

CD133、TROP-2 在非小细胞肺癌中的表达及相关性研究初探

顾宇平¹,朱一蓓²,张光波²,赵云根³,黄建安¹

(¹苏州大学附属第一医院呼吸科,²临床免疫实验室,江苏 苏州 215007;³常熟市第二人民医院呼吸科,江苏 常熟 215500)

[摘要] 目的:探讨肿瘤干细胞标志物 CD133、人滋养层细胞表面抗原-2(trophoblast cell-surface antigens 2, TROP-2)在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中的表达及意义。方法:用免疫组化、免疫荧光法检测 CD133、TROP-2 在 NSCLC 中的表达,激光共聚焦显微镜观察其定位和共定位。结果:①CD133、TROP-2 在 NSCLC 组织中的阳性表达率分别为 30.00% 和 41.25%,均明显高于癌周正常肺组织及肺良性病变组织($P < 0.01$);②细胞分化程度越低,CD133 表达阳性率越高($P = 0.024$);③CD133、TROP-2 在有淋巴结转移组的阳性表达率高于无淋巴结转移组($P < 0.05$),TROP-2 的阳性表达率随着 TNM 分期的升高而升高($P < 0.05$);④CD133、TROP-2 在 NSCLC 中的表达具有密切相关性($P < 0.001$),且两种蛋白有共定位现象。结论:CD133、TROP-2 的阳性表达均与 NSCLC 的侵袭、转移密切相关,初步证实二者在 NSCLC 组织中存在共定位关系,CD133 联合 TROP-2 或许能成为 NSCLC 的肿瘤干细胞筛选标记物。

[关键词] 非小细胞肺癌;肿瘤干细胞;CD133;人滋养层细胞表面抗原-2

[中图分类号] R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)10-1396-05

The expression and correlation of CD133 and TROP-2 in NSCLC

GU Yu-ping¹, ZHU Yi-bei², ZHANG Guang-bo², ZHAO Yun-gen³, HUANG Jian-an¹

(¹Department of Respiratory Medicine, ²Laboratory of Clinical Immunology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215007; ³Department of Respiratory Medicine, the Second People's Hospital of Changshu, Changshu 215500, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and significance of cancer stem cell markers CD133 and TROP-2 in non-small cell lung carcinoma(NSCLC). **Methods:** The expression of CD133 and TROP-2 in NSCLC was detected by immunohistochemistry and double-labelling immunofluorescence. The location and the colocalization of the two proteins were observed under light microscope and confocal laser scanning microscope. **Results:** ①The expression rate of CD133 and TROP-2 were 30.0% and 41.25% in 80 NSCLC tissues respectively, which were significantly higher than that in the tumor-adjacent normal tissues or benign lesion tissues($P < 0.01$);②CD133-positive expression was significantly higher in poor differentiated tumor than that in the well differentiated tumor($P = 0.024$); ③ Positive expression of CD133 and TROP-2 in the lymph node metastasis group was significantly higher than that in the non-lymph node metastasis group ($P < 0.05$). The positive expression rate of TROP-2 increased with the increasing Tumor-Nodes-Metastasis (TNM) stage ($P < 0.05$). ④CD133 expression was correlated with TROP-2 expression ($P < 0.001$). And there was collocation between the CD133 and TROP-2 proteins. **Conclusion:** The expression CD133 and TROP-2 was associated with the invasion and metastasis of NSCLC. Their colocalization in NSCLC was detected preliminarily. CD133 and TROP-2 may be used as two important markers in judging the cancer stem cell of NSCLC.

[Key words] NSCLC; cancer stem cell; CD133; TROP-2

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(10): 1396-1400]

肺癌是世界范围内病死率最高的恶性肿瘤之一,也是我国常见的恶性肿瘤之一,其恶性程度高,发展迅速,治疗困难,总体疗效不理想。肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)是肿瘤组织中一小部分具有自我更新、无限增殖和多向分化能力的肿瘤细胞,是

肿瘤发生、发展、转移与复发的根源。CD133 是经典的肿瘤干细胞标志物之一,同时国外已有研究表明,一些高表达人滋养层细胞表面抗原-2(trophoblast cell-surface antigens 2, TROP-2)的肿瘤细胞往往也具有肿瘤干细胞特性,可以尝试用来作为某些肿瘤

干细胞的筛选标志^[1-3],它与肿瘤发生、发展、转移、侵袭的密切关系很可能与其具有的干细胞特性有关。目前关于 CD133、TROP-2 在非小细胞肺癌(non-small cell lung carcinoma, NSCLC) 中的表达相关性及其表达情况国内尚未见报道。

1 对象和方法

1.1 对象

收集 2005 年 10 月~2011 年 5 月在江苏省常熟市第二人民医院胸外科手术切除的 80 例非小细胞肺癌存档蜡块,所选标本均具完整的病理资料,术前均未经辅助放疗及化疗。因正常肺组织取材困难,取癌旁正常肺组织 13 例(取材于距肿瘤组织 5 cm 以上肺组织,经病理证实为正常肺组织),手术切除的 32 例肺良性病变组织(肺大泡、支气管扩张症、肺脓肿、炎性假瘤、慢性炎症病例)作为对照。

兔抗人 CD133 多抗(PL03-0395R, PLLabs 公司,加拿大),羊抗人 TROP-2 多抗(AF650, R&D 公司,美国)。即用型 SP 试剂盒及 DAB 显色剂(分别为 KIT-9720 及 DAB003,福州迈新生物技术开发有限公司)。免疫荧光抗体(杭州联科生物技术有限公司):FITC 标记的羊抗兔 IgG(70-GAR001)、TRITC 标记的兔抗羊 IgG(05-6160-03)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化

采用 SP 法,兔抗人 CD133 多克隆抗体、羊抗人 TROP-2 多克隆抗体分别为一抗,用自身对照作阳性对照,用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.2.2 阳性判断

参照 Kobayashi 等^[4]的方法,由 2 名病理科医生在对临床资料均不知情的背景下独立完成。高倍镜下观察,据染色阳性肿瘤细胞数所占百分比计分,阴性为 0 分,阳性细胞数 <10% 计 1 分,阳性细胞数 \geq 10%、<50% 计 2 分,阳性细胞数 \geq 50%、<80% 计 3 分,阳性细胞数 \geq 80% 计 4 分;染色强度按肿瘤细胞着色的深浅计分:无着色为 0 分,黄色为弱阳性计 1 分,浅棕色为中等阳性计 2 分,棕褐色为强阳性计 3 分;总分为 2 项评分之积(0~12 分),取总分 \geq 4 分为阳性表达。

1.2.3 免疫荧光双标记法

常规石蜡切片,脱蜡,梯度酒精水化至蒸馏水洗。切片入 pH6.0 柠檬酸缓冲液,高温、高压抗原修复。切片加入 CD133 特异性抗体(兔抗人抗体)与 TROP-2 特异性抗体(羊抗人抗体)的 1:1 混合液,

4℃过夜孵育后, PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。滴加 FITC 标记的抗兔二抗,室温孵育 30 min,继而 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min(避光)。滴加 TRITC 标记抗羊二抗,室温孵育 30 min,继而 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min(避光)。甘油封片,激光共聚焦显微镜观察、采图。PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.4 激光共聚焦显微镜观察方法

激光扫描共聚焦显微镜(LEICA SP5, LEICA 公司,德国)。FITC 激发波长为 488 nm(发绿色荧光),TRITC 激发波长为 594 nm(发橙红色荧光)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件对数据进行分析,采用卡方检验及趋势性卡方检验评估各临床病理参数与 CD133、TROP-2 表达的关系,以配对四格表资料 Pearson 卡方检验和列联系数作二种指标关联性分析。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CD133、TROP-2 蛋白的表达定位

CD133 的免疫组化阳性定位于胞膜和胞质中,免疫荧光染色主要定位于胞膜。免疫组化及免疫荧光染色均显示 TROP-2 阳性表达主要定位于胞膜。

2.2 CD133、TROP-2 蛋白在 NSCLC 癌组织、癌周正常肺组织、良性肺部病变组织中的表达

CD133、TROP-2 蛋白在正常肺及良性病变肺组织中不表达或低表达;在癌组织中可以看到出现较多的棕色或深棕色颗粒(图 1),显示 CD133、TROP-2 蛋白在 NSCLC 中表达明显增强。其中 CD133 的表达以肿瘤细胞游离缘明显,或呈散在、小簇分布。CD133 蛋白在癌周正常肺组织、肺良性病变组及 NSCLC 组表达阳性率分别为 8.33%(1/13)、6.25%(2/32)和 30.0%(24/80),3 组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。TROP-2 蛋白在癌周正常肺组织、肺良性病变组及 NSCLC 组表达阳性率分别为 8.33%(1/13)、9.38%(3/32)和 41.25%(33/80),3 组差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 CD133、TROP-2 蛋白的表达与 NSCLC 临床病理特征的关系

CD133 的表达与细胞分化程度有关($P = 0.024$),TROP-2 的表达与细胞分化程度相关性未达到统计学差异,但也有随着细胞分化程度越差而表达率越高的规律。有淋巴结转移的患者 CD133、TROP-2 的阳性表达率均高于无淋巴结转移的患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。TROP-2 的阳性表

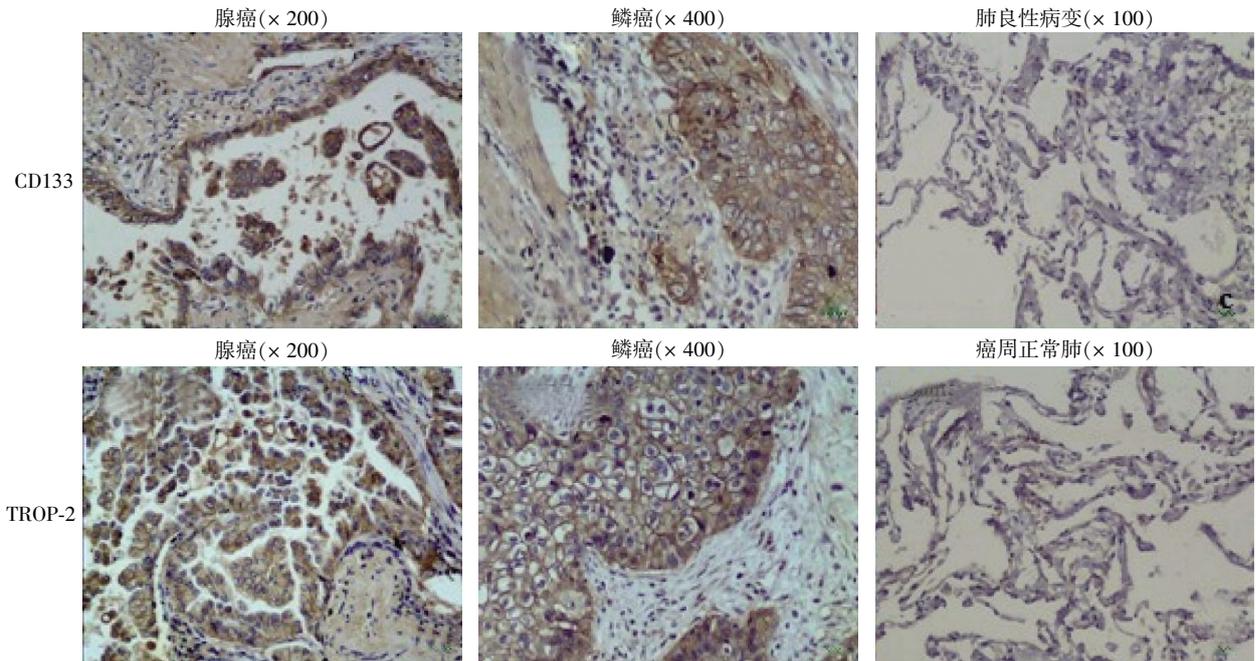


图 1 CD133 和 TROP-2 在 NSCLC 中的表达

Figure 1 Expression of CD133 and TROP-2 in NSCLC

达率随着 TNM 分期的升高而升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。CD133 在 TNM 分期上的表达差异虽未达到统计学意义 ($P = 0.055$), 但也表现为随着 TNM 分期的升高而升高。CD133、TROP-2 的表达均

与患者年龄、性别、病理类型无关 ($P > 0.05$, 表 1)。

2.4 CD133、TROP-2 蛋白表达的相关性

本研究 CD133 阳性表达组的 TROP-2 阳性率为 75%, 显著高于 CD133 阴性表达组的 TROP-2 阳

表 1 CD133、TROP-2 的表达水平与非小细胞肺癌临床病理特征的关系

Table 1 Relationship between CD133, TROP-2 expression and clinicopathological characteristics of non-small cell lung cancer (n)

	n	CD133		χ^2 值	P 值	TROP-2		χ^2 值	P 值
		+	-			+	-		
年龄									
≥ 55 岁	67	20	47	0.004	0.947	27	40	0.154	0.695
< 55 岁	13	4	9			6	7		
性别									
男	62	19	43	0.055	0.815	26	36	0.053	0.817
女	18	5	13			7	11		
病理类型									
SCC	42	15	27	1.375	0.241	18	24	0.094	0.759
ADC	38	9	29			15	23		
分化程度									
高	17	3	14	7.495	0.024	5	12	1.248	0.536
中	45	11	34			20	25		
低	18	10	8			8	10		
淋巴结转移									
N0	49	10	39	5.540	0.019	16	33	3.856	0.049
N1-3	31	14	17			17	14		
TNM 分期									
I	36	6	30	5.805	0.055	9	27	7.287	0.026
II	19	7	12			11	8		
III	25	11	14			13	12		

性率 26.8%,卡方检验提示差异具有统计学意义($P < 0.001$)。进一步计算 Pearson 列联系数 $C = 0.41$,说明在 NSCLC 中 CD133 和 TROP-2 蛋白的表达呈正相关关系(表 2)。

2.5 CD133、TROP-2 蛋白免疫荧光双标染色及激光共聚焦显微镜观察

镜下见绿色荧光 (FITC) 显示肺癌组织中的 CD133,红色荧光(TRITC)显示肺癌组织中的 TROP-2,二种荧光均主要定位于胞膜。黄色荧光显示 CD133 与 TROP-2 在 NSCLC 中存在共定位关系。本研究中同时表达 CD133 和 TROP-2 的 18 例均存在

表 2 肺癌组织 CD133 与 TROP-2 蛋白表达的相关性
Table 2 Relationship between CD133 and TROP-2 expression in non-small cell lung cancer tissues (n)

CD133	TROP-2		合计
	+	-	
+	18	6	24
-	15	41	56
合计	33	47	80

Pearson $X^2 = 16.115, P = 5.96E-05$ 。

两种蛋白表达的共定位现象 (绿色荧光和红色荧光呈部分或全部重叠,图 2)。

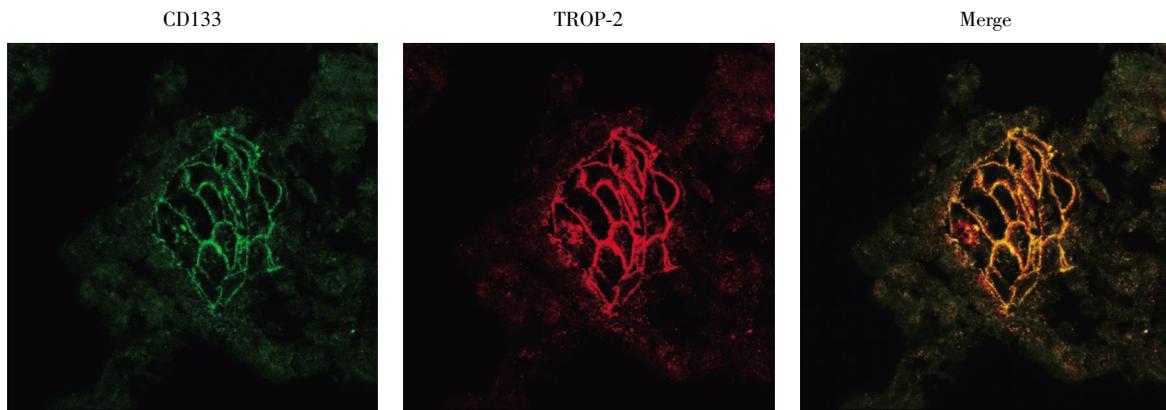


图 2 NSCLC 中 CD133 与 TROP-2 共定位的免疫荧光检测(激光共聚焦显微镜)

Figure 2 Colocalization of CD133(green) and TROP-2(red) in NSCLC(confocal laser scanning microscope)

3 讨论

肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC) 是肿瘤组织中一小部分具有自我更新、无限增殖和多向分化能力的肿瘤细胞,是肿瘤发生、发展、转移与复发的根源。肿瘤干细胞理论促使我们重新审视肿瘤起源、发生发展和肿瘤治疗抗药性的原因,为肿瘤的早期诊断、治疗及判断预后提供新的方法和思路。而如何寻找和鉴定特异性的 CSC 标记物,如何识别肿瘤组织中的 CSC,是 CSC 靶向治疗的关键。有研究指出,CSC 相关标记物的表达与不同类型肺癌的更高分期和更高分级有关;另外,一些 CSC 相关标记物如胚胎基因,或多种标记物的联合表达,可能有助于更好地诊断肺癌^[5]。

最初认为,CD133 是特异性表达于 CD34⁺造血干/祖细胞表面的一种跨膜糖蛋白,故曾被广泛应用于分析和分离纯化造血祖细胞^[6]。近年研究表明,人类 CD133 在某些上皮细胞亦有表达,2007 年 Eramo 等^[7]发现在人的肺癌组织中存在一群 CD133⁺的细胞具有自我更新、多向分化潜能,同时又具有恶性肿瘤

细胞的特征,故被命名为肺癌干细胞。同时 CD133-2/AC141 曾被证实是人滋养层细胞新的细胞标志^[8],因此可能与 TROP-2 存在某种联系。

TROP-2 亦称为 TACSTD2、EGP-1、MIS1、GA733-1,是 GA733 基因家族的一员,可由正常人体的孕期滋养母细胞 (胚泡外层形成的细胞——受精卵和胚胎中间的一个阶段,是发育中的上皮细胞)表达,故又被视为一种胚胎干细胞基因。近年来,TROP-2 被认为是一种肿瘤相关抗原,已证实 TROP-2 在前列腺癌、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌等许多实体肿瘤中高表达^[9-12]。TROP-2 是一种单次跨膜细胞表面糖蛋白,与细胞内钙离子浓度的调控有关,是细胞膜钙离子通道相关蛋白,所以又称被为肿瘤相关钙信号转导蛋白-2 (tumor-associated calcium signal transducer-2, TACSTD2)。同时,TROP-2 与磷酸激酶 C(PKC)和细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)有关^[13],具有调节肿瘤细胞生长、促进肿瘤细胞侵袭和转移的作用。

TROP-2 在肺癌中的分布及其与 CD133 的相关性意义目前国内暂未有类似研究。本研究通过免疫

组化方法,检测了 CD133、TROP-2 在 NSCLC 中的表达,并探讨其与肺癌患者年龄、性别、组织类型、分化程度和淋巴结转移情况以及 TNM 分期的关系,从而进一步探讨 CD133、TROP-2 在 NSCLC 中的临床意义。本研究发现 CD133、TROP-2 在 NSCLC 癌组织中有较高阳性表达率,表达率显著高于癌周正常肺组织和良性肺部病变组织。通过进一步分析发现 CD133、TROP-2 在 NSCLC 中的表达与年龄、性别、组织类型无关。CD133、TROP-2 在有淋巴结转移组的阳性表达率高于无淋巴结转移组,不同 TNM 分期中 CD133、TROP-2 的阳性表达率随着分期的升高而升高,提示 CD133、TROP-2 可以作为评估肿瘤侵袭性的标志物,可能与 NSCLC 的发生、发展密切相关。其中,CD133 的表达阳性率与细胞分化程度(即肿瘤组织分级)密切相关,表现为分化程度越低 CD133 表达阳性率越高,统计学有显著性差异($P = 0.024$),此特征与干细胞特征相符。TROP-2 在细胞分化上的表达差异虽未达到统计学意义,但也存在细胞分化程度越低表达率越高的现象。

尤其引起注意的是,本研究显示 CD133 和 TROP-2 在 NSCLC 中的表达具有极其密切的相关性($P < 0.001$),并进一步通过免疫荧光双染色及激光共聚焦显微镜观察证实:用于标记 CD133 的绿色荧光和用于标记 TROP-2 的红色荧光在 NSCLC 组织中的表达高度一致,均主要分布于细胞膜并可出现重叠分布,在图像叠加后可出现大部分甚至完全重叠的黄色荧光,表明这两种细胞标记物存在共定位现象。

本研究显示 CD133、TROP-2 在 NSCLC 中存在较高阳性表达,二种蛋白表达存在密切相关性,同时二者在 NSCLC 组织中的表达存在共定位现象,提示二者可能在功能上存在一定相关性,有相互作用的可能。CD133、TROP-2 在 NSCLC 中的表达及其相关性是否对肺癌干细胞的探索带来一定帮助,尚需进一步深入研究来揭示。

[参考文献]

[1] Trerotola M, Rathore S, Goel HL, et al. CD133, Trop-2 and

$\alpha 2\beta 1$ integrin surface receptors as markers of putative human prostate cancer stem cells [J]. *Am J Transl Res*, 2010, 2(2): 135-144

- [2] Taylor RA, Toivanen R, Risbridger GP, et al. Stem cells in prostate cancer: treating the root of the problem [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2010, 17(4): 273-285
- [3] 吕刚, 卫立辛, 蒲永东, 等. 不同来源肝干细胞的分选方法[J]. *中国现代普通外科进展*, 2010, 13(4): 293-295
- [4] Kobayashi H, Minami Y, Anami Y, et al. Expression of the GA733 gene family and its relationship to prognosis in pulmonary adenocarcinoma [J]. *Virchows Arch*, 2010, 457(1): 69-76
- [5] 洪暄, 陈国涵, 刘中民. 肺癌干细胞研究进展[J]. *中华胸心血管外科杂志*, 2011, 27(6): 380-382
- [6] Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells [J]. *Blood*, 1997, 90(12): 5002-5012
- [7] Eramo A, Lotti F, Sette G, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(3): 504-514
- [8] 杜美蓉, 李大金, 王明雁, 等. CD133-2/AC141——一种滋养层细胞新的细胞内标志[J]. *生殖医学杂志*, 2004, 13(6): 360-364
- [9] Coldren CD, Helfrich BA, Witta SE, et al. Baseline gene expression predicts sensitivity to gefitinib in nonsmall cell lung cancer cell lines [J]. *Mol Cancer Res*, 2006, 4(8): 521-528
- [10] Wang J, Day R, Dong Y, et al. Identification of TROP-2 as an oncogene and an attractive therapeutic target in colon cancers [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(2): 280-285
- [11] Mühlmann G, Spizzo G, Gostner J, et al. TROP2 expression as prognostic marker for gastric carcinoma [J]. *J Clin Pathol*, 2009, 62(2): 152-158
- [12] Neagu M, Constantin C, Tanase C, et al. Patented biomarker panels in early detection of cancer [J]. *Recent Patents on Biomarkers*, 2011, 1(1): 10-24
- [13] Guerra E, Trerotola M, Dell'Arciprete R, et al. A bicistronic CYCLIN D1-TROP2 mRNA chimera demonstrates a novel oncogenic mechanism in human cancer [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(19): 8113-8121

[收稿日期] 2012-04-09