

ALDH1A3 和 CD133 在皮肤鳞状细胞癌中的表达及其临床意义

陈 雷¹, 吕大伦¹, 刘雯蓓², 丁 伟¹, 张 炜¹, 王合丽¹, 王 帅¹

(皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 1. 烧伤整形外科; 2. 皮肤性病科, 安徽 芜湖 241001)

【摘要】目的: 探讨和研究肿瘤干细胞标志物 ALDH1A3 和 CD133 在人皮肤鳞状细胞癌中的表达及其临床意义。方法: 收集我院烧伤整形外科 2012 ~ 2016 年手术切除 34 例皮肤鳞癌组织蜡块标本及 11 例整形手术切除正常皮肤组织, 采用免疫组化方法对两组标本中的 ALDH1A3 和 CD133 蛋白表达水平进行检测。结果: ALDH1A3 和 CD133 在皮肤鳞状细胞癌患者瘤体组织中高表达(表达肿瘤干细胞标志蛋白的细胞比例较高), ALDH1A3 阳性表达率为 73.52% (25/34), CD133 阳性表达率为 79.41% (27/34)。ALDH1A3 和 CD133 在正常皮肤组织中低表达(表达肿瘤干细胞标志蛋白的细胞比例较低), ALDH1A3 阳性表达率为 18.18% (2/11), CD133 阳性表达率为 9.09% (1/11)。ALDH1A3 和 CD133 在皮肤鳞状细胞癌瘤体组织和正常皮肤组织均有表达, 但在瘤体组织中的表达率更高, 且两组差异性具有统计学意义($P < 0.05$)。结论: ALDH1A3 和 CD133 蛋白在皮肤鳞状细胞癌瘤体组织中呈异常高表达, 可能在皮肤鳞状细胞癌的发生、发展、分期中起到重要作用, 并将有可能作为皮肤鳞状细胞癌肿瘤干细胞新的标志物。

【关键词】皮肤鳞状细胞癌; 肿瘤干细胞标志物; ALDH1A3; CD133

【中图分类号】R 739.5; R 392.1 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2018.03.007

Expression and clinical significance of tumor stem cell marker ALDH1A3 and CD133 in cutaneous squamous-cell carcinoma

CHEN Lei, LÜ Dalun, LIU Wenbei, DING Wei, ZHANG Wei, WANG Heli, WANG Shuai

Department of Burn and Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

【Abstract】Objective: To investigate the expression and clinical significance of tumor stem cell markers ALDH1A3 and CD133 in squamous-cell carcinoma of skin. **Methods:** The tissue samples were obtained from 34 patients of cutaneous squamous-cell cancer and 11 subjects undergone plastic surgery for removal of the normal skins in our department between 2012 and 2016. Immunohistochemical method was used to detect the expression of ALDH1A3 and CD133 protein in the tissues of the two groups. **Results:** ALDH1A3 and CD133 were highly expressed in cutaneous squamous-cell carcinoma, yet moderately expressed in the tissues of normal skins [positive rate: 73.52% (24/34) and 79.41% (27/34) vs. 18.18% (2/11) and 9.09% (1/11)]. Although both ALDH1A3 and CD133 were expressed in the tissues of cutaneous squamous-cell carcinoma and normal skins, yet the expression was higher in the tumor tissues, with significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion:** Abnormal expression of ALDH1A3 and CD133 protein was seen in cutaneous squamous-cell cancer, suggesting that the two proteins can be important roles in the occurrence, development and staging of squamous cell carcinoma of the skin, and may serve as a marker for clinical diagnosis of this neoplasm.

【Key words】cutaneous squamous-cell carcinoma; tumor stem cell marker; ALDH1A3; CD133

皮肤鳞状细胞癌(cutaneous squamous cell carcinomas, SCC)又名棘细胞癌(prickle cell carcinoma),起源于皮肤中角质层。主要好发于长期暴露、易接触理化因素刺激部位,如头部、面颈部和手背等,且以老年患者居多。在我国皮肤肿瘤中 SCC 发生率最高,因其肿瘤特性,早期往往没有引起患者的

足够重视,以致确诊时部分患者已发生淋巴及血性转移。目前 SCC 发生机制尚不十分清楚,因此研究该病的发病机制并寻找出可以提高早期诊断率的方法是控制此类疾病的关键。我科采用免疫组化法对 SCC 和正常皮肤组织中 ALDH1A3 和 CD133 表达进行检测,现报道如下。

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金项目(KJ2017A273)

收稿日期: 2017-07-25

作者简介: 陈 雷(1992-),男,2015 级硕士研究生,(电话)15212201619,(电子信箱)chenlei1619@163.com;

吕大伦,男,主任医师,副教授,硕士生导师,(电子信箱)ldl0776@126.com,通信作者。

1 材料与方法

1.1 材料 收集我院 2012 ~ 2016 年手术切除 34 例皮肤鳞癌组织蜡块标本,患者年龄 47 ~ 80 岁,平均(67 ± 9)岁,部位:头顶部 18 例、面部 8 例、足部 6 例、其他部位 2 例。病理: I 级鳞癌(高分化)18 例、II 级鳞癌(中分化)15 例、III 级鳞癌(低分化)1 例。11 例美容手术切除标本,患者年龄 20 ~ 31 岁,平均(25 ± 3)岁,部位:全部为双眼皮成形术切除的上睑皮肤组织。

1.2 方法 通过收集皮肤鳞状细胞癌肿瘤组织蜡块,采用免疫组化法进行 ALDH1A3 和 CD133 表达的检验,同时收集整形手术中获取的正常皮肤组织 ALDH1A3 和 CD133 表达作阴性对照进行检测,并且我们还切取部分乳腺癌瘤体组织作为阳性对照。免疫组化法步骤如下:①切片常规脱蜡、水化;②预处理组织切片;③PBS 冲洗,2 分钟/次,共冲洗 3 次;④一抗孵育 30 min 或 60 min;⑤PBS 冲洗,2 分钟/次,共冲洗 3 次;⑥PicTure-Plus;液孵育 15 ~ 30 min;⑦PBS 冲洗,2 分钟/次,共冲洗 3 次;⑧DAB 染色,光镜下控制时间;⑨蒸馏水漂洗;⑩复染及封片。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 18.0 进行统计学处理。计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

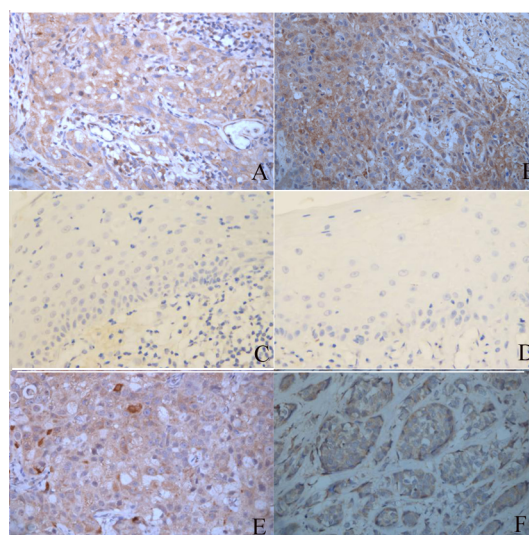
在高倍镜下(400 ×) 每张切片随机选取 5 个视野(每个视野 200 个细胞),计数正常上皮组织细胞及皮肤鳞状细胞癌组织中的肿瘤细胞,统计阳性细胞所占的百分数,并按如下分级:阳性细胞数 > 10% 则视为阳性表达; > 50% 为卅; 30% ~ 50% 为卅; 10% ~ 30% 为 +; < 10% 为阴性表达。本次研究中 ALDH1A3 在 SCC 组织中阳性表达率为 73.52% (25/34) (见图 1A、表 1), CD133 在 SCC 组织中阳性表达率为 79.41% (27/34) (见图 1B、表 1)。ALDH1A3 在正常皮肤中阳性表达率为 18.18% (2/11) (见图 1C、表 2), CD133 在正常皮肤中阳性表达率为 9.09% (1/11) (见图 1D、表 2)。对两种蛋白在正常组织及鳞癌组织中阳性率的比较可见: ALDH1A3 和 CD133 在 SCC 组织中的阳性表达均高于正常组织, ALDH1A3: $\chi^2 = 8.43$ 、CD133: $\chi^2 = 14.62$, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。对三级鳞癌分组中 ALDH1A3 和 CD133 表达情况进行 gamma 值计算,两组 gamma 值均 > 0, ALDH1A3: $G = 0.7$ 、CD133: $G = 0.694$ 由此可知 ALDH1A3 和 CD133 在癌细胞中表达与 SCC 恶性程度成正相关。

表 1 ALDH1A3 在正常组织及不同级别鳞癌中表达情况

组别	n	ALDH1A3				阳性率/%
		-	+	++	+++	
正常组织	11	9	2	0	0	18.18
I 级鳞癌	18	6	8	3	1	66.67
II 级鳞癌	15	3	4	5	3	80.00
III 级鳞癌	1	0	0	0	1	100

表 2 CD133 在正常组织及不同级别鳞癌中表达情况

组别	n	CD133				阳性率/%
		-	+	++	+++	
正常组织	11	10	1	0	0	9.09
I 级鳞癌	18	4	8	5	1	77.78
II 级鳞癌	15	3	4	6	2	80.00
III 级鳞癌	1	0	0	0	1	100



A. ALDH1A3 在皮肤鳞状细胞癌组织中表达; B. CD133 在皮肤鳞状细胞癌组织中表达; C. ALDH1A3 在正常皮肤组织中表达; D. CD133 在正常皮肤组织中表达; E. ALDH1A3 在乳腺癌组织中表达; F. CD133 在乳腺癌组织中表达。

图 1 ALDH1A3 和 CD133 在正常皮肤组织及癌组织的表达

3 讨论

3.1 SCC 起源于表皮或附属器角质形成细胞,世界范围内发病率仅低于基底细胞癌(basal cell carcinoma, BCC)的非黑色素瘤(non melanoma)类恶性肿瘤,并且我国发病率较高。相对于基底细胞癌而言,SCC 在非黑色素瘤皮肤癌发病率中约占 20%。SCC 有着极强的恶性趋势,转移率较高,而且近年来 SCC 患病人数在逐年增长^[1]。研究 SCC 的发生机理和寻求提高早期诊断成功率的方法具有重要的临床意义。

3.2 跨膜糖蛋白 CD133 和乙醛脱氢酶 ALDH1A3 作为肿瘤干细胞标志物的重要性被越来越多的学者所熟知^[2-4]。CD133 蛋白基因位于 4 号染色体,由 865 个氨基酸组成。2003 年首次被学者报道发现于

脑肿瘤干细胞表面 在研究中发现 CD133 (+) 的脑肿瘤干细胞中,肿瘤的自我更新能力尤为突出。此后陆续有学者报道 CD133 被发现于卵巢癌、前列腺癌、肝癌、结肠癌的干细胞中,并且在大鼠的动物实验中显示 CD133 (+) 组比 CD133 (-) 组的肿瘤干细胞具有更强大的增殖、克隆能力^[5]。后 Patel 发现 CD133 在皮肤鳞状细胞癌中也存在异常高表达,并且 CD133 表达程度与肿瘤的分化、预后密切相关^[6]。由此可推断 CD133 对于皮肤鳞状细胞癌的发生、发展起到重要作用,可能为其特异性肿瘤标志物。ALDH1A3 是 ALDH 家族的成员,ALDH 是参与细胞内的维甲酸生产的酶^[7]。维甲酸在细胞分化过程及干细胞对机体自我保护中起重要作用^[8]。已发现在多发性骨髓瘤和急性髓系白血病肿瘤干细胞中 ALDH1A3 高表达^[9]。在人类乳腺癌细胞中 ALDH1A3 是特异性肿瘤标记物,其表达情况与乳腺癌患者预后相关^[10]。同时 ALDH1A3 的表达情况也可以作为肺肿瘤分级的指标,并且随着表达等级的提高,肺癌患者预后也随之越差^[11]。此外,最新报道显示 ALDH1A3 也被证明是前列腺肿瘤干细胞特异性标记物^[12]。ALDH1A3 是众多肿瘤的特异性标记物,但其在人皮肤鳞状细胞癌组织中表达国内外鲜有报道。

3.3 ALDH1A3 和 CD133 已被证明是众多肿瘤细胞特异性标记物,并且 CD133 在 SCC 的发生、发展中起到重要作用,同时 ALDH1A3 和 CD133 与肿瘤分级、转移、愈后等密切相关。由本实验数据可知 ALDH1A3 和 CD133 在 SCC 组织的中阳性表达率为 73.52% 和 79.41%,ALDH1A3 和 CD133 在正常皮肤组织中的阳性表达率分别为 18.18% 和 9.09%。ALDH1A3 和 CD133 在 SCC 组织中的阳性表达高于正常皮肤组织,并且采用同样方法将乳腺癌组织 ALDH1A3 和 CD133 的表达做阳性对照(见图 1E、F)。从而推断 ALDH1A3 和 CD133 可能是 SCC 肿瘤干细胞特异性标记物,并可作为 SCC 诊断参考的重要指标。另外本研究发现,鳞癌分级越高(恶性程度越高),ALDH1A3 和 CD133 的表达水平也随之升高,对两组等级变量进行 gamma 分析得出鳞癌分级与 ALDH1A3 和 CD133 的表达呈正相关,且通过术后回访 1 例 SCC 复发病人的免疫组化结果也显示出 ALDH1A3 和 CD133 呈强阳性的表达,说明 ALDH1A3 和 CD133 表达与 SCC 的分级呈正相关,具体作用机制有待进一步研究。

目前国内外对于 ALDH1A3 和 CD133 在 SCC 中表达的研究报道很少见。本研究通过免疫组化法对 SCC 和正常皮肤组织中 ALDH1A3 和 CD133 表达进行检测,旨在证明 ALDH1A3 和 CD133 可以作为 SCC 特异性标志物。同时我们对皮肤鳞癌相关 lncRNA 研究也在同步进行,或许将来在皮肤鳞状细胞癌的诊断、分级和愈后中 ALDH1A3 和 CD133 都可以作为重要指标。

【参考文献】

[1] 王玉梅,刘勇,岑瑛,等. 135 例皮肤鳞状细胞癌发病相关因素回顾性分析[J]. 中国中西医结合皮肤性病学期刊,2012,11(1):25-27.

[2] SILINSKY J,GRIMES C,DRISCOLL T *et al.* CD 133 + and CXCR4 + colon cancer cells as a marker for lymph node metastasis[J]. J Surg Res 2013,185(1):113-118.

[3] NORDVIG AS,OWENS DM,MORRIS RJ. CD133 in the selection of epidermal stem cells in mice: steps in the right direction[J]. J Invest Dermatol 2012,132(11):2492-2494.

[4] WAKAMATSU Y,SAKAMOTO N,OO HZ *et al.* Expression of cancer stem cell markers ALDH1,CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer[J]. Pathol Int, 2012,62(2):112-119.

[5] FERRANDINA G,BONANNO G,PIERELLI L *et al.* Expression of CD133-1 and CD133-2 in ovarian cancer[J]. International Journal of Gynecological Cancer 2008,18(3):506-514.

[6] PATEL GK,YEE C,TERUNUMA A *et al.* Identification and characterization of tumor-initiating cells in human primary cutaneous squamous cell carcinoma[J]. J Invest Dermatol,2012,132(2):401-409.

[7] YOSHIDA A,HSU LC,DAVÉ V. Retinal oxidation activity and biological role of human cytosolic aldehyde dehydrogenase[J]. Enzyme,1992,46(4-5):239-244.

[8] HESS DA,WIRTHLIN L,CRAFT TP *et al.* Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells[J]. Blood,2006,107(5):2162-2169.

[9] PEARCE DJ,TAUSSIG D,SIMPSON C *et al.* Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples[J]. Stem Cells,2005,23(6):752-760.

[10] GINESTIER C,HUR MH,CHARAFE-JAUFFRET E *et al.* ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome[J]. Cell Stem Cell 2007,1(5):555-567.

[11] JIANG F,QIU Q,KHANNA A *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer[J]. Mol Cancer Res 2009,7(3):330-338.

[12] BURGER PE,GUPTA R,XIONG X *et al.* High ALDH activity: a novel functional marker of murine prostate stem/progenitor cells[J]. Stem Cells 2009,27(9):2220-2228.