



· 论著 ·

# TGF- $\beta$ 1通过TRAF6活化Notch3信号通路促进卵巢癌细胞迁移和侵袭的研究

周韵娇<sup>1</sup>, 王婧姝<sup>2</sup>, 梁凡<sup>2</sup>, 杨丽娜<sup>2</sup>, 杨恭<sup>1,3</sup>

1. 复旦大学附属上海市第五人民医院中心实验室, 上海 200240;
2. 复旦大学附属上海市第五人民医院妇产科, 上海 200240;
3. 复旦大学附属肿瘤医院肿瘤研究所, 上海 200032

**[摘要]** 背景与目的: 转化生长因子 $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)与Notch3在卵巢肿瘤组织中的异常表达与扩增分别与肿瘤转移和患者的低生存率有关。尽管TGF- $\beta$ 1与Notch3信号通路的交互作用促进多种肿瘤细胞的侵袭和转移, 但其具体机制尚存在争议。该研究通过体外细胞学实验, 探究TGF- $\beta$ 1与Notch3信号通路对卵巢癌细胞生物学行为的影响及其可能的相互作用机制。方法: 以上皮性卵巢癌细胞Hey A8和Hey为细胞模型, 用ELISA检测培养上清液中TGF- $\beta$ 1的表达; 分别用500 ng/mL TGF- $\beta$ 1中和抗体(对照组)、10 ng/mL TGF- $\beta$ 1、50  $\mu$ mol/L DAPT、10 ng/mL TGF- $\beta$ 1和50  $\mu$ mol/L DAPT、50  $\mu$ mol/L TRAF6多肽抑制剂、10 ng/mL TGF- $\beta$ 1和50  $\mu$ mol/L TRAF6多肽抑制剂处理细胞, 采用蛋白[质]印迹法(Western blot)检测各处理组TGF- $\beta$ 1和Notch3信号通路分子以及TRAF6蛋白表达水平的变化; 采用细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)、划痕实验和Transwell小室测定各处理组细胞增殖、迁移和侵袭能力的变化。结果: Hey A8和Hey细胞培养上清液中TGF- $\beta$ 1浓度随时间延长而明显增加; 与对照组相比, TGF- $\beta$ 1处理组Notch3-ICD、Hes1表达增加, Notch3抑制剂DAPT与TGF- $\beta$ 1共同处理组Notch3-ICD、Hes1表达水平无明显变化, TGF- $\beta$ 1明显促进细胞增殖、迁移和侵袭, Notch3抑制剂DAPT削弱了TGF- $\beta$ 1对卵巢癌细胞的促增殖、迁移和侵袭能力, 说明TGF- $\beta$ 1通过激活Notch3信号通路促进卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭; 进一步研究发现, TGF- $\beta$ 1激活Notch3信号通路的同时上调TRAF6表达, 特异性抑制TRAF6能够抑制TGF- $\beta$ 1对Notch3信号通路的激活作用。结论: TGF- $\beta$ 1可能通过TRAF6活化Notch3信号通路, 从而促进卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

**[关键词]** Notch3受体; 转化生长因子 $\beta$ 1; 肿瘤坏死因子受体相关因子6; 卵巢癌; 迁移和侵袭

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2018.02.003

中图分类号: R737.31 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2018)02-0098-07

**Transforming growth factor beta-1 promotes migration and invasion of ovarian epithelial carcinoma cells through TRAF6-mediated activation of Notch3 signaling pathway** ZHOU Yunjiao<sup>1</sup>, WANG Jingshu<sup>2</sup>, LIANG Fan<sup>2</sup>, YANG Lina<sup>2</sup>, YANG Gong<sup>1,3</sup> (1. Central Lab, the Fifth's People's Hospital of Shanghai, Fudan University, Shanghai 200240, China; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, the Fifth's People's Hospital of Shanghai, Fudan University, Shanghai 200240, China; 3. Cancer Institute, Fudan University Shanghai Cancer Center, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: YANG Gong E-mail: yanggong@fudan.edu.cn

**[Abstract]** **Background and purpose:** Abnormal expression and amplification of transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) and Notch3 in ovarian carcinoma tissues are associated with metastasis and low survival rate, respectively. The crosstalk between TGF- $\beta$ 1 and Notch3 signaling pathway promotes invasion and metastasis in various cancers. However, the mechanism is still under debate. Therefore, this study was designed, using *in vitro* cytological assays, to investigate the effects of TGF- $\beta$ 1 and Notch3 signaling pathway on ovarian cancer cell biological behavior and the potential mechanisms in terms of the crosstalk between TGF- $\beta$ 1 and Notch3 signaling pathway. **Methods:** Hey A8 and Hey cell lines were used as models in the study. The levels of TGF- $\beta$ 1 in supernatants from culture media

were measured by ELISA. Both cell lines were treated with 500 ng/mL TGF- $\beta$ 1 neutralizing antibody (control group), 10 ng/mL TGF- $\beta$ 1, 50  $\mu$ mol/L DAPT, 10 ng/mL TGF- $\beta$ 1 and 50  $\mu$ mol/L DAPT, 50  $\mu$ mol/L tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) peptide inhibitor, 10 ng/mL TGF- $\beta$ 1 and 50  $\mu$ mol/L TRAF6 peptide inhibitor, respectively. The protein expression levels of TGF- $\beta$ 1 and Notch3 signaling pathway molecules as well as TRAF6 from cell lines with different treatments were detected by Western blot. Cell proliferation, migration and invasion were tested by cell counting kit-8 (CCK-8), scratch and Transwell assays, respectively. **Results:** The levels of TGF- $\beta$ 1 were time-dependently increased in supernatants of culture media from Hey A8 and Hey cell lines. Compared with control group, TGF- $\beta$ 1 treatment increased the expression levels of Notch3-ICD and Hes1, while no obvious change was observed in the group treated with DAPT and TGF- $\beta$ 1. Moreover, TGF- $\beta$ 1 promoted cell proliferation, migration and invasion while DAPT decreased the proliferation, migration and invasion in cell lines treated with TGF- $\beta$ 1. These results indicated that TGF- $\beta$ 1 might promote proliferation, invasion and migration of ovarian epithelial cancer cells through activating the Notch3 signaling pathway. Further study showed that TGF- $\beta$ 1 up-regulated TRAF6 and activated the Notch3 signaling pathway. The activation of the Notch3 signaling pathway by TGF- $\beta$ 1 was inhibited in cells treated with the TRAF6 specific inhibitor. **Conclusions:** TGF- $\beta$ 1 may promote the proliferation, invasion and migration of ovarian epithelial carcinoma cells through TRAF6-mediated activation of the Notch3 signaling pathway.

[**Key words**] Notch3 receptor; Transforming growth factor  $\beta$ 1; Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6; Ovarian carcinoma; Migration and invasion

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤，起病隐匿，多数患者在确诊时已发生远处转移，死亡率高。近年的研究表明，卵巢肿瘤组织细胞外基质高表达的转化生长因子 $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)与卵巢癌的侵袭和转移有关<sup>[1]</sup>。已有的临床数据显示，Notch3在卵巢癌患者中的异常突变和过表达与患者的低生存率和不良预后密切相关<sup>[2-3]</sup>。本课题组前期的研究也发现，Notch3信号通路参与了卵巢癌细胞的侵袭和转移<sup>[4]</sup>。结合肺癌、乳腺癌<sup>[5-6]</sup>等肿瘤转移的机制研究，我们推测，TGF- $\beta$ 1可能通过激活Notch3信号通路，促进卵巢癌细胞的侵袭和转移。

$\gamma$ -分泌酶是Notch信号通路的分子开关。最近的研究报道， $\gamma$ -分泌酶结构蛋白中的早老蛋白presenilin 1受肿瘤坏死因子受体相关因子6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)的调控<sup>[7]</sup>。TRAF6是一种泛素连接酶，通过介导底物蛋白形成K63位多聚泛素链，参与多条信号通路的转导，促进肿瘤形成和转移<sup>[8-9]</sup>。因此我们推测，TRAF6可能作为TGF- $\beta$ 1与Notch3信号通路的接头蛋白发挥作用。为此，本研究将通过体外细胞学实验验证这些假说。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞系

上皮性卵巢癌细胞系Hey A8和Hey由美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection, ATCC)细胞库提供。

#### 1.1.2 试剂与耗材

RPMI-1640、 $\beta$ -actin单克隆抗体、TRAF6抗体、HRP(辣根过氧化物酶)偶联的二抗、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂均购自美国Sigma-Aldrich公司，胎牛血清、青链霉素购自美国Gibco公司，pSmad2/3、Notch3抗体购自美国Cell Signaling Technology公司，Hes1抗体购自美国Santa Cruz公司，TGF- $\beta$ 1中和抗体购自美国Abcam公司，TRAF6多肽抑制剂购自美国Novus Biological公司，TGF- $\beta$ 1酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒购自美国eBioscience公司，细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)购自日本同仁化学研究所，rhTGF- $\beta$ 1购自美国Peprotech公司，(3,5-二氟苯乙酰基)-L-丙氨酰基-L-2-苯基甘氨酸叔丁酯(DAPT)购自Selleck公司，ECL化学发光试剂盒、PVDF膜购自美国Millipore公司，RIPA裂解液、PMSF、BCA蛋白浓度测定试剂盒购自美国

Beyotime Biotechnology公司, Matrigel基质胶购自美国Corning公司, 96孔板、24孔板、6孔板和Transwell小室购自美国Costar公司。

### 1.1.3 仪器

酶标仪购自瑞士TECAN公司, 电泳仪和电转印槽购自美国Bio-Rad公司, 化学发光成像分析仪购自美国Protein simple公司, 倒置显微镜购自德国Leica公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞培养上清液中TGF- $\beta$ 1浓度检测

上皮性卵巢癌细胞系Hey A8和Hey以70%~75%密度接种于100 mm细胞培养皿, 用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100  $\mu$ g/mL链霉素的RPMI-1640培养基, 在37  $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub>体积分数为5%、饱和湿度条件下培养, 次日贴壁后更换为无血清培养基继续培养24 h后, 分别于0、12、24、48和72 h取细胞培养上清液1 mL, 3 000 r/min 4  $^{\circ}$ C离心10 min, -80  $^{\circ}$ C保存待测。采用ELISA检测培养上清液中的TGF- $\beta$ 1浓度, 步骤按试剂盒说明书进行。

### 1.2.2 细胞处理

Hey A8和Hey细胞根据1.2.1的方法接种, 次日贴壁后更换为1%低血清RPMI-1640培养基继续培养24 h后, 分为6组: ① 500 ng/mL TGF- $\beta$ 1中和抗体处理组(对照组); ② 10 ng/mL TGF- $\beta$ 1处理组; ③ 50  $\mu$ mol/L DAPT处理组; ④ 10 ng/mL TGF- $\beta$ 1和50  $\mu$ mol/L DAPT共同处理组; ⑤ 50  $\mu$ mol/L TRAF6多肽抑制剂处理组; ⑥ 50  $\mu$ mol/L TRAF6多肽抑制剂和10 ng/mL TGF- $\beta$ 1共同处理组。

### 1.2.3 蛋白[质]印迹法(Western blot)检测

根据1.2.2的方法处理细胞, 分别收集①~④组0、12、24和48 h的细胞样品和⑤~⑥组48 h的细胞样品, 提取细胞总蛋白, 用BCA蛋白浓度测定试剂盒定量, 取30  $\mu$ g蛋白样品上样检测。电泳前, 所有蛋白样品在100  $^{\circ}$ C水浴5 min, 经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 恒压转移至PVDF膜, 用5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 一抗4  $^{\circ}$ C温育过夜, 用TBST洗涤3遍, 随后加入HRP偶联的二抗, 室温温育1 h, 用TBST洗涤3遍, 进行ECL化学发光显色反应, 用Protein Simple化学发光成像分析仪曝光显色。

### 1.2.4 细胞增殖实验

根据1.2.1的方法常规接种Hey A8和Hey细胞于96孔板, 每组细胞接种6孔, 并根据1.2.2的方

法处理细胞, 分别于0、6、12、24、36、48和72 h用CCK-8试剂盒检测。实验步骤严格根据试剂盒说明书进行, 实验重复3次。

### 1.2.5 细胞划痕实验

Hey A8和Hey细胞根据1.2.1的方法以90%的密度接种于6孔板, 每组细胞接种3孔, 根据1.2.2的方法处理细胞, 于36 h用200  $\mu$ L移液头在单层细胞上划痕, 采用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤1次, 再加入各处理因素, 在37  $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub>体积分数为5%、饱和湿度条件下继续培养12 h, 划痕的0和12 h在倒置显微镜下观察划痕愈合情况并拍照。计算不同处理组的细胞迁移率, 实验共重复3次。

迁移率=(0 h划痕距离-12 h划痕距离)/0 h划痕距离。

### 1.2.6 细胞侵袭实验

将Matrigel基质胶(50  $\mu$ g/mL)与无血清RPMI-1640培养基以1:5比例混合, 取80  $\mu$ L混合后的Matrigel基质胶铺于8  $\mu$ m孔径的Transwell小室内, 置于24孔板, 37  $^{\circ}$ C静置6 h, 确保Matrigel基质胶充分凝固。根据1.2.2的方法处理细胞, 收集处理48 h的细胞, 用无血清RPMI-1640培养基调整各组细胞浓度为 $2.5 \times 10^5$ 个/mL, 取200  $\mu$ L细胞悬液加入上室, 下室加入600  $\mu$ L的1%低血清RPMI-1640培养基, 在37  $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub>体积分数为5%、饱和湿度条件下培养24 h后取出小室。经PBS洗涤、甲醇固定、结晶紫染色, 倒置显微镜下随机选取5个视野进行细胞计数, 以穿过Matrigel基质胶的细胞数表示细胞的侵袭能力, 每次实验设3个复孔, 实验共重复3次。

## 1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0对实验结果进行统计学分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 细胞培养上清液中TGF- $\beta$ 1浓度随时间的变化

本研究采用ELISA法检测Hey A8和Hey细胞在自然生长情况下分泌的TGF- $\beta$ 1水平。结果显示, 在12 h时, Hey A8和Hey细胞培养上清液中的TGF- $\beta$ 1浓度较0 h明显增加, 分别为(143.08 $\pm$ 46.95)pg/mL和(216.30 $\pm$ 22.21)pg/mL, 差

异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 并且随时间延长浓度明显增加, 72 h分别达到( $311.22 \pm 22.02$ ) pg/mL和( $1\ 229.24 \pm 143.47$ ) pg/mL(图1)。

因此, 为了排除细胞自然生长过程中分泌的TGF- $\beta$ 1对实验结果的影响, 后续研究以经500 ng/mL TGF- $\beta$ 1中和抗体处理的细胞作为对照。

## 2.2 TGF- $\beta$ 1通过激活Notch3信号通路促进卵巢癌细胞的增殖

本研究采用Western blot检测了经TGF- $\beta$ 1处理的上皮性卵巢癌细胞系Hey A8和Hey中TGF- $\beta$ 1通路分子pSmad2/3、Notch3受体蛋白细胞内段(Notch3-ICD)及其下游基因Hes1的蛋白表达水平。结果显示, 与对照组相比, Notch3-ICD和下游靶基因Hes1自24 h表达明显增加, 表明TGF- $\beta$ 1

激活了Notch3信号通路(图2A)。

同时, 本研究采用CCK-8检测了TGF- $\beta$ 1对卵巢癌细胞增殖能力的影响, 结果显示, TGF- $\beta$ 1明显促进卵巢癌细胞的增殖。

为了分析TGF- $\beta$ 1是否通过激活Notch3信号通路来促进卵巢癌细胞的增殖, 本研究使用Notch3抑制剂DAPT和TGF- $\beta$ 1共同处理卵巢癌细胞。Western blot检测结果显示, 50  $\mu$ mol/L的DAPT不仅能够有效抑制Notch3信号通路(图2B), 而且也抑制了TGF- $\beta$ 1对Notch3信号通路的激活作用(图2C); CCK-8检测结果也显示, 抑制Notch3信号通路能够削弱TGF- $\beta$ 1对卵巢癌细胞的促增殖能力(图2D)。由此推测, TGF- $\beta$ 1可能通过激活Notch3信号通路促进卵巢癌细胞的增殖。

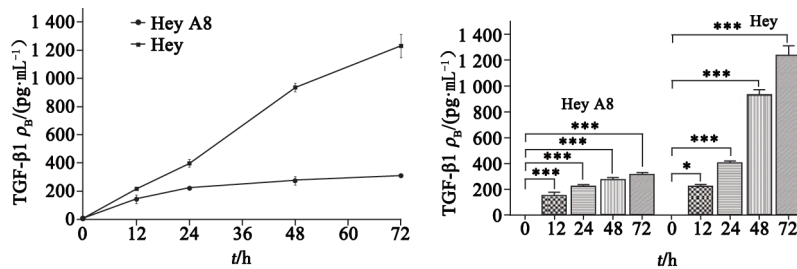


图1 ELISA法检测Hey A8和Hey细胞培养上清液中TGF- $\beta$ 1浓度随时间的变化

( $n=3$ )

Fig. 1 Concentrations of TGF- $\beta$ 1 in supernatants of cell culture medium from Hey A8 and Hey cell lines were measured by ELISA

\*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.000\ 1$ , compared with 0 h group

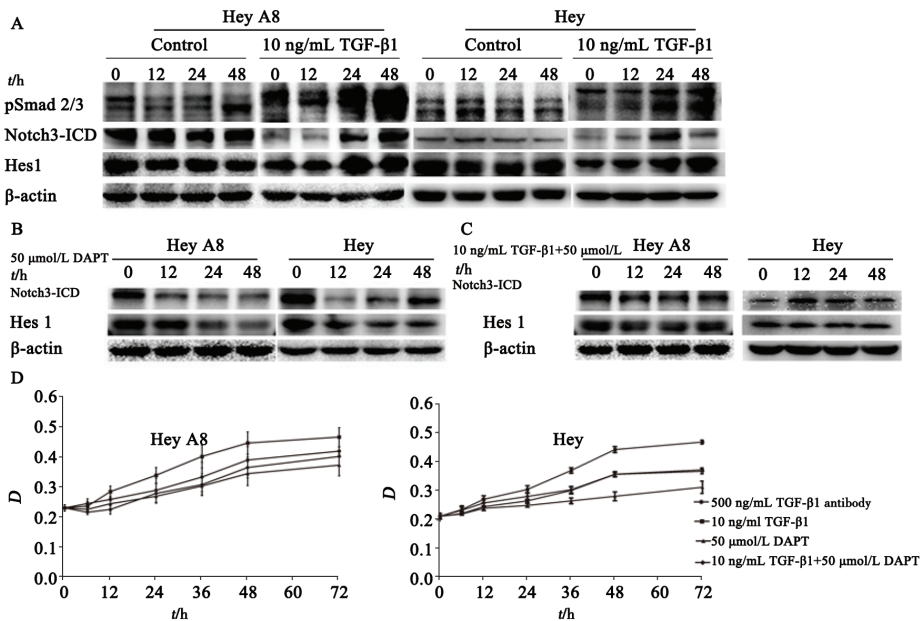


图2 不同处理组Hey A8和Hey细胞中Notch3信号通路分子表达水平和细胞增殖能力的变化

( $n=3$ )

Fig. 2 Alterations of Notch3 pathway molecules and cell proliferation in different groups of Hey A8 and Hey cell lines

The protein expression levels of pSmad2/3, Notch3-ICD and Hes1 in Hey A8 and Hey after the treatment of TGF- $\beta$ 1 (A), DAPT (B), TGF- $\beta$ 1 as well as DAPT (C) were detected by Western blot (D). The cell growth of Hey A8 and Hey after treatment with different reagents

### 2.3 Notch3信号通路活化促进卵巢癌细胞的迁移和侵袭

为了检测被TGF-β1激活的Notch3信号通路对卵巢癌细胞迁移和侵袭的影响,本研究采用划痕实验和Transwell小室检测卵巢癌细胞的迁移和侵袭能力。结果显示,对照组、10 ng/mL TGF-β1处理组、50 μmol/L DAPT处理组、10 ng/mL TGF-β1和50 μmol/L DAPT共同处理组,Hey A8细胞迁移率分别为(39.93±5.31)%、(68.92±13.92)%、(24.28±12.16)%和(37.10±17.46)%,穿孔细胞数分别为(126±7)个、(186±19)个、(18±13)个和

(84±8)个,Hey细胞迁移率分别为(38.11±5.22)%、(54.83±0.70)%、(33.73±4.44)%和(34.64±2.26)%,穿孔细胞数分别为(52±11)个、(170±16)个、(35±5)个和(111±12)个。该结果表明,与对照组相比,TGF-β1处理的Hey A8和Hey细胞迁移和侵袭能力明显增强,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );Notch3抑制剂DAPT能够抑制TGF-β1对卵巢癌细胞的促迁移和侵袭能力(图3A、3B)。由此可见,被TGF-β1激活的Notch3信号通路能够促进卵巢癌细胞的迁移和侵袭,并且在促迁移和侵袭过程中发挥重要的作用。

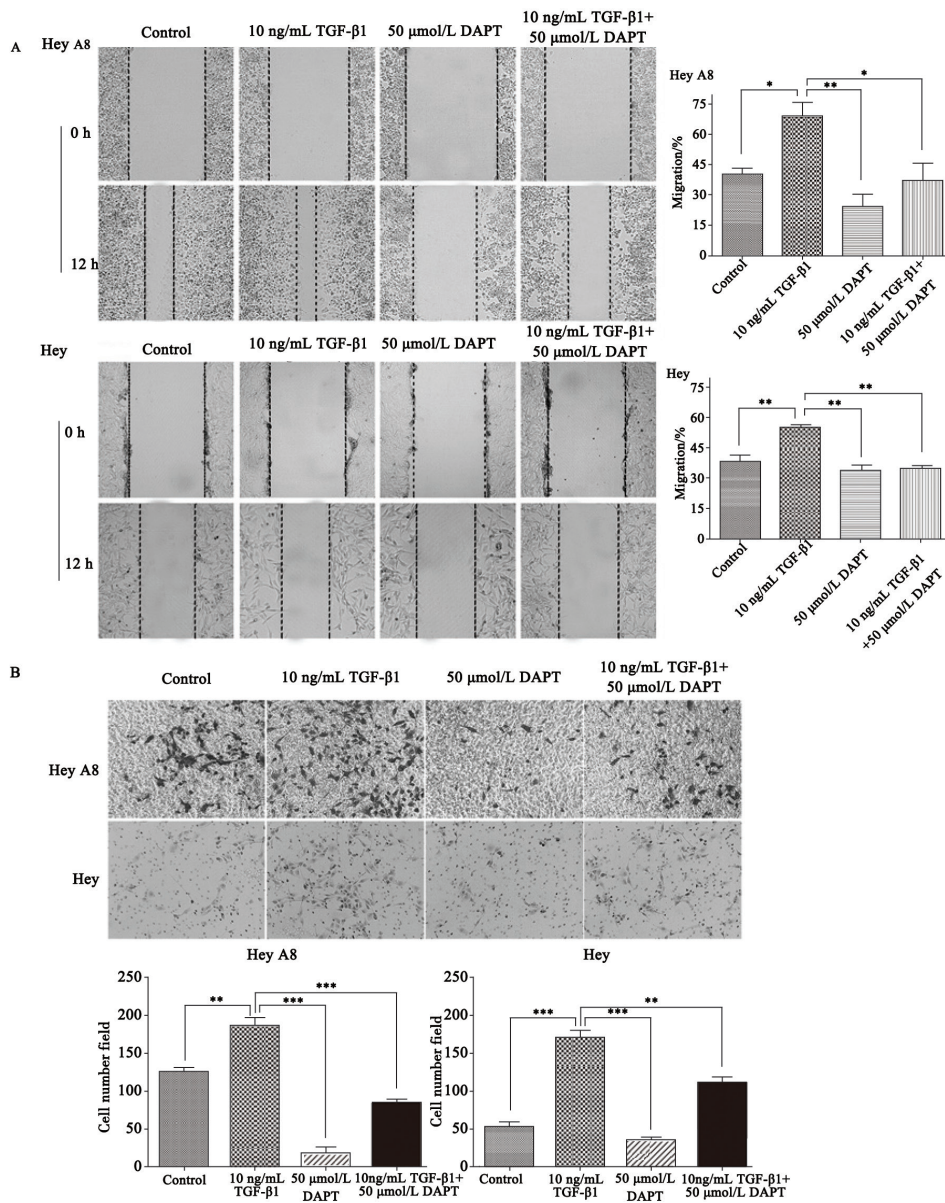


图3 不同处理组的Hey A8和Hey细胞迁移(A)和侵袭能力(B)的变化

(n=3)

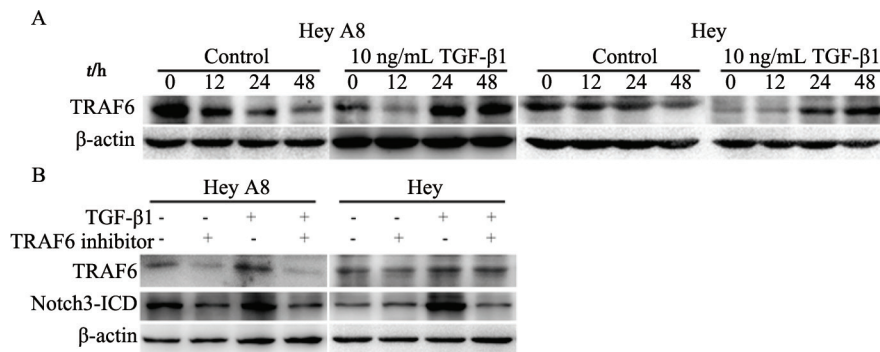
Fig. 3 Migration (A) and invasion (B) assays were performed on Hey A8 and Hey cell lines of different groups

\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.0001$ , compared with 10 ng/mL TGF-β1 group

## 2.4 TRAF6介导TGF- $\beta$ 1对Notch3信号通路的活化

TRAF6作为一个泛素连接酶,有研究报道其参与了TGF- $\beta$ 1信号转导。为此,本研究检测了TGF- $\beta$ 1激活Notch3信号通路过程中TRAF6表达水平的变化,结果发现,与对照组相比,TGF- $\beta$ 1上调Notch3-ICD蛋白表达的同时,TRAF6表达增加(图4A)。为了进一步分析Notch3信号的激活

是否由TRAF6介导,我们又采用了50  $\mu$ mol/L的TRAF6多肽抑制剂特异性抑制TRAF6的表达,观察TGF- $\beta$ 1对Notch3信号通路活化情况的影响。结果显示,抑制TRAF6蛋白的表达阻断了TGF- $\beta$ 1对Notch3信号通路的激活作用。由此可见,TRAF6可能介导了TGF- $\beta$ 1对Notch3信号通路的激活作用。



(n=3)

图4 用TGF- $\beta$ 1和TRAF6抑制剂处理的Hey A8和Hey细胞中TRAF6、Notch3-ICD表达水平变化

Fig. 4 Alterations of TRAF6 and Notch3-ICD expression levels in Hey A8 and Hey cell lines treated with TGF- $\beta$ 1 and TRAF6 inhibitor

A: The protein expression levels of TRAF6 in Hey A8 and Hey cells after TGF- $\beta$ 1 treatment; B: The protein expression levels of TRAF6 and Notch3-ICD after treated with TRAF6 inhibitor and TGF- $\beta$ 1

## 3 讨 论

卵巢癌的侵袭与转移是肿瘤患者治疗失败和死亡的主要原因。TGF- $\beta$ 1通过与多条信号通路的相互作用,促进肿瘤的形成和转移已被广泛认可<sup>[10]</sup>,卵巢癌也不例外<sup>[1]</sup>,但具体机制尚存在争议。TGF- $\beta$ 1通过与细胞表面具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性的受体相互作用,从而使内源性Smad2和Smad3磷酸化,pSmad2/3与Smad4形成三聚体入核,结合转录因子后共同调控Snail、Slug等靶基因的转录<sup>[11-12]</sup>而实现信号转导。

本课题组的前期研究表明,Notch3的活化促进卵巢癌细胞的侵袭和转移<sup>[4]</sup>。已有的临床数据显示,Notch的4个分子亚型中,Notch3分子在卵巢癌中具有癌基因的作用<sup>[13]</sup>,其异常突变和过量扩增与患者的低生存率和不良预后密切相关<sup>[2-3]</sup>。Notch分子是一个跨膜的受体蛋白,通过与相邻或自体细胞分泌的配体结合启动信号转导。结合配体后的Notch在肿瘤坏死

因子- $\alpha$ 转化酶和 $\gamma$ -分泌酶的剪切作用下裂解为细胞外和细胞内两个片段,细胞内段在 $\gamma$ -分泌酶的进一步作用下,释放细胞内结构域(Notch intracellular domain, Notch-ICD)并发生核转位,与转录因子CSL(CBF-1、suppressor of hairless、Lag-1)结合后共同调控Hes1等下游靶基因的转录<sup>[14]</sup>。

越来越多的研究表明<sup>[6, 15]</sup>,Notch3信号通路在TGF- $\beta$ 1促肿瘤侵袭和转移的过程中,发挥重要的作用,但具体的机制尚未明确。本研究结果显示,经TGF- $\beta$ 1处理的Hey A8和Hey卵巢癌细胞,Notch3-ICD和Hes1表达增加,细胞增殖、迁移和侵袭能力增强,说明Notch3信号通路被激活,并影响细胞的生物学行为;用Notch3抑制剂DAPT处理后,TGF- $\beta$ 1不再上调Notch3-ICD和Hes1的表达,细胞增殖、迁移和侵袭能力被抑制,提示TGF- $\beta$ 1可能通过激活Notch3信号通路促进卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。该研究取得了与其他肿瘤转移机制相似的结果。

在调控TGF- $\beta$ 1信号转导的多种泛素连接酶

(E3)分子中, TRAF6能够与多种跨膜受体的细胞内结构域相互作用, 介导底物蛋白形成K63位多聚泛素链, 参与NF- $\kappa$ B、Akt等信号通路的转导, 促进肿瘤血管形成和转移<sup>[8-9,16-17]</sup>。最近有研究报道, 在组成 $\gamma$ -分泌酶的3种结构蛋白中, 早老蛋白presenilin 1的活性受TRAF6调控<sup>[7]</sup>。鉴于 $\gamma$ -分泌酶是Notch3信号通路的“分子开关”, 有关TRAF6在TGF- $\beta$ 1与Notch3信号通路中的作用鲜见报道, 因此本研究对TRAF6在TGF- $\beta$ 1激活Notch3信号通路过程中的表达水平做了进一步的分析。结果显示, TGF- $\beta$ 1激活Notch3信号通路的同时, 上调了TRAF6的表达, 经TRAF6特异性抑制剂处理的卵巢癌细胞, TGF- $\beta$ 1对Notch3信号通路的激活作用被抑制。由此说明, TRAF6介导了TGF- $\beta$ 1对Notch3信号通路的激活, 并且提示TRAF6可能在TGF- $\beta$ 1与Notch3信号通路中作为接头分子发挥作用。

综上所述, 本研究通过体外细胞学实验, 表明了TGF- $\beta$ 1通过激活Notch3信号通路, 促进卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭, TRAF6可能作为TGF- $\beta$ 1与Notch3信号通路的接头分子介导这一过程。进一步研究TGF- $\beta$ 1、Notch3和TRAF6之间的作用机制, 将为临床寻找卵巢癌新的治疗靶点提供理论依据, 我们也将通过体内动物实验和临床组织标本作进一步的验证。

#### [参 考 文 献]

- [ 1 ] CHEN K, WEI H, LING S, et al. Expression and significance of transforming growth factor- $\beta$ 1 in epithelial ovarian cancer and its extracellular matrix [ J ] . *Oncol Lett*, 2014, 8(5): 2171-2174.
- [ 2 ] HU W, LIU T, IVAN C, et al. Notch3 pathway alterations in ovarian cancer [ J ] . *Cancer Res*, 2014, 74(12): 3282-3293.
- [ 3 ] LIU Z, YUN R, YU X, et al. Overexpression of Notch3 and pS6 is associated with poor prognosis in human ovarian epithelial cancer [ J ] . *Mediators Inflamm*, 2016: 5953498. [ Epub ahead of print ] .
- [ 4 ] LU L, WANG J, WU Y, et al. Rap1A promotes ovarian cancer metastasis via activation of ERK/p38 and notch signaling [ J ] . *Cancer Med*, 2016, 5(12): 3544-3554.
- [ 5 ] LIU L, CHEN X, WANG Y, et al. Notch3 is important for TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer bone metastasis by regulating ZEB-1 [ J ] . *Cancer Gene Ther*, 2014, 21(9): 364-372.
- [ 6 ] CHEN J, IMANAKA N, CHEN J, et al. Hypoxia potentiates Notch signaling in breast cancer leading to decreased E-cadherin expression and increased cell migration and invasion [ J ] . *Br J Cancer*, 2010, 102(12): 351-360.
- [ 7 ] GUDEY S K, SUNDAR R, MU Y, et al. TRAF6 stimulates the tumor-promoting effects of TGF  $\beta$  type I receptor through polyubiquitination and activation of presenilin 1 [ J ] . *Sci Signal*, 2014, 7(307): ra2.
- [ 8 ] HE A, JI R, SHAO J, et al. TLR4-MyD88-TRAF6-TAK1 complex-mediated NF- $\kappa$ B activation contribute to the anti-inflammatory effect of V8 in LPS-induced human cervical cancer SiHa cells [ J ] . *Inflammation*, 2016, 39(1): 172-181.
- [ 9 ] FENG H, LOPEZ G Y, KIM C K, et al. EGFR phosphorylation of DCBLD2 recruits TRAF6 and stimulates AKT-promoted tumorigenesis [ J ] . *J Clin Invest*, 2014, 124(9): 3741-3756.
- [ 10 ] FUXE J, VINCENT T, GARCIA DE HERREROS A. Transcriptional crosstalk between TGF- $\beta$  and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes [ J ] . *Cell Cycle*, 2010, 9(12): 2363-2374.
- [ 11 ] KAMATO D, BURCH M L, PIVA T J, et al. Transforming growth factor- $\beta$  signalling: role and consequences of Smad linker region phosphorylation [ J ] . *Cell Signal*, 2013, 25(10): 2017-2024.
- [ 12 ] FENG X H, DERYNCK R. Specificity and versatility in tgf- $\beta$  signaling through Smads [ J ] . *Annual Rev Cell Dev Biol*, 2005, 21: 659-693.
- [ 13 ] ZHANG X, SAMADI A K, ROBY K F, et al. Inhibition of cell growth and induction of apoptosis in ovarian carcinoma cell lines CaOV3 and SKOV3 by natural withanolide Withaferin A [ J ] . *Gynecol Oncol*, 2012, 124(3): 606-612.
- [ 14 ] FORTINI M E. Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation [ J ] . *Dev Cell*, 2009, 16(5): 633-647.
- [ 15 ] VAN NES J, CHAN A, VAN GRONINGEN T, et al. A Notch3 transcriptional module induces cell motility in neuroblastoma [ J ] . *Clin Cancer Res*, 2013, 19(13): 3485-3494.
- [ 16 ] KOINUMA D, SHINOZAKI M, KOMURO A, et al. Arkadia amplifies TGF- $\beta$  superfamily signalling through degradation of Smad7 [ J ] . *EMBO J*, 2003, 22(24): 6458-6470.
- [ 17 ] LUO Z, ZHANG X, ZENG W, et al. TRAF6 regulates melanoma invasion and metastasis through ubiquitination of Basigin [ J ] . *Oncotarget*, 2016, 7(6): 7179-7192.

(收稿日期: 2017-09-01 修回日期: 2017-12-28)