

CD44⁺/C-myc⁺癌干细胞在结直肠肿瘤中表达及与预后的关系

马法库^{1,2}, 王欢^{1,2}, 刘斌^{1,2,3}, 杨艳丽¹, 苏勤军¹, 钱震¹, 董亮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学研究所, 甘肃省兰州市 730000; ³甘肃省干细胞与基因药物重点实验室, 甘肃省兰州市 730000)

文章亮点:

1 实验使用免疫组织化学双染法, 通过表达原癌基因 C-myc 与 CD44 蛋白来标记肿瘤干细胞。通过数据统计发现 CD44⁺/C-myc⁺细胞数量与结直肠癌的病理分级呈负相关, 即肿瘤分化越差, 组织中双阳性细胞越多, 证明肿瘤干细胞对肿瘤的生长分化有重要调控作用。

2 通过对随访资料的单因素分析发现患者淋巴结转移、肿瘤干细胞数量、Ducks 分期是影响预后的重要因素。将患者的总生存率与无进展生存率多因素分析发现肿瘤干细胞的表达是影响患者预后的稳定因素, 肿瘤干细胞的表达不但能影响患者的死亡率还与患者的复发、转移关系密切。

关键词:

干细胞; 肿瘤干细胞; 结直肠癌; CD44⁺/C-myc⁺; 组织芯片; 免疫组化双重染色; 随访; 预后; 甘肃省自然科学基金

主题词:

结直肠肿瘤; 肿瘤干细胞; 基因, myc; 细胞粘附分子

基金资助:

甘肃省自然科学基金资助项目(096RJZA096)

摘要

背景: 肿瘤复发的原因是具有自我更新特性的肿瘤干细胞未能彻底清除, 于是如何标记并消灭肿瘤干细胞成为治疗肿瘤的关键所在。

目的: 观察结直肠癌组织中 CD44⁺/C-myc⁺细胞的形态分布及数量, 并探讨其表达与患者肿瘤复发转移的关系。

方法: 选取 150 例结直肠癌患者的病理组织制成组织芯片, 采用免疫组化双重染色观察并计数 CD44⁺/C-myc⁺细胞, 并与正常组织、腺瘤组织比较。使用手机、书信等方式对患者进行随访, 统计患者的复发转移与 CD44⁺/C-myc⁺细胞表达的关系。

结果与结论: CD44⁺/C-myc⁺细胞在正常组织中无分布, 在腺瘤组织中极少散在分布, 在腺癌组织中少量单个点状或灶性分布, 双阳细胞数量与腺癌分化程度、浸润深度、淋巴结转移有关($P < 0.05$)。单因素分析患者腺癌的总生存率、无进展生存率均与双阳性细胞数量、淋巴结有无转移、Ducks 分期有关($P < 0.05$), 多因素分析患者的总生存率与双阳性细胞数有关, 无进展生存率与双阳性细胞数及 Ducks 分期有关。结果表明结直肠组织中 CD44⁺/C-myc⁺细胞极有可能为腺癌干细胞; Ducks 分期、CD44⁺/C-myc⁺细胞的数量是影响患者预后的重要因素。

马法库, 王欢, 刘斌, 杨艳丽, 苏勤军, 钱震, 董亮. CD44⁺/C-myc⁺癌干细胞在结直肠肿瘤中表达及与预后的关系[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(14):2161-2166.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.14.006

Expression of CD44⁺/C-myc⁺ cancer stem cells and its relationship with the prognosis of patients in colorectal tumors

Ma Fa-ku^{1,2}, Wang Huan^{1,2}, Liu Bin^{1,2,3}, Yang Yan-li¹, Su Qin-jun¹, Qian Zhen¹, Dong Liang¹ (¹Department of Pathology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China; ²Institute of Pathology, College of Basic Medicine, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China; ³Key Laboratory of Stem Cells and Gene Medicine, Lanzhou 730000, Gansu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Tumor recurrence results from the incomplete removal of cancer stem cells with self-renewal characteristics, and then how to label and eliminate cancer stem cells becomes the key to cancer treatment.

OBJECTIVE: To observe the morphology, distribution and number of CD44⁺/C-myc⁺ cells in colorectal cancer, and to explore the relationship between the expression and postoperative metastasis.

METHODS: Pathological tissues from 150 patients with colorectal cancer were taken to prepare tissue microarray, in order to observe and count CD44⁺/C-myc⁺ cells by using immunohistochemical double staining. Patients were followed up through mobile phones, letters, and so on, and the relationship between the expression of CD44⁺/C-myc⁺ cells and postoperative metastasis were statistically recorded.

马法库, 男, 1989 年生, 山东省菏泽市人, 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学研究所, 甘肃省兰州市 730000; 甘肃省干细胞与基因药物重点实验室, 甘肃省兰州市 730000

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2015)14-02161-06

稿件接受: 2015-03-14

http://www.crter.org

Ma Fa-ku, Studying for master's degree, Department of Pathology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China; Institute of Pathology, College of Basic Medicine, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Corresponding author: Liu Bin, Chief physician, Professor, Master's supervisor, Department of Pathology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China; Institute of Pathology, College of Basic Medicine, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China; Key Laboratory of Stem Cells and Gene Medicine, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Accepted: 2015-03-14

RESULTS AND CONCLUSION: There was no CD44⁺/C-myc⁺ cells in normal tissue and little in adenoma. A small number of CD44⁺/C-myc⁺ cells distributed as dots or focal lesions in adenocarcinoma. The number of CD44⁺/C-myc⁺ cells was related to the degree of adenocarcinoma differentiation, depth of invasion, and lymph node metastasis ($P < 0.05$). The univariate analysis showed that the overall survival rate and progression-free survival rate were associated with the number of CD44⁺/C-myc⁺ cells, lymph node metastasis and Ducks staging in adenocarcinoma ($P < 0.05$). The multivariate analysis showed that the overall survival rate was related to CD44⁺/C-myc⁺ cell amount and the progression-free survival rate was related to CD44⁺/C-myc⁺ cell amount and the Ducks staging. Therefore, CD44⁺/C-myc⁺ cells are probably cancer stem cells, and Ducks staging and CD44⁺/C-myc⁺ cell amount are important prognostic factors for colorectal cancer.

Subject headings: Colorectal Neoplasms; Neoplastic Stem Cells; Genes, myc; Cell Adhesion Molecules
Funding: the Natural Science Foundation of Gansu Province, No. 096RJZA096

Ma FK, Wang H, Liu B, Yang YL, Su QJ, Qian Z, Dong L. Expression of CD44⁺/C-myc⁺ cancer stem cells and its relationship with the prognosis of patients in colorectal tumors. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2015;19(14): 2161-2166.

0 引言 Introduction

结直肠癌为发病率及死亡率较高的一种肿瘤相关疾病, 其术后复发率在30%以上^[1], 传统的治疗手段如手术、化疗、放疗已经不能满足患者的需求。肿瘤复发的原因是具有自我更新特性的肿瘤干细胞未能彻底清除, 于是如何标记并消灭肿瘤干细胞成为治疗癌症的关键所在。

细胞黏附分子CD44是较早发现并普遍公认的一种干细胞标志物, 主要作用是调节肿瘤细胞与宿主细胞以及细胞外基质之间的黏附和连接^[2]; 原癌基因C-myc可促进细胞增殖和维持细胞活性, 是维持胚胎干细胞活性的重要因子^[3-4], Polo等^[5]发现C-myc基因在诱导胚胎干细胞转录早期起着重要作用, 提示C-myc可能是干细胞标志物之一。

本实验使用组织芯片、免疫组化双染技术观察CD44⁺/C-myc⁺细胞在结直肠癌组织中的形态特征、表达数量、位置分布, 讨论CD44⁺/C-myc⁺细胞与结直肠癌病理分级、患者生存状况的关系。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 观察统计性实验。

时间及地点: 于2015年2月在解放军兰州军区兰州总医院完成。

材料: 收集2007至2012年解放军兰州军区兰州总医院病理科150例结直肠癌(术中均完整切除肿瘤)患者病历信息, 调取患者癌组织石蜡包埋标本, 其中男91例, 女59例; 年龄83-20岁, 平均年龄58.4岁。石蜡标本中高分化腺癌47例、中分化腺癌48例、低分化腺癌36例、黏液腺癌19例。另取腺瘤组织标本(部分伴有不典型增生)34例, 距癌组织15 cm以外正常组织10例作为对照。患者术前均未行放化疗。

主要试剂: 兔抗人即用型单克隆抗体CD44试剂、兔抗人即用型单克隆抗体C-myc试剂、Dou-SPTM免疫组织化学双染试剂盒(兔/鼠)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

实验方法:

组织芯片的制作: 根据张登才等^[6]发明的简便组织芯

片制作方法, 首先使用穿刺针在空白蜡块打孔作为受体蜡块, 然后观察患者石蜡标本(供体蜡块)苏木精-伊红切片, 镜下标记癌组织, 使用穿刺针穿刺供体蜡块相应癌组织, 最后将穿刺的癌组织柱推入受体蜡块孔内。重复此顺序制得6×8阵列的蜡块, 将蜡块放入60-70 °C烤箱中3 min左右取出, 轻轻挤压蜡块使穿刺的组织柱与受体蜡块相融, 自然冷却后即为制作完成的组织芯片。

免疫组化双染及结果判定:

免疫组化双染: 组织芯片常规切片(厚度4 μm), 严格按照免疫组化双染试剂盒说明步骤进行。使用EDTA高温高压进行抗原修复, 然后滴加C-myc抗体, 碱性磷酸酶(BCIP/NBT)显蓝黑色, 再用双染增强剂孵育, 加入二抗CD44, AEC显红色, 苏木精复染, 水性封固剂封固。

结果判定标准: 经观察发现CD44表达于细胞膜显红色、C-myc表达于细胞核显蓝黑色, 染色结果由两位经验丰富的病理医生双盲法评估, 统计CD44⁺/C-myc⁺细胞在400倍视野下与癌细胞数量的百分比作为阳性强度判定, 双阳性细胞无表达为(-), 双阳性细胞数≤5%(+), 6%-15%(++), >15%(+++).

随访: 使用电话、门诊复诊等方式获取患者生存信息, 随访时间0.5-92个月, 中位随访时间45.8个月, 其中失访20例, 有效随访率为87%(130/150), 死亡53例, 总死亡率为35%(53/150)。

主要观察指标: ①结直肠不同组织中CD44⁺/C-myc⁺细胞的数目。②CD44⁺/C-myc⁺细胞的形态及分布位置。③患者预后与各个病理参数之间的关系。

统计学分析: 使用SPSS 19.0统计软件对数据进行处理, 不同组织中双阳性细胞的表达差异性使用 χ^2 检验, 双阳性细胞数量与各病理参数之间的相关性使用Spearman等级相关分析, 生存率的比较使用多因素Cox回归分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 CD44⁺/C-myc⁺细胞在不同组织中的表达及形态 观

察发现CD44⁺/C-myc⁺细胞胞膜显红色, 胞核显蓝黑色。双阳细胞多表达于癌腺样组织中的基底部和共壁腺样组织的共壁处, 在正常组织中无表达(图1A), 在腺瘤组织中散在单个表达(图1B), 在腺癌组织中呈单个点状或灶性分布(图1C-F)。所有双阳性细胞的形态一致: 胞核大呈卵圆形, 胞质较少。

正常组织、腺瘤组织、腺癌组织中双阳细胞的表达差异有非常显著性意义($P < 0.001$), 见表1。

表1 CD44⁺/C-myc⁺细胞在不同组织中的表达
Table 1 Expression of CD44⁺/C-myc⁺ cells in different tissues

组织类型	n	CD44 ⁺ /C-myc ⁺ 细胞				P
		-	+	++	+++	
正常	10	10	0	0	0	< 0.001
腺瘤	34	29	5	0	0	
腺癌	150	38	42	37	33	

表注: CD44⁺/C-myc⁺细胞在结直肠正常黏膜组织、腺瘤组织、腺癌组织中的表达差异有显著性意义($P < 0.05$)。

表2 CD44⁺/C-myc⁺细胞与各病理参数之间的关系
Table 2 The relationship between CD44⁺/C-myc⁺ cell expression and clinical pathological characteristics

项目	n	CD44 ⁺ /C-myc ⁺ 细胞				r	P
		-	+	++	+++		
性别					0.010	0.904	
男	91	23	29	16	23		
女	59	15	13	21	10		
年龄(岁)					0.136	0.098	
< 60	77	18	31	16	12		
≥60	73	20	11	21	21		
病理分级					0.250	0.004	
高	47	13	17	11	6		
中	48	12	10	16	10		
低	36	7	5	8	16		
黏液腺癌	19	6	10	2	1		
部位					-0.053	0.517	
结肠	56	13	19	6	18		
直肠	94	25	23	31	15		
浸润程度					0.223	0.006	
肌层	39	17	9	8	5		
全层	111	21	33	29	28		
淋巴是否结转移					0.175	0.032	
否	84	24	27	20	13		
是	66	14	15	17	20		
Ducks 分期					0.183	0.025	
A	27	9	7	5	6		
B	54	13	21	12	8		
C	48	13	11	16	8		
D	21	3	3	4	11		
TNM 分期					0.136	0.097	
I - I a	26	9	10	1	6		
II - II d	55	17	12	13	13		
III - III d	47	10	11	16	10		
IV - IV b	22	2	9	7	4		

表注: CD44⁺/C-myc⁺细胞数量与腺癌分化程度、浸润深度、淋巴结转移呈正相关($r > 1$, $P < 0.05$)。

2.2 CD44⁺/C-myc⁺细胞的表达与临床病理特征的关系
据统计发现双阳性细胞数量随着腺癌分化程度由高到低而呈递增趋势($r = 0.250$, $P < 0.05$), 癌浸润全层的组织中双阳性细胞数量明显多于浸润肌层的组织($r = 0.223$, $P < 0.05$), 伴有淋巴结转移的组织中双阳性细胞数量多于未转移的组织($r = 0.175$, $P < 0.05$), 随着Ducks分期由低到高双阳性细胞呈递增趋势($r = 0.183$, $P < 0.05$), 双阳性细胞表达与性别、年龄、部位、浸润程度、TNM分期无关($P > 0.05$), 见表2。

2.3 患者预后与病理特征及双阳性细胞表达的关系

2.3.1 单因素分析结果 将各个临床病理因素分别导入Cox模型中进行单因素分析发现: 淋巴转移、双阳性细胞数、Ducks分期对患者总生存率有显著影响($P < 0.05$), 见表3; 在患者的无进展生存率中, 淋巴转移、双阳性细胞数、Ducks分期同样具有影响($P < 0.05$), 与总生存率的分析结果一致, 见表3。

表3 影响患者总生存率和无进展生存率的单因素分析
Table 3 Univariate analysis of the overall and progression-free survival rate

因素	n	总生存率(%)	P	无进展生存率(%)	P
性别			0.345		0.167
男	91	64.8		50.5	
女	59	64.4		52.5	
年龄(岁)			0.309		0.963
< 60	77	68.2		53.8	
≥ 60	73	59.7		48.6	
病理分级			0.710		0.443
高	47	66.0		66.0	
中	48	55.6		55.6	
低	36	73.5		73.5	
黏液腺癌	19	48.3		48.3	
部位			0.475		0.756
结肠	56	58.9		48.2	
直肠	94	68.1		53.2	
浸润程度			0.701		0.239
肌层	39	71.8		59.0	
全层	111	62.2		48.6	
淋巴是否结转移			0.003		0.026
否	84	76.2		59.5	
是	66	50.0		40.9	
双阳性细胞数			0.001		0.000
-	38	90.6		78.1	
+	42	91.7		77.8	
++	37	55.9		41.2	
+++	33	33.3		20.8	
Ducks 分期			0.000		0.012
A	27	74.1		63.0	
B	54	75.9		59.3	
C	48	60.4		50.0	
D	21	33.3		19.0	
TNM 分期			0.185		0.262
I - I a	26	80.8		65.4	
II - II d	55	54.5		45.5	
III - III d	47	66.0		55.3	
IV - IV b	22	68.2		40.9	

表注: 淋巴转移、双阳性细胞数、Ducks分期是患者总生存率、无进展生存率的影响因素($P < 0.05$)。

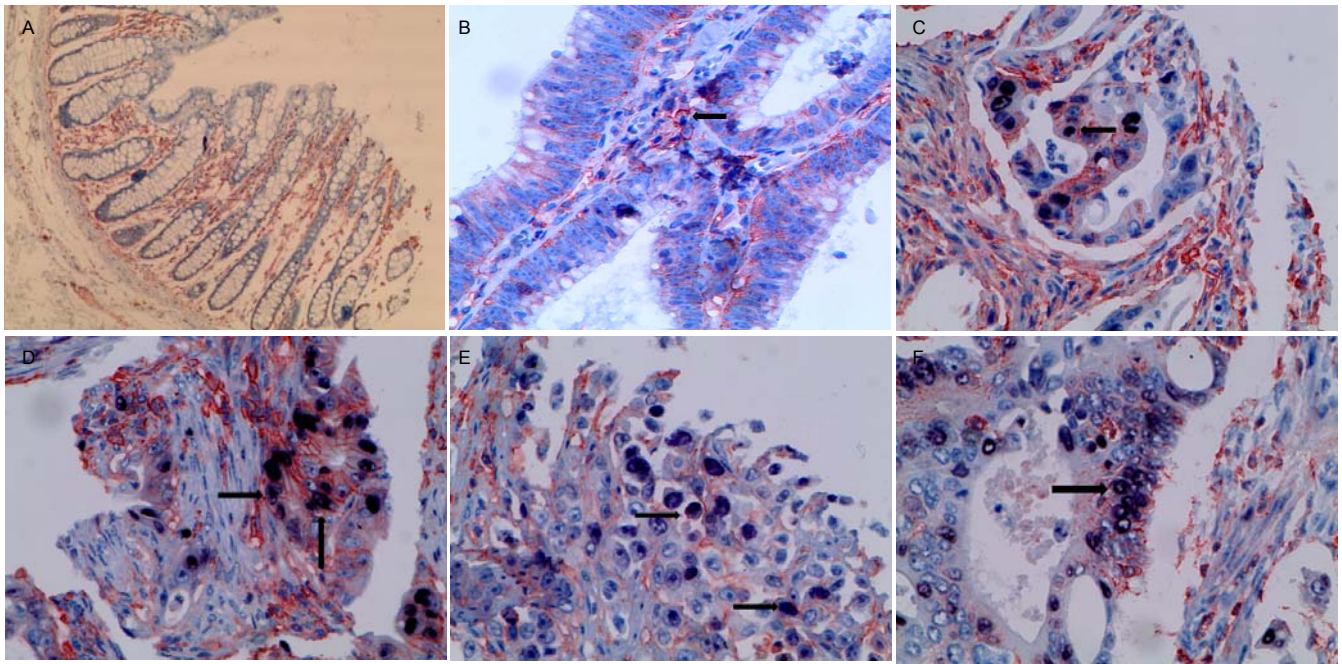


图1 CD44⁺/C-myc⁺细胞在不同组织中的表达及形态(免疫组化双染)

Figure 1 Expression and morphology of CD44⁺/C-myc⁺ cells in different tissues (immunohistochemical double staining)

图注: 图中 A 显示正常结肠组织无双阳性细胞表达(×100); B 显示腺瘤组织中有散在单个双阳性细胞, 黑色箭头所指为双阳性细胞(×400); C, D, E 显示高、中、低分化结肠癌组织有单个点状或灶性分布的双阳性细胞(×400); F 显示结肠黏液腺癌组织中灶性分布的双阳性细胞(×400), 黑色箭头所指为双阳性细胞。

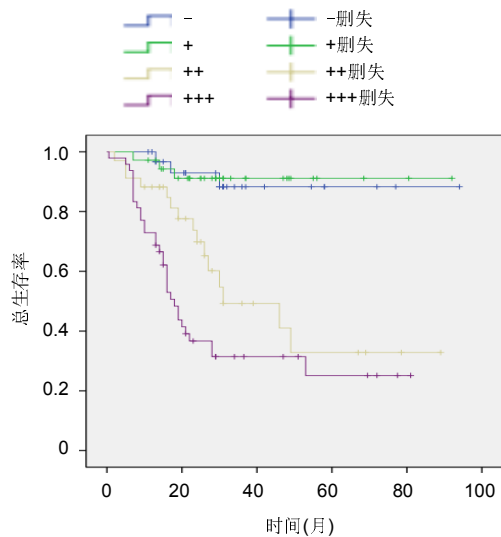


图2 CD44⁺/C-myc⁺细胞数对患者总生存率的影响

Figure 2 Influence of the number of CD44⁺/C-myc⁺ cells on the overall survival rate

图注: 阳性程度越高患者总生存率越低。

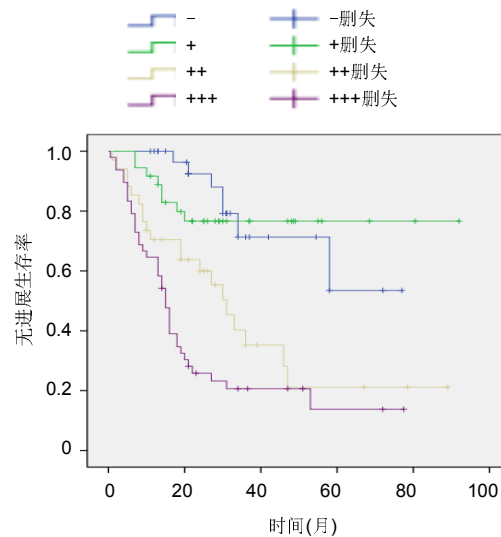


图3 CD44⁺/C-myc⁺细胞数对患者无进展生存率的影响

Figure 3 Influence of the number of CD44⁺/C-myc⁺ cells on the progression-free survival rate

图注: 阳性程度越高患者无进展生存率越低。

2.3.2 多因素分析结果 将各个病理参数导入Cox比例风险模型, 使用“Forward: wald”计算方式进行多因素分析发现: 患者的总生存率仅与组织中双阳性细胞数量有关, 与其他病理参数无关, 在其他参数相同的条件下双阳性细胞数量平均每增加一级, 患者的死亡风险便增加2.562倍 ($P < 0.05$), 见表4, 图2。在患者的无进展生存率中, 双阳性细胞数同样是其独立危险因素, 在其他参数相同的条件下双阳性细胞数量平均每增加一级, 患者的疾病进展风险便增加1.998倍 ($P < 0.05$), 在其他参数相同的条件下

Ducks平均每升一级, 患者的疾病进展风险便增加1.751倍 ($P < 0.05$), 见表5, 图3, 4。

表4 影响患者总生存率的因素

Table 4 Multivariate analysis of the overall survival rate

因素	回归系数(β)	标准误(SE)	Wald 值	P 值	相对危险度	95%可信区间
双阳性细胞	0.941	0.179	27.759	0.001	2.562	1.806-3.636

表注: 双阳性细胞是影响患者总生存率的稳定因素($P < 0.05$)。

表5 影响患者无进展生存率的因素

Table 5 Multivariate analysis of the progression-free survival rate

因素	回归系数 (β)	标准误(SE)	Wald 值	P	相对 危险度	95% 可信区间
双阳性细胞	0.692	0.134	27.390	0.000	1.998	1.536-2.600
Ducks 分期	0.560	0.222	6.345	0.012	1.751	1.132-2.706

备注: 双阳性细胞、Ducks 分期是影响患者无进展生存率的稳定因素($P < 0.05$)。

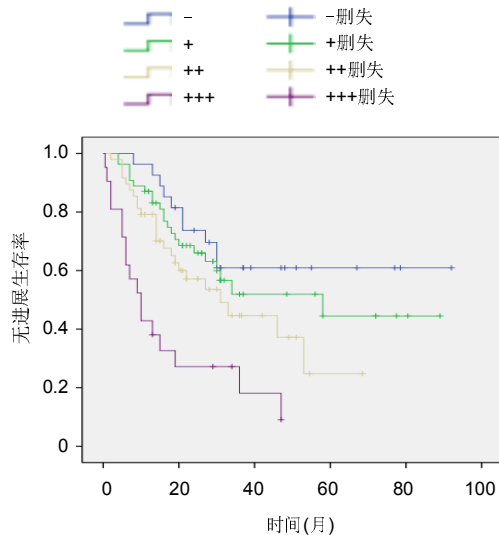


图4 Ducks 分期对患者无进展生存率的影响

Figure 4 Influence of Ducks stages on the progression-free survival rate

图注: Ducks 分期越差患者无进展生存率越低。

3 讨论 Discussion

自20世纪70年代至21世纪初全国的结直肠癌患者的发病率与死亡率呈大幅度增长^[7-8], 严重影响了人类的生活质量与生命健康。目前结直肠癌的主要治疗手段还是以手术为主, 辅助放、化疗; 手术治疗由传统切除方法进展为完整结肠系膜切除术及全直肠系膜切除术^[9], 由传统腹腔镜手术发展到了更精准、安全的腹腔镜机器人手术^[10]; 放疗手段多是以术前增加放疗剂量为主; 临床上正在使用的化疗药物并不多, 多是以奥沙利铂及伊立替康为基础的联合治疗方案及其延伸出来二线、三线的治疗方案^[11-13], 随着中医的深入研究发现多种中药成药联合放、化疗能提高结直肠癌患者的生存质量^[14-17]。虽然治疗后相比以前获得了长足的进步, 但是治疗效果并不理想。手术切除不能完全切除癌干细胞、放化疗对人体的伤害不能避免、中药疗效太慢机制不太明确, 因此需要找到更加具有疗效的治疗方法并明确影响结直肠癌患者生存率的各个病理因素。

肿瘤干细胞学理论于2001年由Reya等^[18]提出后, 科研人员从各种肿瘤组织中陆续发现了肿瘤干细胞, 证明了肿瘤干细胞学说的真实性, 该学说认为肿瘤组织中存在少量的肿瘤干细胞, 是引发肿瘤生长分化的决定性细胞^[19], 具有强致癌性。然而现在对恶性肿瘤的治疗手段多是针对肿瘤细胞的清除, 对肿瘤干细胞却没有有效的清除手段,

会造成肿瘤的复发率较高。因此治疗肿瘤的关键在于有效的清除肿瘤干细胞, 现在流行的靶向治疗就是方法之一, 靶向治疗的前提条件就是找到并标记肿瘤干细胞。

目前已经发现了众多肿瘤干细胞标记物, 在结直肠癌中CD133^[20], CD44^[21-22], ALDH1^[23], EpCAM^[24], Oct4等可能是肿瘤干细胞标记物^[25]。CD44是目前被承认最多的标记物, 其基因位于11号染色体短臂, 属于细胞黏附分子家族中的重要一员, 是一种单基因编码的单链跨膜糖蛋白。研究发现, 将100个CD44⁺结肠癌细胞种植裸鼠体内即可形成癌灶, 培养单个CD44⁺结肠癌细胞就能形成细胞集落, RNA干扰法降低CD44的表达后, 细胞集落生长缓慢并显著减少, 证明CD44⁺结肠癌细胞具有干细胞的特性^[26]。C-myc属于myc基因家族, 是一种常见的原癌基因, 其主要调控细胞的增殖与凋亡。研究发现在结直肠癌中, C-myc的过表达常出现在肿瘤的早期并对肿瘤细胞的增殖、肿瘤的恶性生长有促进作用^[27]。罗瑾等^[28]使用S-腺苷甲硫氨酸(SAM)对大肠癌细胞系HT-29中的C-myc基因重新甲基化, 降低了C-myc的表达, 从而有效的降低了肿瘤细胞的生长水平。

肿瘤干细胞与正常干细胞相似都处于细胞静止期(G₁/G₀期), 主要区别在于正常干细胞是受调控的自我更新分化, 而肿瘤干细胞是失控的生长^[29]。CD44⁺细胞在肿瘤细胞的各个生长期均有表达, 不符合肿瘤干细胞的特性, 说明单因子标记肿瘤干细胞并不精确。因此本实验使用免疫组织化学双染法, 通过表达原癌基因C-myc与CD44蛋白来标记肿瘤干细胞。

实验发现CD44⁺/C-myc⁺细胞的形态与表达位置与正常肠腺体隐窝的干细胞相似, 证明CD44⁺/C-myc⁺细胞很有可能为结直肠癌肿瘤干细胞。通过数据统计发现: CD44⁺/C-myc⁺细胞数量与结直肠癌的病理分级呈负相关($r=0.250$, $P < 0.05$), 即肿瘤分化越差, 组织中双阳性细胞越多, 与王芙蓉等^[22]、张登才等^[25]的研究一致, 证明肿瘤干细胞对肿瘤的生长分化有重要调控作用, 进一步论证了肿瘤干细胞学说^[7, 30]。

通过对随访资料的单因素分析发现患者浸润程度越深、肿瘤干细胞存在越多、Ducks分期越高其预后越差, 证明淋巴结转移、肿瘤干细胞数量、Ducks分期是影响患者预后的重要因素, 这些因素可指导临床医生如何对患者进行后续治疗并对患者的预后进行评估, 从而提高患者的术后生存时间及患者的生存质量。将患者的总生存率与无进展生存率多因素分析发现肿瘤干细胞的表达是影响患者预后的稳定因素, 干细胞的表达不但能影响患者的死亡率还与患者的复发、转移关系密切。

结直肠癌患者的治疗方法多是手术切除患部, 术后复发转移率太高, 效果并不理想, 因此靶向治疗受到了越来越多的关注与接受。目前靶向治疗多是清除已增殖分化的肿瘤细胞, 而针对肿瘤干细胞的靶向治疗方法却很少。肿

瘤干细胞标记物已经发现很多, 下一步的重点就是研究如何让药物只靶向肿瘤干细胞特异性受体而不损伤正常干细胞、如何降低肿瘤对靶向治疗药物的耐药性。随着分子水平的提高, 这些问题将需要不断实验研究来解决, 为肿瘤的治疗带来崭新的时代。

致谢: 感谢解放军兰州军区兰州总医院病理科技师李双明、李金华、肖卫玲在实验技术上提供的指导帮助。

作者贡献: 实验设计为马法库、刘斌, 实验实施为马法库、王欢, 实验评估为杨艳丽、苏勤军、钱震, 资料收集为马法库、王欢。马法库、刘斌成文并对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 所有参与研究患者均对本取材知情同意, 随访信息的收集已获得患者及家属同意, 患者信息遵循医学保密原则保存。

学术术语: 无进展生存时间-是指肿瘤疾病患者从接受治疗开始, 到观察到疾病进展或者发生因为任何原因的死亡之间的这段时间, 是肿瘤实验研究中常用的终点时间, 比总生存期更好的反映肿瘤的生长。

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] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010;60(5):277-300.
- [2] Endo K, Terada T. Protein expression of CD44 (standard and variant isoforms) in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, p53 expression, and patient survival. *J Hepatol*. 2000;32(1):78-84.
- [3] Cartwright P, McLean C, Sheppard A, et al. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*. 2005;132(5):885-896.
- [4] Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(12):976-990.
- [5] Polo JM, Anderssen E, Walsh RM, et al. A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell*. 2012;151(7):1617-1632.
- [6] 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.
- [7] 王宁, 孙婷婷, 郑荣寿, 等. 中国2009年结直肠癌发病和死亡资料分析[J]. *中国肿瘤*, 2013, 22(7): 515-520.
- [8] 武鸣, 张思维, 韩仁强. 2004-2005 年中国结直肠和肛门癌死亡水平分析[J]. *中华预防医学杂志*, 2010, 44(5):403-407.
- [9] Hohenberger W, Weber K, Matzel K, et al. Standardized surgery for colonic cancer: complete mesocolic excision and central ligation--technical notes and outcome. *Colorectal Dis*. 2009;11(4):354-364.
- [10] Baek SK, Carmichael JC, Pigazzi A. Robotic surgery: colon and rectum. *Cancer J*. 2013;19(2):140-146.
- [11] de Gramont A, Figer A, Seymour M, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2000;18(16):2938-2947.
- [12] Díaz-Rubio E, Tabernero J, Gómez-España A, et al. Phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with continuous-infusion fluorouracil plus oxaliplatin as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: final report of the Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors Trial. *J Clin Oncol*. 2007;25(27):4224-4230.
- [13] Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, et al. Randomized controlled trial of reduced-dose bolus fluorouracil plus leucovorin and irinotecan or infused fluorouracil plus leucovorin and oxaliplatin in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: a North American Intergroup Trial. *J Clin Oncol*. 2006;24(21):3347-3353.
- [14] 李宇飞, 李华山. 结直肠癌中医药治疗的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2012, 20(36):3748-3753.
- [15] 刘劲松, 李丽萍, 刘俊. 复方苦参注射液联合化疗治疗对结直肠癌患者血清血管内皮生长因子的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(2):333-334.
- [16] 海艳洁, 郑宇, 庄亚严, 等. 槐耳颗粒联合化疗对晚期大肠癌的初步临床研究[J]. *药物流行病学杂志*, 2012, 21(2):53-55.
- [17] 张勇, 许建华, 孙珏, 等. 健脾解毒方联合 FOLFOX4 方案治疗晚期结直肠癌临床研究[J]. *环球中医药*, 2010, 3(2):117-120.
- [18] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-111.
- [19] Tu SM, Lin SH, Logothetis CJ. Stem-cell origin of metastasis and heterogeneity in solid tumours. *Lancet Oncol*. 2002;3(8):508-513.
- [20] Wend P, Holland JD, Ziebold U, et al. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Semin Cell Dev Biol*. 2010;21(8):855-863.
- [21] 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.
- [22] 王芙蓉, 刘斌, 苏勤军, 等. 结直肠癌组织中CD44⁺肿瘤细胞与S期标志物增殖细胞核抗原的关系[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(40):7537-7540.
- [23] Carpentino JE, Hynes MJ, Appelman HD, et al. Aldehyde dehydrogenase-expressing colon stem cells contribute to tumorigenesis in the transition from colitis to cancer. *Cancer Res*. 2009;69(20):8208-8215.
- [24] Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jun 12;104(24):10158-10163.
- [25] 张登才, 刘斌, 张丽华, 等. 结直肠腺癌组织中CD44⁺/Oct4⁺癌干细胞的形态及分布[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(49):8461-8467.
- [26] 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.
- [27] Böckelman C, Koskensalo S, Hagström J, et al. CIP2A overexpression is associated with c-Myc expression in colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*. 2012;13(5):289-295.
- [28] 罗瑾, 李燕妮, 耿鑫, 等. S-腺苷甲硫氨酸抑制大肠癌细胞生长的实验研究[J]. *生物医学工程与临床*, 2011, 15(2):183-186.
- [29] Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, et al. Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(12):2144-2151.
- [30] He S, Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2009;25:377-406.