

Notch1、Notch2 及 c-Myc 在肾透明细胞癌中的表达及意义*

黄庆波¹ 刘尚文¹ 艾青¹ 司马晋¹ 姚志勇¹ 张帆¹ 马鑫¹ 张旭¹

[摘要] 目的:探讨 Notch 信号受体 Notch1、Notch2 及 c-Myc 在肾透明细胞癌中的表达与意义。方法:通过实时定量 PCR 及 western-blot 方法检测 27 例肾透明细胞癌及瘤旁组织中 Notch1、Notch2 及 c-Myc 的表达水平,并采用相关性分析检验 Notch1、Notch2 的表达与 c-Myc 的表达相关性。结果:Notch1、Notch2 及 c-Myc 在肾癌组织中表达水平明显高于相应的癌旁组织($P < 0.001$),相关性分析表明在肿瘤组织中 c-Myc 与 Notch2 的 mRNA 水平呈正相关($r = 0.629$, $P < 0.001$),而与 Notch1 的 mRNA 水平无相关($P = 0.389$)。结论:Notch 信号通路及 c-Myc 的异常高表达可能与肾透明细胞癌的发生发展有关,而且 c-Myc 可能作为 Notch 信号通路的下游靶基因,发挥促癌的作用。

[关键词] 肾肿瘤;Notch 受体;c-Myc;相关性分析

[中图分类号] R737.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-1420(2012)04-0270-04

Expression and significance of Notch1、Notch2 and c-Myc in clear cell renal cell carcinoma

HUANG Qingbo LIU Shangwen AI Qing SIMA Jin YAO Zhiyong
ZHANG Fan MA Xin ZHANG Xu

(Department of Urology, Chinese PLA General Hospital/PLA Military Postgraduate Medical School, Beijing, 100853, China)

Corresponding author: ZHANG Xu, E-mail: xzhang@foxmail.com

Abstract Objective: To investigate the expression and significance of Notch1, Notch2 and c-Myc in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). **Method:** Message RNA and protein levels of Notch1, Notch2 and c-Myc were detected in 27 ccRCC tissue samples and their corresponding adjacent normal tissue samples by real-time PCR and western-blot, respectively. Correlation analyses were utilized between mRNA expressions of Notch1, Notch2 and c-Myc. **Result:** Notch1, Notch2 and c-Myc were all upregulated in ccRCC samples relative to adjacent normal tissue samples ($P < 0.001$). Correlation analyses showed that c-Myc mRNA expression was closely correlated with Notch2 mRNA expression in ccRCC ($r = 0.629$, $P < 0.001$), but not with Notch1 mRNA expression ($P = 0.389$). **Conclusion:** Up-regulated Notch1, Notch2 and c-Myc may associate with ccRCC and c-Myc may serve as a target gene of Notch pathway signaling.

Key words kidney neoplasms; Notch receptor; c-Myc; correlation analysis

肾细胞癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,起源于肾小管上皮细胞,在我国泌尿系恶性肿瘤中发病率仅次于膀胱癌,占全身恶性肿瘤的 2%~3%,其中 60%~80% 为透明细胞癌。肾透明细胞癌恶性程度高,且容易发生远处转移,已经证实其发生发展与 Von Hippel-Lindau (VHL) 抑癌基因失活有关。以此理论为基础针对血管内皮生长因子(VEGF)受体的分子靶向治疗已经成为转移性肾癌的一线治疗;但有效率仅为 10%~40%,说明肾癌的发生发展中尚存在未知的作用机制。研究表明 Notch 信号通路是一种独立于 VHL/HIF 的信号通路,且在肾癌细胞增殖中发挥重要作用^[1],

具体作用机制有待研究。c-Myc 是 myc 癌基因家族中最重要的成员,作为促进细胞分裂的基因和决定细胞从 G₀/G₁ 期进入 S 期的“开关”,其编码的蛋白与细胞增殖有密切关系^[2]。在其它肿瘤中,c-Myc 是 Notch 信号通路的直接靶向因子^[3,4],在肾透明细胞癌中,Notch 信号是否通过 c-Myc 促进肿瘤细胞增殖,目前尚无报道。本研究主要研究 Notch 信号代表受体 Notch1、Notch2 及 c-Myc 在肾透明细胞癌中的表达及意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

27 例肾透明细胞癌及对应的 27 例瘤旁标本均取自于本单位手术标本,以液氮进行快速冷冻并保存于-80℃冰箱中。标本的一般资料、临床资料及病理资料见表 1。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No:30972982)

¹ 中国人民解放军总医院军医进修学院泌尿外科(北京,100853)

通信作者:张旭, E-mail: xzhang@foxmail.com

表1 Notch1、Notch2 及 c-Myc 的表达与临床病理资料的关系

 $\bar{x} \pm s$

参数	例数	Notch1 相对表达	Notch2 相对表达	c-Myc 相对表达
年龄/岁				
<60	21	4.44±1.05	7.12±1.74	6.60±1.60
≥60	6	5.05±2.66	3.85±1.91	6.45±2.85
性别				
男	22	4.28±0.97	6.76±1.70	6.21±1.49
女	5	5.89±3.43	4.80±1.98	8.16±3.73
体重指数/BMI				
<25	12	4.17±1.23	3.45±0.91	4.11±0.72
≥25	15	4.90±1.50	8.75±2.33	8.54±2.31
核分级				
I 级	22	3.91±1.07	6.47±1.72	7.08±1.65
II 级	5	7.52±2.19	6.06±1.69	4.33±1.31
肿瘤大小/cm				
≤4	12	5.04±1.44	8.55±2.92	7.45±2.25
>4,≤7	10	5.25±1.96	4.01±1.16	7.39±2.49
>7	5	2.12±0.98	6.00±1.86	2.83±0.45
T 分期				
T ₁	20	5.32±1.27	6.57±1.89	7.13±1.77
T ₂	2	3.88±1.96	6.82±1.44	3.25±1.25
T ₃	5	1.90±0.66	5.51±1.78	5.67±2.07

1.2 研究方法

RNA 提取及逆转录合成 cDNA: RNA 提取试剂盒 RNeasy total RNA isolated kit 及逆转录试剂盒 TrueScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 均购自艾德莱公司,按照说明书的方法提取总 RNA 并将其逆转录为 cDNA。

实时定量 PCR: 实时定量 PCR 使用了 SYBR-Green 染料法,试剂盒购自美国 Fermentas 公司。Notch1 的引物为: 正向: 5'-GTG ACT GCT CCC TCA ACT TCA AT-3'; 反向 5'-CTG TCA CAG TGG CCG TCA CT-3'; Notch2 的引物为: 正向: 5'-CAG TTA ATA ATT GGT CCA T-3'; 反向: 5'-ATT CAC CTG TTA ATA TCT AC-3'; c-Myc 的引物为: 正向: 5'-CGT CTC CAC ACA TCA GCA CAA-3'; 反向: 5'-CAC TGT CCA ACT TGA CCC TCT TG-3'; 内参 PPIA 的引物为: 正向: 5'-TCA TCT GCA CTG CCA AGA CTG-3'; 反向: 5'-CAT GCC TTC TTT CAC TTT GCC-3'。熔化曲线分析法确认了产物的特异性,无模板空白对照确保实验过程无 PCR 产物及 cDNA 污染。每个样品行三个重复。最后采用 2-ΔΔCT 相对定量法比较不同组的基因表达差异。

蛋白提取及 western-blot 实验: 采用索莱宝公司的蛋白提取试剂盒从组织中提取总蛋白,采用 BCA 法(试剂盒购自艾德莱公司)测蛋白浓度,然后按照 western-blot 标准流程操作。Notch1 及 Notch2 抗体购自 Abcam 公司, c-Myc 抗体购自

Bioworld 公司,内参 GAPDH 为中杉金桥分装抗体。Notch1 及 Notch2 的工作浓度均为 1:2 000, c-Myc 及 GAPDH 的工作浓度均为 1:1 000。二抗为辣根过氧化物酶标记,工作浓度为 1:5 000。一抗 4 度孵育过夜,二抗常温孵育 1 h。

1.3 统计学方法

相对 mRNA 表达水平采取 Log10 转换为正态分布数据后采用 *t* 检验比较组间差异。采用直线相关分析基因 mRNA 表达水平的相关性。 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

Notch 信号通路受体 Notch1 及 Notch2 在肾透明细胞癌及瘤旁对照中的表达: 采用定量相对准确的实时定量 PCR 检测 27 对肾癌透明细胞癌组织及瘤旁组织的 mRNA 表达,如图 1A 所示,肿瘤组 Notch1 的 mRNA 表达水平比瘤旁组高(2.65±0.27)倍($P < 0.001$),肿瘤组 Notch2 的表达水平比瘤旁组高(3.34±0.37)倍($P < 0.001$)。Western-blot 实验显示肿瘤组 Notch1 及 Notch2 的蛋白水平也高于瘤旁对照组(图 1B)。Notch1 及 Notch2 的 mRNA 水平与临床病理资料的关系见表 1, Notch1 在不同年龄($P = 0.803$)、性别($P = 0.533$)、体重指数($P = 0.719$)、核分级($P = 0.158$)、肿瘤大小($P = 0.508$)及 T 分期($P = 0.416$)组间的表达差异无统计学意义。Notch2 在不同年龄($P = 0.350$)、性别($P = 0.605$)、体重指数($P = 0.064$)、核分级($P = 0.913$)、肿瘤大小

($P=0.372$)及 T 分期($P=0.959$)组间的表达差异无统计学意义。

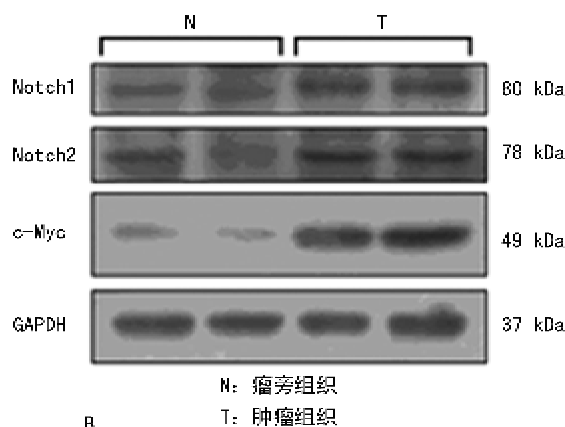
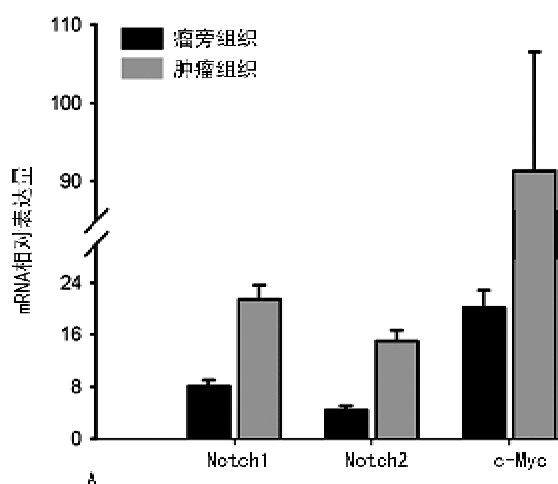


图 1 Notch1, Notch2 及 c-Myc 在肾透明细胞癌及相应瘤旁组织中的表达

C-Myc 在肾透明细胞癌及瘤旁对照中的表达: 如图 1A 所示, 肿瘤组织 C-Myc 的 mRNA 水平高于(4.52 ± 0.75)倍($P < 0.001$), 图 1B 显示肿瘤组 C-Myc 蛋白表达高于瘤旁对照组。C-Myc 在不同年龄($P=0.963$), 性别($P=0.589$), 体重指数($P=0.110$), 核分级($P=0.446$), 肿瘤大小($P=0.446$)及 T 分期($P=0.742$)组间的表达差异无统计学意义。

Notch1, Notch2 及 C-Myc 在肾透明细胞癌中的表达关系: $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量法求得的相对 mRNA 表达水平为指数, 采取 Log10 转换为正态分布数据, 采用直线相关分析基因 mRNA 表达水平的相关性。如图 2 所示, 在正常组织中 c-Myc 与表达与 Notch1($P=0.224$)及 Notch2($P=0.138$)的表达均无相关性。而在肿瘤在组织中, c-Myc 与 c-Myc 与表达与 Notch1 表达仍无相关性($P=0.389$), 而的 Notch2 表达呈直线相关($P < 0.001$), $r=0.629$, 中等相关(图 3)。

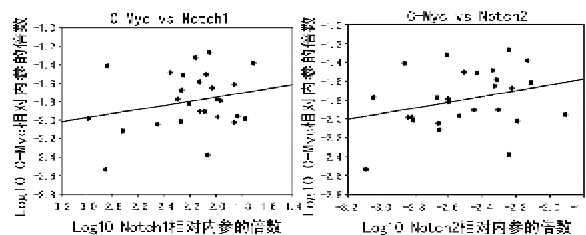


图 2 瘤旁组织中 c-Myc 与 Notch1, Notch2 mRNA 表达水平的相关性分析

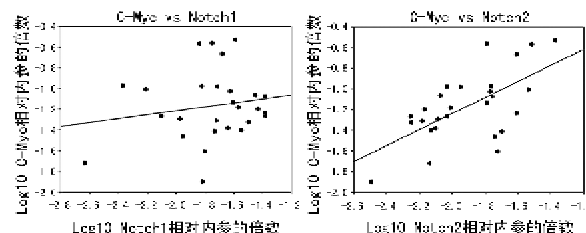


图 3 肿瘤组织中 c-Myc 与 Notch1, Notch2 mRNA 表达水平的相关性分析

3 讨论

Notch 信号途径是通过局部细胞间相互作用控制细胞命运的一种途径, 它在进化中非常保守, 在调节细胞分化, 增殖和凋亡, 及一系列生理、病理过程中都起重要作用。其成员包括 4 种 Notch 受体(Notch 1~4)和 5 种 Notch 配体(Jagged 1, 2 和 Delta 1, 3 和 4), 受体与配体相互作用后细胞内蛋白酶活性被激活, 受体的胞内段在完成三次酶切后被释放并进入细胞核内, 与转录抑制因子 CSL 等结合, 调节靶基因如 Hes、Hey 家族的转录表达, 进而调控细胞的生长和分化^[5]。Notch 信号转导过程的特点是不需要第二信使和蛋白激酶的参与, 直接接受临近细胞的信号并传入细胞核, 激活相关转录因子的表达, 虽然这种转导方式并不能放大信号, 但对于细胞内精确的调控是十分必要的。Notch 信号的作用与组织细胞所处的环境有关, 如 Notch 信号通路在血液系统肿瘤, 实体瘤如乳腺癌, 脑肿瘤, 肺癌等中起促癌作用, 但在皮肤癌中起抑癌的作用^[6]。Notch 信号与很多信号交联, 是许多重要细胞信号通路的交汇点, 这也是 Notch 信号通路成为研究热点的重要原因。

肾透明细胞癌是泌尿系常见的肿瘤, 研究证实其发生发展与 Von Hippel-Lindau (VHL) 抑癌基因失活有关, 但以此理论为基础针对血管内皮生长因子(VEGF)受体的分子靶向治疗效果不理想。说明在肾透明细胞癌发生发展中尚存在未知作用机制。研究表明 Notch 信号通路为独立于 VHL/HIF 的信号通路, 在肾癌细胞增殖中发挥重要作用^[1]。但具体作用机制如通过那些靶因子或与哪些信号交联促进肾癌细胞增殖尚有待研究。本研

究证实 Notch 信号通路的受体 Notch1 及 Notch2 在肾癌组织中高表达,虽然与临床病例资料无明显相关性,但 Notch 信号的激活可能与肾癌的发生有关系。

原癌基因 c-Myc 在肿瘤的发生发展中起着重要作用,它对细胞具有双重作用,既可刺激细胞增殖,也可促进细胞凋亡,影响着细胞的生长、分化、凋亡和细胞周期。正常情况下,c-Myc 受到许多机制的精密调控,使细胞的增殖和凋亡保持平衡,但是在病理条件下,c-Myc 癌基因的异常表达,为肿瘤发生过程中较早出现的分子改变,与肿瘤的启动及癌性增生密切相关。已有研究表明,在多种肿瘤包括肾癌中,c-Myc 蛋白和 mRNA 水平均过度表达^[7,8],并且 c-Myc 可能成为癌症治疗的靶点。本研究发现在肾癌中,c-Myc 癌基因的 mRNA 水平及蛋白水平均高于正常对照组,说明肾癌也是 c-Myc 依赖的肿瘤,c-Myc 蛋白和 mRNA 水平过度表达可能与细胞过度增殖有关。

研究表明 c-Myc 与 Notch 信号通路有许多交联,在 T 细胞急性白血病及乳腺癌中,c-Myc 作为 Notch1 受体介导的 Notch 信号通路的直接靶点,促进肿瘤细胞的增殖,与肿瘤的发生发展有密切联系^[3]。文献报道及本研究均提示在 Notch 信号通路及 c-Myc 肾癌中均高表达。在本实验中,我们发现在肿瘤组织中 c-Myc 的表达与 Notch2 的表达呈正相关,而在癌旁组织中,c-Myc 的表达与 Notch2 的表达无相关性,说明在正常状态下,Notch 信号与 c-Myc 的表达可能为相互独立的作用机制,而在病理状态下 Notch 信号可能通过激活 c-Myc 而促进肿瘤细胞的增殖。由于 c-Myc 对细胞具有双重作用,既可刺激细胞增殖,也可促进细胞凋亡,直接针对 c-Myc 的治疗不足以治愈肿瘤,必须联合其他靶点的治疗才能达到更好的效果,本研究发现 Notch 信号的激活与 c-Myc 异常表达有

关,为将来通过抑制 Notch 信号通路而抑制过度表达的 c-Myc 基因提供一定的理论依据。但是,这种关联尚需细胞水平及动物实验验证。

总之,在肾透明细胞癌中,Notch 信号通路受体 Notch1、Notch2 及 c-Myc 均高表达,且 c-Myc 的表达水平与 Notch2 的表达水平呈正相关,提示 c-Myc 可能作为 Notch 信号通路的直接下游靶基因并在肿瘤发生发展中起重要作用。

参考文献

- [1] SJÖLUND J, JOHANSSON M, MANNA S, et al. Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of Notch signaling in vitro and in vivo[J]. J Clin Invest, 2008, 118: 217–228.
- [2] MORRISH F, NERETTI N, SEDIVY J M, et al. The oncogene c-Myc coordinates regulation of metabolic networks to enable rapid cell cycle entry[J]. Cell Cycle, 2008, 7: 1054–1066.
- [3] WENG A P, MILLHOLLAND J M, YASHIRO-OHTANI Y, et al. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma[J]. Genes Dev, 2006, 20: 2096–2109.
- [4] SHARMA V M, DRAHEIM K M, KELLIHER M A. The Notch1/c-Myc pathway in T cell leukemia[J]. Cell Cycle, 2007, 6: 927–930.
- [5] TIEN A C, RAJAN A, BELLEN H J. A Notch updated[J]. J Cell Biol, 2009, 184: 621–629.
- [6] 李林, 罗进勇. Notch 信号通路及其与肿瘤的关系[J]. 临床和实验医学杂志, 2010, 9(19): 1509–1511.
- [7] 程伟, 金明, 邵国兴, 等. C-myc 基因在肾癌组织中的表达[J]. 临床泌尿外科杂志, 2001, 16(4): 178–180.
- [8] VITA M, HENRIKSSON M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2006, 16: 318–330.

(收稿日期:2011-12-21)

(上接第 269 页)

参考文献

- [1] OST M C, KAYE J D, GUTTMAN M J, et al. Laparoscopic pyeloplasty versus antegrade endopyelotomy: comparison in 100 patients and a new algorithm for the minimally invasive treatment of ureteropelvic junction obstruction[J]. Urology, 2005, 66: 47–51.
- [2] 刘永达, 袁坚. 金属网状支架在继发性肾盂输尿管连接部梗阻中的应用[J]. 中华泌尿外科杂志, 2004, 25(8): 554–556.
- [3] DIMARCO D S, GETTMAN M T, MCGEE S M, et al. Long-term success of antegrade endopyelotomy

compared with pyeloplasty at a single institution[J]. J Endourol, 2006, 20: 707–712.

- [4] RUKIN N J, ASHDOWN D A, PATEL P, et al. The role of percutaneous endopyelotomy for ureteropelvic junction obstruction[J]. Ann R Coll Surg Engl, 2007, 89: 153–156.
- [5] ZELTSER I S, LIU J B, BAGLEY D H. The incidence of crossing vessels in patients with normal ureteropelvic junction examined with endoluminal ultrasound[J]. J Urol, 2004, 172: 2304–2307.

(收稿日期:2011-05-19)