

ID1 对大鼠 C6 细胞侵袭转移能力的影响 *

田 刚¹ 樊明新¹ 陈祖容² 徐 英¹ 杨江河¹ 卢 宁³ 李 华¹ 张翼冠^{4Δ}

(1 兰州军区乌鲁木齐总医院神经外科 新疆 乌鲁木齐 830000; 2 福建省莆田市涵江区顶铺街 366 号涵江医院神经外科 福建 莆田 351111; 3 兰州军区乌鲁木齐总医院肿瘤科 新疆 乌鲁木齐 830000; 4 四川省中医药科学院 四川 成都 610041)

摘要 目的: 观察 ID1 对大鼠胶质瘤细胞 (C6 细胞) 侵袭转移能力的影响。方法: 以 C6 细胞为研究对象, ID1 siRNA 通过脂质体转染 C6 细胞, western blot 检测 C6 细胞中 ID1、P-NF-K Bp65 蛋白的表达、Elisa 法检测细胞培养上清 MMP-9 的含量, Transwell 小室观察成的转移侵袭能力。结果: 干扰 ID1 后能显著降低 C6 细胞中 P-NF-K Bp65 蛋白、细胞培养上清中 MMP-9 的含量(P<0.01), 降低 C6 细胞的转移侵袭能力(P<0.01)。结论: 干扰 ID1 能抑制 C6 细胞的转移侵袭, 其机制可能与抑制 C6 细胞中 P-NF-K Bp65 蛋白、MMP-9 的表达有关。
关键词: NF-K Bp65; MMP-9; ID1; 侵袭力
中图分类号: Q95-3, R730.231 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273 (2011) 21-4047-03

The effect of ID1 on invasive ability of C6*

TIAN Gang¹, FAN Ming-xin¹, CHEN Zu-rong², XU Ying¹, YANG Jiang-he¹, LU Ning³, LI Hua¹, ZHANG Yi-Guan^{4Δ}

(1 Department of neurosurgery of Urumqi General Hospital in Lanzhou Military Area Command, Urumqi 830000;

2 Department of Neurosurgery, The Hanjiang Hospital of Putian City, Putian, 351111;

3 Department of medical oncology of Urumqi General Hospital in Lanzhou Military Area Command, Urumqi 830000;

4 Sichuan Academy Of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041)

ABSTRACT Objective: To study the effect of ID1 on invasive ability of C6. **Methods:** C6 cells were divide into control, non sense , ID1 siRNA groups. The effects of ID1 siRNA on C6 cells invasive ability in vitro was measured by Boyden chamber invasive models. Contents of ID1, NF-K Bp65, MMP-9 protein were detected by western blot and ELISA methods, respectively. **Result:** In ID1 siRNA group, contents of NF-K Bp65 and MMP-9 protein were decreased markedly(P<0.01), the invasive ability was decreased markedly(P<0.01), too. **Conclusion:** ID1 could increase the invasive ability of C6 cell.
Key words: NF-K Bp65; MMP-9; C6; Invasive ability
Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R730.231 **Document code:** A
Article ID: 1673-6273(2011)21-4047-03

肿瘤的侵袭转移是肿瘤患者治疗失败的主要原因, 研究肿瘤的侵袭转移机制对肿瘤的诊断治疗具有重要意义。近年来研究显示分化抑制因子 Id1 作用于多种信号途径而参与人类恶性肿瘤的发生发展^[1,2], 随着 Id1 蛋白促进肿瘤发生发展侵袭转移的相关分子机制深入研究, Id1 靶向治疗恶性肿瘤愈发受到人们的关注。胶质瘤是颅内发病率最高的肿瘤, 本实验拟研究 Id1 在胶质瘤的发生及侵袭转移中的作用, 进一步明确胶质瘤侵袭的分子调控机制, 为临床开展抗胶质瘤治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞

C6 细胞株购自中科院上海细胞库。

1.3 试剂

荧光定量 Realtime PCR、RNA 抽提、逆转录试剂盒 (TakaRa 公司), Matrigel 胶和细胞培养池 (Becton Dickison 公

司)。LipofentamineTM 2000 (invitrogen 公司)。MMP-9 Elisa 检测试剂盒购自 millipore 公司, Anti-Phospho- NF-K Bp65 一抗、GAPDH 一抗购自 millipore 公司, 二抗购自北京中杉公司。

1.4 仪器

低温离心机 (bio-rad 公司), 酶标仪 (Thermo 公司), 凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司), 实时荧光定量基因扩增系统 (MJ 公司)。

1.5 方法

1.5.1 实验分组 C6 细胞在 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下用含 10% 胎牛血清 DMEM 高糖培养基培养 24 h 后分为三组: 对照组、无义序列组、ID1 siRNA 组。

1.5.2 总 RNA 提取及荧光定量逆转录聚合酶链反应 2~10×10⁵ 个细胞, 总 RNA 提取和逆转录按试剂盒说明书进行。荧光定量聚合酶链反应参见试剂盒说明书: 取 1 μl cDNA 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 30s; 扩增条件为 95℃ 5s, 60℃ 30s, 72℃ 45s, 共 40 个循环。采用 "primer premier 5.0" 软件设计引物: ID1 上游: 5'

* 基金项目: 国家自然科学基金资助 (30901990)

作者简介: 田刚, 40 岁, 男, 副主任医师, 研究方向: 脑胶质瘤, E-mail: tiangang71@163.com

Δ 通讯作者: 张翼冠, 35 岁, 男, 博士, 研究方向: 抗炎免疫药理学, 信号转导, 邮箱: yiguanzhang@126.com

(收稿日期: 2011-06-05 接受日期: 2011-06-30)

GGCGAAGTGGTGCTTGGTCT 3', ID1 下游: 5' GTTCTGAG-GCAGGGTAGGC 3', 产物长度: 166bp, 退火温度: 60℃; β -actin 上游: 5' CGTAAAGACCTCTAT GCCAACA 3', β -actin 下游: 5' TAGGAGCCAGGGCAGTAATC 3, 产物长度: 100bp, 退火温度: 60℃。引物由上海生工合成。

1.5.3 siRNA 合成及转染 根据 ID1 序列和 siRNA 的设计原则, 针对 ID1 基因设计合成寡核苷酸序列: Sense strand siRNA: 5'CACCCUGUUCUCAGACUCCUU3', Antisense strand siRNA: 5'GGAGUCUGAGAACAGGGUGUU3', 无义序列为: Sense strand siRNA: 5'CACUGCGCUCUUACUCACCUU3', Antisense strand siRNA: 5'GAGAGUCG AGGUGAGUCAGUU3'。转染操作按照试剂盒说明书进行: 6 孔板细胞密度达到 70%~80 %时吸去原培养基, 每孔加入 1.5ml 无血清、无抗生素 DMEM 高糖培养基培养。取 10 μ l siRNA, 用 240 μ l Opti-MEM I 稀释, 轻轻混合均匀, 取 5 μ l LipofentamineTM 2000, 用 245 μ l 孔 Opti-MEM I 稀释, 轻轻混合后室温孵育 5min 后与稀释的 siRNA 轻轻混合, 室温静置 20min。将 500 μ l 混合液加入 6 孔板中, 轻轻摇晃孔板, 混匀。37℃ 培养 6h, 吸去培养液, 加入 2ml 新鲜高糖培养基(加 10 %胎牛血清, 1%双抗), 37℃ 继续培养 48h。无义序列组转染无义序列, 空白组同步培养, 不做任何处理。

1.5.4 蛋白抽提及 western blot 取 200 μ l 蛋白裂解液(含蛋白酶抑制剂)加入到 6 孔板细胞内, 刮取细胞裂解液, 4℃ 旋转 15 分钟后 4℃ 10000g 离心 10min, 吸取上清。Western blot: 蛋白上样后 80v 电泳 2.5h, 100v 恒压湿转 1h, 转膜结束后脱脂奶粉封闭 30min, 加入一抗, 4℃ 过夜。TBST 洗膜, 3 遍, 每次 10min。加入

二抗, 放室温 30min。TBST 洗膜, 3 遍, 每次 10min。EPL 显影液显影, 凝胶成像仪获取图像。

1.5.5 Boyden 小室法检测细胞侵袭力 取生长良好的 C6 细胞, 将细胞浓度调整为 1×10^5 /ml 的细胞悬液。取细胞悬液 250ul, 加入铺好基质凝胶的细胞培养池(Boyden 小室的上室)中, 分为三组: 空白组, 无义序列组, ID1siRNA 组, 常规培养 24h 后进行转染。转染后继续培养 36h, 细胞培养池放入 24 孔板, 加入细胞培养液 200 μ l, 培养 12h 后从 Boyden 小室中取出细胞培养池, 用棉签轻轻拭去 PET 膜上表面残留的细胞和基质凝胶后, 将其下表面浸泡于 70%甲醇, 固定 30 分钟, 未结合型苏木素染色 10 分钟。在高倍镜下计数 PET 膜下面侵袭的细胞数, 计数中间和四周 5 个视野, 取平均值。

1.5.6 酶联免疫吸附试验 (Elisa) 按试剂盒操作说明书进行。
1.5.7 统计学方法 所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 12.0 专业统计学软件对数据进行统计学处理, 统计学方法采用 χ^2 检验, 当 $P < 0.05$ 时认为有统计学意义。

2 结果

2.1 ID1 siRNA 干扰效率检测

本实验采用了 realtime RT-PCR 和 western blot 法检测了 ID1 siRNA 的干扰效率。结果如表 1, 图 1 所示: ID1 siRNA 能有效抑制 C6 细胞 ID1 mRNA 和蛋白的表达, 其 mRNA 抑制效率为 55.6%, 蛋白抑制效率为。

2.2 ID1 siRNA 对 C6 细胞侵袭转移能力的影响

表 1 C6 细胞 ID1 表达 ($\bar{x} \pm s$, n=4)
Tab.1 The expression of ID1 in C6 cells

Group	ID1 mRNA/ β -actin	ID1/GAPDH
Control	0.027 $\pm$ 0.0043	0.91 $\pm$ 0.14
Non sense	0.029 $\pm$ 0.0041	0.93 $\pm$ 0.15
siRNA	0.012 $\pm$ 0.0024**	0.36 $\pm$ 0.054**

Note: ** $p < 0.01$ vs control

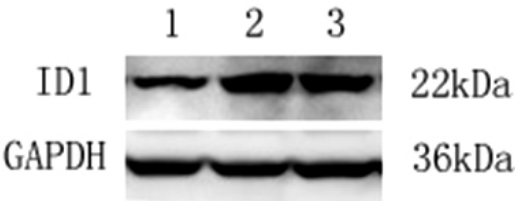


图 1 ID1 蛋白表达 1: siRNA 组, 2: 无义序列组, 3: 对照组
Fig.1 The expression of ID1 1: siRNA group, 2: non-sense group, 3: control group

本实验采用 Boyden 小室法检测了 ID1 siRNA 对 C6 细胞侵袭转移能力的影响。结果如表 2 所示: 干扰 ID1 后能明显降低 C6 细胞侵袭力。

2.3 ID1 siRNA 对 C6 细胞磷酸化 NF- Bp65、MMP-9 表达的影响

本实验采用 western blot 方法检测了 ID1siRNA 对 C6 细胞磷

酸化 NF- Bp65 表达的影响。采用 Elisa 方法测定了 C6 细胞培养上清中 MMP-9 的蛋白表达。结果如表 3、图 2 所示: ID1siRNA 能明显降低 C6 细胞磷酸化 NF- Bp65 蛋白、细胞培养上清中 MMP-9 的表达。

3 讨论

表 2 C6 细胞侵袭力 ($\bar{x} \pm s$, n=4)

Tab 2 The invasion ability of C6 cell

Group	Number of cell
Control	175.29 $\pm$ 21.06
Non sense	184.36 $\pm$ 21.85
siRNA	108.35 $\pm$ 19.47**

Note: ** $p < 0.01$ vs control

表 3 C6 细胞磷酸化 NF- Bp65 蛋白、细胞培养上清中 MMP-9 的表达 ($\bar{x} \pm s, n=4$)
Tab.3 The expression of p- NF- Bp65 and MMP-9

Group	P-NF- Bp65/ GAPDH	MMP-9(ng/ml)
Control	0.75± 0.11	3.45± 0.49
Non sense	0.81± 0.14	3.31± 0.52
siRNA	0.29± 0.041**	1.27± 0.19**

Note: ** p<0.01 vs control

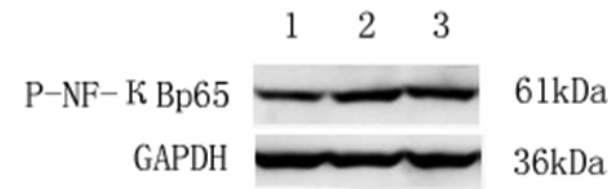


图 2 P-NF- Bp65 蛋白表达 1: siRNA 组, 2: 无义序列组, 3: 对照组
Fig.2 The expression of P-NF- Bp65 1: siRNA group, 2: non-sense group, 3: control group

分化抑制因子 Id1 属于 HLH 蛋白家族, 其 4 种同源系列 Id1、Id2、Id3 及 Id4 均可与碱性 HLH 蛋白作用, 阻碍 bHLH 和 DNA 的结合, 影响特异蛋白的表达、抑制细胞的分化, 故又被称为 DNA 结合抑制因子(inhibitors of DNA binding)。Id1 在肿瘤中的作用愈发受到重视, 研究发现 Id1 的高表达可以激活 VEGF 的转录, 抑制血管生成抑制剂 TSP-1 的转录等多种途径促进肿瘤的血管生成^[3,4]。Id1 蛋白在恶性肿瘤血管生成中的作用近年备受关注, 但目前 Id1 蛋白与其他蛋白的相互作用机制及调控 Id1 基因表达的上游因子和 Id1 蛋白的下游效应子还不完全清楚。

NF-κ B 是调节免疫反应、应激反应、凋亡和炎症的中心环节。NF-κ B 活化后能调控一系列基因的表达, 如粘附分子家族的 ICAM- 1、VCAM-1 等及前炎症性细胞因子 TNF-α、IL-18、IL-2、IL-6 等^[5,6]。当细胞处于静息状态时, NF-κ B 处于细胞质中, 一旦细胞被相关刺激激活, NF-κ B 就会转移到细胞核内行使功能, 作为开关调控各种下游基因的转录水平。NF-κ B 在上游信号如 TNF-α、IL-1β、LPS 等的刺激下, Iκ Bα、Iκ Bβ 被降解, 释放出 p65 的入核序列, 结合到目的基因的启动子上。p65 本身还会受到一系列翻译后的修饰, 主要表现为磷酸化和乙酰化。磷酸化对 p65 的活化非常重要, PI-3K/Akt 通路在 p65 的活化过程中发挥重要作用^[7,8]。MMPs 对肿瘤侵袭和转移起重要作用, 其中最重要的是 MMP-2、MMP-9、MMP-7 和 MMP-3。MMPs 的功能之一是降解细胞外基质(ECM), 在细胞迁移、血管生成、伤口愈合、胚胎发育、动脉粥样硬化、恶性肿瘤的浸润与转移等病理生理过程中发挥重要作用^[9,10]。恶性肿瘤细胞实现扩散转移过程中 ECM 的降解必不可少, 在肿瘤的浸润转移中 MMPs 各种基质降解酶的作用十分重要。

现有研究证实, ID1 能激活 PI-3K/Art 信号通路, 后者在 p65 的活化过程中发挥重要作用^[11,12], ID1 的表达变化可能会影响 p65 的活化, 本实验发现, 过表达 ID1 能增强 p65 的活化, 而 NF- B 的活化又能促进 MMPs 的表达^[13,14]。本研究证实, ID1 能

促进 C6 细胞的侵袭转移, 其机制可能与 PI-3K/Art/NF- B/MMP-9 信号通路有关。

参考文献(reference)

[1] Yap WN, Zaiden N, Tan YL, et al. Id1, inhibitor of differentiation, is a key protein mediating anti-tumor responses of gamma-tocotrienol in breast cancer cells[J]. Cancer Lett, 2010, 291(2): 187-199

[2] Healey MA, Deaton SL, Alder JK, et al. Id1 overexpression is independent of repression and epigenetic silencing of tumor suppressor genes in melanoma[J]. Epigenetics, 2010, 5(5): 410-421

[3] Scharpfenecker M, van Dinther M, Liu Z, et al. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis [J]. J Cell Sci, 2007, 120 (Pt 6): 964-972

[4] Yu Y, Gao Y, Qin J, et al. CCN1 promotes the differentiation of endothelial progenitor cells and reendothelialization in the early phase after vascular injury[J]. Basic Res Cardiol, 2010, 105(6): 713-724

[5] Umesalma S, Sudhandiran G. Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF-kappaB, iNOS, COX-2, TNF-alpha, and IL-6 in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2010, 107(2): 650-655

[6] Kong HJ, Nam BH, Kim YO, et al. Characterization of the flounder IL-6 promoter and its regulation by the p65 NF-kappaB subunit[J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 28(5-6): 961-964

[7] Ho HH, Chang CS, Ho WC, et al. Anti-metastasis effects of gallic acid on gastric cancer cells involves inhibition of NF-kappaB activity and downregulation of PI3K/AKT/small GTPase signals [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(8-9): 2508-2516

[8] Xu CQ, Liu BJ, Wu JF, et al. Icarin attenuates LPS-induced acute inflammatory responses: involvement of PI3K/Akt and NF-kappaB signaling pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 642(1-3): 146-153

[9] Chen NH, Liu JW, Zhong JJ. Ganoderic acid T inhibits tumor invasion in vitro and in vivo through inhibition of MMP expression [J]. Pharmacol Rep, 2010, 62(1): 150-163

[10] Park JH, Jeong YJ, Park KK, et al. Melittin suppresses PMA-induced tumor cell invasion by inhibiting NF-kappaB and AP-1-dependent MMP-9 expression[J]. Mol Cells, 2010, 29(2): 209-215

[11] Sun ZJ, Chen G, Hu X, et al. Activation of PI3K/Akt/IKK-alpha/NF-kappaB signaling pathway is required for the apoptosis-evasion in human salivary adenoid cystic carcinoma: its inhibition by quercetin[J]. Apoptosis, 2010, 15(7): 850-863

(下转第 4053 页)

- molecule and interleukin-12 in a murine hepatoma model[J].Int J Colorectal Dis. 2005, 20(6):494-501
- [4] Isayeva T, Ren C, Ponnazhagan S. Intraperitoneal gene therapy by rAAV provides long-term survival against epithelial ovarian cancer independently of survivin pathway[J].Gene Ther, 2007,14(2):138-146
- [5] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典[M]. (1995年版)二部.北京:化学工业出版社,广东科技出版社,1995;附录 35,76,79,103
- Ministry of Health Pharmacopoeia Committees's, Republic of China Pharmacopoeia [M]. (1995 edition) two. Beijing:Chemical Industry Press,Guangdong Science and Technology Press, 1995;Appendix 35,76,79,103
- [6] 张海涛, 李德春.¹²⁵I- 脱氧嘧啶核苷内照射治疗肝癌的实验研究[J]. 苏州大学学报(医学版), 2005;25(5):807-812
- Zhang Hai-tao, Li De-chun.¹²⁵I-deoxy pyrimidine nucleoside irradiation treatment of liver cancer experimental study [J].Suzhou University (Medical Sciences),2005; 25 (5) :807-812
- [7] 李金泉, 鲍耀东, 周岱等. 125I-UdR 对人脑胶质瘤细胞 SHG44 的杀伤作用[J].核技术,2001,24(11):881-884
- Li Jin-quan, Bao Yao-dong, Zhou Dai, et al.125I-UdR SHG44 human glioma cells in vitro [J].Nuclear technology, 2001,24 (11) :881-884
- [8] 张海涛, 张志德, 李金泉.125I- 脱氧尿嘧啶核苷对肝癌细胞 HepG2 生长的抑制作用[J]. 中华核医学杂志, 2002;22(5):286-287
- Zhang Hai-tao, Zhang Zhi-de, Li Jin-quan.125I-deoxyuridine on growth inhibition of HepG2 hepatoma cells [J].Journal of Nuclear Medicine,2002;22 (5):286-287
- [9] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implication [J].New Engl J Med,1971;285(21): 1182-1186
- [10] 李勇,杨海山,马铎.不同途径给予含血管内皮抑素基因的重组质粒的抑瘤作用研究[J].现代肿瘤医学杂志,2008,16(8):1269-1272
- Li Yong, Yang Hai-shan, Ma Duo. Different ways to give including endostatin recombinant plasmid inhibitory effect of [J].Modern Oncology,2008,16 (8):1269-1272
- [11] Sun X, Vale M, Jiang X, et al. Antisense HIF-1alpha prevents acquired tumor resistance to angiostatin gene therapy [J].Cancer Gene Ther, 2010,17(8):532-540
- [12] Cavallaro C. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis and tumor progression[J].Jneurooncol, 2000, 50(1/2): 63-70
- [13] SIM BK, Macdonald NJ, Gubish ER. Angiostatin and endostatin: endogenous inhibitors of tumor growth [J].CancerMetastasisRev, 2000,19(1/2): 181-190
- [14] Tong AW, Nemunaitis J, Su D, et al. Intratumoral injection of INGN 241, a nonreplicating adenovector expressing the melanoma-differentiation associated gene-7 (mda-7/IL24): biologic outcome in advanced cancer patients[J]. Mol Ther, 2005,11(1):160-172
- [15] Cunningham CC, Chada S, Merritt JA, et al. Clinical and local biological effects of an intratumoral injection of mda-7 (IL24;INGN 241) in patients with advanced carcinoma: a phase I study [J].Mol Ther,2005, 11(1):149-159
- (上接第4049页)
- [12] Wang C, Li S, Wang MW. Evodiamine-induced human melanoma A375-S2 cell death was mediated by PI3K/Akt/caspase and Fas-L/NF-kappaB signaling pathways and augmented by ubiquitin-proteasome inhibition[J]. Toxicol In Vitro, 2010, 24(3): 898-904
- [13] Liu LP, Liang HF, Chen XP, et al. The role of NF-kappaB in Hepatitis b virus X protein-mediated upregulation of VEGF and MMPs[J]. Cancer Invest, 2010, 28(5): 443-451
- [14] Choi EM, Lee YS. Luteolin suppresses IL-1beta-induced cytokines and MMPs production via p38 MAPK, JNK, NF-kappaB and AP-1 activation in human synovial sarcoma cell line, SW982 [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(10): 2607-2611