

电压门控质子通道蛋白 Hv1 在结肠癌中的表达和临床意义

翟立广¹, 陈国荣²

(1.解放军一五九医院, 河南 驻马店 463000; 2.新乡医学院第三附属医院, 河南 新乡 453000)

摘要: [目的] 研究电压门控质子通道蛋白 Hv1 在结肠癌组织中的表达及其临床病理学意义。[方法] 回顾性分析 2004 年 5 月至 2008 年 5 月的 87 例结肠癌患者临床病理学资料; 免疫组化检测 87 例结肠癌组织和 30 例癌旁正常组织石蜡标本中 Hv1 表达。Cox 风险回归模型回归分析影响结肠癌患者预后的独立影响因素。[结果] Hv1 在结肠癌组织中呈阳性表达, 在癌旁正常组织中呈阴性表达。Hv1 表达水平与患者年龄、肿瘤大小、肿瘤 T 分期、淋巴转移、远处转移及临床分期等临床病理因素之间有显著性相关 ($P < 0.05$)。Kaplan-Meier 生存分析显示, 高表达 Hv1 的结肠癌患者预后差, 与 Hv1 低表达的患者相比, Hv1 高表达的患者中位生存期明显缩短 (46 个月 vs. 53 个月, $P < 0.05$), 无复发中位生存时间也明显缩短 (36 个月 vs. 49 个月, $P < 0.05$)。COX 回归分析显示 Hv1 表达是结肠癌患者总生存率 ($P = 0.014$) 和无复发生存率 ($P = 0.037$) 的独立影响因素。[结论] 电压门控质子通道蛋白 Hv1 在结肠癌组织中阳性表达, 是结肠癌患者预后生存的独立影响因素, 是治疗结肠癌药物研发的潜在靶点。

关键词: 电压门控质子通道蛋白 Hv1; 结肠癌; 复发; 预后

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2016)02-0150-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2016.02.A014

Expression and Clinicopathological Significance of Voltage-gated Proton Channel Hv1 in Colon Cancer Tissues

ZHAI Li-guang¹, CHEN Guo-rong²

(1. People's Liberation Army (PLA) 159th Hospital, Zhumadian 463000, China;

2. The Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression and clinicopathological significance of voltage-gated proton channel Hv1 in colon cancer tissues. [Methods] Clinicopathological data of 87 patients with colon cancer hospitalized from May, 2004 to May, 2008 were retrospectively reviewed. Expression of voltage-gated proton channel Hv1 in 87 cases with colon cancer tissues and 30 cases with adjacent normal tissues was determined by immunohistochemistry (IHC). Cox proportional hazard regression model analysis was performed to analyze the independent prognostic factors of patients with colon cancer. The influence of Hv1 expression on the overall survival and recurrence-free survival of patients with colon cancer was analyzed by Kaplan-Meier method with Log-rank test. [Results] Hv1 protein was positively expressed in colon cancer tissues, while negatively expressed in adjacent normal tissues. Hv1 expression in colon cancer tissues significantly correlated with patients' age, tumor size, T stage, lymph node status, distant metastasis and clinical stage. Cox proportional hazard regression analysis indicated that Hv1 expression was independent prognostic factor of overall survival ($P = 0.014$) and recurrence-free survival ($P = 0.037$). Kaplan-Meier survival analysis showed that patients with high Hv1 expression had poorer prognosis than those with low Hv1 expression. Compared with patients with low Hv1 expression, patients with high Hv1 expression had a shorter median survival (46 months vs 53 months, $P < 0.05$) and shorter recurrence-free survival (36 months vs 49 months, $P < 0.05$). [Conclusion] Voltage-gated proton channel protein Hv1, positively expressed in colon cancer tissues, is independent prognostic factor of patients with colon cancer. Hv1 is a promising potential target for developing new methods of tumor therapy.

Key words: voltage-gated proton channel Hv1; colon cancer; recurrence; prognosis

Hv1 蛋白是质子 (H^+) 特异性的电压门控通道,

可以被细胞内环境酸化激活^[1,2], 在肿瘤细胞中促进质子排出, 进而促进肿瘤的进展和转移^[3]。最近有研究发现, Hv1 在转移能力强的 MB-231 乳腺癌细胞

收稿日期: 2014-12-26; 修回日期: 2015-03-15

基金项目: 河南省医学科技攻关计划 (201203076)

通讯作者: 陈国荣, E-mail: chenguorong9988@163.com

系中高表达,siRNA 沉默 Hv1 可以降低 MB-231 迁移和侵袭能力^[4];临床病理学研究表明,高表达 Hv1 与乳腺癌肿块大小、分级、临床分期、淋巴转移以及预后相关^[3]。本研究通过免疫组化的方法检测电压门控质子通道 Hv1 在结肠腺癌中的表达,探讨 Hv1 在结肠腺癌中的表达特点和临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2004 年 5 月至 2008 年 5 月本院住院治疗的 87 例结肠腺癌患者的病历资料。87 例结肠癌患者平均年龄 61.3 岁,男性 43 例,女性 44 例。左结肠癌 25 例,右结肠癌 26 例,直肠癌 36 例。原发肿瘤大小<5cm 34 例,≥5cm 53 例。42 例患者肿瘤发生淋巴转移。

同时使用病理科保存的相应的石蜡标本进行免疫组化检测 Hv1 表达。患者随访方式为电话随访,随访截止时间为 2013 年 2 月,9 例患者失访。

1.2 免疫组化及结果判定

87 例患者肿瘤标本蜡块和 30 例癌旁标本蜡块连续切片,切片厚度 4μm,贴于已经处理的玻片上,置于 70℃孵箱内 48h。切片经常规脱蜡、抗原修复、去内源性过氧化物酶及牛血清封闭后,每个样本滴加 50μl Hv1 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司订制购买)4℃过夜,二抗 37℃孵育 30 min,DAB 显色,苏木精复染。酒精梯度脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封片,光学显微镜下观察。

由两名独立的高年资病理科医生进行免疫组化结果判定。阳性细胞出现棕黄色颗粒。每例标本在显微镜下随机选择 10 个高倍视野(×400),每个视野计数 100 个细胞。采用双评分半定量法进行评价,细胞染色阳性率是在结肠癌样品中染色的阳性细胞的比例,其评分为 1~4 分,分别代表染色阳性率≤25%,26%~50%,51%~75%,76%~100%。着色强弱范围评分为 0~3 分,分别代表无着色、淡黄色、棕黄色和棕褐色。两种计分相乘,>4 分定义为高表达组,≤4 分定义为低表达组。

1.3 统计学处理

应用 SPSS19.0 进行数据分析。Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,Log-rank 法进行检验;COX 比例风险回归模型分析独立的影响因素。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

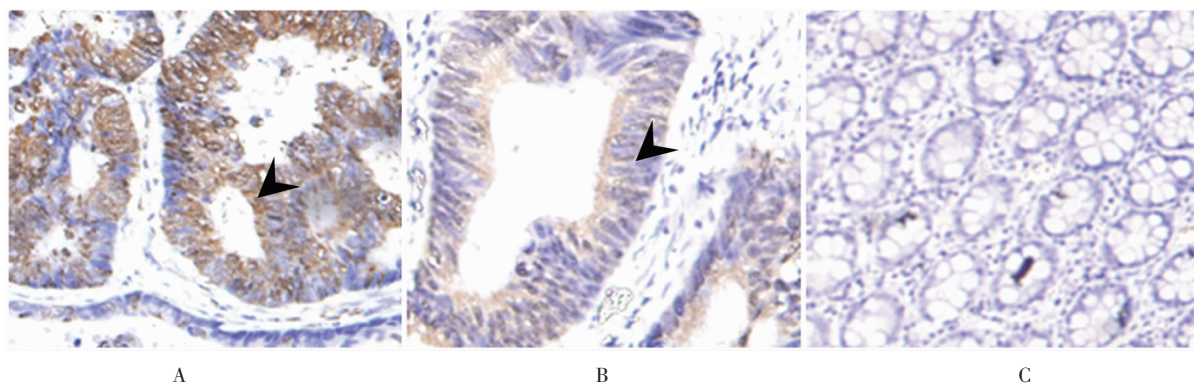
2 结果

2.1 Hv1 表达及其与结肠癌临床病理特征间的关系

Hv1 在结肠腺癌组织中呈阳性表达(Figure 1A, 1B),在 30 例癌旁正常组织中阴性表达(Figure 1C)。Hv1 高表达与患者年龄、肿瘤大小、肿瘤 T 分期、淋巴转移、远处转移和临床分期等有显著性相关($P<0.05$)(Table 1)。

2.2 Hv1 表达与结肠癌患者预后

与 Hv1 低表达患者相比,Hv1 高表达的患者中位生存期明显缩短(46 个月 vs. 53 个月, $P<0.05$)(Figure 2A),无复发中位生存时间也明显缩短(36



A:High expression;B:Low expression;C:Low expression in adjacent normal tissues

Figure 1 Immunohistochemistry detection of Hv1 expression in colon cancer tissues

Table 1 Relationship between Hvl expression in colon cancer tissues and clinicopathological parameters

Parameters	N(%)	Hvl expression		χ^2	P
		High (n=63)	Low (n=24)		
Gender				1.052	0.345
Male	43(49.4)	29	14		
Female	44(50.6)	34	10		
Age (years)				5.079	0.031
<60	41(47.1)	25	16		
≥60	46(52.9)	38	8		
Location				18.900	0.471
Right colon	25(28.7)	18	7		
Left colon	26(29.9)	21	5		
Rectum	36(41.4)	24	12		
Size (cm)				10.594	0.003
<5	34(39.1)	18	16		
≥5	53(60.9)	45	8		
T stage				10.467	0.003
T ₁ ~T ₂	25(28.7)	12	13		
T ₃ ~T ₄	62(71.3)	51	11		
Lymph node status				8.536	0.002
Negative	45(51.7)	26	19		
Positive	42(48.3)	37	5		
Distant metastasis				5.268	0.030
M ₀	48(55.2)	30	18		
M ₁	39(44.8)	33	6		
Clinical stage				4.847	0.033
I ~ II	45(51.7)	28	17		
II ~ IV	42(48.3)	35	7		
Differentiation				13.825	0.215
Well	35(40.2)	28	7		
Moderately	31(35.6)	19	12		
Poorly	21(24.2)	16	5		

个月 vs. 49 个月, $P<0.05$)(Figure 2B)。

结肠癌患者无复发生存率(recurrence-free survival, RFS) 的独立的影响因素包括 Hvl 表达、肿瘤大小、T 分期、淋巴转移、远处转移和临床分期等因素 ($P<0.05$)(Table 2)。结肠癌患者总体生存率(overall survival, OS)的独立影响因素包括 Hvl 表达、肿瘤大小、T 分期、淋巴转移、远处转移和临床分期等因素 ($P<0.05$)(Table 3)。

3 讨论

结直肠癌是常见的肿瘤类型^[5]。临床上通常应用 CEA 和 CA199 进行结直肠癌早期筛查,但由于这些肿瘤标志物的敏感性较低,有必要进一步寻找新的标志物。本研究检测 Hvl 蛋白在结肠癌中的表达,并研究了 Hvl 表达与临床病理学特征和预后间的关系,结果表明, Hvl 在正常癌旁组织中低表达,在癌组织中高表达, Hvl 高表达与患者年龄、肿瘤大小、T 分期、淋巴转移、远处转移和临床分期等临床病理因素间有显著性相关。Kaplan-Meier 法生存分析表明,与 Hvl 低表达的患者相比, Hvl 高表达患者中位生存期明显缩短(46 个月 vs. 53 个月, $P<0.05$);COX 回归分析显示 Hvl 表达是影响结肠癌患者总生存率的独立因素;同时,与 Hvl 低表达患者相比, Hvl 高表达患者的无

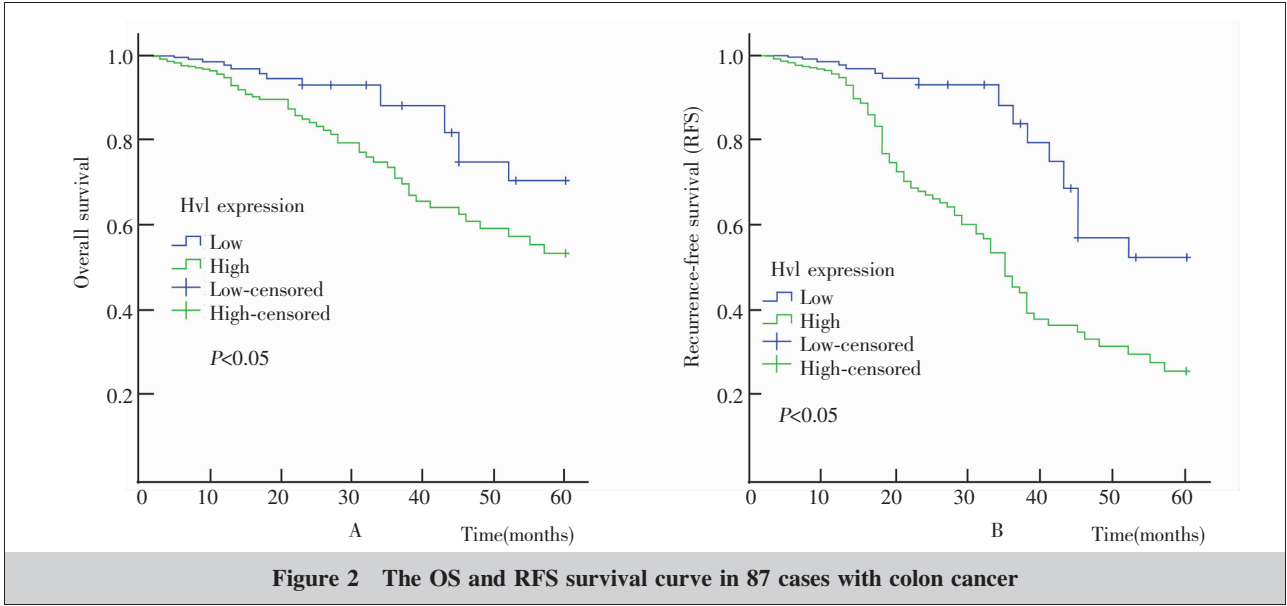


Table 2 Cox proportional hazards analysis of independent predictive factors of recurrence-free survival

Variable	Univariate		Multivariate	
	HR(95%CI)	P	HR(95%CI)	P
Hv1 expression	2.81 (1.99~3.96)	0.077	4.12 (2.13~7.89)	0.037
Age	1.95 (1.43~2.68)	0.437		
Gender	2.37 (1.69~3.33)	0.126		
Location	0.60 (0.20~1.90)	0.317		
Size	1.15 (0.70~1.90)	0.031	1.71 (0.79~4.21)	0.028
T stage	2.21 (1.58~3.09)	0.039	1.67 (0.98~2.56)	0.012
Lymph node status	1.41 (1.26~4.33)	0.083	2.12 (1.23~5.21)	0.022
Distant metastasis	10.21 (2.48~42.14)	0.051	1.82 (1.01~3.72)	0.045
Clinical stage	1.66 (1.13~2.32)	0.078	0.56(0.28~0.87)	0.015
Differentiation	0.98 (0.23~1.34)	0.187		

Table 3 Cox proportional hazards analysis of the independent predictive factors of overall survival

Variable	Univariate		Multivariate	
	HR(95%CI)	P	HR(95%CI)	P
Hv1 expression	2.020(1.897~2.247)	0.044	1.512(0.879~2.617)	0.014
Age	1.093(0.892~2.323)	0.192		
Gender	1.004(0.991~1.011)	0.289		
Location	1.221(0.738~2.332)	0.269		
Size	1.120(0.458~1.872)	0.081	1.639(0.927~2.871)	0.034
T stage	2.021(1.901~2.873)	0.087	2.491(1.207~4.020)	0.010
Lymph node status	3.992(2.673~6.118)	0.008	2.529(2.137~3.895)	0.008
Distant metastasis	4.937(2.768~6.114)	0.015	1.370(0.809~2.538)	0.019
Clinical stage	1.821(0.9627~2.432)	0.028	2.238(2.008~3.474)	0.004
Differentiation	0.843(0.626~1.239)	0.547		

复发中位生存时间也明显缩短 (36 个月 vs. 49 个月, $P<0.05$)。COX 回归分析发现 Hv1 表达是影响结肠癌患者无复发生存率的独立因素。

Hv1 蛋白是一种 H^+ 特异性的电压门控质子通道,可以被肿瘤细胞胞质酸化激活,参与肿瘤细胞质子分泌的过程。肿瘤细胞质子分泌可以维持胞质碱性或者中性,对于肿瘤细胞存活具有重要意义。活跃的糖酵解和过多的酸性代谢物使肿瘤细胞胞质内环境发生酸化,为了阻止胞质内环境的酸化,肿瘤细胞能够将胞质内升高的 H^+ 通过质子泵, Na^+/H^+ 交换体, HCO_3^- 转运体以及质子/乳酸同向转运体等机制排出到肿瘤微环境中,使肿瘤微环境酸化;酸性的肿瘤微环境能促进肿瘤发生、转移和对化疗药物的抵抗^[6-9]。抑制肿瘤细胞排除质子是抗肿瘤治疗的重要潜在靶点^[10-14]。研究发现在肝癌中通过 RNA 干扰技术降低质子泵的表达能够有效地抑制肿瘤的生长和转移^[10,15];使用质子泵抑制剂抑制 H^+ 排出,可以使

人黑色素细胞瘤、腺癌、淋巴瘤等肿瘤细胞胞外 pH 升高,胞质内环境酸化,激活 Caspase 酶,从而导致肿瘤细胞凋亡^[16-19];并且,抑制肿瘤微环境酸化能够增加肿瘤对化疗药物的敏感性。本研究发现具有质子转运功能的电压门控通道蛋白 Hv1 在结肠癌中高表达,且与结肠癌患者的生存相关,提示 Hv1 蛋白可能参与肿瘤的进展过程,进一步验证了肿瘤微环境酸化在肿瘤进展过程中的重要作用。在未来抗肿瘤药物设计方面, Hv1 是一个重要的潜在靶点。

参考文献:

- [1] Meitzler JL, Antony S, Wu Y, et al. NADPH oxidases: a perspective on reactive oxygen species production in tumor biology [J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(17): 2873-2889.
- [2] DeCoursey TE, Hosler J. Philosophy of voltage-gated proton channels [J]. J R Soc Interface, 2014, 11(92): 20130799.
- [3] Wang Y, Li SJ, Wu X, et al. Clinicopathological and biological significance of human voltage-gated proton channel Hv1 protein overexpression in breast cancer [J]. J Biol Chem, 2012, 287(17): 13877-13888.
- [4] Wang Y, Li SJ, Pan J, et al. Specific expression of the human voltage-gated proton channel Hv1 in highly metastatic breast cancer cells, promotes tumor progression and metastasis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 412(2): 353-359.
- [5] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [6] Spugnini EP, Sonveaux P, Stock C, et al. Proton channels and exchangers in cancer [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, pii: S0005-2736(14)00350-2. [Epub ahead of print]
- [7] Lutz NW, Le Fur Y, Chiche J, et al. Quantitative in vivo characterization of intracellular and extracellular pH profiles in heterogeneous tumors: a novel method enabling multiparametric pH analysis [J]. Cancer Res, 2013, 73(15): 4616-4628.
- [8] Ndolo RA, Luan Y, Duan S, et al. Lysosomotropic properties of weakly basic anticancer agents promote cancer cell selectivity in vitro [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e49366.
- [9] Swietach P, Hulikova A, Patiar S, et al. Importance of intracellular pH in determining the uptake and efficacy of the weakly basic chemotherapeutic drug, doxorubicin [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35949.

- [10] Fais S, De Milito A, You H, et al. Targeting vacuolar H⁺-ATPases as a new strategy against cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67(22): 10627-10630.
- [11] Hernandez A. Proton dynamics in cancer [J]. Curr Pharm Des, 2012, 18(10): 1317-1318.
- [12] Huber V, De Milito A, Harguindey S, et al. Proton dynamics in cancer[J]. J Transl Med, 2010, 8: 57.
- [13] Cardone RA, Casavola V, Reshkin SJ. The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(10): 786-795.
- [14] Neri D, Supuran CT. Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy [J]. Nat Rev Drug Discov, 2011, 10(10): 767-777.
- [15] Lu X, Qin W, Li J, et al. The growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma xenografts are inhibited by small interfering RNA targeting to the subunit ATP6L of proton pump[J]. Cancer Res, 2005, 65(15): 6843-6849.
- [16] Fais S. Proton pump inhibitor-induced tumour cell death by inhibition of a detoxification mechanism [J]. J Intern Med, 2010, 267(5): 515-525.
- [17] Luciani F, Spada M, De Milito A, et al. Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs [J]. J Natl Cancer Inst, 2004, 96(22): 1702-1713.
- [18] De Milito A, Iessi E, Logozzi M, et al. Proton pump inhibitors induce apoptosis of human B-cell tumors through a caspase-independent mechanism involving reactive oxygen species[J]. Cancer Res, 2007, 67(11): 5408-5417.
- [19] De Milito A, Canese R, Marino ML, et al. pH-dependent antitumor activity of proton pump inhibitors against human melanoma is mediated by inhibition of tumor acidity[J]. Int J Cancer, 2010, 127(1): 207-219.
- [20] Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer[J]. Lancet, 2014, 383(9927): 1490-1502.
- [21] Greenwald P. Colon cancer overview [J]. Cancer, 1992, 70(5 Suppl): 1206-1215.
- [22] Cresanta JL. Epidemiology of cancer in the United States [J]. Prim Care, 1992, 19(3): 419-441.
- [23] Pihl E, Hughes ES, McDermott FT, et al. Disease-free survival and recurrence after resection of colorectal carcinoma[J]. J Surg Oncol, 1981, 16(4): 333-341.

《中国肿瘤》稿约

《中国肿瘤》杂志创办于1986年。1992年经国家科委批准公开发行人。创刊号上,卫生部陈敏章部长亲笔题词:“交流肿瘤防治经验,推广肿瘤科技成果,促进肿瘤防治事业的发展”。陈部长的题词高度概括了《中国肿瘤》的宗旨与任务。《中国肿瘤》杂志主要栏目有:专题报道、癌情监测、医院管理、防治工作、研究进展、论著等,以研究肿瘤控制为特点。有关撰稿要求如下:

1. 文稿务必材料可靠,数据准确,论据充足,结论明确。文字通顺、准确和简练、重点突出,层次清楚。
2. 文稿作者顺序请自行排列,并注明前3位作者以及通讯作者的单位名称、邮政编码以及详细的联系方式、邮箱等。
3. 需附中英文摘要和关键词,结构式摘要,包括目的、方法、结果、结论四部分。英文摘要务必与中文摘要一一对应。英文摘要前需加英文文题、作者姓名汉语拼音、单位英文全称、所在地名及邮政编码。作者列出前3位后加“et al”。关键词3~8个。

3. 凡文字能表达清楚的内容不必另列图表。图表设计应正确、合理,数字用阿拉伯数字。务请稿件中图表的所有内容均中英文各一份。

4. 所列参考文献为作者亲自阅读的已发表的近5年内主要文献,按文内引用先后顺序列于文末,并在文内引用处右上角以[]号注明序号;并且文献需采用中英文对照。

具体格式如下:期刊:[序号]作者(3位以下全部写出,姓名中间加逗号;3位以上时只写前3位于后加“等”)。文题[J].刊名,年,卷(期):起页-止页。书籍:[序号]作者.书名[M].卷(册)次.版本,出版地:出版者,年.起页-止页。

例如:Chen WQ, Zhang SW, Zeng HM, et al. Report of cancer incidence and mortality in China, 2010 [J]. China Cancer, 2014, 23(1): 1-10. [陈万青, 张思维, 曾红梅, 等. 中国2010年恶性肿瘤发病与死亡[J]. 中国肿瘤, 2014, 23(1): 1-10.]

5. 《中国肿瘤》已启用稿件远程处理系统,只接受网上投稿,不再接收电子邮件投稿和纸质稿。《中国肿瘤》网址:
<http://www.chinaoncology.cn>

6. 网上投稿成功后,请将单位介绍信、基金项目批文的复印件邮寄至编辑部。本刊对所有来稿一律不收审稿费。

7. 编辑部对来稿有文字修改权,凡涉及内容的修改,则提请作者考虑,文责自负。自作者接到收稿回执后6个月内未接到退稿通知,作者欲改投它刊,请函告编辑部。

8. 来稿一经录用,收取一定版面费,发表后寄赠当期杂志2册。