

تعیین میزان جهش اگزون های ۷ و ۸ ژن P53 در نواحی مختلف روده بزرگ و ارتباط آن با شاخص های هیستوپاتولوژی در سرطان کولورکتال

دکتر رحیم گل محمدی^۱، دکتر مهدی نیکبخت^۲، دکتر منصور صالحی^۳

^۱ استادیار، بخش علوم تشریحی، دانشکده علوم پزشکی سبزوار

^۲ استادیار، بخش علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

^۳ استادیار، بخش ژنتیک و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

چکیده

زمینه و هدف

سرطان کولورکتال یکی از سرطانهای کشنده در جهان است. میزان شیوع سرطان کولورکتال بسته به منطقه جغرافیایی متفاوت است. در سرطان کولورکتال عوامل ژنتیکی و عاداتهای غذایی نقش دارند. ژن P53 مهمترین ژن مهارکننده تومور است. میزان جهش اگزون های ۷ و ۸ ژن P53 در نمونه های سرطانی کولورکتال در نواحی مختلف متفاوت گزارش شده است. هدف ما از این مطالعه تعیین میزان جهش اگزون های ۷ و ۸ ژن P53 در نواحی مختلف روده بزرگ و ارتباط آن با شاخصهای هیستوپاتولوژی در سرطان کولورکتال است.

روش بررسی

این مطالعه روی ۸۰ نمونه سرطانی کولورکتال که طی سالهای ۸۲ تا ۸۵ به بیمارستانهای شهر اصفهان مراجعه کرده بودند، انجام شد. DNA نمونه ها بعد از انجام مراحل بافتی و تشخیص پاتولوژی با روش فنل کلروفرم، ایزوآمیل الکل در بخش ژنتیک دانشکده پزشکی اصفهان استخراج شد و اگزون های ۷ و ۸ ژن P53 با PCR تکثیر شد و متعاقب الکتروفورز افقی با روش SSCP جهش اگزون های فوق تعیین شد. داده ها با تست کای دو تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها

از ۸۰ نمونه مطالعه شده، در ۹ نمونه در اگزون های ۷ و ۸ ژن P53 جهش تشخیص داده شد، که ۴ مورد در اگزون ۷ و ۵ مورد در اگزون ۸ بود. بین جهش های ژن P53 با نواحی مختلف روده بزرگ ارتباط معنی داری مشاهده نشد. همچنین بین جهش با درجه تمایز و مرحله بندی تومور ارتباط معنی دار دیده نشد ($P > 0.05$).

نتیجه گیری

مطالعه ما نشان می دهد که میزان جهش در هر یک از اگزون های ۷ و ۸ ژن P53 در سرطان کولورکتال در منطقه مورد مطالعه از الگوی خاصی تبعیت می کند به طوری که با برخی از نواحی جهان تفاوت دارد.

کلید واژه: سرطان کولورکتال، جهش، ژن P53، اگزون

گوارش / دوره ۱۲، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۶، ۲۴۴-۲۴۸

تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۰/۲۳

تاریخ اصلاح نهایی: ۸۶/۱۰/۲۲

تاریخ دریافت: ۸۶/۱/۱۸

زمینه و هدف

سرطان کولورکتال یکی از بیماریهای شایع و کشنده در دنیا، دومین عامل مرگ ناشی از سرطان در آمریکا است (۱ و ۲) و چهارمین سرطان شایع در ایران است (۳). مطالعات ژنتیکی و اپیدمیولوژیک نشان می دهند که در سرطان کولورکتال مجموعه ای از عوامل ژنتیکی، سبک زندگی، محل سکونت و استرس های روحی و عصبی دخالت

نیویسنده مسئول: سبزوار، دانشکده علوم پزشکی، جنب پلیس راه

کدپستی: ۹۶۱۳۸۷۳۱۳۶، صندوق پستی: ۳۱۹

تلفن: ۰۵۷۱-۴۴۴۶۰۳۰۰، نمابر: ۰۵۷۱-۴۴۴۶۰۰۸

E-mail: rahimgolmohammadi@yahoo.com

دارند (۳، ۴، ۵، ۶، ۷)، اکثر تومورهای کولورکتال را آدنوکارسینوما تشکیل می دهند که به اشکال مختلفی دیده می شوند (۸)، کروموزوم ۱۷ اکثراً در سرطان کولورکتال درگیر می شود که روی بازوی کوتاه این کروموزوم ژن P53 قرار دارد (۹ و ۱۰)، این ژن از ۱۱ اگزون تشکیل شده است (۱۱)، محصول این ژن از طریق فعال کردن چندین ژن دیگر موجب تنظیم چرخه سلولی می شود. در شکل طبیعی ژن P53، اگر DNA آسیب ببیند از طریق بیان ژن P21 موجب توقف چرخه سلولی در مرحله G1 می شود تا اینکه سلول خود را ترمیم کند یا روند آپوپتوز را در سلول صدمه دیده تسهیل کند (۱۲ و ۱۳)، سلولهای بنیادی کریپت های کولون پس از تکثیر و تمایز دچار مرگ فیزیولوژی می شوند و ریزش می کنند.

* PCR-SSCP

الف- PCR

از ۱/۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده با ۲/۵ میکرولیتر از ۱۰× buffer با غلظتهای متفاوت ۲ تا ۳ میکرولیتری، برای همه میکروتیوب استفاده شد، از $MgCl_2$ با غلظت ۲۵ میلی مولار با ۱/۵ میکرولیتر dNTP با غلظت ۵ میلی مولار و ۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse با غلظتهای ۵ میلی مولار با توالی زیر استفاده شد (پرایمرها از شرکت HPSF Biotech آلمان به سفارش شرکت فرآیند دانش تهیه گردید) (۲۲ و ۲۵):

F-5'-TCTTGGGCCTGTGTTATCTC- 3'
R-5'-GGTGGATGGGTAGTAGTATG- 3'
F-5'-CCTATCCTGAGTAGTGGTAA- 3'
R-5'-GTCCTGCTTGCTTACCTCGC- 3'

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 Mycycler^{USA} اکسون ۵ تا ۸ ژن P53 متعاقب بهینه سازی (optimization) کردن شرایط مطلوب بر ای PCR از نظر گرادیانت درجه حرارتی، غلظت DNA، پرایمر، کلرید منیزیم، تکثیر شد. بهترین شرایط به شرح ذیل به دست آمد: چرخه اول با دمای $95^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه و 40 ثانیه، چرخه بعدی با درجه حرارت $94^{\circ}C$ به مدت ۵۰ ثانیه و درجه اتصالی پرایمرها به DNA با درجه حرارت $53-56^{\circ}C$ به مدت یک دقیقه و گسترش (extension) در درجه حرارت $72^{\circ}C$ به مدت یک دقیقه و یک سیکل نهایی با درجه حرارت $72^{\circ}C$ 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 Loading dye مخلوط شد و سپس در چاهکهای ژل ۲ درصد آگارز قرار داده شد. از Ethidium bromide برای رنگ آمیزی DNA استفاده گردید. الکتروفورز به مدت ۹۰ دقیقه و با ولتاژ ۸۰ برای قطعات تکثیر شده استفاده شد. پس از قرار دادن ژل در آب مقطر عمل عکسبرداری انجام شد. از نمونه کنترل منفی برای تعیین آلودگی نیز استفاده شد، این نمونه که حاوی تمام مواد لازم برای تکثیر ژن به جزء DNA است؛ محصول PCR ۱۸۶ جفت باز است.

ب- روش SSCP**

در این روش DNA با حرارت یا مواد شیمیایی به صورت تک رشته ای در می آید و از آنجا که DNA در جهش ها تغییر شکل فضایی می دهد، این تغییر در ژل آکریل آمید با جابه جایی باند (migrating bands)

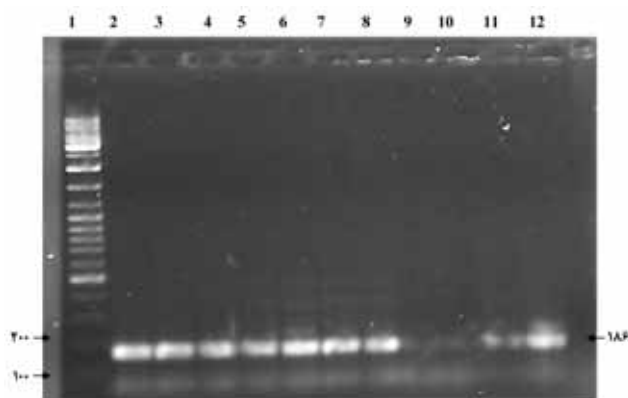
* Polymerase Chain Reaction-Single strand conformation polymorphism

** Single strand conformation polymorphism

این چرخه مرتباً تکرار می شود؛ ولی، با افزایش سن، ترمیم، کاهش و بدخیمی افزایش می یابد. (۱۴)، در شکل جهش یافته ژن P53 در سلولهای سرطانی، آپوپتوز مختل و قدرت رگزایی و تهاجمی زیاد می شود و همچنین مقاومت به شیمی درمانی به وجود می آید که پیش آگهی بیماری خوب نیست و روشهای جدید تشخیصی و درمانی را بر پایه مولکولی می طلبد. (۱۵، ۱۶ و ۱۷)، میزان جهش ژن P53 در سرطان کولورکتال در نواحی مختلف جهان متفاوت گزارش شده است؛ حداقل میزان جهش ژن P53 از تایوان (۱۸) و حداکثر آن از بریتانیا گزارش شده است. (۱۹ و ۲۰)، بیش از ۹۰٪ از جهش ها در اگزونهای ۵ تا ۸ ژن P53 اتفاق می افتند. (۲۱)، از طرفی، میزان جهش در هر یک از اگزون های فوق در سرطان کولورکتال در مناطق مختلف جهان متفاوت گزارش شده است. (۱۵، ۱۷، ۲۲، ۲۳ و ۲۴)، به نظر می رسد میزان جهش در هر یک از اگزونهای ۷ و ۸ ژن P53 در سرطان کولورکتال از الگوی مشخصی پیروی نمی کنند، به طوری که ممکن است از یک منطقه به منطقه دیگر متفاوت باشد. هدف ما از این مطالعه، تعیین میزان جهش اگزون های ۷ و ۸ ژن P53 در نواحی مختلف روده بزرگ و ارتباط آن با شاخص های هیستوپاتولوژی در سرطان کولورکتال در ناحیه اصفهان است.

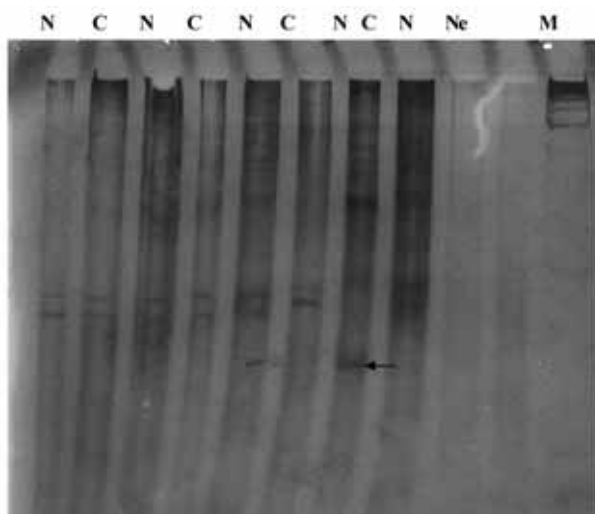
روش بررسی

این مطالعه از نوع توصیفی و تحلیلی و به صورت مقطعی است که روی ۸۰ نمونه سرطانی کولورکتال، که طی سالهای ۸۲ تا ۸۵ به بیمارستانهای شهر اصفهان برای جراحی مراجعه کرده بودند، انجام گرفت. برای بررسی هیستوپاتولوژی، نمونه ها در فرمالین ۱۰ درصد، ثابت شدند و پس از انجام مراحل پاساژ بافتی، با هماتوکسیلین وائوزین رنگ آمیزی شدند؛ در صورتی که نمونه از دید پاتولوژی سالم و یا از نوع پولیپ بود، از جامعه مطالعه حذف می شدند و نمونه جایگزین گرفته می شد. DNA نمونه ها به ترتیب زیر استخراج گردید: حدود ۲۵ میلی گرم از ناحیه مبتلا به سرطان به طور دقیق با ترازوی الکتریکی وزن شد و در داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری استریل قرار داده شد و همین مقدار نیز از ناحیه سالم بافت مجاور به طور جداگانه برداشت شد و در داخل میکروتیوب استریل دیگری قرار داده شد. با استفاده از بافرهای تجزیه TEN، آنزیم پروتئیناز $10^6 K$ میلی مولار، تریس اسیدکلریدریک، EDTA نیم مولار، NaCl، SDS دودرصد (Merk) و درجه حرارت $55^{\circ}C$ به مدت ۳ ساعت بافت هضم شد. DNA با روش فنل، فنل کلروفرم، ایزوآمیل الکل (۲۵، ۲۴ و ۱) و کلروفرم استخراج شد، سپس با اتانول DNA رسوب داده شد و در آب مقطر دوبار تقطیر شده نگهداری شد. در این مطالعه از دستگاه سانتریفوژ یخچال دار اپندورف آلمان با قدرت ۱۲۰۰۰g برای جدا کردن پروتئین ها و رسوب دادن DNA استفاده شد. غلظت DNA با اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد و DNA در فریزر $-20^{\circ}C$ تا زمان استفاده نگهداری شد. (۲۳ و ۲۵)



شماره ۱: استاندارد وزن مولکولی
شماره ۲: نمونه سالم
شماره ۳ الی ۱۱: نمونه های مربوط به سرطان کولورکتال
شماره ۱۲: کنترل منفی
محصول PCR ۱۸۶ جفت باز است که توسط پیکان مشخص شده است.

شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر اگزون ۸ ژن P53 در ژل آگارز ۲٪ در نمونه های مبتلا به سرطان کولورکتال



پیکان باند جابه جاشده را نشان می دهد.

M: marker C: cancer N: normal Ne: negative

شکل ۲: ژل SDS-PAGE آکريل آميد ۱۰ درصد اگزون ۸ ژن P53 در نمونه های مبتلا به سرطان کولورکتال با روش SSCP

سرطانی کولورکتال در منطقه اصفهان با روش PCR-SSCP، که روشی سریع برای تعیین جهش است، انجام شد. (۳۱ و ۳۲)، طبق مطالعات انجام شده برای تعیین حضور جهش این روش، نسبت به روش تعیین توالی حساستر می باشد. (۲۶، ۲۷ و ۳۱)، از ۸۰ نمونه مطالعه شده در ۹ نمونه جهش مشاهده شد که ۴ مورد آن در اگزون ۷ و ۵ مورد در اگزون ۸ بود. مطالعه ای که لیهی * و همکارانش در ۶۶ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال در ایرلند انجام دادند، از نظر حضور جهش ژن P53 شبیه

(Abnormality) همراه می شود که می توان آن را با نمونه سالم از همان بافت مشخص کرد. در این مطالعه ما از ژل آکريل آميد ۱۰٪ حاوی ۰/۵ بیس آکريل آميد ۱۰× buffer TBE و آمونیوم پرسولفات (Merk)، که موجب رادیکالهای آزاد در ژل می شود همراه Temed که نقش یک کاتالیزور را در پلیمریزاسیون آکريل آميد و بیس آکريل آميد دارد، استفاده کردیم. ژل را به مدت ۱/۵ ساعت برای پلیمریزه شدن در فضای اتاق قرار دادیم. ۸ میکرولیتر از محصول PCR را با ۴ میکرولیتر از Loading dye مخلوط کردیم و با استفاده از درجه حرارت ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، DNA به صورت تک رشته ای درآمد. سپس آن را روی ظرف یخ منتقل کردیم و پس از سه دقیقه در چاهکهای ژل قرار دادیم. تانک را به دستگاه الکتروفورز وصل کردیم و در طول یک شب در اتاقک سرد با درجه ۴°C با ولتاژ ۶۶ میلی آمپر، الکتروفورز در ژل آکريل آميد انجام شد. روز بعد ژل را از تانک خارج کردیم و با اسید استیک ۱۰٪ به مدت ۲۰ دقیقه مجاورت دادیم و پس از شست و شو با آب مقطر با نیترات نقره ۰/۱٪ (Merk) در تاریکی ژل رنگ آمیزی کردیم. در پایان با محلول ظهور ۳٪ (بی کریبات سدیم، تیوسولفات سدیم و فرمالدئید ۳۷٪ [Merk]) باندها ظاهر شدند و متعاقب آن ژل در اسید استیک ۱۰٪ ثابت شد و از آن عکس تهیه کردیم. (۲۶، ۲۷ و ۲۸)

یافته ها

از ۸۰ نمونه مطالعه شده ۵۶ نفر مرد و ۲۴ نفر زن بودند که در ۹ نمونه جهش مشاهده شد. ۴ مورد از جهش ها در اگزون ۷ و ۵ مورد در اگزون ۸ ژن P53 بودند (شکل ۱ و ۲). ۳ مورد از جهش های اگزون ۷ در جنس مذکر و یک مورد در جنس مؤنث بود؛ ولی جهش های اگزون ۸ ژن P53 فقط در جنس مذکر مشاهده شد. ۴ مورد از نمونه های همراه جهش مبتلا به آدنو کارسینومای کولورکتال در بخش پروگزیمال روده بزرگ (سکوم، کولون صعودی و عرضی) واقع بودند. ۵ مورد از جهش ها در بخش دیستال (کولون نزولی، سیگموئید و رکتوم) قرار داشتند. بین نواحی مختلف آناتومیکی روده بزرگ در سرطان کولورکتال با حضور جهش در اگزون های ۷ و ۸ ژن P53 ارتباط معنی داری وجود نداشت (جدول ۱). بین حضور جهش در ژن P53 با سن و جنس، شاخص پاتولوژی همچون درجه تمایز و مرحله بندی تومور ارتباط معنی داری مشاهده نشد ($p > 0.05$).

بحث

سرطان کولورکتال یکی از مهمترین سرطانهای شایع جهان است (۲) و (۲۸) و شیوع آن در کشور ما نیز روبه افزایش است. (۳)، افزایش سرطان کولورکتال در جوامع می تواند ناشی از تأثیر متقابل عوامل ژنتیکی، عاداتهای غذایی و محیطی باشد. (۵، ۲۹ و ۳۰)، این مطالعه روی ۸۰ نمونه

جدول ۱: توزیع فراوانی حضور جهش اگزون‌های ۵ تا ۸ ژن P53 در نواحی مختلف روده بزرگ. بین جهش اگزون‌های ۵ تا ۸ ژن P53 در نواحی مختلف روده بزرگ تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0.05$).

نواحی اگزون	سکوم وکولون صعودی	کولون عرضی	کولون نزولی	کولون سیگموئید	رکتوم
۵	۳ (٪۳۰)	۱ (٪۱۰)	-	۵ (٪۵۰)	۱ (٪۱۰)
۶	۵ (٪۴۱/۷)	-	۱ (٪۸/۳)	۴ (٪۳۳/۳)	۲ (٪۱۶/۷)
۷	۲ (٪۵۰)	۱ (٪۲۵)	۱ (٪۲۵)	-	-
۸	-	۱ (٪۲۰)	-	۴ (٪۸۰)	-
۶ و ۵	۱ (٪۵۰)	-	-	۱ (٪۵۰)	-
بدون درگیری اگزون	۸ (٪۱۷)	۳ (٪۶/۴)	۵ (٪۱۰/۶)	۲۲ (٪۴۶/۸)	۹ (٪۱۹/۱)
جمع کل	۱۹ (٪۲۳/۸)	۶ (٪۷/۵)	۷ (٪۸/۸)	۳۶ (٪۴۵)	۱۲ (٪۱۵)

مطالعه ما می‌باشد (۲۳)، اما میزان جهش در هر یک از اگزون‌های ۷ و ۸ ژن P53 در مطالعه آنها به این ترتیب بود: ۹ مورد در اگزون ۷ و ۵ مورد در اگزون ۸. میزان پراکندگی حضور جهش در هر یک از اگزون‌های فوق با مطالعه ما تفاوت دارد. (۲۳)، در مطالعه‌ای که یاماشیتا و همکارانش در ۲۰۰۲ نمونه مبتلا به سرطان کولورکتال در ژاپن انجام دادند، ۳ مورد جهش در اگزون ۷ و یک مورد در اگزون ۸ گزارش شده است. (۲۲)، همچنین طبق گزارش پان * * و همکارانش در سال ۲۰۰۴ میلادی از ۹۷ بیمار مبتلا به سرطان رکتوم در کشور چین در ۴۸ بیمار جهش ژن P53 وجود داشت که بیشتر جهش‌ها در اگزون ۷ بود و در اگزون ۸ هیچ نوع جهشی مشاهده نشد. (۲۴)، براساس گزارش جانسون * * * و همکارانش از سوئد در سال ۲۰۰۱ میلادی از ۷۵ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال، در ۴۱ بیمار جهش ژن P53 وجود داشت که ۳۴٪ در اگزون ۷ و ۲۴٪ در اگزون ۸ بود. مطالعه فوق از نظر میزان جهش در هر یک از اگزون‌های ۷ و ۸ با مطالعه ما تفاوت دارد. (۲۵)

در ۴۲ نمونه مبتلا به سرطان کولورکتال از کشور شیلی، در ۳۱ مورد جهش گزارش شده است که ۷ مورد آن در اگزون ۷ و ۳ مورد در اگزون ۸

ژن P53 بود که از نظر فراوانی جهش در اگزون‌های ۷ و ۸ با مطالعه ما تفاوت دارد. (۳۳)، حداقل میزان جهش گزارش شده در سال ۲۰۰۱ میلادی در سرطانهای کولورکتال مربوط به کشور تایوان است که از ۵۷ نمونه مطالعه شده در سرطان کولورکتال در ۱۸ مورد (٪۳۱) جهش وجود داشته است. (۱۸)، حداکثر میزان جهش گزارش شده در سرطان کولورکتال در ژن P53 مربوط به بریتانیا است که از ۱۹ مورد مبتلا به سرطان کولورکتال در ۱۶ نمونه (٪۸۴) جهش مشاهده شده است. (۲۰)، بنابراین میزان جهش ژن P53 در سرطان کولورکتال در ناحیه اصفهان تقریباً شبیه ناحیه کم جهش است. اما میزان فراوانی جهش در هر یک از اکسون‌های ۷ و ۸ ژن P53 با بعضی از نواحی دیگر فرق دارد.

نتیجه‌گیری

نتیجه می‌گیریم که نه تنها میزان جهش ژن P53 در نواحی مختلف جغرافیایی متفاوت است، بلکه الگوی فراوانی جهش در اگزون‌های ۷ و ۸ ژن P53 در نواحی مختلف جغرافیایی از یک حالت یکنواخت پیروی نمی‌کنند. می‌توان تصور کرد که بسته به عامل استرس زا روی ژن P53، اگزون خاصی در یک ناحیه بیشتر دچار جهش می‌شود که پراکندگی آن از یک کشور به کشور دیگر در سرطان کولورکتال متفاوت است. پیشنهاد می‌کنیم برای مشخص کردن نوع جهش ژن P53 در سرطان کولورکتال از روش تعیین توالی نیز استفاده شود.

سپاسگزاری

از پاتولوژیست محترم آقای دکتر محمدرضا مهاجری و آقای کرمی کارشناس اتاق عمل بیمارستان الزهرا (س) که همکاری خوبی را در انجام این طرح داشتند، سپاسگزاری می‌کنیم.

* Leahy

** Pan

*** Jansson

References

1. Johnston PG, Allegra CJ. Colorectal cancer biology: clinical implications. *Semin Oncol* 1995; 22: 418-32.
2. Shokar NK, Vernon SW, Weller SC. Cancer and colorectal cancer: knowledge, beliefs, and screening preferences of a diverse patient population. *Fam Med* 2005; 37: 341-7.
۳. انصاری رضا، امجدی هیوا، نوروزیگی نسیم، زمانی فرشته، میرناصری سیدمحمد مهدی، خالق نژاد احمد و همکاران. بررسی گذشته‌نگر میزان بقا و تعدادی از عوامل مؤثر بر آن در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال جراحی‌شده در دو بیمارستان شریعتی و مهر تهران. گوارش، ۱۳۸۶؛ سال دوازدهم: ۷-۱۵.
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* 2000; 91: 863-8.
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: 717-35.
7. Soussi T. The p53 tumour suppressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer. *Mol Med Today* 1996; 2: 32-7.
8. Manne U, Myers RB, Moron C, Poczatek RB, Dillard S, Weiss H, et al. Prognostic significance of Bcl-2 expression and p53 nuclear accumulation in colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1997; 74: 346-58.
9. Goi T, Takeuchi K, Katayama K, Hirose K, Yamaguchi A. Mutations of rabphilin-3A-like gene in colorectal cancers. *Oncol Rep* 2002; 9: 1189-92.
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: 7717-22.
11. 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: 674-8.
12. Matsushita K, Kobayashi S, Kato M, Itoh Y, Okuyama K, Sakiyama S, et al. Reduced messenger RNA expression level of p21 CIP1 in human colorectal carcinoma tissues and its association with p53 gene mutation. *Int J Cancer* 1996; 69: 259-64.
13. Wang C, Ivanov A, Chen L, Fredericks WJ, Seto E, Rauscher FJ 3rd, et al. MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation. *EMBO J* 2005; 24: 3279-90.
14. Renehan AG, O'Dwyer ST, Haboubi NJ, Potten CS. Early cellular events in colorectal carcinogenesis. *Colorectal Dis* 2002; 4: 76-89.
15. 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: 1170-4.
16. 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: 227-34.
17. Ruley HE. p53 and response to chemotherapy and radiotherapy. *Important Adv Oncol* 1996: 37-56.
18. 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: 863-8.
19. Webley KM, Shorthouse AJ, Royds JA. Effect of mutation and conformation on the function of p53 in colorectal cancer. *J Pathol* 2000; 191: 361-7.
20. 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: 7518-28.
21. Hamelin R, Laurent-Puig P, Olschwang S, Jeco N, Asselain B, Remvikos Y, et al. Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1994; 106: 42-8.
22. Yamashita K, Yoshida T, Shinoda H, Okayasu I. Novel method for multianalytic analysis of p53 and K-ras mutations and p53 protein expression in single histologic sections. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125: 347-52.
23. 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: 364-70.
24. 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: 3688-90.
25. Jansson A, Gentile M, Sun XF. p53 Mutations are present in colorectal cancer with cytoplasmic p53 accumulation. *Int J Cancer* 2001; 92: 338-41.
26. 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: 325-32.
27. Schmitz I, 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. *Eur J Cancer* 1995; 31 (Suppl 6): S96.
28. Gomez D, Dalal Z, Raw E, Roberts C, Lyndon PJ. Anatomical distribution of colorectal cancer over a 10 year period in a district general hospital: is there a true "rightward shift"? *Postgrad Med J* 2004; 80: 667-9.
29. Akrami SM. Genetics of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Arch Iran Med* 2006; 9: 381-9.
30. Rodier F, Campisi J, Bhaumik D. Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 7475-84.
31. 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.
32. Welsh JA, Castren K, Vahakangas KH. Single-strand conformation polymorphism analysis to detect p53 mutations: characterization and development of controls. *Clin Chem* 1997; 43: 2251-5.
33. 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.

Mutations in Exons 7 and 8 of P53 Gene in Colorectal Cancer and Their Association with Histopathologic Parameters and Anatomic Locations of the Tumor

ABSTRACT

Background: Colorectal cancer (CRC) is a common and lethal malignancy worldwide. The incident rate of CRC is different in various geographical regions. CRC is a multifactorial disease; the factors involved included dietary and genetic factors. P53 gene is the most important tumor suppressor gene which involved in many cancers. The mutation rate in exons 7 and 8 of P53 gene in CRC was reported to be different in the world. The objective of this study was to detect the mutations in the exons 7 and 8 of P53 gene and to determine their correlation with histopathologic parameters in CRC.

Materials and Methods: This study was performed on 80 specimens taken from patients with CRC referred to Isfahan hospitals between 2003 and 2006. DNA was extracted by phenol chloroform isoamyl alcohol after tissue processing and making the pathologic diagnosis in the Genetic Department of Isfahan Medical School. Exons 7 and 8 of P53 gene were amplified using specific primers in a PCR assay. After gel electrophoresis, the mutations were detected by SSCP method.

Results: From 80 specimens, 9 (11%) were found to have mutations; 4 (5%) had mutations in exon 7 and 5 (6%) in exon 8. The presence of mutations did not have any significant association with stage and level of cell differentiation of tumors and with anatomical region ($p > 0.05$).

Conclusion: Although we could not observe any association between the presence of P53 gene mutations and some histopathologic and anatomic presentations of CRC, the pattern of mutations observed in exons 7 and 8 of P53 gene in CRC was different from that reported from many areas of the world. *Govaresh/* Vol. 12, No. 4, Winter 2008; 244-248

Keywords: Colorectal Cancer, Mutation, P53 gene, Exon

Golmohammadi R

Department of Basic Medical Sciences, Sabzevar University of Medical Science

Nikbakhat M

Department of Anatomical Medicine, Isfahan University of Medical Sciences

Salehi M

Department of Genetic Medicine, Isfahan University of Medical Sciences

Corresponding Author:

Rahim Golmohammadi,
Department of Basic Medical Sciences, Sabzevar University of Medical Science.

Tel: +98 571 2649106

Fax: +98 571 4446008

E-mail:

rahimgolmohammadi@yahoo.com