

私立中山醫學院醫學研究所碩士論文

Master Thesis , Institute of Medicine

Chung Shan Medical & Dental College

**$p21^{WAF1/CIP1}$ 基因多型性與台灣肺癌敏感性及
預後關係之研究**

**Analysis of $p21^{WAF1/CIP1}$ Polymorphism with Lung Cancer
Susceptibility and Prognosis in Taiwan**



**指導教授：王憶卿 博士
周明智 博士**

研究生：施純明

中華民國八十九年一月

目 錄

	頁 次
中文摘要	2
英文摘要	4
第一章 前言	5
第二章 文獻探索	
一、 <i>p53</i> 與 <i>p21</i> 抑癌基因的結構與功能	7
二、 <i>p53</i> 與 <i>p21</i> 基因多型性與肺癌罹病率的相關性研究	9
第三章 材料與方法	
一、研究族群	12
二、 <i>p21</i> 基因多型性分析	12
三、 <i>p53</i> 抑癌基因突變分析與 <i>p53</i> 基因多型性分析	13
四、統計分析	14
第四章 結果	
一、台灣地區以及世界各族群 <i>p21</i> 基因多型性分佈	15
二、正常人及肺癌病患之 <i>p21</i> 基因多形性與各種病理分類的相關性--	15
三、 <i>p21</i> 基因多型性與 <i>p53</i> 基因突變、 <i>p53</i> 基因多型性的關係	16
四、 <i>p21</i> 基因多型性與預後的關係	16
第五章 討論	17
參考文獻	20
論文附錄：Submitted to Japanese Journal of Cancer Research	37

中文摘要

自民國七十一年以來，癌症一直是台灣地區的重要死亡原因；其中肺癌的死亡率在女性與男性分佔癌症死亡率的首位及第二位，一些與癌症形成有關的抑癌基因與致癌基因，已被證實其基因多型性與個體的癌症罹病以及預後情形有關；而其中 *p53* 抑癌基因與 *p21* 抑癌基因的某些基因型已知與肺癌形成有關，例如：在腺肺癌 (adenocarcinoma) 中，*p53* 基因第 72 個胺基酸為 Pro/Pro 基因型的機率較高；*p21* 基因第 31 個胺基酸為 Arg 基因型者較易罹患肺癌。這些基因型的分佈尚未在台灣有研究報告，同時這些基因多型性與台灣地區肺癌敏感性與預後的關係並不清楚。所以我們的實驗室，在完成 *p53* 基因多型性的研究後，接著從事 *p21* 基因多型性的分析。本研究論文的目的即是調查 *p21* 之基因多型性在肺癌與健康對照族群的差異性，以及基因多型性與肺癌病人之性別、年齡、癌症種類、癌症時期、和存活率的關係。以分子生物技術與流行病學統計分析來求得 *p21* 基因多型性在肺癌族群之相對危險因子與其顯著性。並將肺癌患者以基因型分類後，求出每類族群之存活率，以分析基因型與預後的關係。本論文的研究目標有四：(1)了解台灣一般族群中 *p21* 之基因型分佈是否與其他國家有顯著性的差異，以確定基因多型性與種族的關係。(2)了解 *p21* 基因多型性是否與台灣地區肺癌形成有關，並探討基因多型性與肺癌患者性別、年齡、癌症種類的關係。(3)了解 *p21* 基因多型性與 *p53* 基因多型性或是 *p53* 基因突變，彼此之間是否有協同作用(synergistic interaction)或是有相關性。(4)了



解 *p21* 基因多型性是否與台灣地區肺癌預後、存活率有關。我的研究論文中，對於 155 位肺癌患者與 189 位性別、年齡相似的對照族群之 *p21* 基因型的研究指出：在台灣非肺癌的對照族群，其 *p21* 基因型出現 Ser 的機率是 0.51，出現 Arg 的機率是 0.49，這與外國族群有統計學上顯著的差異。但是我們發現 *p21* 基因第 31 胺基酸為 Arg 基因型者，並未如先前外國的研究報告認為較易罹患肺癌。肺癌患者，其 *p21* 基因第 31 胺基酸為 Ser/Arg 或 Arg/Arg 基因型者，與基因型為 Ser/Ser 者的比較，雖然有 1.15 倍的機率會得到肺癌（百分九十五信賴區間，95% CI：0.70-1.86），但是並無統計學上的差異。同時，*p21* 與 *p53* 之基因多型性或是 *p53* 基因突變之間並無有協同作用或是相關性。我進一步分析 154 位肺癌患者的預後，雖然觀察生命表，基因型為 Ser/Ser 者預後似乎較差，但是經過統計分析後並無顯著的差異（ $P = 0.097$, by log rank test）。我們的資料顯示 *p21* 之基因多型性與台灣地區肺癌罹病率與預後無關。

關鍵詞：肺癌、*p21* codon 31 基因多型性、敏感性、預後、*p53* 抑癌基因。

英文摘要 ABSTRACT

An association between the Arg allele of the *p21*^{WAF1/CIP1} codon 31 polymorphism and lung cancer has been previously reported. However, the genotype distribution of *p21* codon 31 polymorphism as well as the association of this polymorphism with lung cancer risk and prognosis remain undefined in the Taiwanese population. Therefore, I investigated the genotype distribution of *p21* codon 31 polymorphism in 155 lung cancer patients and 189 non-cancer controls. The genotype frequencies in Taiwanese non-cancer controls were 0.51 (Ser) and 0.49 (Arg). Chi-square analysis indicated significant differences in genotype distribution of *p21* from other reports in Swedish ($P=0.001$), Caucasians ($P=0.001$), Indians ($P=0.001$), and African-Americans ($P=0.001$). However, our data did not found an association of the Arg allele of the *p21* polymorphism with the lung cancer risk in Taiwan. Lung cancer patients with Ser/Arg and Arg/Arg genotypes were at a non-significant 1.15-fold excess risk of lung cancer when compared to individuals with the Ser/Ser genotype (95% CI, 0.70-1.86). In addition, although *p21* is a downstream target of *p53*, I found no significant correlation of *p21* polymorphism with *p53* polymorphism and *p53* gene mutation in lung cancer patients. I further investigated the association of *p21* polymorphism with prognosis in 154 lung cancer patients. Patients with the Ser/Ser genotype tended to have poor prognosis than those with the Ser/Arg and Arg/Arg genotypes ($P=0.10$, by the log rank test). My data suggested that *p21* codon 31 polymorphism may not play a significant role in cancer susceptibility and prognosis of lung cancer patients in Taiwan.

Key words: lung cancer, *p21* codon 31 polymorphism, susceptibility, prognosis, *p53* tumor suppressor gene.

第一章 前言

惡性腫瘤在台灣地區，自 1982 年後一直是佔十大死因之首位，其中肺癌的死亡率亦有逐年提昇的現象；從 1954 年至 1995 年肺癌死亡率，男性由 3.88 人/百萬人提昇至 32.41 人/百萬人；女性由 2.07 人/百萬人提昇至 14.35 人/百萬人。除此之外，在台灣地區肺癌死亡在女性以及男性，分別佔第一位及第二位（行政院衛生署，1996）。而 Yu et al., (1996) 及 Ger et al., (1993) 對中國大陸及台灣地區的流行病學調查顯示，抽菸是這兩個地區肺癌發生的主要原因。但是，在台灣，男性和女性抽菸人口的比例分別為 60%和 4% (Koo and Ho, 1990)。故顯示台灣地區肺癌形成的原因，應該有其他的致癌因子參與，例如二手煙、炒菜油煙、香燭、工作場所或環境污染物都有可能導致肺癌形成的因子 (Chen et al., 1995; Gao et al., 1996; Koo and Ho, 1996; Shields et al., 1995; Wen et al., 1994)。但是，真正的分子致癌機制迄今尚未明瞭，所以研究台灣地區肺癌發生的原因，實為一項刻不容緩的工作。

分析與癌症形成有關的基因，或許可以從其中了解可能的致癌因子與癌症之間的關係。在許多種類的惡性腫瘤上，都可以發現抑癌基因的突變。例如著名的 *p53* 抑癌基因，最早由 Lane and Cranford (1979) 與 Linter and Levine (1979) 所發現之後，Malkin et al., (1990) 研究在 Li-Fraumeni syndrome 中發現有 *p53* 抑癌基因的 germline mutation。同時也有學者發現基因多型性可能與肺癌的罹患急預後有關。因此，我們的實驗室，在過去

研究了台灣地區肺癌病患 *p53* 抑癌基因的突變分析，以及肺癌病患與正常族群其 *p53* 抑癌基因 codon 72 多型性之差異。本研究的目的是，進一步探討與 *p53* 抑癌基因有密切關係的下游 *p21^{WAF1/CIP1}* 抑癌基因，分析肺癌病患與正常族群其 *p21* 抑癌基因 codon 31 多型性之差異，並分析 *p21* 基因型與肺癌患者預後的關係，冀望能找出與肺癌有關的分子機轉。

一、p53 與 p21 抑癌基因的結構與功能

人類 p53 抑癌基因分為 11 個 exons。Exon 2 至 exon 11 轉譯出 393 個胺基酸的 p53 蛋白；在前人的研究中發現，p53 抑癌基因最常發生突變的位置在 exon 5 至 exon 8 (codon 126 至 codon 306) (Nigro et al., 1989)，同時 p53 蛋白包含了三個功能區 (domains)：transactivation domain，DNA binding domain，以及 oligomerization domain。而且，p53 蛋白在細胞週期 (cell cycle) 與 apoptosis 扮演了相當重要的角色 (Seivakumarah et al., 1994 ; Wang et al., 1996)。

當細胞受到損傷時，p53 蛋白表現量會大量增加，同時誘發 p53 下游的 p21^{WAF/CIP1} 基因表現，因為 p21^{WAF/CIP1} 基因上游的 promoter 位置有兩個 p53 蛋白可以認知的序列，一個在 -2225，另一個在 -1330 (El-Deiry et al., 1994 and 1995)，而 p21^{WAF/CIP1} 蛋白是屬於一種 cyclin dependent kinase (CDK) inhibitor，p21^{WAF/CIP1} 蛋白表現量增加的結果會造成 cyclin-CDK complex 對於 retinoblastoma protein (RB 蛋白)的磷酸化功能喪失，使得 RB 蛋白不會釋放出 transcription factor。例如：E2F，讓 cell cycle 不能由 G1 時期進入 S 時期。如此一來使細胞週期停滯在 G1 時期，以利於修補酵素對細胞進行修復 (Kastan et al., 1991; Lane et al., 1992)。

細胞凋零 (apoptosis) 是指細胞進程序性的死亡，當細胞在生長分化

期間，細胞已不被需要或受到外來的嚴重損傷而無法修復就會進行 apoptosis (Seivakumaran et al., 1994; Wang et al., 1996)。根據最近的研究結果顯示，p53 有兩條路徑來調控 apoptosis，一是 Transcription-dependent apoptosis 路徑：p53 蛋白會誘發 *bax* 基因的表現而促使細胞進行 apoptosis；另外一個是 Transcription-independent apoptosis 路徑，p53 protein 會與一些 Transcription repair coupled factor 結合。例如：TF II H (XPB, XPD) 而導致 apoptosis (Seivakumaran et al., 1994; Wang et al., 1996)。

至於 *p21* 抑癌基因發生體質突變 (somatic mutation) 的情形，在人類的癌症則很少見 (Shimizu et al., 1996; Koopman et al., 1995)。雖然如此，*p21* 基因之 codon 31 基因多型性，當 C 轉變為 A 時，會使得 Ser 變成 Arg 氨基酸。這個 *p21* 基因 codon 31 的位置與 DNA-binding zinc-finger domain 有關 (El-Deiry et al., 1993; Huppi et al., 1994)。所以有學者懷疑它和某些特殊蛋白的作用可能有關係；不過在肺癌細胞株的研究發現，不論是 Ser 或是 Arg 的基因多型性，它們的抑癌功能並無差別 (Chedid et al., 1994)。而且，實驗室中測定 *p21* 蛋白抑制 Cyclin-CDK 酵素活性的能力，發現不論是 wild-type Ser *p21* 或是 variant Arg *p21* 蛋白，都有同樣抑制生長的能力 (Lori et al., 1996; Sun et al., 1995)。另外，兩種基因型轉殖後 (Transfection)，測量轉殖細胞受到生長抑制的情形，也相當類似 (Chedid, et al., 1994)。

二、*p53* 與 *p21* 基因多型性與肺癌形成的相關性研究

研究與癌症形成有關的基因其基因多型性 (genetic polymorphism)，可能可以用來探討癌症形成的原因。*p53* 基因之 codon 72 的基因多型性，曾被報導與肺癌形成有關 (Jin et al., 1995; Kawajiri et al., 1993; Weston et al., 1992)。Wild-type *p53* 基因在 codon 72 存在有 CGC 及 CCC 兩種 genotypes：一個轉譯為 Arg (CGC, wild type)，屬於極性胺基酸；另一個轉譯為 Pro (CCC, variant type)，屬非極性胺基酸 (Matlashewski et al., 1987)。Matlashewski et al. (1987) 利用 polymerase chain reaction (PCR) 將 *p53* 基因放大 (amplification) 再藉由 *Bst*UI digestion 即可進行基因多型性分析。這兩種基因型所轉譯出的 *p53* 蛋白，在 electrophoretic mobility 有所不同 (Matlashewski et al., 1987)；另外有研究發現，在大部分的細胞中兩種 *p53* 蛋白半衰期並沒有差異，只有在 Daudi 細胞中 Pro 基因型的 *p53* 蛋白的半衰期增長 (Zhang et al., 1992)。但是，這兩種基因型所轉譯出的 *p53* 蛋白功能之不同處尚未明瞭。

在不同種族的正常人，其 *p53* 基因 codon72 的基因多型性的分佈也有所差異。Beckman et al. (1994) 報導隨著緯度的增加，出現 Pro allele 的頻率隨之遞減；由非洲黑人的 0.63 到歐洲瑞典的 0.17。Weston et al. (1994) 同時也發現 Pro allele 隨著種族的不同而有所差異。另外，兩個日本的研究也指出 Pro allele 在日本人的機率從 0.35 到 0.40 (Kawajiri et al., 1993; Murata et al., 1996)。

在台灣正常族群 *p53* codon 72 基因多型性，正常人 *p53* 基因 codon 72

的三種基因型 Arg/Arg, Arg/Pro, Pro/Pro，其分佈大約是 30.9%，49.3%，以及 19.7%。其中 allele frequencies 分別是 0.56 (Arg) 及 0.44 (Pro)，正常族群中男女基因型的分佈非常相近 (Wang et al., 1999a)。台灣地區與國外所發表的各種正常族群其 *p53* 基因型分佈的情形，與瑞典、西班牙及美國的白種人之 *p53* codon 72 基因型分佈，發現有顯著的差異性。這些族群其 Pro allele 的出現頻率較台灣人低；另外發現美洲的黑人其 Pro allele 的頻率較台灣人多。然而，台灣地區正常人的 *p53* 基因型分佈情形與日本人及中國人並無明顯差異 (Wang et al., 1999a)。

p53 codon 72 基因多型性曾在美、日兩國的研究中發現與肺癌敏感性有關 (Westor et al., 1992；Kawajiri et al., 1993)。在我們的實驗室先前發現，Pro allele 在台灣地區女性肺癌出現的頻率較正常人來得高，肺癌病患其 *p53* 基因多型性以 Arg/Pro 基因型的預後情形最好。另外，Pro/Pro 與 Arg/Arg 基因型要比 Arg/Pro 基因型更容易在開刀後的六個月內就死亡 (Wang et al., 1999a and 1999b)。

至於 *p21* 抑癌基因方面，*p21* codon 31 有一基因多型性，當 C 轉變為 A 時，會使得 Ser (wild type) 變成 Arg (variant type) 胺基酸 (Chedid et al., 1994)。*p21* 基因多型性曾被報導可能與乳癌、胃癌以及子宮內膜癌有關 (Mousses et al., 1995; Akama et al., 1996; Hachiya et al., 1996)。最近瑞典分析 144 位肺癌病患與 95 位慢性阻塞性肺病患者，發現 *p21* 基因之 codon 31 的基因多型性 Arg allele 出現在肺癌病患機率高 (7.3%)，而在慢性阻塞性肺

病患者較低 (1.6%) (Själänder et al., 1996)。還有學者報導，在攝護腺癌與頭頸部扁平細胞癌病患，其 Arg allele 較正常人有高機率出現 (Facher et al., 1997)。印度也報導口腔癌病患之 Arg 基因型較多 (Heinzel et al., 1996)。有趣的是，最後兩篇的研究報導，發現 Arg 基因多型性只存在於沒有 *p53* 突變的病患，這可能表示，*p21* 基因 variant 多型性與 *p53* 基因產生突變，在某些癌症病人是不相容，不會同時發生的。另一方面，目前的研究，沒有證據證明 *p21* 基因多型性會增加罹患鼻咽癌、腦癌、乳癌、卵巢癌或是子宮內膜癌的機會 (Shimizu et al., 1996; Shiohara et al., 1994; Sun et al., 1995; Akama et al., 1996)。

不同的種族的正常人其 *p21* codon 31 的基因多型性分佈也有所差異，出現 Arg allele 的頻率，在廣州與新加坡的華人是 0.50 (Birgander et al., 1996)，非洲黑人是 0.29 (Birgander et al., 1996)，印度是 0.16 (Birgander et al., 1996)，到歐洲瑞典是 0.04 (Själänder et al., 1996)。在台灣，曾報告鼻咽癌與正常對照組出現 Arg allele 的機率分別是 0.56 與 0.55 (Sun et al., 1995)。但是這一篇台灣的報告，其研究族群的 heterozygous 基因型分佈較多 (83%)，不符合遺傳學 Hardy-Weiberg 法則。所以，我的論文研究目的，在搜集更多的樣本，以瞭解 *p21* codon 31 的基因多型性在台灣族群分佈的情形，其次探討 *p21* codon 31 的基因多型性與台灣肺癌罹患以及預後的關係，並進一步偵測 *p21* 基因型與 *p53* 突變和基因型是否有關連性。

第三章 材料與方法

一、研究族群

從 1993 至 1998 年間，一共收集有 155 個肺癌病患與 189 個非肺癌的對照組列入本研究。肺癌病患的分類：其中 138 個是非小形細胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 的肺癌病人 (73 個腺癌 adendocarcinoma, AD；58 個扁平細胞癌 squamous cell carcinoma, SQ；2 個腺性扁平細胞癌 adenosquamous carcinoma；2 個大細胞肺癌, large cell carcinomas；2 個是大細胞肺癌與小形細胞肺癌的複合型；1 個是腺癌及大細胞肺癌的複合型)，還有 17 個是小形細胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC)，肺癌種類以及期數分類方法皆根據 World health organization 的分類 (WHO., 1982)。肺癌病患的追蹤情形，第一年每兩個月追蹤調查一次，第二年之後每三個月調查一次，分別追蹤至 1999 年 4 月 15 日。189 個正常族群檢體來自於體檢中心，他們的年齡分佈則挑選與病患較為接近者。病人與正常對照組平均年齡分別是 66 歲 (分佈:33-86 歲) 與 62 歲 (分佈: 24-92 歲)。

二、*p21* 基因多型性分析

收集肺癌病人及對照族群個體 5 ml 血液，將其 Genomic DNA 純化出來，再參考 Sun (1995) 的實驗方法，用其設計出之 oligodeoxynucleotide primer 以 PCR 方法將 *p21* 基因之 exon 2 放大出來 *p21* codon31 基因多型

性的位置，利用 *Blp1* 限制酵素切割（認知的位在 5'-GCTNAGC-3', New England Biolabs, Beverly, MA), 在 37°C 下反應約 4-8 小時。其中 Ser allele 會被 *Blp1* 限制酵素所認知;而 Arg allele 則否。隨後經由 3% agarose 電泳，以 ethidium bromide 染色即可偵測出 *p21* 基因多型性 (Figure 1)。

三、*p53* 抑癌基因突變分析與 *p53* 基因多型性分析

外科手術取下肺癌檢體後，隨即置於冰上，之後放置液態氮保存。肺癌檢體的 Genomic DNA 萃取，利用傳統的 phenol-chloroform 方法，用 proteinase K，以及酒精沈澱的步驟純化出 DNA。利用 single-strand conformational polymorphism (PCR/SSCP) 以及定序 DNA 方法，分析 63 個肺癌之 *p53* 基因 exon 4-11 突變情形。

PCR/SSCP 分析方法參考 Lehman et al. (1991)的實驗方法設計出 oligodeoxynucleotide primer 及 PCR 之條件，將 *p53* 基因 exon 4-11 的片段經 PCR 放大，而且在 PCR 反應中加入 α ³²P-dCTP，放大後的產物以 95°C 高溫 denaturation，隨即置於冰上，將 sample loading 入可保持其 DNA 構形的 non-denaturing polyacrylamide gel 外加 5%甘油，在室溫利用電風扇吹拂，以維持 DNA 構形的情況下，用 30W，跑 4~5 小時。利用 PCR/SSCP 的分析方法發現 running pattern 有不正常的情況後，再利用 dideoxy chain termination 方法， α -S³⁵-labeled dATP, PCR 反應的 primers, 以及 (United States Biochemical 公司) 的 sequenase II kit 進行 DNA 的定序分析。

p53 基因多型性的分析 是將純化出之血液 Genomic DNA 參考 Lehman et al., (1991) 的實驗方法，用其設計出之 oligodeoxynucleotide primer 以 PCR 方法將 *p53* 基因之 exon 4 放大出來。*p53* codon 72 基因多型性的位置，利用 *BstU1* 限制酵素切割（認知的位在 5'-CGCG-3', New England Biolabs, Beverly, MA），在 60°C 下反應約 4-8 小時。其中 Arg allele 會被 *BstU1* 限制酵素所認知；而 Pro allele 則否。隨後經由 3% agarose 電泳，以 ethidium bromide 染色即可偵測出 *p53* 基因多型性。

四、統計分析

p21 基因多型性分析方面，利用 Pearson χ^2 test 來比較肺癌病患及正常族群 allele 分佈情形；而邏輯式回歸（logistic regression）則用以計算病患與正常族群之 Arg/Arg, Arg/Ser, Ser/Ser 三種基因型的勝算比（Odds ratio, OR）以及 95% 信賴區間（confidence interval, CI）。另外，多變數邏輯回歸（multivariate logistic regression）則用以控制年齡與性別因素。至於 *p21* 基因多型性與預後分析方面，利用 Kaplan-Meier 方法，以時間和存活率分別為橫、縱軸而計算出 median survival time (Kaplan and Meier, 1958)；Logrank test 則用以計算兩群體間存活率的差異性（The life test procedure, 1988）。*p21* 基因多型性與 *p53* 基因之突變及多型性分佈的關聯性，則以 Pearson χ^2 test 來分析。

第四章 結 果

一、台灣地區以及世界各族群 *p21* 基因多型性分佈

我研究了 155 個肺癌病患以及 189 個正常人，發現台灣地區正常人 *p21* 基因 codon 31 的三種基因型 Ser/Ser, Ser/Arg, Arg/Arg 分別是 27.0%, 47.1% 以及 25.9%；且符合 Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2 = 0.02$; df = 2; $P = 0.99$), 其 allele frequencies 分別是 0.51 (Ser) 及 0.49 (Arg), 正常族群中男女基因型的分佈非常相近。Table 1 顯示台灣地區與國外所發表的各種正常族群其 *p21* 基因型分佈的情形。利用 Chi-square 分析台灣地區正常族群與瑞典、美國白人、印度、與非洲裔美人之 *p21* codon 31 基因型的分佈，發現有顯著的差異性 (P 值分別是 $<10^{-3}$, $<10^{-3}$, $<10^{-3}$, $<10^{-3}$)。然而，台灣地區正常人的 *p21* 基因型分佈情形與日本人及中國人並無明顯差異。所以不同 *p21* 基因型出現的頻率與種族有關。

二、正常人及肺癌病患之 *p21* 基因多型性與各種病理分類的相關性

肺癌病患的平均年齡是 66 歲，而正常族群的平均年齡為 62 歲，比較正常人以及肺癌病患的性別分佈，發現正常族群中女性較肺癌患者之女性分佈為多 (正常人中佔 53.4 %, 101 人/189 人；肺癌患者佔 20.6 %, 32 人/155 人)。Table 2 說明肺癌病患及正常人之 *p21* 基因多型性與各種病理分類的關係。就整體而言，肺癌病患與正常人之 *p21* 基因多型性的分佈並沒有顯著的差異性 ($P > 0.05$, χ^2 test)；即使根據肺癌病患的性別，癌症類型、

期數、抽菸習慣、以及年齡來分類，也是不見有統計上顯著的差異。以多變數邏輯回歸分析校正了性別、年齡因素後，*p21* 基因型也與肺癌病人罹病率無顯著關係 (Table 2)。

三、*p21* 基因多型性與 *p53* 基因突變、*p53* 基因多型性的關係

當細胞受到損傷時，*p53* 蛋白表現量會大量增加，同時誘發 *p53* 下游的 *p21^{WAF/CIP1}* 基因表現。所以我分析了 126 肺癌病患的 *p21* 與 *p53* 基因多型性之相關性，其中 *p53* 是 Pro/Pro (variant type) 基因型者出現 *p21* 為 Ser/Ser (wild type) 的機率較高 (29 %, $P>0.05$, Table 3)。我亦分析了 63 個肺癌手術病患，其檢體 *p53* 基因突變與 *p21* 基因多型性的關係，有 *p53* 基因突變者，36.4% 是 *p21* Ser/Ser wild-type 基因型，稍高於無 *p53* 基因突變者 (28.8 %, $P>0.05$, Table 3)。但統計學上的分析結果，發現 *p21* 基因多型性與 *p53* 基因多型性之間，並無明顯相關性；而且 *p21* 基因多型性與 *p53* 基因有無突變，亦無顯著關聯。

四、*p21* 基因多型性與預後的關係

我分析了 154 個肺癌病患，其 *p21* 基因多型性與預後的關係。其中以 Ser/Ser 基因型的預後情形較差 ($P= 0.097$, by log rank test)，平均的存活時間分別是：Ser/Ser 基因型為 18 個月，Ser/Arg 基因型為 20 個月，Arg/Arg 基因型為 24 個月 (Figure 2)。

第五章 討 論

本研究可以用來評估肺癌形成或預後與 *p21* codon 31 基因多型性之間的關係。結果顯示 (1) 台灣人的 *p21* 基因多型性分佈情形與瑞典、印度、美洲的白種人、或非裔美人有顯著的不同。(2) *p21* 基因之 Arg allele 基因多型性與台灣肺癌的形成無關。(3) *p21* 基因多型性與 *p53* 基因突變、*p53* 基因多型性之間無關聯性。(4) 肺癌病患，*p21* 基因型是 Ser/Ser 者可能有較差的預後。

我的研究再次確定，種族因素是流行病學研究遺傳時重要的干擾因子；正如 Birgander et al, (1996) 的研究報告，不同種族會有不同的 *p21* 基因型的分佈 (見 Table 1)。Beckmen et al., (1994) 亦發現 *p53* 基因多型性之 Pro allele 的頻率與緯度有相關。但是，*p21* 與 *p53* 基因多型性在各種族與地區的分佈，並無明顯的一致性。

p21 基因多型性的分佈，在台灣肺癌與對照組都很類似；而且台灣肺癌的罹病率與 *p21* 基因多型性沒有相關性 (Table 2)。*p21* Ser/Arg 與 Arg/Arg 基因型的肺癌患者，只比 Ser/Ser 基因型有 1.15 倍的危險性罹患肺癌。我的研究結果不同於 Sjölander et al. (1996) 的研究發現，在瑞典肺癌的病人要比慢性阻塞性肺病患者有較多 *p21* codon 31 Arg 基因型。我們與瑞典研究的差異性，可能的原因有二：一是兩者的對照組不同，我們是以正常族群當做對照組，瑞典則以慢性阻塞性肺病患者當做對照組，事實上

Själänder et al.的研究發現，Arg 基因型分佈在肺癌與正常族群之間並無明顯的差異；二是基因型的分佈因為種族與地區的不同，所以產生研究結果的差異。在過去有許多 *p21* 基因多型性與癌症的研究，結果也不一致，可能也是受到不同種族或是不同種類癌症研究對象的影響。

由於 *p53* 抑癌基因與 *p21* 抑癌基因位於同一個細胞週期調控路徑，一個有趣的問題是，在癌症患者的 *p53* 與 *p21* 基因會不會有協同作用呢？在我的研究中發現，*p21* 基因多型性與 *p53* 基因多型性之間，並無相關性 (Table 3)；*p21* 基因多型性與 *p53* 基因有無突變，亦無關聯 (Table 3)。有一些外國的報告，在卵巢癌與腦瘤研究中，也獲得相同的結果 (Milner et al., 1996；Birgander et al., 1996)。

在本研究中發現，*p21* 基因多型性為 Ser/Ser 基因型者，有預後較差的趨勢，但是統計學上的分析結果不顯著 ($P=0.097$)。在我們過去的研究中，曾經發現 *p53* 基因多型性為 Pro/Pro 基因型者，預後較差 (Wang et al., 1999a；1999b)，而 *p53* 基因突變者也有一些預後較差的趨勢 (Wang et al., 1999c)。本研究發現 *p21* 基因多型性為 Ser/Ser 基因型者，也有較高機率是 *p53* Pro/Pro 基因型，也有可能真正影響預後的是 *p53* 基因，而非 *p21* 基因；或者，腫瘤分期與病患活動能力是較基因型為更重要的預後決定因子。

結論是，我的研究顯示 *p21* codon 31 基因多型性與台灣肺癌形成與預後無關；*p21* codon 31 基因多型性對於 *p53* 基因突變或是 *p53* 基因多型性也並無影響。不過，其與 *p53* 基因突變的關係，可能還需要搜集更多的病例

來分析。最後，我們未來研究的目標，將著重於肺癌病患其癌細胞中 $p21$ 蛋白質的表現與其 $p21$ 基因型的關係。



参考文献

REFERENCES

- Akama Y, Yasui W, Kuniyasu H, Yokozaki H, Akagi M, Tahara H. No point mutations but a codon 31 polymorphism and decreased expression of the p21(SDI1/WAF1/CIP1/MDA6) gene in human gastric carcinomas. *Mol Cell Differen* 1996, 4, 187-198.
- Beckman G, Birgander R, Sjölander A, Saha N, Holmberg PA, Kivelä A and Beckman L. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum, Hered.*,44:266-270,1994 .
- Birgander R, Sjölander A, Rannung A, Alexandrie AK, Ingelman Sundberg M., Seidergard J, Tomling G, Beckman G, and Beckman L . P53 polymorphisms and haplotypes in lung cancer. *Carcinogenesis*,16:2233-2236, 1995 .
- Birgander R, Sjölander A, Saha N, Spitsyn V, Beckman L, Beckman G. The codon 31 polymorphism of the p53-inducible gene p21 shows distinct differences between major ethnic groups. *Hum Hered* 1996, 46, 148-154.
- Bronner CE, Baker SM and Morrison PT. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*,368.258-261,1994 .
- Buller RE , Sood A, Fullenkamp C, Sorosky J, Powills K and Anderson B . The influence of the p53 codon 72 polymorphism on ovarian carcinogenesis and prognosis. *Cancer Gene Therapy*, 4:239-245,1997 .
- Casey G, Lopez ME, Ramos JC, Plummer SJ, Arboleda MJ, Shaughnessy M, Karlan B, and Slamon DJ. DNA sequence analysis of exons 2 through 11 and immunohistochemical staining are required to detect all known p53 alterations in human malignancies. *Oncogene*,13:1971-1981,1996 .
- Chedid M, Michieli P, Lengel C, Huppi K, Givol DA. A single nucleotide substitution at codon 31 (Ser/Arg) defines a polymorphism in a highly conserved region of the p53-inducible gene WAF1/CIP1. *Oncogene* 1994, 9, 3021-3024.

- Chen CJ, Wu HY, Chuang YC, Chang AS, Luh KT, Chao HH, Chen KY, Chen SG, Lai GM, Huang HH and Lee HH. Epidemiological characteristics and multiple risk factors of lung cancer in Taiwan. *Anticancer Res.*, 10:971-976, 1990,
- Chen RW and Chen RL. Lung cancer mortality update and prevalence of smoking among copper miners and smelters. *Scandinavian J. Work, Environ. Health*, 21: 513-516, 1995.
- Chen YT, Xu L, Massey L, Zlotolow IM, Huvos AG, Garin-Chess P, and Old LJ. Frameshift and nonsense p53 mutations in squamous cell carcinoma of head and neck--nonreactive with three anti-p53 monoclonal antibodies. *Int. J. Oncol.*, 4: 609-614, 1994.
- D'Amico D, Carbone D and Mitsudomi T. High frequency of somatically acquired p53 mutations in small cell lung cancer cell lines and tumors. *Oncogene*, 7:339-346, 1992.
- Department of Health, The executive Yuan. Republic of China: General health statistics. In: *Health and vital statistics, Republic of China*. R.O.C. Press, Taipei. pp.88-111, 1996.
- El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW and Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825, 1993.
- El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J. WAF/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.*, 54:1169-74, 1994.
- El-Deiry WS, Tokino T, Waldmann T, Oliner JD, Velculescu VE, Burrell M. Topological control of p21^{WAF/CIP1} expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.*, 55:2910-2919, 1995.
- Facher EA, Becich MJ, Deka A, Law JC. Association between human cancer and two

- polymorphisms occurring together in the p21Waf1/Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Cancer* 1997, 79, 2424-2429.
- Fong KM, Zimmerman PV and Smith PJ. Microsatellite instability and other molecular abnormalities in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*,55:28-30, 1995 .
- Fujino M, Dosaka-Akita H, Harada M. Prognostic significance of p53 and ras p21 expression in non-small cell lung cancer . *Cancer*,76:2457-63,1995 .
- Fukuyama Y, Mitsudomi T, Sugio K. K-ras and p53 mutations are an independent unfavorable prognostic indicator in patients with non-small-cell lung cancer *Br J Cancer*,75: 1125-30,1997 .
- Gao YT, Risk factors for lung cancer among nonsmokers with emphasis on lifestyle factors. *Lung Cancer*, 14:S39-S45,1996 .
- Ge H, Lam WK, Lee J, Wong MP, Fu KH, Yew WW and Lung ML. Detection and evaluation of p53 intron 2 polymorphism in lung carcinomas in HongKong . *Int.J Cancer*,69:120-124,1996 .
- Ger LP, Hsu, WL, Chen KT and Chen CJ. Risk factors of lung cancer by histological category in Taiwan . *Anticancer Res.* , 13:1491-1500,1993 .
- Goto I, Yoneda S, Yamamoto M, and Kawajiri K. Prognostic significance of germ line polymorphisms of the CYP1A1 and Glutathione S-transferase genes in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* , 56:3725-3730,1996 .
- Gottlieb TM and Oren M. P53 in growth control and neoplasia. *Biophys. Acta.*, 1287:77-102,1996 .
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M and Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis . *Cancer Res.* , 54: 4855-4878,1994 .
- Greenblatt MS, Grollman AP and Harris CC. Deletions and insertions in the p53 tumor suppressor gene in human cancers: confirmation of the DNA polymerase slippage/misalignment model. *Cancer Res.* , 56:2130-2136,1996 .

- Groppi A , Coutelle C , Fleury B . Glutathione S-transferase class mu in French alcoholic cirrhotic patients. Hum Genet.,87:628-30,1991 .
- Hachiya T, Kuriaki Y, Ueoka Y, Nishida J, Kato K, Wake N. WAF1 genotype and endometrial cancer susceptibility. Gynecol Oncol 1999, 72, 187-192.
- Harris CC. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic-an abridged historical perspective. Carcinogene, 17: 1187-1198, 1996 .
- Harris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: Clue for rational cancer therapeutic strategies. JNCI, 88:1442-1455,1996 .
- Hayashi S, Watanabe J, Nakachi K. Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450 1A1 gene. J Biochem, 110: 407-11,1991 .
- Heinzel PA, Balaram P , Bernard HU. Mutations and polymorphisms in the p53, p21 and p16 genes in oral carcinomas of Indian betel quid chewers. Int J Cancer 1996, 68, 420-423.
- Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, and Harris CC. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. Nucleic Acids, , 22: 3551-3555, 1994 .
- Hsieh LL, Huang RC, Yu MW, Chen CJ, and Liaw YF. L-myc, GST M1 genetic polymorphism and hepatocellular carcinoma risk among chronic hepatitis B carriers. Cancer Lett., 103: 171-176, 1996
- Huppi K, Siwarski D, Dosik J, Michieli P, Chedid, M., Reed S, Mock B, Givol D and Mushinsky JF. Molecular cloning, sequencing, chromosomal localization and expression of mouse p21 (WAF). Oncogene 1994, 9, 3017-3020.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D. and Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for carcinogenesis. Nature, 363:558-561,1993 .

- Isobe T, Hiyama K, Yoshida Y. Prognostic significance of p53 and ras gene abnormalities in lung adenocarcinoma patients with stage I disease after curative resection. *Jpn J Cancer Res.* , 85: 1240-6, 1994 .
- Jin X, Wu X, Roth JA, Amos CI, King TM, Branch C, Honn SE and Spitz R. Higher lung cancer risk for younger African-Americans with the Pro/Pro p53 genotype. *Carcinogenesis* , 16:2205-2208, 1995 .
- Johansson B, Mertens E, and Mitelman F. Geographic heterogeneity of neoplasia-associated chromosome aberrations. *Genes Chromosomes & Cancer*, 3:1-7, 1991 .
- Kaplan EL and Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observation. *J. Am. Stat. Assoc.*, 53:457-81, 1958 .
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B and Craig RW . Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage . *Cancer Res.* , 51:6304-6311, 1991 .
- Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B and Fornace AJ. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 1992, 71, 587-597.
- Kawajiri K, Eguchi H, Nakachi K. Association of CYP1A1 germ line polymorphisms with mutations of the p53 gene in lung cancer. *Cancer Res.* ; 56:72-6, 1996 .
- Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Watanabe J and Hayashi SI. Germ line polymorphisms of p53 and CYP1A1 genes involved in human lung cancer. *Carcinogenesis*, 14:1085-1089, 1993 .
- Kishimoto Y, Murakami Y, Shiraishi M, Hayashi K and Sekiya T. Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res.*, 52:4799-4804, 1992 .
- Koo LC and Ho JHC. Diet as a confounder of the association between air

- pollution and female lung cancer: Hong Kong studies on exposures to environmental tobacco smoke, incense, and cooking fumes as examples. *Lung Cancer*, 14:547-561, 1996.
- Koo LC and Ho JHC. Worldwide epidemiological patterns of lung cancer in nonsmokers. *Int. J. Epidemiol.*, 19:S14-S23, 1990.
- Koopmann J, Maintz D, Schild S. Multiple polymorphisms, but no mutations, in the WAF1/CIP1 gene in human brain tumours. *Br J Cancer* 1995, 72, 1231-1233.
- Kunkel TA. DNA replication fidelity. *J. Bio.Chem.*, 267:18251-18254, 1992.
- Kwajiri K, Eguchi H, Nakachi K, Sekiya T and Yamamoto M. Association of CYP1A1 germ line polymorphisms with mutations of the p53 gene in lung cancer. *Cancer Res.*, 56:72-76, 1996.
- Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358:15-6, 1992.
- Lane DP and Crawford LV. T-antigen is bound to host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 278:261-263, 1979.
- Lee ET. Statistical methods for survival data analysis, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, NNC., pp. 1-7, 1992.
- Lehman TA, Bennett WP, Metcalf RA, Welsh JA, Ecker J, Modali RV, Ullrich S, Romano JW, Appella E, Testa JR, Gervin BI and Harris CC. P53 mutations, ras mutations, and p53-heat shock 70 protein complexes in human lung carcinoma cell lines. *Cancer Res.*, 51:4090-4096, 1991.
- Linzer DH, Levine AJ. Characterization of a 54 K dalton cellular SV 40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, 17:43-52, 1979.
- Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Willson JK, Parsons RE, Jen J, Papadopoulos N, Peltomaki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Kinzler KW and Vogelstein B. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat. Genet.*, 9: 48-55, 1995.

- Lohmann D, Putt B, Reich U, Bohm J, Prauer H and Hofler H. Mutational spectrum of the p53 gene in human small-cell lung cancer and relationship to clinico-pathological data . Am.J. Pathol .,142:907-915,1993 .
- Lori AT, Boyd J, Alcorta D, Lyon T, Solomon G, Hannon G, Berchuck A, Beach D and Barrett JC. Mutational analysis of the p21/WAF1/CIP1/SID1 coding region in human tumor cell lines. Mol Carcinogenesis 1996, 16, 221-228.
- Lukas J, Groshen S, Saffari B, Niu, N. Reles A, Wen WH, Felix J, Jones LA, Hall FL and Press MF. WAF1/CIP1 gene polymorphism and expression in carcinomas of the breast, ovary, and endometrium. Am J Pathol 1997, 150, 167-175.
- Lung ML, Wong MP, Skaanild MT, Fok CL, Lam WK and Yew WW . P53 mutations in non-small cell lung carcinomas in Hong Kong. Chest, 109: 718-726,1996 .
- Malkin D, Li FP, Stong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, Kasse LJ, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA and Elriend SH. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasm. Science, 250, 1233-1238, 1990,
- Malkin K, Li FP, Strong LC, Fraumeni, Jr. JF, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA and Friend SH . Science, 250:1233-1238, 1990 .
- Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J and Crawford LV . Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. MoA Cell. Biol., 7:961-963, 1983 .
- McGlynn KA, Rosvold EA, Lustbader ED. Susceptibility to hepatocellular carcinoma is associated with genetic variation in the enzymatic detoxification of aflatoxin B1. . Proc. Natl. Acad. Sci . (USA) , 92:2384-7, 1995 .
- Merle A, Mabry M, Gabrielson E, Vollmer R, Baylin SB and Sidransky D . Frequent microsatellite instability in primary small cell lung cancer . Cancer

- Res. , 54:2098-2101,1994 .
- Miller CW, Simon K, Aslo AK, Yokota, J, Buys CHCM, Terada, M, and Koeffler HP.
P53 mutations in humman lung tumors. Cancer Res. , 52:
1695-1698,1992 .
- Milner BJ, Hosking L, Sun S, Haites NE, Foulkes WD. Polymorphisms in p21^{CIP/WAF1}
are not correlated with TP53 status in sporadic ovarian tumours. Eur J Cancer 1996,
32A, 2360-2363.
- Mountain CF. A new international staging system for lung cancer. Chest 1986, 89,
225-233.
- Mousses S, Ozcelik H, Lee PD, Malkin D, Bull SB, Andrulis IL. Two variants of the
CIP1/WAF1 gene occur together and are associated with human cancer. Hum Mol
Genet 1995, 4, 1089-1092.
- Murata M, Tagawa M, Kimura M, Kimura H, Watanabe S and Saisho H .
Analysis of a germ line polymorphism of the p53 gene in lung cancer patients;
Discrete results with smoking history . Carcinogenesis , 17:261-264,1996 .
- Nakachi K, Imai K, Hayashi S and Kawajiri K. Polymorphisms of the CYPIA1
and glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer
in relation to cigarette dose in a Japanese population. Cancer Res. , 53: 2994-
2999,1993 .
- Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC. Mutations in the p53 gene occur in diverse
human types . Nature (Lond.),342:705-708,1989 .
- Okada T, Kawashima K, Fukushi S, Minakuchi T and Nishimura S . Association of
CYPIA1 germ line polymorphisms with mutations of the p53 gene in lung cancer.
Cancer Res, 4:333-340,1994 .
- Oren M and Prives C. p53: upstream, downstream and off stream. Biophy.
Acta, 1288:R13-R19,1996 .
- Oyama T, Kawamoto T, Mizoue T. Cytochrome P450 ZE1 polymorphism

- as a risk factor for lung cancer:in relation to p53 gene mutation. *Anticancer Res.* , 17:583-8,1997 .
- Passlick B, Izbicki JR, Haussinger K. Immunohistochemical detection of p53 protein is not associated with a poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Cardio vasc Surg.* , 109:1205-11, 1995 .
- Peltomaki P, Lothe RA, and Aaltonen LA. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma carcinoma syndrome. *Cancer Res.* , 53:5853-5855,1993 .
- Pleasant LM and Hansen MF. Identification of a polymorphism in intron 2 of the p53 Gene. *Hum.Genet.* ,93:607-608,1994 .
- Romkes M, Chern HD , Lesnick TG. Association of CYP3A activity with p53 mutation and CYP2D6 activity with Rb mutation in human bladder cancer. *Carcinogenesis*,17:1057-62,1996 .
- Sameshima Y, Matsuno Y, Shiraishi M, Hayashi K and Sekiya T. Alterations of the p53 gene are common and critical events for the maintenance of malignant phenotypes in small-cell lung carcinoma. *Oncogene.* , 52:4799-4804, 1992 .
- Seivakumaran M, Lin HK, Miyashita T, Wang HG, Krajewski S, Reed JC. Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1. a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene*,9:1791-1798,1994 .
- Shields PG, Xu GX, Blot WJ, Fraumeni Jr.JF, Trivers GE, Pellizzari ED, Qu YH, Gao YT and Harris CC. Mutagens from heated Chinese and U.S.cooking oils. *JNCI*,87:836-841,1995 .
- Shimizu T, Miwa W, Nakamori S, Ishikawa O, Konishi Y, Sekiya T. Absence of a mutation of the p21/WAF1 gene in human lung and pancreatic cancers. *Jpn J Cancer Res* 1996, 87, 275-278.
- Shiohara M, El-Deiry WS, Wada M, Nakamaki T, Takeuchi S, Yang R, Chen DL.,

- Volgelstein B and koeffler P. Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood* 1994, 84, 3781-3784.
- Shridhar V, Siegfried J, Hunt J., del Mar Alonso M and Smith DI. Genetic instability of microsatellite sequences in many non-small cell lung carcinomas . *Cancer Res.* , 54:2085-2087,1994 .
- Själänder A, Birgander R, Athlin L, Stenling R, Rutegard J, Beckman L and Beckman G. P53 germ line haplotypes associated with increased risk for colorectal cancer. *Carcinogenesis*,16:1461-1464,1995 .
- Själänder A, Birgander R, Kivela A and Beckman G. P53 polymorphisms and haplotypes in different ethnic groups. *Hum. Hered.*,45: 144-149,1995 .
- Själänder A, Birgander R, Rannug A, Alexandrie AK, Tornling G, Beckman G. Association between the p21 codon 31 A1 (arg) allele and lung cancer. *Hum Hered* 1996, 46, 221-225.
- Sun Y, Hildesheim A, Li H, Li Y, Chen JY, Cheng YJ, Hayes RB, Rothman N, Bi WF, Cao Y, Yao KT, Lanier AP, Hegamyer G, El-Deiry WS, Xiong Y and Colburn NH. No point mutation but a codon 31ser->arg polymorphism of the WAF-1/CIP-1/p21 tumor suppressor gene in nasopharyngeal carcinoma (NPC): the polymorphism distinguishes Caucasians from Chinese. *Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prev* 1995, 4, 261-267.
- Suzuki H, Takahashi T, Kuroishi T, Suyama M, Ariyoshi Y and Ueda R. p53 mutations in non-small cell lung cancer in Japan :association between mutations and smoking. *Cancer Res.* , 52:734-736,1992 .
- Takagi Y, Koo LC , Osada H, Ueda R, Kyaw K, Ma CC, Suyama M, Saji S, Takahashi T, Tominaga S and Takahashi T. Distinct mutational spectrum of the p53 gene in lung cancers from Chinese women in Hong Kong. *Cancer Res.* , 55: 5354-5357,1995 .
- Takahashi T, Suzuki H, Hida T, Sekido Y, Ariyoshi Y and Ueda R. The p53

- gene is very frequently mutated in small-cell lung cancer with a distant nucleotide substitution pattern. *Oncogene*,6:1775-1778,1991 .
- The Lifetest Procedure . In: SAS Technical Report:P-179. Additional SAS/STAT Procedures,Release 6.03. Cary NC:SAS Institute ,pp.49-90,1988 .
- Thibodeau SN, Bren G and Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*,260:816-819,1993 .
- Velculescu VE and El-Deiry WS. Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clin.Chem.* , 42: 858-868,1996 .
- Visscher DW, Yadrangji S, Tabaczka P . Clinicopathologic analysis of K-ras, p53, and ERBB-2 gene alterations in pulmonary adenocarcinoma. *Diagnost Mol Path.*,6:64-9, 1997 .
- Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependence kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994, 369, 574-578.
- Wang XW, Vermeulen W, Coursen JD, Gibson M, Lupold SE, Forrester K. The XPB and XPD helicases are components of the p53 mediated apoptosis pathway. *Genes Dev.* , 10:1219-1232,1996 .
- Wang YC, Chen CY, Chen SK, Cherng SH, Ho WL, Lee H. High frequency of deletion mutations in *p53* gene from squamous-cell lung cancer patients in Taiwan. *Cancer Res*, 58: 328-333, 1998.
- Wang, YC, Chen CY, Lin P, Chen SK, Chang YY. *P53* codon 72 polymorphism in a Taiwanese lung cancer patients: association with lung cancer susceptibility and prognosis. *Clin Cancer Res*, 5:129-34, 1999a.
- Wang YC, Lee HS, Chen SK, Chang YY, Chen CY. Prognostic significance of *p53* codon 72 polymorphism in lung carcinomas in Taiwan. *Eur J Cancer*, 35:226-30, 1999b.
- Wang YC, Chen CY, Wang HJ, Chen SK, Chang YY, Lin P. Influence of polymorphism at the *p53*, *CYP1A1*, and *GSTM1* loci on *p53* mutation with prognosis in lung cancer.

- Chinese Med J, 62:395-403, 1999c.
- Wen CP, Tsai SP and Yen DD. The health impact of cigarette smoking in Taiwan. *Asia-Pacific J. Public Health*, 7:206-213,1994.
- Weston A, Ling-Cawley HM, Caporaso NE, Bowman ED, Hoover RN, Trump BF and Harris CC. Determination of the allelic frequencies of an L-Myc and a p53 polymorphism in human lung cancer. *Carcinogenesis*, 15: 583-587,1994.
- Weston A, Perrin LS, Forrester K, Hoover RN, Trump BF, Harris CC and Caporaso NE. Allelic frequency of a p53 polymorphism in human lung cancer. *Cancer Epidemiol., Biomarkers & Prev.*, 1: 481-483,1992.
- WHO. Histological typing of lung tumors. *Am J Clin Pathol* 1982, 77, 123-126.
- Wooster R, Cleton-Jansen AM, Collins RS, Cooper CS, Gusterson BA, Ponder BAJ, von Deimling A, Wiestler OD, Cornelisse CJ, Devilee P, and Stratton MR. Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nature Genet.*,6:152-156,1994.
- Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R and Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*,366: 701-704,1993.
- Yu SZ and Zhao N. Combined analysis of case-control studies of smoking and lung cancer in China. *Lung Cancer*, 14: S161-S170,1996.
- Zambetti GP and Levine AJ. A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *FASEBJ.*,7:855-863,1993.
- Zhang W, Hu G and Deisseroth A. Polymorphism at codon 72 of the p53 gene in human acute myelogenous leukemia. *Gene*,117:271-275,1992.

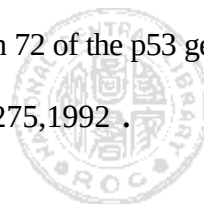


Table 1 Frequency of codon 31 alleles of *p21* in different populations

Population	Genotypes			Arg allele frequency	<i>P</i> value ^a	Reference
	Ser/Ser (%)	Ser/Arg (%)	Arg/Arg (%)			
Taiwanese (n=189)	51 (27.0)	89 (47.1)	49 (25.9)	0.49		This study
Swedes (n=761)	692 (90.9)	67 (8.8)	2 (0.3)	0.05	0.001	Själänder et al., 1996
Caucasians (n=65)	58 (89.2)	7 (10.8)	0 (0.0)	0.05	0.001	Sun et al.,1995
Indians (n=92)	66 (71.7)	23 (25.0)	3 (3.3)	0.15	0.001	Birgander et al.,1996
African-American (n=122)	56 (45.9)	61 (50.0)	5 (4.1)	0.29	0.001	Birgander et al.,1996
Japanese (n=55)	23 (41.2)	19 (34.5)	13 (23.6)	0.46	0.098	Hachiya et al.,1999
Chinese, Singapore (n=121)	27 (22.3)	69 (57.0)	25 (20.7)	0.49	0.251	Birgander et al.,1996
Chinese, Guizhou (n=105)	25 (23.8)	55 (52.4)	25 (23.8)	0.50	0.700	Birgander et al.,1996

^a *P* values were calculated using the X^2 test.

Table 2 Distribution of *p21* polymorphism by case/control status and clinicopathological parameters of lung cancer patients

Characteristics			Genotypes			Total	Crude OR ^a (95% CI)	Adjusted OR ^b (95% CI)
			Ser/Ser (%)	Ser/Arg (%)	Arg/Arg (%)			
Non-cancer control			51 (27.0)	89 (47.1)	49 (25.9)	189	1.00	1.00
Sex	Male		23 (26.1)	45 (51.1)	20 (22.7)	88	1.00	1.00
	Female		28 (27.7)	44 (43.6)	29 (28.7)	101		
Age	≥ 65		30 (31.9)	40 (42.6)	24 (25.5)	94	1.00	1.00
	< 65		21 (22.1)	49 (51.6)	25 (26.3)	95		
Lung cancer			38 (24.5)	85 (54.8)	32 (20.6)	155	1.15 (0.70-1.86)	1.19 (0.71-2.01)
Sex	Male		31 (25.2)	68 (55.3)	24 (19.5)	123	1.05 (0.56-1.96) ^c	1.15 (0.60-2.22) ^d
	Female		7 (21.9)	17 (53.1)	8 (25.0)	32	1.39 (0.54-3.57) ^c	1.41 (0.54-3.70) ^d
Age	≥ 65		28 (25.7)	59 (54.1)	22 (20.2)	109	1.36 (0.74-2.50) ^e	1.36 (0.74-2.50) ^f
	< 65		10 (21.7)	26 (56.3)	10 (21.7)	46	1.02 (0.44-2.39) ^e	1.36 (0.74-2.50) ^f
Tumor type								
	AD		18 (25.0)	41 (56.9)	13 (18.1)	72	1.12 (0.60-2.08)	1.17 (0.62-2.19)
	SQ		15 (25.9)	30 (51.7)	13 (22.4)	58	1.07 (0.55-2.09)	1.17 (0.55-2.48)
Tumor stage								
	I + II		13 (25.5)	26 (51.0)	12 (23.5)	51	1.09 (0.54-2.21)	1.30 (0.61-2.78)
	III + IV		21 (24.7)	49 (57.6)	15 (17.6)	85	1.14 (0.63-2.04)	1.12 (0.62-2.04)
Smoking								
	Yes		27 (25.5)	55 (51.9)	24 (22.6)	106	1.13 (0.65-1.96)	1.38 (0.68-2.79)
	No		11 (22.4)	30 (61.2)	8 (16.3)	49	1.29 (0.61-2.71)	1.30 (0.61-2.76)

^a Odds ratios were calculated to measure the association of the Ser/Arg and Arg/Arg genotypes with lung cancer risk.

^b Adjusted for age and sex.

^c Odds ratios were calculated by using male controls and female controls as references.

^d Adjusted for age.

^e Odds ratios were calculated by using controls aged ≥ 65 and controls aged < 65 as references.

^f Adjusted for sex.

Table 3 Distribution of *p21* polymorphism by the *p53* genotypes and mutation of lung cancer patients

Characteristics	Genotypes			Total	<i>P</i> ^a value
	Ser/Ser (%)	Ser/Arg (%)	Arg/Arg (%)		
<i>p53</i> genotypes (n=126)					
Arg/Arg	10 (23.2)	26 (60.5)	7 (16.3)	43	0.69
Arg/Pro	11 (21.1)	27 (51.9)	14 (26.9)	52	
Pro/Pro	9 (29.0)	15 (48.4)	7 (22.6)	31	
<i>p53</i> mutation (n=63)					
yes	4 (36.4)	4 (36.4)	3 (27.3)	11	0.82
no	15 (28.8)	24 (46.2)	13 (25.0)	52	

^a*P* values were calculated using the χ^2 test.

FIGURE LEGEND

Fig. 1 Detection of p21 codon 31 polymorphism by PCR and Bsp 1 digestion. PCR product digested (+) or undigested (-) with Bsp 1 for 4-8 hrs at 37° C. The Ser encoding and Arg encoding fragments and determined as the 245 plus 145 bp and 100 bp bands, respectively. 1 is an example of an Ser/Ser homozygote, 2 is an example of an Ser/Arg heterozygote, and 3 is an example of an Arg/Arg homozygote.

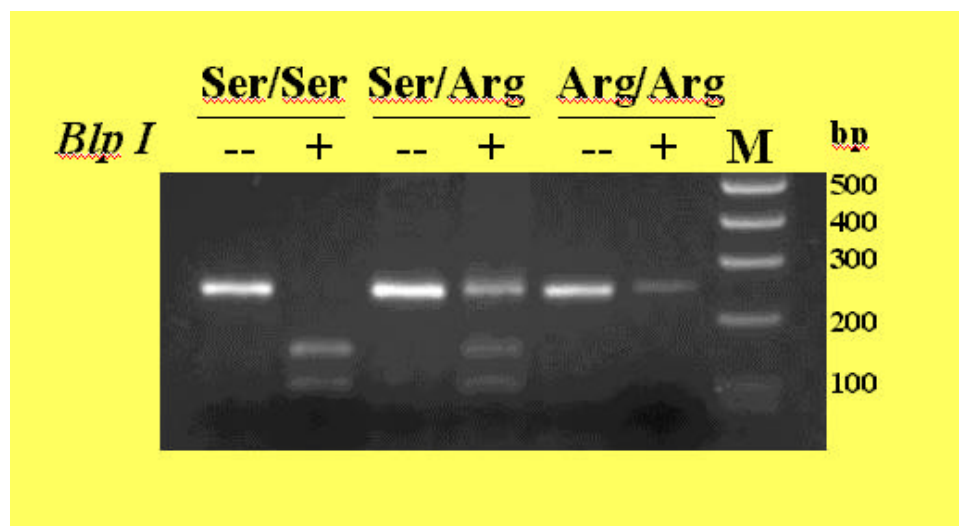


Fig. 2 The Kaplan-Meier survival curves with respect to p21 codon 31 genotypes in 154 lung cancer patients. P-values were calculated using the log rank test. The estimated median survival times for patients with Ser/Ser, Ser/Arg, and Arg/Arg were 18, 20, and 24 months, respectively. The patients with Ser/Ser genotype had poor prognoses than those with Ser/Arg and Arg/Arg genotypes ($P=0.10$).

