

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.10.003

· 基础研究 (专题) ·

Id1 和 *Id3* 协同诱导结肠癌 SW620 细胞 EMT 并影响其侵袭与迁移

陈韡^{1a,b}, 于悦^{1a,b}, 孙艳霞^{1a,b}, 林万松^{1b,2}, 叶韵斌^{1a,b,2} (1. 福建医科大学 a. 基础医学院; b. 教学医院暨福建省肿瘤医院 肿瘤免疫学研究室, 福建 福州 350014; 2. 福建省肿瘤转化医学重点实验室, 福建 福州 350014)

[摘要] **目的:** 探讨分化抑制因子 1 基因 (inhibitor of differentiation-1, *Id1*) 和 *Id3* 是否协同促进结肠癌 SW620 细胞 EMT 和细胞的侵袭迁移能力及其可能的机制。 **方法:** 利用慢病毒载体构建 *Id1* 和 *Id3* 单或双基因敲减的结肠癌 SW620 细胞, 实验分为 4 组: SW620-Sh-*Id1* 组 (转染 shRNA-*Id1*)、SW620-Sh-*Id3* 组 (转染 shRNA-*Id3*)、SW620-Sh-*Id1*-*Id3* 组 (共转染 shRNA-*Id1* 和 shRNA-*Id3*)、SW620-NC 组 (转染阴性空载慢病毒)。用 qPCR 法和 Western blotting 法分别检测敲减效果, 显微镜下观察稳定下调 *Id1* 和 *Id3* 后 SW620 细胞形态的变化, 划痕愈合实验和 Transwell 小室法检测 SW620 细胞迁移和侵袭的变化, Western blotting 检测 EMT 标志分子及迁移、侵袭相关蛋白的表达。 **结果:** 成功构建了 *Id1* 和 *Id3* 单基因敲减与双基因敲减的结肠癌 SW620 细胞株。(1) *Id1* 和 *Id3* 的敲除诱导 SW620 细胞形态由上皮样向间质样转变; (2) 与对照组相比, SW620-Sh-*Id1* 组和 SW620-Sh-*Id3* 组 SW620 细胞侵袭和迁移的能力显著下降 (均 $P < 0.05$); SW620-Sh-*Id1*-*Id3* 组细胞侵袭和迁移的能力较 SW620-Sh-*Id1* 组和 SW620-Sh-*Id3* 组也明显下降 (均 $P < 0.05$); (3) 与对照组相比, SW620-Sh-*Id1* 组和 SW620-Sh-*Id3* 组 β -catenin、snail1 及 MMP2 蛋白表达降低, 上皮黏蛋白及 TIMP2 蛋白表达增高 (均 $P < 0.05$); SW620-Sh-*Id1*-*Id3* 组与 SW620-Sh-*Id1* 组和 SW620-Sh-*Id3* 组相比, β -catenin、snail1 及 MMP2 蛋白表达也下降, 同时上皮钙黏蛋白及 TIMP2 蛋白表达也增高 (均 $P < 0.05$)。 **结论:** *Id1* 和 *Id3* 可能通过诱导 EMT 协同影响结肠癌 SW620 细胞侵袭与迁移的能力。

[关键词] 分化抑制因子 1 基因; 分化抑制因子 3; 上皮间质转化; 结肠癌; SW620 细胞; 侵袭; 迁移

[中图分类号] R730.23; R735.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)10-0987-07

Id1 and *Id3* synergistically influence invasion and migration of colon cancer SW620 cells by inducing EMT

CHEN Wei^{1a,b}, YU Yue^{1a,b}, SUN Yanxia^{1a,b}, LIN Wansong^{1b,2}, YE Yunbin^{1a,b,2} (1a. College of Basic Medicine; 1b. Tumor Immunology Laboratory, Teaching Hospital of Fujian Medical University & Fujian Province Tumor Hospital, Fuzhou 350014, Fujian, China; 2. Fujian Key Laboratory of Translational Medicine, Fuzhou 350014, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether inhibitor of differentiation 1 gene (*Id1*) and *Id3* gene can synergistically promote epithelial-mesenchymal transition (EMT), invasion and migration of colon cancer SW620 cells and to explore its underlying mechanisms. **Methods:** The SW620 cell strain with *Id1* or *Id3* gene knockdown and the SW620 cell strain with *Id1/Id3* gene double-knockdown were constructed by lentiviral vectors transfection. The SW620 cells were divided into four groups, which included SW620-Sh-*Id1* group (transfected with shRNA-*Id1*), SW620-Sh-*Id3* group (transfected with shRNA-*Id3*), SW620-Sh-*Id1*-*Id3* group (transfected with shRNA-*Id1* plus shRNA-*Id3*) and SW620-NC group (transfected with negative lentivirus). The efficiency of knockdown was detected by Real-time qPCR and Western blotting. The influence of stable knockdown of *Id1* or *Id3* on cell morphological change was observed under a microscope. The changes of migration and invasion abilities of the SW620 cells were determined by wound healing assay and Transwell assay. EMT, invasion and migration related proteins were measured by Western blotting. **Results:** The SW620 cell strains with *Id1* and/or *Id3* gene knockdown were successfully constructed. *Id1* and *Id3* knockdown induced the epithelial-like to the mesenchymal-like transformation of SW620 cells. (1) Compared with the control group, the invasion and migration abilities of the SW620 cells were significantly decreased in the SW620-Sh-*Id1* group and SW620-Sh-*Id3* group (all $P < 0.05$). (2) Meanwhile, the invasion and migration abilities in the SW620-Sh-*Id1*-*Id3* group were obviously weaker than the SW620-Sh-*Id1* group and SW620-Sh-*Id3* group (all $P < 0.05$). (3)

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81472720)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81472720)

[作者简介] 陈韡 (1990-), 女, 硕士, 主要从事肿瘤免疫学研究, E-mail: 185931614@qq.com

[通信作者] 叶韵斌 (YE Yunbin, corresponding author), 博士, 主任医师, 博士生导师, 主要从事肿瘤免疫学研究, E-mail: zjyunbin@189.cn

Compared with the control group, the SW620-Sh-Id1 group and SW620-Sh-Id3 group had a reduction in the protein expressions of β -catenin, snail1 and MMP2, and an increase in the protein expressions of E-cadherin and TIMP2 (all $P < 0.05$). (4) Compared with the SW620-Sh-Id1 group and SW620-Sh-Id3 group, the protein expressions of β -catenin, snail1 and MMP2 were reduced, and the protein expressions of E-cadherin and TIMP2 were increased in the SW620-Sh-Id1-Id3 group (all $P < 0.05$). **Conclusion:** *Id1* and *Id3* could synergistically influence invasion and migration of SW620 cells, possibly through inducing EMT.

[Key words] inhibitor of differentiation 1 gene (*Id1*); inhibitor of differentiation 3 gene (*Id3*); epithelial-mesenchymal transition (EMT); colon cancer; SW620 cell; invasion; migration

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(10): 987-993. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.10.003]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球三大常见的恶性肿瘤之一,其发病率与病死率呈上升趋势,严重威胁人类健康^[1-2]。目前CRC患者5年生存率仍然很低,暂无较好的方法控制肿瘤的进展,究其原因在于肿瘤发生发展的确切机制还未完全阐明,因此研究CRC侵袭转移的分子机制、寻找有效的治疗手段尤为重要。近年来,分化抑制因子(inhibitor of differentiation, Id)在肿瘤的侵袭及转移过程中的作用备受关注。在小细胞肺癌^[3]和前列腺癌^[4]中 *Id1* 和 *Id3* 均表现出协同促进血管生成并抑制细胞凋亡的作用,提示 *Id1* 和 *Id3* 存在协同促癌的可能。EMT被认为是肿瘤发展的重要环节,细胞形态由上皮样向间质样转变,细胞与细胞间黏附力减弱。EMT赋予细胞更强的运动能力,使其能自由移动,更轻易能脱离癌巢。课题组前期研究^[5]已初步证明, *Id1* 基因沉默表达后可降低结肠癌 HCT116 细胞的增殖、侵袭能力,同时 *Id1* 参与 HCT116 细胞的 EMT 过程。本课题通过单或双敲减 *Id1* 和 *Id3* 的表达,探索 *Id1* 和 *Id3* 是否共同通过调控 EMT 的发生从而协同促进结肠癌 SW480 细胞的侵袭与迁移。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

人结肠癌细胞株 SW620 购自上海细胞库。L-15 培养基、胎牛血清 FBS 购自美国 Gibco 公司。shRNA-Id1、shRNA-Id3 及阴性空载慢病毒购自上海吉凯基因化学技术有限公司,逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司,引物购自北京梓熙生物科技有限公司, DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit、化学发光试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, BCA 法蛋白定量试剂盒、Matrigel 胶购自美国 Bio-Rad 公司, NC 膜购自美国 Amersham 公司。一抗兔抗 β -actin 多克隆抗体、兔抗 E-cadherin 单克隆抗体、兔抗 snail1 单克隆抗体,及二抗辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔抗体和马抗鼠抗体购自美国 Cell Signaling 公司,一抗兔抗 *Id1* 和 *Id3* 多克隆抗体、鼠抗 β -catenin 单克隆抗体、兔抗 MMP2 多克隆抗体、兔抗 TIMP2 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,纤连蛋白购自美国 Millipore 公司。Transwell 小室购

自美国 Corning 公司。

1.2 细胞培养及慢病毒感染

SW620 细胞采用含 10% 胎牛血清的 L-15 培养基,于 5%CO₂、37 °C 培养箱培养,传代 1 次/3 d。将 SW620 细胞分为 4 组:SW620-Sh-Id1 组(单敲减 *Id1*)、SW620-Sh-Id3 组(单敲减 *Id3*)、SW620-Sh-Id1-Id3 组(双敲减 *Id1* 和 *Id3*)、SW620-NC 组(对照组)。取 SW620 细胞接种于 6 孔板(3×10⁵ 个/孔),每组均接种 4 个平行孔。24 h 后细胞贴壁,SW620-Sh-Id1 组、SW620-Sh-Id3 组、SW620-Sh-Id1-Id3 组、SW620-NC 组分别加入 shRNA-Id1、shRNA-Id3、shRNA-Id1+shRNA-Id3、阴性对照病毒液,慢病毒感染 12 h 后,更换为新鲜的 L-15 培养基(含 10%FBS),继续培养 48 h 后更换为含 1.5 μ g/ml 嘌呤霉素的 L-15 培养基(含 10%FBS)筛选细胞,每 3 d 更换一次新鲜的嘌呤霉素抗性培养基。

1.3 qPCR 检测敲减 *Id1* 和 *Id3* 对 SW620 细胞 *Id1* 和 *Id3* mRNA 表达的影响

收集稳定单、双敲减 *Id1* 和 *Id3* 的细胞以及对照组 4 组细胞,用 TRIzol 法提取各组细胞总 RNA,并根据逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA。PCR 引物序列:*Id1* 上游为 5'-GTAAACGTGCTGCTCTACGACATGA-3',下游为 5'-AGCTCCAAGTGAAGGTCCCTGA-3';*Id3* 上游为 5'-AGCCAGGTGGAAATCCTAC-3',下游为 5'-AAGTCCTTTTGTCTGTTGG-3';以 β -actin 作为参照,上游为 5'-TGGCACCACACCTTCTACA-3',下游为 5'-AGCACAGCCTGGATAGCA-3'。PCR 反应用 DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit 试剂盒,qPCR 反应条件:95 °C 15 min;95 °C 15 s,55 °C 30 s,72 °C 1 s,进行 40 个循环;55 °C 1 s,40 °C 1 min。用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 值表示 *Id1* 和 *Id3* mRNA 的相对表达量。实验重复 5 次。

1.4 Western blotting 检测敲减 *Id1* 和 *Id3* 对 SW620 细胞 EMT 及迁移侵袭相关蛋白表达的影响

收集稳定单、双敲减 *Id1* 和 *Id3* 的 SW620 细胞以及对照组细胞,用裂解液裂解,冰上孵育 15 min,提取细胞总蛋白。用 BCA 法进行蛋白定量,每组取 25 μ g 裂解蛋白进行凝胶电泳,电转至 NC 膜。用 5% BSA 封闭液室温封闭 1 h,加一抗(稀释比例 1:500,1:1 000)4 °C 过夜,用 TBST 洗 3 次后加二抗(稀释比例 1:

1 000), 室温孵育 2 h 后, TBST 洗 3 次。使用化学发光试剂盒显影, 采用 Image Lab 4.1 凝胶图像分析软件分析灰度值, 以目的蛋白条带与 β -actin 条带灰度比值表示各目的蛋白相对表达水平。实验重复 5 次。

1.5 敲减 *Id1* 和 *Id3* 细胞的形态学观察与分析

胰酶消化 4 组 SW620 细胞, 分别用 L-15 培养基 (含 10% FBS) 调整细胞密度至 4×10^5 个/ml, 取 2 ml 接种于 6 孔板, 24 h 细胞贴壁后, 在光学显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.6 划痕愈合实验检测敲减 *Id1* 和 *Id3* 对 SW620 细胞迁移的影响

胰酶消化 4 组 SW620 细胞, 分别用 L-15 培养基 (含 10% FBS) 调整密度至 6×10^5 个/孔接种到 6 孔板, 每组设置 3 个复孔, 24 h 后细胞贴壁并铺满, 用 10 μ l 枪头在孔中央划出一道均匀的痕, 用 PBS 洗去悬浮的细胞, 加入无血清培养基 L-15 继续培养 48 h, 在划痕 0、48 h 显微镜下拍照观察划痕愈合情况。实验重复 5 次。

1.7 Transwell 小室法检测敲减 *Id1* 和 *Id3* 对 SW620 细胞迁移的影响

将 Transwell 小室置于 24 孔板中, 吸取 10 μ l 纤连蛋白 (1 mg/ml) 均匀涂抹在下室膜上, 置于 37 $^{\circ}$ C 孵箱中孵育 4 h。胰酶消化 4 组 SW620 细胞, 分别用无血清培养基 L-15 调整至密度为 1×10^6 个/ml 的细胞悬液, 取 100 μ l 加至上室中, 下室为 600 μ l 含 20% FBS 的 L-15 培养基液, 每组设置 3 个复孔。置于 37 $^{\circ}$ C 孵箱中孵育 48 h 后, 取出 Transwell 小室, 擦去膜上层细胞, PBS 轻轻冲洗 2 次, 甲醇固定 30 min, 室温晾干后, 0.1% 结晶紫染液 600 μ l/孔, 染色 20 min。弃染液, 双蒸水润洗 2 次。在显微镜下 ($\times 200$) 随机选 5 个不同的视野计数穿膜细胞数, 取平均值。实验重复 5 次。

1.8 Transwell 小室法检测敲减 *Id1* 和 *Id3* 对 SW620 细胞侵袭的影响

取 200 μ l Matrigel 原液用 300 μ l 无血清培养基 L-15 稀释。取 100 μ l 稀释后的 Matrigel 加至 Transwell 小室的上室中, 置于 37 $^{\circ}$ C 孵箱中孵育 2 h 使 Matrigel 凝固。余下步骤与 Transwell 迁移实验相同。实验重复 5 次。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计学软件分析, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建成 *Id1* 和 *Id3* 单或双基因敲减的 SW620 细胞株

慢病毒感染的 SW620 细胞经嘌呤霉素筛选 3 周后, 荧光显微镜下观察感染效率 (图 1A) 显

示, 4 组 (SW620-NC、SW620-Sh-*Id1*、SW620-Sh-*Id3* 及 SW620-Sh-*Id1-Id3*) 细胞表达绿荧光率均达 90% 以上, 提示慢病毒成功感染 SW480 细胞。

qPCR 检测结果 (图 1B) 表明, 与 SW620-NC 组相比, SW620-Sh-*Id1*、SW620-Sh-*Id1-Id3* 组细胞的 *Id1* mRNA 表达水平均下降 ($t=28.78, 30.55$, 均 $P < 0.05$), SW620-Sh-*Id3*、SW620-Sh-*Id1-Id3* 组细胞的 *Id3* mRNA 表达水平均下降 ($t=25.90, 24.37$, 均 $P < 0.05$)。

Western blotting 检测结果 (图 1C) 表明, SW620-Sh-*Id1* 及 SW620-Sh-*Id1-Id3* 组细胞的 *Id1* 蛋白表达水平均低于 SW620-NC 组 ($t=26.39, 32.67$, 均 $P < 0.05$), SW620-Sh-*Id3* 及 SW620-Sh-*Id1-Id3* 组细胞的 *Id3* 蛋白表达水平均低于 SW620-NC 组 ($t=38.89, 37.48$, 均 $P < 0.05$)。

2.2 *Id1* 和 *Id3* 诱导 SW620 细胞形态由上皮样向间样转变

显微镜下观察稳定的 *Id1* 和 *Id3* 单、双基因敲减的 SW620 细胞株 (图 2) 发现, SW620-NC 对照组细胞形态多呈现长梭状, 与之相比, *Id1* 和 *Id3* 分别敲减后 SW620-Sh-*Id1*、SW620-Sh-*Id3* 组约 70% 的细胞形态变的较圆且细胞间隙变小, 而双敲减 SW620-Sh-*Id1-Id3* 组较单敲减 SW620-Sh-*Id1*、SW620-Sh-*Id3* 组更多的细胞都转变为卵圆形, 呈现上皮样的极性特征。

2.3 双敲减 *Id1* 和 *Id3* 协同抑制 SW620 细胞的迁移和侵袭

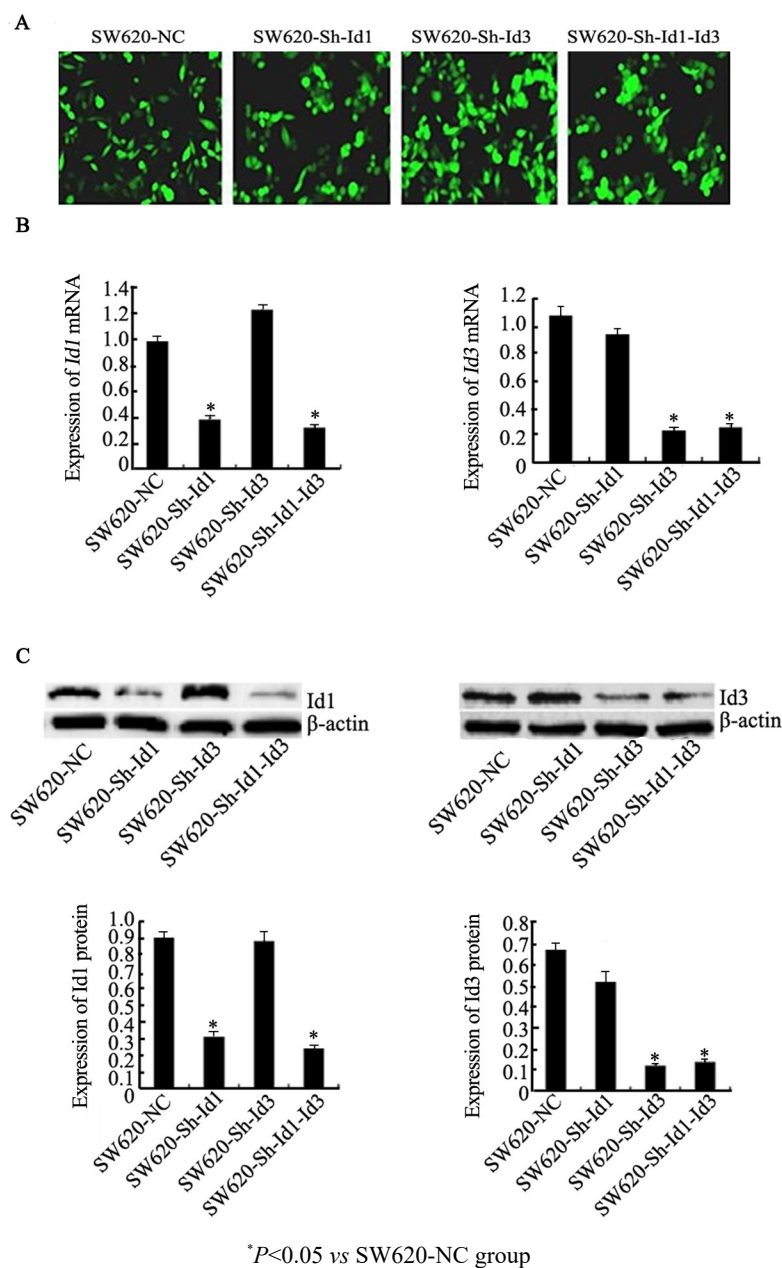
划痕愈合实验结果 (图 3A) 显示, 48 h 后, 单敲减 SW620-Sh-*Id1* 组和 SW620-Sh-*Id3* 组细胞划痕愈合能力低于 SW620-NC 细胞组 ($t=6.24, 5.00$, 均 $P < 0.05$), *Id1* 和 *Id3* 双敲减的 SW620-Sh-*Id1-Id3* 组较单敲减组细胞划痕愈合能力变弱更加明显 ($t=6.63, 7.31$, 均 $P < 0.05$)。Transwell 迁移 (图 3B) 与侵袭实验 (图 3C) 结果显示, 与 SW620-NC 组相比, 单敲减 SW620-Sh-*Id1* 组和 SW620-Sh-*Id3* 组细胞穿膜的细胞数均减少 ($t=7.29, 7.91$, 均 $P < 0.05$; $t=5.52, 3.68$, 均 $P < 0.05$), 双敲减 SW620-Sh-*Id1-Id3* 组较单敲减 SW620-Sh-*Id1* 组和 SW620-Sh-*Id3* 组细胞穿膜数更少 ($t=5.50, 4.06$, 均 $P < 0.05$; $t=3.89, 8.05$, 均 $P < 0.05$)。以上结果表明, 双敲减 *Id1* 和 *Id3* 对 SW620 细胞的迁移和侵袭能力都具有协同抑制作用。

2.4 *Id1* 和 *Id3* 对 SW620 细胞 EMT 及迁移侵袭相关蛋白的影响

Western blotting 检测结果 (图 4) 显示, 相比于对照组, 单敲减 SW620-Sh-*Id1* 和 SW620-Sh-*Id3* 组的 β -catenin、snail1 及 MMP2 蛋白表达降低 ($t=17.89, 53.69, 20.90$, 均 $P < 0.05$; $t=20.03, 40.00, 17.84$, 均 $P < 0.05$), 同时上皮钙黏蛋白及 TIMP2 蛋白表达增高 ($t=$

17.33, 30.23, 均 $P < 0.05$; $t = 26.83, 29.79$, 均 $P < 0.05$)。双敲减 SW620-Sh-Id1-Id3 组对 β -catenin、snail1 和 MMP2 蛋白表达的下调作用($t = 10.30, 18.97, 16.97$, 均 $P < 0.05$; $t = 14.85, 22.90, 21.21$, 均 $P < 0.05$), 及对上皮钙

黏蛋白和 TIMP2 蛋白表达的上调作用明显强于单敲减 SW620-Sh-Id1 组和 SW620-Sh-Id3 组($t = 9.90, 17.45$, 均 $P < 0.05$; $t = 10.00, 11.17$, 均 $P < 0.05$)。



A: Expression of GFP in the SW620 cells under fluorescence microscope ($\times 200$); B: Expression of *Id1* and *Id3* mRNA in the SW620 cells; C: Expression of *Id1* and *Id3* protein in the SW620 cells

图1 成功构建 *Id1* 和 *Id3* 单或双基因敲减的 SW620 细胞株

Fig.1 The SW480 cell strain with *Id1* and *Id3* gene knockdown was successfully constructed

3 讨论

CRC 是预后与转归最差的恶性肿瘤之一, 发生远处转移的晚期 CRC 患者 5 年生存率仅为 12%^[6], 阐明 CRC 发生转移的机制, 是提高患者生存率的重要手段。Id 分子在肿瘤的侵袭及转移中发挥的作用越来越受到关注, Id 基因表达产物属于碱性螺旋-环-螺

旋(basic helix-loop-helix, bHLH)转录因子家族, 由于 Id 分子缺少与 DNA 结合必需的碱性区^[7], 使其成为负性调控类 bHLH 转录因子。Id1 和 Id3 基因同属分化抑制因子家族, 分别定位于 20q1 和 1p36 号染色体上^[8], 分子质量均在 13 000~20 000 之间^[9]。Id1 和 Id3 与 bHLH 结合成异二聚体后阻碍其与靶基因上的 E-box 基因序列结合, 从而阻断细胞的分化进程, 促进

细胞增殖。由于结构上互不干扰,功能上有诸多重叠效应,当 *Id1* 和 *Id3* 在同一细胞中同时高表达时即可能产生协同效应。*Id1* 和 *Id3* 在乳腺癌^[10]、胃腺癌^[11]

等多种恶性肿瘤中高表达,同时促进了肿瘤细胞的转移。

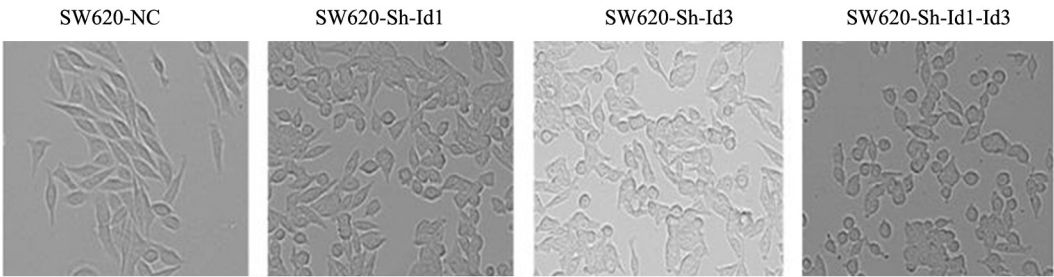
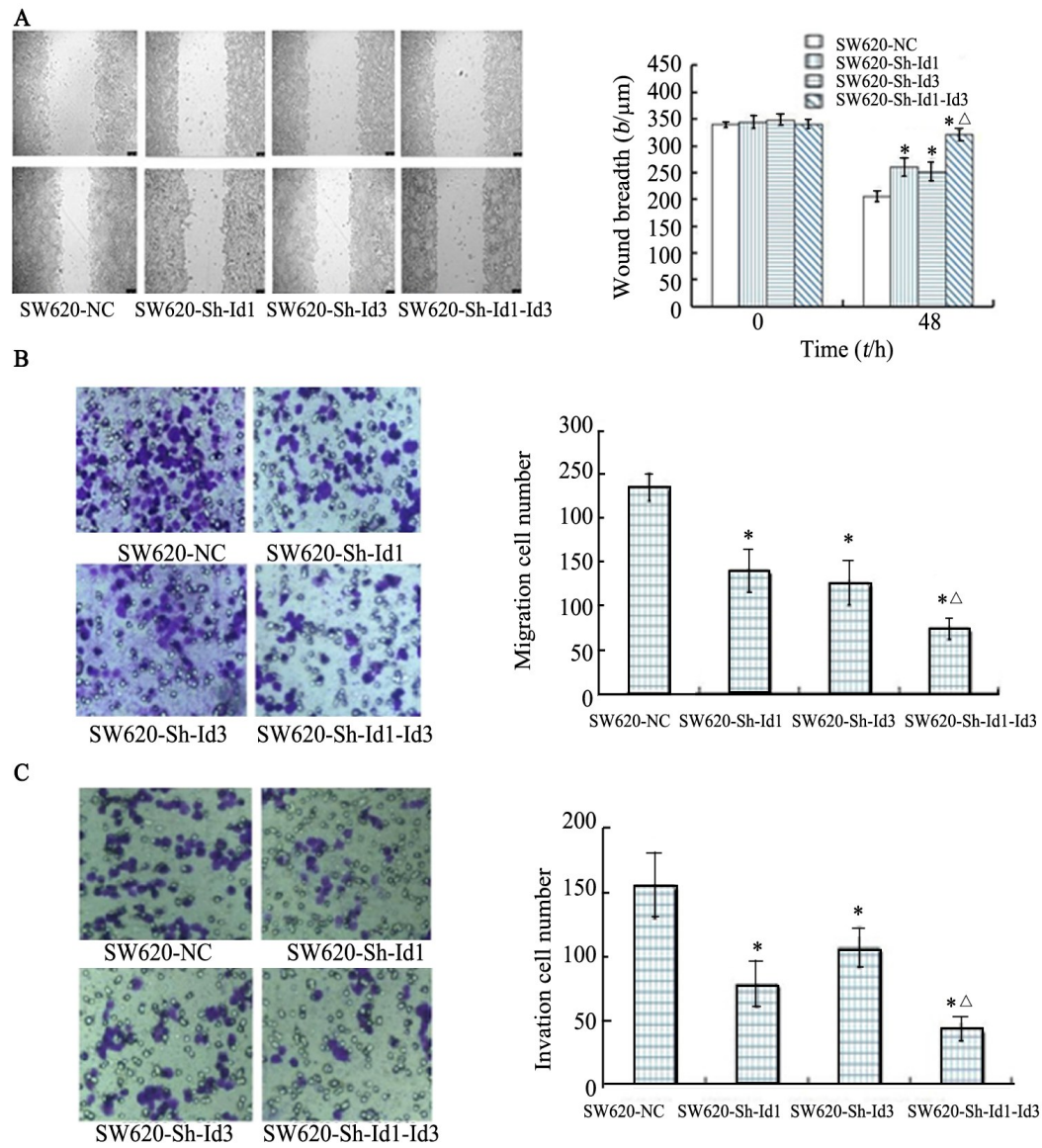


图2 显微镜下观察稳定下调 *Id1* 和 *Id3* 后细胞形态的改变(×200)

Fig.2 Influence of stable knockdown of *Id1* and *Id3* on cell morphological change under a microscope (×200)

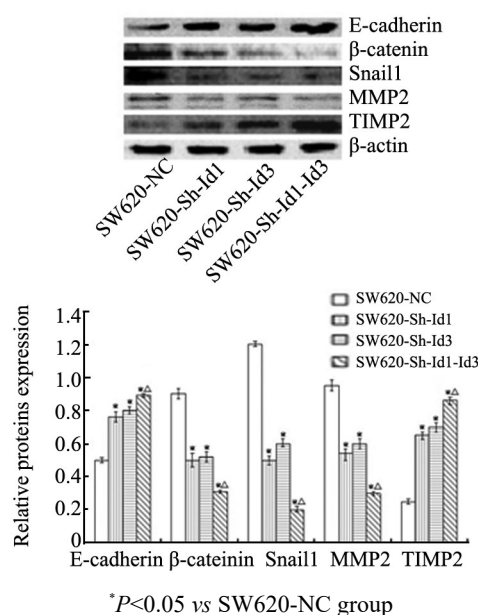


* $P<0.05$ vs SW620-NC group; $^{\Delta}P<0.05$ vs SW620-Sh-Id1 or SW620-Sh-Id3 group

A: Wound healing assay; B: Transwell migration assay; C: Transwell invasion assay

图3 *Id1* 和 *Id3* 单或双基因敲减协同抑制 SW620 细胞的迁移和侵袭(×200)

Fig.3 *Id1* and *Id3* single or double-knockdown synergistically inhibited the migration and invasion of SW620 cells (×200)



* $P < 0.05$ vs SW620-NC group
 $\Delta P < 0.05$ vs SW620-Sh-Id1 or SW620-Sh-Id3 group

图4 *Id1*和*Id3*对SW620细胞中EMT及迁移和侵袭相关蛋白表达的影响

Fig.4 Effects of *Id1* and *Id3* on the expressions of EMT, migration and invasion related proteins in the SW620 cells

EMT是肿瘤侵袭和转移的早期事件,有学者^[12]认为EMT是CRC发生侵袭与转移的重要环节。TELLEZ等^[13]对肺上皮细胞形态学观察发现,细胞发生EMT,细胞形态向长梭形转变,细胞间黏附性减弱,细胞获得更强的迁移能力。本研究构建了稳定单敲减和双敲减*Id1*和*Id3*的结肠癌SW620细胞株。显微镜下观察所见,*Id1*和*Id3*低表达时SW620细胞呈卵圆形上皮样形态,细胞排列紧密,而*Id1*和*Id3*高表达时SW620细胞呈长梭形间质样,细胞间隙较大。根据以上结果推断,*Id1*和*Id3*皆参与了EMT形态学改变,*Id1*和*Id3*高表达时SW620细胞形态更易于脱离细胞团自由移动。

EMT的过程伴随上皮标志物上皮钙黏蛋白表达水平下调^[14],以及间质标志物β-连环素(β-catenin)表达水平上调^[15],*Id*分子可以显著抑制上皮钙黏蛋白活性,主要通过抑制转录起始位点上游1281~1286位的E-box活性发挥转录调控作用^[16]。另一间质标志物*snail*,既是EMT的活化分子,又是上皮钙黏蛋白的转录抑制子。ELLOUL等^[17]证实,在卵巢癌中*snail*与SIP1竞争性结合上皮钙黏蛋白基因启动子近端的E-box序列,当*snail*表达增加时,进一步降低了上皮钙黏蛋白的表达。本课题组前期研究^[5]发现,在结肠癌HCT116细胞中靶向敲低*Id1*基因后,*snail*的mRNA和蛋白表达水平均随之下调,推测*Id1*的表达与*snail*的表达呈正相关关系。同时有研究^[18]指出,*Id1*使甲状腺癌细胞由上皮表型向间质表型转化,本实验结

果与此报道相符,Western blotting检测显示*Id1*和*Id3*单或双敲减时,由于EMT逆转,间质标志物β-catenin、*snail*表达下调,上皮标志物上皮钙黏蛋白表达上调,说明*Id1*和*Id3*正调控间质标志物的表达,负调控上皮标志物的表达,双敲减比单敲减作用更显著。结合形态学观察进一步推测,*Id1*和*Id3*在结肠癌SW620细胞中可协同诱导EMT。

肿瘤侵袭转移的过程常伴随侵袭转移相关蛋白表达水平的改变。肿瘤开始转移首先必须要通过细胞外基质的破坏这一关键的过程。MMP属于降解细胞外基质的主要酶类,MMP蛋白水解过程受到金属蛋白酶组织抑制物(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)的调节,细胞外基质的动态代谢取决于两者表达水平的动态平衡^[19]。CHO等^[20]发现,在肝癌细胞中沉默*Id1*后可抑制MMP2的表达,同时抑制了肿瘤的转移。本课题前期研究^[5]同样发现,在结肠癌HCT116细胞中沉默*Id1*基因后MMP2的mRNA和蛋白水平及其活性均下调。本实验结果也证实了这一点,*Id1*和*Id3*单基因敲减和双基因敲减组较于对照组,MMP2的表达水平降低,TIMP2的表达水平升高,并且双敲减比单敲减效果更显著。RADISKY等^[21]发现,MMPs水平升高诱导了乳腺上皮细胞EMT的发生;何平等^[22]在实验中证明了靶向敲低MMP2的表达后阻碍了肝癌细胞EMT的发生。上述研究说明,MMP2很有可能是EMT效应的上游调控分子,*Id1*和*Id3*可以协同上调MMP2的表达,从而诱导了EMT的发生,伴随细胞外基质的降解使肿瘤细胞更易于转移。结合划痕实验和Transwell实验结果,再次验证*Id1*和*Id3*能协同增强结肠癌SW620细胞侵袭和迁移的能力。

综上所述,*Id1*和*Id3*协同促进了SW620细胞的侵袭和迁移,可能通过诱导EMT发挥作用。如果靶向共敲减*Id1*和*Id3*,可对CRC的发展与转移起到一定的抑制作用。但*Id1*和*Id3*对CRC具体的作用机制以及参与的信号通路还需要更加深入的研究。

[参考文献]

- [1] TESSMER M S, ANDERSON K C. AACR cancer progress report 2016: improving lives through research[J/OL]. Cancer Res, 2016, 22(19): 4759[2018-07-10]. <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/22/19/4759.long>. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2102.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. Ca Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [3] CHEN D, FOROOTAN S S, GOSNEY J R, et al. Increased expression of *Id1* and *Id3* promotes tumorigenicity by enhancing angiogenesis and suppressing apoptosis in small cell lung cancer[J]. Genes Cancer, 2014, 5(5/6): 212-225. DOI: 10.18632/genesandcan-

- cer.20.
- [4] SHARMA P, PATEL D, CHAUDHARY J. *Id1* and *Id3* expression is associated with increasing grade of prostate cancer: *Id3* preferentially regulates CDKN1B[J]. Cancer Med, 2012, 1(2): 187-197. DOI: 10.1002/cam4.19.
- [5] LAI X, LIAO J, LIN W, et al. Inhibitor of DNA-binding protein 1 knockdown arrests the growth of colorectal cancer cells and suppresses hepatic metastasis in vivo[J]. Oncol Rep, 2014, 32(1): 79-88. DOI: 10.3892/or.2014.3172.
- [6] DESANTIS C E, LIN C C, MARIOTTO A B, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(4): 252-271. DOI: 10.3322/caac.21235.
- [7] 孟庆荣, 张锦萍, 耿莉. CD40 和 *Id4* 在前列腺癌中的表达及意义[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(1): 100-104. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2016.01.029.
- [8] RUZINOVA M B, BENEZRA R. *Id* proteins in development, cell cycle and cancer[J/OL]. Trends Cell Biol, 2003, 13(8): 410-418[2018-07-10]. <http://sciencedirect.com/science/journal/09628924>. DOI: 10.1016/S0962-8924(03)00147-8.
- [9] PERK J, IAVARONE A, BENEZRA R. *Id* family of helix-loop-helix proteins in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(8): 603-614. DOI: 10.1038/nrc1673.
- [10] GUMIREDDY K, LI A, KOSSENKOV A V, et al. *ID1* promotes breast cancer metastasis by *S100A9* regulation[J]. Mol Cancer Res, 2014, 12(9): 1334-1343. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0049.
- [11] YANG H Y, LIU H L, LIU G Y, et al. Expression and prognostic values of *Id-1* and *Id-3* in gastric adenocarcinoma[J]. J Surg Res, 2011, 167(2): 258-266. DOI: 10.1016/j.jss.2009.08.006.
- [12] QIU L, TAN X, LIN J, et al. CDC27 Induces metastasis and invasion in colorectal cancer via the promotion of epithelial-to-mesenchymal transition[J/OL]. J Cancer, 2017, 8(13): 2626-2635[2018-07-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5595092/>. DOI: 10.7150/jca.19381.
- [13] TELLEZ C S, JURI D E, DO K, et al. EMT and stem cell-like properties associated with miR-205 and miR-200 epigenetic silencing are early manifestations during carcinogen-induced transformation of human lung epithelial cells[J/OL]. Cancer Res, 2011, 71(8): 3087-3097[2018-07-10]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3035.
- [14] 唐康, 程勇, 庞云, 等. 缺氧诱导因子 1- α 参与结肠癌细胞上皮间质转化及 DNA 同源重组修复的机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2016, 23(6): 766-772 DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2016.06.005.
- [15] HUANG J, YANG B, XIANG T, et al. Diallyl disulfide inhibits growth and metastatic potential of human triple-negative breast cancer cells through inactivation of the β -catenin signaling pathway[J]. Mol Nutr Food Res, 2015, 59(6): 1063-1075. DOI: 10.1002/mnfr.201400668.
- [16] 李凯. ID(inhibitor of DNA binding)家族蛋白调控乳腺细胞的分化并影响乳腺癌的预后[D]. 上海, 复旦大学, 2014.
- [17] ELLOUL S, ELSTRAND M B, NESLAND J M, et al. Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma[J]. Cancer, 2005, 103(8): 1631-1643. DOI: 10.1002/cncr.20946.
- [18] CIARROCCHI A, PIANA S, VALCAVI R, et al. Inhibitor of DNA binding-1 induces mesenchymal features and promotes invasiveness in thyroid tumour cells[J]. Eur J Cancer, 2011, 47(6): 934-945. DOI: 10.1016/j.ejca.2010.11.009.
- [19] ZENG R, WEN F, ZHANG X, et al. Serum levels of matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 elevated in polypoidal choroidal vasculopathy but not in age-related macular degeneration[J/OL]. Mol Vis, 2013, 19(3): 729-736[2018-07-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3611936/>.
- [20] CHO Y, CHO E J, LEE J H, et al. Fucoidan-induced ID-1 suppression inhibits the in vitro, and in vivo, invasion of hepatocellular carcinoma cells[J/OL]. Biomed Pharmacother, 2016, 83: 607-616[2018-07-10]. <http://sciencedirect.com/science/journal/07533322>. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.07.027.
- [21] RADISKY E S, RADISKY D C. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010, 15(2): 201-212. DOI: 10.1007/s10911-010-9177-x.
- [22] 何平. 探讨基质金属蛋白酶 2 在肝癌细胞株 SMMC-7721 上皮间质转化发生中的作用[J/OL]. 临床医药文献电子杂志, 2016, 3(14): 2682-2684[2018-07-10]. http://www.wanfangdata.com.cn/details/detail.do?_type=perio&id=lcydz201614002.

[收稿日期] 2018-07-15

[修回日期] 2018-09-04

[本文编辑] 党瑞山