

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

دکتر رحیم گل محمدی^۱، دکتر محمد رضا مهاجری^۲، دکتر مهدی زرگریان^۳

^۱ استادیار علوم تشریحی، دانشکده علوم پزشکی سبزوار

^۲ پاتولوژیست، بیمارستان شهید صدوقی اصفهان

^۳ عضو هیئت علمی رشته علوم آزمایشگاهی دانشکده علوم پزشکی سبزوار

نشانی نویسنده مسؤل: 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 ژن p53 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 ایمونوهیستوشیمی 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 ثابت کردن 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 (۳۴ 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 پیش‌آگهی و روند درمانی سرطان مهم است. (مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره ۱۴/ شماره ۳ / صص ۱۴۶-۱۴۱).

واژه‌های کلیدی: سرطان کولورکتال؛ ایمونوهیستوشیمی؛ پروتئین p53.

مقدمه

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 روده بزرگ یکی از مهم‌ترین تومورهای

بدخیم در دنیا است و دومین عامل مرگ ناشی از سرطان

قدرت رگزای و تهاجمی زیاد می شود (۲۹-۲۷). زمانی که در ژن p53 جهش به وجود آید، مقاومت های درمانی ایجاد می شود که روش های نوین درمانی را بر پایه مولکولی می طلبد (۳۱,۳۰). پایداری پروتئین p53 را می توان به- عنوان نشانه ای 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 شاخص های پاتولوژیک در سرطان کولورکتال با روش ایمونوهیستوشیمی می باشد.

مواد و روش ها

این مطالعه توصیفی تحلیلی به صورت مقطعی با روش ایمونوهیستوشیمی بر روی ۸۰ نمونه سرطانی کولورکتال انجام شد که در طول سال های ۸۲ تا ۸۶ به بیمارستان های شهر اصفهان مراجعه کرده بودند. ایمونوهیستوشیمی یک روش میکروسکوپی است که با کمک آن می توان محل آنتی ژن را در نمونه های بافتی یا سلولی ردیابی کرد؛ این تکنیک بر پایه شناسایی کمپلکس آنتی ژن و آنتی بادی صورت می گیرد. نمونه کنترل از ناحیه سالم مجاور تومور برداشته شد. برای جلوگیری از اتولیز و هترولیز، نمونه ها بلافاصله در فرمالین ۱۰ درصد ثابت شدند و بعد از ۳ ساعت فرمالین تعویض شد. پس از ۲۴ ساعت پاساژ بافتی به وسیله دستگاه Tissue processing انجام شد. مقاطع ۴ میکرونی از تمام بلوک های پارافینی با میکروتوم چرخشی تهیه شد. برای عمل ماسک زدایی پس از پارافین زدایی نمونه ها در داخل کوپلین ظرف بافر سترات قرار داده شدند و به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه ماکروویو در درجه حرارت ۹۵ سانتی گراد گذاشته شدند. این مرحله برای واکنش بهتر مراحل بعدی لازم است چون در طی روند فیکساسیون بافتی ممکن است محل شاخص های آنتی ژنی که باید با آنتی بادی واکنش بدهد،

سرطان کولورکتال عوامل متعددی نقش دارند ولی عادات غذایی و آسیب های ژنتیکی، جزء مهم ترین فاکتورهای خطر در سرطان کولورکتال محسوب می شوند (۷-۴). رژیم غذایی پرچرب از طریق تولید هیدروکربن های هتروسیکلیک آروماتیک (۸,۹) و مصرف گوشت قرمز زیاد به واسطه تولید N-nitroso-compound نقش سرطان زایی را در روده بزرگ دارد. الکل از طریق کاهش فولات موجب خطر آدنومای کولون می شود و بالعکس، سبزیجات و میوجات حاوی مواد آنتی اکسیدان به خاطر مهار رادیکال های آزاد از آسیب به DNA پیشگیری می- کنند (۱۳-۱۰).

در سرطان کولورکتال ژن های مختلفی درگیر می- شوند که مهم ترین آن ها ژن p53 می باشد (۱۴). محصول این ژن یک فسفو پروتئین هسته ای است که از ۳۹۳ اسید آمینه تشکیل شده است. بخش مرکزی این پروتئین (Core domain) مهم ترین قسمت آن است که نقش سرکوب- کنندگی تومور را به عهده دارد (۱۶,۱۵). نیمه عمر پروتئین p53 در حالت طبیعی در حدود چند دقیقه می باشد و سپس توسط پروتئازها تجزیه و ناپایدار می گردد (۱۷,۱۸). در حالی که در فرم موتانت شده طول عمر پروتئین p53 افزایش می یابد (۱۹) افزایش نیمه عمر پروتئین p53 ناشی از تغییرات پس از ترجمه ای است که در ساختمان این پروتئین به وجود آید که از بی اثر شدن آن جلوگیری می کند (۲۲-۲۰).

تغییر در فرم طبیعی موجب فسفوریلاسیون در ریشه های N ترمینال چند اسید آمینه و پایداری p53 را سبب می شود که با روش ایمونوهیستوشیمی می توان آن را در بافت های سرطانی ردیابی کرد (۲۴ و ۲۳). در حالت طبیعی اگر DNA آسیب ببیند، پروتئین p53 از طریق بیان ژن p21 موجب توقف چرخه سلولی در مرحله G1 به S می شود تا این که سلول خود را ترمیم کند یا روند آپوپتوز را در سلول صدمه دیده تسهیل کند (۲۶,۲۵). در شکل جهش یافته، ژن p53 در سلول های سرطانی آپوپتوز مختل،

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، ۴). از نرم‌افزار SPSS و آزمون مجذور کای جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.

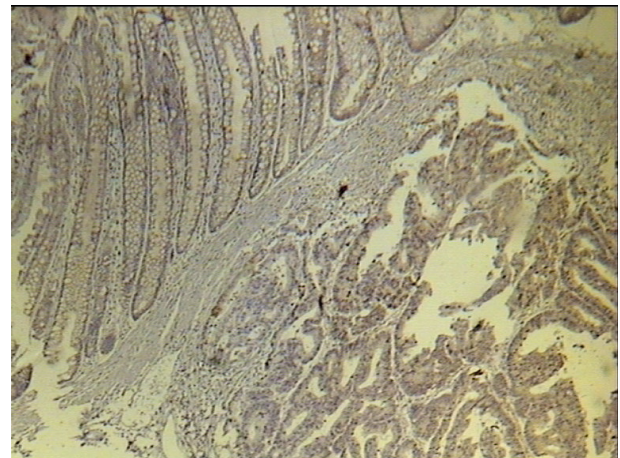
یافته‌ها

در این پژوهش از ۸۰ نمونه‌ی سرطانی کولورکتال ۵۶ نمونه مرد و ۲۴ نمونه زن بودند. در ۲۷ نمونه (۳۴ درصد) پایداری پروتئین p53 مشاهده شد که ۱۶ نمونه آن در جنس مذکر و ۱۱ مورد آن مربوط به جنس مؤنث بود و در ۵۳ نمونه (۶۷ درصد) پایداری پروتئین p53 منفی بود. از ۲۷ نمونه که با پایداری پروتئین p53 همراه بودند، ۲۴ نمونه در نواحی مختلف روده بزرگ یعنی سکوم،

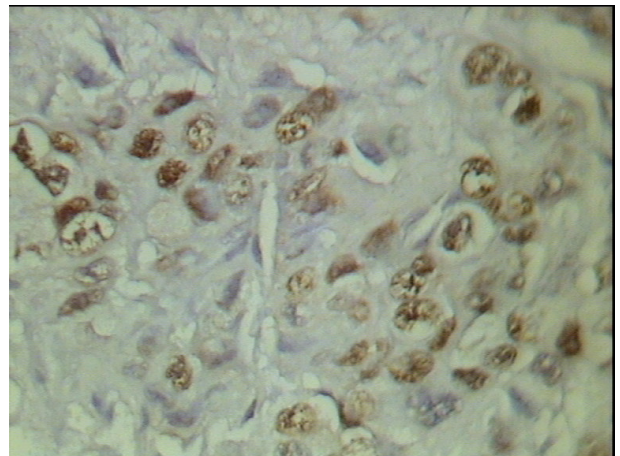
جدول ۱: توزیع فراوانی پایداری پروتئین p53 (مثبت) و عدم پایداری پروتئین (منفی) در نواحی مختلف روده بزرگ

ایمونوهیستوشیمی		نواحی روده بزرگ
مثبت (درصد) تعداد	منفی (درصد) تعداد	
۱۰(۵۲/۶)	۹(۴۷/۴)	سکوم و کولون صعودی
۳(۵۰)	۳(۵۰)	کولون عرضی
۱(۱۴/۳)	۶(۸۵/۷)	کولون نزولی
۱۰(۲۷/۸)	۲۶(۷۲/۲)	کولون سیگموئید
۳(۳۰)	۹(۷۰)	رکتوم
۲۷(۳۴)	۵۳(۶۶)	جمع کل

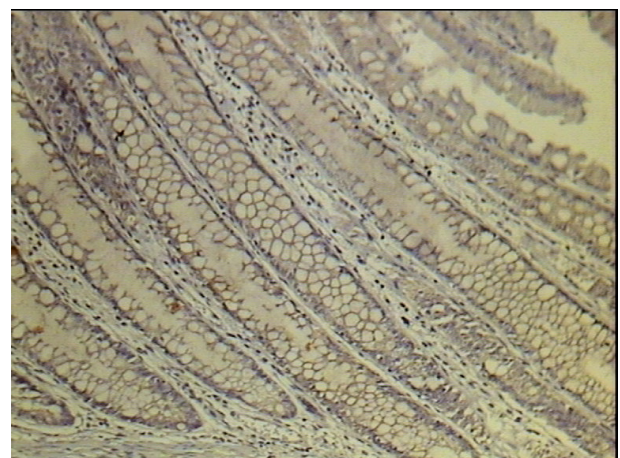
دچار Mask شده باشند (۳۳، ۳۴). مهار پراکسیداز بافتی با



شکل A-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)



شکل B-۱: پایداری پروتئین p53 در سلول‌های سرطانی بافت روده بزرگ با روش ایمونوهیستوشیمی (بزرگ‌نمایی ۴۰۰)



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

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 (جدول ۱). 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 (جدول ۲).

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

متغیر	تعداد کل	فراوانی		P
		پایداری پروتئین P53	عدم پایداری پروتئین P53	
جنس	مرد	۵۶	۱۶	p=۰/۰۶
	زن	۲۴	۱۳	
سن	<۶۰	۳۵	۲۳	p=۰/۱۱
	≥۶۰	۴۵	۳۰	
درجه تمایز	خوب	۶۵	۱۹	p=۰/۱۳
	متوسط	۹	۵	
	ضعیف	۶	۲	
Dukes Stage	A	۴۰	۱۴	p=۰/۷۴
	B	۲۹	۸	
	C	۷	۳	
	D	۴	۲	
جهش	با جهش	۳۳	۲۷	p=۰/۰۰۱
	بدون جهش	۴۷	۴۷	

بحث

این مطالعه بر روی ۸۰ نمونه‌ی سرطانی آدنوکارسینوما کولون و رکتوم در اصفهان انجام شده است در ۵۳ نمونه (۶۶ درصد) بیان ژن p53 مشاهده نشد ولی در ۲۷ نمونه (۳۴ 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 ۴۱

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 ۴۴ درصد از بیماران مبتلا به آدنوکارسینوما 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.
 از کارشناس محترم آزمایشگاه پاتولوژی خانم
 محمودی به خاطر همکاری خوبی که در مراحل انجام این
 طرح داشتند، قدردانی می‌نمایم.

تشکر و قدردانی

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 colorectal cancer. *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 Colorectal cancer. *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, Jeco 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 p53 gain-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 colorectal carcinoma 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 clinicopathological features in colon cancer. *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 . p53 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.