

復旦大學

本科毕业论文



论文题目：利用类器官模型探究 DKK2 对肠癌早期发生的影响

姓 名：林子桓 学 号：19307110308

院 系：生命科学学院

专 业：生物科学

指导教师：赵冰 职 称：教授

单 位：复旦大学生命科学学院

完成日期： 2023 年 5 月 11 日

利用类器官模型探究 DKK2 对肠癌早期发生的影响

完成人

林子桓

指导小组成员

赵冰 教授

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
一、前 言.....	1
1 肠癌的基本情况、分型与早期发生	1
1.1 肠癌基本情况简述	1
1.2 肠癌的分型与靶向治疗	2
1.3 肠癌的早期发生与癌变进程	4
2 Wnt 信号通路及其作用.....	6
2.1 Wnt 信号通路简述.....	6
2.2 Wnt 信号通路在发育和结肠癌中的作用.....	9
3 DKK2 简介	10
3.1 DKK2 对 Wnt 信号通路的双重调节作用	10
3.2 DKK2 在机体发育和癌症中的作用	11
4 类器官模型	12
二、材料与方法.....	13
2.1 实验材料	13
2.1.1 细胞与小鼠样品	13
2.1.2 宿主菌	13
2.2 实验试剂与耗材	13
2.3 实验仪器与设备	14
2.4 实验引物	15

2.4.1 基因扩增涉及引物	15
2.4.2 荧光定量 PCR 涉及引物	15
2.5 实验方法	15
2.5.1 基因扩增与质粒构建	15
2.5.2 细胞培养与转染	16
2.5.3 Western Blotting 蛋白免疫印迹实验	17
2.5.4 TOP-FLASH 双荧光素酶报告系统检测	18
2.5.5 小鼠小肠类器官的培养	19
2.5.6 逆转录实时荧光定量 PCR	20
三、研究结果	23
3.1 DKK2 基因的克隆与表达检测	23
3.1.1 DKK2 基因的克隆与分泌质粒构建	23
3.1.2 DKK2 基因的表达与活性检测	23
3.2 4-OHT 处理 APC ^{fl/fl} 小肠类器官条件的探究	24
3.3 DKK2 对肠癌早期发生类器官模型的影响	25
3.3.1 DKK2 对肠癌早期发生类器官模型基因表达的影响	25
3.3.2 DKK2 对肠癌早期发生类器官模型形态学指标的影响	27
四、讨 论	29
参考文献	32
致 谢	36

摘 要

肠癌是危害人类健康的重大疾病之一，其早期发生机制是肠癌早筛早诊的关键。DKK2 是一类 Wnt 信号通路的双重作用因子，在肠癌组织中表达量高，对其早期发生有潜在作用，但 DKK2 在肠癌早期发生过程中的作用却鲜为人知。

本文利用 LGR5-Cre; APC:f/f 小鼠肠道类器官建立了肠癌早期发生类器官模型，并用此模型探究 DKK2 对肠癌早期发生的作用。结果表明，DKK2 能够抑制早期肠癌组织 Wnt 信号通路活性，提高其干性，使类器官面积增大。本研究建立了肠癌早期发生的类器官模型，初步证明 DKK2 能够促进肠癌早期发生。

关键词：肠癌发生，DKK2，类器官，Wnt 信号通路

Abstract

Intestinal cancer is one of the severe cancers threatening human's well-being. The pathogenesis of intestinal cancer is crucial for screening and preventing it. DKK2 is a dual-functional regulator of the Wnt signaling pathway. Its expression in intestinal cancer is relatively high and it may have underlying function for intestinal carcinogenesis. However, what DKK2's function is in intestinal carcinogenesis remains elusive.

This research modeled intestinal carcinogenesis with LGR5-Cre; APC:f/f mice small intestine organoids and studied the function of DKK2 in this process. DKK2 could suppress the Wnt signaling and promote the stemness of early intestinal cancer. With DKK2, the area of the organoids increased. This research established the organoid model for intestinal cancer pathogenesis. And it preliminarily proved that DKK2 can advance intestinal cancer early pathogenesis.

Key words: Intestinal cancer pathogenesis, DKK2, Organoids, Wnt signaling

一、前言

1 肠癌的基本情况、分型与早期发生

1.1 肠癌基本情况简述

数十年前的人们不会想到，曾经发病率相对较低的肠癌^[1]，竟会在数十年经济突飞猛进之后，发展为最为重大的危害人类健康的疾病之一。根据世界卫生组织（World Health Organization, WHO）下属的国际癌症研究机构（International Agency for Research on Cancer）于 2020 年对全球各癌肿发生率和死亡率进行的统计（GLOBOCAN 2020），2020 年肠癌（含结直肠癌等）新增病例一百八十八万余人，占全球新发癌症总数的 9.8%，位居世界新发肿瘤排行的第三位；新增死亡则为九十一万余人，是全球新增因癌死亡人数的 9.2%，是夺走人类生命第二多的癌症^[2]。在 2009-2015 年间，肠癌总体五年生存率仅为 64%，对于患有特定类型肠癌的高龄患者，五年生存率更可能低至 10%^[3]，情况不容乐观。在发达国家中，由于吸烟等风险因素的控制和肠镜早筛的普及，肠癌的总体发病率近年有所下降，但却出现了肠癌年轻化的新趋势^[4]。另一方面，在发展中国家中，肠癌发病的增长趋势却仍未得到遏制^[4-6]。

我们如果再不采取措施，很有可能面临与数十年前人们相似的境况。若肠癌增长趋势持续，预计到 2040 年，全球新增肠癌病例将达到三百二十余万人，相比 2020 年增长了 63%，死亡数更是可能增长 73.4%，涨到一百六十余万之巨，而且这种增长趋势对于中国这样的发展中国家而言，只会更加严峻^[6]。因此，我们需要对这一曾经被忽视的癌症有更充分的认识。

DNA 是中心法则中“核心的核心”，基因组的不稳定性和表观遗传的重编程也已被列入癌症的里程碑性事件之一^[7]。因此，要解读肠癌的种种行为，也应该从其基因组和表观组的异常变化入手。约 60-65%的肠癌患者没有家族史，其癌变过程是由于获得性的体细胞突变或表观遗传异常^[4]。肠癌中的这些变化大体可分为三类：染色质不稳定性（Chromosomal Instability, CIN）、CpG 岛甲基化表型（CpG Island Methylator Phenotype, CIMP）和微卫星不稳定性（Microsatellite Instability, MSI）^[8]。染色质不稳定性是指染色质拷贝数的异常变化，例如染色质的非整倍性或多倍体化等现象，一般是由于有丝分裂检查机制的错误。CIMP 则

是在一些抑癌基因启动子区域内的 CpG 岛发生的高度甲基化，这种表观遗传修饰能够沉默这些抑癌基因的表达，从而促进癌症发生。顾名思义，MSI 指微卫星串联序列长度的变化，由 DNA 错配修复机制中的一些关键组分（例如 *MLH1*）发生的功能性突变导致^[4]。这些机制并不总是单兵作战，而是协同配合的关系，其中最为显著的联系当属 CIMP 与 MSI：CIMP 能够导致 DNA 错配修复基因的失活，进而促进 MSI 的进程，于是，高 MSI 肠癌中约 70%同时也具有高 CIMP 的指征^[9]。基因组中发生不同变异的肠癌患者的预后和药物敏感度也有所差异，也使得基因组特征成为了肠癌分子分型的重要特征之一。

1.2 肠癌的分型与靶向治疗

对于一个未知的事物，从林奈发展而来的学术传统让研究者们首先想到的就是对其分类。按照肠癌发生的部位，可以将肠癌简要分为发生在小肠和胰胆管壶腹区的、发生在阑尾的和发生在结直肠的肿瘤^[10]。其中前二者的病例都相对较少，对人类的危害性也相对较小，相关研究较为缺乏，因此难以进行讨论。相比之下，结直肠癌是最常见的癌症之一，每年新增病例数和新增死亡数均位居消化道肿瘤之首位，相关研究汗牛充栋，对于其分子机制和精细分型的讨论也更加充分。因此，如无特别指明，下文中所讨论的肠癌一般代指结直肠癌。从形态学和病理学的角度，WHO 又对结直肠癌做出了如下分类：先按恶性程度划分，可分为良性上皮肿瘤和恶性上皮肿瘤。良性上皮肿瘤按照其形态和发生机制可分为：结直肠锯齿状病变/息肉（Serrated lesions and polyps）、传统结直肠腺瘤（Conventional adenoma）和炎症性肠病相关性结肠癌（Inflammatory bowel disease-associated dysplasia）。恶性上皮肿瘤按其细胞来源也可划分为结直肠腺癌（Colorectal Adenocarcinoma）和结直肠神经内分泌肿瘤（Colorectal Neuroendocrine Neoplasms）^[10]。

在测序技术更新换代和人类全基因组测序诞生之后，单纯利用形态学指标来对肠癌进行分类已不能满足研究和临床需求，一系列以基因组和转录组数据为基础的肠癌分子分型研究就此诞生。其中最有影响力的当属 2015 年由领域内多名专家组成的联合会所提出的肠癌分子亚型共识（consensus molecular subtype, CMS）^[11]。综合 6 个对肠癌进行分子分型的独立实验，作者归纳了他们不同分型之间共同的表达谱特征和病理特征，将肠癌分为四种 CMS：CMS1（微卫星不

稳定性免疫型, *microsatellite instability immune*) 占 14%, 病理上表现为锯齿状病变, 一般分布于结肠近端^[12], 主要具有突变率高和强免疫激活反应的特点^[11]; CMS2 (传统型, *canonical*) 占 37%, 与上述传统结直肠癌病理特征相符, 特点为上皮来源, 有显著 Wnt 和 Myc 信号通路的激活; CMS3 (代谢型, *metabolic*) 占 13%, 同样为上皮来源, 但代谢紊乱, 主要表现为 *KRAS* 基因的突变; 还有 CMS4 (间质型, *mesenchymal*) 占 23%, 病理上也表现为锯齿状病变, 具有明显的 TGF- β 信号通路激活, 间质浸润和血管新生的特征也较为显著^[11]。从分子遗传的角度, CMS1 具有高 MSI 和高 CIMP 的特征, CMS2, 3 和 4 则都具有 CIN 高的特点, CMS2 和 4 表现为体细胞拷贝数变异 (*Somatic Copy-number Alteration*, SCNAs) 高, CMS3 的 SCNA 则相对较低^[12]。

这四种分类在临床上具有指导意义。CMS1 中具有早期 MSI 的类型占大部分, 相比于微卫星稳定型 (*Microsatellite stable*, MSS) 的肠癌患者预后更好^[12]。由于其基因组发生大规模的移码突变或碱基替换, CMS1 型的结肠癌会表达一些新蛋白和新肽段, 这些蛋白具有免疫原性, 因此, CMS1 型结肠癌患者一般对 PD-1 或 PD-L1 等免疫检查点抑制疗法敏感^[13]。CMS2 确诊时一般处于较晚期, 一般采取化疗的手段^[12]。CMS2 也是四种肠癌分子亚型中平均五年生存率最高的^[11]。CMS3 的基因表达谱是四种分子亚型中与正常结肠最为接近的^[12]。因为它 *KRAS* 的突变, 其在化疗之后可能更易复发, 预后也较差。未来, 针对该亚型的靶向治疗可能会围绕其特异高表达的基因 (例如 *HER2*) 和其代谢紊乱的特征来进行研发^[12]。CMS4 的预后最差, 五年生存率最低, 诊断时一般处于进展后期^[12], 目前其治疗靶点主要是一些其特异性突变的基因, 例如 *BRAF* 和 *PI3CA* 等, 由于其血管生成更加活跃, 因此血管生成素抑制相关疗法也可能使患者获益^[13]。

近年来, 随着单细胞组学技术的发展和肿瘤生态系统概念的提出, 肿瘤中的间质细胞和免疫细胞组分越来越得到重视, 与之相关的分子分型也逐渐进入研究视野。Khaliq et al. 指出, 以上分型主要是基于组织总转录组测序, 其中的基质细胞可能会掩盖肠癌中其他细胞内的一些关键表型特征, 给分型的临床应用带来了不确定性^[14]。为解决这一问题, 利用单细胞测序技术, 研究者发现 Wnt 信号通路的激活和血管新生信号的加强在不同 CMS 的肿瘤的上皮细胞中都存在, 在 CMS 之间没有显著性差异。作者进一步指出, 与其说每一肠癌患者归属于某一

分立的分子分型，不如说他们的各方面表型都可以映射到一个肠癌表型的连续谱上，革新了现有的分子分型理念^[14]。

1.3 肠癌的早期发生与癌变进程

上述研究专注于肠癌的分型，可以划分为“共时性”研究，专注于一个系统中不同要素之间的联系与区别。而肠癌研究中还有一种非常重要的研究思路，也就是与共时性相对的“历时性”研究，也就是对肠癌的起源与癌变进程进行阐述。那么肠癌从哪里来，又是如何一步一步演变成癌症的呢？

欲论肠癌，必先由正常肠道说起。正常成人肠道具有隐窝和绒毛，由胚胎时期的一层假复层上皮发育而来^[15]。在隐窝底部分布着 3-4 个肠道干细胞(Intestinal Stem Cell, ISC)，它们具有 $Lgr5^+$ 的特征^[16]，能够自我更新并分化成为潘氏细胞(Paneth cell)、肠上皮细胞(enterocyte)、杯状细胞(goblet cell)和肠内分泌细胞(enteroendocrine cell)等所有种类的肠道细胞^[15, 16]。由于 $Lgr5$ 受到 Wnt 信号调控，为维持 ISC 的干性(stemness)，肠道隐窝附近的其他细胞分泌了各种胞外信号，形成了一个干细胞龛(stem cell niche)，维持 ISC 的高 Wnt 信号激活水平^[17]。

由于 ISC 与肠癌肿瘤细胞一样都具有高 Wnt 信号通路激活水平，人们首先提出，ISC 可能是肠癌的源细胞(cell-of-origin)。实验结果也证明了这种想法，在 $Lgr5^+$ 的 ISC 中特异性敲除 *APC* 基因，能够导致小鼠体内小肠和结肠腺瘤的发生^[18]。研究者进一步提出， $APC^{-/-}$ ISC 是通过干细胞龛演替(niche succession)、单克隆转化(monoclonal conversion)和隐窝分裂(crypt fission)三步，逐渐在隐窝中建立起竞争优势，从而导致癌症的发生^[19]。尽管肠道隐窝底部的干细胞微环境可以支持几个不同的 ISC，但 *APC* 突变的 ISC 会获得竞争优势，进行几次对称分裂之后，单一的 ISC 就可能成为这一生态位的“优势种”，占据主导地位。这一现象称为干细胞龛演替。在这一演替之后，单一 ISC 的子细胞会逐渐充满整个隐窝，最后一个隐窝从上到下均为单克隆细胞，也就是所谓的单克隆转化。最后，一个隐窝会发生隐窝分裂而形成多个隐窝，于是单一 ISC 的后代群体在肠道上皮中不断扩大，最终造成区域性癌变(field cancerization)，促成肠癌发生^[19]。这一由 *APC* 基因突变而引发的单克隆腺瘤在家族性腺瘤性息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP)患者中广泛存在^[20]，进一步从临床角度验证了干细

胞演替的存在。

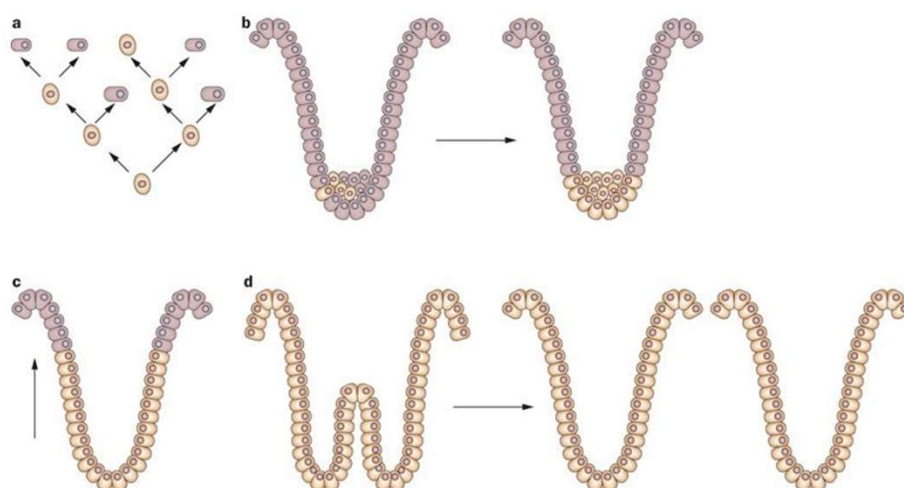


图 1. 干细胞龛继承、单克隆转化和隐窝分裂示意图^[19]

(a)干细胞可对称分裂为两个干细胞，或不对称分裂为一个干细胞和一个子细胞；(b)由于干细胞两种分裂方式的存在，单一干细胞可能会主导结肠干细胞龛，称为干细胞龛继承；(c)干细胞龛继承导致单一干细胞的子代会自下而上（如箭头所示）充满整个隐窝，也就是单克隆转化；(d)一个隐窝可能由下至上分叉为两个独立的隐窝，经过隐窝分裂后，单一干细胞来源的细胞可以扩散到邻近隐窝

但肠癌源细胞并不一定是 ISC。虽然在非干细胞中敲除 *APC* 不能形成肿瘤，仅能形成一些微囊肿^[17]，但如果这些突变持续，再加上肿瘤微环境的改变，非干细胞也可能成为癌症的源细胞^[21]。由于源细胞的 DNA 甲基组特征在肠癌细胞中能够得到保留，DNA 甲基化特征也为我们判断肠癌源细胞提供了新的证据。通过分析不同肠癌样本的甲基化组，Bormann et al.发现肠癌源细胞既有干细胞，又有非干细胞^[22]。值得注意的是，肠癌中的癌症干细胞（cancer stem cell）已被发现^[23]，近年来有关于癌症干细胞的研究也是进展迅猛，但是癌症干细胞和癌症源细胞的概念并不相同，它们之间是既不充分也不必要的关系^[19]。

源细胞分裂增殖之后一般会形成良性增生——肠息肉，这是肠癌癌变过程中的一个重要的里程碑性事件^[4]。一般而言，这类肉眼可见、边缘清楚的增生发展为肠癌需要 10 年时间^[24]，这为肠癌的预防和早治疗提供了一个宝贵的时间窗口。

那么肠癌是如何从一个息肉发展为恶性程度高的肿瘤的呢？这一过程大致可分为三类：腺瘤-癌序列（adenoma-carcinoma sequence）、锯齿状病变（serrated pathway）和炎症性病变（inflammatory pathway）^[4]。在腺瘤-癌序列中，结肠癌的前体是腺瘤，其通过一种逐步渐进的突变累积过程，从正常细胞一步步演变到腺瘤，再进一步演进形成肠癌。这是肠癌癌变最经典的一种解释方式，也适用于

大部分的肠癌。

在这一过程中，首先发生的一般是 *APC* 基因的突变，它是 Wnt 信号通路的重要抑制性组分，在肠癌演进过程中起到“守门员”的作用（关于 *APC* 基因和 Wnt 信号通路的相关介绍详见下文）。随后，癌基因 *KRAS* 的突变进一步促进了腺癌的生长。*KRAS* 的突变在许多肠癌病例中都与 PI3K 酶的其中一个催化亚基 *PIK3CA* 的功能增强突变相关，这一基因的突变能够提高 PI3K 的活性，促进前列腺素的合成^[25]，还能够抑制一些凋亡相关的蛋白的合成，最终使得肠癌细胞免于凋亡。*PIK3CA* 的突变一般出现于腺瘤-癌序列的晚期^[26]。不仅如此，*KRAS* 基因的突变还导向 *TP53* 抑癌基因的突变，使得肠癌癌变愈演愈烈^[4, 26]。在这些癌基因的突变中，*APC* 突变的作用似乎强于其余二者。有研究表明，在体内结直肠癌细胞中恢复 *APC* 基因的水平，即使在 *KRAS* 和 *TP53* 基因的突变仍然存在的情况下，肠癌细胞也同样能够回补恢复为正常的肠道上皮细胞^[27]。

与腺瘤-癌序列不同，锯齿状病变来源于锯齿状腺瘤，与之相关的发育信号通路则为 MAPK 信号通路，其主要是由于癌基因 *BRAF* 的突变，导致细胞增殖速度加快，从而导致癌变的发生^[26]。三种癌变途径中最为特殊的当属炎症性病变。它的形成原因并不是直接由于某一经典信号通路的突变，而是与炎症性肠病（Inflammatory Bowel Disease, IBD）导致的长期慢性炎症有所关联。另一个显著差异是，前两种经典癌变途径都是由某一边界清晰的前体异常增殖演变而来，而炎症性病变却来源于粘膜层的多病灶增生^[4]。这也使得炎症性病变更加隐蔽，难以被传统肠镜检测到，需要通过高分辨率内窥镜检查等方式才能发现。*TP53* 基因的突变是炎症性病变型肠癌的早期事件，而 *APC* 基因的突变则可能仅出现在少数晚期的此类肠癌患者身上^[28]。

2 Wnt 信号通路及其作用

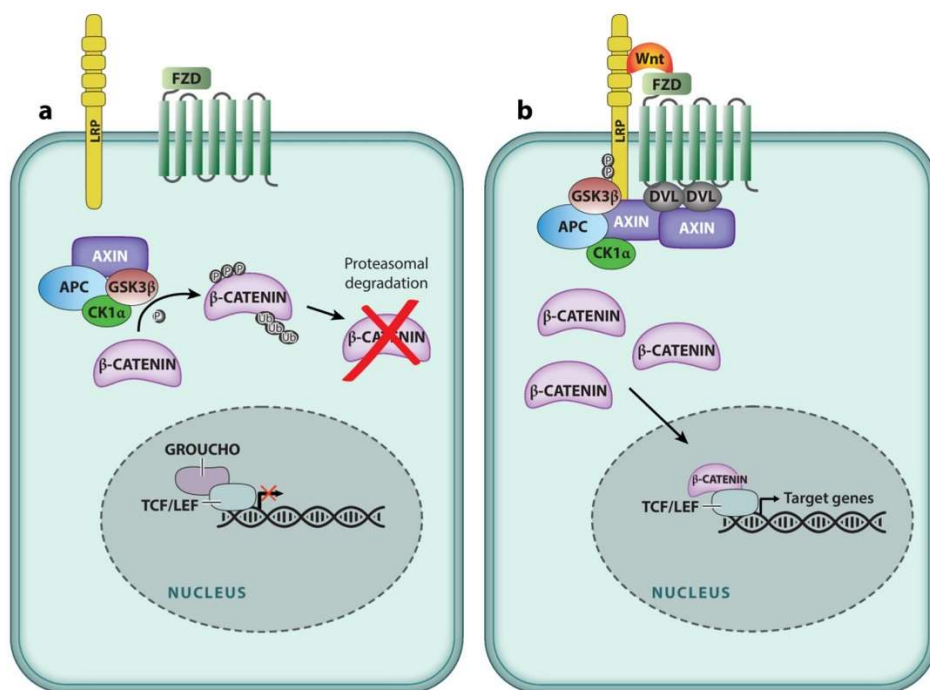
2.1 Wnt 信号通路简述

Wnt 信号通路是最重要、最保守的发育信号通路之一^[29, 30]。从单细胞到多细胞，不同细胞之间需要协调一致，而 Wnt 信号通路就在这一过程中扮演了非常重要的角色^[31]。传统认为，Wnt 下游主要作用元件为 β -catenin（基因名为 *CTNNB1*），它是一种转录因子，参与介导多种 Wnt 靶基因的转录激活。随着研究的进一步深入，越来越多下游不依赖于 β -catenin 的 Wnt 信号通路被发现，称为非经典

Wnt 信号通路 (non-canonical Wnt signaling), 这些非经典的 Wnt 信号通路不在本文的讨论范围之内。

Wnt 信号通路的一般作用机制如图 2 所示。当无 Wnt 配体结合时, 细胞质内的糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK3 β) 会和酪氨酸激酶 1 α (casein kinase 1 alpha, CK1 α)、体轴抑制蛋白 (axis inhibition protein, AXIN) 和 APC 一起形成降解复合体 (destruction complex), 这一复合体可以结合 β -catenin, 再由 GSK3 β 在 β -catenin N 端的丝氨酸和苏氨酸残基上加上磷酸化修饰。这些磷酸化修饰亦被称为降解决定子 (degron) [29], 它们能被 E3 泛素连接酶的一个亚基 β -TrCP 识别, 由此将 β -catenin 引向蛋白酶体途径降解。

当 Wnt 配体与膜上的 Frizzled (FZD) 和其共受体低密度脂蛋白受体相关蛋白 DKK2 (low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6, LRP5/6) 结合时, LRP5/6 胞内段会发生磷酸化^[31], 并招募寡聚化的 Dishevelled (DVL) 到膜上与 FZD 结合。于是, AXIN 与磷酸化的 LRP5/6 和膜上的 DVL 结合, 将降解复合体锚定到膜上, 使其不能发挥磷酸化降解 β -catenin 的功能。胞内游离的 β -catenin 不断聚集, 就这样获得了进入核内的机会, 其在核内与 T 细胞因子 (T cell factor, TCF) /淋巴增强子结合因子 (lymphoid enhancer-binding factor, LEF) 转录因子家族结合, 调控下游多种 Wnt 靶基因的转录。



Rim EY, et al. 2022
Annu. Rev. Biochem. 91:571–98

图 2. Wnt 信号通路总览^[31]

(a) Wnt 配体未结合时，骨架蛋白 AXIN 和 APC 协助激酶 CK1 α 和 GSK3 β 将胞质内的 β -catenin 磷酸化，导致其泛素化降解。由于核内 β -catenin 浓度较低，转录抑制因子阻止 Wnt 靶标基因的转录；(b) 当 Wnt 配体与胞外共受体 FZD 和 LRP 结合时，LRP 受体发生磷酸化，招募 DVL 和 AXIN 到膜上，阻止它们磷酸化 β -catenin。胞质内累积的游离 β -catenin 进入核内，与 TCF/LEF 转录因子互作激活 Wnt 靶标基因表达

在 Wnt 信号通路之中，APC 起到承上启下的重要作用。值得注意的是，Wnt 信号通路与疾病之间的直接联系最早就来源于 APC 基因^[30]。APC 基因全称为腺瘤性结肠息肉病基因 (adenomatous polyposis coli)，顾名思义，其最早就是在 FAP 遗传家系中发现的一种遗传病基因，后来发现其与 β -catenin 存在相互作用，这才进入 Wnt 信号通路作用元件的范围。APC 蛋白含有三个 AXIN 结合基序，散布在一系列结合 β -catenin 蛋白的重复序列中^[29]。APC 和 AXIN 共同作为骨架蛋白，把 GSK3 β 和 β -catenin 牵引到一起，在 Wnt 信号未激活时确保 β -catenin 得到降解。一种结肠癌中常见的 APC 截断突变能够减弱其与 AXIN 和 β -catenin 互作的能力^[32]，使得结肠癌细胞中的降解复合体不能很好地招募 β -catenin，最终导致细胞内 Wnt 信号通路的持续激活。

Wnt 信号通路受到很多水平的调节, 其中胞外针对 Wnt 受体的激活或抑制是极为重要的一环。天然 Wnt 激动剂或拮抗剂广泛参与了一系列 Wnt 相关发育过程, 如体轴建立和血管新生等^[33], 使得 Wnt 信号能够精准无误地在各个部位发挥作用。Wnt 配体激活 Wnt 信号通路需要同时与 FZD 和 LRP 受体结合, 因此, 体内一些仅与 FZD 或 LRP 二者之一的蛋白就成为了 Wnt 信号通路的拮抗剂。这类型的 Wnt 抑制剂包括 Dickkopf (DKKs) 家族和 Sclerostin 蛋白^[31]。另一类 Wnt 抑制剂则主要是降低胞外基质内有活性的游离 Wnt 含量, 主要包括分泌型 Frizzled 相关蛋白 (Secreted Frizzled-related proteins, sFRPs)、Wnt 抑制因子 1 (Wnt inhibitory factor 1, WIF1) 和 Notum^[33]。这些分泌性 Wnt 调节因子精密协同配合, 以维持 Wnt 信号通路的时空精准表达。

2.2 Wnt 信号通路在发育和结肠癌中的作用

如前所述, Wnt 信号通路是重要的发育信号通路之一, 故而其最重要的作用就体现在胚胎发育过程中。简而言之, Wnt 信号通路在早期胚胎发育过程中是体轴形成的重要调控因子, 在多种物种中参与决定早期胚胎的背-腹轴和前-后轴^[34], 是早期胚胎中 Spemann 组织中心 (Spemann Organizer) 的主效作用因子之一^[35]。Wnt 还参与调控胚胎干细胞的细胞命运决定过程, Wnt 和其下游 β -catenin 的水平高低是胚胎干细胞自我更新或分化的重要决定因素^[34]。在成体中, Wnt 信号通路则主要参与成体组织稳态维持过程, 作为干细胞龛组分, 负责维持干细胞增殖与自我更新的能力。其中, Wnt 信号在小肠干细胞中的作用研究得尤为透彻。Wnt 信号通路的强度沿隐窝至绒毛从下至上呈梯度分布, 底部 Wnt 信号最强, 由下至上逐渐衰减^[36]。结肠类器官的培养必须依赖于体外额外添加的 Wnt 配体^[37], 这也从侧面说明了 Wnt 信号对于肠道上皮稳态维持的重要性。

Wnt 在正常发育和组织稳态维持过程中主要是作为一种激活性的力量: 维持细胞的干性, 促进细胞的增殖。在癌变的过程中, 癌细胞可能利用这种力量来促进自身的增殖, 这也就是为何增殖性信号通路的组成性激活被列入了肿瘤的里程碑性事件之一^[7]。在结肠癌中也如前所说, Wnt 信号关键因子 APC 基因的突变导致了 Wnt 信号的持续激活, 使得肠癌细胞增殖加强, 干性提高, 引向早期癌变。但 Wnt 信号通路在肠癌中的作用不限于此, 它还广泛参与了结肠癌对自噬和凋亡的抵抗和代谢谱的重塑, 影响了结肠癌组织内的炎症反应和微环境构成,

几乎参与到了肠癌癌变的方方面面中^[38]。最为值得注意的是, *APC* 基因突变的 ISC 会分泌 Wnt 信号通路抑制剂, 如 DKK2、NOTUM 和 Wif1 等^[39], 其中以 Notum 最为重要^[40]。这些 Wnt 信号抑制剂能够抑制其他野生型细胞的生长和增殖, 从而使得 *APC* 突变的 ISC 在竞争中占据有利地位, 成为所谓的“超级竞争者”, 进一步促进肠癌早期发生的过程^[39, 40]。

Wnt 信号通路不仅参与肠癌肿瘤细胞的各种行为, 还作为其“党同伐异”的一种因素, 作用于肠癌早期癌变的过程中。因此厘清 Wnt 信号通路调节因子在肠癌早期发生中的作用不仅能够帮助我们更好地理解肠癌, 还能够为肠癌的早发现早治疗提供参考, 为肠癌靶向治疗竖立新的靶点。

3 DKK2 简介

3.1 DKK2 对 Wnt 信号通路的双重调节作用

Dickkopf2 (DKK2) 是分泌型 Wnt 拮抗糖蛋白家族 DKKs 的成员, 一般认为其可以通过与 Wnt 受体 LRP6 结合, 抑制 Wnt 信号通路^[33]。其包括两个富含半胱氨酸的结构域, 其中 C 端结构域 DKK2C 能够与 LRP6 结合, 而 N 端结构域则起到调节 DKK2 功能的作用^[41]。但与 DKK1 不同, DKK2 不仅只有抑制 Wnt 信号通路的功能, 还能够在某些情况下激活 Wnt 信号通路, 是除 Wnt 蛋白外发现的第一个 Wnt 信号通路配体^[33, 41, 42]。DKK2 既可能激活 Wnt 信号通路, 也可能抑制 Wnt 信号通路。

DKK2 这一双重作用特点与一种含 Kringle 结构域的单次跨膜蛋白 KREMEN2 (KRM2) 有关。当细胞中表达 KRM2 时, KRM2 能够与 DKK2 和 LRP6 形成三元复合物, 促进 LRP6 的内吞, 从而抑制 Wnt 信号通路作用; 但当细胞中不表达 KRM2 时, DKK2 却能够通过其 C 端结构域与 LRP6 结合, 激活 Wnt 信号通路^[43]。然而, DKKs-KRM2 的结合在正常组织稳态维持和癌症进程中起到的作用尚缺乏研究, 其下游的分子机制还有待挖掘。

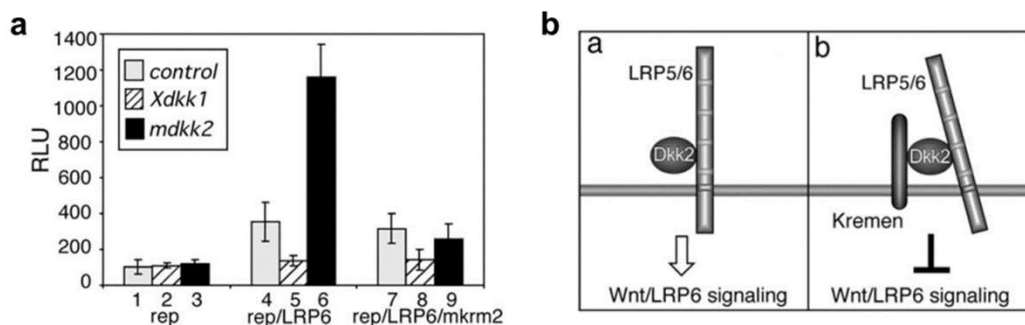


图 3. DKK2 对 Wnt 信号通路的双重作用^[43]

(a) *TOP-FLASH* 双荧光素酶报告实验检测 10 龄爪蟾胚胎 Wnt 信号通路激活水平；
(b) DKK2, KRM2 和 LRP5/6 之间功能关系示意图，当没有 KRM2 时，DKK2 与 LRP5/6 结合，激活 Wnt 信号通路；当有 KRM2 时，DKK2、KRM2 和 LRP6 形成三元复合体，抑制 Wnt 信号通路

3.2 DKK2 在机体发育和癌症中的作用

不同于同一家族的 *DKK1*，*DKK2* 突变的小鼠并不会胚胎致死^[33]，而是会导致小鼠眼角膜细胞分化异常，在眼球表面产生类似于皮肤上皮组织的结构^[44]，造成失明。这说明 *DKK2* 除在特定组织区域的特定时期发挥功能之外，对于机体总体的胚胎发育无显著影响，也就使得 *DKK2* 相关药物相比于 *DKK1* 的特异性可能更好，安全性更高。

DKK2 对于 Wnt 信号通路的双重调节作用使得其在不同组织的发育过程中表现出了双重作用：一方面，在爪蟾胚胎中注射 *DKK2* mRNA 可以导致体轴的重复，与注射 Wnt8 的表型相类似^[45]；另一方面，*DKK2* 也在成骨细胞矿质化^[46]、早期心脏发育^[47]和成体毛囊干细胞的维持^[48]中表现出对于 Wnt 信号通路的抑制作用。

DKK2 在发育过程中的两面性最为明显地表现在神经嵴的发育过程中。在神经胚形成期，*DKK2* 与 Wnt8 协同激活 Wnt 信号通路，诱导神经嵴前体细胞的产生^[49]；在器官形成期的眼球发育过程中，*DKK2* 又参与视杯前端分泌的视黄酸对 Wnt 信号通路的抑制，促进神经嵴细胞分化为角膜^[50]。对于同一种细胞（神经嵴细胞），*DKK2* 在不同的发育阶段中对 Wnt 信号通路却产生了相反的作用，进而表现出不同的功能。

与发育类似，*DKK2* 的表达量在肿瘤中也呈现出两种截然不同的状态：在尤因氏肉瘤（Ewing's cancer）和结肠癌中表达量上升，但是在胃肠癌、肾癌和卵巢癌中其表达量却有所下降^[42]。

在结肠癌中 *DKK2* 的作用研究得相对深入。结肠癌中 *APC* 基因或 *PTEN* 基因的突变导致 *DKK2* 基因表达量的上调^[51, 52]。对肿瘤细胞本身，上调的 *DKK2* 不仅能够促进 *LGR5* 的表达从而促进表达肿瘤干细胞的生成^[52]，还能够抑制肿瘤的凋亡而促进肿瘤进程。与此同时，*DKK2* 还可以分泌到细胞外而作用在 NK 细胞上，通过与其细胞膜上的 LRP5 互作而阻止 IL-15 通路中 pSTAT5 的入核，从而抑制 NK 细胞的作用而改变肿瘤免疫微环境^[53]。也有研究发现 *DKK2* 能够

加速结肠癌细胞的无氧糖酵解，从而促进结肠癌肿瘤的血管生成并促进其转移^[54]。但上述研究主要限于 DKK2 在肠癌中后期肿瘤内部的作用，对于 DKK2 在肠癌早期发生过程中的作用还尚未有人报道。

4 类器官模型

较之小鼠更为方便快捷，比起细胞又更能模拟体内环境，类器官模型作为体外模拟器官结构与功能的有效模型，愈来愈广泛为研究者们所用。究其本源，类器官是一种由干细胞体外培养而来的体外三维立体结构，由器官特有的细胞类型经细胞选择和谱系定向而自组装形成^[55]，能够反映器官的重要特征。近年来，各种组织与器官的类器官模型层出不穷，类器官不仅被用于有关于发育的基础研究，还被应用在精准医疗^[55]和器官移植^[56]等领域，类器官相关研究正呈如火如荼之势。

在癌症研究领域，类器官模型也同样具有极高的应用价值。在类器官兴起之前，研究者主要通过肿瘤细胞细胞系和患者来源肿瘤异种移植模型（Patient-derived Tumour Xenografts, PDXs）来研究肿瘤，然而，从患者来源组织建立这些模型的过程费时费力，而且这些模型并不适用于所有患者，效率相对较低。类器官模型的建立与培养相对简单，可长时间传代，冻存后仍能保持患者肿瘤遗传和表型稳定性^[57]，因此也广泛应用于癌症相关基础研究和临床试验当中。

本研究即希望通过对类器官的体外诱变处理，来建立肠癌早期发生的体外模型，并利用此模型来研究 DKK2 对于肠癌早期发生的作用，评估其对诱变后类器官特征基因表达水平与形态学指标的影响。

二、材料与amp;方法

2.1 实验材料

2.1.1 细胞与小鼠样品

细胞

HEK293T, 购自 ATCC 公司。

小鼠

B6.Cg-*Apc*^{tm2Rak} 小鼠, 品系编号 01XAA, 购自 NCI Mouse Repository.

2.1.2 宿主菌

DH5 α , 购自擎科公司。

2.2 实验试剂与耗材

表 1 实验所设试剂与耗材列表

试剂/耗材名称	厂家品牌
Phanta 高保真酶	Vazyme
FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit	Vazyme
ClonExpress II One Step Cloning Kit	Vazyme
2 $\times$ Rapid Taq Master Mix	Vazyme
Dual Luciferase Reporter Assay Kit	Vazyme
FastPure Plasmid Mini Kit	Vazyme
Vigofect	威格拉斯
微量样品总 RNA 提取试剂盒	天根
GoScript TM Reverse Transcription System	Promega
2x SYBR Green Mixture	Bimake
70um 细胞筛网	Falcon
Matrigel	Corning
0.5 M EDTA pH8.0	Invitrogen
Advanced DMEM/F12	Invitrogen
DPBS	Gibco
PBS	Gibco

B27	Gibco
DMEM	Gibco
FBS	Gibco
GlutaMAX-100	Gibco
N-acetylcysteine	Sigma-Aldrich
Nicotinamide	Sigma-Aldrich
Bovine Serum Albumin Fraction V	Sigma-Aldrich
EGF	R&D Systems
R-spondin1	伯桢
Noggin	Peprtech
β -巯基乙醇	Amresco
DNase I	Roche
Triton X-100	Sigma-Aldrich
His-Tag Monoclonal antibody	Proteintech
HRP 标记山羊抗兔 IgG	雅酶

2.3 实验仪器与设备

表 2 实验所设仪器与设备列表

仪器设备名称	厂家品牌
PCR 仪器	Bio-Rad
实时定量 PCR 仪	Bio-Rad
蛋白质电泳仪	Bio-Rad
水平电泳槽	Bio-Rad
化学发光成像系统	Bio-Rad
金属浴	天能
多功能酶标仪	Berthold
4°C 低温离心机	Thermo
37°C 恒温细胞培养箱	Thermo
Nanodrop2000	Thermo
普通倒置显微镜	尼康

2.4 实验引物

2.4.1 基因扩增涉及引物

表 3 基因扩增实验涉及引物序列表

名称	引物序列 (5'-3')
vec-DKK2-F	AGAAAATTGGTGGAGGTGGCAGTC
vec-DKK2-R	GCGGCCATGCTGCCGGCGGACACAAA
DKK2-F	CGGCAGCATGGCCGCGTTGATGCGGAG
DKK2-R	CTCCACCAATTTTCTGACACACATGGAGTCTGGCT

2.4.2 荧光定量 PCR 涉及引物

表 4 荧光定量 PCR 涉及引物序列表

引物名称	引物序列 (5'-3')
m-Gapdh-F	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
m-Gapdh-R	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
m-Lgr5-F	CGGGACCTTGAAGATTTTCCT
m-Lgr5-R	GATTCGGATCAGCCAGCTAC
m-Axin2-F	TGACTCTCCTTCCAGATCCCA
m-Axin2-R	TGCCCACACTAGGCTGACA

2.5 实验方法

2.5.1 基因扩增与质粒构建

扩增目的片段和载体时，使用 PCR 体系如下表所示（总体积为 30 μL ）：

表 5 基因扩增 PCR 实验体系

体系组分	含量 (μL)
10 μM 正向扩增引物	1
10 μM 反向扩增引物	1
5x SF Buffer	6
2.5 μM dNTP 溶液	1
Phanta 高保真 DNA 聚合酶	0.5
模板	以 cDNA 为模板时，补齐至 30 μL ； 以质粒为模板时，体积为 0.2 μL ，其余用 ddH ₂ O 补齐

扩增人源 DKK2 基因时，使用人结肠癌细胞系 HT29 反转录产生的 cDNA 作为模板；扩增表达载体时，以实验室已有 pcDNA3.1(+)质粒作为模板。

使用的 PCR 程序如下表所示，

表 6 基因扩增 PCR 程序

编号	PCR 阶段	温度	时间
1	预变性	95 °C	3 min
2	变性	95 °C	15 s
3	退火	60 °C（可调节）	30 s
4	延伸	72 °C	0.5 min/Kb
5	终反应	72 °C	10 min
6	保温	10 °C	forever

PCR 扩增时，退火温度根据引物适当调整，阶段 2-阶段 4 设置为循环反应。扩增 DKK2 基因片段时，循环次数设为 35 次；当扩增表达载体时，循环次数减少为 28 次。经过琼脂糖凝胶电泳检测后，将目的片段切下进行胶回收纯化，详细实验操作步骤参见胶回收试剂盒使用说明书。

随后通过 ClonExpress 试剂盒进行同源重组，连接 DKK2 基因片段与表达载体。将连接获得的质粒转染至 DH5 α 感受态大肠杆菌菌株中，均匀涂布在含有氨苄西林的筛选培养基上，37 °C 培养 8-10 小时。在培养基中挑出具有抗性的菌株，加入 4 毫升 LB 培养基，在 37 °C 摇床上扩大培养 6-7 小时，达到一定浓度后提交给测序公司进行测序验证。

2.5.2 细胞培养与转染

293T 细胞系在 37 °C，CO₂ 含量 5% 的细胞培养箱中培养。培养至细胞密度约为 60~80% 时可进行转染。转染前，将培养皿中残余的培养基更换为新鲜完全的 DMEM 细胞培养基。

首先配制质粒/Vigofect 转染混合液。根据需要转染细胞的量决定转染质粒质量，稀释至对应体积的生理盐水中，吹打混匀备用。细胞培养皿大小、转染质粒质量、需要 Vigofect 试剂的量与转染混合液体积对应关系如下表所示。

表 7 质粒转染试剂与细胞量对应关系表

培养板大小	质粒用量	质粒稀释液	Vigofect 用量	Vigofect 稀释	转染混合液
-------	------	-------	-------------	-------------	-------

	(μg)	体积 (μl)	(μl)	液体积 (μl)	总体积 (μl)
48 孔板	0.5	10	0.2	10	20
6 孔板	5	100	2	100	200

再将对应体积的 Vigofect 试剂稀释至生理盐水中，吹打混匀后短暂离心，室温静置 5 分钟，待 Vigofect 与溶剂充分混合。随后在质粒-生理盐水溶液中等体积缓慢加入 Vigofect 稀释液，再次吹打混匀并短暂离心，所得溶液室温静置 15 分钟。

静置结束后，再把对应体积的质粒/Vigofect 转染混合液贴壁缓慢加入每孔细胞培养基中，轻轻左右晃动混匀，在 5% CO₂, 37°C 细胞培养箱中转染 12 小时，再弃去含有转染试剂的培养基，将其更换为新鲜完全培养基。

2.5.3 Western Blotting 蛋白免疫印迹实验

蛋白样品的准备：转染细胞 24 小时后收取培养基，13,000 RPM 离心 5 分钟，吸取上清液，去除可能残留的细胞或细胞碎片。吸出 70 μl 上清液，加入 10 μl loading buffer，95 °C 金属浴 5~10 分钟，冷却至室温后备用。

1.5 mm 聚丙烯酰胺凝胶制备：先制备 10% 分离胶共 8 mL，其配方如下所示：

表 8 10%分离胶配方

组分	体积 (mL)
1 M Tris-HCl pH=8.8	3.04
30%丙烯酰胺混合液	2.72
10%过硫酸铵 APS	0.08
10% SDS	0.08
TEMED	0.004
ddH ₂ O	2.08
总体积	8 mL

待分离胶凝固后再配制 5% 浓缩胶共 3 mL，其配方如下所示：

表 9 5%浓缩胶配方

组分	体积 (mL)
30%丙烯酰胺混合液	0.5
1 M Tris-HCl pH=6.8	0.375

10%过硫酸铵 APS	0.03
10% SDS	0.03
TEMED	0.004
ddH ₂ O	2.065
总体积	3 mL

电泳：每个蛋白样品上样 15 μ l，蛋白 marker 用量 6 μ l，在 80 V 恒压条件下电泳 30 分钟，至样品与 Marker 完全进入分离胶后，再在 120V 恒压下电泳约 1 小时，至溴酚蓝条带接近分离胶底部，marker 条带完全分离时方可停止电泳。

转膜：用甲醇浸泡 PVDF 膜使其活化，按照负极→海绵垫→两张薄滤纸→聚丙烯酰胺凝胶→活化 PVDF 膜→两张薄滤纸→海绵垫的顺序依次排列放置为“三明治”结构，转膜槽中放入冰袋，在冰浴中 0.6 A 恒流转膜 90 分钟。

封闭：在 TBST 缓冲液中配制 5%脱脂牛奶（40 mL/膜），室温缓慢摇晃封闭一小时。

一抗孵育：用 TBST 缓冲液清洗 PVDF 膜，室温摇晃 5 分钟弃去，重复三次。将膜裁剪至适宜大小，加入一抗稀释液，4 °C 孵育过夜。

二抗孵育：用 TBST 缓冲液清洗 PVDF 膜，室温摇晃 5 分钟弃去，重复三次。随后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 1:5000 稀释液（5 mL/膜），室温孵育一小时，再在室温下用 TBST 缓冲液清洗三次，每次 5 分钟。

显色并成像：配制 ECL 显色液（A 液/B 液= 1:1），将 PVDF 膜在 ECL 显色液中浸泡反应 1 分钟，使用 Bio-Rad 化学发光成像系统进行成像，调节曝光时间至合适程度，拍照采集。

2.5.4 TOP-FLASH 双荧光素酶报告系统检测

该实验是通过在 293T 细胞系中转入两种含不同荧光素酶的质粒，其中一种含有 TCF/ β -catenin 结合位点，另一种的结合位点则突变失活。因此，用酶标仪检测这两种荧光素酶催化底物发出荧光的比值，便可反映 293T 细胞中 Wnt 信号通路被激活的倍数^[58]。在 48 孔板中铺入密度适宜的 293T 细胞，每组待测基因设置 3 个平行重复孔，以 3 孔为一组实验，一起配制质粒/Vigofect 转染混合液。其中质粒配方为：150 ng TOPFlash + 25 ng Renilla + 300 ng 待测基因 + 1025 ng 空载质粒 pcDNA3.1(+), 在生理盐水中稀释至总体积为 30 μ l，吹打混匀备用。

随后按照前述细胞转染的方法进行。每孔加入 20 μ l 质粒/Vigofect 转染混合液，转染 12 小时后换液。

用 ddH₂O 将 5 $\times$ Cell Lysis Buffer 稀释至工作浓度，在冰上备用。转染 48 小时后，弃去培养基，用 200 μ l/孔 PBS 缓冲液洗涤一次，加入 100 μ l/孔 1 $\times$ Cell Lysis Buffer，室温摇晃 10-15 分钟，至孔内出现白色絮状沉淀。

吸取 20 μ l 细胞裂解上清至 96 孔酶标板中，用多功能酶标仪自动先后吸取 Luciferase 和 Renilla 底物工作液，分别检测 Firefly luciferase 和 Renilla luciferase 在细胞裂解上清液中的含量，从而反映报告基因的活性。

2.5.5 小鼠小肠类器官的培养

小鼠小肠消化液的配制：在 DPBS 中配制 5 mM 的 EDTA 溶液，保存在 4 $^{\circ}$ C 中。

小鼠小肠类器官的配制：先配制 2 $\times$ 小鼠小肠类器官培养基，其配方如下：

表 10 2 $\times$ 小鼠小肠类器官培养基配方

培养基组分	终浓度
Advanced DMEM/F12	2 $\times$
B27	2 $\times$
GlutaMAX-100	2 $\times$
N-acetylcysteine	2 mM
Penicillin/Streptomycin	2%
EGF	100 ng/mL
R-spondin1	1000 ng/mL
Noggin	200 ng/ml

细胞转染对应质粒后 24 小时，收集培养基，4 $^{\circ}$ C，13,000 RPM 离心 5 分钟，去除细胞碎片，随后等量加入 2 $\times$ 小鼠小肠类器官培养基中，置于冰上备用。

小鼠小肠隐窝的分离：以 CO₂ 窒息法将小鼠安乐死后，用 75%乙醇对小鼠体表进行消毒，将小鼠腹部皮肤与体壁肌肉沿身体长轴剖开，在胃下端约 2 cm 处取十二指肠，约 5 cm 长，将其放置于事先冰上预冷的 DPBS 中。用眼科剪纵向剪开小鼠十二指肠，将组织浸泡在预冷 DPBS 中振荡洗涤 4-5 次；用手术刀片在肠道内壁轻轻刮动，以除去小肠上皮绒毛。再放置于提前倒好 5 ml DPBS 的

15 ml 离心管中，轻轻上下振荡，完全除去残余绒毛。最后，将组织浸泡在 5 ml 小鼠小肠消化液中，在 4℃冰箱内静置消化 35 分钟，期间每 10 分钟轻轻前后晃动小肠 2-3 次。

取出消化完毕的组织块，在 6 cm 培养皿中用弯头剪剪碎，重复剪约 200 次，以剪碎组织块大小不堵塞 1 ml 枪头为宜。吸取 1 ml DPBS，轻轻吹打组织块约 10 次，至液体微微浑浊，镜下能观察到已解离且完整的小肠隐窝为止。收集培养皿中液体，过 70 μm 细胞滤网，重复清洗几次，以将隐窝完全滤过。收集全部滤液，在 800 RPM 下离心 5 分钟，弃上清，沉淀即为小肠隐窝。

小肠隐窝的接种与培养：以 48 孔板每孔 15 μl Matrigel 轻轻重悬已预冷的小肠隐窝，把小肠隐窝-Matrigel 混合液接种摊布于 48 孔细胞培养板内，在 37℃细胞培养箱中静置 10 分钟。待 Matrigel 基本凝固后，向培养孔内添加 500 μl 小鼠小肠类器官培养基，周围添加 DPBS 以维持类器官湿润，每 3 天更换一次新鲜培养基。

2.5.6 逆转录实时荧光定量 PCR

类器官样品总 RNA 提取：将类器官孔板内的培养基弃去，加入 500 μl PBS 缓冲液，用枪头将类器官-Matrigel 混合物刮起，收集至 1.5 mL RNAase free 离心管内。转速 1000 RPM 离心 3 分钟，弃去上清，每孔加入 350 μl 已加入 1%β-巯基乙醇的 RL 裂解液，轻轻吹打裂解。随后用微量样品总 RNA 提取试剂盒提取类器官总 RNA，详细步骤参见试剂盒说明书。

反转录：用 Nanodrop 测量提取 RNA 浓度，再使用 Promega 公司的 GoScript™ Reverse Transcription System 反转录试剂盒进行 RNA 反转录。首先配制体系 1，总体积为 15 μl，组分如表 11 所示。70 °C 水浴 5 分钟，再冰浴至少 5 分钟。

表 11 逆转录实时荧光定量 PCR 体系 1 组分

组分	体积 (μl)
Random Primer	1
Oligo(dT) Primer	1
RNA 模版	0.5-1 μg
RNase Free Water	补齐至 15μl
总体积	15 μl

接着配制体系 2，组分如下表所示。将 10 μl 体系 2 与 15 μl 体系 1 混匀，总

体积为 25 μl 。

表 12 逆转录实时荧光定量 PCR 体系 2 组分

组分	体积 (μl)
GoScript™ 5× Reaction Buffer	5
PCR Nucleotide Mix	1
MgCl ₂	2
GoScript™ Reverse Transcriptase	1
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	1
总体积	10 μl

逆转录反应程序如下：

表 13 逆转录反应程序

反应温度	时间
25 °C	5 min
42 °C	1 h
70 °C	15 min
4 °C	forever

反应结束后，将所得 cDNA 溶液稀释 10 倍，用于后续实验。

实时荧光定量 PCR：使用 SYBR Green 进行荧光定量 PCR，每个样本设置三组平行重复。利用 Bio-Rad CFX-96 荧光定量 PCR 仪进行实验，并采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行统计分析。实时荧光定量 PCR 反应体系如下：

表 14 实时荧光定量 PCR 反应体系组分

组分	体积 (μl)
2× SYBR-Green Mix	10
实时荧光定量上游引物 (10 μM)	1.5
实时荧光定量下游引物 (10 μM)	1.5
cDNA 模版	7
总体积	20 μL

将体系放入仪器中，按如下程序运行，其中阶段 2-阶段 4 设置为循环反应，共循环 40 次。

表 15 实时荧光定量 PCR 反应程序

步骤	温度 (°C)	时间
1	95	5 min
2	95	30 s
3	60	20 s
4	72	20 s
5	72	5 min
熔解曲线		

三、研究结果

3.1 *DKK2* 基因的克隆与表达检测

3.1.1 *DKK2* 基因的克隆与分泌质粒构建

从人结肠癌细胞系 HT29 的 cDNA 中扩增得到结肠癌来源的 *DKK2* 基因序列，经测序无误后，连接到 pcDNA3.1(+) 质粒表达载体中。克隆得到的载体图谱如图 4(a) 所示。在 *DKK2* 基因 5' 端加上分泌信号肽 tPA 序列，使得表达产生的 *DKK2* 蛋白能够分泌到胞外发挥作用。再在其 3' 端加上 6×His 标签，便于后续表达检测。

3.1.2 *DKK2* 基因的表达与活性检测

pcDNA3.1(+)-*DKK2*-6×His 表达质粒构建完成后，将其转入 293T 细胞中，进行表达检测。收取转染后的 293T 细胞培养液上清进行 Western Blot 免疫印迹实验检测（结果如图 4(b) 所示），在转入 *DKK2* 表达质粒的细胞上清液中可以发现与 *DKK2* 蛋白大小相近的特异性条带，表明 *DKK2* 蛋白能够成功表达并分泌到细胞外。

为证明分泌产生的 *DKK2* 具有抑制 Wnt 信号通路的活性，我们进一步将不同质粒用量的 *DKK2* 表达质粒转染入 293T 细胞系中进行 *TOP-FLASH* 实验，以检测不同条件下细胞的 Wnt 信号通路激活倍数（如图 4(c) 所示）。结果表明，只加入 sWnt 时，细胞系中的 Wnt 信号通路能被激活 9 倍，而这一激活作用能够被 *DKK2* 蛋白完全抑制，而且抑制作用在转入 100 ng *DKK2* 表达质粒时就已达到饱和，恢复到与空白对照组相近的水平。其后再增加 *DKK2* 表达质粒的浓度，抑制作用无明显变化。综上，本实验中构建的 pcDNA3.1(+)-*DKK2*-6×His 表达质粒转入细胞后能够表达并分泌产生有活性的 *DKK2* 蛋白，可用于后续处理。

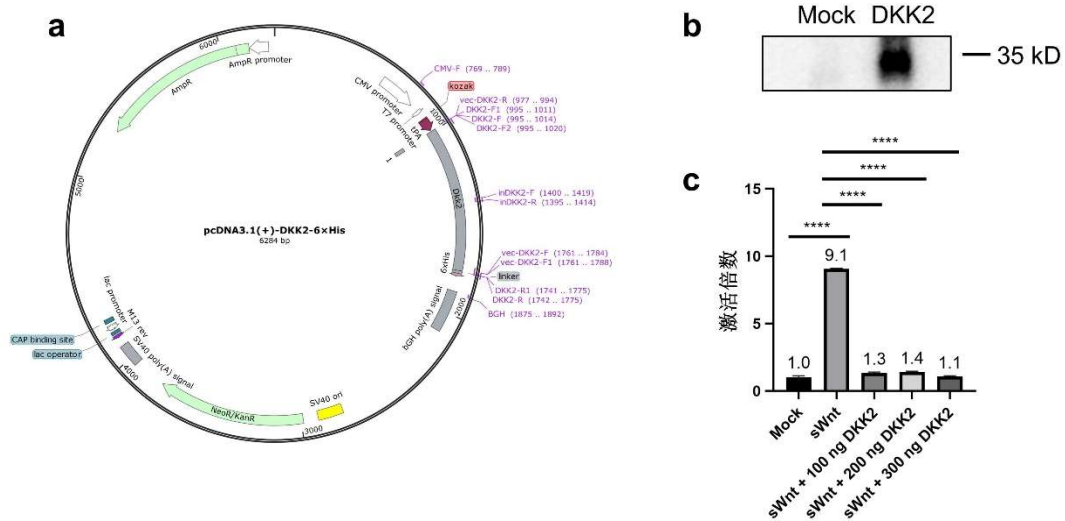


图 4. *DKK2* 基因的克隆与表达检测

(a)pcDNA3.1(+)-*DKK2*-6×His 表达质粒图谱;(b)用 Western Blot 检测 *DKK2* 表达, 其中 Mock 和 *DKK2* 分别表示转入空载质粒和 *DKK2* 表达载体质粒细胞培养液上清样品;(c)TOP-Flash 双荧光素酶报告实验验证分泌 *DKK2* 具有抑制 Wnt 信号通路活性, 其中纵轴表示各组样品相对于空白对照的 Wnt 信号通路的激活倍数

3.2 4-OHT 处理 *APC^{fl/fl}* 小肠类器官条件的探究

本实验中用到的 LGR5-EGFP-IRES-CreERT2;*APC*:f/f 小鼠 (下简称 *APC^{fl/fl}* 小鼠) *APC* 基因 flox 位点插入位置如图 5(a)所示。该小鼠 *APC* 基因 14 号外显子左右插入了 flox 序列, 于是在外加 4-羟基他莫昔芬 (4-OHT) 时, 该小鼠体内 *LGR5⁺* ISC 中就会表达 CreERT2 酶, 使得 flox 位点之间发生重组, 特异性编辑 ISC 中 *APC* 基因第 14 号外显子, 使得 ISC 中的 *APC* 失活, 进而模拟以 ISC 为源细胞的肠癌早期发生的过程。

由于后续实验涉及在体外对 *APC^{fl/fl}* 小鼠的小肠类器官进行的 4-OHT 处理, 为确定 4-OHT 处理的适宜浓度, 先进行了一项预实验(实验规划如图 5(b)所示)。原代培养 *APC^{fl/fl}* 小鼠小肠类器官 4 天, 待其出芽后传代, 并在此时分别加入浓度为 1 μ M、2 μ M 和 3 μ M 的 4-OHT, 处理 3 天后观察类器官生长状态, 并收取样本 RNA 以确认 *APC* 基因敲除效率。

经过 3 天不同浓度的 4-OHT 处理, 在明场下观察小肠类器官生长情况良好, 未发现提前变黑死亡的情况, 说明三种处理浓度均未达到类器官耐受阈值, 不会影响类器官活性。小肠类器官 *APC* 基因表达水平如图 5(c)所示, 小肠类器官中 *APC* 基因的表达水平均有显著下降, 是对照组类器官表达水平的 60-70%, 说明各个浓度的 4-OHT 都能够有效在 ISC 细胞中敲除 *APC* 基因。为使得 *APC* 基因

敲除得更为彻底，鉴于 3 μ M 的 4-OHT 并不会影响类器官生长活性，后续实验将采用预实验中得最高浓度 3 μ M 来处理小肠类器官。

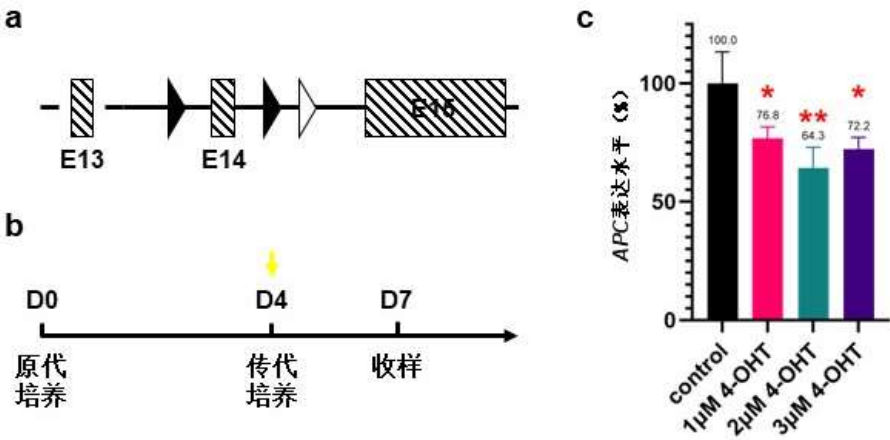


图 5. 4-OHT 处理最适浓度的探究

(a) $APC^{fl/fl}$ 小鼠 APC 基因 flox 位点插入位置示意图，其中 E13、E14 和 E15 分别表示对应编号的 APC 基因外显子；(b) 预实验方案，其中“D”表示培养天数，黄色箭头表示加入 4-OHT 时间；(c) 不同浓度处理条件下小肠类器官的 APC 基因表达水平

3.3 DKK2 对肠癌早期发生类器官模型的影响

3.3.1 DKK2 对肠癌早期发生类器官模型基因表达的影响

为模拟 DKK2 对肠癌早期发生的影响，本研究分别向正常的和用 4-OHT 处理的 $APC^{fl/fl}$ 小鼠原代培养小肠类器官加入正常培养基和表达 $DKK2$ 基因的培养基（如图 6(a)所示），培养 7 天后观察并提取样本 RNA 进行基因表达检测。首先检测类器官中 APC 基因的表达水平（图 6(b)），仅用 DKK2 培养基处理的类器官中 APC 水平出现了一定程度的下降，而用 4-OHT 处理的两组类器官中 APC 基因表达水平的下降程度更为显著，与对照组相比下降了近一半之多，比预实验处理的效果更好，说明该处理方式能够更高效地敲除 ISC 的 APC 基因。

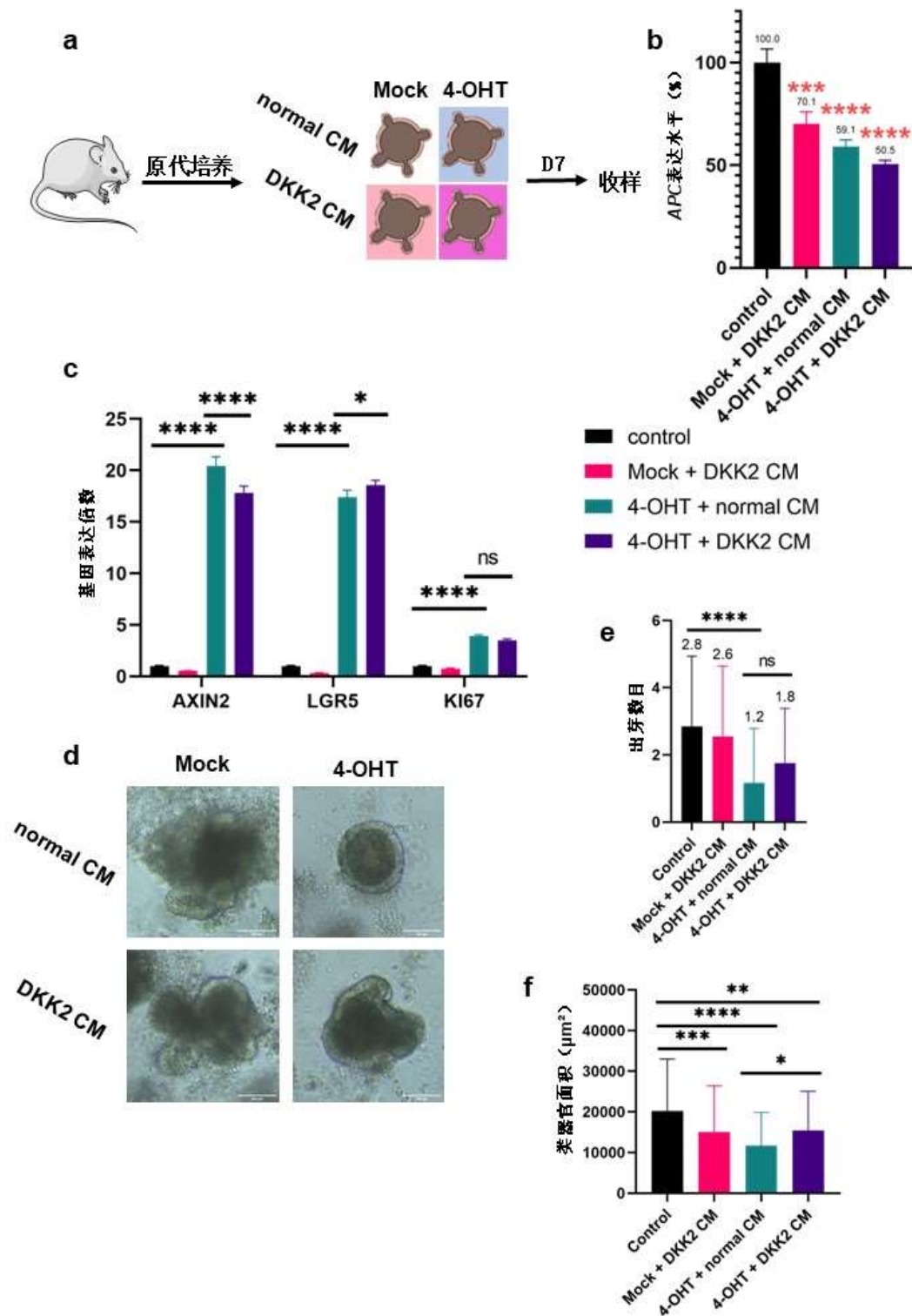


图 6. DKK2 对早期肠癌发生类器官模型的影响

(a)实验方案 (小鼠素材来自于 Servier Medical Art, 由 Servier 提供); (b)各组 APC 基因表达水平; (c)各组类器官 *AXIN2*、*LGR5* 和 *KI67* 基因表达水平; (d)各组类器官明场图片, 其中比例尺=100 μm; (e)-(f)各组类器官的平均出芽数目和平均面积

随后, 本课题进一步检测了不同条件下类器官 *AXIN2*、*LGR5* 和 *KI67* 基因的表达水平 (结果如图 6(c)所示)。*AXIN2* 是 Wnt 信号通路下游重要靶标基因, 其表达水平能够间接反映 Wnt 信号通路激活水平。仅加入 DKK2 的类器官 *AXIN2* 水平出现了下降趋势, 但未造成显著性差异。加入 4-OHT 的两组 *AXIN2* 基因表达水平相比于空白对照组均有显著提高, 表示 4-OHT 诱导的早期癌变能够激活类器官内的 Wnt 信号通路。其中加入 DKK2 的一组 *AXIN2* 表达水平有所下降, 说明在肠癌早期发生的条件下, DKK2 能够发挥 Wnt 信号通路抑制剂的作用。

LGR5 基因是 ISC 的标记基因, 其水平高低反应了肠道组织干性的强弱。4-OHT 处理的类器官的 *LGR5* 基因相比于对照均出现了大幅提升, 说明在体外诱导肠癌模型中, 类器官受诱导时干性会显著增强。相比于未加入 DKK2 的一组, 既加入 4-OHT 又加入 DKK2 的类器官 *LGR5* 水平有所升高, 说明 DKK2 可能与早期肠癌组织的干性的增加相关。

KI67 基因则表征了细胞增殖活性。*KI67* 基因的表达水平越高, 说明组织内细胞增殖的活性越强。受 4-OHT 诱导的类器官 *KI67* 基因水平明显提升, 说明体外诱导 *APC* 基因的敲除能够提高组织整体细胞增殖水平, 模型有效。然而, DKK2 和 4-OHT 共处理的类器官细胞增殖却与仅加入 4-OHT 组无显著差异。

由上可得, 4-OHT 处理后类器官 *APC* 基因表达水平显著降低, Wnt 信号通路激活水平上升, 干性和细胞增殖活性均相对增强, 说明 4-OHT 诱导的类器官模型能够模拟肠癌早期发生过程中的一些里程碑性事件, 具有一定有效性。而加入 DKK2 之后, 早期肠癌模型则出现了 Wnt 信号通路活性的下降和干性的增强, 但其细胞增殖水平却未见显著差异。

3.3.2 DKK2 对肠癌早期发生类器官模型形态学指标的影响

除对 DKK2 对肠癌早期发生类器官模型的基因表达水平进行观察外, 本课题还主要观察了不同处理下类器官的形态学表型, 如图 6(d)所示。未加入任何处理的类器官在第 7 天已出现大量出芽, 且中间开始变为黑色不透明; 仅加入 DKK2 的类器官同样表现为大量出芽, 表型与空白对照较为类似; 加入 4-OHT 后, 第 7 天的小肠类器官明显变为球形, 未出现出芽, 面积也相对较小; 同时加入 DKK2 和 4-OHT 的类器官则表现得较为“折中”, 出芽数量相对较少, 同时也有一些表现出了变圆的特征。

基于对明场下典型类器官的观察，受处理的类器官可能会在其类器官出芽数目（图 6(e)）和面积（图 6(f)）上表现出差异，于是本课题进一步对各组类器官的相应指标进行了统计。相比于空白对照，DKK2 组和加入 4-OHT 的两组类器官的面积均减小，其中加入 DKK2 和 4-OHT 的一组面积略大于仅加入 4-OHT 组。另一方面，加入 4-OHT 的相比于未加的类器官平均出芽数目更少，出现了变圆的趋势，而 DKK2 的加入使类器官在出芽数目方面却无明显变化。于是可以看出，相比于未诱变的类器官，用 4-OHT 处理的类器官在出芽的数目和面积方面均有差异，再次说明早期肠癌发生模型的有效性和用以上指标来衡量癌变程度的可行性。然而，DKK2 的处理对癌变类器官形态学表型的影响却弱于预期，仅在面积上表现出了一定的差异性。

综上所述，本研究选取了 *AXIN2*、*LGR5* 和 *KI67* 基因表达水平等分子指征，和类器官平均出芽数量和面积等形态学指标来多方面衡量体外诱导肠癌早期发生类器官模型的有效性，并借这些指标来衡量 DKK2 对于肠癌早期发生的影响。结果表明，加入 4-OHT 的类器官在各个指标上都表现出了显著差异性，说明模型构建有效。加入 DKK2 的组中，癌变类器官的 Wnt 信号通路活性减弱，组织干性增强，类器官面积增大。这说明 DKK2 对于结肠癌的癌变过程有一定促进作用，但在现有实验条件下这一作用表现得较弱。

四、讨 论

至此,本文先后通过 *DKK2* 高表达分泌质粒的构建、体外诱导癌变条件的摸索和 4-OHT 与 *DKK2* 对小肠类器官的处理,验证了用 4-OHT 处理 *APC^{fl/fl}* 小鼠小肠类器官模拟早期肠癌发生模型的有效性,观察了 4-OHT 与 *DKK2* 处理后各组小肠类器官 *AXIN2*、*LGR5* 和 *KI67* 基因表达水平以及类器官的面积和平均出芽数量,发现 *DKK2* 的处理能够抑制类器官 Wnt 信号通路,增强肠道组织干性,并在类器官层面上提高类器官的面积,说明了 *DKK2* 对于肠癌的早期发生具有一定的促进作用。

DKK2 对 Wnt 信号通路有双重调节作用,使得其成为研究 Wnt 信号通路与癌变过程关系的一个有趣的切入点。本文便试图以 *DKK2* 为例,进一步探究 Wnt 信号通路在肠癌早期发生过程中所起到的作用,最终发现 *DKK2* 能够起到促进癌变的作用,为 Wnt 信号通路促进肠癌发生机制增添了新的一环。鉴于目前已有将 *DKK2* 单克隆抗体开发为针对肠癌的靶向药物的尝试^[59, 60],本研究还可帮助阐明 *DKK2* 单克隆抗体治愈肠癌的作用机制,有利于 *DKK2* 靶点相关治疗药物的临床应用。

本课题首先是构建了一个有效的肠癌早期发生类器官模型。加入 4-OHT 后,类器官出现了 Wnt 信号通路水平上升,干性增强,细胞增殖能力增强和出芽数量减小等特征,这些特征一方面与现有对癌症癌变进程的认知相合,另一方面也与正常肠道类器官与肠癌类器官之间的区别相类似^[37]。在 *DKK2* 加入之后,正常的小肠类器官出现了 Wnt 信号通路活性下降的表型,这说明 *DKK2* 在小肠的稳态维持中还是主要以 Wnt 信号通路抑制剂的形式发挥作用,这与 *KRM2* 在小肠上皮组织中的表达相关^[61]。但 *DKK2* 对小肠类器官中 Wnt 信号通路的抑制程度并不显著,这也与前述研究中 *DKK2* 无法抑制正常结肠组织中的 Wnt 信号通路相吻合^[52]。由此可见,本研究中建立的肠癌早期发生类器官模型能够正确反映前人已探明的 *DKK2* 对于肠癌组织的一些作用,具有有效性。

这一模型的成立主要依赖于 4-OHT 对 ISC 中 *APC* 基因的特异性敲除,因此敲除的特异性是模型有效的重要前置条件。但实验中仅加入 *DKK2* 而未加入 4-OHT 的类器官也出现了 *APC* 基因水平的下调。这可能是因为在单独加入 *DKK2* 时,类器官生长的状态可能比未加时更差,面积有所下降,增殖速度和干性都呈

现下降趋势，这些因素都可能导致其细胞内 *APC* 基因表达水平的下降。

其次，本研究还尝试说明 *DKK2* 对于肠癌早期发生具有促进作用。对于加入 4-OHT 诱导癌变的类器官，加入 *DKK2* 后 Wnt 下游靶标基因 *AXIN2* 的组织总体表达水平下调，这也能够从侧面反应出 *DKK2* 对于肠癌癌变的促进作用：肠癌源细胞 *APC* 基因突变后分泌 *DKK2*^[39, 51, 52]，抑制其余正常细胞中的 Wnt 信号通路，从而使其在竞争中获得优势地位^[39, 40]。组织中 *APC* 基因发生突变的 ISC 仅占少数，其余大部分细胞为正常的小肠上皮细胞，因此加入 *DKK2* 后，总体 Wnt 信号通路激活水平下降。与此同时，在癌变的小肠类器官中加入 *DKK2* 后，其 *LGR5* 基因表达水平所示的干性有所提升，同时 *APC* 基因的表达水平也显示出了下降趋势，这一方面与前人对 *DKK2* 能够提高结直肠癌干性的研究暗合^[52]，另一方面也说明，在加入 *DKK2* 后类器官中癌变的 ISC 数目增多，使得总体的 *APC* 表达水平下降。这些现象都表明，*DKK2* 推动了肠癌的早期发生，在癌变细胞与野生型细胞的竞争中起到了一定的正面作用。

但是加入 *DKK2* 后表现出的差异性却弱于预期。在细胞增殖指标 *KI67* 基因的水平 and 类器官出芽数目上均未表现出差异性，形态上的差异也较弱。这首先可能是由于 *DKK2* 需要与其他 Wnt 信号通路抑制剂协同发挥作用，作为单一因子难以主导促癌过程^[39]，其次也可能是因为实验中选取的时间窗口不够适宜。由于 4-OHT 的处理时间越长，诱癌作用就越强，随着时间的推移，4-OHT 处理可能就会拉平 *DKK2* 所带来的差异，从而造成加入 *DKK2* 所造成的差异较小。而且体内癌变是一个漫长的过程，这反映在类器官上就说明，癌变的差异可能不会在一代内反映出来，细胞分裂竞争可能需要在传代几代之后才能决出胜负，这也可能导致 *DKK2* 所带来的差异较小。

本研究的创新点在于首次利用 *APC*^{fl/fl} 小鼠类器官模型探究了 *DKK2* 对于肠癌早期发生的作用。过去对于 *DKK2* 在肠癌中的作用的研究主要专注于 *DKK2* 在肠癌细胞内和肠癌进展过程中的作用^[52, 53]，对于 *DKK2* 在肠癌早期发生过程中的作用着墨相对较少，造模也多于小鼠体内。本实验中使用的类器官模型则更便于对癌变过程进行药物处理，同时更有利于对癌症发生过程的观察。而在 Wnt 信号通路抑制剂 Notum 促进肠癌早期发生的相关文章中，研究方法则为条件培养基处理类器官和类器官-类器官共培养^[40]。与之相比，直接对 *APC*^{fl/fl} 类器官进

行体外诱变则更能够反映体内早期癌变时真实的源细胞比例,与体内以 ISC 为源细胞的癌变过程更为相近。

然而,本研究也显示出了一定的局限性。首先,本研究中衡量的一系列指标,例如类器官总体基因表达水平和类器官的形态,均为组织总体水平的检测,由于本研究涉及类器官中 *APC* 突变和未突变两种细胞群体,仅观测总体组织指标可能会导致细分细胞类型的表型被掩盖。其次,本研究时间尺度选得较短,仅能够表现给药后短时状态,而未能体现体内长时慢性变化。针对这些局限性,未来应用这一模型的研究可能需要引用一些更为精细的实验方法来评估类器官癌变状态,这些实验方法包括但不限于免疫组织化学染色和单细胞测序等,以评估不同细胞群体对于处理的反应。另外,未来还可尝试将类器官再传代培养并持续处理,以观察处理在更长的时程之内对癌变过程的影响。

参考文献

- [1] Kuipers E J, Grady W M, Lieberman D, et al. Colorectal cancer [J]. Nat Rev Dis Primers, 2015, 1: 15065.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, 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): 209-49.
- [3] Siegel R L, Miller K D, Goding Sauer A, et al. Colorectal cancer statistics, 2020 [J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(3): 145-64.
- [4] Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(12): 713-32.
- [5] Kanth P, Inadomi J M. Screening and prevention of colorectal cancer [J]. Bmj, 2021, 374: n1855.
- [6] Morgan E, Arnold M, Gini A, et al. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN [J]. Gut, 2023, 72(2): 338-44.
- [7] Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions [J]. Cancer Discov, 2022, 12(1): 31-46.
- [8] Li J, Ma X, Chakravarti D, et al. Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer [J]. Genes Dev, 2021, 35(11-12): 787-820.
- [9] Funkhouser W K, Jr., Lubin I M, Monzon F A, et al. Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology [J]. J Mol Diagn, 2012, 14(2): 91-103.
- [10] WHO. WHO Classification of Tumours Digestive System Tumors• 5th Edition [M]. France: IARC, 2019.
- [11] Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer [J]. Nat Med, 2015, 21(11): 1350-6.
- [12] Thanki K, Nicholls M E, Gajjar A, et al. Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and their Clinical Implications [J]. Int Biol Biomed J, 2017, 3(3): 105-11.
- [13] Rodriguez-Salas N, Dominguez G, Barderas R, et al. Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2017, 109: 9-19.
- [14] Khaliq A M, Erdogan C, Kurt Z, et al. Refining colorectal cancer classification and clinical stratification through a single-cell atlas [J]. Genome Biol, 2022, 23(1): 113.
- [15] Ramadan R, van Driel M S, Vermeulen L, et al. Intestinal stem cell dynamics in homeostasis and cancer [J]. Trends Cancer, 2022, 8(5): 416-25.
- [16] Barker N, van Es J H, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5 [J]. Nature, 2007, 449(7165): 1003-7.
- [17] Huels D J, Sansom O J. Stem vs non-stem cell origin of colorectal cancer [J].

- Br J Cancer, 2015, 113(1): 1-5.
- [18] Barker N, Ridgway R A, van Es J H, et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer [J]. *Nature*, 2009, 457(7229): 608-11.
 - [19] Zeki S S, Graham T A, Wright N A. Stem cells and their implications for colorectal cancer [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011, 8(2): 90-100.
 - [20] Nakamura S, Kino I. Morphogenesis of minute adenomas in familial polyposis coli [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1984, 73(1): 41-9.
 - [21] Davis H, Irshad S, Bansal M, et al. Aberrant epithelial GREM1 expression initiates colonic tumorigenesis from cells outside the stem cell niche [J]. *Nat Med*, 2015, 21(1): 62-70.
 - [22] Bormann F, Rodriguez-Paredes M, Lasitschka F, et al. Cell-of-Origin DNA Methylation Signatures Are Maintained during Colorectal Carcinogenesis [J]. *Cell Rep*, 2018, 23(11): 3407-18.
 - [23] O'Brien C A, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice [J]. *Nature*, 2007, 445(7123): 106-10.
 - [24] Carethers J M, Jung B H. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer [J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(5): 1177-90.e3.
 - [25] Wang D, Fu L, Sun H, et al. Prostaglandin E2 Promotes Colorectal Cancer Stem Cell Expansion and Metastasis in Mice [J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(7): 1884-95.e4.
 - [26] Nguyen L H, Goel A, Chung D C. Pathways of Colorectal Carcinogenesis [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(2): 291-302.
 - [27] Dow L E, O'Rourke K P, Simon J, et al. Apc Restoration Promotes Cellular Differentiation and Reestablishes Crypt Homeostasis in Colorectal Cancer [J]. *Cell*, 2015, 161(7): 1539-52.
 - [28] Robles A I, Traverso G, Zhang M, et al. Whole-Exome Sequencing Analyses of Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancers [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(4): 931-43.
 - [29] Nusse R, Clevers H. Wnt/beta-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities [J]. *Cell*, 2017, 169(6): 985-99.
 - [30] Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease [J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1192-205.
 - [31] Rim E Y, Clevers H, Nusse R. The Wnt Pathway: From Signaling Mechanisms to Synthetic Modulators [J]. *Annu Rev Biochem*, 2022, 91: 571-98.
 - [32] Polakis P. Wnt signaling in cancer [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(5).
 - [33] Cruciat C M, Niehrs C. Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(3): a015081.
 - [34] Steinhart Z, Angers S. Wnt signaling in development and tissue homeostasis [J]. *Development*, 2018, 145(11).
 - [35] Albrecht L V, Tejeda-Munoz N, De Robertis E M. Cell Biology of Canonical Wnt Signaling [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2021, 37: 369-89.
 - [36] Degirmenci B, Hausmann G, Valenta T, et al. Wnt Ligands as a Part of the

- Stem Cell Niche in the Intestine and the Liver [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2018, 153: 1-19.
- [37] Sato T, Stange D E, Ferrante M, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1762-72.
 - [38] Zhao H, Ming T, Tang S, et al. Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 144.
 - [39] van Neerven S M, de Groot N E, Nijman L E, et al. Apc-mutant cells act as supercompetitors in intestinal tumour initiation [J]. *Nature*, 2021, 594(7863): 436-41.
 - [40] Flanagan D J, Pentinmikko N, Luopajarvi K, et al. NOTUM from Apc-mutant cells biases clonal competition to initiate cancer [J]. *Nature*, 2021, 594(7863): 430-5.
 - [41] Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators [J]. *Oncogene*, 2006, 25(57): 7469-81.
 - [42] Kikuchi A, Matsumoto S, Sada R. Dickkopf signaling, beyond Wnt-mediated biology [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2022, 125: 55-65.
 - [43] Mao B, Niehrs C. Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling [J]. *gene*, 2003, 302: 179-83.
 - [44] Mukhopadhyay M, Gorivodsky M, Shtrom S, et al. Dkk2 plays an essential role in the corneal fate of the ocular surface epithelium [J]. *Development*, 2006, 133(11): 2149-54.
 - [45] Brott B K, Sokol S Y. Regulation of Wnt/LRP signaling by distinct domains of Dickkopf proteins [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(17): 6100-10.
 - [46] Li X, Liu P, Liu W, et al. Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation [J]. *Nat Genet*, 2005, 37(9): 945-52.
 - [47] Phillips M D, Mukhopadhyay M, Poscablo C, et al. Dkk1 and Dkk2 regulate epicardial specification during mouse heart development [J]. *Int J Cardiol*, 2011, 150(2): 186-92.
 - [48] Harshuk-Shabso S, Dressler H, Niehrs C, et al. Fgf and Wnt signaling interaction in the mesenchymal niche regulates the murine hair cycle clock [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5114.
 - [49] Devotta A, Hong C S, Saint-Jeannet J P. Dkk2 promotes neural crest specification by activating Wnt/beta-catenin signaling in a GSK3beta independent manner [J]. *Elife*, 2018, 7.
 - [50] Kumar S, Duester G. Retinoic acid signaling in perioptic mesenchyme represses Wnt signaling via induction of Pitx2 and Dkk2 [J]. *Dev Biol*, 2010, 340(1): 67-74.
 - [51] Matsui A, Yamaguchi T, Maekawa S, et al. DICKKOPF-4 and -2 genes are upregulated in human colorectal cancer [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(10): 1923-30.
 - [52] Shin J H, Jeong J, Choi J, et al. Dickkopf-2 regulates the stem cell marker LGR5 in colorectal cancer via HNF4alpha1 [J]. *iScience*, 2021, 24(5): 102411.
 - [53] Xiao Q, Wu J, Wang W J, et al. DKK2 imparts tumor immunity evasion

- through beta-catenin-independent suppression of cytotoxic immune-cell activation [J]. *Nat Med*, 2018, 24(3): 262-70.
- [54] Deng F, Zhou R, Lin C, et al. Tumor-secreted dickkopf2 accelerates aerobic glycolysis and promotes angiogenesis in colorectal cancer [J]. *Theranostics*, 2019, 9(4): 1001-14.
- [55] Clevers H. Modeling Development and Disease with Organoids [J]. *Cell*, 2016, 165(7): 1586-97.
- [56] 赵冰. 类器官在器官移植领域的应用前景 [J]. *器官移植*, 2022, (002): 013.
- [57] Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(7): 407-18.
- [58] Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S-I, et al. The TAK1–NLK–MAPK-related pathway antagonizes signalling between β -catenin and transcription factor TCF [J]. *Nature*, 1999, 399(6738): 798-802.
- [59] Zhao R, Xiao Q, Li M, et al. Rational design of peptides for identification of linear epitopes and generation of neutralizing monoclonal antibodies against DKK2 for cancer therapy [J]. *Antib Ther*, 2020, 3(2): 63-70.
- [60] Hu J, Wang Z, Chen Z, et al. DKK2 blockage-mediated immunotherapy enhances anti-angiogenic therapy of Kras mutated colorectal cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127: 110229.
- [61] Uhlén M, Fagerberg L, Hallström B M, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome [J]. *Science*, 2015, 347(6220): 1260419.

致 谢

谢赵冰老师和郑丙莲老师春风化雨，谢代权辉师兄和赵幼尚师姐不吝赐教，谢亲朋好友一路与伴，谢蟹螯伴蟹爪宽慰我心，谢清风随明月畅怡我情。还需要感谢的是那个日夜兼程而坚守本心的自己。