

网络出版时间: 2016-6-22 14:44:58 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160622.1444.054.html>

## 结直肠癌组织中 Id-1 表达、临床意义及预后分析

武雪亮<sup>1</sup>, 王立坤<sup>2</sup>, 薛军<sup>1</sup>, 杨东东<sup>3</sup>, 屈明<sup>1</sup>, 郭飞<sup>1</sup>, 杨瑞敏<sup>2</sup>, 刘博<sup>4</sup>, 李青<sup>5</sup>

**摘要** 目的 研究结直肠癌组织中 DNA 结合分化抑制蛋白 1 (Id-1) 蛋白表达情况及与结直肠癌患者预后的相关性。方法 收集手术切除的结直肠癌和正常黏膜组织各 50 例, 应用免疫组化 SP 法检测结直肠癌及正常黏膜组织中 Id-1 的表达, 分析其与临床各病理因素的相关性; 结合随访资料, 应用 Kaplan-Meier 法和 Log-rank 检验分析 Id-1 的表达与结直肠癌患者生存的相关性; 并建立 Cox 回归模型评估 Id-1 及各临床病理因素与患者预后的相关性。结果 结直肠癌组织中 Id-1 表达阳性率为 72.00% (36/50), 明显高于正常黏膜组织的 24.00% (12/50) ( $\chi^2 = 23.431$ ,  $P = 0.000$ ); Id-1 的表达与肿瘤浆膜浸润 ( $\chi^2 = 4.521$ ,  $P = 0.034$ )、肿瘤 TNM 分期 ( $\chi^2 = 7.044$ ,  $P = 0.008$ )、淋巴结转移 ( $\chi^2 = 15.253$ ,  $P = 0.000$ )、肝转移 ( $\chi^2 = 8.333$ ,  $P = 0.003$ )、脉管浸润 ( $\chi^2 = 4.079$ ,  $P = 0.043$ ) 明显相关; 死亡患者 Id-1 的表达程度为 85.19%, 明显高于生存患者的 56.52% ( $\chi^2 = 5.062$ ,  $P = 0.025$ ); Id-1 表达水平与结直肠癌患者预后明显相关 ( $RR = 1.193$ ,  $P =$

0.002)。结论 Id-1 在结直肠癌组织中呈高表达, 与结直肠癌的发生、侵袭有较高的相关性, 且与患者生存期显著相关, 是影响结直肠癌患者预后的独立危险因素。

**关键词** Id-1; 结直肠肿瘤; 免疫组化; 临床意义; 预后分析  
中图分类号 R 735.37

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)08-1192-04

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, 动物实验<sup>[1-2]</sup>表明其可促进细胞增殖, 诱导肿瘤血管生成, 促进肿瘤生长侵袭, 加速肿瘤生长并转移。目前已证实 Id-1 在乳腺癌、宫颈癌、食管癌等多种恶性肿瘤中呈高表达状态<sup>[3-5]</sup>, 但在结直肠方面研究较少。该实验通过对 Id-1 行免疫组织化学染色分析检测, 旨在探讨 Id-1 在结直肠癌中的表达情况及相关临床病理因素间关系, 初步探讨其致癌机制, 并分析 Id-1 作为结直肠癌预后的独立影响因子的价值。

### 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 收集 2008 年 5 月 1 日~2010 年 12 月 31 日于河北北方学院附属第一医院血管腺体外科手术切除的 50 例原发性结直肠癌组织, 50 例癌旁正常组织 (距肿瘤边缘 > 10 cm), 且术前未行新辅助放化疗等针对性治疗, 癌组织取自癌灶中心处。其中男 32 例, 女 18 例; 年龄 44~62 (50 ± 4.8)

2016-04-19 接收

基金项目: 河北省卫计委医学科学研究重点课题计划 (编号: 20150058); 张家口市科学技术研究与发展指令计划 (编号: 1311055D)

作者单位: 河北北方学院附属第一医院<sup>1</sup> 血管腺体外科、<sup>2</sup> 超声医学科、<sup>3</sup> 胃肠外科、<sup>4</sup> 病理科、<sup>5</sup> 河北北方学院第一临床医学院临床医学系 张家口 075000

作者简介: 武雪亮, 男, 主治医师, 硕士;

杨东东, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: ydd8048869@163.com

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

Logrank test. The Cox regression model was applied to analyze the multivariate prognosis. **Results** The follow-up rate was 93%. The median OS was 18 months and the median PFS was 13 months. The elderly group receiving radiotherapy dose  $DT \geq 60$  Gy had better OS than those receiving radiotherapy dose  $DT < 60$  Gy. The five-year OS was 15% to 0 ( $P = 0.001$ ). The Median PFS was 23 months to 14 months. The multivariate analysis was made to find out whether neoplasm staging, radiotherapy dose, the occurrence of complications and smoking was identified as factors influencing the clinical outcomes and prognosis of elderly patients with esophageal carcinoma. **Conclusion** The OS of the CRT group has increased compared with that of the RT group and chemotherapy is not the independent prognostic factor. Elderly patients receiving radiotherapy dose  $DT \geq 60$  Gy have better OS than those receiving radiotherapy dose  $DT < 60$  Gy.

**Key words** esophageal carcinoma; radiotherapy; elderly; prognosis

岁,中位年龄 54 岁;其中升结肠癌 7 例、横结肠 3 例、降结肠癌 5 例、乙状结肠癌 8 例、直肠癌 27 例。

**1.2 主要仪器与试剂** 兔抗人单克隆浓缩型 Id-1 抗体购自香港 Abcam 公司;二抗工作液和 DAB 显色剂均购自武汉博士德生物工程有限公司。

**1.3 免疫组化染色** 收集蜡块切片,厚度为 4  $\mu\text{m}$ , HE 染色。切片经过 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。室温下使用 DAB 显色,苏木精轻度复染,并用 1% 的盐酸乙醇分化 5 min、梯度乙醇脱水 (80%、85%、90%、95%、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。

**1.4 Id-1 阳性判定标准<sup>[6]</sup>** Id-1 以细胞质中出现棕黄色颗粒为阳性表达,根据着色细胞占视野细胞总数的百分比及着色细胞染色强弱评分  $\leq 5\%$  为 0 分,6% ~ 25% 为 1 分,26% ~ 50% 时为 2 分,51% ~ 75% 时为 3 分, > 75% 时为 4 分;阴性: 0 分;弱 (+): 1 分;中 (++) : 2 分;强 (+++) : 3 分。两者相乘,0 分为 (-), 1 ~ 4 分为 (+), 5 ~ 8 分为 (++) , 9 ~ 12 分为 (+++) , (+) ~ (+++) 均视为阳性。

**1.5 随访** 对 50 例结直肠癌患者进行定期复查并随访,时间为 2008 年 10 月 ~ 2015 年 5 月,中位随访时间为 59 个月,无 1 例失访,其中 23 例生存, 27 例死亡,随访期间有 21 例患者确诊复发转移。

**1.6 统计学处理** 应用 SPSS 17.0 软件进行分析,计数资料以百分率表示,采用  $\chi^2$  检验、Fisher 精确概率法、Pearson 法。Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, Log-rank 检验分析,应用 Cox 回归模型对结直肠癌患者预后进行多因素分析,设检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 Id-1 表达情况** Id-1 在结直肠癌组织中阳性表达率是 72.00% (36/50),明显高于正常黏膜组织的 24.00% (12/50),差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 23.431$ ,  $P < 0.001$ ),见图 1。

**2.2 Id-1 蛋白与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、分化程度无关,而与肿瘤浆膜浸润 ( $\chi^2 = 4.521$ ,  $P = 0.034$ )、肝转移 ( $\chi^2 = 8.333$ ,  $P = 0.003$ )、淋巴结转移 ( $\chi^2 = 15.253$ ,  $P < 0.001$ )、肿瘤 TNM 分期 ( $\chi^2 = 7.004$ ,  $P = 0.008$ )、脉管浸润 ( $\chi^2 = 4.079$ ,  $P = 0.043$ ) 密切相关,死亡患者 Id-1 阳性表达为 85.19% (23/27),明显高于生存患者的 56.52% (13/23) ( $\chi^2 = 5.062$ ,  $P$

$= 0.025$ )。见表 1。

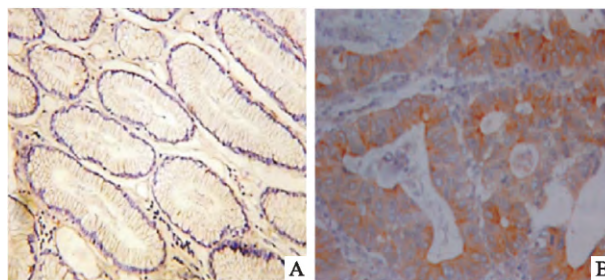


图 1 免疫组化法检测结直肠腺癌组织及正常黏膜组织中 Id-1 蛋白的表达 SP  $\times 200$   
A: 正常黏膜组织; B: 结直肠腺癌组织

表 1 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			$\chi^2$ 值	P 值
		- (n)	+ (n)	阳性率 (%)		
肿瘤直径 (cm)					0.043	0.836
$\geq 5$	31	9	22	70.97		
< 5	19	5	14	73.68		
分化程度					0.074	0.964
高	12	3	9	75.00		
中	21	6	15	71.43		
低	17	5	12	70.59		
浆膜浸润					4.521	0.034
有	39	9	30	76.92		
无	11	5	6	54.55		
TNM 分期					7.044	0.008
I + II	13	6	7	53.84		
III + IV	37	8	29	78.38		
淋巴结转移					15.253	0.000
有	29	2	27	93.10		
无	21	12	9	42.86		
肝转移					8.333	0.003
有	15	0	15	100.00		
无	35	14	21	60.00		
脉管浸润					4.079	0.043
有	16	1	15	93.75		
无	34	13	21	61.76		
随访情况					5.062	0.025
生存	23	10	13	56.52		
死亡	27	4	23	85.19		

**2.3 Id-1 表达与患者生存的相关性** Id-1 表达阳性的 36 例患者,13 例生存,23 例死亡,中位生存时间为 32 个月。Id-1 表达阴性的 14 例患者,10 例生存,4 例死亡,中位生存时间为 43 个月。Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,Log-rank 单变量分析显示,Id-1 表达阳性和 Id-1 表达阴性结直肠癌患者的生存函数比较差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 4.383$ ,  $P = 0.036$ ),即 Id-1 表达和患者生存时间有关,Id-1 阳性患者预后较差。见图 2。

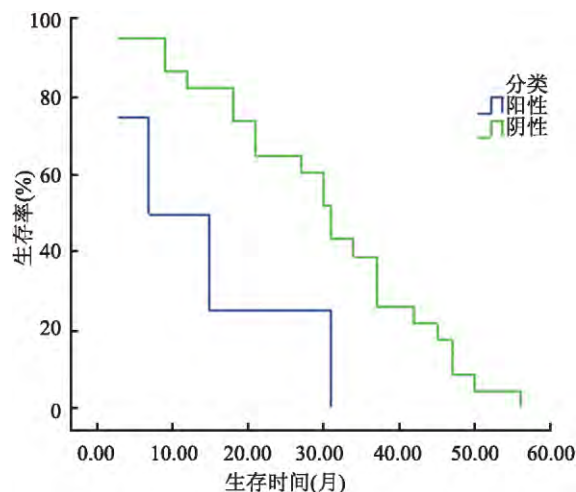


图2 结直肠癌患者 Id-1 表达与生存期的相关性

**2.4 结直肠癌的独立预后因素分析** Cox 回归模型分析显示, Id-1 表达水平 ( $RR = 1.193, P = 0.002$ )、浸润深度 ( $RR = 1.431, P < 0.001$ )、肝转移 ( $RR = 2.018, P = 0.038$ )、淋巴结转移 ( $RR = 1.856, P = 0.015$ )、TNM 分期 ( $RR = 1.714, P < 0.001$ ) 和脉管浸润 ( $RR = 1.310, P < 0.001$ ) 均是影响结直肠癌患者预后的独立因素, 见表 2。

表2 结直肠癌患者 Cox 回归分析多因素分析

项目	回归系数	标准差	RR 值	95% 置信区间	P 值
浆膜浸润	0.3585	0.726	1.431	1.171 ~ 1.750	<0.001
TNM 分期	0.1603	0.665	1.174	0.977 ~ 1.411	<0.001
淋巴结转移	0.0389	0.153	1.856	0.997 ~ 1.085	0.015
肝转移	0.7019	0.585	2.018	1.716 ~ 2.372	0.038
脉管浸润	0.2703	0.791	1.310	1.053 ~ 1.631	<0.001
Id-1 表达水平	0.4720	0.629	1.193	1.347 ~ 1.908	0.002

### 3 讨论

Id-1 系螺旋-环-螺旋 (helix-loop-helix, HLH) 转录因子家族重要成员之一, Benazra 于 1990 年在鼠红白血病 MEL 细胞中发现, 包含 2 个  $\alpha$  螺旋, 15 ~ 20 个残基, 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 在正常组织中呈低表达或不表达状态, 而在恶性肿瘤及体外培养的肿瘤细胞系中均呈高表达趋势<sup>[7]</sup>。Id-1 对细胞的增殖分化起负性调控作用, 其结构中的 HLH 区域能与碱性 HLH 蛋白 (bHLH) 结合形成无转录功能的异质二聚体, 抑制 bHLH 与目标 DNA 结合, 从而抑制细胞增殖分化。

Id-1 通过与 E2A 结合形成特异性复合物抑制

E2A 活化 p21, 激活 CDK2 诱导 Rb 蛋白磷酸化, 抑制细胞分裂周期中 G1/S 停滞, 促使细胞分裂周期顺利进行<sup>[8]</sup>。研究<sup>[9]</sup>证实, Id-1 表达上调能促进 TGF- $\beta$ 1 的表达, 诱导上皮细胞间质化, 导致细胞间极性消失、黏附力下降, 使肿瘤细胞突破基底膜屏障, 向邻近组织迁移、浸润; 此外, Id-1 的高异常表达可激活 VEGF 及其受体 (EGFR), 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及微淋巴管形成, 从而促进肿瘤的生长和侵袭<sup>[10]</sup>。

本研究表明, 结直肠癌组织中 Id-1 mRNA 和蛋白的阳性表达率明显高于正常结直肠组织, 这与胃癌、子宫内膜癌组织中 Id-1 表达的研究<sup>[11-12]</sup>结果一致, 提示 Id-1 特异性的高表达可能在结直肠癌的发生发展中发挥重要作用。进一步研究表明: Id-1 蛋白的表达水平与肿瘤浆膜浸润、肝转移、淋巴结转移、肿瘤 TNM 分期、脉管浸润等恶性生物学行为密切相关, 这与樊鸿炎等<sup>[13]</sup>研究结果一致, 提示 Id-1 对结直肠癌的侵袭转移有促进作用。本研究中死亡患者 Id-1 的阳性表达程度也明显高于生存患者, 提示高表达 Id-1 的结直肠癌患者预后差。

本研究进一步收集了 50 例结直肠癌患者 5 ~ 7 年的随访资料, Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, Long-rank 单变量分析显示 Id-1 表达阳性的结直肠癌患者生存时间明显短于 Id-1 表达阴性的患者, 表明 Id-1 表达水平可作为评估结直肠癌患者生存期的有效生物学指标。此外, 通过建立 Cox 回归模型, 将 Id-1 表达水平及各临床病理因素作为独立变量进行多因素回归分析, 结果显示 Id-1 表达水平、浸润深度、肝转移、淋巴结转移、TNM 分期和脉管浸润均是影响结直肠癌患者预后的独立因素, 这与于游等<sup>[14]</sup>研究结果基本一致, 因而 Id-1 有望成为新的肿瘤监测指标, 为临床诊治、预后监测及基因的精准化治疗提供重要的参考。

### 参考文献

- [1] Yang G, Zhang Y, Xiong J. Downregulation of Id-1 by small interfering RNA in gastric cancer inhibits cell growth via the Akt pathway [J]. Mol Med Report 2012 5(4): 1075-9.
- [2] 宋丽楠, 刘巍. 分化抑制因子 1 与肿瘤发生发展相关性的研究进展 [J]. 中华肿瘤防治杂志 2009, 16(2): 152-5.
- [3] 陈晶晶, 陈柯, 王晓秋, 等. 子宫内膜样腺癌中 Id-1、Smad4 和 p21<sup>wAF1/CIP1</sup> 蛋白及 mRNA 的表达 [J]. 安徽医科大学学报, 2010 45(1): 39-42.
- [4] Luo K J, 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(5): 1682-8.

- [5] 马莉娟,何金彩,柴泽英,等. 细胞分化抑制因子-1 与细胞增殖核抗原 Ki-67 在宫颈癌中的表达及相关性研究[J]. 中国临床药理学杂志 2015, 31(8): 627-30.
- [6] 李秀娟,赵轶峰,李明霞,等. 食管鳞癌组织 Nanog 表达临床意义分析[J]. 中华肿瘤防治杂志 2014, 21(24): 1962-5.
- [7] Sun W, Guo M M, Han P, et al. Id-1 and the p65 subunit of NF- $\kappa$ B promote migration of nasopharyngeal carcinoma cells and are correlated with poor prognosis [J]. *Carcinogenesis* 2012, 33(4): 810-7.
- [8] Li W, Zhang C H, Hong Y L, et al. Inhibitor of DNA-binding-1 / inhibitor of differentiation-1( ID-1) is implicated in various aspects of gastric cancer cell biology [J]. *Mol Biol Rep* 2012, 39(3): 3009-15.
- [9] Yang J, Weinberg R A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis [J]. *Dev Cell*, 2008, 14(6): 818-29.
- [10] 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.
- [11] 潘晓莉,熊枝繁. 胃癌组织 Id-1 和 VEGF 表达及其临床意义的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志 2011, 18(5): 345-7.
- [12] 陈艳艳,张声,江忠清,等. 分化抑制因子-1, -3 在宫颈上皮内瘤变及宫颈鳞状细胞癌组织中的表达及其意义[J]. 中华妇幼临床医师杂志 2014, 10(2): 177-9.
- [13] 樊鸿炎,张文权,薛迪强,等. DNA 结合抑制蛋白-1 在结肠癌中的表达及其临床意义[J]. 中国老年学杂志 2014, 34(2): 320-2.
- [14] 于游,张才全. 分化抑制因子 1 对结肠癌 HT-29 细胞增殖的影响[J]. 中国老年学杂志 2013, 33(12): 2829-32.

## Expressions of Id-1, its clinical significance and prognostic analysis in colorectal adenocarcinoma tissues

Wu Xueliang<sup>1</sup>, Wang Likun<sup>2</sup>, Xue Jun<sup>1</sup>, et al

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

**Abstract Objective** To study the expression of inhibitors of DNA binding-1 (Id-1) in human colorectal adenocarcinoma tissues and explore their correlation between the expression of Id-1 and clinical prognosis. **Methods** 50 cases of colorectal adenocarcinoma tissues and 50 cases of normal colorectal tissues were selected. Immunohistochemistry (SP) was used to detect the expression level of Id-1 in colorectal adenocarcinoma tissues and normal colorectal tissues, subsequently the relationship between clinical pathological features and the expression of Id-1 was analyzed. According to the follow-up data, Kaplan-Meier method and Log-rank test were employed to explore the correlation between Id-1 expression and survival rates. Cox regression analysis was performed to evaluate the connection between Id-1 expression and prognosis. **Results** The positive expression level of Id-1 in colorectal adenocarcinoma tissues was 72.00% (36/50), which was obviously higher than that of normal colorectal tissues (24.00%, 12/50) ( $\chi^2 = 23.431$ ,  $P = 0.000$ ). The Id-1 expression in colorectal adenocarcinoma tissues had significant relations with tumor invasion ( $\chi^2 = 4.521$ ,  $P = 0.034$ ), TNM stage ( $\chi^2 = 7.044$ ,  $P = 0.008$ ), lymph node metastasis ( $\chi^2 = 15.253$ ,  $P = 0.000$ ), liver metastasis ( $\chi^2 = 8.333$ ,  $P = 0.003$ ), and vessel invasion ( $\chi^2 = 4.079$ ,  $P = 0.043$ ). Patients with higher expression of Id-1 had significantly shorter survival time ( $\chi^2 = 5.062$ ,  $P = 0.025$ ). The expression of Id-1 was obviously correlated with the prognosis of colorectal adenocarcinoma tissues ( $RR = 1.193$ ,  $P = 0.002$ ). **Conclusion** The high expression of Id-1 in colorectal adenocarcinoma tissues plays an important role in the process of cancer, and is related to the survival time of patients with colorectal adenocarcinoma. It is an independent prognostic factor for colorectal adenocarcinoma.

**Key words** Id-1; colorectal neoplasms; immunohistochemistry; clinical significance; prognosis; survival time