

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.02.016

· 临床研究 ·

ATPase F1 α 在人结直肠癌组织和细胞株中的表达及其意义

李敏玉, 朱海沫, 周俊平, 楼国良* (第二军医大学附属长海医院特需诊疗科, 上海 200433)

[摘要] 目的: 观察人结直肠癌组织和细胞株中 ATPase F1 α 的表达, 并探讨其意义。方法: 应用免疫组化 EnVision 法测定收集自长海医院 2007 年 8 月至 12 月的 44 例结直肠癌组织及癌旁组织手术切除标本中 ATPase F1 α 的表达; 半定量 RT-PCR 方法检测 8 例结直肠癌及癌旁组织中 ATPase F1 α mRNA 的表达水平。采用免疫荧光法检测 ATPase F1 α 在人结肠癌 LoVo 细胞株胞膜的表达; 采用 CCK-8 活细胞计数法检测抗 ATPase F1 α 抗体对 LoVo 细胞增殖的抑制作用。结果: 44 例结直肠癌组织中 ATPase F1 α 的表达显著高于癌旁组织 ($P < 0.01$); 44 例结直肠癌组织中 ATPase F1 α 的中高度表达有 35 例 (79.5%), 癌旁配对组织的中高度表达为 15 例 (34.1%)。8 例结直肠癌组织中 ATPase F1 α mRNA 的表达明显高于癌旁组织 ($P < 0.01$)。ATPase F1 α 在结直肠癌组织中的阳性表达率高于患者术前血浆 CEA 阳性率 ($P < 0.01$), 而与患者年龄、性别、肿瘤的临床分期、淋巴结转移、远处转移、肿瘤的部位、分化程度等均无关 ($P > 0.05$)。结肠癌 LoVo 细胞株胞膜上可见颗粒状分布的 ATPase F1 α , ATPase F1 α 抗体对 LoVo 细胞的增殖活性有明显的抑制作用 ($P < 0.01$)。结论: 人结直肠癌组织和细胞株均高表达 ATPase F1 α , 其作为肿瘤抗原, 有可能成为结直肠癌靶向治疗的新靶点。

[关键词] ATP 合成酶; 结直肠肿瘤; 免疫组织化学; 免疫荧光化学; CCK-8

[中图分类号] R735.2; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)02-0181-06

Expression of ATPase F1 α in human colorectal cancer tissues and cell line and its clinical significance

LI Min-yu, ZHU Hai-mo, ZHOU Jun-ping, LOU Guo-liang* (Department of Special Clinic, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the expression of ATPase F1 α in colorectal cancer (CRC) tissues and in LoVo cells, and to discuss its clinical significance. **Methods:** Expression of ATPase F1 α protein in 44 CRC specimens and their adjacent normal tissues (August 2007 to December 2007, Changhai Hospital) and ATPase F1 α mRNA in 8 colorectal cancer tissues and their adjacent normal tissues were examined by immunohistochemistry EnVision assay and RT-PCR, respectively. Expression of ATPase F1 α on the cell surface of LoVo cells was observed by immunofluorescence. The inhibitory effect of anti-ATPase F1 α antibody on the proliferation of LoVo cells was evaluated by CCK-8 assay. **Results:** Expression of ATPase F1 α in the 44 CRCs were significantly higher than those in the adjacent normal tissues as detected by immunohistochemistry ($P < 0.01$). Thirty-five samples (79.5%) in 44 CRCs and 15 samples (34.1%) in their adjacent normal tissues showed moderate to high expression of ATPase F1 α . Expression of ATPase F1 α mRNA in 8 CRCs was significantly higher than those in their adjacent normal tissues ($P < 0.01$). Positive rate of ATPase F1 α mRNA in CRCs was significantly higher than that of CEA in the same patients before surgery ($P < 0.01$). There was no correlation of ATPase F1 α expression with the age, gender, tumor stage, lymphoid metastasis, remote metastasis, tumor location and tumor differentiation of colorectal cancer ($P > 0.05$). Expression of ATPase F1 α was observed on the cell surface of LoVo cells, and anti-ATPase F1 α antibody significantly inhibited the proliferation of LoVo cells ($P < 0.01$). **Conclusion:** ATPase F1 α is highly expressed in colorectal cancer tissues and cell line. As a tumor association antigen, ATPase F1 α may serve as a new target in colorectal cancer immunotherapy.

[Key words] ATPase F1 α ; colorectal neoplasms; immunohistochemistry; immunofluorescence; CCK-8

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(2): 181-186]

[基金项目] 全军医学科研“十一五计划”资助项目(No.01MA159)。Supported by the Medical Science Research the “11th Five-Year Plan” of PLA (No.01MA159)

[作者简介] 李敏玉(1977-), 江苏省无锡市人, 硕士, 医师, 主要从事恶性肿瘤免疫治疗方面的研究。E-mail: flybird-lmy@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). E-mail: lou115@sohu.com

肿瘤的生长需要依赖异常的血管新生,而肿瘤血管的生成受很多因素的调控,其中血管抑素(angiotatin)通过抑制内皮细胞的增殖分化达到抑制血管生成的作用^[1]。Moser等^[2]发现血管抑素作用于内皮细胞的受体就是内皮细胞表面的F1FO-ATP合成酶(F1FO-ATPase)的 α/β 亚基。以往观点认为F1FO-ATP合成酶在真核细胞仅存在于线粒体内膜,最近研究^[3-6]发现,不仅在血管内皮细胞,而且在多种肿瘤细胞的胞膜表达,提示这种异位表达的ATP合成酶也许能够成为新的肿瘤标志物和靶向治疗的新靶点。曾有研究表明,ATPase F1 α (ATP合成酶的 α 亚基)的胞膜表达与乳腺癌^[7]、非小细胞肺癌^[8-9]等有关,而尚少有对结直肠癌中ATPase F1 α 表达状况的研究。本实验应用免疫组化EnVision法和RT-PCR法分别对人结直肠癌组织及配对癌旁组织中ATPase F1 α 在蛋白及基因水平的表达进行检测,探讨其与临床病理特征的关系;同时对人肠癌LoVo细胞株进行免疫荧光染色,观察其ATPase F1 α 的表达;以CCK-8法检测ATPase F1 α 抗体对LoVo细胞的增殖抑制,期望能为结直肠癌的诊断、治疗及深入研究提供重要资料。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

收集第二军医大学附属长海医院2007年8-12月间手术切除的结直肠癌组织及癌旁(癌块切缘3cm外)配对组织标本44对。所有临床特征(包括性别、年龄、肿瘤部位、术前血浆CEA、CA199水平)均通过分析病历收集,病理特征(包括肿瘤Dukes分期、是否存在淋巴结转移、有无远处转移、肿瘤分化程度、组织学类型、P53表达阳性与否)则通过分析病理报告获得。另从44例结直肠癌组织中随机选取新鲜肠癌及癌旁正常组织8对标本取于手术即刻,保存于液氮罐中。鼠抗人ATPase F1 α 单克隆抗体、FITC标记的兔抗人ATPase F1 α 抗体、RPMI 1640培养液、标准胎牛血清均为美国Gibco公司产品。Trizol试剂盒购自英骏生物技术有限公司。引物由第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室设计,上海捷瑞生物有限公司合成。活细胞计数试剂盒CCK-8购自Sigma公司。人结肠癌LoVo细胞株由上海国际抗体组研究院晨健抗体有限公司传代保存,SP2/0细胞培养上清由晨健抗体有限公司制备、保存。

1.2 免疫组化法检测组织标本中ATPase F1 α 蛋白的表达

手术切除结直肠癌标本及时取材,常规切取癌

组织及癌旁组织,标本经40g/L中性甲醛溶液固定,梯度酒精脱水、石蜡包埋,常规切片后行免疫组化EnVision法染色。将石蜡切片脱蜡至水后,95℃水浴中抗原修复,加入1:1000稀释的ATPase F1 α 鼠抗人单克隆抗体。将已经确诊的乳腺癌阳性切片作为阳性对照,PBS代替一抗作阴性对照。由1位病理学者和1位肿瘤学者采用双盲法评定。用OlympusX71显微镜观察切片。每张切片取中央及外周4个高倍视野,每视野数200个细胞。判定方法:无着色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分;阳性染色细胞:<5%为0,5%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分。两者乘积为结果:0~1为阴性表达;2~6为中度表达;8~12为高度表达。

1.3 RT-PCR法检测组织标本中ATPase F1 α mRNA的表达

将随机选取的8对肠组织抽提RNA后进行RT-PCR。组织中总RNA的提取按Trizol试剂盒一步法进行,测 D_{260}/D_{280} 值,计算RNA浓度。每例取总RNA1 μ g,加入引物及逆转录酶MMLV,合成cDNA。PCR扩增ATPase F1 α ,同时扩增 β -actin作为内参照。94℃5min预变性后开始循环:94℃30s,60℃40s,72℃30s,共35个循环,最后于4℃延伸10min。引物序列:5'CGGTATAATCAACACTACGAGAG3'(正义),5'GGAACCAATTGGACCCTTTC3'(反义);扩增片段:668bp。引物扩增序列对应于ATPase F1 α II肽段。 β -actin内参照:5'TCTCCTTAATGTACGCACGA3'(正义),5'ACAATGAGCTGCGTGTGGCT3'(反义),扩增片段:368bp。扩增产物在1.5%琼脂糖凝胶上电泳分离,紫外透射反射仪下观察结果,并在紫外自动成像仪上照相。采用凝胶图像分析软件计算ATPase F1 α 与 β -actin条带的相对灰度值,结果以ATPase F1 α 与 β -actin的灰度之比值表示。

1.4 免疫荧光法检测ATPase F1 α 在LoVo细胞胞膜的表达

将人肠癌LoVo细胞的细胞悬液(含10%胎牛血清RPMI 1640培养液)以 5×10^4 个/孔加入12孔细胞培养板中,37℃培养24h。经多聚甲醛固定,羊血清封闭后,加1:100稀释的ATPase F1 α 鼠抗人单抗每片50 μ l孵育,将PBS代替一抗设置为阴性对照。然后以PBS反复冲洗,每孔加50 μ l荧光二抗(1:200稀释)。充分洗去多余抗体后,每孔加入50 μ l DAPI进行核染,室温干燥后显微镜下观察荧光拍照记录。

1.5 CCK-8 法检测 ATPase F1 α 单抗对 LoVo 细胞增殖的影响

将人肠癌 LoVo 细胞的细胞悬液(含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养液)以 1×10^4 个/孔种于 96 孔细胞培养板,37 °C 培养 24 h 后加入不同浓度的 ATPase F1 α 鼠抗人单抗,其浓度质量梯度分别调整为 2 000、1 000、500、250、125、62.5 ng/ml,每个质量浓度设 3 个复孔。另设空白对照组、溶剂对照组与抗体对照组,空白对照组为不加细胞只加 RPMI 1640 培养液,溶剂对照组为细胞孵育 24 h 后只加 RPMI 1640 培养液,抗体对照组为细胞孵育 24 h 后加入 SP2/0 细胞培养上清。最后比色时,空白对照用于调零。置于 37 °C,5% CO₂ 的培养箱内继续孵育培养 48 h。用 CCK-8 试剂检测细胞增殖活性,每孔加入 CCK-8 10 μ l,孵育 4 h 后,以空白对照孔调零,全自动酶标仪于 450 nm 处测定光密度值 D , 参比波长为 650 nm。抑制率(%) = $(1 - \text{实验组平均 } D \text{ 值} / \text{溶剂对照组平均 } D \text{ 值}) \times 100\%$ 。

1.6 统计学处理

用 SPSS11.1 统计软件包进行分析,免疫组化检测采用 χ^2 检验比较构成比,RT-PCR 检测 mRNA 及细胞增殖抑制实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 t 检验。

2 结果

2.1 人结直肠癌及癌旁组织中 ATPase F1 α 蛋白的表达

结直肠癌及癌旁组织的免疫组化染色结果见图 1。44 例肠癌组织的中高度表达共 35 例(79.5%) [其中高度表达 25 例(56.8%),中度表达 10 例(22.7%)],低度表达 9 例(20.5%);癌旁配对组织中高度表达 0 例,中度表达 15 例(34.1%),低度表达及阴性 29 例(65.9%)。因此结直肠癌组织中 ATPase F1 α 表达均值明显高于癌旁组织($P < 0.01$)。ATPase F1 α 在结直肠癌组织中的阳性表达率高于术前血浆 CEA 阳性检出率($P < 0.05$),而与患者年龄、性别、肿瘤的临床分期、淋巴结转移、远处转移、肿瘤的部位、分化程度、P53 表达等均无关($P > 0.05$,表 1)。

2.2 结直肠癌及癌旁组织中 ATPase F1 α mRNA 的表达

肿瘤和癌旁组织 RT-PCR 扩增产物电泳主要显示 2 个条带:368 bp 的 β -actin 条带和 668 bp 的 ATPase F1 α 条带(图 2),8 例结直肠癌组织中 ATPase F1 α mRNA 表达的灰度值为(0.59 \pm 0.19),癌旁配对组织中表达的灰度值为(0.28 \pm 0.12),两组

比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 结直肠癌 ATPase F1 α 蛋白表达与病理特征之间的关系
Tab.1 Expression of ATPase F1 α in colorectal cancer and its relationship with clinicopathologic parameters of colorectal cancer

Index	N	High expression of ATPase F1 α [n(%)]	P
Age			
≥ 60	19	10(52.6)	>0.05
< 60	25	15(60.0)	
Gender			
Male	25	17(68.0)	>0.05
Female	19	8(42.1)	
Location of tumor			
Colon	19	10(52.6)	>0.05
Rectum	25	15(60.0)	
Dukes classification			
A and B	23	13(56.5)	>0.05
C and D	21	12(57.1)	
Lymph node metastasis			
Present	20	11(55.0)	>0.05
Absent	24	14(58.3)	
Remote metastasis			
Present	5	2(40.0)	>0.05
Absent	39	23(59.0)	
Histological type			
Adenocarcinoma	35	22(62.9)	>0.05
Mucinous adenocarcinoma	9	3(33.3)	
Differentiation			
Well differentiated	39	23(58.9)	>0.05
Poorly differentiated	5	2(40)	
P53 expression			
+	21	11(52.4)	>0.05
-	23	14(60.9)	
CEA($\rho_B/\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$)			
> 10	10	5(50)	<0.05
≤ 10	34	20(58.8)	
CA199($\rho_B/\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$)			
> 37	8	5(62.5)	>0.05
≤ 37	36	20(55.6)	

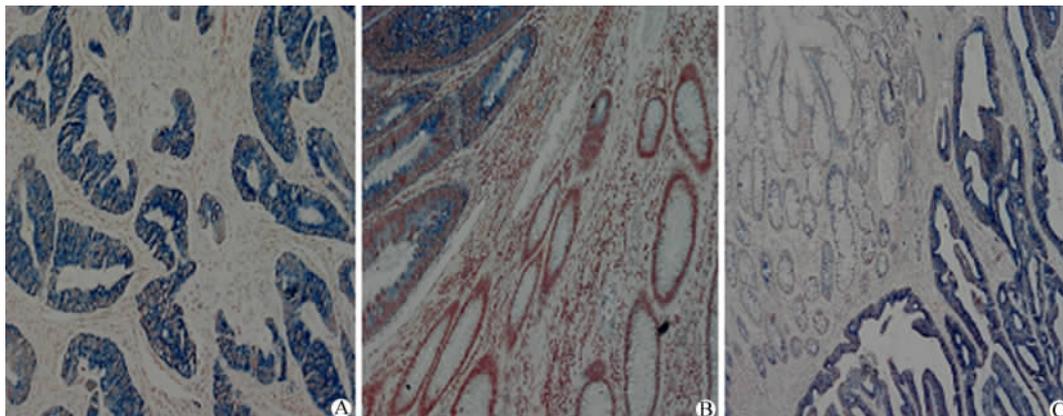


图 1 免疫组化检测人结直肠癌及癌旁组织中 ATPase F1 α 的表达($\times 200$)

Fig. 1 Expression of ATPase F1 α in colorectal cancer tissues and adjacent normal tissues detected by immunohistochemical staining ($\times 200$)

A:Rectum adenocarcinoma;B:Colon adenocarcinoma and adjacent normal tissues;C:Colon adenocarcinoma and adjacent normal tissues

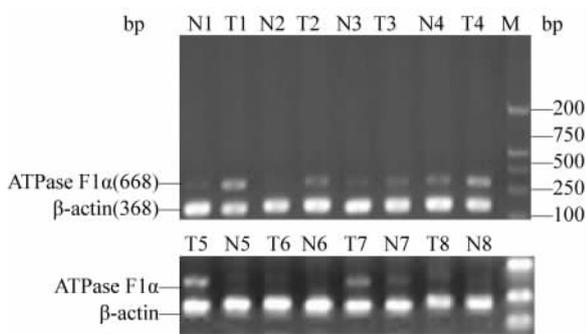


图 2 RT-PCR 检测结直肠癌组织及癌旁组织中 ATPase F1 α mRNA 的表达

Fig. 2 ATPase F1 α mRNA expression in colorectal cancer tissues and adjacent normal tissues detected by RT-PCR

T: Tumor; N: Normal; M: Marker

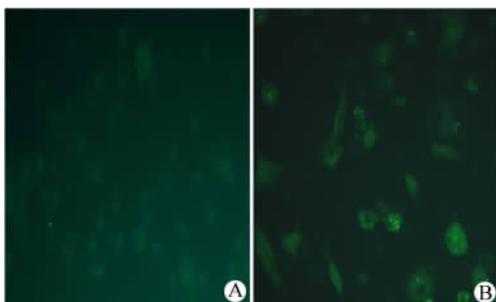


图 3 细胞免疫荧光染色法检测 ATPase F1 α 在 LoVo 细胞胞膜的表达($\times 200$)

Fig. 3 Expression of ATPase F1 α on the membrane of LoVo cells detected by immunofluorescence($\times 200$)

A: Control; B: ATPase F1 α

2.3 ATPase F1 α 在 LoVo 细胞胞膜的表达

免疫荧光实验结果如图 3 所示,抗体组与 PBS 阴性对照组不同,可清楚地观察到环绕细胞膜分布的颗粒状 ATPase F1 α 蛋白。

2.4 ATPase F1 α 单抗对 LoVo 细胞增殖的抑制作用

ATPase F1 α 鼠抗人单抗对 LoVo 细胞生长有增殖抑制作用,各质量浓度组与对照组相比较,均有显著性差异($P < 0.01$);质量浓度大于 62.5 ng/ml 时,ATPase F1 α 鼠抗人单抗各浓度组与同浓度 SP2/0 细胞培养上清组比较有显著性差异($P < 0.01$, 表 2)。随着 ATPase F1 α 抗体浓度升高,ATPase F1 α 抗体对 LoVo 细胞的增殖抑制率逐步增高。

3 讨论

结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一,全球范围内每年约 100 万人罹患,50 万人因之死亡。随着生活方式及饮食结构的改变,国内结直肠癌的发病率呈逐年上升趋势。目前晚期结直肠癌的治疗是以氟尿嘧啶为基础的化疗联合 Avastin 及西妥昔单抗等靶向药物为主的综合治疗。研究证明,在结直肠癌治疗中靶向药物发挥了出色的功效,但相对于肿瘤严重的危害性,其疗效仍是有限的。因此,开发新的抗肿瘤途径或药物仍是当务之急。

本课题研究的 F1F0-ATP 合成酶过去认为是严格表达在线粒体内,近来发现其组成部分也存在于细胞膜表面。1994 年 Das 等^[3]首次报道 ATP 合成酶的 F1 β 亚单位出现在某些肿瘤细胞膜表面,并与淋巴细胞介导的细胞毒性作用有关。随后,通过免

疫荧光技术等方法,ATP合成酶的F1部分多次在细胞膜被检测到^[10]。后来这种观察逐渐被扩展至成熟肝细胞、角化细胞、血管内皮细胞等,发现异位表达的F1F0-ATP合成酶同样通过调节ATP水平,可作为多种配体的受体参与各种过程,如调节脂质代谢^[11]、控制细胞增殖^[12]、内皮细胞分化和肿瘤的免疫识别^[13]等。更有意义的是ATP合成酶的F1 α 、F1 β 成分也在多种肿瘤细胞株中被发现,且部分是高表达的,如白血病细胞株(K562)^[3]、肺癌细胞株(A549、H1299)^[3,5]、肝癌细胞株(HepG2)^[6]及前列腺癌细胞株(PC-3、DU145、LNCaP)^[4]。

表2 CCK-8法检测ATPase F1 α 单抗
对LoVo细胞增殖的抑制作用

Tab. 2 Anti-ATPase F1 α antibody inhibited proliferation
of LoVo cells as detected by CCK-8

Group	Mass concentration ($\rho_B/\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$)	$D_{450}(\bar{x} \pm s)$
Control	0	0.782 \pm 0.010
Anti-F1 α antibody	62.5	0.602 \pm 0.035*
Anti-F1 α antibody	125	0.525 \pm 0.021**
Anti-F1 α antibody	250	0.243 \pm 0.012**
Anti-F1 α antibody	500	0.186 \pm 0.015**
Anti-F1 α antibody	1 000	0.126 \pm 0.006**
Anti-F1 α antibody	2 000	0.089 \pm 0.023**
SP2/0	62.5	0.618 \pm 0.016
SP2/0	125	0.601 \pm 0.024 Δ
SP2/0	250	0.582 \pm 0.019 $\Delta\Delta$
SP2/0	500	0.480 \pm 0.006 $\Delta\Delta$
SP2/0	1 000	0.390 \pm 0.004 $\Delta\Delta$
SP2/0	2 000	0.320 \pm 0.019 $\Delta\Delta$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; $\Delta P < 0.05$,

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs anti-F1 α antibody

血管抑素是人体内天然的血管生成抑制剂,它是多种蛋白水解酶水解纤溶酶原的产物,能特异结合血管内皮细胞,抑制血管生成。1999年Moser等^[1]研究发现内皮细胞表面的F1F0-ATP合成酶是血管抑素(angiotatin)作用于内皮细胞的受体,血管抑素是通过和内皮细胞表面的ATP合成酶的 α / β 亚基结合,抑制内皮细胞的增殖,从而发挥其抗肿瘤血管活性的。随后Pizzo等^[4]发现血管抑素及抗F1 α /

β -ATP合成酶抗体对胞膜表达ATP合成酶的肿瘤细胞有明显的抑制作用。Chi等^[14]制备的一株识别F1 β -ATP合成酶催化活性位点的单克隆抗体(mAb)3D5AB1,其内皮细胞血管分化抑制活性比血管抑素更强。

基于以上的实验基础,本课题选择人类结直肠癌的组织标本和结肠癌LoVo细胞株作为研究对象。首先,比较了44例结直肠癌肿瘤组织与癌旁组织中ATPase F1 α 蛋白的表达情况。实验发现ATPase F1 α 蛋白在结直肠癌中的中高度表达率显著高于癌旁组织;mRNA水平检测与免疫组化结果一致,其相对含量也明显高于癌旁组织。目前一般认为肿瘤细胞线粒体ATP合成酶功能低下,肝癌、肾癌、结肠癌、食管鳞癌包括乳腺癌、胃腺癌等线粒体上ATP合成酶的表达都是下调的^[15-17];即肠癌细胞线粒体上ATPase F1 α 蛋白的表达应该较对应正常肠上皮细胞上ATPase F1 α 蛋白的表达低下。但是本实验发现ATPase F1 α 在肠癌组织中的表达水平显著高于正常组织。由此推断,除了线粒体部位的表达,肠癌细胞必定在细胞外膜或其他细胞结构处高度表达了ATPase F1 α 。而且提示这种异位表达的ATPase F1 α 可能参与肠癌的发生、发展等有关过程。因而F1F0-ATP合成酶也许能作为肿瘤标志物来检测,对肿瘤的早期诊断和预后具有重大的意义。

本研究进一步采用LoVo细胞株展开研究,发现该细胞高表达ATPase F1 α mRNA。通过细胞荧光免疫组化,清楚地观察到了表达于LoVo细胞膜呈颗粒状环绕细胞膜分布的ATPase F1 α 。CCK-8实验显示,ATPase F1 α 单克隆抗体对LoVo细胞株有抑制生长的作用,呈剂量依赖效应。以上结果提示,异常定位于肠癌细胞膜表面的ATPase F1 α 亚基同内皮细胞表面的类似,可用作抑制细胞恶性增殖的靶点,进而为肠癌靶向治疗提供一条新的途径。

在对血管抑素的研究中,Pizzo团队^[4]发现在酸化环境下血管抑素对肿瘤细胞有直接毒性作用。在较低的胞外pH值(pH在6.5~6.7)情况下,肿瘤细胞表面的F1F0-ATP合成酶的活性更强,而血管抑素及抗F1 β -ATP合成酶的单克隆抗体对肿瘤细胞的抑制作用也更强。低pH环境被认为是肿瘤细胞所特有的,那么肿瘤细胞表面的F1F0-ATP合成酶可能就是通过将合成ATP和跨膜质子运动耦合起来来维持胞内pH值的稳态,而当细胞外环境处于酸性时,这种作用就更强了。在酸化环境下血管抑素及抗ATP合成酶抗体通过作用于肿瘤细胞表面的F1F0-ATP合成酶,抑制ATP的合成和分解,阻止

质子流的运动,使胞内 pH 值降低,从而使肿瘤细胞坏死,因而这种作用表现为直接的细胞毒性作用。已有研究表明胞内酸中毒与细胞死亡有关,目前已被认为是发展新的抗肿瘤药物的实验依据^[18-19]。

韩国研究者^[20]在比较结直肠癌肝转移灶组织与结直肠癌原发病灶中的 ATPase F1 α 表达水平时发现,肝转移组织中的水平明显升高,提示 ATPase F1 α 的高表达与结直肠癌肝转移可能有关。本实验中在分析 ATPase F1 α 的表达水平与结直肠癌的临床分期、淋巴结转移、远处转移、病理类型、分化程度的关系时未见明显差异,考虑样本量较小可能影响结果。综上,本研究确证人结直肠癌组织和细胞株高表达 ATPase F1 α ,而且异位表达于细胞膜上,ATPase F1 α 单抗可显著抑制人结肠癌细胞的增殖;ATPase F1 α 作为肿瘤抗原,很可能成为结直肠癌治疗的新靶点。

[参 考 文 献]

- [1] O' Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, *et al.* Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma [J]. *Cell*, 1994, 79(2): 315-328.
- [2] Moser TL, Stack MS, Asplin I, *et al.* Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(6): 2811-2816.
- [3] Das B, Mondragon MO, Sadeghian M, *et al.* A novel ligand in lymphocyte-mediated cytotoxicity: expression of the beta subunit of H⁺ transporting ATP synthase on the surface of tumor cell lines [J]. *J Exp Med*, 1994, 180(1): 273-281.
- [4] Chi SL, Pizzo SV. Angiostatin is directly cytotoxic to tumor cells at low extracellular pH: a mechanism dependent on cell surface-associated ATP synthase [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(2): 875-882.
- [5] Zhao Y, Zhang W, Kho Y, *et al.* Proteomic analysis of integral plasma membrane proteins [J]. *Anal Chem*, 2004, 76(7): 1817-1823.
- [6] Bae TJ, Kim MS, Kim JW, *et al.* Lipid raft proteome reveals ATP synthase complex in the cell surface [J]. *Proteomics*, 2004, 4(11): 3536-3548.
- [7] 朱海沫,李敏玉,史平,等.人非小细胞肺癌 F1ATPase- α 的表达及临床意义[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28(11): 1219-1222.
- [8] 张霞,彭艳,俞丽丽,等. 抗人 F1-F0 ATP 合成酶 beta 亚基单抗的制备及其抗肿瘤活性研究[J]. 中国免疫学杂志, 2008, 24(11): 984-989.
- [9] 周俊平,楼国良,朱海沫,等. 抗 ATPase F1 α 抗体对人非小细胞肺癌血管内皮细胞的抑制作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2008, 15(3): 217-222.
- [10] Kim BW, Choo HJ, Lee JW, *et al.* Extracellular ATP is generated by ATP synthase complex in adipocyte lipid rafts [J]. *Exp Mol Med*, 2004, 36(5): 476-485.
- [11] Scotet E, Martinez LO, Grant E, *et al.* Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I [J]. *Immunity*, 2005, 22(1): 71-80.
- [12] Watabe M, Nakaki T. ATP depletion does not account for apoptosis induced by inhibition of mitochondrial electron transport chain in human dopaminergic cells [J]. *Neuropharmacology*, 2007, 52(2): 536-541.
- [13] Burwick NR, Wahl ML, Fang J, *et al.* An inhibitor of the F1 subunit of ATP synthase (IF1) modulates the activity of angiostatin on the endothelial cell surface [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(3): 1740-1745.
- [14] Chi SL, Wahl ML, Mowery YM, *et al.* Angiostatin-like activity of a monoclonal antibody to the catalytic subunit of F1F0 ATP synthase [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(10): 4716-4724.
- [15] Cuezva JM, Krajewska M, de Heredia ML, *et al.* The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(22): 6674-6681.
- [16] Isidoro A, Martínez M, Fernández PL, *et al.* Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer [J]. *Biochem J*, 2004, 378(Pt 1): 17-20.
- [17] Cuezva JM, Chen G, Alonso AM, *et al.* The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis [J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(7): 1157-1163.
- [18] Shrode LD, Tapper H, Grinstein S. Role of intracellular pH in proliferation, transformation, and apoptosis [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 1997, 29(4): 393-399.
- [19] Wong P, Kleemann HW, Tannock IF. Cytostatic potential of novel agents that inhibit the regulation of intracellular pH [J]. *Br J Cancer*, 2002, 87(2): 238-245.
- [20] Chang HJ, Lee MR, Hong SH, *et al.* Identification of mitochondrial FoF1-ATP synthase involved in liver metastasis of colorectal cancer [J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(8): 1184-1191.

[收稿日期] 2009-02-24

[修回日期] 2009-03-17

[本文编辑] 王莹

