

# 过度活化Notch1信号促进肾癌细胞增殖的机制研究



许乐, 林宗明, 朱煜, 王国民

**Proliferative Role of Notch1 Signaling in Renal Cell Carcinoma**

XU Le, LIN Zongming, ZHU Yu, WANG Guomin

Department of Urology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Corresponding Author: LIN Zongming, E-mail: zongminglin@gmail.com

**Abstract: Objective** To explore the proliferative role of over-activated Notch1 signaling in renal cell carcinoma and the underlying mechanism. **Methods** The expression of Notch1 in 120 renal cell carcinoma (RCC) patients was evaluated immunohistochemically and compared with clinicopathological characteristics. RCC cell line ACHN was used in functional experiments to analyze the proliferative role of Notch1 signaling in renal cell carcinoma and its collaboration with PI3K/Akt pathway by Western blot. **Results** There were 64 cases of high expression of Notch1 in 120 cases of clear cell carcinoma of kidney tissue specimens. Higher expression of Notch1 was detected in larger tumors (diameter  $\geq 7$ cm) compared with smaller ones (diameter  $< 7$ cm) significantly ( $P = 0.005$ ), and was also detected in advanced tumors (TNM III ~ IV stage) compared with localized ones (TNM I ~ II stage) insignificantly ( $P = 0.062$ ). **Conclusion** Identification of the growth-promoting effect of Notch1 signaling and the underlying mechanism provides potential therapeutic targets for the treatment of RCC.

**Key words:** Renal cell carcinoma; ACHN; Notch1; Proliferation

**摘要: 目的** 研究Notch1信号过度活化对肾癌细胞增殖的影响及其可能的分子机制。**方法** 首先应用免疫组织化学法检测120例肾透明细胞癌患者的肿瘤组织中Notch1的表达水平,并结合患者的临床病理特征进行比较。然后在肾癌细胞系ACHN中开展体外的机制和功能研究。用Western blot检测Notch1过度活化对PI3K/Akt信号通路的调控。并进一步分析Notch1和PI3K/Akt信号通路对细胞增殖和细胞周期的影响。**结果** 120例肾透明细胞癌组织标本中,有64例高表达Notch1,占53.3%。Notch1在直径 $\geq 7$ cm的肿瘤中的表达强度要高于直径 $< 7$ cm的肿瘤( $P = 0.005$ )。与局限期(TNM I ~ II)肾癌相比,进展期(TNM III ~ IV期)肾癌有高表达Notch1的趋势( $P = 0.062$ )。**结论** 肾癌细胞中过度活化的Notch1信号,通过上调PI3K/Akt信号通路的活性,加快了肿瘤细胞的增殖,进而促进肾癌的发生、发展。该发现提供了一种可能的肾透明细胞癌发生的新机制和潜在分子药靶。

**关键词:** 肾细胞癌; ACHN; Notch1; 增殖

中图分类号: R737.11 文献标识码: A

## 0 引言

肾细胞癌 (renal cell carcinoma, RCC) 简称肾癌, 占成人恶性肿瘤的2% ~ 3%<sup>[1]</sup>。肾透明细胞癌 (clear cell RCC, ccRCC) 起源于肾近曲小管上皮, 是肾癌中最常见的病理类型, 约占总数的60% ~ 70%<sup>[1]</sup>; 因此, 对肾透明细胞癌的研究也最为深入和广泛。VHL综合征可表现为家族性

肾透明细胞癌。通过对VHL综合征患者进行分子遗传学研究, 发现了VHL抑癌基因。目前研究已证实VHL基因异常在家族性和散发性肾透明细胞癌的发病中都起着关键作用。但是有一部分患者 (30% ~ 40%) 并不存在VHL基因突变, 表明有其他机制参与肾癌的发生<sup>[2]</sup>。研究发现Notch、PI3K/Akt等信号通路的异常活化在肾癌的发生中也起到重要作用<sup>[3-4]</sup>。

Notch信号通路由配体-受体结合诱导的蛋白水解所触发, 经两步剪切从细胞膜上释放活性的Notch活性片段ICN (intracellular domain of Notch) 并转入核内, 调节下游靶基因的表达, 从而参与一系列细胞过程<sup>[5-6]</sup>。本课题以肾透明细

收稿日期: 2013-09-02; 修回日期: 2013-10-23

作者单位: 200032 上海, 复旦大学附属中山医院泌尿外科

通信作者: 林宗明, E-mail: zongminglin@gmail.com

作者简介: 许乐 (1982-), 男, 博士, 住院医师, 主要从事泌尿系统肿瘤的基础与临床研究

胞癌的临床标本和细胞系为研究对象,运用分子生物学和细胞生物学的方法,探讨Notch1信号过度活化对肾癌细胞增殖的影响及其可能的分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 免疫组织化学染色法

石蜡切片60℃烘烤2 h,常规二甲苯脱蜡,梯度酒精入水;3%新鲜双氧水避光孵育10 min灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水洗涤;微波修复抗原;滴加一抗(1:100),4℃过夜,PBS洗涤3次,滴加辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,室温孵育30 min后,PBS洗涤3次,DAB显色,苏木精对比染色,酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。每组切片均以PBS代替一抗作为阴性对照,以已知阳性片作阳性对照。

### 1.2 免疫组织化学结果判断

采用半定量的方法,根据免疫组织化学染色强度及阳性细胞的数量分别记分。染色强度不着色为0分,浅棕黄色为1分,棕黄色为2分,深褐色为3分。阳性细胞百分率<5%为0分,5%~10%为1分,>10%~50%为2分,>50%为3分。两项指标之和0~1分为(-),2分为(+),3~4分为阳性(++),5~6分为强阳性(+++)(-)和(+)归为低表达组,(++)和(+++)归为高表达组,并以此为分组依据,结合患者的临床病理参数进行统计分析。所有组织切片由两位病理科医生进行独立盲检。当评分结果不一致时,则请两位医生共同读片,以达成一致。

### 1.3 抗体和试剂

本研究中使用的抗体包括:鼠抗人Notch1单克隆抗体(美国Abcam公司)、兔抗人ICN1单克隆抗体(美国Cell Signaling Technology公司)、兔抗人pAkt(Ser473)单克隆抗体(美国Cell Signaling Technology公司)、兔抗人tAkt单克隆抗体(美国Cell Signaling Technology公司)、鼠抗人PCNA单克隆抗体(美国BD公司)和鼠抗人GAPDH单克隆抗体(美国Santa Cruz Biotechnology公司)。pcDNA3-ICN1质粒由美国Jon C. Aster博士惠赠。PI3K抑制剂LY-294002(美国Sigma-Aldrich公司)溶解于有机溶剂DMSO中。

### 1.4 细胞培养

人肾透明细胞癌细胞系ACHN购自中科院上海细胞库。ACHN细胞生长于含有10%胎牛血清的DMEM培养液中(含100 u/ml青霉素和50 μg/ml链霉

素),37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的温箱中培养。2~3天传代一次。细胞生长状态良好,取对数生长期的细胞进行实验。

### 1.5 细胞分组及处理

将对数生长期的ACHN细胞均匀接种在6孔板中,每孔细胞数为 $2.5 \times 10^5$ ,分为4组:Con组(对照组,转染pcDNA3空载质粒)、ICN1组(转染pcDNA3-ICN1质粒)、ICN1+LY组(转染pcDNA3-ICN1质粒同时用25 μM的LY-294002处理)和ICN1+DMSO组(转染pcDNA3-ICN1质粒同时用等量DMSO处理)。将细胞置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养48 h后进行相关检查。

### 1.6 Western blot检测

分别提取上述4组细胞的蛋白并测浓度。取等量蛋白,用5%的浓缩胶和10%的分离胶行SDS-PAGE电泳。电泳完成后,电转移法将蛋白质转移到PVDF膜。5%脱脂奶粉的TBST封闭PVDF膜。加一抗(1:1 000),4℃过夜。TBST洗涤3次。加二抗(1:2 000),室温孵育2 h。TBST洗涤3次。PVDF膜用ECL化学发光试剂于暗室中显影并感光胶片。

### 1.7 CCK-8检测细胞增殖

将上述4组细胞每孔100 μl(含104个细胞)接种于96孔板中。分别于接种后0、12、24和48 h,加入10 μl的CCK-8试剂(日本Dojindo公司),在细胞培养箱继续孵育1 h,于酶标仪上测定450 nm波长的光吸收度并记录数据。每组细胞的每个时间点设3个平行孔。

### 1.8 流式细胞术检测细胞周期

将上述4组细胞(每组 $2 \times 10^6$ 个细胞)制成单细胞悬液,4%的多聚甲醛固定。每管加入含0.2% Triton X-100和1% BSA的PBS约1 ml,冰上静置5 min。PBS洗涤3次。用含50 μg/ml碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)、0.05% Triton X-100、37 μg/ml EDTA和100 u/ml核糖核酸酶的溶液染色30 min。BD FACSCalibur流式细胞仪检测细胞周期。

### 1.9 统计学方法

所有统计学处理均由Stata8.0统计软件完成。分类变量的比较时,采用卡方检验;连续变量的比较时,采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肾癌组织中Notch1的表达水平与临床病理特征之间的相关性分析

应用免疫组织化学法检测120例肾透明细胞

癌组织中Notch1的表达水平。肾癌组织的Notch1阳性表达主要位于肿瘤细胞的胞膜,可呈现完整的胞膜形态,胞质亦有不同程度表达,染色呈灶状或弥漫分布,深度不一,从浅棕黄色到深褐色,见图1。120例肾透明细胞癌组织标本中,有64例高表达Notch1,占53.3%。Notch1的表达在不同年龄和性别的患者中没有显著差异( $P = 0.310$ ,  $P = 0.242$ )。Notch1在直径 $\geq 7$ cm的肿瘤中的表达强度要高于直径 $< 7$ cm的肿瘤( $P = 0.005$ )。与局限期(TNM I ~ II)肾癌相比,进展期(TNM III ~ IV期)肾癌有高表达Notch1的趋势( $P = 0.062$ )。但在不同分级的肾癌组织中,没有发现Notch1表达强度的差异( $P = 0.104$ ),见表1。上述结果提示,Notch1信号通路的活化可能参与肾癌的发生发展。

表1 Notch1表达与患者临床病理特征之间的关系( $n = 120$ )  
Table1 Correlation of Notch1 expression and clinicopathological characteristics of ccRCC patients ( $n = 120$ )

Characteristics	Number of patients (%)	Notch1 expression		$P^*$
		Low ( $n = 56$ )	High ( $n = 64$ )	
Age(year)				
<65	80 (66.7)	40	40	0.310
$\geq 65$	40 (33.3)	16	24	
Gender				
Male	77 (64.2)	39	38	0.242
Female	43 (35.8)	17	26	
Tumor size(cm)				
<7	91 (75.8)	49	42	0.005
$\geq 7$	29 (24.2)	7	22	
TNM stage				
I - II	104 (86.7)	52	52	0.062
III - IV	16 (13.3)	4	12	
Fuhrman grade				
1-2	88 (73.3)	45	43	0.104
3-4	32 (26.7)	11	21	

Notes: \*: $\chi^2$  test

## 2.2 肾透明细胞癌中Notch1信号异常活化参与调控PI3K/Akt信号通路

在ACHN细胞系中,通过质粒转染,过表达外源性的Notch1活性片段ICN1持续活化Notch1信号。Western blot检测ICN1、pAkt(磷酸化的Akt)、tAkt(总Akt)和PCNA(细胞增殖指标)的蛋白水平,结果提示Notch1信号过度活化后,pAkt、PCNA水平也随之上调;即Notch1信号的活化可以上调PI3K/Akt通路的活性,进而促进肾癌细胞的增殖,见图2。另外,在ACHN细胞中过表达ICN1的同时,应用PI3K抑制剂LY-294002(LY)抑制PI3K/Akt信号。Western blot的结果表明,LY-294002可以逆转Notch1信号对pAkt和PCNA水平的上调,见图2。因此,我们推测在肾透明细胞癌中,过度活化Notch1信号可能通过

PI3K/Akt信号通路来发挥促增殖的作用。

## 2.3 Notch1信号活化促进肾癌细胞的增殖

应用CCK-8的方法检测ACHN细胞的增殖水平,结果显示过表达外源性的ICN1活化Notch1信号后,ACHN细胞的增殖水平明显增加;同时用LY-294002处理,抑制PI3K/Akt信号通路,可以逆转该现象,见图3。因此,我们认为肾癌细胞中Notch1信号的活化可以促进肿瘤细胞的增殖;而这一作用可能是通过上调PI3K/Akt信号通路来实现的。

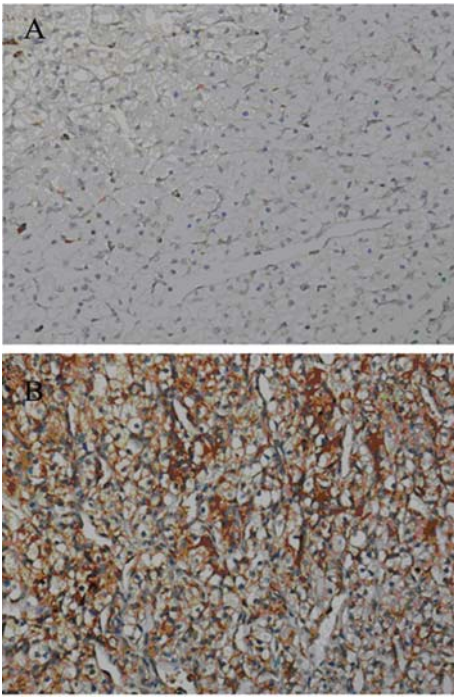
## 2.4 Notch1信号活化促进肾癌的细胞周期进展

为了进一步检测Notch1信号通路和PI3K/Akt信号通路对细胞增殖的影响,对ACHN细胞进行PI染色并用流式细胞术检测细胞周期的改变。结果显示过表达外源性的ICN1活化Notch1信号后,ACHN细胞处于S期(DNA合成期)的比例明显增多,即加快了 $G_1 \sim S$ 期的细胞周期进程;而阻断PI3K/Akt信号后可部分逆转该作用,见图4。细胞周期的实验结果和之前细胞增殖实验的结果一致,也进一步验证了我们的假设,即肾癌细胞中过度活化的Notch1信号,通过上调PI3K/Akt信号通路的活性,加快了肿瘤细胞的增殖,进而促进肾癌的发生、发展。

## 3 讨论

Notch信号通路是一个进化上保守的局部细胞信号转导机制,它参与细胞的分化、增殖、凋亡、黏附、上皮-间质转化、迁移和血管发生等诸多细胞过程<sup>[7]</sup>。在哺乳动物中,其受体家族包含四个I型跨膜受体(Notch1、Notch2、Notch3和Notch4),可与作为表达于邻近细胞表面五种配体分子(Jagged1、Jagged2、DLL1、DLL3和DLL4)特异性结合<sup>[8]</sup>。在本研究中,我们证实了在肾透明细胞癌中Notch1信号持续活化,并且Notch1信号通路的过度活化可能参与了肾癌的发生、发展。由于无限制的细胞增殖是肿瘤最显著的特征之一<sup>[9]</sup>,所以本研究着眼于探讨Notch1信号通路的过度活化和肿瘤细胞增殖之间的关系。

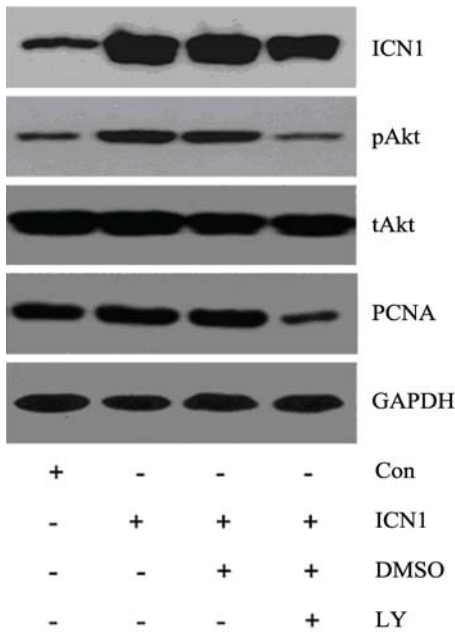
已有研究表明,PI3K/Akt信号通路主要参与调控细胞的增殖与存活,在多种恶性肿瘤中都处于过度激活状态,而且过度活化的PI3K/Akt信号在这些恶性肿瘤的发生中起着重要作用。在肾癌中,免疫组织化学研究表明,PI3K/Akt信号通路的活化状态与肿瘤的进展具有相关性;在进展期肾癌或者转移性肾癌中pAkt染色往往呈强阳性<sup>[10]</sup>。另外,不论



A: low Notch1 expression; B: high Notch1 expression

图1 Notch1在肾癌组织中的低表达和高表达 (免疫组织化学法, 标尺, 50μm)

Figure1 Representative images of low (A) and high (B) expression of Notch1 in clear cell RCC (ccRCC) tissues (IHC, Scale bars, 50 μm)



GAPDH was used as loading control; ACHN cells were transfected with pcDNA3 empty vector control (Con) and pcDNA3-ICN1 (ICN1) in the presence of DMSO or LY294002 (LY)

图2 Western blot检测各组细胞中ICN1、pAkt、tAkt、PCNA和GAPDH的蛋白水平

Figure2 Expressions of ICN1, pAkt, tAkt, PCNA and GAPDH in ACHN cells detected by Western blot

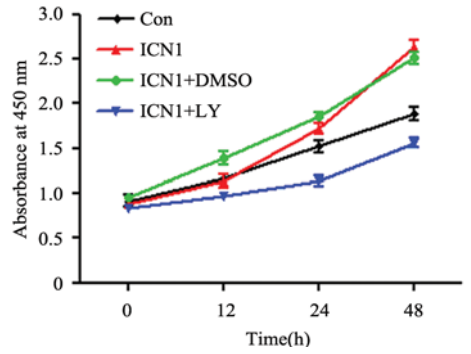
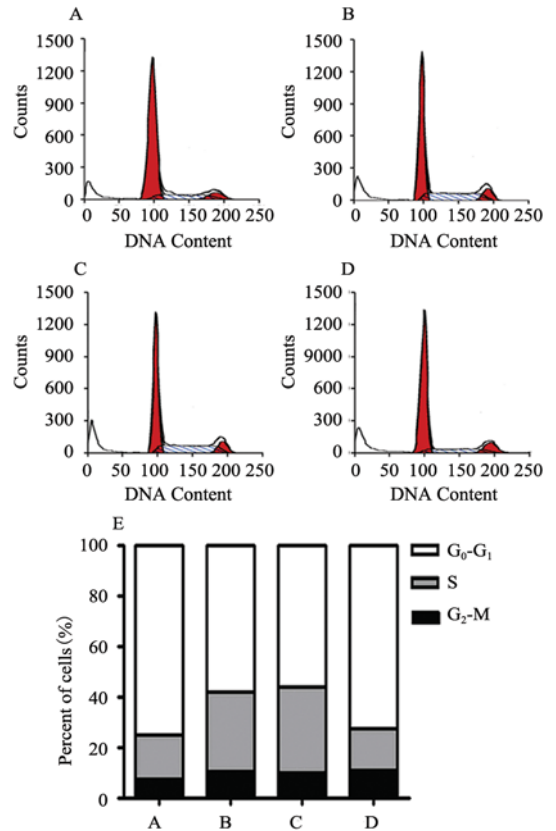


图3 CCK-8细胞增殖实验检测各组细胞的增殖水平

Figure3 Cell proliferation of each group evaluated by using CCK-8 tests



A: Con; B: ICN1; C: ICN1+DMSO; D: ICN1+LY

A-D: cell-cycle distribution was examined by PI staining and flow cytometry of the four groups of cells as described in Figure 2. E: the percentage of cells present in each phase of the cell cycle was shown in bar graph

图4 流式细胞术检测各组细胞的细胞周期分布

Figure4 Cell cycle phase distribution of each group detected by flow cytometry

VHL基因突变与否, 在多种肾癌细胞系中, PI3K/Akt信号均呈活化状态<sup>[4]</sup>。

在本研究中, 我们发现在肾癌中Notch1信号的促肿瘤作用是通过上调PI3K/Akt信号来实现的。而且, 在临床肾癌标本中证实了Notch1的表达水平与肿瘤的大小和分期之间具有相关性。

我们认为PI3K/Akt信号通路位于Notch1信号的下游,受Notch1信号的调控,但是我们并不能排除Notch1信号与其他参与调控细胞增殖与存活的信号通路之间的交互通话。虽然在其他肿瘤中也曾有过报道,Notch1信号可以参与调控PI3K/Akt信号通路,但是其调控的具体机制尚不明确<sup>[11]</sup>。在急性T淋巴母细胞白血病中,Notch1的活化可以抑制PTEN的表达。作为肿瘤抑制因子,PTEN可以抑制Akt的磷酸化,进而抑制肿瘤细胞的增殖、促进肿瘤细胞的凋亡。因此,在急性T淋巴母细胞白血病中,阻断Notch1信号通路可以起到很好的治疗效果<sup>[12]</sup>。是否在其他类型的肿瘤中也存在这种相互作用机制,这个问题仍然需要深入研究。

最近的一项研究表明,在乳腺癌中Notch1诱导的PI3K/Akt信号通路活化可能是通过肿瘤细胞自分泌释放的某种生长因子来实现的<sup>[13]</sup>。考虑到肾癌中,血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF- $\beta$ )、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、转化生长因子(transforming growth factor, TGF- $\beta$ )等细胞因子都参与了肾癌的发生、发展,而且这些生长因子都可以激活PI3K/Akt信号通路,所以很有可能类似的相互调控机制也存在于肾癌中。值得一提的是,研究发现在黑色素瘤中,Notch1信号位于PI3K/Akt信号通路的下游,受其调控<sup>[14]</sup>。因此,进一步明确Notch1信号通路和PI3K/Akt信号通路的相互作用成为我们今后工作的重点。

综上所述,肾透明细胞癌中存在Notch1信号异常活化,并且这种异常活化的Notch1信号可以通过激活PI3K/Akt信号促进肾癌细胞增殖和G<sub>1</sub>~S期的细胞周期进展,进而促进肾癌发生发展,该发现提供了一种可能的肾透明细胞癌发生的新机制和潜在分子药靶。

#### 参考文献:

- [1] Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal-cell carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 1996, 335(12):865-75.
- [2] Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(24):4991-5004.
- [3] Sjölund J, Johansson M, Manna S, *et al.* Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of Notch signaling in vitro and in vivo[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(1):217-28.
- [4] Sourbier C, Lindner V, Lang H, *et al.* The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: a new target in human renal cell carcinoma therapy[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(10):5130-42.
- [5] Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor?[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(10):756-67.
- [6] Ristorcelli E, Lombardo D. Targeting Notch signaling in pancreatic cancer[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2010, 14(5):541-52.
- [7] Roy M, Pear WS, Aster JC. The multifaceted role of Notch in cancer[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2007, 17(1): 52-9.
- [8] Gridley T. Kick it up a Notch: NOTCH1 activation in T-ALL[J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(5):431-2.
- [9] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer[J]. *Cell*, 2000, 100(1):57-70.
- [10] Horiguchi A, Oya M, Uchida A, *et al.* Elevated Akt activation and its impact on clinicopathological features of renal cell carcinoma[J]. *J Urol*, 2003, 169(2):710-3.
- [11] Palomero T, Sulis ML, Cortina M, *et al.* Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia[J]. *Nat Med*, 2007, 13(10): 1203-10.
- [12] Gutierrez A, Look AT. NOTCH and PI3K-AKT pathways intertwined[J]. *Cancer Cell*, 2007, 12(5):411-3.
- [13] Meurette O, Stylianou S, Rock R, *et al.* Notch activation induces Akt signaling via an autocrine loop to prevent apoptosis in breast epithelial cells[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(12):5015-22.
- [14] Bedogni B, Warneke JA, Nickoloff BJ, *et al.* Notch1 is an effector of Akt and hypoxia in melanoma development[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(11):3660-70.

[编辑校对: 周永红]