

JAG1影响血管生成并促进三阴性乳腺癌细胞的迁移、侵袭和粘附

刘俊平, 石宇彤, 吴敏敏, 徐梦岐, 张凤梅, 何志强, 唐敏

重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016

摘要:目的 探究JAG1对三阴性乳腺癌(TNBC)恶性表型的影响,并研究乳腺癌微环境血管生成的机制。方法 体外培养人TNBC细胞231和231B, Q-PCR实验检测Notch相关分子的表达水平。动物实验将雌性裸鼠分为231组和231B组, 5只/组, 乳腺脂肪垫分别注射231和231B细胞 1×10^6 /只。4~6周取肿瘤组织进行免疫组化和免疫荧光实验。使用JAG1重组蛋白处理231细胞和DAPT处理231B细胞, 实验分4组: 231空白对照组; rJAG1处理231组; 231B空白对照组; DAPT处理231B组。用CCK-8法、Hoechst 33258染色实验、划痕愈合实验、Transwell小室实验和内皮细胞粘附实验检测TNBC的生物学特性变化。使用Western blot检测231和231B生物学特性相关蛋白的水平。接下来体外培养血管内皮细胞HUVEC, TNBC条件培养基处理HUVEC, 实验分5组: (1)HUVEC阴性对照组; (2)231空白条件培养基处理组; (3)rJAG1处理231的条件培养基处理组; (4)231B空白条件培养基处理组; (5)DAPT处理231B的条件培养基处理组。CCK-8实验和基质胶成管实验分别检测HUVEC的增殖与成管能力。结果 与231细胞相比, 231B表达更高的JAG1($P < 0.05$)。231B肿瘤表达更高的VEGFA和CD31。与231空白组相比, rJAG1处理组中231细胞的迁移、侵袭和粘附能力明显受到促进($P < 0.05$)。Twist1和Snail的蛋白水平均增加(均 $P < 0.01$), 抗凋亡蛋白Bcl-2表达量增加($P < 0.05$), 而DAPT明显抑制231B的相关现象和指标。JAG1过表达的条件培养基增加了HUVEC的细胞数以及成管数量($P < 0.05$)。结论 JAG1可能影响TNBC的恶性表型, 并促进微环境的血管生成。

关键词: JAG1; 三阴性乳腺癌; 血管生成; 血管内皮细胞生长因子; 肿瘤微环境

JAG1 promotes migration, invasion, and adhesion of triple-negative breast cancer cells by promoting angiogenesis

LIU Junping, SHI Yutong, WU Minmin, XU Mengqi, ZHANG Fengmei, HE Zhiqiang, TANG Min

Key Laboratory of Clinical Laboratory and Diagnostics of Ministry of Education, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To investigate the effect of JAG1 on the malignant phenotype of triple-negative breast cancer (TNBC) and its role in angiogenesis in breast cancer microenvironment. **Methods** The expressions of Notch molecules were detected in human TNBC 231 and 231B cells using RT-qPCR. Five female nude mice were inoculated with 231 cells and another 5 with 231B cells into the mammary fat pads, and 4-6 weeks later, the tumors were collected for immunohistochemical and immunofluorescence tests. 231 cells and 231B cells were treated with recombinant JAG (rJAG) protein and DAPT, respectively, and changes in their malignant phenotypes were assessed using CCK-8 assay, Hoechst 33258 staining, wound healing assay, Transwell chamber assay and endothelial cell adhesion assay. Western blotting was used to detect the changes in the expressions of proteins related with the malignant phenotypes of 231 and 231B cells. The effects of conditioned medium (CM) derived from untreated 231 and 231 B cells, rJAG1-treated 231 cells and DAPT-treated 231B cells on proliferation and tube formation ability of cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were evaluated using CCK-8 assay and tube-forming assay. **Results** The expression of JAG1 was higher in 231B cells than in 231 cells ($P < 0.05$). Tumor 231B showed higher expression of VEGFA and CD31. Compared with 231-Blank group, the migration, invasion and adhesion of 231 cells in 231-rJAG1 were significantly enhanced ($P < 0.05$). Protein levels of Twist1 and Snail increased ($P < 0.01$), anti-apoptotic protein Bcl-2 increased ($P < 0.05$), while DAPT inhibited the related phenomena and indicators of 231B. The 231-rJAG1-CM increased the cell number and tubule number of HUVEC ($P < 0.05$). **Conclusion** JAG1 may affect the malignant phenotype of TNBC and promote angiogenesis in the tumor microenvironment.

Keywords: JAG1; triple-negative breast cancer; angiogenesis; vascular endothelial cell growth factor-A; tumor microenvironment

三阴性乳腺癌(TNBC)患者得益于早期筛查和联合治疗, 5年生存率得到了显著提高^[1], 但由于TNBC与其他类型乳腺癌相比, 其更容易发生侵袭、转移和复发^[2], 且不能从内分泌或分子靶向治疗中获益, 四期TNBC患者的5年生存率仅为28%左右^[3,4]。TNBC较高的血管密度为肿瘤生长提供大量的营养物质^[5,6], 从而促进

其恶性进展和侵袭转移^[7], 因此靶向血管生成可能是其治疗的突破口之一。目前TNBC抗血管治疗主要以血管内皮细胞生长因子(VEGF)信号通路为靶点, 代表药物有贝伐单抗、阿帕替尼等, 但临床试验^[8]显示, 用药后TNBC患者的总生存期(OS)无明显改善, 并且由于替代性促血管生成因子的上调^[9-11], 耐药也成为抗血管治疗的重要挑战。关于肿瘤血管生成, 目前较为明确的是VEGF^[12]和DLL4/Notch1^[13,14]信号通路。Notch信号在进化过程中较为保守, 几乎在所有器官中表达, 协调细

收稿日期: 2022-02-08

作者简介: 刘俊平, 在读硕士研究生, E-mail: jp666@stu.cqmu.edu.cn

通信作者: 唐敏, 博士, E-mail: catom@126.com; tangmin@cqmu.edu.cn

胞增殖、分化和凋亡,决定细胞命运^[15];其有4个受体(Notch1, Notch2, Notch3, Notch4)和5个配体(JAG1, JAG2, DLL1, DLL3, DLL4^[16]),与乳腺癌的发生发展关系已经得到证实,但不同配体和受体其的作用具有一定异质性,比如JAG1与乳腺癌的骨转移和不良预后相关^[17];缺氧诱导的JAG2可以促进乳腺癌转移和干细胞的自我更新^[18];DLL1通过影响细胞增殖和血管生成来促进管腔型乳腺癌的肿瘤生长和转移^[19],并且DLL1与乳腺癌化疗耐药有关^[20];DLL4在乳腺癌细胞中也过表达,并与淋巴结和远处转移有关^[21]。众所周知,Notch1在乳腺癌中主要作为癌基因发挥作用,而Notch2在乳腺癌中的具体作用仍然不明确^[22]。Notch3通过抑制乳腺癌的EMT从而抑制肺转移^[23],但是也有功能研究^[24-26]证明Notch3可以促进基底乳腺癌的生长,表现出促癌作用;Notch4可以触发与乳腺癌转移和复发相关的EMT过程^[27]。不同Notch分子发挥着不同的功能,因此需要系统研究Notch信号在乳腺癌中的作用。

现有的研究显示,DLL4-Notch1也参与了肿瘤血管生成^[28],但Notch信号通路中的其他配体,比如JAG1等,在肿瘤血管生成中的研究较少^[29-31],而JAG1与乳腺癌血管生成的关系尚未还未见报道。因此,本研究拟通过体内外实验明确JAG1对TNBC增殖、迁移、侵袭等生物学功能的影响,初步研究JAG1对TNBC微环境血管生成的影响,探讨其是否能成为TNBC的诊疗新靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

人正常乳腺上皮细胞MCF-10a、TNBC细胞MDA-MB-231(231)、侵袭性TNBC细胞MDA-MB-231-B(231B)以及人脐静脉内皮细胞(HUVEC)保存于重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室。JAG1重组蛋白(rJAG1)及DAPT(MedChemExpress);胎牛血清(BS)、青霉素、链霉素(S110JV)和DMEM高糖培养基(上海源培生物);MCF-10a细胞专用培养基(武汉普诺赛);基质胶(matrigel matrix 356234)及Transwell小室(康宁);RNA快速提取试剂盒(ES-RN001)(上海奕杉生物科技);RT-PCR及Q-PCR相关试剂(TaKaRa);蛋白质提取与定量试剂、Western blot相关试剂、DAPI、Hoechst染色试剂盒及HE染色试剂盒均(上海碧云天);ECL发光液(Millipore);鼠抗人 β -actin抗体(钟鼎生物);兔抗人JAG1、Twist1、Snail、Cyclin-B1、Cyclin-E、Bcl-2、VEGFA、CD31抗体(沈阳万类生物科技);兔抗人ERK及p-ERK抗体(Abcam);小鼠SP试剂盒,兔SP试剂盒,二抗(山羊抗鼠IgG/HRP标记,山羊抗兔IgG/HRP标记)(中杉金桥);兔抗人FITC荧光二抗(protein-tech);Q-PCR引物由上海生工生物工程股份有限公司

合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MCF-10a正常乳腺上皮细胞用专用培养基培养,231、231B和HUVEC用含1000 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素和100 mL/L FBS的DMEM培养基培养,并静置于37 °C、50 mL/L CO₂的培养箱。细胞用2.5 g/L的胰蛋白酶消化传代。处于对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 细胞处理及分组 231和231B细胞生长至对数生长期后,胰蛋白酶消化1 min,传代接种于20 cm²的培养皿内(1×10⁶),待细胞长至50%~60%的汇合度。弃去原培养基,每个培养皿加入2 mL新鲜培养基。rJAG1以50 ng/mL的量加入231细胞培养皿,DAPT以50 μ mol/L的浓度处理231B细胞。TNBC实验细胞分为4组:(1)231空白对照组(231-Blank);(2)rJAG1处理231组(231-rJAG1);(3)231B空白对照组(231B-Blank);(4)DAPT处理231B组(231B-DAPT)。轻轻晃动混匀后放孵箱培养24~48 h,用于细胞功能实验。收集上述各组乳腺癌细胞条件培养基(CM)用于后续血管实验。以CM:新鲜培养基=1:1的比例处理HUVEC细胞24~48 h后,进行后续处理。血管生成实验细胞分为5组:(1)HUVEC细胞阴性对照组(NC);(2)231空白条件培养基处理组(231-Blank-CM);(3)rJAG1处理231的条件培养基处理组(231-rJAG1-CM);(4)231B空白条件培养基处理组(231B-Blank-CM);(5)DAPT处理231B的条件培养基处理组(231B-DAPT-CM)。

1.2.3 实时荧光定量PCR检测MCF-10a正常乳腺上皮细胞和231、231B乳腺癌细胞中JAG1的表达 细胞中总RNA用RNA快提试剂盒提取,并用紫外分光光度计测其浓度和纯度。取1 μ g RNA逆转成cDNA,利用实时荧光定量PCR检测并分析Notch1、Notch2、JAG1、JAG2、DLL1、DLL4、VEGFA和GAPDH的相对表达水平,其中GAPDH作为内参对照。引物序列见表1。

1.2.4 Western blot法检测231、231B乳腺癌细胞Actin、JAG1、Twist1、Snail、Cyclin-B1、Cyclin-E及Bcl-2蛋白表达 231乳腺癌株用rJAG1处理24~48 h和231B侵袭性乳腺癌细胞株用DAPT处理24~48 h后,收集细胞,使用RIPA裂解后提取总蛋白,并使用BCA法测其浓度。取35 μ g蛋白质经10%的SDS-PAGE分离(90 V 30 min, 120 V 60 min),210 mA恒流冰浴条件下将蛋白质湿转到PVDF膜上,用50 g/L的牛血清白蛋白于37 °C摇床上封闭2 h,4 °C条件下一抗孵育过夜,Actin、JAG1、Twist1、Snail、Cyclin-B1、Cyclin-E及Bcl-2的抗体使用一抗稀释液以1:1000稀释。TBST洗膜10 min×3次,分别加入HRP标记的1:5000稀释的山羊抗兔IgG或HRP标记的1:5000稀释的山羊抗小鼠IgG,37 °C孵

表1 引物序列

Tab.1 Primer sequences for RT-PCR

Name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
JAG1	AACTGGTACCGGTGCGAA	TGATGCAAGATCTCCCTGAAAC
JAG2	AGGTGGAGACGGTTGTTACG	TTGCACTGGTAGAGCACGTC
Notch1	TCAGCGGGATCCACTGTGAG	ACACAGGCAGGTGAACGAGTTG
Notch2	AAAAATGGGGCCAACCGAGAC	AACTGGTACCGGTGCGAA
DLL1	GATGTGATGAGCAGCATGGA	CCATGGAGACAGCCTGGATA
DLL4	GCCAACTATGCTTGTGAATGTCC	CAGTAGGTGCCCGTGAATCC
VEGFA	GGGCAGAATCATCACGAAGT	TGGTGATGTTGGACTCCTCA
GAPDH	GATTTGGTCGTATTGGCGGC	TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC

育1 h, TBST洗膜10 min×3次, ECL发光液显影并统计。

1.2.5 CCK-8法检测JAG1和DAPT对TNBC细胞增殖的影响 将231和231B细胞传入96孔板培养(3000/孔), 其中231-rJAG1组加入50 ng/mL的rJAG1, 231B-DAPT组加入50 μmol/L的DAPT, 每组设置5个孔, 37℃孵箱培养0、24、48、72 h后, 每孔加入10 μL CCK-8试剂, 37℃孵育1 h后酶标仪测其的光密度($A_{450\text{ nm}}$)。Hoechst染色实验检测JAG1和DAPT对TNBC细胞凋亡的影响。24孔板每孔 3×10^4 个231和231B细胞, 接受处理24 h后, 加入4%多聚甲醛固定15 min, PBS洗3 min×2次。加入500 μL/孔Hoechst 33258染色液, 染色5 min, PBS洗3 min×2次。荧光显微镜检测呈蓝色的细胞核。

1.2.6 Wound healing实验检测JAG1和DAPT对TNBC细胞迁移的影响 将231和231B细胞传至6孔板(3.0×10^5 /孔), 待细胞长满孔板, 使用10 μL的枪头垂直于孔板对细胞划一条直线, PBS洗去漂浮细胞。每孔加入2 mL不含血清的DMEM培养基, 其中231-rJAG1组加入50 ng/mL的rJAG1, 231B-DAPT组加入50 μmol/L的DAPT。显微镜下拍摄0、24和48 h同一位置的划痕图片。平均划痕愈合率的计算采用以下公式: $(0\text{ h划痕宽度}-24\text{ h划痕宽度})/0\text{ h划痕宽度}$ 和 $(0\text{ h划痕宽度}-48\text{ h划痕宽度})/0\text{ h划痕宽度}$, 其中划痕宽度利用AI软件分析得到。

1.2.7 Transwell小室实验检测JAG1和DAPT对TNBC细胞侵袭的影响 为了检测231和231B乳腺癌细胞的侵袭性, 将Transwell小室放入24孔板, 上室加入1:10无血清培养基稀释的基质胶50 μL, 随后将24孔板置于37℃孵箱1 h。胰蛋白酶消化细胞后用双无培养基重悬, 上室加入200 μL含 3×10^4 细胞的悬液, 下室加入500 μL含10%血清的培养基, 37℃孵箱培养24 h后, 取出上室, 4%多聚甲醛固定15 min, 0.05%结晶紫染色或DAPI染色10 min, 棉签轻轻擦拭掉小室上方细胞, 干燥后在倒置显微镜(结晶紫染色)和荧光显微镜(DAPI染

色)下观察侵袭到小室下方的细胞数量。

1.2.8 内皮细胞粘附实验检测JAG1对231细胞粘附的影响 各组231和231B细胞使用GFP病毒转染, 24 h后细胞90%以上细胞被转染上GFP绿色荧光蛋白, 添加rJAG1/DAPT条件处理24 h。胰蛋白酶消化HUVEC细胞至24孔板, 待HUVEC长至满视野后, 消化各组乳腺癌细胞, 加入 3×10^4 /孔231和231B细胞至上述24孔板, 随后将24孔板置于37℃孵箱1 h。PBS洗去未贴壁细胞, 荧光显微镜下观察贴在HUVEC表面的231和231B乳腺癌细胞数量, 贴壁细胞使用Image J软件计数。

1.2.9 基质胶血管形成实验检测TNBC微环境对血管生成的影响 96孔板加入基质胶50 μL/孔, 随后将96孔板置于37℃孵箱45 min。胰蛋白酶消化HUVEC后, 使用231和231B的条件培养基重悬细胞, 加入50 μL 3×10^4 细胞至上述96孔板内, 放入37℃孵箱, 4~6 h后倒置显微镜下观察血管形成情况, 并对血管节点数进行统计量化。

1.2.10 免疫组化和免疫荧光实验检测肿瘤VEGFA和CD31表达 雌性裸鼠分为231组(5只, 乳腺脂肪垫注射231细胞 1×10^6 /只)和231B组(5只, 乳腺脂肪垫注射231B细胞 1×10^6 /只)。4~6周后取出肿瘤保存于4%多聚甲醛溶液。对肿瘤组织行石蜡切片后, 进行免疫组化染色, VEGFA和CD31使用一抗稀释液以1:200稀释, 更多步骤参考中杉金桥小鼠SP试剂盒说明书, 倒置显微镜观察VEGFA和CD31表达并拍照。免疫荧光实验中, 对组织行冰冻切片, 4%多聚甲醛固定15 min, 50g/L山羊血清室温封闭1 h, PBS洗3 min×2次, 1:200稀释的VEGFA一抗4℃冰箱孵育过夜。荧光二抗室温孵育1 h, PBS洗3 min×2次, DAPI染色10 min, 激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光表达强度并拍照。HE染色检测TNBC肝脏转移灶, 具体实验步骤参考碧云天HE染色试剂盒说明书, 普通光学显微镜观察并拍照。所有涉及动物的实验操作均按照《实验动物护理和使用指南》进

行,并经重庆医科大学伦理委员会(2021-023)批准。

1.3 统计分析

各实验均独立重复3次后,用GraphPad Prism 6进行数据分析。实验数据用均数±标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析,组内差异采用Tukey检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 JAG1与TNBC的恶性程度和不良预后相关

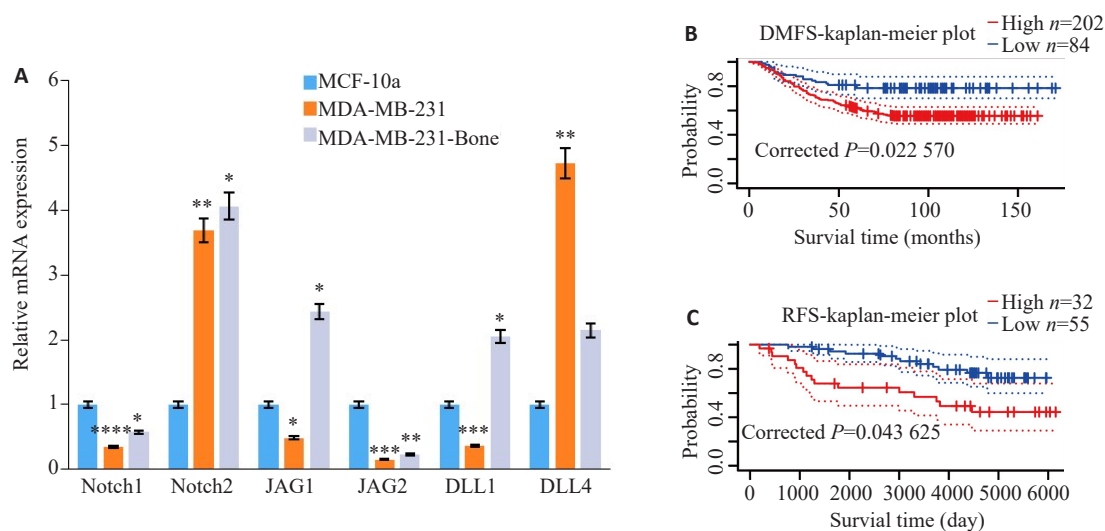


图1 JAG1在231B细胞中高表达,并与不良预后相关

Fig.1 JAG1 is highly expressed in 231B cells and is associated with a poor prognosis of breast cancer patients. A: RT-qPCR results. B, C: PrognoScan database analysis of the effect of JAG1 expression on DMFS (GSE2034) and RFS (GSE6532-GPL570). Ns: Not significant. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ (MCF-10a vs 231, MCF-10a vs 231B).

2.2 动物实验证明高表达JAG1的231侵袭细胞株表达更高的VEGFA和CD31

HE染色裸鼠肝脏组织,接种231B细胞的裸鼠较231表现出更强的肝脏转移(图2A),肝脏转移常常伴随着大量新生血管的形成,为肿瘤细胞的定植提供营养^[32-34]。免疫组化实验结果显示231B肿瘤比231肿瘤表达更高的VEGFA,且CD31标记的血管数量也更多(红色箭头所示)(图2B)。免疫荧光染色实验同样表明231B肿瘤较231肿瘤表达更高的VEGFA(图2C)。

2.3 JAG1通过抑制凋亡影响TNBC的数量

WB实验结果显示,JAG1重组蛋白可以促进231的JAG1蛋白水平($P<0.01$),而DAPT可以抑制231B的JAG1蛋白表达($P<0.001$,图3A)。Q-PCR实验结果表明DAPT可以抑制JAG1的基因表达水平($P<0.01$,图3B)。CCK-8实验结果显示,JAG1对231乳腺癌细胞的增殖没有显著影响($P>0.05$),而DAPT处理231B细胞72h后,其活力明显受到了抑制($P<0.05$,图3C)。Western

通过Q-PCR实验筛查Notch信号通路相关分子(Notch1,Notch2,JAG1,JAG2,DLL1,DLL4)发现,231细胞的JAG1表达低于MCF-10a正常乳腺上皮细胞($P<0.05$),同时,231B细胞的JAG1表达高于231($P<0.05$)和MCF-10a($P<0.05$)(图1A),DLL1的表达情况和JAG1一致。PrognoScan数据库分析JAG1对乳腺癌患者无远处转移生存率(DMFS)和无复发生存率(RFS)。发现JAG1高表达的乳腺癌患者有相对较差的DMFS(图1B)和RFS(图1C)。

Blot实验检测231和231B增殖相关蛋白显示,JAG1不影响231的Cyclin-B1和Cyclin-E表达,而DAPT可以显著抑制231B的Cyclin-B1($P<0.0001$)和Cyclin-E($P<0.05$)的蛋白表达(图3D)。Hoechst染色结果显示(图3E),231细胞经过rJAG1处理后,细胞凋亡出现了明显的减弱,231空白对照组细胞凋亡数为 8.0 ± 0.9 个/视野,rJAG1处理组细胞凋亡数为 4.5 ± 0.6 个/视野,rJAG1处理组较空白组凋亡数显著降低($P<0.05$)。同样,DAPT-231B组的细胞凋亡数为 10.5 ± 1.0 个/视野,231B空白对照组的细胞凋亡数为 4.0 ± 0.9 个/视野,DAPT处理组较空白组凋亡数显著升高($P<0.01$)。Western blot结果同样显示,233细胞经过rJAG1处理后,可上调231细胞中抗凋亡蛋白Bcl-2的水平($P<0.05$),相反,DAPT处理231B细胞则会下调其抗凋亡蛋白Bcl-2的表达($P<0.05$,图3F)。

2.4 JAG1促进TNBC的迁移、侵袭及黏附能力

划痕愈合实验结果显示(图4A),在rJAG1处理48h

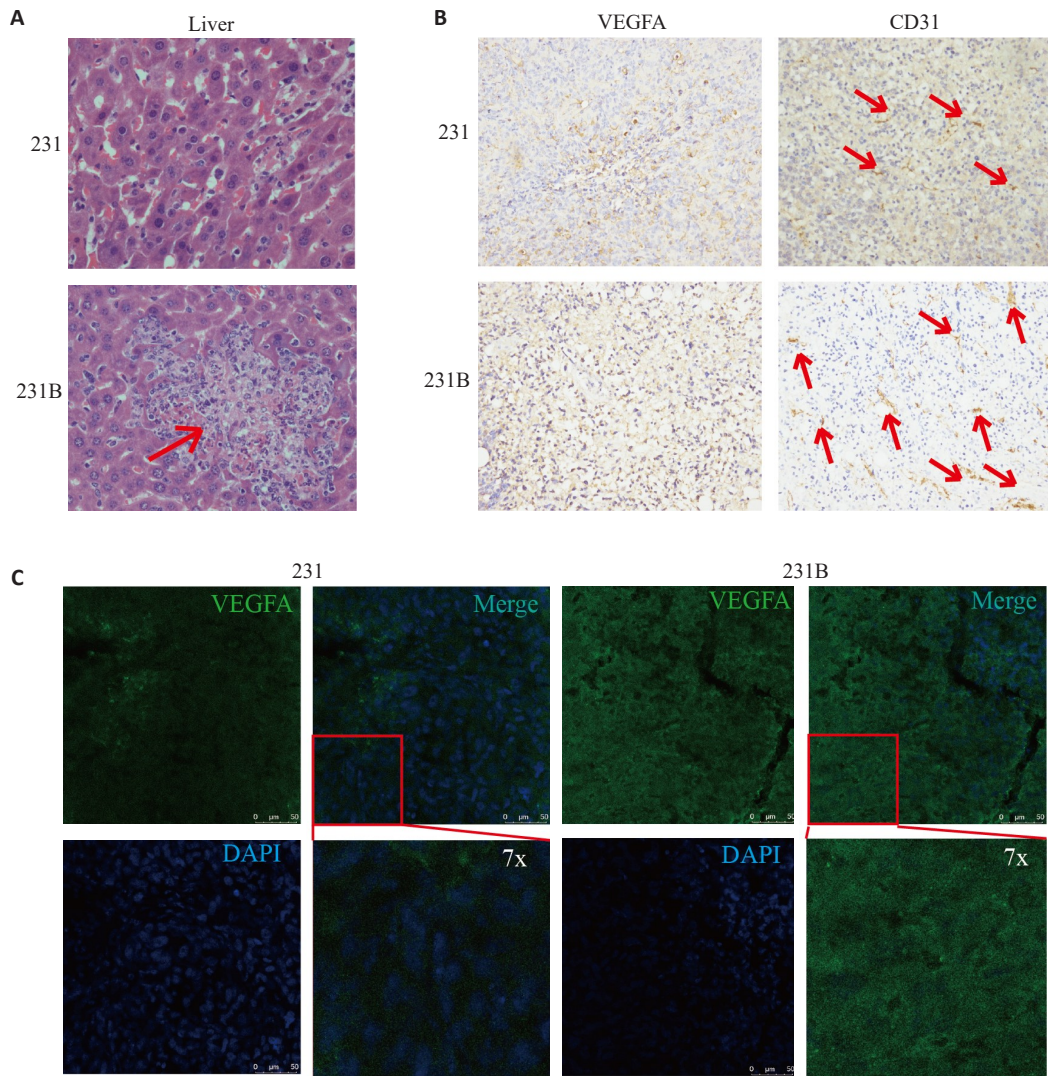


图2 TNBC肿瘤中的VEGFA和CD31表达

Fig.2 Protein expression of VEGFA and CD31 in TNBC tumors. A: HE staining of liver metastases (Original magnification: $\times 400$). B: Immunohistochemistry ($\times 200$). Arrow: Expression of CD31. C: Immunofluorescence and laser confocal microscopy ($\times 200$).

后,231乳腺癌细胞的迁移受到了明显的促进($P<0.05$),愈合率为85.95%,而与231空白对照组相比,48 h后231空白对照组的愈合率仅为58.52%。DAPT处理231B乳腺癌细胞后,231B细胞的迁移能力受到了明显的抑制($P<0.05$),48 h愈合率为36.62%。未加DAPT的231B空白对照组的迁移率为53.31%。使用Transwell小室实验检测rJAG1和DAPT对TNBC细胞侵袭性的影响,在处理24 h后,rJAG1处理组231乳腺癌细胞穿透小室的数量为629个,而231空白对照组穿过了270个细胞;同样使用DAPT处理231B细胞后,其穿过的细胞数(154个)远低于231B对照组穿过的细胞数(397个)(图4B)。Western blot实验检测231和231B迁移侵袭相关蛋白显示,JAG1促进了231的Twist1和Snail的蛋白表达,而DAPT可以显著抑制231B的Twist1和Snail的蛋白表达(图4C)。内皮细胞粘附实验表明,DAPT显

著($P<0.01$)抑制了231B细胞对血管内皮细胞的粘附性,而rJAG1显著增加了231乳腺癌细胞的粘附性。

2.5 TNBC的JAG1过表达促进血管生成

GEPIA数据库分析JAG1与血管生成因子VEGFA的相关性,发现二者成正相关,差异具有显著统计学意义($P=8.9e-16$,图5A)。在乳腺癌细胞条件培养基处理24-48 h后,231B-DAPT-CM组的HUVEC的VEGFA表达较231B-Blank-CM组明显受到了抑制($P<0.0001$),而231-rJAG1-CM组的HUVEC的VEGFA表达较231-Blank-CM组的VEGFA表达明显升高($P<0.05$,图5B)。CCK-8的实验证明,乳腺癌的JAG1过表达可促进HUVEC血管内皮细胞的增殖,DAPT可以抑制这一现象(图5C)。231B条件培养基的促血管生成能力明显强于231的条件培养基($P<0.05$),并且可以被DAPT抑制(图5D)。

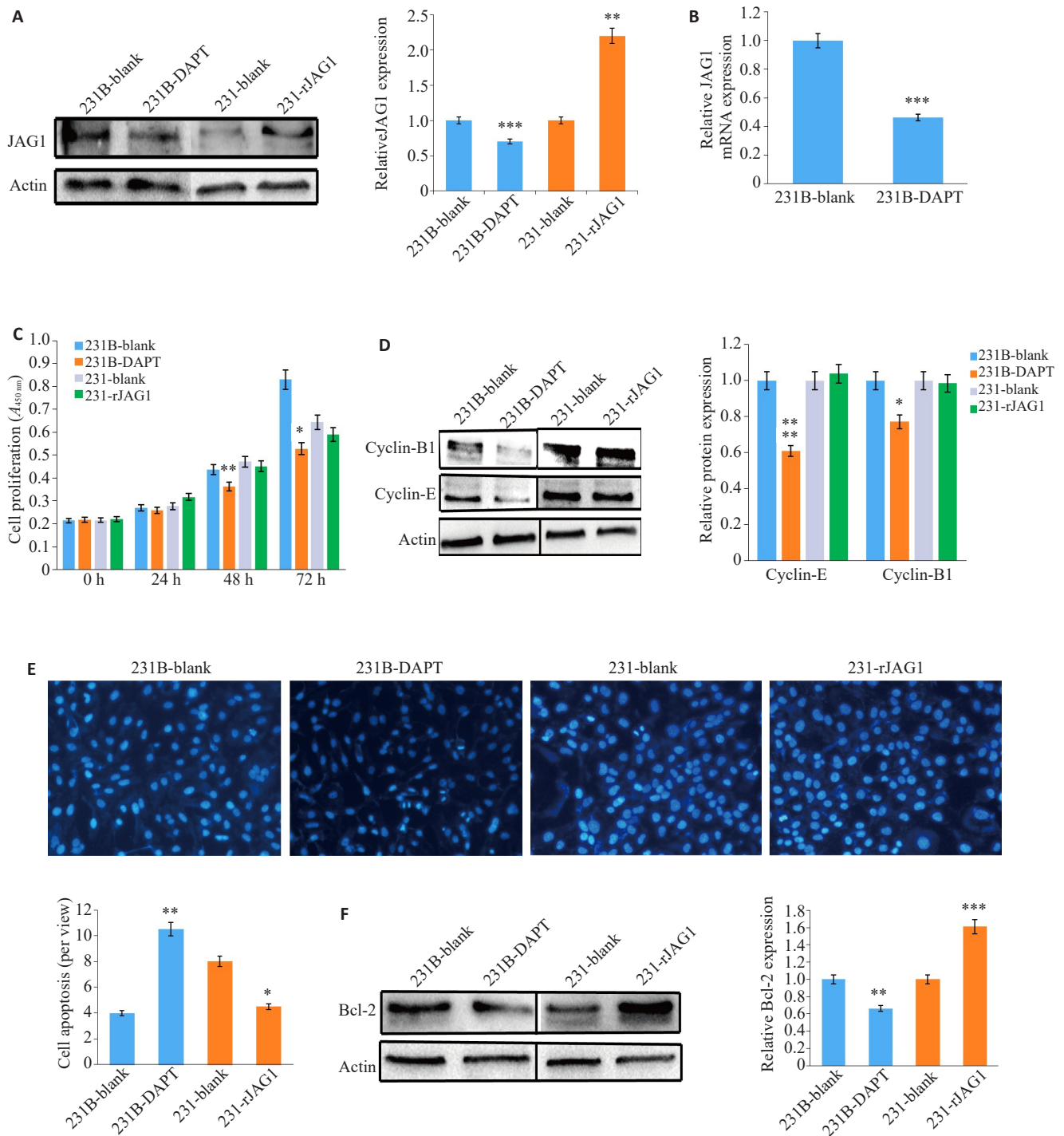


图3 JAG1抑制TNBC的凋亡

Fig.3 JAG1 inhibits apoptosis of TNBC cells. A: Western blotting. B: RT-qPCR results. C: CCK8 assay. D: Western Blot assay. E: Hoechst staining ($\times 200$). F: Western Blot assay. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ (231B-Blank vs 231B-DAPT, 231-Blank vs 231-rJAG1).

3 讨论

研究显示,乳腺癌已取代肺癌成为全球肿瘤发病率最高的肿瘤^[32],占新发肿瘤的11.7%。虽然针对乳腺癌治疗的方法有了长足的进步,包括手术治疗、放疗、化疗和以免疫检查点抑制剂为代表的免疫治疗^[33,34],但乳腺癌导致的死亡仍占女性癌症患者死亡原因的1/6,尤其

是TNBC。由于TNBC的雌激素受体、孕激素受体和人表皮生长因子受体2(HER2)为阴性,因此患者不能从内分泌^[35]或分子靶向治疗^[36]中获益;另一方面,研究发现TNBC血管密度高^[37],患者或许能从抗血管治疗中获益,研究显示现有的抗血管生成药物(靶向VEGF-VEGFR)的疗效并未达到预期^[38],提示关于TNBC的肿

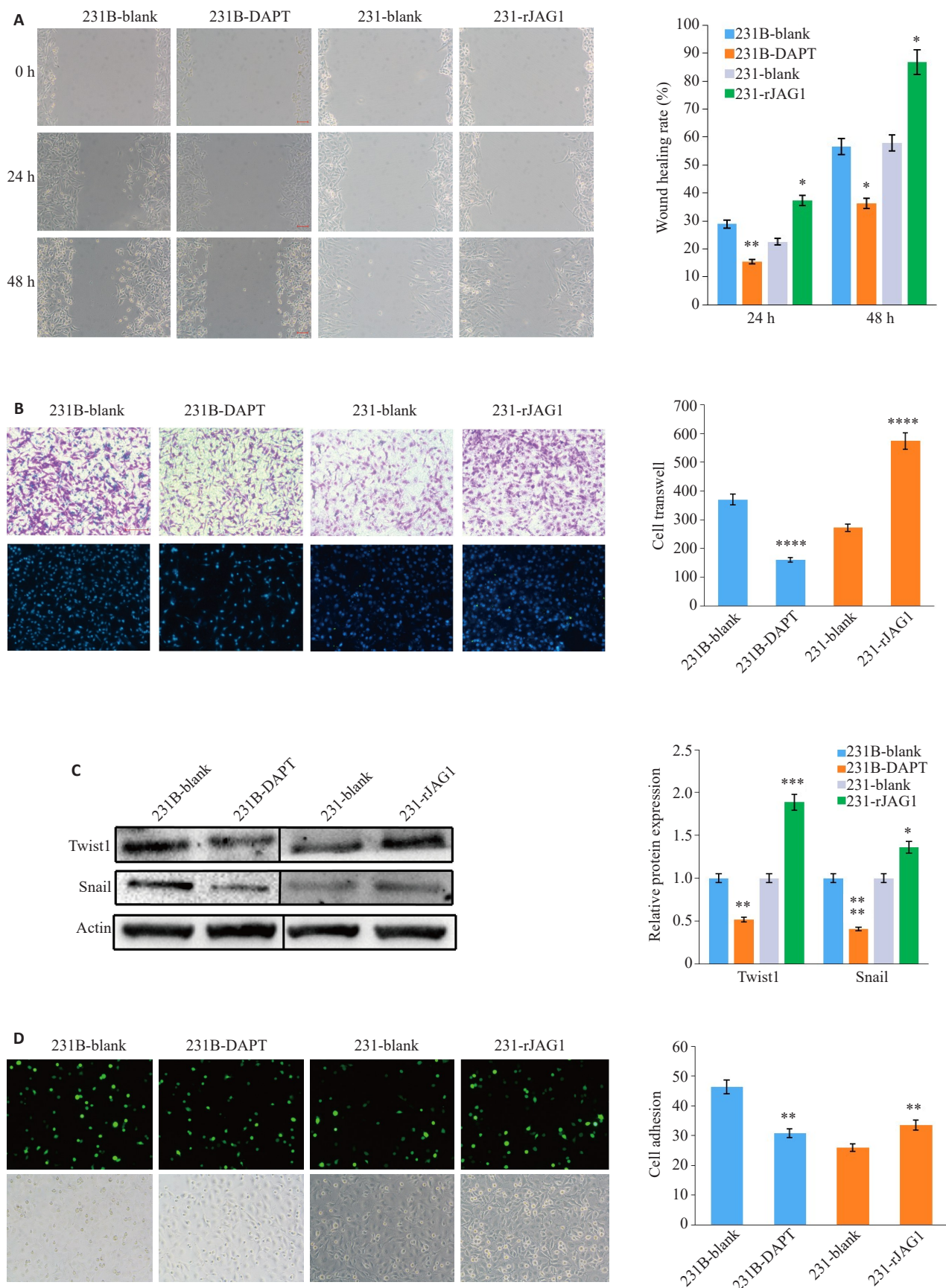


图4 JAG1促进TNBC的迁移、侵袭和黏附性

Fig.4 JAG1 promotes migration, invasion and adhesion of TNBC. **A:** Wound healing experiments ($\times 200$). **B:** Transwell assay with crystal violet staining (upper) and DAPI staining (lower, $\times 200$). **C:** Western blotting. **D:** Adhesion test ($\times 200$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ (231B-Blank vs 231B-DAPT, 231-Blank vs 231-rJAG1).

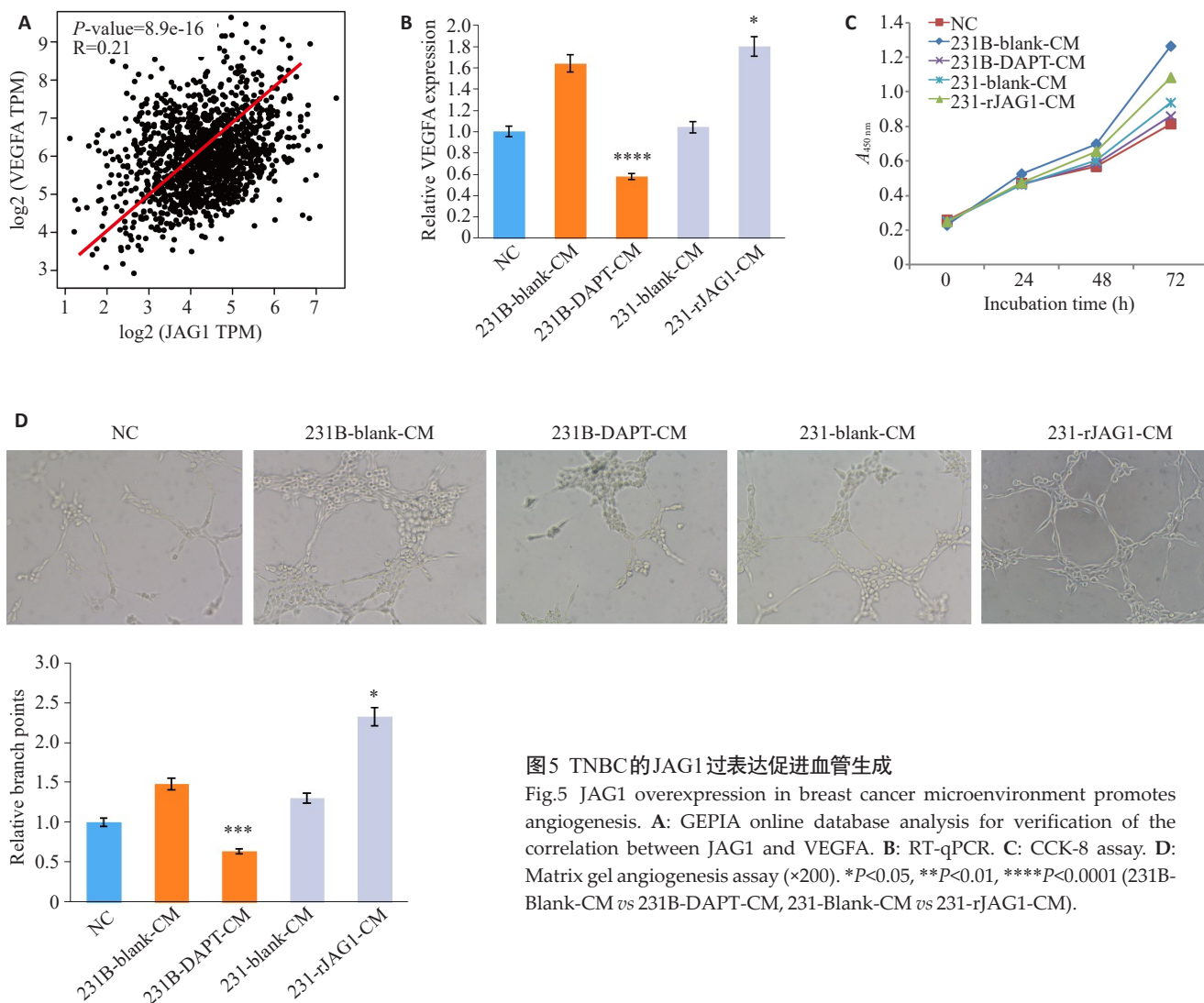


图5 TNBC的JAG1过表达促进血管生成

Fig.5 JAG1 overexpression in breast cancer microenvironment promotes angiogenesis. A: GEPIA online database analysis for verification of the correlation between JAG1 and VEGFA. B: RT-qPCR. C: CCK-8 assay. D: Matrix gel angiogenesis assay ($\times 200$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ (231B-Blank-CM vs 231B-DAPT-CM, 231-Blank-CM vs 231-rJAG1-CM).

瘤血管生成机制研究至关重要。

本研究首先通过实验室研究发现侵袭性强的TNBC细胞株231B中JAG1表达明显增加;JAG1是乳腺癌的预后不良因子之一,与DMFS和RFS显著相关,这一结果与Xue和刘野的临床研究结论一致^[39,40]。进一步裸鼠成瘤实验发现JAG1高表达的231B肿瘤表现出更强的肝脏转移能力,肿瘤组织中血管内皮生长因子VEGFA和血管内皮标志物CD31表达增强。通过生物学功能实验,我们证实JAG1能明显增强231的迁移、侵袭能力,还可通过抑制凋亡促进肿瘤生长,这与Yihong chen等在宫颈癌中的研究一致^[41]。内皮细胞粘附实验表明,DAPT显著($P < 0.01$)抑制了231B细胞对血管内皮细胞的粘附性,而rJAG1显著增加了231乳腺癌细胞的粘附性,同样,可以发现侵袭性更强的231B乳腺癌细胞株比普通231细胞株具有更强的黏附性。DAPT可以抑制Notch1、JAG1信号通路的分子表达^[42-44],本研究中DAPT抑制了231B的生物学功能,由于Notch1在231B中表达低于正常乳腺上皮细胞($P < 0.05$),并且231和

231B的Notch1表达没有差异,因此JAG1发挥了促进TNBC侵袭性的功能。

那么JAG1对TNBC肿瘤血管生成有什么影响呢?我们通过基因共表达分析发现JAG1与血管内皮生长因子VEGFA成正相关,提示JAG1与VEGFA可能协同促进血管内皮细胞生成。我们利用高表达JAG1的231B条件培养基处理血管内皮细胞,Q-PCR实验和CCK-8实验结果表明其能显著促进血管内皮细胞的增殖能力,而基质胶成管实验表明JAG1高表达的TNBC能明显促进血管内皮细胞的成管能力,这些结果与Tsung-hoying等关于VEGFA对血管生成的影响相一致^[45,46],支持我们关于JAG1与VEGFA功能相似,协同促进血管内皮细胞的成管能力的猜想。

综上所述,本研究通过一系列体内外功能实验进一步揭示了JAG1对TNBC恶性表型的影响,初步证实JAG1能促进乳腺癌血管生成,可能与VEGFA协同促进血管生成。这一研究结果提示JAG1可以作为TNBC抗血管治疗的潜在靶点,但JAG1是否与DLL4等其他

Notch配体相互配合调控肿瘤血管生成,尚需进一步实验证实。

参考文献:

- [1] Cancer Stat Facts: Female Breast Cancer[DB/OL/OL]. [https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html\(2021\)](https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html(2021)).
- [2] Diana AN, Franzese E, Centonze S, et al. Triple-negative breast cancers: systematic review of the literature on molecular and clinical features with a focus on treatment with innovative drugs [J]. *Curr Oncol Rep*, 2018, 20(10): 1-11.
- [3] Burke EE, Kodumudi K, Ramamoorthi G, et al. Vaccine therapies for breast cancer[J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2019, 28(3): 353-67.
- [4] Survival Rates for Breast Cancer[DB/OL/OL], 2021. <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/breast-cancer-survival-rates.html>.
- [5] Ridwan SM, Hainfeld JF, Ross V, et al. Novel Iodine nanoparticles target vascular mimicry in intracerebral triple negative human MDA-MB-231 breast tumors[J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 1203.
- [6] Pan T, Zhou DD, Shi ZD, et al. Centromere protein U (CENPU) enhances angiogenesis in triple-negative breast cancer by inhibiting ubiquitin-proteasomal degradation of COX-2[J]. *Cancer Lett*, 2020, 482: 102-11.
- [7] Mirando AC, Patil A, Rafie CI, et al. Regulation of the tumor immune microenvironment and vascular normalization in TNBC murine models by a novel peptide [J]. *OncoImmunology*, 2020, 9(1): 1760685.
- [8] Robert NJ, Diéras V, Glaspy J, et al. RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(10): 1252-60.
- [9] Ji LY, Waduge P, Wan WC, et al. Comparative ligandomics implicates secretogranin III as a disease-restricted angiogenic factor in laser-induced choroidal neovascularization [J]. *FEBS J*, 2022, doi.org/10.1111/febs.16356.
- [10] Tao J, Thibault J, Fabien D, et al. FGF-2 promotes angiogenesis through a SRSF1/SRSF3/SRPK1-dependent axis that controls VEGFR1 splicing in endothelial cells[J]. *BMC Biol*, 2021, 19(1).
- [11] Hosaka K, Yang YL, Seki T, et al. Therapeutic paradigm of dual targeting VEGF and PDGF for effectively treating FGF-2 off-target tumors[J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 3704.
- [12] Zhang XT, Zou GY, Li XY, et al. An isoflavone derivative potently inhibits the angiogenesis and progression of triple-negative breast cancer by targeting the MTA2/SerRS/VEGFA pathway [J]. *Cancer Biol Med*, 2020, 17(3): 693-706.
- [13] Hultgren NW, Fang JS, Ziegler ME, et al. Slug regulates the Dll4-Notch-VEGFR2 axis to control endothelial cell activation and angiogenesis[J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 5400.
- [14] Mancarella S, Serino G, Dituri F, et al. Crenigacestat, a selective NOTCH1 inhibitor, reduces intrahepatic cholangiocarcinoma progression by blocking VEGFA/DLL4/MMP13 axis[J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(8): 2330-43.
- [15] Ballhause TM, Jiang S, Baranowsky A, et al. Relevance of Notch signaling for bone metabolism and regeneration [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(3): 1325.
- [16] van de Walle I, Waegemans E, de Medts J, et al. Specific Notch receptor-ligand interactions control human TCR- $\alpha\beta\gamma\delta$ development by inducing differential Notch signal strength[J]. *J Exp Med*, 2013, 210(4): 683-97.
- [17] Bednarz-Knoll N, Efstathiou A, Gotzhein F, et al. Potential involvement of Jagged1 in metastatic progression of human breast carcinomas[J]. *Clin Chem*, 2016, 62(2): 378-86.
- [18] Xing F, Okuda H, Watabe M, et al. Hypoxia-induced Jagged2 promotes breast cancer metastasis and self-renewal of cancer stem-like cells[J]. *Oncogene*, 2011, 30(39): 4075-86.
- [19] Kumar S, Srivastav RK, Wilkes DW, et al. Estrogen-dependent DLL1-mediated Notch signaling promotes luminal breast cancer[J]. *Oncogene*, 2019, 38(12): 2092-107.
- [20] Kumar S, Nandi A, Singh S, et al. Dll1 + quiescent tumor stem cells drive chemoresistance in breast cancer through NF- κ B survival pathway[J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 432.
- [21] Kontomanolis E, Panteliadou M, Giatromanolaki A, et al. Delta-like ligand 4 (DLL4) in the plasma and neoplastic tissues from breast cancer patients: correlation with metastasis[J]. *Med Oncol*, 2014, 31(5): 1-6.
- [22] Nandi A, Chakrabarti R. The many facets of Notch signaling in breast cancer: toward overcoming therapeutic resistance [J]. *Genes Dev*, 2020, 34(21/22): 1422-38.
- [23] Lin HY, Liang YK, Dou XW, et al. Notch3 inhibits epithelial-mesenchymal transition in breast cancer *via* a novel mechanism, upregulation of GATA-3 expression[J]. *Oncogenesis*, 2018, 7(8): 59.
- [24] Choy L, Hagenbeek TJ, Solon M, et al. Constitutive NOTCH3 signaling promotes the growth of basal breast cancers [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(6): 1439-52.
- [25] Leontovich AA, Jalalirad M, Salisbury JL, et al. NOTCH3 expression is linked to breast cancer seeding and distant metastasis [J]. *Breast Cancer Res*, 2018, 20: 105.
- [26] Sansone P, Storci G, Tavolari S, et al. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(12): 3988-4002.
- [27] Harrison H, Farnie G, Howell SJ, et al. Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the Notch4 receptor [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2): 709-18.
- [28] Gross SJ, Webb AM, Peterlin AD, et al. Notch regulates vascular collagen IV basement membrane through modulation of lysyl hydroxylase 3 trafficking[J]. *Angiogenesis*, 2021, 24(4): 789-805.
- [29] Scherer D, Deutelmoser H, Balavarca Y, et al. Polymorphisms in the angiogenesis-related genes EFNB2, MMP2 and JAG1 are associated with survival of colorectal cancer patients[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5395.
- [30] Marchetto NM, Begum S, Wu T, et al. Endothelial Jagged1 antagonizes Dll4/Notch signaling in decidual angiogenesis during early mouse pregnancy[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6477.
- [31] Zhang L, Zhang X, Xu HJ, et al. Exome sequencing revealed Notch ligand JAG1 as a novel candidate gene for familial exudative vitreoretinopathy[J]. *Genet Med*, 2020, 22(1): 77-84.
- [32] World health organization. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 19.3 million new cases and 10.0 million cancer deaths in 2020 [R], 2020.

(上接1108页)

- [33] Barreto L, Caminero F, Cash L, et al. Resistance to checkpoint inhibition in cancer immunotherapy[J]. *Transl Oncol*, 2020, 13(3): 100738.
- [34] Hargadon KM, Johnson CE, Williams CJ. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: an overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 62: 29-39.
- [35] Chen J, Wan RL, Li QQ, et al. Utilizing the Hippo pathway as a therapeutic target for combating endocrine-resistant breast cancer [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21: 306.
- [36] Yin L, Duan JJ, Bian XW, et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress[J]. *Breast Cancer Res*, 2020, 22: 61.
- [37] Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(7): 2750-67.
- [38] Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, et al. Triple-negative breast cancer-current status and future directions [J]. *Ann Oncol*, 2009, 20(12): 1913-27.
- [39] Xue SL, He L, Zhang X, et al. Expression of Jagged1/Notch3 signaling pathway and their relationship with the tumor angiogenesis in TNBC[J]. *Arch Med Res*, 2017, 48(2): 169-79.
- [40] 刘野, 王红艳, 刘金丽, 等. YAP1、JAG1在三阴性乳腺癌中的表达及意义[J]. *牡丹江医学院学报*, 2021, 42(3): 29-31, 36.
- [41] Chen YH, Wu QM, Lin J[et al. DARS-AS1 accelerates the proliferation of cervical cancer cells *via* miR-628-5p/JAG1 axis to activate Notch pathway[J]. *Cancer Cell Int Chen*, 2020, 20: 535.
- [42] P you, F xing, C mao, et al. Jagged-1-HES-1 signaling inhibits the differentiation of TH17 cells *via* ROR γ mat [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 27(1): 79-93.
- [43] Guangxu zhu, Jinxiang wang, Mingbao song, et al. Overexpression of jagged1 ameliorates aged rat-derived endothelial progenitor cell functions and improves Its transfusion efficiency for rat balloon-induced arterial injury[J]. *Ann Vasc Surg*, 2017, 41: 241-58.
- [44] 李均, 陈莎莎. 丹参酮IIA配伍DAPT对TGF- β ₁诱导的HK-2细胞Notch1/Jagged1信号通路的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2021, 41(9): 1-6.
- [45] Tsung-ho ying, Chia-liang lin, Pei-ni chen, et al. Angelol-A exerts anti-metastatic and anti-angiogenic effects on human cervical carcinoma cells by modulating the phosphorylated-ERK/miR-29a-3p that targets the MMP2/VEGFA axis[J]. *Life Sci*, 2022: 120317.
- [46] Wang H, Chen L, Wang SX, et al. Tetrandrine promotes angiogenesis *via* transcriptional regulation of VEGF-A[J]. *Vasc Pharmacol*, 2021, 141: 106920.

(编辑:吴锦雅)