

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.11.002

· 基础研究 ·

Thy-1 通过调控 Notch1 通路促进肝癌细胞 EMT 进程

邢强^a, 周文君^b, 李云山^a (兰州市第一人民医院 a. 肝胆外科; b. 普通外科, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] **目的:** 探索细胞表面抗原 Thy-1 通过调控 Notch1 通路促进肝癌 HepG2 和 MHCC-97 细胞上皮间质转化(EMT)。**方法:** 选用具有高转移特性的 MHCC-97 细胞和低转移特性的 HepG2 细胞作为研究对象, WB 检测细胞内 Thy-1、Notch1 蛋白表达水平。用重组慢病毒转染 MHCC-97 和 HepG2 细胞, 构建高表达与低表达 Thy-1 蛋白的细胞, 再分别用 Notch1 激动剂 rhNF- κ B (1 gsu/ml) 和 Notch1 抑制剂 MW167 (100 μ mol/L) 处理细胞 24 h。Transwell 实验检测 Thy-1 表达变化、rhNF- κ B 和 MW167 处理对细胞侵袭能力的影响, qPCR 检测对 Notch1 mRNA 表达的影响, WB 实验检测细胞内 EMT 相关蛋白表达的影响。**结果:** MHCC-97 细胞中 Thy-1、Notch1 蛋白表达量均高于 HepG2 细胞 ($P < 0.05$)。成功构建 Thy-1 过表达的 HepG2 细胞和 Thy-1 低表达的 MHCC-97 细胞。与亲本 HepG2 细胞相比, Thy-1 过表达 HepG2 细胞侵袭能力显著增强 [(475.78 $\pm$ 80.37) vs (183.23 $\pm$ 55.34) 个, $P < 0.05$]、波形蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)、上皮钙黏素蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)、Notch1 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与亲本 MHCC-97 细胞相比, Thy-1 沉默的 MHCC-97 细胞侵袭能力显著降低 [(237.44 $\pm$ 62.18) vs (543.56 $\pm$ 77.94) 个, $P < 0.05$]、波形蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)、上皮钙黏素蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)、Notch1 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。而 Notch1 激活剂或抑制剂处理上述肝癌细胞可逆转由于 Thy-1 沉默或过表达所造成的改变。**结论:** Thy-1 可通过调控 Notch1 表达影响肝癌 HepG2 和 MHCC-97 细胞的 EMT。

[关键词] 肝癌; HepG2 细胞; MHCC-97 细胞; Thy-1; 细胞表面抗原; Notch1 通路; 转移; 上皮间质转化

[中图分类号] R735.7; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)11-1189-07

Thy-1 promotes EMT process of liver cancer cells by regulating Notch1 pathway

BING Qiang^a, ZHOU Wenjun^b, LI Yunshan^a (a. Department of Hepatobiliary Surgery; b. Department of General Surgery, The First People's Hospital of Lanzhou City, Lanzhou 730000, Gansu, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the role of Thy-1 cell surface antigen (Thy-1) in promoting epithelial-mesenchymal transition (EMT) in liver cancer HepG2 and MHCC-97 cells by regulating Notch1 pathway. **Methods:** MHCC-97 cells with high metastatic characteristics and HepG2 cells with low metastatic characteristics were selected as subjects. WB was used to detect the expression levels of Thy-1 and Notch1 in cells. MHCC-97 and HepG2 cells were transfected with lentivirus to construct cells with high and low expression of Thy-1 protein. Cells were treated with Notch1 agonist rhNF- κ B (1 gsu/ml) and Notch1 inhibitor MW167 (100 μ mol/L) for 24 h respectively. Transwell assay was used to detect the effect of Thy-1 expression on cell invasion; qPCR was used to detect the effect on Notch1 mRNA expression; WB was used to detect the effect on intracellular EMT-related protein expression. **Results:** The expression levels of Thy-1 and Notch1 in MHCC-97 cells were higher than those in HepG2 cells ($P < 0.05$). Thy-1 overexpressing HepG2 cells and Thy-1 low expressing MHCC-97 cells were successfully constructed. Compared with HepG2 cells, the invasion ability of Thy-1 overexpressing HepG2 cells was significantly enhanced (183.23 $\pm$ 55.34 vs 475.78 $\pm$ 80.37, $P < 0.05$), vimentin expression was significantly increased ($P < 0.05$), epithelial cadherin protein expression was significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression level of Notch1 mRNA was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with MHCC-97 cells, the invasion ability of Thy-1 silenced MHCC-97 cells was significantly decreased (543.56 $\pm$ 77.94 vs 237.44 $\pm$ 62.18, $P < 0.05$), the expression of vimentin was significantly decreased ($P < 0.05$), epithelial cadherin protein expression was significantly increased ($P < 0.05$), and Notch1 mRNA expression level was significantly decreased ($P < 0.05$). Treatment of liver cancer cells with Notch1 activators or inhibitors can reverse the changes caused by Thy-1 silencing or overexpression. **Conclusion:** Thy-1 can affect the EMT process of HepG2 and MHCC-97 cells by regulating the expression of Notch1.

[基金项目] 兰州市科技局指导项目资助(No. 2018-ZD-13)。Project supported by the Guiding Project from Bureau of Science and Technology of Lanzhou City (No. 2018-ZD-13)

[作者简介] 邢强(1982-), 男, 本科, 主治医师, 主要从事肝癌发病机制的研究, E-mail: 672192389@qq.com

[通信作者] 李云山(LI Yunshan, corresponding author), 本科, 主任医师, 主要从事肝癌转移的基础和临床研究, E-mail: 460760155@qq.com

[Key words] liver cancer; HepG2 cells; MHCC-97 cells; Thy-1; cell surface antigen; Notch1 pathway; metastasis; epithelial-mesenchymal transition (EMT)

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(11): 1189-1195. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.11.002]

上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在促进癌症获得转移能力的过程中起重要作用^[1-2]。该过程中上皮钙黏素(E-cadherin)表达下调以及细胞骨架蛋白波形蛋白(Vimentin)等表达下调,进而改变细胞间连接与细胞形态,促进细胞转移^[3]。E-cadherin以及波形蛋白的表达变化与肝癌的分期、分化程度以及浸润转移具有密切关系^[4]。与EMT相关的因子包括TGF- β 、FGF、miRNAs、BMP-2等^[5-8],相关通路包括TGF- β /Smads通路、Wnt/ β -catenin通路、Notch1通路等^[7, 9-12]。其中Notch信号通路异常与肝癌的发生、发展、转移密切相关^[13]。细胞表面抗原Thy-1作为间质干细胞标志物,表达于细胞膜表面,在基质互作、神经再生、黏附转移、癌症、炎症以及纤维化中起重要作用^[14-15]。研究^[16-18]发现,Thy-1在骨髓来源的干细胞、成人或胎儿肝脏干细胞/祖细胞均有表达,但是在成熟的肝细胞中并未发现其表达。Thy-1是前列腺癌的肿瘤标志物^[19-20];在低分化肝癌中Thy-1出现表达^[21];Thy-1⁺肝癌细胞具有肿瘤干细胞特性,与Thy-1⁻细胞相比,具有强的致癌能力和转移能力^[22-23]。基因分析显示,肝癌细胞中Thy-1⁺的过表达与肝癌组织的炎症、耐药性、转移、脂质代谢密切相关^[24]。但Thy-1蛋白调控肝癌细胞转移的具体机制尚不明确。本研究将基于Notch1信号通路,探索Thy-1调控肝癌细胞转移的分子机制,为临床治疗肝癌转移提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

HepG2、MHCC-97细胞均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,均用含有10%胎牛血清的DMEM高糖培养液于37℃、5% CO₂的培养箱中培养,待细胞贴壁生长至80%~90%汇合时传代。

Notch1激动剂rhNF- κ B购自美国Promega公司,Notch1抑制剂MW167购自美国Calbiochem公司,兔SP9001免疫组化试剂、SDS-PAGE凝胶试剂盒、ECL发光液均购自碧云天生物科技有限公司,逆转录试剂盒、荧光定量试剂盒购自TaKaRa公司,Transwell小室购自Millipore公司,Matrigel胶购自BD公司,兔抗Notch1单克隆抗体、兔抗Thy-1单克隆抗体、兔抗E-cadherin单克隆抗体、兔抗Vimentin单克隆抗体均购自Abcam公司。实时荧光定量PCR仪购自Bio-rad公司。绿色荧光蛋白(GFP)标记的Thy-1过表达(GV365)与低表达(GV493)慢病毒载体由上海吉凯基因化学技术有限公司构建。

Notch1正向引物:5'-CCCAGCAGGTGCAGC-CACAG-3'、反向引物:5'-GGTGATCTGGGACG-GCATGG-3'; GAPDH正向引物:5'-AAGGCTGTGGGCAAGG-3'、反向引物:5'-TGGAGGAGTGGGTGTCG-3'。

1.2 高表达或低表达Thy-1蛋白细胞的构建

绿色荧光蛋白(GFP)标记的Thy-1过表达与低表达慢病毒载体由上海吉凯基因化学技术有限公司构建。将 1×10^4 个HepG2或MHCC97细胞悬浮于0.4 ml H-DMEM培养基中,加入0.1 ml GFP标记的Thy-1过表达或低表达慢病毒载体(2×10^7 IU/ml),在37℃下温育12 h。将转染后的细胞转移到25 cm²的培养瓶中,加入4 ml新鲜的完全培养基连续培养,转染72 h后在荧光显微镜下观察计数GFP阳性细胞以评估转导效率。通过WB实验进一步验证高表达或低表达Thy-1蛋白的细胞是否构建成功。以不做任何处理的培养细胞作为对照组。

1.3 实验分组

根据细胞转染物不同,分为Thy-1过表达组、Thy-1低表达组。后续实验中,Notch1激动剂rhNF- κ B以1 gsu/ml处理细胞24 h,Notch1抑制剂MW167以100 μ mol/L处理细胞24 h,取处理后细胞进行实验。

1.4 Transwell实验检测Thy-1表达对肝癌细胞侵袭能力的影响

取4℃放置30 min的24孔板和Transwell小室。将Transwell小室放入24孔板,用4℃无血清DMEM培养基稀释Matrigel基质胶(培养基:胶=8:1),取稀释好的基质胶50 μ l铺于Transwell小室微孔膜的上表面,轻轻震荡24孔板使胶均匀铺展开,放入培养箱1 h使胶凝固。同时取对数生长期的各组细胞,胰蛋白酶消化,用无血清DMEM培养基吹打成单细胞悬液,细胞密度为 4×10^5 个/ml,其中不加血清。取出24孔板,下室中加入600 μ l含有20%FBS的DMEM培养基,上室中加入400 μ l配制好的单细胞悬液,盖上盖子,放入37℃、5%CO₂培养箱培养24 h,取出小室,小心吸弃培养基,PBS漂洗,甲醇固定30 min后,用棉签轻轻拭去未穿膜的细胞,0.1%结晶紫染色2 min,PBS反复漂洗至未结合染料全部洗去,显微镜下观察并计数穿膜细胞,每个浓度选取不同视野拍照记录。

1.5 WB实验检测细胞中EMT相关蛋白的表达

取各组细胞,PBS洗涤后,组织中加入预冷RIPA裂解液研碎、细胞直接加入RIPA裂解液在冰上裂解,提取细胞总蛋白,测定蛋白浓度,加入4 $\times$ 上样缓冲液,煮沸

5 min, 充分变性, -20°C 保存备用。SDS-PAGE 制胶: 10% 分离胶+5% 浓缩胶, 按蛋白浓度确定上样量, 然后经过电泳、转膜、封闭、一抗孵育过夜(Notch1、Thy-1 抗体以 1:800 稀释, E-cadherin、Vimentin 抗体以 1:1 000 稀释), PBS 洗涤, 二抗室温孵育 1.5 h, PBS 洗涤, ECL 发光液显色, X 射线片显影, 拍照。

1.6 qPCR 实验

取细胞加入 TRIzol 于冰上充分研碎, 室温静置 5 min, $13\ 000\times g$ 离心 5 min, 吸取上清, 加入氯仿, 静置离心, 吸取上清加入异丙醇, 静置离心, 弃去上清, 75% 乙醇清洗沉淀, 离心弃上清, 保留沉淀干燥, 用 DEPC 水溶解。然后按照 TaKaRa 反应试剂盒依次经过去除基因组 DNA 反应、反转录反应和 PCR 进行扩增, 扩增程序为: 预变性: 95°C 、10 min、1 循环数; 扩增: 95°C 、15 s, 60°C 、15 s, 72°C 、30 s、40 个循环。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算基因相对表达量。

1.7 统计学处理

采用 SPSS21.0 统计软件进行分析, 所有实验独立重复 3 次。率的比较采用卡方检验, Pearson 相关系数衡量两组间相关性, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 均以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 MHCC-97 和 HepG2 肝癌细胞中 Thy-1 和 Notch1 表达的差异

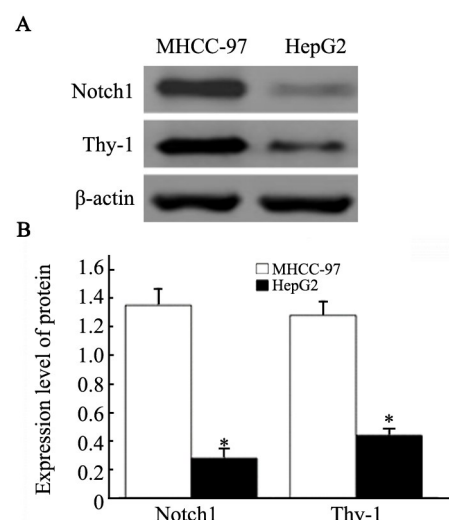
WB 检测结果(图1)显示, MHCC-97 细胞中 Thy-1、Notch1 蛋白表达量均高于 HepG2 细胞, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 成功构建 Thy-1 过/低表达的 HepG2/MHCC-97 细胞

Thy-1 过表达载体转染 HepG2 细胞、Thy-1 低表达载体转染 MHCC-97 细胞 72 h 后, 荧光显微镜下观察结果(图2)显示, 转染组细胞发出绿色荧光, 而对照组细胞几乎没有 GFP 表达, 说明转染效率较高。WB 实验检测结果(图3)显示, 与对照组相比, 转染组 HepG2 细胞内 Thy-1 表达升高、转染组 MHCC-97 细胞内 Thy-1 表达降低, 说明 Thy-1 过表达的 HepG2 细胞和 Thy-1 低表达的 MHCC-97 细胞构建成功。

2.3 Thy-1 影响 HepG2 和 MHCC-97 细胞的侵袭能力

Transwell 侵袭实验结果(图4)显示, 与无转染的对照组 MHCC-97 细胞相比, Thy-1 沉默后 MHCC-97 细胞侵袭数目显著降低, 差异具有统计学意义 [(237.44 ± 62.18) vs (543.56 ± 77.94) 个, $P<0.05$]; 与 HepG2 细胞相比, Thy-1 过表达的 HepG2 细胞侵袭数目明显增多, 差异具有统计学意义 [(475.78 ± 80.37) vs (183.23 ± 55.34) 个, $P<0.05$]。



* $P<0.05$ vs MHCC-97 group

A: Protein expression detected by WB; B: Data statistics

图1 Thy-1 和 Notch1 在 MHCC-97 细胞中呈高表达

Fig.1 Thy-1 and Notch1 were highly expressed in MHCC-97 cells

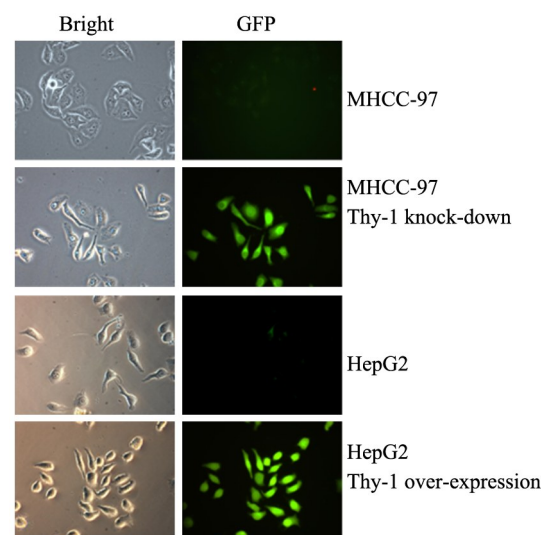
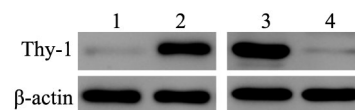


图2 Thy-1 过表达、低表达载体成功转染 HepG2、MHCC-97 细胞($\times 400$)

Fig.2 Thy-1 overexpression and low expression vectors were successfully transfected into HepG2 and MHCC-97 cells ($\times 400$)



1: HepG2; 2: HepG2 Thy-1 over-expression;

3: MHCC-97; 4: MHCC-97 Thy-1 knock-down

图3 Thy-1 过表达的 HepG2 细胞和 Thy-1 低表达的 MHCC-97 细胞构建成功

Fig.3 Thy-1 overexpressing HepG2 cells and Thy-1 low expressing MHCC-97 cells were successfully constructed

2.4 Thy-1 影响 HepG2 和 MHCC-97 细胞中 EMT 标志蛋白的表达

WB 实验检测结果(图 5)显示,与 HepG2 细胞相比,Thy-1 过表达组细胞中波形蛋白表达显著升高($P<0.05$),上皮钙黏素蛋白表达显著降低($P<0.05$);与 MHCC-97 细胞相比,Thy-1 沉默组 MHCC-97 细胞中波形蛋白表达显著降低($P<0.05$),上皮钙黏素蛋白表达显著升高($P<0.05$)。

2.5 Thy-1 对 HepG2 和 MHCC-97 细胞中 Notch1 mRNA 表达的影响

qPCR 检测结果(见图 6)显示,与 HepG2 细胞相比,Thy-1 过表达 HepG2 细胞中 Notch1 mRNA 表达水平显著升高($P<0.05$);与 MHCC-97 细胞相比,Thy-1 沉默的 MHCC-97 细胞中 Notch1 mRNA 表达水平显著降低($P<0.05$)。

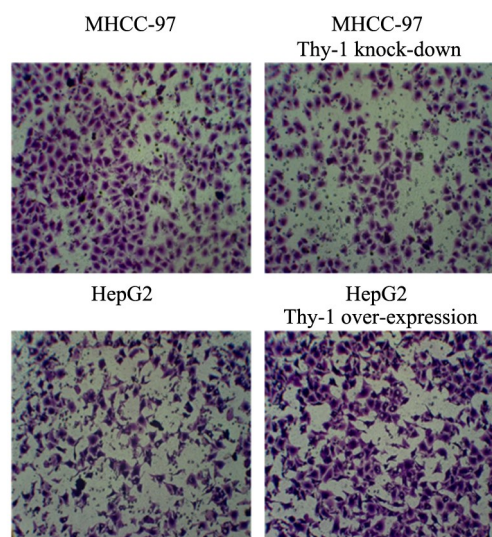
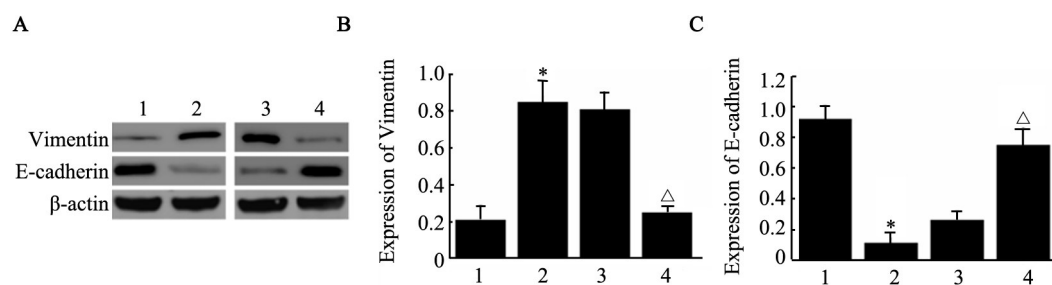


图 4 Thy-1 对肝癌细胞侵袭的影响($\times 200$)

Fig.4 Effect of Thy-1 on invasion of liver cancer cells ($\times 200$)



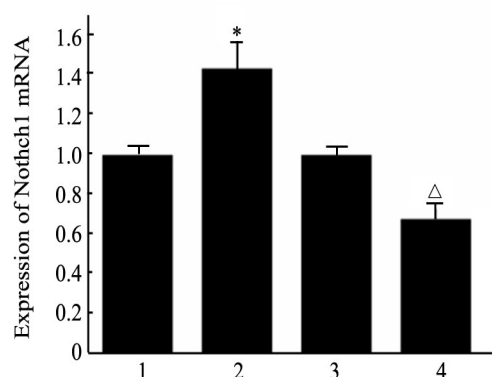
1: HepG2; 2: HepG2 Thy-1 over-expression; 3: MHCC-97; 4: MHCC-97 Thy-1 knock-down

* $P<0.05$ vs HepG2 group; $\Delta P<0.05$ vs MHCC-97 group

A: WB analysis of Vimentin and E-cadherin protein expression; B, C: Semi-quantitative analysis of Vimentin and E-cadherin protein expression

图 5 Thy-1 蛋白过表达与沉默对细胞中波形蛋白、上皮钙黏素蛋白表达的影响,

Fig.5 Effect of Thy-1 protein overexpression and silencing on the expression of Vimentin and E-cadherin in cells



1: HepG2; 2: HepG2 Thy-1 over-expression; 3: MHCC-97;
4: MHCC-97 Thy-1 knock-down

* $P<0.05$ vs HepG2 group; $\Delta P<0.05$ vs MHCC-97 group

图 6 Thy-1 过表达与沉默对细胞中 Notch1 mRNA 的影响

Fig.6 Effect of Thy-1 overexpression and silencing on Notch1 mRNA in cells

2.6 Thy-1 通过 Notch1 蛋白调控肝癌细胞侵袭

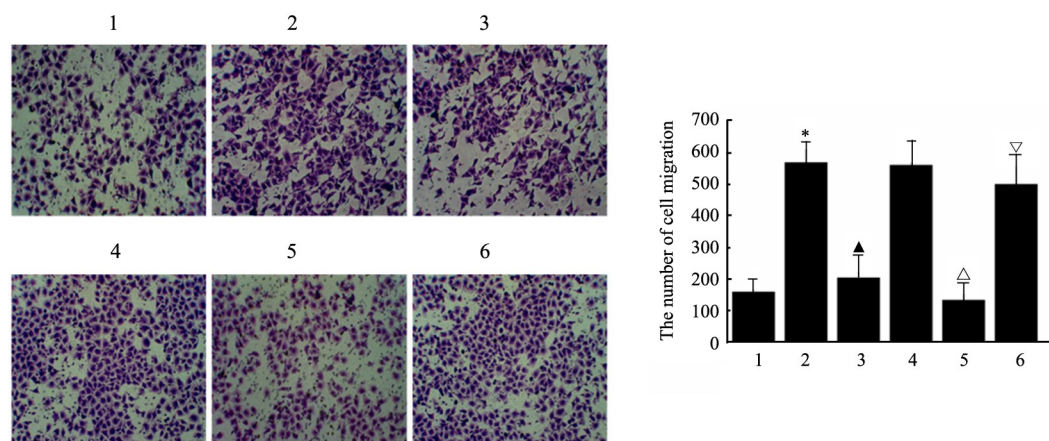
Transwell 侵袭实验结果(图 7)显示,与 HepG2 细胞相比,Thy-1 过表达 HepG2 细胞侵袭能力显著升高($P<0.05$);与 Thy-1 过表达 HepG2 细胞相比,Notch1 抑制剂 MW167 使 Thy-1 过表达 HepG2 细胞侵袭能力显著降低($P<0.05$)。与 MHCC-97 细胞相比,Thy-1 沉默的 MHCC-97 细胞侵袭能力显著降低($P<0.05$);与 Thy-1 沉默的 MHCC-97 细胞相比,Notch1 激动剂 rhNF- κ B 使 Thy-1 沉默的 MHCC-97 细胞的侵袭能力显著升高($P<0.05$)。

2.7 Thy-1 通过 Notch1 蛋白对肝癌细胞中 EMT 标志蛋白的影响

WB 实验检测结果(图 8)显示,与 HepG2 细胞相比,Thy-1 过表达 HepG2 细胞内 Vimentin 表达水平显著升高($P<0.05$),E-cadherin 表达水平显著降低($P<0.05$);与 Thy-1 过表达 HepG2 细胞相比,Notch1 抑制剂 MW167 使 Thy-1 过表达 HepG2 细胞 Vimentin 显著降低($P<0.05$),E-cadherin 蛋白显著升高($P<0.05$)。

与 MHCC-97 细胞相比, Thy-1 沉默的 MHCC-97 细胞 Vimentin 蛋白显著降低 ($P<0.05$), E-cadherin 蛋白显著升高 ($P<0.05$); 与 Thy-1 沉默的 MHCC-97 细胞相

比, Nochl 激动剂 rhNF- κ B 使 Thy-1 沉默的 MHCC-97 细胞 Vimentin 显著升高 ($P<0.05$), E-cadherin 蛋白显著降低 ($P<0.05$)。



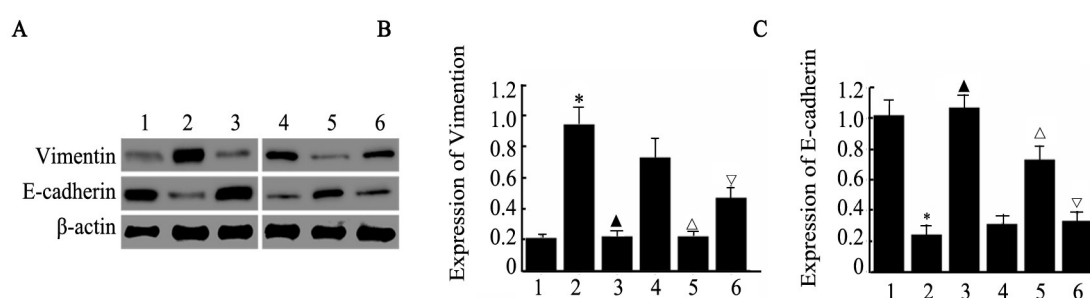
1: HepG2; 2: HepG2 Thy-1 over-expression; 3: HepG2 Thy-1 over-expression+MW167; 4: MHCC-97; 5: MHCC-97 Thy-1 knock-down; 6: MHCC-97 Thy-1 knock-down+rhNF- κ B

* $P<0.05$ vs group 1; [▲] $P<0.05$ vs group 2; [△] $P<0.05$ vs group 4; [▽] $P<0.05$ vs group 5

A: Image of transwell chamber invasion assay ($\times 200$); B: Statistical graph of the number of invading cells

图7 Thy-1 通过 Notch1 蛋白对肝癌细胞侵袭的影响

Fig.7 Effect of Thy-1 on the invasion of liver cancer cells via Notch1 protein



1: HepG2; 2: HepG2 Thy-1 over-expression; 3: HepG2 Thy-1 over-expression+MW167; 4: MHCC-97; 5: MHCC-97 Thy-1 knock-down; 6: MHCC-97 Thy-1 knock-down+rhNF- κ B

* $P<0.05$ vs group 1; [▲] $P<0.05$ vs group 2; [△] $P<0.05$ vs group 4; [▽] $P<0.05$ vs group 5

A: WB analysis of Vimentin and E-cadherin protein expression;

B, C: Semi-quantitative analysis of Vimentin and E-cadherin protein expression

图8 Thy-1 通过 Notch1 蛋白对肝癌细胞中 EMT 标志蛋白的影响

Fig.8 Effect of Thy-1 on EMT marker protein in liver cancer cells via Notch1 protein

3 讨论

在正常细胞中 Thy-1 作为干细胞标志物可抑制干细胞异常增殖, 具有维持细胞干性的功能^[23]; 在肝癌中 Thy-1 作为癌基因调控癌症细胞的增殖、分化、转移以及致瘤能力^[23, 25]。Notch 1 和 Thy-1 蛋白不仅能促进细胞增殖, 还能抑制细胞分化, 保持细胞处于低分化状态。为在体外研究 Thy-1 和 Notch1 之间相互关系以及两者对肝癌 EMT 转化的影响, 本研究选取具有高转移特性的 MHCC-97 细胞和低转移特性

的 HepG2 细胞进行实验, 首先发现 MHCC97 细胞中 Notch1 和 Thy-1 蛋白表达均显著高于 HepG2 细胞, 提示肝癌细胞中 Notch1 和 Thy-1 蛋白表达可能与其转移能力有关。

采用基因技术使 MHCC-97 细胞中 Thy-1 基因沉默, 同时使 HepG2 细胞中 Thy-1 基因过表达, 结果发现 Thy-1 基因的沉默使 MHCC-97 细胞转移能力显著降低, Thy-1 基因过表达使 HepG2 细胞转移能力显著升高, 证实 Thy-1 的表达可促进肝癌细胞的转移。肿瘤细胞的转移与 EMT 密切相关, EMT 赋予肿瘤细

胞结构和功能上的易变性,使其获得间质细胞特性,进而增强转移能力^[26]。本研究发现,Thy-1基因的沉默使MHCC-97细胞中上皮钙黏素表达升高,波形蛋白表达降低,Thy-1基因过表达使HepG2细胞中上皮钙黏素表达降低,波形蛋白表达升高。作为EMT标志物,上皮钙黏素在EMT中表达降低,使细胞间连接减弱;波形蛋白在EMT中表达升高,赋予细胞高的变形性^[27]。以上提示肝癌细胞中Thy-1的高表达促进细胞EMT,提高肝癌细胞转移能力。

进一步发现Thy-1基因的沉默使MHCC-97细胞中Notch1表达降低,Thy-1基因过表达使HepG2细胞中Notch1表达升高,提示Thy-1可激活肝癌细胞中Notch1信号通路。研究^[28-29]发现Notch1作为原癌基因在多个癌症中表达上调。在癌症中,Notch1高表达导致癌症细胞对来自于邻近细胞的Notch配体的刺激极为敏感,Notch信号通路激活的阈值降低,大量Notch受体被活化,进入细胞核招募与转移相关的转录因子启动相关蛋白的表达,促进癌细胞EMT,同时抑制癌细胞分化。因此推测,在肝癌细胞中异常表达的Thy-1可通过激活Notch1信号通路促进肝癌细胞EMT和转移。为进一步探索Thy-1是否通过调控Notch1信号通路促进肝癌细胞转移和EMT,本研究将Notch1激动剂rhNF- κ B和抑制剂MW167应用于实验,结果发现,rhNF- κ B可逆转由于Thy-1沉默造成的MHCC-97细胞侵袭能力的降低,而MW167同样可逆转由于Thy-1过表达造成的HepG2细胞侵袭能力的升高,并且rhNF- κ B可逆转Thy-1沉默造成的MET转化和Thy-1过表达造成的EMT转化。以上证实在肝癌细胞中Thy-1可通过调控Notch1通路的表达影响肝癌细胞的EMT转化和转移。

综上,在肝癌细胞中Thy-1的高表达可通过激活Notch1信号通路促进肝癌细胞EMT进程,提高肿瘤转移能力。但由于影响EMT转化的信号通路复杂,Thy-1是否同时与其他信号通路发生作用影响肝癌细胞转移,还需进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] JOLLY M K, WARE K E, GILJA S, et al. EMT and MET: necessary or permissive for metastasis[J]. *Mol Oncol*, 2017, 11(7): 755-769. DOI:10.1002/1878-0261.12083.
- [2] HEERBOTH S, HOUSMAN G, LEARY M, et al. EMT and tumor metastasis[J]. *Clin Trans Med*, 2015, 4: 6. DOI: 10.1186/s40169-015-0048-3.
- [3] CAMPBELL K. Contribution of epithelial-mesenchymal transitions to organogenesis and cancer metastasis[J/OL]. *Curr Opin Cell Biol*, 2018, 55: 30-35[2019-06-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6284102/>. DOI:10.1016/j.ceb.2018.06.008.
- [4] 李裕明, 韩克强, 郑璐, 等. 上皮间质转化标志物E-cadherin和Vimentin在原发性肝癌中的表达及其临床意义[J]. *中华肝脏病杂志*, 2013, 21(4): 279-284.
- [5] ZHANG J Y, TIAN X J, XING J H. Signal transduction pathways of EMT induced by TGF- β , SHH, and WNT and their crosstalks[J/OL]. *J Clin Med*, 2016, 5(4): E41[2019-06-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4850464/>. DOI:10.3390/jcm5040041.
- [6] SMITH B N, BHOWMICK N A. Role of EMT in metastasis and therapy resistance[J/OL]. *J Clin Med*, 2016, 5(2): E17[2019-06-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4773773/>. DOI: 10.3390/jcm5020017.
- [7] 张建波, 宋魏, 王媛媛, 等. miR-133通过Notch1信号通路调控BCAR4对乳腺癌迁移和侵袭的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(7): 733-741. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.07.007.
- [8] GU K, LI M M, SHEN J, et al. Interleukin-17-induced EMT promotes lung cancer cell migration and invasion via NF- κ B/ZEB1 signal pathway[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(3): 1169-1179.
- [9] 范冬利, 于文成, 刘亚秋, 等. TGF- β /SMAD信号通路与EMT及肺纤维化关系的研究进展[J]. *青岛大学医学院学报*, 2017, 53(5): 618-621. DOI:10.13361/j.qdyxy.201705035.
- [10] YANG Q C, CAO X J, TAO G H, et al. Effects of FOXJ2 on TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition through Notch signaling pathway in non-small lung cancer[J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41(1): 79-83. DOI:10.1002/cbin.10680.
- [11] 王雷, 杜媛, 米源, 等. Hedgehog/Gli和PI3K/AKT信号通路的串话促进胃癌AZ521细胞上皮-间质转化[J]. *中国医科大学学报*, 2018, 47(2): 151-156. DOI: 10.12007/j.issn.02584646.2018.02.013.
- [12] 刘卉芳, 曹梦婷, 徐薇, 等. 调控肿瘤EMT的转录因子及其相关信号通路[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(13): 2155-2160. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2017.13.037.
- [13] 周煜, 薛淑一, 李明春. Notch信号通路及其与肝癌相关性的研究进展[J]. *实用医药杂志*, 2018, 35(9): 842-846. DOI:10.14172/j.issn1671-4008.2018.09.027.
- [14] REGE T A, HAGOOD J S. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis[J]. *FASEB J*, 2006, 20(8): 1045-1054. DOI:10.1096/fj.05-5460rev.
- [15] MORAES D A, SIBOV T T, PAVON L F, et al. A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells[J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1): 97[2019-06-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4964048/>. DOI:10.1186/s13287-016-0359-3.
- [16] ZHU H, KIMURA T, SWAMI S, et al. Pluripotent stem cells as a source of osteoblasts for bone tissue regeneration[J/OL]. *Biomaterials*, 2019, 196: 31-45[2019-06-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6077105/>. DOI:10.1016/j.biomaterials.2018.02.009.
- [17] HERRERA M B, BRUNO S, BUTTIGLIERI S, et al. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(12): 2840-2850. DOI:10.1634/stemcells.2006-0114.
- [18] DAN Y Y, RIEHLE K J, LAZARO C, et al. Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(26): 9912-9917. DOI:10.1073/pnas.0603824103.
- [19] PASCAL L E, GOO Y A, VÊNCIO R Z, et al. Gene expression

- down-regulation in CD90+ prostate tumor-associated stromal cells involves potential organ-specific genes[J/OL]. BMC Cancer, 2009, 9: 317[2019-06-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2745432/>. DOI:10.1186/1471-2407-9-317.
- [20] TRUE L D, ZHANG H, YE M L, et al. CD90/THY1 is overexpressed in prostate cancer-associated fibroblasts and could serve as a cancer biomarker[J]. Mod Pathol, 2010, 23(10): 1346-1356. DOI: 10.1038/modpathol.2010.122.
- [21] LU J W, CHANG J G, YE H K T, et al. Overexpression of Thy1/CD90 in human hepatocellular carcinoma is associated with HBV infection and poor prognosis[J]. Acta Histochem, 2011, 113(8): 833-838. DOI:10.1016/j.acthis.2011.01.001.
- [22] YANG Z F, NGAI P, HO D W, et al. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer[J]. Hepatology, 2008, 47(3): 919-928. DOI:10.1002/hep.22082.
- [23] YANG Z F, HO D W, NG M N, et al. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer[J]. Cancer Cell, 2008, 13(2): 153-166. DOI:10.1016/j.ccr.2008.01.013.
- [24] HO D W, YANG Z F, YI K, et al. Gene expression profiling of liver cancer stem cells by RNA-sequencing[J/OL]. PLoS One, 2012, 7(5): e37159[2019-06-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3351419/>. DOI:10.1371/journal.pone.0037159.
- [25] SUKOWATI C H, ANFUSO B, TORRE G, et al. The expression of CD90/Thy-1 in hepatocellular carcinoma: an in vivo and in vitro study[J/OL]. PLoS One, 2013, 8(10): e76830[2019-06-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3792890/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0076830.
- [26] 杜晓欣, 赵素芬. 与肿瘤转移相关的上皮间质转化信号通路研究进展[J]. 中国癌症防治杂志, 2017, 9(5): 412-414.
- [27] 刘海丽, 吴建龙, 申志华, 等. E-cadherin 及 Vimentin 在大肠癌侵袭和转移中的作用研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(41): 48-49. DOI:10.19613/j.cnki.1671-3141.2018.41.024.
- [28] 王红卫, 赵阳, 李鹏, 等. Notch1 对人胰腺癌细胞迁移及侵袭能力影响的体外实验研究[J]. 新疆医科大学学报, 2017, 40(12): 1559-1563.
- [29] BOLÓ S V, GREGO-BESSA J, DE LA POMPA J L. Notch signaling in development and cancer[J]. Endocr Rev, 2007, 28(3): 339-363. DOI:10.1210/er.2006-0046.

[收稿日期] 2019-06-28

[修回日期] 2019-09-29

[本文编辑] 黄静怡