文章编号:1000-5404(2010)20-2189-04

论著

Notch1胞内结构域在星形细胞肿瘤中的表达及其临床意义

杨东虹[1,2],唐文渊[1],徐伦山[2],肖华亮[3],周 椿[2],许民辉[2] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科[1];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所:神经外科[2],病理科[3])

【摘要】 目的 探讨Notch1胞内结构域(intracellular Domain,ICD)在星形细胞肿瘤中的表达规律及其临床意义。**方法** 收集大坪医院2009年1-6月间经手术切除的12例不同级别星形细胞肿瘤及2例瘤周正常脑组织新鲜标本,采用实时定量PCR方法检测Notch1 ICD mRNA表达;收集85例有完整随访资料的星形细胞肿瘤存档标本,采用免疫组织化学技术检测Notch1 ICD蛋白表达。**结果** Notch1 ICD在正常脑组织中低或不表达,肿瘤组织中Notch1 ICD mRNA水平(4.65±3.04)显著高于正常脑组织(1.13±0.11)($P<0.01$);高级别(WHOⅢ和Ⅳ级)星形细胞肿瘤Notch1 ICD mRNA表达水平显著高于低级别星形细胞肿瘤(WHOⅡ级)[分别为(6.58±2.63)与(2.49±1.01),$P<0.01$]。免疫组化结果显示,相对于瘤周正常脑组织,各级星形细胞肿瘤Notch1 ICD表达明显增强,并由单纯胞质表达向胞质胞核联合表达及单纯胞核表达过渡;Notch1 ICD蛋白表达与组织学分级及患者的存活期有关,Notch1 ICD高表达预示着较高的组织学分级和较短的存活时间。**结论** Notch信号通路的激活是星形细胞肿瘤的常见事件,Notch1 ICD的异常表达与肿瘤分级及患者预后关系密切,可能成为胶质瘤基因治疗的有用分子靶标之一。

【关键词】 脑肿瘤,星形细胞;Notch;逆转录聚合酶链式反应;免疫组织化学
【中图法分类号】 R394.2;R730.23;R739.41 **【文献标志码】** A

Expression of Notch1 intracellular domain in astrocytic tumors and their clinical significance: an analysis based on 97 cases

Yang Donghong[1,2], Tang Wenyuan[1], Xu Lunshan[2], Xiao Hualiang[3], Zhou Chun[2], Xu Minhui[2] ([1]Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Neurosurgery, [3]Department of Pathology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the expression pattern of Notch1 intracellular domain (ICD) in astrocytic tumors and its clinical significance. **Methods** Notch1 ICD mRNA was detected in 12 fresh-resected astrocytic tumors of various grades after pathological diagnosis and 2 normal cerebral tissues in Daping Hospital from January to Jane in 2009 by real-time quantitative PCR. Notch1 ICD protein was detected in 85 archived astrocytic tumor samples at different grades using immunohistochemical method. **Results** Mild or low expression of Notch1 ICD mRNA was found in normal cerebral tissues. The expression level of Notch1 ICD mRNA in neoplastic tissues (4.65±3.04) were significantly higher than in normal tissues (1.13±0.11) ($P<0.01$). There was statistical significance of difference of Notch1 ICD mRNA expression between high-grade astrocytic tumors (grade Ⅲ and Ⅳ, $n=7$) and low-grade tumors (grade Ⅱ, $n=5$) (6.58±2.63 *vs* 2.49±1.01, $P<0.01$). Immunohistochemical results revealed that obvious upregulation of Notch1 ICD protein was seen in neoplastic tissues, and transformation of protein localization from pure cytoplasmic staining, combined cytoplasmic and nuclear staining, to pure nuclear staining. The expression of Notch1 ICD protein was correlated with histological grade and patient's survival time. Higher expression of Notch1 ICD protein predicted higher malignant grade and shorter survival time. **Conclusion** Activation of Notch signaling is frequently found in astrocytic tumors. Aberrant expression of Notch1 ICD is correlated with tumor malignant grade and patient's survival,

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(30700862,30872649)
【通信作者】 唐文渊,电话:(023)89012161;E-mail:wld730@163.com

which implies that Notch1 might be one of useful target molecules for anti-glioma gene therapy.

[Key words] brain tumor; astrocyte; Notch; reverse transcriptase polymerase chain reaction; immunohistochemistry

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30700862, 30872649). Corresponding author, Tang Wenyuan, Tel: 86-23-89012161, E-mail: wld730@163.com

Notch信号是一条进化保守的信号通路,其经典活化途径是通过Notch受体与配体的结合引发连续性的蛋白水解过程,进而释放出Notch胞内结构域(notch intracellular domain, NICD)。NICD是Notch受体的活化形式,其进入细胞核内,与DNA结合蛋白CSL结合从而激活下游一系列基因表达,参与细胞增殖、凋亡及分化的调控[1]。Notch信号通路的异常与多种肿瘤的发生、发展关系密切,但其在不同类型肿瘤中发挥的作用并不尽相同。已有研究表明[2-8],包括胶质瘤在内的多种脑肿瘤中存在Notch信号通路相关蛋白的异常表达,但其生物学作用以及临床病理学意义目前并未阐明。本研究以人星形细胞肿瘤为研究对象,探讨Notch1 ICD在星形细胞肿瘤中的表达规律及其临床意义,旨在为以Notch信号相关分子为靶标的胶质瘤基因治疗提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 实验材料

12例各级脑星形细胞肿瘤新鲜标本于2009年1-6月取自第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经外科手术室。12例患者中,男性8例,女性4例,年龄23~68岁,平均年龄42岁,中位年龄38岁。术前经核磁共振及CT检查,临床均拟诊为"颅内胶质瘤",行肿瘤部分或全切术。标本取回后除留取部分组织做冰冻切片外,其余组织迅速置于液氮冻存备用。按照2007年WHO神经系统肿瘤分类标准以确定肿瘤类型及分级,其中,弥漫浸润的星形细胞瘤(WHOⅡ级)及多形性胶质母细胞瘤(WHOⅣ级)各5例,间变性星形细胞瘤(WHOⅢ级)2例。另取2例瘤周正常脑组织作为对照。

收集重庆医科大学附属第一医院及第三军医大学大坪医院野战外科研究所1993年1月至2001年12月脑星形细胞源性胶质瘤存档标本85例,参照2007年WHO神经肿瘤分类进行分类和分级。其中弥漫浸润的星形细胞瘤(WHOⅡ级)24例,间变性星形细胞瘤(WHOⅢ级)38例,多形性胶质母细胞瘤(WHOⅣ级)23例。所有患者在肿瘤切除前均未接受放疗和化疗。该组病例基本临床病理资料如表1所示。男性47例,女性38例,男女比例为1.24∶1;年龄5~76岁,中位年龄为39岁。随访时间3~108个月,中位随访时间为34个月,术后1个月内死亡者不纳入本研究之列。

表1 Notch1 ICD蛋白表达与临床因素之间的关系

临床因素	n	Notch1 ICD蛋白表达			P
		+	++	+++	
性别					
男	47	14	17	16	>0.05
女	38	10	11	17	
年龄					
<39岁	45	13	15	17	>0.05
≥39岁	40	11	13	16	
肿瘤直径					
<3.7 cm	44	17	11	16	>0.05
≥3.7 cm	41	7	17	17	
Karnoffsky评分					
<70分	43	10	13	20	>0.05
≥70分	42	14	15	13	
组织学分级					
WHOⅡ	24	19	4	1	<0.01
WHOⅢ	30	5	18	7	
WHOⅣ	31	0	6	25	
存活时间					
<34个月	41	3	11	27	<0.01
≥34个月	44	21	17	6	

1.2 总RNA提取和cDNA合成

采用上述12例脑胶质瘤及2例瘤周正常脑组织新鲜标本,各80~100 mg,加入1 ml Trizol(Invitrogen公司)抽提总RNA,以紫外分光光度计测定光密度值D(260)及D(280)的计算RNA的浓度。取2 μg总RNA按MultiScribe® MuLV reverse transcriptase cDNA合成试剂盒(Applied Biosystems, Foster City, CA)说明书合成cDNA,-20 ℃保存备用。

1.3 实时荧光定量PCR扩增

采用Applied Biosystems Prism 7000荧光定量PCR仪进行检测。引物序列由Primer Premier 5.0软件进行设计,委托TaKaRa生物技术公司进行引物合成。内参照GADPH上游引物:5′-ACCCATCACCATCTTCCAGGAG-3′;下游引物:5′-GAAGGGGCGGAGATGATGAC-3′,退火温度为58 ℃;Notch1 ICD上游引物:5′-GCAGTTGTGCTCCTGAAGAA-3′;下游引物:5′-CGGGCGGCCAGAAAC-3′,退火温度为60 ℃。PCR反应体系为20 μl,以无菌纯水代替DNA模板作为阴性对照。PCR反应混合物包括:包括2×SYBR 10 μl,ROX 0.4 μl,上、下游引物(10 μmol/L)各1 μl,模板1 μl,其余用无菌去离子水补足。扩增条件:95 ℃预变性10 s,95 ℃5 s,60 ℃34 s,60 ℃34 s,76 ℃5 min,共40个循环。每个标本均行复管检测,取均值代表其表达水平。PCR产物利用ABI 7500 PCR系统软件分析,观察扩增曲线,并对

cDNA 的含量进行定量分析，计算样本的△△Ct 值（样本同内参的对数比值）。

1.4 免疫组织化学

所有存档蜡块行连续切片，厚度为 5 μm。采取 S-P 法行免疫组化染色，具体步骤按试剂盒说明进行。一抗兔抗人 Notch1 ICD IgG，购自 Abcam 公司（ab83232，Abcam，Cambridge，UK），稀释浓度为1∶400。以大肠癌标本作为阳性对照，以 PBS 替代一抗作为阴性对照。

避开切片边缘及坏死区域，于高倍镜（×400）下随机计数 1000 个肿瘤细胞，并计算标记指数（labeling index，LI），即 LI（%）＝阳性细胞数/1 000×100%。按以下方法进行半定量：阴性：<5%，记为“－”；弱阳性 5%～24%，记为“＋”；阳性：25%～50%，记为“＋＋”；LI >50% 定为强阳性，记为“＋＋＋”。

1.5 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 12.0 统计软件进行单因素方差分析。不同临床病理因素之间 Notch1 ICD 蛋白表达的差异性比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 各级星形细胞肿瘤 Notch1 ICD mRNA 表达

各级星形细胞肿瘤 Notch1 ICD mRNA 表达水平（4.65±3.04）显著高于瘤周脑组织（1.13±0.11）（$P<0.01$）。恶性胶质瘤（WHO Ⅲ级和Ⅳ级）Notch1 ICD mRNA 表达水平为（6.58±2.63），显著高于 WHO Ⅱ级的星形细胞肿瘤（2.49±1.01）（$P<0.01$）。

2.2 各级星形细胞肿瘤 Notch1 ICD 蛋白表达

所有 85 例各级星形细胞肿瘤有不同程度的 Notch1 ICD 蛋白表达，瘤周脑组织不表达或为胞质弱阳性表达（图 1A）。WHO Ⅱ级的弥漫浸润性星形细胞瘤 Notch1 ICD 阳性产物主要定位于细胞质（18/24，图 1B），其余 6 例为细胞质和细胞核联合表达，多为弱阳性（19/24）或阳性（4/24）表达。而 WHO Ⅲ级和Ⅳ级的恶性星形细胞瘤以细胞质、细胞核联合表达为主（分别为 24/30 和 26/31），为阳性或强阳性表达（图 1C、D）；少数病例为单纯胞核（分别为 2/30 和 5/31）表达，WHO Ⅲ级的间变性星形细胞瘤中有 4 例为单纯细胞质阳性，而所有的 WHO Ⅳ 胶质母细胞瘤未发现单纯胞质阳性表达者。

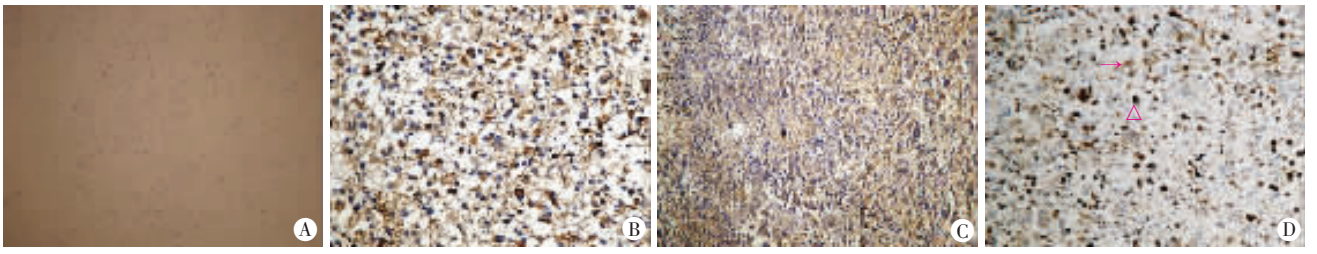
2.3 星形细胞肿瘤 Notch1 ICD 蛋白表达与临床因素之间的关系

Notch1 ICD 蛋白表达与该组病例临床病理因素之间的关系如表 1 所示。Notch1 ICD 蛋白表达与肿瘤 WHO 分级关系，高级别星形细胞瘤 Notch1 ICD 蛋白表达显著高于低级别星形细胞瘤（$\chi^2=65.8$，$P<0.01$）。Notch1 ICD 表达亦与患者预后有关，术后生存期 <34 个月的病例 Notch1 ICD 表达以强阳性为主，与术后生存期≥34 个月病例相比差异显著（$\chi^2=28.08$，$P<0.01$），而该组病例 Notch1 ICD 蛋白表达与患者性别、年龄、术前 KPS 评分及肿瘤大小等关系不密切。

3 讨论

Notch 信号通过细胞间受体与配体的相互作用，调控细胞增殖、凋亡与分化，从而在多个物种的系统发育中起着关键性作用。近年来，Notch 信号通路与肿瘤发生发展的关系日益受到重视。研究表明，在包括宫颈癌[9]、恶性淋巴瘤[10]、乳腺癌[11]、肝细胞癌[12]以及胰腺癌[13]在内的不同类型肿瘤中存在着多种 Notch 信号受体及配体分子的异常表达，提示 Notch 信号通路在肿瘤的发生和恶性进展中起着重要的作用。

Notch 信号在肿瘤发生发展中的作用存在双重性。一方面，在结肠癌、宫颈癌[7]及恶性淋巴瘤[8]等肿瘤中一种或几种 Notch 受体及其配体过度表达，通过抑制凋亡、促进增殖、活化 Ras 信号途径以及阻抑 TGF-β 信号的细胞抑制功能等，而发挥促瘤效应；另一方面，在皮肤癌[14]、小细胞肺癌[15]等肿瘤中，Notch1 或 Notch2 处于未活化状态，引入 NICD 使 Notch 信号活化，可引起细胞 p21Cip1 和 p27Kip1 的上调，导致细胞周期阻滞，而发挥抑瘤效应。鉴于 Notch 信号在不同系统肿瘤，甚至在同一系统不同类型肿瘤之间作用不尽相同，甚至完全相反，因此，有必要进行更为深入的研究以揭示 Notch 信号在某一类型肿瘤中的具体作用及其分子机制。



A：瘤周增生脑组织；B：弥漫浸润的星形细胞瘤（WHO Ⅱ级）；C：间变性星形细胞瘤（WHO Ⅲ级）；D：胶质母细胞瘤（WHO Ⅳ级） △：细胞核阳性细胞；↑：细胞质阳性细胞

图 1 Notch1 ICD 在瘤周脑组织及星形细胞肿瘤中的表达（S-P ×200）

Notch 信号分子在脑肿瘤中的表达及其功能备受关注。研究表明,不同类型脑肿瘤中 Notch1 表达及其功能差别很大。在神经母细胞瘤的研究中,Hallahan 等[7]证实神经母细胞瘤组织中存在 Notch 信号通路的异常活化,以 Notch 通道抑制剂进行干预,瘤细胞数量明显减少,增殖抑制,凋亡增加;Grynfeld 等[8]研究发现通过激活 Notch 信号活化转录因子 Hes-1,可显著抑制神经母细胞瘤细胞的分化,提示 Notch 信号的活化对于维持神经母细胞瘤的低分化状态可能起重要作用。上述研究表明,Notch1 信号在神经母细胞瘤中主要起着促瘤作用。而在髓母细胞瘤的研究中,尹昌林等[5]发现髓母细胞瘤 Notch1 低或不表达,激活 Notch1 信号显著抑制体外髓母细胞瘤的细胞增殖,提示 Notch1 信号在髓母细胞瘤主要起抑瘤效应,而 Notch2 信号激活促进瘤细胞生长。在胶质瘤,Purow 等[2]研究表明 Notch1 及其配体 delta-like-1(Dll-1),Jagged-1 在人脑胶质瘤细胞系及组织中均过度表达,以 RNA 干扰技术"knockdown"Notch1、Dll-1 或 jagged-1 表达,可诱导胶质瘤细胞凋亡、抑制增殖,延长荷瘤鼠的生存时间;Zhang 等[4]证实不同级别的星形细胞瘤组织中存在多种 Notch 受体及配体分子以及下游转录因子 Hes-5 的高表达,NICD 的过度表达可促进胶质瘤细胞的增殖及神经干细胞样克隆形成;因此可见,Notch1 信号在胶质瘤中主要起着促瘤作用。

Notch1 表达与胶质瘤组织学分级之间的关系目前尚存在争议。Purow 等[2]研究发现 Notch1 在Ⅱ和Ⅲ级星形细胞肿瘤中高表达,而在 GBM(WHO Ⅳ级)中表达下调;而新近 Xu [3]及易海波等[6]的研究却表明 Notch1 在各级星形细胞肿瘤表达上调,并与组织学分级呈正相关。Notch1 的活化形式 Notch1 ICD 在恶性胶质瘤中的表达及其临床意义目前尚缺乏研究,而检测 Notch 信号的活化分子应该能更准确的反应其功能状态。我们通过荧光定量 PCR 及免疫组化的方法研究了恶性胶质瘤样本中 Notch1 ICD 的表达,结果显示胶质瘤中 Notch1 ICD mRNA 和蛋白水平明显高于正常脑组织,并与 WHO 分级密切相关:WHO 分级越高,Notch1 ICD 表达水平越高,其蛋白表达有由胞质表达向胞核表达转移的趋势;Notch1 ICD 蛋白表达与该组患者的预后相关,Notch1 ICD 高表达者术后总体生存期较短。我们的研究提示 Notch1 信号的激活是星形细胞肿瘤的常见事件,Notch1 ICD 的异常表达与肿瘤分级及患者预后关系密切,可能成为胶质瘤基因治疗的有用分子靶标之一,其分子机制有待于进一步探讨。

参考文献:

[1] Talora C, Campese A F, Bellavia D, *et al*. Notch signaling and diseases: an evolutionary journey from a simple beginning to complex outcomes[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1782(9): 489-497.

[2] Purow B W, Haque R M, Noel M W, *et al*. Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation[J]. Cancer Res, 2005, 65(6): 2353-2363.

[3] Xu P, Qiu M, Zhang Z, *et al*. The oncogenic roles of Notch1 in astrocytic gliomas *in vitro* and *in vivo* [J]. J Neurooncol, 2010, 97(1): 41-51.

[4] Zhang X P, Zheng G, Zou L, *et al*. Notch activation promotes cell proliferation and the formation of neural stem cell-like colonies in human glioma cells[J]. Mol Cell Biochem, 2008, 307(1/2): 101-108.

[5] 尹昌林, 吕胜青, 黄轶, 等. pSiRNA-Notch1 逆转录病毒载体的构建及对恶性脑胶质瘤细胞的作用[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(12): 1211-1214.

[6] 易海波, 石松生, 杨卫忠, 等. Notch-1 基因在人脑胶质瘤中的表达及其意义[J]. 肿瘤防治研究, 2006, 33(10): 701-703.

[7] Hallahan A R, Pritchard J I, Hansen S, *et al*. The SmoA1 mouse model reveals that notch signaling is critical for the growth and survival of sonic hedgehog-induced medulloblastomas[J]. Cancer Res, 2004, 64(21): 7794-7800.

[8] Grynfeld A, Pahlman S, Axelson H. Induced neuroblastoma cell differentiation, associated with transient HES-1 activity and reduced HASH-1 expression, is inhibited by Notch1[J]. Int J Cancer, 2000, 88(3): 401-410.

[9] Maliekal T T, Bajaj J, Giri V, *et al*. The role of Notch signaling in human cervical cancer: implications for solid tumors[J]. Oncogene, 2008, 27(38): 5110-5114.

[10] Jundt F, Schwarzer R, Dorken B. Notch signaling in leukemias and lymphomas[J]. Curr Mol Med, 2008, 8(1): 51-59.

[11] Stylianou S, Clarke R B, Brennan K. Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2006, 66(3): 1517-1525.

[12] Qi R, An H, Yu Y, *et al*. Notch1 signaling inhibits growth of human hepatocellular carcinoma through induction of cell cycle arrest and apoptosis[J]. Cancer Res, 2003, 63(23): 8323-8329.

[13] Wang Z, Zhang Y, Li Y, *et al*. Down-regulation of Notch-1 contributes to cell growth inhibition and apoptosis in pancreatic cancer cells [J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(3): 483-493.

[14] 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

[15] Sriuranpong V, Borges M W, Ravi R K, *et al*. Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells[J]. Cancer Res, 2001, 61(7): 3200-3205.

(收稿:2010-05-20 修回:2010-07-08)

(编辑 栗 嘉)