Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 1:41 +0330 on Thursday November 23rd 2017

مقاله پژوهشی

بررسی پلی مورفیسم اینترون ۳ ژن P53 در نمونه های سرطانی پستان در اصفهان

دکتر معصومه فغانی*، دکتر فهیمه محمدقاسمی*، دکتر ابراهیم نصیری*، دکتر مهدی نیکبخت**

دریافت : ۸۸/۶/۱۷ ، پذیرش : ۸۸/۱۰/۷

چکیده:

مقدمه و هدف: عوامل ژنتیکی مانند ژن P53 نقش مهمی در ایجـاد سـرطان دارنـد. موتاسـیون و پلـی مورفیـسم روی عملکـرد پروتئین P53 در سرکوب تومور اثر می گذارد. هدف از این مطالعـه تعیـین پلـی مورفیـسم اینتـرون ۳ ژن P53 در کارسـینومای مجرایی مهاجم پستان می باشد.

روش کار: در این مطالعه مورد ـ شاهدی ۹۶ نمونه سرطانی از نوع کارسینومای مجرایـی مهـاجم و ۹۶ نمونـه کنتـرل در شـهر اصفهان بررسی گردید. ژنوتیپ های مختلف ژن P53 با استفاده از واکـنش زنجیـره ای پلیمـراز (PCR) تعیـین شـد و از آزمـون مجذور کای برای تحلیل آماری داده ها استفاده گردید.

نتایج : توزیع ژنوتیپی این پلی مورفیسم ژن P53 در گروه کنترل برای ژنوتیپ هـای A1/A2, A1/A1 بـه ترتیـب ۵۷/۳٪ و ۴۲/۷٪ بود. توزیع ژنوتیپ مورد نظر در گروه سرطانی شامل ۸۵/٤٪ ژنوتیپ A1/A2 و ۱٤/۶٪ ژنوتیپ A1/A1 بود. اختلاف بین توزیع این پلی مورفیسم ژن P53 در گروه کنترل و سرطانی معنی دار بود (P<0.001).

نتیجه نهایی: یافته ها نشان داد که پلی مورفیسم ژن P53 احتمالا یک عامل ژنتیکی مستعد کننده برای ابتلا به کارسینومای مجرایـی مهاجم پستان می باشد و بهتر است این پلی مورفیسم را به عنوان یک مارکر مولکولی در بررسی ژنتیکی بیماران مبتلا به سرطان پستان در نظر گرفت.

کلید واژه ها : اینترون ۳ / پلی مورفیسم / سرطان پستان / ژن سرکوب کننده تومور P53

مقدمه :

سرطان همواره یکی از مشکلات عمده جوامع انـسانی محـسوب مـی شـود. از بـین سـرطانها، سـرطان پـستان شایعترین سرطان درمیان زنـان مـی باشـد (۱،۲) و اغلـب موارد سرطانهای پستان منجر به مرگ، از نوع کارسینومای مجرایی مهاجم است(۳). عوامل متعددی فرد را در معرض ابتلا به سرطان قرار می دهد کـه از بـین آنهـا میتـوان بـه تغییرات ژنتیکـی، رژیـم غـذایی، شـیردهی و فاکتورهـای محیطی اشاره نمود. مهمترین عاملی که موجـب ابـتلا بـه سرطان می شود تغییرات ژنتیکی در ژنهـای مهمـی مثـل ژنهای سرکوب کننده تومور، تنظیم کننده رشد و انکوژنها می باشد(۴). علیرغم آمار جهانی پایین تر ابتلا به سـرطان در کـشورهای آسـیایی نـسبت بـه کـشورهای اروپـایی و امریکای شمالی(۲) آمار ابـتلا بـه سـرطان در کـشور مـا و بویژه در اصفهان بالا می باشد (۵،۶) که شاید بتـوان آن را ناشی از تفاوتهای نژادی و جغرافیایی دانست .

ژن P53 به عنوان مهمترین ژن سرکوب کننده تومور روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۱۷ واقع اسـت و دارای ۱۱ اگـزون و۱۰ اینتـرون مـی باشـد(۷). ایـن ژن نقـش کلیدی در حفظ تمامیت ژنوم دارد و ازتکثیر سـلول دارای DNA آسـیب دیـده جلـوگیری مـی کنـد بـدین سـبب غیرفعـال شـدن ژن در ایجـاد تومـور نقـش دارد(۸). موتاسیون و حذف شده گی P53 یک آسیب شایع ژنتیکی در اغلب سرطانها می باشـد، سـرطان پـستان بـا تغییـرات ژنتیکی سوماتیک مانند موتاسـیون در انکوژنهـا و ژنهـای سرکوب کننده تومور مرتبط است(۹،۱۰)و در حـدود ۴۰٪ موارد کارسینوماهای پـستان دارای ژن جهـش یافتـه P53 می باشند(۱۱). گزارش شده است که علاوه بر موتاسـیون،

* استادیار گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان(mfaghani@gums.ac.ir)

** دانشیار گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 1:41 +0330 on Thursday November 23rd 2017

پلی مورفیسم هم روی عملکرد ژن تاثیر می گذارد(۱۲) ۱۴ نوع پلی مورفیسم در ژن P53 گزارش شده است که شایعترین آنها پلی مورفیسم کدون ۷۲ ، اینترون۳ و اینترون۶ می باشد(۱۳). پلی مورفیسم ژنتیکی ژن P53 ممکن است تعیین کننده حساسیت افراد در سرطان هایی مانند پستان(۱۴،۱۵) کولورکتال(۱۶) ریه(۱۷) و مثانه(۱۸) باشد. بیان شده است که پلی مورفیسم اینترون ۳ ژنP53 در ایجاد سرطان پستان فامیلی دخالت دارد(۲۱-۱۹).

با توجه به مطالعات انجام شده روی پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P53 روی سرطان پستان در ایران (۱۴،۲۲) و گزارشات ضد و نقیض موجود در مورد ارتباط پلی مورفیسم اینترون ۳ با خطر ابتلا به سرطان(۲۰،۲۲) این مطالعه با هدف تعیین پلی مورفیسم اینترون ۳ ژن P53 در نمونه های سرطانی پستان در شهر اصفهان انجام گرفت.

روش کار:

در این مطالعه مورد شاهدی ۹۶ فرد مبتلا به سرطان پستان از نوع کارسینومای مجرایی مهاجم و ۹۶ نمونه کنترل بررسی گردید. روش نمونه گیری از نوع آسان و افراد گروه کنترل از نظر سن و جنس با گروه سرطانی همانند انتخاب شدند و ضایعه شناخته شده سرطانی نداشتند. از افراد هر دو گروه برای انجام نمونه گیری رضایتنامه دریافت گردید.

برای استخراج DNA از نمونه خون استفاده شد. با استفاده از کیت استخراج DNA کمپانی Roche و دستورالعمل آن DNA استخراج گردید و برای تعیین غلظت DNA استخراج شده از اسپکتروفتومتر و تعیین جذب نوری (OD) ۲۶۰/۲۸۰ استفاده گردید که در نمونه های این تحقیق میزان آن ۱/۴ تا ۱/۸۵ بود.

برای بررسی پلی مورفیسم اینترون ۳ ژن P53 از PCR استفاده گردید. بعد از بهینه سازی PCR، با استفاده از ۲۰۰-۱۰۰ نانوگرم DNA ، ۱ واحد تک پلی مر از ، ۱/۵ میلی مولار MgCl2 ، ۲۰ میکرومولار از هر یک ازdATP ، dCTP ، dTTP، dGTP و ۲ میکرومولار از زوج پرایمرهای اختصاصی ، برای مشخص نمودن 16bp duplication در اینترون ۳ ژن P53 ، PCR انجام شد.

توالی پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر اینترون ۳ ژن P53 عبارتند از(۲۳):

پرایمر Forward : 5′-CTGAAAACAACGTTCTGGTA-3′

پرایمرReverse : 5′-AAGGGGGACTGTAGATGGGTG-3′

تنظیم دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر توالی پلی مورفیک اینترون ۳ ژن P53 به ترتیب زیر انجام گرفت:

مرحله اول : Denaturation ابتدایی با دمای $95^{\circ}c$ به مدت ۵ دقیقه

مرحله دوم: شامل۳۵ سیکل است و هر سیکل از سه بخش زیر تشکیل میشود:

الف- Denaturation با دمای $94^{\circ}c$ به مدت ۳۰ ثانیه

ب- Annealing با دمای $60^{\circ}c$ به مدت ۳۰ ثانیه

ج- Extension با دمای $72^{\circ}c$ به مدت ۶۰ ثانیه

مرحله سوم: Extension نهایی با دمای $72^{\circ}c$ به مدت ۵ دقیقه

بعد از اتمام کار محصول PCR تا زمان الکتروفورز در یخچال نگهداری شد. برای مشخص نمودن تکثیر اینترون ۳ ژن P53 ابتدا محصولPCR روی ژل آگاروز ۲٪ برده شد. سپس برای مشخص نمودن وجود آلل A1 (Wild type) بدون 16bp duplication (با اندازه ۱۱۹ bp) و آلل A2 دارای 16bp duplication (با اندازه ۱۳۵bp) محصول PCR روی ژل پلی اکریل آمید ۱۵٪ برده شد و توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید.

شیوه تجزیه و تحلیل داده ها: اطلاعات بدست آمده از طریق نرم افزار SPSS ، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. برای مقایسه توزیع فراوانی سه ژنوتیپ مختلف اینترون ۳ در نمونه های سرطانی با توزیع فراوانی این سه ژنوتیپ در نمونه های شاهدازChi-squared test استفاده شد وP-Value کوچکتر از 0.05 معنی دار در نظر گرفته شد.

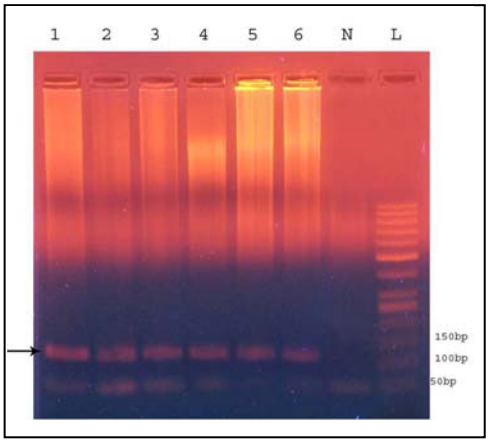
نتایج:

برای انجام این مطالعه ۱۲۵ نمونه جمع آوری گردید. تعدادی از نمونه ها بدلیل نداشتن شرایط مناسب حذف شدند و در نهایت ۹۶ عدد مورد بررسی قرار گرفتند. سن نمونه ها بین ۷۹-۲۳ سال بود و نمونه های توموری از نوع کارسینومای مجرایی مهاجم (invasive ductal carcinoma) انتخاب شدند.

نتایج بدست آمده در خصوص محصول PCR تکثیر یافته اینترون ۳ ژن P53 در ژل پلی آکریل آمید ۲٪ در شکل ۱ و محصول تکثیر یافته آن در ژل پلی آکریل آمید

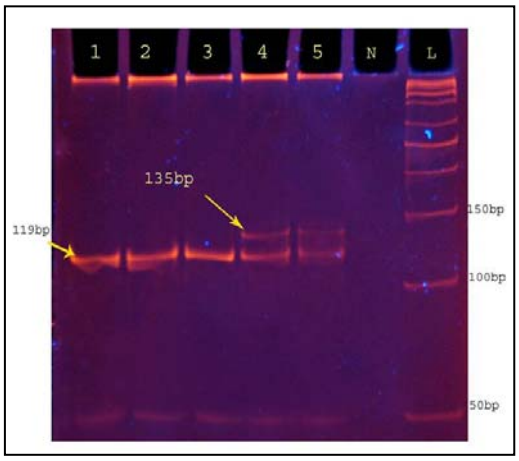
Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 1:41 +0330 on Thursday November 23rd 2017

۱۵٪ در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR برای تکثیر اینترون ۳ ژن P53 در ژل آگاروز ۲٪

درشماره ۱ تا ۶ وجود باند نشاندهنده تکثیر اینترون ۳ ژن P53 می باشد
N : نمونه کنترل منفی
L : استاندارد وزن ملکولی DNA
باند پائین ژل ، پرایمر دایمر می باشد



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR برای تکثیر اینترون ۳ ژن P53 در پلی اکریل آمید ۱۵٪

نمونه های شماره ۱ ، ۲ و۳ دارای آلل A1 می باشند
نمونه های شماره ۴ و ۵ دارای آلل A1 و A2 هستند
N: نمونه کنترل منفی
L: استاندارد وزن ملکولی DNA
باند پائین ژل ، پرایمر دایمر می باشد

توزیع سه ژنوتیپ اینترون ۳ ژن P53 در گـروه بیمـاران و کنترل در جدول ۱ خلاصه شده است. در تجزیه و تحلیل داده ها اختلاف معنی دار آماری در توزیع ژنوتیپی اینترون ۳ ژن P53 در گروه بیماران و کنترل وجود داشت. ژنوتیپ A1/A2 در۸۲ نفر ازافراد گروه بیمـاران وجـــود داشت در حالیکه ۵۵ نفر از افـراد گـروه کنتـرل دارای ایـن ژنوتیـپ بودند، فراوانی ژنوتیپ A1/A1 در گروه بیماران ۱۴/۶٪ بود ولی درگروه کنترل ۴۲/۷٪ ازافراد دارای این ژنوتیپ بودند. فراوانی آلل A1 درگروه بیماران ۰/۴۲۷ و در گروه کنتـرل ۰/۷۱۳ بود. میـزان آلـل A2 در گـروه بیمـاران ۰/۵۷۳ در حالیکه در گروه کنترل ۰/۲۸۷ بود. بین توزیـع آلـل هـای A1 و A2 در گـروه بیمـاران و کنتـرل تفـاوت معنـی دار آماری وجود داشت.

جدول ۱: توزیع فراوانی ژنوتیپ های مختلف اینترون ۳ ژن P53 در گروههای کنترل و بیماران

	بیمار	کنترل	
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	ارزش P
آلل			
A_1	۸۲ (۴۲/۷)	۱۳۷ (۷۱/۳)	0.04
A_2	۱۱۰ (۵۷/۳)	۵۵ (۲۸/۷)	Odds= 1.48, 0.97-2.42
ژنوتیپ			
A_1/A_1	۱۴ (۱۴/۶)	۴۱(۴۲/۷)	0.001
A_1/A_2	۸۲ (۸۵/۴)	۵۵(۵۷/۳)	Odds= 4.36, 2.17-8.76

بحث:

با وجود مطالعات گسترده روی پلـی مورفیـسم هـای شایع ژن P53 ماننـد کـدون ۷۲، اینتـرون ۳ و اینتـرون ۶ نقش این پلی مورفیسم ها در کارسینوژنز پستان هنوز مورد بحث است. تفاوتهای اینترونی ژن P53 هماننـد تفاوتهـای ژنتیکـی در کـدون۷۲ روی عملکـرد پـروتئین در چرخـه سلولی ،آپوپتوز و ترمیم DNA تاثیر می گذارد (۲۴).

چون پلی مورفیـسم بـه نـژاد و موقعیـت جغرافیـایی بستگی دارد(۲۵) بر خلاف یافته های ایـن تحقیـق، نتـایج مطالعه بویرو و همکارانش در ترکیه (۲۴) روی زنان مبـتلا بـه سـرطان پـستان نـشان داد کـه بـین پلـی مورفیـسم اینترون۳ ژن P53 و سرطان پستان ارتباط وجود ندارد که ممکن است اختلافات نژادی علت وجود این تفاوت باشد.

در مطالعه دیگری کـه توسـط پـاول و همکـارانش در استرالیا برروی ۷۴ بیمار مبتلا به سرطان پستان انجام شد در ۹۸/۴٪ از بیماران ژنوتیـپ A1/A2 وجـود داشـت(۲۶) ایشان مشخص نمودند که ایـن پلـی مورفیـسم بـا درجـه هیستولوژیکی تومور ارتباط دارد ولی با خصوصیات کلینیکی و پاتولوژیکی تومورها از جمله رسـپتور اسـتروئید ، انـدازه تومور و درگیری گره های لنفاوی ارتباط ندارد. در مطالعه ما ارتباط بین این پلی مورفیسم با خصوصیات هیستولوژیکی، کلینیکی و پاتولوژیکی تومورها بررسی نشـــد و لازم است

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 1:41 +0330 on Thursday November 23rd 2017

این موارد در مطالعات بعدی مورد بررسی قرار گیرد.

بر اساس گزارش ماهاسنه و همکارانش در بررسی پلی مورفیسم اینترون۳ ژن P53 در افراد مبتلا به سرطان پستان و ریه در دو نژاد Charkas و Bedouin شیوع این پلی مورفیسم در نژادهای مختلف حتی در مناطق مختلف یک کشورهم یکسان نیست(۲۵). برخلاف یافته های ما که میزان آلل A2 (دوتایی شدن توالی ۱۶bp در اینترون شماره ۳) در نمونه های سرطانی از نمونه های گروه کنترل بیشتر بود (۰/۵۷۳) و این موضوع موجب افزایش میزان ژنوتیپA1/A2 در گروه بیماران شده بود در تحقیق فوق الذکر فراوانی ژنوتیپ A1/A1 بیشتر از ژنوتیپ A1/A2 گزارش شده است.

از سوی دیگر در تائید نتایج بدست آمده در مطالعه ما، وانگ و همکارانش (۱۷) پلی مورفیسم اینترون۳ ژن P53 را در ۵۶۳ زن مبتلا به سرطان پستان در آلمان بررسی کردند. نتایج تحقیق آنان نشان داد که آلل A2 خطر ابتلا به سرطان پستان در زنان بالای ۵۰ سال و دارای فامیل درجه یک مبتلا به سرطان را ۵/۳ برابر افزایش می دهد، همچنین در افراد بدون تاریخچه خانوادگی نیز خطر ابتلا به سرطان۱/۷ برابر افزایش داشت(P<۰/۰۴). در مطالعه ما نیز میزان آلل A2 درگروه بیماران بیشتر از گروه کنترل بود و این نشان می دهد که شاید این آلل با خطر ایجاد سرطان ارتباط داشته باشد ، البته برای اثبات این ارتباط نیاز به انجام مطالعات گسترده تری می باشد.

نتیجه نهایی:

با توجه به یافته های این تحقیق فراوانی آلل A2 در افراد گروه بیمار بیشتر (۰/۵۷۳) از گروه کنترل (۰/۲۸۷) بود(P<۰/۰۰۱). از سوی دیگر در بررسی پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P53 در نمونه های سرطانی پستان در اصفهان(۱۲) ۷۰/۸٪ از نمونه های سرطانی در مقایسه با ۳۶/۵٪ از افراد گروه کنترل دارای ژنوتیپ آرژینین/آرژینین بودند (P<۰/۰۰۱) چون این ژنوتیپ با رشد سریعتر تومور و خصوصیات تهاجمی بیشتر آن ارتباط دارد(۲۷) و نیز موجب تغییر فعالیت آپوپتوزی ژن P53 می شود(۱۰) به نظر می رسد که این دو پلی مورفیسم احتمالا با هم روی بروز سرطان تاثیر گذاشته باشند. پس می توان با مشخص نمودن این دو پلی مورفیسم ژن P53 ، افراد در معرض خطر برای ابتلا به سرطان پستان را غربالگری کرد. مسلم است که تشخیص زود هنگام سرطان نقش مهمی در درمان بیماری دارد و با تشخیص به موقع بیماری، می توان کمک موثری در درمان این بیماران نمود.

سپاسگزاری :

منابع مالی این پژوهش در غالب طرح تحقیقاتی توسط دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تامین شده است و بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی و گروه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان سپاسگزاری می گردد.

منابع :

1. Ferlay J, Bray F, Pisane P, Parkin DM. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, Lyon: Globocan IARC Press, 2000.
2. Albano JD, Ward E, Jemal A, Anderson R, Cokkinides VE. Cancer mortality in the United States by education level and race. J Natl Cancer Inst 2007; 99(18):1384-94.
3. Li Ci, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristic of different histologic types of breast cancer. Br J Cancer 2005; 93:1046-52.
4. Turnpenny PD, Ellard S. Emery's elements of medical genetics. 13th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2007:192-219.
5. Asadpour A. [Isfahan: First degree of cancer in Iran]. Jame Jam 2007: 15. (Persian)
6. [Breast cancer age in Iran is 10 years lower than the world statistics] Available from http://www.irna.ir/View/FullStory/?NewsId=609984.
7. Borresen –Dale A. Tp53 and breast cancer. Hum Mutat 2003; 21: 292-300.
8. Barnes DM, Camplejohn RS. P53, apoptosis, and breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia 1996 ;1(2):163-75.
9. Troester MA, Herschkowitz JI, Oh DS, He X, Hoadley KA, Barbier CS, et al. Gene expression patterns associated with p53 status in breast cancer. BMC Cancer 2006 ;6:276
10. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. Mol Cell Biol 1999; 19(2): 1092-100.
11. Gemignani F, Moreno V, Landi S, Moullan N, Chabrier A, Gutiérrez-Enríquez S, et al. A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. Oncogene 2004; 23(10):1954-6.
12. Faghani M, Nikbahkt M, Rabbani M , Talebi A, Soleimanie B. [Investigation of codon 72 polymorphism of p53 gene in breast cancer specimen in Isfahan]. Journal of Isfahan University of Medical Sciences 2007, 84:26-33. (Persian)
13. Tommiska J, Eerola H, Heinonen M, Salonen L, Kaare M. Breast cancer patients with p53 Pro72 homozygous genotype have a poorer survival. Clin Cancer Res 2005; 11(14):5098-103.

14. Zhu ZZ, Wang AZ, Jia HR, Jin XX, He XL, Hou LF, et al. Association of the TP53 codon 72 polymorphism with colorectal cancer in a Chinese population. Jpn J Clin Oncol 2007;37 (5): 385-90.
15. Nadji SA, Mahmoodi M, Ziaee AA, Naghshvar F, Torabizadeh J. An increased lung cancer risk associated with codon 72 polymorphism in the TP53 gene and human papillomavirus infection in Mazandaran province, Iran. Lung Cancer 2007; 56(2):145-51
16. Soulitzis N, Sourvinos G, Dokianakis DN, Spandidos DA. P53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. Cancer Lett 2002; 179:175-83.
17. Wang-Gohrke S, Becher H, Kreienberg R, Runnebaum IB, Chang- Claude J. Intron 3 16 bp duplication polymorphism of p53 is associated with an increased risk for breast cancer by the age of 50 years. Pharmacogenetics 2002; 12: 269–72.
18. Wirtenberger M, Frank B, Hemminki K, Klaes R, Schmutzler RK, Wappenschmidt B, et al. Interaction of Werner and Bloom syndrome genes with p53 in familial breast cancer. Carcinogenesis 2006; 27:1655–60.
19. Lazar V, Hazard F, Bertin F, Janin N, Bellet D, Bressac B. Simple sequence repeat polymorphism within the p53 gene. Oncogene 1993; 8(6): 1703-5.
20. Khadang B, Fattahi MJ, Talei A, Dehaghani AS, Ghaderi A. Polymorphism of TP53 codon 72 showed no association with breast cancer in Iranian women. Cancer Genet Cytogenet 2007; 173(1):38-42.
21. De Vecchi G, Verderio P, Pizzamiglio S, Manoukian S, Bernard L, Pensotti V, et al. The p53 Arg72Pro and Ins16bp polymorphisms and their haplotypes are not associated with breast cancer risk in BRCA-mutation negative familial cases. Cancer Detect Prev 2008;32(2):140-3.
22. Sjalander A, Birgander R, Saha N, Beckman L, Beckman G. p53 polymorphisms and haplotypes show distinct differences between major ethnic groups. Hum Hered 1996; 46:41-48.
23. Costa S, Pinto D, Pereira D, Rodrigues H, Cameselle-Teijeiro J, Medeiros R, Schmitt F. Importance of TP53 codon 72 and intron 3 duplication 16bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer. BMC Cancer. 2008 Jan 29;8:32.
24. Buyru N, Altinisik J, Demokan S, Dalay N. P53 genotypes and haplotypes associated with risk of breast cancer. Cancer Detect Prev 2007; 31(3):207-13.
25. Mahasneh AA, Abdel-Hafiz SS. Polymorphism of p53 gene in Jordanian population and possible associations with breast cancer and lung adenocarcinoma. Saudi Med J 2004; 25(11): 1568-73.
26. Powell BL, van Staveren IL, Roosken P, Grieu F, Berns EM, Iacopetta B. Associations between common polymorphisms in TP53 and p21WAF1/Cip1 and phenotypic features of breast cancer. Carcinogenesis 2002;23(2):311-5.
27. Langerød A, Zhao H, Borgan Ø, Nesland JM, Bukholm IR. TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. Breast Cancer Res 2007; 9(3):R30.

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 1:41 +0330 on Thursday November 23rd 2017