

宫颈癌 HeLa 细胞抗顺铂作用的 Notch1 机制研究

杨 晶 张军红 马慧娟 王志华 王 琼 王 川

摘 要 **目的** 利用宫颈癌 HeLa 细胞系探讨宫颈癌的抗化疗机制。**方法** 利用球形成试验 (sphere forming assay) 和 Western blot 法检测顺铂对癌症干细胞形成的影响以及 Notch1 在 HeLa 细胞系的表达。基因沉默试验分析 Notch1 基因是否在宫颈癌 HeLa 癌症干细胞中发挥关键作用。**结果** 顺铂能促进球结构 (意味着癌症干细胞形成) 的形成。5 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂较 1 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂能促进更多球结构形成 ($P < 0.05$)。10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂会抑制球结构形成。5 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂还能提高 HeLa 中 Notch1 的表达 ($P < 0.05$), 而沉默 HeLa 细胞的 Notch1 后, HeLa 细胞中形成的球数量降低 1.7 倍 ($P < 0.05$)。**结论** 宫颈癌 HeLa 细胞系具有抗顺铂治疗的特性, 尤其是 5 $\mu\text{mol/L}$ 的顺铂, 该抗化疗作用与宫颈癌 HeLa 细胞中的 Notch1 表达升高, 最终促进癌症干细胞自我更新有关。

关键词 癌症干细胞 Notch1 宫颈癌 HeLa 细胞系

中图分类号 R339.2

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.10.010

Notch1 Mediates the Anti - cisplatin Character of Cervical Cancer LeLa Cell Line. Yang Jing, Zhang Junhong, Ma Huijuan, et al. Department of Physiology, Hebei Medical University, Hebei 050017, China

Abstract Objective To explore the anti - chemotherapy mechanism of cervical cancer using the cervical cancer HeLa cell line. **Methods** Sphere forming assay and Western blotting were used to measure the potential effects of Cisplatin on cancer stem cell formation and Notch1 expression in HeLa cells. Gene silencing assay was performed to analyze whether Notch1 played a key role in the proliferation of HeLa cancer stem cells. **Results** Cisplatin basically promoted the formation of ball structures (an indicator of cancer stem cells) except at larger concentration (10 $\mu\text{mol/L}$). Cisplatin at 5 $\mu\text{mol/L}$ exerted greater promoting effect on the ball structures compared with that at 1 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$). Cisplatin at 10 $\mu\text{mol/L}$ inhibited the formation of ball structures. Cisplatin at 5 $\mu\text{mol/L}$ also promoted Notch1 expression in HeLa cells ($P < 0.05$), while silencing Notch1 decreased ball structure formation by 1.7 folds ($P < 0.05$). **Conclusion** Cervical cancer HeLa cell line behaves an character of anti - Cisplatin therapy especially at 5 $\mu\text{mol/L}$, and this tendency is likely associated the promoting effect of Cisplatin on the expression of the self - renewal factor Notch1 and proliferation of cancer stem cells.

Key words Cancer stem cell; Notch1; Cervical cancer; HeLa cell line

目前宫颈癌占全球癌症发生率的 9%, 病死率高达 8%, 是一种严重危害女性健康的恶性肿瘤^[1]。在宫颈癌的综合治疗中, 化疗占据重要的地位, 但化疗后宫颈癌的复发率和转移率仍然很高, 因此弄清楚宫颈癌细胞的抗化疗的作用机制意义重大。现阶段大量研究表明肿瘤中的癌症干细胞具有抗化疗的作用,

这是导致癌症化疗失败的主要原因^[2]。但是癌症干细胞通过何种机制对抗化疗尚不清楚。本研究主要聚焦于研究在干细胞自我更新机制中发挥重要作用的自我更新因子 Notch, 研究其中的 Notch1、Notch2、Notch3 和 Notch4 是否在其中起调控作用, 通过研究顺铂作用于宫颈癌 HeLa 细胞后对细胞的影响, 并从 Notch1 蛋白的角度分析其对宫颈癌干细胞自我更新机制的作用^[3]。

材料与方法

1. 材料: 宫颈癌细胞株 HeLa 购于中国科学院上海细胞库。96 孔超微黏附培养板购自 Corning 公司。高糖 DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司。顺铂 (cisplatin) 购自 Sigma - aldrich 公司。兔抗人多克隆抗体 Notch1 购自 CST 公司。鼠抗兔二抗购自 Santa Cruz 公司。表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 和基本型成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 均购自 Sigma 公司。B27 (50X) 购自 BD 公司。Notch1 干扰序列和对照序列购自吉玛公司, 序列如下:

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31171097); 国家自然科学基金资助项目 (青年项目) (81100229); 河北省自然科学基金资助项目 (C2014206419); 河北省高等学校科学技术研究项目 (ZD2015007); 邢台市科技支撑计划项目 (2013ZC062); 河北省卫生厅医学研究重要课题 (20090319); 河北省科技厅科学技术研究与发展计划项目 (11246125D)

作者单位: 050017 石家庄, 河北医科大学生理学教研室 (杨晶、马慧娟); 054000 河北省邢台市眼科医院病理科、河北省眼病治疗中心、河北省眼科研究所 (张军红); 河北医科大学药理学教研室 (王川) (注: 杨晶、张军红为共同第一作者)

通讯作者: 王川, 教授, 博士生导师, 电子信箱: wchpha@hotmail.com

Notch1 干扰序列:5'-GCGGATTAATTTGCATCTGAA-3',对照序列:5'-GUAUGA CAACAGCCUCAAG-3'。

2. 细胞培养:将宫颈癌细胞株 HeLa 加入含 10% 小牛血清、100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素的高糖 DMEM 培养基中,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

3. 球形形成试验中 (sphere-forming assay):将顺铂 (cisplatin) 用 PBS 溶解后配制成 1mg/ml 的溶液,过滤后存放在 -80℃ 冰箱中。取对数生长期的 HeLa 细胞培养在 60mm 培养皿中,分别加入 0、1、5 和 10μmol/L 的顺铂,72h 后以 500 细胞/孔细胞密度加入含有球形形成试验培养基的 96 孔超低黏附培养板中继续培养,每个样本各 3 个,每 48h 加入 25μl 球形形成试验培养基,6 天后观察不同浓度顺铂组形成球的数量差别。培养使用球形形成试验专用培养基,包括无血清的 DMEM 培养基,20ng/ml 表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF),10ng/ml 基本型成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF),4μg/ml 肝素和 B27 (50X)。

4. Western blot 法检测:取对数生长期的 HeLa 细胞培养在 60mm 培养皿中,分别加入 0 和 5μmol/L 顺铂继续培养,3 天后, RIPA 裂解细胞、提取蛋白并定量、SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭、加入 1:4000 稀释的兔抗人多克隆抗体 Notch1 和 1:4000 稀释的鼠抗兔二抗孵育 PVDF 膜,用 TBST 洗膜 3 次后行免疫印迹化学发光。X 线胶片扫描后用 Image J 软件定量分析 Notch1 蛋白水平。

5. 分析干扰 Notch1 后对球数量的影响:取生长融合达 40% 的 HeLa 细胞,加入 30nmol/L 的 Notch1 干扰序列 (5'-GCGGATTAATTTGCATCTGAA-3') 和对照序列 (5'-GUAUGACAACAGCCUCAAG-3')。2 天后, Western blot 法分析 Notch1 的干扰效果,通过球形形成试验分析干扰 Notch1 对球数量的影响。

6. 统计学方法:采用 SPSS 16.0 统计软件分析,所有数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。计数资料数据以百分率表示。计量资料两组间的数据比较采用 *t* 检验,多组间的数据比较采用 one-way ANOVA。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 球形形成试验:球形形成试验球常用来分析细胞系是否发生了干细胞的改变,已应用于研究多种癌症的癌症干细胞。结果发现,计数球形形成试验中的球数量,0μmol/L 顺铂组中 500 个 HeLa 细胞平均生成 19 个球结构,1μmol/L 顺铂组中 500 个 HeLa 细胞平均生成 23 个球结构,5μmol/L 顺铂组中 500 个 HeLa 细胞平均生成 34 个球结构,10μmol/L 顺铂组中 500 个 HeLa 细胞平均生成 1.7 个球结构,5μmol/L 顺铂组的球结构较 0μmol/L 顺铂组的增加 1.5 倍,显著多于 0μmol/L 顺铂组 (*P* < 0.05),见图 1。最终选择 5μmol/L 顺铂研究其对宫颈癌细胞 HeLa 的影响,5μmol/L 顺铂作用宫颈癌 HeLa 细胞后 HeLa 细胞中

癌症干细胞的比例显著增加。

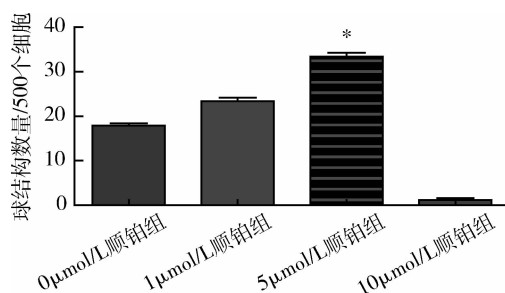


图 1 不同浓度顺铂在球形形成试验中对宫颈癌 HeLa 细胞形成球数量的影响
与 0μmol/L 顺铂组比较, * *P* < 0.05

2. 顺铂促进 HeLa 细胞 Notch1 表达增加:Western blot 法检测结果发现,5μmol/L 顺铂组中 HeLa 细胞 Notch1 表达较 0μmol/L 顺铂组的显著增加 (*P* < 0.05,图 2),说明 5μmol/L 顺铂作用于 HeLa 细胞后可能会促进宫颈癌癌症干细胞的自我更新,这与文献报道的 Notch1 可能是癌症干细胞的自我更新因子是一致的^[4]。

3. 分析干扰 Notch1 后对球数量的影响:通过干扰试验分析 Notch1 对宫颈癌癌症干细胞的影响。Western blot 法结果显示,siN1 组中笔者成功干扰了 Notch1 在 HeLa 细胞中的表达,siN1 组中 HeLa 细胞的 Notch1 表达较未被干扰的 NC 组中的 Notch1 表达显著降低 (*P* < 0.05,图 3 中 A 和 B)。球形形成试验结果发现,siN1 组中 500 个 HeLa 细胞平均生成 20 个球结构,而未被干扰的 NC 组中 500 个 HeLa 细胞平均生成 32 个球结构,siN1 组中形成的球结构数量较未被干扰的 NC 组中的球结构数量显著降低 (*P* < 0.05,图 3 中 C 和 D)。说明 HeLa 细胞中的 Notch1 基因沉默后,不利于在 HeLa 细胞中形成宫颈癌癌症干细胞,这可能与癌症干细胞的自我更新因子 Notch1 的表达显著减少有关。

讨 论

综上所述,笔者发现不用 10μmol/L 的顺铂作用 HeLa 细胞后,不能形成球结构,而用 5μmol/L 的顺铂作用 HeLa 细胞后,形成球的数量明显增多。因此,笔者使用 5μmol/L 的顺铂用于后续的试验。

越来越多的研究表明癌症干细胞有抗化疗的作用^[4-7]。Yang 等^[5]发现 SP1 和 SP3 可以促进肺癌细胞中干细胞标志分子 ABCG2 的表达,沉默 SP1 或者 SP3 后导致肺癌形成的侧群细胞 (side population) 数量减少。光神霉素可以抑制 SP1 的活性,导致肺癌细

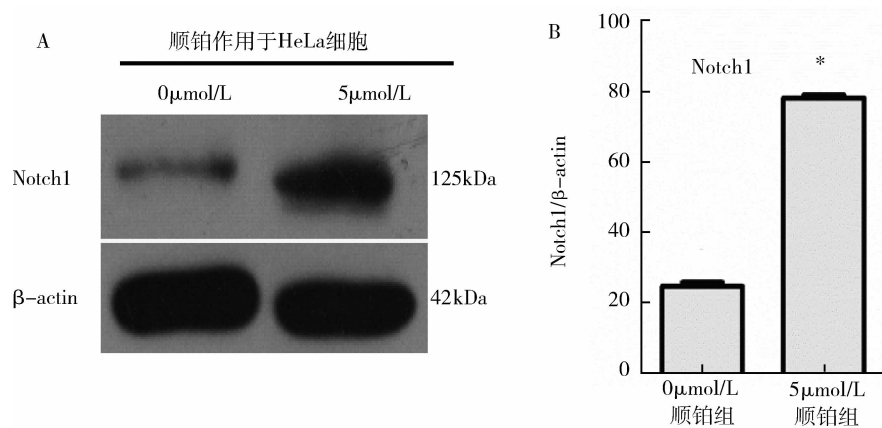


图2 Western blot 法检测顺铂作用于 HeLa 细胞后 Notch1 的表达

A. Western blot 法检测 0 μ mol/L 顺铂和 5 μ mol/L 顺铂作用于 HeLa 细胞后 Notch1 表达; B. Western blot 法检测 0 μ mol/L 顺铂和 5 μ mol/L 顺铂作用于 HeLa 细胞后 Notch1 表达的统计图;与 0 μ mol/L 顺铂组比较, * $P < 0.05$

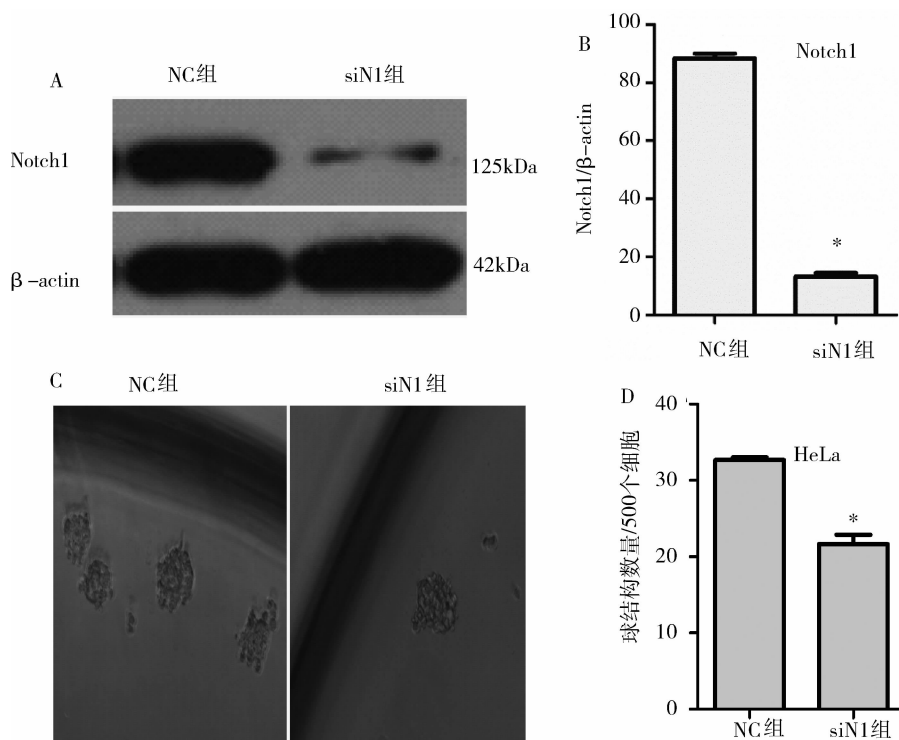


图3 Western blot 法检测干扰 Notch1 后对 Notch1 表达和球形成数量的影响

A. Western blot 法检测未干扰 Notch1 组和干扰 Notch1 组时 Notch1 蛋白表达; B. Western blot 法检测未干扰 Notch1 组和干扰 Notch1 组时 Notch1 蛋白表达的统计图; C. 球形成试验检测未干扰 Notch1 组和干扰 Notch1 组中形成的球结构数量; D. 球形成试验检测未干扰 Notch1 组和干扰 Notch1 组中形成的球结构数量的原始图;与 NC 组比较, * $P < 0.05$

胞中侧群细胞减少和球形成能力下降。抑制 SP1 或者 SP3 后,癌症干细胞数量减少,导致肺癌对化疗药物顺铂敏感。在胰腺癌中,流式细胞术筛选的具有癌症干细胞潜能的侧群细胞具有球形成能力,可以抵抗吉西他滨的化疗作用^[6]。Yo 等^[7]通过球形成试验分离卵巢癌的癌症干细胞,体外观察到这些细胞对一部

分药物有抗化疗作用。在进展型结肠癌中,高表达 Lgr5 可提高球形成的效率,促进结肠癌癌症干细胞的增殖,抵抗化疗药物 5-FU 和奥沙利铂的作用^[8]。在胆囊癌中,CD44⁺CD133⁺的细胞可形成具有癌症干细胞特性的球形结构,最终抵抗化疗药物的作用^[9]。在原代培养的乳腺癌中,CD49f⁺细胞可形成

球形结构,将该 CD49f⁺ 的乳腺癌细胞进行移植实验后,形成的乳腺肿瘤更多,并能抵抗阿霉素的化疗作用^[10]。López 等^[11] 从球形成试验中分离宫颈癌细胞系中的球形结构,发现球结构细胞高表达宫颈癌癌干细胞标志 CD49f,很少数量的球细胞可以在动物体内形成肿瘤。因此,球形成试验可以富集包括肺癌、胰腺癌、卵巢癌、结肠癌、胆囊癌和乳腺癌等中的癌干细胞,形成的球形结构高表达癌干细胞的基因,并且这些癌干细胞具有抗化疗的作用^[12]。

笔者的研究结果也发现,顺铂作用 HeLa 细胞后,球形成试验中形成的球形结构的数量明显增加,同时癌干细胞的自我更新因子 Notch1 表达显著增加。但是顺铂作用 HeLa 细胞后通过干扰 Notch1 基因后,被干扰 Notch1 的 HeLa 细胞的中球形结构的数量明显减少,说明 Notch1 能调控宫颈癌癌干细胞的自我更新作用。Peng 在研究中也发现,顺铂可以引起沉默 Notch1 的宫颈癌细胞凋亡增加。因此笔者推测宫颈癌癌干细胞的抗顺铂作用和 Notch1 的表达有关,可通过增加 Notch1 的表达促进宫颈癌癌干细胞的自我更新。而这种增强表达的癌干细胞的自我更新因子与癌症的复发和转移关系密切^[13,14]。笔者认为,通过病理学检测宫颈癌中 Notch1 的表达,对于分析宫颈癌的复发、转移和抗化疗作用可能有指示作用。在临床上深入研究 Notch1 与宫颈癌转移复发的关系,对于分析 Notch1 在宫颈癌诊断、治疗和预后都有重要的意义。

参考文献

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69–90
- 2 Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges [J]. *Nature Medicine*, 2011; 313–319
- 3 Pannuti A, Foreman K, Rizzo P, *et al.* Targeting Notch to target cancer stem cells[J]. *Clinical Cancer Research*, 2010, 16(12): 3141–3152

- 4 de Paiva CS, Chen Z, Corrales RM, *et al.* ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells[J]. *Stem Cells*, 2005, 23(1): 63–73
- 5 Yang WJ, Song MJ, Park EY, *et al.* Transcription factors Sp1 and Sp3 regulate expression of human ABCG2 gene and chemoresistance phenotype[J]. *Molecules Cells*, 2013; 1–8
- 6 Asuthkar S, Stepanova V, Lebedeva T, *et al.* Multifunctional roles of urokinase plasminogen activator (uPA) in cancer stemness and chemoresistance of pancreatic cancer[J]. *Molecular Biology of Cell*, 2013, 24(17): 2620–2632
- 7 Yo YT, Lin YW, Wang YC, *et al.* Growth inhibition of ovarian tumor – initiating cells by niclosamide[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2012, 11(8): 1703–1712
- 8 Liu YS, Hsu HC, Tseng KC, *et al.* Lgr5 promotes cancer stemness and confers chemoresistance through ABCB1 in colorectal cancer[J]. *Bio-medicine & Pharmacotherapy*, 2013; 791–799
- 9 Shi C, Tian R, Wang M, *et al.* CD44⁺ CD133⁺ population exhibits cancer stem cell – like characteristics in human gallbladder carcinoma [J]. *Cancer Biology Therapy*, 2010, 10(11): 1182–1190
- 10 Lee KM, Han W, Kim JB, *et al.* The CD49d⁺/high subpopulation from isolated human breast sarcoma spheres possesses tumor – initiating ability [J]. *International Journal of Oncology*, 2012, 40(3): 665–672
- 11 López J, Poitevin A, Mendoza – Martínez V, *et al.* Cancer – initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem – cell markers and increased radioresistance[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12(1): 48
- 12 Feng D, Peng C, Li C, *et al.* Identification and characterization of cancer stem – like cells from primary carcinoma of the cervix uteri [J]. *Oncology Reports*, 2009, 22(5): 1129–1134
- 13 Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2008, 8(10): 755–768
- 14 Medema JP. Cancer stem cells: the challenges ahead[J]. *Nature Cell Biology*, 2013, 15(4): 338–344

(收稿日期:2015–01–29)

(修回日期:2015–03–06)

(上接第 33 页)

- 7 Parameswaran S, Khalil M, Ahmed KA, *et al.* Enhanced protective immunity derived from dendritic cells with phagocytosis of CD40 ligand transgene – engineered apoptotic tumor cells via increased dendritic cell maturation[J]. *Tumori*, 2015, Epub ahead of Print
- 8 钱莉,王寿,龚卫娟,等. 小鼠 CD40L 基因的克隆与真核细胞表达研究[J]. *实用临床医药杂志*, 2007, 11(6): 1–4
- 9 Miller EA, Gopal R, Valdes V, *et al.* Soluble CD40 ligand contributes to dendritic cell – mediated T – cell dysfunction in HIV – 1 infection [J]. *AIDS*, 2015, 29(11): 1287–1296
- 10 Kwa S, Lai L, Gangadhara S, *et al.* CD40L – adjuvanted DNA/MVA SIV239 vaccine enhances SIV – specific humoral and cellular immunity, and improves protection against a heterologous SIVE660 mucosal challenge[J]. *J Virol*, 2014, 88(17): 9579–9589

- 11 Harcourt JL, Brown MP, Anderson LJ, *et al.* CD40 ligand(CD154) improves the durability of respiratory syncytial virus DNA vaccination in BALB/c mice[J]. *Vaccine*, 2003, 20(21–22): 2964–2979
- 12 Sin JJ, Kim JJ, Zhang D, Weiner DB. Modulation of cellular responses by plasmid CD40L: CD40L plasmid vectors enhance antigen – specific helper T cell type 1 CD4⁺ T cell – mediated protective immunity against herpes simplex virus type 2 in vivo[J]. *Hum Gene Ther*, 2001, 12(9): 1091–1102
- 13 Ma K, Xu W, Shao XN, *et al.* Coimmunization with RANTES plasmid polarized Th1 immune response against hepatitis B virus envelope via recruitment of dendritic cells[J]. *Antiviral Research*, 2007, 76(2): 140–149

(收稿日期:2015–07–07)

(修回日期:2015–07–21)