

and Hsp70/Hsc70 [J]. *Oncogene* 2000 ,19(38) : 4385 - 4395.

[14] Kim JA ,Lee S ,Kim DE ,et al. Fisetin a dietary flavonoid induces apoptosis of cancer cells by inhibiting HSF1 activity through blocking its binding to the hsp70 promoter [J]. *Carcinogenesis* 2015 , 36(6) : 696 - 706.

[15] Karpel - Massler G ,Shu C ,Chau L ,et al. Combined inhibition of Bcl - 2/Bcl - xL and Usp9X/Bag3 overcomes apoptotic resistance in glioblastoma in vitro and in vivo [J]. *Oncotarget* 2015 6(16) : 14507 - 14521.

(编校: 张西敏)

上调 Notch - 1 基因对 U215 细胞 AKT - mTOR 通路的影响

楚可新^{1,2} 戴明明^{1,2} 林 勤^{1,2} 赵能江^{2,3}

Effect of Notch - 1 gene upregulation on AKT - mTOR signal of U251 cell

Chu Kexin^{1,2} ,Dai Mingming^{1,2} ,Lin Qin^{1,2} ,Zhao Nengjiang^{2,3}

¹Department of Radiation the First Affiliated Hospital of Xiamen University ,Fujian Xiamen 361003 ,China; ²Cancer Center of Xiamen City ,Fujian Xiamen 361003 ,China; ³Department of Traditional Chinese Medicine ,the First Affiliated Hospital of Xiamen University , Fujian Xiamen 361003 ,China.

【Abstract】 Objective: To investigate the effect of Notch - 1 gene up - regulation on biological behaviors of U215 cell and explore its effects on AKT - mTOR signal. **Methods:** U251 cells were infected with over - expression NICD or control lentivirus ,the mRNA and protein expression of Notch - 1 gene were examined with RT - PCR and Western - Blot ,the cell proliferation was assayed with MTT ,cell cycle was determined by flow cytometry ,the effects of Notch - 1 gene on U251 cell invasion were studied using matrigel coated Transwell chambers ,the effects of Notch - 1 up - regulation on AKT ,mTOR ,P70S6K and 4Ebp - 1 protein expression were also analyzed. **Results:** Compared with the untreated and empty group ,after 72h of infection ,the protein and mRNA expression of Notch - 1 increased ($P < 0.05$) . It was found that up - regulation of Notch - 1 promoted U251 cell growth ,invasion and S - phase cells were increased ($P < 0.05$) . Up - regulation of Notch - 1 promoted Cyclin D1 ,CDK - 4 protein expression ,and p - AKT and p - mTOR also increased in Notch - 1 up - regulated U251 cells. **Conclusion:** Up - regulation Notch - 1 promotes U251 glioma cell proliferation and invasion ,the mechanism was partly through regulating AKT - mTOR signaling.

【Key words】Notch - 1 gene ,AKT - mTOR signaling ,glioma ,U251 cell

Modern Oncology 2016 24(07) : 1038 - 1041

【摘要】 目的: 观察上调 Notch - 1 基因对人胶质瘤 U251 细胞生物学行为及 AKT - mTOR 信号通路的影响。 **方法:** 采用 pNL - NICD 慢病毒感染 U251 细胞 ,以 RT - PCR 和 Western - Blot 检测 Notch - 1 基因 mRNA 和蛋白的表达 ,以 MTT 检测细胞增殖能力 ,流式细胞术检测细胞周期变化 ,Transwell 实验检测细胞侵袭能力 ,同时检测 Notch - 1 上调对 AKT、mTOR、P70S6K、4Ebp - 1 蛋白的影响。 **结果:** 与对照组比较 ,NICD 慢病毒转染 72h 后 ,Notch - 1 基因 mRNA 和蛋白表达明显增高 ($P < 0.01$) ; Notch - 1 上调明显促进 U251 细胞增殖、侵袭、促进细胞进入 S 期 ,增加周期蛋白 Cyclin D1、CDK - 4 的表达 ,促进 AKT、mTOR 蛋白磷酸化。 **结论:** 上调 Notch - 1 基因促进 U251 细胞增殖、侵袭 ,其机制和活化 AKT - mTOR 通路有关。

【关键词】Notch - 1 基因; AKT - mTOR 信号; 胶质瘤; U251 细胞

【中图分类号】R730.231 **【文献标识码】**A **DOI:** 10.3969/j.issn.1672-4992.2016.07.005

【文章编号】1672 - 4992 - (2016) 07 - 1038 - 04

【收稿日期】 2015 - 09 - 14

【修回日期】 2015 - 10 - 15

【基金项目】 福建省卫生厅青年基金资助项目(编号: 2012 - 2 - 76)

【作者单位】 ¹厦门大学附属第一医院放疗科 福建 厦门 361003

²厦门市肿瘤医学中心 福建 厦门 361003

³厦门大学附属第一医院中医科 福建 厦门 361003

【作者简介】 楚可新(1978 -) ,女 辽宁锦州人 主治医师 硕士 主要从事肿瘤放射治疗工作。 E - mail: 526421001@qq.com

【通讯作者】 赵能江(1978 -) ,男 湖北随州人 助理教授 博士 主要从事肿瘤综合治疗工作。 E - mail: zhaonengjiang@163.com

Notch 信号是调控肿瘤生长的重要通路,大量的研究发现 Notch - 1 基因在胶质瘤中表达明显增高,与胶质瘤的发生、发展密切相关^[1]。同时很多肿瘤都存在 AKT - mTOR 通路的过度活化,在胶质瘤中发现 Notch - 1 调控 EGFR 的表达,但是能否影响其下游的 AKT 和 mTOR 尚不清楚。目前已经发现 Notch 信号能调节 Cyclin D1、NF - κ B、Bcl - 2 等基因^[2-3],而这些基因也属于 AKT - mTOR 的下游靶点^[4],因此 Notch - 1 可能通过 AKT - mTOR 通路来调节胶质瘤生长。本研究通过构建表达 Notch - 1 胞内段 NICD(Notch - 1 的活化形式)的慢病毒,感染人神经胶质瘤 U251 细胞,观察 Notch - 1 基因上调对 U251 胶质瘤细胞增殖、细胞周期、侵袭转移及对 AKT - mTOR 信号通路的影响,探讨 Notch - 1 调控胶质瘤生长的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

克隆载体 PCR - XL - Topo 质粒购自美国 Invitrogen 公司,逆转录病毒载体 PNL - IRES2 - EGFP 由本实验室保存,CCK - 8 试剂购自 Beyotime 生物有限公司,基质胶(Matrigel)购自美国 Becton Dickinson 公司,Transwell 侵袭小室购自美国 Becton Dickinson 公司(3422 型,聚碳酸酯膜径 6.5mm,孔径 8.0 μ m),抗体:兔抗人 Notch - 1、T - AKT、p - AKT、p - mTOR、p - P70S6K、p - 4Ebp - 1、Cyclin D1、CDK - 4、GAPDH 购自 Santa Cruz 公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自 Santa Cruz 公司,ECL 化学发光试剂购自碧云天生物技术公司;人神经胶质瘤 U251 细胞由本实验室保存,其余试剂为国产或进口分析纯。

1.2 质粒扩增和病毒包装

采用长片段克隆的方法,从胶质瘤 U251 细胞中提取 RNA 经逆转录获得人 Notch - 1 胞内段 NICD 的 cDNA,PCR 扩增后将其连接入 TA 克隆载体 pCR - XL - Topo 质粒,测序正确后,经酶切、连接,构建 pNL - NICD - IRES2 - EGFP 慢病毒表达质粒,再和辅助包装质粒 Helper 和 VSVG 共转染 293T 细胞,20 000r/min 30min 超滤离心浓缩后,获得滴度为 2.0E + 8TU/ml 的慢病毒。

1.3 细胞培养和病毒感染

将神经胶质瘤细胞系分为对照组(U251)、空载体组(PNL)和 Notch - 1 组(PNL - NICD)。将对数生长的细胞种于 6 孔板,每孔约 5 \times 10⁴ 个细胞,第二天约 30% 融合时,除去旧培养液,对照组加入正常培养基,病毒感染组每孔加入无血清培养基 900 μ l,慢病毒液 10 μ l,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中,12h 后除去含病毒培养基,更换新鲜培养基 2ml 继续培养

12h,病毒感染 72h 后荧光显微镜观察感染效果,并进行后续实验。

1.4 MTT 检测细胞增殖能力

细胞按每孔 2 \times 10³ 个细胞(100 μ l)接种于 96 孔培养板,接种后第 1、2、3、4、5、6 天各取出一块 96 孔板行 CCK - 8 检测。每孔加入 10 μ l CCK - 8 试剂,37 $^{\circ}$ C 继续培养 2h 后,在酶标仪(550nm 波长)上测量各孔吸光度(OD)值,实验重复 3 次,采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以时间为横轴,以吸光度值为纵轴绘制生长曲线。

1.5 流式细胞术检测细胞周期变化

收集各组细胞,用预冷的 PBS 洗涤细胞两次,调整细胞密度为 1 \times 10⁶ /ml,将细胞加入到预冷的乙醇中,4 $^{\circ}$ C 固定 12 小时,1 000r/min 离心 5min,去除乙醇,PBS 洗两遍;用 1ml 配制好的 PI 染液重悬细胞,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30min,用流式细胞术检测细胞周期变化。

1.6 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

取对数生长期的各组细胞,用无血清 DMEM 制成 5 \times 10⁵ /ml 的单细胞悬液,取细胞悬液 100 μ l 加入基质胶包备的 Transwell 小室的上室,下室加入 500 μ l 含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基作为趋化因子。细胞于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱内孵育 24 小时,加 0.1% 的结晶紫 1ml 染色,在显微镜下计数侵袭细胞个数,每膜计数上下左右中 5 个不同视野穿过的细胞数,每个实验重复 3 次。

1.7 Western - Blot 检测 AKT - mTOR 通道蛋白表达

收集各组细胞,RIP1 裂解后,离心收集上清,BCA 法测定蛋白浓度后,加 Buffer 煮沸变性,SDS - PAGE 电泳后转膜,5% 的脱脂奶粉室温封闭 2h,加入 TBST 稀释的一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗脱 10min \times 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 2h,TBST 洗脱 10min \times 3 次后,加入 ECL 化学发光试剂曝光,胶片条带扫描后进行灰度分析。

2 结果

2.1 上调 Notch - 1 表达的验证

用携带外源性 NICD 基因的慢病毒感染胶质瘤 U251 细胞,病毒感染 72h 后,在荧光显微镜下观察,80% 以上的细胞发出绿色荧光(图 1),说明大部分细胞被感染。RT - PCR 和 Western - Blot 检测 NICD 的表达(图 2),结果表明,与转染空载体的 U251 细胞比较,NICD 的 mRNA 和蛋白表达量较对照组分别增加约 1.6 和 1.4 倍($P < 0.05$),说明 Notch - 1 基因胞内段 NICD 克隆成功,并能在细胞内稳定高效表达。

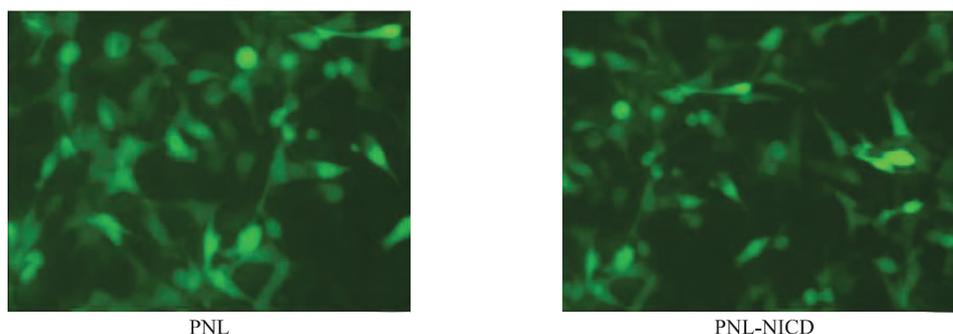


图 1 慢病毒感染后荧光显微镜观察 U251 ($\times 200$)

Fig. 1 The figure of slow virus infected cells observed in fluorescence microscope ($\times 200$)

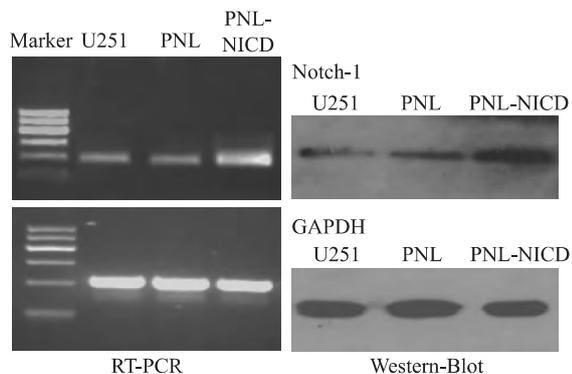


图2 RT-PCR 和 Western-Blot 鉴定 NICD 的表达

Fig. 2 RT-PCR and Western-Blot were used to identification the expression of NICD

2.2 上调 Notch-1 对细胞增殖的影响

MTT 法检测 Notch-1 上调组 (PNL-NICD)、对照细胞 (PNL) 和空白对照细胞 (U251) 的增殖情况,结果显示,活化的 Notch-1 促进 U251 细胞生长(图3)。

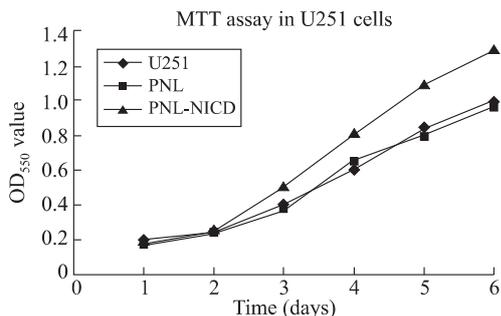


图3 上调 Notch-1 后 U251 细胞增殖能力的变化

Fig. 3 The change of cell proliferation after up of Notch-1

2.3 上调 Notch-1 对细胞进入 S 期的影响

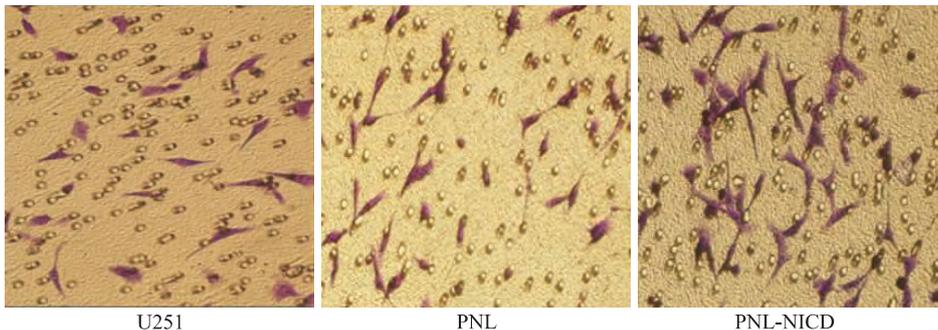


图4 上调 Notch-1 对 U251 胶质瘤细胞侵袭的影响 (结晶紫染色 ×200)

Fig. 4 The change of cell invasion after up of Notch-1 in U251 cell (Crystal violet staining ×200)

3 讨论

Notch 信号通路在肿瘤中的作用广泛,包括胶质瘤在内的很多肿瘤,如头颈部鳞癌、子宫内膜癌、肺癌和乳腺癌等都存在 Notch 信号通路的异常表达^[5-6]。目前发现 Notch-1 在胶质瘤组织和细胞中表达增高,但其作用机制尚不明确,是否通过 AKT-mTOR 起作用尚未见报道。NICD 是 Notch 信号的活性形式,通过载体将 NICD 转染进入细胞内,可在没有配体参与的情况下激活 Notch 通路,为研究 Notch 信号的功能提供了便利。

Notch 信号通路是许多重要信号传导通路的交汇点,虽然 Notch 信号的活化比较简单,Notch 受体从细胞膜裂解后

可采用流式细胞术检测细胞周期,结果显示:U251 空白对照组和空载体组 S 期细胞比例分别为 (23.9 ± 1.3)% 和 (23.5 ± 0.3)% 差异无统计学意义 (P > 0.05); 但 Notch-1 组的 S 期细胞比例为 (27.8 ± 2.5)% ,明显高于空载体组和空白对照组 (P < 0.01)。同时,Notch-1 基因上调后,U251 细胞 G₀/G₁ 期细胞减少到 (62.1 ± 3.2)% ,明显低于空载体组和空白对照组 (P < 0.01) ,表明上调 Notch-1 的表达变化引起了胶质瘤细胞周期分布的改变,促进细胞进入 S 期, DNA 复制增加,细胞增殖加快(表 1)。

表 1 上调 Notch-1 后细胞周期的变化 (% $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The change of cell cycle after up of Notch-1 (% $\bar{x} \pm s$)

Groups	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁
U251	23.9 ± 1.3	8.3 ± 1.7	67.7 ± 1.6
PNL	23.5 ± 0.3	8.7 ± 0.3	67.7 ± 3.6
PNL-NICD	27.8 ± 2.5*	10.0 ± 0.7	62.1 ± 3.2*

Compare with the PNL group, * P < 0.01.

2.4 上调 Notch-1 对 U251 细胞侵袭能力的影响

采用 Transwell 检测各组细胞的侵袭能力,结果显示(图 4) 对照组和空载体组穿膜细胞数分别为 (81.3 ± 6.4) 个和 (80.7 ± 7.1) 个,差异无统计学意义 (P > 0.05); 上调 Notch-1 后,穿膜细胞数 (111.5 ± 9.2) 明显增加 (P < 0.05),提示 Notch-1 能调控胶质瘤细胞的体外侵袭能力,活化 Notch-1 则促进胶质瘤侵袭。

2.5 Notch-1 上调对 AKT-mTOR 通路及其下游靶点活化的影响

Western-Blot 结果显示,上调 Notch-1 对总 AKT 的表达未见明显影响,但明显增加 p-AKT、p-mTOR、p-4Ebp-1 的活化 (P < 0.05); 促进细胞周期蛋白 Cyclin D1、CDK-4 的表达 (P < 0.05) (图 5)。

可直接转至核内,但是激活的 Notch 胞内段 NICD 在细胞核内形成一个复杂的转录复合物,这个复合物能结合多种转录因子。Notch 信号的下游靶点除 hes 和 hey 家族成员外,其它下游靶基因尚不清楚;胚胎发育的研究表明 hes 和 hey 主要调控分化,但 Notch 信号在肿瘤增殖和侵袭中如何发挥作用仍不清楚。因此研究 Notch 信号的作用机制,找出其下游的关键靶点显得尤为重要。

AKT-mTOR 信号传导通路在胶质瘤发生发展中扮演重要角色,作为 EGFR 下游的重要调控通路,该通路的活化参与细胞周期进展和细胞凋亡抵抗,通过调节 p27、Cyclin D1、Bcl-2 等下游靶蛋白来促进细胞的存活和增殖^[4]。文献报

道 Notch-1 能调节 AKT-mTOR 的上游基因 EGFR^[7], 因此推测 Notch-1 也可能调控了 EGFR 的下游基因 AKT 和 mTOR, 为此我们检测了 Notch-1 表达变化对 AKT-mTOR 通路的影响。AKT-mTOR 信号途径是调控细胞生长、分化、存活的重要通路。在人类胶质瘤中发现 AKT-1 的过度扩增和表达^[8], AKT 活化后通过磷酸化 mTOR 及其下游分子 P70S6K、4Ebp-1 等下传生存信号, 促进细胞增殖和凋亡抵抗^[9]。哺乳动物雷帕霉素靶点蛋白(mammalian target of rapamycin mTOR) 是 AKT 下游重要的效应分子, 可调控细胞增殖、凋亡和肿瘤形成^[10]。mTOR 是 AKT 在细胞增殖和生长中重要的功能执行者, mTOR 主要调控 mRNA 的翻译, 4Ebp-1 和 S6K1 是研究最广泛的 mTOR 的下游分子, 它们是蛋白翻译的关键调节因子, mTOR 通过调节这两个因子来控制蛋白合成和调节细胞的生长, 加快 Cyclin D1、CDK-4 等合成, 促进 S 期的发生^[11]。

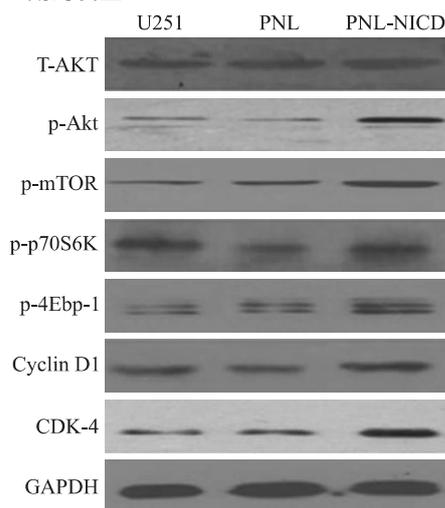


图5 Western-Blot 检测 AKT-mTOR 通路蛋白的表达

Fig. 5 The protein expression of AKT-mTOR signaling pathway were examine by Western-Blot

我们研究发现, 活化 Notch-1 促进 AKT 和 mTOR 的磷酸化, 增加周期相关蛋白 Cyclin D1、CDK-4 的表达, 使细胞周期进入 S 期; 因此 Notch-1 可能通过 AKT-mTOR 通路来调节胶质瘤细胞周期进展。同时我们的研究也证实在胶质瘤中活化 Notch-1 能促进 U251 胶质瘤细胞侵袭。因此我们推测, Notch-1 作为癌基因可能是通过活化 AKT-mTOR

信号通路来促进胶质瘤的恶性生物学行为。

【参考文献】

- [1] Yun J, Espinoza I, Pannuti A, et al. p53 modulates notch signaling in MCF-7 breast cancer cells by associating with the notch transcriptional complex via MAML1 [J]. J Cell Physiol, 2015, 230 (12): 3115-3127.
- [2] Previs RA, Coleman RL, Harris AL, et al. Molecular pathways: Translational and therapeutic implications of the Notch signaling pathway in cancer [J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(5): 955-961.
- [3] Karamboulas C, Ailles L. Developmental signaling pathways in cancer stem cells of solid tumors [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830(2): 2481-2495.
- [4] Wang C, Wang Z, Zhang X, et al. Protection by silibinin against experimental ischemic stroke: Up-regulated pAKT, pmTOR, HIF-1 α and Bel-2, down-regulated Bax, NF- κ B expression [J]. Neurosci Lett, 2012, 529(1): 45-50.
- [5] Kimura K, Satoh K, Kanno A, et al. Activation of Notch signaling in tumorigenesis of experimental pancreatic cancer induced by dimethylbenzanthracene in mice [J]. Cancer Sci, 2007, 981(2): 155-162.
- [6] Song Xiaoqing, Qiu Huilei, Geng Jingshu. Research progress on Notch signaling pathway in head and neck cancer [J]. Modern Oncology, 2014, 22(12): 3007-3010.
- [7] Purow BW, Sundaresan TK, Burdick MJ, et al. Notch-1 regulates transcription of the epidermal growth factor receptor through p53 [J]. Carcinogenesis, 2008, 29(5): 918-925.
- [8] Helmy K, Halliday J, Fomchenko E, et al. Identification of global alteration of translational regulation in glioma in vivo [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46965.
- [9] Li Y, Zhang P, Qiu F, et al. Inactivation of PI3K/AKT signaling mediates proliferation inhibition and G₂/M phase arrest induced by andrographolide in human glioblastoma cells [J]. Life Sci, 2012, 90(25): 962-967.
- [10] Huang B, Wang Y, Wang W, et al. mTORC1 prevents preosteoblast differentiation through the notch signaling pathway [J]. PLoS Genet, 2015, 11(8): e1005426.
- [11] Alkethi A, Attoub S. Notch signaling in cancer: Rationale and strategies for targeting [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2015, 15(5): 364-374.

(编校: 张西敏)

关于变更刊期及优先数字出版的通知

根据期刊发展需要, 本刊自 2015 年 23 卷 1 期开始, 刊期由月刊变更为半月刊, 出版时间为每月的 5 日、20 日, 每期 144 页码, 国际标准 A4 开本, 定价 10 元, 全年 240 元(境外订户每期 5 美元, 全年 120 美元), 欢迎广大读者在当地邮局订购(邮发代码 52-297) 或直接向编辑部邮购。

本刊从 2014 年 5 期起, 刊发的所有文章在纸质版出版前一月左右, 均已在“中国知网(www.cnki.net) ”上优先数字出版, 详情请登陆中国知网查询。