

结直肠癌 CD133⁺ 细胞定量评估的意义

缪 刚 李 尧 赵艳阳 黄美雄 韦军民

摘 要 **目的** 研究 CD133⁺ 结直肠癌干细胞与肿瘤增殖、转移的相关性。**方法** 取得术后新鲜的结直肠癌组织后,立刻进行清洗、消化、培养等过程,得到了具有活性的原代结直肠癌单细胞。特异性抗体 CD133 标记后运用流式细胞技术检测癌干细胞分布比例。癌组织同时进行免疫组化和分子生物学研究,确定增殖蛋白 Ki-67、抑制肿瘤转移相关蛋白 e-cadherin 和细胞凋亡相关蛋白 caspase-3 的表达。**结果** 结直肠癌原代细胞分离、纯化和检测技术简明可行,所得数据客观准确。研究病例按照 CD133⁺ 癌干细胞比例 $\geq 3\%$ 和 $< 3\%$ 分成两组。结果显示 CD133⁺ 癌干细胞 $\geq 3\%$ 组在肿瘤大小和淋巴转移有增大和增多趋势;肿瘤增殖特异性蛋白 Ki-67 增高具有显著性差异;抑制肿瘤转移相关蛋白 e-cadherin 的表达降低;凋亡相关蛋白 caspase-3 的表达降低。**结论** 本研究成功建立了一套可行性高的结直肠癌 CD133⁺ 干细胞准确定量评估系统。结直肠癌干细胞的准确定量检测可以作为评估患者预后和化疗敏感度的一项重要指标。本技术也为进一步提纯结直肠癌干细胞,并且最终研究对此靶点的攻击提供了平台。

关键词 结直肠癌 CD133 肝癌干细胞

Importance of Quantitative Evaluation of Colorectal Cancer CD133⁺ Cells. Miao Gang, Li Yao, Zhao Yanyang, Huang Meixiong, Wei Junmin. Department of Surgery, Beijing Hospital, Beijing University School of Medicine, Beijing 100730, China

Abstract Objective To precisely quantify the percentage of CD133⁺ cancer stem cells by isolation and purification of primary colorectal cancer cells, and to clarify its relationship with cancer proliferation and metastasis. **Methods** Primary colorectal cancer cells were obtained after washing, digesting and culturing fresh colorectal cancer tissues. Cancer stem cells were labeled with specific CD133 antibody and analyzed by flow cytometry. Cancer tissues were also tested using immunostaining and Western blotting to detect expression of proliferative marker Ki-67, invasion suppressor related protein e-cadherin, and apoptosis related protein caspase-3. **Results** Isolation, purification and precisely quantification of primary colorectal cancer stem cells were efficiently modified as feasible procedures. Patients were divided into two groups with percentage of CD133⁺ cancer stem cells $\geq 3\%$ or $< 3\%$. In the $\geq 3\%$ group, a increase of tumor size and lymphatic metastasis was observed, expression of the specific proliferation protein Ki-67 was significantly increased, production of the tumor metastasis suppressor protein e-cadherin and the apoptotic protein caspase-3 was decreased. **Conclusion** A precisely quantitative evaluation system of the primary colorectal cancer stem cells was feasibly established in our study. The system can be used as indicators of prognosis and sensibility to chemotherapy in colorectal cancer patients. The technique also functions as a platform in purification of colorectal cancer stem cells and cancer-stem-cell-targeted therapy in the future.

Key words Colorectal cancer; CD133; Tumor stem cell

越来越多的证据表明肿瘤中存在肿瘤干细胞(cancer stem cells),并且其与肿瘤的增殖、转移、复发和对化疗不敏感关系密切。CD133 被确认为最好的独立结直肠癌干细胞标志物,并且可以通过对结直肠癌 CD133⁺ 细胞表达来预测患者的生存期^[1]。这说明 CD133 不但可以在筛选肿瘤干细胞以及靶向性或选择性杀伤肿瘤干细胞中发挥重要作用,还可以成为

结直肠癌患者的一个重要预后指标。本研究取材于手术中切除的新鲜结直肠癌组织标本,提取具有活性的原代结直肠癌单细胞进行流式细胞分析。在准确定量评估后发现 CD133⁺ 结直肠癌干细胞的表达与肿瘤增殖能力和肿瘤转移相关蛋白的表达相关。这为临床结直肠癌干细胞的准确定量检验提供了方法和依据。

材料与方法

1. 肿瘤组织取材:结直肠癌组织直接来源于手术切取标本(术前经纤维结肠镜活检病理确认)。标本离体后迅速切开肠道,用 0.9% 生理盐水冲洗后切取肿瘤边缘约 1cm × 2cm 大小非坏死组织。癌组织经 5 次清洗液(青霉素 1mg/ml、卡那

基金项目:首都医学发展科研基金资助项目(2005-2052)

作者单位:100730 卫生部北京医院普外科(缪刚、李尧、黄美雄、韦军民);卫生部北京医院老年医学研究所(赵艳阳)

通讯作者:韦军民,电子信箱:weijunmin@263.net

霉素 0.5mg/ml、两性霉素 2.5 μ g/ml 的生理盐水)清洗后,放入 4℃ 保存液(5% FBS 的 DMEM, 抗生素剂量同清洗液)备用。相关操作程序经北京医院伦理委员会审核通过。

2. 原代结直肠癌细胞提取:肿瘤组织进入实验室无菌操作台。经细胞清洗液(Hanks 液, 抗生素剂量同前)清洗 3 次后将组织剪碎,然后用刀片将组织切至稠液状。将组织用 9ml 清洗液清洗收集入 50ml 离心管,加入 1% collagenase 1ml (type I, Invitrogen corporation)后放入 37℃ 培养箱震荡消化 60min。消化后组织液经清洗离心,然后用 60 目筛网滤过后再次收集离心。离心后组织与 10ml 培养液(10% FBS 的 DMEM/F12, 抗生素同前)混匀后放入 25cm² 细胞培养 Flask (collagen coated) 过夜培养。第 2 天将上清悬浮细胞液吸除,保留贴壁活性细胞。用 EGTA/Trypsin 液将贴壁细胞游离收集后过 120 目筛网。细胞经计数后备用。

3. 流式细胞计数:应用直接免疫荧光法检测细胞表面抗原。所用单克隆干、祖细胞单抗为 CD133 - PE。管中加入细胞 1 × 10⁶ 个/毫升,加入 20 μ l CD133 - PE 荧光抗体。避光孵育 20min 后,加 PBS 混悬。采用 FACScalibur (BD 公司, 美国)流式细胞仪,应用 CELL - Quest 软件,每管获取并分析 10⁵ 个细胞。

4. Western blotting:新鲜组织放入液态氮,研磨 6 ~ 8 次,直至细胞与生物重组基膜混合物粉碎融合。细胞裂解液包含 Tris 液(pH 值 7.4)、氯化钠液、1% 的蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂(roche applied science, 德国)的 NP - 40 的缓冲液。全细胞裂解液蛋白浓度测定使用 BCA 试剂盒(Pierce)。蛋白质通过 SDS - PAGE 电泳转移到聚偏氟乙烯膜(Millipore)。使用以下抗体:caspase - 3、e - cadherin 和 GAPDH (Sigma - Aldrich, 美国)。蛋白斑点随后与山葵过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (KPL, 美国)或抗兔抗山羊抗体(Santa Cruz)培养。蛋白质的 ECL 检测试剂盒的(Pierces)。

5. 免疫组化:将 10% 甲醛固定包埋的结直肠癌标本行 4 μ m 厚度连续切片,免疫组织化学方法采用非生物素二步法,常规免疫组织化学染色程序染色;其基本流程为:烤片 - 脱蜡和水化 - 抗原修复 - 免疫组织化学染色 - 复染、分化 - 封片 - 镜检、拍照。实验结果评估标准:用 PBS 代替一抗作阴性对照。由两位病理医师分别双盲阅片。结直肠癌组织中 P53 和 Ki - 67 阳性细胞数目判断方法如下:每张玻片均选择 10 个高倍视野;结果取 10 个视野的平均数。P53 按照 0 ~ 3 评分, Ki - 67 按占总细胞百分比量化比较。

6. 实验设计:按照流式细胞定量评估结果,将 CD133⁺ 肿瘤干细胞 < 3% 的病例分于 A 组, CD133⁺ 肿瘤干细胞 ≥ 3% 的病例分于 B 组。实验检测结果分别在 A、B 两组之间比较。

7. 统计学方法:运用不成对 *t* 检验, *P* ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 建立了具有可行性的原代结直肠癌单细胞提取体系:原代结直肠癌单细胞的提取需经过取材(图

1A)、消化过夜培养来确定贴壁的活性细胞(图 1B)、特异性染色(图 1C)和 EGTA/Trypsin 处理计数(图 1D)等几个步骤。方法保证了所提取的肿瘤细胞接近 100%, 并且具有活性。虽然取材后的新鲜癌组织可在 4℃ 保存液中保存 1 ~ 3 天, 当天取材后立即提取可得到最佳结果。一般手术取材多在中午或下午进行, 然后经过 2h 左右操作可培养过夜。第二天操作时间约 45min 可得到备用细胞。提取过程一人操作, 简明可行。

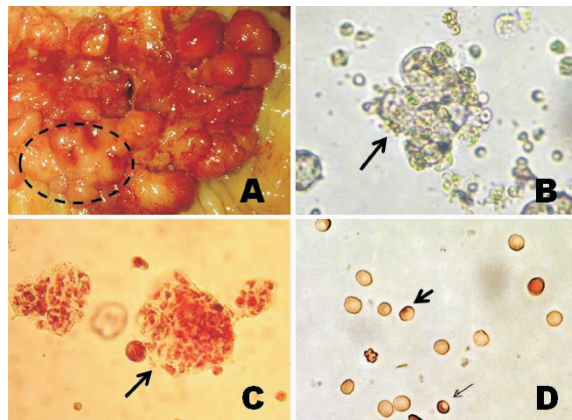


图 1 原代结直肠癌单细胞的提取过程

A. 术中新鲜肿瘤标本, 切取边缘非坏死区组织(虚线); B. 肿瘤消化过夜后的贴壁细胞团(箭头); C. 贴壁细胞经特异性染色确定为具有活性的肿瘤细胞团(箭头); D. 贴壁细胞经处理后镜下单细胞计数。可见肿瘤细胞(粗箭头)和少量红细胞(细箭头)。红细胞将在检测前被溶红细胞素去除(×200)

2. 准确定量评估癌组织中 CD133⁺ 肿瘤干细胞:因为 CD133 是造血干细胞表面标志蛋白, 研究首先将外周血单个核细胞作为参照对象和流式细胞仪单色设定参考(图 2A 和 B)。病例根据 CD133 检测结果被分为 A 组(CD133⁺ 细胞 < 3%) 和 B 组(CD133⁺ 细胞 ≥ 3%)。A 组 CD133⁺ 细胞平均为 1.7%, B 组 CD133⁺ 细胞平均为 7.7%; A 组平均肿瘤大小为 27cm³, B 组为 32cm³; A 组肠系膜淋巴转移平均为 0.7 个, B 组为 2.4 个; A 组肿瘤中 P53 平均表达为 1.8 分, B 组为 1.6 分(表 1)。

3. CD133 的表达与肿瘤增殖和转移相关: Ki - 67 是一种增殖抗原, 主要定位于细胞核, 与细胞周期密切相连, 在有丝分裂中起着维持 DNA 有规则结构的重要作用。肿瘤的增殖速度与预后密切相关。本研究中 B 组的 Ki - 67 平均表达为 74%, 比 A 组的平均表达 52% 显著增高(图 3), 说明 CD133⁺ 细胞增多的

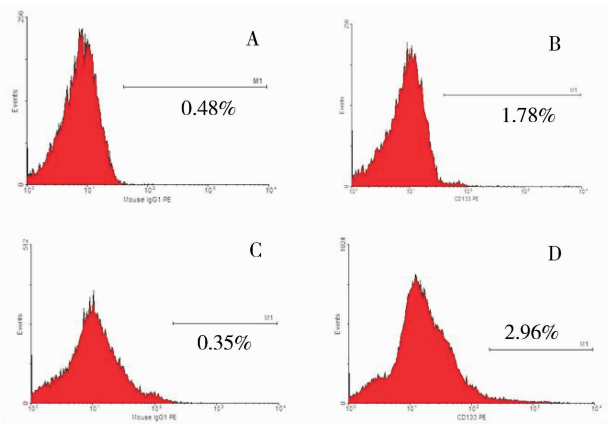


图 2 流式细胞计数评估系统的建立

A. 外周血单个核细胞阴性对照;B. 外周血单个核细胞 CD133⁺ 细胞;C. 原代结肠癌单细胞阴性对照;D. 原代结肠癌 CD133⁺ 细胞

表 1 两组病人情况比较

组别	病理	肿瘤直径 (cm)	CD133 (%)	淋巴转移 (个)	P53 表达 (分)
A 组	腺癌	5.3 ± 2.8	1.7 ± 0.8	0.7 ± 1.2	1.8 ± 1.3
B 组	腺癌	6.8 ± 4.4	7.7 ± 3.9	2.4 ± 3.2	1.6 ± 1.2

研究将病例分为 A 组 (CD133⁺ 细胞 < 3%, n = 15) 和 B 组 (CD133⁺ 细胞 ≥ 3%, n = 8) 两组。分别比较了两组病例的病理、肿瘤直径、CD133⁺ 细胞比例、肿瘤周围淋巴结转移和 P53 表达情况

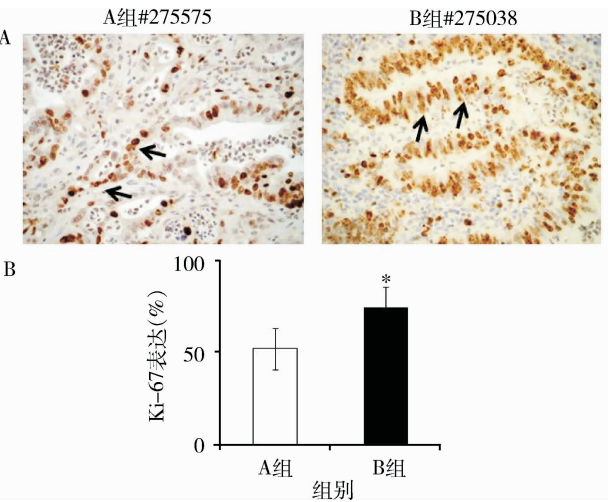


图 3 用免疫染色方法比较了两组病例 Ki-67 的表达

A. 显示 A 组代表性 Ki-67 表达比 B 组降低 (箭头);B. 两组 Ki-67 量化比较 B 组表达显著性增高 (P < 0.05, ×200)

癌组织中肿瘤活性也增加了。e-cadherin 在多数上皮细胞中有表达。作为一种与抑制肿瘤侵犯和转移相关的蛋白,e-cadherin 在多数癌组织中表达下降。本研究中 A 组 e-cadherin 表达较 B 组增高,细胞凋

亡相关蛋白 caspase-3 的表达在 A 组中增高(图 4),这些说明 CD133⁺ 细胞增多的癌组织中抑制癌转移的蛋白表达下降,细胞凋亡相关蛋白也下降了。本研究还检测了正常结肠黏膜中 CD133⁺ 细胞的比例。原代正常黏膜上皮细胞 CD133⁺ 细胞为 0.82% ± 0.64% (n = 8),比癌细胞低 (3.06% ± 2.65%, n = 22, P < 0.05)。

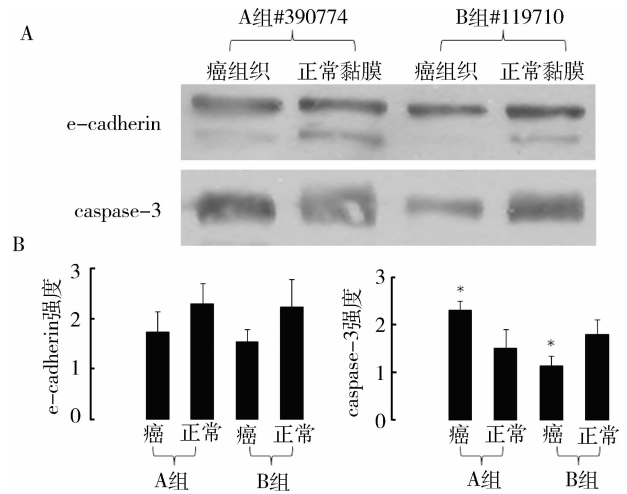


图 4 用 Western blotting 方法比较了两组 e-cadherin 和 caspase-3 在癌组织和正常黏膜的表达

A. 为代表性组织表达;B. 为数据定量分析 (n = 5)。图中显示 A 组代表性癌组织 e-cadherin 表达比 B 组增多;这两组的数据统计学分析。caspase-3 较 B 组表达量显著性升高 (* P < 0.05)。与正常黏膜相比,e-cadherin 的表达在 A、B 组中均降低

讨 论

CD133 作为肿瘤中干细胞最重要的标志物已经多次被证实是结肠直肠癌的一个预后指标,CD133 表达率越高预示着患者的预后越差^[1-5]。作为一种准确而重要的评估方法,本研究首次提出直接从肿瘤中提取新鲜组织分离细胞,然后用流式细胞计数检测得到 CD133⁺ 细胞在肿瘤中的精确比例。这种方法与常规 CD133 免疫组化得到的结论会有很大的差别^[2,3,6]。免疫组化染色的优点是可以明确 CD133⁺ 细胞在肿瘤中的定位。有报道显示 CD133⁺ 肿瘤细胞并没有均匀分散在癌巢中,而是形成所谓的“热点”,即 CD133⁺ 肿瘤细胞通常聚集在一个癌巢或相邻的几个癌巢^[4]。而同一张切片另外一些癌巢 CD133⁺ 肿瘤细胞只有少数几个或是根本没有。因此,CD133⁺ 肿瘤细胞所占的比例很难通过若干张切片而准确得出。本研究的方法是直接从肿瘤组织中提取原代新鲜细胞,这样即可以保证所检测的细胞 100% 为肿瘤细胞,又可以避免因为 CD133⁺ 肿瘤细胞分布差异而造

成的评估误差。

值得注意的是,CD133⁺肿瘤细胞≥3%的B组在肿瘤大小和淋巴结转移个数上都比CD133⁺肿瘤细胞<3%的A组高。虽然研究的病例有限(23例),但是表明了CD133⁺肿瘤细胞与不良预后相关的趋势。尤其是在Ki-67肿瘤增殖标志物的比较中显示CD133⁺细胞≥3%的结直肠癌增殖显著性增高(图3)。研究显示在胃腺癌中,CD133⁺细胞的表达与Ki-67的表达正相关,并且预示着胃癌的最差预后^[7]。CD133的表达还与肿瘤的大小和侵犯深度有关,这些都与本研究结果相符。CD133的表达与较短的生存期相关,这提示了CD133⁺肿瘤细胞相关数据对患者的预后意义重大^[3]。基于癌干细胞假设,癌干细胞在常规治疗后可能会通过自身更新和分化导致肿瘤的复发和转移^[8,9]。

虽然结直肠癌组织中CD133⁺细胞是否全部为肿瘤干细胞仍需要更深入的研究^[10],但是有证据显示结肠癌组织CD133⁺细胞移植于裸鼠后具有更高的成瘤率^[11]。Todaro等^[12]将新鲜分离出的结直肠癌细胞注入裸鼠的皮下,发现其均可形成皮下肿瘤。然而通过免疫磁珠的方法将相同细胞中的CD133⁺细胞彻底去除后,则发现肿瘤的形成明显减少。将少量的纯化结直肠癌CD133⁺细胞注入裸鼠中即可形成皮下肿瘤。这些研究表明CD133⁺细胞是结直肠癌组织中具有肿瘤干细胞特性的亚群,对结直肠癌的形成、生长和转移起决定性作用。因此,检测CD133⁺细胞的量化比例是目前评估结直肠癌干细胞的有效方法之一。

本研究还揭示了结直肠癌中CD133的表达与抑制肿瘤侵犯相关蛋白e-cadherin的关系。在本研究CD133表达量高的结直肠癌中e-cadherin表达有下降的趋势,说明CD133在结直肠癌中的表达可能与肿瘤的侵犯和转移相关。另外,本研究显示CD133表达量高的结直肠癌中caspase-3的表达下降,说明了肿瘤细胞凋亡的减少,这与之之前Ki-67增殖相关蛋白在结直肠癌中的表达规律相符。总之,CD133⁺结直肠癌干细胞的存在比例很可能预示着肿瘤的活性与侵犯和转移能力,这进一步说明了准确定量评估

CD133⁺结直肠癌干细胞的重要性。

综上所述,本研究成功建立了一套具有可行性的原代结直肠癌干细胞准确定量评估系统。结直肠癌干细胞的准确定量检测可以作为评估患者预后和化疗敏感度的一项重要指标。本技术也为肿瘤细胞化疗药物敏感试验,进一步提纯结直肠癌干细胞,和最终研究对癌干细胞靶点的攻击提供了平台。

参考文献

- Horst D, Kriegl L, Engel J, *et al.* Prognostic significance of the cancer stem cell markers CD133, CD44, and CD166 in colorectal cancer [J]. *Cancer Invest*, 2009, 27(8): 844 - 850
- 尚立娜, 杨爱军, 王晨昱, 等. 结直肠癌中CD133的表达与血管成相关性的研究[J]. *肿瘤*, 2010, 30(6): 524 - 528
- 何向辉, 罗宇东, 卢兰涛, 等. 结直肠癌组织CD133的表达及其意义[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2010, 15(2): 120 - 123
- Horst D, Kriegl L, Engel J, *et al.* CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer[J]. *British Journal of Cancer*, 2008, 99: 1285 - 1289
- 李宝秀, 张晓实, 刘国龙. CD133在局部晚期结直肠癌肿瘤细胞中的异常表达及意义[J]. *广东医学*, 2010, 31(13): 1678 - 1681
- Takahashi S, Kamiyama T, Tomaru U, *et al.* Frequency and pattern of the stem cell marker CD133 have strong prognostic effect on the surgical outcome of colorectal cancer patients[J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(5): 1201 - 1212
- Zhao P, Li Y, Lu Y, *et al.* Aberrant expression of CD133 protein correlates with Ki-67 expression and is a prognostic marker in gastric adenocarcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 218 - 224
- Ieta K, Tanaka F, Haraguchi N, *et al.* Biological and genetic characteristics of tumor-initiating cells in colon cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15: 638 - 648
- Verneulen L, Todaro M, de Sousa Mello F, *et al.* Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 13427 - 13432
- Labarge MA, Bissell MJ. Is CD133 a marker of metastatic colon cancer stem cells? [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(6): 2021 - 2024
- O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, *et al.* A human colon cancer cell capable of initiating tumor growth in immunodeficient mice[J]. *Nature*, 2007, 445(4): 106 - 110
- Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, *et al.* Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4[J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(4): 389 - 402

(收稿: 2011-07-04)

(修回: 2012-04-06)