靶向肺腺癌干细胞OCT4多潜能基因的 体外抗癌效应研究

宁仁利¹ 黄进肃² 吴丽霞¹ 李 榕² 徐慧莉¹ 周 瑾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上海交通大学附属胸科医院肺内科,上海 200030)

摘要 八聚体结合转录因子4(octamer-binding transcription factor 4, OCT4)是干细胞维持自我 更新所必需的多潜能基因(pluripotent gene)。近年来已有多项临床研究报道, 肺腺癌中存在OCT4阳 性细胞的患者预后差, 揭示OCT4是此类肿瘤的一个重要治疗靶标。该文借助小RNA(micro RNA) 介导的基因沉默及cDNA表达芯片筛查技术, 证明OCT4在肺腺癌细胞中具有转录调控功能。实验 显示, 15-脱氧--前列腺素J₂(15d-PGJ₂)与去铁胺(desferrioxamine, DFO)组合, 可以显著下调肺腺癌细 胞中OCT4的表达并有效抑制细胞增殖及集落形成。研究结果显示至少在体外实验条件下, 药理性 调控OCT4表达具有显著抗癌效应。该结果为探索肺癌靶向治疗新技术提供了思路。

关键词 肺腺癌; OCT4; 药理性调控; 抗癌效应

八聚体结合转录因子4(octamer-binding transcription factor 4, OCT4)属于POU(Pit-Oct-Unic)蛋白家 族,其编码基因POU5fl位于6号染色体短臂6p21.33 区^[1]。OCT4通过与启动子区的八聚体基序(ATTTG-CAT)特异性结合调控基因表达,是干细胞维持自我 更新及分化潜能的核心转录因子^[2]。但近年来的研 究发现,OCT4可在多种实体肿瘤中阳性表达,并且 其表达威胁患者生存^[3-6]。因此,OCT4作为肿瘤靶向 治疗的关键靶标之一,引起了学术界的高度关注。

肺腺癌是肺癌的常见组织类型之一,其OCT4 的表达与预后呈负相关^[7-13]。此类肿瘤可能源自外 周肺的细支气管肺泡干细胞(bronchioalveolar stem cells, BASC)或具有BASC表型的II型肺泡细胞(alveolar type 2, AT2)的恶性转化^[14-15],其中AT2细胞特 异性表达低氧诱导因子HIF2α(hypoxia-inducible factors 2α)^[16-17]。实验证明,*HIF2α*异常表达具有促癌效 应,临床研究则显示,肺腺癌中存在*HIF2α*与OCT4共 表达的现象,并且*HIF2α*高表达患者预后差^[12,18]。现 有证据显示,胚胎干细胞中OCT4表达受*HIF2α*的转 录调控^[19],提示*HIF2α*可能也是肺腺癌中OCT4的上 游调控基因。基于上述分析,本文以*HIF2α*为治疗 靶标,探讨了靶向OCT4的体外抗癌效应。

1 材料与方法

1.1 材料

胎牛血清、DMEM及DMEM/F12培养基均购自HyClone公司。

实验所用免疫荧光检测抗体: 羊抗人OCT4多 克隆抗体(sc-9081、5279), 羊抗人CCSP单克隆抗体 (sc-9770), 兔抗人SP-C多克隆抗体(sc-13979), 鼠抗人 IRP1单克隆抗体(sc-166022), 鼠抗人Slug单克隆抗体 (sc-166902), 荧光素Rhodamine标记的驴抗鼠IgG、驴 抗羊IgG及驴抗兔IgG抗体均购自Santa Cruz公司; 兔 抗人HIF2α多克隆抗体(NB100-122)购自Novus公司。

磁珠偶联抗体: 鼠抗人CD221抗体购自BD公司, 羊抗鼠IgG免疫磁珠购自Miltenyi公司。

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

收稿日期: 2012-06-28 接受日期: 2012-07-25

国家自然科学基金(No.30872952, No.81101770)、上海市科委科研基金(No.09411961700, No.10411968600)和上海市卫生局科研基金(No.2009198, No.20114184)资助项目

^{*}通讯作者。Tel: 021-64046615, E-mail: qgdong@shsmu.edu.cn

15-脱氧--前列腺素J₂(15d-PGJ₂)(Cat.No.18500)购 自Cayman公司,去铁胺(desferrioxamine, DFO)(D95533) 购自Sigma公司, CCK-8(Cell Counting Kit-8)购自Dojindo公司,结晶紫染液(C0121)购自碧云天生物技术研究 所。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 肺腺癌SPC-A1和A549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,肺腺癌PC9细胞由同济大学附属 肺科医院范丽宏教授惠赠。细胞培养条件为含10% 胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的 DMEM或DMEM/F12培养基, 37 ℃、5% CO₂恒温培 养。实验选择对数增殖期细胞, 经0.25%胰酶消化后 收集。

1.2.2 肺腺癌干细胞的分选与培养 收集SPC-A1
 细胞,离心后重悬于500 μL PBS中,按2 μg抗体/10⁶
 细胞的比例加入鼠抗人CD221抗体,4 ℃避光温育

30 min后用PBS离心洗涤,细胞重悬于500 μL PBS中,加入羊抗鼠IgG磁珠4 ℃避光孵育30 min, PBS离心洗涤后用磁性细胞分选柱(MACS)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 μmol/L)和BIO(1 μmol/L)。

1.2.3 表达载体构建 应用计算机软件筛查人 POU5fI基因的4个miRNA干扰序列(表1划线部分所 示),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。应用此表达 载体,miRNA转染细胞呈绿色荧光蛋白GFP示踪基 因阳性(图1)。

Table 1OCT4 miRNA sequences				
miRNA名称	miRNA序列(5'-3')			
miRNA	miRNA sequences(5'-3')			
SR80-1F	TGC TGA GAA GGC GAA ATC CGA AGC CAG TTT TGG CCA CTG ACT GAC <u>TGG CTT CGT TTC GCC TTC T</u>			
SR80-1R	CCT GAG AAG GCG AAA CGA AGC CAG TCA GTC AGT GGC CAA AAC TGG CTT CGG ATT TCG CCT TCT C			
SR80-2F	TGC TGT TCT GCA GAG CTT TGA TGT CCG TTT TGG CCA CTG ACT GAC <u>GGA CAT CAG CTC TGC AGA A</u>			
SR80-2R	CCT GTT CTG CAG AGC TGA TGT CCG TCA GTC AGT GGC CAA AAC GGA CAT CAA AGC TCT GCA GAA C			
SR80-3F	TGC TGT GTT CTT GAA GCT AAG CTG CAG TTT TGG CCA CTG ACT GAC <u>TGC AGC TTC TTC AAG AAC A</u>			
SR80-3R	CCT GTG TTC TTG AAG AAG CTG CAG TCA GTC AGT GGC CAA AAC TGC AGC TTA GCT TCA AGA ACA C			
SR80-4F	TGC TGA AAT TCT CCA GGT TGC CTC TCG TTT TGG CCA CTG ACT GAC GAG AGG CAC TGG AGA ATT T			
SR80-4R	CCT GAA ATT CTC CAG TGC CTC TCG TCA GTC AGT GGC CAA AAC GAG AGG CAA CCT GGA GAA TTT C			

表1 OCT4 miRNA序列



图1 miRNA干扰序列表达质粒载体构建图 Fig.1 Scheme of cloning miRNA sequence into the expression vector

1.2.4 基因转染 6孔板(Costa公司)内每孔种植 2.0×10⁵ CD221⁺细胞(1.8 mL含血清培养基),培养24 h。 将Exgen 500微纳米转染试剂(Fermentas公司)与4种 *OCT4*表达质粒(各1 μg)混合温育10 min后,每孔加 入200 μL配制的转染试剂,按生产商提供的操作方 法,培养48 h后分选细胞。

1.2.5 流式细胞(FACS)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,经FACS Aria II流式细胞仪(BD公司)分选并 收集GFP⁺及GFP⁻细胞。

1.2.6 免疫荧光检测 将细胞(1×10⁵细胞, 50 μL 培养基)接种于置有无菌盖玻片的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3 min,下同), 0.25% Triton通透15 min, 1% BSA封闭非特异性结合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Hoechest 33342(1:50稀 释)染核5 min, PBS洗2次,加封片剂于Olympus IX51 型荧光显微镜下观察。

1.2.7 功能基因组表达筛查 以体外培养的肺腺 癌CSC为对照组,OCT4表达沉默细胞为实验组,提 取总RNA后按照生产商操作指南,采用human-12T Illumina Beadchip进行全基因组表达筛查。阳性表 达及差异表达基因按以下标准确定,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),视为阳性表达。若实验组与对 照组相应基因的信号值相差1.5倍或以上,则认定为 差异表达。

1.2.8 细胞分化的诱导 PC9细胞(2×10⁶)培养
在25 cm²培养瓶中过夜, 换液为含终浓度分别为
10 μmol/L 15d-PGJ₂和100 μmol/L DFO的10 mL 10%
胎牛血清的培养基, 处理48 h后免疫荧光检测该细胞表型标志的表达。

1.2.9 细胞增殖及集落形成实验 细胞增殖采用CCK-8比色法检测,在96孔板中每孔加入1×10³个细胞及100 μL含10%胎牛血清的培养基,培养48 h后分4组,分别用不同浓度的15d-PGJ₂、DFO分别单独处理或15d-PGJ₂+DFO组合处理48 h,每孔加入100 μL CCK-8,作用4 h后在492 nm波长处检测吸光

值。细胞存活率(%)=(实验组吸光值/对照组吸光 值)×100%。集落形成采用结晶紫染色法检测,在6 孔板内每孔加入1×10³个细胞及2 mL含10%胎牛血 清的培养基,细胞贴壁5 h后分组(每组3孔),用不同 浓度15d-PGJ₂及DFO处理72 h,更换培养基后继续培 养7 d。细胞集落经4%多聚甲醛固定10 min,1 mL结 晶紫染色10 min后摄片。细胞集落中的结晶紫采用 3%乙酸溶出,在570 nm波长处检测吸光值。预实验 结果显示,在1×10³~1×10⁶细胞范围内,吸光值与细 胞数量间呈线性关系(数据未显示)。

1.2.10 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 肺腺癌干细胞中OCT4转录调控的靶基因分析

与前期报道^[20]一致, SPC-A1细胞株中的CD221⁺ CSC在SMC特殊培养基中可以传代培养并表达OCT4、 CCSP和SP-C(图2A)。基于上述平台,我们采用微纳 米介导的基因转染技术使肺腺癌CSC表达POU5fl特 异性miRNA。FCM(flow cytometry)检测显示转染率 (GFP⁺比例)为17.9%(图2B)。分选获得GFP⁺和GFP⁻细 胞群后进行免疫荧光检测,证实未转染的GFP⁻细胞表 达OCT4,而miRNA转染的GFP⁺细胞中OCT4表达显著 下调(图2C)。

提取GFP⁺及GFP⁻细胞总RNA后,采用human-12T IlluminaBeadchip进行了全基因组表达筛查。根据 Boyer等^[2]的报道,我们从芯片数据库中筛查了具有 Octameric motif的OCT4靶基因,发现GFP⁻细胞(即肺 腺癌CSC)阳性表达271个OCT4靶基因,其中129个 基因在GFP⁺细胞中差异表达,包括43个基因表达上 调和86个基因下调(资料未显示)。表2列出了差异表 达最显著的20个基因,实验结果说明OCT4在肺腺癌 CSC中具有转录调控功能。

2.2 靶向HIF2a下调OCT4表达

为了探讨OCT4的表达调控,我们以PC9肺腺癌 细胞系为研究对象。PC9细胞属于EGFR酪氨酸激酶 编码区基因突变(delE746-A750)细胞,对EGFR-TKI吉 非替尼(Gefitinib)高度敏感,但该细胞经药物诱导后 可形成获得性耐药^[21-22]。采用CCK-8比色法对该细 胞进行体外药敏测试,结果显示吉非替尼的半数抑 制剂量(IC₅₀)约为2.5 μmol/L,证实其具有耐药性,与



A: 磁性分选SPC-A1细胞株中的CD221⁺细胞亚群, 免疫荧光检测CD221⁺亚群中OCT4、CCSP、SP-C蛋白的表达; B: 转染POU5f1特异性miRNA 后, 流式细胞分选GFP⁻(GFP-Neg)和GFP⁺(GFP-Pos)细胞亚群; C: 免疫荧光检测GFP⁻(a)和GFP⁺(b)细胞中OCT4蛋白的表达。 A: the CD221⁺ cell subtype was sorted by MACS from SPC-A1 cells and was subjected for immunostaining of OCT4, CCSP, SP-C proteins; B: after transduction with POU5f1-specific miRNA, the GFP⁻(GFP-Neg) and GFP⁺(GFP-Pos) cell subtypes were sorted by FACS; C: immunostaining for OCT4 protein in sorted GFP⁻(a) and GFP⁺(b) subtypes.



图2 OCT4表达沉默与细胞分选 Fig.2 Silence of OCT4 expression and cell sorting

A: Gefitinib对PC9细胞的增殖抑制作用; B: PC9细胞中Slug、OCT4、HIF2α、IRP1蛋白表达的免疫荧光检测。 A: growth inhibition of Gefitinib in PC9 cells; B: immunostaining for Slug, OCT4, HIF2α, IRP1 protein expression in PC9 cells. **图3 PC9细胞的表型及Gefitinib的增殖抑制效应**

Fig.3 The phenotype of PC9 cells and growth inhibition of Gefitinib in PC9 cells

文献报道一致(图3A)。免疫荧光检测显示, PC9细胞 表达吉非替尼的耐药调控基因*Slug*^[23],该细胞也阳 性表达*OCT4*(图3B)。

最近研究揭示, OCT4表达受低氧诱导因子HIF2α

调控,而后者的转译又受铁调蛋白IRP1(iron regulatory protein 1)和15-脱氧-前列腺素J₂(15d-PGJ₂)调控^[19,24]。 我们检测了PC9细胞中HIF2α和IRP1蛋白的表达情况, 发现二者均呈阳性表达(图3B)。据此,将PC9细胞置

Table 2 The top 20 OCT4 target genes differentially expressed after OCT4 knockdown						
基因	基因定义	Genbank检索号	OCT4 ⁺ BASC/OCT4-KD			
Symbol genes	Gene definition	Genbank access No.	OCT4 ⁺ BASC/OCT4-KD			
Upregulation						
RAB5A	RAB5A, member of RAS oncogene family	NM_004162.3	4.474 9			
DKK1	Dickkopf homolog 1(Xenopus laevis)	NM_012242.2	4.228 6			
FGF2	Fibroblast growth factor 2(basic)	NM_002006.3	3.935 3			
KLHL5	Kelch-like 5(Drosophila)	NM_001007075.1	3.843 0			
HIST2H2BE	Histone cluster 2, H2be	NM_003528.2	3.803 0			
CABLES1	Cdk5 and Abl enzyme substrate 1	NM_138375.1	3.681 3			
DDX21	DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 21	NM_004728.2	3.411 6			
RBBP5	Retinoblastoma binding protein 5	NM_005057.2	3.369 3			
ALKBH1	AlkB, alkylation repair homolog 1(E.coli)	NM_006020.1	3.364 2			
KIAA1279	KIAA1279	NM_015634.2	3.281 7			
Downregulation						
FOXB1	Forkhead box B1	NM_012182.1	-51.557 3			
KIAA1244	KIAA1244	NM_020340.2	-47.906 1			
HIST1H4L	Histone cluster 1, H4l	NM_003546.2	-8.874 6			
OTP	Orthopedia homolog(Drosophila)	XM_937572.1	-7.080 3			
CYP26B1	Cytochrome P450, family 26, subfamily B	NM_019885.2	-6.489 2			
FLJ10374	Hypothetical protein FLJ10374	NM_018074.3	-4.453 1			
GLI3	GLI-Kruppel family member GLI3	NM_000168.2	-4.330 7			
DSC3	Desmocollin 3	NM_024423.1	-3.896 5			
RFX4	Regulatory factor X, 4	NM_002920.3	-3.752 9			
HOXB13	Homeobox B13	NM_006361.4	-3.257 9			

表2 灭活*OCT4*后差异表达最显著的20个靶基因

于10 μmol/L 15d-PGJ₂中处理48 h后检测,发现HIF2α 和OCT4蛋白表达同步下调(图4B)。当15d-PGJ₂与 100 μmol/L DFO组合时,这种表达下调效应更为明 显(图4C)。DFO是铁离子螯合剂,其作用机制是耗竭 细胞内铁离子促使IRP1由胞浆乌头酸酶转变为RNA 结合型IRP1,从而增强后者的转译抑制活性^[25]。本 文观察到的结果与此原理吻合,提示肺腺癌细胞中 存在OCT4表达的IRP1-HIF2α调控轴。对该调控轴 的作用机制尚在进一步分析中。此外,除了PC9细胞 外,在其他肺腺癌细胞系如SPC-A1的OCT4⁺BASC细 胞中,我们也观察到了这种调控效应(资料未显示)。

2.3 药理性下调OCT4表达抑制了细胞增殖及集落形成

近年来已有多项独立研究报道,证明肺腺癌 组织中OCT4蛋白的表达威胁着患者的生存,提示 OCT4是该肿瘤的一个重要治疗靶标^[7-13]。本文首次 观察到15d-PGJ2与DFO联合作用具有显著下调OCT4 表达的效应,因而我们探讨了该组合的体外抗癌作 用。实验首先采用CCK-8比色法检测细胞增殖效应, 图5A显示,15d-PGJ2对PC9细胞增殖的抑制作用呈剂 量依赖性,而DFO的量-效关系不明显(图5B),但将 100 µmol/LDFO与不同浓度15d-PGJ2组合时,发现 DFO与低浓度15d-PGJ2(1.25,5 µmol/L)之间存在协 同效应,其协同指数分别为0.26和0.23(图5C)。

采用平板集落实验进一步评估了15d-PGJ₂与 DFO对PC9细胞的克隆形成能力。发现100 μmol/L DFO与10 μmol/L 15d-PGJ₂联合作用72 h后, PC9细胞 完全失去了克隆形成能力,使用SPC-A1、A549细胞 的*OCT4*⁺CSC也获得了相同结果(图6和表3)。将 100 μmol/L DFO与不同浓度15d-PGJ₂组合也产生了 相同效应(表4)。为了评估DFO与15d-PGJ₂对集落形 成的量-效关系,我们对DFO与15d-PGJ₂进行系列



PC9细胞经15d-PGJ₂(B)或15d-PGJ₂+DFO组合(C)处理后, 免疫荧光检测HIF2α及OCT4的表达。未经处理的细胞作为对照(A)。 After exposure to 15d-PGJ₂(B) or 15d-PGJ₂+DFO in combination(C), the expression of HIF2α and OCT4 was analyzed by immunostaining. The untreated cells were used as control(A).

> 图4 靶向HIF2a下调OCT4表达 Fig.4 OCT4 down-regulation after targeting HIF2a



PC9细胞经不同浓度的15d-PGJ₂(A)、DFO(B)或15d-PGJ₂+DFO组合(C)处理后, CCK-8检测细胞增殖。 The PC9 cells were treated with different concentrations of 15d-PGJ₂(A), DFO(B) or 15d-PGJ₂+DFO in combination(C), the cell growth was measured by CCK-8 assay.

图5 药理性下调OCT4抑制PC9细胞增殖效应 Fig.5 Pharmacological down-regulation of OCT4 inhibited the proliferation of PC9 cells



PC9细胞(A)、SPC-A1细胞(B)和A549细胞(C)经15d-PGJ₂+DFO组合处理3天后,结晶紫染色观察集落形成(下排3孔)。未处理细胞作为对照(上排3孔)。

After 3 days exposure to 15d-PGJ₂/DFO in combination, the colonies of PC9 cells(A), SPC-A1 cells(B), and A549 cells(C) were stained with crystol violet(3 wells in lower law). The untreated cells were used as control(3 wells in upper law).

图6 15d-PGJ₂和DFO组合对集落生长的抑制效应

Fig.6 The inhibitory effect of 15d-PGJ₂+DFO in combination on colony formation

稀释,结果显示在最高稀释度(6.25 µmol/L DFO与 0.625 µmol/L 15d-PGJ2组合)时,集落抑制率仍达到 89.5%(表4), 说明靶向HIF2a/OCT4具有显著的体外 抗癌效应。

表3 15d-PGJ ₂ +DFO组合的集落抑制效应						
Table 3	The inhibitory effect of 15d-PG	J ₂ +DFO combination on colon	y formation			
细胞	对照	15-PGJ ₂ +DFO	P值			
Cells	Control	15-PGJ ₂ +DFO	P value			
PC9	4.251 3±0.252 1	0.062 4±0.016 7	0.001			
SPC-A1	4.551 8±0.268 8	0.022 9±0.016 1	0.001			
A549	5.023 6±0.062 0	0.030 8±0.007 2	< 0.001			

集落(图6)染色后的结晶紫用3%乙酸溶出,测定570 nm处的吸光值。

The crystaol violet in stained colonies(Fig.6) was soluble in 3% actate acid and measured for absorbance at 570 nm.

	Table 4 The effect of unificant combinations of 150-1652 and D10 on colony formation					
浓度(µmo	ol/L)	570 nm吸光值	浓度(µmol	I/L)	570 nm吸光值	
Concentrations(µmol/L)		Absorbance at 570 nm	Concentrations(µmol/L)		Absorbance at 570 nm	
DFO	$15d-PGJ_2$	-	DFO	15d-PGJ ₂		
0	0	4.786 4±0.640 7	0	0	4.685 2±0.305 6	
100	0	0.215 5±0.019 7*	6.250	0.625	0.492 5±0.035 4*	
100	1.25	0.165 7±0.035 4*	12.500	1.250	0.158 4±0.010 0*	
100	2.50	0.078 9±0.012 8*	25.000	2.500	0.121 4±0.005 3*	
100	5.00	0.070 0±0.006 8*	50.000	5.000	0.118 7±0.007 5*	
100	10.00	0.066 0±0.009 2*	100.000	10.000	0.114 7±0.007 8*	

表4 不同浓度15d-PGJ2/DFO组合对集落形成的影响 ble 4 The effect of diffident combinations of 15d-PGJ2 and DFO on colony formatio

*P<0.01, 与未处理组比较。

*P<0.01 in comparison with the untreated group.

3 讨论

近十余年来,随着CSC研究的深入,其特异性靶向治疗问题已日益引起学术界关注^[26]。在肺腺癌中, OCT4多潜能基因表达已被临床研究证实是威胁患 者生存的一项独立性的预后因子,因而OCT4代表了 肺腺癌CSC的一个新的治疗靶点^[7-13]。本实验室曾 报道^[20],Notch信号抑制剂DAPT联合维生素D活性 产物1,25-(OH)₂D₃可以下调OCT4表达。本文进一步 报道,15d-PGJ₂联合DFO也具有相同效应。此外我 们还证明,这种OCT4表达调控作用与肺腺癌细胞的 体外增殖尤其是集落形成能力密切相关,提示其具 有显著的体外抗癌效应。

目前,关于15d-PGJ₂的抗癌机制尚未完全清楚, 多数研究认为15d-PGJ₂作为过氧化物酶体增生物激 活受体γ(peroxisome proliferator-activated receptor γ, PPARγ)的激动剂,通过抑制细胞周期相关激酶的表 达而发挥抗癌作用^[27]。但Zimmer等^[24]发现,除了活 化PPARγ外, 15d-PGJ₂能够增强IRP1-IRE的相互作 用从而抑制HIF2α蛋白的转译。进一步追踪HIF2α 转录调控的靶基因,发现HIF2α具有活化OCT4表 达的能力,而DFO通过促使乌头酸酶向mRNA结合 型IRP1转化而发挥功能^[19,25]。由此提示,多潜能干 细胞包括肺癌CSC中存在调控OCT4表达的IRP1-HIF2α调控轴。显然,深入分析IRP1-HIF2α的作用机 制将为探索新颖的肺腺癌CSC靶向治疗手段提供理 论依据,这方面的研究正在进行之中。

与前文^[20]比较,本文选择了吉非替尼(Gefitinib) 耐药的PC9细胞株作为研究对象。自2000年以来, 吉非替尼在我国进入临床后显示了明显的抗癌效 应。该药特异性抑制*EGFR*突变型肺癌细胞增殖,此 类基因突变多见于女性和非吸烟的肺腺癌患者。但 临床研究也发现,吉非替尼的客观有效期仅为6~9 个月,获得性耐药是限制此类靶向治疗临床疗效的 一个主要因素^[21-22]。因而,寻找有效方法消除其耐 药性是一个值得探讨的课题。本文的初步研究结果 显示,与细胞毒药物如顺铂相似,肺腺癌对吉非替尼 的耐药也与CSC密切相关,此类耐药细胞阳性表达 OCT4。该细胞持续表达OCT4为实验研究提供了一 个理想的模型。研究结果首次揭示,PGJ2+DFO组 合不仅显著下调OCT4表达,而且在此浓度下完全消 除了其克隆生长能力,提示此类治疗有可能使得吉 非替尼治疗失败者再次获益。因此,15d-PGJ2联合 DFO对该细胞的体内致瘤转移能力以及毒性评估, 是我们正在探索的一项研究。

参考文献 (References)

- Cauffman G, Liebaers I, van Steirteghem A, van de Velde H. POU5F1 isoforms show different expression patterns in human embryonic stem cells and preimplantation embryos. Stem Cells 2006; 24(12): 2685-91.
- 2 Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, *et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. Cell 2005; 122(6): 947-56.
- 3 Ge N, Lin HX, Xiao XS, Guo L, Xu HM, Wang X, et al. Prognostic significance of Oct4 and Sox2 expression in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. J Transl Med 2010; 8: 94-100.
- 4 He W, Li K, Wang F, Qin YR, Fan QX. Expression of OCT4 in human esophageal squamous cell carcinoma is significantly associated with poorer prognosis. World J Gastroenterol 2012; 18(7): 712-9.
- 5 Rodini CO, Suzuki DE, Saba-Silva N, Cappellano A, de Souza JE, Cavalheiro S, *et al.* Expression analysis of stem cell-related genes reveal OCT4 as a predictor of poor clinical outcome in medulloblastoma. J Neurooncol 2012; 106(1): 71-9.
- 6 Huang PZ, Lu CL, Li BK, Hong J, Huang L, Wang L, et al. OCT4 expression in hepatocellular carcinoma and its clinical significance. Chin J Cancer 2010; 29(1): 111-6.
- 7 Zhang XY, Dong QG, Huang JS, Huang AM, Shi CL, Jin BT, *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.
- 8 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.
- 9 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 (Zhang Xueyan, Zheng Biqiang, Han Baohui, Huang Jinsu, Geng Qin, Xu Huili, *et al.* Lung adenocarcinoma stem cell phenotypes and their correlation with patient prognosis. Chinese Journal of Oncology) 2009; 31(11): 836-40.
- 10 Chiou SH, Wang ML, Chou YT, Chen CJ, Hong CF, Hsieh WJ, et al. Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. Cancer Res 2010; 70(24): 10433-44.
- 11 Chen Z, Wang T, Cai L, Su C, Zhong B, Lei Y, et al. Clinicopathological significance of non-small cell lung cancer with high prevalence of Oct-4 tumor cells. J Exp Clin Cancer Res 2012; 31: 10-9.
- 12 魏林方, 刘先领, 胡春宏. HIF2α和OCT4在非小细胞肺癌中的

表达及与预后的关系. 中南大学学报(医学版)[Wei Linfang, Liu Xianling, Hu Chunhong. Correlation between expression of HIF-2α and OCT-4 and prognosis of NSCLC. Journal of Central South University (Medical Sciences)] 2011; 36(9): 854-8.

- 13 Cortes-Dericks L, Galetta D, Spaggiari L, Schmid RA, Karoubi G, *et al.* High expression of octamer-binding transcription factor 4A, prominin-1 and aldehyde dehydrogenase strongly indicates involvement in the initiation of lung adenocarcinoma resulting in shorter disease-free intervals. Eur J Cardiothorac Surg 2012; 41(6): e173-81.
- 14 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.
- 15 Xu X, Rock JR, Lu Y, Futtner C, Schwab B, Guinney J, *et al.* Evidence for type II cells as cells of origin of K-Ras-induced distal lung adenocarcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109(13): 4910-5.
- 16 Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Hörstrup JH, Warnecke C, *et al.* Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. FASEB J 2003; 17(2): 271-3.
- 17 Ito Y, Ahmad A, Kewley E, Mason RJ. Hypoxia-inducible factor regulates expression of surfactant protein in alveolar type II cells *in vitro*. Am J Respir Cell Mol Biol 2011; 45(5): 938-45.
- 18 Kim WY, Perera S, Zhou B, Carretero J, Yeh JJ, Heathcote SA, *et al*. HIF2alpha cooperates with RAS to promote lung tumorigenesis in mice. J Clin Invest 2009; 119(8): 2160-70.
- 19 Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, *et al*. HIF-2alpha regulates Oct-4: Effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. Genes Dev 2006; 20(5): 557-70.
- 20 薛明明, 宁仁利, 黄进肃, 李 钟, 李 榕, 徐慧莉, 等. 人肺腺癌 干细胞分子表型及PLAGL2基因的生物学功能研究. 中国细胞 生物学学报(Xue Mingming, Ning Renli, Huang Jinsu, Li Zhong, Li Rong, Xu Huili, *et al.* A study on the molecular phenotype of human lung adenocarcinoma stem cells and biological functions of PLAGL2 gene. Chinese Journal of Cell Biology) 2012; 34(4): 366-75.
- 21 Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, *et al.* EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. N Engl J Med 2005; 352(8): 786-92.
- 22 魏 巍,范 羽,刘红雨,吴志浩,万海粟,阎志琴,等.人肺 癌EGFR基因突变与Gefitinib耐药相关性研究.中国肺癌杂 志(Wei Wei, Fan Yu, Liu Hongyu, Wu Zhihao, Wan Haisu, Yan Zhiqin, *et al.* Relationship between mutations of the epidermal growth factor receptor gene and drug-resistance to Gefitinib in human lung cancer *in vitro*. Chin J Lung Cancer) 2009; 12(1): 28-32.
- 23 Chang TH, Tsai MF, Su KY, Wu SG, Huang CP, Yu SL, *et al.* Slug confers resistance to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. Am J Respir Crit Care Med 2011; 183(8): 1071-9.
- 24 Zimmer M, Lamb J, Ebert BL, Lynch M, Neil C, Schmidt E, *et al.* The connectivity map links iron regulatory protein-1-mediated inhibition of hypoxia-inducible factor-2a translation to the antiinflammatory 15-deoxy- delta12,14-prostaglandin J2. Cancer Res 2010; 70(8): 3071-9.

25 Volz K. The functional duality of iron regulatory protein 1. Curr Opin Struct Biol 2008; 18(1): 106-11.

26 Rasheed ZA, Kowalski J, Smith BD, Matsui W. Concise review: Emerging concepts in clinical targeting of cancer stem cells. Stem Cells 2011; 29(6): 883-7.

27 Chen YX, Zhong XY, Qin YF, Bing W, He LZ. 15d-PGJ₂ inhibits cell growth and induces apoptosis of MCG-803 human gastric cancer cell line. World J Gastroenterol 2003; 9(10): 2149-53.

A Study on the *in vitro* Anti-cancer Effects by Targeting *OCT4* Pluripotent Gene in Lung Adenocarcinoma Stem Cells

Ning Renli¹, Huang Jinsu², Wu Lixia¹, Li Rong², Xu Huili¹, Zhou Jin¹, 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 School of Medicine, Shanghai 200030, China)

Abstract Octamer-binding transcription factor 4 (*OCT4*) is a pluripotent gene critical for the maintenance of self-renewal in stem cells. In recent years, emerging evidence in clinic has indicated that the presence of OCT4 in lung adenocarcinoma portends a dismal prognosis for patients, suggesting OCT4 as a potential target for the treatment of this tumor. With microRNA-mediated gene silencing and cDNA microarray techniques, we reported herein that *OCT4* is functional for transcriptional regulation in lung adenocarcinoma cells. The studies showed that treatment with 15-deoxy-delta^{12,14}-Prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) and desferrioxamine (DFO) in combination significantly down-regulated the expression of *OCT4* and inhibited the proliferation and colony formation in lung adenocarcinoma cells. These data documented that pharmacological regulation of *OCT4* expression possesses a markedly anti-cancer effects, at least in the *in vitro* setting. Thus, the results provide a novel avenue for exploring targeted therapies in lung cancer.

Key words lung adenocarcinoma; OCT4; pharmacological regulation; anti-cancer effect

Received: June 28, 2012 Accepted: July 25, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30872952, No.81101770), 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, No.20114184)

^{*}Corresponding author. Tel: 86-21-64437181, E-mail: qgdong@shsci.org