

长非编码RNA Z38对BT549细胞多能因子 表达调控的初步研究

孙园园¹ 刘斌¹ 欧阳婧¹ 莫林波¹ 唐政山¹ 乔小银¹ 李放军² 杨寅柯^{1*}

(¹湖南大学生物学院, 长沙 410082; ²湖南省人民医院社会医学部, 长沙 410002)

摘要 该文旨在研究长非编码RNA Z38对BT549细胞中多能因子表达的影响。通过流式细胞术和实时荧光定量PCR(Real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)进行Z38与CD44⁺CD24^{-low}亚群细胞相关性分析, 并利用慢病毒Z38-shRNA感染BT549细胞以干扰Z38表达, 通过RT-qPCR和蛋白质印迹实验检测多能因子表达水平。结果显示, Z38表达水平与CD44⁺CD24^{-low}亚群细胞比例存在差异性, 以BT549细胞Z38表达水平和CD44⁺CD24^{-low}比例相对较高, 干扰BT549细胞Z38表达水平后, CD44⁺CD24^{-low}比例下降, NANOG和SOX2 mRNA和蛋白质水平皆被下调, 而OCT4 mRNA和蛋白质水平无明显变化。干扰Z38影响BT549多能因子的表达, 尤其可下调与乳腺癌干细胞分化密切相关的NANOG和SOX2基因表达, 提示它可能与乳腺癌干细胞的分化有关。

关键词 Z38; 乳腺癌; NANOG; SOX2; OCT4; CD44⁺CD24^{-low}

Primary Study on the Regulation of Pluripotent Factor Expression of BT549 Cells with Long Non-Coding RNA Z38

Sun Yuanyuan¹, Liu Bin¹, Ouyang Jing¹, Mo Linbo¹, Tang Zhengshan¹, Qiao Xiaoyin¹, Li Fangjun², Yang Yinke^{1*}

(¹College of Biology, Hunan University, Changsha 410082, China;

²Department of Social Medicine, Hunan Province People's Hospital, Changsha 410002, China)

Abstract Z38 is a newly discovered long non-coding RNA that promotes the formation of breast cancer, but the specific mechanism is unclear. The aim of this study was to investigate the effect of Z38 on the expression of pluripotency gene *NANOG*, *SOX2* and *OCT4* in BT549 cells. The correlation between Z38 and CD44⁺CD24^{-low} subpopulations was analyzed by flow cytometry and RT-qPCR (Real-time quantitative polymerase chain reaction). Z38-shRNA was used to interfere Z38 level in BT549 cells. The mRNA and protein levels of NANOG, SOX2 and OCT4 were detected by RT-qPCR and Western blot. The results showed that the expression levels of Z38 and CD44⁺CD24^{-low} subpopulations were different in MCF-7, MDA-MB-453 and BT549 breast cancer cells. The ratio of CD44⁺CD24^{-low} subpopulations in BT549 cells was relatively high, and the percentage of CD44⁺CD24^{-low} subgroups decreased in BT549 cells after interference of Z38. The results also showed that the genes *NANOG* and *SOX2* were down-regulated at mRNA and protein levels, while the gene *OCT4* had no significant change in mRNA and protein level. Interference of Z38 affected the expression of BT549 pluripotency factor, especially downregulating the *NANOG* and *SOX2* genes closely related to the differentiation of breast cancer stem cells, suggesting that it may be involved in regulating the differentiation of breast cancer stem cells.

收稿日期: 2017-03-09 接受日期: 2017-05-16

“985工程”专项资金(批准号: 531109020011)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0731-83998546, E-mail: ykyang99@hnu.edu.cn

Received: March 9, 2017 Accepted: May 16, 2017

This work was supported by “985 Project” Special Funds (Grant No.531109020011)

*Corresponding author. Tel: +86-731-83998546, E-mail: ykyang99@hnu.edu.cn

网络出版时间: 2017-07-25 16:12:09

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170725.1612.002.html>

Keywords Z38; breast cancer; NANOG; SOX2; OCT4; CD44⁺CD24^{-low}

乳腺癌是一种多因素作用、多基因参与、多阶段形成的复杂异质性疾病,也是全世界女性癌症死亡的首要原因^[1]。长非编码RNA(long noncoding RNA, LncRNA)是一类转录本长度超过200 nt且不编码蛋白质的RNA分子,主要由RNA聚合酶II转录生成^[2-4]。许多LncRNA在正常发育及肿瘤发生过程中具有关键的调控作用,根据在肿瘤中的功能和表达模式可以将它们分为肿瘤抑制基因或癌基因^[5]。它们可以通过与微RNA(microRNA)、mRNA、蛋白质和基因组DNA的相互作用实现生理和病理功能^[6]。LncRNA在癌症相关途径的调节作用以及在许多癌症中表达模式的改变,使其可作为癌症检测和预后标志物以及癌症治疗的靶标。研究发现,LncRNA参与乳腺癌的形成、发展和转移过程^[7-8]。例如,SOX2OT是新发现的LncRNA,可以在乳腺癌细胞系MCF-7和MCF-10A中诱导SOX2基因表达;再如,LncRNA H19通过miR-675促进肿瘤转移与乳腺癌细胞的转移潜能相关。

Z38是一个762 bp的LncRNA,以RNA的形式存在于核内。Z38在乳腺肿瘤组织中的表达水平高于正常乳腺、增生乳腺及癌旁组织。此外,Z38在多种乳腺癌细胞株中(如MDA-MB-453和BT549)也高表达。研究表明,沉默Z38会抑制细胞增殖,减缓肿瘤的生长速度并且诱导细胞凋亡,但是目前并不清楚具体的作用机制^[9]。本文主要探究Z38对干细胞转录因子NANOG和SOX2的影响,为研究Z38在乳腺癌干细胞中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

人乳腺癌细胞系MCF-7、MDA-MB-453和BT549购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。慢病毒购自吉玛生物有限公司。逆转录试剂购自TaKaRa公司。抗体(FITC标记的鼠抗人CD44及多甲藻叶绿素蛋白PerCP-Cy5.5标记的鼠抗人CD24单克隆抗体)购自BD公司。SOX2、OCT4、NANOG、p53以及p21抗体购自Cell Signaling Technology公司。β-actin购自Promega公司。

1.2 细胞培养

贴壁培养:人乳腺癌细胞系BT549用含有10%胎

牛血清的RPMI1640培养基,人乳腺癌细胞系MCF-7和MDA-MB-453用含有10%胎牛血清的DMEM培养基,37℃、5% CO₂培养箱中培养。无血清悬浮培养:将BT549细胞接种到无血清培养基DMEM/F12,并添加10 ng/mL bFGF、20 ng/mL EGF和2% B27,用Ultra Low Attachment Culture Dish进行培养。接种后每隔2~3 d进行半量换液。

1.3 慢病毒转染

将乳腺癌细胞BT549以1×10⁵/孔接种于6孔板,于37℃、5% CO₂培养箱中培养过夜,弃去原来的培养基,用慢病毒pGMLV-Z38-shRNA(干扰组)和pGMLV-scramble(对照组)感染BT549细胞后,通过3 μg/mL的嘌呤霉素筛选建立Z38低表达的细胞系,以pGMLV-scramble(对照组)为对照材料。病毒液用含5 μg/mL Polybrene的新鲜培养基按照感染复数=80进行稀释。

1.4 RNA提取、逆转录及RT-qPCR

分别提取对照组和干扰组细胞中总的RNA,以总RNA为模板进行逆转录。利用Primer Premier设计SOX2、OCT4、Z38、NANOG、GAPDH、p53和p21等基因的引物,具体序列见表1。用SYBR Green RT-qPCR法检测上述基因mRNA水平。

1.5 蛋白质印迹实验(Western blot)

提取对照组和干扰组细胞中的总蛋白,取35 μg变性蛋白进行SDS-PAGE,转膜,抗体孵育,用ECL化学发光试剂显色。

表1 引物序列信息

Table 1 Information of primer sequence

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
<i>GAPDH</i>	FP: AAC GGA TTT GGT CGT ATT GGG RP: CCT GGA AGA TGG TGA TGG GAT
<i>NANOG</i>	FP: TAC CTC AGC CTC CAG CAG AT RP: CAT CCC TGC GTC ACA CCA TT
<i>SOX2</i>	FP: ACA TGA ACG GCT GGA GCA A RP: GTA GGA CAT GCT GTA GGT GGG
<i>OCT4</i>	FP: TGG GGG TTC TAT TTG GTG GG RP: TCC CCA CTA GGT TCA GGG AT
Z38	FP: AGT GGG ATT GTG GAG ACG GTG T RP: AGG TAA AAG GAA CTG GCA ACG
<i>p53</i>	FP: TTC TCT CCC CAA CAA TGA GG RP: TCT GTG AAG CAG CAC CAT TC
<i>p21</i>	FP: AAA CTT TGG AGC TCC CCT CAC RP: AAA GCT CAA CAC TGA GAC G

表2 流式细胞术检测实验中细胞的处理方式
Table 2 The treatment of cells used in flow cytometry

编号 Number	抗体 Antibody
1	FITC Isotype Control (20 μ L)+PerCP-Cy TM 5.5 Isotype Control (5 μ L)
2	FITC-CD44 (20 μ L)
3	PerCP-Cy TM 5.5-CD24 (5 μ L)
4	FITC-CD44 (20 μ L)+PerCP-Cy TM 5.5-CD24 (5 μ L)

1.6 流式细胞术检测

将贴壁培养的细胞,用0.25%胰蛋白酶消化后加入含血清培养基,轻轻吹打混匀。300目细胞筛过筛,调整细胞浓度为 1×10^6 /mL,将每种细胞平均分为4管,每管200 μ L。按照表2加入抗体,于冰上孵育25 min,离心后PBS清洗2次,加入200 μ L PBS重悬,流式细胞仪检测分析。

1.7 统计分析

采用SPSS 13.0统计软件,两个独立样本组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性, $P < 0.01$ 为差异具有极显著性。

2 结果

2.1 慢病毒成功感染人乳腺癌细胞系BT549

用慢病毒pGMLV-scramble和pGMLV-Z38-shRNA感染BT549细胞,以pGMLV-scramble感染的细胞为对照材料。病毒感染72 h后,于荧光显微镜下观察细胞形态及荧光表达情况,上部分为白光下的细胞图像,下部分为对应荧光条件下的细胞图像,细胞感染效率高达90%以上(图1A)。RT-qPCR实验显示,干扰组Z38的mRNA水平明显低于对照组(图1B)。设置三条干扰序列,RT-qPCR实验显示,干扰组Z38的mRNA水平明显低于对照组(图1B),选择最佳干扰序列shZ38-1进行后续实验。

2.2 Z38对CD44⁺CD24^{-low}亚群细胞相关性分析

我们利用流式细胞术检测Luminal A型乳腺癌细胞MCF-7、三阴乳腺癌细胞MDA-MB-453和三阴乳腺癌细胞BT549三种乳腺癌细胞系中CD44⁺CD24^{-low}亚群细胞的比例,结果发现,从高到低依次为:BT549、MDA-MB-453、MCF-7(图2A和图2B)。同时,利用RT-qPCR检测三种乳腺癌细胞系中Z38的mRNA水平,发现BT549中Z38的表达水平显著高于MDA-MB-453和MCF-7,MDA-MB-453也明显高于MCF-7(图2C)。同时,检测了Z38干扰的

BT549细胞,发现CD44⁺CD24^{-low}亚群细胞比例明显降低(图2B和图2D)。这表明,在上述三种乳腺癌细胞系中,Z38的表达量可能与CD44⁺CD24^{-low}亚群细胞的比例成正相关。

2.3 不同培养条件下BT549中CD44⁺CD24^{-low}亚群细胞的比例和Z38水平变化

此外,我们将BT549在三种不同的培养条件下进行培养,发现BT549细胞在无血清悬浮培养时可以形成微球(图3A)。流式细胞术结果显示,无血清悬浮培养时细胞中CD44⁺CD24^{-low}亚群细胞的比例明显高于普通的贴壁培养,而且经无血清悬浮培养的BT549细胞再进行贴壁培养后,CD44⁺CD24^{-low}亚群细胞比例有所下降(图3B和图3C)。此外,比较上述三种不同培养条件下培养细胞中Z38 mRNA水平,发现无血清富集之后Z38 mRNA水平升高,再进行贴壁培养之后Z38 mRNA水平降低(图3D)。这一结果进一步说明,Z38的表达水平可能与CD44⁺CD24^{-low}亚群细胞的比例有相关性。

2.4 在BT549细胞中干扰Z38后多能因子NANOG、SOX2和OCT4的表达变化

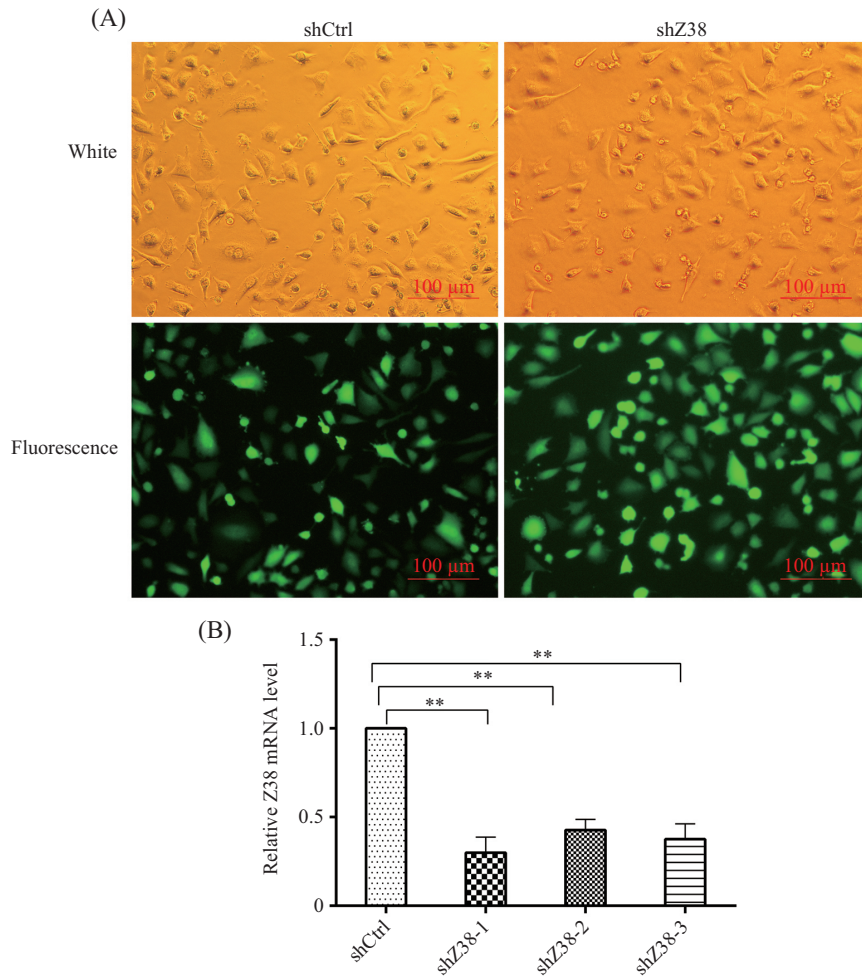
本研究还检测了BT549细胞中Z38被干扰后,细胞内OCT4、SOX2和NANOG三种多能因子的表达情况。结果显示,干扰Z38后,OCT4在mRNA水平和蛋白质水平上皆无显著变化,而SOX2和NANOG在mRNA水平和蛋白质水平被下调,其中NANOG的下调更为显著(图4)。

2.5 干扰Z38的BT549细胞中p53、p21的表达变化

在BT549细胞中干扰Z38,通过RT-qPCR和Western blot检测p53和p21表达变化,结果显示,干扰以后p53和p21的mRNA水平和蛋白质水平升高(图5)。

3 讨论

乳腺癌干细胞具有高表达CD44、低表达或不表达CD24的特征^[10-12],本研究通过比较三种



A: 荧光显微镜下慢病毒感染BT549细胞后的GFP表达; shCtrl: 对照组; shZ38: 干扰组。B: RT-qPCR检测shZ38的干扰效果, $**P < 0.01$ 。

A: GFP expression after lentiviral infection of BT549 cells under fluorescence microscope; shCtrl: control group; shZ38: interference group. B: RT-qPCR detection of shZ38 interference effect, $**P < 0.01$.

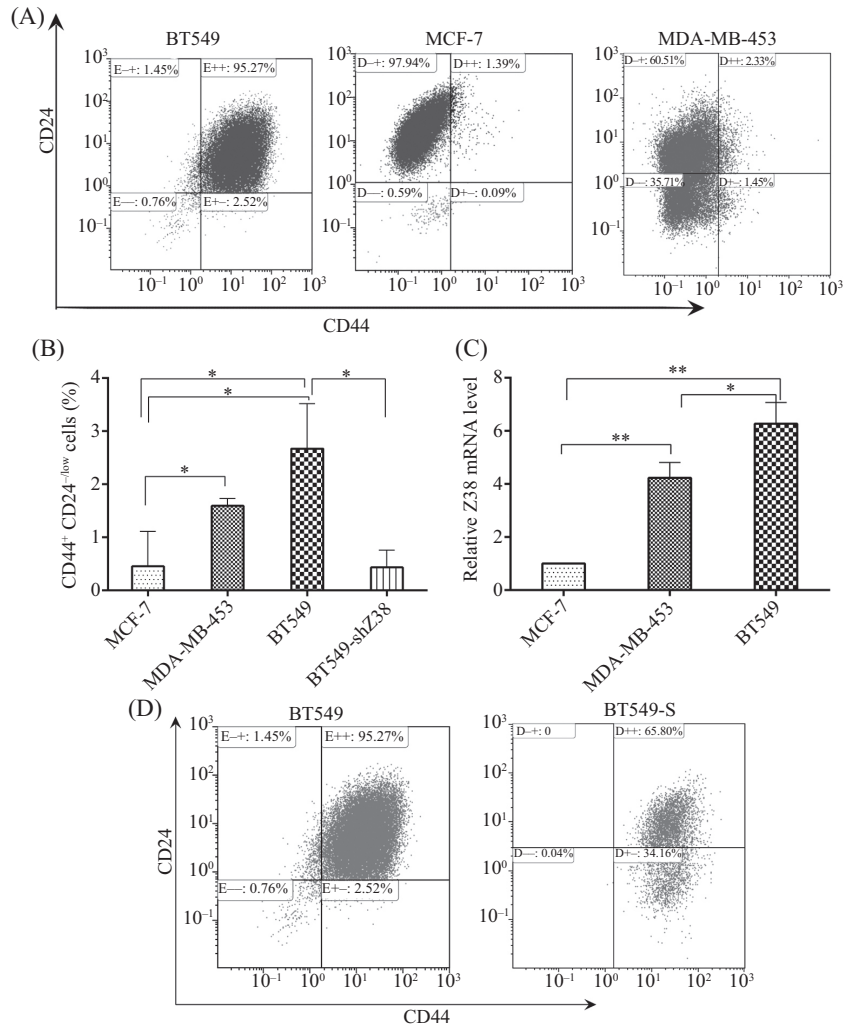
图1 人乳腺癌细胞系BT549中Z38的沉默

Fig.1 Knockdown of Z38 expression in human breast cancer cell line BT549

不同的乳腺癌细胞系,发现高表达Z38的细胞中, $CD44^+CD24^{-low}$ 亚群细胞的比例也高。进而发现,干扰Z38表达后, BT549细胞 $CD44^+CD24^{-low}$ 亚群细胞的比例即降低。这提示,上述三种乳腺癌细胞系中Z38表达量可能与 $CD44^+CD24^{-low}$ 亚群细胞的比例成正相关。BT549细胞系中含有少量的 $CD44^+CD24^{-low}$ 亚群细胞。 $CD44^+CD24^{-low}$ 细胞可以在无血清悬浮培养中生长并且形成微球,这一点在我们的实验中得到了证实,而非 $CD44^+CD24^{-low}$ 细胞在无血清悬浮培养的条件下存活率较低,所以通过无血清悬浮培养的方式可以实现 $CD44^+CD24^{-low}$ 亚群细胞的富集。我们将BT549细胞在贴壁、无血清悬浮以及无血清悬浮后再贴壁这三种不同的培养条件下培养,发现无血清悬浮培养后 $CD44^+CD24^{-low}$ 亚群细胞的比例和Z38的表达水平均升高,而经无血清悬浮培养之后再

进行贴壁培养, $CD44^+CD24^{-low}$ 亚群细胞的比例和Z38的表达水平又降低。此结果提示, $CD44^+CD24^{-low}$ 亚群细胞比例的变化可能跟Z38有关。这进一步说明, Z38表达水平可能与 $CD44^+CD24^{-low}$ 细胞比例成正相关。

研究发现,大量的LncRNA参与细胞多能性分化的调控过程,如Guttman等^[13]针对胚胎干细胞转录组中的226个序列设计shRNA,发现其中26个LncRNA敲降后会影响NANOG的表达,从而导致胚胎(embryo stem, ES)细胞的多能性丧失。Rinn等^[14]也曾发现一条重要的LncRNA——lincRNA-RoR,它可以与能够调控OCT4、SOX2和NANOG的miR145-5p、181a-5p以及99b-3p结合。OCT4、SOX2和NANOG位于细胞全能性调控网络的顶端,是维持胚胎干细胞自我更新和多向分化潜能的核心因子^[15],主要是



A、B: 流式细胞术检测乳腺癌细胞系中CD44⁺CD24^{-low}的比例; C: RT-qPCR检测乳腺癌细胞系中Z38的mRNA水平; D: 流式细胞术检测BT549细胞干扰Z38前后的CD44⁺CD24^{-low}比例。*P<0.05, **P<0.01。

A,B: the proportion of breast cancer cell lines detected by flow cytometry in the CD44⁺CD24^{-low}; C: detecting breast cancer cell lines Z38 mRNA levels detected by RT-qPCR; D: CD44⁺CD24^{-low} ratio after interference of Z38 detected by flow cytometry. *P<0.05, **P<0.01.

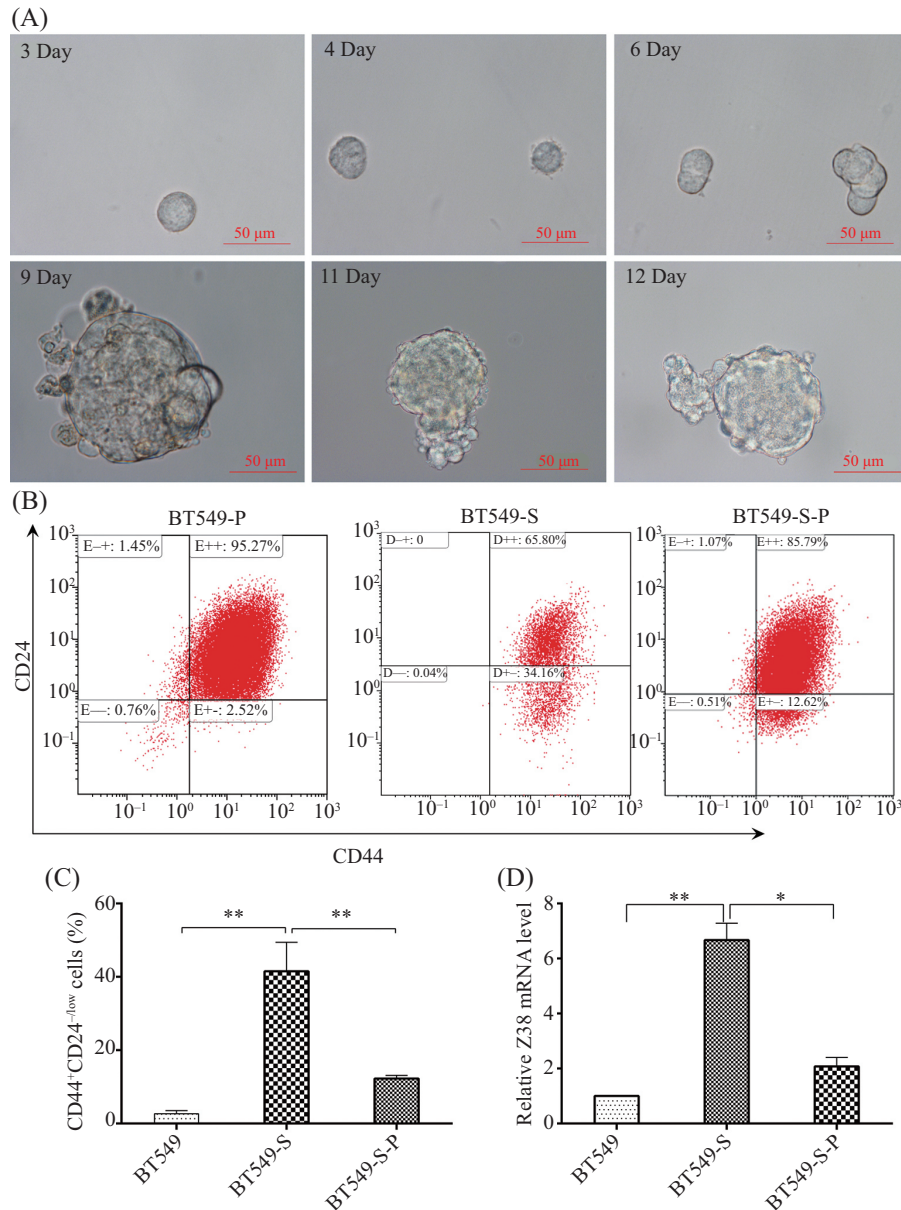
图2 Z38与乳腺癌干细胞的相关性分析

Fig.2 Correlation between Z38 and breast cancer stem cells

通过组成前馈系统、自身调节网络和与其他信号转导通路协同作用对大量靶基因及其自身编码基因进行转录调控。其中, NANOG用于维持胚胎干细胞的多能性, 在肿瘤细胞中发挥重要的作用, 过表达NANOG并不诱导分化而是维持多能性, 敲除NANOG促进胚胎干细胞在体外的分化^[16-18]。SOX2也是维持干细胞自我更新和多潜能性的必要条件。NANOG的表达受SOX2和OCT4的调控, 通过基因突变和体外结合分析证实, SOX2-OCT4复合物与NANOG的启动子相互作用。SOX2和OCT4也可以相互作用, 这种自身调节网络, 既可以缩短OCT4、SOX2和NANOG对环境刺激的反应时间, 又能增加其基因表达的稳定性。Loh等^[19]在实验中通过遗传学证据和结合实

验证明, NANOG调控OCT4和SOX2的表达。他们认为, NANOG维持自我更新和未分化状态是通过调节OCT4和SOX2表达水平实现的。当NANOG的表达水平变化时, 很有可能引起SOX2和OCT4的表达变化。而本研究发现, 干扰Z38之后, NANOG的表达水平降低, SOX2的表达水平也降低, 说明Z38影响NANOG和SOX2的表达, 但具体的作用机制还不是很清楚。

有研究发现, NANOG在乳腺癌中表达, 且肿瘤级别越高, NANOG表达越强, 临床预后越差^[20]。此外, NANOG和恶性肿瘤细胞增殖、分化以及侵袭转移有关, 而且在维持肿瘤干细胞特征方面也有着显著的抗凋亡作用, 通过调控NANOG的表达可以减弱其



A: BT549细胞的无血清悬浮培养; B、C: 流式细胞术检测在不同培养条件下BT549细胞中CD44⁺CD24^{-low}亚群细胞比例; D: RT-qPCR检测BT549细胞在不同培养条件下Z38的mRNA水平(BT549-P或者BT549表示经普通贴壁培养的BT549细胞; BT549-S表示经无血清悬浮培养的BT549细胞, BT549-S-P表示经无血清悬浮培养再贴壁培养的BT549细胞)。**P*<0.05, ***P*<0.01。

A: BT549 cells cultured in serum-free suspension; B,C: the percentage of CD44⁺CD24^{-low} subpopulations in BT549 cells under different culture conditions detected by flow cytometry; D: Z38 mRNA levels in BT549 cells under different culture conditions detected by RT-qPCR (BT549-P or BT549 represents BT549 cells cultured in plain adherent, BT549-S represents BT549 cells cultured in serum-free suspension, BT549-S-P represents BT549-S cells cultured in plain adherent). **P*<0.05, ***P*<0.01.

图3 不同培养条件下 BT549细胞中CD44⁺CD24^{-low}比例和Z38 mRNA水平

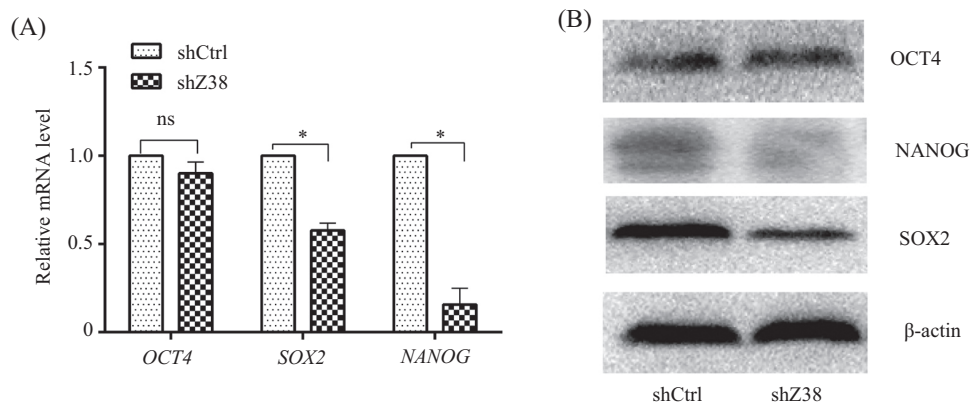
Fig.3 The proportion of CD44⁺CD24^{-low} and Z38 mRNA levels in BT549 cells under different culture conditions

侵袭力^[21]。而SOX2也是维持干细胞自我更新和多潜能性的必要条件,与乳腺癌的发生发展有关^[22]。本研究发现, Z38和CD44⁺CD24^{-low}亚群细胞有一定的相关性,尤其是干扰Z38可以影响多能因子NANOG和SOX2的表达,暗示Z38可能与抑制乳腺癌肿瘤干细胞的分化以及干性维持相关。该研究为在乳腺癌

干细胞中进一步开展Z38功能研究提供了理论依据,并且为乳腺癌的治疗提供了新的思路。

参考文献 (References)

- 1 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. CA Cancer J Clin 2015; 65(1): 5-29.
- 2 Hansji H, Leung EY, Baguley BC, Finlay GJ, Askarian-

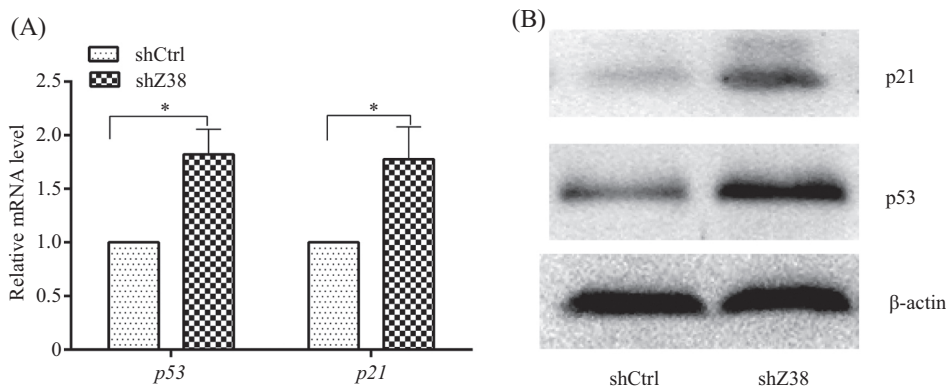


A: 定量检测*OCT4*、*SOX2*和*NANOG*的mRNA水平, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns表示无显著性差异; B: Western blot检测*OCT4*、*SOX2*和*NANOG*蛋白质水平。

A: the mRNA levels of *OCT4*, *SOX2* and *NANOG* detected by RT-qPCR, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; ns: no significant difference; B: the protein levels of *OCT4*, *SOX2* and *NANOG* detected by Western blot.

图4 慢病毒感染后BT549细胞中*OCT4*、*SOX2*和*NANOG*的表达情况

Fig.4 The expression of *OCT4*, *SOX2* and *NANOG* in BT549 cells after transfected with lentivirus



A: 定量检测*p53*和*p21* mRNA水平, * $P < 0.05$; B: Western blot检测*p53*和*p21*在蛋白水平上的变化。

A: the mRNA levels of *p53* and *p21* changes detected by RT-qPCR, * $P < 0.05$; B: the protein levels of *p53* and *p21* detected by Western blot.

图5 慢病毒转染后BT549细胞中*p53*和*p21*的表达变化

Fig.5 The changes of *p53* and *p21* expression in BT549 cells after transfected with lentivirus

Amiri ME. Keeping abreast with long non-coding RNAs in mammary gland development and breast cancer. *Front Genet* 2014; 5: 379.

3 Ørom UA, Shiekhattar R. Long non-coding RNAs and enhancers. *Curr Opin Genet Dev* 2011; 21(2): 194-8.

4 van Heesch S, van Iterson M, Jacobi J, Boymans S, Essers PB, de Bruijn E, *et al.* Extensive localization of long noncoding RNAs to the cytosol and mono-and polyribosomal complexes. *Genome Biol* 2014; 15(1): R6.

5 Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: New players in cell differentiation and development. *Nat Rev Genet* 2014; 15(1): 7-21.

6 Vikram R, Ramachandran R, Abdul KS. Functional significance of long non-coding RNAs in breast cancer. *Breast Cancer* 2014; 21(5): 515-21.

7 Gibb EA, Vucic EA, Enfield KS, Stewart GL, Lonergan KM, Kennett JY, *et al.* Human cancer long non-coding RNA transcriptomes. *PLoS One* 2011; 6(10): e25915.

8 Su X, Gabriel G, Chen Y, Zhang J, Yao H, Valero V, *et al.* Comprehensive analysis of long non-coding RNAs in human breast cancer clinical subtypes. *Oncotarget* 2014; 5(20): 9864-76.

9 Deng R, Liu B, Wang Y, Feng Y, Hu S, Wang H, *et al.* High expression of the newly found long noncoding RNA Z38 promotes cell proliferation and oncogenic activity in breast cancer. *J Cancer* 2016; 7(5): 576.

10 Ewertz M, Jensen AB. Late effects of breast cancer treatment and potentials for rehabilitation. *Acta Oncol* 2011; 50(2): 187-93.

11 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(7): 3983-8.

12 Velasco-Velázquez MA, Homsí N, de La Fuente M, Pestell RG. Breast cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44(4): 573-7.

13 Guttman M, Donaghey J, Carey BW, Garber M, Grenier JK, Munson G, *et al.* lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature* 2011; 477(7364): 295-300.

14 Loewer S, Cabili MN, Guttman M, Loh YH, Thomas K, Park

- IH, *et al.* Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells. *Nat Genet* 2010; 42(12): 1113-7.
- 15 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.
- 16 Pan G, Thomson JA. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res* 2007; 17(1): 42-9.
- 17 Jeter CR, Yang T, Wang J, Chao HP, Tang DG. Concise review: NANOG in cancer stem cells and tumor development: An update and outstanding questions. *Stem Cells* 2015; 33(8): 2381-90.
- 18 Sato A, Okada M, Shibuya K, Watanabe E, Seino S, Suzuki K, *et al.* Resveratrol promotes proteasome-dependent degradation of Nanog via p53 activation and induces differentiation of glioma stem cells. *Stem Cell Res* 2013; 11(1): 601-10.
- 19 Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang WW, Chen X, *et al.* The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 2006; 38(4): 431-40.
- 20 Lu X, Mazur SJ, Lin T, Appella E, Xu Y. The pluripotency factor nanog promotes breast cancer tumorigenesis and metastasis. *Oncogene* 2014; 33(20): 2655-64.
- 21 骆梅青, 康马飞, 卜庆. Nanog基因的研究进展. *现代医药卫生* (Luo Meiqing, Kang Mafei, Bu Qing. *J Mod Med Health*) 2016; 32(24): 3791-3.
- 22 纪晓宁, 王小杰. 基因Sox2与肿瘤的研究进展. *肿瘤防治研究* (Ji Xiaoning, Wang Xiaojie. *Progress in relationship between Sox2 gene and cancer. Cancer Res Prev Treat*) 2014; 41(12): 1352-6.