本文引用:李怡春,张敏,杨晓煜,等. CD133 在人结直肠癌组织中的表达及其与缺氧诱导因子 1α 和核心蛋白聚糖的相关性[J]. 新乡医学院学报,2019,36(11):1036-1039. DOI:10.7683/xxyxyxb.2019.11.007.

【临床研究】

CD133 在人结直肠癌组织中的表达及其与缺氧诱导因子 1α 和核心蛋白聚糖的相关性

李怡春, 张 敏, 杨晓煜, 侯玉龙, 姬颖华, 路 平
(新乡医学院第一附属医院肿瘤科,河南 卫辉 453100)

摘要: **目的** 探讨人结直肠癌组织中 CD133、缺氧诱导因子 1α(HIF-1α)、核心蛋白聚糖(DCN)的表达,分析 CD133 表达与结直肠癌临床病理特征及 HIF-1α、DCN 的相关性。**方法** 收集 2012 年 12 月至 2013 年 7 月新乡医学院第一附属医院保存的结直肠癌组织及其相对应的癌旁组织标本各 34 例。应用免疫组织化学法检测癌组织及癌旁组织中 CD133、HIF-1α 及 DCN 的表达,分析 CD133 与 HIF-1α 及 DCN 表达的相关性,以及 CD133 表达与结直肠癌患者临床病理特征的关系。**结果** 结直肠癌组织中 CD133、HIF-1α、DCN 的相对表达量分别为 0.123 ± 0.023、0.117 ± 0.036、0.049 ± 0.018,癌旁组织中 CD133、HIF-1α、DCN 的相对表达量分别为 0.26 ± 0.048、0.018 ± 0.035、0.211 ± 0.014;结直肠癌组织中 CD133、HIF-1α 的相对表达量高于癌旁组织($P < 0.05$),结直肠癌组织中 DCN 的相对表达量低于癌旁组织($P < 0.05$)。CD133 表达与淋巴结转移、TNM 分期、病理分级有关($P < 0.05$),与患者年龄、性别无关($P > 0.05$)。Pearson 相关分析显示,结直肠癌组织中 CD133 表达与 HIF-1 a 表达呈正相关($P < 0.05$),与 DCN 表达无显著相关性($P > 0.05$)。**结论** 结直肠癌组织中 CD133 与 HIF-1α 表达呈正相关;CD133 可以作为判断结直肠癌恶性程度的指标,也可作为判断患者预后的潜在指标。

关键词: 结直肠癌;CD133;缺氧诱导因子 1α;核心蛋白聚糖;TNM 分期
中图分类号: R735.3+5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2019)11-1036-04

Expression of CD133 in human colorectal cancer tissues and correlation with hypoxia-induced factor-1α and decorin

LI Yi-chun, ZHANG Min, YANG Xiao-yu, HOU Yu-long, JI Ying-hua, LU Ping
(*Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui* 453100, *Henan Province, China*)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of CD133, hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) and decorin (DCN) in human colorectal cancer tissues, and to analyze the correlation between the expression of CD133 and the clinicopathological features of colorectal cancer, HIF-1α and DCN. **Methods** The cancerous tissues and the corresponding paracancer tissues of 34 patients with colorectal cancer were selected in the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University from December 2012 to July 2013. The expressions of CD133, HIF-1α and DCN were determined by immunohistochemical method. The correlation between CD133 and HIF-1 α, DCN was analyzed, and the relationship between the expression of CD133 and clinicopathological characteristics of colorectal cancer was analyzed. **Results** The relative expression of the CD133, HIF-1α and DCN in cancerous tissue was 0.123 ± 0.023, 0.117 ± 0.036, 0.049 ± 0.018, respectively. The relative expression of the CD133, HIF-1α and DCN in paracancer tissue was 0.26 ± 0.048、0.018 ± 0.035、0.211 ± 0.014 respectively. The relative expression of the CD133 and HIF-1α in the cancerous tissue was higher than that in the paracancer tissue ($P < 0.05$). The expression of the DCN in the cancerous tissue was lower than that in the paracancer tissue ($P < 0.05$). The expression of CD133 was correlated with lymph node metastasis, TNM stage and pathological grade ($P < 0.05$), but it was not correlated with the age and gender of patients ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed that the expression of CD133 in colorectal cancer tissues was positively correlated with the expression of HIF-1α ($P < 0.05$), but it was not significantly possitive correlated with DCN ($P > 0.05$). **Conclusion** There is a significant possitive correlation between CD133 and HIF-1 α in colorectal cancer patients. CD133 can be used as an indicator of colorectal cancer malignancy and a potential indicator of prognosis.

Key words: colorectal cancer; CD133; hypoxia-induced factor-1α; decorin; TNM stage

DOI:10.7683/xxyxyxb.2019.11.007
收稿日期:2019-01-30
基金项目:河南省科技攻关项目(编号:2018020369);新乡医学院科研基金培育项目(编号:2013QN110)。
作者简介:李怡春(1994-),女,河南新乡人,硕士研究生在读,研究方向:恶性肿瘤的综合治疗。
通信作者:路 平(1969-),女,河南新乡人,博士,主任医师,研究方向:恶性肿瘤的综合治疗;E-mail:luingdoctor@126.com。
张 敏(1982-),女,河南新乡人,博士,主治医师,研究方向:恶性肿瘤侵袭转移及复发;E-mail:38089649@qq.com。

结肠癌是全球高发的恶性肿瘤之一[1],SIEGEL 等[2]统计结果显示,2017 年美国约 14 万人被诊断为结肠癌,其中约 5 万人死亡;CHEN 等[1]调查结果显示,结肠癌是中国最常见的恶性肿瘤之一,且发病率逐年升高。随着外科技术的不断进步和各种新型抗癌药的出现,结肠癌患者的生存率有了一定的提升[3],但肿瘤复发及转移仍然是临床治疗的难题。尽管许多靶向药物已被用于治疗结肠癌,但手术切除联合化学治疗、放射治疗仍然是标准的治疗手段[4]。大多数肿瘤起源于肿瘤干细胞,这种细胞具有无限增殖和体内外形成肿瘤的能力,但其与肿瘤微血管的关系目前尚不清楚。有研究报道,在诸多肿瘤中成功分离了肿瘤干细胞,如结肠癌、胰腺癌、头颈部肿瘤、乳腺癌、脑肿瘤、前列腺癌、黑色素瘤、肝癌等[5]。CD133 是戊聚糖跨膜糖蛋白,相对分子质量为 120 000[6]。虽然 CD133 mRNA 最初被认为是造血干细胞的标志物,但是在正常非淋巴性造血组织中也可能存在 CD133 mRNA 转录。CD133 在各种实体肿瘤、结肠癌和胶质母细胞瘤中高表达。缺氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α,HIF-1α)是在缺氧状态下普遍存在于人体的核转录因子,具有调节细胞内酸碱度、促进血管生成、诱导自噬、调控凋亡以及促进间充质干细胞自我更新与分化的功能,在肿瘤的发生和发展中具有重要意义[7-8];核心蛋白聚糖(decorin,DCN)是富含亮氨酸的蛋白聚糖基因中的一种小分子成员,作为一种核心糖蛋白,是重要的细胞外基质成分之一,可以抑制多种肿瘤如肾癌、肝癌和乳腺癌的体外增殖及迁移[9]。CD133、HIF-1α 及 DCN 在肿瘤进程中均有重要作用,然而,它们之间关联性的研究相对较少。本研究旨在检测 CD133 在人结直肠癌组织中的表达,探讨 CD133 与 HIF-1α 和 DCN 的相关性,以及 CD133 表达与结直肠癌患者临床病理学特征的关系。

1　资料与方法

1.1　一般资料　收集 2012 年 12 月至 2013 年 7 月新乡医学院第一附属医院普外科结直肠癌患者手术切除的癌组织及相对应的癌旁组织标本 34 例为研究对象,其中男 19 例,女 15 例;年龄 26 ~ 75 (50.23 ± 11.01)岁;高分化腺癌 19 例,中分化腺癌 10 例,低分化腺癌 5 例;TNM 分期:Ⅱ期 13 例,Ⅲ期 11 例,Ⅳ期 10 例;有淋巴结转移者 16 例,无淋巴结转移者 18 例。患者术前均未进行放射治疗和化学治疗。本研究经患者及家属知情同意,并获新乡医学院第一附属医院伦理委员会批准。

1.2　主要试剂与仪器　兔抗人 CD133 单克隆抗体(ab19898)购自英国 Abcam 公司,小鼠抗人 DCN 单克隆抗体(SC-73896)购自美国 Santa cruz 公司,兔抗人 HIF-1α 单克隆抗体(BS3514)购自美国 Bioworld 公司;GTVisionⅢ抗鼠/兔通用型免疫组织化学检测试剂盒、二氨基联苯胺(diaminobenzidine,DAB)显色试剂盒购自基因科技(上海)股份有限公司,枸橼酸钠缓冲液、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)购自北京索莱宝科技有限公司;NikonECLIPSE55i 型 BX51 荧光显微镜购自日本尼康株式会社,BX51 荧光显微镜购自日本尼康株式会社。

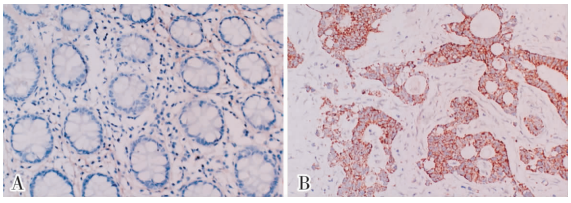
1.3　免疫组织化学法检测癌组织及癌旁组织中 CD133、HIF-1α 和 DCN 的表达　将结直肠癌组织及癌旁组织标本制作石蜡切片,并在病理切片及相应组织蜡块上进行标记。首先,石蜡标本切片厚约 3 μm,烤片 60 min,经二甲苯、梯度乙醇脱蜡至水,用枸橼酸钠缓冲液修复。体积分数 3% H_2O_2 处理,PBS 洗 3 次,每次5 min;血清封闭 30 min,甩去血清,加入稀释好的一抗 4 ℃过夜;加生物素标记的二抗,37 ℃孵育 30 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min,DAB 显色;苏木精复染,切片脱水,封片,显微镜下观察,每张切片于表达最密集处取 3 个视野,使用 Imagepro-plus 软件对 CD133、DCN、HIF-1α 的相对表达量进行半定量分析。

1.4　统计学处理　应用 IBM SPSS Statistics V 21.0 软件进行统计分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验和方差分析;CD133 与 HIF-1α、DCN 的相关性采用Pearson相关分析;$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　CD133、DCN 和 HIF-1α 在结直肠癌组织和癌旁组织中的表达　结果见图 1 ~ 3。CD133 在结直肠癌组织中主要位于细胞膜和细胞质,呈黄色颗粒;DCN 主要位于细胞外基质和纤维组织,呈黄色颗粒;

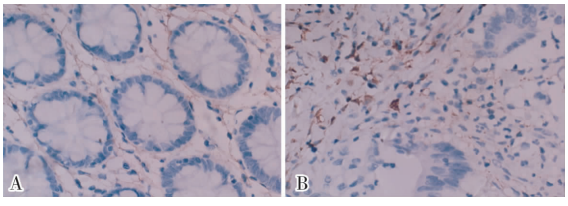
HIF-1α 主要位于细胞核和部分细胞质,呈黄褐色颗粒。结直肠癌组织中 CD133、HIF-1α 和 DCN 的相对表达量分别为 0.123 ±0.023、0.117 ±0.036、0.049 ±0.018,癌旁组织中 CD133、HIF-1α、DCN 的相对表达量分别为 0.026 ±0.048、0.018 ±0.035、0.211 ±0.014。结直肠癌组织中 CD133、HIF-1α 的相对表达量高于癌旁组织,结直肠癌组织中 DCN 相对表达量低于癌旁组织,差异有统计学意义($P<0.05$)。



A:癌旁组织;B:癌组织。

图 1 结直肠癌组织和癌旁组织中 CD133 表达(HE 染色,×100)

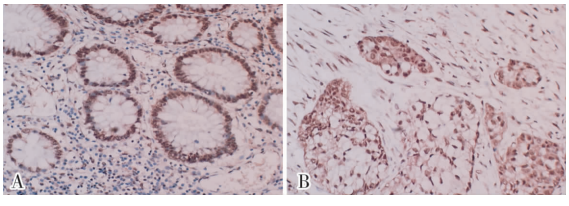
Fig. 1 Expression of CD133 in adjacent tissues and colorectal cancer tissues (HE staining, ×100)



A:癌旁组织;B:癌组织。

图 2 癌旁组织和结直肠癌组织中 DCN 表达(HE 染色,×400)

Fig. 2 Expression of DCN in adjacent tissues and colorectal cancer tissues (HE staining, ×400)



A:癌旁组织 ;B:癌组织。

图 3 癌旁组织和结直肠癌组织中 HIF-1α 表达(HE 染色,×400)

Fig. 3 Expression of HIF-1α in adjacent tissues and colorectal cancer tissues (HE staining, ×400)

2.2 结直肠癌组织中 CD133 表达与患者临床病理学特征的关系 结果见表 1。CD133 的表达与淋巴结转移、TNM 分期、病理分级有关($P<0.05$),与患者年龄、性别无关($P>0.05$)。

表 1 结直肠癌组织中 CD133 表达与患者临床病理学特征的关系

Tab. 1 Relationship between expression of CD133 in colorectal cancer tissues and clinicopathological features of patients

($\bar{x}\pm s$)

临床特征	n	CD133 表达量	t/F	P
年龄				
≥60 岁	12	0.121 ±0.022	0.452	>0.05
<60 岁	22	0.124 ±0.027		
性别				
男	19	0.127 ±0.027	0.851	>0.05
女	15	0.119 ±0.013		
淋巴结转移				
有	16	0.108 ±0.013	3.589	<0.05
无	18	0.127 ±0.024		
病理分级				
低	5	0.129 ±0.025		
中	10	0.108 ±0.016	3.589	<0.05
高	19	0.136 ±0.006		
临床 TNM 分期				
Ⅱ期	13	0.112 ±0.019		
Ⅲ期	11	0.120 ±0.020	8.203	<0.05
Ⅳ期	10	0.142 ±0.020		

2.3 人结直肠癌组织中 CD133 与 HIF-1α、DCN 表达的相关性 Pearson 相关分析显示,结直肠癌组织中 CD133 表达与 HIF-1α 表达呈正相关($P<0.05$),与 DCN 表达无显著相关性($P>0.05$)。

3 讨论

本研究发现,CD133 主要表达于结直肠癌细胞膜表面和细胞质内,这与文献[10]报道的 CD133 主要位于细胞膜表面不同,原因可能为使用了不同类型的抗体,导致结果具有差异性,需要进一步探讨。

CD133 蛋白是在人类造血干细胞上发现的戊跨膜糖蛋白,最初被认定为造血干细胞的特异性标志。在目前的研究中,CD133 单独与其他分子作为分选标记,分选出阳性亚群细胞的生物学特性。ZHOU 等[11]研究发现,在结肠癌 HCT116 细胞中,$CD133^+$ 亚群具有克隆形成和肿瘤形成的能力。这些研究提示 CD133 与结肠癌 HCT116 细胞的侵袭、转移有关。

ISHIMOTO 等[12]研究发现,CD133 可以作为胃癌预后评估的指标,认为 CD133 可能是结直肠癌的重要标志物。CD133 表达与胃肠道肿瘤患者的临床病理特征和预后有明显关系,随着 CD133 表达的升高,肿瘤的分化程度降低、浸润程度加深、淋巴结转移数目增多。KOJIMA 等[13]采用免疫组织化学法分析 CD133 在结直肠癌组织中的表达,结果发现,21

例患者 CD133 呈过表达,且均为中分化或高分化腺癌。本研究观察到 CD133 在结直肠癌组织中的表达情况与 HORST 等[14] 和 KOJIMA 等[13] 的研究类似,CD133 在癌旁组织、肿瘤组织中均有表达,且肿瘤组织的表达明显高于癌旁组织,CD133 可作为结直肠癌患者的独立预后因子。

本研究采用免疫组织化学法检测结直肠癌组织中 CD133 表达,并分析其与患者临床病理学特征的关系,结果发现,CD133 表达与有无淋巴结转移、肿瘤的临床分期和分化程度有关,即肿瘤组织中 CD133 表达量越高,其发生淋巴结转移的可能性就越大,肿瘤的侵袭能力和恶性程度就越高。

D133 和 HIF-1α 在结直肠组织中的表达具有正相关性,因此可以证实,缺氧微环境、肿瘤干细胞在结直肠癌的发生、发展中具有重要作用。HIF-1α是介导细胞低氧反应的核心转录因子,在多数癌组织中呈高表达[15-16]。缺氧与肿瘤进展和转移密切相关,可以通过上皮-间充质转化过程调控关键因子来影响肿瘤进展;在结直肠癌组织中,HIF-1α 可以通过激活细胞内磷脂酰肌醇 3-激酶、丝裂原活化蛋白激酶等通路来调节 CD133 表达[14]。CD133 可通过增加肿瘤细胞的葡萄糖摄取的过程,导致缺氧,从而诱导 HIF-1α 的产生,刺激肿瘤血管形成,增加其侵袭转移的能力。这些机制在维持肿瘤细胞的能量代谢、血管形成等过程中发挥重要作用。

冯晨露等[17] 研究发现,CD133 与 HIF-1α、CD133 与 DCN、DCN 与 HIF-1α 有相互调节的作用。本研究发现,结直肠癌组织中 CD133 表达与 HIF-1α 表达呈正相关,与 DCN 表达无明显相关性,考虑主要与下列原因有关:(1)实验的样本量较小;(2)病例来源集中于豫北地区,存在人群局限性。因此,其相关性需要进一步扩大样本量进行验证。

综上所述,CD133 在结直肠癌的发生、发展、转移中发挥重要作用,通过检测 CD133、DCN 与 HIF-1α 的表达可判断结直肠癌的恶性程度,CD133 可以作为预后评估的潜在指标,并提供治疗靶点,但其具体机制有待进一步探讨。

参考文献:

[1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, *et al*. Cancer statistics in China[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.

[2] SIEGEL R L, MILLER K D, FEDEWA S A, *et al*. Colorectal cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(3): 177-193.

[3] 杜飞,董亚萍,朴成钢. 结肠癌靶向治疗的研究进展[J]. 生命的化学, 2018, 38(2): 84-91.

[4] HEWETT P J, ALLARDYCE R A, BAGSHAW P F, *et al*. Short-term outcomes of the Australasian randomized clinical study comparing laparoscopic and conventional open surgical treatments for colon cancer [J]. *Annals Surg*, 2008, 248(5): 728-738.

[5] 郭明. 胃癌中干细胞标志物 CD44、CD133 与 VEGF、HIF-1a 蛋白及临床病理间相关性研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2015.

[6] ZHAO P, LI Y, LU Y. Aberrant expression of CD133 protein correlates with Ki-67 expression and is a prognostic marker in gastric adenocarcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10(1): 1-6.

[7] YONG Y, ZHANG C, GU Z, *et al*. Polyoxometalate-based radiosensitization platform for treating hypoxic tumors by attenuating radioresistance and enhancing radiation response[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(7): 7164-7176.

[8] 王继霞,路平,姬颖华,等. 低氧下褪黑素抑制 HCT116 增殖机制探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2018, 25(17): 1205-1210.

[9] 周阳,侯玉龙,冯晨露,等. 核心蛋白聚糖在结直肠癌组织中的表达及其与患者临床病理特征的关系[J]. 新乡医学院学报, 2018, 35(9): 796-798.

[10] CHOI J, SHIN P K, KIM Y, *et al*. Metabolic influence of walnut phenolic extract on mitochondria in a colon cancer stem cell model[J]. *Eur J Nutri*, 2019, 58(4): 1635-1645.

[11] ZHOU J Y, CHEN M, MA L, *et al*. Role of CD44high/CD133high HCT-116 cells in the tumorigenesis of colon cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(7): 7657-7666.

[12] ISHIMOTO T, NAGANO O, YAE T, *et al*. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth[J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(3): 387-400.

[13] KOJIMA M, ISHⅡ G, ATSUMI N, *et al*. CD133 expression in rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(4): 906-912.

[14] HORST D, KRIEGL L, ENGEL J, *et al*. CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2008, 99(8): 1285-1289.

[15] DAI X, PI G, YANG S L, *et al*. Association of PD-L1 and HIF-1α coexpression with poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Transl Oncol*, 2018, 11(2): 559-566.

[16] XU Y, LU X, HU Y, *et al*. Melatonin attenuated retinal neovascularization and neuroglial dysfunction by inhibition of HIF-1α-VEGF pathway in oxygen-induced retinopathy mice[J]. *J Pin Res*, 2018, 64(4): e12473.

[17] 冯晨露,张敏,王继霞,等. 核心蛋白聚糖抑制结直肠腺癌细胞系 HCT116 的体外侵袭[J]. 基础医学与临床, 2017, 37(6): 849-854.

(本文编辑:杨　博　英文编辑:杨　博)