

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2009.11.003

Notch1 信号途径在食管鳞癌细胞中的激活及对细胞周期的影响

许培荣¹, 范天黎², 刘冲³, 鲁照明¹, 刘红涛¹, 巩天晓¹, 薛乐勋¹

Activation of Notch1 Signaling Pathway in Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Its Effect on Cell Cycle

XU Pei-rong¹, FAN Tian-li², LIU Chong³, LU Zhao-ming¹, LIU Hong-tao¹, GONG Tian-xiao¹, XUE Le-xun¹

1. Laboratory for Cell Biology, Department of Bioengineering of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Department of Pharmacology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University; 3. Department of Pharmacy, Zhengzhou University

Corresponding Author: XUE Le-xun, E-mail: xuelx@371.net

Abstract: Objective To investigate the active status of Notch1 signaling pathway in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and its effect on cell cycle. **Methods** The expression of Notch1 gene was detected by immunocytochemistry in EC9706 cells, and the active status of Notch1 signaling pathway was investigated by immunofluorescence. In addition, cell proliferation assay was performed using CCK-8 Kit. Proteins and mRNA of the genes related to cell cycle was studied by Western blot and RT-PCR techniques. Finally, cell cycle distribution was measured by flow cytometry (FCM). **Results** The expression of Notch1 gene was found in EC9706 cells transfected with pcNICD. Besides, the result of immunofluorescence revealed that Notch1 appeared to be expressed in the cytosol and nucleus, implying an activated status. EC9706 cells had an obvious decreased growth rate compared to the control EC9706 cells and EC9706 cells transfected with pcDNA3.1 ($P < 0.01$). Furthermore, the mRNA and proteins expressions of the CDK2, cyclin D1 and cyclin E genes were significantly decreased in the EC9706 cells transfected with pcNICD compared to those of the cells untreated and transfected with pcDNA3.1. There were higher proportions of cells (74.5%, $P < 0.05$) in EC9706 cells transfected with pcNICD at G₀/G₁ phase than that in cells untreated (59.1%) and transfected with pcDNA3.1 (59.0%). Cell cycle distribution analysis demonstrated that the cell increased ($P < 0.05$) at G₀/G₁ phase in the cells transiently expressing NICD, which suggested that active Notch1 signaling pathway induces G₀/G₁ cell cycle arrest in EC9706 cells. **Conclusion** Active Notch1 signaling pathway can obviously inhibit the growth of EC9706 cells, suggesting Notch1 gene may be a new target of treating esophageal squamous cell carcinoma.

Key words: Notch1 signaling pathway; Cell cycle; pcNICD vector; EC9706 cell

摘要:目的 观察 Notch1 信号途径在食管鳞癌 EC9706 细胞中的激活状态及其对细胞周期的影响。**方法** 通过免疫细胞化学检测 Notch1 基因在食管鳞癌细胞株 EC9706 细胞中的表达,并通过免疫荧光方法研究 Notch1 基因在 EC9706 细胞中的激活状态。并且利用 CCK-8 试剂检测食管癌细胞的增殖状态。此外,采用 RT-PCR 和 Western blot 技术检测与细胞周期相关基因的表达,最后通过流式细胞仪进一步探索激活的 Notch1 信号途径对细胞周期的影响。**结果** 转染 pcNICD 后的食管鳞癌细胞株中发现 Notch1 基因的表达。免疫荧光结果显示,转染 pcNICD 后的食管鳞癌细胞株中 Notch1 信号途径处于激活状态。与未处理和转染 pcDNA3.1

的 EC9706 细胞相比,稳定表达 NICD 的 EC9706 细胞的生长速率明显受到抑制 ($P < 0.01$)。此外,与未处理的和转染 pcDNA3.1 的 EC9706 细胞相比,稳定表达 NICD 的 EC9706 细胞的 CDK2, cyclin D1 和 E 基因的 mRNA 和蛋白的表达明显下调 ($P < 0.05$)。转染 pcNICD 的 EC9706 细胞在 G₀/G₁ 期的比率高达 74.5%,而未处理的

收稿日期:2008-09-19;修回日期:2009-03-12

基金项目:河南省医学科技攻关资助项目 (20050009)

作者单位:1. 450052 郑州大学生物工程系细胞生物学研究室;2. 郑州大学基础医学院药理学教研室;3. 郑州大学药学院

通信作者:薛乐勋, E-mail: xuelx@371.net

作者简介:许培荣(1971-),女,本科,实验师,主要从事肿瘤分子生物学研究

和转染 pcDNA3.1 的 EC9706 细胞在 G_0/G_1 期的比率分别为 59.1% 和 59.0%。细胞周期分析显示瞬时表达 NICD 的 EC9706 细胞在 G_0/G_1 期比率的增加,提示激活的 Notch1 信号途径能够诱导细胞静止在 G_0/G_1 期。**结论** Notch1 信号途径的激活引起食管鳞癌细胞的细胞周期静止,提示 Notch1 基因有可能成为治疗食管鳞癌的新靶点。

关键词: Notch1 信号途径; 细胞周期; pcNICD 载体; EC9706 细胞

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A

文章编号: 1000-8578(2009)11-0908-06

0 引言

食管癌是一种高侵袭的恶性肿瘤,居世界癌症死亡的第六位^[1]。食管鳞癌占食管癌的 90%,在中国仍然是食管癌的主要类型,尤其在河南省林州市^[2]。随着科学技术的进步,食管癌的预后在过去三十年稍微有些改善,然而,五年的生存率依然很低^[3]。因此,早期食管癌检测,改善目前的治疗系统是十分必要的。

最近研究表明,在人类的癌细胞中,Notch1 基因有着癌基因和抑癌基因的双重作用。Notch1 信号途径的激活已经被证实能抑制小细胞肺癌的生长^[4]。此外,Notch1 与 T 细胞急性淋巴细胞瘤 (T-ALL) 有着密切的关联,当 Notch1 信号被阻断后,在几个 T-ALL 来源的细胞系中,细胞生长受到明显的抑制,提示调节 Notch1 信号途径可能是治疗这类肿瘤有效的分子靶点^[5]。

本研究首先通过免疫荧光研究转染 pcNICD 的食管鳞癌 EC9706 细胞的转染效率及 Notch1 信号途径在 EC9706 细胞中的状态。同时利用 CCK-8 来分析未转染、转染 pcDNA3.1 和 pcNICD 的食管鳞癌 EC9706 细胞的增殖情况。并通过半定量 RT-PCR 和 Western blot 来研究与 Notch1 信号通路相关的细胞周期调控基因的表达。最后通过流式细胞仪来进行细胞周期分析,旨在探讨 Notch1 信号途径在食管鳞癌发生发展中的作用及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

pcDNA3.1 和脂质体 2000 均购自美国 Invitrogen 公司,pcNICD 载体为本室构建,稳定表达 Notch1 的 EC9706 细胞由本室筛选,碘化吡啶 PI 购自美国 Sigma 公司,Cell Counting Kit-8(CCK-8)购自中国 Beyotime 生物有限公司,鼠抗人 cyclinD1、cyclinE 和 CDK2 均购自美国 Santa Cruz 公司,半定量 RT-PCR 引物 CDK2 为: F: 5'-CCTGGACACTGAGACTGAGGGT-

3', R: 5'-CTCAGAATCTCCAGGGAACAGG-3', cyclin E 为: F: 5'-CTGGCTGAATGTTTATGTCC-3', R: 5'-TCTTTGCTTGGGCTTTGTCC-3', cyclin D1 为: F: 5'-TGGAGCCCCTGAAGAAGAG-3', R: 5'-AAGTGCCT-TGTGCGGTAGC-3', 内参 β -actin 为: F: 5'-GCATCCT-CACCCTGAAGTAC-3', R: 5'-TTCTCCTTAAATGTCACGCAC-3'。退火温度分别为: 58 °C、58 °C、60 °C 和 55 °C。

1.2 方法

1.2.1 免疫细胞化学法

将培养瓶中未转染以及用 pcDNA3.1 和 pcNICD 转染的食管癌细胞 EC9706 经胰蛋白酶消化后,接种于 6 孔培养板中,在 37 °C、5% CO_2 条件下培养 24 h,制备细胞爬片。标本置于 3% 的 H_2O_2 中,室温下 30 min,以阻断内源性过氧化物酶。PBS 洗 5 min \times 3 次。滴加 10% 正常兔血清,室温下 30 min。弃去血清,滴加 Notch1 抗体(稀释度均为 1:100)于切片上,湿盒内 4 °C 过夜。PBS 洗 5 min \times 3 次。滴加生物素化二抗工作液,湿盒内 37 °C 孵育 30 min。PBS 洗 5 min \times 3 次。滴加辣根酶标记的链霉卵白素工作液,湿盒内 37 °C 孵育 10 min。PBS 洗 5 min \times 3 次。将 DAB 底物工作液滴加于切片上,显微镜下控制显色,自来水终止显色反应。常规酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封固。结果判定:阳性显色为棕黄色颗粒,主要位于胞质和胞核。

1.2.2 免疫荧光法

细胞准备与固定:取转染 pcNICD 的 EC9706 的对数生长期细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化,制成单细胞悬液。将细胞接种到预先放置几张 6 mm \times 22 mm 盖玻片的培养瓶或培养皿中,置 CO_2 培养液培养 1~3 d,待细胞接近长成单层,取出盖玻片,放入 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)洗 2 次,用多聚甲醛固定细胞 20 min;标本置于 3% 的 H_2O_2 中,室温 30 min,以阻断内源性过氧化物酶。PBS 洗 5 min \times 3 次;滴加 10% 封闭用正常兔血清,室温,30 min;弃去血清,滴加 Notch1 抗体(稀释度均为 1:100)于玻片上,湿盒内 4 °C 过夜。PBS 洗 5 min \times 3 次;滴加适当稀释的 FITC 荧光素标记的二抗,置于湿盒内,37 °C 保温 30~60 min;PBS 振洗 2 次,每次 5 min,然后用蒸馏水振洗 1 次;50% 缓冲甘油封片;在荧光显微镜下观察。

1.2.3 细胞增殖分析

CCK-8 是一种灵敏的非放射性的比色分析方法,在细胞增殖和细胞毒性实验中它可以检测活细胞的数量。CCK-8 溶液可直接加入到细胞中,用 CCK-8 进行细胞增殖分析,其敏感度优于其他检测方法,用

CCK-8 方法测定稳定或瞬时表达 NICD 的 EC9706 细胞的生长。稳定表达 NICD 的 EC9706 细胞以每孔 5×10^3 个细胞分别进行接种,当测定生长速率时,加入含 10% CCK-8 的等量新鲜培养液于 37 °C 培养 1~4 h,然后用酶标仪测 450 nm 的吸光度。

1.2.4 半定量 RT-PCR 分析与 Notch1 相关基因 mRNA 水平的变化

根据操作说明用 Trizol 试剂提取总 RNA,并用紫外分光光度计测定其浓度。然后用 AMV First Strand DNA Synthesis 试剂盒合成 cDNA 第一链。具体操作如下:1 μ g 提取的总 RNA 在 42 °C 反转录成 cDNA,体系如下:1 μ l AMV 逆转录酶,1 μ l 随机六聚体,4 μ l $5 \times$ 缓冲液,2 μ l dNTP(10 mM) and 1 μ l Rnase 抑制剂(20 u/ μ l),然后进行 PCR 反应。PCR 反应体系如下:1 μ l cDNA, 0.5 u LA Taq DNA 聚合酶,2.5 μ l $10 \times$ LA PCR 缓冲液,2.5 mM dNTP 混合物和各 50 pM 正向和反向引物。 β -actin 作为对照,PCR 反应条件为:预变性 94 °C 2 min,然后 94 °C 30 s,不同基因按材料中所示的退火温度 30 s, 72 °C 50 s,总共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 6 min。扩增结束后,取 10 μ l 进行电泳检测,并用 Gene Tools 进行 mRNA 相对表达量分析。

1.2.5 Western blot 检测与 Notch1 相关基因蛋白水平的变化

将未处理和转染的 EC9706 细胞在裂解缓冲液中进行裂解。收集细胞提取物于 12 000 r/min \times 5 min 离心,蛋白浓度用 Bradford 法进行测定。80 μ g 总蛋白在上样缓冲液中煮 5 min,于 10% SDS-PAGE 电泳,然后通过电转到硝酸纤维素膜上。硝酸纤维素膜用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 于室温封闭 2 h,然后分别加一抗(cyclin D1 和 E, CDK2 和 β -actin) 于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中,4 °C 过夜,第

二天,用 TBST 洗 5 min \times 3 次,然后分别加合适的二抗作用 1 h,洗 5 min \times 3 次,然后曝光。最后用 Gene Tools 进行蛋白相对表达量分析。

1.2.6 细胞周期分析

1×10^6 个未处理的和转染的 EC9706 细胞于 24、48 和 72 h 分别收获,在 PBS 缓冲液中进行漂洗,然后于 4 °C 70% 的冰乙醇中固定 30 min。接着在冷 PBS 中漂洗三次,细胞重悬于含 40 μ g propidium iodide 和 100 μ g RNase A 的 PBS 溶液中,于 37 °C 孵育 30 min。最后通过流式细胞仪分析样品中的 DNA 含量。

1.2.7 统计学方法

RT-PCR 和 Western blot 结果应用 Gene Tools 进行灰度值分析,上述实验均分别重复三次。应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理,统计学数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用 *t* 检验,多个样本均数比较应用单因素方差分析(One-way ANOVA),*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

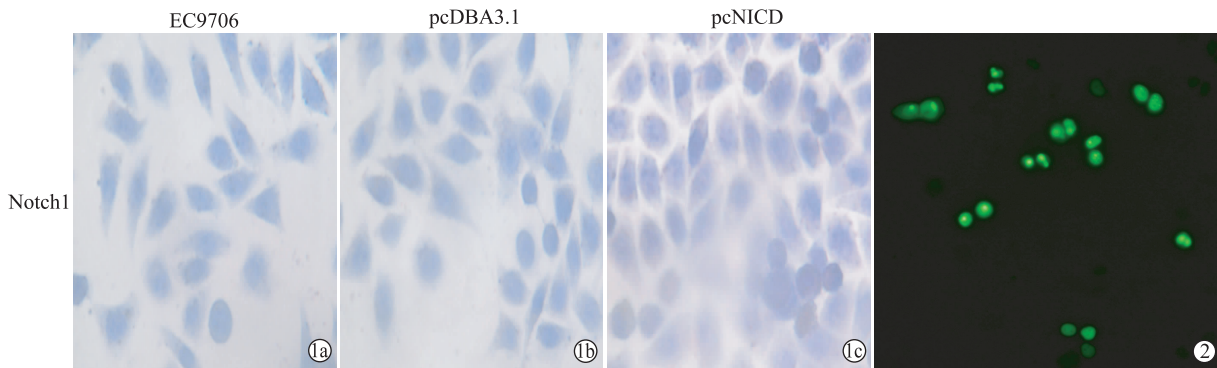
2 结果

2.1 EC9706 细胞中 Notch1 的表达以及 Notch1 信号途径的激活

免疫细胞化学结果表明,在未处理的和转染 pcDNA3.1 的 EC9706 细胞中,Notch1 的表达不可检测或很弱,而在转染 pcNICD 的 EC9706 细胞中,能够发现 Notch1 的表达,见图 1。此外,免疫荧光结果显示 Notch1 在胞质和胞核内均有表达,表明转染 pcNICD 后能够激活 Notch1 信号途径,见图 2。

2.2 Notch1 信号途径对人食管鳞癌 EC9706 细胞增殖的影响

在未处理和转染 pcDNA3.1 的 EC9706 细胞中,EC9706 细胞的生长率两组间差异无统计学



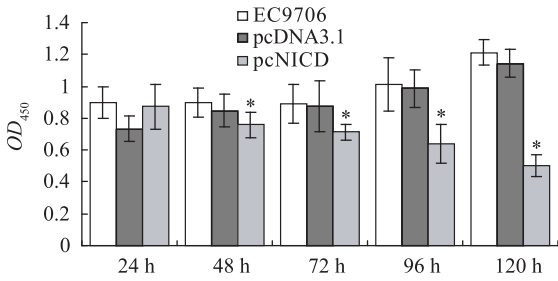
Expression of Notch1 were observed immunocytochemically in EC9706 cells untransfected,transfected with pcDNA3.1 and pcNICD vectors

图 1 Notch1 在 EC9706 细胞中的表达 Figure 1 Expression of Notch1 in EC9706 cells

Notch1 appears to be expressed in the cytosol and nucleus, implying an activated status

图 2 Notch1 蛋白在 EC9706 细胞中的定位 Figure 2 Localizations of Notch1 protein in EC9706 cells

意义($P>0.05$)。但是,与未处理和转染 pcDNA3.1 的 EC9706 细胞相比,稳定表达 NICD 的 EC9706 细胞的生长速率明显受到抑制($P<0.01$),见图 3。这些结果表明,稳定表达组成性激活的 Notch1 信号途径能明显抑制食管鳞癌细胞的生长。

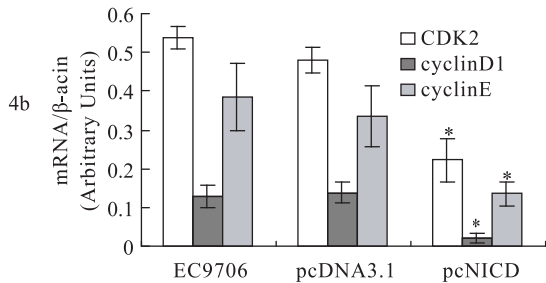
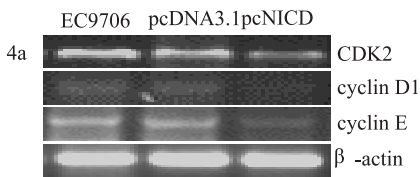


The growth of EC9706 cells stably expressing Notch1 (NICD) was detected by CCK8 kit assay. EC9706 cells had an obvious decreased growth rate compared to the control EC9706 cells and EC9706 cells transfected with pcDNA3.1 ($P<0.01$)

*: $P<0.05$, compared to those of EC9706 untreated and transfected with pcDNA3.1

图 3 稳定激活 Notch1 信号途径抑制食管鳞癌细胞的生长

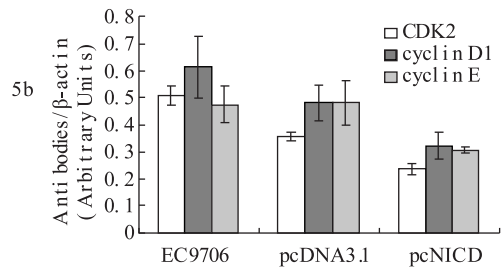
Figure 3 Stably activated Notch1 signaling pathway inhibits the growth of human ESCC cells



To verify the specificity of the reactions, EC9706 cells untreated and transfected with pcDNA3.1 were used as negative controls, respectively. The house-keeping gene β -actin has been used for normalization. 4a; Analysis of mRNA levels of CDK2, cyclin D1, cyclinE and β -actin in EC9706 cells; 4b; Semi-quantitated values of mRNA levels of CDK2, cyclin D1, and cyclinE to β -actin, respectively

图 4 RT-PCR 分析与 Notch1 信号途径相关的细胞周期调控基因

Figure 4 RT-PCR analysis of Notch1 signaling pathway-related cell cycle regulatory genes



To verify the specificity of the reactions, EC9706 cells untreated and transfected with pcDNA3.1 were used as negative controls, respectively. The house-keeping gene β -actin has been used for normalization. 5a; Analysis of proteins levels of CDK2, cyclin D1, cyclinE, and β -actin in EC9706 cells; 5b; Semi-quantitated values of proteins levels of CDK2, cyclin D1, and cyclinE to β -actin, respectively

图 5 Western blot 分析与 Notch1 信号途径相关的细胞周期调控基因

Figure 5 Western blot analysis of Notch1 signaling pathway-related genes

2.3 Notch1 信号途径相关基因的 mRNA 的表达

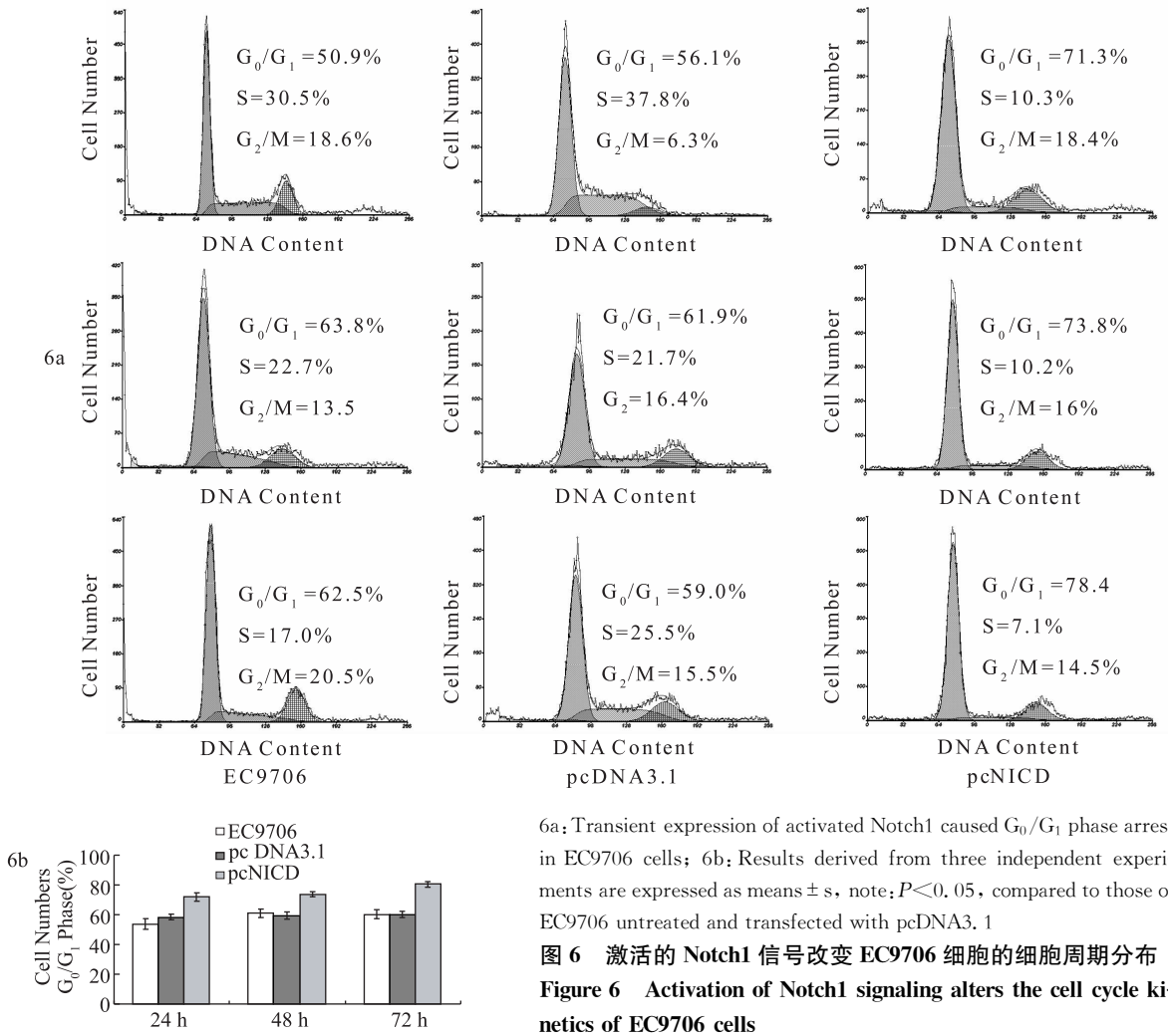
与未处理的和转染 pcDNA3.1 的 EC9706 细胞相比,稳定表达 NICD 的 EC9706 细胞的 CDK2, cyclin D1 和 E 基因的 mRNA 的表达明显下调($P<0.05$),见图 4a、b。

2.4 EC9706 细胞中与 Notch1 信号途径有关蛋白表达的变化

在三个独立的实验中,与未处理的和转染 pcDNA3.1 的 EC9706 细胞相比,稳定表达 NICD 的 EC9706 细胞的 CDK2, cyclin D1 和 E 的蛋白表达明显下调($P<0.05$),见图 5a、b。

2.5 激活的 Notch1 信号途径诱导细胞周期静止

图 6a 和 b 表明,转染 pcNICD 的 EC9706 细胞在 G_0/G_1 期的比率高达 74.5%,而未转染和转染 pcDNA3.1 在 G_0/G_1 期的比率分别为 59.1% 和 59.0%。与未转染和转染 pcDNA3.1 的 EC9706 细胞相比,转染 pcNICD 的 EC9706 细胞在 S 期的比率从 10.3% 逐渐下降到 7.1%,表明 Notch1 信号途径的激活导致 DNA 的合成受阻。细胞周期分析揭示瞬时表达 NICD 的 EC9706 细胞在 G_0/G_1 期比率的增加提示激活的 Notch1 信号途径能够诱导细胞静止在 G_0/G_1 期。



6a: Transient expression of activated Notch1 caused G_0/G_1 phase arrest in EC9706 cells; 6b: Results derived from three independent experiments are expressed as means \pm s, note: $P < 0.05$, compared to those of EC9706 untreated and transfected with pcDNA3.1

图 6 激活的 Notch1 信号改变 EC9706 细胞的细胞周期分布
Figure 6 Activation of Notch1 signaling alters the cell cycle kinetics of EC9706 cells

3 讨论

3.1 Notch1 信号通路在食管鳞癌中的状态以及对食管鳞癌细胞增殖的影响

Notch1 是一类多功能的跨膜受体蛋白,在细胞的分化和发育中起着十分重要的作用^[6]。几个相关的研究已经阐明 Notch1 信号途径与恶性肿瘤的转化和发生密切相关^[7]。然而,Notch1 在癌细胞中的作用仍然有争议。作者通过免疫荧光发现,在转染 pcNICD 的食管鳞癌细胞中,胞质和胞核内均发现 Notch1 基因的表达,提示转染 pcNICD 后的食管鳞癌细胞中 Notch1 信号途径处于激活状态。进一步通过 CCK-8 方法检测激活的 Notch1 信号途径对食管鳞癌细胞的生长的影响,结果显示,无论是瞬时表达 NICD 还是稳定表达 NICD 的食管鳞癌细胞的生长均受到明显的抑制,也就是说,激活的 Notch1 信号途径能显著地抑制食管鳞癌细胞的生长。

3.2 Notch1 信号通路激活后,对食管鳞癌细胞细胞周期的影响

cyclin 和 CDK 在控制哺乳动物细胞周期主要检验点中起着十分关键的作用^[8]。联结信号转导与

细胞周期机制的途径中,重要的一条通路是 cyclin-D-CDK4/6,它是 G_1 期进行的限速步骤,它通过与 p27Kip1 结合,形成有蛋白激酶活性的 cyclin-D-CDK4/6-p27Kip1 复合物。在此复合物的作用下,pRB 进入高磷酸化状态,pRB 失活,驱动细胞周期继续进行。cyclin D1 的过度表达可使细胞失去对生长因子的依赖,使 G_1/S 调控点失控,细胞不停地进入细胞周期,造成恶性增生而发生癌变。Stacey^[9]的研究发现,cyclinD1 在 G_1 期的活化是细胞增殖所必需的,它将促使细胞进入 S 期,而在 S 期,cyclinD1 的表达则维持在低水平。

有研究表明,Notch1 信号通路通过调节 cyclin D1 的表达使 SMMC7721 细胞静止在 G_0/G_1 期^[4]。此外,Notch1 诱导的 RKE-1 细胞的转化需要上调 cyclin D1 的表达^[10]。这些证据表明,cyclinD1 是 Notch1 信号通路的一个十分重要的下游调控基因,活化的 Notch1 信号通路通过对 cyclinD1 的调节,参与细胞周期的早期事件,从而抑制细胞的生长。

cyclin E 和 CDK2 一起形成复合物,是进入 S 期所必须的^[11],同时在肿瘤发生中也起着十分重要

的作用^[12]。激酶复合物 cyclin E/CKD2 在进入 S 期以前活性达最高水平^[13]。通过注射抗 cyclin E 的抗体进入成纤维细胞能促使细胞在 G₁ 期静止^[14]。此外, cyclin E 和肿瘤发生之间的关系在乳腺癌中得以详细阐明, 通过改变 cyclin E 的表达能够引起乳腺癌细胞生长失控^[15]。有研究表明, cyclin E 的过表达在 50%~60% 的胃腺癌中出现过^[16]。由于 cyclin E 的正常表达在细胞增殖中起着十分重要的作用, 因此其表达失调对肿瘤发生有着极其密切的联系。

本研究采用半定量 RT-PCR 及 Western blot 法, 检测转染 pcNICD 的食管鳞癌 EC9706 细胞, 激活 Notch1 信号通路后, 是否能够下调与 Notch1 信号通路有关的细胞周期调控蛋白基因 cyclinD1、cyclinE 以及 CDK2 的表达。收集稳定表达 NICD 和 pcDNA3.1 以及未转染的食管鳞癌 EC9706 细胞的总蛋白和总 RNA, 结果发现, 与未转染和转染 pcDNA3.1 的 EC9706 细胞相比, 转染 pcNICD 的 EC9706 细胞中 cyclinD1、cyclinE 以及 CDK2 的 mRNA 和蛋白的表达明显受到抑制。本研究还采用流式细胞仪检测未转染, 转染 pcDNA3.1 及 pcNICD 的食管鳞癌 EC9706 细胞在 24 h, 48 h 以及 72 h 细胞周期的变化。转染 pcNICD 的 EC9706 细胞在 G₀/G₁ 期的比率高达 74.5%, 而未转染和转染 pcDNA3.1 在 G₀/G₁ 期的比率分别为 59.1% 和 59.0%。与未转染和转染 pcDNA3.1 的 EC9706 细胞相比, 转染 pcNICD 的 EC9706 细胞在 S 期的比率从 10.3% 逐渐下降到 7.1%, 表明 Notch1 信号途径的激活导致 DNA 的合成受阻。细胞周期分析揭示瞬时表达 NICD 的 EC9706 细胞在 G₀/G₁ 期比率的增加提示激活的 Notch1 信号途径能够诱导细胞静止在 G₀/G₁ 期。以上这些结果表明, 由于 cyclinD1 和 cyclin E 是细胞周期进行中的重要调节者, 当转染 pcNICD 后的食管鳞癌细胞中 Notch1 信号通路激活后, cyclinD1 和 cyclin E 的表达下调, 细胞周期被停滞在 G₀/G₁ 期, 提示 cyclinD1 和 cyclin E 是受 Notch1 调节的一个重要的下游基因, Notch1 信号途径是通过调节 cyclinD1 和 cyclin E 的调控来抑制食管鳞癌细胞的增殖。

参考文献:

- [1] Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000: the global picture[J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37 (Suppl 8): S4-66.
- [2] Pisani P, Parkin DM, Bray F, et al. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990 [J]. *Int J Cancer*, 1999, 83 (1), 18-29.
- [3] Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(23): 2241-2252.
- [4] Sriuranpong V, Borges MW, Ravi RK, et al. Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(7): 3200-3205.
- [5] Weng AP, Ferrando AA, Lee W, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Science*, 2004, 306(5694): 269-271.
- [6] Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development[J]. *Science*, 1999, 284(5415): 770-776.
- [7] Maillard I, He Y, Pear WS. From the yolk sac to the spleen: New roles for Notch in regulating hematopoiesis[J]. *Immunity*, 2003, 18(5): 587-589.
- [8] Sherr CJ. Cancer cell cycles[J]. *Science*, 1996, 274 (5293): 1672-1677.
- [9] Stacey DW. cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15 (2): 158-163.
- [10] Stahl M, Ge C, Shi SL, et al. Notch1-induced transformation of RKE-1 cells requires up-regulation of cyclin D1[J]. *Cancer Res*, 2006, 66 (15): 7562-7570.
- [11] Resnitzky D, Reed SI. Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G₁-to-S transition[J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15 (7): 3463-3469.
- [12] Keyomarsi K, Conte D, Toyofuku W, et al. Deregulation of cyclin E in breast cancer[J]. *Oncogene*, 1995, 11 (5): 941-950.
- [13] Koff A, Giordano A, Desia D, et al. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G₁ phase of the human cell cycle[J]. *Science*, 1992, 257 (5077): 1689-1694.
- [14] Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, et al. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G₁-to-S phase transition[J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15 (5): 2612-2624.
- [15] Scott KA, Walker RA. Lack of cyclin E immunoreactivity in non-malignant breast and association with proliferation in breast cancer[J]. *Br J Cancer*, 1997, 76 (10): 1288-1292.
- [16] Yasui W, Akama Y, Kuniyasu H, et al. Expression of cyclin E in human gastric adenomas and adenocarcinomas: correlation with proliferative activity and p53 status[J]. *J Exp Ther Oncol*, 1996, 1 (2): 88-94.

[编辑校对:刘红武]