بررسی پایداری پروتئین p53 با شاخص‌های پاتولوژی در سرطان کولورکتال با روش ایمونوهیستوشیمی

دکتر رحیم گل‌محمدی[1]، دکتر محمد رضا مهاجری[2]، دکتر مهدی زرگریان[3]

[1] استادیار علوم تشریحی، دانشکده علوم پزشکی سبزوار

[2] پاتولوژیست، بیمارستان شهید صدوقی اصفهان

[3] عضو هیئت علمی رشته علوم آزمایشگاهی دانشکده علوم پزشکی سبزوار

نشانی نویسنده مسؤول: سبزوار، جنب پلیس راه، دانشکده علوم پزشکی سبزوار، دکتر رحیم گل محمدی

E-mail: Rahimgolmohammadi@Yahoo.com

وصول:۸۶/۳/۳، اصلاح: ۸۶/۴/۳۰، پذیرش:۸۶/۶/۱۰

چکیده

زمینه هدف: در سرطان کولورکتال آسیب‌های ژنتیکی و عادت‌های غذایی نقش اصلی را دارند. پروتئین p53 که محصول ژنp53 می‌باشد، مهم‌ترین عامل سرکوب‌کننده تومور است. میزان جهش و بیان ژن p53 در نمونه‌های سرطانی کولورکتال در نواحی مختلف متفاوت گزارش شده است. در حالت طبیعی، نیمه عمر پروتئین p53 کوتاه بوده و در شکل جهش‌یافته، نیمه عمر پروتئین افزایش می‌یابد که با روش ایمو نوهیستوشیمی قابل ردیابی است. هدف از این مطالعه تعیین پایداری پروتئین p53 با استفاده از شاخص‌های پاتولوژی در نواحی مختلف روده بزرگ در سرطان کولورکتال می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه توصیفی تحلیلی بر روی ۸۰ نمونه سرطانی کولورکتال انجام شد که در طول سال‌های ۸۲ تا ۸۶ به بیمارستان-های شهر اصفهان مراجعه کرده بودند. بعد از ثابت‌کردن نمونه‌ها در فرمالین، پاساژ بافتی و ماسک‌زدایی بیان ژن p53 با روش ایمونوهیستوشیمی در نمونه‌های فوق مشخص شد. داده‌ها با آزمون مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: از ۸۰ نمونه مورد مطالعه، در ۲۷ نمونه (۳٤ درصد) پایداری پروتئین p53 مشاهده شد. بین پایداری پروتئین p53 با مرحله‌بندی تومور، درجه تمایز و نواحی مختلف روده بزرگ و رکتوم ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد ولی ارتباط بین جهش و پایداری پروتئین معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر پایداری پروتئین p53 در تعداد زیادی از نمونه‌های جهش‌دار مشاهده شد. بنابراین مشخص شدن پروتئین p53 را در نمونه‌های سرطانی می‌توان نشانه‌ی مهمی از جهش قلمداد نمود که در پیش آگهی و روند درمانی سرطان مهم است. ***(مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره۱۴/شماره ۳ / صص ۱۴۶-۱۴۱).***

واژه‌های‌کلیدی: *سرطان کولورکتال؛ ایمونوهیستوشیمی؛ پروتئین p53 .*

مقدمه

سرطان روده بزرگ یکی از مهم‌ترین تومورهای بدخیم در دنیا است و دومین عامل مرگ ناشی از سرطان در غرب می‌باشد (۱,۲). اکثر تومورهای کولورکتال را آدنوکارسینوما تشکیل می‌دهند که به اشکال مختلفی از جمله موسینی و غیر موسینی دیده می‌شوند (۳). در

سرطان کولورکتال عوامل متعددی نقش دارند ولی عادات غذایی و آسیب‌های ژنتیکی، جزء مهم‌ترین فاکتورهای خطر در سرطان کولورکتال محسوب می‌شوند (۷-٤). رژیم غذایی پرچرب از طریق تولید هیدروکربن‌های هتروسیکلیک آروماتیک (۸,۹) و مصرف گوشت قرمز زیاد به واسطه تولید N-nitroso-compound نقش سرطان‌زایی را در روده بزرگ دارد. الکل از طریق کاهش فولات موجب خطر آدنومای کولون می‌شود و بالعکس، سبزیجات و میوجات حاوی مواد آنتی‌اکسیدان به خاطر مهار رادیکال‌های آزاد از آسیب به DNA پیشگیری می‌کنند (۱۳-۱۰).

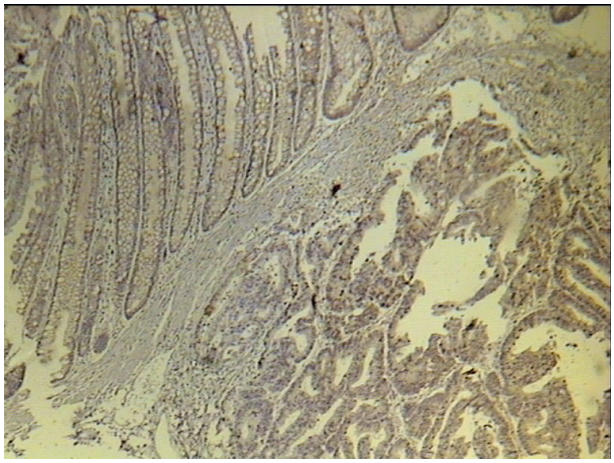
در سرطان کولورکتال ژن‌های مختلفی درگیر می‌شوند که مهم‌ترین آن‌ها ژن p53 می‌باشد (١٤). محصول این ژن یک فسفوپروتئین هسته‌ای است که از ۳۹۳ اسید آمینه تشکیل شده است. بخش مرکزی این پروتئین (Core domain) مهم‌ترین قسمت آن است که نقش سرکوب‌کنندگی تومور را به عهده دارد (١٥,١٦). نیمه عمر پروتئین p53 در حالت طبیعی در حدود چند دقیقه می‌باشد و سپس توسط پروتئازها تجزیه و ناپایدار می‌گردد (۱۷,۱۸). در حالی‌که در فرم موتانت شده طول عمر پروتئین p53 افزایش می‌یابد (۱۹) افزایش نیمه عمر پروتئین p53 ناشی از تغییرات پس از ترجمه‌ای است که در ساختمان این پروتئین به‌وجود آید که از بی‌اثر شدن آن جلوگیری می‌کند (۲۲-۲۰).

تغییر در فرم طبیعی موجب فسفوریلاسیون در ریشه‌های N ترمینال چند اسید آمینه و پایداری p53 را سبب می‌شود که با روش ایمونوهیستوشیمی می‌توان آن را در بافت‌های سرطانی ردیابی کرد (٢٤و٢٣). در حالت طبیعی اگر DNA آسیب ببیند، پروتئین p53 از طریق بیان ژنp21 موجب توقف چرخه سلولی در مرحله G1 به S می‌شود تا این‌که سلول خود را ترمیم کند یا روند آپوپتوز را در سلول صدمه دیده تسهیل کند (٢٥,٢٦). در شکل جهش‌یافته، ژن p53 در سلول‌های سرطانی آپوپتوز مختل، قدرت رگزای و تهاجمی زیاد می‌شود (۲۹-۲۷). زمانی‌که در ژن p53 جهش به‌وجود آید، مقاومت‌های درمانی ایجاد می‌شود که روش‌های نوین درمانی را بر پایه مولکولی می‌طلبد (۳۰,۳۱). پایداری پروتئین p53 را می‌توان به‌عنوان نشانه‌ای از موتاسیون ژن p53 قلمداد نمود (۳۲). از طرفی مشخص نیست که بین پایداری پروتئین p53 در نواحی مختلف روده بزرگ تفاوتی وجود دارد یا خیر. هدف از این مطالعه تعیین پایداری پروتئین p53 در نواحی مختلف روده بزرگ و ارتباط آن با شاخص‌های پاتولوژیک در سرطان کولورکتال با روش ایمونوهیستوشیمی می‌باشد.

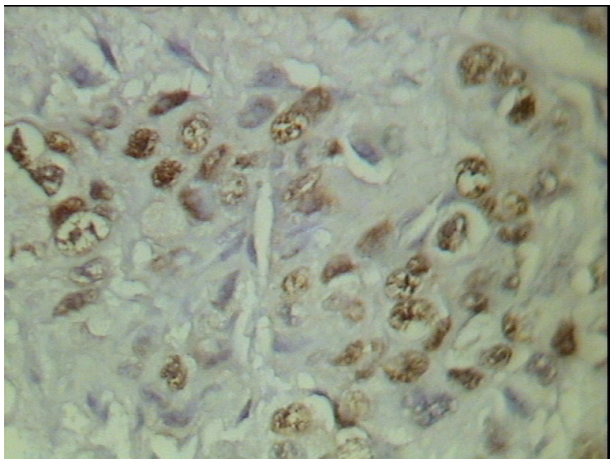
مواد و روش‌ها

این مطالعه توصیفی تحلیلی به‌صورت مقطعی با روش ایمونوهیستوشیمی بر روی ۸۰ نمونه سرطانی کولورکتال انجام شد که در طول سال‌های ۸۲ تا ٨٦ به بیمارستان‌های شهر اصفهان مراجعه کرده بودند. ایمونوهیستوشیمی یک روش میکروسکوپی است که با کمک آن می‌توان محل آنتی‌ژن را در نمونه‌های بافتی یا سلولی ردیابی کرد؛ این تکنیک بر پایه شناسایی کمپلکس آنتی‌ژن و آنتی‌بادی صورت می‌گیرد. نمونه کنترل از ناحیه سالم مجاور تومور برداشته شد. برای جلوگیری از اتولیز و هترولیز، نمونه‌ها بلافاصله در فرمالین ۱۰ درصد ثابت شدند و بعد از ۳ ساعت فرمالین تعویض شد. پس از ٢٤ ساعت پاساژ بافتی به‌وسیله دستگاه Tissue processing انجام شد. مقاطع ٤ میکرونی 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 به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه ماکروویو در درجه حرارت ۹۵ سانتی‌گراد گذاشته شدند. این مرحله برای واکنش بهتر مراحل بعدی لازم است چون در طی روند فیکساسیون بافتی ممکن است محل شاخص‌های آنتی ژنی که باید با آنتی‌بادی واکنش بدهد،

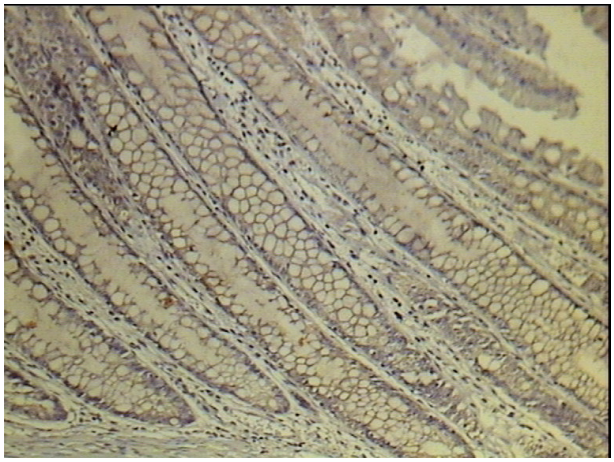
دچار Mask شده باشند (۳۳,۳٤). مهار پراکسید از بافتی با



شکلA- ۱ : پایداری پروتئین p53 در سلول‌های سرطانی بافت روده بزرگ مقطع عرضی بافت کولون ناحیه راست تحتانی (lower right) غدد نئوپلاستیک و بخش چپ فوقانی (upper left) غدد سالم رنگ‌آمیزی با روش ایمونوهیستوشیمی (بزرگ‌نمایی ۱۰۰)



شکلB –۱ : پایداری پروتئین p53 در سلول‌های سرطانی بافت روده بزرگ با روش ایمونوهیستوشیمی (بزرگ‌نمایی ٤۰۰)



شکل ۲: عدم پایداری پروتئین p53 در سلول‌های سالم بافت روده بزرگ با روش ایمونوهیستوشیمی (بزرگ‌نمایی ۱۰۰)

آب اکسیژنه انجام گرفت. از آنتی‌بادی مونوکلونال مخصوص p53 (DAKO سفارش طب آسیا) که با پروتئین p53 باند می‌شود در اتاقک مرطوب با غلظت ۳۲ صدم گرم در لیتر استفاده شد و پس از شستشو با بافر فسفات سالین آنتی‌بادی ثانویه Biotinylated روی لام‌ها چکانده شد. از استرپتو آویدین متصل به HRP که قادر است دی آمینو بنزیدین(DAB) را اکسید کند، استفاده شد. سلول‌هایی که با پایداری پروتئین p53 همراه هستند، رسوب غیرمحلول قهوه‌ای رنگ ایجاد می‌کنند. پس از رنگ‌آمیزی زمینه بافت با هماتوکسیلین لام‌ها با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند (شکل ۳,٤). از نرم‌افزار SPSS و آزمون مجذور کای جهت تجزیه وتحلیل داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

در این پژوهش از ۸۰ نمونه‌ی سرطانی کولورکتال ٥٦ نمونه مرد و ٢٤ نمونه زن بودند. در ۲۷ نمونه (۳٤ درصد) پایداری پروتئین p53 مشاهده شد که ۱٦ نمونه آن در جنس مذکر و ۱۱ مورد آن مربوط به جنس مؤنث بود و در ٥۳ نمونه (٦۷ درصد) پایداری پروتئین p53 منفی بود. از ۲۷ نمونه که با پایداری پروتئین p53 همراه بودند، ٢٤ نمونه در نواحی مختلف روده بزرگ بعنی سکوم،

جدول۱: توزیع فراوانی پایداری پروتئین p53 (مثبت) و عدم پایداری پروتئین (منفی) در نواحی مختلف روده بزرگ

نواحی روده بزرگ	ایمونوهیستوشیمی	
	مثبت (درصد) تعداد	منفی (درصد) تعداد
سکوم و کولون صعودی	۱۰(٥۲/٦)	۹(٤۷/٤)
کولون عرضی	۳(٥۰)	۳(٥۰)
کولون نزولی	۱(۱٤/۳)	٦(۸٥/۷)
کولون سیگموئید	۱۰(۲۷/۸)	۲٦(۷۲/۲)
رکتوم	۳(۳۰)	۹(۷۰)
جمع کل	۲۷(۳٤)	٥۳(٦٦)

کولون صعودی، عرضی، نزولی و سیگموئید قرار داشتند و ۳ مورد در رکتوم قرار داشتند. بین پایداری پروتئین_p53 در سرطان کولورکتال با نواحی مختلف روده بزرگ و رکتوم از نظر آماری ارتباط معنی‌داری وجود نداشت (جدول۱). بین پایداری پروتئین p53 با سن و جنس، شاخص‌های پاتولوژی همچون درجه تمایز و مرحله‌بندی تومور ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد ولی بین پایداری پروتئین p53 و جهش ارتباط معنی‌دار بود (جدول۲).

جدول ۲: نتایج حاصل از پایداری پروتئین p53 در سرطان کولورکتال با سن، جنس وشاخص‌های پاتولوژی

متغیر		تعداد کل	پایداری پروتئین P53	فراوانی عدم پایداری پروتئین P53	P
جنس	مرد	۵۶	۱۶	٤۰	p=۰/۰۶
	زن	۲٤	۱۱	۱۳	
سن	۶۰<	۳۵	۱۲	۲۳	p =۰/۱۱
	≥۶۰	٤۵	۱۵	۳۰	
درجه تمایز	خوب	۶۵	۱۹	٤۶	p =۰/۱۳
	متوسط	۹	٤	۵	
	ضعیف	۶	٤	۲	
Dukes Stage	A	٤۰	۱٤	۲۶	p =۰/۷٤
	B	۲۹	۸	۲۱	
	C	۷	۳	٤	
	D	٤	۲	۲	
جهش	با جهش	۳۳	۲۷	۶	p =۰/۰۰۱
	بدون جهش	٤۷	۰	٤۷	

بحث

این مطالعه بر روی ۸۰ نمونه‌ی سرطانی آدنوکارسینومای کولون و رکتوم در اصفهان انجام شده است در ۵۳ نمونه (٦٦ درصد) بیان ژن p53 مشاهده نشد ولی در ۲۷ نمونه (۳٤ درصد) پایداری پروتئین p53 مشخص شد که می‌تواند نشانه‌ای از جهش ژن p53 باشد. در مطالعه‌ای که توسط جنسون و همکارانش در سوئد در ۷۵ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال انجام شد، در ٤۱ نمونه (۵۵ درصد) جهش ژن p53 با پایداری پروتئین همراه بود ولی بین پایداری پروتئین با محل آناتومیک و مرحله‌بندی تومور ارتباط معنی‌دار آماری وجود نداشت (۳۵). در گزارش ناسیرواسکا و همکارانش که در سال ۲۰۰۰ میلادی در لهستان انجام شد، از ۳۸ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال در ۲۱ نمونه جهش ژن p53 وجود داشت که در ۲۰ نمونه پایداری پروتئین p53 مشاهده شد (۳۳). مطالعات فوق تأییدی بر این هستند که پایداری پروتئین p53 می‌تواند نشانه‌ی مهمی از جهش ژن p53 در نمونه‌های سرطانی باشد.

در مطالعه‌ای که توسط روسل و همکارانش در بیرمینگام انجام شد، در ٤٤ درصد از بیماران مبتلا به آدنو کارسینوما کولون با پایداری پروتئین و پیش‌آگهی بد همراه بود ولی بین پایداری پروتئین و نواحی روده بزرگ ارتباط معنی‌داری گزارش نشده است (۳۸). این مطالعه از نظر میزان پایداری پروتئین با مطالعه حاضر تفاوت دارد ولی از نظر پایداری پروتئین با محل آناتومیک روده بزرگ با مطالعه فوق همخوانی دارد. همچنین بر اساس تحقیق لن و همکارانش در سال ۲۰۰۷ میلادی از چین تایپه، در ۳۷ درصد از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال پایداری پروتئین p53 گزارش شده است و بین پایداری پروتئین با سن و مرحله‌بندی تومور ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد که شبیه مطالعه حاضر است (۳۷). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که میزان بیان ژن p53 در ناحیه اصفهان شبیه نواحی کم‌جهش است. البته نقطه نظرات متناقضی نیز در مورد پایداری پروتئین p53 گزارش شده است که عدم پایداری پروتئین P53 نمی‌تواند دلیل بر نبود جهش ژن p53 باشد (۳۸). چون ممکن است جهش‌های نادری ایجاد شوند که با تولید پروتئین ناقص یا توقف آن همراه باشند (۳۹). در مطالعه حاضر پایداری پروتئین p53 در تعداد زیادی از نمونه‌های جهش‌دار مبتلا به سرطان کولورکتال در نواحی مختلف روده بزرگ و رکتوم مشاهده شد، بنابراین مشخص شدن پروتئین p53 را می-

توان نشانه‌ی مهمی از جهش قلمداد نمود که در پیش-آگهی و روند درمانی این سرطان می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از کارشناس محترم آزمایشگاه پاتولوژی خانم محمودی به خاطر همکاری خوبی که در مراحل انجام این طرح داشتند، قدردانی می‌نماییم.

References

1. Johnston PG, Allegra CJ. Colorectal cancer biology: clinical implications. Semin Oncol. 1995 ; 22(5): 418-32.
2. 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.
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 U S A. 2002; 99(14): 9433-8.
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(6): 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 olorectalcancer.Gastroenterol Clin North Am. 1996; 25(4):717-35.
7. Soussi T. The p53 tumour suppressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer. Mol Med Today. 1996; 2(1): 32-7.
8. Steinmetz KA, Kushi LH, Bostick RM, Folsom AR, Potter JD. Vegetables, fruit, and colon cancer in the Iowa Women's Health Study. Am J Epidemiol. 1994; 139(1): 1-15.
9. Wargovich MJ, Baer AR, Hu PJ, Sumiyoshi H. Dietary factors and colorectal cancer. Gastroenterol Clin North Am.1988; 17(4): 727-45.
10. Turesky RJ, Lang NP, Butler MA, Teitel CH, Kadlubar FF. Metabolic activation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by human liver and colon. Carcinogenesis. 1991; 12(10): 1839-45.
11. Sandler RS. Epidemiology and risk factors for Colorectalcancer. Gastroenterol Clin North Am. 1996; 25(4): 717-35.
12. Anti M, Armelao F, Marra G, Percesepe A, Bartoli GM, Palozza P, et al. Effects of different doses of fish oil on rectal cell proliferation in patients with sporadic colonic adenomas.Gastroenterology. 1994; 107(6): 1709-18.
13. Bostick RM, Potter JD, Kushi LH, Sellers TA, Steinmetz KA, McKenzie DR, et al. Sugar, meat, and fat intake, and non-dietary risk factors for colon cancer incidence in Iowa women (United States). Cancer Causes Control. 1994; 5(1): 38-52.
14. Hamelin R, Laurent-Puig P, Olschwang S, Jego N, Asselain B, Remvikos Y, et al. Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. Gastroenterology. 1994; 107(5): 1571-2.
15. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. Trends Pharmacol Sci. 2004; 25(4): 177-81.
16. Cadwell C, Zambetti GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53gain-of-function on cell growth. Gene. 2001; 277(1-2): 15-30.
17. 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
18. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage.Cancer Res. 1991; 51(23 Pt 1): 6304-11.
19. Ali IU, Schweitzer JB, Ikejiri B, Saxena A, Robertson JT, Oldfield EH. Heterogeneity of subcellular localization of p53 protein in human glioblastomas. Cancer Res. 1994; 54(1): 1-5.
20. Hunter T. 1001 protein kinases redux--towards 2000.Semin Cell Biol. 1994 ; 5(6): 367-76.
21. Lee MH, Reynisdottir I, Massague J. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique

domain structure and tissue distribution.Genes Dev. 1995 ;9(6):639-49.

22. Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, et al. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. Genes Dev. 1995;9(8):935-44.
23. Wang C, Ivanov A, Chen L, Fredericks WJ, Seto E, Rauscher FJ , et al. MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation.EMBO J. 2005;24(18):3279-90.
24. Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C.DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. Cell. 1997;91(3):325-34.
25. Matsushita K, Kobayashi S, Kato M, Itoh Y, Okuyama K, Sakiyama S, et al. Reduced messenger RNA expression level of p21 CIP1 in human colorectalcarcinoma tissues and its association with p53 gene mutation.Int J Cancer. 1996;69(4):259-64.
26. 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.
27. 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 coloncancer.Cancer Lett. 2004;208(2):227-34.
28. Ruley HE. p53 and response to chemotherapy and radiotherapy. Important Adv Oncol. 1996;:37-56.
29. 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.
30. Offer H, Erez N, Zurer I, Tang X, Milyavsky M, Goldfinger N, et al. The onset of p53-dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damaged DNA. Carcinogenesis. 2002;23(6):1025-32.
31. Westra JL, Schaapveld M, Hollema H, de Boer JP, Kraak MM, de Jong D, et al. Determination of TP53 mutation is more relevant than microsatellite instability status for the prediction of disease-free survival in adjuvant-treated stage III colon cancer patients. J Clin Oncol. 2005;23(24):5635-43.
32. Xu L, Pirollo KF, Tang WH, Rait A, Chang EH. Transferrin-liposome-mediated systemic p53 gene therapy in combination with radiation results in regression of human head and neck cancer xenografts.Hum Gene Ther. 1999;10(18):2941-52.
33. Nasierowska-Guttmejer A, Trzeciak L, Nowacki MP, Ostrowski J. p53 protein accumulation and p53 gene mutation in colorectal cancer.Pathol Oncol Res. 2000;6(4):275-9.
34. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry:Past,Present,and Future. J Histochem Cytochem. 1997;45(3):327-43
35. 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.
36. 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(3):346-58.
37. Lan YT, Chang SC, Li AF, Lin TC, Chen WS, Jiang JK ,et al . 53 protein accumulation as a prognostic marker in sporadic colorectal cancer.Int J Colorectal Dis. 2007;22(5):499-506.
38. 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(2):130
39. Bertorelle R, Esposito G, Belluco C, Bonaldi L, Del Mistro A, Nitti D, et al. p53 gene alterations and protein accumulation in colorectal cancer.Clin Mol Pathol. 1996;49(2):M85-M90.