

陆小琴,杜锐,赵玉强,等. 分化抑制因子1在乙型肝炎病毒复制、肝癌细胞增殖和凋亡中的作用及机制研究[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(2): 90-96.

Lu XQ, Du R, Zhao YQ, et al. Role and mechanism of inhibitor of differentiation 1 on the replication of hepatitis B virus, and proliferation and apoptosis of hepatoma cells [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(2): 90-96.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.02.014

分化抑制因子1在乙型肝炎病毒复制、肝癌细胞增殖和凋亡中的作用及机制研究

陆小琴¹, 杜锐¹, 赵玉强¹, 牛司强^{2*}

(1.雅安职业技术学院药学与检验学院,四川雅安 625000; 2.重庆医科大学附属第一医院医学检验科,重庆 400016)

【摘要】 目的 探讨分化抑制因子1 (inhibitor of differentiation 1, Id1)在乙型肝炎病毒复制、肝癌细胞增殖和凋亡中的作用及机制。方法 使用RNA干扰技术将HepG2.2.15肝癌细胞株的Id1基因沉默,作为siRNA-Id1组;设计无关序列作为siRNA-Control组;使用Pifithrin- α 抑制siRNA-Id1细胞中p53的表达,作为siRNA-Id1+Pifithrin- α 组;将HepG2.2.15肝癌细胞作为Control组。依次使用qRT-PCR、Western blot、ELISA、MTT、流式细胞术检测乙型肝炎病毒的复制、细胞的增殖和凋亡。结果 siRNA-Id1组细胞中Id1 mRNA和蛋白的表达量低于siRNA-Control组($P<0.05$)。与siRNA-Control组相比较,siRNA-Id1组细胞中HBx mRNA和蛋白的表达量降低($P<0.05$),上清液中HBsAg和HBeAg的含量降低($P<0.05$),细胞增殖缓慢($P<0.05$),早期细胞凋亡比例和晚期细胞凋亡比例升高($P<0.05$),细胞中Bax和Cleaved caspase-3蛋白的表达量升高($P<0.05$),而Bcl-2蛋白的表达量降低($P<0.05$)。Pifithrin- α 可不同程度的抑制Id1基因沉默后的上述生物学效应($P<0.05$)。结论 RNA干扰Id1可以降低乙型肝炎病毒的复制,抑制肝癌细胞的增殖,诱导细胞凋亡,其机制可能与p53的过表达有关。

【关键词】 分化抑制因子1;乙型肝炎病毒;肝细胞癌;小分子干扰RNA;p53

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)02-0090-07

Role and mechanism of inhibitor of differentiation 1 on the replication of hepatitis B virus, and proliferation and apoptosis of hepatoma cells

LU Xiaoqin¹, DU Rui¹, ZHAO Yuqiang¹, NIU Siqiang^{2*}

(1.School of Pharmacy and laboratory science, Ya'an Vocational and Technical College, Ya'an 625000, China.

2. Department of medical laboratory, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016)

【Abstract】 **Objective** To explore the role and mechanism of inhibitor of differentiation 1 (Id1) on replication of the hepatitis B virus, and proliferation and apoptosis of hepatoma cells. **Methods** The Id1 gene in the HepG2.2.15 hepatoma cell line was silenced by RNA interference (siRNA-Id1 group). An unrelated sequence was designed and used for the siRNA-Control group. The expression of p53 in siRNA-Id1 cells was inhibited by pifithrin- α (siRNA-Id1+Pifithrin- α group) and HepG2.2.15 hepatoma cells were used as the control group. The replication of hepatitis B virus, cell proliferation, and apoptosis were detected by qRT-PCR, western blot, ELISA, MTT, and flow cytometry, respectively. **Results** The mRNA and protein expressions of Id1 in the siRNA-Id1 group were lower than those in the siRNA-Control

【作者简介】陆小琴,讲师,主管检验师,本科,医学学士,研究方向:免疫学检验与肝病机制研究。E-mail: wyq163-25@163.com

【通信作者】牛司强,博士,主管检验师,主要从事细菌耐药监测及肝病发病机制研究。E-mail: z373671409@163.com

group ($P < 0.001$). Compared with the siRNA-control group, the mRNA and protein expressions of HBx in the siRNA-Id1 group were decreased ($P < 0.001$), the contents of HBsAg and HBeAg in the supernatant were decreased ($P < 0.001$), the proliferation rate of cells was decreased ($P < 0.05$), the proportions of early apoptosis cells and late apoptosis cells were increased ($P < 0.001$), the protein expressions of Bax and cleaved caspase-3 in cells were increased ($P < 0.001$), and the protein expression of Bcl-2 was decreased ($P < 0.05$). Pifithrin- α partly inhibited these biological effects induced by Id1 gene silencing. **Conclusions** The RNA interference of Id1 reduced the replication of hepatitis B virus, inhibited the proliferation of hepatocellular carcinoma cells, and induced cell apoptosis. The mechanism may be related to the overexpression of p53.

【Keywords】 inhibitor of differentiation 1 (Id1); hepatitis B virus (HBV); hepatocellular carcinoma; small interfering RNA (siRNA); p53

分化抑制因子 1 (inhibitor of differentiation 1, Id1) 是一种螺旋-环-螺旋状结构的负性转录因子调控蛋白^[1]。Id1 可抑制转录因子的 DNA 结合和转录激活能力,参与调节细胞生长和分化^[2-4]。Id1 的表达与乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 相关性肝细胞癌的预后密切相关^[5],如 Ding 等^[6]人对 96 例 HBV 相关性肝细胞癌的组织样本进行分析发现,64.6% 的样本显示 Id1 过表达,与组织学分级、淋巴结转移呈正相关,而且 Id1 过表达患者的生存率较低。但是,Id1 在 HBV 相关性肝细胞癌中的作用机制仍缺乏报道,因此本文旨在探讨 Id1 在 HBV 复制、肝癌细胞增殖和凋亡中的作用及机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

HepG2. 2. 15 肝癌细胞株 (批号: ZQ0551) 购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

MTT、细胞凋亡检测试剂盒 (批号: ST316、C1062S) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒 (批号: D6110 A、DRR820 A) 购自日本 Takara 公司; pGEx-4T-1 质粒 (批号: CW2198) 购自北京康为世纪生物科技有限公司; TRIzol、Lipofectamine 2000 转染液 (批号: 15596018、11668019) 购自美国 Invitrogen 公司; 胎牛血清、青链霉素、DMEM 培养基 (批号: 16250086、15140163、11965092) 购自美国 Gibco 公司; G418 (批号: G8160) 购自北京索莱宝科技有限公司; Pifithrin- α (批号: P4359) 购自美国 Sigma 公司; HBsAg 和 HBeAg ELISA 试剂盒 (批号: 227712、227699) 购自武汉艾美捷科技有限公司; 抗 Id1 抗体 (批号: MAB4372) 购自美国 Chemicon 公司; 抗 HBx 抗体、抗 Bax 抗体、抗 Bcl-2 抗体、抗 Cleaved caspase-3

抗体、抗 GAPDH 抗体 (批号: ab39716、ab32503、ab32124、ab2302、ab181602) 购自英国 Abcam 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 质粒构建与细胞转染

参照于游等^[7]的报道设计 Id1 的干扰序列 (siRNA-Id1) 和无关序列 (siRNA-Control) (见表 1)。使用基因工程的方法将干扰序列和无关序列构建至 pGEx-4T-1 质粒中。使用 Lipofectamine 2000 转染液将 siRNA-Id1 质粒和 siRNA-Control 质粒转染至 HepG2. 2. 15 肝癌细胞株,使用实时定量聚合酶链式反应 (Quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 和蛋白质免疫印迹试验 (Western blot) 验证 Id1 mRNA 和蛋白质表达量的抑制效果。

1.3.2 细胞培养与分组

使用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青链霉素和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 的 DMEM 培养基培养 HepG2. 2. 15 肝癌细胞。将细胞随机分为 4 组: 对照组 (Control group)、siRNA-Control 组 (siRNA-Control group)、siRNA-Id1 组 (siRNA-Id1 group)、siRNA-Id1 + Pifithrin- α 组 (siRNA-Id1 + Pifithrin- α group)。对照组细胞不进行细胞转染, siRNA-Control 组细胞使用 siRNA-Control 质粒转染, siRNA-Id1 组细胞使用 siRNA-Id1 质粒转染, siRNA-Id1 + Pifithrin- α 组细胞使用 siRNA-Id1 质粒转染后加入终浓度为 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 Pifithrin- α ^[8]。孵育 48 h 后,收集细胞和上清液进行检测。

1.3.3 qRT-PCR

TRIzol 试剂盒提取 HepG2. 2. 15 细胞中的 mRNA,逆转录试剂盒将 mRNA 逆转录为 cDNA,荧光定量 PCR 试剂盒检测 Id1 和 HBx 基因的表达,引物序列 (见表 2)。目的基因的相对表达量 = (实验组的 $2^{-\Delta\text{Ct}}$) / (对照组的 $2^{-\Delta\text{Ct}}$) (ΔCt = 目的基因 Ct 值

-内参基因 Ct 值)^[9]。

1.3.4 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

ELISA 试剂盒检测细胞上清液中 HBsAg 和 HBeAg 的含量,酶标仪 450 nm 波长处测定吸光度值(Optical Density, OD)。

1.3.5 Western blot

细胞裂解后,12000 r/min 离心 10 min,取上清进行蛋白定量,然后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳和转膜,封闭 2 h,使用抗 Id1 抗体 (1:500)、抗 HBx 抗体 (1:1000)、抗 Bax 抗体 (1:1000)、抗 Bcl-2 抗体 (1:1000)、抗 Cleaved caspase-3 抗体 (1:1000)、抗 GAPDH 抗体 (1:5000),4℃ 过夜孵育。洗涤后,加入二抗孵育 1 h,洗涤后显色,曝光和拍照。使用 Image Pro Plus 6.0 软件测定灰度值,对照组中目的条带和 GAPDH 条带的灰度值之比作为 1^[10]。

1.3.6 MTT 试验

将 5×10^3 个细胞种植于 96 孔板,于培养 24 h、48 h 和 72 h 后加入 10 μ L 5 mg/mL 的 MTT 溶液,继续培养 4 h,吸弃上清液,加入 100 μ L 的 DMSO 溶液,室温下振荡混匀 5 min,酶标仪在 490 nm 下测定 OD 值。

1.3.7 流式细胞术

向 10^5 个细胞中加入 195 μ L 的 Annexin V-FITC 结合液重悬,加入 5 μ L 的 Annexin V-FITC 和 10 μ L 的碘化丙啶,混匀后孵育 20 min,流式细胞仪检测。Annexin V⁺PI⁻ 细胞为早期凋亡细胞,Annexin V⁺PI⁺ 细胞为晚期凋亡细胞,凋亡率=凋亡细胞数/总细胞数 \times 100%。

1.4 统计学方法

使用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计分析。计量数据均以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较使用单因素方差分析,两两比较使用 SNK-*q* 检验,两组间比较使用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结果

2.1 siRNA-Id1 抑制 Id1 的表达

siRNA-Id1 组细胞中 Id1 mRNA 和蛋白的表达量低于 siRNA-Control 组 ($P < 0.05$) (见图 1 和表 3)。

2.2 siRNA-Id1 抑制 HBx 的表达

与 siRNA-Control 组相比较,siRNA-Id1 组细胞中 HBx mRNA 和蛋白的表达量降低 ($P < 0.05$);与 siRNA-Id1 组相比较,siRNA-Id1+Pifithrin- α group 组细胞中 HBx mRNA 和蛋白的表达量升高 ($P < 0.05$) (见图 2 和表 4)。

表 1 siRNA 序列
Table 1 The sequence of siRNA

小分子干扰 RNA siRNA		序列 Sequence
Id1 干扰序列 siRNA-Id1	上游序列 Forward sequence	5'-GAATTCUGAGCAAGGUGGAGAUCUCGGCCGC-3'
	下游序列 Reverse sequence	5'-GCGGCCGCAGAAUCUCCACCUUGCUCAGAAUUC-3'
无关序列 siRNA-Control	上游序列 Forward sequence	5'-GAATTGGCGACGAUCUGCCUAAGAUGCGGCCGC-3'
	下游序列 Reverse sequence	5'-GCGGCCGCAUCUAGGCAGAUUCGCGCGGCCGC-3'

表 2 引物序列
Table 2 Primer sequence

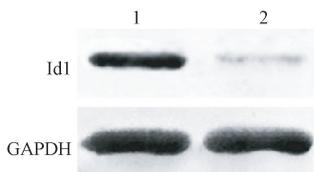
基因 Gene	引物序列 Primer sequence	
Id1	上游序列 Forward sequence	5'-CTGCTCTACGACATGAACGG-3'
	下游序列 Reverse sequence	5'-GAAGTCCCTGATGTAGTCGAT-3'
HBx	上游序列 Forward sequence	5'-CACTTCGCCTCACCTCTG-3'
	下游序列 Reverse sequence	5'-TCGGTCGTTGACATTGCT-3'
GAPDH	上游序列 Forward sequence	5'-GATTGTTGCCATCAACGACC-3'
	下游序列 Reverse sequence	5'-GTGCAGGATGCATTGCTGAC-3'

2.3 siRNA-Id1 抑制乙型肝炎病毒的复制

与 siRNA-Control 组相比较, siRNA-Id1 组细胞上清液中 HBsAg 和 HBeAg 的含量降低 ($P < 0.05$); 与 siRNA-Id1 组相比较, siRNA-Id1+Pifithrin- α group 组细胞上清液中 HBsAg 和 HBeAg 的含量升高 ($P < 0.05$) (见表 5)。

2.4 siRNA-Id1 抑制 HepG2. 2. 15 肝癌细胞的增殖

与 siRNA-Control 组相比较, siRNA-Id1 组细胞在培养 48 h 和 72 h 时的 OD 值降低 ($P < 0.05$); 与 siRNA-Id1 组相比较, siRNA-Id1+Pifithrin- α group 组细胞在培养 48 h 和 72 h 时的 OD 值升高 ($P < 0.05$) (见表 6)。



注: 1: siRNA-Control 组; 2: siRNA-Id1 组。

图 1 Western blot 检测细胞中 Id1 蛋白的表达

Note. 1, siRNA-Control group; 2, siRNA-Id1 group.

Figure 1 Western blot was used to examine the protein expression of Id1

表 3 Id1 表达的比较 ($n = 10$)

Table 3 Comparison of Id1 expression

组别 Groups	信使 RNA mRNA	蛋白质 Protein
siRNA-Control 组 siRNA-Control group	1.00±0.18	1.00±0.16
siRNA-Id1 组 siRNA-Id1 group	0.39±0.20	0.46±0.22
<i>t</i> 值 <i>t</i> value	7.169	6.277
<i>P</i> 值 <i>P</i> value	<0.001	<0.001



注: 1: Control 组; 2: siRNA-Control 组; 3: siRNA-Id1 组; 4: siRNA-Id1+Pifithrin- α 组。

图 2 Western blot 检测 HBx 蛋白的表达

Note. 1, Control group; 2, siRNA-Control group; 3, siRNA-Id1 group; 4, siRNA-Id1+Pifithrin- α group.

Figure 2 Western blot was used to examine the protein expression of HBx

表 4 4 组细胞中 HBx 表达的比较 ($n = 10$)

Table 4 Comparison of HBx expression in four groups of cells

组别 Groups	信使 RNA mRNA	蛋白质 Protein
Control 组 Control group	1.00±0.15	1.00±0.12
siRNA-Control 组 siRNA-Control group	1.06±0.17	1.03±0.15
siRNA-Id1 组 siRNA-Id1 group	0.41±0.26 ^{**}	0.31±0.22 ^{**}
siRNA-Id1+Pifithrin- α 组 siRNA-Id1+Pifithrin- α group	0.79±0.25 ^{**} ▲	0.83±0.27 [▲]
<i>F</i> 值 <i>F</i> value	19.020	28.120
<i>P</i> 值 <i>P</i> value	<0.001	<0.001

注: 与 Control 组相比, ^{*} $P < 0.05$; 与 siRNA-Control 组相比, [#] $P < 0.05$; 与 siRNA-Id1 组相比, [▲] $P < 0.05$ 。

Note. Compared with Control group, ^{*} $P < 0.05$. Compared with siRNA-Control group, [#] $P < 0.05$. Compared with siRNA-Id1 group, [▲] $P < 0.05$.

表 5 细胞上清液中 HBsAg 和 HBeAg 水平的比较 ($n = 10$)

Table 5 Comparison of HBsAg and HBeAg levels in cell supernatant

组别 Groups	HBsAg(吸光度值) HBsAg(OD)	HBeAg(吸光度值) HBeAg(OD)
Control 组 Control group	0.583±0.054	0.988±0.095
siRNA-Control 组 siRNA-Control group	0.589±0.051	0.981±0.090
siRNA-Id1 组 siRNA-Id1 group	0.277±0.073 ^{**}	0.477±0.108 ^{**}
siRNA-Id1+Pifithrin- α 组 siRNA-Id1+Pifithrin- α group	0.572±0.069 [▲]	0.862±0.113 ^{**} ▲
<i>F</i> 值 <i>F</i> value	59.470	55.620
<i>P</i> 值 <i>P</i> value	<0.001	<0.001

注: 与 Control 组相比, ^{*} $P < 0.05$; 与 siRNA-Control 组相比, [#] $P < 0.05$; 与 siRNA-Id1 组相比, [▲] $P < 0.05$ 。

Note. Compared with Control group, ^{*} $P < 0.05$. Compared with siRNA-Control group, [#] $P < 0.05$. Compared with siRNA-Id1 group, [▲] $P < 0.05$.

2.5 siRNA-Id1 诱导 HepG2. 2. 15 肝癌细胞的凋亡

与 siRNA-Control 组相比较, siRNA-Id1 组细胞的早期细胞凋亡比例和晚期细胞凋亡比例升高 ($P < 0.05$); Pifithrin- α 可抑制 Id1 基因沉默后的促凋亡效应 ($P < 0.05$) (见图 3 和表 7)。

2.6 siRNA-Id1 对凋亡相关蛋白表达的影响

与 siRNA-Control 组相比较, siRNA-Id1 组细胞中 Bax 和 Cleaved caspase-3 蛋白的表达量升高, 而 Bcl-2 蛋白的表达量降低 ($P < 0.05$); Pifithrin- α 可部分抑制 Id1 基因沉默后的生物学效应 ($P < 0.05$) (见图 4 和表 8)。

表 6 4 组细胞增殖的比较($n=10$)

Table 6 Comparison of cell proliferation in four groups

组别 Groups	24 h(吸光度值) 24 h(OD)	48 h(吸光度值) 48 h(OD)	72 h(吸光度值) 72 h(OD)
Control 组 Control group	0.718±0.042	1.085±0.044	1.528±0.041
siRNA-Control 组 siRNA-Control group	0.710±0.039	1.099±0.036	1.538±0.037
siRNA-Id1 组 siRNA-Id1 group	0.552±0.028 ^{*#}	0.754±0.031 ^{*#}	0.968±0.035 ^{*#}
siRNA-Id1+Pifithrin- α 组 siRNA-Id1+Pifithrin- α group	0.632±0.032 ^{*#▲}	0.904±0.033 ^{*#▲}	1.318±0.037 ^{*#▲}
<i>F</i> 值 <i>F</i> value	47.430	203.200	504.100
<i>P</i> 值 <i>P</i> value	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Control 组相比, * $P<0.05$;与 siRNA-Control 组相比, # $P<0.05$;与 siRNA-Id1 组相比, ▲ $P<0.05$ 。

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with siRNA-Control group, # $P<0.05$. Compared with siRNA-Id1 group, ▲ $P<0.05$.

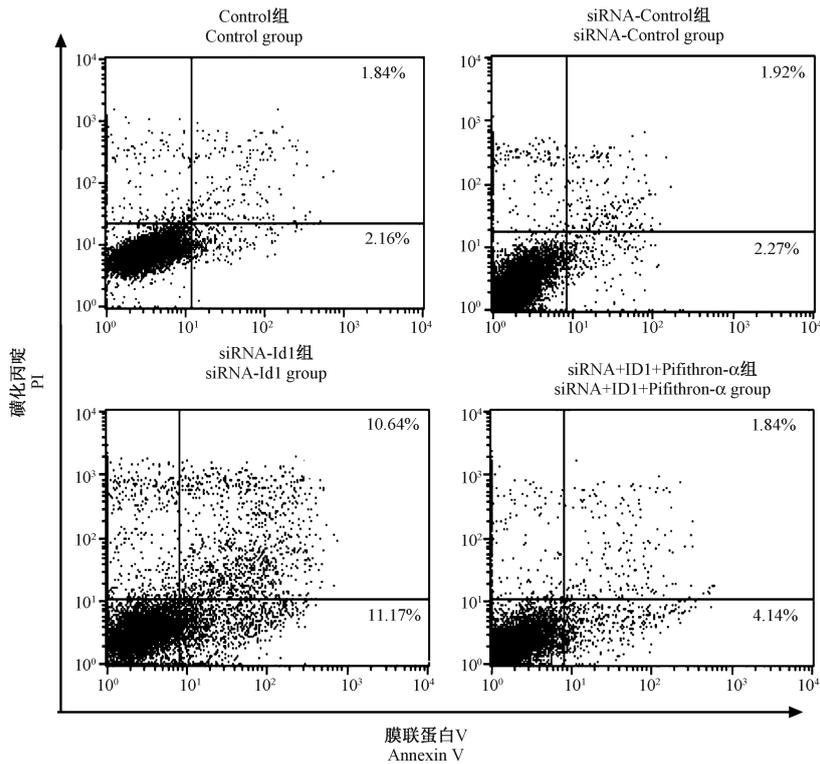


图 3 流式细胞术检测细胞的凋亡

Figure 3 Flow cytometry was used to examine cell apoptosis

表 7 4 组细胞凋亡率的比较($n=10$)

Table 7 Comparison of apoptotic rate in four groups

组别 Groups	早期凋亡细胞比例(%) Proportion of early apoptotic cells	晚期凋亡细胞比例(%) Proportion of late apoptotic cells
Control 组 Control group	1.83±0.69	2.19±0.72
siRNA-Control 组 siRNA-Control group	1.90±0.75	2.26±0.77
siRNA-Id1 组 siRNA-Id1 group	10.38±2.33 ^{*#}	11.41±2.63 ^{*#}
siRNA-Id1+Pifithrin- α 组 siRNA-Id1+Pifithrin- α group	1.98±0.91 [▲]	4.20±1.58 ^{*#▲}
<i>F</i> 值 <i>F</i> value	98.510	72.380
<i>P</i> 值 <i>P</i> value	<0.001	<0.001

注:与 Control 组相比, * $P<0.05$;与 siRNA-Control 组相比, # $P<0.05$;与 siRNA-Id1 组相比, ▲ $P<0.05$ 。

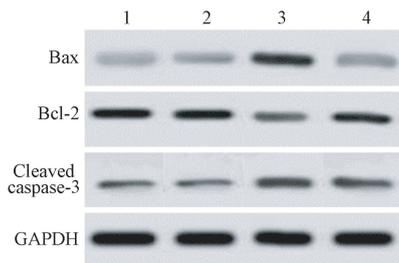
Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with siRNA-Control group, # $P<0.05$. Compared with siRNA-Id1 group, ▲ $P<0.05$.

表 8 细胞凋亡相关蛋白表达的比较($n=10$)
Table 8 Comparison of apoptosis-related protein expression

组别 Groups	BcL-2 相关 X 蛋白 Bax	B 淋巴细胞瘤-2 BcL-2	活性半胱天冬酶-3 Cleaved caspase-3
Control 组 Control group	1.00±0.17	1.00±0.19	1.00±0.16
siRNA-Control 组 siRNA-Control group	1.06±0.21	0.97±0.15	0.96±0.17
siRNA-Id1 组 siRNA-Id1 group	2.36±0.48 ^{**}	0.67±0.31 ^{**}	1.95±0.42 ^{**}
siRNA-Id1+Pifithrin-α 组 siRNA-Id1+Pifithrin-α group	1.25±0.27 [▲]	0.94±0.23 [▲]	1.58±0.29 ^{**▲}
<i>F</i> 值 <i>F</i> value	43.170	4.451	29.010
<i>P</i> 值 <i>P</i> value	<0.001	0.009	<0.001

注:与 Control 组相比, * $P<0.05$;与 siRNA-Control 组相比,[#] $P<0.05$;与 siRNA-Id1 组相比,[▲] $P<0.05$ 。

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with siRNA-Control group,[#] $P<0.05$. Compared with siRNA-Id1 group,[▲] $P<0.05$.



注:1:Control 组;2:siRNA-Control 组;3:siRNA-Id1 组;4:siRNA-Id1 +Pifithrin-α 组。

图 4 Western blot 检测细胞中 Bax、BcL-2、Cleaved caspase-3 蛋白的表达

Note. 1, Control group; 2, siRNA-Control group; 3, siRNA-Id1 group; 4, siRNA-Id1+Pifithrin-α group.

Figure 4 Western blot was used to examine the protein expression of Bax, BcL-2, Cleaved caspase-3

3 结论

Id1 是一种 DNA 结合抑制因子,可与碱性 HLH 家族成员形成异二聚体,抑制转录因子的 DNA 结合和转录激活能力^[1]。Id1 的过表达会导致肝细胞癌预后不良,如邓宏宇等^[11]发现 Id1 在肝细胞肝癌组织标本中表达升高,而且其表达水平与患者的生存时间负相关。尽管已有研究表明 Id1 可能参与肝癌细胞的病理进展,但是 Id1 对肝癌细胞增殖、凋亡等生物学功能的影响仍缺乏相关证据,其作用机制尚不清楚,尤其是在 HBV 相关性肝细胞癌。

HBx 蛋白可调节蛋白酶活性、胞浆钙离子信号通路等功能,在促进 HBV 的有效复制中发挥重要作用,如 Keasler 等^[12]发现在缺乏 HBx 蛋白的情况下,HBV 在 HepG2 肝癌细胞中的复制水平降低了 65%,而且该研究结论在小鼠模型中也得到了证实。此外,Ding 等^[6]人发现 Id1 与 HBx 的表达量呈正相关,双重免疫荧光染色证实 Id1 与 HBx 在 HBV 相关性肝细胞癌组织中共表达,而且 HBx 可以促进

HepG2 肝癌细胞表达 Id1 mRNA 和蛋白。本文结果显示,Id1 沉默后 HBx mRNA 和蛋白的表达量均显著下降,表明 Id1 不仅受到 HBx 的调节,还可以反过来调节 HBx 的表达。HBsAg 和 HBeAg 是评价 HBV 复制的重要指标,本文也发现 Id1 沉默后的 HepG2. 2. 15 细胞培养上清液中 HBsAg 和 HBeAg 的含量低于转染对照组。以上结果表明,抑制 Id1 的表达可以下调 HBx 的表达和降低乙型肝炎病毒的复制。

为了进一步探讨 Id1 对 HBV 相关性肝癌细胞增殖和凋亡的影响,本文分别对各组 HepG2. 2. 15 细胞进行了 MTT 试验和 Annexin V-FITC 标记,结果显示 Id1 沉默后细胞的增殖受到抑制,而且早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞比例均显著升高。此外,与 siRNA-Control 组相比较,siRNA-Id1 组细胞中 Bax 和 Cleaved caspase-3 蛋白的表达量升高,而 Bcl-2 蛋白的表达量降低,表明 Id1 沉默导致的促凋亡效应可能与线粒体凋亡信号通路的激活有关。

p53 基因是一种抑癌基因,其缺失和变异在一系列肿瘤的发生发展中起重要作用。p53 也在 HBV 相关性肝细胞癌中发挥重要的病理作用,如 Liu 等^[13]发现 p53 表达的缺失可激活 HGF/c-Met 信号通路,导致肝细胞癌的侵袭和转移能力增强。此外,Yu 等^[14]发现 Id1 可以促进 p53 蛋白的降解,与上调 MDM2 癌基因的表达有关。根据以上研究结论,本文推测 Id1 对 HBV 复制、肝癌细胞增殖和凋亡的影响是否与 Id1 沉默导致 p53 过表达有关。因此,本文将一种常用的 p53 抑制剂 Pifithrin-α 添加至 Id1 沉默的 HepG2. 2. 15 细胞中,结果显示 Pifithrin-α 可不同程度的抑制 siRNA-Id1 对 HBV 复制和细胞增殖的抑制效应以及细胞凋亡的促进效应,表明 Id1 可能通过调节 p53 参与上述生物学效应。

综上所述,Id1 的特异性小分子干扰 RNA 可以

降低乙型肝炎病毒的复制,抑制肝癌细胞的增殖,诱导肝癌细胞的凋亡,其机制可能与 p53 的过表达有关。

参考文献:

- [1] Perk J, Iavarone A, Benezra R. Id family of helix-loop-helix proteins in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(8): 603-614.
- [2] Li DN, Wang L, Wang L, et al. Expression of inhibitor of differentiation-1 and its effects on angiogenesis in gastric cancer [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2016, 31(7): 233-237.
- [3] Patil M, Sharma BK, Elattar S, et al. Id1 promotes obesity by suppressing brown adipose thermogenesis and white adipose browning [J]. *Diabetes*, 2017, 66(6): 1611-1625.
- [4] Man N, Sun XJ, Tan Y, et al. Differential role of Id1 in MLL-AF9-driven leukemia based on cell of origin [J]. *Blood*, 2016, 127(19): 2322-2326.
- [5] Sharma BK, Kolhe R, Black SM, et al. Inhibitor of differentiation 1 transcription factor promotes metabolic reprogramming in hepatocellular carcinoma cells [J]. *FASEB J*, 2016, 30(1): 262-275.
- [6] 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 Bio Ther*, 2010, 10(3): 299-307.
- [7] 于游, 张才全. RNA 干扰分化抑制因子 1 基因表达对结肠癌细胞增殖的影响 [J]. *山东医药*, 2015, 55(16): 31-32, 111.
- [8] Ding H, Xu JJ, Huang Y, et al. XPD could suppress growth of HepG2. 2. 15 and down-regulate the expression of hepatitis B virus x protein through P53 pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 419(4): 761-767.
- [9] Zhang C, Xiao C, Dang E, et al. CD100-Plexin-B2 promotes the inflammation in psoriasis by activating NF-kappaB and the inflammasome in keratinocytes [J]. *J Invest Dermatol*, 2018, 138(2): 375-383.
- [10] Luo Q, Zeng J, Li W, et al. Silencing of miR155 suppresses inflammatory responses in psoriasis through inflammasome NLRP3 regulation [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(2): 1086-1095.
- [11] 邓宏宇, 朱杰, 杨丽. 分化抑制因子-1 在肝细胞肝癌中的表达及与预后相关性的初步研究 [J]. *华西医学*, 2013, 28(6): 871-874.
- [12] Keasler VV, Hodgson AJ, Madden CR, et al. Enhancement of hepatitis B virus replication by the regulatory X protein in vitro and in vivo [J]. *J Virol*, 2007, 81(6): 2656-2662.
- [13] Liu WT, Jing YY, Yu GF, et al. Hepatic stellate cell promoted hepatoma cell invasion via the HGF/c-Met signaling pathway regulated by p53 [J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(7): 886-894.
- [14] Yu H, Yue X, Zhao Y, et al. LIF negatively regulates tumour-suppressor p53 through Stat3/ID1/MDM2 in colorectal cancers [J]. *Nat Commun*, 2014, 5(2014): 5218.

[收稿日期] 2019-06-05