

肿瘤干细胞标志物 CD133 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义

魏益平^{1,2}, 王梅¹, 华平¹, 吴澄¹, 曹永科¹, 杨艳旗¹, 陈炬¹, 张惠忠¹
(1.中山大学附属第二医院心胸外科, 广东 广州 510120;
2. 南昌大学第二附属医院外科, 江西 南昌 330006)

摘要:【目的】研究肿瘤干细胞标志物 CD133 在非小细胞肺癌(NSCLC)组织中表达的临床意义。【方法】用免疫组织化学方法检测 77 例手术切除的 NSCLC 组织中 CD133 的表达,分析 CD133 表达与患者吸烟指数、组织学类型、组织分化程度、淋巴结转移、肿瘤 T 分期、N 分期和患者预后之间的关系。【结果】77 例 NSCLC 患者到随访结束时死亡率 72.73%(56/77),术后生存时间 1~84($s=19$)月,3 年生存率为 32.47%(25/77);无淋巴结转移组 NSCLC 的中位生存时间和 3 年生存率高于有淋巴结转移组($P < 0.05$)。CD133 阳性表达率 51.9%(40/77);CD133 的表达与淋巴结转移呈正相关($r=0.246, P < 0.05$),与患者手术后生存期呈负相关($P < 0.05$)。COX 多因素分析仅癌肿病理类型和 CD133 蛋白表达为影响生存率的独立因素。【结论】NSCLC 的淋巴结转移和病理类型与预后密切相关;肿瘤干细胞标志物 CD133 蛋白的表达与 NSCLC 的淋巴结转移和预后密切相关。

关键词:非小细胞肺癌;肿瘤干细胞;CD133;淋巴转移;预后

中图分类号:R655;R730.3

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2008)03-0312-05

Expression of Tumor Stem Cell Marker CD133 in Non-small Cell Lung Carcinoma and Its Clinical Significance

WEI Yi-ping, WANG Mei, HUA Ping, WU Cheng, CAO Yong-ke,
YANG Yan-qi, CHEN Ju, ZHANG Hui-zhong

(1.Department of Heart Surgery, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 2.Department of Surgery, The Second Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang 330006, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the expression of tumor stem cell marker CD133 in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) and its relationship with NSCLC clinical significance. 【Methods】 Immunohistochemical staining was used to detect the expression of CD133 in 77 cases of patients with NSCLC. The relationship of the expression of CD133 with smoking index number, histological type, differentiation, lymphoid metastasis, T stage, N stage and survival time of the patients was analyzed. 【Results】 The death rate, live time (mid-live time), and three years survival rate of NSCLC patients after operation were 72.73%(56/77), 1~84($s=19$)month, 32.47% (25/77), respectively. Both mid-live time and survival rate of three years after operation in NSCLC patients were longer in negative lymphonode metastasis group than the positive ones ($P < 0.05$). Out of 77 cases of NSCLC 40 cases (51.9%) showed positive expression of CD133. The expression of CD133 was associated positively with lymphoid metastasis ($r=0.246, P < 0.05$), and inversely with survival time ($P < 0.05$). In a COX multivariate analysis, the survival of NSCLC was significantly influenced by the histological type and expression of CD133. 【Conclusion】 The prognosis of NSCLC were associated with lymphoid metastasis and histological type. The expression of tumor stem cell marker CD133 was associated with lymphoid metastasis and prognosis in NSCLC.

Key words: lung cancer; tumor stem cell; CD133; lymphatic metastasis; prognosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(3): 312-316]

收稿日期:2007-12-20

基金项目:广东省科技计划项目(2007B060401015);广州市科委科技攻关引导项目(02Z3-E0016)

作者简介:魏益平(1979-),男,江西进贤人,现工作单位为南昌大学附属第二医院,在读心胸外科博士生,weiyip2000@hotmail.com;张惠忠,通讯作者,副教授,医学硕士,主要从事肺、食管肿瘤的研究,E-mail:zhzhgd@163.com

肺癌细胞的侵袭转移是导致肺癌患者术后预后不良的主要因素。肿瘤干细胞(tumor stem cell, TSC)理论^[1,2]认为 TSC 是存在于肿瘤组织中的一小部分具有干细胞特性的细胞群体,具有自我更新能力和多向分化潜能、是形成不同分化程度肿瘤细胞和肿瘤不断生长的根源。CD133 是肿瘤干细胞的特征性表面标志物之一,人们已经发现恶性胶质瘤^[3]、肝癌^[4]和结肠癌^[5]中 CD133 表达阳性细胞的成瘤性比阴性细胞强。本研究用免疫组织化学染色法检测 77 例肺癌组织中 CD133 的表达,并探讨肿瘤组织中 CD133 的表达与肿瘤大小、组织学类型、组织分化程度、淋巴结转移和患者术后生存期之间的关系。

1 材料和方法

1.1 试剂

CD133 多克隆抗体(北京博奥森公司),SABC 试剂盒(武汉 BOSTER 公司)。

1.2 研究对象

所有患者知情同意;选取本院胸外科 1996 年~2001 年手术切除并经病理证实,有术后随访资料的 NSCLC 患者 77 例。所有患者手术前均未进行放疗或化疗。根据影像学资料或手术记录确定肿瘤大小。查阅住院记录获得吸烟指数(吸烟指数=每天吸烟支数×吸烟年数)、组织学类型、组织分化程度和淋巴结转移情况。所有手术切除标本均用 40 g/L 的多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,厚 4 μm。

1.3 免疫组化染色

石蜡包埋组织切片,脱蜡水化,蒸馏水漂洗 5 min,在枸缘酸微缓冲液波炉抗原修复(95~98℃,维持 20 min)。室温下冷却 30 min,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 5 min×3 次,体积分数为 3% H₂O₂ 室温下孵育 10 min,PBS 漂洗 5 min×3 次。一抗稀释度为(1:200),稀释剂为 PBS,阳性对照为已知阳性的神经胶质瘤组织;以 PBS 代替一抗作阴性对照。4℃冰箱中过夜。第 2 天取出置室温 1 h 后,PBS 漂洗 5 min×3 次,滴加生化素标记的第二抗体,37℃孵育 30 min,PBS 漂洗 5 min×3 次。滴加链霉素化蛋白生物素复合物,37℃孵育 30 min,PBS 漂洗 5 min×3 次,二氨基联苯胺(DAB)显色 3~10 min。蒸馏水漂洗,苏木精复染细胞核,中性树胶封片。

1.4 结果判断

DAB 阳性染色为棕(黄)色。计数 4 个不同高倍视野下 200 个癌细胞,阳性细胞数 > 10% 为阳性,≤10% 为阴性。由 3 位病理科医生在不了解患者临床预后情况下独立进行观察判断,对独立判断不一致的病例再共同进行观察。

1.5 统计分析

数据用 SPSS11.5 计算,肿瘤大小的比较采用 *t* 检验,率的比较用 χ^2 检验,生存分析采用 Kaplan-Meier 曲线法和 Log-Rank 检验;Pearson 法计算相关系数。用 Cox 多因素分析评价各因素对生存率的影响。 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 NSCLC 患者的术后生存情况

77 例非小细胞肺癌(男 57 岁,女 20 岁);年龄 29~79 岁(中位年龄 63 岁)。术中发现淋巴结转移率 50.7%(39/77)。本组病例到随访结束时(2004 年 12 月)病死率 72.73%(56/77)。术后生存时间 1~84 ($s=19$) 月,3 年生存率为 32.47%(25/77)。

2.2 NSCLC 组织中 CD133 的表达情况与临床特征的关系

NSCLC 组织中 CD133 蛋白阳性染色为棕/黄色(图 1),与 CD133 表达阴性的支气管上皮和肺泡组织(图 2)比较差异明显。CD133 阳性表达率 51.9%(40/77);CD133 阳性表达组术后生存期的中位生存时间(10 个月)明显短于阴性表达组(37 个月),3 年生存率分别为 15.0%(6/40)和 51.4%(19/37),有统计学差异($P=0.001$,表 1,图 3)。CD133 阳性组淋巴结转移率为 64.1%(25/39)较阴性组 39.8%(15/38)高,两组比较有统计学差异($r=0.246, P < 0.05$);CD133 的阳性表达与肿瘤大小、组织学类型、组织分化程度均无相关性($P > 0.05$,表 2)。

2.3 NSCLC 患者的临床特点与预后的关系

CD133 阳性表达、术中有无胸腔积液、T 分期、N 分期和肿瘤病理类型与患者术后生存率有相关性($P < 0.05$,表 1)。无淋巴结转移和有淋巴结转移组的中位生存期分别为 30 月和 11 月,3 年生存率分别为 50.0%(18/36)和 17.1%(7/41),差别有统计学意义($P < 0.05$,图 4)。患者吸烟指数、性别、年龄、肿瘤细胞分化程度等临床特点均未见与长期生存率无关。

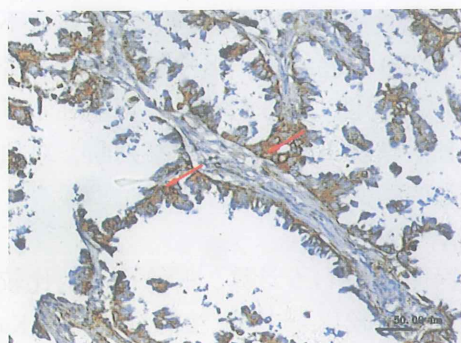


图 1 肺腺癌组织 CD133 免疫组化染色癌细胞浆呈阳性表达

Fig.1 Positive expression of CD133 detected by immunohistochemical staining in a lung adenocarcinoma (brown, $\times 200$)

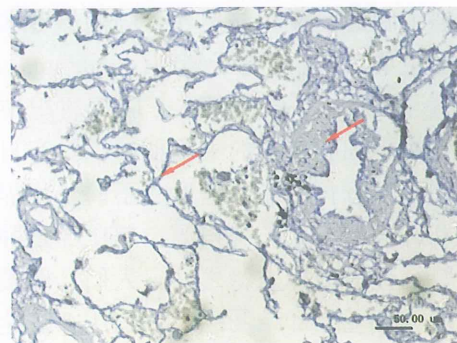


图 2 支气管上皮和肺泡组织 CD133 免疫组化染色癌细胞浆呈阴性表达

Fig.2 Negative expression of CD133 detected by immunohistochemical staining in bronchus epithelium and pulmonary alveolus tissue ($\times 200$)

表 1 CD133 的表达与手术切除的 NSCLC 的临床特点和预后的关系

Table 1 Relation of expression of CD133 with NSCLC clinical characteristic and prognosis after operation

Group	N (%)	mid-live time (month)	3-year survival rate (%)	χ^2	P
Smoking index				0.914	0.339
≤ 400	48(62.34)	19	27.1(13/48)		
>400	29(37.66)	18	41.4(12/29)		
Gender				3.437	0.064
Male	57(74.03)	14	28.1(16/57)		
Female	20(25.97)	27	45.0 (9/20)		
Age				0.636	0.425
≤ 60	34(44.16)	18	26.5 (9/34)		
>60	43(55.84)	20	37.2(16/27)		
Peural effusion				9.800	0.002
No	71(92.21)	21	35.2(25/71)		
Yes	6(7.79)	6	0		
P-T stage				9.810	0.011
T1	22(28.57)	24	50.0(11/22)		
T2	35(45.45)	21	34.3(12/35)		
T3	20(25.97)	9	10.0 (2/20)		
P-N stage				8.298	0.016
N0	38(49.35)	27	47.4(18/38)		
N1	23(29.87)	18	21.7 (5/23)		
N2	16(20.78)	9	12.5 (2/16)		
Histological type				19.017	0.001
SC ¹⁾	25(32.47)	20	36.0 (9/25)		
AC ²⁾	40(51.95)	19	30.0(12/40)		
ACC ³⁾	7(9.09)	39	57.1 (4/7)		
MNC ⁴⁾	4(5.19)	4	0		
MC ⁵⁾	1(1.30)	4	0		
Cell differentiation				1.270	0.529
Well	35(45.45)	23	34.3(12/35)		
Moderately	15(19.48)	17	40.0 (6/15)		
Poorly	27(35.06)	13	25.9 (7/27)		
CD133				11.983	0.001
Negative	37(32.47)	37	51.4(19/37)		
Positive	40(67.53)	10	15.0 (6/40)		

1) squamous carcinoma; 2) adenocarcinoma; 3) alveolar cell carcinoma; 4) megacell undifferentiated carcinoma; 5) mucoepidermoid carcinoma

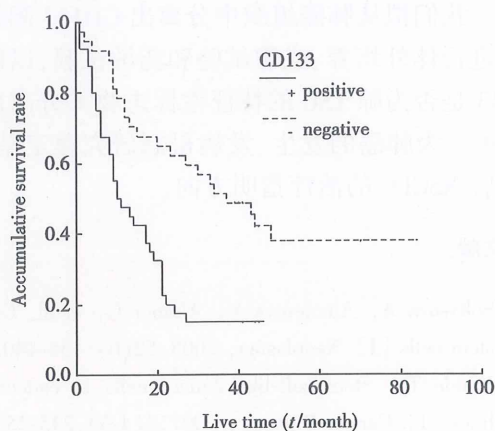


图 3 NSCLC 癌组织中 CD133 的表达与患者术后生存期的关系

Fig.3 Relationship between expression of CD133 and the patients' survival time after operation

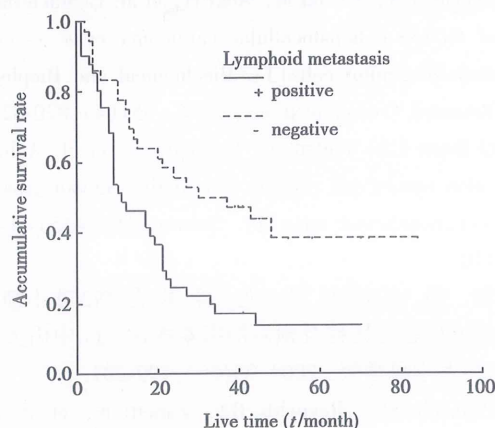


图 4 NSCLC 淋巴结转移与患者术后生存期的关系

Fig.4 Relationship between lymphoid metastasis and the patients' survival time after operation of NSCLC

2.4 影响预后的多因素分析

经 COX 多因素生存率分析, 肿瘤病理类型和 CD133 阳性表达是影响 NSCLC 患者预后的独立因素 ($P < 0.05$, 表 3)。

3 讨论

肺癌细胞的侵袭转移是导致肺癌患者术后预后的不良的主要因素^[6]。人们对肺癌发生及发展机制已探索多年, 但由于肿瘤病因复杂、具体发病机制不明, 缺乏有针对性的治疗手段, 患者的长期生存率无明显改善。传统理论认为肿瘤生长是所有肿瘤细胞一起增殖的结果, 因而治疗方法主要是针对肿瘤组织内的大多数细胞, 结果常因肿

表 2 CD133 与 NSCLC 临床病理指标的关系

Table 2 Relation of expression of CD133 with clinical pathological marks

Group	n	CD133		P
		-	+	
Tumor size ($\bar{x} \pm s$, cm)		4.2 ± 2.2	4.6 ± 2.5	> 0.05
Histological type				
SC ¹⁾	25	11	14	> 0.05
AC ²⁾	40	20	20	
ACC ³⁾	7	5	2	
MNC ⁴⁾	4	0	4	
MC ⁵⁾	1	1	0	
Cell differentiation				
Well	35	19	16	> 0.05
Moderately	15	6	9	
Poorly	27	12	15	
Lymph node metastasis				
No	38	23	15	< 0.05
Yes	39	15	25	

1) squamous carcinoma; 2) adenocarcinoma; 3) alveolar cell carcinoma; 4) megacell undifferentiated carcinoma; 5) mucoepidermoid carcinoma

表 3 COX 多因素生存率分析

Table 3 COX multivariate survival rate analysis

Group	Relative Risk	95% Confidence Interval		P
		Lower	Upper	
Age	0.991	0.962	1.020	0.537
Gender	0.494	0.235	1.040	0.063
Histological type	1.518	1.080	2.134	0.016
Cell differentiation	1.234	0.871	1.748	0.237
CD133	2.401	1.315	4.386	0.004
Smoking index	0.668	0.353	1.265	0.216
P-T stage	1.585	0.930	2.701	0.091
P-N stage	0.795	0.394	1.605	0.522

瘤转移和复发使治疗失败。TSC 又称为癌干细胞 (cancer stem cell, CSC), 包括干细胞样细胞 (stem/like cells)、癌起始细胞 (cancer initiating cell, CIC)^[1] 和肿瘤起始细胞 (tumor initiating cells, TIC) 等^[7]。近年来 TSC 的发现、确认和特性的研究为揭示肿瘤发病机制, 乃至肿瘤靶向治疗提供了新线索。癌干细胞因具有自我更新和潜在的强增殖能力, 在肿瘤发生发展、复发转移中均发挥着很重要的作用; 肿瘤干细胞理论的提出对传统的肿瘤治疗方式提出了巨大挑战, 提示肿瘤治疗可靶向性杀死

肿瘤干细胞,使根治肿瘤和防止肿瘤复发和转移成为可能。

CD133 是传统的造血干细胞、血液肿瘤和内皮祖细胞的标志物^[8]。Sussman 等^[9]发现 CD133 表达阳性细胞与实体瘤的发生、发展有关。Atsushi Suetsugu 等^[4]从肝癌细胞株 Huh-7 中 CD133 阳性的细胞增殖能力比 CD133 阴性细胞强。临床工作中迄今报道的成瘤性最强的是脑瘤干细胞^[10],每只 NOD/SCID 小鼠接种 100 个 CD133 阳性肿瘤干细胞,结果在接种后 6 个月内形成肿瘤;而每只接种 1×10^5 个 CD133 阴性非肿瘤干细胞的小鼠在相同时间内未形成肿瘤。Catherine 等^[5]将结肠癌组织中的 CD133 阳性细胞移植到 NOD/SCID 小鼠肾被膜下,发现所有结肠癌 CIC 都是 CD133 阳性细胞而哪些 CD133 阴性细胞没有致瘤性。

2005 年 Kim 等^[11]成功在分离了支气管肺泡干细胞(bronchioalveolar stem cells, BASCs), BASCs 具有多向分化和自我更新能力,在培养过程 K-ras 基因可刺激 BASCs 扩增并产生肺腺癌细胞。这为肺癌肿瘤干细胞的存在提供了一定的证据;但该研究只说明来源于支气管的上皮干细胞可被诱导分化成恶性肿瘤细胞,并未直接从肺癌组织中分离出肺癌干细胞。且到目前为止国内外文献未见从人类肺癌组织中分离出肺癌干细胞的报到。Hilbe 等^[12]研究发现在 66 例 NSCLC 患者肿瘤组织中 43 例 CD133 阳性细胞增多,其中部分 CD133 阳性细胞呈管状排列,并得出 NSCLC 组织中的 CD133 阳性内皮祖细胞增多是促使肿瘤血管生成和肿瘤生长的原因之一的结论。

本研究发现肺癌标本中的 CD133 阳性表达与患者的淋巴转移和预后相关,即患者肺癌组织中的 CD133 表达阳性细胞越多,其肿瘤发生淋巴转移的可能性就越大,术后生存时间也就越短。提示肿瘤组织中 CD133 阳性细胞越多,肿瘤组织中含有的 TSC 就越多,手术后残留在患者体内的 TSC 也就较多;这些残留的 TSC 通过自我更新和多向分化,而发生肿瘤复发和转移。上述结果提示 CD133 可能就是肺癌干细胞的特导性表面标志物,且 Hilbe 等^[12]发现的 NSCLC 组织中的 CD133 阳性内皮祖细胞可能就是肺癌干细胞。

肿瘤干细胞标志物 CD133 表达与 NSCLC 的临床特征和预后的关系的发现为今后肺癌 TSC 特异性标志物的确定和肺癌 TSC 的分选提供了重要

线索。我们拟从肺癌组织中分离出 CD133 阳性细胞群进行体外培养、成瘤试验和药敏试验,以确定 CD133 是否为肺 TSC 的特征性标志物并分离出肺癌 TSC。为肺癌的发生、发病机制研究奠定基础,为今后 NSCLC 的治疗指明方向。

参考文献:

- [1] Soltysova A, Altanerova V, Altaner C, et al. Cancer stem cells [J]. *Neoplasma*, 2005, 52(6):435-440.
- [2] Kondo T. Stem cell-like cancer cells in cancer cell lines [J]. *Cancer Biomark*, 2007, 3(4-5):245-250.
- [3] Beier D, Hau P, Proescholdt M, et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(9):4010-4015.
- [4] Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, et al. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 351(4):820-824.
- [5] O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice [J]. *Nature*, 2007, 445(4):106-110.
- [6] 程超,谷力加,吴一龙,等.影响 PN2 非小细胞肺癌术后远处转移及预后的因素探讨 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2004, 25(3S):199-201.
- [7] Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells [J]. *Nature*, 2006, 444(7120):687-688.
- [8] 郭再玉,姜晓丹,徐如祥,等.骨髓基质细胞源性神经干细胞体外分化及电生理特性的研究 [J]. *中华神经医学杂志*, 2005, 4(6):545-550.
- [9] Sussman LK, Upalakalin JN, Roberts MJ, et al. Blood markers for vasculogenesis increase with tumor progression in patients with breast carcinoma [J]. *Cancer Biol Ther*, 2003, 2(3):255-256.
- [10] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells [J]. *Nature*, 2004, 432(7015):396-401.
- [11] Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer [J]. *Cell*, 2005, 121(6):823-835.
- [12] Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F, et al. CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer [J]. *J Clin Pathol*, 2004, 57(9):965-969.

(编辑 徐杰)