

人肺腺癌干细胞分子表型及*PLAGL2*基因的生物功能研究

薛明明¹ 宁仁利¹ 黄进肃² 李 钟³ 李 榕² 徐慧莉¹ 董强刚^{1*}

(¹上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市肿瘤研究所肿瘤干细胞课题组, 上海 200032; ²上海交通大学医学院附属胸科医院肺内科, 上海 200030; ³上海交通大学医学院附属九龙医院胸外科, 苏州 215000)

摘要 目前, 不断有证据证明肿瘤源自组织成体干细胞或其祖细胞的恶性转化, 这些转化的干(祖)细胞称为肿瘤起始细胞(tumor-initiating cells)或肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSC)。但肺癌CSC细胞的起源尚不清楚。该实验室曾报道人体肺腺癌中存在一类表达OCT4(octamer-binding transcription factor 4)的细支气管肺泡干细胞(bronchioalveolar stem cell, BASC)样CSC。该研究采用RNA干扰技术灭活了此类癌细胞中的锌指蛋白转录因子编码基因多形腺瘤样基因2(pleiomorphic adenoma gene-like 2, *PLAGL2*), 证明该基因表达沉默驱使肺腺癌CSC分化形成了I型肺泡细胞(alveolar type 1 cells, AT1)样细胞并失去致瘤能力。借助基因芯片筛查技术平台, 发现肺腺癌CSC具有与人体肺脏未分化干细胞和肺泡祖细胞相似的分子表型, 提示此类肺干(祖)细胞可能是肺腺癌潜在的细胞起源。此外, 该研究结果还揭示肺腺癌CSC的分化受TTF-1(甲状腺转录因子-1)和*PLAGL2*的双重调控, 通过基因操作以及药理性诱导可以驱使此类癌细胞分化。这些结果为针对肺癌CSC的靶向治疗提供了新的思路。

关键词 肺腺癌; 肿瘤干细胞; 分子表型; *PLAGL2*; 细胞起源

多形腺瘤样基因2(pleiomorphic adenoma gene-like 2, *PLAGL2*)属于*PLAG*基因家族, 是一种锌指蛋白转录因子, 具有致癌潜能^[1-2]。最近的研究揭示, *PLAGL2*异常表达与肺腺癌的发生及患者预后密切相关, 但其分子机制尚不清楚^[3]。

目前, 不断有证据证明肿瘤源自组织成体干细胞或其祖细胞的恶性转化, 这些转化的干(祖)细胞称为肿瘤起始细胞(tumor-initiating cells)或肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSC)^[4-8]。近三年来, 国际上关于人体肺干(祖)细胞的研究已取得明显进展^[9-13], 但未分化细胞与肺癌CSC之间的关系仍有待深入研究。本实验室曾报道, 肺腺癌CSC(即OCT4⁺BASC)具有与肺干细胞和肺泡祖细胞相似的分子表型标志, 表达肺干细胞标志OCT4、Nanog和Sox2以及肺泡祖细胞标志, 如TTF-1、CCSP和SP-C^[21-23]。采用RNA干扰技术, 我们已证明选择性灭活*TTF-1*基因可以引起肺腺癌CSC向II型肺泡细胞(alveolar type 2 cells, AT2)样细胞分化^[23]。本研究发现, 此类CSC表达*PLAGL2*, 灭活*PLAGL2*基因后可促使肺腺癌CSC向AT1细胞分化, 并失去致瘤能力。借助这一研究

技术平台, 我们进行了功能基因组表达筛查, 发现肺腺癌CSC具有与肺干(祖)细胞相似的分子表型。该研究为针对肺癌CSC的靶向治疗提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

胎牛血清购自PAA Laboratories GmbH公司; DMEM及DMEM/F12培养基分别购自HyClone公司和Gibco公司; 羊抗人OCT4多克隆抗体(sc-8628)、羊抗人CCSP单克隆抗体(sc-9770)、兔抗人SP-C多克隆抗体(sc-13979)、羊抗人TTF-1多克隆抗体(sc-17694)、羊抗人*PLAGL2*多克隆抗体(sc-19907)、羊抗人SP-B多克隆抗体(sc-7701)、羊抗人AQP5多克隆抗体(sc-9891)、鼠抗人CA9多克隆抗体(sc-365900)和鼠抗人

收稿日期: 2011-12-20 接受日期: 2012-03-15

国家自然科学基金(No.30872952)、上海市科委科研基金(No.09411-961700, No.10411968600)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

ITGA5多克隆抗体(sc-52595)、荧光素Rhodamine标记的驴抗兔IgG以及驴抗羊IgG抗体均购自Santa Cruz公司;荧光素FITC标记的鼠抗人pan-Cytokeratin单克隆抗体购自Miltenyi Biotec公司;重组人胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)和表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)购自Serotec公司;小分子p38 MAPK抑制剂SB239063、嘌呤霉素(P8833-25-MG)、糖原合成酶-3(GSK-3)抑制剂BIO购自Sigma公司;PLAGL2特异性shRNA慢病毒载体(sc-38181-V)和Polybrene购自Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 肺腺癌SPC-A1细胞购自中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所细胞库,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,培养在37 °C、5% CO₂的恒温培养箱中。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,按1 μ g抗体/10⁶细胞的比例加入鼠抗人CD221或CA9及ITGA5抗体,4 °C温育30 min。离心洗涤去除未结合的抗体,然后按5个磁珠/细胞的比例加入羊抗鼠IgG免疫磁珠,继续温育30 min。之后进行磁性细胞分选(MACS),分选后的阳性细胞在SMC(stemness-maintaining combinations)特种培养基中传代培养。SMC配方为: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 免疫荧光检测 将细胞(1 $\times$ 10⁵细胞,50 μ L培养基)接种至有盖玻片的24孔板(Costa公司)中,培养过夜后经4%多聚甲醛固定30 min, PBS洗3次(每次洗涤3 min,下同),0.25% Triton X-100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 °C过夜。PBS洗3次去除未结合抗体后加二抗(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Olympus IX51荧光显微镜下观察。

1.2.4 病毒转染及基因表达沉默 PLAGL2特异性shRNA慢病毒载体购自Santa Cruz公司,按生产商提供的操作指南操作,简述如下:6孔板(Costa公司)内每孔种植3.0 $\times$ 10⁵ SPC-A1 CD221⁺细胞(1.8 mL含血清培养基),培养24 h。吸去上清,每孔加入浓度为

5 μ g/mL的polybrene的稀释液以及30 μ L的病毒颗粒,摇匀继续培养24 h。弃上清,血清培养基2 mL/孔培养24 h。消化细胞转入25 cm²的培养瓶中,加入10 g/mL嘌呤霉素筛选抗性细胞克隆。

1.2.5 动物实验 BALA/c裸鼠10只,雄性,体重18~21 g,由本所实验动物房提供,生产许可证号(沪)2002-0001,使用许可证号SYXK(沪)2002-0009。将肺腺癌CSC和PLAGL2表达沉默的细胞浓度调整到1 $\times$ 10⁶/mL,在裸鼠一侧腹壁皮下注射1 $\times$ 10⁵肺腺癌CSC,对侧皮下注射等量的PLAGL2表达沉默细胞。每周观察肿瘤生长并测量体积。肿瘤体积计算公式为:V=(AB²)/2(单位: mm³),其中,A为瘤体最长径,B为A的垂直径。

1.2.6 功能基因组表达筛查 以体外培养的肺腺癌CSC为对照组,PLAGL2表达沉默细胞以及TTF-1表达沉默细胞^[23]为实验组,采用human-12T Illumina Beadchip进行全基因组表达筛查。按照生产商操作指南进行差异表达基因分析,即待测基因所有有效重复点的检测信号值减去背景信号值,获得平均信号值,若平均信号值与背景信号值之间存在统计学显著差异(P<0.05),则认定为待测基因阳性表达。实验组与对照组相应基因的信号值相差1.5倍或以上则为差异表达基因。

1.2.7 外周血循环肿瘤细胞的分离及检测 将枸橼酸盐抗凝的10 mL静脉血转移到含30 mL PBS的50 mL离心管中,离心去上清后加入10 mL含10%胎牛血清的培养基,各取5 mL加入含有5 mL淋巴细胞分离液的15 mL离心管中,400 $\times$ g离心20 min后收集界面细胞于50 mL离心管内,补充PBS至40 mL,离心,弃上清,加入350 μ L PBS。用CA9及ITGA5抗体标记细胞,MiniMACS分离柱分离得到CA9/ITGA5⁺肿瘤细胞。外周血样本由上海交通大学附属上海市胸科医院和苏州九龙医院提供,25例均经病理确诊为肺腺癌。

1.2.8 细胞分化的诱导 25 cm²培养瓶中的肺腺癌干细胞(2 $\times$ 10⁶/mL,10% FCS DMEM培养基)用DAPT(浓度为8 μ mol/L)诱导7天后,加入1,25-OH₂-D₃(浓度为1 $\times$ 10⁻⁷ mol/L)作用7天,免疫荧光检测该细胞表面标志的变化。

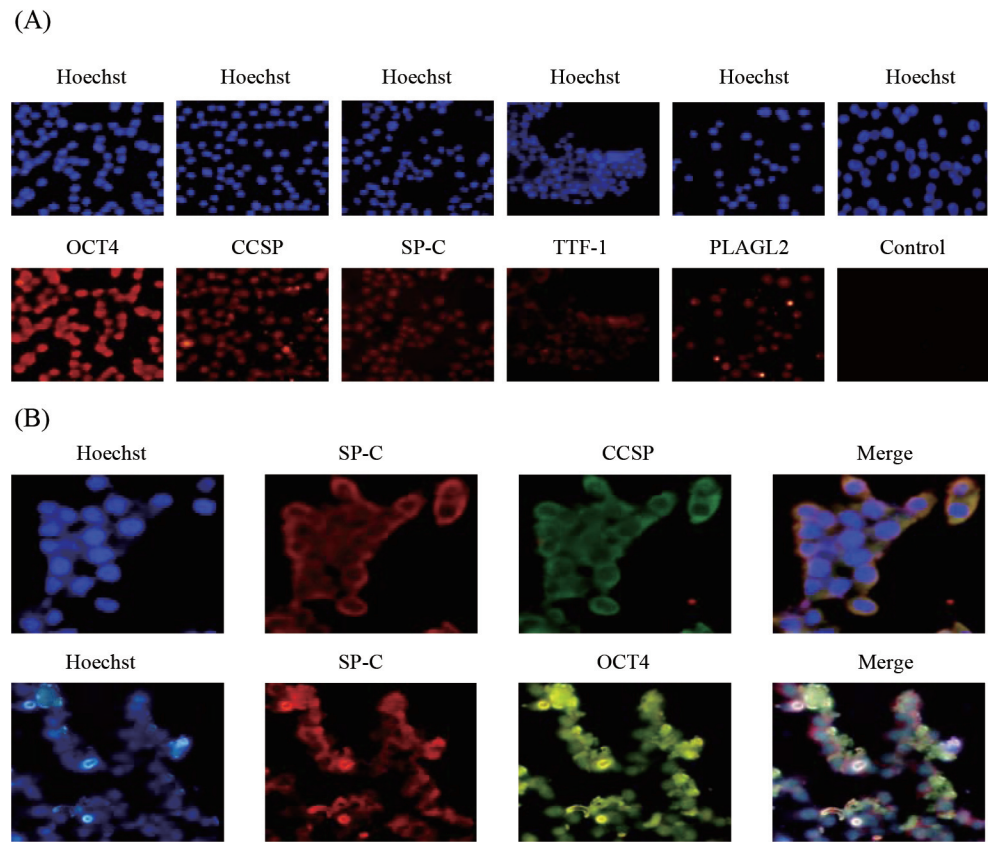
1.2.9 统计分析 对实验结果的数据资料进行描述性统计分析。两配对样本比较采用t检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺腺癌CSC中PLAGL2的表达

本实验室曾报道^[23], SPC-A1细胞株中CD221⁺细

胞亚群表达OCT4、CCSP、SP-C和TTF-1等干细胞表型标志, 本文证实了该细胞株中上述标志阳性表达(图1A)。此外, 研究结果还显示, SPC-A1 CD221⁺



A: 肺腺癌干细胞中干细胞标志OCT4、CCSP、SP-C、TTF-1和PLAGL2的表达; B: 肺腺癌干细胞中干细胞标志OCT4和SP-C、CCSP和SP-C的共表达。

A: the expression of stem cell marker OCT4, CCSP, SP-C, TTF-1 and PLAGL2 in lung adenocarcinoma CSC; B: the coexpression of stem cell marker OCT4 and SP-C, CCSP and SP-C in lung adenocarcinoma CSC.

图1 肺腺癌CSC中干细胞标志OCT4、CCSP、SP-C、TTF-1和PLAGL2的表达

Fig.1 The expression of stem cell marker OCT4, CCSP, SP-C, TTF-1 and PLAGL2 in lung adenocarcinoma CSC

细胞可以表达PLAGL2。双色免疫荧光检测证实, CD221⁺细胞共表达CCSP和SP-C, 即具有BASC样表型, 此类细胞也同时阳性表达OCT4(图1B)。

2.2 灭活PLAGL2促使肺腺癌CSC分化

将PLAGL2特异性 shRNA慢病毒转染肺腺癌CSC后, 经10 μg/mL嘌呤霉素筛选7天, 获得抗性细胞克隆(图2A)。免疫荧光检测(图2B)显示, 抗性细胞除PLAGL2表达显著下调外, OCT4、CCSP、SP-C和TTF-1的表达也明显下调, 但AQP5(aquaporin 5)染色阳性, 提示此类表达沉默细胞(称为PLAGL2-KD)已分化形成了AT1样细胞^[14]。

2.3 灭活PLAGL2损害了肺腺癌CSC的致瘤能力

本实验室曾报道, SPC-A1细胞中的CD221⁺细胞亚群在NOD-SCID复合免疫缺陷小鼠中具有显著致瘤能力, 仅需接种100个细胞即能形成肿瘤^[21]。本文观察了此类CSC在裸鼠中的成瘤率。实验结果显示, 皮下接种1×10⁵肺腺癌CSC后分别在第14, 16, 18, 21, 24 d观察到肿瘤, 成瘤率为50%(5/10只小鼠), 并且自接种后第4周开始测量肿瘤体积, 显示在第24~36天内肿瘤呈线性生长(图3)。为了评估PLAGL2基因对致瘤能力的影响, 我们在接种肺腺癌CSC的小鼠对侧皮下同时接种等量PLAGL2-KD细胞, 结果发现

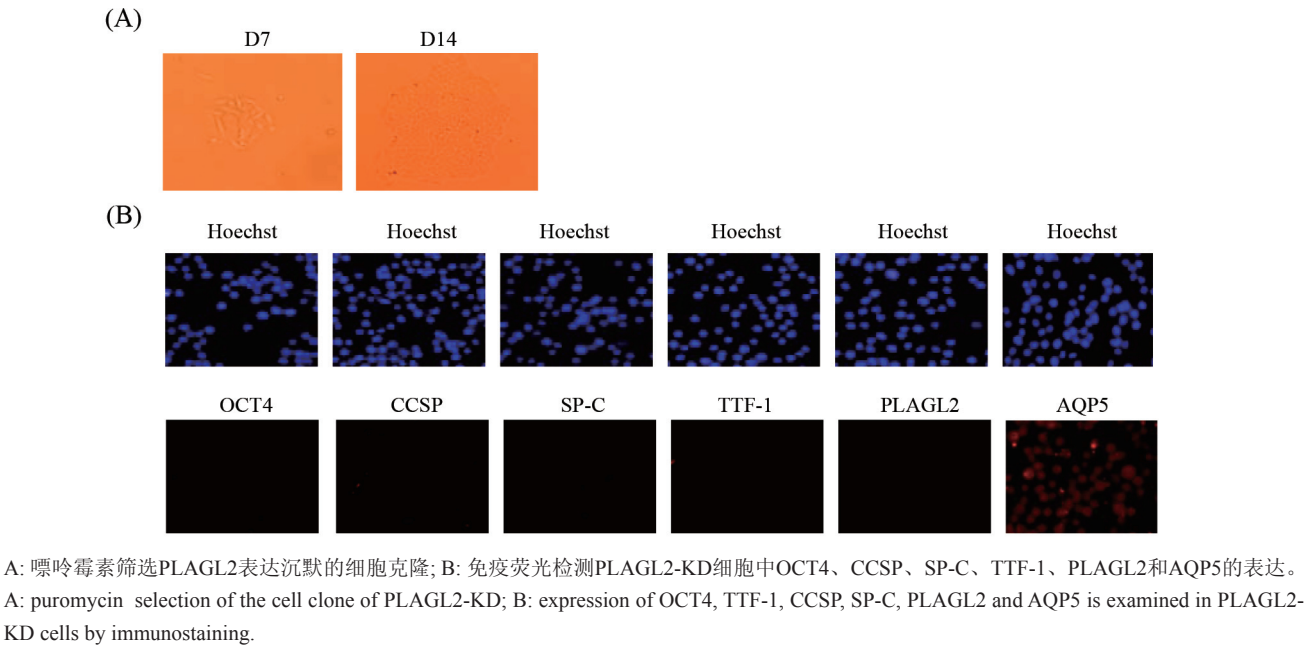


图2 PLAGL2-KD细胞克隆的形成及OCT4、CCSP、SP-C、TTF-1、PLAGL2、AQP5的表达检测
Fig.2 Formation of PLAGL2-KD cell clone and expression of OCT4, TTF-1, CCSP, SP-C, PLAGL2 and AQP5

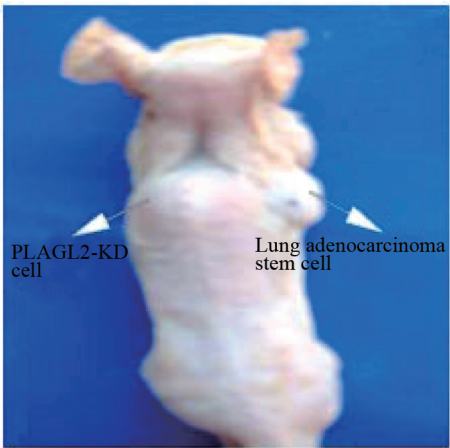


图3 OCT4+BASC与PLAGL2-KD细胞致瘤性的差异
Fig.3 The oncogenicity difference between the OCT4+BASC and the PLAGL2-KD cells

在相同观察期内均无肿瘤形成(表1), 说明PLAGL2-KD细胞的致瘤能力明显降低($P<0.05$)。

2.4 差异表达基因分析

采用human-12T Illumina Beadchip对2种基因表达沉默细胞(TTF1-KD和PLAGL2-KD)进行了全基因组表达筛查, 与同步检测的肺腺癌CSC比较, 以信号检测值相差1.5倍或以上为基准, 筛查差异表达基因。结果发现TTF-1灭活引起1 353个基因差异表达, 其中952个基因表达上调, 401个基因表达下调。而PLAGL2灭活仅引起220个基因差异表达, 其中, 105个基因表达上调, 115个基因表达下调。上述差异表达基因的分类及验证尚在进行之中。

通过芯片数据库分析, 我们发现PLAGL2表达在基因沉默细胞中明显下调(表2), 此结果经RT-PCR

表1 肺腺癌干细胞和PLAGL2-KD细胞致瘤性的不同

Table 1 The tumorigenic difference between lung adenocarcinoma CSC and PLAGL2-KD cells			
细胞类型 Cell type	天数 Days	成瘤率 Rate of tumorigenesis	肿瘤体积(cm ³) Tumor volume(cm ³)
Lung adenocarcinoma stem cells	21	30%	①0.022 5②0.128 6③0.018
	24	50%	①0.026 1②0.139 3③0.033 12④440.027⑤0.012 5
	28	50%	①0.027 4②0.200 8③0.034 6④440.042 6⑤0.035 5
	32	50%	①0.050 5②0.274 1③0.035 6④440.119 1⑤0.078
PLAGL2-KD cells	21	0	0
	24	0	0
	28	0	0
	32	0	0

表2 肺腺癌CSC的分子表型

Table 2 The molecular phenotype of lung adenocarcinoma CSC

基因	基因定义	信号值	P值	PLAGL2-KD [#]	TTF1-KD [#]
Genes	Gene definition	Signal score	P value	PLAGL2-KD [#]	TTF1-KD [#]
<i>PLAGL2</i>	Pleiomorphic adenoma gene-like 2	341.631	0	-2.522	1.036
<i>AHR</i>	Aryl hydrocarbon receptor	8 901.270	0	-1.478	-1.233
<i>ANXA8</i>	Annexin A8	138.798	0	3.303	1.123
<i>CDH1</i>	Cadherin 1, type 1, E-cadherin(epithelial)	-44.312	0.979	—	—
<i>CYP1A1</i>	Cytochrome P450, family 1, subfamily A	672.577	0	-672.577	-11.061
<i>CYP1B1</i>	Cytochrome P450, family 1, subfamily B	971.75	0	-3.07	-3.02
<i>HES1</i>	Hairy and enhancer of split 1(<i>Drosophila</i>)	1 270.439	0	2.284	-1.843
<i>KRT5</i>	Keratin 5	-20.650	0.756	—	—
<i>KRT7</i>	Keratin 7	414.957	0	2.825	1.551
<i>KRT8</i>	Keratin 8	1 059.045	0	1.611	1.524
<i>KRT14</i>	Keratin 14	-34.850	0.881	—	—
<i>LAMP3</i>	Lysosomal-associated membrane protein 3	67.921	0.005	-2.831	-1.259
<i>NOTCH1</i>	Notch homolog 1(<i>Drosophila</i>)	567.298	0	-1.239	1.031
<i>P63</i>	Tumor protein p63	2.099	0.505	—	—
<i>RXRβ</i>	Retinoid X receptor beta	332.593	0	1.597	1.018
<i>VIM</i>	Vimentin	7 273.688	0	1.073	-1.345
<i>SLUG</i>	Snail homolog 2(<i>Drosophila</i>)(<i>SNAI2</i>)	129.330	0	1.085	1.372
<i>TWIST1</i>	Twist homolog 1(<i>Drosophila</i>)	106.260	0	-4.555	-26.586
<i>VDR</i>	Vitamin D(1,25-dihydroxyvitamin D3) receptor	29.271 4	0.127	1.111	1.731

Signal为经校正后的芯片检测信号值, P值为信号值与本底值的统计分析结果, $P < 0.05$ 显示差异有显著意义。*差异倍数。

Signal is the corrected signal detected in the array, P value is the statistical result compared with the basic signal, $P < 0.05$ has statistical significance.

[#]Folds score.

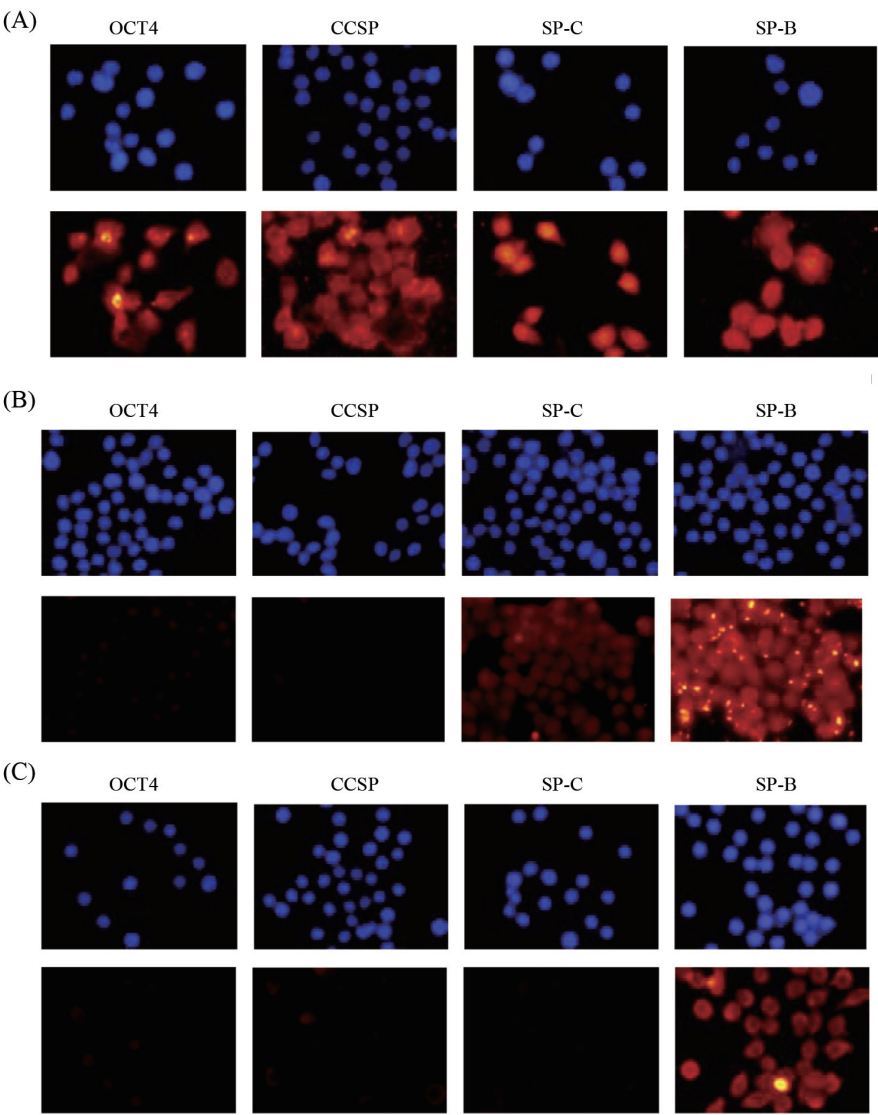
检测确认(资料未列)。此外,除了SP-C和CCSP表型标志阳性表达外(图1),肺腺癌CSC还表达AT2细胞的板层小体(lamellar body)相关膜蛋白LAMP3(又称DC-LAMP)和ANXA8^[15-16]。此类细胞也同时表达Clara细胞相关蛋白^[17],如AHR、CYP1A1、CYP1B1以及呼吸道单层上皮标志KRT7和KRT8(表2)。在TTF-1和PLAGL2表达沉默的细胞中,CYP1A1和CYP1B1表达均明显下调,而KRT7和KRT8表达显著上调,免疫荧光检测显示CCSP染色阴性,说明出现肺泡上皮样分化。

此外,肺腺癌CSC具有表皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[18]分子表型特征,如VIM高表达而CDH1不表达,进一步分析EMT的转录调控基因,发现此类细胞表达Slug(Snai2)和Twist1。肺腺癌CSC的另一个分子特征是不表达基底细胞标志p63^[19]、KRT5和KRT14^[20],说明此类细胞不具备分化形成气道上皮的潜能。因而我们探讨了能否促使肺腺癌CSC向成熟的AT2细胞分化。经过分析研究,我们发现采用 γ -分泌酶(γ -secretase)特异性抑制剂DAPT阻断Notch信号后,CCSP表达下调,而在此基础上用维生素D3活性产物1,25-OH₂-

D3(VD3)进一步诱导,则OCT4和SP-C表达下调而分化形成了SP-B⁺成熟AT2细胞(图4)。表2显示肺腺癌CSC阳性表达Notch受体及其转录调控的靶基因HES1以及VD3受体VDR和RXR,但Notch抑制剂与VD3诱导细胞分化的分子机制尚待进一步研究。

我们最后筛查了肺腺癌CSC的表面标志。表3结果显示,肺腺癌CSC不表达CD117和CD133,我们也没有筛查到CD73和CD90的特异性信号,但存在MSC标志CD105,此标志在TTF-1和PLAGL2基因灭活后表达上调。此外,我们发现肺腺癌CSC表达CA9和ITGA5,其表达在上述基因灭活后显著下调。

为了验证CA9和ITGA5能否作为肺腺癌CSC的特异性标志,我们采用CA9和ITGA5抗体组合从SPC-A1细胞中MACS分选阳性细胞后,免疫荧光检测了此类细胞的表型,揭示此类阳性细胞同时表达OCT4、CCSP和SP-C(图5A)。然后,我们应用这项技术检测了25例肺腺癌患者外周血中的循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC),发现CA9/ITGA5抗体俘获的细胞均阳性表达KRT(即属于表皮样癌细胞),此类CTC同时表达OCT4和SP-C(图5B),提示这些CSC通过形成隐匿性(occult)血源转移威胁患者生



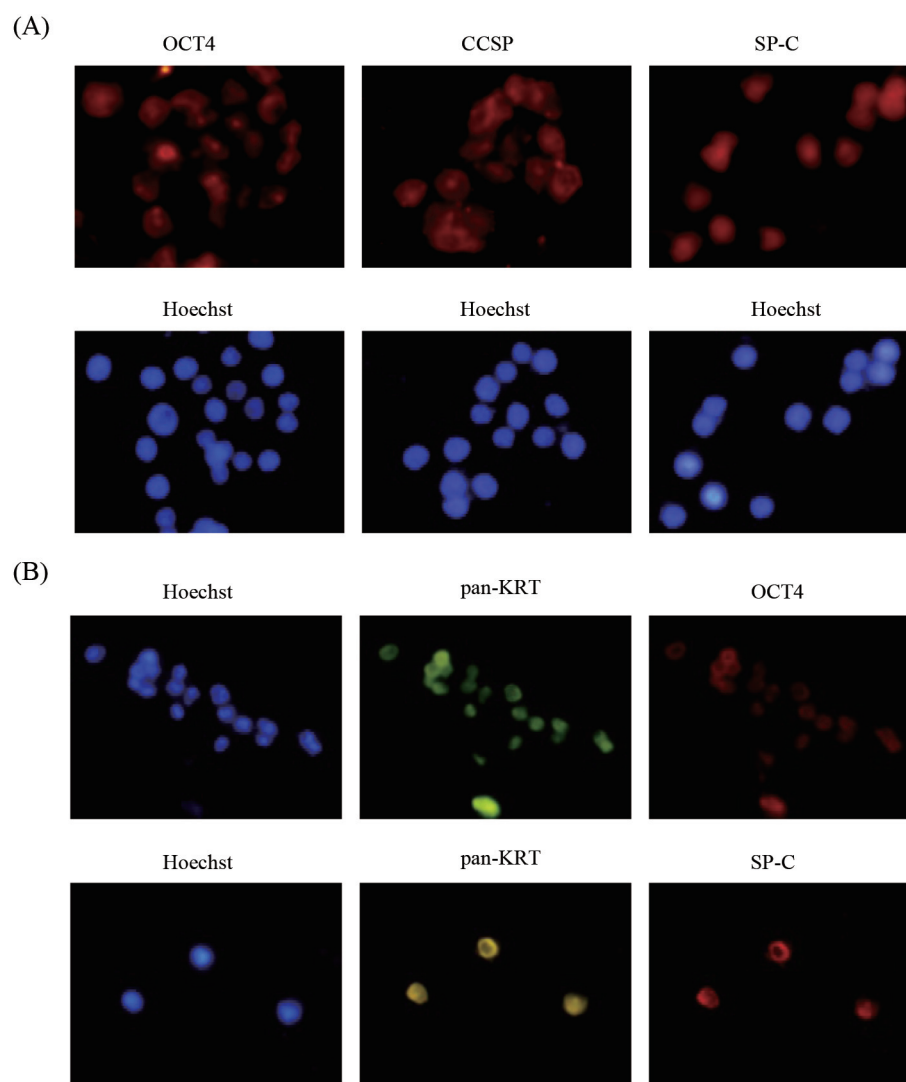
A: 体外培养的肺腺癌CSC中OCT4、CCSP、SP-C和SP-B的表达; B: 8 mmol/L DAPT处理7天后OCT4表达下调; C: DAPT处理过的细胞经7天的1×10⁻⁷ mol/L 1,25-OH₂-D₃(VD₃)作用后, OCT4和SP-C表达明显下调。
A: the expression of OCT4, CCSP, SP-C and SP-B in the cultured lung adenocarcinoma CSC; B: down-regulation of CCSP expression was observed after 7 days of treatment with 8 mmol/L DAPT; C: the significant declination of OCT4 and SP-C expression was found after exposing the DAPT-treated cells to 1×10⁻⁷ mol/L 1,25-OH₂-D₃ (VD₃) for further 7 days.

图4 肺腺癌CSC的诱导分化
Fig.4 Induced differentiation of lung adenocarcinoma CSC

表3 肺腺癌CSC的表面标志
Table 3 The surface markers of lung adenocarcinoma CSC

基因	基因定义	信号值	P值	PLAGL2-KD [#]	TTF1-KD [#]
Genes	Gene definition	Signal score	P value	PLAGL2-KD [#]	TTF1-KD [#]
<i>CD117</i>	V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	-35.137	0.881	—	—
<i>CD133</i>	Prominin 1	15.105	0.291	—	—
<i>CD73</i>	5'-nucleotidase, ecto(NT5E)	-5.209	0.606	—	—
<i>CD90</i>	Thy-1 cell surface antigen	-31.205	0.830	—	—
<i>CD105</i>	Endoglin(ENG)	63.387	0.008	1.467	1.551
<i>ITGA5</i>	Integrin, alpha 5	658.001	0	-1.991	-2.043
<i>CA9</i>	Carbonic anhydrase IX	353.364	0	-2.9	-26.998

Signal为经校正后的芯片检测信号值, P值为信号值与本底值的统计分析结果, P<0.05显示差异有显著意义。[#]差异倍数。
Signal is the corrected signal detected in the array, P value is the statistical result compared with the basic signal, P<0.05 has statistical significance.
[#]Folds score.



A: CA9⁺/ITGA5⁺ SPC-A1细胞中OCT4、CCSP和SP-C的表达; B: 肺腺癌病人中OCT4、pan-KRT和SP-C的表达。

A: the expression of OCT4, CCSP and SP-C in CA9⁺/ITGA5⁺ SPC-A1 cells; B: the expression of OCT4, pan-KRT and SP-C in patients with lung adenocarcinoma.

图5 肺腺癌细胞和肺腺癌病人外周血中OCT4、CCSP、Pan-KRT和SP-C的表达

Fig.5 The expression of OCT4, CCSP, pan-KRT and SP-C in CSCs and in peripheral blood of patients with lung adenocarcinoma

存。我们曾对肺腺癌CSC的转移潜能进行了分析, 证明此类癌细胞进入血循环后能形成广泛肺转移^[22]。

3 讨论

近4年来我们相继报道, 人体肺腺癌细胞株及肺腺癌组织中存在一类表达OCT4的细支气管肺泡干细胞 (bronchioalveolar stem cell, BASC) 样CSC, 我们曾将其命名为OCT4⁺BASC。实验研究显示, 肺腺癌CSC具有显著的致瘤、转移和耐药特性^[21-25], 临床研究揭示此类CSC严重威胁患者的生存^[26-28]。在成功建立SMC体外培养系统后, 我们发现此类CSC还同时表达Nanog和Sox2。而通过选择性灭活*TTF-1*基因, 发

现肺腺癌CSC能够分化形成SP-C⁺的AT2样细胞, 此类基因表达沉默细胞(称为TTF1-KD)经传代培养数周后即失去SP-C的表达而变成AQP5⁺的AT1样细胞^[23]。

以上研究结果提示, 肺腺癌CSC属于肺泡上皮细胞谱系(lineage), 其潜在的细胞起源是肺泡上皮中的未分化干细胞或其祖细胞。最近3年来的研究结果揭示, 人体肺脏的肺泡上皮中确实存在干细胞的层级(hierarchy)结构。2011年, 美国哈佛医学院Kajstura等^[11]首次报道人体肺脏的肺泡上皮中存在未分化的多潜能肺干细胞(lung stem cells, LSC)。此类细胞表达CD117(stem cell factor receptor, c-kit)、OCT4、Nanog和Sox2等干细胞标志, 但不表达间质细胞标

志,如波形蛋白(vimentin, VIM)和呼吸上皮的谱系标志。通过异种气道移植实验,证明LSC能分化形成纤毛细胞、Clara细胞和肺泡上皮细胞。同年,日本东北大学Fujino等^[10]分离鉴定了一类AT2样肺泡祖细胞,其特征是同时表达SP-C和间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)标志,如CD73、CD90、CD105和VIM。经体外诱导分化后,这些细胞中的MSC标志表达明显下调并出现AT2细胞的形态特征,如微绒毛(microvilli)和板层小体。而美国加州大学Ballard等^[9]在分离人体肺脏AT2细胞后,发现此类细胞同时表达SP-C和CCSP的特异性mRNA,免疫荧光检测显示CCSP⁺细胞约占AT2细胞总数的4%,研究结果揭示人体肺脏中存在BASC样细胞。综合免疫荧光检测和基因芯片筛查,我们发现肺腺癌CSC的表型特征介于LSC和AT2祖细胞之间。肺腺癌CSC类似于LSC,可以表达OCT4、Nanog和Sox2,但表达多个谱系相关标志,如MSC标志CD105和VIM,提示CSC已出现分化。此外,肺腺癌CSC除了表达AT2细胞标志(如SP-C、LAMP3和ANXA8)外,还同时表达Clara细胞相关标志(如CCSP、AHR、CYP1A1、CYP1B1)以及呼吸道单层上皮标志(KRT7和KRT8),但不表达CD73和CD90,提示其分化出现在AT2样肺泡祖细胞之前。这种表型比较分析为深入探讨肺腺癌CSC的细胞起源提供了研究依据。

发育生物学研究揭示,肺泡上皮的发育和分化受TTF-1转录因子的调控。基因敲除(knockout)实验显示,TTF-1基因缺陷小鼠肺脏的气道(气管和支气管)发育良好,但肺泡发育不全^[29]。但在缺氧(hypoxic)状态下,肺泡上皮标志SP-C的表达主要依赖于PLAGL2,而最近研究发现该因子能激活Wnt信号通路从而抑制干细胞分化^[30-31]。因此,异位(ectopic)表达PLAGL2影响肺泡干细胞尤其是BASC的生物学功能,并形成肺气肿和肺腺癌等病理性改变^[3,32]。本文结果显示PLAGL2是肺腺癌一种潜在的癌基因,灭活该基因导致CSC分化形成AT1样细胞,此类分化细胞明显失去致瘤能力。结合前期研究^[5],我们认为肺腺癌CSC的分化受TTF-1和PLAGL2转录因子的双重调控,这种调控机制保障了肺腺癌细胞不会终末分化成为AT1样细胞。

CSC研究的最终目标是选择性杀灭此类癌细胞或诱导其分化,从而提高临床疗效、改善患者预后。根据芯片数据分析我们发现,随着TTF-1的表达沉

默,Notch信号通路特别是其调控的靶基因Hes1表达显著下调,提示该信号途径可能参与肺腺癌CSC的分化调控。据此我们采用小分子抑制剂DAPT抑制 γ -分泌酶阻止Notch受体的胞浆内功能域NICD(Notch intracellular domain)形成,结果证明能够显著下调CCSP的表达,而在此基础上激活VD3受体,可以使肺腺癌CSC变成OCT4⁺SP-C⁺但SP-B⁺的成熟AT2样细胞。近年来,Notch信号通路作为CSC靶向治疗的新颖靶标已引起学界关注,目前已有多种 γ -分泌酶抑制剂正在进行临床试验^[33],我们的初步研究为肺癌CSC靶向治疗提供了新的思路。

综上所述,本文结果揭示肺腺癌CSC具有肺干(祖)细胞的分子表型,其分化受TTF-1和PLAGL2的双重调控。通过基因操作以及药理性诱导可以驱使此类癌细胞分化,提示肺癌CSC的靶向治疗是可以实现的。但此类靶向治疗的分子机制尚需进一步研究探讨。

参考文献 (References)

- 1 Kas K, Voz ML, Hensen K, Meyen E, van de Ven WJ. Transcriptional activation capacity of the novel PLAG family of zinc finger proteins. *J Biol Chem* 1998; 273(36): 23026-32.
- 2 Abdollahi A. LOT1 (ZAC1/PLAGL1) and its family members: mechanisms and functions. *J Cell Physiol* 2007; 210(1): 16-25.
- 3 Yang YS, Yang MC, Weissler JC. Pleiomorphic adenoma gene-like 2 expression is associated with the development of lung adenocarcinoma and emphysema. *Lung Cancer* 2011; 74(1): 12-24.
- 4 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.
- 5 Wang X, Kruithof-de Julio M, Economides KD, Walker D, Yu H, Halili MV, *et al.* A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. *Nature* 2009; 461(7263): 495-500.
- 6 Goldstein AS, Huang J, Guo C, Garraway IP, Witte ON. Identification of a cell of origin for human prostate cancer. *Science* 2010; 329(5991): 568-71.
- 7 Liu C, Sage JC, Miller MR, Verhaak RG, Hippenmeyer S, Vogel H, *et al.* Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell* 2011; 146(2): 209-21.
- 8 Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, *et al.* Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(31): 12771-5.
- 9 Ballard PL, Lee JW, Fang X, Chapin C, Allen L, Segal MR, *et al.* Regulated gene expression in cultured type II cells of adult human lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010; 299(1): L36-50.
- 10 Fujino N, Kubo H, Suzuki T, Ota C, Hegab AE, He M, *et al.* Isolation of alveolar epithelial type II progenitor cells from adult human lungs. *Lab Invest* 2011; 91(3): 363-78.
- 11 Kajstura J, Rota M, Hall SR, Hosoda T, D'Amario D, Sanada F, *et al.* Evidence for human lung stem cells. *N Engl J Med* 2011; 364(19): 1795-806.

- 12 Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67(10): 4827-33.
- 13 Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, *et al.* Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 2008; 15(3): 504-14.
- 14 Verkman AS. Role of aquaporins in lung liquid physiology. *Respir Physiol Neurobiol* 2007; 159(3): 324-30.
- 15 Fisher AB, Dodia C, Ruckert P, Tao JQ, Bates SR. Pathway to lamellar bodies for surfactant protein A. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010; 299(1): L51-8.
- 16 Wade KC, Guttentag SH, Gonzales LW, Maschhoff KL, Gonzales J, Kolla V, *et al.* Gene induction during differentiation of human pulmonary type II cells *in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34(6): 727-37.
- 17 Chang H, Chang LW, Cheng YH, Tsai WT, Tsai MX, Lin P. Preferential induction of CYP1A1 and CYP1B1 in CCSP-positive cells. *Toxicol Sci* 2006; 89(1): 205-13.
- 18 Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133(4): 704-15.
- 19 Sheikh HA, Fuhrer K, Cieply K, Yousem S. p63 expression in assessment of bronchioloalveolar proliferations of the lung. *Mod Pathol* 2004; 17(9): 1134-40.
- 20 Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, *et al.* Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(31): 12771-5.
- 21 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.
- 22 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.
- 23 李焱, 薛明明, 亓雪莲, 耿沁, 徐慧莉, 董强刚. 靶向TTF-1转录因子诱导人肺腺癌干细胞表型分化. *中国细胞生物学学报* 2011; 33(2): 119-26.
- 24 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.
- 25 黄进肃, 亓雪莲, 张雪艳, 李焱, 韩宝惠, 董强刚, 等. 人肺腺癌干细胞对顺铂和卡铂的药物敏感度分析. *肿瘤* 2010; 30(2): 95-9.
- 26 张雪艳, 郑必强, 韩宝惠, 黄进肃, 徐慧莉, 董强刚, 等. 人肺腺癌干细胞的表型及与肺腺癌患者预后的关系. *中华肿瘤杂志* 2009; 31(11): 836-40.
- 27 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.
- 28 Zhang XY, Dong QG, Huang JS, Huang AM, Shi CL, Jin B, *et al.* The expression of stem cell-related indicators as a prognostic factor in human lung adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2010; 102(7): 856-62.
- 29 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.
- 30 Guo Y, Yang MC, Weissler JC, Yang YS. PLAGL2 translocation and SP-C promoter activity—a cellular response of lung cells to hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 360(3): 659-65.
- 31 Zheng H, Ying H, Wiedemeyer R, Yan H, Quayle SN, Ivanova EV, *et al.* PLAGL2 regulates Wnt signaling to impede differentiation in neural stem cells and gliomas. *Cancer Cell* 2010; 17(5): 497-509.
- 32 Yang YS, Yang MC, Guo Y, Williams OW, Weissler JC. PLAGL2 expression-induced lung epithelium damages at bronchiolar alveolar duct junction in emphysema: bNip3- and SP-C-associated cell death/injury activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 297(3): L455-66.
- 33 Pannuti A, Foreman K, Rizzo P, Osipo C, Golde T, Osborne B, *et al.* Targeting Notch to target cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 2010; 16(12): 3141-52.

A Study on the Molecular Phenotype of Human Lung Adenocarcinoma Stem Cells and Biological Functions of *PLAGL2* Gene

Xue Mingming¹, Ning Renli¹, Huang Jinsu², Li Zhong³, Li Rong², Xu Huili¹, Dong Qianggang^{1*}

(¹Laboratory of Cancer Stem Cells, Shanghai Cancer Institute, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200032, China; ²Department of Pulmonary Medicine, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China; ³Department of pneumosurgery, JiuLong Hospital, Shanghai Jiaotong University, Suzhou 215000, China)

Abstract Emerging evidence indicated that tumors originated from malignant transformation of tissue-resident stem cells and/or progenitor cells. These transformed stem/progenitor cells are named as tumor-initiating cells or cancer stem cells (CSC). However, the potential cell origin of CSC in lung cancer remains unclear at present. We reported the existence of OCT4-expressing BASC (bronchiolaveolar stem cells)-like CSC in human lung adenocarcinoma. With the technique of RNA interfering, we inactivated the expression of *PLAGL2* (pleiomorphic adenoma gene-like 2), a gene encoding the zinc finger transcription factors, in the CSC of lung adenocarcinoma. The results demonstrated that knockdown of *PLAGL2* enforced the cells to differentiate into the AT1 (alveolar type 1) cell-like state and lost the tumorigenic ability. With the platform of microarray (gene chip) screening, we showed that the CSC in lung adenocarcinoma shared molecular phenotypes with the undifferentiated stem cells and the alveolar progenitor cells of human lung, suggesting these primitive cells as a promising cell origin of CSC in lung adenocarcinoma. In addition, the results presented herein revealed that the differentiation of CSC in lung adenocarcinoma was under the dural control of TTF-1 (thyroid transcription factor-1) and *PLAGL2*. By gene menagement and pharmacological induction, these CSCs were able to differentiate. These studies provided a novel evanue for CSC-targeted therapies in lung cancer.

Key words lung adenocarcinoma; cancer stem cells; molecular phenotype; *PLAGL2*; cell origin

Received: December 20, 2011 Accepted: March 15, 2012

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, No.10411968600) 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