

结直肠癌组织中DCLK1⁺/Ki67⁻肿瘤干细胞样细胞的形态和分布

王欢^{1,2}, 马法库^{1,2}, 刘斌^{1,2}, 史敏¹, 肖卫玲¹(¹解放军兰州军区兰州总医院病理科, 甘肃省兰州市 730050; ²兰州大学基础医学院病理研究所, 甘肃省兰州市 730030)

文章亮点:

- 1 肿瘤干细胞的存在被认定是恶性肿瘤转移和复发的根本原因, 能否准确的标记出肿瘤干细胞一直是学者们研究的重点。
- 2 Ki67 表达于增殖期细胞, 静止期细胞不表达, 利用这一特性, 辅助 DCLK1 可以标记出肿瘤干细胞。
- 3 利用免疫组织化学双重染色标记 DCLK1⁺/Ki67⁻ 细胞, 在细胞数量、位置、形态方面都表明 DCLK1⁺/Ki67⁻ 细胞符合肿瘤干细胞的特征。

关键词:

干细胞; 肿瘤干细胞; 标志物; DCLK1; Ki67; 结直肠肿瘤

主题词:

肿瘤干细胞; 结直肠肿瘤; Ki-67 抗原

摘要

背景: DCLK1 是在有丝分裂后的神经元中发现的一种跨膜微管相关蛋白激酶, 近些年来发现其可能是肠道肿瘤干细胞的标志物。

目的: 观察 DCLK1 与 Ki67 在结直肠肿瘤中的表达及其病理学意义, 探讨是否可以将 DCLK1⁺/Ki67⁻ 作为结直肠肿瘤干细胞的标志物。

方法: 运用免疫组织化学方法检测 150 例结直肠癌组织中 DCLK1 与 Ki67 的表达, 并与正常肠黏膜组织、癌旁组织、腺瘤组织比较。

结果与结论: DCLK1 和 Ki67 在癌组织中的表达率分别为 36.7%, 34.7%, 其数量明显高于正常肠黏膜和腺瘤组织; DCLK1 的表达与部位、浸润深度、淋巴结转移有关($P < 0.05$), 而 Ki67 的表达仅与浸润深度有关($P < 0.05$); DCLK1 与 Ki67 的表达呈负相关($r = -0.460$, $P = 0.000$)。结直肠癌组织中 DCLK1⁺/Ki67⁻ 细胞数量约为 2.01%, 主要分布于肠黏膜隐窝的基底部及共壁腺管的共壁处, 细胞核大深染且呈圆形或卵圆形, 核仁明显, 核分裂象少见, 细胞质较少。DCLK1⁺/Ki67⁻ 细胞在不同分化程度的腺癌组织中均存在, 且分化程度越低, 细胞数量越多, 故无论从细胞数量和位置, 还是细胞形态, 都表明 DCLK1⁺/Ki67⁻ 细胞符合肿瘤干细胞的特征, 可以将 DCLK1⁺/Ki67⁻ 作为结直肠肿瘤干细胞的标志物。

王欢, 马法库, 刘斌, 史敏, 肖卫玲. 结直肠癌组织中 DCLK1⁺/Ki67⁻ 肿瘤干细胞样细胞的形态和分布[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(10):1575-1579.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.10.018

DCLK1⁺/Ki67⁻ cell morphology and distribution in colorectal cancer

Wang Huan^{1,2}, Ma Fa-ku^{1,2}, Liu Bin^{1,2}, Shi Min¹, Xiao Wei-ling¹ (¹Department of Pathology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command of PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China; ²Institute of Pathology, School of Basic Medicine, Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: DCLK1 is a transmembrane microtubule-associated kinase in neurons after mitotic division, which may be the intestinal cancer stem cell marker.

OBJECTIVE: To observe the expression and pathological significance of DCLK1 and Ki67 in colorectal cancer.

METHODS: Expression of Ki67 and DCLK1 in 150 cases of colorectal cancer tissues was detected by immunohistochemical method in contrast to normal colorectal mucosa, para-carcinoma tissue, and adenoma tissue.

RESULTS AND CONCLUSION: The expression rates of DCLK1 and Ki67 were 36.7% and 34.7% in cancer tissues, respectively, both of which were significantly higher than those in normal colorectal mucosa and adenoma. The expression of DCLK1 was associated with the location, depth of invasion, lymph node metastasis ($P < 0.05$), while the expression of Ki67 was just associated with the depth of invasion ($P < 0.05$). There was a negative correlation between the expression of DCLK1 and Ki67 ($r = -0.460$, $P = 0.000$). The count of DCLK1⁺/Ki67⁻ cells was about 2.01% in colorectal cancer tissues, and these cells mainly distributed at the bottom of intestinal mucosa base and common duct wall. DCLK1⁺/Ki67⁻ cells were oval, the nuclei were large and deep-stained with

王欢, 女, 1987 年生, 天津市人, 汉族, 兰州大学在读硕士, 主要从事肿瘤病理的研究。

通讯作者: 刘斌, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 解放军兰州军区兰州总医院病理科, 甘肃省兰州市 730050; 兰州大学基础医学院病理研究所, 甘肃省兰州市 730030

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)10-01575-05

稿件接受: 2015-02-12

http://www.crter.org

Wang Huan, Studying for master's degree, Department of Pathology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command of PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China; Institute of Pathology, School of Basic Medicine, Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

Corresponding author: Liu Bin, Chief physician, Professor, Master's supervisor, Department of Pathology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command of PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China; Institute of Pathology, School of Basic Medicine, Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

Accepted: 2015-02-12

prominent nucleolus, and there was rare nuclear fission and less cytoplasm. From the aspects of cell number, location, and cell morphology, DCLK1⁺/Ki67 cells are in line with the characteristics of cancer stem cells; therefore, DCLK1⁺/Ki67 can be used as a cancer stem cell marker of colorectal cancer.

Subject headings: Neoplastic Stem Cells; Colorectal Neoplasms; Ki-67 Antigen

Wang H, Ma FK, Liu B, Shi M, Xiao WL. DCLK1⁺/Ki67 cell morphology and distribution in colorectal cancer. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2015;19(10):1575-1579.

0 引言 Introduction

结直肠癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一, 占中国肿瘤死因的第4名, 近年来其发病率正逐年增高, 其复发和转移也愈加多见。结直肠癌发病年龄多在40-60岁, 由于近年来饮食结构的改变, 发病年龄有向年轻化发展的趋势。研究表明传统抗癌治疗失败的原因是癌组织中存在极少数具有无限增殖和自我更新能力的细胞, 即肿瘤干细胞, 它是肿瘤转移、复发及耐药的根源。传统治疗, 包括手术治疗和放、化疗只能消灭已分化的肿瘤细胞, 对处于静止期的肿瘤干细胞却无能为力。肿瘤干细胞来源于正常干细胞。研究肿瘤干细胞标志物对肿瘤的诊断、治疗、预后等方面有重要的意义。如何找到并清除肿瘤干细胞一直是学者们研究的重点。

Doublecortin-like kinase 1(DCLK1)是在有丝分裂后的神经元中发现的一种跨膜微管相关蛋白激酶^[1], 近些年来发现其可能是肠道肿瘤干细胞的标志物。国内外学者在动物实验和培养细胞株方面对DCLK1已经有了初步的研究^[2], 但是在实体瘤组织中的研究少见。因此, 本文研究了DCLK1在正常肠黏膜及结直肠肿瘤中的表达情况及其病理学意义, 同时以Ki67作为细胞增殖活性指标观察DCLK1⁺/Ki67细胞的形态, 探讨其作为肿瘤干细胞标志物的可能性。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 制作组织芯片, 利用免疫组化双重染色观察DCLK1和Ki67在结直肠癌组织中的表达以及DCLK1⁺/Ki67细胞的形态、分布情况。

时间及地点: 实验于2014年9至12月在解放军兰州军区兰州总医院病理科实验室完成。

材料:

组织标本: 于2007年3月至2012年9月在解放军兰州军区兰州总医院病理科选取结直肠癌组织标本150份, 其中来源于男性91份, 女性59份; 所选病例患者年龄20-83岁, 平均年龄58.4岁。150份结直肠癌组织标本中高分化47份, 中分化48份, 低分化36份, 黏液腺癌19份; 腺瘤组织标本34份; 癌旁组织和距肿瘤病灶15 cm以上处的正常肠黏膜组织各10份。

主要试剂: 兔抗人DCLK1单克隆抗体(1:200)购自美国Sigma公司, 鼠抗人Ki67单克隆抗体、免疫组化双染试剂盒(Dou-SP)购自福州迈新公司。

实验方法:

制作组织芯片: 挑选组织保留良好的供者蜡块, 制作空白蜡块; 将供者蜡块和空白蜡块预热至30-40℃备用。用穿刺针打孔, 将穿好的组织推入孔内。每个空白蜡块可穿刺47个点(6×8, 最后一点不穿便于标记)。将含有组织的一面向下放置于载玻片上, 放到65-70℃的烤箱里, 待蜡块与载玻片之间出现液体石蜡时, 迅速移去载玻片, 轻轻挤压蜡块四周, 自然冷却。具体操作过程详见参考文献^[3]。

免疫组织化学双重染色及结果判定: 组织芯片1-5号蜡块3 μm连续切片、脱蜡至水, 严格按照试剂盒说明书步骤进行: EDTA煮沸法进行抗原修复; 过氧化氢阻断内源性氧化物酶活性; 加入Ki67抗体室温孵育2 h; DAB显色; 加入DCLK1抗体4℃过夜; AEC显色; 苏木精复染细胞核; 水性封固剂封固。PBS代替一抗做阴性对照。结果判定标准: 观察5个高倍镜视野, 染色强度与背景颜色一致(-), 淡黄色(+), 棕黄色(++), 深褐色(+++); 阳性细胞比例小于10%(-), 11%-25%(+), 26%-50%(++), 51%及以上(+++)。

主要观察指标: ① DCLK1和Ki67在正常组织、腺瘤组织及腺癌组织中的表达。②免疫组化双染DCLK1⁺/Ki67细胞数量, 并与苏木精-伊红染色的相邻切片对比观察细胞形态分布。

统计学分析: SPSS 19.0统计软件进行分析, 计数资料运用 χ^2 检验, 等级分组资料用Spearman等级相关分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 Ki67在正常肠黏膜组织、癌旁组织及病变组织中的表达 Ki67蛋白表达在细胞核, 阳性细胞胞核呈棕黄色。在正常肠黏膜组织和癌旁组织中Ki67阳性细胞数量少, 主要位于肠上皮隐窝基底部; 在腺瘤组织中Ki67表达量略增加, 存在位置不定; 在癌组织中Ki67表达量明显增加, 但表达强度、数量和位置不一(表1, 图1A, C)。Ki67在正常肠黏膜组织、癌旁组织及腺瘤组织中的表达与癌组织中表达差异有显著性意义($P < 0.05$); 在正常肠黏膜组织、癌旁组织中的表达与腺瘤组织中表达差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.2 DCLK1在正常肠黏膜组织、癌旁组织及病变组织中的表达 DCLK1蛋白表达在细胞浆, 阳性细胞胞浆呈棕黄色。在正常肠黏膜组织和癌旁组织中DCLK1不表达; 在腺瘤组织中少量表达, 集中在伴有重度不典型增生的腺瘤组织中,

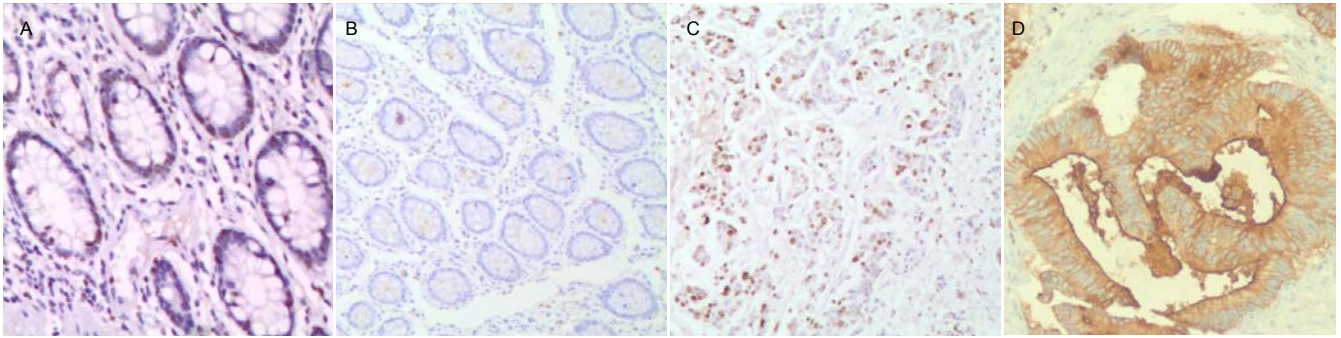


图 1 Ki67 和 DCLK1 在正常肠黏膜组织和癌组织的表达

Figure 1 The expression of Ki67 and DCLK1 in normal colorectal mucosa and adenocarcinoma

图注: 图中 A 显示正常肠黏膜弱阳性表达 Ki67($\times 200$); B 显示正常肠黏膜不表达 DCLK1($\times 100$); C 显示癌组织表达 Ki67($\times 100$); D 显示癌组织表达 DCLK1($\times 100$)。

表 1 Ki67 和 DCLK1 在正常肠黏膜、腺瘤和腺癌组织中的表达

Table 1 Expression of Ki67 and DCLK1 in normal colorectal mucosa, adenoma and adenocarcinoma

组织类型	n	Ki67				DCLK1			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
正常黏膜组织	10	7	2	1	0	10	0	0	0
癌旁组织	10	6	2	1	1	10	0	0	0
腺瘤组织	34	22	8	2	2	11	13	8	3
腺癌组织	150	52	33	39	26	55	35	49	11
P		0.046				< 0.001			

表注: Ki67 和 DCLK1 在正常肠黏膜组织、癌旁组织及腺瘤组织中的表达与癌组织中表达差异有显著性意义($P < 0.05$); 在正常肠黏膜组织、癌旁组织中的表达与腺瘤组织中表达差异无显著性意义($P > 0.05$)。

表 2 Ki67 和 DCLK1 的表达与临床病理参数之间的关系

Table 2 Relationship between expression of Ki67 and DCLK1 and clinicopathological parameters

临床病理参数	n	Ki67				P	DCLK1				P
		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
性别						0.371					0.899
男	91	29	24	24	14		33	23	27	8	
女	59	23	9	15	12		22	12	22	3	
年龄(岁)						0.355					0.106
< 60	77	24	16	21	11		33	21	21	2	
≥ 60	73	28	17	17	15		22	14	28	9	
病理分级						0.006					0.436
高分化	47	21	14	5	7		21	11	14	1	
中分化	48	14	9	16	9		15	10	16	7	
低分化	36	6	8	13	9		11	9	13	3	
黏液腺癌	19	11	2	5	1		8	5	6	0	
淋巴转移						0.320					0.020
是	66	20	10	21	15		31	9	20	6	
否	84	32	23	18	11		24	26	29	5	
部位						0.616					0.030
结肠	56	18	12	18	8		14	12	23	7	
直肠	94	34	21	21	18		41	23	26	4	
浸润深度						0.011					0.000
\leq 肌层	39	20	8	5	6		24	1	14	0	
>肌层	111	32	25	34	20		31	34	35	11	

表注: DCLK1 的表达与部位、浸润深度、淋巴转移有关($P < 0.05$), Ki67 在癌组织中的表达与浸润深度、组织学类型有关($P < 0.05$)。

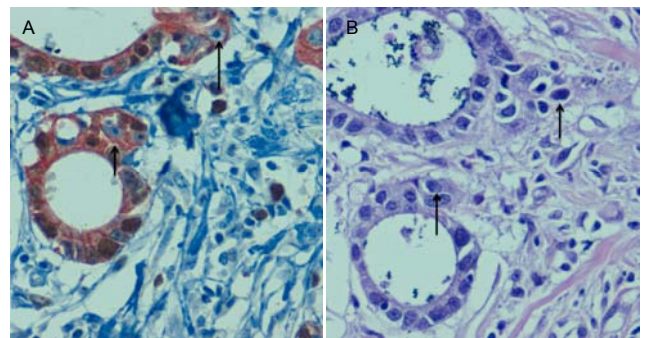


图 2 DCLK1⁺/Ki67⁻ 细胞的形态、分布位置

Figure 2 The morphology and distribution of DCLK1⁺/Ki67⁻ cells

图注: 图中 A 为癌组织中 DCLK1 和 Ki67 双重标记(\uparrow 所示为 DCLK1⁺/Ki67⁺ 细胞, $\times 400$); B 为苏木精-伊红染色观察 DCLK1⁺/Ki67⁻ 细胞形态, 细胞核大深染且呈圆形或卵圆形, 核仁明显, 核分裂象少见, 细胞质较少(\uparrow 所示为 DCLK1⁺/Ki67⁻ 细胞, $\times 400$)。

大多位于肠腺管底部; 在癌组织中 DCLK1 明显表达, 主要分布于沿隐窝底部或共壁腺管处, 但各类型之间的表达强度、数量不一(表 1, 图 1B, D)。

DCLK1 在正常肠黏膜组织、癌旁组织及腺瘤组织中的表达与癌组织中表达差异有显著性意义($P < 0.05$); 在正常肠黏膜组织、癌旁组织中的表达与腺瘤组织中表达差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.3 DCLK1 和 Ki67 蛋白的表达与临床病理参数的关系 在结直肠癌组织中 DCLK1 的表达与部位、浸润深度、淋巴结转移有关($P < 0.05$), 且伴随浸润深度的增加, 其表达增强, 而与组织学类型、性别、年龄无关($P > 0.05$)。Ki67 在癌组织中的表达与浸润深度、组织学类型有关($P < 0.05$), 且伴随浸润加深, 其表达增强, 而与性别、年龄、淋巴结转移无关($P > 0.05$), 见表 2。

Spearman 等级相关分析, DCLK1 和 Ki67 在结直肠癌中的表达呈负相关($r = -0.460$, $P = 0.000$)。

2.4 DCLK1⁺/Ki67⁻ 细胞的形态、分布位置及百分比 免疫组织化学双重染色结果显示在结直肠癌组织中 DCLK1⁺/Ki67⁻ 细胞胞浆呈紫红色, 细胞核呈蓝色, 数量约占 2.01%, 其主要分布于肠黏膜隐窝的底部及共壁腺管的

共壁处。DCLK1⁺/Ki67⁺癌细胞卵圆形, 细胞核大深染且呈圆形或卵圆形, 核仁明显, 核分裂象少见, 细胞质较少(图2A, B)。

3 讨论 Discussion

结直肠癌是消化道常见的恶性肿瘤, 占中国肿瘤死因的第4名, 且发病率仍在上升中。发病年龄多在40-60岁之间, 由于近年来饮食结构的改变, 发病年龄有向年轻化发展的趋势。肠腺瘤与结直肠癌的关系密切, 被认为是癌前病变。结直肠从上皮过度增生到结直肠癌的演化机制尚不明确, 但大量数据表明这可能与肠道隐窝中干细胞的异常增殖有密切关系。

自从1997年Bonnet和Dick^[4]第一次分离出CD34⁺/CD38⁻白血病细胞亚群, 人们对于肿瘤干细胞的研究热情越来越高涨。正常的干细胞以非对称的方式分裂产生两个子细胞, 其中一个新的干细胞而另外一个为祖细胞, 它们拥有分化和增殖成为成熟细胞的能力。肿瘤中细胞生长的失控是干细胞自我更新调控机制异常的结果, 其可以来源于基因突变等表观遗传改变的正常干细胞和/或祖细胞, 这些细胞突变后可形成特异性的肿瘤组织; 也可以来源于体细胞的突变, 使其获得自我增殖和更新的干细胞特性^[5-7]。这些突变而来的肿瘤干细胞可以形成新的肿瘤, 但数量极少, 不足全部肿瘤细胞数量的1%^[8-9]。若肿瘤组织出现了转移和/或远处播散, 其肿瘤干细胞数量会有所增加, 故有学者认为癌症可能是一种干细胞调控性疾病而非单纯的增生信号增强^[10]。这就意味着传统的化学治疗只能消灭大多数没有分化能力的肿瘤细胞, 而不能清除肿瘤干细胞。Ki67是细胞增殖指数, DCLK1是近来研究热门的肿瘤干细胞标志蛋白之一。本实验旨在检测Ki67和DCLK1在不同病理状态下肠道组织中的表达情况及其与临床病理学参数、患者预后的关系。

目前比较公认的结直肠癌肿瘤干细胞标志物有Ki67^[11]、CD44^[12]、LGR-5^[13]、MSI-1等^[14]。Ki67是一种与细胞增殖相关的核抗原, 是临床上公认的判断肿瘤细胞增殖指数的抗原之一, 其蛋白存在于细胞周期中的所有活跃阶段, 包括G₁期, S期, G₂期和有丝分裂期, 但G₀期休眠细胞不存在这种蛋白^[15-16]。本实验结果显示Ki67在正常肠黏膜有少量表达, 此外, 还发现Ki67在结直肠癌组织中的高表达与浸润深度、组织学类型相关, 且伴随浸润程度的加深, 其表达量增强, 但在性别、年龄、淋巴结转移方面差异无显著性意义, 这与韩军平等^[17]的实验结果不大一致, 其认为Ki67的表达与浸润深度和淋巴结转移有关, 出现这一情况的原因可能是: ①选取的样本数量差距较大, 韩军平等^[17]研究样本量仅59例。②均是制作组织芯片进行实验, 可观察的视野较局限。

DCLK1是一种跨膜微管相关蛋白样激酶, 其结合在Doublecortin蛋白的微管蛋白部分, 主要参与骨架的形成、

调节细胞运动、细胞分化以及细胞周期^[18]。DCLK1蛋白在多种恶性肿瘤中表达^[19-22], 如胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌等, 相关数据表明DCLK1可能为结直肠癌CSC标志蛋白。采用免疫组化染色发现DCLK1在大肠腺瘤的表达率为67.6%, 而在结直肠癌组织的表达率为63.3%。这一发现表明, DCLK1的上调可能是大肠癌发生前的早期改变, 另外, 有近40%的腺瘤伴不典型增生组织中强阳性表达DCLK1, 进一步证实DCLK1对结直肠癌的早期发现和早期预防方面具有重要意义。同时实验结果显示, 在结直肠癌组织中DCLK1的表达与浸润深度、淋巴结转移相关, 且伴随浸润深度的增加, 其表达增强, 与Gagliardi等^[18]研究结果一致, 提示DCLK1可能参与了结直肠癌的发生、发展及转移过程, 进一步研究其与结直肠肿瘤的关系有利于了解肿瘤的发生、发展及转移机制, 对临床治疗和预后提供了新的方向。除此之外, 外的发现DCLK1的表达与肿瘤的部位相关, 这在以前的研究中从未出现, 可能是所在位置的结构和功能的不同所导致。

本研究结果显示在结直肠癌组织中Ki67⁺细胞数量约占65%, 这说明大部分癌细胞处于增殖状态, 而剩下的小部分癌细胞处于G₀期, 但是并不是所有处于G₀期的细胞都是肿瘤干细胞, 这就说明Ki67不能单独作为肿瘤干细胞的标志物。在同一癌组织中, DCLK1⁺细胞数量明显少于Ki67⁺细胞数, 同时DCLK1⁺细胞大部分不表达Ki67, DCLK1⁺/Ki67细胞数占Ki67细胞数量不足30%; 将连续切片苏木精-伊红染色后观察到少部分DCLK1⁺/Ki67细胞呈核大浆少的原始细胞形态; DCLK1⁺/Ki67细胞多位于腺腔的基底部或隐窝处, 在不同分化程度的腺癌组织中均存在, 且分化程度越低, 细胞数量越多。故无论从细胞数量和位置, 还是细胞形态, 都表明DCLK1⁺/Ki67细胞符合肿瘤干细胞的特征。因此可以将DCLK1⁺/Ki67作为结直肠癌肿瘤干细胞的标志物。

通常情况下, 临床常规治疗(放射和化学治疗)可以消灭大部分肿瘤细胞, 但肿瘤干细胞仍然存在, 其具有的自我复制和抗药性等特性是肿瘤复发和远处转移的主要原因^[23-25], 所以分离和鉴定肿瘤干细胞对研究和治疗恶性肿瘤具有重要意义, 也是之后实验的研究重点。

作者贡献: 实验设计为王欢、刘斌, 实验实施为王欢, 实验评估为刘斌、史敏、肖卫玲, 资料收集为王欢、马法库。王欢成文, 刘斌审核, 王欢、刘斌对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 所有标本取材均在患者知情同意情况下进行, 并签署《知情同意书》, 研究方案经医院伦理委员会批准。

学术术语: 肿瘤干细胞-被认为是在恶性肿瘤组织中存在的一群数量极少的具有干细胞样特性的细胞, 这群细胞具有自我更新能力、可以无限增殖以及多向分化的潜能, 是肿瘤的启动细胞。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Lin PT, Gleeson JG, Corbo JC, et al. DCAMKL1 encodes a protein kinase with homology to doublecortin that regulates microtubule polymerization. *J Neurosci.* 2000;20(24): 9152-9161.
- [2] Nakanishi Y, Seno H, Fukuoka A, et al. Dcl1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine. *Nat Genet.* 2013;45(1):98-103.
- [3] 张登才, 刘斌, 张丽华, 等. 一种简便实用的组织芯片制作方法[J]. *诊断病理学杂志*, 2013, 20(11): 722-724.
- [4] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997;3(7):730-737.
- [5] He S, Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009;25:377-406.
- [6] Simons BD, Clevers H. Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell.* 2011;145(6):851-862.
- [7] Lyashenko N, Winter M, Migliorini D, et al. Differential requirement for the dual functions of β -catenin in embryonic stem cell self-renewal and germ layer formation. *Nat Cell Biol.* 2011;13(7):753-761.
- [8] Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, et al. HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol.* 2007;17(2): 165-172.
- [9] Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science.* 2009;324(5935): 1670-1673.
- [10] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674.
- [11] Merlos-Suárez A, Barriga FM, Jung P, et al. The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse. *Cell Stem Cell.* 2011;8(5):511-524.
- [12] Du L, Wang H, He L, et al. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin Cancer Res.* 2008;14(21): 6751-6760.
- [13] Barker N, van Es JH, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature.* 2007;449(7165):1003-1007.
- [14] Todaro M, Perez Alea M, Scopelliti A, et al. IL-4-mediated drug resistance in colon cancer stem cells. *Cell Cycle.* 2008; 7(3):309-313.
- [15] Polley MY, Leung SC, McShane LM, et al. An international Ki67 reproducibility study. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(24): 1897-1906.
- [16] Nielsen T, Polley M, Leung S, et al. An international Ki67 reproducibility study. *Cancer Res.* 2012;72(24 suppl):S4-6.
- [17] 韩军平, 刘斌, 杨艳丽, 等. 结直肠癌 CD44⁺/ki-67-癌干细胞特征及其与临床病理关系[J]. *世界华人消化杂志*, 2011, 19(34): 3483-3488.
- [18] Gagliardi G, Bellows CF. DCLK1 expression in gastrointestinal stem cells and neoplasia. *Journal of Cancer Therapeutics and Research.* 2012;1:12.
- [19] Sureban SM, May R, Lightfoot SA, et al. DCAMKL-1 regulates epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cells through a miR-200a-dependent mechanism. *Cancer Res.* 2011; 71(6):2328-2338.
- [20] Sureban SM, May R, Ramalingam S, et al. Selective blockade of DCAMKL-1 results in tumor growth arrest by a Let-7a MicroRNA-dependent mechanism. *Gastroenterology.* 2009; 137(2):649-659.
- [21] Sureban SM, May R, Mondalek FG, et al. Nanoparticle-based delivery of siDCAMKL-1 increases microRNA-144 and inhibits colorectal cancer tumor growth via a Notch-1 dependent mechanism. *J Nanobiotechnology.* 2011;9:40.
- [22] Ali N, Allam H, May R, et al. Hepatitis C virus-induced cancer stem cell-like signatures in cell culture and murine tumor xenografts. *J Virol.* 2011;85(23):12292-1303.
- [23] Tirino V, Desiderio V, Paino F, et al. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J.* 2013;27(1):13-24.
- [24] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(4):275-284.
- [25] Vermeulen L, de Sousa e Melo F, Richel DJ, et al. The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. *Lancet Oncol.* 2012;13(2):e83-89.