

·基础研究·

NANOG基因在侧群表型干细胞样肝癌细胞中的表达及意义

周嘉嘉, 陈汝福*, 邓小耿, 周雨, 周泉波, 张杰, 伍耀豪, 曾乐祥, 邱荣林

(中山大学孙逸仙纪念医院外科, 广东广州 510120)

摘要:【目的】基于侧群(SP)细胞分选方法,从肝癌细胞 Huh7 和 Hep3B 中分选 SP 表型干细胞样肝癌细胞,观察干细胞标记物 NANOG 基因在该 SP 表型肝癌细胞中的表达。【方法】采用流式细胞术检测和分选肝癌细胞 Huh7 和 Hep3B 中的 SP 细胞和非侧群(NSP)细胞,细胞生长曲线法检测 SP 和 NSP 细胞的增殖能力,Transwell 侵袭实验检测 SP 和 NSP 细胞的侵袭能力,MTT 法检测 SP 和 NSP 细胞对 5-氟尿嘧啶(5-FU)和阿霉素(DOX)的药物敏感性;Real-time PCR 和 WB 检测 SP 与 NSP 细胞中 NANOG 基因的表达。【结果】肝癌细胞 Huh7 和 Hep3B 中分选的 SP 细胞比例分别为 $(5.3 \pm 0.8)\%$ 和 $(13.49 \pm 1.0)\%$ 。生长曲线表明 Huh7 和 Hep3B 的 SP 细胞的增殖速度快于 NSP 细胞 ($P < 0.05$),体外侵袭实验结果显示 Huh7 和 Hep3B 的 SP 细胞体外侵袭能力高于 NSP 细胞 ($P < 0.05$),MTT 结果显示 Huh7 和 Hep3B SP 细胞对 5-FU 和 DOX 有耐药性,高于 NSP 细胞 ($P < 0.05$)。Huh7 和 Hep3B SP 细胞 NANOG mRNA 平均表达水平分别是 NSP 细胞的 4.17 和 5.51 倍 ($P < 0.05$),NANOG 蛋白平均表达水平分别是 NSP 细胞的 3.78 和 5.01 倍 ($P < 0.05$)。【结论】肝癌细胞 Huh7 和 Hep3B 中分选的 SP 细胞符合肿瘤干细胞的部分生物学特征,NANOG 基因在 SP 表型干细胞样肝癌细胞中高表达。

关键词: 肝癌;侧群细胞;肿瘤干细胞;NANOG 基因

中图分类号:R735.7

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2014)01-0012-06

Significance of NANOG Gene Expression in SP Phenotype Stem Cell-like Hepatoma Cells

ZHOU Jia-jia, CHEN Ru-fu*, DENG Xiao-geng, ZHOU Yu, ZHOU Quan-bo, ZHANG Jie,

WU Yao-hao, ZENG Le-xiang, QIU Rong-lin

(Department of Surgery, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To isolate and identify the biological characteristics of stem cell-like hepatoma cells from the hepatoma cell line Huh7 and Hep3B based on side population (SP) cell sorting method, and to study the expression of NANOG gene in the SP phenotype stem cell-like hepatoma cells. 【Methods】 Flow cytometry was used to sort SP cells and non-side population (NSP) cells from hepatoma cell line Huh7 and Hep3B, the proliferation ability of SP cells and NSP cells were detected by cell growth curve, the invasive properties of SP cells and NSP cells were tested by transwell assay, the chemotherapeutic drug sensitivity of SP cells and NSP cells towards 5-fluorouracil and doxorubicin were tested by MTT assay, the expression levels of NANOG mRNA and protein in SP cells and NSP cells were detected by real-time PCR and Western blot analysis. 【Results】 $(5.3 \pm 0.8)\%$ and $(13.49 \pm 1.0)\%$ SP cells were sorted from Hepatoma cell line Huh7 and Hep3B, respectively. Growth curve assay showed that the proliferation ability of Huh7 and Hep3B SP cells was higher than that of NSP cells. Transwell assay showed that the in-vitro invasion capacity of Huh7 and Hep3B Sp cells was significantly higher than that of NSP cells ($P < 0.05$). MTT assay showed that Huh7 and Hep3B SP cells have stronger drug tolerance to 5-fluorouracil and doxorubicin than NSP cells ($P < 0.05$). The expression levels of NANOG mRNA in Huh7 and Hep3B SP cells were 4.17 and 5.51 times of that in NSP cells, respectively ($P < 0.05$). The expression levels of NANOG protein in Huh7 and Hep3B SP cells were 3.78 and 5.01 times of that in NSP cells, respectively ($P < 0.05$). 【Conclusions】 The SP cells sorted from Hepatoma cell line Huh7 and Hep3B have some of the characteristics of cancer stem cells, and NANOG gene is highly expressed in these SP phenotype stem cell-like hepatoma cells.

Key words: hepatocellular carcinoma; side population cells; cancer stem cells; NANOG gene

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(1): 12-17]

收稿日期 2013-08-28

基金项目:国家自然科学基金(30872485, 81000889)

作者简介:周嘉嘉,医学硕士,主治医师,E-mail: jiajiazh2004@163.com; * 通信作者:陈汝福,教授,研究方向:肝胆胰腺肿瘤,E-mail: chenrf63@163.com

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界上第 5 大常见癌症, 在我国也是常见的恶性肿瘤之一, 其相关死亡率排第二。肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC) 理论认为肿瘤是一种干细胞疾病, CSC 是肿瘤形成的根源, 也是肿瘤化疗耐受、转移、复发的主导因素^[1]。肝癌中存在 CSC 这一观点也被认可^[2]。侧群 (side population, SP) 细胞, 因其能将 Hoechst33342 排出细胞而呈弱染状态, 这种表型称为 SP 表型^[3]。SP 细胞具有干细胞相似的生物学特性, 从肿瘤细胞分选的 SP 细胞具有更强的肿瘤形成能力和自我更新能力, 具备 CSC 的一些特性^[3]。在缺乏特异标记的情况下, SP 细胞分选被认为是分离 CSC 的一种重要方法。2003 年有报道一种在囊胚内细胞群、原始生殖细胞及胚胎干细胞系表达的新转录因子, 命名为 NANOG, 意即生命绿洲和永不枯竭。NANOG 的主要作用除了有助于胚胎干细胞自我更新和维持其未分化状态, 还促进细胞增殖。研究发现 NANOG 在精原细胞瘤、乳腺癌、前列腺癌等存在表达, 表明 NANOG 可能是某些肿瘤标志之一^[4]。目前关于 NANOG 基因与 SP 表型肝癌细胞的关系尚不清楚。本研究通过分选 SP 表型肝癌细胞, 检测 NANOG 基因在 SP 表型肝癌细胞中的表达和功能, 旨在探讨该基因与肝癌干细胞的关系及意义, 为肝癌干细胞研究提供一定的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

肝癌细胞 Huh7 和 Hep3B 由本实验室保存, 细胞在体积分数为 5%CO₂、37 °C 培养箱条件下培养, 培养液为含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基 (购自 Gibco 公司)。HBSS 液、Hoechst33342、碘化丙啶 (propidium iodide, PI)、维拉帕米 (Verapamil)、二甲基亚砷 (DMSO)、MTT 试剂购自 Sigma 公司。Matrigel 胶购自美国 BD 公司, Transwell 小室购自美国 Corning 公司, RNA 提取试剂 Tripure reagent 购自 ROCHE 公司, NANOG、GAPDH 一抗购自 abcam 公司; 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU)、阿霉素 (doxorubicin, DOX) 购自齐鲁制药公司。流式细胞仪 (美国 BECKMAN COULTER 公司)。

1.2 流式细胞术检测 SP 细胞

取对数生长期细胞, 调整细胞密度至 1×10^9

cells/mL, 实验组加入 Hoechst33342 至终浓度 2.5 mg/L, 对照组再加入维拉帕米至终浓度 100 mg/L。37 °C 水浴 90 min, PBS 洗涤离心, 重悬于冰冷 RPMI-1640 培养基中, 上机前加入 PI 至终浓度 1 mg/L。详细操作及 SP 细胞检测参照文献^[3], 用离心管收集 SP 细胞和非 SP (NSP) 细胞备用。

1.3 生长曲线绘制

将前 1 d 分选的 SP 和 NSP 细胞制备成单细胞悬液, 接种于 96 孔板, 每孔 1×10^4 个细胞。每隔 24 h 将 SP 和 NSP 细胞各取 3 孔进行细胞计数, 计算平均值。7 d 后以培养时间为横坐标, 细胞数为纵坐标绘制 SP 和 NSP 细胞的生长曲线。

1.4 Transwell 小室侵袭实验

Transwell 上室底部预先包被 Matrigel 胶, 每孔加入 1×10^5 个细胞, 常规培养 48 h 后自 24 孔板中取出上室, 小心擦去上室的 Matrigel 胶, 置于 95% 酒精固定 15 min, 结晶紫染色 15 min, PBS 漂洗去除多余的结晶紫。200 倍光镜下观察, 随机计数 5 个视野, 取均值。

1.5 化疗药物敏感性检测

将前 1 d 分选的 SP 和 NSP 细胞制备成单细胞悬液, 接种于 96 孔板, 每孔 1×10^4 个细胞, 用含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI-1640 液培养过夜, 5-FU 实验组加入 5-FU 溶液至终浓度为 5 μ g/mL, DOX 组加入 DOX 溶液至终浓度为 2 μ g/mL, 每组设 5 个平行孔, 培养 48 h 后 MTT 法检测细胞存活率。

1.6 实时荧光定量 PCR (Real-Time PCR) 检测 NANOG mRNA 表达

NANOG 引物序列 F: 5'-GCT GAG ATG CCT CAC ACG GAG -3', 反义引物序列 R: 5'-TCT GTT TCT TGA CTG GGA CCT TGT C-3'; 内参 β -actin 引物序列 F: 5'-GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG-3', 反义引物序列 R: 5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'。反应体系置入 ABI7300 Real-Time PCR 仪按如下程序进行 PCR 扩增: 94 °C 预变性 4 min, 进入 3 步循环 (94 °C \times 30 s, 57 °C \times 30 s, 72 °C \times 35 s, 共 45 个循环), Real-Time PCR 仪记录 SYBR Green 释放的荧光。使用 7300 System SDS Software 进行数据分析和统计学处理。

1.7 免疫印记 (Western blot, WB) 检测 NANOG 蛋白表达

收集 SP 和 NSP 细胞, 提取细胞总蛋白, BCA

法测定蛋白浓度。配制 8% SDS-PAGE 凝胶,各孔加入 30 μg 蛋白样品,凝胶电泳将蛋白转移到 PVDF 膜上,50 g/L 脱脂奶粉封闭 2 h。TBST 洗涤 3 次,4 ℃ 孵育 NANOG 抗体(1:1 000)过夜。室温下孵育山羊抗兔抗体(1:5 000)1 h。用 ECL 显影曝光,图片经 Quantity One 软件分析灰度值。

1.8 统计学处理

实验数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析及 *t* 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SP 细胞的分选

流式细胞术检测分选肝癌细胞 Huh7 和 Hep3B 中的 SP 和 NSP 细胞。SP 细胞能排出荧光染料 Hoechst33342 呈现 Hoechst33342 低染,这一功能可被维拉帕米抑制。无维拉帕米组 Huh7 和 Hep3B 细胞中 SP 细胞比例分别为 (5.3 ± 0.8)% 和 (13.49 ± 1.0)%,经维拉帕米抑制后 SP 细胞比例减少,分别为(0.32 ± 0.0)%和(0.41 ± 0.0)%(图 1)。

2.2 SP 和 NSP 细胞增殖能力比较

肝癌细胞 Huh7 和 Hep3B 的 SP 及 NSP 细胞

生长曲线显示,SP 细胞快速增殖至指数生长期,在 1 周时尚未达到平台期。Huh7 和 Hep3B 的 SP 细胞生长增殖速度快于 NSP 细胞,SP 和 NSP 细胞生长速度差异有统计学意义($n = 3, P < 0.05$,图 2,3)。

2.4 体外侵袭能力比较

Transwell 小室侵袭实验检测 SP 和 NSP 细胞的侵袭能力(图 4)。结果显示,Transwell 小室侵袭实验中 Huh7 SP 细胞穿过基底膜的细胞数为 (49.5 ± 8.7)个,NSP 细胞为(11.9 ± 6.6)个;Hep3B SP 细胞穿过基底膜的细胞数为(72.8 ± 11.4)个,NSP 细胞为(23.5 ± 7.3)个;SP 和 NSP 细胞侵袭能力差异有统计学意义($n = 3, P < 0.05$)。

2.5 化疗药物敏感性比较

MTT 法检测 SP 和 NSP 细胞对化疗药物 5-FU 和 DOX 的敏感性(图 5,6)。MTT 结果显示,5-FU 处理后的 Huh7 SP 细胞存活率为 (78.5 ± 5.78)%,NSP 细胞为(61.2 ± 4.89)%;5-FU 处理后的 Hep3B SP 细胞存活率为(83.3±5.39)%,NSP 细胞为(65.3 ± 4.66)%。DOX 处理后的 Huh7 SP 细胞存活率为 (67.8 ± 5.91)%,NSP 细胞为 (52.3 ± 4.82)%;DOX 处理后的 Hep3B SP 细胞存活率为(68.1 ± 6.50)个,NSP 细胞为(53.8 ± 4.4)%;SP 和 NSP 细胞对 5-FU 和 DOX 的耐药性差异有统计学

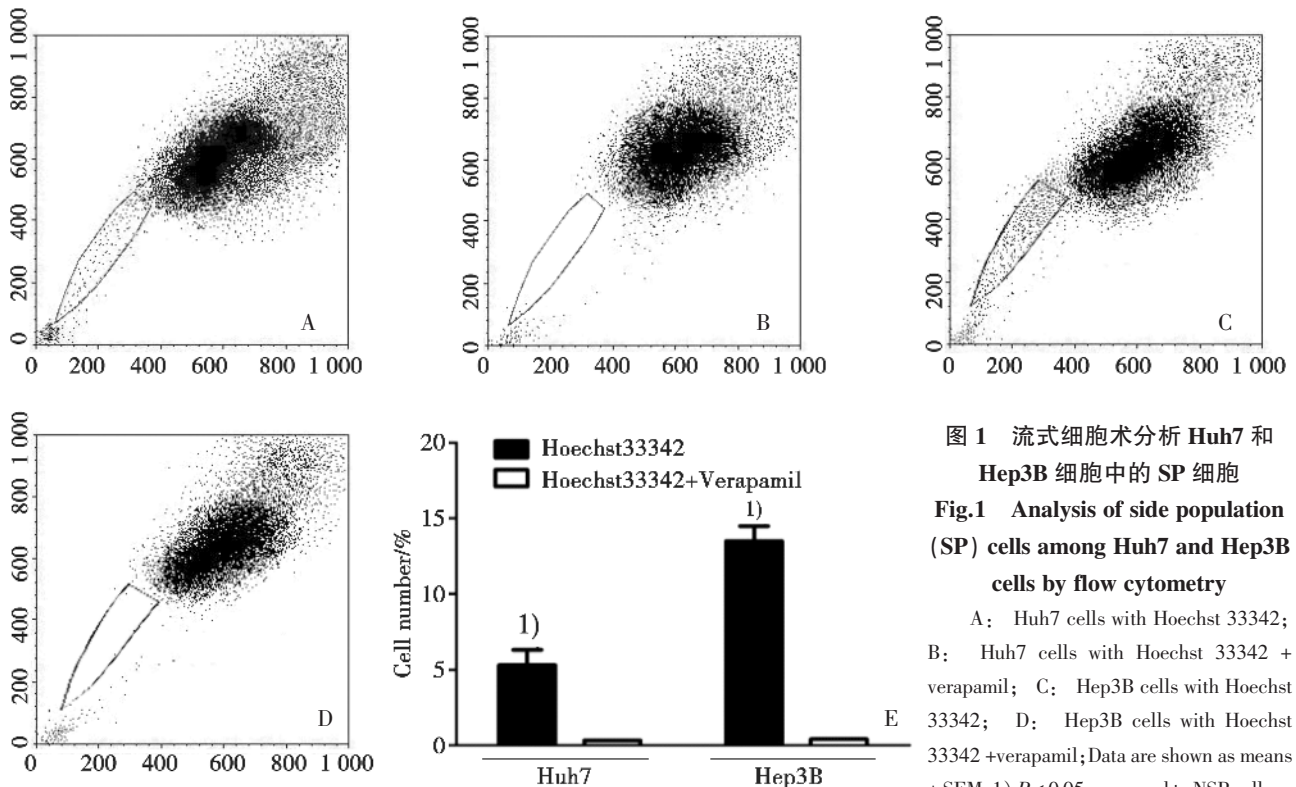


图 1 流式细胞术分析 Huh7 和 Hep3B 细胞中的 SP 细胞
Fig.1 Analysis of side population (SP) cells among Huh7 and Hep3B cells by flow cytometry
 A: Huh7 cells with Hoechst 33342; B: Huh7 cells with Hoechst 33342 + verapamil; C: Hep3B cells with Hoechst 33342; D: Hep3B cells with Hoechst 33342 + verapamil; Data are shown as means ± SEM. 1) $P < 0.05$ compared to NSP cells

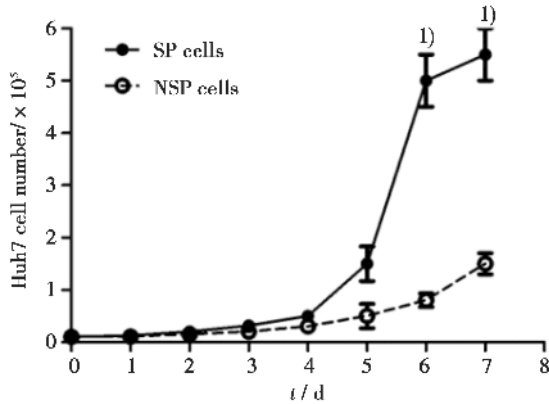


图 2 Huh7 SP 细胞与 NSP 细胞生长曲线图

Fig.2 Proliferation curves of Huh7 SP cells and NSP cells

Data are shown as means \pm SEM; 1) $P < 0.05$ compared to NSP cells

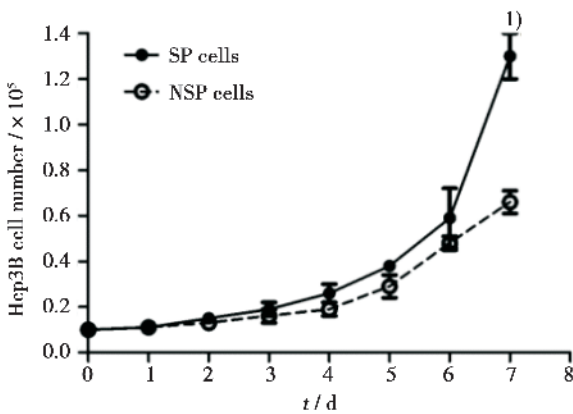


图 3 Hep3B SP 细胞与 NSP 细胞生长曲线图

Fig.3 Proliferation curves of Hep3B SP cells and NSP cells

Data are shown as means \pm SEM; 1) $P < 0.05$ compared to NSP cells

意义 ($n = 5, P < 0.05$)。

2.6 Real-Time PCR 检测 NANOG mRNA 表达

提取 SP 和 NSP 细胞内总 RNA 进行 Real-Time PCR 分析, 结果显示 Huh7 SP 细胞 NANOG mRNA 平均表达水平是 NSP 细胞的 4.17 倍, Hep3B SP 细胞 NANOG mRNA 平均表达水平是 NSP 细胞的 5.51 倍, NANOG mRNA 在 SP 和 NSP 细胞的表达差异有统计学意义 ($n = 3, P < 0.05$, 图 7)。

2.7 WB 检测 NANOG 蛋白表达

WB 结果显示, NANOG 蛋白在 Huh7 SP 细胞和 Hep3B SP 细胞中高表达, 其中 Huh7 SP 细胞 NANOG 蛋白表达水平是 NSP 细胞的 3.78 倍,

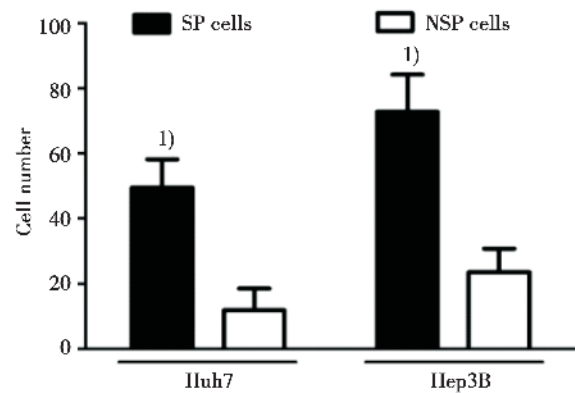
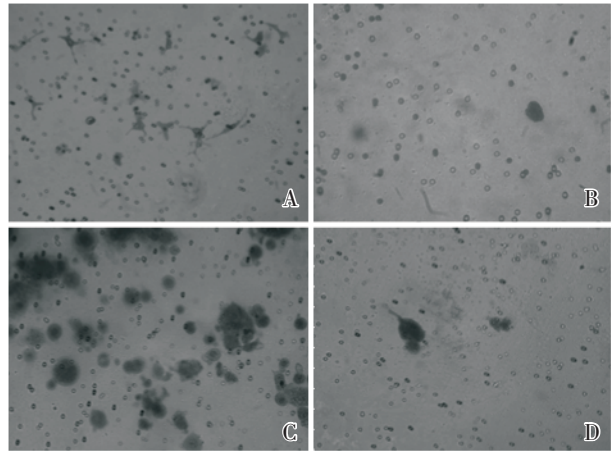


图 4 Transwell 小室侵袭实验检测 SP 细胞和 NSP 细胞的侵袭能力

Fig.4 Invasive ability of SP cells and NSP cells detected by transwell invasion assay

A: Huh7 SP cells; B: Huh7 NSP cells; C: Hep3B SP cells; D: Hep3B NSP cells; 200 \times . Data are shown as means \pm SEM; 1) $P < 0.05$ compared to NSP cells

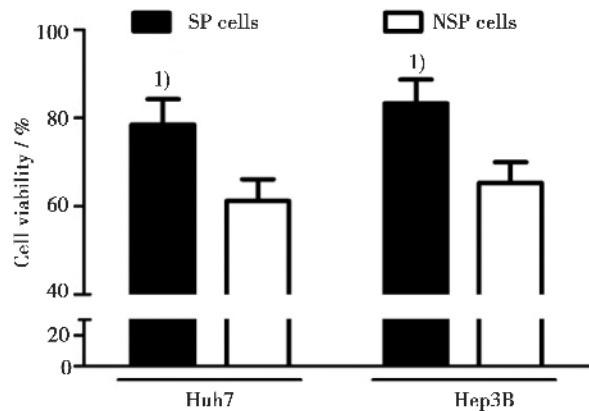


图 5 MTT 检测 SP 细胞和 NSP 细胞对化疗药物 5-FU 的药物敏感性

Fig.5 Chemotherapeutic drug sensitivity of SP cells and NSP cells to 5-fluorouracil detected by MTT assay

Data are shown as means \pm SEM; 1) $P < 0.05$ compared to NSP cells

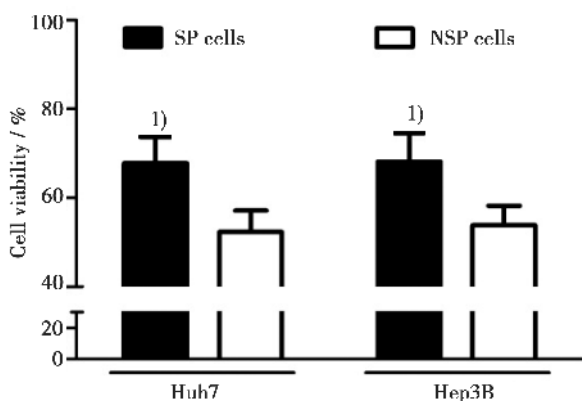


图 6 MTT 检测 SP 细胞和 NSP 细胞对化疗药物 DOX 的药物敏感性

Fig.6 chemotherapeutic drug sensitivity of SP cells and NSP cells to doxorubicin detected by MTT assay

Data are shown as means \pm SEM; 1) $P < 0.05$ compared to NSP cells

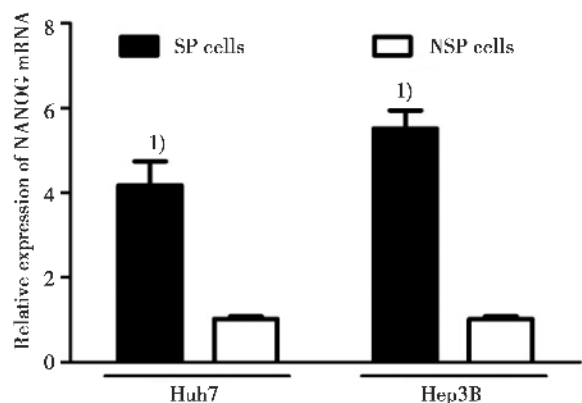


图 7 Real-Time PCR 检测 SP 细胞和 NSP 细胞中 NANOG mRNA 的表达水平

Fig.7 The expression levels of NANOG mRNA in SP cells and NSP cells detected by real-time PCR

Data are shown as means \pm SEM; 1) $P < 0.05$ compared to NSP cells

Hep3B SP 细胞 NANOG 蛋白表达水平是 NSP 细胞的 5.01 倍, NANOG 蛋白在 SP 和 NSP 细胞的表达差异有统计学意义($n = 3, P < 0.05$, 图 8)。

3 讨论

1959 年 Makino 首次提出 CSC 假说, 指出肿瘤可能由 CSC 产生。1997 年 Bonnet 首次发现并证实 CD34⁺CD38⁻ 表型细胞是人类急性髓系白血病的 CSC。目前已成功从乳腺癌、胶质瘤、前列腺癌、结肠

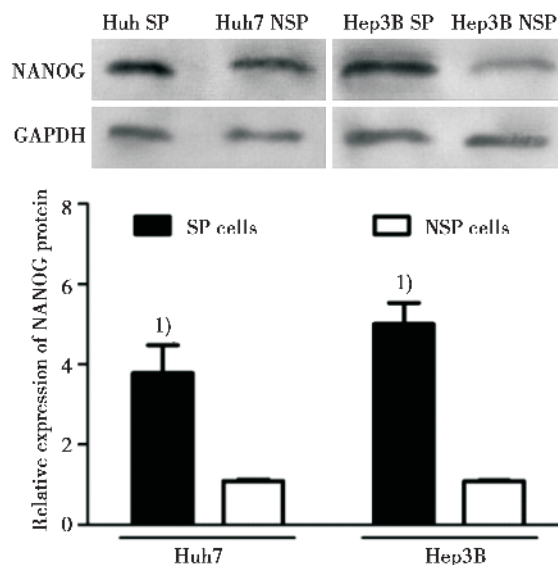


图 8 WB 检测 SP 细胞和 NSP 细胞中 NANOG 蛋白的表达水平

Fig.8 The expression levels of NANOG protein in SP cells and NSP cells detected by Western blot analysis

Data are shown as means \pm SEM; 1) $P < 0.05$ compared to NSP cells

癌等实体肿瘤中鉴定并分离到 CSC^[7-8]。研究发现, HCC 中可能存在肝癌干细胞 (liver cancer stem cells, LCSCs)^[2,7]。CD133、EpCAM、CD44、CD90 等被认为是 LCSC 可能的表面标记物。深入研究 LCSC 的生物学特性,有助于揭示肝癌发生的分子基础,阐明肝癌复发、转移和化疗耐药的作用机理。目前分离 CSC 主要通过三种途径:SP 分选法表面分子标记法和成球培养法,其中 SP 分选法是目前最简便的分离 CSC 方法,特别是在无法确定某种特定类型 CSC 分子标志时。本研究采用 SP 分选法从肝癌细胞 Huh7 和 Hep3B 中分离出 SP 细胞,表明 Huh7 和 Hep3B 细胞中含有不同比例的 SP 细胞,其中 Hep3B 细胞含有较多的 SP 细胞。细胞增殖实验显示 SP 细胞具有较强的增殖能力,明显强于 NSP 细胞。体外侵袭实验显示 SP 细胞 48 h 穿过人工基底膜的细胞数远多于 NSP 细胞,提示 SP 细胞中可能存在参与肿瘤侵袭转移的 CSC 亚群。肿瘤耐药实验显示 SP 细胞对化疗药物的抗性强于 NSP 细胞,这与 SP 细胞具备将染料和毒性物质排出胞外的功能相吻合。上述研究显示, Huh7 和 Hep3B 细胞中 SP 细胞具有较强的增殖和侵袭能力以及化疗药物抗性,呈现出与 CSC 相似的生物学特性,可能与 SP 细胞富集了 LCSC 有关。

NANOG是近年来发现的一个维持 ESCs 自我更新和多向分化潜能的重要转录因子,是干细胞发育成各种类型细胞能力的“总开关”,去除 NANOG 基因将导致胚胎干细胞向原始内胚层样细胞的分化^[8]。将 NANOG 基因转入造血干细胞后,并没有增强造血干细胞的自我更新能力,却导致 $\gamma\delta$ T 细胞恶性肿瘤的发生,故认为 NANOG 是一种癌基因^[9]。NANOG 还与肿瘤进展密切相关,RNA 干扰敲除 NANOG 后可阻止肿瘤的恶性进展,抑制细胞增殖^[5]。目前 NANOG 与 LCSC 的关系仍不甚清楚。本研究发现,NANOG mRNA 和蛋白在 Huh7 和 Hep3B SP 细胞中高表达,提示两者之间可能具有一定的联系。研究表明外源性表达 NANOG 能推动 NIH3T3 细胞进入 S 期,促进细胞增殖;敲除 NANOG 表达则抑制肿瘤细胞增殖^[5]。研究还发现 NANOG 在侵袭性乳腺癌及淋巴结转移灶中的表达明显高于原位癌,敲除 NANOG 可显著抑制乳腺癌细胞的迁移侵袭能力,提示 NANOG 表达可能是乳腺癌细胞侵袭及淋巴结转移的重要机制^[10]。目前认为 SP 细胞泵出 Hoechst33342 的能力主要是通过其细胞膜上 ABC 转运超家族实现的,其家族成员 ABCG2 表达与 SP 细胞密切相关^[3]。多耐药基因 MDR1 是多种肿瘤产生化疗耐药的重要机制,也是 ABC 转运超家族成员之一。通过阿霉素耐药而富集的 K562/A02 细胞中伴随 NANOG 高表达,外源性表达 NANOG 可以使食管癌细胞中 MDR1 表达增加,对顺铂的耐药性增强,提示 NANOG 功能还与 ABC 转运超家族成员 MDR1 表达有关^[11]。上述研究表明 NANOG 可能在肿瘤细胞增殖、侵袭和耐药性等多方面特性中起重要作用。故我们推测 Huh7 和 Hep3B SP 细胞所表现出较强的细胞增殖和侵袭能力以及化疗药物抗性,可能与 SP 细胞中 NANOG 高表达有关,NANOG 可能是 LCSC 的重要标志之一。

综上,本研究证实了肝癌细胞 Huh7 和 Hep3B 中存在 SP 细胞,NANOG 基因在 SP 细胞中高表达,高表达 NANOG 的 SP 细胞表现出强于 NSP 细胞的增殖能力、侵袭能力和化疗药物耐药性,提示 SP 细胞可能富集了 CSC,NANOG 可能是 LCSC 的重要标志之一。本研究为 HCC 的起源和生物学行为提供了有价值的线索,为后续开展以 CSC 为靶点治疗 HCC 复发转移相关研究提供了新方向。

参考文献:

- [1] Zhou BB, Zhang H, Damelin M, et al. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(10): 806-823.
- [2] 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.
- [3] 陈伟,姜楠,张彤,等. 肝癌细胞株 Bel-7402 中侧群细胞的分离和致瘤能力[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2012, 33(5): 561-566.
- [4] Chen W, Jiang N, Zhang T, et al. Isolation and tumorigenicity of side population cells sorted from hepatocellular carcinoma Bel-7402 cell line[J]. *J Sun Yat-sen Univ*, 2012, 33(5):561-566.
- [5] Jeter CR, Badaeux M, Choy G, et al. Functional evidence that the self-renewal gene NANOG regulates human tumor development[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(5): 993-1005.
- [6] Hallett RM, Kondratyev MK, Giacomelli AO, et al. Small molecule antagonists of the Wnt/ β -catenin signaling pathway target breast tumor-initiating cells in a Her2/Neu mouse model of breast cancer[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33976.
- [7] Zhang J, Espinoza LA, Kinders RJ, et al. NANOG modulates stemness in human colorectal cancer [J]. *Oncogene*, 2013, 32(37): 4397-4405.
- [8] Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, et al. Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2013, 57(4): 1484-1497.
- [9] Silva J, Nichols J, Theumissen TW, et al. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state[J]. *Cell*, 2009, 138(4): 722-737.
- [10] Tanaka Y, Era T, Nishikawa S, et al. Forced expression of Nanog in hematopoietic stem cells results in a gammadelta T-cell disorder[J]. *Blood*, 2007, 110(1): 107-115.
- [11] Han J, 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): 80-88.
- [12] Xin H, Kong Y, Jiang X, et al. Multi-drug-resistant cells enriched from chronic myeloid leukemia cells by Doxorubicin possess tumor-initiating-cell properties[J]. *J Pharmacol Sci*, 2013, 122(4): 299-304.

(编辑 徐杰)