

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.03.002

· 研究快报 ·

## 单细胞克隆肝癌干细胞向间充质样细胞的分化潜能

刘虹麟<sup>1</sup>, 彭亮<sup>1</sup>, 王在<sup>1</sup>, 许世清<sup>1</sup>, 娄晋宁<sup>1</sup>, 冉宇靓<sup>2</sup>, 杨治华<sup>2</sup>, 王培刚<sup>3</sup>, 张文健<sup>1△</sup>(1. 卫生部中日友好医院 临床医学研究所, 北京 100029; 2. 中国医学科学院 肿瘤研究所, 北京 100021; 3. 中国科学院 生物物理所 蛋白质与多肽重点实验室, 北京 100101)

**[摘要]** **目的:**探讨单细胞克隆肝癌干细胞(liver cancer stem cell, LCSCs)向间充质样细胞分化的潜能。**方法:**通过有限稀释法获得单个细胞来源的 LCSC 克隆,采用 RT-PCR 法鉴定干细胞标志物;将该单细胞克隆分别用成骨、软骨和脂肪诱导分化培养基培养 3 周后,采用 Real-time PCR 及特殊染色技术比较诱导前后 LCSC 表达成骨、软骨及脂肪细胞特异标志物的差异。**结果:**单细胞克隆的 LCSC 表达多种干细胞标志物、干细胞因子(stem cell factor, SCF)、干细胞因子受体、C-kit、巢蛋白(nestin)、CD34、三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2(ATP-binding cassette sub-family G member 2, ABCG2)、CD133。分化诱导培养 3 周后,成骨方向诱导的细胞茜素红染色呈现橘红色钙结节形成,软骨方向诱导的细胞阿尔新蓝染色显示蓝色蛋白多糖沉积,脂肪方向诱导的细胞油红 O 染色显示大量脂滴形成。Real-time PCR 结果显示,诱导后成骨细胞特异标志物骨钙素和 I 型胶原、软骨细胞特异标志物蛋白聚糖和 II 型胶原、脂肪细胞特异标志物脂联素和过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  的 mRNA 表达均较对照组显著上调(I 型及 II 型胶原间为  $P < 0.05$ ,其他指标间均为  $P < 0.01$ )。**结论:**LCSC 具有可塑性,在特定的微环境下具有向间充质样细胞分化的潜能。

**[关键词]** 肝癌干细胞;单细胞克隆;间充质样细胞;多向分化潜能;可塑性

**[中图分类号]** R735.7; R730.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2014)03-0245-06

## Mesenchymal differentiation potential of single-cell cloned liver cancer stem cells

Liu Honglin<sup>1</sup>, Peng Liang<sup>1</sup>, Wang Zai<sup>1</sup>, Xu Shiqing<sup>1</sup>, Lou Jinning<sup>1</sup>, Ran Yuliang<sup>2</sup>, Yang Zhihua<sup>2</sup>, Wang Peigang<sup>3</sup>, Zhang Wenjian<sup>1△</sup>(1. Institute of Clinical Medical Sciences, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China; 2. Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China; 3. Key Laboratory of Proteins and Peptide Pharmaceuticals, Biophysics Institute, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the multilineage differentiation potential of single-cell-cloned liver cancer stem cells (LCSCs). **Methods:** Single cell cloned LCSCs were generated by limiting dilution cloning and confirmed by RT-PCR analysis of stem cell markers. Phenotype-confirmed LCSCs were induced to differentiate into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes, respectively, by culturing them in corresponding differentiation-inducing media for 3 weeks. Both before and after the differentiation induction culture, the expression of markers specific for osteoblasts, chondrocytes and adipocytes was comparatively analyzed by real-time PCR and cell type-specific staining techniques. **Results:** Stem cell markers including CD133, CD34, ATP-binding cassette sub-family G member 2 (ABCG2), nestin, stem cell factor (SCF) and stem cell growth factor receptor (C-kit) were detected in undifferentiated single cell cloned LCSCs. After three weeks of differentiation induction, cells cultured in the osteoblast-specific medium formed orange calcium nodules as demonstrated by Alizarin red staining; cells cultured in the chondrocyte-specific medium showed blue proteoglycan deposi-

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(No. 2009CB521804);国家自然科学基金资助项目(No. 81370873, No. 81302334)。Project supported by the Major National Basic Research Development Program (973 program) of China (No. 2009CB521804), and the National Natural Science Foundation of China (No. 81370873, No. 81302334)

**[作者简介]** 刘虹麟(1976-),女,贵州省遵义市人,博士,助理研究员,主要从事肿瘤微血管内皮细胞的特性、肿瘤干细胞生物学特性的研究。E-mail: honglin2003@163.com

**[通信作者]** 王培刚(Wang Peigang, corresponding author), E-mail: peigangwang@gmail.com; 张文健(Zhang Wenjian, co-corresponding author), E-mail: zwj-72@163.com。△为共同通信作者。

**[优先发表]** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.3872/j.issn.1007-385X.2014.03.002.html>

tions as revealed by Alcian blue staining; and cells cultured in the adipocyte-specific medium showed Oil Red O stained lipid droplets. In the three corresponding differentiation induction cultures, LCSCs acquired the expression of markers for osteoblast (osteocalcin and collagen), chondrocyte (aggrecan and collagen type II), and adipocyte (adiponectin and peroxisome proliferator-activated receptor) respectively. All the differences were significant ( $P < 0.01$ ) except for collagen type I and collagen type II ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** These preliminary observations suggest that single cell cloned LCSCs possess a plasticity and may potentially differentiate into mesenchymal-like cells under specific microenvironments. [ **Key words** ] liver cancer stem cell (LCSC); single-cell clone; mesenchymal-like cell; multilineage differentiation potential; plasticity

[ Chin J Cancer Biother, 2014, 21(3): 245-250 ]

肿瘤是一种干细胞疾病,肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)在肿瘤的发生、发展、转移和复发中发挥着重要的作用。目前,已在包括肝癌在内的多种肿瘤中证实了CSC的存在<sup>[1-3]</sup>。以CSC为靶点的抗肿瘤治疗将成为很有前景的肿瘤治疗策略。因此,深入理解CSC的生物学特征对阐明肿瘤发生、发展和转移的机制,形成新的诊断和治疗策略具有重要意义<sup>[4]</sup>。多向分化潜能是CSC的重要特征,多项研究<sup>[5-6]</sup>表明,CSC可以分化成不同类型的细胞。对肾癌和乳腺癌的研究<sup>[7-8]</sup>显示,通过诱导CSC分化以减少肿瘤组织中干细胞的数量,同时增加其对放疗的敏感性已成为肿瘤治疗的新方向。但肝癌干细胞是否具有分化为间充质样细胞的潜能尚未见报道。

由于CSC是异质性的群体<sup>[9]</sup>,故其多向分化潜能的研究首先要排除研究对象本身就存在具有不同表型的细胞群体。本研究中,为了排除因干细胞异质性导致不同分化的可能,采用单细胞克隆的肝癌干细胞(liver cancer stem cell, LCSC)为研究对象,分析其向间充质样细胞方向分化的能力,以阐明LCSC的多向分化潜能,为诱导CSC分化的抗肿瘤治疗策略提供重要的实验数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株及主要试剂

LCSC株分离于人原发性肝癌组织,本课题组前期研究中已进行了LCSC特性的鉴定并保存<sup>[10]</sup>。DMEM/F12培养基、FBS购自美国Gibco公司,碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和B27购自美国Invitrogen公司。超低黏附培养板购自美国Corning公司。茜素红染色、阿尔新蓝染色及油红O染色试剂盒均购自美国Genmed Scientific公司。地塞米松、 $\beta$ -甘油磷酸钠、维生素C、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-isobutyl-1-methyl-xanthine, IBMX)、吲哚美辛(indomethacin)购自美国Sigma公司。RNA提

取试剂盒购自美国Qiagen公司,逆转录试剂盒购自美国Promega公司,Real-time PCR试剂盒SYBR Premix EX Taq购自日本TAKARA公司。

### 1.2 LCSC的培养

LCSC培养于DMEM/F12培养基,添加1%胎牛血清、1:50比例的B27、20 ng/ml EGF、10 ng/ml bFGF、100  $\mu$ g/ml内皮生长因子、2 mg/ml肝素、2 mmol/L谷氨酰胺、100 U/ml青霉素、100  $\mu$ g/ml链霉素、5  $\mu$ g/ml胰岛素和0.5  $\mu$ g/ml氢化可的松。

### 1.3 单细胞克隆LCSC的分离及鉴定

通过有限稀释法筛选单细胞克隆,单细胞克隆的生长速度存在差异,部分克隆不能持续生长而死亡。Driessens等<sup>[11]</sup>及本课题组前期研究<sup>[10]</sup>发现,增殖较快的克隆更能代表CSC。因此,本研究挑选增殖较快的一个克隆作为研究对象,并通过RT-PCR对干性标志物做进一步的验证。

### 1.4 RT-PCR检测LCSC干细胞标志物的表达

采用Rneasy试剂盒提取细胞总RNA,采用Promega逆转录试剂盒进行逆转录,RT-PCR检测干细胞标志物干细胞因子(stem cell factor, SCF)、干细胞生长因子受体(C-kit)、巢蛋白(Nestin)、CD34、三磷酸腺苷结合转运蛋白G超家族成员2(ATP-binding cassette sub-family G member 2, ABCG2)和CD133在单克隆的LCSC的表达,引物序列见表1。

### 1.5 LCSC向成骨细胞的分化

将细胞按 $6 \times 10^3$ /孔接种于24孔培养板。8个孔作为实验组,更换含成骨诱导添加剂(100  $\mu$ mol/L地塞米松、10 mol/L  $\beta$ -磷酸甘油、50 mol/L维生素C)的新鲜培养基。另取8孔对照,更换不加成骨添加剂的新鲜培养液作为未诱导组。每周更换2次培养基,于第21天取部分孔内细胞提取RNA,以Real-time PCR检测成骨细胞标志物的表达。另一部分孔进行茜素红染色:吸弃培养液,加清理液清洗细胞后弃掉,加入固定液室温固定10 min,洗涤3次,加入茜素红染色液(室温)10 min,小心吸弃染色液,空

气中晾干。显微镜下观察细胞样本中橘红色钙沉积情况。

### 1.6 LCSC 向软骨细胞的分化

将细胞按  $6 \times 10^3$ /孔接种于 24 孔培养板,8 个孔作为实验组更换含软骨诱导添加剂(10 mg/L TGF- $\beta$ )的新鲜培养基。另取 8 孔对照,更换不加软骨添加剂的新鲜培养液,作为未诱导组。以后每周换 2 次培养基,培养 3 周后进行阿尔新蓝染色和 Real-time PCR 检测软骨细胞标志物的表达。阿尔新蓝染色步骤按说明书进行:吸弃培养液,用清理液清洗细胞后,加入酸性液室温 3 min,弃掉酸性液后再次用清理液清洗 3 次,加入阿尔新蓝染色液 A,室温避光孵育 40 min,小心吸弃染色液 A,加入清理液清洗 2 次。显微镜下观察细胞样本中蓝色黏多糖蛋白的情况。

表 1 人干细胞标志物 PCR 引物序列  
Tab.1 Sequences of PCR primers for human stem cell markers

Gene	Sequence
<i><math>\beta</math>-actin</i>	Forward:5'-TGGCACCACACCTTCTACAATGAGC-3' Reverse:5'-GCACAGCTTCTCCTTAATGTCACGC-3'
<i>SCF</i>	Forward:5'-CTCCTATTTAATCCTCTCGTC-3' Reverse:5'-TACTACCATCTCGCTTATCCA-3'
<i>C-kit</i>	Forward:5'-GGCTCTTCTCAACCATCTGTG-3' Reverse:5'-ATTTGCCGGTGTGTTGGCTT-3'
<i>CD34</i>	Forward:5'-ACAACCTGAAGCCTAGCCTG-3' Reverse:5'-CAAGACCAGCAGTAGACACTG-3'
<i>ABCG2</i>	Forward:5'-GGCCTCAGGAAGACTTATGT-3' Reverse:5'-AAGGAGGTGGTGTAGCTGAT-3'
<i>Nestin</i>	Forward:5'-AGAGGGGAATTCCTGGAG-3' Reverse:5'-CTGAGGACCAGACTCTCTA-3'
<i>CD133</i>	Forward:5'-CCTTGTGGCAAAGCTCAACC-3' Reverse:5'-TCACCTCCTCTCACCAG-3'

### 1.7 LCSC 向脂肪细胞的分化

将细胞按  $6 \times 10^3$ /孔的细胞密度接种于 24 孔培养板,待细胞 90% 汇合时,加入含 1  $\mu$ mol/L 的地塞米松、0.5 mmol/L 的 IBMX、2  $\mu$ mol/L 的胰岛素、0.2 mmol/L 的吡啶美辛的高糖 DMEM 诱导 3 d,再用含 2  $\mu$ mol/L 的胰岛素、10% FBS 的高糖 DMEM 处理 1 d,循环 3 次后,用含 2  $\mu$ mol/L 的胰岛素、体积分数为 10% FBS 的高糖 DMEM 处理继续培养 8 d,每 3 d 换液 1 次。另取 8 孔对照,加入仅含 2  $\mu$ mol/L 的胰岛素、10% FBS 的高糖 DMEM 的未诱导组,每隔 3 d 换液 1 次。诱导结束后分别进行油红 O 染色和 Real-time PCR 检测脂肪细胞标志物的表达。油红 O 染色按说明书进行:将细胞用清理液清洗后,加入固定液

室温 10 min,清理液清洗 3 次,加入脱水液室温 5 min,吸弃后重复脱水步骤 1 次,然后加入油红 O 染色液室温 8 min,吸弃染色液,用清理液室温 2 min,重复染色 2 次,于显微镜下观察细胞样本中的脂滴。

### 1.8 Real-time PCR 检测诱导后 LCSC 中成骨、软骨和脂肪细胞标志分子的表达

采用 RNeasy 试剂盒提取细胞总 RNA 并进行逆转录获取 cDNA,采用 SYBR Green PCR 试剂盒,按照 ABI PRISM 7500 系统两步法进行 PCR 扩增,分别检测向间充质诱导分化后的 LCSC 中成骨细胞标志物骨钙素(osteocalcin)和 I 型胶原(collagen I)、软骨细胞标志物蛋白聚糖(aggrecan)和 II 型胶原(collagen II)、脂肪细胞标志物脂联素(adiponectin)和过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR $\gamma$ ) 的表达。以 GAPDH 作为内参,各基因特异的引物序列见表 2。反应结束后确认实时定量 PCR 的扩增曲线和融解曲线,计算目的基因与 GAPDH 的 Ct 值之差(即  $\Delta$ Ct),诱导前后基因 mRNA 的表达水平根据  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算。由于上述几个标志物基因表达水平非常低,为使结果数据清晰明了,最终检测结果数据以  $\Delta Ct/2^{-\Delta\Delta Ct}$  的形式表示。实验重复 3 次。

表 2 间充质细胞相关基因 PCR 引物序列  
Tab.2 Sequences of PCR primers for mesenchymal cells-related genes

Gene	Sequence of primers
<i>Osteocalcin</i>	Forward:5'-CACTCCTCGCCCTATTGGC-3' Reverse:5'-CCCTCCTGCTTGACACAAAG-3'
<i>Collagen I</i>	Forward:5'-ATCAACCGGAGGAATTTCCGT-3' Reverse:5'-CACCAGGACGACCAGGTTTTTC-3'
<i>Aggrecan</i>	Forward:5'-GTGCCTATCAGGACAAGGTCT-3' Reverse:5'-GATGCCCTTACCACGACTTC-3'
<i>Collagen II</i>	Forward:5'-CCAGATGACCTTCTACGCC-3' Reverse:5'-TTCAGGGCAGTGTACGTGAAC-3'
<i>Adiponectin</i>	Forward:5'-AACATGCCATTCGCTTTACC-3' Reverse:5'-TAGGCAAAGTAGTACAGCCCA-3'
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	Forward:5'-TCTCTCCGTAATGGAAGACC-3' Reverse:5'-CATTATGAGACATCCCCAC-3'
<i>GAPDH</i>	Forward:5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3' Reverse:5'-GAGCTTCCCGTTCAGCTCAG-3'

### 1.9 统计学处理

采用 SPSS15.0 统计软件,计量资料以均数  $\pm$  标

准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 单细胞克隆人 LCSC 的形态

体外培养的人 LCSC 体积小、增殖快, 表现单层生长接触抑制的特性(图 1A)。通过有限稀释法进行单细胞克隆后, 共获得 20 个克隆。挑选增殖最快的一个克隆用于本研究, 该克隆形态与未克隆的细胞形态相似, 但均一化程度更高(图 1B)。

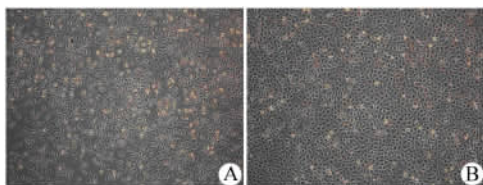


图 1 单细胞克隆 LCSC 的形态(×40)

Fig. 1 Morphology of single cell cloned LCSCs (×40)

A: Before single cell clone screening;  
B: After single cell clone screening

### 2.2 单细胞克隆人 LCSC 表达干性标志物

选择增殖最快的单细胞克隆, 通过 RT-PCR 法检测其表达干细胞标志物的情况, 结果显示, 该单细胞克隆人 LCSC 表达 CD133、CD34、Nestin、ABCG2、SCF、C-kit 等干细胞相关标志分子(图 2)。

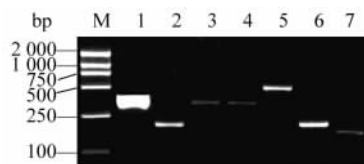


图 2 单细胞克隆 LCSC 表达干细胞标志物

Fig. 2 Expressions of stem cell markers in single cell cloned LCSCs

### 2.3 诱导后的人 LCSC 呈现间充质细胞特异性染色阳性

经成骨、软骨及脂肪诱导培养 3 周后, 分别对 LCSC 进行茜素红、阿尔新蓝及油红 O 染色。结果(图 3)显示, 跟未诱导的 LCSC 相比, 诱导后的 LCSC 分别出现矿化橘红色骨结节沉积、蓝色蛋白多糖的沉积及红色脂滴的沉积, 提示 LCSC 向成骨、软骨及脂肪方向发生了分化。

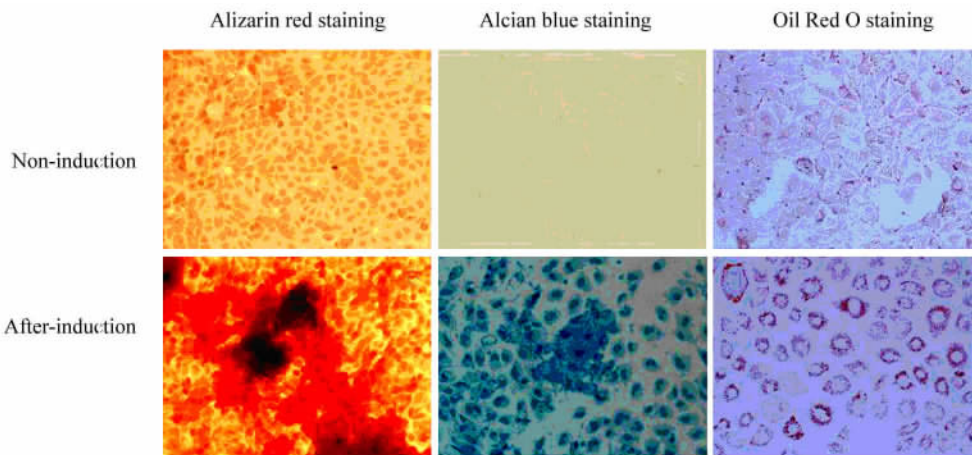


图 3 特殊染色检测 LCSC 向间充质样细胞的分化潜能(×400)

Fig. 3 Special staining detection of differentiation potential of LCSCs into mesenchymal-like cells(×400)

### 2.4 诱导后的人 LCSC 表达间充质细胞的特异标志物

Real-time PCR 检测结果(表 3)显示, LCSC 诱导前表达成骨、软骨及脂肪的特异标志物水平较低, 经成骨、软骨及脂肪诱导培养 3 周后, 表达成骨细胞标志分子骨钙素和 I 型胶原、软骨细胞标志分子蛋白聚糖和 II 型胶原及脂肪细胞标志分子脂联素和

PPAR $\gamma$  均明显上调(除 I 型及 II 型胶原组  $P < 0.05$  外, 其他均  $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

肿瘤干细胞不仅是肿瘤发生发展的重要始动因素, 而且对放疗不敏感, 使其成为肿瘤复发、转移的根源。目前认为, 肿瘤干细胞是肿瘤难以治愈的

原因之一。对肿瘤干细胞特性的深入研究有助于开发清除肿瘤干细胞的治疗手段,本研究对肝癌干细胞向间充质细胞分化的特性进行了分析。

即使从同一组织来源的肿瘤干细胞也可能具有异质性<sup>[9, 12-13]</sup>,以单细胞克隆方法进行干细胞分选

和研究已成为非常重要的手段。因此,为分析肿瘤干细胞的分化特性,首先对从肝癌组织中分离获得的肿瘤干细胞进行了单细胞克隆培养,以获得的单细胞克隆作为研究对象,确保了细胞的均质性,从而排除了不同分化能力源自不同细胞的可能性。

表3 诱导前后的人 LCSC 表达间充质细胞的特异标志物\*

Tab.3 Expression of mesenchymal cell-specific markers before and after inducement of LCSCs\*

Group	Osteoblast marker		Chondrocyte marker		Adipocyte marker	
	Osteocalcin	Collagen I	Agrecan	Collagen II	Adiponectin	PPAR $\alpha$
Control	16.22 $\pm$ 0.07/1.0	17.50 $\pm$ 0.35/1.0	15.49 $\pm$ 0.11/1.0	14.09 $\pm$ 0.06/1.0	15.16 $\pm$ 0.30/1.0	11.48 $\pm$ 0.02/1.0
Induced	13.23 $\pm$ 0.07/7.9	15.57 $\pm$ 0.21/3.8	10.93 $\pm$ 0.02/25.0	9.97 $\pm$ 0.02/17.5	11.55 $\pm$ 0.10/12.4	8.32 $\pm$ 0.08/9.0
<i>t</i>	38.82	4.75	46.93	23.48	11.93	77.53
<i>P</i>	<0.01	<0.05	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01

\* Data are represented in " $\Delta Ct/2^{-\Delta\Delta Ct}$ " form

对所获得的单细胞克隆的肝癌干细胞进行鉴定发现,该细胞表达多种经典的干细胞标志分子,如 CD133、CD34、Nestin、ABCG2、SCF 和 C-kit。前期研究表明,该细胞也表达多潜能相关的因子,包括 Oct4、Sox2、Nanog、C-myc、Lin28 和 Klf4,提示 LCSC 具有多向分化潜能。在其他研究中也证实 CSC 表达多种多向分化潜能因子<sup>[14-17]</sup>,在表观遗传的调控下具有分化的可塑性,多向分化潜能是 CSC 的重要特性之一。除内在因素外,微环境在决定干细胞行为,尤其是干细胞分化方向上起着关键的作用。最近研究<sup>[18]</sup>表明,胚胎干细胞微环境可改变恶性肿瘤细胞的表型特征,导致致瘤性降低。同样,肿瘤微环境也能使正常干细胞向恶性细胞发生转变<sup>[19]</sup>。而且,在不同微环境中,干细胞的分化方向可能完全不同。在前期研究<sup>[10]</sup>已证实,该群细胞在不同肿瘤微环境的诱导下,具有向不同肿瘤细胞分化的潜能。

本研究中,为分析 LCSC 是否具有向间充质样细胞分化的潜能,使用成骨、软骨及脂肪细胞培养基诱导 LCSC 分化。在诱导 2 周后,Real-time PCR 已能检测到间充质细胞标志物的表达明显上调(结果未显示);诱导 3 周后,成骨、软骨及脂肪细胞特异标志物的 mRNA 上调更加明显。并且,特殊染色结果证实,诱导后的 LCSC 分别出现了成骨、软骨及脂肪细胞特异性标志物染色阳性,说明 LCSC 分别向以上三个方向发生了分化。由于进行多向分化潜能研究的 LCSC 来自单细胞克隆,因此排除了这种多向分化潜能是由于细胞群体中本身就存在能够产生

成骨、软骨及脂肪的不同表型细胞的可能。

单细胞来源的 LCSC 具有多向分化潜能一方面解释了肝癌异质性的可能原因,另一方面对开发靶向 LCSC 的临床治疗提供线索。临床上很多肝癌在发现时已是晚期,无法进行手术治疗,因此保守治疗是肝癌治疗的重要手段,减少和杀灭肝癌干细胞将对治疗效果非常重要。近年在其他类型肿瘤上的实验研究发现,促进肿瘤干细胞的分化,提高其分化成熟度可使其对化疗更敏感,明显改善疗效<sup>[7]</sup>。本研究结果提示,肝癌干细胞也具有很强的分化潜能,对调控肝癌干细胞分化的关键因子和促进其分化的微环境因素进行深入研究,将为开发以促进肝癌干细胞分化、达到改善抗肿瘤疗效目标的新型治疗策略提供重要依据。

#### [参考文献]

- [1] Rountree CB, Mishra L, Willenbring H. Stem cells in liver diseases and cancer: Recent advances on the path to new therapies [J]. Hepatology, 2012, 55(1): 298-306.
- [2] Hassan KA, Wang L, Korkaya H, et al. Notch pathway activity identifies cells with cancer stem cell-like properties and correlates with worse survival in lung adenocarcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(8): 1972-1980.
- [3] Kobayashi S, Yamada-Okabe H, Suzuki M, et al. LGR5-positive colon cancer stem cells interconvert with drug-resistant LGR5-negative cells and are capable of tumor reconstitution [J]. Stem Cells, 2012, 30(12): 2631-2644.
- [4] Wicha MS. Targeting self-renewal, an Achilles' heel of cancer stem cells [J]. Nat Med, 2014, 20(1): 14-15.

- [ 5 ] Wang X, Liu J, Wang Z, et al. Periostin contributes to the acquisition of multipotent stem cell-like properties in human mammary epithelial cells and breast cancer cells [ J ]. *PLoS ONE*, 2013, 8( 8 ): e72962.
- [ 6 ] Varghese S, Whipple R, Martin SS, et al. Multipotent cancer stem cells derived from human malignant peritoneal mesothelioma promote tumorigenesis [ J ]. *PLoS ONE*, 2012, 7( 12 ): e52825.
- [ 7 ] Azzi S, Bruno S, Giron-Michel J, et al. Differentiation therapy: Targeting human renal cancer stem cells with interleukin 15 [ J ]. *J Natl Cancer Inst*, 2011, 103( 24 ): 1884-1898.
- [ 8 ] Gupta PB, Onder TT, Jiang G, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening [ J ]. *Cell*, 2009, 138( 4 ): 645-659.
- [ 9 ] Mukhopadhyay P, Farrell T, Sharma G, et al. Heterogeneity of functional properties of clone 66 murine breast cancer cells expressing various stem cell phenotypes [ J ]. *PLoS ONE*, 2013, 8( 11 ): e78725.
- [ 10 ] Liu H, Zhang W, Jia Y, et al. Single-cell clones of liver cancer stem cells have the potential of differentiating into different types of tumor cells [ J/OL ]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e857.
- [ 11 ] Driessens G, Beck B, Caauwe A, et al. Defining the mode of tumour growth by clonal analysis [ J ]. *Nature*, 2012, 488( 7412 ): 527-530.
- [ 12 ] Vermeulen L, Todaro M, de Sousa Mello F, et al. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105( 36 ): 13427-13432.
- [ 13 ] Colombo F, Baldan F, Mazzucchelli S, et al. Evidence of distinct tumour-propagating cell populations with different properties in primary human hepatocellular carcinoma [ J ]. *PLoS ONE*, 2011, 6( 6 ): e21369.
- [ 14 ] Leis O, Eguiara A, Lopez-Arribillaga E, et al. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells [ J ]. *Oncogene*, 2012, 31( 11 ): 1354-1365.
- [ 15 ] Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, et al. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells [ J ]. *Cancer Res*, 2011, 71( 13 ): 4640-4652.
- [ 16 ] Okuda H, Xing F, Pandey PR, et al. miR-7 suppresses brain metastasis of breast cancer stem-like cells by modulating KLF4 [ J ]. *Cancer Res*, 2013, 73( 4 ): 1434-1444.
- [ 17 ] Leng Z, Tao K, Xia Q, et al. Kruppel-like factor 4 acts as an oncogene in colon cancer stem cell-enriched spheroid cells [ J ]. *PLoS ONE*, 2013, 8( 2 ): e56082.
- [ 18 ] Postovit LM, Margaryan NV, Sefror EA, et al. Human embryonic stem cell microenvironment suppresses the tumorigenic phenotype of aggressive cancer cells [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105( 11 ): 4329-4334.
- [ 19 ] Chen L, Kasai T, Li Y, et al. A model of cancer stem cells derived from mouse induced pluripotent stem cells [ J ]. *PLoS ONE*, 2012, 7( 4 ): e33544.
- [ 收稿日期 ] 2014-02-14 [ 修回日期 ] 2014-04-05  
[ 本文编辑 ] 周玲琳, 韩丹

· 科技动态 ·

## 转染因子 BATF 在 CD8<sup>+</sup>T 细胞分化过程中起决定性作用

既往对 CD8<sup>+</sup>T 细胞分化过程中的转录调控研究表明,多种转录因子如 T-bet、Eomes、Runx3、Id2、Blimp-1 等,在 CD8<sup>+</sup>T 细胞增殖活化以及发挥效应功能中起着重要的作用,但如果单独敲除上述任一转录因子,CD8<sup>+</sup>T 细胞的增殖和活化仅受极小影响,说明上述因子在功能方面可能存在重叠性,而且在这些转录因子的上游可能存在一个更为重要的转录因子。本文报道的研究围绕 BATF 展开。既往研究表明 BATF 在 CD4<sup>+</sup>T 细胞、B 细胞及巨噬细胞分化发育过程中起着关键的作用。该研究首先发现 LCMV 感染后在 BATF<sup>-/-</sup> 鼠中效应及记忆性 T 细胞明显减少,说明 BATF 在 CD8<sup>+</sup>T 细胞从 Naïve 到 effector 和 memory 的分化过程中起着关键的作用,在此后的过继回输实验中又证实 BATF<sup>-/-</sup> 鼠中效应以及记忆 T 细胞的缺失是内在性的缺陷,而非 T 细胞分化发育的环境因素引起。如在 BATF<sup>-/-</sup> 鼠中 CD8<sup>+</sup>T 细胞中过表达 BATF 可以挽救 BATF<sup>-/-</sup> 鼠 CD8<sup>+</sup>T 细胞分化发育的缺陷,表现为 LCMV 感染后 BATF<sup>-/-</sup> 鼠中 CD8<sup>+</sup>T 细胞向效应以及记忆 T 细胞分化恢复正常。此后的 Chip-seq 实验证明,在 CD8<sup>+</sup>T 细胞中,BATF 多结合在效应分子序列的 promoter 以及 enhancer 区,并不结合于效应分子的调控序列区或 poly-comb 区,并多与 IRF-4 和 Jun 形成复合物。BATF 靶向的效应分子分布广泛,包括大量转录因子、T 细胞活化相关分子、细胞因子信号通路各种分子、凋亡过程中各分子、细胞迁移相关分子、CD8<sup>+</sup>T 细胞的效应分子以及代谢过程中各类分子,侧面证明了 BATF 在 CD8<sup>+</sup>T 细胞从 Naïve 到 effector 和 memory 分化过程中的决定性作用。

[ 田军 摘译,郭振红审阅. Kurachi M, Barnitz RA, Yosef N, et al. *Nat Immunol*, 2014, 15( 4 ): 373-383. ]