

## Imunoekspresi Lgr5 dan E-cadherin sebagai Faktor Prediksi Metastasis ke Kelenjar Getah Bening Regional pada Adeno-karsinoma Kolorektal

Sri Dharmayanti, Abdul Hadi Hassan, Herry Yulianti, Bethy S. Hernowo

Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjajaran Bandung

### ABSTRAK

#### Latar belakang

Karsinoma kolorektal (KKR) merupakan keganasan dengan morbiditas dan mortalitas yang tinggi di dunia. Lebih dari 90% KKR adalah adenokarsinoma. Tingginya angka kekambuhan dan metastasis pada KKR disebabkan oleh *Cancer Stem Cell* (CSC). Metastasis ke kelenjar getah bening merupakan penanda prognosis yang buruk pada KKR. Lgr5 adalah penanda CSC di usus halus dan kolon. E-cadherin berperan penting menjaga integritas hubungan antar sel. Imunoekspresi Lgr5 berhubungan dengan prognosis yang buruk. Kehilangan fungsi E-cadherin berhubungan dengan pertumbuhan yang invasif. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui apakah Lgr5 dan E-cadherin dapat digunakan sebagai faktor prediksi metastasis ke kelenjar getah bening regional pada KKR.

#### Metode

Penelitian ini menggunakan analisis observasi dengan disain potong lintang. Sampel diambil dari blok parafin yang berasal dari jaringan operasi kolon dan rektum dengan jumlah kelenjar getah bening  $\geq 12$  buah. Keseluruhan sampel berjumlah 52 dan terbagi menjadi dua kelompok yaitu non metastasis dan metastasis dengan 26 sampel setiap kelompok. Sampel didapatkan dari Departemen Patologi Anatomi Rumah Sakit Dr Hasan Sadikin Bandung periode 1 Januari 2010-31 Desember 2015 dan dilakukan pewarnaan imunohistokimia Lgr5 dan E-cadherin. Analisis statistik menggunakan *chi-square* dengan nilai kemaknaan  $p < 0,05$ .

#### Hasil

Lgr5 berhubungan dengan metastasis ke kelenjar getah bening regional  $p = 0,001$ . E-cadherin tidak berhubungan dengan metastasis ke kelenjar getah bening regional  $p = 0,09$ .

#### Kesimpulan

Lgr5 dapat digunakan sebagai faktor prediksi terjadinya metastasis ke kelenjar getah bening regional pada KKR.

**Kata kunci:** karsinoma kolorektal, kelenjar getah bening, Lgr5, E-cadherin, metastasis.

### ABSTRACT

#### Background

Colorectal carcinoma (CRC) is malignancy with high morbidity and mortality in the world. More than 90% of CRC are adenocarcinoma. The high rate of recurrence and metastasis in CRC caused by Cancer Stem Cell (CSC). Metastatic to lymph node is marker of poor prognosis. Lgr5 is CSC marker in the small intestine and colon. E-cadherin plays an important role to maintain the integrity of cells. High expression of Lgr5 is associated with poor prognosis. Loss of E-cadherin is associated with invasive growth. The aim of this study is to determine whether Lgr5 and E-cadherin can be used as predictive factors of metastasis to regional lymph node in CRC.

#### Methods

This study was observational analysis with cross-sectional design. Samples were taken from paraffin block derived from colon and rectum resection which have  $\geq 12$  lymph nodes. The total samples were 52 and divided into two groups: non metastasis (26) and metastasis (26). Samples were obtained from the Department of Pathology of Dr. Hasan Sadikin General Hospital in period 1 January 2010-31 December 2015 and performed immunohistochemical staining Lgr5 and E-cadherin. Statistical analysis using Chi-square with a significance value of  $p < 0.05$ .

#### Results

Lgr5 significantly associated with metastasis to regional lymph node ( $p = 0.001$ ), whereas E-cadherin showed no significant association metastasis with regional lymph node  $p = 0.09$ .

#### Conclusion

Lgr5 can be used as predictive factor for metastasis to regional lymph node in CRC.

**Key words :** colorectal carcinoma, lymph node, Lgr5, E-cadherin, metastasis.

## PENDAHULUAN

Karsinoma kolorektal (KKR) adalah tumor ganas yang berasal dari epitel mukosa kolorektal.<sup>1</sup> Keganasan ini menempati urutan ke empat penyebab kematian dengan insiden >600.000 kematian setiap tahunnya di seluruh dunia.<sup>2</sup> Insiden tertinggi ditemukan di Eropa, Australia, New Zealand, Amerika Utara dan Jepang dengan insiden lebih rendah ditemukan di negara Asia.<sup>3</sup> Di Indonesia, KKR merupakan salah satu penyebab masalah kesehatan di masyarakat. Berdasarkan data Global tahun 2013, keganasan ini berada di urutan ke-4 dari seluruh keganasan setelah kanker serviks, paru-paru dan payudara. Insiden laki-laki ditemukan lebih tinggi daripada perempuan.<sup>4</sup>

Sebagian besar KKR adalah jenis adenokarsinoma (>90%). Diagnosis adenokarsinoma ditegakkan dengan ditemukannya gambaran struktur kelenjar.<sup>1</sup> Adenokarsinoma berdiferensiasi baik dan sedang digolongkan ke dalam tumor *low grade* sedangkan diferensiasi buruk digolongkan ke dalam *high grade*. Varian adenokarsinoma yaitu *signet ring cell carcinoma* digolongkan ke dalam tumor *high grade*. Tumor yang *high grade* mempunyai prognosis yang buruk.<sup>1</sup>

Kekambuhan dan metastasis merupakan faktor penting yang mempengaruhi harapan hidup penderita KKR.<sup>5</sup> Meskipun telah banyak protokol terapi yang diberikan, namun tidak mendapatkan hasil pengobatan yang memuaskan. Keadaan ini disebabkan karena adanya *Cancer Stem Cell*.<sup>6</sup> *Cancer Stem Cell* berasal dari *stem cell* yang mengalami akumulasi mutasi genetik.<sup>5,7</sup> *Cancer Stem Cell* merupakan suatu populasi kecil sel tumor yang mempunyai karakteristik mampu memperbarui diri, mampu mencetuskan pertumbuhan tumor serta berpotensi membentuk massa tumor.<sup>7</sup> *Cancer Stem Cell* tumbuh progresif dan berhubungan dengan prognosis yang buruk.<sup>8</sup>

Penanda *Cancer Stem Cell* pada usus halus dan kolon adalah *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5* (Lgr5).<sup>9</sup> Lgr5 merupakan suatu molekul sinyal permukaan yang memiliki 7 protein transmembran yang bekerja pada jalur sinyal Wnt.<sup>10</sup> Jalur sinyal Wnt diatur fungsinya oleh gen *Adenomatous Polyposis Coli* (APC) yang merupakan gen supresi tumor.<sup>11</sup> *Adenomatous Polyposis Coli* merupakan jalur selular yang penting dalam proses pembentukan tumor. Kehilangan fungsi

APC akan menyebabkan terjadinya gangguan jalur sinyal Wnt. Keadaan tersebut akhirnya menyebabkan terjadinya pertumbuhan sel yang terus menerus, kehilangan fungsi E-cadherin serta terjadinya *Epithelial Mesenchymal Transition*.<sup>12-14</sup> *Epithelial Mesenchymal Transition* merupakan proses penting terjadinya metastasis sel tumor.<sup>15</sup> Imunoekspresi Lgr5 yang tinggi berhubungan dengan prognosis yang buruk.<sup>9</sup>

E-cadherin merupakan suatu glikoprotein transmembran yang menjaga perlekatan antar sel. E-cadherin memegang peranan penting dalam mempertahankan struktur dan integritas epitel. Kehilangan fungsi E-cadherin berhubungan dengan proliferasi sel dan pertumbuhan tumor yang invasif.<sup>16</sup>

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah Imunoekspresi Lgr5 dan E-cadherin dapat digunakan sebagai faktor prediksi terjadinya metastasis ke kelenjar getah bening regional pada kasus adenokarsinoma kolorektal. Penelitian yang menghubungkan kedua penanda ini (Lgr5 dan E-cadherin) dengan metastasis ke kelenjar getah bening regional belum pernah dilakukan sebelumnya.

Hasil penelitian ini diharapkan bahwa Imunoekspresi Lgr5 dan E-cadherin dapat digunakan sebagai faktor prediksi metastasis ke kelenjar getah bening regional pada adenokarsinoma kolorektal yang di dapat dari sampel sediaan biopsi massa tumor.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan analisis observasi dengan menggunakan disain penelitian potong lintang yang dilaksanakan di Departemen Patologi Anatomi RSUP dr. Hasan Sadikin (RSHS) Bandung. Sampel penelitian diambil dari blok parafin yang berasal dari jaringan operasi kolon dan rektum dengan jumlah kelenjar getah bening  $\geq 12$  buah dan terdiagnosa sebagai adenokarsinoma kolorektal pada periode 1 Januari 2010 sampai 31 Desember 2015. Jumlah seluruh sampel adalah 52 dan dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok non metastasis dan metastasis ke kelenjar getah bening regional dengan jumlah masing-masing kelompok adalah 26. Sediaan HE dievaluasi ulang dan dicari sampel yang memiliki massa tumor yang banyak sehingga memudahkan dalam penilaian pewarnaan imunohistokimia.

Sampel yang berasal dari massa tumor dipotong setebal 4 mikron kemudian dilakukan

pewarnaan imunohistokimia. Antibodi primer yang digunakan adalah antibodi poliklonal Lgr5 (*Biocare Medical*) dan antibodi monoklonal E-cadherin (*Biocare Medical*). Antibodi sekunder yang digunakan adalah Starr Trek Universal HRP Detection System (*Biocare Medical*). Antigen retrieval yang digunakan adalah *sodium citrate buffer* dengan pH 6.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah imunoekspresi Lgr5 dan E-cadherin, sedangkan variabel terikatnya adalah non metastasis dan metastasis.

Imunoekspresi Lgr5 dan E-cadherin Imunoekspresi Lgr5 dinilai menurut kriteria Remelle dan Stegner (IRS; *immunoreactive score*). Imunoekspresi Lgr5 dan E-cadherin dinilai secara visual dengan menggunakan mikroskop cahaya kemudian dilakukan penghitungan skor (Histoskor) dengan cara menghitung distribusi (jumlah sel yang positif) dikalikan intensitas (area sel tumor yang terwarnai coklat). Sel tumor dinyatakan positif Lgr5 dan E-cadherin apabila terwarnai coklat pada membran sel dan sitoplasma.

Kriteria histoskor rendah pada Lgr5, apabila distribusi dikali intensitas memiliki nilai  $\leq 5$ , sedangkan histoskor tinggi apabila memiliki nilai  $> 5$ . Nilai distribusi 1-4 ( $1 = \leq 25\%$ ,  $2 = > 25\% - 50\%$ ,  $3 = > 50\% - 75\%$ ,  $4 = > 75\%$ ). Nilai Intensitas ( $1 = \text{coklat muda}$ ,  $2 = \text{coklat}$ ,  $3 = \text{coklat tua}$ ).

Kriteria histoskor rendah pada E-cadherin, apabila distribusi dikali intensitas memiliki nilai  $< 6$ , sedangkan histoskor tinggi apabila memiliki nilai  $\geq 6$ . Nilai distribusi 1-4 ( $1 = \leq 25\%$ ,  $2 = > 25\% - 50\%$ ,  $3 = > 51\% - 75\%$ ,  $4 = 75\% - 100\%$ ). Nilai intensitas ( $1 = \text{coklat muda}$ ,  $2 = \text{coklat}$ ,  $3 = \text{coklat tua}$ ).

Data yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya dianalisis dengan statistik menggunakan sistem *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versi 21.0. Analisis variabel bebas dengan analisis univariat, bivariat dan multivariat menggunakan uji *chi-square*. Nilai kemaknaan diperoleh  $p < 0,05$ . Analisis multivariate dengan melakukan *multiple logistic biner regression* untuk dapat mengetahui variable yang paling berpengaruh terhadap metastasis. Analisis multivariate dilakukan berdasarkan analisis bivariate yang memiliki nilai  $p < 0,25$ .

**HASIL**

Pada Tabel 1 didapatkan hasil bahwa, pada kelompok non metastasis, laki-laki sedikit lebih

banyak ditemukan daripada perempuan. Pada kelompok metastasis, perempuan sedikit lebih banyak ditemukan daripada laki-laki. Rerata usia kelompok non metastasis lebih tua daripada kelompok metastasis. Lokasi tersering massa tumor pada kedua kelompok adalah di kolon.

Berdasarkan jenis histopatologi, kelompok non metastasis lebih banyak ditemukan pada tumor *low grade* yaitu adenokarsinoma berdiferensiasi baik, dan tidak ditemukan *signet ring cell carcinoma*. Kelompok metastasis, tumor *low grade* yaitu adenokarsinoma berdiferensiasi baik lebih banyak ditemukan daripada tumor adenokarsinoma berdiferensiasi buruk dan *signet ring cell carcinoma*.

Tabel 1: Karakteristik subjek penelitian.

| Variabel                          | Kelompok                |                       |
|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------|
|                                   | Non metastasis<br>N=26% | Metastasis<br>N=26(%) |
| Jenis kelamin:                    |                         |                       |
| Laki-laki                         | 16 (61,5%)              | 11 (42,3%)            |
| Perempuan                         | 10 (38,5%)              | 15 (57,7%)            |
| Usia :                            |                         |                       |
| Mean±Std                          | 52,19±12,45             | 45,88±15,43           |
| Median                            | 52,000                  | 46,00                 |
| Range (Min-max)                   | 28,00-85,00             | 17,00-77,00           |
| Lokasi tumor:                     |                         |                       |
| Kolon                             | 20 (76,9%)              | 18 (69,2%)            |
| Rektum                            | 2 (7,7%)                | 6 (23,1%)             |
| Rektosigmoid                      | 4 (15,4%)               | 2 (7,7%)              |
| Adenokarsinoma:                   |                         |                       |
| Diferensiasi baik                 | 15 (57,69%)             | 7 (26,9%)             |
| Diferensiasi sedang               | 7 (26,9%)               | 6 (23,1%)             |
| Diferensiasi buruk                | 0 (0%)                  | 3 (11,5%)             |
| Varian adenokarsinoma             |                         |                       |
| Adenokarsinoma musinosum          | 4 (15,4%)               | 7 (26,9%)             |
| <i>Signet ring cell carcinoma</i> | 0 (0%)                  | 3 (11,5%)             |

Tabel 2. Imunoekspresi Lgr5 pada kelompok non metastasis dan metastasis ke kelenjar getah bening regional.

| Variabel    | Kelompok               |                    | Nilai P |
|-------------|------------------------|--------------------|---------|
|             | Non metastasis<br>N=26 | Metastasis<br>N=26 |         |
| Histoskor   |                        |                    |         |
| Skor rendah | 19 (73,1%)             | 7 (26,9%)          | 0,001** |
| Skor tinggi | 7 (26,9%)              | 19 (73,1%)         |         |

Pada Tabel 2 didapatkan hasil bahwa pada kelompok non metastasis lebih banyak didapatkan Lgr5 dengan skor rendah (histoskor  $\leq 5$ ) yaitu 73,1% daripada Lgr5 dengan skor tinggi (histoskor  $> 5$ ) yaitu 26,9%. Pada kelompok metastasis lebih banyak didapatkan Lgr5 dengan skor tinggi yaitu 73,1% daripada Lgr5 dengan skor rendah yaitu 26,9%. Berdasarkan perhitungan statistik analisis bivariate dengan

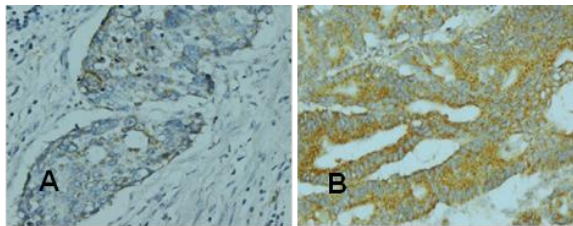
menggunakan *chi-square*, didapatkan hasil nilai  $p=0,001$  ( $p<0,05$ ).

Pada Tabel 3 dijelaskan bahwa E-cadherin dengan skor tinggi (histoskor $\geq 6$ ) banyak ditemukan pada kedua kelompok tersebut dengan presentase 88,5% dan 69,2%. E-cadherin dengan skor rendah (histoskor  $<6$ ) ditemukan lebih sedikit pada kedua kelompok tersebut.

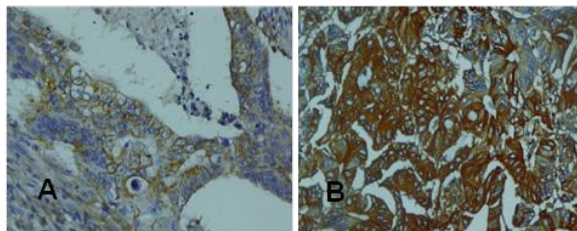
Berdasarkan perhitungan analisis statistik dengan *chi-square*, didapatkan hasil bahwa E-cadherin tidak berhubungan dengan terjadinya metastasis ke kelenjar getah bening regional pada adenokarsinoma kolorektal dengan nilai  $p=0,090$ .

Tabel 3. Imunoekspresi E-cadherin pada kelompok non metastasis dan metastasis ke kelenjar getah bening regional.

| Variabel    | Kelompok               |                    | Nilai p |
|-------------|------------------------|--------------------|---------|
|             | Non metastasis<br>N=26 | Metastasis<br>N=26 |         |
| Histoskor   |                        |                    |         |
| Skor rendah | 3 (11,5%)              | 8 (30,8%)          | 0,090   |
| Skor tinggi | 23 (88,5%)             | 18 (69,2%)         |         |



Gambar 1. A. Imunoekspresi Lgr5 dengan skor rendah; B. Imunoekspresi Lgr5 dengan skor tinggi. (200x).



Gambar 2. A. Imunoekspresi E-cadherin dengan skor rendah; B. Imunoekspresi E-cadherin dengan skor tinggi. (200x)

**DISKUSI**

Menurut beberapa kepustakaan, KKR pada usia muda dapat berada pada stadium lanjut dan mempunyai prognosis yang lebih buruk.<sup>17</sup> Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian ini, yaitu

rerata usia pada kelompok metastasis lebih muda dibandingkan kelompok non metastasis. KKR yang telah bermetastasis mempunyai prognosis yang lebih buruk dibandingkan yang belum bermetastasis.

Secara histopatologi, tumor *high grade* biasanya memiliki stadium yang tinggi (stadium III dan IV) dan mempunyai prognosis yang buruk.<sup>18-20</sup> Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian ini yaitu tumor *high grade* dengan jenis adenokarsinoma berdiferensiasi buruk dan *signet ring cell carcinoma* ditemukan pada kelompok metastasis dan tidak ditemukan pada kelompok non metastasis.

Beberapa kepustakaan menyebutkan bahwa Lgr5 berhubungan dengan terjadinya metastasis ke kelenjar getah bening. Menurut Jiang yang telah melakukan penelitian meta analisis terhadap 12 penelitian lainnya dengan melibatkan 2.600 pasien, hasil penelitian didapatkan bahwa imunoekspresi Lgr5 berhubungan secara bermakna dengan terjadinya invasi ( $p=0,002$ ) dan metastasis ke kelenjar getah bening ( $p=0,003$ ).<sup>8</sup> Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian ini yaitu secara statistik Lgr5 berhubungan dengan metastasis ke kelenjar getah bening regional ( $p<0,05$ ).

Lgr5 bekerja pada jalur sinyal Wnt/ $\beta$ -*cathenin*, yang merupakan jalur sinyal yang berperan pada perkembangan normal dan pertahanan *adult stem cell* serta berperan pula pada patogenesis pertumbuhan tumor. Pada jaringan mukosa yang normal,  $\beta$ -*cathenin* dipertahankan pada kadar yang rendah didalam sitoplasma akibat adanya degradasi oleh kompleks perusak yang terdiri atas *glycogen synthase kinase 3* (GSK3), axin dan faktor lainnya. Pada KKR, adanya mutasi gen APC akan menyebabkan terjadinya inhibisi aktivitas kompleks perusak tersebut dan terjadilah akumulasi dan translokasi  $\beta$ -*cathenin* kedalam inti sel.<sup>21</sup> Pada tingkat membran, Lgr5 berikatan dengan ligannya yaitu R-spondin, dan membentuk kompleks protein dengan *frizzled lipoprotein receptor-related protein 5 dan 6* (LRP5/6) kemudian berikatan dengan ligan Wnt sehingga terjadi fosforilasi LPR. Kompleks reseptor tersebut kemudian menarik kompleks axin yang menyebabkan  $\beta$ -*cathenin* tidak terfosforilasi dan tidak terdegradasi. Keadaan ini menyebabkan terjadinya stabilisasi dan akumulasi  $\beta$ -*cathenin* didalam sitoplasma.<sup>10</sup>  $\beta$ -*cathenin* yang terakumulasi didalam sitoplasma ini,

akhirnya masuk kedalam inti sel.<sup>21</sup> Masuknya  $\beta$ -catenin kedalam inti sel mengakibatkan teraktifasinya gen transkripsi yaitu Lef-1 (*Lymphocyte enhancer binding factor-1*)/Tcf (*T-cell factor*) sehingga terjadi proliferasi serta migrasi sel tumor.<sup>12</sup>

Hasil statistik menunjukkan tidak terdapat hubungan antara E-cadherin dengan metastasis ke kelenjar getah bening regional ( $p > 0,05$ ). Hal ini mengacu pada teori terjadinya metastasis, di antaranya menurut Onder bahwa ada beberapa tahapan agar sel tumor mampu bermetastasis di antaranya yaitu hilangnya hubungan antar sel, meningkatnya motilitas sel serta terjadinya invasi sel ke dalam sirkulasi pembuluh darah atau limfatik. Onder juga mengatakan bahwa kehilangan E-cadherin hanya merupakan salah satu manifestasi dari multi-kompleksnya *Epithelial Mesenchymal Transition*.<sup>22</sup> Garg mengatakan bahwa untuk terjadinya *Epithelial Mesenchymal Transition* diperlukan banyak keterlibatan jalinan sinyal yang saling berhubungan.<sup>15</sup>

Keberhasilan terjadinya metastasis melalui program *Epithelial Mesenchymal Transition*, tidak hanya diakibatkan oleh kehilangan atau menurunnya ekspresi E-cadherin, tetapi juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan disekitarnya seperti *extracellular matrix* serta disekresinya beberapa faktor seperti *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Fibroblast growth Factor* (FGF) dan sitokin.<sup>23,24</sup> *Epithelial Mesenchymal Transition* juga terjadi karena adanya *crosstalk* diantara beberapa jalur sinyal yaitu Wnt, hedgehog, Notch dan TGF- $\beta$  sehingga terjadi penurunan ekspresi E-cadherin.<sup>15</sup> Faktor lain yang menyebabkan terjadinya metastasis sel tumor adalah peran dari *matrix metalloproteinase* (MMPs) yang menyebabkan terjadinya pemecahan protein permukaan sel (protein antar sel dengan sel dan protein antar sel dengan *extracellular matrix*). Terdegradasinya komponen *extracellular matrix* akhirnya menyebabkan terjadinya migrasi sel, invasi ke jaringan sekitarnya serta terpecahnya membran basalis.<sup>23</sup>

## KESIMPULAN

Imunoekspresi Lgr5 dapat digunakan sebagai faktor prediksi terjadinya metastasis ke kelenjar getah bening regional pada adenokarsinoma kolorektal dari sampel sediaan biopsi massa tumor. Imunoekspresi E-cadherin tidak dapat

digunakan sebagai faktor prediksi terjadinya metastasis ke kelenjar getah bening regional pada adenokarsinoma kolorektal.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Fleming M, Ravula S, Sergei, Tatishchev, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol.* 2012;3:153-73.
2. Patel SG, Ahnen DJ. Familial colon cancer syndromes: an update of a rapidly evolving field. *Curr Gastroenterol Rep.* 2012;14:428-38.
3. Bardhan K, Liu K. Epigenetics and colorectal cancer pathogenesis. *Cancers.* 2013;5:676-713.
4. Naghavi M. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol.* 2013;1:505-27.
5. Treviño ENG, Fernández SLS, Rodríguez HGM. Understanding the colon cancer stem cells and perspectives on treatment. *Cancer Cell Int.* 2015;15:1-9.
6. Wu XS, Xi HQ, Chen L. Lgr5 is a potential marker of colorectal carcinoma stem cells that correlates with patient survival. *World J Surg Oncol* 2012;10:1-8.
7. Anderson EC, Hessman C, Levin TG, Monroe MM, Wong MH. The role of colorectal cancer stem cells in metastatic disease and therapeutic response. *Cancers.* 2010;3:319-39.
8. Jiang Y, Li W, He X, Zhang H, Jiang F, Chen Z. Lgr5 expression is a valuable prognostic factor for colorectal cancer: evidence from a meta-analysis. *BMC Cancer.* 2016;16:1-9.
9. Chen Q, Zhang X, Li WM, Ji YQ, Cao HZ, Zheng P. Prognostic value of LGR5 in colorectal cancer: A meta-analysis. *Plos One.* 2014;9:1-8.
10. Nakata S, Phillips E, Goidts V. Emerging role for leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors LGR5 and LGR4 in cancer stem cells. *Cancer Management Res.* 2014;6:171-80.
11. Anderson EC, Hessman C, Levin TG, Monroe MM, Wong MH. The role of colorectal cancer stem cells in metastatic disease and therapeutic response. *Cancers.* 2011;3:319-39.
12. Curtin JC, Lorenzi MV. Drug discovery approaches to target Wnt signaling in cancer stem cells. *Oncotarget.* 2010;1:563-6.

13. Aoki K, Taketo MM. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *Journal of Cell Science*. 2007; 120: 3327-33.
14. Heuberger J, Birchmeier W. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2:1-15.
15. Garg M. Epithelial-mesenchymal transition-activating transcription factors-multifunctional regulators in cancer. *World J Stem Cells*. 2013;5:188-95.
16. Tranou E, Peschos D, Batistatou A, Charalabopoulo A. The E-Cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. *A Global Literature. Anti Cancer Res*. 2008; 28: 3815-26.
17. Wang MJ, Ping J, Li Y, Adell G, Arbman G, Nodin B, *et al*. The prognostic factors and multiple biomarkers in young patients with colorectal cancer. *Sci Rep*. 2015;5:1-11.
18. Nitsche U, Zimmermann A, Späth C, Müller T, Maak M, Schuster T, *et al*. Mucinous and signet-ring cell colorectal cancers differ from classical adenocarcinomas in tumor biology and prognosis. *Ann Surg*. 2013;258:775-83.
19. Myers EA, Feingold DL, Forde KA, Arnell T, Jang JH, Whelan RL. Colorectal cancer in patients under 50 years of age: A retrospective analysis of two institutions' experience. *World J Gastroenterol*. 2013; 19: 5651-7.
20. Gopalan V, Smith RA, Ho YH, Lam AK. Signet-ring cell carcinoma of colorectum-current perspectives and molecular biology. *Colorectal J*. 2011;26:127-33.
21. Lin Y, Wu T, Yao Q, Zi S, Cui L, Yang M, Li J. Lgr5 promotes the proliferation of colorectal cancer cells via the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Oncol Lett*. 2015;9:2859-63.
22. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander E, Weinberg RA. Loss of E-Cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Am Assoc Cancer Res*. 2008;68:3645-53.
23. Heerboth S, Housman G, Leary M, Longacre M, Byler S, Lapinska K, *et al*. EMT and tumor metastasis. *Clin Transl Med*. 2015; 4: 1-13.
24. Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou BP. The role of snail in EMT and tumorigenesis. *Nat Health Inst* 2013;13:963-72.