临床研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0076-03

CD133 在膀胱移行细胞癌的表达及临床意义

李 瑞,唐 伟
(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究 CD133 在膀胱移行细胞癌(Transitional cell carcinoma of bladder,TCCB)中的表达,并探讨其在膀胱移行细胞癌发生发展中的作用。方法:采用半定量 RT-PCR 及免疫组织化学 S-P 法方法检测 50 例膀胱癌组织及 43 例癌旁正常组织中 CD133 的表达。结果:50 例膀胱移行细胞癌中,CD133 蛋白阳性表达率为 78%(39/50),CD133 mRNA 阳性表达率为 84%(42/50);43 例癌旁组织中 CD133 蛋白阳性表达率为 16.28%(7/43),CD133 mRNA 表达阳性率为 13.95%(6/43),CD133 蛋白和 mRNA 在癌组织和癌旁正常膀胱组织表达有显著差异($P<0.01$)。临床病理资料的相关性分析显示,膀胱移行细胞癌中,CD133 mRNA 和蛋白的表达分布与性别无关($P>0.05$,)与病理分级、分化程度等相关($P<0.05$)。结论:CD133 在膀胱癌中的表达明显高于在癌旁组织中的表达;CD133 在膀胱移行细胞癌中的表达与性别无相关性,与病理分级、临床分期有无淋巴结转移等相关;CD133 有望成为判断膀胱移行细胞癌的病情发展及指导临床治疗的有用指标。

【关键词】CD133;膀胱肿瘤;肿瘤干细胞;免疫组织化学;逆转录聚合酶链反应
【中国图书分类法分类号】R737 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-09-03

Expression of CD133 in bladder cancer and their clinical significance

LI Rui, et al
(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expressions of CD133 in bladder cancer and elucidate the role of CD133 protein and mRNA in the development of human bladder transitional cell carcinoma (TCCB). *Methods*: The expression of CD133 in 50 cases of human TCCB tissue and 43 cases of adjacent normal bladder tissue were detected by Immunohistochemistry S-P and Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), respectively. The correlation was analysed statistically, between the expression of CD133 protein and mRNA and clinicopathological parameters of human TCCB. *Results*: The positive rate of CD133 protein and mRNA in malignant specimens was 78.0% (39/50) and 84% (42/50), respectively, while that in the adjacent normal bladder tissue was 16.28% (7/43) and 13.95%(6/43), respectively. The expression of CD133 protein and mRNA was significantly different between TCCB tissue and adjacent normal bladder tissue ($P<0.01$). The further statistical analysis showed that the CD133 protein and mRNA expression was correlated to the pathology grades of BTCC ($P<0.05$), but had no correlation to the sex of TCCB ($P>0.05$). *Conclusion*: Different expression of CD133 gene is correlated to invasion and metastasis of TCCB.CD133 may be one of the markers for assessment of the progress of the cancer and clinical prognosis for TCBB.

【Key words】Bladder neoplasms; CD133; Immunohistochemistry; Reverse transcriptase polymerase chain reaction

CD133 是一种分子质量为 120 kD 的跨膜蛋白,最初被认为是造血干细胞标志物,后发现正常的非淋巴造血组织中也可以检测到 CD133 mRNA 的转录本[1]。目前 CD133 主要用于各种恶性肿瘤癌干细胞的研究,但在膀胱癌中少见报道。本研究应用半定量 RT-PCR 及免疫组织化学方法在蛋白质水平检测膀胱癌中 CD133 的表达情况,并探讨其与膀胱癌生物学行为的关系以及可能的临床应用。

作者介绍:李 瑞(1982-),男,硕士,
研究方向:泌尿系肿瘤。
通讯作者:唐 伟,男,教授,E-mail:2060tanwei@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 标本来源

取 2007 年 2 月 ~ 2008 年 12 月重庆医科大学附属第一医院泌尿外科膀胱肿瘤开放手术切除标本(病变较表浅行 TURBT 术或膀胱镜检取活检的标本因尽量避免外界操作对标本的影响而未采用),共 50 例,其中男性 39 例,女性 11 例。年龄 45 ~ 78 岁,平均 56.5 岁。术后经病理证实均为膀胱移行细胞癌。病理分级Ⅰ级 17 例,Ⅱ级 16 例,Ⅲ级 17 例。43 例癌旁组织标本取自远离肿瘤 5 cm 以上,术后病理检查证

实均为正常膀胱移行上皮组织。手术切除标本后,迅速置入液氮中,再转入 -80℃保存。

1.2 实验试剂

本实验所用 PCR 引物均由上海英骏生物技术公司合成。Taq 酶、DNaseI(RNase free)购自 TaKaRa 公司,RNA 提取试剂 Tripure reagent 为 ROCHE 公司产品,M-Mulv Reverse Transcriptase 购自 Promega 公司,其余均为国产分析纯试剂。

1.3 实验方法

1.3.1 组织免疫化学 组织用 4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋、切片,切片厚 4 ~ 5 μm。免疫组织化学采用链霉素抗生物素一过氧化物酶(SP)法,简述如下:切片脱蜡、水化。水浴法进行抗原修复,修复后的切片用 3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶活性。正常血清孵育,滴加 Oct4 多克隆抗体(工作浓度为 1:200),4℃过夜。二抗采用抗兔 SP 试剂盒。DAB 显色,苏木精复染,封片。PBS 代替一抗作为空白对照,正常膀胱癌旁组织作为阴性对照。光镜下观察,CD133 抗原阳性反应为位于细胞膜的棕黄色均匀细颗粒。随机选择 5 ~ 10 个高倍视野,计数 1 000 个瘤细胞中阳性染色细胞,阳性细胞率 =(阳性表达瘤细胞数 /1 000)× l00%,采用 HMIA,%2000 型全自动彩色图像分析系统进行平均吸光度分析。

1.3.2 RT-PCR

1.3.2.1 组织总 RNA 提取 在液氮速冻条件下将标本组织磨成粉末,趁液氮尚未挥发完时把组织粉末转移到 1.5 mlEP 管中。每 50 mg 组织中加 0.1 ml 的 Trizol 裂解液,其余按 Trizol 试剂盒说明书进行。

1.3.2.2 RT-PCR 方法 采用公司反转录试剂盒进行反转录,然后进行 PCR 扩增,PCR 反应体积为 50 μl。反应物及条件如下:CD133 上游引物:5'-GAGAAACCTGCGTAACTC-CATC-3',下游引物:5'-ACTCATGTTAGCTGCACTCCAA -3',产物长度:136 bp。内参照引物 β -Actin,上游引物:5'-CAA CTGGG ACGACATGGAG-3',下游引物:5'-CATCTGCTGGA AGGTGGAC-3',产物:835 bp。

应用 BIO-RAD PCR 扩增仪,CD133、human β -Actin -PCR 反应条件:94℃预变性 3 min;94℃ 30s,60℃ 30 s,72℃ 20 s;循环 35 周,72℃延伸 10 min。

1.4 结果判定

MARKER 采用 DL2000,与反应物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳 25min,经 BIO-RAD 数字化凝胶成像分析仪扫描成像,以出现条带为阳性表达,无明确条带形成为阴性表达(图 1)

1.5 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件分析各种因素与 CD133 表达的关系。计数资料比较采用 χ^2 检验。样本较小的病例采用 Fisher 精确概率法。$P \leq 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结 果

2.1 CD133 在肿瘤组织与癌旁组织中的表达(表 1)

RT-PCR 检测 CD133 在膀胱移行癌及癌旁组织中的表达,在 50 例膀胱移行细胞癌组织中 42 例有 CD133 表达,阳性率为 84%(42/50),在 43 例癌旁正常组织中有 9 例 CD133 表达,阳性率 13.95%(6/43),两者比较差异显著($P<0.05$)有统计学意义(图 1)。

免疫组化检测 CD133 在膀移行细胞癌和癌旁组织的阳性表达率分别为 84.38%(39/50)、16.28%(7/43),两者比较差异有显著性($P<0.05$)有统计学意义(图 2)。

2.2 CD133 表达与临床病理资料之间的关系(表 2)

免疫组化、RT-PCR 检测 CD133 得出表达与分期、癌细胞分化程度呈正相关,与性别、有无转移无明显相关性($P>0.05$)。其中低分化组与中分化组无明显差异($P>0.05$),高分化组与中分化组、低分化组都有显著差异性($P<0.05$)。

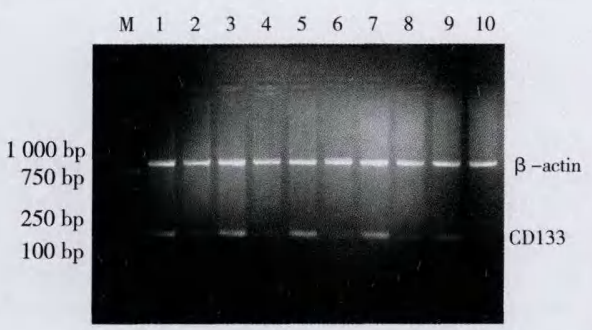


图 1 CD133mRNA 表达情况(1、3、5、7、9 为癌组织,2、4、6、8、10 为正常组织



图 2 膀胱癌(SP 染色 ×200)

表 1 CD133 在膀胱癌组织与癌旁组织中的表达

组别	总例数	CD133 蛋白表达		CD133 mRNA 表达	
		阳性	阴性	阳性	阴性
癌组织	50	39	11	42	8
癌旁组织	43	7	36	9	34

表 2 CD133 表达与临床病理资料之间的关系

组别		例数	CD133 蛋白表达			P 值	CD133mRNA 表达			P 值
			阳性	阴性	阳性率		阳性	阴性	阳性率	
性别	男	39	32	13	82%	P>0.05	30	9	76.9%	P>0.05
	女	11	8	3	72.7%		7	4	63.6%	
TNM 分期	Ta-T1	38	22	16	57.9%	P<0.05	24	14	63.1%	P<0.05
	T2-T4	12	11	1	100%		12	0	100%	
分化程度	高分化	8	2	6	25%	P<0.05	4	4	50%	P<0.05
	中分化	30	24	6	80%		26	4	86.7%	
	低分化	12	11	1	91.7%		10	2	83.3%	
淋巴结转	有	12	10	2	83.3%	P>0.05	9	3	75%	P>0.05
	无	38	30	8	78.9%		28	10	73.7%	

3 讨 论

100 多年前,病理学家发现肿瘤组织与胚胎组织之间存在相似性,提出了肿瘤来源于胚胎样组织的可能性。后来有人利用大鼠骨髓瘤细胞进行体外克隆培养发现仅 0.1% ~ 1%的细胞形成克隆细胞株,而不是所有的细胞都具有形成克隆的能力,从而提出了肿瘤干细胞理论。1994 年 Lapidot 等[2]首次在人急性粒细胞白血病细胞中分离出具有维持急性粒细胞白血病恶性显性能力的一组细胞,证明了白血病中肿瘤干细胞的存在。肿瘤干细胞(Tumor stem cell,TSC),又称癌干细胞,是指癌组织中一些较少的具有无限自我更新潜能并促使肿瘤形成的细胞。目前肿瘤的发病率不断增高,但治疗手段贫乏且不理想,多数得不到根治,许多患者因肿瘤复发或转移而死亡,肿瘤干细胞理论的提出无疑让我们看到了根治肿瘤的希望。而 CD133 是目前用于肿瘤干细胞研究的热点标志物之一。

CD133 是一种分子量为 120 kD 具有 5 个跨膜区的糖蛋白,在胞外形成 2 个大环结构,细胞质内形成 2 个小环结构,c 末端结构域在细胞质内[3]。它是一种早期抗原,可以促进新生血管的形成[4],参与信号传递[5]。最初该蛋白被命名为 AC133。2000 年,在英国举行的第 7 届国际人类白细胞分化抗原研讨会上被正式命名为 CD133。它是未成熟的造血干/祖细胞的标志,最近研究发现,CD133 作为一种干细胞标记物亦在人类白血病、脑肿瘤[6]、肺癌[7]、前列腺癌[8]、B16 黑色素瘤[9]、肝细胞癌[10]及胰腺癌[11]中表达和起作用。

本次试验研究得出,膀胱癌组织中存在 CD133 表达;膀胱癌组织中 CD133 的阳性表达明显高于膀胱癌旁组织表达,且随着肿瘤病理分级增高 CD133 的阳性表达也随着增高;低分化癌组织较高分化癌组织、有转移的癌组织较无转移的癌组织、多发癌组织较单发癌组织,CD133 的阳性表达为高。说明膀胱肿瘤组织中存在类似于肿瘤干细胞的细胞,而且与肿瘤分化程度、生长、转移复发密切相关。有学者在肠上皮肿瘤细胞中做过研究发现表明 CD133 一个显著特征就是随着细胞的分化其表达也随着迅速下调[12];在胃癌细胞中的研究表明 CD133 作为一种人类干细胞或祖细胞膜抗原可在肿瘤血管内皮祖细胞及间质干细胞中表达,而成熟血管内皮细胞和间质细胞则不表达[13,14](血管内皮祖细胞的活化参与肿瘤血管形成[15],间质干细胞调控肿瘤微环境[16])。上述研究与本次研究结果相吻合,反之我们推测若不抑制此类细胞的异常分化,将很难从根本上治愈肿瘤。

综上所述,随着膀胱癌肿瘤组织的生长、浸润、转移,CD133 的表达将越来越高,其高表达与膀胱肿瘤的生物性活动密切相关,我们推测 CD133 很可能是膀胱移行细胞癌肿瘤干细胞或类似干细胞细胞的标志物之一。虽然 CD133 在目前被认为是癌干细胞的可能标志物之一,并且在手术切除的人膀胱移行细胞癌中用免疫组化级 RT-PCR 进行检测,阳性率较高,但是这些细胞是否为癌干细胞尚需进一步研究。传统的膀胱癌治疗方式集中在缩小肿瘤体积、杀死或移除肿瘤细胞上,而忽视了对此类细胞高选抑制。若今后能找出针对此类细胞的抑制方法,或许能为治疗膀胱移行细胞癌带来新的希望。

参 考 文 献

[1] Miraglia S,Godfrey W,Yin A H,et al.A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen:isolation,characterization,and molecular clonings[J].Blood,1997,90:5013-5021

[2] Lapidot T,Sirard C,Vormoor J,et al.A cell initiating human acute myeloidleukaemia after transplantation into SCID mice[J].Nature,1994,367(6464):645.

[3] Shmelkov S V,St Clair R,Lyden D,et al.AC133/CD133/Prominin-1 [J].Int J Biochem Cell Biol,2005,37(4):715-719.

[4] Reyes M,Dudek A,Jahagirdar B,et al.Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow[J].J Clin Invest,2002,109(3):337-346.

[5] Gehling UM,Ergun S,Schumacher U,et al.In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells[J].Blood,2000,95(10):3106-3112.

临床研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0079-05

载脂蛋白 E 基因型多态性与 SAH 后血管痉挛的相关研究

阮 健[1],谢延凤[1],孙晓川[1],苏 海[2],江 涌[1],唐文渊[1]
(1.重庆医科大学附属第一医院神经外科,重庆 400016;2.重庆市第二人民医院神经外科,重庆 402160)

【摘 要】目的:探讨载脂蛋白 E 基因(Apolipoprotein E,APOE)多态性与自发性蛛网膜下腔出血(Subarachnoid hemorrhage,SAH)后脑血管痉挛(Cerebral vasospasm,CVS)的相关性。方法:采用聚合酶链反应限制性片段长度多态性(Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism,PCR-RFLP)检测 185 例 SAH 患者,测定 APOE 基因型多态性,通过 TCD 评定 SAH 患者出血后的 CVS 情况。分型结果与 CVS 及相关临床资料等分别进行 χ^2 检验和 Logistic 回归分析。结果:185 例 SAH 患者中,32 例 APOE ε4 携带者中有 21 例(占 65.7%)发生 CVS,153 例非 ε4 携带者中有 56 例(占 36.7%)发生 CVS,ε4 携带者的 CVS 发生率明显高于非 ε4 携带者(P=0.022);单因素和多因素 Logistic 回归均提示 ε4 是 CVS 的危险因素。结论:APOE ε4 等位基因是 SAH 患者发生 CVS 的危险因素。

【关键词】载脂蛋白 E;基因多态性;蛛网膜下腔出血;脑血管痉挛
【中国图书分类法分类号】R743.35 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-23

Association of Apolipoprotein E genotypes polymorphisms with cerebral vasospasm after spontaneous subarachnoid hemorrhage

RUAN Jian, et al
(*Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the influence of the apolipoprotein E(APOE) gene polymorphisms on cerebral vasospasm(CVS) in patients with spontaneous subarachnoid hemorrhage(SAH). *Methods*: One hundred and eighty-five patients with spontaneous SAH were selected in this study. Venous blood samples and clinical data of the patients were collected. The APOE polymorphisms of all patients were determined by PCR-RFLP. Associations of APOE genotypes polymorphisms with cerebral vasospasm after SAH were analyzed by χ^2 test, Uni-and multivariate logistic regression. *Results*: In 185 patients, 21 of 32(65.7%) patients with APOE ε4 allels showed CVS, while only 56 (36.7%) out of 153 patients without APOE ε4 showed it. Incidence rate of CVS in ApoE ε4 (+) group was significantly higher than that in APOE ε4(−) (P=0.022). Uni-and multivariate logistic regression analyses demonstrated that APOE ε4 allel was

作者介绍:阮 健(1982-),男,医师,硕士,研究方向:脑血管疾病。现工作单位:重庆市肿瘤医院神经外科。
通讯作者:孙晓川,男,教授,E-mail:sunxch1445@gmail.com。

[6] Singh S K, Clarke I D, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. Cancer Res, 2003, 63(18): 5821-5828.
[7] Kim C F, Jackson E I, Woolfenden A E, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer[J]. Cell, 2005, 121(6): 823-835.
[8] Colins A T, Berry P A, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(23): 10946-10951.
[9] Monzani E, Facchetti F, Galmozzi E, et al. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential[J]. Eur J Cancer, 2007, 43(5): 935-946.
[10] Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, et al. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 351(4): 820-824.
[11] Olempska M, Eisenach PA, Ammerpohl O, et al. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2007, 6(1): 92-97.
[12] Corbeil D, Raper K, Hellwig A, et al. The human AC133 hemato poietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusion[J]. Biol Chem, 2000, 275(8): 5512-5520.
[13] 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]. Clin Pathol, 2004, 57: 965-969.
[14] Yu Y, Fuhr J, Boye E, et al. J. Mesenchymal stem cells and adipogenesis in hemangioma involution[J]. Stem cells, 2006, 24: 1605-1612.
[15] Ribatti D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis[J]. Cell Mol Med, 2004, 8: 294-300.
[16] Zhu W, Xu W, Jiang R, et al. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo[J]. Exp Mol Pathol, 2006, 80: 267-274.

(责任编辑:冉明会)