

食管鳞状细胞癌 ID-2 的表达及其与新生血管生成的关系

李志雄, 林杰成, 吴宁, 许燕常, 林文霖, 郭仁杰, 黄汉兴

(福建医科大学教学医院莆田市第一医院, 福建 莆田 351100)

摘要: [目的] 通过观察 ID-2 在食管鳞癌(ESCC)中的表达及其与微血管密度(MVD)的关系, 探讨 ID-2 在 ESCC 发生及血管生成中的作用。[方法] 应用 SP 法对 115 例 ESCC 组织、60 例切缘正常组织进行 ID-2 免疫组化染色, 检测癌组织、正常食管黏膜组织中 ID-2 的表达, 并分析 ID-2 的表达与 ESCC 临床病理特征及与 MVD 之间的关系。[结果] ID-2 在 ESCC 组织中的阳性表达率为 85.2%(98/115), 切缘正常组织中阳性率 15.0% (9/60), 两者差异有统计学意义($P<0.01$), 其表达与患者年龄、性别及是否伴淋巴结转移均无关($P>0.05$), 而与肿瘤浸润深度、MVD、肿瘤分期以及肿瘤分化程度有关($P<0.05$)。ID-2 高表达组术后生存率低($P<0.05$)。[结论] ID-2 在 ESCC 的发生及血管生成中起重要作用, 可能是 ESCC 的重要促血管生成因子之一, ID-2 蛋白高表达者 ESCC 患者预后差。

关键词: 食管肿瘤; 分化抑制因子-2(ID-2); 血管生成; 免疫组织化学

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)09-0704-05

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2013.09.B009

Expression of ID-2 Protein in Esophageal Squamous Cell Carcinoma (ESCC) and Its Relationship with Tumor Angiogenesis

LI Zhi-xiong, LIN Jie-cheng, WU Ning, et al.

(Fujian Medical University Teaching Hospital, Putian First Hospital, Putian 351100, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of ID-2 protein in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and its relationship with tumor angiogenesis. [Methods] The expression of ID-2 in 115 cases of surgical resected ESCC tissue specimens and 60 negative margin tissues as control were examined by SP immunohistochemical staining. The relationships of the expression of ID-2 with carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinoma and MVD were analyzed. [Results] The positive expression rate of ID-2 was 85.2%(98/115) in ESCC tissues and 15.0% (9/60) in negative margin tissues, with significantly different ($P<0.01$). The expression of ID-2 related to depth of tumor invasion, MVD, tumor stage and differentiation ($P<0.05$), but didn't relate to the age, gender, depth of invasion and lymphatic metastasis ($P>0.05$). High expression of ID-2 had a worse prognosis ($P<0.05$). [Conclusion] Expression of ID-2 plays an important role in tumorigenesis, tumor angiogenesis in ESCC. ID-2 may be one of important agents in promoting tumor angiogenesis in ESCC. High expression of ID-2 may shorten survival.

Subject words: esophageal neoplasms; inhibitors of DNA binding-2; angiogenesis; immunohistochemistry

食管鳞状细胞癌(ESCC)是一种全世界高发、预后较差的消化道恶性肿瘤, 5 年生存率仅 20% 上下。寻找早期诊断、治疗及预后评价的有效生物学指标是目前食管癌研究的重要内容。分化抑制因子 2 (inhibitors of differentiation 2 or inhibitors of DNA binding 2,

ID-2) 于 1990 年由 Benezra 等^[1]发现, 在动物及一些人体标本实验发现其在肿瘤细胞中高表达, 可促进细胞增殖, 参与肿瘤血管生成, 促进肿瘤的生长及转移。但有关 ID-2 与 ESCC 关系国内外研究较少。本文通过检测 ID-2 蛋白在 ESCC 中的表达并分析其与 ESCC 临床病理参数及血管生成的关系, 探讨 ID-2 蛋白在 ESCC 发生及肿瘤血管生成中的作用, 以期寻求干预 ESCC 发生与发展的新靶点。

基金项目: 莆田市 2009 年科研立项项目 [2009S09(2-1)]

通讯作者: 李志雄, 主治医师, 硕士; 福建医科大学教学医院莆田市第一医院肿瘤外科一区, 福建省莆田市城厢区龙德井 389 号 (351100); E-mail: lz200003300@126.com

收稿日期: 2013-06-10; **修回日期:** 2013-06-29

1 资料与方法

1.1 临床资料

2009 年 1 月至 2012 年 6 月福建省莆田市第一医院手术切除的 ESCC 病理蜡块共 115 例(男性 73 例,女性 42 例),中位年龄 62 岁(39~79 岁),术前病理明确且均未行任何放化疗。所有病例中伴有淋巴结转移 40 例。ESCC 按癌细胞分化程度分级,高、中、低分化分别为 33 例、43 例、39 例。正常对照组 60 例(定义为:癌灶边缘>5cm 肉眼观察正常的食管黏膜)。

1.2 试剂

兔多克隆抗人 ID-2 抗体 (C-20, 美国 Santa Cruz), 鼠单克隆抗人 CD34 抗体,SP 免疫组化试剂盒(PV-9000)和 DAB 底物试剂盒(美国 Vector Laboratories Inc), 以上试剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。其中 ID-2 抗体为浓缩液,工作配置浓度 1:30。

1.3 方法

采用免疫组化 PV-9000 通用二步法。各组织 2 μ m 切片,严格按说明书完成免疫组化各步骤,PBS 代替一抗作阴性对照。结果请经验丰富的病理科主任阅片。

1.4 结果判断

ID-2 蛋白的表达强度根据细胞染色程度(A)及阳性细胞表达百分率(B)进行半定量评估分级。染色程度 A:0 分(不着色)、1 分(淡黄色明显高于背景)、2 分(棕黄色)、3 分(棕褐色)。阳性细胞表达百分率 (B):每片随机观察 5 个高倍视野($\times 400$)计数癌细胞

总数和表达的细胞个数,0 分 ($\leq 5\%$)、1 分 (6%~30%)、2 分 (31%~75%)、3 分 ($>75\%$)。A $\times$ B 积分评价:0 分为阴性(-),1~4 分为低表达(+), >4 分为高表达 (++)。

ESCC 微血管密度(MVD)的染色结果判断参照文献^[2]的方法,先在低倍镜($\times 100$)下全面观察切片,寻找血管高密度区,即热点区。找到热点以后,在 400 倍视野下,以与周围肿瘤细胞和结缔组织成分有明显区别的、任何一个染成棕黄色的内皮细胞或内皮细胞簇作为一个微血管,只要结构不相连,其分枝结构也作为一个血管进行计数;但管腔 >8 个红细胞大小或带有肌层、管腔较厚的血管均不计数,记录 5 个高倍视野内的微血管数,取其平均值作为每例的 MVD。

1.5 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件包进行统计分析。ID-2 的表达情况与 ESCC MVD 之间的关系采用单因素方差分析,Spearman 等级相关分析相关性,计数资料采用 χ^2 检验。生存分析采用 Kaplan-Meier 法,生存率的比较用 Log-Rank 法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ID-2 与 ESCC 临床病理参数的关系

ID-2 在 ESCC 组织中高表达(阳性率为 85.2%),其主要表达在肿瘤细胞细胞质,呈棕黄色或棕褐色 (Figure 1),癌旁正常组织低表达甚至不表达(阳性率为 15.0%)(Figure 2),两者表达差异有统计学意

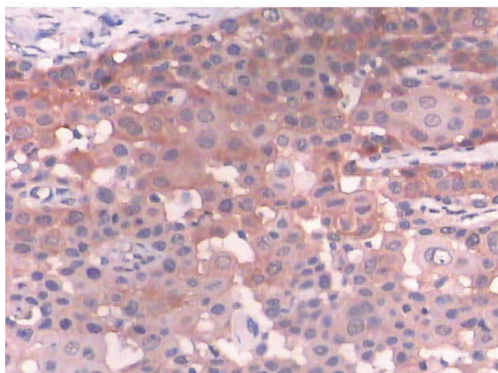


Figure 1 ID-2 in esophageal squamous cell staining (DAB staining $\times 200$)

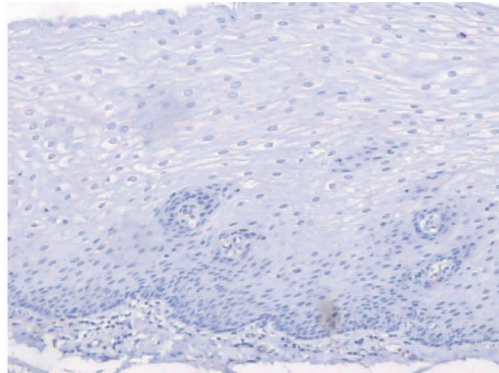


Figure 2 ID-2 in normal esophageal tissue staining (DAB staining $\times 200$)

Table 1 The relationship of ID-2 expression with pathological features of ESCC

Features	n	ID-2 expression		Positive rate (%)	χ^2	P
		Negative(-)	Positive (+~++)			
Gender						
Male	73	10	63	86.3	0.186	0.430
Female	42	7	35	83.3		
Age(years)						
<62	55	8	47	85.5	0.005	0.578
≥62	60	9	51	85.0		
Lymph node metastasis						
-	75	11	64	85.3	0.002	0.582
+	40	6	34	85.0		
Depth of invasion						
Not involving the full thickness esophagus	49	13	36	73.5	9.354	0.003
Involving the full thickness esophagus	66	4	62	93.9		
TNM staging						
I	32	10	22	71.9	9.544	0.004
II ~ III	83	7	76	90.4		

义($P<0.01$)。ID-2 蛋白表达与浸润深度、TNM 分期有关 ($P<0.05$),但与患者的年龄、性别及是否伴淋巴结转移均无关 ($P>0.05$)(Table 1)。ID-2 蛋白表达与肿瘤分化呈负相关($r=-0.256,P<0.01$),即 ESCC 组织分化越好,ID-2 表达越低。(Table 2)。

2.2 ID-2 与 ESCC 血管生成的关系

ID-2 阳性表达 MVD 值明显高于阴性表达值($P<0.01$)(Table 3)。

2.3 ID-2 表达与 ESCC 患者预后的关系

ID-2 表达分两组,高表达组(++)和低表达组(-~+)。Kaplan-Meier 生存曲线分析显示 ID-2 高表达组术后累计生存率显著低于低表达组,Log-Rank 检验, χ^2 值为 60.19, $P=0.000$ (Figure 3)。

3 讨论

ID-2 是一类在发育过程中广泛表达的转录调控因子,属于螺旋—环—螺旋 (helix-loop-helix,HLH)家族的分化抑制因子 ID 蛋白家族成

Table 2 The relationship of the degree of tumor differentiation with ID-2 expression

Tumor differentiation	n	ID-2 expression		
		-	+	++
Low	39	2	14	23
Moderate	43	5	22	16
High	33	10	16	7

Table 3 The relationship of ID-2 expression with MVD

ID-2 expression	n	MVD	F	P
-	17	9.35±2.04	23.69	<0.01
+	52	17.97±2.57		
++	46	23.39±3.88		

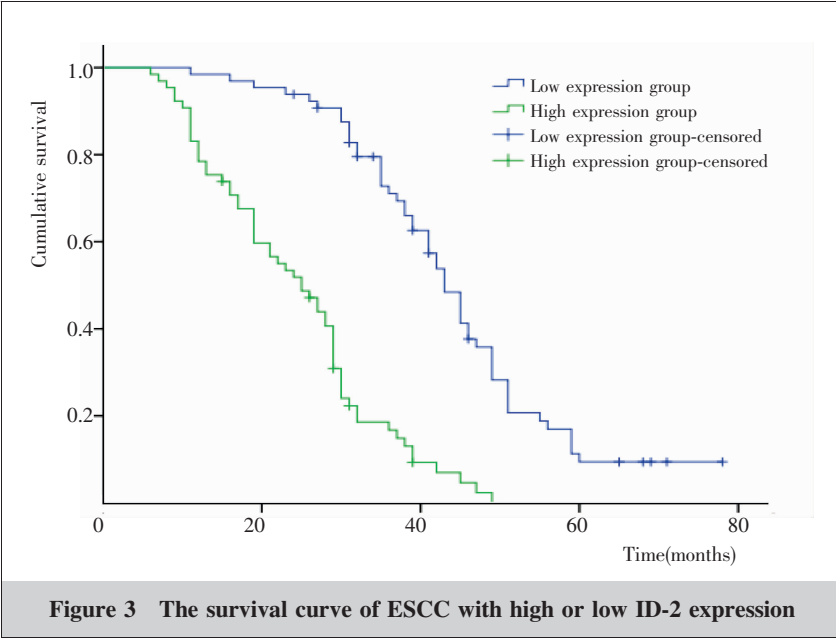


Figure 3 The survival curve of ESCC with high or low ID-2 expression

员。ID-2 定位于 2p25 号染色体上, ID-2 蛋白是一段长为 1.3kb 的 mRNA 编码的含有 134 个氨基酸的小蛋白分子。近来研究表明 ID-2 具有广泛的生物学作用, 如调控细胞周期和细胞定向分化、促进胚胎形成和器官形成、诱导细胞凋亡、维持细胞存活、促进血管形成及肿瘤浸润、发挥癌蛋白功能等。目前研究已发现 ID-2 蛋白在肺癌、乳腺癌等中过表达^[3,4]。但有关 ID-2 蛋白在食管癌方面表达情况, 国内外报道较少。本研究结果显示, ID-2 在 ESCC 组织中高表达, 其主要表达在肿瘤细胞细胞质, 而在癌旁正常组织低表达甚至不表达, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 提示 ID-2 的过表达可能与 ESCC 的发生密切相关, 可能是 ESCC 发生中的一个重要分子学改变, 这与杨维群等^[5]的研究结果一致。本研究同时发现 ID-2 的表达与 ESCC 的分化程度成负相关, 即 ID-2 蛋白表达越高, ESCC 分化越差, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 而 ESCC 分化差往往提示预后不良, 本实验得出 ID-2 蛋白高表达者预后差, 预后生存的分析同样说明了这一点。然而 Newton 等^[6]的研究发现 ID-2 与卵巢癌的预后呈负相关, 却可作为乳腺癌预后的良性指标。这种差异可能反应了 ID-2 表达在腺癌和鳞癌中的不同意义。本研究结果亦显示, ID-2 蛋白在 ESCC 的表达随着肿瘤浸润程度的加深而增加, 提示 ID-2 高表达的 ESCC 癌细胞的侵袭性增强, 这可能与 ID 基因可调节促进肿瘤侵袭性相关基因基质金属蛋白酶 9(MMP9) 的表达有关^[7]。另外本研究同时显示 ID-2 蛋白表达与患者的年龄、性别及是否伴淋巴结转移均无关, 这与岳峰等^[8]研究结果一致。

肿瘤血管生成的过程为瘤细胞和巨噬细胞→血管生成因子 (VEGF) 等→小血管或毛细血管伸展→内皮细胞迁移形成毛细血管芽→新生毛细血管形成并连通。肿瘤的生长转移与肿瘤的新生血管生成关系密切, 抑制肿瘤血管生成能够明显抑制肿瘤生长。目前国内外关于 ID 蛋白在血管生成方面有相关报道, ID-1 和 ID-3 双敲除小鼠在肿瘤血管畸形嫁接时表现出血管内皮的缺陷, 接种到小鼠体内的肿瘤中均表现出生长及转移的抑制, ID 等位基因的单独敲除也使肿瘤血管生成不能进行, 表明 ID 表达水平的消减可以影响肿瘤的表型。另外, 在人脐静脉内皮细胞中的研究发现, ID-1 通过提高低氧诱导因子-

1a(HIF-1a)的稳定性和活性在转录和蛋白质水平诱导 VEGF 的表达, 而 HIF-1a 转录激活和蛋白质的表达又依赖于 ERK 通路的激活^[9], ID 蛋白也可通过 PI3K/Akt 通路调控肿瘤的增殖, Li 等^[10]研究发现, 稳定转染 ID-1 质粒的食管癌细胞能够在裸鼠皮下形成更大的肿瘤, 其细胞增殖抗原 Ki-67 明显上调, 血管生成显著增多。而 ID-1 的这一影响是通过 PI3K/Akt 通路介导的, 使用 PI3K 的抑制剂 LY294002 对细胞进行处理能够减弱 ID-1 对肿瘤细胞增殖的影响。上述研究都支持 ID 在肿瘤血管生成中有不可或缺的地位。ID-2 促进肿瘤新生血管形成已经在某些方面得到证实, 如有报道, 肿瘤细胞表达 ID-2 蛋白时可以提高血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达量^[11]。Vandeputte 等^[12]发现, 胶质细胞瘤的血管内皮细胞、ID 1-3 阳性表达水平与肿瘤血管密度呈显著正相关。但国内未见 ID-2 蛋白表达与 ESCC 血管生成的关系研究。本研究结果显示, CD34 免疫染色定位于微血管内皮细胞。癌区组织中微血管形态不规则, 分布不均。癌灶边缘血管最密集, 成簇状, 部分呈发芽状, ID-2 蛋白的表达程度与 ESCC MVD 呈正相关, ID-2 表达越高 MVD 值越大。一定程度说明 ID-2 的高表达在 ESCC 新生血管的形成中起重要作用, ID-2 蛋白可能是 ESCC 的重要促血管生成因子之一。进而提示抑制 ID-2 的表达可能抑制 ESCC 新生血管生成, 具抗肿瘤效应。然后目前 ID-2 在促进血管生成方面的机制并不是很明确, 有待今后进一步深入研究加以阐明。

综上所述, 我们得出 ID-2 蛋白的表达与 ESCC 的发生、新生血管形成关系密切, 其可能是 ESCC 的重要促血管生成因子之一, 尽管 ID-2 蛋白在血管发生中起重要作用, 但其机制及能否促进肿瘤的转移目前还没有定论, 尚需作相关细胞增殖及其他血管生成因子等方面的研究, 期望随着今后在基因水平、预后随访及大宗样本等的深入研究, 其在肿瘤治疗和预后判断等方面的潜在价值将得以凸显, 在翻译水平抑制 ID-2 表达可能抑制 ESCC 血管生成, 可能提高患者的预后, 并有望成为 ESCC 治疗的重要靶点之一。

参考文献:

- [1] 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(1):49-59.
- [2] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors [J]. Breast Cancer Res Treat, 1995, 36(2):169-180.
- [3] Li XL, Yang S. Expression of Id gene in lung cancer and its relationship with clinical parameter[J]. Cancer Research and Clinic, 2010, 22(6):396-399. [李晓莉, 杨舒. 肺癌患者 Id 蛋白及基因的表达及其与临床参数的关系[J]. 肿瘤研究与临床, 2010, 22(6):396-399.]
- [4] Stighall M, Manetopoulos C, Axelson H, et al. High ID2 protein expression correlates with a favourable prognosis in patients with primary breast cancer and reduces cellular invasiveness of breast cancer cells [J]. Int J Cancer, 2005, 115(3):403-411.
- [5] Yang WQ, Wu CL, Cai YM, et al. Expression of Id1 and Id2 in esophageal squamous cell carcinoma and its significance[J]. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2010, 26(2):144-147. [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.]
- [6] Newton TR, Parsons PG, Lincoln DJ, et al. Expression profiling correlates with treatment response in women with advanced serous epithelial ovarian cancer[J]. Int J Cancer, 2006, 119(4):875-883.
- [7] Asirvatham AJ, Carey JP, Chaudhary J. ID-1, ID-2, and ID-3 regulated gene expression in E2A positive or negative prostate cancer cells[J]. Prostate, 2007, 67(13):1411-1420.
- [8] Yue F, Zhou JC, Wang F, et al. Comparison study on the expression of inhibitor of differentiation-2 in esophageal carcinoma and their pericarcinous tissues [J]. Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2012, 21(19):2053-2055. [岳峰, 周进朝, 王芳, 等. 分化抑制因子-2 在食管癌及癌旁组织表达的比较研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(19):2053-2055.]
- [9] Kim HJ, Chung H, Too YG, et al. Inhibitor of DNA binding 1 activates vascular endothelial growth factor through enhancing the stability and activity of hypoxia-inducible factor-1 α [J]. Mol Cancer Res, 2007, 5(4):321-329.
- [10] Li B, Tsao SW, Li YY, et al. Id-1 promotes tumorigenicity and metastasis of human esophageal cancer cells through activation of PI3K/AKT signaling pathway[J]. Int J Cancer, 2009, 125(11):2576-2585.
- [11] Lasorella A, Rothschild G, Yokota Y, et al. Id2 mediates tumor initiation, proliferation, and angiogenesis in Rb mutant mice[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(9):3563-3574.
- [12] Vandeputte D, Troost D, Leenstra S, et al. Expression and distribution of Id helix-loop-helix proteins in human astrocytic tumors[J]. J. Neurosci, 2002, 22(14):329-338.

第三届广州国际肿瘤学术会议通知

为充分把握国际肿瘤学术研究前沿和进展动态,促进我国肿瘤学发展,加强基础与临床的紧密结合,为从事肿瘤研究和防治工作的相关学者提供交流信息的平台,广东省抗癌协会、美中抗癌协会(USCACA)、中山大学肿瘤防治中心、《癌症(*Chinese Journal of Cancer*)》杂志将于2013年11月7日至9日在广东广州联合主办“第三届广州国际肿瘤学术会议”。

在成功举办前两届会议的基础上,第三届广州国际肿瘤学术会议将以“关注学科发展前沿,加强国内外学术交流”为宗旨,拟邀请多位来自美国及其他国家的著名肿瘤中心的国际知名肿瘤学家及国内多名医学界两院院士和著名肿瘤学专家、学术精英作专题学术报告。

初冬的羊城依然繁花似锦,气候宜人!我们诚挚地邀请中外专家、学者参加本次大会,相互交流,共同进步,为我国肿瘤学防治事业的发展不懈努力。

会议地点:广州白云国际会议中心

网上报名截止日期:2013年10月15日

联系人:欧老师 联系电话:020-87343138 E-mail:gzco2011@163.com

详情敬请登陆大会网站:<http://gzco.sysucc.org.cn>