

Id4 基因与机体发育及肿瘤相关性的研究进展

齐 康 初向阳

摘 要 DNA 结合抑制因子 4 (inhibitor of DNA binding 4, Id4) 是碱性螺旋环螺旋 (basic helix-loop-helix, bHLH) 转录因子的抑制因子。研究发现 Id4 基因在多种生物进程及肿瘤形成中发挥重要作用, 其参与正常组织细胞的生长分化, 调控细胞周期及增殖, 并在肿瘤形成中起到癌基因或抑癌基因的作用。关于 Id4 基因的研究尚存在许多分歧, 本文就 Id4 基因在机体发育及肿瘤形成中的作用进行综述。

关键词 Id4 基因 发育 癌基因 抑癌基因

中图分类号 R34 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.07.048

DNA 结合抑制因子 (inhibitor of DNA binding, Id) 家族 (Id1, Id2, Id3 和 Id4) 是碱性螺旋环螺旋转录因子 (basic helix-loop-helix, bHLH) 的抑制因子, 其具有高度的保守性, 由于它缺少碱性 DNA 结合区域, 所以不能特异性的结合到 DNA 共同的 E 盒子上调节转录功能。但 Id 可以与 bHLH 结合形成二聚体, 阻止 DNA 与 bHLH 结合从而形成转录失活, 是 bHLH 转录因子的负性调节因子。Id 蛋白家族具有相似的分子质量, 大小介于 13~20kDa, 它们的序列在螺旋环螺旋 (HLH) 以外的区域呈现出广泛变异, 现有研究已证明不同亚型的 Id 基因分别参与和调节不同的生物学活动, 其中包括细胞增殖、分化和凋亡等过程^[1,2]。除此之外还参与肿瘤形成、侵袭和转移过程^[3]。Id4 基因在表达及功能上均表现出有别于其余 Id 基因亚型的特征, 其不同组织器官, 多种肿瘤及肿瘤不同阶段分别具有不同作用。

一、Id4 基因的分子生物学特性

Id4 基因位于染色体 6p22.3~p22 的一个 4Mb 区域, 编码 Id 基因家族中最长的蛋白, 包括 161 个氨基酸残基。Id4 基因启动子区 5' 侧的 TATA 盒下游有两个功能元件调控其启动子活性, 其中一个含有 E 盒子顺式作用元件, 能够与上游刺激因子转录子结合并激活 Id4 基因, 另一个是转录起始点下游 GA 结合序列, 其突变可使转录活性明显增强。启动子除 N-和 C-末端区域外, Id4 基因与家族中其它亚型具有共同的核心 HLH 区域, 此外至少有 4 个氨基酸是 Id4

基因 HLH 区域独有的, 包括谷氨酰胺、半胱氨酸、螺旋 1 区域的精氨酸、环区域的脯氨酸。相对于含有 41 个氨基酸残基的保守 HLH 区域, Id 蛋白家族一般有 3 个 (Id1)、4 个 (Id2)、10 个 (Id3) 氨基酸的差异。Id4 蛋白具有高度变异的 N-末端 (富含丙氨酸) 和 C-末端 (富含脯氨酸), 这可能是导致 Id4 在功能上区别于 Id 蛋白家族其他成员的原因^[1]。

Id4 基因在人体内广泛分布, 正常表达在人类脑、睾丸、甲状腺、精原细胞和胰腺组织中, 同时也是乳腺和前列腺发育所必需的^[4,5]。Id4 基因在脂肪细胞、成骨细胞、前列腺上皮细胞、睾丸支持细胞、神经元细胞中呈高表达, 其在精原细胞发育的多个阶段均有表达^[6]。

Id4 基因参与细胞分化及周期调控过程, 有研究发现过表达的 Id4 基因可以阻止少突胶质前体细胞 (oligodendrocyte precursor cells, OPCs) 的分化, 这与髓鞘基因内源性表达降低有关, 缺乏 Id4 基因的少突胶质前体细胞会出现过早的分化和凋亡增加现象, 这说明 Id4 基因是少突胶质细胞发育必不可少的^[7]。在参与细胞周期调控机制方面, Id4 基因也起到重要作用, 其转录进行性减少可作为细胞内的计时器, 帮助决定神经胶质前体细胞何时退出细胞周期和分化过程。在前列腺癌细胞系 DU145 中, Id4 基因过量表达可以阻滞细胞周期和抑制增殖, 这与细胞周期素依赖激酶抑制 p21 和 p27 蛋白有关。与 Id4 基因相关的细胞周期停滞似乎主要是在 S 期而不在 G₁ 期, E2F1 因子是 G₁ 期向 S 期转换的重要因子, 细胞阻滞在 S 期则是由于 E2F1 表达下降导致的^[8], 所以进一步明确 Id4 与 E2F1 之间的关系应该是下一步研究的重点。在动物实验中, 原代小鼠 Ink4a/Arf -/- 星形胶

作者单位: 100853 北京, 中国人民解放军医学院 (齐康); 中国人民解放军总医院胸外科 (初向阳)

通讯作者: 初向阳, 教授, 博士生导师, 电子信箱: doctorchu301@sohu.com

质细胞中的 Id4 基因可以通过抑制细胞周期蛋白 E 和 Jagged - notch1 信号激活,从而来解除细胞周期和分化的正常调控,进而驱动星形胶质细胞的恶性转化^[9]。以上关于 Id4 基因特性的研究结果有力的支持了其作为细胞分化的抑制因子作用,并且明确了其参与细胞周期调控的分子生物学机制。

二、Id4 基因在组织器官发育过程中的作用

Id4 基因在动物及人类机体发育过程中起到重要作用,其参与组织细胞的正常生长发育及自我更新,并且可以诱导部分组织干细胞分化成熟。Id4 基因在乳腺发育过程中参与乳腺组织的正常分化。表达在小鼠乳腺帽状细胞、基底细胞和导管上皮细胞的 Id4 基因可以促进导管延长和分支形态的发生,Id4 的缺失可以损害导管扩张和分支形态以及雌激素和(或)孕激素诱导的细胞增殖。Id4 通过抑制 p38MAPK 活性促进乳腺发育,当乳腺细胞中的 Id4 基因表达被 siRNA 沉默后,p38MAPK 的活性随之增强^[4]。

Id4 基因正常表达在雄性种系小鼠的未分化精原细胞族群中,当小鼠缺乏 Id4 基因表达时,精子形成过程中数量正常,但中未分化的精原细胞数量在成年小鼠体内的逐步丧失。神经胶质细胞源性神经营养因子(glia cell line - derived neurotrophic factor, GDNF)作为细胞自我更新的关键因子,其可以上调 Id4 基因的表达。这些研究都提示 Id4 基因参与组织细胞自我更新过程。

Id4 基因与干细胞的分化成熟有关。老年人骨质疏松组织中发现过度积累骨髓脂肪细胞是由骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)向脂肪细胞和成骨细胞分化不平衡引起的。研究发现将小鼠的 Id4 基因敲除后, MSCs 向成骨细胞分化大幅减少,进而出现向脂肪细胞分化增加的现象。Id4 基因可以促进 Hes1 - Hey2 复合体中 Hes1 释放, Hes1 可以增加 Runx2 的稳定性及转录活性。Runx2 作为细胞分化的关键分子,其转录增加可以促进成骨细胞的分化^[10]。另有研究提示, Id4 基因的表达与小鼠精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)调节自我更新功能有关^[6]。以上研究结果说明 Id4 基因参与了部分干细胞的分化成熟过程。

三、Id4 基因与肿瘤的关系

正常组织中的 Id4 基因参与细胞增殖、分化等调控过程。而在肿瘤组织中, Id4 基因根据不同肿瘤来源、性质、分期呈现不同的表达程度。Id4 在大多数肿瘤中被认为充当抑癌基因的角色,在少数肿瘤中

Id4 又可作为原癌基因或促癌基因发挥功能。

Id4 基因在肿瘤形成过程中可以充当癌基因的角色。在乳腺癌的形成过程中, Id4 与 BRCA1 相互作用形成调节环路, BRCA1 作为已知的抑癌基因,其突变或表达降低在诱发乳腺癌形成过程中发挥重要作用。BRCA1 在基底样型乳腺癌中表达下调,而 Id4 在基底样型乳腺癌中呈高表达,最新研究发现在乳腺癌 MDA - MB - 231 细胞系中, miRNA - 342 可以通过抑制 Id4 的表达而增加 BRCA1 的表达^[11],这些均提示 Id4 与 BRCA1 表达呈负相关, Id4 高表达可能是 BRCA1 在基底样型乳腺癌中表达下调的原因之一。激素相关受体(estrogen receptor, ER)及相关信号通路异常可以促使乳腺细胞过度增殖或乳腺细胞凋亡受阻,进而导致乳腺癌的发生。在 ER α 阳性的乳腺导管上皮非典型性增生、导管原位癌和浸润癌组织中, Id4 基因出现缺失,而在雌激素受体 α 阴性的乳腺上皮细胞中 Id4 基因呈正常表达,这种现象说明雌激素受体 α 可能负向调控 Id4 基因表达^[12]。而另一项研究提示, Id4 基因作为雌激素信号通路调节器,可以抑制乳腺基底细胞及官腔细胞间隔中的 ER α 表达,这与先前研究结果相矛盾,所以 Id4 与 ER α 之间的关系需要更多研究来证实^[13]。另外, Id4 基因启动子区域的甲基化可以导致 Id4 基因表达减低或缺失,是乳腺癌不利的预后因素,增加了乳腺癌淋巴转移风险,提示 Id4 基因在乳腺癌转移机制中起到抑制转移的作用,这与 Id4 在乳腺癌中充当的癌基因角色相矛盾。以上众多的矛盾点说明 Id4 基因与乳腺癌之间的关系错综复杂,有待于进一步明确。

正常膀胱组织与膀胱癌组织之间的 Id4 基因表达无明显差异,但在侵袭性膀胱癌中 Id4 基因呈高表达,充当了癌基因的角色,高表达的 Id4 始终与 E2F3 同时扩增, E2F3 是重要的细胞周期调控因子,其在膀胱癌中呈过度表达,并与 Id4 相互协同促进肿瘤的发生、发展。在神经胶质细胞瘤、神经管细胞瘤、少突神经胶质细胞瘤中的 Id4 基因均呈高表达状态,可以阻滞细胞周期和抑制细胞分化,从而使正常星形胶质细胞向恶性转化,并且有研究发现兴奋毒素诱导海马神经元死亡后, Id4 可以激活星形胶质细胞的增殖,这些研究均提示 Id4 基因在神经系统中充当癌基因角色^[9,14]。

Id4 基因具有促进肿瘤血管生成的作用,在肿瘤血管形成机制中可被视为癌基因。高表达的 Id4 基因在乳腺癌中可以通过稳定 GRO - α 和 IL - 8 基因的 mRNA 来促进血管生成。在神经胶质肿瘤中,下

调 Id4 基因与血管生成抑制有关,将免疫抑制小鼠体内异种移植胶质母细胞瘤来源的肿瘤,发现肿瘤组织中的 Id4 高表达可以促进肿瘤血管生成。通过探索 Id4 促血管生成效应,可以为今后研究抗血管生成相关的靶向药物提供新的作用靶点。

Id4 基因在一些肿瘤中表达沉默,如食管癌、肺癌、胰腺癌、淋巴瘤、结肠癌、胆管癌急性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、神经胶质瘤、鳞状细胞癌和胃癌。研究者也把它归类为抑癌基因。

在前列腺癌的研究中,Id4 被认为起到抑癌基因的角色。正常前列腺组织和恶性前列腺组织的免疫组化分析表明,Id4 基因表达的下调是在前列腺癌中,而不是在正常前列腺腺体。与其他肿瘤一样,Id4 基因在前列腺癌组织中表达减低是由于其启动子高度甲基化造成的^[15]。但是 Id4 基因在前列腺癌发生、发展过程中的作用机制仍需进一步研究。

Id4 基因在人类大部分血液系统肿瘤中起到抑癌基因的角色。Id4 基因启动子在正常人骨髓中呈完全非甲基化状态,而在白血病患者中的 Id4 启动子区出现高度甲基化,尤其急性白血病患者中的 Id4 基因的甲基化高达 80%,这与血液系统肿瘤的发生、疾病的稳定、复发、进展等不同阶段密切相关。急性白血病细胞中 Id4 基因启动子高度甲基化使得其表达沉默,而在白血病细胞中过表达 Id4 基因后发现白血病细胞凋亡增加,生长抑制,这说明 Id4 基因在白血病中起到抑癌基因作用^[16]。急性髓细胞白血病患者出现骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)时,会有更高的频率 Id4 甲基化现象出现,这预示患者生存期的缩短^[17]。另有研究发现在慢性淋巴细胞白血病中,Id4 基因启动子存在不同程度的甲基化,并提示随启动子甲基化程度的增加患者生存期可能会缩短^[18]。在慢性粒细胞白血病中,伴随疾病从慢性期到加速期再到急变期,Id4 基因启动子甲基化程度也不断增加。Id4 基因甲基化的特征可以作为白血病检测及诊断的分子生物学标志物,并为去甲基化药物的研究提供重要的线索。

除充当癌基因或抑癌基因之外,最近研究发现 Id4 基因与化疗耐药相关。高表达的 Id4 基因可以促进神经胶质干细胞(glioma stem cells, GSCs)对化疗药物出现耐药。Id4 基因可以抑制 microRNA-9,这会导致 SOX2 基因表达的增加。SOX2 是非 bHLH 转录因子,在神经胶质干细胞发育和维持中起到重要作用,并受到 microRNA-9 的抑制。Id4 基因会促进

SOX2 的表达并进一步诱导 ABC 转录因子中的 AB-CC3 和 ABCC6 表达增加,通过直接转录调控导致神经胶质干细胞对化疗药物产生耐药。探索 Id4 基因参与化疗耐药的机制可以为今后解决临床中广泛存在的耐药现象找到新的突破口。

四、展 望

众多研究发现了 Id4 基因在发育、分化以及疾病方面的作用,并揭示了 Id4 与家族其他成员的差异。由于 Id4 基因的生物学特性非常复杂,在不同疾病、不同肿瘤、乃至同一肿瘤不同阶段发挥着不同的作用。Id4 基因充当着癌基因或抑癌基因的角色,众多 Id4 与肿瘤之间关系的研究尚存在诸多的矛盾点。Id4 基因在肿瘤中起到抑癌基因的作用,这主要是基于它在大多数肿瘤中存在表观遗传沉默现象,Id4 在少数肿瘤中的高表达提示疾病预后较好,这又进一步支持其抑癌基因的作用,但 Id4 基因作为肿瘤抑制基因的具体机制尚不明确。另一方面,Id4 作为癌基因的机制也正在被不断证实,在乳腺癌的研究结果中,Id4 与 ER α 之间的关系存在分歧,究竟雌激素受体 α 负向调控 Id4 基因表达? 还是 Id4 基因抑制雌激素受体 α 表达? 它们之间关系有待于进一步证实。为了解决上述疑问,应该重点探索 Id4 基因参与机体发育的信号通路及其在不同肿瘤中的调控机制并追踪 Id4 与疾病预后的关系。

参考文献

- 1 Patel D, Morton DJ, Carey J, *et al.* Inhibitor of differentiation 4 (ID4): from development to cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1855(1):92-103
- 2 Ling F, Kang B, Sun XH. Id proteins: small molecules, mighty regulators [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2014, 110:189-216
- 3 Anna L, Robert B, Antonio I. The ID proteins: master regulators of cancer stem cells and tumour aggressiveness [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(2):77-91
- 4 Jie D, Shixia H, Marian C, *et al.* ID4 regulates mammary gland development by suppressing p38MAPK activity [J]. *Development*, 2011, 138(23):5247-5256
- 5 Sharma P, Knowell AE, Chinanranagari S, *et al.* Id4 deficiency attenuates prostate development and promotes PIN-like lesions by regulating androgen receptor activity and expression of NKX3.1 and PTEN [J]. *Mol Cancer*, 2013, 12(25):18612-18623
- 6 Oatley MJ, Kaucher AV, Racicot KE, *et al.* Inhibitor of DNA binding 4 is expressed selectively by single spermatogonia in the male germline and regulates the self-renewal of spermatogonial stem cells in mice [J]. *Biol Reprod*, 2011, 85(2):347-356
- 7 Mireya M, Ye H, Li J, *et al.* Multiple roles of Id4 in developmental myelination: Predicted outcomes and unexpected findings [J]. *Glia*, 2006, 54(4):285-296
- 8 Carey JP, Ashley Evans K, Swathi C, *et al.* Id4 Promotes senescence and sensitivity to doxorubicin-induced apoptosis in DU145 prostate cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(10):4271-4278

(下转第 134 页)

解的特异性底物之一,其C末端可选择性与泛素化蛋白结合,同时p62包含一段与LC3相互作用区域,可使泛素化蛋白经自噬途径降解,若降解通路受阻,p62与泛素在胞质中成阳性聚集^[7,8]。因此LC3Ⅱ表达升高,p62表达降低,表示自噬通畅,自噬活性增强;LC3Ⅱ表达升高,p62表达同时升高,表明自噬起始正常,但降解出现障碍。本实验中,LC3Ⅱ表达升高,p62表达同时升高,说明血管内皮细胞在较高尼古丁浓度 6×10^{-6} mol/L影响下,自噬降解通路异常。LAMP-2是溶酶体膜相关蛋白,在本实验中,LC3Ⅱ表达升高,LAMP-2表达没有升高反而降低,进一步说明自噬体与溶酶体结合异常,导致降解受阻^[9]。

细胞死亡是一种极其复杂且被周密调控的过程。凋亡是第1个被认定的程序性细胞死亡程序(programmed cell death, PCD)而被大众所熟知。近年来,越来越多的研究证实细胞自噬与凋亡共同调控细胞死亡。某些情况下,自噬功能紊乱促进细胞凋亡。Chen等^[10]发现脂多糖加剧体外培养的肺矽病巨噬细胞的凋亡伴随自噬小体的累积,这种自噬小体累积的同时伴随溶酶体膜相关蛋白-2(LAMP-2)表达的增加。Li等^[11]发现IL-24可以通过降低口腔鳞状细胞癌细胞自噬水平促进细胞凋亡。在本实验中,自噬降解异常,同时内皮细胞凋亡率增加,提示,自噬功能的紊乱可能促进细胞凋亡的增加。

综上所述,笔者初步研究了尼古丁对内皮细胞自噬的影响,较高浓度的尼古丁可以紊乱自噬体与溶酶体的结合,导致自噬降解异常,使自噬功能异常。自噬功能的紊乱可能是细胞凋亡升高的原因。总而言之,尼古丁和内皮自噬的研究将为研究心血管疾病的

发生、发展提供一个新的研究方向。

参考文献

- Yin HS, Li YJ, Jiang ZA, *et al.* Nicotine - induced ICAM - 1 and VCAM - 1 expression in mouse cardiac vascular endothelial cell via p38 MAPK signaling pathway[J]. *Anal Quant Cytopathol Histopathol*, 2014, 36(5): 258 - 262
- Wang LL, Zhao JL, Lau WB, *et al.* Estradiol pretreatment attenuated? nicotine - induced? endothelial cell? apoptosis via estradiol functional membrane receptor[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(6): 675 - 682
- Kuhlmann CR, Scharbrodt W, Schaefer CA, *et al.* Discordant effects of nicotine on endothelial cell? proliferation, migration, and the inward rectifier potassium current[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 38(2): 315 - 322
- Balakumar P, Kaur J. Is nicotine a key player or spectator in the induction and progression of cardiovascular disorders[J]? *Pharmacol Res*, 2009, 60: 361 - 368
- Mercado C, Jaimes EA. Cigarette smoking as a risk factor for atherosclerosis and renal disease: novel pathogenic insights[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2007, 9(1): 66 - 72
- Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy [M]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2009, 335: 1 - 32
- Yao TP. The role of ubiquitin in autophagy—dependent protein aggregate processing[J]. *Genes Cancer*, 2010, 1(7): 779 - 786
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 24131 - 24145
- Mello AS, Goldim MP, Mezzalana J, *et al.* LAMP2 as a marker of EBV - mediated B lymphocyte transformation in the study of lysosomal storage diseases[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 385(1-2): 1 - 6
- Chen S, Yuan J, Yao S, *et al.* Lipopolysaccharides may aggravate apoptosis through accumulation of autophagosomes in alveolar macrophages of human silicosis[J]. *Autophagy*, 2015, 11(10): 1908 - 1927
- Li J, Yang D, Wang W, *et al.* Inhibition of autophagy by 3 - MA enhances IL - 24 - induced apoptosis in human oral squamous cell carcinoma cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 11: 84 - 97
(收稿日期: 2015 - 11 - 26)
(修回日期: 2015 - 12 - 14)
- Lee YS, Kang JW, Lee YH, *et al.* ID4 mediates proliferation of astrocytes after excitotoxic damage in the mouse hippocampus [J]. *Anat Cell Biol*, 2011, 44(2): 128 - 134
- Anna V, Wolfgang G, Marc I, *et al.* ID4 is frequently downregulated and partially hypermethylated in prostate cancer [J]. *World J Urol*, 2012, 30(3): 319 - 325
- 刘洋, 康慧媛, 王莉莉, 等. 急性白血病细胞中 ID4 基因甲基化的 PCR 定量检测系统的建立及其特异性和敏感性 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2014, 02(2): 269 - 274
- Shih - Shih C, Rainer C, Lucas DM, *et al.* Silencing of the inhibitor of DNA binding protein 4 (ID4) contributes to the pathogenesis of mouse and human CLL [J]. *Blood*, 2011, 117(3): 862 - 871
- Kuzontkoski PM, Mulligan - Kehoe MJ, Harris BT, *et al.* Inhibitor of DNA binding - 4 promotes angiogenesis and growth of glioblastoma multiforme by elevating matrix GLA levels [J]. *Oncogene*, 2010, 29(26): 3793 - 3802
(收稿日期: 2015 - 12 - 08)
(修回日期: 2016 - 01 - 05)

(上接第 178 页)

- Jeon H, Jin XJ, Oh S, *et al.* Inhibitor of differentiation 4 drives brain tumor - initiating cell genesis through cyclin E and notch signaling [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(15): 2028 - 2033
- Tokuzawa Y, Yagi K, Yamashita Y, *et al.* Id4, a new candidate gene for senile osteoporosis, acts as a molecular switch promoting osteoblast differentiation [J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(7): e1001019
- Crippa E, Lusa L, De CL, *et al.* miR - 342 regulates BRCA1 expression through modulation of ID4 in breast cancer [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e87039 - e87039
- Paola DC, Muzaffar A, Robert B, *et al.* Id4 messenger RNA and estrogen receptor expression: inverse correlation in human normal breast epithelium and carcinoma [J]. *Hum Pathol*, 2006, 37(8): 1032 - 1041
- Best SA, Hutt KJ, Nai Yang F, *et al.* Dual roles for Id4 in the regulation of estrogen signaling in the mammary gland and ovary [J]. *Development*, 2014, 141(16): 3159 - 3164