

## · 论著 ·

## 化疗及非化疗组神经母细胞瘤干细胞标志物的表达及意义

沙永亮 吴晔明

**【摘要】 目的** 探讨干细胞标志物 CD133、ABCG2、CD117 及 nestin 在神经母细胞瘤化疗组及非化疗组患儿中的表达及意义。**方法** 收集上海交通大学附属新华医院小儿外科保存完好的 20 例神经母细胞瘤肿瘤组织的石蜡标本,按术前是否经历化疗分为术前化疗组和非化疗组,每组各 10 例,采用免疫组化 Super Vision 法检测 4 种标记物在肿瘤组织中的表达。**结果** CD133、ABCG2、CD117 及 nestin 干细胞标志物在非化疗神经母细胞瘤组织中的平均阳性细胞率低于化疗后残留神经母细胞瘤组织中阳性细胞率的平均值,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。两组患儿年龄、性别、分期及组织分型比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 儿童神经母细胞瘤中可能存在肿瘤干细胞,肿瘤干细胞对常规化疗药物具有耐药性。

**【关键词】** 神经母细胞瘤;抗肿瘤联合化疗方案;肿瘤干细胞;生物学标记

**Expression of stem cell makers in chemotherapy and non-chemotherapy neuroblastoma.** SHA Yong-liang, WU Ye-ming. Department of Pediatric Surgery, Xin Hua hospital, Shanghai Jiao tong University, Shanghai, 200092, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression of stem cell makers CD133、ABCG2、CD117 and nestin in neuroblastoma before and after chemotherapy and their significance. **Methods** The paraffin sections of 20 cases managed in our hospital were divided into pre-operative chemotherapy group (10 cases) and non-chemotherapy group (10 cases). The expressions of four markers were immunohistochemically detected in the samples. **Results** There was no significant difference of the expressions intensity of CD133、ABCG2、CD117 and nestin between the two groups of specimens ( $P > 0.05$ ). In non-chemotherapy and pre-operative chemotherapy neuroblastoma, the expression intensity of CD133、ABCG2、CD117 and nestin showed no significant correlation with patients, sex, age, tissue type or tumor stage (all  $P > 0.05$ ). **Conclusions** Tumor stem cells might exist in neuroblastoma tissue. Tumor stem cells are resistant to conventional chemotherapy.

**【Key words】** Neuroblastoma; Antineoplastic Combined Chemotherapy Protocols; Tumor Stem Cells; Biological Markers

肿瘤干细胞是一群存在于肿瘤组织中的一小部分具有干细胞特征的细胞,在肿瘤放化疗抗性的产生和肿瘤复发中起关键作用,目前已在血液系统肿瘤和多种实体肿瘤中发现相应的肿瘤干细胞<sup>[1-2]</sup>。CD133、ABCG2、CD117 及 nestin 作为肿瘤干细胞的表面标志物,已分别在脑肿瘤、结直肠癌、视网膜母细胞瘤中得到证实<sup>[4-6]</sup>。神经母细胞瘤是儿童常见的实体肿瘤之一,生长迅速,转移早,恶性程度高,晚

期手术及化疗效果不理想<sup>[3]</sup>。尽管已有关于神经母细胞瘤干细胞标志物的文献报道,但目前多涉及一种或两种标志物。本研究通过免疫组化技术检测化疗组与未化疗组儿童神经母细胞瘤(Neuroblastoma, NB)中 CD133、ABCG2、CD117 及 nestin 的表达,探讨肿瘤干细胞是否存在于神经母细胞瘤中,并观察其与化疗药物的关系。

## 材料与方法

## 一、临床资料

2005 年 1 月至 2010 年 5 月上海交通大学附属新华医院小儿外科收治 20 例神经母细胞瘤患儿,均

经组织病理学检查证实。按照术前是否化疗分为术前化疗组和未化疗组,每组各 10 例。术前未化疗组 10 例中,男 4 例,女 6 例,年龄 13 个月至 8 岁,平均 43.5 个月;其中预后不良组织型(unfavorable histology, UFH) 5 例,平均肿瘤分期 3.4 期;预后良好组织型(favorable histology, FH) 5 例,平均肿瘤分期 3.1 期。术前化疗组 10 例中,男 6 例,女 4 例,年龄 2~7 岁,平均 4 岁 1 个月;其中 UFH 型 6 例,平均肿瘤分期 3.6 期;FH 型 4 例,平均肿瘤分期 3.3 期;10 例均估计肿瘤过大或包绕周围大血管无法一期切除,于术前使用长春新碱、环磷酰胺、阿霉素、顺铂、卡铂及依托泊苷等化疗药物 2~6 个疗程,平均 4 个疗程,待肿瘤体积缩小后二期手术切除。

分型依据<sup>[7]</sup>: UFH 型:任何年龄发生、基质丰富而有结节者,或基质少,年龄 >5 岁,或年龄 1.5~5 岁,基质少伴组织分化不良,或年龄 1.5~5 岁,基质少伴分化好,但核碎裂指数(MKI) >100,或年龄 <1.5 岁,基质少, MKI >200。FH 型:任何年龄发生,基质丰富,无结节;年龄 1.5~5 岁,基质少,组织分化好, MKI <100,或年龄 ≤1.5 岁,基质少, MKI <200。

## 二、主要试剂

兔抗人 CD133 单克隆抗体、兔抗人 ABCG2 多克隆抗体均购自武汉博士德生物技术有限公司;兔抗人 nestin 多克隆抗体、兔抗人 CD117 单克隆抗体购自上海长岛生物技术有限公司,免疫组化试剂购自上海长岛生物技术有限公司。

## 三、方法

收集石蜡包埋的组织标本,切片(厚约 4~5 μm),免疫组织化学检测采用 Super Vision 法(长岛生物技术有限公司,上海)。PBS 代替一抗作为阴

性对照,已知抗体阳性标本作为阳性对照。

## 四、结果判定

CD133、nestin 及 CD117 染色阳性反应信号呈棕色细小颗粒,位于细胞质;ABCG2 染色阳性反应信号呈棕色细小颗粒,位于细胞膜。采用低倍和高倍镜下观察,随机选择 5~10 个高倍视野,计算 1 000 个肿瘤细胞中阳性染色细胞所占百分比。

## 五、统计学处理

采用 SASS 软件包进行数据分析,两组中 CD133、nestin、CD117 及 ABCG2 阳性表达率的比较采用计数资料的  $\chi^2$  检验;两组中 CD133、nestin、CD117 及 ABCG2 阳性细胞率平均值的比较采用  $t$  检验,检验水准均为  $\alpha = 0.05$ 。

## 结 果

### 一、CD133、nestin、CD117 及 ABCG2 的表达

20 例中, CD133 阳性表达 19 例,其中化疗组 9 例,未化疗组 10 例; nestin 阳性表达 20 例;CD117 阳性表达 17 例,其中化疗组 9 例,未化疗组 8 例; ABCG2 阳性表达 19 例,其中化疗组 10 例,未化疗组 9 例,阳性细胞百分比见表 1。CD133、nestin、CD117 及 ABCG2 阳性细胞呈小圆形,散在或小的巢状分布,见图 1。

### 二、CD133、nestin、CD117 及 ABCG2 阳性与患儿性别、年龄、分期及组织分型的关系

术前化疗组和未化疗组患儿 CD133、nestin、CD117 及 ABCG2 阳性细胞百分比与性别、年龄、分期及组织分型比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 1 两组 CD133、nestin、CD117 及 ABCG2 表达阳性百分比(% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	nestin	ABCG2	CD133	CD117
化疗组	10	26.54 ± 11.35	6.08 ± 5.06	1.66 ± 0.88	1.01 ± 1.00
未化疗组	10	21.96 ± 12.10	5.90 ± 4.03	1.51 ± 0.83	0.38 ± 0.22
$t$ 值		1.21	0.52	0.4	1.10
$P$ 值		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

## 讨 论

Reya 等<sup>[8]</sup>提出肿瘤干细胞学说,认为肿瘤组织由异质性细胞群体构成,其干细胞具有无限自我更新、多向分化潜能和高度增殖能力,并产生不同表

型,形成新的肿瘤。有研究显示,神经母细胞瘤细胞系中也存在具有肿瘤干细胞特性的干细胞样细胞,这些细胞具有耐药性、高致瘤性和多向分化能力,且表达干细胞标志物,如 CD133、ABCG2、CD117、nestin 及 OCT-4 等<sup>[9-11]</sup>。有报道 CD133、ABCG2 在神经母细胞瘤组织及细胞系中也有表达,认为

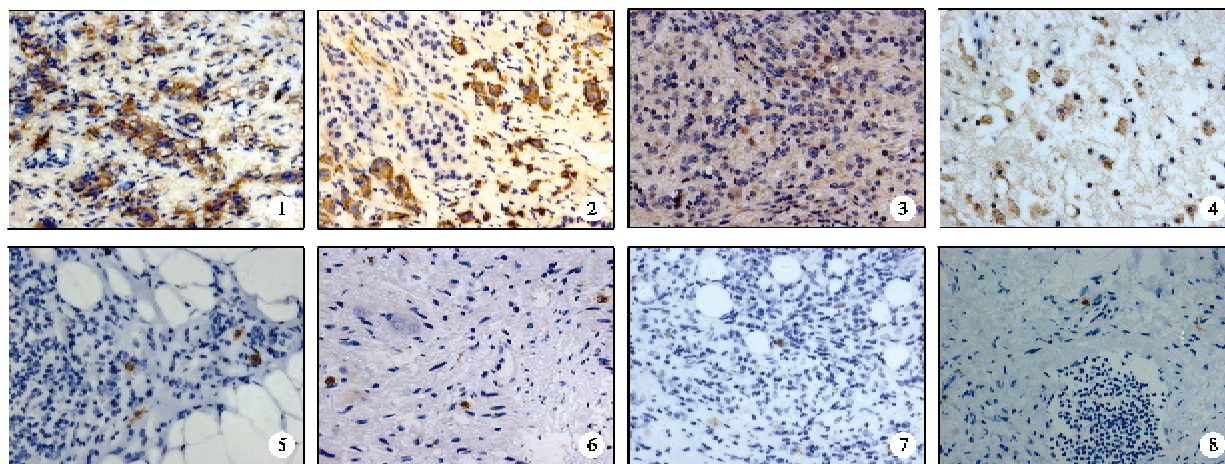


图 1 nestin 在术前未化疗 NB 组织中呈散在中等阳性表达( $\times 400$ );图 2 nestin 在化疗后 NB 组织中呈局灶状中等阳性表达( $\times 400$ );图 3 ABCG2 在未化疗 NB 组织中呈散在强阳性表达( $\times 400$ );图 4 ABCG2 在化疗后 NB 组织中呈局灶状强阳性表达( $\times 400$ );图 5 CD133 在未化疗 NB 组织中呈散在中等阳性表达( $\times 400$ );图 6 CD133 在化疗后 NB 组织中呈散在中等阳性表达( $\times 400$ );图 7 CD117 在未化疗 NB 组织中呈散在中等阳性表达( $\times 400$ );图 8 CD117 在未化疗 NB 组织中呈巢状强阳性表达( $\times 400$ )

CD133<sup>+</sup> 及 ABCG2<sup>+</sup> 细胞是神经母细胞瘤中具有干细胞特征的细胞<sup>[12]</sup>。Hirschmann-Jax 等用 Hoechst 33342 染色及流式细胞术鉴定 23 例复发、分化良好及分化不良的神经母细胞瘤组织中的细胞,结果发现 15 例中,0.8%~51% 的细胞表达干细胞表面标志物<sup>[13]</sup>。本组免疫组化结果表明,神经母细胞瘤组织中存在干细胞标志物阳性细胞,提示儿童神经母细胞瘤中可能存在肿瘤干细胞。未化疗组干细胞标志物阳性细胞表达率为 0.38%~21.96%,而在经历 2~6 个规范性化疗疗程后,残存肿瘤中干细胞标志物的阳性表达比例为 2.01%~26.54%,提示肿瘤干细胞对目前的规范性化疗方案有一定的耐药性。

nestin 为神经上皮细胞的特异性抗原,属第 IV 类中间丝,在神经板上皮细胞即开始表达,当神经细胞的迁移基本完成后,nestin 的表达量开始下降,并随神经细胞分化的完成而停止表达,已被广泛应用于神经干细胞的鉴定<sup>[14]</sup>。有实验表明,体外培养获得的神经母细胞瘤肿瘤细胞球存在 nestin 表达阳性的肿瘤干细胞<sup>[11]</sup>。本研究结果与文献报道一致,且化疗后神经母细胞瘤组织中同样存在 nestin 阳性细胞(26.54%),提示这些阳性细胞对常规化疗药物有较高的耐药性,也就是说化疗药物导致大量肿瘤细胞坏死,使肿瘤细胞总体数量下降,从而提高了阳性细胞比例。

CD117 又称 c-kit 受体、干细胞因子受体(SCFR),是由 c-kit 原癌基因编码的 I 型跨膜糖蛋白受体,其配体为干细胞因子(SCFR),已成为肿瘤干细胞的特征性表面标志物之一,在胃癌、结肠癌等多种

恶性肿瘤中已得到初步证实,其表达变化可反映肿瘤干细胞的表达水平<sup>[15,16]</sup>。MR Raspollini 等<sup>[17]</sup>报道 c-kit 与卵巢癌的化疗药物抵制有密切关系。作者的实验研究证实,神经母细胞瘤组织及经过常规化疗残留的肿瘤组织中存在阳性细胞,提示这群阳性细胞对常规化疗药物具有耐药性。

CD133 最初作为造血干细胞标志物,主要在造血组织 CD34<sup>+</sup> 细胞中表达,如骨髓、胎儿肝脏等,近年来已被用来标记人类神经嵴干细胞<sup>[18]</sup>。Singh SK 等<sup>[19]</sup>采用免疫组化和流式细胞术,证实了 CD133 在小儿恶性髓母细胞瘤和毛细胞型星形细胞瘤中表达,运用 CD133 抗体免疫磁珠或免疫荧光细胞分选术能在细胞悬液中分离出脑肿瘤干细胞,且表达另一神经干细胞标志物巢蛋白(nestin)。有研究显示,CD133<sup>+</sup> 神经母细胞瘤肿瘤细胞高度表达多药耐药基因及其他干细胞标志物如 ABCG2、nestin 及 C-kit(CD117)等<sup>[20]</sup>。Vangipuram PhD 等<sup>[21]</sup>研究表明,从神经母细胞瘤细胞株 SK-N-SH 和 SK-N-BE 分选出的 CD133<sup>+</sup> 细胞比 CD133<sup>-</sup> 细胞对化疗药物更具有耐药性。作者的研究显示,化疗后残存 NB 组织中仍然存在 CD133 阳性细胞(1.66%),也印证了这群干细胞标志物阳性细胞具有耐药性。Simone Wesbuer 等<sup>[22]</sup>发现经过化疗药物处理后存活下来的部分神经母细胞瘤细胞也表达 CD133,与本研究结果相一致。

ABCG2 属于 ATP-binding cassette(ABC)家族,被认为是一个具有普遍意义的干细胞标志物,且在多种肿瘤干细胞高表达<sup>[23]</sup>。ABCG2 在不同来源的

SP(side population)细胞中均呈高表达,并与 SP 细胞群所呈现的弱 Hoechst 激发荧光特性相关,故 ABCG2 可作为确定 SP 干细胞的表型标记。Liu 等<sup>[2]</sup>研究表明,CD133<sup>+</sup>的胶质母细胞瘤细胞对化疗药物有明显的耐药性,且高表达 ABCG2。本研究表明,化疗组神经母细胞瘤组织中存在 ABCG2 阳性细胞(6.08%),提示 ABCG2 阳性细胞对常规化疗药物具有耐药性,其机制可能是 ABCG2 通道蛋白能将多种药物转运出细胞外,从而产生耐药性。

总之,观察 CD133、ABCG2、CD117 及 nestin 在神经母细胞瘤组织中的表达,将有利于进一步分选神经母细胞瘤肿瘤干细胞,且对神经母细胞瘤耐药性的研究及靶向性治疗有重要意义。

### 参考文献

- Liu G, Yuan X, Zeng Z, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133<sup>+</sup> cancer stem cells in glioblastoma[J]. Mol Cancer, 2006, 5: 67.
- Zhang S, Baleh C Chan, M W Lai, HC, Mater, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors[J]. Cancer Res, 2008, 68: 4311-4320.
- 汤静燕, 潘慈, 徐敏, 等. 多学科协作在儿童实体瘤诊断治疗整体方案中作用探讨[J]. 临床儿科杂志, 2004, 22(4): 67-71.
- Vangipuram SD, Wang ZJ, Lyman WD. Resistance of stem-like cells from neuroblastoma cell lines to commonly used chemotherapeutic agents[J]. Pediatr Blood Cancer, 2010, 54(3): 361-368.
- Jeanette D, Walton, David R, et al. Characteristics of Stem Cells from Human Neuroblastoma Cell Lines and in Tumors[J]. Neoplasia, 2004, 8: 838-845.
- Yonatan Y, Mahller Jon P, Williams Baird, et al. Neuroblastoma Cell Lines Contain Pluripotent Tumor Initiating Cells That Are Susceptible to a Targeted Oncolytic Virus[J]. LoSONE, 2009, 4(1): 4235.
- Tornoczky T, Semjen D, Shimada H, et al. Pathology of peripheral neuroblastic tumors; significance of prominent nucleoli in undifferentiated/poorly differentiated neuroblastoma[J]. Pathol Oncol Res, 2007, 13: 269-275.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Clarke Irving L, Weissman. Stem cell, cancer, and cancer stem cells[J]. Nature, 2001, 414(6859): 105-111.
- Sandra Acosta, Cinzia Lavarino, Raquel Paris, et al. Comprehensive characterization neuroblastoma cell line subtypes reveals bilineage potential similar to neural crest stem cells[J]. BMC Developmental Biology 2009, 9: 1.
- 顾松, 徐敏, 洪莉, 等. p14ARF/p16 $\beta$  与 Oct-4、Nestin、GFAP 在不同组织结构类型的神经母细胞瘤中的表达及意义[J]. 临床小儿外科杂志, 2009, (3): 36-39.
- Thomas SK, Messam CA, Spengler BA, et al. Nestin is a potential mediator of malignancy in human neuroblastoma H cells[J]. J Biol Chem 2004, 279: 27994-27999.
- Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5: 275-284.
- Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern, et al. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells[J]. PNAS, September 28, 2004 101(42): 14228-14233.
- Akamatsu W, Okano H. Neural stem cell, as a source of graft material for transplantation in neuronal disease [J]. No To Hat2tatsu, 2001, 33(2): 114-120.
- Brien CA, Polletta, Gallingers, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice[J]. Nature, 2007, 445(7123): 106-110.
- Anne T, Collins, Paul A, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells [J]. Cancer Res, 2005, 65(23): 10946-10951.
- Raspolini MR, Amunni G, Villanucci A, et al. c-KIT expression correlation with chemotherapy resistance in ovarian carcinoma: an immunocytochemical study [J]. Annals of Oncology, 2004, 15: 594-597.
- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells [J]. Blood, 1997, 90: 5002-5012.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells [J]. Nature, 2004, 432: 396-401.
- Mahller YY, Williams JP, Baird WH, et al. Neuroblastoma cell lines contain pluripotent tumor initiating cells that are susceptible to a targeted oncolytic virus [J]. PLoS ONE 2009, 4: e4235.
- Sharada D, Vangipuram PhD, Zhihong J, et al. Resistance of Stem-Like Cells From Neuroblastoma Cell Lines To Commonly Used Chemotherapeutic Agents [J]. Pediatr Blood Cancer, 2010, 54: 361-368.
- Simone Wesbuer, Claudia Lanvers-Kaminsky, Ines Duran-Seuberth. Association of telomerase activity with radio- and chemo-sensitivity of neuroblastomas [J]. Radiation Oncology, 2010, 5: 66.
- Hadnagy A, Gahoury L, Beaulieu R, et al. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations [J]. Exp Cell Res, 2006, 312: 3701-3710.