بررسی فراوانی جهش اکسون ۶ ژن P53 با روش PCR-SSCP در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های اصفهان در طی سال‌های ۱۳۸۲ الی ۱۳۸۴

رحیم گل‌محمدی [۱*]، مهدی نیکبخت [۲]، منصور صالحی [۳]، مژگان مختاری [٤]

خلاصه

سابقه و هدف: سرطان کولورکتال از سرطان‌های شایع جهانی می‌باشد. میزان شیوع سرطان کولورکتال بسته به ناحیه جغرافیایی متفاوت می‌باشد. در سرطان کولورکتال عوامل مختلفی از جمله رژیم غذایی، فاکتورهای محیطی و ژنتیکی نقش دارند. ژن P53 مهمترین ژن سرکوب‌کننده تومور می‌باشد، میزان جهش ژن P53 در سرطان‌های کولورکتال در نواحی مختلف، متفاوت گزارش شده است. هدف از این مطالعه تعیین جهش اکسون ٦ ژن P53 در سرطان کولورکتال است. این تحقیق در سال ۱۳۸٤ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به انجام رسید.

مواد و روش‌ها: این مطالعه بر روی ٤۰ نمونه سرطان کولورکتال که در طول سال‌های ۱۳۸۲ تا ۱۳۸٤ به بیمارستان‌های شهر اصفهان مراجعه کرده بودند پس از تشخیص پاتولوژی انجام شد. DNA نمونه‌ها با روش فنول کلروفرم، ایزوآمیل الکل در بخش ژنتیک دانشکده پزشکی اصفهان استخراج گردید و اکسون ٦ ژن P53 با PCR تکثیر گردید، و متعاقب الکتروفورز افقی با روش SSCP جهش اکسون ٦ ژن تعیین شد.

نتایج: از ٤۰ نمونه مورد مطالعه، ۹ نمونه (۲۲/۵٪) در ناحیهٔ رکتوم و ۳۱ نمونه (۷۷/۵٪) در بخش‌های مختلف رودهٔ بزرگ قرار داشتند. در ۷ نمونه (۱۷/۵٪) جهش اکسون ٦ ژن P53 دیده شد و در ۳۳ نمونه (۸۲/۵٪) در این اکسون جهش دیده نشد.

نتیجه‌گیری: مطالعهٔ ما نشان می‌دهد که جهش اکسون ٦ ژن P53 یکی از اکسون‌های شایع در سرطان‌های کولورکتال در ناحیهٔ اصفهان می‌باشد.

واژگان کلیدی: ژن‌های P53، PCR-SSCP، جهش، سرطان کولورکتال

۱- استادیارگروه علوم پایه دانشکده علوم پزشکی سبزوار

۲- استادیار گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

۳- استادیارگروه ژنتیک دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

٤- استادیارگروه پاتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

تاریخ دریافت: ۸٤/۷/۷

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۵/۳/۲۵

* نویسنده مسوول: رحیم گل‌محمدی

آدرس: سبزوار، دانشکده علوم پزشکی سبزوار

پست الکترونیک: Rahimgolmohammadi@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۵ ۵۷۱ ۲۵۷۳

فاکس: ۰۵۷۱ ٤٤٤٦۰۰۸

مقدمه

سرطان کولورکتال دومین عامل مرگ ناشی از سرطان در غرب می‌باشد [۱] و یکی از مهمترین تومورهای بدخیم در دنیا است [۲]. عوامل متعددی از جمله عادات غذایی، توارث، مواد شیمیایی، استرس‌های روحی و عصبی و محیط جغرافیایی در ایجاد تومورهای روده بزرگ دخیل می‌باشند [۳، ٤، ۵، ٦، ۷]. در حدود ۹۰ تا ۹۵ درصد تومورهای کولورکتال را آدنوکارسینوما تشکیل می‌دهند که به اشکال مختلفی از جمله موسینی و اسکواموسی دیده می‌شوند [۸]. کروموزوم ۱۷ در اکثر موارد در سرطان کولورکتال درگیر می‌شود که بر روی بازوی کوتاه این کروموزوم ژن P53 قرار دارد [۳، ۹، ۱۰]. این ژن در سال ۱۹۸۹ به وسیلهٔ تکنیک PCR و SSCP که یکی از روش‌های دقیق تعیین جهش می‌باشد مشخص شد [۱۱، ۱۲]. با استفاده از این روش که در آن DNA به صورت تک‌رشته‌ای درمی‌آید نزدیک به صد در صد جهش‌ها که در امر تشخیص، پیگیری و درمان سرطان‌ها ضروری می‌باشند را می‌توان تشخیص داد [۱۳] زیرا جهش‌ها موجب تغییر در توالی ژن و شکل فضایی آن شده و در مقایسه با نمونه سالم همان بافت با روش PCR-SSCP قابل تعیین می‌شود. میزان

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-24]

جهش این ژن در سرطان‌های کولورکتال با توجه به ناحیه جغرافیایی بین ۳۰ تا ۷۰ درصد متفاوت می‌باشد [٤]. ژن P53 از یازده اکسون و ۱۰ اینترون (Intron) تشکیل شده است [١٤] این ژن ابتدا به عنوان یک انکوژن شناخته می‌شد و اکنون به عنوان مهمترین مهارکننده تومور شناخته می‌شود، که کنترل‌کننده اصلی در پایداری ژنوم می‌باشد [۱۱، ۱۲]. این ژن یک فسفوپروتئین هسته‌ای را کد می‌کند که از ۳۹۳ اسید آمینه تشکیل شده که پایانهٔ N آن نقش یک Transactivator را دارد، پایانهٔ C آن عمل Transregulator دارد و بخش مرکزی یا DNA-Binding یک مهارکننده تومور می‌باشد [۱۱، ۱۲]. در پی آسیب فیزیکی یا شیمیایی DNA ژن P53 در مرحلهٔ G1 از طریق بیان ژن P21 که مهارکننده کینازی است موجب توقف چرخه سلولی می‌شود و از همانندسازی DNA پیشگیری می‌کند [۱۵] تا اینکه سلول خود را ترمیم کند و یا روند آپوپتوز را در سلول آسیب دیده تسهیل نماید [١٦]. پروتئین این ژن به ناحیه پروموتور چند ژن دیگر متصل شده و موجب افزایش (enhancer) نسخه‌برداری (Transcription) این ژن‌ها می‌شود. این عمل از طریق فعال کردن و بیان کردن چند ژن دیگر موجب تنظیم چرخهٔ سلولی می‌شود [۱۱، ۱۲]. چنین حالتی در سلول‌های بنیادی کریپت‌های کولون نیز اتفاق می‌افتد. این سلول‌ها پس از تکثیر و تمایز دچار آپوپتوز شده و ریزش می‌کنند و این چرخه مرتباً تکرار می‌شود ولی با افزایش سن، ترمیم و ریزش کاهش و نئوپلازی افزایش می‌یابد [۱۷]. هر نوع تغییر ژنتیکی و یا عامل دیگری که روند دیسپلازی را در اپی‌تلیوم رودهٔ بزرگ موجب شود بدخیمی را به دنبال خواهد داشت. از طرف دیگر، سرطان‌های روده بزرگ که همراه با جهش ژن P53 می‌باشند به درمان‌های معمولی مقاوم بوده و روش‌های درمانی را بر پایه مولکولی می‌طلبند. در سرطان‌های کولورکتال یکی از اکسون‌های درگیر که دچار جهش می‌شود اکسون ٦ ژن P53 است. حضور جهش این اکسون در نواحی مختلف جهان از جمله ژاپن، ایرلند و شیلی متفاوت گزارش شده است [۱۸، ۱۹، ۲۰]. تمام جهش‌های این ژن خصوصاً اکسون ٦ آن به خاطر عدم پایداری پروتئین P53 با روش ایمونوهیستوشیمی مشخص نمی‌شود [۲۱، ۲۲]. هدف ما در این مطالعه تعیین جهش اکسون ٦ ژن P53 با روش PCR-SSCP در ناحیه اصفهان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه بر روی ٤٢ نمونه سرطان کولورکتال که در طول سال‌های ۱۳۸۲ تا ۱۳۸٤ به بیمارستان‌های شهر اصفهان جهت جراحی مراجعه کرده بودند انجام گرفت. DNA نمونه‌ها پس از تشخیص پاتولوژی به ترتیب ذیل استخراج گردید حدود ۲۵ میلی‌گرم از ناحیه مبتلا به سرطان به طور دقیق با ترازوی الکتریکی وزن شد و در داخل اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری استریل قرار داده شد و همین مقدار نیز از ناحیه سالم بافت مجاور به طور جداگانه برداشت شد و در داخل اپندورف استریل دیگری قرار داده شد. با استفاده از بافرهای تجزیه TEN، آنزیم پروتئیناز K ۱۰ میلی‌مولار، تریس اسیدکلریدریک، EDTA نیم‌مولار، NaCl، SDS ۲٪ (Merk) و درجه حرارت ٥٥°C به مدت ۳ ساعت بافت هضم شد. DNA با روش فنول، فنول کلروفرم، ایزوآمیل الکل [۱، ۲٤، ۲۵] و کلروفرم استخراج، سپس با اتانول DNA رسوب داده شده و در آب مقطر دو بار تقطیر شده نگهداری شد. در این مطالعه از دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار اپندورف 541-7R با قدرت 12000g برای جدا کردن پروتئین‌ها و رسوب دادن DNA استفاده شد و با اسپکتروفتومتر غلظت DNA و میزان خلوص آن اندازه‌گیری شد و DNA در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد [۱۹، ۲۳].

PCR-SSCP[1]:

الف ـ PCR: یک و نیم میکرولیتر از DNA استخراج شده که حدود ۵۰ نانوگرم بود همراه با ۲/۵ میکرولیتر از buffer×۱۰ با غلظت‌های متفاوت ۲ تا ۳ میکرولیتری از $MgCl_2$ ۲۵ میلی‌مولار با ۱/۵ میکرولیتر d_{NTP} ۵ میلی‌مولار و ۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse با غلظت‌های ۵ میلی‌مولار و توالی زیر

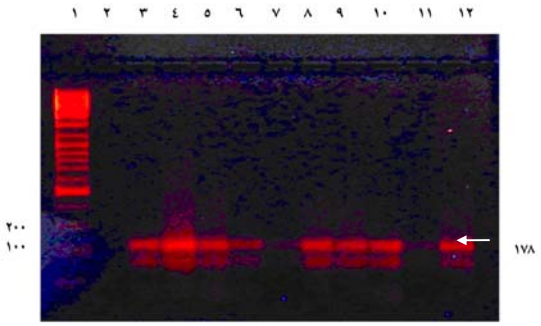
F: 5’-GTCCCCAGGCCTCTGATTC-3
R: 5’-CAGAGACCCTCCTCCCCAA-3’

(از شرکت MWG Biotech آلمان سفارش فرآیند دانش) [۲۳] و یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase به میکروتیوب استریل افزوده شد و با آب مقطر دو بار تقطیر شده حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد، سپس با استفاده از دستگاه ترموسیکلر Biored MycyclerUSA اکسون ٦ ژن P53 متعاقب بهینه سازی (optimizatioin) کردن شرایط مطلوب برای PCR از نظر گرادیانت درجهٔ حرارتی، غلظت DNA، پرایمر، کلریدمنیزیم و زمان، اکسون ٦ ژن P53 تکثیر گردید. بهترین شرایط به شرح ذیل به دست آمد. سیکل اول با دمای ۹٥°C به مدت ٥ دقیقه و ٤٠ سیکل بعدی با درجهٔ حرارت ۹٤°C به مدت ٥٠ ثانیه و درجه اتصالی پرایمر به DNA ٥٥°C درجه به مدت یک دقیقه و گسترش (extension) در درجه حرارت ۷۲°C به

1 - Polymerase Chain Reaction- Single strand conformation polymorphism.

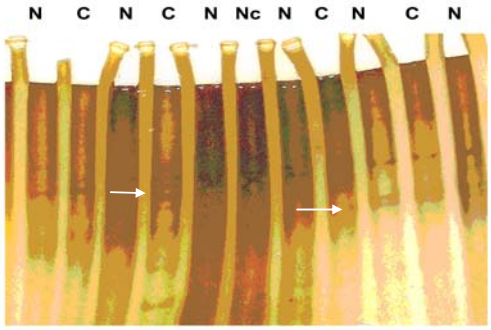
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-24]

مدت یک دقیقه و یک سیکل نهایی با درجه حرارت ۷۲°C به مدت ده دقیقه انجام شد. پس از تکثیر، محصول PCR در یخچال قرار داده شد. شش میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر از Loadying dye مخلوط گردید و سپس در چاهک‌های ژل ۲ درصد آگارز قرار داده شد. از Ethydium bromide برای رنگ‌آمیزی DNA استفاده گردید، از دستگاه الکتروفورز (HYBAID با مدل PS-250) به مدت ۹۰ دقیقه و با ولتاژ ۸۰ جهت الکتروفورز قطعات تکثیر شده استفاده شد. پس از قرار دادن ژل در آب مقطر با استفاده از دستگاه Documentation Gel Translominator مدل (Vilber-lourmat-700 54,7) عمل عکسبرداری انجام شد. با استفاده از مارکر ۱۰۰bp اندازه قطعات مشخص گردیدند که از قطعه تکثیر شده ۱۸۷ bp بود (شکل شماره ۱). از نمونه کنترل منفی جهت تعیین آلودگی نیز استفاده شد، این نمونه حاوی تمام مواد لازم برای تکثیر ژن به جز DNA بود [۱۹].



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر اکسون ٦ ژن P53 در ژل آگارز ۲٪ در نمو نه‌های مبتلا به سرطان کولورکتال
شماره ۱: استاندارد وزن مولکولی، شماره ۲: کنترل منفی، شماره ۳: نمونه سالم، شماره ٤ تا ۱۲: نمونه‌های مربوط به سرطان کولورکتال باند مورد نظر (۱۸۷bp) توسط پیکان مشخص شده است.

ب ـ روش SSCP[2]: در این روش DNA با حرارت یا مواد شیمیایی به صورت تک‌رشته‌ای درمی‌آید، از آنجا که DNA در جهش‌ها تغییر شکل فضایی می‌دهد، این تغییر در ژل آکریل آمید با جا به جایی باند (Abnormaly migrating bands) همراه می‌شود که می‌توان آن را با نمونه سالم از همان بافت مشخص نمود. روش PCR-SSCP یک متد سریع و حساس برای تعیین جهش می‌باشد [۲٤، ۲۵]. طبق مطالعات انجام شده این روش برای تعیین جهش نسبت به روش تعیین توالی حساس‌تر می‌باشد [۲۵، ۲٦، ۲۷]. در این مطالعه ما از ژل اکریل‌آمید ۱۰٪ حاوی ۰/۵٪ بیس آکریل آمید buffer TBE×۱۰ و آمونیوم پرسولفات (Merk) که رادیکال‌هایی آزاد را در ژل موجب می‌شود توأم با Temed که نقش یک کاتالیزور را در پلیمریزاسیون آکریل آمید و بیس اکریل آمید را دارد استفاده نمودیم. ژل را به مدت ۱/۵ساعت برای پلیمریزه شدن در فضای اتاق قرار دادیم، سپس ۸ میکرولیتر از محصول PCR را با ٤ میکرولیتر از Lodying dye مخلوط و با استفاده از درجه حرارت ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه DNA به صورت تک‌رشته‌ای درآورده شد، سپس بر روی ظرف یخ منتقل و پس از سه دقیقه در چاهک‌های ژل قرار داده شد. تانک به دستگاه پایا پژوهش مدل EPS-6oo وصل گردید و در طول یک شب در اتاقک سرد (Cold Room) با درجه ٤°C با ولتاژ ٦۰ و ٦ میلی‌آمپر جهت الکتروفورز قطعات تکثیر شده در ژل اکریل آمید قرار گرفت. روز بعد ژل به آهستگی از تانک خارج و با اسید استیک ده درصد به مدت ۲۰ دقیقه مجاورت داده شد و پس از شستشو با آب مقطر با نیترات نقره ۰/۱٪ (Merk) در تاریکی ژل رنگ‌آمیزی شد، در پایان با محلول ظهور ۳٪ (بیکربنات سدیم، تیوسولفات سدیم و فرمالدئید ۳۷٪ (Merk) باندها ظاهر شد و متعاقب آن ژل در اسید استیک ۱۰ درصد ثابت و از آن عکس تهیه گردید (شکل شماره ۲) [۱۹، ۲٤] و پروتکل قدم به قدم SSCP).



شکل ۲- SSCP اکسون ٦ ژن P53 در نمونه‌های مبتلا به سرطان کولورکتال
پیکان ها، باند جابجا شده را نشان می دهد
Nc: Negative control, C: cancer, N: Normal

نتایج

از ٤۲ نمونه سرطان کولورکتال متعاقب تشخیص پاتولوژی با تعیین غلظت و خلوص DNA ٤۰ نمونه از نظر کیفی جهت PCR مناسب تشخیص داده شد. با استفاده از پرایمر اختصاصی اکسون ٦ ژن P53 با دستگاه PCR تکثیر گردید و از الکتروفورز با مارکر ۱۰۰bp قطعات باندهای مورد نظر تعیین گردید از ٤۰ نمونه مورد مطالعه ۱۲ مورد (۳۰٪) زن و ۲۸ مورد

2 - Single strand conformation polymorphism.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-24]

(۷۰٪) مرد بودند ۹ نمونه (۲۲/۵٪) در ناحیه رکتوم و ۳۱ نمونه (۷۷/۵٪) در بخش‌های مختلف روده بزرگ یعنی سکوم، کولون صعودی، عرضی نزولی و سیگموئید قرار داشتند. حداقل سن در نمونه‌های مورد مطالعه ٥٤ سال حداکثر سن ۷۲ سال میانگین سن آنها ٦١ سال بود. در ۷ نمونه (۱۷/۵٪) از سرطان‌ها با روش SSCP جهش اکسون ٦ دیده شد که از این تعداد ۱ مورد در ناحیه رکتوم و ٦ نمونه دیگر در نواحی مختلف کولون قرار داشت و در ۸۲/۵ درصد آنها در این اکسون در مقایسه با نمونه‌های کنترل که از بافت سالم ناحیه مجاور تومور برداشته شده بود هیچ نوع جهشی دیده نشد، دو نمونه (۵٪) از جهش‌های فوق مربوط به جنس مؤنث و ۵ نمونه دیگر (۱۲/۵٪) از جهش‌های اکسون ٦ ژن P53 مربوط به جنس مذکر بود. (جدول شماره ۲).

جدول ۱- نتایج حاصل از جهش اکسون ٦ ژن P53 در سرطان‌های کولورکتال مورد مطالعه

متغیر		تعداد کل	فراوانی: حضور جهش P53	فراوانی: عدم حضور جهش P53	P value
جنس	مرد	۲۸	۵	۲۳	p=۰/۰۱
	زن	۱۲	۲	۱۰	
سن	<٦٠	۱۵	۳	۱۲	p=۰/۱۱
	≥٦٠	۲۵	٤	۲۱	
محل تومور	کولون	۳۱	٦	۲۵	p<۰/۰۰۱
	رکتوم	۹	۱	۸	

بحث

در این مطالعه که بر روی ٤٠ نمونه تازه سرطان کولورکتال در ناحیهٔ اصفهان انجام شده است ۲۸ مورد مربوط به جنس مذکر و ۱۲ مورد مربوط به جنس مؤنث می‌باشد. تفسیر ما برای تعداد بیشتر سرطان‌های کولورکتال در جنس مذکر وجود استرس‌های محیطی بیشتر برای مردان می‌باشد. در ۷ نمونه از سرطان‌ها (۱۷/۵٪) جهش اکسون ٦ ژن P53 مشاهده شد، که در مقایسه با مطالعات مشابه انجام شده توسط محققینی چون Dermot، Yamashita و همکارانشان در دانشگاه دوبلین ایرلند و ژاپن بیشتر می‌باشد [۱۸، ۱۹]. در ایرلند در ٦ مورد از ٦٦ نمونه مورد مطالعه جهش اکسون ٦ گزارش شده است [۱۹]. در حالی که در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۰ میلادی در ژاپن انجام شد یک مورد از ۲۰ مورد (۵٪) در اکسون ٦ جهش دیده شده است [۱۸]. در شیلی در ۱۲ مورد از ٤٢ نمونه (۲۹٪) جهش اکسون ٦ در سرطان کولورکتال گزارش گردیده است [۲۰]. با توجه به مطالعاتی که از سال ۱۹۸۹ میلادی به بعد در پی تشخیص جهش ژن P53 با روش PCR و SSCP در جهان انجام شده میزان جهش این ژن به عوامل مختلفی بستگی دارد [٤، ۱۱، ۱۳]. تفسیر ما در مورد تغییر میزان جهش به شرح ذیل می‌باشد نمونه‌های ما از نوع تازه بوده که در مقایسه با نمونه‌های مشابه از دقت بیشتری برخوردار می‌باشد زیرا محققین فوق DNA را از نمونه‌های پارافینی که در فرمالین ثابت (Fix) شده استخراج نموده‌اند و استخراج DNA از نمونه‌های پارافینی به خاطر ایجاد اتصالات متقاطع (cross-link) تکثیر ژن مورد نظر را با مشکل مواجه می‌سازد [۲۸، ۲۹]. از طرفی در مطالعه‌ای که توسط محققینی چون Roa و همکارانش که از نمونه‌های بیوپسی سرطان کولورکتال در سال ۲۰۰۰ میلادی در کشور شیلی استفاده کردند میزان جهش نسبتاً زیادی در اکسون ٦ مشاهده نمودند که می‌تواند احتمالاً تأییدی بر این باشد که نمونه‌های تازه برای کارهای مولکولی و تعیین جهش از دقت بیشتری در مقایسه با نمونه‌های پارافینی برخوردار باشند [۲۰]. در سال ۲۰۰۳ میلادی در اسپانیا مطالعه‌ای که توسط Colomer و همکارانش با روش ایمونوهیستوشیمی و PCR-SSCP انجام شد در ۲۹ نمونه از ۱۰۰ مورد سرطان کولورکتال، بیان ژن P53 با روش ایمونوهیستوشیمی منفی بود، که در ۱۵ مورد از آنها با روش PCR-SSCP جهش تشخیص داده شد که این می‌تواند تأییدی بر روشی که ما برای مطالعه انتخاب کردیم باشد [۲۱]. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است عادات غذایی و یا عوامل دیگر از جمله منطقه‌ای یا صنعتی در میزان جهش ژن P53 به عنوان یک عامل خطر به صورت مستقل و یا همراه عوامل دیگر در سرطان‌های کولورکتال مهم باشند.

نتیجه‌گیری

از آنجایی که روش SSCP یک روش ارزان، سریع، آسان، عملی و دقیق است و امکان راه‌اندازی آن در آزمایشگاه‌های پاتولوژی ما با یک هزینه نسبتاً خیلی کم ممکن می‌باشد و در هر مرحله می‌توان با روش PCR-SSCP چندین نمونه را مورد ارزیابی قرار داد. بنابراین از نظر اقتصادی برای بیماران و آزمایشگاه‌ها این روش مقرون به صرفه می‌باشد. با توجه به متنوع بودن میزان حضور جهش این اکسون در نواحی مختلف جغرافیایی پیشنهاد می‌شود همزمان با روش PCR-SSCP جهت تعیین نوع جهش از روش تعیین توالی نیز استفاده شود.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-24]

تشکر و قدردانی

از اعضای شورای پژوهشی دانشکده پزشکی اصفهان به خاطر تصویب طرح فوق به شماره ۸۳۱۸۲ و جناب آقایان دکتر رسول صالحی، دکتر معراج پورحسین، دکتر علی‌اصغر سروری، دکتر مهاجری، دکتر صفایی، دکتر میرمحمد صادقی و آقای کرمی کارشناس اتاق عمل الزهرا (س)، خانم‌ها: غفاری، امینی، مرادی و رضوانی پرسنل بخش ژنتیک دانشکده پزشکی و خانم‌ها آموزگار، محمودی و حقیقی کارشناسان بخش پاتولوژی اتاق عمل و دندانپزشکی سیدالشهداء.

References:

1- Johnston PG. Allegra CJ. Colorectal cancer biology: clinical implications. ***Semin Oncol*** 1995; 22: 418-432.
2- Jin W. Gao MQ. Lin ZW. Yang DX. Multiple biomarkers of colorectal tumor in a differential diagnosis model: a quantitative study. ***World J Gastroenterol*** 2004; 10: 439-442.
3- Smith G. Carey FA. Beattie J. Wilkie MJ. Lightfoot TJ. Coxhead J. et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative netic pathways to colorectal cancer. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 2002; 99: 9433-9438.
4- Tang R. Wang PF. Wang HC. Wang JY. Hsieh LL. Mutations of p53 gene in human colorectal cancer: distinct frameshifts among populations. ***Int J Cancer*** 2001; 91: 863-868.
5- Lipkin M. Reddy B. Newmark H. Lamprecht SA. Dietary factors in human colorectal cancer. ***Annu Rev Nutr*** 1999; 19: 545-86.
6- Sandler RS. Epidemiology and risk factors for olorectal cancer. ***Gastroenterol Clin North Am*** 1996; 25: 717-735.
7- Soussi T. The p53 tumour suppressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer. ***Mol Med Today*** 1996; 2: 32-37.
8- DeVita, Jr. Samuel Hellman Steven A. Rosenberg Cancer, principles and practice of oncology/edited by Vincent T. 319 contributing authors. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 2001. p. 1216-1312.
9- Goi T. Takeuchi K. Katayama K. Hirose K. Yamaguchi A. Mutations of rabphillin-3A-like gene in colorectal cancers. ***Oncol Rep*** 2002; 9: 1189-1192.
10- Baker SJ. Preisinger AC. Jessup JM. Paraskeva C. Markowitz S. Willson JK. et al. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. ***Cancer Res*** 1990; 50: 7717-7722.
11- Hofseth LJ. Hussain SP. Harris CC. p53: 25 years after its discovery. ***Trends Pharmacol Sci*** 2004; 25: 177-181.
12- Cadwell C. Zambetti GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. ***Gene*** 2001; 277: 15-30.
13- Glavac D. Dean M. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. ***Hum Mutat*** 1993; 2: 404-414.
14- Zhang JS. Caplin S. Bosman FT. Benhattar J. Genetic diversity at the p53 locus between primary human colorectal adenocarcinomas and their lymph-node metastases. ***Int J Cancer*** 1997; 70: 674-678.
15- Rowland BD. Peeper DS. KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. ***Nat Rev Cancer*** 2006; 6: 11-23.
16- Moll UM. Wolff S. Speidel D. Deppert W. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. ***Curr Opin Cell Biol***. 2005; 17: 631-636.
17- Renehan AG. O'Dwyer ST. Haboubi NJ. Potten CS. Early cellular events in colorectal carcinogenesis. ***Colorectal Dis*** 2002; 4: 76-89.
18- Yamashita K. Yoshida T. Shinoda H. Okayasu I. Novel method for simultaneous analysis of p53 and K-ras mutations and p53 protein expression in single histologic sections. ***Arch Pathol Lab Med*** 2001; 125: 347-352.
19- Leahy DT. Salman R. Mulcahy H. Sheahan K. O'Donoghue DP. Parfrey NA. Prognostic significance of p53 abnormalities in colorectal carcinoma detected by PCR-SSCP and immunohistochemical analysis. ***J Pathol*** 1996; 180: 364-370.
20- Roa JC. Roa I. Melo A. Araya JC. Villaseca MA. Flores M. et al. p53 gene mutation in cancer of the colon and rectum. ***Rev Med Chil*** 2000; 128: 996-1004.
21- Colomer A. Erill N. Verdu M. Roman R. Vidal A. Cordon-Cardo C. et al. Lack of p53 nuclear immunostaining is not indicative of absence of TP53 gene mutations in colorectal adenocarcinomas. ***Appl Immunohistochem Mol Morphol*** 2003; 11: 130-137.
22- Cripps KJ. Purdie CA. Carder PJ. White S. Komine K. Bird CC. et al. A study of stabilisation of p53 protein versus point mutation in colorectal carcinoma. ***Oncogene*** 1994; 9: 2739-2743.
23- Jansson A. Gentile M. Sun XF. p53 Mutations are present in colorectal cancer with cytoplasmic p53 accumulation. ***Int J Cancer*** 2001; 92: 338-341.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-24]

24- Sheffield VC. Beck JS. Kwitek AE. Sandstrom DW. Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. ***Genomics*** 1993; 16: 325-332.
25- SchmitzI M. Kayser M. Pauly P. Lagoda O. Tureci J. Weber A. Kerschen F. Ries and M. Dicato PCR-SSCP a sensitive and rapid method to detect mutations in the P53 tumor suppressor gene of patients with advanced colorectal cancer European ***Journal of Cancer*** 1995; 31: S96.
26- Chaubert P. Bautista D. Benhattar J. An improved method for rapid screening of DNA mutations by nonradioactive single-strand conformation polymorphism procedure. ***Biotechniques*** 1993; 15: 586.
27- Welsh JA. Castren K. Vahakangas KH. Single-strand conformation polymorphism analysis to detect p53 mutations: characterization and development of controls. ***Clin Chem*** 1997; 43: 2251-2255.
28- Coombs NJ. Gough AC. Primrose JN. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. ***Nucleic Acids Res*** 1999; 27: 12.
29- Williams C. Ponten F. Moberg C. Soderkvist P. Uhlen M. Ponten J. Sitbon G. Lundeberg J. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. ***Am J Pathol*** 1999; 155: 1467-1471.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-24]