

DCAMKL-1 在小鼠结肠急性及慢性黏膜损伤中的表达

温泉, Mahesh MAHASETH, 周李平, 陈欢, 张燕[△]

四川大学华西医院 消化内科(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨微管相关蛋白-1(DCAMKL-1)在结肠上皮的表达,同时分析 DCAMKL-1 阳性细胞在急性结肠黏膜损伤[葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎]及慢性结肠黏膜损伤(结肠炎相关结直肠癌)中的表达变化。**方法** 取 60 只健康雌性 C57 BL/6J 小鼠,其中 40 只用于 DSS 结肠炎模型实验,20 只用于结肠炎相关结直肠癌模型实验。DSS 结肠炎模型实验中小鼠分为 4 组,每组 10 只,其中 3 组饮用 2.5% DSS 溶液 7 d,再分别自由饮用自来水不同天数后处死,对照组小鼠仅自由饮用自来水,7 d 后处死;结肠炎相关结直肠癌模型实验中小鼠分为 2 组,每组 10 只,其中实验组小鼠腹腔内注射氧化偶氮甲烷(AOM)后给予 3 个周期 DSS 溶液和自来水饮用,对照组小鼠腹腔注射等量生理盐水,始终自由饮用自来水,两组小鼠均 61 d 后处死。采用免疫组化观察 DCAMKL-1、Musashi-1、增殖细胞核抗原(PCNA)和 β -Catenin 的表达,Western blot 分别检测 2 种模型实验中小鼠结肠上皮 DCAMKL-1 的表达。**结果** 正常小鼠结肠上皮存在 DCAMKL-1 的表达,多数位于结肠隐窝的基底部。所有 DCAMKL-1 阳性细胞均表达 Musashi-1。在 DSS 结肠炎模型中,DCAMKL-1 阳性细胞在 DSS 作用 7 d 后明显减少,停用 DSS 3 d 后逐渐恢复正常;DCAMKL-1 在结肠炎相关结直肠癌小鼠结肠上皮中表达明显增加,除隐窝底部以外,部分 DCAMKL-1 阳性细胞位于隐窝的中部,且部分 DCAMKL-1 阳性细胞胞浆内出现 β -Catenin 表达。**结论** DCAMKL-1 可能是结肠干细胞的标志物之一。使用 DCAMKL-1 作为结肠干细胞的标记物,我们能够描述结肠干细胞在急性慢性结肠黏膜损伤中的表达变化情况。

【关键词】 微管相关蛋白 干细胞 DSS 结肠炎 结肠炎相关结直肠癌

Investigation of Doublecortin and Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase-like-1-expressing Cells in the Mouse Colon with Acute and Chronic Mucosal Injury WEN Quan, Mahesh MAHASETH, ZHOU Li-ping, CHEN Huan, ZHANG Yan[△]. Department of Gastroenterology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: fengyixx@sohu.com

【Abstract】 **Objective** To identify the expression of Doublecortin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase-like-1-expressing cells (DCAMKL-1-expressing cells) in the colon epithelium and to analyze their deviation in dextran sulfate sodium (DSS) induced colitis and colitis associated cancer. **Methods** A total of 60 healthy female C57 BL/6J mice were used, 40 for the DSS induced colitis model group and 20 for colitis associated cancer model group. In the former group, mice were sacrificed at day 7 after DSS administration (B group), 3 days (C group) and 7 days (D group) after DSS withdraw, separately. The control (A group) mice were sacrificed at day 7. In the latter group, mice were gave three repetitive oral administrations of DSS and regular water after injected intraperitoneally with azoxymethane (AOM). The control group mice were injected intraperitoneally with physiological saline, and then regular water was given. All the mice were sacrificed 61 days later. DCAMKL-1 expressions were detected by both immunohistochemistry and Western blot. **Results** There were some DCAMKL-1-expressing cells in the normal mouse colon epithelium. Most of them were located in the base of the crypt. All DCAMKL-1-expressing cells expressed Musashi-1. In the DSS-induced colitis, the number of DCAMKL-1-expressing cells decreased 7 days after DSS administration and recovered 3 days later. The expression of DCAMKL-1 increased apparently in the mice with colitis-induced cancer. Except the base of the crypt, some of them were located in the middle portion of the crypt and some exhibited cytoplasm β -Catenin staining. **Conclusion** DCAMKL-1 is a putative intestinal stem cell marker. Using DCAMKL-1 as a marker for colon stem cells, we could describe the expression pattern of colon stem cells during acute and chronic mucosal injury.

【Key words】 Doublecortin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase-like-1 Stem cell DSS colitis Colitis-associated colorectal cancer

结肠上皮具有较强的再生修复能力,能够修复各种病变所致的黏膜损伤^[1]。结肠干细胞在这一过

程中起着重要作用^[2]。尽管研究者们进行了大量的探讨研究,目前仍未发现结肠干细胞的确切标记物,因此,其在组织损伤中的变化情况尚不得而知。

研究表明长期慢性炎症可诱发组织发生癌变,

[△] 通讯作者, E-mail: fengyixx@sohu.com

后者目前被认为是“不可治愈的病变”^[3]。溃疡性结肠炎(UC)患者发生结直肠癌的风险远远高于普通人群,其机制尚不明确。许多研究者认为在长期慢性炎症的刺激下,某些组织干细胞可能逐渐发生一系列的基因突变,进而发展为肿瘤干细胞,但到目前为止,肿瘤干细胞的确切来源及表面标记物尚未明确。

微管相关蛋白-1(DCAMKL-1)是一种表达在神经元有丝分裂后期的微管相关蛋白,有研究表明它可能是胃和小肠干细胞的标记物之一^[4,5]。为此,本研究探讨 DCAMKL-1 在结肠上皮的表达,同时分析 DCAMKL-1 阳性细胞在急性结肠黏膜损伤及慢性结肠黏膜损伤中的表达变化情况。Musashi-1 目前被认为可能是胃肠干细胞的标记物之一,因此我们同时探讨了 DCAMKL-1 及 Musashi-1 之间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

健康雌性 C57 BL/6J 小鼠(B6,四川大学实验动物中心)60只,鼠龄6~8周,体质量18~22g。实验经四川大学华西医院动物研究伦理委员会批准。

主要试剂:氧化偶氮甲烷(AOM)购于美国 Sigma-Aldrich 公司,葡聚糖硫酸钠(DSS)购于新加坡 MP 生物学公司,BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于美国 Pierce 公司,ECL 化学发光试剂盒和辣根过氧化物酶(HRP)标记的驴抗兔免疫球蛋白购于 Amersham 公司,兔单克隆抗 DCAMKL-1 抗体及兔抗 Musashi-1 购于美国 Abcam 公司,鼠抗人的增殖细胞核抗原(PCNA)购于 Chemicon 公司,鼠抗 β -Catenin 抗体购于 BD Transduction 实验室,Cy3 标记的羊抗兔免疫球蛋白(IgG)及 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 购于美国 Jackson 免疫研究中心,Alexa Fluor 488 购于美国 Invitrogen 公司。

1.2 DSS 结肠炎模型实验

40只小鼠分为4组,每组10只。A组:对照组,小鼠仅饮用自来水,7d后处死;B组:饮用2.5%DSS溶液7d后处死小鼠;C组:饮用2.5%DSS溶液7d后停用,此后自由饮用自来水,3d后处死;D组:饮用2.5%DSS溶液7d后停用,此后自由饮用自来水,7d后处死。DSS结肠炎模型建立成功的标志为饮用2.5%DSS溶液7d后出现半稀便、腹泻、大便隐血(+)和肉眼血便中的任一症

状。

用颈椎脱臼法处死小鼠,剖腹,取肛门至回盲部的结肠,沿肠系膜边缘纵行剖开,观察结肠大体形态。在严重炎症处至少取1块组织标本(2mm \times 10mm),然后以病灶为中心轴切开分为两部分,常规石蜡包埋切片(4 μ m),部分用于HE染色,部分用于免疫组化;另一部分用于蛋白质印迹法检测。小鼠疾病活动指数采用DAI评分,结肠炎组织学严重程度参照 Cooper 等^[6]提出的经典评分方法。

1.3 结肠炎相关结直肠癌模型实验

采用 Greten 等^[7]的方法进行模型诱导。将20只小鼠分为2组,每组10只,模型组小鼠腹腔内注射 AOM (12.5 mg/kg)5 d 后给予 2.5% DSS 溶液饮用 7 d,此后自由饮用自来水 14 d,如此经过两个 DSS 喂养周期,第 3 个周期再给予 2% DSS 溶液饮用 4 d,此后饮用自来水 10 d;对照组小鼠腹腔注射等量生理盐水,始终自由饮用自来水。在注射 AOM 或生理盐水后的第 61 d 处死小鼠。成功建立的结肠炎相关结直肠癌模型可表现为经 DSS 作用期间出现腹泻、大便隐血(+),停用 DSS 后,上述症状逐渐消失,如此反复循环,最终肉眼可见肠壁息肉样、扁平隆起新生物形成。

按前述解剖方法获取结肠标本,纵形剖开,观察结肠大体形态,将肠道卷成同心环状,一部分用于蛋白质印迹法检测;另一部分经固定,常规石蜡包埋切片(4 μ m),部分用于HE染色,部分用于免疫组化染色。

1.4 免疫荧光双染

免疫组化具体方法见文献^[5]。结肠组织在1%甲醛溶液中固定,组织切片脱蜡水化,3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,微波抗原修复,5%小牛血清30min封闭非特异性抗原,兔单克隆抗 DCAMKL-1 抗体(1:50)4 $^{\circ}$ C过夜,二抗 Cy3 标记的羊抗兔 IgG (1:500)室温孵育30min,PBS洗涤后添加第二个一抗[鼠抗人 PCNA(1:200);鼠抗 β -Catenin(1:1000);兔抗 Musashi-1 (1:200)]室温孵育1h,之后分别加入第二个二抗[FITC 标记的羊抗鼠 IgG(1:200);FITC 标记的羊抗鼠 IgG(1:200);驴抗兔 Alexa Fluor 488 (1:500)]室温孵育30min。最后使用 DAPI 复染细胞核。

1.5 DCAMKL-1、PCNA 及 Musashi-1 阳性细胞计数

选取炎症明显部位进行阳性细胞计数。每只小鼠共计数10个不同高倍视野(\times 400),每个视野均

含有完整隐窝(即从隐窝底部到顶部柱状上皮细胞连续存在),计数由两位病理学家分别独立完成,每组数据至少核实 3 次。结果以每个隐窝中的阳性细胞平均数表示。

1.6 Western blot 检测 DCAMKL-1 表达

结肠组织加入含有蛋白酶抑制剂混合物的裂解液中,组织匀浆器匀浆,11000 × g 4 °C 离心 10 min,收集上清液,采用 BCA 法测定蛋白浓度,75 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转印至 PVDF 膜上,1% 小牛血清封闭 1 h,加入一抗兔单克隆抗 DCAMKL-1 抗体(1:50) 4 °C 过夜孵育;此后添加二抗 HRP 标记的驴抗兔免疫球蛋白(1:3500)室温孵育 1 h。反应带用 ECL 化学发光试剂盒检测。

1.7 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 Mann-Whitney U 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般状态及结肠组织病理学观察

DSS 结肠炎实验显示,小鼠饮用 2.5% DSS 溶液后出现体质量下降、腹泻、便血等症状,停用 DSS 后症状逐渐消失,体质量逐渐恢复。DAI 评分分别为:0(A 组)、 9.2 ± 2.1 (B 组)、 7.8 ± 1.4 (C 组)、 3.5 ± 1.3 (D 组)。镜下可见结肠壁广泛充血水肿,散在糜烂及溃疡形成,C、D 组病变较 B 组轻,其组织学评分分别为 0(A 组)、 12.50 ± 0.52 (B 组)、 8.33 ± 0.42 (C 组)、 3.46 ± 0.89 (D 组)。DAI 评分及组织学评分中 C、D 组与 B 组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

结肠炎相关结直肠癌实验显示小鼠经 AOM/DSS 作用后出现体质量下降、腹泻、便血等症状。镜下可见不同程度的不典型增生及浸润癌表现。

2.2 DCAMKL-1 在正常结肠上皮的表达

免疫荧光染色显示正常小鼠结肠上皮存在 DCAMKL-1 表达,每个结肠隐窝中 DCAMKL-1 阳性的细胞数平均为 0.32 ± 0.45 ,其中多数细胞位于隐窝的基底部分(图 1A),DCAMKL-1 蛋白表达于细胞浆中,所有 DCAMKL-1 阳性的细胞均不表达 PCNA(图 1B)。

2.3 DCAMKL-1 及 Musashi-1 共染情况

所有 DCAMKL-1 阳性的细胞均表达 Musashi-1,但是仅部分 Musashi-1 阳性细胞表达 DCAMKL-1(图 1C, 1D, 1E)。这些数据表明

DCAMKL-1 阳性细胞可能是 Musashi-1 阳性细胞的一部分。

2.4 DCAMKL-1、PCNA、Musashi-1 在结肠炎的表达变化情况

在 DSS 作用的不同阶段,DCAMKL-1 表达不同,B 组 DCAMKL-1 阳性细胞数低于其它各组(P 均 < 0.05)。提示 DCAMKL-1 阳性细胞数在 DSS 作用 7 d 后明显减少,停用 DSS 3 d 后逐渐恢复正常(图 2,附表)。

Western blot 结果显示 DSS 作用 7 d 后 DCAMKL-1 蛋白表达明显降低,停用 DSS 3 d 后恢复正常(图 3),这一结果与免疫组化结果一致。

Musashi-1 阳性细胞数结果也显示 B 组低于其它各组(P 均 < 0.05),Musashi-1 与 DCAMKL-1 的表达变化趋势一致(附表)。

而 PCNA 阳性细胞数为 B 组高于其它各组(P 均 < 0.05)。表明 PCNA 阳性细胞在饮用 DSS 7 d 后明显增加,停用 DSS 后其表达逐渐下降至恢复正常(附表)。

附表 DCAMKL-1、Musashi-1 与 PCNA 在结肠炎的表达变化情况

Table Expression of DCAMKL-1, Musashi-1 and PCNA in DSS colitis

Group	n	Positive expression cells/crypt		
		DCAMKL-1	Musashi-1	PCNA
A	10	0.32 ± 0.45	0.42 ± 0.35	9.2 ± 3.2
B	10	$0.15 \pm 0.14^*$	$0.25 \pm 0.15^*$	$20.3 \pm 7.8^*$
C	10	0.35 ± 0.23	0.37 ± 0.26	16.6 ± 8.5
D	10	0.38 ± 0.24	0.47 ± 0.36	13.6 ± 5.6

* $P < 0.05$, vs. other groups

2.5 DCAMKL-1 在结肠炎相关结直肠癌的表达情况

Western blot 结果显示,结肠炎相关结直肠癌小鼠结肠组织中的 DCAMKL-1 蛋白含量明显增加(图 4)。免疫荧光染色显示,DCAMKL-1 在患结肠炎相关结直肠癌小鼠中的表达增加,除隐窝底部以外,部分 DCAMKL-1 阳性细胞出现在隐窝中部(图 5A, 5B, 5C)。DCAMKL-1 阳性细胞平均数(0.49 ± 0.43 /隐窝明显高于正常对照组(0.32 ± 0.45)/隐窝, $P < 0.05$)。

2.6 DCAMKL-1 和 β -Catenin 在结肠炎相关结直肠癌中的表达

在正常小鼠和 DSS 结肠炎结肠黏膜中, β -Catenin 只表达在 DCAMKL-1 阳性细胞的细胞膜上。但在结肠炎相关结直肠癌小鼠的结肠黏膜中,除细胞膜外,部分 DCAMKL-1 阳性细胞胞浆内出现 β -Catenin 的表达(图 5D, 5E, 5F)。

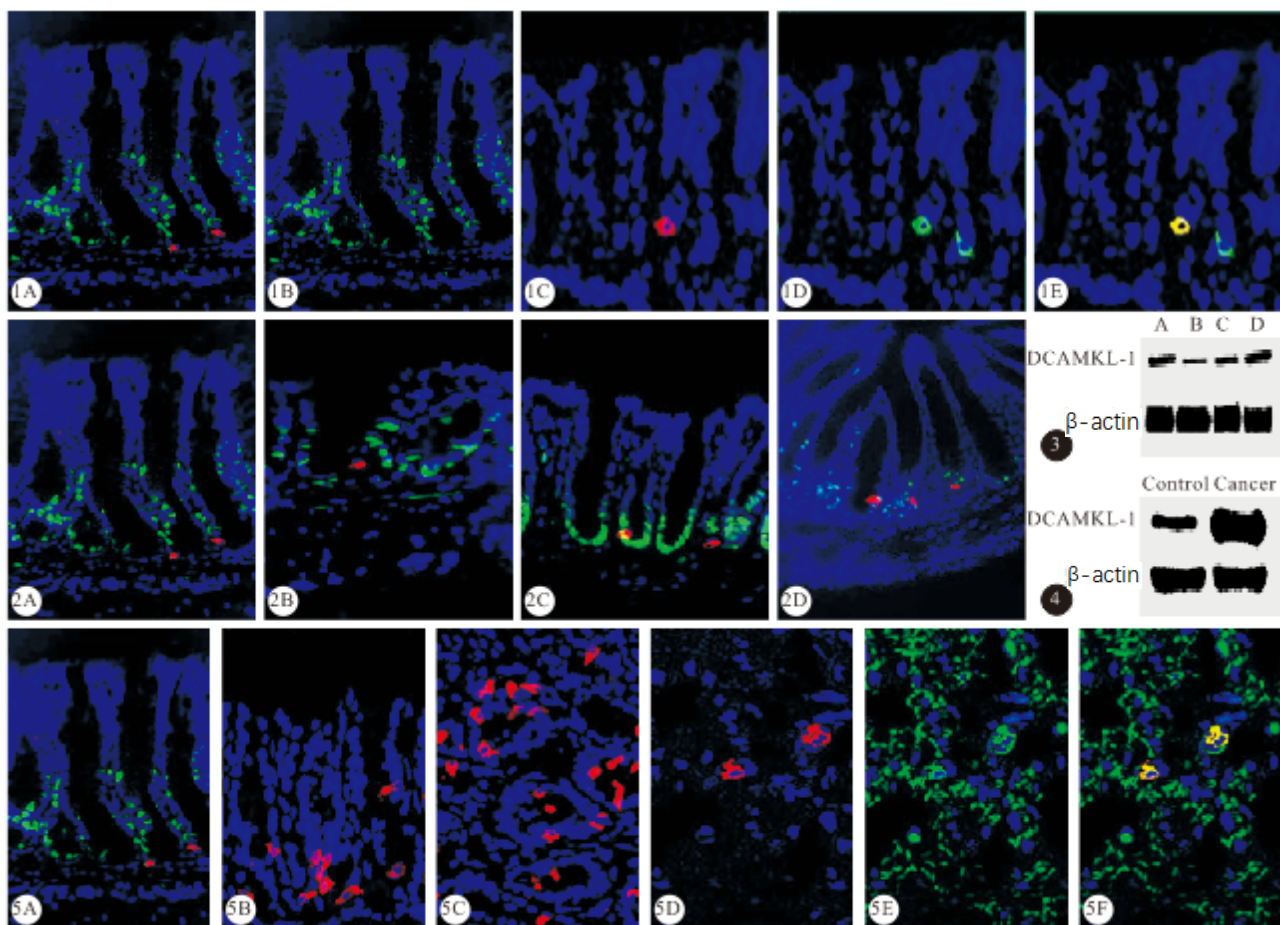


图 1 DCAMKL-1 在正常小鼠结肠上皮中的表达 (A,B ×200; C,D,E ×400) 图 2 DCAMKL-1 在结肠炎的表达变化。×200
 图 3 DCAMKL-1 蛋白在结肠炎的表达变化 图 4 DCAMKL-1 蛋白在结肠炎相关性大肠癌的表达 图 5 DCAMKL-1 在结肠炎相关性大肠癌的表达情况 (A,B ×200; C,D,E ×400)

Fig 1 Expression of DCAMKL-1 in the normal mouse colon (A,B ×200; C,D,E ×400) Fig 2 Expression of DCAMKL-1 in the DSS induced colitis. ×200
 Fig 3 Expression of DCAMKL-1 protein in the DSS induced colitis Fig 4 Expression of DCAMKL-1 protein in colitis-associated cancer
 Fig 5 Expression of DCAMKL-1 in the colitis-associated cancer (A,B ×200; C,D,E ×400)

1A, 1B; DCAMKL-1 expressed in the cytoplasm and DCAMKL-1-expressing cells mainly located at the base of the colon. None of them expressed PCNA (Red; DCAMKL-1; Green; PCNA); 1C, 1D, 1E; DCAMKL-1 expressing cells also expressed Musashi-1 (Red; DCAMKL-1; Green; Musashi-1); 2A, 2B, 2C, 2D; A, B, C, D group (Red; DCAMKL-1; Green; Musashi-1 or PCNA); Fig 3; A, B, C, D group; 5A, 5B, 5C; Expression of DCAMKL-1 increased in the mice with colitis-associated cancer. Besides the base of the crypt, some of them were located in the middle portion of the crypt (Red; DCAMKL-1); 5D, 5E, 5F; Some DCAMKL-1 expression cells exhibited cytoplasm β-Catenin staining in colitis-associated cancer (Red; DCAMKL-1; Green; β-Catenin)

3 讨论

本结果显示,在正常小鼠结肠上皮组织中,大部分 DCAMKL-1 阳性细胞位于结肠隐窝的底部,后者被认为是结肠干细胞存在的区域,所有 DCAMKL-1 阳性细胞均不表达 PCNA,这些结果与我们既往的研究结果一致^[5],提示 DCAMKL-1 可能是胃肠上皮干细胞的标记物之一。每个结肠隐窝中确切的干细胞数目前并不十分明确,有研究者认为每个结肠隐窝中有 5~10 个干细胞,也有人认

为每个隐窝中可能存在 4~6 个^[8,9],本研究显示平均每个结肠隐窝内干细胞数平均数仅为 0.32 ± 0.45,这一数据的差异可能是由于腺体存在多维性所致,因此,不可能在每个横断面中都找到干细胞。

研究表明 Musashi-1、EphB 可能是结肠上皮干细胞的标记物^[10,11]。其中 Musashi-1 是目前研究中应用最广泛的干细胞标记物^[12,13]。本结果显示 DCAMKL-1 阳性细胞同时也表达 Musashi-1,而部分 Musashi-1 阳性细胞并不表达 DCAMKL-1;两者在 DSS 作用的不同阶段表达变化趋势一致。这些

数据提示这两种细胞(DCAMKL-1 和 Musashi-1 阳性细胞)具有相同的生物学特性,DCAMKL-1 可能是结肠干细胞的标记物之一。

在 DSS 诱导的急性结肠黏膜损伤修复模型中,DCAMKL-1 的表达趋势与 PCNA 表达趋势相反。DCAMKL-1 的表达在 DSS 作用 7 d 后明显降低,停用 DSS 3 d 后逐渐恢复;PCNA 阳性细胞在 DSS 作用 7 d 后明显增加,停用 DSS 后逐渐恢复正常。表明这两种细胞在胃肠道黏膜修复中起着不同的作用。PCNA 阳性细胞在损伤早期出现数量增加可能有助于病变早期黏膜上皮的重建。干细胞在损伤早期数量减少可能是一个自我保护机制,有助于将黏膜病变中出现的基因突变减少到最小程度。

15%~20%的肿瘤与慢性炎症有关^[3,14],研究显示炎症性肠病(IBD)患者出现结直肠癌的风险较普通人群明显增加,然而到目前为止,这一确切机制尚未阐明,P53 基因和 APC 基因突变可能参与其中^[15,16]。干细胞模型学说认为癌症起源于正常组织干细胞或祖细胞中的某些特殊细胞群^[17]。我们对 DCAMKL-1 蛋白在 DSS 结肠炎相关结直肠癌中的表达进行了研究,结果显示 DCAMKL-1 不仅有表达数量增加,且表达部位也发生改变,部分 DCAMKL-1 阳性细胞出现在隐窝的中部。

β -Catenin 是 Wnt 信号传导通路的重要组成部分,在肠道恶性肿瘤的发病中起着重要作用^[18,19]。生理情况下, β -Catenin 在细胞膜上大量表达,当 β -Catenin 被激活后,转移至细胞浆和/或细胞核中,与 T 细胞因子(Tcf)相结合,进而调控基因转录,这些基因多与细胞的生长及分化相关^[20]。在 DSS 结肠炎模型中, β -Catenin 仅表达在细胞膜上,而在结肠炎相关结直肠癌中,除细胞膜外,部分 DCAMKL-1 阳性细胞胞浆内出现 β -Catenin 的表达,提示 β -Catenin 在这些 DCAMKL-1 阳性的细胞中被激活,可能参与了慢性炎症向肿瘤转变的过程。

总之,结肠干细胞在结肠黏膜损伤修复中占有重要地位,进一步寻找特异性干细胞标志物将有助于推动相关机制的研究,我们的结果显示 DCAMKL-1 可能是结肠干细胞的标记物之一,通过对 DCAMKL-1 的研究,我们能够描述在急慢性结肠黏膜损伤中结肠干细胞的表达变化情况。

参 考 文 献

- 1 Radtke F, Clevers H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science*,2005;307(5717):1904-1909.
- 2 Qiu JM, Roberts SA, Potten CS. Cell migration in the small

- and large bowel shows a strong circadian rhythm. *Epithelial Cell Biol*,1994;3(4):137-148.
- 3 Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*, 2002;420(6917):860-867.
 - 4 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.
 - 5 Zhang Y, Huang XL. Investigation of doublecortin and calcium/calmodulindependent protein kinase-like-1-expressing cells in the mouse stomach. *J Gastro Hepatol*,2010;25(3):576-582.
 - 6 Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, *et al*. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest*,1993;69(2):238-249.
 - 7 Greten F, Eckmann L, Greten T, *et al*. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*,2004;118(3):285-296.
 - 8 Cai WB, Roberts SA, Potten CS. The number of clonogenic cells in crypts in three regions of murine large intestine. *Int J Radiat Biol*,1997;71(5):573-579.
 - 9 Potten CS, Booth C, Pritchard DM. The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int J Exp Pathol*,1997;78(4):219-243.
 - 10 Nishimura S, Wakabayashi N, Toyoda K, *et al*. Expression of Musashi-1 in human normal colon crypt cells; a possible stem cell marker of human colon epithelium. *Dig Dis Sci*,2003;48(8):1523-1529.
 - 11 Battle E, Henderson JT, Beghtel H, *et al*. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell*,2002;111(2):251-263.
 - 12 Potten CS, Booth C, Tudor GL, *et al*. Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1. *Differentiation*,2003;71(1):28-41.
 - 13 Kayahara T, Sawada M, Takaishi S, *et al*. Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS Lett*,2003;535(1-3):131-135.
 - 14 Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, *et al*. Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 2008;18(1):3-10.
 - 15 Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*,2004;287(1):G7-G17.
 - 16 Krok KL, Lichtenstein GR. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol*,2004;20(1):43-48.
 - 17 Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med*,2007;58:267-284.
 - 18 Carmen AB, Meirong X, Gayle AO, *et al*. β -Catenin mutation in rat colon tumors initiated by 1,2-dimethylhydrazine and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, and the effect of post-initiation treatment with chlorophyllin and indole-3-carbinol. *Carcinogenesis*,2001;22(2):315-320.
 - 19 Yamada Y, Oyama T, Hirose Y, *et al*. β -Catenin mutation is selected during malignant transformation in colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*,2003;24(1):91-97.
 - 20 Miller JR, Moon RT. Signal transduction through β -catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes Dev*, 1996;10(20):2527-2539.

(2012-04-20 收稿,2012-07-27 修回)

编辑 汤洁