

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.05.003

· 基础研究 ·

顺铂通过 Notch4 信号通路增强口腔鳞癌干细胞的自我更新能力

贾怡婷¹, 孙博文^{2,3} (1. 上海中医药大学 研究生院, 上海 201203; 2. 上海健康医学院 医学技术学院 生物化学教研室, 上海 201318; 3. 上海中医药大学, 上海 201203)

[摘要] **目的:** 研究 Notch4 信号通路对口腔鳞癌 PJ15 和 PJ41 细胞的肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC) 自我更新能力的影响及其作用机制。**方法:** 利用 TCGA 数据库分析 Notch4 基因在头颈部肿瘤中的表达。2 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理口腔鳞癌 PJ15 和 PJ41 细胞 48 h, 再加入 Notch 通路抑制剂 DAPT 作用 24 h, 采用流式细胞术检测 CSC 比例, Western blotting 法和 qPCR 法检测 CSC 标志物 (Sox2、Bmi-1、Oct4、Nanog) 和 Notch4 信号通路中的下游基因 (JAG1、HEY1、HEY2、HES1、HES2、DLL4 等) 的表达。采用 siRNA 技术敲降 Notch4, Western blotting 法和 qPCR 法检测 si-Notch4 和顺铂对 CSC 标志物表达水平的影响, 干细胞成球实验检测 CSC 的自我更新能力。**结果:** 头颈部肿瘤组织中 Notch4 基因呈高表达 ($P=0.046$)。顺铂处理后, PJ15 和 PJ41 细胞中 NICD4 和 CSC 标志物 (Sox2、Bmi-1、Oct4、Nanog) 和 Notch4 信号通路的下游基因 (JAG1、HEY1、HEY2、HES1、HES2、DLL4) 的表达水平较对照组均显著增加 (均 $P<0.05$), ALDH1 阳性细胞群体比例显著增加 ($P<0.05$); 再加入 Notch 通路抑制剂 DAPT 作用 24 h 后上述基因表达量均显著下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。敲降 Notch4 后, 与对照组相比, si-Notch4 组 PJ15 细胞 [(1.33 \pm 0.47) vs (8.00 \pm 0.82) 个, $P<0.01$] 和 PJ41 细胞 [(1.00 \pm 0.82) vs (7.67 \pm 1.25) 个, $P<0.01$] 球体的数量和大小均显著减少; 再加入 2 $\mu\text{mol/L}$ DDP 作用 24 h, si-Notch4 组 Nanog 和 Bmi-1 基因表达量与对照组无显著差异。**结论:** 激活 Notch4 信号通路可增加口腔鳞癌 PJ15 和 PJ41 细胞的干细胞自我更新能力。

[关键词] 口腔鳞癌; PJ15 细胞; PJ41 细胞; 肿瘤干细胞; 自我更新; Notch4; 顺铂

[中图分类号] R739.85; R730.2; R730.53 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)05-0487-09

Cisplatin increases self-renewal ability of oral squamous cell carcinoma stem cells through Notch4 signaling pathway

JIA Yiting¹, SUN Bowen^{2,3} (1. Graduate School, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Department of Biochemistry, School of Medical Technology, Shanghai University of Medicine & Health Science, Shanghai 201318, China; 3. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Notch4 signaling pathway on the self-renewal capacity of cancer stem cells (CSCs) of oral squamous cell carcinoma PJ15 and PJ41 cells and its mechanism. **Methods:** The expression of Notch4 gene in head and neck tumors was analyzed using TCGA database. 2 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin was used to treat oral squamous cell carcinoma PJ15 and PJ41 cells for 48 h, following with the treatment of Notch pathway inhibitor DAPT for 24 h. Flow cytometry was used to detect the ratio of CSCs, Western blotting and qPCR were used to detect the expressions of CSCs markers (Sox2, Bmi-1, Oct4, Nanog) and downstream genes in Notch4 signaling pathway (JAG1, HEY1, HEY2, HES1, HES2, DLL4, etc.). Notch4 was knocked down by siRNA technology. Notch4 was silenced with siRNA technology. Western blotting and qPCR were used to detect the effect of si-Notch4 and cisplatin on the expression level of CSCs markers. The stem cell pelleting test was used to detect the self-renewal ability of CSCs. **Results:** Notch4 gene was highly expressed in head and neck tumor tissues ($P=0.046$). After cisplatin treatment, compared with the control group, expressions of NICD4 and CSCs markers (Sox2, Bmi-1, Oct4, Nanog) as well as downstream genes of Notch4 signaling pathway (JAG1, HEY1, HEY2, HES1, HES2, DLL4, etc.) increased significantly (all $P<0.05$), and the proportion of ALDH1 positive cells increased significantly ($P<0.05$); with the further addition of DAPT, the expressions of the above genes decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). After knocking down Notch4, compared with the control group, the size and number of spheres of PJ15 cells [1.33 \pm 0.47] vs [8.00 \pm 0.82], $P<0.01$ and PJ41 cells [(1.00 \pm 0.82) vs (7.67 \pm 1.25), $P<0.01$] were significantly lower than that of the control group; after the addition

[基金项目] 上海市自然科学基金资助项目 (No. 16ZR1416100)。Project supported by the Natural Science Foundation of Shanghai City (No. 16ZR1416100)

[作者简介] 贾怡婷 (1994-), 女, 硕士生, 主要从事头颈部肿瘤发生发展的机制及治疗研究, E-mail: jmario@163.com

[通信作者] 孙博文 (SUN Bowen, corresponding author), 博士, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事肿瘤干细胞的研究, E-mail: sunbw@sumhs.edu.cn

of 2 $\mu\text{mol/L}$ DDP for 24 h, there was no significant difference in the expressions of Nanog and Bmi-1 gene between si-Notch4 group and control group. **Conclusion:** Activation of Notch4 signaling pathway can enhance the self-renewal ability of CSCs in oral squamous cell carcinoma PJ15 and PJ41 cells.

[Key words] oral squamous cell carcinoma; PJ15 cell; PJ41 cell; cancer stem cell (CSC); self renewal; Notch4; cisplatin

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(5): 487-495. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.05.003]

口腔鳞癌是头颈部肿瘤的一种,是世界上第六大常见的癌症类型,大多数口腔鳞癌的发病和病死发生在发展中国家^[1-2],患者的5年生存率不到60%^[3-4]。大多数患者发现较晚、肿瘤复发率高、对治疗不敏感以及缺乏特异的治疗靶点是导致口腔鳞癌患者生存率较低的主要原因^[5]。肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)存在于多种肿瘤中,在肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[6-7]。Notch通路是一类高度保守的信号转导通路,在哺乳动物中有该通路的4种受体(Notch1~4),可影响不同类型细胞的增殖和凋亡,该信号通路的激活已被证实与癌症发病机制有关,异常激活的Notch信号通路在肿瘤干细胞的自我更新中也发挥重要作用^[8-11]。既往研究^[12-14]大多侧重于Notch4与上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的影响,关于肿瘤干细胞自我更新能力的研究极少,特别是在头颈部肿瘤干细胞中的作用尚少见报道。本研究探讨Notch4信号通路在口腔鳞癌干细胞的自我更新中发挥的作用,为寻找头颈部肿瘤的治疗靶点提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

口腔鳞癌细胞系PJ15、PJ41,购自南京科佰生物科技有限公司,用含10%胎牛血清和双抗的IMDM培养基常规培养。顺铂(cisplatin, DDP)注射液购自江苏豪森药业集团有限公司(批准文号:国药准字H20040813;商品名称为诺欣,规格:6 ml、30 mg, 5 mg/ml),Notch信号通路抑制剂(3,5-二氟苯乙酰基)-L-丙氨酰基-L-2-苯基甘氨酸叔丁酯{N-[(3,5-difluorophenyl) acetyl]-l-alanyl-2-phenyl} glycine-1, 1-dimethylethylester, DAPT}购自Tocris公司,IMDM培养基、DMEM/F12培养基和血清均购自Gibco公司,Western blotting(WB)使用的一抗如 α 微管蛋白(α -Tubulin)、Nanog、Bmi-1、Oct4、Notch4受体的胞内结构域(Notch intracellular domain4, NICD4)单克隆抗体均购自Abcam公司, NICD1、Notch2、Notch3单抗均购自CST公司, Split多毛增强子1(hairy/enhancer of split1, HES1)、HEY2(hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 2)单抗均购自Absin公司,HRP标记的山羊抗兔二抗、HRP标记的山羊抗小鼠二抗均购自雅酶公司,qPCR使用的总RNA提取试剂盒购自

TIANGEN公司,PrimeScript™逆转录试剂盒购自TaKaRa公司,ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (Low ROX Premixed)试剂盒购自诺唯赞公司,流式细胞术使用的ALDEFLUOR KIT试剂盒购自Stem cell公司,肿瘤干细胞成球实验使用的无血清补充剂B27、EGF、bFGF、胰岛素和BSA均购自Thermo Fisher公司,Lipofectamine3000转染试剂购自Thermo Fisher公司。qPCR引物由赛音生物技术(上海)有限公司合成,si-Notch4及NC(对照组)由上海吉玛公司合成。

1.2 CCK-8法检测顺铂对口腔鳞癌细胞增殖的影响

将PJ15和PJ41细胞分别以 1.2×10^4 个/孔、溶液体积为100 μl 接种于96孔板,培养至对数生长期后加入顺铂至终浓度0、1、2、4、8 $\mu\text{mol/L}$,以0 $\mu\text{mol/L}$ 为对照,其余均为药物处理组,每个浓度设3个复孔。48 h后每孔均加入10 μl CCK-8试剂,置于细胞培养箱至颜色变为橙色,用酶标仪测量450 nm处的光密度(D)值,以顺铂浓度 $[c_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})]$ 作为横坐标,以细胞存活率(%)作为纵坐标绘制细胞增殖曲线。

1.3 TCGA数据库分析头颈鳞癌Notch1~4基因的表达

从加利福尼亚大学圣克鲁兹数据库(University of California Santa Cruz Xena, UCSC Xena)^[15]中选择头颈部肿瘤癌症基因组图谱(The cancer genome atlas Head and Neck Cancer, TCGA HNSC),输入Notch1~4,再选基因表达谱和样本类型,下载数据,去除空值以及2例转移病例,最终得到44例正常人和564例肿瘤患者的相关数据。再将数据导入R语言中,利用R做箱线图,采用Wilcoxon检验分析正常组与肿瘤组间的基因表达量差异($P < 0.05$ 认为有显著差异)。

1.4 顺铂诱导口腔鳞癌干细胞的产生及其鉴定

口腔鳞癌细胞系PJ15、PJ41长至对数生长期时,加入2 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱培养48 h,用质量分数为0.25%的胰酶消化,收集细胞,通过WB、qPCR及流式细胞术鉴定Nanog、Bmi-1、SOX2、Oct4、ALDH1等肿瘤干细胞特异性生物标志物的表达。

1.5 细胞转染与分组

取PJ15、PJ41细胞接种于6孔板内,细胞生长至50%~60%汇合时进行分组处理:(1)检测顺铂对CSC标志物和Notch通路相关基因和蛋白表达情况的影

响, PJ15 和 PJ41 细胞均分为 4 组, 即对照 (NC) 组 (不加顺铂处理) 和 0.02、0.2、2 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理组, 加入顺铂处理 48 h 后进行后续实验; (2) 检测敲降 Notch4 基因后顺铂对 CSC 的影响时, PJ15 和 PJ41 细胞均分为 4 组, 即 NC+0、2 $\mu\text{mol/L}$ DDP 组和 si-Notch4+0、2 $\mu\text{mol/L}$ DDP 组, 按照 Lipofectamine 3000 说明书进行转染, 每孔 si-Notch4 量为 100 pmol, 转染 48 h 后加入 DDP 作用 24 h, 收集细胞, 进行后续实验; (3) 检测抑制 Notch4 信号通路对 CSCs 特异性标志物和 Notch 通路下游基因、蛋白表达的影响时, PJ15 和 PJ41 细胞用 2 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理 48 h 后, 各自分为 2 组, 即对照组 (仅加入 DMSO) 和实验组 (5 $\mu\text{mol/L}$ DAPT), 24 h 后进行后续实验。

1.6 WB 法检测目的基因和蛋白表达水平

收集各组 PJ15 和 PJ41 细胞, 随后使用 RIPA 缓冲液 (含蛋白酶抑制剂混合物) 裂解细胞, 提取蛋白后采用二喹啉酸 (bicinchoninic acid, BCA) 试剂盒测定蛋白浓度。上样缓冲液中加入萃取的蛋白, 加热至 100 $^{\circ}\text{C}$, 维持 3 min, 使蛋白变性。10% 和 12% SDS-PAGE 分离蛋白质, 采用湿转法转膜, 置于冰上, 200 mA、120 min, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 去除脱脂牛奶, 采用 1 \times TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min; 加入用 5% 脱脂牛奶稀释的一抗 Nanog (1:1 000)、Bmi-1 (1:1 000)、Oct4 (1:1 000)、SOX2 (1:500)、Notch1 (1:1 000)、Notch2 (1:1 000)、Notch3 (1:1 000)、Notch4 (1:5 000)、HES1 (1:1 000)、HEY2 (1:500)、 α -Tubulin (1:8 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜孵育; 去除一抗, 采用 1 \times TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 随后加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:10 000) 或 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 二抗 (1:10 000), 室温摇床孵育 1 h; 去除二抗, 采用 1 \times TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, ECL 发光显色, 暗室曝光。

1.7 qPCR 检测顺铂或 DAPT 对 CSC 标志物和 Notch 通路相关基因表达的影响

收集各组 PJ15 和 PJ41 细胞, 根据总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA。按照逆转录试剂盒将 RNA 反转录合成 cDNA。以 GAPDH 为内参, 检测目的基因 mRNA 表达水平。引物设计见表 1。反应程序设定为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 扩增共 40 个循环, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、60 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s。反应结束后整理数据, 并对所得数据 Ct 值进行分析, 以 GAPDH 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 算法计算所测基因 mRNA 相对表达量。

1.8 Annexin-V-FITC 染色流式细胞术检测顺铂或敲降 Notch4 基因对 PJ15 和 PJ41 CSC 比例的影响

各组 PJ15 和 PJ41 细胞用无钙镁 PBS 清洗 2 次后用胰酶消化, 锥虫蓝计数后记下活细胞所占比例, 选

细胞活力 90% 以上的细胞进行后续实验。用 ALDEFUOR 缓冲液将细胞密度调整为 1×10^7 个/ml, 共 1 ml, 标记为样品管; 随后加 5 μl DEAB 于另一离心管内, 标记为对照管。加入 5 μl 活化的 ALDEFUOR™ 试剂于样品管内, 混匀并立即取 500 μl 到对照管内, 后将样品管和对照管在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 以 250 \times g 离心所有试管 5 min 并除去上清液, 加 500 μl ALDEFUOR™ 缓冲液重悬, 转移到流式管内按照 ALDEFLOUR KIT 流式细胞仪检测试剂盒操作说明书, 测定不同组细胞的 CSC 比例, 采用 FlowJo 软件进行数据分析。

表 1 qPCR 引物序列
Tab.1 Primer sequences of qPCR

Gene	Sequence
Oct4	F: CTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAA R: CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA
Bmi-1	F: TGGAGAAGGAATGGTCCACTTC R: GTGAGGAACTGTGGATGAGGA
Nanog	F: AATACCTCAGCCTCCAGCAGATG R: TGCGTCACACCATTGCTATTCTTC
SOX2	F: AAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGGAG R: AGCTGTCATTTGCTGTGGGTGATG
Notch1	F: ACCTTGGCGGTCTCGTAGCT R: CCGCAGTTGTGCTCCTGAA
Notch2	F: TCCTTCATTACACAGGGTTCA R: GGAGGCGACCGAGAAGAT
Notch3	F: CTGACTGCTCCCTGCCAGAT R: GTAGCCAGGTGGGCAGGA
Notch4	F: AGACGTGCCAGTTTCTGAC R: GGTGTCAATGGAGAGGGAGA
JAG1	F: ATCGTGCTGCCTTTTCAGTTT R: TCAGGTTGAACGGTGTGTCATT
DLL4	F: TCTCGCTCATCATCGAAGC R: TGCTGATGAGTGCATCTGGT
HES1	F: AACACGACACCCGGATAAACC R: TTGCTCTTCGTCTTTTCTCCA
HES2	F: CTGCGCAAGAGCCTGAAG R: GGCAGGATGAGCCCCCTTA
HEY1	F: CCAGAAAAAGACGGAGAGGA R: CTGGGTACCAGCTTCTCAG
HEY2	F: GGCAAGAAAGAAAAGGAGAGG R: TCAAAAAGCAGTTGGCACAAG
GAPDH	F: TGAAGGTCGGAGTCAACGGATT R: CCTGGAAGATGGTGTGGGATT

1.9 肿瘤干细胞成球实验观察敲降 Notch4 对 PJ15 和 PJ41 CSC 成球能力的影响

PJ15 和 PJ41 细胞均分为 2 组, 即对照组 (NC) 和实验组 (si-Notch4), 将 si-Notch4 转染后的 PJ15 和 PJ41 细胞消化后计数, 以 5×10^3 个/孔细胞数接种至低吸附 6 孔板中, 加入在含有 1 \times B27、5 $\mu\text{g/ml}$ 胰岛素、20 ng/ml EGF、10 ng/ml bFGF、0.4% BSA 的干细胞培养基中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱内培养 7 d, 在倒置光学显微镜 ($\times 200$) 下观察肿瘤干细胞成球的大小、数量并拍照。

1.10 统计学处理

采用 GraphPad Prism 6 软件绘制图片以及分析处理数据, 正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数差异比较采用 *t* 检验, 多组间数据差异比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

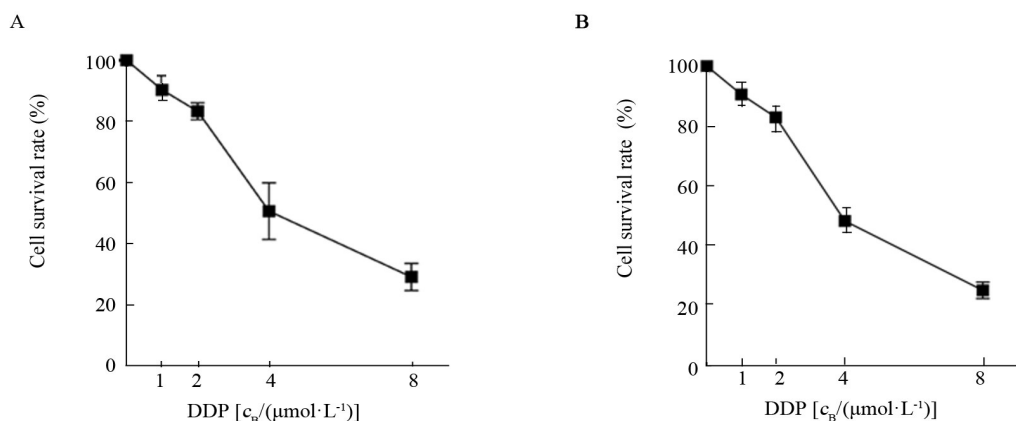
2 结果

2.1 顺铂增加口腔鳞癌干细胞标志物的表达

CCK-8法检测结果(图1A、B)显示, 顺铂浓度为 $2 \mu\text{mol/L}$ 时, PJ15 和 PJ41 细胞存活率均在 80% 以上, 细胞没有显著死亡, 而浓度为 4 和 $8 \mu\text{mol/L}$ 时细胞存活率明显降低。WB 实验结果(图2A)显示, 0、0.02、0.2、 $2 \mu\text{mol/L}$ 顺铂作用 48 h 后, CSC 特异性标志物 Nanog、

Bmi-1、Oct4 表达随顺铂浓度增加呈上升趋势, 最终选取 $2 \mu\text{mol/L}$ 作为顺铂最适浓度进行后续实验。

qPCR 检测结果(图2B)显示, $2 \mu\text{mol/L}$ 顺铂处理后 PJ15 和 PJ41 细胞中 Sox2、Bmi-1、Oct4、Nanog mRNA 表达水平均显著增加 ($P < 0.05$)。乙醛脱氢酶 1 (acetaldehyde dehydrogenase 1, ALDH1) 可作为口腔鳞癌干细胞的特异性标志物^[16], 在采用 $2 \mu\text{mol/L}$ 顺铂处理细胞后, 流式细胞术检测结果(图2C)显示, ALDH1 阳性细胞群体比例与对照组相比显著增加, PJ15 细胞 $[(11.8 \pm 0.45)\% \text{ vs } (4.94 \pm 0.20)\%, P < 0.05]$ 和 PJ41 细胞 $[(11.3 \pm 0.37)\% \text{ vs } (4.08 \pm 0.44)\%, P < 0.05]$ 的 ALDH1 阳性细胞群体比例均较对照组显著上升。



Oral squamous cell lines PJ15 (A) and PJ41 (B) were treated with DDP at concentrations of 0, 1, 2, 4 and $8 \mu\text{mol/L}$ for 48 h

图1 不同浓度顺铂作用 48 h 对 PJ15、PJ41 细胞活力的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of DDP treating for 48 h on the viability of PJ15 and PJ41 cells

2.2 在头颈鳞癌组织中 Notch4 基因呈高表达

从 TCGA 数据库中选取头颈部肿瘤中的正常组织和肿瘤样本进行 Notch 通路相关基因表达量比较, 结果(图3)显示, 纵坐标为基因表达量, 正常组与肿瘤组中 Notch1 ($P=0.93$) 和 Notch3 ($P=0.14$) 基因表达量无显著差异, Notch2 ($P=0.00029$) 基因在正常组中高表达、肿瘤组中低表达, 而 Notch4 ($P=0.046$) 基因的表达量在肿瘤组中高于正常组。

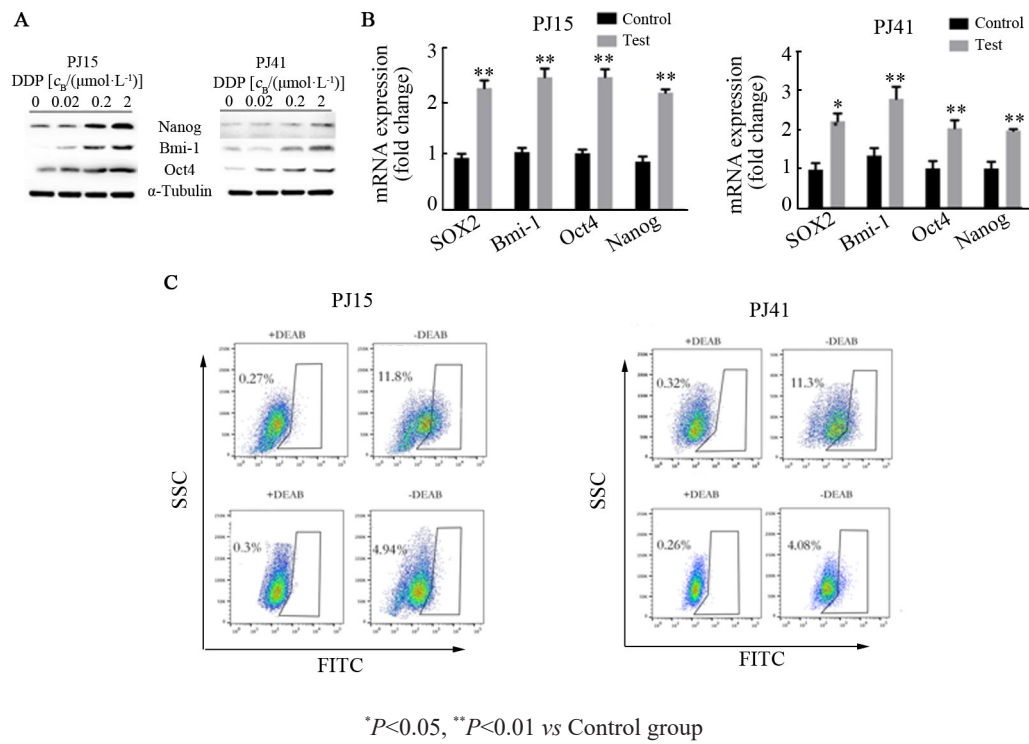
2.3 顺铂通过 Notch4 信号通路调控口腔鳞癌干细胞自我更新

WB 检测结果(图4A)显示, 梯度浓度的顺铂作用下, Notch 通路的 4 个受体的蛋白表达量中, (Notch4 的胞内段部分 NICD4 上升趋势较为显著, 而其他受体的表达水平无明显改变, 提示顺铂有可能激活了 Notch4 信号通路。进一步, qPCR 检测结果(图4B)显示, $2 \mu\text{mol/L}$ 顺铂处理 48 h 后, PJ15 $[(16.01 \pm 0.78) \text{ vs } (0.83 \pm 0.20), P < 0.01]$ 和 PJ41 细胞 $[(4.2 \pm 0.37) \text{ vs } (1.0 \pm 0.07), P < 0.01]$ 中 NICD4 基因表达水平也显著高于对照组; 同时, Notch4 信号通路中

的下游基因 JAG1、HEY1、HEY2、HES1、HES2、DLL4 等的表达也显著高于对照组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.01$), 提示 Notch4 信号通路在顺铂作用下被激活。

顺铂处理细胞 48 h 后加入 Notch 通路抑制剂 DAPT 作用 24 h, WB 检测结果(图5A)显示, NICD4 及 HES1、HEY2、Nanog、Bmi-1 基因的表达量出现下降。qPCR 检测结果(图5B)显示, DAPT 组细胞中 Notch4 信号通路的相关基因 (Notch4、HEY1、HEY2、HES1、HES2、JAG1、DLL4) 和肿瘤干细胞相关基因 (SOX2、Bmi-1、Oct4 和 Nanog) 表达量也显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。提示 Notch4 信号通路的激活可能与口腔鳞癌干细胞存在密切关系。

为验证 Notch4 信号通路在口腔鳞癌干细胞中的作用, 敲降 Notch4 后加入 $2 \mu\text{mol/L}$ DDP 作用 24 h, WB 实验检测结果(图6A)显示, si-Notch4 组与对照组相比, CSC 特异性基因 Nanog 和 Bmi-1 表达量无显著差异。流式细胞术检测结果(图6B)显示, si-Notch4 组中 CSC 比例升高幅度小于对照组, 这进一步提示 Notch4 信号通路参与了 CSC 的自我更新。



A: After adding different concentrations of DDP, expressions of Nanog, Bmi-1 and Oct4 were detected by WB;

B: After adding DDP, the mRNA levels of Nanog, Bmi-1, Oct4 and Sox2 were detected by qPCR;

C: The percentage of CSCs was detected by Annexin V-FITC flow cytometry

图2 顺铂增加 PJ15 和 PJ41 细胞肿瘤干性标志物的表达

Fig.2 DDP increased the expressions of CSC markers in PJ15 and PJ41 cells

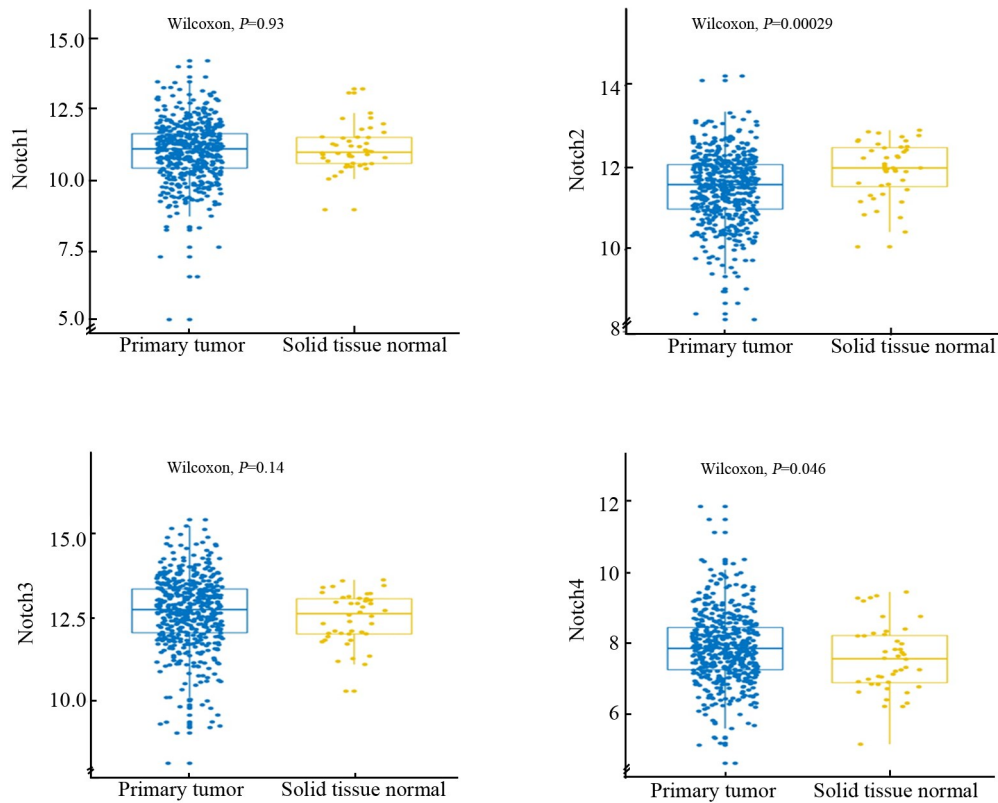
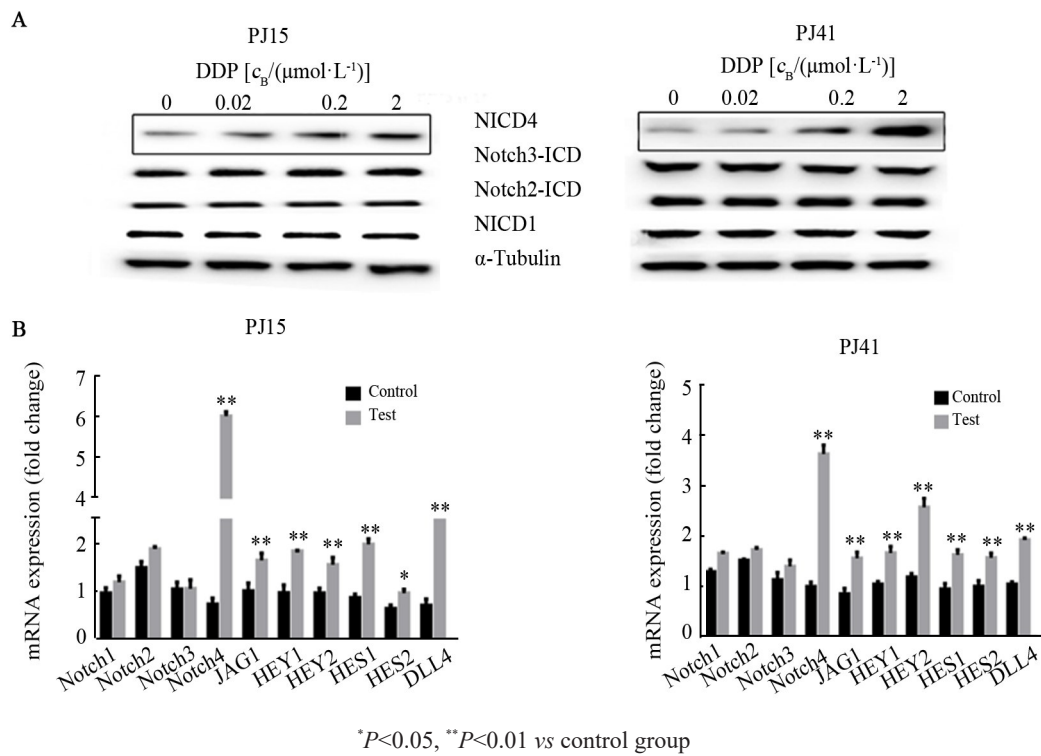


图3 使用 TCGA 数据集比较 Notch 通路相关基因在正常组与肿瘤组间的表达情况

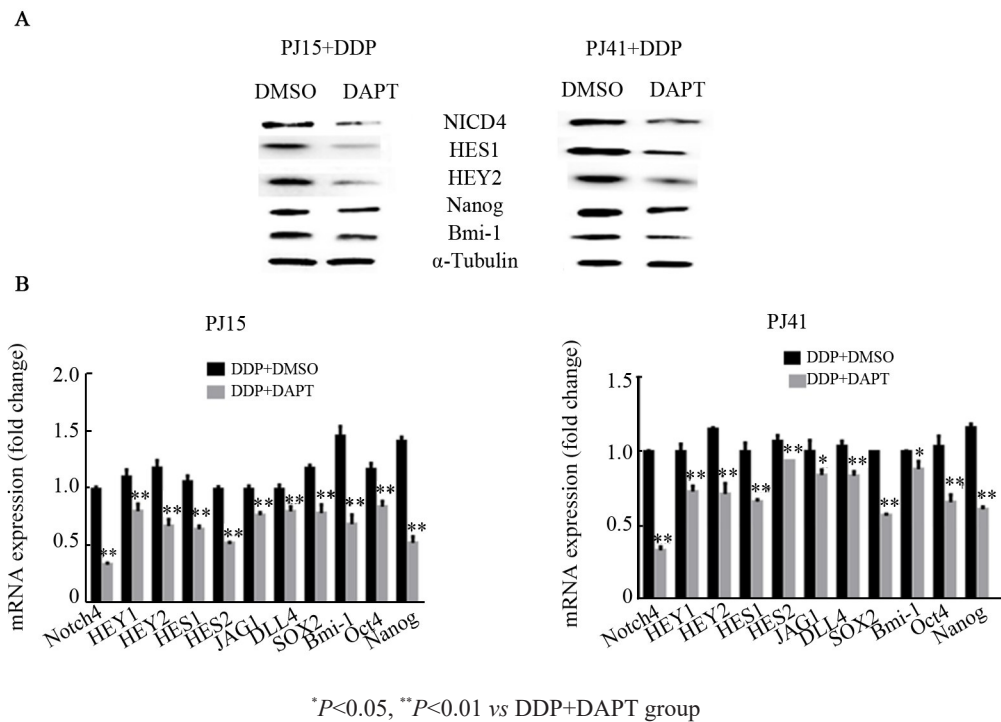
Fig.3 Comparison of Notch pathway related genes between the normal group and the tumor group using the TCGA data set



A: The expression of NICD1-4 in Notch pathway was detected by WB;
 B: The expressions of related genes in Notch pathway were detected by qPCR

图4 顺铂促进Notch通路相关基因的表达

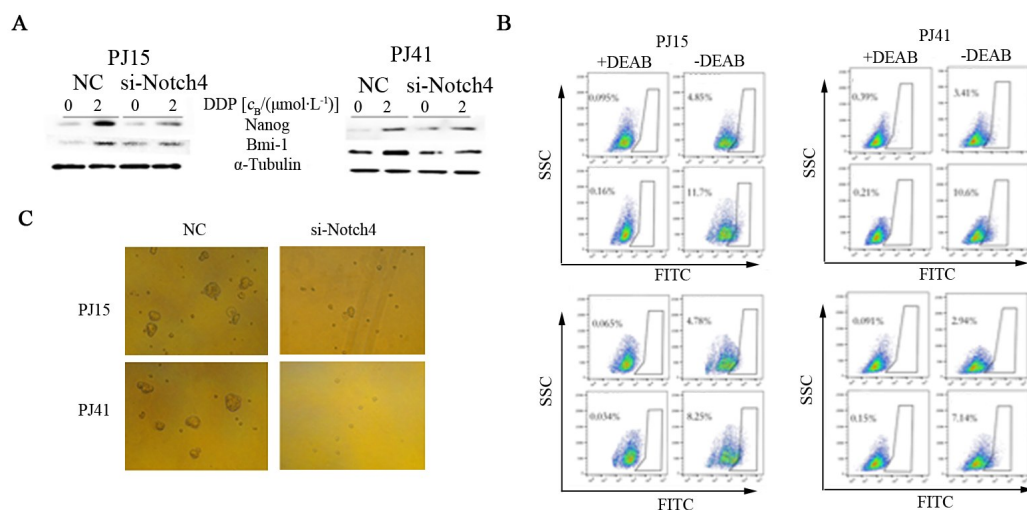
Fig.4 DDP promoted the expressions of Notch pathway related genes



A: After being added with 5 μmol/L DAPT, expression levels of NICD4, HES1, HEY2, Nanog and Bmi-1 were detected by WB;
 B: mRNA levels of the target genes were detected by qPCR

图5 DAPT下调PJ15和PJ41 CSC特异性标志物和Notch通路下游基因的表达

Fig.5 DAPT down-regulated the expressions of CSC specific markers and downstream genes of Notch pathway in PJ15 and PJ41 cells



A: After transfection, the protein levels of Nanog and Bmi-1 in si-Notch4 and NC groups were detected by WB;

B: The percentage of CSCs was detected by Annexin V-FITC flow cytometer assay;

C: Knock-down of Notch4 reversed the sphere-forming ability of PJ15 and PJ41 cells ($\times 200$)

图6 敲降 Notch4 降低 PJ15 和 PJ41 CSC 相关基因表达水平及细胞成球能力
Fig.6 Knock-down of Notch4 reduced the expressions of CSCs-related genes and the sphere-forming ability of PJ15 and PJ41 cells

为了进一步阐明 Notch4 信号通路对口腔鳞癌干细胞自我更新的作用,我们进行了验证肿瘤干细胞增殖能力的成球实验。结果(图 6C)显示,与对照组相比,si-Notch4 组 PJ15 细胞 $[(1.33\pm 0.47) \text{ vs } (8.00\pm 0.82)]$ 个, $P<0.01$]和 PJ41 细胞 $[(1.00\pm 0.82) \text{ vs } (7.67\pm 1.25)]$ 个, $P<0.01$]球体的数量和大小均显著低于对照组,提示 Notch4 信号通路可以调控 CSC 的自我更新。

3 讨论

临床上头颈部肿瘤的治疗方法最常用的仍为手术、放疗和化疗,缺乏特异且高效的治疗靶点,导致过去 30 年头颈部肿瘤患者的总体生存率并没有显著提高。顺铂是常用的铂类化疗药物,主要杀灭构成肿瘤主体的普通肿瘤细胞,临床用药后常出现耐药现象^[17-18]。阐明头颈部肿瘤化疗耐药的机制,对提升患者生存率有重要的意义,而肿瘤干细胞的作用可能是头颈部肿瘤化疗耐药的重要机制之一^[19-20]。本研究发现,顺铂处理后的口腔鳞癌细胞系中的干细胞比例显著提升,这与“顺铂诱导肿瘤干细胞标志物 Bmi-1 的表达和增加肿瘤干细胞在实体肿瘤中比例”的报道^[21]一致。通过 TCGA 数据库分析发现,Notch4 在头颈部肿瘤组织中呈高表达,体外实验证明口腔鳞癌细胞在顺铂处理后出现肿瘤干细胞特异基因 Nanog、Bmi-1、Oct4 表达升高,同时 Notch4 受体蛋白表达量也显著增高,提示 Notch4 信号通路与头颈部肿瘤干细胞有一定的关系。Notch 信号通路在进化

过程中高度保守,在胚胎发育过程中发挥重要作用^[22],Notch 信号通路也是一个极有潜力的口腔癌治疗靶点。PIKERING 等^[23]对口腔鳞癌患者的基因表达、拷贝数、甲基化和点突变进行了全面的基因组分析,认为 Notch 通路是口腔鳞癌 4 个主要的驱动通路之一,且 66% 的患者 Notch 通路被破坏,强调了 Notch 通路在口腔鳞癌中的重要性。OSATHANON 等^[24]也同样证实了口腔鳞癌组织中 Notch 信号通路中的基因表达上升,表明 Notch 信号通路在人口腔鳞癌中表达失调,并在细胞增殖中发挥作用。Notch 通路可以维持 CSC 干性及自我更新能力^[25-26];Notch4 在乳腺癌中可调控 CSC 的自我更新能力^[27-28];而在头颈鳞癌中,与 Notch 通路其他受体相比,只有 Notch4 表达较正常黏膜显著升高,且 Notch4 的染色体区域在口腔鳞癌中扩增,这提示着 Notch4 在口腔鳞癌中可能占有重要地位^[29-30]。

研究^[31]发现,敲降 Notch4 可抑制乳腺 MCF-7 细胞中约 41% 的干细胞标志物表达,即 Notch4 信号通路参与调控乳腺癌干细胞自我更新;同时 GAO 等^[32]也证实,卵巢癌中 CD24 阳性细胞群体与 CD24 阴性细胞群体相比具有更高的自我更新能力和分化能力,且 Notch4 的表达量在 CD24 阳性细胞群体中显著增加,提示 Notch4 与卵巢癌干细胞自我更新能力有关。本研究发现,敲降 Notch4 基因后加入顺铂, Nanog、Bmi-1 这两个参与 CSC 自我更新的特异基因的表达量并没有显著增加,且 CSC 比例显著小于对照组,提示 Notch4 可直接影响口腔鳞癌干细胞的自

我更新。为进一步验证这一假设,我们采用了肿瘤干细胞成球实验,结果发现,敲降 Notch4 后,细胞成球能力明显减弱。这些结果提示 Notch4 可调控口腔鳞癌 CSC 的自我更新能力。

本实验的数据表明 Notch4 信号通路在口腔鳞癌 PJ15 和 PJ41 细胞的干细胞自我更新中发挥重要作用,这一发现为口腔鳞癌的治疗提供了新的分子靶点。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017[J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 7-30. DOI:10.3322/caac.21387.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.
- [3] KIM S Y, HAN Y K, SONG J M, et al. Aberrantly hypermethylated tumor suppressor genes were identified in oral squamous cell carcinoma (OSCC)[J/OL]. *Clin Epigenetics*, 2019, 11(1): 116[2019-10-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6689875/>. DOI:10.1186/s13148-019-0715-0.
- [4] LI X, BU W H, MENG L, et al. CXCL12/CXCR4 pathway orchestrates CSC-like properties by CAF recruited tumor associated macrophage in OSCC[J]. *Exp Cell Res*, 2019, 378(2): 131-138. DOI: 10.1016/j.yexcr.2019.03.013.
- [5] YANG L Q, SHI P F, ZHAO G C, et al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy[J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2020, 5: 8. DOI:10.1038/s41392-020-0110-5.
- [6] BAILLIE R, TAN S T, ITINTEANG T. Cancer stem cells in oral cavity squamous cell carcinoma: a review[J/OL]. *Front Oncol*, 2017, 7: 112[2019-10-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5454033/>. DOI:10.3389/fonc.2017.00112.
- [7] ZHAO Q, ZHUANG K, HAN K, et al. Silencing DVL3 defeats MTX resistance and attenuates stemness via Notch signaling pathway in colorectal cancer[J]. *Pathol Res Pract*, 2020: 152964. DOI: 10.1016/j.prp.2020.152964.
- [8] ZENG F, CHEN H, ZHANG Z H, et al. Regulating glioma stem cells by hypoxia through the Notch1 and Oct3/4 signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(5): 6315-6322. DOI:10.3892/ol.2018.9442.
- [9] UPADHYAY P, NAIR S, KAUR E, et al. Notch pathway activation is essential for maintenance of stem-like cells in early tongue cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(31): 50437-50449. DOI:10.18632/oncotarget.10419.
- [10] XIE J, LIN L S, HUANG X Y, et al. The NOTCH1-HEY1 pathway regulates self-renewal and epithelial-mesenchymal transition of salivary adenoid cystic carcinoma cells[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(4): 598-610. DOI:10.7150/ijbs.36407.
- [11] KIM S H, SINGH S V. The role of polycomb group protein Bmi-1 and Notch4 in breast cancer stem cell inhibition by benzyl isothiocyanate[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 149(3): 681-692. DOI: 10.1007/s10549-015-3279-5.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] HAEUSSLER M, ZWEIG A S, TYNER C, et al. The UCSC Genome Browser database: 2019 update[J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D853-D858[2019-11-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6323953/>. DOI:10.1093/nar/gky1095.
- [16] MARANGON JUNIOR H, MELO V V M, CAIXETA Â B, et al. Immunolocalization of cancer stem cells marker ALDH1 and its association with tumor budding in oral squamous cell carcinoma[J]. *Head Neck Pathol*, 2019, 13(4): 535-542. DOI:10.1007/s12105-018-0985-4.
- [17] THONGNUANJAN P, SOODVILAI S, CHATSUDTHIPONG V, et al. Fenofibrate reduces cisplatin-induced apoptosis of renal proximal tubular cells via inhibition of JNK and p38 pathways[J]. *J Toxicol Sci*, 2016, 41(3): 339-349. DOI:10.2131/jts.41.339.
- [18] FORASTIERE A A. Chemotherapy in the treatment of locally advanced head and neck cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2008, 97(8): 701-707. DOI:10.1002/jso.21012.
- [19] LIU Y P, YANG C J, HUANG M S, et al. Cisplatin selects for multi-drug-resistant CD133⁺ cells in lung adenocarcinoma by activating Notch signaling[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(1): 406-416. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1733.
- [20] CHEN J, LI Y J, YU T S, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy[J]. *Nature*, 2012, 488(7412): 522-526. DOI:10.1038/nature11287.
- [21] NÖR C, ZHANG Z C, WARNER K A, et al. Cisplatin induces Bmi-1 and enhances the stem cell fraction in head and neck cancer[J]. *Neoplasia*, 2014, 16(2): 137-146. DOI:10.1593/neo.131744.
- [22] BRAY S J. Notch signalling: a simple pathway becomes complex [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(9): 678-689. DOI: 10.1038/nrm2009.
- [23] PICKERING C R, ZHANG J X, YOO S Y, et al. Integrative genomic characterization of oral squamous cell carcinoma identifies frequent somatic drivers[J]. *Cancer Discov*, 2013, 3(7): 770-781. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0537.
- [24] OSATHANON T, NOWWAROTE N, PAVASANT P. Expression and influence of Notch signaling in oral squamous cell carcinoma [J]. *J Oral Sci*, 2016, 58(2): 283-294. DOI:10.2334/josnusd.15-0535.
- [25] SULLIVAN J P, SPINOLA M, DODGE M, et al. Aldehyde dehydrogenase activity selects for lung adenocarcinoma stem cells dependent on notch signaling[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(23): 9937-9948. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-0881.
- [26] PORCHERI C, MEISEL C T, MITSIADIS T. Multifactorial contribution of notch signaling in head and neck squamous cell carcinoma [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): E1520[2019-11-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6471940/>. DOI: 10.3390/ijms20061520.
- [27] SIMÕES B M, O'BRIEN C S, EYRE R, et al. Anti-estrogen resistance in human breast tumors is driven by JAG1-NOTCH4-depend

- dent cancer stem cell activity[J]. *Cell Rep*, 2015, 12(12): 1968-1977. DOI:10.1016/j.celrep.2015.08.050.
- [28] AGUR Z, KIRNASOVSKY O U, VASSERMAN G, et al. Dickkopf1 regulates fate decision and drives breast cancer stem cells to differentiation: an experimentally supported mathematical model[J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24225[2019-11-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3167819/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0024225.
- [29] HA P K, BENOIT N E, YOCHER R, et al. A transcriptional progression model for head and neck cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(8): 3058-3064. DOI:10.1093/carcin/bgg106.
- [30] LUNDE M L, ROMAN E, WARNAKULASURIYA S, et al. Profiling of chromosomal changes in potentially malignant and malignant oral mucosal lesions from South and South-East Asia using array-comparative genomic hybridization[J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2014, 11(3): 127-140. DOI: 10.5732/cjc.013.10133.
- [31] KIM S H, SINGH S V. Mammary cancer chemoprevention by withaferin A is accompanied by in vivo suppression of self-renewal of cancer stem cells[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2014, 7(7): 738-747. DOI:10.1158/1940-6207.CAPR-13-0445.
- [32] GAO M Q, CHOI Y P, KANG S, et al. CD24⁺ cells from hierarchically organized ovarian cancer are enriched in cancer stem cells[J]. *Oncogene*, 2010, 29(18): 2672-2680. DOI:10.1038/onc.2010.35.

[收稿日期] 2019-12-05

[修回日期] 2020-05-20

[本文编辑] 黄静怡