

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.02.009

· 临床研究 ·

Notch4通过调控活化转录因子2影响胰腺癌细胞的迁移和侵袭及其可能的机制

陈璐彦^{1a}, 孙耀^{1a}, 许朱榕^{1a}, 姚军¹, 钱翠娟^{1b,1c,2}(1. 台州学院 a. 医学院, b. 临床医学院, c. 肿瘤研究所, 浙江 台州 318000; 2. 台州市中心医院暨台州学院附属医院 消化内科, 浙江 台州 318000)

[摘要] **目的:** 探讨 Notch4 调控活化转录因子 2 (activating transcription factor 2, ATF2) 对胰腺癌 (pancreatic cancer, PC) 细胞侵袭和迁移的影响及其可能的机制。 **方法:** 收集台州学院附属医院 2015 年 2 月至 2019 年 7 月手术切除的 PC 组织及其配对的癌旁组织标本各 60 份, 采用免疫组织化学技术检测 Notch4 的表达水平。采用 siRNA 技术敲减 PC 细胞系 MiaPaCa-2 和 PANC-1 中 Notch4 基因的表达, Transwell 法分析 Notch4 敲减对细胞侵袭及迁移的影响, qPCR 及 Western blotting 法检测 Notch4 敲减对细胞中 Notch4 和 ATF2 的 mRNA 及蛋白表达的影响。 **结果:** 与癌旁组织相比, Notch4 在 PC 组织中的表达显著增加 ($P < 0.01$)。转染 Notch4 siRNA 后, MiaPaCa-2 和 PANC-1 中 Notch4 和 ATF2 mRNA 及蛋白表达水平显著下降 (均 $P < 0.01$)。与 Control siRNA 组比较, Notch4 siRNA 组的 PC 细胞迁移和侵袭能力显著降低 (均 $P < 0.01$)。 **结论:** Notch4 在 PC 组织中呈高表达, 敲减 Notch4 可在转录水平下调 ATF2 的表达, 进而抑制 PC 细胞的侵袭及迁移能力。

[关键词] 胰腺癌; Notch4; 活化转录因子 2; siRNA; 基因敲减

[中图分类号] R735.9; R730.23 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)02-0156-05

Notch4 affects migration and invasion of pancreatic cancer cells by regulating activated transcription factor 2 and its possible mechanism

Chen Luyan^{1a}, Sun Yao^{1a}, Xu Zhurong^{1a}, Yao Jun¹, Qian Cuijuan^{1b,1c,2}(1. a. Medical school, b. School of Clinical Medicine, c. Institute of Tumor, Taizhou University, Taizhou 318000, Zhejiang, China; 2. Department of Gastroenterology, Taizhou Central Hospital & Taizhou University Hospital, Taizhou 318000, Zhejiang, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Notch4 regulating ATF2 (activating transcription factor 2) on the invasion and migration of pancreatic cancer (PC) cells and its possible mechanism. **Methods:** A total of 60 pairs of PC tissues and corresponding para-cancerous tissues that surgically resected at Taizhou University Hospital during February 2015 and July 2019 were collected for this study. The expression of Notch4 was detected by immunohistochemistry. siRNA technology was used to knock down Notch4 gene expression in PC cell lines (MiaPaCa-2 and PANC-1). Transwell assay was used to analyze the effect of Notch4 knockdown on cell invasion and migration. qPCR and Western blotting (WB) were used to detect the effects of Notch4 knockdown on mRNA and protein expressions of Notch4 and ATF2. **Results:** Compared with para-cancerous tissues, the expression of Notch4 in PC tissues significantly higher ($P < 0.01$). After Notch4 siRNA transfection, the mRNA and protein expressions of Notch4 and ATF2 in MiaPaCa-2 and PANC-1 cells significantly decreased (all $P < 0.01$). Compared with Control siRNA group, the migration and invasion ability of PC cells in Notch4 siRNA group significantly reduced (all $P < 0.01$). **Conclusion:** Notch4 is highly expressed in PC tissues. Knockdown of Notch4 can down-regulate the expression of ATF2 at the transcriptional level, thereby inhibiting the invasion and migration ability of PC cells.

[Key words] pancreatic cancer (PC); Notch4; activating transcription factor 2 (ATF2); siRNA; gene knockdown

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(2): 156-160. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.02.009]

[基金项目] 浙江省医药卫生科技计资助(No. 2019RC314); 浙江省自然科学基金项目资助(No. LY16H160033); 国家级大学生创新创业训练计划资助项目(No. 201910350008)。Project supported by the Medical and Health Science and Technology Project of Zhejiang Province (No. 2019RC314), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. LY16H160033), and the National College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program of China (No. 201910350008)

[作者简介] 陈璐彦(1998-), 女, 本科生, 主要从事肿瘤细胞信号转导的基础及临床研究, E-mail: lotus2006wh@sina.com

[通信作者] 姚军(YAO Jun, corresponding author), 博士, 教授, 主要从事肿瘤细胞信号转导的基础研究, E-mail: yaojunzu@yeah.net; 钱翠娟(QIAN Cuijuan, corresponding author), 博士, 主要从事消化系统肿瘤与细胞信号转导的研究, E-mail: qiancuijuan2007@163.com

胰腺癌(pancreatic cancer, PC)是一种进展迅速、临床预后极差的消化系统恶性肿瘤,发病率呈逐年增加趋势,5年生存率低于5%^[1-3]。肿瘤的侵袭和转移是导致PC治疗失败、预后不佳乃至患者死亡的主要原因。因此,探索PC侵袭转移的相关机制,对于合理设计治疗药物、改善PC的诊疗现状具有重要意义。

人类的Notch受体有4种,分别为Notch1~4^[4-6]。研究^[5-7]发现,Notch1~3对肿瘤有抑制或促进的作用。作为同一家族的Notch4在结构上与Notch1~3相似,但目前关于Notch4在肿瘤中的研究相对较少。Notch家族在多种肿瘤的发生发展及侵袭转移中发挥了重要作用^[5-6],其中Notch4通路在肝细胞癌、头颈鳞癌、大肠癌等多种肿瘤细胞的侵袭转移中起不可忽视的作用^[8-17],Notch4通路阻滞可抑制肝癌细胞的侵袭能力^[8]。同时研究表明,活化转录因子2(activating transcription factor 2, ATF2)在多种肿瘤的发生发展及侵袭转移中发挥了重要作用^[18-20]。下调ATF2表达可抑制PC细胞的侵袭能力^[21-22],但是对于ATF2是否参与了Notch4对PC侵袭转移的调节,以及Notch4与ATF2之间的相互作用及调节关系尚不清楚。本研究旨在探索Notch4通过ATF2调控PC细胞迁移及侵袭的作用及机制,为以后PC的临床治疗提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 临床样本、细胞株和主要试剂

收集2015年2月至2019年7月台州学院附属医院病理确诊的60例胰腺癌患者癌组织及距离癌灶边缘3~5 cm的癌旁组织。均经液氮速冻后置于-80℃冰箱中保存。研究方案经本单位医学伦理委员会批准,所有标本获取前均告知患者并签署知情同意书。

人PC细胞系PANC-1(低分化)、MIAPaCa-2(未分化)购自美国组织培养库(American Tissue Culture Collection, ATCC),由本实验室传代保存。靶向特定序列的Notch4 siRNA和阴性对照杂乱siRNA(Control siRNA,即与任何基因不同源的非特异性siRNA)由上海GenePharma有限公司合成。M-Per哺乳动物蛋白提取试剂盒购自美国Pierce公司,Rever Transcriptase M-MLU逆转录试剂盒、SYBR Green Master Mix Kit实时荧光定量PCR(qPCR)试剂盒均购自日本TaKaRa公司。DMSO购自Sigma公司,RPMI 1640培养液、胎牛血清均购自美国Gibco公司,Transwell小室购自Corning公司,基质胶购自美国BD公司,ATF2抗体(目录号ab47476)、Notch4抗体(目录号ab184742)均购自美国Abcam公司,辣根过氧化物酶(HRP)偶联的兔二抗购自

美国Santa Cruz公司,GAPDH抗体购自杭州贤至生物科技有限公司,ECL试剂盒购自美国Pierce公司,PVDF膜购自美国Millipore公司。LAS-4000成像系统购自日本Fujifilm Holdings公司,X71荧光显微镜购自日本Olympus公司。

1.2 细胞的传代培养

当PANC-1、MIAPaCa-2细胞生长接近90%汇合时进行传代。弃去陈旧培养基,用PBS冲洗后,加入少量0.05%的胰蛋白酶,37℃消化1 min。显微镜下观察,细胞皱缩呈圆形,细胞间隙增大。此时加入少量含有血清的完全培养基,用弯头吸管轻轻吹打使细胞脱离瓶壁成为单细胞悬液。按1:2~1:4分入新培养瓶中,再加入5 ml培养液,置于37℃、5%CO₂孵箱中培养。

1.3 免疫组织化学检测Notch4在PC组织中的表达

将60例胰腺癌患者的癌组织及癌旁组织制备组织芯片,利用免疫组化染色检测Notch4在PC及其配癌旁组织中的表达水平,并对染色结果进行分析。

Carcangiù半定量法^[23]作为免疫组化结果判断标准,以视野内阳性细胞占细胞总数的百分比和细胞着色强度进行计分。每张切片随机选择5个视野,每个视野500个细胞,共计2 500个细胞。阳性细胞所占百分比按<5%、5%~<35%、35%~<70%和≥70%分别计为0、1、2和3分;细胞着色强度按无色、淡黄色、棕黄色和棕褐色依次计为0、1、2和3分。计算上述两项评分之乘积,结果≤3分判定为阴性,>3分判定为阳性。

1.4 Notch4 siRNA转染PC细胞

将PC细胞接种于6孔板(4×10⁴个/孔),并在2 ml含有10%FBS细胞培养液中培养至细胞达到70%汇合。使用脂质体将Notch4 siRNA和Control siRNA(100~200 nmol/L)转染PC细胞,48 h后进行后续实验。

Notch4 siRNA序列为5'-GGCGACGUCGCU-CACCAAdTdT-3'和5'-UUGGUGAGCGACGUCC-GCCdGdG-3'; Control siRNA序列为5'-UUCUCC-GAACGUGUCACGUdTdT-3'和5'-ACGUGACAC-GUUCGGAGAAAdTdT-3'。

1.5 Transwell法检测转染Notch4 siRNA对PC细胞迁移、侵袭能力的影响

根据对PC细胞不同的转染处理,实验分为空白对照组(Blank Control,无转染)、Control siRNA组和Notch4 siRNA组。

Transwell细胞迁移实验:将独立包装的小室在无菌条件下取出,37℃放置1 h。以PBS冲洗聚碳酸酯膜外壁后,将小室放入24孔细胞培养板。收集对数生长期人PC细胞,加入2 ml含1%胎牛血清的培养液,将细胞充分吹散混匀后计数,调整密度至2×10⁵

个/ml,取细胞悬液 250 μ l 加入小室。以血清浓度差作为趋化条件,24孔板下室加入 500 μ l 含 15% 胎牛血清的培养液,细胞接种后培养 24 h,取出小室,去除小室内培养液,甲醇固定 10 min,置于 DAPI 细胞核染料(0.5 μ g/ml)中染色 5 min,冲洗后用棉签擦去上室内的细胞,用镊子尖将聚碳酸酯膜切下后贴于干净载玻片上,以荧光淬灭剂封片;荧光显微镜(IX71;Olympus 公司,日本)观察及拍照,随机选取 5 个视野计数细胞数,取平均数。

Transwell 细胞侵袭实验:将上室内铺好基质胶的小室在无菌条件下取出,在 Transwell 上室加入 300 μ l 预温的无血清培养基,室温下静置 30 min,使基质胶再水化,吸去剩余培养液;收集细胞,加入 2 ml 含 1% 胎牛血清的培养液,将细胞充分混匀后计数,调整密度至 4×10^5 个/ml 左右。取细胞悬液 250 μ l 加入 Transwell 小室,24孔板下室加入 500 μ l 含 15% 胎牛血清的培养液,细胞接种后培养 24 h,小心移除上室内的细胞悬液,再在干净的 24 孔板中每孔加入 400 μ l 细胞染料,使膜浸没在染料中,室温下放置 30 min,将小室放在干净的水中清洗几次,用棉签轻轻擦去基质胶和上室内的细胞,24 孔板中加入 200 μ l 裂解试剂,将小室置于其中,室温下放置 15 min。轻轻前后移动小室使细胞充分裂解;取 100 μ l 混悬液转移至 96 孔板内,使用酶标仪检测 560 nm 处光密度(D)值。

1.5 qPCR 检测 PC 细胞中 Notch4、ATF2 mRNA 的表达

取 Notch4 siRNA 组和 Control siRNA 组细胞,根据试剂制造商的说明书使用 TRIzol 试剂分离细胞总 RNA。采用逆转录试剂盒对 Notch4 和 ATF2 的 mRNA 进行逆转录,生成第一个互补的脱氧核糖核酸(cDNA)链。然后,使用 qPCR 检测试剂盒检测 Notch4、ATF2 mRNA 的表达水平。qPCR 反应体系(总体积 25 μ l):含 Taq 酶、SYBR 染料的预混液 12.5 μ l,正、反向引物各 0.5 μ l,cDNA 2 μ l,ddH₂O 9.5 μ l。qPCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C、30 s,95 $^{\circ}$ C、3 s,60 $^{\circ}$ C、30 s,重复 40 个循环;95 $^{\circ}$ C、15 s,60 $^{\circ}$ C、60 s,95 $^{\circ}$ C、15 s。以 GAPDH 基因为内参照,通过 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算目的基因 mRNA 相对表达水平。相应基因引物见表 1。

1.6 Western blotting(WB)检测 PC 细胞中 Notch4 及 ATF2 的表达

取 Notch4 siRNA 组和 Control siRNA 组细胞,按试剂盒说明操作提取各组 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞中总蛋白,使用 Bio-Rad 测定法定量检测蛋白质浓度。提取的蛋白行 SDS-PAGE,将分离的蛋白质转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜,将 PVDF 膜置于封闭液(含 5% 脱脂奶粉的洗膜缓冲液)中室温缓慢振荡 90 min,与抗 ATF2 或 Notch4

的一抗(1:1 000)共同孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜。洗膜后加入兔二抗(1:2 500)在室温下孵育 1 h。以 GAPDH 作为内参照。使用增强的化学发光系统 ECL 试剂盒对目标蛋白进行可视化处理,然后使用 LAS-4000 成像系统进行扫描检测,并利用 ImageJ 软件进行条带灰度分析,计算目的蛋白相对表达量。

表 1 Notch4、ATF2 与 GAPDH 基因扩增的引物

Tab.1 Primers for the amplification of Notch4, ATF2 and GAPDH

Gene	Primer sequence
Notch4	F: 5'-CCACTAGGCGAGGACAGCATT-3'
	R: 5'-CAACTCCATCCTCATCAACTTCTG-3'
ATF2	F: 5'-GCAACGACCGTAATCGCATC-3'
	R: 5'-CCATTGCCGGCTAGGGTTTA-3'
GAPDH	F: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'
	R: 5'-GGATCTCGCTCCTGGAAGATG-3'

1.7 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件处理,呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验;计数资料采用 χ^2 检验;多组资料之间的比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Notch4 在 PC 组织中呈高表达

免疫组织化学检测结果(图 1)显示,Notch4 蛋白在 PC 组织及癌旁组织的细胞核和细胞质中均有分布,其中细胞核表达稍多。Notch4 蛋白在 PC 组织中阳性表达率为 81.67%(49/60),在癌旁组织中阳性表达率为 36.67%(22/60),差异具有统计学意义($\chi^2 = 25.15, P < 0.01$)。

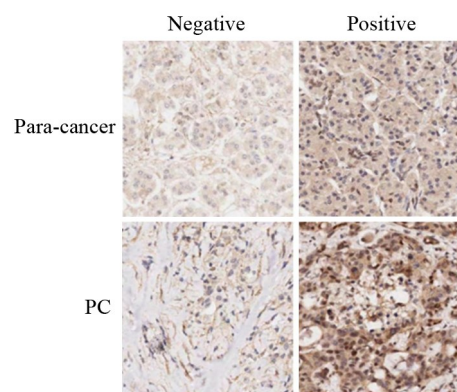


图 1 免疫组化检测 Notch4 在 PC 组织及癌旁组织中的表达($\times 200$)

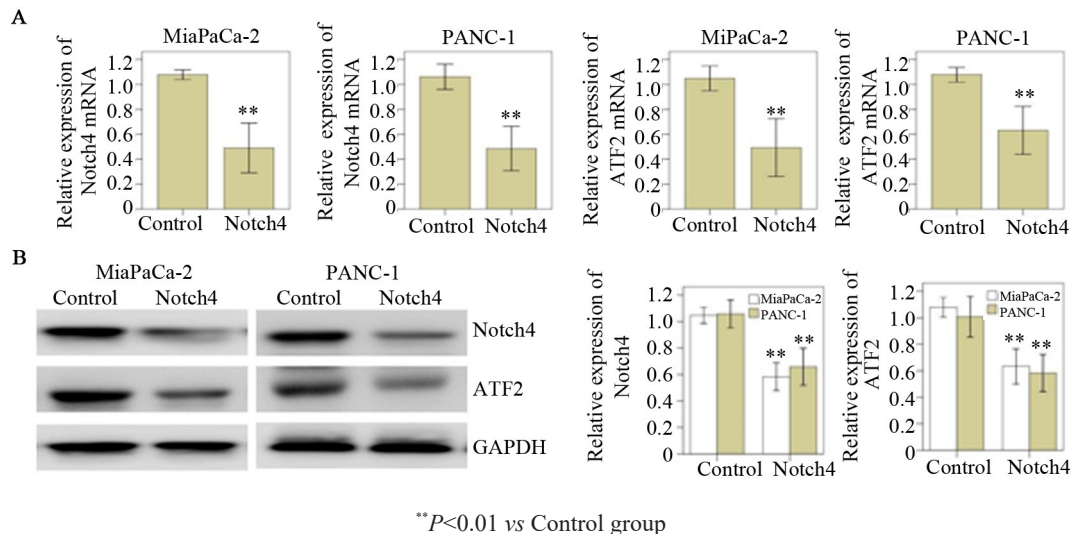
Fig. 1 Immunohistochemical detection of Notch4 expression in pancreatic cancer tissues and para-cancerous tissues ($\times 200$)

2.2 转染 Notch4 siRNA 下调 PC 细胞中 Notch4、ATF2 mRNA 和蛋白的表达

qPCR 法及 WB 检测结果显示,与 Control siRNA 组比较,Notch4 siRNA 组 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞中的 Notch4 mRNA(图 2A)及蛋白(图 2B)表达水平显著降低(均 $P < 0.01$)。并且,Notch4 敲减显著下调了 MiaPaCa-2 和 PANC-1 细胞中 ATF2 mRNA(图 2A)及蛋白(图 2B)表达水平(均 $P < 0.01$)。

2.3 敲减 Notch4 抑制 PC 细胞的迁移和侵袭

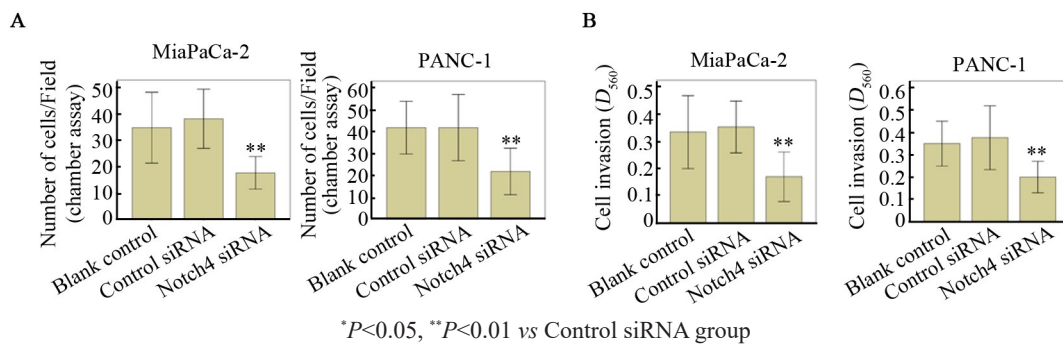
采用 siRNA 技术敲减 Notch4 的 mRNA 及蛋白表达水平之后,细胞迁移(图 3A)和侵袭(图 3B)检测结果显示,与 Control siRNA 组比较,Notch4 siRNA 组细胞的迁移和侵袭能力显著降低(均 $P < 0.01$),Blank Control 组与 Control siRNA 组之间的迁移和侵袭能力间无显著差异(均 $P > 0.05$)。



** $P < 0.01$ vs Control group

图2 转染 Notch4 siRNA 下调 PC 细胞中 Notch4 和 ATF2 mRNA(A)及蛋白(B)的表达

Fig.2 Transfection of Notch4 siRNA down-regulated the expression of Notch4 and ATF2 mRNA (A) and protein (B)



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control siRNA group

图3 敲减 Notch4 降低 PC 细胞的迁移(A)和侵袭(B)能力

Fig.3 Knockdown of Notch4 reduces the migration (A) and invasion (B) ability of PC cells

3 讨论

Notch4 参与了多种肿瘤侵袭转移的调节作用^[18-17]。ATF2 是参与细胞对压力的反应和 DNA 损伤的 ATF/cAMP-反应元件结合蛋白家族中的一种多功能转录因子,也参与调节乳腺癌、前列腺癌、PC 等肿瘤的上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transitions, EMT)及侵袭转移过程^[18-22]。已有研究^[21-22]证实,下调 ATF2 表达可抑制 PC 细胞的侵袭能力。然而,ATF2 是否参与了 Notch4 对 PC 侵袭转移调节机制,以及 Notch4 与 ATF2 之间的相互作用及调节关系尚不清楚。

Notch4 表达在口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)肿瘤和神经周围浸润阳性病例的组织中显著上调,而通过 siRNA 敲低 Notch4 表达可抑制高转移性 OSCC 细胞 HSC-3 的细胞迁移能力^[24]。本研究对 Notch4 在 PC 组织及其配对癌旁组织中的表达水平进行了比较,发现与癌旁组织相比,Notch4 在 PC 组织中呈高表达(图 1),提示 Notch4 在 PC 发生发展的过程中起着重要作用。本实验以低分化和未分化人 PC 细胞系 PANC-1 和 MiaPaCa-2 为实验对象,通过转染 Notch4 siRNA 敲减 Notch4 表达,发现敲减 Notch4 显著抑制了 PC 细胞迁移和侵袭能力。

为了探讨 Notch4 与 ATF2 之间的相互作用机制, 本研究检测了 Notch4 敲减后 PC 细胞中 Notch4 和 ATF2 mRNA 及蛋白的表达水平变化, 发现 Notch4 敲减显著下调 PC 细胞中 ATF2 mRNA 及蛋白的表达, 提示 Notch4 敲减后可能在 mRNA 转录水平下调 ATF2 的表达水平, 进而抑制 PC 细胞侵袭及转移能力。然而, Notch4 在 PC 中对 ATF2 的转录调控具体机制仍需进一步研究。

综上, Notch4 在 PC 组织中呈高表达, Notch4 可通过上调 ATF2 mRNA 及蛋白的表达增强 PC 细胞的迁移和侵袭能力。本研究为阐明 Notch4 对 ATF2 基因的转录调控的机制, 及在 Notch4 调节 PC 侵袭转移过程中 ATF2 是否发挥了关键的介导作用等科学问题上提供了研究思路, 并为 PC 的分子诊断及靶向治疗提供新的实验依据。

[参考文献]

- [1] MCGUIGAN A, KELLY P, TURKINGTON R C, et al. Pancreatic cancer: a review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes[J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(43): 4846-4861. DOI: 10.3748/wjg.v24.i43.4846.
- [2] KARAKAS Y, LACIN S, YALCIN S. Recent advances in the management of pancreatic adenocarcinoma[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2018, 18(1): 51-62. DOI:10.1080/14737140.2018.1403319.
- [3] REN B, CUI M, YANG G, et al. Tumor microenvironment participates in metastasis of pancreatic cancer[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 108. DOI:10.1186/s12943-018-0858-1.
- [4] BRZOWA-ZASADA M, PIECUCH A, MICHALSKI M, et al. Notch and its oncogenic activity in human malignancies[J]. *Eur Surg*, 2017, 49(5): 199-209. DOI:10.1007/s10353-017-0491-z.
- [5] BIGAS A, ESPINOSA L. The multiple usages of Notch signaling in development, cell differentiation and cancer[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2018, 55: 1-7. DOI:10.1016/j.ceb.2018.06.010.
- [6] HARBUZARIU A, OPREA-ILIES G M, GONZALEZ-PEREZ R R. The role of notch signaling and leptin-notch crosstalk in pancreatic cancer[J/OL]. *Medicines (Basel)*, 2018, 5(3): E68[2019-07-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6164868/>. DOI: 10.3390/medicines5030068.
- [7] RODRIGUES C, JOY L R, SACHITHANANDAN S P, et al. Notch signalling in cervical cancer[J]. *Exp Cell Res*, 2019, 385(2): 111682. DOI:10.1016/j.yexcr.2019.111682.
- [8] CHENG R, CAI X R, KE K, et al. Notch4 inhibition suppresses invasion and vasculogenic mimicry formation of hepatocellular carcinoma cells[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2017, 37(5): 719-725. DOI:10.1007/s11596-017-1794-9.
- [9] FUKUSUMI T, GUO T W, SAKAI A, et al. The NOTCH4-HEY1 pathway induces epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(3): 619-633. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-17-1366.
- [10] ZHANG Z X, BU X, YANG J Y, et al. NOTCH4 regulates colorectal cancer proliferation, invasiveness, and determines clinical outcome of patients[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(10): 6975-6985. DOI:10.1002/jcp.26619.
- [11] BUI Q T, IM J H, JEONG S B, et al. Essential role of Notch4/STAT3 signaling in epithelial-mesenchymal transition of tamoxifen-resistant human breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2017, 390: 115-125. DOI:10.1016/j.canlet.2017.01.014.
- [12] BONYADI RAD E, HAMMERLINDL H, WELS C, et al. Notch4 signaling induces a mesenchymal-epithelial-like transition in melanoma cells to suppress malignant behaviors[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(7): 1690-1697. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-15-1722.
- [13] ZHANG J W, KUANG Y L, WANG Y, et al. Notch-4 silencing inhibits prostate cancer growth and EMT via the NF- κ B pathway[J]. *Apoptosis*, 2017, 22(6): 877-884. DOI:10.1007/s10495-017-1368-0.
- [14] WU G Y, CHEN Z P, LI J, et al. NOTCH4 is a novel prognostic marker that correlates with colorectal cancer progression and prognosis[J]. *J Cancer*, 2018, 9(13): 2374-2379. DOI:10.7150/jca.26359.
- [15] HARISHANKAR M K, MOHAN A M, KRISHNAN A V, et al. Downregulation of Notch4-a prognostic marker in distinguishing oral verrucous carcinoma from oral squamous cell carcinoma[J]. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2019, 85(1): 11-16. DOI:10.1016/j.bjori.2017.09.005.
- [16] GRAGNANI L, FOGNANI E, DE RE V, et al. Notch4 and mhc class II polymorphisms are associated with hcv-related benign and malignant lymphoproliferative diseases[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(42): 71528-71535. DOI:10.18632/oncotarget.17655.
- [17] LIN X, SUN B C, ZHU D W, et al. Notch4⁺ cancer stem-like cells promote the metastatic and invasive ability of melanoma[J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(8): 1079-1091. DOI:10.1111/cas.12978.
- [18] WATSON G, RONAI Z A, LAU E. ATF2, a paradigm of the multifaceted regulation of transcription factors in biology and disease[J/OL]. *Pharmacol Res*, 2017, 119: 347-357[2019-07-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5457671/>. DOI: 10.1016/j.phrs.2017.02.004.
- [19] HARPER K L, SOSA M S, ENTENBERG D, et al. Mechanism of early dissemination and metastasis in Her2⁺ mammary cancer[J]. *Nature*, 2016, 540(7634): 588-592. DOI:10.1038/nature20609.
- [20] MURILLO-GARZÓN V, GORROÑO-ETXEBARRIA I, ÅKERFELT M, et al. Frizzled-8 integrates Wnt-11 and transforming growth factor- β signaling in prostate cancer[J/OL]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1747[2019-07-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5931552/>. DOI:10.1038/s41467-018-04042-w.
- [21] LI M, WU X D, LIU N, et al. Silencing of ATF2 inhibits growth of pancreatic cancer cells and enhances sensitivity to chemotherapy[J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41(6): 599-610. DOI:10.1002/cbin.10760.
- [22] WU X D, LIU Z, GUO K J, et al. Inactivation of ATF-2 enhances epithelial-mesenchymal transition and gemcitabine sensitivity in human pancreatic cancer cells[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3): 4463-4471. DOI:10.1002/jcb.27734.
- [23] CARCANGIU M L, CHAMBERS J T, VOYNICK I M, et al. Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptor content in 183 patients with endometrial carcinoma. Part I: Clinical and histologic correlations[J]. *Am J Clin Pathol*, 1990, 94(3): 247-254. DOI:10.1093/ajcp/94.3.247.
- [24] MK H, PRINCE S, MOHAN A M, et al. Association of Notch4 with metastasis in human oral squamous cell carcinoma[J]. *Life Sci*, 2016, 156: 38-46. DOI:10.1016/j.lfs.2016.05.019.

[收稿日期] 2019-09-25

[修回日期] 2020-01-10

[本文编辑] 黄静怡