

本文引文格式:彭莎妮,陆海善,赵志文,等.膀胱癌中CAIX和 $\beta$ -catenin的表达及临床意义[J].右江民族医学院学报,2023,45(3):491-494.

【论著与临床报道】

## 膀胱癌中CAIX和 $\beta$ -catenin的表达及临床意义

彭莎妮<sup>1</sup>,陆海善<sup>2</sup>,赵志文<sup>2</sup>,王兴枝子<sup>2</sup>,龙喜带<sup>2</sup>,黄炳臣<sup>2</sup>

(1. 右江民族医学院研究生学院,广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院附属医院病理科,广西 百色 533000)

**摘要:**目的 探讨碳酸酐酶 IX 蛋白(CAIX)及 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)在膀胱癌中的表达及临床病理意义。方法 对65例膀胱癌组织和31例癌旁尿路上皮免疫组化EnVision法检测CAIX及 $\beta$ -catenin蛋白表达,分析两者表达与膀胱癌临床病理特征的关系及两者表达的相关性。结果 膀胱癌组织中CAIX及 $\beta$ -catenin蛋白表达明显高于癌旁尿路上皮( $P < 0.05$ )。CAIX蛋白表达与膀胱癌组织学分级、临床分期有关( $P < 0.05$ ),与患者性别、年龄、肿瘤最大直径、单发/多发无关( $P > 0.05$ )。 $\beta$ -catenin蛋白表达与膀胱癌患者组织学分级有关( $P < 0.05$ ),与患者年龄、性别、临床分期、肿瘤最大直径以及肿瘤单发/多发无关( $P > 0.05$ )。膀胱癌组织中CAIX及 $\beta$ -catenin蛋白表达呈正相关( $P < 0.05$ )。结论 ①CAIX、 $\beta$ -catenin在膀胱癌组织中表达上调,可能参与膀胱癌的发生;②CAIX和 $\beta$ -catenin异常表达与膀胱癌组织学分级、临床分期有关,提示可能参与膀胱癌恶性发展;③膀胱癌中CAIX、 $\beta$ -catenin表达呈正相关。

**关键词:**膀胱肿瘤;碳酸酐酶 IX 蛋白; $\beta$ -连环蛋白;病理学,临床

中图分类号:R737.14

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2023)03-0491-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.03.023

### Expressions and clinical significance of CAIX and $\beta$ -catenin in bladder cancer

Peng Shani<sup>1</sup>, Lu Haishan<sup>2</sup>, Zhao Zhiwen<sup>2</sup>, Wang Xingzhizi<sup>2</sup>, Long Xidai<sup>2</sup>, Huang Bingchen<sup>2</sup>

(1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 2. Department of Pathology, The Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the expressions and clinicopathological significance of carbonic anhydrase IX protein (CAIX) and  $\beta$ -catenin in bladder cancer. **Methods** This study detected the protein expressions of CAIX and  $\beta$ -catenin in 65 bladder cancer tissues and 31 paracancerous urothelium by the method of immunohistochemical EnVision method, and analyzed the relationship between the expression of CAIX,  $\beta$ -catenin proteins and the clinicopathologic features of bladder cancer as well as the correlation between the expressions of CAIX and  $\beta$ -catenin. **Results** Bladder cancer had a significantly higher expression of CAIX and  $\beta$ -catenin proteins than paracancerous urothelium ( $P < 0.05$ ). The protein expression of CAIX was correlated with the histological grade and clinical stage of bladder cancer ( $P < 0.05$ ), but not with the patient's gender, age, maximum tumor diameter or single/multiple tumor ( $P > 0.05$ ). The protein expression of  $\beta$ -catenin was correlated with the histological grade of bladder cancer patients ( $P < 0.05$ ), but not with the patient's age, gender, clinical stage, maximum tumor diameter or single/multiple tumor ( $P > 0.05$ ). There was a positive correlation between the expressions of CAIX and  $\beta$ -catenin proteins in bladder cancer tissues ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** ① The expressions of CAIX and  $\beta$ -catenin are up-regulated in bladder cancer tissues, which may be involved in the

基金项目:广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(2020KY13010);百色市分子病理学研究学术人才小高地(百人才办[2020]3号-2)

第一作者简介:彭莎妮(1996-),女,在读硕士研究生,研究方向:临床病理学,E-mail:849138704@qq.com

通讯作者简介:黄炳臣(1966-),男,本科,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:病理学教育与临床病理诊断,E-mail:hbc9928@163.com

occurrence of bladder cancer. ②The abnormal expressions of CAIX and  $\beta$ -catenin is correlated with the histological grade and clinical stage of bladder cancer, suggesting that they may be involved in the malignant development of bladder cancer. ③There is a positive correlation between the expressions of CAIX and  $\beta$ -catenin in bladder cancer.

**Key words:** bladder tumor; carbonic anhydrase IX protein;  $\beta$ -catenin; pathology; clinical

尿路上皮癌(urothelial carcinoma)约占膀胱癌的 90%,膀胱癌是泌尿系统最常见的肿瘤之一。芳香胺类化合物、多环芳烃的长期接触和慢性炎症刺激等导致细胞生长调控异常、DNA 凋亡及修复的蛋白抑制基因失活、P53 突变等多种机制参与膀胱癌的发生发展。由于膀胱癌有很高的复发率,探寻肿瘤进展和复发机制,是临床研究的重点<sup>[1]</sup>。缺氧和氢离子浓度增高的酸性改变是不同于正常组织的肿瘤微环境特点,碳酸酐酶 IX(carbonic anhydrase IX, CAIX)是一种缺氧诱导的含锌酶,缺氧上调 CAIX 的表达水平,在许多肿瘤细胞中过表达。肿瘤微环境内的成纤维细胞、肿瘤细胞以及介导慢性炎症反应的细胞和细胞因子可促进肿瘤的发生和转移进展。 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)是上皮钙黏素-连环素复合体的重要组成部分,参与同型细胞间的识别和黏附,同时还作为 Wnt 信号通路中的转导分子在细胞转录、肿瘤增殖、侵袭转移进展中起重要作用。本文采用免疫组化方法检测 CAIX 及  $\beta$ -catenin 蛋白在膀胱癌和癌旁尿路上皮组织的表达,探讨两者在膀胱癌发生、发展中的作用及其相关性。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 65 例膀胱癌选自本院病理科 2014 年 1 月至 2018 年 12 月间膀胱癌手术标本及癌旁尿路上皮 31 例,膀胱癌组中男患者 51 例,女性患者 14 例;发病的年龄在 38~83 岁,患者的平均年龄为(62.50±10.08)岁,其中≤60 岁 29 例,>60 岁 36 例;肿瘤最大直径≤3 cm 者 38 例,>3 cm 者 27 例;肿物为多发的有 22 例,肿物为单发的 43 例。低级别膀胱癌 40 例;高级别膀胱癌 25 例;临床分期:Tis-T1 期 26 例、T2-T4 期 39 例。所有患者术前均未经生物疗法、放化疗或免疫治疗。

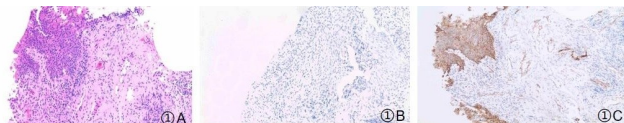
1.2 免疫组织化学染色 所有标本均经 10%福尔马林固定 24 h,常规脱水、石蜡包埋、HE 切片、光镜观察。鼠抗人  $\beta$ -catenin 单克隆抗体、兔抗人 CAIX 多克隆抗体、即用型快捷免疫组化 Max Vision 检测试剂盒(KIT-5020)均购自福州迈新生物科技有限公司。免疫组化染色采用 EnVision 两步法,EDTA(pH 9.0)水浴抗原修复,一抗 1 h,二抗 20 min 室温孵育,DAB 显色 10 min,苏木精复染、封固。用已知阳性切片作为阳性对照,用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定  $\beta$ -catenin 在癌旁尿路上皮主要表达于细胞质/细胞膜,在膀胱癌中为细胞核或细胞质着色呈黄棕色,阳性细胞数≥10%为阳性,<10%为阴性。CAIX 蛋白主要定位于细胞质和或细胞膜,呈棕褐色、棕黄色。根据着色强度和阳性细胞占比进行半定量分析阳性结果,在 400 倍显微镜下选取 5 个视野,无着色记为 0 分,1 分记为淡黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色;根据阳性细胞比例<10%为 1 分,11%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,>75%为 4 分。两项得分相乘,总分<3 分为阴性表达病例、≥3 分为阳性表达病例。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 26.0 统计软件进行数据的处理,计数资料采用  $\chi^2$  检验或者连续性校正  $\chi^2$  检验,Spearman 检验膀胱癌中 CAIX 和  $\beta$ -catenin 表达的相关性。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

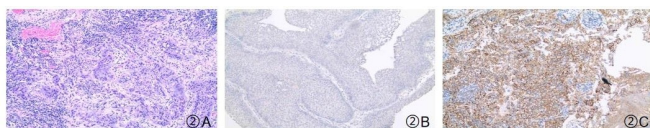
## 2 结果

2.1 膀胱癌及癌旁尿路上皮中 CAIX 和  $\beta$ -catenin 蛋白的表达 CAIX 和  $\beta$ -catenin 蛋白在癌旁膀胱黏膜中的表达,见图 1;CAIX 和  $\beta$ -catenin 蛋白在低级别浸润性膀胱尿路上皮癌中的表达,见图 2;CAIX 和  $\beta$ -catenin 蛋白在高级别浸润性尿路上皮癌中的表达,见图 3。CAIX 在膀胱癌中的表达高于癌旁尿路上皮,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); $\beta$ -catenin 在膀胱癌表达明显高于癌旁尿路上皮,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。



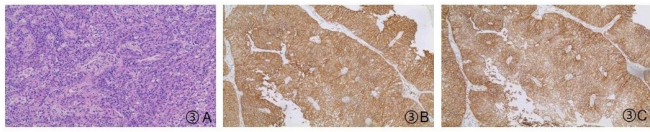
注:A.癌旁尿路上皮(HE染色,100倍);B.CAIX呈阴性;C. $\beta$ -catenin胞膜阳性(EnVision两步法,100倍)。

图 1 CAIX 和  $\beta$ -catenin 蛋白在癌旁尿路上皮中的表达



注:A.低级别浸润性膀胱癌(HE染色,100倍);B.CAIX呈阴性;C. $\beta$ -catenin呈胞质及核阳性(EnVision两步法,100倍)。

图 2 CAIX 和  $\beta$ -catenin 蛋白在低级别浸润性膀胱癌中的表达



注:A.高级别浸润性膀胱癌(HE染色,100倍);

B. CAIX 呈阳性;C.  $\beta$ -catenin 呈胞质及胞

核强阳性(EnVision 两步法,100倍)。

图 3 CAIX 和  $\beta$ -catenin 蛋白在

高级别浸润性膀胱癌中的表达

表 1 膀胱癌及癌旁尿路上皮中 CAIX 和  $\beta$ -catenin 蛋白的表达差异

组织类别	n	CAIX		$\beta$ -catenin			
		阳性	$\chi^2$	P	阳性	$\chi^2$	P
癌旁	31	5(16.13)	14.194	<0.001	3(9.68)	16.104	<0.001
癌组织	65	37(56.92)			34(52.31)		

注:表内计数资料数据用[n(%)]表示。

2.2 CAIX 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达与膀胱癌患者临床病理特征的关系 CAIX 蛋白在高级别癌组的表达明显高于低级别癌组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );CAIX 蛋白在临床分期 T2-T4 的患者表达明显高于在 Tis-T1 患者组中的表达,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );CAIX 蛋白的表达与病理分级有关,与患者性别、年龄、肿瘤最大直径及多发/单发均无关( $P > 0.05$ ); $\beta$ -catenin 蛋白在高级别癌组的表达明显高于低级别癌组的表达,差异具有统计学意义( $P < 0.001$ ); $\beta$ -catenin 蛋白的表达与肿瘤分级有关,与患者性别、年龄、肿瘤最大直径及多发/单发均无关( $P > 0.05$ ),见表 2。

表 2 膀胱癌中 CAIX 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达与患者临床病理特征的关系

分组	n	CAIX		$\beta$ -catenin			
		阳性	$\chi^2$	P	阳性	$\chi^2$	P
性别			0.394	0.530		0.639	0.424
男	51	28			28		
女	14	9			6		
年龄/岁			0.577	0.447		0.341	0.559
≤60	29	15			14		
>60	36	22			20		
病理分级			20.385	<0.001		25.656	<0.001
低级别	40	14			11		
高级别	25	23			23		
临床分期			12.088	0.001		1.737	0.188
Tis-T1	26	8			19		
T2-T4	39	29			15		
肿瘤最大直径/cm			0.103	0.749		0.195	0.659
≤3	38	21			19		
>3	27	16			15		
肿瘤发生			0.077	0.782		0.067	0.796
单发	43	25			22		
多发	22	12			12		

注:表内计数资料数据用例数表示。

2.3 膀胱癌组织中 CAIX 表达与  $\beta$ -catenin 蛋白表达的相关性 65 例膀胱癌组织中 CAIX 表达和  $\beta$ -catenin 表达存在正相关性( $r = 0.289, P = 0.020$ ),见表 3。

表 3 膀胱癌中 CAIX 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达的相关性

CAIX	$\beta$ -catenin		r	P
	阴性	阳性		
阴性	18	10	0.289	0.020
阳性	13	24		

### 3 讨论

CAIX 蛋白是细胞表面跨膜蛋白,是一类含锌金属酶,参与许多需要碳酸氢盐作为底物的细胞代谢和生理过程,CAIX 能够将缺氧环境下的细胞糖降解产生的二氧化碳水解,产生  $\text{HCO}_3^-$  和  $\text{H}^+$  提高细胞内外的 pH 值,肿瘤细胞的内环境保持稳定,使得肿瘤的微环境保持在一个酸性的环境中,缺氧耐受和酸性的微环境中异常的增殖是肿瘤生长的重要特征,也是肿瘤微环境的重要特点<sup>[2]</sup>。细胞外微环境缺氧和酸性改变的影响已被认为是肿瘤进展的重要标志,肿瘤的微环境中氢离子含量的增高加速了肿瘤细胞的增殖和细胞外基质降解,促使肿瘤细胞的浸润和迁移<sup>[3-4]</sup>。目前发现 CAIX 在多种肿瘤如乳腺癌<sup>[5]</sup>、卵巢癌<sup>[6]</sup>、结肠癌<sup>[7]</sup>、膀胱癌<sup>[8]</sup>和肺癌<sup>[9]</sup>等呈高表达,缺氧状态下,缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )介导 CAIX 上调表达,进而激活 VEGF 表达,通过 VEGFR 信号转导途径促进细胞增殖与分化<sup>[5]</sup>。国外学者应用免疫组化检测 74 例结肠直肠癌和癌旁组织中 CAIX 表达发现,癌旁黏膜上皮几乎不表达,而癌组织的表达率为 42%,癌组织中 CAIX 的表达明显增高,但其表达与患者肿瘤分级、淋巴结转移和患者的性别均无关<sup>[6]</sup>。在三阴性乳腺癌中 CAIX 的表达与肿瘤最大径和较高的组织分级密切相关,CAIX 蛋白高表达是三阴乳腺癌患者不良预后的独立危险因素<sup>[7]</sup>。目前研究 CAIX 蛋白在尿路上皮肿瘤的表达结果报道不一,TODENHÖFER TILMAN 等<sup>[8]</sup>研究发现,与良性尿路上皮相比,CAIX 在癌组织中的表达较高,尤其在腔型乳头状癌和基底细胞样鳞癌中高表达。通过 siRNA 沉默 CAIX,可降低肿瘤的侵袭,但不能影响细胞生长和迁移,抑制 CAIX 并不导致肿瘤生长的抑制。而 AL-SHARAKY<sup>[9]</sup>研究则发现,CAIX 在膀胱癌中的高表达与固有肌层浸润和较高的恶性程度显著相关,在膀胱癌中的过表达,可能是膀胱癌患者的独立不良预后因素和潜在的治疗靶点。本文实验结果发现,65 例膀胱癌组织中 CAIX 的表达

随着肿瘤细胞的分化越低和临床分期越高,其 CAIX 阳性表达率越高,提示 CAIX 可能参与膀胱癌的去分化和促进侵袭,推测 CAIX 高表达与肿瘤组织酸性微环境促进基质降解从而有利于肿瘤的侵袭和迁移,CAIX 的表达水平可以反映膀胱癌的预后。

$\beta$ -catenin 是连接素蛋白 (catenin) 家族中的一员,基因位于染色体区域 3p22-p21.3,主要作用是维持上皮细胞的黏附功能,是非常重要的细胞黏附分子和细胞骨架成分,维持正常的上皮结构, $\beta$ -catenin 主要与 E-cadherin、结肠腺瘤样息肉蛋白 (APC)、骨架蛋白、TX 细胞转录因子 (Tcf) 等结合,在许多实体肿瘤中都可以检测到  $\beta$ -catenin 基因第 3 外显子突变及其蛋白的异常表达<sup>[5]</sup>。肿瘤微环境的缺氧和活性氧类物质增多可激活 Wnt 信号通路<sup>[11]</sup>, $\beta$ -catenin 积累在细胞质和细胞核,导致细胞增殖、侵袭和转移。研究表明, $\beta$ -catenin 参与肿瘤的发生、发展和侵袭转移。国内学者周震等<sup>[12]</sup>应用免疫组化方法检测胃癌及癌前病变组织中  $\beta$ -catenin 的表达结果发现, $\beta$ -catenin 在癌旁组织中呈低表达或不表达,而在癌前病变、癌组织中表达明显增高,在癌组织中  $\beta$ -catenin 的表达随着肿瘤分级的增高而增强,反映了肿瘤的分化及恶性程度。郑林峰等<sup>[13]</sup>免疫组化检测 104 例膀胱癌、癌旁组织 40 例  $\beta$ -catenin 的表达结果,结果表明,癌旁组织阳性表达率仅为 7.5% (3/40),而癌中的阳性表达率达 57.69% (60/104),男性患者、年龄  $\geq 63$  岁、高级别尿路上皮癌、肿瘤直径  $\geq 2$  cm、临床分期为 T2-T4 的患者表达明显增高,且  $\beta$ -catenin 表达阳性患者生存期短,说明  $\beta$ -catenin 异常高表达与膀胱癌患者肿瘤分级、临床进展和预后密切相关。MAURYA N 等<sup>[14]</sup>研究结果证实,膀胱癌中, $\beta$ -catenin 在有肌层浸润的表达明显高于无肌层浸润的病例,并且其表达与肿瘤复发相关,是患者不良预后的指标。以上研究表明,膀胱癌中  $\beta$ -catenin 的表达上调参与膀胱癌的发生发展并提示患者的不良预后。本实验结果显示, $\beta$ -catenin 表达阳性率随膀胱癌的组织分级增高而显著增高,部分支持以上观点,说明  $\beta$ -catenin 高表达可能与膀胱癌分化程度低、恶性度高有关,是膀胱癌患者预后差的指标。

相关分析显示,膀胱癌中 CAIX 与  $\beta$ -catenin 的表达呈明显的正相关,提示 CAIX 和  $\beta$ -catenin 可能协同调控膀胱癌的发生和侵袭进展。肿瘤缺氧微环境下的 CAIX 上调表达可激活 Wnt 信号通路的传导,阻碍  $\beta$ -catenin 降解复合物的活性,阻碍  $\beta$ -catenin 的降解,使得  $\beta$ -catenin 在细胞质内积聚并转入细胞核内,与转录因子 TCF/LEF 结合,刺激下游 c-myc、cyclinD1、CD44、VEGF 等靶基因的激活,调控肿瘤细胞增殖、浸润和转移<sup>[15]</sup>,但其机制仍需深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 金露,代光成,朱进,等. PRKG1 在膀胱癌组织中的表达分析和临床意义研究[J]. 现代泌尿生殖肿瘤杂志,2022,14(2):102-106.
- [2] 李新,刘薇,牛冰,等. CAIX 在乳腺癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国现代医学杂志,2018,28(17):42-45.
- [3] PASTOREK J, PASTOREKOVA S. Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: From biology to clinical use[J]. Semin Cancer Biol, 2015,31:52-64.
- [4] SWIETACH P, WIGFIELD S, COBDEN P, et al. Tumor-associated carbonic anhydrase 9 spatially coordinates intracellular pH in three-dimensional multicellular growths [J]. J Biol Chem, 2008,283(29):20473-20483.
- [5] 林超群,李维纳,邱波,等. 血塞通注射液通过 HIF-1 $\alpha$ -VEGF 通路调控 NSCs 的增殖和分化[J]. 右江民族医学院学报,2022,44(2):184-189.
- [6] KOVÁČOVÁ Z, HODOROVÁ I. Carbonic anhydrase IX and survivin in colorectal adenocarcinoma cells: slovakian population study[J]. Biology (Basel), 2021,10(9):872.
- [7] ONG C H C, LEE D Y, LEE B, et al. Hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX (CAIX) protein is an independent prognostic indicator in triple negative breast cancer [J]. Breast Cancer Res, 2022,24(1):38.
- [8] TODENHÖFER T, GIBB E A, SEILER R, et al. Evaluation of carbonic anhydrase IX as a potential therapeutic target in urothelial carcinoma [J]. Urol Oncol, 2021,39(8):498.e1-498.e11.
- [9] AL-SHARAKY D R, KANDIL M A E, AIAD H A S, et al. ROC-1, P21 and CAIX as markers of tumor aggressiveness in bladder carcinoma in Egyptian patients. [J]. Diagn Pathol, 2020,15(1):33.
- [10] 何小龙,朱海琴,高漓. 经典 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号通路在膀胱癌发生与发展中的作用研究进展[J]. 广西医学, 2016,38(6):838-841.
- [11] 巩奇明,李德慧,龚元勋,等. CaMK II 调控脂多糖诱导的心肌细胞内钙、ROS 的作用机制研究[J]. 右江民族医学院学报,2021,43(3):297-301.
- [12] 周震,叶冠男,彭进,等. Wnt3/ $\beta$ -catenin/MMP-7 在胃癌和癌前病变中的表达及其与幽门螺杆菌感染的相关性 [J]. 中南大学学报(医学版),2021,46(6):575-582.
- [13] 郑林峰,倪型灏,程国平,等. 膀胱尿路上皮癌中 DAB2IP 和  $\beta$ -catenin 的表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志,2017,33(4):398-402.
- [14] MAURYA N, GOEL A, SINGHAI A, et al. Altered expressions of pS9GSK-3 $\beta$  / $\beta$ -catenin/EMT markers as strong predictors of short survival in subsets of urothelial carcinoma of bladder patients [J]. Adv Cancer Biol Metastasis, 2021,2:100006.
- [15] GUO H L, JI Y Y, ZHANG B, et al. Fibulin-3 sponges Tiam1 to manipulate MMP-7 activity through  $\beta$ -catenin signaling in oral squamous cell carcinoma [J]. Med Oncol, 2022,39(10):154.

收稿日期:2022-10-09;修回日期:2022-11-31