

# 癌干细胞CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>在结直肠癌中的表达及其临床病理学意义

张彩兰, 刘斌, 杨艳丽, 苏勤军, 史敏, 韩军平, 钱震, 董亮, 哈英娣

张彩兰, 刘斌, 杨艳丽, 苏勤军, 史敏, 韩军平, 钱震, 董亮, 哈英娣, 中国人民解放军兰州军区兰州总医院病理科 兰州大学基础医学院病理研究所 甘肃省干细胞与基因药物重点实验室甘肃省兰州市 730050

张彩兰, 主治医师, 主要从事临床病理诊断, 侧重于肿瘤发生和转移的分子机制的研究。

甘肃省自然科学基金资助项目, No. 096RJZA096

作者贡献分布: 课题由刘斌与张彩兰设计; 研究过程由所有作者完成; 研究所用病例选取及结果分析由张彩兰、刘斌、杨艳丽及苏勤军负责; 试剂及技术指导由董亮与韩军平提供; 数据分析由张彩兰完成; 论文写作由刘斌与张彩兰完成。

通讯作者: 刘斌, 教授, 主任医师, 730050, 甘肃省兰州市七里河区滨河南路333号, 中国人民解放军兰州军区总医院病理科。liumb@189.cn

电话: 0931-8994567

收稿日期: 2012-07-17 修回日期: 2012-10-07

接受日期: 2012-10-23 在线出版日期: 2012-11-08

## Clinicopathologic significance of expression of CD44<sup>+</sup>/ALDH1<sup>+</sup> cancer stem cells in colorectal carcinoma

Cai-Lan Zhang, Bin Liu, Yan-Li Yang, Qin-Jun Su, Mei Shi, Jun-Ping Han, Zhen Qian, Liang Dong, Ying-Di Ha

Cai-Lan Zhang, Bin Liu, Yan-Li Yang, Qin-Jun Su, Mei Shi, Zhen Qian, Liang Dong, Jun-Ping Han, Ying-Di Ha, Department of Pathology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Command, Chinese PLA; Institute of Pathology, College of Basic Medical Sciences, Lanzhou University; Key Laboratory of Stem Cells and Gene Drugs in Gansu Province, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Supported by: the Nature Science Foundation of Gansu Province, No.096RJZA096

Correspondence to: Bin Liu, Professor, Chief Physician, Department of Pathology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China. liumb@189.cn

Received: 2012-07-17 Revised: 2012-10-07

Accepted: 2012-10-23 Published online: 2012-11-08

## Abstract

**AIM:** To observe the expression of CD44<sup>+</sup>/ALDH1<sup>+</sup> cancer stem cells in colorectal carcinoma and to analyze its clinicopathologic significance.

**METHODS:** Tissue chip technology and immunohistochemistry were used to detect the expression of CD44<sup>+</sup>, ALDH1<sup>+</sup>, and CD44<sup>+</sup>/ALDH1<sup>+</sup>

cells in colorectal carcinoma, colorectal adenoma and normal colorectal mucosa.

**RESULTS:** The expression of CD44 and ALDH1 was obviously higher in colorectal carcinoma than in colorectal adenoma and normal mucosa (all  $P < 0.05$ ). The positive rates of CD44 and ALDH1 expression were related to tumor pathologic grade, invasion, and lymph node metastasis (all  $P < 0.05$ ). The expression of CD44<sup>+</sup>/ALDH1<sup>+</sup> cells was obviously higher in colorectal carcinoma than in normal mucosa and adenoma (both  $P < 0.05$ ), and the positive rate of CD44<sup>+</sup>/ALDH1<sup>+</sup> cells was negatively correlated with tumor differentiation.

**CONCLUSION:** CD44/ALDH can be used as valuable markers for colorectal cancer stem cells and may be a reliable parameter for evaluation of early relapse and metastasis of colorectal cancer.

**Key Words:** Colorectal cancer; Cancer stem cells; CD44<sup>+</sup>ALDH1<sup>+</sup> cells; Immunohistochemical double-staining

Zhang CL, Liu B, Yang YL, Su QJ, Shi M, Han JP, Qian Z, Dong L, Ha YD. Clinicopathologic significance of expression of CD44<sup>+</sup>/ALDH1<sup>+</sup> cancer stem cells in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(31): 3005-3009

## 摘要

**目的:** 观察癌干细胞CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>在结直肠癌组织中的表达, 并探讨其临床病理学意义。

**方法:** 利用组织芯片仪制作组织芯片, 通过免疫组织化学染色, 免疫组织化学双重染色观察结直肠癌组织和不同组织中CD44<sup>+</sup>, ALDH<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>的表达。

**结果:** CD44, ALDH1在结直肠癌中的表达明显高于正常肠黏膜和伴不典型增生的管状腺瘤(均 $P < 0.05$ ); 在结直肠癌中, CD44和ALDH1的表达率与癌组织的病理分级、浸润、淋巴结转移有关(均 $P < 0.05$ ); CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>在结直

## ■背景资料

肿瘤干细胞是当前肿瘤的研究的热点, 结直肠癌干细胞在国内研究甚少, 有特异性标志的癌干细胞, 将为肿瘤靶向治疗开辟新径; CD44是结直肠癌干细胞研究比较多的标志物, 而ALDH1是近年来肿瘤干细胞研究的热点。

## ■同行评议者

邓昊, 副教授, 江汉大学医学院病理学与病理生理学教研室

## ■相关报道

据文献报道CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>的致癌能力明显高,可作为结直肠癌肿瘤干细胞的标志物,而今后靶向治疗更要针对有特异标志的肿瘤干细胞。

肠癌中的表达明显高于正常肠黏膜组织和伴不典型增生的管状腺瘤(均 $P<0.05$ ),随着癌分化程度的降低,表达率增加。

**结论:** CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>可作为结直肠癌干细胞有价值的标志物,可作为结直肠癌早期和预防复发转移的可靠指标。

**关键词:** 结直肠癌; 肿瘤干细胞; CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>; 免疫组织化学双重染色

张彩兰, 刘斌, 杨艳丽, 苏勤军, 史敏, 韩军平, 钱震, 董亮, 哈英娣. 癌干细胞CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>在结直肠癌中的表达及其临床病理学意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(31): 3005-3009  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3005.asp>

## 0 引言

结直肠癌是全球最流行的癌症之一,而且是癌症死亡的主要原因<sup>[1]</sup>,据统计,我国2005年结直肠癌发病率和死亡率分别为24.7/10万和14/10万,且有逐年增加的趋势<sup>[2]</sup>,探讨恶性肿瘤的形成和转移是当前研究的热点,而恶性肿瘤的形成和转移是一个多因素综合作用的结果,是临床和基础研究的主题之一,CD44和ALDH1是与结直肠癌浸润和转移密切相关的两个因子. 本实验利用免疫组织化学、免疫组织化学双染技术,定位标记CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>双阳性细胞,进一步探讨比较其在正常黏膜及伴不典型增生的管状腺瘤,结直肠癌组织中的表达及与临床病理学意义。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 68例结直肠癌标本取自中国人民解放军兰州军区兰州总医院病理科2010-2012外检档案(术前均未行放化疗),男46例,女22例,年龄32-79岁,平均年龄57.8岁. 按WHO标准,高分化腺癌22例,中分化腺癌30例,低分化腺癌16例,有淋巴结转移48例. 20例伴不典型增生的结直肠腺瘤及12例正常肠黏膜组织,均取自兰州军区兰州总医院病理科2010-2012外检档案. 鼠抗人单克隆抗体CD44购自北京中杉生物技术公司,兔抗人多克隆抗体ALDH1购自北京博奥森生物技术有限公司, Polymer双染试剂盒(KIT-9999)购自福州迈新生物技术有限公司。

**1.2 方法** 所选病例蜡块采用组织芯片制作仪制成阵列块3块(42点),以4 μm厚度进行连续切片制成组织芯片切片,3块组织芯片连续切片各4

张. 每张切片分别做HE常规染色、免疫组织化学及免疫组织化学双重染色. 免疫组织化学采用SP法,分别标记CD44和ALDH1,严格按照说明书操作;免疫组织化学双重染色,在同一组织芯片中同时标记CD44和ALDH1,严格按双染试剂盒说明书进行操作,CD44表达于细胞膜,呈黑色,ALDH1表达于细胞浆呈红色。

免疫组织化学染色CD44, ALDH1分别表达于细胞膜和细胞浆,均呈棕黄色,阳性表达均采用半定量分析法: 未见阳性细胞为(-),阳性细胞数0-5%为(+),5%-15%为(++),>15%为(+++)。

细胞计数标准参照Tomomi Ishida的计数标准,40×物镜视野下共查100个细胞,查10个视野<sup>[3]</sup>,染色结果均由两位病理医生用盲法进行评估。

**统计学处理** 实验数据采用SPSS17.0统计软件包进行统计学处理,计数资料用 $\chi^2$ 检验,定性等级分组资料采用Spearman等级相关分析。

## 2 结果

**2.1 CD44和ALDH1的表达与临床病理特征的关系** ALDH1表达于细胞浆,呈棕黄色(图1),CD44阳性表达于细胞膜,呈棕黄色(图2),CD44在管状腺瘤中局灶阳性表达,在正常肠黏膜中几乎不表达,ALDH1在伴不典型增生的管状腺瘤和正常肠黏膜中局灶阳性表达;CD44的阳性表达与癌组织浸润深度,分化高低,有无淋巴结转移有明显差异( $P<0.05$ ),而与性别,年龄无相关性( $P>0.05$ ). ALDH1的阳性表达在癌组织浸润深度,分化高低,有无淋巴结转移有明显差异,且与年龄有明显差异性,随着年龄的增加(>60岁),表达率越来越高(表1). CD44和ALDH1在结直肠癌中的表达明显高于正常肠黏膜和伴不典型增生的管状腺瘤(表2)。

**2.2 CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>在正常黏膜和不同病变组织中的表达** CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>在正常肠黏膜几乎不表达(图3),在伴不典型增生的管状腺瘤中局灶弱阳性表达,而在结直肠癌组织中双阳性细胞的表达率明显高于正常肠黏膜和伴不典型增生的管状腺瘤;CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>在结直肠癌中的表达随着癌组织浸润深度的增加,表达率越来越高(表3)。

## 3 讨论

近年来,随着肿瘤研究的深入,肿瘤干细胞(cancer stem cells cscs)成为研究的热点和重点,结直肠癌干细胞国内研究相对较少,CD44是结直肠



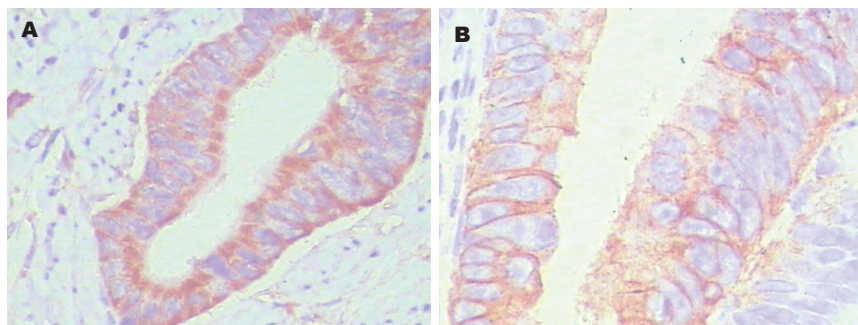


图1 ALDH1和CD44在结直肠癌中的阳性表达( $\times 40$ ).  
A: ALDH1; B: CD44.

**■应用要点**  
本实验利用免疫组织化学、免疫组织化学双染技术, 定位标记CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>双阳性细胞, 进一步探讨比较其在正常黏膜及伴不典型增生的管状腺瘤, 结直肠癌组织中的表达及与临床病理学意义。

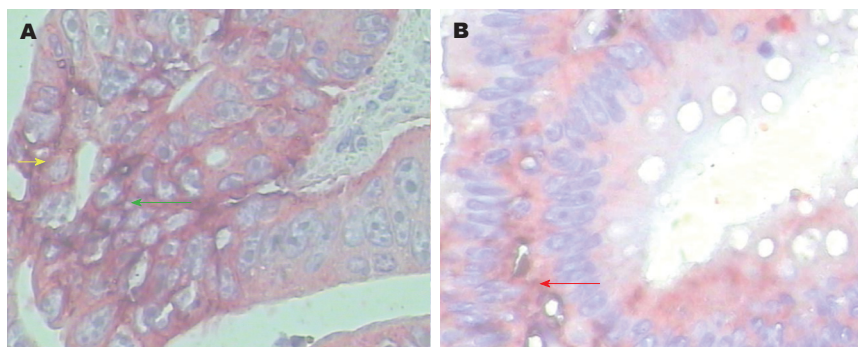


图2 双阳性细胞在结直肠癌和管状腺瘤中的表达( $\times 40$ ). A: 结直肠癌; B: 管状腺瘤. 绿色箭头所示双阳性细胞, 红色所示为ALDH( $\times 40$ )箭头所示为双阳性细胞1阳性, 黄色所示为CD44阳性.

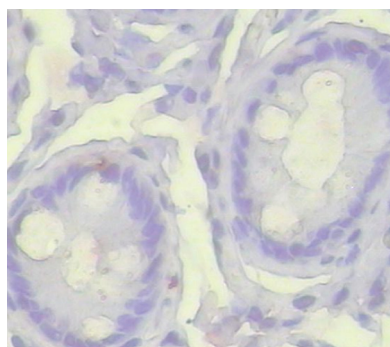


图3 正常肠黏膜中未见双阳性细胞( $\times 40$ ).

癌干细胞研究比较多的标志物, 他是一种细胞黏附分子, 主要表达于上皮细胞、淋巴细胞及巨噬细胞, 其功能主要是介导淋巴细胞的归巢、淋巴细胞向炎症部位和黏膜相关淋巴组织归位、黏附细胞外基质等, CD44分子与许多恶性肿瘤的侵袭及转移有着密切的联系; 而ALDH1是乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH)家族之一, 是催化细胞内乙醛氧化为乙酸的细胞溶质酶, 参与多种组织的分化与基因表达, 是近年来研究的比较有前景的结直肠癌标志物之一, 现已被认为是乳腺癌、头颈部鳞状细胞癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、眼癌、结直肠癌干细胞的通用标志物<sup>[4]</sup>, Huang等<sup>[5]</sup>研究的CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>致癌能力为70%, 提示ALDH1是结直肠癌CSC的一个标志, CD133可以增加富集, 在联合分析CD44和CD133表达时发现CD44<sup>+</sup>细

胞通常都表达CD133, 在多数情况下, CD44<sup>+</sup>细胞包含在CD133<sup>+</sup>细胞亚群中, 并进一步浓缩了Co-CSC. 据此研究CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>细胞在结直肠癌中的高表达, 将有可能作为结直肠癌干细胞有价值的标志物, 对恶性肿瘤的早期检测及预防复发转移有重要作用.

本实验的研究显示, CD44和ALDH1在结直肠癌中的表达明显高于正常肠黏膜和伴不典型增生的管状腺瘤, CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>细胞在结直肠癌中高于正常肠黏膜组织和伴不典型增生的管状腺瘤. 同时发现, 随着结直肠癌分化程度的降低及浸润深度的增加, CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>双阳性细胞的数量逐渐增多, 主要分布在腺管的基底侧和共壁侧, 呈灶状或散在分布, 胞浆稀少, 或呈空泡状. 在本实验早期研究EpCAM high/CD44<sup>+</sup><sup>[6]</sup>及CD44<sup>+</sup>/CD166<sup>+</sup><sup>[7]</sup>表型的结直肠癌干细胞可以促进结直肠癌的转移. 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, 如Barker等<sup>[8,9]</sup>提出的Lgr5作为肠道肿瘤干细胞标志物, 这些结直肠癌干细胞标志物的研究, 为肿瘤的复发, 转移及耐药, 靶向治疗的研究提供了新方向.

早期Blacking等<sup>[10]</sup>研究在培养的犬科动物细胞中, CD44的表达与增殖状态及在细胞周期中的位置紧密相连, 同时Vogler等<sup>[11]</sup>发现: 在结直肠癌中, 癌细胞ALDH1的表达在肿瘤的恶性发展和患者的预后方面具有重要的意义, 是一个潜在的独立预后指标. 近来的李亭等<sup>[12]</sup>研究

### ■同行评价

该文章的科学性、创新性和可读性能较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平,研究工作适合大多数读者。

表 1 CD44和ALDH1在结直肠癌中的表达与临床病理特征的关系

分组	n	CD44				P值	ALDH1				P值
		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
性别						>0.05					>0.05
男	46	14	19	13			10	8	9	19	
女	22	9	5	8			4	4	8	6	
年龄						>0.05					<0.05
>60	40	13	14	13			4	9	11	16	
≤60	28	10	10	8			10	3	6	9	
肿瘤						>0.05					>0.05
>4	42	11	16	15			7	8	13	14	
≤4	26	12	8	6			7	4	4	11	
部位						>0.05					>0.05
结肠	36	12	13	11			9	6	8	13	
直肠	32	11	11	10			5	6	9	12	
淋巴						<0.05					<0.05
有	48	11	19	18			5	10	11	22	
无	20	12	5	3			9	2	6	3	
病理						<0.05					<0.05
高	22	13	2	7			10	3	6	3	
中	30	8	12	10			2	6	8	14	
低	16	2	10	4			2	3	3	8	
分期						<0.05					<0.05
A+B	28	15	7	6			12	5	8	3	
C+D	40	8	17	15			2	7	9	22	
浸润						<0.05					<0.05
≤肌	24	13	6	5			9	4	5	6	
≥浆膜	44	10	18	16			5	8	12	19	

表 2 CD44和ALDH1在不同组织中的表达

分组	n	CD44				P值	ALDH1				P值
		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
结直肠癌	68	0	23	24	21		14	12	17	25	
管状腺瘤	20	16	4	0	0	<0.05	17	3	0	0	<0.05
正常肠黏膜	12	12	0	0	0		11	1	0	0	

表 3 CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>在正常黏膜和不同病变组织中的表达

分组	n	CD44 <sup>+</sup> /ALDH <sup>+</sup>				P值
		-	+	++	+++	
管状腺瘤	20	17	3			<0.05
正常肠黏膜	12	12	0			
结直肠癌						>0.05
病理						
高	22	6	13	2	1	
中	30	6	15	7	2	
低	16	2	3	9	2	
淋巴						<0.05
有	48	6	21	17	4	
无	20	8	10	1	1	
浸润						<0.05
A+B	28	10	11	5	2	
C+D	40	4	20	13	3	

发现ALDH1在结肠癌组织和癌旁组织中表达有明显差异,临床上有用于结肠癌早期病变检测的可能性。所以根据本实验的结果显示,联合检测CD44和ALDH1在结直肠癌中的表达,CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>更有作为结直肠癌干细胞的价值。此外有学者Armstrong等<sup>[13]</sup>从C57BL/6和Balb/C小鼠骨髓中分离出一群ALDH1高表达(ALDH1 high)的HSC,发现这些ALDH1 high细胞显示较成熟细胞更高的端粒酶活性,在S期比例较少,与“肿瘤干细胞相对静止”<sup>[14]</sup>的干细胞理论相一致,本实验的研究使得CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>成为结直肠癌干细胞成为可能,可作为早期检测和预防复发转移的可靠指标。

肿瘤干细胞的发现和研究是肿瘤的治疗有了新的研究热点,而晚期和转移的恶性肿瘤治疗最大的障碍是药物耐药,所有肿瘤干细胞的研究是为临床治疗服务,有效的治愈肿瘤,不仅要杀死大部分已分化的肿瘤细胞,更要杀灭小部分的肿瘤干细胞。Douville等<sup>[15]</sup>实验结果显示,转移肿瘤ALDH1<sup>+</sup>的细胞能够避开CTX化疗

作用,此研究表明ALDH1在肿瘤中的表达差异可能是因为ALDH1+CSC的存在。这种抗癌药物对肿瘤干细胞的耐药渐渐受到关注,如能进一步的研制出杀死肿瘤干细胞的药物,这将是肿瘤治疗的最佳效果,但如何识别肿瘤干细胞将依如何更加合理有效地使用靶向治疗药物只针对肿瘤干细胞而不损伤正常干细胞?这就是所说的肿瘤干细胞,而CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>结直肠癌干细胞为结直肠癌的早期发现和及时治疗开辟了新径,这就又使我们更进一步的研究肿瘤干细胞特异性标志物,如何使药物只靶向肿瘤干细胞的肿瘤干细胞的特异性受体?这些问题仍亟待解决,要求我们通过临床及实验,作进一步的研究。

### 4 参考文献

- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277-300
- 杨玲, 李连弟, 陈育德, Parkin DM. 中国2000年及2005年恶性肿瘤发病死亡的估计与预测. *中国卫生统计* 2005; 22: 218-231
- Ishida T. Immunohistochemical expression of the CD44 variant 6 in colorectal adenocarcinoma. *Surg Today* 2000; 30: 28-32
- Chen YC, Chen YW, Hsu HS, Tseng LM, Huang PI, Lu KH, Chen DT, Tai LK, Yung MC, Chang SC, Ku

- HH, Chiou SH, Lo WL. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 385: 307-313
- 5 Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H, Fields JZ, Wicha MS, Boman BM. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res* 2009; 69: 3382-3389
- 6 张秋菊, 刘斌, 邢传平, 苏勤军, 董亮, 钱震, 高自芳. 结直肠癌组织中ESA和CD44的表达及其临床病理意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1417-1421
- 7 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. *中国组织工程研究与临床康复* 2011; 15: 6714-6717
- 8 Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 2007; 449: 1003-1007
- 9 Barker N, van Es JH, Jaks V, Kasper M, Snippert H, Toftgård R, Clevers H. Very long-term self-renewal of small intestine, colon, and hair follicles from cycling Lgr5+ve stem cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2008; 73: 351-356
- 10 Blacking TM, Waterfall M, Argyle DJ. CD44 is associated with proliferation, rather than a specific cancer stem cell population, in cultured canine cancer cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 141: 46-57
- 11 Vogler T, Kriegl L, Horst D, Engel J, Sagebiel S, Schäffauer AJ, Kirchner T, Jung A. The expression pattern of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is an independent prognostic marker for low survival in colorectal tumors. *Exp Mol Pathol* 2012; 92: 111-117
- 12 李亭, 胡立强, 齐海智, 贺志军, 吴建国. 乙醛脱氢酶 1 在结肠癌组织中的表达及其临床意义. *中国外科临床杂志* 2011; 20: 269-272
- 13 Armstrong L, Stojkovic M, Dimmick I, Ahmad S, Stojkovic P, Hole N, Lako M. Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells* 2004; 22: 1142-1151
- 14 Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 755-768
- 15 Douville J, Beaulieu R, Balicki D. ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev* 2009; 18: 17-25

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊

本刊讯 2011-12-02, 中国科学技术信息研究所在北京发布2010年中国科技论文统计结果, 经过中国精品科技期刊遴选指标体系综合评价, 《世界华人消化杂志》被评为2011年度中国精品科技期刊. 中国精品科技期刊以其整体的高质量示范作用, 带动我国科技期刊学术水平的提高. 精品科技期刊的遴选周期为三年. (编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)