

结肠癌中 ID1 上调 OCT4 信号通路的机制研究

尚爽, 宋佳玮, 花芳*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室,
新药作用机制研究与药效评价北京市重点实验室 (BZ0150), 北京 100050)

摘要: DNA 结合抑制蛋白-1 (inhibitor of DNA binding 1, ID1) 在结肠癌、肺癌和乳腺癌等多种肿瘤组织中异常高表达, 并与肿瘤恶性进展及患者不良预后密切相关。已有研究发现, ID1 在结肠癌中可以维持肿瘤干细胞样特性, 介导肿瘤干细胞耐药, 但其分子生物学机制并未被完全阐明。通过免疫印迹、基因集富集分析、双荧光素酶报告基因检测及实时定量 PCR, 本研究发现 ID1 可从转录水平上调维持肿瘤干细胞的关键转录因子八聚体结合蛋白 (octamer binding transcription factor, OCT4) 的蛋白表达及信号通路活性。利用体外成球实验, 本研究证明过表达 OCT4 可逆转敲低 *ID1* 对干细胞成球能力的抑制作用。在进一步的机制研究中, 利用 JASPAR 及 GEPIA 数据库, 本研究预测并得到能够负向调控 OCT4 转录的转录抑制因子叉头蛋白 D3 (forkhead box D3, FOXD3)。通过免疫共沉淀、免疫荧光共聚焦及实时定量 PCR 等方法, 本研究最终证明 ID1 通过与转录抑制因子 FOXD3 相互作用, 抑制其活性从而上调 OCT4 的转录及信号通路活性。综上, 本研究为结肠癌干细胞的分子调控机制提供了新的理论基础, 研究中发现的 ID1-FOXD3 蛋白-蛋白相互作用为结肠癌治疗提供了新的潜在干预靶点。

关键词: DNA 结合抑制蛋白-1; 叉头蛋白 D3; 八聚体结合转录因子; 结肠癌干细胞; 转录活性

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)07-1945-08

The upregulation mechanism of OCT4 signaling by ID1 in colorectal cancer

SHANG Shuang, SONG Jia-wei, HUA Fang*

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Beijing Key Laboratory of New Drug Mechanisms and Pharmacological Evaluation Study (BZ0150), Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Inhibitor of DNA binding 1 (ID1) has an aberrantly high expression in multiple cancer tissues, including colon cancer, lung cancer, breast cancer, and so on, which is closely related to cancer aggressiveness and poor clinical outcomes in cancer patients. It has been reported that ID1 maintains colorectal cancer cells (CRCs) stemness traits and contributes to the CRC drug resistance. While, the biological molecular mechanisms have not been fully elucidated. In this research, we found that ID1 upregulates octamer binding transcription factor (OCT4) protein level as well as OCT4 signaling pathway via Western blot, gene set enrichment analysis (GSEA), dual-luciferase reporter assay, and real-time PCR. Through the *in vitro* sphere formation assay, we found that overexpression of OCT4 reverses the inhibitory effect of knocking down *ID1* on CRC sphere formation ability. With the help of JASPAR and GEPIA database, we predicted a novel transcriptional repressor—forkhead box D3 (FOXD3) of OCT4. Finally, by using co-immunoprecipitation (Co-IP), confocal and real-time PCR, we demonstrated that ID1 interacts with FOXD3 to inhibit its transcriptional repression activity and therefore to upregulate OCT4 transcrip-

收稿日期: 2021-01-28; 修回日期: 2021-03-10.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973344, 81903636).

*通讯作者 Tel: 86-10-83165034, E-mail: huafang@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0160

tion and OCT4 signaling pathway. In conclusion, this study provides a new theoretical basis for the regulation mechanism of colon cancer stem cells, and the newly found protein-protein interaction of ID1-FOXD3 provides a potential drug target for the therapy of CRC.

Key words: inhibitor of DNA binding 1; forkhead box D3; octamer binding transcription factor; colorectal cancer stem cell; transcriptional activity

结肠癌是全球第三大恶性肿瘤,发生率占所有癌种的10.2%,死亡率占所有癌种的9.2%,且有逐年上升的趋势,严重威胁人类健康^[1-3]。目前,结肠癌治疗尚无有效的靶向性治疗药物,主要以手术切除为主,化疗及放疗为辅。化、放疗不良反应大,严重降低患者生存质量;且一旦患者出现耐药、复发或转移,将使治疗陷入绝境。

结肠癌干细胞(colon cancer stem cells, CCSCs)的发现为解决结肠癌耐药、复发及转移等问题带来曙光^[4]。肿瘤干细胞是一群自我更新能力强、具有高度分化潜能并且可以休眠的细胞类群^[5]。其较高的DNA修复能力、解毒酶活性及药物转运蛋白的表达是造成结肠癌治疗中患者耐药和复发的主要机制^[6,7]。最近的研究发现,肿瘤中存在干细胞池(CSCs niche)且干细胞具有可塑性,即肿瘤干细胞可从静止状态向增殖状态转变,从药物敏感状态向耐药状态转变,从不对称向对称分裂转变,并可从干细胞状态向非干细胞状态转变,这些也是导致肿瘤治疗耐药和复发的关键原因^[8-10]。因此,深入研究调控CCSCs的分子生物学机制,并寻找靶向CSCs的药物新靶点是治疗结肠癌的潜在策略。

拥有碱基螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)结构的转录因子对于细胞分化具有重要调节作用。ID(inhibitor of DNA binding)家族蛋白具有HLH样结构,但由于缺乏碱基富集区域而不具备DNA结合能力,它们主要通过具有bHLH样结构的转录因子形成二聚体,负性调控这些转录因子的功能^[11,12]。ID蛋白能够抑制不同细胞类型祖细胞的分化,促进细胞周期进程,延缓细胞衰老^[13,14]。这些特性使其在干细胞维持及肿瘤发生中发挥重要作用。该家族中, ID1主要表达于胚胎干细胞及前体细胞,其表达量随细胞分化程度增高而降低^[15]。研究证实, ID1在乳腺癌、胆管癌、食管癌和胃癌等多种肿瘤细胞中存在异常高表达现象并通过调节细胞增殖、上皮间叶转化及耐药发挥促癌作用^[16-21]。且已有研究发现,结肠癌中ID1可通过维持结肠癌细胞干性特征促进结肠癌的发展进程^[22,23],但相关分子生物学机制研究并不深入,尚未发现有效靶点。

通过免疫印迹检测及GSEA(gene set enrichment analysis)分析,本研究发现ID1与维持肿瘤细胞干

性的八聚体结合蛋白(octamer binding transcription factor, OCT4)关键信号通路呈正相关关系, ID1直接上调OCT4的蛋白表达。基于此,本研究猜想ID1通过上调OCT4信号通路维持结肠癌干细胞特性。本研究拟探求ID1对OCT4调控的分子生物学机制,寻找靶向结肠癌肿瘤干细胞的新药物作用靶点。

材料与方法

试剂和抗体 胰酶、胎牛血清、DMDM、DMEM/F12培养基购于Gibco公司;原代细胞培养基购自Cell Biologics 生物技术有限公司;RIPA细胞裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;RNA提取试剂盒购自北京奕杉生物技术有限公司;RNA逆转录试剂盒购自全式金生物技术有限公司。双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自Promega 生物技术有限公司;转染试剂VigoFect购于北京威格拉斯生物技术有限公司;Western blot超敏发光液购自Thermo Fisher 有限公司;放线菌酮(cycloheximide, CHX)购于Sigma Aldrich 公司;干细胞成球半固体培养基CCM012购自R&D生物技术有限公司。OCT4、c-Myc(MYC proto-oncogene)、Nanog(Nanog homeobox)、SOX2(SRY-box transcription factor 2)及FOXD3购自Cell Signalling Technology 生物技术有限公司;GAPDH购自北京中杉金桥生物技术有限公司;HA、DDK及GFP标签抗体购自北京博尔迈生物技术有限公司。

细胞及细胞培养 原代结肠癌细胞购自Cell Biologics 生物技术有限公司;结肠癌细胞系HCT-8、HT-29购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心;HEK 293T细胞由本实验室长期保存。HCT-8细胞培养于含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基中;HT-29细胞培养于含10%FBS的DMEM/F12培养基中;HEK293细胞培养于含10%FBS的DMEM培养基中。所有细胞置于37℃、5%CO₂的孵箱中培养,根据细胞生长状态进行传代。

稳定转染细胞株的构建 为构建HCT-8或HT-29 ID1稳定敲低或过表达的细胞株,用ID1 shRNA(序列:5'-GAGGAATTACGTGCTCTGT-3')的敲低慢病毒或ID1-3×Flag-GFP的过表达慢病毒[由汉恒生物(上

海) 科技有限公司合成] 感染 HCT-8 或 HT-29 细胞, 48 h 后加入 $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 嘌呤霉素进行抗性筛选或利用 GFP 进行流式分选。培养 7 天后, 挑取单克隆细胞, 经过 Western blot 鉴定, 筛选获得 ID1 稳定敲低或高表达的细胞株。

质粒 ID1-HA、FOXD3-DDK 及 OCT4-DDK 质粒均购自长沙优宝生物技术有限公司; PEGFP-C1-ID1 重组质粒由本实验室构建。

质粒转染 为获得瞬时过表达 FOXD3 的 HCT-8 细胞, 使用转染试剂 Lipofectamine[®]2000, 根据说明书的转染方法将 FOXD3-DDK 转入 HCT-8 细胞。

主要仪器 电泳仪 (北京六一仪器厂)、qPCR 仪 (美国 BIO-RAD 公司)、ImageQuant LAS 4000mini 成像系统 (美国通用电气公司)、激光扫描共聚焦显微镜 (日本奥林巴斯公司)。

实时荧光定量 PCR (real-time PCR) 检测 细胞总 RNA 提取及 RNA 逆转录均按照试剂盒说明操作, qPCR 引物由睿博兴科生物技术有限公司合成。OCT4: 上游 5'-ATTCAGCCAAACGACCATCT-3', 下游 5'-TCTCACTCGTTCTCGATACTG-3'; GAPDH: 上游 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3', 下游 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'。q-PCR 反应体系 (20 μL) 如下: SYBR PremixExTaq[™] 10 μL , 去离子水 6 μL , 上下游引物各 1 μL , 模板 cDNA 2 μL 。两步法反应过程如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 进入循环, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火和延伸 30 s, 循环次数 40 次。以 GAPDH 作为内参, 将所得 Ct 值按 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 的方法进行处理。

RNAi 实验 FOXD3 siRNA 由广州锐博生物科技有限公司合成, 将适量细胞接种于孔板中, 待其密度合适时, 将 FOXD3 siRNA 稀释于 RPMI-1640 中, 轻轻混匀; 另外, 将适量 Lipofectamine RNAi MAX 稀释于 100 μL RPMI-1640 中, 室温放置 5 min 后, 将含有 Lipofectamine RNAi MAX 的培养基滴加到含有 siRNA 的培养基中, 轻轻混匀, 室温孵育 5 min 后滴加到细胞中。

Western blot 收集细胞, 加入裂解液, 置于冰上裂解 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 收集上清液, 测定其蛋白浓度并进行定量处理, 加入 5 \times 上样缓冲液, 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min。蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 湿法转膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 0.5 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 一抗孵育过夜, 次日用 TBST 洗膜液洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入相应二抗室温孵育 2 h, 洗膜 3 次后加入 ECL 溶液进行显影。

GSEA 分析 从 GEO 数据库下载结肠癌转录组测序数据 (GSE41258, $n = 390$)。按照 ID1 表达高低进行排序, 前 100 和后 100 名患者分别被认为是 ID1 高表

达组和 ID1 低表达组。从 <http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp> 网站下载 OCT4、Nanog、c-Myc 和 SOX2 基因集。运用 GSEA 软件分别对 ID1 高表达组和低表达组中 OCT4、Nanog、c-Myc 及 SOX2 信号集进行富集分析。其中, 伪发现率 (false discovery rate, FDR) 值小于 0.25 被视为具有显著性差异。

免疫共沉淀实验 (co-immunoprecipitation, CO-IP) 待细胞生长到 70% 的密度时进行质粒转染, 质粒转染 24~48 h 后收集细胞, 加入细胞裂解液 (含蛋白酶抑制剂), 冰上裂解 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 将上清转移至新的 1.5 mL 离心管中。吸取少量的裂解液用于 Western blot 分析, 剩余的裂解液加入 5 mg 的抗体和 20 mL protein A 琼脂糖珠, 4 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢摇晃孵育过夜, 使抗体与 protein A 琼脂糖珠偶连。次日, 用缓冲液清洗 4 次, 每次 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min。加入 2 \times 上样缓冲液, 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 样品进行 Western blot 分析。

体外干细胞成球实验 将 CCM012 半固体培养基在 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热融化, 用胰酶消化不同组别细胞并计数, 将细胞和胶混合配成每毫升含 5 000 个细胞, 并接种于 Corning-costar 96 孔低吸附板, 每孔接种 500 个细胞。3~7 天后观察、计数并拍照。

双荧光素酶报告基因实验 首先将转录因子 OCT4 或 FOXD3 的 DNA 结合元件构建在 luciferase 报告基因载体中 (OCT4-luc、FOXD3-luc), 之后在 HCT-8 细胞中转染 OCT4-luc 或 FOXD3-luc 质粒, 并同时共转染海肾荧光素酶 (pRL-TK) 报告基因作为内参。利用 Promega 双荧光素酶检测试剂盒及酶标仪测出荧光强度后进行计算。荧光强度 = 萤火虫荧光素酶对应荧光强度/内参荧光强度。

统计学分析 实验平均重复 3 次以上, 数据用 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示, 使用 Graphpad Prism 8 统计分析软件进行数据统计和计算, 用 t 检验各组间的差异, 显著性结果以 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 分别表示。

结果

1 结肠癌中 ID1 增强 4 个干性相关转录因子的表达

Nanog、c-Myc、SOX2 及 OCT4 是 4 个维持肿瘤细胞干性的经典转录因子^[24-27]。为探究 ID1 是否影响这 4 个转录因子的表达, 本研究首先构建了两个稳定敲低 ID1 (ID1^{KD1} 和 ID1^{KD2}) 及一个稳定过表达 ID1 (ID1^{OE}) 的结肠癌 HCT-8 细胞株及对照细胞株。免疫印迹实验结果显示, 敲低 ID1 可显著降低 Nanog、c-Myc、SOX2 及 OCT4 这 4 个转录因子的蛋白表达 (图 1A、B); 而过表达 ID1 则可显著增加上述 4 种蛋白的表达 (图 1C、D); 且表达变化幅度以 OCT4 最为突出。以

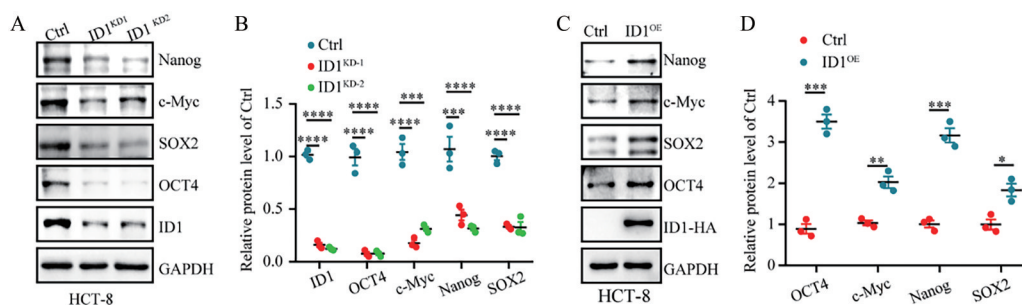


Figure 1 Inhibitor of DNA binding 1 (ID1) upregulates the expression of four stemness sustaining transcriptional factors. A: Immunoblot analyses of Nanog homeobox (Nanog), MYC proto-oncogene (c-Myc), SRY-box transcription factor 2 (SOX2), octamer binding transcription factor (OCT4), and ID1 expression in HCT-8 cells stably expressing control (Ctrl) or two *ID1*-knockdown shRNAs; B: Statistical analyses of the protein levels detected in A; C: Immunoblot analyses of Nanog, c-Myc, SOX2, OCT4, and ID1 expression in Ctrl or *ID1*-overexpressed HCT-8 cells; D: Statistical analyses of the protein levels detected in C. $n = 3$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

上结果提示, ID1 可能通过上调 Nanog、c-Myc、SOX2 或 OCT4 信号通路发挥其维持结肠癌干性的促肿瘤作用。

2 ID1 通过上调 OCT4 信号通路维持结肠癌细胞干性

为进一步探究结肠癌患者肿瘤样本中 ID1 表达水平与 Nanog、c-Myc、SOX2 及 OCT4 信号通路的关系, 本研究对从 GEO 数据库中获得的结肠癌患者转录组测序数据集 (GSE41258, $n = 390$) 进行分析。将所有患者的转录组测序数据按照 *ID1* 转录水平由高到低排序, 并利用 GSEA 分析比较了 ID1 表达前 100 个患者以及后 100 个患者这 4 个转录因子信号通路的富集情况 (图 2A)。结果显示, *ID1* 的转录水平仅与 OCT4 信号通路存在良好的正相关关系 [normalized enrichment score (NES) = 1.305, FDR q -value = 0.092], 而与 Nanog (NES = 0.864, FDR q -value = 0.731)、c-Myc (NES = 0.94, FDR q -value = 0.619)、SOX2 (NES = 1.105, FDR q -value = 0.86) 信号通路无明显相关性 (图 2B~E)。这些数据说明, ID1 主要调节了 OCT4 表达及下游信号通路, 进而评估了 ID1 对结肠癌干细胞特性的影响是否依赖于 OCT4。本研究构建了 *ID1* 稳定敲低且 OCT4 稳定过表达的 HCT-8 细胞株 (*ID1*^{KD}/*OCT4*^{OE})。体外干细胞成球结果显示, 敲低 *ID1* 造成 HCT-8 细胞成球能力降低; 该现象可被过表达 OCT4 所反转 (图 2F)。双荧光素酶报告基因实验显示, 过表达 *ID1* 可在 HCT-8 及 HT-29 细胞株中显著增加 OCT4 的转录激活活性; 而敲低 *ID1* 则降低 OCT4 的转录激活活性 (图 2G~J)。以上结果表明, 结肠癌中 ID1 表达水平与 OCT4 信号通路呈正相关关系, ID1 可通过增强 OCT4 的转录激活活性维持结肠癌细胞干性。

3 ID1 通过增强 OCT4 的转录水平而上调其蛋白质表达

本研究进一步探索了 ID1 上调 OCT4 蛋白表达的分子生物学机制。GEPIA 数据库^[28]的 mRNA 相关性分

析结果显示, 结肠癌患者组织中 ID1 与 *OCT4* 的 mRNA 呈正相关关系, 提示 ID1 可能上调 *OCT4* 的转录水平 (图 3A)。荧光实时定量 PCR 的结果提示, 敲低 *ID1* 可显著降低 HCT-8 及 HT-29 细胞系中 *OCT4* 的转录水平; 而过表达 *ID1* 则可增强 *OCT4* 转录水平 (图 3B~E)。鉴于某些蛋白会同时从转录和蛋白稳定性水平对其他蛋白进行调控, 本研究也分析了 ID1 对 OCT4 蛋白质稳定性的影响。在不同的时间点加入蛋白合成抑制剂 CHX 阻断 OCT4 从头合成途径, 进而观察其降解速度^[29]。结果显示, 过表达 *ID1* 并不会延长 OCT4 的降解半衰期 (图 3F)。这一结果提示, ID1 并不影响 OCT4 的蛋白质稳定性。以上结果表明, 结肠癌中 ID1 可通过增强 *OCT4* 的转录水平而上调其蛋白质表达。

4 转录因子 FOXD3 抑制 OCT4 转录

由于 ID1 自身并无 DNA 结合能力, 其主要通过与具有 bHLH 结构的转录因子形成异源二聚体, 进而抑制其 DNA 结合和转录活性发挥。基于前面的研究结果推测, ID1 可能对某个 OCT4 的转录抑制因子具有负调节作用, 进而间接促进 OCT4 转录。本研究利用 JASPAR 数据库 (<http://jaspar.genereg.net/>) 分析了与 *OCT4* 的启动子序列结合的转录调节蛋白, 共预测到 37 个潜在结合 *OCT4* 启动子区域的转录调节蛋白。结合 GEPIA 数据库分析发现, 在结肠癌患者中只有 FOXD3 与 *OCT4* 的转录呈负相关关系 ($R = -0.22$, $P = 0.00061$) (表 1、图 4A)。为确认 FOXD3 是否的确抑制 *OCT4* 转录, 分别在敲低和过表达 *FOXD3* 的条件下检测了 OCT4 的转录和蛋白表达。实时定量 RT-PCR 及免疫印迹结果证明, 敲低 *FOXD3* 增强 OCT4 的 mRNA 及蛋白表达水平, 过表达 *FOXD3* 则相反 (图 4B~E)。进一步用 *OCT4*-luc 报告基因系统检测了 FOXD3 对 OCT4 转录激活活性的影响。在 HCT-8 细胞中敲低 *FOXD3* 可增强 OCT4 的

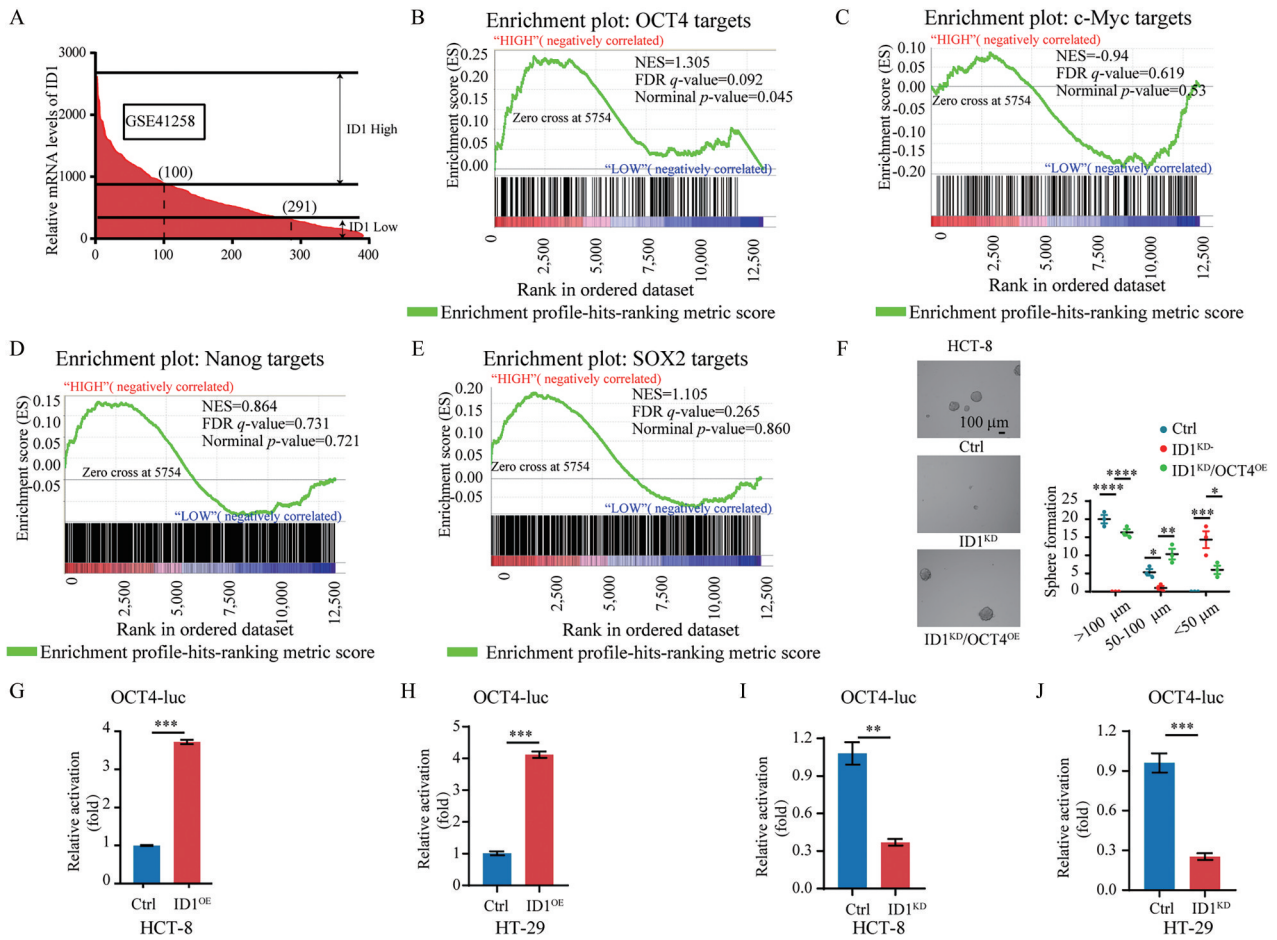


Figure 2 *ID1* maintains colorectal tumor cells stemness traits through upregulating OCT4 signaling pathway. A: 390 human colorectal tumor tissue samples in the GSE41258 dataset were divided into 3 groups according to the mRNA level of *ID1*; B-E: Gene set enrichment analysis plot for the OCT4, c-Myc, Nanog, and SOX2 signaling gene modules in *ID1*-high and *ID1*-low groups identified in A; F: Phase contrast images and quantification of tumor spheres derived from HCT-8 cells with the indicated gene manipulation; G, H: Relative OCT4-reporter luciferase activity in HCT-8 cells and HT-29 cells of Ctrl or *ID1* overexpression groups; I, J: Relative OCT4-reporter luciferase activity in HCT-8 cells and HT-29 cells of Ctrl or *ID1* knockdown groups. $n = 3$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

Table 1 Correlation analysis of *OCT4* mRNA level and predictive *OCT4* transcription factors in colon cancer

Name	P	R	Name	P	R	Name	P	R
Foxk1	1.7e-07	0.29	HIC2	0.035	0.12	Bach1 Mafk	0.89	-0.0078
BHLHF41	0.86	-0.01	ZNF263	5.2e-06	0.25	RELA	0.0043	0.16
ID2	0.093	-0.095	ETV3	0.24	0.067	TFAP2B	0.42	-0.045
BHLHE40	0.028	0.12	TEAD4	0.22	0.069	RREB1	0.14	0.083
Foxd3	0.00061	-0.22	ZBTB7A	0.2	0.073	SNAI2	0.014	-0.14
MLXIPL	3.2e-19	0.48	POU4F2	0.3	-0.058	TFAP2A (var.2)	0.74	-0.019
FOXP1	0.18	-0.075	GLIS2	0.78	0.016	TFEC	0.23	-0.068
Nkx3-1	0.053	-0.11	YY1	0.42	0.045	Nr2e1	0.38	-0.049
HMBOX1	0.77	0.016	SP1	0.58	0.031	REL	0.12	0.088
MSX2	0.67	-0.024	Klf1	0.12	0.089	BHLHE23	0.71	-0.021
TGIF2	3.2e-05	0.23	Mecom	0.32	0.057	NFKB2	0.11	0.089
MSX1	7.8e-05	0.22	GLI2	0.44	-0.044	NFIL3	0.69	0.022
Hes2	0.74	0.019						

转录激活活性; 而过表达 *FOXD3* 则降低 *OCT4* 转录激活活性 (图 4F、G)。上述结果表明, *FOXD3* 通过抑制 *OCT4* 转录, 降低 *OCT4* 作为转录因子的转录激活活性。

5 ID1 通过与 FOXD3 相互作用抑制其转录调节功能促进 OCT4 表达

为明确 *FOXD3* 是否是介导 *ID1* 对 *OCT4* 转录调控

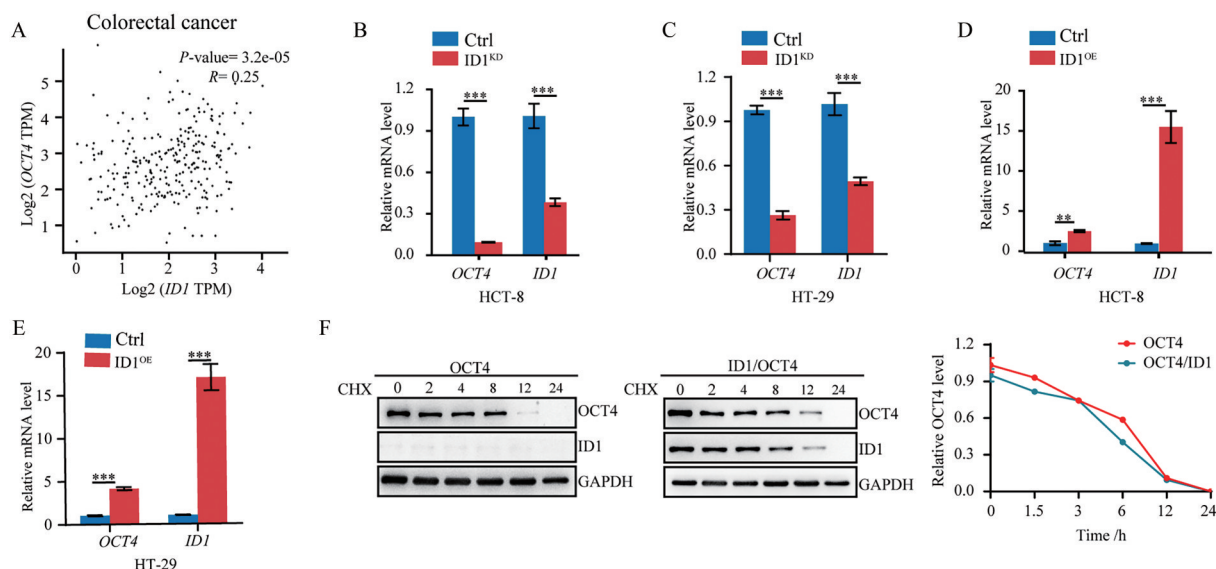


Figure 3 ID1 increases OCT4 expression *via* upregulating its transcriptional level. A: mRNA correlation of *OCT4* and *ID1* in colorectal cancer analyzed by the web of GEPIA; B, C: Effects of *ID1* knockdown on mRNA level of *OCT4* in HCT-8 (B) or HT-29 (C) cells; D, E: Effects of *ID1* overexpression on mRNA level of *OCT4* in HCT-8 (D) or HT-29 (E) cells; F: Effects of *ID1* overexpression on OCT4 protein stability in HEK 293 cells. *n* = 3, mean ± SEM. ***P* < 0.01, ****P* < 0.001

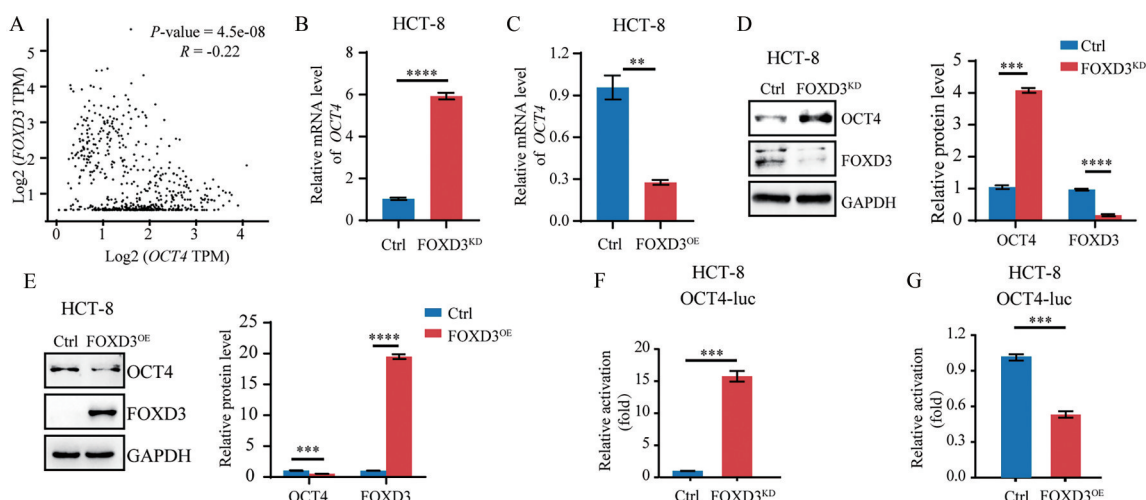


Figure 4 FOXD3 inhibits OCT4 signaling *via* inhibiting its transcription. A: mRNA correlation of *FOXD3* and *OCT4* in colorectal cancer analyzed by the web of GEPIA; B, C: Effects of *FOXD3* knockdown (B) or overexpression (C) on *OCT4* mRNA level in HCT-8 cells; D, E: Effects of *FOXD3* knockdown (D) or overexpression (E) on protein level of *OCT4* in HCT-8 cells; F, G: Effects of *FOXD3* knockdown (F) or overexpression (G) on *OCT4*-reporter luciferase activity in HCT-8 cells. *n* = 3, mean ± SEM. ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001

的关键中间环节, 本研究检测了 ID1 对 FOXD3 表达的影响, 结果表明敲低或过表达 *ID1* 并不影响 FOXD3 的蛋白表达 (图 5A)。因此, 推测 ID1 可能通过与 FOXD3 形成相互作用复合物发挥调节功能。免疫共沉淀实验结果证实, FOXD3 与 ID1 在 HEK293 中存在相互作用 (图 5B), 免疫荧光共定位实验表明二者在结肠癌原代细胞中存在共定位 (图 5C)。进一步探索 ID1 是否调节 FOXD3 的转录抑制活性, 将 FOXD3 所识别的特定 DNA 序列“*AATGTTTGT*”构建到荧光素酶报告基

因载体中^[30], 建立了 FOXD3 双荧光素酶报告基因体系。在 HCT-8 细胞中敲低 *ID1* 降低 FOXD3-luc 荧光素酶报告基因活性, 提示 FOXD3 的转录抑制活性增强 (图 5D); 过表达 *ID1* 增强 FOXD3-luc 荧光素酶报告基因活性, 提示 FOXD3 的转录抑制活性受到抑制 (图 5E)。在 HCT-8 细胞中利用 FOXD3 的小干扰 RNA 敲低 *FOXD3* 则可逆转 *ID1* 敲低对 *OCT4* 的 mRNA 表达及 *OCT4* 转录激活活性的抑制作用 (图 5F、G)。此外, 在 HCT-8 细胞中过表达 *FOXD3* 质粒可逆转 *ID1* 过表

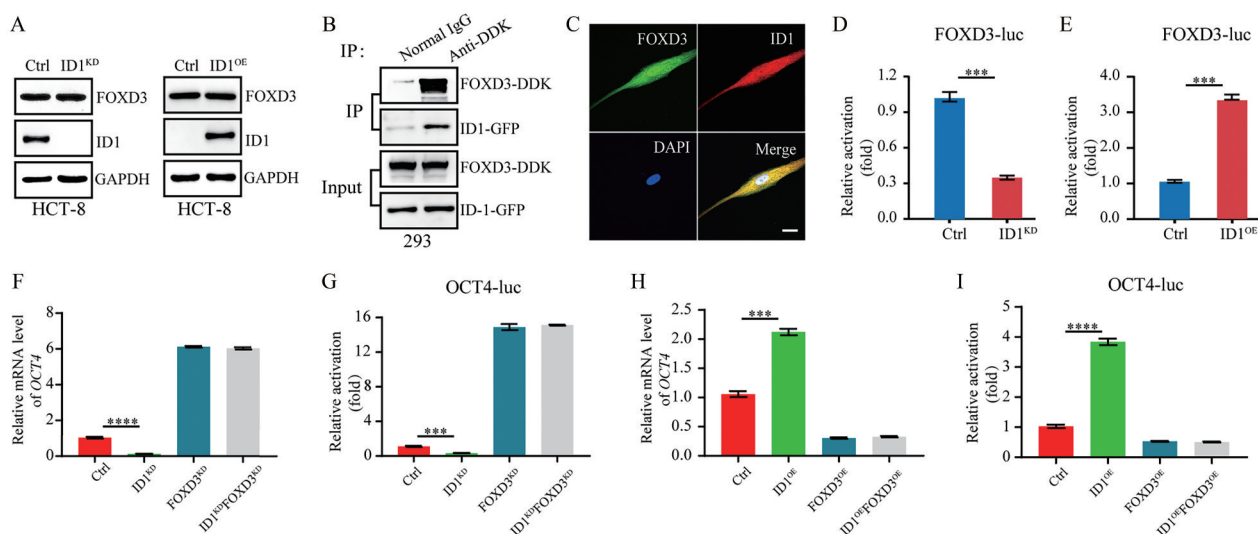


Figure 5 ID1 interacts with FOXD3 to promote *OCT4* transcriptional level. A: Effects of *ID1* knockdown or overexpression on protein level of FOXD3 in HCT-8 cells; B: 293 cells were transfected with plasmids of FOXD3-DDK and ID1-GFP. Cell extracts were immuno-precipitated with anti-DDK antibody or normal mouse IgG and blotted with anti GFP antibody; C: Immunofluorescence staining of ID1 and FOXD3 in primary colorectal cancer cells. Scale bar = 15 μ m; D, E: Effects of *ID1* overexpression (D) or knockdown (E) on FOXD3-reporter luciferase activity in HCT-8 cells; F, G: Relative mRNA level of *OCT4* in HCT-8 cells of indicated groups; H, I: Relative OCT4-reporter luciferase activity in HCT-8 cells of indicated groups. $n = 3$, mean \pm SEM. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

对 *OCT4* 的 mRNA 表达及转录激活活性的增强作用 (图 5H、I)。以上实验表明, FOXD3 是介导 ID1 增强 *OCT4* 转录及信号通路活性的中间转录抑制因子。

讨论

伴随人们生活质量提高, 高脂、高蛋白等不良饮食习惯的增多, 结肠癌成为威胁我国人民身体健康的主要癌种之一^[31]。结肠癌治疗中存在的复发、转移及耐药等问题是威胁结肠癌患者生命的重大医学难题, 而结肠癌干细胞的存在是导致以上 3 个问题的重要原因。已有报道发现, ID1 在胃癌及结肠癌中维持肿瘤干细胞特性, 但具体的生物学机制并不明确, 尚未发现可用的药物靶点。本研究在结肠癌中发现 ID1-FOXD3-OCT4 调控轴, 即 ID1 通过与 FOXD3 相互作用抑制其作为转录抑制因子的活性, 最终上调 *OCT4* 转录并激活 OCT4 信号通路, 增强结肠癌肿瘤细胞干性。因此, 靶向干扰 ID1-FOXD3 的相互作用, 解除 ID1 对 FOXD3 转录抑制活性的负调节作用可能是改善结肠癌复发、耐药及转移的新策略。

具有 HLH 结构域 ID 家族主要通过完整的 bHLH 转录因子形成非活性的异二聚体而成为 bHLH 蛋白的负性调节因子。本研究中发现的介导 ID1-OCT4 的中间桥梁蛋白是具有叉头样结构的 FOXD3 而非具有 bHLH 样结构的转录因子, 这与传统发现的 ID 家族发挥作用的模式不同。本发现为 ID1 蛋白作用方式的多

样性提供了新的证据。FOXD3 在肺癌、神经胶质瘤及结肠癌中的抑肿瘤作用已被广泛报道^[32-35]。已有研究认为, 在结肠癌中 FOXD3 主要通过抑制 EGFR-Ras-Raf-Mek-ERK 信号通路抑制肿瘤的发展进程^[36]。本研究在结肠癌中发现 FOXD3 对 *OCT4* 转录抑制作用, 这为 *OCT4* 的调节机制增添了新的理论基础。在今后的研究当中, 本课题组将进一步在体内验证 ID1-FOXD3-OCT4 的调控关系对结肠癌干细胞的作用; 并深入研究 ID1 与 FOXD3 的相互作用结构域, 开发筛选干扰二者相互作用的化学小分子或 α 螺旋肽。

综上所述, 本研究结果表明, ID1 通过与叉头蛋白样转录抑制因子 FOXD3 相互作用, 抑制其活性而增强 *OCT4* 的转录, 最终上调 OCT4 信号通路活性, 维持结肠癌干细胞的干性特征。本研究结果有利于深入了解 ID1 促肿瘤功能的机制, 为今后相关靶向药物的开发提供重要的理论基础。

作者贡献: 尚爽负责细胞、动物实验和实验设计及论文的撰写; 宋佳伟负责分子克隆实验; 花芳负责论文的指导及审阅。

利益冲突: 本文的研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] ohdi NA, Sukor NF. Colorectal cancer immunotherapy: options and strategies [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1624.
- [2] Ahmed M. Colon cancer: a clinician's perspective in 2019 [J].

- Gastroenterology Res, 2020, 13: 1-10.
- [3] Moghimi-Dehkordi B, Safaei A. An overview of colorectal cancer survival rates and prognosis in Asia [J]. World J Gastrointest Oncol, 2012, 4: 71-75.
- [4] Batlle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited [J]. Nat Med, 2017, 23: 1124-1134.
- [5] Ma HY, He M, Wei MJ. Research progress on targeting effect and regulating mechanisms of the stemness of cancer stem cells [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2016, 51: 189-196.
- [6] Vaiopoulos AG, Kostakis ID, Koutsilieris M, et al. Colorectal cancer stem cells [J]. Stem Cells, 2012, 30: 363-371.
- [7] Lugli A, Iezzi G, Hostettler I, et al. Prognostic impact of the expression of putative cancer stem cell markers CD133, CD166, CD44s, EpCAM, and ALDH1 in colorectal cancer [J]. Br J Cancer, 2010, 103: 382-390.
- [8] Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity [J]. Nature, 2013, 501: 328-337.
- [9] Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges [J]. Nature Med, 2011, 17: 313-319.
- [10] Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty [J]. Cancer Cell, 2012, 21: 283-296.
- [11] Benezra R, Davis RL, Lockshon D, et al. The protein ID: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins [J]. Cell, 1990, 61: 49-59.
- [12] Sikder HA, Devlin MK, Dunlap S, et al. ID proteins in cell growth and tumorigenesis [J]. Cancer Cell, 2003, 3: 525-530.
- [13] Perk J, Iavarone A, Benezra R. ID family of helix-loop-helix proteins in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5: 603-614.
- [14] Ling F, Kang B, Sun XH. ID proteins: small molecules, mighty regulators [J]. Curr Top Dev Biol, 2014, 110: 189-216.
- [15] Ling MT, Wang X, Zhang X, et al. The multiple roles of ID-1 in cancer progression [J]. Differentiation, 2006, 74: 481-487.
- [16] Yang HY, Liu HL, Liu GY, et al. Expression and prognostic values of ID-1 and ID-3 in gastric adenocarcinoma [J]. J Surg Res, 2011, 167: 258-266.
- [17] Luo KJ, Wen J, Xie X, et al. Prognostic relevance of ID-1 expression in patients with resectable esophageal squamous cell carcinoma [J]. Ann Thorac Surg, 2012, 93: 1682-1688.
- [18] Ding Y, Wang G, Ling MT, et al. Significance of ID-1 up-regulation and its association with EGFR in bladder cancer cell invasion [J]. Int J Oncol, 2006, 28: 847-854.
- [19] Gumireddy K, Li A, Kossenkov AV, et al. ID1 promotes breast cancer metastasis by S100A9 regulation [J]. Mol Cancer Res, 2014, 12: 1334-1343.
- [20] Sachdeva R, Wu M, Smiljanic S, et al. ID1 is critical for tumorigenesis and regulates chemoresistance in glioblastoma [J]. Cancer Res, 2019, 79: 4057-4071.
- [21] Tan HY, Wang N, Chan YT, et al. ID1 overexpression increases gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancer by activating RIP3/MLKL-dependent necroptosis [J]. Cancer Lett, 2020, 475: 109-118.
- [22] Sun Y, Lai X, Yu Y, et al. Inhibitor of DNA binding 1 (ID1) mediates stemness of colorectal cancer cells through the Id1-c-Myc-PLAC8 axis via the Wnt/ β -catenin and Shh signaling pathways [J]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 6855-6869.
- [23] O'Brien CA, Kreso A, Ryan P, et al. ID1 and ID3 regulate the self-renewal capacity of human colon cancer-initiating cells through p21 [J]. Cancer Cell, 2012, 21: 777-792.
- [24] van Schaijik B, Davis PF, Wickremesekera AC, et al. Subcellular localisation of the stem cell markers OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 and c-MYC in cancer: a review [J]. J Clin Pathol, 2018, 71: 88-91.
- [25] Mamun MA, Mannoor K, Cao J, et al. SOX2 in cancer stemness: tumor malignancy and therapeutic potentials [J]. J Mol Cell Biol, 2020, 12: 85-98.
- [26] Elbadawy M, Usui T, Yamawaki H, et al. Emerging roles of c-Myc in cancer stem cell-related signaling and resistance to cancer chemotherapy: a potential therapeutic target against colorectal cancer [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20: 2340.
- [27] Roudi R, Barodabi M, Madjd Z, et al. Expression patterns and clinical significance of the potential cancer stem cell markers OCT4 and NANOG in colorectal cancer patients [J]. Mol Cell Oncol, 2020, 7: 1788366.
- [28] Tang Z, Kang B, Li C, et al. GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47: W556-W560.
- [29] Zhou DD, Yu JJ, Hu ZW, et al. TRIM25 enhances EGFR stability and signaling activity to promote lung cancer progression [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2019, 54: 1026-1035.
- [30] Katoh M, Katoh M. Human FOX gene family (review) [J]. Int J Oncol, 2004, 25: 1495-1500.
- [31] Zheng RS, Sun KX, Zhang SW, et al. Report of cancer epidemiology in China, 2015 [J]. Chin J Oncol, 2019, 41: 19-28.
- [32] Han L, Shi SJ, Gong T, et al. Cancer stem cells: therapeutic implications and perspectives in cancer therapy [J]. Acta Pharm Sin B, 2013, 3: 65-75.
- [33] Xu M, Zhu J, Liu S, et al. FOXD3, frequently methylated in colorectal cancer, acts as a tumor suppressor and induces tumor cell apoptosis under ER stress via p53 [J]. Carcinogenesis, 2020, 41: 1253-1262.
- [34] Li D, Mei H, Qi M, et al. FOXD3 is a novel tumor suppressor that affects growth, invasion, metastasis and angiogenesis of neuroblastoma [J]. Oncotarget, 2013, 4: 2021-2044.
- [35] Xu W, Li J, Li L, et al. FOXD3 suppresses tumor-initiating features in lung cancer via transcriptional repression of WDR5 [J]. Stem Cells, 2019, 37: 582-592.
- [36] Li K, Guo Q, Yang J, et al. FOXD3 is a tumor suppressor of colon cancer by inhibiting EGFR-Ras-Raf-MEK-ERK signal pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8: 5048-5056.