

• 论 著 •

Notch-1 基因检测在大肠癌中的表达及其临床意义

窦翠云¹, 常洪劲¹, 乔海红²

(1. 济宁医学院附属医院检验科, 山东 272029; 2. 山东省济宁市泗水妇幼保健院 272400)

摘要:目的 探讨 Notch-1 基因在人大肠癌中的表达水平, 并探讨其在大肠癌发生、发展中的作用。方法 采用 RT-PCR 和 Western blot 方法检测大肠癌组织和对照组织标本中 Notch-1 的表达水平。结果 Notch-1 在癌组织与对照组织中均有表达, 但在癌组织中的表达明显高于对照组织, 两者差异有统计学意义。结论 Notch-1 基因在大肠癌中的表达水平明显增高, 提示在结直肠癌中, Notch-1 高表达对大肠癌的发生和发展具有促进作用。

关键词:结肠肿瘤; 聚合酶链反应; 印迹法, 蛋白质; Notch

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.18.005

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)18-2055-02

Expression and clinical significance of Notch-1 in cancer of colon

Dou Cuiyun¹, Chang Hongjin¹, Qiao Haihong²

(1. Department of clinical laboratory, Affiliated Hospital of Jining Medical College, Jining

Shandong 272029, China; 2. Maternity and Child Health Care Hospital of Sishui, Jining Shandong 272400, China)

Abstract: Objective To evaluate the expression of Notch-1 gene and its mechanisms in the development of cancer of colon. Methods The levels of Notch-1 gene in tissues of cancer of colon and normal colon were measured by RT-PCR and Western blot. Results The expression of Notch-1 gene could be detected both in tissues of cancer of colon and normal colon. The expression of Notch-1 was significantly up-regulated in cancer of colon, compared with normal colon tissues ($P < 0.05$). Conclusion The expression of Notch-1 in cancer of colon was significantly higher than that in normal tissues, indicating that the expression of Notch-1 might be correlated with the carcinogenesis and development of cancer of colon.

Key words: colonic neoplasms; polymerase chain reaction; blotting, western; Notch

大肠癌是中国第四大肿瘤疾病, 是威胁人类生存的重要疾病之一。在过去的一段时间里, 由于大肠癌手术治疗、放疗、化疗技术的进步, 大肠癌患者的生存期明显延长, 生活质量也有了明显的提高, 但是仍有大量的大肠癌患者的治疗效果欠佳。了解大肠癌发生、发展的生物学基础, 对结直肠癌治疗的方法和药物作用的靶点有重要意义, 有利于提高大肠癌患者的治疗效果。Notch 信号通路是一个广泛存在于生物进化过程中的、高度保守的、介导细胞与细胞之间通讯机制的信号通路之一, 与调控细胞的增殖、分化和凋亡有关^[1-3]。在不同的肿瘤中, Notch-1 信号所起的作用并不相同。目前, Notch-1 信号系统在大肠癌中的表达水平的研究比较少, 现研究 Notch-1 基因在大肠癌组织中的表达水平并探讨其在大肠癌发生、发展的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 济宁医学院附属医院肛肠科和胃肠外科大肠癌住院患者的手术标本或者肠镜活检标本 56 例, 大肠良性息肉标本 60 例。病例资料完整, 所有病例经术后组织病理学确诊。

1.2 仪器与试剂 凝胶成像分析系统、核酸蛋白测定仪为美国 Bio-rad 公司产品, PCR 仪为 ABI 公司产品。Western 细胞裂解液为碧云天产品, Notch-1 抗体(sc-9170)、 β -actin 抗体(sc-47778)以及蛋白印迹检测试剂盒(Western Bolting Luminol Reagent, sc-2048)为 Santa Cruz 产品。Trizol reagent, cDNA 第一链合成试剂盒、PCR Supermix、蛋白分离胶, 硝酸纤维素膜为 Invitrogen 产品。PCR 引物由上海生工生物技术有限公司合成, 序列(5'→3')如下: β -actin-F: GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG; β -actin-R: AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG; Notch-1-F: CAG GCA ATC CGA GGA CTA TG; Notch-1-R: CAG GCG TGT TGT TCT CAC AG。

1.3 方法

1.3.1 RT-PCR (1)组织总 RNA 的提取: 采用酚/氯仿抽提法提取 RNA。(2)逆转录合成 cDNA: 以上一步所得总 RNA 为模板逆转录合成 cDNA, cDNA 产物保存于 -20℃, 备用。(3)PCR 扩增 Notch-1 和 β -actin 基因片段: 以上一步所得 cDNA 产物为模板, Notch-1-F、Notch-1-R 和 β -actin-F、 β -actin-R 为上下游引物, 扩增反应体系为 50 μ L, 94℃预变性 5 min 后, 94℃30 s, 55℃30 s, 72℃30 s, Notch-1 基因进行 30 个循环, β -actin 基因进行 25 个循环, 最后 72℃延伸 7 min, 将所得 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3.2 Western blot 提取 Notch-1 蛋白和 β -actin 蛋白, 测定蛋白浓度, 每个标本取 40 μ g 蛋白, SDS-PAGE 电泳分离后, 恒定电流 200 mA 1.5 h 转膜至硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂奶粉在摇床上室温封闭 2 h。按照 Notch-1 和 β -actin 蛋白相对分子质量的大小将膜剪成两条, 使 Notch-1 和 β -actin 分别位于其上, 之后用一抗再孵育 2 h, 然后用辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h。在暗室内加入发光试剂, 进行压片检测。

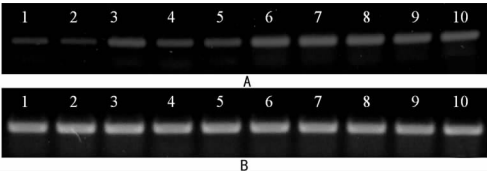
1.4 统计学处理 计算 Western blot 和 RT-PCR 图片条带的灰度值, 用 Notch-1 的灰度值除以 β -actin 灰度值得出比值。以每块胶中对照组的平均比值为标准, 算出患者组的相对比值, 以消除胶与胶之间的差异。以此比值进行两样本均数的 t 检验。

2 结果

2.1 总 RNA 提取 所提取的总 RNA 经核酸蛋白测定仪检测, A260/A280 在 1.8~2.0 之间, 表明总 RNA 未被降解, 可以用于下一步的逆转录反应。

2.2 RT-PCR 所得总 RNA 经逆转录合成 cDNA, 以此 cDNA 为模板扩增 Notch-1 和 β -actin 基因片段。PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 从大肠癌组织中扩增出的 Notch-1 片

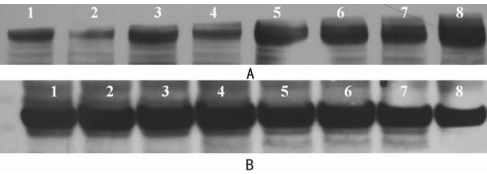
段要比对照组织的亮度强,见图 1。



A: Notch-1; B: β -actin; 1~5: 对照组; 6~10: 患者组。

图 1 RT-PCR 电泳结果

2.3 Western blot 在同样质量的总蛋白中,患者组织标本的 Notch-1 蛋白显影的条带比健康标本亮度强,说明 Notch-1 蛋白在结直肠癌中的表达明显高于健康大肠组织,见图 2。



A: Notch-1; B: β -actin; 1~4: 对照组; 5~8: 患者组。

图 2 Western blot 表达结果

2.4 图像处理及统计分析 算出每个样品 Notch-1 和 β -actin 的灰度值,用 Notch-1 的灰度值除以 β -actin 灰度值得出比值。以每块胶中对照组的平均比值为标准,算出患者组的相对比值,以消除胶与胶之间的差异。见表 1。

表 1 western blot 和 RT-PCR 相对灰度比值($\bar{x} \pm s$)

方法	对照组	患者组
RT-PCR	100 $\pm$ 0.00	135.83 $\pm$ 4.33*
Western blot	100 $\pm$ 0.00	122.63 $\pm$ 7.43*

*: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨 论

Notch 基因参与调节了各种细胞分化发育及调控的信号途径,其对细胞凋亡、增殖、分化及血管形成的效应具有广泛的影响。1991 年,Notch-1 在人类 T 淋巴瘤细胞白血病中首先被鉴定出来,首次提示了 Notch-1 信号通路与肿瘤相关^[4]。随后的研究发现,染色体易位 t(7;9)(q34;q34.3)使位于 9 号染色体上的 Notch-1 基因断裂,导致 Notch-1 胞外区丢失,其胞内区获得组成性活性而出现致癌作用^[1]。但 Notch 信号与肿瘤的关系极其复杂,组成性表达的 Notch-1 异常活化可以抑制许多细胞系的分化,不同的 Notch-1 活化形式对不同的肿瘤产生不同的作用。研究发现在脑肿瘤、乳腺癌等实体瘤和血液系统肿瘤中 Notch-1 表达上调^[5];而在前列腺癌、小细胞肺癌中其表达下调^[6]。Notch-1 在肿瘤中具有截然相反的作用,可能与 Notch-1 在生物进化中高度保守,并在多种组织细胞中广泛存在有关,并且其上下游的调控机制尚未完全明确^[7]。

Notch 信号对正常大肠黏膜更新的自稳调节起重要作用。转基因动物实验表明,肠上皮细胞的变化受到 Notch 的直接调控^[8-10]。但 Notch 信号表达的异常与大肠癌的关系尚不明确。本研究在转录和翻译的水平上对 Notch-1 基因在大肠癌中的表达进行了研究,结果显示,Notch-1 基因在大肠癌组织和对照组织中均有表达,但是在大肠癌组织中的表达水平要明显高于对照组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。这与 Chu 等和 Zhang 等^[11-12]的研究结果相符,提示 Notch-1 可能参与了大肠癌的发生,Notch-1 信号通路的高表达可能对大肠癌的发生和发展具有促进作用。而 Notch-1 基因在乳腺导管上皮细胞和

乳腺癌的研究中也已得到证实,Notch-1 过表达可能导致上皮细胞增殖过度,凋亡减少,并通过上皮表型的恶性转化导致癌变^[13]。

综上所述,本组结果显示大肠癌组织中 Notch-1 蛋白表达明显增强,提示 Notch 信号在大肠癌致病过程中起促进作用,因此分析 Notch-1 蛋白的表达情况,对于评估大肠癌的发展及预后判断具有重要意义,可作为重要的生物学标志物,但其作用机制有待进一步进行体内和体外的实验证实。

参考文献

[1] Artavanis TS, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development[J]. Science, 1999, 284(5415): 770-776.

[2] Miele L, Osborne B. Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis[J]. J Cell Physiol, 1999, 181(3): 393-409.

[3] Kopan R. Notch: a membrane-bound transcription factor[J]. J Cell Sci, 2002, 115(6): 1095-1097.

[4] Ellisen LW, Bird J, West DC, et al. TAN-1, the human homolog of the drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms[J]. Cell, 1991, 66(4): 649-661.

[5] Grynfeld A, Phlman S, Axelson H. Induced neuroblastoma cell differentiation, associated with transient HES-1 activity and reduced HASH-1 expression, is inhibited by Notch1[J]. Int J Cancer, 2000, 88(3): 401-410.

[6] Leong KG, Karsan A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis[J]. Blood, 2006, 107(6): 2223-2233.

[7] Massi D, Tarantini F, Franchi A, et al. Evidence for differential expression of Notch receptors and their ligands in melanocytic nevi and cutaneous malignant melanoma[J]. Mod Pathol, 2006, 19(2): 246-254.

[8] Stanger BZ, Datar R, Murtaugh LC, et al. Direct regulation of intestinal fate by Notch[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(35): 12443-12448.

[9] Fre S, Huyghe M, Mourikis P, et al. Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine[J]. Nature, 2005, 435(7044): 964-965.

[10] Zecehini V, Domaschew R, Winton D. Notch signaling regulates the differentiation of post-mitotic intestinal epithelial cells[J]. Genes Dev, 2005, 19(14): 1686-1691.

[11] Chu D, Wang W, Xie H, et al. Notch 1 expression in colorectal carcinoma determines tumor differentiation status[J]. J Gastrointest Surg, 2009, 13(2): 253-260.

[12] Zhang Y, Li B, Ji ZZ, et al. Notch-1 regulates the growth of human colon cancers[J]. Cancer, 2010, 116(22): 5207-5218.

[13] Stylianou S, Clarke RB, Brennan K. Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2006, 66(3): 1517-1525.

(收稿日期: 2011-06-02)