Notch1 信号抑制对成骨肉瘤细胞化疗药物敏感性的影响

高天君,杨达宇 (解放军第 309 医院骨科,北京 100091)

[摘 要] **目的** 研究抑制 Notch1 信号对成骨肉瘤细胞化疗药物敏感性的影响及部分机制。**方法** 将人成骨肉瘤细胞系 OS-732 按 γ-分泌酶抑制剂(GSI)作用与否分为 GSI 组和对照组;脂质体法转染真核细胞表达质粒;Realtime PCR 检测 NICD、Hes1 mRNA 表达;流式细胞仪(FACS)检测 Annexin V-PE/7-AAD 双标的细胞凋亡;MTT 法检测化疗药物对细胞的抑制率。**结果** GSI 组 NICD 和 Hes1 mRNA 均较对照组明显降低($P<0.01$)。GSI 组化疗药物导致的瘤细胞抑制率和凋亡率均明显高于对照组。过表达 Hes1 可减弱 GSI 诱导的瘤细胞化疗药物敏感性增高。**结论** GSI 通过抑制 Notch1 受体激活和下游靶基因 Hes1 表达促进人成骨肉瘤细胞凋亡,从而增加人成骨肉瘤细胞对化疗药物的敏感性。

[关键词] 人成骨肉瘤细胞;细胞凋亡;γ-分泌酶抑制剂;Notch1;化疗敏感性

[中图分类号] R738.1;R730.53 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2012)03-0285-03

Effects of Notch1 signaling inhibition in sensitivity of Osteosarcoma cells to chemotherapy

GAO Tian-jun, YANG Da-yu (309th Hospital of PLA, Beijing 100091, China)

Abstract: Objective To study the Effect of Notch1 signaling inhibition in sensitivity of osteosarcoma cells to chemotherapy. **Methods** The osteosarcoma cells OS-732 were divided into two groups with γ-secretase inhibitor (GSI) or without it. The plasmid was transfected by liposome. NICD and Hes1 mRNA was analyzed by Realtime PCR. The chemosensitivity and apoptosis rate of cells were measured by MTT and flow cytometry respectively. **Results** The level of NICD and Hes1 mRNA was reduced in group GSI, compared with that in control group($P<0.01$). Meanwhile, the chemosensitivity and apoptosis rate of osteosarcoma cells in GSI group were higher than that in control gourp. However, the over-expression of Hes1 decreased the chemosensitivity of osteosarcoma cells which increased by GSI treatment. **Conclusion** GSI enhances the sensitivity of osteosarcoma cells to chemotherapy through promoting the cell apoptosis, which is induced by inhibition of Notch1 receptor activity and target gene Hes1 expression.

Keywords: osteosarcoma cells; cell apoptosis; γ-secretase inhibitor; Notch1; sensitivity to chemotherapy

成骨肉瘤(osteosarcoma)又称骨肉瘤,是常见、恶性程度最高的原发性骨肿瘤,具有早期远处转移、预后差的特点,其治疗主要依赖早期综合治疗。但骨肉瘤对放疗不敏感,因此,早期化疗成为重要的辅助治疗手段,如何提高瘤细胞对化疗药物的敏感性是目前研究的热点。Notch 通路是广泛存在于动物体内,决定细胞命运的保守信号通路,与多种肿瘤的发生、发展关系密切。新近研究发现,在人成骨肉瘤细胞系中 Notch1 受体及其靶基因 Hes1 高表达[1],但 Notch1 高表达与成骨肉瘤的发生发展有无因果关系目前尚不清楚。国外学者报道[2],在不同肿瘤细胞模型中,Notch 信号通路对细胞生存具有正负双向的调节作用。因此本实验通过抑制成骨肉瘤细胞 Notch1 信号通路,研究其对成骨肉瘤细胞化疗药物敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及分组

人成骨肉瘤细胞系 OS-732(ATCC 公司)用含 10% 胎牛血清(GIBCO 公司)的 DMEM 培养液,置 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养。按添加 γ-分泌酶抑制剂(γ-secretase inhibitor, GSI; Calbiochem 公司)与否分为 GSI 组和对照组,GSI 组添加 GSI 5 μmol/L作用 48 h,对照组以等量 PBS 替代 GSI。按添加化疗药物不同分为顺铂(Sigma 公司)、阿霉素(P&U 公司)和紫杉醇(Sigma 公司)组,各组在 GSI 作用或无 GSI 作用 48 h 后,再分别使用顺铂 400 μg/mL、阿霉素 2 μg/mL 和紫杉醇 6 μg/mL 作用 48 h[3]。

1.2 质粒转染与筛选

按 Lipofectamine™ 2000(Invitrogen 公司)说明书操作,将 pCMV-Hes1 及 pCMV-GFP(空载体对照质粒)经脂质体(均由美国南佛罗里达大学肿瘤研究所 Gabrilovich 教授惠赠)转入人成骨肉瘤细胞系 OS-732 中,以 600 μg/mL G418 筛选具有抗性的细胞克隆,挑取克隆扩大培养,4 周后流式细胞仪(FACS)检测 GFP 阳性细胞比例判断转染率,结果转染率均大于 90%。

1.3 Realtime PCR 检测

PBS 清洗 3 次后在每个细胞培养孔中加入 1 mL TRIzol,吸

[基金项目] 国家重点实验室开放基金项目(SKLKF 201005)

[作者简介] 高天君(1966-),男,黑龙江省双鸭山市人,副主任医师,博士,主要从事临床骨肿瘤的基础研究。电话:(010)66775007,E-mail:kuanguanjie@126.com

[收稿日期] 2012-02-10 [修回日期] 2012-03-15

管反复吹打使细胞裂解均匀,然后吸至 1 mL 去酶 EP 管中。4 ℃,12 000 × g 离心 20 min 后吸取无色透明的上层水相至另一 EP 管中,4 ℃,7 500 × g 离心 5 min 后取沉淀。紫外分光光度计测定 RNA 的浓度及纯度后 -70 ℃保存。逆转录总 RNA 制备 cDNA。Realtime PCR 反应体系为:SYBR Green I master mix 10 μl、上下游引物(5 μmol/L)各 0.75 μl、cDNA 1 μl 和无酶 dH_2O 12.5 μl。其中 Hes1 上游引物::5'-GGCAGGCGCACCCCGCCTTG-3',下游引物:5'-GCAGCCAGGCTGGAGAGGCT-3';GAPDH 上游引物:5'-ATTGTCAGCAATGCATCCTGCA-3',下游引物:5'-AGACAACCTGGTCCTCAGTGTA-3'。采用两步法进行 PCR 扩增,扩增程序为:A(94 ℃,15 min);B(94 ℃,30 s);C(56 ℃,30 s);D(72 ℃,30 s)。其中 B 到 D 重复 45 个循环。目的 mRNA 量以 β-actin 相对量表示。

1.4 细胞凋亡检测

取对数生长期细胞,GSI 或化疗药物作用后,0.25% 胰酶消化,PBS 洗涤 3 次,台盼蓝染色计数活细胞后以 500 μl 检测缓冲液重悬,制成浓度为 1×10^6/mL 的细胞悬液。取 150 μl 细胞悬液于 EP 管中,加入 Annexin V-PE 和 5 μl 7-AAD 溶液(BD 公司)各 5 μl,混匀后室温避光孵育 15 min,在反应管中加 400 μl PBS,流式细胞仪检测,Annexin V^+/PI^- 细胞比例代表细胞凋亡率。

1.5 MTT 法检测细胞化疗药物抑制性

消化收集细胞调整为 6×10^5/mL 的细胞悬液。在 24 孔培养板中接种细胞悬液,每孔 200 μl,按前述浓度加入不同的化疗药物,混匀后置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱培养 48 h,之后每孔加入 20 μl MTT(5 mg/mL),继续培养 4 h。弃上清,吸水纸吸去残留液体,每孔加入 100 μl DMSO,轻轻振荡混匀,酶标仪 570 nm 处检测各孔吸光度(OD)值。细胞平均抑制率(IR) = (1 - 给药孔平均 OD 值/对照孔平均 OD 值) × 100%。

1.6 统计学分析

使用 SPSS 13.0 软件进行数据的统计分析,定量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)进行描述。两组间比较采用独立样本 t 检验,三组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 判断为有统计学意义。

2 结果

2.1 GSI 抑制人成骨肉瘤细胞 Notch1 信号通路

Realtime PCR 检测活化的 Notch1 受体 NICD 及其主要靶基因 Hes1 表达。结果发现 GSI 组 NICD mRNA(0.29 ± 0.03)较对照组(0.81 ± 0.06)明显降低,$P < 0.01$;同时 GSI 组 Hes1 mRNA(0.21 ± 0.02)也较对照组(0.75 ± 0.05)明显降低,$P < 0.01$。提示 GSI 可明显抑制 Notch1 受体激活,并降低其靶基因 Hes1 的表达。

2.2 GSI 促进人成骨肉瘤细胞凋亡

分别用顺铂、阿霉素和紫杉醇诱导人成骨肉瘤细胞凋亡,各药物作用下,GSI 组细胞凋亡率均明显高于对照组(表 1)。

表 1 各组人成骨肉瘤细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s$, $n = 6$, %)

分组	顺铂	阿霉素	紫杉醇
GSI 组	16.02 ± 2.14 *	15.48 ± 1.62 *	12.63 ± 1.81 *
对照组	10.26 ± 1.47	9.15 ± 1.08	8.06 ± 0.72

*:与对照组比较,$P < 0.01$

2.3 GSI 提高人成骨肉瘤细胞化疗药物敏感性

人成骨肉瘤化疗药物分别选用顺铂、阿霉素和紫杉醇。各化疗药物作用下,GSI 组人成骨肉瘤细胞抑制率均明显高于对照组(表 2),GSI 提高人成骨肉瘤细胞对化疗药物的敏感性。

表 2 成骨肉瘤细胞化疗药物抑制率比较($\bar{x} \pm s$, $n = 6$, %)

分组	顺铂	阿霉素	紫杉醇
GSI 组	37.15 ± 2.18 *	38.02 ± 3.06 *	36.27 ± 2.45 *
对照组	29.54 ± 1.87	30.31 ± 3.22	24.77 ± 2.08

*:与对照组比较,$P < 0.01$

2.4 过表达 Hes1 减弱 GSI 诱导的瘤细胞化疗药物敏感性增高

细胞转染过表达质粒 pCMV-Hes1 后,转染组 Hes1 mRNA 水平(1.23 ± 0.37)明显高于空载体质粒转染组(0.20 ± 0.02)及未转染对照组(0.19 ± 0.03),$P < 0.01$。在化疗药物顺铂作用下,过表达 Hes1 可降低人成骨肉瘤细胞的化疗药物抑制率,并且可以减少 GSI 导致的抑制率增加(表 3)。

表 3 成骨肉瘤细胞化疗药物抑制率比较($\bar{x} \pm s$, $n = 6$, %)

分组	转染过表达质粒 pCMV-Hes1	转染空载体质粒 vetor	未转染对照组
GSI 组	27.18 ± 2.24 *	35.45 ± 3.46	35.56 ± 3.34
对照组	21.41 ± 1.82#	28.37 ± 2.66	28.69 ± 1.92

*:与同组转染空载体质粒 vetor、未转染对照组比较,$P < 0.01$;#:与 GSI 组比较,$P < 0.01$

3 讨论

既往研究证明,Notch 信号通路在多种肿瘤细胞的分化、增殖及凋亡中发挥重要作用,决定细胞的命运[4]。Notch 信号通路主要由 Notch 受体、Notch 配体以及 CSL DNA 结合蛋白三部分组成[5]。Notch 受体在哺乳动物体内共发现 4 种基因,分别命名为 Notch1、Notch2、Notch3 和 Notch4。所有的同源 Notch 受体都是Ⅰ型跨膜蛋白,分为胞内区(Notch intracellular domain, NICD)与胞外区(Notch extracellular domain, NECD)。配体与 Notch 受体胞外区结合后,Notch 构象发生改变,暴露出肿瘤坏死因子-α-转化酶(TNF-α-converting enzyme, TACE)切割位点,被 TACE 金属蛋白酶切后发生第一次蛋白裂解,使得 Notch 受体的胞内区与胞外区分离。随后在 γ-分泌酶(γ-secretase)作

用下发生第二次裂解,使 Notch 受体的胞内区从近膜处脱离并释放进入细胞核。因此,NICD 是 Notch 的活化形式,它在细胞核通过其 RAM 域和锚蛋白样重复序列与转录抑制因子 RBP-Jκ 结合,形成转录激活复合物,激活其下游靶基因 Hes(hairy/enhancer of split)及 Hes 相关抑制蛋白 HERP 等转录,最终调节细胞功能。γ-分泌酶抑制剂(GSI)是常用的 Notch 信号通路激活抑制剂,GSI 可阻断 Notch 受体的第二次蛋白水解,阻止 Notch 胞内段的分离和核内转移,从而抑制 Notch 信号通路激活[6]。本研究中在成骨肉瘤细胞系中加入 GSI 后,Realtime PCR 检测发现,细胞 NICD 及其下游靶基因 Hes1 的表达均明显降低。证明 GSI 可以有效抑制成骨肉瘤细胞的 Notch1 信号通路激活。本研究还发现,GSI 抑制瘤细胞的 Notch1 信号通路,可以增加细胞对顺铂、阿霉素和紫杉醇三种化疗药物的敏感性,提示 Notch1 信号通路很有可能具有保护瘤细胞免受化疗药物损伤的作用,而 Notch1 则可能是成骨肉瘤细胞生长的促进因素之一。Notch1 信号通路与肿瘤的发生发展关系密切。研究发现,从正常宫颈组织到宫颈上皮内瘤样病变,再到早期高分化宫颈癌,Notch1 激活形式 NICD 表达量逐渐增高,但在晚期宫颈癌组织中 NICD 水平显著降低,提示 Notch1 在宫颈癌发生早期阶段为促癌作用,而晚期表现为抗癌作用,与本研究结果相反。但更多的研究发现,在不同组织来源和生长阶段,Notch1 信号对肿瘤的作用可能不同。而且在不同的肿瘤类型中,Notch1 信号可以分别具有促进肿瘤生长或抑制肿瘤生长的作用。这可能是上述貌似矛盾现象的原因之一。

肿瘤细胞的增殖和凋亡是决定肿瘤增生的重要因素,化疗药物多是通过促进肿瘤细胞凋亡和抑制其增殖发挥抗肿瘤作用的。研究表明,在乳腺癌 B 淋巴样细胞、红白血病细胞和卵巢癌细胞中 Notch 信号激活具有促凋亡作用[7-8],但在子宫内膜癌细胞株 HeLa 细胞和急性 T 淋巴细胞白血病细胞中 Notch 信号通路则扮演抗凋亡的角色[9-10]。本研究发现 GSI 抑制 Notch1 信号通路激活可以增加化疗药物诱导的成骨肉瘤细胞凋亡率,提示 Notch1 信号通路激活具有保护成骨肉瘤细胞中凋亡的作用,这也可能是 GSI 增加其化疗药物敏感性的机制之一。

另外,本研究通过质粒转染过表达 Hes1 可以降低成骨肉瘤细胞的化疗药物敏感性,而且过表达 Hes1 还可以阻断 GSI 诱导的瘤细胞化疗药物敏感性增加。国外学者发现[10],Hes1 在化疗药物诱导的骨髓瘤细胞凋亡中发挥重要作用,通过 GSI 抑制 Hes1 表达可以增加细胞凋亡率,且质粒介导的 Hes1 过表达可以降低细胞凋亡率,与本研究结果相似。他们认为 Hes1 抑制 Noxa 表达可能是其保护凋亡的原因之一。Noxa 是 Bcl-2 家族的促凋亡蛋白之一,Noxa 的表达主要受 p53 的调控,而 p53 正是 Hes1 的靶基因之一。同时研究还发现,Noxa 基因启动子上有 2 个 Hes1 蛋白的结合位点,提示 Hes1 也可能直接抑制 Noxa 表达[11]。因此本文推测,在成骨肉瘤细胞中,GSI 也可能通过降低 Hes1 上调 Noxa 表达,导致凋亡增加,从而增加瘤细胞对化疗药物的敏感性,但这些推测都需要进一步研究验证。

综上所述,GSI 通过抑制 Notch1 受体激活和下游靶基因 Hes1 表达促进成骨肉瘤细胞凋亡,进而增加成骨肉瘤细胞对化疗药物的敏感性。希望该研究能为提高成骨肉瘤早期综合治疗效果提供新的思路。

[参考文献]

[1] Zhang P, Yang Y, Nolo R, et al. Regulation of NOTCH signaling by reciprocal inhibition of HES1 and Deltex 1 and its role in osteosarcoma invasiveness[J]. Oncogene, 2010, 29(20): 2916 - 2926.

[2] Tao J, Chen S, Lee B. Alteration of Notch signaling in skeletal development and disease[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1192: 257 - 268.

[3] 杨彩虹,陈安民,曾 恒. 紫杉醇与常规化疗药物对人骨肉瘤细胞的毒性比较[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(18): 3095 - 3098.

[4] Shimojo H, Ohtsuka T, Kageyama R. Oscillations in notch signaling regulate maintenance of neural proge[J]. Neuron, 2008, 58(1): 52 - 64.

[5] 施荣茂,连小华. 毛囊干细胞巢研究现状[J]. 局解手术学杂志, 2011, 20(4): 436 - 438.

[6] Hozumi K, Negishi N, Tsuchiya I, et al. Notch signaling is necessary for GATA3 function in the initiation of T cell developm[J]. Eur J Immunol, 2008, 38(4): 977 - 985.

[7] Robert Moreno A, Espinosa L, Sanchez MJ, et al. The notch pathway positively regulates programmed cell death during erythroid differentiation[J]. Leukemia, 2007, 21(7): 1496 - 1503.

[8] Wang M, Wu L, Wang L, et al. Down-regulation of Notch1 by gamma-secretase inhibition contributes to cell growth inhibition and apoptosis in ovarian cancer cells A2780[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 393(1): 144 - 149.

[9] Perumalsamy LR, Nagala M, Sarin A. Notch-activated signaling cascade interacts with mitochondrial remodeling proteins to regulate cell survival [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(15): 6882 - 6887.

[10] Chadwick N, Zeef L, Portillo V, et al. Notch protection against apoptosis in T-ALL cells mediated by GIMAP5[J]. Blood Cells Mol Dis, 2010, 45(3): 201 - 209.

[11] Nefedova Y, Sullivan DM, Bolick SC, et al. Inhibition of Notch signaling induces apoptosis of myeloma cells and enhances sensitivity to chemotherapy[J]. Blood, 2008, 111(4): 2220 - 2229.

(编辑:余汇洋)