

人非小细胞肺癌 F₁ATPase- α 的表达及临床意义

朱海沫,李敏玉,史平,周俊平,楼国良*

(第二军医大学属长海医院特需诊疗科,上海 200433)

[摘要] **目的:**研究人类非小细胞肺癌(NSCLC)组织中 ATP 合酶 F₁ATPase- α 的表达,并探讨其临床意义。**方法:**(1)以 EnVision 免疫组织化学方法检测 38 例 NSCLC 配对标本、7 例肺良性肿瘤与肺炎性病变标本的 F₁ATPase- α 表达情况。(2)应用 RT-PCR 方法检测 12 例 NSCLC 组织、癌旁肺组织中 F₁ATPase- α 的 mRNA 表达。(3)用免疫荧光法检测 F₁ATPase- α 在正常支气管上皮细胞与 A549 细胞胞膜中的表达。**结果:**(1) F₁ATPase- α 在肺癌组织呈中高度表达者 36 例(36/38),低度表达 2 例;癌旁正常配对组织呈中高度表达 11 例(11/38),低度表达 27 例;7 例肺良性病变组织全部低度表达。肺腺癌 F₁ATPase- α 的高表达显著高于肺鳞癌(11/16 vs 5/20, $P < 0.05$)。F₁ATPase- α 高表达率在肿瘤不同部位、分化程度、大小、淋巴结转移及临床分期之间差异无统计学意义。(2) 12 例肺癌组织中 F₁ATPase- α mRNA 相对表达量为 0.54 ± 0.19 ,显著高于配对的癌旁肺组织(0.31 ± 0.12 , $P < 0.01$)。(3) 肺癌 A549 细胞胞膜上有颗粒状分布的 F₁ATPase- α ,正常支气管上皮细胞未检测到。**结论:**(1)F₁ATPase- α 在 NSCLC 中有相对较高的表达水平。(2)F₁ATPase- α 表达于非小细胞肺癌 A549 细胞株的细胞膜上,提示有作为靶向药物治疗分子靶点的潜力。

[关键词] ATP 合成酶复合物;癌,非小细胞肺;免疫组织化学;免疫荧光化学

[中图分类号] R 734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)11-1219-04

Expression of F₁ATPase- α in non-small cell lung cancer and its clinical significance

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

[ABSTRACT] **Objective:** To study the expression of F₁ATPase- α in non-small cell lung cancer and its clinical significance. **Methods:** (1) The expression level of F₁ATPase- α was examined by immunohistochemical Envision method in 38 NSCLC samples and the adjacent normal tissues, 7 benign tumors and chronic pneumonia samples. (2) F₁ATPase- α mRNA expression were detected in 12 fresh samples of NSCLC and the adjacent normal tissues by RT-PCR. (3) The expression of F₁ATPase- α on the pericellular membrane of A549 cells was observed by immunofluorescence. **Results:** (1) Immunohistochemistry analysis showed median and higher expression of F₁ATPase- α in 36 of NSCLC specimens and 11 adjacent normal tissues; lower expression was detected in all the benign samples. The overexpression of F₁ATPase- α in lung adenocarcinoma tissues were significantly higher than that in the lung squamous cancer ($P < 0.05$). The expression of F₁ATPase- α in NSCLC was not associated with the histology type, location, differentiation degree, size, invasion and metastasis. (2) The relative level of ECTO-F₁ATPase- α was 0.31 ± 0.12 in the adjacent normal tissues and 0.54 ± 0.19 in NSCLC tissues ($P < 0.01$). (3) The conspicuous positive expression of F₁ATPase- α on the pericellular membrane of A549 cells was not observed on normal bronchial epithelial cells. **Conclusion:** (1) NSCLC has a higher expression of F₁ATPase- α and the expression is on the pericellular membrane of A549 cells, which may provide a new target for molecular therapy of NSCLC.

[KEY WORDS] ATP synthetase complexes; carcinoma, non-small-cell lung; immunohistochemistry; immunofluorescence

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(11):1219-1222]

肺癌是当前严重威胁人类健康与生命的恶性肿瘤。近年来在我国许多大城市,肺癌的发病率在恶性肿瘤中占据第一位,且 70%~80% 的肺癌患者在确诊时即为晚期。临床上肺癌常见的组织学类型为非小细胞肺癌(NSCLC),其 5 年存活率仅 10%~15%。近年来 NSCLC 的靶向治疗研究取得了很大进展^[1-2],其中寻找到肺癌细胞的某些分子靶点,尤其是膜表面的抗原性蛋白,可以为制备相应的靶向抗体药物提供方向。

ATP 合酶(F₁ATPase- α , F₁ATPase- β)与肿瘤细胞的关系已有不少报道^[3-5],过去认为 F₁ATPase- α 表达在胞内线粒体上,但新近研究表明 F₁ATPase- α 也是存在于细胞表面的受体蛋白^[4-5]。因此,本研究采用 EnVision 免疫组织化学法和 RT-PCR 检测 F₁ATPase- α 在 NSCLC 肺癌组织及肺良

[作者简介] 朱海沫,硕士,医师. E-mail: seafoam1979@163.com

* Corresponding author. E-mail: lou115@sohu.com

性病变组织中的表达情况,并用免疫荧光法检测 F₁ATPase- α 在这肺癌 A549 细胞株胞膜的表达情况,旨在为 NSCLC 的发病机制与靶向治疗研究提供一个新的线索。

1 材料和方法

1.1 标本采集 收集 2005 年 12 月至 2006 年 9 月间第二军医大学长海医院手术室切除的肺组织石蜡包埋标本,包括:(1)NSCLC 患者 38 例,收集肿瘤及癌旁组织配对标本。所有标本均经病理确诊。男 25 例,女 13 例,年龄 27~76 岁,中位年龄 64.8 岁。肺鳞癌 20 例,肺腺癌 16 例(包含细支气管肺泡细胞癌 2 例),腺鳞混合癌 2 例。高分化癌 10 例,中分化癌 19 例,低分化癌 9 例。按国际抗癌联盟标准分期:Ⅰ期 5 例,Ⅱ期 19 例,Ⅲ期 14 例。(2)对照组 7 例,包括肺脓肿 2 例,炎性假瘤 4 例,肺结核瘤 1 例;男性 4 例,女性 3 例。上述标本行免疫组化染色。另从 38 例 NSCLC 中随机选取新鲜肺癌及癌旁正常组织 12 对 RT-PCR 检测,标本均取于手术即刻,保存于-80℃冰箱保存备用。

1.2 细胞株 A549 肺癌细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所,正常支气管上皮细胞株购自美国 Sciencell 公司。

1.3 F₁ATPase- α 蛋白检测 采用免疫组织化学 EnVision 法。将石蜡包埋标本制成常规切片,脱蜡至水后,95℃水浴中抗原修复,加入 1:100 稀释的一抗。一抗 F₁ATPase- α 单克隆抗体由上海张江国际抗体研究院惠赠。将已经确诊的乳腺癌阳性切片作为阳性对照,PBS 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 显微镜系统观察切片。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,25%~50%为 2 分,50%~75%为 3 分,>75%为 4 分。两者乘积为结果:0~1(阴性表达);2~6(中度表达);8~12(高度表达)。

1.4 RT-PCR 检测 mRNA 水平 将选取的 12 对肺组织抽提 RNA 后进行 RT-PCR。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。引物序列:正向为 5'-GTC TTG ACC TTC TTT GCG GCT C-3',反向为 5'-GGA ACC AAT TGG ACC CTT TC-3',扩增片段 594 bp,引物扩增序列对应于 F₁ATPase- α V4 II 肽链段。另以 β -actin 作为内参照,正向为 5'-TCT

CCT TAA TGT CAC GCA CGA-3',反向为 5'-ACA ATG AGC TGC GTG TGG CT-3',扩增片段 368 bp。组织中总 RNA 的提取按 TRIzol 试剂盒(英骏生物技术有限公司)一步法进行,测 D₂₆₀/D₂₈₀ 值,计算 RNA 浓度。取 RNA 1 μ g,加入引物及逆转录酶 M-MLV 合成 cDNA 链。再将逆转录反应液 5 倍稀释后每管取 0.2 μ l 作为模板,总反应体系为 50 μ l,加入引物和 Taq 酶后用 PCR 仪扩增。循环步骤如下:94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,共 35 个循环;4℃ 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,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各条带光密度值,结果以目的基因与 β -actin 的灰度之比表示。

1.5 免疫荧光法检测 F₁ATPase- α 的胞膜表达 将含有 A549 肺癌细胞或正常支气管上皮细胞的细胞悬液以 5×10⁴/孔加入细胞培养板中,37℃ 培养 24 h。经多聚甲醛固定、羊血清封闭后,加 1:100 稀释的 F₁ATPase- α 单克隆抗体孵育。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。

1.6 统计学处理 用 SPSS 11.0 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 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,按配对 *t* 检验对数据进行分析。

2 结果

2.1 不同肺组织中 F₁ATPase- α 的表达 正常肺组织和 NSCLC 组织中 F₁ATPase- α 的免疫组化染色表现见图 1。38 例肺癌组织中 F₁ATPase- α 呈中高度表达者总计 36 例(94.7%),低度表达 2 例(5.3%);癌旁正常配对组织的中高度表达者总计 11 例(28.9%),低度表达 27 例(71.1%);7 例肺良性病变组织全部低度表达。NSCLC 肿瘤组织中 F₁ATPase- α 中高度表达阳性率高于癌旁配对组织和肺良性病变组织,差异均有统计学意义(均 *P*<0.01)。在肺癌肿瘤组织标本中,肺腺癌高度表达 11 例(11/16),中度表达 5 例(5/11);肺鳞癌高度表达 5 例(5/20),中度表达 13 例(13/20),低度表达 2 例(2/20);2 例腺鳞癌高度表达、中度表达各 1 例。肺腺癌的高表达率高于肺鳞癌,差异有统计学意义(*P*<0.05),提示肺癌组织 F₁ATPase- α 的表达水平与肿瘤组织类型有关。而肺癌不同部位(中央型、周围型)、分化程度(高、中、低分化)、大小(直径≤3 cm

或 >3 cm)、淋巴结转移(N₀、N₁₋₂)、临床分期(TNM I、II、III)之间, F₁ATPase- α 高表达率的差异均无

统计学意义(P>0.05, 表 1)。

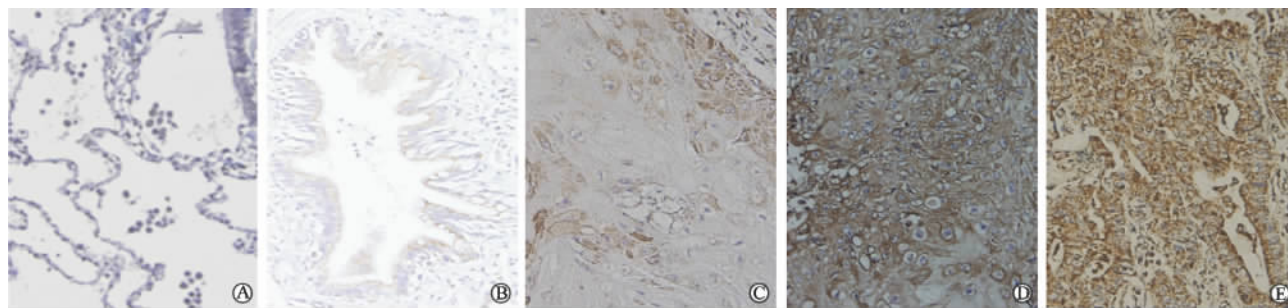


图 1 正常肺组织和 NSCLS 组织中 F₁ATPase- α 的表达

Fig 1 Expression of F₁ATPase- α in normal lung tissues and non-small cell lung cancer tissue (×400)

A: Negative control; B: Lower expression(normal tissues) ; C: Moderate expression(squamous cell carcinoma) ; D: Higher expression(squamous cell carcinoma) ; E: Higher expression(adenocarcinoma)

表 1 NSCLC 中主要临床病理参数与 F₁ATPase- α 表达的关系

Tab 1 Expression level of F₁ATPase- α in NSCLC and its relationship with clinical and pathological parameters

| Clinical index | NSCLC (N=38) | NSCLC with higher expression of F ₁ ATPase- α [n(%)] |
|------------------------|--------------|--|
| Tumor location | | |
| Central type | 25 | 11(44.0) |
| Peripheral type | 13 | 6(46.2) |
| Tumor size | | |
| ≤3 cm | 11 | 5(45.5) |
| >3 cm | 27 | 12(44.4) |
| Lymph node metastasis | | |
| N ₀ | 23 | 10(43.5) |
| N ₁₋₂ | 15 | 7(46.7) |
| Differentiation degree | | |
| High | 10 | 5(50.0) |
| Moderate | 19 | 8(42.1) |
| Low | 9 | 4(44.4) |
| TNM stage | | |
| Stage I | 5 | 2(40.0) |
| Stage II | 19 | 9(47.4) |
| Stage III | 14 | 6(42.9) |

2.2 肺癌及癌旁组织中 F₁ATPase- 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 594 bp 的 F₁ATPase- α 条带。F₁ATPase- α mRNA 在肺癌组织中表达的相对含量为 0.54±0.19, 在癌旁组织中表达的相对含量 0.31±0.12, 两组比较差异有统计学意义(P<0.01)。

2.3 F₁ATPase- α 在肺癌细胞胞膜的表达 通过免疫荧光染色, 观察到环绕 A549 细胞膜分布的颗粒

状 F₁ATPase- α (图 2B), 而正常支气管上皮细胞没有观察到 F₁ATPase- α 的表达(图 2A)。

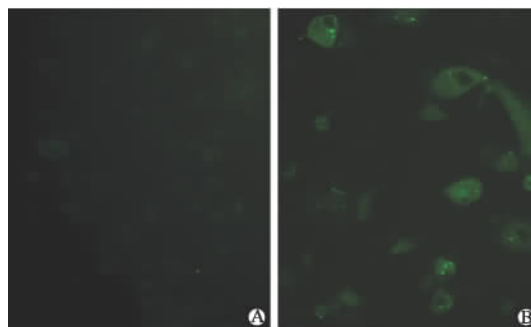


图 2 细胞免疫荧光染色显示 F₁ATPase- α 在胞膜的表达

Fig 2 Expression of F₁ATPase- α on pericellular membrane observed by immunofluorescence

A: Normal tracheal epithelium cell; B: A549 cells

3 讨论

近年 NSCLC 发病率呈明显增高趋向, 其长期存活率非常低。除了传统的放化疗及介入性治疗, 对 NSCLC 进行靶向治疗的研究取得了很大成果^[1-2]。靶向制剂主要针对肺癌细胞信号转导的 ras、蛋白激酶 C、凋亡蛋白、免疫逃避的细胞表面抗原等。其中表皮生长因子受体抑制剂 ZD1839 取得了令人瞩目的疗效。找到肺癌细胞的某些分子靶点, 特别是膜表面的抗原性蛋白, 就可以制备相应的靶向抗体药物。该靶点最好在 NSCLC 细胞有较高的表达, 而在正常组织无表达或低表达; 并且该靶点对于肺癌的恶性表型有重要的作用, 当它受到阻断干扰时, 肺癌的生长和扩散将被阻抑^[6]。

F_1F_0 ATPase 是一种合酶复合物,过去被认为是严格表达在线粒体内部,但近来认为, F_1F_0 ATPase的构成部分也存在于细胞膜表面,它们可以作为多种配体的受体参与各种过程,如:脂代谢调节^[7]、细胞增殖控制、细胞凋亡^[8]、内皮细胞分化以及肿瘤的免疫识别等^[4]。该复合物第1个区域是 F_0 区域。这个 F_0 区域是一个旋转发动机,它能够使 c_{10-14} 环旋转。 F_1F_0 ATPase的第2个区域 F_1 是起催化作用的,它由 α, β 二聚物合成的一种三聚物组成。这两个区域分别被中心和外周的杆状单位所连接^[9]。中心的杆状单位由 γ, δ, ϵ 亚单元构成, δ, ϵ 两个亚单元将 γ 的一个末端耦合至 c 环上,这样 c 环可以和 γ 亚单元一起旋转^[10]。失去 F_0 区域或丧失代谢活动能力的 F_1F_0 ATPase复合物通常被称为 F_1 ATPase,而 F_1 ATPase- α 是组成 F_1 ATPase的一个基本的亚单位。最初Das等^[3]在肿瘤细胞的表面探测到异位表达的 F_1 ATPase- β ,Chang等^[11]率先鉴定出 F_1 ATPase- α 是内皮细胞上EMAPII的一个受体。有学者认为 F_1 ATPase- α 可能就是某些肿瘤NK细胞和LAK细胞发挥先天细胞毒性的标靶,并且能特异性的激活T细胞亚群^[3]。值得注意的是,在一定条件下,抗 F_1 ATPase- α 抗体作用于肿瘤细胞,会引起细胞胞内酸化,继而发生细胞毒性杀伤作用^[5]。

本研究比较了NSCLC患者肿瘤组织与癌旁组织以及肺良性肿瘤与肺炎性病变中整体的表达情况,发现 F_1 ATPase- α 在NSCLC肿瘤组织中的表达水平显著高于正常组织、肺良性肿瘤及肺炎性病变组织。一般认为肿瘤组织的细胞线粒体功能相对低下,因此导致ATP生成不足及糖酵解增加,线粒体 F_1 ATPase- α 表达也相应下调,即:肺癌细胞线粒体上 F_1 ATPase- α 的表达应该较同类正常支气管上皮细胞 F_1 ATPase- α 的表达低下。但在本研究中发现 F_1 ATPase- α 在NSCLC肿瘤组织中的表达水平显著高于正常组织。我们推测,除了线粒体部位的表达,肺癌细胞可能在细胞外膜或其他细胞结构处也高度表达了 F_1 ATPase- α 。这种异位表达的 F_1 ATPase- α 可能参与了NSCLC的发生、发展等有关过程。通过荧光免疫组化方法,清楚地观察到A549细胞膜上呈颗粒状环绕分布的 F_1 ATPase- α 。 F_1 ATPase- α 在肺癌细胞膜的表达通过本实验已得到证实。本研究虽然证实 F_1 ATPase- α 在NSCLC中表达水平较高,且与组织类型有关,在肺腺癌的表达水平显著高于肺鳞癌,但并未发现其表达水平与临床病理特征之间的相关性,它在NSCLC中具体的生物学功能仍不清楚。另外,A549细胞所表达的 F_1 ATPase- α 与正常上皮细胞所表达的 F_1 ATPase- α 除了功能与分布相异,其构型结构是否有所不同,这些都有待进一步研究。

达水平显著高于肺鳞癌,但并未发现其表达水平与临床病理特征之间的相关性,它在NSCLC中具体的生物学功能仍不清楚。另外,A549细胞所表达的 F_1 ATPase- α 与正常上皮细胞所表达的 F_1 ATPase- α 除了功能与分布相异,其构型结构是否有所不同,这些都有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Cascone T, Gridelli C, Ciardiello F. Combined targeted therapies in non-small cell lung cancer: a winner strategy[J]? *Curr Opin Oncol*, 2007,19:98-102.
- [2] Gridelli C. Targeted therapies and non-small-cell lung cancer: new developments[J]. *Curr Opin Oncol*,2007,19:75-77.
- [3] Das B, Mondragon M O, Sadeghian M, et al. A novel ligand in lymphocyte-mediated cytotoxicity: expression of the beta subunit of Ht transporting ATPsynthase on the surface of tumor cell lines[J]. *J Exp Med*, 1994, 180:273-281.
- [4] Burwick N R, Wahl M L, Fang J, et al. An inhibitor of the F_1 subunit of ATPsynthase (IF_1) modulates the activity of angiostatin on the endothelial cell surface[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280:1740-1745.
- [5] Chi S L, Pizzo S V. 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: 875-882.
- [6] Ramalingam S, Belani C P. Recent advances in targeted therapy for non-small cell lung cancer[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2007,11:245-257.
- [7] Scotet E, Martinez L O, Grant E, et al. Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F_1 -ATPase related structure and apolipoprotein A-I [J]. *Immunity*,2005,22:71-80.
- [8] 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*, 2006,7:37-43.
- [9] Peng G, Bostina M, Radermacher M, et al. Biochemical and electron microscopic characterization of the F_1F_0 ATPase from the hyperthermophilic eubacterium *Aquifex aeolicus*[J]. *FEBS Lett*,2006, 580:5934-5940.
- [10] Feniouk B A, Suzuki T, Yoshida M. The role of subunit epsilon in the catalysis and regulation of F_0F_1 -ATPase[J]. *Biochim Biophys Acta*,2006,1757: 326-338.
- [11] Chang S Y, Park S G, Kim S. Interaction of the C-terminal domain of p43 and the alpha subunit of ATP synthase[J]. *J Biol Chem*,2002,277:8388-8394.

[收稿日期] 2007-03-29

[修回日期] 2007-09-20

[本文编辑] 贾泽军