

结直肠腺瘤,单原发及多原发结直肠癌中 P53 及 K-ras 基因的突变分析

徐 维,程 勇[△],沈雄飞

重庆医科大学附属第一医院 胃肠外科(重庆 400016)

【摘要】 目的 探讨结直肠腺瘤、单原发结直肠癌、多原发结直肠癌中 P53 及 K-ras 基因的突变。方法 收集 25 例正常结直肠组织、38 例结直肠腺瘤、78 例单原发结直肠癌、19 例(同时性多原发癌 7 例,异时性多原发癌 12 例)多原发结直肠癌组织标本及患者临床病理资料,提取标本组织中基因组 DNA,直接测序方法进行 P53 基因外显子 5、6、7、8 及 K-ras 基因密码子 12、13 序列分析,并对结直肠腺瘤及单原发结直肠癌的临床资料与其 P53 及 K-ras 基因突变进行多因素相关性分析。结果 正常结直肠组织、结直肠腺瘤、单原发结直肠癌、多原发结直肠癌中 P53 基因的突变概率分别是 0%(0/25)、44.8%(17/38)、43.6%(34/78)、42.1%(8/19),K-ras 基因的突变概率分别为 0%(0/25)、18.4%(7/38)、39.7%(31/78)、47.4%(9/19),正常结直肠组织中 P53 和 K-ras 基因突变概率与结直肠腺瘤、单原发结直肠癌、多原发结直肠癌中突变概率相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$),结直肠腺瘤中 K-ras 基因突变概率与单原发结直肠癌、多原发结直肠癌中突变概率相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$),结直肠腺瘤中 P53 基因突变概率高于 K-ras 基因($P < 0.05$)。P53 及 K-ras 基因在单原发结直肠癌的 I、II 期及高分化类型中的突变概率与其在 III、IV 期及中低分化类型中差异无统计学意义。患者的年龄、性别、家族史、肿瘤位置与结直肠腺瘤及单原发结直肠癌中 P53 及 K-ras 基因突变无相关性,肿瘤分期及肿瘤的分化程度亦不是单原发结直肠癌中 P53 及 K-ras 基因发生突变的危险因素。结论 本研究再次证实了在结直肠肿瘤的发生和发展过程中,P53 及 K-ras 基因的突变起着重要的作用,并且在结直肠的肿瘤发生发展过程中 P53 基因的突变可能早于 K-ras 基因。

【关键词】 结直肠腺瘤 多原发结直肠癌 P53 K-ras 测序 突变

A Study on the Mutation of P53 and K-ras Gene in Colorectal Adenomas and Colorectal Carcinomas XU Wei, CHENG Yong[△], SHEN Xiong-fei. Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[△] Corresponding author, E-mail: chengyongcq@yahoo.com.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the incidence of P53 and K-ras gene mutation in colorectal adenomas and primary colorectal carcinomas. **Methods** There were 25 normal samples, 38 samples of colorectal adenoma, 78 samples of single primary colorectal cancer and 19 samples of multiple primary colorectal carcinomas (7 synchronous colorectal carcinomas and 12 metachronous colorectal carcinomas) collected in this study. With the analysis of clinico-pathologic features for each patient, exon 5-8 of P53 gene and codon 12-13 of K-ras gene of each sample were extended by real-time PCR. Multi-factor correlation analysis was carried out between the clinicopathologic features and the mutation of P53 and K-ras gene in colorectal adenoma and primary colorectal cancer. **Results** The P53 gene mutation is 0% (0/25), 44.8% (17/38), 43.6% (34/78) and 42.1% (8/19) respectively in normal mucosa tissue, colorectal adenomas, single lesion and multiple lesion of primary colorectal carcinomas, while the proportion of K-ras gene mutation was 0% (0/25), 18.4% (7/38), 39.7% (31/78), 47.4% (9/19) respectively. In our investigation there were obvious statistical differences as to the proportion of mutation of the P53 and K-ras gene between normal mucosa tissue and other three groups respectively ($P < 0.05$), while statistical differences as to the proportion of mutation of K-ras gene were found between colorectal adenomas group and single or multiple colorectal carcinoma group ($P < 0.05$). There was significant statistical difference between P53 and K-ras gene mutation in colorectal adenomas ($P < 0.05$). In addition, there were no statistical differences as to the proportion of mutation of the P53 and K-ras gene between the stage I, II and well-differentiated ones of primary colorectal cancers and the stage III IV and poorly-differentiated ones. There was no relationship between the age, gender, family history and tumor locations of the patients and the mutation of the P53 and K-ras gene. The stage and grade of differentiation of cancer was not the risky factor of the mutation of the P53 and K-ras gene in primary colorectal cancers. **Conclusion** The

cancers. **Conclusion** results of this study not only suggest that mutation of *P53* suppressor gene and *K-ras* play a significant role in the procedure of colorectal tumorigenesis, but also indicate that the mutation of *P53* gene occurs earlier than *K-ras* mutation does during tumorigenesis.

[Key words] Colorectal adenomas Multiple primary colorectal carcinomas *P53* *K-ras*
Sequence Mutation

结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一,结直肠癌根据其肿瘤起源部位的数目不同分为单原发性结直肠癌(PCC)和多原发性结直肠癌(MPCC)。多原发结直肠癌是指结直肠发生的 ≥ 2 个的互不相连的原发癌灶,在6个月以内发现的 ≥ 2 个的原发癌灶称同时性多原发性结直肠癌(SCC),6个月以上发现的 ≥ 2 个的原发癌灶称异时性多原发性结直肠癌(MCC)^[1]。结直肠腺瘤是一种常见的结直肠癌癌前病变,具有较高的恶变潜质,其存在的时间越长,恶变的可能性越大。腺瘤被认为是可以很好地反映在早期结直肠肿瘤发生发展过程中基因的突变情况的新生物^[2]。文献报道结直肠腺瘤和单原发结直肠癌中 *P53* 及 *K-ras* 基因突变较为常见^[2],但对多原发结直肠癌中 *P53* 及 *K-ras* 基因突变情况报道较少^[3]。为此,我们分别对正常结直肠组织、38例结直肠腺瘤、78例单原发结直肠癌和19例多原发结直肠癌中 *P53* 基因外显子5、6、7、8及 *K-ras* 基因密码子12、13序列进行分析,并结合患者临床病理资料进行 *P53* 及 *K-ras* 基因突变的 logistic 多因素相关性分析,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 标本来源和主要试剂

取1998年2月至2010年12月在重庆医科大学附属第一医院胃肠外科行手术切除的结直肠腺瘤38例、单原发结直肠癌78例和多原发结直肠癌19例标本组织(均经病理专家会诊证实)或病理科保存的石蜡切片标本。结直肠癌术前均未接受任何抗癌治疗(放疗、化疗或生物治疗),取同期门诊行肠镜活检者组织标本(取出的组织病理检查证实为正常结直肠黏膜)25例(为无遗传疾病的无关个体,均获得其知情同意)。同时收集患者基本情况及临床病理资料。将母系、父系家族中任一一级直系亲属患有原发性消化道恶性肿瘤的患者定义为有肿瘤家族史^[2]。

DNA提取试剂盒购自基因科技(上海)有限公司;*Taq* DNA聚合酶和dNTP均购自TaKaRa公司;所有引物均由上海生物工程公司合成;PCR产

物测序由上海生物工程公司完成。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA的提取及目的基因的扩增 将标本按DNA提取试剂盒说明书方法提取DNA,根据文献^[4]方法合成扩增 *P53* 基因外显子5、6、7、8及 *K-ras* 基因密码子12、13的特异性引物(引物序列见表1),以从正常组织中获取的DNA产物作为阳性对照模板,以灭菌去离子水作为阴性对照模板,扩增 *P53* 基因外显子5、6、7、8及 *K-ras* 基因密码子12、13的PCR反应体系均为:在20 μL 反应体系中,含10 \times PCR Buffer 2 μL ,dNTP 2 μL ,*Taq* DNA聚合酶 0.1 μL ,灭菌去离子水 12.9 μL ,上、下引物分别为1 μL ,模板DNA为1 μL (阴性对照则加入相同量的灭菌去离子水)。扩增 *P53* 基因外显子5、6、7、8的PCR循环条件为94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸10 min,总共35个循环。扩增 *K-ras* 基因密码子12、13的PCR循环条件为94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸5 min,总共55个循环。取4 μL PCR产物和1 μL 酚蓝混合后加样于含2%溴化乙锭(EB)的琼脂糖凝胶中,并在110 mV的恒压电泳槽中电泳30 min,用紫外观察分析仪观察条带。

表1 扩增引物序列及片段长度

Table 1 The primer sequences of *P53* and *K-ras* gene and base pair of their fragments

Gene	Exon	Sequence (5'-3')	Sense (S)/ antisense (A)	Fragment (bp)
<i>P53</i>	Exon 5	TCCCTGCCTCAACAAGAT	S	185
		TCACCATCGCTATCTGAGCA	A	
	Exon 6	TCCTCACTGATTGCTCTTAG	S	148
		AGTTGCAAACCGACCTCAG	A	
Exon 7	GCTGTGTTATCTCCTAGGT	S	143	
	CAAGTGGCTCCTGACCTGGA	A		
<i>K-ras</i>	Codon 12,13	CCTATCTGAGTAGTGGTAA	S	180
		GGTGAAGCTCCCTTCTT	A	
		AGGCCTGCTGAAAATGACTG	S	
		CTATTGTTGATCATATTTCG	A	

1.2.2 目的基因的测序 将所获取的PCR产物交由上海生物工程公司测序部行DNA测序。测序所得结果中 *P53* 基因外显子5、6、7、8中和 *K-ras* 基因密码子12、13中有一个或一个以上发生突变都计为 *P53* 基因和 *K-ras* 基因发生突变。

1.3 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,

两两间比较用 Fisher 确切概率法检验；多因素相关性分析采用 logistic 回归检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般情况分析

正常结直肠组织、结直肠腺瘤、单原发结直肠癌、多原发结直肠癌 4 组间的年龄和性别之间的差异无统计学意义(P 均 > 0.05)，结直肠腺瘤、单原发

结直肠癌、多原发结直肠癌 3 组间家族史及肿瘤所在位置之间的差异无统计学意义(P 均 > 0.05)，单原发结直肠癌、多原发结直肠癌 2 组间肿瘤的分化程度及分期之间的差异无统计学意义(P 均 > 0.05)，见表 2。

2.2 目的基因的扩增鉴定及测序

扩增的 PCR 产物凝胶电泳，结果显示 PCR 产物为 P53 和 K-ras 基因片段(图 1)，将目的基因片段行测序，基因突变序列见图 2。

表 2 各组间患者临床病理资料对比分析

Table 2 The analysis of the clinicopathologic features of four groups

Clinicopathologic feature	Normal mucosa tissue (n=25)	Colorectal adenomas (n=38)	Single primary colorectal cancer (n=78)	Multiple primary colorectal cancer (n=19)
Age (yr.)	61.4±8.5	60.2±7.9	63.5±8.3	62.7±8.7
>60 yr. [case (%)]	15 (60.0)	24 (63.2)	45 (57.7)	12 (63.2)
Male/female (case)	13/12	16/22	40/38	10/9
Family history [case (%)]	/	13 (34.2)	22 (28.2)	6 (31.6)
Tumor locations [case (%)]				
Colon	/	15 (39.5)	34 (43.6)	7 (36.8)
Rectal colon	/	23 (60.5)	44 (56.4)	12 (63.2)
Differentiation [case (%)]				
Poorly-differentiated	/	/	60 (76.9)	17 (89.5)
Well-differentiated	/	/	18 (23.1)	2 (10.5)
Stage [case (%)]				
I - II	/	/	16 (20.5)	3 (15.8)
III - IV	/	/	62 (79.5)	16 (84.2)

No statistical differences between the clinicopathologic features of the four groups

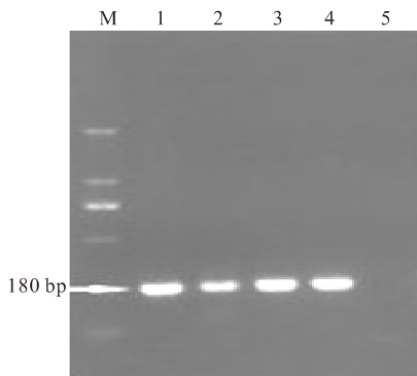


图 1 各组组织中 K-ras 基因 PCR 扩增产物电泳图

Fig 1 The gel-electrophoreses image of amplified products of K-ras

M: DNA ladder; 1: Normal mucosa tissue; 2: Colorectal adenomas; 3: Single primary colorectal cancers; 4: Multiple primary colorectal cancers; 5: Negative control by H₂O

2.3 P53 基因的突变情况

在正常结直肠组织、结直肠腺瘤、单原发结直肠癌、多原发结直肠癌中 P53 基因的突变概率分别是 0% (0/25)、44.8% (17/38)、43.6% (34/78)、42.1% (8/19)，P53 基因在正常结直肠组织中的突变概率与结直肠腺瘤、单原发结直肠癌、多原发结直

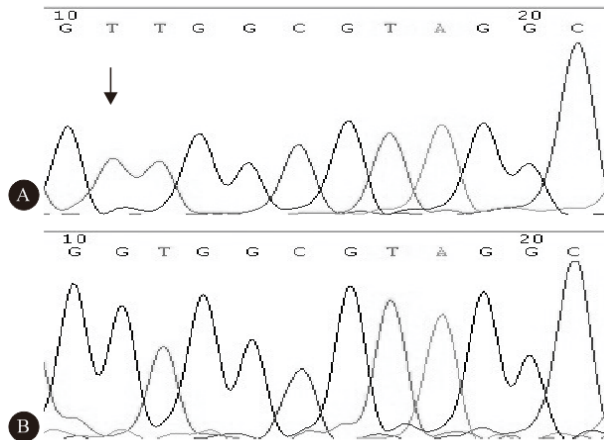


图 2 K-ras 基因突变序列与正常序列对比

Fig 2 DNA sequencing analysis between the wild and mutation type of K-ras

A: Mutation type; B: Wild type

肠癌突变概率差异有统计学意义(P 均 < 0.05)，其余两两之间的差异无统计学意义(P 均 > 0.05)，见表 3。

2.4 K-ras 基因的突变情况

在正常结直肠组织、结直肠腺瘤、单原发结直肠

癌、多原发结直肠癌中 K-ras 基因的突变概率呈上升趋势,分别是 0%(0/25)、18.4%(7/38)、39.7%(31/78)、47.4%(9/19),其突变概率在正常结直肠组织中与在结直肠腺瘤、单原发结直肠癌、多原发结直肠癌中差异有统计学意义(P 均 <0.05),在结直肠腺瘤和单原发结直肠癌间($P<0.05$)、多原发结直肠癌和结直肠腺瘤间($P<0.05$)其突变概率差异均有统计学意义,但在单原发结直肠癌和多原发结直肠癌间 K-ras 基因的突变概率差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

表 3 P53 与 K-ras 基因在各组中的突变情况 [例数(%)]

Table 3 The proportion of P53 and K-ras gene mutation in different groups [case (%)]

Group	<i>n</i>	P53	K-ras
Normal mucosa tissue	25	0 (0.0)	0 (0.0)
Colorectal adenomas	38	17 (44.8)*	7 (18.4)*
Single primary colorectal cancers	78	34 (43.6)*	31 (39.7)*·△
Multiple primary colorectal cancers	19	8 (42.0)*	9 (47.4)*·△

* $P<0.05$, vs. normal colorectal tissue group; △ $P<0.05$, vs. colorectal adenomas tissue group

2.5 P53, K-ras 基因在各组内突变率的比较

由表 3 可见,仅结直肠腺瘤组 P53 基因突变概率高于 K-ras 基因($P=0.025$),其余各组 P53 及 K-ras 基因突变突变率差异均无统计学意义(P 均 >0.05),提示腺瘤组织中 P53 基因的突变可能更早

表 4 腺瘤中 P53、K-ras 基因突变与各临床因素间的 logistic 回归分析

Table 4 The logistic regression analysis between the mutation of P53 and K-ras gene and the clinicopathologic features of colorectal adenomas

Clinicopathologic feature	The mutation of P53 gene				The mutation of K-ras gene			
	Regression coefficient	Standard error	<i>P</i>	OR	Regression coefficient	Standard error	<i>P</i>	OR
Age	0.049	0.791	0.915	1.050	-0.246	1.083	0.820	0.782
Gender	0.584	0.725	0.420	1.794	-0.251	1.002	0.802	0.778
Family history	0.709	0.833	0.395	2.031	0.333	1.028	0.746	1.395
Tumor locations	0.355	0.760	0.640	1.426	-0.211	0.986	0.831	0.810

表 5 单原发癌中 P53、K-ras 基因突变与各临床因素间的 logistic 回归分析

Table 5 The logistic regression analysis between the mutation of P53 and K-ras gene and the clinicopathologic features of primary colorectal cancers

Clinicopathologic feature	The mutation of P53 gene				The mutation of K-ras gene			
	Regression coefficient	Standard error	<i>P</i>	OR	Regression coefficient	Standard error	<i>P</i>	OR
Age	0.116	0.490	0.813	1.122	0.013	0.512	0.980	1.013
Gender	-0.184	0.492	0.709	0.832	-0.002	0.473	0.997	0.998
Family history	-0.223	0.548	0.685	0.800	-0.249	0.537	0.643	0.780
Tumor locations	0.024	0.496	0.961	1.025	0.164	0.491	0.738	1.179
Differentiation	0.023	0.574	0.968	1.023	0.141	0.585	0.810	1.151
Stage	-0.009	0.575	0.987	0.991	0.175	0.611	0.775	1.191

3 讨论

大量的科学研究表明,抑癌基因的失活及原癌

于 K-ras 基因。

2.6 在结直肠癌的不同分期及分化类型中 P53 及 K-ras 基因突变分析

由于多原发癌组经过分期及分型后病例数目太少无法行统计学分析,故仅对单原发癌组内不同分期和分型的肿瘤中 P53 及 K-ras 基因突变概率进行分析,结果显示 P53 及 K-ras 基因在肿瘤的 I、II 期 [P53 突变 7 例(43.8%, 7/16), K-ras 突变 5 例(31.3%, 5/16)] 与 III、IV 期 [P53 突变 27 例(43.5%, 27/62), K-ras 突变 26 例(41.9%, 26/62)] 间突变率的差异均无统计学意义(P 均 >0.05),肿瘤高分化 [P53 突变 7 例(38.9%, 7/18), K-ras 突变 6 例(33.3%, 6/18)] 与低分化 [P53 突变 27 例(45.0%, 27/60), K-ras 突变 25 例(41.7%, 25/60)] 间突变率的差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。

2.7 腺瘤及单原发癌中各临床因素与 P53 及 K-ras 基因突变间的 logistic 多因素分析

由于本次实验所收集的多原发癌标本量不足,故仅将上述收集的腺瘤及单原发癌的临床病理资料与 P53 及 K-ras 基因突变间行 logistic 回归检验,结果发现患者年龄、性别、家族史、肿瘤位置与腺瘤及单原发癌中 P53 及 K-ras 基因突变无相关性,肿瘤分期及肿瘤的分化程度亦不是单原发癌中 P53 及 K-ras 基因发生突变的危险因素。见表 4、表 5。

基因的激活在肿瘤的发生发展中起到了至关重要的作用。P53 和 K-ras 基因均为广谱肿瘤抑制基因, P53 基因定位于人类 17p13.1 染色体,由 11 个外显

子和 10 个内含子组成。K-ras 基因位于人类 12 号染色体短臂上, 全长约 35kb, K-ras 突变可诱导结肠黏膜的腺上皮过度增生, 与肿瘤抑制基因 APC 联合作用促使结肠癌变, K-ras 突变可促使肿瘤的恶性进展, 此外突变后的 K-ras 与 P53 的作用相似, 可抑制细胞的凋亡^[5]。Chang 等^[6]研究表明在肿瘤细胞中大约 90% 的基因突变发生在外显子 5~8 即密码子 134~290 之间, Vagelstein 等^[7]研究表明在肿瘤细胞中大约 95% 的基因突变发生在密码子 12、13 之间, 故本实验以检测 P53 基因的外显子 5、6、7、8 及 K-ras 基因密码子 12、13 的突变情况来反映正常结直肠癌、结直肠腺瘤、单原发结直肠癌、多原发结直肠癌分子生物学特点, 并结合其临床特点进行综合分析。

本实验结果表明, 与正常结直肠组织相比, P53 基因及 K-ras 基因在腺瘤、单原发癌、多原发癌中的突变概率确实存在明显的增高, 再次证实了在结直肠肿瘤的发生和发展中, P53 基因及 K-ras 基因的突变起着重要的作用。国内外的研究表明 P53 基因及 K-ras 基因不仅在结直肠肿瘤中突变明显, 在其他消化器官肿瘤中同样存在不同程度的突变。研究显示, 在胰腺癌组织中 P53 基因突变概率至少在 50%~70%, K-ras 基因突变概率为 75%~95%^[8-10]。胃癌细胞中 P53 基因和 K-ras 基因突变概率分别是 33% 和 13%^[11,12]。P53 基因在食管癌中的突变概率约为 20%~77%, 并且基本不存在 K-ras 基因的突变^[13-15]。Tada 和 Guo 等^[16,17]研究发现在原发性肝癌中 P53 基因突变概率为 48.5%, 而且基本上也不存在 K-ras 基因突变。综上提示 P53 及 K-ras 基因在消化道不同类型的肿瘤中其突变概率不尽相同。

本实验中 P53 基因的突变概率在结直肠腺瘤、单原发结直肠癌、多原发结直肠癌三者间均无显著差异, 但 K-ras 基因在结直肠腺瘤与单原发结直肠癌、多原发结直肠癌间差异均有统计学意义, 各组内 P53 和 K-ras 基因突变对比分析显示仅结直肠腺瘤中 P53 基因突变概率高于 K-ras 基因, 余下各组内两者突变概率对比差异均无统计学意义。提示在正常的结直肠组织转变成腺瘤的过程中, P53 基因可能就已大部分发生了突变, 而 K-ras 基因却仅有少部分发生了突变, 从而我们可以得出: 在结直肠的肿瘤发生发展过程中, P53 基因的突变比 K-ras 更早些这样一个假设, Hosaka 等^[2]的研究同样证实了这一点, 此假设颠覆了教科书上提出的各个基因在肿

瘤发生发展过程中所起的作用, 并为进一步论证在肿瘤早期发生发展过程中 P53 基因占何种地位提供了新的线索。同时我们发现 P53 及 K-ras 基因在单原发结直肠癌的 I、II 期及高分化类型中的突变概率与其在 III、IV 期及中低分化类型中的概率差异无统计学意义, 更进一步证实了上述观点, 本研究通过多因素分析显示患者的年龄、性别、家族史、肿瘤位置与腺瘤及单原发癌中 P53 及 K-ras 基因突变无相关性, 同样肿瘤分期及肿瘤的分化程度亦不是单原发癌中 P53 及 K-ras 基因发生突变的危险因素。

本实验在对单原发结直肠癌与多原发结直肠癌两者 K-ras 基因及 P53 基因突变概率的进一步研究中并未发现显著差异, 这与 Katsuhiko 等^[3]的研究结果相一致, 但是笔者并不简单地认为单原发结直肠癌与多原发结直肠癌两种疾病在分子生物学方面是一致的, 因为可能与本研究所选样本量及分子生物学指标少有关, 只有通过多原发结直肠癌进行大样本、多国多中心、多指标、前瞻性研究才能得到较为准确、全面的评价。

肿瘤是一种干细胞疾病是关于肿瘤如何形成的最新的理论, 并有很多学者对这一理论进行了论证^[18-20]。肿瘤干细胞(肿瘤中具有自我更新能力并能产生异质性肿瘤细胞的细胞), 其由正常干细胞经过长期的循序渐进的变异及致癌物质的长期选择所变化而来, 是肿瘤组织中最早发生变异而且也是最能反映肿瘤细胞基因突变的一类细胞^[18], 通过激光捕获显微切割技术(laser capture microdissection, LCM)获取含有干细胞龛的结肠隐窝, 并在隐窝水平分析研究结直肠肿瘤基因突变情况, 这是一种全新的技术方法, Leedham 等^[21]已经应用此技术对 Barrett's 食管中隐窝的基因异型性进行了分析, 并得出了在 Barrett's 食管是由多个相互独立的祖细胞无性克隆而产生的结论, 如果我们也从隐窝水平即干细胞水平并且从多种不同分子生物学指标层面来研究正常结直肠组织、慢性炎症组织、息肉组织、单原发癌组织、多原发癌组织、复发癌组织、转移癌组织, 应该能够更好的反映各分子生物学指标在结直肠肿瘤发生发展过程中所占的地位以及在不同肿瘤组织中所存在的差别。

参 考 文 献

- 1 Heald RJ. Synchronous and metachronous carcinoma of the colon and rectum. *Ann R Coll Surg Engl*, 1990; 72(3): 172-174.

- 2 Hosaka S, Aoki Y, Akamatsu T, *et al.* Detection of genetic alterations in the p53 suppressor gene and the K-ras oncogene among different grades of dysplasia in patients with colorectal adenomas. *Cancer*,2002;94(1):219-227
- 3 Katsuhiko N, Shoko K, Natsumi I, *et al.* A prospective cohort study shows unique epigenetic, genetic, and prognostic features of synchronous colorectal cancers. *Gastroenterology*, 2009;137(5):1609-1620.
- 4 Herring JA, Udaya S, Cathie CH, *et al.* Multiple synchronous primaries of the gastrointestinal tract: a molecular case report. *Cancer Letters*,1996;110(1-2):1-9.
- 5 Smith G, Carey FA, Beattie J, *et al.* Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53—alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*,2002;99(14):9433-9438.
- 6 Chang F, Syrjanen S, Kurvinen K, *et al.* The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. *Am J Gastroenterol*,1993;88(2):174-186.
- 7 Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, *et al.* Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med*,1988;319(9):525-532.
- 8 Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, *et al.* Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*,1994;54(18):4855-4878.
- 9 Motojima K, Urano T, Nagata Y, *et al.* Detection of point mutations in the Kirsten-ras oncogene provides evidence for the multicentricity of pancreatic carcinoma. *Ann Surg*,1993;217(2):138-143.
- 10 Pellegata NS, Sessa F, Renault B, *et al.* K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Res*,1994;54(6):1556-1560.
- 11 Yashiro M, Inoue T, Nishioka N, *et al.* Allelic imbalance at p53 and microsatellite instability are predictive markers for resistance to chemotherapy in gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol*,2009;16(10):2926-2935.
- 12 Ming SC. Cellular and molecular pathology of gastric carcinoma and precursor lesions; a critical review. *Gastric Cancer*,1998;1(1):31-50.
- 13 Campomenosi P, Conio M, Bogliolo M, *et al.* p53 is frequently mutated in Barrett's metaplasia of the intestinal type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*,1996;5(7):559-565.
- 14 Hollstein MC, Smits AM, Galiana C, *et al.* Amplification of epidermal growth factor receptor gene but no evidence of ras mutations in primary human esophageal cancers. *Cancer Res*, 1988;48(18):5119-5123.
- 15 Lung M L, Chan W C, Zong YS, *et al.* p53 mutational spectrum of esophageal carcinomas from five different geographical in China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1996;5(4):277-284.
- 16 Tada M, Omata M, Ohto M, *et al.* Analysis of ras gene mutations in human hepatic malignant tumors by polymerase chain reaction and direct sequencing. *Cancer Res*,1990;50(4):1121-1124.
- 17 Guo C, Liu QG, Zhang L, *et al.* Expression and clinical significance of p53, JunB and KAI1/CD82 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2009;8(4):389-396.
- 18 Humphries A, Wright NA. Colonic crypt organization and Tumorigenesis. *Nature Rev*,2008;8(6):415-424.
- 19 Mali P, Ye Z, Hommond HH, *et al.* Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells*,2008;26(8):1998-2005.
- 20 Sato T, Vries RG, Snippert HJ, *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature Letters*,2009;459(7244):262-265.
- 21 Leedham SJ, Preston SL, McDonald SA, *et al.* Individual crypt genetic heterogeneity and the origin of metaplastic glandular epithelium in human Barrett's oesophagus. *Gut*,2008;57(8):1041-1048.

(2012-04-06 收稿, 2012-07-05 修回)

编辑 沈进