



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.013  
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.013  
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(4):527-531.

· 基础研究 ·

## 自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤对结直肠腺癌细胞生长与 Notch1 蛋白表的影响

谢杰斌<sup>1</sup>, 庞月珊<sup>2</sup>, 王崇树<sup>1</sup>, 魏寿江<sup>1</sup>, 王攀<sup>1</sup>, 唐锦<sup>1</sup>

(川北医学院附属医院 1. 胃肠外科 / 肝胆胰研究所 2. 疼痛科, 四川 南充 637000)

### 摘要

**目的:** 探讨自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3-MA) 对人大肠癌 SW480 细胞生长与 Notch1 蛋白表达的影响。  
**方法:** 将 3-MA (5 mmol/L) 作用于 SW480 细胞 24 h 后 (以培养相同时间无处理的 SW480 细胞为对照), 分别免疫组化和 Western blot 法检测细胞 Notch1 蛋白的表达, 用 CCK-8 法和 Annexin/PI 双染法检测细胞增殖与凋亡。

**结果:** 免疫组化与 Western blot 结果均显示, 3-MA 作用后, SW480 细胞 Notch1 蛋白的表达明显下调 (均  $P < 0.05$ ); 增殖与凋亡检测结果显示, 3-MA 作用后, SW480 细胞增殖率明显降低, 而凋亡率明显增加 (均  $P < 0.05$ )。

**结论:** 3-MA 能抑制结直肠癌细胞的增殖并促进其凋亡, 该作用可能与 3-MA 抑制 Notch1 蛋白表达从而改变细胞自噬水平有关。

### 关键词

结直肠肿瘤; 受体, Notch1; 自噬

中图分类号: R735.3

## Effects of autophagy inhibitor 3-methyladenine on growth and Notch1 protein expression in colorectal cancer cells

XIE Jiebin<sup>1</sup>, PANG Yueshan<sup>2</sup>, WANG Chongshu<sup>1</sup>, WEI Shoujiang<sup>1</sup>, WANG Pan<sup>1</sup>, TANG Jing<sup>1</sup>

(1. Department of Gastrointestinal Surgery/Institute of Hepatopancreatobiliary Surgery 2. Department of Pain Management, Affiliated Hospital, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

### Abstract

**Objective:** To investigate the effects of autophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA) on growth and Notch1 protein expression in human colon cancer SW480 cells.

**Methods:** In SW480 cells after exposure to 3-MA (5 mmol/L) for 24 h (using untreated SW480 cells cultured for the same time period as control), the Notch1 protein expression was determined by immunohistochemical staining and Western blot analysis, and cell proliferation and apoptosis was detected by CCK8 assay and Annexin/PI double staining, respectively.

**Results:** Both results of immunohistochemical staining and Western blot analysis showed that the Notch1 protein expression was significantly down-regulated in SW480 cells after 3-MA treatment (both  $P < 0.05$ ). Results of cell

基金项目: 四川省教育厅科研基金资助项目 (13ZB0243); 川北医学院科研发展计划资助项目 (CBY12-A-QN20)。

收稿日期: 2014-09-09; 修订日期: 2015-03-08。

作者简介: 谢杰斌, 川北医学院附属医院助教, 主要从事消化道肿瘤基础与临床、糖尿病外科治疗方面的研究。

通信作者: 谢杰斌, Email: xiejiebin84@126.com

proliferation and apoptosis assay showed that the proliferation was significantly decreased while apoptosis rate was significantly increased in SW480 cells after 3-MA treatment (both  $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** 3-MA can suppress the proliferation and promote apoptosis of colorectal cancer cells, which may probably be associated with its inhibition of notch1 protein expression and thereby altering autophagy level of the cells.

**Key words** Colorectal Neoplasms; Receptor, Notch1 ; Autophagy

**CLC number:** R735.3

结直肠癌是常见消化道恶性肿瘤，全球每年新增结直肠癌患者约102万例，同期死亡约53万例<sup>[1]</sup>。尽管结直肠癌在手术、放疗、化疗、生物治疗等方面取得一定的进展，但由于肿瘤细胞的异质性及其对化疗药物的耐药性，使目前疗效受到不同程度的限制<sup>[2]</sup>。研究发现，自噬和Notch信号通路在肿瘤的发生发展中都具有重要的作用，然而，关于两者之间有无相互影响目前尚不十分明确。本实验采用经典自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤（3-methyladenine, 3-MA）抑制结直肠癌细胞的自噬活性，初步探讨抑制结直肠癌自噬活性后对Notch1蛋白表达的影响，为进一步研究两者的关系提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞及主要试剂

人大肠癌细胞株SW480购于中科院上海细胞库；CCK-8试剂盒购于中国南京凯基生物科技公司；胎牛血清（优级）购于杭州四季青生物工程材料有限公司；3-MA购于美国Gibco公司；兔抗人Notch1多克隆抗体购于美国Santa Cruz公司；Western blot相关试剂购于北京鼎国昌盛生物技术有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及分组** 细胞在含15%胎牛血清的新鲜1640培养基中培养，培养条件37℃，CO<sub>2</sub>体积分数为5%，饱和湿度，待细胞达到80%的生长面积时，按不同处理因素分为对照组与实验组。实验组加入3-MA（终浓度为5 μmol/L）；对照组加入相同体积的培养基。

**1.2.2 细胞增殖活性的检测** 挑选处于对数生长期生长状态良好、存活率较高（90%以上）且致密度约为70%~80%的SW480细胞，吸出培养液，PBS洗1次，0.25%胰酶消化，制成单细胞悬液，

每组6个复孔，按 $1 \times 10^5$ 个/孔接种细胞于96孔板上，培养24 h后，实验组加入含3-MA的培养基（终浓度为5 μmol/L），对照组加入相同体积的培养基。37℃培养箱继续培养24 h，后每孔加入10 μL CCK-8试剂，37℃继续孵育培养3 h，酶标仪测450 nm光吸收值（OD值）。计算细胞增殖率。细胞增殖率（%）=（加药孔OD值 - 空白孔OD值）/（对照孔OD值 - 空白孔OD值）×100%。

**1.2.3 细胞凋亡率检测** 取对数生长期的SW480细胞，经消化后制成单细胞悬液，按 $5 \times 10^6$ 个/孔接种细胞于96孔板上，细胞贴壁后，按实验分组用药物处理后继续培养24 h，PBS洗涤2次后，离心弃去上清后，加入500 μL染色缓冲液，然后加入5 μL Annexin-FITC试剂和10 μL PI，混匀，室温下避光孵育15 min，上流式细胞仪检测。

**1.2.4 免疫组化检测 Notch1 蛋白的表达** 6孔板中置入预先处理过的无菌盖玻片，将制备好的细胞悬液加入6孔板中，使得每个孔中细胞量约为 $1 \times 10^5/2$  mL培养基，放置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养24 h后各组加入相应药物，继续培养24 h。取出六孔板，用PBS轻柔地流水冲洗3次；然后4%的多聚甲醛（PFA）2 mL室温固定15 min；去除PFA，细胞用PBS清洗1次；采用免疫组化SP二步法检测，步骤参照试剂盒说明书操作。用PBS做空白对照，已多次检测为阳性的标本做阳性对照，Notch1抗体稀释浓度为1:100，抗体孵育为37℃ 1 h，用IPP 6.0行结果分析。

**1.2.5 Western blot 检测 Notch1 蛋白在各组中的表达** 蛋白的提取：对照组和实验组用药处理后培养24 h，收集细胞，每瓶加入120 μL预先冷却的细胞裂解液（RIPA），混匀，冰浴下摇动15 min进行裂解，预冷的离心机中以14 000 r/min速度离心15 min，取上清转移入新的离心管中-80℃保存待用。BCA法测蛋白浓度。用4×上样缓

冲液将蛋白稀释成相同浓度,沸水中煮3 min,分装后-80℃保存备用。以40 μg总蛋白上样进行SDS-PAGE凝胶(分离胶10%,浓缩胶5%)在4℃条件下电泳,恒流(20 mA分离胶,然后60 mA恒定电流电泳至溴酚蓝刚出胶底部);30 mA恒流条件下,4℃转移过夜。5%的BSA封闭1 h;加一抗(1:500),4℃过夜;37℃复温2 h,TBST洗膜(5 min×3次),加辣根过氧化物酶标记二抗(稀释比为1:4 000),37℃孵育2 h;TBST洗膜(5 min×3次);ECL显像,凝胶成像仪照相,用Quantity One行结果分析。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 16.0软件和GraphPad Prism5软件进行统计分析和作图。每次随机试验独立重复3次,所有数据均用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用独立

样本 $t$ 检验比较两组间差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3-MA对结直肠腺癌细胞Notch1蛋白表达的影响

免疫组化表明Notch1蛋白在结直肠腺癌细胞SW480中高表达,但经3-MA处理后,Notch1的表达明显受到抑制,仅有极少数细胞有弱阳性,差异有统计学意义( $t=19.36$ ,  $P < 0.05$ ) (图1)。Western blot结果与免疫组化结果一致,3-MA明显抑制了结直肠腺癌细胞SW480中Notch1蛋白的表达,差异有统计学意义( $t=26.97$ ,  $P < 0.05$ ) (图2)。

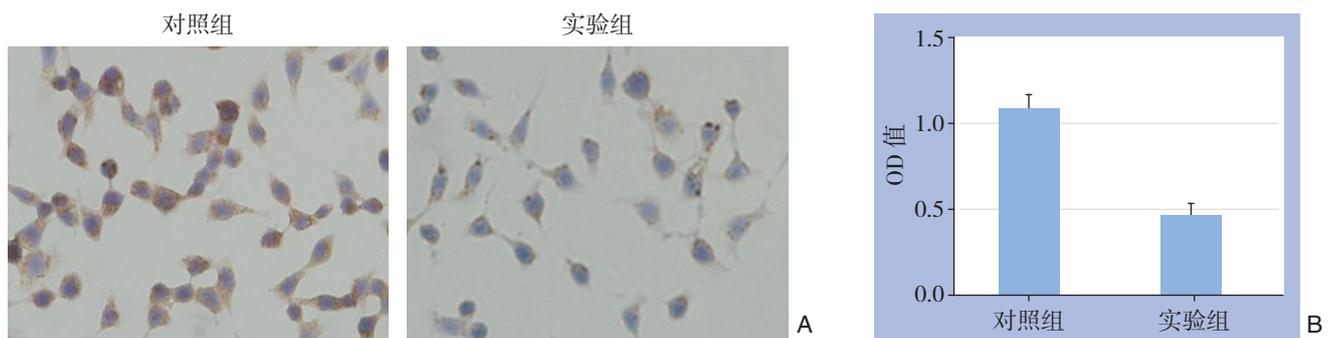


图1 免疫组化检测SW480细胞Notch1蛋白表达 A: 实验组与对照组Notch1蛋白表达情况( $\times 400$ ); B: 实验组与对照组Notch1蛋白OD值比较

Figure 1 Immunohistochemical staining for Notch1 protein expression in SW480 cells A: Notch1 protein expression in experimental group and control group ( $\times 400$ ); B: Comparison of the OD values for Notch1 protein between experimental group and control group

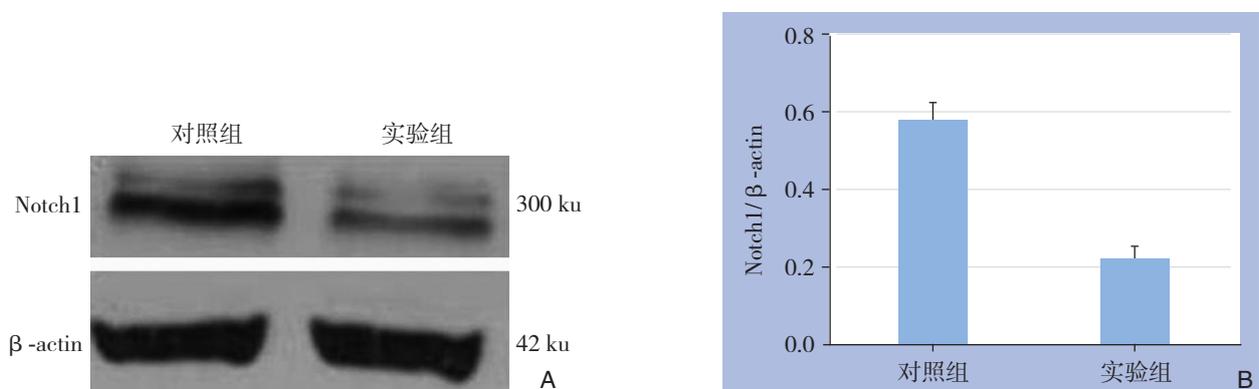


图2 Western blot检测SW480细胞Notch1蛋白表达 A: Western blot电泳条带; B: 实验组与对照组Notch1蛋白相对表达量比较

Figure 2 Western blot analysis for Notch1 protein expression in SW480 cells A: Protein bands detected by Western blot; B: Comparison of the relative expression levels of Notch1 protein between experimental group and control group

## 2.2 3-MA对细胞增殖与凋亡的影响

3-MA对SW480细胞增殖活性具有抑制作用,其增殖率为 $(85.23 \pm 5.61)\%$ ,与对照组比较,差异有统计学意义( $t=8.64, P<0.05$ ); 3-MA处

理后的SW480细胞凋亡率为 $(11.0 \pm 4.3)\%$ ,对照组为 $(4.5 \pm 2.1)\%$ ,实验组凋亡率明显高于对照组( $t=6.43, P<0.05$ ) (图3)。

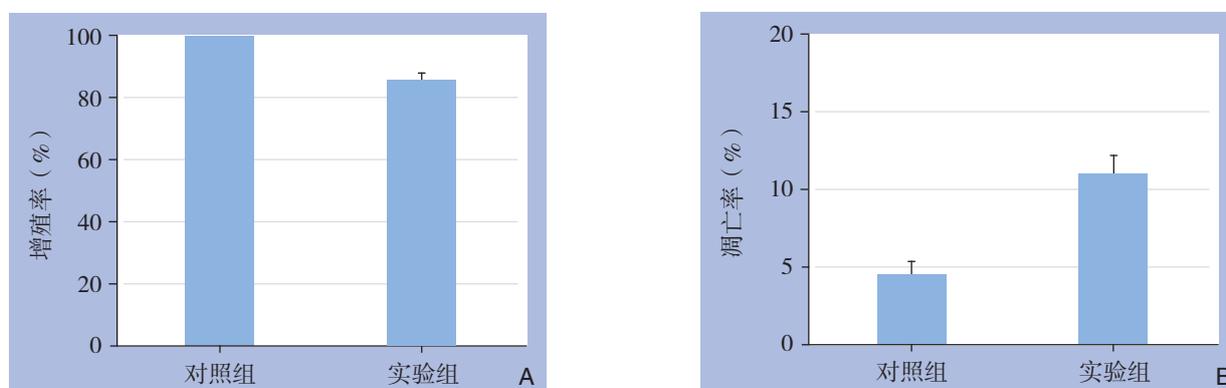


图3 SW480细胞增殖率和凋亡率检测 A: 实验组与对照组细胞增殖率比较; B: 实验组与对照组细胞凋亡率比较

Figure 3 Determination of proliferation and apoptosis of SW480 cells A: Comparison of the cell proliferation rate between experimental group and control group; B: Comparison of the apoptosis rate between experimental group and control group

## 3 讨论

Notch是进化高度保守的信号传导系统,由受体和相应配体组成,目前研究较多的是Notch1信号通路<sup>[3-4]</sup>。大量研究都证明了Notch1信号通路的过度活化与肿瘤恶性潜能密切相关,可通过调控细胞的增殖、分化、凋亡及肿瘤干细胞特性影响肿瘤的发生发展<sup>[5-7]</sup>,现已发现多种肿瘤组织中有Notch1的高表达。在结直肠癌中的研究表明Notch1的高表达与其恶性程度、TNM分期,淋巴转移,细胞分化程度等成正相关,并与5年生存率成负相关<sup>[8]</sup>, $\gamma$ -分泌酶抑制剂(Notch信号通路抑制剂)能提高奥沙利铂及紫杉醇类化疗药物诱导的结直肠癌细胞凋亡率,增加细胞对化疗的敏感性<sup>[9]</sup>。笔者<sup>[10]</sup>在前期检测了Notch1在结直肠癌患者标本中的表达情况,也得到一致的研究结果。Notch1信号通路的调控非常复杂,还和其他信号通路存在串话,如VEGF、Hedgehog和Wnt等<sup>[11-13]</sup>。因此由生长因子,激素和致癌蛋白激酶激活的信号通路会影响Notch的靶基因,而Notch信号的改变则可能导致各种疾病与人类恶性肿瘤。

自噬作为一种高度保守的细胞行为,是细胞在极端条件下的一种生存方式,如缺乏营养和能量时,氧化应激、放疗、化疗等因素<sup>[14-16]</sup>,与多种肿瘤的发生发展密切相关,一方面:肿瘤细

胞可以利用自噬维持生存<sup>[17]</sup>;另一方面:肿瘤可以通过自噬发生自发性或者化疗诱导的细胞死亡<sup>[18-19]</sup>。但自噬影响肿瘤细胞活性的机制目前尚未完全清楚,有研究<sup>[20]</sup>表明自噬抑制剂能通过改变caspase-3、caspase-9等的变化增加细胞的死亡率,提高多种药物对化疗的敏感性。抑制自噬是否存在其他途径提高化疗的敏感性,目前研究较少。最近在果蝇体内发现一个参与自噬前体稳定的基因danc,其突变能抑制自噬的发生并表现为翅缘缺口(Notch基因的表型),添加该基因时能取消上述效果<sup>[21]</sup>,由此可见,自噬可能通过调节Notch信号通路发挥作用。本实验基于上述研究和假设,采用经典自噬抑制剂3-MA抑制结直肠癌细胞的自噬活性,检测其对Notch1表达的影响,明确自噬抑制剂3-MA能否通过改变Notch1信号通路的活性发挥其生物学功能。本研究结果显示结直肠癌腺癌细胞经3-MA作用后Notch1蛋白表达较对照显著下降,表明自噬抑制剂3-MA可能通过降低Notch1蛋白的表达量而下调Notch1信号通路的活性;同时3-MA对结直肠癌腺癌细胞增殖活性的检测表明3-MA本身具抗肿瘤作用,推测其抗肿瘤可能主要是通过抑制肿瘤关键生存信号通路如Notch1等,最近的研究表明3-MA具有放化疗的增敏作用,其是否也通过类似机制有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2007[J]. CA Cancer J Clin, 2007, 57(1):43-66.
- [2] 田衍, 罗华友. 老年直肠癌根治术后局部复发的危险因素分析[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(4):533-536.
- [3] Capaccione KM, Pine SR. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(7):1420-1430.
- [4] Liu W, Morgan KM, Pine SR. Activation of the Notch1 Stem Cell Signaling Pathway during Routine Cell Line Subculture[J]. Front Oncol, 2014, 4:211.
- [5] Wael H, Yoshida R, Kudoh S et al. Notch1 signaling controls cell proliferation, apoptosis and differentiation in lung carcinoma[J]. Lung Cancer, 2014, 85(2):131-140.
- [6] Zhang B, Pu WT. Notching up vascular regeneration[J]. Cell Res, 2014, 24(7):777-778.
- [7] Okigawa S, Mizoguchi T, Okano M, et al. Different combinations of Notch ligands and receptors regulate V2 interneuron progenitor proliferation and V2a/V2b cell fate determination[J]. Dev Biol, 2014, 391(2):196-206.
- [8] Chu D, Li Y, Wang W, et al. High level of Notch1 protein is associated with poor overall survival in colorectal cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(5):1337-1342.
- [9] Meng RD, Shelton CC, Li YM, 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):573-582.
- [10] 谢杰斌, 陈荣. Notch1、Jagged1与MMP-9蛋白在结直肠癌中的表达及其临床病理意义[D]. 温州:温州医科大学硕士论文, 2012: 13-23.
- [11] Li JL, Harris AL. Crosstalk of VEGF and Notch pathways in tumour angiogenesis:therapeutic implications[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2009, 14:3094-3110.
- [12] Bertrand FE, Angus CW, Partis WJ, et al. Developmental pathways in colon cancer:crosstalk between WNT, BMP, Hedgehog and Notch[J]. Cell Cycle, 2012, 11(23):4344-4351.
- [13] Nakamura T, Tsuchiya K, Watanabe M. Crosstalk between Wnt and Notch signaling in intestinal epithelial cell fate decision[J]. J Gastroenterol, 2007, 42(9):705-710.
- [14] Altman BJ, Rathmell JC. Metabolic stress in autophagy and cell death pathways[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012, 4(9):a008763.
- [15] Naveed S, Aslam M, Ahmad A. Starvation based differential chemotherapy: a novel approach for cancer treatment[J]. Oman Med J, 2014, 29(6):391-398.
- [16] Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, et al. Metabolic control of autophagy[J]. Cell, 2014, 159(6):1263-1276.
- [17] Wong YC, Holzbaur EL. Autophagosome dynamics in neurodegeneration at a glance[J]. J Cell Sci, 2015, 128(7):1259-1267.
- [18] Zhou ZW, Li XX, He ZX, et al. Induction of apoptosis and autophagy via sirtuin1- and PI3K/Akt/mTOR-mediated pathways by plumbagin in human prostate cancer cells[J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9:1511-1554.
- [19] Nazim UM, Jeong JK, Seol JW, et al. Inhibition of the autophagy flux by gingerol enhances TRAIL-induced tumor cell death[J]. Oncol Rep, 2015, 33(5):2331-2336.
- [20] 张石云, 段振玲, 徐琳. 3-甲基腺嘌呤对顺铂诱导卵巢癌细胞凋亡影响的研究[J]. 现代妇产科进展, 2012, 21(1):1-3.
- [21] Haberman AS, Akbar MA, Ray S, et al. Drosophila acinus encodes a novel regulator of endocytic and autophagic trafficking[J]. Development, 2010, 137(13):2157-2166.

( 本文编辑 姜晖 )

本文引用格式: 谢杰斌, 庞月珊, 王崇树, 等. 自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤对结直肠腺癌细胞生长与Notch1蛋白表的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(4):527-531. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.013  
**Cite this article as:** XIE JB, PANG YS, WANG CS, et al. Effects of autophagy inhibitor 3-methyladenine on growth and Notch1 protein expression in colorectal cancer cells[J]. Chin J Gen Surg, 2015, 24(4):527-531. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.013