

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.21.005

文章编号: 1005-8982(2017)21-0025-06

凝溶胶蛋白对胃癌细胞凋亡及细胞中 活性氧水平的影响研究*

倪猛¹, 殷涛², 郑喜胜³, 刘驰⁴, 王博⁵, 樊宏伟¹

[1. 郑州大学附属南阳医院(南阳市中心医院) 消化内科一病区, 河南 南阳 473000; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 胰腺外科, 湖北 武汉 430022; 3. 郑州大学附属南阳医院(南阳市中心医院) 重症医学科, 河南 南阳 473000; 4. 郑州大学附属南阳医院(南阳市中心医院) 肝脏普外科, 河南 南阳 473000; 5. 郑州大学附属南阳医院(南阳市中心医院) 肿瘤内科三病区, 河南 南阳 473000]

摘要:目的 探讨凝溶胶蛋白(GSN)对胃癌细胞凋亡及细胞中活性氧(ROS)水平的影响。**方法** 免疫印迹法(Western blot)检测胃癌细胞 SGC7901、AGS、BGC823 及胃黏膜上皮细胞 GES-1 中 GSN 的表达水平。细胞转染 GSN siRNA(GSN siRNA 组)和 siRNA 对照(siRNA control 组),同时以只加入转染试剂的细胞为对照组,培养 48 h 后,噻唑蓝(MTT)检测细胞增殖,流式细胞术检测细胞凋亡,激光扫描共聚焦显微镜法检测 ROS 水平,Western blot 检测细胞中 GSN、Notch1 胞内段受体(NICD1)、Notch2 胞内段受体(NICD2)、DNA 结合蛋白 1(HES1)多克隆抗体及活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(Cleaved Caspase-3)水平。**结果** GSN 在胃癌细胞 SGC7901、AGS 及 BGC823 中的表达水平高于胃黏膜上皮细胞 GES-1($P < 0.05$),且在 AGS 细胞中的表达水平最高,后期选用胃癌细胞 AGS 为研究对象。siRNA control 组细胞增殖、凋亡及细胞中 ROS 水平、GSN、NICD1、NICD2、HES1 及 Cleaved Caspase-3 水平与对照组相比均差异无统计学意义($P > 0.05$)。GSN siRNA 组细胞增殖能力及细胞中 GSN、NICD1、NICD2 及 HES1 水平低于对照组($P < 0.05$),而细胞凋亡能力及细胞中 ROS 水平、Cleaved Caspase-3 水平均高于对照组($P < 0.05$)。**结论** 干扰 GSN 表达后,胃癌细胞增殖能力减弱,凋亡增加,作用机制可能与细胞中 ROS 水平及 NOTCH 信号通路有关。

关键词: 胃癌细胞;凋亡;NOTCH 信号通路;活性氧

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

Effect of GSN on apoptosis and ROS level in gastric cancer cells*

Meng Ni¹, Tao Yin², Xi-sheng Zheng³, Chi Liu⁴, Bo Wang⁵, Hong-wei Fan¹

(1. Department of Gastroenterology, Nanyang Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Nanyang, Henan 473000, China; 2. Department of Pancreatic Surgery, Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430022, China; 3. Department of Critical Care Medicine, 4. Department of Liver Surgery, 5. Department of Oncology, Nanyang Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Nanyang, Henan 473000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of GSN on the apoptosis and the level of ROS in gastric cancer cells. **Methods** The expression of GSN in gastric cancer cell lines SGC7901, AGS, BGC823 and gastric epithelial cells GES-1 were detected by Western blot. Cells were transfected with GSN siRNA (the GSN siRNA group), siRNA control (the siRNA control group) and transfection vehicle (the vehicle control group), respectively. Cell proliferation was determined by MTT assay. Cell apoptosis was determined by flow

收稿日期: 2017-03-13

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 81372665)

[通信作者] 樊宏伟, E-mail: xhkfhr@sohu.com; Tel: 13507638051

cytometry. ROS level was measured by laser scanning confocal microscopy. The levels of GSN, NICD1, NICD2, HES1, and cleaved Caspase-3 were detected by Western blot. **Results** Expression level of GSN in gastric cancer cell lines including SGC7901, AGS and BGC823 was significantly higher than that in gastric epithelial cells GES-1 ($P < 0.05$). Given that AGS witnessed the highest expression of GSN, following experiments were performed on it. There was no significant difference in cell proliferation, apoptosis, ROS, GSN, NICD1, NICD2, HES1 or cleaved Caspase-3 level between the siRNA control group and the vehicle control group ($P > 0.05$). Cell proliferation and the levels of GSN, NICD1, NICD2, and HES1 in the GSN siRNA group were dramatically lower than those in the control group ($P < 0.05$), while cell apoptosis and the levels of ROS and cleaved Caspase-3 were notably higher than those in the vehicle control group ($P < 0.05$). **Conclusions** GSN decreases proliferation ability while increases apoptosis of gastric cancer cells through manipulation on ROS level and NOTCH signaling pathway.

Keywords: gastric cancer cell; apoptosis; NOTCH signaling pathway; reactive oxygen specie

目前,全球胃癌发病率在全部恶性肿瘤中位居第4位,死亡率位居第2位^[1]。每年大约有70万人死于胃癌,占全部恶性肿瘤死亡人数的10%左右^[2]。>50岁的中老年人是胃癌高发人群,遗传因素、饮食习惯及环境等均能够引起胃癌的发生。寻找有效的靶基因治疗胃癌是目前研究的热点。凝溶胶蛋白(gelsolin, GSN)参与肌动蛋白合成及生物学功能的发挥,在肌动蛋白丝的切断、聚集等过程中均发挥重要作用^[3]。凝溶胶蛋白是细胞骨架蛋白的重要组成部分,在癌症的发生过程中也具有重要作用^[4]。GSN参与调控肝癌、食管癌等多种癌细胞的生长过程,而NOTCH信号通路是目前公认的与肿瘤细胞生长有关的信号转导通路^[5-6]。本研究中,首先检测GSN在不同胃癌细胞中的表达水平,并通过小核糖核酸(RNA)干扰技术干扰胃癌细胞中GSN的表达,探讨GSN对胃癌细胞增殖凋亡的影响及机制,以期为治疗胃癌提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

GSN siRNA、siRNA Control(购自上海吉玛生物科技有限公司),GSN多克隆抗体、Notch1胞内段受体(NICD1)多克隆抗体、Notch2胞内段受体(NICD2)多克隆抗体、DNA结合蛋白1(hairy and enhancer of split 1, HES1)多克隆抗体及活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 3, Cleaved Caspase-3)单克隆抗体(购自美国Santa Cruz公司),DMEM培养基、RPMI 1640培养基(购自美国Sigma公司),二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度检测试剂盒(购自北京鼎国生物技术有限公司),胎牛血清

(购自美国Gibco公司),活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平检测试剂盒(购自上海研拓生物科技有限公司)。

1.2 细胞培养

胃癌细胞SGC7901、AGS、BGC823及胃黏膜上皮细胞GES-1(购自中国科学院细胞库)。取出冻存在液氮罐中的人胃癌细胞SGC7901、AGS及BGC823,放置于37℃的环境下融化。在细胞中加入细胞培养液(胃癌细胞用含有10%胎牛血清的RPMI 1640细胞培养液,胃黏膜上皮细胞GES-1用含有10%胎牛血清的DMEM细胞培养液),混匀后,1 000 r/min离心10 min。弃上清液,加入5 ml细胞培养液悬浮细胞后,接种到细胞培养瓶中,放置于37℃,5%二氧化碳CO₂培养箱中培养48 h后,观察细胞密度>90%时,弃掉细胞培养液,加入0.25%的胰蛋白酶消化细胞,1 000 r/min离心10 min,用适量细胞培养液悬浮细胞后,根据实验要求按照不同比例接种到细胞培养瓶中继续培养。

1.3 Western blot 检测细胞中 GSN 表达水平

取胃癌细胞SGC7901、AGS、BGC823及胃黏膜上皮细胞GES-1,加入裂解液,放置于冰上裂解30 min。转移裂解液至离心管中,12 000 r/min,4℃离心20 min,转移蛋白上清至EP管中。BCA蛋白浓度检测试剂盒检测蛋白浓度。取蛋白样品与Loading buffer混合后放置于100℃煮沸5 min。取变性蛋白样品加入到上样孔中,每孔中加入蛋白样品50 μl,80 V电压电泳30 min后,调整电压为120 V至电泳结束。取出蛋白凝胶,4℃转印至PVDF膜上,经5%脱脂奶粉封闭后,依次与一抗(200倍稀释)、二抗(1 000倍稀释)反应,在暗室中显影,曝光后以GAPDH为内参,分析蛋白表达水平。

1.4 细胞转染

取培养至对数生长期的细胞,加入胰蛋白酶消化后,用细胞培养液悬浮细胞沉淀,调整每毫升细胞悬浮液中含有细胞 2×10^4 个,接种于 96 孔细胞培养板中,每孔中加入 $100 \mu\text{l}$ 细胞悬浮液,放置于 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养,观察细胞融合度为 60% 时,转染 GSN siRNA (GSN siRNA 组) 和 siRNA 对照 (siRNA Control 组)。用不含胎牛血清的不完全培养液稀释 siRNA,混合后,加入转染试剂 Lipofectamine™ 2000,混合后,放在室温下静置 15 min 形成转染的复合体。将细胞培养板中的培养液吸出,加入转染复合体,培养 6 h 后,更换为含有胎牛血清的细胞培养液继续培养。

1.5 MTT 检测细胞增殖

取转染后的胃癌细胞,加入 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞后,调整细胞浓度为每毫升 2×10^4 个。接种于 96 孔细胞培养板中,每孔加入 $100 \mu\text{l}$ 的细胞悬浮液,放置于 37°C 培养细胞 48 h。在细胞中加入噻唑蓝 (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT) 溶液孵育 4 h,加入 DMSO 溶液在室温下孵育反应 10 min。每组设置 5 个复孔提高实验准确性,同时设置空白组,空白组中不加细胞。观察结晶物完全融化后,酶标仪检测细胞吸光度,计算细胞存活率。细胞存活率 = (转染组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值)。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡

转染后的细胞培养 48 h 后,弃掉上清液,胰蛋白酶消化后,1 000 r/min 离心 10 min,弃酶消化液,加入细胞培养液,调整细胞浓度为每毫升含有 1×10^6 个细胞。收集 1 ml 的细胞,加入 $500 \mu\text{l}$ 结合缓冲液混合均匀,加入体积为 $10 \mu\text{l}$ 的膜联蛋白 V-FITC (Annexin V-FITC),放在避光条件下室温反应 30 min,加入碘化丙啶 (propidium iodide, PI) $5 \mu\text{l}$,避光反应 5 min。流式细胞仪检测细胞凋亡情况,分析细胞凋亡率。

1.7 激光扫描共聚焦显微镜检测 ROS 水平

取转染后的细胞,接种到 96 孔细胞培养板中,每孔中加入 4×10^3 个细胞。放在 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养 48 h 后,吸除上清液,每孔中加入 $100 \mu\text{l}$ 的 H2DCFDA 染液 ($5 \mu\text{mol/L}$),放置于避光条件下反应 30 min 后,激光扫描共聚焦显微镜检测细胞荧光强度,激发波长和吸收波长分别为 488 和 490 nm。荧光强度越强 ROS 水平越高。

1.8 Western blot 检测细胞中 NICD1、NICD2、HES1 及 Cleaved Caspase-3 水平

收集转染后 48 h 的细胞,参照 1.4 中 Western blot 方法检测细胞中 NICD1、NICD2、HES1 及 Cleaved Caspase-3 水平。

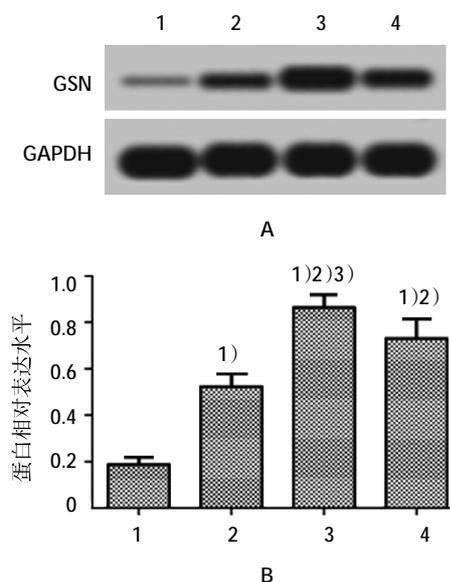
1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较用方差分析,两两比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞中 GSN 表达水平比较

Western blot 检测人胃癌细胞 SGC7901、AGS、BGC823 及胃黏膜上皮细胞 GES-1 中 GSN 表达水平依次为 (0.52 ± 0.06)、(0.86 ± 0.06)、(0.73 ± 0.09) 及 (0.19 ± 0.02)。细胞 SGC7901、AGS、BGC823 中 GSN 水平均高于细胞 GES-1,差异有统计学意义 ($F = 65.350$, $P = 0.000$)。细胞 AGS 中 GSN 水平最高,后续实验中选择胃癌细胞 AGS 继续研究。见图 1。



A: Western blot 结果; B: 蛋白相对表达水平。1: GES-1 细胞; 2: SGC7901 细胞; 3: AGS 细胞; 4: BGC823 细胞。1) 与 GES-1 细胞比较, $P < 0.05$; 2) 与 SGC7901 细胞比较, $P < 0.05$; 3) 与 BGC823 细胞比较, $P < 0.05$; 整体比较

图 1 细胞中 GSN 表达水平比较

2.2 转染后细胞中 GSN 表达水平比较

对照组、siRNA Control 组及 GSN siRNA 组 GSN 表达水平依次为 (0.67 ± 0.07)、(0.68 ± 0.08) 和 (0.20 ± 0.05), 组间比较差异有统计学意义 ($F = 49.065$, $P = 0.000$)。AGS 细胞转染 siRNA Control 后细胞中 GSN

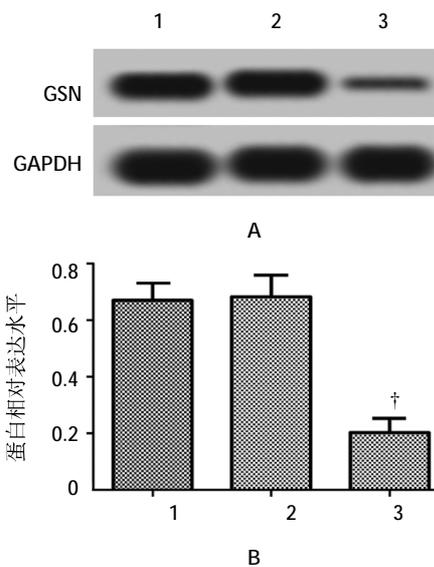
表达水平与对照组比较无差异($t=0.163, P=0.879$)。细胞转染 GSN siRNA 后细胞中 GSN 表达水平低于对照组,差异有统计学意义($t=9.463, P=0.001$)。见图 2。

2.3 细胞增殖凋亡检测结果

转染后的 AGS 细胞,经 MTT 和流式细胞术检测细胞的存活率和细胞凋亡情况。对照组、siRNA Control 组、GSN siRNA 组细胞存活率依次为 (100.01 ± 9.99)%、(100.5 ± 9.33)%和 (44.67 ± 7.33)%, 凋亡率依次为 (9.70 ± 2.61)%、(10.47 ± 3.07)%和 (34.55 ± 4.34)%。细胞转染 GSN siRNA 后细胞存活率下降,细胞转染 GSN siRNA 后细胞凋亡率升高,与对照组比较,差异有统计学意义($F_{\text{细胞存活率}}=38.531, P_{\text{细胞存活率}}=0.000$)。细胞转染 siRNA control 后细胞存活率和凋亡率与对照组比较均无差异($F_{\text{细胞凋亡率}}=51.236, P_{\text{细胞凋亡率}}=0.000$)。见图 3。

2.4 细胞中 ROS 水平比较

检测各组 AGS 细胞中 ROS 水平,荧光强度越高,ROS 水平也就越高。对照组、siRNA Control 组及 GSN siRNA 组 ROS 水平依次为 (42.33 ± 3.66)、(42.92 ± 3.87)和 (65.67 ± 6.31),组间比较差异有统计学意义($F=23.376, P=0.002$)。转染 GSN siRNA 后的细胞 ROS 水平高于对照组,差异有统计学意义($t=5.542,$



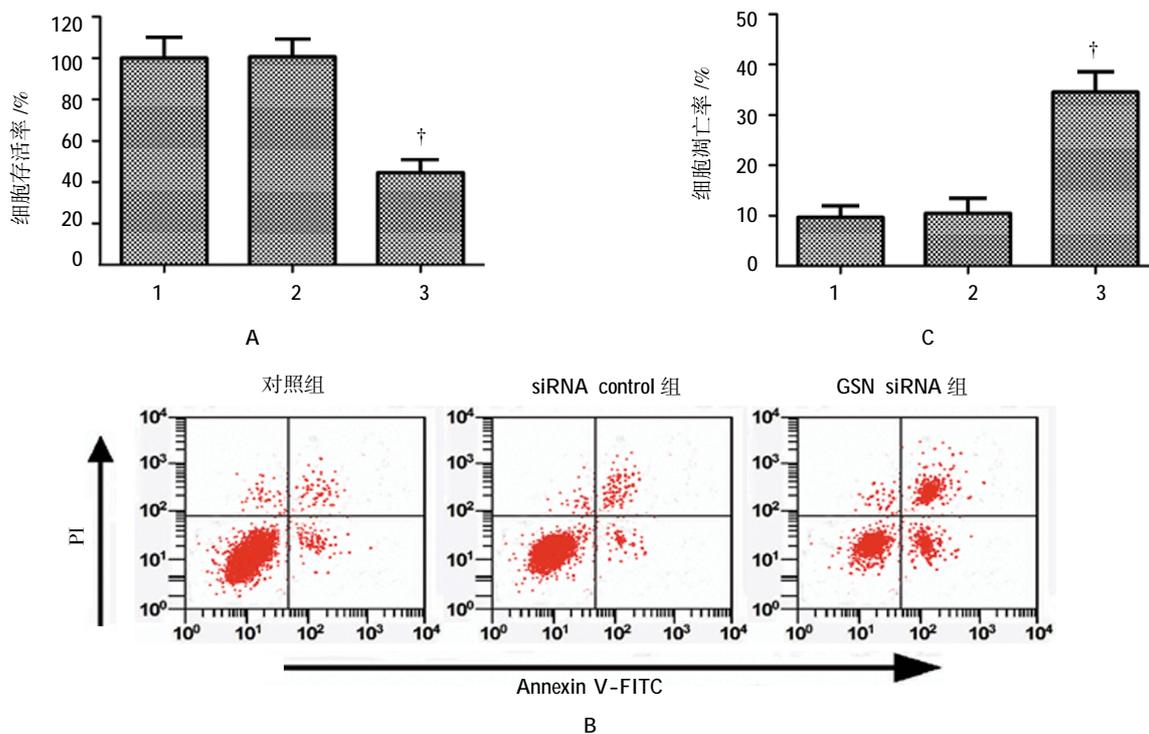
A: Western blot 结果;B: 蛋白相对表达水平。1: 对照组;2: siRNA Control 组;3: GSN siRNA 组。† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 2 转染后细胞中 GSN 表达水平比较

$P=0.005$)。转染 siRNA Control 后的细胞 ROS 水平与对照组比较无差异($t=0.192, P=0.857$)。见图 4。

2.5 细胞中 NICD1、NICD2、HES1 及 Cleaved Caspase-3 水平比较

检测各组 AGS 细胞中 NICD1、NICD2、HES1 水平, 对照组、siRNA Control 组、GSN siRNA 组 Cleaved



A: 细胞存活率;B: 流式细胞术结果;C: 细胞凋亡率。1: 对照组;2: siRNA Control 组;3: GSN siRNA 组。† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 3 细胞增殖凋亡检测结果

Caspase-3 水平依次为(0.21 ± 0.05)、(0.21 ± 0.06)及(0.48 ± 0.06),NICD1 水平依次为(0.56 ± 0.06)、(0.55 ± 0.07)及(0.28 ± 0.06),NICD2 水平依次为(0.84 ± 0.05)、(0.84 ± 0.06)及(0.20 ± 0.05),HES1 水平依次为(0.30 ± 0.05)、(0.30 ± 0.06)及(0.18 ± 0.02),组间比较差异有统计学意义($F_{\text{Cleaved Caspase-3}}=22.546, P_{\text{Cleaved Caspase-3}}=0.002; F_{\text{NICD1}}=18.769, P_{\text{NICD1}}=0.003, F_{\text{NICD2}}=142.884; P_{\text{NICD2}}=0.000, F_{\text{HES1}}=6.646, P_{\text{HES1}}=0.030$)。GSN siRNA 组细胞中 NICD1、NICD2 及 HES1 水平均低于对照组,而 Cleaved Caspase-3 水平高于对照组,差异有统计学意义($t_1=5.716, P_1=0.005; t_2=15.677, P_2=0.000; t_3=3.860, P_3=0.018; t_4=5.988, P_4=0.004$)。siRNA Control 组细胞中 NICD1、NICD2、HES1 及 Cleaved

Caspase-3 水平与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 5。

3 讨论

胃癌的发病率在 20 世纪以前呈逐年上升趋势,随着生活条件的改善,胃癌发病率的上升趋势有所减缓。世界范围内每年新增的胃癌患者中有 50%左右的患者在中国,而胃癌也是我国癌症中死亡人数最多的恶性肿瘤^[7-9]。胃癌发生早期症状不明显,大部分患者在确诊时基本已经处于胃癌的晚期,这为治疗带来很多的困难。胃癌严重危害着人类的生命健康。

GSN 是一种近年来发现的与肿瘤有关基因,在细胞的生长、死亡过程中均发挥作用^[9]。既往的研究表明,GSN 在肝癌患者血清及癌症组织中均表达上调,过表达肝癌细胞中 GSN 的水平,能够抑制肝癌细胞的凋亡^[6,10-11]。本研究结果与之前的报道相一致,胃癌细胞株中 GSN 的水平均高于胃黏膜细胞,这提示 GSN 可能是一种癌基因,能够促进癌症的发展。

细胞凋亡是一种正常情况下的细胞死亡,受多种基因蛋白和细胞内 ROS 水平的调控^[12]。有研究表明,GSN 能够通过作用于 Caspase-3 的活化水平,进而影响癌细胞的凋亡^[13-14]。Caspase-3 的活化是细胞凋亡进入不可逆阶段的标志^[15]。本研究结果显示,干扰 GSN 表达后的胃癌细胞增殖能力下降,而流式细胞术结果显示,干扰 GSN 后胃癌细胞的凋亡数目增多,细胞中 Caspase-3 活化增多,细胞内 ROS 水平升高,这进一步提示,GSN 是一种癌基因,干扰其表达后能够抑制胃癌细胞增殖,促进胃癌细胞凋亡。

NOTCH 能够调控海胆、人等多种生物体内细胞的生长和死亡^[16]。多项研究已显示,NOTCH 在多种肿瘤中异常活化,能够调控肿瘤细胞的多种生物学功能的发挥^[17-18]。NICD1、NICD2 是 NOTCH 信号通路的胞内段基因,DNA 结合蛋白 1(HES1)含有 α 螺旋-环-螺旋结构,能够调控靶基因的转录,是 NOTCH 信号转导过程中的重要传递因子^[19]。本研究结果发现,干扰 GSN 后胃癌细胞中 NICD1、NICD2 及 HES1 蛋白表达均出现下调。这说明 GSN 对胃癌细胞的作用机制可能与 NOTCH 信号通路有关。

综上所述,GSN 在胃癌细胞株中的表达水平高于人正常的胃黏膜细胞,干扰胃癌细胞中 GSN 表达后,胃癌细胞的增殖受到抑制,凋亡增多,作用机制可能与 NOTCH 信号通路及细胞内的 ROS 水平有

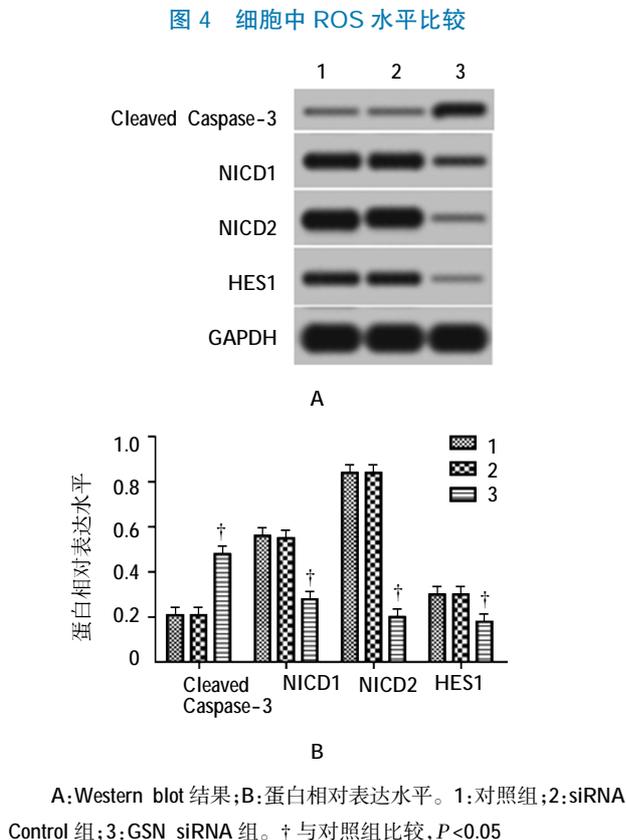
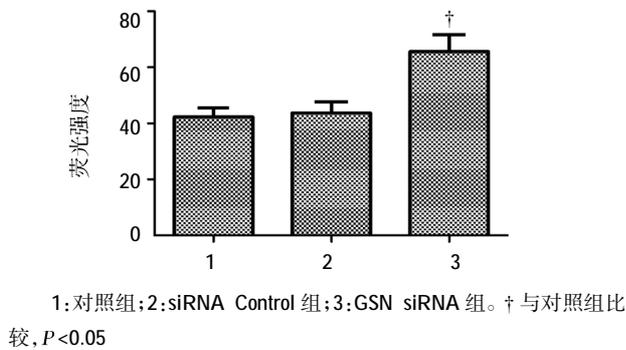


图 5 细胞中 NICD1、NICD2 及 HES1 水平比较

关。这为后期进一步在体内研究 GSN 对胃癌的作用机制奠定基础,为治疗胃癌提供新思路。

参 考 文 献:

- [1] HESS L M, MICHAEL D, MYTELKA D S, et al. Chemotherapy treatment patterns, costs, and outcomes of patients with gastric cancer in the United States: a retrospective analysis of electronic medical record (EMR) and administrative claims data[J]. *Gastric Cancer*, 2016, 19(2): 607-615.
- [2] HUANG S C, NG K F, LEE S E, et al. HER2 testing in paired biopsy and excision specimens of gastric cancer: the reliability of the scoring system and the clinicopathological factors relevant to discordance[J]. *Gastric Cancer*, 2016, 19(1): 176-182.
- [3] MAZUR A J, MOROSAN-PUOPOLO G, MAKOWIECKA A, et al. Analysis of gelsolin expression pattern in developing chicken embryo reveals high GSN expression level in tissues of neural crest origin[J]. *Brain Structure and Function*, 2016, 221(1): 515-534.
- [4] 黎相照, 薛小磊, 许锦文. 凝溶胶蛋白在结直肠癌组织中的表达及意义[J]. *广东医学*, 2016, 37(16): 2452-2454.
- [5] SAIDI S, POPOV Z, STAVRIDIS S, et al. Alterations of microsatellite loci GSN and D18S51 in urinary bladder cancer[J]. *Hippokratia*, 2015, 19(3): 200-204.
- [6] 周怡. GSN 抑制肝癌细胞凋亡并促进肝癌细胞浸润转移的研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2014.
- [7] FUJITA J, TAKAHASHI M, URUSHIHARA T, et al. Assessment of postoperative quality of life following pylorus-preserving gastrectomy and Billroth-I distal gastrectomy in gastric cancer patients: results of the nationwide postgastrectomy syndrome assessment study[J]. *Gastric Cancer*, 2016, 19(1): 302-311.
- [8] 金红顺, 徐红, 王京, 等. 老年胃癌的诊疗研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(7): 1773-1774.
- [9] ABEDINI M R, WANG P W, HUANG Y F, et al. Cell fate regulation by gelsolin in human gynecologic cancers[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(40): 14442-14447.
- [10] REIS H, PÜTTER C, MEGGER D A, et al. A structured proteomic approach identifies 14-3-3 Sigma as a novel and reliable protein biomarker in panel based differential diagnostics of liver tumors[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2015, 1854(6): 641-650.
- [11] LI X Y, ZANG S B, FANG X T, et al. Identification and verification of the candidate proteins that interact and collaborate with ATF3 in inhibiting hepatocarcinogenesis[J]. *Chinese Journal of Pathology*, 2016, 45(5): 314-317.
- [12] BRÜNKER P, WARTHA K, FRIESS T, et al. RG7386, a novel tetravalent FAP-DR5 antibody, effectively triggers FAP-dependent, avidity-driven DR5 hyperclustering and tumor cell apoptosis[J]. *Molecular cancer therapeutics*, 2016, 15(5): 946-957.
- [13] KONG B, TSUYOSHI H, ORISAKA M, et al. Mitochondrial dynamics regulating chemoresistance in gynecological cancers[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2015, 1350(1): 1-16.
- [14] DENG B, FANG J Q, ZHANG X F, et al. Role of gelsolin in cell proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Gene*, 2015, 571(2): 292-297.
- [15] SOHN D, PETERS D, PIEKORZ R P, et al. miR-30e controls DNA damage-induced stress responses by modulating expression of the CDK inhibitor p21WAF1/CIP1 and caspase-3[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(13): 15915-15929.
- [16] BHOLA N E, JANSEN V M, KOCH J P, et al. Treatment of triple-negative breast cancer with TORC1/2 inhibitors sustains a drug-resistant and notch-dependent cancer stem cell population[J]. *Cancer research*, 2016, 76(2): 440-452.
- [17] DELURY C, HART C, BROWN M, et al. Stroma-induced jagged1 expression drives PC3 prostate cancer cell migration; disparate effects of RIP-generated proteolytic fragments on cell behaviour and Notch signaling[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2016, 472(1): 255-261.
- [18] TAKEBE N, MIELE L, HARRIS P J, et al. Targeting notch, hedgehog, and wnt pathways in cancer stem cells: clinical update[J]. *Nature reviews Clinical oncology*, 2015, 12(8): 445-464.
- [19] LANIER V, JEFFERS M, WALTERBERGER J, et al. Leptin Notch VEGFR-2 axis influences cancer stromal cell behavior[J]. *Cancer Research*, 2015, 75(15): 2911.