

网络出版时间: 2016-1-20 10:32:27 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160120.1032.068.html>

Id-1 在结直肠腺癌、腺瘤、正常黏膜中的表达及意义

武雪亮¹, 王立坤², 薛军¹, 杨东东², 屈明¹, 郭飞¹, 杨瑞敏³, 刘博⁴, 侯占富⁵

摘要 目的 研究 DNA 结合分化抑制蛋白 1 (Id-1) 在结直肠癌细胞增殖、分化过程中的重要作用。方法 选取手术切除腺瘤伴不典型增生 30 例(中低度 16 例、重度 14 例)、腺癌 50 例、邻近正常黏膜 50 例,通过免疫组化、荧光原位杂交方法检测其 Id-1 的表达情况,并研究其与结直肠癌相关临床病理因素之间的关系。结果 Id-1 蛋白在结直肠正常黏膜、中低度不典型增生腺瘤、重度不典型增生腺瘤、腺癌中的阳性表达率分别为 24.00%、31.25%、57.14%、72.00%; Id-1 mRNA 在结直肠正常黏膜、中低度不典型增生腺瘤、重度不典型增生腺瘤、腺癌中的阳性表达率分别为 20.00%、25.00%、57.14%、76.00%; Id-1 蛋白及 Id-1 mRNA 在正常黏膜组织、腺瘤伴中低度不典型增生、腺瘤伴重度不典型增生、腺癌中的阳性表达逐步增强 ($P < 0.01$); Kappa 一致性检验显示,在正常黏膜、腺瘤、腺癌组织中吻合系数分别为 $k = 0.791, 0.729, 0.905$; 从 TNM I ~ IV 期 Id-1 表达也逐渐增强,差异有统计学意义 ($P < 0.01$); Id-1 表达与肿瘤浆膜浸润、CEA(+)、淋巴结转移、肝转移及脉管浸润等密切相关 ($P < 0.01$),而与肿瘤大小及分化程度无关。结论 Id-1 异常表达在肿瘤癌变过程中发挥了重要作用,有望成为新的肿瘤监测指标,为临床诊治及预后判断指明新的方向。

关键词 结直肠癌; Id-1; 免疫组化; 原位杂交; 临床意义

中图分类号 R 735.37; R 735.35

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)02-0297-05

目前对结直肠癌的治疗仍以手术根治为主,但以早期治疗效果最佳,术后积极复查预防复发转移是关键^[1-2]。因而寻找有效、特异性高的生物学指标对结直肠癌的早期诊断及术后防治有极其重要的价值。DNA 结合分化抑制蛋白 1 (inhibitors of DNA

binding-1, Id-1) 是近年来研究较热的一种致癌基因,能抑制细胞分化、加速有丝分裂、调控细胞周期、诱导血管生成、加速肿瘤生长并转移^[3],在乳腺癌、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、肝癌、胰腺癌等肿瘤中均呈高表达^[4-8],但在结直肠癌方面研究较少。该实验通过对 Id-1 行免疫组化染色、原位杂交分析,旨在探讨 Id-1 在结直肠癌发生过程中的重要作用及与相关临床病理因素的联系,初步探讨其致癌机制。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2012 年 5 月~2014 年 5 月河北北方学院附属第一医院血管腺体外科手术切除的原发性结直肠癌组织 50 例、正常组织 50 例、腺瘤伴不典型增生 30 例(中低度 16 例、重度 14 例),癌组织取自癌灶中心处,另取标本残端切缘经病理证实为正常肠组织。术前行新辅助放化疗等针对性治疗。

1.2 免疫组化方法及试剂 兔抗人单克隆浓缩型 Id-1 抗体(克隆号 ab50932 R2-4 G6) 购于香港 Abcam 公司;链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶(SP)、DAB 试剂盒均购于美国 Abnova 公司。10% 甲醛溶液固定部分标本,并用石蜡包埋,对其进行免疫组化染色,同时收集全部制备好的蜡块并切片,切片厚度为 4 μm 。使用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色方法,染色切片由高年资病理医师在光学显微镜下独立观察评估并做出病理诊断。切片置 80 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱烤片 30 min,乙醇脱水,灭活内源性过氧化物酶,枸橼酸缓冲液高温高压水化修复; PBS 洗 3 次,加一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; PBS 洗 3 次,加二抗。室温下 DAB 显色,根据显色情况控制显示时间,苏木精轻度复染,并用 1% 的盐酸乙醇分化 5 min、流水冲 5 min、梯度乙醇脱水(80%、85%、90%、95%、100%、100%)及松节油透明 5 min,最后树胶封片。阴性对照为 PBS 代替一抗。

1.3 原位杂交方法及试剂 Id-1 mRNA 原位杂交试剂盒购于香港 Abcam 公司,其靶基因的 mRNA 序

2015-11-17 接收

基金项目: 河北省医学科学研究重点课题计划(编号: 20150058); 张家口科技局指令性计划(编号: 1311055D)

作者单位: 河北北方学院附属第一医院¹ 血管腺体外科、² 胃肠外科、³ 超声医学科、⁴ 病理科、⁵ 河北省张家口市宣化中医院普外科 张家口 075000

作者简介: 武雪亮,男,主治医师,硕士;

薛军,男,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: yfyxuejun@163.com

列为 F: 5'-TCTACGACATGAACGGCTG-3', R: 5'-GGTCCCTGATGTAGTCGAT-3'。切片厚度为 4 μm , 脱蜡、水化; 3% H_2O_2 室温孵 15 min, 灭活内源性过氧化酶, 暴露 mRNA 核酸片段。滴加 3% 稀释胃蛋白酶(1 ml 3% 柠檬酸: 2 滴浓缩型胃蛋白酶), 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化, PBS 冲洗, 预杂交; 滴加 15 μl 预杂交液, 置恒温箱 42 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; SSC 洗涤 5 min; 滴加封闭液; 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min。PBS 冲洗, 滴加生物素化鼠地高辛一抗-SABC-生物素化过氧化物酶; 37 $^{\circ}\text{C}$ 20 min。DAB 显色, 显色 20 min, 充分水洗, 苏木精轻度复染, 最后树脂封片。

1.4 阳性结果的判定标准 Id-1 阳性表达的判定: 细胞浆中染有棕黄色、褐色颗粒。计算阳性细胞百分比评分: $\leq 5\%$ 为 0 分, $6\% \sim 25\%$ 为 1 分, $26\% \sim 50\%$ 为 2 分, $51\% \sim 75\%$ 为 3 分, $> 75\%$ 为 4 分; 无着色: 0 分, 浅黄色: 1 分, 黄色: 2 分, 深黄色: 3 分。两者相乘 ρ 分为 (-), 1 ~ 4 分为 (+), 5 ~ 8 分为 (++) 9 ~ 12 分为 (+++) (-) ~ (+++) 均视为阳性。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 计数资料以百分率表示, 采用 χ^2 检验和 Fisher 精确概率法, 设检验水平 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠正常黏膜、腺瘤、腺癌组织中 Id-1 蛋白

表达的情况 结直肠癌组织中 Id-1 的阳性表达率为 72.00% (36/50), 腺瘤伴中低度不典型增生、腺瘤伴高度不典型增生组织中 Id-1 的阳性表达率分别是 31.25% (5/16) 和 57.14% (8/14), 而在正常组织中阳性表达率为 24.00% (12/50)。Id-1 在正常黏膜、腺瘤伴中低度不典型增生组织中的阳性率明显低于腺瘤伴重度不典型增生组织及腺癌组织 ($P < 0.01$); 而 Id-1 在正常黏膜、腺瘤伴中低度不典型增生组织中的阳性率则差异不大; Id-1 在腺瘤伴重度不典型增生组织及腺癌组织组织中的阳性率则亦无明显变化。见图 1、表 1。

2.2 结直肠正常黏膜、腺瘤、腺癌组织中 Id-1 mRNA 表达的情况 50 例结直肠癌组织中 Id-1 mRNA 的阳性表达率为 76.00% (38/50), 稍高于 Id-1 蛋白表达; 16 例腺瘤伴中低度不典型增生、14 例腺瘤伴高度不典型增生组织中 Id-1 mRNA 的阳性表达率分别是 25.00% (4/16) 和 57.14% (8/14), 而在 50 例

表 1 Id-1 蛋白在结直肠正常组织、腺瘤及腺癌组织中的表达

项目	n	Id-1			χ^2 值	P 值
		-	+	阳性率 (%)		
正常结直肠组织	50	38	12	24.00	0.152	0.690
腺瘤伴中低度不典型增生	16	11	5	31.25	12.402	0.000
腺瘤伴高度不典型增生	14	6	8	57.14	11.387	0.001
结直肠腺癌组织	50	14	36	72.00	3.551	0.060
					23.431	0.000

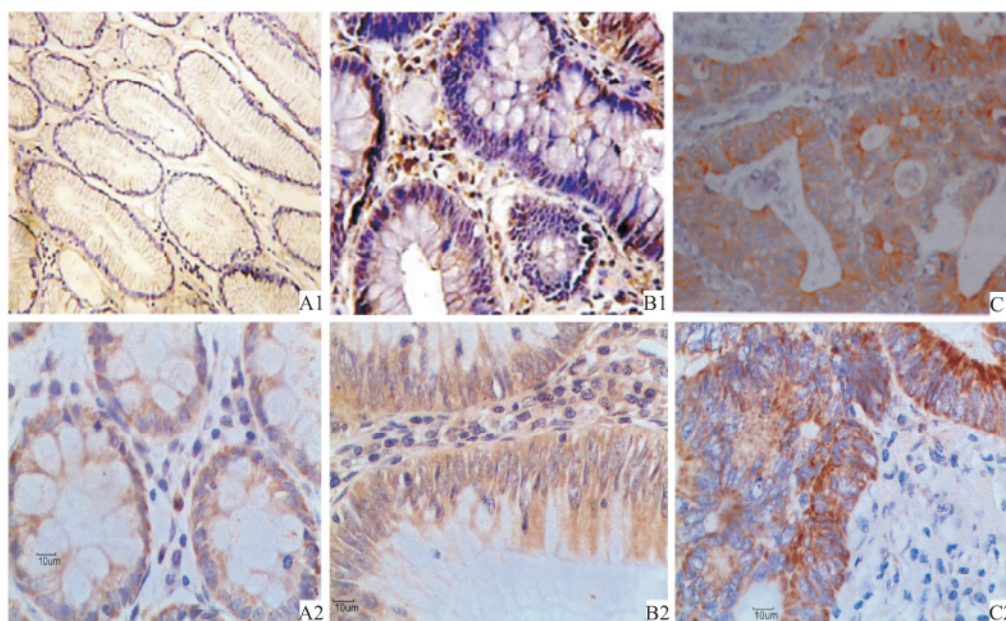


图 1 Id-1 在结直肠正常组织、腺瘤及结直肠癌组织中的表达 $\times 400$

1: IHC; 2: ISH; A: 结直肠正常组织; B: 腺瘤; C: 结直肠癌组织

正常组织中阳性表达率为 20.00% (10/50), 稍低于 Id-1 蛋白表达; Id-1 mRNA 在正常黏膜、腺瘤伴中低度不典型增生组织中的阳性率明显低于腺瘤伴重度不典型增生组织及腺癌组织 ($P < 0.01$); 而 Id-1 mRNA 在正常黏膜、腺瘤伴中低度不典型增生组织中的阳性率则差异不大; Id-1 mRNA 在腺瘤伴重度不典型增生组织及腺癌组织组织中的阳性率则亦无明显变化, 与 Id-1 蛋白表达基本一致, 见图 1、表 2。

表 2 Id-1 mRNA 在结直肠正常组织、腺瘤及腺癌组织中的表达

项目	n	Id-1			χ^2 值	P 值
		-	+	阳性率(%)		
正常结直肠组织	50	40	10	20.00	0.057	0.517
					14.616	0.000
腺瘤伴低度不典型增生	16	12	4	25.00	12.566	0.000
腺瘤伴高度不典型增生	14	6	8	57.14	3.844	0.050
结直肠腺癌组织	50	12	38	76.00	30.246	0.000

2.3 两种检测方法检测 Id-1 和 Id-1 mRNA 的结果对比分析 运用 Kappa 检验两种方法检测的一致性, 在正常黏膜组织中, 吻合系数为 0.791, 腺瘤组织中吻合系数为 0.729; 腺癌组织中, 吻合系数为 0.905。

2.4 结直肠癌组织中 Id-1 和临床病理参数之间的相关性 Id-1 蛋白的表达水平与患者肿瘤大小、分化程度等临床病理参数无关, 而是与肿瘤浆膜浸润、肝转移、淋巴结转移、肿瘤 TNM 分期、脉管浸润和 CEA(+) 密切相关 ($P < 0.01$), 见表 3。

3 讨论

Id-1 是 1995 年发现的一种分化抑制因子, 最初的小鼠实验发现其可促进细胞增殖、诱导肿瘤血管生成、促进肿瘤的生长及侵袭^[9]。Id-1 定位于染色体 6p21-22 上, 广泛表达于哺乳动物的胚胎、生殖腺体及一些分化不成熟的组织细胞中。Id-1 系螺旋-环-螺旋(helix-loop-helix, HLH) 转录因子家族重要成员, 是细胞分化的负性调控因子。HLH 区高度保守, 包含 2 个 α 螺旋, 由 15~20 个残基组成, 这两条 α 螺旋被一个多序列、多长度环区分割开来, 广泛表达于各生物体^[10-11]。大多数 HLH 结构存在一个碱性 HLH(bHLH) 因子与其紧密相邻, 二者相互结合形成异质二聚体, 其中两个碱性区与目标 DNA 结合, 诱导启动子中的 E-盒样结构的靶基因转录并整合成所谓的“E-box”DNA 序列, 从而调控细胞增殖

表 3 Id-1 在结直肠癌组织中的表达与相关临床病理指标的关系

病理参数	n	Id-1			χ^2 值	P 值
		-	+	阳性率(%)		
肿瘤大小(cm)					0.411	0.520
≥5	31	9	22	70.97		
<5	19	5	14	73.68		
分化程度					0.864	0.601
高	12	3	9	75.00		
中	21	6	15	71.43		
低	17	5	12	70.59		
浆膜浸润					8.069	0.005
有	39	9	30	76.92		
无	11	5	6	54.55		
TNM 分期					6.978	0.008
I + II	13	6	7	53.84		
III + IV	37	8	29	78.38		
淋巴结转移					12.477	0.000
有	29	2	27	93.10		
无	21	12	9	42.86		
肝转移					26.214	0.000
有	15	0	15	100.00		
无	35	14	21	60.00		
脉管浸润					12.755	0.000
有	16	1	15	93.75		
无	34	13	21	61.76		
CEA					29.156	0.000
+	40	7	33	82.50		
-	10	7	3	30.00		

分化。Id-1 无碱性结构域, 因而与 bHLH 因子结合生成的二聚体无转录功能, 无法与目标 DNA 序列结合, 从而抑制细胞分化^[12]。研究^[13]证实, Id-1 基因在细胞增殖期表达上调, 分化期表达下降。Cheung et al^[14] 研究报道 Id-1 表达上调能激活 Raf-1 及 MAPK 激酶信号传导途径, 抑制细胞凋亡, 参与肿瘤发生发展。Lee et al^[15] 发现 Id-1 还可通过磷酸化抑制 Rb 途径并阻断 p16(INK4a) 表达, 从而促进 G₁、G₂、S、M 期细胞增殖增加目标 DNA 合成; Id-1 的高异常表达可激活 VEGF 及其受体, 以释放促血管生成的自分泌信号, 诱导形成新生的肿瘤血管内皮细胞, 从而促进肿瘤的发生进展。Sharma et al^[16] 发现, Id-1 可直接或间接抑制血小板凝血酶敏感蛋白-1 即血栓收缩蛋白-1, 来调节血管的生成。

本研究表明, Id-1 mRNA 及蛋白在正常黏膜组织、腺瘤、腺癌中的阳性表达逐步增强, 且在结直肠腺癌中的阳性率远高于腺瘤伴中低度不典型增生及正常黏膜组织, 提示 Id-1 表达的异常上调是正常黏膜-癌前病变-腺癌这一癌变过程中的早期分子学事件, 即在癌变的早期阶段 Id-1 即被激活, 这与叶英海等^[17] 研究结果一致。进一步研究表明 Id-1 与结直肠肿瘤的浆膜浸润、肝转移、淋巴结转移、TNM

分期、脉管浸润等密切相关,表明 Id-1 在结直肠癌组织中的高表达,不仅与结直肠癌的发生进展有关,而且与肿瘤的浸润和侵袭相关。因而 Id-1 有望成为新的肿瘤监测指标,为临床诊治及预后判断提供重要的参考。

参考文献

- [1] Siegel R, DeSantis C, Virgo K, et al. Cancer treatment and survivorship statistics 2012[J]. *CA Cancer J Clin* 2012, 62(4): 220 – 41.
- [2] 代珍, 郑荣寿, 邹小农, 等. 中国结直肠癌发病趋势分析和预测[J]. *中华预防医学杂志* 2012, 46(7): 598 – 603.
- [3] Jang T J, Jung K H, Choi E A. Id-1 gene downregulation by sulindac sulfide and its upregulation during tumor development in gastric cancer[J]. *Int J Cancer* 2006, 118(6): 1356 – 63.
- [4] 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 Biol Ther* 2010, 10(3): 299 – 307.
- [5] 陈晶晶, 陈柯, 王晓秋, 等. 子宫内腺样腺癌中 Id-1、Smad4 和 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白及 mRNA 的表达[J]. *安徽医科大学学报*, 2010, 45(1): 39 – 43.
- [6] 李晓梅, 庞宇, 侯刚. 食管鳞状细胞癌患者细胞分化抑制因子-1 和低氧诱导因子-1 α 的表达及意义[J]. *中华临床医师杂志(电子版)* 2013, 7(3): 1035 – 8.
- [7] 李建峰, 扈玉华, 董雅兰. 分化抑制因子 1、3 及基质金属蛋白酶 9 在脑转移瘤组织中的表达及意义[J]. *中华实验外科杂志* 2013, 30(2): 300 – 2.
- [8] Rothschild S I, Kappeler A, Ratschiller D, et al. The stem cell gene “inhibitor of differentiation 1” (Id1) is frequently expressed in non-small cell lung cancer[J]. *Lung Cancer* 2011, 71(5): 306 – 11.
- [9] Forootan S S, Wong Y C, Dodson A, et al. Increased Id-1 expression is significantly associated with poor survival of patients with prostate cancer[J]. *Hum Pathol* 2007, 38(9): 1321 – 9.
- [10] Sun R, Chen W, Zhao X, et al. Acheron regulates vascular endothelial proliferation and angiogenesis together with Id-1 during wound healing[J]. *Cell Biochem Funct* 2011, 29(8): 636 – 40.
- [11] Dong Z, Liu S, Zhou C, et al. Overexpression of Id-1 is associated with tumor angiogenesis and poor clinical outcome in oral squamous cell carcinoma[J]. *Oral Oncol* 2010, 46(3): 154 – 7.
- [12] Mern D S, Hasskarl J, Burwinkel B. Inhibition of Id proteins by aptamer induces cell-cycle arrest and apoptosis in ovarian cancer cells[J]. *Br J Cancer* 2010, 103(8): 1237 – 44.
- [13] Maw M K, Fujimoto J, Tamaya T. Expression of the inhibitor of DNA-binding (ID)-1 protein as an angiogenic mediator in tumour advancement of uterine cervical cancers[J]. *Br J Cancer* 2008, 99(10): 1557 – 63.
- [14] Cheung H W, Ling M T, Tsao S W, et al. Id-1-induced Raf/MEK pathway activation is essential for its protective role against taxol-induced apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *Carcinogenesis* 2004, 25(6): 881 – 7.
- [15] Lee T K, Man K, Ling M T, et al. Over-expression of Id-1 induces cell proliferation in hepatocellular carcinoma through inactivation of p16INK4a/RB pathway[J]. *Carcinogenesis* 2003, 24(11): 1729 – 36.
- [16] Sharma P, Patel D, Chaudhary J. Id-1 and Id-3 expression is associated with increasing grade of prostate cancer: Id-3 preferentially regulates CDKN1B[J]. *Cancer Med* 2012, 1(2): 187 – 97.
- [17] 叶英海, 张晓勇, 周晓聪, 等. DNA 结合分化抑制蛋白 1 与 Ki-67 和血管内皮生长因子在直肠癌组织中的表达[J]. *中华胃肠外科杂志* 2011, 14(7): 552 – 3.

Expressions of Id-1 in colorectal adenocarcinoma tissues, adenoma tissues and normal colorectal tissues

Wu Xueliang¹, Wang Likun², Xue Jun¹, et al

(¹Dept of Vascular Gland Surgery, ²Dept of Ultrasound, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000)

Abstract Objective To study the expression of Id-1 in human colorectal adenocarcinoma tissues and explore its correlation with the initiation and progression of colorectal cancer. **Methods** The expression of Id-1 in 50 specimens of normal colorectal tissues, 50 specimens of colorectal adenocarcinoma tissues and 30 colorectal adenoma tissues (moderate-low dysplasia of 16 cases and high dysplasia of 14 cases) were detected using immunohistochemistry technique and in situ hybridization. The correlation between its expression and the clinicopathologic features was analyzed. **Results** The positive expression rates of Id-1 protein in colorectal normal tissues, colorectal adenoma tissues with moderate-low dysplasia, colorectal adenoma tissues with high dysplasia, and colorectal adenocarcinoma tissues were 24.00%, 31.25%, 57.14%, and 72.00%. The positive rates of Id-1 mRNA in colorectal normal ti-

ssues ,colorectal adenocarcinoma tissues with moderate-low dysplasia ,colorectal adenocarcinoma tissues with high dysplasia ,and colorectal adenocarcinoma tissues ,were 20. 00% 25. 00% 57. 14% and 76. 00% . The positive expression rates of Id-1 protein and Id-1mRNA in colorectal normal tissues ,colorectal adenocarcinoma tissues with moderate-low dysplasia ,colorectal adenocarcinoma tissues with high dysplasia ,and colorectal adenocarcinoma tissues gradually increased and the differences had obvious statistical significance ($P < 0. 01$) . The coincidence coefficient in normal colorectal tissues ,adenoma tissues and colorectal adenocarcinoma tissues were 0. 791 0. 729 and 0. 905 by Kappa testing. The positive expression level from TNMI to TNMIV stage in colorectal adenocarcinoma tissues increased gradually and there was statistical significance ($P < 0. 01$) . Expression of Id-1 was correlated with the depth of tumor invasion ,CEA(+) ,lymph node metastasis ,vessel invasion and liver metastasis($P < 0. 01$) ,but not with the patient's tumor size and differentiation degrees. **Conclusion** The abnormal expression of Id-1 in colorectal adenocarcinoma tissues plays an important role in the process of cancer ,and is expected to become the new tumor monitoring indicators , which indicates the new direction for clinical diagnosis and treatment and prognosis judgement.

Key words colorectal neoplasms; Id-1; immunohistochemistry; in situ hybridization; clinical significance

(上接第 296 页)

CT gemstone spectral imaging and Ki-67 joint evaluation of pathologic grading in clear cell renal cell carcinoma

Guo Jinlong , Cheng Qi , Xu Shicheng , et al

(*Dept of Radiology Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230001*)

Abstract Objective Discussing the correlation between CT spectroscopy imaging parameters and Ki-67 labeling index (LI) , to assess the pathologic grading of clear cell renal cell carcinoma. **Methods** 44 cases with CCRCC were analyzed by using retrospective way , all the patients underwent gemstone spectral imaging scans before operation and all tumor tissue pathologic specimens were confirmed by Ki-67 immunohistochemical staining after operation. The patients were divided into high differentiation group and low differentiation group. Spectral characteristic parameters and the expression of Ki-67 between two groups were compared. **Results** The Ki-67 LI of high differentiation group was lower than the low differentiation group($P < 0. 01$) , and CT spectroscopy imaging parameters in two phases had a significantly negative correlation with Ki-67 LI. The CT value ratio of CCRCC under 70 keV , the iodine concentration ratio and the spectrum curve slope of high differentiation group were higher than the low differentiation group in cortex phase($P < 0. 05$) . The CT value ratio under 70 keV , the iodine concentration ratio and the spectrum curve slope of high differentiation group were higher than the low differentiation group in medulla phase($P < 0. 01$) . However , the water concentration ratio had no difference at each phase between the two groups. The 70 keV single energy ratio in the medulla phase provided the best combination of sensitivity (82. 8%) and specificity (80%) in deciding the nuclear grading of CCRCC , and the area under the ROC curve was 0. 870. **Conclusion** The expression of Ki-67 has a certain correlation with spectral characteristic parameters , and the evaluating methods combined gemstone spectral imaging with Ki-67 have important diagnostic value for deciding tumor's pathologic grading.

Key words carcinoma , renal cell; tomography , X-ray computed; spectral imaging; neoplasm grading; immunohistochemistry , Ki-67