

Hes1在结肠癌组织中的表达及对SW620细胞成瘤能力的影响

杨妙玲 高飞*

暨南大学附属第一医院消化内科, 广东 广州 510630

[摘要] **背景与目的:** 研究发现Hes1可促进多种肿瘤的发生、发展和侵袭转移, 且Hes1过表达可能会导致结肠癌的发生。本研究探讨Hes1在结肠癌组织中的表达及其对结肠癌SW620细胞株成瘤能力的影响。**方法:** 免疫组化和定量逆转录聚合酶链反应(quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测Hes1在结肠癌组织中的表达并分析其表达与结肠癌分化程度的关系; 建立Hes1过表达的结肠癌SW620细胞株, qRT-PCR和蛋白质印迹法(Western blot)分别检测Hes1在mRNA水平和蛋白水平的表达, 并在裸鼠体内检测Hes1对SW620细胞皮下成瘤能力的影响。**结果:** Hes1在正常结肠组织中少许表达, 表达多位于结肠腺管的底部。然而Hes1在结肠癌组织中的表达显著高于癌旁正常结肠组织, 且Hes1的表达水平与细胞分化程度呈负相关($P<0.05$); 在结肠癌SW620细胞株中稳定转染Hes1后, Hes1被成功过表达, 约380倍($P<0.05$); 用 1×10^5 个Hes1过表达的SW620细胞及对照细胞株分别注射至裸鼠皮下, 结果Hes1过表达的SW620细胞成瘤能力增强, 瘤体较对照组大, 生长速度较对照组快。**结论:** Hes1在结肠癌组织中的表达显著高于癌旁正常结肠组织, 并且随结肠癌组织分化程度降低而表达量上调; Hes1在体内促进结肠癌SW620细胞的成瘤能力。

[关键词] Hes1; 结肠癌; 成瘤能力

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.09.002

中图分类号: R735.3+5 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)09-0646-06

Increased expression of Hes1 and its effect on tumour-formation ability in colon cancer YANG Miao-ling, GAO Fei* (Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou Guangdong 510630, China)

Correspondence to: GAO Fei E-mail: gaofeidoc@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** It is reported that Hes1 is related to the progression and metastasis of many kinds of tumor. This study was to investigate the expression of Hes1 in colon cancer and its effect on tumour-formation ability of SW620 cells. **Methods:** The expression of Hes1 in colon cancer tissues and control normal samples was analyzed by immunohistochemistry and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR), and the relationship between Hes1 expression and differentiation in human colon cancer was detected. Hes1 overexpressing SW620 cell lines were established, and the expression of Hes1 mRNA and protein was detected by qRT-PCR and Western blot simultaneously. We also detected the effect of Hes1 on the ability of tumour-formation in Hes1 overexpressing SW620 cells in nude mice *in vivo*. **Results:** We found that Hes1 was expressed in almost all normal tissues, particularly at the bottom of the crypts, and in all cancer tissues, including moderate and poorly differentiated cancer samples and well-differentiated cancer samples. In addition, the expression of Hes1 in poorly differentiated cancer samples was higher than that observed in well-differentiated tumor ($P<0.05$). After stably transfected Hes1 in SW620 colon cancer cell lines, Hes1 was overexpressed successfully ($P<0.05$). We injected 1×10^5 Hes1-overexpressing colon cancer cells and the control cells into nude mice subcutaneously, and found Hes1-overexpressing tumours exhibited significantly bigger size compared with that observed in controls. The growth of the Hes1-overexpressing

*: 原工作单位为南方医科大学。

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(No: 81401973); 广东省医学科研基金(No: B2014222); 中央高校基本科研业务费专项资金(No: 21614304)。

通信作者: 高飞 E-mail: gaofeidoc@163.com

tumours was found to be slightly faster than those of the controls. **Conclusion:** Hes1 is overexpressed in colon cancer than that in normal tissue, and Hes1 is upregulated in poorly differentiated cancer samples compared with well-differentiated tumour samples. Hes1 has a positive influence on the ability of tumour-formation in SW620 cells *in vivo*.

[**Key words**] Hes1; Colon cancer; Tumor-formation ability

目前,我国结肠癌发生率和病死率正在上升,随着国人饮食结构的改变,结肠癌新发患者日益增多。早期结肠癌的治疗以手术为主,辅以化疗和放疗,但很多患者在就诊时已经错过手术机会,晚期结肠癌的化疗效果有限,且容易产生化疗耐药。因此,新的基因治疗及生物治疗为结肠癌患者的生存获益带来希望,寻找有价值的肿瘤标志物对结肠癌的诊断、治疗、预后尤为重要。研究发现, Hes1可促进多种肿瘤发生、发展和侵袭转移^[1-4]。另有研究表明, Hes1在消化系统的肿瘤形成中起重要作用^[5],另外, Hes1过表达可能会导致结肠癌的发生^[6]。然而, Hes1在结肠癌中的作用及机制尚不明确。

本研究通过检测Hes1在结肠癌组织中的表达及其对SW620细胞体内成瘤能力的影响,进一步探讨Hes1与结肠癌的分化程度是否相关,为临床结肠癌的早期诊断、靶向治疗、预后判断提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

临床标本均为南方医科大学南方医院病理科所收集的2010-2012年的77例结肠癌组织和38例非肿瘤组织(由该院郑林博士提供)。患者术前均未接受放疗或化疗等抗肿瘤治疗。

实验SPF级裸鼠3~4周龄,体质量16~22 g,雌性(购自广东省实验动物中心)。饲养于学校动物中心,在恒温25~27℃、恒湿(45%~50%)、新鲜空气、除尘除菌的无特殊病原菌饲养室条件下饲养。裸鼠先放于有机玻璃盒内,再置于超净生物层流架内,每个饲养盒内饲养5~6只,经无菌处理的水和饲料供裸鼠自由摄入,高温消毒的饲料、垫料每3天更换1次,笼具及饮水瓶每3天紫外线消毒1次,饮用

无菌蒸馏水。更换饲养用品时严格遵循无菌原则操作。

SW620人结肠癌细胞株是在RPMI-1640培养基中用10%胎牛血清(FBS),在CO₂体积分数为5%、37℃的加湿培养箱中培养。

1.2 主要试剂和仪器

培养载玻片购自美国Costar公司。Hes1抗体购自美国Bioss公司,1:500稀释。10%牛血清白蛋白购自美国Sigma公司。二次山羊抗小鼠或者山羊抗兔抗体购自美国Bioss公司。0.25%胰蛋白酶购自美国Sigma公司。聚偏二氟乙烯膜(PVDF)购自美国Millipore公司。4-,6-二脒基-2-苯基吡啶(propidium iodide)购自美国Sigma公司。TRIzol试剂、RT试剂盒、扩增预混试剂(扩增产物)购自日本TaKaRa公司。免疫组化试剂化学发光凝胶成像系统及分析软件为美国Bio-Rad公司生产。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化分析

石蜡切片脱蜡至水,组织列阵检测技术TMA部分切片高压2 min,达到抗原修复,以实现抗原性检索。培养载玻片在4℃温育过夜,然后将切片显色剂DAB显色2 min。每次实验时,初级抗体被PBS取代作为阴性对照。

染色肿瘤细胞等级评价:无阳性肿瘤细胞为0级,阳性肿瘤细胞<10%为1级,10%≤阳性肿瘤细胞≤50%为2级,阳性肿瘤细胞>50%为3级。染色强度评分:无染色为0分,弱染色为1分,中度染色为2分,强染色为3分。最后评分的计算方法由染色强度评分乘以染色肿瘤细胞等级。根据上述方法,染色评分≤4和≥6被分别视为组织的低表达和高表达。

1.3.2 RNA提取、逆转录和定量逆转录聚合酶链反应(quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测

采用TRIzol法裂解、氯仿抽提、异丙醇

沉淀, 从而提取Hes1过表达结肠癌SW620细胞株总RNA。采用逆转录试剂盒进行反应后进行聚合酶反应。运用Stratagene公司Mx3005P软件设计引物, 以GAPDH为内参照, 参照试剂盒说明采用SYBR Green荧光染料法完成。Hes1基因引物序列顺义链: 5'-ACGTGCGAGGGCGTTAATAC-3'; 反义链: 5'-GGGGTAGGTCATGGCATTGA-3'。

1.3.3 蛋白质印迹法(Western blot)检测

取Hes1过表达的结肠癌SW620细胞株及对照细胞, 蛋白质裂解后由10%~15%SDS-PAGE凝胶分离, 湿转法将胶上的蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上, 用5%BSA封闭1.5 h, 加Hes1抗体(1:500)温育, 洗膜后加二抗温育。ECL显影液及高灵敏化学发光成像系统检测蛋白表达。

1.3.4 裸鼠皮下成瘤实验

生长状态良好的细胞胰酶消化后, PBS液洗涤2次, 用PBS重悬细胞, 计数仪计数, 分别将 1×10^5 个过表达Hes1的SW620细胞(LV-Hes1)和其对照组(LV-con)随机接种在裸鼠背部两侧皮肤, 待长出肿瘤后每2~3 d测量瘤径(长径和短径), 计算瘤体积: 体积=(长径×短径×短径)/2。待瘤体积超过500 mm³时, 处死裸鼠, 取出组织。

1.4 统计学处理

采用SPSS 13.0统计学软件进行数据分析。

结果采用两独立样本 t 检验, 数值大小以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Hes1在结肠癌组织中的表达

本研究通过免疫组化法和qRT-PCR法, 发现Hes1在结肠癌组织中的表达明显高于癌旁正常结肠组织(图1A), 且Hes1在结肠癌组织中的mRNA表达明显高于癌旁正常结肠组织(图1B), 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 Hes1与结肠癌分化程度的关系

Hes1在正常结肠组织中少许表达, 表达主要位于结肠腺管的底部(图2A)。然而Hes1在结肠癌组织中的表达显著高于癌旁正常结肠组织, 且在低分化结肠癌组织中的表达(图2C)高于高分化结肠癌组织(图2B)。

2.3 建立Hes1稳定过表达的结肠癌SW620细胞株

把LV-Hes1用瑞士包装系统包装病毒后感染结肠癌SW620细胞。在mRNA水平和蛋白水平检测实验组(LV-Hes1)与对照组(LV-con)中Hes1的表达, 结果显示, 在Hes1过表达后, LV-Hes1组在mRNA水平的表达较LV-con组显著上调, 差异有统计学意义($P < 0.01$, 图3A)。进一步通过Western blot检测Hes1在蛋白水平的表达,

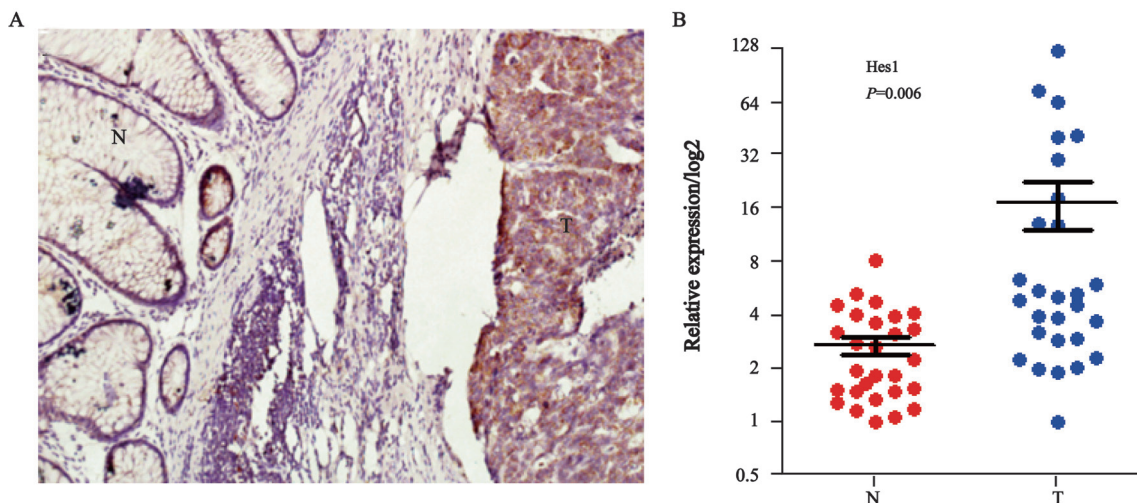


图1 Hes1在结肠癌组织中的表达

Fig. 1 Increased expression of Hes1 in human colon cancer tissues

A: Expression of Hes1 by immunohistochemical analysis (HE, $\times 100$); B: Expression of Hes1 in colon cancer tissues and control normal samples measured by qRT-PCR; N: Normal tissue; T: Tumour.

证实Hes1的过表达(图3B)。

2.4 Hes1增强结肠癌SW620细胞的皮下成瘤能力

皮下成瘤实验结果显示，两组裸鼠的肿瘤

形态均为圆形或椭圆形，边界较清楚，有纤维包膜包裹，符合裸鼠皮下成瘤特点。但LV-Hes1组肿瘤体积较LV-con组大(图4A)，且LV-Hes1组肿瘤生长较快(图4B, $P < 0.01$)。

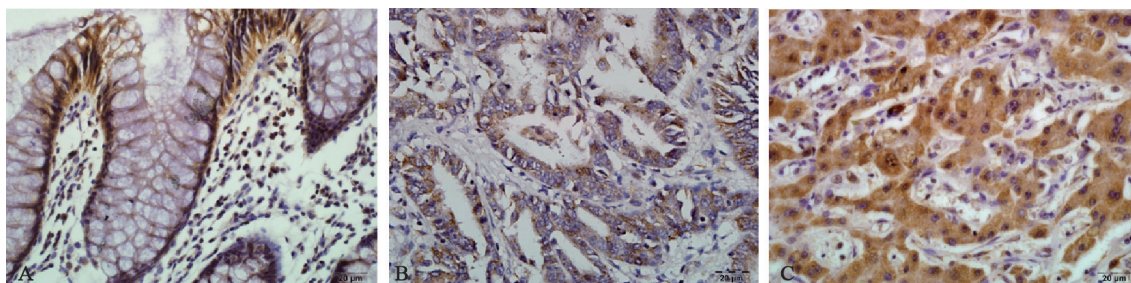


图2 Hes1在不同分化程度结肠癌中的表达

Fig. 2 Hes1 expression in human colon cancer tissues

A: Normal colon tissue; B: Well differentiated colorectal cancer tissue; C: Poorly differentiated colorectal cancer tissue.

(HE, ×100)

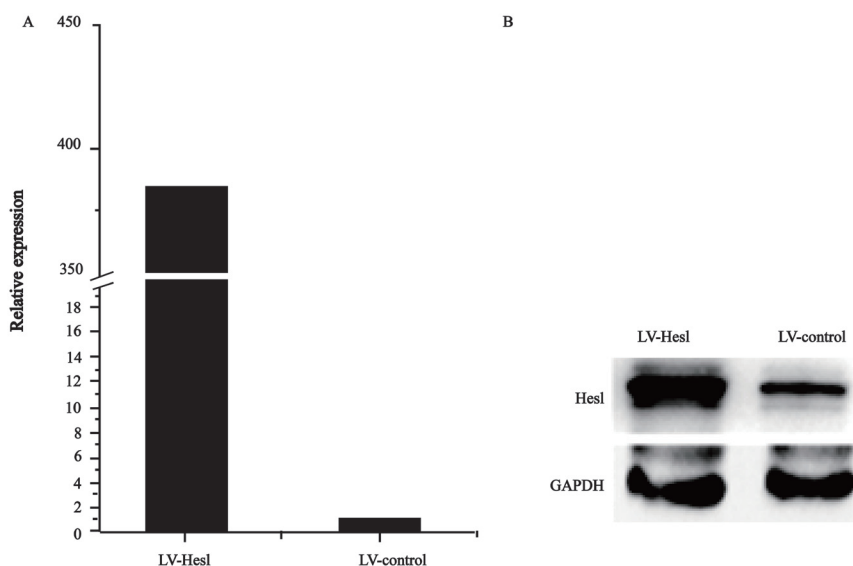


图3 过表达Hes1后SW620细胞株中Hes1的表达

Fig. 3 Expression of Hes1 in Hes1 overexpressing SW620 cell lines

A: Expression of Hes1 mRNA detected by qRT-PCR; B: Expression of Hes1 protein detected by Western blot.

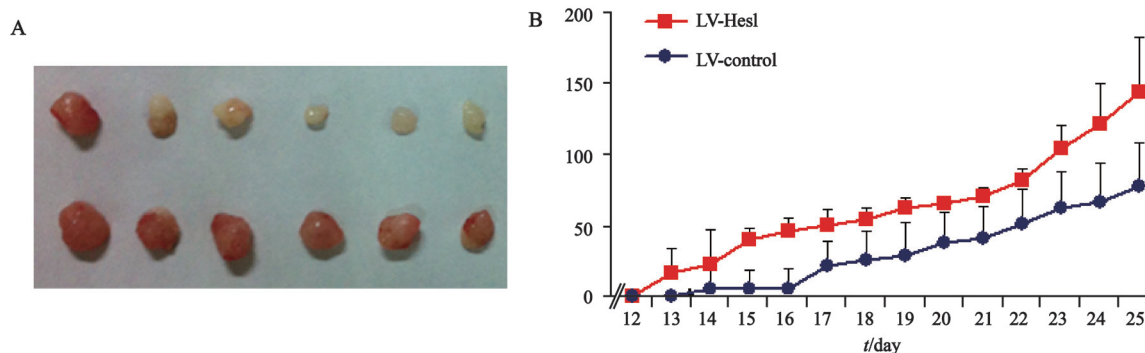


图4 过表达Hes1后SW620细胞的体内成瘤能力

Fig. 4 Effect of Hes1 on the ability of tumour-formation in Hes1 overexpressing SW620 cells

A: Subcutaneous tumours in nude mice; B: The growth curve of tumours formation in nude mice.

3 讨 论

结肠癌起病隐匿, 患病初期症状不明显, 且进展迅速, 大多数患者就诊时已是中晚期, 因此寻找理想的肿瘤标志物用于诊断、治疗、预后评估将有较高的临床价值。在结肠癌的发生、发展过程中, 常涉及到多种蛋白质表达的改变, 然而哪些可作为结肠癌发生、发展及预后的肿瘤标志物成为当今研究之难点。

迄今, 脊椎动物的6种Hes分子(Hes1~6)已被发现, 其中Hes1分子表达最为广泛, 人类的Hes1含268个氨基酸残基, 相对分子质量约为 35×10^3 。Hes1是前神经元碱性螺旋-环-螺旋(proneural basic helix-loop-helix, bHLH)转录因子家族中的成员, 有研究已经证实, *Hes1*基因可通过PTEN/PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制抑癌基因*p53*表达阻止细胞凋亡^[7-8]。*Hes1*作为Notch蛋白的下游靶基因, 将Notch信号下传, 可使多种不成熟细胞维持在未分化状态, 以确保正确的分化方向。有研究表明, Hes1在急性淋巴细胞白血病^[7]、肺癌^[9]、宫颈癌^[10-11]、卵巢癌^[12]、骨肉瘤^[13]、星形细胞瘤^[14]和胃癌^[15]中起到癌基因的作用, 能促进肿瘤增殖、转移和浸润侵袭。金黑鹰等^[16]及Michael等^[17]研究提示, Notch1、Hes1在结肠癌中的表达一致, 而且Notch1的表达程度与细胞的分化程度呈负相关。然而, Hes1在结肠癌中的确切作用尚缺乏系统研究。

本研究首先检测了Hes1在结肠癌组织及癌旁正常结肠组织中的表达, 结果Hes1在癌旁正常结肠组织和结肠癌组织中都有表达, 但在癌组织中的表达显著较癌旁正常组织高, 且Hes1的表达水平与细胞的分化程度呈负相关, 即分化程度越低, Hes1的表达水平越高。结果表明, Hes1的定性和定量, 可能对结肠组织的癌变与否及分化程度的诊断有辅助价值。

接着我们建立了稳定过表达Hes1的SW620细胞株, 并进行了皮下成瘤实验。结果表明

Hes1的表达与肿瘤的体积、生长速度、肿瘤出现时间有关。LV-Hes1的最终瘤体积较LV-con的瘤体积大, 且生长明显迅速, 表明Hes1增强结肠癌SW620细胞株的成瘤能力。因此我们推测, Hes1过表达, 可促进肿瘤发生和生长。并且我们发现过表达Hes1的瘤体形态大, 充血明显, 推测可促使肿瘤细胞进入血液循环, 增加肿瘤复发及转移的机会, 此部分将会实施进一步的实验验证。另外, Hes1促进肿瘤细胞的体内成瘤能力, 且有报道表明其与干细胞的维持相关, 我们推测Hes1与肿瘤干细胞的干性维持亦相关, 仍需进一步证实。

综上所述, 目前国内外关于Hes1在结肠癌中的表达、作用及机制尚很少见, 我们的结果表明Hes1的过表达可能导致结肠癌的发生和发展, 然而, 其具体作用机制仍需进一步探讨。

[参 考 文 献]

- [1] HARADA K, SATO Y, IKEDA H, et al. Notch1-Hes1 signalling axis in the tumourigenesis of biliary neuroendocrine tumours [J]. *Clin Pathol*, 2013, 66(5): 386-391.
- [2] KABOS P, KABOSOVA A, NEUMAN T. Blocking Hes1 expression initiates GABAergic differentiation and induces the expression of p21CIP1/WAF1 in human neural stem cells [J]. *Biol Chem*, 2002, 277(11): 8763-8766.
- [3] PIPER M, BARRY G, HAWKINS J, et al. NFIA controls telencephalic progenitor cell differentiation through repression of the Notch effector Hes1 [J]. *Neurosci*, 2010, 30(27): 9127-9139.
- [4] SCHRECK K C, TAYLOR P, MARCHIONNI L, et al. The Notch target Hes1 directly modulates Gli1 expression and hedgehog signalling: A potential mechanism of therapeutic resistance [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(24): 6060-6070.
- [5] KATOH M, KATOH M. Notch signaling in gastrointestinal tract review [J]. *Int J Oncol*, 2007, 30(1): 247-251.
- [6] FREA S, PALLAVIB S K, HUYGHE M, et al. Notch and Wnt signals cooperatively control cell proliferation and tumourigenesis in the intestine [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(15): 6309-6314.
- [7] PALOMERO T, SULIS M L, CORTINA M, et al. Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia [J]. *Nat Med*, 2007, 13(10): 1203-1210.
- [8] WEINMASTER G. Notch signal transduction: a real rip and more [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2000, 10(4): 363-369.
- [9] DANG T P, GAZDAR A F, VIRMANI A K, et al. Chromosome 19 translocation, overexpression of Notch3, and human lung cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(16): 1355-1357.

- [10] LIU J, YE F, CHEN H, et al. Expression of differentiation associated protein Hes1 and Hes5 in cervical squamous carcinoma and its precursors [J]. Int J Gynecol Cancer, 2007, 14(6): 789-792.
- [11] 江金群, 张玉心, 徐成岭, 等. Hes1基因启动子的克隆及活性研究 [J]. 蚌埠医学院学报, 2013, 38(9): 1073-1076.
- [12] 吴利英, 王明义, 辛晓燕, 等. 人卵巢癌A2780细胞侵袭转移与HES1相关性的实验研究 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(5): 829-832.
- [13] ENGIN F, BERTIN T, MA O, et al. Notch signaling contributes to the pathogenesis of human osteosarcomas [J]. Hum Mol Genet, 2009, 18(14): 1464-1470.
- [14] 王春华, 郑志斌, 杨卫忠, 等. Notch1 和Hes1、Hes5 在星形细胞瘤中的表达及其相关性研究 [J]. 福建医科大学学报, 2009, 43(3): 207-209.
- [15] 王依满, 杨晶金, 权明明, 等. HES1 与ICN1、Notch1在胃癌组织中的表达及其意义 [J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(1): 87-92.
- [16] 金黑鹰, 徐俊华, 王小峰, 等. 肿瘤干细胞调节基因Hes1在结直肠癌中的表达及其临床意义 [J]. 中华医学杂志, 2011, 91(41): 2891-2894.
- [17] MICHAEL R, SILVIA O, HUI Z, et al. Activation of Notch signaling in human colon adenocarcinoma [J]. Int J Oncol, 2008, 33(6): 1223-1229.

(收稿日期: 2014-04-24 修回日期: 2014-06-20)

《中国癌症杂志》2015年征订启事

《中国癌症杂志》是由国家教育部主管、复旦大学附属肿瘤医院主办的全国性肿瘤学术期刊, 读者对象为从事肿瘤基础、临床防治研究的中高级工作者。主要报道内容: 国内外研究前沿的快速报道、专家述评、肿瘤临床研究、基础研究、文献综述、学术讨论、临床病理讨论、病例报道、讲座和简讯等。《中国癌症杂志》已入选中文核心期刊、中国科技核心期刊及全国肿瘤类核心期刊, 并为中国科技论文统计源期刊, 先后被“中国期刊网”、“万方数据——数字化期刊群”和“解放军医学图书馆数据库(CMCC)”等收录。

《中国癌症杂志》为月刊, 大16开, 80页铜版纸(随文彩图), 每月30日出版, 单价10元, 全年120元。国际标准刊号1007-3639, 国内统一标准刊号CN31-1727/R, 邮发代号4-575。

读者可在当地邮局订阅, 漏订者可直接向本刊编辑部订阅。

也欢迎广大作者来稿。

主 编: 沈镇宙

联系地址: 上海市东安路270号复旦大学附属肿瘤医院内

《中国癌症杂志》编辑部

邮 编: 200032

电 话: 021-64188274; 021-64175590 × 83574

网 址: www.china-oncology.com

电子邮件: zgazzz@163.com