

Lgr5 蛋白和 E-钙黏蛋白在胃癌组织中表达的研究



冯宁, 林峰, 张旭, 薛帆, 崔佑刚, 马洋, 刘文志

大连大学附属中山医院普外科(辽宁大连 116001)

【摘要】 目的 检测胃癌组织中 Lgr5 及 E-钙黏蛋白(E-cad)的蛋白表达情况并分析其与胃癌患者临床病理特征及预后的关系。方法 采用免疫组织化学 SABC 方法检测 69 例胃癌组织及 30 例癌旁正常胃黏膜组织中 Lgr5 及 E-cad 的蛋白表达情况,同时分析其与胃癌患者临床病理特征和生存的关系。结果 Lgr5 和 E-cad 蛋白分别在 60 例(87.0%)和 30 例(43.5%)胃癌患者的胃癌组织中呈阳性表达, 分别有 5 例(16.7%)和 30 例(100%)在癌旁正常胃黏膜组织中呈阳性表达,二者在不同组织中的蛋白表达阳性率比较差异均有统计学意义(Lgr5 蛋白: $\chi^2=45.814$, $P<0.001$; E-cad 蛋白: $\chi^2=11.249$, $P=0.001$)。Lgr5 和 E-cad 蛋白在胃癌组织中的阳性表达均与分化程度和浸润深度有关($P<0.05$), Lgr5 蛋白在胃癌组织中的阳性表达还与淋巴结转移和幽门螺杆菌(HP)感染有关($P<0.05$)而 E-cad 蛋白阳性表达却与此无关($P>0.05$)。Lgr5 蛋白表达阳性和阴性患者的 5 年总生存情况比较差异无统计学意义($\chi^2=1.819$, $P=0.117$), 而 E-cad 蛋白表达阳性胃癌患者的 5 年总生存情况明显优于 E-cad 蛋白表达阴性胃癌患者($\chi^2=5.814$, $P=0.016$)。Lgr5 蛋白表达与 E-cad 蛋白表达呈明显的负相关($r_s=-0.355$, $P=0.003$)。结论 Lgr5 蛋白可能参与了肿瘤组织局部浸润、淋巴结转移过程,与肿瘤恶性程度有关,未发现其阳性表达与预后有关; E-cad 的表达可能参与了肿瘤的肿瘤局部侵袭和进展且与患者预后有关。

【关键词】 胃癌; Lgr5 蛋白; E-钙黏蛋白; 肿瘤干细胞; 免疫组织化学; 生存分析

Research of expressions of E-cadherin and Lgr5 proteins in gastric cancer tissues

FENG Ning, LIN Feng, ZHANG Xu, XUE Fan, CUI Yougang, MA Yang, LIU Wenzhi

Department of General Surgery, Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian, Liaoning 116001, P. R. China

Corresponding author: LIU Wenzhi, Email: doc070735@yahoo.com

【Abstract】 Objective To detect expressions of Lgr5 and E-cadherin (E-cad) proteins in gastric cancer tissues and analyze their relationships with the clinicopathologic characteristics and prognosis of patients with gastric cancer. **Methods** The expressions of Lgr5 and E-cad proteins in the 69 patients with gastric cancer and adjacent normal gastric mucosa tissues were measured by the immunohistochemical SABC method, and the relationships between the Lgr5 or E-cad protein expression in the gastric cancer tissues and the clinicopathologic characteristics and the survival of patients with gastric cancer were analyzed. **Results** The expressions of Lgr5 and E-cad proteins were positive in 60 cases (87.0%) and 30 cases (43.5%) of gastric cancer tissues, respectively, and in 5 cases (16.7%) and 30 cases (100%) of adjacent normal gastric mucosa tissues. There was a significant difference in the positive rate of Lgr5 or E-cad protein expression in the different tissues, respectively (Lgr5 protein: $\chi^2=45.814$, $P<0.001$; E-cad protein: $\chi^2=11.249$, $P=0.001$). The positive rates of Lgr5 and E-cad protein expressions in the gastric cancer were related to the degree of differentiation and the depth of invasion. Meanwhile the positive rate of Lgr5 protein expression in the gastric cancer tissue was also related to the lymph node metastasis and *Helicobacter pylori* infection, while the positive rate of E-cad protein expression was not related to these ($P>0.05$). The 5-year total survival time had no significant difference in the patients between with positive and with negative expressions of Lgr5 protein ($\chi^2=1.819$, $P=0.117$), which had a significant difference in the patients between with positive and with negative expressions of E-cad protein ($\chi^2=5.814$, $P=0.016$). The positive expression of Lgr5 was negatively

DOI: 10.7507/1007-9424.201909064

基金项目: 2016 年大连市卫计委课题资助项目(项目编号: 1611109)

通信作者: 刘文志, Email: doc070735@yahoo.com

correlated with that of E-cad ($r_s = -0.355, P = 0.003$). **Conclusions** Lgr5 protein may get involved in the mechanism of tumor invasion, lymph nodal metastasis, and low differentiation, while no relationship between the Lgr5 protein and prognosis has been confirmed. E-cad protein may get involved in the mechanism of tumor invasion and affect the prognosis of patients.

【Keywords】 gastric cancer; Lgr5 protein; E-cadherin protein; tumor stem cell; immunohistochemistry; survival analysis

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,其预后差,患者早期发现率低,出现症状时发现多为中晚期,其传统治疗方式多采用以手术为主辅以化疗,但其效果仍然较差,肿瘤恶性侵袭、淋巴结转移和远处转移是其预后不良的主要原因,因此,近年来针对胃癌细胞的侵袭及转移相关机制的探索成为研究的热点。目前随着胃癌研究的不断深入,认为与肿瘤发生、发展密切相关的一个假说是癌干细胞(也称肿瘤干细胞),其具有自我更新、抗化疗药物治疗及耐放射线治疗特性,其持续生长、复制能够导致术后肿瘤的复发、化疗后肿瘤再进展以及患者最终死亡。因此,研究的重点已不仅仅是杀死已增殖成熟的肿瘤细胞,还要通过其特定标志物早期检测及特异性靶向治疗消灭肿瘤干细胞。富含亮氨酸重复序列的G蛋白偶联受体5(leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 5, Lgr5)作为已知直肠癌肿瘤干细胞的标志物目前在胃癌中被广泛关注^[1-4];同时在建立并维持细胞间连接、细胞极性及组织构架方面起重要作用的E-钙黏蛋白(E-cadherin, E-cad)在胃癌研究中被认为是关键的肿瘤抑制基因。Lgr5和E-cad被许多研究发现其存在基因甲基化而失活现象,可能与肿瘤发生及发展有密切关系。本研究着眼于探索胃癌可能的肿瘤干细胞标志物及可能用于胃癌术后风险评估的标志物,因此,检测肿瘤干细胞标志物Lgr5及肿瘤抑制基因E-cad蛋白在胃癌组织的表达情况,并分析其与胃癌患者的临床病理特征和生存的关系,同时分析二者在胃癌发展中是否存在协同作用。

1 资料与方法

1.1 组织标本的收集

收集2011-2013年期间大连大学附属中山医院胃肠外科手术切除的胃腺癌标本(69例)及距离癌组织5 cm以远的正常胃黏膜组织(30例);同时收集这些患者的性别、年龄、分化程度、浸润深度^[5]、淋巴结转移、远处转移及幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, HP)感染情况。所有患者均为首次手术,术前未进行过放、化疗,手术切除组织均有病理报告。

69例胃腺癌患者中男49例,女20例;年龄36~90岁、(66±10)岁。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 一抗:鼠抗人单克隆抗Lgr5抗体(购自北京中杉金桥生物技术有限公司)和兔抗人单克隆抗E-cad抗体(购自武汉博士德生物工程有限公司),二抗即用型SABC-POD(小鼠/兔IgG)试剂盒和DAB显色剂(均购自武汉博士德生物技术有限公司),磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)、培养基等实验耗材等(大连大学附属中山医院中心实验室)。

1.2.2 检测方法 手术标本常规经4%甲醛溶液固定,行石蜡包埋后连续切片4 μm,再采用免疫组织化学SABC法染色以检测Lgr5及E-cad蛋白表达情况。严格按照说明书进行操作:脱蜡、脱水、灭活、抗原修复、封闭工作液、加一抗、二抗、DAB显色、封片等步骤。阳性对照用已知的阳性组织,用PBS代替一抗作为阴性对照。采用快速尿素酶法检测HP感染情况。

1.2.3 结果判断 参照抗体说明书,Lgr5蛋白表达以细胞浆和(或)细胞膜出现黄色和(或)棕黄色颗粒判断为阳性,根据细胞着色程度和阳性细胞百分比进行半定量评分,按细胞着色程度计分:无色为0分、浅黄色为1分、黄色为2分、棕黄色为3分;按阳性细胞百分比计分:阳性细胞数>75%为4分、50%~75%为3分、25%~50%为2分、5%~25%为1分、<5%为0分进行判断赋值。通过细胞着色程度与阳性细胞百分比分值进行相乘为最终表达计分,总分为0~12分,其中0分为不表达(-)、1~4分为弱阳性表达(+)、5~8分为中等阳性表达(++)、9~12分为强阳性表达(+++)。E-cad蛋白表达以细胞浆或细胞膜内存在棕黄色颗粒作为阳性标志,阳性细胞数>75%为强阳性表达(+++)、50%~75%为中等阳性表达(++)、10%~50%为弱阳性表达(+)、<10%为不表达(-)。最终阳性表达结果包括“(+)~(+++)”。

1.3 统计学方法

采用SPSS 25.0软件进行统计分析。计数资料

及四格表资料比较采用卡方(χ^2)检验。两等级变量相关性分析采用 Spearman 等级相关进行分析。术后 5 年生存分析采用 Kaplan-Meier 分析,采用 log-rank 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Lgr5 和 E-cad 蛋白在胃癌患者不同组织中的表达情况

Lgr5 蛋白在 60 例 (87.0%) 胃癌患者的胃癌组织中呈阳性表达,主要表达于细胞质和细胞膜中,呈黄色或棕黄色颗粒弥漫性表达 (图 1a),其在 5 例 (16.7%) 癌旁正常胃黏膜组织中也呈阳性表达 (图 1b); E-cad 蛋白在 30 例 (43.5%) 胃癌患者的胃癌组织中呈阳性表达,主要表达于细胞膜及细胞浆中,呈棕黄色 (图 1c),其在 30 例 (100%) 癌旁正常胃黏膜组织中均呈阳性表达 (图 1d),主要表达于细胞膜及细胞浆中,呈棕黄色。Lgr5 和 E-cad 蛋白在胃癌患者的胃癌组织和癌旁正常胃黏膜组织中的蛋白表达具体情况见表 1。Lgr5 蛋白表达阳性率在胃癌组织中明显高于癌旁正常胃黏膜组织 ($\chi^2=45.814, P<0.001$); E-cad 蛋白表达阳性率在胃癌组织中明显低于癌旁正常胃黏膜组织 ($\chi^2=11.249, P=0.001$)。

2.2 Lgr5 和 E-cad 蛋白在胃癌组织中的表达与胃癌患者临床病理特征的关系以及其与患者 5 年生存率的关系

结果见表 2。Lgr5 和 E-cad 在胃癌组织中的蛋白表达阳性率均与胃癌患者的性别和远处转移无关 ($P>0.05$),二者的蛋白表达阳性率均与分化程度和浸润深度有关,即 Lgr5 蛋白表达阳性率在

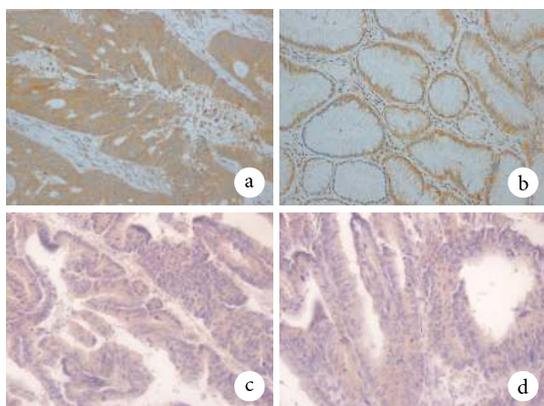


图 1 免疫组织化学方法检测 Lgr5 和 E-cad 蛋白表达情况 (SABC 法 $\times 400$)

a, b: Lgr5 蛋白在胃癌组织 (a) 及癌旁正常胃黏膜组织 (b) 中的表达; c, d: E-cad 蛋白在胃癌组织 (c) 及癌旁正常胃黏膜组织 (d) 中的表达

T3+T4 期和低-未分化胃癌组织中明显高于在 T1+T2 期和高-中分化胃癌组织中 ($P<0.05$),在有淋巴结转移和 HP 感染阳性患者中明显高于无淋巴结转移及 HP 感染阴性患者 ($P<0.05$); E-cad 蛋白表达阳性率在 T3+T4 期和低-未分化胃癌组织中明显低于在 T1+T2 期和高-中分化胃癌组织中 ($P<0.05$),其与淋巴结转移和 HP 感染无关 ($P<0.05$)。Lgr5 蛋白表达阳性患者 5 年生存率为 28.33% (17/60),阴性患者的 5 年生存率为 66.67% (6/9),二者的 5 年总生存时间曲线比较差异无统计学意义 ($\chi^2=1.819, P=0.177$); E-cad 蛋白表达阳性患者 5 年生存率为 43.33% (13/30),阴性患者的 5 年生存率为 20.51% (8/39),阳性胃癌患者的 5 年总生存时间明显优于阴性胃癌患者 ($\chi^2=5.814, P=0.016$),见图 2。

表 1 Lgr5 和 E-cad 蛋白在胃癌组织及癌旁正常胃黏膜组织中的表达情况 (例)

组织	n	Lgr5 蛋白表达				E-cad 蛋白表达			
		(-)	(+)	(++)	(+++)	(-)	(+)	(++)	(+++)
胃癌组织	69	9	12	30	18	39	4	18	8
癌旁正常胃黏膜组织	30	25	4	1	0	0	6	15	9

表 2 Lgr5 和 E-cad 蛋白在胃癌组织中的表达与胃癌患者的临床病理特征的关系 [例(%)]

临床病理特征	n	Lgr5 蛋白表达			E-cad 蛋白表达		
		阳性	χ^2 值	P 值	阳性	χ^2 值	P 值
性别							
男	49	42 (85.7)	0.230	0.483	21 (42.9)	0.414	0.520
女	20	18 (90.0)			9 (45.0)		
分化程度							
高-中分化	23	15 (65.2)	14.375	<0.001	18 (78.3)	16.985	<0.001
低-未分化	46	45 (97.8)			12 (26.1)		
浸润深度							
T1+T2	17	11 (64.7)	9.847	0.005	12 (70.6)	6.746	0.010
T3+T4	52	49 (94.2)			18 (34.6)		
淋巴结转移							
N0	16	10 (62.5)	10.985	0.004	10 (62.5)	3.067	0.080
N1 ~ N3	53	50 (94.3)			20 (37.7)		
远处转移							
M0	64	55 (85.9)	0.809	0.486	30 (46.9)	4.147	0.051
M1	5	5 (100)			0 (0)		
HP 感染							
阴性	28	21 (75.0)	5.939	0.020	12 (57.1)	0.007	0.565
阳性	41	39 (95.1)			18 (43.9)		

2.3 胃癌组织中 Lgr5 蛋白表达与 E-cad 蛋白表达的相关性

经 Spearman 相关性分析显示, Lgr5 蛋白表达与 E-cad 表达呈明显的负相关 ($r_s = -0.355$, $P = 0.003$), 见表 3。

3 讨论

目前 Lgr5 蛋白在胃癌中被广泛关注, 同时作为抑癌基因的 E-cad 蛋白表达在胃癌发生及发展中的作用机制目前尚不明确。本研究对此进行了探索, 并且探讨了二者在胃癌发生及发展中是否具有协同作用。

3.1 Lgr5 蛋白表达与胃癌患者临床病理特征的关系

Lgr5 蛋白是 G 蛋白偶联受体家族的成员之一, 其广泛分布于人体各种组织中, 如在毛囊、大脑、胃肠道、乳腺、生殖器官等均有表达, 它的结构

特点为其多肽链的细胞外区有 17 个富含亮氨酸的重复序列, N 端和 C 端富含半胱氨酸序列以及高度保守的 7 次 α 螺旋跨膜区。Lgr5 蛋白广泛表达于结直肠癌小肠和结肠黏膜的腺隐窝基底部的柱状细胞中^[1-8], 还发现下调其 mRNA 水平成功诱导了结直肠癌细胞的凋亡现象, 因此认为其在恶性肿瘤的发生过程中可能起着潜在的促进作用; Lgr5 作为 Wnt 信号通路下游的靶向基因, 其能够增强 Wnt/ β -catenin 信号通路的作用^[9-16]。Lgr5 作为结肠癌肿瘤干细胞标志物在结肠癌组织中大量表达且与结肠癌的发生、复发、转移、患者的生存预后等指标密切相关。目前也有研究者发现 Lgr5 在胃癌组织中呈高表达并怀疑其与胃癌的增殖、侵袭和转移有关。本研究中结果发现, Lgr5 在胃癌组织中的蛋白表达阳性率较癌旁正常胃黏膜组织中明显升高, 并且发现 Lgr5 蛋白表达阳性率在 T3+T4 期、N1 ~ N3 期及低-未分化胃癌组织中均较 T1+T2、N0 和高-中分化胃癌中明显升高 ($P < 0.05$), 结果提示, Lgr5 蛋白表达可能参与了肿瘤组织局部浸润、淋巴转移过程并与肿瘤分化程度较低密切相关, 具有在结肠癌中类似的促肿瘤作用, 但其具体机制仍需进一步的研究揭示; 本研究中未发现 Lgr5 蛋白表达阳性率与肿瘤远处转移有关 ($P = 0.486$), 分析其原因可能与纳入样本量有关, M1 期病例数仅有 5 例, 客观上可能会造成统计学上的偏差, 后期的研究还需增大 M1 期患者的样本量以明确 Lgr5 蛋白表达与肿瘤远处转移的确切相关性; 本研究进一步分析了 Lgr5 蛋白阳性和阴性表达胃癌患者的术后 5 年生存情况, 其结果未发现二者的术后 5 年生存率比较差异有统计学意义 ($P = 0.117$), 还需增加样本量及延长随访时间进一步分析才能得出明确结论。本实验中还发现 HP 感染阳性患者具有较高的 Lgr5 蛋白表达阳性率, 尚不明确二者是否具有协同作用, 还需进一步的大样本分析明确 HP 感染与 Lgr5 蛋白在胃癌进展中的联系及具体机制。

3.2 E-cad 蛋白表达与胃癌患者临床病理特征的关系

E-cad 是一种由染色体 16q22.1 上的 CDH1 基因编码的嗜同种跨膜细胞黏附蛋白, 其主要表达于上皮细胞内, 该蛋白在建立并维持细胞间连接、细胞极性以及组织构架方面均起重要作用。CDH1 基因被认为在人类肿瘤中是关键的肿瘤抑制基因。E-cad 的异常表达已经被发现存在于多种肿瘤如结直肠癌、胃腺癌、乳腺癌及妇科肿瘤组织中。有研究^[17-20]发现, CDH1 基因表达下调或失活与肿瘤的浸润和远处转移有关, 同时由于 E-cad 是一种位于

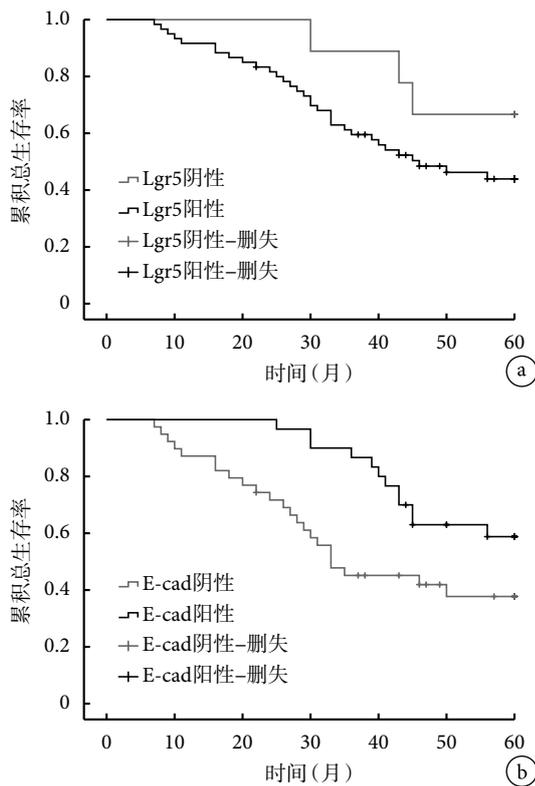


图 2 Lgr5 (a) 和 E-cad (b) 蛋白在胃癌组织中表达阳性和阴性患者的总生存曲线比较

表 3 胃癌组织中 Lgr5 蛋白表达与 E-cad 蛋白表达的相关性分析结果 (例)

E-cad 蛋白表达	Lgr5 蛋白表达		r_s 值	P 值
	阳性	阴性		
阳性	22	8	-0.355	0.003
阴性	38	1		

上皮细胞内的钙依赖性细胞黏附分子,其表达程度的改变可能造成肿瘤结构的改变。同时已有研究^[1-4]证实其在结肠癌中失活或下调与肿瘤的浸润生长和转移潜能有关。本研究中发现,E-cad 在胃癌组织中的蛋白表达阳性率较癌旁正常胃黏膜组织中明显下调,并且发现 E-cad 表达在 T3+T4 期及低-未分化胃癌组织的表达阳性率均较 T1+T2 和高分化明显降低($P<0.05$),结果提示,E-cad 蛋白表达阳性率低可能与肿瘤浸润、组织分化较低等生物学特性有关,分析其机理可能是由于 E-cad 与细胞膜细胞骨架的良好锚合及其维持正常生物屏障功能密切相关,因此,E-cad 的表达异常、功能缺失或其细胞膜锚合结构中某些分子的缺损,都可能导致癌细胞脱离肿瘤组织而向周围侵犯^[20-25];此外,本研究结果未发现胃癌组织中 E-cad 蛋白表达阳性率与患者性别、淋巴结转移、远处转移及 HP 感染情况有关($P>0.05$),还需要进一步探索;本研究进一步分析了 E-cad 蛋白阳性和阴性表达胃癌患者的术后 5 年生存情况,其结果显示,E-cad 阳性表达患者的术后生存情况明显优于阴性表达患者($P=0.016$),结果提示,E-cad 不仅在肿瘤的浸润及分化过程中发挥着重要作用,还与预后有关,未来 E-cad 检测可作为判断胃癌患者预后的重要指标之一。

3.3 Lgr5 蛋白与 E-cad 蛋白的关联

Lgr5 作为肿瘤干细胞标志物在肿瘤发生及进展中起到重要作用,在胃癌中其表达上调是否会被其他抑癌基因所抑制目前尚不明确,如作为抑癌因子的 E-cad 蛋白是否对 Lgr5 有一定影响成为关注焦点。在本研究中发现,Lgr5 在胃癌组织中的蛋白表达阳性率明显高于癌旁正常胃黏膜组织,而 E-cad 蛋白表达阳性率情况与此相反且呈明显的负相关关系($r_s=-0.355$, $P=0.003$),并且发现 E-cad 蛋白和 Lgr5 蛋白表达均与胃癌的局部浸润和分化程度有关,结果提示,二者可能在胃癌的发生及发展过程中起到某种协同作用,但其具体机制还不清楚,需要进一步探索。

总之,从本研究初步结果提示,Lgr5 蛋白和 E-cad 蛋白在胃癌组织中的表达阳性率相对于癌旁正常胃黏膜组织分别上升和下降,且二者与肿瘤的分化程度和淋巴结转移有密切的关系,二者可能共同参与了胃癌的发生、发展及转移过程;同时还发现 Lgr5 蛋白可能与 HP 感染具有协同作用,但其具体机制尚不清楚。本研究结论仍需大样本的随机对照研究证实并进一步发掘其在胃癌中的相互关系和作用机制。

重要声明

利益冲突声明:本文全体作者阅读并理解了《中国普外基础与临床杂志》的政策声明,我们没有相互竞争的利益。

作者贡献声明:冯宁完成课题设计、课题实施及论文撰写工作;刘文志、林峰完成论文设计、实验指导;张旭、薛帆、崔佑刚、马洋参与病例收集、部分免疫组化实验、术后随访等工作。

伦理声明:本研究通过了大连大学附属中山医院伦理委员会审批(伦理编号:2016004)。

参考文献

- 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.
- Buczacki SJ, Zecchini HI, Nicholson AM, et al. Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature*, 2013, 495(7439): 65-69.
- Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature*, 2009, 459(7244): 262-265.
- Schepers AG, Snippert HJ, Stange DE, et al. Lineage tracing reveals Lgr5⁺ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science*, 2012, 337(6095): 730-735.
- Ajani JA, D'Amico TA, Almhanna K, et al. Gastric Cancer, Version 3. 2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*, 2016, 14(10): 1286-1312.
- Yin X, Farin HF, van Es JH, et al. Niche-independent high-purity cultures of Lgr5⁺ intestinal stem cells and their progeny. *Nat Methods*, 2014, 11(1): 106-112.
- Metcalfe C, Kljavin NM, Ybarra R, et al. Lgr5⁺ stem cells are indispensable for radiation-induced intestinal regeneration. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(2): 149-159.
- Morgan RG, Molnár E, Jones RF, et al. Nutrient stress alters the glycosylation status of LGR5 resulting in reduced protein stability and membrane localisation in colorectal tumour cells: implications for targeting cancer stem cells. *Br J Cancer*, 2015, 112(4): 714-719.
- Sato K, Uehara T, Iwaya M, et al. Correlation of clinicopathological features and LGR5 expression in colon adenocarcinoma. *Ann Diagn Pathol*, 2019, 40: 161-165.
- Nagata H, Ishihara S, Abe H, et al. LGR5 expression predicts peritoneal recurrence after curative resection of primary colon cancer. *Br J Cancer*, 2019, 120(10): 996-1002.
- Jing N, Huang T, Guo H, et al. LncRNA CASC15 promotes colon cancer cell proliferation and metastasis by regulating the miR-4310/LGR5/Wnt/β-catenin signaling pathway. *Mol Med Rep*, 2018, 18(2): 2269-2276.
- Zhou X, Geng L, Wang D, et al. R-spondin1/LGR5 Activates TGFβ signaling and suppresses colon cancer metastasis. *Cancer Res*, 2017, 77(23): 6589-6602.
- Jia Y, Li Z, Cheng X, et al. Depletion of death-associated protein-3 induces chemoresistance in gastric cancer cells through the β-catenin/LGR5/Bcl-2 axis. *J Invest Med*, 2019, 67(5): 856-861.
- Carmon KS, Gong X, Yi J, et al. LGR5 receptor promotes cell-cell adhesion in stem cells and colon cancer cells via the IQGAP1-Rac1 pathway. *J Biol Chem*, 2017, 292(36): 14989-15001.
- de Sousa e Melo F, Kurtova AV, Harnoss JM, et al. A distinct role

- for Lgr5⁺ stem cells in primary and metastatic colon cancer. *Nature*, 2017, 543(7647): 676-680.
- 16 Shimokawa M, Ohta Y, Nishikori S, *et al.* Visualization and targeting of LGR5⁺ human colon cancer stem cells. *Nature*, 2017, 545(7653): 187-192.
- 17 Kurata A, Yamada M, Ohno SI, *et al.* Expression level of microRNA-200c is associated with cell morphology in vitro and histological differentiation through regulation of ZEB1/2 and E-cadherin in gastric carcinoma. *Oncol Rep*, 2018, 39(1): 91-100.
- 18 Schizas D, Moris D, Michalinos A, *et al.* E-cadherin in gastric carcinomas: Relations with histological parameters and its prognostic value. *J BUON*, 2017, 22(2): 383-389.
- 19 Kojima K, Minatani N, Ushiku H, *et al.* Prediction of onset of remnant gastric cancer by promoter DNA methylation of CDO1/HOPX/Reprimo/E-cadherin. *Oncotarget*, 2019, 10(25): 2423-2434.
- 20 Tang Y, Yang G, Zhang J, *et al.* E-cadherin is required for the homeostasis of Lgr5⁺ gastric antral stem cells. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(1): 34-43.
- 21 Lin Y, Zhang CS, Li SJ, *et al.* LncRNA LOC554202 promotes proliferation and migration of gastric cancer cells through regulating p21 and E-cadherin. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(24): 8690-8697.
- 22 Bahnassy AA, Helal TE, El-Ghazawy IM, *et al.* The role of E-cadherin and Runx3 in *Helicobacter Pylori*-associated gastric carcinoma is achieved through regulating P21waf and P27 expression. *Cancer Genet*, 2018, 228-229: 64-72.
- 23 Zhao K, He J, Wang YF, *et al.* EZH2-mediated epigenetic suppression of EphB3 inhibits gastric cancer proliferation and metastasis by affecting E-cadherin and vimentin expression. *Gene*, 2019, 686: 118-124.
- 24 Jang M, Koh I, Lee JE, *et al.* Increased extracellular matrix density disrupts E-cadherin/ β -catenin complex in gastric cancer cells. *Biomater Sci*, 2018, 6(10): 2704-2713.
- 25 Chen Z, Wu J, Huang W, *et al.* Long non-coding RNA RP11-789C1.1 suppresses epithelial to mesenchymal transition in gastric cancer through the RP11-789C1.1/MiR-5003/E-cadherin axis. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(6): 2432-2444.

收稿日期: 2019-09-16 修回日期: 2019-12-12

本文编辑: 李缨来/蒲素清

• 读者•作者•编者 •

发表学术论文“五不准”

为弘扬科学精神,加强科学道德和学风建设,抵制学术不端行为,端正学风,维护风清气正的良好学术生态环境,重申和明确科技工作者在发表学术论文过程中的科学道德行为规范,中国科协、教育部、科技部、卫生计生委、中科院、工程院、自然科学基金会共同研究制定了《发表学术论文“五不准”》:

1. 不准由“第三方”代写论文。科技工作者应自己完成论文撰写,坚决抵制“第三方”提供论文代写服务。
2. 不准由“第三方”代投论文。科技工作者应学习、掌握学术期刊投稿程序,亲自完成提交论文、回应评审意见的全过程,坚决抵制“第三方”提供论文代投服务。
3. 不准由“第三方”对论文内容进行修改。论文作者委托“第三方”进行论文语言润色,应基于作者完成的论文原稿,且仅限于对语言表达方式的完善,坚决抵制以语言润色的名义修改论文的实质内容。
4. 不准提供虚假同行评审人信息。科技工作者在学术期刊发表论文如需推荐同行评审人,应确保所提供的评审人姓名、联系方式等信息真实可靠,坚决抵制同行评审环节的任何弄虚作假行为。
5. 不准违反论文署名规范。所有论文署名作者应事先审阅并同意署名发表论文,并对论文内容负有知情同意的责任;论文起草人必须先征求署名作者对论文全文的意见并征得其署名同意。论文署名的每一位作者都必须对论文有实质性学术贡献,坚决抵制无实质性学术贡献者在论文上署名。

本“五不准”中所述“第三方”指除作者和期刊以外的任何机构和个人;“论文代写”指论文署名作者未亲自完成论文撰写而由他人代理的行为;“论文代投”指论文署名作者未亲自完成提交论文、回应评审意见等全过程而由他人代理的行为。

《中国普外基础与临床杂志》编辑部