

# MCM4在结直肠癌中的表达及意义

李康<sup>1</sup>, 闫静<sup>1</sup>, 张晓明<sup>2\*</sup>, 张海峰<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>锦州医科大学研究生培养基地临沂市人民医院, 山东 临沂

<sup>2</sup>临沂市人民医院普外科中心三病区, 山东 临沂

收稿日期: 2024年4月21日; 录用日期: 2024年5月14日; 发布日期: 2024年5月23日

## 摘要

目的: 分析MCM4在结直肠癌细胞中的表达情况, 研究MCM4对结直肠癌细胞的作用, 进一步探讨MCM4和结直肠癌(CRC)之间的联系。方法: 1) 采用免疫组织化学法比较MCM4在不同结肠组织中的表达情况, 分析MCM4与结直肠癌患者临床病理之间的关系。2) 生存分析使用Kaplan-Meier方法, logrank检验评估生存差异。采用Cox回归分析确定MCM4对CRC的预测价值。3) 采用qRT-PCR和Western Blot检测MCM4在结直肠癌细胞系HCT 116和Caco2中的表达水平。4) 构建敲低MCM4的表达载体, 建立敲低MCM4的表达细胞系。通过CCK-8细胞增殖实验、细胞克隆形成实验检测CRC细胞的增殖能力。结果: 1) MCM4在CRC组织和细胞中的表达水平高于正常结肠组织和细胞。2) MCM4可促进结直肠癌细胞的增殖能力。3) MCM4的高表达与患者的预后不良显著相关。结论: MCM4促进结直肠癌的发生发展, 可能是有效的结直肠肿瘤标志物和潜在的治疗靶点。

## 关键词

结直肠癌, MCM4, 进展, 生存, 预后标志物

# Expression and Significance of MCM4 in Colorectal Cancer

Kang Li<sup>1</sup>, Jing Yan<sup>1</sup>, Xiaoming Zhang<sup>2\*</sup>, Haifeng Zhang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Linyi People's Hospital, Postgraduate Training Base of Jinzhou Medical University, Linyi Shandong

<sup>2</sup>The Third Ward of General Surgery Center, Linyi People's Hospital, Linyi Shandong

Received: Apr. 21<sup>st</sup>, 2024; accepted: May 14<sup>th</sup>, 2024; published: May 23<sup>rd</sup>, 2024

## Abstract

**Objective:** To analyze the expression of MCM4 in colorectal cancer cells, study the role of MCM4 on

\*通讯作者。

colorectal cancer cells, and further explore the association between MCM4 and colorectal cancer (CRC). **Methods:** 1) Immunohistochemistry was used to compare the expression of MCM4 in different colon tissues and analyze the relationship between MCM4 and clinicopathology in colorectal cancer patients. 2) Survival analysis was performed using the Kaplan-Meier method with log-rank test to assess survival differences. Cox regression analysis was used to determine the predictive value of MCM4 for CRC. 3) The expression levels of MCM4 in colorectal cancer cell lines HCT 116 and Caco2 were detected by qRT-PCR and Western Blot. 4) To construct an expression vector that knocks down MCM4 and establish a cell line expressing the knocked-down MCM4. The proliferative ability of CRC cells was detected by CCK-8 cell proliferation assay and cell clone formation assay. **Results:** 1) MCM4 is expressed at higher levels in CRC tissues and cells than in normal colorectal tissues and cells. 2) MCM4 promotes the proliferative capacity of colorectal cancer cells. 3) High expression of MCM4 was significantly associated with poor prognosis. **Conclusions:** MCM4 promotes the development of colorectal cancer and may be an effective colorectal tumor marker and a potential therapeutic target.

## Keywords

Colorectal Cancer, MCM4, Progress, Survival, Prognostic Marker

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

如今,结直肠癌(CRC)在全球最常见的恶性肿瘤中位于第三,同时在与癌症相关的死亡率中位列第二[1]。近年来,中国的结直肠癌发病人数和死亡人数在持续上升[2]。2020年,中国新增的CRC患者为555,477例,占全球新增CRC患者的28.8%,CRC相关死亡患者为286,162例,占全球的30.6%[3]。几乎一半的病例因症状确诊时已为肿瘤晚期[4]。因此,通过筛查,早期发现和诊断结直肠癌,及时干预控制危险因素,对于降低CRC的发病率、死亡率以及提高的患者的生存率具有重要意义[5]。最近的研究证实,一些生物标志物与CRC的发生发展之间存在相关联系[6][7][8][9],如MSI-2高表达与结直肠癌患者的不良预后相关,并可能是结直肠癌肝转移的潜在生物标志物;Wnt7a促进结直肠腺癌的发生发展;SALL4在CRC中存在过表达,SALL4低表达与术后高生存率相关。SALL4可以作为一个潜在的诊断和预后的结直肠癌标志物;血浆中升高的miR-183可能是一个很有前景的生物标志物,可以预测CRC患者的肿瘤复发风险和不良生存。这为探求新的CRC治疗靶点提供了方向,这也将有助于患者的个性化治疗。

微小染色体维持蛋白(MCMs)包含6种相关蛋白,参与DNA复制的起始以及维持染色体的功能,在基因稳定性中扮演重要角色[10]。MCM4作为MCMs的重要一员,具有ATP酶活性,是DNA由超卷曲状态解开的核心,也是复制叉形成和招募其他DNA复制蛋白的关键[11]。最近的研究发现,MCM4的异常表达与多种肿瘤的发生发展密切相关,MCM4在肝癌、子宫内膜癌、乳腺癌、胃癌中高表达,且与患者预后不良相关[12][13][14][15]。然而,目前MCM4与CRC的相关性研究很是缺乏,MCM4在CRC中的作用有待探讨。

在本研究中,我们系统分析了MCM4在结直肠癌组织和细胞系中的表达情况,MCM4对结直肠癌细胞增殖的效应,我们还探讨了MCM4的表达水平在CRC中的临床意义及患者的预后情况。这些研究为进一步研究MCM4作为一种新的CRC生物标志物提供了新的思路。

## 2. 方法和材料

### 2.1. 病人和样本

选取临沂市人民医院 2017~2018 年行结直肠癌根治术的 134 例患者, 获得配对 CRC 组织样本和邻近的正常肠壁组织样本, 134 例患者均被术后病理结果证实为 CRC。确定患者的一般临床和病理资料, 该研究经临沂市人民医院医学伦理委员会批准并获得了患者的知情同意。

### 2.2. 细胞系和细胞培养

两株人结直肠癌细胞系(HCT 116、Caco2)以及人正常结肠上皮细胞(NCM460)均购自中国科学院细胞库(中国 上海)。HCT 116 用 McCoy's 5A 培养基培养, Caco2 用 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培养, NCM460 用 1640 培养基培养。3 种培养基均含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素链霉素。细胞在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。

### 2.3. 细胞转染

MCM4 的特异性 shRNA 和非编码 shRNA 慢病毒载体购自 Vigene Biosciences (中国, 山东)。靶向 MCM4 的不同区域, 设计了 4 个短发夹 RNA(shRNA), 并包装到一个载体上。shRNA 的序列如表 1 所示。将慢病毒转染到 HCT 116 和 Caco2 细胞中, HCT116 以 2 μg/mL 浓度的嘌呤霉素筛选, Caco2 以 5 μg/mL 的嘌呤霉素筛选, 以构建稳定下调 MCM4 表达的细胞系。下调效果用 qPCR 和 Western Blot 实验验证。

**Table 1.** shRNA sequences

**表 1.** shRNA 序列

shRNA	shRNA 序列(5'-3')
shRNA1	GCCACACCACCCACAGCATGGTTCAAGAGACCATGCTGTGGGTGGTGTGGCTTTTTT
shRNA2	GGGCAGCAGCAGAAGATATAGTTCAAGAGACTATATCTTCTGCTGCTGCCCTTTTTT
shRNA3	GGGCTGAGATCAACATCTTGCTTCAAGAGAGCAAGATGTTGATCTCAGCCCTTTTTT
shRNA4	GCCTTGGCTCCAAGCATTATTTCAAGAGAATAAATGCTTGGAGCCAAGGCTTTTTT

### 2.4. 免疫组织化学

石蜡包埋、福尔马林固定切片后, 70°C 干燥 60 min。石蜡切片脱蜡至水后, 将切片置于磷酸盐缓冲液(PBS)中洗涤以修复抗原, 然后放入 3% 双氧水溶液中, 室温孵育 25 min, 阻断内源性过氧化物酶。滴加 3% BSA 均匀覆盖组织, 室温封闭 30 min 完成血清封闭。切片与 MCM4 (兔多克隆抗体, abcam)以 1:500 稀释, 4°C 孵育过夜。于 PBS 缓冲液洗涤后, 与二抗室温孵育 50 min。用 DAB 显色后, 苏木精反染, 乙醇脱水, 清除二甲苯, 显微镜下观察石蜡切片。

根据染色强度(阴性 = 0 分, 弱 = 1 分, 中 = 2 分, 强 = 3 分)和染色阳性面积占比(0~10% = 0 分, 11%~50% = 1 分, 51%~75% = 2 分, 76%~100% = 3 分)对 MCM4 的反应情况进行评分。MCM4 的表达评分为染色强度评分乘以染色阳性面积占比评分。0~2 分定义为低表达, 3~9 分定义为高表达。

### 2.5. RNA 提取和 qRT-PCR

使用 Trizol 试剂(Invitrogen)从细胞样品中提取总 RNA, 根据制造商的说明使用 Accurate Biotechnology 反转录试剂盒合成 cDNA。采用 SYBR Green Premix Pro Taq Hs qPCR 试剂盒(湖南, 中国)进行

实时荧光定量 PCR。MCM4 的引物为: forward, 5'-AGCATGGCACTCATCCACAA-3'和 reverse, 5'-GCACAGCTCGATAGATGCCT-3'。GAPDH 的引物为: forward, 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'和 reverse, 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'。相对定量采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法。

## 2.6. Western Blot

细胞蛋白样品由 RIPA 裂解缓冲液(Solarbio, China)裂解获得, 蛋白浓度由 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Solarbio, China)测得。蛋白样品通过 SDS-PAGE 电泳并转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 1.5 h 后, 加入一抗 MCM4 (1:2000 稀释, abcam)、GAPDH (1:3000 稀释, Affinity, China), 4℃ 孵育过夜。TBST 洗涤后, 二抗孵育 1.5 h。用 ECL 显影剂曝光显影。

## 2.7. CCK-8 细胞增殖实验

将转染后的细胞接种于 96 孔板中, 每孔  $2 \times 10^3$  个细胞, 在 37°、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24、48、72、96 h 后, 每孔加入 10 μL Cell Counting Kit-8 (CCK-8)试剂(APEX BIO, 美国), 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的环境中孵育 2 h, 然后用酶标仪检测 450 nm 处吸光度值。

## 2.8. 细胞克隆形成实验

将转染后的细胞接种于 6 孔板中,  $1 \times 10^3$  个细胞/孔, 于含有 10% 胎牛血清的 McCoy's 5A 和 DMEM 中培养 10~14 天。当观察到克隆时, 终止培养。弃上清, 用 PBS 洗涤。用 4% 多聚甲醛固定 20 min 后, 适量 Giemsa 染色液染色, 流动的清水缓慢清洗, 晾干。光学显微镜下计数克隆数。

## 3. 统计分析

采用 SPSS 26.0 进行统计分析。结果数据以平均值  $\pm$  标准差表示。采用  $\chi^2$  检验分析 MCM4 与 CRC 患者的一般临床病理特征的相关性。采用 t 检验比较两组之间的差异。采用单因素方差分析分析三组间的差异。采用单因素和多因素 Cox 回归分析。所有统计检验均为双边概率检验,  $\alpha = 0.05$ ,  $P < 0.05$  被认为具有统计学意义。

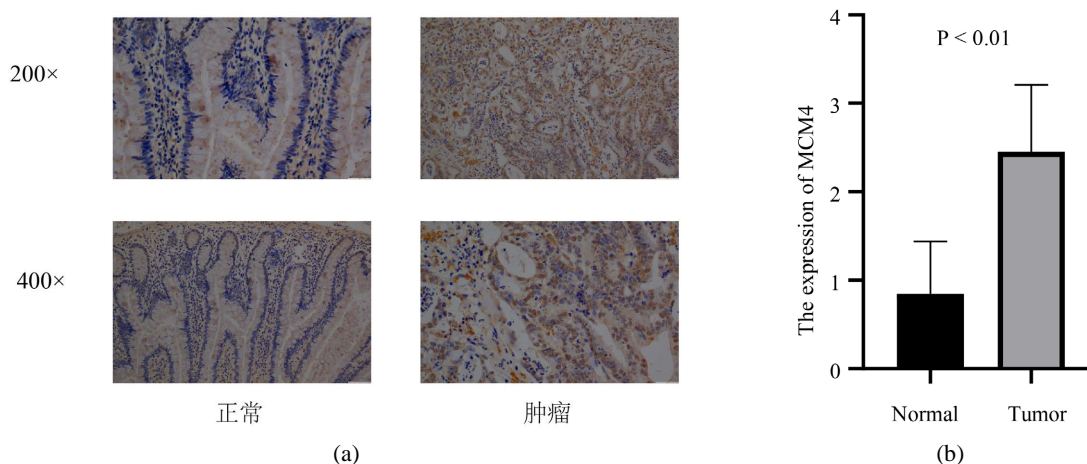
## 4. 结果

### 4.1. MCM4 在正常结直肠壁组织与 CRC 组织中的表达情况

MCM4 在结直肠癌组织中的阳性表达高于正常结直肠壁组织( $P < 0.01$ ) (图 1)。

### 4.2. MCM4 的表达水平与一般临床病理特征的相关性

根据 134 例患者的免疫组化结果, 我们将 CRC 患者分为两组, 研究 MCM4 表达水平与 CRC 患者一般临床病理特征的相关性(表 2)。如表 1 所示, MCM4 的高表达与肿瘤大小( $P = 0.030$ )、T Grade ( $P = 0.034$ )、N Grade ( $P < 0.001$ )、TNM Staging ( $P < 0.001$ )显著相关。MCM4 的表达与年龄、性别、肿瘤位置、组织学分级、M Grade 均无关(all  $P > 0.05$ )。同时, 我们使用 Cox 比例风险模型确定了 MCM4 对 CRC 的预测价值(表 3)。单因素 Cox 生存分析显示, 肿瘤大小、组织学分级、TNM Staging 以及 MCM4 表达水平(HR = 4.691, 95%CI = 1.621~13.581,  $P < 0.001$ )与 OS 显著相关(表 3)。多因素 Cox 生存分析证实, TNM Staging (HR = 4.022, 95%CI = 1.545~10.471,  $P = 0.004$ )以及 MCM4 表达水平(HR = 4.691, 95%CI = 1.621~13.581,  $P = 0.004$ )是 CRC 患者 OS 的独立预后指标。此外, 我们还分析了 MCM4 的表达水平与 CRC 患者预后之间的关系(图 2), 如图 2 所示, MCM4 的高表达水平与 CRC 患者的预后不良显著相关。



**Figure 1.** MCM4 expression in human colorectal cancer tissues. (a) Immunohistochemical (IHC) staining of normal and colorectal cancer tissues for MCM4 expression (200 $\times$ , 400 $\times$ ); (b) Expression level of MCM4 in CRC. MCM4 was significantly upregulated in colorectal cancer tissues compared with normal tissues

**图 1.** MCM4 在人结直肠癌组织中的表达。(a) 免疫组织化学(IHC)染色正常和结直肠癌组织中 MCM4 的表达(200 $\times$ , 400 $\times$ )。 (b) MCM4 在 CRC 中的表达水平。与正常组织相比, MCM4 在结直肠癌组织中显著上调

**Table 2.** Correlation between MCM4 expression level and general clinicopathological features in 134 patients with colorectal cancer

**表 2.** 134 例结直肠癌患者 MCM4 表达水平与一般临床病理特征的相关性

因素	例数(n)	MCM4 表达水平		P
		Low (n = 102)	High (n = 32)	
年龄				
≤60	40	28	12	
>60	94	74	20	0.278
性别				
男性	74	56	18	
女性	60	46	14	0.894
肿瘤位置				
结肠	38	30	8	
直肠	96	72	24	0.629
肿瘤大小				
≤5 cm	92	75	17	
>5 cm	42	27	15	0.030
组织学分级				
高/中	107	82	22	
低	27	20	10	0.168
T 分期				
T1/T2	31	28	3	
T3/T4	103	74	29	0.034

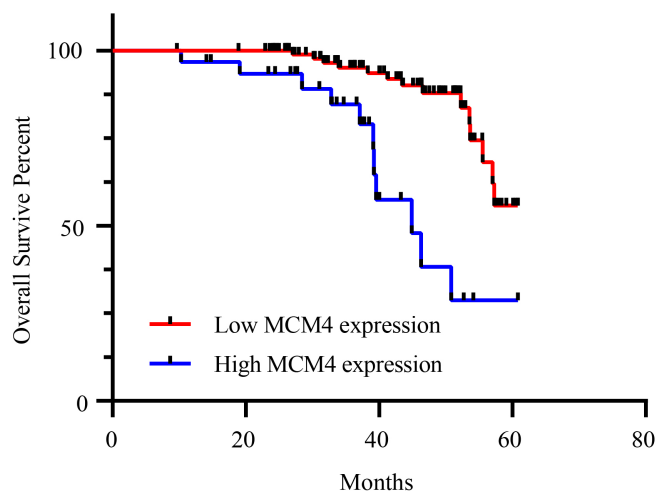
续表

N 分期				
N0	101	94	7	
N1/2/3	33	8	25	<0.001
M 分期				
M0	126	98	28	
M1	8	4	4	0.074
TNM 分期				
I/II	106	93	5	
III/IV	28	9	27	<0.001

**Table 3.** Univariate and multivariate analyses of OS in 134 patients with colorectal cancer**表 3.** 对 134 例结直肠癌患者的 OS 进行单因素和多因素分析

因素	单因素分析		多因素分析	
	HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
年龄				
≤60	1			
>60	0.585 (0.270~1.267)	0.174		
性别				
男性	1			
女性	1.206 (0.557~2.608)	0.635		
肿瘤位置				
结肠	1			
直肠	1.213 (0.528~2.786)	0.649		
肿瘤大小				
≤5cm	1		1	
>5cm	3.588 (1.672~7.696)	0.001	1.964 (0.869~4.441)	0.105
组织学分级				
高/中	1		1	
低	3.238 (1.467~7.416)	0.004	2.126 (0.949~4.764)	0.067
TNM 分期				
I/II	1		1	
III/IV	10.469 (4.756~23.048)	< 0.001	4.022 (1.545~10.471)	0.004
MCM4 表达水平				
低	1		1	
高	11.616 (4.675~28.866)	< 0.001	4.691 (1.621~13.581)	0.004



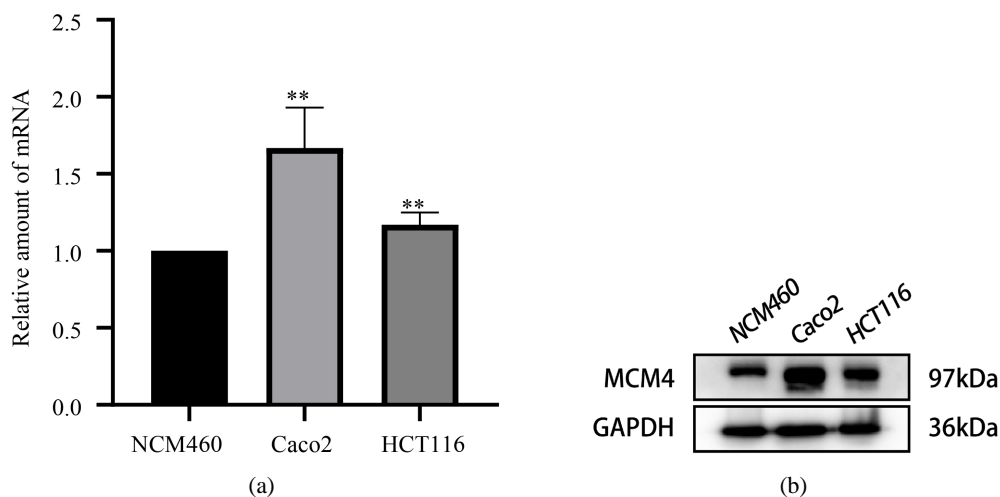


**Figure 2.** Kaplan-Meier survival analysis of MCM4 expression levels in 134 patients with colorectal cancer

**图 2.** Kaplan-Meier 生存分析 134 例结直肠癌患者 MCM4 表达水平

#### 4.3. 与正常结肠上皮细胞相比，MCM4 在 CRC 细胞中为高表达

为了研究 MCM4 在 CRC 中的作用，我们采用了实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和 Western Blot 检测 MCM4 在人正常结肠上皮细胞(NCM460)和结直肠癌细胞(HCT 116、Caco2)中的表达水平。结果显示，结直肠癌细胞中 MCM4 的 mRNA 水平显著高于正常结肠上皮细胞( $P < 0.01$ , 图 3(a))。同时，我们还发现与正常结肠上皮细胞相比，结直肠癌细胞在蛋白水平上 MCM4 也为高表达水平(图 3(b))。



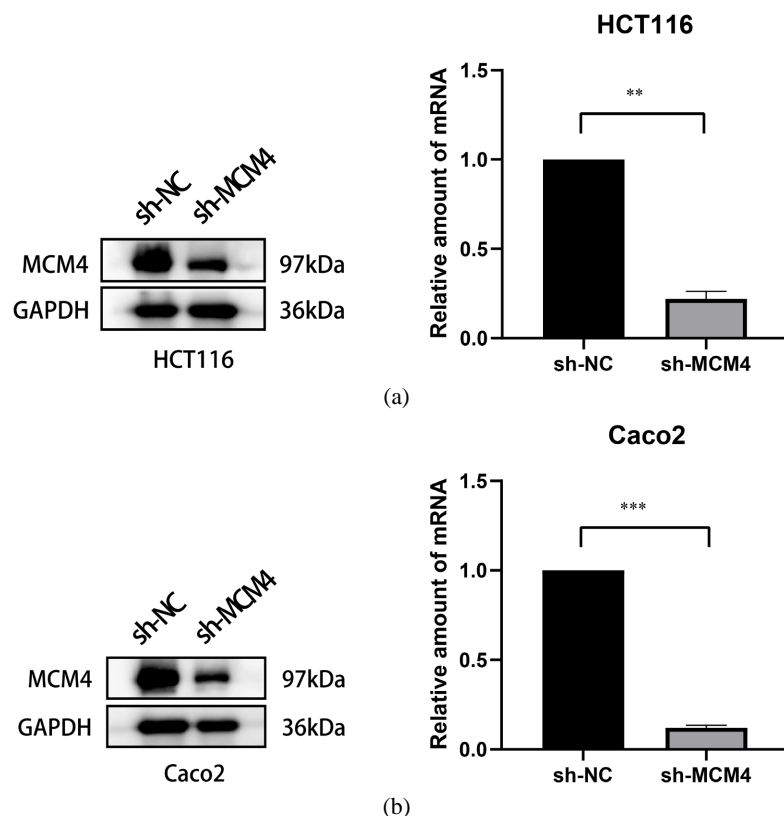
**Figure 3.** MCM4 expression levels in CRC cells (Caco2, HCT116) and human normal colonic epithelial cells (NCM460) as determined by qRT-PCR (A) and Western Blot (B)

**图 3.** 通过 qRT-PCR (A) 和 Western Blot (B) 检测 MCM4 在 CRC 细胞(Caco2、HCT116) 和人正常结肠上皮细胞(NCM460) 中的表达水平

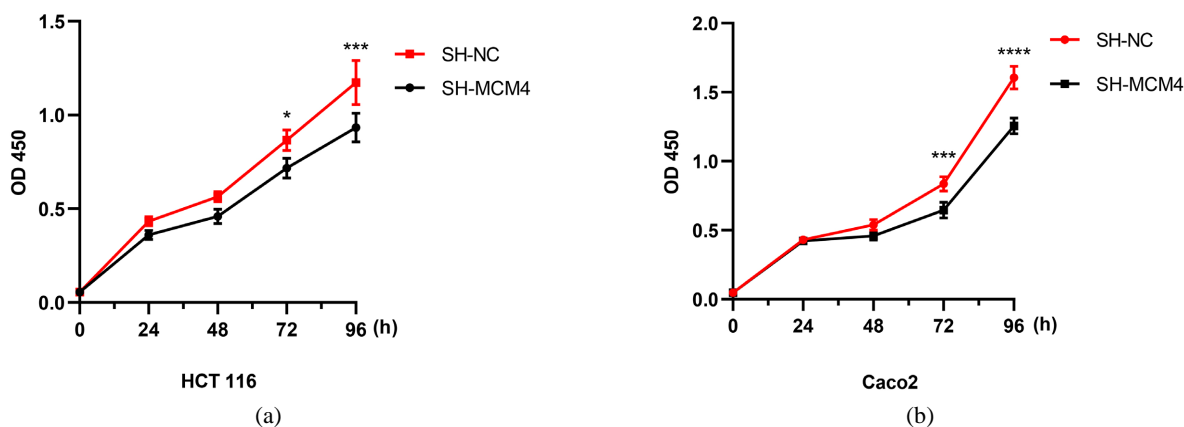
#### 4.4. MCM4 促进 CRC 细胞的增殖

为了研究 MCM4 对 CRC 细胞增殖的影响，我们敲低了 MCM4 在 CRC 细胞中的表达水平。qRT-PCR 和 Western Blot 的检测结果显示 shHCT116 和 shCaco2 在 mRNA 和蛋白水平上 MCM4 表达水平显著降

低(all  $P < 0.01$ , 图 4)。接下来, 我们通过 CCK-8 细胞增殖实验发现, 与对照组相比, 敲低 MCM4 的表达水平可显著抑制 shMCM4 组的细胞增殖(图 5(a), 图 5(b))。类似的, 敲低 MCM4 后, 与对照组相比, CRC 细胞 HCT 116 和 Caco2 的细胞克隆形成数量显著减少(图 6(a), 图 6(b))。以上结果都表明敲低 MCM4 的表达水平可抑制 CRC 细胞的增殖。



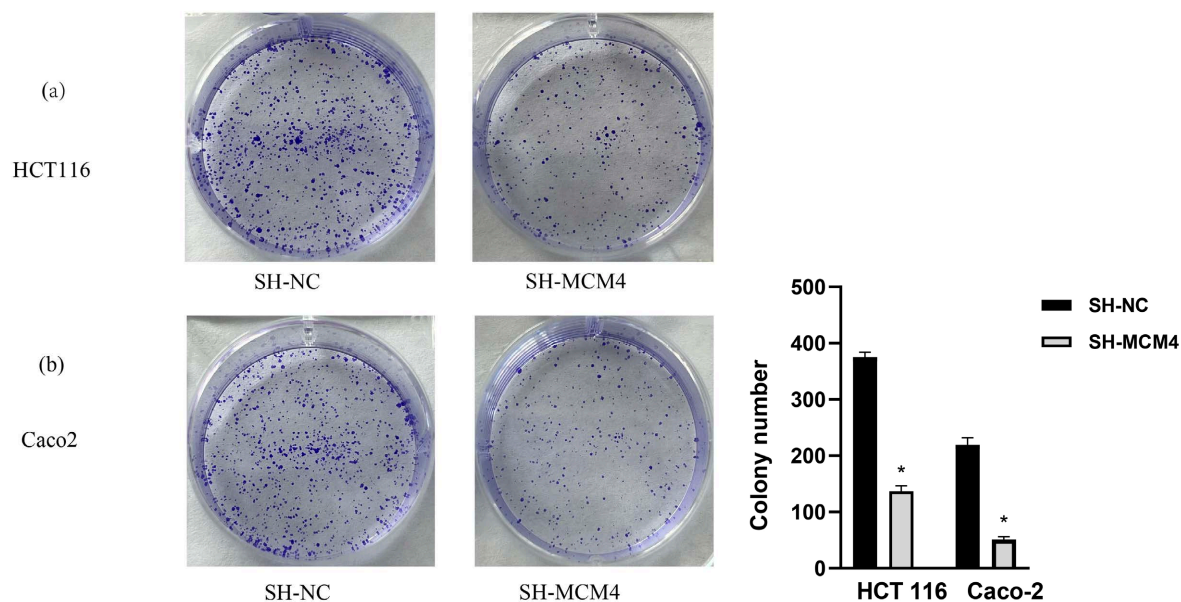
**Figure 4.** Validation of the efficiency of MCM4 knockdown in CRC cells (a), (b). The results of qRT-PCR and Western Blot showed that the expression level of MCM4 in sh-MCM4 group was significantly lower than that in control group  
**图 4.** 在 CRC 细胞中验证 MCM4 敲低的效率(a), (b)。qRT-PCR 和 Western Blot 结果显示, sh-MCM4 组 MCM4 的表达水平明显低于对照组



**Figure 5.** Effect of stable knockdown of MCM4 on the proliferation of HCT116 (A) Caco2 (B) cells detected by CCK-8 cell proliferation assay

**图 5.** CCK-8 细胞增殖实验检测稳定敲低 MCM4 对 HCT116 (a) Caco2 (b) 细胞增殖的影响





**Figure 6.** Effect of stable knockdown of MCM4 on cell proliferation in HCT116 (a) and Caco2 (b) cells detected by cell clone formation assay

**图 6.** 细胞克隆形成实验检测稳定敲低 MCM4 对 HCT116 (a)和 Caco2 (b)细胞增殖的影响

## 5. 讨论

在本项研究中，我们研究了 MCM4 在 CRC 中的作用。我们发现 MCM4 在 CRC 组织以及细胞中为高表达水平，同时，我们还研究了 MCM4 在 CRC 中的增殖作用。我们还分析了 MCM4 的表达水平与 CRC 临床病理参数的关系，提示 MCM4 的表达水平与 CRC 病理分期相关。同时，我们还发现 MCM4 的高表达与 CRC 患者的预后不良相关。Cox 多因素分析显示，MCM4 是 CRC 患者的独立预后因素。总之，我们的研究表明，MCM4 可能促进 CRC 的发生发展且与预后不良相关。

微小染色体维持蛋白(MCMs)含有 DNA 依赖性 ATPase，可与复制起点结合并支持 DNA 复制[16]。据报道，MCMs 水平的升高与恶性细胞的增殖有关[17] [18] [19] [20]，此外，也预示着细胞癌变与肿瘤复发[21]。作为 MCM 家族的一份子，MCM4 在 DNA 复制过程中起核心作用，包括 MCM4 在内的 MCMs 过表达可能导致细胞过度增殖和肿瘤的产生。而 MCM4 在 CRC 的发生发展中尚不清楚。在本研究中，我们证实了 MCM4 在 CRC 组织以及细胞中为过表达，敲低 MCM4 可显著降低 CRC 细胞的增殖速率和细胞克隆形成。此外，我们还发现，MCM4 的过表达往往与患者的预后不良显著相关。这与既往的研究一致，Go Kobayashi 等人研究到与正常尿路上皮相比，MCM4 在尿路上皮癌中高表达且与 Ki-67、HER2、EGFR、p53 的高表达相关，此外还与病理分期和预后不良显著相关[22]。Yan Xu 等人通过沉默 MCM4 发现肝癌细胞的增殖和集落形成明显受到抑制，还可大大降低肿瘤的生长速度[12]。

在我们的研究中，我们还分析出 MCM4 的高表达与肿瘤的病理分期、肿瘤大小等一般临床病理特征显著相关。高水平的 MCM4 与患者较差的 OS 相关，而且，Cox 多因素分析显示 MCM4 是 CRC 患者的独立预后因素。以上研究结果暗示，MCM4 可能是 CRC 潜在的预后标志物。这与 Narutaka Katsuya 等人的研究结果一致，MCM4 在胃癌患者中与肿瘤分期显著相关。另外，高水平 MCM4 与 GC 的预后不良相关，而且在多因素分析中，MCM4 是一个独立的预后因素[23]。

本研究存在一定的局限性。首先，该实验需要进一步从分子机制方面研究 MCM4 对 CRC 的作用。其次，实验样本量较少，可能会存在统计偏倚。最后，需要靶向药物进一步验证对 MCM4 的效果。

## 6. 结论

综上所述,我们发现 MCM4 在 CRC 中高表达,且高水平 MCM4 与 CRC 患者预后不良相关。MCM4 可能是 CRC 有效的生物标志物和潜在的治疗靶点。

## 参考文献

- [1] Weng, J., *et al.* (2022) Exploring Immunotherapy in Colorectal Cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, **15**, Article No. 95. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01294-4>
- [2] Li, N., *et al.* (2021) Incidence, Mortality, Survival, Risk Factor and Screening of Colorectal Cancer: A Comparison among China, Europe, and Northern America. *Cancer Letters*, **522**, 255-268. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.09.034>
- [3] Sung, H., *et al.* (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [4] Zygulska, A.L. and Pierzchalski, P. (2022) Novel Diagnostic Biomarkers in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, Article No. 852. <https://doi.org/10.3390/ijms23020852>
- [5] Gini, A., *et al.* (2020) Impact of Colorectal Cancer Screening on Cancer-Specific Mortality in Europe: A Systematic Review. *European Journal of Cancer*, **127**, 224-235. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.12.014>
- [6] Zong, Z., *et al.* (2016) Musashi2 as a Novel Predictive Biomarker for Liver Metastasis and Poor Prognosis in Colorectal Cancer. *Cancer Medicine*, **5**, 623-630. <https://doi.org/10.1002/cam4.624>
- [7] Li, C., *et al.* (2021) Wnt7a Promotes the Occurrence and Development of Colorectal Adenocarcinoma. *Frontiers in Oncology*, **11**, Article 522899. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.522899>
- [8] Wu, H.K., Liu, C., Fan, X.-X., Wang, H. and Zhou, L. (2017). Spalt-Like Transcription Factor 4 as a Potential Diagnostic and Prognostic Marker of Colorectal Cancer. *Cancer Biomarkers*, **20**, 191-198. <https://doi.org/10.3233/CBM-170204>
- [9] Yuan, D., Li, K., Zhu, K., Yan, R. and Dang, C. (2015) Plasma miR-183 Predicts Recurrence and Prognosis in Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Biology & Therapy*, **16**, 268-275. <https://doi.org/10.1080/15384047.2014.1002327>
- [10] Forsburg, S.L. (2004) Eukaryotic MCM Proteins: Beyond Replication Initiation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **68**, 109-131. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.1.109-131.2004>
- [11] Yardimci, H. and Walter, J.C. (2014) Prereplication-Complex Formation: A Molecular Double Take? *Nature Structural & Molecular Biology*, **21**, 20-25. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2738>
- [12] Xu, Y., Xueling, Y., Si, T., *et al.* (2021) MCM4 in Human Hepatocellular Carcinoma: A Potent Prognostic Factor Associated with Cell Proliferation. *BioScience Trends*, **15**, 100-106. <https://doi.org/10.5582/bst.2021.01016>
- [13] Pei, L.-P., Zhang, Y.-Z., Li, G.-Y. and Sun, J.-L. (2022) Comprehensive Analysis of the Expression and Prognosis for MCM4 in Uterine Corpus Endometrial Carcinoma. *Frontiers in Genetics*, **13**, Article 890591. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.890591>
- [14] Liu, X., *et al.* (2021) The Alterations and Potential Roles of MCMs in Breast Cancer. *Journal of Oncology*, **2021**, Article ID: 7928937. <https://doi.org/10.1155/2021/7928937>
- [15] Guo, F., *et al.* (2020) Comprehensive Analysis of the Expression and Prognosis for MCMs in Human Gastric Cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*, **19**, 1533033820970688. <https://doi.org/10.1177/1533033820970688>
- [16] Sun, J., *et al.* (2015) The Architecture of a Eukaryotic Replisome. *Nature Structural & Molecular Biology*, **22**, 976-82. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3113>
- [17] Freeman, A., *et al.* (1999) Minichromosome Maintenance Proteins as Biological Markers of Dysplasia and Malignancy. *Clinical Cancer Research*, **5**, 2121-2132.
- [18] Going, J.J., *et al.* (2002) Aberrant Expression of Minichromosome Maintenance Proteins 2 and 5, and Ki-67 in Dysplastic Squamous Oesophageal Epithelium and Barrett's Mucosa. *Gut*, **50**, 373-377. <https://doi.org/10.1136/gut.50.3.373>
- [19] Ishimi, Y., *et al.* (2003) Enhanced Expression of MCM Proteins in Cancer Cells Derived from Uterine Cervix. *European Journal of Biochemistry*, **270**, 1089-1101. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03440.x>
- [20] Meng, M.V., *et al.* (2001) Minichromosome Maintenance Protein 2 Expression in Prostate: Characterization and Association with Outcome after Therapy for Cancer. *Clinical Cancer Research*, **7**, 2712-2718.

- [21] Alison, M.R., Hunt, T. and Forbes, S.J. (2002) Minichromosome Maintenance (MCM) Proteins May Be Pre-Cancer Markers. *Gut*, **50**, 290-291. <https://doi.org/10.1136/gut.50.3.290>
- [22] Kobayashi, G., Hayashi, T., Sentani, K., *et al.* (2023) MCM4 Expression Is Associated with High-Grade Histology, Tumor Progression and Poor Prognosis in Urothelial Carcinoma. *Diagnostic Pathology*, **18**, Article No. 106. <https://doi.org/10.1186/s13000-023-01392-y>
- [23] Katsuya, N., Ishikawa, A., Kido, A., *et al.* (2023) Minichromosome Maintenance 4 Is Associated with Cancer Stemness and Poor Survival of Patients with Gastric Cancer. *Pathobiology*, **90**, 147-154. <https://doi.org/10.1159/000525590>