

LIM 结构域蛋白 FHL1C 抑制 Notch 信号途径的转录激活研究 *

付 伟¹ 秦鸿雁² 严学倩¹ 于恒超² 韩 骅^{2△} 梁英民^{1△}

(1 第四军医大学唐都医院血液内科 陕西 西安 710038; 2 第四军医大学基础部遗传与发育教研室 陕西西安 710032)

摘要 目的:克隆人表达 FHL1C 基因以及建立真核表达载体和慢病毒载体。**方法:**从人的骨骼肌细胞来源的 cDNA 中扩增并克隆人 FHL1C 基因的编码区,连接至 pMD-18T 载体酶切鉴定后测序。序列测定确认后,双酶切 pMD18T-FHL1C 回收片段,插入真核表达载体,构建真核表达载体 pCMV-Myc-FHL1C 酶切鉴定正确后,转染 Hela 细胞及 Cos7 细胞,用 Western Blot 检测其在转染细胞中的表达,用双荧光素报告基因系统检测其对 Notch 信号作用。构建 FHL1C-IRES-GFP 表达单元,建立慢病毒表达载体 pLenti6/V5-FHL1C-IRES-GFP,包装慢病毒后感染培养的细胞,用免疫荧光显微镜、Western Blot 检测分析其在被感染的细胞中的表达。**结果:**通过 PCR 方法成功扩增了人 FHL1C 基因的编码区。通过转染 Hela 及 Cos7 细胞,使用 Western Blot 检测其蛋白水平表达,双荧光报告基因系统分析均能够下调激活的 Notch 信号。成功构建了 FHL1C 慢病毒表达载体 pLenti6/V5-FHL1C-IRES-GFP,包装慢病毒,把获取的慢病毒感染细胞后通过荧光显微镜证实被感染的细胞绿色荧光蛋白正确表达,Western Blot 检测证实其表达。**结论:**成功建立起 FHL1C 真核表达载体及慢病毒表达系统,为研究急性 T 淋巴细胞白血病与 Notch 信号转导通路之间的关系奠定了基础。

关键词:FHL1C;急性 T 淋巴细胞白血病;慢病毒;Notch 信号途径

中图分类号:R373,Q75,Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)04-657-05

Inhibitory Effects of Homo Sapiens Lim Protein FHL1C on Notch Signaling Transcription Activities*

FU Wei¹, QIN Hong-yan², YAN Xue-qian¹, YU Heng-chao², HAN Hua^{2△}, LIANG Ying-Min^{1△}

(1 Department of Hematology of Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University;

2 Department of Medical Genetics and Development Biology, Fourth Military Medical University)

ABSTRACT Objective: To clone and express the full-length of human FHL1C and construct the FHL1C eukaryotic expression vector and a lentiviral expression vector. **Methods:** Total RNA was isolated from skeletal muscles, and the full-length FHL1C was amplified by RT-PCR which was ligated with pMD18T vector. After retrieve and purification, FHL1C were subcloned to pCMV-Myc by using the restricted endonuclease digestion and solution I DNA ligase connection, the reconstructed plasmid pCMV-Myc-FHL1C was transfected into Hela and Cos7 cells, respectively. The expression was identified by Western blot. The effect of FHL1C on Notch pathways was detected by the Dual Luciferase assay system. FHL1C was inserted into pMX-IRES-GFP to construct FHL1C-IRES-GFP, the recombinant plasmid pLenti6/V5-FHL1C-IRES-GFP was identified by restriction endonuclease analysis and DNA sequencing. The plasmid was packaged into 293FT Cell Line to produce lentivirus and Virus titer was measured according to the expression level of GFP. **Results:** The enzyme and PCR analyses revealed that the correct FHL1C was cloned. The sequence of cloned cDNA was identical to the sequence deposited in GenBank. The current expression in transfected cell was identified by Western Blot. The FHL1C gene could downregulate the Notch signaling. The reconstructed plasmid was identified correctly by colony PCR and enzyme digestion. The production of infectious lenti-virus with appropriate titers using 293FT is suitable and feasible by detect the expression of GFP. **Conclusion:** The eukaryotic expression vector and the recombinant lentiviral vector was constructed successfully, which will be beneficial to guiding further study on relationship between T-ALL and Notch.

Key words: FHL1C; T-ALL; Lentivirus, Notch signaling pathway

Chinese Library Classification: R373, Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)04-657-05

前言

LIM 结构域蛋白 FHL1C 是 FHL1 (the human

four-and-a-half LIM domain protein 1) 缺失第 4 外显子导致其在 3' 编码区读码框移位而产生的剪接体,在人体睾丸、骨骼肌、心肌等中有比较高的表达,是小鼠 LIM 结构域蛋白 KyoT2 在人

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81071874);陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2010 JQ 4002)

作者简介:付伟(1982-),男,硕士研究生,主要研究方向 Notch 信号途径与 T-ALL 的关系

△通讯作者:梁英民,电话:029-84777841, E-mail:Liangym@fmmu.edu.cn

韩骅 电话:029-84774487, E-mail:huahan@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2010-11-04 接受日期:2010-12-27)

类的同源物。其结构为 N 端一个锌指结构及两个串联的 LIM 结构域, C 端为 RBP-J 结合基序。既往研究证实小鼠 KyoT2 通过与 NIC 或 EBNA2 竞争 RBP-J 上的结合位点而抑制 RBP-J 介导的 Notch 信号途径转录激活。

转录因子 RBP-J 是 Notch 信号途径在核内的主要效应分子, 通过介导四种 Notch 受体的转录激活活性而在胚胎发育和干细胞增殖分化调节以及相关疾病的发生中发挥着重要作用^[4]。急性 T 细胞淋巴细胞白血病(T-ALL)是小儿白血病常见一种疾病, 研究表明在超过 50% 的 T-ALL 患者携带突变 Notch1 分子从而导致 Notch 信号异常激活, 这也使得 Notch1 基因成为了 T-ALL 中常见的活化癌基因^[5], 目前人们已经针对 Notch 信号提出了新型 T-ALL 治疗策略^[6]。其中在转录水平抑制 Notch1 持续激活成为有效地治疗 T-ALL 的策略之一^[6,7]。已知鼠源的 LIM 结构域蛋白 kyoT2 能抑制 RBP-J 介导的 Notch 信号途径的转录激活, 是否人源化的 LIM 结构域蛋白 FHL1C 具有同样的抑制活性?

本研究拟在克隆人 FHL1C 基因, 通过报告基因实验观察其过表达后对 Notch 信号的作用。同时构建 FHL1C 表达的慢病毒载体, 并获得感染病毒滴度, 感染 Jurkat 细胞后其能成功表达。为今后更加深入地研究 FHL1C 与 Notch 相互作用的分子机制及为开展以 FHL1C 为可能靶点的 Notch 信号异常相关疾病(如 T-ALL 等)治疗方案提供理论研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料、质粒、细胞系和细菌品系

真核表达载体 pCMV-Myc, 逆转录病毒载体 pMX-IRES-GFP 为本室保存。慢病毒表达载体 pLent i6/V5-EGFP 和包装细胞 293FT 由预防医学科学院北京病毒研究所吴小兵教授馈赠。报告基因 pGa9816 和 Notch 胞内段质粒 pEF-BOS-NIC 来自京都大学 Tasuku Honjo 教授馈赠。Hela 细胞系, Cos7 细胞系, Jurkat 细胞系系本室保存; 大肠杆菌 XL-10 为本实验室保存菌种; 细胞培养用 DMEM, R1640 购自 GIBCO 公司, 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; rTaq 酶购自 Promeg 公司; 胰化蛋白胨、酵母提取物为 Oxoid 公司产品, RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司 pMD18-T 载体、逆转录试剂, 限制性内切酶 Sal I、EcoR I 和 SolutionI 连接酶购自 Takara 生物公司; 抗 myc 抗体, 抗 GFP 抗体由第四军医大学免疫教研室金伯泉教授馈赠。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 RNA 提取和 RT-PCR 采集正常人的骨骼肌组织(由第四军医大学骨科医院提供)加入 TRIzol(Invitrogen)提取液, 研磨后经过酚-氯仿提取后得到总 RNA。利用 TaKaRa 公司反转录试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA。

利用以下条件及引物扩增人 FHL1C 的编码区基因: DNA 模板 2μl, 上游引物 (FHL1C-F: 5'-ATGGCGGA-GAAGTTTGACTGCCACTACT-3') 0.5μl, 下游引物 (FHL1C-R: 5'-TCACGGAGCATTTTTTGCAGTGAAGCA-3') 0.5μl, rTaq 酶 0.5μl, PCR buffer 5μl, dNTP 5μl, 最后用二次去离子水补足 50μl。PCR 反应条件: 94℃ 5min; 94℃ 1min, 63℃ 1min, 72℃ 1min 共 35 个循环; 72℃ 延伸 5min。取 5μl 进行 2%

凝胶电泳。FHL1C 引物设计是根据 GenBank 上 FHL1C 基因序列(AF220153), 通过 Primer5.0 软件设计, 并委托 Takara 公司合成。

1.2.2 分子克隆 PCR 法扩增 FHL1C, 用胶回收试剂盒回收 PCR 产物。构建 pMD18T-FHL1C 克隆质粒, 连接、转化、质粒提取及酶切参照文献的方法进行。将连接好的产物转化感受态细胞(E. Coli XL10): 取 100μl 转化混合物铺于 90mm 的含有氨苄青霉素(50mg/ml)、IPTG(1mM) 和 X-Gal (20mg/ml) 的细菌培养基 (Luria-bertani, LB) 培养平板上, 室温下放置 10~20min, 待溶液被琼脂吸收后, 倒置平皿于 37℃ 培养 16~20h, 可见蓝白相间的单菌落。挑取培养平板上白色单菌落做克隆 PCR 鉴定, 摇菌培养, 同时将菌液送样测序。

1.2.3 细胞培养及转染 Hela 细胞和 COS7 细胞都用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养, Jurkat 细胞用含有 10% 胎牛血清的 1640 中培养, 同时加入 HEPES (10mmol/L)。所有细胞均在 50mL/LCO₂、37℃、饱和湿度下的孵箱中培养。细胞在转染前, 分别以 1×10⁵ 和 5×10⁵ 个细胞每孔细胞培养在 24 孔板和 6 孔板, 在第二天细胞融合约为 80-90% 时, 使用脂质体 (lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司) 进行转染, 随后在相应的时间点收获细胞进行相关实验检测。

1.2.4 真核表达载体 pCMV-Myc-FHL1C 的构建及表达 用 SmaI 和 SalI 双酶切质粒 pMD18-FHL1C, 首先使用 EcoRI 单酶切后用 klenow 补平粘段, 回收的产物再次使用 SalI 酶切, 在加入 CIAP 去磷酸化, 把 FHL1C 片段插入到载体 pCMV-Myc, 经过连接、转化, 得到质粒 pCMV-Myc-FHL1C, 酶切并测序鉴定。Western Blot 检测构建 pCMV-Myc-FHL1C 的表达, 脂质体转染法转染 Hela 细胞, 每一个六孔板约为 5×10⁵ 个细胞, 共转 2μg 质粒, 48h 后, RIPA 裂解液裂解细胞, 对提取蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 100V 转膜 100 分钟, 用脱脂奶粉封闭 1h 后用抗 myc 抗体在 4℃ 孵育过夜, TBST 漂洗 3 次, 用 HRP 标记的羊抗鼠抗体室温孵育 1h, 加入显影剂, 化学发光检测目的蛋白。

1.2.5 双荧光素酶报告基因 如上转染方法分别在 24 孔板内接种 Hela 细胞和 Cos7 细胞, 脂质体法转染 40ng pGa981-6 报告基因质粒、100ng pEF-BOS-NIC 和 5ng pRL-TK 内参质粒, 同时按浓度梯度转染 pCMV-Myc-FHL1C 质粒 (100ng、300ng 和 500ng), 用空载体 pCMV-Myc 平衡各孔转染质粒总量。每一个实验组设 3 个副孔并重复 3 遍, 使用 GLOMAX[™] LUMINOMETER 荧光发光仪检测 Luciferase 值, 所得数据进行 Student's T 检验。

1.2.6 病毒载体构建、包装慢病毒及感染 FHLC 与 IRES-EGFP 融合后, 先用 EcoRI 单酶切 Plenti/V5-EGFP, 然后用 SalI 单酶切 PMX-KyoT2-IRES-GFP, 分别用 Klenow 将其末端补平之后, 再分别用 XhoI 单酶切, 将得到的 FHL1C-IRES-GFP 基因片段以一平一粘的末端插入到病毒载体 Plenti6/V5 中, 最终成功构建慢病毒表达载体 Plenti6/V5 -FHL1C-IRES-GFP。慢病毒包装: 接种 5×10⁶ 293FT 细胞于 90 mm 大皿, 次日细胞基本融合皿底约 90% 以上, 将 9μg 包装质粒 Mix 和 3μg pLenti6/V5-FHL1C-IRES-GFP 质粒混合于无血清培养液中; 取另 5mL 离心管, 加入 1.5mL 无血清 1640 培养液, 在其中加入 36μL 脂

质体 lipofectamine2000,室温静置 5 min;将二者轻柔混合,室温静置 20 min。将质粒-脂质体混合物滴加到培养皿中,轻柔摇匀,37℃培养过夜。第 2 天更换无抗生素的全培养液,第 4 天收集含病毒颗粒的细胞上清,4℃、60000g 离心 2h,弃掉上清,1mL 无血清 1640 培养液重悬沉淀,100 μL/支分装后 -80℃ 储存。把获得的慢病毒病毒感染 Jurkat 细胞,100μL 病毒与等量的培养液混合,加入 2μg polybrene,混匀后接入 12 孔板,继续培养进行下一步实验。

1.2.7 荧光显微镜观察及 Western blot 检测蛋白表达 感染 Jurkat 细胞,48 h 后显微镜下开始观察 Jurkat 细胞的绿色荧光表达情况,同时应用流式细胞术检测 GFP 细胞数,观察转染效率。Western blot 检测 FHL1C 的表达:收获细胞,TPBS 洗涤细胞 3 次,加入裂解液 (RIPA) 冰上孵育 5 min,4℃ 旋转 30 min,4℃ 离心 10min (12 000 r·min⁻¹),收集蛋白样品,用 BCA 法测定蛋白浓度。10% SDS PAGE 电泳分离蛋白后电转移至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭 2 h, PBS 洗涤后,加入抗 EGFP 抗体,4℃ 孵育过夜,TPBS 洗涤后,加入相应的辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 孵育 2 h,TPBS 洗涤后化学发光法检测。

2 结果

2.1 FHL1C 基因克隆

本研究从骨骼肌提取 RNA,反转录成 cDNA。以此 cDNA 为模板,利用设计的引物进行 PCR 扩增。2%琼脂糖凝胶电泳在 585bp 处显示出符合预期大小的扩增条带,进而从凝胶回收扩增产物,插入 pMD-18T 克隆载体,转化大肠杆菌后获得酶切正确的阳性克隆,测序公司进行 DNA 序列测序后显示,获得序列正确的 FHL1C 基因(图 1)。

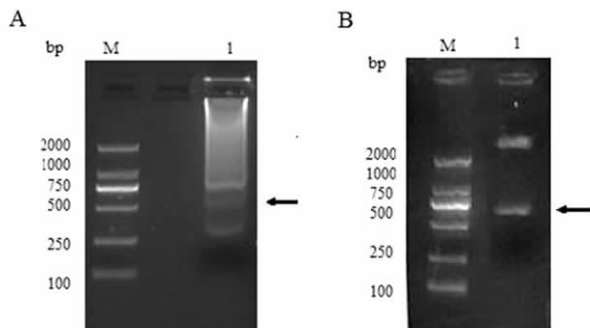


图 1 PCR 克隆大小约为 585bp 的 FHL1C.FHL1C 片段用箭头提示。A 为扩增产物;B pMD18T-FHL1C 质粒酶切,均进行 1.5g/L 琼脂糖凝胶电泳.M:Marker(DL2000)

Fig. 1 Homo sapiens FHL1C gene amplified by PCR.(A) PCR product (black arrow) (B)Identification of pMD18T-FHL1C with EcoRI and SalI, M:Marker DL2000

2.2 真核表达载体 pCMV-myc-FHL1C 的构建及表达

将获得测序正确的 FHL1C 片段经 EcoRI 酶切补平,SalI 二次酶切后插入到 SmaI 和 SalI 双酶切的真核表达载体 pCMV-Myc 中,构建 FHL1C 真核表达载体 pCMV-Myc-FHL1C。PstI 单酶切鉴定所得载体,经过 1%的琼脂糖凝胶电泳显示得到约为 2665bp,917bp,813bp 的条带,与预期大小一致,证明获得

正确的真核表达载体(图 2a)。用脂质体瞬时转染 Hela 细胞 48 小时后收集细胞,使用细胞裂解液获取细胞总蛋白,经 Western Blot 检测(抗 myc 抗体)鉴定获得表达正确的 FHL1C 融合蛋白(图 2b)。

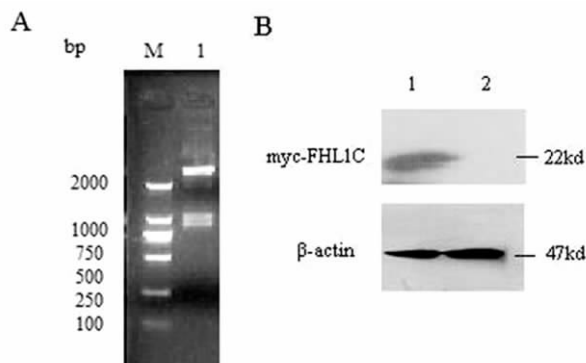


图 2 pCMV-Myc-FHL1C 真核表达载体的构建和鉴定。

A. 酶切鉴定图 M:2000bp DNA marker 1:pCMV-myc-FHL1C 经过 PstI 单酶切鉴定正确 B. Western Blot 结果显示上图为 Myc-FHL1C 蛋白表达 1 为处理组,2 为空白对照组,下图为 β-actin 作为对照

Fig. 2 Construction an identification of eukaryotic vector pCMV-Myc-FHL1C.A Identification of pCMV-Myc-FHL1C digestion with PstI.B Identificaiton of the expression of Myc-FHL1C in transfected cells with western-blot

2.3 报告基因检测

报告基因质粒 pGa9816 中虫荧光素酶基因 (Luciferase) 处于含有 RBP-J 结合序列 CGTGGGAA 的启动子序列之下,而我们之前应用 pGa9816 的研究证明过表达 NIC 或者 EB 病毒核心抗原 (EBNA2),能够激活 RBP-J 介导的 Notch 信号途径的转录。应用相同的方法,将报告基因质粒 pGa9816, pEF-BOS-NIC, 内参质粒 pRL-TK 结合不同量的 pCMV-myc-FHL1C 共转染入 Hela 和 COS-7 细胞时, Luciferase 及 Renila 的相对活性水平结果显示,人源化的 FHL1C 像鼠源的 KyoT2 一样能够抑制 RBP-J 介导的 Notch 信号的转录激活(图 3)。

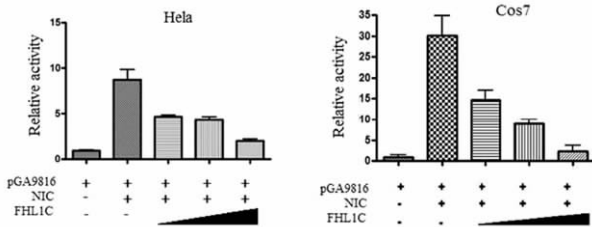


图 3 FHL1C 以剂量依赖形式抑制 Notch 信号

Fig 3 Reporter assay analysis of the inhibition of Notch signal by FHL1C in dose-dependent detected

2.4 人 FHL1C 慢病毒表达载体 pLenti6/V5-FHL1C-IRES-GFP 成功构建

本实验利用 pMX-IRES-GFP 载体先构建了 FHL1C-IRES-GFP 表达单元。随后将表达正确的

FHL1C-IRES-GFP 表达单元经相应的酶切插入慢病毒表达载体 plenti6/V5,最终得到 plenti6/V5-FHL1C-IRES-GFP 慢病毒表达质粒,酶切鉴定及 DNA 测序均显示构建正确(图 4)。随后将该质粒与包装质粒共转染 293FT 细胞,48 小时后收集病毒上清,浓缩后将获得病毒颗粒感染 Jurkat 细胞,同时使用 plenti6/V5-EGFP 作为对照。病毒感染 48 小时后 荧光显微镜下可见绿色荧光蛋白表达,同时使用流式细胞仪检测到 GFP 表达阳性的 Jurkat 细胞(图 5)。这些结果均表明我们已初步获得表达正确的 FHL1C 慢病毒表达载体。

3 讨论

许多的实验研究证实了 Notch 信号在 T-ALL 发生发展中的关键作用,例如给骨髓移植小鼠,持续性过表达 Notch1 信号会导致 T-ALL 的发生^[9],而持续激活 Notch3 则会导致小鼠胸腺淋巴瘤的发生^[9]。同时 Notch3 受体也被发现也高表达于 T-ALL 细胞^[10]。近期发现有 50%的 T-ALL 病人有着 Notch1 功能获得性突变,这些突变发生于 Notch1 受体的 HD 和 PEST

区,当 PEST 突变被认为 Notch 信号能够非配体依赖性激活,这是因为 PEST 区的突变导致 Notch 胞内段降解异常,使得延长的 Notch 信号的激活^[11]。

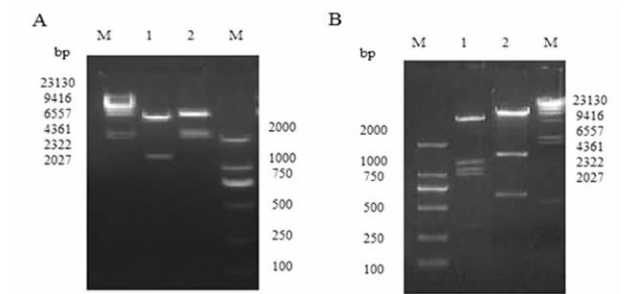


图 4 pLenti6/V5-FHL1C-IRES-GFP 酶切鉴定 A:EcoRI+NcoII 双酶切得到约 6800bp 1400bp1200bp 1000bp 400bp 5 条条带 B: EcoRI+NotI 双酶切 得到约 8000bp 1600bp 600bp 3 条条带 酶切鉴定正确 M:Marker
Fig 4 Construction an identification of vector
pLenti-pLenti6/V5-FHL1C-IRES-GFP. Identification of pCMV-Myc-FHL1C digestion with EcoRI+NcoII(A)and EcoRI+NotI(B)

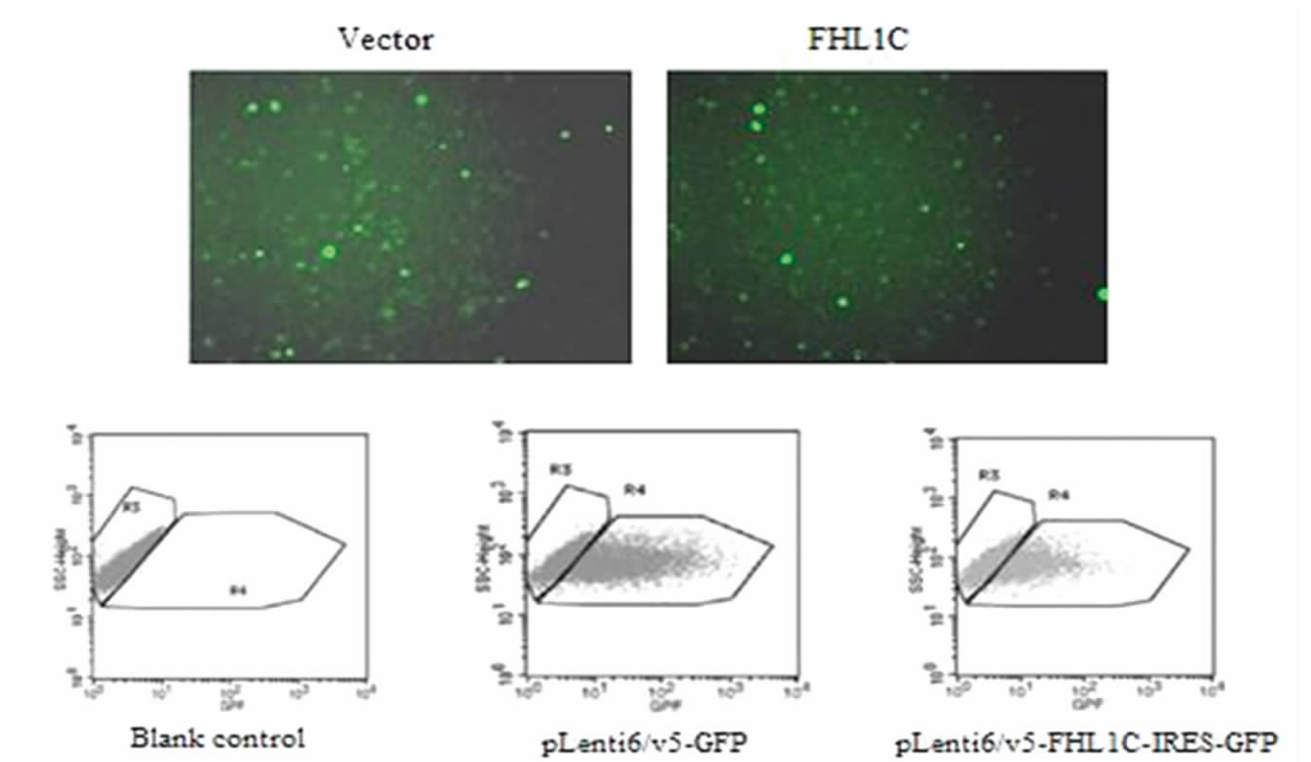


图 5 病毒感染 Jurkat 细胞,取细胞进行荧光显微镜观察及流式细胞术分析
Fig 5 Jurkat cells were transfected with lentivirus, and were examined under uorescencemicroscope and FACS 48h after the transfection

在 T-ALL 里 Notch 信号的激活被认为能够抑制淋巴细胞凋亡,这是因为 Notch 信号能够激活 NF-kb 通路^[12],及 PKB/AKT/mTOR 通路介导抑制 P53 作用^[13]。使用 γ -分泌酶抑制剂 GSI 处理 T-ALL 细胞能够阻断 Notch 信号激活,抑制增殖导致细胞凋亡^[14,15],同时有学者研究证实,应用 siRNA 下调 Notch 信号能够增加共培养的 T-ALL 细胞对于化疗药物的敏感性^[16],这些研究预示了 Notch 信号作为分子靶向治疗的潜在价值,Notch 信号介导细胞周期过程被认为是通过直接转录

激活 c-myc^[17-18],同时抑制 PTEN 的表达,并且激活 AKT/PI3K 通路^[19]。
根据 Notch 信号在 T-ALL 中的作用机制而采取的靶向治疗已经进入到临床研究阶段。使用 γ -分泌酶抑制剂 GSIs 治疗 T-ALLs 已进入二期临床阶段,其能够快速清除胞内激活的 NOTCH1 蛋白及 NOTCH1 活化的下游基因^[20]。然而临床上使用口服 GSI 类药物 MK-0752,观察治疗效果有限,同时患者出现明显疲乏和剂量限制胃肠道毒性^[21]。此外 GSI 只能阻断

Notch 受体的配体依赖性激活,并不能阻断 Notch 信号非配体依赖性活化。已知 FHL1C 能够在转录水平抑制激活 Notch 信号,从而抑制 RBP-J 介导的转录,因而相比 GSI,其更能有效地抑制 Notch 信号的异常活化。因而本研究期望在深入了解 FHL1C 抑制 Notch 信号途径的基础上尝试建立新的 Notch 信号途径的阻断剂,从而为肿瘤的治疗开辟新的治疗策略。

本研究成功克隆了人源化的 LIM 结构域蛋白 FHL1C 的 cDNA 的编码区序列,并通过 DNA 测序分析证实其正确性。通过双荧光素酶报告基因系统证实 FHL1C 同样具有抑制 Notch 信号途径的作用。为进一步研究 FHL1C 阻断 Notch 信号途径的生理意义,我们构建了表达 FHL1C 的慢病毒表达载体 pLenti6/V5-FHL1C-IRES-GFP,免疫荧光显微镜和流式细胞仪检测结果均显示 GFP 蛋白表达。该项研究为今后观察 FHL1C 在体内相关功能研究奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Ng EK, Lee SM, Li HY, et al. Characterization of tissue-specific LIM domain protein (FHL1C) which is an alternatively spliced isoform of a human LIM-only protein (FHL1)[J]. J Cell Biochem, 2001, 2-27;82 (1):1-10
- [2] Taniguchi Y, Furukawa T, Tun T, et al. LIM protein KyoT2 negatively regulates transcription by association with the RBP-J DNA-binding protein[J]. Mol Cell Biol, 1998,18(1):644-54
- [3] Qin H, Wang J, Liang Y, et al. RING1 inhibits transactivation of RBP-J by Notch through interaction with LIM protein KyoT2[J]. Nucleic Acids Res, 2004,32(4):1492-501
- [4] Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development [J]. Science, 1999,284 (5415):770-6
- [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):269-71
- [6] Weng AP, Lau A. Notch signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Future Oncol, 2005,1(4):511-9
- [7] Qin H, Du D, Zhu Y, et al. The PcG protein HPC2 inhibits RBP-J-mediated transcription by interacting with LIM protein KyoT2[J]. FEBS Lett, 2005,579(5):1220-6
- [8] Pear WS, Aster JC, Scott ML, et al. Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles[J]. J Exp Med, 1996,183(5):2283-91
- [9] 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):3337-48
- [10] 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 U S A, 2002,99 (6):3788-93
- [11] Weng AP, Ferrando AA, Lee W, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia [J]. Science, 2004,306(5694):269-71
- [12] Shin HM, Minter LM, Cho OH, et al. Notch1 augments NF-kappaB activity by facilitating its nuclear retention [J]. EMBO J, 2006,25(1): 129-38
- [13] Mungamuri SK, Yang X, Thor AD, et al. Survival signaling by Notch1: mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent inhibition of p53[J]. Cancer Res, 2006,66(9):4715-24
- [14] Weng AP, Nam Y, Wolfe MS, et al. Growth suppression of pre-T acute lymphoblastic leukemia cells by inhibition of notch signaling[J]. Mol Cell Biol, 2003,23(2):655-64
- [15] Lewis HD, Leveridge M, Strack PR, et al. Apoptosis in T cell acute lymphoblastic leukemia cells after cell cycle arrest induced by pharmacological inhibition of notch signaling[J]. Chem Biol, 2007,14(2): 209-19
- [16] Guo D, Ye J, Li L, et al. Down-regulation of Notch-1 increases co-cultured Jurkat cell sensitivity to chemotherapy [J]. Leuk Lymphoma, 2009,50(2):270-8
- [17] Palomero T, Lim WK, Odom DT, et al. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006,103(48):18261-6
- [18] Sharma VM, Draheim KM, Kelliher MA. The Notch1/c-Myc pathway in T cell leukemia[J]. Cell Cycle, 2007,6(8):927-30
- [19] Calzavara E, Chiaramonte R, Cesana D, et al. Reciprocal regulation of Notch and PI3K/Akt signalling in T-ALL cells in vitro[J]. J Cell Biochem, 2008,103(5):1405-12
- [20] Pui CH. T cell acute lymphoblastic leukemia: NOTCHing the way toward a better treatment outcome[J]. Cancer Cell, 2009,15(2):85-7
- [21] Ferrando AA. The role of NOTCH1 signaling in T-ALL[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009,353-61