

[文章编号] 1000-1182(2010)01-0087-05

过表达外源性Notch1对舌鳞癌细胞体外生长及表皮生长因子受体表达的影响

黄红杰¹ 平飞云² 胡济安³ 赵士芳⁴

(1.杭州师范大学附属医院 口腔科, 浙江 杭州 310015; 2.浙江大学附属第二医院 口腔科, 浙江 杭州 310008; 3.浙江大学附属口腔医院 口腔病理科; 4.口腔颌面外科, 浙江 杭州 310006)

[摘要] 目的 研究过表达外源性Notch1对人舌鳞癌细胞体外生长及表皮生长因子受体(EGFR)表达的影响。方法 用脂质体将编码Notch1胞内域的表达质粒体外转染人舌鳞癌细胞系Tca8113细胞, 用甲基噻唑基四唑法(MTT)和流式细胞仪分别检测细胞增殖活性和凋亡情况, 用逆转录聚合酶链式反应和Western blot检测Notch1和EGFR的mRNA和蛋白的变化, 用免疫细胞化学检测EGFR蛋白的表达。结果 转染后Tca8113细胞的增殖活性降低($P<0.05$), 细胞凋亡率增高($P<0.05$), Notch1表达上调($P<0.05$), 而EGFR表达下调($P<0.05$)。结论 体外过表达外源性Notch1抑制人舌鳞癌细胞增殖, 诱导其凋亡, 并下调其表皮生长因子受体的表达。

[关键词] Notch1; 表皮生长因子受体; 舌鳞状细胞癌

[中图分类号] R 739.8 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.01.023

Study on the effects of overexpression of exogenous Notch1 in tongue squamous cell carcinoma cells on cell growth and expression of epidermal growth factor receptor *in vitro* HUANG Hong-jie¹, PING Fei-yun², HU Ji-an³, ZHAO Shi-fang⁴. (1. Dept. of Stomatology, The Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou 310015, China; 2. Dept. of Stomatology, The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310008, China; 3. Dept. of Oral Pathology, The Affiliated Stomatology Hospital, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China; 4. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Stomatology Hospital, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of overexpression of exogenous Notch1 in human tongue squamous cell carcinoma(TSCC) cells on cell growth and expression of epidermal growth factor receptor(EGFR) *in vitro*. **Methods** Human TSCC cell line Tca8113 cells were transiently transfected with the eukaryotic expression plasmid pRAMIC-IRES2-EGFP encoding exogenous intracellular fragment of Notch1 and control plasmid pIRES2-EGFP by Lipofectamine™ 2000, respectively. Untransfected parental Tca8113 cells served as control. The cell proliferation was evaluated by methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay. The apoptosis was assessed by flow cytometry. The mRNA and protein levels of Notch1 and EGFR in Tca8113 cells were detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. The expression of EGFR protein in Tca8113 cells was detected by immunocytochemistry. **Results** MTT assay showed that the cell proliferation of Tca8113 cells transfected with pRAMIC-IRES2-EGFP was significantly inhibited as compared with controls($P<0.05$). After transfected with pRAMIC-IRES2-EGFP for 48 h, the apoptosis rate of Tca8113 cells was significantly higher than those of Tca8113 cells transfected with pIRES2-EGFP and untransfected Tca8113 cells($P<0.05$), and Notch1 expression was significantly increased at mRNA($P<0.05$) and protein($P<0.05$) levels, while EGFR expression was significantly decreased at mRNA($P<0.05$) and protein($P<0.05$) levels. **Conclusion** Overexpression of exogenous Notch1 may inhibit cell growth and down-regulate EGFR expression in TSCC cells.

[Key words] Notch1; epidermal growth factor receptor; tongue squamous cell carcinoma

[收稿日期] 2009-07-20; [修回日期] 2009-10-27

[基金项目] 浙江省自然科学基金资助项目(Y206192); 浙江省教育厅科研基金资助项目(20061057)

[作者简介] 黄红杰(1968—), 男, 浙江人, 副教授, 博士

[通讯作者] 赵士芳, Tel: 0571-87217218

Notch信号途径的主要受体为Notch1, 其是否具有促癌或抑癌作用取决于肿瘤的组织来源和细胞类型^[1-2], 在舌癌中的作用尚未明确。表皮生长因子受

体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在舌癌等多种上皮性肿瘤中过表达,具有促癌作用^[3-4]。近年来的研究^[5-7]表明,Notch1和EGFR信号途径在许多肿瘤中存在交互作用,共同调控细胞增殖和分化。本课题组在以前的实验中检测了舌癌标本中Notch1和EGFR的表达,推测Notch1在舌癌中起抑癌作用并与EGFR可能存在交互作用。本实验将在人舌鳞癌Tca8113细胞中进一步探讨过表达外源性Notch1对细胞体外生长和EGFR表达的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

RPMI1640培养基、TRIzol溶液(Gibco公司,美国),脂质体Lipofectamine™ 2000(Invitrogen公司,美国),甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)(Sigma公司,美国),Taq DNA聚合酶、逆转录酶M-MLV(Promega公司,美国),一抗Notch1(sc-6014)、EGFR(sc-03)、β-actin(sc-47778)(Santa Cruz公司,美国),ECL试剂盒(Pierce公司,美国),SP免疫细胞化学试剂盒(北京中杉公司)。

1.2 细胞培养

Tca8113细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所,用含有10%胎牛血清的RPMI1640培养基在含5% CO₂的37 °C恒温培养箱中常规传代培养。

1.3 体外基因转染

编码Notch1胞内域的真核表达质粒pRAMIC-IRES2-EGFP和对照质粒pIRES2-EGFP由第四军医大学基础医学院医学遗传和发育系张萍惠赠。采用Lipofectamine™ 2000进行体外基因转染,按产品说明书操作。实验分3组:目的质粒转染组、对照质粒转染组和未转染组。细胞培养于6孔板中,转染日细胞密度为80%~90%。以OPTI-MEM 无血清培养基分别稀释质粒和脂质体,室温孵育5 min后,将上述2组分别轻柔混合,室温下孵育20 min,将混合液加入细胞中,37 °C下继续培养。转染8 h后开始用荧光倒置显微镜观察并计算转染效率。在高倍镜下随机选择5个视野计数细胞,按发生绿色荧光的细

胞数占细胞总数的百分比评估转染效率。转染48 h后收集每组细胞,用RT-PCR和Western blot分别检测Notch1和EGFR的mRNA和蛋白的相对水平。

1.4 MTT法检测细胞增殖

取对数生长期Tca8113细胞接种于96孔板中,每孔100 μL(细胞密度为每孔2.5×10⁴个),37 °C、5% CO₂培养箱孵育,过夜后分别用上述方法转染目的质粒和对照质粒,未转染细胞作为阴性对照,完全培养基作为空白对照。分别于转染后1~4 d每天采用MTT法检测细胞增殖活性,每一时间点设3个复孔。每孔加入10 mg·mL⁻¹ MTT溶液10 μL,37 °C、5% CO₂饱和湿度下孵育4 h,吸弃孔内培养液,加入二甲基亚砷150 μL,室温振荡10 min。酶标仪检测490 nm处光密度值。以时间为横坐标、光密度值为纵坐标绘制细胞增殖曲线。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

转染48 h后,收集目的质粒转染组、对照质粒转染组和未转染组细胞,1 000 r·min⁻¹离心5 min,弃上清,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(pH=7.4)洗1次。用70%冰乙醇1 mL于-20 °C下固定过夜。上机前离心,弃乙醇,PBS洗2次。加RNase A(终浓度为0.05 g·L⁻¹)10 μL、碘化丙啶250 μL(终浓度为25 μg·mL⁻¹)、PBS 240 μL,混合后室温避光染色0.5 h。流式细胞仪(BD公司,美国)检测细胞凋亡。

1.6 RT-PCR检测

转染48 h后,分别用TRIzol试剂提取目的质粒转染组、对照质粒转染组和未转染组细胞总RNA,总RNA浓度和纯度用紫外分光光度计测定。各取2 μg总RNA,用M-MLV进行逆转录,再取等体积cDNA模板进行RCR扩增,β-actin作为内参照。反应条件:预变性94 °C 3 min,变性94 °C 40 s、退火55 °C 30 s、延伸72 °C 60 s,共30个循环,经72 °C 5 min,至4 °C。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶作电泳,用凝胶电泳显像系统(Bio-Rad Laboratories公司,美国)分析。PCR引物见表1。

表 1 目的基因PCR引物序列及扩增长度

Tab 1 List of primers used for RT-PCR with corresponding amplicon sizes

基因	编号	上游引物	下游引物	扩增长度/bp
Notch1	AF308602	5'-ACAGCCTCAACGGGTACAAG-3'	5'-GGCAGACACAGGAGAAGCTC-3'	378
EGFR	NM005228.3	5'-GCATGACCACGGAGGATAGT-3'	5'-ACCACTGGAATCAAGCATCC-3'	492
β-actin	AK223055.1	5'-GATCATTGCTCCTCTGAGC-3'	5'-CACCTTCACCGTTCAGTTT-3'	306

1.7 Western blot检测

转染48 h后,分别用三去污剂法提取目的质粒

转染组、对照质粒转染组和未转染组细胞总蛋白,用Bradford法测定蛋白浓度,各取50 μg蛋白上样。

其操作步骤简述如下：蛋白经SDS-PAGE 60 V电泳1.5 h后转移至聚偏氟乙烯膜，5%脱脂奶粉37℃下封闭1 h，一抗4℃过夜，相应二抗(1:3 000)37℃孵育1 h，ECL试剂盒化学发光后曝光成像。一抗Notch1、EGFR的工作浓度为1:200。β-actin(1:500)作为内参。用BandScan5.0软件进行灰度扫描分析蛋白相对水平。

1.8 免疫细胞化学检测

细胞接种前在6孔板底铺盖玻片，按上述方法培养细胞并基因转染。于转染48 h后吸去液体，PBS轻洗、吸干；用4℃纯丙酮固定5 min，PBS轻洗5 min×3、吸干。按SP法免疫细胞化学试剂盒操作步骤进行。鼠抗人EGFR单克隆抗体工作浓度为1:100。用PBS代替一抗作为阴性对照。阳性标准为光镜下细胞膜及细胞质有棕黄色颗粒状染色，背景清晰；反之，细胞膜及细胞质无棕黄色颗粒染色，则为阴性标准。

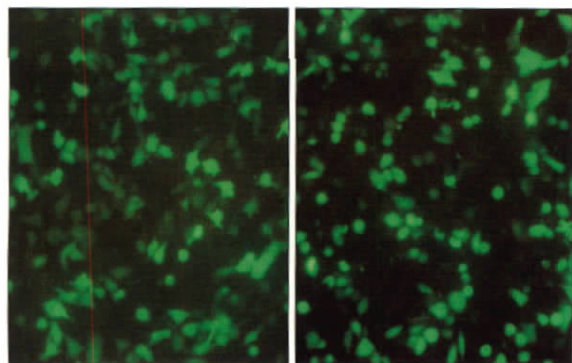
1.9 统计学处理

应用SPSS 12.0软件进行统计学分析，组间差异比较用*t*检验和方差分析，*P*<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因转染结果

质粒转染Tca8113细胞8 h后，在荧光倒置显微镜下可观察到少量绿色荧光表达细胞，24 h后表达量明显增加，48 h后达到高峰。转染24 h后，目的质粒pRAMIC-IRES2-EGFP和对照质粒pIRES2-EGFP的转染效率分别为69.8%和67.3%(图1)。



左：目的质粒转染组；右：对照质粒转染组。

图1 Tca8113细胞质粒转染24 h后转染效率 荧光倒置显微镜 ×400

Fig 1 Transfection rates of the plasmids in Tca8113 cells fluorescent inverted microscope ×400

2.2 基因转染后Tca8113细胞增殖的变化

瞬时转染编码Notch1胞内域的表达质粒后，Tca8113细胞增殖受到明显抑制(*P*<0.05)，对照质粒转染后则无明显抑制效应(*P*>0.05)(图2)。

2.3 基因转染后Tca8113细胞凋亡率的变化

转染48 h后，流式细胞仪检测显示，目的质粒转染组、对照质粒转染组、未转染组的细胞凋亡率分别为19.51%±4.12%、2.63%±0.78%、2.55%±0.69%。与对照质粒转染组和未转染组相比，目的质粒转染组的细胞凋亡率增高(*P*<0.05)，对照质粒转染组与未转染组之间差异无统计学意义(*P*>0.05)。

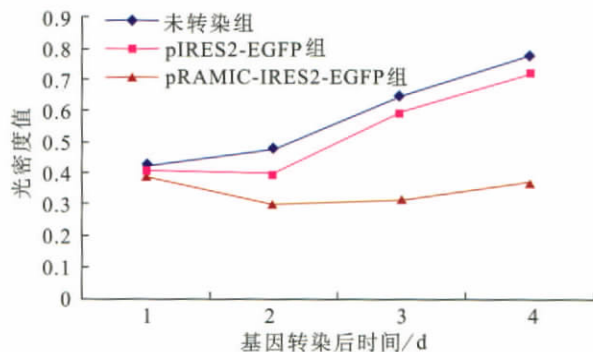
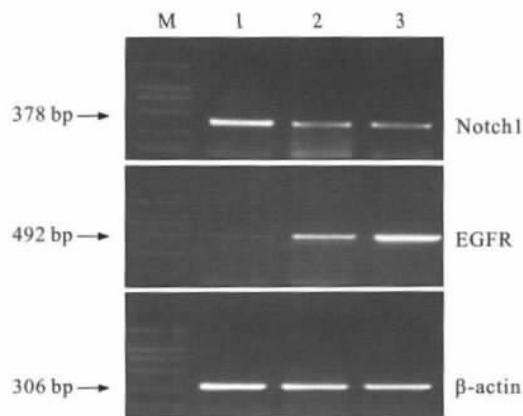


图2 MTT法检测Tca8113细胞增殖

Fig 2 The cell proliferation of Tca8113 cells evaluated by MTT assay

2.4 基因转染后Tca8113细胞Notch1和EGFR表达的变化

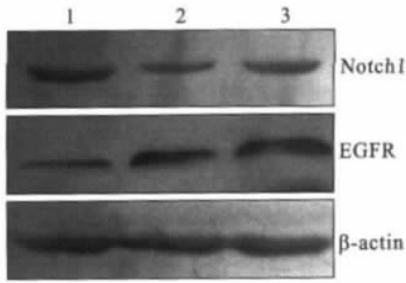
瞬时转染48 h后，目的质粒转染组、对照质粒转染组和未转染组细胞的Notch1的mRNA和蛋白的相对水平分别为1.102±0.135和0.976±0.103、0.243±0.032和0.136±0.028、0.265±0.039和0.138±0.029，EGFR的mRNA和蛋白的相对水平分别为0.083±0.009和0.079±0.008、0.605±0.075和0.554±0.067、0.915±0.115和0.813±0.091(均以β-actin作为内参)。质粒转染后48 h，RT-PCR检测Tca8113细胞的Notch1和EGFR的mRNA表达见图3、4。



M: DNA Marker DL2000; 1: 质粒pRAMIC-IRES2-EGFP转染组; 2: 对照质粒pIRES2-EGFP转染组; 3: 未转染质粒组。

图3 质粒转染后48 h，RT-PCR检测Tca8113细胞的Notch1和EGFR的mRNA表达

Fig 3 The mRNA levels of Notch1 and EGFR in Tca8113 cells were detected by RT-PCR



1: 质粒pRAMIC-IRES2-EGFP转染组; 2: 对照质粒pIRES2-EGFP转染组; 3: 未转染质粒组。

图4 质粒转染后48 h, Western blot检测Tca8113细胞的Notch1和EGFR的蛋白表达

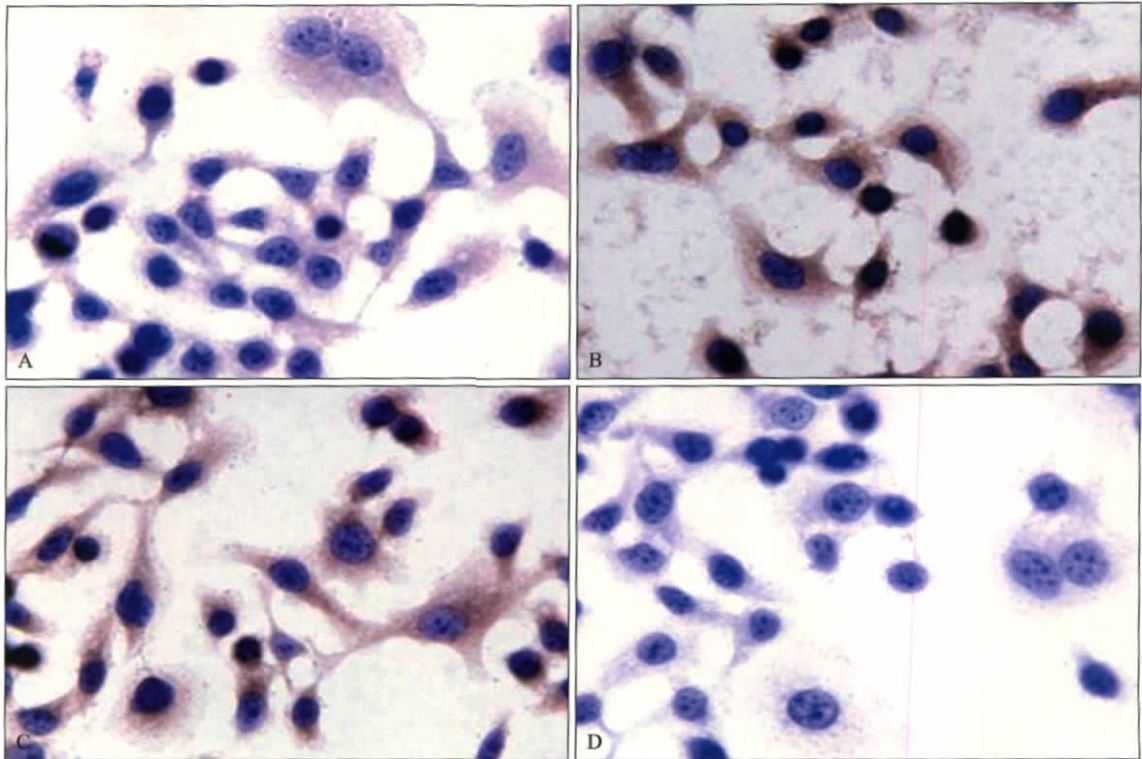
Fig 4 The protein levels of Notch1 and EGFR in Tca8113 cells were detected by Western blot

与未转染组相比, 目的质粒转染组的Notch1的mRNA和蛋白分别上调3.2倍和6.1倍, EGFR的mRNA

和蛋白则下调10.0倍和9.3倍。目的质粒转染组与对照质粒转染组和未转染组相比, Notch1的mRNA和蛋白的表达上调($P < 0.05$), 而EGFR的mRNA和蛋白的表达下调($P < 0.05$); 对照质粒转染组与未转染组相比, Notch1的mRNA和蛋白的表达差异无统计学意义($P > 0.05$), EGFR mRNA和蛋白的表达稍有下调, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)(图3、4)。

2.5 基因转染后Tca8113细胞EGFR蛋白表达的变化

Tca8113细胞在转染编码Notch1胞内域的表达质粒48 h后, 与对照质粒转染组和未转染组相比, EGFR蛋白的阳性表达率下降, 染色强度明显降低, 而对照质粒转染后对Tca8113细胞EGFR蛋白表达无明显影响(图5)。



A: 质粒pRAMIC-IRES2-EGFP转染组; B: 对照质粒pIRES2-EGFP转染组; C: 未转染质粒组; D: PBS代替一抗的阴性对照。

图5 质粒转染48 h后, Tca8113细胞EGFR蛋白的表达 SP ×400

Fig 5 The expression of EGFR protein in Tca8113 cells was detected by immunocytochemistry SP ×400

3 讨论

Notch信号途径通过相邻细胞膜上的受体-配体间相互作用而被激活, 在哺乳动物细胞增殖、分化和凋亡等命运决定中起关键作用, 其异常调控可引起肿瘤等多种疾病的发生^[8-10]。现已明确, Notch信号途径的主要受体Notch1在大多数组织中维持细胞未分化或保持干细胞状态、促进细胞增殖^[8-10], 但在皮肤等组织中Notch1诱导细胞分化^[11-12]。Notch1在许多肿瘤中存在异常表达。在人低分化乳腺癌^[13]和急

性T淋巴细胞白血病^[13]中, Notch1过表达起促癌作用。在皮肤癌^[11-12]和晚期宫颈癌^[13]中, Notch1表达下调起抑癌作用。舌癌是最常见的口腔癌, 起源于舌黏膜上皮基底层中部分角质形成细胞。本课题组在以前的实验中通过免疫组化首次检测了正常舌黏膜和舌鳞癌标本中Notch1的表达。在正常舌黏膜中, Notch1的阳性表达主要位于角化层及部分颗粒层和棘层细胞, 基底层细胞无表达。这一结果与Notch1在皮肤中的表达相似, 提示Notch1在正常舌黏膜中诱导细胞分化。在舌鳞癌标本中, Notch1主要表达

于癌巢中鳞状化生的角化细胞及类棘层细胞，癌巢周边细胞则无Notch1表达。这一结果与Notch1在皮肤癌^[11-12]和宫颈癌^[13]中的表达相似。本实验中，通过基因转染上调Tca8113细胞Notch1的表达，抑制细胞增殖，并诱导细胞凋亡。这一结果与Duan等^[14]报道的一致。上述结果提示，Notch1在舌鳞癌中可能起抑癌作用，外源性过表达Notch1抑制舌鳞癌细胞生长。

Notch1抑癌作用的分子机制尚未明确，抗细胞增殖效应和诱导细胞凋亡作用可能是其中的重要机制。研究^[13]发现，外源性过表达Notch1在小细胞肺癌和肝癌细胞系中引起细胞p21^{waf1/Cip1}和p27^{kip1}的上调，导致G₀/G₁细胞周期停止，抑制细胞增殖，且在肝癌细胞系中引起细胞p53的明显上调而诱导细胞凋亡，在皮肤癌^[11-12]中则下调β-连环蛋白的表达而抑制细胞增殖。Duan等^[14]同样发现，外源性过表达Notch1可能通过下调Wnt/β-catenin信号而抑制舌鳞癌细胞体外增殖并诱导其凋亡。

Notch1和EGFR信号通路在不同肿瘤中存在相互协同或拮抗的交互作用^[5-7]，共同调控细胞增殖和分化。本课题组在以前的实验中发现，EGFR在舌鳞癌标本中的表达与Notch1的明显不同，EGFR表达的部位，Notch1失表达，反之亦然。本实验首次发现，Tca8113细胞在瞬时转染编码Notch1胞内域的表达载体后，在上调Notch1的同时，明显下调EGFR表达。上述结果提示，Notch1和EGFR信号途径可能在舌鳞癌中存在交互拮抗作用，共同调控细胞增殖和分化。EGFR信号途径维持正常皮肤和黏膜细胞的未分化状态，在皮肤癌和舌癌中持续激活，促进细胞增殖，起促癌作用^[3-4,15]。而Notch1在皮肤和黏膜中促进细胞分化，在皮肤癌和舌癌中下调而起抑癌作用。因此，舌鳞癌标本及Tca8113细胞中Notch1的下调和EGFR的上调，可能与促进癌细胞增殖有关，而在鳞状化生部分Notch1的上调和EGFR的下调，可能是癌细胞分化的标志。

Notch1和EGFR交互作用的内在机制目前仍不清楚。最新研究表明，p53可能介导二者的交互作用。在神经胶质瘤细胞中，Notch1和EGFR均过表达，p53作为EGFR启动子的激活子介导Notch1对EGFR的正向调控，抑制Notch1的表达，则下调p53表达，同时下调EGFR的表达，而外源性过表达Notch1，则上调p53表达，同时上调EGFR的表达，二者相互协同促进细胞增殖^[7]。在皮肤癌细胞中，Notch1和EGFR

相互拮抗，EGFR信号通路通过下调p53基因的转录而负向调节其靶基因Notch1的表达，抑制细胞分化，维持增殖状态^[6]。舌癌与皮肤癌一样均属于角质形成细胞来源的肿瘤，p53是否介导舌鳞癌细胞中EGFR对Notch1的负向调节目前仍不清楚。但本实验发现，舌鳞癌细胞中存在Notch1对EGFR的负向调节，p53是否参与其中值得进一步探讨。

【参考文献】

- [1] Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: Oncogene or tumor suppressor[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(10): 756-767.
- [2] Weng AP, Aster JC. Multiple niches for Notch in cancer: Context is everything[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2004, 14(1): 48-54.
- [3] Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(17): 2666-2672.
- [4] Hiraishi Y, Wada T, Nakatani K, et al. Immunohistochemical expression of EGFR and p-EGFR in oral squamous cell carcinoma[J]. *Pathol Oncol Res*, 2006, 12(2): 87-91.
- [5] Sundaram MV. The love-hate relationship between Ras and Notch[J]. *Genes Dev*, 2005, 19(16): 1825-1839.
- [6] Kolev V, Mandinova A, Guinea-Viniegra J, et al. EGFR signaling as a negative regulator of Notch1 gene transcription and function in proliferating keratinocytes and cancer[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(8): 902-911.
- [7] Purow BW, Sundaesan 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] Miele L. Notch signaling[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(4): 1074-1079.
- [9] Lai EC. Notch signaling: Control of cell communication and cell fate[J]. *Development*, 2004, 131(5): 965-973.
- [10] Bianchi S, Dotti MT, Federico A. Physiology and pathology of notch signalling system[J]. *J Cell Physiol*, 2006, 207(2): 300-308.
- [11] Lefort K, Dotto GP. Notch signaling in the integrated control of keratinocyte growth/differentiation and tumor suppression[J]. *Semin Cancer Biol*, 2004, 14(5): 374-386.
- [12] Nicolas M, Wolfer A, Raj K, et al. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin[J]. *Nat Genet*, 2003, 33(3): 416-421.
- [13] Leong KG, Karsan A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis[J]. *Blood*, 2006, 107(6): 2223-2233.
- [14] Duan L, Yao J, Wu X, et al. Growth suppression induced by Notch1 activation involves Wnt-beta-catenin down-regulation in human tongue carcinoma cells[J]. *Biol Cell*, 2006, 98(8): 479-490.
- [15] Normanno N, De Luca A, Bianco C, et al. Epidermal growth factor receptor(EGFR) signaling in cancer[J]. *Gene*, 2006, 366(1): 2-16.

(本文编辑 汤亚玲)