

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.10.004
网络首发 https://www.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.r.20200312.1719.019.html(2020-03-16)

Id1 调控 NF-κB 提高垂体瘤侵袭性的作用^{*}

李义云,李美华,余念祖

(南昌大学第一附属医院神经外科 330006)

[摘要] **目的** 探讨抑制分化因子 1(Id1)对垂体瘤中核转录因子-κB(NF-κB)信号通路的调控作用。**方法** 采用 Realtime PCR、Western blot、免疫荧光法检测侵袭性垂体瘤和非侵袭性垂体瘤中 Id1 及 NF-κB 的表达。构建 Id1-pcDNA3.1 过表达载体,并将构建成功的 Id1-pcDNA3.1 过表达载体与 NF-κB 阻断剂 LY294002 共同作用小鼠垂体腺瘤 αT3-1 细胞,细胞分为未处理组(对照组)、NF-κB 阻断剂 LY294002 组(LY294002 组)、空载组、空载+LY294002 组、Id1 过表达组、Id1 过表达+LY294002 组,Realtime PCR、Western blot 及免疫荧光法检测各组细胞中 NF-κB 的表达。**结果** Realtime PCR、Western blot 结果显示:与非侵袭性垂体瘤比较,侵袭性垂体瘤中 Id1 及 NF-κB mRNA 及蛋白表达水平均显著提高($P<0.05$);免疫荧光实验结果显示: NF-κB 主要定位于细胞核中。酶切结果证实 Id1-pcDNA3.1 过表达载体构建成功。Realtime PCR、Western blot 及免疫荧光实验结果显示:与对照组比较,LY294002 组及 Id1 过表达+LY294002 组中 NF-κB mRNA 及蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$),红色荧光减弱;与空载组比较,Id1 过表达组中 NF-κB mRNA 及蛋白表达水平均显著提高($P<0.05$);与 Id1 过表达组比较,Id1 过表达+LY294002 组中 NF-κB mRNA 及蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$),红色荧光减弱。**结论** Id1 对垂体瘤中 NF-κB 的表达具有正向调控作用。

[关键词] 垂体肿瘤;抑制分化因子 1;NF-κB 信号通路

[中图分类号] R739.41 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)10-1564-06

Role of Id1 in improving the invasiveness
of pituitary tumor via regulating NF-κB^{*}

LI Yiyun,LI Meihua,YU Nianzu

(Department of Neurosurgery,the First Affiliated Hospital of Nanchang
University,Nanchang,Jiangxi 330006,China)

[Abstract] **Objective** To explore the role of inhibitor of DNA binding or differentiation1 (Id1) in regulating nuclear factor kappa B (NF-κB) signaling pathways in pituitary tumor. **Methods** The expression of Id1 and NF-κB in invasive and non-invasive pituitary tumor was detected by Realtime PCR,Western blot and immunofluorescence. The Id1-pcDNA3.1 overexpression vector was constructed,and the mouse pituitary tumor αT3-1 cells was cultured with Id1-pcDNA3.1 overexpression vector and NF-κB blocker LY294002. The cells were divided into the untreated group (the control group),the NF-κB blocker LY294002 group (the LY294002 group),the Id1 overexpression group,the empty+LY294002 group,the Id1 overexpression group,the Id1 overexpression+LY294002 group. The expression of NF-κB was detected by Real-time PCR,Western blot and immunofluorescence. **Results** The results of Realtime PCR and Western blot showed that the expressions of Id1 and NF-κB mRNA and protein in invasive pituitary tumors were significantly higher than those in non-invasive pituitary tumor ($P<0.05$). The results of immunofluorescence showed that NF-κB was mainly located in nucleus. The results of enzyme digestion confirmed construction of Id1 pcDNA3.1 overexpression vector was successful. The results of Realtime PCR,Western blot and immunofluorescence showed that compared with the control group,the expression of NF-κB mRNA and protein,the red fluorescence decreased significantly in the LY294002 group and the Id1 overexpression+LY294002 group ($P<0.05$). Compared with the empty group,the expression of NF-κB mRNA and protein significantly increased in the Id1 overexpression group ($P<0.05$). Compared with the Id1 overexpression group,the expression of NF-κB mRNA and protein,and the red fluorescence decreased in the Id1 overexpression+LY294002 group ($P<0.05$). **Conclusion** Id1 had a positive

^{*} 基金项目:江西省重点研发计划项目(20161BBG70161)。 作者简介:李义云(1973—),副主任医师,硕士,主要从事颅底肿瘤研究。

regulatory effect on the expression of NF- κ B in pituitary tumor.

[Key words] pituitary neoplasms; Id1; NF- κ B

垂体瘤虽然是一种良性的颅内肿瘤,但常常侵犯骨质、硬脑膜等重要脑内组织结构^[1-2]。其治疗手段包括手术治疗、放射治疗和药物治疗等,但手术切除困难、术后复发率高仍然困扰着神经外科医生。近来,WHO 把能够通过脑脊液和人体系统播散的垂体瘤定义为“垂体癌”,侵袭性垂体瘤诊断需要借助影像学、组织学、临床表现及一些生物分子标志物^[3-4]。因此探讨侵袭性垂体瘤发病机制,寻找有效生物标记物对于垂体瘤的治疗具有重要意义。细胞外基质降解酶(MMP)-2、MMP-9 在垂体瘤的侵袭转移过程中发挥着重要作用^[4],抑制分化因子(inhibitor of DNA binding or differentiation, Id1)与 MMP-2、MMP-9 在多种恶性肿瘤中共表达,提示 Id1 可能通过调控 MMP-2、MMP-9 表达参与肿瘤的发生发展^[5-6]。而且研究还发现 Id1 能够通过调控 NF- κ B/MMPs 信号通路促进血管内皮组织细胞增殖及肿瘤组织血管再生和侵袭性生长^[7]。NF- κ B 也能够调节下游信号蛋白 MMP-2、MMP-9 表达进而促进肿瘤细胞的侵袭转移^[8-9],提示 Id1 可能通过调控 NF- κ B/MMP-2、MMP-9 信号通路影响垂体瘤的侵袭。所以本研究将探讨 Id1 是否能够调控 NF- κ B 信号通路表达,以便进一步了解垂体瘤侵袭性机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

Trizol Reagent, Ultrapure RNA 超纯 RNA 提取试剂盒, HiFiScript cDNA 第一链合成试剂盒, BCA 试剂盒, 山羊抗兔 IgG Cy3 均购自北京康为世纪生物科技有限公司; OPTI-MEM[®] I 购自美国 Gibco 公司; 兔抗 Id1、NF- κ B 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司, 批号分别为 ab230679、ab16502; 鼠抗 GAPDH 单克隆抗体、辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)、辣根酶标记山羊抗鼠 IgG(H+L)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号分别为 TA-08、ZB-2301、ZB-2305; 兔抗 NF- κ B p65 多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司, 批号 bs-0465R; 即用型 DAPI 染液购自南京凯基生物技术有限公司, 批号 KGA215-50; LipofectamineTM3000 脂质体购自美国 Invitrogen 公司; LY294002(NF- κ B 阻断剂)购自美国 MCE 公司; MF53 倒置显微镜购自广州市明美光电有限公司。RT-6000 酶标分析仪购自美国 Rayto 公司; UV-1600PC 紫外可见分光光度计购自上海美谱达仪器有限公司; CFX ConnectTM 实时荧光 PCR 仪购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

本次实验分为实验(1)和实验(2),其中实验(1)对象

为侵袭性垂体腺瘤组织和非侵袭性腺体瘤组织;实验(2)对象为小鼠垂体腺瘤 α T3-1 细胞系,并将细胞分为未处理组(对照组)、NF- κ B 阻断剂 LY294002 组(LY294002 组)、空载组、空载+LY294002 组、Id1 过表达组、Id1 过表达+LY294002 组。其中 LY294002 用二甲基亚砜(DMSO)溶解,最终浓度为 50 μ mol/L。

1.2.2 Id1 过表达载体的建立

NCBI 查找 Id1 基因序列,引入酶切位点(Xba I / Xho I)生物合成基因片段[克隆至 pcDNA3.1(+)载体上]。质粒转化 DH5 α ,小提质粒,37 $^{\circ}$ C 酶切 2 h, 1%琼脂糖凝胶电泳分离条带,将 Id1-pcDNA3.1 菌种以 1:100 的比例接种于 50 mL LB 肉汤液体培养基(含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素)中,过夜培养,大提质粒,并酶切,琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.3 质粒的转染

125 μ L opti-MEM+5 μ L Lipofectamine[®] 3000 混匀,125 μ L opti-MEM+ $\geq$ 2.5 μ g Id1-pcDNA3.1 质粒(Id1 过表达组)或 pcDNA3.1 空白质粒(空载组)+5 μ L Lipofectamine[®] 3000 混匀,将两种混合物混匀,加入六孔板细胞中,此时小鼠垂体腺瘤 α T3-1 细胞生长融合度达 70%,转染 6 h,弃掉转染液,换新鲜培养基继续培养 48 h,利用 Realtime PCR 法检测转染效果。

1.2.4 Realtime PCR 检测 Id1、NF- κ B mRNA 的表达

收集组织或细胞,根据 Trizol Reagent 提取细胞总 RNA,紫外分光光度计检测总 RNA 浓度及纯度($A_{260}/A_{280}>2.0$ 说明 RNA 纯度良好),将 RNA 通过逆转录 HiFiScript cDNA 第一链合成试剂盒合成 cDNA,70 $^{\circ}$ C 10 min,再迅速冰浴 2 min,50 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 min,最后 Realtime PCR 进行扩增,操作体系:RNase Free ddH₂O 9.5 μ L,模板 1.0 μ L,上游引物 1.0 μ L,下游引物 1.0 μ L,2 $\times$ UltraSYBR Mixture 12.5 μ L。反应程序:预变性 95 $^{\circ}$ C 10 min;变性 95 $^{\circ}$ C 10 s,退火 57.5 $^{\circ}$ C 30 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 30 s,循环 30 次。扩增结果利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{试验}}} - \Delta C_{t_{\text{对照}}}$, $\Delta C_{t_{\text{试验}}} = C_{t_{\text{目的}}} - C_{t_{\text{内参}}}$, $\Delta C_{t_{\text{对照}}} = C_{t_{\text{目的}}} - C_{t_{\text{内参}}}$ 。引物如下。Id1 上游引物:5'-TGT CTG TCT GAG CAG AGC GTG-3',下游引物:5'-CCA ACT GAA GGT CCC TGA TGT A-3',产物长度 220 bp;NF- κ B 上游引物:5'-ACC CAC CCC ACC ATC AA-3',下游引物:5'-CAG AGC CGC ACA GCA TT-3',产物长度 331 bp;GAPDH 上游引物:5'-GAA GGT CGG AGT CAA CGG AT-3',下游引物:5'-CCT GGA AGA TGG TGA TGG G-3',产物长度 224 bp。

1.2.5 Western blot 检测 Id1、NF-κB 的表达

将适量的 RIPA 裂解液加入组织或细胞中,裂解,离心收集上清液,获得总蛋白。BCA 试剂盒对蛋白浓度进行测定。蛋白上样,进行凝胶电泳,后湿法转 PVDF 膜。一抗溶液(兔抗 Id1、NF-κB 多克隆抗体,小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体,稀释度 1:100)4℃ 孵育过夜;二抗溶液(羊抗鼠 IgG、羊抗兔 IgG,稀释度 1:500)室温孵育 1~2 h。滴加 ECL 曝光液,在凝胶成像系统中曝光。

1.2.6 免疫荧光单染检测组织中 NF-κB 的表达

将组织切片放入 65℃ 烤箱中烤 2 h;切片在二甲苯放置 10 min,更换二甲苯再放置 10 min;将切片依次放入 100%乙醇、100%乙醇、95%乙醇、80%乙醇和纯化水中各 5 min。将切片放入修复盒中,加入抗原修复液(柠檬酸缓冲液),高压锅加热到自动放气,2 min 后离开热源自然冷却,弃去抗原修复液,将切片用磷酸盐缓冲液(PBS)淋洗。0.5% Triton X-100 室温通透 20 min。PBS 浸洗玻片 3 次,每次 5 min,吸水纸吸干 PBS,在玻片上滴加 5% 血清清蛋白(BSA),37℃ 封闭 30 min。滴加一抗 NF-κB P65(1:500),并放入湿盒,4℃ 孵育过夜;玻片复温至室温后,PBS 浸洗玻片 3 次,每次 3 min,滴加稀释好的荧光二抗 Cy3(1:200),湿盒中 37℃ 孵育 30 min。滴加 4,6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI)避光孵育 5 min,对标本进行染核,用 PBS 冲洗多余的 DAPI,再用自来水冲洗 1 min。用吸水纸吸干玻片上的液体,用含抗荧光淬灭剂的封片液封片。然后在荧光显微镜下观察采集图像。

1.2.7 免疫荧光检测细胞中的表达

将收集好的悬浮细胞在 EP 管中用 PBS 浸洗 3 次,每次 3 min,然后进行涂片;玻片上的细胞干燥后用 4%多聚甲醛固定 15 min,PBS 浸洗载玻片 3 次,每次 3 min;0.5% Triton X-100 室温通透 20 min。PBS 浸洗载玻片 3 次,每次 5 min,擦干 PBS,在载玻片内滴加 5% BSA,37℃ 封闭 30 min。滴加一抗 NF-κB P65(1:200),4℃ 孵育过夜。PBS 浸洗载玻片 3 次,每次 3 min,滴加稀释好的荧光二抗 Cy3(1:200),37℃ 孵育 30 min,PBS 浸洗载玻片 3 次,每次 3 min;注意:从加荧光二抗起,后面所有操作步骤都尽量在较暗处进行。滴加 DAPI 避光孵育 5 min,对标本进行染核,用 PBS 冲洗多余的 DAPI;用 50%甘油封闭培养皿,然后在荧光显微镜下观察采集图像。红色荧光为检测的目的蛋白,蓝色荧光为细胞核。

1.3 统计学处理

所有数据均用 SPSS17.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 侵袭性垂体瘤和非侵袭性垂体瘤中 Id1 及 NF-κB 的表达

Realtime PCR 结果显示:与非侵袭性垂体瘤比较,侵袭性垂体瘤中 Id1 及 NF-κB mRNA 表达水平显著提高($P < 0.01$);Western blot 结果显示:与非侵袭性垂体瘤比较,侵袭性垂体瘤中 Id1 及 NF-κB 表达水平显著提高($P < 0.01$);免疫荧光显示:NF-κB 主要定位于细胞质中,见图 1~4。

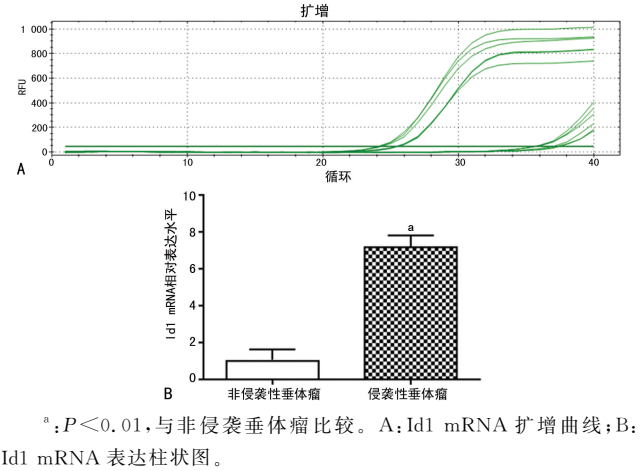


图 1 侵袭性垂体瘤和非侵袭性垂体瘤中 Id1 mRNA 的表达

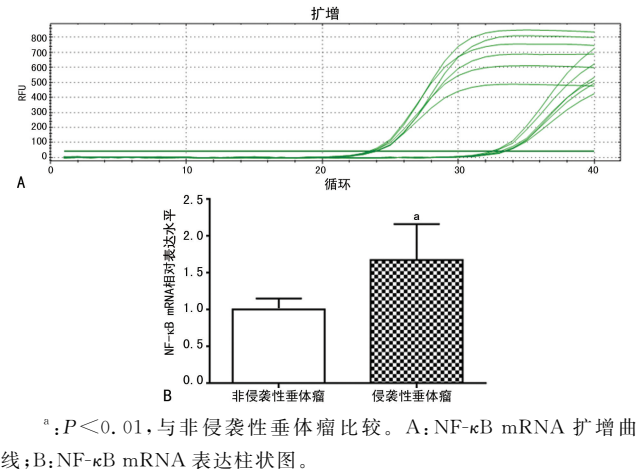


图 2 侵袭性垂体瘤和非侵袭性垂体瘤中 NF-κB mRNA 的表达

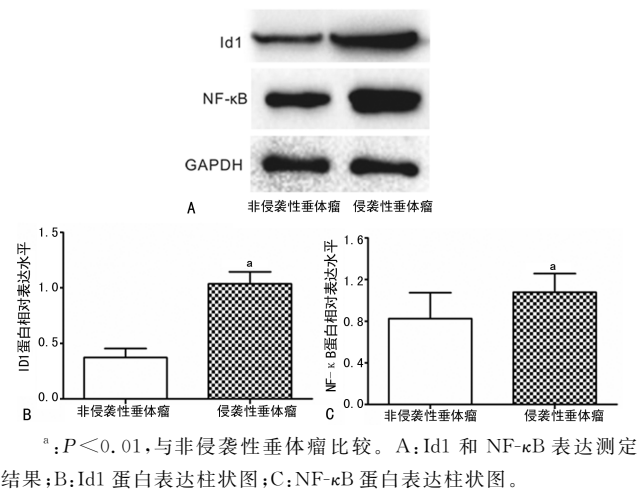


图 3 侵袭性垂体瘤和非侵袭性垂体瘤中 Id1 和 NF-κB 蛋白表达

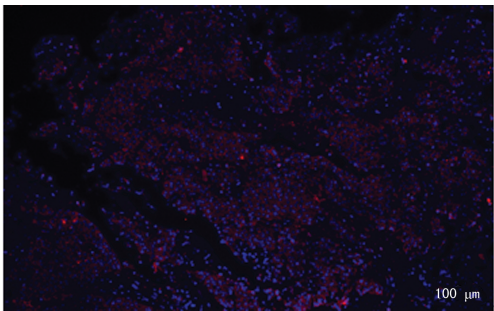
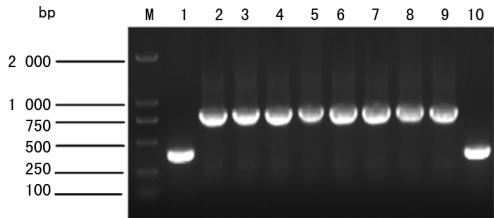


图 4 侵袭性垂体瘤中 NF-κB 的定位表达(×100)

2.2 菌落 PCR 电泳结果

用引物 pcDNA3.1-F/pcDNA3.1-R PCR 扩增质粒 pcDNA3.1 理论上应有 379 bp 的条带,而 Id1 基因片段大小为 477 bp,即 Id1-pcDNA3.1 经菌落 PCR 后,理论上会得到 856 bp 的条带。电泳结果与理论值相符,有 8 个阳性点,见图 5。



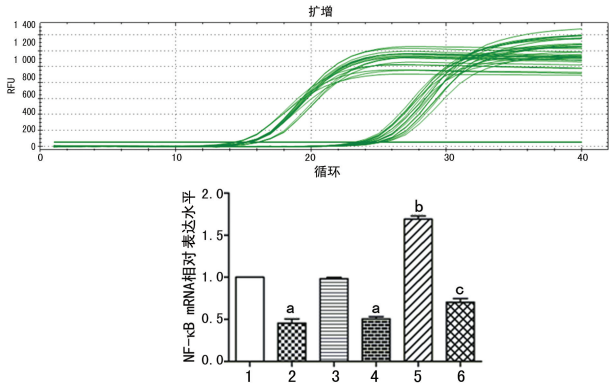
M:DNA 分子量标准;1:pcDNA3.1 质粒;2~10:Id1-pcDNA3.1。

图 5 菌落 PCR 电泳结果

2.3 Id1 过表达对小鼠垂体腺瘤 αT3-1 细胞中 NF-κB 表达水平的影响

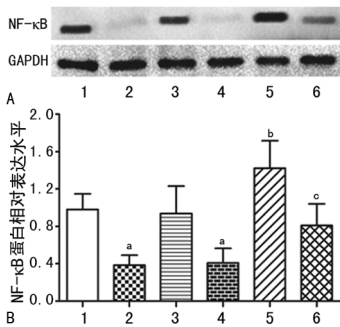
Realtime PCR、Western blot 及免疫荧光实验结果显示:与对照组比较,LY294002 组及空载+LY294002 组中 NF-κB mRNA 及蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$),红色荧光减弱;与空载组比较,Id1 过表达组中 NF-κB mRNA 及蛋白表达水平均显著提高($P<0.05$),红色荧光增强;与 Id1 过表达组比较,Id1 过表达+LY294002 组中 NF-κB mRNA 及蛋白

表达水平均显著降低($P<0.05$),红色荧光减弱,见图 6~8。



1:对照组;2:LY294002 组;3:空载组;4:空载+LY294002 组;5:Id1 过表达组;6:Id1 过表达+LY294002 组;^a: $P<0.01$,与 1 组比较;^b: $P<0.01$,与 3 组比较;^c: $P<0.01$,与 5 组比较。A:NF-κB mRNA 扩增曲线;B:NF-κB mRNA 表达柱状图。

图 6 各组小鼠垂体腺瘤 αT3-1 细胞中 NF-κB mRNA 表达



1:对照组;2:LY294002 组;3:空载组;4:空载+LY294002 组;5:Id1 过表达组;6:Id1 过表达+LY294002 组;^a: $P<0.01$,与 1 组比较;^b: $P<0.01$,与 3 组比较;^c: $P<0.01$,与 5 组比较。A:NF-κB 蛋白表达测定结果;B:NF-κB 蛋白表达柱状图。

图 7 各组小鼠垂体腺瘤 αT3-1 细胞中 NF-κB 蛋白表达

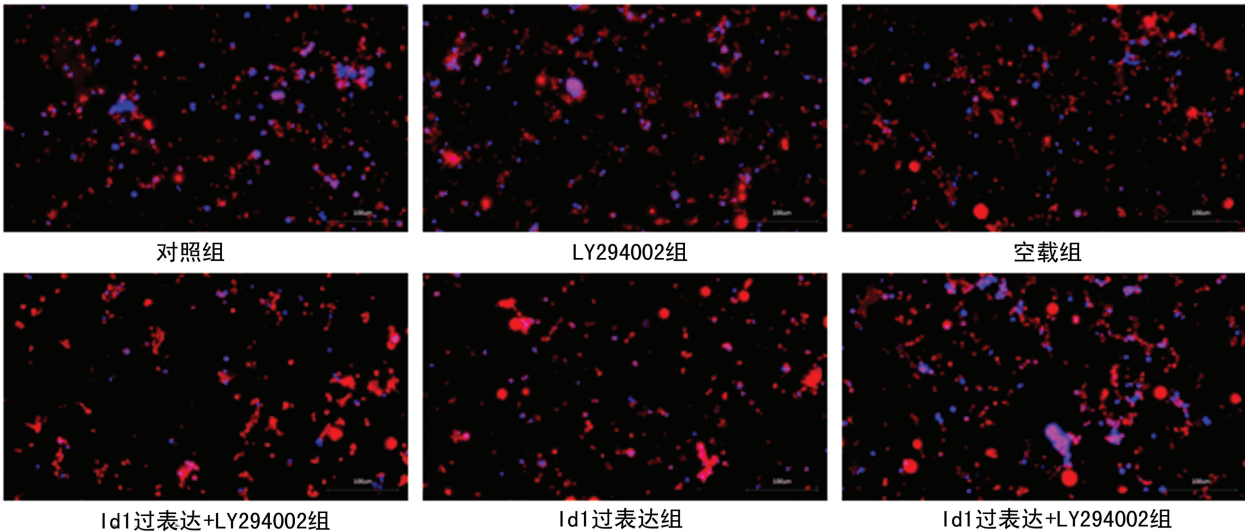


图 8 免疫荧光检测各组小鼠垂体腺瘤 αT3-1 细胞中 NF-κB 表达(×200)

3 讨 论

分化抑制因子 Id 是 helix-loop-helix(HLH)蛋白家族的亚家族,包括 Id1、Id2、Id3、Id4。自 1990 年 Id 家族被克隆后,有研究发现 Id 蛋白由于缺乏碱性 DNA 结合域,因此能够与 bHLH 竞争性形成无功能的异源二聚体,进而阻止 DNA 在 E boxes、N boxes 等位点与 bHLH 的结合,最终抑制 bHLH 的转录活性。Id1 作为 Id 蛋白家族成员之一,其所介导的信号通路是目前肿瘤侵袭转移的研究热点之一^[10]。研究表明,Id1 在 20 多种肿瘤组织中呈现高表达,而且这种高表达能够促进肿瘤细胞的生长、侵袭转移。如 Id1 在乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌中高表达,且高表达的 Id1 与肿瘤的侵袭性呈正相关^[10-11]。Id1 在前列腺癌中通过使抑癌基因 p16/Rb 失活,进而诱导癌细胞扩散,同时还通过 Raf-1/MAPK 信号途径促进肿瘤细胞增殖^[12]。另外研究也证实,在肺癌中 Id1 mRNA 和蛋白水平均升高,而小分子 RNA 抑制 Id1 表达的同时减弱了癌细胞的侵袭和转移能力^[13]。这些研究充分说明了 Id1 在肿瘤的侵袭过程中起着重要作用。而 Id1 在垂体瘤中的研究较少,因此本研究采用 Real-time PCR、Western blot 检测了侵袭性垂体瘤和非侵袭性垂体瘤中 Id-1 的表达,结果表明侵袭性垂体瘤中 Id1 mRNA 及蛋白表达水平均高于非侵袭性垂体瘤,从而说明 Id1 在垂体瘤侵袭过程中的重要性。而且以往研究还发现,Id1 能够通过调控 NF- κ B/MMPs 信号通路促进血管内皮细胞增殖及肿瘤组织血管再生和侵袭性生长^[7]。Id1 促进小鼠胰岛内皮细胞 MS1 及人脐静脉内皮细胞血管生成,而敲除 Id1 表达后,能显著下调 PI3K/AKT、NF- κ B 及 NOS 信号通路并抑制 Id1 诱导的内皮细胞血管生成^[14]。NF- κ B 也能够调节下游信号蛋白 MMP-2、MMP-9 表达进而促进肿瘤细胞的侵袭转移^[8-9]。提示 Id1 可能通过调控 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达,进而影响垂体瘤的侵袭性。

NF- κ B 是 1986 年从 B 淋巴细胞核中抽提出来的的一种核蛋白,属于 Rel 蛋白家族,具有 Rel 同源结构域,能够与相关基因的启动子或者增强子 DNA 特异性结合后,携带有核定位的信号,进而使自身由细胞质向细胞核移动,进而调控原癌基因,调节侵袭转移的表达,因此在肿瘤的发生发展过程中起着重要作用。CHEN 等^[15]研究表明 NF- κ B、MMP-9 在垂体瘤中的表达显著高于正常组织,且 NF- κ B 被激活后能显著上调 MMP-9 表达,进而促进垂体瘤发生免疫逃逸。本研究 Realtime PCR、Western blot 结果表明侵袭性垂体瘤中 NF- κ B mRNA 及蛋白表达水平均高于非侵袭性垂体瘤,且免疫荧光实验结果表明 NF- κ B 定位于细胞核中。从而说明高表达的 NF- κ B 促进垂体瘤的侵袭。因此为了进一步证实 Id1 对侵袭性垂体瘤中 NF- κ B 的调控作用,本研究通过构建 Id1-pcDNA3.1

过表达载体,并将构建成功的 Id1-pcDNA3.1 过表达载体与 NF- κ B 阻断剂 LY294002 组共同作用小鼠垂体腺瘤 α T3-1 细胞,并通过 Realtime PCR、Western blot 及免疫荧光法检测各组细胞中 NF- κ B 的表达。酶切结果证实 Id1-pcDNA3.1 过表达载体构建成功。Realtime PCR、Western blot 及免疫荧光实验结果显示:与对照组比较,LY294002 组及空载+LY294002 组中 NF- κ B mRNA 及蛋白表达水平均显著降低、红色荧光减弱;与空载组比较,Id1 过表达组中 NF- κ B mRNA 及蛋白表达水平均显著提高、红色荧光增强;与 Id1 过表达组比较,Id1 过表达+LY294002 组中 NF- κ B mRNA 及蛋白表达水平均显著降低、红色荧光减弱。从而说明 Id1 对 NF- κ B 信号通路影响垂体瘤的侵袭。

综上所述,侵袭性垂体瘤中 Id1、NF- κ B mRNA 及蛋白表达水平均高于非侵袭性垂体瘤,且 Id1-pcDNA3.1 过表达载体与 NF- κ B 阻断剂 LY294002 共同作用小鼠垂体腺瘤 α T3-1 细胞实验结果表明,Id1 能够通过调控 NF- κ B 信号通路影响垂体瘤的侵袭性。

参考文献

- [1] ANDELA C D,LOBATTO D J,PEREIRA A M,et al. How non-functioning pituitary adenomas can affect health-related quality of life: a conceptual model and literature review[J]. Pituitary,2018,21(suppl 2):208-216.
- [2] MAGHATHE T,MILLER W K,MUGGE L,et al. Immunotherapy and potential molecular targets for the treatment of pituitary adenomas resistant to standard therapy: a critical review of potential therapeutic targets and current developments [EB/OL]. (2018-07-17) [2019-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30014686>.
- [3] ROELFSEMA F,BIERMASZ N R,PEREIRA A M. Clinical factors involved in the recurrence of pituitary adenomas after surgical remission: a structured review and meta-analysis[J]. Pituitary,2012,15(1):71-83.
- [4] LIU H Y,GU W J,WANG C Z,et al. Matrix metalloproteinase-9 and-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in invasive pituitary adenomas A systematic review and meta-analysis of case-control trials[J]. Medicine (Baltimore),2016,95(24):e3904.
- [5] HUNG Y H,CHANG S H,HUANG C T,et al. Inhibitor of differentiation-1 and Hypoxia-Inducible factor-1 mediate sonic hedgehog induction by amyloid Beta-Peptide in rat cortical

- neurons[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(2): 793-809.
- [6] VIALES R R, DIOTEL N, FERG M A, et al. The Helix-Loop-Helix protein Id1 controls stem cell proliferation during regenerative neurogenesis in the adult zebrafish telencephalon[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(3): 892-903.
- [7] SU Y J, GAO L J, TENG L C, et al. Id1 enhances human ovarian cancer endothelial progenitor cell angiogenesis via PI3K/Akt and NF-kappa B/MMP-2 signaling pathways [J]. *J Transl Med*, 2013, 11: 132.
- [8] HUANG H, DU T, XU G B, et al. Matrine suppresses invasion of castration-resistant prostate cancer cells by downregulating MMP-2/9 via NF-kappa B signaling pathway[J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(2): 640-648.
- [9] WANG W, WANG J Y. Toll-Like receptor 4 (TLR4)/cyclooxygenase-2 (COX-2) regulates prostate cancer cell proliferation, migration, and invasion by NF-kappa B activation[J]. *Medical Science Monitor*, 2018, 24: 5588-5597.
- [10] LING F, KANG B, SUN X H. Id proteins: small molecules, mighty regulators[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2014, 110: 189-216.
- [11] CASTANON E, SOLTERMANN A, LOPEZ I, et al. The inhibitor of differentiation-1 (Id1) enables lung cancer liver colonization through activation of an EMT program in tumor cells and establishment of the pre-metastatic niche [J]. *Cancer Lett*, 2017, 402: 43-51.
- [12] AHLQVIST K, SAAMARTHY K, KHAJA A, et al. Expression of Id proteins is regulated by the Bcl-3 proto-oncogene in prostate cancer [J]. *Oncogene*, 2013, 32(12): 1601-1608.
- [13] KIM M S, PARK T I, LEE Y M, et al. Expression of Id-1 and VEGF in non-small cell lung cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(10): 2102-2111.
- [14] TSAI C H, YANG M H, HUNG A C, et al. Identification of Id1 as a downstream effector for arsenic-promoted angiogenesis via PI3K/Akt, NF-kappa B and NOS signaling[J]. *Toxicol Res (Camb)*, 2016, 5(1): 151-159.
- [15] CHEN Z, LI Z, CHANG Y, et al. Relationship between NF-kappaB, MMP-9, and MICA expression in pituitary adenomas reveals a new mechanism of pituitary adenomas immune escape[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 597: 77-83.

(收稿日期: 2019-10-18 修回日期: 2019-12-29)

(上接第 1563 页)

- [10] LI Y, ZENG Z, CAO Y, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 prevents lipopolysaccharide-induced rat acute lung injury via suppressing the ERK1/2 and NF-κB signaling pathways [J]. *Sci Rep*, 2016, 15(6): 27911.
- [11] KANGUSSU L M, DE ALMEIDA T C S, PRESTES T R R, et al. Beneficial effects of the angiotensin-converting enzyme 2 activator dize in renovascular hypertension[J]. *Protein Pept Lett*, 2019, 26(7): 523-531.
- [12] TAO L, QIU Y, FU X, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 activator diminazene aceturate prevents lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibiting MAPK and NF-κB pathways in human retinal pigment epithelium [J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13: 35.
- [13] BRUCE E B, SAKARYA Y, KIRICHENKO N, et al. ACE2 activator diminazene aceturate reduces adiposity but preserves lean mass in young and old rats[J]. *Experimental Gerontology*, 2018, 111(1): 133-140.
- [14] CAO X, YANG F, SHI T, et al. Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas axis activates Akt signaling to ameliorate hepatic steatosis[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21592.
- [15] RAFFAI G, KHANG G, VANHOUTTE P M. Angiotensin-(1-7) augments endothelium-dependent relaxations of porcine coronary arteries to bradykinin by inhibiting angiotensin-converting enzyme 1 [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2014, 63(5): 453-460.
- [16] YANG X H, WANG Y H, WANG J J, et al. Role of angiotensin-converting enzyme (ACE and ACE2) imbalance on tourniquet-induced remote kidney injury in a mouse hindlimb ischemia-reperfusion model[J]. *Peptides*, 2012, 36(1): 60-70.

(收稿日期: 2019-12-14 修回日期: 2020-04-12)