

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.10.028

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2016.10.028

乳腺癌分子亚型中CAIX的表达及临床意义

周炳娟¹, 陈红¹, 马秋双¹, 孙吉瑞¹, 乔海芝¹, 张金库¹, 邓美瑶², 张艳³

(保定市第一中心医院, 1. 病理科; 2. ICU, 河北 保定 071000; 3. 涿州市妇幼医院妇产科, 河北 涿州 072750)

[摘要] 目的: 探讨乳腺癌各分子亚型中碳酸酐酶IX(carbonic anhydrase IX, CAIX)的表达及临床意义。方法: 采用免疫组织化学检测CAIX在4种不同乳腺癌分子亚型中的表达水平并分析其与临床病理参数的关系。结果: CAIX在管腔A型、管腔B型、HER-2过表达型和基底样型乳腺癌中的阳性表达率分别为6.65%(28/421)、12.50%(7/56)、60.61%(40/66)和32.31%(84/260)。ER阴性的HER-2过表达型及基底样型乳腺癌组织中, CAIX的阳性表达明显高于ER阳性的管腔A型和管腔B型($P<0.001$), 并且HER-2过表达型乳腺癌组织CAIX的阳性表达率明显高于基底样型相比, 差异有统计学意义。CAIX与乳腺癌的组织学分级、淋巴结转移、临床分期及高增殖指数相关($P<0.05$), 而与患者年龄、是否绝经及肿瘤大小无关。结论: CAIX在不同乳腺癌分子亚型中的表达具有明显差异, 可能与ER阴性乳腺癌关系更密切, 并在乳腺癌的侵袭、转移中发挥重要作用, 可能成为乳腺癌浸润、进展及预后评估的指标。

[关键词] 乳腺肿瘤; 分子亚型; 碳酸酐酶IX

Expression and clinical significance of CAIX in molecular subtypes of breast carcinoma

ZHOU Bingjuan¹, CHEN Hong¹, MA Qiushuang¹, SUN Jirui¹, QIAO Haizhi¹, ZHANG Jinku¹,
DENG Meiyao², ZHANG Yan³

(1. Department of Pathology; 2. Department of ICU, the First Central Hospital of Hebei, Baoding Hebei 071000; 3. Department of Obstetrics and Gynecology, Obstetrics and Gynecology Hospital, Zhuozhou Hebei 072750, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression and clinical significance of CAIX in the molecular subtypes of breast carcinoma. **Methods:** The expression of CAIX was detected by immunohistochemistry in different subtype of breast carcinoma. **Results:** Positive expression rates of CAIX in Luminal A, Luminal B, HER-2 over-expression and basal-like subtypes were 6.65% (28/421), 12.50% (7/56), 60.61% (40/66) and 32.31% (84/260), respectively. The positive expression rate of CAIX in ER-negative breast carcinomas (HER-2 over-expression and basal-like) were significantly higher than that in ER-positive subtypes (luminal A and luminal B) ($P<0.001$). The expression rate of CAIX in HER-2 over-expressing subtype is much higher than that in basal-like ones. There was a significant correlation between CAIX with the histopathologic grade, lymph node metastasis, pTNM stage and higher Ki-67 index ($P<0.05$), while there was no significant correlation between CAIX with patients' age, whether

收稿日期 (Date of reception): 2016-06-14

通信作者 (Corresponding author): 张金库, Email: zjkbk@sohu.com

menopause or not and the size of tumor. **Conclusion:** The over-expression of CAIX was different in 4 subtypes of breast carcinoma, and it may be closely related to the ER-negative breast cancer. CAIX may play an important role in the invasion and metastasis of breast carcinoma, and may be used as an indicator for invasion, progress and prognosis evaluation.

Keywords breast neoplasm; molecular subtypes; carbonic anhydrase IX (CAIX)

乳腺癌是一种高度异质性的肿瘤, 传统上按组织形态、激素受体表达与否HER-2扩增的情况进行分类。2000年Perou等^[1]首次应用基因芯片对乳腺癌肿瘤样本进行基因表达的研究, 发现乳腺癌可被分为不同的亚型。2003年Sorlie等^[2]最终将乳腺癌分为5种不同的分子亚型, 即管腔A型(Luminal A)、管腔B型(Luminal B)、HER-2过表达型(HER-2 over-expression)、基底细胞样型(basal-like)及普通乳腺样型(normal breast-like), 这些亚型在生物学特性上是完全独立的。目前, 多采用2015年StGallen乳腺癌会议共识对乳腺癌各分子亚型进行免疫组织化学分类。因此, 探讨乳腺癌不同分子亚型的发生、发展机制, 并为其提供个性化治疗方案成为研究热点。

缺氧是多种实体肿瘤的特征, 主要是由肿瘤微血管分布及数量异常所导致。缺氧在多方面影响肿瘤的生物行为, 包括基因的不稳定性、新生血管形成、浸润、生存和代谢^[3-4]。碳酸酐酶IX(carbonic anhydrase IX, CAIX)是一种缺氧诱导的含锌酶, 在许多肿瘤细胞中过表达。CAIX能够水解糖酵解过程中产生的CO₂, 产生HCO₃⁻和H⁺。碳酸氢盐被运输到细胞内, 在一定程度上提高了细胞内的PH值, 促进了肿瘤细胞的增殖, 而H⁺使细胞外的酸性微环境加强, 诱导细胞外基质降解, 促进了肿瘤细胞的浸润、迁移, 最终形成转移^[5-6]。CAIX是一个肿瘤缺氧有效的内源性标记物, 也成为抗肿瘤治疗重要的靶点。

本研究通过免疫组化的方法检测CAIX在不同乳腺癌分子亚型中表达的情况以及与乳腺癌临床病理指标的关系, 以期对不同分子亚型乳腺癌的浸润转移机制及个性化治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

收集2005年1月至2014年10月河北省保定市第一中心医院病理科的乳腺浸润性导管癌存档石蜡切片, 选取有完整临床病理资料的803例, 所有患者均为女性, 平均年龄51.45岁, 术前均未行

放疗、化疗及内分泌治疗。根据2015年StGallen会议达成的共识对803例乳腺癌进行分类: 管腔A型(ER阳性与PR阳性, HER-2阴性, Ki-67低表达)421例; 管腔B型[HER-2阴性型(ER阳性、HER-2阴性, 至少具备下列条件之一: Ki-67“高表达”或PR“阴性或低表达”)]20例; HER-2阳性型(ER阳性, HER-2过表达或扩增, 任何Ki-67, 任何PR)36例; HER-2过表达型(HER-2过表达或扩增, ER与PR阴性)66例; 基底细胞样(ER、PR和HER-2均阴性)260例。

1.2 主要试剂

兔抗人HIF-1 α 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司, 兔抗人CAIX多克隆抗体、即用型快捷免疫组化MaxVision检测试剂盒(KIT-5020)和氨基联苯胺(DAB-0031)显色试剂盒均购自福州迈新生物科技有限公司。

1.3 免疫组织化学

所有标本均为10%中性福尔马林固定, 石蜡包埋。4 μ m厚连续切片, 常规脱蜡至水, 0.01%柠檬酸盐或EDTA抗原修复, 采用Max-Vision两步法染色(具体操作步骤参照试剂盒说明书进行), DAB显色, 苏木素复染, 透明封固。PBS代替一抗设为阴性对照; 以已知CAIX阳性的胃癌组织设为阳性对照。

1.4 结果判定

CAIX蛋白免疫组化的结果判定标准: CAIX蛋白以胞膜出现棕黄色颗粒为阳性。在高倍镜下随机选取5个高倍镜视野($\times 400$), 每个视野计数200个细胞, 共计1 000个, 观察染色强度并计算每张切片阳性细胞百分率。CAIX的阳性判定标准为0: 阳性细胞数 $< 1\%$; 1: 阳性细胞数 $1\% \sim 30\%$; 2: 阳性细胞数 $> 30\%$ ^[7]。CAIX(0)即为阴性; > 1 判定为阳性。Ki-67 $> 20\%$ 阈值判定为高表达状态。

1.5 统计学处理

采用IBM SPSS23.0软件对数据进行统计学处

理。计数资料采用 χ^2 检验, 相关关系采用Spearman等级相关分析, 多个样本间的两两比较采用卡方分割法, $\alpha=0.05$ 作为检验水准。

2 结果

2.1 乳腺癌各亚型的临床病理特征

各乳腺癌亚型的临床病理特征情况见表1。

2.2 CAIX蛋白在乳腺癌各分子亚型中的表达

CAIX蛋白在乳腺癌中的阳性表达率为19.80%(159/803)。HER-2过表达型及基底细胞样型乳腺癌中CAIX蛋白的阳性表达率分别为60.61%(40/66)、32.31%(84/260), 显

著高于管腔A型[6.65%(28/421)]和管腔B型[12.50%(7/56)]($P<0.001$)(表2)。在ER阴性组中, HER-2过表达型中CAIX的阳性表达率显著高于基底细胞样型, 差异具有统计学意义(表2)(图1)。

2.3 CAIX蛋白与乳腺癌临床病理特征间的关系

CAIX蛋白与乳腺癌组织学分级、淋巴结转移及pTNM分期相关($P<0.001$), 与患者年龄、是否绝经及肿瘤大小无关。同时, CAIX蛋白的表达与ER及PR表达呈显著负相关($r=-0.251/-0.265$, $P<0.01$); 与HER-2呈显著正相关($r=0.383$, $P<0.01$); 高增殖活性的乳腺癌组织中CAIX过表达($r=-0.350$, $P<0.01$)(表2)。

表1 乳腺癌各分子亚型与临床病理特征间的关系

Table 1 The relationship between every breast cancer subtype and the clinicopathological features

临床病理参数	管腔A型	管腔B型		HER-2过表达型	基底细胞样型
		HER-2阴性型	HER-2阳性型		
年龄/岁					
≤51	97	14	25	39	133
>51	324	6	11	27	127
绝经					
是	318	18	31	54	206
否	103	2	5	12	54
肿瘤大小					
T1	177	10	23	19	94
T2	201	8	10	35	110
T3	43	2	3	12	56
组织学分级					
I	149	2	9	2	2
II	229	14	17	25	76
III	43	4	10	39	182
淋巴结转移					
无	278	17	19	28	113
有	143	3	17	38	147
TNM分期					
I~II	381	14	33	56	194
III~IV	40	6	3	10	66

表2 CAIX蛋白表达与乳腺癌临床病理参数的关系

Table 2 The relationship between CAIX and clinicopathological parameters of breast cancer

临床病理参数	例数	CAIX		χ^2	P
		+	-		
年龄/岁				0.717	0.397
≤51	308	65	243		
>51	395	94	301		
绝经				0.061	0.805
是	176	36	140		
否	627	123	504		
肿瘤大小				1.602	0.449
T1	323	66	257		
T2	364	66	298		
T3	116	27	89		
组织学分级				26.805	<0.001
I	164	15	149		
II	361	64	297*		
III	278	80	198 ^{△*}		
淋巴结转移				14.209	<0.001
无	455	69	386		
有	348	90	258		
TNM分期				24.464	<0.001
I~II	678	114	564		
III~IV	125	45	80		
ER				50.607	<0.001
+	477	55	422		
-	326	104	222		
PR				56.579	<0.001
+	469	51	418		
-	334	108	226		
HER-2				117.743	<0.001
+	102	61	41		
-	701	98	603		
Ki-67				98.642	<0.001
低表达	429	29	400		
高表达	374	130	244		
乳腺癌亚型				142.537	<0.001
管腔A型	421	28	393		
管腔B型	56	7	49		
HER-2过表达型	66	40* [▲]	26		
基底细胞样型	260	84 [△]	176		

CAIX: *与管腔A型相比($\chi^2=138.261$, $P<0.001$), 与管腔B型相比($\chi^2=29.603$, $P<0.001$); [▲]与基底细胞样型相比($\chi^2=17.885$, $P<0.001$); [△]与管腔A型相比($\chi^2=76.998$, $P<0.001$), 与管腔B型相比($\chi^2=8.816$, $P=0.003$)。组织学分级: *与组织学I级相比($\chi^2=6.497$, $P=0.011$); [△]与组织学I级相比($\chi^2=23.557$, $P<0.001$), ^{*}与组织学II级相比($\chi^2=10.982$, $P=0.001$)。相关性分析: CAIX与ER, $r=-0.251$; CAIX与PR, $r=-0.265$; CAIX与HER-2, $r=0.383$; CAIX与Ki-67指数: $r=-0.350$ 。

CAIX: *, vs. Luminal A ($\chi^2=138.261$, $P<0.001$), vs. Luminal B ($\chi^2=29.603$, $P<0.001$); [▲], vs. basal-like ($\chi^2=17.885$, $P<0.001$); [△], vs. Luminal A ($\chi^2=76.998$, $P<0.001$); vs. Luminal B ($\chi^2=8.816$, $P=0.003$). *, vs. histological grade I ($\chi^2=6.497$, $P=0.011$); [△], vs. histological grade I ($\chi^2=23.557$, $P<0.001$), ^{*}, vs. histological grade II ($\chi^2=10.982$, $P=0.001$). Correlation of CAIX with ER: $r=-0.251$; correlation of CAIX with PR: $r=-0.265$; correlation of CAIX with HER-2: $r=0.383$; the correlation of CAIX with Ki-67 index: $r=-0.350$.

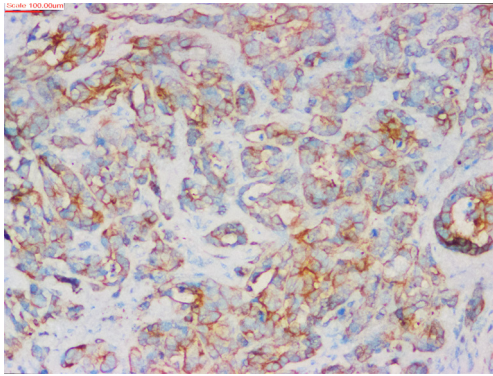


图1 CAIX在乳腺癌组织中的阳性表达(IHC, ×100)

Figure 1 Positive expression of CAIX in breast carcinoma (IHC, ×100)

3 讨论

碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)是一族含锌酶,在自然界如细菌、植物及哺乳动物中广泛存在^[8-9]。目前,哺乳动物体内发现了16种在细胞定位、催化活性、对不同抑制因子敏感性及组织特异性分布方面截然不同的CA同工酶。CAIX作为CA家族的成员,在人类宫颈癌HeLa细胞株中被首次发现,并被命名为“MN蛋白”^[8],结构上包含4个域^[10]:氨基端蛋白多糖(proteoglycan, PG)样结构域;CA催化性结构域;跨膜段(transmembrane, TM)及胞浆内(intracytoplasmic, IC)部分。与其它同工酶相比,CAIX的CO₂水合作用活性最高,而且PG样结构域可直接和催化域相连,使CAIX在酸性条件下效果更佳^[11]。CAIX的胞质尾包含3个潜在的磷酸化位点(⁴⁴³T、⁴⁴⁸S和⁴⁴⁹Y)能够参与信号转导过程。当⁴⁴⁹Y被磷酸化,能够和PI3K的调节性亚基相互作用,反式激活丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt),对于细胞的糖代谢有直接的作用^[12]。

CAIX在正常组织内的表达很局限,主要集中在胃黏膜上皮、胆道系统、十二指肠隐窝细胞及小肠的黏膜上皮^[13-14]。常氧条件下,CAIX在肿瘤细胞中的表达量很低,但在缺氧环境中,CAIX在肺癌^[15]、卵巢癌^[16]、结肠癌^[17]、膀胱癌^[18]等多种实体肿瘤中高表达。

本次研究结果显示,乳腺癌各分子亚型中CAIX的表达水平不同。ER阴性的HER-2过表达型和基底细胞样型乳腺癌中CAIX蛋白的阳性表达率显著高于ER阳性的管腔A型和管腔B型,差异具有统计学意义。CAIX蛋白在高侵袭性、高转移活性的乳腺癌分子亚型中高表达,推测ER阴性的乳腺癌分子亚型

肿瘤细胞可能生长速度更快、氧耗量更大,增殖活性更高。显著缺氧的微环境及高细胞密度都提高了HIF-1 α 的稳定性和转录活性,激活位于VHL肿瘤抑制基因下游的CAIX,使CAIX的表达增加。非小细胞肺癌中,CAIX和EGFR、c-erbB-2、MUC1表达的上调显著相关,而且在乳腺癌中,也发现了CAIX和c-erbB-2过度表达的相关性^[19-20]。本次实验同样发现CAIX蛋白的表达与ER、PR呈显著负相关,与HER-2呈显著正相关关系,与既往研究结果一致。

CAIX过表达与特定的肿瘤类型有关。Ilie等^[15]发现在非小细胞肺癌各组织学类型中,CAIX在肺鳞癌中的阳性率更高。Tan等^[21]证实CAIX在预后欠佳、有明显抗药性的基底细胞样或三阴性乳腺癌中显著高表达。本次实验结果显示,与基底细胞样型相比,CAIX蛋白在HER-2过表达型中明显高表达。实验结果与既往研究略有差异,可能与实验方法及标本选择人群的差异有关。

CAIX高表达与多种肿瘤的侵袭和转移密切相关,并且可能成为肿瘤患者预后评估独立的指标^[22-23]。一方面,CAIX参与细胞外酸性环境的产生,激活基质金属蛋白酶,使肿瘤细胞表面蛋白和间质重构,增强肿瘤细胞的侵袭性。另一方面,CAIX通过与 β -catenin相互作用,降低E-cadherin介导的细胞黏附作用,促进肿瘤细胞的浸润和转移^[5,24]。本研究发现,组织学分级为I级、II级和III级的乳腺癌中CAIX蛋白的阳性表达率分别为9.14%、17.73%和28.78%,随着组织学分级提高,CAIX的阳性表达率升高,差异具有统计学意义。而且CAIX在有淋巴结转移和pTNM分期较晚的乳腺癌组中阳性表达率明显较高,并且高增殖活性的乳腺癌中CAIX明显高表达,进一步证实CAIX可能参与了乳腺癌的进展、浸润和转移过程,CAIX可能成为乳腺癌预后评估的重要指标。

综上所述,CAIX蛋白在ER阴性的乳腺癌分子亚型中的表达显著高于ER阳性组,而且CAIX蛋白与乳腺癌组织学分级、淋巴结转移、pTNM分期及增殖活性密切相关。因此,我们推测CAIX作为乳腺癌缺氧、侵袭和转移的重要标志,可能成为ER阴性乳腺癌分子亚型治疗的靶点,为控制ER阴性乳腺癌的发生、发展提供了新的理论依据。

参考文献

1. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours[J]. Nature, 2000, 406(6797): 747-752.

2. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(14): 8418-8423.
3. Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(6): 393-410.
4. Lendahl U, Lee KL, Yang H, et al. Generating specificity and diversity in the transcriptional response to hypoxia[J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(12): 821-832.
5. Pastorek J, Pastorekova S. Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: from biology to clinical use[J]. *Semin Cancer Biol*, 2015, 31: 52-64.
6. Swietach P, Wigfield S, Cobden P, et al. Tumor-associated carbonic anhydrase 9 spatially coordinates intracellular pH in three-dimensional multicellular growths[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(29): 20473-20483.
7. Meier V, Guscetti F, Roos M, et al. Hypoxia-Related Marker GLUT-1, CAIX, Proliferative Index and Microvessel Density in Canine Oral Malignant Neoplasia[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0149993.
8. Závada J, Závadová Z, Pastoreková S, et al. Expression of MaTu-MN protein in human tumor cultures and in clinical specimens[J]. *Int J Cancer*, 1993, 54(2): 268-274.
9. Pastoreková S, Závadová Z, Kostál M, et al. A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system[J]. *Virology*, 1992, 187(2): 620-626.
10. Opavský R, Pastoreková S, Zelník V, et al. Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships[J]. *Genomics*, 1996, 33(3): 480-487.
11. Innocenti A, Pastorekova S, Pastorek J, et al. The proteoglycan region of the tumor-associated carbonic anhydrase isoform IX acts as an intrinsic buffer optimizing CO₂ hydration at acidic pH values characteristic of solid tumors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(20): 5825-5828.
12. Dorai T, Sawczuk IS, Pastorek J, et al. The role of carbonic anhydrase IX overexpression in kidney cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41(18): 2935-2947.
13. Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, et al. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer[J]. *Am J Pathol*, 2001, 158(3): 905-919.
14. Pastoreková S, Parkkila S, Parkkila AK, et al. Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts[J]. *Gastroenterology*, 1997, 112(2): 398-408.
15. Ilie M, Mazure NM, Hofman V, et al. High levels of carbonic anhydrase IX in tumour tissue and plasma are biomarkers of poor prognostic in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(11): 1627-1635.
16. Choschzick M, Oosterwijk E, Müller V, et al. Overexpression of carbonic anhydrase IX (CAIX) is an independent unfavorable prognostic marker in endometrioid ovarian cancer[J]. *Virchows Arch*, 2011, 459(2): 193-200.
17. Korkeila E, Talvinen K, Jaakkola PM, et al. Expression of carbonic anhydrase IX suggests poor outcome in rectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(6): 874-880.
18. Klätte T, Seligson DB, Rao JY, et al. Carbonic anhydrase IX in bladder cancer: a diagnostic, prognostic, and therapeutic molecular marker[J]. *Cancer*, 2009, 115(7): 1448-1458.
19. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, et al. Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrase-9 relates to angiogenic pathways and independently to poor outcome in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(21): 7992-7998.
20. Bartosová M, Parkkila S, Pohlodek K, et al. Expression of carbonic anhydrase IX in breast is associated with malignant tissues and is related to overexpression of c-erbB2[J]. *J Pathol*, 2002, 197(3): 314-321.
21. Tan EY, Yan M, Campo L, et al. The key hypoxia regulated gene CAIX is upregulated in basal-like breast tumours and is associated with resistance to chemotherapy[J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(2): 405-411.
22. Lee S, Shin HJ, Han IO, et al. Tumor carbonic anhydrase 9 expression is associated with the presence of lymph node metastases in uterine cervical cancer[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(3): 329-333.
23. Lou Y, McDonald PC, Oloumi A, et al. Targeting tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(9): 3364-3376.
24. Svastová E, Zilka N, Zat'ovicová M, et al. Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with beta-catenin[J]. *Exp Cell Res*, 2003, 290(2): 332-345.

本文引用: 周炳娟, 陈红, 马秋双, 孙吉瑞, 乔海芝, 张金库, 邓美瑶, 张艳. 乳腺癌分子亚型中CAIX的表达及临床意义[J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(10): 1610-1615. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.10.028

Cite this article as: ZHOU Bingjuan, CHEN Hong, MA Qiushuang, SUN Jirui, QIAO Haizhi, ZHANG Jinku, DENG Meiyao, ZHANG Yan. Expression and clinical significance of CAIX in molecular subtypes of breast carcinoma[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2016, 36(10): 1610-1615. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.10.028