

Eksresi VEGF dan p53 Mutan pada Derajat Diferensiasi Adeno-karsinoma Kolorektal

Artika Uthary, Troef Soemarno

Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga
Surabaya

ABSTRAK

Latar belakang

Adenokarsinoma kolorektal merupakan karsinoma kolorektal yang paling sering. Angiogenesis merupakan persyaratan penting untuk perkembangan, pengembangan dan metastasis tumor ganas. VEGF memainkan peranan penting dalam pengembangan angiogenesis pada beberapa keganasan termasuk adenokarsinoma kolorektal. Tumor *suppressor* gen p53 adalah regulator transkripsi yang ampuh dari gen yang terlibat dalam aktivitas seluler, termasuk *cell cycle arrest*, apoptosis dan angiogenesis. Tujuan penelitian ini untuk menjelaskan ekspresi VEGF dan p53 pada adenokarsinoma kolorektal derajat diferensiasi tinggi, sedang dan rendah.

Metode

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *cross sectional*. Sampel dibagi dalam 11 derajat diferensiasi tinggi, 7 sedang dan 11 rendah yang telah didiagnosis di Rumah Sakit Dr Soetomo Surabaya periode 2011-2013. Sampel dilakukan pulasan imunohistokimia dengan antibodi monoklonal p53 dan poliklonal VEGF serta dinilai secara semikuantitatif. Perbedaan ekspresi VEGF dan p53 pada adenokarsinoma kolorektal derajat diferensiasi tinggi, sedang dan rendah dianalisa menggunakan Kruskal-Wallis. Hubungan antara ekspresi VEGF dan p53 dianalisa menggunakan Spearman.

Hasil

Didapatkan perbedaan ekspresi VEGF yang signifikan pada adenokarsinoma kolorektal derajat diferensiasi tinggi, sedang dan rendah ($p < 0,05$). Didapatkan perbedaan ekspresi p53 yang signifikan pada adenokarsinoma kolorektal derajat diferensiasi tinggi, sedang dan rendah ($p < 0,05$). Didapatkan hubungan yang signifikan antara VEGF dan p53 ($p < 0,05$)

Kesimpulan

Didapatkan hubungan antara VEGF dan p53 pada adenokarsinoma kolorektal

Kata kunci: adenokarsinoma kolorektal, p53, VEGF.

ABSTRACT

Background

Adenocarcinoma is the most common colorectal carcinoma. Angiogenesis is an essential requirement for the development, progression and metastasis of malignant tumors. Vascular endothelial growth factor (VEGF) plays an important role in the development of angiogenesis of numerous solid malignancies. The tumor suppressor gen p53 is a potent transcriptional regulator of genes which are involved in many cellular activities, including cell cycle arrest, apoptosis and angiogenesis. The purpose of this study is to explain the p53 and VEGF expression in adenocarcinoma colorectal well, moderate and poorly differentiated.

Methods

Study design is cross sectional. Samples divided into 11 well differentiated, 7 moderately differentiated and 11 poorly differentiated which had been diagnosed in Hospital Surabaya between 2011-2013. Sample had been staining with immunohistochemistry with monoclonal antibody of p53 and polyclonal antibody of VEGF, and has been evaluated semi quantitatively. The differences of p53 and VEGF expression on grading adenocarcinoma colorectal were analyzed by Kruskal-Wallis. The correlation between p53 and VEGF expression were analyzed by Spearman.

Results

The test result showed there were different significance statistically of VEGF expression on well, moderately and poorly differentiated ($p < 0.05$), different significance of p53 expression on well, moderately and poorly differentiated ($p < 0.05$). There is correlation between the expression of VEGF and p53 in adenocarcinoma colorectal ($p < 0.05$)

Conclusion

VEGF and p53 expression may play a role in distinguishing well, moderate and poorly differentiated adenocarcinoma colorectal. There is correlation between the expression of VEGF and p53 in adenocarcinoma colorectal

Key words: adenocarcinoma colorectal, p53, VEGF.

PENDAHULUAN

Karsinoma kolorektal adalah keganasan yang terbanyak kedua di dunia, pada wanita, terjadi 195.400 kasus baru dan pada laki-laki 217.400 kasus baru setiap tahunnya, dengan angka kematian mencapai 207.400 baik pada laki-laki maupun perempuan di Eropa. Sedangkan di Amerika, karsinoma kolorektal merupakan keganasan terbanyak ketiga dengan angka kejadian 153.760 kasus baru dan 52.180 kematian setiap tahunnya.¹

Secara histopatologik, derajat diferensiasi adenokarsinoma kolorektal dibagi menjadi derajat diferensiasi tinggi, derajat diferensiasi sedang dan derajat diferensiasi rendah. Derajat diferensiasi ini berdasarkan komposisi struktur kelenjar (asinar), dikatakan derajat diferensiasi tinggi apabila didapatkan struktur kelenjar sebanyak lebih dari 75%, sedangkan derajat diferensiasi sedang dan rendah apabila didapatkan struktur kelenjar sebanyak 25-75% dan kurang dari 25%.²

Salah satu faktor prognostik pada adenokarsinoma kolorektal adalah derajat diferensiasi. Bagaimanapun derajat diferensiasi ini tidak memprediksi sepenuhnya keluaran pasien, sehingga diperlukan petanda prognostik untuk menentukan keluaran pasien.³

Angiogenesis adalah proses pembentukan pembuluh darah baru, yang merupakan proses yang penting dalam pertumbuhan tumor dan metastasis. Umumnya, tumor berukuran 1-2 mm tidak dapat tumbuh tanpa adanya suplai dari pembuluh darah. Proses angiogenesis diatur oleh keseimbangan antara proangiogenik lokal dan faktor angiogenik, yang dihasilkan oleh sel tumor dan sel induk yang mencakup sel endotel, perisit dan sel imun.⁴

Sel tumor dapat menghasilkan faktor angiogenik yang mengalahkan kemampuan antiangiogenik dari sel autoimun. *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) adalah suatu molekul proangiogenik yang terlibat pada beberapa proses angiogenik. Adanya peningkatan *level* dari sitokin ini berhubungan dengan keluaran klinik pasien yang buruk pada beberapa tumor *solid* pada payudara, paru, kolorektal, *liver* dan *bladder*.⁵

VEGF merupakan faktor pertumbuhan angiogenik yang unik karena dapat mengganggu fungsi pertahanan pada endotel sehingga berperan pada proses ekstrasvasi sel tumor dan metastasis.⁴

Salah satu petanda tumor yang secara intensif diteliti adalah P53, yang merupakan gen penekan tumor yang mengkode 53 kDa fosfo-protein. p53 adalah gen yang paling sering mengalami mutasi dan mempunyai peranan penting pada keganasan gastrointestinal. Over-ekspresi yang abnormal dari P53 mempunyai hubungan dengan prognosis yang buruk, termasuk pada *gaster*, kolorektal dan *hepar*.⁶⁻⁹

P53 mempunyai peranan penting untuk mengontrol angiogenesis melalui pengaturan VEGF. Hubungan yang signifikan antara keduanya ditemukan pada karsinoma *gaster*, karsinoma kolorektal, *non small cell* karsinoma paru dan *oral squamous cell carcinoma*.^{6,8,10,11}

Penelitian ini bertujuan untuk melihat peran VEGF dan P53 mutan pada adenokarsinoma kolorektal derajat diferensiasi tinggi, sedang dan rendah, sehingga dapat digunakan sebagai petanda prognostik.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini bersifat observasional analitik dengan desain *cross sectional*, dilakukan di Departemen/SMF/Instalasi Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSUD Dr. Soetomo dengan menggunakan blok parafin dengan diagnosis adenokarsinoma kolorektal derajat diferensiasi tinggi, sedang dan rendah mulai 1 Januari 2011-31 Mei 2013. Sediaan hematoksilin dan eosin dinilai ulang dan dari blok parafin yang mengandung cukup sel tumor dibuat sediaan dengan pulasan antibodi monoklonal p53 *biocare clone* DO7 untuk *human* (Biocare, USA), serta antibodi poliklonal VEGF *biocare* untuk *mouse* (Biocare, USA).

Eksresi p53 mutan dinilai secara visual dengan mikroskop cahaya binokular dan dibuat skor semikuantitatif berdasarkan jumlah inti sel tumor yang terpulask; 0, 1+, 2+, 3+ yang berarti tidak terpulask atau <5%, 5-25%, 26-75%, dan >75%. Sementara VEGF dibuat skor semikualitatif berdasarkan intensitasnya pada sitoplasma dan membran sel; 0, 1, 2, 3 yang berarti tidak terpulask, lemah, sedang dan kuat.

Perbedaan ekspresi p53 dan VEGF pada adenokarsinoma kolorektal diferensiasi tinggi, sedang dan rendah dianalisis secara statistik menggunakan uji Kruskal-Wallis. Hubungan antara ekspresi p53 dan VEGF pada adenokarsinoma kolorektal derajat diferensiasi tinggi, sedang dan rendah dianalisis mengguna-

kan uji Spearman. Analisis statistik menggunakan perangkat lunak *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS).

HASIL

Selama periode 1 Januari 2011 sampai 31 Mei 2013 didapatkan 11 sampel untuk kelompok diferensiasi tinggi, 7 sampel untuk kelompok diferensiasi sedang, dan 11 sampel untuk kelompok diferensiasi rendah. Data klinikopatologi yang terdapat pada penelitian ini adalah usia sampel penelitian dan jenis kelamin. Variabel penelitian yang dinilai adalah ekspresi protein VEGF dan p53 mutan pada adenokarsinoma kolorektal derajat diferensiasi tinggi, sedang dan rendah (Tabel 1).

Tabel 1. Karakteristik klinikopatologik sampel penelitian.

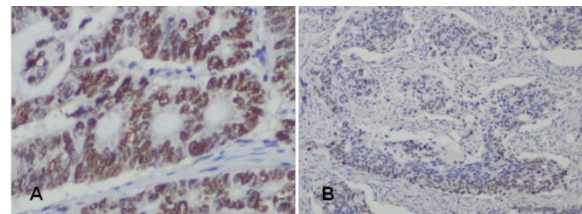
	Adenokarsinoma kolorektal diferensiasi		
	(n=11) tinggi	(n=7) sedang	(n=11) rendah
Usia			
<30 th	0	1	0
31-40 th	1	0	0
41-50 th	0	3	6
51-60 th	7	3	3
61-70 th	3	1	1
>70 th	0	0	
Jenis kelamin			
Laki-laki	6	3	7
Perempuan	5	4	4
Skor p53			
0	0	0	0
+1	0	0	0
+2	7	3	0
+3	4	4	11
Skor VEGF			
0	0	0	0
+1	3	0	0
+2	8	6	4
+3	0 (0%)	1	7

Dari Tabel di atas, didapatkan usia terbanyak pada rentang 51-60 tahun, dan jenis kelamin terbanyak adalah laki-laki. Pada tabel 1 juga didapatkan skor p53 mutan terbesar (+3) dan skor VEGF terbesar (+3) adalah adenokarsinoma kolorektal derajat diferensiasi rendah.

Tabel 2. Hasil uji Mann-Whitney ekspresi p53 pada tiap kelompok.

	Diferensiasi	
	Tinggi	Sedang
Diferensiasi Tinggi		
Sedang	0,401	
Rendah	0,002	0,021

Setelah dilakukan analisis statistik menggunakan Kruskal-Wallis, didapatkan hasil $p=0,007$ ($p<0,05$) untuk perbedaan ekspresi p53, yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara ekspresi p53 pada adenokarsinoma kolorektal derajat diferensiasi tinggi, sedang dan rendah. Untuk mengetahui perbedaan tiap-tiap kelompok dilakukan analisis menggunakan Mann-Whitney dengan hasil pada tabel 2. Ekspresi p53 mutan dapat dilihat pada Gambar 1.

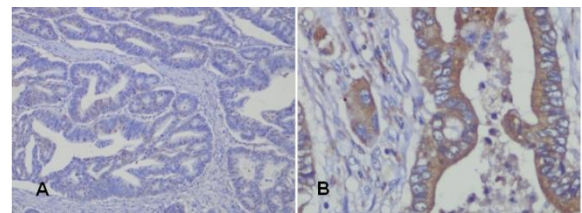


Gambar 1. Ekspresi p53. Skor +3 pembesaran obyektif 20x (A); Skor +2, pembesaran obyektif 4x (B).

Tabel 3. Hasil statistik Mann-Whitney ekspresi VEGF pada tiap kelompok.

	Diferensiasi	
	Tinggi	Sedang
Diferensiasi sedang	0,033	
Diferensiasi rendah	0,002	0,293

Setelah dilakukan analisis statistik menggunakan Kruskal-Wallis, didapatkan hasil $p=0,005$ ($p<0,05$) untuk perbedaan ekspresi VEGF. Hasil tersebut berarti terdapat perbedaan VEGF yang signifikan pada adenokarsinoma kolorektal derajat diferensiasi tinggi, sedang dan rendah. Selanjutnya dilakukan analisis Mann-Whitney untuk masing-masing kelompok didapatkan hasil pada tabel Tabel 3. Sedangkan gambar histopatologis ekspresi VEGF dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Ekspresi VEGF. Skor +1 (A); Skor +3 (B), pembesaran obyektif 20x.

DISKUSI

Penelitian ini menggunakan sampel total sebanyak 29 pasien. Kasus adenokarsinoma kolorektal terbanyak terjadi pada rentang usia 51-60 tahun. Hal ini sesuai jika dibandingkan dengan kepustakaan yang menyatakan bahwa adenokarsinoma kolorektal jarang ditemukan pada pasien dengan usia kurang dari 40 tahun.¹²

Dari Tabel 1 didapatkan data pada pasien adenokarsinoma kolorektal derajat diferensiasi tinggi, bahwa sebanyak tiga sampel menunjukkan ekspresi VEGF positif satu (+1) dan delapan sisanya dengan ekspresi VEGF (+2). Sedangkan pasien adenokarsinoma kolorektal derajat diferensiasi sedang mempunyai enam sampel dengan ekspresi VEGF positif 2 (+2) dan satu sampel dengan ekspresi VEGF positif tiga (+3). Empat pasien dengan derajat diferensiasi rendah mempunyai ekspresi VEGF positif dua (+2) dan tujuh sampel dengan ekspresi VEGF positif 3 (+3). Dari data tersebut dilakukan analisis statistik menggunakan Kruskal-Wallis, didapatkan hasil $p < 0,05$ yang berarti hipotesis dari penelitian ini diterima, yaitu terdapat hubungan yang bermakna antara ekspresi VEGF dengan derajat diferensiasi.

Penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya, yang dilakukan oleh Ali F. Hasyim *et al*, dilaporkan bahwa VEGF terpulas positif sebanyak 47,4% pada diferensiasi tinggi, 52,4% pada diferensiasi sedang dan 58,3% pada diferensiasi tinggi, sehingga didapatkan hubungan yang bermakna antara derajat diferensiasi dengan ekspresi VEGF.¹³ Penelitian ini didukung pula oleh Shu Zheng *et al*. yang melaporkan ekspresi VEGF lebih kuat terekspresi pada adenokarsinoma kolorektal derajat diferensiasi rendah apabila dibandingkan dengan derajat diferensiasi yang lain.¹⁴

Dari penelitian ini, dari keseluruhan derajat diferensiasi tidak didapatkan ekspresi VEGF dengan skor 0, dan semakin rendah derajat diferensiasinya diperoleh skor VEGF yang semakin tinggi. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh JC. Lee *et al*. yang melaporkan bahwa VEGF tidak terdeteksi pada normal mucosa kolon ataupun adenomatous polyp. Sebaliknya ekspresi VEGF didapat pada sekitar 50% karsinoma kolorektal.¹⁵

Berbeda dengan yang diungkapkan oleh Günsilius *et al* pada penelitiannya yang menyatakan bahwa tidak didapatkan hubungan yang

signifikan antara VEGF dengan derajat diferensiasi. Adanya perbedaan ini kemungkinan dikarenakan jumlah sampel yang terbatas, sehingga diperlukan penelitian-penelitian lainnya untuk menjelaskan peran VEGF dalam memprediksi prognosis pasien adenokarsinoma kolorektal.¹⁶

Overekspresi dari p53 yang dideteksi dengan imunohistokimia berdasarkan akumulasi protein p53 dalam inti sel. Pada penelitian yang dilakukan oleh Claudia Georgescu *et al*. didapatkan overekspresi p53 sebesar 58,53% kasus. Sedangkan pada penelitian ini semua mengekspresikan p53 mutan, dimana tidak ada sampel dengan ekspresi p53 mutan dengan skor negatif.¹⁷

Pada penelitian yang dilakukan oleh Claudia Georgescu *et al*. didapatkan pulasan p53 sebesar 37,5% pada *low grade* (*grade* 1 dan 2) dan 57,14% pada kasus dengan adenokarsinoma *high grade*. Pada penelitian ini, didapatkan hasil yang serupa yaitu skor p53 semakin tinggi pada derajat diferensiasi yang rendah.¹⁷

Pada penelitian oleh Jurach, Marcia *et al*. mengemukakan bahwa tidak ada hubungan antara p53 dengan ukuran tumor, derajat diferensiasi lokasi maupun jenis kelamin.¹⁸ Hasil yang sama juga dikemukakan oleh Yamac Erhan *et al*. di mana pada penelitian mereka juga tidak didapatkan hubungan antara p53 dengan jenis kelamin, umur, lokasi tumor, derajat diferensiasi, stadium maupun nodal metastasis. Pada sampel yang terdapat metastasis ataupun rekurensi menunjukkan persentase p53 lebih tinggi daripada yang tidak rekuren atau yang tidak metastasis.¹⁹

Pada penelitian ini hubungan antara ekspresi p53 dan VEGF pada adenokarsinoma kolorektal derajat diferensiasi tinggi, sedang maupun rendah dengan uji lanjutan *Spearman* didapatkan hasil koefisien korelasi $r=0,570$ dan $p=0,001$ ($p < 0,05$), yang artinya terdapat korelasi yang signifikan antara ekspresi p53 dengan VEGF pada adenokarsinoma kolorektal derajat diferensiasi tinggi, sedang maupun rendah.

Mutasi pada p53 yang terjadi hampir pada semua karsinoma kolorektal, telah diketahui sebagai regulator ekspresi VEGF. Cassano *et al*. menunjukkan bahwa mutasi pada p53 memicu ekspresi VEGF pada sampel penelitiannya, hal ini mengindikasikan bahwa mutasi pada p53 mempunyai kontribusi pada

perubahan angiogenik pada karsinoma kolorektal.²⁰ Kieser *et al.* melaporkan bahwa ekspresi VEGF dipicu melalui jalur stimulasi protein kinase C dengan adanya mutasi pada tumor suppressor gene p53.²¹ Hasil yang berbeda dikemukakan oleh Joo *et al.* yang melaporkan bahwa ekspresi p53 tidak berhubungan dengan ekspresi VEGF.²²

Kang *et al.* pada penelitiannya menunjukkan keterlibatan yang erat antara VEGF dan p53 mutan dalam liver metastasis. Insiden liver metastasis sangat tinggi pada pasien dengan p53 dan VEGF yang positif, dimana pasien tersebut mempunyai prognosis yang buruk. Tumor yang kehilangan fungsi p53 tidak hanya menyebabkan pertumbuhan yang tidak terkontrol tetapi juga membuat lingkungan yang sesuai untuk metastasis hematogen melalui stimulasi VEGF yang memicu angiogenesis akumulasi p53 mutan erat hubungannya dengan ekspresi VEGF, vaskularisasi tumor dan liver metastasis pada karsinoma kolorektal, diduga bahwa p53 mempunyai peran yang penting untuk menekan pertumbuhan tumor dengan meregulasi angiogenesis. Aplikasi klinis dari kombinasi analisa p53 dan VEGF sangat berguna untuk memprediksi kejadian liver metastasis.²³

KESIMPULAN

VEGF dan p53 mutan berperan dalam membedakan adenokarsinoma kolorektal derajat diferensiasi tinggi, sedang dan rendah, sehingga dapat digunakan sebagai petanda prognostik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Theodoropoulos GE, Eleni K, Joanna P, Stamopoulos P, Zambitins C, Bramis K, *et al.* P53 and EGFR expression in colorectal cancer : A reappraisal of 'old' tissue markers in patients with long follow-up. *Anticancer Res.* 2009; 29: 785-92.
2. Fenoglio PCM, Lantz PE, David M, Listrom MB. The neoplastic large intestine. Gastrointestinal pathology: an atlas and text. New York: Raven Press; 2008.
3. Abdou AG, Hayam A, Nancy A, Moshira W, Marwa D. Immunohistochemical evaluation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in colorectal carcinoma. *J Egypt Nat Cancer Inst.* 2006; 18: 311-22.
4. Kresno SB. Angiogenesis, In: Ilmu Dasar Onkologi. 3th ed. Jakarta: Penerbit FKUI; 2010
5. Laakkonen P, Waltari M, Holopainen T, Takahashi T, Pytowski B, Steiner P. Vascular endothelial growth factor receptor 3 is involved in tumor angiogenesis and growth. *Cancer Res.* 2007; 67: 539-9.
6. Montero E, Abreau C, Tonino P. Relationship between VEGF and p53 expression and tumor cell proliferation in human gastrointestinal carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008; 134: 193-201.
7. Saito H, Tujitani S, Ikegichu M, Maeta M. Neoangiogenesis and relationship to nuclear p53 accumulation and vascular endothelial growth factor expression in advanced gastric carcinoma. *Oncol.* 1999; 57: 164-72.
8. Takahashi Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. P53, vessel count, and vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer. *Int J Cancer* 1998; 79: 34-8.
9. Guan YH, He Q, La Z. Roles of p53 in carcinogenesis, diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Mol.* 2006; 2: 191-7.
10. Maeda K, Kang SM, Onoda M, Ogawa M, Sawada T, Nakata B, *et al.* Expression of p53 and vascular endothelial growth factor associated with tumor angiogenesis and prognosis in gastric cancer. *Oncol.* 1998; 55: 594-9.
11. Fontanini G, Faviana P, Lucchi M, Boldrini L, Mussi AA. High vascular count and overexpression of vascular endothelial growth factor are associated with unfavorable prognosis in operated small cell lung carcinoma. *Br J Cancer* 2002; 86: 558-63.
12. Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S, Riboli E, Nakamura S, Hainaut P. Carcinoma of the colon and rectum. WHO Classification of Tumors, Pathology, and Genetics: Tumors of the digestive system. Lyon: IARC Press; 2000.
13. Hashim AF, Al-Janabi AA, Mahdi LH, Al-Toriahi KM, Yasseen AA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor expression correlates with histologic grade and stage of colorectal cancer. *Libyan J Med.* 2010; 5: 1-4.
14. Shu Z, Ming YH, Zuo XX, Jia PP, Qi D. Clinical significance of vascular endothelial

- growth factor expression and neovascularization in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2003; 9: 1227-30.
15. Lee JC, Chow NH, Wang ST, Huang SM. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients. *Eur J Cancer* 2000; 36: 748-53.
 16. Gunsilius E, Tsemelitsch J, Eberwein M, Schwelbergetr H, Spizzo G, Kahler C, *et al.* *In vivo* release of vascular endothelial growth factor from colorectal carcinoma. *Oncol* 2002; 62: 313-7.
 17. Georgescu C, Saftoiu A, Georgescu C, Ciurea R, Ciurea T. Correlation of proliferation markers, p53 expression and histological findings in colorectal carcinoma. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2007; 16: 133-9.
 18. Jurach MT, Meurer L, Moriere LF. Expression of the p53 protein and clinical and pathologic correlation in adenocarcinoma of the rectum. *Arq Gastroenterol* 2006; 43: 14-9.
 19. Erhan Y, Korkut MA, Kara E, Aydede H, Sakarya A, Ikgul O. Value of p53 protein expression and its relationship with short-term prognosis in colorectal cancer. *Ann Saudi Med.* 2002; 22: 377-9.
 20. Cassano A. Expression of vascular endothelial growth factor, mitogen activated protein kinase and p53 in human colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2002; 22: 2179-84.
 21. Kieser A, Weich HA, Bradner G, Marmer D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogen.* 1994; 9: 963-9.
 22. Joo YE, Sohn YA, Joo SY, Lee WS, Min SW, Park CH. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) and p53 status for angiogenesis in gastric cancer. *Koren J Int Med.* 2002; 17: 211-9.
 23. Kang SM, Maeda K, Onmoda N, Chung YS, Nakata B, Nishiguchi Y, *et al.* Combined analysis of p53 and vascular endothelial growth factor expression in colorectal carcinoma for determination of vascularity and liver metastasis. *Int J Cancer Pred Oncol.* 1997; 74: 502-7.