

Notch 1 信号通路对人肝癌 SMMC 7721 细胞中 CD133⁺ 细胞增殖和凋亡的影响

吴乐乐, 俞广进, 陈双升, 熊奇如

摘要 目的 研究人肝癌 SMMC 7721 细胞中 CD133⁺ 细胞的干细胞特性, 初步探讨调控 Notch 1 信号通路对 CD133⁺ 细胞亚群增殖和凋亡的影响。方法 流式分选和检测 SMMC 7721 细胞中的 CD133⁺ 细胞。利用软琼脂集落实验及裸鼠成瘤实验验证 CD133⁺ 细胞的干细胞特性。RT-PCR 法检测 CD133⁺ 细胞中 Notch 信号系统的表达; 将分选出来的 CD133⁺ 细胞分为激活组(加入 Notch 1 激活剂 Jagged 1)、抑制组(加入 Notch 1 抑制剂 DAPT)和空白对照组(加入 PBS 缓冲液), RT-PCR 法检测 3 组细胞 Hes-1 基因的表达, MTT 法和流式细胞仪检测各组细胞增殖能力和凋亡能力。结果 成功分选出 CD133⁺ 亚群细胞; 软琼脂集落实验和裸鼠成瘤实验表明 CD133⁺ 细胞较 CD133⁻ 细胞具有较强集落形成能力和体内成瘤能力; RT-PCR 检测 CD133⁺ 细胞中仅表达 Notch 1/Jagged 1 信号通路; 激活组 Hes-1 表达强度增强, 抑制组表达强度减弱, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。MTT 检测激活组、抑制组和空白对照组吸光度值差异均有统计学意义($P < 0.05$)。流式细胞仪检测激活组总凋亡率大于空白对照组, 反之, 抑制组总凋亡率小于空白对照组, 各组差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 CD133⁺ 细胞是人肝癌 SMMC 7721 细胞中干细胞标志物之一, Notch 1 信号通路对 CD133⁺ 细胞的增殖和凋亡发挥着重要作用。

关键词 CD133⁺; Notch 1 信号通路; 肝癌

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)12-1701-05

肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)在肿瘤细胞中有一种数量极少, 是肿瘤形成的起始细胞, 具有无限增殖潜能的一种干细胞样癌细胞亚群^[1]。目前已经在许多肿瘤(如乳腺癌、结肠癌)中成功分离出 CSCs, 且利用干细胞特性, 在治疗中发挥了重要的作用, 也是未来最佳的生物治疗靶点之一^[2]。该研究通过 CD133 细胞表面标志物, 对 CD133⁺ 细胞的进行分选, 检测 CD133⁺ 细胞 Notch 信号系统的表

达, 研究 Notch 1 信号通路是否在 CD133⁺ 细胞中发挥着重要的调控作用, 为今后 CSCs 的生物研究奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料 人肝癌 SMMC 7721 细胞株(安徽医科大学中心实验室馈赠); 实验动物: SPF 级 A/J 裸小鼠 30 只, 4~6 周龄, 体重 18~20 g, 雌雄各半(南京军事科学研究所); DMEM 培养液、胎牛血清(美国 Hyclone 公司); 青霉素、链霉素、胰蛋白酶(华美生物工程有限公司); Jagged 1 蛋白(美国 Promega 公司); DAPT(美国 Sigma 公司); CD133-抗体(德国 Miltenyi 公司); 重组人碱性成纤维细胞生长因子(basicity fibroblast growth factor, bFGF)、上皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)(美国 Pepro Tech 公司); B27(美国 Invitrogen 公司); RT-PCR 试剂盒(大连 TaKaRa 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌细胞系 SMMC 7721 用含 10% 胎牛血清, 100 U/ml 青霉素, 100 U/ml 链霉素的 DMEM 培养液, 置于 5% CO₂、37 °C 饱和湿度的培养箱中培养, 细胞贴壁 80%, 用 0.25% 胰蛋白酶消化按 1:2 或 1:3 传代培养, 实验采用对数生长期细胞。

1.2.2 流式细胞术分选 SMMC 7721 肝癌细胞中 CD133⁺ 亚群及培养 CD133⁺ 细胞 选取大量处于对数期生长的 SMMC 7721 细胞 0.01% 的 PBS 洗涤 2 次, 用胰酶消化, 重悬, 离心(1 000 r/min, 5 min), 去上清液, 制备成单细胞悬液, 加入标记荧光的 CD133 抗体 10 μl, 室温暗处孵育 0.5 h, PBS 洗涤, 上机检测、分选。将分选后的 CD133⁺ 细胞培养在含 20 ng/ml 的 EGF、10 ng/ml 的 bFGF 和 2% B27 的无血清 DMEM/F12 干细胞培养液中, 悬浮培养, 置于含 5% CO₂、37 °C 饱和湿度的培养箱中培养, 每 2 d 换 1 次培养液, 在第 7、10 天利用流式细胞仪检测 CD133⁺ 细胞百分比。

1.2.3 体内成瘤及体外增殖实验 将分选后的

2014-08-11 接收

基金项目: 安徽省科技厅年度重点科研项目(编号: 12070403066)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院普通外科, 合肥 230022

作者简介: 吴乐乐, 男, 硕士研究生;

熊奇如, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:

928619858@qq.com

CD133⁺细胞、未分选的 SMMC 7721 细胞及 CD133⁻细胞按 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 /ml 密度分别接种于裸鼠背部皮下, 每组 10 只, 注意观察肿瘤形成情况及测量肿瘤的大小, 连续 4 周, 比较 3 组细胞的成瘤能力是否有差异。给 1.2% 的琼脂糖与干细胞培养液等体积混合, 制成 0.6% 的底层琼脂凝胶, 加至 24 孔板, 每孔 600 μ l, 待凝固后, 再利用 0.6% 的琼脂糖与干细胞培养液等体积混合制成上层琼脂, 每孔 200 μ l, 将分选后的 CD133⁺、未分选的 SMMC 7721 细胞及 CD133⁻的各组 SMMC 7721 细胞加入上层琼脂中, 每孔 1 000 个, 重复 5 孔。待上层琼脂凝固后将培养板置于含 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 饱和湿度的培养箱中培养 1 周, 拍照, 光镜下计数集落数。实验重复 5 次。

1.2.4 RT-PCR 检测 CD133⁺细胞中 Notch 信号系统的表达及比较其与 CD133⁻、未分选细胞的 Notch 1 mRNA 的比较 将分选出的 CD133⁺细胞、CD133⁻和未分选的肝癌细胞, 按照 TRIzol 试剂盒说明提取总 RNA, 逆转录为 cDNA, 所检测基因引物序列见表 1。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 56 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共循环 37 次, 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。取产物 5 μ l 进行电泳, 凝胶成像系统拍照, 以各目的基因与内参 β -actin 灰度值的比值表示各目的基因的表达量。

表 1 各检测基因序列

基因	引物序列	扩增长度 (bp)
Notch 1	上游: 5'-CACCCATGACCACTACCCAGTT-3'	510
	下游: 5'-CCTCGGACCAATCAGAGATGTT-3'	
Notch 2	上游: 5'-CGTGCAGAGTGAGACCGTGGA-3'	599
	下游: 5'-TGCCTGTCTGCTGTTGTGCA-3'	
Notch 3	上游: 5'-TGATGGACGAATGCCCTTTTCC-3'	385
	下游: 5'-ACTGGGAGAAATGCTTCACCA-3'	
Notch 4	上游: 5'-ATCCATGGCTCCATCGTCTA-3'	422
	下游: 5'-TTCTGATTGCTCGTCCATCAG-3'	
Jagged 1	上游: 5'-AACTGGTACCGGTGCGAA-3'	216
	下游: 5'-TGATGCAAGATCTCCCTGAAAC-3'	
Jagged 2	上游: 5'-GCTGAGCCTGACCAATA-3'	373
	下游: 5'-GGCAATCACAGTAATAG-3'	
Hes-1	上游: 5'-CGAAGAGCAAGAATAAAT-3'	565
	下游: 5'-GAATGAGGAAAGCAAACT-3'	
β -actin	上游: 5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3'	285
	下游: 5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3'	

1.2.5 调控 CD133⁺细胞 Notch 1 信号通路及 RT-PCR 检测靶基因 Hes-1 表达 将分选的 CD133⁺细胞分为 3 组, 分别为激活组(加入 Notch 1 激活剂

Jagged 1 蛋白 5 mg/L), 抑制组(加入 Notch 1 抑制剂 DAPT 50 μ mol/L) 和空白对照组(加入等体积 PBS 缓冲液)。再按上述条件检测加入激活剂和抑制剂 24 h 后各组细胞中 Hes-1 mRNA 的表达量。

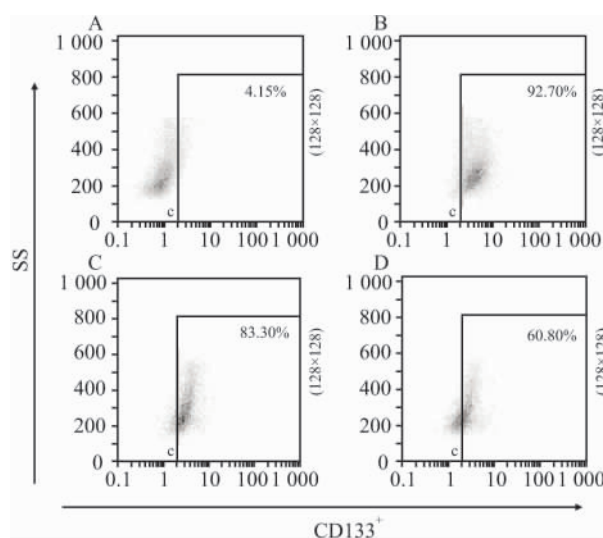
1.2.6 检测各组 CD133⁺细胞增殖能力 将 CD133⁺细胞接种到 96 孔板中, 每孔 1 000 个细胞, 按上述分组, 每组重复 5 孔。加干细胞培养基, 置于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 饱和湿度的细胞培养箱中培养, 分别在 12、24、36、48 h 后用 MTT 检测, 于 570 nm 波长测量吸光度(absorbance, A) 值。重复实验 5 次。

1.2.7 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况 收集 3 组 CD133⁺细胞, 以 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, PBS 洗涤 2 次, 以 Binding Buffer 悬浮; 加入 Annexin V-FITC 和碘化丙啶各 5 μ l, 避光孵育 15 min 后, 上机检测, 分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 基因灰度分析采用 Image J 及 Excel 软件分析, 均采用单因素方差分析, 两两间比较采用 LSD 法。

2 结果

2.1 流式细胞仪检测分选前后及培养 10 d 中的 SMMC 7721 细胞系中 CD133⁺的细胞 流式检测在未分选肝癌 SMMC 7721 细胞系中仅少量的细胞表达 CD133⁺; 上机分选后 CD133⁺细胞纯度提高; 分选后的 CD133⁺细胞接种于无血清含生长因子的干细胞培养液中, 第 7、10 天细胞中 CD133⁺表达率逐渐下降, 提示干细胞正在进行分化, 见图 1。

图 1 CD133⁺细胞所占比例

A: 分选前; B: 分选后; C: 培养第 7 天; D: 培养第 10 天

2.2 CD133⁺ 体内成瘤能力 1×10^3 /ml 的 CD133⁺ 细胞在 4 周后可在背部形成明显的肿瘤,未分选的细胞 1×10^4 /ml 可在背部形成瘤体,而 CD133⁻ 细胞在 1×10^5 /ml 的细胞数形成不明显的肿瘤,见图 2。

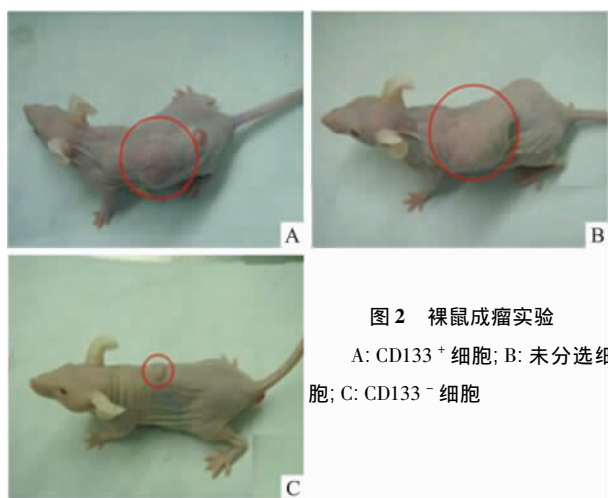


图 2 裸鼠成瘤实验

A: CD133⁺ 细胞; B: 未分选细胞; C: CD133⁻ 细胞

2.3 CD133⁺ 体外增殖能力 在软琼脂培养基中培养 1 周后,未分选的 SMMC 7721 细胞的集落数为 61.6 ± 4.6 , CD133⁺ 和 CD133⁻ 细胞的集落数分别为 86.2 ± 6.3 和 49.6 ± 7.1 ,各组细胞集落数目差异有统计学意义 ($F = 46.707, P < 0.05$), CD133⁺ 细胞集落数目明显增多,反之, CD133⁻ 细胞集落数目明显减少 ($P < 0.05$),见图 3。

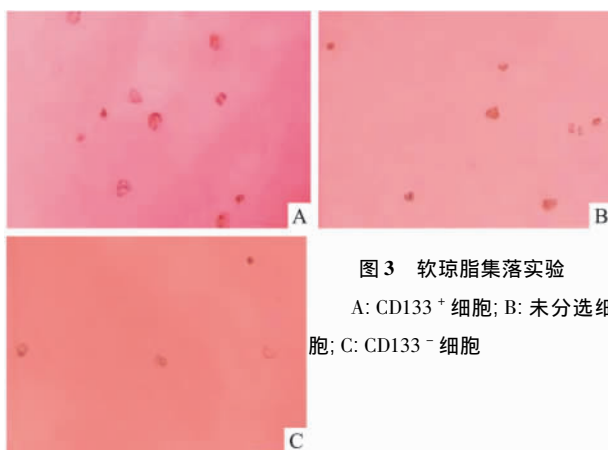


图 3 软琼脂集落实验

A: CD133⁺ 细胞; B: 未分选细胞; C: CD133⁻ 细胞

2.4 RT-PCR 检测 CD133⁺ 细胞中 Notch 信号系统的表达及调控 Notch 1 信号通路后 Hes-1 基因表达情况 在 CD133⁺ 人肝癌 SMMC 7721 细胞系中,仅有 Notch 1 和 Jagged 1 显著表达。激活剂 Jagged 1 蛋白和抑制剂 DAPT 蛋白作用 CD133⁺ 细胞 24 h 后,各组 Notch 1 下游靶基因 Hes-1 mRNA 表达差异有统计学意义 ($F = 489.697, P < 0.05$)。Notch 1 下

游靶基因 Hes-1 基因表达与空白对照组相比,激活组表达增强,抑制组表达降低 ($P < 0.05$),表明对 Notch 1 信号通路双向调控成功,见图 4、5。

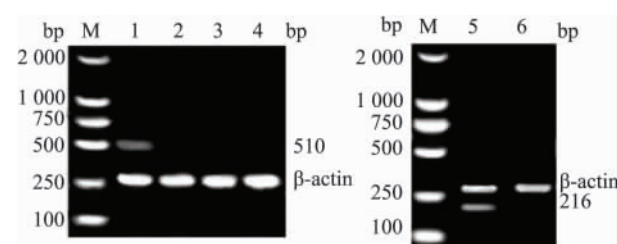


图 4 Notch 信号通路受体和配体 mRNA 表达情况

M: Marker; 1: Notch 1; 2: Notch 2; 3: Notch 3; 4: Notch 4; 5: Jagged 1; 6: Jagged 2

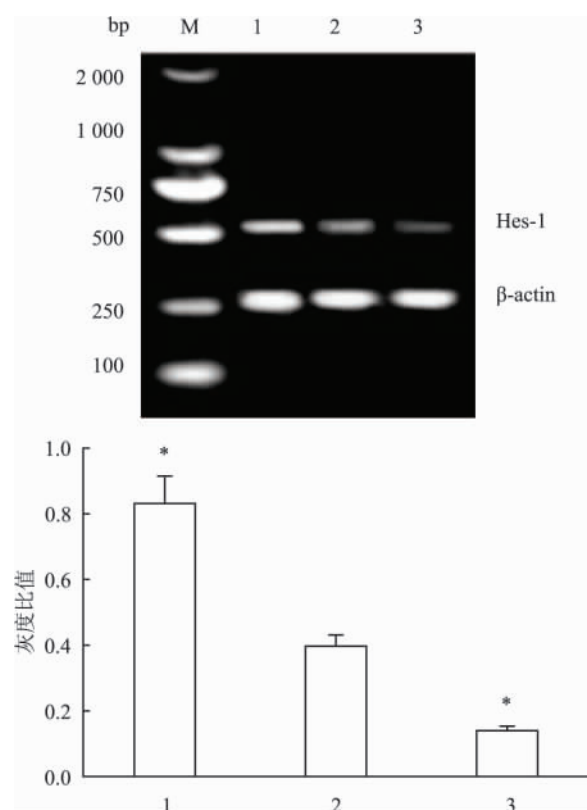


图 5 RT-PCR 检测调控 Notch 1 后 3 组细胞 Hes-1 表达情况

M: Marker; 1: 激活组; 2: 空白对照组; 3: 抑制组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$

2.5 CD133⁺ 细胞的增殖能力变化 MTT 检测提示,各组细胞不同时间段增殖能力差异有统计学意义 ($F_{12h} = 110.253, F_{24h} = 210.246, F_{36h} = 355.245, F_{48h} = 351.991; P < 0.05$),激活组 CD133⁺ 细胞增殖能力明显低于空白对照组 ($P < 0.05$),抑制组 CD133⁺ 细胞增殖能力高于空白对照组 ($P < 0.05$),且均具有时间依赖性。见表 2。

表2 各组 CD133⁺ 细胞 A 值比较 ($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

组别	12 h	24 h	36 h	48 h
空白对照	0.358 ± 0.011	0.412 ± 0.019	0.545 ± 0.026	0.637 ± 0.053
激活	0.322 ± 0.007*	0.258 ± 0.022*	0.202 ± 0.031*	0.118 ± 0.048*
抑制	0.398 ± 0.017*	0.526 ± 0.021*	0.623 ± 0.022*	0.945 ± 0.049*

与空白对照组比较: * $P < 0.05$

2.6 调控 Notch 1 通路后 CD133⁺ 细胞的凋亡能力变化 流式细胞仪检测提示, 各组细胞凋亡能力差异有统计学意义(早期、晚期和总凋亡的 3 组 $F = 22.766, 71.703, 58.308$, $P < 0.05$), 与空白对照组比较, 激活组 CD133⁺ 细胞的凋亡能力明显增强, 而抑制剂组 CD133⁺ 细胞的凋亡能力明显降低 ($P < 0.05$)。显示抑制了 Notch 1 信号通路有明显的抗 CD133⁺ 细胞凋亡的作用, 见表 3、图 6。

表3 各组细胞凋亡情况(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	早期	晚期	总凋亡
空白对照	13.40 ± 3.99	15.00 ± 2.18	28.40 ± 4.21
激活	20.00 ± 4.58*	26.10 ± 2.91*	46.10 ± 6.73*
抑制	4.45 ± 1.78*	9.04 ± 1.56*	13.49 ± 2.38*

与空白对照组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

Suetsugua et al^[3] 从肝癌 Huh-7 细胞中成功分离出 CD133⁺ 细胞, 证实 CD133⁺ 细胞的体内成瘤能力、增殖、侵袭能力均比 CD133⁻ 细胞较强, 但 CD133⁺ 细胞中细胞色素 P450 等干细胞标志物表达水平一般, 甲胎蛋白表达程度增强, 提示 CD133⁺ 肝癌细胞仅为幼稚干细胞的状态, 初步证实 CD133 作为 CSCs 的表面标志物是可行的。目前分选干细胞主要是通过磁珠分选和流式细胞仪, 但细胞流式仪

较磁珠分选能更好地提高分选纯度, 细胞流式仪检测显示 SMMC 7721 细胞中表达 CD133⁺ 细胞, 分选出的 CD133⁺ 细胞体外集落形成能力和裸鼠体内成瘤能力明显高于未分选的肝癌细胞, 通过干细胞金标准的鉴定, 表明 CD133⁺ 具有典型的干细胞特性, 目前对干细胞的生物学靶向治疗较普通细胞的生物学治疗能够更好地抑制肿瘤的进展, 是一个新型的治疗方法, 所以对 CD133⁺ 细胞的有关联肿瘤发展的生物学研究有利于对最原始肿瘤细胞的认识。

Notch 1 基因在果蝇中发现, 在哺乳动物体内有 4 种受体(Notch 1~4)及 5 种配体(Jagged 1~2, Dll 1~3), Notch 受体与配体结合, 经 γ -分泌酶内切释放胞内段 NICD, 激活 Hes、Hey 等靶基因的释放, 从而发挥作用^[4]。通过 RT-PCR 检测表明 CD133⁺ 的 SMMC 7721 肝癌细胞中, 存在 Notch 信号通路, 且仅有 Notch 1 及 Jagged 1 基因显著表达, 说明 Notch 1 信号通路在 SMMC 7721 中有着一定的作用。Jagged 1 蛋白不能直接激活细胞内 Notch 1 信号通路, 但可以通过增强配体 Jagged 1 的表达来活化 Notch 1 信号通路, DAPT 主要通过抑制 γ -分泌酶, 抑制了 Notch 1 通路的活性^[5]。Hes-1 基因是 Notch 1 信号通路的一种下游靶基因, 反映 Notch 1 信号通路的活化程度, RT-PCR 检测显示相比空白对照组, 激活组 Hes-1 基因高表达, 而抑制组低表达, 说明激活剂和抑制剂对 Notch 1 信号通路调控是可行的。前期研究^[6]显示 Notch 1 信号通路在肝癌细胞中普遍表达, 对增殖和侵袭有密切联系。肿瘤细胞具有无限增殖的特点, 如何控制肿瘤细胞增殖是治疗肿瘤的关键之一, MTT 结果提示激活组 CD133⁺ 细胞增殖率低, 而抑制组细胞增殖率高, 且在 48 h 内具

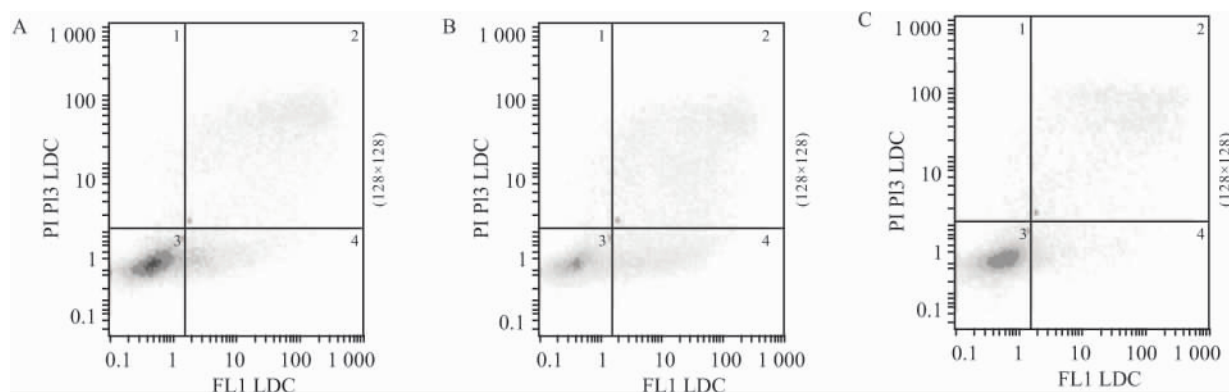


图6 流式细胞仪检测 3 组细胞凋亡情况

A: 空白对照组; B: 激活组; C: 抑制组

有时间的依赖性。肿瘤细胞的凋亡能力关乎肿瘤细胞存活时间的长短,与肿瘤的治疗效果密不可分。流式细胞仪检测分析3组细胞凋亡情况,发现激活组的细胞凋亡率增高,反之,抑制组的细胞凋亡率降低。相对于空白对照组差异均有统计学意义。

目前只初步研究 Notch 1 信号通路对 CD133⁺ 细胞内部分的生物学作用,已有研究^[7-8]显示 Notch 1 信号通路导致肝癌生长缓慢的作用机制,可能是因为下调了 Akt 通路和 Notch 受体转录因子的失活等原因,所以在今后的研究中,要进一步分析其内在通路之间可能存在的联系再研究其分子机制。

参考文献

- [1] Reya T, Morrison S J, Clarke M F, et al. Stem cells cancer and cancer stem cells[J]. *Nature* 2001 414(6859): 105–11.
- [2] Tu L C, Foltz G, Lin E, et al. Targeting stem cells-clinical implications for cancer therapy[J]. *Curr Stem Cell Res Ther* 2009 4(2): 147–53.
- [3] Suetsugu A, Nagakura M. Characterization of CD133⁺ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 351(4): 820–4.
- [4] Schreck K C, Taylor P, Marchionni L, et al. The Notch target Hes1 directly modulates Gli1 expression and Hedgehog signaling: a potential mechanism of therapeutic resistance [J]. *Clin Cancer Res* 2010 16(24): 6060–70.
- [5] Meng R D, Shelton C C, Li Y M, et al. gamma-secretase inhibitors abrogate oxaliplatin-induced activation of the Notch-1 signaling pathway in colon cancer cells resulting in enhanced chemosensitivity [J]. *Cancer Res* 2009 69(2): 573–82.
- [6] 岳 犇,熊奇如,夏 俊,等. Notch 1/Jagged 1 信号对人肝癌 SMMC7721 细胞增殖和侵袭的影响及其作用机制[J]. *安徽医科大学学报* 2013 48(2): 128–32.
- [7] Wang C, Qi R, Li N, et al. Notch 1 signaling sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells by inhibiting Akt/Hdm2 mediated p53 degradation and up regulating p53 dependent DR5 expression [J]. *J Biol Chem* 2009 284(24): 16183–90.
- [8] Hu X B, Feng F, Wang Y C, et al. Blockade of Notch signaling in tumor-bearing mice may lead to tumor regression, progression, or metastasis, depending on tumor cell type [J]. *Neoplasia* 2009 11(1): 32–8.

Role of Notch 1 signaling in the proliferation and Die depth of CD133⁺ cells from human hepatoma SMMC 7721 cells

Wu Lele, Yu Guangjin, Chen Shuangsheng, et al

(Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To study the stem cell properties of CD133⁺ cells from the human hepatoma SMMC 7721 cells and investigate the effect of Notch 1 signaling pathway on the proliferation and apoptosis of CD133⁺ cells. **Methods** The CD133⁺ cells from SMMC 7721 cells were sorted out and detected by flow cytometer. Soft agar colony formation and tumor formation in nude mice were used to validate the stem cell properties of CD133⁺ cells. The Notch signaling system of CD133⁺ cells was measured by RT-PCR. The Jagged 1, an activator of Notch signaling, and the γ -secretase inhibitor (DAPT) were added into the mediums of the CD133⁺ cells respectively, the control was added with PBS buffer. Then the level of each Hes-1 mRNA was measured by RT-PCR, MTT assay and Flow cytometry were used to detect the proliferation and apoptosis of CD133⁺ cells. **Results** The CD133⁺ cells were sorted out from the SMMC 7721 cells successfully. Compared to CD133⁻ cells, CD133⁺ cells had stronger abilities of colony formation *in vitro* and tumorigenic *in vivo*. Only the Notch 1/Jagged 1 expressed in the CD133⁺ cells. Expression of Hes-1 mRNA in activator group and inhibitor group had significant difference compared with control group ($P < 0.05$). A value of CD133⁺ cells cultured in activator group and inhibitor group had significant difference compared with control group ($P < 0.05$), and the total apoptosis rates in activator group and inhibitor group had significant difference compared with control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The CD133⁺ cells have the stem cell properties and the CD133⁺ is a label of the stem cell in human SMMC 7721 cells. The Notch 1 signaling pathway plays an important role in the proliferation and apoptosis of the CD133⁺ cells.

Key words CD133⁺; Notch 1 signaling; liver cancer