

Id-2在结直肠癌组织中的表达及临床意义

韩芸¹, 王强²(什邡市人民医院肿瘤内科¹、检验科², 四川 什邡 618400)

【摘要】 目的 探讨分化抑制因子2 (Id-2)在人结直肠癌组织中的表达及其与患者临床病理参数和预后的关系。方法 选择2013年1月至2015年6月在我院手术治疗的结直肠癌患者56例为研究对象。采用免疫组织化学法检测所有患者肠癌组织和其中26例患者癌旁正常肠上皮组织中Id-2的表达水平,比较阳性与阴性表达者间的年龄、性别、病理分级、临床分期、淋巴结转移和预后的差异。结果 免疫组织化学染色显示,Id-2主要表达于胞浆,其在肠癌组织和癌旁组织中的阳性表达率分别为64.3% (36/56)和34.6% (9/26),癌组织阳性表达率明显高于癌旁组织,差异有统计学意义($P<0.05$);临床病理特征分析显示,在结直肠癌中,Id-2阳性表达与患者TNM分期($P<0.05$)、病理分级($P<0.05$)和淋巴结转移($P<0.05$)有关,阳性患者Ⅲ~Ⅳ、低分化及有淋巴结转移者比例明显高于阴性患者,差异均有统计学意义($P<0.05$);Id-2阳性患者的中位无疾病进展生存时间为24.7个月,阴性患者为38.5个月,两组比较差异有统计学意义($HR=2.23$, 95%CI: 1.02~4.87, $P<0.05$)。结论 Id-2蛋白可能与结直肠癌的发生发展有关,且阳性患者预后较差。

【关键词】 结直肠癌;分化抑制因子2;免疫组织化学;临床病理参数;生存时间

【中图分类号】 R735 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2016)14-2246-03

Clinical significance of inhibitor of differentiation 2 expression in colorectal cancer. HAN Yun¹, WANG Qiang².
Department of Oncology¹, Department of Clinical Laboratory², Shifang People's Hospital, Shifan 618400, Sichuan, CHINA

【Abstract】 Objective To evaluate the association between inhibitor of differentiation 2 (Id2) expression and clinical characteristic in patients with colorectal cancer. **Methods** Fifty-six patients with colorectal cancer, who underwent surgery in our hospital from Jan 2013 to Jun 2015, were enrolled in this study. The Id2 expression of 56 cases of cancer tissue and 26 cases of normal tissue were tested by immunohistochemistry. The associations between inhibitor of differentiation 2 expression and age, gender, pathology grading lymph node metastasis and prognosis in colorectal patients were analyzed. **Results** The immunohistochemistry showed that Id2 was general expressed in the cytolymph. The positive expression rate of Id2 in cancer tissue [64.3% (36/56)] was significantly higher than that in normal tissue [34.6% (9/26)], $P<0.05$. Clinical pathological features analysis showed a significant association between Id2 positive expression and clinical stage ($P<0.05$), pathology grading ($P<0.05$), lymph node metastasis ($P<0.05$). The proportion of poor differentiation, stage Ⅲ~Ⅳ, lymph node metastasis in Id2 positive expression patients was significantly higher than those in negative expression patients ($P<0.05$). The median survival time of disease progression in Id2 positive patients (24.7 months) was significantly lower than that in Id2 negative patients (38.5 months), $P<0.05$. **Conclusion** Id2 may play an important role in the development of colorectal cancer, which could be a biomarker for prognosis.

【Key words】 Colorectal cancer; Inhibitor of differentiation 2 (Id2); Immunohistochemistry; Clinical characteristics; Survival time

分化抑制因子2 (Inhibitor of differentiation 2, Id-2)属于螺旋-环-螺旋(HLH)蛋白家族的Id家族成员,分子生物学功能研究显示,其能够负性调控bHLH转录因子的活性^[1]。因而在肿瘤细胞增殖、分化、侵袭和转移等方面具有总要功能。近年来研究显示Id-2在多种肿瘤组织中呈现高表达并与患者的预后不良有关^[2-3]。本研究采用免疫组织化学SP法检测结直肠癌组织及癌旁组织中Id-2表达水平探讨其与患者临床特征及预后的关系,为临床结直肠癌的诊治及预后工作提供一定的参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2013年1月至2015年6月我院手术治疗的结直肠癌患者56例为研究对象。采用免疫组织化学法检测所有患者肠癌组织和其中26例患者癌旁正常肠上皮组织中Id-2的表达水平。病例纳入标准:术后病理学确诊为结直肠癌;临床病理资料完整;有随访数据;组织病理标本获取经家属书面同意。排除标准:术前接受过新辅助放化疗或生物治疗者;病理学诊断不明确者;合并其他系统恶性肿瘤者;临床病理资料不全者。56例结直肠癌患者中男

基金项目:四川省德阳市2014年度重点科学技术研究项目(编号:2014SZ100-2)

通讯作者:韩芸。E-mail: huanyun_sf@sina.com

性31例,女性25例,平均年龄(57.2 ± 16.6)岁,临床分期I~II期25例,III~IV期31例。

1.2 仪器与试剂 石蜡切片机(购自德国徕卡公司);显微镜(购自日本奥林巴斯公司)、电热恒温箱(上海荣珂检测仪器有限公司生产)、微波炉,台式离心机(购自BechmanCoulter公司)。

1.3 主要试剂 鼠抗人Id-2多克隆抗体购自北京中杉金桥有限公司;即用型免疫组织化学法试剂盒购自上海美轩生物科技有限公司;DAB显示试剂盒购自北京中杉金桥有限公司;以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照,以已知阳性对照片为阳性对照。

1.4 Id-2免疫组化检测 脱蜡和水化:肿瘤组织石蜡包埋后进行组织切片($4 \sim 7 \mu\text{m}$),然后二甲苯洗涤切片3次,每次5 min进行脱蜡;接着分别用100%和95%的乙醇洗涤切片各3次,每次5 min,进行水化。灭活内源性过氧化物酶:将切片置于3% H_2O_2 (30% H_2O_2 :甲醇=1:9)中,避光孵育15 min; dH_2O 润洗5 min。抗原修复:将切片置于抗原修复液(浓缩液:水=15 mL:1 600 mL)中,微波修复25 min,在微波过程中应随时加满抗原修复液,5 min加一次。洗涤:室温冷却20 min,以蒸馏水冲洗后,用TBST洗涤两次,每次5 min。封闭:用100 μL 含10%的正常驴血清(TBST稀释)将滴在组织处,并用剪切好的卫生纸覆盖,湿盒里孵育1 h。加一抗:加入实验所需一抗,用10%血清稀释到合适的终浓度,滴在组织处,并用卫生纸覆盖放

入湿盒中,4℃ 孵育过夜,同时以同型抗体作为阴性对照。洗涤:用TBST洗涤3次,每次15 min。加二抗:加入HRP标记的二抗(稀释比例为1:100),室温孵育1 h。显色:根据实验中所用的显色试剂盒,根据要求操作。一般可用亲和素生物素过氧化物酶复合物(ABC)、3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)显色。苏木精复染:用苏木精染核2~4 min。反蓝:用1%盐酸处理1 min。洗涤封片: dH_2O 洗涤2次,5~10 min,封片,干燥后显微镜先观察拍照。

1.5 阳性结果判定^[4] 采用双盲法对染色结果进行判定,在显微镜下每张载玻片计数5个视野,计数每个视野中细胞总数及Id-2阳性的细胞数。阳性细胞均以细胞质中出现棕黄色颗粒为主。阳性细胞<5%为(-);阳性细胞5%~25%为(+);阳性细胞25%~50%为(++);阳性细胞>50%为(+++)。

1.6 统计学方法 应用SPSS17.0统计软件进行数据分析,计数资料采用率表示,组间比较采用 χ^2 检验或者Fisher确切概率检验;生存分析采用风险比例模型Log-rank检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Id-2蛋白表达 免疫组织化学染色显示,Id-2主要表达于胞浆,呈棕黄色或棕褐色颗粒(图1)其在肠癌组织和癌旁组织中的阳性表达率分别为64.3% (36/56)和34.6% (9/26),癌组织显著高于癌旁组织($P < 0.05$)。

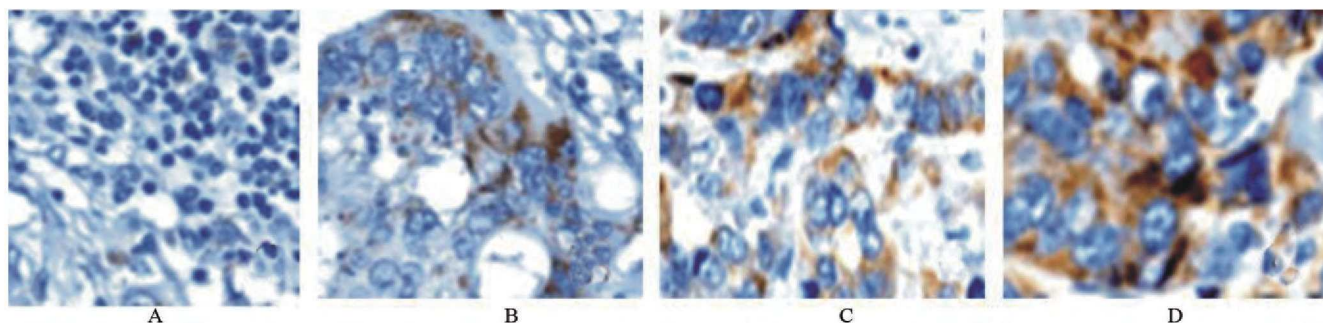


图1 Id-2蛋白在癌组织中的表达($\times 40$)

注:A,阴性;B,+;C,++;D,+++。

2.2 Id-2表达与临床病理参数关系 临床病理特征分析显示,在上结直肠癌中Id-2阳性表达与患者TNM分期($P < 0.05$)、病理分级($P < 0.05$)和淋巴结转移($P < 0.05$)移有关,阳性患者III~IV、低分化及有淋巴结转移者比例明显高于阴性者,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

2.3 Id-2表达与患者预后 Id-2阳性患者的中位无疾病进展生存时间为24.7个月,阴性患者为38.5个月,两组比较差异有统计学意义($\text{HR} = 2.23$, 95%CI: 1.02~4.87, $P < 0.05$),见图2。

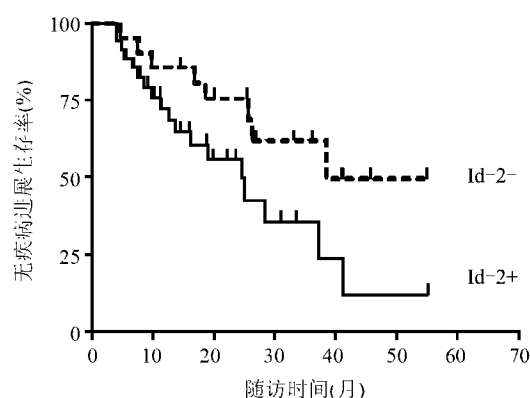


图2 Id-2表达与患者无疾病进展生存时间

表1 Id-2表达与临床病理特征关系(例)

临床病理	例数	Id-2 表达		χ^2 值	P值
		阳性(n=36)	阴性(n=20)		
年龄(岁)				0.25	>0.05
≤50	20	12	8		
>50	36	24	12		
性别				0.27	>0.05
男	31	19	12		
女	25	17	8		
TNM				11.60	<0.05
I~II	25	10	15		
III~IV	31	26	5		
分化程度				2.22	<0.05
高中分化	22	12	10		
低分化	34	24	10		
病理类型				0.08	>0.05
乳头状腺癌	21	13	8		
管状腺癌	26	17	9		
其他	9	6	3		
区域淋巴转移				2.01	<0.05
有	33	24	9		
无	23	12	11		

3 讨论

结直肠癌是临床上较为常见的一类消化系统肿瘤,新近的肿瘤流行病学研究显示,北美2012年新发结直肠癌患者约为14万,死亡患者5万,结直肠癌已成为美国发病率和死亡率较高的恶性肿瘤之一^[5]。在我国尚缺乏相对完整的全国范围内实体肿瘤或结直肠癌流行病学数据,但区域性发病率研究显示,近年来随着人口老龄化的加剧、饮食结构及生活方式的改变,我国结直肠癌的发病率呈现出了上升趋势和年轻化趋势^[6]。目前,结直肠癌的发病原因及侵袭转移的分子机制并不十分清楚,但普遍认为其是一个涉及多个基因多个步骤的分子生物学过程,包括多个癌基因的激活和抑癌基因的失活。

Id-2是1990年由Benezra等^[7]发现的一个癌基因,初期的研究结果认为其与肿瘤细胞的增殖和分裂有关。随后的研究发现,Id-2同时具有细胞周期调控和抑制细胞凋亡的功能。近年来的研究发现,在多种肿瘤细胞和组织中Id-2呈现高表达而在对应的正常细胞或正常组织中呈现低表达,提示其在实体肿瘤的发生发展中可能发挥重要作用^[8]。杨维群等^[9]采用免疫组织化学检测了122例食管鳞状细胞癌及90例癌旁正常组织中Id-2的表达情况,结果显示,食管鳞状细胞癌中Id-2表达高于癌旁正常组织,且其阳性表达与肿瘤的分化程度和浸润深度有关。因而,该研究认为Id-2是食管鳞癌一个重要的分子学改变,Id-2可作为判断食管鳞状细胞癌生物学行为的潜在指标。单铁英等^[10]探讨了直肠癌组织中Id-2表达与患者临床病理

学参数的关系,该研究提示Id-2表达水平与直肠癌的发生发展存在着密切的关系,直肠癌组织中Id-2高表达可能是通过MMP-9途径来促进肿瘤的侵袭转移。我们的研究发现,结直肠癌组织中Id-2阳性表达率显著高于癌旁正常组织,且阳性表达患者中低分化和淋巴结转移患者比例高于阴性患者,提示Id-2可能参与了结直肠癌的发生发展与侵袭转移过程,这与单铁英等^[10]的研究结论基本一致。同时我们根据患者肿瘤组织中Id-2的表达水平分为阴性组和阳性组,并采用Kaplan-meier风险比例模型探讨了Id-2表达水平与患者无疾病进展生存时间的关系,发现阳性患者中位无疾病进展生存时间显著低于阴性组,提示Id-2阳性患者预后不良,可作为转移复发的生物学指标。

Id-2参与多种肿瘤的发生发展侵袭转移已被多个研究证实,但其调控结直肠癌细胞恶性生物学行为的分子机制并不清楚。因此,应进一步以各种实体肿瘤细胞系为研究对象,综合采用多种分子生物学技术,在分子水平和体内探讨其调控细胞和生物体恶性表型的分子机制,为临床结直肠肿瘤靶向药物的研发提供理论依据。

参考文献

[1] Mohamed JS, Lopez MA, Cox GA, et al. Ankyrin repeat domain protein 2 and inhibitor of DNA binding 3 cooperatively inhibit myoblast differentiation by physical interaction [J]. J Biol Chem, 2013, 288 (34): 24560-24568.

[2] 杨维群, 邱建龙, 蔡玉梅, 等. p53和Id2蛋白在食管鳞状细胞癌的表达及其意义[J]. 解剖科学进展, 2014, 20(2): 151-153, 157.

[3] Nakashima A, Tamura M. Regulation of matrix metalloproteinase-13 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 gene expression by WNT3A and bone morphogenetic protein-2 in osteoblastic differentiation [J]. Front Biosci, 2006, 11: 1667-1678.

[4] 马颖, 杨向红, 林连捷, 等. PTEN和Caspase-3在大肠癌中的表达及临床意义[J]. 中国医科大学学报, 2010, 39(4): 290-292.

[5] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29.

[6] Fang JY, Dong HL, Sang XJ, et al. Colorectal cancer mortality characteristics and predictions in China, 1991-2011 [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(17): 7991-7995.

[7] Parodi MT, Varesio L, Tonini GP. The specific inhibitor of protein kinase C, 1-(5-isoquinolylsulfonyl)-2-methylpiperazine (H7), induces morphological change and cell differentiation of human neural crest-derived cell lineages [J]. FEBS Lett, 1990, 269(1): 4-6.

[8] 顾成磊, 孟元光, 赵亚力, 等. 分化抑制因子2在肿瘤中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(9): 1623-1625.

[9] 杨维群, 吴春林, 蔡玉梅, 等. 食管鳞状细胞癌组织中Id1和Id2的表达及其意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2010, 26(2): 144-147.

[10] 单铁英, 单铁强, 岳峰, 等. 直肠癌组织中Id-2和MMP-9的表达与临床病理学指标的关系[J]. 重庆医学, 2015, 44(31): 4392-4395.

(收稿日期:2016-01-12)