⁺ and GFP⁻ cells colony formation

细胞	孔 1	孔 2	孔 3	平均
Cell	Well 1	Well 2	Well 3	Mean
GFP ⁺	10	18	16	14.7
GFP ⁻	28	37	34	33

9 个标志, 提示此类细胞处于未分化状态。而 TTF-1 灭活后的 GFP⁺ 细胞仅表达 SP-C 和 GATA6, 说明其已经失去自我更新能力, 但分化阻断在 II 型肺泡细胞。

美国研究者 Bhaskaran 等^[13]曾报道, II 型肺泡细胞在体外培养过程中能够自发转型分化(transdifferentiate)为 I 型肺泡细胞。为了探讨 TTF-1 灭活癌细胞是否具有类似特性, 我们将 GFP⁺ 细胞连续传代培养 4 周后检测 SP-C 及 AQP5 表达, 结果显示此类细胞不表达 TTF-1 和 SP-C, 但仍阳性表达 AQP5, 提示其已经分化为 I 型肺泡样细胞。同时我们也检测了 SPC-A1 细胞, 发现该细胞在相同培养条件下均阳性表达 TTF-1、SP-C 和 AQP5(图 5), 说明此株肺腺

癌细胞的分化存在缺陷, 不能自发转型分化形成 I 型肺泡细胞。

3 讨论

前文作者报道, 无论是原发肿瘤还是细胞系, 肺腺癌细胞均具有 II 型肺泡细胞的表型特征(即阳性表达 SP-C), 其中少量癌细胞还同时表达 Clara 细胞标志 CCSP 和 ESC 转录因子 OCT4, 此类 OCT4⁺BASC (即 SP-C⁺CCSP⁺OCT4⁺ 细胞)具有显著的致瘤、转移和耐药特性^[14~16]。五年生存随访结果显示, 肺腺癌组织中存在 OCT4⁺BASC 严重威胁患者生存^[17,18]。本文进一步报道, OCT4⁺BASC 属于 CD221⁺ 细胞亚群, 此类癌细胞是具有 ESC 样表型特征的原始未分化细胞, 表现为同时表达多种呼吸道上皮的谱系标志, 如 II 型肺泡细胞标志 SP-C, Clara 细胞标志 CCSP, I 型肺泡细胞标志 AQP5 和纤毛细胞标志 Foxj1。这些癌细胞中也存在 ESC 自我更新的核心调控环(core regulatory circuitry), 即 OCT4、Nanog 和 Sox2, 提示其可能表达 ESC 样基因谱, 具有自我更新能力。上述结果支持肺腺癌的 BASC 起源说^[5,6]。

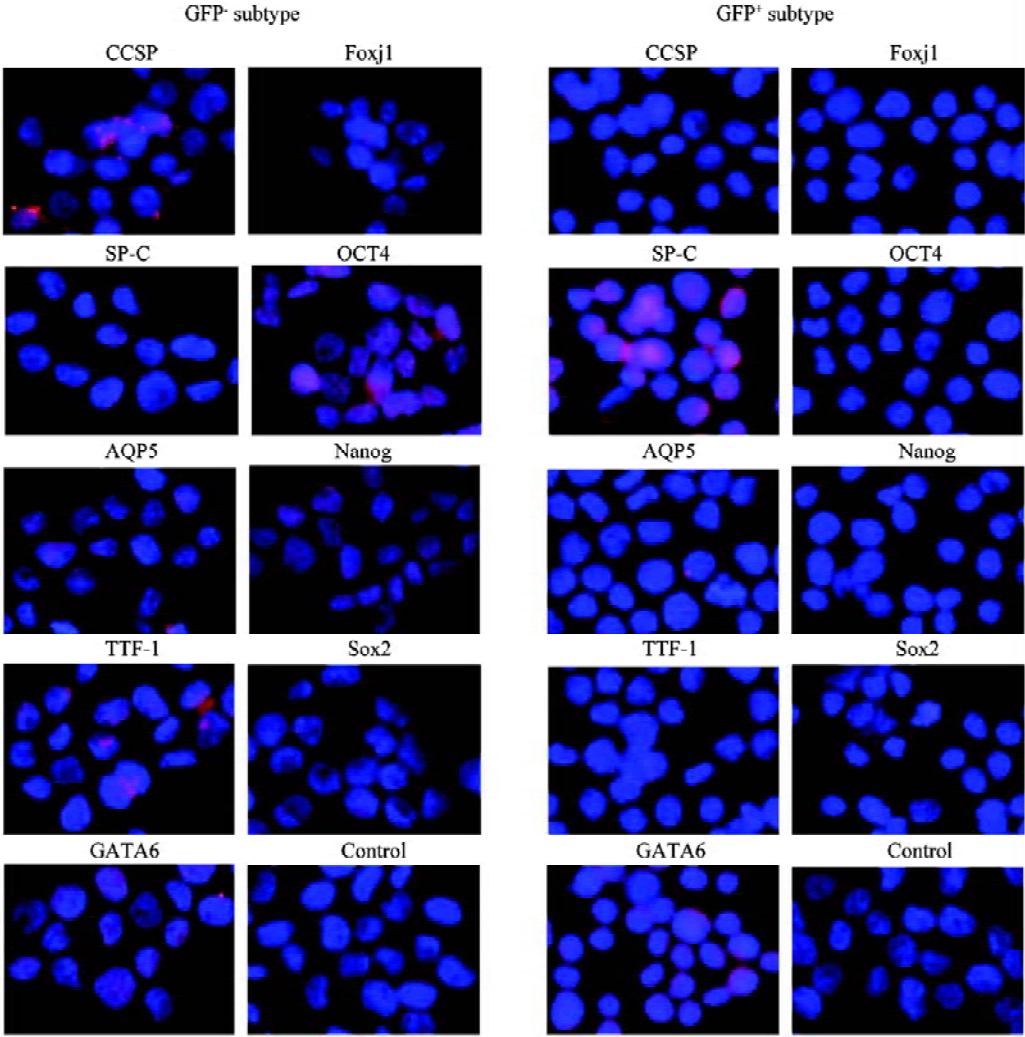


图4 *TTF-1* 表达沉默后的表型分析

对分选获得的 GFP^+ (右)及 GFP^- (左)细胞，采用免疫荧光检测 ESC 全能因子、肺特异性转录因子以及呼吸道上皮的细胞谱系标志表达。

Fig.4 Phenotypic analysis after silencing *TTF-1* expression

The sorted GFP^+ (right) and GFP^- (left) cells were stained immunofluorescently for the expression of ESC pluripotency factors, lung specific transcription factors and respiratory cell lineage markers.

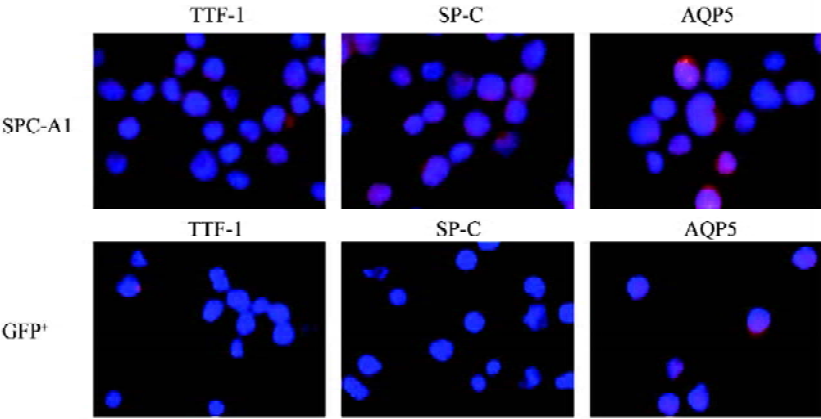


图5 SPC-A1 细胞和 *TTF-1* 表达沉默后的 GFP^+ 细胞表型分析

Fig.5 Phenotypic analysis of SPC-A1 cells and the GFP^+ cells after *TTF-1* silencing

近年来, CSC 作为恶性肿瘤的治疗靶标已引起国内外研究者的普遍关注。此类新颖靶向治疗的优点是在杀灭 CSC 或诱导其分化后, 可以从源头上有效控制肿瘤复发转移并提高细胞毒化疗药物的疗效, 从而显著改善患者预后^[19]。但开展这项靶向治疗研究的前提是需要系统解读控制 CSC 自我更新及分化的分子机制。实验研究揭示, 小鼠 BASC 是肺脏内控制肺泡发育及代谢更新(homeostasis)的成体干细胞, 此类肺干细胞系由胚胎早期的肺原基(bud)发育形成^[20]。TTF-1 是该原基的特异性标志之一, 基因敲除(knockout)实验证实, 选择性灭活 TTF-1 基因(又称 *Nkx2.1*)后的遗传缺陷小鼠肺脏内缺乏肺泡^[21]。细胞谱系追踪(lineage trace)研究进一步显示, 肺泡上皮源自胚肺小管期(canalicular phase)支气管树盲端的远端干细胞(distal stem cells), 后者向肺泡上皮分化可能需要多种转录因子(如 TTF-1 和 GATA6 等)的协同作用^[22]。Zhang 等^[23]报道, 灭活 GATA6 基因引起肺脏内 BASC 积聚, 导致明显的肺泡发育障碍。但 TTF-1 在 BASC 中有何生物学功能, 目前未见研究报道。本文以 OCT4⁺BASC 为研究对象进行了初步探讨。实验结果显示, 采用微纳米技术将特异性 miRNA 导入 OCT4⁺BASC 后 TTF-1 表达显著下调, 这些 TTF-1 灭活细胞呈现典型的表型分化特征, 表现为(1)ESC 核心转录因子消失; (2)除 SP-C 和 GATA6 外, 其他呼吸道上皮谱系标志不再表达。因而通过上述研究可以认为, 靶向 TTF-1 驱使 OCT4⁺BASC 向 II 型肺泡细胞分化。

按照肺干细胞的层级学说, II 型肺泡细胞是肺泡上皮的祖细胞, 能够转型分化成为 I 型肺泡细胞, 后者属于终末分化细胞, 最终从肺泡壁脱落消失^[24]。但肺腺癌细胞存在明显的分化缺陷, 在肺腺癌细胞系如 SPC-A1 中很难观察到此类癌细胞能自发形成 SP-C-AQP5⁺ I 型肺泡细胞, 这种分化缺陷可能与 TTF-1 持续表达有关。那么, 灭活 TTF-1 将驱使肺腺癌细胞进一步分化。我们探讨了这种可能性, 发现将 TTF-1 灭活细胞连续传代培养 4 周后可以检测到 SP-C 细胞, 此类细胞表达 AQP5。实验结果提示, 就表型特征的角度, 灭活 TTF-1 赋予了肺腺癌细胞终末分化的能力, 但这种分化是否与 TGFβ1 的自分泌调控有关^[13], 尚待深入研究。

TTF-1 是肺癌的一种谱系特异性(lineage-specific)癌基因, 主要表达在肺腺癌和小细胞肺癌^[8], 而此

类肺癌的发生被认为与远端干细胞恶变有关^[15,10]。尤其在肺腺癌中, 最近的研究发现存在 TTF-1 的基因扩增现象, 这些 TTF-1 过表达的癌细胞(特别是伴随 *Nkx2-8* 基因表达时)恶性程度较高^[25]。因而在上述癌细胞中灭活 TTF-1 可以抑制细胞增殖甚至诱发凋亡^[26]。本文结果与此吻合。我们也观察到 TTF-1 灭活细胞的体外集落形成能力明显下降, 其中 GFP^{High} 细胞在分选后 3 天内出现凋亡。最近报道, TTF-1 能够转录调控癌胚细胞粘附分子 6(carcinoembryonic cell adhesion molecule 6, CEACAM6)的表达, 后者具有抑制 I I 型肺泡细胞及肺腺癌细胞失巢凋亡(anoikis)的作用, 因而灭活 TTF-1 下调 CEACAM6 表达会促使细胞凋亡^[27,28]。但 TTF-1 在 OCT4⁺BASC 中是否也通过类似的作用机制调控细胞凋亡, 尚需进一步分析。

综上所述, OCT4⁺BASC 属于具有 ESC 样表型特征的原始未分化细胞, 此类癌细胞持续表达 TTF-1 可能是导致其分化缺陷的机理之一。实验显示, 靶向灭活该转录因子后 OCT4⁺BASC 的表型发生了显著改变, 形成 SP-C-AQP5⁺ 细胞, 提示其向 I 型肺泡上皮分化, 伴随着这一分化事件出现细胞增殖能力下降和凋亡。

参考文献(References)

- 1 廖美琳. 肺部肿瘤学. 上海: 上海科学技术出版社, 2008, 7-61.
- 2 Mimeault M, Hauke R, Mehta PP, Batra SK. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. *J Cell Mol Med* 2007; 11(5): 981-1011.
- 3 Croker AK, Allan AL. Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease. *J Cell Mol Med* 2008; 12(2): 374-90.
- 4 Stevenson M, Mostertz W, Acharya C, Kim W, Walters K, Barry W, *et al*. Characterizing the clinical relevance of an embryonic stem cell phenotype in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2009; 15(24): 7553-61.
- 5 Sullivan JP, Minna JD, Shay JW. Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2010; 29(1): 61-72.
- 6 Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, *et al*. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005; 121(6): 823-35.
- 7 Maeda Y, Dave V, Whitsett JA. Transcriptional control of lung morphogenesis. *Physiol Rev* 2007; 87(1): 219-44.
- 8 Boggaram V. Thyroid transcription factor-1 (TTF-1/Nkx2.1/

- TITF1) gene regulation in the lung. *Clin Sci (London)* 2009; 116(1): 27-35.
- 9 Kendall J, Liu Q, Bakleh A, Krasnitz A, Nguyen KC, Lakshmi B, *et al.* Oncogenic cooperation and coamplification of developmental transcription factor genes in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(42): 16663-8.
- 10 Kim CF. Paving the road for lung stem cell biology: bronchioalveolar stem cells and other putative distal lung stem cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293(5): L1092-8.
- 11 Yuan P, Kadara H, Behrens C, Tang XM, Woods D, Solis LM, *et al.* Sex determining region Y-box 2 (Sox2) is a potential cell-lineage gene highly expressed in the pathogenesis of squamous cell carcinomas of the lung. *PLoS One* 2010; 5(2): e9112.
- 12 Zhou B, Francis TA, Yang H, Tseng W, Zhong Q, Frenkel B, *et al.* GATA-6 mediates transcriptional activation of aquaporin-5 through interactions with Sp1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295(5): C1141-50.
- 13 Bhaskaran M, Kolliputi N, Wang Y, Gou DM, Chintagari NR, Liu L. Trans-differentiation of alveolar epithelial type II cells to type I cells involves autocrine signaling by transforming growth factor β 1 through the Smad pathway. *J Biol Chem* 2007; 282(6): 3968-76.
- 14 董强刚, 姚 明, 耿 沁, 周 瑾, 闫明霞. 人肺腺癌干细胞的分离及鉴定. *肿瘤* 2008; 28(1): 1-7.
- 15 耿 沁, 董强刚, 姚 明, 郑必强, 胡晶莹, 周 瑾, 等. 肺癌干细胞的球体形成与致瘤性分析. *肿瘤* 2008; 28(9): 751-4.
- 16 郑必强, 周 瑾, 耿 沁, 董强刚. 人肺腺癌干细胞源自肺脏细支气管肺泡干细胞的初步研究. *中国肺癌杂志* 2008; 11(6): 759-64.
- 17 张雪艳, 郑必强, 韩宝惠, 黄进肃, 耿 沁, 徐惠莉, 等. 人肺腺癌干细胞的表型及其与肺腺癌患者预后的关系. *中华肿瘤杂志* 2009; 31(11): 836-40.
- 18 Zhang XY, Han BH, Huang JS, Zheng BQ, Geng Q, Aziz F, *et al.* Prognostic significance of OCT4 expression in adenocarcinoma of the lung. *Jpn J Clin Oncol* 2010; 40(10): 961-6.
- 19 Massard C, Deutsch E, Soria JC. Tumor stem cell-targeted treatment: elimination or differentiation. *Ann Oncol* 2006; 17(11): 1620-4.
- 20 Londhe VA, Maisonet TM, Lopez B, Jeng JM, Li C, Minoo P. A subset of epithelial cells with CCSP-promoter activity participates in alveolar development. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010 [Epub ahead of print].
- 21 Costa RH, Kalinichenko VV, Lim L. Transcription factors in mouse lung development and function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280(5): L823-38.
- 22 Rawlins EL, Clark CP, Xue Y, Hogan BL. The Id2⁺ distal tip lung epithelium contains individual multipotent embryonic progenitor cells. *Development* 2009; 136(22): 3741-5.
- 23 Zhang YZ, Goss AM, Cohen ED, Kadzik R, Lepore JJ, Muthukumaraswamy K, *et al.* A Gata6-Wnt pathway required for epithelial stem cell development and airway regeneration. *Nat Gene* 2008; 40(7): 862-70.
- 24 Herzog EL, Brody AR, Colby TV, Mason R, Williams MC. Knowns and unknowns of the alveolus. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5(7): 778-82.
- 25 Hsu DS, Acharya CR, Balakumaran BS, Riedel RF, Kim MK, Stevenson M, *et al.* Characterizing the developmental pathways TTF-1, Nkx2-8, and PAX9 in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(13): 5312-7.
- 26 Tanaka H, Yanagisawa K, Shinjo K, Taguchi A, Maeno K, Tomida S, *et al.* Lineage-specific dependency of lung adenocarcinomas on the lung development regulator TTF-1. *Cancer Res* 2007; 67(13): 6007-11.
- 27 Ordenez C, Screaton RA, Ilantzis C, Stanners CP. Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. *Cancer Res* 2000; 60(13): 3419-24.
- 28 Kolla V, Gonzales LW, Bailey NA, Wang P, Angampalli S, Godinez MH, *et al.* Carcinoembryonic cell adhesion molecule 6 in human lung: regulated expression of a multifunctional type II cell protein. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 296(6): L1019-30.

Targeting the Thyroid Transcription Factor-1 Induces Phenotypic Differentiation of Human Lung Adenocarcinoma Stem Cells

Yan Li, Ming-Ming Xue, Xue-Lian Qi, Qin Geng, Hui-Li Xu, Qiang-Gang Dong*

(Laboratory of Cancer Stem Cells, Shanghai Jiaotong University Cancer Institute,
Shanghai 200032, China)

Abstract The cancer stem cells (CSC) have been characterized by their abilities to self-renew and to differentiate into heterogeneous lineages of cancer cells that compose the tumor. The molecular mechanisms regulating these properties, however, remain largely unknown. In this study, we explored the impact of targeting thyroid transcription factor-1 (TTF-1) on the differentiation of CSC in human lung adenocarcinoma by using of nanoparticle-mediated microRNA silencing technique. The results showed that CSC in lung adenocarcinoma belonged to the primitive, undifferentiated cells with phenotypic features of embryonic stem cells (ESC). These cancer cells expressed the core regulatory circuitry for self-renewal in ESC (i.e., OCT4, Nanog and Sox2), the phenotypic markers of bronchioalveolar stem cells (CCSP and SP-C), and the lineage markers related to the type I pneumocytes AQP5 and the ciliated cells Foxj1. They also exhibited the lung development-related transcription factors (TTF-1 and GATA6). In contrast, the *TTF-1*-inactivated cells expressed SP-C and GATA6 only, indicating the loss of capacity to self-renew and the phenotypic differentiation into type II pneumocytes. After propagations in culture, these *TTF-1*-inactivated cells further differentiated into the type I-like pneumocytes with phenotype of SP-C⁺AQP5⁺. These data documented that *TTF-1* played a critical role in maintaining the biological features of CSC in lung adenocarcinoma. Silencing this gene enforced the lung adenocarcinoma stem cells to differentiate phenotypically.

Key words cancer stem cell; lung adenocarcinoma; TTF-1; silencing; differentiation

Received: September 29, 2010 Accepted: December 1, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30872952), the Scientific Development Foundation of Shanghai Science and Technology Commission (No.09411961700), the Nano-science Project Foundation of Shanghai Science and Technology Commission (No.0582nm5800) and the Scientific Development Foundation of Shanghai Bureau of Public Health (No.2009198)

*Corresponding author. Tel: 86-21-64437181, Fax: 86-21-64046615, E-mail: qgdong@shsci.org