

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201703003

· 咽喉疾病专栏 ·

IDO 和 BIN1 在喉鳞状细胞癌组织中的表达及其临床意义

彭丽娜

(邯郸市中心医院耳鼻咽喉科,河北邯郸 056000)

摘要: **目的** 通过检测喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma)患者肿瘤组织中吡啶胺 2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase,IDO)和桥接整合因子1(bridging integrator 1,BIN1)的表达,探讨其在喉癌发生发展中的作用。**方法** 应用免疫组织化学染色法检测 50 例喉鳞状细胞癌肿瘤组织和 23 例正常喉黏膜组织中 IDO 和 BIN1 的表达,并分析两者表达的相关性及其与患者临床特征的关系。**结果** IDO 在 50 例喉癌中阳性表达率为 60%,而在癌旁正常喉黏膜组织中 IDO 表达为 17.39%,与癌旁正常喉黏膜组织比较,喉癌 IDO 阳性表达率明显增高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);BIN1 在 50 例喉癌中阳性表达率为 50%,而在癌旁正常喉黏膜组织中 BIN1 蛋白阳性表达率为 95.65%,与癌旁正常喉黏膜组织比较,BIN1 阳性表达率明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$);而且 IDO 在原发灶和转移灶中的表达显著增高,BIN1 在原发灶和转移灶中的表达降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。在喉癌肿瘤组织中,IDO 表达与有无淋巴结转移、临床分期相关;BIN1 表达与肿瘤分化程度、有无淋巴结转移、临床分期相关。**结论** 喉癌患者肿瘤组织和颈部转移淋巴结中 IDO 表达水平明显提高,而 BIN1 表达水平显著降低,并且与患者临床特征紧密相关,这两者可能是影响喉癌发生发展的重要因素。

关键词: 喉鳞状细胞癌;吡啶胺 2,3-双加氧酶;桥接整合因子 1

中图分类号:R739.65 文献标识码:A [中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2017,23(3):202-206]

Expressions and clinical significance of IDO and BIN1 in laryngeal squamous cell carcinoma

PENG Li-na

(Department of Otolaryngology, Central Hospital of Handan City, Handan 056000, China)

Abstract: **Objective** To study the expressions of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and bridging integrator 1 (BIN1) in laryngeal squamous cell carcinoma, and to analyze their clinicopathological significances. **Methods** The expressions of IDO and BIN1 in 50 specimens of laryngeal carcinoma and 23 of normal laryngeal mucous tissues were detected by immunohistochemical staining, and correlation between the two expressions and their relations with clinical characteristics of the patients were analyzed. **Results** The positive expression rates of IDO were 60% and 17.39% in specimens of laryngeal carcinoma and normal laryngeal mucous tissue respectively, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). The positive expression rates of BIN1 in specimens of laryngeal carcinoma and normal laryngeal mucous tissue were 50% and 95.65%, and the difference was also statistically significant ($P < 0.01$). Comparing primary tumors with metastatic ones, the expression level of IDO was up-regulated, while that of BIN1 was down-regulated with statistically significant differences (both $P < 0.05$). The expression of IDO protein was associated with lymph node metastasis and clinical stage of the tumor, while the expression of BIN1 protein was associated with degree of differentiation, lymph node metastasis and clinical stage of the tumor. **Conclusions** In laryngeal squamous cell carcinoma specimens and metastatic cervical lymph nodes, the expression level of IDO is up-regulated significantly and that of BIN1 is down-regulated, which is closely associated with clinical features of the tumor. IDO and BIN1 might be important factors affecting

基金项目:邯郸市科学技术研究与发展计划项目(16232080662c)。

作者简介:彭丽娜,女,硕士,主治医师。

通信作者:彭丽娜,Email:pengpengheng2009@163.com

occurrence and progression of laryngeal squamous cell carcinoma.

Key words: Laryngeal squamous cell carcinoma; Indoleamine 2,3-dioxygenase; Bridging integrator 1

[Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2017, 23(3):202-206]

喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma)是耳鼻咽喉头颈外科最常见的一种恶性肿瘤,其发病率逐年上升,其原因到目前为止尚不明确,但通常认为是由多种因素联合作用的结果。近年来,虽然手术、放射治疗、化疗等治疗手段取得很大进步,但是仍有很多患者出现迅速进展和复发转移。目前肿瘤致死性的主要原因是其肿瘤的侵袭转移性,而肿瘤细胞的迁移和侵袭是促进肿瘤转移的关键步骤。吡哆胺 2,3-双加氧酶(in-doleamine 2,3-dioxygenase,IDO)是肝外色氨酸沿犬尿氨酸途径分解代谢过程中的一种限速酶,它能够抑制 T 细胞、NK 细胞的增殖及其活化,在食管癌、卵巢癌、膀胱癌、肺癌等多种恶性肿瘤组织中均呈高表达状态,可以参与肿瘤的免疫逃逸,并促进肿瘤的生长及远处转移。桥接整合因子 1(bridging integrator 1, BIN1)是目前人类发现的极少数具有抑癌功能的配体蛋白,它通过抑制 STAT1 和 NF- κ B 途径使吡哆胺 2,3-双加氧酶的表达水平降低^[1],在多种恶性肿瘤中呈低表达甚至无表达状态^[2]。目前关于 IDO 和 BIN1 在喉癌中的表达情况尚无报道。本实验通过研究喉癌组织中 IDO 和 BIN1 的表达水平,探讨二者与喉癌的临床和病理特征的联系及相关性,旨在为喉癌防治提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 标本来源

选择 2014 年 8 月~2016 年 10 月在邯郸市中心医院耳鼻咽喉科行部分喉或全喉切除术的 50 例喉鳞状细胞癌患者,术前均未进行放疗和化疗,其中男 48 例、女 2 例;年龄 50~75 岁,平均年龄 61 岁。每位患者取其肿瘤组织作为实验样本,取 23 例患者的癌旁正常喉黏膜组织作为对照,并在伴有颈部淋巴结转移的患者中取其原发灶和转移灶进行比较。并根据国际抗癌协会(UICC)标准(1997)确定 TNM 分期:I 期 6 例,II 期 13 例,III 期 21 例,IV 期 10 例。喉癌分型:声门上型 23 例,声门型 27 例;按 WHO 肿瘤病理学分级标准:鳞状细胞癌高分化 18 例,中分化 13 例,低分化 19 例。所有标本均离体后 2 h 内放入 4% 甲醛中固定 24 h,石蜡包埋,常规病理苏

木精-伊红染色。肿瘤组织均病理证实为鳞状细胞癌,癌旁组织证实为正常喉黏膜组织。

1.2 免疫组化检测 IDO 和 BIN1 表达

常规石蜡切片,每张切片厚 4 μ m。采用免疫组织化学 SP 法检测 IDO、BIN1 表达,SP 试剂盒购自中杉金桥生物技术有限公司,具体步骤按试剂盒操作说明书进行。一抗为鼠抗人单克隆抗体,工作浓度为 1:300。每次染色均设用 PBS 代替一抗的阴性对照。

1.3 结果判定标准^[3]

显微镜下高倍镜观察,在肿瘤组织中,IDO 和 BIN1 阳性部位分别位于肿瘤细胞胞质和胞核,在颈部转移淋巴结中 IDO 和 BIN1 阳性部位分别见于胞浆和胞核。染色为浅黄色和棕褐色颗粒。每例标本随意选取 10 个视野,计算每个视野中染色面积,染色面积定量积分,无着色为 0, <25% 为 1, 25%~50% 为 2, >50% 为 3;同时计分多数阳性细胞呈现的染色强度,不显色 0 分、浅棕黄色 1 分、棕黄色 2 分、棕褐色 3 分。相加上述 2 项得分,0 分为“-”,1~2 分为“+”,3~4 分为“++”,5~6 分为“+++”。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件,蛋白阳性表达率的比较采用 χ^2 检验,不同蛋白在同一种组织中表达的关系采用 Spearman 相关性检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 IDO 和 BIN1 在喉癌组织和癌旁组织中的表达

IDO 在喉癌组织中的阳性率为 30 例 60%, 12 例(24%)IDO 呈“++”,18 例(36%)IDO 呈“+++”;IDO 在癌旁组织阳性率为 4 例(17.39%), 3 例(13.04%)IDO 呈“++”,1 例(4.34%)IDO 呈“+++”。喉癌组织与癌旁正常喉黏膜组织比较,喉癌肿瘤细胞 IDO 阳性表达率显著增高,差异具有显著统计学意义($P = 0.006$)。BIN1 在喉癌组织中的阳性率为 25 例(50%),7 例(14%)BIN1 呈“++”,18 例(36%)BIN1 呈“+++”;BIN1 在癌旁组织阳性率为 22 例 95.65%,2 例(8.69%)BIN1 呈阳性“++”,20 例(86.96%)BIN1 呈“+++”。喉

癌组织与癌旁正常喉黏膜组织比较,喉癌肿瘤细胞 BIN1 阳性表达率显著降低,差异有显著统计学意义 ($P=0.001$)。此外,IDO 与 BIN1 在喉癌组织中的表达呈显著负相关关系 ($r = -0.517, P = 0.000$)。见表 1、2。

表 1 喉癌患者肿瘤组织和癌旁组织中 IDO 的表达

分组	例数	IDO 表达				P
		-	+	++	+++	
肿瘤组织	50	13	7	12	18	0.006
癌旁组织	23	13	6	3	1	

表 2 喉癌患者肿瘤组织和癌旁组织中 BIN1 的表达

分组	例数	BIN1 表达				P
		-	+	++	+++	
肿瘤组织	50	15	10	7	18	0.001
癌旁组织	23	0	1	2	20	

2.2 IDO 和 BIN1 在 28 例喉癌患者肿瘤组织和颈部转移淋巴结中的表达

IDO 在原发灶(肿瘤组织)中的阳性率为 82.14%,在转移灶(颈部转移淋巴结)中的阳性率为 96.43%,差异具有统计学意义 ($P = 0.004$)。BIN1 蛋白在原发灶(肿瘤组织)中的阳性率为 28.57%,在转移灶(颈部转移淋巴结)中的阳性率为 10.71%,差异具有统计学意义 ($P = 0.044$)。见表 3、4。

表 3 喉癌患者原发灶和转移灶中 IDO 的表达

分组	例数	IDO 表达				P
		-	+	++	+++	
原发灶	28	3	2	9	14	0.004
转移灶	28	0	1	1	26	

表 4 喉癌患者原发灶和转移灶中 BIN1 的表达 (例)

分组	例数	BIN1 表达				P
		-	+	++	+++	
原发灶	28	12	8	3	5	0.044
转移灶	28	22	3	2	1	

2.3 IDO 和 BIN1 的表达与患者临床特征的相关性

在喉癌肿瘤组织中,IDO 的表达与淋巴结转移、肿瘤 TNM 分期相关,与患者年龄、肿瘤部位、肿瘤分化程度不相关;BIN1 的表达与淋巴结转移、肿瘤 TNM 分期、肿瘤分化程度相关,与患者年龄、部位不相关。具体数据见表 5。

3 讨论

恶性肿瘤的重要特征是浸润与转移,其决定着患者的预后。有学者^[4]提出了恶性肿瘤浸润的三步学说,即黏附、降解和移动。喉癌是耳鼻咽喉科最为常见的一种恶性肿瘤,其发生、发展是一个多基因、多阶段的演进过程^[5]。喉鳞状细胞瘤作为喉癌主要病理类型,约占喉癌的 95%,恶性程度高、侵袭力强,易发生侵袭转移,严重影响患者预后^[6]。

表 5 50 例喉癌患者 IDO、BIN1 的表达与临床病理因素之间的关系 (例)

项目	例数	IDO				P	BIN1				P
		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
年龄(岁)											
>60	37	8	5	11	13	0.384	13	7	5	12	0.602
≤60	13	5	2	1	5		2	3	2	6	
肿瘤生长部位											
声门上型	23	6	5	3	9	0.254	8	5	2	8	0.738
声门型	27	7	2	9	9		7	5	5	10	
淋巴结转移											
有	28	3	2	9	14	0.004	12	8	3	5	0.007
无	22	10	5	3	4		3	2	4	13	
肿瘤 TNM 分期											
I	6	4	1	1	0	0.005	0	1	3	2	0.036
II	13	7	1	4	1		1	3	1	8	
III	21	1	4	6	10		8	5	2	6	
IV	10	1	1	1	7		6	1	1	2	
肿瘤分化程度											
高	18	5	4	6	3	0.176	2	5	3	8	0.047
中	13	2	2	4	5		2	2	2	7	
低	19	5	1	2	11		11	3	2	3	

免疫逃逸机制是恶性肿瘤产生的重要因素,它可以使肿瘤逃避免疫系统的监控,决定肿瘤侵袭和转移能力,影响临床治疗的效果^[7]。色氨酸是一种维持细胞活化和增殖的必需氨基酸,也是蛋白质构成不可缺少的重要成分,对维持细胞正常功能至关重要。若 IDO 活性表达异常增高,可造成细胞环境中色氨酸的耗竭,从而导致某些局部重要功能细胞处于一种“色氨酸饥饿”状态,失去正常功能。并催化底物色氨酸生成代谢产物,这些代谢产物对免疫细胞的增殖起到抑制作用,从而对机体免疫机制产生不良影响^[8]。故 IDO 对于介导肿瘤逃避免疫系统过程发挥了关键作用。IDO 的高表达和多种恶性肿瘤的不良预后有关,比如,肺癌^[9]、膀胱尿路上皮癌^[10]、卵巢癌^[11]等,在这个实验中我们发现,IDO 在喉癌组织、颈部转移淋巴结的表达水平均明显高于癌旁组织、原发灶,故推测肿瘤组织中 IDO 的高表达可促使转移灶高表达 IDO。由此可见,IDO 既是肿瘤形成的关键因素,也有可能与恶性细胞转移有关。此外,我们还发现,在喉癌组织中,淋巴结转移、临床分期均与 IDO 的高表达相关,却与肿瘤分化程度、患者年龄、性别无关。声门上区域具有丰富的淋巴网,故喉癌尤其是声门上型极易发生颈淋巴结转移,因此,喉癌患者早期颈淋巴结的处理至关重要^[12]。IDO 对于肿瘤细胞转移起着非常重要的作用,通过 IDO 的研究对于提高 5 年生存率至关重要。而且,临床分期与 IDO 高表达密切相关,临床分期越高,意味着肿瘤侵犯部位越多,淋巴结转移越多,故使肿瘤易逃避免疫系统的监控,IDO 必然处于高表达状态。除此之外,肿瘤的分化受 IDO 影响不大,这有待于我们的进一步研究。

BIN1 是机体内具有抑癌功能的配体蛋白,它可以与 c-Myc 蛋白的 N 末端结合,并抑制其恶性转化功能。正常细胞一旦缺失 BIN1,有可能转变为恶性细胞^[13]。大量研究发现在多数肿瘤中,BIN1 呈缺失状态^[14]。国外研究学者^[15]通过小鼠移植瘤研究发现,BIN1 的缺失可以促进肿瘤细胞发生转移并促进肿瘤进一步发展。本研究发现在喉癌患者的肿瘤组织、颈部转移淋巴结中,BIN1 蛋白阳性率降低,呈缺失状态,而且其与肿瘤分化程度、淋巴结转移、临床分期关系密切。BIN1 低表达可能导致喉癌肿瘤组织的去分化、增殖、转移和侵袭^[16]。随着患者病情的加重,出现了淋巴结转移、侵袭范围扩大等,BIN1 的表达逐步下降,且肿瘤分化越低,BIN1 越低表达。由此说明,BIN1 可能是喉癌的一个潜在肿瘤

抑制基因。BIN1 表达可作为评估喉癌患者的预后因子,BIN1 有可能成为一个新的喉癌患者预后标志物。在这个研究中,我们还发现 BIN1 和 IDO 的表达呈显著负相关关系,BIN1 可能造成 IDO 表达水平的上调,从而使机体发生免疫逃逸^[17]。

综上所述,IDO 和 BIN1 在喉癌的发生发展中发挥了重要作用,而且 IDO 的高表达与 BIN1 的低表达与喉癌临床特征关系密切。BIN1 的缺失可以促进 IDO 的过量表达,进而使肿瘤细胞发生免疫逃逸,并促进肿瘤的生长及远处转移。本研究阐释了 IDO 和 BIN1 与喉癌发生发展的关系,为寻找治疗喉癌的新靶点提供了新思路。

参考文献:

- [1] Muller AJ, Duhadaway JB, Donover PS, et al. Inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy [J]. *Nat Med*, 2005, 11(3): 312-319.
- [2] Pan K, Liang XT, Zhang HK, et al. Characterization of bridging integrator 1 (BIN1) as a potential tumor suppressor and prognostic marker in hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Med*, 2012, 18(5): 507-518.
- [3] 韩晓楠, 田志辉, 王佳丽, 等. 食管鳞癌组织和引流淋巴结中 IDO 和 BIN1 的表达及其临床意义 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(2): 276-281.
- [4] Watanabe T, Okano M, Hattori H, et al. Oles of Fegamma RIIB in nasal eosinophiliand IgE production inmurine allergic rhinitis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, 169(1): 105-112.
- [5] 刘丽庭, 刘丹, 郭其云, 等. KAI-1 和 CD44v3 在喉癌组织中的表达及其相关性研究 [J]. *中国中西医结合耳鼻喉科杂志*, 2014, 22(2): 88-90, 99.
- [6] 孙志宏, 齐莹. RNAi 干扰 Twist 基因对喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞株增殖与侵袭力及 E-钙黏蛋白甲基化的影响 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2016, 22(6): 467-471.
- [7] 梁雪, 陈祥彬, 李广平, 肿瘤免疫逃逸机制研究进展 [J]. *生命的化学*, 2015, 35(4): 504-508.
- [8] 王海燕, 李菊英, 王刚, 等. 新型吡啶 2,3-双加氧酶抑制剂对小鼠肺癌细胞系的体外影响 [J]. *青海医学院学报*, 2013, 34(2): 84-90.
- [9] 夏俊芝, 辛建保, 白明. 吡啶胺 2,3-双加氧酶在非小细胞肺癌中的表达 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2010, 39(1): 9-12.
- [10] 杨承纲, 叶丽娟, 周永春. 膀胱尿路上皮癌 IDO 和 Bin1 表达临床意义研究 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2015, 22(7): 524-528.
- [11] 姜艳丽, 方艳秋, 芦小单, 等. 吡啶胺 2,3-双加氧酶在良、恶性卵巢肿瘤中的表达及临床意义 [J]. *中国妇幼保健*, 2014, 29(36): 6106-6108.
- [12] 胡艳红, 王东海, 赵国锋, 等. 声门上型喉癌 cN0 患者颈部淋巴结转移的相关因素分析 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*,

2014,20(1):50-52.

- [13] Pyndiah S, Sakamuro D. C-MYC, PARP1 and Bcl-2 targets therapy of cancer cell resistance [J]. *Med Sci (Paris)*, 2013, 29(2):133-135.
- [14] Sakamuro D, Prendergast GC. New Myc-interacting proteins; a second Myc network emerges [J]. *Oncogene*, 1999, 18(19):2942-2954.
- [15] Muller AJ, Duhadaway JB, Donover PS, et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy [J]. *Nat Med*, 2005, 11(3):312-319.

- [16] Pan K, Liang XT, Zhang HK, et al. Characterization of bridging integrator 1 (BIN1) as a potential tumor suppressor and prognostic marker in hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Med*, 2012, 9:507-518.
- [17] Muller AJ, Duhadaway JB, Donover PS, et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy [J]. *Med*, 2005, 11(3):312-319.

(收稿日期:2017-04-21)

(上接第201页)

- human brain metastases of breast cancer reveal the association between up-regulation of hexokinase 2 and poor prognosis [J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(9):1438-1445.
- [15] Peng QP, Liang HJ, Zhou Q, et al. Expression of hexokinase-II gene in human colon cancer cells and the therapeutic significance of inhibition thereof [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2007, 87(15):1058-1062.
- [16] 彭国庆, 尹红玲, 田焱. 糖酵解限速酶 HK-2 与宫颈组织癌变的关系 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(9):941-942.
- [17] Patra KC, Wang Q, Bhaskar PT, et al. Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer [J]. *Cancer Cell*, 2013, 24(2):213-228.
- [18] Robey RB, Hay N. Mitochondrial hexokinases: guardians of the mitochondria [J]. *Cell Cycle*, 2005, 4(5):654-658.
- [19] Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(9):7610-7618.
- [20] Sato-Tadano A, Suzuki T, Amari M, et al. Hexokinase II in breast carcinoma: a potent prognostic factor associated with hypoxia-inducible factor-1 α and ki-67 [J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(10):1380-1388.
- [21] Deron P, Vermeersch H, Mees G, et al. Expression and prognostic value of glucose transporters and hexokinases in tonsil and mobile tongue squamous cell carcinoma [J]. *Histol Histopathol*, 2011, 26(9):1165-1172.
- [22] Gong L, Cui Z, Chen P, et al. Reduced survival of patients with hepatocellular carcinoma expressing hexokinase II [J]. *Med Oncol*, 2012, 29(2):909-991.
- [23] Qiu MZ, Han B, Luo HY, et al. Expressions of hypoxia-inducible factor-1 α and hexokinase-II in gastric adenocarcinoma: the impact on prognosis and correlation to clinicopathologic features [J]. *Tumour Biol*, 2011, 32(1):159-166.
- [24] Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, et al. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(11):3892-3899.
- [25] Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, et al. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase [J]. *Genes & Development*, 2001, 15(15):1406-1418.
- [26] Min JW, Kim KI, Kim HA, et al. INPP4B-mediated tumor resistance is associated with modulation of glucose metabolism via hexokinase 2 regulation in laryngeal cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 440(1):137-142.

(收稿日期:2017-01-01)