

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2024.01.013

肿瘤出芽分子机制的研究进展

梁迪¹ 综述 刘艳荣² 审校¹ 济宁医学院临床医学院, 济宁 272013; ² 济宁医学院附属医院病理科, 济宁 272029)

摘要 肿瘤出芽是一种存在于多种实体癌中的病理现象,通常被定义为位于肿瘤侵袭前沿的孤立的一个或多达 4 个癌细胞的簇。肿瘤出芽的预后价值已得到了大量证据的支持,也被视为恶性肿瘤转移的关键步骤。肿瘤出芽为一个动态转化过程,本文将探究其在肿瘤细胞分离、迁移和侵袭、免疫抵抗、增殖和凋亡等具体过程中的细胞因子和分子变化,并阐明形成和维持肿瘤出芽所涉及到的分子途径和基因调控通路。

关键词 肿瘤出芽;分子机制;上皮-间充质转化;EMT

中图分类号:R73 文献标识码:B 文章编号:1000-9760(2024)02-061-04

Advances in molecular mechanisms of tumor budding

LIANG Di¹, LIU Yanrong²¹ School of Clinical Medicine, Jining Medical University, Jining 272013, China;² Department of Pathology, Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, China)

Abstract: Tumor budding is a pathological phenomenon in a variety of solid cancers, which is usually defined as an isolated cluster of one or up to four cancer cells located at the front of an invasive tumor. The prognostic value of tumor budding has been supported by a lot of evidence, and tumor budding is also regarded as a key step in malignant tumor metastasis. Since tumor budding is a dynamic transforming process, this paper aims to explore its cytokine and molecular changes in the specific processes of tumor cell separation, migration and invasion, immune resistance, proliferation and apoptosis, and clarify the molecular pathways and gene regulatory pathways involved in the formation and maintenance of tumor budding.

Keywords: Tumor budding; Molecular mechanism; Epithelial-mesenchymal transition; EMT

肿瘤出芽是各种高度恶性癌症中常见的病理学现象,通常作为疾病的预后指标,用来预测患者的整体生存率和疾病复发率。因所涉及的肿瘤细胞具有转移性和干细胞特性,肿瘤出芽是恶性肿瘤从局部向远处转移的一个关键步骤。探究其分子生物学特点和细胞行为学特点可能为恶性肿瘤的治疗提供新的思路。

1 肿瘤出芽概述

1.1 肿瘤出芽的定义

肿瘤出芽是一种存在于多种实体癌中的病理现象,自 1949 年被日本学者 Imai 报道以来,一直备受人们关注。关于肿瘤出芽的定义,目前最为公认的是 2016 年国际肿瘤出芽共识会议所提出的:在高倍显微镜下位于肿瘤浸润前沿,

散在的呈未分化状态的肿瘤细胞小簇,细胞数目为 1 至 4 个^[1]。

1.2 肿瘤出芽的特征

在组织学上,肿瘤出芽多出现于腺癌,如食管、胃、胆囊、胰腺、结直肠等处,其次是鳞癌,如皮肤、口腔、肺,在尿路上皮癌中也可观察到。通过 HE 染色或细胞角蛋白免疫组化,可观察到肿瘤出芽细胞呈圆形、细长型或呈现非典型性的形态特征,其连接复合物表达降低或缺失,且没有微绒毛^[2]。通过将肿瘤出芽连续的切片进行三维重建表明,肿瘤出芽不是静态过程,而是呈现动态变化,肿瘤延伸出许多指状突起投射到邻近的间质中,每个突起包含许多细胞,随后这些细胞与原发肿瘤分离为小细胞集群,即为肿瘤出芽^[3]。

1.3 肿瘤出芽的临床意义

2016 年 4 月在伯尔尼举行的国际肿瘤出芽共识会议上,就基于证据的标准化肿瘤出芽评分系统达成共识:肿瘤出芽是 pT1 结直肠癌淋巴结转移的独立预测因子;肿瘤出

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(81972629)

[通信作者]刘艳荣, E-mail: liuyanrong1984@163.com

芽是 II 期结直肠癌生存率的独立预测因素;肿瘤出芽是结直肠癌术前活检中一个不利的预后因素。在其他实体性肿瘤中,肿瘤出芽也被视为一种组织学预后标志物,用来预测淋巴结转移、淋巴管或血管侵犯、化疗-放疗抵抗、局部复发和远处扩散^[4]。无论在疾病的初期还是其他阶段,出芽等级越高,复发率越高,患者整体生存率也就越差^[5]。

1.4 肿瘤出芽的分子背景

在生物学上,肿瘤出芽是肿瘤微环境(TEM)的一部分,目前绝大多数研究都将其看成上皮-间充质转化(EMT)的形态学表现。EMT 被认为与肿瘤细胞运动能力、侵袭力和抗凋亡能力的增强相关,在 EMT 过程中,上皮细胞变得更加细长,形态为梭形,呈纤维母细胞样,经历极性丧失、伪足形成和 E 钙黏蛋白相关细胞-细胞黏附解体^[6]。在肿瘤出芽中也可发现 EMT 的一些特征,如细胞骨架重排(例如肌动蛋白重组)、细胞运动和侵袭、细胞相关蛋白水解活性增加和基因表达重编程^[7]。然而,这些特征在肿瘤出芽中缺乏统一性,并且由于没有单细胞迁移,肿瘤出芽被解释为细胞集体迁移的混合上皮/间充质表型^[8]。对于肿瘤出芽的研究,目前绝大多数都是在组织学上进行,而忽视了其作为一个动态转化过程的特性。

2 肿瘤出芽的过程及相关分子学改变

2.1 癌细胞的解离

肿瘤出芽的发生发展是多阶段的动态连续过程,其第一步被认为是肿瘤细胞从原发肿瘤的解离。癌细胞间黏附作用降低是癌细胞侵袭转移关键。已知 E-钙粘蛋白是参与细胞黏附和维持上皮细胞结构的钙黏蛋白家族的成员,其可以作为锚定连接点,在介导上皮细胞与细胞间黏附中发挥重要作用。多项研究表明,肿瘤出芽中 E-钙黏蛋白表达下调或数目减少,并受多种因子调控。其中,转化生长因子 β (TGF- β)可以通过激活 SMAD 蛋白家族调控 EMT 相关基因的转录,增加 E-钙黏蛋白抑制因子如 Snail、Slug、Twist、ZEB1、ZEB2 的表达^[9]。Pavlic 等^[2]率先使用激光捕获显微切割技术获得结直肠癌中特定肿瘤出芽组织,其进一步的研究结果表明,肿瘤出芽中 E-钙黏蛋白抑制因子 ZEB2 表达上调。

除了 E-钙黏蛋白,上皮细胞黏附分子(Ep-CAM)被发现在肿瘤出芽细胞上缺乏膜性表达,而细胞质中 Ep-CAM 染色却高度增加^[10]。膜性 Ep-CAM 的缺失也会导致细胞-细胞黏附降低,促进肿瘤细胞解离,增加迁移能力和肿瘤出芽。Ep-CAM 启动子由 Wnt- β -连环蛋白-TCF4 复合体进行调控,其表达的转录抑制因子为 EMT 诱导转录因子 ZEB1^[11]。

2.2 肿瘤出芽细胞的迁移和侵袭

肿瘤细胞的侵袭机制较为复杂,主要包括细胞黏附的失调、细胞外基质(ECM)分解和细胞转移 3 个部分。出芽细胞在与原发肿瘤解离后,首先需要黏附在细胞外基质上,

接着降解 ECM,为癌细胞的浸润创造环境,并通过降解的基质进行移动。其中整合素是 ECM 的主要黏附分子,其激活和与 ECM 的结合可引起一系列黏附素的聚集^[12]。层粘连蛋白 5 γ 2(LN-5 γ 2)作为整合素配体,在结直肠癌、口腔鳞癌和肺鳞癌的肿瘤出芽细胞中均有表达。在结直肠癌中, LN-5 γ 2 和整合素 β 1 通过激活黏着斑激酶(FAK)和 Yes 相关蛋白(YAP)转录共激活物和 PDZ 结合基序(TAZ),促进了肿瘤出芽^[13]。已知 YAP 是 Hippo 通路的转录辅激活子和下游元件,其功能是调节器官大小和凋亡。当脱离 Hippo 通路的负调控时,YAP 被初步证明是一个原癌基因,诱导主要的癌症特征,如癌症干细胞特性、细胞极性丧失和转移。而 FAK 的激活在促进其他黏附分子磷酸化及整合素信号通路传导中起着核心作用。

基质金属蛋白酶(MMPs)由恶性肿瘤细胞刺激产生,是降解 ECM 的关键酶^[14]。在侵袭前沿,MMPs 可将 LN-5 切割为 LN-5 γ 2,使其具有类似表皮生长因子(EGF)的作用,从而有助于肿瘤生长和侵袭^[15]。在乳腺浸润性导管癌中,来自肿瘤出芽和来自侵袭前沿肿瘤块的癌细胞中都有类似的 MMPs 表达,且基质细胞中肿瘤出芽等级与 MMPs 表达的结合可显著提高预后评估的准确性^[16]。Sogawa 等^[17]在结肠癌病例中发现 MMP9 的高表达和基因扩增,小鼠和人中 MMP9 的近端启动子序列包含转录因子 β -连环蛋白/TCF/LEF、糖皮质激素受体(GR)和 NF- κ B 的保守结合位点,且小鼠 MMP9 启动子可通过 β -连环蛋白信号刺激剂氯化锂(LiCl)被激活。这进一步支持了 β -连环蛋白在结直肠癌侵袭转移中的重要作用。

此外,尿激酶(UPA)驱动的细胞外基质降解也可能是导致肿瘤出芽的众多因素之一。Markl 等^[18]在出芽中的结肠癌细胞中发现了 LN-5 和尿激酶型受体(UPAR)的共表达。UPA 与其受体 UPA-R 结合,激活其蛋白水解活性,促进细胞外基质降解,进而促进肿瘤细胞的侵袭和迁移。UPA 是 Wnt/ β -连环蛋白途径和 TGF- β 信号通路的共同靶点,转录抑制因子 ZEB1 是最终的下游效应因子,ZEB1 通过组蛋白乙酰转移酶 p300 与 UPA 启动子直接结合,从而增强 UPA 的表达^[19]。

RAF 激酶抑制蛋白(RKIP),也称为磷脂酰乙醇胺结合蛋白(PEBP),是一种肿瘤转移抑制蛋白,其可通过抑制 NF κ B/Snail 回路来抑制 EMT 进程^[20]。RKIP 在肿瘤芽中的表达明显低于肿瘤主体^[21],RKIP 本身也可作为高级别肿瘤出芽的预测因子,肿瘤芽自身的 RKIP 丢失似乎参与了肿瘤的转移过程,并导致肿瘤侵袭性的增加^[22]。

2.3 肿瘤出芽中的免疫抵抗

在肿瘤出芽中存在免疫反应,CD8⁺T 细胞、FOXP3⁺T 细胞和 CD68⁺巨噬细胞是结直肠癌肿瘤出芽区中最常检测到的免疫细胞^[7]。TGF- β 激活的 SMADS 与转录激活蛋白 5(STAT5)和活化 T 细胞核因子(NFAT)合作,诱导幼稚 CD4⁺T 细胞的叉头状转录因子 3(FOXP3)表达,从而促进

其向调节性 T 细胞表型分化。在 TGF- β 刺激的 CD8⁺T 细胞中, SMADS 与转录因子 ATF1 协同抑制涉及 CD8⁺T 细胞裂解功能的几个基因的启动子, 直接抑制 CD8⁺T 细胞的细胞毒性程序, 这些可能有助于肿瘤细胞的免疫抑制与免疫逃避^[23]。

程序性细胞死亡配体 1 (PD-L1) 是一种表达于肿瘤细胞表面的膜蛋白, 在与其受体程序性细胞死亡 1 蛋白 (PD-1) 后, 可抑制肿瘤微环境中 CD8⁺T 淋巴细胞的细胞毒活性, 促使肿瘤细胞逃避免疫系统监视。而 PD-L1 在肿瘤出芽区域高表达, 并与 EMT 有关^[24]。此外, Martinez-Ciarpaglini 等^[25]发现, PD-L1 过表达的基因谱与 EMT 表达谱之间存在显著相关性; ZEB1 和 ZEB2 增加, miR200a 和 miR200c 表达减少。而 miRNA 被认为是 EMT 的激动剂或抑制剂。miR-200 表达下调被认为与肿瘤出芽高度相关。这些发现表明, PD-L1 过表达可能与肿瘤出芽中逃避免疫反应有关。

趋化因子中, 正常 T 细胞表达和分泌调节活化因子 (RANTES) 又称 CC 型趋化因子配体 5 (CCL5), 在免疫调节、自身免疫紊乱和炎症中起着至关重要的作用。在结直肠癌中, 巨噬细胞来源的 CCL5 通过 p65/STAT3-CSN5-PD-L1 途径来抑制 CD8⁺T 细胞对癌症的反应, 促进癌细胞的免疫逃逸^[26]。Chang 等^[27]研究表明肿瘤来源的 CCL5 通过 CCL5/CCR5 轴增强 T 调节细胞中 TGF- β 的分泌, 从而阻断 CD8⁺T 细胞的杀伤功能, 有助于肿瘤的免疫逃避行为。Gao 等^[28]研究发现在结直肠癌中, 肿瘤出芽分泌高水平的 CCL5, 其可以通过 CCR5 溶质载体家族 25 成员 24 (SLC25A24) 途径招募成纤维细胞, 并导致在侵袭前沿的肿瘤芽周围形成特征性成纤维细胞簇。癌相关成纤维细胞 (CAF) 和肿瘤细胞之间的串扰可导致成纤维细胞活化, 随后导致肿瘤转移和免疫抑制等。

2.4 肿瘤出芽细胞的增殖和凋亡

β -连环蛋白在肿瘤主体内呈细胞膜、质阳性, 在浸润前沿 (即出芽的肿瘤细胞) 中呈细胞核阳性, 此为目前获得普遍认可且特异性较强的用于证实肿瘤出芽的免疫标志物^[29]。在经典 Wnt 信号通路中, β -连环蛋白是主要调控因素。正常情况下, 体内 Wnt 不活跃, β -连环蛋白会被胞浆内糖原合成酶激酶 (GSK)-3 β 磷酸化而泛素化, 再被蛋白酶体降解掉^[30]。而当受到外界刺激, 如 APC 基因突变, 细胞外 Wnt 配体被激活, Wnt 与 Frizzles-Axin-LRP-5/6 复合物结合后, 胞浆 GSK-3 β 被隔离, β -连环蛋白的磷酸化则不能完成^[31]。至此, 低磷酸化的 β -连环蛋白在胞浆中的积累允许其迁移到细胞核, 并通过在细胞核内与淋巴增强因子 (LEF) 或 T 细胞因子 (TCF) 形成复合物来激活靶基因, 以促进细胞增殖以及存活而不分化^[32]。

与原发肿瘤相比, 肿瘤芽显示出较低的核 Ki-67 水平和 caspase-3, 较高的核 p16INK4 和细胞周期蛋白 D1^[7], 这即表明肿瘤出芽处于低水平的增殖和凋亡状态, 且生长停滞。因此, 为维持其存活, 大部分芽必须具有一些抗凋亡机

制, 如抗失巢凋亡 (指当正常的上皮细胞失去了与细胞外基质的连接时触发的一种特殊的程序性细胞死亡方式)。嗜神经性酪氨酸受体激酶 B (TrkB) 是一种强有力的失巢凋亡抑制因子, 与原发肿瘤相比, 它在肿瘤出芽中显著过度表达^[33]。然而, 肿瘤出芽中抗失巢凋亡的具体机制仍未明确。另外, 肿瘤芽通常过表达干细胞标记物, 如 LGR5、ALDH1 和 CD44, 这表明它们可能具有自我更新的能力, 无论是在原发部位还是远处转移组织^[34]。

3 小结与展望

综上所述, 肿瘤出芽过程中肿瘤细胞分离、迁移和侵袭能力的增强与各种细胞因子和分子水平变化密切相关, 其恶性表型的维持有赖于各种分子途径和基因的调控, 如 WNT 信号通路、TGF- β 信号通路以及 miR-200microRNA 的下调。了解肿瘤出芽的分子机制及动态分子变化, 一方面有助于提高临床实践中肿瘤出芽评估的准确性和全面性, 另一方面也可用于临床干预疾病提供潜在的治疗靶点。然而, 肿瘤出芽相关的细胞和分子生物学较为复杂, 有关其确切的分子机制仍需要进一步深入探究。

利益冲突: 所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] Le Tran N, Wang Y, Nie G. Podocalyxin in normal tissue and epithelial cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(12): 2863.
- [2] Pavlič A, Boštjančič E, Kavalar R, et al. Tumour budding and poorly differentiated clusters in colon cancer-different manifestations of partial epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Pathol*, 2022, 258(3): 278-288. DOI: 10.1002/path.5998.
- [3] Xiao SM, Li J. Tumor budding in gastric cancer [J]. *World J Gastrointest Surg*, 2023, 15(4): 578-591. DOI: 10.4240/wjgs.v15.i4.578.
- [4] Öztürk Ç, Paşaoğlu HE, Emre F, et al. High tumor budding activity may predict poor prognosis in laryngeal squamous cell carcinomas [J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2022, 65(2): 280-287.
- [5] Qu Q, Wu D, Li Z, et al. Tumor budding and the prognosis of patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2023, 38(1): 141. DOI: 10.1007/s00384-023-04423-8.
- [6] Bakir B, Chiarella AM, Pitarresi JR, et al. EMT, MET, plasticity, and tumor metastasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(10): 764-776. DOI: 10.1016/j.tcb.2020.07.003.
- [7] Lugli A, Zlobec I, Berger MD, et al. Tumour budding in solid cancers [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(2): 101-115.
- [8] Okuyama K, Suzuki K, Yamamoto S. Relationship between tumor budding and partial epithelial-mesenchymal transition in head and neck cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(4): 1111. DOI: 10.3390/cancers15041111.
- [9] Su J, Morgani SM, David CJ, et al. TGF- β orchestrates fibrogenic and developmental EMTs via the RAS effector RREB1 [J]. *Nat*

- ture, 2020, 577 (7791) : 566-571. DOI: 10. 1038/s41586-019-1897-5.
- [10] Regmi P, Paudyal A, Paudyal P, et al. Prognostic significance of tumor budding in biliary tract cancer [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2022, 48 (1) : 160-168.
- [11] Gires O, Pan M, Schinke H, et al. Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2020, 39 (3) : 969-987. DOI: 10. 1007/s10555-020-09898-3.
- [12] Pang X, He X, Qiu Z, et al. Targeting integrin pathways: mechanisms and advances in therapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8 (1) : 1. DOI: 10. 1038/s41392-022-01259-6.
- [13] Zhou B, Zong S, Zhong W, et al. Interaction between laminin-5 γ 2 and integrin β 1 promotes the tumor budding of colorectal cancer via the activation of Yes-associated proteins [J]. *Oncogene*, 2020, 39 (7) : 1527-1542. DOI: 10. 1038/s41388-019-1082-1.
- [14] Mondal S, Adhikari N, Banerjee S, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 194 : 112260.
- [15] Aokage K, Ishii G, Ohtaki Y, et al. Dynamic molecular changes associated with epithelial-mesenchymal transition and subsequent mesenchymal-epithelial transition in the early phase of metastatic tumor formation [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128 (7) : 1585-1595.
- [16] González LO, Noemi E, María F, et al. Joint tumor bud - MMP/TIMP count at the invasive front improves the prognostic evaluation of invasive breast carcinoma [J]. *Biomedicine*, 2021, 9 (2) : 196. DOI: 10. 3390/biomedicine9020196.
- [17] Sogawa C, Eguchi T, Okusha Y, et al. A reporter system evaluates tumorigenesis, metastasis, β -catenin/MMP regulation, and druggability [J]. *Tissue Eng Part A*, 2019, 25 (19-20) : 1413-1425. DOI: 10. 1089/ten. TEA. 2018. 0348.
- [18] Märkl B, Renk I, Oruzio DV, et al. Tumour budding, uPA and PAI-1 are associated with aggressive behaviour in colon cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2010, 102 (3) : 235-241.
- [19] Jaiswal RK, Yadava PK. TGF- β -mediated regulation of plasminogen activators is human telomerase reverse transcriptase dependent in cancer cells [J]. *Biofactors*, 2019, 45 (5) : 803-817.
- [20] Cessna H, Baritaki S, Zaravinos A, et al. The role of RKIP in the regulation of EMT in the tumor microenvironment [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14 (19) : 4596.
- [21] Karamitopoulou E, Zlobec I, Gloor B, et al. Loss of raf-1 kinase inhibitor protein (RKIP) is strongly associated with high-grade tumor budding and correlates with an aggressive phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) [J]. *J Transl Med*, 2013, 11 : 311.
- [22] Koelzer VH, Karamitopoulou E, Dawson H, et al. Geographic analysis of RKIP expression and its clinical relevance in colorectal cancer [J]. *Br J Cancer*, 2013, 108 (10) : 2088-2096.
- [23] Batlle E, Massagué J. Transforming growth factor- β signaling in immunity and cancer [J]. *Immunity*, 2019, 50 (4) : 924-940.
- [24] Secinti IE, Ozgur T, Dede I. PD-L1 expression in colorectal adenocarcinoma is associated with the tumor immune microenvironment and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Am J Clin Pathol*, 2022, 158 (4) : 506-515.
- [25] Martinez-Ciarpaglini C, Oltra S, Roselló S, et al. Low miR200c expression in tumor budding of invasive front predicts worse survival in patients with localized colon cancer and is related to PD-L1 overexpression [J]. *Mod Pathol*, 2019, 32 (2) : 306-313.
- [26] Liu C, Yao Z, Wang J, et al. Macrophage-derived CCL5 facilitates immune escape of colorectal cancer cells via the p65/STAT3-CSN5-PD-L1 pathway [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27 (6) : 1765-1781. DOI: 10. 1038/s41418-019-0460-0.
- [27] Chang LY, Lin YC, Mahalingam J, et al. Tumor-derived chemokine CCL5 enhances TGF- β -mediated killing of CD8(+) T cells in colon cancer by T-regulatory cells [J]. *Cancer Res*, 2012, 72 (5) : 1092-1102. DOI: 10. 1158/0008-5472.
- [28] Gao LF, Zhong Y, Long T, et al. Tumor bud-derived CCL5 recruits fibroblasts and promotes colorectal cancer progression via CCR5-SLC25A24 signaling [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41 (1) : 81. DOI: 10. 1186/s13046-022-02300-w.
- [29] 徐程, 张响, 姬东泽, 等. 肿瘤出芽与 pT1 期胃癌临床病理特征的相关性分析 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2021, 37 (4) : 384-388. DOI: 10. 13315/j. enki. cjcep. 2021. 04. 002.
- [30] Liu J, Xiao Q, Xiao J, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7 (1) : 3. DOI: 10. 1038/s41392-021-00762-6.
- [31] 段亚楠. 经典 Wnt 信号通路与子宫肌瘤 [J]. *济宁医学院学报*, 2023, 46 (1) : 34-37. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-9760. 2023. 01. 008.
- [32] 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. DOI: 10. 1186/s12943-022-01616-7.
- [33] Saito K, Okuyama T, Miyazaki S, et al. Tumor budding as a predictive marker of relapse and survival in patients with stage II colon cancer [J]. *In Vivo*, 2022, 36 (4) : 1820-1828.
- [34] Huang T, Bao H, Meng YH, et al. Tumour budding is a novel marker in breast cancer: the clinical application and future prospects [J]. *Ann Med*, 2022, 54 (1) : 1303-1312. DOI: 10. 1080/07853890. 2022. 2070272.

(收稿日期 2023-06-13)

(本文编辑: 石俊强)