

· 讲座 ·

Notch3 的表达与乳腺癌发生发展的关系

陈春发 豆晓伟 张国君

Notch 受体家族是一类高度保守的 I-型跨膜糖蛋白,除了调节细胞的分化、增殖、自我更新和生存外,在决定细胞命运中起着重要的作用。Notch3 基因是在哺乳动物中发现的第三个 Notch 家族成员,因此命名为 Notch3 基因,起初描述是表达在增殖的神经上皮细胞上^[1],它的异常可导致伴有皮质下梗死及白质脑病的常染色体显性遗传性脑动脉病(cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy, CADASIL),一种可致中风和痴呆的遗传性小血管脑病^[2]。尽管 Notch3 受体与其他 Notch 受体家族成员的结构存在高度相似性,以及其作用机制类似,但越来越多的研究发现 Notch 家族成员之间的结构不同,其功能也不相同。他们激活后所召集的蛋白不同,激活的信号通路不同,最终调控的结果就不相同。Notch3 受体异常与人类多种恶性肿瘤之间的关系逐渐被研究人员所注意,它不仅参与乳腺发育的调控,而且其异常同样与乳腺癌的发生发展有关。这种致癌作用可能是通过与其他信号通路共同作用完成的,抑制 Notch3 信号通路可能成为靶向治疗乳腺癌的一个新方法。

1 Notch 3 受体蛋白的概述

1.1 Notch3 受体蛋白的结构与激活

完整的 Notch 信号通路由 Notch 受体、Notch 配体、细胞内效应分子(CBF-1/RBP-J κ , suppressor of hairless and Lag-1, CSL)蛋白和其他相关分子等组成。目前在哺乳动物中发现有 4 种 Notch 受体(Notch1~4)以及 5 种配体,这些配体分别命名为 Delta-like-1、Delta-like-3、Delta-like-4(DLL1、3、4)和 Jagged1、Jagged2(JAG1、2)。Notch3 受体蛋白与其他家族成员具有相似的基本结构,由胞外区、跨膜区及胞内区三部分组成。胞外区包括三部分:可与配体结合的 34 个表皮生长因子样(epithelial growth factor-like, EGFL)重复序列,可阻止非配体依赖性信号转导的 3 个富含半胱氨酸的 LIN 重复序列(Lin-Notch repeats, LNR)以及 1 个异二聚体区域。它们的主要功能是和配体结合并激活 Notch

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2012.06.012

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30973377);国家重点基础研究发展计划(973)(2011CB70770)

作者单位:515041 广东 汕头,汕头大学医学院附属肿瘤医院乳腺中心;汕头大学医学院肿瘤研究中心

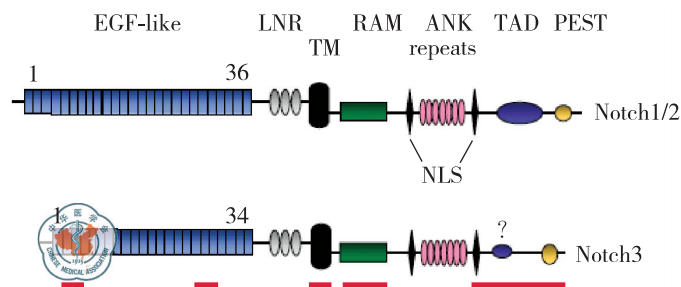
通信作者:张国君, E-mail: guoj_zhang@yahoo.com

信号通路。胞内区包括接近胞膜(RBP-jk-associated molecule, RAM)区域、7 个连续性锚蛋白(ankyrin repeat, ANK)重复区域、2 个核定位信号区(nuclear localization signal, NLS)、1 个退化的转录激活结构域(transactivation domain, TAD)和羧基端富集脯氨酸-谷氨酸-丝氨酸-苏氨酸(proline-glutamate-serine-threonine, PEST)序列。

Notch3 受体蛋白同样在内质网上合成,然后被运送至高尔基体内,在弗林(Furin)蛋白酶的作用下发生第 1 次裂解,断裂的两个结构以非共价键的方式连接成异二聚体。形成的 Notch3 前体在被运输到细胞表面之前被 Fringe 家族进行糖基化修饰成为成熟的 Notch 受体,并表达在膜上。当细胞上特定配体与相邻细胞 Notch3 受体胞外区域结合后 Notch3 信号通路被激活。随后发生第 2、3 次裂解。第 2 次裂解是在肿瘤坏死因子 α 转化酶(tumor necrosis factor α converting enzyme, TACE)的作用下发生的,产生了一个短暂的、包括跨膜区和胞内区的蛋白结构。紧接着被 γ -分泌酶膜蛋白复合物识别,并在它的作用下发生第 3 次裂解,从膜上释放可溶性的 Notch3 胞内域(intracellular domain, ICD), ICD 能够进入核内,与 CSL 转录因子和转录共激活物(mastermind-like, MAML)家族结合产生作用,调节下游靶基因的表达。

1.2 Notch3 受体蛋白与其他家族成员结构的差异

Notch3 基因位于 19q12 染色体上,由 33 个外显子组成,编码 1 个由 2321 个氨基酸组成的跨膜蛋白受体。因为是在哺乳动物身上发现的第 3 个 Notch 家族成员,因此命名为 Notch3。尽管和 Notch 家族其他成员有相似的基本结构,但 Notch3 还是显示出一些结构上的差异,其中最明显的地方是大大缩短的 TAD 区域(图 1)^[3]。相对于 Notch1 和 Notch2,在某种程度上表明 Notch3 胞内区域的超激活活性较弱。此外,轻微的差别还表现在胞外区域,不同 Notch 家族成员其胞外区域的 EGFL 重复序列数不同:Notch1、2 各含有 36 个,Notch3 含有 34 个,Notch4 含有 29 个^[4]。且 Notch3 缺少相当于 Notch1 和 Notch2 的 EGF 重复序列 21 片段和 2、3 片段间的部分片段^[1]。最后,也有人报道胞内区域其他结构的不同。在比较 Notch1 和 Notch3 的胞内结构的不同区域时发现:在锚蛋白重复区域的氨基酸相似度最高,达到 72%,而在 RAW 区域和羧基端,以及由 Beatus 等^[5]描述的在锚蛋白重复区域和羧基端之间的 RE/AC(repression/activation)区域,氨基酸相似度就明显下降,分别为 41%、21% 和 50%。这些不同或许能解释 Notch3 胞内片段在召集共激活物和/或共抑制物及经受不同构型的改变所出现的不同作用,因此,不能排除这些细微结构的不同可能在调节 Notch 蛋白在胞内的生产、修饰、装配,在膜上表达、裂解,以及最终召集不同蛋白之间存在着差异性。



Notch3 结构下方的红色标记显示主要的不同区域,问号表明有争议的转录激活结构域^[5]; EGF-like:表皮生长因子样; LNR: Lin-Notch 重复序列; TM:跨膜区; RAM:接近胞膜区; ANK repeats:锚蛋白重复区域; TAD:转录激活结构域; PEST:脯氨酸-谷氨酸-丝氨酸-苏氨酸

图 1 Notch3 与 Notch1/2 的结构差异

2 Notch3 与肿瘤的关系

自从 Bellavia 等^[6-7]发现上调 T 淋巴细胞系中的 Notch3-ICD 后,在小鼠动物模型中可以诱导 T 淋巴细胞白血病的发生和复发人类急性 T 淋巴细胞白血病(T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL)的患者中存在 Notch3 过表达。越来越多的研究表明:Notch3 基因的扩增和 Notch3 蛋白的过表达存在于人类多种恶性肿瘤中。Indraccolo 等^[8]进一步验证 Bellavia 等之前的发现,报道了肿瘤微环境中表达 Notch 配体 DLL4 后能上调 Notch3 的表达,使 T-ALL 癌细胞逃避凋亡,引起肿瘤的发生。Gramantieri 等^[9]发现与肝硬化患者相比,肝细胞癌患者存在 Notch3 mRNA 上调,表明 Notch3 的异常激活可能与肝细胞癌的发生有关。Notch3 的异常表达也发生在消化道的其他肿瘤中。Serafin 等^[10]通过基因芯片检测表明:Notch3 转录水平与正常黏膜相比,在原发性和转移性大肠癌标本中明显上调。同样,在妇科恶性肿瘤中也存在 Notch3 的异常表达。与宫颈正常组织和宫颈上皮内瘤变相比,宫颈鳞状细胞癌显示 Notch3 高表达^[11]。Park 等^[12-13]先后在原发性和复发性浆液性卵巢癌组织中检测到高表达的 Notch3。最后,乳腺癌中同样也存在 Notch3 的高表达^[14]。综上所述,人类的多种恶性肿瘤中存在 Notch3 异常表达表明了 Notch3 信号通路参与肿瘤发生的调控,目前这种机制尚不清楚,还需进一步研究。

3 Notch3 与乳腺的关系

3.1 Notch3 在乳腺发育中的作用

Raafat 等^[15]用定量方法检测了出生后小鼠乳腺腺体 Notch 受体和它们配体的基因以及靶基因的水平 and mRNA 表达水平,分析出生后乳腺腺体发育的不同阶段的 Notch mRNA 水平时发现:Notch3 mRNA 的水平在所有受体基因

中最高。随后用免疫组织化学方法检测 Notch 受体,证实了 Notch 受体表达在
小鼠正常乳腺上皮细胞中。这些结果明确了 Notch 受体的表达贯穿于小鼠乳
腺腺体发育的过程中,而 Notch3 或许在乳腺的发育中起着重要的作用。而
Hu 等^[14]研究发现高表达 Notch3 ICD 的转基因小鼠在乳腺发育过程中因导管
及小叶腺泡受损而无法哺育自己的幼仔,甚至导致乳腺肿瘤的形成。这些研
究表明 Notch3 受体在小鼠乳腺的生长发育中起着重要的作用,而过表达
Notch3 又可以使腺体结构受损,引起肿瘤形成。目前这方面机制尚不清楚,
Notch3 在人类的乳腺发育过程中是否也起到同样的作用,还需进一步研究证实。

3.2 Notch3 与乳腺癌的关系

已经有研究表明 Notch3 信号通路的异常可导致人类多种恶性肿瘤疾病
的发生,包括:T-ALL、肝癌、结肠癌、宫颈癌、卵巢癌等^[6-13]。同样,近年研究表
明 Notch3 信号异常也和乳腺癌的形成有关。Hu 等^[14]发现高表达 Notch3 ICD
的转基因小鼠不仅存在乳腺发育障碍,而且可导致乳腺癌的发生。Notch3 在
乳腺癌中的作用机制中仍不清楚,这种致癌作用可能一部分是与其他信
号通路相互作用共同完成的。笔者在下文列举了雌激素信号通路、HER-2 信
号通路两条信号通路与 Notch3 通路相互作用导致乳腺肿瘤发生。

3.2.1 Notch3 与 HER-2 信号通路:乳腺上皮细胞 HER-2 的表达与 Notch 信 号通路有关,它们之间可能存在正反馈的关系。一方面,HER-2 的启动子包含 有能与 CBF-1 和 Notch-ICD 组成转录复合物的转录因子结合的序列^[16],说明 了 Notch3 或许可以通过其 ICD 上调 HER-2 的表达;另一方面,HER-2 的表达 又可上调 Notch3 的表达,促进肿瘤细胞的增殖。将转染了 HER-2 的 MCF10A-HER-2 乳腺上皮细胞和 MCF10A 乳腺上皮细胞培养在细胞外基质三 维的球状体上,MCF10A-HER-2 细胞能逃避凋亡向管腔内生长而 MCF10A 细 胞却长成一个空心管腔状。这种逃避凋亡、管腔内填充的生长方式需要上调 由 Notch3 组成的信号通路。Notch3 裂解释放胞内片段转录上调 HES1,引起 c-MYC 和 cyclin D1 水平升高,调节细胞周期,加快肿瘤细胞增殖生长^[17]。而 有学者却认为 Notch3 参与 HER-2 阴性的乳腺癌细胞的调控,如 Yamaguchi 等^[18]发现通过 siRNA 干扰 Notch3 及其下游的靶基因 CSL 后都能显著抑制 HER-2 阴性肿瘤细胞的增殖和促进肿瘤细胞凋亡,而对 HER-2 阳性的肿瘤细 胞影响甚微,这种作用可能通过核转录因子 κ B(NF κ B)或者丝裂原活化蛋白 激酶(MAPK)/AKT 信号通路激活不同类型的肿瘤细胞产生。这表明 Notch3 信号通路的激活在参与不同类型的 HER-2 肿瘤细胞的调控过程中作用不同。 目前,Notch3 和 HER-2 之间的相互作用促进乳腺癌发生的机制尚不清楚,还 有待进一步研究。

3.2.2 Notch3 与 ER 信号通路: Hirose 等^[19]研究表明干扰 MCF7 细胞中 Notch3 或 CBF 的表达能明显抑制肿瘤细胞的生长,这种抑制作用可能通过与雌激素受体相互作用发生。Notch3 信号通路和雌激素受体信号通路与乳腺肿瘤的生长、增殖有关,是否存在 Notch3 与 ER 协同作用目前尚不清楚。近来 Rizzo 等^[20]研究表明雌激素受体阳性的乳腺癌患者耐药的产生可能与 Notch 信号通路有关。大约有 80% 的乳腺癌患者 ER 受体呈阳性表达,这部分患者需要内分泌治疗,但其中常部分患者出现耐药。其中耐药机制可能是通过 Notch 信号通路产生的。在缺乏雌激素作用下,Notch 信号能够激活并能直接刺激 ER- α 依赖转录因子,这种作用明显强于抗雌激素作用。因此,Notch3 可能在没有雌激素的作用下激活雌激素信号通路,促进肿瘤细胞增殖生长。

4 与 Notch3 通路相关的乳腺癌靶向治疗

Notch3 信号异常与人类多种肿瘤的形成有关,抑制 Notch3 信号通路可作为治疗癌症的一种新的靶向治疗。Konishi 等^[21]通过 γ -分泌酶抑制剂和 siRNA 作用于高表达 Notch3 和低表达 Notch3 的肺癌细胞株,高表达 Notch3 的细胞株出现明显增殖抑制和细胞凋亡;同样,Chen 等^[22]用 siRNA 干扰 Notch3 后,在体外能显著抑制 T-ALL 细胞的增殖和凋亡,在体内能抑制肿瘤的形成。既然 Notch3 在乳腺的发育过程中起着重要的作用,其异常表达可引起乳腺癌的发生,那么抑制 Notch3 信号通路也可能为治疗乳腺癌提供一条新的方向。Yamaguchi 等^[18]下调 Notch3 或 CSL 后能显著抑制 HER-2 阴性肿瘤细胞的增殖和促进肿瘤细胞凋亡,表明 Notch-CSL 信号轴参与 HER-2 阴性的乳腺癌细胞的增殖。同样,Pradeep 等^[17]发现 HER-2-Notch3 的共同作用可促使乳腺导管内癌的发生,使用 HER-2 或 Notch3 其中任一种药物阻断后可以恢复正常表型。而且,近来 Hirose 等^[19]研究显示了 HER-2(-) 的乳腺癌起始细胞明显高表达 Notch3,干扰 Notch3 后能明显增加 HER-2(-) 的乳腺癌起始细胞对放射治疗的敏感性。这些结果表明:Notch3 信号通路的激活对肿瘤的生长和增殖是必需的,抑制 Notch3 信号通路可能是靶向治疗乳腺癌的一个新的方向,联合放射治疗可能对治疗乳腺癌干细胞提供一个令人憧憬的未来。

5 结语

综上所述,Notch 的不同结构可能在调节 Notch 蛋白在胞内的生产、修饰、装配,在膜上表达、裂解,以及最终召集不同蛋白之间存在着差异性。Notch3 与其他家族成员结构的不同,表明其功能作用也不相同。Notch3 信号通路的异常与人类多种恶性肿瘤的发生有关,其中包括了乳腺癌,它在乳腺癌

发生及发展中起重要作用逐渐被认识,但其具体的作用机制尚不清楚。是否是 Notch3 信号通路的异常使细胞的增殖发生障碍,从而导致乳腺癌的发生,还是 Notch3 信号通路与其他信号通路相互作用引起的,目前还不清楚。以 Notch3 信号通路为靶点的抗肿瘤药物以及联合放疗有望成为一种新的有效的治疗手段,具有广阔应用前景,但其疗效如何,长期使用的副作用,及如何实现肿瘤靶向治疗的个体化等均待进一步探讨。

【关键词】 乳腺肿瘤;糖蛋白类;Notch3 受体;Notch3 信号通路

【中图法分类号】 R737.9 【文献标志码】 A

参考文献

- [1] Lardelli M, Dahlstrand J, Lendahl U. The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium[J]. *Mech Dev*, 1994, 46(2):123-136.
- [2] Joutel A, Corpechot C, Ducros A, et al. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia[J]. *Nature*, 1996, 383(6602):707-710.
- [3] Bellavia D, Checquolo S, Campese AF, et al. Notch3: from subtle structural differences to functional diversity[J]. *Oncogene*, 2008, 27(38):5092-5098.
- [4] Wu F, Stutzman A, Mo YY. Notch signaling and its role in breast cancer[J]. *Front Biosci*, 2007, 12(1):4370-4383.
- [5] Beatus P, Lundkvist J, Oberg C, et al. The origin of the ankyrin repeat region in Notch intracellular domains is critical for regulation of HES promoter activity[J]. *Mech Dev*, 2001, 104(1/2):3-20.
- [6] Bellavia D, Campese AF, Alesse E, et al. Constitutive activation of NF-kappaB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice[J]. *EMBO J*, 2000, 19(13):3337-3348.
- [7] Bellavia D, Campese AF, Checquolo S, et al. Combined expression of pTalpha and Notch3 in T cell leukemia identifies the requirement of preTCR for leukemogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(6):3788-3793.
- [8] Indraccolo S, Minuzzo S, Masiero M, et al. Cross-talk between tumor and endothelial cells involving the Notch3-Dll4 interaction marks escape from tumor dormancy[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(4):1314-1323.
- [9] Gramantieri L, Giovannini C, Lanzi A, et al. Aberrant Notch3 and Notch4 expression in human hepatocellular carcinoma[J]. *Liver Int*, 2007, 27(7):997-1007.
- [10] Serafin V, Persano L, Moserle L, et al. Notch3 signalling promotes tumour growth in colorectal cancer[J]. *J Pathol*, 2011, 224(4):448-460.
- [11] Yeasmin S, Nakayama K, Rahman MT, et al. Expression of nuclear Notch3 in cervical squamous cell carcinomas and its association with adverse clinical outcomes[J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 117(3):409-416.
- [12] Park JT, Li M, Nakayama K, et al. Notch3 gene amplification in ovarian cancer[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(12):6312-6318.
- [13] Park JT, Chen X, Trope CG, et al. Notch3 overexpression is related to the recurrence of ovarian cancer and confers resistance to carboplatin[J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(3):1087-1094.
- [14] Hu C, Dievart A, Lupien M, et al. Overexpression of activated murine Notch1 and Notch3 in transgenic mice blocks mammary gland development and induces mammary tumors[J]. *Am J Pathol*, 2006, 168(3):973-990.
- [15] Raafat A, Goldhar AS, Klauzinska M, et al. Expression of Notch receptors, ligands, and target genes during development of the mouse mammary gland[J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(7):1940-1952.
- [16] Chen Y, Fischer WH, Gill GN. Regulation of the ERBB-2 promoter by RBPJkappa and NOTCH[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(22):14110-14114.
- [17] Pradeep CR, Köstler WJ, Lauriola M, et al. Modeling ductal carcinoma in situ: a HER2-Notch3 collaboration enables luminal filling[J]. *Oncogene*, 2012, 31(7):907-917.

- [18] Yamaguchi N, Oyama T, Ito E, et al. NOTCH3 signaling pathway plays crucial roles in the proliferation of ErbB2-negative human breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2008, 68(6):1881-1888.
- [19] Hirose H, Ishii H, Mimori K, et al. Notch pathway as candidate therapeutic target in Her2/Neu/ErbB2 receptor-negative breast tumors[J]. Oncol Rep, 2010, 23(1):35-43.
- [20] Rizzo P, Miao H, D'Souza G, et al. Cross-talk between notch and the estrogen receptor in breast cancer suggests novel therapeutic approaches[J]. Cancer Res, 2008, 68(13): 5226-5235.
- [21] Konishi J, Kawaguchi KS, Vo H, et al. Gamma-secretase inhibitor prevents Notch3 activation and reduces proliferation in human lung cancers[J]. Cancer Res, 2007, 67(17):8051-8057.
- [22] Chen X, Stoeck A, Lee SJ, et al. Jagged1 expression regulated by Notch3 and Wnt/beta-catenin signaling pathways in ovarian cancer[J]. Oncotarget, 2010, 1(3):210-218.

(收稿日期:2012-09-04)

(本文编辑:刘军兰)

陈春发, 豆晓伟, 张国君. Notch3 的表达与乳腺癌发生进展的关系[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2012, 6(6):681-687.

