医学新进展 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.10.001

Id1与肿瘤侵袭

谯　波，罗小辑，蒋电明
（重庆医科大学附属第一医院骨科，重庆　400016）

【摘　要】分化抑制因子-1（Inhibitor of differentiation-1，Id1），属于螺旋-环-螺旋（Helix-loop-helix，HLH）蛋白，最初研究发现在正常细胞发育过程中 Id1 能抑制细胞的分化，近年来发现 Id1 还参与到细胞周期的调控过程中，促进细胞增殖。Id1 不仅影响正常细胞的发育生长，在许多肿瘤中也出现高表达。Id1 能影响细胞外基质的降解及肿瘤血管的生成，与肿瘤的侵袭密切相关。本文主要探讨 Id1 在肿瘤侵袭中的作用及其可能的分子机制。

【关键词】分化抑制因子-1；肿瘤侵袭
【中国图书分类法分类号】R730.2　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2011-02-14

Id1 and tumor invasion

QIAO Bo，LUO Xiao-ji，JIANG Dian-ming
（*Department of Orthopedics，the First Affiliated Hospital，Chongqing Medical University*）

【Abstract】Id1 (Inhibitor of differentiation-1) is a member of helix-loop-helix protein family.Early studies showed Id1 could inhibit differentiation of cells during development in normal cells.Recent findings indicated that Id1 can regulate cell cycle and promote cell proliferation.Id1 can not only affect the development in normal cells，but overexpress in many types of tumor.Id1 which is associated with degradation of extracellular matrix and tumor angiogenesis is closely related to tumor invasion.This review will discuss the role of Id1 in tumor invasion and its molecular mechanism.

【Key words】inhibitor of differentiation-1 (Id1)；tumor invasion

分化抑制因子（Inhibitor of differentiation，Id）蛋白属于螺旋-环-螺旋蛋白（Helix-loop-helix，HLH）家族，目前在哺乳动物中共发现 4 种 Id 蛋白，即 Id1、Id2、Id3、Id4。Id 蛋白可以与碱性 HLH（Basic HLH，bHLH）蛋白作用，阻碍其与 DNA 结合，抑制细胞的分化。Id 蛋白特别是 Id1 不仅参与正常细胞的生长发育，在许多肿瘤中也出现高表达，与肿瘤的侵袭力密切相关。Id1 能上调基质金属蛋白酶（Matrix metalloproteinases，MMPs），血管内皮生长因子（Vascular endothelial growth factor，VEGF）的表达，增强肿瘤的侵袭力。本为主要就 Id1 在肿瘤侵袭过程中的作用作一综述。

1　Id1 的生物学特征

大多数 HLH 蛋白属于 bHLH 家族成员，都有高度保守的 HLH 结构域和碱性 DNA 结合区。细胞特异性转录因子可通过碱性DNA结合区与DNA上E框（E box）基序（CANNTG）或相关 N 框（N box）基序（CACNAG）结合发挥转录激活或抑制作用调控基因的表达。在细胞发育过程中，bHLH 形成的异二聚体能够与 DNA 相结合，激活相关组织特异性基因的表达，从而促使细胞分化[1]。Id 蛋白同样属于 bHLH 蛋白家族，但由于缺乏碱性 DNA 结合区，与 bHLH（如 E2A，E2-2）结合成异二聚体后不能结合 DNA，从而抑制 bHLH 与 DNA 及其他组织特异性 bHLH 转录因子结合，对 bHLH 转录因子活性起负调节作用[2]，从而抑制细胞分化，促进细胞增殖。因此认为大多数 bHLH 蛋白对细胞分化起正性调节作用，而 Id 蛋白则起负性调节性作用。

到目前为止，在哺乳动物中共发现 4 种 Id 蛋白（Id1~4），其编码基因分别位于染色体的 20q11（Id1）、2p25（Id2），1p36.1（Id3）和 6p21-22（Id4）[3]。这 4 种 Id 蛋白都具有高度保守的 HLH 结构域，分子量在 13~20 kD 之间。Id 蛋白在许多组织和器官中都有表达，但在不同的发育阶段和组织中的表达存在一定差异性。在 4 种蛋白中，对 Id1 的研究最多，Id1 不仅与细胞生长和分化相关[2]，并在许多类型的肿瘤中都存在高表达。Iwatsuki[4]发现在发生淋巴结转移和腹腔转移的胃癌患者中，骨髓和外周血中 Id1 的表达明显高于没有远处转移的胃癌患者，并提出骨髓和外周血中 Id1 是胃癌发生淋巴结和

作者介绍：谯　波（1985-），男，硕士，
研究方向：骨肿瘤。
通信作者：罗小辑，男，副研究员，Email：luoxiaoji@gmail.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30901530）。

腹腔转移的“真正的指标”。许多研究证实 Id1 在肿瘤细胞中的表达及表达水平与肿瘤细胞的分化和侵袭力相关[5]，被研究者们认为是“准癌基因”，因此被广泛研究。

2 Id1 在细胞分化中的作用

研究显示利用基因敲除技术同时敲除小鼠 Id1 和 Id3 基因，小鼠在胚胎期就死亡，而只敲除 Id1 基因并不会引起小鼠致死性改变，这表明 Id1 的单独表达在胚胎发育中并不是必不可缺的[6]。Desprez 早期对乳腺上皮细胞的研究发现转染 Id1 基因质粒的 SCp2 细胞较对照组细胞生长迅速，但细胞分化标记物 β-酪蛋白的表达减少，并且细胞对分化信号如催乳激素的反应降低，细胞分化差，并逐渐失去三维结构[7]。早期支持 Id1 蛋白能抑制细胞分化的证据来源于对肌原性和造血细胞家系的研究。Shoji 发现在鼠科动物红白血病细胞分化早期阶段 Id1 的高表达降低了转录因子与E-box 的结合能力，在前体细胞中 Id1 高表达，但随着细胞的分化，Id1 的表达逐渐减少[8]。肌原细胞中 Id1 的高表达能与 E 蛋白相互作用，阻碍肌细胞决定基因相关产物的表达，从而抑制肌原细胞向肌细胞方向分化。而最近对骨形态发生蛋白（Bone morphogenetic protein，BMP）抑制成肌细胞分化的研究中发现，BMPs 能诱导 Id1的表达，并与 Id1 相互作用，对成肌细胞的分化起抑制作用[9]。James 报道[10]通过抑制 TGFβ 来扩增和保持内皮细胞来源性的人胚胎干细胞是依赖 Id1 表达的。普通细胞在进入分化的终末阶段后就失去再生能力，这和组织型特异性标志物以及非特异性的细胞周期调控基因如 p21WAF1 和 p27KIP1 相关。在 TGFβ 诱导的永生化人前列腺细胞系的细胞分化中，Id1 表达下调。由于 TGFβ 的作用，在细胞开始分化阶段 p21WAF1 和 p27KIP1 表达上调，Id1 的转录和表达减少，而在已经分化成熟的细胞中 p21WAF1 和p27KIP1 表达稳定，说明 Id1 表达的下调在细胞开始分化和分化成熟后都起作用，而 p21WAF1 和 p27KIP1 的作用只存在细胞开始分化时。Id1 还能与转录因子样蛋白 MIDA1 相作用，MIDA1 在细胞生长过程中普遍表达，特别是在红白血病细胞中，能强化 MIDA1 蛋白与 DNA5’端的特异序列 GTCAAGC 结合，从而调控细胞周期[11]。

3 Id1 在肿瘤侵袭中的作用

首先报道 Id1 在肿瘤侵袭中的作用是 Desprez 在永生化的乳腺上皮细胞株 SCp2 研究中发现，通过外源性 Id1 的表达能增加细胞穿透基底膜能力[12]。Ling 认为肿瘤血管上皮 Avb3 整合素及与其相关金属蛋白酶 MMP2 丢失造成血管生成障碍是肿瘤细胞生长抑制及退化的原因。Id1 作为转录因子的共同作用分子可以发挥双向调节作用，研究发现 Id1 的高表达可通过激活 VEGF 转录[13]，抑制血管生成抑制剂TSP-1 转录等多种途径促进肿瘤的血管生成[14]，从而增强肿瘤侵袭能力。

Id1 在肿瘤侵袭中的直接作用来自 Lin 等[15]对乳腺癌细胞的研究，Id1 在具有高侵袭力的细胞株中如 MDA-MB-321 和MDA-MB-435中的表达要高于低侵袭力的细胞株如MCF7 和 T47D。外源性的 Id1 在 T47D 细胞中表达增加细胞的生长和侵袭力。而利用反义 RNA 技术阻断 Id1 基因的表达降低乳腺癌细胞转移到动物肺的能力[16]。以上实验不仅说明 Id1 在肿瘤细胞侵袭中具有作用，而且为 Id1 作为靶基因治疗转移性乳腺癌提供实验依据。Monika 等对卵巢肿瘤的研究发现卵巢癌中 Id1 的表达要明显高于卵巢的交界性肿瘤（74.3% vs 32.5%），而在卵巢囊腺瘤中没有 Id1 的阳性表达，认为Id1 的高表达与卵巢肿瘤的低分化及高侵袭力相关[17]。

4 Id1 在肿瘤侵袭中可能的分子机制

4.1 Id1 与 MMPs

MMPs是一类能调节基底膜和细胞外基质降解的蛋白家族。在肿瘤发展过程中，MMPs 如 MMP2，MMP9，MT1-MMP 等在肿瘤细胞中都有高表达[18]。现在普遍认为 MMPs 的高表达与基底膜和细胞外基质的降解相关，从而有利于肿瘤细胞的扩散和肿瘤的远处转移。前面提到早在 1998 年 Desprez 对乳腺上皮细胞株 SCp2 的研究中就发现，Id1 在细胞中的组成型表达能引起MMP蛋白的表达上调，且过度表达 Id1 的SCp2 细胞能分泌一种 120 kD 的明胶酶，这种酶被证实是一种 MMPs，而这种 MMPs 增加了 SCp2 细胞的侵袭能力[12]。因此 Despre 认为 Id1 能够调控 MMPs 的表达和肿瘤细胞的侵袭能力。Rothschild 通过对大量非小细胞肺癌组织进行免疫组化染色，发现 Id1的表达和 MMP-9 的表达高度相关，并与肿瘤的分级相关[19]。Fong 将 Id1 基因的反义表达载体导入具有高转移性的乳腺癌细胞中，结果 MTI-MMP 蛋白的表达下调，并通过将肿瘤细胞注射裸鼠体内，发现转染了 Id1 基因的反义表达载体的肿瘤细胞肺转移的发生率要明显降低[20]。

4.2 Id1 参与肿瘤血管的生成

血管形成不仅是肿瘤生长所必需，而且是肿瘤细胞与新生血管系统的接触最终导致肿瘤侵袭和远处转移的原因。Maw 等[21]的最新研究发现 Id1 的表达与宫颈癌的微血管生成相关。Lyden 等[22]发现 Id1 和 Id3 双敲除的小鼠脑神经外胚层出现血管生成缺陷，尤其在前脑神经节隆起处还观察到明显的脉管膨胀且显现 VEGF 的异常表达；这些既缺失 Id1 又缺失 Id3 基因的小鼠由于具有血管生成缺陷，同时认为肿瘤血管上 Avb3 整合素及与其相关的 MMP2 的丢失所造成的血管生成障碍是肿瘤细胞生长抑制及退化的原因。Ling 发现在前列腺癌细胞中 Id1 分子过表达，从转录和翻译水平都促进 VEGF 的表达增加，并通过体内实验证实转染 Id1 基因使细胞 VEGF 的表达增加，并促进了内皮细胞的生长和形成血管的能力。而采用 siRNA 技术抑制 Id1，发现 VEGF 的转录和翻译水平均下调[13]。Volpert 发现单纯敲除 Id1 基因同样能抑制

肿瘤血管的生成，这种抗血管生成的作用是非 VFGF 依赖性的，而与凝血酶敏感蛋白（Thmmbospondin-1，TSP-1）的表达活性增加相关，TSP-1 是体内强大的血管生成抑制因子，可以诱导内皮细胞凋亡，抑制内皮细胞增殖和迁移[6]。最近的研究利用 RNA 干扰技术抑制 Id1 和 Id3 的表达活性，结果发现前列腺癌细胞的生长和转移能力降低，并且导致促血管生长因子如整合素 α3、α6 和 β1 的表达下调。此外 Lyden 通过研究还发现 Idl 可通过诱导 VEGF 受体生成更多的与血管内皮细胞募集相关蛋白（MMP-2、整合素等），使血管内皮细胞的前体细胞向肿瘤局部迁移而促进肿瘤血管生成[23]。

4.3 其他

早期许多研究都发现 Id1 的表达能诱导正常细胞的凋亡[24]。而有学者通过对前列腺癌细胞的研究发现 Id1 的表达能抑制细胞凋亡，促进肿瘤细胞生长。最近 Demissew 等分离一种新的肽适体 Id11/3-PA7，能阻断乳腺癌细胞 Id1 和 Id3 的活性，并通过增强 E-box 的活性，使细胞周期停滞，促进乳腺癌细胞凋亡。最近几年对 Notch 信号通路的研究较多，研究者普遍认为 Notch 信号通路与许多肿瘤的发展和侵袭相关，而最近研究显示 Notch 信号通路能调节 Id1 的表达而影响肿瘤的发生发展[25]。

5 展 望

随着对 Id1 的研究不断深入，发现 Id1 不仅能与 bHLH蛋白结合而抑制细胞分化，还直接影响其他一些肿瘤侵袭相关因子的表达，如 MMps、VEGF 等。Lee 等还发现 Id1 能通过抑制磷酸酶与张力蛋白同源物 PTEN 激活 Akt 介导的 Wnt 信号通路，提示 Id1 的致癌作用可能与 Wnt 信号通路相关[26]，前文还提到 Notch 信号通路能调节 Id1 的表达。因此作者认为 Id1 影响肿瘤侵袭的过程非常复杂，可能与多种信号通路相互作用，激活或抑制肿瘤相关因子的表达，并形成复杂的调控网络影响肿瘤的发生发展。Id1 的高表达与肿瘤的侵袭相关性已得到证实，Id1 可能成为提示肿瘤预后的有效因子，但对 Id1 致癌的分子机制还需要进一步研究。此外，虽然动物实验证实抑制 Id1 的表达能降低肿瘤的侵袭力[16,20]，但将 Id1 作为靶向治疗肿瘤仍面临很大挑战，如治疗的安全性和有效性，肿瘤属于多基因疾病，治疗同样需要多基因联合治疗才能取得理想效果。

参 考 文 献

[1] Kadesch T.Consequences of heteromeric interactions among helix-loop-helix proteins[J].Cell Growth Differ,1993,4(1):49-55.

[2] Benezra R,Davis R L,Lockshon D,et al.The protein Id:A negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins[J].Cell,1990,61(1):49-59.

[3] Norton J D,Deed R W,Craggs G,et al.Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation[J].Trends Cell Biol,1998,8(2):58-65.

[4] Iwatsuki M,Fukagawa T,Mimori K,et al.Bone marrow and peripheral blood expression of ID1 in human gastric carcinoma patients is a bona fide indicator of lymph node and peritoneal metastasis[J].Br J Cancer,2009,100(12):1937-1942.

[5] Schoppmann S F,Schindl M,Bayer G,et al.Overexpression of Id-1 is associated with poor clinical outcome in node negative breast cancer[J].Int J Cancer,2003,104(6):677-682.

[6] Volpert O V,Pili R,Sikder H A,et al.Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1[J].Cancer Cell,2002,2(6):473-483.

[7] Desprez P Y,Hara E,Bissell M J,et al.Suppression of mammary epithelial cell differentiation by the helix-loop-helix protein Id-1[J].Mol Cell Bio,1995,15(6):3398-3404.

[8] Shoji W,Yamamoto T,Obinata M.The helix-loop-helix protein Id inhibits differentiation of murine erythroleukemia cells[J].J Biol Chem,1994,269(7):5078-5084.

[9] Grcevič D,Kusec R,Kovačič N,et al.Bone morphogenetic proteins and receptors are over-expressed in bone-marrow cells of multiple myeloma patients and support myeloma cells by inducing ID genes[J].Leu Res,2010,34(6):742-751.

[10] James D,Nam H S,Seandel M,et al.Expansion and maintenance of human embryonic stem cell-derived endothelial cells by TGFβ inhibition is Id1 dependent[J].Nat Biotechnol,2010,28(2):161-166.

[11] Inoue T,Shoji W,Obinata M.MIDA1 is a sequence-specific DNA binding protein with novel DNA binding properties[J].Genes Cells,2000,5(9):699-709.

[12] Desprez P Y,Lin C Q,Thomasset N,et al.A novel pathway for mammary epithelial cell invasion induced by the helix-loop-helix protein Id-1[J].Mol Cell Biol,1998,18(8):4577-4588.

[13] Ling M T,Lau T C,Zhou C,et al.Overexpression of Id-1 in prostate cancer cells promotes angiogenesis through the activation of vascular endothelial growth factor(VEGF)[J].Carcinogenesis,2005,26(10):1668-1676.

[14] Sakurai D,Tsuchiya N,Yamaguchi A,et al.Crucial role of inhibitor of DNA binding/differentiation in the vascular endothelial growth factor-induced activation and angiogenic processes of human endothelial cells[J].J Immunology,2004,173(9):5801-5809.

[15] Lin C Q,Singh J,Murata K,et al.A role for Id-1 in the aggressive phenotype and steroid hormone response of human breast cancer cells[J].Cancer Res,2000,60(5):1332-1340.

[16] Minn A J,Gupta G P,Siegel P M,et al.Genes that mediate breast cancer metastasis to lung[J].Nature,2005,436(7050):518-524.

[17] Schindl M,Schoppmann S F,Ströbel T,et al.Level of Id-1 protein expression correlates with poor differentiation,enhanced malignant potential,and more aggressive clinical behavior of epithelial ovarian tumors[J].Clin Cancer Res,2003,9(2):779-785.

[18] Shiomi T,Okada Y.MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers[J].Cancer Metastasis Rev,2003,22(2-3):145-152.

基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.10.002

骨形态发生蛋白 2 联合热化疗对人结肠癌细胞 SW480 的增殖抑制作用及机制

龙 腾,王亚旭,晏 佳,刘小虎,刘娜娜
(重庆医科大学附属第二医院普外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨骨形态发生蛋白-2(Bone morphogenetic protein-2,BMP-2)、热化疗单独和联合应用对人结肠癌细胞 SW480 株增殖凋亡的影响并探讨其可能机制。方法:BMP-2(25、50、100、200、400 μg/L)作用于 SW480 细胞株,MTT 法检测其细胞活力。BMP-2、五氟尿嘧啶(5-Fluorouracil,5-FU)单独与联合作用于 SW480 细胞株,流式细胞(Flow cytometry,FCM)检测细胞凋亡率,Western blot 检测人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因(Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten,PTEN)蛋白的表达,逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 PTEN mRNA 表达。结果:BMP-2 可以抑制 SW480 细胞的增殖。与单独作用比较,BMP-2 联合热化疗作用于 SW480 细胞株时,其凋亡率明显增高($P<0.05$)。BMP-2 能够提高 PTEN 蛋白的表达水平,但是不能提高 PTEN mRNA 的表达水平。结论:BMP-2 可以提高热化疗的敏感性。BMP-2 与热化疗联合作用有协同诱导 SW480 细胞株凋亡的作用,其机制可能与上调 PTEN 蛋白表达及阻止 PTEN 蛋白降解有关。

【关键词】热化疗;骨形态发生蛋白 2;人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因;细胞凋亡
【中国图书分类法分类号】R735.35 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-03-04

Effects and mechanisms of bone morphogenetic protein-2 combined with thermo-chemotherapy on proliferation inhibition in colon cancer SW480 cells

LONG Teng, WANG Ya-xu, YAN Jia, LIU Xiao-hu, LIU Na-na
(*Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: Investigate effects of bonemorphogeneticprotein-2 (BMP-2), Thermo-chemotherapy and their combination on proliferation and apoptosis in human colon cancer cell(SW480) line, and to explore its probable mechanisms. *Methods*: SW480 cells were co-cultured with different concentrations of BMP-2(25, 50, 100, 200, 400 μg/L), then, the apoptosis rate was detected by FCM. The protein level of PTEN was detected by Western blot.The mRNA expression of PTEN was detected by reverse transcription PCR. *Results*: BMP-2 can inhibit the proliferation of SW480 cells. The apoptosis rate of SW480 cell treated Thermo-chemotherapy+BMP-2 was significantly higher than that of BMP-2 treated and that of Thermo-chemotherapy treated cell ($P<0.05$).BMP-2 can improve the expression of PTEN protein, but can not improve

作者介绍:龙 腾(1983-),男,硕士,
研究方向:胃肠道肿瘤的综合治疗。
通信作者:王亚旭,男,副教授,Email:wangyaxu1967@yahoo.com.cn。

[19] Rothschild S I, Kappeler A, Ratschiller D, et al.The stem cell gene "inhibitor of differentiation 1"(ID1) is frequently expressed in non-small cell lung cancer[J].Lung Cancer, 2011, 71(3):306-311.

[20] Fong S, Itahana Y, SumIda T, et al.Id-1 as a molecular target in therapy for breast cancer cell invasion and metastasis[J].Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(23):13543-13548.

[21] Maw M K, 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.

[22] Lyden D, Young A Z, Zagzag D, et al.Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts[J]. Nature, 1999, 401(6754):670-677.

[23] Lyden D, Hattori K, Dias S, et al.Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth[J].Nat Med, 2001, 7(11):1194-1201.

[24] Parrinello S, Lin C Q, Murata K, et al.Id-1, ITF-2, and Id-2 comprise a network of helix-loop-helix proteins that regulate mammary epithelial cell proliferation, differentiation, and apoptosis[J].J Biol Chem, 2001, 276(42):39213-39219.

[25] Chadwick N, Zeef L, Portillo V, et al.Identification of novel Notch target genes in T cell leukaemia[J]. Mol Cancer, 2009, 8:35.

[26] Lee J Y, Kang M B, Jang S H, et al.Id-1 activates Akt-mediated Wnt signaling and p27(Kip1) phosphorylation through PTEN inhibition [J].Oncogene, 2009, 28(6):824-831.

(责任编辑:张学颖)