

بررسی جهش در کدون ۱۲ ژن k-ras در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال Sporadic با استفاده از روش PCR-RFLP

حوری عدالت^۱، مجید صادقی زاده^{۲*}، منصور جمالی زواره‌ای^۳

۱- دانشجوی دکترای ژنتیک مولکولی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد گروه پاتولوژی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

هدف: سرطان کولورکتال یکی از شایعترین سرطانها در جهان است. بدیهی است که درک رفتار تومور و در سطح مولکولی به درمانی اثربخش تر و پیش آگهی دقیق تری در مورد بیماری می‌انجامد. از بین تمامی ژنهایی که در سرطان کولورکتال دچار تغییر می‌شوند، k-ras از اهمیت تشخیصی و پیش آگهی قابل توجهی برخوردار است. جهشهای k-ras از جمله وقایع کلیدی در سرطانهای کولورکتال به حساب می‌آیند. بررسیهای گذشته نشان داده‌اند که به‌طور متوسط ۴۰ درصد (۲۰ تا ۵۰ درصد) سرطانهای کولورکتال واجد جهش در انکوژن k-ras هستند. غالب جهشهای k-ras در کدون ۱۲ این ژن و به میزان کمتری در کدون ۱۳ و ۶۱ اتفاق می‌افتند. متمرکز بودن جهشهای این ژن در نقاطی خاص، امکان تشخیص آنها را با روشهای ساده و حساس بر پایه PCR فراهم کرده است و این موضوع در برابر ژنهایی مانند APC یا P53 مزیتی به حساب می‌آید که در آنها جهشها در طول توالی DNA توزیع شده‌اند.

مواد و روشها: در این مطالعه، ما شیوع جهش در کدون ۱۲ ژن k-ras را در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان کولورکتال، به‌منظور مقایسه آن با سایر کشورها مورد بررسی قرار دادیم. بدین منظور، DNA توموری ۵۵ فرد بیمار استخراج شده و جهشهای کدون ۱۲ با استفاده از روش RFLP تشخیص داده شدند.

نتایج: نتایج شیوع ۶۵ درصدی جهش نقطه‌ای را نشان دادند که این میزان در مقایسه با سایر کشورها بالاتر است. این امر ممکن است به علت اختلاف در نوع روش تشخیص جهش و تفاوت در جمعیت مورد بررسی از جمله تفاوت‌های ژنتیکی، اختلاف در عوامل محیطی، رژیم غذایی، شیوه زندگی اجتماعی مردم و سایر پارامترهای مختص جمعیت ایرانی باشد. ارتباط بین جهش در کدون ۱۲ و عوامل کلینیکوپاتولوژیکی مختلف نیز تحت مطالعه قرار گرفت. بررسیها حاکی از وجود رابطه معناداری میان جهش و درجه تمایز ضعیف تومورهاست. این امر تأکیدی بر نقش مهم Ras در پیشبرد تمایز سلولی است.

کلید واژگان: سرطان کولورکتال، کدون ۱۲، پی. سی. آر-آر. اف. ال. پی، تشخیص جهش.

۱- مقدمه

نیم میلیون نفر در دنیا به این سرطان، تخمین زده می‌شود. شیوع و مرگ و میر جهانی سرطان کولورکتال در حال افزایش است [۱]. زیرا تشخیص بالینی اولیه این سرطان با استفاده از کولونوسکوپی و اشعه ایکس، صورت می‌گیرد که روشهایی

سرطان کولورکتال دومین علت مرگ در اثر سرطان و سومین سرطان شایع در ایالات متحده و اکثر کشورهای غربی است. خطر ابتلای فرد به این سرطان در آمریکا، ۶ درصد است. این سرطان در آسیا و آفریقا شیوع کمتری دارد. ابتلای سالیانه حداقل

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک، صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۱۷۵، دورنگار: ۸۸۰۰۹۷۳۰

و ۱۳ بیشترین فراوانی را دارند. به علاوه، جهشهای k-ras حتی در مرحله آدنومای خوش خیم نیز قابل تشخیص است. جهشهای k-ras عمدتاً در آدنوماهای بزرگتر از ۲ سانتی متر شایعند و در مراحل ابتدایی تر بندرت دیده می‌شوند [۶]. این امر از نظر پیش‌گویی آینده بیمار، دارای اهمیت است. زیرا شانس پیشرفت آدنوماهای بزرگتر به سمت بدخیمی نسبت به آدنوماهای کوچکتر بالاتر است. آخرین مزیت بررسی جهشهای این ژن این است که در مدفوع بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال از جمله بیمارانی که هنوز عوارض بیماری در آنها بروز پیدا نکرده نیز قابل تشخیص است. از این رو می‌توان از آنها به عنوان شیوه‌ای آسان و غیر تهاجمی غربالگری استفاده کرد [۷]. در این تحقیق شیوع جهش کدون ۱۲ ژن k-ras در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان کولورکتال بررسی شد. همچنین ارتباط بین این جهش و عوامل مختلف کلینیکوپاتولوژیکی و دموگرافیک را نیز بررسی کردیم.

۲- مواد و روشها

در این مطالعه از نمونه‌های تازه و پارانینه استفاده شد. نمونه‌های تازه مربوط به برخی بیماران که در نیمه اول سال ۱۳۸۴ در انستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی تحت عمل قرار گرفته بودند، داخل تانک ازت به آزمایشگاه منتقل و در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. بلوکهای پارانینه مربوط به سالهای ۸۱ و ۸۲ نیز از قسمت آرشیو بخش پاتولوژی بیمارستان امام خمینی گردآوری شدند. در مجموع ۵۵ نمونه، شامل ۲۰ نمونه تازه و ۳۵ نمونه پارانینه جمع‌آوری شد. تمام تومورها، شامل کارسینوماهای کولون و رکتوم بودند. ۳۹ درصد نمونه‌ها مربوط به رکتوم بودند و ۶۱ درصد نیز تحت کارسینوماهای کولون طبقه‌بندی شدند. براساس سیستم مرحله‌بندی دوک، ۷۶ درصد نمونه‌ها در مرحله B و ۲۴ درصد نیز در مرحله C قرار داشتند. حدود ۳۸ درصد تومورها تمایز یافته بالا^۳، ۳۶ درصد تمایز یافته متوسط^۴ و ۲۶ درصد نیز تمایز یافته ضعیف^۵ بودند. ۲۸ درصد نمونه‌ها نیز از نوع موسینی^۶ بودند. در این مطالعه حدود ۴۷ درصد بیماران مذکر و بقیه مؤنث بودند.

استخراج DNA ژنومی از بافتهای تازه و پارانینه با استفاده از روش فنل - کلروفرم انجام شد [۸]. از حدود ۵۰ میلی گرم بافت تازه و ۱ تا ۳ برش ۱۰ میکرونی از بافت پارانینه برای استخراج DNA استفاده شد. نمونه‌های DNA از نظر وجود جهش در

هزینه‌بر، تهاجمی و با آثار شدید است. روش تشخیص خون در مدفوع که پر استفاده‌ترین روش غربالگری غیر تهاجمی است، به اندازه کافی برای تشخیص افراد مستعد یا مبتلا در جمعیت، قابل اعتماد نیست. هم‌چنین علی‌رغم دستیابی به تعداد زیادی از مارکرهای مولکولی، هیچ یک از آنها به صورت عملی در پزشکی روزمره وارد نشده‌اند. اما به اهمیت برخی از این مارکرها در آینده‌ای نزدیک، در درمان بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال امید فراوان می‌رود [۲].

برخی افراد با جهشهایی در DNA خود به دنیا می‌آیند که باعث ایجاد سرطانهای کولورکتال وراثتی می‌شود. حدود ۱۰ درصد تمام سرطانهای کولون، وراثتی بوده و به دلیل تغییرات ژنتیکی خاص بروز می‌کنند. برخلاف سرطانهای غیر وراثتی تک‌گیر، که پس از ۵۰ سالگی بروز می‌کنند، این نوع سرطانها غالباً در افراد جوانتر اتفاق می‌افتد. پولیپوز آدنوم فامیلی (FAP) و سرطان کولورکتال غیر پولیپوز وراثتی (HNPCC) از جمله سرطانهای کولون وراثتی هستند [۳، ۴ و ۵]. سرطانهای کولورکتال تک‌گیر، که شامل حدود ۹۰ درصد سرطانهای کولون است، از یک مدل چند مرحله‌ای پیشرفت تومور تبعیت می‌کنند که با تغییرات ژنتیکی همراه است. در این مسیر ژنتیکی که برای اولین بار وگلشتاین^۱ و فیرون^۲ در سال ۱۹۸۸ ارائه کردند، تبدیل اپی‌تلیوم نرمال به اپی‌تلیوم تکثیرشونده با جهش در APC و از اپی‌تلیوم تکثیرشونده به آدنوما با تغییرات در متیلاسیون DNA همراه است. در مرحله آدنوما نیز جهش در k-ras رخ می‌دهد و در نهایت تبدیل آدنوما به کارسینوما با جهش در p۵۳ همراه است. در نتیجه جهشهای APC، p۵۳ و k-ras به دلیل شیوع بالا، در تومورهای کولورکتال به عنوان مارکرهای تشخیص مولکولی استفاده می‌شوند. از آنجا که غالب آدنوماهای کوچک واجد جهش در APC هستند و بیش از ۹۰ درصد آدنوماها نیز به بدخیمی منتهی نمی‌شوند، بنابراین جهشهای APC مارکر تشخیصی خوبی به حساب نمی‌آیند. جهشهای p۵۳ در حدود ۷۰ درصد تومورهای کولورکتال اتفاق می‌افتند. اما این جهشها در محلهای مختلفی از توالی این ژن پخش شده‌اند و عمدتاً در مراحل پیشرفته بدخیمی اتفاق می‌افتند. از این رو، جهشهای p۵۳ نیز برای تشخیص اولیه مناسب نیستند [۶].

جهشهای k-ras که در حدود ۵۰ درصد تومورهای کولورکتال اتفاق می‌افتند، تنها به سه کدون ۱۲، ۱۳ و ۶۱ این ژن محدود شده‌اند. در میان این سه کدون نیز جهشهای کدونهای ۱۲

3. well differentiated
4. moderately differentiated
5. poorly differentiated
6. mucinous

1. Vogelstein
2. Fearon

بالا تری از جهش را به خود اختصاص دادند. به طور کلی، از میان ۲۵ نمونه توموری تازه و ۳۰ نمونه توموری پارافینه، به ترتیب ۱۴ و ۲۲ عدد از آنها واجد جهش بودند. این نسبت به ترتیب معادل ۵۶ درصد و ۷۳ درصد برای نمونه‌های توموری تازه و پارافینه بود.

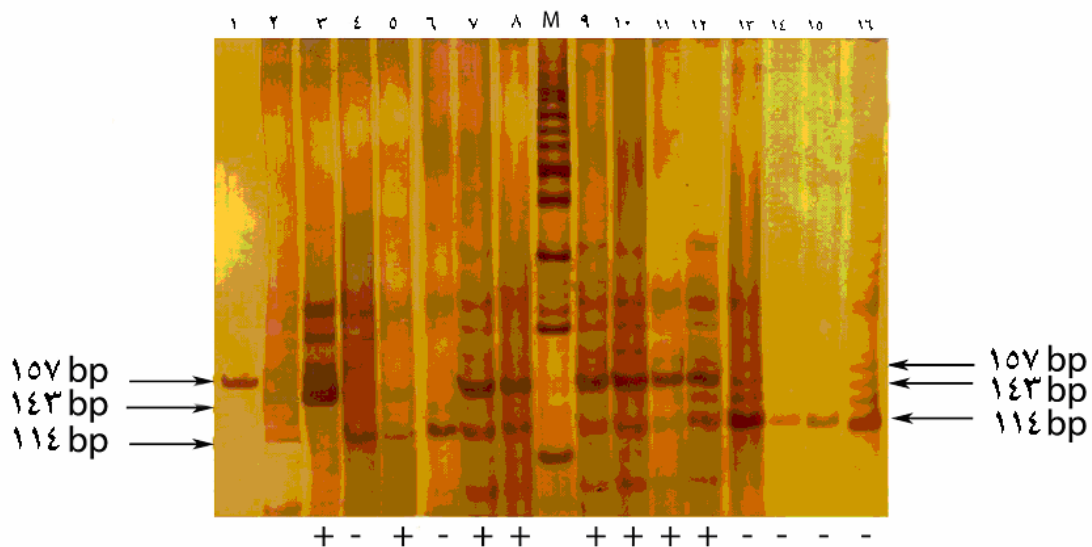
تعیین توالی محصول PCR نیز برای تأیید وجود جهش در کدون ۱۲ به صورت تصادفی روی یکی از نمونه‌های مثبت توموری پارافینه انجام شد. نتیجه آزمایش نشان داد که باز اول کدون ۱۲ از گوانین به آدنین تغییر یافته است. به عبارت دیگر گلایسین در ساختمان پروتئین سلولهای توموری این بیمار به سرین تبدیل شده است.

کدون ۱۲ بررسی شد [۹]. پس از هضم با آنزیم BstN I، نیوانگلند بایولب^۱، محصولات PCR وحشی و جهش یافته به ترتیب در قطعات ۱۱۴ و ۱۴۳ جفت بازی بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد قابل تشخیص بودند (شکل ۱).

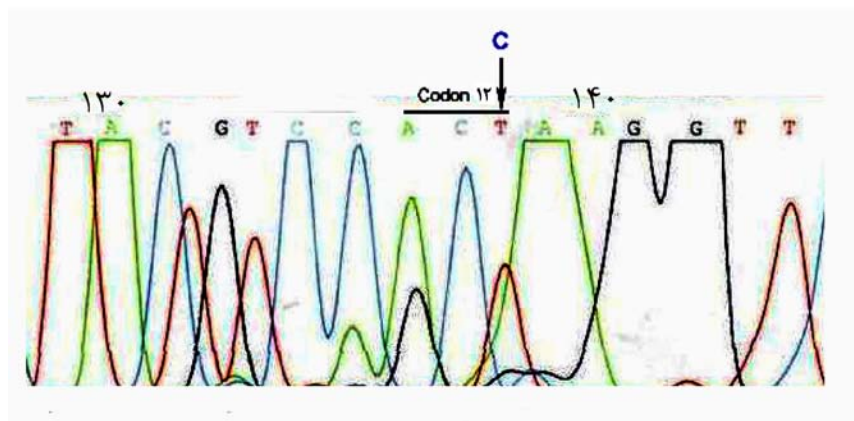
آنالیز آماری نیز با کمک آزمون χ^2 و آزمون دقیق فیشر انجام، و مقادیر P کوچکتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شدند.

۳- نتایج

از بین ۵۵ نمونه مورد بررسی، ۳۶ نمونه (۶۵ درصد) واجد جهش بودند. در این میان نمونه‌های توموری پارافینه سهم



شکل ۱ طرح الکتروفورزی قطعات هضم شده پس از تکثیر مرحله دوم enriched-PCR با نمونه‌های توموری پارافینه. ستون ۱ محصول تکثیر تیمار نشده با آنزیم، ستون ۲ کنترل منفی، ستون M مارکر و بقیه ستونها، که مربوط به هضم قطعات تکثیر شده هستند، شامل ستون ۳ مربوط به رده سلولی SW۴۸۰ و ستونهای ۴ تا ۱۶ مربوط به نمونه‌های توموری پارافینه می‌باشند. وضعیت جهش در هر یک از نمونه‌ها در پایین شکل، ذکر شده است.



شکل ۲ تعیین توالی محصول PCR همان‌طور که در شکل مشخص شده، کدون ۱۲ از GGT به AGT تغییر یافته است.

1. (New England Biolabs)

شد. بنابراین جهش با هیچ کدام از فاکتورها به جز درجه رابطه‌ای نشان نداد.

۴- بحث

فراوانی گزارش شده برای این جهش در سرطان کولورکتال، در طیف وسیعی شامل ۲۰ تا ۵۰ درصد گزارش شده است. جدول ۲ بیانگر میزان شیوع جهش در برخی از کشورهاست.

در خصوص بررسی ارتباط بین وجود جهش در کدون ۱۲ و فاکتورهای کلینیکی پاتولوژیکی و دموگرافیک موجود در پرونده بیماران، یک آنالیز تحلیلی برای هر دو گروه نمونه‌های تازه و پارافینه به طور جداگانه انجام شد. در جدول ۱، مقدار p برای هر کدام از عوامل جنس، سن، اندازه تومور، محل تومور، تولید یا نبود تولید موسین، وجود یا نبود پولیپ آدنوماتوس، مرحله و درجه با کمک آزمون مربع کای و آزمون دقیق فیشر برای نمونه‌های تازه و پارافینه به طور جداگانه محاسبه شده است. فقط مقدار p مربوط به فاکتور درجه بود که عدد کمتر از ۰/۰۵ را برای هر دو گروه نمونه‌ها نشان داد و بنابراین معنادار در نظر گرفته

جدول ۱ P-value محاسبه شده برای هریک از فاکتورهای کلینیکی پاتولوژیکی و درصد هریک از فاکتورهای

مربوط در دو گروه نمونه‌های توموری تازه و پارافینه

نمونه‌های توموری پارافینه		نمونه‌های توموری تازه		متغیر
χ^2 P	درصد اعتبار	χ^2 P	درصد اعتبار	
۰/۴۷۱	۵۱/۷	۰/۵۳۶	۴۲/۹	جنسیت
	۴۸/۳		۵۷/۱	مذکر
۰/۸۳۹	۱۰/۸	۰/۵۷	۹/۶	مؤنث
	۴۹/۷		۴۷/۸	سن
	۳۹/۵		۴۲/۶	<۴۰
۱/۰۰۰	۴۰	۰/۶۷۷	۳۱/۶	۴۰-۶۰
	۶۰		۶۸/۴	>=۶۰
۰/۶۶۶	۲۳/۱	۱/۰۰	۳۱/۶	اندازه تومور
	۶۵/۴		۳۶/۹	<۵
	۱۱/۵		۳۱/۶	>=۵
۰/۲۰۹	۷۱/۴	۰/۱۷۸	۷۵	محل تومور
	۲۸/۶		۲۵	کولون صعودی
۰/۹۰۰	۸۶/۲	۰/۷۱۶	۸۵/۷	کولون نزولی و سیگموئید
	۱۳/۸		۱۴/۳	رکتوم
۰/۵۰۸	۸۹/۷	۰/۵۵۲	۶۵	تولید موسین
	۱۰/۳		۳۵	منفی
	۴۱/۴		۳۸/۹	مثبت
۰/۰۲۹	۳۷/۹	۰/۰۴۳	۲۷/۸	وجود پولیپ آدنوماتوس
	۲۰/۷		۳۳/۳	منفی
				مثبت
				مرحله تومور
				B1-B2
				C
				درجه تومور
				خوب
				متوسط
				ضعیف

جدول ۲ شیوع جهش k-ras در کشورهای مختلف در تومورهای کولورکتال

آمریکا	اسرائیل	انگلیس	فرانسه	آلمان	ژاپن	
۴۷	۳۰	۲۷	۴۹	۳۵	۲۰	درصد جهش در کدون ۱۲
۶۹	۳۲	۸۸	۶۳	۷۸	۴۸	نمونه جهش یافته / کل
۱۰۷	۱۰۵	۳۲۶	۱۲۸	۲۲۰	۲۴۴	

مراجع اطلاعات جمع آوری شده از: ژاپن (۱۳)، آلمان (۱۴)، فرانسه (۷)، انگلیس (۱۱)، اسرائیل (۲۱)، آمریکا (۳).

شده است. در برخی از این مطالعات ارتباطی بین جهش k-ras و فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیکی که به آنها در جدول ۱ اشاره شد، وجود نداشته است [۶، ۱۰، ۱۱].

برخی از مطالعات نیز بیانگر امکان وجود ارتباط جهشهای ژنتیکی خاص با خصوصیات کلینیکوپاتولوژیکی خاص می‌باشند. در این مطالعات جهش k-ras ترجیحاً در پیشرفت از آدنوما به کارسینوما دخالت دارد، در حالی که روی تمایز تومور تأثیری ندارد [۱۲]. ما نیز در نتایج منتشر شده تاکنون، گزارشی در مورد ارتباط میان جهش k-ras و درجه تومور مشاهده نکردیم. تعدادی از مطالعات نیز ارتباطی را بین جهش k-ras و جنسیت، سن، محل تومور و بخصوص با مرحله تومور پیدا کرده‌اند [۱۳، ۱۴].

نتایج این تحقیق نیز مدل پروفیسور و گلشتاین را، که بیانگر وجود جهش k-ras در مراحل مختلف تومورها و بنابراین بروز این جهش در مراحل اولیه سرطانزایی کولورکتال است، تأیید می‌کند [۶]. زیرا در این بررسی نیز ارتباطی میان این جهش و مرحله تومور یافت نشد. در نتیجه k-ras می‌تواند در آزمایشات غربالگری (مثل تست مدفوع) به عنوان یک مارکر تشخیصی مناسب پیش از بروز علائم استفاده شود.

در خصوص ارتباط میان جهش و درجه ضعیف تومور در این بررسی، می‌توان گفت که علت شیوع بیشتر جهش در تومورهای با تمایز پایین در تومورهای کولورکتال می‌تواند ناشی از افزایش ناپایداری ژنتیکی در تومورهای با تمایز پایین باشد. به علاوه، جالب است که بررسی عملکرد Ras در سیستمهای سلولی نشان داده است که علی‌رغم اینکه ras به عنوان یک انکوژن مورد توجه قرار می‌گیرد، در پیشبرد تمایز سلولی نیز نقش مهمی را ایفا می‌کند [۱۵]. بنابراین فعال شدن آن ممکن

در این مطالعه، میزان جهش ۶۵ درصد، که شامل (۱۴/۲۵) ۵۶ درصد در نمونه‌های تازه و (۲۲/۳۰) ۷۳ درصد در نمونه‌های پارافینه بود، مشاهده شد. علت این اختلاف در فراوانی جهش بین نمونه‌های تازه و پارافینه، می‌تواند به این دلیل باشد که نمونه‌های تازه به صورت ماکروسکوپی و با چشم غیرمسلح به وسیله جراح جدا می‌شدند و ممکن بود بافت نرمال اطراف تومور را هم داشته باشند، در حالی که در بلوکهای پارافینه، تنها از قسمتهای توموری هر بلوک استفاده می‌شد که قبلاً تحت نظر متخصص پاتولوژی، با کمک لام‌های H & E مربوط به هر بلوک مشخص شده بودند.

اختلافی که در فراوانی جهش بین مطالعات مختلف و بخصوص بین این تحقیق با سایر تحقیقات وجود دارد، می‌تواند ناشی از اختلاف در نوع روش و اختلاف در جمعیت مورد بررسی باشد. در اینجا از بلوکهای پارافینه رنگ‌آمیزی نترات نقره برای تشخیص استفاده شد که تمام این موارد حساسیت تشخیص را به میزان زیادی بالا می‌برد. همچنین این تفاوت ممکن است ناشی از اختلافات ژنتیکی یا قومیتی، رژیم غذایی، فاکتورهای محیطی، شیوه زندگی اجتماعی مردم و پارامترهای دیگر، که می‌تواند مختص جمعیت ایرانی باشد.

آنالیز آماری دیگری که انجام شد، بررسی وجود ارتباط بین جهش کدون ۱۲ و فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیکی بود که برای تومورهای تازه و پارافینه به طور جداگانه انجام شد. طبق نتایج جدول ۱، ارتباط معناداری با درجه تومور در دو گروه پارافینه و تازه مشاهده شد.

از زمان ارائه مدل ژنتیک مولکولی سرطان کولورکتال، مطالعات زیادی در زمینه ارتباط بین جهش k-ras در این مدل و خصوصیات کلینیکوپاتولوژیکی سرطان کولورکتال تک‌گیر انجام

نسبتاً کم بود و از این روست مطالعه اپیدمیولوژیکی کنترل شده گسترده‌تری، برای بررسی فراوانی جهش k-ras در ایران ضروری خواهد بود.

است باعث از دست رفتن تمایز شود، که این مسأله با نتیجه مطالعات این تحقیق مطابقت دارد. در هر صورت تعداد نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه،

۵- منابع

- [1] Greenlee, R. T., Murray, T., Bolden, S., Wingo, P. A., Cancer statistics, 2000. CA Cancer J. Clin., 50: 7-33.
- [2] Burt, R.W., Colon cancer screening. Gastroenterology, 119 (3): 837-853, 2000.
- [3] Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61:759-767, 1990.
- [4] Fearon ER: Human cancer syndromes: Clues to the origin and nature of cancer. Science 278: 1043-1050, 1997.
- [5] Vogelstein B, Kinzler KW: The multistep nature of cancer. Trends Genet., 9: 138-141, 1993.
- [6] Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M, Nakamura, Y., White, R., Smits, A., Bos, J. L. Genetic alterations during colorectal tumor development. N. Engl. J. Med., 319: 525-532, 1988.
- [7] Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Levin B, Frost P, Vogelstein B: Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. Science, 256:102-105, 1992.
- [8] Tobi M, Luo FC, Ronai Z. Detection of K-ras mutation in normal and malignant colonic tissues by enriched PCR method. Int. J. Oncol., 4:391-6, 1994.
- [9] Minamoto T, Sawaguchi K, Mai M, Yamashita N, Sugimura T, Esumi, H., Infrequent K-ras activation in superficial-type (flat) colorectal adenomas and adenocarcinomas. Cancer Res., 54:2841-4, 1994.
- [10] Andreyev, H. J., Norman, A. R., Cunningham, D., et al., Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. J. Natl. Cancer Inst., 90: 675-84, 1998.
- [11] Andreyev, H. J. N., Tilsed, J. V. T., Cunningham, D., Sampson, S. A., Norman, A. R., Schneider, H. J., Clarke, P. A., K-ras mutations in patients with early colorectal cancers. Gut, 41: 323-329, 1997.
- [12] Laurent-Puig, P., Olschwang, S., Delattre, O., Validire, P., Melot, T., Mosseri, V., Salmon, R. J., Thomas, G., Association of Ki-ras mutation with differentiation and tumor-formation pathways in colorectal carcinoma. Int. J. Cancer, 49: 220-223, 1991.
- [13] Samowitz, W. S., Curtin, K., Schaffer, D., Robertson, M., Leppert, M., Slattery, M. L., Relationship of K-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage and survival: a population-based study. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev., in press, 2000.
- [14] Slattery, M. L., Friedman, G. D., Potter, J. D., Edwards, S., Caan, B. J., Samowitz, W. A., description of age, sex, and site distributions of colon carcinoma in three geographic areas. Cancer (Phila.), 78: 1666-1670, 1996.
- [15] Crespoa, P., Leo'nb, J., Ras proteins in the control of the cell cycle and cell Differentiation. Cell. Mol. Life Sci., 57: 1613-1636, 2000.