

[文章编号] 1007-385X(2007)01-0190-04

· 综述 ·

碳酸酐酶 9 及其在肾细胞癌防治中作用的研究进展

Carbonic anhydrase IX and renal cell carcinoma: An update

李 贞 综述; 姜玉华 审阅(山东大学齐鲁医院放疗科, 山东 济南 250012)

[摘要] 碳酸酐酶 9(carbonic anhydrase IX, CA IX)是新发现的碳酸酐酶家族异构体之一,是由酸性氨基酸组成的跨膜糖蛋白,在调控细胞增殖、转化方面有重要作用。它能催化 CO_2 水解为碳酸和水,参与机体的酸碱平衡,调节细胞内外 pH 值,有利于肿瘤的生长和转移。CA IX 位于 VHL 肿瘤抑制基因的下流,由 HIF-1 途径激活,在正常组织中表达极低,在肾细胞癌中高度表达,是其特异性抗原。CA IX 的表达水平可预测肾癌患者对白介素-2 治疗的反应和生存期,CA IX 低表达是不良预后因素。近年来对 CA IX 相应抗体的研究取得了很大进展, ^{131}I 标记的 MAbG250 在肾癌组织中具有高摄取率和高蓄积率,可对肾癌进行放射性核素显像,用来诊断肾癌; ^{131}I 标记的 cG250MAb 用于治疗晚期肾癌,已显示其安全性和有效性。肾细胞癌 CA IX 的高度特异性表达使其成为肿瘤疫苗潜在的靶抗原和肾癌治疗的重要靶位,在肾癌靶向治疗方面的应用前景广阔。

[关键词] 碳酸酐酶 9; 肾细胞癌

[中图分类号] R737.11

[文献标志码] A

肾细胞癌是高度侵袭性的肿瘤,1/3 的患者在确诊时已经转移,超过 40% 的患者最终将死于该病。肾癌对放疗均不敏感,主要依靠手术治疗。对转移的晚期肾癌或不适宜于手术者,可采用生物治疗和化疗,但总缓解率仅为 15%~20%。近年来,肾肿瘤分子生物学研究进展迅速,为肾癌的诊断和治疗提供了更好的方法。碳酸酐酶 9(carbonic anhydrase IX, CA IX)是新发现的碳酸酐酶家族(CAs)的异构体之一,在肾细胞癌中高度表达,是目前肾细胞癌最重要的分子标记物。CA IX 位于 VHL(von hippel-lindau)肿瘤抑制基因下游,由乏氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)途径激活。CA IX 表达的高度特异性对肾细胞癌的诊断、分期和治疗的选择具有重要意义。

1 CA IX 的分子生物学特点

1.1 CA IX 的结构

1986 年 Oosterwijk^[1]最早通过杂交瘤技术筛选出一种鼠源性 G250 单克隆抗体,用该抗体进行免疫组织化学研究发现 98% 的肾细胞癌原发灶有 G250 抗原表达,尤其是透明细胞癌全部表达,88% 的转移灶有该抗原表达。1992 年 Pastorekova^[2]在与人类乳腺癌细胞联合培养的人宫颈癌 HeLa 细胞系中发现 MN 蛋白,并认为具有肿瘤相关基因产物的特点,命名为 MN。1994 年, Pastorek^[3]研究小组首次克隆了 MN 蛋白的 cDNA,发现 MN 的结构与碳酸酐酶 α -CA 的结构有高度同源性,由此认为其是 CA 的异构酶,命名为 CA IX。近年来研究^[4]发现, G250 与 MN/CA IX 的基因结构是相同的。

CA IX 是由酸性氨基酸组成的跨膜糖蛋白,分布于细胞膜和细胞核,相对分子质量分别为 58 000 和

54 000。CA IX 蛋白由 459 个氨基酸组成,cDNA 及基因组序列分析表明,CA IX 蛋白由 4 个区组成:37 个氨基酸构成的 N-末端信号肽(SP),377 个氨基酸构成的细胞外区,20 个氨基酸构成的跨膜区和 25 个氨基酸构成的细胞内 C-末端(IC)。细胞外区又分为两个部分:蛋白多糖区(PA)和碳酸酐酶区(CA),其中 CA 区位于细胞膜。

将 CA IX 的 cDNA 转染小鼠 NIH3T3 成纤维细胞,可促进细胞增殖,细胞间接触抑制消失,细胞周期缩短,DNA 合成增多;CA IX 基因的表达还可以促进上皮细胞的增殖。由此可见,CA IX 基因在调控细胞增殖、转化方面有重要作用,有诱导恶性表型的潜力^[3]。

Zavada 等^[5]认为 CA IX 是一种细胞黏附分子,它有利于促进细胞之间信息的传递。随后, Saarnio 等^[6]应用免疫组化技术,发现 CA IX 的表达与细胞增生有关。研究表明只有完整的 CA IX 蛋白才具有细胞黏附活性,截断跨膜区和细胞内尾段, MN/CA IX 的黏附作用减弱或者消失,甚至可引起细胞之间排斥作用。

1.2 CA IX 的功能

CA IX 催化 CO_2 水化可逆性反应 $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$, HCO_3^- 与细胞内 Cl^- 交换,维持细胞内碱性环境,有利于细胞的生长;细胞内 H^+ 则通过离子泵、 $\text{H}^+ - \text{Na}^+$ 交换等方式运输到细胞外,使细胞外为酸性微环境。在肾癌细胞系 VHL 对 CA IX 的调节可影响 H_2CO_3 的转运。细胞外酸性环境可以激活细胞表面蛋白酶如 cathepsin B 和 MMP-9,释放生长因子,抑制效应

[作者简介] 李贞(1970-),女,山东招远人,博士生,主要从事肿瘤放疗增敏方面的研究

[通讯作者] 姜玉华, E-mail: jiangyuhua66666@sina.com

T-细胞的免疫功能,使细胞外基质瓦解,有利于肿瘤生长和转移^[7]。因此 CA IX 被视为细胞特异的肿瘤相关蛋白,还可作为靶向治疗的靶标^[8]。

Bartosova 等^[9]的研究发现,CA IX 通过与 β -catenin 相互作用降低 ECD(E-cadherin)-介导的细胞黏附作用。ECD 是重要的黏附分子,其功能丧失或不稳定与肿瘤侵袭性有关。与细胞黏附分子共同表达,并干扰其功能,可能是表达 CA IX 的肿瘤更易发生转移的原因。

2 CA IX 的调节及表达

2.1 CA IX 的调节

对宫颈癌细胞系 C33A 和 SiHa,CA IX 启动子的活性和表达是通过细胞密度增加而上调的。在体外培养的膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌和肺癌细胞通过缺氧诱导 CA IX 表达^[10]。近年来研究发现 CA IX 是 HIF-1 的一个新的靶基因。对 CA IX 基因启动子的分析发现在 CA IX 5'侧链上有一个缺氧反应元件(hypoxia-responsive element, HRE),从 5'端的 3 bp 到转录起始位点,读作 5'-TACGTGCA-3'。已经证实缺少 HIF 途径的细胞系无缺氧诱导,但可被人的 HIF-1 α 重新转染。HRE 核心内的突变也可使缺氧反应消失,证实了 HIF 诱导途径的重要作用^[10]。CA IX 启动子结构比较特殊,其帽端本身不含 TATA 盒,也无起始因子序列。

其他因素在上调 CA IX 的表达中也起重要作用,p53 突变可调节 CA IX 表达,CA IX 启动子低甲基化也可上调 CA IX 表达,另外 CA IX 启动子含 AP1 和 SP 转录因子的结合位点,与转录因子的结合也可上调 CA IX 表达^[11-12]。VHL 肿瘤抑制基因在该过程中起重要作用,Ivanov 等^[13]最早发现在肾癌细胞中由突变的 VHL 基因调节 CA IX 表达。Wycoff 等^[10]则发现将野生型的 VHL 基因重新引入相同的细胞系导致 CA IX 在常氧下下调,在缺氧时重新恢复。常氧下通过 RPA 检测 CA IX mRNA 水平极低,而缺氧诱导时表达很高。

2.2 CA IX 的表达

在正常组织中,CA IX 表达极低,仅在胃、胆管、胰腺、小肠、输精管上皮中散在发现。Northern blotting 分析发现,心脏、肝脏、毛囊、关节腔、胎盘、脉络膜血管丛和腮腺也表达 CA IX。胎儿的肺和肌肉组织相对表达较高,而成人的肺和肌肉不表达 CA IX^[14]。

CA IX 在宫颈癌、乳腺癌、肺癌、食管癌、胃癌、胆管癌、结肠癌、和膀胱癌、皮肤癌中过表达,在肾细胞癌中也过表达。CA IX 在正常胎儿和成人的肾标本中不表达,提示其在器官形成时不起作用,而是肿瘤组织的产物。CA IX 在不同肾肿瘤中的表达不同,在透明细胞癌、颗粒细胞癌和乳头状癌中免疫组化染色阳性,但

在嫌色细胞肾癌和大噬酸性细胞肾癌中不表达。在肾透明细胞癌中,VHL 基因突变(50%~60%)及杂合子缺失(97%)率很高。VHL 蛋白通过降解 HIF 蛋白体达到控制 CA IX 的表达,肾透明细胞癌由于 VHL 肿瘤抑制基因的功能丧失,导致 HIF-1 α 浓聚,从而上调 CA IX 的表达。因此 CA IX 是肾癌的重要标记物,对透明细胞癌尤为重要,可作为肾癌的特异性肿瘤标记物。

Oosterwijk 等^[1]首次报道肾细胞癌 CA IX 免疫组化染色 46/47 原发病灶阳性,7/8 转移灶阳性。Bui 等^[15]报道 94% 的肾透明细胞癌标本为 CA IX 染色阳性。以 CA IX 染色率 85% 为界限,可以预测患者不同的生存情况:低 CA IX 染色率是提示不良预后的独立预后因素。Liu X 等^[16]报道将 CA IX 表达 85% 作为判定无病生存的最佳阈值,转移的肾细胞癌患者和 CA9 表达 <85% 的患者在肿瘤 T 分期、Fuhrman 分级、淋巴结侵犯和身体状态的多因素分析中其无病生存率明显要低,临床局部高风险的肿瘤 CA IX 低表达也是预后差的标志。

3 CA IX 与肾细胞癌的分期和预后

肾细胞癌分期的发展与对肾肿瘤生物学的快速发展相平行,经历了从宏观到微观再到分子水平的过程。第 1 个正式的分期系统由 Flocks 等^[17]提出,后来 Robson^[18]对其进行了修改,应用的是当时临床上的解剖信息。现今的 TNM 分期由 UICC(Union Internationale Contre le Cancer)提出。整合的分期系统已包括了许多与预后有关的非解剖信息。

加利福尼亚大学(University of California, Los Angeles, UCLA)的科研人员开发了肾癌风险分级系统,即 UISS(University of California, Los Angeles Integrated Staging System)^[19]。依据肾癌 TNM 分期(1997)、肿瘤病理分级(Fuhrman Grade)和 ECOG 生活质量评分,UISS 将肾癌分成 5 组,这 5 组患者的预后具有显著性差异。而后改良的 UISS 将肾癌术后患者根据 CA IX 的表达与代表细胞增殖的标记物 Ki67 结合,将患者分成:低风险组、中度风险组和高风险组^[20]。UCLA 致力于将肿瘤组织基因芯片分析信息整合到 UISS 中,并建立分子水平的预后分期系统。使用 318 例肾透明细胞癌肿瘤组织基因芯片对 Ki67、p53、gelsolin、CA IX、CA XII、PTEN、EpCAM、vimentin 等分子进行免疫组化分析,发现 Ki67、p53、vimentin 和 gelsolin 的高表达提示不良预后,而高表达的 CA IX、PTEN、CA XII 和 EpCAM 则同良好预后相关。联合临床信息和分子标志物的预后模型也已开发。通过多变量分析,证实了 CA IX、vimentin 和 p53 是独立于 TNM 分期、分级和 ECOG 评分等临床信息之外的重要预后因素^[21]。这个整合的分

子模型比标准的临床预后因素如 TNM 分期,病理分级和 ECOG 身体状态提供了更准确的预后信息^[22]。

根据蛋白表达水平预测生存期,用蛋白表达信息改变传统的分期系统,使肾癌预后分析效率和准确性大大提高。肾癌预后分析系统则具有良好的操作性,可以将风险分级并预测生存率,也能够帮助临床试验设计和制定随访策略。开发使用分子标志物的预后分析系统是肾癌预后分析的发展趋势。

4 CA IX 预测白介素-2 治疗反应的临床意义

肾细胞癌 CA IX 的表达可预测对白介素-2 免疫治疗的反应。来自 UCLA 的一组患者,以白介素-2 为基础的治疗方案的研究发现,完全反应的患者其 CA IX 均高表达($>85\%$)^[11]。用同一阈值,Atkins 等^[23]发现 CA IX 高表达的肿瘤患者对大剂量白介素-2 治疗的 CR、PR 更高(机会概率 3.3),高反应率与生存期相关,生存期超过 5 年的患者仅限于 CA IX 高表达的肿瘤。更有意义的是 CA IX 的表达与白介素-2 治疗反应相关性在不同的病理亚型中都存在,乳头状癌、大嗜酸性细胞癌 CA IX 表达极弱或不表达,对白介素-2 治疗不敏感。对以白介素-2 为基础的生物治疗常伴有发热、寒颤、乏力、恶心、呕吐、腹泻等不良反应,选择对白介素-2 治疗敏感性高的患者将减少患者不必要的治疗毒性。

5 CA IX 靶向显像和放射免疫治疗

5.1 放射性核素显像

Oosterwijk 等^[1]首先筛选出一种鼠源性肾癌 MAbG250,但其鼠源性使其重复应用受到限制。随着基因工程技术和抗体工程的发展和运用,已开发出众多新型抗体。WX-G250(cG250)是经过改造的嵌合 G250MAb,既保留了原有抗体的特异性,又大大降低了其鼠的抗性,在免疫原性、穿透性以及对各种水解酶的抵抗力等方面又优于常规的 MAb,能更有效地透入肿瘤。

MAbG250 能与所有的肾透明细胞癌及大多数的非透明细胞癌结合,但与正常肾细胞则不发生反应。应用放射性核素标记 MAb,将其与放射性核素耦联,灌注人荷瘤肾,使放射性核素靶向并浓集于肿瘤组织,可筛选作为活体内诊断药物的肾癌相关抗体并使肾癌成像。

¹³¹I 标记的 MAbG250 在肾癌组织中具有高摄取率和高蓄积率,比传统成像技术更敏感,在动物试验和活体外灌注试验中都被证实,因而可用作诊断肾癌的有效工具。I/II 期临床试验证实肾占位病变直径 >2 cm,可精确显像。¹³¹I-标记的 cG250 具有很好的显像特

征,而无宿主反应。Steffens 等^[24]利用 cG250 进行影像学研究发现所有抗原阳性的肿瘤灶均显影。¹³¹I 标记的 cG250 在肿瘤区域的聚集浓度是所有已试验过的实体瘤单抗中最高的,每克组织达到注射剂量的 0.1% 以上,明显高于 0.001% ~ 0.01% 的一般水平,并可在 90% 的肾癌细胞表面发现有 cG250 结合。

5.2 放射免疫治疗

Steffens 等^[25]首先进行了 ¹³¹I 标记的 cG250MAb 的 I 期临床研究,确定了安全的最大给药剂量。试验从静脉输注诊断性的 ¹³¹I 标记的 cG250 MAb 5 mg 开始,有效者逐步加大剂量,增至 2 220 MBq/m² 为止,大多数患者只有轻度的恶心而没有出现呕吐。Bleumer 等^[26]报道了多中心 II 期临床研究结果,评价了 WX-G250 在晚期肾癌患者中应用的安全性和有效性,共有 36 例晚期肾癌患者参与实验。每周通过静脉输注 WX-G250 1 次,共持续 12 周,病情稳定或发生应答适宜者再接受 8 周的治疗。全部 36 例患者耐受性良好,10 例病情稳定者接受了延续治疗;治疗随访中观察到 1 例完全缓解,1 例明显消退,5 例处于进展期患者病情稳定了 6 个月;平均存活期 15 个月,WX-G250 的每周给药量可以耐受。结果提示,WX-G250 对肾癌有治疗作用。现正在开展 WX-G250 III 期临床试验。

6 肾癌疫苗治疗

肿瘤疫苗主要是通过激活抗肿瘤抗原的免疫反应来达到治疗目的。肾细胞癌 CA IX 的高度特异性表达使其成为肿瘤疫苗潜在的靶抗原和肾癌治疗的重要靶位。Vissers 等^[27]报道多肽 G250 与以前证实的能被细胞毒性 T 淋巴细胞识别的限制性抗原表位 HLA-A2.1 重叠,具有免疫源性,并可在体外诱导 CA IX-特异性 T 细胞。CA IX 转导外周血单核细胞,已产生了可溶解表达 CA IX 的肿瘤细胞的细胞毒性 T 淋巴细胞。为增加其免疫性,生成了 GM-CSF-CA IX 融合分子^[28]。双传递措施通过抗原-递呈细胞为肿瘤相关性抗原(tumor-associated antigen, TAA)提供了免疫调节剂,可用质粒和腺病毒载体传递 GM-CSF-CA IX 分子。

总之,肾癌 CA IX 的现有研究成果已展示了其充满希望的前景,随着分子生物学研究技术的不断完善,将从根本上阐明肾癌预后的分子生物学基础,为肾癌患者的合理个体化治疗奠定理论基础,提供更多的靶向治疗。

[参考文献]

- [1] Oosterwijk E, Ruiter DJ, Hoedemaker PJ, et al. Monoclonal antibody G250 recognizes a determinant present in renal cell carcinoma and absent from normal kidney [J]. Int J Cancer, 1986, 38 (4): 489-494.

- [2] Pastorekova S, Zaavadova Z, Kostal M, *et al.* A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system[J]. *Virology*, 1992, 187(2): 620-626.
- [3] Pastorek J, Pastorekova S, Callebaut I, *et al.* Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment[J]. *Oncogene*, 1994, 9(10): 2877-2888.
- [4] Opavsky R, Pastorekova S, Zeinik 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.
- [5] Zavada J, Zavadova Z, Pastorek J, *et al.* Human tumor-associated cell adhesion protein MN/CAIX: Identification of M75 epitope and of the region mediating cell adhesion[J]. *Br J Cancer*, 2000, 82(11): 1808-1813.
- [6] Saarnio J, Parkkila S, Parkkila AK, *et al.* Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation[J]. *Am J Pathol*, 153(1): 279-285.
- [7] Potter C, Harris AL. Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumour hypoxia, survival pathway and therapy target [J]. *Cell Cycle*, 2004, 3(2): 164-167.
- [8] 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.
- [9] Bartosova 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 cerbB2[J]. *J Pathol*, 2002, 197(3): 314-321.
- [10] Wykoff CC, Beasley NJ, Waston PH, *et al.* Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(24): 7075-7083.
- [11] Cho M, Uemura H, Kim SC, *et al.* Hypomethylation of the MN/CA 9 promoter and upregulated MN/CA9 expression in human renal cell carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2001, 85(4): 563-567.
- [12] Ashida S, Nishimori I, Tamimura M, *et al.* Effects of von Hippel-Lindau gene renal cancer carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2002, 128(10): 561-568.
- [13] Ivanov SV, Kuzmin I, Wei MH, *et al.* Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(21): 12596-12601.
- [14] Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, *et al.* Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrase in human cancer[J]. *Am J Pathol*, 2001, 158(3): 905-919.
- [15] Bui MH, Seligson D, Han KR, *et al.* Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: Implications for prognosis and therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(2): 802-811.
- [16] Liu X, Minin V, Huang Y, *et al.* Statistical methods for analyzing tissue microarray data[J]. *J Biopharm Stat*, 2004, 14(3): 671-685.
- [17] Flocks RH, Kadesky MC. Malignant neoplasms of the kidney; an analysis of 353 patients followed five years or more[J]. *J Urol*, 1958, 79(2): 196-201.
- [18] Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma[J]. *J Urol*, 1969, 101(3): 297-301.
- [19] Patard JJ, Kim HL, Lam JS, *et al.* Use of the University of California Los Angeles integrated staging system to predict survival in renal cell carcinoma: an international multicenter study[J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(16): 3316-3322.
- [20] Bui MH, Visapaa H, Seligson D, *et al.* Prognostic value of carbonic anhydrase IX and Ki67 as predictors of survival for renal clear cell carcinoma[J]. *J Urol*, 2004, 171(6 Pt 1): 2461-2466.
- [21] Kim HL, Seligson D, Liu X, *et al.* Using protein expressions to predict survival in clear cell renal carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(16): 5464-5471.
- [22] Kim HL, Seligson D, Liu X, *et al.* Using tumor markers to predict the survival of patients with metastatic renal cell carcinoma[J]. *J Urol*, 2005, 173(5): 1496-1501.
- [23] Atkins M, McDermott D, Mier J, *et al.* Carbonic anhydrase IX expression predicts outcome of interleukin 2 therapy for renal cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(10): 3714-3721.
- [24] Steffens MG, Boerman OC, Oosterwijk- Wakka JC, *et al.* Targeting of renal cell carcinoma with iodine-131-labeled chimeric monoclonal antibody G250 [J]. *J Clin Oncol*, 1997, 15(4): 1529-1537.
- [25] Steffens MG, Boerman OC, de Mulder PH, *et al.* Phase I radioimmunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with ¹³¹I -labeled chimeric monoclonal antibody G250[J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(10 suppl): 3268s-3274s.
- [26] Bleumer I, Knuth A, Oosterwijk E, *et al.* A phase II trial of chimeric monoclonal antibody G250 for advanced renal cell carcinoma patients[J]. *Br J Cancer*, 2004, 90(5): 985-990.
- [27] Vissers JL, De Vries IJ, Schreurs MW, *et al.* The renal cell carcinoma-associated antigen G250 encodes a human leukocyte antigen (HLA)-A2.1-restricted epitope recognized by cytotoxic T lymphocytes[J]. *Cancer Res* 1999, 59(21): 5554-5559.
- [28] Mukoyama H, Janzen NK, Hernandez JM, *et al.* Generation of kidney cancerspecific antitumor immune responses using peripheral blood monocytes transduced with a recombinant adenovirus encoding carbonic anhydrase 9[J]. *Clin Cancer Res* 2004, 10(4): 1421-1429.

[收稿日期] 2006 - 10 - 25

[修回日期] 2007 - 02 - 20

[本文编辑] 王 莹