

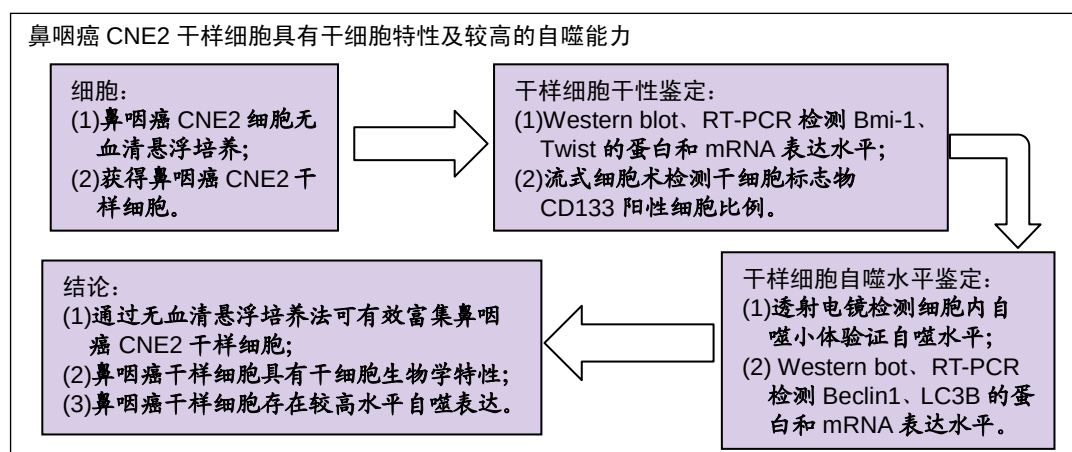
鼻咽癌CNE2干样细胞具有干细胞特性及较高水平的自噬表达

代森林¹, 李晓倩², 吴杰², 岳昌武², 李亚军² (¹遵义医学院, 贵州省遵义市 563000; ²遵义医学院第三附属医院, 贵州省遵义市 563000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1718

ORCID: 0000-0003-2284-221X(代森林)

文章快速阅读:



代森林, 男, 1990 年生, 河南省平舆县人, 汉族, 遵义医学院转化医学在读硕士, 主要从事重大疾病分子诊断与新药研制方面的研究。

通讯作者: 李亚军, 博士, 硕士生导师, 遵义医学院第三附属医院, 贵州省遵义市 563000

并列通讯作者: 岳昌武, 博士, 硕士生导师, 遵义医学院第三附属医院, 贵州省遵义市 563000

文献标识码:A

稿件接受: 2019-01-28



文题释义:

鼻咽癌干样细胞: 鼻咽癌组织中存在具有干细胞生物学特性的一小部分细胞, 它们参与肿瘤形成过程的始终, 与鼻咽癌的发生、发展、复发、转移及放化疗抵抗密切相关, 和患者的预后息息相关。

细胞自噬: 又称细胞自我消化, 是真核生物中进化保守的对细胞内物质进行周转的重要过程。该过程中一些损坏的蛋白或细胞器被双层膜结构的自噬小泡包裹后, 送入溶酶体(动物)或液泡(酵母和植物)中进行降解并得以循环利用。

摘要

背景: 鼻咽癌是具有高侵袭转移潜能的头颈部恶性肿瘤, 对鼻咽癌晚期患者尚未取得满意治疗效果。目前, 已有一些自噬抑制剂与抗肿瘤药物同时应用于临床研究, 但可能机制尚未明确。

目的: 探索鼻咽癌干样细胞是否存在较高水平自噬表达。

方法: 通过无血清悬浮培养法从人源化鼻咽癌 CNE2 细胞株中富集得到肿瘤干样细胞球。通过细胞分化实验、流式细胞术、透射电镜、Western blot 及 RT-PCR 检测鼻咽癌 CNE2 亲本细胞和 CNE2 干样细胞的干细胞特性及细胞自噬水平。

结果与结论: ①通过无血清悬浮培养法能富集得到鼻咽癌 CNE2 干样细胞, 在含血清培养基中培养能贴壁分化成鼻咽癌 CNE2 亲本细胞; ②鼻咽癌 CNE2 干样细胞 CD133 阳性标记的细胞比例(9.6%)高于鼻咽癌 CNE2 亲本细胞(0.3%), 差异有显著性意义($P < 0.01$); ③与鼻咽癌 CNE2 亲本细胞相比, 鼻咽癌 CNE2 干样细胞高表达干性相关基因(Bmi-1、Twist1)和自噬相关基因(Beclin1、LC3B), 差异有显著性意义($P < 0.01$); ④透射电镜观察鼻咽癌 CNE2 干样细胞自噬小体较鼻咽癌 CNE2 亲本细胞形成明显增多; ⑤结果表明, 通过无血清悬浮培养法可有效富集鼻咽癌 CNE2 干样细胞, 鼻咽癌干样细胞具有干细胞生物学特性, 并存在较高水平自噬表达。

关键词:

鼻咽癌; 肿瘤干细胞; 无血清悬浮培养法; 鼻咽癌干样细胞; 细胞自噬; 国家自然科学基金

中图分类号: R459.9; R394.2

基金资助:

国家自然科学基金项目(81560444), 项目负责人: 李亚军; 贵州省科技厅基金项目(黔科合 SY[2015]3046 号), 项目负责人: 李亚军; 联合科技(遵市科合社字[2017]47 号), 项目负责人: 李亚军

CNE2 stem-like cells of nasopharyngeal carcinoma have stem cell characteristics and high level of autophagy

Dai Senlin¹, Li Xiaoqian², Wu Jie², Yue Changwu², Li Yajun² (¹Zunyi Medical College, Zunyi 563000, Guizhou Province, China; ²the Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563000, Guizhou Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Nasopharyngeal carcinoma is a head and neck malignant tumor with high invasion and metastatic potential. It has not yet achieved satisfactory effects in the treatment of advanced nasopharyngeal

Dai Senlin, Master candidate, Zunyi Medical College, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Corresponding author: Li Yajun, MD, Master's supervisor, the Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Corresponding author: Yue Changwu, MD, Master's supervisor, the Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

carcinoma. Some autophagy inhibitors and anti-tumor drugs have been used in clinical research, but the possible mechanism has not been clarified.

OBJECTIVE: To explore whether high-level autophagy occurs in stem-like cells of nasopharyngeal carcinoma.

METHODS: Tumor stem-like cell spheres were enriched from humanized nasopharyngeal carcinoma CNE2 cell line by serum-free suspension culture. The stem cell characteristics and expression levels of autophagy-related genes and proteins in CNE2 parental cells and CNE2 stem-like cells were detected using cell differentiation assay, flow cytometry, transmission electron microscope, western blot and RT-PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: The nasopharyngeal carcinoma CNE2 stem-like cells were enriched by serum-free suspension culture. The suspension spheres were cultured in serum-containing medium to differentiate into CNE2 parental cells. Proportion of CD133⁺ cells in CNE2 stem-like cells (9.6%) was significantly higher than that in CNE2 parental cells (0.3%; $P < 0.01$). Compared with CNE2 parental cells, CNE2 stem-like cells highly expressed stemness-related genes Bmi-1, Twist1 and autophagy-related genes Beclin1 and LC3B ($P < 0.01$). Under the transmission electron microscope, the autophagic bodies of CNE2 stem-like cells in nasopharyngeal carcinoma were significantly increased compared with CNE2 parental cells. Therefore, nasopharyngeal carcinoma CNE2 stem-like cells can be effectively enriched using the serum-free suspension culture method, and be verified to have the biological characteristics of stem cells and exhibit high-level autophagy.

Key words: nasopharyngeal carcinoma; tumor stem cells; serum-free suspension culture; nasopharyngeal carcinoma stem-like cells; autophagy; National Natural Science Foundation of China

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81560444 (to LYJ); the Foundation of Guizhou Provincial Science and Technology Department, No. SY[2015]3046 (to LYJ); the United Technology Project, No. [2017]47 (to LYJ)

0 引言 Introduction

鼻咽癌是一种源发于鼻咽部的头颈部恶性肿瘤, 发病隐匿, 具有高侵袭转移潜能。鼻咽癌对放疗的高敏感性使得放疗成为治疗鼻咽癌的主要方式, 但由于鼻咽癌早期临床症状隐匿, 就诊时大多已属中晚期, 治疗后容易出现复发或远处转移。尽管放疗技术不断发展, 鼻咽癌治疗疗效较10年前有一定的提高, 但尚未取得满意效果^[1]。随着近年来各个领域对干细胞的深入研究, 鼻咽癌组织中可能含有少量的具有自我更新能力的多潜能细胞, 这些细胞被称为肿瘤干细胞或肿瘤起始细胞^[2]。肿瘤干细胞是肿瘤发生、发展、转移和复发的主要执行者^[3], 不仅具有增殖、分化和自我更新等多种生物学特性, 还具有对高敏感性放化疗的抵抗效应^[4-6], 因此肿瘤干细胞靶向治疗理论上来说可以阻止肿瘤的复发并延长患者的生存期。

研究发现, 细胞自噬是广泛存在于真核细胞中的一系列相关基因严格调控的生物学过程, 自噬调控的异常与肿瘤的发生、发展密切相关^[7-8]。肿瘤发生发展不同阶段、细胞分化形态、组织类型、周围环境以及基因特征共同影响自噬的活性^[9-11]。因此, 探索肿瘤干细胞发生发展特性与细胞自噬的关系, 对于进一步探寻靶向肿瘤干细胞的治疗策略具有重要意义。该实验在以往研究基础上进一步探索并初步发现采用无血清悬浮培养法可有效富集具有干细胞生物特性的鼻咽癌CNE2干细胞, 并且其存在较高水平自噬表达现象, 将为后续深入研究细胞自噬在鼻咽癌疾病发生发展中的作用及机制提供一定的前期实验基础及理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学对比观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2017年11月至2018年7月在遵义医学院第三附属医院中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 细胞 人鼻咽癌细胞CNE2(低分化鳞癌)细胞系为遵义医学院第三附属医院中心实验室保存。

1.3.2 实验试剂 DMEM、DMEM/F12培养基、B27、Accutase(Gibco公司); 青链霉素、胰酶、二甲基亚砷(索

莱宝公司); 人表皮生长因子和人碱性成纤维细胞生长因子(Peprotech公司); 胎牛血清(碧云天公司); BV421-Anti-CD133(BD Biosciences公司); 兔抗多克隆抗体Bmi-1、Twist、Beclin1和LC3B(美国CST公司); 反转录试剂盒及RT-PCR试剂盒(日本Takara公司)。

DMEM培养基中加入体积分数为10%胎牛血清和双抗, 配制成完全培养液。DMEM/F12培养液中加入双抗、20 $\mu\text{g/L}$ 人表皮生长因子、20 $\mu\text{g/L}$ 人碱性成纤维细胞生长因子、2%B27, 配制成无血清培养液。

1.3.3 实验仪器 CO₂培养箱(Thermo公司); 层流超净工作台(苏州净化设备厂); 倒置光学显微镜(日本Olympus公司); 实时荧光定量PCR仪(BIO-RAD公司); 紫外分光光度计(Amersham公司); 凝胶成像系统(BIO-RAD公司); 流式细胞仪(Beckman公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 贴壁细胞培养 将人源化鼻咽癌细胞CNE2细胞放置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5%的CO₂培养箱中, 用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养基培养, 每1 d或2 d换1次新鲜培养基, 细胞密度约95%时, 用0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.4.2 鼻咽癌干细胞培养 取少量第3代对数生长期细胞接种于无血清培养基中, 并将培养瓶竖直放入37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5%的CO₂培养箱中培养且每日摇晃数次以保持细胞呈悬浮状态, 观察微球体形成情况, 每2 d或3 d半量换液, 每6-8 d传代。传代时离心收集微球体, 自然沉降15 min后弃去半量陈旧上清液, 加入等量新鲜无血清培养液, 机械吹打成单细胞悬液后传代培养; 而对于成球细胞球体较大者给予细胞分离剂Accutase替代胰酶消化为单细胞悬液(消化时间控制于3-5 min), 继续在37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5%CO₂的条件下传代培养。实验所用细胞均是鼻咽癌干细胞第3代细胞。

1.4.3 鼻咽癌CNE2干细胞分化能力 将鼻咽癌CNE2干细胞重悬接种于6孔板中(含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5%CO₂条件下培养, 培养7 d后, 采用相差显微镜观察细胞形态变化。

鼻咽癌干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	鼻咽癌 CNE2 细胞进行无血清悬浮培养诱导
细胞培养基:	DMEM/F12 培养基(Gibco 公司)
添加材料:	人表皮生长因子、人碱性成纤维细胞生长因子、B27
培养时间:	在含细胞生长因子的无血清培养基中培养, 两三天半量换液
细胞传代:	6-8 d 传代, 实验所用细胞均是鼻咽癌干细胞第 3 代细胞
细胞鉴定:	①CNE2 细胞在无血清培养基中呈悬浮生长, 形成立体的细胞球; ②鼻咽癌 CNE2 干细胞中 CD133 ⁺ 细胞比例显著高于鼻咽癌 CNE2 亲本细胞; ③鼻咽癌 CNE2 干细胞中干性相关蛋白和基因的表达明显高于鼻咽癌 CNE2 亲本细胞

1.4.4 流式细胞术检测鼻咽癌CNE2干细胞和鼻咽癌CNE2亲本细胞中CD133阳性细胞比例 收集对数期生长的鼻咽癌CNE2亲本细胞及鼻咽癌CNE2干细胞, 分别用0.25%胰酶及Accutase消化离心后PBS重悬, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 进行BV421 Anti-CD133标记, 流式细胞仪检测两种细胞中CD133阳性细胞比例。

1.4.5 透射电镜观察鼻咽癌CNE2干细胞和鼻咽癌CNE2亲本细胞的超微结构 收集对数生长期鼻咽癌CNE2亲本细胞及鼻咽癌CNE2干细胞, 分别用0.25%胰酶消化及Accutase消化离心后PBS重悬清洗, 各自离心成细胞团块, 去上清, 2.5%戊二醛前固定、漂洗、1%锇酸后固定, 梯度脱水、浸透、包埋、聚合、半薄切片定位、超薄切片; 铀、铅双重电子染色; 透射电镜下观察两组细胞的超微结构。

1.4.6 Western blot检测鼻咽癌CNE2干细胞和鼻咽癌CNE2亲本细胞中干性蛋白及自噬蛋白的表达 收集对数生长期鼻咽癌CNE2亲本细胞及鼻咽癌CNE2干细胞, 按照RIPA裂解液说明书提取细胞蛋白, BCA蛋白定量, 进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, 上层5%浓度浓缩胶, 电压80 V, 下层12%浓度分离胶, 电压120 V, 溴酚蓝跑至凝胶底端即可终止电泳, 半干转至PVDF膜, 在含有5%脱脂奶粉的TBST溶液中室温封闭2 h后, 将膜孵育一抗(1:1 000), 4 ℃过夜, TBST洗涤3次, 10 min/次, 二抗室温孵育2 h(1:10 000), TBST洗涤3次, 10 min/次; 最后化学发光试剂盒显影, 凝胶成像仪曝光成像, 以 β -actin对目的蛋白进行标准化。

1.4.7 RT-PCR检测鼻咽癌CNE2干细胞和鼻咽癌CNE2亲本细胞中干性基因及自噬基因的表达 收集对数生长期鼻咽癌CNE2亲本细胞及鼻咽癌CNE2干细胞, 消化离心后得到细胞沉淀, 用Trizol裂解细胞, 提取总RNA, 紫外分光光度计定量。按反转录试剂盒说明书提供的方法进行反转录反应, 得到的cDNA -20 ℃保存。根据PCR试剂盒说明书中qPCR反应体系及qPCR反应参数进行RT-PCR。反应条件: 95 ℃预变性30 s, 1个循环; PCR反应: 95 ℃变性5 s, 56 ℃退火30 s, 72 ℃延伸30 s, 39个循环; 从60 ℃开始, 每0.5 ℃采集1次荧光, 每次5 s, 共采集71次确定溶解曲线。RT-PCR引物序列由上海博迈德公司设计合成。实验所需引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'-3')
Bmi-1	Forward: ATG GAC TGA CAA ATG CTG GAG AAC Reverse: CTA GGC AAA CAA GAA GAG GTG GA
Twist	Forward: CGG GAG TCC GCA GTC TTA C Reverse: CAG ACC GAG AAG GCG TAG C
Beclin1	Forward: CCC GTG GAA TGG AAT GAG ATT A Reverse: GGT TTC CGT AAG GAA CAA GTC G
LC3B	Forward: AAC GAT ACA AGG GTG AGA AGC Reverse: ACT GAC AAT TTC ATC CCG AAC
β -actin	Forward: GTT GCG TTA CAC CCT TTC TT Reverse: ACC TTC ACC GTT CCA GTT TT

1.5 主要观察指标 鼻咽癌CNE2亲本细胞无血清培养诱导CNE2干细胞, 通过细胞分化实验、流式细胞术、透射电镜、Western blot及RT-PCR检测鼻咽癌CNE2亲本细胞和CNE2干细胞的干细胞特性及细胞自噬水平。

1.6 统计学分析 采用SPSS 18.0统计软件进行数据分析, 两组样本比较采用独立样本 t 检验, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 鼻咽癌细胞系干细胞的形成情况 与普通细胞贴壁生长方式不同, CNE2细胞在无血清培养基中呈悬浮生长, 形成立体的细胞球。在培养第3, 4天, 少数球体开始成形, 第6-8天可见较大的圆形或卵圆形细胞微球体, 最终在第15天左右形成由大量细胞紧密结合而成的实体结构, 见图1。

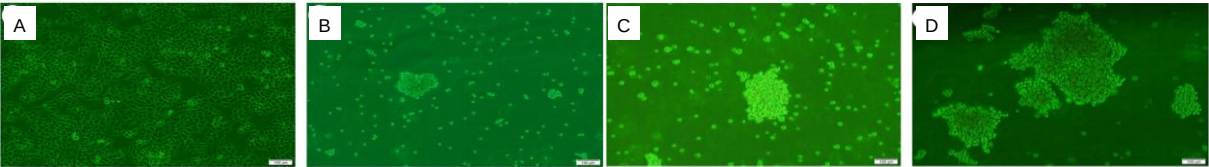
2.2 鼻咽癌CNE2干细胞分化能力 鼻咽癌CNE2干细胞在无血清培养液中培养形成悬浮细胞球后, 接种于含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液的6孔板中培养, 24 h后观察到悬浮细胞球开始变小, 单细胞增多, 底部边缘细胞开始贴壁生长, 5 d时细胞球完全消失, 显微镜下均为单细胞, 且多为贴壁生长, 形态与在完全培养液中常规贴壁培养的鼻咽癌CNE2细胞无明显差异, 见图2。

2.3 流式细胞术检测CD133在鼻咽癌CNE2干细胞和鼻咽癌CNE2亲本细胞中的表达 鼻咽癌CNE2干细胞中CD133⁺细胞比例(9.6%)高于鼻咽癌CNE2亲本细胞(0.3%), 差异有显著性意义($P < 0.01$), 见图3。

2.4 Western blot、RT-PCR检测干性相关蛋白、干性相关基因的表达 鼻咽癌CNE2干细胞组干性相关Bmi-1、Twist蛋白和基因的表达明显高于鼻咽癌CNE2亲本细胞组($P < 0.05$), 见图4。

2.5 透射电镜观察鼻咽癌CNE2干细胞和鼻咽癌CNE2亲本细胞的超微结构 鼻咽癌CNE2干细胞内自噬小体数量多于鼻咽癌CNE2亲本细胞, 见图5。

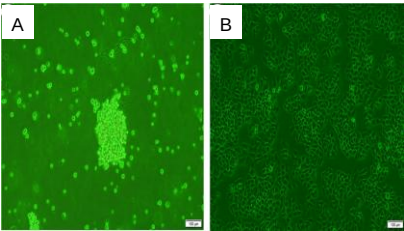
2.6 Western blot、RT-PCR检测自噬相关蛋白、自噬相关基因的表达 鼻咽癌CNE2干细胞组自噬相关Beclin1、LC3B蛋白和基因的表达明显高于鼻咽癌CNE2亲本细胞组($P < 0.05$), 见图6。



图注: 图中 A 为鼻咽癌 CNE2 细胞, 细胞贴壁生长, 形态呈椭圆形或不规则形, 排列紧密; B 为 CNE2 细胞成球悬浮培养第 5 天, 少数球体开始成形; C 为 CNE2 细胞球培养第 10 天, 可见较大的圆形或卵圆形细胞微球体; D 为 CNE2 细胞球培养第 15 天, 形成由大量细胞紧密结合而成的实体结构。

图 1 无血清培养法富集鼻咽癌干细胞球生长情况($\times 100$)

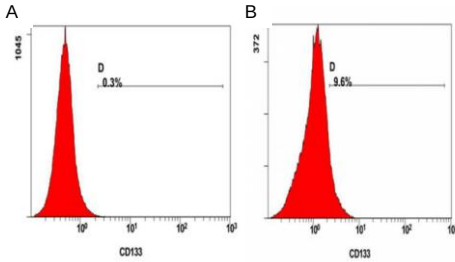
Figure 1 The serum-free culture method enriches the growth of stem-like cells in nasopharyngeal carcinoma ($\times 100$)



图注: 图中 A 为分化前, 细胞呈球形, 悬浮生长, 细胞间连接紧密; B 为分化后, 细胞贴壁生长, 呈椭圆形, 排列紧密。

图 2 相差显微镜观察鼻咽癌 CNE2 干细胞球分化能力($\times 100$)

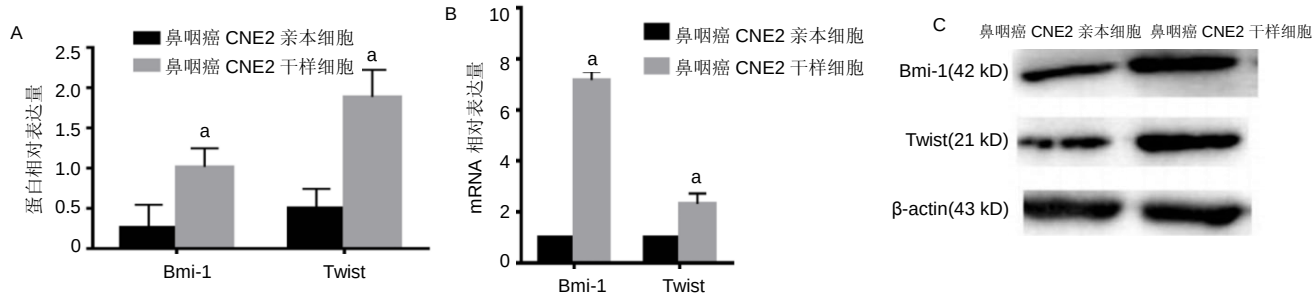
Figure 2 Phase contrast microscopy observation of nasopharyngeal carcinoma CNE2 stem-like cell differentiation ($\times 100$)



图注: 图中 A 为鼻咽癌 CNE2 亲本细胞; B 为鼻咽癌 CNE2 干细胞。

图 3 流式细胞术检测鼻咽癌 CNE2 干细胞和鼻咽癌 CNE2 亲本细胞中 CD133 阳性标记细胞比例

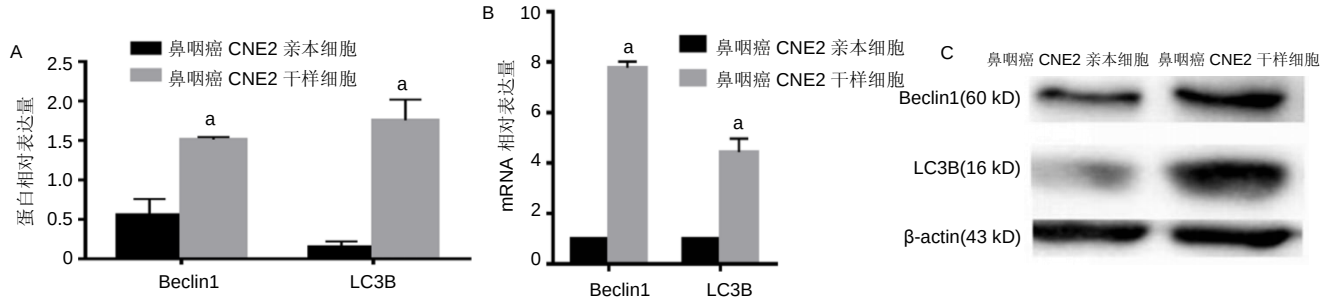
Figure 3 Flow cytometry detection of CD133⁺ labeled cells in nasopharyngeal carcinoma CNE2 parental cells and CNE2 stem-like cells



图注: 图中 A 为 Western blot 半定量分析 Bmi-1 和 Twist 蛋白的表达; B 为 RT-PCR 半定量分析 Bmi-1 和 Twist mRNA 的表达; C 为 Western blot 电泳条带。与鼻咽癌 CNE2 亲本细胞比较, $^aP < 0.05$ 。

图 4 鼻咽癌 CNE2 干细胞和鼻咽癌 CNE2 亲本细胞中干性相关蛋白、基因的表达

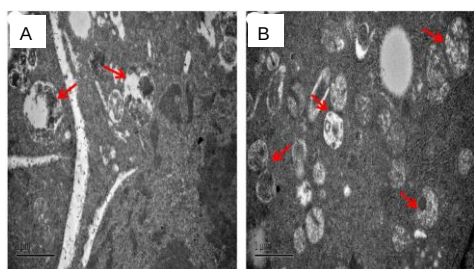
Figure 4 Expression of stemness-related proteins and genes in nasopharyngeal carcinoma CNE2 parental cells and CNE2 stem-like cells



图注: 图中 A 为 Western blot 半定量分析 Beclin1 和 LC3B 蛋白的表达; B 为 RT-PCR 半定量分析 Beclin1 和 LC3B mRNA 的表达; C 为 Western blot 电泳条带。与鼻咽癌 CNE2 亲本细胞比较, $^aP < 0.05$ 。

图 6 鼻咽癌 CNE2 干细胞和鼻咽癌 CNE2 亲本细胞中自噬相关蛋白、基因的表达

Figure 6 Expression of autophagy-related proteins and genes in nasopharyngeal carcinoma CNE2 parental cells and CNE2 stem-like cells



图注：图中 A 为鼻咽癌 CNE2 亲本细胞；B 为鼻咽癌 CNE2 干细胞。红色箭头所指为自噬小体。

图 5 透射电镜观察鼻咽癌 CNE2 干细胞和鼻咽癌 CNE2 亲本细胞的超微结构

Figure 5 Ultrastructure of nasopharyngeal carcinoma CNE2 parental cells and CNE2 stem-like cells under transmission electron microscope

3 讨论 Discussion

随着放疗技术不断进步，鼻咽癌治疗效果较前有一定提高，但尚未取得满意效果^[1]。肿瘤干细胞理论的出现，从新的方向为鼻咽癌发生和复发机制提供了全新的解释，该理论认为鼻咽癌存在肿瘤干细胞，肿瘤干细胞存在“干细胞特性”是始动肿瘤形成，维持自我更新及多向分化潜能而促进细胞生长、成瘤、复发、转移及放化疗抵抗的根源^[12-13]。为了探索鼻咽癌干细胞的相关分子机制，该实验在以往研究基础上通过无血清悬浮培养法有效富集得到鼻咽癌 CNE2 干细胞。所谓无血清就是其培养液中不含普通贴壁细胞分裂增殖所需要的胎牛血清等营养物质，但含有干细胞生存所必需的生长因子等物质，因而干细胞在这种培养液中能够存活，而普通细胞则比较难存活，从而达到分离和富集肿瘤干细胞的目的。为了证实无血清悬浮细胞培养法富集鼻咽癌肿瘤干细胞的干细胞特性，国内陆续有研究证实，CD133 可以作为肿瘤干细胞的表面标志物^[14-15]，通过流式细胞术检测了鼻咽癌 CNE2 干细胞和鼻咽癌 CNE2 亲本细胞中 CD133 阳性细胞比例。结果显示，鼻咽癌 CNE2 干细胞中 CD133 阳性细胞比例高于鼻咽癌 CNE2 亲本细胞。Bmi-1 基因是多梳基因(PcG)家族中重要的调控基因，参与调控细胞的增殖与分化，在维持干细胞的自我更新及多向分化过程中起着重要作用。Twist 基因是一种高度保守的碱性螺旋-环-螺旋转录因子，其异常表达在恶性肿瘤中可诱导肿瘤干细胞表型形成。通过 RT-PCR 和 Western blot 检测了 Bmi-1 和 Twist 在基因和蛋白层面的差异性表达。以上实验结果对于鼻咽癌肿瘤干细胞的鉴定应该更为可靠。

自噬是广泛存在于真核细胞中的生命现象，是一种复杂的分解代谢过程，使细胞能够在压力条件下通过细胞器和其他细胞成分降解和自我“消化”而存活。在肿瘤早期阶段，自噬对肿瘤微环境的支持作用，表现出对肿瘤的抑制特性；而在晚期阶段，自噬可能有助于肿瘤存活、休眠、生长和转移，为肿瘤细胞提供能源，从而起到促进肿瘤生长的作用^[16-18]。因此可以认为，自噬是肿瘤细胞的生存机制之一^[19]。最新研究表明自噬在肿瘤干细胞的起源、维持和发展中可能发挥重要作用^[20-21]。大量研究显示，Beclin1 是在哺乳类动物中被确认的自噬特异性调控基因，反映自

噬水平^[22-23]。LC3B 是目前研究比较多的自噬标志性物质，参与自噬体的形成，被认为是较特异的自噬形成指标。在实验过程中通过透射电镜观察发现鼻咽癌干细胞较其亲本细胞中自噬小体的形成增多，为了进一步探究自噬在鼻咽癌干细胞内的自噬表达，通过 Western blot、RT-PCR 等实验检测显示鼻咽癌干细胞较其亲本细胞自噬关键基因和蛋白表达均增强，从而证实了鼻咽癌 CNE2 干细胞较亲本细胞存在较高水平自噬表达现象。在实验结果中 LC3B 和 Twist 蛋白表达在鼻咽癌 CNE2 干细胞中高于 Beclin1 和 Bmi-1，但在 mRNA 水平却低于 Beclin1 及 Bmi-1，作者分析出现这一现象可能原因：首先，基因的表达分为转录和翻译两个层面，即 mRNA 水平和蛋白水平，真核基因表达的转录和翻译发生时间、位点存在时空间隔；其次，在转录后，又会有转录后加工，转录产物的降解、翻译，翻译后加工及修饰好几个层面，因此转录水平和翻译水平并不完全一致；再者，因为检测的时间点不同，可能在蛋白达到峰值的时候 mRNA 已经降解了或者在 mRNA 达到峰值的时候蛋白量还在增加中。因此 mRNA 和蛋白水平不一致也是正常的情况。

近期越来越多的研究已发现肿瘤干细胞和自噬之间存在着密切联系，自噬相关基因 LC3 被认为是肿瘤干细胞影响乳腺癌进展的一个关键因素^[24]。自噬对 CD133 阳性肝癌干细胞在低氧和低营养肿瘤微环境中的存活起重要作用^[25]。自噬可维持胰腺癌干细胞的活性^[26]。自噬在神经胶质瘤干细胞的模拟血管形成过程中起关键作用，可作为胶质瘤耐药的治疗目标^[27]。罗特林诱导前列腺癌干细胞凋亡是通过诱导自噬作用实现的^[28]。硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 抑制激活内质网应激反应并增强自噬，更好地控制肺癌^[29]。自噬在膀胱癌干细胞生物学特性的各个方面发挥重要作用^[30]。慢性髓样白血病干细胞通过自噬逃逸凋亡，抵抗酪氨酸激酶抑制剂的治疗作用^[31-32]。还有相关研究发现自噬在乳腺癌、结肠癌等肿瘤细胞中发挥重要作用^[33-36]，因此作者推测自噬在维持鼻咽癌干细胞生物特性中可能也发挥重要作用，从而影响了鼻咽癌的发生、发展、复发及转移。

对于癌症研究和治疗，自噬已引起相当多的重视，自噬相关药物与抗肿瘤药物相结合治疗肿瘤已逐渐进入临床试验阶段^[37-38]，此研究初步发现鼻咽癌干细胞中存在较高水平自噬表达现象，这一初步发现将为后续深入研究细胞自噬在鼻咽癌发生发展中的作用及机制提供一定的前期实验基础及理论依据，为深入研究自噬在鼻咽癌干细胞中的调控机制奠定了实验基础，对后续探索鼻咽癌防治的新策略具有重要意义。

作者贡献：代森林、李亚军和岳昌武负责实验设计和实验评估，代森林、吴杰负责实验实施，代森林和李晓倩负责收集资料和处理数据，代森林负责论文撰写，李亚军、岳昌武负责审核。

经费支持：该文章接受了“国家自然科学基金项目(81560444)”“贵州省科技厅基金项目(黔科合 SY[2015]3046 号)”“联合科技(遵市科合社字[2017]47 号)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中

不存在利益冲突。

伦理问题: 研究用细胞的实验方案符合相关伦理学要求。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过遵义医学院第三附属医院生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Cheng Y, Ho RL, Chan KC, et al. Anti-angiogenic pathway associations of the 3p21.3 mapped BLU gene in nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene*. 2015;34(32):4219-4228.
- [2] Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*. 2006;66(19):9339-9344.
- [3] Tirino V, Desiderio V, Paino F, et al. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J*. 2013;27(1):13-24.
- [4] Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756-760.
- [5] Eyler CE, Rich JN. Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol*. 2008;26(17):2839-2845.
- [6] Xie P, Yang JP, Cao Y, et al. Promoting tumorigenesis in nasopharyngeal carcinoma, NEDD8 serves as a potential theranostic target. *Cell Death Dis*. 2017;8(6):e2834.
- [7] Joffe C, Dupont N, Hoa L, et al. The Pro-apoptotic STK38 Kinase Is a New Beclin1 Partner Positively Regulating Autophagy. *Curr Biol*. 2015;25(19):2479-2492.
- [8] Tian Y, Kuo CF, Sir D, et al. Autophagy inhibits oxidative stress and tumor suppressors to exert its dual effect on hepatocarcinogenesis. *Cell Death Differ*. 2015;22(6):1025-1034.
- [9] Dikic I, Johansen T, Kirkin V. Selective autophagy in cancer development and therapy. *Cancer Res*. 2010;70(9):3431-3434.
- [10] Li Y, Zhang J, Liu T, et al. Molecular machinery of autophagy and its implication in cancer. *Am J Med Sci*. 2012;343(2):155-161.
- [11] Cho YY, Kim DJ, Lee HS, et al. Autophagy and cellular senescence mediated by Sox2 suppress malignancy of cancer cells. *PLoS One*. 2013;8(2):e57172.
- [12] Lang SH, Anderson E, Fordham R, et al. Modeling the prostate stem cell niche: an evaluation of stem cell survival and expansion in vitro. *Stem Cells Dev*. 2010;19(4):537-546.
- [13] Kakarala M, Wicha MS. Cancer stem cells: implications for cancer treatment and prevention. *Cancer J*. 2007;13(5):271-275.
- [14] Shen C, Chen F, Wang H, et al. The Pinx1 Gene Downregulates Telomerase and Inhibits Proliferation of CD133+ Cancer Stem Cells Isolated from a Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line by Regulating Trfs and Mad1/C-Myc/p53 Pathways. *Cell Physiol Biochem*. 2018;49(1):282-294.
- [15] Lin T, Luo JJ, He YC, et al. Cancer Stem Cell Markers in Nasopharyngeal Carcinoma and Its Relevance for Therapy. *Current Traditional Medicine*. 2016; 2:115-123.
- [16] White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(6):401-410.
- [17] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132(1):27-42.
- [18] Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J*. 2015;34(7):856-880.
- [19] Guo JY, Karsli-Uzunbas G, Mathew R, et al. Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumors to oncocytoomas and maintains lipid homeostasis. *Genes Dev*. 2013;27(13):1447-1461.
- [20] Gong C, Bauvy C, Tonelli G, et al. Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells. *Oncogene*. 2013;32(18):2261-2272.
- [21] Lin YH, Huang YC, Chen LH, et al. Autophagy in cancer stem/progenitor cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015;75(5):879-886.
- [22] 张玉梅,冯凡,林方方,等.自噬相关基因ATG5在肿瘤发生发展及治疗中的作用[J].中国肿瘤,2018,27(10):774-778.
- [23] Rosenfeldt MT, Ryan KM. The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis*. 2011;32(7):955-963.
- [24] Zhao XL, Lin Y, Jiang J, et al. High-mobility group box 1 released by autophagic cancer-associated fibroblasts maintains the stemness of luminal breast cancer cells. *J Pathol*. 2017;243(3):376-389.
- [25] Song YJ, Zhang SS, Guo XL, et al. Autophagy contributes to the survival of CD133+ liver cancer stem cells in the hypoxic and nutrient-deprived tumor microenvironment. *Cancer Lett*. 2013;339(1):70-81.
- [26] Yang MC, Wang HC, Hou YC, et al. Blockade of autophagy reduces pancreatic cancer stem cell activity and potentiates the tumoricidal effect of gemcitabine. *Mol Cancer*. 2015;14:179.
- [27] Wu HB, Yang S, Weng HY, et al. Autophagy-induced KDR/VEGFR-2 activation promotes the formation of vasculogenic mimicry by glioma stem cells. *Autophagy*. 2017;13(9):1528-1542.
- [28] Kumar D, Shankar S, Srivastava RK. Rottlerin induces autophagy and apoptosis in prostate cancer stem cells via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Cancer Lett*. 2014;343(2):179-189.
- [29] Pisanu ME, Noto A, De Vitis C, et al. Blockade of Stearoyl-CoA-desaturase 1 activity reverts resistance to cisplatin in lung cancer stem cells. *Cancer Lett*. 2017;406:93-104.
- [30] Ojha R, Singh SK, Bhattacharyya S. JAK-mediated autophagy regulates stemness and cell survival in cisplatin resistant bladder cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1860(11 Pt A):2484-2497.
- [31] Calabretta B, Salomoni P. Inhibition of autophagy: a new strategy to enhance sensitivity of chronic myeloid leukemia stem cells to tyrosine kinase inhibitors. *Leuk Lymphoma*. 2011;52 Suppl 1:54-59.
- [32] Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, et al. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *J Clin Invest*. 2009;119(5):1109-1123.
- [33] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(1):7-34.
- [34] Niklaus M, Adams O, Berezowska S, et al. Expression analysis of LC3B and p62 indicates intact activated autophagy is associated with an unfavorable prognosis in colon cancer. *Oncotarget*. 2017;8(33):54604-54615.
- [35] Lee MH, Koh D, Na H, et al. MTA1 is a novel regulator of autophagy that induces tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Autophagy*. 2018;14(5):812-824.
- [36] Zhao S, Fortier TM, Baehrecke EH. Autophagy Promotes Tumor-like Stem Cell Niche Occupancy. *Curr Biol*. 2018;28(19):3056-3064.
- [37] Onorati AV, Dyczynski M, Ojha R, et al. Targeting autophagy in cancer. *Cancer*. 2018;124(16):3307-3318.
- [38] Chude CI, Amaravadi RK. Targeting Autophagy in Cancer: Update on Clinical Trials and Novel Inhibitors. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6): E1279.