

组织芯片观察CD44⁺/CD166⁺结直肠癌干细胞的形态及分布**◆

罗雁^{1,2,3}, 刘斌^{1,2}, 安宁⁴, 董亮¹, 钱震¹, 张永东³

Observation of morphology and distribution of CD44⁺/CD166⁺ colorectal cancer stem cells by tissue microarray

Luo Yan^{1,2,3}, Liu Bin^{1,2}, An Ning⁴, Dong Liang¹, Qian Zhen¹, Zhang Yong-dong³

Abstract

¹Key Laboratory of Stem Cell and Gene Medicine, Department of Pathology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China; ²Department of Pathology, Basic Medical College, Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China; ³Gansu Academy of Medical Science, Lanzhou 730050, Gansu Province, China; ⁴Tumor Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Luo Yan★, Studying for master's degree, Key Laboratory of Stem Cell and Gene Medicine, Department of Pathology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China; Department of Pathology, Basic Medical College, Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China; Gansu Academy of Medical Science, Lanzhou 730050, Gansu Province, China
Luoy1982@yeah.net

BACKGROUND: More and more research employs CD44 as a specific marker of colorectal cancer stem cells.
OBJECTIVE: To investigate the quantity, location and distribution of colorectal cancer stem cells (Co-CSCs) CD44⁺/CD166⁺ in primary colorectal carcinoma.
METHODS: A totally of 61 cases of human colorectal carcinoma and 10 cases of normal mucosa, 18 cases of adenoma were collected and made into three tissue microarrays each containing of 42 dots respectively.
RESULTS AND CONCLUSION: The results of double-label immunohistochemical staining demonstrated there was no CD44⁺/CD166⁺ cell in normal intestine mucosa, a very small amount of CD44⁺/CD166⁺ cells in adenoma, also double-positive cells could be seen in colorectal carcinoma, the number of double-positive cells was rare and the cells were scattered or distributed focally along the basement of gland basal side. The cells with scarcely cytoplasm were square, and its nucleus was oval or high cylindrical, deep stained and homogeneous. The quantity of double-positive cells was negatively correlated with the differentiation of colorectal carcinoma. The more depth was infiltrated, the more quantity of double-positive cells was observed. To observe the number, location, distribution and morphology of Co-CSCs can contribute to the diagnosis and prognostic evaluation of colorectal carcinoma.

Luo Y, Liu B, An N, Dong L, Qian Z, Zhang YD. Observation of morphology and distribution of CD44⁺/CD166⁺ colorectal cancer stem cells by tissue microarray. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(36): 6714-6717. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 越来越多的研究将 CD44 作为结直肠癌干细胞的一个特异性的标志物。
目的: 观察结直肠癌干细胞 CD44⁺/CD166⁺在原发性结直肠癌组织中的数量、位置及分布方式。
方法: 取 61 份结直肠癌、10 份正常肠黏膜组织及 18 份伴不典型增生的结直肠腺瘤标本制成 42 点的共 3 块组织芯片。
结果与结论: 免疫组织化学双染结果显示, 正常肠黏膜中未见 CD44⁺/CD166⁺细胞, 在伴不典型增生腺瘤中可见极少量 CD44⁺/CD166⁺细胞, 结直肠癌中可见到少量 CD44⁺/CD166⁺双阳性细胞。双阳性细胞主要分布在结直肠腺管基底侧, 呈灶状或散在分布; 细胞呈立方形, 胞浆稀少, 胞核规则, 呈卵圆形或高柱状, 随着结直肠癌分化程度的降低, 数量增多, 且其数量在浸润较深的癌巢中较多。提示结直肠癌干细胞的数量、位置、分布方式及其形态有助于结直肠癌的诊断及判断预后。
关键词: 结直肠癌; 肿瘤干细胞; CD44⁺/CD166⁺; 组织芯片; 免疫组织化学双重染色法
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.36.015

罗雁, 刘斌, 安宁, 董亮, 钱震, 张永东. 组织芯片观察 CD44⁺/CD166⁺结直肠癌干细胞的形态及分布[J].中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(36):6714-6717. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

结直肠癌是消化道常见的恶性肿瘤之一, 肿瘤的侵袭转移是患者死亡的主要原因^[1]。肿瘤干细胞的发现开辟了肿瘤研究的新途径。近几年陆续发现了CD44、CD166等结直肠癌肿瘤干细胞标志物^[2]。CD44是一种细胞表面黏附分子, 又称为淋巴细胞表面归巢因子, 它具有黏附特性, 能促进肿瘤细胞的浸润性生长, 与肿瘤的发生、发展、复发和转移关系密切^[3]。CD166属于免疫球蛋白基因超家族的一类跨膜蛋白, 它的过表达可以促进肿瘤细胞的增殖^[4]。最近, Dalerba等^[5]通过对NOD/SCID小鼠的研

究发现CD166可以作为一个附加的结(直)肠癌干细胞的标志, 也是CD44的一个协同标志。本实验利用组织芯片及免疫组织化学、免疫组织化学双染技术, 采用连续切片的方法, 定位标记CD44⁺/CD166⁺双阳性细胞, 观察其在结直肠癌中分布、数量及形态, 探讨其在正常黏膜及不同组织中的表达以及与结直肠癌病理分级、浸润程度的关系。

1 材料和方法

设计: 观察性实验。

时间及地点: 于2010-03/10在解放军兰州军区兰州总医院病理科完成。

材料: 61份结肠直肠癌石蜡包埋标本取自解放军兰州军区兰州总医院病理科2006/2010外检档案, 所有标本术前均未行放疗。患者中男41例, 女20例, 年龄22~81岁, 平均年龄58.8岁。病理分级按WHO标准, 高分化腺癌21例, 中分化腺癌30例, 低分化腺癌10例。有淋巴结转移及远处转移的28例。10份正常肠黏膜组织(距癌组织> 5 cm, 经苏木精-伊红染色确定为正常肠黏膜组织)作为对照组, 18份伴不典型增生的结直肠腺瘤均取自解放军兰州军区总医院病理科2006/2010外检档案, 供者对实验均知情同意。所有手术切除标本24 h内取对应癌组织, 经体积分数4%中性甲醛固定, 常规石蜡包埋。鼠抗人单克隆抗体CD44(北京中杉生物技术公司), 兔抗人多克隆抗体CD166(北京博奥森生物技术有限公司), Polymer双染检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

实验方法:

组织芯片的制作: 所有病例组织蜡块行常规病理切片后苏木精-伊红染色, 两位病理专家双盲法观察切片, 并在苏木精-伊红切片上标记典型病变部位。阵列制作: 利用组织芯片制备仪在空白蜡块上打孔(直径1.5 mm), 然后根据苏木精-伊红片上标记的典型病变部位, 在病例组织蜡块相应位置获取所要组织置入受体蜡块阵列孔中, 并记录组织编号, 重复上述步骤制成阵列块3块(42点)。以4 μm厚度进行连续切片制成组织芯片切片, 苏木精-伊红染色, 显微镜观察复验所得组织芯片的每个位点。

免疫组织化学及免疫组织化学双重染色步骤: 3块组织芯片连续切片各4张(厚4 μm), 分别做苏木精-伊红染色、免疫组织化学及免疫组织化学双重染色。免疫组织化学S-P法分别标记CD44和CD166, 操作步骤按说明书进行。DAB显色, 苏木精复染核, 中性树脂胶封固。免疫组织化学双重染色步骤: 依照Polymer双染检测试剂盒说明进行, 同时滴加CD44、CD166抗体混合物, DAB、AP-Red显色, 阳性显色为棕黄色和红色, 苏木精复染, 封片剂封固。PBS代替第一抗体作阴性对照。光学显微镜下观察结果。

结果判断: CD44阳性染色主要表达于结直肠癌的, CD166阳性染色表达于结直肠癌细胞浆。免疫组化双染切片可见, CD44呈胞膜棕黄色, CD166呈胞浆红色。依阳性细胞百分率判定阳性强度, 未见阳性细胞为(-), 阳性细胞数0~5%(+), 5%~15%(++), >15%(+++)。参照Ishida^[6]的计数标准, 物镜(×40)下查10个视野, 每个视野共

查100个细胞, 计算阳性细胞数。每张切片在物镜(×4, ×10, ×40)视野下观察双阳性细胞的分布方式及位置, 分别查10个视野。

主要观察指标: CD44⁺/CD166⁺数量、分布方式、位置及苏木精-伊红染色形态。

统计学分析: 采用SPSS13.0统计软件包进行统计学处理, 等级分组资料用Spearman等级相关分析, P<0.05为差异有显著性意义。统计学由第一作者完成。

2 结果

2.1 结直肠癌干细胞CD44⁺/CD166⁺数量、分布方式和位置 正常肠黏膜中未见CD44⁺/CD166⁺细胞; 在伴不典型增生腺瘤中可见极少量CD44⁺/CD166⁺细胞, 散在分布在腺瘤外周; 结直肠癌组织中可见少量双阳性细胞, 沿腺管基底侧呈灶状或散在分布; 双阳性细胞在癌组织和伴不典型增生腺瘤中表达, 且两者之间表达强度有明显差异($r=0.643, P=0$), 可见随着病变程度的加重, 双阳性细胞表达增强, 见表1, 图1, 2。

表1 结直肠癌干细胞CD44⁺/CD166⁺在正常肠黏膜及不同病变组织中的表达
Table 1 Expression of colorectal cancer stem cells CD44⁺/CD166⁺ in normal colorectal mucosa and different pathological tissues

Group	n	CD44 ⁺ /CD166 ⁺				Position	Distribution
		-	+	++	+++		
Normal intestine mucosa	10	10	0	0	0	No	No
Adenoma	18	12	6	0	0	Peripheral adenoma	Scattered
Adenocarcinoma	61	0	33	20	8	Along the basement of gland	Spotty or scattered

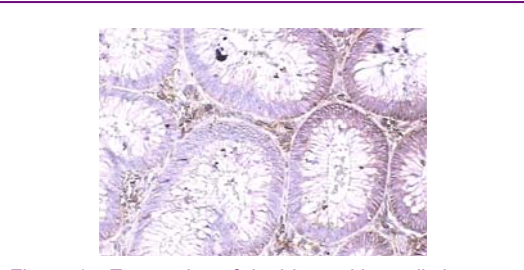


Figure 1 Expression of double-positive cells in adenoma (IHC, ×100)
图1 双阳性细胞在腺瘤中的表达(IHC, ×100)

61例结直肠癌中, CD44⁺/CD166⁺细胞表达与病理分级呈正相关, 病理分级越低, 双阳性细胞的数量越多($r=0.449, P=0$), 见图3。随着浸润深度的加深, 双阳性细胞数量越

Correspondence to: Liu Bin, Chief physician, Professor, Master's supervisor, Key Laboratory of Stem Cell and Gene Medicine, Department of Pathology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China; Department of Pathology, Basic Medical College, Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China liumb@189.cn

Supported by the Natural Science Foundation of Gansu Province, No. 096RJZA096*

Received: 2011-03-02 Accepted: 2011-03-31

¹ 甘肃省干细胞与基因药物重点实验室, 解放军兰州军区兰州总医院病理科, 甘肃省兰州市 730050; ² 兰州大学基础医学院病理教研室, 甘肃省兰州市 730030; ³ 甘肃省医学科学研究所, 甘肃省兰州市 730050; ⁴ 甘肃省肿瘤医院, 甘肃省兰州市 730050

罗雁★, 女, 1982年生, 浙江省上虞市人, 汉族, 兰州大学在读硕士, 主要从事临床肿瘤病理的研究。Luoy1982@yeah.net

通讯作者: 刘斌, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 解放军兰州军区兰州总医院病理科, 甘肃省兰州市 730050 liumb@189.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2011)36-06714-04

收稿日期: 2011-03-02
修回日期: 2011-03-31
(20110302023/GW·W)

多($r=0.291, P=0.023$), 见表2。

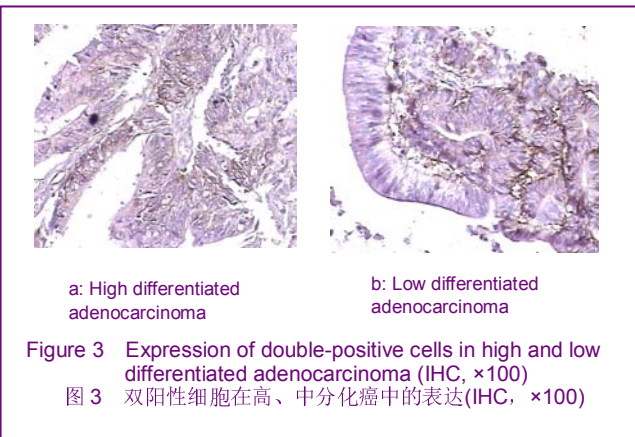
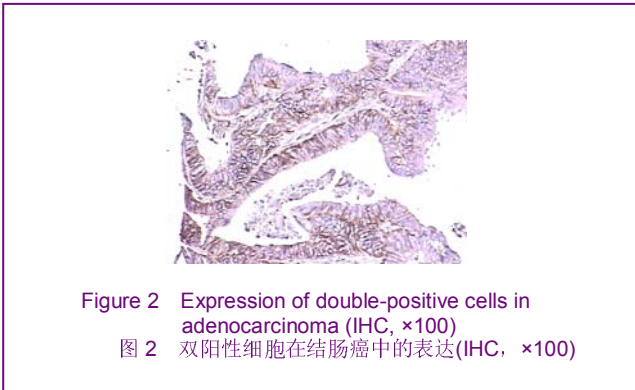
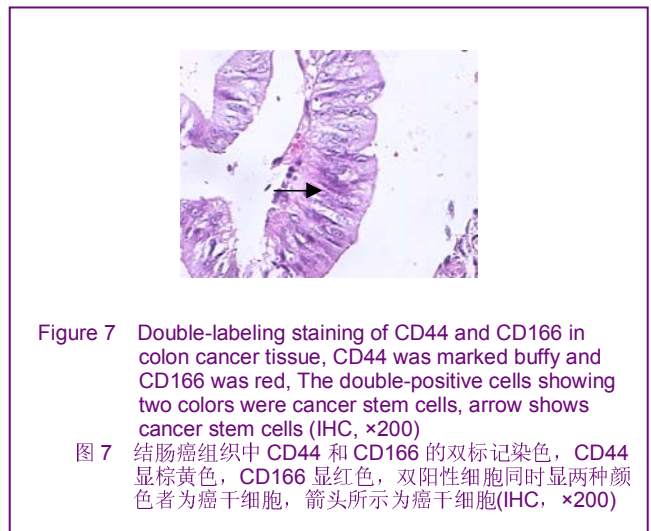
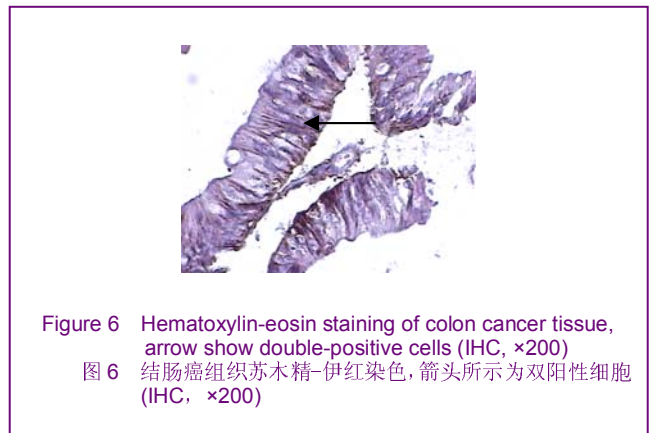
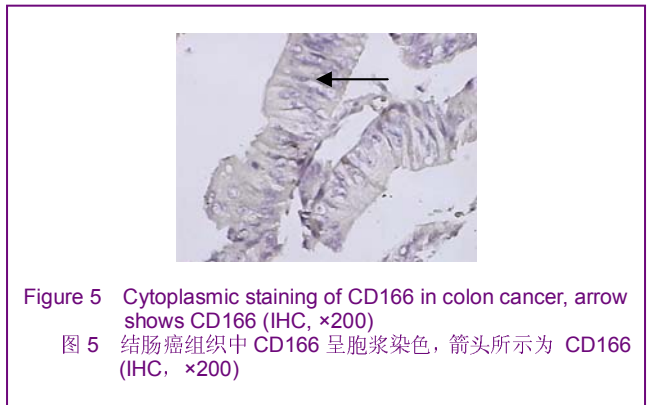
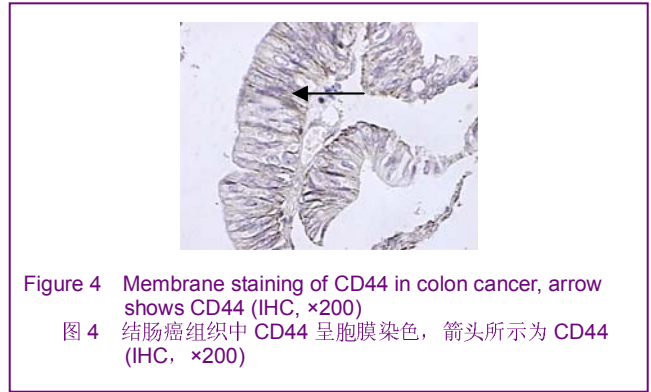


表 2 结直肠癌干细胞 CD44⁺/CD166⁺ 在结直肠癌中的表达
Table 2 Expression of colorectal cancer stem cells CD44⁺/CD166⁺

Group	n	CD44 ⁺ /CD166 ⁺			Position	Distribution
		+	++	+++		
Well-differentiated adenocarcinoma	21	17	3	1	Along the basement of gland	Spotty or scattered
Moderately-differentiated adenocarcinoma	30	14	14	2	Along the basement of gland	Spotty or scattered
Poorly-differentiated adenocarcinoma	10	2	3	5	Along the basement of gland	Spotty or scattered
Depth of invasion ≤ muscle	9	8	1	0	Along the basement of gland	Spotty or scattered
Depth of invasion ≥ serosa	52	25	19	8	Along the basement of gland	Spotty or scattered

2.2 连续切片对比结直肠癌中同一腺体内 CD44、CD166、CD44⁺/CD166⁺ 的表达及分布 同一腺体内, 可见 CD44 呈胞膜黄染, CD166 呈胞浆红染, CD44⁺/CD166⁺ 双阳性细胞沿结直肠癌腺管的基底侧呈灶状或散在分布, 见图4~6。

2.3 结直肠癌中 CD44⁺/CD166⁺ 苏木精-伊红染色形态 双阳性细胞主要呈立方状, 胞浆少, 胞核规则, 均质深染, 呈卵圆形或高柱状, 见图7。



3 讨论

随着对肿瘤研究的进一步深入,发现大多数肿瘤起源于肿瘤干细胞。自从Bonnet等^[7]首次确认了白血病干细胞的存在后,科学家们陆续从各种实体瘤(乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌、胰腺癌等)中发现了肿瘤干细胞的存在。结直肠癌干细胞的研究也逐渐得到重视。O'Brien等^[8]通过对NOD/SCID小鼠的研究发现,CD133⁺细胞具有致瘤性,从而证明CD133是结直肠癌干细胞的一个标志物。最近,越来越多的研究将CD44作为结直肠癌干细胞的一个特异性的标志物,而CD166则为CD44的一个协同标志物。

CD44作为一种细胞黏附分子,主要表达于上皮细胞、淋巴细胞及巨噬细胞。它促进肿瘤细胞外基质的降解,刺激新生血管的生成,促进肿瘤细胞的侵袭转移^[9]。CD166属于免疫球蛋白基因超家族的成员,目前在前列腺癌、乳腺癌、恶性黑色素瘤、食管癌中发现其表达增加。CD166过表达可以促进肿瘤细胞的增殖,与肿瘤的侵袭及预后差相关^[10]。

本实验利用免疫组织化学双重染色法,根据结直肠癌干细胞特异性表面标记物CD44和CD166,标记CD44⁺/CD166⁺双阳性细胞。免疫组织化学双染结果显示CD44呈胞膜棕黄色,CD166呈胞浆红色。正常肠黏膜中未见CD44⁺/CD166⁺细胞,在伴不典型增生腺瘤中可见极少量CD44⁺/CD166⁺细胞,结直肠癌中可见到双阳性的细胞,其数量非常少(0.1%~15.0%)。同时发现,随着结直肠癌分化程度的降低,CD44和CD166双阳性细胞的数量逐渐增多;浸润至浆膜外的数量高于肌层。双阳性细胞主要分布在腺瘤的边缘,呈灶状或散在分布。常规苏木精-伊红染色可见结直肠癌中,双阳性细胞主要呈立方状,胞浆少,胞核规则,呈卵圆形或高柱状。目前,已发现的结直肠癌干细胞的标志物包括CD133、ESA、CD44、CD166等。随着研究的不断深入,Dalerba等^[5]认为CD44⁺细胞为CD133⁺细胞一亚群,且CD44更适合作为结直肠癌干细胞的生物标记。同时发现EpCAMhigh/CD44⁺可致瘤且与原发瘤表型相同。本实验室早期研究发现以EpCAMhigh/CD44⁺为表型的结直肠癌干细胞可以共同促进结直肠癌的转移^[11]。本实验也发现CD44⁺/CD166⁺结直肠癌干细胞分布在腺瘤的边缘,可以促进结直肠癌的浸润与转移。

随着研究的深入,不断发现一些新的结直肠癌干细胞标志物。最新研究发现利用基因标志Lgr5分离的细胞具有肠干细胞的特性,同时发现这些细胞与结直肠癌的发生有关^[12]。另外,乙醛脱氢酶1也是新近发现的结直

肠癌干细胞的分子标志之一,在结直肠癌中有一定的高表达率,且其表达与患者的临床预后密切相关^[13]。随着新的结直肠癌干细胞标志物的不断出现,将有助于更清楚的阐明肿瘤干细胞的生物学特性。

在结直肠癌的治疗方面,一直坚持放疗和化疗相结合的方法,随着肿瘤干细胞理论的出现,针对肿瘤干细胞的靶向治疗成为研究的热点。它可以减少复发,改善预后。但由于缺乏特异性的标志物,因此开展肿瘤干细胞的靶向治疗需要进一步探索。同时,如何将靶向治疗与化疗药物联合起来治疗肿瘤,还有待进一步的研究。

4 参考文献

- [1] Cho RW, Clarke MF. Recent advances in cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 2008;18(1):48-53.
- [2] Ailles LE, Weissman IL. Cancer stem cells in solid tumors. *Curr Opin Biotechnol.* 2007;18:460-466.
- [3] Kitamura H, Okudela K, Yazawa T, et al. Cancer stem cell: Implications in cancer biology and therapy with special reference to lung cancer. *Lung Cancer.* 2009;66(3):275-281.
- [4] Van Kempen LC, Van Den Oord JJ, Van Muijen GN, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule /CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin. *Am J Pathol.* 2000;156(3): 769-774.
- [5] Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(24):10158-10163.
- [6] Ishida T. Immunohistochemical expression of the CD44 variant 6 in colorectal adenocarcinoma. *Surg Today.* 2000;30(1):28-32.
- [7] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 1997;3(7):730-737.
- [8] O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 2007;445(7123):106-110.
- [9] Sumiyoshi Y, Yamashita Y, Maekawa T, et al. Expression of CD44, vascular endothelial growth factor, and proliferating cell nuclear antigen in severe venous invasional colorectal cancer and its relationship to liver metastasis. *Surg Today.* 2000; 30(4): 323-327.
- [10] Weichert W, Knosel T, Bellach J, et al. ALCAM /CD166 is over expressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *J Clin Pathol.* 2004;57:1160-1164.
- [11] Zhang QJ, Liu B, Xing CP, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(27):5296-5300. 张秋菊,刘斌,邢传平,等. EpCAMhigh/CD44⁺结直肠癌干细胞的形态特征及分布[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(27):5296-5300.
- [12] Huang EH, Wicha MS. Colon cancer stem cells: implications for prevention and therapy. *Trends Mol Med.* 2008; 14(11): 503-509.
- [13] Pan ZJ, Jiang ZM, Guo YJ, et al. Zhonghua Putong Waixue Wenxian. 2009;3(1):19-22. 潘兆军,江志敏,郭运杰,等. 乙醛脱氢酶1在结肠癌组织中的表达及意义[J]. 中华普通外科学文献, 2009, 3(1):19-22.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 甘肃省自然科学基金资助项目 (096RJZA096)。

作者贡献: 罗雁、安宁、董亮、钱震及张永东对此文所作贡献均等; 课题由刘斌和罗雁设计; 研究过程由所有作者共同完成; 研究所用病例选取及结果分析由罗雁、刘斌、安宁及钱震负责; 试剂及技术指导由董亮与张永东提供; 数据分析由罗雁完成; 论文写作由刘斌与罗雁完成。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。