

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00362

非可控性炎症、表观遗传和遗传改变在结直肠癌发生和侵袭过程中的作用

丁一波¹, 杜 琰^{1*}, 王 颢², 傅传刚², 曹广文¹

1. 第二军医大学热带医学与公共卫生学系流行病学教研室, 上海 200433
2. 第二军医大学长海医院肛肠外科, 上海 200433

[摘要] 结直肠癌(colorectal carcinoma, CRC)的发生和发展是慢性炎症促进关键基因后天突变累积的过程。炎症促进癌症进化各阶段均受表观遗传和遗传改变所驱动。在癌症信号刺激下, 腺瘤通过积累遗传变异逐渐发展成腺癌。新一代测序技术为阐明癌症进化过程中的“驱动”变异和融合基因提供了有效途径, 为癌症进化提供了分子证据。腺瘤恶性转化过程中最明确的遗传改变是微卫星不稳定和染色体不稳定性显著增加。研究CRC的进化规律, 尤其是研究体细胞变异的主要目的是明确这种变异影响了何种信号途径, 而信号途径是目前探索早期CRC的有效干预方式和CRC靶向治疗的关键。

[关键词] 结直肠肿瘤; 肿瘤进化发育学; 炎症; 表观遗传; 变异(遗传学)

[中图分类号] R 735.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)04-0362-05

Role of non-resolving inflammation, epigenetic and genetic alterations in carcinogenesis and invasion of colorectal carcinoma

DING Yi-bo¹, DU Yan^{1*}, WANG Hao², FU Chuan-gang², CAO Guang-wen¹

1. Department of Epidemiology, Faculty of Tropical Medicine and Public Health, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Colorectal Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] The development and progression of colorectal cancer (CRC) is a process that accumulates the driver somatic mutations elicited by chronic inflammation. Epigenetic modifications and genetic mutations play key roles in the whole evolutionary process of chronic inflammation-induced CRC. Adenoma gradually progresses into adenocarcinoma via accumulating genetic mutations stimulated by cancer promoting stimulations. The next generation sequencing technology provides an effective way to identify the “driver” mutations and fusion genes in the carcinogenesis, providing molecular evidences for cancer evolution. The most significant genetic changes during malignant transformation from adenoma to adenocarcinoma are the significant increases in microsatellite instability and chromosome instability. The main purpose of investigating the evolutionary process of CRC, especially somatic mutations, is to identify the related signaling pathways, which are the key steps to explore early effective intervention strategies and targeted therapies for CRC.

[Key words] colorectal neoplasms; neoplasm evolution and development; inflammation; epigenetics; variation (genetics)

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(4): 362-366]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是我国常见癌症。在上海随着人口老龄化和饮食结构西化, CRC已经上升为男女恶性肿瘤发病率的第二位^[1]。尽管患者对治疗的应答率和存活率都有所提高, 但转移期患者的预后仍不乐观, 是我国公共卫生问题。

1 炎症促进CRC进化发育

持续性炎症是许多癌症共有的过程。肿瘤微环境中富集的免疫细胞与正常免疫细胞不同, 它能维持炎症状态、新血管生成、促进癌症发生和转移。慢性炎症为癌症进化发育提供了微环境, 其中包括

[收稿日期] 2014-09-23 **[接受日期]** 2014-12-31

[基金项目] 国家重点基础研究项目(“973”计划, 2015CB554006), 国家自然科学基金重大研究计划重点项目(91129301), 国家自然科学基金杰出青年科学基金(81025015), 国家自然科学基金(81302492), 上海市自然科学基金(12ZR1453600)。Supported by National Program on Key Basic Research Projects (“973” Program, 2015CB554006), National Natural Science Foundation of China (91129301, 81025015, 81302492), and Natural Science Foundation of Shanghai Municipal Government (12ZR1453600)。

[作者简介] 丁一波, 硕士。E-mail: god_bob@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81871062, E-mail: sophiedu_61@163.com

NF- κ B 等保守基因高表达造成的持续炎症状态、免疫细胞对病毒变异的选择以及氧化应激对“驱动”变异的选择等诸多进化问题^[2]。炎症持续活跃是形成癌症的前提条件, NF- κ B 和信号转导和转录因子(STAT 3)-转化生长因子(TGF) β 1 等炎症信号关键分子均参与致癌过程,而且癌前病变组织中炎症持续活跃能促进癌症干细胞“变异-选择-适应”的进化过程。我们前期研究发现, CRC 自身抗体可以在癌前病变如锯齿状腺瘤性息肉患者血清中高表达,为癌症早发现提供新指标^[3]。从致癌因素暴露引发遗传损伤和持续炎症反应,继而导致表观遗传学改变、基因突变和免疫选择,经过一系列癌前变化最后发展到癌症乃至侵袭转移的整个过程代表了癌症的进化发育过程。

2 CRC 癌前病变和侵袭的早期分子事件

CRC 有明确的癌前病变过程,除了 5%~6% 的病例为家族性 CRC,大部分的 CRC 都是由环境与遗传因素共同作用导致的^[4]。大量流行病学和实验室证据表明慢性炎症促进 CRC 的发生,其中受前列腺素 E₂(PGE₂)调控的环氧合酶 2(COX-2)在 CRC 发生过程中发挥了重要作用。长期使用非类固醇类抗炎药物如阿司匹林能够显著降低 CRC 的发生^[5]。在炎症促进癌症进化发育过程中,癌前病变是炎症致癌的重要步骤。高危腺瘤是重要的 CRC 癌前病变,为肠镜筛查的重点。肠镜下息肉摘除可以显著降低 5 年内 CRC 发病风险,但对 5 年后 CRC 发病影响不大^[6]。肠镜筛查后 5 年内发生 CRC 的癌组织中 CpG 岛甲基化表型(CpG island methylator phenotype, CIMP)和微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)显著高于筛查 5 年后发生的 CRC,提示 CIMP 和 MSI 在 CRC 迅速进化中的重要性^[7]。有报道提出, CIMP 高表达的 CRC 患者对氟尿嘧啶(5-FU)化疗的反应更好。5-FU 化疗抗药性的主要机制是胸苷酸合成酶(tymidylate synthase, TYMS)的表达升高,并且 TYMS 的表观遗传调控可能与组蛋白乙酰化/脱乙酰化过程相关。因此,识别分子标志物诸如 DNA 甲基化生物标记在 CRC 早期诊断、发生、侵袭转移、预后和治疗等过程中都有指导意义。

2.1 关键炎症信号通路的作用 Wnt 信号通路的持续激活首先打破了正常肠上皮细胞“增生-分化-凋亡”的平衡状态,是促进肠腺瘤生成的主要信号途径。在癌症信号刺激下,腺瘤通过积累遗传变异逐渐发展成腺癌。克服衰老是腺瘤恶性转化的关键步

骤,包括通过激活 *hTERT* 促进端粒酶稳定、通过 *ATM* 基因突变或 p53 和 RB 信号途径效应分子的失活导致 DNA 损伤修复系统的破坏、以及通过干扰一些重要信号途径如白细胞介素(IL)-6 等发挥作用。腺瘤恶性转化表现为生长加速、分化紊乱、侵袭能力和新血管生成能力被激活,染色体不稳定性(chromosomal instability, CIN)大量增加。肠道微生物产物导致肠道炎症性损伤,激活炎症信号途径,其中免疫/炎症细胞浸润、IL-17 信号途径促进腺瘤性息肉向 CRC 转化,而肿瘤间质髓样细胞产生的 IL-23 信号通路维持了 CRC 的进化^[8]。Wnt/ β -catenin 信号途径的活化,刺激肿瘤起始细胞的增殖、分化,促进 CRC 的形成^[9]。

CRC 的侵袭是指癌细胞穿过基底膜进入下层基质,是 CRC 恶性表型的主要特征。该过程在肿瘤炎症性微环境中出现类似于伤口修复的主要改变,即肿瘤特异性基质细胞激活和新血管生成。主要表现为侵袭相关基因(*SPARC*、*DCN* 和 *PDGFRB*)、新血管生成基因(*EGFR* 和 *COL15A1*)、CIN 相关基因(*AURKA*、*C20orf24* 和 *TPX2*)、分化相关基因(*ADRM1* 和 *NUDT1*)以及间质激活相关基因(*SSSCA1*、*ID3* 和 *LUM*)的表达,生长因子相关通路如磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)信号通路活跃^[10]。PI3K 通路中 *PIK3CA* 基因突变可以改变 PI3K 通路活性,促进腺瘤向腺癌转化。

CRC 的发生和侵袭表型特征是由功能基因表达所致。一般认为,单个基因甚至单个信号途径难以准确反映肿瘤形成机制,全基因组范围表达谱的差异能够从整体水平揭示肿瘤形成过程中基因表达的变化规律,进而发现起关键作用的基因、RNA、蛋白、关键分子调控功能网络和网络核心分子。我们应用系统生物学方法整合了目前公共数据库中 CRC 基因表达谱,建立了预后相关亚网络,发现网络核心分子 *GRB2*、*PTPN11*、*ITGB1* 和 *POSTN* 在癌细胞中表达差异能够指示 CRC 预后和化疗效果,对 II 期 CRC 作用尤其明显^[11]。

2.2 染色体遗传改变、先天遗传多态性和后天体细胞基因突变 腺瘤恶性转化过程中最明确的遗传改变是 MSI 和 CIN 显著增加。腺瘤恶性转化中最具有特征性的染色体改变是染色体 20q 扩增,引起该染色体上的癌相关基因 *AURKA* 和 *TPX2* 表达增强。目前认为染色体 20q 扩增是腺瘤向腺癌转化的主要驱动分子,少量存在 20q 扩增的高危腺瘤更容易转化为癌症^[12]。

在炎症性肠病向 CRC 转化过程中, CRC 起始细胞的遗传易感性决定了在外界刺激条件下肠道炎症的持续性和 CRC 的发生。家族性腺瘤性息肉病 (familial adenomatous polyposis, FAP) 是一种 CRC 癌前病变, 由 Wnt 信号通路主要功能基因先天变异所致。研究发现, 在能够调控细胞衰老的信号途径中, 毛细血管扩张突变基因 (ATM)-ATM 和 Red-3 相关蛋白 (ATR) DNA 损伤修复通路中的 *RNF43* 基因功能缺失型先天变异与多发性锯齿状息肉密切相关^[13]。基因组关联性研究发现, 位于染色体 8q24 的 CRC 相关单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点 rs6983267 能够影响 Wnt 调节转录因子 TCF4 的结合能力, 增强 Wnt 信号和癌基因 *Myc* 表达, 并可改变转录因子 TCF7L2 与 CTNNB1 的结合能力, 从而影响阿司匹林通过 Wnt/ β -catenin 信号途径对 CRC 的化学预防作用^[14]。这些炎-癌转化信号通路上关键分子的遗传多态性可部分解释中国人 CRC 发生的遗传易感性。

CRC 发生和发展是慢性炎症促进关键基因后天突变累积的过程。在锯齿状息肉发生早期就存在 BRAF 或 K-RAS 的变异, 在 CRC 早期还存在 PIK3CA 变异。这些变异通过影响炎症信号途径如 ERK/MAPK 发挥促癌作用^[15]。APC 失去功能的变异和 K-RAS 获得功能的变异是腺瘤向腺癌转化过程中的常见变异。在溃疡性结肠炎发展到 CRC 的过程中, p53 失活性突变是癌细胞克隆形成的必要突变, 而 K-RAS 获得功能的突变是补充突变, 这两种突变在 CRC 形成过程中起关键作用^[16]。K-RAS 变异可通过诱导上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 而活化癌症起始“干”细胞, 促进有 APC 变异的腺瘤发生癌变和侵袭。人类癌细胞中 RAS 变异与 8-氧桥鸟嘌呤-7, 8-二氢-2'-脱氧鸟苷 (8-oxo-dG) 特异性降解酶 MTH1 (Mut T Homolog 1) 的表达水平正相关。MTH1 表达对维持肿瘤细胞基因组稳定性和肿瘤“干性”特征至关重要。APC 失活可启动 β -catenin 信号途径; K-RAS 变异可通过诱导 CD44、CD133 和 CD166 表达, 进一步促进“干性”肠癌的 β -catenin 信号途径的活化^[17]。PI3K 信号途径突变是近端结肠癌的特征性变异, 其中 *PIK3CA* 外显子 20 突变和重要肿瘤抑制基因 PTEN 突变与无蒂锯齿状信号途径 (*MSI-H/CIMP-H/BRAF* 突变) 有关, *PIK3CA* 外显子突变与传统锯齿状信号途径 (*CIMP-L/K-RAS* 突变) 有关^[18]。可见, PI3K 信号途径是阻遏 CRC

发生和侵袭的重要治疗靶点。

2.3 表观遗传和非编码 RNAs 炎症促进癌症进化, 各阶段均受表观遗传和遗传改变所驱动, 且表观遗传变化比遗传改变更为普遍。目前公认 CRC 是由基因突变和表观遗传修饰累积的结果。表观遗传修饰的主要形式有基因组甲基化、组蛋白乙酰化、染色质重塑和非编码 RNA (ncRNA) 的异常。CRC 中经常可以观察到异常的基因启动子甲基化。从正常肠上皮、腺瘤到侵袭性 CRC 进化过程中, CIMP 具有明确的规律性: CIMP 标志 *RUNX3* 最早出现 CpG 岛甲基化; 在息肉增生期, CIMP 标志 *NEUROG1* 和 *CACNA1G* 出现甲基化; 在晚期腺瘤性息肉期, *SFRP2* 和 *IGF2 DMR0* 高度甲基化; 最后到 CRC 期, CIMP 标志 *CDKN2A* 和 *hMLH1* 甲基化。DNA 甲基转移酶 3B (DNMT3B) 表达水平在这个进化过程中逐渐升高。一组 CIMP 标志 (*NEUROG1*、*CACNA1G* 和 *CDKN2A*) 的甲基化与 DNMT3B 的表达水平显著正相关^[19]。发生在近端结肠高度 CIMP 的 CRC 常因错配修复基因 *MLH1* 被甲基化后沉默导致 MSI, 常伴有 *BRAF* 突变; 该类 CRC 常有染色质重塑基因 *CHD7* 和 *CHD8* 的突变, *CHD7* 和 *CHD8* 是赖氨酸特异性去甲基化酶家族成员, 这种突变与 p53 失活突变相反, 提示 *CHD7* 和 *CHD8* 的突变与 p53 突变启动信号途径明显不同^[20]。

我国科学家最近发现了能够准确区分结直肠腺瘤和早期 CRC 的 microRNAs (miRNAs)^[21]。国外研究报道 miRNA-141 和 miRNA-200c 影响上皮分化, miRNA-145、miRNA-135a 和 miRNA-135b 作用于 Wnt 信号通路^[22]。另有研究发现与 CRC 侵袭过程相关的 ncRNAs, 包括 miR-137、miR-30b 和 miR-224 等^[23-25]。

3 腺瘤-CRC-侵袭过程中的进化问题

肠腺瘤是由多克隆细胞组成, 在 CRC 炎-癌转化过程中, 部分细胞发生体细胞突变, 如 *APC*、*BRAF*、*p53*、*K-RAS* 的变异和染色体 5q、17p 和 18q 的缺失^[26]。在由溃疡性结肠炎发展成 CRC 的患者中, 主要起始体细胞变异为 p53 变异, 且在大多数 CRC 中均会发生; 在此基础上, 部分结肠炎患者发生 K-RAS 变异, 这些体细胞变异赋予了肠上皮细胞无限增殖的能力, 最终形成 CRC。从进化角度来说, 在炎症环境下只有发生了关键体细胞变异的克隆具有生长优势进而被选择出来, 成为 CRC 主要克隆。同时, 这些克隆表达 Wnt/ β -catenin 的能力增

强,引起炎症的持续活跃,进一步选择了具有转移潜能的“干性”CRC 克隆,具备这些变异的克隆能够适应持续的炎症环境,成为 CRC 复发和转移的基本亚群。我们前期研究发现,一种位于细胞核内的神经元再生所必须的孤核受体 NR4A2 在炎癌转化中起重要作用^[27-28]。伴随 NR4A2 在腺瘤、癌旁组织和 CRC 组织中表达水平的逐渐增高,能够赋予 CRC 细胞化疗抵抗能力,而且 NR4A2 高表达的结肠癌患者生存期显著缩短,尤其是在接受化疗治疗结肠癌人群中更加明显^[29]。我们还发现,在 CRC 中表达锌指蛋白 148 (ZNF148) 增高预示 CRC 不良预后^[30]。这些研究提示,在 CRC 组织中存在促进癌症进化的“干性”分子对 CRC 的预后有明显的指示作用。结肠癌和直肠癌基因组变异谱基本相同,如 APC、p53、SMAD4、PIK3CA、K-RAS、ARID1A、SOX9 基因发生变异, FAM123B、ERBB2 和 IGF2 基因拷贝数改变, NAV2 基因和 Wnt 通路分子 TCF7L1 基因融合以及 Myc 调控的转录激活或抑制,其中 ERBB2 和 IGF2 可以作为药物靶标^[31]。炎症因子激活的胞苷脱氨酶(AID)促进肠上皮细胞的基因组不稳定,不但能促进 CRC 的发生,而且其相对应的人类 APOBEC3G 亚型还能促进 CRC 的肝转移^[32]。CRC 细胞克隆之间的基因组拷贝数变异、基因变异以及细胞生长优势的差异在化疗抵抗方面具有重要作用^[33]。

4 研究展望

在炎症或其他因素诱导的体细胞基因变异是癌症发生和侵袭的主要驱动力。少量的癌症起始细胞是癌症发生、复发、转移和耐药的关键^[34]。癌症是突变积累的结果,以胞苷脱氨酶 APOBECs 家族为基础的突变基因簇是许多癌症共有的,在癌症体细胞变异的形成和进化中起关键作用^[35]。国际癌症基因组联盟(International Cancer Genome Consortium, ICGC)开展的癌症基因组项目(Cancer Genome Project),计划在 5~7 年内完成 2 000~3 000 个癌症基因测序。ICGC 在中国发起 4 个新项目,主要针对 CRC、食道癌、肝癌和鼻咽癌的驱动基因进行检测。此外,由美国癌症研究中心(National Cancer Institute)及人类基因组研究中心(National Human Genome Research Institute)为主共同构建的癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA),绘制了各种常见和罕见的癌症基因组图谱。研究 CRC 的进化规律,尤其是研究体细胞变异

的主要目的是明确这种变异影响了何种信号途径,而信号途径是目前探索早期 CRC 的有效干预方式和 CRC 靶向治疗的关键。

[参考文献]

- [1] 韩雪,黄晨曦,赵佳,丁一波,张宏伟,曹广文. 上海市杨浦区户籍人口 2002-2012 年结直肠癌发病和生存分析[J]. 中华流行病学杂志,2014,35:61-66.
- [2] Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker [J]. Nat Immunol, 2011,12:715-723.
- [3] Chang W, Wu L, Cao F, Liu Y, Ma L, Wang M, et al. Development of autoantibody signatures as biomarkers for early detection of colorectal carcinoma[J]. Clin Cancer Res,2011,17:5715-5724.
- [4] Coppede F. Epigenetic biomarkers of colorectal cancer; Focus on DNA methylation[J]. Cancer Lett,2014,342:238-247.
- [5] Chan A T, Ogino S, Fuchs C S. Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2[J]. N Engl J Med,2007,356:2131-2142.
- [6] Brenner H, Chang-Claude J, Rickert A, Seiler C M, Hoffmeister M. Risk of colorectal cancer after detection and removal of adenomas at colonoscopy: population-based case-control study[J]. J Clin Oncol,2012,30:2969-2976.
- [7] Nishihara R, Wu K, Lochhead P, Morikawa T, Liao X, Qian Z R, et al. Long-term colorectal-cancer incidence and mortality after lower endoscopy[J]. N Engl J Med,2013,369:1095-1105.
- [8] Grivennikov S I, Wang K, Mucida D, Stewart C A, Schnabl B, Jauch D, et al. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth[J]. Nature,2012,491:254-258.
- [9] Shenoy A K, Fisher R C, Butterworth E A, Pi L, Chang L J, Appelman H D, et al. Transition from colitis to cancer: high Wnt activity sustains the tumor-initiating potential of colon cancer stem cell precursors [J]. Cancer Res,2012,72:5091-5100.
- [10] Sillars-Hardebol A H, Carvalho B, van Engeland M, Fijneman R J, Meijer G A. The adenoma hunt in colorectal cancer screening; defining the target[J]. J Pathol, 2012,226:1-6.
- [11] Chang W, Gao X, Han Y, Du Y, Liu Q, Wang L, et al. Gene expression profiling-derived immunohistochemistry signature with high prognostic value in colorectal carcinoma[J]. Gut,2014,63:1457-1467.
- [12] Sillars-Hardebol A H, Carvalho B, Tijssen M, Beliën J A, de Wit M, Delis-van Diemen P M, et al. TPX2 and AURKA promote 20q amplicon-driven colorectal adenoma to carcinoma progression[J]. Gut,2012,61:

- 1568-1575.
- [13] Gala M K, Mizukami Y, Le L P, Moriichi K, Austin T, Yamamoto M, et al. Germline mutations in oncogene-induced senescence pathways are associated with multiple sessile serrated adenomas[J]. *Gastroenterology*, 2014, 146:520-529.
- [14] Nan H, Morikawa T, Suuriniemi M, Imamura Y, Werner L, Kuchiba A, et al. Aspirin use, 8q24 single nucleotide polymorphism rs6983267, and colorectal cancer according to CTNNB1 alterations[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2013, 105:1852-1861.
- [15] Tian S, Simon I, Moreno V, Roepman P, Tabernero J, Snel M, et al. A combined oncogenic pathway signature of BRAF, KRAS and PI3KCA mutation improves colorectal cancer classification and cetuximab treatment prediction[J]. *Gut*, 2013, 62:540-549.
- [16] Leedham S J, Graham T A, Oukrif D, McDonald S A, Rodriguez-Justo M, Harrison R F, et al. Clonality, founder mutations, and field cancerization in human ulcerative colitis-associated neoplasia[J]. *Gastroenterology*, 2009, 136:542-550.
- [17] Moon B S, Jeong W J, Park J, Kim T I, Min do S, Choi K Y. Role of oncogenic K-Ras in cancer stem cell activation by aberrant Wnt/ β -catenin signaling[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2014, 106:djt373.
- [18] Day F L, Jorissen R N, Lipton L, Mouradov D, Sakthianandeswaren A, Christie M, et al. PIK3CA and PTEN gene and exon mutation-specific clinicopathologic and molecular associations in colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19:3285-3296.
- [19] Ibrahim A E, Arends M J, Silva A L, Wyllie A H, Greger L, Ito Y, et al. Sequential DNA methylation changes are associated with DNMT3B overexpression in colorectal neoplastic progression[J]. *Gut*, 2011, 60:499-508.
- [20] Tahara T, Yamamoto E, Madireddi P, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, et al. Colorectal carcinomas with CpG island methylator phenotype 1 frequently contain mutations in chromatin regulators[J]. *Gastroenterology*, 2014, 146:530-538.
- [21] Wang S, Wang L, Bayaxi N, Li J, Verhaegh W, Janovski A, et al. A microRNA panel to discriminate carcinomas from high-grade intraepithelial neoplasms in colonoscopy biopsy tissue[J]. *Gut*, 2013, 62:280-289.
- [22] van Engeland M, Derks S, Smits K M, Meijer G A, Herman J G. Colorectal cancer epigenetics; complex simplicity[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29:1382-1391.
- [23] Liang L, Li X, Zhang X, Lv Z, He G, Zhao W, et al. MicroRNA-137, an HMGA1 target, suppresses colorectal cancer cell invasion and metastasis in mice by directly targeting FMNL2[J]. *Gastroenterology*, 2013, 144:624-635.
- [24] Liao W, Ye Y P, Zhang N J, Li T T, Wang S Y, Cui Y M, et al. MicroRNA-30b functions as a tumour suppressor in human colorectal cancer by targeting KRAS, PIK3CD and BCL2[J]. *J Pathol*, 2014, 232:415-427.
- [25] Liao W, Li T T, Wang Z G, Wang S Y, He M R, Ye Y P, et al. MicroRNA-224 promotes cell proliferation and tumor growth in human colorectal cancer by repressing PHLPP1 and PHLPP2[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19:4662-4672.
- [26] Thirlwell C, Will O C, Domingo E, Graham T A, McDonald S A, Oukrif D, et al. Clonality assessment and clonal ordering of individual neoplastic crypts shows polyclonality of colorectal adenomas[J]. *Gastroenterology*, 2010, 138:1441-1454.
- [27] Chang W, Ma L, Lin L, Gu L, Liu X, Cai H, et al. Identification of novel hub genes associated with liver metastasis of gastric cancer[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125:2844-2853.
- [28] Han Y F, Cao G W. Role of nuclear receptor NR4A2 in gastrointestinal inflammation and cancers[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18:6865-6873.
- [29] Han Y, Cai H, Ma L, Ding Y, Tan X, Liu Y, et al. Nuclear orphan receptor NR4A2 confers chemoresistance and predicts unfavorable prognosis of colorectal carcinoma patients who received postoperative chemotherapy[J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49:3420-3430.
- [30] Gao X H, Liu Q Z, Chang W, Xu X D, Du Y, Han Y, et al. Expression of ZNF148 in different developing stages of colorectal cancer and its prognostic value; a large Chinese study based on tissue microarray[J]. *Cancer*, 2013, 119:2212-2222.
- [31] Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer[J]. *Nature*, 2012, 487:330-337.
- [32] Ding Q, Chang C J, Xie X, Xia W, Yang J Y, Wang S C, et al. APOBEC3G promotes liver metastasis in an orthotopic mouse model of colorectal cancer and predicts human hepatic metastasis[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121:4526-4536.
- [33] Kreso A, O'Brien C A, van Galen P, Gan O I, Notta F, Brown A M, et al. Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer[J]. *Science*, 2013, 339:543-548.
- [34] Greaves M, Maley C C. Clonal evolution in cancer[J]. *Nature*, 2012, 481:306-313.
- [35] Deng Y, Du Y, Zhang Q, Han X, Cao G. Human cytidine deaminases facilitate hepatitis B virus evolution and link inflammation and hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2014, 343:161-171.