

# 胃癌中 18 号染色体的杂合性丢失研究

任 群,王振宁,罗 阳,敖 杨,鲁 冲,姜 莉,徐惠绵,张 学

任群,王振宁,罗阳,敖杨,鲁冲,姜莉,徐惠绵,张学,中国医科大学医学基因组学研究室、卫生部细胞生物学重点实验室 辽宁省沈阳市 110001  
任群,女,1969-4-5 生,辽宁省丹东人,汉族,1995 年中国医科大学硕士毕业,现为中国医科大学细胞生物学博士研究生,主要从事胃癌分子病理学研究。国家杰出青年科学基金资助课题, No.30125017  
项目负责人:张学,110001,辽宁省沈阳市,中国医科大学医学基因组学研究室、卫生部细胞生物学重点实验室。 xzhang@mail.cmu.edu.cn  
电话:024-23256666-5532  
收稿日期:2003-01-11 接受日期:2003-02-19

## Loss of heterozygosity on chromosome 18 in microdissected gastric cancer cells

Qun Ren, Zhen-Ning Wang, Yang Luo, Yang Ao, Chong Lu, Li Jiang, Hui-Mian Xu, Xue Zhang

Qun Ren, Zhen-Ning Wang, Yang Luo, Yang Ao, Chong Lu, Li Jiang, Hui-Mian Xu, Xue Zhang, The Research Center for Medical Genomics, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China Supported by the National Science Fund for Distinguished Young Scholars, No. 30125017  
Correspondence to: Dr. Xue Zhang, Research Center for Medical Genomics, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. xzhang@mail.cmu.edu.cn  
Received: 2003-01-11 Accepted: 2003-02-19

## Abstract

AIM: To detect loss of heterozygosity (LOH) on chromosome 18 in primary gastric carcinomas.

METHODS: Short insertion deletion polymorphism (SIDP) markers on chromosome 18 were analyzed using high fidelity-whole genome amplification (HF-WGA) and denatured high pressure liquid chromatography (DHPLC) to detect LOH in gastric cancer cells purified by laser capture microdissection (LCM).

RESULTS: LOH in 3 (MID148, MID150 and MID352) of 9 SIDP loci was found. Three of 10 samples of gastric cancer showed LOH at the same SIDP locus (MID150) (30 %) and one of them also demonstrated LOH at the other 2 SIDP loci (MID148, MID352). No LOH was detected in 6 of 9 SIDP loci.

CONCLUSION: Detection of LOH in cancer cells can be achieved by the combination of LCM, HF-WGA and the analysis of SIDP marker by DHPLC. This study provides an alternative new way to map tumor suppressor genes on chromosome 18.

Ren Q, Wang ZN, Luo Y, Ao Y, Lu C, Jiang L, Xu HM, Zhang X. Loss of heterozygosity on chromosome 18 in microdissected gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(3):310-313

## 摘要

目的: 检测原发性胃癌组织中 18 号染色体的杂合性丢失 (loss of heterozygosity, LOH) 情况。

方法: 联合应用激光捕获显微切割 (laser capture microdissection, LCM)-高可信度全基因组扩增 (high fidelity-whole genome amplification, HF-WGA)-变性高效液相色谱 (denatured high pressure liquid chromatography, DHPLC) 方法, 检测胃癌中 18 号染色体上短插入/缺失多态 (short insertion deletion polymorphism, SIDP) 标记的 LOH。

结果: 在所检测的 10 例胃癌组织中 3 例呈现 SIDP 位点 LOH (30 %); 9 个 SIDP 位点中 3 个 (MID148、MID150 和 MID352) 发生 LOH, 其中 MID150 位点 LOH 见于 3 例胃癌组织。在 1 例胃癌组织中 3 个 SIDP 位点同时呈现 LOH。

结论: 联合应用 LCM 和 HF-WGA, 经 DHPLC 分析 SIDP 标记, 可进行肿瘤细胞中 LOH 检测。本研究为 18 号染色体上胃癌相关抑癌基因的研究提供一种新技术策略。

任群,王振宁,罗阳,敖杨,鲁冲,姜莉,徐惠绵,张学. 胃癌中 18 号染色体的杂合性丢失研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(3):310-313  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/310.htm>

## 0 引言

肿瘤是多种基因变化的参与和积累的结果。揭示这些基因变化的规律,不仅可以阐明癌变的机制,更可以协助肿瘤的诊断、治疗和预后判断。胃癌是严重威胁人类健康的恶性疾病,是我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,其发病率呈明显的上升趋势<sup>[1-4]</sup>。同其他恶性肿瘤一样,胃癌的发生也是由多因素参与,并经历了多阶段的演变过程,涉及到多种癌基因的激活和抑癌基因的失活<sup>[5-26]</sup>。现已明确在胃癌发生发展过程中, c-met, c-may, ras, c-erbB-2 等癌基因, p53, p16, Rb, DCC, APC 等抑癌基因, 以及肿瘤转移相关基因 nm23, CD44, CDH1 等有结构或表达的异常。这些异常或影响细胞的异型增生,或涉及分化程度与浸润和转移等生物学行为的改变。虽然有上述众多的相关研究,但胃癌发生发展的完整的分子机制远未阐明。因此进一步确定胃癌最常见丢失或失活的抑癌基因,将其定位、分离,并研究其生物学功能,进一步揭示胃癌发生发展的分子机制是当务之急。胃癌细胞有明显染色体片段丢失,胃癌杂合性缺失 (loss of heterozygosity, LOH) 发生率可高达 50 %<sup>[27,28]</sup>, 染色体 18q 是最常见的丢失区域,这表明在 18 号染色体长臂上可能存在有一种或几种肿瘤抑制基因,他的丢失与胃癌的发生发展密切相关。为探讨 18 号染色体杂合性丢失在胃癌发生

发展中的作用, 我们联合应用激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM)、高可信度全基因组扩增(high fidelity-whole genome amplification, HF-WGA)和变性高效液相色谱(denatured high pressure liquid chromatography, DHPLC)技术对胃癌中 18 号染色体短插入/缺失多态(short insertion deletion polymorphism, SIDP)标记的杂合性丢失进行分析。

## 1 材料和方法

1.1 材料 中国医科大学附属第一医院肿瘤科住院患者的手术切取胃癌组织标本 10 例, 切取原发性胃癌组织和距癌组织 1 cm 以上的癌旁正常组织。所有患者术前均未接受放疗和化疗。

1.2 方法 按 LCM 方法提取 DNA。手术切取新鲜胃癌和癌旁正常组织标本, 立即 OCT 包埋, 放入液氮中保存, 行 8  $\mu\text{m}$  厚连续冰冻切片, 常规行 HE 染色。第一张封片镜下明确病理诊断, 其余切片不封片, 采用 LCM 系统, 分别捕获癌细胞和正常胃黏膜细胞, 至覆盖聚乙烯乙酸乙烯酯薄膜的塑料帽表面, 将塑料帽盖于预先加有 50  $\mu\text{L}$  裂解缓冲液(1  $\times$  Pyrobest™ 缓冲液, 4 mg/mL 蛋白酶 K, 5 % Tween20)的 0.5 mL 的 Eppendorf 管上。倒置 Eppendorf 管, 48  $^{\circ}\text{C}$  水浴 14 h, 94  $^{\circ}\text{C}$  10 min 终止反应。以我室自建方法行高可信度全基因组扩增: 取 5  $\mu\text{L}$  上述的 DNA 样品, 加入 10  $\times$  Pyrobest™ 缓冲液 5  $\mu\text{L}$ , 100 mol/L 的核苷酸随机引物 (N15) 10  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol/L dNTPs 4  $\mu\text{L}$  和 Pyrobest™ DNA 聚合酶 1  $\mu\text{L}$ , 最后加水至反应体积 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增 50 循环: 94

1 min, 37  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 以 0.1  $^{\circ}\text{C}/\text{s}$  速率缓慢升温至 55  $^{\circ}\text{C}$ , 延伸 4 min 后, 再升温至 68  $^{\circ}\text{C}$  1 min。产物 DNA 于 -20  $^{\circ}\text{C}$  储存。18 号染色体 SIDP 标记引物碱基序列来源于网上数据库(表 1), 由大连宝生物公司合成。PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 含全基因组扩增产物 1  $\mu\text{L}$ , 2.5  $\mu\text{mol/L}$  dNTPs 1.6  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  的引物混合物 4  $\mu\text{L}$ , Taq DNA 聚合酶 0.1  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  PCR 缓冲液 2  $\mu\text{L}$  (含有  $\text{MgCl}_2$  1.5  $\mu\text{mol/L}$ , Tris-HCl 10  $\mu\text{mol/L}$ , KCl 50  $\mu\text{mol/L}$ ), 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 75 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 25 s, 共重复 35 个循环。最后在 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 6 min。PCR 产物不需纯化处理, 取 8  $\mu\text{L}$  PCR 产物行 DHPLC 分析, 以非变性温度进行检测, 流动相为 0.1 mol/L 三乙酸基乙胺(TEAA, pH 7.0)和 25 % 乙晴, 按不同梯度进行混合, 柱温 50  $^{\circ}\text{C}$ , 流速 0.9 mL/min。取经 DHPLC 检测有 LOH 的标本的 PCR 产物 5  $\mu\text{L}$ , 加入变性缓冲液(95 % 甲酰胺, 10 mmol/L EDTA, 0.05 % 溴酚蓝, 0.05 % 二甲苯蓝)稀释 5 倍, 98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 min, 取 2-3  $\mu\text{L}$  上样于含 7 mol/L 尿素的 6 % 变性聚丙烯酰胺凝胶, 室温恒压 450V, 电泳 2.5 h, 取下凝胶以硝酸银染色后观察结果。

## 2 结果

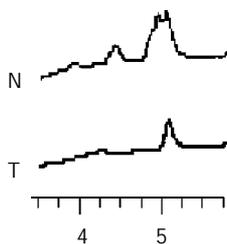
2.1 全基因组扩增产物的 DHPLC 分析结果 正常组织 DNA 等位片段为杂合子者(即色谱峰数目为 2 个或 2 个以上)可提供判断 LOH 信息。共检测 10 例胃癌组织标本及其相应的正常组织标本, 将肿瘤组织与其相应正常组织相比, DNA 的扩增产物的 DHPLC 色谱峰数目减少或色谱峰相对高度减少 50 % 以上判定为 LOH(图 1)。结

表 1 引物的一般情况

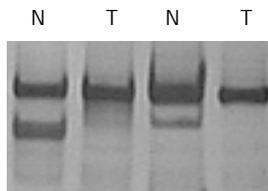
名称	引物序列(5' - 3')	产物的长度(bp)
MID24	MID24-F:5' -CAGTGAAAGCCTCATTTCTTAA-3'	155-159
	MID24-R:5' -TCACAAAGGAAATGTTCTTTTAC-3'	
MID25	MID25-F:5' -TCAACAGTTTTGCATATACAAAA-3'	129-130
	MID25-R:5' -TAAGCCCTTTTATTTTTCTTAAC-3'	
MID148	MID148-F:5' -CAAAGCCATTCCAAAGTTAA-3'	134-138
	MID148-R:5' -TATTTGTCCAGCCTATTGCA-3'	
MID149	MID149-F:5' -TTTGAACACATTCTGGAAGG-3'	115-127
	MID149-R:5' -TTGAAGATAATCGATCCCAA-3'	
MID150	MID150-F:5' -GACGAATGCAGAACACTTCT-3'	106-112
	MID150-R:5' -AATCTGAGGGAGCTGAGTAAC-3'	
MID151	MID151-F:5' -AAAATGTGTGTGTTGCACTG-3'	79-82
	MID151-R:5' -AAACTCATCCAGATTTAAATGC-3'	
MID298	MID298-F:5' -AACATTGGCGTTTTCTAGTG-3'	131-135
	MID298-R:5' -TGTTTGTTCATCAAGCATTTTT-3'	
MID352	MID352-F:5' -CATTCACTGTTGTATTGCGA-3'	98-101
	MID352-R:5' -ATGCTCCTTATGTTGACTGG-3'	
MID487	MID487-F:5' -AGTTGTGCACCCAAGAGAG-3'	74-78
	MID487-R:5' -TATGACGGAAGAAAATGAGC-3'	

果表明有3例胃癌组织的MID150位点的PCR产物的DHPLC峰型呈现LOH(30%)。其中1例同时在另外2个SIDP位点(MID148、MID352)DHPLC色谱峰型也呈现LOH。9个位点中有6个位点(MID24, MID25, MID149, MID151, MID298, MID487)的PCR产物的DHPLC色谱峰型未见异常。

2.2 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果分析 取5对经DHPLC检测峰型表现为LOH的PCR产物,将肿瘤组织与其相应的正常组织DNA的PCR结果相比较,若肿瘤样品某一等位基因条带消失或相对密度减少50%以上,记为LOH(图2)。结果可见5例癌组织PCR产物与其相应正常组织相比,癌组织DNA的扩增条带消失,表现为LOH。



T:胃癌组织; N:配对癌旁正常组织  
图1 DHPLC检测的LOH。



T:胃癌组织; N:配对癌旁正常组织  
图2 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后硝酸银染色的LOH。

### 3 讨论

近年来肿瘤分子生物学研究表明,肿瘤的发生发展是个多阶段、多步骤的过程,涉及多种癌基因的激活和抑癌基因的失活。抑癌基因是野生型的等位基因,肿瘤细胞中抑癌基因突变失活常常表现为一个等位基因丢失(allelic loss)和另一个存留等位基因(retained allele)失活性突变。其中,等位基因丢失就是由肿瘤细胞中多见的染色体缺失所致,他同时还会伴有抑癌基因座位相邻区域的杂合性缺失。LOH是指肿瘤基因组中特定染色体上某种DNA多态标记(如RFLP和微卫星多态标记)的等位基因片段由同一患者正常组织基因组的两种变成一种,即等位基因型由杂合子变成纯合子。LOH是肿瘤细胞中染色体缺失的结果,提示所检查DNA多态标记附近存在抑癌基因。因此,肿瘤组织LOH分析为定位和发现抑癌基因的有效手段。

众所周知,肿瘤细胞并非孤立存在于组织中,而是依存于多种不同类型细胞相互构成的三维空间中。用传统方法从磨碎组织中提取DNA,因各种细胞成分混杂难免造成检测结果的偏差。因此,肿瘤组织中细胞的

异质性已成为分子病理学和肿瘤基因组学研究的突出问题。本实验运用LCM技术,捕获单个肿瘤细胞,从而避免了异质细胞对实验结果的干扰。同时为了克服LCM技术分离目的细胞的数量有限性,本实验对LCM分选的细胞进行高可信度的全基因组扩增。因其有简便、精确、高效和可靠等特点,可广泛应用于肿瘤细胞基因的杂合性丢失的检测。

传统的杂合性丢失的检测方法多为聚丙烯酰胺凝胶电泳加硝酸银染色的方法,存在费时、费力、有毒操作等许多弊端,本实验采用DHPLC技术检测LOH,PCR产物不需纯化处理,可直接行DHPLC分析,完全自动化检测,每20 min即可检测一个样品,满足肿瘤基因组学研究中高通量检测技术的需求,其省时省力的同时,可精确、高效的进行LOH的检测,可以与传统的聚丙烯酰胺凝胶电泳加硝酸银染色的方法相媲美。

胃癌的发生发展中,经常发生18号染色体的LOH<sup>[29,30]</sup>,常见的杂合性丢失为18q和17p,并发现在18q的杂合性丢失比17p的杂合性丢失在胃癌的发展过程中更早出现。目前定位于18q的候选抑癌基因主要有3个,即DCC基因,DPC4基因,JV18-1基因或MADR2基因。DCC基因是在研究大肠癌时发现并命名的,有研究表明DCC基因LOH是胃癌的晚期改变,与病情进展相关<sup>[31,32]</sup>。DPC4基因,主要是在前列腺癌中检测中发现的,其在胃癌的发生中也起重要作用<sup>[33-35]</sup>。JV18-1基因或MADR2基因,主要是编码一个DPC4相关蛋白的基因,其与胃癌发生发展的关系尚不明确。另外,有报道发现18q12.2区域也常常发生胃癌LOH,其中的抑癌基因尚未被克隆出来。

本实验选用18号染色体上的9个短插入/缺失多态(SIDP)标记,对10例原发性胃癌进行了LOH的研究,结果表明在MID150位点处发生LOH的频率最高(3/10),其次在MID148位点和MID352位点也可见LOH(1/10),而其他位点在本实验中未检测到LOH。推测胃癌中18号染色体的MID150位点LOH较常见,该染色体位点上有可能存在与胃癌发生和发展相关的抑癌基因。这个抑癌基因是否为胃癌常见缺失基因,还需要进一步研究,加以证实。

我们的研究也尝试将LCM、HF-WGA和DHPLC技术相结合,应用于肿瘤细胞LOH检测,建立了准确、高效、快速的胃癌相关抑癌基因定位方法,其应用将有助于肿瘤基因组学和分子病理学中对抑癌基因定位与功能的研究。

### 4 参考文献

- 1 吴云林,陈颖.早期胃癌的临床筛选研究.世界华人消化杂志 2002; 10:1372-1375
- 2 程时丹,吴云林,章永平,乔敏敏,郭强苏.胃癌多药耐药细胞药物积累的异常.世界华人消化杂志 2001;9:131-134
- 3 房殿春.基因不稳定在胃癌发生中的作用.世界华人消化杂志 2003;11:1-5

- 4 房静远. 胃癌发生中后生修饰的异常. 世界华人消化杂志 2002;10:749-752
- 5 王东旭, 房殿春, 刘为纹. 胃黏膜肠化及异型增生和胃癌组织中多基因异常. 世界华人消化杂志 2000;8:855-859
- 6 Gao HJ, Yu LZ, Bai JF, Peng YS, Sun G, Zhao HL, Miu K, Lu XZ, Zhang XY, Zhao ZQ. Multiple genetic alterations and behavior of cellular biology in gastric cancer and other gastric mucosal lesions: *H pylori* infection, histological types and staging. *World J Gastroenterol* 2000;6:848-854
- 7 房殿春, 周晓东, 罗元辉, 王东旭, 鲁荣, 杨仕明, 刘为纹. 胃癌微卫星不稳定性及抑癌基因杂合缺失. 世界华人消化杂志 1999;7:479-481
- 8 Wang DX, Fang DC, Liu WW, Luo YF, Lu R. A study on the loss of heterozygosity of multiple tumor suppressor genes in gastrointestinal metaplasia. *Zhonghua Binglixue Zazhi* 1999;28:264-267
- 9 施秀清, 李功, 李春生, 倪灿荣, 栾汛, 曲阳. 胃癌中癌基因 ras c-myc mRNA 表达的临床意义. 华人消化杂志 1998;6:123-124
- 10 王维, 罗和生, 余保平. 胃癌及癌前病变中 hTERT 基因和 c-myc 蛋白的表达意义. 世界华人消化杂志 2002;10:258-261
- 11 Tsugawa K, Yonemura Y, Hirono Y, Fushida S, Kaji M, Miwa K, Miyazaki I, Yamamoto H. Amplification of the *c-met*, *c-erbB-2* and epidermal growth factor receptor gene in human gastric cancers: correlation to clinical features. *Oncology* 1998;55:475-481
- 12 蒋艳霞, 赵明彦, 耿明, 曹永成, 王兴友. p16, *cerbB-2* 蛋白在胃肿瘤中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2002;10:1050-1051
- 13 朱华乔, 罗和生, 于保平. cFLIP 基因表达与胃癌的关系研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1329-1330
- 14 费素娟, 陈玉林, 林志发, 陈淑敏, 刘广珍. 胃癌及癌前病变 ras P12, P53 的表达意义. 世界华人消化杂志 2001;9:465-466
- 15 李晓清, 郝丽萍, 张小丽, 龚飞跃, 郭惠学, 伍尤皇. 胃黏膜不典型增生 P53 基因表达及其癌变率的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1216-1217
- 16 孙秀菊, 孙开来, 付浩, 王舒宝, 陈峻青. 胃癌细胞 nm23H1 基因表达与体内外侵袭力的关系. 世界华人消化杂志 2003;11:10-13
- 17 Chen GY, Wang DR. The expression and clinical significance of CD44v in human gastric cancers. *World J Gastroenterol* 2000;6:125-127
- 18 孙喜文, 申宝忠, 石美森, 戴旭东. CD44v6 基因表达与胃癌危险因素的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:1129-1132
- 19 周永宁, 徐采朴, 韩彪, 王金穗, 房殿春, 彭贵勇, 杨建民, 刘海峰. 胃癌 E-钙粘蛋白表达与临床病理学的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:1121-1124
- 20 郑志红, 孙秀菊, 邱广蓉, 刘言厚, 王梅先, 孙开来. 胃癌癌前和发展阶段中 E-cadherin 基因的突变. 世界华人消化杂志 2002;10:153-156
- 21 张晓梅, 沈守荣, 王晓艳, 王洁如, 李江. 胃癌和大肠癌中肿瘤相关基因 NGX6 的表达. 世界华人消化杂志 2002;10:873-876
- 22 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 杨仕明, 汪荣泉. 胃癌前组织和胃癌中 Bax 基因表达及其与细胞凋亡的关系. 世界华人消化杂志 2000;8:665-668
- 23 崔大祥, 闫小君, 张沥, 赵景蓉, 江梅, 郭晏海, 张玲霞, 白西平, 苏成芝. 胃癌及癌前病变黏膜中呈高表达 6 个基因片段的筛选及其临床意义. 世界华人消化杂志 1999;7:770-772
- 24 汪波, 石灵春, 张维彬, 肖楚梅, 吴继锋, 董聿明. 胃癌及癌前病变中抑癌基因 P16 表达的意义. 世界华人消化杂志 2001;9:39-42
- 25 陈世耀, 王吉耀, 纪元, 张希德, 朱畴文. 幽门螺杆菌与蛋白激酶 C 在胃癌及癌前病变基因突变中的作用. 世界华人消化杂志 2001;9:302-307
- 26 张林, 付红梅, 金树珍, 黄润, 周成刚. P53 过度表达及细胞外基质与胃癌分化、浸润和转移的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:992-996
- 27 Kawabata K, Yamamoto T, Hara A, Shimizu M, Yamada Y, Matsunaga K, Tanaka T, Mori H. Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F334 rats. *Cancer Letters* 2000;157:15-21
- 28 杜建军, 窦科峰, 曹云新, 王中华, 王为忠, 高志清. 胃癌下调新基因 CA11 的功能研究. 世界华人消化杂志 2002;10:525-529
- 29 de Manzoni G, Tomezzoli A, Di Leo A, Moore PS, Talamini G, Scarpa A. Clinical significance of mutator phenotype and chromosome 17p and 18q allelic loss in gastric cancer. *British J Surgery* 2001;88:419-425
- 30 Yustein AS, Harper JC, Petroni GR, Cummings OW, Moskaluk CA, Powell SM. Allelotype of gastric adenocarcinoma. *Cancer Research* 1999;59:1437-1441
- 31 Fang DC, Jass JR, Wang DX, Zhou XD, Luo YH, Young J. Infrequent loss of heterozygosity of APC/MCC and DCC genes in gastric cancer showing DNA microsatellite instability. *J Chin Pathol* 1999;52:504-508
- 32 Fang DC, Jass JR, Wang DX. Loss of heterozygosity and loss of expression of the DCC gene in gastric cancer. *J Clin Pathol* 1998;51:593-596
- 33 Schwarte-Waldhoff I, Klein S, Blass-Kampmann S, Hintelmann A, Eilert C, Dreschers S, Kalthoff H, Hahn SA, Schmiegel W. DPC4/SMSD4 mediated tumor suppression of colon carcinoma cells is associated with reduced urokinase expression. *Oncogene* 1999;18:3152-3158
- 34 Iacobuzio-Donahue CA, Wilentz RE, Argani P, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH. Dpc4 protein in mucinous cystic neoplasms of the pancreas-Frequent loss of expression in invasive carcinomas suggests a role in genetic progression. *Am J Surg Pathol* 2000;24:1544-1548
- 35 Xu X, Brodie SG, Yang X, Im YH, Parks WT, Chen L, Zhou YX, Weinstein M, Kim SJ, Deng CX. Haploid loss of the tumor suppressor Smad4/Dpc4 initiates gastric polyposis and cancer in mice. *Oncogene* 2000;19:1868-1874