

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.06.011

人脑胶质瘤组织中 CD133 与 EGFRvⅢ 的共表达及其临床意义

栗超跃¹, 赵黎明^{2△}, 田向阳³, 韩双印³ (1. 郑州大学人民医院 神经外科, 河南 郑州 450003; 2. 新乡医学院 研究生部, 河南 新乡 453003; 3. 郑州大学人民医院 中心实验室, 河南 郑州 450003)

[摘要] **目的:** 观察人脑胶质瘤组织中肿瘤干细胞标记物 CD133 与表皮生长因子受体Ⅲ型突变体(epidermal growth factor receptor variant Ⅲ, EGFRvⅢ)的共表达情况及其临床意义。**方法:** 取河南省人民医院自 2011 年 1 月至 2011 年 6 月手术切除的脑胶质瘤组织 40 例, 其中Ⅱ级 17 例、Ⅲ级 12 例、Ⅳ级 11 例。流式细胞术检测不同级别脑胶质瘤中 CD133⁺、EGFRvⅢ⁺ 和 CD133⁺/EGFRvⅢ⁺ 细胞所占的比例, 分析其临床意义。**结果:** CD133、EGFRvⅢ 在人脑胶质瘤组织中的表达率及其阳性表达细胞比例均随肿瘤级别逐步升高(均 $P < 0.05$)。不同级别脑胶质瘤中均发现 CD133 和 EGFRvⅢ 共表达细胞, CD133⁺/EGFRvⅢ⁺ 细胞共表达率在(4.75 ± 1.26)% ~ (18.26 ± 3.45)% 之间, Ⅲ、Ⅳ级胶质瘤中 CD133⁺/EGFRvⅢ⁺ 细胞的共表达率高于Ⅱ级($P < 0.05$)。CD133⁺/EGFRvⅢ⁺ 细胞比 CD133⁺ 细胞、EGFRvⅢ⁺ 细胞对脑胶质瘤患者的生存期影响更大, 共表达细胞患者的中位生存时间明显缩短。**结论:** 人脑胶质瘤组织中存在 CD133⁺/EGFRvⅢ⁺ 共表达细胞, 其与胶质瘤的恶性程度及患者生存时间有关, 本研究为脑胶质瘤的靶向治疗提供了潜在的靶点。

[关键词] 脑胶质瘤; 肿瘤干细胞; CD133; EGFRvⅢ; 流式细胞术

[中图分类号] R739.41; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)06-0628-04

Co-expressions of CD133 and EGFRvⅢ in gliomas and their clinical significance

LI Chao-yue¹, ZHAO Li-ming^{2△}, TIAN Xiang-yang³, HAN Shuang-yin³ (1. Department of Neurosurgery, People's Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, Henan, China; 2. Graduate School, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China; 3. Central Research Lab, People's Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the co-expressions of human glioma tumor stem cell marker (CD133) and epidermal growth factor receptor variant Ⅲ (EGFRvⅢ) in the glioma tissues and their clinical significance. **Methods:** Forty glioma samples (17 with grade Ⅱ, 12 with grade Ⅲ, 11 with grade Ⅳ) were obtained from patients with glioma (who had been diagnosed in the People's Hospital, Zhengzhou University, from Jan. 2011 to Jun. 2011) receiving surgery. The percentages of CD133⁺, EGFRvⅢ⁺ and CD133⁺/EGFRvⅢ⁺ cells in the glioma tissues in different grades were analyzed by flow cytometry and the clinical features were compared. **Results:** The expression of CD133 and EGFRvⅢ in human glioma increased gradually with the pathologic grade of glioma tissue. The double positive CD133⁺/EGFRvⅢ⁺ cells were found in the glioma tissues of different grades. The percentage of CD133⁺/EGFRvⅢ⁺ cells was between (4.75 ± 1.26)% to (18.26 ± 3.45)% in different grades of gliomas, with the percentages of CD133⁺/EGFRvⅢ⁺ cells in grade Ⅲ and Ⅳ being higher significantly than that in grade Ⅱ ($P < 0.05$). CD133⁺/EGFRvⅢ⁺ cells exerted much more influence than did cells expressing CD133⁺ or EGFRvⅢ⁺ on survival time of the gliomas patients, and the median survival time of the patients with double positive CD133⁺/EGFRvⅢ⁺ was shorter. **Conclusion:** The co-expressions of CD133 and EGFRvⅢ exist in human gliomas, which are related with the degree of malignant glioma and the survival rate. Our study provides a new potential target for the treatment of glioma.

[Key words] glioma; cancer stem cell; CD133; EGFRvⅢ; flow cytometry

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(6): 628-631]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81172415)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81172415)

[作者简介] 栗超跃(1974 -)男, 河南省新野县人, 教授, 主要从事胶质瘤的基础和临床研究。E-mail: Dunawe@yahoo.com.cn。赵黎明(1987 -)男, 河南省禹州市人, 硕士生, 主要从事胶质瘤的免疫治疗方面的研究。E-mail: zhaoliming1201@126.com。△为共同第一作者

[通信作者] 韩双印(HAN Shuang-yin, correspondence author), E-mail: shuangyinhan@zzu.edu.cn

[网络出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20121210.1717.002.html

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤之一,占颅内肿瘤的 40% ~ 50%,由于发病率高、复发率高和致死率高,成为肿瘤治疗的难题。近年来,肿瘤干细胞的发现对脑胶质瘤的发生、发展提出了新的理论^[1],为其治疗拓展了新的思路。Singh 等^[2]从胶质瘤组织中分离出以 CD133 为标志物的肿瘤干细胞,从而证实了脑胶质瘤干细胞的存在。CD133 作为肿瘤干细胞的分子靶点在肿瘤治疗方面的潜在价值受到人们普遍的关注,但 CD133 也表达于神经、骨髓和外周造血细胞,这为其作为肿瘤治疗的靶点提出了挑战。表皮生长因子受体 III 型突变体 (epidermal growth factor receptor variant III, EGFRv III) 是胶质瘤中表达率很高的癌基因,与胶质瘤的多种恶性表型密切相关^[3,4],其在肿瘤细胞表面的特异性表达使其成为肿瘤治疗的理想靶点之一。本研究通过流式细胞术检测胶质瘤中 EGFRv III 和 CD133 的共表达情况,分析其临床特征,为脑胶质瘤的靶向治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料与主要试剂

标本取自郑州大学人民医院神经外科 2011 年 1 月至 2011 年 6 月手术切除的脑胶质瘤组织 40 例,患者年龄在 25 ~ 55 岁,中位年龄 45.7 岁,男女比例为 8:1,均为初次发病病例,手术前未行放疗化疗等治疗,术后均经过病理检查确诊。按照 2000 年 WHO 神经系统肿瘤分级标准对本行组织学分类和分级:II 级 17 例、III 级 12 例、IV 级 11 例;成胶质细胞瘤 11 例、间变性星型细胞瘤 7 例、间变性少突胶质细胞瘤 5 例、少突星型细胞瘤 14 例、室管膜瘤 3 例。本实验将 II 级定为低级别组,III 级和 IV 级定为高级别组,本组中低级别组 17 例、高级别组 23 例。Anti-EGFRv III-FITC 抗体、anti-CD133-APC 抗体为美国 BD 公司产品,胶原酶 I 为美国 Sigma 公司产品,流式细胞仪 FACS Aria II 为美国 BD 公司产品。

1.2 流式细胞术检测胶质瘤细胞中 CD133 与 EGFRv III 的表达

用生理盐水洗掉胶质瘤组织块表面血污,剪切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 小块,用冻存液(含 10% DMSO 高糖 DMEM)保存,置于程序降温盒内, -80 °C 保存。40 份标本收集完成后,将冰冻的肿瘤组织在 37 °C 速溶,胶原酶 I 消化溶解,37 °C 下孵育 1 h 后,用 300 目尼龙网过滤,1 500 × g 离心 5 min,弃上清液,以生理盐水漂洗,然后用 70% 冷乙醇固定,应用荧光抗体 anti-EGFRv III-FITC、anti-CD133-APC,按 1 μl 抗体/5 × 10⁵ 细胞的比例孵育染色 60 min,4 °C 冰箱保存,待流式细胞仪检测。兔 IgG/FITC、鼠 IgG/APC 作为同型对照抗体,PBS 为空白对照。

1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,各组间差异比较用 *t* 检验,生存率估计采用 Kaplan-Meier 法描绘生存曲线。*P* < 0.05 或 *P* < 0.01 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CD133、EGFRv III 在脑胶质瘤组织中的表达

流式细胞术检测脑胶质瘤组织中 CD133、EGFRv III 的表达,结果(表 1)显示,CD133 在 II、III、IV 级脑胶质瘤中的表达率均为 100%,而 EGFRv III 在各级别胶质瘤中的表达率明显不同。尽管 CD133 在各级脑胶质瘤所有病例中都有阳性表达,但不同级别的阳性表达组织中的 CD133⁺ 细胞比例却不同,从 II 级的(12.6 ± 2.3)% 到 III 级的(19.2 ± 3.12)% ,再到 IV 级的(24.8 ± 3.0)% (*P* < 0.05)。EGFRv III 在 II、III、IV 级脑胶质瘤中的表达率分别为 23.5% (4/17)、41.7% (5/12)、63.6% (7/11);其中 II 级胶质瘤阳性表达组织的细胞比例明显低于 III、IV 级 [(10.6 ± 2.5)% vs (17.7 ± 3.3)%、(26.2 ± 2.8)% ,*P* < 0.05]。

表 1 CD133⁺、EGFRv III⁺ 在胶质瘤中阳性表达率及阳性组织中的 CD133⁺、EGFRv III⁺ 细胞比例

Tab. 1 Expression rates of CD133⁺ and EGFRv III⁺ in different stages of gliomas

Pathological grade	Case	CD133 ⁺		EGFRv III ⁺	
		Positive [% (n/N)]	CD133 ⁺ cell ($\bar{x} \pm s$, %)	Positive [% (n/N)]	EGFRv III ⁺ cell ($\bar{x} \pm s$, %)
II	17	100(17/17)	12.6 ± 2.4(17)	23.5(4/17)	10.6 ± 2.6(4)
III	12	100(12/12)	19.2 ± 3.2(12)*	41.7(5/12)*	17.8 ± 3.3(5)*
IV	11	100(11/11)	24.8 ± 3.1(11)*	63.6(7/11)*	26.2 ± 2.8(7)*

* *P* < 0.05 vs grade II

以上结果表明, CD133、EGFRv III 表达率随肿瘤恶性级别逐步升高, CD133、EGFRv III 阳性细胞比例从胶质瘤 II 级到 IV 级逐渐增多, 不同的表达率及阳性细胞比例反映了肿瘤组织中细胞表型的异质性, 而且与肿瘤的恶性程度正相关。

2.2 高级别脑胶质瘤组织中 CD133⁺/EGFRv III⁺ 共表达细胞比例升高

利用 FITC 和 APC 双染检测各级别胶质瘤组织中

CD133 与 EGFRv III 共表达的细胞, 结果显示, 在不同级别胶质瘤中 CD133⁺/EGFRv III⁺ 细胞的共表达率在 (4.7 ± 1.2)% ~ (18.2 ± 3.4)% 之间, 高级别胶质瘤组织中 CD133⁺/EGFRv III⁺ 细胞明显增多 ($P < 0.05$)。图 1 显示一例 III 级少突星型细胞瘤中 CD133⁺/EGFRv III⁺ 细胞达 5.8% (图 1B)、III 级间变性星型细胞瘤中 CD133⁺/EGFRv III⁺ 细胞达 16.0% (图 1C)、IV 级成胶质细胞瘤中 CD133⁺/EGFRv III⁺ 细胞达 19.6% (图 1D)。

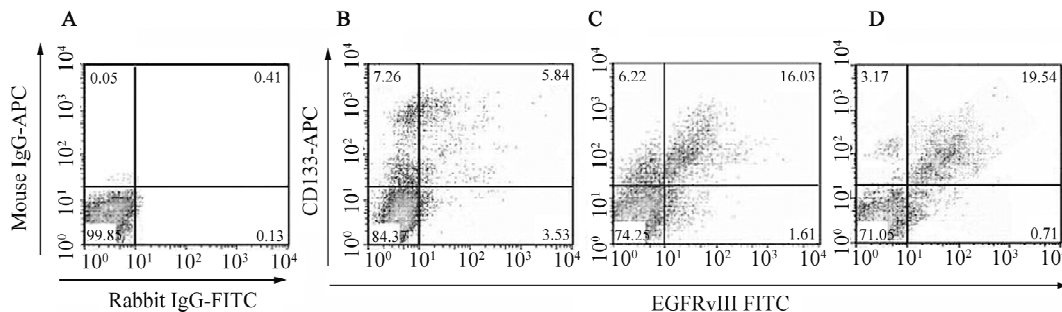


图 1 流式细胞术检测胶质瘤中 CD133⁺/EGFRv III⁺ 细胞的比例

Fig. 1 Ratio of CD133⁺/EGFRv III⁺ cells in gliomas detected by flow cytometry

A: Isotype control; B: Grade II oligodendroglioma; C: Grade III anaplastic astrocytoma; D: Grade IV glioblastoma

2.3 CD133/EGFRv III 共表达胶质瘤患者中位生存时间缩短

所有胶质瘤患者随访 6 ~ 12 个月, 平均 7.8 个月, 探讨胶质瘤组织中 CD133、EGFRv III、CD133/EGFRv III 表达与患者生存时间的关系。结果 (图 2) 表明, 患者中位生存时间依次 EGFR⁻/CD133⁻ > EGFR⁻/CD133⁺ > EGFR⁺/CD133⁻ > EGFR⁺/CD133⁺。CD133/EGFRv III 共表达患者生存时间明显缩短, 从 2 个月到 8 个月, 显示出 CD133/EGFRv III 共表达比 CD133、EGFRv III 单独表达对患者的生存时间有更大的影响。

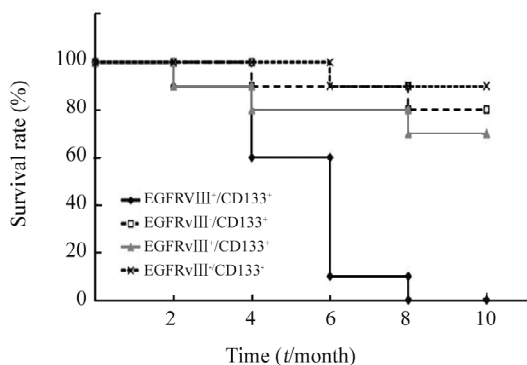


图 2 CD133⁺、EGFRv III⁺、CD133⁺/EGFRv III⁺ 胶质瘤患者的生存曲线

Fig. 2 Survival curves of CD133⁺, EGFRv III⁺ or CD133⁺/EGFRv III⁺ gliomas patients

3 讨论

近年来, 越来越多的证据^[5-6]表明, 脑胶质瘤中存在着具有干细胞特征的肿瘤干细胞, 对肿瘤的发生、发展等起着关键作用。CD133 作为脑胶质瘤干细胞的标记物得到了广泛的认可。Singh 等^[7]从脑胶质瘤中分离出具有干细胞特性的 CD133⁺ 细胞, 注射 100 个 CD133⁺ 细胞到 NOD/SCID 鼠脑内, 3 个月后即可出现胶质瘤, 免疫组化检测发现其与原发肿瘤有高度相似性; 而即使注入 1×10^5 个 CD133⁻ 细胞也不会产生肿瘤。进一步研究^[8-9]发现, CD133 的表达与脑胶质瘤的恶性程度、放疗抵抗及预后存在相关性。鉴于 CD133 阳性细胞的肿瘤干细胞特性, 其作为肿瘤治疗的分子靶点引起人们的极大兴趣^[10-11]。目前围绕阻断 CD133 信号通路, 恢复 CD133⁺ 细胞对放、化疗敏感性等方面的研究已取得一定进展^[12-13]。本研究表明, CD133 在各级别胶质瘤中均有表达, 且随着胶质瘤恶性程度的增加, CD133⁺ 细胞随之增多, 支持 CD133⁺ 肿瘤干细胞在胶质瘤发病中起着重要作用, CD133 可作为胶质瘤恶性程度的诊断指标之一。

EGFRv III 是 EGFR 最常见的缺失性突变体, 由外显子 2 ~ 7 的缺失导致外显子 1 和 8 的融合, 在细胞表面产生了肿瘤特异性表面抗原。EGFRv III 在

40% ~ 50% 恶性胶质瘤中表达,导致了细胞内多条信号通路的组成型激活,引起细胞的恶性转化^[14]。EGFRv III 在肿瘤细胞表面的特异性表达使其成为肿瘤治疗理想的分子靶点^[15-16]。John 等^[17]对手术后的胶质瘤患者连续 3 次皮内注射 EGFRv III 多肽疫苗,使患者中位生存期从 18.7 个月延长到 22.8 个月,据此制成的疫苗 PEP-3-KLH(CDX-110)^[18]已获美国 FDA 批准进入 III 期临床试验。张庆丽等^[19]构建 EGFRv III 噬菌体库,筛选出的 EGFRv III-scFv 可特异性地结合表达 EGFRv III 的 U87 胶质瘤细胞,为胶质瘤靶向治疗提供了基础。本课题组^[20]研制的针对 EGFRv III 的微小抗体(minibody)在免疫组化、免疫荧光等试验中也展示出良好的特异性和亲和性,正在进一步的转化医学研究之中。本研究中,EGFRv III 在胶质瘤标本中表达率随着胶质瘤级别的增高呈上升趋势,从 23.5% (II 级)到 63.6% (IV 级),差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 EGFRv III 的表达强度与胶质瘤的恶性程度相关,也提示了靶向 EGFRv III 在胶质瘤治疗中的重要性。

本研究分析了胶质瘤组织中 CD133 和 EGFRv III 的表达情况,探讨两者共表达对患者生存期的关系。结果显示,在各级别胶质瘤中均存在 CD133 和 EGFRv III 共表达细胞,随着胶质瘤病理级别的增加其共表达阳性率也增高,同时 CD133/EGFRv III 共表达比 CD133、EGFRv III 单独表达对胶质瘤患者的生存期影响更大,共表达患者中位生存时间明显缩短。

CD133⁺/EGFRv III⁺ 细胞的发现为胶质瘤的靶向治疗提供了新的靶标,为高效、特异、安全的临床肿瘤治疗提供了实验依据,对恶性胶质瘤的治疗将产生积极的意义。

[参 考 文 献]

- [1] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [J]. *Nature*, 2001, 414(6859): 105-111.
- [2] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(18): 5821-5828.
- [3] Montano N, Cenci T, Martini M, et al. Expression of EGFRv III in glioblastoma: Prognostic significance revisited [J]. *Neoplasia*, 2011, 13(12): 1113-1121.
- [4] Lammering G, Hewit TH, Holmes M, et al. Inhibition of the type III epidermal growth factor receptor variant mutant receptor by dominant-negative EGFR-CD533 enhances malignant glioma cell radiosensitivity [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(19): 6732-6743.
- [5] Yuan X, Cunin J, Xiong Y, et al. Isolation of cancer stem cell from adult glioblastoma multiforme [J]. *Oncogene*, 2004, 23(58): 9392-9400.
- [6] Dirks PB. Brain tumor stem cells: The cancer stem cell hypothesis writ large [J]. *Mol Oncol*, 2010, 4(5): 420-430.
- [7] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells [J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 396-401.
- [8] Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, et al. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(1): 123-129.
- [9] Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, et al. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma [J]. *Cancer Cell*, 2010, 17(4): 362-375.
- [10] Yu SP, Yang XJ, Zhang B, et al. Enhanced invasion *in vitro* and the distribution patterns *in vivo* of CD133⁺ glioma stem cells [J]. *Chin Med J*, 2011, 124(17): 2599-2604.
- [11] 孟祥姣, 王秀问, 马道新. CD133 在实体肿瘤干细胞研究中的作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(2): 185-188.
- [12] Qin K, Jiang X, Zou Y, et al. Study on the proliferation and drug-resistance of human brain tumor stem-like cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2010, 30(6): 955-960.
- [13] Hua W, Yao Y, Chu Y, et al. The CD133⁺ tumor stem-like cell-associated antigen may elicit highly intense immune responses against human malignant glioma [J]. *Neurooncol*, 2011, 105(2): 149-157.
- [14] Sihto H, Puputti M, Pulli L, et al. Epidermal growth factor receptor domain II, IV, and kinase domain mutations in human solid tumors [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2005, 83(12): 976-983.
- [15] Miller BR, Demarest SJ, Lugovskoy A, et al. Stability engineering of scFvs for the development of bispecific and multivalent antibodies [J]. *Protein Eng Des Sel*, 2010, 23(7): 549-557.
- [16] Haque A, Banik NL, Ray SK. Molecular alterations in glioblastoma: Potential targets for immunotherapy [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2011, 98: 187-234.
- [17] John H, Gary E, Duane A, et al. An epidermal growth factor receptor variant III-targeted vaccine is safe and immunogenic in patients with glioblastoma multiforme [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(10): 2773-2779.
- [18] Heimberger AB, Sampson JH. The PEP-3-KLH(CDX-110) vaccine in glioblastoma multiforme patients [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2009, 9(8): 1087-1098.
- [19] 张庆丽, 石必之, 蒋华, 等. EGFRv III 特异性单链抗体的制备及靶向性能 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011, 18(1): 11-16.
- [20] Gupta P, Han SY, Holgado-Madruga M, et al. Development of an EGFRv III specific recombinant antibody [J]. *BMC Biotechnol*, 2010, 10(72): 1-13.

[收稿日期] 2012-08-05

[修回日期] 2012-10-25

[本文编辑] 王莹