

بررسی بیان ژن *P53* در بیماران مبتلا به سرطان مری با استفاده از روش Reverse transcriptase real time polymerase chain reaction

سمیه سنجولی^۱، دکتر غلامرضا مطلب^{۲*}، دکتر احمد یگانه مقدم^۳، دکتر رضوان طلائی^۴

۱. کارشناس ارشد ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲. دانشیار و دکترای تخصصی بیولوژی ملکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۳. متخصص گوش، حلق و بینی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۴. متخصص پوست، استادیار دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سرطان مری، ششمین عامل مرگ ناشی از سرطان در جهان است. شیوع سرطان مری در ایران بسیار بالاست. *P53* یکی از شناخته شده ترین ژن های بازدارنده ی تومور است که در برابر آسیب های وارده به DNA فعال می شود و هدف مهمی برای تحقیقات شناخته می شود. به دلیل اینکه تاکنون هیچ تحقیق و پژوهشی در مورد ژن *P53* در بیماران مبتلا به سرطان مری با تکنیک Real-time PCR در ایران انجام نگرفته است، ضرورت انجام این تحقیق با روش ذکر شده به شدت احساس می گردد. این تحقیق به روش Historical cohort study انجام گرفت.

مواد و روش ها: این تحقیق از مهرماه سال ۱۳۹۲ تا خرداد ۱۳۹۳ در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل انجام گردید. در این پژوهش، بیان ژن *P53* که یکی از فاکتورهای مهم ایجاد سرطان مری است، در بیماران مبتلا به سرطان مری در ایران مورد مطالعه قرار گرفت. ۱۵ نمونه بافت پارافینه سرطان مری و ۱۵ نمونه پارافینه سالم جمع آوری شده از مراکز مختلف پزشکی درمانی (زابل، زاهدان، کاشان) جهت اندازه گیری بیان ژن *P53* توسط روش Reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) آنالیز گردید. تمامی واکنش های PCR با سه تکرار برای ژن *P53* و کنترل داخلی (β -actin) توسط متد (Livac) $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام شد. بیان ژن *P53* در دو گروه بیمار و سالم با آزمون t-test مورد قضاوت قرار گرفت.

یافته ها: تحقیق در دو گروه ۱۵ نفره انجام گرفت. اختلاف نسبتاً زیادی بین افراد بیمار و سالم در بیان ژن *P53* وجود داشت. به طوری که بیان ژن *P53* در افراد بیمار، ۱۲ برابر بیشتر از افراد سالم بود ($P < 0/05$). به نظر می رسد که افزایش بیان ژن *P53* احتمالاً می تواند به عنوان بیومارکر در سرطان مری باشد.

نتیجه گیری: بیان ژن *P53* در مبتلایان به سرطان مری به مراتب بیشتر از افراد سالم بود.

واژگان کلیدی: *P53*، RT-qPCR، سرطان مری

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Sancholi S, Motalleb G, Yegane Moghadam A, Talae R. *P53* gene expression evaluation in patients with esophageal cancer using Reverse transcriptase real time polymerase chain reaction. *Pejouhandeh* 2015;20(3):154-162.

مقدمه

تومور ساپرسور ژنی است که به طور جداگانه توسط David Lane و Arnold Levine و همکارانش در سال ۱۹۷۹ زمانی که روی پروتئین ها در سلول های ترنسفورم شده توسط ویروس DNA دار SV40 کار می کردند کشف شد. عوامل متعددی منجر به تبدیل پروتوانکوژن به انکوژن می شود. از جمله ی این عوامل، تغییرات تک نوکلئوتیدی، تکثیر یا ازدیاد ژنی، ترکیب ژنی و سایر بازآرایی های کروموزومی است که فعالیت پروتئین های ساخته شده توسط پروتوانکوژن ها را افزایش می دهد (۳). بیان موتاسیون یافته ی ژن *P53* یکی از

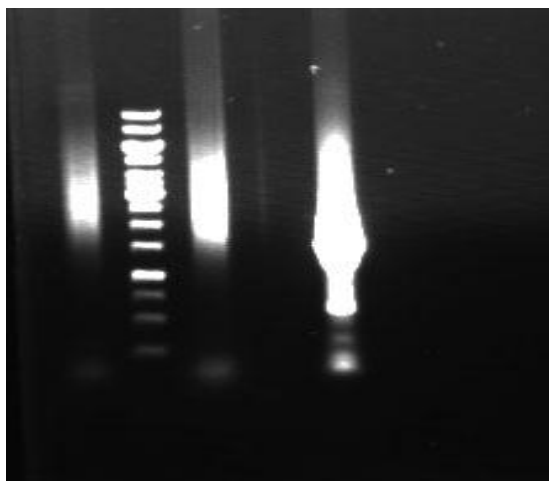
در سال، ۳۰ هزار ایرانی به علت سرطان، جان خود را از دست می دهند (۱). سرطان مری سومین سرطان شایع گوارش و با ۳۸۶ هزار مرگ و میر، ششمین عامل مرگ ناشی از سرطان در جهان است (۲). به دلیل همراهی علائم و اتیولوژی سرطان مری درمان آن مشکل می باشد. *P53* یک

* نویسنده مسؤل مکاتبات: دکتر غلامرضا مطلب؛ دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، دانشگاه زابل؛ تلفن: ۳۲۲۳۱۱۹۳ (۰۵۴)؛ پست الکترونیک: rezamotalleb@gmail.com

بیمارستان‌های زابل، کاشان و زاهدان تهیه گردید. جهت استخراج اسیدهای نوکلئیک از بافت‌های پارافین نیاز به پارافین‌زدایی بافت مورد نظر و همچنین مقدار مشخصی از بافت بود. بدین منظور، بلوک‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده تا به خوبی برش‌گیری انجام گیرد. سپس از هر بلوک با توجه به میزان بافت موجود در بلوک، توسط دستگاه میکروتوم مقطع‌گیری شده و مقاطع در تیوب‌های استریل شده ۱/۵ میلی‌لیتری قرار گرفته و کدگذاری شدند. بررسی کمیت RNA، جذب نوری نمونه از ۲۶۰ نانومتر تعیین و توسط فرمول زیر تعیین شد:

(میکروگرم بر میلی‌لیتر) غلظت RNA = نمونه $OD_{260} \times 40$. (۱)

کیفیت نمونه‌های RNA روی ژل آگارز بررسی شد. از آنجا که RNA استخراج شده از بافت‌های پارافینه بوده و از کیفیت بالایی برخوردار نیست، باند RNA به صورت اسمیر روی ژل مشاهده می‌گردد (شکل ۱) (۱۳).



شکل ۱. نتایج استخراج RNA روی ژل آگارز ۱ درصد.

به منظور انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR و اطمینان از بیان ژن و همچنین به دست آوردن دمای اپتیموم اتصال آغازگرها واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با شیب دمایی توسط دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت. دما از ۵۶ تا ۶۰ درجه در نظر گرفته شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت 2-Steps RT-PCR kit ساخت شرکت Vivantis انجام گرفت. جهت تأیید سنتز تمامی cDNA توسط آغازگرهای P53 و ژن مرجع واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد. واکنش Real-time PCR جهت بررسی میزان بیان ژن P53 انجام شد. Hot Taq PCR master Mix (n.k) ساخت شرکت

فاکتورهای مهم ایجاد سرطان مری و پیشرفت آن به سوی بدخیمی است (۴). این ژن در تولید بسیاری از پروتئین‌های خاص نقش دارد (۵). مطالعات، ارتباط بین افزایش بیان ژن P53 و کاهش حیات را نشان داده‌اند (۶) در حالی که بعضی مطالعات دیگر، ارتباطی بین آنها نیافتند (۷). تفاوت در استعداد ژنتیکی و میزان مواجه با عوامل تغذیه‌ای و محیطی و خطاهای کروموزومی، منجر به تنوع در بروز و خصایص سرطان‌های مری بر اساس منطقه‌ی جغرافیایی و نژاد می‌گردد (۹). گزارش شده است که جهش روی ژن P53 در سرطان مری در مناطق مختلف مؤید این حقیقت است که بروز جهش در این ژن شدیداً تحت تأثیر عوامل محیطی و شرایط جغرافیایی و قومی است (۱۰). P53 توسط تغییرات بعد از ترجمه (Post-translational changes) پایدار و فعال شده و به شکل کمپلکس‌های تترامر به یکدیگر متصل می‌شوند. در این حالت، P53 با میل ترکیبی بالا به DNAیی که دارای توالی اتصال مشترک (موتیف) باشد، متصل می‌شود. این موتیف غالباً در پروموتورژن دیده می‌شود. بنابراین P53 که به عناصر پروموتوری متصل می‌شود، الفاکنده‌ی قوی بیان ژن می‌باشد (۱۱). فعال شدن P53 توسط شبکه‌ی پاسخ به آسیب‌دیدگی DNA، عوامل محیطی مختلف و وضعیت‌های مختلف سلولی می‌تواند منجر به تغییر ساختار DNA کروموزومی و اشکال در همانندسازی DNA گردند. هدف از انجام این تحقیق، ارزیابی بیان ژن P53 در بیماران مبتلا به سرطان مری جهت پیش‌برد اهداف درمانی می‌باشد. از آنجایی که تفاوت در میزان جهش‌های گزارش شده روی ژن P53 در مناطق مختلف مؤید این حقیقت است که بروز جهش در این ژن شدیداً تحت تأثیر عوامل محیطی، شرایط جغرافیایی و قومی است. با این وجود روش آزمایش و تکنیک شناسایی جهش نیز از اهمیت بالایی برخوردار است. به دلیل اینکه تاکنون هیچ تحقیق و پژوهشی در مورد ژن P53 در بیماران مبتلا به سرطان مری با تکنیک Real-time PCR در ایران انجام نگرفته، ضرورت انجام این تحقیق با روش ذکر شده به شدت احساس می‌گردد. این مطالعه، یک تحقیق همگروهی تاریخی بود که از مهرماه سال ۱۳۹۲ تا خرداد ۱۳۹۳، در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل انجام گردید.

مواد و روش‌ها

گروه مورد مطالعه، نمونه‌های پارافین به تعداد ۱۵ نمونه‌ی سرطانی و ۱۵ نمونه کنترل (سالِم) که از بخش پاتولوژی

RT-PCR، روش مورد تأیید، تکثیر همزمان RNA است که به عنوان استاندارد داخلی به کار می‌رود. برای آنالیز داده‌ها، در صورتی که توزیع نرمال باشد، با توجه به حجم نمونه باید از آزمون‌های آماری غیرپارامتریک استفاده نمود. در این پژوهش، مقایسه‌ی هر کدام از دو گروه ۱۵ نفری بیمار و کنترل، با استفاده از آزمون t-test و نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶)، مورد قضاوت آماری قرار گرفت.

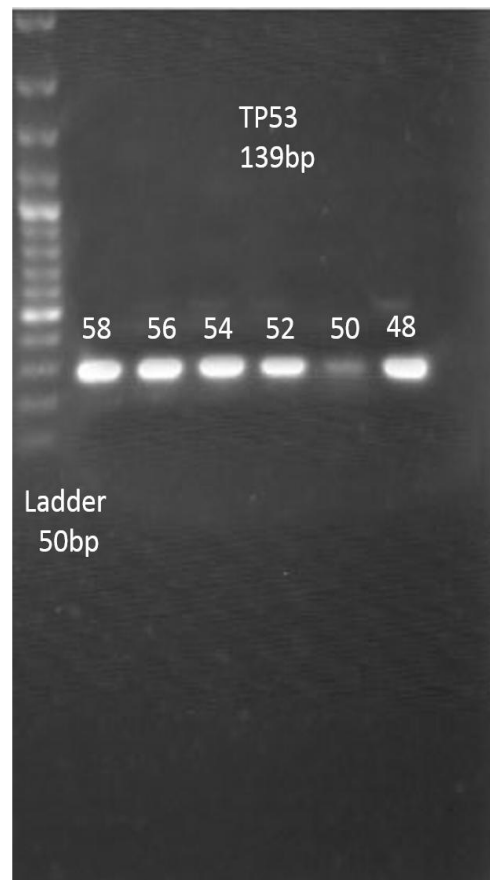
یافته‌ها

تعداد بیماران مرد ۱۱ نفر (۷۳/۳۳٪) و تعداد بیماران زن ۴ نفر (۲۶/۶۶٪) بود. تعداد افراد کنترل نیز ۱۵ نفر بود که در این میان ۶ نفر مرد (۴۰٪) و ۹ نفر زن (۶۰٪) بودند. برای اطمینان از سنتز صحیح cdNA برای تمامی نمونه‌ها توسط هر دو آغازگر ژن *P53* و β -actin انجام گرفت. دمای اتصال ژن *P53* و β -actin به ترتیب در دماهای ۵۸ و ۶۲ درجه سانتی‌گراد به دست آمد (شکل‌های ۲ و ۳).

سیناژن و دستگاه Research RG 3000 Corbett برای انجام این واکنش استفاده گردید. از مهمترین مزایای Real-time PCR ترسیم منحنی ذوب است. با استفاده از این منحنی می‌توان تنوع محصولات را در فرآیند PCR مشخص کرد. برای رسم منحنی، دستگاه دمای نمونه‌ها را در فواصل زمانی مشخص به مقدار معینی تغییر می‌دهد. سرعت تغییرات در محور Y و دمای دستگاه در محور X نشان داده می‌شود. از β -actin به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد و توسط نرم افزار CLC Main work bench5 آغازگرهای آن طراحی و توسط نرم افزارهای آنلاین beacon designer از نظر محل اتصال و ویژگی‌های مطلوب مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت و همچنین توسط NCBI Blast از یکتا بودن محل جفت شدن آغازگرها اطمینان حاصل شد. پردازش اطلاعات در-Real-time PCR بسیار اهمیت دارد. برای بررسی، دو روش وجود دارد: ۱- روش pffafl ۲- روش $\Delta\Delta Ct$ (۱۲). برای کم کردن اشتباهات و همچنین تصحیح تغییرات در مواد آغازکننده در



شکل ۳. تکثیر قطعه ۱۷۰bp مربوط به ژن β -actin

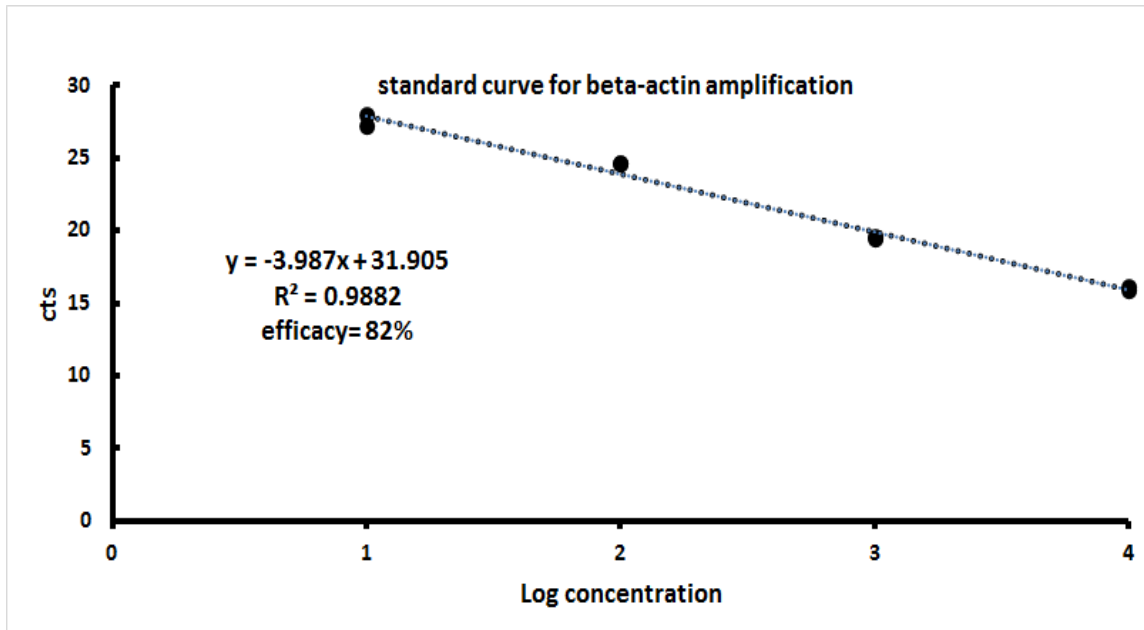


شکل ۲. تکثیر قطعه ۱۳۹bp مربوط به ژن *P53*

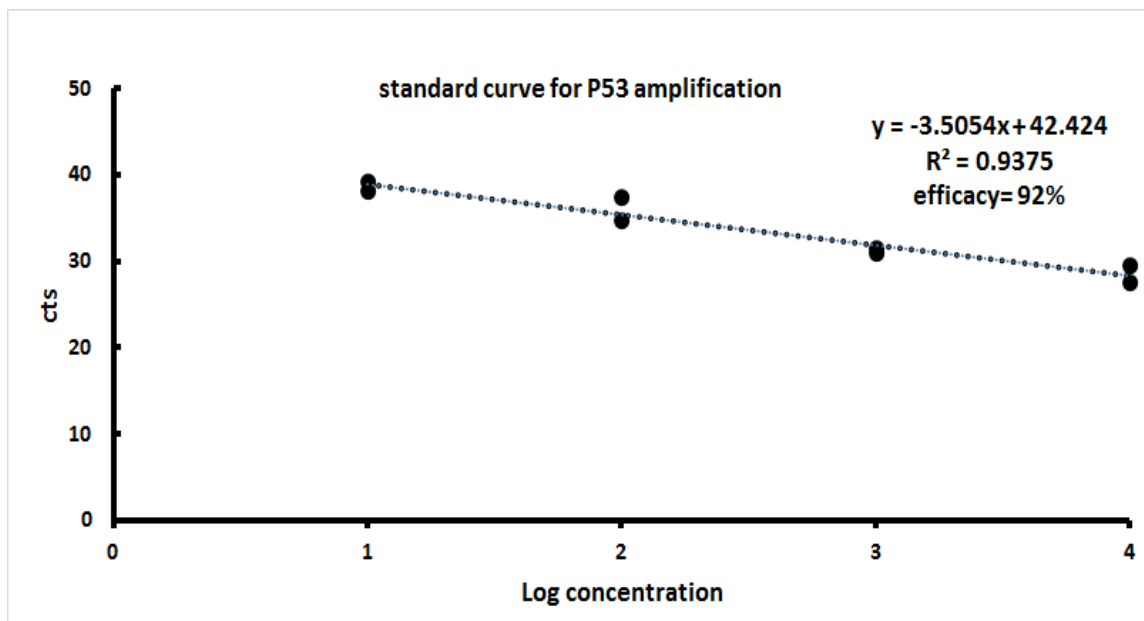
گردید (شکل ۴).

منحنی استاندارد ژن *P53* بر اساس همان رقت‌های تهیه‌شده برای ژن *β-actin*، منحنی استاندارد ژن *P53* نیز رسم شد (شکل ۵). برای ژن *P53* بازده واکنش برابر با ۰/۹۲ و میزان R^2 برابر ۰/۹۳ محاسبه گردید.

منحنی استاندارد ژن *β-actin* پس از انجام واکنش برای تمامی رقت‌های تهیه‌شده با استفاده از آغازگر *β-actin* از روی نمودارهای تکثیر، Ct نمونه‌ها مشخص و سپس منحنی آنها رسم شد (بر اساس Ct در محور Yها و log مقدار کپی در محور Xها). پس از رسم منحنی استاندارد، بازده واکنش برای ژن *β-actin* برابر با ۰/۸۲ و میزان R^2 برابر ۰/۹۸ محاسبه



شکل ۴. منحنی استاندارد ژن *β-actin*



شکل ۵. منحنی استاندارد ژن *P53*

نمونه‌ها ساطع می‌شود اندازه‌گیری خواهد شد. در شکل برای ژن β -actin افت ناگهانی شدت نور فلورسانت در دمایی حدود ۸۳ درجه دیده می‌شود.

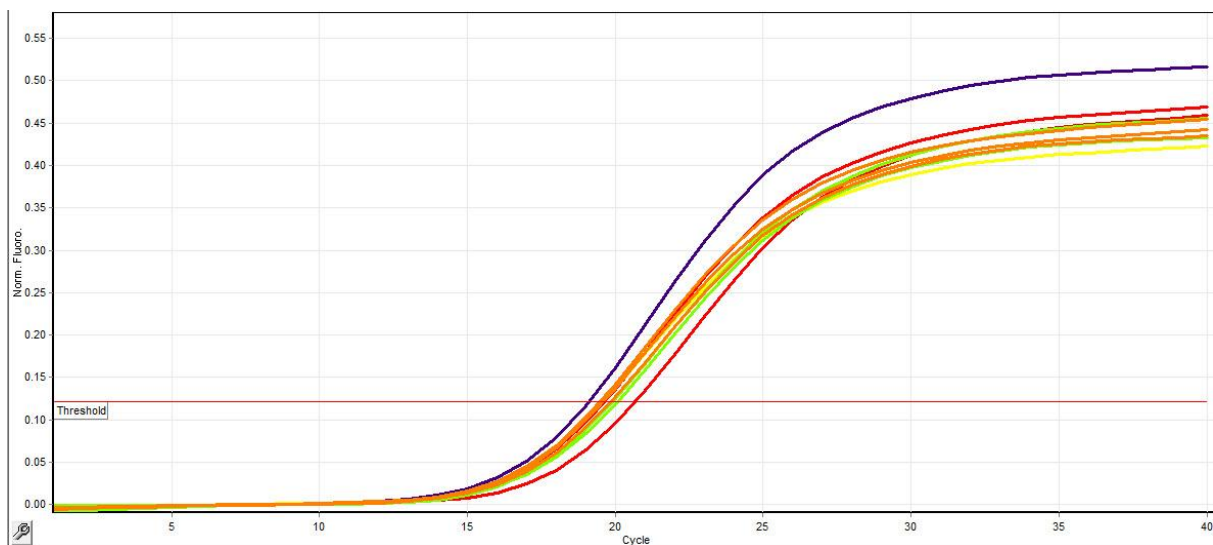
آنالیز منحنی ذوب ژن β -actin در این منحنی هر پیک نمایانگر یک محصول است. پیک ذوب نیز شامل یک پیک در دمای ۸۳ درجه بود که T_m محصول ژن β -actin می‌باشد. منحنی تغییرات ذوب برحسب دمای ژن. شکل‌های ۱۰ و ۱۱، نتایج حاصل از تغییرات ذوب برحسب دمای ژن *P53* را نشان می‌دهد ($T_m=81^\circ\text{C}$).

نتایج واکنش Real-time PCR جهت انجام واکنش Real-time PCR، میزان بهینه‌ی مصرف cDNA مشاهده شد.

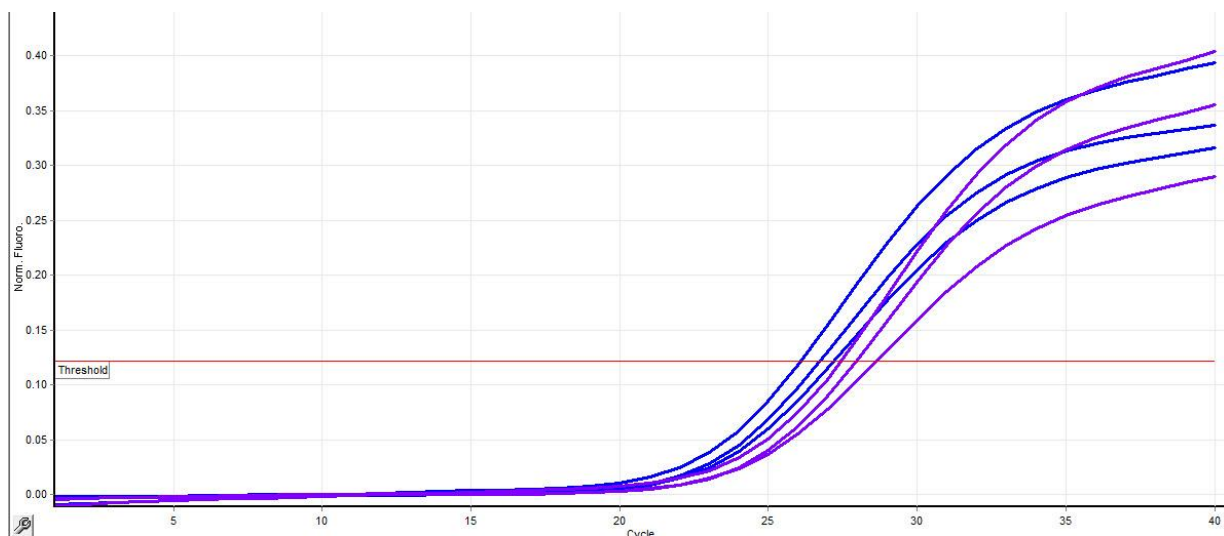
تکثیر ژن β -actin در شکل ۶، منحنی پیشرفت واکنش تکثیر ژن β -actin در طول هر سیکل، نشان داده شده است. تکثیر ژن *P53* در شکل ۷ منحنی پیشرفت واکنش تکثیر ژن *P53* در طول هر سیکل، نشان داده شده است.

نتایج آنالیز منحنی ذوب:

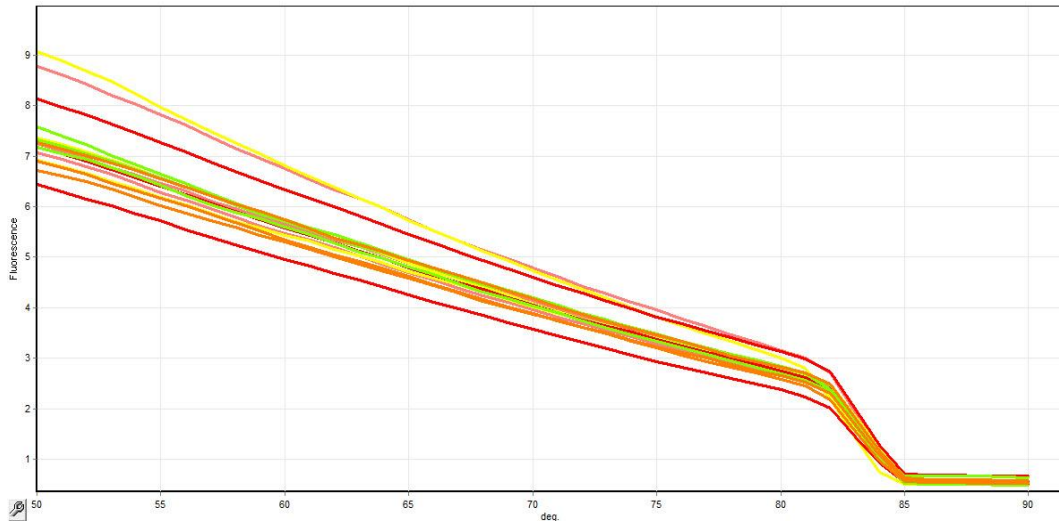
منحنی تغییرات ذوب بر حسب دمای ژن β -actin برای رسم نمودار، دمای نمونه‌ها افزایش پیدا کرده و نوری که از



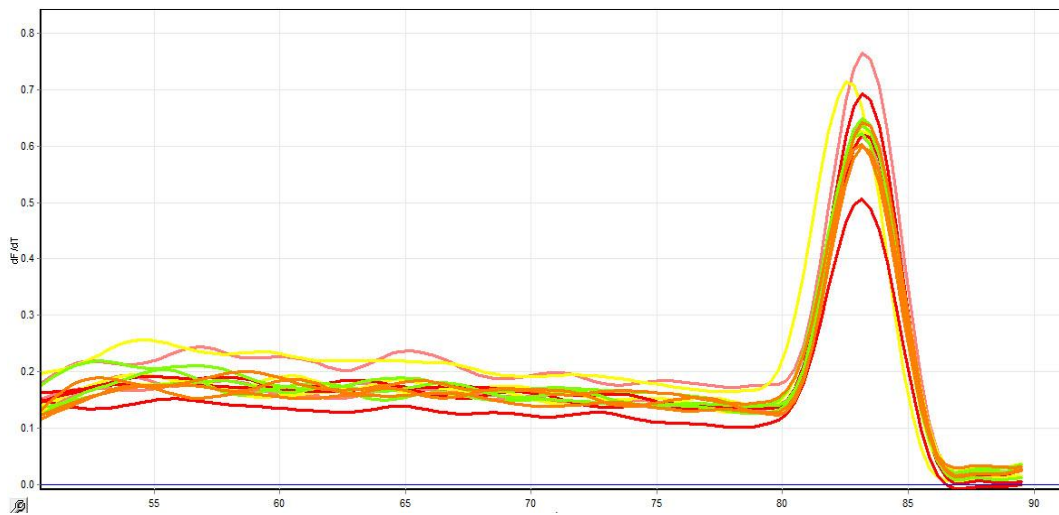
شکل ۶. منحنی تکثیر ژن β -actin در این منحنی، شماره‌ی سیکل در محور افقی و شدت نور فلورسانت در محور عمودی قرار می‌گیرد.



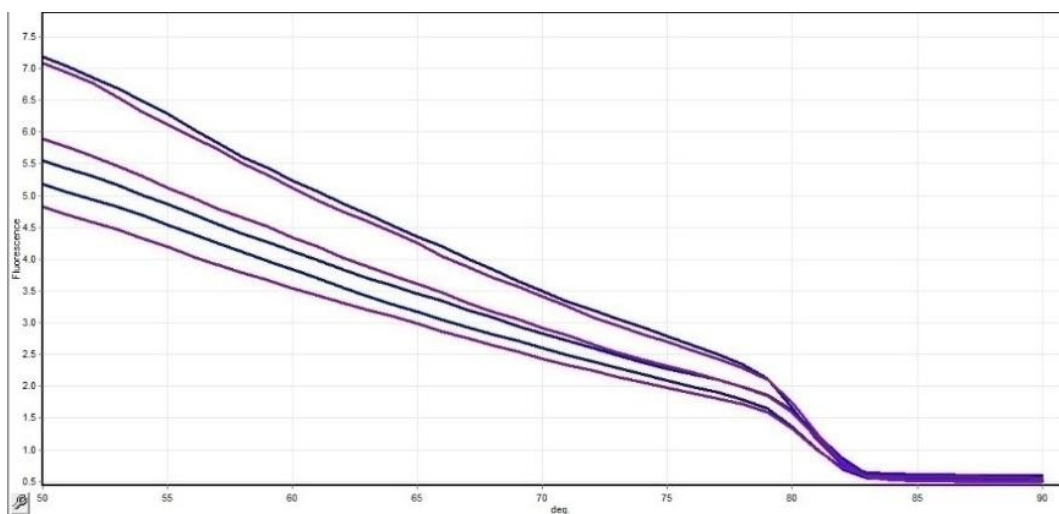
شکل ۷. منحنی تکثیر ژن *P53*



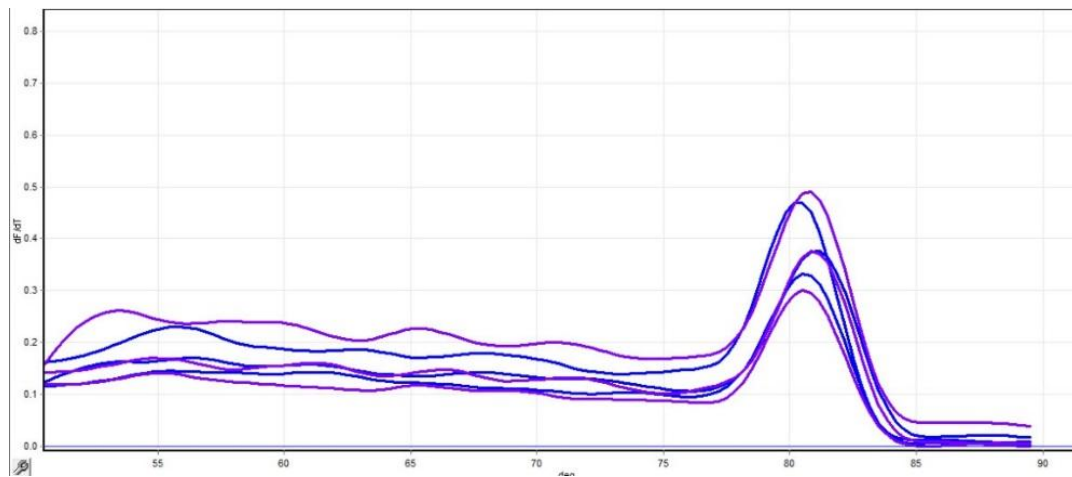
شکل ۸. تغییرات فلورسانس بر حسب دما برای ژن *β-actin*. دما در این منحنی در محور افقی و شدت نور فلورسانس در محور عمودی قرار دارد.



شکل ۹. منحنی ذوب ژن *β-actin*. هر پیک نمایانگر یک محصول PCR است.



شکل ۱۰. تغییرات فلورسانس بر حسب دما برای ژن *P53*. در این منحنی دما در محور افقی و شدت نور در محور عمودی قرار دارد.



شکل ۱۱. منحنی ذوب ژن P53، دمای حدود ۸۱ درجه سانتی‌گراد، Tm محصول ژن P53 می‌باشد.

مشاهده شده است. در واقع، تغییرات ژنتیکی P53، پیشگوی مناسبی برای پاسخ درمانی و بقا می‌باشد (۲). Tagwa در ژاپن نشان داد که وقتی سلول‌های سرطانی دارای جهش در P53 باشند، نسبت به شیمی درمانی، بسیار آسیب‌پذیر خواهند شد (۱۵). کلید نهایی فعال شدن P53 تغییر در ساختمان کروموزوم است. در هنگام فعال شدن پروتئین‌های با تکثیر یک قطعه کروموزومی تعداد نسخه‌های یک ژن افزایش می‌یابد که موجب افزایش بیان ژن می‌شود و در پیشرفت تومور و ایجاد بدخیمی نقش دارد (۳). بنابراین نمی‌توان با قطعیت در مورد ارتباط افزایش بیان و میزان پیشرفت بیماری نظری را اعلام کرد. بروز ناگهانی سرطان نیازمند تجمع جهش‌های متعددی در سطح ژنوم یک سلول است که به سلول اجازه‌ی شکستن شبکه تنظیمی سلول‌های آن ارگانیزم است (۱۶). شاید بیان بیش از حد P53 نتیجه‌ی رونویسی بالای این ژن باشد. افزایش رونویسی این ژن می‌تواند ناشی از جهش‌های فعال‌کننده در ژن‌های کنترل‌کننده‌ی بیان ژن P53 باشد. همچنین بازآرایی‌های کروموزومی از جمله تکثیر ناحیه‌ی کروموزومی ژن P53 در بازوی کوچک کروموزوم ۱۷ است. با تکثیر یک قطعه‌ی کروموزومی، تعداد نسخه‌های یک ژن افزایش می‌یابد که موجب افزایش بیان ژن می‌شود. همچنین ما در این مطالعه جهت تأیید صحت عمل Real-time PCR، محصول تکثیر شده برای هر دو ژن توسط این روش را جهت توالی‌یابی ارسال داشتیم. معمولی‌ترین روش‌هایی که امروزه به منظور بررسی بیان ژن و تکثیر ژن استفاده می‌شوند، تکنیک‌های ایمونوهیستوشیمی (IHC) و Fluorescence in situ hybridization (FISH) می‌باشند. تکنیک IHC دقت

تفاوت معنی‌داری در میزان بیان ژن P53 در افراد بیمار و سالم گروه‌های مورد مطالعه وجود داشت. اختلاف نسبتاً زیادی بین افراد بیمار و سالم در بیان ژن P53 وجود دارد، به طوری که بیان ژن P53 در افراد بیمار، ۱۲ برابر بیشتر از افراد سالم بود ($P < 0.05$) (جدول ۱).

جدول ۱. میانگین ΔCT ژن P53 در دو گروه بیمار و سرطان مری.

گروه	ΔCT
کنترل	4.47 ± 0.22
سرطان	0.37 ± 0.41
نتیجه آزمون	$P < 0.05$

بحث

تحقیق نشان داد که میزان بیان ژن در افراد بیمار، ۱۲ برابر بیشتر از افراد سالم می‌باشد. در این مطالعه، بیان ژن P53 با استفاده از روش RT-qPCR روی ۱۵ نمونه توموری و ۱۵ نمونه سالم بررسی گردید. نتایج این تحقیق مشابه، نتایج Davidoff و همکارانش می‌باشد که نشان دادند بیان ژن P53 در بیماران مبتلا به سرطان پستان، افزایش بیان نشان می‌دهد (۱۴). مطالعات نشان می‌دهد چندین انکوژن و ژن سرکوب‌کننده‌ی تومور به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم، در توسعه و پیشرفت سرطان شرکت می‌کنند. اختلاف‌های ژنتیکی این ژن‌ها همچنان به درک صحیحی از سرطان کمک می‌کند (۱). P53 از نمونه‌های مرسوم ژن‌های سرکوب‌گر تومور می‌باشد که مطالعات نقش جهش این ژن را در مراحل آغازین سرطان نشان داده است. ناهنجاری‌های P53 در ۴۰ تا ۶۰ درصد بیماران سرطانی و حتی در ضایعات پیش سرطانی ژن

اجازه‌ی تجزیه و تحلیل مایعات بدون سلول، مانند سرم، که هنوز هم می‌تواند شامل DNA از منابع سلولی دیگر باشد را فراهم می‌نماید. (۵) توانایی روش qPCR برای شناسایی تغییرات کمی بیان ژن‌ها در سلول‌های سرطانی که در سلول‌های طبیعی دیده نمی‌شود (۱۶). نتایج حاصل از این پژوهش و استفاده از qPCR، افزایش بیان ژن P53 را در بیماران مبتلا به سرطان مری مورد مطالعه نشان داد که مشابه نتایج Scian و همکارانش می‌باشد (۱۷). از طرفی آنها نشان دادند که افزایش بیان ژن جهش یافته P53 در H1299 cells (lung carcinoma) و القای عدم حساسیت به دارو می‌تواند از طریق مسیر NF-kB2 باشد.

نتیجه‌گیری

بیان ژن P53 در مبتلایان به سرطان مری به مراتب بیشتر از افراد سالم می‌باشد. از آنجایی که تاکنون هیچ تحقیق و پژوهشی در مورد ژن P53 در بیماران مبتلا به سرطان مری با تکنیک RT-qPCR در ایران انجام نگرفته و این اولین گزارش می‌باشد و با توجه به تعداد محدود نمونه‌ها (Qualitative Research) لذا پیشنهاد می‌گردد این پژوهش روی تعداد بیشتری از بیماران (Quantitative Research) صورت گیرد.

پایینی داشته و نتایج مثبت کاذب بسیاری در بیماران ارایه می‌دهد. آنالیز بیان ژن می‌تواند در فراهم کردن اطلاعاتی در زمینه‌ی عوامل مؤثر در پیش‌آگهی بیماری مفید واقع شود. در پژوهش حاضر، از بتا-اکتین به عنوان ژن مرجع استفاده شد زیرا این ژن نسبت به 18S rRNA و GAPDH از نظر بیان در بافت مری، ثبات بیشتری نشان می‌دهد و قابل اطمینان‌تر برای نرمال‌سازی محسوب می‌شود (۱۶). اندازه‌گیری تعیین سطح بیان ژن و نیز مقدار و بازآرایی ژن در تحقیق و در یک محیط تشخیصی و کلینیکال اونکولوژی، بسیار حایز اهمیت است. از سوی دیگر اندازه‌گیری کمی و کیفی بیان اونکوژن‌ها، پروتئوونکوژن‌ها و تومورسایپرسور ژن‌ها در هر مرحله از تومورزایی بسیار حایز اهمیت است. تکنیک qPCR امروزه یک روش تثبیت شده و بسیار قدرتمند جهت نیل به اهداف یادشده می‌باشد که عدم اجرای آن در پژوهش‌ها، نتایج بیان ژن و بررسی‌های بیولوژی ملکولی و پزشکی ملکولی، ناقص خواهد بود. qPCR دارای مزیت‌های ذیل نسبت به Southern blotting، FISH و LOH می‌باشد: (۱) آمپلیفیکاسیون و حذف ژنی، هر دو توسط آن قابل اندازه‌گیری می‌باشد. (۲) تنها مقدار کمی از DNA برای این روش مورد نیاز است. (۳) لذا مقدار کمی از DNA استخراج شده که می‌تواند از منابعی مانند سرم و رسوب ادرار باشد برای این روش کافی است. (۴) تنها DNA برای تجزیه و تحلیل مورد نیاز است، در نتیجه

REFERENCES

- Motaleb G, Gholipour N, Samaei NM. Association of the human astrocyte elevated gene-1 promotor variants with susceptibility to hepatocelhila carcinom. *Med Oncol* 2014; 31: 916.
- Kamangar F, Malekzadeh R, Dawsey SM, Saidi F. Esophageal cancer in northeastern Iran: a review. *Arch Iran Med* 2007; 10 (1): 70-82.
- Pappou E, Ahuja N. The role of oncogenes in gastrointestinal cancer. *Gastrointest Cancer Res* 2010; 1: S2-S15.
- Xu Xc. Risk factors and gene expression in esophageal cancer. *Methods Mol Biol* 2009; 471: 335-60.
- Hollstein M, Hergenhahn M, Yang Q, Bartsch H, Wang ZQ, Hainaut P. New approaches to understanding p53 gene tumor mutation spectra. *Mutat Res* 1999; 431(2): 199-209.
- Hashemzadeh Chaleshtori M. Application of molecular genetics to the study of human diseases. A thesis submitted in partial full filament of the requirements for the degree of Doctor of Biology, School of Biological Sciences University of Wales Swansea; 1997.
- Yamada Y, Yoshida T, Hayashi K, Sekiya T, Yokota J, Hirohashi S, *et al.* P53 gene mutations in gastric cancer metastases and in gastric cancer cell lines derived from metastases. *Cancer Res* 1991; 51(21): 5800-5.
- Demester SR. Epidemiology and biology of esophageal cancer. *Gastrointest Cancer Res* 2009; 3(2suppl): S2-S5.
- Jobe B, Hunt J, Thomac C. Esophageal tumors: principles and practice. New York: Demos Medical Publishing; 2009. p. 27-33.
- Saffari Chaleshtori J, Moradi MT, Farrokhi E, Tabatabaiefar MA, Taherzadeh Farrokshahri M, Shayesteh F. Study of two common P53 gene mutations in gastric cancer using PCR-RFLP in Chaharmahal va Bakhtiari province, Iran, 2003. *Shahrekord Univ of Med Sci J* 2009; 10(4): 43-50. (Full Text in Persian)
- Giacinti C, Kastan MB. The complexity of P53 modulation: Emerging patterns from divergent signals. *Genes* 1998; 12: 2973-83.

12. Pavelik K, Krizanac S, Cacev T, Popovichadzija M, Radosevic S, Crnic I, *et al.* Aberration of FHIT gene is associated with increased tumor proliferation and decreased apoptosis clinical evidence in lung and head and neck carcinomas. *Mol Med* 2001; 7: 442-53.
13. Zhang F, Wang Z, Liu H, Wei S, Li Y, Wang N, *et al.* Application of RT-PCR in formalin fixed and paraffin embedded lung cancer tissues. *Acta Pharmacol Sinica* 2010; 31: 111-7.
14. Davidoff AM, Humphery PM, Iglehart J, Marks JR. Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5006-10.
15. Noori Dalooi MR, Alvandi E. Micro RNA: Little but a mysterious method. *Tehran Univ Med* 1385; 64(6): 5-19.
16. Loeb KR, Loeb LA. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21: 379-85.
17. Chiang PW, Beer DG, Wei WL, Orringer MB, Kurnit DM. Detection of erbB-2 amplifications in tumors and sera from esophageal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1381-6.