Id 基因在多种肺癌细胞中的表达及意义

李晓莉 赵艳滨 孙立春 李乐静
(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院内科 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要 目的:研究 Id 基因在肺癌和永生化支气管上皮细胞中的表达,探讨其在肺癌细胞中表达的意义。方法:利用半定量 RT-PCR 和 Western blot 方法检测多种肺癌和永生化支气管上皮细胞中 Id1-Id4mRNA 和 Id1-Id4 蛋白的表达。结果:A549、NCI-H460、NCI-H446、SK-MES-1、Anip973 中 Id1-Id3mRNA 均高表达,Id1 相对表达较强;而 AGZY 和 MP-184 中未表达 Id1-Id3mRNA;腺癌细胞均表达了 Id4mRNA,而 NCI-H446、SK-MES-1 未表达 Id4mRNA。A549,NCI-H460,NCI-H446,SK-MES-1,Anip 973 中 Id1,Id2,Id3 蛋白均高表达,A549,NCI-H446,Anip 973 中 Id2 的表达高于 NCI-H460,SK-MES-1;A549,NCI-H460,Anip 973 有 Id4 的高表达,NCI-H446,SK-MES-1 无 Id4 的表达,Id1-Id4 在 AGZY 和 MP-184 中均未表达。结论:4 种 Id 基因均作为癌基因在肺癌的发生发展中发挥作用,Id1,Id2,Id3 与肺癌细胞的恶性程度以及增殖和转移密切相关,Id4 可做为肺腺癌的检测标志物。

关键词:肺癌;Id 基因;癌基因

The expression and significance of Id in different lung cancer cells

LI Xiao-li[1], ZHAO Yan-bin[1], SUN Li-chun[1], LI Le-jing[1]
Department of Internal Medicine, the Third Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150040, China)

ABSTACT Objective: To investigate the expression and significance of Id gene in lung cancer and immortalization bronchial epithelial cells. **Methods:** The expressions of Id1-Id4 mRNA and their proteins were examined by semiquantitative RT-PCR and Western blot assay. **Results:** Id1 to Id3 mRNA were high expressed in A549, NCI-H460, NCI-H446, SK-MES-1and Anip973 cells but not in AGZY and MP-184 cells. The expression of Id1 was much higher than others. Id4 mRNA was expressed in adenocarcinoma cells but not in NCI-H446 and SK-MES-1 cells. The proteins of Id1 to Id3 were high expressed in A549, NCI-H460, NCI-H446, SK-MES-1 and Anip973 cells. The expression of Id2 in A549, NCI-H446 and Anip973 was higher than that in NCI-H460 and SK-MES-1. Id4 was high expressed in A549, NCI-H460 and Anip973 cells but not in NCI-H446 and SK-MES-1 cells. There were no expressions from Id1 to Id4 in AGZY and MP-184 cells. **Conclusion:** The four kinds of Id gene took a part in the progression and metastasis of lung cancer as an oncogene. Id1, Id2 and Id3 were closely related to the malignant degree, proliferation and metastasis of lung cancer. Id4 may be a mark of lung adenocarcinoma.

Key words: Lung cancer; Id gene; Oncogene

1 引言

Id(Inhibitor of DNA binding and/or differentiation)蛋白是1990年 Robert Benezra 等首先从 MEL(murine erythroleukemia)细胞 cDNA 文库中克隆出来的,属于HLH 蛋白中的一类;对细胞的分化、增殖、凋亡具有重要的作用。目前,在高等生物中发现4种 Id 因子,即 Id1Id4。大量研究结果表明,Id 在不同的肿瘤中具有不同的特性。Id1 在人体肿瘤标本及体外培养的肿瘤细胞中均呈高表达趋势[1,2],特别是 Id1 在肿瘤发生、发展中的作用已得到广泛认可。用原位杂交和免疫组化技术在多种肿瘤(神经胶质瘤、神经母细胞瘤、胰腺癌、甲状腺髓质癌、乳腺癌、子宫内膜癌、宫颈癌、黑色素瘤、前列腺癌、肝细胞癌等)中发现 Id1 均有高异常表达[2-3]。而 Id2 在侵袭、转移的乳腺癌细胞中的表达低于已分化的乳腺癌细胞[5],在胃癌中也有相似的趋势;Id3 与 Id1 高度同源,功能相近;Id4 在某些肿瘤表现出抑癌基因的特性。但目前在肺癌中的表达及作用如何,尚未见报道。因此,本实验对组织类型不同、侵袭转移能力不同的肺癌细胞进行4种 IdmRNA 和 Id 蛋白表达的检测及分析,研究 Id1~Id4 在肺癌的表达及可能的作用。

2 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 主要试剂

标准胎牛血清为 Hyclone 公司产品,RPMI1640 培养基和 DMEM 培养基购自 GIBCOBRL 公司,无血清培养基 LHC-8 购自 BIOSOURCE 公司。TRIZOL(Reagent, DNase I, Taq DNA Polymerase 和 SUPERSCRIPT(Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis 均购自 Invitrogen 公司;鼠抗人 Id 单克隆抗体:Id1, Id2, Id3, Id4 一抗购自 Santa Cruz 公司;动植物组织蛋白裂解液购自博大泰克公司;其他为进口或国产分析纯试剂。本实验引物均由上海博亚公司合成。引物序列详见表1。

2.1.2 细胞株与细胞培养

作者简介:李晓莉,女,汉族,1964 年生,博士研究生,主任医师,副教授
主要研究方向:肺癌的基因诊断、基因治疗,E-mail: lixiaoli4088@tom.com
通讯作者:李乐静,教授,博士生导师,Tel: 0451-86298260 E-mail: Lixiaoli1964@yahoo.com.cn
(收稿日期:2006-02-18 接受日期:2006-03-12)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

肺腺癌细胞株 A549, 人肺鳞状细胞癌细胞株 SK- MES-1, 大细胞肺癌细胞株 NCI- H460, 小细胞肺癌细胞株 NCI-H446 购自中科院上海细胞所; 高转移肺腺癌细胞株 Anip973, 低转移肺腺癌细胞株 AGZY 由黑龙江省肿瘤研究所惠赠; 永生化支气管上皮细胞 MP- 184 由中科院肿瘤研究所程书钧所长惠赠。A549, NCI- H460, NCI- H446, Anip973, AGZY 用含 10% 胎牛血清, 200mM 谷氨酰胺, 1% 双抗的 RPMI 1640 培养基, SK- MES- 1 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, MP- 184 用无血清培养基 LHC- 8, 均在 37℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养。每 2- 3 日更换培养基。

表 1 扩增基因 cDNA 引物序列

基因	扩增片段(bp)	引物序列	退火温度(℃)	片段位置
Id1	700	Id1/F: CAAGAATCATGAAAGTCGCCAGTG Id1/R: CAGCTCCAACTGAAGGTCCCTG	62	92- 796
Id2	510	Id2/F: GGGACGAAGGGAAGCTCC Id2/R: CCGCTTATTCAGCCACACAG	60	85- 595
Id3	460	Id3/F: TCCTACAGCGCGTCATCGACTAC Id3/R: TCACAGTCCTTCGCTCCTGAGC	61	537- 997
Id4	180	Id4/F: GAAAGTCAGCAAAGTGGAGATC Id4/R: CTCTCTCTCTCTTGGAATGAC	59	627- 826
β- actin	520	β- actin/F: CTGGGACGAATGGCGAAA β- actin/R: AAGGAAGGCTGGAGGGAGTGC	60	305- 827

2.2 方法

2.2.1 RT- PCR 检测 Id mRNA 水平的表达

收获培养细胞汇合率达到 90% 的肺癌细胞和永生化支气管上皮细胞, 加入 Trizol RNA Isolation 试剂, 采用 Trizol 一步法提取待分析样品的总 RNA, 加入 1ml 75% 的乙醇悬洗 2 次沉淀, 最终溶解于 100ul RNAase- free H2O 中; 各取 5ul 于 2% 的甲醛变性琼脂糖凝胶中电泳, 检测总 RNA 的完整性及片段大小。采用 Reverse Transcription System 以 OligoT 为引物, 反转录总 RNA 生成第一条 cDNA 单链; 采用 Takara PCR 试剂盒, 依据设计的 Id1- Id4 和 β- actin 的引物 RT- PCR 扩增各标本内对照 β- actin 及 Id 片段, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2.2.2 Western Blot 检测 Id 蛋白水平的表达

将生长至 70% ~ 80% 融合的 7 种细胞用 PBS 冲洗 3 次, 再加入适量 PBS, 以细胞刮子收集细胞并转移至离心管中, 5 000 × g 离心 10min 后尽量弃上清。根据细胞量加入适量的动植物组织蛋白裂解液(博大泰克)约 1ml, 振荡后于冰浴中放置 30min。4℃, 5000rpm 离心后, 上清液转入新的 eppendorf 管中, 经 DU640 核酸/蛋白分析仪测定蛋白质浓度, 后加入等体积的异丙醇, 于室温下放置 10min, 10 000rpm 离心 10min 收集沉淀。加入 100ul 蛋白样品缓冲液。按转膜装置说明书将蛋白转移至 PVDF 膜, 30V 恒压, 4℃过夜。TBS- T 洗膜 3 次后, 以 5% 脱脂奶粉室温封闭 PVDF 膜 2h。加入 20ml 含抗 Id1 ~ Id4 的抗体(100ul/20ml), 室温下杂交 2h, TBS- T 洗膜 3 次, 每次 5min, 加入 1:1000 的相应的辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温下杂交 2h, TBS- T 洗膜 3 次; 将洗净的膜置于干净的平皿中, 加入 DAB 显色底物溶液, 于 37℃ 保温至深红色条带显色完全, 用 ddH2O 冲洗, 终止显色; 采用打扫仪扫描然后结果。

3 结果与分析

3.1 总 RNA 完整性检测结果

各细胞系总 RNA 的 2% 甲醛变性琼脂糖凝胶的检测结果如图 1。从图中可以看到, 总 RNA 为弥散的带型, 28SRNA 的含量约为 18SRNA 含量的 2 倍, 说明总 RNA 完整性良好, 无降解。

3.2 肺癌及永生化支气管上皮细胞 IdmRNA 的表达

RT- PCR 扩增各细胞系内对照 β- actin 及 Id1- Id4 基因片段, 结果见表 2, 图 2, 可见在 5 株肺癌细胞系(A549、NCI-H460、NCI- H446、SK- MES- 1、Anip973) 中 Id1- Id3mRNA 均高表达, Id1 表达较强; 而 AGZY 和 MP- 184 中未表达 Id1-Id3mRNA; NCI- H446、SK- MES- 1 未表达 Id4mRNA, 腺癌细胞均表达了 Id4mRNA。

表 2 RT- PCR 扩增细胞系 4 种 Id 基因的结果

细胞株	Id1	Id2	Id3	Id4
A549	+ + +	+ +	+ +	+
NCI- H460	+ +	+ +	+ +	+
NCI- H446	+ +	+ +	+	—
SK- MES- 1	+ + +	+ + +	+ + +	—
Anip973	+ + +	+ +	+ +	+ + +
AGZY	—	—	—	+
MP- 184	—	—	—	—

附注: - : 表达未检测出 + : 表达强度低于对照 β- actin

+ + : 表达强度与对照 β- actin 相当 + + + : 表达强度高于对照 β- actin

3.3 肺癌及永生化支气管上皮细胞 Id 蛋白的表达

如图 3 可见 A549, NCI- H460, NCI- H446, SK- MES- 1, Anip 973 均有 Id1, Id2, Id3 蛋白的高表达, A549, NCI- H446, Anip 973 Id2 的表达高于 NCI- H460, SK- MES- 1; A549, NCI-H460, Anip 973 有 Id4 的高表达, NCI- H446, SK- MES- 1 无 Id4 的表达, Id1, Id2, Id3, Id4 在 AGZY 和 MP- 184 中均未表达。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

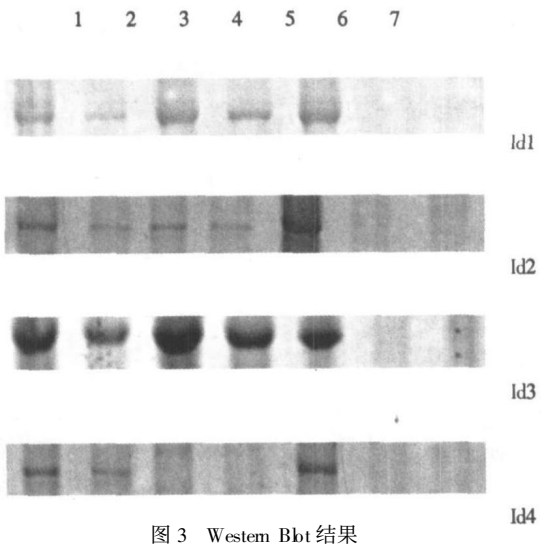

图 3 Western Blot 结果

4 讨论

肺癌对人类健康的危害日益严重,其发病率和死亡率在大多数国家和地区居恶性肿瘤之首,是治疗效果相对较差的恶性肿瘤,总的 5 年生存率仅为 13%。大部分病人确诊时已属晚期,丧失了早期手术治疗的时机。现代肿瘤分子生物学研究揭示了:肺癌是基因疾病,肺癌的发生发展与多种癌基因的激活,抑癌基因的失活密切相关。通过基因进行早期诊断,监测疗效,评估预后以及开展基因治疗、靶向治疗成为肺癌治疗领域基础和临床研究的方向。

自 1990 年第一个 Id 基因被克隆以来,Id 的研究越来越受到重视,已在多种肿瘤中开展了 Id 基因和蛋白表达的研究,目前,就 Id1、Id2、Id3 和 Id4 这四种基因来说,Id1 的作用已经比较明确,无论在何种肿瘤中,它都是肿瘤增殖的正性调控基因,Id1 的表达水平与肿瘤侵袭程度和不良的临床预后有关[6-10]。Id3 和 Id1 有高度的序列同源性,因此作用也很相似,可以促进肿瘤细胞增殖,但也有例外,比如在骨肉瘤 MG- 63 细胞系,Id3 表达反倒可以促进细胞凋亡[11]。Id2 和 Id4 多充当肿瘤增殖的负性调控基因。因此,针对分化抑制基因的肿瘤基因治疗将有很大的优势,我们可以在转录或翻译水平上阻止或促进 Id 基因的表达,由此,我们可以应用某些方法(RNAi 等)使 Id1 基因沉默。这样就可以抑制 Id1 基因对肿瘤增殖的正性调控作用,而对于某些肿瘤同时又有 Id2 作为肿瘤负性调控基因表达的,我们还可以人为地促进 Id2 表达,甚至可以将两种方法结合起来。那么 4 种 Id 基因在肺癌起到什么样的作用呢?本研究者在前期进行了 4 种 Id 蛋白和基因在肺癌组织表达情况的研究,已对 4 种 Id 在肺癌组织的表达有初步认识。

本实验通过 RT- PCR 和 Westen blot 进一步研究了 Id 在各类型肺癌细胞中的表达,发现 Id1、Id2、Id3 在恶性程度高的,增殖快及高转移的细胞中,无论在转录水平(mRNA),还是在蛋白水平均高表达,而 Id4 只在腺癌中表达,正常细胞- - 永生化支气管上皮细胞均不表达 Id1- Id4。说明 Id1- Id4 在肺癌均做为癌基因而发挥作用,Id1、Id2、Id3 可帮助我们判断肺癌的恶性程度,判断预后。肺癌如果有 Id4 表达时,腺癌的可能性大,因此,可以用来评估肺癌的病理类型,指导治疗。并且为进一步开展针对 Id 基因的基因治疗提供理论依据奠定基础。

参 考 文 献

[1] Yokota Y, Mori S. Role of Id family proteins in growth control[J]. J Cell Physiol, 2002, 190(1): 21~ 28

[2] Lasorella A, Uo T, Iavarone A. Id proteins at the cross- road of development and cancer[J]. Oncogene, 2001, 20: 8326~ 8333

[3] Coppe J P, Itahama Y, Moore D H, 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

[4] Lee K T, Lee Y W, Lee J K, et al. Overexpression of Id- 1 is significantly associated with tumour angiogensis in human pancreas cancers[J]. Br J Cancer, 2004, 90(6): 1198~ 1203

[5] Itahana Y, Singh J, Sumida T, et al. Role of Id- 2 in the maintenance of a differentiated and noninvasive phenotype in breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2003, 63(21): 7098- 7105

[6] Lin CQ, Singh J, Murata K, et al. A role for Id- 1 in the aggressive phenotype and steroid hormone of human breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2000, 60: 1332~ 1340

[7] Hu YC, Lam KY, Law S, et al. Identification of differentially expressed genes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) by cDNA expression array: Overexpression of Fra- 1, Neogenin. Id- 1, and CDC25B genes in ESCC[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7: 2213~ 2221

[8] 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: 5703~ 5706

[9] Schindl M, Schoppmann SF, Strobel 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: 779~ 785

[10] Schoppmann SF, 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: 677~ 682

[11] Koyama T, Suzuki H, Imakiire A, et al. Id3- mediated enhancement of cisplatin- induced apoptosis in a sarcoma cell line MG- 63[J]. Anticancer Res, 2004, 24(3): 1519- 1524

(图 1, 图 2 请见封 3)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(正文请见 36 页)

Id 基因在多种肺癌细胞中的表达及意义

李晓莉[1] 赵艳滨[1] 孙立春[1] 李乐静[1*]

1 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院内科 （ 150040 ）

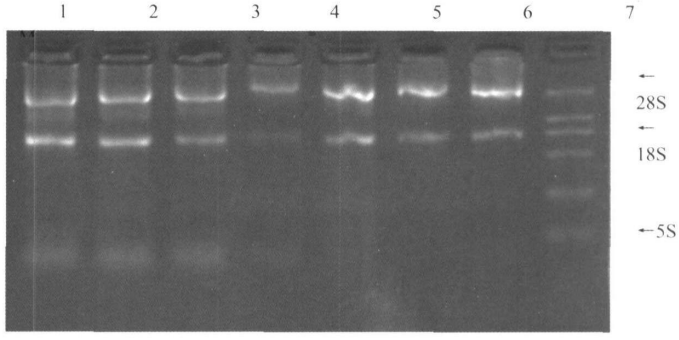

图 1 肺癌细胞系总 RNA 琼脂糖凝胶检测结果

附注：1、2、3、4、5、6、7 分别是 A549、NCI-H460、NCI-H446、 SK-MES—1、Anip973、AGZY、MP-184

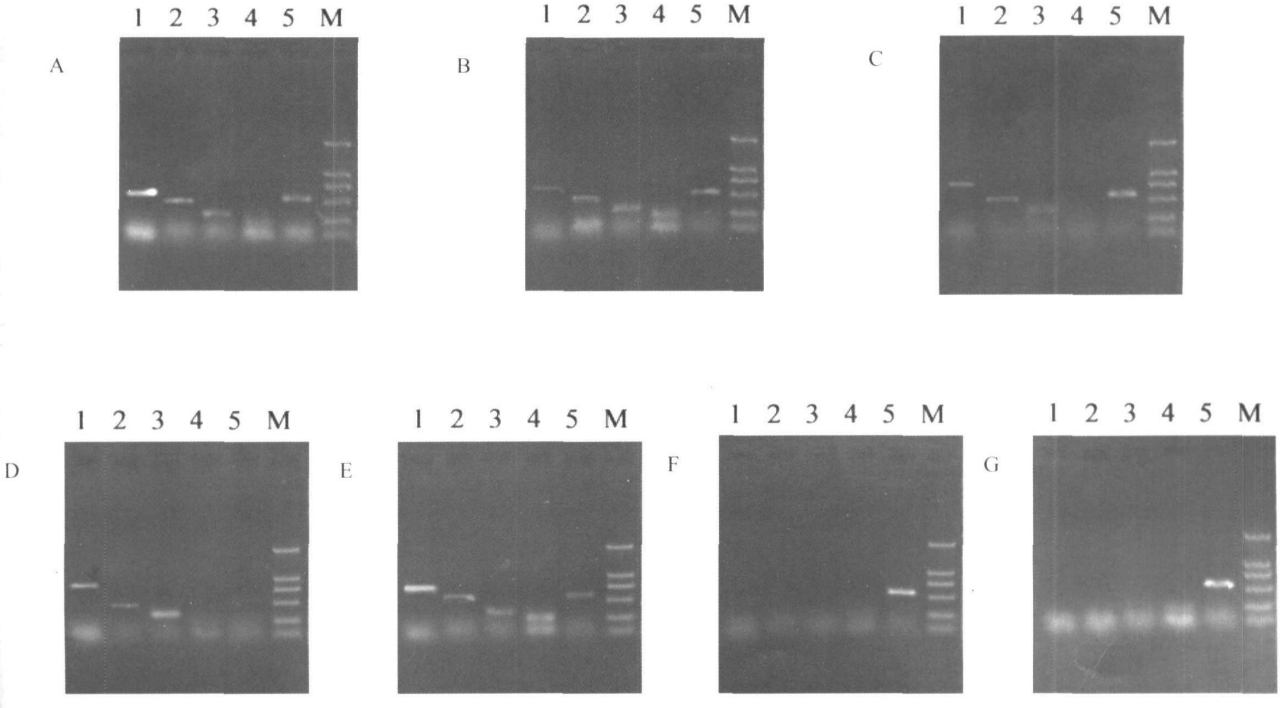

图 2 肺癌及人永生化支气管上皮细胞系 RT—PCR 结果

附注：各图中 1—5，分别为 Id1，Id2，Id3，Id4，β--actin.

M 为 marker, DL2000，自上而下分别为 2000,1000,750,500,250,100bp.

A、B、C、D、E、F、G 分别为 A549、NCI-H460、 NCI-H446、SK-MES—1、Anip973、AGZY、MP-184。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net