

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 24520120153964

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

细胞外基质蛋白 Mindin 在结肠癌中的功能  
及机制研究

The mechanism and function of extracellular matrix protein  
Mindin in the colon cancer progression

肖传兴

指导教师姓名: 任建林 教授

专 业 名 称: 生理学

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩时间: 2015 年 5 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2015 年 03 月

细胞外基质蛋白 E.C.M. 在结肠癌中的功能及机制研究

肖传兴

指导教师

任建林  
教授

厦门大学

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（      ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于      年    月    日解密，解密后适用上述授权。

（      ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年    月    日

## 摘 要

在世界范围内，结直肠癌是临床上常见的恶性肿瘤之一。结肠癌的发病机制也在不断细致、深入的研究。然而结肠癌这种实体肿瘤不像单纯的肠癌细胞系。相反，它是由多种类型的细胞和细胞外基质组成的功能失调的器官。细胞外基质是肿瘤微环境的重要组成部分，包含各种各样的细胞因子和代谢产物，具有向细胞传导各种环境信号的作用。这些信号对于细胞生命过程的方方面面都必不可少，包括增殖、分化和死亡等。然而，细胞外基质蛋白在结肠癌发生发展的演变过程中的作用尚未完全明确。

分泌型的细胞外基质蛋白 Mindin 作为 Mindin-F-spondin 家族的重要成员在先天和后天免疫中发挥了及其重要的作用。然而它在结肠癌发生发展过程中的作用和机制尚未明确。

Mindin 在多个器官中都有表达，其中在肠道、peyer's 淋巴小结、脾脏、肠系膜淋巴结、肺脏以及心肌组织等有丰富的表达。我们的研究发现 Mindin 的 mRNA 和蛋白在肠癌组织的表达明显低于正常组织，同时肿瘤患者外周血 Mindin 的含量也明显比健康人低，并且 Mindin 表达量的降低与肠癌的分期、生存率、复发率相关。另外，血清 Mindin 含量的变化还可以作为肿瘤患者化疗疗效的预测指标。我们的结果表明过表达 Mindin 后肠癌细胞 CMT93 和 CT26.WT 增殖和侵袭受到了明显抑制，而干扰了 Mindin 之后明显促进了肿瘤细胞的增殖和侵袭，其功能主要是通过 ERK、c-Fos 通路和细胞周期进行调控。进一步的研究发现过表达 Mindin 之后能明显抑制小鼠移植瘤和 AOM/DSS 诱导的小鼠结肠炎相关性大肠癌的发生发展，反之亦然。本论文的研究揭示了 Mindin 作为抑癌基因具有抑制肠癌发生发展的作用，提示 Mindin 可能是肿瘤治疗的一个全新的潜在靶点。

**关键字：**Mindin 结肠癌增殖 MAPK/ERK

## Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancers worldwide. The mechanism of CRC initiation has been analyzed in detail. However, solid tumors are not simply clones of cancer cells. Instead, they are abnormal organs that are composed of multiple cell types and extracellular matrix (ECM). The ECM, one component of the tumor microenvironment, contains various peptide factors and metabolites that are responsible for transmitting environmental signals to cells, and these signals essentially affect all aspects of a cell's life, including its proliferation, differentiation and death. However, the identity of the ECM protein that is involved in CRC development and progression is not yet completely clear.

Mindin is a member of the Mindin-F-spondin family of secreted ECM proteins which is important in both innate and adaptive immunity. However, the role of Mindin during colon cancer development remains undefined.

Mindin is expressed in multiple organs, including the gut, peyer's lymph nodes spleen, lungs, and heart tissues. We found that the mRNA and protein of Mindin were significantly decreased in colon cancer tissue serum compared with normal tissue. Additionally, the Mindin levels were significantly decreased in colorectal cancer patients when compared with healthy controls. This decreased level of Mindin was found to be significantly associated with the early stages of disease, rate of survival and recurrence, and its increase was identified as a predictor for chemotherapy response in the partial response group. Our data demonstrated that overexpression of Mindin suppressed cell proliferation in both of CMT93 and CT26.WT colon cancer cell lines, while the silencing of Mindin promoted *in vitro* cell proliferation via the ERK and c-Fos pathways and cell cycle control. Furthermore, the overexpression of Mindin significantly suppressed *in vivo* tumor growth in both the subcutaneous transplantation and AOM/DSS-induced CAC models. The silencing of Mindin consistently reversed these *in vivo* results. Mindin plays a novel tumor suppressive function during colon cancer development. Our results suggest that Mindin can be exploited as a potential therapeutic target for CRC.

**Keywords:** Mindin; colon cancer proliferation; MAPK/ERK

# 目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
<b>第一章 前 言.....</b>	<b>10</b>
<b>第一节 肠癌的研究进展.....</b>	<b>10</b>
1.1.1 概述.....	10
1.1.2 大肠癌的分子机制.....	10
1.1.3 干细胞与大肠癌.....	12
1.1.4 炎症相性大肠癌.....	14
1.1.5 肠道菌群与大肠癌.....	16
1.1.6 大肠癌的表观遗传学.....	17
1.1.6.1 基因组 DNA 甲基化.....	17
1.1.6.2 组蛋白转录后修饰.....	18
1.1.6.3 染色质重塑.....	18
<b>第二节 大肠癌小鼠模型.....</b>	<b>20</b>
<b>第三节 肿瘤微环境.....</b>	<b>22</b>
1.3.1 肿瘤相关巨噬细胞.....	22
1.3.2 肿瘤相关纤维细胞.....	23
1.3.3 髓源性抑制细胞.....	24
1.3.4 细胞外基质蛋白.....	24
<b>第四节 Mindin-F-spondin 家族蛋白的生物学功能.....</b>	<b>27</b>
1.4.1 F-Spondin 蛋白的结构与分布.....	27
1.4.2 F-Spondin 蛋白的功能研究.....	27
1.4.3 M-Spondin 蛋白的结构与分布.....	28
1.4.4 M-spondin 蛋白的功能研究.....	28
1.4.5 Mindin 蛋白的结构与分布.....	28
1.4.6 Mindin 蛋白的功能研究.....	29
<b>第五节 本课题研究的目的是与意义.....</b>	<b>31</b>
<b>第二章 实验材料与方法.....</b>	<b>33</b>

<b>第一节 实验材料 .....</b>	<b>33</b>
2.1.1 细胞株.....	33
2.1.2 肠癌患者组织、血液标本及伦理申明.....	33
2.1.3 实验小鼠.....	33
2.1.4 质粒载体.....	33
2.1.4.1 普通真核表达载体.....	33
2.1.4.2 慢病毒载体.....	34
2.1.4.3 RNA 干扰载体 .....	34
2.1.5 试剂与药品.....	36
2.1.6 主要试剂的制备.....	37
2.1.7 主要设备及仪器.....	40
<b>第二节 实验方法 .....</b>	<b>43</b>
2.2.1 大肠杆菌感受态制备.....	43
2.2.2 质粒转化.....	43
2.2.3 质粒提取.....	44
2.2.3.1 小规模质粒提取.....	44
2.2.3.2 大规模质粒提取.....	44
2.2.4 总 RNA 提取 (Trizol 法) .....	45
2.2.5 逆转录 RT-PCR .....	46
2.2.6 表达质粒的构建.....	46
2.2.7 干扰质粒的构建.....	48
2.2.8 实时荧光定量 PCR .....	50
2.2.9 细胞培养.....	51
2.2.10 细胞转染.....	51
2.2.10.1 磷酸钙沉淀法.....	51
2.2.10.2 Attractene 转染试剂转染.....	52
2.2.11 构建 Mindin 干扰细胞株和过表达稳定细胞株.....	52
2.2.11.1 Mindin 干扰细胞株的建立 .....	52
2.2.11.2 Mindin 过表达细胞株的构建.....	52
2.2.12 慢病毒包装与感染.....	53
2.2.12.1 慢病毒的包装.....	53
2.2.12.2 浓缩和纯化.....	54
2.2.12.3 荧光计数法测定滴度 .....	54



2.2.12.4	慢病毒感染目的细胞 .....	54
2.2.13	蛋白提取与 Western blot .....	55
2.2.13.1	细胞蛋白的提取 .....	55
2.2.13.2	组织蛋白的提取 .....	55
2.2.13.3	考马斯亮蓝测定蛋白浓度 .....	56
2.2.13.4	Western blot 分析 .....	56
2.2.14	血清 Mindin 含量检测 .....	58
2.2.15	细胞的迁移能力检测 .....	58
2.2.16	细胞的侵袭能力检测 .....	59
2.2.17	CCK-8 细胞增殖能力检测 .....	59
2.2.18	BrdU 细胞增殖能力检测 .....	59
2.2.19	流式细胞术 .....	60
2.2.20	小鼠 C57BL/6 和 BALB/c 皮下成瘤 .....	61
2.2.21	建立原发性结肠癌小鼠模型 .....	61
2.2.22	统计学分析 .....	62
<b>第三章</b>	<b>结果与讨论 .....</b>	<b>63</b>
<b>第一节</b>	<b>结肠癌患者血清和组织 Mindin 表达量降低并且与患者疗效、生存率 和复发率相关 .....</b>	<b>63</b>
3.1.1	结肠癌组织中 Mindin 的 mRNA 表达下调 .....	63
3.1.2	结肠癌组织中 Mindin 的蛋白表达下调 .....	64
3.1.3	结肠癌患者外周血中 Mindin 的表达水平下调 .....	66
3.1.4	结肠癌患者 Mindin 表达水平与疗效、生存率及复发率相关 .....	68
3.1.5	讨论 .....	71
<b>第二节</b>	<b>Mindin 在体内外抑制肠癌细胞增殖和侵袭，抑制小鼠结肠炎相关性 大肠癌的发生 .....</b>	<b>73</b>
3.2.1	Mindin 抑制结肠癌细胞的侵袭 .....	73
3.2.2	Mindin 在体外抑制结肠癌细胞的增殖 .....	75
3.2.3	Mindin 在体内抑制结肠癌细胞的增殖 .....	77
3.2.4	Mindin 抑制小鼠结肠炎相关性大肠癌的发生 .....	80
3.2.5	讨论 .....	83
<b>第三节</b>	<b>Mindin 通过调节 ERK 信号通路、c-Fos 蛋白和细胞周期蛋白抑制结 肠癌的发生发展 .....</b>	<b>85</b>
3.3.1	Mindin 通过抑制 ERK 的磷酸化调节结肠癌细胞的增殖 .....	85

3.3.2	Mindin 通过抑制 c-Fos 蛋白的表达调节结肠癌细胞的增殖.....	89
3.3.3	Mindin 通过抑制细胞周期蛋白的表达调节结肠癌细胞的增殖.....	89
3.3.4	讨论.....	90
<b>附录 1</b>	<b>图表索引.....</b>	<b>94</b>
<b>附录 2</b>	<b>缩略语及中英文对照.....</b>	<b>95</b>
<b>参 考 文 献</b> .....		<b>98</b>
<b>在学期间发表的论文</b> .....		<b>115</b>
<b>致 谢</b> .....		<b>117</b>

厦门大学博硕士学位论文摘要

# Table of Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>II</b>
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	<b>10</b>
<b>Section 1 Researching progress of colorectal cancer</b> .....	<b>10</b>
1.1.1 Overview .....	10
1.1.2 Molecular mechanisms of colorectal cancer .....	10
1.1.3 Stem cells and colorectal cancer .....	12
1.1.4 Colitis-associated colorectal cancer .....	14
1.1.5 Intestinal bacteria and colorectal cancer .....	16
1.1.6 Epigenetics of colorectal cancer .....	17
1.1.6.1 Genomic DNA methylation.....	17
1.1.6.2 Post-translational modifications of histone.....	18
1.1.6.3 Chromatin remodeling.....	18
<b>Section 2 Mouse model of colorectal cancer</b> .....	<b>20</b>
<b>Section 3 Tumor microenvironment</b> .....	<b>22</b>
1.3.1 Tumor-associated macrophages .....	22
1.3.2 Cancer-associated fibroblasts.....	23
1.3.3 Myeloid-derived suppressor cells .....	24
1.3.4 Extracellular matrix.....	24
<b>Section 4 Biological function of Mindin-F-spondin family</b> .....	<b>27</b>
1.4.1 F-Spondin structure and distribution .....	27
1.4.2 F-Spondin function .....	27
1.4.3 M-Spondin structure and distribution .....	28
1.4.4 M-spondin function.....	28
1.4.5 Mindin structure and distribution.....	28
1.4.6 Mindin function .....	29
<b>Section 5 Purpose and Significance of this thesis</b> .....	<b>31</b>
<b>Chapter 2 Materials and Methods</b> .....	<b>33</b>
<b>Section 1 Materials</b> .....	<b>33</b>
2.1.1 Cell lines .....	33
2.1.2 Patients tissue, blood samples and ethics affirms .....	33
2.1.3 Mice .....	33

2.1.4	Plasmids .....	33
2.1.4.1	General eukaryotic expression vector.....	33
2.1.4.2	Lentiviral vectors .....	34
2.1.4.3	RNA vectors.....	34
2.1.5	Chemicals and reagents.....	36
2.1.6	Reagent preparation .....	37
2.1.7	Equipments .....	40
<b>Section 2</b>	<b>Methods .....</b>	<b>43</b>
2.2.1	Competent cells.....	43
2.2.2	Transformation.....	43
2.2.3	Extraction of Plasmids .....	44
2.2.3.1	Extraction of small-scale plasmids.....	44
2.2.3.2	Extraction of large-scale plasmids.....	44
2.2.4	Extraction of RNA (Trizol) .....	45
2.2.5	RT-PCR .....	46
2.2.6	Construction of expression plasmid.....	46
2.2.7	Construction of shRNA.....	48
2.2.8	Real-time quantitative PCR .....	50
2.2.9	Cell culture.....	51
2.2.10	Transfection.....	51
2.2.10.1	Method of calcium phosphate precipitation .....	51
2.2.10.2	Attractenetransfection reagent .....	52
2.2.11	Construction of Mindin stable cell line.....	52
2.2.11.1	Construction of Mindin knock down cell line.....	52
2.2.11.2	Construction of Mindin overexpression cell line .....	52
2.2.12	Lentiviral packaging and infection .....	53
2.2.12.1	Lentiviral packaging.....	53
2.2.12.2	Concentrated and purified .....	54
2.2.12.3	Titer fluorescence counting .....	54
2.2.12.4	Lentiviral infection .....	54
2.2.13	Protein extraction and Western blot .....	55
2.2.13.1	Extraction protein from cell line.....	55
2.2.13.2	Extraction protein from tissue .....	55
2.2.13.3	Coomassie Brilliant Blue.....	56
2.2.13.4	Western blot analysis .....	56
2.2.14	Concentration of the serum Mindin .....	58

2.2.15	Cell migration analysis .....	58
2.2.16	Cell invasion analysis .....	59
2.2.17	CCK-8 cell proliferation analysis .....	59
2.2.18	Brdu proliferation analysis.....	59
2.2.19	Flow cytometry .....	60
2.2.20	Mice subcutaneous tumor .....	61
2.2.21	Mouse model of primary colon cancer .....	61
2.2.22	Statistical analysis .....	62
<b>Chapter 3 Result and discussion .....</b>		<b>63</b>
<b>Section 1 Mindin levels in serum and tissues of colon cancer patients and associated with chemotherapy,survival and recurrence rates.....</b>		<b>63</b>
3.1.1	Mindin mRNA was decrease in colon cancer tissue.....	63
3.1.2	Mindin protein was decrease in colon cancer tissue.....	64
3.1.3	Mindin was decrease in peripheral blood .....	66
3.1.4	Mindin level associated with chemotherapy,survival and recurrence.....	68
3.1.5	Discussion .....	71
<b>Section 2 Mindin inhibit cell proliferation and invasion in vitro and in vivo</b>		<b>73</b>
3.2.1	Mindin inhibit colon cancer cell invasion.....	73
3.2.2	Mindin inhibit colon cancer cell proliferation in vitro.....	75
3.2.3	Mindin inhibit colon cancer cell proliferation in vivo .....	77
3.2.4	Mindin inhibit colitis-associated colorectal cancer.....	80
3.2.5	Discussion .....	83
<b>Section 3 Mindin inhibit the development of colon cancer via ERK signaling pathway, c-Fos protein and cell cycle proteins.....</b>		<b>85</b>
3.3.1	Mindin inhibit proliferation of colon cancer cells through inhibiting the phosphorylation of ERK .....	85
3.3.2	Mindin inhibit proliferation of colon cancer cells through inhibiting the expression of c-Fos protein .....	89
3.3.3	Mindin inhibit proliferation of colon cancer cells through inhibiting the expression of cell cycle protein.....	89
3.3.4	Discussion .....	90
<b>Appendix 1 Index of figures and tables .....</b>		<b>94</b>
<b>Appendix 2 Abbreviation.....</b>		<b>95</b>
<b>Reference.....</b>		<b>98</b>
<b>Publication.....</b>		<b>115</b>
<b>Acknowledgement.....</b>		<b>117</b>

## 第一章 前言

### 第一节 肠癌的研究进展

#### 1.1.1 概述

在世界范围内，大肠癌(colorectal cancer, CRC)发病率在恶性肿瘤中排第三位，在癌症引起死亡病例中排第四位，每年有 100 多万的大肠癌新发病例<sup>[1, 2]</sup>。根据其病因学分类，有约 20%的大肠癌患者有家族遗传史<sup>[3]</sup>，包括家族性腺瘤性息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP)及遗传性非息肉病性大肠癌<sup>[4]</sup>(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)等。其余则为散发性大肠癌，其病因与环境危险因素相关，包括环境污染及食物来源的致突变源、特异性肠道病原体及慢性肠炎等<sup>[5]</sup>。

肠癌是临床上常见的恶性肿瘤之一，2014 年世界卫生组织癌症趋势分析表明，中国新增病例和死亡人数的绝对数值居世界首位，其中大肠癌位列第 3 位，并且呈逐年上升趋势<sup>[6]</sup>。Siegel 等<sup>[7]</sup>统计结果显示，在美国大肠癌仍是常见以及致死率列于第三的恶性肿瘤。大量实验数据表明，大肠癌的发生与周围环境，生活习惯，饮食偏好有明显关系，其中，饮食偏好对于大肠癌的影响，在很大程度上是由于细菌的异常代谢造成<sup>[8]</sup>。

#### 1.1.2 大肠癌的分子机制

大肠癌的发生是一个多基因多步骤的复杂过程，从正常上皮到异常增生、腺瘤、癌变及癌的转移，先后发生了一系列基因突变、错配和癌基因的活化及抑癌基因的失活，形成了经典的“腺瘤-癌变”学说<sup>[9]</sup>。但事实上，只有部分 CRC 是通过此途径发生发展，其余则有着不同的发病机制。目前研究认为，除遗传性大肠癌外，从息肉发展到散发性大肠癌过程中有几种重要的分子机制，分别是染色体不稳定(chromosomal instability, CIN)、微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)及 CpG 岛甲基化(CIMP)。这几条途径的界定并非互相排斥，肿瘤可呈现多种途径的特征。例如，CIMP 可导致大部分 MSI<sup>+</sup>/CIN<sup>-</sup>的发生大肠癌<sup>[10]</sup>，接近 33% CIMP<sup>+</sup>的肿瘤可呈现高度的染色体畸形。相反，多达 12%的 CIN<sup>+</sup>肿瘤呈现高

水平的 MSI。这些重叠特征的意义和作用尚未被完全阐明。大部分大肠癌是通过 CIN 途径发生的,此途径以染色体数目失调及杂合性缺失为特征,可由染色体分离、端粒稳定性和 DNA 损伤反应的缺陷所导致<sup>[11, 12]</sup>,然而导致 CIN 的全部基因尚未完全发现。在 CIN 肿瘤中典型核型畸形与特殊肿瘤抑制基因和致癌基因特征突变的累积同时存在,这是大肠癌发生、发展的关键途径。1990 年 Fearon 和 Vogelstein 提出的 APC、MCC、K-ras 基因突变、MMR 基因失活、抑癌基因 DCC 缺失、抑癌基因 p53 的突变与缺失等系列改变是大肠癌发生的经典分子遗传学模式,其在大肠癌分子机制研究中具有里程碑式的意义,为大肠癌的诊断和治疗提供了理论依据<sup>[13]</sup>。这个模型预计需要至少 7 种不同的突变,最近的基因组测序结果已经计算出每个大肠肿瘤患者有多达 80 个突变基因,然而只有少部分突变(<15 个)被认为是肿瘤发生真正“驱动者”<sup>[14, 15]</sup>。尽管最初的模型仍在不断的完善,一些关键的步骤已经明确:肿瘤发生需要多种基因突变、在癌症发生中一些不连续的中间体以及引起某些基因改变事件的刺激因素。例如,APC 突变是人体及小鼠模型中腺瘤发生的初始事件。与此相反,K-ras 的单一突变并不能在生物体内引发癌症,而当突变的 K-ras 与 APC 的同时突变时才能促进肿瘤的发生<sup>[16, 17]</sup>。

MSI 则是由于 DNA 错配修复缺失引起的高突变表型,错配修复基因 MMR(mismatch repair gene)系统功能失活引起 MSI,导致一系列基因改变是其主要发病机制<sup>[18, 19]</sup>。目前已确定这个系统包括 MLH1、PMS2、PMS1、MSH6 等基因<sup>[20-22]</sup>。受 MSI 影响的其他基因也被确定,包括编码细胞增殖调节因子<sup>[23, 24]</sup>(GRB1、TCF-4、WISP3、activin receptor-2、insulin-like growth factor-2 receptor、axin-2、CDX)、细胞周期或细胞凋亡<sup>[25, 26]</sup>(BAX、caspase-5、RIZ、BCL-10、PTEN、hG4-1、FAS)和 DNA 修复(MBD-4、BLM、CHK1、MLH3、RAD50、MSH2、MSH3、MSH6)等<sup>[27, 28]</sup>。值得注意的是,除了 MLH1 基因,每个个体的错配修复基因都包含 A7 单核苷酸重复。因此,随着系统成员缺失的积累,MMR 系统功能缺陷就越来越严重。但是,在所有肿瘤中这些基因的双等位基因失活尚无报道,因此,目前这些位点的突变有多少是有意义的突变尚不清楚,或者说有些只单纯是 MSI 的标记。以往关于 MSI 的研究主要都集中在遗传性大肠癌,如 HNPCC 及 Lynch 综合征上,但实际上只有 3%与 Lynch 综合征有关,而有 12%~17%的大肠肿瘤都存在 MSI,大多数 MSI 都存在于散发性大肠癌中<sup>[29]</sup>,但其具体机制

并不十分清楚。MSI<sup>+</sup>大肠癌有一些特点,例如好发部位靠近近端结肠、易发生淋巴细胞浸润和低分化等<sup>[30, 31]</sup>。MSI<sup>+</sup>散发性大肠癌患者比 MSI<sup>-</sup>患者的预后要好,对化疗反应也不同。同散发性大肠癌相比, Lynch 综合征患者年龄较轻,因此 MSI<sup>+</sup>散发性大肠癌患者的年龄较大。MLH1 基因表达缺失随着年龄增加而增加,在 90 岁以上的大肠癌患者中,约有 50%MLH1 基因表达缺失<sup>[32, 33]</sup>。大肠肿瘤 MSI 的发现,提高了人们对大肠癌发病机制多样性的认识,可应用于一部分肿瘤如 Lynch 综合征的诊断,也可用于大肠癌人群筛查和预后判断<sup>[34]</sup>。在肿瘤治疗方面,研究认为 MSI 可以作为大肠癌化疗疗效的预测因子<sup>[30]</sup>,从而为肿瘤个体化治疗提供依据和新的思路。

第三个重要的途径是 CpG 岛甲基化表型(CIMP)。约一半人类基因组的基因启动子,嵌入在称为 CpG 岛的胞嘧啶-鸟嘌呤残基簇中,这个区的胞嘧啶通过 DNA 甲基转移酶甲基化。在大肠癌中发现有 DNA 甲基化异常的基因主要是 DNA 错配修复基因 hMLH1、hMSH2、p16、p14、MYF、MDR1 和 E-cadherin 等<sup>[35, 36]</sup>。研究发现, MSI 相关散发性大肠癌的形成过程也涉及 CIMP<sup>[37]</sup>。hMLH1、p16、MYF 和 E-cadherin 基因高甲基化与 MSI<sup>+</sup>大肠癌的表型相关,这些基因甲基化可导致相应基因表达减少或完全丢失,使其不能正常地发挥其生理功能,引发了 MSI<sup>+</sup>大肠癌的发生和发展。在年龄较大的 MSI<sup>+</sup>散发性大肠癌患者中一半具有 BRAF(V600E)突变,且与其 CIMP 背景有关,这部分患者死亡率较低<sup>[38]</sup>,这也是与 Lynch 综合征的重要区别之一,为其成为治疗靶点提供了有利的依据<sup>[39]</sup>。

### 1.1.3 干细胞与大肠癌

根据肿瘤细胞表面特异性生物标志的表达差异,可将结肠癌细胞分为不同的亚群。目前结肠癌细胞表面特异性生物标志包括 CD133、CD44、CD166、上皮细胞黏附分子(EpCAM, 也可称为 ESA)和富含亮氨酸重复单位的 G 蛋白偶联受体 5 (Lgr5)<sup>[40-42]</sup>。

传统观念认为肿瘤的发生是由于原癌基因的激活以及抑癌基因的失活,肿瘤干细胞假说的提出,为结直肠肿瘤发生途径提供了新的思路和方向。从事干细胞研究的学者认为,肿瘤组织中只有小部分细胞具备导致肿瘤发生发展以及复发的潜能,这些细胞被认为是肿瘤发生的根源<sup>[43]</sup>。肿瘤干细胞的概念源于人类血液病



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.