

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.17.008
文章编号: 1005-8982 (2018) 17-0042-04

CA IX在乳腺癌组织中的表达及其临床意义

李新, 刘薇, 牛冰, 冯燕枝, 李庆辉

(河南省郑州人民医院 乳腺外科, 河南 郑州 450003)

摘要: **目的** 探讨碳酸酐酶IX (CA IX) 蛋白在乳腺癌组织中的表达差异, 以及与乳腺癌患者临床病理特征的关系。**方法** 选取2013年6月-2016年1月郑州人民医院病理科收集的乳腺癌组织标本120例, 其中80例为标准的乳腺良性肿瘤标本。采用免疫组织化学法检测两组CA IX蛋白表达水平, 并分析其与临床病理特征的关系。**结果** 乳腺癌组织的CA IX蛋白阳性表达率为61.67%, 高于乳腺良性肿瘤的18.75% ($P < 0.05$); 乳腺癌组织CA IX蛋白阳性表达与患者的TNM分期、分化程度、Ki-67蛋白表达有相关性 ($P < 0.05$), 与患者年龄、淋巴结转移、病灶直径、雌激素受体、孕激素受体、Cerb-2蛋白表达无相关性 ($P > 0.05$)。**结论** CA IX蛋白在乳腺癌组织中高表达, 并且与患者的TNM分期、分化程度、Ki-67蛋白表达有相关性。

关键词: 碳酸酐酶IX; 分子亚型; 乳腺癌; 临床病理特征

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

Expression of CAIX in breast cancer and its clinical significance

Xin Li, Wei Liu, Bing Niu, Yan-zhi Feng, Qing-hui Li

(Department of Breast Surgery, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450003, China)

Abstract: Objective To investigate the protein expression of carbonic anhydrase IX (CAIX) in breast carcinoma tissues and its relationship with the clinicopathological characteristics of the patients with breast cancer. **Methods** From June 2013 to January 2016, 120 breast cancer specimens and 80 specimens of benign breast tumor were collected from the Department of Pathology in our hospital. The expression of CAIX protein was detected by immunohistochemistry and the relationships between the expression of CAIX protein and clinicopathological features were also discussed. **Results** The positive expression rate of CAIX protein in the breast cancer tissues (61.67%) was significantly higher than that in the benign breast tumor (18.75%), the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The positive expression of CAIX protein in the breast cancer tissues was correlated with TNM stage, differentiation degree and Ki-67 protein expression ($P < 0.05$), but not correlated to ER, PR, Cerb-2 protein expression, age, lymphatic metastasis or lesion diameter ($P > 0.05$). **Conclusions** CAIX protein is highly expressed in breast cancer tissues, and the expression is correlated with TNM stage, degree of differentiation and Ki-67 protein expression.

Keywords: carbonic anhydrase IX; molecular subtype; breast cancer; clinicopathological characteristics

乳腺癌是女性健康的头号杀手, 近年来, 我国乳腺癌的发病率逐年递增, 已成为当前社会的重大公共卫生问题^[1-2]。根据肿分期和患者的身体状况, 临床医

生会选取手术、放化疗、生物靶向治疗、内分泌治疗等多种方案^[3]。碳酸酐酶IX (carbonic anhydrase IX, CA IX) 是人类碳酸酐酶家族中的一种, 作为一种跨

膜蛋白, CA IX 在除胃和膀胱外的大多数正常组织中并不存在, 却大量表达于肿瘤细胞中。CA IX 是一种具有一定特异性的肿瘤标志物和潜在的治疗靶点, 有学者已经在肺部和肾脏肿瘤治疗领域有初步探索^[4-5]。本研究探讨 CA IX 蛋白在乳腺癌组织中的表达差异, 以及与乳腺癌患者临床病理特征的关系, 希望为 CA IX 在乳腺癌的诊断治疗中的应用提供一定的理论基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2013 年 6 月 -2016 年 1 月河南省郑州市人民医院病理科收集的乳腺癌组织标本 120 例, 其中 80 例为标准的乳腺良性肿瘤标本。120 例组织标本中, 年龄 37 ~ 73 岁, 平均 (51.6 ± 9.4) 岁; 体重指数 (body mass index, BMI) (23.5 ± 2.0) kg/m²; 绝经 24 例; 组织学分级: 高分化 40 例, 中分化 47 例, 低分化 33 例; 淋巴结转移 60 例; TNM 分期: I 期 22 例, II 期 35 例, III 期 63 例。乳腺良性肿瘤 80 例, 年龄 41 ~ 76 岁, 平均 (52.8 ± 10.9) 岁; BMI (23.8 ± 1.9) kg/m²; 其中乳腺纤维瘤 47 例, 乳腺囊性增生病 22 例, 乳腺大导管乳头状瘤 12 例, 乳房平滑肌瘤 9 例; 绝经 17 例。

1.2 纳入与排除标准

1.2.1 纳入标准 ①所有乳腺癌患者的诊断以病理学结果作为标准; ②病理组织学类型为浸润性非特殊癌; ③首次诊断或首次手术治疗, 未接受任何放化疗及免疫治疗; ④各项临床资料完整。

1.2.2 排除标准 ①转移性乳腺癌; ②既往接受放化疗及免疫治疗; ③伴有甲状腺功能障碍

1.3 免疫组织化学法

选取乳腺癌组织及乳腺良性肿瘤标本置于多聚甲醛中固定、脱水, 自来水冲洗后置于梯度酒精中浸泡, 使用二甲苯透明 2 次后于 60℃ 石蜡浸泡包埋 3 h, 使用石蜡切片机将包埋好的组织连续切片, 厚 4 μm。石蜡切片放入 60℃ 烤箱 30 min 防脱处理, 常规脱蜡、水化并用 PBS 冲洗 3 次, 组织切片放入抗原修复液中, 然后置于微波炉中行抗原修复 15 min, 蒸馏水冲洗切片, PBS 冲洗 3 次, 0.3% 过氧化氢溶液阻断内源性过氧化物酶 12 min, PBS 冲洗 3, 5 min/ 次, 分别将 CA IX、雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素

受体 (progesterone receptor, PR)、Cerb-2 蛋白一抗滴加在切片上, 4℃ 孵化过夜。复温后 PBS 冲洗 3 次, 5 min/ 次, 滴加二抗, 2.5 h 后行 DAB 染色, 并在显微镜下仔细观察切片。蒸馏水冲洗切片, 苏木精复染, 自来水冲洗后使用梯度酒精干燥, 二甲苯处理并中性树脂封固, 作为阴性、阳性对照^[6]。

免疫组织化学法结果判断标准: CA IX 蛋白的阳性着色主要定位于细胞浆、细胞膜, 呈黄色、棕黄色、褐色表达, 在 400 倍显微镜下选取 5 个视野, 进行观察。根据着色强度: 0 分为无色, 1 分为淡黄色, 2 分为棕黄色, 3 分为褐色、黑色; 根据阳性细胞比例: 阳性细胞数目所占比例 <10% 为 1 分, 11% ~ 50% 为 2 分, 51% ~ 75% 为 3 分, >75% 为 4 分。两种积分相乘, 总分 <3 分为阴性, ≥3 分为阳性。总分 <3 分为阴性 (-), 3 ~ 5 分为弱阳性 (+), 6 ~ 9 分为阳性 (++) , >9 分为强阳性 (+++)。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SAS 9.0 统计软件, 计数资料以率 (%) 表示, 比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种组织标本中 CA IX 蛋白的表达

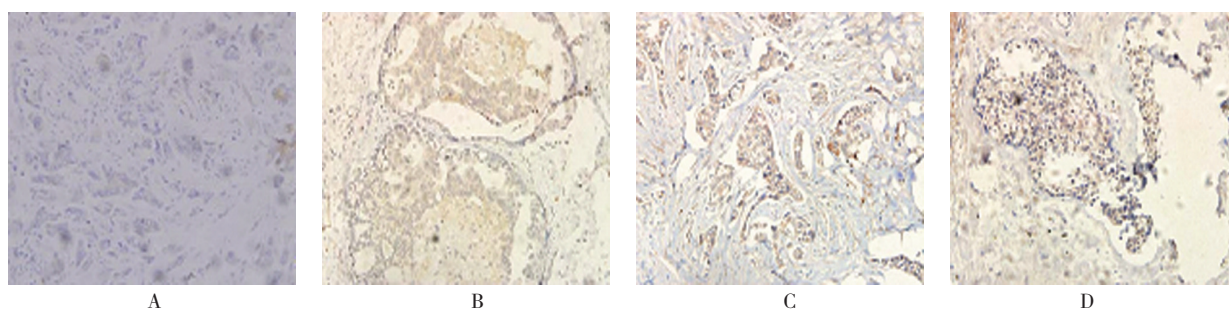
乳腺癌组织的 CA IX 蛋白阳性表达率为 61.67%, 乳腺良性肿瘤为 18.75%, 经 χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 35.796$, $P = 0.000$), 乳腺癌组织的 CA IX 蛋白阳性表达率高于乳腺良性肿瘤。见表 1 和附图。

2.2 乳腺癌组织中 CA IX 蛋白表达与临床病理特征的关系

乳腺癌组织 CA IX 蛋白阳性表达与患者 TNM 分期、分化程度、Ki-67 蛋白表达有相关性 ($P < 0.05$), 与患者年龄、淋巴结转移、病灶直径、ER、PR、Cerb-2 蛋白表达无相关性 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 1 两种组织标本中 CA IX 蛋白的表达比较

组别	例数	(-) / 例	(+) / 例	(++) / 例	(+++) / 例	阳性率 例 (%)
乳腺癌组织	120	46	32	33	9	74 (61.17)
乳腺良性肿瘤	80	65	15	0	0	15 (18.75)



A: 乳腺良性肿瘤; B: 乳腺癌组织 CA IX 蛋白弱阳性; C: 乳腺癌组织 CA IX 蛋白阳性; D: 乳腺癌组织 CA IX 蛋白强阳性

附图 乳腺癌组织和乳腺良性肿瘤中 CA IX 蛋白的表达 (免疫组织化学法 ×200)

表 2 不同临床病理特征与乳腺癌组织 CA IX 蛋白表达的关系

因素	例数	CA IX 蛋白阳性例 (%)	χ^2 值	P 值
年龄				
≥ 50 岁	65	38 (51.35)	0.616	0.432
<50	55	36 (48.65)		
病灶直径				
≥ 2 cm	73	42 (56.76)	1.346	0.246
<2 cm	47	32 (43.24)		
分化程度				
高、中	87	47 (63.51)	7.819	0.005
低	33	27 (36.49)		
淋巴结转移				
是	60	42 (56.76)	3.525	0.060
否	60	32 (43.24)		
TNM 分期				
I、II 期	57	29 (39.19)	5.347	0.021
III 期	63	45 (60.81)		
ER				
(+)	60	39 (52.70)	0.564	0.453
(-)	60	35 (47.30)		
PR				
(+)	61	41 (55.41)	1.615	0.204
(-)	59	33 (44.59)		
Ki-67				
(+)	56	42 (56.76)	7.897	0.005
(-)	64	32 (43.24)		
Cerb-2				
(+)	68	45 (60.81)	1.35	0.245
(-)	52	29 (39.19)		

3 讨论

乳腺癌是一种严重危害女性健康的恶性肿瘤，现代医学发展到今天，在传统外科治疗和放疗的基础上，相继出现了生物靶向治疗、内分泌治疗等新的治疗方法，分子生物学领域的研究已成为当今乳腺癌研究的重点和热点，也取得了一定的成绩。异常增殖的肿瘤往往处于低氧和酸性的微环境中^[7]，因为肿瘤细胞的爆发性复制会导致局部氧浓度不足，而肿瘤本身的供氧无法满足大量氧需求，这就造成肿瘤细胞更多地靠无氧呼吸来提供能量，产生较多的酸性物质，导致细胞外 pH 值下降，所以低氧和酸化是肿瘤微环境的 2 个重要特征^[8-9]。这种特殊的微环境会改变肿瘤基因的表达和相关蛋白质的合成，促进肿瘤的侵袭和转移^[10]，影响肿瘤患者预后。

CA IX 是最早在人宫颈癌海拉细胞系中发现的碳酸酐酶家族的重要异构体，成熟的 CA IX 主要分布于细胞膜，具有 N 端独特的蛋白多糖领域、细胞外区、跨膜区和细胞内 C 末端 4 个特征性部分，是一种与肿瘤具有高度相关性的跨膜蛋白^[11]。CA IX 蛋白具有将细胞内的氢离子转移到细胞外的作用，维持肿瘤细胞内环境的相对稳定，使肿瘤的微环境保持在一个相对酸性的状态，在一定程度上影响肿瘤基因的表达和蛋白质的合成，使肿瘤侵袭性增加，减少肿瘤细胞的凋亡^[12]。在本研究中，乳腺癌组织 CA IX 蛋白阳性表达率为 61.67%，高于乳腺良性肿瘤的 18.75%，而且乳腺癌组织中 CA IX 蛋白阳性表达与患者的 TNM 分期、分化程度有相关性，CA IX 蛋白能增加肿瘤侵袭性，从而影响诸如肿瘤形态、淋巴结及远处转移的情况，说明 CA IX 蛋白有作为一种独立的影响乳腺癌预后因素的潜力，可用于临床乳腺癌的诊断和治疗。

Ki-67 蛋白是一种定位于细胞核的蛋白，表达水平与处于有丝分裂的细胞数量有关，是细胞增殖的指

标之一, 在 M 期高表达, G₀ 期不表达, 细胞分裂像后期和末期迅速下降^[13], 对 Ki-67 进行免疫组织化学法测定已被广泛应用于判定乳腺癌细胞增殖性强弱、判断化疗和内分泌治疗效果的指标^[14]。本研究发现, 乳腺癌组织 CA IX 蛋白阳性表达与患者 Ki-67 蛋白表达相关, 说明 CA IX 蛋白表达极可能与乳腺癌细胞的增殖性有一定联系。有学者使用 CA IX 单克隆抗体和特异性 CA IX 小分子抑制剂减低 CA IX 活性, 从而改变肿瘤微环境, 在一定程度上控制原发肿瘤的生长和转移^[15]。这在一定程度上说明 CA IX 蛋白有作为乳腺癌药物治疗靶点的潜力。

综上所述, CA IX 蛋白在乳腺癌组织中高表达, 并且与患者 TNM 分期、分化程度、Ki-67 蛋白表达相关, 未来可能作为一个评价乳腺癌恶性程度、评估乳腺癌转移情况的临床指标, 并作为药物治疗靶点, 在乳腺癌的治疗中发挥重要作用。

参 考 文 献:

- [1] 韩婷婷, 叶长生, 刘民锋, 等. 中国 1973-2009 年女性乳腺癌死亡率流行趋势 [J]. 广东医学, 2014, 35(12): 1931-1933.
- [2] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Adjuvant bisphosphonate treatment in early breast cancer: meta-analyses of individual patient data from randomised trials[J]. The Lancet, 2015, 386(10001): 1353-1361.
- [3] 赵毅, 邓鑫. 乳腺癌分子分型与治疗策略 [J]. 中国实用外科杂志, 2015, 35(7): 704-708.
- [4] 黄勇, 朱耀, 姚旭东. 碳酸酐酶 IX 与肿瘤 [J]. 中国癌症杂志, 2008, 18(12): 941-946.
- [5] 李剑波, 施玲丽, 王成, 等. 碳酸酐酶 IX 在核医学中的研究进展 [J]. 同位素, 2011, 24(3): 140-145.
- [6] 王功伟, 沈丹华. 免疫组化染色在肾上皮性肿瘤诊断中的应用 [J]. 诊断病理学杂志, 2014, 21(2): 65-68.
- [7] REINHARDT A, NEUNDORF I. Design and application of antimicrobial peptide conjugates[J]. International journal of molecular sciences, 2016, 17(5): 701-702.
- [8] 程海波, 沈卫星, 吴勉华, 等. 基于肿瘤微环境的癌毒病机理论研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(2): 105-107.
- [9] CHAFE S C, LOU Y, SCENEAY J, et al. Abstract B03: Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX promotes MDSC recruitment and establishment of the breast cancer premetastatic niche by stimulating G-CSF production[J]. Cancer Research, 2015, 75(1): B03.
- [10] FURJELOVA M, KOVALSKA M, JURKOVA K, et al. Correlation of carbonic anhydrase IX expression with clinico-morphological parameters, hormonal receptor status and HER-2 expression in breast cancer[J]. Neoplasma, 2015, 62(1): 88-97.
- [11] CARRADORI S, SECCI D, DE M C, et al. A novel library of saccharin and acesulfame derivatives as potent and selective inhibitors of carbonic anhydrase IX and XII isoforms[J]. Bioorganic Medicinal Chemistry, 2016, 24(5): 1095-1105.
- [12] CHU C Y, JIN Y T, ZHANG W, et al. CA IX is upregulated in CoCl₂-induced hypoxia and associated with cell invasive potential and a poor prognosis of breast cancer[J]. International Journal of Oncology, 2016, 48(1): 39-44.
- [13] LEITANS J, KAZAKS A, BALODE A, et al. An efficient expression and crystallization system of the cancer associated carbonic anhydrase isoform IX [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2015, 58(22): 9004-9009.
- [14] 白建平, 张霆, 秦大伟. TK1、Ki-67、p53 在乳腺癌组织中的表达与其预后的关系 [J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(5): 629-633.
- [15] 李美平, 包磊, 蔡红光, 等. 乳腺浸润性导管癌中碳酸酐酶 IX 蛋白表达与纤维灶病变的关系 [J]. 中华病理学杂志, 2015, 44(4): 250-253.

(童颖丹 编辑)