

结直肠癌患者血清外泌体整合素的表达及其临床意义

焦蕉^{1,2}, 唐继云³, 刘佳琴⁴, 唐麒², 李东芳¹, 胡广生², 蒋益兰^{4*}

¹湖南省肿瘤医院中西医结合科, 长沙 410013; ²湖南中医药大学研究生院, 长沙 410208; ³衡阳市中医医院肿瘤科, 湖南衡阳 421000; ⁴湖南省中医药研究院附属医院中医肿瘤学湖南省重点实验室, 长沙 410006

[中图分类号] R735

[文献标志码] A

[DOI]

10.11855/j.issn.0577-7402.2022.06.0586

[声明]

本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文]

焦蕉, 唐继云, 刘佳琴, 等. 结直肠癌患者血清外泌体整合素的表达及其临床意义[J]. 解放军医学杂志, 2022, 47(6): 586-592.

[收稿日期] 2021-06-22

[录用日期] 2021-09-06

[上线日期] 2022-03-24

[摘要] 目的 探讨不同分期结直肠癌患者血清外泌体中整合素 α_5 、 β_5 、 β_6 的表达水平及其临床意义。方法 收集2016年1月—2020年10月就诊于湖南省中医药研究院附属医院和湖南省肿瘤医院的50例结直肠癌患者的血清标本, 按照TNM分期分为结直肠癌 I 期组($n=5$)、II 期组($n=19$)、III 期组($n=14$)与IV 期组(仅肝转移, $n=12$)。另收集2018年8月—2020年5月于湖南省中医药研究院附属医院健康管理中心体检的10名健康者的血清标本作为健康对照组。对血清标本进行外泌体提纯, 运用纳米微粒追踪分析(NTA)及Western blotting鉴定外泌体; 采用Western blotting检测血清外泌体中整合素 α_5 、 β_5 、 β_6 的表达水平。随访追踪50例结直肠癌患者的生存期, 采用Kaplan-Meier法绘制生存曲线, 采用Cox比例风险回归模型进行生存分析。结果 50例结直肠癌患者中, 男26例(52.0%), 女24例(48.0%), 以中老年群体为主, 平均年龄58岁; TNM分期 I 期5例(10.0%), II 期19例(38.0%), III 期14例(28.0%), IV 期(仅肝转移) 12例(24.0%)。随访截至2021年2月, 随访时间5~60个月, 中位随访时间44个月, 无病例脱落或失访。NTA分析结果显示, 各组血清外泌体的粒径分布集中在50~150 nm。Western blotting检测结果显示, 各组血清外泌体中ALIX、HSP70等标志性蛋白均有表达, 证实提取物为外泌体; 各组血清外泌体中整合素 α_5 、 β_5 、 β_6 均有不同程度表达, 其中整合素 α_5 、 β_5 的表达水平随着TNM分期增加而升高, 肝转移IV 期患者 α_5 、 β_5 表达水平明显高于非IV 期患者($P<0.05$), 而整合素 β_6 表达与TNM分期无明显关系($P>0.05$)。Kaplan-Meier生存曲线分析显示, 整合素 α_5 、 β_5 及TNM分期与结直肠癌患者的生存期有关($P<0.05$); Cox比例风险回归模型分析结果显示, 整合素 α_5 及病理分化程度是结直肠癌患者生存期的独立影响因素($P<0.05$)。结论 外泌体整合素 α_5 、 β_5 与结肠癌肝转移及TNM分期有关, 外泌体整合素 α_5 及病理分化程度与结肠癌预后有关, 外泌体整合素 α_5 、 β_5 可能成为潜在的血清标志物。

[关键词] 结直肠癌; 整合素; 外泌体; 生存期

Expression of serum exosomes integrins and their clinical significance in patients with colorectal cancer

Jiao Jiao^{1,2}, Tang Ji-Yun³, Liu Jia-Qin⁴, Tang Qi², Li Dong-Fang¹, Hu Guang-Sheng², Jiang Yi-Lan^{4*}

¹Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan Cancer Hospital, Changsha 410013, China

²Graduate School, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

³Department of Oncology, Hengyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hengyang, Hunan 421000, China

⁴Hunan Key Laboratory of Chinese Medicine Oncology, Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Changsha 410006, China

[基金项目] 国家自然科学基金(81774287); 湖南省中医药科研计划项目(2021193); 长沙市科技计划项目(kq1706040); 湖南创新型省份建设专项经费资助项目(2019SK4013)

[作者简介] 焦蕉, 硕士研究生, 主治医师, 从事中西医结合防治恶性肿瘤方面的研究

[通信作者] 蒋益兰, E-mail: tianshangren624@163.com

*Corresponding author, E-mail: tianshangren624@163.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81774287), the Scientific Research Program of Traditional Chinese Medicine in Hunan Province (2021193), the Changsha Science and Technology Planning Project (kq1706040), and the Hunan Innovative Province Construction Special Fund Project (2019SK4013)

[Abstract] Objective To investigate the expression levels of serum exosomes integrin α_5 , β_5 and β_6 and their clinical significance in patients with different stages of colorectal cancer (CRC). **Methods** The serum samples were collected from 50 patients with CRC admitted in the Affiliated Hospital of Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine and Hunan Cancer Hospital from January 2016 to October 2020, and were divided into CRC stage I group ($n=5$), CRC stage II group ($n=19$), CRC stage III group ($n=14$), and CRC stage IV group (only liver metastasis, $n=12$) according the TNM stage. The serum samples were collected from 10 healthy people who underwent physical examination in the Health Management Center of the Affiliated Hospital of Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine from August 2018 to May 2020, and set as healthy people group. The exosomes were purified, and then identified by nanoparticle tracking assay (NTA) and Western blotting. The expression levels of integrin α_5 , β_5 and β_6 were detected by Western blotting, the survival time of 50 patients with CRC were followed up. Kaplan-Meier method was used to draw the survival curve, and Cox proportional hazards model was used for survival analysis. **Results** The 50 patients with CRC [26 males (52.0%) and 24 females (48.0%)] are mainly middle- and elderly-aged with average age of 58 years. Five cases (10.0%) in TNM stage I, 19 cases (38.0%) in stage II, 14 cases (28.0%) in stage III and 12 cases (24.0%) in stage IV (only liver metastasis). Up to February 2021, the follow-up time was 5-60 months, and the median follow-up time was 44 months, no cases fell off or lost follow-up. NTA analysis showed that the particle diameter of serum exosomes in all serum samples were concentrated in 50-150 nm. Western blotting results showed that the marker proteins of serum exosomes ALIX and HSP70 were expressed in all serum samples, which confirmed that these extracts were exosomes. Integrin α_5 , β_5 and β_6 were expressed in different degrees, the expression levels of integrin α_5 and β_5 increased with the increase of TNM stage, and significantly higher in live metastasis than in non-stage IV ($P<0.05$). However, no significant relationship existed between the expression of integrin β_6 and TNM stage ($P>0.05$). Kaplan-Meier method showed that integrin α_5 , β_5 and TNM stage were related with survival of patients with CRC ($P<0.05$). The results of Cox proportional risk model suggested that integrin α_5 and the degree of pathological differentiation were independent influencing factors of survival in patients with CRC ($P<0.05$). **Conclusion** Exosomes integrin α_5 , β_5 are related to liver metastasis and TNM stage of CRC. Exosomes integrin α_5 and the degree of pathological differentiation are related to the prognosis of colorectal cancer, and integrin α_5 and β_5 may become potential serum markers.

[Key words] colorectal cancer; integrin; exosomes; survival

结直肠癌是全球癌症发病率第三、死亡率第二的恶性肿瘤^[1],严重影响人们的生命健康,临床治疗常采用手术、放化疗、靶向治疗、免疫及中医药治疗为一体的综合治疗模式。肿瘤转移是导致结直肠癌患者死亡的主要原因^[2],肝脏是结直肠癌转移发生率最高的器官,而晚期结直肠癌5年生存率约11.7%^[3-5]。因此,深入探讨结直肠癌肝转移的机制具有十分重要的意义。整合素属于细胞表面黏附分子家族,通过与相应配体结合,介导细胞与细胞间及细胞与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的黏附反应,调控细胞的生物学行为。多项研究显示,整合素 α_5 、 β_5 、 β_6 在结直肠癌侵袭、转移过程中发挥着重要作用^[6-10]。本研究检测不同分期结直肠癌患者及健康人血清外泌体整合素 α_5 、 β_5 、 β_6 的表达情况,分析其与生存期的关系,探讨整合素 α_5 、 β_5 、 β_6 在结直肠癌诊断、治疗及预后预测中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2016年1月—2020年10月就诊

于湖南省中医药研究院附属医院和湖南省肿瘤医院的50例结直肠癌患者的血清标本。纳入标准:年龄>18岁,性别不限;符合结直肠癌诊断标准;未经放化疗和手术的初诊患者。排除标准:因其他疾病或事故死亡;依从性差不能随访。结直肠癌按照中国临床肿瘤学会(Chinese Society of Clinical Oncology, CSCO)结直肠癌诊疗指南^[11]标准,经手术或病理活检确诊。按照国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)及美国肿瘤联合会(American Joint Committee on Cancer, AJCC) TNM分期系统(第8版)^[12],将50例结直肠癌患者分为结直肠癌I期组($n=5$)、II期组($n=19$)、III期组($n=14$)与IV期组(仅肝转移, $n=12$)。

收集2018年8月—2020年5月于湖南省中医药研究院附属医院健康管理中心体检的10名健康者的血清标本作为健康对照组。经过询问病史、体格检查以及完善胃肠镜、肿瘤标志物、影像学等检查认定为无恶性肿瘤,且无肠道癌前病变如腺瘤、黑病变等,排除合并糖尿病、心脑血管疾病、肝肾疾病等慢性疾病及肿瘤家族史者。本研究通过湖

南省中医药研究院伦理委员会[HZL(K)20180614-001-01C号]和湖南省肿瘤医院医学伦理委员会(SBQLL-2020-110)审核,所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 主要试剂及仪器 外泌体提取试剂盒(EIQ3-01001 kit, 171018, 上海华盈生物医药科技有限公司);四甲基乙二胺(TEMED; T105497, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司);RIPA裂解液(P0013B, 上海碧云天生物技术有限公司);三羟甲基氨基甲烷缓冲液(Tris; V900483, 美国Sigma公司);兔抗人HSP70抗体(ab181606)、兔抗人ALIX抗体(ab186249)、兔抗人整合素 α_5 抗体(ab150361)、兔抗人整合素 β_5 抗体(ab187155)、兔抗人整合素 β_3 抗体(ab184312)(英国Abcam公司);兔抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶抗体(GAPDH, 10494-1-AP)、羊抗兔抗IgG HRP(SA00001-2)(美国Proteintech公司)。纳米检测仪(NanoFCM, 厦门福流生物科技有限公司);台式冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);电泳仪、转膜仪(北京六一生物科技有限公司);摇床、旋涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);磁力搅拌器(上海雷磁仪器电科学仪器股份有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 外泌体分离 按照外泌体提取试剂盒(EIQ3-01001 kit)说明书步骤操作,取血清标本于4℃下3000g离心10 min;取200 μ l,加入50 μ l提取试剂A,混匀后4℃静置孵育30 min;室温下3000g离心10 min,弃上清;用200 μ l PBS重悬,向重悬液中加入50 μ l试剂B,混匀后4℃静置孵育30 min;室温下3000g离心10 min,弃上清;用50~120 μ l PBS重悬,分装后于-80℃冻存待测。

1.3.2 纳米微粒追踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)外泌体^[13-14] 取冻存的外泌体样品,25℃水浴解冻后,于冰上放置;取20 μ l置于离心管中,加入980 μ l已过滤的PBS溶液(样本50倍稀释),反复吹打混匀,0.22 μ m滤膜过滤,采用纳米检测仪进行分析,具体由上海逍鹏生物公司测定。

1.3.3 Western blotting鉴定外泌体及测定整合素 α_5 、 β_5 、 β_3 表达水平 取外泌体样品,根据BCA定量结果加入6 \times 蛋白上样缓冲液,金属浴中煮沸变性,取20 μ g上样,行凝胶电泳,转至PVDF膜上,5%封闭液封闭60 min,加入HSP70(1:3000)、ALIX(1:3000)、整合素 α_5 (1:3000)、整合素 β_5 (1:3000)、整合素 β_3 (1:1000)、GAPDH(1:5000)一抗,4℃摇床孵育过夜;次日用TBST及TBS洗涤,加入山羊抗兔二抗(1:6000)室温孵育90 min;

用TBST洗涤3次,加入ECL化学发光液显影,用Quantity One灰度分析软件进行分析。

1.3.4 直肠癌患者生存期的影响因素分析 所有患者每1~2个月接受1次电话随访,随访日期从入组开始至患者出现本病相关死亡,随访截至2021年2月。生存期为从随机化开始至死亡或末次随访时间。采用Kaplan-Meier法和Cox比例风险回归模型分析预后影响因素。

1.4 统计学处理 采用SPSS 19.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,若符合正态分布和方差齐,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验或非参数检验。采用GraphPad Prism 8.0软件制作粒径图,Quantity One灰度分析软件进行Western blotting分析,实验均重复3次。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般资料 50例中,男26例(52.0%),女24例(48.0%),以中老年群体为主,平均58岁;年龄 ≤ 60 岁者24例(48.0%), >60 岁者26例(52.0%);TNM分期 I期5例(10.0%), II期19例(38.0%), III期14例(28.0%), IV期(仅肝转移)12例(24.0%);黏液性腺癌2例(4.0%),低分化腺癌15例(30.0%),中分化腺癌25例(50.0%),高分化腺癌8例(16.0%)。随访截至2021年2月,随访时间5~60个月,中位随访时间44个月,无病例脱落或失访。

2.2 外泌体鉴定结果 NTA分析结果显示,各组血清外泌体的粒径分布集中在50~150 nm(图1)。Western blotting检测结果显示,各组血清外泌体中ALIX、HSP70等标志性蛋白均有表达(图2),证实提取物为外泌体,可进行后续实验。

2.3 各组血清外泌体中整合素 α_5 、 β_5 、 β_3 的表达情况 Western blotting检测结果显示,各组血清外泌体中整合素 α_5 、 β_5 表达水平较高,其水平随着结直肠癌TNM分期增加而增高;结直肠癌 I、II、III、IV期组整合素 α_5 、 β_5 表达水平差异有统计学意义($P<0.05$),整合素 β_3 仅少量表达,其水平并不随着TNM分期而呈一致性改变($P>0.05$)(图3)。结直肠癌IV期组整合素 α_5 、 β_5 表达水平明显高于结直肠癌 I、II、III期组($P<0.01$),结直肠癌 III期组明显高于结直肠癌 I、II期组($P<0.01$),结直肠癌 II期组高于结直肠癌 I期组($P<0.05$)(图3)。

2.4 结直肠癌患者生存期的影响因素分析 Kaplan-Meier生存曲线分析显示,整合素 α_5 、整合素 β_5 、TNM分期与结直肠癌患者生存期有关($P<0.01$),病理分化程度、性别、年龄与结直肠癌患者生存期无明显相关性($P>0.05$,图4)。

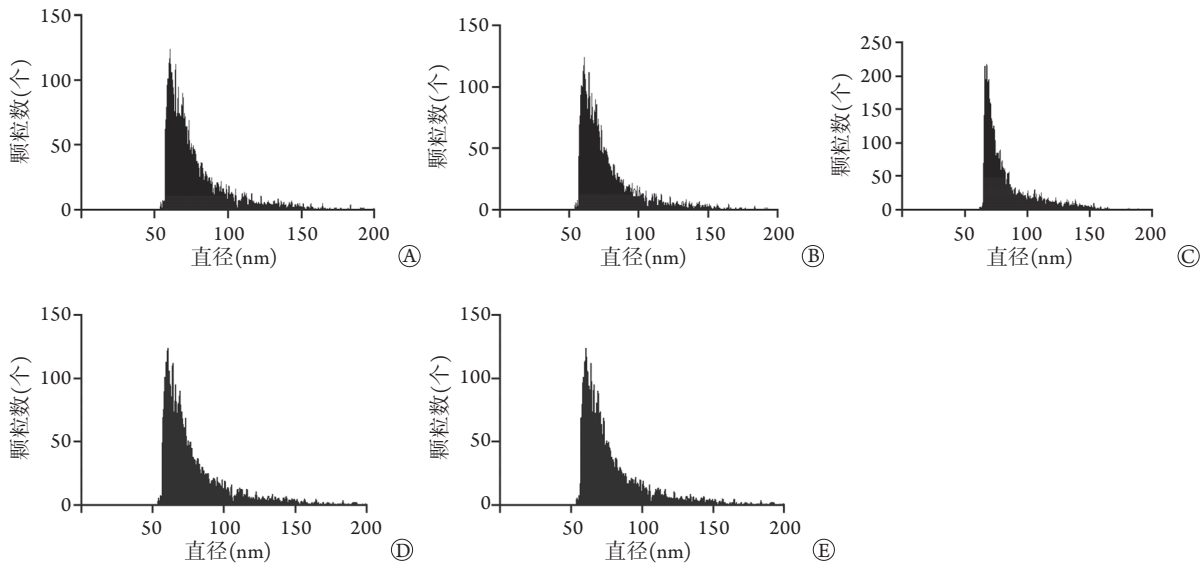


图1 各组血清外泌体纳米微粒追踪分析(NTA)结果

Fig.1 Nanoparticle tracking analysis (NTA) of serum exosomes in each group

A. 健康对照组; B. 结直肠癌 I 期组; C. 结直肠癌 II 期组; D. 结直肠癌 III 期组; E. 结直肠癌 IV 期组

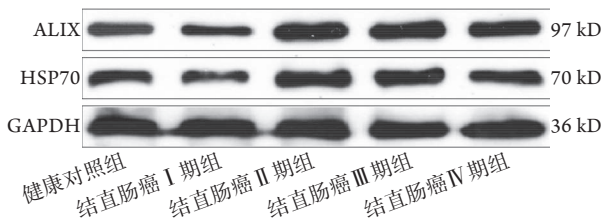


图2 各组血清外泌体标志蛋白ALIX、HSP70的表达情况 (Western blotting)

Fig.2 Expression of serum exosomes marker proteins ALIX and HSP70 in each group (Western blotting)

Cox比例风险回归模型分析结果显示, 整合素 α_5 及病理分化程度是结直肠癌患者生存期的独立影响因素($P < 0.01$, 图5、表1)。

3 讨论

结直肠癌是2020年中国癌症发病率第二、死亡率第五的恶性肿瘤^[15]。肝转移是结直肠癌患者死亡的主要原因之一。因此, 深入探讨结直肠癌肝转移的机制具有重要意义。目前研究认为, 恶性肿瘤的侵袭、转移是一个动态连续的过程^[16]。肿瘤细胞首先从原发部位脱落, 侵入到ECM中, 与基底膜细胞间质中的一些分子黏附, 并激活细胞合成、分泌各种降解酶类, 协助肿瘤细胞穿过ECM进入血管, 然后在某些因子的作用下运行并穿过血管壁外渗到继发部位, 继续增殖形成转移灶^[17]。

整合素作为细胞表面黏附分子家族的一员, 是由 α (120~185 kD)和 β (90~110 kD)两个亚单位经非共价键连接组成的异源二聚体, 包括一段C端细胞质内区域和一段N端细胞外区域(β_4 除外)。现已

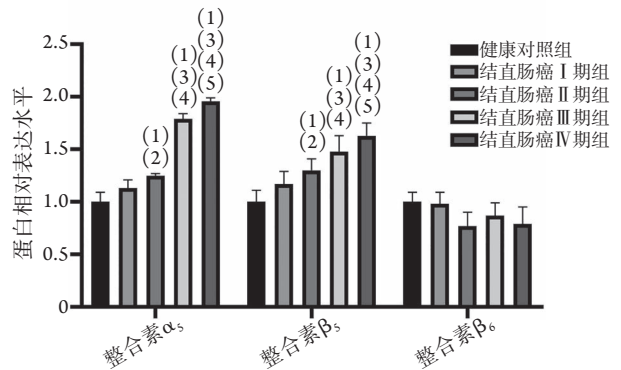
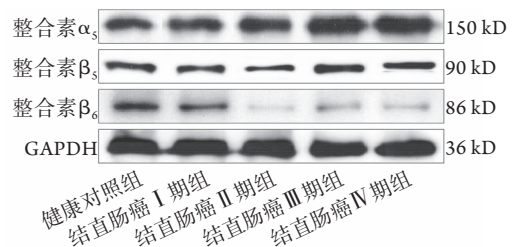


图3 各组血清外泌体中整合素 α_5 、 β_5 、 β_6 的表达情况 (Western blotting)

Fig.3 Expression of integrin α_5 , β_5 and β_6 in serum exosomes of each group (Western blotting)

与健康对照组比较, (1) $P < 0.01$; 与结直肠癌 I 期组比较, (2) $P < 0.05$, (3) $P < 0.01$; 与结直肠癌 II 期组比较, (4) $P < 0.01$; 与结直肠癌 III 期组比较, (5) $P < 0.01$

发现18种 α 亚单位和8种 β 亚单位。 α 、 β 链共同构成识别配体的结合点, 构成20多种整合素。整合素在与ECM连接后, 通过聚集(包括支架分子, 如p130-CRK相关底物)、招募并激活激酶[如局部黏附激酶(FAKs)和src家族激酶(sFKs)]将ECM与肌动蛋白细胞骨架耦合^[9], 直接或间接地影响肿瘤细胞的分

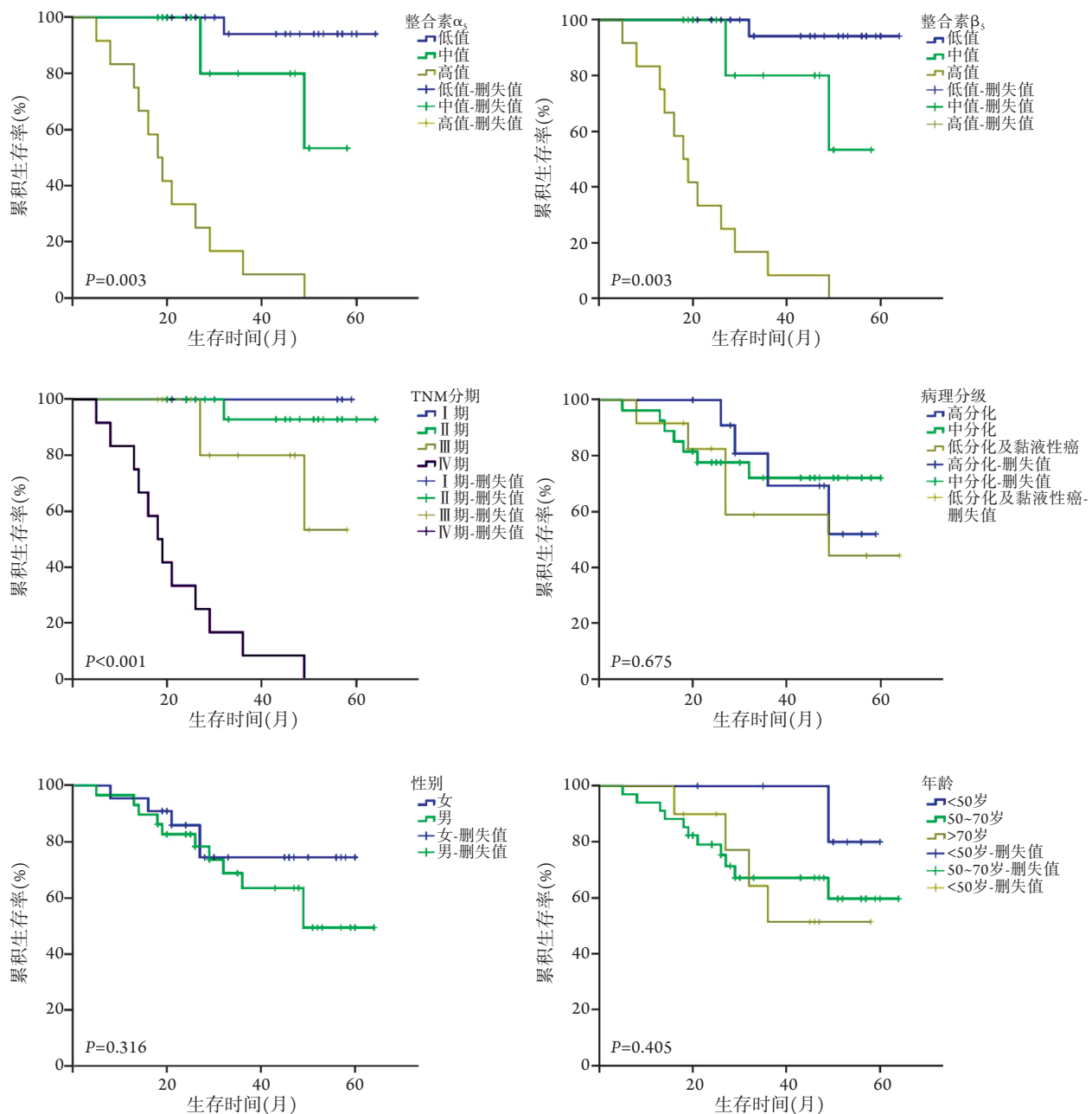


图4 结直肠癌患者生存期影响因素的Kaplan-Meier曲线分析

Fig.4 Kaplan-Meier curve analysis of the influencing factors of survival of patients with colorectal cancer

表1 结直肠癌患者生存期影响因素的Cox比例风险回归模型分析

Tab.1 Multivariate Cox proportional hazards model analysis of the influencing factors of survival of patients with colorectal cancer

因素	β	SE	Wald χ^2	df	P	OR	95%CI
病理分化程度	1.202	0.489	6.059	1	0.014	3.328	1.278~8.671
整合素 α_5	2.925	0.738	15.686	1	0.000	18.626	4.381~79.191

β . 偏回归系数; SE. 标准误; df. 自由度; P. 概率; OR. 优势比; 95%CI. 95%置信区间; Cox回归方程中的变量包含整合素 α_5 、病理分化程度, 提示整合素 α_5 及病理分化程度对生存曲线存在影响, OR>1, 提示整合素 α_5 值越高, 病理分化程度越差, 预后越差

化、增殖、迁移、凋亡及肿瘤血管的形成等^[18-19]。有研究发现, 整合素 $\alpha_5\beta_1$ (ITGA5)可通过 $\alpha_5\beta_1$ -纤连蛋白途径促进原位肿瘤向远处器官转移^[20]。Shao等^[21]采用Western blotting检测发现, 与原始细胞相比, 转移性HT29细胞中整合素 $\alpha_5\beta_1$ 表达增

加。Lu等^[22]利用生物信息学方法分析了癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA), 结果显示, ITGA5表达越高, 结直肠癌患者的总生存率越低。Pelillo等^[23]发现, 肝脏微环境通过调节整合素 $\alpha_5\beta_1$ 及其信号通路(FAK)的活性来驱动大肠癌细

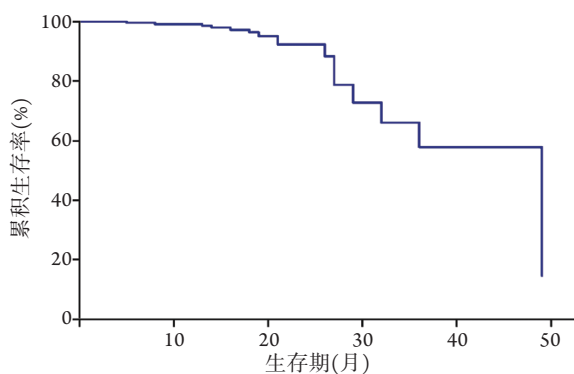


图5 基于整合素 α_5 、病理分化程度的Cox比例风险回归模型

Fig.5 Multivariate Cox proportional hazards model of integrin α_5 and the degree of pathological differentiation

Cox比例风险回归方程： $h(t, X)=h_0(t)\exp(-2.925 \times \text{整合素}\alpha_5+1.202 \times \text{病理分化程度})$ 。整合素 α_5 ：1=低值，2=中值，3=高值；病理分化程度：1=高分化，2=中分化，3=低分化及黏液性腺癌

胞沉降到肝脏中，而整合素 $\alpha_5\beta_1$ 与 $\alpha_2\beta_1$ 协同发挥作用，共同促进癌细胞在肝脏中的侵袭和扩散。整合素 β_5 (ITG β_5 /ITG $\alpha\nu\beta_5$)是一种玻连蛋白受体^[24]，可与 $\alpha\nu$ 亚基组成异二聚体，影响肿瘤的黏附、生长、迁移及侵袭等^[25-30]。Hoshino等^[31]通过定量质谱分析和Western blotting检测发现，ITG β_5 主要在肝嗜性细胞的外泌体中检测到。同样，有研究在黑色素瘤肝转移、结肠癌肝转移、胰腺癌肝转移及胃癌肝转移的外泌体中均检测到整合素 β_5 ^[32]，提示整合素 β_5 可调节肝转移的倾向性。整合素 $\alpha\nu\beta_6$ 是仅存在于上皮源性恶性肿瘤的一类特殊亚型，与多种上皮性肿瘤的发生、发展、侵袭和转移密切相关。Bates等^[33]发现，启动子转录调节因子-1(Ets-1)与整合素 β_6 的转录激活及结肠癌患者的生存获益存在相关性。Wang等^[34]发现，整合素 $\alpha\nu\beta_6$ 通过内吞、胞吐循环直接参与细胞的迁移运动，为结肠癌细胞的肝转移提供动力。本研究发现，各组血清外泌体中整合素 α_5 、 β_5 、 β_6 均有不同程度表达，其中整合素 α_5 、 β_5 表达水平随着TNM分期增加逐渐增高，且肝转移IV期患者 α_5 、 β_5 表达水平明显高于I、II、III期患者($P<0.05$)，提示整合素 α_5 、 β_5 与肝转移、TNM分期有关。Kaplan-Meier生存曲线分析显示，整合素 α_5 、 β_5 与结肠癌患者生存期有关；Cox比例风险回归模型分析显示，结肠癌患者整合素 α_5 水平越高、病理分化程度越低，则预后越差，提示整合素 α_5 、 β_5 、病理分化程度与结肠癌的预后有关。

值得注意的是，本研究发现，整合素 β_6 在结肠癌I—IV期患者中均有表达，但各分期表达水平差异无统计学意义，这与既往Peng等^[35]和Ahn等^[36]的研究结果一致，提示整合素 $\alpha\nu\beta_6$ 表达水平与结肠

肠癌良恶性无明显关联，总体生存率或临床病理特征与整合素 $\alpha\nu\beta_6$ 表达无明显相关性。但Peng等^[35]和Ahn等^[36]的研究仅对整合素 $\alpha\nu\beta_6$ 进行单因素分析，未对其相互作用因子如Ets-1、磷酸化细胞外信号调节激酶2(phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 2, p-ERK2)或尿激酶型纤溶酶原激活物受体(urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR)以及真核细胞起始因子4E(eukaryotic initiation factor-4E, eIF4E)等进行分析，因为结肠直肠癌患者在同时表达上述因子和整合素 $\alpha\nu\beta_6$ 时更容易出现复发转移^[35]，或者这些因子可增强整合素 $\alpha\nu\beta_6$ 的效力^[8]，或者整合素 β_6 同时受Ets-1和eIF4E的调节才能发挥作用^[7]，且 β_6 的表达可能提示化疗耐药，导致患者生存率明显降低^[37]，但并不意味着整合素 β_6 的表达与分期呈一致性^[36]。

本研究存在一定的局限性：未对整合素 β_6 的相互作用因子进行研究；未对其他IV期如肺部、远处淋巴结转移等患者进行同期研究，以明确整合素 α_5 、 β_5 是否引导结肠癌细胞定向转移至肝脏组织；未进行深入的细胞、动物实验加以验证。

综上所述，本研究结果表明，整合素 α_5 、 β_5 参与了结肠癌的侵袭、迁移过程，是导致结肠癌肝转移的原因之一，可能成为潜在的血清标志物。该结果为深入挖掘整合素 α_5 、 β_5 作为结肠癌浸润转移的预测分子以及结肠癌肝转移的作用机制提供了理论依据，但仍需进行多中心、大样本的临床与基础研究，以确定整合素 α_5 、 β_5 对结肠癌的诊断、治疗及预后价值。

【参考文献】

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, *et al*. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Donadon M, Ribero D, Morris-Stiff G, *et al*. New paradigm in the management of liver-only metastases from colorectal cancer[J]. Gastrointest Cancer Res, 2007, 1(1): 20-27.
- [3] Miller KD, Siegel RL, Lin CC, *et al*. Cancer treatment and survivorship statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(4): 271-289.
- [4] Tiberio GAM, Coniglio A, Marchet A, *et al*. Metachronous hepatic metastases from gastric carcinoma: A multicentric survey[J]. Eur J Surg Oncol, 2009, 35(5): 486-491.
- [5] Ueda K, Iwahashi M, Nakamori M, *et al*. Analysis of the prognostic factors and evaluation of surgical treatment for synchronous liver metastases from gastric cancer[J]. Langenbecks Arch Surg, 2009, 394(4): 647-653.
- [6] Starchenko A, Graves-Dealb R, Yang YP, *et al*. Clustering of integrin α_5 at the lateral membrane restores epithelial polarity in invasive colorectal cancer cells[J]. Mol Biol Cell, 2017, 28(10): 1288-1300.

- [7] Enyu L, Zhengchuan N, Jiayong W, *et al.* Integrin β_6 can be translationally regulated by eukaryotic initiation factor 4E: Contributing to colonic tumor malignancy[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(8): 6540-6550.
- [8] Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(1): 9-22.
- [9] Łasińska I, Mackiewicz I. Integrin as a new target for cancer treatment[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2019, 19(5): 580-586.
- [10] Cantor DI, Cheruku HR, Nice EC, *et al.* Integrin $\alpha v \beta_6$ sets the stage for colorectal cancer metastasis[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2015, 34(4): 715-734.
- [11] Guidelines of Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO). Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO) colorectal cancer (2019)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2019: 7-41. [中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 中国临床肿瘤学会(CSCO)结直肠癌诊疗指南(2019)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2019: 7-41.]
- [12] In H, Solsky I, Palis B, *et al.* Validation of the 8th edition of the AJCC TNM staging system for gastric cancer using the national cancer database[J]. *Ann Surg Oncol*, 2017, 24(1): 3683-3691.
- [13] Qin DY, Zhang YH, Li XY, *et al.* Proteomics analysis of exosomes from adipose-derived stem cells in skin damage repair[J]. *J Clin Rehabil Tis Eng Res*, 2020, 24(13): 2011-2019. [秦丹莹, 张玉恒, 李学拥, 等. 脂肪干细胞来源外泌体在组织损伤修复中的蛋白组学分析[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(13): 2011-2019.]
- [14] Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, *et al.* Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle tracking analysis[J]. *Nanomedicine*, 2011, 7(6): 780-788.
- [15] Liu ZC, Li ZX, Zhang Y, *et al.* Interpretation on the report of Global Cancer Statistics 2020[J]. *J Multidiscipl Cancer Manag (Electr Vers)*, 2021, 7(2): 1-13. [刘宗超, 李哲轩, 张阳, 等. 2020全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(2): 1-13.]
- [16] Chen H, Qu JL, Gong JN. Modern medical research progress of mechanisms of malignant tumor metastasis[J]. *China J Chin Mater Med*, 2014, 39(15): 2823-2828. [陈惠, 渠景连, 龚婕宁. 现代医学对恶性肿瘤转移相关机制的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(15): 2823-2828.]
- [17] Pinon P, Wehrle-Haller B. Integrins: Versatile receptors controlling melanocyte adhesion, migration and proliferation[J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2011, 24(2): 282-294.
- [18] Selivanova G, Ivaska J. Integrins and mutant p53 on the road to metastasis[J]. *Cell*, 2009, 139(7): 1220-1222.
- [19] Anderson LR, Owens TW, Naylor MJ. Structural and mechanical functions of integrins[J]. *Biophys Rev*, 2014, 6(2): 203-213.
- [20] Maric G, Annis MG, Dong Z, *et al.* GPNMB cooperates with neuropilin-1 to promote mammary tumor growth and engages integrin $\alpha_5 \beta_1$ for efficient breast cancer metastasis[J]. *Oncogene*, 2015, 34(43): 5494-5504.
- [21] Shao S, Zhu Y, Meng T, *et al.* Targeting high expressed $\alpha_5 \beta_1$ integrin in liver metastatic lesions to resist metastasis of colorectal cancer by RPM peptide modified chitosan-stearic micelles[J]. *Mol Pharm*, 2018, 15(4): 1653-1663.
- [22] Lu L, Xie R, Wei R, *et al.* Integrin α_5 subunit is required for the tumor supportive role of fibroblasts in colorectal adenocarcinoma and serves as a potential stroma prognostic marker[J]. *Mol Oncol*, 2019, 13(12): 2697-2714.
- [23] Pelillo C, Bergamo A, Mollica H, *et al.* Colorectal cancer metastases settle in the hepatic microenvironment through $\alpha_5 \beta_1$ integrin[J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(10): 2385-2396.
- [24] Bae JS, Lee W, Son HN, *et al.* Anti-transforming growth factor β -induced protein antibody ameliorates vascular barrier dysfunction and improves survival in sepsis[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2014, 212(4): 306-315.
- [25] Bianchi A, Gervasi ME, Bakin A. Role of β_5 -integrin in epithelial-mesenchymal transition in response to TGF- β [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(8): 1647-1659.
- [26] Bianchi-Smiraglia A, Paesante S, Bakin AV. Integrin β_5 contributes to the tumorigenic potential of breast cancer cells through the Src-FAK and MEK sig-ERK signaling pathways[J]. *Oncogene*, 2013, 32(25): 3049-3058.
- [27] Hung WY, Huang KH, Wu CW, *et al.* Mitochondrial dysfunction promotes cell migration *via* reactive oxygen species-enhanced β_5 -integrin expression in human gastric cancer SC-M1 cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820(7): 1102-1110.
- [28] Fok JY, Ekmekcioglu S, Mehta K. Implications of tissue transglutaminase expression in malignant melanoma[J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(6): 1493-1503.
- [29] Herman JF, Mangala LS, Mehta K. Implications of increased tissue transglutaminase (TG2) expression in drug-resistant breast cancer (MCF-7) cells[J]. *Oncogene*, 2006, 25(21): 3049-3058.
- [30] Tancioni I, Uryu S, Sulzmaier FJ, *et al.* FAK inhibition disrupts a β_5 integrin signaling axis controlling anchorage-independent ovarian carcinoma growth[J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(8): 2050-2061.
- [31] Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis[J]. *Nature*, 2015, 527(7578): 329-335.
- [32] Lin CY, Chen HJ, Li TM, *et al.* β_5 integrin up-regulation in brain-derived neurotrophic factor promotes cell motility in human chondrosarcoma[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e67990.
- [33] Bates RC, Bellovin DI, Brown C, *et al.* Transcriptional activation of integrin β_6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(2): 339-347.
- [34] Wang B, Wang W, Niu J, *et al.* SDF-1/CXCR4 axis promotes directional migration of colorectal cancer cells through upregulation of integrin $\alpha v \beta_6$ [J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(2): 282-291.
- [35] Peng C, Gao H, Niu Z, *et al.* Integrin $\alpha v \beta_6$ and transcriptional factor Ets-1 act as prognostic indicators in colorectal cancer[J]. *Cell Biosci*, 2014, 4(1): 53.
- [36] Ahn SB, Mohamedali A, Chan C, *et al.* Correlations between integrin $\alpha v \beta_6$ expression and clinico-pathological features in stage B and stage C rectal cancer[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97248.
- [37] Liu S, Wang J, Niu J, *et al.* The β_6 -integrin-ERK/MAP kinase pathway contributes to chemo resistance in colon cancer[J]. *Cancer Lett*, 2013, 328(2): 325-334.