V-ATPase 在结肠癌中的表达及其临床意义

赵森林[1],孟 镔[2],严东旺[1],张丽康[2],崔菲菲[1],陆惠军[1],陈 健[1],彭志海[1] (1. 上海交通大学附属第一人民医院普外科,上海 200080;2. 安徽理工大学医学院临床外科应用解剖学教研室,安徽 淮南 232001)

[摘 要] **目的** 探讨结肠癌组织中液泡型 ATP 合酶(V-ATPase)表达与结肠癌临床病理特征的关系及其对结肠癌发生发展的意义。**方法** 随机选取 20 例结肠肿瘤组织和配对的正常组织,通过逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和实时定量聚合酶链反应(Real-time PCR)检测 V-ATPase 基因的 mRNA 表达量,采用免疫组织化 EnVinsion 法检测 V-ATPase 基因在 68 例结肠癌组织及配对的正常癌旁组织中蛋白表达量。**结果** 结肠癌组织及配对正常组织中 V-ATPase 基因 mRNA 平均表达量分别为(5.37 ± 0.44)、(2.03 ± 0.35)($P < 0.01$)。免疫组织化学结果显示 V-ATPase 在结肠肿瘤组织及配对正常组织中阳性表达率分别为 69.1%(47/68)和 5.8%(4/68),其阳性表达主要在胞膜和胞质中,V-ATPase 过表达与肿瘤分期($P < 0.05$)、区域淋巴结转移($P = 0.044$)、远处转移($P = 0.049$)、脉管浸润($P = 0.044$)和分化($P < 0.001$)有关。**结论** V-ATPase 基因在结肠癌组织中高表达对结肠癌的发生发展起重要作用,可能为结肠癌术后辅助化疗的重要靶点。

[关键词] 结肠癌;液泡型;ATP 合酶

[中图分类号] R735.35;R329.3 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2014)05-0486-03

The expression of V-ATPase and its significance in colon cancer

ZHAO Sen-lin, Meng Bin, YAN Dong-wang, ZHANG Li-kang, CUI Fei-fei, LU Hui-jun, CHEN Jian, PENG Zhi-hai (Department of General Surgery, First Affiliated People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China)

Abstract: Objective To explore the expression of V-ATPase in colon cancer and its clinical significance. **Methods** Detecting the expression of V-ATPase mRNA in 20 paired of colon tumor tissues and normal tissues by using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and testing the expression of V-ATPase protein by immunohistochemistry of EnVinsion. **Results** The expression of V-ATPase mRNA in tumor tissues and its paired normal tissues were (5.37 ± 0.44) and (2.03 ± 0.35) ($P < 0.01$). The positive immunohistochemistry of V-ATPase in tumor tissues and its paired normal tissues were 69.1% (47/68) and 5.8% (4/68) respectively, and the positive expression were primarily in cytoplasm and cytomembrane. Overexpression of V-ATPase was associated with tumor stage ($P < 0.05$), lymph node metastasis ($P = 0.044$), distant metastasis ($P = 0.049$), vessel invasion ($P = 0.044$) and differentiation ($P < 0.001$). **Conclusion** Overexpression of V-ATPase plays a significant role in the carcinogenesis and the progression of colon cancer, which might be an important postoperative therapeutic target.

Keywords: colon cancer ;vacuole type;V-ATPase

结肠癌是临床上常见的恶性肿瘤,近年来发病趋势不断上升,上海地区结肠癌发病率已高居全部恶性肿瘤的第 2 位,仅次于肺癌,死亡率位于第三位[1]。目前,结肠癌手术治疗技术成熟,术后能进行规范性化疗。但是患者 5 年总体生存率仅达到 50% ~55%,生存率并没有明显提高,其主要原因是缺少判断预后和预测化疗耐药的灵敏指标,这也是制约目前临床诊治的核心问题[2]。因此,探寻并应用新型预测肿瘤复发与化疗敏感性的分子指标是临床亟待解决的问题[3]。V-ATPase 是一种广泛存在于真核细胞的胞质膜及细胞管泡膜系统中的 H^+ 泵[4]。新发现 V-ATPase 基因在非小细胞肺癌[5]和食管鳞状细胞癌中高表达,而且与化疗耐药高度相关[5-6],但是,国内外对 V-ATPase 基因在结肠癌中表达及其意义报道尚少。因此,为了提高结肠癌的术后的治愈率和生存率,本研究通过分析 V-ATPase 基因在结肠癌中的表达及其与临床病理特征关系,探讨 V-ATPase 基因对结肠癌生物学的作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集上海交通大学附属第一人民医院胃肠外科标本库的 68 例结肠癌患者肿瘤标本及患者对应的正常组织样本。其中男 29 例,女 39 例,患者平均年龄 64.22 岁。全部为结肠腺癌,其中升结肠癌 23 例,横结肠癌 8 例,降结肠癌 37 例。按美国癌症联合会(AJCC)对结肠癌分期,Ⅰ期 5 例,Ⅱ期 19 例,Ⅲ期 35 例,Ⅳ期者 9 例。病理检查显示高分化者 40 例,中等分化者 26

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201405014

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81172328,81220108021)

[收稿日期] 2014-03-20 [修回日期] 2014-04-03

例,低分化者 2 例。发现淋巴结转移者 8 例,无淋巴结转移者 60 例;有远处转移者 14 例,无远处转移者 54 例。术中发现脉管浸润者 13 例,其余 55 例无脉管浸润。

1.2 方法

1.2.1 逆转录聚合酶链反应及荧光定量聚合酶链反(qPCR)检测 随机选取 20 对新鲜冰冻组织,应用 Trizol(Invitrogen 公司,美国)提取总 RNA,然后采用 cDNA 合成试剂盒(Thermo 公司,美国)根据使用说明反转录合成 cDNA。最后使用荧光定量检测试剂盒(Thermo 公司,美国),在 Eppendoff 公司生产的 PCR 仪上进行 Real-time PCR 扩增反应。反应中使用的引物序列为:①V-ATPase 上游引物序列 5'-ATGGCCATGGAGATAGACAGC-3';②V-ATPase 下游引物序列 5'-CCATGGCTGCAAAGACGATG-3';③GAPDH 上游引物序列 5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3';④GAPDH 下游引物序列 5'-CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA-3'。QPCR 反应条件为:起始变性 95 ℃时间 10 min,45 个循环(变性 95 ℃时间 10 s、退火 60 ℃时间 30 s、延伸 72 ℃时间 30 s)。每种实验至少重复 3 次。V-ATPase 变化的 2-ΔΔCt 用于表示 V-ATPase 基因的表达量,V-ATPase 在结肠肿瘤组织相对配对正常组织中的表达计算公示为:V-ATPase△Ct = (Avg. V - ATPase _Ct-Avg. GAPDH _Ct);V-ATPase △△Ct = (V - ATPase △Ct _tumor - V-ATPase△Ct_non-tumor)。

1.2.2 免疫组织化学方法检测 从标本库中提取本实验随机选取的 68 对组织样本制作的石蜡切块,并制备厚度为 4 μm 的切片。然后采用两步法进行免疫组化染色实验,经过脱蜡、尿素消化、3% H_2O_2 封闭和微波修复等步骤后,一抗孵育并 4 ℃过夜;次日复温后,抗兔二抗(EnVision)37 ℃孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次,每次冲洗 10 min,显微镜下加 DAB(1∶40)显色。经苏木素复染、盐酸乙醇化、脱水和中性树胶封片,并在室温风干后光镜下观察。根据 V-ATPase 染色强度进行评分,分为:3 分(强阳性)、2 分(中等阳性)、1 分(弱阳性)、0 分(阴性);根据 V-ATPase 染色阳性面积评分,分为 3 分(51 ~ 100%)、2 分(10 ~ 50%)、1 分(小于 10%)、0 分(0)。按照我们前期病理评分标准,V-ATPase 免疫组化染色总评分为 V-ATPase 染色免疫染色强度与染色面积评分和[7]:(5 ~ 6)分,强阳性;(3 ~ 4)分,弱阳性;(0 ~ 2)分,阴性。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 19.0 软件进行分析,采用 χ^2 检验或者 Fisher'S 确切概率法检验。所有比较均为双侧检验,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 V-ATPase 基因在结肠癌组织及配对正常组织中的表达

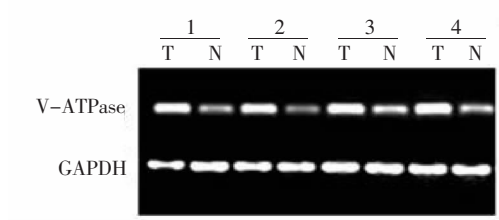
20 对新鲜冰冻组织中 V-ATPase mRNA 的平均相对表达量分别为(5.37 ± 0.44)和(2.03 ± 0.35),对特异性 PCR 扩增产物凝胶电泳结果验证了此结果,$P < 0.01$,差异有统计学意义,见图 1。免疫组化染色显示,68 例患者肿瘤组织中 V-ATPase 基因阳性表达者 47 例(69.1%),而配对正常肿瘤组织中阳性表达者仅有 4 例(5.8%),两组间差异显著,而且 V-ATPase 阳性表达主要出现在肿瘤组织的胞膜和胞质中。

2.2 V-ATPase 基因表达与结肠癌临床病理参数的关系

V-ATPase 基因的高度表达与结肠癌患者的 T 分期($P < 0.001$)、局部淋巴结转移($P = 0.044$)、肿瘤远处转移($P = 0.049$)、AJCC 分期($P = 0.012$)、脉管浸润($P = 0.044$)以及肿瘤分化程度($P < 0.001$)有关;但对结肠癌患者的年龄($P = 0.342$)、性别($P = 0.981$)和肿瘤发生部位($P = 0.393$)的影响无统计学意义。Ⅰ ~ Ⅱ期患者中,V-ATPase 阳性表达者为 50%(12/24),Ⅲ ~ Ⅳ期患者中阳性表率高达 79.5%(35/44)。免疫组化实验结果还显示 V-ATPase 基因在正常组织中不表达或者低表达,进一步证明 qPCR 检测结果,见表 1、图 2。这些结果同样提示了 V-ATPase 基因可能参与了结肠癌的转移和浸润。

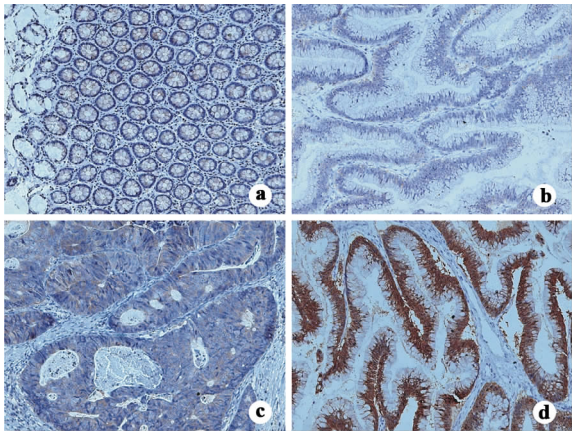
表 1 V-ATPase 表达与结肠癌患者临床病理特征的关系($n = 68$)

影响因素		n	V-ATPase 表达		P
			阴性(n = 21)	阳性(n = 47)	
性别	男	29	9	20	0.981
	女	39	12	27	
年龄(岁)	< 65	35	9	26	0.342
	≥65	33	12	21	
病变部位	升结肠	23	5	18	0.393
	横结肠	8	2	6	
	降结肠	37	14	23	
TMN 分期	T1 + T2	25	12	13	0.001*
	T3 + T4	43	9	34	
	N0	60	21	39	0.044*
	N1	8	0	8	
	M0	54	20	34	0.049*
	M1	14	1	13	
AJCC 分期	Ⅰ + Ⅱ	24	12	12	0.012*
	Ⅲ + Ⅳ	44	9	35	
脉管浸润	有	13	1	12	0.044*
	无	55	20	35	
分化程度	高	40	20	20	0.001*
	中	26	1	25	
	低	2	0	2	



T:肿瘤组织;N:配对正常黏膜组织

图 1 实时定量聚合酶链反应扩增产物凝胶电泳图



a:正常黏膜组织(阴性);b:肿瘤组织(阴性);c:肿瘤组织(弱阳性);d:肿瘤组织(强阳性)

图 2 V-ATPase 在结肠癌组织中免疫组化 EnVision 法染色(×200)

3 讨论

V-ATPase 广泛存在真核生物胞质膜及细胞管泡膜系统中,编码一种能主动转运 H^+ 的蛋白。正常情况下 V-ATPase 蛋白由跨膜的 V_0 亚基和胞质内的 V1 亚基组成,两种亚基聚合时,能利用分解 ATP 产生的能量逆浓度梯度转运 H^+,从而维持细胞内外在一个相对稳定的 pH 值[4]。在肿瘤细胞中 V-ATPase 常常过表达,这样不但能抑制细胞内酸化对抗细胞凋亡,而且胞外高浓度 H^+ 可以改变蛋白水解酶的活性,增强细胞外基质的分解,进而影响了肿瘤细胞的侵袭、转移等生物学行为[8]。

本文研究结果显示,69.1% 结肠癌组织中 V-ATPase 显示高表达,而配对的正常组织中仅有 5.8% 的阳性表达率。不论是在 mRNA 水平还是在蛋白水平,V-ATPase 在结肠癌组织中表达均显著高于配对正常组织,说明 V-ATPase 过表达同时发生在转录和转录后水平。通过分析 V-ATPase 表达与结肠癌临床病理特征的关系,进一步揭示了 V-ATPase 与结肠癌临床分期、局部淋巴结转移、远处脏器转移、脉管浸润及肿瘤组织的分化程度显著相关,而与患者年龄、性别和肿瘤发生部位则无明显相关性。从而提示结肠癌中 V-ATPase 过表达很有可能参与了肿瘤浸润转移。另外,我们还发现随着肿瘤分期的提高,结肠癌中 V-ATPase 的阳性表达率也也明显升高(Ⅰ~Ⅱ期为 50%;Ⅲ~Ⅳ期为 79.5%),这表明结肠癌分期越晚,V-ATPase 的阳性表达率越高,也说明 V-ATPase 的过表达与结肠癌的发展呈正相关。有文献报道,V-ATPase 的过表达后能促进 MMP(matrix metalloproteinases)分泌,增强肿瘤细胞的侵袭能力,而抑制 V-ATPase 后,肿瘤细胞的侵袭力大大减弱[8-9]。近来,也有许多研究表明,V-ATPase 参与了黑色素瘤、乳腺癌和肝癌的侵袭生长和转移[9-12],并且与非小细胞肺癌和食管鳞癌的浸润以及化疗耐药有关[5-6]。从而提示 V-ATPase 在结肠癌的发生发展中也有重要作用,可能成为结肠癌术后预后判断的重要分子标记物和化疗预测的灵敏指标。

V-ATPase 过表达与肿瘤的发生发展和化疗耐药关系密切,我们也发现 V-ATPase 过表达对结肠癌生物学行为有显著影响,但目前 V-ATPase 对结肠癌发生发展及结肠癌化疗耐药影响的具体机制仍不明确。因此,我们需要进一步探讨 V-ATPase 对结肠癌发生发展生物学的作用,寻找新的结肠癌诊疗靶点,全面提高结肠癌患者的诊治效果。

[参考文献]

[1] 赵森林,孟 镔,严东旺,等. Bmi-1 基因与大肠癌术后相关性研究进展[J]. 局解手术学杂志,2013,22(13):306-308.

[2] Graham JS, Cassidy J. Adjuvant therapy in colon cancer[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2012, 12(1): 99-109.

[3] Zhang JX, Song W, Chen ZH, et al. Prognostic and predictive value of a microRNA signature in stage II colon cancer: a microRNA expression analysis[J]. Lancet Oncol, 2013, 14(13): 1295-1306.

[4] Nishi T, Forgac M. The vacuolar (H^+)-ATPases--nature's most versatile proton pumps[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(2): 94-103.

[5] Lu Q, Lu S, Huang L, et al. The expression of V-ATPase is associated with drug resistance and pathology of non-small-cell lung cancer[J]. Diagn Pathol, 2013, 8(1): 145-152.

[6] Huang L, Lu Q, Han Y, et al. ABCG2/V-ATPase was associated with the drug resistance and tumor metastasis of esophageal squamous cancer cells[J]. Diagn Pathol, 2012, 17(7): 180-187.

[7] Yan DW, Li DW, Yang YX, et al. Ubiquitin D is correlated with colon cancer progression and predicts recurrence for stage II-III disease after curative surgery[J]. Br J Cancer, 2010, 103(7): 961-969.

[8] Kubota S, Seyama Y. Overexpression of vacuolar ATPase 16-kD subunit in 10T1/2 fibroblasts enhances invasion with concomitant induction of matrix metalloproteinase-2[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 278(2): 390-394.

[9] Creemers LB, Jansen ID, Hoeben KA, et al. Involvement of V-ATPases in the digestion of soft connective tissue collagen[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 251(2): 429-436.

[10] Nishisho T, Hata K, Nakanishi M, et al. The a3 isoform vacuolar type H($^+$)-ATPase promotes distant metastasis in the mouse B16 melanoma cells[J]. Mol Cancer Res, 2011, 9(7): 845-855.

[11] Hendrix A, Sormunen R, Westbroek W, et al. V-ATPase expression and activity is required for Rab27B-dependent invasive growth and metastasis of breast cancer[J]. Int J Cancer, 2013, 133(4): 843-845.

[12] Straud S, Zubovych I, De Brabander JK, et al. Inhibition of iron uptake is responsible for differential sensitivity to V-ATPase inhibitors in several cancer cell lines [J]. PLoS One, 2010, 5(7): e11629.

(编辑:左艳芳)