

分化抑制因子 1 重组腺病毒的构建及其动物模型的建立

魏杰¹, 张祥¹, 王石磊¹, 靳鑫¹, 阳媛¹, 师悦媛¹, 牛司强², 汪德强³

(1. 重庆医科大学检验医学院, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 400016;

3. 感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:构建分化抑制因子-1(inhibitor 1 of differentiation, Id1)重组腺病毒(recombinant adenovirus, Rad),并建立 Id1 过表达的小鼠动物模型。**方法:**在 HEK293 细胞中将腺病毒重组质粒 AdEasy-Id1 进行包装以获得 Id1 重组腺病毒(RAd-Id1);通过绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记法测定腺病毒滴度;通过 qRT-PCR 和 Western blot 验证 RAd-Id1 感染的 HepG2 细胞中的 Id1 过表达效果,用 MTS 比色法检测 RAd-Id1 对 HepG2 细胞增殖的影响;通过尾静脉注射 RAd-Id1 的感染方式建立肝组织中过表达 Id1 的小鼠动物模型,病毒载量梯度实验分 PBS 空白组、RAd-GFP 对照组及 RAd-Id1 实验组($n=5$ /组)以测定 RAd-Id1 感染小鼠的适合载量;病毒感染时间梯度实验分 5 d 检测 1 次为 1 组,共 7 组($n=5$ /组)以测定感染小鼠的适合时间;通过 Western blot 检测小鼠肝组织中 Id1 的过表达效果及甲胎蛋白(alpha fetal protein, AFP)和癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)的表达水平,再采用 ELISA 检测小鼠血清中 Id1 的免疫原性及 AFP 和 CEA 的表达情况。**结果:**成功包装获得 RAd-Id1,测得其滴度为 1.5×10^{11} CFU/mL;RAd-Id1 感染 HepG2 细胞 48 h 和 72 h 后,Id1 的转录和蛋白水平均明显升高($P<0.01$);96 h 时 RAd-Id1 实验组的 MTS 检测值较 PBS 空白组和 RAd-GFP 对照组(2.00 ± 0.06 vs. 1.18 ± 0.05 , 2.00 ± 0.06 vs. 1.10 ± 0.07 ; $F=51.350$, $P=0.000$)明显升高;Western blot 结果显示:在 RAd-Id1 感染的小鼠肝组织中,Id1、AFP 和 CEA 蛋白水平较 PBS 空白组和 RAd-GFP 对照组升高;ELISA 实验结果表明:血清中 AFP 和 CEA 蛋白水平与 RAd-Id1 的载量呈正相关($r_{AFP}=0.903$, $P_{AFP}=0.014$; $r_{CEA}=0.964$, $P_{CEA}=0.002$),不同载量 RAd-Id1 感染小鼠的血清中 Id1 抗体滴度无显著差异($P>0.05$)。**结论:**成功构建了 RAd-Id1 及其介导的小鼠动物模型;RAd-Id1 可作为细胞水平上研究 Id1 对肝癌影响的载体工具;AFP 和 CEA 的升高提示 Id1 可能参与诱导 AFP 和 CEA 的表达。

【关键词】重组腺病毒;分化抑制因子 1;肝癌;动物模型

【中图分类号】Q782

【文献标志码】A

【收稿日期】2016-08-30

Construction of the recombinant adenovirus of inhibitor of differentiation 1 and establishment of its animal model

Wei Jie¹, Zhang Xiang¹, Wang Shilei¹, Jin Xin¹, Yang Yuan¹, Shi Yueyuan¹, Niu Siqiang², Wang Deqiang³

(1. College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University; 2. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 3. Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct the recombinant adenovirus(Rad) with expressing inhibitor 1 of differentiation(Id1), and to establish its animal model. **Methods:** AdEasy-Id1, the recombinant adenovirus plasmid which had been constructed previously, was packaged in HEK293 cells to obtain recombinant adenovirus Id1(RAd-Id1). Then the titer of virus was determined by green fluorescent protein(GFP) labeling method. The over-expression efficiency of Id1 was measured by qRT-PCR and Western blot in HepG2 cells infected with RAd-Id1, and the effect of Id1 on proliferation of HepG2 cells was detected by MTS assay. Animal model of Id1 expressing in liver tissue was established through the way of tail vein injection of RAd-Id1. In order to determine the suitable load of

RAd-Id1 virus for infecting the mice, viral load gradient experiment was divided into PBS control group, RAd-GFP control group and RAd-Id1 experimental group($n=5$ /group). Time gradient experiment examined once every 5 days as a group, a total of 7 group($n=5$ /group), to explore the appropriate time. The expression of Id1 as well as the changes of alpha fetal protein(AFP) and carcinoembryonic antigen(CEA) in liver tissues were determined by Western blot. The level of Id1 antibody and

作者介绍:魏杰, Email: 1093595520@qq.com,

研究方向:原发性肝癌的发病机理。

通信作者:汪德强, Email: wangdq@cqmu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81301395);重庆市科委自然科学基金资助项目(编号:cstc2015jcyjA10003);重庆市卫计委 2016 年医学科研面上资助项目(编号:2016MSXM001)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170427.1018.002.html>
(2017-04-27)

the concentrations of AFP and CEA in serum were detected by ELISA. **Results:** Recombinant adenovirus plasmid containing Id1 gene was successfully established, then the corresponding adenovirus were acquired and the measured titer was 1.5×10^{11} GFU/mL. Western blot and qRT-PCR analysis showed that Id1 mRNA and protein levels significantly increased in HepG2 infected with RAd-Id1 for 48 h and 72 h respectively ($P < 0.01$). MTS assay reported that the values in RAd-Id1 group were higher than those in NC group and RAd-GFP group after 96 h (2.00 ± 0.06 vs. 1.18 ± 0.05 , 2.00 ± 0.06 vs. 1.10 ± 0.07 ; $F = 51.350$, $P = 0.000$); Western blot results showed; when compared with PBS group and RAd-GFP group, the RAd-Id1 group's levels of Id1 as well as AFP and CEA in liver was higher. ELISA results showed; the concentrations of AFP and CEA in serum were positively correlated with the load of RAd-Id1 ($r_{s_AFP} = 0.903$, $P_{AFP} = 0.014$; $r_{s_CEA} = 0.964$, $P_{CEA} = 0.002$). There was no significant difference among these concentrations of Id1 antibody in serum of mice infected with different load of RAd-Id1 ($P > 0.05$). **Conclusion:** The RAd-Id1 is successfully constructed, which serves as the vector tool to study the effect of Id1 on hepatic neoplasm at the cellular level. Mouse animal model of RAd-Id1 accompanied with the elevation of both AFP and CEA in liver also has been successfully established by tail vein injection, which suggests that the ectopic expression of Id1 may be related to the expression of AFP and CEA, but further studies will be required to determine how the mechanism works.

【Key words】recombinant adenovirus(Rad); inhibitor of differentiation protein 1(Id1); hepatic neoplasm; animal model

分化抑制因子-1(inhibitor 1 of differentiation, Id1) 又称 DNA 结合抑制因子-1(inhibitor of DNA binding-1), 位于 20q11, 编码 156 个氨基酸(约 17 kD)。Id1 蛋白是目前研究最热的 Id 蛋白(Id1-Id4), 与经典的 bHLH(basic helix-loop-helix) 转录因子相比, 其特点是保留了 HLH 的结构, 但缺乏与 DNA 结合的碱性区(basic domain), 导致 Id1 可以和其他 bHLH 转录因子相结合形成异源二聚体, 但不能与 DNA 结合, 从而抑制 bHLH 转录因子对下游分子的激活作用^[1]。众所周知, bHLH 转录因子参与调控组织器官的发育分化, Id1 蛋白则通过对这类因子的显性负向调节实现对细胞分化的抑制^[2]。此外, Id1 蛋白还通过抑制某些具有 helix-turn-helix(HTH) 结构的转录因子活性, 如 E26 转录因子家族(Ets)^[3-4] 和 PAX 家族^[5], 从而抑制细胞凋亡和调节细胞增殖。因此在多种肿瘤细胞中均能检测到 Id1 的异常表达, 这与它抑制分化和促进增殖的功能密切相关。Ling 等^[6]发现 Id1 通过上调血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 和下调血小板反应蛋白-1(thrombospondin-1, TSP-1)^[7-8] 实现促进肿瘤血管生成, 改善微环境为肿瘤提供更充足的营养, 提高了肿瘤细胞的增殖、周期进展和抗衰老的能力。

肝癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一。据 Torre 等^[9]最新报道, 2012 年全球肝癌新发病例人数高达 78 万, 仅我国就占全球新发病例人数的 55%, 而我国的肝癌治愈率仅 30%, 对人类健康构成严重威胁。目前研究显示 Id1 在大多数肝癌中呈异常增高, 增

高趋势和肝癌的组织分级、门静脉侵犯及淋巴结转移密切相关^[10], Matsuda^[11]和 Lee^[12]等证实 Id1 抑制分化与细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 2A(cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, CDKN2A) 的灭活及细胞增殖核抗原(cell proliferating nuclear antigen, PCNA) 升高相关, 导致 S 期时相的细胞增多, 同时也增加了肝癌的预后风险, 但该作用机制尚不清楚。因此, 本课题拟构建 Id1 重组腺病毒并检测其对 HepG2 肝癌细胞增殖的影响, 并通过感染小鼠建立 Id1 介导的动物模型。

1 材料和方法

1.1 材料

细胞和质粒: HEK293 和 HepG2 细胞株、BJ5183 和 DH10B 感受态细胞、Id1-pcDNA3.1(+) 和 pAdTrack-TO4 质粒均由本实验室保存。试剂和引物: *Pme* I 和 *Pac* I 内切酶购自 NEB 公司; Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司; 基因转染增强剂 Polybrene 购自 Sigma 公司; RNA 提取试剂 Tripure 和逆转录试剂盒均购自 Roche 公司; anti-Id1 抗体购自 Abcam 公司; anti-AFP 和 anti-CEA 抗体购自成都正能生物公司; ELISA 试剂盒(AFP 和 CEA) 购自 Elabscience 公司; MTS 检测试剂盒购自 Promega 公司; 引物合成和质粒测序在成都擎科梓熙生物公司完成。实验动物: 普通雌性 C57BL/6J 小鼠购自重庆医科大学实验动物中心并由其代养。

1.2 方法

1.2.1 穿梭质粒 Id1-pAdTrack-TO4 和重组腺病毒质粒 AdEasy-Id1 的构建 设计 Id1 编码区上下游引物 Id1-TO4-F/R(表 1), 以 Id1-pcDNA3.1(+) 质粒为模板进行 PCR 扩增, 产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴别扩增效率, 乙醇沉淀法纯化

PCR产物,纯化后产物同 pAdTrack-T04 载体行 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,再经 T4 连接酶连接后转入 DH10B,菌液 PCR 和双酶切验证均为阳性的菌落进行测序。提取质粒用 *Pme* I 酶切线性化,电转入携带 AdEasy-1 的 BJ5183 中,涂板(含 50 μ g/mL 硫酸卡那霉素的固体 LB),37 $^{\circ}$ C 培养过夜,挑取大菌落周围的较小菌落放大提取质粒,*Pac* I 酶切验证,出现 1 条 4.5 kb 或 3 kb 的小片段及 1 条大于 15 kb 的大片段即为阳性,命名 AdEasy-Id1。

表 1 引物序列

Tab.1 Sequences of primers

引物	序列(5'→3')
Id1-T04-F	CGGGATCCATGAAAGTCGCCAGTGGCAGC
Id1-T04-R	CCCAAGCTTTTATCAGCGACACAAGATGCGATCG
Id1-F(for qRT-PCR)	TGTTACTCACGCCTCAAGG
Id1-R(for qRT-PCR)	AACTGAAGGTCCTCGATGCTAG

1.2.2 RAd-Id1 重组腺病毒的包装及滴度的测定 转染前 8~16 h 种板 HEK293 细胞,转染时将 6 μ g *Pac* I 酶切后的 AdEasy-Id1 线性化质粒按 LipofectamineTM 2000 说明书进行转染,于 37 $^{\circ}$ C 和 5%CO₂ 的细胞培养箱中培养。细胞绿色荧光率达 95%时(10~14 d)收集细胞至 BD 管中,4 $^{\circ}$ C、4 000 $\times$ g 离心 5 min 得到细胞沉淀,弃上清,加入 400 μ L PBS,涡旋混匀,分别在液氮中速冻和 37 $^{\circ}$ C 水浴中溶解,“冰冻-涡旋混匀-溶解”反复循环 5 次,上述条件再次离心,保留上清,加入 200 μ L 病毒储存液,储存于-80 $^{\circ}$ C^[13]。为获得高滴度病毒,需扩增 3~5 轮,每一轮加入的病毒逐渐减少,直至最后加入 1 μ L RAd-Id1 存储液即可在 24 h 后达到 90%的细胞荧光率,要求 48 h 细胞病变率应低于 30%。最终,于 24 孔板中种板 1×10^5 个/孔 HEK293 细胞,12 h 后换作 450 μ L 完全培养基,依次加入倍比稀释(10^{-3} ~ 10^{-10})的 RAd-Id1 稀释液 50 μ L,每稀释倍数 3 个复孔,24 h 后记录出现绿色荧光的最低稀释倍数及其平均荧光细胞数,根据以下公式计算病毒滴度^[14]:

病毒滴度=(平均荧光细胞数 $\times$ 培养基总体积)/(病毒液体积 $\times$ 稀释倍数)

1.2.3 RAd-Id1 重组腺病毒的体外细胞学验证 感染前 8~12 h 铺板 HepG2 细胞,分别加入 RAd-Id1、对照腺病毒(RAd-GFP)和适量 Polybrene 试剂辅助病毒感染,48~72 h 后用 Tripure 提取 mRNA 并反转录得到 cDNA;72~96 h 后提取细胞蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。以 cDNA 为模板,Id1-F/R 为引物(表 1),用 qRT-PCR 测定 Id1 mRNA 水平,GAPDH 作内参。Western blot 以 50 μ g 蛋白样品经 12%的 SDS-Page 电泳再转印至 PVDF 膜,兔抗 Id1 作一抗,GAPDH 作内参抗体评价 Id1 的蛋白水平。

1.2.4 MTS 实验检测 RAd-Id1 感染 HepG2 细胞的增殖 提前 12 h 将 HepG2 细胞铺于 96 孔板中,分别设置 RAd-Id1 实验组、RAd-GFP 对照组和 PBS 空白组,每孔 2×10^3 个细胞,100 μ L 培养基,待细胞贴壁,加入相应腺病毒。24 h 后,避光加入 10 μ L MTS,继续培养 2 h,酶标仪测定 490 nm 处吸

光度(absorbance,A)值,记录数据。同样的方法测得 48、72 和 96 h 的 A 值。

1.2.5 RAd-Id1 重组腺病毒的小鼠体内功能实验 采用 4~6 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠,根据 RAd-Id1 病毒载量将实验组分为 5 组(1×10^6 、 3×10^6 、 5×10^6 、 7×10^6 、 9×10^6 GFU, $n=5$ /组),通过尾静脉注入小鼠体内,同时设置 PBS 空白组(注射等体积 PBS)和 RAd-GFP 对照组,10 d 后收集小鼠血清和肝脏组织;另取 35 只小鼠,均注入 7×10^6 GFU 的 RAd-Id1,每隔 4 d 随机选取 5 只小鼠,收集肝脏组织;所有样本收集后立即存于-80 $^{\circ}$ C。提取小鼠肝脏组织蛋白,Western blot 实验分析肝组织中 Id1 是否呈现过表达趋势,同时检测反映相关肿瘤标志物 AFP 和 CEA 水平的变化。最后 ELISA 实验分析血清中 Id1 抗体及上述肿瘤标志物水平的变化。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行绘图,SPSS 19.0 软件进行统计学分析。所有数据均为计量数据,采用 Kolmogorov-Smirnov 检验确定数据是否为正态分布,且表示为均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$),两组均数间比较采用独立样本 *t* 检验分析;多组均数间比较采用单因素方差分析,并应用 Tukey 检验作两两比较;相关性检验采用 Spearman 等级相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 成功构建重组腺病毒质粒 pAdEasy-Id1

Id1 PCR 产物凝胶电泳显示,其条带大小为 468 bp,与预期相符(图 1A)。克隆至穿梭载体 pAdTrack-T04 后,得到阳性菌落(图 1B-1),随后的双酶切验证结果如图 1C 所示。测序结果由 DNAssist 软件进行比对(图 1D),表明 Id1-pAdTrack-T04 质粒克隆成功。最终,图 1E 中第 6 泳道的质粒经 *Pac* I 酶切验证后存在 1 条大于 15 kb 的 DNA 片段和 1 条 4.5 kb 的 DNA 片段,表明该重组腺病毒质粒 pAdEasy-Id1 构建成功(图 1E-6)。

2.2 腺病毒 RAd-Id1 的包装及其滴度的测定

病毒经包装、纯化后感染 HEK293 细胞,于 24 h 后在荧光显微镜下观察到大于 90%的细胞均能表达绿色荧光(图 2C),表明腺病毒有较高的感染效率,滴度为 1.5×10^{11} GFU/mL,满足后续实验要求。

2.3 HepG2 细胞感染 RAd-Id1 后 Id1 的表达水平

RAd-Id1 感染 HepG2 细胞后,qRT-PCR 结果显示:RAd-Id1 感染组 HepG2 细胞中 Id1 mRNA 的表达水平较 RAd-GFP 对照组(20.64 ± 0.33 vs. 1.00 ± 0.03)明显增加(图 2A),差异有统计学意义($t=57.860$, $P=0.000$);Western blot 检测结果显示:RAd-Id1 感染组 HepG2 细胞中 Id1 蛋白的表达水平较 RAd-GFP 对照组(1.61 ± 0.09 vs. 1.00 ± 0.05)明显增加($t=10.060$, $P=0.000$;图 2B),表明腺病毒 RAd-Id1 可以有效地在 HepG2 细胞中过表达 Id1。

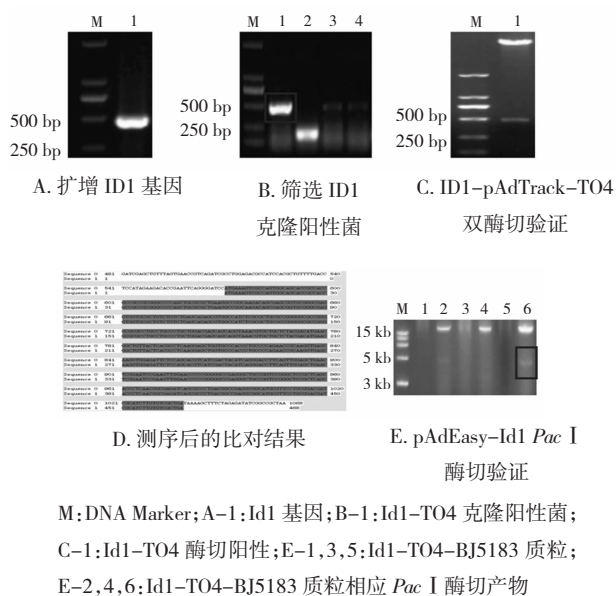


图 1 重组腺病毒质粒 pAdEasy-Id1 的构建

Fig.1 Construction of recombinant adenovirus vector pAdEasy-Id1

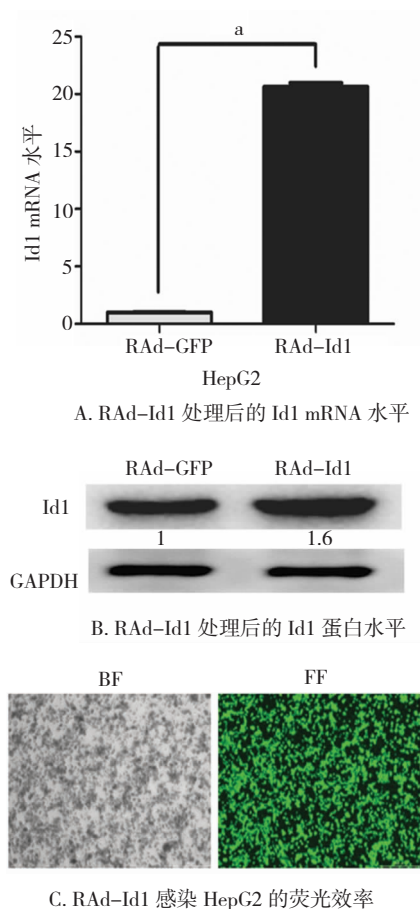


图 2 Id1 mRNA、蛋白水平和病毒感染效率的检测

Fig.2 Detection of Id1 mRNA, protein levels and viral infection efficiency

2.4 过表达 Id1 对 HepG2 细胞有促增殖作用

在感染 RAd-Id1、RAd-GFP 的 HepG2 细胞和未感染腺病毒的 PBS 空白组中,连续 4 d 观察 Id1 的过表达对细胞增殖的影响。MTS 实验结果显示:与 RAd-GFP 对照组或 PBS 空白组相比,实验组细胞感染 RAd-Id1 48 h 后即有促进增殖的作用 ($P < 0.05$),并且感染病毒 96 h 后这种生长促进作用仍持续存在 ($P < 0.01$),如图 3、表 2 所示。

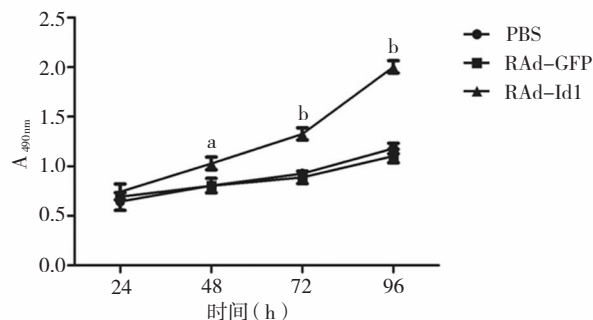


图 3 过表达 Id1 对 HepG2 细胞增殖的影响

Fig.3 Effects of Id1 over-expression on HepG2 cell proliferation

2.5 RAd-Id1 感染 C57 小鼠动物模型的建立

通过 Western blot 比较不同 RAd-Id1 载量感染的小鼠肝组织中 Id1 蛋白的表达水平,结果显示:RAd-Id1 载量为 1×10^9 、 3×10^9 GFU 时,Id1 的表达水平与 0×10^9 GFU 组相比无明显差异;RAd-Id1 载量为 5×10^9 、 7×10^9 、 9×10^9 GFU 组的 Id1 表达水平较 0×10^9 GFU 组均明显升高,表明 RAd-Id1 载量达到 $(5-9) \times 10^9$ GFU 时可以用于建立小鼠动物模型(图 4A)。同样比较 7×10^9 GFU RAd-Id1 在感染小鼠后不同时间里肝组织中 Id1 的表达水平,结果显示:Id1 的蛋白水平在 RAd-Id1 感染 5 d 后明显升高,20 d 时达到高峰,之后有所下降,表明 RAd-Id1 用于建立小鼠动物模型的感染时间在 5~20 d(图 4B)。此外,本实验检测到肿瘤标志物 AFP 和 CEA 的表达在 Id1 升高时发生上调(图 4A、B)。PBS 空白组和 RAd-GFP 对照组之间 Id1、AFP 和 CEA 的蛋白表达水平无明显差异,排除实验结果由腺病毒本身对小鼠造成(图 4C)。

通过 ELISA 方法,检测不同 RAd-Id1 载量的小鼠血清中 Id1 抗体的滴度,实验数据见表 3,结果显示:不同病毒载量的小鼠血清中,Id1 抗体的滴度没有统计学差异(图 5),说明该病毒载量范围内的 RAd-Id1 并没有引起小鼠强烈的免疫抗性。

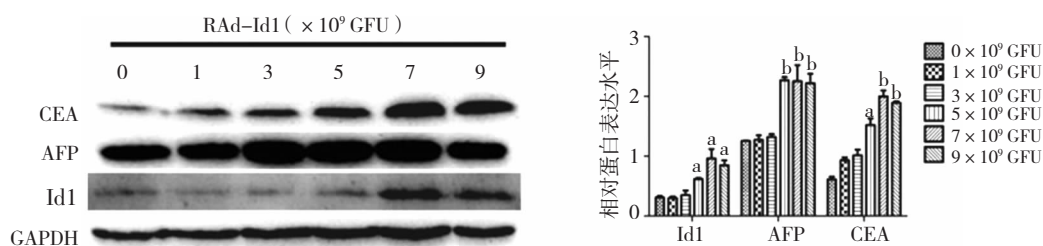
ELISA 方法检测小鼠血清中 AFP 和 CEA 的蛋白表达水平,结果显示:RAd-Id1 处理的小鼠血清中 AFP 和 CEA 蛋白浓度较未处理小鼠明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$; 表 4);此外,Spearmen 相关分析检验小鼠血清中 AFP 和 CEA 表达水平与 RAd-Id1 的相关性,结果表明:AFP 和 CEA 的浓度分别与 Id1-RAd 的滴度呈正相关 ($r_{AFP} = 0.903$, $P_{AFP} = 0.014$; $r_{CEA} = 0.964$, $P_{CEA} = 0.002$; 图 6)。

表 2 各组细胞的增殖活性

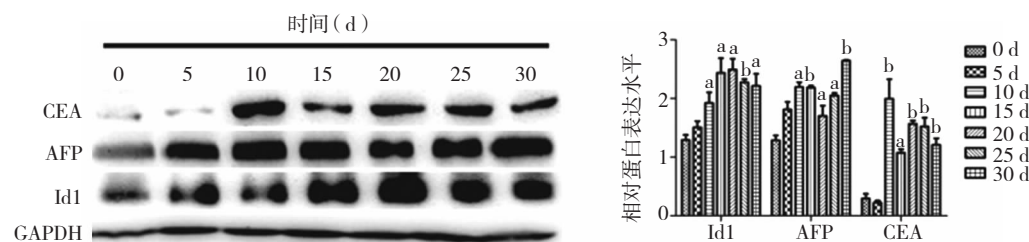
Tab.2 Detection of cell proliferation activity in each group

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
PBS空白组	0.64 ± 0.09	0.80 ± 0.07	0.93 ± 0.04	1.18 ± 0.05
RAd-GFP对照组	0.69 ± 0.05	0.80 ± 0.02	0.89 ± 0.06	1.10 ± 0.07
RAd-Id1实验组	0.74 ± 0.08	1.03 ± 0.06 ^{ab}	1.33 ± 0.06 ^{cd}	2.00 ± 0.06 ^{ef}
<i>F</i> 值	0.327	7.193	13.940	51.350
<i>P</i> 值	0.734	0.026	0.006	0.000

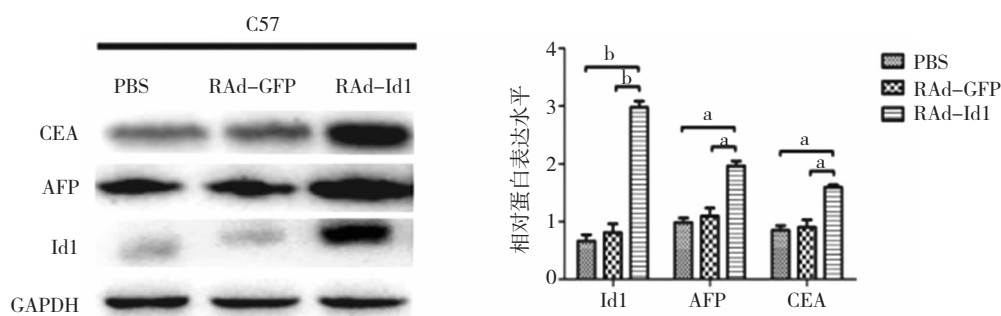
注:a,与 PBS 空白组比较, $P=0.06$;b,与 RAd-GFP 对照组比较, $P=0.014$;c,与 PBS 空白组比较, $P=0.001$;d,与 RAd-GFP 对照组比较, $P=0.003$;e,与 PBS 空白组比较, $P=0.000$;f,与 RAd-GFP 对照组比较, $P=0.000$;24 h 时 RAd-Id1 实验组与 PBS 空白组或 RAd-GFP 对照组之间的比较均无统计学意义;24,48,72 和 96 h 时 PBS 空白组和 RAd-GFP 对照组之间的比较均无统计学意义



A. 小鼠肝脏中 Id1, AFP 和 CEA 蛋白水平随着 RAd-Id1 载量的增加而增加
(左图是 Western blot 结果,右图是相应的灰度柱状图)



B. 小鼠肝脏中 Id1, AFP 和 CEA 蛋白水平随着 RAd-Id1 感染时间的增加而增加
(左图是 Western blot 结果,右图是相应的灰度柱状图)



C. PBS, RAd-GFP 和 RAd-Id1 处理组间蛋白表达的差异
(左图是 Western blot 结果,右图是相应的灰度柱状图)

图 A、图 B:a,与 0×10^9 GFU RAd-Id1 组或 0 d 组比较, $P<0.05$;b,与 0×10^9 GFU RAd-Id1 组或 0 d 组比较, $P<0.01$;
图 C:a,与 RAd-GFP 对照组或 PBS 空白组比较, $P<0.05$;b,与 RAd-GFP 对照组或 PBS 空白组比较, $P<0.01$

图 4 小鼠感染 RAd-Id1 后肝组织蛋白水平的变化

Fig.4 Changes of protein levels in liver tissues of mice infected with RAd-Id1

表 3 血清中 Id1 抗体滴度的检测数据

Tab.3 Detection data of serum concentrations of anti-Id1

指标	PBS	1×10^9	3×10^9	5×10^9	7×10^9	9×10^9	F 值	P 值
A_{450nm}	0.40 ± 0.02	0.41 ± 0.03	0.39 ± 0.05	0.41 ± 0.02	0.43 ± 0.01	0.43 ± 0.05	2.569	0.141
AFP(ng/mL)	0.68 ± 0.20	3.90 ± 0.32	4.20 ± 0.35	5.20 ± 0.25	5.53 ± 0.10	6.07 ± 0.40	179.800	0.000
CEA(pg/mL)	253.10 ± 20.00	1436.00 ± 200.00	1796.00 ± 190.00	2546.00 ± 245.00	3612.00 ± 215.00	3768.00 ± 30.00	159.200	0.000

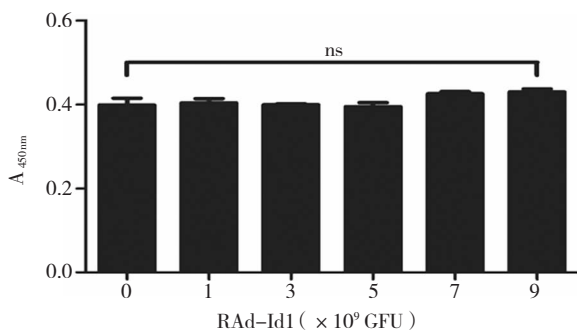
ns; 与 0×10^9 GFU 组比较, $P > 0.05$

图 5 血清中 Id1 抗体滴度的检测

Fig.5 Detection of serum titers of Id1 antibody

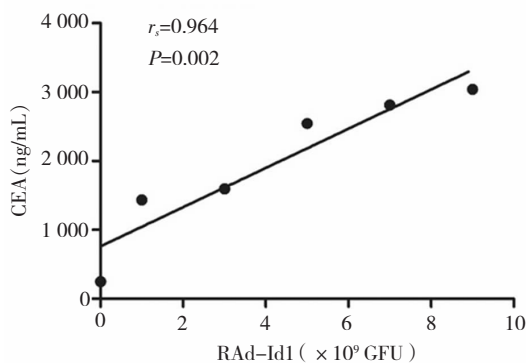
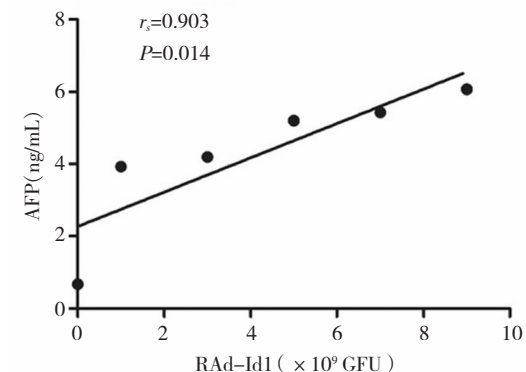


图 6 血清中 AFP 和 CEA 浓度的检测

Fig.6 Detection of serum concentrations of AFP and CEA

3 讨论

Id1 基因在正常组织中不表达或低表达,而在肿瘤中则会升高,包括前列腺癌、乳腺癌、胃癌、肝

癌和结直肠癌等肿瘤。通常恶性肿瘤中 Id1 基因表达,标志着肿瘤具有侵袭性、易增强血管生成,且预后差^[1],然而肝癌中 Id1 发挥的作用似乎与大多数肿瘤存在着某些差异。一方面,相同的是在肝癌早期和高分化肝癌中 Id1 呈高表达,Id1 可通过 Raf/MEK 途径抑制 p16INK 4a 活化引起肝癌细胞增殖作用^[12];Id1 通过上调 VEGF 和下调 TSP-1 实现促进肿瘤血管生成,改善微环境^[6-7];且外源性 Id1 可诱导人类角化细胞中 RB 发生磷酸化^[15],但该影响机制尚不明确。另一方面,Damdinsuren 等^[16]发现在肝癌晚期尤其是恶性肝癌中 Id1 表达反而降低,随后研究^[17-18]发现低分化肝癌组织中 TGF- β 呈强阳性,升高的 TGF- β 可以通过抑制 Smad3-ATP 途径而降低 Id1,进而解释了肝癌恶性程度与 Id1 表达呈负相关的现象。目前,对于肝癌的研究,寻找新的早期肿瘤标志物和治疗靶点已成为热点,而 Id1 的这些特点使得其作为候选癌基因极有可能成为新的治疗靶标,近年来已有国内学者报道了传统中药“松友饮”能够抑制肝癌组织细胞中 Id1 的表达,从而抑制肝癌“干性”和促进肝癌分化的作用,增加肝癌组织细胞对奥沙利铂化疗的敏感性^[19]。

选择将 Id1 目的基因构建到 5 型腺病毒 (ADV5) 上,是因为腺病毒载体的构建较容易制备,产毒滴度高,可嵌入超大大片段的外源基因(7~30 kb),能有效地将外源基因转染到各种靶细胞或体内组织中,特别是一些转染效率低的细胞(如 HepG2 细胞),仍能高效稳定地表达外源基因。改造的腺病毒不表达自身蛋白,削弱了自身的毒性与免疫原性,难被免疫清除,从而长期存活在动物体内发挥作用,尤其是在一些血管和血液疾病治疗的动物实验中存活时间可达 2~3 年^[20]。

本研究成功利用腺病毒系统构建 Id1 的载体,显著提高靶细胞 HepG2 中 Id1 的 mRNA 和蛋白的表达水平,且 HepG2 的增殖能力受到明显上调,表明 Id1 很可能参与维持肝癌细胞的“干性”,这一点与 Romero-Lanman 等^[21]的研究报道一致。本实验也成功建立了 Id1 腺病毒介导的小鼠动物模型,小鼠肝脏中 Id1 表达水平明显升高,测定了 Id1-RAd 感染

小鼠的合适载量为 $(5\sim 9)\times 10^9$ GFU,感染 5~20 d 内 Id1 表达水平较高。同时也在肝脏和血清中检测到 AFP 的升高,众所周知,AFP 是目前评估肝癌发生风险的特异性肿瘤标志物,虽然该测量值仍低于正常值(20 ng/mL),但 AFP 升高的趋势提示 Id1 可能参与诱导 AFP 的表达,但该机制有待进一步研究。此外,还检测到 CEA 的升高(高于正常值 2.5 ng/mL),CEA 异常升高常见于结直肠癌等消化系统肿瘤,提示 RAd-Id1 可能介导感染了小鼠的肠道,暗示腺病毒的感染可能并不具备组织特异性。本实验成功建立了 Id1 在体内过表达的动物模型,对于探索 Id1 基因在体内参与诱导 AFP 和 CEA 表达的作用机制迈出了很重要的一步,特别是对 Id1 通过调节肿瘤标志物影响肿瘤发生发展的研究有着很重要的意义,同时该模型也具有一定的缺点,即它不能排除腺病毒对其他器官的影响,而且具体的通路尚未明确,这也是本课题组进一步研究工作中需要突破的难点。

参 考 文 献

- [1] Lasorella A, Benezra R, Iavarone A. The ID proteins; master regulators of cancer stem cells and tumour aggressiveness[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(2): 77-91.
- [2] Massari ME, Murre C. Helix-loop-helix proteins; regulators of transcription in eucaryotic organisms[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(2): 429-440.
- [3] Muthu K, Panneerselvam M, Jayaraman M, et al. Structural insights into interacting mechanism of ID1 protein with an antagonist ID1/3-PA7 and agonist ETS-1 in treatment of ovarian cancer; molecular docking and dynamics studies[J]. *J Mol Model*, 2012, 18(11): 4865-4884.
- [4] Polsky D, Young AZ, Busam KJ, et al. The transcriptional repressor of p16/Ink4a, Id1, is up-regulated in early melanomas[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(16): 6008-6011.
- [5] Roberts EC, Deed RW, Inoue T, et al. Id helix-loop-helix proteins antagonize pax transcription factor activity by inhibiting DNA binding[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(2): 524-533.
- [6] Ling MT, Lau TC, 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.
- [7] Volpert OV, Pili R, Sikder HA, et al. Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1[J]. *Cancer Cell*, 2002, 2(6): 473-483.
- [8] Stapleton CJ, Armstrong DL, Zidovetzki R, et al. Thrombospondin-1 modulates the angiogenic phenotype of human cerebral arteriovenous malformation endothelial cells[J]. *Neurosurgery*, 2011, 68(5): 1342-1353.
- [9] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [10] Ding R, Han S, Lu Y, et al. Overexpressed Id-1 is associated with patient prognosis and HBx expression in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10(3): 299-307.
- [11] Matsuda Y, Yamaqiwa S, Takamura M, et al. Overexpressed Id-1 is associated with a high risk of hepatocellular carcinoma development in patients with cirrhosis without transcriptional repression of p16[J]. *Cancer*, 2005, 104(5): 1037-1044.
- [12] Lee TK, Man K, Ling MT, et al. Over-expression of Id-1 induces cell proliferation in hepatocellular carcinoma through inactivation of p16INK4a/RB pathway[J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24(11): 1729-1736.
- [13] Luo J, Deng ZL, Luo X, et al. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(5): 1236-1247.
- [14] Hitt DC, Booth JL, Dandapani V, et al. A flow cytometric protocol for titrating recombinant adenoviral vectors containing the green fluorescent protein[J]. *Mol Biotechnol*, 2000, 14(3): 197-203.
- [15] Alani RM, Young AZ, Shifflett CB. Id-1 regulation of cellular senescence through transcriptional repression of p16/Ink4a[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(14): 7812-7816.
- [16] Damdinsuren B, Nagano H, Kondo M, et al. Expression of Id proteins in human hepatocellular carcinoma; relevance to tumor dedifferentiation[J]. *Int J Oncol*, 2005, 26(2): 319-327.
- [17] Damdinsuren B, Nagano H, Kondo M, et al. TGF-beta1-induced cell growth arrest and partial differentiation is related to the suppression of Id1 in human hepatoma cells[J]. *Oncol Rep*, 2006, 15(2): 401-408.
- [18] Kang Y, Chen CR, Massagué J. A self-enabling TGF beta response coupled to stress signaling; Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells[J]. *Mol Cell*, 2003, 11(4): 915-926.
- [19] Jia QA, Ren ZG, Bu Y, et al. Herbal compound "Songyou Yin" renders hepatocellular carcinoma sensitive to oxaliplatin through inhibition of stemness[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 908601.
- [20] Kim IH, Jozkowicz A, Piedra PA, et al. Lifetime correction of genetic deficiency in mice with a single injection of helper-dependent adenoviral vector[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(23): 13282-13287.
- [21] Romero-Lanman EE, Pavlovic S, Amlani B, et al. Id1 maintains embryonic stem cell self-renewal by up-regulation of Nanog and repression of Brachyury expression[J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(3): 384-393.

(责任编辑:冉明会)