

大肠侧向发育型肿瘤中 Wnt/ β -catenin/c-myc 轴激活水平研究

戚岳, 李刚强, 濮亚斌

(中国人民解放军第四五五医院, 上海 200052)

摘要: [目的] 研究大肠侧向发育型肿瘤(LSTs)的发生与 Wnt/ β -catenin/c-myc 通路活化的关系。[方法] 选取 20 例大肠隆起型腺瘤(PAs)、20 例 LSTs 和 20 例大肠癌(colorectal cancers, CCs)患者的组织标本, 采用免疫组化染色法检测标本中 Wnt/ β -catenin/c-myc 蛋白的表达, 反转录 PCR(RT-PCR)和 Western blot 法分别检测标本中对应 mRNA 和蛋白的相对表达水平。[结果] 免疫组化染色显示 LSTs 组中 Wnt/ β -catenin/c-myc 蛋白的阳性表达率(70.0%, 75.0%, 75.0%)低于 CCs 组(85.0%, 80.0%, 80.0%), 但高于 PAs 组(25.0%, 35.0%, 40.0%), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。标本中 Wnt/ β -catenin/c-myc 的 mRNA 和蛋白水平的变化也与免疫组化结果的趋势一致, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。[结论] Wnt/ β -catenin/c-myc 的表达水平可能与大肠肿瘤的恶化相关, 这种表达水平的变化可能与 LSTs 的发生及恶化生物学行为有关。
主题词: 大肠侧向发育型肿瘤; Wnt/ β -catenin/c-myc; 隆起型腺瘤; 大肠肿瘤
中图分类号: R735.3⁴ **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)02-0128-05
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.02.B010

Activation of Wnt/ β -catenin/c-myc Axis in Laterally Spreading Colorectal Tumor

QI Yue, LI Gang-qiang, PU Ya-bin

(The People's Liberation Army 455 Hospital, Shanghai 200052, China)

Abstract: [Objective] To study the relationship between the occurrence of and the activation of Wnt/ β -catenin/c-myc pathway in laterally spreading colorectal tumor (LST). [Methods] Tissue samples of 20 cases of colorectal protruding adenoma (PA), 20 cases of LSTs and 20 cases of colorectal carcinoma(CC) were obtained. The positive expression of Wnt/ β -catenin/c-myc protein was detected by immunohistochemical staining. The relative expression levels of corresponding mRNA and protein were detected by reverse transcription PCR (RT-PCR) and Western blot, respectively. [Results] Immunohistochemical staining showed that the positive expression of Wnt/ β -catenin/c-myc protein in LST group(70.0%, 75.0%, 75.0%) was lower than that in CC group(85.0%, 80.0%, 80.0%), but higher than that in PA group(25.0%, 35.0%, 40.0%), and the expression intensity was in the middle position of the three groups(all $P < 0.05$). The changes of mRNA and protein levels of Wnt/ β -catenin/c-myc in samples were also consistent with the those of immunohistochemical results(all $P < 0.05$). [Conclusion] The expression level of Wnt/ β -catenin/c-myc may be positively correlated with the deterioration of colorectal tumors, which may be closely related to the malignant biological behavior of LSTs.

Subject words: laterally spreading tumors; Wnt/ β -catenin/c-myc signal pathway; protuberant adenoid tumors; colorectal cancers

大肠腺瘤性息肉是大肠癌发生的最主要癌前病变类型^[1]。大肠癌的发生和发展是多基因、多因素共同参与, 逐渐变化的过程, 在促癌因素的刺激下, 有发展为大肠癌的可能。结直肠腺瘤性息肉病蛋白

(adenomatous polyposis protein of colorectum, APC) 基因作为重要的抑癌基因之一, 在大多数结直肠癌的早期癌变过程中发挥着重要作用^[2]。大肠侧向发育型肿瘤(laterally spreading tumors, LSTs)作为一种特殊形态的大肠腺瘤性息肉, 病理类型以腺瘤和黏膜癌为主, 直径多大于 10mm, 比隆起型腺瘤(protuberant adenoid tumors, PAs)具有更高的恶性潜能。临

通信作者: 濮亚斌, 主任, 副主任医师, 学士; 中国人民解放军第四五五医院普外科, 上海市长宁区淮海西路 338 号(200052);
E-mail: puyb05s@163.com

收稿日期: 2019-03-21; **修回日期:** 2019-07-16

床上 LSTs 主要表现为大肠黏膜的扁平样突出,沿肠壁黏膜表面侧向性生长,较少向深部浸润,常需染色内镜辅助检查^[3],检出率约 0.5%~2.0%^[4],以直肠和盲肠部位多见^[5]。有研究证实,Wnt 细胞信号转导通路的活化程度与大肠癌的发生关系密切,相关研究也最为深入^[6]。而 β -catenin 蛋白是 Wnt 信号通路系统中的关键分子之一,在细胞核内聚集是 Wnt 信号通路激活的主要因素^[7]。C-myc 和 cyclinD1 是 Wnt 信号通路的主要下游靶基因,在调控肿瘤细胞的分裂周期、增殖和凋亡等生物学行为中扮演着重要角色^[8]。基于此,本研究旨在分析 LSTs 的发生与 Wnt/ β -catenin/c-myc 通路活化的关系,为肿瘤的发生机制和发现早期干预靶点提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 一般资料

连续选择 2016 年 10 月至 2018 年 10 月入我院诊断为 PAs 患者 20 例,LSTs 患者 20 例和大肠癌患者 20 例,既往无手术、放化疗病史,排除炎症性肠病、家族性腺瘤性息肉等,内镜下或手术切除获得完整的病灶组织标本。三组患者的基线资料具有可比性($P>0.05$)。见 Table 1。

1.2 研究方法

采用免疫组化染色法检测各组标本中 Wnt/ β -catenin/c-myc 蛋白的阳性表达率及阳性表达强度,反转录 PCR(RT-PCR)和 Western blot 法检测标本中对应 mRNA 和蛋白的相对表达水平。切片制作:常规方法包埋、固定、切片,厚 8 μ m,-80℃保存。

1.2.1 免疫组化染色法

切片经脱蜡至水,过氧化氢溶液灭活内源性过氧化物酶,抗原修复,羊血清封闭抗原,滴加抗鼠

Wnt、 β -catenin 和 c-myc 单克隆抗体(sigma 公司,St. Louis,MO,USA,工作浓度 1:2000)4℃过夜;复温、PBS 冲洗 5min $\times$ 3 次;滴加兔抗鼠 IgG 二抗(上海碧云天科技有限公司,工作浓度 1:500),27℃孵育 1h;PBS 冲洗 5min $\times$ 3 次,置于免疫组化湿盒(Invitrogen 公司,Carlsbad,California,USA)内反应 1h;PBS 冲洗 5min $\times$ 3 次,DAB 显色、苏木素复染、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂封片、显微镜下拍照观察。相关免疫组化结果判断:选择 400 倍镜下左、右、上、下和中央共 5 个区域,每个区域观察 200 个细胞。Wnt 阳性的评价标准:以已知阳性切片为阳性对照,PBS 为阴性对照,胞浆中黄色至深棕色为阳性标准。计算阳性细胞比例和着色强度,其中着色强度无黄色为 0 分,淡黄色为 1 分,中等黄色为 2 分,棕黄色为 3 分;阳性细胞比例<10%为 0 分,10%~50%为 1 分,50%~75%为 2 分, $\geq$ 75%为 3 分。两项积分相乘得总分,0~3 分为阴性,3~9 分为阳性。 β -catenin 和 c-myc 阳性评价标准同 Wnt。

1.2.2 RT-PCR 法

常规 TRIzol 法提取 RNA、紫外分光光度仪下测定 RNA 的浓度和纯度,逆转录试剂盒合成 cDNA。引物由日本 Takara 公司设计合成,Wnt (F):5'-TACCTCCAGTCACACTCCCC-3',(R):5'-CCATGGCAGGAGAATAGGA-3',348bp; β -catenin (F):5'-TGCAGTTCGCCTTCACTATG-3',(R):5'-ACTAGTCGTGGAA-TGGCACC-3',162bp;c-myc (F):5'-ATGCCCCCTCAACGTTAGC-3',(R):5'-AGCTCGCTCTGCTGCTGC-3',143bp;内参 GAPDH (F):5'-TGCTTACCACCTTCTTGA-3',(R):5'-TCACCATCTTCCAGGAGC-3',456bp。反应体系为 5 $\times$ buffer 2.5 μ l+MgCl₂ 1.5 μ l+dNTP 0.5 μ l+ GAP-43 和内参上下游引物各 1 μ l+Taq 酶 0.3 μ l+cDNA 模板 2 μ l,加水至总体积 25 μ l。反应条件为 95℃ 5min,95℃ 30s,62℃ 30s,72℃ 30s,共 35 个循环,72℃ 10min。构建溶解曲线,以 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法计算 mRNA 的相对表达量。

1.2.3 Western blot 法

RIPA 裂解液处理组织细胞,冰上反应 30min、每隔 5min 剧烈震荡 1min、样品 4℃ 2000g

Table 1 Baseline data of three groups

Index	PAs(n=20)	LSTs(n=20)	CCs(n=20)	F/ χ^2	P
Gender					
Male	12	11	10	0.404	0.817
Female	8	9	10		
Age(years)	52.6 $\pm$ 13.2	53.4 $\pm$ 14.5	55.2 $\pm$ 13.3	0.315	0.862
Maximum diameter of tumors(mm)	9.5 $\pm$ 2.6	12.2 $\pm$ 3.4	11.5 $\pm$ 3.5	0.625	0.537
Location					
Rectum (%)	13(65.0)	10(50.0)	11(55.0)	0.950	0.622
Colon (%)	7(35.0)	10(50.0)	9(45.0)		

离心 20min, 吸取上清即为样品全蛋白; Bradford 法 (Invitrogen 公司, Carlsbad, California, USA) 测定蛋白质浓度; SDS-PAGE 凝胶电泳 (浓缩胶 50V, 分离胶 100V, 电泳时间 3h)、PVDF 转膜, 加入 5% 脱脂奶粉封闭液, 室温孵育 4h; 加稀释羊抗 Wnt、 β -catenin 和 c-myc 单克隆抗体 (北京中杉金桥生物有限公司, 工作浓度 1:2500) 和内参 β -actin (北京中杉金桥生物有限公司, 工作浓度 1:500) 37℃ 孵育 1h; TBST 洗涤 5min×3 次, 加兔抗羊 IgG 二抗 (R&D 公司, Minneapolis, USA, 工作浓度 1:200) 37℃ 孵育 1h; TBST 洗涤 5min×3 次, ECL 显色、扫描、图像分析软件 IPP6.0 (Media Cybernetics 公司, Washington, USA) 进行灰度分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数±标准差表示, 组间比较采用单因素 ANOVA 分析, 两两比较采用 LSD-t 法检验, 计数资料以例数或 (%) 表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 等级资料采用秩和检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化染色结果

Wnt 表达结果: 大肠癌组 85.0% (17/20) 的患者表达阳性, 明显高于 PAs 组 (25.0%) 和 LSTs 组 (70.0%)。大肠癌组 80.0% 的患者 β -catenin 表达阳性, 明显高于 PAs 组 (35.0%) 和 LSTs 组 (75.0%)。大肠癌组 80.0% 的患者 c-myc 表达阳性, 明显高于 PAs 组 (40.0%) 和 LSTs 组 (75.0%)。大肠癌组与 PAs 组和 LSTs 组比较, 各指标表达差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见 Table 2。

2.2 RT-PCR 结果

各肿瘤组织 RT-PCR 检测结果比较如 Figure 1, 结果显示: PAs、LSTs 和 CCs 组组织中 Wnt/ β -catenin/c-myc mRNA 水平呈递增趋势 (Table 3), 其中, LSTs 组 Wnt 表达水平为 (0.3629 ± 0.1235), 低于大肠癌组 (0.5214 ± 0.1527), 但明显高于 PAs 组 (0.1235 ± 0.0639)。

LST 组 β -catenin 表达水平为 (0.3725 ± 0.1027), 低于 CCs 组 (0.5328 ± 0.1634), 明显高于 PAs 组 (0.1026 ± 0.0528)。LSTs 组 c-myc mRNA 水平 (0.3638 ± 0.1163) 低于 CCs 组 (0.5166 ± 0.1529), 但明显高于 PAs 组 (0.1324 ± 0.0467)。各指标 PAs 组与 LSTs 组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 Western blot 结果

各肿瘤组织代表性 Western blot 检测结果如 Figure 2 及 Table 4。结果显示: 与 PAs 组比较, LSTs 组的 Wnt 与 c-myc 蛋白水平有明显上调, 上调趋势与 CCs 组相似, 但上调幅度低于 CCs 组。 β -catenin 的蛋白水平结果提示 LSTs 与 PAs 相比有略上调, 幅度低于 CCs 组上调程度。其中, 大肠癌组与 PAs 组各指标比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), PAs

Table 2 Comparison of the Wnt, β -catenin and c-myc expression in different group

Index	PAs (n=20)	LSTs (n=20)	CCs (n=20)	χ^2	P
Wnt					
Negative	15 (75.0)	6 (30.0)	3 (15.0)	17.417	0.002
Positive	5 (25.0)	14 (70.0)	17 (85.0)		
β -catenin					
Negative	13 (65.0)	5 (25.0)	4 (20.0)	11.557	0.021
Positive	7 (35.0)	15 (75.0)	16 (80.0)		
c-myc					
Negative	12 (60.0)	5 (25.0)	4 (20.0)	10.048	0.040
Positive	8 (40.0)	15 (75.0)	16 (80.0)		

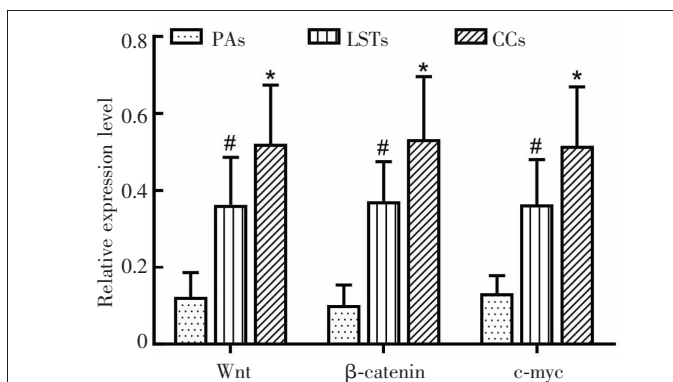


Figure 1 Comparison of column diagrams of RT-PCR results

Table 3 Comparison of the Wnt, β -catenin and c-myc mRNA in different group

Index	PAs (n=20)	LSTs (n=20)	CCs (n=20)	F	P
Wnt	0.1235 ± 0.0639	$0.3629 \pm 0.1235^{\#}$	$0.5214 \pm 0.1527^*$	9.632	<0.001
β -catenin	0.1026 ± 0.0528	$0.3725 \pm 0.1027^{\#}$	$0.5328 \pm 0.1634^*$	8.629	<0.001
c-myc	0.1324 ± 0.0467	$0.3638 \pm 0.1163^{\#}$	$0.5166 \pm 0.1529^*$	10.325	<0.001

Note: $^{\#}$: LSTs group compared with PAs group, $P < 0.05$; * : CCs group compared with LSTs group, $P < 0.05$.

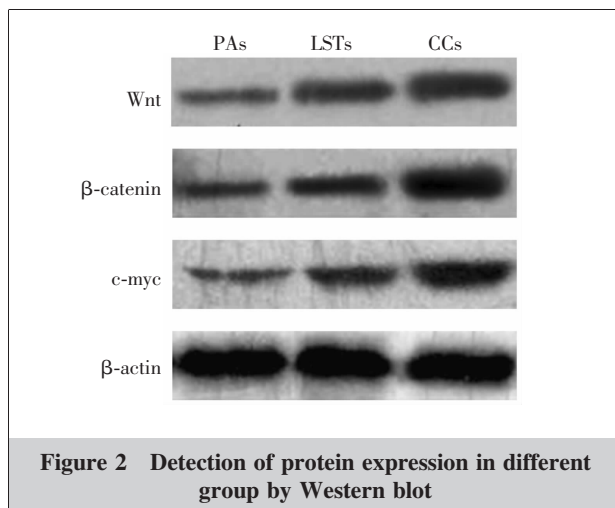


Table 4 Comparison of Western blot results

Index	PAs(n=20)	LSTs(n=20)	CCs(n=20)	F	P
Wnt	0.15±0.05	0.35±0.12 [#]	0.58±0.19 [*]	7.628	<0.001
β-catenin	0.183±0.06	0.27±0.11	0.61±0.21 [*]	8.324	<0.001
c-myc	0.11±0.04	0.23±0.07 [#]	0.63±0.18 [*]	8.629	<0.001

Note: [#]: LSTs group compared with PAs group, $P < 0.05$; ^{*}: CCs group compared with LSTs group, $P < 0.05$.

组合 LSTs 组 Wnt 与 c-myc 蛋白水平比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

前期研究证实, *k-ras*、*p53* 和环氧合酶(COX-2)与 LSTs 和大肠癌的发生密切相关。*k-ras* 基因在 LSTs 癌变中的突变率高达 70%~80%, 明显高于 PAs 的 20%~30%^[9]。*p53* 与多种恶性肿瘤的抑癌效应密切相关^[10]。COX-2 是前列腺素合成的关键限速酶, COX-2 可抑制细胞凋亡发生, 促进细胞黏附, 在绝大多数胃肠道肿瘤中均有较高表达, 且与肿瘤的发生、病理分期、预后等有关^[11]。我国自行分离的 LSTs 细胞株(LST-R1), 通过对细胞的超微结构、染色体及异种动物接种实验, 证实其具有高度的恶性倾向^[12]。通过对 LST-R1 中一系列黏附因子 E-cadherin、TM4SF9 及 galectin-1 等研究, 发现细胞中多项黏附因子表达均显著缺乏, 可能与侧向浅表扩散的特殊生长方式密切相关^[13]。

通过该研究得出, 大肠癌组标本中 Wnt/β-catenin/c-myc 蛋白的阳性表达程度显著高于 LSTs, PAs 最低, 差异有统计学意义。并且大肠癌组 Wnt/β-

catenin/c-myc mRNA 和蛋白的相对表达水平也显著高于 LSTs, PAs 最低, 差异有统计学意义。提示, Wnt/β-catenin/c-myc 通路活化程度与 LSTs 的发生及恶化生物学行为有密切联系。90%以上大肠癌的发生与 Wnt 经典信号通路的激活有着密切联系, 以该信号通路中关键分子为靶点治疗大肠癌, 已成为研究的热点方向。其中 β-catenin 作为正性调控因子, APC、轴蛋白(Axin)、糖原合成酶激酶(GSK)-3β 和酪蛋白激酶(CK)1 作为负性调节因子^[14]。β-catenin 分子结构中氨基末端含有数个 GSK-3β 的磷酸化位点, 羧基末端含有活化相应靶基因转录的功能, 中间区域形成 α 螺旋和连接环结构, 与 Cadherin、APC 蛋白及核内转录因子 T 细胞因子(TCF)结合, 因此, β-

catenin 在细胞内稳定和积聚调节是 Wnt 信号通路激活的关键^[15]。C-myc 蛋白是细胞增殖的重要调节因子, 被认为 G₁ 期的进展因子^[16]。C-myc 也可以诱导细胞凋亡, 其调节方向取决于细胞接受的信号及细胞所处的生长环境^[17]。研究表明, C-myc 可激活细胞的端粒酶, 诱导细胞端粒酶转录, 使细胞“永生化”, 从而促进肿瘤的形成^[18]; 此外, C-myc 还可促进血管内皮生长因子(VEGF)的表达, 促进肿瘤中新生血管的形成^[19]。癌基因 C-myc 在基因转录和细胞调节中具有“分子开关”作用, 在直肠腺瘤向腺癌序列演变过程中, C-myc 异常激活, 蛋白表达增高, 促进细胞增殖^[20]。

此外, 调控 Wnt 通路的多种关键基因的 DNA 甲基化状态也与 LSTs 和大肠癌的发生密切相关, 而且 DNA 甲基化为可逆的基因修饰, 可能成为有效的分子干预靶点。研究表明 LST 组织 DNA 的 CpG 岛高甲基化与 *B-raf* 基因突变密切相关^[21]; *APC* 基因的高甲基化与 LST 的黏膜下侵袭呈负相关^[22]。

综上所述, Wnt/β-catenin/c-myc 通路活化程度可能与 LSTs 的发生及恶化生物学行为有着密切的联系。该研究的创新点是提出了 LSTs 的发生可能与肿瘤细胞中 Wnt/β-catenin/c-myc 通路的活化程度相关, 为疾病的发生机制和探索早期干预靶点提供重要的参考依据。当然, 肿瘤的发生除了与细胞信号通路的活化状态相关, 其他多种因素也共同参与。因此, 该研究结果仅能说明 LSTs 的发生与细胞 Wnt/β-catenin/c-myc 这条信号通路有关。

参考文献:

- [1] Sobin L, Brierley JD, Gospodarowicz M, et al. Principles of cancer staging [M]. UICC Manual of Clinical Oncology. 9. John Wiley & Sons, Ltd. 2015.34-39.
- [2] Wang X, Li A, Guo Y, et al. ITRAQ-Based Proteomics Screen identifies LIPOCALIN-2 (LCN-2) as a potential biomarker for colonic lateral-spreading tumors [J]. Sci Rep, 2016, 6(1):28600-28608.
- [3] Matthaios D, Balgouranidou I, Karayiannakis A, et al. Methylation status of the APC and RASSF1A promoter in cell-free circulating DNA and its prognostic role in patients with colorectal cancer [J]. Oncol Lett, 2016, 12(1): 748-756.
- [4] Sanduleanu S, Siersema PD. Laterally spreading tumor through the magnifying glass: we only see what we know [J]. Endoscopy, 2016, 48(5):421-423.
- [5] Kawano K, Kawano R, Harada T, et al. Successful endoscopic submucosal dissection of a rectal laterally spreading tumor causing intussusception [J]. Gastrointestinal Endoscopy, 2017, 85(3):682-683.
- [6] Bauer AK, Umer M, Richardson VL, et al. Requirement for MUC5AC in KRAS-dependent lung carcinogenesis [J]. JCI Insight, 2018, 3(15):e120941-e120955.
- [7] Shi L, Wu YX, Yu JH, et al. Research of the relationship between β -catenin and c-myc-mediated Wnt pathway and laterally spreading tumors occurrence [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(2):252-257.
- [8] Snezhkina AV, Krasnov GS, Lipatova AV, et al. the dysregulation of polyamine metabolism in colorectal cancer is associated with overexpression of c-Myc and C/EBP β rather than enterotoxigenic bacteroides fragilis infection [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016:1-11.
- [9] Levi M, Prayogi G, Sastranagara F, et al. Clinicopathological associations of K-RAS and N-RAS mutations in Indonesian colorectal cancer cohort [J]. J Gastrointest Cancer, 2018, 49(2):124-131.
- [10] Sakai E, Fukuyo M, Matsusaka K, et al. TP53 mutation at early stage of colorectal cancer progression from two types of laterally spreading tumors [J]. Cancer Sci, 2016, 107(6): 820-827.
- [11] Sorski L, Melamed R, Matzner P, et al. Reducing liver metastases of colon cancer in the context of extensive and minor surgeries through β -adrenoceptors blockade and COX2 inhibition [J]. Brain Behav Immun, 2016, 58:91-98.
- [12] Matsukuma S, Murayama M, Utsumi Y, et al. Laterally spreading features of gastrointestinal stromal tumors: A clinicopathological study [J]. Oncol Rep, 2018, 39 (6): 2681-2687.
- [13] Albouys J, Geyl S, Charissoux A, et al. Counter-traction using clips and rubber banding for endoscopic submucosal dissection of a laterally spreading tumor involving a diverticulum in the colon [J]. Endoscopy, 2019, 23(5):156-157.
- [14] Cha PH, Choi KY. Simultaneous destabilization of β -catenin and Ras via targeting of the axin-RGS domain as a potential therapeutic strategy for colorectal cancer [J]. BMB Rep, 2016, 49(9):455-456.
- [15] Mao D, Qiao L, Lu H, et al. B-cell translocation gene 3 overexpression inhibits proliferation and invasion of colorectal cancer SW480 cells via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Neoplasia, 2016, 63(5):705-716.
- [16] Rennoll SA, Eshelman MA, Raup-Konsavage WM, et al. the myc 3' wnt-responsive element drives oncogenic myc expression in human colorectal cancer cells [J]. Cancers (Basel), 2016, 8(5):52-67.
- [17] Tögel L, Nightingale R, Chueh AC, et al. Dual targeting of bromodomain and extraterminal domain proteins, and WNT or MAPK signaling, inhibits c-MYC expression and proliferation of colorectal cancer cells [J]. Mol Cancer Ther, 2016, 15(6):1217-1226.
- [18] Baker AM, Van Noorden S, Rodriguez-Justo M, et al. Distribution of the c-MYC gene product in colorectal neoplasia [J]. Histopathology, 2016, 69(2):222-229.
- [19] Mansour MA, Hyodo T, Akter KA, et al. SATB1 and SATB2 play opposing roles in c-Myc expression and progression of colorectal cancer [J]. Oncotarget, 2016, 7(4): 4993-5006.
- [20] Rennoll S, Yochum G. Regulation of MYC gene expression by aberrant Wnt/ β -catenin signaling in colorectal cancer [J]. World J Biol Chem, 2015, 6(4):290-300.
- [21] Zhang P, Kawakami H, Liu W, et al. Targeting CDK1 and MEK/ERK overcomes apoptotic resistance in braf-mutant human colorectal cancer [J]. Mol Cancer Res, 2018, 16(3): 378-389.
- [22] Ni HB, Wang FY, Xu J, et al. Screening and identification of a tumor specific methylation phenotype in the colorectal laterally spreading tumor [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(11):2611-2616.