

CD133 肿瘤干细胞标志物在肺癌中的应用进展

马雪曼^{1,2}, 张培彤¹

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

摘要: CD133 作为肿瘤干细胞标志物已被广泛应用于临床, 在肺癌干细胞的分选中亦具有重要作用。全文就肿瘤干细胞概念、CD133 基因和结构、CD133 与肿瘤干细胞的关系、CD133 的临床应用以及 CD133 作为肿瘤干细胞标志物的局限性作一综述。

关键词: CD133; 肺癌; 肿瘤干细胞; 肿瘤干细胞标志物

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2014)03-0224-04

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.03.A011

Progress in CD133 as Cancer Stem Cell Markers in Lung Cancer

MA Xue-man^{1,2}, ZHANG Pei-tong¹

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China; 2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: As a marker of cancer stem cells, CD133 has been widely used in clinical, especially in lung cancer stem cells which plays an important role in cell selected. In this paper, the concept of tumor stem cell, CD133 gene and its structure, relationship of CD133 with cancer stem cells, usage of CD133 for clinic and the limitation of CD133 as cancer stem cell markers are reviewed.

Key words: CD133; lung cancer; cancer stem cells; cancer stem cell markers

1983 年 Mackillop^[1]首次提出肿瘤干细胞假说, 认为肿瘤中存在部分细胞具有干细胞的生物学特性。自此肿瘤干细胞成为了研究热点, 为恶性肿瘤耐药、治疗后复发及远处转移做出了合理解释, 并为肿瘤的靶向治疗提供了新思路和方法^[2,3]。近年研究已从多种实体肿瘤中分离鉴定出 CD133+肿瘤干细胞, 例如结肠癌、脑瘤、肺癌、卵巢癌、胃癌、黑色素瘤等。CD133 作为实体肿瘤干细胞标志物已被广泛应用, 其在肺癌干细胞纯化中亦具有重要作用, 但由于 CD133-细胞具有干细胞特性、CD133 蛋白表达受微环境影响、CD133 蛋白在肺组织中广泛表达、CD133 生物学功能尚不明确、流式细胞分选技术本身的局限性等原因, 对于 CD133 作为肺癌干细胞标志物有部分学者持谨慎的态度, 亦有学者通过实验研究提出了质疑。本文就 CD133 作为肿瘤干细胞标志物在肺癌中的应用及其局限性作一综述。

收稿日期: 2013-05-20; 修回日期: 2013-10-14

通讯作者: 张培彤, E-mail: zhangpeitong@sohu.com

1 干细胞和肿瘤干细胞

干细胞^[4,5](stem cell, SC)即起源细胞, 是一类具有多向分化潜能和自我复制能力的未分化细胞, 是哺乳动物各组织器官的原始细胞; 按分化潜能分为全能干细胞、多能干细胞和单能干细胞; 按发育状态分为胚胎干细胞和成体干细胞。

“肿瘤干细胞学说”认为肿瘤组织由异质性的细胞群体组成, 肿瘤组织中存在部分细胞具有干细胞特性, 能够无限增殖、自我更新、多向分化, 产生表型各异的肿瘤细胞, 并促使肿瘤不断增大或生成新的肿瘤。1997 年, Bonnet 等^[6]在人急性粒细胞白血病研究中, 首次分离出表型为 CD34+和 CD38-的白血病肿瘤干细胞, 并发现该细胞的体内成瘤能力远高于普通肿瘤细胞, 从而证实了肿瘤干细胞的存在。2003 年, Al-Hajj 等^[7]在乳腺癌组织中首次成功分离纯化出实体肿瘤干细胞, 标志物为 CD44+CD24-/low

Lineage⁻。随后表型为 ALDH1^[8]和 SOX2^[9]的乳腺癌肿瘤干细胞被分离出。

2 CD133 与肿瘤干细胞

1997 年,CD133 作为 CD34+造血干细胞表面抗原被 AC133 单抗靶定而被首次发现^[10]。人 CD133 蛋白是 Prominin 细胞表面蛋白家族成员之一,是一个含 5 次跨膜结构的分子量为 120kb 的糖蛋白,包含 1 个细胞外 N-端,2 个细胞外 Loop 环,1 个细胞内 C-端和 8 个 N-糖基区^[11]。人 CD133 基因作为保守基因位于 4 号染色体^[12]。研究表明在正常组织中,CD133 蛋白主要表达于胎儿骨髓、胎肝、脐血、成人骨髓及动员前后的外周血等造血组织的 CD34+细胞亚群,以及胰、肾、胎盘、肝、肺、脑、心肌组织和视网膜^[13]等组织,并且 CD133 表达随细胞分化程度升高而减弱或消失。Gehling 等^[14]将 CD133+细胞体外培养 2 周,CD133+细胞分化成内皮细胞,收集黏附细胞和非黏附细胞,与肺癌细胞同时接种于小鼠体内,发现肿瘤组织中新生血管显著性高于对照组,提示 CD133 蛋白可能在血管生成中起重要作用。但目前 CD133 的生物学功能尚不明确。

目前肿瘤干细胞的分选是通过标记特异性细胞表面分子来实现的。分选技术包括两类^[15]:一是磁珠分选(magnetic activated cell sorting,MACS),将 CD 抗原的单克隆抗体作为一抗与单细胞悬液孵育,再与免疫磁珠标记的二抗结合,经过特殊的磁珠磁场,阳性细胞可吸附于磁式分选柱内;二是流式细胞术分选(fluorescence activated cell sorting,FACS),利用可以激发不同波长的荧光素标记特异性单克隆抗体,再与单细胞结合,通过 FACS 分选。目前临床上普遍利用肿瘤干细胞表面标志性抗体进行分离与纯化,CD133 作为细胞表面标志物已经被广泛用于分离纯化多种肿瘤干细胞。

3 CD133 临床应用

肺癌组织中(包括鳞癌、腺癌、大细胞肺癌以及小细胞肺癌)存在 CD133+肿瘤干细胞,并且 CD133 蛋白表达与肿瘤病理类型无明显相关性。将 CD133+肺癌细胞和 CD133⁻肺癌细胞经皮下注射分

别接种于小鼠体内,CD133+肺癌细胞再现原发肿瘤,但 CD133⁻肺癌细胞不能成瘤,表明 CD133+肺癌细胞比 CD133⁻肺癌细胞具有更强的致瘤能力。另外,分别将 CD133⁻肺癌细胞和 CD133+肺癌细胞进行体外培养,CD133⁻肺癌细胞在培养 2~3 周后逐渐凋亡;CD133+肺癌细胞在 1~2 个月后形成肿瘤球,肿瘤球中含有自我更新细胞,表明 CD133+肺癌细胞具有更强的增殖及自我更新能力。曹宝山等^[16]应用荧光激活细胞分选方法检测和分选肺癌细胞株 A549 和 H460 中的 SP 细胞和非 SP 细胞,并用 RT-PCR 方法检测出 CD133 蛋白在 SP 细胞中呈过表达,提出 CD133 可作为肺癌干细胞分子标志物。Bertolini 等^[17]发现在非小细胞肺癌组织中 CD133+细胞数量多于正常肺组织,并且表现出干细胞样特性以及对于铂类药物耐受。上皮细胞特异性抗原阳性(CD133+ESA+)细胞在非小细胞肺癌患者的癌组织中显著性高于正常肺组织,与 CD133⁻细胞相比具有较高的致瘤、黏附运动和药物外排能力,体外培养的 CD133+肺癌细胞具有稳定的顺铂耐药表型。顾永平等^[18]利用肿瘤干细胞标志物 CD133、ABCG2 及 p75NTR 对非小细胞肺癌组织进行检测,结果显示三种标志物在癌组织中的表达率均显著性高于癌旁组织及正常组织;并且 CD133+肿瘤细胞呈散在分布,其分化越差,CD133 表达越高,均符合肿瘤干细胞的特点。

研究认为 CD133 表达在非小细胞肺癌患者中与肿瘤耐药相关。Salnikov 等^[19]对 88 例未经治疗的非小细胞肺癌患者 CD133 表达进行免疫组化分析,发现 CD133 表达与耐药相关蛋白谷胱甘肽 S-转移酶、胸苷酸合酶、过氧化氢酶、O(6)-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶和 P170 表达均显著性相关,因此检测 CD133+细胞可以预测细胞毒疗法的疗效。有学者认为 CD133 表达与肺癌淋巴转移及预后密切相关。张惠忠等^[20]采用免疫组化法检测了 77 例非小细胞肺癌组织中 CD133 表达,结果显示 CD133 阳性表达率为 51.9%(40/77),且与淋巴结转移呈正相关,与患者术后生存时间呈负相关,与肿瘤大小、组织学类型和组织分化程度均无关,CD133 高表达提示患者预后不良。姚杰等^[21]采用免疫组化法检测 CD133 和 CD44 在 42 例肺癌患者的肿瘤原发灶及转移淋巴结中的表达,结果显示原发灶和转移淋巴结中 CD133

均呈高表达,CD133 阳性组淋巴结转移率较阴性组显著性增高,CD133 阳性组患者生存率低于 CD133 阴性组,提示 CD133 在肺癌原发灶及转移淋巴结中的表达与肿瘤生物学特征密切相关,而且影响患者预后。研究显示 CD133 与肺腺癌靶向治疗密切相关,可应用于肺癌的靶向治疗。Zhou 等^[22]用免疫磁珠法分选 10 例肺腺癌标本中 CD133+细胞,用荧光定量 RT-PCR 方法检测 CD133+细胞中 N-乙酰葡萄糖氨基转移酶 (Mgat5) 的表达,结果表明 Mgat5 在 CD133+肺腺癌细胞中呈高表达,且下调 Mgat5,对体内外癌细胞生长均有明显抑制作用,表明 Mgat5 可能在肿瘤发生中具有重要作用,可作为肺腺癌的潜在治疗靶点。Li 等^[23]利用 FQRT-PCR 法检测出半乳糖-3 在 CD133 阳性肺腺癌细胞中呈高表达,半乳糖-3 具有抑制癌症细胞生长和诱导 CD8 阳性 T 细胞凋亡的功能,表明半乳糖-3 在肺腺癌的靶向治疗中可能发挥重要的作用。

4 CD133 作为肿瘤干细胞标志物局限性

CD133 作为标志物分选肿瘤干细胞,在方法和技术上均存在局限性。例如胰酶消化会影响流式细胞分选时 CD133 糖基化胞外段的胰酶切割位点,导致分选过程中部分细胞不能被识别。流式细胞分选只能识别表达于细胞表面的 CD133,不能识别胞浆中表达的 CD133^[24],导致识别出的 CD133 细胞比实际数量少。肿瘤干细胞的生物学特性受微环境的影响,胰酶消化对细胞微环境亦有影响,从而影响 CD133 表达。

AC133 和 AC141 是 CD133 单克隆抗体的两个表位,糖基化 CD133 抗原能被 AC133 和 AC141 抗体识别,非糖基化 CD133 的大量存在则会导致假阴性结果。研究发现 CD133 mRNA 在组织中的分布远高于 AC133 表达^[11],AC133 和 AC141 表位下调与 CD133 蛋白及其 mRNA 水平并无相关性^[13,25]。因此,AC133 和 AC141 并不能反映 CD133 表达水平,CD133 也不能称为肿瘤干细胞标志物,准确地说 CD133 糖基化表位才是肿瘤干细胞标志物。

Meng 等^[26]研究发现部分肺癌 CD133-细胞具有较强的自我更新能力和致瘤性。Chen 等^[27]用免疫荧光法检测出 CD133 蛋白在晚期胃肠道间质肿瘤组

织中普遍表达,进一步实验研究表明 CD133-细胞比 CD133+细胞更具增殖和侵袭能力。Tirino 等^[28]研究表明在部分肺癌组织中不存在 CD133+细胞。钱莘等^[29]研究发现肺腺癌组织中存在具备干细胞特性的 CD133+细胞和 CCA+SP-C+双阳性细胞,同时检测到 CD133 蛋白在肺组织中广泛表达,在肺癌组织和正常肺组织中无明显差异。Rocco 等^[30]从 44 例原发性胃癌患者胃组织中分离肿瘤细胞,用流式细胞仪富集 CD133+细胞,通过皮下或腹腔注射至 NOD/SCID 裸鼠体内,其致瘤性与 CD133-细胞相比并无差异,表明 CD133+细胞既不具有干细胞特性也不具备致瘤性,以上研究对 CD133 作为肿瘤干细胞表面标志物提出了质疑。

5 结 语

肿瘤干细胞理论为肿瘤发生、发展、复发、转移、耐药等机制提供了合理解释,并且为肿瘤的靶向治疗提供了新思路与方法。CD133 作为肿瘤干细胞标志物,在肺癌干细胞的分离、纯化中也具有重要作用,并且与肺癌细胞耐药、预后以及靶向治疗密切相关。然而有学者对肿瘤干细胞理论及 CD133 作为肿瘤干细胞标志物提出了质疑,故仍需进一步研究,对 CD133 进行评估与检测。

参考文献:

- [1] Mackillop WJ, Ciampi A, Till JE, et al. A stem cell model of human tumor growth, implications for tumor cell clonogenic assays[J]. J Natl Cancer Inst, 1983, 70(1): 9-16.
- [2] Hu Y, Fu L. Targeting cancer stem cells: a new therapy to cure cancer patients[J]. Am J Cancer Res, 2012, 2(3): 340-356.
- [3] Loureiro R, Mesquita KA, Oliveira PJ, et al. Mitochondria in cancer stem cells: a target for therapy[J]. Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov, 2013, 7(2): 102-114.
- [4] Reyes T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. Nature, 2001, 414(6859): 105-111.
- [5] Sugihara E, Saya H. Complexity of cancer stem cells [J]. Cancer, 2013, 132(6): 1249-1259.
- [6] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell[J]. Nat Med, 1997, 3(7): 730-737.
- [7] Al-Hajj M, Wicha M, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(7): 3983-3988.
- [8] Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 is

- a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome[J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(5):555-567.
- [9] Ling GQ, Chen DB, Wang BQ, et al. Expression of the pluripotency markers Oct3/4, Nanog and Sox2 in human breast cancer cell lines[J]. *Oncol Lett*, 2012, 4(6):1264-1268.
 - [10] 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.
 - [11] Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning[J]. *Blood*, 1997, 90(12):5013-5021.
 - [12] Fargeas CA, Joester A, Missol-Kolka E, et al. Identification of novel Prominin-1/CD133 splice variants with alternative C-termini and their expression in epididymis and testis[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 18):4301-4311.
 - [13] Corbeil D, Röper K, Hellwig A, et al. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions[J]. *Biol Chem*, 2000, 275(8):5512-5520.
 - [14] Gehling UM, Ergn S, Schumacher U, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells[J]. *Blood*, 2000, 95 (10):3106-3112.
 - [15] Zhu B, Murthy SK. Stem cell separation technologies[J]. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 2013, 2(1):3-7.
 - [16] Cao BS, Jia J, Ren J, et al. The different mechanism and significance of verapamil and reserpine blocking on A549 and H460 lung cancer SP cells[J]. *Journal of Modern Oncology*, 2009, 117(1):18. [曹宝山, 贾军, 任军, 等. 维拉帕米和利血平对 A549 和 H 460 肺癌侧群细胞的阻断差异机制及意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2009, 117(1):18.]
 - [17] Bertolini G, Roz L, Perego P, et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(38):16281-16286.
 - [18] Gu YP, Sun MM, Gu LQ, et al. Expression and significance of cancer stem cell marker CD133, ABCG2 and p75NTR in non-small cell lung carcinoma[J]. *Suzhou University Journal of Medical Science*, 2010, 30(3):513-516. [顾永平, 孙茂民, 顾丽琴, 等. 肿瘤干细胞标志物 CD133、ABCG2、p75NTR 在非小细胞肺癌组织的表达及其生物学意义[J]. *苏州大学学报(医学版)*, 2010, 30(3):513-516.]
 - [19] Salnikov AV, Gladkich J, Moldenhauer G, et al. CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(4):950-958.
 - [20] Zhang HZ, Wei YP, Wang M, et al. Association of CD133 and endothelin-converting enzyme expressions with prognosis of non-small cell lung carcinoma[J]. *Journal of Southern Medical University*, 2007, 27(5):696-699. [张惠忠, 魏益平, 王梅, 等. 肿瘤干细胞标志物 CD133 和内皮素转化酶对非小细胞肺癌预后的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2007, 27(5):696-699.]
 - [21] Yao J, Wang ZG, Tong WX, et al. Expression of tumor stem cell marker CD133 and CD44 in original tumor tissues and metastatic lymph nodes of lung cancer[J]. *Medical Journal of National Defending Forces in Southwest China*, 2010, 20(12):1300-1303. [姚杰, 王志刚, 童文先, 等. 肿瘤干细胞标志物 CD133 和 CD44 在肺癌原发灶及转移淋巴结中的表达情况[J]. *西南国防医药*, 2010, 20(12):1300-1303.]
 - [22] Zhou X, Chen H, Wang Q, et al. Knockdown of Mga5 inhibits CD13+ human pulmonary adenocarcinoma cell growth in vitro and in vivo[J]. *Clin Invest Med*, 2011, 34(3):155-162.
 - [23] Li W, Jian-jun W, Xue-Feng Z, et al. CD133+ human pulmonary adenocarcinoma cells induce apoptosis of CD8+ T cells by highly expressed galectin-3[J]. *Clin Invest Med*, 2010, 33(1):44-53.
 - [24] Sakariassen PO, Immervoll H, Chekenya M. Cancer stem cells as mediators of treatment resistance in brain tumors: status and controversies[J]. *Neoplasia*, 2007, 9(11):882-892.
 - [25] Florek M, Haase M, Marzesco AM, et al. Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer[J]. *Cell Tissue Res*, 2005, 319(1):15-26.
 - [26] Meng X, Li M, Wang X, et al. Both CD133+ and CD133-subpopulations of A549 and H446 cells contain cancer-initiating cells[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(6):1040-1046.
 - [27] Chen J, Guo T, Zhao L, et al. CD133 and CD44 are universally overexpressed in GIST and do not represent cancer stem cell markers[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2011, 51(2):186-195.
 - [28] Tirino V, Camerlingo R, Franco R, et al. The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2009, 36(3):446-453.
 - [29] Qian S, Ding JY, Lv J, et al. The distribution of cells both expressing clara cell specific antigen (CCA) and surfactant protein C (SPC) and CD 133+ cells in human lung adenocarcinoma tissues[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2009, 14(1):6-9. [钱莘, 丁金勇, 吕军, 等. CCA+SP-C+细胞和 CD133+细胞在人肺腺癌组织分布的初步研究[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2009, 14(1):6-9.]
 - [30] Rocco A, Liguori E, Pirozzi G, et al. CD133 and CD44 cell surface markers do not identify cancer stem cells in primary human gastric tumors[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2012, 227 (6):2686-2693.