

碳酸酐酶XII在口腔鳞癌中的表达及意义

余少壮 尹学敏 王德明 尹晓东

摘要 **目的** 探讨碳酸酐酶XII(carbonic anhydrase XII, CA XII)在口腔鳞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)中的表达及其与临床病理特征的关系。**方法** 采用免疫组织化学的方法检测 CA XII在 60 例 OSCC 组织及 20 例正常口腔黏膜组织中的表达,酶联免疫法(ELISA)检测 CA XII在 30 例 OSCC 患者及 10 例健康人血清中的表达,观察其与 OSCC 的相关性。**结果** 60 例 OSCC 组织中有 43 例 CA XII 呈阳性表达,阳性率为 71%,明显比正常口腔黏膜组织高(10%)($P < 0.05$);CA XII 的组织表达水平和 OSCC 的临床分期以及肿瘤直径显著相关($P < 0.05$),但是和患者的年龄、性别、淋巴结转移以及 OSCC 的分化程度无关($P > 0.05$)。OSCC 患者血清中 CA XII 的表达量显著高于健康对照者($Z = 4.685$, $P = 0.00$),但在 OSCC 的各项临床病理特征之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** CA XII 可能在 OSCC 的生长、侵袭中发挥着重要作用;定量检测血清 CA XII 在 OSCC 的诊疗中具有一定的应用价值。

关键词 碳酸酐酶XII 口腔鳞癌 免疫组化 酶联免疫法

中图分类号 R739.8

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.11.020

Expression and significance of CA XII in the Oral Squamous Cell Carcinoma. Yu Shaozhuang, Yin Xuemin, Wang Deming, et al. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Harbin Medical University, Heilongjiang 150000, China

Abstract **Objective** To explore the expression of CA XII and its correlation with clinical pathologic findings in the oral squamous cell carcinoma(OSCC). **Methods** Immunohistochemistry method was applied to measure the expression of CA XII in 60 cases of OSCC and 20 cases of normal oral mucosa tissues, serum CA XII was measured with ELISA in 30 patients with OSCC and 10 healthy controls. The relationship of CA XII with the clinicopathologic features of OSCC patients were analyzed. **Results** CA XII was positive in 43/60 cases of OSCC, with the positive rate of 71%, which was significantly higher than that of the normal oral mucosa($P < 0.05$). The expression of CA XII was significantly associated with the clinical stages, tumor size of OSCC ($P < 0.05$), but was not associated with sex, age, lymph node metastasis of patients with OSCC and differentiation of OSCC ($P > 0.05$). Serum levels of CA XII were higher in the patients with OSCC than healthy controls($Z = 4.685$, $P = 0.00$), there was no significant difference among clinicopathologic characters($P > 0.05$). **Conclusion** CA XII might play an important role in the development and invasion of OSCC. Quantification of serum CA XII may be a valuable tool in the diagnosis and treatment of OSCC.

Key words CA XII; OSCC; Immunohistochemistry; ELISA

口腔鳞状细胞癌是口腔颌面部恶性肿瘤中最常见的病理类型,具有侵袭性强、进展速度快等特点,这也是导致患者预后差的一个主要因素^[1]。低氧和酸性微环境是实性肿瘤特别是恶性肿瘤长期生存的基础,其中酸性微环境在肿瘤的增殖、浸润和转移中发挥重要作用^[2]。碳酸酐酶XII(carbonic anhydrase XII, CA XII)是一种在低氧环境下产生的蛋白,对肿瘤的pH值调节起重要作用,在正常组织中无表达或少数特殊组织中低表达,而在恶性肿瘤组织中呈广泛的高

表达^[3,4]。CA XII亦是一种跨膜蛋白,其中位于细胞膜外的部分可被酶降解而进入血液。目前已有研究证实 CA XII在肾透明细胞癌等多种恶性肿瘤组织及肺癌患者血清中呈高表达,并且和肿瘤的侵袭、转移有关,而有关 CA XII在 OSCC 中的研究较少^[5,6]。研究证实 CA XII可以通过碱化肿瘤胞内环境、酸化胞外环境促进肿瘤的浸润。本研究通过检测 OSCC 组织标本及患者血清中 CA XII 的表达水平,进一步探讨 CA XII 和 OSCC 临床病理特征的关系及其在 OSCC 临床诊疗中的应用价值。

资料与方法

1. 检测对象:OSCC 组织标本来源于 2015 年 9 月~2017 年 5 月就诊于哈尔滨医科大学附属口腔医院口腔颌面外科初次行手术切除的口腔鳞癌患者标

基金项目:黑龙江省教育厅科学研究项目(11521187)

作者单位:150000 哈尔滨医科大学附属口腔医院口腔颌面外科

通讯作者:尹晓东,副主任医师,硕士生导师,电子信箱:yinxiaodong117@126.com

本蜡块共 60 例,相关资料完整,术前未经其他治疗,其中,男性 37 例,女性 23 例,患者年龄 38 ~ 82 岁,高分化者 17 例,中、低分化者 43 例。选取正常口腔黏膜组织 20 例作为对照。OSCC 血清收集于 2016 年 8 月 ~ 2017 年 5 月就诊于哈尔滨医科大学附属口腔医院口腔鳞癌患者术前静脉血共计 30 例,收集 10 例健康人静脉血提取血清作为对照。所有静脉血(5ml 非抗凝采血管收集)都是在常温下以 3000r/min 离心 10min,取出上清液分装后置于 -80℃ 冰箱保存备用。检测之前将所有样本在常温下一次解冻。

2. 主要试剂:CAⅫ兔抗人多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司)、CAⅫ ELISA 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),免疫组化试剂盒及其他材料为哈尔滨医科大学第一临床医院病理科和中心实验室提供。

3. 检测方法及结果判定:(1)免疫组化:石蜡标本切片,脱蜡。严格遵照 SP 免疫组化试剂盒的说明进行操作检测 CAⅫ的表达,PBS 代替一抗作阴性对照。切片观察由两位病理专家采用双盲法独立完成,结果统一为准。结果判读,CAⅫ的阳性表达呈棕黄、褐色颗粒,且主要部位是细胞膜,少量位于胞质内。参考以往相关研究所采用的标准,染色强度联合染色的比率进行评分^[7]。具体如下:将每张切片于高倍显微镜下($\times 100$)随机选取 10 个独立的区域,每个区域观察 100 个肿瘤细胞,累计观察 10 个视野共计 1000 个细胞计算阳性肿瘤细胞所占比率。染色强度分级:0 级:无染色;1 级:淡黄色(弱染色);2 级:棕黄色(中等染色);3 级:棕褐色(强染色)。计分标准如下:0 :无染色;1 + :弱染色或阳性细胞比率 $< 10\%$;2 + :中等染色且阳性细胞比率 $> 10\%$;3 + :强染色且阳性细胞比率 $> 10\%$ 。2 + ,3 + 判定为阳性。(2)酶联反应:严格遵照 ELISA 试剂盒操作说明书处理血清样本。操作完成后 15min 内用微孔板读数器在波长 450nm 下测 A 值,根据 A 值查出相应浓度再乘以稀释倍数得出样本实际浓度。

4. 统计学方法:采用 SPSS 20.0 统计学软件对数据进行统计分析,计数资料组间用 χ^2 检验进行比较、计量资料先进行正态性检验,因不符合正态分布而采用秩和检验进行组间比较,数据采用四分位法进行表示,以 $P < 0.05$ 为差异统计学意义。

结 果

CAⅫ在 OSCC 组织中的阳性表达主要位于细胞膜,少量位于细胞质,呈棕黄色颗粒(图 1、图 2)。

OSCC 组织中 CAⅫ的阳性表达率为 71% (43/60) 高于正常口腔黏膜组织 10% (2/20),差异有统计学意义($P = 0.000$,表 1)。

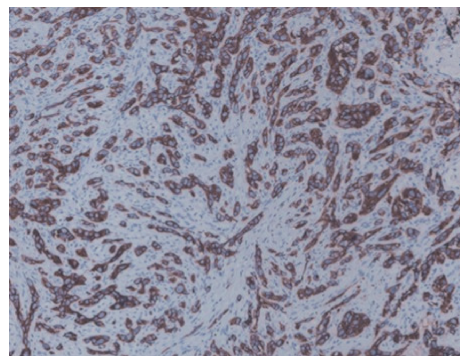


图 1 CAⅫ在口腔鳞状细胞癌组织中的表达(SP, $\times 200$)

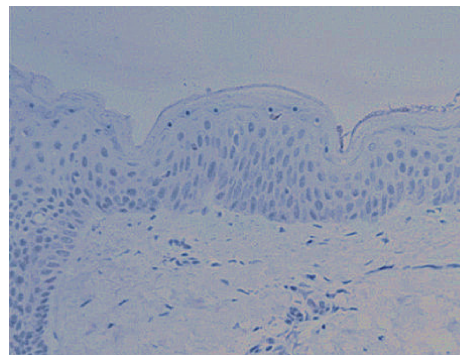


图 2 CAⅫ在正常的口腔黏膜组织中的表达(SP, $\times 200$)

表 1 CAⅫ在口腔鳞癌及正常口腔黏膜组织的表达[n(%)]

组别	n	阴性(-)	阳性(+)
口腔鳞癌组织	60	17(29)	43(71)
正常口腔黏膜组织	20	18(90)	2(10)

$$\chi^2 = 23.179, P = 0.000$$

CAⅫ的组织表达和 OSCC 的 TNM 分期及肿瘤直径相关($P < 0.05$),而与患者的性别、年龄、有无淋巴结转移以及 OSCC 分化程度无关($P > 0.05$,表 2)。口腔鳞癌患者血清中 CAⅫ的表达水平较健康对照者显著增高($P = 0.000$,表 3),而其表达量和 OSCC 的各临床病理特征无关($P > 0.05$,表 4)。

讨 论

口腔鳞癌和大多数恶性肿瘤一样,随着肿瘤的不断生长,在肿瘤的内部势必形成低氧和酸性的微环境,而肿瘤细胞通过调整相关因子的表达维持自身活性,促进肿瘤的生长、侵袭以及对放化疗的抵抗^[8-10]。CAⅫ是低氧酸性条件下维持肿瘤细胞活性

表 2 CAXII在口腔鳞癌组织中的表达与临床病理特征的关系

项目	<i>n</i>	阴性(-)	阳性(+)	χ^2	<i>P</i>
性别					
男性	35	9	26	0.248	0.594
女性	25	8	17		
年龄(岁)					
<60	27	7	20	0.140	0.708
≥60	33	10	23		
肿瘤直径(cm)					
≤4	22	12	10	11.754	0.001
>4	38	5	33		
临床分期					
I + II	21	11	12	6.979	0.008
III + IV	39	6	31		
淋巴结转移					
无	38	13	25	1.763	0.184
有	22	4	18		
分化程度					
高分化	17	2	15	2.169	0.141
中、低分化	43	15	28		

表 3 口腔鳞癌患者及健康对照者血清中 CAXII的表达

组别	<i>n</i>	血清 CAXII水平(pg/L) [<i>Q</i> ₂ (<i>Q</i> ₁ , <i>Q</i> ₃)]
口腔鳞癌患者	30	303.59(257.37,345.81)
健康对照者	10	91.51(84.76,94.43)

$Z = -4.685, P = 0.000$

表 4 口腔鳞癌患者血清中的 CAXII表达与临床病理特征的关系

项目	<i>n</i>	血清 CAXII水平(pg/L) [<i>Q</i> ₂ (<i>Q</i> ₁ , <i>Q</i> ₃)]	<i>Z</i>	<i>P</i>
性别				
男性	20	303.59(257.99,344.79)	-0.440	0.965
女性	10	304.675(255.02,351.36)		
年龄(岁)				
<60	16	293.56(253.85,341.24)	-0.582	0.561
≥60	14	310.93(260.45,353.09)		
肿瘤直径(cm)				
≤4	11	298.52(256.20,346.57)	-0.065	0.949
>4	19	308.66(257.76,345.55)		
临床分期				
I + II	9	308.66(240.15,362.565)	-0.113	0.91
III + IV	21	296.15(260.56,342.51)		
淋巴结转移				
无	17	268.52(247.90,350.58)	-1.318	0.187
有	13	316.25(292.38,343.02)		
分化程度				
高分化	6	348.58(255.89,389.90)	-1.296	0.195
中、低分化	24	297.34(256.59,337.53)		

促进肿瘤生长的一种跨膜蛋白,其主要机制是在低氧酸性环境下维持肿瘤细胞内碱性环境进一步酸化胞外环境,而且位于细胞外的部分可被酶类降解进入血液^[3,11,12]。

体外研究表明 CAXII的表达可促进肿瘤细胞的增殖和侵袭,目前已在肾癌、直肠癌、肺癌、乳腺癌等多

种恶性肿瘤中得到证实,而抑制 CAXII的表达可延缓肿瘤的生长^[5,13,14]。本研究同样发现 CAXII在 OSCC 组织中的表达显著高于正常口腔黏膜组织,且与 OSCC 的临床分期及肿瘤直径呈正相关($P < 0.05$)。由此可以推测 CAXII对 OSCC 的生长和侵袭起重要作用。其可能的机制,首先 OSCC 细胞在低氧酸性环境下诱导 CAXII的表达后适应了酸性环境,而适应酸性环境的肿瘤细胞可发生上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),提高了自身迁移能力^[15];其次 CAXII在碱化肿瘤细胞内环境的同时进一步酸化胞外环境,而酸性环境通过钙离子通道诱导了基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的表达上调,MMPs 直接降解细胞外基质,破坏肿瘤细胞侵袭的屏障,进而促进肿瘤向周围正常组织内侵袭^[16];同时因酸凋亡的正常细胞也能为肿瘤的生长提供空间。此外,低氧和酸化还能介导肿瘤细胞对化疗的抵抗^[17,18]。以往的研究表明对化疗药物产生耐药的肿瘤细胞在沉默 CAXII的表达后可增强其对化疗药物的敏感度,因此 CAXII可能作为肿瘤治疗的靶点^[19,20]。基于碳酸酐酶 CAXII在肿瘤进展中的作用以及 OSCC 对化疗的低敏感性,CAXII可能促进了 OSCC 细胞对化疗药的抵抗。由此可以推测在 OSCC 的生长过程中如果抑制 CAXII的表达,既能减缓肿瘤细胞的生长又能增强其对化疗药物的敏感度,有效地减少肿瘤的扩散。这将有利于肿瘤的综合治疗,从而达到提高肿瘤治愈率、减少患者痛苦、改善预后的效果。

Kobayashi 等^[6]报道肺癌患者血清中 CAXII 的浓度显著高于健康对照组,中、高分化组较低分化组更为显著。本研究发现 CAXII在 OSCC 患者血清中的表达水平明显高于健康对照者($P < 0.05$),这和以往的研究结论相吻合。但和 Kobayashi 等^[6]的研究结果有所不同的是 CAXII的血清表达量在 OSCC 的不同分化程度及各临床特征之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。因此 CAXII可能作为一种血清检测标志物用于口腔鳞癌的辅助诊断或对口腔鳞癌患者治疗前后进行监测,以便于进行疗效评估,但在 OSCC 分化程度的判断中不能提供参考。

综上所述,检测 CAXII的表达可能为口腔鳞癌的诊断及恶性程度的判断提供参考,同时血清中 CAXII 的定量检测可能为口腔鳞癌的诊疗及效果评估提供参考。参与肿瘤 pH 值调节的因子众多,而 CAXII与其他因子在口腔鳞癌发生、发展中的具体机制及相互作用有待于进一步研究。

(下转第 106 页)

- mia (B-CLL) cells[J]. Blood, 2005, 106(2): 690-697
- 11 Fong W, Tse A, Poon K, *et al.* Magnolol and honokiol enhance HL-60 human leukemia cell differentiation induced by 1, 25-dihydroxy vitamin D3 and retinoic acid[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(2): 427-441
 - 12 Kenji I, Teru H, Makoto H, *et al.* Honokiol overcomes conventional drug resistance in human multiple myeloma by induction of caspase-dependent and -independent apoptosis[J]. Blood, 2005, 106(5): 1794-1800
 - 13 Park E, Zhao Y, Kim Y, *et al.* Honokiol induces apoptosis via cytochrome crelease and caspase activation in activated rat hepatic stellate cells in vitro[J]. Planta Med, 2005, 71(1): 82-84
 - 14 杨光丽, 侯文礼, 付阿富, 等. 和厚朴酚对人宫颈癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 四川大学学报:医学版, 2008, 39(4):558-562
 - 15 Sun J, Chen Z, Tan X, *et al.* MicroRNA-99a/100 promotes apoptosis by targeting mTOR in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. Med Oncol, 2013, 30(1):411-417
 - 16 孙建鸣, 徐仁芳. miR-99a 在泌尿系肿瘤中的研究进展[J]. 系统医学, 2016, 1(9):162-165
 - 17 黎文汉. miR-99a 调控胶质瘤细胞侵袭与迁移的作用及机制研究[D]. 天津:天津医科大学, 2016

- 18 罗玉政, 李铁军, 王侑. 腺病毒介导 miR-99a 过表达抑制人结肠癌 HCT-8 细胞的生长抑制及其作用机制[J]. 兰州大学学报:医学版, 2016, 42(3):22-28
- 19 李连香, 于翠革, 陈丽宏, 等. miR-99b 在新辅助化疗宫颈癌组织中的表达[J]. 陕西医学杂志, 2016, 45(10):1292-1293
- 20 姜丽, 王燕. microRNA-99b 过表达对宫颈癌细胞增殖、侵袭及化疗敏感性的影响[J]. 山东医药, 2015, 29:56-58
- 21 Kang J, Lee SY, Sun YL, *et al.* microRNA-99b acts as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer by directly targeting fibroblast growth factor receptor 3[J]. Exp Therapeut Med, 2012, 3(1): 149-153
- 22 J Zhang, S Wang, LY Lu, *et al.* MiR99a modulates MMP7 and MMP13 to regulate invasiveness of Kaposi's sarcoma[J]. Tumour Biol, 2014, 35(12):12567-12573
- 23 Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, *et al.* Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs[J]. Genes Dev, 2006, 20(5):515-524

(收稿日期:2018-01-13)

(修回日期:2018-01-25)

(上接第 91 页)

参考文献

- 1 陈新. 口腔鳞状细胞癌现状[J]. 口腔医学, 2017, 37(5):462-465
- 2 Jiang X, Overholtzer M, Thompson CB. Autophagy in cellular metabolism and cancer[J]. J Clin Invest, 2015, 125(1): 47-54
- 3 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
- 4 Viikila P, Kivela AJ, Mustonen H, *et al.* Carbonic anhydrase enzymes II, VII, IX and XII in Colorectal carcinomas[J]. World J Gastroentero, 2016, 22(36):8168-8177
- 5 Abdul W, William S. Sly carbonic anhydrase XII functions in health and disease[J]. Gene, 2017, 623:33-40
- 6 Kobayashi M, Matsumoto T, Ryuge S, *et al.* CA XII is a sero-diagnostic marker for lung cancer[J]. PLoS One, 2012, 7(3):e33952
- 7 Jiang J, Zhao JH, Wang XL, *et al.* Correlation between carbonic anhydrase IX (CA-9), XII (CA-12) and hypoxia inducible factor-2 α (HIF-2 α) in breast cancer[J]. Neoplasma, 2015, 62(3):456-463
- 8 秦承东, 任正刚, 汤钊猷. 缺氧微环境在肿瘤进展中的作用[J]. 肿瘤, 2016, 3(1):96-102
- 9 Macklin PS, McAuliffe J, Pugh CW, *et al.* Hypoxia and HIF pathway in cancer and the placenta[J]. Placenta, 2017, 56:8-13
- 10 Rankin EB, Giaccia AJ. Hypoxic control of metastasis[J]. Science, 2016, 352(6282):175-180
- 11 Asgharzadeh MR, Barar J, Pourseif MM, *et al.* Molecular machineries of pH dysregulation in tumor microenvironment: potential targets for cancer therapy[J]. Bioimpacts, 2017, 7(2):115-133
- 12 Payen VL, Porporato PE, Baselet B, *et al.* Metabolic changes associat-

- ed with tumor metastasis, part I: tumor pH, glycolysis and the pentose phosphate pathway[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(7):1333-1348
- 13 Kivela A, Parkkila S, Saamio J, *et al.* Expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase isozyme XII in normal human gut and colorectal tumors[J]. Am J Pathol, 2000, 156(2):577-584
- 14 Gondi G, Mysliwicz J, Hulikova A, *et al.* Antitumor efficacy of a monoclonal antibody that inhibits the activity of cancer-associated carbonic anhydrase XII[J]. Cancer Res, 2013, 73(21):6494-6503
- 15 Zhao MN, Liu Q, Gong YC, *et al.* GSH-dependent antioxidant defense contributes to the acclimation of colon cancer cells to acidic microenvironment[J]. Cell Cycle, 2016, 15(8):1125-1133
- 16 Maeda T, Yuzawa S, Suzuki A, *et al.* RhoA mediates the expression of acidic extracellular pH-induced matrix metalloproteinase-9 mRNA through phospholipase D1 in mouse metastatic B16-BL6 melanoma cells[J]. Int J Oncol, 2016, 48(3):1251-1257
- 17 McDonald PC, Chafe SC. Overcoming hypoxia-mediated tumor progression: combinatorial approaches targeting pH regulation, angiogenesis and immune dysfunction[J]. Front Cell Dev Biol, 2016, 4(370):27
- 18 Barar J, Omid Y. Dysregulated pH in tumor microenvironment checkmates cancer therapy[J]. Bioimpacts, 2013, 3(4):149-162
- 19 Kopecka J, Rankin GM, Salaroglio IC, *et al.* P-glycoprotein-mediated chemoresistance is reversed by carbonic anhydrase XII inhibitors[J]. Oncotarget, 2016, 7(52):85861-85875
- 20 Kopecka J, Campia I, Jacobs A, *et al.* Carbonic anhydrase XII is a new therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer cells[J]. Oncotarget, 2015, 6(9):6776-6793

(收稿日期:2018-01-17)

(修回日期:2018-01-28)