

文章编号 1006-8147(2015)01-0090-04

综述

Nanog 及其假基因 Nanog P8 在肿瘤中的研究进展

孙秀梅,张 飞 综述,牛瑞芳 审校

(天津医科大学肿瘤医院公共实验室,国家肿瘤临床医学研究中心,天津市肿瘤防治重点实验室,乳腺癌防治教育部重点实验室,天津 300060)

关键词 Nanog;Nanog P8;肿瘤

中图分类号 R730.2

文献标志码 A

随着肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)学说的提出,干细胞相关基因在肿瘤发生中的作用日益被重视。Nanog 是一种维持干细胞全能性的核转录因子,与包含 POU 结构域的 Oct4 (octamer-binding transcription factor 4) 和包含 HMG 盒的 Sox2 (sex determining region Y-box 2, SRY-box 2) 共同维持胚胎干细胞的自我更新和多潜能性,被认为是胚胎干细胞的标志物之一^[1]。最初的研究认为 Nanog 在胚胎干细胞中表达,在分化的细胞和正常组织中不表达,然而最近的研究发现 Nanog 在很多肿瘤细胞及组织中存在表达,并且证实这些肿瘤细胞及组织中的 Nanog 主要来自其假基因 Nanog P8 的转录产物^[2]。本文针对 Nanog P8 和胚胎 Nanog 在基因定位、结构和蛋白序列的区别以及二者在肿瘤中发挥的作用进行简要总结。

1 Nanog P8 与胚胎 Nanog 的区别与联系

除了胚胎 Nanog 基因外,目前发现人 Nanog 还有 11 个假基因(Nanog P1-11),这 11 个假基因主要存在于大多数的肿瘤细胞系和组织中,正常的细胞中则不存在^[3]。由于这些假基因中存在大量的突变或缺失,在这些假基因当中,只有 Nanog P8 的转录产物没有内部终止密码子,具有完整的开放阅读框(open reading frame, ORF),能够翻译为完整的、具有功能性的 Nanog 蛋白^[4]。

1.1 Nanog P8 与胚胎 Nanog 基因的定位 胚胎 Nanog 基因定位于染色体 12p13.31,由 4 个外显子和 3 个内含子构成^[5]。与胚胎 Nanog 不同,假基因 Nanog P8 位于 15q14,仅含有 1 个外显子^[6]。尽管二者的结构不同,但两个基因的蛋白质编码区却有 99.5%的一致性。运用基本局部比对搜索工具(basic local alignment search tool, Blast) 进行基因序列比

对,结果发现两者间仅有 5 个碱基不同(表 1)。

表 1 Nanog P8 与胚胎 Nanog 基因及蛋白序列比对结果

指标	47	144	246	531	759
Nanog	C	G	G	T	G
Nanog P8	A	A	T	C	C
amino acid change	A-E		K-N		Q-H

1.2 Nanog P8 与胚胎 Nanog 的蛋白结构 胚胎 Nanog 与 Nanog P8 的 ORF 均编码 305 个氨基酸, Blast 蛋白序列比对,结果发现两者间仅有 3 个氨基酸不同(表 1)。故商用 Nanog 的抗体也能识别 Nanog P8^[7]。因此,两基因转录产物统称为 Nanog^[6,8]。Nanog 蛋白包括 N-末端(aa,1-94)、与 DNA 结合的同源结构域 H 区(aa,95-154)、C-末端(aa,155-305)3 个结构域。而 C-末端结构域又进一步被分为 C1 结构域(aa,155-195)、色氨酸富集的区域 W 结构域(aa,196-240)以及 C2 结构域(aa,241-305)3 部分^[5,9]。其中,N 末端结构域具有转录抑制的作用,且受磷酸化或其它的转录后修饰的调节,H 区结构域能够与其他 DNA 或者蛋白结合,从而调控下游基因的转录,C 末端结构域具有转录激活的作用^[5]。Nanog 同源结构域中包含一个核定位序列(nuclear localization sequence, NLS) 对于其发挥转录因子的功能具有重要的作用,而对于 NLS 起关键作用的是同源结构域 H 中的 6 个氨基酸(136YKQVK141),尤其是其中的 2 个赖氨酸(K137 和 K140)^[5]。由于 Nanog P8 中构成 NLS 的氨基酸没有突变,故 Nanog P8 也定位于核,也具有 DNA 的识别位点,表明它可能像胚胎 Nanog 一样,也具有转录因子的功能。

1.3 Nanog P8 与胚胎 Nanog 的鉴别 除了基因的定位、结构不同之外,还可根据以下 3 点将二者区别开来:(1)在胚胎 Nanog 的 3'非编码区(untranslated regions, UTR)有一个 22 bp 的碱基序列^[6,10];(2)存在 Sma I 酶切位点^[11];(3)由于在编码区的碱基改变 G-A 使 Nanog P8 有 AlwN1 酶切位点^[12]。此外,胚胎

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81372844; 81071731)

作者简介 孙秀梅(1985-),女,硕士在读,研究方向:生物化学与分子生物学;通信作者:牛瑞芳, E-mail:niuruifang@tjmuch.com。

Nanog 在 ESCs 中的转录调控已经被深入研究,与 Oct4、Sox2 协同调控下游基因的表达,Oct4 或 Sox2 的表达下调会影响胚胎 Nanog 的表达^[13]。但是在结直肠癌细胞系中,干扰 Oct4 和(或)Sox2 的表达,却对 Nanog P8 的表达调控不起作用^[13]。而且 Nanog P8 的 5' UTR 从-1 000 bp 到转录起始点却没有 Oct4 和 Sox2 的结合位点。因此,推测 Nanog P8 的转录调控与胚胎 Nanog 的不同^[14]。

1.4 Nanog P8 与胚胎 Nanog 功能上的联系 目前研究发现 Nanog 主要在胚胎干细胞中表达,而 Nanog P8 主要表达在肿瘤细胞或者组织中,但是由于这两个基因在编码区只有 5 个碱基的不同,在氨基酸序列上的差异则只有 3 个,而且这种差异还不在于核心区,因此,目前对这两个基因功能上的差异并不十分清晰^[13]。多项研究发现,肿瘤细胞中高表达 Nanog P8 以后能够明显促进细胞的集落形成能力和致瘤能力,而下调 Nanog P8 后的肿瘤细胞在 NOD/SCID 小鼠中的成瘤能力明显下降(形成肿瘤的数量和大小减少),表明 Nanog P8 与癌细胞中的干性有关^[15];此外,在另外一项针对人或小鼠成纤维细胞的研究中发现,Nanog P8 和 Nanog 一样能够诱导多能干细胞的活性。因此,这些结果表明 Nanog P8 与 Nanog 在功能上具有极大的相似性。

2 Nanog P8 与胚胎 Nanog 和肿瘤的关系

最初的研究认为 Nanog 只在胚胎干细胞以及胚胎生殖(embryonic germ,EG)细胞等多能性干细胞中表达,在成体组织中不表达。然而最近的研究发现在一些癌细胞(精原细胞瘤、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、人胎儿生殖母细胞、睾丸原位癌和生殖细胞肿瘤等)中也有 Nanog 的表达^[13,16-18]。鉴于肿瘤细胞与胚胎干细胞均有无限增殖及保持低分化状态的特征,尽管肿瘤中 Nanog 的表达量比在 ESCs 中低,但仍可推测 Nanog 可能在肿瘤发生发展中也发挥重要的作用。随后的进一步研究发现,肿瘤细胞中的 Nanog 主要来自其假基因 Nanog P8 的转录产物^[19],所以可以推测之前关于 Nanog 在肿瘤方面的研究大部分为 Nanog P8 在发挥作用。由于胚胎 Nanog 和 Nanog P8 在蛋白的序列、结构上区分不大,而且功能上的差异目前还不清楚,目前的研究中往往将二者的转录和翻译产物统称为 Nanog,故以下对 Nanog 和 Nanog P8 在肿瘤的研究中的作用统一用 Nanog 表示。

2.1 Nanog 与细胞增殖和细胞周期的关系 多项研究发现 Nanog 能够影响肿瘤细胞的增殖能力和成瘤能力,如 Nanog 高表达能够增强肺腺癌细胞的

克隆形成能力和集落形成能力,而敲除 Nanog 后能够抑制肺腺癌细胞的克隆形成能力和增殖能力^[20];此外,另外一项研究也发现,下调乳腺癌细胞中的 Nanog 的表达后,乳腺癌细胞的增殖能力和克隆形成能力显著下降^[21]。机制方面的研究发现利用小 RNA 干扰技术下调胚胎癌细胞中的 Nanog 表达后,多个细胞周期相关蛋白,如 CyclinD1、D2、D3、E1 以及细胞周期蛋白依赖性激酶 1(cyclin-dependent kinase 1,CDK1)和细胞周期蛋白依赖性激酶 6(cyclin-dependent kinase 6,CDK6)的表达也下调,表明 Nanog 可能调控细胞周期相关蛋白的表达^[22]。与此相一致的是,有研究发现 Nanog 表达下调会抑制乳腺癌细胞的增殖和 CyclinD1 和 C-myc 的表达,同时导致细胞周期阻滞在 G0/G1 期。此外,进一步通过染色质免疫沉淀发现 Nanog 蛋白能够直接与 CyclinD1 的启动子区相结合从而调控其转录活性,进而调控其表达,从而促进细胞的增殖^[21]。

2.2 Nanog 与癌细胞的转移和侵袭的关系 多项研究发现虽然 Nanog 在乳腺癌、卵巢癌和结直肠癌中高表达与患者年龄、性别无关,但是与肿瘤的 TNM 分期及低生存率有关^[12,20-21,23-24],还与血管和胆管受侵程度有关^[23],这些结果提示 Nanog 可能在肿瘤的进展中起关键性的作用^[25],Nanog 的高表达可作为浆液性卵巢癌、结直肠癌和乳腺癌等预后不良的标志^[15,26-27]。随后分子机制的研究发现,在卵巢癌细胞系中,下调 Nanog 的表达会导致 E-Cadherin、FOXO1、FOXO3a、FoxJ1 及 FOXB1 的 mRNA 水平增加,而 Nanog 表达上调会使其表达减少^[25]。此外,还有研究发现 Nanog 与 Oct4 的共表达或 Nanog 单独存在的情况下,会通过转录调控引起 Slug 表达水平升高导致细胞的运动能力和肿瘤的转移能力增强^[20]。由于 E-cadherin 和 Slug 在癌细胞上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)中发挥重要作用,因此这些结果表明 Nanog 可能通过调控癌细胞 EMT 从而促进癌细胞的迁移和侵袭。

2.3 Nanog 与 CSC 的关系 过去几年的大量研究已经为 CSC 在实体肿瘤中的存在及特征提供了强有力的证据^[6,28]。CSC 在无血清培养基中能够形成悬浮的微球(集落),有研究发现,采用慢病毒介导的 shRNA 技术,抑制结肠癌细胞中 Nanog 的表达以后,会明显减少结肠癌细胞的集落形成率。而且这种现象在前列腺癌、神经胶质瘤中也进一步得到证实^[6,29]。肿瘤干细胞中往往呈现为 CD133⁺或 CD44⁺,而多项研究发现高表达 CSC 标志物的癌细胞 Nanog 的表达水平也高,例如 CD133⁺或 CD44⁺的癌

细胞的 Nanog 表达水平明显高于 CD133⁺或CD144⁺的癌细胞。此外,有证据显示,Nanog 能够诱导癌细胞中 CD133 和乙醛脱氢酶 1 (aldehyde dehydrogenase class 1,ALDH1)的表达上调^[30-32]。总之,这些结果说明 Nanog 的表达上调与肿瘤干细胞的发生密切相关。

2.4 Nanog 与肿瘤细胞耐药的关系 目前已有文献报道,CSC 的耐药特性与干性标志物 Nanog 和 Oct4 的表达有关。在人食管癌中,Nanog 高表达会增强细胞对顺铂的耐药能力^[28];在肺腺癌中,Nanog 与 Oct4 的高表达会增强 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp)mRNA 的表达水平,从而导致癌细胞对顺铂耐药^[20];此外,在口腔鳞癌细胞中也观察到类似现象^[33]。机制方面的研究表明,Nanog 促进肿瘤细胞耐药可能与其信号转导及转录激活蛋白 3(signal transducer and activator of transcription 3,STAT3)在核内形成复合物从而导致 STAT3 特异性的转录激活以及上调多药耐药蛋白 ABCB1 基因(编码 P-gp)的表达有关^[34-35]。

2.5 Nanog 与肿瘤细胞免疫耐受的关系 肿瘤细胞能够适应机体的免疫系统从而逃脱 CD8⁺的 T 细胞所介导的细胞杀伤和凋亡^[36-37]。Noh 等发现 Nanog 表达水平上调能够使肿瘤细胞处于免疫抵抗状态,使肿瘤细胞对具有杀伤性的细胞毒性 T 细胞耐受;采用小 RNA 干扰技术下调 Nanog 的表达之后,肿瘤细胞失去免疫耐受表型,能够被细胞毒性 T 细胞识别^[37]。因此,Nanog 可以作为免疫治疗的一个潜在的靶点。

3 肿瘤细胞中调控 Nanog 的信号传导通路

目前的研究发现多条在肿瘤细胞中激活的信号通路均与 Nanog 的表达有关,例如在肺癌、乳腺癌和胶质瘤细胞中,表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor,EGFR)信号通路的激活能够上调 Nanog 的蛋白和 mRNA 水平,从而促进了肿瘤细胞的干性^[38-39]。此外,还有研究发现,在肺腺癌细胞中,胰岛素样生长因子-1 的受体(insulin-like growth factors-1 receptor,IGF-1R)激活以后通过 PI3K/Akt/GSK 3/ β -catenin 信号通路导致 Nanog 的转录激活;而抑制 IGF-1R 会导致 Nanog 表达下降^[40]。在结直肠癌细胞中,有研究发现黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)能够通过与 Nanog 结合从而使其发生磷酸化而激活,更有意思的是,激活的 Nanog 能够直接结合到 FAK 的启动子上,从而增强 FAK 的转录,形成一个正反馈,进而介导肿瘤细胞的侵袭等一系列生物学行为^[41]。

4 展望

越来越多的研究表明,Nanog 及其假基因 Nanog P8 在多种肿瘤细胞或组织中表达,而且通过增强癌细胞的干性从而促进了肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭等生物学行为,大量证据显示肿瘤组织中 Nanog 高表达与患者预后不良密切相关,因此,干预 Nanog 或者 Nanog P8 的表达有可能成为一种有效的治疗肿瘤的新手段。但是目前对肿瘤细胞中调控 Nanog 或 Nanog P8 表达的分子机制方面的研究很少;而且对 Nanog 表达出现以后通过何种方式促进了肿瘤的发生发展还知之甚少;此外,目前的研究推测 Nanog 蛋白可能存在多个翻译后修饰的氨基酸位点,而对调控这些位点修饰的上游通路的研究目前也才刚刚开始。因此,相信随着研究的深入,我们必将进一步深入理解 Nanog 的调控机制以及 Nanog 促进肿瘤发生发展的分子机制,而这些研究也将有助于我们更好地理解肿瘤细胞的生物学行为以及为研究新的肿瘤治疗手段提供新的思路和方法。

参考文献:

- [1] Cavaleri F, Schöler H R. Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra[J]. *Cell*, 2003,113(5):551
- [2] Palla A R, Piazzolla D, Abad M, et al. Reprogramming activity of NANOGP8, a NANOG family member widely expressed in cancer[J]. *Oncogene*, 2014,33(19):2513
- [3] Polisenio L. Pseudogenes: newly discovered players in human cancer [J]. *Sci Signal*, 2012,5(242):5
- [4] Zhang J, Wang X, Li M, et al. NANOGP8 is a retrogene expressed in cancers[J]. *FEBS J*, 2006,273(8):1723
- [5] Chang D F, Tsai S C, Wang X C, et al. Molecular characterization of the human NANOG protein[J]. *Stem Cells*, 2009,27(4):812
- [6] Jeter C R, Liu B, Liu X, et al. NANOG promotes Cancer stem cell characteristics and prostate Cancer resistance to androgen deprivation[J]. *Oncogene*, 2011,30(36):3833
- [7] Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells[J]. *Cell*, 2003,113(5):643
- [8] Jeter C R, Badeaux M, Choy G, et al. Functional evidence that the self-renewal gene NANOG regulates human tumor development[J]. *Stem Cells*, 2009,27(5):993
- [9] Liu B, Badeaux M D, Choy G, et al. Nanog1 in NTERA-2 and recombinant NanogP8 from somatic Cancer cells adopt multiple protein conformations and migrate at multiple M.W species[J]. *PLoS One*, 2014,9(3):90615
- [10] Fairbanks D J, Fairbanks A D, Ogden T H, et al. NANOGP8: evolution of a human-specific retro-oncogene[J]. *G3 (Bethesda)*, 2012,2(11):1447
- [11] Ambady S, Malcuit C, Kashpur O, et al. Expression of NANOG and NANOGP8 in a variety of undifferentiated and differentiated human cells[J]. *Int J Dev Biol*, 2010,54(11/12):1743
- [12] Ishiguro T, Sato A, Ohata H, et al. Differential expression of nanog1

- and nanogp8 in colon Cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012,418(2):199
- [13] Ibrahim E E, Babaei-Jadidi R, Saadeddin A, et al. Embryonic NANOG activity defines colorectal Cancer stem cells and modulates through API- and TCF-dependent mechanisms[J]. *Stem Cells*, 2012,30(10):2076
- [14] Uchino K, Hirano G, Hirahashi M, et al. Human nanog pseudogene8 promotes the proliferation of gastrointestinal Cancer cells[J]. *Exp Cell Res*, 2012,318(15):1799
- [15] Meng H M, Zheng P, Wang X Y, et al. Over-expression of Nanog predicts tumor progression and poor prognosis in colorectal Cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010,9(4):295
- [16] Zhang J, Espinoza L A, Kinders R J, et al. NANOG modulates stemness in human colorectal Cancer[J]. *Oncogene*, 2013,32(37):4397
- [17] Ezeh U I, Turek P J, Reijo R A, et al. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma[J]. *Cancer*, 2005,104(10):2255
- [18] Ye F, Zhou C, Cheng Q, et al. Stem-cell-abundant proteins Nanog, Nucleostemin and Musashi1 are highly expressed in malignant cervical epithelial cells[J]. *BMC Cancer*, 2008,8:108
- [19] Chiou S H, Wang M L, Chou Y T, et al. Coexpression of Oct4 and nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal trans-differentiation[J]. *Cancer Res*, 2010,70(24):10433
- [20] Han J H, Zhang F, Yu M, et al. RNA interference-mediated silencing of NANOG reduces cell proliferation and induces G0/G1 cell cycle arrest in breast Cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2012,321(1):80
- [21] Choi S C, Choi J H, Park C Y, et al. Nanog regulates molecules involved in stemness and cell cycle-signaling pathway for maintenance of pluripotency of P19 embryonal carcinoma stem cells[J]. *J Cell Physiol*, 2012,227(11):3678
- [22] Shan J J, Shen J J, Liu L M, et al. Nanog regulates self-renewal of cancer stem cells through the insulin-like growth factor pathway in human hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2012,56(3):1004
- [23] Chiou S H, Yu C C, Huang C Y, et al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2008,14(13):4085
- [24] Siu M, Wong E, Kong D, et al. Stem cell transcription factor NANOG controls cell migration and invasion via dysregulation of E-cadherin and FoxJ1 and contributes to adverse clinical outcome in ovarian cancers[J]. *Oncogene*, 2013,32(30):3500
- [25] Nagata T. Prognostic significance of NANOG and KLF4 for breast cancer[J]. *Breast Cancer*, 2012,30(15, S):96
- [26] Lee M, Nam E J, Kim S W, et al. Prognostic impact of the Cancer stem Cell-Related marker NANOG in ovarian serous carcinoma[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2012,22(9):1489
- [27] Yang L, Zhang X, Zhang M, et al. Increased nanog expression promotes tumor development and cisplatin resistance in human esophageal Cancer cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012,30(4):943
- [28] Zbinden M, Duquet A, Lorente-Trigos A, et al. NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-function-al network with GLI1 and p53[J]. *EMBO J*, 2010,29(15):2659
- [29] Xu F, Dai C, Zhang R, et al. Nanog: a potential biomarker for liver metastasis of colorectal cancer[J]. *Dig Dis Sci*, 2012,57(9):2340
- [30] He A, Qi W, Huang Y, et al. CD133 expression predicts lung metastasis and poor prognosis in osteosarcoma patients: A clinical and experimental study[J]. *Exp Ther Med*, 2012,4(3):435
- [31] Leung E L, Fiscus R R, Tung J W, et al. Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties[J]. *PLoS One*, 2010,5(11):14062
- [32] Tsai L L, Yu C C, Chang Y C, et al. Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma[J]. *J Oral Pathol Med*, 2011,40(8):621
- [33] Bourguignon L Y, Peyrollier K, Xia W, et al. Hyaluronan-CD44 interaction activates stem cell marker Nanog, Stat-3-mediated MDR1 gene expression, and ankyrin-regulated multidrug efflux in breast and ovarian tumor cells[J]. *J Biol Chem*, 2008,283(25):17635
- [34] Wang M L, Chiou S H, Wu C W. Targeting Cancer stem cells: e-merging role of Nanog transcription factor[J]. *Onco Targets Ther*, 2013,6:1207
- [35] Noh K H, Kim B W, Song K H, et al. Nanog signaling in cancer promotes stem-like phenotype and immune evasion[J]. *J Clin Invest*, 2012,122(11):4077
- [36] Noh K H, Lee Y H, Jeon J H, et al. Cancer vaccination drives Nanog-dependent evolution of tumor cells toward an immune-resistant and stem-like phenotype[J]. *Cancer Res*, 2012,72(7):1717
- [37] Ma L, Zhang G, Miao X B, et al. Cancer stem-like cell properties are regulated by EGFR/AKT/ β -catenin signaling and preferentially inhibited by gefitinib in nasopharyngeal carcinoma[J]. *FEBS J*, 2013, 280(9):2027
- [38] Hyder A, Ehnert S, Hinz H, et al. EGF and HB-EGF enhance the proliferation of programmable cells of monocytic origin (PCMO) through activation of MEK/ERK signaling and improve differentiation of PCMO-derived hepatocyte-like cells [J]. *Cell Commun Signal*, 2012,10(1):23
- [39] Xu C, Xie D, Yu S C, et al. β -Catenin/POU5F1/SOX2 transcription factor complex mediates IGF-I receptor signaling and predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2013,73(10):3181
- [40] Ho B, Olson G, Figel S, et al. Nanog increases focal adhesion kinase (FAK) promoter activity and expression and directly binds to FAK protein to be phosphorylated[J]. *J Biol Chem*, 2012,287(22):18656

(2014-07-10 收稿)