

# mTOR - Notch 通路在人乳腺癌组织中的验证

石玉镯 张 舒 孙 强 陈欣欣

**摘 要** **目的** 在人乳腺癌组织中验证 mTOR 与 Notch 通路的相关性。**方法** 收集 33 例人乳腺癌组织样本通过 Western blot 检测 mTOR 下游信号 pS6 与 Notch 下游因子 Hes1 表达水平;57 例人乳腺癌组织样本进行免疫组化染色,5 例乳腺腺瘤及腺病标本作为对照,检测 mTOR 下游信号蛋白 pS6 与 Notch 的表达水平。将 Western blot 结果和免疫组化染色结果定量后采用 Stata 9.2 软件统计分析二者的相关性。**结果** 在所有的有效样本中(Western blot 30 例,免疫组化 57 例),mTOR 与 Notch 的表达水平正相关。**结论** 乳腺癌中 mTOR 和 Notch 通路共同活化,两条通路可能存在相关性。

**关键词** 乳腺癌 mTOR Notch

**Correlative Activation of mTOR and Notch Pathways in Human Breast Cancer.** Shi Yuzhuo, Zhang Shu, Sun Qiang, Chen Xinxin. Department of Physiology, Institute of Basic Medical Sciences CAMS, School of Basic Medicine PUMC, Beijing 100005, China

**Abstract Objective** To examine the correlation of mTOR and Notch in human breast cancer tissues. **Methods** Western blot of pS6, the direct target of mTOR and HES1, the canonical target of Notch was done on 33 human breast cancer tissues. Immunohistochemistry (IHC) staining of pS6 and Notch1 was done on 57 human breast cancer tissues. The results were then quantified and statistically analyzed to reveal the correlation of mTOR and NOTCH activation by Stata 9.2. **Results** mTOR and Notch had significant relevance in the breast cancer samples examined (30 samples using Western blot and 57 samples using IHC). **Conclusion** The coactivation of mTOR and Notch signaling pathways suggests the correlation of the two pathways in breast cancer.

**Key words** Breast cancer; mTOR; Notch

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,在我国的发生率正在以高于世界平均水平 1% ~ 2% 的速度增长,在部分城市乳腺癌已占女性恶性肿瘤之首位。虽然已知乳腺癌与遗传、激素影响、生活方式等因素有关,但具体发病机制尚不清楚。

膜受体酪氨酸激酶(RTK) - PI<sub>3</sub>K - AKT - mTOR 通路可以调节细胞增殖、代谢、死亡等功能,这一通路上任何原癌基因的活化或抑癌基因的失活均会导致 mTOR 异常活化,从而促进肿瘤的发生发展<sup>[1, 2]</sup>。Notch 通路则是调控细胞分化的重要通路,它的上调可抑制细胞分化<sup>[3, 4]</sup>。大量研究证明在乳腺癌中这两条通路常存在异常活化<sup>[5]</sup>。研究表明,mTOR 通过上调 Notch 信号通路使细胞由分化转向增殖从而促进肿瘤发生,这一现象在多种细胞系包括人乳腺癌细胞系中

得到验证<sup>[6, 7]</sup>,但在肿瘤组织中较少关于此通路的验证。本文旨在于大量的人乳腺癌组织中通过 Western blot 和免疫组织化学的方法验证该通路的存在。

## 材料与方法

1. 材料:(1)人乳腺癌组织来源:用于 Western blot 的组织共 33 例乳腺癌组织标本,取自北京协和医院 2008 年 12 月 ~ 2009 年 3 月间收治的乳腺癌病例。患者均为女性,年龄 31 ~ 72 岁,中位年龄 51.6 岁。标本均为浸润性导管癌。用于免疫组织化学的组织共 57 例乳腺癌标本,来源于北京协和医院病理科 2008 年 1 ~ 12 月的外科手术标本。患者均为女性,平均年龄 52.8(29 ~ 82)岁。57 例均为浸润性导管癌。同时选取 5 例乳腺腺瘤及腺病标本作为对照。(2)抗体:pS6 (Ser235/236)和 S6 抗体由多肽(CAKRRRLpSpSLRA 和 CNGYD TSAQ EDTM - NH<sub>2</sub>)注射兔子,得到免疫血清,经纯化获得。 $\beta$  - actin 单克隆抗体(Santa Cruz 公司),Hes1 抗体(CHEMICON 公司),Notch1 抗体(Sigma 公司),用于 Western blot 的二抗(Santa Cruz 公司),用于免疫组化染色的二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

2. 方法:(1)Western blot:将乳腺癌组织标本从 - 80℃ 超低温冰柜中取出,切取称量 10mg 置入 EP 管中,加入裂解液 800 $\mu$ l 进行超声,每次 5s,间隔 6s,重复 20 次,10000r/min 离心 15s 后 98℃ 加热 10min 变性。低温离心机 4℃ 下 15000r/min 离心 15min,吸取上清,得到总蛋白裂解液。常规 SDS - PAGE

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81101516)

作者单位:100005 中国医学科学院/北京协和医学院基础医学研究所生理系(石玉镯、陈欣欣);中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院皮肤科(张舒);中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院乳腺外科(孙强)

通讯作者:陈欣欣,电子信箱:chenxinx@hotmail.com;孙强,电子信箱:sunq@medmail.com.cn

胶电泳操作。Western blot 结果经 AlphaEase FC 凝胶图像分析软件进行灰度分析,计算整合密度值(代表面积与平均密度值的乘积)。(2)免疫组化染色:组织蜡块由北京协和医院病理科免疫组化室切片并制片,分别行 HE、pS6、Notch1 抗体免疫组化染色。所有染色切片由高年资病理科医师阅片。pS6 基因表达产物定位于细胞质,Notch1 基因表达产物定位于细胞核及细胞质,以出现棕黄色颗粒作为阳性细胞。对阳性细胞计数,以阳性细胞百分比计,由此得到免疫组化定量结果。

3. 统计学方法:Western blot 整合密度值及免疫组化染色定量结果的回归分析均应用 Stata 9.2 软件。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。其中免疫组化定量结果回归分析中,以每张切片中 pS6 及对应 Notch1 阳性细胞百分比得分作为变量。

**结 果**

1. Western blot 确定乳腺癌肿瘤组织中 mTOR 与

Notch 的表达水平呈正相关;mTOR 活化可磷酸化下游的 S6K,因此 S6K 的底物 S6 磷酸化水平可作为 mTOR 信号通路活化的指示蛋白。Hes1 是 Notch 下游靶点,Notch 信号活化时其表达量升高,因此经常被作为 Notch 信号活化的指示蛋白。

应用 Western blot 检测 33 例乳腺癌组织中 pS6 与 Hes1 表达水平,筛选后得到其中 30 例的结果(图 1)。

因乳腺癌组织较为硬韧,超声波无法使其破碎完全,导致内参  $\beta$ -actin 蛋白量不完全一致。使用 AlphaEase FC 凝胶图像分析软件对 Western blot 结果进行灰度分析,计算整合密度值。结果见图 2 和表 1。

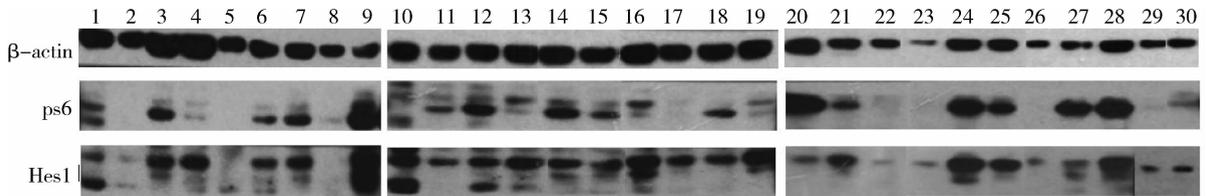


图 1 Western blot 验证乳腺癌组织中存在 pS6 及 Hes1 的共同活化

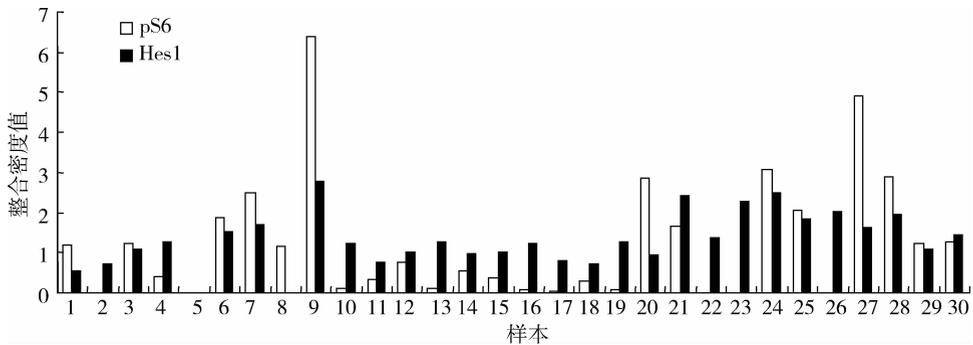


图 2 pS6 与 Hes1 在 Western blot 中的整合密度值

表 1 pS6 与 Hes1 在 Western blot 中的整合密度值

	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A10	A11	A12
pS6	119886.3	0	122991.7	40071.71	0	186872.6	248054	117080.4	639682.9	9656.401
Hes1	55410.94	71203.29	108933.4	127460.5	0	150538.9	168520.1	0	276692.8	122024.3
	A13	A14	A15	A17	A18	A20	A21	A22	A23	A24
pS6	33188.05	77274.9	9688.197	55824.32	36560.19	8740.785	2488.746	28324.32	6284.835	285685.2
Hes1	74673.61	100752.9	125989.5	97761.45	99709.46	121814.7	78556.57	70672.63	126636.5	92753.24
	A25	A26	A28	A29	A31	A33	A34	A35	A37	A38
pS6	164818	0	0	305219.9	205432.4	0	491868.3	287870.8	123797.1	125875.2
Hes1	241278.5	136617.6	229064.2	247932.6	182254.5	200364	163016.6	196293	109243.2	145321.3

应用统计学软件 Stata 9.2 进行回归分析,结果显示 pS6 与 Hes1 的表达水平正相关( $r = 1.252, P <$

$0.01$ )。说明 mTOR 通路与 Notch 通路在人乳腺癌组织中呈正相关(图 3)。

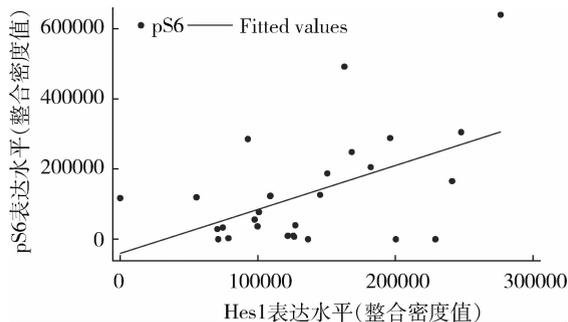


图3 pS6与Hes1在Western blot中表达水平的回归分析

2. 免疫组织化学染色确定乳腺癌组织中 pS6 与 Notch 的表达水平正相关:应用免疫组织化学染色检测 57 例乳腺癌组织及 5 例乳腺良性疾病[乳腺纤维腺瘤和(或)乳腺腺病]中 pS6 与 Notch 受体 Notch1 表达水平。结果显示,恶性组中 pS6 阳性率 83.6%, Notch1 阳性率 93.0%;良性对照组中 pS6 阳性率 100%, Notch1 阳性率 40% (阳性切片表达均 < 5%) (图 4)。

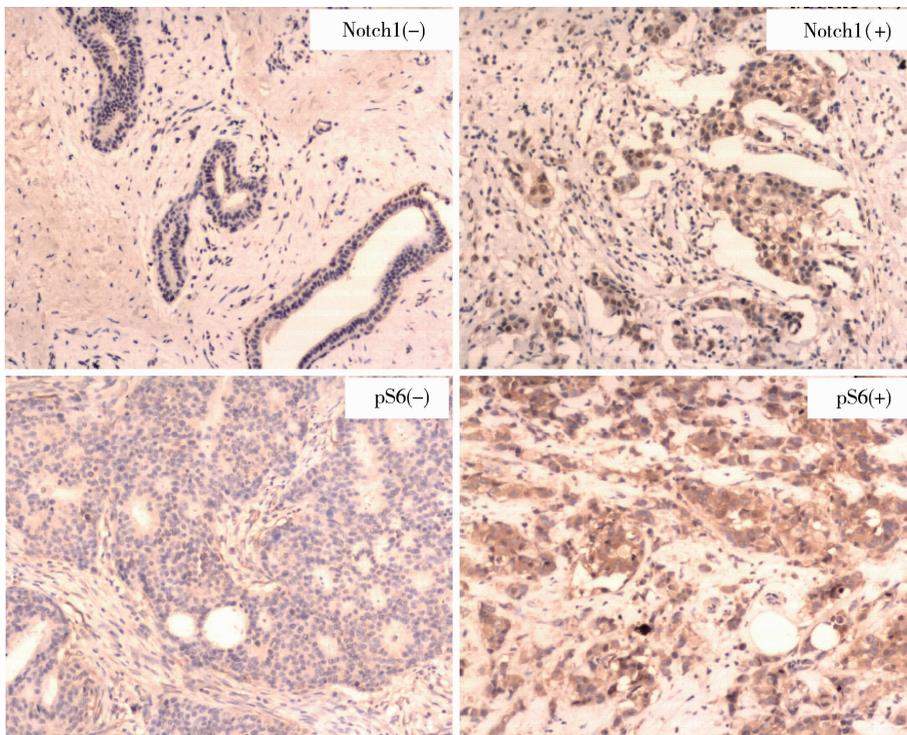


图4 乳腺癌病理切片 pS6 与 Notch1 染色结果(免疫组化染色, ×20)

对染色结果进行计分,应用统计学软件 Stata 9.2 进行回归分析,结果显示 pS6 与 Notch1 的表达水平正相关( $r=0.403, P<0.01$ )。进一步验证了 mTOR 通路与 Notch 通路在人乳腺癌组织中呈正相关(图 5)。

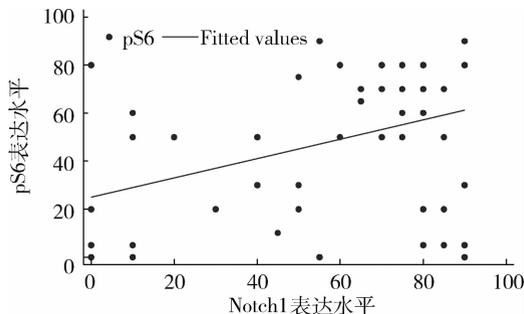


图5 应用免疫组化染色检测 pS6 与 Notch1 表达水平的回归分析

### 讨 论

应用 Western blot 及免疫组化染色,我们证明了在乳腺癌组织中 mTOR 与 Notch 表达呈正相关。

在恶性肿瘤中, RTK/PI<sub>3</sub>K/AKT/mTOR 通路及 Notch 通路经常出现异常调节。PI<sub>3</sub>K - mTOR 通路调节细胞的增殖、分化、存活和迁移等功能,而 Notch 通路则被证明与细胞的分化功能密切相关<sup>[8]</sup>。有很多研究报道了乳腺癌中存在 Notch 的异常表达,一些研究表明在细胞水平 PI<sub>3</sub>K - mTOR 通路控制 Notch 通路的活性,但在组织水平上,对于 mTOR 与 Notch 的相关性研究较为缺乏,对于它们在乳腺癌中的相互作用关系及具体机制尚不清楚<sup>[7]</sup>。

Parr 等<sup>[9]</sup>的研究发现相对于癌旁正常乳腺组织,乳腺癌中 Notch1 存在异常高表达,且在分化较差的

肿瘤中表达相对较高,我们的免疫组化染色结果中,恶性肿瘤组 Notch1 阳性率 93%,良性对照组 5 例中 3 例 Notch1 表达为阴性,另 2 例表达阳性率均 <5%,与文献报道相符。

本实验验证了乳腺癌组织中 mTOR 与 Notch 通路存在相关性,符合肿瘤中存在 mTOR - Notch 通路的假设,但仅能说明两者同时活化,并不能证明其共同活化是由于一种蛋白作为上游活化了另一蛋白,亦或两种蛋白具有共同的活化因素。笔者认为,组织中存在更为复杂的信号通路网络和更多的影响因素,对于组织中 mTOR - Notch 通路的存在与具体组成还需进一步的实验验证。

由于 Notch 与肿瘤发生发展的关系十分复杂,应用 Notch 抑制剂治疗肿瘤仍然十分具有争议。笔者的结果提示在 mTOR 与 pS6 共同活化的肿瘤当中,如果两者之间为上游与下游的关系,则可以通过抑制 Notch 通路来对 pS6 活化的乳腺癌进行靶向治疗,反之,在 Notch 通路活化的肿瘤当中,亦可使用 mTOR 抑制剂进行治疗,从而扩大了 mTOR 活化亚型的乳腺癌中靶向治疗药物的选择范围。如果两者作用关系为共同活化因子作用下的并列关系,则可考虑应用联合靶向治疗,这对未来乳腺癌靶向治疗新方案及肿瘤个体化治疗具有很好的指导意义。由于尚有研究表明 Notch 通路可以正调节 mTOR,我们认为 mTOR 与 Notch 以非常复杂的方式相互作用。但两者的关系在肿瘤的发生发展、生理病理作用上可能具有更多的方

式和更为重要的影响。

参考文献

- 1 Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream[J]. Cell, 2007, 129(7): 1261 - 1274
- 2 Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(9): 729 - 734
- 3 Ehebauer M, Hayward P, Arias AM. Notch, a universal arbiter of cell fate decisions[J]. Science. 2006, 314(5804): 1414 - 1415
- 4 Chen VC, Stull R, Joo D, et al. Notch signaling respecifies the hemangioblast to a cardiac fate [J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(10): 1169 - 1178
- 5 Robertson GP. Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma [J]. Cancer Metastasis Rev, 2005, 24(2): 273 - 285
- 6 Ma J, Meng Y, Kwiatkowski DJ, et al. Mammalian target of rapamycin regulates murine and human cell differentiation through STAT3/p63/Jagged/Notch cascade[J]. J Clin Invest, 2010, 120(1): 103 - 114
- 7 McKenzie G, Ward G, Stallwood Y, et al. Cellular Notch responsiveness is defined by phosphoinositide 3 - kinase - dependent signals [J]. BMC Cell Biol, 2006, 7: 10
- 8 Artavanis - Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development [J]. Science, 1999, 284(5415): 770 - 776
- 9 Parr C, Watkins G, Jiang WG. The possible correlation of Notch - 1 and Notch - 2 with clinical outcome and tumour clinicopathological parameters in human breast cancer [J]. Int J Mol Med, 2004, 14(5): 779 - 786

(收稿日期:2013 - 05 - 06)

(修回日期:2013 - 05 - 17)

## RYP慢病毒表达载体的构建及对结肠癌细胞 HCT116 增殖的影响

马雯 陈虹 黄秉仁 陈等

**摘要** 目的 构建 RYP慢病毒表达载体 pWPI - RYP,包装慢病毒颗粒并感染结肠癌细胞 HCT116,分析 RYP 的表达及对 HCT116 细胞增殖的影响。**方法** 用 DNA 克隆技术在慢病毒表达载体 pWPI - IRES - EGFP 序列中引入 Flag 标签及多个单酶切位点序列,改造后的载体命名为 pWPI - linker。采用反转录 - 多聚酶链反应 (RT - PCR) 从肝癌 SK - Hep - 1 细胞总 RNA 中扩增 RYP 的全长开放阅读框序列,克隆入 pWPI - linker 载体中,得到 pWPI - RYP。利用人胚肾细胞 HEK293T 包装重组慢病毒颗粒,分析该慢病毒颗粒感染 HCT116 细胞的效率、RYP 蛋白的表达,用 MTS 方法分析 RYP 过表达对 HCT116 细胞增殖的

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81272229)

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所、北京协和医学院基础学院生物化学与分子生物学系、医学分子生物学国家重点实验室

通讯作者:陈等,电子邮箱:chendeng2001@hotmail.com