

· 综述 ·

碳酸酐酶 IX 与乳腺癌

冷婕 吴斌

缺氧是肿瘤微环境的代表性特征之一。肿瘤微环境中氧浓度的波动可引起肿瘤细胞的一系列反应,如凋亡途径的失活、存活途径的激活、侵袭性和转移性表型的诱导、糖酵解代谢途径的转变和新生血管的生成等。血供不足的肿瘤细胞在缺氧环境中,被迫采用能量转换效率低下的无氧呼吸模式。为满足能量需求,肿瘤细胞上调其呼吸作用强度进而使排酸增加,导致细胞外 pH 值下降,使其在缺氧和细胞外低 pH 条件下仍能维持细胞内的 pH 值,并杀死周围正常细胞。低氧和酸化是肿瘤微环境的两个代表性特征,两者相互协同作用,通过改变肿瘤基因表达谱和重塑肿瘤细胞表型,促进肿瘤的侵袭和转移^[1]。

碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA) IX 作为碳酸酐酶家族的一员,主要催化 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ 这一反应。它通过调节细胞膜内外气体交换、离子转运等,维持肿瘤细胞在缺氧状态下细胞膜内外的酸碱平衡,并且,研究证实 CA IX 的表达程度与缺氧呈正相关^[2]。本文就 CA IX 在乳腺癌方面的研究进展作一综述。

1 CA 家族

1.1 CA 家族及其组织分布

CA 家族分布于人类几乎所有的正常组织中,参与组织间 $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ 的转运、pH 的调节、离子转运、钙化作用、生物合成和信号转导等。CA 各亚型,如 CA II、CA IV、CA XII、CA XIII 等可在不同的组织中表达。一些亚型仅在特定的肿瘤细胞中表达,如 CA II 在肾癌和乳腺癌中表达^[3]。相反,CA IX 在大多数正常组织中缺失(只在胃及膀胱上皮组织中大量表达),但在肿瘤细胞中却大量地过表达,特别是在侵袭性更强的肿瘤变异型中^[1],所

以,CA IX 的组织分布有力地证明了肿瘤细胞对其的依赖性。

1.2 CA IX 的结构和功能

CA IX 是一种跨膜糖蛋白,是 Zn^{2+} 依赖的金属酶,也是 15 种人类 α 碳酸酐酶家族中的一员。CA IX 在胞外区有一个活性中心,能有效催化 CO_2 转换为 HCO_3^- 和 H^+ ,是促进细胞碱化、进行碳酸氢盐转运的先决条件^[4]。CA IX 运用其胞外的活化区域催化周围较近区域的 CO_2 ,并与碳酸氢盐转运体有效地合作。这一催化过程导致该区域的碳酸氢盐离子迅速产生,并直接呈递给碳酸氢盐转运体,如生电碳酸氢钠协同转运蛋白 NBCe1 和阴离子交换蛋白 2(anion exchanger 2, AE2) 等,进而转运至细胞质^[5]。在那里,它们能和质子一起产生 CO_2 ,并且, CO_2 能通过分泌的形式离开细胞并酸化细胞周围环境^[6]。CA IX 的胞外催化结构与 AE2、CA IX 与 NBCe1 在试管内反应的实验证据,以及 CA IX 通过这些转运体加速碳酸氢盐转运^[7]的实验证据均支持该假说。众所周知,CA IX 被内吞,细胞受体信号不仅在细胞表面而且在核内体介导,但这又很容易被忽略^[8]。CA IX 存在于细胞内可能有其特殊的生理学意义。

2 缺氧微环境与 CA IX 的调控

不管是明显的缺氧症还是轻微的氧供减少,CA IX 都会做出敏感的反应。CA IX 编码基因的转录被缺氧诱导因子 1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) 及缺氧反应原件(hypoxia-response element, HRE) 所调控。HRE 是 CA IX 基因核心启动子的一个重要组成成分,定位于转录起始位点前,临近处有一个特异性蛋白 1(specific protein 1, SP1) 结合位点。这个 SP1-HRE 结构是 CA IX 转录的一个主要调控者,它可能通过细胞密度或依赖酸化过程来诱导 CA IX 转录。研究发现缺氧可调节 CA IX mRNA 的剪接^[9],缺氧还可诱导 cAMP 增加、蛋白

酶 A 活化,使细胞内 CAIX 尾端的 THr443 磷酸化,从而活化 CAIX 蛋白^[10]。然后,磷酸化的 THr443 介导信号到胞外的催化结构域,导致 CAIX 蛋白水平发生变化进而调节 pH 值。

CAIX 是一个非常稳定的蛋白,半衰期为 40 h,缺氧能诱导其胞外域从细胞表面裂解和释放。在某些细胞类型和条件下,缺氧能通过细胞内成分诱导 CAIX 内化及再循环^[11]。内吞及外吐作用能降低 CAIX 在细胞膜表面的水平,缺氧能强烈地诱导产生新的 CAIX 分子,这些过程相互协作从而调整 CAIX 的含量^[8]。细胞外酸化影响着 CAIX 的表达。大型的基因组研究发现:在缺氧、乳酸堆积及正常氧供情况下,酸化的基因表达谱及其诊断价值存在着显著的差异,要分清哪些情况能在多相的肿瘤组织中同时发生非常重要^[12]。

3 CAIX 与乳腺癌的侵袭性及预后

多项研究表明,CAIX 与乳腺癌的侵袭性密切相关^[13-14]。Li 等^[13]研究 CAIX 的表达及其在乳腺癌分子分型中的重要性,通过免疫组织化学方法检测 117 位乳腺癌患者 ER、PR、HER-2、CK5/6、EGFR 和 CAIX 的表达。结果显示,CAIX 的表达不仅与乳腺癌分子分型有关,还与肿瘤分级、激素受体、大体标本的直径相关,提示 CAIX 是乳腺癌预后不良的一个独立指标。众所周知,三阴性乳腺癌侵袭性强,预后不佳。耶鲁大学的 Neumeister 等^[14]检测了 637 例乳腺癌患者术后标本的 CAIX 表达水平,进而评估缺氧与三阴性乳腺癌 BRCA1 基因功能缺失之间的关系,并进行长期随访(随访时间 4 个月至 41 年,中位随访时间为 12.6 年)。结果显示:CAIX 与 BRCA1 的蛋白表达呈负相关,CAIX 蛋白高表达者总生存率明显降低;升高的 CAIX 与 BRCA1 基因突变、BRCA1 基因功能丧失等有关。CAIX 可能是一种有用的生物标志物,可协助了解三阴性乳腺癌患者缺陷的同源重组,还可判断患者能否从多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶抑制剂治疗中获益。

研究显示,CAIX 的表达是多种癌症预后差的标志^[15]。Brennan 等^[16]的研究表明,对于仅有 1~3 枚淋巴结转移的绝经前乳腺癌患者,CAIX 可作为一个独立的预后因子。英国伯明翰大学医院的 Hussain 等^[17]通过病例对照研究发现,不论是单变量分析还是多变量分析,肿瘤表达 CAIX 的患

者其生存率明显降低。在浸润性乳腺癌中,原发肿瘤 CAIX 的表达是总生存率的一个独立预测因子。Kaya 等^[18]对 1996—2008 年期间 111 例乳腺癌患者进行 ER、PR、HER-2 等免疫组织化学检测,必要时还进行 HER-2 的 FISH 检测,并研究了 HIF-1 α 及 CAIX 的表达与肿瘤分期、分级、淋巴结转移、肿瘤大小、是否绝经、生存率等的关系。结果显示,与 ER(+)、PR(+)、HER-2(-) 患者相比,HIF-1 α 及 CAIX 过表达在 ER(-)、PR(-)、HER-2(+) 乳腺癌患者中更常见,且与预后不良相关。Trastour 等^[19]首先在实验条件下模仿外科手术切除异种移植的肿瘤,或取常温条件下外科手术切除但未固定的新鲜标本,对其中 HIF- α 的染色情况进行评测,然后又评估了 132 例浸润性乳腺癌 HIF- α 和 CAIX 的免疫组织化学染色情况,并随访 10 年,分析其与临床病理参数、辅助治疗反应等的关系。该研究结果显示:HIF- α 和 CAIX 的表达与肿瘤大小、淋巴结转移情况无明显相关性,但与病理组织学分级、激素受体缺失、原位癌的出现等显著相关;HIF- α 和 CAIX 与乳腺癌预后不良相关;在多变量分析中,HIF- α 和 CAIX 过表达与传统辅助治疗后的预后不良相关。

4 CAIX 与乳腺癌的诊断

CAIX 虽然是一种跨膜蛋白,但其胞外域能在体液中被检测到^[20],因此,它可用于肿瘤患者的普查,还可作为监视肿瘤的研发新方向。淋巴结转移的检测对乳腺癌的分期非常重要。前哨淋巴结活组织检查对乳腺癌患者治疗方案的抉择至关重要。Tafreshi 等^[21]建立了一个靶向荧光分子成像探针,可对乳腺癌的淋巴结转移进行非侵袭性检测,通过对 47 例正常乳腺组织标本、42 例导管原位癌、43 例无远处转移的浸润性导管癌、46 例有远处转移的浸润性导管癌以及 49 例乳腺癌淋巴结转移标本进行 CAIX 检测,结果显示所有癌转移淋巴结均有 CAIX 表达,提示这些成像探针有望成为临床上无创性乳腺癌分期的依据,可作为是否进行耗资巨大且有相关并发症的临床手术的指导。Müller 等^[22]测定血清中金属蛋白酶 1 和 CAIX 与转移性乳腺癌患者循环肿瘤细胞的关系,结果提示转移性乳腺癌患者血清中金属蛋白酶 1 和 CAIX 升高是预后差的指标,并且与循环肿瘤细胞的出现相关。Vermeulen 等^[23]通过对 483 例侵袭

性乳腺癌患者的组织切片进行免疫组织化学染色,检测了葡萄糖转运体 1 (glucose transporter 1, GLUT1)、EGFR、胰岛素样生长因子 1 受体 (insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1-R)、HER-2、肝细胞生长因子受体 (MET)、CAIX 等乳腺癌细胞膜表面蛋白的表达情况,结果显示 80% 的乳腺癌患者至少表达一种细胞膜表面标志物,因此,这些标志物可试用于分子成像。Li 等^[24]用 RT-PCR 法检测 71 例患者胸腔积液中 MN/CAIX 基因的表达情况(其中 59 例为恶性渗出液),并以 12 例良性疾病作为对照,癌症患者胸腔积液中 CAIX 基因表达的灵敏度和特异性分别为 89.8% 和 91.7%,提示 MN/CAIX 可以作为渗出液中存在恶性细胞的一个潜在标志物。

5 CAIX 与乳腺癌的治疗

5.1 CAIX 与乳腺癌治疗的抵抗

多项研究表明,CAIX 过表达与放射治疗、化疗、内分泌治疗、抗血管生成治疗等的抵抗性密切相关^[16,25-29]。Betof 等^[25]对 209 例早期乳腺癌患者的手术标本进行了研究,患者术后辅以包括多柔比星类药物在内的系统化疗,超过 10 年的随访结果提示,CAIX 是早期乳腺癌患者多柔比星耐药及 HER-2 和人类拓扑异构酶 II α 基因扩增的预测指标。Liu 等^[26]发现,乳腺癌患者区域缺氧与 ER α 表达减少有关,间歇性缺氧能引起 ER α 持续性下调,缺氧可能与 ER α 阳性转为阴性以及潜在的内分泌治疗耐药有关。Voss 等^[27]研究发现,缺氧可增加乳腺癌细胞迁移的活性,但尚未表现出对细胞增殖的影响。这也许解释了抗血管生成治疗可加速癌细胞远处转移的现象^[28]。肿瘤新生血管是乳腺癌发生、侵袭和转移的关键过程^[29]。在特定的 luminal 和 basal-like 乳腺癌细胞系中,缺氧细胞通过自分泌行为释放信号物质增加肿瘤细胞的迁移,这可能是抗血管生成治疗会使某些患者治疗效果变差的原因,建议抗血管生成治疗需与癌细胞迁移治疗策略同时进行。Brennan 等^[16]的研究表明,CAIX 可能与肿瘤的放射治疗抵抗相关。

5.2 针对 CAIX 的药物研究

由于 CAIX 在人体内独特的表达情况,并且,其主要定位于细胞膜表面,能够与抗体或药物相互作用,与肿瘤侵袭性密切相关,可作为有效的治

疗靶点。CAIX 单克隆抗体如 G250 等在肾细胞癌中表现出良好的安全性、耐受性及治疗前景,目前已进入 III 期临床试验^[30]。另外,主要以磺胺类及其衍生物为基础的 CA 抑制剂的研究较为广泛。其机制包括靶向 CAIX 活性中心的 Zn²⁺,阻滞活性位点有效果空间构象的形成,干扰 pH 的调节作用,进而影响药物的吸收、作用等。但是,大多数 CA 抑制剂还在临床前研究阶段,主要有乙酰唑胺、芳烃和杂环磺胺类药物、卤代磺胺类药物、脂肪族氨基磺酸盐、氨基磺胺盐和双氨基磺胺盐(+类固醇磷酸酯酶抑制剂)、E7070 抗癌药、非甾体类抗炎药、含阳离子吡啶的磺胺类衍生物、多氟化的磺胺类药物、磺胺类药物合并第 1、2、4-三嗪根、来源于 4-异硫氰酸根-苯唑拉磺胺类似物、羧化物、双氨基磺酸盐、合并胍基磺胺类药物、含硼磺胺嘧啶类、磺胺类药物、氨基磺酸盐、在缺氧肿瘤中活化的芳香族磺胺类药物、噻嗪类抗癫痫药物、糖基硫脲基磺胺类药物、含硝基生物还原剂、联苯磺胺类药物、纳米涂层抑制剂、香豆素类衍生物、伊马替尼和尼罗替尼等^[1]。期待这些非常有潜力的抗癌药物早日进入临床,造福人类。

5.3 针对 CAIX 治疗的其他研究

Robertson 等^[31]应用 RNA 干扰技术(RNAi)处理在缺氧状态下高表达 CAIX 的 MDA468 和 MDA231 细胞株时发现:缺氧诱导的 CAIX 活性完全被特异性 RNAi 阻断($P < 0.01$)。RNAi 技术处理过的细胞在密集的单层培养状态下表现出生长迟滞,缺氧状态下减少了 50% 的集落形成。在 MDA-MB-468 细胞株中,RNAi 对肿瘤细胞的侵袭性没有任何效果。在缺氧状态不会诱导其表达 CAIX 的细胞株 RT112 中,细胞转染 CAIX 对其侵袭性和转移能力没有任何影响。CAIX 在肿瘤细胞常氧或缺氧状态下的生长和存活中扮演着重要的角色,使其成为癌症治疗的潜在靶标。Shareef 等^[32]的研究结果表明,虽然 CAIX 是一个缺氧应答基因,但它的表达被 HIF- α 、Notch3、希佩尔林道(VonHippel-Lindau, VHL)蛋白等的相互作用所调控,靶向 CAIX 的上游调控因子有望成为有效的抗肿瘤/干细胞治疗方法。

6 结语

CAIX 与乳腺癌的发展、转移等密切相关,是乳腺癌早期筛查及诊断、淋巴结转移情况、循环肿

瘤细胞检测、远处转移情况、浆膜腔积液良恶性判断及预后等评估的潜在指标。针对 CAIX 的治疗前景远大。其单克隆抗体的研究在欧洲已被申请专利^[33]。小分子抑制剂如磺胺类药物价格低廉,在老药新用的研究方面具有重大价值,可为广大乳腺癌患者特别是第三世界国家患者谋福音,但尚在研发阶段,未投入临床使用,需要更多科研工作者的努力。另外,CAIX 胞外域的功能有待阐明,CAIX 在不同肿瘤中表达的表型仍未知,其与乳腺癌发生、发展、转移的确切关系,所诱导的对内分泌治疗、放射治疗、化疗、抗血管生成治疗抵抗性的机制,与 HER-2 靶向治疗的关系、与抗血管生成药物的协作效用等还需要进一步研究。相信将来靶向 CAIX 的治疗将会是乳腺癌治疗,甚至是多种肿瘤治疗的新靶点,会为更多的癌症患者带来新的希望。

【关键词】 乳腺肿瘤; 缺氧; 碳酸酐酶 IX

【中图法分类号】 R737.9 【文献标志码】 A

参 考 文 献

- [1] Bagley RG. 肿瘤微环境[M]. 覃文新,樊嘉,译. 杭州:浙江大学出版社,2013;51-78.
- [2] 张金忠,戈伟,张园如,等. CT/CT 图像融合用于非小细胞肺癌放射治疗对 V20 及放射性肺炎影响的临床研究[J]. 临床肿瘤学杂志,2011,16(2):154-157.
- [3] Korhonen K, Parkkila AK, Helen P, et al. Carbonic anhydrases in meningiomas; association of endothelial carbonic anhydrase II with aggressive tumor features[J]. J Neurosurg, 2009,111(3):472-477.
- [4] Pastorekova S, Ratcliffe PJ, Pastorek J. Molecular mechanisms of carbonic anhydrase IX-mediated pH regulation under hypoxia[J]. BJU Int, 2008,101 Suppl 4:8-15.
- [5] Svastova E, WitarSKI W, Csaderova L, et al. Carbonic anhydrase IX interacts with bicarbonate transporters in lamellipodia and increases cell migration via its catalytic domain[J]. J Biol Chem,2012,287(5):3392-3402.
- [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] Orłowski A, De Giusti VC, Morgan PE, et al. Binding of carbonic anhydrase IX to extracellular loop 4 of the NBCe1 Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter enhances NBCe1-mediated HCO₃⁻ influx in the rat heart[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2012, 303(1): C69-C80.
- [8] Zatoňičová M, Pastoreková S. Modulation of cell surface density of carbonic anhydrase IX by shedding of the ectodomain and endocytosis[J]. Acta Virol,2013,57(2): 257-264.
- [9] Barathova M, Takacova M, Holotnakova T, et al. Alternative splicing variant of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX expressed independently of hypoxia and tumour phenotype[J]. Br J Cancer,2008,98(1):129-136.
- [10] Ditte P, Dequiedt F, Svastova E, et al. Phosphorylation of carbonic anhydrase IX controls its ability to mediate extracellular acidification in hypoxic tumors[J]. Cancer Res, 2011,71(24):7558-7567.
- [11] Zatoňicova M, Jelenska L, Hulikova A, et al. Carbonic anhydrase IX as an anticancer therapy target: preclinical evaluation of internalizing monoclonal antibody directed to catalytic domain[J]. Curr Pharm Des, 2010,16(29):3255-3263.
- [12] Chen JL, Lucas JE, Schroeder T, et al. The genomic analysis of lactic acidosis and acidosis response in human cancers[J]. PLoS Genet,2008,4(12):e1000293.
- [13] Li MP, Ren LF, Cai HG, et al. Significance of carbonic anhydrase IX protein expression in molecular subtyping of breast cancers[J]. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi, 2013,42(3):182-185.
- [14] Neumeister VM, Sullivan CA, Lindner R, et al. Hypoxia-induced protein CAIX is associated with somatic loss of BRCA1 protein and pathway activity in triple negative breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012,136(1):67-75.
- [15] Li Y, Wang H, Oosterwijk E, et al. Antibody-specific detection of CAIX in breast and prostate cancers[J]. Biochem Biophys Res Commun,2009,386(3):488-492.
- [16] Brennan DJ, Jirstrom K, Kronblad A, et al. CA IX is an independent prognostic marker in premenopausal breast cancer patients with one to three positive lymph nodes and a putative marker of radiation resistance[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(21):6421-6431.
- [17] Hussain SA, Ganesan R, Reynolds G, et al. Hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX expression is associated with poor survival in patients with invasive breast cancer[J]. Br J Cancer,2007,96(1):104-109.
- [18] Kaya AO, Gunel N, Benekli M, et al. Hypoxia inducible factor-1 alpha and carbonic anhydrase IX overexpression are associated with poor survival in breast cancer patients[J]. J BUON,2012,17(4):663-668.
- [19] Trastour C, Benizri E, Ettore F, et al. HIF-1a and CA IX staining in invasive breast carcinomas: Prognosis and treatment outcome[J]. Int J Cancer,2007,120(1):1451-1458.
- [20] Schütze D, Milde-Langosch K, Witzel I, et al. Relevance of cellular and serum carbonic anhydrase IX in primary breast cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol,2013,139(5): 747-754.
- [21] Tafreshi NK, Bui MM, Bishop K, et al. Noninvasive Detection of breast cancer lymph node metastasis using carbonic anhydrases IX and XII targeted imaging probes[J]. Clin Cancer Res,2012,18(1):207-219.
- [22] Müller V, Riethdorf S, Rack B, et al. Prospective evaluation of serum tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and carbonic anhydrase IX in correlation to circulating tumor cells in patients

- with metastatic breast cancer [J]. Breast Cancer Res, 2011, 13(4):R71.
- [23] Vermeulen JF, van Brussel AS, van der Groep P, et al. Immunophenotyping invasive breast cancer: paving the road for molecular imaging[J]. BMC Cancer, 2012, 12:240.
- [24] Li G, Passebosch-Faure K, Feng G, et al. MN/CA9: a potential gene marker for detection of malignant cells in effusions[J]. Biomarkers, 2007, 12(2):214-220.
- [25] Betof AS, Rabbani ZN, Hardee ME, et al. Carbonic anhydrase IX is a predictive marker of doxorubicin resistance in early-stage breast cancer independent of HER2 and TOP2A amplification [J]. Br J Cancer, 2012, 106(5):916-922.
- [26] Liu GY, Shen KW, Shao ZM, et al. Hypoxia induces down-regulation of estrogen receptor alpha in human breast cancer [J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2004, 26(11):664-668.
- [27] Voss MJ, Möller MF, Powe DG, et al. Luminal and basal-like breast cancer cells show increased migration induced by hypoxia, mediated by an autocrine mechanism [J]. BMC Cancer, 2011, 11:158.
- [28] Loges S, Mazzone M, Hohensinner P, et al. Silencing or fueling metastasis with VEGF inhibitors: antiangiogenesis revisited [J]. Cancer Cell, 2009, 15(3):167-170.
- [29] 杨后圃, 王殊. 转化医学助力 21 世纪的乳腺癌研究 [J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2014, 8(1):9-12.
- [30] Mulders P, Bleumer I, Debruyne F, et al. Specific monoclonal antibody-based immunotherapy by targeting the RCC-associated antigen carbonic anhydrase-IX (G250/MN) [J]. Urologe A, 2004, 43 Suppl 3:S146-147.
- [31] Robertson N, Potter C, Harris AL. Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion [J]. Cancer Res, 2004, 64(17):6160-6165.
- [32] Shareef MM, Udayakumar TS, Sinha VK, et al. Interaction of HIF-1 α and Notch3 is required for the expression of carbonic anhydrase 9 in breast carcinoma cells [J]. Genes Cancer, 2013, 4(11-12):513-523.
- [33] Soyupak B, Erdogan S. MN/CA IX/CA9 and renal cancer prognosis: Turkey, 20090191557 [P/OL]. (2009-07-30)[2014-04-26]. <http://www.faq.s.org/patents/app/20090191557>. (收稿日期:2014-05-08)
- (本文编辑:罗承丽)

冷婕, 吴斌. 碳酸酐酶 IX 与乳腺癌 [J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2014, 8(6):423-427.

中华医学会