

# Notch 信号通路在低剂量铅暴露对卵巢癌干细胞样细胞体外致瘤功能中的作用

乔谷媛<sup>1</sup>, 申向丽<sup>3</sup>, 刘春燕<sup>2</sup>, 段海霞<sup>4</sup>, 张建彬<sup>2</sup>

1. 空军军医大学第一附属医院, 陕西 西安 710032; 2. 空军军医大学军事预防医学系, 陕西 西安 710032;  
3. 陕西中医药大学, 陕西 西安 710063; 4. 西北妇女儿童医院生殖妇科, 陕西 西安 710029

**摘要:** **目的** 探讨 Notch 信号通路改变在低剂量铅暴露对卵巢癌干细胞样细胞体外致瘤功能中的作用。 **方法** 对 SKOV3 细胞进行悬浮培养, 对其进行低剂量(2  $\mu\text{M}$ )的铅暴露。分别观察铅暴露组、对照组 SKOV3 细胞球形成率和集落形成率的差异; 通过 Western blot 检测铅暴露组与未处理组 SKOV3 细胞 Notch 信号通路的改变; 通过 Notch 信号通路的抑制剂作用 SKOV3 细胞, 检测铅暴露对 SKOV3 细胞球形成率和集落形成率的改变。 **结果** 与对照组相比, 铅暴露组 SKOV3 源性卵巢癌干细胞样细胞球形成率降低, 细胞集落形成率显著降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Notch1 和 Hes1 蛋白表达显著增加。当 Notch 信号通路被抑制后, 铅诱导的卵巢癌干细胞样细胞球形成率和集落形成率降低的趋势被逆转( $P < 0.05$ )。 **结论** 低剂量的铅暴露能够抑制 SKOV3 细胞球形成率和集落形成率, 并且在此过程中 Notch 信号通路发挥了关键作用, 抑制 Notch 信号通路能够降低铅暴露对 SKOV3 细胞球形成率和集落形成率。

**关键词:** 卵巢癌; 铅暴露; 致瘤性; Notch 信号通路

**中图分类号:** R737.31 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2019)12-1519-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.12.032

卵巢癌是威胁女性健康的重要恶性肿瘤之一, 其特点为早期不易被发现, 预后差, 近年来该病的发病率逐年上升<sup>[1-3]</sup>。Notch 信号通路参与多种组织器官的生长发育, 尤其在干细胞的增殖和发育中发挥关键作用<sup>[4]</sup>。Notch 信号通路与肿瘤的关系极为紧密, 近年来有不少的研究发现 Notch 信号通路参与了卵巢癌的发生过程, 在卵巢癌细胞中发现 Notch 信号通路的受体和配体普遍激活, 然而 Notch 信号通路的激活状态的作用不得而知<sup>[5]</sup>。Notch 是以二聚体的形式存在的一种跨膜蛋白, 它存在配体和受体, 当 Notch 的配体通过与受体的结合, 继而激活 Notch 信号通路, 从而产生一系列生物级联反应<sup>[6]</sup>。

铅广泛存在于自然界中, 微量的铅暴露作用于人体均会引起损伤效应<sup>[7]</sup>。铅暴露对肿瘤细胞的作用研究较少, 是否铅暴露能够导致卵巢癌干细胞样细胞增殖活力的降低, 值得深入研究。本研究试图揭示低剂量铅暴露对卵巢癌 SKOV3 细胞的影响, 最终阐明 Notch 信号通路在低剂量铅暴露对卵巢癌干细胞样细胞体外致瘤功能中的作用。

**基金项目:** 国家自然科学基金青年项目(No. 81602815); 陕西省自然科学基金青年项目(No. 2018JQ8005)

**作者简介:** 乔谷媛(1977-), 女, 陕西西安人, 博士, 副主任医师, 研究方向: 妇科肿瘤, 围产科学。

**通信作者:** 张建彬, Email: zjbin777@fmmu.edu.cn。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞与试剂** 人卵巢癌 SKOV3 细胞系购买于中国科学院细胞库; 兔抗人 Notch1、Hes1 和  $\beta$ -actin 抗体购买自美国 Abcam 公司。DMEM/F12 培养基、B27、重组人表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)和重组人成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)购买于 Invitrogen 公司; 辣根过氧化物酶标记兔抗鼠 IgG 二抗, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 多克隆二抗, 增强化学发光检测试剂购买自中国碧云天生物技术研究; Notch 信号通路抑制剂 MK-0752 购自美国 Sigma 生物科技有限公司。

**1.2 球细胞培养** 用含 EGF 和 FGF 生长因子、B27、胰岛素的无血清 DMEM/F12 培养基悬浮培养 SKOV3 细胞, 接种密度为  $10^4$  个细胞/孔, 种于 6 孔板中。在孵箱中悬浮培养 6 d, 得到三维克隆性生长肿瘤球( $\geq 30$  细胞); 胰蛋白酶-EDTA 消化, 常温  $200 \times g$  离心 10 min, 用巴斯管吹散获得球细胞。再以  $10^4$  个细胞/孔的密度接种于 6 孔板, 培养 6 d 后得到第 2 代球细胞, 作为卵巢癌干细胞样细胞, 用于后续的研究。

**1.3 球形成率测定** 用含 EGF 和 FGF 生长因子、B27 和胰岛素的无血清 DMEM/F12 培养基悬浮细胞, 以密度为  $10^3$  个细胞/孔, 接种到 24 孔培养板, 培养 6 d, 计数肿瘤球, 依照球形成率(%)公式计算: 每孔平均肿瘤球数/接种活细胞数( $10^3$ ) $\times 100$ 。

**1.4 集落形成试验** 首先向 6 孔板中的各孔滴加 1.0 ml 含 0.8% 琼脂糖和 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基。然后,密度为  $10^3$  个细胞/孔、0.4% 琼脂糖和 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基 1.0 ml 接种在每个孔中。每 4 d 添加 1.0 ml 含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 的培养基,共孵育 2 周。最后在倒置显微镜上常规计数集落 ( $\geq 20$  细胞)。计算琼脂集落形成率,公式:每孔平均集落数/接种活细胞数 ( $10^3$ )  $\times 100$  计算。

**1.5 Western blot 试验** 提取细胞的蛋白,用预冷的 PBS 液洗涤 2 次,加入 1.0 ml RIPA 缓冲液,冰上裂解 20 min,12 500 r/min、4  $^{\circ}\text{C}$  下离心 10 min。用 Bradford 试剂盒检测各组蛋白质浓度。每组用含 50  $\mu\text{g}$  蛋白细胞裂解物用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。然后,转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。以抗 Notch 1, Hes1 和抗  $\beta$ -actin 抗体作为一抗,使用 ECL 试剂盒检测印迹信号。

**1.6 铅暴露处理** 将前期得到的卵巢癌干细胞样细胞加入 2  $\mu\text{M}$  的醋酸铅溶液进行混合培养。

**1.7 统计学分析** 使用 SPSS 20.0 进行统计学分析,数据表示为均数  $\pm$  标准差。两组间均数比较用 Student's *t* 检验,多组均数比较用 One-way ANOVA 方差分析(多组之间的两两比较采用 SNK-*q* 检验), $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 铅暴露对 SKOV3 源性卵巢癌干细胞样细胞球形成率的影响** 细胞以密度为  $10^3$  个细胞/孔,接种到 24 孔培养板,实验组用 2  $\mu\text{M}$  的醋酸铅溶液进行处理,对照组不添加任何物质,培养 6 d,计算细胞球形成率。结果提示,铅暴露组与对照组相比,细胞球形成率显著降低(图 1),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

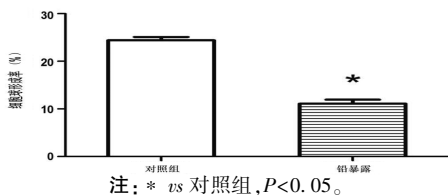
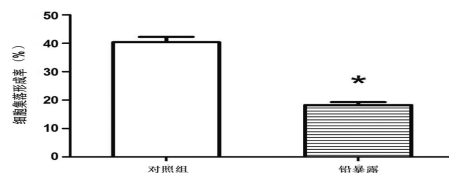


图 1 铅暴露对 SKOV3 源性卵巢癌干细胞样细胞球形成率的影响

**2.2 铅暴露对 SKOV3 源性卵巢癌干细胞样细胞集落形成率的影响** 细胞以密度为  $10^3$  个细胞/孔接种于六个孔中。每 4 d 添加 1.0 ml 含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 的培养基,铅暴露组的浓度为 2  $\mu\text{M}$  的醋酸铅,对照组为不添加任何物质,共孵育 2 周,计算细胞球形成率。结果提示,铅暴露组与对照组相比,细胞

集落形成率显著降低(图 1),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。



注: \*  $P < 0.05$ , vs 对照组,差异有统计学意义。

图 2 铅暴露对 SKOV3 源性卵巢癌干细胞样细胞集落形成率的影响

**2.3 Notch 信号通路在 SKOV3 源性卵巢癌干细胞样细胞铅暴露后的改变** 运用 Western blot 检测铅暴露组与对照组两组细胞蛋白样本的 Notch1 和 Hes1 的蛋白表达,观察 Notch 信号通路在铅暴露对 SKOV3 源性卵巢癌干细胞样细胞的改变。结果提示,铅暴露组与对照组相比,Notch1 和 Hes1 蛋白表达显著增加。

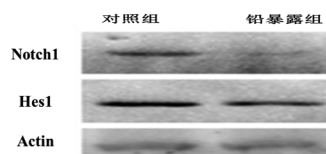
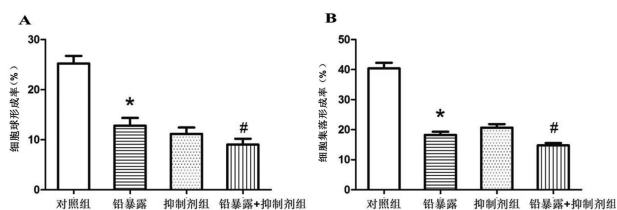


图 3 Western blot 检测铅暴露对 SKOV3 源性卵巢癌干细胞样细胞 Notch 信号通路的影响

**2.4 抑制 Notch 信号通路后对 SKOV3 源性卵巢癌干细胞样细胞球形成率和集落形成率的影响** 运用 Notch 信号通路的抑制剂 MK-0752 在铅暴露的同时进行干预,观察 Notch 信号通路抑制后,SKOV3 源性卵巢癌干细胞样细胞球形成率和集落形成率的改变。结果提示,当 Notch 信号通路被抑制后,铅诱导的卵巢癌干细胞样细胞球形成率和集落形成率降低的趋势被逆转,且差异有统计学意义。



注: \*  $P < 0.05$ , vs 对照组; #  $P < 0.05$ , vs 铅暴露组,差异有统计学意义。

图 4 抑制剂干预后,铅暴露对 SKOV3 源性卵巢癌干细胞样细胞球形成率(A)、细胞集落形成率(B)的影响

## 3 讨论

铅作为一种重金属,对细胞具有一定的毒性作用<sup>[8-10]</sup>。按此理论,铅对肿瘤细胞也可能具有一定的毒性作用。本研究试图揭示铅暴露对卵巢癌肿瘤细胞的作用效果。在本项研究中,观察了低剂量的铅对 SKOV3 细胞系第 2 代球细胞成球率和集落形成率的