

· 论 著 ·

分化抑制因子 1 对结肠癌 HT-29 细胞增殖的影响

于 游,张才全[△]

(重庆医科大学附属第一医院普外科 400016)

摘要:目的 探讨检测分化抑制因子 1(Id1)对结肠癌 HT-29 细胞增殖中的影响。方法 HT-29 转染 Id1 表达质粒及合成 Id1 干扰序列转染 HT-29 细胞后,RT-PCR 和 Western blot 法检测 VEGF mRNA 和蛋白的表达,MTT 法检测各组细胞增殖情况。结果 Id1 过表达能显著上调 VEGF mRNA 和蛋白表达($P<0.05$),促进细胞的生长,Id1 抑制后能显著下调 VEGF mRNA 和蛋白表达($P<0.05$),减缓细胞的生长。结论 在结肠癌 HT-29 细胞中 Id1 为 VEGF 的上游基因,Id1 可通过调控 VEGF 途径来影响结肠癌细胞增殖,在肿瘤血管生成中发挥重要作用。Id1 有望成为结肠癌治疗的一个新靶点。

关键词:结肠肿瘤;分化抑制因子 1;细胞增殖

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.08.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)08-0848-02

Effect of inhibitor of differentiation-1 on proliferation of colon carcinoma HT-29 cells

Yu You, Zhang Caiquan[△]

(Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the role of inhibitor of differentiation-1 (Id1) on proliferation of colon carcinoma HT-29 cells. Methods The expression of VEGF mRNA and protein was detected by RT-PCR and the Western blot assay in HT-29 cells after HT-29 cells transfection with Id1 expressing plasmid and Id1-siRNA. The impact on proliferation of HT-29 cells was investigated by MTT methods. Results The overexpression of Id1 could promote both the mRNA and protein of VEGF and Id1 suppression could significantly reduce both the mRNA and protein of VEGF. The MTT assay showed that the cell proliferation of the suppression group was significantly slower than that of the control group. Conclusion Suppression of Id1 can down-regulate the expression of VEGF in HT-29 cells and play an important role in colon carcinoma proliferation. Id1 is expected to become a new target for colon cancer therapy.

Key words: colon carcinoma; Id1; cell proliferation

Id 蛋白^[1]又称为分化抑制因子(inhibitor of differentiation, Id),是新的准原癌基因^[2],在多种肿瘤中有异常的表达,参与了肿瘤细胞增殖、凋亡、浸润、迁移以及肿瘤血管生成等多方面相关行为的调控^[3-8]。Id1 在结肠癌组织中表达明显高于正常组织及结肠癌旁组织^[9],故研究 Id1 与结肠癌的关系,对于进一步阐明结肠癌的生物行为以及治疗将会有积极意义。本研究在体外过表达及抑表达 Id1 情况下检测结肠癌 HT-29 细胞血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) mRNA 和蛋白的表达情况以及肿瘤细胞增殖情况,以探讨 Id1 在结肠癌细胞增殖中的作用。

1 材料与与方法

1.1 试剂 Id1 一抗购于 Miliipore 公司;山羊抗兔二抗购于北京中杉生物有限公司;RNA 提取试剂盒购于 Takara 公司;RT-PCR 试剂盒购自 Tiangen 公司;Trisbase 购于上海生工生物工程有限公司;EXTaq 酶购于 Takara 公司;dNTP 购于 Takara 公司;VEGF 一抗购于 Miliipore 公司;脂质体 ipofect amine 2000 购于 Invitrogen 公司;Id1 基因的特异性小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)Si-Id-1-001(19 bp)^[10]由广州锐博生物公司设计与合成,各自的正义和反义序列分别为:正义链 5'-UGA GCA AGG UGG AGA UUC U dTdT-3',反义链 3'-dTdT ACU CGU UCC ACC UCU AAG A-5'。

1.2 细胞培养与 Id1 过表达及抑表达质粒构建及转染 人结肠癌细胞(human colon cancer cells, HT-29)株由中科院上海细胞库提供;HT-29 经复苏后,常规培养于含 10%新生小牛血清,青霉素(100 U/mL),链霉素(100 μg/mL)的 1640 培养基中。Id1 全长基因扩增 Id1:上游引物:5'-TAA CTG TTC CAT

TTT CCG TA-3',下游引物:5'-TTA CCA CCA TCT AAA TTA TTT G-3',扩增长度:975 bp,退火温度:60 ℃,采用 Pfu 保真酶扩增。PCR 扩增 Id1 片段,利用限制性内切酶 EcoR I 和 NotI 将其连接至载体 pGEX-4T-1,将连接产物转化大肠杆菌,挑取单菌落,提取质粒,经 PCR 和双酶切鉴定后测序。转染前 1 d,将 2.5×10^5 个细胞/孔接种于 6 孔培养板。过表达分为 3 组:空白组:仅加培养血清;对照组:空载体,转染无义序列;过表达组:转染 Id1 过表达质粒。抑表达分为 3 组:空白组:仅加培养血清;对照组:空载体,转染无义序列;抑表达组:转染 Id1-siRNA。各组均在 37 ℃,1%O₂,99%N₂,5%CO₂ 恒温培养箱培养 12 h 后进行转染,实验参照 Lipofect amine 2000 产品说明书进行操作。待细胞转染 48 h 后,分别用 Trizol 和 RIPA 裂解液提取细胞总 RNA 和细胞总蛋白。

1.3 RT-PCR 检测 VEGF mRNA 参照 Trizol 试剂盒说明书提取各组细胞总的 RNA。VEGF 上游引物:5'-GGG CAG AAT CAT CAC GAA GT-3',下游引物:5'-GAT GTA CTC GAT CTC ATC AGG GT-3',扩增长度:117 bp,退火温度:60 ℃。反应体系:1×PCR Buffer, dNTP 0.2 mmol/L, cDNA 模板 200 ng,引物浓度 0.4 μmol/L, Taq 酶 1.25 U,反应总体积 25 μL。按照 RT-PCR 试剂盒进行 PCR 扩增:1 μL DNA 样本作为 PCR 扩增模板,阴性对照扩增模板为去离子水;扩增条件为 95 ℃预变性 2 min;随后 95 ℃10 s,退火温度 15 s,72 ℃延伸 45 s,共 40 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。实验重复 3 次,取其平均值。

1.4 Western 检测 Id1、VEGF 蛋白 用 RIPA 裂解液提取各组细胞总蛋白后,用 Western 检测 Id1、VEGF 蛋白。每 10⁶ 个

细胞加入 500 L 细胞裂解液,冰上放置 30 min 裂解细胞,12 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,测定提取的总蛋白浓度。取等量蛋白样品 50 g 进行 8%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。然后将蛋白转移至 PVDF 膜上,经 5%脱脂奶粉封闭,分别与 Id1、VEGF 多克隆抗体(浓度为 1 : 1 500)4 ℃ 反应过夜及相应的羊抗兔二抗(浓度为 1 : 3 000)反应,加入化学发光剂 ECL 反应,显色,密度扫描分析。实验重复 3 次,取其平均值。

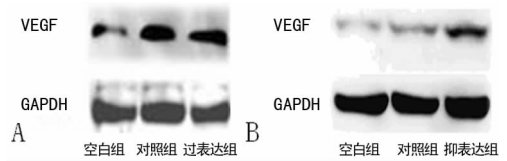
1.5 MTT 实验 取各组对数生长期的 HT-29 细胞,以每孔 10^3 接种于 96 孔板内,加入条件培养基。在第 1~8 天,每天每种条件培养基的细胞各取出 3 孔加入 MTT 溶液(5 g/L)20 μ L,继续 37 ℃ 孵育 4 h 后,吸弃培养上清液,加入 DMSO 150 μ L,振荡 10 min。在 ELISA 检测仪器上测定各孔的 $A_{490\text{nm}}$ 值。以时间为横坐标,3 复孔的平均光吸收值为纵坐标,绘制 HT-

29 细胞生长曲线。

1.6 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

两组 Id1 过表达与抑表达 VEGF mRNA 和 VEGF 蛋白的结果见表 1 及图 1。干扰后两组 MTT 结果见图 2~3。



A:过表达;B:抑表达。

图 1 Id1 对 VEGF 蛋白的表达电泳图

表 1 Id1 过表达与抑表达 VEGF mRNA 和 VEGF 蛋白表达结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	过表达		抑表达	
	VEGF mRNA	VEGF 蛋白	VEGF mRNA	VEGF 蛋白
空白组	0.002 99±0.000 69	0.132 00±0.035 10	0.006 16±0.000 83	0.450 00±0.039 30
对照组	0.003 49±0.001 34	0.131 00±0.053 00	0.006 26±0.000 45	0.464 00±0.023 10
过表达组	0.031 30±0.006 05▲	0.245 00±0.032 60▲	0.002 30±0.000 31▲	0.231 00±0.027 30▲

▲: $P < 0.05$,与各自对照组比较。

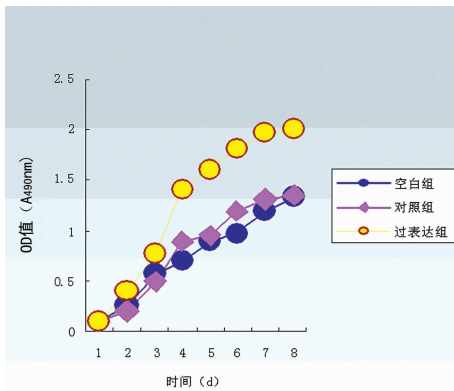


图 2 过表达 3 组生长曲线

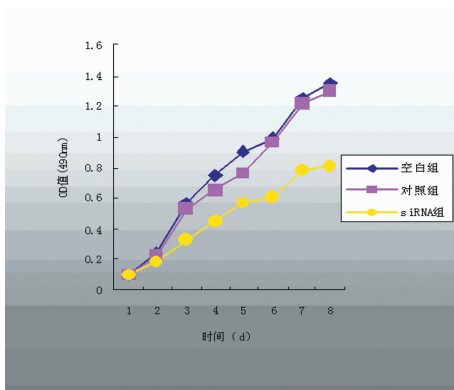


图 3 抑表达 3 组生长曲线

3 讨 论

结肠癌发生不仅是癌细胞不断增殖的过程,也是癌细胞分化不断抑制的过程,结肠癌细胞的恶性程度与分化程度密切相关。细胞的分化程度提示肿瘤的良、恶性,并直接影响其预后。Id1 负性调节转录因子的活性,抑制细胞分化,从而促进细胞增殖^[11]。目前确定在 20 多种人类肿瘤中均有 Id1 过表达,提示 Id1 在肿瘤的发生过程中可能起重要作用,可将其作为这些

肿瘤的一个新标志物^[12]。敲除 Id1 基因的荷瘤小鼠身上发现肿瘤不能生长和转移,显示出广泛坏死和少血管,血管缺乏分枝出芽。在胰腺肿瘤组织中,Id1 的表达水平越高,肿瘤中的血管密度指数也就越高,都提示 Id1 的表达和肿瘤的血管发生密切相关^[13]。对前列腺肿瘤进行的研究也发现同类现象^[14]。在消化系统的肿瘤中,Id1 在结肠癌、胰腺癌中的表达也异常增高,Id1 蛋白在结肠黏膜的正常组织中没有表达,而在结肠癌组织中的表达明显高于正常组织及癌旁组织。这些均提示 Id1 蛋白在肿瘤新生血管形成中可能起重要作用。在 4 个已发现的 Id 分子中,Id1 在肿瘤中的异常表达更为普遍。但 Id1 蛋白与其他蛋白相互作用机制及调控 Id1 基因表达上游因子和 Id1 蛋白的下游效应因子还不清楚。

本研究显示,上调 Id1 表达后,结肠癌 HT-29 细胞 VEGF mRNA 及蛋白均显著提高,这种提高出现在转录水平上,同时肿瘤细胞增殖明显加快;下调 Id1 表达后 HT-29 细胞 VEGF mRNA 及蛋白均显著降低,也出现在转录水平上,而肿瘤细胞增殖明显减慢。以上结果证实了在结肠癌 HT-29 细胞中 Id1 通过下游因子 VEGF 来产生新生血管网,从而影响肿瘤细胞的增殖。

本研究证实,在结肠癌 HT-29 细胞中 Id1 为 VEGF 的上游因子,其在结肠癌细胞增殖中发挥重要作用,Id1 有望成为结肠癌治疗的一个新靶点^[15]。但 Id1 通过何种信号途径来调控 VEGF,以及调控 Id1 基因的上游因子有待今后实验中进一步明确。

参考文献:

[1] Ling MT, Wang X, Zhang X, et al. The multiple roles of Id-1 in cancer progression[J]. Differentiation, 2006, 74(9-10): 481-487.
 [2] Meteoglu I, Meydan N, Erkus M. Id-1; regulator of EGFR and VEGF and potential target for colorectal cancer therapy [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2008, 27: 69. (下转第 852 页)

IDO 表达的细胞内信号通路,为其在鼻咽癌治疗的应用中提供了实验依据,为以 IDO 为靶点的鼻咽癌的免疫治疗提供一种新的策略。

参考文献:

- [1] 张文颖. IDO、树突状细胞与免疫耐受[J]. 国际免疫学杂志, 2006, 29(6): 364-367.
- [2] 王慧, 潘科, 夏建川. IDO 和 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞在肿瘤免疫逃逸中相互作用的研究进展[J]. 癌症, 2009, 28(2): 221-224.
- [3] Uyttenhove C, Pilote L, Théate I, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2, 3-dioxygenase [J]. Nat Med, 2003, 9(10): 1269-1274.
- [4] Munn DH. Indoleamine 2, 3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation[J]. Curr Opin Immunol, 2006, 18(2): 220-225.
- [5] Zeng J, Cai S, Yi Y, et al. Prevention of spontaneous tumor development in a ret transgenic mouse model by ret peptide vaccination with indoleamine 2, 3-dioxygenase inhibitor 1-methyl tryptophan[J]. Cancer Res, 2009, 69(9): 3963-3970.
- [6] Blottiere HM, Buecher B, Galmiche JP, et al. Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation[J]. Proc Nutr Soc, 2003, 62(1): 101-106.
- [7] Budillon A, Di Gennaro E, Bruzzese F, et al. Histone deacetylase inhibitors; a new wave of molecular targeted anticancer agents[J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2007, 2(2): 119-134.

- [8] Bi G, Jiang G. The molecular mechanism of HDAC inhibitors in anticancer effects[J]. Cell Mol Immunol, 2006, 3(4): 285-290.
- [9] Choi WH, Ji KA, Jeon SB, et al. Anti-inflammatory roles of retinoic acid in rat brain astrocytes: Suppression of interferon-gamma-induced JAK/STAT phosphorylation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 329(1): 125-131.
- [10] David M, Petricoin E, Lerner AC. Activation of protein kinase a inhibits interferon induction of the Jak/Stat pathway in U266 cells[J]. J Biol Chem, 1996, 271(9): 4585-4598.
- [11] Heim MH, Kerr IM, Stark GR, et al. Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the JAK-STAT pathway[J]. Science, 1995, 267(5202): 1347-1349.
- [12] Greenlund AC, Morales MO, Viviano BL, et al. STAT recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process[J]. Immunity, 1995, 2(6): 677-687.
- [13] Tanaka N, Kawakami T, Taniguchi T. Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system [J]. Mol Cell Biol, 1993, 13(8): 4531-4538.

(收稿日期: 2012-11-08 修回日期: 2012-12-28)

(上接第 849 页)

- [3] Langlands K, Down GA, Kealey T. Id proteins are dynamically expressed in normal epidermis and dysregulated in squamous cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2000, 60(21): 5929-5933.
- [4] Jang TJ, Jung KH, Choi EA. Id-1 gene downregulation by sulindac sulfide and its upregulation during tumor development in gastric cancer[J]. Int J Cancer, 2006, 118(6): 1356-1363.
- [5] Schindl M, Oberhuber G, Obermair A, et al. Overexpression of Id-1 protein is a marker for unfavorable prognosis in early-stage cervical cancer[J]. Cancer Res, 2001, 61(15): 5703-5706.
- [6] Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, et al. Id1 expression is associated with histological grade and invasive behavior in endometrial carcinoma[J]. Cancer Lett, 2001, 165(2): 185-193.
- [7] Coppe JP, Itahana Y, Moore DH, et al. Id-1 and Id-2 proteins as molecular markers for human prostate cancer progression[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(6): 2044-2051.
- [8] Maw MK, Fujimoto J, Tamaya T. Expression of the inhibitor of DNA-binding (id)-1 protein as an angiogenic mediator in tumour advancement of uterine cervical cancers [J]. Br J Cancer, 2008, 99(10): 1557-1563.
- [9] Wilson JW, Deed RW, Inoue T, et al. Expression of Id el-

- ix-loop-helix proteins in colorectal adenocarcinoma correlates with p53 expression and mitotic index[J]. Cancer Res, 2001, 61(24): 8803-8810.
- [10] 曾达武, 方明霞, 刘豫瑞. RNA 干扰分化抑制因子-1 基因表达对食管鳞状细胞癌增殖与凋亡的影响[J]. 福建医科大学学报, 2009, 43(6): 447-461.
- [11] Li W, Zhang CH, Hong YL, et al. Inhibitor of DNA-binding-1/inhibitor of differentiation-1 (ID-1) is implicated in various aspects of gastric cancer cell biology[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(3): 3009-3015.
- [12] Perk J, Iavarone A, Benezra R. Id family of helix-loop-helix proteins in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(8): 603-614.
- [13] Hua H, Sarvetnick N. Expression of Id1 in adult, regenerating and developing pancreas [J]. Endocrine, 2007, 32(3): 280-286.
- [14] Ling MT, Wang X, Ouyang XS, et al. Activation of MAPK signaling pathway is essential for Id-1 induced serum independent prostate cancer cell growth[J]. Oncogene, 2002, 21(55): 8498-8509.
- [15] Nishiyama K, Takaji K, Kataoka K, et al. Id1 gene transfer confers angiogenic property on fully differentiated endothelial cells and contributes to therapeutic angiogenesis [J]. Circulation, 2005, 112(18): 2840-2850.

(收稿日期: 2012-10-21 修回日期: 2012-11-15)