

Notch-1信号通路与甲状腺乳头状癌的关系

杨晶晶¹ 姚 军² 沈峰清¹ 陈佳玉² 杨林军³ 张 强³ 金晓燕³ 梁 勇^{2,3*}

(¹温州医学院第一临床学院, 温州 325000; ²台州学院医学院, 台州 318000;

³台州学院医学院附属台州市立医院肿瘤科, 台州 318000)

摘要 研究Notch-1信号通路中Notch-1、NICD、Hes1、c-Myc与人甲状腺乳头状癌的关系, 探讨Notch-1信号通路在甲状腺乳头状癌中的分子机制。对照人甲状腺乳头状癌及正常甲状腺组织标本各35例, 采用Real Time PCR检测*Notch-1*、*Hes1*、*c-Myc*的mRNA表达情况, 采用免疫组织化学、Western blot方法检测组织标本中Notch-1、NICD、Hes1、c-Myc蛋白的表达情况。*Notch-1*、*Hes1*在甲状腺乳头状癌中的mRNA表达水平明显降低, *c-Myc* mRNA的表达在甲状腺乳头状癌中升高, Notch-1、NICD、Hes1蛋白在人甲状腺乳头状癌中的表达低于正常甲状腺组织($P < 0.05$), c-Myc蛋白在甲状腺乳头状癌中的表达高于正常甲状腺组织($P < 0.05$)。甲状腺乳头状癌组织标本中, Notch-1信号通路中Notch-1、NICD、Hes1在基因转录和蛋白质表达水平上均明显下调, 而c-Myc的基因转录和蛋白质表达水平均升高, 提示Notch-1信号通路在甲状腺乳头状癌的发生发展中起抑癌作用, *c-Myc*基因表达升高与Notch-1信号通路可能无关。

关键词 甲状腺乳头状癌; Notch-1信号通路; Notch-1; NICD; Hes1; c-Myc

甲状腺癌是内分泌系统常见的恶性肿瘤之一, 约占恶性肿瘤的1%。据报道, 甲状腺癌的发病率以每年4%的速度增加, 已成为女性第八大常见肿瘤^[1]。甲状腺癌发病率女性高于男性, 男女发病比例约为1:3, 甲状腺癌可发生在任何年龄段。世界不同国家和地区的各类甲状腺癌构成比大体一致, 都以甲状腺乳头状癌最常见, 约占78%。因此, 在分子水平研究甲状腺乳头状癌的发病机制是非常必要的。

Notch信号通路是一条保守的信号传导途径, 该通路对细胞的发育、生长及凋亡都起着重要的调控作用。大量的研究证明Notch-1信号通路与几乎所有恶性肿瘤发生和发展有关, 本文研究Notch-1信号通路中的关键蛋白分子Notch-1及其活化产物NICD(intracellular domain of Notch)及下游靶蛋白Hes1、c-Myc在甲状腺乳头状癌中的表达情况, 旨在探讨Notch-1信号通路与人甲状腺乳头状癌发生发展的关系及可能的分子机制。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 组织样本 收集2010年6月~2011年2月浙江省台州市市立医院肿瘤外科手术切除的甲状腺乳头状癌标本35例为肿瘤组, 取结节性甲状腺肿

术标本中病灶旁正常的甲状腺组织标本35例为对照组。标本取样在5 mm×5 mm以上并均分为两部分, 一部分于20 min内置入-80 °C保存备用, 一部分置于10%福尔马林液中固定。肿瘤组男性12例, 女性23例, 年龄为21~58岁, 中位年龄42.3岁, 标本均经病理证实为甲状腺乳头状癌, 所有患者术前未接受化疗或放疗。对照组男性16例, 女性19例, 年龄为23~59岁, 中位年龄40岁, 对照组标本均经病理证实为正常甲状腺组织。

1.1.2 主要仪器及试剂 Real Time PCR为ABI公司stepone PCR仪, 垂直电泳槽及转膜槽为北京六一仪器厂产品, 兔抗人Notch-1单克隆抗体、兔抗人c-Myc单克隆抗体、兔抗人GAPDH单克隆抗体均购自Cell Signaling公司, 兔抗人多克隆Notch-1-Cleaved-Val1744抗体(NICD)、兔抗人Hes1多克隆抗体购自Abcam公司, 二步法免疫组化检测试剂盒购自北京中杉金桥生物科技有限公司, DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物科技有限公司, T-PER组织总蛋白提取试剂购自Thermo Fisher公司, TrizolRNA提取试剂

收稿日期: 2011-08-04 接受日期: 2011-10-31

国家自然科学基金(No.81072209)资助项目

*通讯作者。Tel: 0576-88665191, E-mail: liangy@yahoocn

为Invitrogen公司产品, Quant cDNA第一链合成试剂盒、RealMasterMix(SYBR Green)试剂盒为天根生物科技有限公司产品, 引物由上海捷瑞生物工程有

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 10%福尔马林液固定, 常规石蜡包埋, 4 μm 厚度连续切片, 脱蜡, 3% H_2O_2 室温孵育10 min以灭活内源性过氧化物酶, 0.1 mmol/L枸橼酸缓冲液煮沸修复抗原, 3% BSA封闭30 min, 分别加入一抗(Notch-1、NICD、Hes1抗体稀释倍数均为1:400) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 再分别加入二抗, 常规DAB显色, 苏木素复染, 封片后光镜下观察。以PBS代替一抗作为阴性对照, 用已知阳性片作为阳性对照, 其余步骤相同。

1.2.2 Real Time PCR 取-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的甲状腺乳头状癌及正常甲状腺组织标本各35例, 每例标本重约50~100 mg, 采用Trizol提取细胞中的总RNA, 用

紫外分光光度计测定RNA的浓度和纯度, 要求 $D_{260}/D_{280}=1.8\sim 2.0$, 并在1%琼脂糖凝胶电泳中显示出清晰的28S和18S两条rRNA带, 证明提取的RNA完整。cDNA合成(20 μL 反应体系): 取2 μg RNA, 加2 μL 10 \times RT mix(终浓度为1 \times), 2 μL dNTP混合液(终浓度为0.25 mmol/L each dNTP), 2 μL Oligo-dT15(终浓度为1 $\mu\text{mol/L}$), 1 μL Quant Reverse Transcriptase, 加RNase free ddH $_2\text{O}$ 至终体积为20 μL , 于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育60 min。采用SYBR Green荧光染料, 参照试剂盒说明完成Real Time PCR, 不同基因进行单独的PCR过程, 每个样本重复3次。PCR反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s(不同基因退火温度见表1), 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸60 s, 40个循环; 最后95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 降温至60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 然后按每15 s上升0.3 $^{\circ}\text{C}$ 至95 $^{\circ}\text{C}$ 后, 保持15 s。分别收集荧光信号, 进行熔解曲线分析。独立实验重复3次, 反应结束后由系统自动计算相对定量结果。引物序列见表1。

表1 Notch1、Hes1、c-Myc、GAPDH引物序列

Table 1 The primer sequences of Notch1, Hes1, c-Myc and GAPDH

基因名称	上游序列(5'-3')	下游序列(5'-3')	产物长度	退火温度($^{\circ}\text{C}$)
Genes	Forward primer sequence(5'-3')	Reverse primer sequence(5'-3')	Product size(bp)	Tm($^{\circ}\text{C}$)
Notch-1	GCC GCC TTT GTG CTT CTG TTC	CCG GTG GTC TGT CTG GTC GTC	300	65
Hes1	TGG AAA TGA CAG TGA AGC ACC T	GTT CAT GCA CTC GCT GAA GC	116	63
c-Myc	GAA TGT CAA GAG GCG AAC ACA	CGT CGT TTC CGC AAC AAG	216	60
GAPDH	ATG GCC TTC CGT GTC CCC ACT G	TGA GTG TGG CAG GGA CTC CCC A	398	65

1.2.3 Western blot 取-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的甲状腺乳头状癌及正常甲状腺组织标本各35例约25 mg加入500 μL T-PER组织总蛋白提取液(含1% PMSF)中, 在冰上充分碾磨, 10 000 \times g离心5 min, 收集上清液。BCA法检测蛋白浓度, 取30 μg 总蛋白进行电泳。SDS-PAGE凝胶的分离胶浓度为8%, 浓缩胶浓度为5%, 蛋白分离后, 湿转法将胶上的蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 用5% BSA封闭1.5 h, 加兔抗人Notch1(1:1 000)、NICD(1:1 000)、Hes1(1:1 250)、c-Myc(1:1 000)和GAPDH(1:1 000)孵育过夜。二抗为用HRP标记的羊抗兔IgG抗体(1:1 000), 室温孵育1.5 h, 用化学发光法(ECL)显色, 进行X射线曝光显影, 计算机软件处理分析结果, 独立实验重复3次。

1.3 统计学分析

采用SPSS13.0统计软件, 采用 χ^2 检验及配对 t 检

验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

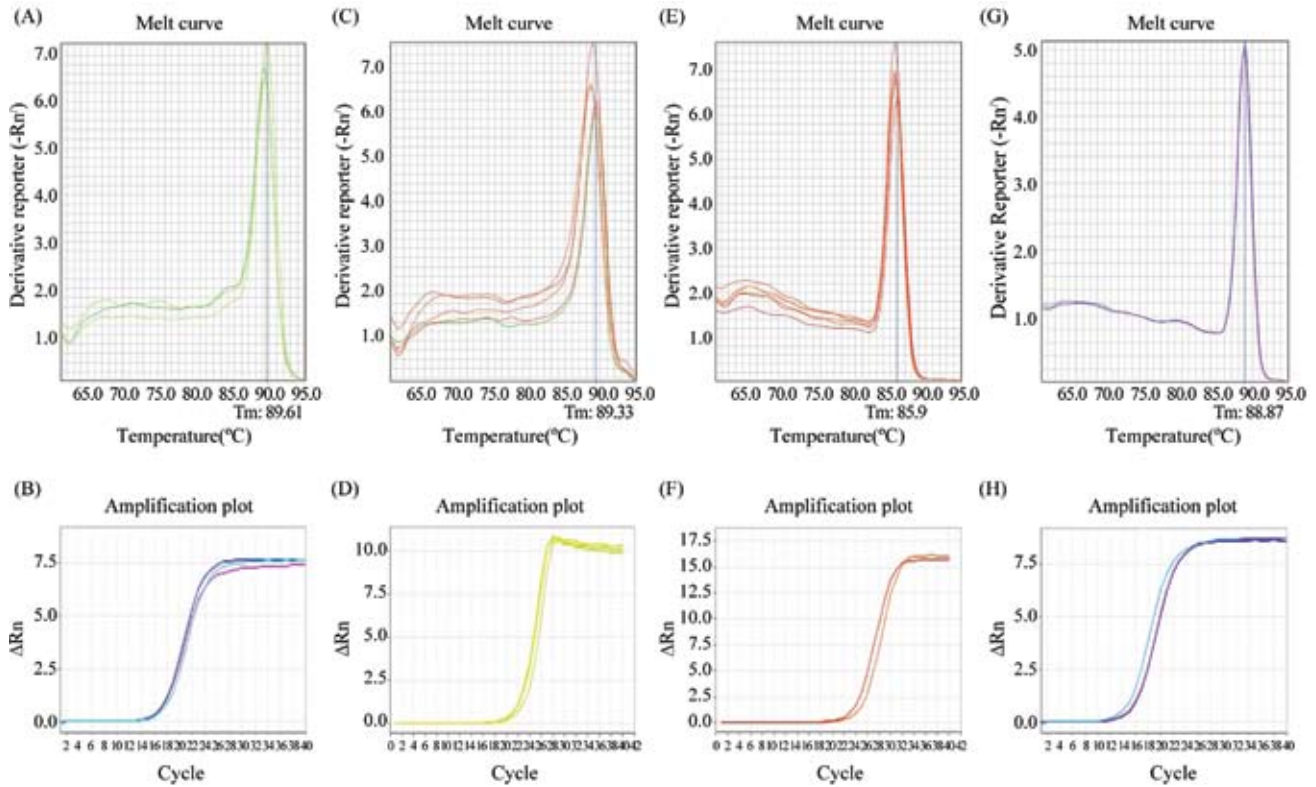
2 结果

2.1 实时荧光定量PCR体系的确定

由目的基因Notch-1、Hes1和c-Myc与内参照基因GAPDH的扩增曲线及熔解曲线(图1)可见, Notch-1、Hes1、c-Myc与GAPDH的PCR扩增效率恒定, 且均已达到平台期; 相应的阈值循环数(Ct)稳定, 重现性好; 它们的熔解曲线均为单峰特异, 峰值分别为89.01, 88.28, 85.90, 89.31 $^{\circ}\text{C}$, 引物的特异性好且无引物二聚体产生。故可以使用该体系对目的基因Notch-1、Hes1、c-Myc进行定量。

2.2 甲状腺乳头状癌及正常甲状腺组织中Notch-1、Hes1和c-Myc的mRNA表达情况

Notch-1、Hes1和c-Myc的mRNA水平在甲状



A: *Notch-1*融解曲线; B: *Notch-1*扩增曲线; C: *Hes1*融解曲线; D: *Hes1*扩增曲线; E: *c-Myc*融解曲线; F: *c-Myc*扩增曲线; G: *GAPDH*融解曲线; H: *GAPDH*扩增曲线。

A: *Notch-1* melting curves; B: *Notch-1* amplification curves; C: *Hes1* melting curves; D: *Hes1* amplification curves; E: *c-Myc* melting curves; F: *c-Myc* amplification curves; G: *GAPDH* melting curves; H: *GAPDH* amplification curves.

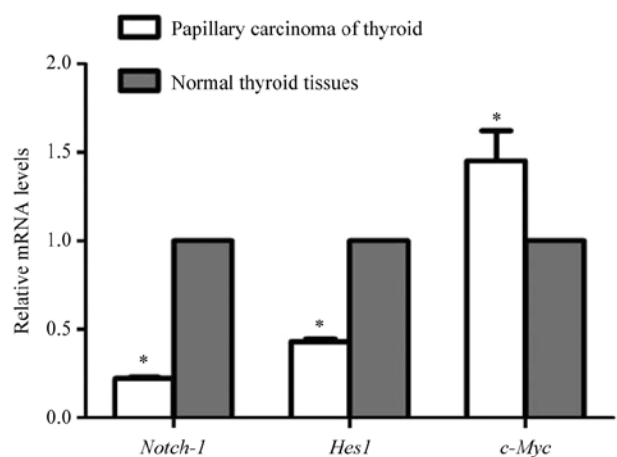
图1 *Notch-1*、*Hes1*、*c-Myc*和*GAPDH*的融解曲线和扩增曲线

Fig.1 Melting and amplification curves of *Notch-1*, *Hes1*, *c-Myc* and *GAPDH*

腺乳头状癌中的表达与其在正常甲状腺组织中的表达比较(图2), 结果采用相对定量方法 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。*Notch-1*、*Hes1*、*c-Myc*在甲状腺乳头状癌及正常甲状腺组织中均有mRNA表达, 但前二者在甲状腺乳头状癌中的表达明显降低, 后者在甲状腺乳头状癌中的表达增高, *Notch-1* mRNA在甲状腺乳头状癌中的表达为对照组的 0.2228 ± 0.1202 , *Hes1* mRNA为对照组的 0.4307 ± 0.2554 , *c-Myc* mRNA甲状腺乳头状癌中的表达为对照组的 1.3990 ± 0.1157 , 采用配对*t*检验分析, 具有统计学差异($P < 0.05$)。

2.3 甲状腺乳头状癌及正常甲状腺组织中*Notch-1*、*NICD*、*Hes1*蛋白的表达情况

2.3.1 免疫组化实验结果 免疫组化结果判定标准: *Notch-1*以细胞浆或者细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性, *NICD*以细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性, *Hes1*以细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性。参照



* $P < 0.05$.

* $P < 0.05$.

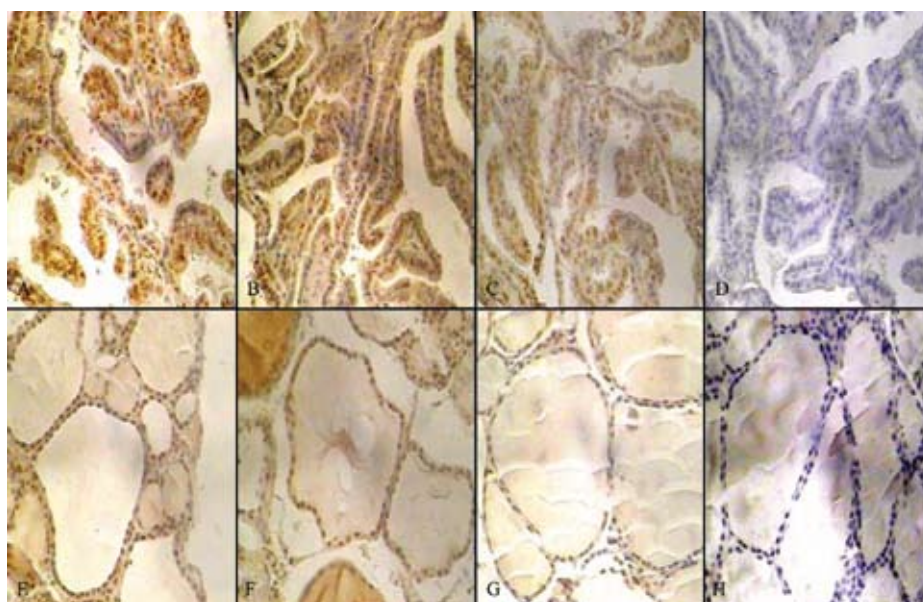
图2 *Notch-1*、*Hes1*、*c-Myc*基因的相对表达量

Fig.2 The relative mRNA levels of *Notch-1*, *Hes1* and *c-Myc*

Carcangiu等^[2]的半定量评分方法, 根据阳性细胞着色强度和阳性细胞数量计分, 阳性着色强度按无色、淡棕色、棕黄色和棕褐色分别记为0, 1, 2, 3分; 再在高倍镜(40×)下对每张切片随机选取5个高倍镜视野, 计数500/视野, 共计2 500个, 阳性细胞数按<5%, 5%~35%, 36%~70%和>70%分别记为0, 1, 2, 3分。取两项评分的乘积进行综合评分, ≤1分为阴性、2~3分为弱阳性、4~5分为中度阳性、≥6分为强阳性。本

实验中合并阴性和弱阳性作为阴性表达标准, 中度阳性和强阳性作为阳性表达标准。结果如图3所示。

实验结果显示(表2), 甲状腺乳头状癌中Notch-1、NICD、Hes1的阳性率分别为20.0%, 28.6%和37.1%。正常甲状腺组织中阳性率分别为60.0%, 54.3%和68.6%; 正常甲状腺组织中Notch-1、NICD、Hes1的表达显著高于甲状腺乳头状癌组($P<0.05$), 有统计学意义。



A: Notch-1在人甲状腺乳头状癌中的表达; B: NICD在人甲状腺乳头状癌中的表达; C: Hes1在人甲状腺乳头状癌中的表达; D: 甲状腺乳头状癌阴性对照; E: Notch-1在正常甲状腺组织中的表达; F: NICD在正常甲状腺组织中的表达; G: Hes1在正常甲状腺组织中的表达; H: 正常甲状腺阴性对照。

A: Notch-1 expression in the human papillary carcinoma of thyroid; B: NICD expression in the human papillary carcinoma of thyroid; C: Hes1 expression in the human papillary carcinoma of thyroid; D: negative control of the human papillary carcinoma of thyroid; E: Notch-1 expression in the normal thyroid tissues; F: NICD expression in the normal thyroid tissues; G: Hes1 expression in the normal thyroid tissues; H: negative control of the normal thyroid tissues.

图3 Notch-1、NICD和Hes1的免疫组化结果(400×)

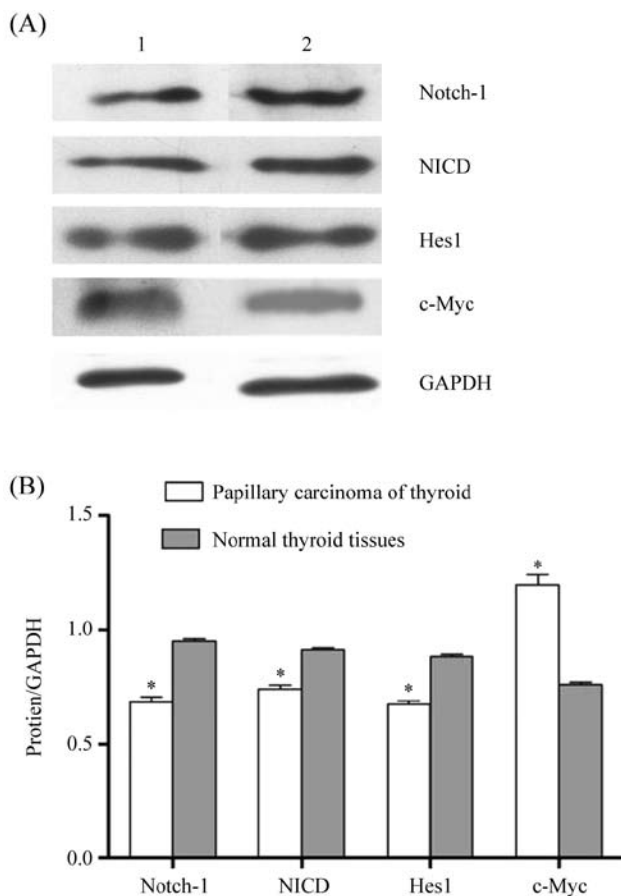
Fig.3 The expression of Notch-1, NICD and Hes1 in the human papillary carcinoma of thyroid and normal thyroid tissues around the nodular goiter determined by immunohistochemistry(400×)

表2 Notch-1、NICD、Hes1在正常甲状腺组织及甲状腺乳头状癌中的表达

Table 2 Expressions of Notch-1, NICD and Hes1 in normal thyroid tissues and papillary carcinoma of thyroid

组别 Groups	Notch-1				NICD				Hes1			
	Notch-1		Notch-1		NICD		NICD		Hes1		Hes1	
	阴性 Negative	阳性 Positive	χ^2	P值 P value	阴性 Negative	阳性 Positive	χ^2	P值 P value	阴性 Negative	阳性 Positive	χ^2	P值 P value
Papillary carcinoma of thyroid	21	14			19	16			24	11		
Normal thyroid tissues	7	28			10	25			13	22		
			11.677	0.001			4.769	0.029			6.937	0.008

2.3.2 Western blot结果 Western blot结果(图4)显示: Notch-1、NICD、Hes1、c-Myc在甲状腺乳头状癌中蛋白质水平的表达分别是 0.683 ± 0.041 , 0.739 ± 0.031 , 0.674 ± 0.024 , 1.196 ± 0.078 ; 在正常组织中的蛋白质水平的表达分别是 0.949 ± 0.019 , 0.912 ± 0.017 , 0.881 ± 0.020 和 0.706 ± 0.016 。甲状腺乳头状癌中的Notch-1、NICD、Hes1表达均低于正常甲状腺组织; 而c-Myc则高于正常甲状腺组织中的表达量, 差异具有显著性($P<0.05$)。



1: 甲状腺乳头状癌; 2: 正常甲状腺组织。* $P<0.05$ 。

1: thyroid papillary carcinoma; 2: thyroid tissue. * $P<0.05$ 。

图4 Western blot检测Notch-1、NICD、Hes1、c-Myc蛋白的表达量($\bar{x}\pm s$)

Fig.4 Expression of Notch-1, NICD and Hes1 determined by Western blot($\bar{x}\pm s$)

3 讨论

Notch基因最早于1917年由Thomas Hunt Morgan在果蝇中发现, 1980年此基因首次被克隆出来。在哺乳动物中发现有4种Notch受体(Notch 1~4)以及5种配体^[3]。受体配体的结合引起了两次连续分裂事件, 前一次由去整合素和金属蛋白酶(ADAM)介导, 产

生Notch的胞外区; 后一次由 γ 分泌酶复合体介导, 释放Notch蛋白的可溶性胞内区(NICD), 这一胞内区能转移进入胞核, 并作为辅助激活因子, 取代先前结合在转录调节基因CSL上的辅助抑制因子, 诱导靶基因表达^[4]。Notch-1的靶基因众多, 如Hes1、HERP、p21、cyclin D1、c-Myc等。Hes1蛋白是属于bHLH基因家族的负性转录因子, 具有一个特殊的保守的bHLH结构域, 可与某些基因如激活型bHLH基因Mash1的启动子特异性结合, 行使其负性转录因子的作用^[5]。c-Myc原癌基因定位于8q24区, 其转录产物与DNA结合, 调节与增殖、分化和凋亡相关的多个基因, 并促进细胞的恶性转化^[6]。c-Myc基因的表达受多个水平的调控, c-Myc蛋白水平的增高参与了肿瘤的形成过程。Notch-1信号通路激活与肿瘤的发生发展密切相关, 其激活后的产物NICD是主要的功能因子。大多数的研究显示, Hes1是Notch-1信号通路中极重要的靶蛋白, Hes1基因的表达与否是Notch-1信号通路激活的重要标志。然而研究表明, 致癌事件不一定发生在Notch基因表达水平, 也可以发生在Notch信号通路的下游, c-Myc既是Notch-1的靶基因, 也可能同时受到其他信号通路的调控。

Notch-1在肿瘤细胞中的作用存在争议, 在人类肿瘤中, Notch-1既可以作为抑癌基因也可以作为原癌基因。在人T淋巴细胞白血病中Notch-1第一次作为癌基因被发现^[7], 随后发现Notch-1在多种肿瘤中表达上调, 包括胰腺癌、结肠癌、非小细胞肺癌、宫颈癌、肾细胞癌、淋巴瘤、卵巢癌等。然而, Notch-1信号在前列腺癌及神经内分泌肿瘤如小细胞肺癌、甲状腺髓样癌、胰腺类癌中表达很低或者缺失。这两种相反的功能表明了Notch信号的表达可能与其所在的细胞内环境有关^[8]。

目前, 甲状腺髓样癌和滤泡状癌与Notch-1的表达关系的研究已经较为深入。Kunnimalaiyaan等^[9]发现了人甲状腺髓样癌组织和甲状腺髓样癌TT细胞株中的Notch-1蛋白处于失活状态时, 神经内分泌(NE)的标志物如降钙素、CgA(嗜铬粒蛋白A)和ASCL1均表达较高。使用多西环素可以促进TT细胞株中Notch-1及Hes1蛋白的表达, 且随着Notch-1表达的增高ASCL-1的表达下降, 而且Notch-1信号的活化抑制了TT细胞株的增殖, 这表明甲状腺髓样癌细胞增殖的抑制是通过Notch-1上调了细胞周期调节蛋白P21。Jaskula-Sztul等^[10]向甲状腺髓样癌小鼠

模型注射强力霉素以诱导Notch-1的表达, 结果发现小鼠肿瘤与正常对照相比明显生长缓慢。Xiao等^[11]发现Notch-1在甲状腺滤泡状癌细胞株FTC-236和乳头状癌细胞株DRO中低表达, 将Notch-1胞内段的质粒转染这两种细胞后, 可以抑制细胞的增殖并下调cyclin D1的表达和上调p21的表达。给予HDAC(组蛋白去乙酰化酶)的抑制剂VPA(丙戊酸)和SBHA后, Notch-1蛋白的表达增加且与抑制细胞增殖呈剂量依赖性, 证明了在DRO和FTC236细胞中Notch-1起到了抑癌基因的作用。Ferretti等^[12]发现通过转染使Notch-1或者Hes1在甲状腺癌细胞中过表达, 发现甲状腺癌细胞可以恢复分化, 降低细胞增殖。金晓燕等^[13]通过免疫荧光及RT-PCR检测了甲状腺乳头状癌中Notch-1和Notch-2蛋白及基因的表达, 发现Notch-1和Notch-2蛋白表达降低, 显示Notch-1在甲状腺乳头状癌中为低表达, 但是Notch-1信号通路和甲状腺乳头状癌的相关性及其下游靶基因的调控机制仍不明确。

本实验的Real Time PCR结果显示: *Notch-1*、*Hes1*、*c-Myc*在甲状腺乳头状癌中的mRNA表达水平分别为对照组的 $0.222\ 8 \pm 0.120\ 2$ 、 $0.430\ 7 \pm 0.255\ 4$ 和 $1.452\ 6 \pm 0.291\ 4$, 与正常甲状腺组织中的表达存在显著差异($P < 0.05$)。免疫组化结果表明, 在35例甲状腺乳头状癌组织中, Notch-1蛋白及其活化形式的NICD蛋白、Hes1蛋白的阳性表达率分别为20%、28.6%、37.1%; 在正常甲状腺组织中, Notch-1蛋白60%阳性表达, 其活化形式的NICD蛋白54.3%阳性表达, Hes1蛋白68.6%阳性表达。本实验还采用Western blot方法比较了Notch-1、NICD、Hes1、*c-Myc*蛋白在甲状腺乳头状癌及正常甲状腺组织中的表达, 结果显示: 与正常甲状腺组织相比, Notch-1及其活化形式的NICD、Hes1、*c-Myc*蛋白的表达存在显著性差异($P < 0.05$), 提示Notch-1信号通路与甲状腺乳头状癌的发生密切相关。Notch-1的表达在甲状腺乳头状癌中降低, Notch-Hes信号途径中下游效应分子Hes1表达降低, 其表达与Notch-1的表达呈同向变化, 提示Notch-1信号通路在甲状腺乳头状癌中是通过其经典的Notch-Hes信号途径传导的。但Hes1还受到其他信号途径的调节, 其与甲状腺乳头状癌的发生发展的关系以及与Notch-1信号通路的确切关系, 尚有待进一步研究证实。*c-Myc*在甲状腺乳头状癌组织中的表达从基因到蛋白质水平平均比在正常

甲状腺组织中升高了, 与Notch-1的表达呈反向关系, 提示*c-Myc*在甲状腺乳头状癌中并非是Notch-1信号通路的直接下游靶基因。这和乳腺癌中Notch-1与*c-Myc*同向上调的结论不同^[14]。相关研究提示*c-Myc*的表达不仅与Notch-1信号通路相关, 还可能与其它信号通路如PI3K/Akt、Wnt/ β -catenin等相关。我们的研究表明: 在甲状腺乳头状癌中Notch-1处于低活化状态, 说明*c-Myc*在甲状腺乳头状癌中高表达可能存在其他的上游调控机制。

Hes1与*c-Myc*之间是否存在相互作用? Notch-1作用于这两个靶基因的具体机制如何? 这些问题至今尚无明确的答案。有报道认为Notch-1还可能作用于其他靶基因(如*cyclin D1*、*p21*)或通过其他信号通路(PI3K、NF- κ B、WNT、Bcl-2)^[15-18]的交互作用参与肿瘤的发生发展。甲状腺乳头状癌中Notch-1信号通路与PI3K/AKT/PTEN等其他信号通路的关系有待进一步证实。

参考文献 (References)

- 1 Nix P, Nicolaides A, Coatesworth AP. Thyroid cancer review 1: Presentation and investigation of thyroid cancer. *Int J Clin Pract* 2005; 59(11): 1340-4.
- 2 Carcangiu ML, Chambers JT, Voynick IM, Pirro M, Schwartz PE. Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptor content in 183 patients with endometrial carcinoma. Part I: Clinical and histologic correlations. *Am J Clin Pathol* 1990; 94(3): 247-54.
- 3 Fiuza UM, Arias AM. Cell and molecular biology of Notch. *J Endocrinol* 2007; 194(3): 459-74.
- 4 Talora C, Campese AF, Bellavia D, Felli MP, Vacca A, Gulino A, *et al.* Notch signaling and diseases: An evolutionary journey from a simple beginning to complex outcomes. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1782(9): 489-97.
- 5 Kageyama R, Ohtsuka T, Hatakeyama J, Ohsawa R. Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp Cell Res* 2005; 306(2): 343-8.
- 6 Zhang L, Hou Y, Ashktorab H, Gao L, Xu Y, Wu K, *et al.* The impact of C-MYC gene expression on gastric cancer cell. *Mol Cell Biochem* 2010; 344(1/2): 125-35.
- 7 Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, *et al.* TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 1991; 66(4): 649-61.
- 8 Kunnimalaiyaan M, Chen H. Tumor suppressor role of Notch-1 signaling in neuroendocrine tumors. *Oncologist* 2007; 12(5): 535-42.
- 9 Kunnimalaiyaan M, Vaccaro AM, Ndiaye MA, Chen H. Overex-

- pression of the NOTCH1 intracellular domain inhibits cell proliferation and alters the neuroendocrine phenotype of medullary thyroid cancer cells. *J Biol Chem* 2006; 281(52): 39819-30.
- 10 Jaskula-Sztul R, Pisarnurakit P, Landowski M, Chen H, Kun-nimalaiyaan M. Expression of the active Notch1 decreases MTC tumor growth *in vivo*. *J Surg Res* 2011; 171(1): 23-7.
- 11 Xiao X, Ning L, Chen H. Notch1 mediates growth suppression of papillary and follicular thyroid cancer cells by histone deacetylase inhibitors. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(2): 350-6.
- 12 Ferretti E, Tosi E, Po A, Scipioni A, Morisi R, Espinola MS, *et al*. Notch signaling is involved in expression of thyrocyte differentiation markers and is down-regulated in thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(10): 4080-7.
- 13 金晓燕, 梁 勇, 陈佳玉, 姚 军, 杨林军, 周 健, 等. Notch-1 在甲状腺乳头状癌中的表达及意义. *中国卫生检验杂志* 2011; 21(1): 1-3.
- 14 Efstratiadis A, Szabolcs M, Klinakis A. Notch, Myc and breast cancer. *Cell Cycle* 2007; 6(4): 418-29.
- 15 Wang Z, Azmi AS, Ahmad A, Banerjee S, Wang S, Sarkar FH, *et al*. TW-37, a small-molecule inhibitor of Bcl-2, inhibits cell growth and induces apoptosis in pancreatic cancer: Involvement of Notch-1 signaling pathway. *Cancer Res* 2009; 69(7): 2757-65.
- 16 Shahi P, Seethammagari MR, Valdez JM, Xin L, Spencer DM. Wnt and Notch pathways have interrelated opposing roles on prostate progenitor cell proliferation and differentiation. *Stem Cells* 2011; 29(4): 678-88.
- 17 Modder UI, Oursler MJ, Khosla S, Monroe DG. Wnt10b activates the Wnt, notch, and NFkappaB pathways in U2OS osteosarcoma cells. *J Cell Biochem* 2011; 112(5): 1392-402.
- 18 Calzavara E, Chiamonte R, Cesana D, Basile A, Sherbet GV, Comi P. Reciprocal regulation of Notch and PI3K/Akt signalling in T-ALL cells *in vitro*. *J Cell Biochem* 2008; 103(5): 1405-12.

The Relationship of Notch-1 Signaling Pathway with Human Papillary Carcinoma of Thyroid

Yang Jingjin¹, Yao Jun², Shen Fengqing¹, Chen Jiayu², Yang Linjun³, Zhang Qiang³, Jing Xiaoyan³, Liang Yong^{2,3*}
 (¹The First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China; ²Medical School, Taizhou University, Taizhou 318000, China; ³Department of Oncologic Surgery, Taizhou Municipal Hospital, Taizhou 318000, China)

Abstract To approach the role of Notch-1 signaling pathway in the pathological development of human papillary carcinoma of thyroid, the expression levels of *Notch-1*, *Hes1* and *c-Myc* mRNA were determined by Real Time PCR in 35 specimen of human papillary carcinoma of thyroid and 35 specimen of normal thyroid tissues around the nodular goiter. The Notch-1, NICD, Hes1 and c-Myc protein levels were determined by immunohistochemistry and Western blot. The expression of Notch-1 and Hes1 was significantly lower in the papillary carcinoma of thyroid than that in the normal thyroid tissues, but the expression of c-Myc was higher in the papillary carcinoma of thyroid. It suggested that Notch-1 and Hes1 may play a role in the pathological development of human papillary carcinoma of thyroid, and the expression of oncogene c-Myc may be unconcerned with the Notch-1 signaling pathway.

Key words papillary carcinoma of thyroid; Notch-1 signaling pathway; Notch-1; Hes1; c-Myc

Received: August 4, 2011 Accepted: October 31, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81072209)

*Corresponding author. Tel: 86-576-88665191, E-mail: liangy@yahoo.cn