

胸部肿瘤患者肋间肌碳酸酐酶Ⅲ及其mRNA表达的研究

朱玉丹 王蕾 方利洲 戴路明

昆明医科大学第一附属医院呼吸内二科, 云南 昆明 650031

[摘要] **背景与目的:** 有研究提示肿瘤可以上调其原发灶及转移灶中的碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)含量, 但至今为止尚不知肿瘤组织是否会影响其他非转移组织中CA的含量。本研究通过测定CAⅢ及其mRNA在胸部良性肿瘤、肺腺癌患者肋间肌中的表达, 探讨CAⅢ在这些疾病状态下的表达调控情况。**方法:** 对昆明医科大学第一附属医院胸外科行开胸肿瘤切除术的38例住院患者取肋间肌组织活检, 根据术后肿瘤组织病理结果提示纵隔良性肿瘤10例、肺腺癌12例。肺腺癌组患者根据肿瘤转移情况分为淋巴结转移组(6例)和无淋巴结转移组(6例), 根据分化程度分为低分化组(3例)、中分化组(6例)及高分化组(3例), 此外, 16例单纯胸外伤作为对照组。然后, 利用ELISA法定量测定患者肋间肌CAⅢ的浓度, 利用Real-time PCR法检测患者肋间肌的CAⅢ mRNA表达水平, 分析比较各组患者肋间肌中CAⅢ的浓度定量及其mRNA表达水平差异, 探讨CAⅢ在肺腺癌等疾病状况下的表达调控情况。**结果:** CAⅢ的浓度定量结果方面, 与其他2组比较, 肺腺癌组患者肋间肌CAⅢ的浓度显著升高($P < 0.01$), 且淋巴结转移组高于无淋巴结转移组($P < 0.05$), CAⅢ浓度在低、中、高分化肺腺癌各组患者肋间肌间的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。在CAⅢ mRNA相对表达量方面($2^{-\Delta\Delta C_t}$), 与其他2组比较, 肺腺癌组患者肋间肌CAⅢ mRNA表达水平显著升高($P < 0.01$), 且淋巴结转移组高于无淋巴结转移组高($P < 0.01$), 但CAⅢ mRNA水平在低、中、高分化肺腺癌各组患者肋间肌间差异无统计学意义($P > 0.05$)。患者CAⅢ的浓度定量及其mRNA表达水平与患者的 $FEV_1/Pred\%$ (第一秒呼气容积占预计值百分比)呈正相关($P < 0.05$), 与患者的年龄、体质指数、 $FEV_1/FVC\%$ 、 PaO_2 、 $PaCO_2$ 无显著相关性($P > 0.05$)。在各组患者, 其肋间肌CAⅢ mRNA表达水平与CAⅢ浓度定量呈现一致性表现, 即mRNA表达水平升高组, 其蛋白浓度定量也升高; 相反, mRNA表达水平降低组, 其蛋白浓度定量也降低。**结论:** 肺腺癌组患者肋间肌的CAⅢ的浓度定量及其mRNA水平表达均较其他2组高。由于肺腺癌肋间肌CAⅢ的mRNA表达水平与CAⅢ的浓度定量呈现一致性表现, 其对CAⅢ的调控可能主要在上游DNA转录水平得到实现, 使得其肋间肌CAⅢ mRNA转录水平及蛋白表达异常, 进而影响其肋间肌功能状态。

[关键词] 碳酸酐酶Ⅲ; 胸部肿瘤; 肺腺癌; 肋间肌

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.12.003

中图分类号: R734 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)12-0895-06

The study of the expression of carbonic anhydrase Ⅲ and its mRNA in the intercostals muscles of chest tumor patients ZHU Yu-dan, WANG Lei, FANG Li-zhou, DAI Lu-ming (Department of Respiratory 2, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

Correspondence to: DAI Lu-ming E-mail: dailuming6622@hotmail.com

[Abstract] **Background and purpose:** Many studies have showed that tumor tissues can up-regulate the content of carbonic anhydrase (CA) at the primary lesion and metastasis, but, Until to now, we still did not know whether tumor tissues could affect the CA content at other non-metastasis tissues. In this study, we should detect the expression levels of CAⅢ and mRNA in the intercostals muscles of patients with chest tumor, to explore the regulation mechanism of CAⅢ in patients with certain disease states. **Methods:** Intercostals muscle biopsy specimens were obtained from 38 in patients of the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University. A total of 10 patients with benign mediastinal tumor, and 12 patients with lung adenocarcinoma were included according to the postoperative pathologic results. Lung adenocarcinoma group was divided into lymph node metastasis group (6 cases) and non-metastasis group (6 cases), and

divided into low differentiated carcinoma group (3 cases), moderately differentiated carcinoma group (6 cases) and well differentiated carcinoma group (3 cases) and 16 cases purely chest trauma also were included as control group. The concentrations quantification of CA III were measured by ELISA methods, the mRNA expression levels of CA III were detected using RT-PCR methods. **Results:** The concentrations quantification of CA III were remarkably raised in intercostals muscles of lung adenocarcinoma group compared to other two group ($P < 0.05$), and the concentrations were tend to be higher in the group of lung adenocarcinoma with lymph node metastasis than the group of non-metastasis ($P < 0.05$), but there were no significant difference of the concentrations of CA III among each group of low differentiated adenocarcinoma, moderately differentiated adenocarcinoma and well differentiated adenocarcinoma (each $P > 0.05$). The mRNA expression levels of CA III were remarkably raised in intercostals muscles of lung adenocarcinoma group compared to control group ($P < 0.01$), and the mRNA levels were tend to be higher in the group of lung adenocarcinoma with lymph node metastasis than the group of non-metastasis ($P < 0.05$), but there were no significant difference of the mRNA levels of CA III among each group of low differentiated adenocarcinoma, moderately differentiated adenocarcinoma and well differentiated adenocarcinoma (each $P > 0.05$). The concentrations quantification and mRNA expression levels of CA III in intercostals muscles were positively correlation with patient's FEV₁/Pred% ($P < 0.05$), but there were no significant correlation with patient's age, BMI, FEV₁/FVC%, PaO₂ and PaCO₂ ($P > 0.05$). This study showed a consistent performance between the mRNA expression levels and concentrations quantification of CA III in intercostals muscles of each group. The higher mRNA expression levels of CA III in intercostals muscles of each group, the higher protein concentrations quantification; and the lower mRNA expression levels of CA III, the lower protein concentration quantification. **Conclusion:** The concentrations quantification and mRNA expression levels of CA III in intercostals muscles of lung adenocarcinoma group were higher than control group. This study showed a consistent performance between mRNA expression levels and concentrations quantification of CA III in intercostals muscles of each group, it suggested that the regulation of CA III in intercostals muscles of COPD patients might be achieved mainly in the upstream of DNA transcription level, which makes the transcription levels of mRNA and protein expression of CA III abnormal and further affects the state of intercostals muscles function.

[Key words] Carbonic anhydrase III; Chest tumor; Intercostals muscle

碳酸酐酶(carbonic anhydrases, CA)是一种含锌的金属蛋白酶家族,在脊椎动物及人类中高度表达,其动力学性质、组织分布、亚型定位均不同;哺乳动物的 α -CA基因家族包括16种不同的CA同工酶亚型,其中CA I、II、III、VII、XII存在于细胞质中,属于细胞溶质酶,CAIV、IX、XII、XIV存在于细胞膜上,属于跨膜蛋白酶,VA和VB存在线粒体,CAVI存在于唾液腺,它们均具有不同程度的CO₂水化活性;CA III主要表达于人类骨骼肌中。之前的许多研究还表明,不同肿瘤组织中可有不同的CA同工酶表达,CA被证明参与许多肿瘤的进展过程。CAIX在非小细胞肺癌、透明肾细胞癌、宫颈癌、膀胱癌和结直肠癌等肿瘤组织中表达上调^[1-4],CA I、CA II在肺腺癌组织中表达下调^[5],以及上调CA III在肝癌组织中的表

达^[6],此外CA在肺腺癌的远处肾转移灶中也有表达^[7],可以通过改变肿瘤的生长微环境,促进肿瘤细胞的生长和转移,CA被认为可能是评价肿瘤预后的一种特异性肿瘤标志。我们猜测,肺腺癌除了影响原发灶和转移灶的CA水平,有可能也会影响患者其他临近组织(如肋间肌)的表达。本研究拟对纵隔良性肿瘤组、肺腺癌组,通过测定CA III及其mRNA在2组患者肋间肌中的表达水平,探讨CA III在这些疾病状态下的调控情况。

1 资料和方法

1.1 临床标本及相关资料

临床肋间肌标本来源于云南省昆明医科大学第一附属医院胸外科2012年4月—2012年10月行肺部肿瘤或纵隔肿瘤切除术患者,术后所有

患者均经病理确诊,且术前均未接受生物反应调节剂、化学药物及放射治疗。所有参与人员均知情同意并志愿配合。术前对患者详细询问病史、进行全面体格检查,完善三大常规及凝血功能、血糖、血脂、肝肾功能、人类免疫缺陷病毒、梅毒抗体检测、肝炎病毒学检查、甲状腺功能、自身抗体谱、动脉血气分析、心电图、胸部CT扫描、腹部B超、骨扫描及肺功能检测等检查。

1.2 对象纳入标准

患者年龄在55~71岁之间,根据病理结果最终纳入纵隔良性肿瘤组10例(纵隔平滑肌脂肪瘤4例,胸腺瘤3例,纵隔成熟畸胎瘤3例),肺腺癌组12例(低分化腺癌3例,中分化腺癌6例,高分化腺癌3例,6例有淋巴结转移,其余均无淋巴结及远处转移)。此外,16例单纯胸外伤作为对照组。

1.3 对象排除标准

①其他肺部疾病如支气管哮喘、肺炎、肺结核、支气管扩张、间质性肺疾病、肺挫伤等;②睡眠呼吸障碍;③严重心脑血管系统疾病;④严重肝病、肾病、内分泌疾病;⑤免疫系统性疾病;⑥合并其他部位的感染;⑦患有智力障碍或认知障碍;⑧近4周内全身使用过糖皮质激素者;⑨术前接受过生物反应调节剂、化学药物及放射治疗。

1.4 终止标准

①患者拒绝参与;②研究期间与患者及家属失去联系;③患者中途退出;④患者研究期间死亡。

1.5 肋间肌标本采集及保存

以入选对象患者手术侧作为取材部位,在患者实施手术过程中直接取肋间肌肉约0.5 g做样本,用冰PBS冲洗,去掉样本组织上的残留血液,将标本放在纱布上,对标本沿肌纤维排列方式稍作排列整理,并在显微镜下去除脂肪及结缔组织,并剪成脆片置于Eppendorf管中,在

管盖上做好标记。预处理后的肋间肌标本迅速储存于-80℃冰箱中。

1.6 酶联免疫分析法(ELISA)定量测定CAⅢ浓度

应用双抗体夹心法测定标本中人CAⅢ的浓度。试剂采用美国RD公司肌肉CAⅢ专用测定试剂盒。切割组织标本后,称取重量,加入定量的PBS(pH=7.4),用手工或匀浆器将标本匀浆充分。离心20 min(2000~3000 r/min,离心半径8 cm)。仔细收集上清液。分装后一份待检测。用纯化的人CAⅢ抗体包被微孔板,制成固相抗体,往包被单抗的微孔中加入CAⅢ,再与HRP标记的CAⅢ抗体结合,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,经过彻底洗涤后加底物TMB显色。TMB在HRP酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的CAⅢ正相关。用酶标仪在450 nm波长下测定吸光度(A)值,通过标准曲线计算样品中人CAⅢ的浓度。

1.7 Real-time PCR法测定CAⅢ mRNA表达水平

利用TRIzol法提取CAⅢ的总RNA,经过反转录形成互补cDNA;建立Real time-PCR反应体系,在体系中加入荧光基团(SYBR荧光染料),然后通过PCR进行DNA扩增,并利用荧光信号积累实时监测整个PCR进程,得出CAⅢ基因和内参基因表达的熔解曲线和扩增曲线,得到确切的Tm值和Ct值;最后根据Ct值通过特定的数学原理($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法)计算出CAⅢ mRNA的相对表达量。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法即对照组与实验组之间待测基因的相对表达量差异倍数。其中, $\Delta Ct=Ct_{目的}-Ct_{管家基因}$, $\Delta\Delta Ct=\Delta Ct_{实验组}-\Delta Ct_{对照组}=(Ct_{目的}-Ct_{管家基因})_{实验组}-(Ct_{目的}-Ct_{管家基因})_{对照组}$ 。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 得出的数值代表实验组待测基因的表达水平是对照组的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 倍。

1.8 肺功能测定

患者在安静状态下,按标准法行肺功能测

定, 并记录第1秒用力呼气容积占预计值百分比($FEV_1/Pred\%$)、第1秒钟用力呼气容积占用力肺活量百分比($FEV_1/FVC\%$)。

1.9 血气分析

清晨在安静状态下, 让入选者停止吸氧30 min后采集股动脉肝素抗凝血, 进行动脉血气分析检查, 记录氧分压(PaO_2)及二氧化碳分压($PaCO_2$)。

1.10 统计学处理

运用SPSS 17.0统计软件进行统计学分析。计量资料数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 计数资料采用构成比表示。计量资料的两样本均数之间比较采用两独立样本 t 检验, 多样本均数间两两比较采用LSD法; 计数资料多个样本构成比之间比较采用 χ^2 检验; 符合正态分布的计量资料相关性分析采用Pearson相关性分析法, 不符合正态分布的计量资料相关性分析采用Spearman相关性分析法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 研究对象

由表1可以看出, 所入选对象的年龄差异无统计学意义, 与纵隔良性肿瘤组比较, 肺腺癌组患者的 $FEV_1/Pred\%$ 较高($P<0.05$), 而BMI、 $FEV_1/FVC\%$ 、 $PaCO_2$ 、 PaO_2 差异均无统计学意义。单纯胸外伤组(对照组)与其他2组比较, 除

年龄、 $PaCO_2$ (mmHg)外, 其他指标差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 3组患者CAⅢ及mRNA的浓度定量结果

如表2所示, ①与对照组及纵隔良性肿瘤组比较, 肺腺癌组患者肋间肌CAⅢ及mRNA浓度显著升高, 差异有统计学意义($P<0.01$), 对照组与纵隔良性肿瘤组之间比较, 差异无统计学意义($P>0.05$); ②在肺腺癌组中, 淋巴结转移组患者肋间肌的CAⅢ及mRNA的浓度都高于无转移组, 差异都具有统计学意义($P<0.05$); CAⅢ及mRNA浓度在低、中、高分化肺腺癌各组患者肋间肌中差异无统计学意义(P 均 >0.05)。

CAⅢ mRNA荧光定量PCR扩增曲线(图1)显示, 在上述各组患者中, 利用Real-time RT-PCR检测其肋间肌CAⅢ的mRNA水平表达与ELISA测定肋间肌CAⅢ的浓度定量呈现一致性表现, 即mRNA表达水平升高组, 其蛋白浓度定量也升高; 相反, mRNA表达水平降低组, 其蛋白浓度定量也降低。

2.3 相关性分析

患者肋间肌CAⅢ浓度定量与其肋间肌CAⅢ mRNA表达水平呈正相关性(P 均 <0.01); 所有患者肋间肌CAⅢ浓度定量及其mRNA表达水平与患者的 $FEV_1/Pred\%$ 呈正相关性(P 均 <0.01), 而与患者的年龄、BMI、 $FEV_1/FVC\%$ 、 PO_2 、 PCO_2 无显著相关性(P 均 >0.05)。

表1 入选对象的一般情况

Tab. 1 Characteristics of enrolled patients

Characteristic	Benign mediastinal tumor (n=10)	Lung adenocarcinoma (n=12)	Control group (n=16)
Gender(male/female)	7/3*	8/4	9/7 [▲]
Age/years	62.6±5.0	64.3±6.8	64.3±5.4
BMI/kg·m ⁻²	23.3±4.0*	23.8±3.6	29.8±2.7 [▲]
$FEV_1/Pred\%$	85.0±6.0*	105.1±13.2*	104.3±12.7 [▲]
$FEV_1/FVC\%$	80.7±4.4*	83.0±5.8	85.1±4.1 [▲]
PaO_2 /mmHg	66.9±3.2*	65.0±3.6	84.5±6.4 [▲]
$PaCO_2$ /mmHg	37.2±2.9	37.6±2.6	38.7±6.8
Metastasis(yes/non)	-	6/6	-
Differentiation (low/middle/well)	-	3/6/3	-

*: Benign mediastinal tumor group compared with lung adenocarcinoma group, $P<0.05$; [▲]: Lung adenocarcinoma group compared with control group, $P<0.05$; *: Benign mediastinal tumor group compared with control group, $P<0.05$.

表 2 3组患者肋间肌CAⅢ浓度(±s)及CAⅢ mRNA 相对表达量比较

Tab. 2 Comparison of CA Ⅲ and CA Ⅲ mRNA in intercostal muscles between the 3 groups

Item	n	CA Ⅲ /ng·mL ⁻¹	P value	CA Ⅲ mRNA(2 ^{-△△Ct})	P value
Group			0.000*		0.000*
Control group	16	15.5±1.7		1.1±0.8	
Benign mediastinal tumor	10	15.4±1.2		1.0±0.7	
Lung adenocarcinoma	12	22.5±3.8		4.6±1.4	
Metastasis			0.024 [▲]		0.008 [▲]
Yes	6	24.9±3.8		5.9±1.3	
No	6	20.0±1.7		3.5±1.1	
Differentiation			0.746 [•]		0.456 [•]
Low	3	20.9±1.4		5.4±1.2	
Middle	6	22.7±3.6		4.1±1.4	
High	3	23.6±6.3		4.8±1.4	

*: Lung adenocarcinoma group compared with other two groups, [▲]: P<0.01; Metastasis group compared with non-metastasis group, P<0.01; [•]: Comparison between the three distinct differentiation groups each other, P>0.05.

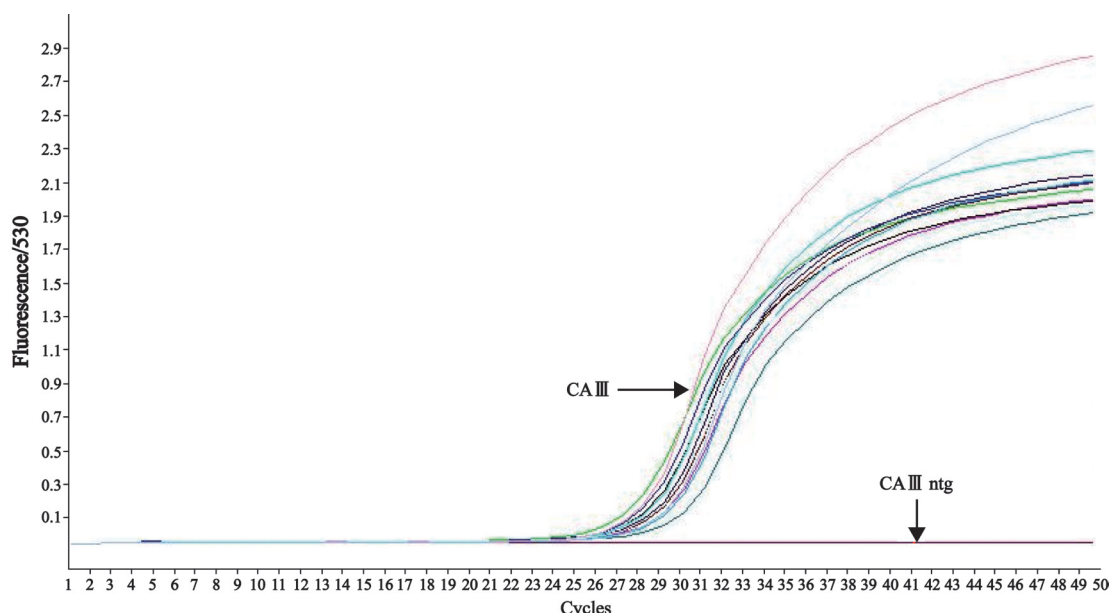


图 1 CA Ⅲ mRNA 荧光定量PCR扩增曲线

Fig. 1 The amplification curve for CA Ⅲ mRNA by PCR fluorescent quantitation

3 讨 论

虽然近年来CA和肿瘤的关系已成为一大研究热点，但其研究主要集中在CA在肿瘤组织中的表达作用方面，目前尚未发现CA在肿瘤患者肋间肌表达的研究报道。之前的研究显示，CA Ⅲ在肺腺癌组织中表达下调可以促进肿瘤细胞生长^[5]，主要是因为CAⅢ具有CO₂水化功能，可以催化CO₂+H₂O↔H₂CO₃↔HCO₃⁻+H⁺的可逆反应，CA在肿瘤细胞内表达可以引起肿瘤细胞外pH(pHe)下降，而低pHe有利于细胞外基质

降解，有助于肿瘤浸润、转移以及促发肿瘤细胞增殖信号瀑布^[8]。除了二氧化碳合酶活性，CAⅢ还具有羧基化酶活性和磷酸酯酶活性，从而表明其是1个络氨酸磷酸酶^[9]。Dai等^[6]研究发现CAⅢ在肝癌中过表达，可以增加细胞内和细胞外环境的酸度，通过激活黏附激酶(FAK)信号通路促进肿瘤的侵袭和转移。而FAK已被证明是1种细胞质络氨酸激酶，其与整联信号转导途径中的信号分子结合而触发一系列下游信号转导途径调整细胞的功能，可使肿瘤细胞侵袭性和转移能力增强^[10]。

肿瘤细胞除了可以通过自分泌和旁分泌改

变和维持自身生存和发展的条件促进肿瘤的生长, 全身和局部组织也可以通过代谢、分泌、免疫、结构和功能的改变, 限制和影响肿瘤的发展。我们的研究显示, CAⅢ在肺腺癌组患者肋间肌的表达较纵隔良性肿瘤组升高, 且在淋巴结转移组患者肋间肌中的表达高于无转移组。故我们猜测, 肺腺癌在进展过程中可能有选择性地向周围组织侵袭及远处转移的能力, 这种特性可能导致其邻近肋间肌组织中各种信号分子(例如FAK增加)和肌细胞生长环境(如细胞内外酸性pH、氧化应激增加)发生改变, 从而影响CAⅢ在其肋间肌的表达。但是, 肺腺癌调控CAⅢ在其肋间肌高表达的具体途径以及这种高表达是否有具体作用目前还不清楚。

生物基因组结构所携带的遗传信息经过转录和翻译, 产生具有特异生物学功能的蛋白质分子的过程, 简单地说就是从DNA到蛋白质的过程, 这一过程称为基因表达, 而对这个过程的调节就是基因表达调控, 其为多级调控, 主要表现在以下几个方面: ①转录水平上的调控(DNA转录生成mRNA); ②mRNA的加工、成熟水平上的调控; ③翻译水平上的调控(mRNA翻译成具有生物学功能的蛋白质)。其中, 转录水平特别是转录起始(上游基因)的调控是真核基因表达调控最关键的环节。我们的研究显示, 各组患者肋间肌中CAⅢ mRNA表达水平与CAⅢ浓度定量呈现一致性表现, 表明CAⅢ在患者肋间肌的表达受基因表达调控, 且CAⅢ mRNA到CAⅢ蛋白质的表达调控过程并没有发生明显异常。之前Zimmerman等^[11]利用鼠类基因组U74Av2微点阵分析小鼠骨骼肌CAⅢ基因表达, 在配对比较敲除CAⅢ小鼠和野生同胞鼠仔发现, 1 200个基因中有超过500个基因表现出转录水平的改变。故结合我们的研究, 肺腺癌可以上调肋间肌CAⅢ, 患者肋间肌CAⅢ mRNA水平及蛋白表达与患者的FEV₁/Pred%呈正相关。我们认为, 在肺腺癌, 患者对CAⅢ的调控可能主要在上游DNA转录水平得到实现, 使得其肋间肌CAⅢ mRNA转录水平及蛋白表达异常, 进而影响其肋间肌功能状态。

肺腺癌各种类型都可以使肋间肌CAⅢ上调, 其对CAⅢ的调控可能主要在上游DNA转录水平得到实现, 使得其肋间肌CAⅢ mRNA转录水平及蛋白表达异常, 进而影响其肋间肌功能状态。

[参 考 文 献]

- [1] LIAO S Y, DARCY K M, RANDALL L M, et al. Prognostic relevance of carbonic anhydrase-IX in high-risk, early-stage cervical cancer: a Gynecologic Oncology Group study [J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 116(3): 452-458.
- [2] KLATTE T, SELIGSON D B, RAO J Y, et al. Carbonic anhydrase IX in bladder cancer: a diagnostic, prognostic, and therapeutic molecular marker [J]. *Cancer*, 2009, 115(7): 1448-1458.
- [3] NIEMELA A M, HYNINEN P, MECKLIN J P, et al. Carbonic anhydrase IX is highly expressed in hereditary nonpolyposis colorectal cancer [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007, 16(9): 1760-1766.
- [4] SIMI L, VENTRURINI G, MALENTACCHI F, et al. Quantitative analysis of carbonic anhydrase IX mRNA in human non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2006, 52(1): 59-66.
- [5] CHIANG W L, CHU S C, YANG S S, et al. The aberrant expression of cytosolic carbonic anhydrase and its clinical significance in human non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Lett*, 2002, 188(1-2): 199-205.
- [6] DAI H Y, HONG C C, LIANG S C, et al. Carbonic anhydrase III promotes transformation and invasion capability in hepatoma cells through FAK signaling pathway [J]. *Mol Carcinog*, 2008, 47(12): 956-963.
- [7] RAMSEY M L, YUH B J, JOHNSON M T, et al. Carbonic anhydrase IX is expressed in mesothelioma and metastatic clear cell renal cell carcinoma of the lung [J]. *Virchows Archiv*, 2012, 460 (1): 89-93.
- [8] ROBERTSON N, POTTER C, HARRIS A L. Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(17): 6160-6165.
- [9] HUANG W C, SWIETACH P, VAUGHAN-JONES RD, et al. Extracellular acidification elicits spatially and temporally distinct Ca²⁺ signals [J]. *Curr Biol*, 2008, 18(10): 781-785.
- [10] INNOCENTI A, SCOZZAFAVA A, PARKKILA S, et al. Investigations of the esterase, phosphatase, and sulfatase activities of the cytosolic mammalian carbonic anhydrase isoforms I, II, and VIII with 4-nitrophenyl esters as substrates [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(7): 2267-2271.
- [11] ZIMMERMAN U J, WANG P, ZHANG X, et al. Anti-oxidative response of carbonic anhydrase III in skeletal muscle [J]. *IUBMB Life*, 2004, 56(6): 343-347.

(收稿日期: 2014-07-06 修回日期: 2014-08-17)