

بررسی مقایسه‌ای بروز پروتئین مهارکننده تومور P16 در نمونه‌های سرطانی و سالم کولورکتال توسط روش ایمونوهیستوشیمی

دکتر مهدی نیکبخت دستجردی^۱، محمد معینی^۲

چکیده

مقدمه: P16 پروتئین مهارکننده تومور است. برای بررسی ارتباط بروز P16 با پاتوژنز سرطان کولورکتال، بیان این پروتئین را در بافت‌های سرطانی و سالم کولورکتال توسط روش ایمونوهیستوشیمی بررسی نمودیم.

روش‌ها: بیان پروتئین P16 در ۵۰ جفت از نمونه‌های سرطانی کولورکتال و بافت کولورکتال طبیعی مجاور با روش ایمونوهیستوشیمی بر روی مقاطع پارافینی بررسی شد.

یافته‌ها: P16 در تمام بافت‌ها بروز پیدا کرده بود. P16 در نمونه‌های سرطانی کولورکتال در مقایسه با بافت‌های طبیعی مجاور کاهش یافته بود ($P < 0.001$).

نتیجه‌گیری: بروز پروتئین P16 می‌تواند به عنوان یک مارکر بیولوژیک مطلوب و یک عامل پیش‌آگهی‌دهنده مناسب در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال مطرح باشد.

واژگان کلیدی: سرطان کولورکتال، ایمونوهیستوشیمی، ژن مهارکننده تومور، P16INK4a

مقدمه

نژادهای آفریقایی - آمریکایی در معرض خطر بالاتری از نظر ابتلا به این نوع سرطان قرار دارند و میزان مرگ و میر در آن‌ها نسبت به بقیه‌ی نژادها بیشتر است (۲). افرادی که رژیم‌های غذایی همراه با میوه و سبزیجات و رژیم‌های حاوی کلسیم و ویتامین D مصرف می‌کنند، خطر کمتری برای ابتلای به این سرطان دارند. در مقابل افرادی که فعالیت بدنی کمتری دارند و نیز مصرف‌کنندگان حرفه‌ای سیگار و مشروبات الکلی در معرض خطر بیشتری هستند (۲). مشخص شده است که برخی از عوامل ژنتیکی شامل فقدان آلی در بازوهای برخی از کروموزوم‌ها،

سرطان کولورکتال دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان‌های منجر به مرگ در دنیا است که میزان بقای ۵ ساله‌ی ناشی از آن بسیار پایین است و بیش از ۵۰ درصد از موارد تازه تشخیص داده شده‌ی آن در مراحل پیشرفته‌ی بیماری قرار دارند (۱). ۱۰۸۰۷۰ مورد جدید از این بیماری شامل ۵۳۷۶۰ مرد و ۵۴۳۱۰ زن در سال ۲۰۰۸ در ایالات متحده تشخیص داده شده است. سرطان‌های پیشرفته‌ی کولورکتال اغلب همراه با متاستاز به پریتون، غدد لنفاوی و سایر ارگان‌ها هستند (۲).

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای مرفه‌ای به شماره‌ی ۳۹۰۵۷۳ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

^۱ دانشیار، گروه آناتومی و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۲ دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

موتاسیون در انکوژن‌ها، موتاسیون در ژن‌های مهارکننده‌ی تومور و نقص‌های متیلاسیون در پروموتور ژن‌ها در ایجاد سرطان کولورکتال مؤثر هستند (۳).

P16 (CDKN_{2A}) یک مهارکننده‌ی CDK₄ (Cyclin-dependent kinase 4) و CDK₆ است و عملکرد آن به عنوان یک مهارکننده‌ی تومور می‌باشد (۴). بیان P16 در سلول‌های پیر به صورت خیلی منظم رخ می‌دهد و در بافت‌های مختلف انسان با افزایش سن افزایش می‌یابد (۴). مطالعات دیگری نشان داده است که فعال شدن پروتئین P16 با توقف فرایند رشد و پیر شدن سلول‌ها موجب پیش‌گیری از بروز سرطان می‌شود (۵). فقدان عملکرد P16 با حذف یا جهش‌های نقطه‌ای و یا با متیلاسیون پروموتور آن می‌تواند باعث تکثیر سلولی خارج از کنترل شود و در نهایت منجر به ایجاد نئوپلاسم گردد. متیلاسیون پروموتور P16 و خاموش شدن ژن آن در بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان کولون اثبات شده است (۱۲-۵).

موتاسیون مهم‌ترین علت غیر فعال شدن ژن پروتئین مهارکننده‌ی تومور P16 و شروع فرایند تومورزایی در سرطان کولورکتال می‌باشد (۷). در بعضی مطالعات نشان داده شده است که موتاسیون در ژن P16 منجر به کاهش میزان بروز محصول پروتئینی آن در نمونه‌های اسپورادیک سرطان کولورکتال می‌شود (۸).

در مطالعات مشابه نشان داده شده است که بین میزان کاهش پروتئین محصول ژن و میزان بقای ۵ ساله‌ی ناشی از سرطان کولورکتال رابطه‌ی مستقیم وجود دارد (۷-۸).

با توجه به اهمیت این موضوع در پیش بینی میزان

بقای ۵ ساله‌ی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال و تأثیر متیلاسیون بر روی بیان ژن و نیز با توجه به تفاوت‌های نژادی در میزان بروز پروتئین، هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی میزان بروز پروتئین P16 در بافت سرطانی و مقایسه‌ی آن با میزان بروز پروتئین در بافت سالم مجاور آن در نمونه‌های سرطانی در شهر اصفهان بود.

روش‌ها

در این مطالعه از ۵۰ نمونه‌ی سرطانی کولورکتال و ۵۰ نمونه از بافت سالم مجاور همان نمونه‌های توموری استفاده شد. نمونه‌ها به صورت بلوک پارافینی آماده از بخش پاتولوژی بیمارستان الزهرای (س) اصفهان تهیه گردید.

نمونه‌ها توسط H&E رنگ‌آمیزی شدند و پس از تأیید تشخیص پاتولوژی، مراحل زیر جهت تهیه‌ی لام ایمنو‌هیستوشیمی انجام گردید:

آماده سازی بافت: ابتدا آب‌گیری نمونه‌ها توسط اتانول‌های صعودی (۷۰، ۹۵ و ۹۹ درصد) انجام شد. سپس شفاف‌سازی نمونه‌ها توسط گزیلن و قالب‌گیری نمونه‌ها به وسیله‌ی پارافین صورت گرفت.

برش‌گیری: در این مرحله برش‌های بافتی به ضخامت ۴ تا ۵ میکرون تهیه شد.

رنگ‌آمیزی ایمنو‌هیستوشیمی: ابتدا پارافین زدایی توسط غوطه‌ورسازی نمونه‌ها در گزیلن انجام گرفت. سپس توسط اتانول‌های نزولی (۹۹، ۹۵ و ۷۰ درصد) آب‌دهی صورت گرفت. در مرحله‌ی بعد به منظور توقف فعالیت Endogenous Peroxide برش‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در مجاورت پراکسید هیدروژن ۵ درصد انکوبه و پس از آن در آب جاری شستشو داده شدند.

پس از آن نمونه‌ها برای انجام Antigen retrieval به مدت یک دقیقه در دمای ۹۸ درجه‌ی سانتی‌گراد در بافر ۰/۰۱ مولار سیترات سدیم در یک میکروویو قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد، برش‌ها به مدت ۵ دقیقه به Tris بافر سالین (Tris-buffered saline یا TBS) انتقال داده شد. توقف فعالیت Endogenous peroxide توسط سرم طبیعی ۱۰ درصد (Goat) در به مدت پنج دقیقه انجام گرفت و سرم اضافی برداشته شد. آنتی‌بادی اولیه با رقت ۱:۲۰۰ اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس شستشو با TBS دوبار و هر بار پنج دقیقه انجام گرفت. بعد از آن نمونه‌ها با آنتی‌بادی ثانویه با رقت ۱:۵۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شدند و به طور مجدد دوبار با TBS هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. واکنش کروموزنیک توسط Diaminobezidine و رنگ‌آمیزی مخالف نیز با Hematoxilin انجام گردید. در نهایت نمونه‌ها زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند. در گروه‌های شاهد منفی از PBS (Phosphate buffered saline) به جای آنتی‌بادی‌های اختصاصی استفاده شد.

پس از تهیه‌ی لام ایمنو‌هیستوشیمی، بررسی میکروسکوپی مقاطع نشان‌دار شده با آنتی‌بادی انجام گردید. برای این کار مقاطع نشان‌دار شده با آنتی‌بادی به منظور بررسی میکروسکوپی با استفاده از میکروسکوپ نوری و به کارگیری نرم‌افزار Motoc advance plus 2 در ۱۰ محدوده‌ی متفاوت تصویربرداری و جهت بررسی کمی از مانیتور LCD استفاده شد. در این بررسی، حداقل ۱۰۰۰ سلول در هر لام شمارش گردید و درصد سلول‌هایی که هسته‌ی آن‌ها رنگ‌آمیزی شده بود، تعیین شد.

پس از آن درصد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده به رنگ قهوه‌ای نسبت به سلول‌هایی که رنگ آبی گرفته بودند، در هر بافت مشخص گردید و بر این اساس نمونه‌های سرطانی به سه گروه تقسیم شدند:

(۱) گروه ++ که میزان بروز پروتئین در آن مشابه بافت طبیعی مجاور بود (درصد سلول‌های قهوه‌ای بین ۵۰ تا ۱۰۰ درصد بود).

(۲) گروه + که میزان بروز پروتئین در آن نسبت به بافت طبیعی مجاور کاسته شده بود (درصد سلول‌های قهوه‌ای بین ۳۰ تا ۴۹ درصد بود).

(۳) گروه - که رنگ‌آمیزی قابل ردیابی نداشت (درصد سلول‌های قهوه‌ای بین صفر تا ۲۹ درصد بود).
آنالیز آماری اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) و با به کارگیری آزمون χ^2 و Student-t انجام گرفت. از نظر آماری یافته‌های با مقدار $P < ۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه از ۵۰ نمونه‌ی سرطان کولورکتال به عنوان گروه آزمایش و ۵۰ نمونه از بافت سالم مجاور همان نمونه‌های تومور به عنوان گروه شاهد استفاده گردید. خصوصیات دموگرافیک نمونه‌های سرطانی که شامل سن، جنس، محل و نوع تومور می‌باشد، در جدول ۱ ثبت شده است.

قبل از مراحل آماده‌سازی بافت و رنگ‌آمیزی ایمنو‌هیستوشیمی، تمامی نمونه‌ها مورد تأیید پاتولوژی نیز قرار گرفت. در این مطالعه پروتئین P16 در تمامی نمونه‌ها بیان شده بود و به طور عمده در هسته‌ی سلول‌های اپی‌تلیال متمرکز بود. بر حسب بیان پروتئین P16، هسته‌ی سلول‌ها به دو دسته‌ی آبی و

از مانیتور LCD استفاده گردید. در این بررسی حداقل ۱۰۰۰ سلول در هر لام شمارش شد.

بررسی درصد سلول‌هایی که هسته‌ی آن‌ها رنگ‌آمیزی شده بود و بیان این پروتئین در بافت‌های سرطانی نسبت به بافت‌های طبیعی مجاور نشان داد، بیان این پروتئین در بافت‌های سرطانی در مقایسه با بافت‌های طبیعی مجاور به طور معنی‌دار کاهش یافته بود ($P < 0.001$).

جدول ۲. مقایسه‌ی بروز پروتئین P16 در نمونه‌های سرطانی کولورکتال با بافت سالم مجاور (مارژین)

متغیر	گروه		مقدار P
	تومور	مارژین	
نسبت سلول‌های قهوه‌ای به آبی*	0.65 ± 0.09	$1/5 \pm 0.21$	< 0.001
سلول‌ها**	۳۸ (۷۶)	۵۰ (۱۰۰)	< 0.001
	۱۲ (۲۴)	۰	

*: انحراف معیار \pm میانگین
**: درصد (تعداد)

بر طبق جدول ۲، ۷۶ درصد نمونه‌های توموری در گروه ++ و ۲۴ درصد در گروه + قرار گرفت. همچنین ۱۰۰ درصد نمونه‌های بافت سالم مجاور در گروه ++ قرار گرفت که نشان دهنده‌ی کاهش بیان این پروتئین در نمونه‌های توموری بود.

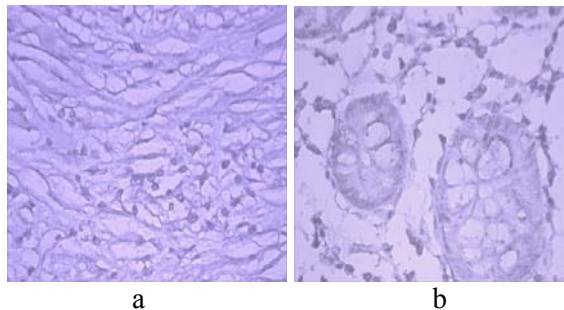
بحث

سرطان روده‌ی بزرگ دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان است. ژن‌های مهارکننده‌ی تومور متعددی در این سرطان نقش دارند که از این بین ژن مهارکننده‌ی تومور P16 نقش قابل توجهی دارد (۱۳). پروتئین P16 در اغلب سرطان‌ها، دچار تغییرات ژنتیکی می‌گردد که این تغییرات شامل جهش و هایپرمتیلاسیون ناحیه‌ی

قهوه‌ای تقسیم شدند. سلول‌های قهوه‌ای نمایانگر بیان پروتئین P16 و سلول‌های آبی نشان از عدم بیان این پروتئین می‌باشد که در شکل ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. مشخصات دموگرافیک ۵۰ نمونه‌ی مبتلا به سرطان آدنوکارسینومای کولورکتال

متغیر	تعداد
جنس	مرد ۳۳ زن ۱۷
سن	≥ 60 ۳۲ ≥ 59 ۱۸
نوع تومور	آدنوکارسینومای موسینی ۸ آدنوکارسینومای غیرموسینی ۴۲
Grade	G1 ۳۱ G2 ۱۴ G3 ۵
محل تومور	کولون ۳۶ رکتوسیگموئید ۱۴



شکل ۱. بروز پروتئین P16 در نمونه‌های بافت سرطانی (a) و بافت سالم مجاور تومور (b). در کلیه‌ی نمونه‌ها اعم از سرطانی و سالم دو دسته سلول قابل مشاهده است: دسته‌ی اول سلول‌هایی که هسته‌ی آن‌ها رنگ قهوه‌ای گرفته بود و دسته‌ی دوم سلول‌هایی که هسته‌ی آن‌ها به رنگ آبی بود (بزرگ‌نمایی ۴۰۰x)

برای ردیابی پروتئین P16 در نمونه‌ها، رنگ‌آمیزی ایمنووهیستوشیمی انجام شد. با استفاده از میکروسکوپ نوری و نرم‌افزار Motic advance plus 2 در ۱۰ محدوده‌ی متفاوت تصویربرداری و جهت بررسی کمی

بوده و در تعیین پروگنوز بیمار دارای اهمیت بوده است (۲۰-۱۸).

Shima و همکاران اثر پروگنوستیک متیلاسیون پروموتور P16 و فقدان P16 را بررسی کردند (۱۳). به این منظور از اطلاعات بالینی و مولکولی ۹۰۲ مورد سرطان کولورکتال استفاده کردند. تعداد بالای نمونه‌ها توانایی کافی در آنالیز عود و آنالیز Survival این بیماری را برای آن‌ها فراهم کرده بود. آن‌ها دریافتند که متیلاسیون P16 یا فقدان آن مستقل از پروگنوز بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال نمی‌باشد. مطالعه‌ی آن‌ها نتایج مهمی درباره‌ی متیلاسیون پروموتور P16 و کاهش بیان P16 در سرطان کولورکتال فراهم کرد (۱۳). برخی مطالعات دیگر نشان دادند که متیلاسیون P16 و عدم بروز P16 با پروگنوز بیماری ارتباط دارد؛ اگر چه در این مطالعات تعداد نمونه‌ی کمی مورد بررسی قرار گرفته بود (۲۲-۲۱) و برعکس در مطالعه‌ی ای با ۸۴ مورد سرطان کولورکتال (۲۳) و در مطالعه‌ی دیگری با ۱۰۴ مورد سرطان کولورکتال (۲۴)، متیلاسیون P16 ارتباطی با کاهش بروز پروتئین مربوط نداشت.

در رابطه با فقدان بیان P16 در مطالعه‌ی Cui و همکاران با تعداد ۱۱۷ نمونه، بین فقدان P16 و افزایش میزان مرگ و میر ارتباط وجود داشت (۲۵)؛ در حالی که دو مطالعه‌ی دیگر به ترتیب با ۴۰۴ و ۱۹۴ نمونه، نقش پروگنوستیک را برای فقدان بروز P16 نشان ندادند (۲۶-۲۷). در نهایت شواهد قطعی برای حمایت از نقش پروگنوستیک مستقل از متیلاسیون P16 با فقدان بیان آن در سرطان کولورکتال وجود ندارد.

بررسی تغییرات مولکولی یا فاکتورهای پروگنوستیک

پروموتور می‌باشد که منجر به کاهش بیان پروتئین P16 و رشد خارج از کنترل سلول می‌شود و از طرف دیگر، منجر به کاهش حساسیت سلول به آپوپتوز می‌گردد و می‌تواند روند تشکیل سرطان را تسهیل کند (۱۳). بیان این پروتئین در اغلب سرطان‌ها از جمله سرطان کولورکتال کاهش می‌یابد (۱۳).

در مطالعه‌ی حاضر این کاهش بیان در نمونه‌های سرطانی در مقایسه با نمونه‌های سالم مجاور مشاهده شد. به طور کلی با توجه به نتایج حاصل از شمارش سلولی، بیان ژن مهارکننده‌ی تومور P16 در نمونه‌های سرطانی در مقایسه با نمونه‌های سالم کاهش یافته بود. مشابه نتایج ما، محققین دیگر نیز به این نتیجه رسیدند که بروز پروتئین P16 در سرطان کولورکتال کاهش معنی‌داری نسبت به بافت طبیعی مجاور دارد (۱۷-۱۴).

در مطالعه‌ی Sanchez-Cespedes و همکاران در مورد نقش پروتئین P16 در بروز سرطان کولورکتال که روی ۲۱ نمونه‌ی سرطانی انجام دادند، ۷۶ درصد بیماران دارای هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن P16 و کاهش بیان پروتئین مربوط بودند (۱۴). در مطالعه‌ی که Jass و همکاران روی ۱۹۵ نمونه سرطان کولورکتال با روش ایمونوهیستوشیمی انجام دادند، رابطه‌ی معنی‌داری بین این سرطان و کاهش میزان بروز پروتئین P16 مشاهده شد (۱۵).

در مطالعه‌ی Zou و همکاران روی نمونه‌های سرطان کولورکتال، در ۳۸ درصد موارد ژن P16 دچار هایپرمتیلاسیون بود و کاهش بیان پروتئین مربوط تشخیص داده شد (۱۶).

Tada و همکاران نیز نشان دادند که متاستاز غدد لنفاوی در تومورهای دارای کاهش بروز پروتئین P16 دیده می‌شود (۱۷). متیلاسیون P16 با CIMP همراه

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده پروتئین P16 می‌تواند نقش مهمی در ایجاد سرطان کولورکتال داشته باشد و کاهش بیان این پروتئین ممکن است با پاتوزن سرطان مرتبط باشد. بر همین اساس می‌توان از کاهش بیان این پروتئین به عنوان یک مارکر در تشخیص سرطان کولورکتال استفاده نمود و با تشخیص زودرس سرطان میزان مرگ و میر آن را کاهش داد.

تشکر و قدردانی

در پایان از تمامی اعضای آزمایشگاه پاتولوژی دکتر مهاجری به خصوص سرکار خانم محمودی به خاطر همکاری همه جانبه تشکر و قدردانی می‌شود.

در تحقیق در مورد سرطان اهمیت دارد. در این مطالعه ما متیلاسیون ژن P16 را بررسی نکردیم و پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی این مسأله مد نظر قرار گیرد.

در این تحقیق بیان ژن P16 در سطح پروتئین بررسی شد. این بررسی با دقت بسیار بالا و شمارش حداقل ۱۰۰۰ سلول در ۱۰ محدوده‌ی مختلف از نظر کمی و کیفی صورت گرفت که می‌تواند از مزایای این مطالعه باشد.

با توجه به سایر تحقیقات بین میزان بیان پروتئین و بروز سرطان ارتباط وجود دارد. بر همین اساس پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده ارتباط بیان پروتئین در سطح بافت با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

References

- McCormick D, Kibbe PJ, Morgan SW. Colon cancer: prevention, diagnosis, treatment. *Gastroenterol Nurs* 2002; 25(5): 204-11.
- Gayet J, Zhou XP, Duval A, Rolland S, Hoang JM, Cottu P, et al. Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines. *Oncogene* 2001; 20(36): 5025-32.
- Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991; 253(5020): 661-5.
- Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 2007; 130(2): 223-33.
- Liu Y, Sharpless NE. Tumor suppressor mechanisms in immune aging. *Curr Opin Immunol* 2009; 21(4): 431-9.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61(8): 3225-9.
- Paya A, Alenda C, Perez-Carbonell L, Rojas E, Soto JL, Guillen C, et al. Utility of p16 immunohistochemistry for the identification of Lynch syndrome. *Clin Cancer Res* 2009; 15(9): 3156-62.
- Gibson SL, Boquoi A, Chen T, Sharpless NE, Brensinger C, Enders GH. p16(Ink4a) inhibits histologic progression and angiogenic signaling in min colon tumors. *Cancer Biol Ther* 2005; 4(12): 1389-94.
- Furth EE, Gustafson KS, Dai CY, Gibson SL, Menard-Katcher P, Chen T, et al. Induction of the tumor-suppressor p16(Ink4a) within regenerative epithelial crypts in ulcerative colitis. *Neoplasia* 2006; 8(6): 429-36.
- Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, Levin TR, Sweeney C, Murtaugh MA, et al. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* 2005; 129(3): 837-45.
- Barault L, Charon-Barra C, Jooste V, de la Vega MF, Martin L, Roignot P, et al. Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: study on a population-based series of 582 cases. *Cancer Res* 2008; 68(20): 8541-6.
- Nosho K, Irahara N, Shima K, Kure S, Kirkner GJ, Schernhammer ES, et al. Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population-based sample. *PLoS One* 2008; 3(11): e3698.
- Shima K, Nosho K, Baba Y, Cantor M, Meyerhardt JA, Giovannucci EL, et al. Prognostic significance of CDKN2A (p16) promoter methylation and loss of expression in 902 colorectal cancers: Cohort study and literature review. *Int J Cancer* 2011; 128(5): 1080-94.

14. Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Hibi K, Cope FO, Westra WH, Piantadosi S, et al. Molecular detection of neoplastic cells in lymph nodes of metastatic colorectal cancer patients predicts recurrence. *Clin Cancer Res* 1999; 5(9): 2450-4.
15. Jass JR, Barker M, Fraser L, Walsh MD, Whitehall VL, Gabrielli B, et al. APC mutation and tumour budding in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2003; 56(1): 69-73.
16. Zou HZ, Yu BM, Wang ZW, Sun JY, Cang H, Gao F, et al. Detection of aberrant p16 methylation in the serum of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002; 8(1): 188-91.
17. Tada T, Watanabe T, Kazama S, Kanazawa T, Hata K, Komuro Y, et al. Reduced p16 expression correlates with lymphatic invasion in colorectal cancers. *Hepatogastroenterology* 2003; 50(54): 1756-60.
18. Ishiguro A, Takahata T, Saito M, Yoshiya G, Tamura Y, Sasaki M, et al. Influence of methylated p15 and p16 genes on clinicopathological features in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21(8): 1334-9.
19. Ward RL, Cheong K, Ku SL, Meagher A, O'Connor T, Hawkins NJ. Adverse prognostic effect of methylation in colorectal cancer is reversed by microsatellite instability. *J Clin Oncol* 2003; 21(20): 3729-36.
20. Ogino S, Noshio K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Meyerhardt JA, Loda M, et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut* 2009; 58(1): 90-6.
21. Maeda K, Kawakami K, Ishida Y, Ishiguro K, Omura K, Watanabe G. Hypermethylation of the CDKN2A gene in colorectal cancer is associated with shorter survival. *Oncol Rep* 2003; 10(4): 935-8.
22. Mitomi H, Fukui N, Tanaka N, Kanazawa H, Saito T, Matsuoka T, et al. Aberrant p16((INK4a)) methylation is a frequent event in colorectal cancers: prognostic value and relation to mRNA expression and immunoreactivity. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136(2): 323-31.
23. Liang JT, Chang KJ, Chen JC, Lee CC, Cheng YM, Hsu HC, et al. Hypermethylation of the p16 gene in sporadic T3N0M0 stage colorectal cancers: association with DNA replication error and shorter survival. *Oncology* 1999; 57(2): 149-56.
24. Sanz-Casla MT, Maestro ML, Vidaurreta M, Maestro C, Arroyo M, Cerdan J. p16 Gene methylation in colorectal tumors: correlation with clinicopathological features and prognostic value. *Dig Dis* 2005; 23(2): 151-5.
25. Cui X, Shirai Y, Wakai T, Yokoyama N, Hirano S, Hatakeyama K. Aberrant expression of pRb and p16(INK4), alone or in combination, indicates poor outcome after resection in patients with colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2004; 35(10): 1189-95.
26. Lam AK, Ong K, Giv MJ, Ho YH. p16 expression in colorectal adenocarcinoma: marker of aggressiveness and morphological types. *Pathology* 2008; 40(6): 580-5.
27. Norrie MW, Hawkins NJ, Todd AV, Meagher AP, O'Connor TW, Ward RL. Inactivation of p16INK4a by CpG hypermethylation is not a frequent event in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2003; 84(3): 143-50.

A Comparative Survey on the Expression of P16 as a Tumor Suppressor Protein in Cancerous and Non-Cancerous Colorectal Tissue Samples Using Immunohistochemistry Method

Mehdi Nikbakht Dastjerdi PhD¹, Mohammad Moeini²

Abstract

Background: P16 is known as a tumor suppressor protein. This study was conducted to evaluate the association of P16 expression and pathogenesis of colorectal cancer. The presence of P16 in cancerous and non-cancerous colorectal tissue samples were thus compared using immunohistochemistry method.

Methods: In this stud, 50 paired tissue samples were provided. The pairs were comprised of samples of cancerous colorectal tissue and normal peers from non-cancerous tissue adjacent to cancerous ones. Expression of P16 was studied on paraffined sections using immunohistochemistry method.

Findings: Although P16 was expressed in all tissue samples, we found a lower expression in colorectal cancerous tissue in comparison with normal tissue samples. This difference was revealed to be statistically significant ($P < 0.001$).

Conclusion: The presence of P16 can be regarded as an appropriate biological marker and a valuable prognostic factor for colorectal cancer.

Keywords: Colorectal cancer, Immunohistochemistry, Tumor suppressor gene, P16INK4a

* This paper is derived from a medical doctorate thesis No. 390573 in Isfahan University of Medical Sciences.

¹ Associate Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

² Student of Medicine, School of Medicine And Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Corresponding Author: Mehdi Nikbakht Dastjerdi PhD, Email: nikbakht@med.mui.ac.ir