

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.25.015

## Id2 和 MMP9 的表达及其与食管鳞癌的临床病理特征关系研究\*

岳黎敏<sup>1</sup>,程书珍<sup>2</sup>,郑海萍<sup>3</sup>,商小涓<sup>1</sup>

(河北工程大学:1. 医学院基础医学系;2. 医学院检验系;3. 附属医院中心实验室,河北邯郸 056029)

**[摘要]** **目的** 观察细胞分化/DNA 结合抑制因子 2(Id2)和基质金属蛋白酶 9(MMP9)在食管鳞癌组织中的表达,探讨 Id2 和 MMP9 表达的意义及相关性。**方法** 应用免疫组织化学方法检测 70 例食管鳞癌和 30 例正常食管上皮中 Id2 和 MMP9 的表达水平。**结果** 食管鳞癌中 Id2 和 MMP9 的阳性表达率均显著高于正常食管上皮( $P<0.01$ );Id2 和 MMP9 的表达水平均随食管鳞癌的浸润加深、临床 TNM 分期级别增高而升高,浸润深度在 T<sub>3</sub>+T<sub>4</sub> 组的表达水平高于 T<sub>1</sub>+T<sub>2</sub> 组( $P<0.05$ ),临床 II 期和 III、IV 期的表达水平高于 I 期( $P<0.05$ ),但 Id2 和 MMP9 的表达均与食管鳞癌的分化程度无显著相关( $P>0.05$ )。淋巴结转移组中 MMP9 的表达水平高于无淋巴结转移组( $P<0.05$ );而 Id2 的表达与淋巴结转移无显著相关( $P>0.05$ );食管鳞癌组织中 Id2 和 MMP9 的表达水平呈正相关关系( $P<0.05$ )。**结论** Id2 和 MMP9 在食管鳞癌的发生和浸润进展中存在协同促进作用,同时检测对于评估食管鳞癌的生物行为学和预后具有重要意义。

**[关键词]** 食管肿瘤;Id2;基质金属蛋白酶 9**[中图分类号]** R735.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)25-3503-03

## Expression of Id2 and MMP9 in esophageal squamous cell carcinoma and its relationship with clinicopathological features\*

Yue Limin<sup>1</sup>, Cheng Shuzhen<sup>2</sup>, Zheng Hai ping<sup>3</sup>, Shang Xiaojuan<sup>1</sup>

(1. Department of Basic Medicine, Medical school; 2. Inspection Department of Medical School;

3. Central Laboratory of Affiliated Hospital, Hebei Engineering University, Handan, Hebei 056029, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression and clinicopathological significance of inhibitors of differentiation 2(Id2) and Matrix metalloproteinase9(MMP9)in esophageal squamous cell carcinoma(ESCC) and explore their correlation. **Methods** The expression of Id2 and MMP9 in 70 cases of ESCC and 30 cases of controls were detected by immunohistochemical staining. **Results** The positive rates of Id2 and MMP9 in ESCC were significantly higher than those in normal esophageal epithelia( $P<0.01$ ). Expression levels of Id2 and MMP9 were increased as the infiltration depth and TNM staging increased, and the levels were higher in T<sub>3</sub>+T<sub>4</sub> group and II, III, IV stage than in T<sub>1</sub>+T<sub>2</sub> group and I stage( $P<0.05$ ), but not correlate to pathologic grades ( $P>0.05$ ). Expression level of MMP9 was higher in lymph node metastasis group than in group without lymph node metastasis ( $P<0.05$ ), but expression levels of Id2 were not related to lymph node metastasis( $P>0.05$ ). The expression of Id2 and MMP9 were positively correlated( $P<0.05$ ). **Conclusion** Id2 and MMP9 might synergistically promote the tumorigenesis and development of ESCC, and their co-detection can be of great importance for estimation of biological behavior and prognosis of ESCC.

**[Key words]** esophageal neoplasms; Id2; MMP9

食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是一种高侵袭性的恶性肿瘤,5 年生存率仅为 10.00%~13.00%,高侵袭转移能力是 ESCC 预后差的主要原因。细胞分化/DNA 结合抑制因子 2(inhibitor of differentiation/DNA binding 2, Id2)属于螺旋-环-螺旋(HLH)家族中分化抑制因子 Id 蛋白家族的成员。近年研究表明 Id2 分子在多种肿瘤高表达,并可促进肿瘤的生长及侵袭转移<sup>[1-2]</sup>。基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9, MMP9)作为 MMPs 家族的重要成员,在多种肿瘤的侵袭、转移中起重要作用<sup>[3-5]</sup>。但 ESCC 中 Id2 的表达及其与 MMP9 表达的关系,国内外少有报道。本文通过检测 ESCC 中 Id2 和 MMP9 的表达情况,以期探讨 Id2 在 ESCC 发生、浸润进展中的作用,以及 Id2 与 MMP9 表达的相关性。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 收集 2011~2014 年河北工程大学附属医院就诊的食管癌高发地区(河北邯郸市及周围地区)ESCC 术后标本

70 例,另随机选取 30 例手术切除的食管癌切除段的两端切缘处组织(>5 cm)为对照,经组织学确认为正常食管上皮。病例纳入标准:(1)经病理医师确诊为 ESCC;(2)术前未接受放射治疗或化学治疗;(3)病史及临床病理资料完整。排除标准:(1)病理学诊断不属于 ESCC;(2)术前曾接受放射治疗或化学治疗;(3)临床病理资料不完整。

**1.2 方法** 兔抗人 Id2 单克隆抗体为 Bioworld 公司产品,鼠抗人 MMP9 单抗、SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥公司。免疫组织化学采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶法(streptavidin peroxidase, SP),按试剂盒说明书操作,微波抗原修复,用已知的乳腺癌阳性切片做阳性对照,以 PBS 代替一抗做阴性对照。

**1.3 结果判定** Id2 结果判定根据染色强度和阳性细胞百分比进行综合计分。染色强度:无着色计 0 分,淡黄色计 1 分,棕黄色计 2 分,棕褐色计 3 分;阳性细胞的百分比:在光学显微镜下随机选取 5 个高倍视野( $\times 400$ ),计数阳性细胞的百分比的

平均数,阴性为 0 分,阳性细胞:≤25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,>75% 计 4 分;染色程度×阳性细胞百分比得 0 分为阴性(-),1~4 分为低表达(+),>4 分为高表达(++).MMP9 结果判定,阳性细胞:<10% 为(-),10%~50% 为(+),>50% 为(++);计数均由 2 位资深病理医师采用双盲法观察计算获得。

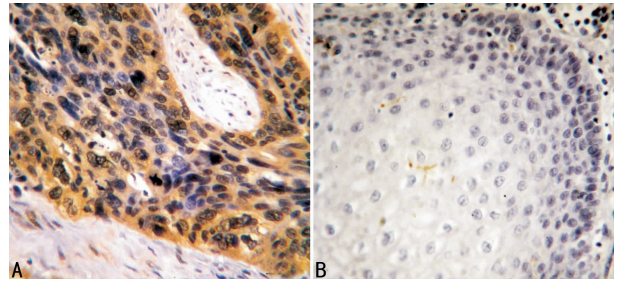
**1.4 统计学处理** 应用 SPSS17.0 统计学软件进行数据处理,采用  $\chi^2$  检验、等级资料秩和检验(Mann-Whitney *U* 法和 Kruskal-Wallis *H* 法)及 Spearman 等级相关分析。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 Id2 和 MMP9 在正常食管上皮和 ESCC 组织中的表达** Id2 与 MMP9 均主要定位表达于 ESCC 细胞的细胞质(图 1、2),在 ESCC 中两者表达阳性率分别为 92.85%(65/70)和 84.29%(59/70),均显著高于在正常食管上皮中阳性率 16.67%(5/30)和 20.00%(6/30),差异有统计学意义(均  $P<0.001$ )。

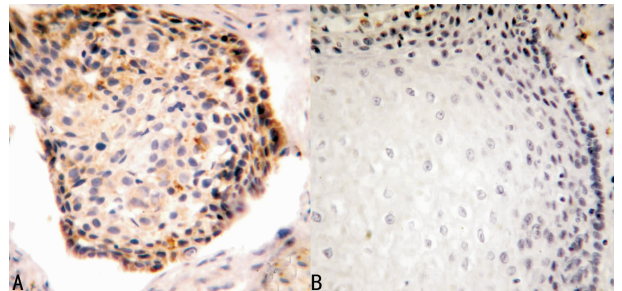
**2.2 Id2、MMP9 表达与 ESCC 临床病理参数的关系** Id2 和 MMP9 的表达均与 ESCC 的浸润深度、临床 TNM 分期显著相关,两种因子的表达水平均随浸润加深、TNM 分期级别增高而升高,浸润深度在  $T_3+T_4$  组(浸及纤维膜)的表达水平高于  $T_1+T_2$  组(未浸及纤维膜),临床 II 期和 III、IV 期的表达水平高于 I 期,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。Id2 和 MMP9 的表达均与分化程度无相关( $P>0.05$ )。淋巴结转移组中 MMP9

的表达水平高于无淋巴结转移组( $P<0.05$ );而 Id2 的表达与淋巴结转移无相关( $P>0.05$ ),见表 1。



A:ESCC;B:正常食管上皮。

图 1 Id2 在 ESCC 和正常食管上皮的表达(SP 染色×400)



A:ESCC;B:正常食管上皮。

图 2 MMP9 在 ESCC 和正常食管上皮的表达(SP 染色×400)

表 1 Id2、MMP9 表达与 ESCC 临床病理参数的关系(n)

临床病理参数	n	Id2					MMP9				
		-	+	++	<i>U</i> / $\chi^2$	<i>P</i>	-	+	++	<i>U</i>	<i>P</i>
<b>浸润深度</b>											
$T_1+T_2$	45	5	24	16	400.000	0.026 <sup>a</sup>	11	18	16	404.000	0.035 <sup>a</sup>
$T_3+T_4$	25	0	10	15			0	12	13		
<b>分化程度</b>											
未、低分化	24	3	9	12	0.047	0.977	3	9	12	1.253	0.534
中分化	20	1	11	9			3	9	8		
高分化	26	1	14	11			5	12	9		
<b>TNM 分期</b>											
I	10	3	6	1	9.507	0.009 <sup>a</sup>	5	5	0	13.041	0.001 <sup>a</sup>
II	45	2	22	21		0.005 <sup>b</sup>	6	18	21		0.001 <sup>b</sup>
III、IV	1	0	6	9		0.004 <sup>b</sup>	0	7	8		0.000 <sup>b</sup>
<b>淋巴结转移</b>											
无	45	4	24	17	452.00	0.130	10	21	14	365.000	0.009 <sup>a</sup>
有	25	1	10	14			1	9	15		

<sup>a</sup>: $P<0.05$ ,组内比较;<sup>b</sup>: $P<0.017$ (校正检验标准),与临床 I 期比较。

表 2 Id2 与 MMP9 在 ESCC 中表达的相关性

MMP9	Id2			<i>r<sub>s</sub></i>	<i>P</i>
	-	+	++		
-	1	9	1	0.272	0.023
+	4	11	15		
++	0	14	15		

**2.3 Id2 与 MMP9 表达的相关性** 经 Spearman 等级相关分析显示,ESCC 中 Id2 和 MMP9 的表达水平呈正相关( $r_s=0.272,P=0.023$ ),见表 2。

**3 讨论**

Id 蛋白为碱性 DNA 结合区缺失的 HLH 蛋白,作为转录调控因子,他主要通过与众多的 bHLH 类转录因子(约 200 多个)形成无活性的异二聚体,抑制 bHLH 的功能,从而抑制细

胞的分化,促进细胞的增殖。已有研究表明 Id 分子作为转录调控因子参与调控细胞周期、细胞分化以及肿瘤的发生、转移等过程<sup>[1,6]</sup>。目前在哺乳动物已发现的 Id 蛋白有 4 种:Id1、Id2、Id1 和 Id4。其中 Id1 在多种肿瘤中的诊断和治疗价值已得到广泛关注。近年研究表明 Id2 与多种肿瘤的发生也关系密切。本研究结果显示 Id2 在 ESCC 中的阳性表达率显著高于正常食管上皮,与多数文献报道一致<sup>[6-8]</sup>,提示 Id2 可能是食管鳞癌的发生中一个重要的分子生物学标志。

有关 Id2 与肿瘤临床病理特征关系的研究发现,Id2 的功能存在明显的组织特异性,在不同类型的肿瘤中其功能和意义也不同,如在前列腺癌、卵巢癌中 Id2 表达水平与肿瘤的分化程度、浸润深度呈正相关,与其预后呈负相关<sup>[7]</sup>;而在乳腺癌,Id2 表达水平与肿瘤浸润深度、淋巴结转移呈负相关,是其预后的良性指标<sup>[2,8]</sup>。此外,在体外培养的细胞株研究中发现,Id2 蛋白可使多种肿瘤细胞的侵袭性增强,如在乳腺癌细胞株 MCF-7<sup>[9]</sup>、卵巢癌细胞株 SKOV3<sup>[9]</sup>及前列腺癌细胞株<sup>[7]</sup>转染结构性表达的 Id2,均可引起癌细胞侵袭能力明显增强。本研究结果显示在体内 ESCC 组织中 Id2 的表达随肿瘤的浸润加深、TNM 分期级别增高而升高,提示 Id2 过表达使 ESCC 细胞的侵袭能力增强,促进 ESCC 浸润进展,可能是判断其生物学行为和预后的恶性指标。但本研究也显示 Id2 的表达水平与 ESCC 的分化程度及淋巴结转移未见显著相关性,结果与 Yuen 等<sup>[6]</sup>一致。

MMP9 属于明胶酶类,又称为明胶酶 B。已从基因水平证实 MMP9 由癌细胞产生,MMP9 可降解基膜和细胞外基质,促使癌细胞穿越组织屏障,向肿瘤的周围或远处侵袭转移<sup>[3]</sup>。MMP9 在多种肿瘤中表达升高,本研究证实 MMP9 在 ESCC 中阳性表达率显著高于正常食管上皮,并且 MMP9 表达水平与 ESCC 的浸润深度、临床分期及淋巴结转移存在相关性,说明 MMP9 的过表达在 ESCC 的侵袭和转移中也具有重要作用,与以往报道结果一致<sup>[10]</sup>。目前关于 Id 分子与 MMP 表达关系的研究中发现,将 Id1 转染前列腺癌细胞株 CNCaP,可使活化型 MMP2 分泌量显著升高<sup>[7]</sup>;采用 SiRNA 技术在高侵袭性前列腺癌细胞株 PC3 和 DU145 中沉默 Id1、Id2、Id3 基因表达,均可引起 MMP9 基因的表达下降,其作用机制已证实依赖于 Id 分子的 HLH 结构域<sup>[11]</sup>。另 Wang 等<sup>[12]</sup>证实 Id2 的靶基因 NF- $\kappa$ B 可调控 MMP9 的表达,在 ESCC 细胞株 EC9706 中转染结构性表达的 NF- $\kappa$ B,可致 MMP9 表达升高。本研究显示在体内 ESCC 组织中 Id2 与 MMP9 均高表达并呈正相关关系,提示 Id2 可能通过 HLH 结构域或转录因子 NF- $\kappa$ B 等途径促进 MMP9 的表达,Id2 可直接或间接提高癌细胞的侵袭能力,两种因子可能协同促进了 ESCC 的浸润进展。

综上所述,Id2 与 MMP9 在 ESCC 的发生及浸润进展中可能起着协同促进作用,联合检测 Id2 与 MMP9 的表达,有望成为评估其生物学行为和预后的重要生物学指标。但在体内 ESCC 中,Id2 能否促进转移及 Id2 与 MMP9 协同作用的分子机制等问题,还有待于通过预后随访、大宗样本及基因水平等深入研究。

## 参考文献

- [1] Ling F, Kang B, Sun XH, et al. Id proteins; small molecules, mighty regulators[J]. *Curr Top Dev Bio*, 2014, 110(1):189-216.
- [2] Wazir U, Jiang WG, Sharma AK, et al. The mRNA expression of inhibitors of DNA binding-1 and-2 is associated with advanced tumour stage and adverse clinical outcome in human breast cancer [J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(5):2179-2183.
- [3] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z, et al. Matrix metalloproteinases; regulators of the tumor microenvironment [J]. *Cell*, 2010, 141(1):52-67.
- [4] Puzovic V, Brcic I, Ranogajec I, et al. Prognostic values of ETS-1, MMP-2 and MMP-9 expression and co-expression in breast cancer patients[J]. *Neoplasma*, 2014, 61(4):439-446.
- [5] 孙晋敏, 郭存存, 柳红, 等. 结肠癌组织中 FOXO3a 与 MMP9 的表达及意义[J]. *重庆医学*, 2014, 43(1):35-38.
- [6] Yuen HF, Chan YP, Chan KK, et al. Id-1 and Id-2 are markers for metastasis and prognosis in oesophageal squamous cell carcinoma. [J]. *Br J Cancer*, 2007, 97(10):1409-1415.
- [7] Coppe JP, Itahana Y, Moore DH, et al. Id-1 and Id-2 proteins as molecular markers for human prostate cancer progression [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(6):2044-2051.
- [8] Li K, Yao L, Chen L, et al. ID2 predicts poor prognosis in breast cancer, especially in triple-negative breast cancer, and inhibits E-cadherin expression[J]. *Onco Targets Ther*, 2014, 18(7):1083-1094.
- [9] Meng Y, Gu C, Wu Z, et al. Id2 promotes the invasive growth of MCF-7 and SKOV-3 cells by a novel mechanism independent of dimerization to basic helix-loop-helix factors. [J]. *BMC cancer*, 2009, 75(10):5023-5019.
- [10] Li Y, Ma J, Guo Q, et al. Overexpression of MMP-2 and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Dis Esophagus*, 2009, 22(8):664-667.
- [11] Asirvatham AJ, Carey JP, Chaudhary J, et al. ID1-, ID2-, and ID3-regulated gene expression in E2A positive or negative prostate cancer cells[J]. *Prostate*, 2007, 67(13):1411-1420.
- [12] Wang F, He W, Fanghui P, et al. NF- $\kappa$ B P65 promotes invasion and metastasis of oesophageal squamous cell cancer by regulating matrix metalloproteinase-9 and epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Cell Boil Int*, 2013, 37(8):780-788.