

## فراوانی حضور ارتباط جهش اگزون ۷ ژن P53 با پیش آگهی بیماری در سرطان کولورکتال

دکتر رحیم گل محمدی<sup>۱</sup>؛ دکتر مهدی نیکبخت<sup>۲</sup>

### چکیده

**مقدمه:** سرطان کولورکتال یکی از سرطان‌های شایع جهان می‌باشد. در سرطان کولورکتال آسیب‌های ژنتیکی و عادت‌های غذایی نقش اصلی را ایفا می‌نمایند. ژن P53 مهم‌ترین ژن مهارکننده سرطان می‌باشد. میزان جهش اگزون ۷ ژن P53 در نمونه‌های سرطانی کولورکتال در نواحی مختلف متفاوت گزارش شده است که می‌تواند با پیش آگهی بیماری ارتباط داشته باشد. هدف از مطالعه حاضر، تعیین ارتباط جهش اگزون ۷ ژن P53 با پیش آگهی بیماری در سرطان کولورکتال می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه از نوع توصیفی تحلیلی است و در روی ۸۰ نمونه سرطانی کولورکتال که طی سال‌های ۸۵-۱۳۸۲ به بیمارستان‌های شهر اصفهان مراجعه کرده بودند انجام شد. DNA نمونه‌ها با روش فنل کلروفورم در بخش ژنتیک دانشکده پزشکی اصفهان استخراج گردید و اگزون ۷ ژن P53 با PCR تکثیر گردید و متعاقب الکتروفورز افقی با روش SSCP جهش اگزون ۷ تعیین شد. با روش ایمنووهیستوشیمی پایداری پروتئین P53 مشخص شد. داده‌ها با آزمون کای دو تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** از ۸۰ نمونه مورد مطالعه، در ۴ نمونه (۵٪) جهش مشاهده شد، که با پایداری پروتئین P53 همراه بود. بین جهش اگزون ۷ ژن P53 با پایداری پروتئین ارتباط معنادار وجود داشت ( $p < 0/001$ ). ولی بین جهش و مرحله تومور ارتباط معنادار وجود نداشت ( $P > 0/05$ ). دو مورد از نمونه‌های همراه با جهش و یک مورد از نمونه‌های غیرجهش‌دار به بافت کبد، متاستاز داشتند. طول بقاء سه سال پس از تشخیص و پیگیری در بیماران با جهش، کم‌تر از بیماران بدون جهش بود.

**نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر نشان داد که تمام جهش‌های اگزون ۷ ژن P53 با پایداری پروتئین P53 همراه می‌باشند و وجود جهش در بیماران با پیش آگاهی بد در سرطان کولورکتال همراه بود.

**کلیدواژه‌ها:** سرطان کولورکتال، جهش، اگزون ۷ ژن P53، پیش آگهی

«دریافت: ۱۳۸۶/۱۱/۲۷ پذیرش: ۱۳۸۷/۱۱/۲۹»

۱. استادیار گروه علوم پایه دانشکده علوم پزشکی سبزوار

۲. استادیار بخش علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

\* عهده‌دار مکاتبات: سبزوار، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دانشکده علوم پزشکی، تلفن: ۰۹۱۵۵۷۱۲۵۷۳، فاکس: ۰۵۷۱ ۴۴۴۶۰۰۸

## مقدمه

سرطان کولورکتال در مردان از نظر شیوع، بعد از سرطان ریه و پروستات قرار دارد، در حالی که در زنان دومین سرطان شایع پس از سرطان پستان می باشد (۱ و ۲). سرطان کولورکتال دومین عامل مرگ ناشی از سرطان در غرب می باشد (۳ و ۴) و حدود ۱۵ درصد علت های مرگ ناشی از سرطان را به خود اختصاص می دهد (۴). در سرطان کولورکتال عوامل متعددی نقش دارند ولی آسیب های ژنتیکی و عادات غذایی، جزء مهم ترین عوامل خطر در سرطان کولورکتال محسوب می شوند (۵ و ۶). بیشتر تومورهای کولورکتال را آدنوکارسینوما تشکیل می دهند که به اشکال مختلفی از جمله موسینی و

ایرلند و شیلی متفاوت گزارش شده است (۱۵-۱۱). از طرفی با توجه به تغییرات ژنتیکی و مقاومت دارویی در سرطان ها، مطالعات جهش ها از دید مولکولی برای تشخیص، پیگیری و درمان های نوین لازم و ضروری می باشد، زیرا جهش های ژن P53 عموماً با مقاومت دارویی و اختلال در آپوپتوز همراه است، البته ممکن است با حساسیت به دارو نیز همراه باشد و از طرفی جهش های اگزون ۷ ژن P53 با پیش آگهی بد همراه می باشد (۱۶ و ۱۷). هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی فراوانی حضور جهش اگزون ۷ ژن P53 با پیش آگهی بیماری در سرطان کولورکتال در شهر اصفهان با روش PCR-SSCP می باشد.

## مواد و روش ها

این مطالعه از نوع توصیفی و تحلیلی است و در روی ۸۰ نمونه سرطان کولورکتال که طی سال های ۸۵-۱۳۸۲ به بیمارستان های شهر اصفهان برای جراحی مراجعه کرده بودند انجام گرفت. DNA نمونه ها پس از هضم بافتی با استفاده از بافرهای تجزیه TEN، آنزیم پروتیناز ۱۰K، میلی مولار، تریس اسیدکلریدریک، EDTA ۰/۵ مولار، NaCl، SDS ۲ درصد (Merk) و درجه حرارت با روش فنل، فنل کلروفرم، ایزوآمیل الکل (۲۵، ۲۴ و ۱) و کلروفرم استخراج و با اتانول DNA رسوب داده شد، با اسپکتروفوتومتر غلظت DNA و میزان خلوص آن اندازه گیری شد و DNA در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگه داری شد (۱۸ و ۱۹).

اسکواموسی دیده می شوند (۷). کروموزوم ۱۷ در بیشتر موارد در سرطان کولورکتال درگیر می شود که در روی بازوی کوتاه این کروموزوم ژن P53 قرار دارد، ژن P53 از ۱۱ اگزون تشکیل شده است. اولین مدرک جهش ژن p53 در سرطان کولورکتال به سال ۱۹۹۰ میلادی برمی گردد (۸). محصول این ژن یک فسفوپروتئین هسته ای است که سه ناحیه اصلی دارد، مهم ترین بخش این پروتئین بخش مرکزی<sup>۱</sup> است که از روی اگزون های ۵ تا ۸ ژن P53 نسخه برداری می شود، این قسمت از ژن نقش سرکوب کنندگی تومور را به عهده دارد (۹). بیش از ۹۰ درصد از جهش های ژن P53 در اگزون های ۵ تا ۸ اتفاق می افتد (۱۰). اگزون ۷، بخشی از این ناحیه بوده که در نمونه های سرطانی کولورکتال، میزان شیوع جهش این ژن در نواحی مختلف جغرافیایی از جمله چین، ژاپن،

● PCR-SSCP<sup>۱</sup>

الف - PCR:

۱/۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده که حدود ۵۰ نانوگرم بود همراه با ۲/۵ میکرولیتر از  $10\times$  buffer با غلظت‌های متفاوت ۲ تا ۳ میکرولیتری از  $MgCl_2$  ۲۵ میلی‌مولار با ۱/۵ میکرولیتر  $dNTP$  ۵ میلی‌مولار و ۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse با غلظت‌های ۵ میلی‌مولار و با توالی: Forward: 5'-TCTTGGGCCTGTGTTATCTC-3' و Reverse: 3'-GGTGGATGGGTAGTAGTATG-5' (از شرکت HPSF Biotech آلمان سفارش فرآیند دانش)، تمام طول اگزون ۷ را از کدون ۲۲۴ تا ۲۶۱ تکثیر می‌کرد (۱۸). یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase به میکروتیوب استریل افزوده شد و با آب مقطر دو بار تقطیر شده و حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد، سپس با استفاده از دستگاه ترموسیکلر Biored Mycycler<sup>USA</sup>، اگزون ۷ ژن P53 متعاقب بهینه‌سازی کردن شرایط مطلوب برای PCR از نظر گرادیانت درجه حرارتی، غلظت DNA، پرایمر، کلراید منیزیم و زمان، اگزون ۷ ژن P53 تکثیر گردید. بهترین شرایط به شرح ذیل به دست آمد: سیکل اول با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۴۰ سیکل بعدی با درجه حرارت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و درجه اتصالی پرایمر به DNA ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، گسترش در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه

و یک سیکل نهایی با درجه حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه انجام شد. پس از PCR موفق، ۶ میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر از محلول Loading dye مخلوط گردید، الکتروفورز به مدت ۹۰ دقیقه و با ولتاژ ۸۰ انجام می‌شد و با اتیدیوم برماید ژل رنگ آمیزی می‌گردید (شکل ۱) (۱۸ و ۲۰).  
ب- روش SSCP:

در این روش DNA با حرارت یا مواد شیمیایی به صورت تک‌رشته‌ای در می‌آید، از آنجا که DNA در جهش‌ها تغییر شکل فضا می‌دهد، این تغییر در ژل آکریل آمید با جابه‌جایی باندها<sup>۲</sup> همراه می‌شود که می‌توان آن را با نمونه سالم از همان بافت مشخص نمود. روش PCR-SSCP یک روش سریع و حساس برای تعیین جهش می‌باشد (۲۱ و ۲۲). طبق مطالعات انجام شده، این روش برای تعیین جهش، سریع‌تر و کم‌هزینه‌تر نسبت به روش تعیین توالی می‌باشد (۲۲ و ۲۳). در این مطالعه از ژل آکریل آمید ۱۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد بیس‌آکریل آمید buffer  $10\times$ TBE و آمونیوم پرسولفات (Merk) که موجب به وجود آمدن رادیکال‌های آزاد در ژل می‌شود توأم با محلول Temed که نقش یک کاتالیزور را در پلیمریزاسیون آکریل آمید و پایه آکریل آمید دارد استفاده شد. ژل به مدت ۱/۵ ساعت برای پلیمریزه شدن در فضای اتاق قرار داده شد، سپس ۸ میکرولیتر از محصول PCR را با ۴ میکرولیتر از محلول Lodying dye مخلوط و با استفاده از درجه حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵

1. Polymerase Chain Reaction- Single strand conformation polymorphism

2. Abnormaly migrating bands

طب آسیا) در اتافک مرطوب با غلظت ۰/۳۲ گرم در لیتر استفاده شد و پس از شستشو با بافر فسفات سالین، آنتی‌بادی ثانویه Biotinylated روی لام‌ها چکانده شد. از استرپتوآویدین متصل به HRP که قادر است دی‌آمینو بنزیدین (DAB) را اکسید کند، استفاده شد (۲۴ و ۲۵). سلول‌هایی که با پایداری پروتئین P53 هستند رسوب غیرمحلول قهوه‌ای‌رنگ ایجاد می‌کنند. پس از رنگ‌آمیزی زمینه با همتوکسیلین، لام‌ها با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند (شکل ۳). داده‌ها با استفاده از آزمون کای‌دو تجزیه و تحلیل شدند.

#### یافته‌ها

از ۸۰ نمونه سرطانی کولورکتال مورد مطالعه در این پژوهش در ۴ نمونه (۵٪) در اگزون ۷ جهش مشاهده شد که ۳ نمونه آن در جنس مذکر و ۱ مورد آن مربوط به جنس مؤنث بود. از ۴ مورد جهش در اگزون ۷، ۳ نمونه در بخش پروگزیمال و یک مورد در بخش دیستال روده بزرگ قرار داشتند. توزیع جهش‌ها در روده بزرگ به ترتیب ذیل بود: ۲ مورد در سکوم و کولون صعودی، ۱ مورد در کولون عرضی و ۱ مورد در کولون نزولی قرار داشتند. در روش SSCP که در این مطالعه استفاده شد در صورتی که نمونه باند جابه‌جاشده داشت، به‌عنوان نمونه جهش‌دار قلمداد می‌شد، زیرا که نمونه‌های جهش‌دار، تغییر شکل فضا می‌دهند که این تغییر در الکتروفورز ژل آکریل‌آمید مشخص می‌شود، البته به‌طور نادر این تغییر می‌تواند مربوط به پلی‌مریسم ژنی باشد. از آن‌جاکه در این پژوهش از بخش سالم همان نمونه به‌عنوان کنترل

دقیقه، DNA به‌صورت تکرارته‌ای در آورده شد، سپس در روی ظرف یخ منتقل و پس از سه دقیقه در چاهک‌های ژل قرار داده شد و در طول یک شب در اتافک سرد با درجه ۴ درجه سانتی‌گراد با ولتاژ ۶۰ و ۶ میلی‌آمپر در ژل آکریل‌آمید الکتروفورز انجام شد. روز بعد، ژل به آهستگی از تانک خارج و با اسیداستیک ۱۰ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه مجاورت داده شد و پس از شستشو با آب مقطر با نیترات نقره ۰/۱ درصد (Merk) در تاریکی، ژل رنگ‌آمیزی شد، در پایان با محلول ظهور ۳ درصد (بیکربنات سدیم، تیوسولفات سدیم و فرمالدئید ۳۷٪) (Merk) باندها ظاهر شد و متعاقب آن، ژل در اسیداستیک ۱۰ درصد ثابت و از آن عکس تهیه گردید (شکل ۲) (۲۱ و ۲۳).

#### ● ایمونوهیستوشیمی:

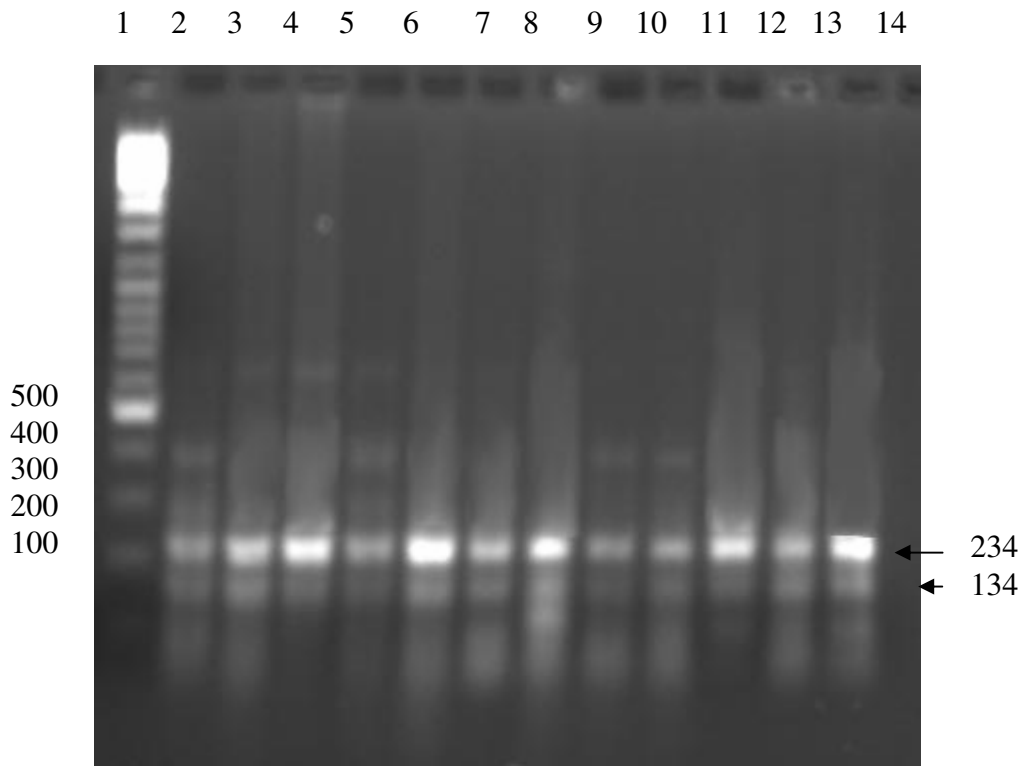
پاساژ بافتی پس از ثابت کردن نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد به‌وسیله دستگاه Tissue processing انجام شد و مقاطع ۵ میکرونی برای ایمونوهیستوشیمی از تمام بلوک‌های پارافینی با میکروتوم چرخشی تهیه شد. برای عمل ماسک‌زدایی پس از پارافین‌زدایی، نمونه‌ها در داخل کوپلین ظرف بافر سیترات قرار داده شدند و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه ماکروویو در درجه حرارت ۹۵ سانتی‌گراد گذاشته شدند، این مرحله برای واکنش بهتر در مراحل بعدی لازم می‌باشد چون در طی روند فیکساسیون بافتی ممکن است محل شاخص‌های آنتی‌ژنی که باید با آنتی‌بادی واکنش بدهد پوشیده شده باشند (۲۴ و ۲۵). مهار پراکسیداز بافتی با آب اکسیژنه انجام گرفت. از آنتی‌بادی مونوکلونال مخصوص P53 (DAKO سفارش

(شکل ۲). تمام نمونه‌های همراه با جهش در اگزون ۷ با پایداری پروتئین P53 همراه بودند (شکل ۳). بین جهش اگزون ۷ با پایداری پروتئین P53 ارتباط معنادار بود ( $p < 0/001$ ). بین مرحله سرطان، سن و جنس با جهش اگزون ۷ P53 ارتباط معنادار وجود نداشت ( $P > 0/05$ ) (جدول ۱). دو مورد از نمونه‌های همراه با جهش در این اگزون، متاستاز به بافت کبد داشتند، در حالی که یک مورد از نمونه‌های غیرجهش‌دار به بافت کبد، متاستاز داشتند. طول بقاء در بیماران سرطانی کولورکتال همراه با جهش پس از سه سال پیگیری، کم‌تر از بیماران بدون جهش بود.

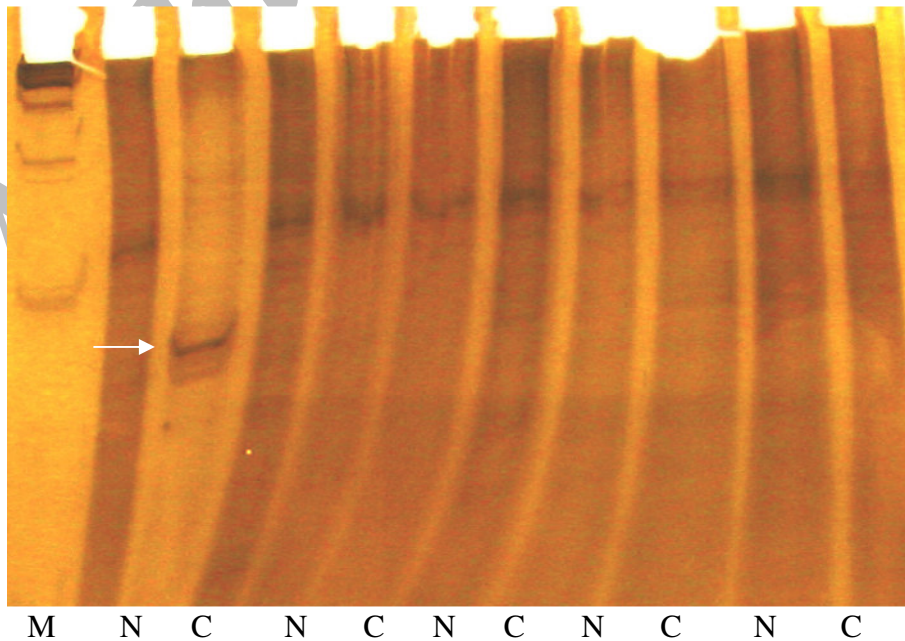
استفاده شد بنابراین این تغییر مربوط به جهش ژن است نه پلی مورفیسم، زیرا اگر این تغییر مربوط به پلی مورفیسم ژنی بود باید در نمونه سالم نیز دیده می‌شد که چنین نبود، بنابراین جابه‌جایی باند ایجاد شده در اگزون ۷ ژن P53 مربوط به جهش می‌باشد (شکل ۲). ضمناً طول قطعه DNA تکثیر شده در اگزون ۷ ژن P53 با PCR ۲۳۴ زوج باز می‌باشد (شکل ۱). طول قطعه محصول PCR در SSCP ۱۳۴ باز است زیرا در SSCP محصول DNA با درجه حرارت یا مواد شیمیایی، تکرشته می‌شود. در این مطالعه برای جداسدن دو رشته DNA از حرارت استفاده شد و طول قطعه جهش یافته حدود ۸۰ باز می‌باشد و استانداردهای مولکولی استفاده شده آن‌ها را تأیید می‌کنند

جدول ۱- نتایج حاصل از جهش اگزون ۷ ژن P53 در سرطان‌های کولورکتال

متغیر	فراوانی		
	تعداد کل	حضور جهش	عدم حضور جهش
جنس	مرد	۵۶	۳
	زن	۲۴	۱
سن	< ۶۰	۳۵	۱
	≥ ۶۰	۴۵	۳
محل تومور	کولون	۶۸	۴
	رکتوم	۱۲	۰
نوع تومور	موسینی	۱۷	۱
	غیر موسینی	۶۳	۳
P53	پایداری پروتئین	۸۰	۴



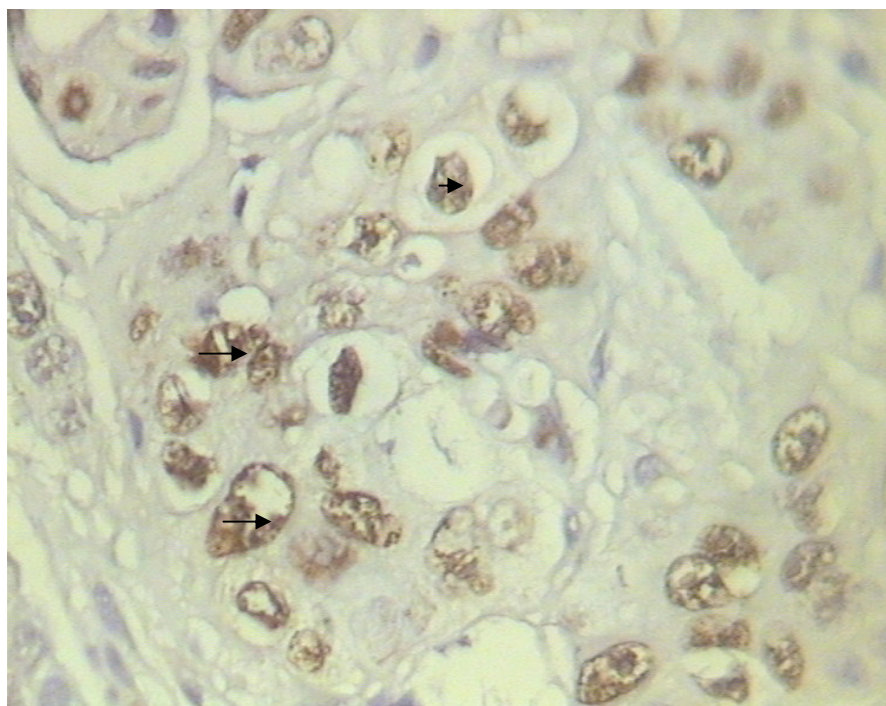
شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر اگزون ۷ ژن P53 در ژل آگارز ۲ درصد در نمونه‌های مبتلا به سرطان کولورکتال شماره ۱: استاندارد وزن مولکولی شماره ۲: نمونه سالم شماره ۳-۱۳: نمونه‌های مربوط به سرطان کولورکتال شماره ۱۴: کنترل منفی باند مورد نظر توسط پیکان مشخص شده است.



شکل ۲- SSCP اگزون ۷ ژن P53 در نمونه‌های مبتلا به سرطان کولورکتال

پیکان باند جایه‌جاشده را نشان می‌دهد

N: Normal C: cancer M: marker [www.SID.ir](http://www.SID.ir)



شکل ۳- پایداری پروتئین P53 در سلول‌های سرطانی بافت روده بزرگ با روش ایمونوهیستوشیمی (بزرگ‌نمایی ۴۰۰) پیکان‌ها محل پایداری پروتئین P53 را در هسته سلول‌های سرطانی روده بزرگ نشان می‌دهد.

### بحث

نمونه مبتلا به سرطان کولورکتال، ۷ مورد جهش در اگزون ۷ ژن P53 مشاهده شد (۱۳) که در مقایسه با مطالعه حاضر تفاوت دارد. در مطالعه‌ای که توسط یاماشیتا و همکارانش روی ۲۰ نمونه مبتلا به سرطان کولورکتال در ژاپن انجام شده است، در ۳ مورد اگزون ۷، جهش دیده شده بود (۱۱). در حالی که در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۴ میلادی در کشور چین توسط پانز و همکارانش روی ۹۷ بیمار مبتلا به سرطان رکتوم انجام شد در ۴۷ مورد اگزون ۷، جهش گزارش گردیده است (۱۴) که در مقایسه با مطالعه حاضر تفاوت چشم‌گیری را نشان می‌دهد. در مطالعه‌ای که توسط تانگ و همکارانش روی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال با روش PCR-SSCP برای تعیین جهش انجام شد با روش

این مطالعه در روی ۸۰ نمونه آدنوکارسینومای کولورکتال در ناحیه اصفهان انجام شده است. در ۴ نمونه جهش اگزون ۷ ژن P53 با روش SSCP مشاهده شد که با پایداری پروتئین P53 همراه بودند، بیشتر جهش‌های اگزون ۷ ژن P53 در آدنوکارسینومای غیرموسینی مشاهده گردید و همگی آن‌ها در ناحیه کولون بودند و پیگیری وضعیت بیماران به مدت سه سال پس از تشخیص نشان داد که بقاء بیماران دارای جهش کم‌تر از بیماران فاقد جهش است. مطالعه‌ای که توسط لاهی و همکارانش روی ۶۶ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال انجام شده است، در ۹ مورد اگزون ۷، جهش گزارش شده بود (۱۲). همچنین طبق مطالعه روا و همکارانش در کشور شیلی، از ۴۲

کبد باشد و این احتمال نیز وجود دارد که جهش اگزون ۷ همراه با قدرت تهاجمی بیشتر سلول‌های سرطانی همراه باشد. زیرا جهش‌های ژن P53 در سرطان کولورکتال همراه با بیان عوامل آنژیونژ همراه می‌شود (۳۱ و ۳۲) که برای رشد سلول‌های سرطانی لازم و ضروری می‌باشد و در نتیجه ورود سلول‌های سرطانی به بافت‌های مجاور را تسریع می‌کند. طول بقا در بیماران همراه با جهش، کم‌تر از بیماران بدون جهش بود که به احتمال زیاد علت کم بودن طول بقا در بیماران همراه با جهش می‌تواند مربوط به قدرت تهاجمی سلول‌های سرطان به بافت‌های مجاور باشد و یا به عوامل دیگری همچون مرحله تومور، شاخص‌های پاتولوژی و یا مقاومت دارویی مربوط باشد.

### نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، تمام جهش‌های اگزون ۷ ژن P53 با پایداری پروتئین P53 همراه بودند و وجود جهش در بیماران با پیش‌آگاهی بد در سرطان کولورکتال همراه بود. پیشنهاد می‌شود که برای مشخص کردن نوع جهش از روش تعیین توالی نیز استفاده شود.

### تشکر و قدردانی

نویسنده بر خود لازم می‌داند که از شورای محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به‌خاطر تصویب طرح و همچنین از پاتولوژیست محترم جناب آقای دکتر محمدرضا مهاجری تشکر و قدردانی به‌عمل آورد.

تعیین توالی، جهش‌ها تأیید شدند (۲۶) که می‌تواند بر مطمئن بودن روش مذکور برای مشخص کردن جهش مؤثر باشد. طول بقا در بیماران همراه با جهش، کم‌تر از بیمارانی بود که جهش نداشتند. در مطالعه‌ای که توسط اینستا و همکارانش در اسپانیا روی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال انجام شد، نشان داد که جهش‌های اگزون ۷ ژن P53 با پیش‌آگاهی ضعیف همراه است که با مطالعه حاضر از نظر طول بقا هم‌خوانی دارد (۲۷). تورتولا و همکارانش نیز جهش‌های ژن 53 در سرطان کولورکتال را همراه با افزایش قدرت تهاجمی و مقاوم به درمان در بیماران سرطانی بیان کردند (۲۸). اما بعضی از مطالعات، شاخص‌های پاتولوژی را در افزایش قدرت تهاجمی بیان می‌کنند و جهش‌های ژن P53 را به‌عنوان یک عامل در نظر می‌گیرند (۲۹ و ۳۰). دو مورد از نمونه‌های همراه با جهش در این اگزون، متاستاز به بافت کبد داشتند درحالی که یک مورد از نمونه‌های غیرجهش‌دار به بافت کبد، متاستاز داشتند. تفسیر مطالعه حاضر در مورد تغییر میزان جهش به‌شرح ذیل می‌باشد: می‌توان گفت عوامل صنعتی، محیطی، جغرافیای سبک زندگی یا عادت‌های غذایی در کشورها و شهرهای مختلف، متفاوت می‌باشد که می‌تواند روی میزان جهش اگزون ۷ ژن P53 در نواحی مختلف جغرافیایی تأثیر بگذارد و کم‌تر بودن میزان جهش اگزون ۷ در ناحیه مورد مطالعه احتمالاً می‌تواند مربوط به سبک زندگی باشد. کم‌تر بودن طول بقا در بیماران آدنوکارسینومای کولون می‌تواند مربوط به متاستاز سلول‌های سرطانی به بافت



## Abstract

### *Frequency of the correlation between mutation in 7th exon of P53 gene and the prognosis of colorectal cancer*

*Golmohamadi, R.<sup>1</sup>; Nikbakht, M.<sup>2</sup>*

*1. Department of Anatomical Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences*

*2. Department of Anatomical Medicine, Isfahan University of Medical Sciences*

**Introduction:** *Colorectal cancer (CRC) is one of the most prevalent cancers in the world. Genetic disorders and dietary habits play a part in CRC. The most important cancer suppressor gene is P53. Different mutations rates in 7th exon of p53 gene are reported in different areas which may have a relationship with prognosis of CRC. This study examines the relationship between mutation in 7th exon of P53 gene and the prognosis of CRC.*

**Materials and Methods:** *This descriptive analytical study included 80 CRC cases hospitalized in Isfahan between 2003 and 2007. The DNA samples were extracted through phenol chloroform isoamil alcohol. In genetic department of Isfahan medical faculty. The 7th exon of P53 gene was amplified using specific primers in a PCR assay. After that mutation was detected by gel electrophoresis and SSCP analysis. P53 gene expression was detected by immunohistochemical methods. Data was analyzed using chi-square test.*

**Results:** *From the total of 80 specimens, 4 (5%) had mutation in 7th exon. The positive specimens demonstrated over expression for p53 gene. There was a significant ( $p<0/001$ ) relationship between 7th exon mutation and over expression of p53 protein. However, the relationship between stage tumor and mutation in 7th exon of p53 gene was not significant ( $P>0.05$ ). Two samples with mutations as well as one sample without mutation showed metastases in the liver tissue. The prognosis of CRC was 3 years after diagnosis. And follow-up was less in patients with mutation compared to those without mutation.*

**Conclusion:** *The result showed that all mutations in 7th exon of p53 are accompanied by p53 over expression. The mutation in 7th exon of p53 gene is associated with poor prognosis in CRC.*

**Key words:** *Colorectal Cancer, Mutation, 7th oxen of p53, Prognosis.*

## منابع

1. Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen LA, Pylkkanen L, Nystrom-Lahti M, Seruca R, et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res.* 1993; 53(24):5853-5
2. Johnston PG, Allegra CJ. Colorectal cancer biology: clinical implications. *Semin Oncol.* 1995; 22(5):418-32
3. Jin W, Gao MQ, Lin ZW, Yang DX. Multiple biomarkers of colorectal tumor in a differential diagnosis model: quantitative study. *World J Gastroenterol.* 2004; 10(3):439-42
4. 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 U S A.* 2002; 99(14):9433-8
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 colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 1996; 25(4):717-35
7. Bosari S, Viale G, Roncalli M, Graziani D, Borsani G, Lee AK, et al. p53 gene mutations, p53 protein accumulation and compartmentalization in colorectal adenocarcinoma. *Am J Pathol.* 1995; 147(3): 790-8
8. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25(4):177-81
9. 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(1-2):15-30
10. Hamelin R, Laurent-Puig P, Olschwang S, Jago N, Asselain B, Remvikos Y, et al. Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 1994; 106(1):42-8
11. Yamashita K, Yoshida T, Shinoda H, Okayasu I. Novel method for multaneous analysis of p53 and K-ras mutations and p53 protein expression in single histologic sections. *Arch Pathol Lab Med.* 2001; 125(3):347-52
12. 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(4):364-70

13. 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(9):996-1004
14. Pan ZZ, Wan DS, Chen G, Li LR, Lu ZH, Huang BJ. Co-mutation of p53, K-ras genes and accumulation of p53 protein and its correlation to clinicopathological features in rectal cancer. World J Gastroenterol. 2004; 10(24):3688-90
15. Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia N. TP53-CRCCollaborative Study Group. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. J Clin Oncol. 2005; 23(30):7518-28
16. Schmitt CA, Lowe SW, Apoptosis and chemoresistance in transgenic cancer models J Mol Med. 2002; 80(3):137-46
17. Iniesta P, Vega FJ, Caldes T, Massa M, de Juan C, Cerdan FJ, et al. p53 exon 7 mutations as a predictor of poor prognosis in patients with colorectal cancer. Cancer Lett. 1998; 130(1-2):153-60
18. Jansson A, Gentile M, Sun XF. p53 Mutations are present in colorectal cancer with cytoplasmic p53 accumulation. Int J Cancer. 2001; 92(3): 338-41
19. Tullo A, D'Erchia AM, Honda K, Mitry RR, Kelly MD, Habib NA, et al. Characterization of p53 mutations in colorectal liver metastases and correlation with clinical parameters. Clin Cancer Res. 1999; 5(11): 3523-8
20. 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(2): 325-32
21. Schmitz I M, Kayser M, Pauly P, Lagoda Ö, Türeci J, Weber A, et al. 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 (6): 96.
22. 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(4): 586
23. Welsh JA, Castren K, Vahakangas KH. Single-strand conformation polymorphism analysis to detect p53 mutations: characterization and development of controls. Clin Chem. 1997; 43(12): 2251-5
24. Shi SR, Richard J, Cote and Clive R. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. The

Journal of Histochemistry and Cytochemistry 1997; 43(3); 327-343

25. Kerns BJ, Jordan PA, Moore MB, Humphrey PA, Berchuck A, Kohler MF. P53 Overexpression in formalin-fix, Paraffin-embedded Tissue Detected by Immunohistochemistry. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1992; 140 (7): 1047-1051
26. 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(6):863-8
27. Iniesta P, Vega FJ, Caldés T, Massa M, de Juan C, Cerdán FJ, et al. p53 exon 7 mutations as a predictor of poor prognosis in patients with colorectal. Cancer. Cancer Lett. 1998; 130(1-2):153-60
28. Roth JA. p53 prognostication: paradigm or paradox? Clin Cancer Res. Clin Cancer Res. 1999; 5(11): 3523-8
29. Tullo A, D'Erchia AM, Honda K, Mitry RR, Kelly MD, Habib NA, et al. Clin Cancer Res. Characterization of p53 mutations in colorectal liver metastases and correlation with clinical parameters. 1999; 5(11): 3523-8
30. Russo A, Bazan V. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. J Clin Oncol. 2005; 23(30):7518-28
31. Cristi E, Perrone G, Toscano G, Verzi A, Nori S, Santini D, et al. Tumour proliferation, angiogenesis, and ploidy status in human colon cancer. J Clin Pathol. 2005; 58(11): 1170-4
32. Perrone G, Vincenzi B, Santini D, Verzi A, Tonini G, Vetrani A, et al. Correlation of p53 and bcl-2 expression with vascular endothelial growth factor(VEGF), microvessel density (MVD) and clinico-pathological features in colon cancer. Cancer Lett. 2004; 208(2): 227-34