胃癌组织中 Notch1、Jagged1、Hes1 的表达及临床意义

王春斐[1]，桂忠娜[2]，田　强[1]，曲红梅[1]，宗　蕾[1]，李登欣[1]
（1.潍坊市人民医院，山东 潍坊 261053；2.宁津县人民医院，山东 宁津 253400）

摘　要：[目的] 探讨胃癌组织及其相应癌旁组织中 Notch1 及其配体 Jagged1、下游信号 Hes1 的表达情况，并分析其临床意义。[方法] 采用实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）检测胃癌组织及其相应的癌旁组织（距癌组织>5cm）中 Notch1、Jagged1、Hes1 mRNA 的表达，免疫组织化学染色法检测 Notch1、Jagged1、Hes1 蛋白的表达，并分析三种蛋白的表达与胃癌临床病理特征的关系。[结果] 免疫组织化学染色、qRT-PCR 结果均显示 Notch1、Jagged1 在癌旁组织中的表达高于胃癌组织（$P<0.05$），Hes1 在癌旁组织中的表达低于胃癌组织（$P<0.05$）。Notch1、Jagged1、Hes1 的表达与肿瘤脉管浸润、分化程度、浸润深度相关（$P<0.05$），而与年龄、性别、TNM 分期、淋巴结转移无关（$P>0.05$）。胃癌组织中 Notch1 与 Jagged1 的表达呈正相关（$r=0.032$，$P<0.05$），而 Jagged1 与 Hes1 的表达呈负相关（$r=-0.862$，$P<0.001$）。[结论] Notch 信号通路中 Notch1 受体及其配体 Jagged1 在胃癌组织中低表达，Hes1 在胃癌组织中高表达，提示 Notch1、Jagged1、Hes1 的表达有望为胃癌诊断提供理论依据。

主题词：胃肿瘤；Notch；Jagged1；Hes1；免疫组化；实时荧光定量 PCR
中图分类号：R735.2　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1671-170X(2018)02-0091-06
doi：10.11735/j.issn.1671-170X.2018.02.B003

Expression of Notch1, Jagged1 and Hes1 in Gastric Carcinoma Tissues and Their Clinicopathological Significance

WANG Chun-fei[1], GUI Zhong-na[2], TIAN Qiang[1], et al.
(1. *Weifang People's Hospital*, *Weifang* 261053, *China*; 2. *Ningjin People's Hospital*, *Ningjin* 253400, *China*)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of Notch1, Jagged1 and Hes1 in gastric carcinoma tissues and their clinicopathological significance. [Methods] The expression of Notchl, Jagged1 and Hes1 was detected in 26 cases of gastric carcinoma and 20 cases of adjacent normal gastric tissues by qRT-PCR and immunohistochemistry PV-9000. The relationship between their expressions and clinicopathologic parameters of gastric cancer was analyzed. [Results] The expression of Notch1 and Jagged1 in gastric cancer was lower than that in adjacent normal gastric tissue, The expression of Hes1 in gastric cancer was higher than that in adjacent normal gastric tissue(all $P<0.05$). The expression of Notch1, Jagged1 and Hes1 was closely related with the lymphoid vascular invasion, differentiation, depth of tumor invasion of gastric cancer ($P<0.05$). There was a positive correlation between the expression levels of Notch1 and Jagged1 protein in gastric cancer($r=0.032$, $P<0.05$).And there was a negative correlation between expression levels of Jagged1 and Hes1 protein in gastric cancer ($r=-0.862$, $P<0.001$). [Conclusion] Notch1, Jagged1 are lowly expressed and Hes1 is over expressed in gastric carcinoma, which suggests that those proteins may be of reference value in early diagnosis of gastric carcinoma.

Subject words: gastric carcinoma; Notch1; Jagged1; Hes1; immunohistochemistry; qRT-PCR

胃癌是全球常见的消化道恶性肿瘤之一。目前，我国每年新发胃癌病例数达 40 万例，占世界总发病例数 42%。在胃癌的发生、发展中，Notch 通路起重要作用，Notch 通路在胃癌中的表达已成为未来研究方向，Notch 信号通路对正常发育调控的作用主要体现在可以调节细胞增殖、分化和凋亡等方面，多

基金项目：山东省医药卫生科技发展计划项目(2014WS0263)
通讯作者：李登欣，科副主任，主任医师，硕士；潍坊市人民医院消化内科，山东省潍坊市奎文区广文街 151 号(261053)；E-mail：lidengxin0515@sina.com
收稿日期：2017-02-27；**修回日期**：2017-07-09

个研究团队的研究显示 Notch 通路正常与否与肿瘤的发生、发展关系密切,具有促癌或抑癌作用。促癌作用的本质是细胞过度增殖,是由于 NF-κB(核转录因子)的上调导致的;抑癌作用的本质是加速细胞凋亡,这一作用是通过上调 p21 的表达,将细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期,从而使癌基因 *Bcl-2* 的表达降低。但目前学者们对 Notch 通路在胃癌发生发展过程中的作用是促癌还是抑癌,仍有很大争议。本研究试图从分子和蛋白水平探讨 Notch 通路在胃癌中的作用。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集 2015 年 4~6 月潍坊市人民医院普外科、肿瘤外科、急诊普外科手术切除并经术后病理证实的人胃癌组织 26 例及相对应的癌旁组织 (距肿瘤 5cm 以上)20 例,所有病例术前均未行放疗、化疗治疗,所有患者年龄在 41~75 岁,平均年龄 60.54 岁;其中,男性 16 例,女性 10 例;年龄 60 岁以上 14 例,60 岁(包括 60 岁)以下 12 例;细胞浸润深度未及浆膜层者共 12 例,侵及浆膜层者共 14 例;高分化、中分化腺癌共 14 例,低分化腺癌共 12 例;临床 TNM 分期:Ⅰ、Ⅱ期共 8 例,Ⅲ、Ⅳ期共 18 例;有淋巴结转移 18 例,无淋巴结转移 8 例;有脉管浸润 18 例,无脉管浸润 8 例。肿瘤和正常组织离体后取部分组织置于冻存管中经液氮速冻后转移至-80℃保存,用于 RNA 提取,余组织经甲醛固定、石蜡包埋后行免疫组织化学切片、染色。

1.2 试 剂

RNA 提取试剂盒、cDNA 合成试剂盒、qRT-PCR 试剂盒均购自 TaKaRa 公司,Notch1、Jagged1 引物序列由上海生工公司设计、合成。兔抗人 Notch1 多克隆抗体、兔抗人 Jagged1 多克隆抗体、SP9000 三步法免疫组化检测试剂,其中一抗均于北京博奥森生物科技有限公司购买,免疫组化 SP9000 试剂盒于北京中杉金桥生物科技有限公司购买。

1.3 方 法

1.3.1 实时荧光定量 PCR

每份标本为 100mg 的组织,根据 RNA 提取试剂盒的标准操作步骤进行,提取 total RNA,3%琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度计用来测定 RNA 浓度和纯度。A260/A280 值控制在 1.7~2.1 符合要求。反转录后以 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR。反应体系为 25μl。SYBR Premix 12.5μl,上下游引物(0.2μM)各 0.5μl,cDNA 模板 2.0μl,dH_2O 9.5μl。反应条件:预变性 95℃,2min;PCR 反应,95℃,15s,60℃,30s,45 个循环;溶解曲线分析:95℃ 15s,冷却至 60℃。*Notch1* 基因引物序列:上游 5′-GAATGGCGGGAAGTGTGAAG-3′,下游 5′-GTTGGTGAGGCAGGCATTGT-3′,扩增产物 232bp;*Jagged1* 基因引物序列:上游 5′-TCCTGCTCGCCCTGCTCTGTGCCCT-3′,下游 5′-TGAGGTTGAAGGTGTTGCCC-3′,扩增产物 177bp;*Hes1* 基因引物序列:上游 5′-GGATAAACCAAAGACAGCAT-3′,下游 5′-AATGTCCGCCTTCTCCAGCT-3′,扩增产物 189bp;内参基因引物 GAPDH:上游 5′-ATGGGGAAGGTGAAGGTCGGAG-3′,下游 5′-GATGACAAGCTTCCCGTTCTCA-3′,扩增产物 196bp。采用 2ΔΔCt 分析。

1.3.2 免疫组化方法及结果判断

采用 HE 染色技术和免疫组化染色技术进行染色处理,实验步骤严格按照 SP-9000 试剂盒所示进行。阳性对照组为已知的标准的 Notch1、Jagged1 阳性表达的正常胃组织标本,阴性组为 PBS。

根据阳性细胞染色程度及深度以及阳性细胞率作为结果判断的标准。细胞阳性染色程度分为无色、淡棕黄色、棕黄色、棕褐色,计分分别为 0、1、2、3 分。随机计数 5 个高倍镜中阳性细胞的百分比,阳性细胞率<5%,5%~25%,25%~50%,>50%,计分分别为 0、1、2、3 分。将阳性率和染色强度评分之积作为判定结果,总分≥3 分为阳性表达,<3 分为阴性表达[1]。

1.4 统计学处理

数据采用 SPSS17.0 统计学软件处理。正态分布计量资料均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验;计数资料均以例数(n)表示,组间比较采用 Fisher 精确概率法;相关性分析采用 Spearman 等级相关分析及 Pearson 相关分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Notch1、Jagged1、Hes1mRNA 的表达

扩增曲线为典型 S 峰,基线平整,熔解曲线为单

一峰(Figure 1~4)。Notch1 mRNA 在癌旁组织中的表达(10.59±0.73)高于胃癌组织(1.39 ±0.64)(P <0.001),Jagged1 mRNA 在癌旁组织中的表达(4.76±1.92)高于胃癌组织(1.02±0.09)(P<0.001),HES1 mRNA 在癌旁组织的表达(0.11±0.02)低于胃癌组织(1.12±0.11)(P<0.001),差异均有统计学意义。

2.2 Notch1、Jagged1、Hes1 蛋白的表达

Notch1 在胃癌组织和癌旁组织中的阳性表达率分别为 38.5%和 75.0%,差异有统计学意义(P<0.05);Jagged1 在胃癌组织和癌旁组织中的阳性表达率分别为 34.6%和 80.0%,差异有统计学意义(P<0.05),Hes1 在胃癌组织和癌旁组织中的阳性表达率分别为 57.7%和 20.0%,差异有统计学意义(P<0.05)。见 Table 1,Figure 5~8。

Spearman 相关性分析显示,Notch1 和 Jagged1 在胃癌组织中的表达呈正相关(r=0.032,P<0.05)(Table 2),Pearson 相关分析显示 Jagged1 和 Hes1 在胃癌组织中的表达呈负相关(r=-0.862,P<0.001)(Figure 9)。

2.3 Notch1、Jagged1、Hes1 在胃癌组织中表达与临床病理特征的关系

Notch1 和 Jaggd1、Hes1 在胃癌组织中的阳性表达与患者的性别、年龄、TNM 分期、淋巴结转移均无明显相关性(P 均>0.05),与肿瘤分化程度、浸润深度、有无脉管浸润相关(P 均<0.05)。高、中分化癌组织 Notch1、Jagged1 的阳性表达率高于低分化癌组织,而 Hes1 的阳性表达低于低分化癌组织;未侵及浆膜者癌组织 Notch1、Jagged1 的阳性表达率高于侵及浆膜者癌组织,而 Hes1 的阳性表达低于侵及浆膜者癌组织;无脉管浸润者癌组织 Notch1、Jagged1 的阳性表达率高于脉管浸润者癌组织,而 Hes1 的阳性表达低于有脉管浸润癌组织。见 Table 3。

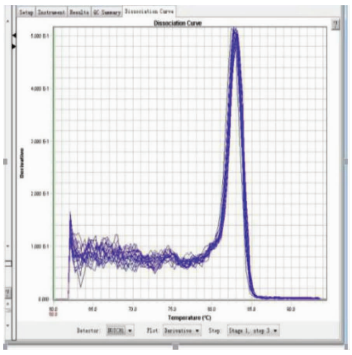

Figure 1 Dissociation curve of Notch1

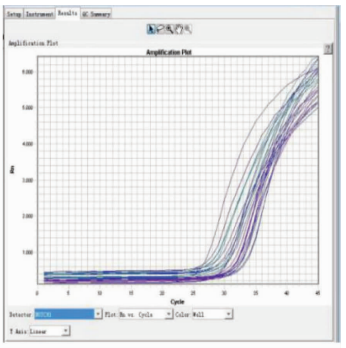

Figure 2 Amplification curve of Notch1

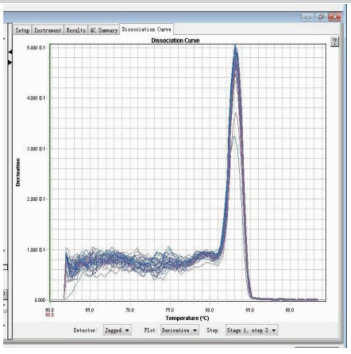

Figure 3 Dissociation curve of Jagged1

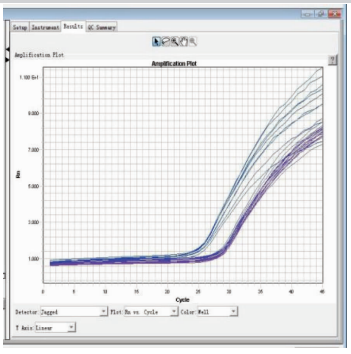

Figure 4 Amplification curve of Jagged1

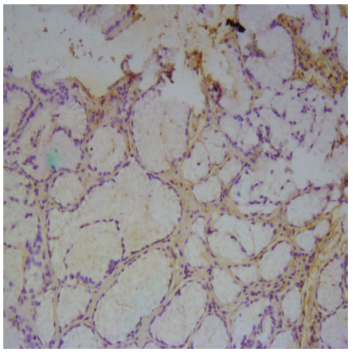

Figure 5 Negative expression of Notch1 in gastric cancer(SP×400)

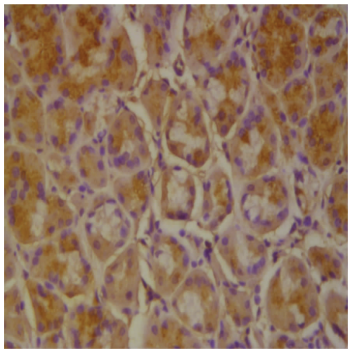

Figure 6 Positive expression of Notch1 in gastric cancer(SP×400)

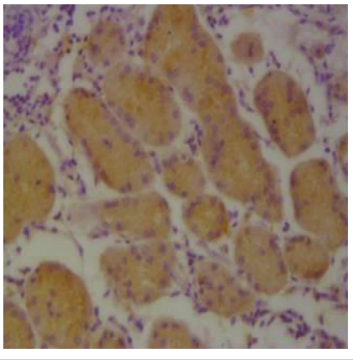

Figure 7 Negative expression of Jagged1 in gastric cancer(SP×400)

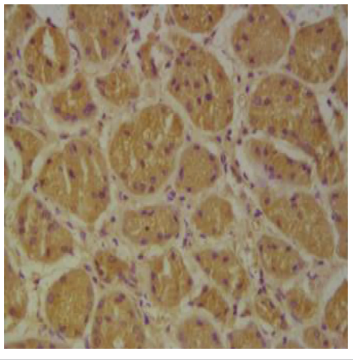

Figure 8 Positive expression of Jagged1 in gastric cancer(SP×400)

Table 1 The expression of Notch1, Jagged1 and Hes1 in gastric carcinoma and paracancerous tissues

Group	n	Notch1			Jagged1			Hes1		
		Positive(%)	χ^2	*P*	Positive(%)	χ^2	*P*	Positive(%)	χ^2	*P*
Gastric cancer tissue	26	10(38.5)	6.083	0.014	9(34.6)	7.645	0.006	15(57.7)	5.161	0.023
Peficancerous tissues	20	15(75.0)			16(80.0)			4(20.0)		

Table 2 Correlation between the expression of Notch1 and Jagged1 in gastric carcinoma

Notch1	Jagged1		Total	*r*	*P*
	Positive	Negative			
Positive	6	4	10	0.032	0.046
Negative	3	13	16		
Total	9	17	26		

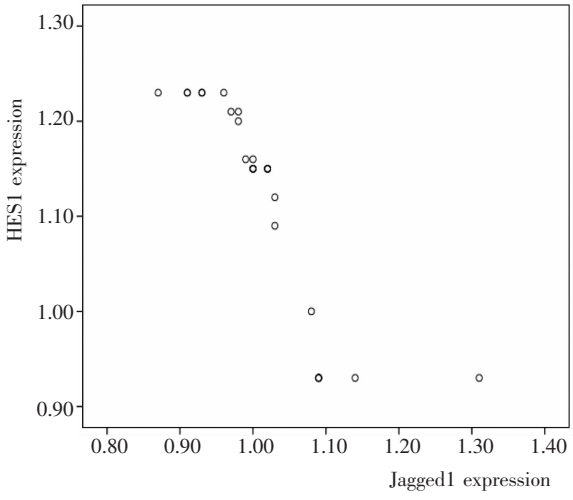

Figure 9 The relationship between Notch1 and Jagged1 expression in gastric cancer

3 讨 论

Notch 信号通路是一种信号转导通路，近几年研究较多，在进化过程中保守度较高，作用相当广泛，从胚胎发育、组织分化、干细胞干性维持到细胞增殖及凋亡[2]。在哺乳动物体内，发现 4 种 Notch 受体（Notch1~4）和 5 种 Notch 配体（Delta1、Delta3、Delta4、Jagged1 和 Jagged2）[3]。Notch 受体属于跨膜受体，其分子构成相对简单，主要由两部分组成，胞外域和跨膜区/胞内域。Notch 胞外区负责激活，前提是与其配体结合后，还要通过调节细胞间相互作用而发挥功能，3 次裂解之后产生的 NICDN，就是 Notch 的活化形式[4]。Notch1 与肿瘤的关系早在 1991 年就被发现，当时的研究是关于人 T 淋巴细胞白血病。后来，经过学者的深入研究得知，染色体易位 t(7;9)(q34;q3403)使 9 号染色体上的 *Notch1* 基因发生断裂，使 Notch1 胞外区脱落，这一变化使得使胞内区获得活性，因此产生致癌效应[5]。Jagged1 属于 Notch 受体的配体，Notch1 受体与 agged1 相互作用，可以对组织生长起到调控作用，作用机理是配体与受体胞外域结合，通过 Hes1、Deltax 和 NF-κB 等转录因子的共同参与，从而对靶基因的转录进行调节[6]。*Hes1* 基因可以通过 Notch1-Delta-Hes1 通路参与肿瘤的发生、发展，*Hes1* 作为 Notch1 蛋白的下游靶基因，将 Notch 信号向下游传递，并可使多种不成熟的细胞维持在未分化状态，维持未分化细胞数量上的稳定，并使干细胞处于增殖状态[7]。

本研究采用免疫组化和实时荧光定量 PCR 两种实验方法，结果发现，Notch1、Jagged1 在胃癌组织的阳性表达率明显低于其癌旁组织，进一步分析两者的相关性，Notch1 与 Jagged1 在胃癌中的表达呈正相关，并且 Notch1、Jagged1 mRNA 与其蛋白在表达强度上一致。Hes1 在癌旁组织低表达，在胃癌组织中高表达，提示 Hes1 的高表达对细胞分化的调控作用减弱，而对细胞增殖的促进作用增强。Hes1 在胃癌组织中表达上调，在胃癌癌旁组织中表达下调，而 Jagged1 在胃癌组织中表达下调，在胃癌癌旁组织中表达上调，进一步分析两者的相关性发现两者呈负相关。根据我们的研究，得知 Notch1、Jagged1 通过协同作用对胃癌的发生起负性调控作用，而 Hes1 起促癌作用。这与默娟等[8]的研究一致，勾朝阳等[9]也得出类似的结论，同时，也有研究表明，Notch1、Jagged1 在胃癌发生发展过程中主要起促进作用[10,11]。从临床病理学角度分析，Notch1、Jagged1 和 Hes1 的表达与临床病理学因素如分化程度、有无脉管浸润和浸润深度均明显相关，Notch1、Jagged1 在高分化、无脉管浸润、未侵及浆膜的胃癌组织中高表达，Hes1 在高分化、无脉管浸润、未侵及浆膜的胃癌组织中低表达，提示 Notch1、Jagged1、Hes1 的表达与胃癌患者预后相关。需要我们关注的是，由于 Notch 信号通路与肿瘤的关系错综复杂，大量研究表明，在不同组

Table 3 The relationship between the expression of Notch1,Jagged1 and Hes1 and clinicopathological features

Clinicopathological features	n	Notch1			Jagged1			HES1		
		Positive	Negative	*P*	Positive	Negative	*P*	Positive	Negative	*P*
Gender										
Male	16	5	11	0.425	4	12	0.234	11	5	0.228
Female	10	5	5		5	5		4	6	
Age(years)										
≤60	12	4	8	0.701	3	9	0.429	9	3	0.130
>60	14	6	8		6	8		6	8	
Invasion depth										
Not invastion serosal layer	12	8	4	0.014	11	1	0.014	10	2	0.021
Invastion serosal layer	14	2	12		6	8		5	9	
TNM										
Ⅰ~Ⅱ	8	5	3	0.189	4	4	0.382	3	5	0.218
Ⅲ~Ⅳ	18	5	13		5	13		12	6	
Lymph node metastasis										
Yes	18	3	15	1.000	5	13	0.382	11	7	0.683
No	8	7	1		4	4		4	4	
Metastasis vascular invasion										
Yes	18	4	14	0.026	3	15	0.008	13	5	0.038
No	8	6	2		6	2		2	6	
Differentiation										
High/middle differentiation	14	12	2	0.001	8	6	0.014	5	9	0.021
Poorly differentiation	12	2	10		1	11		10	2	

织,Notch 对细胞发生发展的作用有所不同,即使是在同一组织的肿瘤,因为发展阶段的不同,Notch 的作用也会发生变化。另有学者发现 Notch1 在早期宫颈癌的进展中主要起到促癌作用，在晚期宫颈癌则起相反的作用，即抑癌作用[12]。而本实验表明，Notch1 及 Jagged1 在胃癌发展中起抑制作用,而 Hes1 则起促进作用。并且,由于 Notch 信号通路的“共享性”及其配体、靶基因的多样性[13]，仅从 Notch1、Jagged1、Hes1 在胃癌中的表达情况判断 Notch 通路在胃癌组织的发生发展中起抑癌或促癌作用是远远不够的。因此,如果要研究 Notch 通路与胃癌的关系，应该深入而全面的研究 Notch 所有配体及受体在胃癌中的表达并了解其相互之间的作用。综上所述，可推测 Notch1、Jagged1、Hes1 通过 Notch 通路共同参与胃癌组织增殖、分化的调节,并与胃癌患者的预后相关。因此,Notch1、Jagged1、Hes1 的表达情况有望为胃癌诊断提供理论依据，从而为胃癌基因治疗提供参考指标。

参考文献:

[1] He LL,Zhang FH,Zhang JH,et al.Relationship between Notch,DLL4 and HES1 expression and clinicopathological characteristics and prognosis of gastric cancer[J].International Journal of Digestive Diseases,2015,(2):132-135.[何黎黎,张富花,张锦华,等.胃癌中 Notch、DLL4 和 HES1 的表达及其与临床病理学特征和预后的关系[J].国际消化病杂志,2015,(2):132-135.]

[2] Zhang YC,Li YJ,Shi J,et al.Notch signaling pathway and gastic cancer[J].World Chinese Journal of Digestology,2015,23(3):381-387.[张映城,李勇进,施俊,等.Notch 信号通路在胃癌中的研究进展[J].世界华人消化杂志,2015,23(3):381-387.]

[3] Artavanis-Tsakonas S. The molecular biology of the Notch locus and the fine tuning of di-fferentiation in drosophila [J].Trends Genet,1988,4(4):95-100.

[4] Yan B,Liu L,Zhao Y,et al. Xiaotan sanjie decoction attenuates tumor angiogenesis by manipulating Notch-1-regulated proliferation of gastric cancer stem-like cells[J]. World J Gastroenterol,2014,20(36):13105-13118.

[5] Matsumoto Y,Matsunobu T,Harimaya K,et al. Bone and soft tissue tumors presenting as sciatic notch dumbbell masses:A critical differential diagnosis of sciatica [J]. World J Clin Oncol,2016,7(5):414-419.

[6] Du X,Cheng Z,Wang YH,et al. Role of Notch signaling pathway in gastric cancer:A meta-analysis of the literature [J]. World J Gastroenterol,2014,20(27):9191-9199.

[7] Zhang K,Zhang YQ,Ai WB,et al.Hes1,an important gene for activation of hepatic stellate cells,is regulated by Notch1 and TGF-/BMP signaling[J]. W World J Gastroenterol,2015,21(3):878-887.

[8] Mo J,Li H.Influence of Notch1 signaling pathway on proliferation of gastric cancer [J].Shandong Medical Journal,2012,52(7):15-17. [默娟,李红.Notch1 信号通路对胃癌细胞增殖的影响[J].山东医药,2012,52(7):15-17.]

[9] Gou CY,Ha MW,Li H.Notch1 expression and its significance in human gastric cancer[J].Journal of China Medical University,2010,39(5):356-358. [勾朝阳,哈敏文,李红. Notch1 在人胃癌组织中的表达及意义[J].中国医科大学学报,2010,39(5):356-358.]

[10] Kang H,An HJ,Song JY,et al.Notch3 and Jagged2 contribute to gastric cancer development and to glandular differentiation associated with MUC2 and MUC5AC expression[J]. Histopathology,2012,61(4):576-586.

[11] Fu T,Li JH,Cai X. Progress in Notch signaling pathway in gastrointestinal tumors[J]. Journal of Chinese Oncology,2015,21(10):852-855. [傅涛,李佳欢,蔡逊. Notch 信号通路在胃肠道肿瘤机制研究中的新进展 [J]. 肿瘤学杂志,2015,21(10):852-855.]

[12] Shi YL,Jiang J. Research progress of Notch signaling pathway in cervical cancer [J]. Chinese Journal of Clinical Obstetrics and Gynecology,2016,17 (3):286-288.[石亚利,江静. Notch 信号通路在宫颈癌中的研究进展[J]. 中国妇产科临床杂志,2016,17(3):286-288.]

[13] Zhang Q,Song X. Progress in Notch signaling pathway in cancer stem cells[J]. China Cancer,2014,20(7):585-590. [张奇, 宋鑫. Notch 信号通路在肿瘤干细胞中的研究进展[J]. 中国肿瘤,2014,20(7):585-590.]

坚决贯彻执行《发表学术论文“五不准”》规定

为弘扬科学精神,加强科学道德和学风建设,抵制学术不端行为,端正学风,维护风清气正的良好学术生态环境,重申和明确科技人员在发表学术论文过程中的科学道德行为规范,中国科协、教育部、科技部、卫生计生委、中科院、工程院和自然科学基金委共同研究制定并联合下发了《发表学术论文“五不准”》的通知。

(1)不准由“第三方”代写论文。科技工作者应自己完成论文撰写,坚决抵制“第三方”提供论文代写服务。

(2)不准由“第三方”代投论文。科技工作者应学习、掌握学术期刊投稿程序,亲自完成提交论文、回应评审意见的全过程,坚决抵制“第三方”提供论文代投服务。

(3)不准由“第三方”对论文内容进行修改。论文作者委托“第三方”进行论文语言润色,应基于作者完成的论文原稿,且仅限于对语言表达方式的完善,坚决抵制以语言润色的名义修改论文的实质内容。

(4)不准提供虚假同行评议人信息。科技工作者在学术期刊发表论文如需推荐同行评议人,应确保所提供的评议人姓名、联系方式等信息真实可靠,坚决抵制同行评议环节的任何弄虚作假行为。

(5)不准违反论文署名规范。所有论文署名作者应事先审阅并同意署名发表论文,并对论文内容负有知情同意的责任; 论文起草人必须事先征求署名作者对论文全文的意见并征得其署名同意。论文署名的每一位作者都必须对论文有实质性学术贡献,坚决抵制无实质性学术贡献者在论文上署名。

希望广大科技工作者、读者和作者,以及本刊编委、审稿专家和有关工作人员都应加强学术道德自律,共同努力,捍卫学术尊严,维护良好学风。