论著

文章编号:1000-5404(2011)06-0574-04

Notch1 过表达对 K562 细胞增殖及其周期的影响

杨春秀[1],陈建斌[1],张树君[1],李芳菲[2] (400016 重庆,重庆医科大学 附属第一医院血液科[1],干细胞与组织工程研究室[2])

【摘要】 **目的** 研究外源性 Notch1 过表达对慢性粒细胞白血病细胞株 K562 增殖和细胞周期的影响。**方法** 用脂质体将携带 Notch1 胞内段(ICN1)的质粒转染入 K562 细胞,倒置相差显微镜观察转染前后 K562 细胞形态学变化,RT-PCR 和 Western blot 检测 Notch1 mRNA 和蛋白的表达,MTT 比色法检测细胞增殖,流式细胞仪检测细胞周期分布。**结果** 与未转染组相比,ICN1 转染组 K562 细胞数量减少,成团生长,直径和体积均变小;Notch1 mRNA 及其蛋白表达均比未转染组增强;ICN1 转染组 K562 细胞增殖显著受抑($P<0.01$),且随时间延长而明显($P<0.05$);细胞周期检测表明 G_1 期细胞增多($P<0.05$),S 期细胞显著减少($P<0.01$)。**结论** Notch1 胞内段过表达可能通过阻滞细胞于 G_1 期而抑制 K562 细胞增殖。

【关键词】 Notch1 信号;过表达;K562 细胞;细胞周期
【中图法分类号】 R733.72;R394.2;R730.23 【文献标志码】 A

Exogenous Notch1 overexpression inhibits proliferation of K562 cells by arresting at G_1 phase

Yang Chunxiu[1], Chen Jianbin[1], Zhang Shujun[1], Li Fangfei[2] ([1]Department of Hematology, First Affiliated Hospital, [2]Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the effects of overexpression of exogenous Notch1 on cell proliferation and cell cycle of human chronic myeloid leukemia cell line K562. **Methods** Plasmid pcDNA3.1-ICN1 containing exogenous intracellular fragment of Notch1 was transfected in K562 cells with Lipofectamine™2000. Inverted phase contrast microscope was used to observe the morphology change of K562 cells, RT-PCR and Western blot analysis were used to detect the expression of Notch1 mRNA and protein. MTT assays and flow cytometry were used to detect the proliferation and cell cycle of K562 cells respectively. **Results** As compared with untransfected group, the cell number of transfected K562 cells was decreased with cells aggregating. Both Notch1 mRNA and protein were up-regulated after transfection. The proliferation of transfected K562 cells were inhibited significantly ($P<0.01$) and as we cultured more time, the cells were inhibited more significantly ($P<0.05$). The cell cycle assay indicated that the cells at G_1 phase were increased ($P<0.05$) and those at S phase were decreased significantly ($P<0.01$) as compared to control group. **Conclusion** The overexpression of exogenous intracellular fragment of Notch1 can inhibit the proliferation of K562 cells by inhibiting the cell cycle in G_1 phase.

【**Key words**】 Notch1 signal; overexpression; K562 cells; cell cycle

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5401). Corresponding author: Chen Jianbin, Tel: 23-86-89012918, E-mail: cqchenjianbin2007@126.com

Notch 信号通路是进化过程中高度保守的信号通路,在从无脊椎动物到人的多种细胞中表达,与胚胎发育进程如造血发生、神经发生、肌节发生、翅形成、脑形成和骨形成等密切相关。近年来,多项研究表明,Notch1 信号蛋白在急性 T 淋巴细胞白血病、乳腺癌、结直肠癌和非小细胞肺癌等多种人类恶性肿瘤中高表达;在宫颈癌早期阶段高表达,于晚期阶段低表达;在慢性粒细胞白血病细胞中低表达[1-3],这些研究表明 Notch 信号与肿瘤的发生、发展密切相关。在血液系统恶性肿瘤的发病过程中,异常 Notch 信号的表达可能通过改变细胞的分化发育阶段、保持细胞未分化状态并持续增殖及抑制细胞凋亡等机制发挥作用。在不同的肿瘤细胞外环境中,Notch1 可能具有促进或抑制

【基金项目】 重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5401)
【通信作者】 陈建斌,电话:(023)89012918,E-mail:cqchenjianbin2007@126.com

肿瘤发生、发展的双重作用[4]。但 Notch 信号对慢性粒细胞白血病的影响，目前尚无定论。国外有学者指出，激活 Notch1 信号不影响慢性粒细胞白血病细胞株 K562 细胞生长，但抑制其向红系/巨核系分化，并协同 12-o-十四烷酰佛波醋酸酯-13（TPA）作用，诱导凋亡[5]。也有学者表明 Notch 信号可抑制 K562 细胞生长[6]，但相关机制尚不明确。本实验采用基因转染的方法，在 K562 细胞中过表达组成性激活形式的 Notch1 胞内段（ICN1），观察其对 K562 细胞生长和细胞周期构成的影响，进而研究 Notch1 在慢性粒细胞白血病细胞中的调控作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

质粒小抽试剂盒、Pro-light HRP 化学发光检测试剂盒、DNA Marker Ⅰ（天根生物），脂质体 Lipofectamine™2000（Invitrogen），RNA 提取试剂（Roche），逆转录及 PCR 试剂盒（TaKaRa），RPMI1640、胎牛血清（HyClone），Western 及 IP 细胞裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、6×上样缓冲液及蛋白标准（碧云天生物技术研究所），MTT、二甲基亚砜（DMSO，Sigma），Notch1 小鼠抗人单克隆抗体（Santa Cruz），辣根过氧化物酶标记二抗（北京中杉）。其余试剂均为国产分析纯。慢性粒细胞白血病细胞株 K562 细胞、大肠杆菌 DH5α 由本室常规保存。质粒 pcDNA3.1-ICN1 由重庆医科大学干细胞与组织工程研究室李芳菲老师惠赠。主要仪器：倒置相差显微镜、酶标仪、PCR 仪、凝胶成像系统（Bio-Rad，美国）。

1.2 重组质粒的扩增与鉴定

用氯化钙制备新鲜的 DH5α 感受态细胞，质粒转化感受态细菌 1.5 h，涂板培养过夜，挑取琼脂板上的单克隆细菌集落，在含氨苄青霉素的 LB 培养液中摇菌 12～16 h，质粒小抽试剂盒提取质粒，PCR 鉴定。

1.3 细胞培养与质粒转染

K562 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中，于 37 ℃，饱和湿度，含 5% CO_2 的孵箱中培养，隔天传代。于转染前 1 d，K562 换液培养，以调整细胞状态到最佳。按 Lipofectamine™2000 说明书对 K562 细胞进行转染，取对数生长期细胞，调整细胞汇合度为 5×10^5/ml 于 12 孔板中。取 2 μg Notch1 质粒用 4 μl 脂质体转染 K562 细胞；未转染组加入等量培养基，常规培养。

1.4 RT-PCR 检测转染后 Notch1 mRNA 的表达

常规方法分别提取未转染组与转染 24、48、72 h 组总 RNA，进行 RT-PCR 扩增，引物序列：Notch1 上游 5′-CGCTGACGGAGTACAAGTG-3′，下游 5′-GGTAGGAGCCGACCTCGTT-3′，扩增产物为 246 bp；以 β-actin 为内参照，上游 5′-TGGCATCCACGAGACCACCTTCA-3′，下游 5′-GACTGCTGTCACCTTCACCGTTCC-3′，扩增产物为 496 bp。Notch1 扩增条件为：94 ℃预变性 5 min，1 个循环；94 ℃变性 30 s，56 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，30 个循环，72 ℃延伸 5 min。β-actin 退火温度为64 ℃，其余条件相同。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测，凝胶成像仪下观察并照相，电泳结果用 Quantity One 图像分析软件进行光密度分析，将 Notch1 与 β-actin 产物灰度值的比值作为mRNA 的表达水平。

1.5 Western blot 法检测转染后 Notch 蛋白的表达

用 Western 及 IP 细胞裂解液处理细胞提取总蛋白，12 000 r/min 离心 8 min 后，转移上清至新 EP 管中，BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度，方法见说明书。计算蛋白量，调整各组上样量为 60 ng；加入 6×SDS 上样缓冲液，100 ℃变性 5 min，在电泳缓冲液中进行 10% SDS-PAGE，转移至 PVDF 膜；用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭过夜，加入 1∶200 的 Notch1 抗体，37 ℃孵育 3 h。TBST 洗膜 3 次，加入辣根过氧化物酶标记的二抗作用 1.5 h，洗膜 3 次后，压片显影，待胶片干后，凝胶成像仪下照相，Quantity One 图像分析软件分析，以 GAPDH 为内参。

1.6 MTT 法检测细胞增殖水平

取对数生长期的 K562 细胞，调整细胞汇合度为 1.5×10^4/ml，接种于 96 孔板中，转染组与对照组各设 6 个复孔。分别培养 24、48、72 h 后，每孔加入 5 g/L MTT 20 μl，放入孵箱继续培养 4 h，1 000 r/min 离心 5 min，小心吸弃上清，加入 DMSO 150 μl，120 r/min 振荡 10 min，以充分溶解甲臜颗粒，酶标仪测定波长 570 nm 处的光密度值[D(570)]，实验重复 3 次。

1.7 细胞周期分析

收集转染后 48 h 组的 K562 细胞，PBS 洗涤 3 次，用 70% 冰乙醇固定，4 ℃放置。测定前离心去除固定液，加入 RNA 酶工作液和碘化丙啶，4 ℃染色 30 min，流式细胞仪检测，每例标本固定 1×10^6 个细胞，计算机处理分析，实验重复 3 次。

1.8 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 16.0 统计软件，组间差异比较行 t 检验。

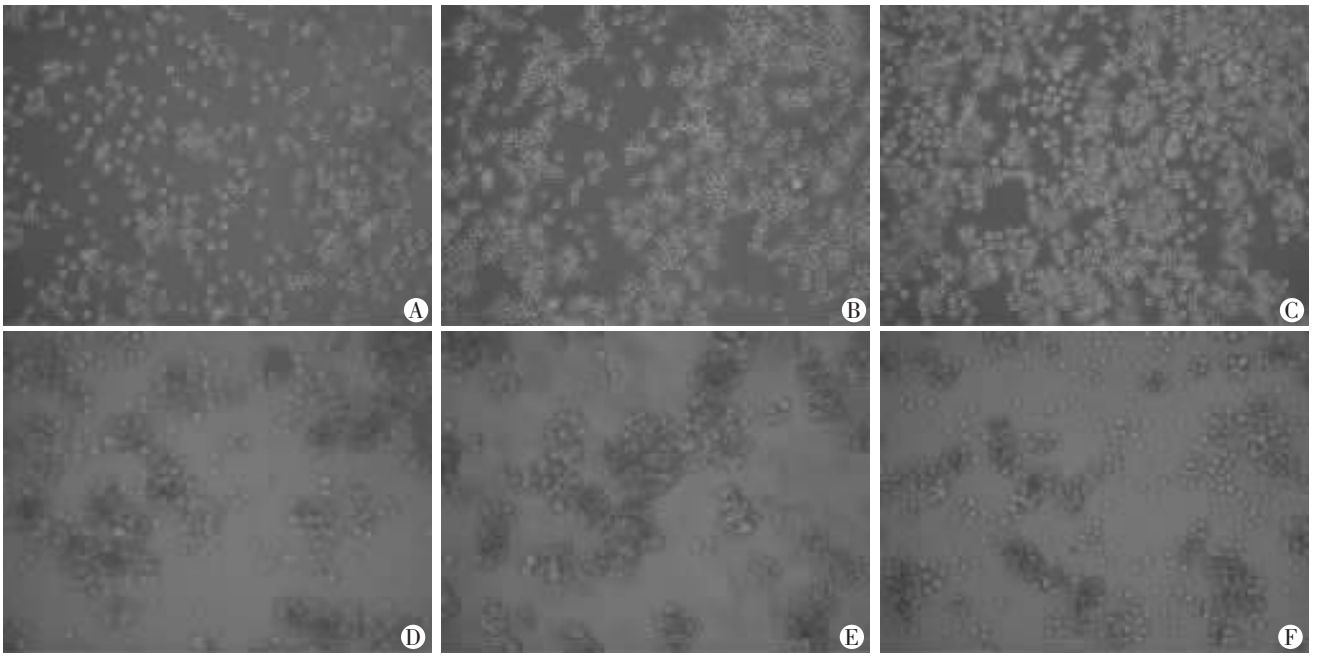
2 结果

2.1 倒置相差显微镜下观察转染 ICN1 前后细胞形态的变化

倒置相差显微镜下观察结果显示，未转染组 K562 细胞胞膜透亮，体积较大，随培养天数的增加，细胞数增多，密集，72 h 时细胞已达融合状态（图 1A～C）。转染 ICN1 组从 24 h 时开始，细胞数量减少，成团生长，胞膜透亮性变差，体积缩小，且随时间的迁移，细胞的直径和体积有进一步减小的趋势（图 1D～F）。

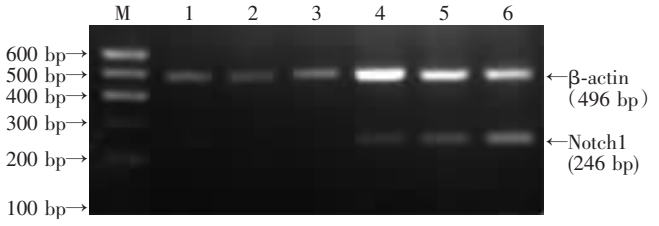
2.2 RT-PCR 检测转染 ICN1 后 Notch1 mRNA 表达的变化

提取转染 ICN1 后 24、48、72 h 转染组与未转染组 K562 细胞总 RNA，利用 RT-PCR 法检测 Notch1 mRNA 的表达。结果显示，转染后 24 h Notch1 mRNA 在 K562 细胞中的表达（0.396 3±0.025 2）与未转染组（0.244 1±0.006 2）相比显著增高（$P<0.05$），并随时间的延长表达增强，在 72 h（0.734 6±0.025 4）时达到最强（$P<0.01$）。见图 2。



A～C：分别为未转染组24、48、72 h；D～F：分别为ICN1转染组24、48、72 h

图1 倒置相差显微镜下观察转染ICN1前后K562细胞形态的变化 （ICC ×400）

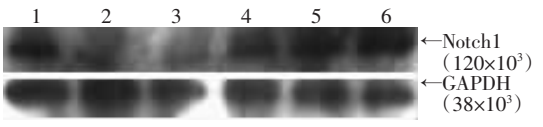


M：DNA标准Ⅰ；1－3：未转染组24、48、72 h；4－6：ICN1转染组24、48、72 h

图2 RT-PCR检测Notch1 mRNA在K562细胞中的表达

2.3 Western blot检测转染ICN1后Notch1蛋白表达的变化

提取转染后24、48、72 h转染组与未转染组K562细胞总蛋白，利用Western blot法检测Notch1蛋白的表达。结果显示，转染后24 h开始Notch1蛋白在K562细胞中的表达（0.794 1 ± 0.025 4）与未转染组相比表达增强（0.538 2 ± 0.019 5）（$P < 0.01$）。见图3。

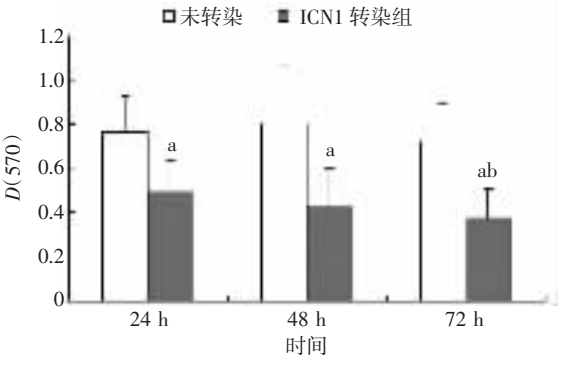


1－3：未转染组24、48、72 h；4－6：ICN1转染组24、48、72 h

图3 Western blot检测Notch1蛋白在K562细胞中的表达

2.4 MTT法分析ICN1过表达对K562细胞增殖的影响

Notch1信号可影响多种细胞的生长，我们应用MTT法检测了ICN1过表达对K562细胞增殖水平的影响。结果显示，ICN1在K562细胞中过表达后，细胞生长变缓。未转染组与转染组间比较具有统计学差异（$P < 0.01$），ICN1转染组24 h与72 h相比具有统计学差异（$P < 0.05$），而未转染组各时相点间比较则无统计学差异（P > 0.05）。MTT检测结果显示ICN1的瞬时加强表达对K562细胞的生长有抑制作用。见图4。



a：$P < 0.01$，与未转染组比较；b：$P < 0.05$，与ICN1转染组转染24 h比较

图4 MTT法测定未转染组与ICN1转染组K562细胞的增殖水平

2.5 流式细胞仪检测ICN1过表达对K562细胞周期分布的影响

ICN1转染K562细胞后明显抑制细胞增殖，收取48 h转染组与未转染组细胞，处理后检测周期分布。结果表明，与未转染组相比，ICN1转染组G_1期细胞增多（$P < 0.05$），S期细胞显著减少（$P < 0.01$），而G_2/M期细胞相比则无统计学差异（$P > 0.05$）。说明ICN1的瞬时加强表达可影响K562细胞周期分布。见表1。

表1 转染ICN1后48 h K562细胞的细胞周期变化（$\bar{x} \pm s$）

组别	G_1	S	G_2/M
未转染组	24.79 ± 2.36	54.74 ± 1.36	24.74 ± 4.22
ICN1转染组	37.62 ± 2.88[a]	24.16 ± 3.22[b]	33.18 ± 5.28

a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与未转染组比较

3 讨论

慢性粒细胞白血病是一种发生在早期多能造血干细胞的恶性增殖性疾病,占成人新诊断白血病的20%以上,且发病率有逐年上升趋势。已有研究证实,Notch信号的表达与造血系统的正常维持密切相关,维持造血干细胞(HSC)未分化状态,决定细胞命运与分化,并随着HSC分化而表达下调[7]。Notch受体通过与相邻细胞膜上的配体结合,释放出具有活性的ICN而激活,参与多种细胞的分化发育过程,在从无脊椎动物到脊椎动物的多种组织器官的生长发育过程中起重要调控作用。

Notch信号的活化在不同的细胞环境中可能具有双重作用,一方面,Notch信号的活化可能促进肿瘤细胞增殖,Notch1信号的激活促进Hodgkin淋巴瘤和间变性大细胞淋巴瘤细胞的增殖。最近有研究报道,抑制Notch1信号的表达可抑制ATL细胞的增殖与存活[8];另一方面,Notch信号的活化也可能起抑癌基因的作用,如抑制胰腺导管腺癌的进展[9],抑制小细胞肺癌细胞、前列腺癌细胞、食管癌细胞及皮肤鳞癌细胞的增殖等[10]。

正常细胞周期中存在周期调节控制点,而癌细胞失去了周期调控点的调节,可以无限增殖。如果能重建周期控制点的作用,控制细胞于某个期,使细胞不能增殖,则能达到控制癌细胞增殖的作用。有研究表明,激活Notch1信号后可通过影响G_1期细胞分化动力学及改变G_1期周期蛋白作用而延迟$CD34^+$前体细胞分化。激活红白血病细胞株TF-1中Notch1信号可致细胞周期阻滞并诱导凋亡[11]。因此我们设想:激活Notch1信号可能会通过改变细胞周期而影响慢性粒细胞白血病细胞株K562细胞的增殖。

本研究通过脂质体转染法将ICN1转染入K562细胞,RT-PCR和Western blot检测到Notch1的表达在K562细胞中上调,证实我们转染ICN1成功。以此为细胞模型,倒置相差显微镜下观察到细胞形态学的变化,与未转染组相比,表达ICN1组细胞数量减少,直径和体积变小,趋于凋亡模式。MTT比色法检测ICN1过表达对K562细胞增殖的影响,结果表明,转染ICN1后慢性粒细胞白血病细胞株K562生长减慢。细胞的增殖主要在于G_1期的长短,G_1期越长,细胞增殖越慢。通过分析转染后48 h未转染组与转染组细胞周期的分布情况,发现ICN1的加强表达可以使G_1期细胞增多,S期细胞显著减少,因此我们推测ICN1过表达能使K562细胞周期分布发生改变,通过使细胞阻滞于G_1期,延缓由G_1期进入S期的进程,从而抑制细胞增殖。

以上研究结果均提示Notch1信号的表达可抑制慢性粒细胞白血病细胞的增殖,阻滞细胞于G_1期。但对于ICN1过表达后引起K562细胞阻滞于G_1期的机制是否与周期蛋白的表达及ICN1过表达后与其他信号通路的交联作用有关,尚有待进一步的研究。

参考文献:

[1] Srivastava S, Ramdass B, Nagarajan S, *et al*. Notch1 regulates the functional contribution of RhoC to cervical carcinoma progression[J]. Br J Cancer, 2010, 102(1):196-205.

[2] Zardawi S J, Zardawi I, McNeil C M, *et al*. High Notch1 protein expression is an early event in breast cancer development and is associated with the HER-2 molecular subtype[J]. Histopathology, 2010, 56(3):286-296.

[3] Talora C, Sgroi D C, Crum C P, *et al*. Specific down-modulation of Notch1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation[J]. Genes Dev, 2002, 16(17):2252-2263.

[4] Leong K G, Karsan A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis[J]. Blood, 2006, 107(6):2223-2233.

[5] Ishiko E, Matsumura I, Ezoe S, *et al*. Notch signals inhibit the development of erythroid/megakaryocytic cells by suppressing GATA-1 activity through the induction of HES1[J]. J Biol Chem, 2005, 280(6):4929-4939.

[6] Yin D D, Fan F Y, Hu X B, *et al*. Notch signaling inhibits the growth of the human chronic myeloid leukemia cell line K562[J]. Leuk Res, 2009, 33(1):109-114.

[7] Renstrom J, Kroger M, Peschel C, *et al*. How the niche regulates hematopoietic stem cells[J]. Chem Biol Interact, 2010, 184(1/2):7-15.

[8] Pancewicz J, Taylor J M, Datta A, *et al*. Notch signaling contributes to proliferation and tumor formation of human T-cell leukemia virus type 1-associated adult T-cell leukemia[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(38):16619-16624.

[9] Hanlon L, Avila J L, Demarest R M, *et al*. Notch1 fuctions as a tumor suppressor in a model of K-ras-induced pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Cancer Res, 2010, 70(11):4280-4286.

[10] 张永利, 张可杰, 闵祥辉, 等. Notch1通路活化抑制EC109细胞的增殖及机制探讨[J]. 中国癌症杂志, 2009, 19(8):597-601.

[11] Chadwick N, Fennessy C, Nostro M C, *et al*. Notch induces cell cycle arrest and apoptosis in human erythroleukaemic TF-1 cells[J]. Blood Cells Mol Dis, 2008, 41(3):270-277.

(收稿:2010-10-18 修回:2010-12-03)

(编辑 吴培红)