

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.31.024

## 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

单铁英<sup>1</sup>,单铁强<sup>2</sup>,岳峰<sup>3</sup>,袁征<sup>1</sup>,王芳<sup>1</sup>,王雪丹<sup>1</sup>,郑海萍<sup>1</sup>,董永杰<sup>3</sup>,周进朝<sup>4</sup>,李桂英<sup>1△</sup>

(1. 河北工程大学医学院基础医学系,河北邯郸 056002;2. 河北省秦皇岛市海港医院检验科 066000;  
3. 河北省邯郸市中心医院普外科,河北邯郸 056002;4. 河北省邯郸市永年县第二医院普外科 056002)

**[摘要]** **目的** 观察在人直肠癌组织中分化抑制因子-2(Id-2)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达情况,分析两者表达水平的相关性,探讨直肠癌临床病理学指标与两者的表达水平的关系。**方法** 收集直肠癌组织和癌旁正常组织标本 56 例,采用免疫组织化学方法观察 Id-2 和 MMP-9 在直肠癌和癌旁正常组织中的表达水平,Spearman 相关分析法分析 Id-2 与 MMP-9 表达有无相关性,分析 Id-2 与 MMP-9 表达与直肠癌临床病理学指标之间的关系。**结果** Id-2 在直肠癌组织的阳性表达率明显高于癌旁正常组织(73.21% vs. 48.21%, $P<0.05$ ),MMP-9 在直肠癌组织中的阳性表达率高于癌旁正常组织(71.43% vs. 44.64%, $P<0.05$ )。Spearman 相关分析检测 Id-2 与 MMP-9 表达水平存在正相关性( $r=0.393$ , $P=0.003$ );Id-2 和 MMP-9 表达水平与直肠癌分化程度、TNM 分期和淋巴结转移有关( $P<0.05$ );而与年龄和性别无关( $P>0.05$ )。**结论** Id-2 和 MMP-9 的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。

**[关键词]** 直肠癌;分化抑制因子-2;基质金属蛋白酶-9;免疫组织化学

**[中图分类号]** R735.3

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)31-4392-04

### The relationship between expression of Id-2 and MMP-9 and clinical pathology index in rectal cancer

Shan Tieying<sup>1</sup>, Shan Tieqiang<sup>2</sup>, Yue Feng<sup>3</sup>, Yuan Zheng<sup>1</sup>, Wang Fang<sup>1</sup>, Wang Xuedan<sup>1</sup>,  
Zheng Hai ping<sup>1</sup>, Dong Yongjie<sup>3</sup>, Zhou Jinchao<sup>4</sup>, Li Guiying<sup>1△</sup>

(1. College of Medical Sciences, Hebei Engineering University, Handan, Hebei 056002, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Harbor Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao, Hebei 066000, China; 3. Department of General Surgery, Central Hospital of Handan, Handan, Hebei 056002, China;  
4. Department of General Surgery, the Second Hospital of Yongnian, Handan, Hebei 056002, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the expression level of inhibitor of differentiation 2 (Id-2) and matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) in rectal cancer, analysis the correlation of the expression level of them, to study the relationship between the expression level of them and the clinical pathology indicators of rectal cancer. **Methods** Rectal cancer tissues and normal tissue adjacent to rectal cancer were obtained from the rectal cancer resection of 56 patients with rectal cancer, using immunohistochemical method to observe the expression level of Id-2 and MMP-9 in normal tissue adjacent to rectal cancer and rectal cancer and Spearman correlation test to detect the correlation between the expression level of Id-2 and MMP-9; then we analyzed the relationships between the expression level of Id-2 and MMP-9 and the index of rectal cancer clinical pathology. **Results** The positive expression rate of Id-2 in the in rectal cancer tissues is more higher than that of normal tissue of adjacent to rectal cancer (73.21% vs. 48.21%, $P<0.05$ ). The positive expression rate of MMP-9 in the in rectal cancer tissues is higher than that of normal tissue of adjacent to rectal cancer (71.43% vs. 44.64%, $P<0.05$ ). Spearman correlation test showed that there is the positive correlation between the expression level of Id-2 and MMP-9 ( $r=0.393$ , $P=0.003$ ). The expression levels of Id-2 and MMP-9 in rectal cancer were correlated with the degree of tumor differentiation, TNM stage and lymph node metastasis ( $P<0.05$ ), but had no differences between the elements of age and sex ( $P>0.05$ ). **Conclusion** There is a close relationship between the expression levels of Id-2 and MMP-9 in rectal cancer and the occurrence and development of rectal cancer. Rectal cancer with the higher Id-2 expression level may be the ways to achieve tumor invasion and metastasis through MMP-9 as a facilitator.

**[Key words]** rectal neoplasms; inhibitor of differentiation protein 2; matrix metalloproteinases-9; immunohistochemistry

直肠癌是我国消化道肿瘤中最为常见的恶性肿瘤之一,其发生率仅次于胃癌和食管癌,近年来由于人们的饮食结构发生变化,它的发病率有逐年增高的趋势,同时发病年龄也趋向年轻化,因此对于直肠癌的发生发展的研究引起广大医学者的兴趣。研究表明,分化抑制因子 2(inhibitors of differentiation 2, Id-2)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达水平与直肠癌的发生发展存在着密切的关系。本研究主要观察在人直肠癌组织

中 Id-2 和 MMP-9 的表达情况,分析两者表达水平的相关性,探讨直肠癌临床病理学指标与两者表达水平的关系。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2010 年 1 月 1 日至 2011 年 9 月 1 日来自邯郸市中心医院经手术切除的原发性直肠癌组织标本 56 例,其中男 44 例,女 12 例。年龄 33~75 岁,中位年龄 55 岁。所有标本中均以直肠癌组织的中心组织为直肠癌组织,以距癌

肿 5 cm 的组织为癌旁正常组织。根据第 7 版肿瘤 TNM 分期(国际抗癌联盟和美国癌症联合会合作制订),对直肠癌进行分期:56 例患者中,11 例为 I 期,15 例为 II 期,17 例为 III 期,13 例为 IV 期。采用 2000 年 WHO 标准对直肠癌组织学分型:33 例为高、中等分化,23 例为低等分化。24 例患者有淋巴结转移,32 例患者无淋巴结转移。所有断端组织均未发现癌细胞。所有病例取材前均未接受化学治疗及放射治疗。上述患者均无异常病史如糖尿病及糖耐量等。患者的标本经病理科确诊。

**1.2 主要试剂** 鼠抗人 Id-2、鼠抗人 MMP-9 多克隆抗体以及 SP 免疫组织化学试剂盒均购自北京中杉金桥生物有限公司,DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物有限公司。

**1.3 结果判定标准**

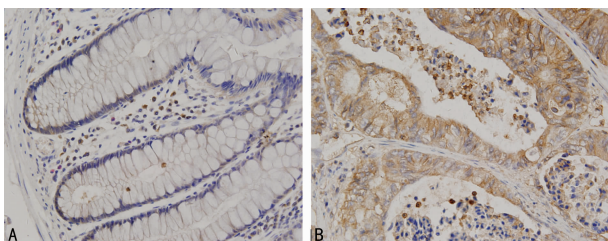
**1.3.1 Id-2 染色结果的判断** Id-2 阳性细胞表示为:细胞质呈现出染色为棕黄色的细颗粒。结果的判断以阳性细胞数的多少和细胞染色强度的高低为依据并采用半定量积分的方法来表示,染色强度计分:0 分为无色,1 分为浅黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色;阳性细胞数所占的比例计分:0 分为无阳性细胞,1 分为小于或等于 25%,2 分为 26%~50%,3 分为 51%~75%,4 分为大于或等于 76%。上述二者计分的乘积:阴性(-)为 0 分,弱阳性(+)为 1~3 分,中阳性(++)为 4~8 分,强阳性(+++)为 9~12 分。

**1.3.2 MMP-9 染色结果判定方法** 结果判断 MMP-9 蛋白主要在细胞质表达,阳性染色为细胞质呈现出棕黄色或黄褐色的颗粒,根据染色细胞所占细胞总数的百分比计分:阴性(-)为无细胞染色;弱阳性(+)为阳性细胞数小于 20%;中阳性(++)为阳性细胞数 21%~50%;强阳性(+++)为阳性细胞数大于 50%。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS14.0 软件分析和处理数据,计数资料采用率表示,组间的比较采用  $\chi^2$  检验,两种蛋白的表达水平有无相关性采用 Spearman 相关分析法。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 Id-2 在各组织中的表达情况** 在大部分直肠癌组织标本中可见 Id-2 着色呈棕黄或棕褐色,位于细胞质中,阳性细胞较多且呈弥散分布;癌旁正常组织标本中也可见着色,但是阳性细胞数较少且染色较浅呈浅黄色,散在分布于间质;癌旁正常组织中阳性表达极少(见图 1)。在直肠癌组织和癌旁正常组织中 Id-2 的阳性表达率分别为 73.21% 和 48.21%;在癌旁正常组织中 Id-2 的阳性表达率比在直肠癌组织的阳性表达率明显降低。经统计学分析其差异有统计学意义( $\chi^2 = 13.077, P < 0.05$ ),见表 1。



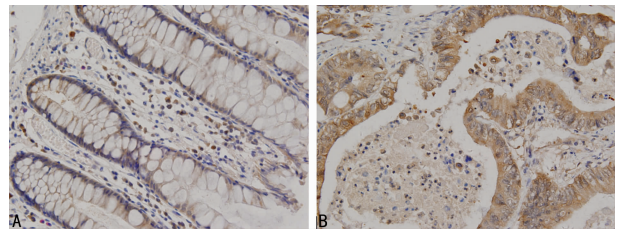
A:癌旁正常组织;B:直肠癌组织。

图 1 Id-2 在癌旁正常组织及直肠癌中的表达( $\times 400$ )

表 1 Id-2 在直肠癌及癌旁正常组织中的表达

组别	n	Id-2 表达				阳性表达率(%)
		- (n)	+ (n)	++ (n)	+++ (n)	
癌旁正常组织	56	29	18	5	4	48.21
直肠癌组织	56	15	21	12	8	73.21

**2.2 MMP-9 在各组织中的表达情况** 在大部分直肠癌组织标本中可见 MMP-9 着色呈棕黄或者棕褐色,位于细胞质中,阳性细胞较多且呈弥散分布;癌旁正常组织标本中也可见着色,但是阳性细胞数较少且染色较浅呈浅黄色,散在分布于间质;癌旁正常组织中阳性表达极少(见图 2)。在直肠癌组织和癌旁正常组织中 MMP-9 的阳性表达率分别为 71.43% 和 44.64%;在癌旁正常组织中的 MMP-9 阳性表达率比直肠癌组织的阳性表达率明显降低。经统计学分析其差异有统计学意义( $\chi^2 = 13.875, P < 0.05$ ),见表 2。



A:癌旁正常组织;B:直肠癌组织

图 2 MMP-9 在癌旁正常组织及直肠癌中的表达( $\times 400$ )

表 2 MMP-9 在直肠癌及癌旁正常黏膜中的表达

组别	n	MMP-9 表达				阳性表达率(%)
		- (n)	+ (n)	++ (n)	+++ (n)	
癌旁正常组织	56	31	16	5	4	44.64
直肠癌组织	56	16	15	20	5	71.43

**2.3 相关性分析** Spearman 相关分析表明 Id-2 与 MMP-9 在癌旁正常组织和直肠癌组织中的阳性率存在正相关性( $r = 0.393, P = 0.003$ ),见表 3。

表 3 Id-2 和 MMP-9 在癌旁正常组织和直肠癌组织中表达的相关性

Id-2	MMP-9				$r_s$	P
	-	+	++	+++		
-	11	2	1	1	0.393	0.003
+	6	3	4	4		
++	2	4	4	2		
+++	3	2	2	5		

**2.4 直肠癌的临床病理指标与肿瘤细胞中 Id-2 和 MMP-9 蛋白表达水平的关系**

**2.4.1 直肠癌的临床病理指标与 Id-2 表达水平的关系** 在 56 例直肠癌组织中 Id-2 的表达水平均升高,其中低分化组的 Id-2 阳性表达率(91.30%)明显高于中、高分化组(60.61%);III~IV 期组(90.00%)明显高于 I~II 期组(53.85%);有淋巴结转移组(91.67%)明显高于无淋巴结转移组(59.38%)。以

上差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。但是在直肠癌组织中 Id-2 的阳性表达率与患者的性别、发病年龄之间的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 4。

表 4 Id-2 的表达与不同直肠癌临床病理因素的关系

临床病理指标	n	- (n)	+ (n)	++ (n)	+++ (n)	阳性表达率(%)	$\chi^2$	P
年龄(岁)								
<55	26	7	10	6	3	73.08	0.000	0.983
≥55	30	8	11	7	4	73.33		
性别								
男	42	11	16	10	5	73.81	0.030	0.862
女	14	4	5	3	2	71.43		
分化程度								
高、中	33	13	13	5	2	60.61	6.513	0.011
低	23	2	4	7	10	91.30		
TNM分期								
I~II	26	12	7	4	3	53.85	9.284	0.002
III~IV	30	3	5	9	13	90.00		
淋巴结转移								
无	32	13	10	5	4	59.38	7.292	0.007
有	24	2	5	7	10	91.67		

#### 2.4.2 直肠癌的临床病理指标与 MMP-9 表达水平的关系

在 56 例直肠癌组织中 MMP-9 的表达水平均升高,其中低分化组的 MMP-9 阳性表达率(86.96%)明显高于中、高分化组(60.61%); III~IV 期组(86.67%)明显高于 I~II 期组(53.85%);有淋巴结转移组(87.50%)明显高于无淋巴结转移组(59.38%),以上差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。但是在直肠癌组织中 MMP-9 的阳性表达率与患者的性别、发病年龄之间的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 5。

表 4 MMP-9 的表达与不同直肠癌临床病理因素的关系

临床病理指标	n	- (n)	+ (n)	++ (n)	+++ (n)	阳性表达率(%)	$\chi^2$	P
年龄(岁)								
<55	26	7	10	5	4	73.08	0.065	0.799
≥55	30	9	11	6	4	70.00		
性别								
男	42	13	14	10	5	69.05	0.467	0.495
女	14	3	6	3	2	78.57		
分化程度								
高、中	33	13	12	6	2	60.61	4.611	0.032
低	23	3	3	7	10	86.96		
TNM分期								
I~II	26	12	8	3	3	53.85	7.352	0.007
III~IV	30	4	4	9	13	86.67		
淋巴结转移								
无	32	13	9	6	4	59.38	5.316	0.021
有	24	3	5	6	10	87.50		

### 3 讨论

Id-2 是一种在细胞发育过程中广泛表达的转录调控因子,作为 Id 蛋白家族成员之一,它也具有螺旋-环-螺旋(helix-loop-helix,HLH)的结构。Id-2 分子参与细胞的生长、发育、成熟、分化及死亡等过程,还参与调控细胞周期的进程。随后发现在不同种类的组织发育与肿瘤发展中 Id-2 蛋白表现出多种作用:如参与胚胎发生和器官形成,肿瘤的浸润、分化、侵袭转移行为及不良预后等功能<sup>[1-2]</sup>。目前已发现 Id-2 蛋白在多种恶性肿瘤组织如神经母细胞瘤<sup>[3]</sup>、乳腺癌<sup>[4]</sup>、鼻咽癌<sup>[5]</sup>、膀胱癌<sup>[6]</sup>中过表达,因此人们日益重视其在肿瘤发生发展中的作用及意义。本研究显示:直肠癌组织中 Id-2 的阳性表达率比癌旁正常组织的阳性表达率明显升高,两者比较差异有统计学意义,与上述文献的研究结果一致,表明 Id-2 的异常高表达可能与直肠癌的发生发展密切相关。

研究表明,有关 Id-2 蛋白与肿瘤的分化程度、肿瘤的侵袭和浸润、淋巴结转移和肿瘤的预后等的研究,其结果不完全相同,甚至还有矛盾的结果。Coppe 等<sup>[7]</sup>研究表明 Id-2 蛋白表达增多能使肿瘤细胞变得更有侵袭性。Itahana 等<sup>[8]</sup>在研究乳腺癌与 Id-2 表达的关系中发现,把 Id-2 基因导入 SCp2 鼠上皮细胞中后,细胞的增殖明显减慢。同时也发现在侵袭性高、分化低的乳腺癌细胞中 Id-2 mRNA 的表达水平明显高于侵袭性低、分化高的乳腺癌细胞。Schindl 等<sup>[9]</sup>应用免疫组织化学技术在早期宫颈癌组织中检测 Id-2 蛋白的表达水平,结果显示 Id-2 表达水平则与宫颈癌的预后无关。本研究结果也表明,Id-2 在直肠癌组织的阳性表达率明显高于癌旁正常组织。在分化低、III~IV 期和有淋巴结转移的直肠癌组织中 Id-2 的阳性表达率明显高于分化高、I~II 期和无淋巴结转移的直肠癌组织,而在年龄和性别方面 Id-2 的阳性表达率,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

MMP-9 属于水解酶的一种,它可对细胞外基质和基底膜成分进行降解,导致肿瘤细胞侵袭到身体的其他部位,从而促进了肿瘤的发展。研究表明,MMP-9 在许多肿瘤组织中,如颅内动脉瘤<sup>[10]</sup>、胃癌<sup>[11]</sup>、乳腺癌<sup>[12]</sup>等组织中均有不同程度的阳性表达。本研究结果表明:癌旁正常组织中 MMP-9 的阳性表达率明显低于其在直肠癌组织的阳性表达率;在分化低、III~IV 期和有淋巴结转移的直肠癌组织中 MMP-9 的阳性表达率明显高于分化高、I~II 期和无淋巴结转移的直肠癌组织,而在年龄和性别方面 MMP-9 的阳性表达率,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

本研究还显示 Id-2 表达与 MMP-9 表达呈正相关,直肠癌与癌旁正常组织中 Id-2 蛋白表达及 MMP-9 蛋白表达均存在差异。同时还观察到 Id-2 与 MMP-9 的表达部位一致,提示直肠癌组织中 Id-2 高表达可能是通过 MMP-9 途径来实现对肿瘤侵袭转移起促进作用。可以推测,在肿瘤的演进发展过程中,Id-2 与 MMP-9 的高表达起着协同作用。在直肠癌发生早期,Id-2 基因已发生改变,使细胞恶性转化、细胞增殖、分化失控和侵袭转移,促进了肿瘤的发生发展,同时也可能促进 MMP-9 的转录和功能,MMP-9 蛋白的表达也升高,对肿瘤细胞周围的基质和基底膜成分进行降解,从而增强肿瘤细胞侵袭转移能力,又进一步促进了肿瘤的发展。在这个过程中 Id-2 是通过何种信号途径来上调 MMP-9 水平,其机制尚不清楚,有待于进一步的研究。

总之,Id-2 的异常高表达可能在直肠癌演变过程中对直肠癌细胞的生长和侵袭起着重要的作用,其机制可能是通过激活 MMP-9 的转录,从而促进 MMP-9 的表达,直接或间接地促进肿瘤细胞的侵袭作用。因此,Id-2 可能为抗肿瘤治疗提供了新的靶点。

#### 参考文献

- [1] Norton JD. ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis[J]. *J Cell Sci*,2000,113(Pt 22):3897-3905.
- [2] Onken MD, Ehlers JP, Worley LA, et al. Functional gene expression analysis uncovers phenotypic Switch in aggressive uveal melanomas[J]. *Cancer Res*,2006,66(9):4602-4609.
- [3] Paoletta BR, Havrda MC, Mantani A, et al. p53 directly represses Id2 to inhibit the proliferation of neural progenitor cells[J]. *Stem Cells*,2011,29(7):1090-1101.
- [4] 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.
- [5] Liu Z, Chen J, Luo W, et al. Overexpressed DNA-binding protein inhibitor 2 as an unfavorable prognosis factor promotes cell proliferation in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*,2012,44(6):503-512.
- [6] Luo M, Li Z, Wang W, et al. Upregulated H19 contributes to bladder cancer cell proliferation by regulating ID2 expression[J]. *FEBS J*,2013,280(7):1709-1716.
- [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] Itahana Y, Singh J, Sumida T, et al. Role of Id-2 in the maintenance of a differentiated and noninvasive phenotype in breast cancer cells[J]. *Cancer Res*,2003,63(21):7098-7105.
- [9] Schindl M, Oberhuber G, Obermair A, et al. Overexpression of Id-1 protein is a marker for unfavorable prognosis in early-stage cervical cancer [J]. *Cancer Res*,2001,61(15):5703-5706.
- [10] 门中华. VEGF 和 MMP-9 在颅内动脉瘤中的表达及临床意义[J]. *细胞与分子免疫学杂志*,2010,26(11):1126-1128.
- [11] 陈健, 齐菲, 黄莹, 等. MMP-9 基因多态性与胃癌关系的研究[J]. *现代预防医学*,2013,40(12):2329-2333,2336.
- [12] 夏庆安, 付玉环, 姜广建. HSG、MMP-2 和 MMP-9 在乳腺癌组织中的表达及意义[J]. *现代预防医学*,2012,39(2):323-324,327.
- (收稿日期:2015-07-18 修回日期:2015-08-16)
- (上接第 4391 页)
- what are the risk factors? [J]. *Gynecology and Minimally Invasive Therapy*,2012,1(1):34-36.
- [9] Mettler L, Schollmeyer T, Tinelli A, et al. Complications of uterine fibroids and their management, surgical management of fibroids, laparoscopy and hysteroscopy versus hysterectomy, haemorrhage, adhesions, and complications [J]. *Obstet Gynecol Int*,2012,2012:791248.
- [10] Kim MS, Uhm YK, Kim JY, et al. Obstetric outcomes after uterine myomectomy; laparoscopic versus laparotomic approach[J]. *Obstet Gynecol Sci*,2013,56(6):375-381.
- [11] Mine Kiseli HA, Zeynep D. Spontaneous rupture of uterus in midtrimester pregnancy due to increased uterine pressure with previous laparoscopic myomectomy[J]. *Int J Fertil Steril*,2013,7(3):239-242.
- [12] 尹格平. 射频消融治疗子宫肌瘤疗效评价[J]. *中国实用妇科与产科杂志*,2012,28(12):908-911.
- [13] 王婷, 陈文直, 陈锦云, 等. 聚焦超声消融不同 MRI 图像表现的子宫肌瘤的疗效[J]. *重庆医科大学学报*,2011,36(5):539-541.
- [14] Ren XL, Zhou XD, Zhang J, et al. Extracorporeal ablation of uterine fibroids with high-intensity, focused ultrasound; imaging and histopathologic evaluation[J]. *J Ultrasound Med*,2007,26(2):201-212.
- [15] Ren XL, Zhou XD, Yan RL, et al. Sonographically guided extracorporeal ablation of uterine fibroids with high-intensity focused ultrasound: midterm results[J]. *J Ultrasound Med*,2009,28(1):100-103.
- [16] Dobrotwir A, Pun E. Clinical 24 month experience of the first MRgFUS unit for treatment of uterine fibroids in Australia[J]. *J Med Imaging Radiat Oncol*,2012,56(4):409-416.
- [17] Zhao WP, Chen JY, Zhang L, et al. Feasibility of ultrasound-guided high intensity focused ultrasound ablating uterine fibroids with hyperintense on T2-weighted Mr imaging[J]. *Eur J Radiol*,2013,82(1):e43-49.
- [18] Peng S, Xiong Y, Li K, et al. Clinical utility of a microbubble-enhancing contrast ("SonoVue") in treatment of uterine fibroids with high intensity focused ultrasound; a retrospective study[J]. *Eur J Radiol*,2012,81(12):3832-3838.
- [19] Meng X, He G, Zhang J, et al. A comparative study of fibroid ablation rates using radio frequency or high-intensity focused ultrasound [J]. *Cardiovasc Intervent Radiol*,2010,33(4):794-799.
- (收稿日期:2015-06-21 修回日期:2015-07-15)