

## ·基础研究·

本文引用:向利军,贺翊峰,鲁才杰,陈伟强,郭亮,季明芳.siRNA干扰Notch1诱导肝癌细胞凋亡的机制研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(3):284-288.

## siRNA干扰Notch1诱导肝癌细胞凋亡的机制研究

向利军<sup>1,2</sup>,贺翊峰<sup>1</sup>,鲁才杰<sup>1</sup>,陈伟强<sup>3\*</sup>,郭亮<sup>4</sup>,季明芳<sup>5</sup>

(1.广东医科大学研究生学院,广东 湛江 524003,2.广东医科大学附属第一医院,广东 湛江 524001,3.中山市人民医院肝胆外科,广东 中山 528403,4.广东医科大学附属中山医院,广东 中山 528415,5.中山市肿瘤研究所,广东 中山 528403)

**〔摘要〕**目的 研究Notch1在肝癌组织及细胞中的表达并初步探讨Notch1下调后诱导肝癌细胞凋亡的机制。方法 2016年3月至2016年9月于广东医科大学附属第一医院肝胆外科收集32例肝癌病人样本,利用qRT-PCR方法检测肝癌组织及癌旁组织中Notch1基因的表达,免疫组化检测组织中Notch1蛋白表达,siRNA沉默肝癌细胞Notch1表达,流式细胞术检测细胞凋亡情况,Western blot方法检测Notch1、Bcl2和Bax蛋白表达,统计分析Notch1表达水平与肝癌病人临床诊断指标甲胎蛋白(AFP)的相关性。结果 肝癌组织标本中Notch1高表达率为71.9%(23/32),明显高于癌旁组织的28.1%(9/32),差异具有显著统计学意义( $P<0.01$ ); Pearson相关性分析显示,Notch1与AFP存在正相关性( $R^2=0.3376, P=0.0036$ );免疫组化验证Notch1蛋白分别在肝癌组织样本中高表达和癌旁组织中低表达;siRNA干扰Notch1基因表达后,镜下发现肝癌细胞4401增殖抑制,流式检测示转染组明显凋亡,蛋白免疫印迹显示凋亡相关蛋白Bcl2蛋白下调、Bax表达上调。结论 Notch1与肝癌的发生、发展相关,下调Notch1可诱导肝癌细胞凋亡,同时Notch1还可作为临床治疗肝癌的潜在新靶点。

**〔关键词〕** Notch1;甲胎蛋白;凋亡;肝癌 siRNA

**〔中图分类号〕** R735.7 **〔文献标志码〕** A **〔文章编号〕** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.03.013

## Mechanism of siRNA Targeting Notch1 on Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cells

XIANG Lijun<sup>1,2</sup>, HE Yifeng<sup>1</sup>, LU Caijie<sup>1</sup>, CHEN Weiqiang<sup>3\*</sup>, GUO Liang<sup>4</sup>, JI Mingfang<sup>5</sup>

(1 Postgraduate College of Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong 524003, China; 2. Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong 524001, China; 3. Department of Hepatobiliary Surgery, Zhongshan People's Hospital, Zhongshan, Guangdong 528403, China; 4. Affiliated Zhongshan Hospital of Guangdong Medical University, Zhongshan, Guangdong 528415, China; 5. Cancer Institute of Zhongshan, Zhongshan, Guangdong 528403, China.)

**〔Abstract〕 Objective** To investigate the expression of Notch1 in liver cancer specimens and explain the mechanism of induction of apoptosis by downregulating Notch1 expression. **Methods** The 32 tissue samples were obtained from Hepatobiliary Surgery of the Affiliated Hospital of Guangdong Medical College during March 2016 to September 2016. The expression of Notch1 gene in hepatocellular carcinoma and adjacent tissues was detected by qRT-PCR. The expression of Notch1 protein was detected by immunohistochemistry. The expression of Notch1, Bcl2 and Bax protein in siRNA was detected by Western blot. The cells were transfected Notch1 siRNA. Apoptosis was detected by flow cytometry. The correlation of Notch 1 expression with the clinical diagnostic index of alpha-fetoprotein (AFP) were revealed by statistical analysis. **Results** The

**〔收稿日期〕** 2017-11-15

**〔基金项目〕** 国家自然科学基金项目(81672098)。

**〔作者简介〕** 向利军,男,硕士,从事肝胆外科相关研究。

**〔通讯作者〕** \* 陈伟强,男,博士,E-mail: cwq20138@aliyun.com。

positive rate of Notch1 in tumor tissues was 71.9% (23/32) and negative rate was 28.1% (9/32), the difference was statistically significant ( $P<0.01$ ). Pearson correlation analysis showed that there was a positive correlation between Notch1 and AFP ( $R^2=0.3376$ ,  $P=0.0036$ ). Immunohistochemical results confirmed that Notch1 protein was positive in hepatocellular carcinoma tissues. The data indicated that knockout of Notch1 expression by siRNA would inhibit the proliferation and induce the apoptosis in 4401 cells. In addition, the expression of Bcl2 was attenuated and the expression of Bax was enhanced. **Conclusion** Notch1 is associated with the development and progression of HCC and the induction of Hepatocellular carcinoma cells apoptosis is driven by down-regulation of Notch1. Notch1 can be used as a potential new target for clinical treatment of hepatocellular carcinoma.

[**Keywords**] Notch1; alpha fetoprotein; apoptosis; hepatocellular carcinoma; siRNA

肝癌仍是严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一,虽然随着科技的发展及治疗手段的进步,肝癌病人的治疗取得一定的进展,但肝癌发生、发展机制仍不明确,而且肝癌高复发,高转移,导致肝癌患者总体预后仍然较差<sup>[1-2]</sup>。因此,探索肝癌发生、发展的机制及其临床治疗靶点对于肝癌的治疗及提高生存率具有积极的作用。研究发现 Notch1 与多种肿瘤的发生、发展相关,在乳腺癌、甲状腺癌、直肠癌中均发现 Notch1 明显高表达<sup>[3]</sup>。然而 Notch1 在肝癌发生发展中的作用及是否参与调控肝癌细胞凋亡并未见报道,本实验通过 qRT-PCR 方法检测肝癌组织及癌旁组织中 Notch1 基因的表达,siRNA 沉默 Notch1 表达后观察对肝癌细胞 4401 的影响,来探讨 Notch1 在肝癌发生发展及调控肝癌细胞凋亡机制中的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 临床样本

于 2016 年 3 月至 2016 年 9 月收集 32 例肝癌标本,肝癌及癌旁组织均取自广东医科大学附属医院肝胆外科手术切除标本,术后病理均为肝细胞肝癌,该实验符合广东医科大学伦理委员会标准且取得病人同意。

### 1.2 实验材料

Lipo 2000 和 DEPC 水购于美国 Invitrogen 公司;Trizol RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒购于大连宝生物工程公司;免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒购于北京中杉生物技术公司;Annexin V-FITC/碘化丙啶(propidium iodide, PI)细胞凋亡检测试剂盒购于杭州碧云天公司。Notch1(批号:3608S)、Bax(批号:5023S)、Bcl2(批号:3498S)和 GAPDH(批

号:2118L)多克隆抗体购于 Cell Signaling Technology 公司。

### 1.3 原代细胞培养

人肝癌 4401 细胞分离于肝癌病人手术后肝癌组织,组织用灭菌手术刀片切成 1 mm 见方小块,加含 20%胎牛血清和 100 单位/mL 双抗(青霉素 链霉素的 DMEM/F12 培养基,置 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度下培养 1 周,肝癌细胞从原组织块中伸出后生长,去除组块后传代培养,用于后续实验。细胞贴壁长满 80%传代,0.25%胰蛋白酶消化,每 2~3 天传代 1 次。实验选用对数期生长细胞。

### 1.4 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测

按照 Trizol 试剂盒方法提取对应癌与癌旁组织中总 RNA,逆转录为 cDNA,取 2 μL cDNA 模板配制 PCR 反应液上机,所检测 Notch1 上游为 5'-CC-CGTTCTTGAAATGTAGGCATC-3',下游 5'-TGTCTTCCCCAGAAAAGGGTA-3';18 s 上游 5'-CGGC GACGACCCATTCGAAC-3',下游 5'-GAATCGAACCC TGATTCCCCGTC-3',扩增条件为:95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 后延伸 10 s,10 μL 体系,40 个循环扩增。

### 1.5 免疫组化以及判定标准

收集手术切除的肝癌及癌旁组织,PBS 清洗标本用含 10%甲醛的福尔马林固定过夜,每例样本切取 1.0 cm×1.0 cm×0.5 cm 大小组织块,经脱水、透明处理后由石蜡包埋,将包埋的组织标本置于切片机上均匀快速并连续的切成 2~4 μm 左右的切片,展片后置于载玻片 1/3~2/3 交界处。采用免疫组织化学(SP)染色,经脱蜡、高温热抗原修复、封闭后滴加 Notch1 一抗(稀释比例 1:150)后 4 °C 孵育过夜,室温孵育二抗 1 h,最后由 DAB 显色,苏木精复染,封片。阳性表达率(%)=(Notch1 表达阳性的肿瘤细胞

数/所有肿瘤细胞数) $\times 100\%$ , 阳性表达率大于 10% 即为阳性, 小于 10% 为阴性。3 个独立观察者分别选取 5 个高倍镜下独立视野进行诊断。

### 1.6 Western-blot 方法检测蛋白含量

提取细胞总蛋白, 加入含 1 mol/L PMSF 的裂解液 200  $\mu\text{L}$  冰上裂解, 由 4  $^{\circ}\text{C}$  13 000 r/min 离心 10 min 后分别取上清液, 蛋白浓度经 BCA 法测定, 经 SDS-PAGE (8% 分离胶) 电泳, 转膜至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 洗膜, 二抗常温孵育 1 h, TBST 洗膜, 加入发光液曝光, 选取 GAPDH 蛋白作为内参。

### 1.7 siRNA 转染

实验分为对照组(Control)、脂质体转染组(si-NC)和 siRNA 转染组(si-N1)。按照 Lipo 2 000 试剂盒进行转染, 采用无双抗培养基培养细胞融合度为 90% 时进行转染, 50  $\mu\text{L}$  OPTI-MEM I 稀释 0.8  $\mu\text{g}$  DNA, 50  $\mu\text{L}$  OPTI-MEM I 培养基稀释 2  $\mu\text{L}$  Lipo 2 000, 稀释的 Lipo 2000 同稀释的 DNA 轻轻混合后, 将其加入到每孔中, 来回摇动培养板, 轻轻混匀。在 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养 24~48 h 吸除无双抗培养液, 换入正常培养液继续培养。

### 1.8 流式细胞术

为检测下调 Notch1 后肝癌细胞凋亡情况, 细胞经转染处理后培养 24 h, 收集细胞并按照 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明进行染色处理后上机检测细胞凋亡。实验独立进行, 重复 3 次。

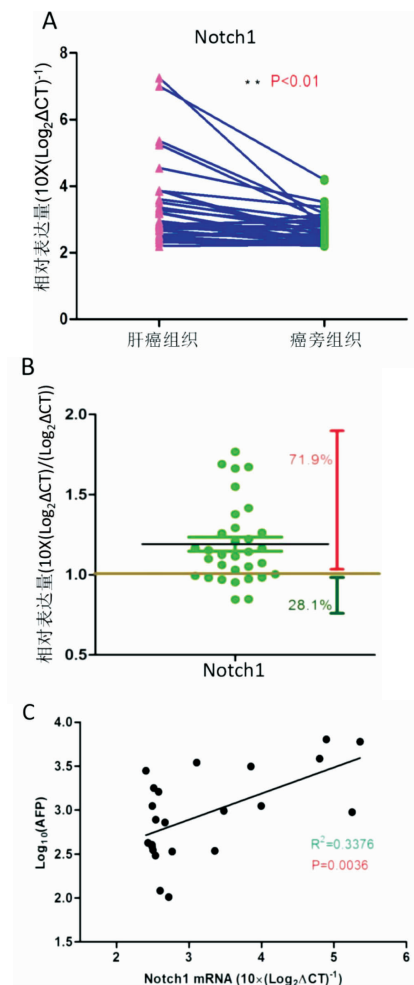
### 1.9 统计学方法

实验所得数据采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 计量资料采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示, 两样本均数的比较采用  $t$  检验, 运用皮尔森相关性分析检测参数间的关系, 检验水准  $\alpha$  取值为 0.05, 以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肝癌样本中 Notch1 基因的表达及与临床指标 AFP 的相关性

图 1A, 1B 所示, 通过 qRT-PCR 方法分析同一病人肝癌及癌旁组织中 Notch1 的表达, 发现 32 例肝癌组织中 23 例样本 Notch1 高表达 (71.9%), 9 例低表达 (28.1%), 差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ )。同时, 图 1C 所示, Notch1 的表达与病人血清 AFP 含量存在正相关性 ( $R^2=0.3376, P=0.0036$ )。

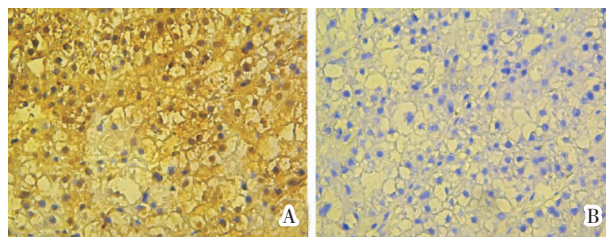


注: A. qRT-PCR 检测肝癌和癌旁肝组织样本中 Notch1 的表达 ( $P<0.01$ ); B. 肝癌组织 (71.9%) 中 Notch1 基因表达明显高于癌旁组织 (28.1%); C. 皮尔森相关性分析表明 Notch1 与 AFP 具有相关性 ( $R^2=0.3376, P=0.0036$ )。

图 1 Notch1 基因在肝癌中的表达及与 AFP 相关性

### 2.2 肝癌样本中 Notch1 蛋白的表达

免疫组化检测 Notch1 蛋白的表达, 结果进一步证实 Notch1 在肝癌组织中被激活 (图 2)。



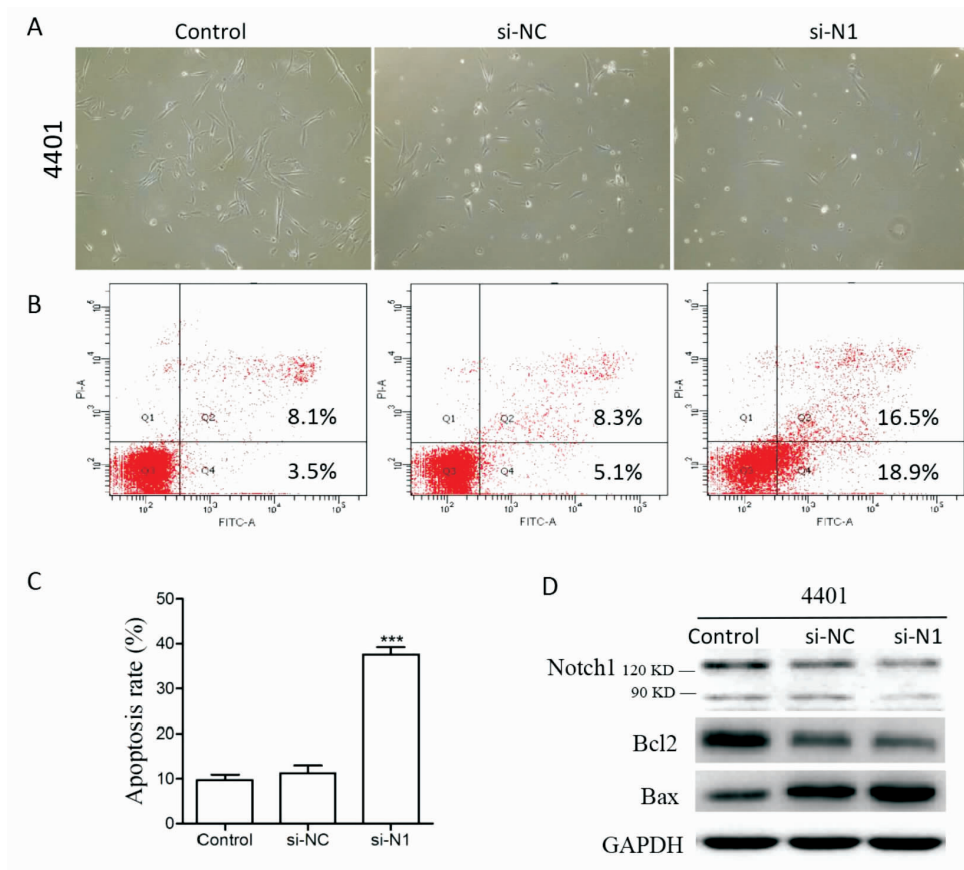
注: A. Notch1 蛋白在肝癌组织中高表达; B. Notch1 在癌旁组织中低表达。

图 2 Notch1 蛋白在组织中表达情况 (光镜图  $\times 100$ )

### 2.3 沉默 Notch1 后诱导肝癌细胞系 4401 凋亡

Notch1 转染 4401 细胞, 24 h 后镜下 ( $\times 100$ ) 观察肝癌 4401 细胞发生明显凋亡 (图 3A); 流式结果示 siRNA-N1 组细胞明显发生凋亡 (图 3B, 3C); Western

blot 检测示 Notch1 蛋白表达降低,同时抗凋亡蛋白 Bcl2 表达下调,促凋亡蛋白 Bax 表达上调(图 3D)。



注:A.形态学观察 siRNA 转染后肝癌细胞系 4401 凋亡情况;B.流式细胞数检测 siRNA 转染后肝癌细胞系 4401 凋亡情况;C. 统计分析各组细胞凋亡比例;D.Western-blot 检测 Notch1、Bcl2 和 Bax 蛋白表达情况。(与对照组比较,\*\*\* $P<0.001$ )

图 3 沉默 Notch1 后诱导肝癌细胞系 4401 凋亡

### 3 讨论

Notch 通路与肿瘤的相关性最先是在 T 细胞急性白血病中确定的<sup>[4]</sup>。然而,一旦当 Notch1 表达异常的时候,往往会表现出致癌的特性,譬如在原发性肝癌,胰腺癌中 Notch1 表达上调并表现出促细胞增殖,抑制细胞凋亡及分化的作用<sup>[5-6]</sup>。Notch 途径由跨膜家族受体(Notch 1-4),其配体(Jagged 1-2,Delta-like 1-3)组成<sup>[7]</sup>。通过受体与配体的相互作用转导细胞信号,从而在细胞增殖、分化、凋亡、个体生长、发育中发挥重要的调控作用 Notch1 基因是 Notch 信号通路中跨膜蛋白受体之一,可与配体结合进入核内并促进相应靶基因激活,从而导致疾病的发生<sup>[8]</sup>。同时,中国的肝癌病例数和因病死亡数占到了全球范围内的一半上<sup>[9]</sup>。有荟萃分析证实,在原发性肝癌和胃癌中,Notch1 的高表达与肿瘤的发生有着密不可分的关系<sup>[10-11]</sup>,同时还预示着病人的预后

不良<sup>[12]</sup>。这些都提示 Notch1 参与了原发性肝癌的发生和发展。

如 qRT-PCR 及免疫组化结果所示,在肝癌组织中 Notch1 基因的表达较癌旁组织明显升高,这进一步证实了 Notch1 在肝癌中被激活,Notch1 可能与肝癌的发生相关。在近期有研究表明,Notch1 还可以调节结肠癌肿瘤干细胞从而促使结肠癌的发生,同时还能激活干性基因使肿瘤细胞维持在低分化的状态<sup>[13-14]</sup>。在临床上,大约 80%的肝癌患者血清中的甲胎蛋白含量升高,临床上常将 AFP 作为诊断原发性肝癌的特异性肿瘤标志物,其对确立诊断、早期诊断、鉴别诊断的具有重要指示作用。在最近的一篇报道中,有人指出乙肝病毒通过刺激 AFP 的表达诱导肝细胞的重编程,还发现 AFP 在启动肝癌干细胞进程中起到了重要的作用<sup>[15]</sup>。本文进一步研究了 Notch1 和甲胎蛋白(AFP)血清含量之间的关系,结果表明 Notch1 与 AFP 具有一定的相关性( $R^2=0.3376$ ,  $bP=0.0036$ )。



我们认为过表达 Notch1 是通过 AFP 诱导肝癌的发生。本研究还发现沉默 Notch1 后诱导肝癌细胞系 4401 凋亡。线粒体凋亡通路是常见的细胞凋亡通路,且主要受 Bcl-2, Bax 蛋白家族调控, Bcl-2 是关键的抗凋亡蛋白, Bax 是主要的促凋亡蛋白<sup>[16]</sup>, Bcl-2/Bax 的比率能进一步反映了凋亡倾向<sup>[17]</sup>。Wu 等<sup>[18-19]</sup>发现抑制 Notch1 表达可抑制肾癌细胞和结肠癌细胞的增殖并诱导其凋亡。所以通过 siRNA 沉默肝癌细胞中 Notch1 表达,在镜下发现肝癌细胞可见细胞死亡,通过流式分析证实敲除 Notch1 的肝癌细胞发生凋亡。蛋白质印迹法结果显示:抗凋亡蛋白 Bcl-2 被下调,促凋亡蛋白 Bax 则被上调。这表明 Notch1 的下调将诱导肝癌细胞的凋亡。综上可知,本实验证实了 Notch1 与肝癌的发生、肝癌病人 AFP 血清含量均具有一定的相关性。敲除 Notch1 后可以诱导肝癌细胞的凋亡,这也进一步证实了 Notch1 与肝癌间的关系。然而,Notch1 参与肝癌的发生发展、诱导肝癌细胞凋亡的具体机制以及能否作为潜在的诊断指标以及治疗肝癌的新靶点还有待于进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 范上达,邱宗祥,潘冬平.肝癌的综合治疗[J].中华消化外科杂志, 2011,10(4):241-246.
- [2] FORNER A, LIOVET J M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet, 2012,379(9822):1245-1255.
- [3] LIU M, LEE D, CHEN C, et al. IKK $\alpha$  activation of NOTCH links tumorigenesis via FOXA2 suppression[J]. Mol Cell, 2012,45(2):171-184.
- [4] ELLISEN LW, BIRD J, WEST D C, et al. TAN -1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms[J]. Cell, 1991,66(4):649-661.
- [5] 吴乐乐.Notch1 信号通路对人肝癌 SMMC 7721 细胞中高纯度 CD133+细胞增殖和凋亡的影响[D].合肥:安徽医科大学,2015.
- [6] 易超,苏雅婷,丁伟,等.Notch 受体在胰腺癌组织中的表达及其临床意义[J].现代生物医学进展,2016,16(34):6684-6687.
- [7] HORI K, SEN A, ARTAVANIS-TSAKONAS S. Notch signaling at a glance[J]. J Cell Sci, 2013,126(10):2135-2140.
- [8] FABIAN G, MARIO S. Emerging roles of Notch signaling in liver disease. Hepatology[J]. 2015,61(1):382-392.
- [9] CHEN W, ZHENG R, BAADE PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016,66(2):115-132.
- [10] HUANG R, TANG Q, YOU Q, et al. Disparity expression of Notch1 in benign and malignant colorectal diseases[J]. PLoS One, 2013,8(12):e81005.
- [11] DU X, CHENG Z, WANG Y H, et al. Role of Notch signaling pathway in gastric cancer: a meta-analysis of the literature[J]. World journal of gastroenterology, 2014,20(27):9191-9199.
- [12] 宋翔,张玲利,于红刚.Notch1 和 p-Akt 在结肠癌组织中的表达及其意义[J].中华临床医师杂志,2013,7(3):1093-1096.
- [13] NERADUGOMMA N K, SUBRAMANIAM D, TAWFIK OW, et al. Prolactin signaling enhances colon cancer stemness by modulating Notch signaling in a Jak2-STAT3/ERK manner[J]. Carcinogenesis, 2014,35(4):795-806.
- [14] GARCIA-HEREDIA J M, LUCENA-CACACE A, VERDUGO-SIVIANES E M, et al. The Cargo Protein MAP17 (PDZK1IP1) Regulates the Cancer Stem Cell Pool Activating the Notch Pathway by Abducting NUMB[J]. Clin Cancer Res, 2017.
- [15] ZHU M, LI W, LU Y, et al. HBx drives alpha fetoprotein expression to promote initiation of liver cancer stem cells through activating PI3K/AKT signal pathway [J]. International Journal of Cancer, 2017,140(6):1346-1355.
- [16] BAGCI E Z, VODOVOTZ Y, BILLIAR T R, et al. Bistability in apoptosis: roles of bax, bcl-2, and mitochondrial permeability transition pores[J]. Biophys J, 2006,90(5):1546-1559.
- [17] PERUCHO J, CASAREJOS M J, RUBIO I, et al. The effects of parkin suppression on the behaviour, amyloid processing, and cell survival in APP mutant transgenic mice[J]. Exp Neurol, 2010,221(1):54.
- [18] WU K, HU L, HOU J. Selective suppression of Notch1 inhibits proliferation of renal cell carcinoma cells through JNK/p38 pathway[J]. Oncol Rep, 2016, 35(5):2795-2800.
- [19] 刘少琼,杨芳,禹正杨,等.姜黄素调控 Notch1 信号通路诱导结肠癌 SW480 细胞株凋亡[J].湖南中医药大学学报,2015,35(8):13-16.

(本文编辑 李杰)