

肝母细胞瘤中的干细胞表面标记物的初步识别*

张守华¹, 肖菊花², 邓庆强¹, 徐红艳¹, 罗鸣¹, 谌卫龙¹, 雷俊¹, 陶强^{1△}

(1. 江西省儿童医院普外科, 南昌 330006; 2. 江西省妇幼保健院超声诊断科, 江西南昌 330006)

摘要:目的 初步筛选出肝母细胞瘤(HB)中的肿瘤干细胞(NSC)相关表面标记组合,并了解 NSC 的分布。方法 选择入住江西省儿童医院并接受手术的 HB 患儿,采用免疫组织化学染色的方法,观察干细胞相关标记物 CD34、Thy-1、c-kit、CD56 和干细胞生长因子(SCF),在 HB 组织及距肿瘤组织边缘 3 cm 以外的正常肝脏组织的表达和分布。结果 Thy-1、c-kit 散在分布于 HB 组织中,主要集中在汇管区,而正常肝脏组织中不表达;CD34 及 SCF 在 HB 中的表达明显高于正常肝脏组织($P < 0.05$),其中 CD34 主要在血管内皮系统中分布,SCF 主要表达在汇管区;CD56 表达于成簇的神经纤维组织中,在 HB 及正常肝脏组织中表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 不同干细胞相关表面标志物分布于 HB 组织中,并且集中表达在特定区域。表达 Thy-1/c-kit 阳性细胞可能对 HB 的发生起一定作用。

关键词:肿瘤干细胞;肝母细胞瘤;抗原,CD34;抗原,Thy-1;原癌基因蛋白质 c-kit

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.10.020

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)10-1208-03

Preliminary recognition of stem cells surface markers in hepatoblastoma*

Zhang Shouhua¹, Xiao Juhua², Deng Qingqiang¹, Xu Hongyan¹, Luo Ming¹, Chen Weilong¹, Lei Jun¹, Tao Qiang^{1△}

(1. Department of General Surgery, Jiangxi Provincial Children's Hospital, Nanchang, Jiangxi 330006, China;

2. Department of Ultrasound Diagnosis, Jiangxi Provincial Maternal and Child Health Care Hospital, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: Objective To preliminarily screen the neoplastic stem cell(NSC) related surface markers combination and to understand the NSC distribution in hepatoblastoma(HB). **Methods** The children cases of HB undergone the surgical therapy in the Jiangxi Provincial Children's Hospital were selected. The immunohistochemical method was adopted for observing the expression and distribution of NSC-related markers CD34, Thy-1, c-kit, CD56 and stem cell factor(SCF) in the HB tissue and the normal hepatic tissue away from the edge of tumor tissue 3cm outside. **Results** Thy-1 and c-kit were sporadically distributed in the HB tissue and mainly focused on the portal area, but did not expressed in the normal liver tissue; the expression of CD34 and SCF in HB was significantly higher than that in the normal liver tissue($P < 0.05$), in which CD34 was mainly distributed in the endothelial system and SCF was mainly expressed in the portal area; CD56 was expressed in the tissue of the clustered nerve fibers, the expression difference between them had no statistical significance($P > 0.05$). **Conclusion** The different NSC related surface markers are distributed in the HB tissue and focus on the specific areas. The positive cells of Thy-1/c-kit expression may play a role in the HB occurrence.

Key words: neoplastic stem cells; hepatoblastoma; antigens, CD34; antigens, Thy-1; proto-oncogene proteins c-kit

肿瘤干细胞(neoplastic stem cells, NSC)的存在已在许多肿瘤细胞株及原发性肿瘤中得到了证实。NSC 学说认为,肿瘤组织由异质性的细胞组成,其中有极少部分细胞亚群具有起始肿瘤的能力,它们虽然数量极少,却在肿瘤发生、转移和复发中起重要作用。目前如白血病、乳腺癌、胃癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌、卵巢癌等均证实了 NSC 的存在^[1],可是肝母细胞瘤(hepatocastoma, HB)的 NSC 却一直未能确定,而筛选出合适的表面标记组合是有效分离和鉴定 NSC 的前提。本文旨在初步探讨 HB 的 NSC 相关表面标记物存在的合理性,为后续的 NSC 标记物分离和确定提供依据和参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2002~2012 年江西省儿童医院普外科收治的 HB 患儿 8 例(肿瘤组),其中男 5 例,女 3 例,年龄 15 d~10 岁,平均发病年龄为 19.8 个月,术前未经放疗、化疗,8 例患儿均手术完整切除并经病理检查诊断为 HB,根据病理分型,其中上皮型 4 例,混合型 4 例。取距肿瘤组织边缘 3 cm 以外的正常肝脏组织作为对照组。

1.2 方法 标本组织离体后立即取材,并以 4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,4 μm 切片。石蜡包埋组织切片经常规脱蜡

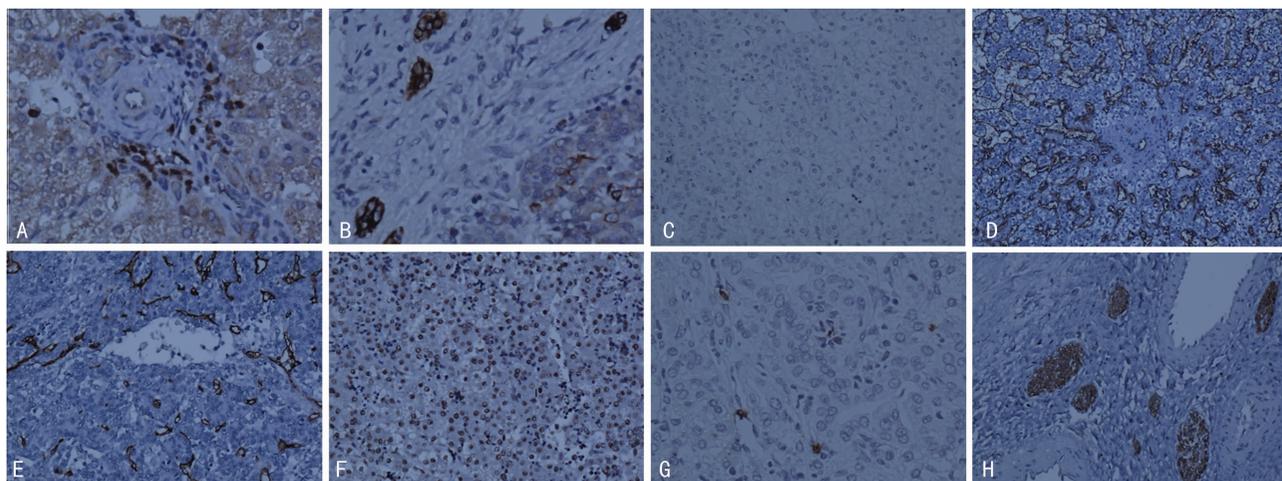
至水,3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶,山羊血清封闭,抗原修复,然后采用常规 SP 免疫组织化学方法检测 CD34、Thy1、c-kit 以及干细胞生长因子(SCF)和 CD56 的蛋白表达情况。由两位病理科医生独立阅片,在光学显微镜下观察阳性细胞的分布特征。以出现棕黄色、高出背景色者为阳性细胞。选取具有代表性的肿瘤区域,在高倍镜下(×400)随机选取 10 个视野,记录阳性细胞占组织细胞的百分率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS15.0 统计软件对数据进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

本文 8 例患儿 HB 组织中均可见到表达 CD34、Thy-1、c-kit、SCF 和 CD56 阳性细胞,其中 Thy1、c-kit 散在分布于肿瘤组织,主要集中在汇管区(图 1A、B),而在正常肝脏组织中不表达(图 1C);CD34 主要表达于血管内皮系统,HB 组织中的表达明显高于正常肝脏组织(图 1D、E, $P < 0.05$);SCF 阳性细胞主要分布于汇管区,HB 中的表达明显高于正常肝脏组织(图 1F、G, $P < 0.05$);CD56 表达于成簇的神经纤维组织中,二者表达差异无统计学意义(图 1H, $P > 0.05$)。两组 CD34、SCF

* 基金项目:江西省卫生计生课题资助项目(20131137)。 作者简介:张守华(1982-),主治医师,硕士研究生,主要从事儿童肿瘤以及干细胞研究。 △ 通讯作者, Tel:13979170606; E-mail:taoqiang_2008@126.com。



A: HB 组织中 Thy-1 阳性细胞; B: HB 组织中 c-kit 阳性细胞; C: 正常肝脏组织中 Thy-1 阴性表达; D: HB 组织中 CD34 阳性细胞; E: 正常肝脏组织中 CD34 阳性细胞; F: HB 组织中 SCF 阳性细胞; G: 正常肝脏组织中 SCF 阳性细胞; H: HB 组织中 CD56 阳性细胞。

图 1 HB 及正常肝脏组织中相关标记物表达 (×400)

和 CD56 的表达比较, 见表 1。

表 1 两组 CD34、SCF 等表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	CD34	SCF	CD56
肿瘤组	0.32 ± 0.09	0.43 ± 0.09	0.11 ± 0.04
对照组	0.17 ± 0.07	0.11 ± 0.04	0.09 ± 0.09
P	<0.01	<0.01	>0.05

3 讨论

HB 是小儿最常见的肝脏原发性恶性肿瘤, 在小儿恶性实体性肿瘤中, HB 发病率仅次于肾母细胞瘤和神经母细胞瘤, 位于第 3 位^[2]。儿童 HB 是一种胚胎性肿瘤, 其有未成熟的胚胎性组织, 这些组织持续增生, 形成发育幼稚的组织块而可能转化成恶性的母细胞瘤。HB 病理组织学上可分为上皮型及混合型^[3]。上皮型又分为 4 个亚型: 胎儿性、胚胎型、巨梁型、小细胞未分化型。HB 明确的发病机制尚未完全明了, 有学者认为可能与染色体异常、低出生体质量、母体妊娠期不良外界因素等有关。HB 的预后不容乐观, 特别是在中国, 由于患儿就诊较晚, 手术完整切除率低, 治疗不规范, 3 年生存率小于 50%^[4]。但近年 NSC 理论的出现一定程度上为 HB 的发病机制、治疗和预后提供了新的视角。该理论认为, NSC 是存在于肿瘤细胞中的一个亚群, 具有高度自我更新及无限增殖能力, 呈不对称分裂, 大量事实证实其与肿瘤发生、侵袭、转移、复发及耐药密切相关。许多肿瘤如乳腺癌、前列腺癌等, 均分离出了 NSC, 但 HB 的 NSC 表面标记物一直未能确定。

卵圆细胞是人们目前公认的肝组织中的肝源性肝干细胞, 是肝内胆管系统源性的多潜能分化细胞群, 可以分化为胆管上皮细胞和肝细胞^[5]。OV6、SCF、c-kit、CK-8、CD34、CD49、Thy-1、AFP 等被认为是卵圆细胞表达相对较高的标志物, 其某些标志物可以作为今后肝 NSC 筛选的参考标志物。本研究基于此前对肝脏干细胞的研究, 结合文献^[6-7]报道, 初步设想 HB 的 NSC 相关几个表面标记物并验证其合理性。本研究采用免疫组织化学染色的方法, 观察表达 CD34、Thy1、c-kit、SCF 和 CD56 的阳性细胞在 HB 组织及正常肝脏组织的表达情况和分布, 结果发现, Thy-1、c-kit 散在分布于 HB 组织, 主要集中在汇管区, 而正常肝脏组织中表达为阴性。Thy-1 是相对分子质量为 25~37 × 10³ 的细胞表面糖蛋白, 通过二酰甘油(DAG)锚定于糖基磷脂酰肌醇(GPI)的 C 末端而附着在细胞膜的胞浆

面, 参与细胞的分化、识别、迁徙等功能。人类许多实体瘤细胞(包括脑瘤、皮肤瘤)中都有 Thy-1 的表达, 广泛分布于许多恶性肿瘤中。有研究表明在某些肿瘤如肝癌、肺癌等组织中, 其表达情况与病理类型、肿瘤转移以及预后密切相关。Yang 等^[8]从肝癌细胞株和肝癌组织中筛选出 Thy-1 阳性细胞, 异种移植入重症复合型免疫缺陷病小鼠体内, 发现其有致瘤性, 病理提示符合肝细胞肝癌的诊断, 进一步指出 Thy-1 阳性肝癌细胞具有自我更新、多向分化和高致瘤性等生物学特性, 是肝癌干细胞的特异性标志物。c-kit 基因位于人染色体 4q12-13, 属于原癌基因, 其产物是 III 型酪氨酸激酶, 编码 145 × 10³ 的跨膜糖蛋白, c-kit 受体分布于细胞表面, 结构类似于粒-巨核细胞集落刺激因子(GM-CSF)和血小板源生长因子受体(PDGF-R)^[9]。c-kit 与其配体结合后, 诱导其胞外区的构象发生变化, 使受体在细胞膜上迁移、聚集, 形成二聚体, 使得酪氨酸激酶磷酸化, 继而激活酪氨酸激酶功能区, 细胞质内多个蛋白质持续磷酸化, 这些效应分子的磷酸化促发细胞间信号的瀑布级链反应, 调控 c-kit 的下游底物, 包括 MAPK、Ras-Raf-MAP、JAK/STAT 等多条信号传导通路, 最终活化细胞质内的转录因子, 从而调节基因表达, 控制细胞生长、增殖和分化^[10]。诸如急性髓细胞白血病、肺癌、肝癌等恶性肿瘤均有 c-kit 的表达, 有些肿瘤如胃肠道间质瘤, 甚至认为 c-kit 是其特征性标记物^[11]。c-kit 基因诱导肿瘤有两种方式, (1)c-kit 基因的过表达, 激活下游信号通路, 引起肿瘤过度增殖所导致; (2)c-kit 基因发生突变, 导致非配体依赖性的受体二聚体形成, 从而激活 c-kit 的酪氨酸激酶活性, 并持续刺激下游的信号传导通路, 引起细胞不断的生长、增殖, 最终成为肿瘤细胞^[12]。结合 Thy-1 和 c-kit 的特性本研究发现, 其主要在 HB 组织的汇管区表达, 而在正常肝组织中不表达或表达极少。由此, 本研究推测 Thy-1/c-kit 阳性细胞可能在 HB 的发生起一定作用。

SCF 又称肥大细胞生长因子, SCF 可以促使处于 G₀ 期的干细胞进入细胞分裂周期, 以此促进干细胞的增殖和分化。另外, SCF 还可抑制细胞凋亡过程, 从而提高细胞的存活力^[13-14]。SCF 在人体肝脏、骨髓、胎盘、睾丸和肾脏等多种组织和细胞中都有表达, 特别是干细胞群体更是高表达。有研究表明, 在肺癌、神经系统肿瘤、前列腺癌等均有 c-kit 和 SCF 共表达现象。CD34 在血管内皮细胞均有表达, 在肿瘤组织中是判断新生血管、侵袭性、恶性程度的重要指标^[15]。本实验中发

现 CD34 及 SCF 在 HB 组织中的表达明显高于正常肝组织,这可能与肿瘤新生血管、恶性程度有关,与 NSC 的关系有待进一步研究。CD56 是神经细胞黏附分子的一种糖蛋白,位于中枢和外周神经细胞及纤维膜表面,在神经系统的生长发育发挥重要作用。本实验发现 CD56 均表达于 HB 以及正常肝脏组织中成簇的神经纤维组织,二者在数量、分布未见明显差异。

HB 是儿童最常见的肝脏原发恶性肿瘤,其最基本的治疗方法是手术切除或通过化疗增加可切除的 HB 病例数^[16]。但部分病例因原发性、继发性或多药耐药性而对化疗不敏感,预后极差。NSC 理论在一定程度上为治疗提供了新的视角,鉴定和筛选 HB 中 NSC 并了解表面标记组合的相关调控机制和信号通路,对发现潜在的药物靶点,进而为临床治疗、提高治愈率和长期存活率都具有重要意义。

参考文献:

- [1] Jiang W, Peng J, Yue Zhang Y, et al. The implications of cancer stem cells for cancer therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(12):16636-16657.
- [2] Horton JD, Lee S, Brown SR, et al. Survival trends in children with hepato-blastoma[J]. *Pediatr Surg Int*, 2009, 25(5):407-441.
- [3] 张伟令, 张谊, 黄东生, 等. 儿童晚期肝母细胞瘤综合治疗的疗效观察[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2013, 28(7):521-524.
- [4] 张法标, 王义, 丛文铭, 等. 儿童期及青春期肝细胞癌临床病理特点及影响术后生存率的多因素分析[J]. *中华小儿外科杂志*, 2006, 27(1):1-5.
- [5] 付文广, 梁天成, 雷正, 等. 肝卵圆细胞与原发肝癌的相关性研究[J]. *泸州医学院学报*, 2012, 35(1):23-26.
- [6] Fiegel HC, Gluer S, Rönner B, et al. Stem-like cells in human hepatoblastoma[J]. *Histochem Cytochem*, 2004, 52(11):1495-1501.
- [7] 张守华, 廖彩仙, 张春兴, 等. 肝纤维化小鼠骨髓源性肝干细胞动员及确定实验研究[J]. *广东医学*, 2007, 28(10):1577-1579.

- [8] Yang ZF, Ho DW, Ng MN, et al. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer[J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(2):153-166.
- [9] Kikuchi H, Miyazaki S, Setoguchi T, et al. Rapid relapse after resection of a sunitinib-resistant gastrointestinal stromal tumor harboring a secondary mutation in exon 13 of the c-KIT gene[J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(9):4105-4109.
- [10] Agarwal S, Kazi JU, Rönnerstrand L. Phosphorylation of the activation loop tyrosine 823 in c-kit is crucial for cell [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(31):22460-22468.
- [11] Gao J, Dang Y, Sun N, et al. C-KIT mutations were closely associated with the response to imatinib in Chinese advanced gastrointestinal stromal tumor patients[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(5):3039-3045.
- [12] Sun J, Pedersen M, Rönnerstrand L, et al. The D816V mutation of c-kit circumvents a requirement for Src family kinases in c-kit signal transduction[J]. *J Biol Chem*, 2009, 28(17):11039-11047.
- [13] Du Z, Cai H, Ye Z, et al. Optimization of SCF feeding regimen for ex vivo expansion of cord blood hematopoietic stem cells[J]. *J Biotechnol*, 2012, 164(2):211-219.
- [14] Tajima F, Tsuchiya H, Nishikawa K, et al. Hepatocyte growth factor mobilizes and recruits hematopoietic progenitor cells into liver through a stem cell factor-mediated mechanism[J]. *Hepatol Res*, 2010, 40(7):711-719.
- [15] Jiang JT, Zhang LF, Zhou B, et al. Relationships of uPA and VEGF expression in esophageal cancer and microvascular density with tumorous invasion and metastasis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(7):3379-3383.
- [16] 李长春, 金先庆. 儿童肝母细胞瘤诊治进展[J]. *重庆医学*, 2007, 36(15):1481-1482.

(收稿日期:2013-09-18 修回日期:2013-11-25)

(上接第 1207 页)

参考文献:

- [1] 中华医学会消化病学分会. 肠易激综合症的共识意见[J]. *中华内科杂志*, 2003, 42(9):669-670.
- [2] 中华医学会. 第一届全国肠易激综合症学术会议纪录[J]. *中华消化杂志*, 2003, 23(7):428-428.
- [3] 胡敏, 刘诗. 肠易激综合症[J]. *临床消化病杂志*, 2012, 24(2):103-104.
- [4] 胡俊, 胡团敏, 何文钦. 黄术灌肠液对腹泻型肠易激综合症大鼠 IL-1 β 、IL-10 表达的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(21):2188-2191.
- [5] 毛丽娟, 韩树堂. 肠易激综合症中西医诊疗进展[J]. *中西医结合研究*, 2011, 3(1):28-30.
- [6] 李熠萌, 蔡滢. 腹泻型肠易激综合症的中医研究进展[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2009, 11(4):541-544.
- [7] 乔明崎. 肝气逆、肝气郁两证客观指标实验研究[J]. *山东中医学院学报*, 1992, 22(3):23-26.
- [8] Spinelli A. Irritable bowel syndrome[J]. *Clin Drug Investig*,

2007, 27(1):15-33.

- [9] 吕妍, 李丹, 唐方. 藿香单品对腹泻型肠易激综合症大鼠胃肠激素的影响[J]. *中医杂志*, 2010, 51(5):237-239.
- [10] 熊观瀛, 林琳. P 物质与肠易激综合症[J]. *国外医学内科学分册*, 2003, 30(6):245-247.
- [11] 谢建群, 郑昱, 吴大正, 等. 疏肝饮对腹泻型肠易激综合症大鼠血管活性肠肽和 P 物质的影响[J]. *上海中医药大学学报*, 2004, 18(3):291-293.
- [12] 杨云生, 张万岱. 肠易激综合症血浆及乙状结肠黏膜中 CCK 及 SP 的含量[J]. *新消化病学杂志*, 1997, 5(7):437-438.
- [13] 石君杰, 戴玉英, 徐发莹. 逍遥散对肠易激综合症大鼠作用的实验研究[J]. *福建中医药*, 2007, 38(6):54-56.
- [14] 王丽华, 董宏生, 李颖辰, 等. 肠易激综合症中医证型血中胃肠激素水平初探[J]. *中医药学刊*, 2005, 23(9):1618-1619.
- [15] 田力男. 浅论腹泻型肠易激综合症的中医治疗[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2011, 9(10):139-140.

(收稿日期:2013-10-10 修回日期:2013-12-07)