

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.01.008

· 基础研究 ·

## $\gamma$ -分泌酶抑制剂诱导 B 淋巴瘤细胞凋亡

章双凤<sup>1,3</sup>, 杨露君<sup>1</sup>, 滕熔<sup>2</sup>, 尤学芬<sup>2</sup>, 施文瑜<sup>2</sup> (1. 南通大学医学院 血液科, 江苏 南通 226001; 2. 南通大学附属医院 血液科, 江苏 南通 226001; 3. 宜兴市人民医院 血液科, 江苏 宜兴 214200)

**[摘要]** **目的:** 探讨  $\gamma$ -分泌酶抑制剂 (gamma-secretase inhibitor, GSI) 对伯基特淋巴瘤 (Burkitt lymphoma, BL) Namalwa 细胞增殖与凋亡的影响及其可能的作用机制。**方法:** GSI 处理 Namalwa 细胞后, MTT 法检测细胞增殖抑制率, 流式细胞术检测细胞的凋亡, Western blotting 法检测凋亡相关蛋白 caspase-9、caspase-3 以及 Notch 信号通路中 Notch1 蛋白胞内片段的表达。建立裸鼠移植瘤模型, 观察 GSI 对裸鼠移植瘤生长的抑制作用。**结果:** GSI 处理 Namalwa 细胞 48、72 h 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 2.14 和 0.61  $\mu\text{mol/L}$ , GSI 对 Namalwa 细胞的增殖抑制作用呈剂量和时间依赖性。GSI (1.25  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 Namalwa 细胞 24 h 后, 其凋亡率明显高于对照组 [(17.71  $\pm$  1.87)% vs (3.42  $\pm$  0.95)%,  $P < 0.01$ ]; 处理 48 h 后与对照组差异更为显著 [(43.68  $\pm$  0.53)% vs (4.65  $\pm$  0.8)% ,  $P < 0.01$ ]。GSI 处理 Namalwa 细胞 24、48 h 后, 凋亡蛋白 caspase-3、caspase-9 蛋白前体表达下降, caspase-9 活性片段表达上调, Notch1 蛋白胞内片段表达下降。GSI 处理后裸鼠移植瘤体积明显小于对照组 [13 d 时, (2.199  $\pm$  0.183) vs (1.15  $\pm$  0.399)  $\text{cm}^3$ ,  $P < 0.01$ ]; 瘤组织中 Namalwa 细胞的凋亡率明显高于对照组 [(5.3  $\pm$  0.48)% vs (2.1  $\pm$  0.26)% ,  $P < 0.01$ ]。**结论:** GSI 能够有效抑制 BL 细胞株 Namalwa 细胞的增殖及促进其凋亡, caspase-3 和 caspase-9 凋亡蛋白以及 Notch 信号通路可能参与 GSI 诱导 Namalwa 细胞凋亡的过程。

**[关键词]**  $\gamma$ -分泌酶抑制剂 (GSI); B 细胞淋巴瘤; 凋亡; Notch

**[中图分类号]** R733.4; R730.5; R979.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2015)01-0047-05

## Gamma-secretase inhibitor-induced B lymphoma cell apoptosis

Zhang Shuangfeng<sup>1,3</sup>, Yang Lujun<sup>1</sup>, Teng Rong<sup>2</sup>, You Xuefen<sup>2</sup>, Shi Wenyu<sup>2</sup> (1. Department of Hematology, Medical College of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu, China; 2. Department of Hematology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu, China; 3. Department of Hematology, Yixing People's Hospital, Yixing 214200, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of  $\gamma$ -secretase inhibitor (GSI) on proliferation and apoptosis of B lymphoma in vitro and in vivo. **Methods:** In experiments in vitro, Burkitt lymphoma (BL) Namalwa cells were treated with GSI at different concentrations. At different time points after treatment, cell viability and apoptosis were assessed by MTT assay and flow cytometry, respectively. Apoptosis-related proteins caspase-3 and caspase-9 and Notch signaling pathway proteins were assessed by Western blotting. In experiments in vivo, nude mice were injected with Namalwa cells. Mice that developed tumor lesions after xenograft implantation were treated with GSI or PBS. Tumor development was comparatively assessed in the two treatment groups. **Results:** GSI inhibited Namalwa cell proliferation in time- and dose-dependent manners; at 48 h and 72 h after treatment, the IC<sub>50</sub> value was 2.14  $\mu\text{mol/L}$  and 0.61  $\mu\text{mol/L}$ , respectively. GSI also induced Namalwa cell apoptosis in a time-dependent manner; (17.71  $\pm$  1.87)% of Namalwa cells treated with GSI at 1.25  $\mu\text{mol/L}$  but only 3.42  $\pm$  0.95% of cells treated with PBS underwent apoptosis at 24 h ( $P < 0.01$ ), and these numbers (43.68  $\pm$  0.53)% and (4.65  $\pm$  0.8)%, respectively, at 48 ( $P < 0.01$ ). Contents of caspase-3 and caspase-9 and intracellular Notch proteins were decreased but activated caspase-9 protein content was increased in a time-dependent manner in Namalwa cells after GSI treatment. In tumor-bearing nude mice, GSI treatment for 13 days resulted in a significant

**[基金项目]** 国家青年科学基金资助项目 (No. 81101786); 江苏省“六大人才高峰”资助项目 (No. 2011-ws-062)。Project supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (No. 81101786), and the Six Top Talents Foundation of Jiangsu Province (No. 2011-ws-062)

**[作者简介]** 章双凤 (1987 - ), 女, 安徽省绩溪县人, 硕士生, 住院医师, 主要从事血液肿瘤的基础和临床研究, E-mail: zsf4970@hotmail.com

**[通信作者]** 施文瑜 (Shi Wenyu, corresponding author), E-mail: shiwenyu@hotmail.com

decrease in the tumor volume as compared with the PBS control ( $2.199 \pm 0.183\%$  vs  $1.15 \pm 0.399\%$ ,  $P < 0.01$ ). Correspondingly, a significantly higher rate of apoptosis was detected in tumors from GSI-treated animals ( $5.3 \pm 0.48\%$ ) than in PBS-treated animals ( $2.1 \pm 0.26\%$ ) ( $P < 0.01$ ). **Conclusions:** GSI can efficiently inhibit the proliferation and promote apoptosis of B lymphoma cells, at least through regulating caspase-3 and caspase-9 and Notch signaling pathway. [ **Key words** ] Gamma-secretase inhibitor( GSI ); B lymphoma; apoptosis; Notch

[ Chin J Cancer Biother, 2015, 22(1): 47-51 ]

伯基特淋巴瘤( Burkitt lymphoma, BL )属高度恶性的非霍奇金淋巴瘤,好发于儿童<sup>[1]</sup>,进展快、病死率高。目前, BL 多采用化疗、放疗和手术等综合治疗,但疗效差、复发率高,且容易产生继发耐药,成年患者预后差,5年生存率仅30%左右<sup>[2]</sup>。近10年来,大量靶向药物问世,利妥昔单抗作为抗CD20抗体在B细胞淋巴瘤的治疗上取得了划时代的进步<sup>[3]</sup>,提示靶向治疗成为现今发展趋势。新一代潜在靶向抗肿瘤药物  $\gamma$ -分泌酶抑制剂( gamma-secretase inhibitor, GSI )是一类人工合成的抑制剂,过去人们对其研究多集中在阿尔茨海默病的治疗上<sup>[4]</sup>,近年来,人们逐渐发现 GSI 还具有很强的抗肿瘤效应<sup>[5]</sup>,其通过抑制 Notch 蛋白胞内片段的释放,阻断 Notch 信号通路的激活,从而诱导肿瘤细胞凋亡。本研究通过体内、外实验进一步验证 GSI 对 BL 细胞株 Namalwa 细胞是否具有抑制增值、促进凋亡的作用,为 BL 的治疗开辟新的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物、细胞株及主要试剂

Burkitt 淋巴瘤 Namalwa 细胞来自美国标准生物制品收藏中心( American Type Culture Collection ),用含10%胎牛血清 RPMI1640 完全培养液( Gibco, USA ),  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下常规培养。SPF 级 BALB/c 雌性裸鼠( 4~5 周 )购自上海实验动物中心,动物实验合格证号为: SCXK( 沪 )2012-0002。I 型  $\gamma$ -分泌酶抑制剂( GSI-I ) ( 产品编号: 565750 )购自美国 Calbiochem 公司, MTT 购自美国 Sigma 公司, Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 Invitrogen 公司, Tunel 试剂盒购自美国 Promega 公司, caspase-3 兔抗人多克隆抗体( 产品编号: 9665S )、caspase-9 兔抗人多克隆抗体( 产品编号: 9502 S )、Notch1 兔抗人多克隆抗体( 产品编号: 3268S )、GAPDH 兔抗人多克隆抗体( 产品编号: 2118S )均购自美国 Cell Signaling 公司,标记有辣根过氧化物酶的山羊抗兔二抗( 产品编号: 89368 )购自美国 Jacksonimmuno 公司。

### 1.2 MTT 法检测 GSI 作用后 Namalwa 细胞的增殖

取对数生长期 Namalwa 细胞,调整细胞至  $2 \times 10^4$  个/孔( 每孔体积  $200\ \mu\text{l}$  )接种于 96 孔板。按 GSI 终浓度分为 0.625、1.25、2.5 和 5.0  $\mu\text{mol/L}$  共四组,对照组加入等体积 PBS, 每组均设 3 个平行孔。细胞分别培养 48、72 h 后,加入质量浓度为 5 mg/ml 的 MTT 溶液,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  培养箱继续孵育 4 h,离心弃上清,加入  $150\ \mu\text{l}$  二甲亚砜( DMSO ),震荡 10 min 待结晶充分溶解后,于全自动酶标仪 490 nm 波长处测量每孔的光密度(  $D$  )值,按下列公式计算细胞增值抑制率: 细胞增值抑制率( % ) = ( 对照组  $D$  值 - 实验组  $D$  值 ) / 对照组  $D$  值  $\times 100\%$ 。再用半数抑制浓度(  $\text{IC}_{50}$  )分析软件( 版本 1.0.0 )计算出  $\text{IC}_{50}$  值。实验重复 3 次。

### 1.3 流式术检测 GSI 对 Namalwa 细胞凋亡的影响

取对数生长期的 Namalwa 细胞,以细胞  $4 \times 10^5$  个/孔( 每孔体积 2 ml )接种于 6 孔板。实验组选用终浓度为 1.25  $\mu\text{mol/L}$  的 GSI 与 Namalwa 细胞共培养 24、48 h, 对照组选用等量 PBS 与 Namalwa 细胞共培养, 每组均设 3 个复孔。根据 Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作: ( 1 )收集细胞  $1 \times 10^6$  个,  $1\ 000 \times g$  离心 5 min, 弃上清,用预冷的 PBS 洗两次; ( 2 )用  $100\ \mu\text{l}$  结合液重悬细胞; ( 3 )加入  $5\ \mu\text{l}$  Annexin-V 试剂及  $1\ \mu\text{l}$  PI 试剂( 100  $\mu\text{g/ml}$  )至  $100\ \mu\text{l}$  细胞悬液中,避光孵育 15 min 后,流式仪检测波长为 530 nm 处光密度(  $D$  )值。实验重复 3 次。

### 1.4 Western blotting 检测 Namalwa 细胞中凋亡蛋白 caspase-3、caspase-9 以及 Notch1 蛋白的表达

取对数生长期的 Namalwa 细胞,按  $2 \times 10^5$  个/ml 接种于培养皿,加入终浓度为 1.25  $\mu\text{mol/L}$  的 GSI, 对照组加入等体积的 PBS, 分别处理 24、48 h, 收集细胞,加  $100\ \mu\text{l}$  裂解液,冰上裂解 15~20 min,  $1\ 000 \times g$  离心 10 min, 取上清液,以 BCA 法测定蛋白浓度,并调节最终浓度为 4.0 mg/ml,电泳、转膜、封闭,以 TBST( 1:100 )稀释的 caspase-3、caspase-9 以及 Notch1 兔抗人抗体  $4\text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜,第 2 天以 1:5 000 的羊抗兔二抗孵育 1 h 后,洗膜 3 次,每次 10 min,发光、显影,以 Quantity One 软件分析结果。以 3-磷酸甘油醛脱氢酶( GAPDH )为内参照。

### 1.5 动物实验

裸鼠按完全随机分组法分成对照组和 GSI 治疗组,每组 4 只。两组动物分别在右前肢皮下注射  $1 \times 10^7$  个 Namalwa 细胞,10 d 左右即可在注射部位检测到肿瘤。在肿瘤达到 0.5 cm(长)  $\times$  0.5 cm(宽)时开始用药。GSI 治疗组腹腔注射 5 mg/kg(溶解于 100  $\mu$ l DMSO 中),每天 1 次,用药 5 d 后停止 2 d,再用药 5 d(共 10 d);对照组腹腔注射相同量生理盐水,注射时间与治疗组相同。

两组动物从治疗即日起,每 2 d 用游标卡尺测量一次小鼠肿瘤的长、宽径,肿瘤体积通过公式:  $V = 0.5 \times a(\text{长}) \times b(\text{宽})^2$  计算,并绘制肿瘤生长曲线图。留取肿瘤组织,用 10% 甲醛固定,石蜡包埋切片,用于 H-E 染色及细胞凋亡检测。

裸鼠肿瘤组织中细胞凋亡采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口标记(Tunel)法检测。按 Tunel 试剂盒说明完成切片染色:弃培养基,PBS 漂洗,4% 多聚甲醛固定,PBS 漂洗,1% Triton X-100 通透,漂洗,3%  $H_2O_2$  封闭,漂洗,加 DNase I 反应液反应,加入 TdT 酶反应液反应,最后于荧光显微镜激发波长 450 ~ 500 nm,发射波长为 515 ~ 565 nm 处检测荧光。镜下观察细胞核呈棕色的为凋亡细胞。通过计数每张切片中每个显微镜视野下调亡细胞占总细胞数的百分率,每张切片取 5 个视野,取其均值。

### 1.6 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 GSI 抑制 Burkitt 淋巴瘤 Namalwa 细胞的增殖

不同浓度(0.625、1.25、2.5、5.0  $\mu$ mol/L)的 GSI 处理 Namalwa 细胞 48 h 和 72 h,MTT 检测结果显示(图 1),GSI 对 Namalwa 细胞的增殖抑制存在浓度依赖性,随着 GSI 浓度的增加,Namalwa 细胞的增殖抑制率逐渐增加。GSI 对 Namalwa 细胞的增殖抑制也存在时间依赖趋势,其在 48 h 和 72 h 的  $IC_{50}$  值分别为 2.14  $\mu$ mol/L 和 0.61  $\mu$ mol/L。

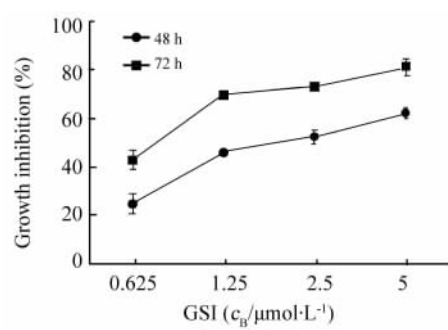


图 1 GSI 对 Namalwa 细胞增殖的抑制作用

Fig.1 Inhibitory effect of GSI on proliferation of Namalwa cells

### 2.2 GSI 诱导 Namalwa 细胞凋亡

流式细胞术检测(图 2)显示,1.25  $\mu$ mol/L 的 GSI 处理 Namalwa 细胞 24 h 后,凋亡率明显高于对照组[(17.71  $\pm$  1.87)% vs (3.42  $\pm$  0.95)% ,  $P < 0.01$ ],处理 48 h 后凋亡率更显著高于对照组[(43.68  $\pm$  0.53)% vs (4.65  $\pm$  0.80)% ,  $P < 0.01$ ]。实验结果提示,GSI 对 Namalwa 细胞有诱导凋亡作用,且存在时间依赖趋势。

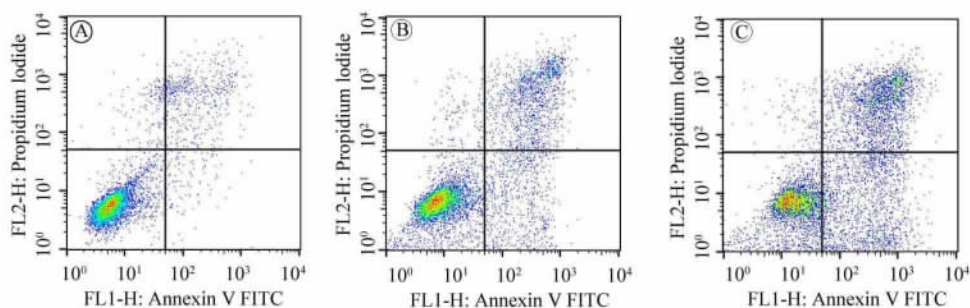


图 2 GSI 对 Namalwa 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of GSI on Namalwa cells apoptosis

A: Control group; B: 24 h group; C: 48 h group

### 2.3 GSI 上调 Namalwa 细胞凋亡蛋白 caspase-3 及 caspase-9 的活性,抑制 Notch1 蛋白胞内片段释放

Western blotting 检测结果(图 3)显示,2.5  $\mu$ mol/L GSI 作用 24、48 h 后,caspase-3、caspase-9 酶

原蛋白表达水平较对照组降低, caspase-9 裂解片段表达量增多, Notch1 蛋白胞内片段表达水平下降。实验结果提示, GSI 能够上调 Namalwa 细胞中 caspase-9 及 caspase-3 的活性, 抑制 Notch1 蛋白胞内片段释放。

2.4 GSI 抑制裸鼠模型中移植瘤的生长

在接种 Namalwa 细胞 10 d 后, 裸鼠接种部位出现了肿瘤。检测移植瘤生长情况(图 4)显示, 腹腔用药治疗 11 d 后, GSI 处理组裸鼠的肿瘤体积明显小于对照组裸鼠的肿瘤体积, 且在第 13 天时最为显著[(2.199 ± 0.183) vs (1.15 ± 0.399) cm<sup>3</sup>, P < 0.01]。H-E 染色(图 5)证实, 移植瘤细胞为 B 系淋巴瘤细胞。Tunel 染色(图 5)显示, GSI 处理组 Namalwa 细胞凋亡率显著高于对照组[(5.3 ± 0.48)% vs (2.1 ± 0.26)% , P < 0.01]。

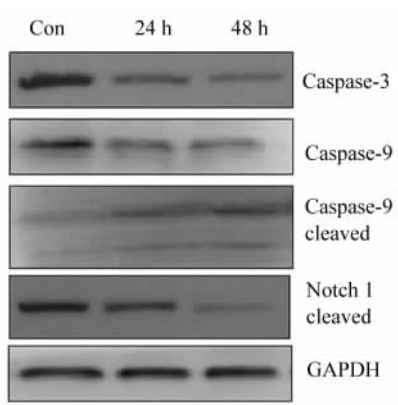


图 3 GSI 对 Namalwa 细胞中凋亡蛋白 caspase-3、caspase-9 以及 Notch1 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of GSI on expressions of apoptosis proteins caspase-3, caspase-9 and Notch1 in Namalwa cells

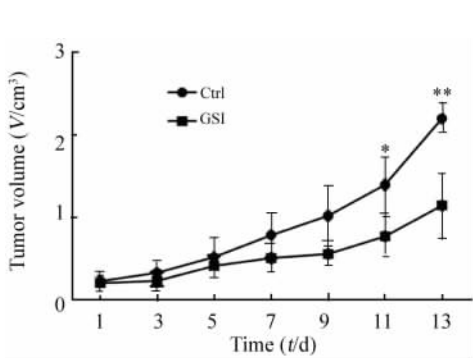


图 4 GSI 治疗显著抑制模型裸鼠移植瘤的生长

Fig. 4 GSI can efficiently inhibit the growth of xenografts in nude

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs Ctrl group

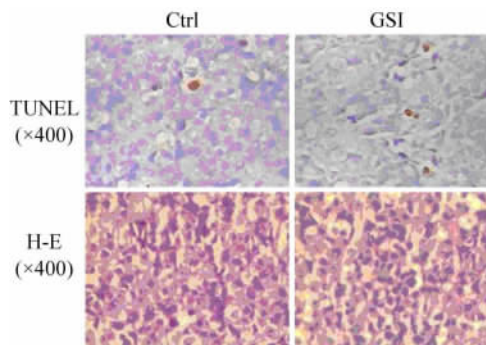


图 5 裸鼠移植瘤组织的 H-E 染色和 TUNEL 染色

Fig. 5 H-E staining and TUNEL staining of xenografts in nude mice

3 讨论

BL 是一种具有高度侵袭性的非霍奇金淋巴瘤, 其恶性程度高, 发展迅速, 病死率高, 其发病机制尚未明确。目前 BL 的治疗仍以化放疗为主, 随着现在对早期诊断、早期治疗的重视, 以及各种新型生物制剂的使用, 其治愈率有所提高, 但由于 BL 在治愈后 2 年内复发率高, 其治疗仍为一个难题。

研究发现, 在 BL 细胞中存在细胞周期蛋白、凋亡蛋白、细胞信号通路传导等方面的异常, 一些信号通路如 PI3K/AKT/mTOR、Notch、JAK/STAT、NF-κB 等在淋巴瘤发病中起着非常重要的作用。其中 Notch 信号决定了细胞的命运, 在许多器官及细胞的正常发育中发挥重要作用, 其异常与一系列肿瘤的发生、发展密切相关, 成为国内外研究的热点<sup>[6]</sup>。有研究<sup>[7-9]</sup>发现, 包括 BL 的许多实体瘤中也存在 Notch 信号通路的异常活化。因此选择针对恶性淋巴瘤赖以生存的信号通路的非化疗药物, 将弥补传统化疗的不足, 进一步提高疗效。

在正常造血细胞中, Notch 配体与相应 N 蛋白结合后, 使得横跨膜上的 S2、S3 断裂, 释放胞内 Notch (intracellular Notch, ICN), ICN 与转录因子 CSL 及转录共激活物结合, 可诱导下游靶基因 HES 表达。HES 又与其相应的效应基因的启动子特异性结合, 进行调控<sup>[10-11]</sup>。细胞中 Notch 的突变可以促进 ICN 的释放, 延长半衰期, 导致不正常肿瘤细胞的生长。而 GSI 可以通过抑制 S3 片段断裂来阻断 Notch 的激活, 抑制 ICN 释放, 诱导 Notch 突变的异常细胞周期阻滞和凋亡<sup>[12-13]</sup>。三种类型的 GSI (GSI-I, GSI-IX 以及 GSI-XII) 对 B 细胞恶性淋巴瘤以及急性粒细胞白血病细胞均有抑制作用, 并呈剂

量依赖性<sup>[14]</sup>。多项动物模型试验及人类临床 I 期研究已证实 GSI 这一抗肿瘤效应<sup>[15-16]</sup>。

本研究发现,GSI-I 对 Namalwa 细胞有显著抑制作用,从生长曲线还可见 GSI- I 对 Namalwa 细胞的抑制作用随着时间的增加而增加。为进一步明确 GSI- I 对 Namalwa 细胞的抑制作用,本实验利用流式细胞术分析了 GSI- I 对 Namalwa 细胞诱导凋亡的作用。结果显示,1.25  $\mu\text{mol/L}$  GSI-I 作用 24 h 后细胞凋亡率为(17.71  $\pm$  1.87)% ,48 h 为(43.68  $\pm$  0.53)% ,说明 GSI-I 对 Namalwa 细胞的诱导凋亡作用存在时间依赖性。

目前所知,Caspase 诱导细胞凋亡依赖的通路主要有两条<sup>[17]</sup>,其中一条由细胞外死亡信号激活,死亡信号通过细胞外死亡配体与膜上相应的死亡受体结合传递到细胞内部,细胞内的 caspase-2、8、10 被募集并激活;另一条通路则由细胞内应激信号激活,它主要由线粒体中的细胞色素 C 介导,导致 caspase-9 的激活。活化的 caspase 片段释放到胞质中启动 caspase 的级联反应,激活下游的效应 caspase,如 caspase-3、6、7,最终导致细胞凋亡<sup>[18]</sup>。为了明确 GSI 促凋亡机制,本实验检测了 GSI 作用 24、36 h Namalwa 细胞 caspase 家族蛋白的表达情况。结果显示,GSI 作用组 caspase-3、9 的酶原片段表达下调,而 caspase-9 的裂解片段表达增加,提示 GSI 可能是通过细胞内途径诱导细胞凋亡来达到抗肿瘤效应。

最后在移植瘤小鼠模型观察到,GSI 用药组裸鼠的肿瘤体积明显小于对照组裸鼠的肿瘤体积,Tunel 染色亦证实 GSI 对 Namalwa 异种移植肿瘤组织细胞促凋亡作用显著高于对照组。

目前为止,本研究解释 GSI- I 抗肿瘤效应的分子机制还远远不够,只是在一定程度上提示了 GSI- I 的可能机制,即通过抑制抗凋亡通路的活性以及下调一些细胞周期相关蛋白的表达。要深入认识 GSI- I 的作用机制还需要进一步研究。

## [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Hochberg J, Waxman IM, Kelly KM, et al. Adolescent non-hodgkin lymphoma and hodgkin lymphoma: State of the science [ J ]. Br J Haematol, 2009, 144( 1 ): 24-40.

[ 2 ] Han X, Kilfoy B, Zheng T, et al. Lymphoma survival patterns by WHO subtype in the United States, 1973-2003 [ J ]. Cancer Causes Control, 2008, 19( 8 ): 841-858.

[ 3 ] Kameta K, Yoshida T, Kaneshima H, et al. From the Japanese journal of clinical hematology, vol 54, no. 5, May 2013, picture in clinical hematology: Case of tropical malaria [ J ]. Rinsho

Ketsucki, 2013, 54( 5 ): 413.

[ 4 ] Selkoe D, Kopan R. Notch and presenilin: Regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration[ J ]. Annu Rev Neurosci, 2003, 26: 565-597.

[ 5 ] Shih IM, Wang TL. Notch signaling,  $\gamma$ -secretase inhibitors, and cancer therapy [ J ]. Cancer Res, 2007, 67( 5 ):1879-1882.

[ 6 ] Yin L, Velazquez OC, Liu ZJ. Notch signaling: Emerging molecular targets for cancer therapy [ J ]. Biochem Pharmacol, 2010, 80( 5 ): 690-701.

[ 7 ] Park JT, Li M, Nakayama K, et al. Notch-3 gene amplification in ovarian cancer [ J ]. Cancer Res, 2006, 66( 12 ): 6312-6318.

[ 8 ] Purow BW, Haque RM, Noel MW, 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.

[ 9 ] Kolb EA, Gorlik R, Keir ST, et al. Initial testing ( stage 1 ) by the pediatric preclinical testing program of R04929097, a  $\gamma$ -secretase inhibitor targeting notch signaling [ J ]. Pediatr Blood Cancer, 2012, 58( 5 ): 815-818.

[ 10 ] Jurynczyk M, Selmaj K. Notch: A new player in MS mechanism [ J ]. J Neuroimmunol, 2010, 218( 1/2 ): 3-11.

[ 11 ] Huang R, Zhou Q, Veeraraqoo P, et al. Notch2/Hes-1 pathway plays an important role in renal ischemia and reperfusion injury-associated inflammation and apoptosis and the gamma-secretase inhibitor DAPT has a nephroprotective effect [ J ]. Ren Fail, 2011, 33( 2 ):207-216.

[ 12 ] Weng AP, Ferrando AA, Lee W, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia [ J ]. Science, 2004, 306( 5694 ): 269-271.

[ 13 ] Malecki MJ, Sanchez-Irizarry C, Mitchell JL, et al. Leukemia-associated mutations within the NOTCH1 heterodimerization domain fall into at least two distinct mechanistic classes [ J ]. Mol Cell Biol, 2006, 26( 12 ): 4642-4651.

[ 14 ] Kogoshi H, Sato T, Koyama T, et al.  $\gamma$ -Secretase inhibitors suppress the growth of leukemia and lymphoma cells [ J ]. Oncol Rep, 2007, 18( 1 ): 77-80.

[ 15 ] De Keersmaecker K, Lahortiga I, Mentens N, et al. In vitro validation of gamma-secretase inhibitors alone or in combination with other anti-cancer drugs for the treatment of T-cell acute lymphoblastic leukemia [ J ]. Haematological, 2008, 93( 4 ): 533-542.

[ 16 ] Wang Z, Li Y, Sarkar FH. Notch signaling proteins: Legitimate targets for cancer therapy [ J ]. Curr Protein Pept Sci, 2010, 11( 6 ): 398-408.

[ 17 ] Long S, Wilson M, Bengten E, et al. Identification and characterization of a FasL-like protein and cDNAs encoding the channel catfish death-inducing signaling complex [ J ]. Immunogenetics, 2004, 56( 7 ): 518-530.

[ 18 ] Donepudi M, Mac Sweeney A, Briand C, et al. Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation [ J ]. Mol Cell, 2003, 11( 2 ): 543-549.

[ 收稿日期 ] 2014 - 10 - 23

[ 修回日期 ] 2014 - 12 - 07

[ 本文编辑 ] 阮芳铭