

[文章编号] 1007-385X(2003)03-0180-05

Notch1 基因转染对人肝癌细胞 Hep3B 生长的影响及作用机制的研究

齐润姿, 厉永建, 安华章, 于益芝, 杨小妍, 曹雪涛 (第二军医大学免疫研究所, 上海 200433)

[摘 要] **目的:** 研究逆转录病毒介导的 Notch1(ICN)基因转染对人肝癌细胞生长的影响,并对其作用机制进行了探讨。**方法:** 采用磷酸钙沉淀法质粒共转染 293T 细胞,制备出表达组成性活化形式的 Notch1(ICN)和/或绿色荧光蛋白(GFP)的逆转录病毒载体 MSCV-ICN/GFP 及对照逆转录病毒载体 MSCV-GFP,并检测病毒滴度。用逆转录病毒感染人肝癌细胞 Hep3B,观察病毒的感染效率,MTT 比色法测定瞬时表达 Notch1(ICN)对 Hep3B 人肝癌细胞生长的影响,利用流式细胞仪分析细胞周期分布的变化,Western blot 方法检测细胞周期调控蛋白的变化。**结果:** 通过质粒共转染可获得具有较高滴度的重组逆转录病毒。MTT 比色法显示瞬时表达 Notch1(ICN)基因可以抑制人肝癌细胞 Hep3B 的生长,瞬时表达 Notch1(ICN)基因可使 Hep3B 细胞周期停滞在 G₀/G₁ 期并上调细胞周期调控蛋白 P53 的表达水平。**结论:** Notch1 基因可通过影响细胞周期分布和 P53 蛋白的表达水平而抑制人肝癌细胞生长。

[关键词] 肝癌细胞; 组成性活化形式的 Notch1(ICN); 重组逆转录病毒载体; 生长; 细胞周期

[中图分类号] R735.7; R373.9 [文献标识码] A

The Effect of Notch1 Gene Transfection on the Growth of Hep3B Hepatocarcinoma Cells and the Related Mechanisms

QI Run-zi, LI Yong-jian, AN Hua-zhang, YU Yi-zhi, YANG Xiao-yan, CAO Xue-tao (Institute of Immunology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the effects of Notch1 gene transfection on the growth of human hepatocarcinoma cells and to explore the mechanisms of Notch signaling. **Methods:** Recombinant retrovirus MSCV-ICN/GFP and MSCV-GFP were prepared by calcium phosphate precipitation mediated gene transduction of 293T package cells. The recombinant retroviruses were used to infect human hepatocarcinoma cells Hep3B. After infected, proliferation of Hep3B cells was observed by MTT assay. Cell cycle distribution was analyzed by FACS and p53 expression was detected by Western blot. **Results:** After infection of MSCV-ICN/GFP recombinant retrovirus, the growth of Hep3B cells was inhibited significantly and cell cycle distribution analysis showed that Hep3B cells in G₀/G₁ phase were increased. Western immunoblotting showed that Notch1 signaling up-regulated p53 expression. **Conclusion:** Notch1 activation could inhibit the growth of hepatocarcinoma cells through G₀/G₁ cell cycle arrest and p53 induction.

[**Key words**] hepatocarcinoma cells; constitutively active Notch1; recombinant retrovirus; growth; cell cycle

* Notch1 参与多种细胞的分化发育过程,起重要的调控作用。Notch1 信号途径的病理生理改变与一些肿瘤的发生发展相关。对于某些肿瘤,Notch1 活化信号可抑制肿瘤的生长,例如,Notch1 信号的激活可抑制前列腺癌细胞的生长^[1]。活化的 Notch1 蛋白的过量表达可造成小细胞肺癌细胞 DMS53 和 NCI-H209 细胞形态学发生改变,其机制与肺癌细胞中 hASH1 蛋白迅速和完全的丢失和细胞周期阻滞在 G₁ 期有关,从而使肺癌细胞的生长停滞^[2]。研究表明,外源性 Notch 分子

胞内区(ICN)组成性活化形式的表达与 Notch 配体激活 Notch 分子后对靶细胞的作用是一致的^[3-4]。采用转基因的方法使细胞表达组成性活化形式的 Notch1 (ICN),可以影响肿瘤细胞的生长和细胞周期。鉴于此,我们应用一个携带 Notch1(ICN)/GFP 目的基因的

[基金项目] 国家自然科学基金(30121002)资助

[作者简介] 齐润姿(1973 -),女,南京人,博士研究生,主要从事肿瘤免疫方面的研究

[通讯作者] 曹雪涛

逆转录病毒以其为载体,研究 Notch1(ICN)基因表达在肝癌细胞生长中的调节作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

质粒小量抽提试剂盒购自上海华舜公司;质粒大量抽提试剂盒购自 Pierce 公司;内毒素去除溶液、无内毒素水、聚凝胺(polybrene)、氯喹购自 Sigma 公司;完全培养基包括:DMEM,10% 胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、0.01 mmol/L 丙酮酸钠、0.05 mmol/L 胺基乙酸、20 mmol/L Hepes、100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素均购自 Hyclone 公司,4℃ 保存备用;磷酸钙转染试剂盒购自 Promega 公司。MTT、二甲亚砜(DMSO)、saponin 购自 Sigma 公司。T-PER 组织蛋白提取试剂和 BCA 蛋白分析试剂购自 Pierce 公司;Western blot 分析所用抗体均购自 Santa Cruz 公司;SDS 上样缓冲液购自上海华舜公司;硝酸纤维素膜购自 Schleicher & Schuell 公司;自显影剂购自 Pierce 公司。

1.2 重组质粒的制备和鉴定

双嗜性逆转录病毒包装质粒 pKat、编码疱疹性口角炎病毒 G-糖蛋白的质粒 pCMV-VSV-G、编码标记基因绿色荧光蛋白的质粒 pMSCV-GFP 以及编码组成性活化形式 Notch1 胞内区的质粒 pMSCV-ICN/GFP 由美国哈佛大学麻省总医院癌症中心的 DT Scadden 博士惠赠。用氯化钙制备新鲜的感受态 DH-5 α 细胞,质粒转化感受态 DH-5 α 。挑取平板上的单克隆细菌,用含氨苄青霉素的 LB 培养基摇菌 12 h,质粒小量抽提试剂盒提取质粒,限制性酶切鉴定。

1.3 质粒 DNA 的大量制备

将含重组质粒的各个细菌摇菌 16 h,用质粒大量抽提试剂盒提取质粒,操作方法详见说明书。用 Endotoxin removal solution 按说明书方法去除所提质粒中的 LPS,100% 乙醇沉淀后,75% 乙醇洗涤,无菌间内风干,加入 Endotoxin-free water 溶解沉淀,检测 DNA 浓度。

1.4 细胞的培养

293T 细胞(ATCC)、人肝癌细胞株 Hep3B 细胞(ATCC)用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养传代。

1.5 重组逆转录病毒载体的制备

pKat, pCMV-VSV-G, pMSCV-GFP, pMSCV-ICN/GFP 载体用磷酸钙-DNA 共沉淀法转染 293T 细胞^[5]。操作方法详见参考文献和说明书。以 3×10^6 的 293T 细胞接种于 10 cm 培养皿内,培养过夜。转染前约 5 min 加入氯喹使其终浓度为 25 μ mol/L,转染后 10 h 更换新鲜培养基。收集转染后 48 ~ 72 h 的病毒上清,用 0.45 μ m 的滤器过滤,分装后冻存于 -80℃。

1.6 重组逆转录病毒滴度的测定^[6]

NIH3T3 细胞传代于 24 孔板中,待细胞形成 60% ~ 80% 汇合时,用于病毒滴度测定。将收集到的不同时间的病毒作 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 倍稀释,分别吸取 0.5 ml 稀释后的病毒液加入培养板,加入 polybrene 至终浓度为 8 mg/L,37℃ 培养 6 h 后,补加新鲜培养基至 1 ml 继续培养 3 d,荧光显微镜计数表达荧光蛋白的细胞。

1.7 重组逆转录病毒感染肝癌细胞

Hep3B 细胞接种于 24 孔板培养过夜,用 PBS 洗细胞 1 次,加入重组逆转录病毒上清和完全培养基,并加入 polybrene 至终浓度为 8 mg/L,1 700 r/min 离心 50 min,置 37℃,5% CO₂ 中培养 6 ~ 8 h 后,更换新鲜培养基过夜。在随后的 2 d 用同样的方式进行第 2 次和第 3 次基因转染。基因转染效率通过感染后第 4 天(感染结束后第 1 天)GFP 的表达来测量。Notch1(ICN)的蛋白表达用 Notch1 的抗体进行 Western blot 检测。

1.8 基因转染后肝癌细胞表面荧光蛋白的 FACS 鉴定

收集培养体系中重组逆转录病毒感染后的细胞,用 PBS 配成 1×10^6 细胞/ml 的细胞悬液,加入离心管,100 μ l/管,用流式细胞仪(FACS calibur, BD 公司)检测细胞表面 GFP 荧光蛋白的表达量,CellQuest 软件分析,可反映出重组逆转录病毒介导的基因转染效率。

1.9 MTT 法检测细胞增殖水平

将感染后的 Hep3B 细胞接种于 96 孔平底培养板,置 37℃,5% CO₂ 培养。检测当天,加入含 10% MTT(5 g/L)的培养基 100 μ l,继续孵育 4 h。离心,小心吸弃上清并加入 100 μ l/孔 DMSO,室温震荡 10 min 溶解胞内的 MTT formazan,酶联仪上 570 nm 波长读取吸光度值。

1.10 细胞周期分析

收集感染后不同时间的细胞,PBS 洗涤 2 次,用 70% 的冰乙醇固定,在 4℃ 放置 30 min,离心去除乙醇,冷 PBS 洗 3 次,加入打孔剂 saponin,4℃ 放置 15 min,加入 PI,流式细胞仪检测细胞周期分布。

1.11 Western blot 杂交

用 T-PER 组织蛋白提取试剂处理细胞提取胞内蛋白,12 kg 离心 5 min 后,吸取上清转移至新管,BCA 蛋白分析试剂检测蛋白浓度,操作方法详见说明书。计算各实验组的蛋白量,使各实验组的蛋白浓度保持一致;加入含二硫苏糖醇的 6 \times SDS 缓冲液裂解各处理组细胞,100℃ 煮沸 5 min,在电泳缓冲液(25 mmol/L Tris,250 mmol/L 甘氨酸,0.1% SDS)中进行 6% 或 12% SDS-PAGE,转移至硝酸纤维素膜。用含 10% 脱脂

奶粉的 TBST(20 mmol/L Tris-HCL,150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween)封闭 4 h,分别按说明书要求加入抗体: Notch1, p53。TBST 洗膜 3 次,HRP 标记的抗兔或抗羊 IgG 二抗作用 1 h,洗膜 3 次后,SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate 自显影。

1. 12 统计学分析

采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 时具有显著性差异。

2 结果

2.1 表达 Notch1(ICN)的重组逆转录病毒的制备

图 1 显示,293T 细胞在质粒转染后的 48 ~ 72 h,用荧光显微镜观察,细胞变圆,贴壁性变差,几乎大部分细胞均有荧光蛋白的表达,表明我们采用的磷酸钙沉淀法转染基因的效率较高。

图 1 293T 细胞经质粒转染后荧光蛋白的表达

Fig. 1 GFP expression in 293T cells 48 h after plasmids cotransfection

2.2 重组逆转录病毒滴度的测定

我们收集质粒转染 293T 细胞后 24 ~ 96 h 各个时间段的病毒上清,感染 NIH3T3 细胞,72 h 时计数表达荧光蛋白的细胞数,用来测定病毒的滴度。其中在转染后 48 ~ 72 h 收集的上清中病毒的滴度最高,均大于 10^5 /ml,我们挑选了质粒转染 293T 细胞后 60 h 收集的上清检测了其逆转录病毒的滴度,结果表明 MSCV-GFP 和 MSCV-ICN/GFP 重组逆转录病毒的滴度分别为 6.5×10^5 /ml 和 7.5×10^5 /ml。

2.3 重组逆转录病毒感染 Hep3B 肝癌细胞的效率

逆转录病毒连续 3 次感染 Hep3B 细胞,感染结束后的第 1 天,用荧光显微镜观察,表达 GFP 的 Hep3B 细胞较多,其平均荧光强度较高。经流式细胞仪分析 MSCV-GFP 和 MSCV-ICN/GFP 逆转录病毒的表达效率,结果如图 2 显示,MSCV-GFP 和 MSCV-ICN/GFP 逆转录病毒在 Hep3B 细胞中的平均感染效率分别为 53.14% 和 20.36%。

图 2 重组逆转录病毒对人肝癌细胞 Hep3B 的感染效率

Fig. 2 Transduction efficiency of human hepatocarcinoma cells Hep3B by recombinant retroviruses

GFP expression in transduced Hep3B cells was analyzed by FACS (Fluorescence intensity for GFP on the x-axis and cell numbers of Hep3B on the y-axis)

2.4 Notch1(ICN)对人肝癌细胞 Hep3B 生长的影响

Notch1 信号可影响多种细胞的生长。我们应用 MTT 比色法检测了 Notch1 (ICN) 表达对肝癌细胞 Hep3B 增殖水平的影响。收集感染后第 1 天的各组细胞,用相同的密度接种于 96 孔板,在接种后不同时间进行 MTT 检测,图 3 显示 MSCV-ICN/GFP 逆转录病毒感染后人肝癌细胞 Hep3B 生长变缓,从接种后的第 4 天开始差异显著。MTT 检测结果显示 Notch1(ICN) 的瞬时表达对人肝癌细胞 Hep3B 的生长有抑制作用。

图 3 组成性活化形式的 Notch1(ICN) 瞬时表达对 Hep3B 细胞增殖反应的抑制作用

Fig. 3 Constitutively active Notch1 inhibits the growth of Hep3B human hepatocarcinoma cells

Growth rate of Notch1- infected Hep3B cells was detected by MTT assays

2.5 Notch1(ICN) 的表达对人肝癌细胞 Hep3B 的细胞周期分布的影响

获得较高滴度的 MSCV-GFP, MSCV-ICN/GFP 逆转录病毒载体后,我们用病毒感染肝癌细胞,使 Hep3B 肝

癌细胞瞬时表达组成性活化形式的 Notch1, 利用流式细胞仪分析了逆转录病毒感染后人肝癌细胞 Hep3B 的细胞周期分布, (图 4) 为感染逆转录病毒后 24 ~ 72 h Hep3B 细胞周期的流式分析图, 结果显示实验组与对照

组相比 G_0/G_1 期细胞增多了 4.44% ~ 8.14% ($P < 0.05$), 具有显著差异, 而其它时相的细胞基本无变化。说明 Notch1 的瞬时表达可影响肝癌细胞 Hep3B 的细胞周期分布, 使 Hep3B 细胞周期停滞于 G_0/G_1 期。

图 4 组成性活化形式的 Notch1(ICN)瞬时表达对 Hep3B 细胞周期的影响

Fig. 4 Activation of Notch1 alters the cell cycle kinetics of human hepatocellular carcinoma cells
Hep3B cells were harvested 24 ~ 72 h postinfection for cell cycle analysis using propidium iodide staining.
Activated Notch1 transient expression caused G_0/G_1 arrest in Hep3B cells

2.6 Notch1(ICN)的表达对人肝癌细胞 Hep3B 的 p53 表达的影响

我们应用 Western blot 检测了部分细胞凋亡相关蛋白的表达。结果显示, 感染 MSCV-ICN/GFP 后 48 h Hep3B 细胞 p53 表达增高(图 5)。

3 讨论

细胞的分化、发育、生长是一个复杂的过程, 受到多种因素的调控。在多种组织和器官的早期发育过程中, Notch 家族成员对细胞的发育、生长、凋亡等起重要的调控作用。Notch 基因编码 I 型跨膜糖蛋白, 是保守的细胞膜表面受体, 可以通过与邻近细胞表面表达的 Notch 配体相互作用而被激活。正常的 Notch 信号由胞外区与其配体结合后触发, 受体和配体相互作用并进而激活 Notch, 在跨膜区裂开, 从膜上释放 Notch 胞内区(ICN)部分。ICN 进入细胞核内, 激活 Su(H)/CBF1 家族转录因子, 通过对靶基因表达的调控, 调节细胞的生长发育^[7-8]。作为一条新的信号传导途径, Notch1 信号活化后能够诱导人类造血祖细胞 $CD34^+$ 前

图 5 组成性活化形式的 Notch1(ICN)瞬时表达对 Hep3B 细胞 p53 表达的影响

Fig. 5 Activation of Notch1(ICN) induces expression of p53 in Hep3B cells. p53 expression was performed by Western blotting in Hep3B cells 48 h postinfection

体细胞分化延迟,通过影响 G_1 期改变细胞分化的动力学,并改变诸如细胞周期蛋白 D1, Rb 和 p16 等 G_1 期调节剂的作用^[9]。此外,Notch1 信号活化后可导致 B 细胞生长阻滞,并伴随细胞周期在 G_1 期的停滞和凋亡^[10]。通过转基因的研究发现 Notch 信号可以影响 CD4/CD8 和 $\alpha\beta/\gamma\delta$ T 细胞谱系在胸腺中的定向分化,调控发育中的 T 细胞的增殖、存活、和/或凋亡^[3,11]。

肝癌是一种恶性程度极高的肿瘤,它的发生、进展过程是多阶段性的。肝脏在慢性肝炎、肝硬化、黄曲霉素中毒等各种慢性肝损害的基础上,肝细胞的细胞周期调节机制发生异常,促使肝细胞永生,并进一步癌变,形成肝癌。绝大多数肝癌的发生与细胞周期 G_1 期调节机制异常有关。在长期的慢性炎症的刺激下, HGF, TGF- α , EGF 等因子持续上调或突变,使肝细胞长期处于分裂刺激的作用下, G_1 期细胞周期调节蛋白调节失常,导致肝细胞增殖过度,甚至癌变^[12-13]。因此我们设想 Notch1 是否能影响肝癌细胞增殖和细胞周期的变化,这种变化是否也通过影响细胞周期而起作用。

通过瞬时转染通常难以制备高滴度的重组逆转录病毒。许多因素可以影响逆转录病毒的滴度,如包装细胞的转染稳定性、表达载体的特征和质粒的拷贝数等。为了提高质粒的转染效率,我们采用内毒素去除试剂处理过的质粒转染 293T 细胞,转染后 48 ~ 72 h, 用荧光显微镜观察到几乎大部分的细胞均有荧光蛋白的表达,说明质粒的转染效率较高,可通过 293T 细胞生成具有较高滴度的逆转录病毒。

用病毒感染后的肝癌细胞作为瞬时表达组成性活化形式 Notch1 的细胞模型,采用 MTT 比色法检测组成性活化形式 Notch1 瞬时表达和稳定表达对肝癌细胞生长的影响,结果显示,与对照组相比,瞬时表达 Notch1(ICN)的人肝癌细胞 Hep3B 生长减缓。细胞的增殖取决于增殖细胞在胞外信号的影响下细胞周期的有序进展。细胞增殖水平主要受细胞周期 G_1 期时相调节^[14]。通过分析末次感染后不同时间段的肝癌细胞的细胞周期分布,发现 Notch1 的瞬时表达可以使 G_0/G_1 期的 Hep3B 细胞增多,表明 Notch1(ICN)的瞬时表达能够使肝癌细胞 Hep3B 细胞周期分布发生改变,细胞停滞于 G_0/G_1 期。细胞周期主要受细胞周期调节蛋白、细胞周期素、细胞周期素依赖性激酶和细胞周期素依赖性激酶抑制剂构成的网络调控。为了进一步探讨 Notch1 活化信号抑制 Hep3B 细胞生长及改变其细胞周期分布的机制,我们采用 Western 免疫印迹技术分析影响细胞周期相关蛋白的表达,证实 Notch1(ICN)可以诱导 p53 的表达。细胞在受到照射或药物

处理后, p53 会使细胞停滞在 G_1 期^[15], 提示 Notch1(ICN)有可能通过使 p53 过度表达而抑制 Hep3B 细胞的生长。

综上所述,本研究通过观察 Notch1 在调节肝癌细胞周期过程中的作用,探讨了 Notch1 活化信号抑制肝癌细胞增殖的作用的机制,从而对 Notch1 与肝癌的相互关系以及 Notch1 活化信号转导机制有了新的认识。

[参考文献]

- [1] Shou J, Ross S, Koeppen H, *et al.* Dynamics of notch expression during murine prostate development and tumorigenesis[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(19): 7291-7297.
- [2] Sriuranpong V, Borges MW, Ravi RK, *et al.* Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(7): 3200-3205.
- [3] Defetos ML, Huang E, Ojala EW, *et al.* Notch1 signaling promotes the maturation of CD4 and CD8 SP thymocytes[J]. *Immunity*, 2000, 13: 73-84.
- [4] Milner LA, Bigas A, Kopan R, *et al.* Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 13014-13019.
- [5] Mochizuki H, Schwartz JP, Tanaka K, *et al.* High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells[J]. *J Virol*, 1998, 72(11): 8873-8883.
- [6] Finer MH, Dull TJ, Qin L, *et al.* kat: A high-efficiency retroviral transduction system for primary human T lymphocytes[J]. *Blood*, 1994, 83(1): 43-50.
- [7] Tan-Pertel HT, Walker L, Browning D, *et al.* Notch signaling enhances survival and alters differentiation of 32D myeloblasts[J]. *Immunol*, 2000, 165: 4428-4436.
- [8] 齐润姿, 曹雪涛. Notch 的结构和信号转导[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2002, 9(3): 212-214.
- [9] Carlesso N, Aster JC, Sklar J, *et al.* Notch1-induced delay of human hematopoietic progenitor cell differentiation is associated with altered cell cycle kinetics[J]. *Blood*, 1999, 93(3): 838-848.
- [10] Morimura T, Goitsuka R, Zhang Y, *et al.* Cell cycle arrest and apoptosis induced by Notch1 in B cells[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(47): 36523-36531.
- [11] Radtke F, Wilson A, Stark G, *et al.* Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1[J]. *Immunity*, 1999, 10: 547-558.
- [12] Rossmanith W, Schulte-Hermann R. Biology of transforming growth factor beta in hepatocarcinogenesis[J]. *Microsc Res Tech*, 2001, 52(4): 430-436.
- [13] Ito Y, Takeda T, Sakon M, *et al.* Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2001, 84(10): 1377-1383.
- [14] Liu ZJ, Ueda T, Miyazaki T, *et al.* A critical role for cyclin C in promotion of the hematopoietic cell cycle by cooperation with c-myc[J]. *Mol and Cell Bio*, 1998, 18(6): 3445-3454.
- [15] 吴昊泉, 李昌本, 赵寿元. p53 功能缺陷型肿瘤的基因治疗[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2000, 7(2): 162-164.

[收稿日期] 2003-03-20

[修回日期] 2003-05-10