

DOI: 10.13376/j.cblls/2019098

文章编号: 1004-0374(2019)08-0802-10

结肠癌干细胞标志物和信号通路的研究进展

张子怡^{1#}, 林泉任^{1#}, 叶春雨^{2#}, 金燕^{2*}

(1 延边大学医学院, 延吉 133002; 2 延边大学医学院细胞生物学与医学遗传学教研室, 延吉 133002)

摘要: 结肠癌是一种最常见的消化道恶性肿瘤, 世界范围内其发病率位列第三。大部分的结肠癌患者死亡由肿瘤的复发转移和耐药性所致, 而这些过程都有肿瘤干细胞的参与。因此, 靶向肿瘤干细胞将成为未来根治结肠癌的重要研究方向, 而结肠癌干细胞标志物的发现则为其提供了新思路。同时, 因结肠癌干细胞的生长依赖多种信号通路的作用, 故其相关信号通路靶向药物的研究也将是一大发展方向。该文就目前关于结肠癌干细胞标志物及其相关信号通路抑制剂的研究进展作一综述。

关键词: 结肠癌干细胞; 生物学标志物; 信号通路; 肿瘤转移; 抑制剂

中图分类号: R735.35

文献标志码: A

Advances in research on stem cell markers and signaling pathways in colon cancer

ZHANG Zi-Yi^{1#}, LIN Quan-Ren^{1#}, YE Chun-Yu^{2#}, JIN Yan^{2*}

(1 College of Medicine, Yanbian University, Yanji 133002, China; 2 Department of Cell Biology and Medical Genetics, College of Medicine, Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: Colon cancer is one of the most common malignant tumors of the digestive tract, and its incidence ranks third in the world. Most patients with colon cancer die of tumor recurrence and metastasis as well as drug resistance, which are related to cancer stem cells. Therefore, targeting cancer stem cells will become an important research direction for radical cure of colon cancer in the future, and the discovery of colon cancer stem cell markers opens a new window for it. Moreover, since the growth of colon cancer stem cells depends on various signaling pathways, the research on targeted drugs of colon cancer stem cell-related signaling pathways will also be a major development direction. In this paper, the current research progress on cancer stem cell markers and inhibitors of related signaling pathway in colon cancer is reviewed.

Key words: colon cancer stem cells; biomarkers; signaling pathway; tumor metastasis; inhibitor

结肠癌是全球第三大常见的癌症, 尽管得益于近年来早期诊断和治疗手段的进步, 结肠癌死亡率逐渐降低, 但其五年生存率仍仅为 65%^[1]。Chen 等^[2]的调查数据表明, 结肠癌在中国的发病率逐年升高, 且患者生存率较低, 其中, 肿瘤的复发转移和耐药性是导致结肠癌死亡率较高的重要影响因素。结肠癌干细胞 (colon cancer stem cell, CCSC) 是一小部分存在于结肠癌中的, 可以通过自我更新和分化产生多种类型细胞, 进而形成肿瘤的肿瘤起始细胞 (tumor initiating cells, TICs), 其与结肠癌的复发、转移和治疗耐受有着密切的联系。结肠癌的治疗

目前仍以传统的放化疗为主, 但其弊端在于无法彻底消除肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC)。因此, 靶向 CCSC 及其相关信号通路的研究显得尤为重要, 或许能为根治结肠癌, 消灭癌症病灶开启一条新的道路。本文将对结肠癌干细胞标志物及其相关信号通路靶向抑制剂作一综述, 为结肠癌靶向治疗提供思路。

收稿日期: 2019-02-25; 修回日期: 2019-04-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(81660494)

*通信作者: E-mail: jinyan@ybu.edu.cn

[#]共同第一作者

1 结肠癌干细胞标志物

现阶段主要的结肠癌干细胞标志物包括CD133、CD44、CD166、EpCAM、CD24、CD26、ITGB1、Lgr5、ALDH1、Oct4、Sox2和Nanog等,通常可用于鉴定和分离CCSC(表1)^[3-15]。其中,CD133、CD44、CD166、EpCAM、CD24、Lgr5、ALDH1、Sox2和Nanog还可能在预测病理分期、癌症诊断方面具有作用。CD24、CD26和CD29是参与细胞间黏附的膜表面糖蛋白,并可能与肿瘤的扩散转移

有关;而Oct4、Sox2和Nanog是维持胚胎干细胞特性的转录因子,并参与肿瘤的形成过程。因此,本文将CD24、CD26和CD29以及Oct4、Sox2和Nanog一起进行概述。此外,miRNA作为CCSC生物标记物的潜力也被证明,而且标志物之间的联合检测有利于结肠癌的诊断及治疗,可用于探索新型的靶向治疗方法。

1.1 CD133

CD133是相对分子质量为120 kDa的5次跨膜

表1 CCSC相关生物学标记物

标志物	定位	性质	主要生物学功能	结肠癌相关功能	CRC中RNA/蛋白表达
CD133	细胞膜	5次跨膜糖蛋白	确切功能尚不清楚,可能是细胞膜拓扑结构的组织者	与肿瘤的侵袭、转移及患者预后有关	高表达
CD44	细胞膜	单次跨膜糖蛋白、细胞黏附分子	淋巴细胞的活化、再循环和归巢、造血	与肿瘤的侵袭、转移有关	高/中度表达
CD166	细胞膜	单次跨膜糖蛋白	参与细胞间的黏附作用	与结肠癌的发生、发展及预后有关	中度表达
EpCAM	细胞膜	单次跨膜糖蛋白	调节细胞间黏附、细胞迁移、促进细胞增殖及调控信号转导等	促进肿瘤生长,促进EMT从而促进肿瘤转移	高表达
CD24	细胞膜	膜表面糖蛋白、细胞黏附分子	调节细胞黏附,与肿瘤细胞的浸润、增殖存在显著联系	与结肠癌的转移有关	高表达
CD26	细胞膜	单次跨膜糖蛋白	参与细胞黏附,与免疫调节、信号转导和细胞凋亡有关	与CRC的复发和转移有关	低表达
ITGB1	细胞膜	细胞表面受体	参与细胞黏附、活化、增殖等过程,在免疫应答、组织修复中发挥作用	调节人CRC细胞的生长和凋亡,与肿瘤扩散、转移有关	高表达
Lgr5	细胞膜	7次跨膜糖蛋白	参与Wnt信号转导 ^[3] ,与胚胎发生有关	抑制结肠癌的发生、发展 ^[3]	中度表达
ALDH1A1	细胞质	酶	将细胞内的乙醛氧化为乙酸,参与多种组织的分化与基因表达;也参与正常干细胞的生长与分化	与结肠癌预后、耐药有关 ^[4]	中度表达
POU5F1	主要位于细胞核	转录因子	是维持胚胎干细胞、成体干细胞自我更新能力及哺乳动物发育的关键分子,还参与了多种恶性肿瘤的形成 ^[5-7]	促进结肠癌的发生、发展	高表达
SOX2	细胞核	转录因子	维持胚胎干细胞特性,参与多种肿瘤的发生与发展 ^[8-10]	SOX2的异位表达可能与CRC细胞的异常分化有关 ^[11]	高表达
Nanog	细胞核	转录因子	是维持胚胎干细胞的多能性和自我更新的关键转录因子之一,参与多种肿瘤的发生与发展	在结肠癌中异常高表达,使其恶性程度增加 ^[12-14]	阴性表达
miRNA	细胞质	小分子非编码单链RNA	阻遏mRNA翻译	miRNA表达水平与CRC预后有关,特定miRNA与CRC的组织学亚型相关 ^[15]	与CRC相关的miRNA有的高表达,有的低表达

注: 以上信息或数据来自于Wikipedia (https://en.wikipedia.org/wiki/Main_Page)、National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>)。

糖蛋白。CD133 在正常造血干细胞、内皮祖细胞、神经元和胶质干细胞、成人肾、乳腺、气管、唾液腺、子宫、胎盘、消化道、睾丸等组织细胞中表达。CD133 已被鉴定为各种癌症中 CSC 的筛选标志物, 包括脑肿瘤、卵巢癌、肝细胞癌、前列腺癌和胰腺癌。2012 年, Schneider 等^[16] 的研究表明, CD133 作为 CCSC 的有效标志物, 优于 CD24、CD44、CD133 和 CXCR4。

此外, 在一些研究中, CD133 被证明是较好的预后标志物^[17]。除 CD133⁺ 可用于预测 CRC 进展和患者存活外^[18], CD133 也可作为结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 的潜在治疗靶标^[19]。近年临床实践证明, CXCR4 和 CD133 共表达是 II~III 期结肠癌患者预后不良的危险因素, 可能参与结肠癌的发展和转移; CD133 和 ezrin 蛋白具有预测 CRC 患者肿瘤侵袭和预后不良的潜在价值; CD133 的阴性表达是切除术后结肠癌腹膜转移患者复发的重要危险因素, 因此, 其可能是结肠癌腹膜转移的临床生物标志物^[20-22]。同时, Li 等^[23] 研究发现, p-STAT3 可能作为一种上游分子, 通过上调 CD133 参与结肠癌早期的进展, 进而诱导存活蛋白 survivin 表达, 提示 STAT3 可作为结肠癌的治疗靶点。Ning 等^[24] 研究发现, 抗 CD133 共轭抗体 SN-38 纳米粒的靶向给药可以消除 CD133 阳性细胞, 起到抑制肿瘤生长进而延缓复发的作用, 是一种潜在应用价值较大的靶向治疗方案。以上研究表明 CD133 表达可作为结肠癌侵袭、复发及转移的生物指标, 对结肠癌患者的预后及开发新的治疗方案起到一定的作用, 但涉及的具体调节机制仍需进一步探究。

1.2 CD44

CD44 也被称为归巢细胞黏附分子 (HCAM), 相对分子质量为 85~200 kDa, 在许多哺乳动物细胞中均有表达, 而由外显子 1~5 和 16~20 组成的标准亚型 CD44s 在大多数细胞类型中表达。含有可变外显子的 CD44 剪接变体称为 CD44v。一些上皮细胞也表达更大的亚型 (CD44E), 包括外显子 v8~10^[25]。

CD44 与其他标志物组合后可作为大量实体肿瘤的 CSC 标志物, 包括乳腺癌、结肠癌和胆囊癌等^[26]。在 Kopp 等^[27] 的研究中, CD44 被认为是结肠原发肿瘤中 CSC 的生物标志物; Zhou 等^[28] 研究发现, 从 HCT-116 细胞分离的 CD44⁺ 细胞可能具有与结肠癌细胞生长相关的 CSC 特性。CD44 过表达的结肠癌细胞对结肠癌的发展和转移起重要作用^[29-30]。有研究发现, STAT1 与 CD74/CD44 在结

肠癌细胞中高表达, 从而调节结肠癌细胞的黏附和迁移能力, 这可能与肿瘤的侵袭和转移密切相关^[31]。此外, Wang 等^[32] 的研究表明 CD44 的剪接变体 CD44v6 是 CRC 的有效预后因素。另外, 由于结肠肿瘤中 CD44 受体的表达显著高于正常结肠组织, 目前已有学者研制出一种智能纳米胶束 (HA-SS-TOS, HSST), 它能高度特异性结合 CD44 受体过表达的肿瘤细胞, 并通过高度选择性的药物释放来抑制原位肿瘤及其转移^[33], 这为未来临床对抗 CD44 高表达的晚期癌症提供了方向。

1.3 CD166

CD166 是相对分子质量为 100~105 kDa 的免疫球蛋白超家族的单次跨膜糖蛋白。它在活化的 T 细胞和单核细胞、上皮细胞、成纤维细胞、神经元、黑色素瘤细胞, 以及汗腺和皮脂腺中表达。在胸腺 T 细胞发育过程中, CD166 介导胸腺上皮细胞与 CD6⁺ 细胞的相互黏附。

已知 CD166 与前列腺癌、甲状腺癌、结肠癌等的形成有较强的相关性, 而与淋巴瘤、黑色素瘤、睾丸癌和肾癌的形成关联较弱。在 Zhang 等^[34] 的研究中, CD166 的高表达与 CRC 患者的不良预后和晚期临床病理学特征相关。张钧书等^[35] 的研究显示, CD166 阳性表达能促进肿瘤的远处转移, 并推测 CD166 阳性表达的结肠癌细胞肝转移的可能性增加, 认为其可作为预后不良的判断标志。陈翔等^[36] 及祝骁涛等^[37] 的研究表明, CD166 的高表达能促进结肠癌的发生、发展、侵袭及转移, 并且随着 CD166 的表达增加, 肿瘤浸润程度加深、淋巴结更易于转移且肿瘤恶性程度增加, 导致患者预后不良。以上均说明 CD166 可作为 CSC 标志物在结肠肿瘤预后方面的价值, 对结肠癌的靶向治疗具有重要意义。

1.4 EpCAM

上皮细胞黏附因子 (epithelial cell adhesion molecule, EpCAM) 是相对分子质量为 30~40 kDa 的单次跨膜糖蛋白。EpCAM 含有 265 个氨基酸残基组成的细胞外结构域 (EpEX) 和 26 个氨基酸残基组成的细胞内结构域 (EpICD)。EpCAM 表达可作为 CRC 临床诊断的有用生物标志物^[38]; 而 EpCAM 的沉默可导致 Wnt/ β -连环蛋白的表达降低, 从而减少细胞增殖并增加凋亡率^[39]。

Kim 等^[40] 发现 EPCAM 表达的完全丧失可用于筛选 EpCAM 缺失诱导的 Lynch 综合征相关的 CRC, 而 EPCAM 表达的部分丧失可用作 CRC 中肿瘤侵

袭性和预后不良的指标。既往研究已经证明 EGF 受体 (EGFR) 的激活可以激活 EpCAM 进而调节膜内蛋白水解, 引起上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[41]。2018 年, Liang 等^[42] 研究发现, EpEX 通过激活 EGFR 依赖性途径增强 EpCAM 的水解, 进而使 EpICD 促进 β -连环蛋白的核转位和缺氧相关基因的表达, 而 EpICD 的核积累与 CRC 患者的肿瘤转移和预后不良相关。这些发现表明针对 EpCAM 的治疗性抗体可能为结肠癌提供有希望的治疗方法, 如 Liao 等^[43] 开发了一种 EpCAM 中和抗体 EpAb2-6, 它在结肠癌细胞中可抑制 EpICD 和 β -catenin 的核转位并诱导细胞凋亡, 因此, 可用于 CRC 治疗; 对于 CRC 的进一步研究结果表明, 抗 EpCAM mAb 可能适用于癌症的诊断、预后、成像和治疗, 而癌细胞中 EpCAM 的过表达与肿瘤进展密切相关, 并且可能受表观遗传机制的调节^[44]。

1.5 CD24、CD26和CD29

CD24 别名热稳定抗原 (heat stable antigen, HSA), 是相对分子质量为 35~45 kDa 的细胞黏附分子, 可通过糖基磷脂酰肌醇 (glycosylphosphatidylinositol, GPI) 锚定到细胞膜表面聚集。CD24 在一些肿瘤, 如宫颈癌、子宫内膜癌和 CRC 中高表达; 但在另一些肿瘤, 如乳腺癌和肝癌中低表达。许多研究发现, CD24 高表达可作为结肠癌细胞中的 CSC 标志, 同时其表达被认为是独立的预后因素^[45-47]。Paschall 等^[48] 的研究证明, 抗 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 的人结肠癌干细胞样细胞的 CD133 高表达和 CD24 低表达参与晚期结肠癌的发展。Wang 等^[49] 的研究证实了 CD24 以 Hsp90 依赖性方式诱导 CRC 血管生成, 并激活 STAT3 介导的 VEGF 转录。有学者使用流式细胞术评估快速解离得到的 CRC 肝转移类器官是否表达干细胞表面标志物时发现, 仅 CD24 在所有培养物中大量表达 (60.5%~95.5%), 提示 CD24 与结肠癌的转移有关^[50]。因此, CD24 的高表达对结肠癌的诊断具有非常高的指导价值。

CD26 是一种具有多种生物学功能的蛋白酶, 属于丝氨酸蛋白酶 S9B 家族, 与肾癌、前列腺癌和甲状腺癌等的发生有关。Pang 等^[51] 研究表明, CD26 的表达与 CRC 分期呈正相关, 且术后 CD26 表达水平降低。CD26 的高表达是 CRC 切除后预后不良的预测因子, CD26 可能是 CRC 患者的有用预后标志物^[52]。CD26 与 CXCR4、CD45、M6P/IGF1IR 等相互作用时, 可增强肿瘤的侵袭性^[53]。作为 CRC 干细胞的标志物, CD133⁺CD44⁺CD26⁺ 比 CD133⁺

CD44⁺CD26⁻ 细胞的增殖能力更强、更具侵袭性且易发生转移, 且其具有明显的耐药性, 导致 CRC 患者预后不良且使肿瘤易于复发转移^[51,54]。此外, CSC CD26⁺CD326⁻ 循环肿瘤细胞的存在与 CRC 患者生存率较低、复发率较高有紧密联系^[55]。以上均表明, CD26 与结肠肿瘤的复发和转移密切相关, 可作为 CCSC 的有效分子标志物。但近年来关于 CD26 的研究较少, 且没有突破性的发现。

整合素 $\beta 1$ (integrin subunit beta 1, ITGB1) 是参与细胞黏附和识别的膜受体。Song 等^[56] 研究发现, ITGB1 调节人 CRC 细胞的生长和凋亡。ITGB1 的单核苷酸多态性 (single-nucleotide polymorphism, SNP) 可能是 CRC 患者的预后生物标志物, 尤其在接受化疗的患者中^[57]。最新研究发现, ITGB1 在 CRC 中具有致癌潜力, 可促进 CRC 进展; 高表达的 ITGB1 与患者预后不良有关, 因此, 可能作为 CRC 患者的潜在预后生物标志物。此外, ITGB1 可能通过黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 信号通路参与 CRC 的迁移和侵袭^[58]。

1.6 Lgr5

富含亮氨酸重复单位的 G 蛋白偶联受体 5 (leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5, Lgr5) 是 G 蛋白偶联的 7-跨膜受体超家族成员, 也是 R-spondins 的受体。Lgr5 在 CCSCs 的维持中起着至关重要的作用, 是结肠癌的潜在治疗靶点; Lgr5 是 CRC 的有效预后因素, 其高表达与 CRC 患者预后不良有关, 而 Lgr5 mRNA 表达是 CRC II 期患者的预后因素^[59-61]。Martin 等^[62] 的最新研究表明, Lgr5⁺ 细胞扩增是 CRC 肿瘤向腺瘤方向发生发展的标志, 是支持 CRC 作为干细胞疾病的依据, 提示其具有 CRC 治疗意义。在 Zhou 等^[63] 的研究中, Lgr5 被鉴定为能够抑制结肠癌转移的 TGF β 信号转导的新调节剂, 而 Lgr5 rs17109924 可用于预测 5-FU 辅助化疗的结肠癌患者的复发时间 (time to recurrence, TTR)^[64]。以上均可表明, Lgr5 可作为结肠癌的抑制因子, 用于结肠癌的靶向治疗。

1.7 ALDH1

乙醛脱氢酶 1 (aldehyde dehydrogenase 1, ALDH1) 是乙醛脱氢酶家族成员之一, 在一些恶性肿瘤, 如胃癌、乳腺癌及结肠癌的发生、发展中起重要作用。ALDH1 表达与结肠癌预后、耐药以及侵袭、转移密切相关。Chen 等^[65] 的实验结果表明, ALDH1 高表达表明 CRC 患者预后不良; 在 Yang 等^[66] 的实验中, 单变量和多变量分析显示 ALDH1A1 表达

是 CRC 的独立预后标志物 ($P < 0.001$)。Dylla 等^[67]的研究表明, ALDH1 表达定位于肿瘤细胞的细胞质, 因此, 比其他的 CCSC 标志物更具诊断优势。Goossens-Beumer 等^[68]的研究表明, ALDH1、Survivin 和 EpCAM 的联合表达是 CRC 患者的一个独立预后因子, 而且 ALDH1 联合其他分子标记物分选出的结肠癌细胞具有更高的致瘤能力。因此, ALDH1 的单独表达或与其他分子标记物的联合表达, 都可作为 CRC 患者预后诊断的重要标志。

1.8 Oct4、Sox2、Nanog

八聚体结合转录因子 4 (octamer-binding transcription factor 4, Oct4) 是包含 POU DNA 结合模板序列的转录因子家族成员。研究证实, Oct4 在维持 CSC 的干细胞特性中发挥了重要作用, 其表达被认为是 CRC 患者的预后因素^[5-7]。Padin-Iruegas 等^[69]研究报告, Oct4 蛋白过表达在结肠癌的发生发展过程中具有促进作用, 并且 Oct4 是维持结肠癌 CSC 样细胞存活的关键转录因子。Wen 等^[70]发现结肠癌细胞的凋亡与 Oct4 基因的沉默显著相关, 认为 Oct4 可能通过调控与凋亡相关的基因的转录来影响结肠癌的发生和发展。随后, 他们首次提出了 Oct4B1 在结肠癌中作为致癌基因发挥作用的结论, 这为治疗结肠癌, 特别是其耐药性提供了新的治疗策略^[71]。

性别决定区 Y 框蛋白 2 (sex determining region Y-box 2, Sox2) 是重要的转录因子家族成员。2018 年, 王军凯和李丽^[72]研究发现, Oct4 和 Sox2 在大肠癌组织中显著高表达, 与肿瘤的病理分期、分型与分化进程密切相关, 且对患者的预后及复发有重要作用, 联合检测 Oct4 和 Sox2 有望成为大肠癌治疗措施选择及预后判断的重要指标。此外, Lundberg 等^[73]的结果表明, CRC 中 Sox2 高表达和 CDX2 (caudal type homeobox 2) 低表达, 导致 CRC 患者预后不良。

同源框蛋白 Nanog (homeobox protein NANOG) 作为一种 DNA 结合同源框转录因子, 被发现在肝癌、结肠癌、乳腺癌、肺癌、膀胱癌、睾丸原位癌、胚胎性癌、多形性胶质瘤等多种恶性肿瘤中异常高表达, 相应的肿瘤级别较高, 临床预期较差^[12-14]。Nanog 蛋白在结肠癌细胞中过表达后, 细胞呈现更易于侵袭转移的间质化表型, 这与患者的预后、淋巴结转移及低存活率相关^[74]。Mattoo 等^[75]发现, 靶向 Nanog 的基因疗法可以增加 BH3 结构域模拟物在 CRC 中的功效。Yao 等^[76]发现 Nanog 阳性表达的 CRC 不仅具有肿瘤干细胞的特性, 而且具有上皮间质转化的特性, 说明 Nanog 信号轴在 CRC

进展中起关键作用, 这使得它成为治疗 CRC 的潜在靶标。Pan 等^[77]的研究结果表明, Nanog 可通过直接转录机制调节 miR-200 簇的表达进而调节 EMT-MET (mesenchymal-epithelial transition) 的可塑性, Nanog-miR-200 轴可能是控制 CRC 的良好靶点。虽然以上发现均提示 Nanog 可作为 CRC 的治疗靶标, 但既往研究表明, Nanog 表达调控是个极其复杂的过程, 它需要和其他生物因子或分子一同协作才能增强其致瘤能力。因此, 仍需进一步研究 Nanog 是否可以作为患者的独立预后因素及其分子机制。

1.9 miRNA

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一大家族小分子非编码单链 RNA, 长度约 22 nt, 通过促进 RNA 降解、阻遏 mRNA 翻译以及在某些情况下影响转录来调节蛋白质表达。Yang 等^[78]应用 qRT-PCR 和癌症基因组图谱 (TCGA) 数据库, 对 205 例 II 期、III 期和 IV 期 CRC 患者的组织进行分析, 以 miR-16 为管家基因, 发现 5 种 miRNA (miR-15b、miR-215、miR-145、miR-192 和 let-7g) 与 CRC 的无进展生存期 (PFS) 和总生存期 (OS) 显著相关, 验证了 miRNA 具有作为结肠癌预后生物标志物的临床潜力。已知 CCSC 对 5-FU 化疗的抗性是晚期 CRC 治疗失败的主要原因。miRNA 的表观遗传学改变是 5-FU 耐药机制的主要贡献者。这也预示着 miRNA 可作为根治结肠癌的生物靶标。

2 结肠癌干细胞与信号转导

通过研究 CCSC 标志物可以及早地检测出肿瘤的存在; 而掌握 CCSC 相关信号通路的转导路径, 可减少肿瘤的复发和转移, 为结肠癌的诊断和治疗降低难度。一般正常干细胞自我更新和分化的平衡由数个信号通路调控, 一旦信号通路失控将形成肿瘤。因此, 目前认为, 靶向抑制特异性信号通路进而抑制 CCSC 将是未来治疗结肠癌的一大发展方向。虽然参与 CCSC 生长的信号通路较多, 但目前研究机制较为清晰的主要有 Wnt、Notch 和 mTOR 信号通路。因此, 下文主要介绍 Wnt、Notch 和 mTOR 信号通路及其抑制剂。

2.1 Wnt信号通路

Wnt 信号通路调控多个细胞过程, 如胚胎发育期间的细胞运动和增殖。Wnt 信号通路也参与干细胞的效力维持和分化诱导。异常的 Wnt 信号通路与 CRC 的发生有关, 且 Wnt/ β -catenin 信号通路级联

在癌症发生的中心, 约 90% 的 CRC 患者该信号通路都发生了突变^[79]。这些突变主要发生于腺瘤性结肠息肉病基因 (adenomatous polyposis coli, APC) 和 β -连环蛋白基因 (β -catenin), 两者均可导致通路异常激活, 但其他通路成分也可发生突变^[80]。既往研究发现, APC 编码 Wnt 通路的负调控因子, 因此, APC 失活易激活 Wnt 信号通路^[81]。同时, Wnt 信号通路通过调控 β -catenin 的表达来参与 EMT, 进而参与包括结肠癌在内的多种上皮肿瘤的生成、转移等。在 CRC 中, EMT 影响 CCSC 的增殖、结肠癌的发育等, 并调控其恶性程度和远端转移^[82]。此外, Vermeulen 等^[83] 研究显示, Wnt 信号通路异常激活能增强结肠癌细胞的增殖和侵袭能力, 这是由于干细胞分子标志物的表达增加导致的。Lgr5 是 Wnt 信号通路的靶基因, 同时也是 CSC 的常见表面标记物^[84], 提示 Wnt 信号通路可作为 CCSC 致癌能力的标志。

Wnt/ β -catenin 信号转导途径处于肿瘤发生和进展的中心。靶向该通路的抗癌药物的开发具有巨大潜力。目前研究的药物主要靶向 Wnt 配体和受体 (LGK974 I、OMP-54F28、OMP-18R5 和 OTSA101)、 β -连环蛋白降解复合物 (塞来昔布, DIF1/3、染料木素、Pyruvium、G007-LK、XAV939、JW55)、 β -连环蛋白胞质-核转位 (WGA) 和 β -连环蛋白转录复合物 (PRI724、维生素 D、维甲酸、PKF115-584、CGP9049090 和 SAH-BCL9)。其中, 膜结合 α -酰基转移酶 Porcupine (PORCN) 对 Wnt 配体进行脂质修饰并促进其分泌, 且增强其与同源受体的结合能力。LGK974 是 PORCN 的有效特异性小分子抑制剂, 通过下调 Wnt 靶基因 *Axin2* 的表达及减少 LRP6 的磷酸化来靶向治疗结肠癌, 目前处于 I 期临床试验阶段^[85-86]。环氧酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 高表达时可促进前列腺素 E2 的产生, 进而抑制糖元合成酶激酶 3 β 和轴蛋白 2 (*Axin2*) 表达来阻止 β -连环蛋白降解, 最终激活 Wnt 通路。非甾体抗炎药 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs), 如阿司匹林、舒林酸或特异性 COX-2 抑制剂, 如塞来昔布均可通过抑制 COX-2 抑制 Wnt 信号转导^[87]。此外, Chen 等^[88] 研究发现, FH535 可通过靶向 Wnt/ β -catenin 信号通路, 在 mRNA 和蛋白质水平上有效下调 cyclin D1 和 survivin 等靶基因的表达, 抑制结肠癌细胞的增殖。

2.2 Notch 信号通路

Notch 信号通路由跨膜的受体 (Notch 1~4)、配

体 δ -like1、3、4 和 Jagged-1, 以及 Jagged-2 和核内结合蛋白及靶基因组成。Notch 受体信号通过与邻近细胞表达的 Jagged 或 δ 样配体结合而起始。在结肠癌中, 这些配体由基质细胞 (stroma cell) 产生, 特别是肿瘤内皮细胞^[89]。与配体结合后, Notch 受体被解聚素-金属蛋白酶 (ADAM) 切割, 随后被跨膜结构域内的 γ -分泌酶复合物切割, 导致 Notch 细胞内结构域 (notch intracellular domain, NICD) 从膜释放并易位到细胞核中。核 NICD 随后结合 CSL 复合物 (C-promoter binding protein-1/Suppressor of Hairless/Lag1, CBF1-Su(H)-LAG1) 从而刺激 Notch 靶基因的表达, 导致细胞增殖加强 (*MYC*、*CCND1*)、存活 (*BCL2*、*NF- κ B*) 和细胞分化的抑制 (*Hes1*)^[90]。

Chu 等^[91] 发现, Notch-1 与 Notch-2 分别在 CRC 中高表达与低表达, 且两者升高与降低的程度与 CRC 的病理分期和恶性程度呈正相关, 且 Notch-1 高表达、Notch-2 低表达均与预后不良相关, 在临床上可以根据其表达程度来评估结肠癌患者病情及预后。Kamstrup 等^[92] 研究发现, Notch-1 信号通路的激活可以使隐窝细胞处于低分化状态并促进干细胞增殖。Zhang 等^[93] 通过敲除结肠癌细胞内 Notch 基因后, 发现结肠癌细胞凋亡率增加, 而 Notch 高表达可促进结肠癌细胞的增殖。Notch 在结肠癌起始细胞 (colon cancer-initiating cell, CC-IC) 中的表达明显强于普通结肠癌细胞。上述研究均表明 Notch 信号通路可以作为 CCSC 的标志特征。

Notch 信号通路在 CCSC 中高度激活, 阻断该通路信号转导将影响 CCSC 的转移及血管形成等过程。Notch 信号可被两种主要类型的 Notch 抑制剂抑制: γ -分泌酶抑制剂 (γ -secretase inhibitor, GSI) 和指向 Notch 受体或配体的单克隆抗体。GSI, 如 DAPT (GSI-IX) 抑制剂作用于结肠癌细胞株 HT-29 后, 抑制细胞增殖, 细胞中 ALDH1、Notch-4 和 DLL1 的 mRNA 和蛋白水平表达下调, 这可能是通过降低 CSC 特性、下调 Notch 信号通路受体与配体表达实现的^[94], 但其效应存在较重的副作用, 只能在化疗中处于辅助地位。但若 GSI 与奥沙利铂联合使用则会提高抗凋亡蛋白 Mcl-1 和 Bcl-xL 的水平而削弱奥沙利铂介导的 CSC 凋亡, 反而使其疗效弱于单用奥沙利铂^[95]。Notch 抑制剂可单独使用或与化疗药物联合用于治疗癌症及其复发, 如与厚朴酚 (honokiol) 联合可靶向抑制 Notch-1 及 Jagged-1 的表达, 进而降低 *Hes-1* 的表达水平, 从而抑制 CCSC 增殖^[96]。节律蛋白同源物 3 (period circadian

protein homolog 3, PER3) 作为双通路抑制剂, 过表达时可降低 Notch 和 Wnt 通路中 Notch-1 受体、Jagged-1 配体、 β -连环蛋白、c-Myc 及 Lgr5 等的蛋白水平, 从而增强化疗药物 5-FU 对 CCSC 的抑制作用^[97]。总之, Notch 抑制剂可抑制癌细胞的增殖, 或者可用于对抗癌症的耐药性, 因此可作为癌症的新疗法。此外, Notch 和其他信号通路 (如 Wnt 和 Hh) 的联合对癌症治疗也很重要, 这也提示通过对不同信号转导途径之间的交叉物质的研究可以发现治疗癌症的新策略。

2.3 mTOR信号通路

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶通路, 其主要蛋白 mTOR 存在于两个不同的复合体中: mTOR 复合物 1 (mTORC1) 和 mTOR 复合物 2 (mTORC2)。mTORC1 由 mTOR、mTOR 相关调节蛋白 (Raptor)、G 蛋白 β 亚基样蛋白 (G protein beta subunit like protein, G β L) 和特异性抑制蛋白 (DEPTOR) 组成, 且其活性受雷帕霉素调节。mTORC1 的活性还可受生长因子、能量水平、细胞应激及氨基酸等因素的影响, 从而调节蛋白质合成过程, 影响细胞的生长和增殖, 并调节自噬过程影响细胞的存活。另外, mTORC1 中 mTOR 的激活导致核糖体 S6 激酶 1 (phosphorylated ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1) 和 eIF4E 结合蛋白 1 (4E binding protein 1, 4EBP1) 的磷酸化, 后两者为蛋白质翻译和细胞生长的介质。mTORC2 由 mTOR、雷帕霉素不敏感蛋白 (Rictor)、G β L、应激活化蛋白激酶相互作用蛋白 1 (Sin1)、病程相关蛋白 5 (pathogenesis related protein 5, PRRP5)/Ptor-1 蛋白和 DEPTOR 蛋白组成。mTORC2 可以通过磷酸化 Akt 而将其激活, 从而影响细胞代谢及存活; 可以参与肌动蛋白细胞骨架的控制与维持; 还可以表现出酪氨酸蛋白激酶活性, 促进胰岛素受体及胰岛素样生长因子 1 受体的激活。

mTOR 信号通路是参与许多细胞过程的重要信号通路。它调节许多细胞内信号分子, 为细胞提供能量。有研究显示 mTOR 信号转导的抑制会在体外抑制 CRC 细胞的生长和在体内抑制腺瘤的形成^[98-100]。由此可以推断, mTOR 抑制剂对于治疗结肠癌的潜力。如 2018 年, Pandurangan 等^[101] 研究发现, 肌醇-6-磷酸盐 (Inositol-6 phosphate, IP6) 可抑制 HT-29 结肠癌细胞的 mTOR 通路, 诱导自噬介导的细胞死亡, 但 mTOR 抑制剂有时是双刃剑,

因为其诱导的自噬过程在肿瘤发展不同阶段发挥不同作用。在肿瘤发生过程中, 自噬抑制肿瘤的形成; 而在肿瘤发展阶段, 自噬却会促进肿瘤细胞存活。AZD8055 为 mTORC1 和 mTORC2 的双重抑制剂, 可抑制 mTOR 通路并作为 mTOR 依赖性细胞周期调节剂, 在结肠癌细胞中诱导细胞毒性作用、细胞凋亡和细胞周期停滞, 并在小鼠中发挥抗肿瘤作用^[102]。它还抑制 mTOR 信号转导途径和 mTOR 依赖性细胞周期进展。另外, 在 CCSC 中 mTOR 抑制剂的研究将 mTOR 与 PI3K/AKT 联系起来, Chen 等^[103] 发现, 双通路抑制剂 BEZ235 能抑制 CCSC 的增殖及其标志物 CD133 和 Lgr5 的表达, 从而抑制 CCSC 的干细胞特性。

3 总结

结肠肿瘤的发生、发展是一个复杂的生物学过程, 需要多种基因、蛋白质和信号通路的参与。随着 CSC 理论不断完善, 寻找高度特异性的 CSC 标志物, 利用 CSC 标志物鉴别和筛选出相应的 CSC, 进而靶向根治肿瘤, 为结肠癌的靶向治疗提供了新的思路。然而, 虽然 CSC 标志物众多, 能用于结肠癌诊疗的标志物仍需进一步的探索, 而针对 CCSC 的特异性标志物现状而言, 重要的是加强标志物之间的联合检测, 这样既可了解各标志物之间的功能联系, 又可提高结肠癌的诊疗效果。同时, 关于 CCSC 抑制剂的研究主要集中于其信号通路方面, 而针对信号通路抑制剂现状而言, 重要的是加强靶向抑制剂与化疗药物的结合, 从而降低 CCSC 的耐药性, 提高治疗效果。此外, 信号通路之间的联合抑制剂的开发也迸发出巨大活力。虽然 CCSC 特异性标志物与其通路抑制剂的研究尚有许多机制仍不明确, 需要进一步的探索, 但这两者作为新兴的结肠癌治疗手段, 相信未来会在结肠癌的诊断、治疗两方面起到十分重要的作用。

[参 考 文 献]

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68: 7-30
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66: 115-32
- [3] Fan XS, Wu HY, Yu HP, et al. Expression of Lgr5 in human colorectal carcinogenesis and its potential correlation with β -catenin. *Int J Colorectal Dis*, 2010, 25: 583-90
- [4] Raha D, Wilson TR, Peng J, et al. The cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase is required to maintain a drug-tolerant tumor cell subpopulation. *Cancer Res*, 2014, 74: 3579-90

- [5] 张丽丽, 林育红. 肺癌干细胞基因Oct-4表达的临床意义. 中国医药导报, 2013, 10: 22-5
- [6] Chen YC, Hsu HS, Chen YW, et al. Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. PLoS One, 2008, 3: e2637
- [7] Miyoshi N, Fujino S, Ohue M, et al. The *POU5F1* gene expression in colorectal cancer: a novel prognostic marker. Surg Today, 2018, 48: 709-15
- [8] 孙丹, 武洋, 辛彦. Sox2和Cdx2基因编码蛋白在胃癌及其癌前病变中的表达及意义. 现代肿瘤医学, 2016, 24: 1585-91
- [9] 温子海, 吕巧云, 李晓华. 干细胞转录因子OCT4、SOX2在食管鳞癌组织中表达及与预后的关系. 中国组织工程研究, 2017, 21: 2741-5
- [10] 高子夜, 刘佩, 刘晓波. 胃癌组织中SOX2表达及其临床病理特征的Meta分析. 临床肿瘤学杂志, 2017, 22: 243-8
- [11] Tani Y, Akiyama Y, Fukamachi H, et al. Transcription factor SOX2 up-regulates stomach-specific pepsinogen a gene expression. J Cancer Res Clin Oncol, 2007, 133: 263-9
- [12] Knezevic J, Pfefferle AD, Petrovic I, et al. Expression of miR-200c in claudin-low breast cancer alters stem cell functionality, enhances chemosensitivity and reduces metastatic potential. Oncogene, 2015, 34: 5997-6006
- [13] Masood N, Basharat Z, Khan T, et al. Entangling relation of micro RNA-let7, miRNA-200 and miRNA-125 with various cancers. Pathol Oncol Res, 2017, 23: 707-15
- [14] Bojmar L, Karlsson E, Ellegard S, et al. The role of microRNA-200 in progression of human colorectal and breast cancer. PLoS One, 2013, 8: e84815
- [15] Eyking A, Reis H, Frank M, et al. MiR-205 and miR-373 are associated with aggressive human mucinous colorectal cancer. PLoS One, 2016, 11: e0156871
- [16] Schneider M, Huber J, Hadaschik B, et al. Characterization of colon cancer cells: a functional approach characterizing CD133 as a potential stem cell marker. BMC Cancer, 2012, 12: 96
- [17] Jing F, Kim HJ, Kim CH, et al. Colon cancer stem cell markers CD44 and CD133 in patients with colorectal cancer and synchronous hepatic metastases. Int J Oncol, 2015, 46: 1582-8
- [18] Wang BB, Li ZJ, Zhang FF, et al. Clinical significance of stem cell marker CD133 expression in colorectal cancer. Histol Histopathol, 2016, 31: 299-306
- [19] Huang R, Mo D, Wu J, et al. CD133 expression correlates with clinicopathologic features and poor prognosis of colorectal cancer patients: an updated meta-analysis of 37 studies. Medicine (Baltimore), 2018, 97: e10446
- [20] Li XF, Guo XG, Yang YY, et al. Effect of CXCR4 and CD133 co-expression on the prognosis of patients with stage II~III colon cancer. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16: 1073-6
- [21] Fathi A, Mosaad H, Hussein S, et al. Prognostic significance of CD133 and ezrin expression in colorectal carcinoma. IUBMB Life, 2017, 69: 328-40
- [22] Nagata H, Ishihara S, Kishikawa J, et al. CD133 expression predicts post-operative recurrence in patients with colon cancer with peritoneal metastasis. Int J Oncol, 2018, 52: 721-32
- [23] Li W, Lee MR, Kim T, et al. Activated STAT3 may participate in tumor progression through increasing CD133/survivin expression in early stage of colon cancer. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 497: 354-61
- [24] Ning ST, Lee SY, Wei MF, et al. Targeting colorectal cancer stem-like cells with anti-CD133 antibody-conjugated SN-38 nanoparticles. ACS Appl Mater Interfaces, 2016, 8: 17793-804
- [25] Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. Mol Pathol, 1999, 52: 189-9
- [26] Greve B, Kelsch R, Spaniol K, et al. Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation. Cytometry A, 2012, 81: 284-93
- [27] Kopp R, Fichter M, Schalhorn G, et al. Frequent expression of the high molecular, 673-bp CD44v3,v8-10 variant in colorectal adenomas and carcinomas. Int J Mol Med, 2009, 24: 677-83
- [28] Zhou JY, Chen M, Ma L, et al. Role of CD44(high)/CD133(high) HCT-116 cells in the tumorigenesis of colon cancer. Oncotarget, 2016, 7: 7657-66
- [29] Orian-Rousseau V. CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. Eur J Cancer, 2010, 46: 1271-7
- [30] Liu C. Identification of miR-34a as a potent inhibitor of prostate cancer progenitor cells and metastasis by directly repressing CD44. Nat Med, 2011, 17: 211-5
- [31] 徐瑞敏, 陈志康, 甘惠玲, 等. 过表达STAT1与CD74CD44促进结肠癌细胞粘附和迁移的相关性. 实用癌症杂志, 2017, 328: 1094-8
- [32] Wang JL, Su WY, Lin YW, et al. CD44v6 overexpression related to metastasis and poor prognosis of colorectal cancer: a meta-analysis Oncotarget, 2017, 8: 12866-76
- [33] Zhu C, Zhang H, Li W, et al. Suppress orthotopic colon cancer and its metastasis through exact targeting and highly selective drug release by a smart nanomicelle. Biomaterials, 2018, 161: 144-53
- [34] Zhang Y, Qian C, Jing L, et al. Meta-analysis indicating that high ALCAM expression predicts poor prognosis in colorectal cancer. Oncotarget, 2017, 8: 48272-81
- [35] 张钧书, 王科, 黄建. 肿瘤干细胞标志CD166在结肠癌中的表达及其临床生物学意义. 浙江医学, 2013, 35: 1123-6
- [36] 陈翔, 梅广林, 王鼎, 等. Cortactin及CD166在结肠癌组织中的表达及临床意义. 实用医学杂志, 2011, 275: 2973-5
- [37] 祝骁涛, 黄建, 李曙光, 等. 肿瘤标志物CD133和CD166在结直肠癌中的表达及临床意义. 中国卫生检验杂志, 2015, 25: 1692-5
- [38] Han S, Zong S, Shi Q, et al. Is Ep-CAM expression a diagnostic and prognostic biomarker for colorectal cancer? A systematic meta-analysis. EBioMedicine, 2017, 20: 61-9
- [39] Zhou FQ, Qi YM, Xu H, et al. Expression of EpCAM and Wnt/ β -catenin in human colon cancer. Genet Mol Res, 2015, 14: 4485-94
- [40] Kim JH, Bae JM, Song YS, et al. Clinicopathologic, molecular, and prognostic implications of the loss of EPCAM expression in colorectal carcinoma. Oncotarget,

- 2016, 7: 13372-87
- [41] Hsu YT, Osmulski P, Wang Y, et al. EpCAM-regulated transcription exerts influences on nanomechanical properties of endometrial cancer cells that promote epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Res*, 2016, 76: 6171-82
- [42] Liang KH, Tso HC, Hung SH, et al. Extracellular domain of EpCAM enhances tumor progression through EGFR signaling in colon cancer cells. *Cancer Lett*, 2018, 433: 165-75
- [43] Liao MY, Lai JK, Kuo MY, et al. An anti-EpCAM antibody EpAb2-6 for the treatment of colon cancer. *Oncotarget*, 2015, 6: 24947-68
- [44] Liao MY, Kuo MY, Lu TY, et al. Generation of an anti-EpCAM antibody and epigenetic regulation of EpCAM in colorectal cancer. *Int J Oncol*, 2015, 46: 1788-800
- [45] Hwang WL, Yang MH, Tsai ML, et al. SNAIL regulates interleukin-8 expression, stem cell-like activity, and tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Gastroenterology*, 2011, 141: 279-91, 291.e1-5
- [46] Wang F, Scoville D, He XC, et al. Isolation and characterization of intestinal stem cells based on surface marker combinations and colony-formation assay. *Gastroenterology*, 2013, 145: 383-95.e1-21
- [47] Seo KJ, Kim M, Kim J. Prognostic implications of adhesion molecule expression in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8: 4148-57
- [48] Paschall AV, Yang D, Lu C, et al. CD133⁺CD24^{lo} defines a 5-fluorouracil-resistant colon cancer stem cell-like phenotype. *Oncotarget*, 2016, 7: 78698-712
- [49] Wang X, Zhang Y, Zhao Y, et al. CD24 promoted cancer cell angiogenesis via Hsp90-mediated STAT3/VEGF signaling pathway in colorectal cancer. *Oncotarget*, 2016, 7: 55663-76
- [50] Buzzelli JN, Ouaret D, Brown G, et al. Colorectal cancer liver metastases organoids retain characteristics of original tumor and acquire chemotherapy resistance. *Stem Cell Res*, 2018, 27: 109-20
- [51] Pang R, Law WL, Chu AC, et al. A subpopulation of CD26⁺ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell*, 2010, 6: 603-15
- [52] Lam CS, Cheung AH, Wong SK, et al. Prognostic significance of CD26 in patients with colorectal cancer. *PLoS One*, 2014, 9: e98582
- [53] Cutler MJ, Lowthers EL, Richard CL, et al. Chemotherapeutic agents attenuate CXCL12-mediated migration of colon cancer cells by selecting for CXCR4-negative cells and increasing peptidase CD26. *BMC Cancer*, 2015, 15: 882
- [54] Wahab SMR, Islam F, Gopalan V, et al. The identifications and clinical implications of cancer stem cells in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 2017, 16: 93-102
- [55] Lieto E, Galizia G, Orditura M, et al. CD26-positive/CD326-negative circulating cancer cells as prognostic markers for colorectal cancer recurrence. *Oncol Lett*, 2015, 9: 542-50
- [56] Song J, Zhang J, Wang J, et al. β 1 integrin modulates tumor growth and apoptosis of human colorectal cancer. *Oncol Rep*, 2014, 32: 302-8
- [57] Zhou F, Huang X, Zhang Z, et al. Functional polymorphisms of ITGB1 are associated with clinical outcome of Chinese patients with resected colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015, 75: 1207-15
- [58] Qiu X, Feng JR, Qiu J, et al. ITGBL1 promotes migration, invasion and predicts a poor prognosis in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104: 172-80
- [59] Chen X, Wei B, Han X, et al. LGR5 is required for the maintenance of spheroid-derived colon cancer stem cells. *Int J Mol Med*, 2014, 34: 35-42
- [60] Chen Q, Zhang X, Li WM, et al. Prognostic value of LGR5 in colorectal cancer: a meta-analysis. *PLoS One*, 2014, 9: e107013
- [61] Stanisavljevic L, Myklebust MP, Leh S, et al. LGR5 and CD133 as prognostic and predictive markers for fluoropyrimidine-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Acta Oncol*, 2016, 55: 1425-33
- [62] Martin ML, Zeng Z, Adileh M, et al. Logarithmic expansion of LGR5⁺ cells in human colorectal cancer. *Cell Signal*, 2018, 42: 97-105
- [63] Zhou X, Geng L, Wang D, et al. R-spondin1/LGR5 activates TGF β signaling and suppresses colon cancer metastasis. *Cancer Res*, 2017, 77: 6589-602
- [64] Szkandera J, Herzog S, Pichler M, et al. LGR5 rs17109924 is a predictive genetic biomarker for time to recurrence in patients with colon cancer treated with 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. *Pharmacogenomics J*, 2015, 15: 391-6
- [65] Chen J, Xia Q, Jiang B, et al. Prognostic value of cancer stem cell marker ALDH1 expression in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2015, 10: e0145164
- [66] Yang W, Wang Y, Wang W, et al. Expression of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) as a prognostic biomarker in colorectal cancer using immunohistochemistry. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 2864-72
- [67] Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, et al. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One*, 2008, 3: e2428
- [68] Goossens-Beumer IJ, Zeestraten EC, Benard A, et al. Clinical prognostic value of combined analysis of Aldh1, Survivin, and EpCAM expression in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 2014, 110: 2935-44
- [69] Padin-Iruegas M E, Herranz-Carnero M, Aguin-Losada S, et al. Prognostic value of changes in the expression of stem cell markers in the peripheral blood of patients with colon cancer. *Oncol Rep*, 2013, 29: 2467-72
- [70] Wen K, Fu Z, Wu X, et al. Oct-4 is required for an antiapoptotic behavior of chemoresistant colorectal cancer cells enriched for cancer stem cells: effects associated with STAT3/Survivin. *Cancer Lett*, 2013, 333: 56-65
- [71] Wen KM, Zhang GH, Li J, et al. OCT4B1 promotes cell growth, migration and invasion suppressing sensitivity to omicronxaliplatin in colon cancer. *Oncol Rep*, 2015, 34: 2943-52
- [72] 王军凯, 李丽. 大肠癌组织中干细胞相关因子Oct4、

- Sox2的表达及其临床意义. 中国实用医刊, 2018, 45: 12-5
- [73] Lundberg IV, Edin S, Eklof V, et al. SOX2 expression is associated with a cancer stem cell state and down-regulation of CDX2 in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 2016, 16: 471
- [74] Mele V, Muraro MG, Calabrese D, et al. Mesenchymal stromal cells induce epithelial-to-mesenchymal transition in human colorectal cancer cells through the expression of surface-bound TGF- β . *Int J Cancer*, 2014, 134: 2583-94
- [75] Mattoo AR, Zhang J, Espinoza LA, et al. Inhibition of NANOG/NANOGP8 downregulates MCL-1 in colorectal cancer cells and enhances the therapeutic efficacy of BH3 mimetics. *Clin Cancer Res*, 2014, 20: 5446-55
- [76] Yao C, Su L, Shan J, et al. IGF/STAT3/NANOG/Slug signaling axis simultaneously controls epithelial-mesenchymal transition and stemness maintenance in colorectal cancer. *Stem Cells*, 2016, 34: 820-31
- [77] Pan Q, Meng L, Ye J, et al. Transcriptional repression of miR-200 family members by Nanog in colon cancer cells induces epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Cancer Lett*, 2017, 392: 26-38
- [78] Yang J, Ma D, Fesler A, et al. Expression analysis of microRNA as prognostic biomarkers in colorectal cancer. *Oncotarget*, 2017, 8: 52403-12
- [79] Sebio A, Kahn M, Lenz HJ. The potential of targeting Wnt/ β -catenin in colon cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 18: 611-5
- [80] Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 2012, 487: 330-7
- [81] Cao H, Xu E, Liu H, et al. Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: a system review. *Pathol Res Pract*, 2015, 211: 557-69
- [82] Dimeo TA, Anderson K, Phadke P, et al. A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer. *Cancer Res*, 2009, 69: 5364-73
- [83] 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: e83-9
- [84] Vermeulen L, De Sousa E Melo F, van der Heijden M, et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*, 2010, 12: 468-76
- [85] Liu J, Pan S, Hsieh MH, et al. Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 20224-9
- [86] Picco G, Petti C, Centonze A, et al. Loss of AXIN1 drives acquired resistance to WNT pathway blockade in colorectal cancer cells carrying RSPO3 fusions. *EMBO Mol Med*, 2017, 9: 293-303
- [87] Moon CM, Kwon JH, Kim JS, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs suppress cancer stem cells via inhibiting PTGS2 (cyclooxygenase 2) and NOTCH/HES1 and activating PPAR γ in colorectal cancer. *Int J Cancer*, 2014, 134: 519-29
- [88] Chen Y, Rao X, Huang K, et al. FH535 inhibits proliferation and motility of colon cancer cells by targeting Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J Cancer*, 2017, 8: 3142-53
- [89] Lu J, Ye X, Fan F, et al. Endothelial cells promote the colorectal cancer stem cell phenotype through a soluble form of Jagged-1. *Cancer Cell*, 2013, 23: 171-85
- [90] Ntziachristos P, Lim JS, Sage J, et al. From fly wings to targeted cancer therapies: a centennial for notch signaling. *Cancer Cell*, 2014, 25: 318-34
- [91] Chu D, Zhang Z, Zhou Y, et al. Notch1 and Notch2 have opposite prognostic effects on patients with colorectal cancer. *Ann Oncol*, 2011, 22: 2440-7
- [92] Kamstrup MR, Biskup E, Gjerdrum LM, et al. The importance of Notch signaling in peripheral T-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma*, 2014, 55: 639-44
- [93] Zhang Y, Li B, Ji ZZ, et al. Notch1 regulates the growth of human colon cancers. *Cancer*, 2010, 116: 5207-18
- [94] 赵小芳, 王红. DAPT对结肠癌细胞株HT-29增殖及乙酰脱氢酶1、Notch信号通路受体和配体表达的影响. *山东医药*, 2017, 57: 5-8
- [95] Timme CR, Gruidl M, Yeatman TJ. γ -secretase inhibition attenuates oxaliplatin-induced apoptosis through increased Mcl-1 and/or Bcl-xL in human colon cancer cells. *Apoptosis*, 2013, 18: 1163-74
- [96] Ponnurangam S, Mammen J M, Ramalingam S, et al. Honokiol in combination with radiation targets notch signaling to inhibit colon cancer stem cells. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11: 963-72
- [97] Zhang F, Sun H, Zhang S, et al. Overexpression of PER3 inhibits self-renewal capability and chemoresistance of colorectal cancer stem-like cells via inhibition of notch and β -catenin signaling. *Oncol Res*, 2017, 25: 709-19
- [98] Wani ZA, Guru SK, Rao AV, et al. A novel quinazolinone chalcone derivative induces mitochondrial dependent apoptosis and inhibits PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human colon cancer HCT-116 cells. *Food Chem Toxicol*, 2016, 87: 1-11
- [99] Wee LH, Morad NA, Aan GJ, et al. Mechanism of chemoprevention against colon cancer cells using combined gelam honey and ginger extract via mTOR and Wnt/ β -catenin pathways. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16: 6549-56
- [100] Din FV, Valanciute A, Houde VP, et al. Aspirin inhibits mTOR signaling, activates AMP-activated protein kinase, and induces autophagy in colorectal cancer cells. *Gastroenterology*, 2012, 142: 1504-15.e3
- [101] Pandurangan AK, Ismail S, Esa NM, et al. Inositol-6 phosphate inhibits the mTOR pathway and induces autophagy-mediated death in HT-29 colon cancer cells. *Arch Med Sci*, 2018, 148: 1281-8
- [102] Chen Y, Lee CH, Tseng BY, et al. AZD8055 exerts antitumor effects on colon cancer cells by inhibiting mTOR and cell-cycle progression. *Anticancer Res*, 2018, 38: 1445-54
- [103] Chen J, Shao R, Li F, et al. PI3K/Akt/mTOR pathway dual inhibitor BEZ235 suppresses the stemness of colon cancer stem cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2015, 42: 1317-26