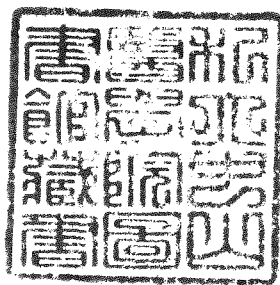


R
008.8
7569
87

中山醫學院毒理學研究所碩士論文

台灣地區肺癌病人其 *p53* 基因突變及
基因多型性與肺癌形成及預後關係之研究

Analysis of *p53* gene mutations and polymorphism
in lung cancer patients in Taiwan:
Correlation with histological subtype,
cancer susceptibility, and prognosis



指導教授：王憶卿 博士

研究生：陳星光

參考書恕不外借

中華民國八十七年六月

中山醫學院圖書館



C050044

授權書
(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 毒理學研究所
八十七 學年度第 二 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱：台灣地區肺癌病患其p53基因突變及基因多型性與肺癌形成及預後關係之研究

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟或紙本重製發行。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至民國 __ 年 __ 月後再公開。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名：王憶卿 教授

研究生簽名：陳星光 學號：R85501
(親筆正楷)

日期：民國 87 年 2 月 16 日

- 備註：1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。
3. 本授權書已於民國85年4月10日送請著委會修正定稿。

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：
在美國授權博碩士論文予UMI公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金45元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入10%的權利金約美金20元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣500元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第5項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話：(02)7377746 江守田、王淑貞
地址：台北市和平東路二段106號17樓1702室

研究生姓名：陳星芝 聯絡電話：02-29859588

地址：台北縣三重市雙園街90號5樓

台灣地區肺癌病人其 *p53* 基因突變及
基因多型性與肺癌形成及預後關係之研究

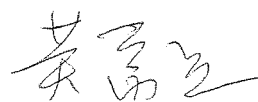
**Analysis of *p53* gene mutations and polymorphism
in lung cancer patients in Taiwan:
Correlation with histological subtype,
cancer susceptibility, and prognosis**

本論文為中山醫學院授與理學碩士學位之必須條件之一，經中山
醫學院毒理學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

國立陽明大學公衛研究所副教授

黃嵩立 博士



台中榮總教學研究部副研究員

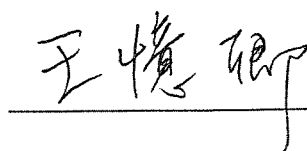
徐士蘭 博士



中山醫學院毒理學研究所副教授

王憶卿 博士

(本論文指導教授)

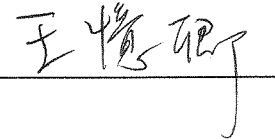


中華民國八十七年六月十六日

學生陳星光論文題目為：台灣地區肺癌病人其 p53 基因突變及基因多型性與肺癌形成及預後關係之研究，其論文已經中山醫學院毒理學研究所碩士論文考試委員會審查及格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授： 王憶卿 博士

簽名：



中華民國八十七年七月十七日

謝 誌

在這畢業的前夕，心中百感交集，一方面趕著畢業，但是另一方面，又有些想念實驗室的人、事、物；在這論文的誌謝中，想寫些什麼，但是又不知從何處下筆。回憶起初進實驗室的時候，對實驗室的一切相當陌生，但是經過老師的細心指導後，才免除了一些莫名的憂慮，只需一步步的跟著學習。看著實驗室從無到有，跟著老師、元衍以及各位學弟妹一起奮鬥，由一些簡單的儀器開始，到現在小有規模，而研究方面亦有一些初步的成績，這些無一不是實驗室中，每一位成員的功勞。在這兩年當中，我學到了許多以往在大學的教育中所學不到的東西，我想這就是研究所精髓之處吧！首先想感謝的是恩師 王憶卿副教授，在我實驗上總是不厭其煩的帶領，其細心的程度，我想在這研究所當中應該是無人能及吧！至於在生活方面的照顧，就毋須在這兒多言，我想只要是實驗室的成員的能夠感同身受。

另外要感謝的人實在太多了：感謝林嬪嬪老師、蔡秀蘭老師、及所長 李輝教授，還有森智學長、文澈學長、志強學長、澧太學弟在實驗及生活上的照顧及幫忙，實驗室的各位學弟妹們：雅梅、怡如、欣玲、瑋琪、佩姿、惠君、浩雲、念祖、艾鍾……及研究夥

伴：元衍，無論在實驗或生活上多方面的幫助，另我感激萬分，除此之外更要感謝我的女友 憶玲，在兩年的研究期間，不厭其煩的聽我發牢騷，及不時給予我鼓勵，謝謝你們！若沒有你們的幫助，我想是不可能有些成果的。更將這一切獻給我的父母，謝謝你們的支持，將榮耀歸於上主，並祝福每個人。

最後更感謝我的口試委員：黃嵩立老師、徐士蘭老師，撥冗參與本論文的審查及口試的工作，謝謝你們！謝謝！

陳星光 謹誌于

中山醫學院毒理學研究所

中華民國八十七年六月

台灣地區肺癌病人其 *p53* 基因突變及
基因多型性與肺癌形成及預後關係之研究

Analysis of *p53* gene mutations and polymorphism in
lung cancer patients in Taiwan:

Correlation with histological subtype,
cancer susceptibility, and prognosis

壹、 中文摘要	1
貳、 文獻總論	5
一、 引言	5
二、 <i>p53</i> 抑癌基因結構與功能	6
三、 <i>p53</i> 抑癌基因在肺癌檢體的突變頻譜分析	7
四、 <i>p53</i> codon 72 基因多型性與肺癌形成的相關 性研究	9
五、 <i>p53</i> 抑癌基因其突變與基因多型性和癌症預 後的關係	11
六、 微衛星 DNA 不穩定性與肺癌形成的關係	12

參、方法總論	15
一、檢體來源及 DNA 萃取	15
1. <i>p53</i> 抑癌基因突變分析	15
2. <i>p53</i> 基因多型性分析	15
二、PCR/SSCP 分析方法	16
三、定序分析	17
四、 <i>p53</i> 蛋白表現分析	17
五、微衛星 DNA 不穩定性分析	18
六、 <i>p53</i> 基因多型性分析	19
七、 <i>CYP1A1</i> 基因多型性分析	19
八、 <i>GSTM1</i> 基因多型性分析	20
九、統計分析	20
肆、結果與討論	21
第一部分：High frequency of deletion mutations in <i>p53</i> gene from squamous cell lung cancer patients in Taiwan	21
ABSTRACT	21
研究目的	23
結果	24

一、 <i>P53</i> 基因突變頻譜	24
二、 <i>P53</i> 基因突變與各項病理分類的分析	25
三、 <i>P53</i> 蛋白的表現情形	25
討論	27
第二部分： Genetic instability of microsatellite sequences in lung cancer patients in Taiwan	33
研究目的	33
結果	34
一、 肺癌病患之微衛星 DNA 不穩定性	34
二、 微衛星 DNA 不穩定性與 <i>p53</i> 基因突 變的關係	35
討論	36
第三部分： <i>p53</i> codon 72 polymorphism in a Taiwanese lung cancer poplation: Correlation with lung cancer susceptibility and prognosis	38
ABSTRACT	38
研究目的	40
結果	41
一、 台灣地區以及世界各族群 <i>p53</i> 基因多型	

性分佈	41
二、正常人及肺癌病患之 <i>p53</i> 基因多型性與 各種病理分類的相關性	42
三、 <i>p53</i> 基因多型性與預後的關係	43
四、在各種病理分類上， <i>p53</i> 基因型與存活 率之間的關係	44
討論	46
第四部分：Influence of polymorphism at the <i>p53</i> , <i>CYP1A1</i> , and <i>GSTM1</i> loci on <i>p53</i> mutation and association of <i>p53</i> mutation with prognosis in lung cancer patients	51
ABSTRACT	51
研究目的	53
結果	54
一、正常人與肺癌病患其 <i>p53</i> 、 <i>CYP1A1</i> 、 <i>GSTM1</i> 基因多型性與 <i>p53</i> 基因突變的 關係	54
二、 <i>p53</i> 基因突變與預後關係	54
討論	56

伍、參考文獻	59
陸、圖表	73
柒、英文摘要	99

壹、中文摘要

台灣地區肺癌死亡率在女性以及男性，分別佔癌症死亡第一位及第二位，然而在台灣，肺癌形成的分子機制尚未明瞭，因此我研究與肺癌發生有關的 *p53* 抑癌基因，來看是否可以發現參與癌症形成的分子機制？我們研究 60 個肺癌病患其 *p53* 抑癌基因的 exon 4~exon 11 突變分析，而且我們也針對 154 個正常人以及 152 個肺癌病患其 *p53* codon 72 基因多型性做分析，同時也分析 *p53* 抑癌基因的突變，以及其 codon 72 多型性與預後情形的相關性。

研究發現，在 60 個肺癌病患中，*p53* 基因突變的機率僅為 18% (11/60)，但是，*p53* 突變的種類與國外所發表的卻有不同，參考國外所發表的論文顯示：*p53* 基因主要的突變型態為 missense mutations；但是，在台灣所發現的大部分以 nonsense mutations 以及 deletions 為主。有 64% (7/11) 的突變為 1-12 個鹼基的 deletions，大多發生在 G:C 配對或一些重複性 (tandem repeat) 的序列上；另外，還有 18% (2/11) 是 nonsense mutations。值得注意的是，這些 *p53* 基因有突變的病患大多數為鱗狀上皮 (Squamous, SQ) 細胞癌病人，而且以晚期的病患居多，因此推論在台灣，可能有一些特殊的環境污染物或遺傳因子 (genetic factors) 會引發小片段的 deletion，同時也參與了台灣地區 SQ

肺癌形成的過程。

另一方面，根據 *p53* codon72 基因多型性的分析結果顯示，Pro allele 會增加台灣地區女性在 adenocarcinoma (AD) 的罹患率，基因型是 Pro/ Pro 的女性 AD 肺癌病患與正常女性其基因型相比較，有顯著性的不同 OR 2.87 (CI, 1.87-4.41 ; P=0.01)。而且，Pro/ Pro 基因型隨著病人的年齡增加而有減少的趨勢，年輕的肺癌病患其基因型是 Pro/Pro 的比例比起其他年齡的肺癌病患有較高的趨勢 (OR 2.53 ; CI, 1.64-3.91 ; P=0.03)，更進一步發現，Pro/ Pro 基因型的病患比起基因型是 Arg/Pro 的病患，更容易在開刀後的初期就死亡，利用 Log rank test 分析得到的結果 OR 5.78 (CI, 1.30-25.71 ; p=0.02)，而且分別在年齡 60 到 69 歲，SQ，或男性肺癌病患上特別顯著，P 值分別為 0.028，0.013，以及 0.052。另外分析早期的肺癌病患，基因型是 Pro/ Pro 以及基因型是 Arg/Arg 比基因型是 Arg/Pro 的病患有較差的預後情形 (P=0.057)。因此我們的研究結果顯示：*p53* codon72 的基因多型性可能在癌症發生的敏感性及預後方面扮演了一個重要的角色。

在分析 *p53* 基因突變與基因多型性及預後關係方面，分析 60 個肺癌病患的 *p53*，*cytochrome p450 1A1 (CYP1A1)*，及 *glutathion S-transferase M1 (GSTM1)* 基因，發現 *p53*、*CYP1A1*、*GSTM1* 三種基因型分佈情形與病人 *p53* 基因突變與否並沒有顯著的不同之處；可是

p53 基因有突變的病患其 *p53* 基因多型性大多為 Arg/ Arg 的基因型；另一方面再分析 134 個正常人和 60 個肺癌病人的 *p53*、*CYP1A1*、*GSTM1* 基因多型性的分佈情形，結果也並無差異 ($P > 0.05$)。更進一步研究 *p53* 抑癌基因突變與預後的關係，也沒有發現有任何的相關性，故綜合這些基因多型性的研究結果顯示：台灣地區肺癌病患其 *p53* 基因突變應該與 *p53*、*CYP1A1*、*GSTM1* 三個基因之基因多型性或預後並無相關。

此外，我還利用了 5 個 microsatellite markers (D9S126，D9S162，D17S5，D13S170，和 D3S1215) 來偵測 53 個肺癌檢體的微衛星 DNA 不穩定性 (microsatellite instability, MI)，初步的分析結果顯示，有 35 個病患 (66.0%, 35/53) 有 MI 現象，marker D13S170 在 53 個病患中的分析結果顯示有 41.5% (22/53) 的 MI，而 marker D9S162 其 MI 機率為 34.0% (18/53)；MI 的分佈與病人的性別、年齡沒有相關性，但是顯示 MI 的病患其癌症種類以 SQ 居多，另外 MI 的病患多以晚期的病人為主；在 11 個 *p53* 基因突變的病患有 81.8% (9/11) 顯示 MI，而且有 4 位病患 (36.4%, 4/11) 在兩個以上的 markers 顯示 MI，值得注意的是七位含 *p53* 小片段缺失的病患全部都顯示 MI 的情形。因此，顯示這些肺癌病患基因不穩定的情形可能是造成台灣地區肺癌病患 *p53* 基因缺失突變的原因之一。

我的研究論文的編排方式，第一部分是中文摘要，第二部分是文獻總論，第三部分為方法總論，而第四部分，則分別包含了四個部份的研究論文之結果與討論，第五部分是參考文獻，第六部分則是所有的圖表，第七部分是英文摘要。

貳、文獻總論

一、引言

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 (Table 1)，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)。故顯示在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是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 *p53* 抑癌基因的突變。*p53* 抑癌基因最早由 Lane and Cranford (1979) 與 Linzer 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。所以，本研究是針對台灣地區肺癌病患其 *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，冀能找出與肺癌有關的分子機轉。

二、*p53* 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 (Fig. 1) 而且，*p53* 蛋白在細胞週期 (cell cycle) 與細胞凋亡 (apoptosis) 扮演了相當重要的角色。

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 (E1-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，以利修補酵素對細胞進行修復 (Kastan et al., 1991 ; Lane et al., 1992)。

細胞凋亡 (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。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：TFIIH (XPB、XPD) 而導致 apoptosis (Selvakumaran et al., 1994; Wang et al., 1996)。

三、*p53* 抑癌基因在肺癌檢體的突變頻譜分析

歐美地區 *p53* 基因突變機率在小細胞肺腫瘤 (small cell lung cancer, SCLC) 上有 70%，在非小細胞肺腫瘤 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 上則有 47% 的機率，而鱗狀上皮細胞癌 (squamous) 有 65% 的突變機率，large cell carcinoma 有 60%，腺癌 (adenocarcinomas) 則只有 33% (reviewed in Greenblatt et al., 1994 ; Harris et al., 1996 ; Velculescu et al., 1996)。我將前人在各類肺癌上所研究的 *p53* 基因突變頻率整理於 Table 2。同時，綜合一些研究結果指出，在 SCLC 上，*p53* 抑癌基因突變的形式多以 A:T→G:C 為主，約佔 60%；在 NSCLC 上，發現在 large cell carcinoma、squamous carcinoma 上的突變類型相類似為 G:C→T:A transversion，約佔 43%~49%，但是在 adenocarcinoma 則較不常見此種類型的突變；而且在 NSCLC 上，只有 4% 的突變為缺失 (deletion)，及插入 (insertion) (D'Amico et al., 1992; Kishimoto et al., 1992; Lohmann et al., 1993; Miller et al., 1992; Sameshima et al., 1992; Suzuki et al., 1992; Takahashi et al., 1991)。然而，最近 Takagi et al. (1995) 針對 35 個居住在香港地區的女性肺癌患者的研究中發現，*p53* 抑癌基因的突變機率只有 20% (7 of 35)；但是，值得注意的是在 7 個含 *p53* 抑癌基因突變的檢體中有

43% (3 of 7) 為 single-base deletion，所以，推測可能有一些特殊的環境污染因子 (environmental factors) 或遺傳因素 (genetic factors) 與中國人的肺癌形成過程有相關性。

四、*P53* codon 72 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，屬於極性 (polar) 胺基酸；另一個轉譯為 Pro (CCC)，屬非極性 (nonpolar) 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* *U* *I* 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)，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。

在不同的種族的正常人其 *p53* 基因 codon 72 的基因多型性也有所差異，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，兩個日本的研究更指出 Pro allele 的機率從 0.35 到 0.40 (Kawajiri et al., 1993；Murata et al., 1996)。但是，在台灣正常族群 *p53* codon 72 基因多型性尚未有人做過研究。

Weston et al. (1992) 發現在美國，AD 型的肺癌病人，Pro allele 與正常族群相比有較高的趨勢，但是，在後來的實驗中卻沒有辦法證實此相關性。另外，Kawajiri et al. (1993) 發現在日本 Pro allele 與 SQ 的肺癌形成有相關性，與 AD 則否；隨後有另一群人重複同樣的實驗，發現肺癌病患與正常人 Pro allele 出現的機率並沒有差異性 (Birgander et al., 1995)。

在考慮抽菸的因素後，Kawajiri et al. (1993) 發現抽菸的族群其基因型是 Pro/Pro 的病人，比起其他基因型有較高的機率得到肺癌，尤其是 SQ 型的肺癌；但是，也有人指出抽菸與肺癌病人 *p53* 基因多

型性無關 (Murata et al., 1996)。

在台灣，*p53* 基因多型性與肺癌之間的關係尚未了解。所以，本實驗針對臺灣地區的肺癌病患與 *p53* 基因多型性做研究，尤其是女性腺癌患者。在台灣地區，肺癌死亡在女性及男性分別佔第一位及第二位。但是，根據 Chen et al. (1990) 針對台灣地區肺癌病人所作的研究，男性與女性的抽菸比率分別是 59.4% 與 3.8%；顯著不同於其他國家的 35% 與 35% (Koo and Ho, 1990)。而且，根據在中國大陸以及台灣所作的一些研究結果顯示：抽菸是導致肺癌發生的主要因子；然而，AD 卻被發現與抽菸並無相關 (Chen et al., 1990 ; Ger et al., 1993)。可是，台灣地區不抽菸的肺癌女性病患日益增加的趨勢 (Health and vital statistics, 1996)，因此，找出其他導致女性肺腺癌發生的因子是極其重要的。

五、*p53* 抑癌基因其突變與基因多型性和癌症預後的關係

一般肺癌病患，經手術治療後，這些人的預後 (prognosis) 情形並不甚相同，即使是同一個時期 (stage) 的肺癌病患，其預後情形也各有不同。因此，很難去估計這些病患在經同樣的手術治療後，哪些

人有較佳的預後？除了一般臨床上用來診斷癌症時期以及手術治療的 TNM system 之外，並無其他更適用的預後指標。

有前人研究指出，NSCLC 的病患，其 *p53* 基因有突變者有較差的預後 (Fukuyama et al., 1997; Fujino et al., 1995; Isobe et al., 1994)；但是另外一些研究顯示這之間並沒有相關性 (Passlick et al., 1995; Visscher et al., 1997)，這些不同的研究結果可能是因為檢體的種類，癌症期數的不同所導致；而在台灣地區尚未有研究分析 *p53* 基因突變用於肺癌病患的預後指標的可能性。*p53* 基因多型性也是一個可能的預後指標，舉一些例子來說，Okada et al. (1994) 證實 SQ 肺癌病患，其 *cytochrome P450 1A1 (CYP1A1)* 基因若是屬於 homozygous genotype C 的 *MspI* 基因多型性，通常會發生淋巴結或較遠端的轉移。Goto et al. (1996) 也報導肺癌病患若同時存在有不穩定的 *CYP1A1* genotype 以及 *glutathione S-transferase M1* gene 為 Null 的基因型，則存活率較低。而在台灣，尚未有人研究過 *p53* 基因多型性和預後之間的關係。因此，本研究是利用跟肺癌發生有關的 *p53* 基因其突變與 codon 72 的基因多型性，來研究與肺癌病人的預後情形之間的關係為何？或許可以合併 TNM system 一起用於臨床診斷。

六、微衛星 DNA 不穩定性與肺癌形成的關係

微衛星 (microsatellite) DNA 是分佈在 genome 的一些小片段重複性的序列，通常不轉譯出任何蛋白。microsatellite DNA 的不穩定性 (microsatellite instability, MI) 最早發現於多數的 hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC)，而在 sporadic colorectal cancers 上大約有 17% 的發生率。(Ionov et al., 1993 ; Thibodeau et al., 1993)。

而在肺癌的研究方面，SCLC 的檢體中發現約有 45% 的 MI，多為 dinucleotide repeat 的缺失 (Merlo et al., 1994)。然而在 NSCLC 上則有著不同形式的 MI，Peltomaki et al. (1993) 研究在 87 個 NSCLC 檢體中只發現有一個位置的微衛星 DNA 有 2% (2/ 87) 的 MI；而 Fong et al. (1995) 研究在 108 個 NSCLC 的檢體中只發現一個位置的微衛星 DNA 有 6.5% (7/ 108) 的 MI，另外一群人則在 38 個 NSCLC 的檢體研究發現，有多個位置的微衛星 DNA 有 34% MI 的情形 (Johansson et al., 1991 ; Shridhar et al., 1994)。同時 Shridhar et al. (1994) 發現在 NSCLC 的檢體中，有 23% (3/ 13) 有 MI 的情形。Fong et al. (1995) 也指出 MI 與基因突變有密切的相關性，例如: *K-ras* 基因、*p53* 基因，或 5q、8p、9p、11p 及 17p 的染色體基因異質性喪失 (Loss of heterozygosity)。所以 MI 可能在癌化過程中亦扮演了相當重要的角

色，且 MI 的發生也會影響一些 mismatch repair 的基因，如：*hMSH2*、*hMLH1* 無法修補複製時的錯誤，導致癌化的形成 (Bronner et al., 1994 ; Wooster et al., 1994)。

在我的研究中，發現 *p53* 基因突變類型大多為小片段的缺失 (64%)，推測是否也是因為基因的不穩定所導致的？因此，我的論文研究也利用一些 Microsatellite markers 來研究肺癌病人基因不穩定性的情形，或許可以從這些研究當中發現台灣地區肺癌高機率的 small intragenic deletion mutations 形成的原因。

參、方法總論

一、檢體來源及 DNA 萃取

1. *p53* 抑癌基因突變分析

60 個肺癌檢體來自台中榮總胸腔外科，其中 59 個病人屬於 NSCLC [24 個是 SQ，31 個是 AD，3 個是 adenosquamous carcinoma (AS)，還有一個是 large cell carcinoma]，另外一個病人是 SCLC。肺癌種類以及期數分類方法皆根據 World health organization 的分類。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，以及酒精沉澱的步驟純化出 DNA。

2. *p53* 基因多型性分析

154 個肺癌檢體是由台中榮總胸腔外科所提供，其中 147 個是 NSCLC 的肺癌病人 (63 個 SQ，71 個 AD，5 個 AS，6 個 large cell carcinomas，1 個是 large cell carcinoma 與 SCLC 的複合型，1 個是 AD 及 large cell carcinoma 的複合型)，還有 7 個是 SCLC。肺癌種類以及期數分類方法皆根據 World health organization 的分類。其中 *p53*

基因多形性與癌症敏感性部份有 128 個，與預後關係部份有 114 個病人在外科手術之後還追蹤調查其預後的情形，第一年每三個月追蹤調查一次，第二年每四個月調查一次，之後每六個月調查一次，分別追蹤至 1998 年 3 月 15 日，以及 1 月 15 日。另外蒐集了 152 個來自中山醫院正常人的血液檢體，而這些正常族群的年齡分佈則挑選與病患較為接近者，其 Genomic DNA 同樣利用標準的 Phenol-chloroform 萃取自血液的淋巴球。

二、PCR/SSCP 分析方法

利用 PCR/SSCP (single-strand conformational polymorphism) 以偵測可能的 *p53* 抑癌基因的突變，參考 Lehman et al. (1991) 的實驗方法設計出 oligodeoxynucleotide primer 及 PCR 之條件 (見 Table 3)，將 *p53* 基因之 exon 4~exon 11 的片段經 PCR 放大，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 中，電泳膠以及 running 條件分別為：6 % 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。

三、定序分析

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 - S^{35} -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，本文中發現的 *p53* 突變皆經重複且獨立的 PCR 以及定序分析實驗確認。另外為了確定此實驗之 PCR/SSCP 的準確性，還直接定序分析了所有檢體的 exon 4，exons 9-11，及 24 個檢體的 exon 7、exon 8。有 8 個檢體更利用 microdissection 方法，取自包埋在 formalin 的 5 μ m 肺癌組織切片，將肺癌細胞在顯微鏡下經病理鑑定後挑出，以 xylene 脫蠟後再以傳統的方法萃取 genomic DNA，接著進行 PCR/SSCP 以及 DNA 的定序分析。

四、*p53* 蛋白表現分析

將包埋在蠟塊的檢體切成 5 μ m 的切片，經去蠟及復水的步驟

後，利用單株抗體 DO-7 (1:150; DAKO, Glostrup, Kenmark)，偵測 wild-type 及 mutant-type 的 p53 蛋白表現，其認知的位在 p53 蛋白 N 端的第 21 個及第 25 個胺基酸序列之間，此為 primary antibody；再利用 biotinylated secondary antibody (DAKO LSAB Kit K675) 來認知 primary antibody。經 p53 免疫染色的結果，若發現有 25% 以上的細胞其細胞核有 p53 蛋白的表現，則表示有 p53 蛋白的過度表現。

五、微衛星 DNA 不穩定性分析

分別從肺癌組織及其鄰近的正常組織中抽出 genomic DNA，利用前人所設計出之 oligodeoxynucleotide primer 及 PCR 之條件見 (Table 4)，將欲研究的微衛星 DNA 序列，利用 PCR 放大，且在 PCR 反應中加入 α ³² P-dCTP，放大後的產物經 95 °C denaturation 再將 samples loading 入 6 % 的 denaturing polyacrylamide gel，根據正常組織與肺癌組織微衛星 DNA 序列其 running pattern 的差異，來判斷是否有 microsatellite instability, MI 的情形。

六、P53 基因多型性分析

將純化出之 Genomic DNA 參考 Leman 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 *BstUI* 限制酵素切割（認知的位在 5'-CGCG-3'，New England Biolabs, Beverly, MA），在 60⁰C 下反應約 4-8 小時。其中 Arg allele 會被 *BstUI* 限制酵素所認知；而 Pro allele 則否，隨後經由 agarose 電泳，以 ethidium bromide 染色即可偵測出 *p53* 基因多型性。

七、*CYP1A1* 基因多型性分析

CYP1A1 基因多型性位置在 polyadenylation signal 的下游第 264 個鹼基之處，參考 Hayashi et al. (1991) 的實驗方法，將此片段以 PCR 放大後，以 *Msp I* 限制酵素切割。 Wild type 的 m1 allele 並不包含 *Msp I* 可認知的位點，故經 agarose 電泳後，則可得到 340 bp 的片段；另外 m2/ m2 基因多型性則帶有一個 T→C 鹼基的置換，故可被 *Msp I* 限制酵素認知，經 agarose 電泳後則可得 140 bp 及 200 bp 兩個片段。

八、*GSTM1* 基因多型性分析

GSTM1 基因多型性是利用 Groppi et al. (1991) 的實驗方法，以存在或缺乏 PCR 的產物來判定其為 *GSTM1* (M1) 或 *GSTM1* (null) 的基因型。

九、統計分析

針對 *p53* 基因突變分析方面，利用 Pearson χ^2 test 或 Fisher's exact test，分析六十個肺癌病人其 *p53* 基因突變及各種病理分類關係的統計分析。至於在 *p53* 基因多型性分析方面，則利用 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 Pro/Pro，Arg/Arg，Arg/Pro 三種基因型的 odds ratio (OR) 以及 95% 信賴區 (confidence interval, CI)；另外，複合式邏輯回歸 (multivariate logistic regression) 則用以控制年齡與性別因素。至於 *p53* 基因突變、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)；Log rank test 則用以計算兩群體間存活率的差異性 (The life test procedure, 1988)。

肆、結果與討論

第一部分：High frequency of deletion mutations in *p53* gene from squamous cell lung cancer patients in Taiwan

ABSTRACT

Lung cancer is the leading and second-leading cause of cancer deaths among women and men in Taiwan, respectively. However, the molecular mechanisms involved in lung tumorigenesis in Taiwan remain poorly defined. A study that analyzed mutation spectrum of *p53* tumor suppressor gene in 35 female lung cancer patients in Hong Kong showed that a high proportion of the mutations observed were deletions, suggesting possible involvement of distinct mutagenic factor(s) in Chinese female lung cancer patients [Takagi, Y., Koo, L. C., Osada, H., Ueda, R., Kyaw, K., Ma, C.-C., Suyama, M., Saji, S., Takahashi, T., Tominaga, S., and Takahashi, T. (1995) *Cancer Res.* 55: 5354-5357]. Therefore, to gain insight into the role of the *p53* tumor suppressor gene and possible etiological factors in lung tumorigenesis in Taiwan, we investigated the mutation spectra of exons 4 to 11 in *p53* tumor suppressor gene of 60 lung cancer patients in Taiwan. These data were also correlated with clinical pathological characteristics of patients. Lung tumors were surgically resected and genomic DNA was isolated and their mutation spectra were examined using polymerase chain reaction/ single-strand conformation polymorphism analysis and direct sequencing. The frequency of *p53* gene mutation was 18% (11/60). However, distinct patterns of *p53* gene mutation were observed. Seven out of the eleven mutations detected (64%) were deletions of 1-12 bp at G:C base pairs, or at

base pairs in the immediate vicinity of repetitive sequences and/or tandem repeat sequences. In addition, two patients (2/11, 18%) exhibited nonsense mutations. In contrast to the frequent occurrence of missense mutations in *p53* gene reported in the literature, the majority (82%) of the mutations in lung cancer patients in Taiwan were non-missense mutations, i.e., deletions and nonsense mutations. Immunohistochemical staining indicated that *p53* mutations including non-inframe deletions and nonsense mutations all resulted in no expression of *p53* protein. Notably, mutations occurred more frequently in patients suffering from squamous-cell carcinoma (SQ). Nine of 31 SQ patients (29%) exhibited deletions or nonsense mutations, suggesting that deletions and nonsense mutations in *p53* gene are involved in formation of SQ in Taiwan. In addition, mutations occurred more frequently in patients with stage III or IV of lung cancer. However, mutations were not correlated with patients' smoking habits. Our data suggest that *p53* gene mutation involved in formation of squamous-cell carcinoma and distinct environmental factor(s) and/or genetic factor(s) that specific induced short deletions in repeat sequences may be involved in lung tumorigenesis in Taiwan.

研究目的：研究台灣地區肺癌病患其 *p53* 基因突變情形

結果

一、P53 基因突變頻譜

利用 PCR/SSCP 以及定序 DNA 分析法分析六十個肺癌病患之 *p53* 基因 exons 4-11 突變情形。PCR/SSCP 結果之代表圖見 Fig. 2，DNA 定序分析見 Fig. 3 及 Fig. 4。在六十個肺癌檢體中發現 *P53* 基因突變機率為 18% (11/60)，這些結果列於 Table 5，我所發現的突變主要發生於 exon 7 (36%, 4/11)，以及 exon 4 (27%, 3/11)。值得注意的是，有 64% (7/11) 為 small intragenic deletion 突變，另外 18% 為 nonsense 突變，綜合上述結果，其中有 82% 屬於 nonmissense 突變；在參考國外學者所研究的結果顯示：只有 8.2% (44/538) 為 small intragenic deletion 突變，6.5% (56/538) 為 nonsense 突變 (Hollstein et al., 1994)。因此在台灣地區所發現的 *p53* 基因，其 small intragenic deletion 突變類型顯著與其他國家所發表的有所不同 ($P < 0.001$, Fisher's exact probability test)，而且我所發現的突變形式皆為 1-12 bp 的小片段突變，大多發生在 G:C bp 或其附近有一些重複性 (repetitive sequences or tandem repeats) 的序列 (見 Table 5)。至於兩個 nonsense 突變分別發生在 codon 107 及 codon 298 的 G:C→C:G 和 G:C→T:A transversion；另外兩個為 missense 突變，分別發生在 codon 249 及

codon 276 之 G:C→T:A transversion。這些突變的結果都經過兩次以上分別獨立的 PCR 及 DNA 定序分析的重複確認，且分析附近的正常肺組織，確定這些突變並非 germ-line 突變或基因多型性。

二、P53 基因突變與各項病理分類的分析

P53 基因突變與病患之不同性別、抽菸習慣、以及各種肺癌病理分類詳見 Table 6。經研究發現 *p53* 基因突變多發生於 SQ 肺癌病患 ($P < 0.05$, χ^2 test)，另外也發現 *p53* 基因突變多發生在晚期的肺癌病患上 ($P = 0.08$, χ^2 test)；而且幾乎所發現的 *p53* 基因突變皆是男性肺癌病患，其中只有一個為女性病患，然而 *p53* 基因突變與病患的性別，年齡，或抽菸習慣並無統計上的差異性。

三、P53 蛋白的表現情形

利用免疫染色法研究 *p53* 基因突變的病患其 *p53* 蛋白的表現情況，結果見 Table 5，而免疫染色法的代表圖見 Fig. 5。在六十個肺癌檢體中，*p53* 基因有 non-in-frame deletion 突變以及 nonsense 突變的檢體，經免疫染色後並沒有見到 *p53* 蛋白的表現，符合前人的研究結果顯示：移碼 (frameshift) 突變或 nonsense 突變皆會導致 *p53* 蛋白的不表現 (Casey et al., 1996; Chen et al., 1994)。但是有趣的是，

p53 基因 codon 251-254 存在 12 bp in-frame small intragenic deletion 突變的檢體，卻有見到 *p53* 蛋白的表現 (Fig. 5A)，另外，codon 249 及 codon 276 之 missense 突變的檢體，經免疫染色的結果也可見到 *p53* 蛋白的表現，亦符合 Oren et al. (1996) 和 Zambetti et al. (1993) 發現 *p53* 基因存在有 missense 突變時，會使 *p53* 蛋白半衰期增長而經免疫染色的結果可見到 *p53* 蛋白的表現。

討論

本篇文章最重要的發現是台灣地區 SQ 肺癌病患的 *p53* 抑癌基因突變的種類，在發現的 11 個 *p53* 基因突變當中有 7 個 (64%) 屬於 1-12 bp 的 small intragenic deletion 突變，這些 small intragenic deletion 突變多發生在 G:C bp 或是一些重複性的序列上；另外有兩個病患 (18%) 有 nonsense 突變 (見 Table 5)，而這些 small intragenic deletion 與 nonsense 突變在前人的研究當中較不常見 (Gottlieb and Oren, 1996; Greenblatt et al., 1994; Harris, 1996; Oren and Prives, 1996; Velculescu and El-Deiry, 1996)。值得注意的是，存在有缺失突變及 nonsense 突變的病患皆為 SQ carcinoma (見 Table 5)，在我分析的 31 個 SQ 肺癌病患當中的 9 個 (29%) 存在有 small intragenic deletion 和 nonsense 突變 (見 Table 5)，所以推測這些 small intragenic deletion 以及 nonsense 突變可能與台灣地區 SQ 型的肺癌形成有關。在我蒐集到的 2 個 SQ 女性病患中就有一個 *p53* 基因有 small intragenic deletion 突變；而其他國家所報導的 SQ 肺癌病患其 *p53* 基因突變的種類多為 G:C→T:A transversion (Gottlieb and Oren, 1996; Greenblatt et al., 1994; Hollstein et al., 1994)，而我所發現的 SQ 肺癌病患其 *p53* 基因高機率的 small intragenic deletion 與 nonsense 突變是相當特殊

之處；但是在 AD 肺癌病患中則沒見到此類的突變（見 Table 5），所以推測引起 small intragenic deletion 與 nonsense 突變的特殊因子並不參與台灣地區 AD 型肺癌的形成。而且值得注意的是 Takagi et al. (1995) 針對香港地區女性肺癌病患所作的研究發現，其 *p53* 基因有 43% (3/7) 為單一鹼基的缺失突變，而這個發現正好與我的研究相符合。在他們發現的 small intragenic deletion 中就有 2 個是 SQ 的肺癌病患，1 個是 AD 型的肺癌病患，但是他們並沒有發現此類的缺失突變在男性肺癌病患中出現，也並未發現有 nonsense 突變或 1 個 bp 以上的缺失突變，這些與我的發現有所不同。

仔細的研究這些 *p53* 基因缺失突變發生的位置後，發現這些缺失突變大都發生在連續的 G:C bp，或位在兩個重複性序列的中間（見 Table 5），舉例來說，第二個及第七個病患 small intragenic deletion 突變發生在連續的 G:C bp 序列上的單一個 G；而第一個及第三個病患其 small intragenic deletion 突變的左右兩側有 2-5 個 G:C bp；而第三個肺癌病患其 codons 156、157 的 G:C rich 區域的 small intragenic deletion 突變，更有前人研究發現為 *p53* 基因最常發生缺失或插入 (insertion) 突變的序列 (Greenblatt et al., 1996)；第五號病患其 8 bp small intragenic deletion 突變的位置在兩個 ATG 重複序列之間；第六號病患之 12 bp 的 small intragenic deletion 突變則發生在三

個 ATC 重複序列之間 (見 Table 5)。而且值得注意的是，這些含有缺失突變的病患大多是第三或第四期的肺癌病患 (見 Table 5 及 Table 6)，因此推測這些 small intragenic deletion 突變可能是癌症形成過程的一些內生性因子所導致，諸如：DNA polymerase 複製時的錯誤 (Kunkel, 1992)或是 DNA mismatch repair 的功能喪失所致 (Ionov et al.,1993)。也有學者研究指出，mismatch repair 基因，例如：*hMSH2*、*hMSH1* 有異常時，常會在一些重複性的微衛星序列上發現有缺失或插入突變 (Leu, et al., 1995)，但是在 NSCLC 的病患微衛星序列不穩定 (microsatellite instability, MI) 的情形卻有著不同的研究結果。舉例說明，Takagi et al. (1995) 發現香港地區的女性肺癌病患並沒有 MI 的情形；有趣的是，Shridhar et al. (1994) 卻發現在他們所研究的 38 個 NSCLC 病患中，卻有著高 MI 的發生率，同時還發生在不同位置的染色體上。造成這些不同研究結果的原因可能是他們所研究的 MI markers 位於不同的染色體，MI 的情形也有所差異，另一個原因可能是由於地域性的差異，或是遺傳因素所導致。因此爲了要研究造成台灣地區肺癌病患其 *p53* 基因有著高比例的缺失突變的原因，目前我們正針對一些 microsatellite 序列的缺失突變 (見第二部分 MI 的分析) 以及 mismatch repair 基因突變的情形進行研究。

這些高機率的 small intragenic deletion 突變或許是台灣地區一些特殊的環境污染物或內生性的因子所造成的結果，然而抽菸與否與 *p53* 基因突變卻沒有相關性 (見 Table 6)，除了抽菸以外的因素，參與台灣地區肺癌其 small intragenic deletion 的形成，進一步推測可能是受到環境污染物或是中式食物烹調中產生有致癌性化合物的影響。此外，參與藥物代謝相關的基因也可以說明每一個個體間罹患癌症敏感性的不同，曾有報導指出，*CYP1A1* 與 *GSTM1* 某些基因多型性會增加肺癌的罹患率 (Kwajiri et al., 1996; Nakachi et al., 1993)。因此我們也分析了 *CYP1A1*、*GSTM1* 基因多型性與 *p53* 基因突變的病患之間的關係，但是這兩種基因之基因多型性與 *p53* 基因突變與否並無相關性 (見第四部份，*p53* 基因突變與基因多型性之關係)，然而 *p53* 基因突變是否與其他基因多型性有關呢？*p53* 基因 codon 72 之基因多型性也是我的一個研究方向，在後來的研究中會詳加介紹 (見第三部分之 *p53* 基因多型性與癌症敏感性及預後之關係)。

台灣地區肺癌病患之 *p53* 基因突變機率較低 (18%)，也許是因為在我所蒐集的肺癌檢體中大多是癌症早期的病患，而 *p53* 基因突變發生在晚期患者居多所致 (見 Table 6)，或是因為 PCR/SSCP 偵測突變的敏感性太低，但是這一點並非是合理的解釋，因為 PCR/SSCP

是最常用來研究突變的方法之一，而且偵測的 DNA 片段在 100-200 bp 左右時有非常高的準確性，另外我研究所用的 primer 則是參考前人所設計，且常用在類似的突變分析；除此之外，我還利用 DNA 定序的方法，直接分析六十個肺癌檢體的 exon 4，exons 9-11，以及 24 個檢體的 exons 4-8，並沒有偵測到任何突變，更進一步針對檢體中少於 50% 的腫瘤組織進行 microdissection，再利用 PCR/SSCP 對 exons 4-8 作分析，結果並沒有發現新的突變，所以這些結果顯示 *p53* 基因突變機率較低，並非是 PCR/SSCP 的準確性有誤。值得注意的是，Takagi et al. (1995) 發現香港地區肺癌病患，*p53* 基因突變的機率也只有 20% (7/35)，Lung et al. (1996) 研究另外一群香港地區的肺癌病患，發現也只有 16% (8/50) 的突變機率，這些對於 *p53* 基因突變機率的研究與我的結果非常相近，因此，台灣地區 *p53* 基因突變機率確實偏低。

另外在本研究當中，*p53* 基因有 non-in-frame deletion、splice 突變、以及 nonsense 突變的肺癌檢體在經免疫染色後，並沒有發現有 *p53* 蛋白的表現 (見 Table 5 及 Fig. 5)。已有前人研究指出，這些突變會導致 *p53* 蛋白不表現或合成缺乏功能區的 *p53* 蛋白 (Casey et al., 1996; Chen et al., 1994)；有趣的是，一個含有 in-frame 12 bp deletion 的檢體，經免疫染色後卻可以見到 *p53* 蛋白的表現，推測可

能是表現出缺乏四個胺基酸的 p53 蛋白，或是 wild-type 的 p53 蛋白過度表現所致。利用免疫染色法研究 52 個肺癌檢體後，發現有 20 個 (38.5%) 有 p53 蛋白的過度表現，這些研究結果與 Lung et al. (1996) 報導在肺癌檢體中有 46% (23/50) p53 蛋白的過度表現，但是 p53 基因突變機率卻只有 16% (8/50) 的結果相符合，可能是亞洲地區或中國人族群有一些環境因素或遺傳因子，導致 p53 基因突變機率較低而 p53 蛋白過度表現情形高的結果。

綜合這些研究結果，我認為 p53 基因突變可能與台灣地區晚期的 SQ 肺癌形成有關。一些遺傳因子，包括 DNA 修補系統的異常，或是基因不穩定現象，皆有可能誘發一些與癌症形成有關的基因造成 small intragenic deletion 突變；另外，可能是空氣汙染物或是中式食物烹調過程中所產生的環境致癌物質，導致 small intragenic deletion 突變的產生；一些內生性的氧化性傷害也是可能的原因之一。

第二部分： Genetic instability of microsatellite sequences in lung cancer patients in Taiwan.

研究目的：研究台灣地區肺癌病患，其微衛星 DNA 不穩定性的情形是否是造成台灣地區肺癌病患，其高機率的 small intragenic deletion 突變發生的原因。

結果

一、肺癌病患之微衛星 DNA 不穩定性

我初步分析了 5 個微衛星 DNA 在 53 個肺癌檢體中，其微衛星 DNA 不穩定性的機率，這些微衛星 DNA 分別位於染色體 3、9、13、以及 17，分別為 D3S1215，D9S126，D9S162，D13S170 以及 D17S5。初步的分析結果顯示，有 35 個病患 (66.0%, 35/53) 有微衛星 DNA 不穩定現象 (microsatellite instability, MI)，這些 MI 現象多以增加或減少一個或數個微衛星 DNA 重複序列 (dinucleotide repeats) 見 (Fig.6)。Table 7 列出所有顯示微衛星不穩定現象的病人其病理分類資料，marker D13S170 在 53 個病患中的分析結果顯示有 41.5%, (22/53) 的 MI，而 marker D9S162 其 MI 機率為 34.0% (18/53)，其餘 3 個 markers 之 MI 機率則偏低。其中有 5 位病患 (9.4%, 5/53) 在所分析的 5 個 markers 中有三個顯示 MI，另外有 9 位病患 (17.0%, 9/53) 在兩個 markers 中顯示 MI。

MI 的分佈與病人的性別、年齡沒有相關性，但是顯示 MI 的病患其癌症種類以 SQ 居多，73% (19/26) 的 SQ 病患顯示在至少一個

以上的微衛星 DNA 序列有 MI 的現象 (Table 7); 另外 MI 的病患多以晚期的病人為主 (75%, 15/20); 可是這些結果並沒有統計上的顯著差異 ($P>0.05$) (Table 8)。

二、微衛星 DNA 不穩定性與 *p53* 基因突變的關係

在我先前分析的 60 位肺癌病患中，有 11 個病人含有 *p53* 基因突變，所以我進一步分析 *p53* 基因突變與 MI 之相關性，發現在這 11 個病患中有 9 位 (81.8%) 顯示 MI，而且有 4 位病患 (36.4%, 4/11) 在兩個以上的 markers 顯示 MI，值得注意的是七位含 *p53* 小片段缺失的病患全部都顯示有 MI 的情形 (Table 7)。

討論

在我所分析的肺癌檢體中，MI 發生的機率為 66% (35/53)。而在其他學者的肺癌研究方面，SCLC 的檢體中發現約有 45% 的 MI，多為 dinucleotide repeat 的缺失 (Merlo et al., 1994)。然而在 NSCLC 上則有著不同形式的 MI，Peltomaki et al. (1993) 研究在 87 個 NSCLC 檢體中只發現有一個位置的微衛星 DNA 有 2% (2/87) 的 MI；而 Fong et al. (1995) 研究在 108 個 NSCLC 的檢體中只發現一個位置的微衛星 DNA 有 6.5% (7/108) 的 MI，另外一群人則在 38 個 NSCLC 的檢體研究發現，有多個位置的微衛星 DNA 有 34% MI 的情形 (Johansson et al., 1991；Shridhar et al., 1994)。同時 Shridhar et al. (1994) 發現在 NSCLC 的檢體中，有 23% (3/13) 有 MI 的情形。這些 MI 機率的差異性可能是由於這些研究所採用的 markers 不盡相同，而每一個 marker 產生 MI 的機率也不相同；另外一個原因可能是 MI 在肺癌形成的重要性在每一個測試族群中是不相同的，或許台灣地區肺癌形成的原因為基因不穩定性所致，所以在我所分析的檢體中有高達 66% 的肺癌檢體顯示 MI，其中有 5 位病患 (9.4%, 5/53) 在所分析的 5 個 markers 中有三個顯示 MI，另外有 9 位病患 (17.0%, 9/53) 在兩個 markers 中顯示 MI。

在我先前分析的 60 位肺癌病患中，有 11 個病人含有 *p53* 基因突變，在這 11 個病患中有 9 位 (81.8%) 顯示 MI (Table 7)，而且有 4 位病患 (36.4%) 在兩個以上的 markers 顯示 MI，值得注意的是七位含 *p53* 小片段缺失的病患全部 (100%, 7/7) 都顯示 MI 的情形 (Table 7)。Fong et al. (1995) 也指出 MI 與基因突變有密切的相關性，例如：*K-ras* 基因、*p53* 基因，或 5q、8p、9p、11p 及 17p 的染色體基因異質性喪失 (Loss of heterozygosity)。已知 MI 形成的原因可能是一些重複的鹼基序列 (repetitive sequences or tandem repeats) 發生複製錯誤，或是一些 mismatch repair 的基因，如：*hMSH2*、*hMLH1* 無法修補複製時的錯誤 (Bronner et al., 1994；Wooster et al., 1994)。我所偵測到的高機率的 MI 可能反應細胞的基因不穩定性，這些基因不穩定性可能導致一些基因的小片段缺失，這個結果可以解釋我之前所分析的肺癌檢體中，*p53* 基因突變類型大多為小片段的鹼基缺失 (64%, 7/11)，所以 MI 可能在台灣地區肺癌形成過程中亦扮演了重要的角色。

第三部分：p53 codon 72 polymorphism in a Taiwanese lung cancer population : Correlation with lung cancer susceptibility and prognosis

ABSTRACT

An association between the *BstU* I (Pro/Pro) genotype of the *p53* codon 72 polymorphism and lung cancer has been previously reported. However, the allelic distribution of *p53* codon 72 polymorphism as well as the etiologic association of this polymorphism with lung cancer risk and prognosis remain undefined in the Taiwanese population. Therefore, we investigated the genotype distribution of *p53* codon 72 polymorphism in 154 lung cancer patients and 152 non-cancer control subjects. The allele frequencies in Taiwanese non-cancer control subjects were 0.56 (Arg) and 0.44 (Pro). Chi-square analysis indicated significant differences in genotype distribution of *p53* from other reports in Swedish ($P < 10^{-3}$), Spanish ($P < 10^{-3}$), Caucasians in USA ($P = 0.002$), and African-America ($P = 0.027$). In addition, our data suggest that the Pro allele of the *p53* codon 72 polymorphism increased the risk of adenocarcinoma (AD) among female Taiwanese. The female patients with genotype Pro/Pro showed a significantly increased OR (2.87; CI, 1.87-4.41; $P = 0.01$) of having AD lung cancer, compared to normal controls with the other genotypes. A gradual increase in the Pro/Pro genotype was also observed as patients' age decreased. Patients with the Pro/Pro genotype had an OR of 2.53 (CI, 1.64-3.91; $P = 0.03$) higher than those with the other genotypes to be diagnosed with lung cancer at the early ages. Furthermore, patients with the Pro/Pro genotype had an OR of 5.78 (CI, 1.30-25.71; $P = 0.02$) to die at early postoperation stages than those with the Arg/Pro genotype. Our data suggested that *p53* codon 72 polymorphism may play a role in cancer susceptibility in

lung tumorigenesis in Taiwan. On the other hand a potential molecular marker associated with cancer susceptibility and prognosis is the genotype of genes involved in tumorigenesis. Therefore, we investigated the association of *p53* codon 72 polymorphism with prognoses in 114 lung cancer patients. The estimated median survival times for patients with Pro (proline) /Pro, Arginine (Arg) /Arg, and Arg/Pro genotypes were 25, 26, and 36 months, respectively. The effects of *p53* codon 72 polymorphism on post-operative survival were also analyzed in stratifying patients into more precise categories. We found that patients with Pro/Pro genotype had worse prognoses compared to those with Arg/ Pro genotypes, especially in three patient groups, i.e., squamous lung cancer, age among 60 to 69, and male patients. These differences were examined by the log rank test and were statistically significant ($P=0.013$, $P=0.028$, and $P=0.052$, respectively). In the patients of early stage of lung cancer, in whom identifying unfavorable prognostic factors is important, patients with Pro/Pro and Arg/Arg genotypes had a tendency of worse prognoses than those with Arg/Pro genotype ($P=0.057$). Our data suggested that *p53* codon 72 polymorphism is a potential prognostic factor in lung tumorigenesis in Taiwan.

研究目的：分析台灣地區肺癌病患其 *p53* 基因多型性與
肺癌發生的敏感性以及預後的關係

結果

一、台灣地區以及世界各族群 *p53* 基因多型性分佈

我研究了 154 個肺癌病患以及 152 個正常人，發現台灣地區正常人 *p53* 基因 codon 72 的三種基因型 Arg/Arg，Arg/Pro，Pro/Pro 分別是 30.9%，49.3%，以及 19.7%，且符合 Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2=0.02$; $df=2$; $P=0.99$)，其 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。Table 9 顯示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，利用 Chi-square 分析台灣地區正常族群與瑞典，西班牙，及美國的白種人之 *p53* codon 72 基因型的分佈，發現有顯著的差異性 (P 值分別是 $<10^{-3}$ ， $<10^{-3}$ ，0.002)，且發現這些族群其 Pro allele 的出現頻率較台灣人低；另外發現美洲的黑人其 Pro allele 的頻率較台灣人高 ($P=0.027$)；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。所以 Pro/Pro 基因型的頻率與種族有關。

二、正常人及肺癌病患之 *p53* 基因多型性與各種病理分類的 相關性

利用肺癌病患與正常人之 genomic DNA 來分析 *p53* codon 72 基因多型性的分佈情形。肺癌病患的平均年齡是 64 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 46.7%，71/152；肺癌患者佔 27.3%，42/154）。Table 10 介紹肺癌病患及正常人之 *p53* 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 *p53* 基因多型性的分佈並沒有顯著的差異性 ($P>0.05$, χ^2 test)，然而根據肺癌病患的性別，癌症類型，期數，抽菸習慣，以及年齡來分類後，呈現出一些有趣的結果（見 Tables 10 and 11）。

在考慮了年齡及性別因素後，女性或 AD 肺癌病患其 Pro/Pro 基因型機率，似乎較正常人來的高，不過並沒有統計上的差異性（見 Table 10）；但是，進一步將 AD 病患根據其性別分類之後發現 Pro allele 在台灣地區女性肺癌出現的頻率較正常人來得高 ($P=0.04$, $df=2$, $\chi^2=6.43$)，將女性 AD 肺癌病患與正常人比較後，女性 AD 肺癌病患其 Pro/Pro 基因型比其他兩種基因型有較高的勝算比, odds

ratio, (OR) 2.87, confidence interval, (CI) 1.87-4.41 ; P=0.01 , 再進一步考慮年齡的因素後，仍具有統計上的差異性 (見 Table 10) 。所以，根據 *p53* codon 72 基因多型性的分析結果顯示，Pro allele 在臺灣地區的女性 AD 肺癌病患增加的趨勢。

當我將肺癌病患根據抽菸狀況分類後，發現沒有抽菸的肺癌病患其 Pro/Pro 基因型比起正常人其他的基因型有稍微增加的趨勢，但是並沒有統計的顯著差異 (見 Table 10) 。另外將肺癌病患根據年齡分類以後，發現隨著病患年齡的降低其 Pro/Pro 基因型有增加的趨勢 (見 Table 11) ，年輕的肺癌病患其基因型是 Pro/Pro 的比例，比起其他年齡的肺癌病患有較高的趨勢 (OR 2.53; CI, 1.64-3.91; P=0.03) 。

三、*p53* 基因多型性與預後的關係

分析 114 個肺癌病患其預後情形與 *p53* 基因多型性之間的關係，其結果列於 Fig. 7 。 Pro/Pro ， Arg/Arg ， Arg/Pro 基因型之半存活的時間 (estimated survival times, MST) 分別為 25 ， 26 ， 36 個月。 Arg/Pro 基因型比其他基因型之肺癌病患的 MST 增長十個月， Arg/Arg 或 Pro/Pro 基因型的肺癌病患的存活率都比 Arg/Pro 基因型

來的低，但是利用 log rank test 並沒有統計上的差異性 (P 值分別為 0.063 與 0.08 ; Fig. 7)。

再多分析了 14 個肺癌病患 (總數為 128 個) 其 *p53* 基因多型性與預後的關係，其中在追蹤調查的 48 個月中，Arg/Pro 基因型的預後情形最好；另外我還分析了在外科手術後六個月內就死亡或迄今還活著的病患與 *p53* 基因多型性分佈的情形 (見 Table 12)。在手術後六個月內就死亡的肺癌病患其 Pro/Pro 基因型的頻率，比起迄今仍存活的病患有增加的趨勢 (P=0.049)，此外，經邏輯回歸分析後，Pro/Pro 基因型比 Arg/Pro 基因型更容易在開刀後的六個月內就死亡 (OR 5.78; CI, 1.30-25.71)。

四、在各種病理分類上 *p53* 基因多型性與存活率的關係

分析 114 個肺癌病患在各種病理分類上，其基因多形性與預後的關係，這些資料詳述於 Table 13 及 Fig. 8、Fig. 9。發現 Pro/Pro 基因型的 SQ 肺癌病患的比 Arg/Pro 基因型的 SQ 肺癌病患的預後來得較差 (P=0.013 ; 及 Fig. 8A)；在男性肺癌病患上，Pro/Pro 基因型

的 MST 為 20 個月，比 Arg/Pro 基因型的 36 個月來得短 ($p=0.052$ ；及 Fig. 8B)，同樣地，利用 log rank test 所得到的結果，發現 Pro/Pro 基因型且年齡在 60-69 歲的肺癌病患，比起 Arg/Pro 基因型在 MST 上有較差的預後情形 ($P=0.028$ ；見 Fig. 8C)。

另外我將肺癌期數因子加進基因型與預後的分析中 (見 Table 13 及 Fig. 9)，發現晚期的肺癌病患 *p53* codon 72 基因多形性與預後之間的關係並沒有統計上的顯著差異性 ($P=0.187$)，然而，Pro/Pro 基因型的肺癌病患其 MST 仍比 Arg/Arg 基因型來得短，具邊緣性顯著性 ($P=0.052$ ；及 Fig. 8B)；而在早期的肺癌病患中，這三種基因型與預後之間的差異性則在臨界值之間 ($P=0.063$ ；及 Table 13)，然而發現 Arg/Arg 與 Pro/Pro 基因型的預後情形還是有比 Arg/Pro 基因型來的差，且有邊緣性的顯著性 ($P=0.057$ ；見 Fig. 9A)。

Table 12 是利用單變項分析法 (univariate analysis) 根據肺癌病患其性別、年齡、抽菸習慣、癌症種類、期數、與淋巴結的轉移，來分析 *p53* 基因多型性與預後的關係。其中有淋巴結轉移之病患，其 *p53* 基因多型性可能是影響預後的一項因子，但是並沒有統計上的顯著性；Pro/Pro 與 Arg/Arg 的肺癌病患的致死率比 Arg/Pro 基因型分別高出 2.28 及 1.796 倍 (P 值分別為 0.045 與 0.092；見 Table 14)。

討論

本研究可以用來評估肺癌發展或預後與 *p53* codon 72 基因多型性之間的關係。結果顯示台灣人的 *p53* 基因多型性分佈情形與瑞典人，西班牙人，美洲的白種人，或美洲的黑人有顯著的不同；Pro allele 在台灣女性 AD 肺癌病患增加的趨勢，基因型是 Pro/Pro 的肺癌病患比起基因型是 Arg/Pro 的病患則有較差的預後。

由我的研究再次確定種族會影響 *p53* 基因型的分佈 (見 Table 9)，而且符合 Beckmen et al. (1994) 報導 Pro allele 的頻率與緯度有相關。已有研究指出，Pro/Pro 基因型較多的族群，有較高的肺癌罹患率 (Jin et al. 1995)；然而與其它國家比較起來，台灣人高 Pro allele 的頻率，卻仍然無法解釋台灣地區肺癌的低發生率 (23.7/100,000)。

在 Table 10 中可以見到 Pro/Pro 基因型在女性 AD 肺癌病患上有較高的頻率，比較女性 AD 肺癌病患與正常人的基因型，發現女性 AD 肺癌病患其 Pro/Pro 基因型比起其他兩種基因型有較高的勝算比 (OR 2.87; CI, 1.87-4.41 ; P=0.01)，因此推測 *p53* 基因多型性之 Pro allele，會增加台灣地區女性罹患 AD 型肺癌的機率。一些調查結果顯示，台灣地區的男性與女性肺癌病患人數為 2 : 1 (Chen et al.,

1990)；然而男性與女性抽菸的比例分別為 59.4%及 3.8% (Koo et al., 1990)，因此假設 Pro/Pro 的基因型對肺癌的發生有敏感性，也許可以部分解釋台灣女性有較高機率的 AD 型肺癌罹患率。

在本研究中，病患與正常人的平均年齡相近，然而基因型是 Pro/Pro 的肺癌病患比起其他基因型有較高的機率在年輕的時候就罹患肺癌 (見 Table 11)；這個發現與 Jin et al. (1995) 所報導的相似，在 *CYP1A1* 基因多形性與肺癌發生的敏感性也有類似的情形 (Nakachi et al. 1993)。綜合這些結果顯示，*p53* 基因多形性與肺癌形成的敏感性可能有關，因此 Pro/Pro 基因型會降低肺癌發生的年齡。

抽菸習慣可能是一個與肺癌形成有關的因子，然而抽菸習慣與 *p53* 基因型之間的關係眾說紛紜 (Murata et al., 1996; Jin et al., 1995)，而我的結果與 Jin et al. (1995) 較為類似，我發現 Pro/Pro 基因型在不抽菸的肺癌病患中有稍多的趨勢 (見 Table 10)，可能在不抽菸的肺癌病患中或暴露在低劑量的致癌物中，例如低劑量的抽菸，使得基因型的重要性容易突顯出來。

由本研究結果推測，*p53* 基因 codon 72 基因多型性，可能可以用來研究台灣地區肺癌病患其預後的情形。據我所知本研究是第一

一篇研究 *p53* codon 72 基因多型性與肺癌病患預後關係的研究；另外一篇分析香港地區 34 個 NSCLC 的肺癌病患，其 *p53* intron 2 基因多型性的報導指出，A1/A1 基因型比 A1/A2 及 A2/A2 基因型的預後較差 (Ge et al., 1996)。Buller et al. (1997) 指出在轉移的卵巢癌病患其 Arg/Arg 與 Pro/Pro 基因型出現的頻率比 Arg/Pro 基因型來得高，故推測 Arg/Arg 以及 Pro/Pro 兩種基因型與卵巢癌的轉移有關。在我的研究中發現 Pro/Pro 基因型的肺癌病患，比起其他基因型容易在開刀後的初期就死亡 (見 Table 12)，我推測 *p53* codon 72 基因多型性可能是一個影響台灣地區特定類別肺癌病患預後的因子。Pro/Pro 基因型的肺癌病患比起其他基因型有較差的預後，而且在 60-69 歲，SQ，或男性肺癌病患上特別顯著。由於早期 Pro/Pro 基因型的肺癌病患其預後情形較 Arg/Arg 及 Arg/Pro 基因型差，所以對於這類基因型的病患，合併多項治療是必須的。

了解為何 *p53* 基因型為 Pro/Pro 者與肺癌形成的敏感性及較差的預後有關，可能是一個有趣的方向。*P53* codon 72 位於 *p53* 蛋白第 60-92 個疏水性的胺基酸之間的 proline-rich 區域，但是 *P53* codon 72 基因多型性與 *p53* 蛋白功能的關係尚未明瞭。各種基因型 encode 出的 *p53* 蛋白其功能不同之處，已有學者在一些細胞株上作過研究，

Pro 基因型轉譯出的 p53 蛋白其結構與 Arg 基因型的 p53 蛋白不同，所以有著不同的電泳速率；另外，將 *H-ras* 分別與不同基因型的 p53 蛋白送入老鼠的細胞後，發現兩種基因型的 p53 蛋白在洋菜膠上都沒有見到轉型的細胞 (transformed foci) 出現 (Matlashewski et al., 1987)；也有學者發現在大部分的細胞中，這兩種基因型的 p53 蛋白半衰期並沒有差異，但是在 Daudi 細胞中，Pro 基因型比 Arg 基因型的 p53 蛋白半衰期長兩倍左右 (Zhang et al., 1992)。可能這兩種基因型產生的 p53 蛋白，在外來傷害所引發的細胞週期停止或細胞凋零的作用上有所不同；另外的原因可能是 *p53* codon 72 基因多型性會影響 *p53* 基因的表現，而轉譯出之 p53 蛋白是一種轉錄因子，進而影響到與細胞週期有關的基因 (Harris, 1996; Gottlieb and Oren, 1996)，目前正根據這項推測，研究 *p53* 基因多型性與 p53 蛋白表現的情形；在我之前的研究中發現 *p53* 抑癌基因突變可能參與台灣地區 SQ 肺癌的進展 (Wang et al., 1998a)，而且在先前 *p53* 基因多型性的研究中也發現，*p53* 基因的突變與否，和 *p53* 基因多型性並無相關；另外一個原因可能是 *p53* 基因多形性只是一項指標，而另有其他基因直接影響肺癌病患的預後情形，這些基因可能與 *p53* 基因有關；或是 Pro/Pro 基因型的肺癌病患其 *p53* 基因較為敏感，容易影響其他基因的改變，而使肺癌病患有較差的預後情形，研究其他參與

癌症形成有關的基因，也許可以得到答案。

我也研究過台灣地區肺癌病患其 *p53* 基因突變的情形 (見 Wang et al., 1998a) 以及 *p53* 基因突變與否，與 *p53* codon 72 基因多形性之間的關係 (Wang et al., 1998b)，但推測 *p53* 基因突變與 *p53* 基因多形性並沒有相關性。另外，目前正著手研究其他的基因多形性與肺癌形成的關係，例如：*L-myc*，*H-ras*，*p21^{waf}* (Birgander et al., 1995; Sjölander et al., 1995)。

第四部分: Influence polymorphism of the p53, CYP1A1, and GSTM1 loci on p53 mutation and association of p53 mutation with prognosis

ABSTRACT

We have previously analyzed the mutation spectra of the *p53* tumor suppressor gene of 60 lung cancer patients in Taiwan and found that the majority (9/11, 82%) of the mutations were deletions and nonsense mutations. To gain insights into the possible etiological factors involved in mutation of the *p53* gene and the prognostic significance of this gene in lung cancer in Taiwan, we investigated the influence of polymorphism at the *p53*, cytochrome p450 *1A1* (*CYP1A1*), and glutathion S-transferase M1 (*GSTM1*) loci on *p53* gene mutation, as well as the association of *p53* gene mutation with prognosis in these lung cancer patients. There was no significant difference with the respect to the genotype distribution of *p53*, *CYP1A1*, and *GSTM1* between patients with and without *p53* mutations, though a tendency toward increasing frequency of the wild-type homozygote genotype of *p53* polymorphism was noted in lung cancer patients containing *p53* mutation. In addition, we studied 134 non-cancer control subjects and 60 lung cancer patients for the distribution of *p53*, *CYP1A1*, and *GSTM1* polymorphisms. There was no difference in genotype

distributions between controls and cancer patients ($P>0.05$). We further analyzed the association of *p53* mutation with prognoses in lung cancer patients for whom the post-operative survival data was available. The estimated median survival times for patients with and without *p53* mutation were 25 and 28 months, respectively. There was no significant correlation between *p53* mutation and survival. Our data suggest that *p53* gene mutation was not associated with polymorphism of *p53*, *CYP1A1*, and *GSTM1* genes, and it has no significant effect on the prognosis of lung cancer patients in Taiwan.

Key words: p53 gene, CYP1A1 gene, GSTM1 gene, prognosis, and lung cancer.

研究目的：研究正常人與肺癌病患其 *p53* 、 *CYP1A1* 、
GSTM1 基因多形性與 *p53* 基因突變的關係；以
及 *p53* 基因突變與肺癌預後的關係

結果

一、正常人與肺癌病患其 *p53*、*CYP1A1*、*GSTM1* 基因多形性與 *p53* 基因突變的關係

研究 134 個正常人及 60 個肺癌病患之 *p53*、*CYP1A1*、*GSTM1* 基因多形性的分佈情形，Table 15 顯示正常人與肺癌病患其三種基因型的分佈情形。但是也許是因為所分析的肺癌病患太少，所以整體來看，肺癌及正常人的基因型分佈並沒有差異 ($P>0.05$)；另外，我也研究了肺癌病患其 *p53* 基因突變，是否與 *p53*、*CYP1A1*、*GSTM1* 基因型有關？Table 16 記錄先前發現的 11 個具有 *p53* 基因突變的病患與 *p53*、*CYP1A1*、*GSTM1* 基因型的關係。發現肺癌病患 *p53*、*CYP1A1*、*GSTM1* 基因型與 *p53* 基因突變與否並沒有差異，但是有 *p53* 基因突變的肺癌病患，其 *p53* 基因多型性多為 Arg/Arg 基因型 (見 Table 15)。

二、*P53* 基因突變與預後關係

11 個含有 *p53* 基因突變的肺癌病患及其預後的情形列於 Table

16。利用 Kaplan-Meier 分析法，分析 48 個有預後資料的肺癌病患，其 *p53* 基因突變與預後的情形，發現 *p53* 基因突變與否其存活率並沒有差異（見 Fig 10），而肺癌病患的 median survival time (MST) 在有無 *p53* 基因突變的族群，分別為 25 及 28 個月，利用 log rank test 得知並沒有顯著的差異 ($P=0.3$)。

討論

本研究在評估台灣地區肺癌病患之 *p53* 基因突變分別與 *p53*、*CYP1A1*、*GSTM1* 基因多形性及預後的關係。結果顯示 *p53* 基因突變與 *p53*、*CYP1A1*、*GSTM1* 基因多形性並沒有相關性，同時，*p53* 基因突變也與台灣地區肺癌病患的預後無關。

GSTM1 及 *CYP1A1* 酵素已經被證實為一種有廣泛受質特異性的酵素，且包含了多種基因型，單獨或合併來看時，也許可以找出暴露的敏感族群 (Kawajiri et al., 1996; McGlynn et al., 1995)，然而我們的結果並沒有辦法證實 *CYP1A1* 以及 *GSTM1* 酵素與台灣地區肺癌病患，其 *p53* 基因 small intragenic deletion 有關，也許是因為造成 *p53* 基因突變的環境前致癌物或其代謝的過程，有選擇性的藉由另外一些代謝酵素解毒或活化，舉例說明，*CYP2E1* 基因多形性被發現與 *p53* 基因有關並且是肺癌的一個指標 (Oyama et al., 1997)，另外在膀胱癌病患中發現 *CYP3A* 酵素的活性較低與 *p53* 基因突變有關 (Romkes et al., 1996)。

至於 *p53* 基因多型性與肺癌病患 *p53* 基因突變之間的關係，我發現有 *p53* 基因突變的肺癌病患，其 Arg/Arg 基因型有增加的趨勢。

但是，*p53* codon 72 基因多型性與 *p53* 基因突變，或 *p53* 蛋白的功能之間的關係尚未明瞭，雖然各種基因型轉譯出的 *p53* 蛋白其功能不同之處，已有學者在一些細胞株上作過研究，Pro 基因型轉譯出的 *p53* 蛋白其結構與 Arg 基因型的 *p53* 蛋白不同，所以有著不同的電泳速率；也有學者發現在大部分的細胞中，這兩種基因型的 *p53* 蛋白半衰期並沒有差異，但是在 Daudi 細胞中，Pro 基因型比 Arg 基因型的 *p53* 蛋白半衰期長兩倍左右 (Zhang et al., 1992)。Buller et al. (1997) 指出在轉移的卵巢癌病患其 Arg/Arg 與 Pro/Pro 基因型出現的頻率比 Arg/Pro 基因型來得高，故推測 Arg/Arg 以及 Pro/Pro 兩種基因型與卵巢癌的轉移有關。我也研究過 152 個正常人與 154 個肺癌病患其 *p53* 基因多型性的分佈情形，發現將女性 AD 肺癌病患與正常人比較後，女性 AD 肺癌病患其 Pro/Pro 基因型比其他兩種基因型有較高的勝算比, odds ratio, (OR) 2.87, confidence interval, (CI) 1.87-4.41 ; P=0.01。然而根據本研究的結果，並沒有發現 *p53* 基因突變與 *p53* 基因多型性的相關性，或許是因為 AD 肺癌病患其 *p53* 基因突變機率低，所以無法發現之間的相關性 (4%, 1/24) (Wang et al., 1998a)。

同時根據本研究結果發現，*p53* 基因突變並沒有辦法當成台灣

地區肺癌病患預後的判斷因子，但是必須再將病患的分析數目增加，以進一步確認。另外，p53 蛋白的過度表現與預後的關係，也是值得研究的一個方向。值得注意的是，我所研究的各項會影響台灣地區肺癌病患的預後因子中，發現 *K-ras* 基因突變可能影響肺癌的預後 (P=0.08)。

綜合上述研究結果發現，*p53* 基因突變與 *p53*、*CYP1A1*、*GSTM1* 基因多形性並沒有相關性，同時，*p53* 基因突變也與台灣地區肺癌病患的預後無關。進一部分分析其他參與藥物代謝，或與癌症形成有關的基因其基因多型性是未來值得研究的方向。

伍、參考文獻

Beckman, G., Birgander, R., Sjölander, A., Saha, N., Holmberg, P.Å, Kivelä, A., and

Beckman, L. Is *p53* polymorphism maintained by natural selection? *Hum. Hered.*, 44: 266-270, 1994.

Birgander, R., Sjölander, A., Rannug, A., Alexandrie, A.-K., Ingelman Sundberg, M.,

Seidergård, J., Tornling, G., Beckman, G., and Beckman, L. *P53* polymorphisms and haplotypes in lung cancer. *Carcinogenesis*, 16: 2233-2236, 1995.

Bronner, C. E., Baker, S. M., and Morrison, P. T. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue *hMLH1* is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*, 368: 258-261, 1994.

Buller, R. E., 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, M. E., Ramos, J. C., Plummer, S. J., Arboleda, M. J., Shaughnessy,

M., Karlan, B., and Slamon, D. J. 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.

Chen, C.-J., Wu, H.-Y., Chuang, Y.-C., Chang, A.-S., Luh, K.-T., Chao, H.-H., Chen, K.-Y., Chen, S.-G., Lai, G.-M., Huang, H.-H., and Lee, H.-H. Epidemiological characteristics and multiple risk factors of lung cancer in Taiwan. *Anticancer Res.*, 10: 971-976, 1990.

Chen, R., Wei, L., and Chen, R. L. Lung cancer mortality update and prevalence of smoking among copper miners and smelters. *Scandinavian J. Work, Environ. Health*, 21: 513-516, 1995.

Chen, Y. T., Xu, L., Massey, L., Zlotolow, I. M., Huvos, A. G., Garin-Chesa, P., and Old, L. J. Frameshift and nonsense *p53* mutations in squamous cell carcinoma of head and neck--nonreactible 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.

EI-Deiry, W. S., Harper, J. W., O'Connor, P. M., Velculescu, V. E., Canman, C. E., Jackman, J., et al. WAF/CIP1 is induced in *p53*-mediated G1 arrest and

- apoptosis. *Cancer Res.*, 54: 1169-74, 1994.
- El-Deiry W. S., Tokino T., Waldman T., Oliner J. D., Velculescu V. E., Burrell M., et al. Topological control of p21^{WAF1/CIP1} expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.*, 55:2910-2919, 1995.
- Fong K. M., Zimmerman P. V., and Smith P. J. 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., et al: 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., et al: 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, Y. T., Risk factors for lung cancer among nonsmokers with emphasis on lifestyle factors. *Lung Cancer*, 14: S39-S45, 1996.
- Ge, H., Lam, W. K., Lee, J., Wong, M. P., Fu, K. H., Yew, W. W., and Lung, M. L., Detection and evaluation of p53 intron 2 polymorphism in lung carcinomas in Hong Kong. *Int. J. Cancer*, 69: 120-124, 1996.
- Ger L.-P., Hsu, W.-L., Chen, K.-T., and Chen, C.-J. 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, T. M., and Oren, M. *P53* in growth control and neoplasia. *Biochem. et Biophys. Acta.*, 1287: 77-102, 1996.
- Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M., and Harris, C. C. Mutations in the *p53* tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.*, 54: 4855-4878, 1994.
- Greenblatt, M. S., Grollman, A. P., and Harris, C. C. 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.
- Gropi, A., Coutelle, C., Fleury, B., et al: Glutathione S-transferase class mu in French alcoholic cirrhotic patients. *Hum Genet.*, 87: 628-30, 1991.
- Harris, C. C. *p53* tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic-an abridged historical perspective. *Carcinogenesis*, 17: 1187-1198, 1996.
- Harris, C. C. 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., et al: 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.
- Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M. S., Soussi, T., Fuchs, R., Sørli, T., Hovig, E., Smith-Sørensen, B., Montesano, R., and Harris, C. C. Database of *p53* gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.*, 22: 3551-3555, 1994.
- Ionov Y., Peinado M. A., 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., et al: 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, J. A., Amos, C. I., King, T. M., Branch, C., Honn, S. E., 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, F., and Mitelman, F. Geographic heterogeneity of neoplasia-associated chromosome aberrations. *Genes Chromosomes & Cancer*, 3: 1-7, 1991.

Kaplan, E. L., and Meier, P. Nonparametric estimation from incomplete observation.

J. Am. Stat. Assoc., 53: 457-81, 1958.

Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Ciriag, R. W.

Participation of *p53* protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer*

Res., 51: 6304-6311, 1991.

Kawajiri, K., Eguchi, H., Nakachi, K., et al: 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, S.-I. 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, L. C., and Ho, J. H.-C. 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: S47-S61, 1996.

Koo, L. C., and Ho, J. H.-C. Worldwide epidemiological patterns of lung cancer in

- nonsmokers. *Int. J. Epidemiol.*, 19: S14-S23, 1990.
- Kunkel, T. A. 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, D. P. *p53*, guardian of the genome. *Nature*, 358: 15-6, 1992.
- Lane, D. P., and Crawford, L. V. T-antigen is bound to host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 278: 261-263, 1979.
- Lee, E. T. *Statistical methods for survival data analysis*, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, INC., pp. 1-7, 1992.
- Lehman, T. A., Bennett, W. P., Metcalf, R. A., Welsh, J. A., Ecker, J., Modali, R. V., Ullrich, S., Romano, J. W., Appella, E., Testa, J. R., Gerwin, B. I., and Harris, C. C. *P53* mutations, *ras* mutations, and *p53*-heat shock 70 protein complexes in human lung carcinoma cell lines. *Cancer Res.*, 51: 4090-4096, 1991.
- Linzer, D. I. H., Levine, A. J. 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, N. C., Markowitz, S., Willson J. K., Parsons, R. E., Jen, J., Papadopolous, N., Peltomäki, P., de la Chapelle, A., Hamilton S. R., Kinzler, K.

- W., and Vogelstein B. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat. Genet.*, 9: 48-55, 1995.
- Lohmann, D., Putz, 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.
- Lung, M. L., Wong, M. P., Skaanild, M. T., Fok, C. L. Lam, W. K., and Yew, W. W. *P53* mutations in non-small cell lung carcinomas in Hong Kong. *Chest*, 109: 718-726, 1996.
- Malkin, K., Li, FP., Strong, L. C., Fraumeni, Jr. JF., Nelson, C. E., Kim, D. H., Kassel, J., Gryka, M. A., Bischoff, F. Z., Tainsky, M. A., and Friend, S. H. *Science*, 250: 1233-1238, 1990.
- Matlashewski, G. J., Tuck, S., Pim, D., Lamb, P., Schneider, J., and Crawford, L. V. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human *p53*. *Mol. Cell. Biol.*, 7: 961-963, 1987.
- McGlynn, K. A., Rosvold, E. A., Lustbader, E. D., et al: 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.
- Merlo, A., Mabry, M., Gabrielson, E., Vollmer, R., Baylin, S. B., and Sidransky, D. Frequent microsatellite instability in primary small cell lung cancer. *Cancer*

Res., 54: 2098-2101, 1994.

Miller, C. W., Simon, K., Aslo, A., Kok, J., Yokota, J., Buys, C. H. C. M., Terada, M.,
and Koeffler, H. P. *P53* mutations in human lung tumors. *Cancer Res.*, 52:
1695-1698, 1992.

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 *CYP1A1*
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, J. M., Baker, S. J., Preisinger, A. C., et al. 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 *CYP1A1* 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. *Biochem. et*
Biophys. Acta, 1288: R13-R19, 1996.

Oyama, T., Kawamoto, T., Mizoue, T., et al. Cytochrome P450 *2E1* polymorphism

- as a risk factor for lung cancer: in relation to *p53* gene mutation. *Anticancer Res.*, 17: 583-8, 1997.
- Passlick, B., Izbicki, J. R., Haussinger, K., et al: Immunohistochemical detection of *p53* protein is not associated with a poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.*, 109: 1205-11, 1995.
- Peltomaki, P., Lothe, R. A., and Aaltonen, L. A. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma carcinoma syndrome. *Cancer Res.*, 53: 5853-5855, 1993.
- Pleasant, L. M., and Hansen, M. F. Identification of a polymorphism in intron 2 of the *p53* Gene. *Hum. Genet.*, 93: 607-608, 1994.
- Romkes, M., Chern, H. D., Lesnick, T. G., et al: Association of low 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.
- Selvakumaran, M., Lin, H. K., Miyashita, T., Wang, H. G., Krajewski, S., Reed, J. C., et al. Immediate early up-regulation of *bas* expression by *p53* but not TGF beta

- 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene*, 9: 1791-1798, 1994.
- Shields, P. G., Xu, G. X., Blot, W. J., Fraumeni, Jr. J. F., Trivers, G. E., Pellizzari, E. D., Qu, Y. H., Gao, Y. T., and Harris, C. C. Mutagens from heated Chinese and U. S. cooking oils. *JNCI*, 87: 836-841, 1995.
- Shridhar, V., Siegfried, J., Hunt, J., del Mar Alonso, M., and Smith, D. I. 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., Rutegård, 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., Kivelä, A., and Beckman, G. *P53* polymorphisms and haplotypes in different ethnic groups. *Hum. Hered.*, 45: 144-149, 1995.
- 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, L. C., Osada, H., Ueda, R., Kyaw, K., Ma, C.-C., 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, S. N., Bren, G., and Schaid, D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*, 260: 816-819, 1993.
- Velculescu, V. E., and El-Deiry, W. S., Biological and clinical importance of the *p53* tumor suppressor gene. *Clin. Chem.*, 42: 858-868, 1996.
- Visscher, D. W., Yadrndji, S., Tabaczka, P., et al: Clinicopathologic analysis of *K-ras*, *p53*, and *ERBB-2* gene alterations in pulmonary adenocarcinoma. *Diagnost Mol Path.*, 6: 64-9, 1997.
- Wang, X. W., Vermeulen, W., Coursen, J. D., Gibson, M., Lupold, S. E., Forrester, K., et al. The XPB and XPD helicases are components of the *p53* mediated apoptosis pathway. *Genes Dev.*, 10: 1219-1232, 1996.
- Wang, Y.-C., Chen, C.-Y., Chen, S.-K., Cherng, S.-H., Ho, W.-L., and Lee, H. High frequency of deletion mutations in *p53* gene from squamous-cell lung cancer patients in Taiwan. *Cancer Res*, 58: 328-333, 1998a.
- Wang, Y.-C., H.-S. Lee, S.-K. Chen, Y.-Y. Chang, and C.-Y. Chen. Prognostic

- significance of *p53* codon 72 polymorphism in lung carcinomas in Taiwan.
(submitted to *Europ. J. Cancer*, 1998b)
- Wang, Y.-C., C.-Y. Chen, P. Lin, S.-K. Chen, Y.-Y. Chang. *P53* codon 72 polymorphism in a Taiwanese lung cancer population: Correlation with lung cancer susceptibility and prognosis. (submitted to *Clin. Cancer Res.*, 1998c)
- Wang, Y.-C., Chen, C.-Y., Wang, H.-J., Chen, S.-K., Chang, Y.-Y., and Lin, P. Influence of polymorphism at the *p53*, *CYP1A1*, and *GSTM1* loci on *p53* mutation and association of *p53* mutation with prognosis in lung cancer patients. (submitted to *J. Clin. Cancer Res. Oncol.*, 1998d.)
- Wen, C. P., Tsai, S. P., and Yen, D. D. The health impact of cigarette smoking in Taiwan. *Asia-Pacific J. Public Health*, 7: 206-213, 1994.
- Weston, A., Ling-Cawley, H.M., Caporaso, N.E., Bowman, E.D., Hoover, R.N., Trump, B.F. and Harris, C.C. 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, L. S., Forrester, K., Hoover, R. N., Trump, B. F., Harris, C. C., and Caporaso, N. E. Allelic frequency of a *p53* polymorphism in human lung cancer. *Cancer Epidemiol., Biomarkers & Prev.*, 1: 481-483, 1992.
- Wooster, R., Cleton-Jansen, A.-M., Collins, R. S., Cooper, C. S., Gusterson, B. A.,

Ponder, B. A. J., von Deimling, A., Wiestler, O. D., Cornelisse, C. J., Devillee, P., and Stratton, M. R. Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nature Genet.*, 6: 152-156, 1994.

Yu, S. Z., and Zhao, N. Combined analysis of case-control studies of smoking and lung cancer in China. *Lung Cancer*, 14: S161-S170, 1996.

Zambetti, G. P. and Levine, A. J. A comparison of the biological activities of wild-type and mutant *p53*. *FASEB J.*, 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.

陸、圖表

Table 1. Secular trend of age-adjusted lung cancer mortality rates per 100,000 population from 1954 to 1995 in Taiwan by sexes.

Year	Aged adjusted		Male-to-female ratio
	Male	Female	
1954 ~ 1958	3.88	2.07	1.87
1959 ~ 1963	6.49	3.53	1.84
1964 ~ 1968	10.35	5.84	1.77
1969 ~ 1973	13.97	6.68	2.09
1974 ~ 1978	16.65	8.29	2.01
1979 ~ 1983	21.79	10.42	2.09
1984 ~ 1988	24.91	12.22	2.04
1989 ~ 1992	27.24	11.19	2.43
1993 ~ 1995	32.41	14.35	2.26

Lung cancer is the leading and second-leading cause of cancer deaths in women and men, respectively, in Taiwan. (行政院衛生署,1996)

Table 2

Prevalence of p53 mutaiton in human lung cancer reported previously

Tumor type ^a	p53 mutation		Reference
	Exon	Percentage (% , n ^b)	
All types			
NSCLC	4 - 8	23.0 (13)	
SCLC	4 - 8	70.0 (27)	Miller (1992)
NSCLC	2 - 11	52.0 (115)	
SQ	2 - 11	67.6 (37)	
AD	2 - 11	41.4 (58)	
LC	2 - 11	57.1 (14)	Kishimoto(1992)
NSCLC	5 - 8	49.0 (71)	Horio (1993)
All types	5 - 8	35.0 (26)	
SQ	5 - 8	80.0 (5)	
AD	5 - 8	33.3 (9)	
SCLC	5 - 8	22.2 (9)	Reichel (1994)
NSCLC	5 - 8	32.0 (108)	Ryberg (1994)
AD (primary)	5 - 8	24.4 (41)	Li (1994)
AD (stage I)	5 - 9	37.0 (30)	Isobe (1994)
NSCLC	5 - 9	26.5 (19)	Casson (1994)
NSCLC	5 - 8	42.0 (36)	Lee (1994)
All types	5 - 8	31.0 (32)	Law (1995)
NSCLC	5 - 8	20.0 (35)	Takagi (1995)
NCSLC	5 - 8	38.0 (24)	Shipman (1996)

^a AD : adenocarcinoma ; SQ : squamous-cell carcinoma ;
 LC : large cell carcinoma ; NSCLC : non-small-cell lung
 cancer; SCLC : small-cell lung cancer.

^b The number of tumors evaluated for p53 mutation

Table 3 *p53* exon 4-exon 11 primers

	5' → 3'	T _m
Exon 4	<u>Sense</u> TGCTCTTTTCCCCATCTAC	50°C
	<u>Anti-sense</u> ATACGGCCAGGCATTGAAGT	
Exon 5	<u>Sense</u> TTCAACTCTGTCTCCTTCCT	55°C
	<u>Anti-sense</u> CAGCCCTGTCGTCTCTCCAG	
Exon 6	<u>Sense</u> GCCTCTGATTCCCTCACTGAT	55°C
	<u>Anti-sense</u> TTAACCCCTCCTCCCAGAGA	
Exon 7	<u>Sense</u> AGGCGCACTGGCCTCATCTT	55°C
	<u>Anti-sense</u> TGTGCAGGGTGGCAAGTGGC	
Exon 8	<u>Sense</u> TTCCTTACTGCCTCTTGCTT	55°C
	<u>Anti-sense</u> AGGCATAACTGCACCCTTGG	
Exon 9	<u>Sense</u> CCAAGGGTGCAGTTATGCCT	55°C
	<u>Anti-sense</u> ACTTGATAAGAGGTCCCAAG	
Exon 10	<u>Sense</u> CAATTGTA ACTTGAACCATC	58°C
	<u>Anti-sense</u> CTTCCAACCTAGGAAGGCA	
Exon 11	<u>Sense</u> ATCTCTCCTTCCCTGCTTCTG	50°C
	<u>Anti-sense</u> AGGCTGTCAGTGGGGAACAA	

PCR 條件 :

95°C 5 min 1 cycle

95°C 1 min 、 T_m 1 min 45 sec 、 72°C 1 min 45 sec 35 cycle

72°C 10 min 1 cycle

Table 4 **Microsatellite sequences primers**

	5' → 3'	Tm
D9S162	<u>Sense</u> GCAATGACCAGTTAAGGTTC <u>Anti-sense</u> AATTCCCACAACAAATCTCC	55 ⁰ C
D13S170	<u>Sense</u> TTGCACTGTGGAGATAAACACATAG <u>Anti-sense</u> TCACATTGTCTTTTAAGGCAGGAG	55 ⁰ C
D9S126	<u>Sense</u> ATTGAAACTCTGATTTTTCTG <u>Anti-sense</u> CAACTCCTCTTGGGAACTGC	55 ⁰ C
D17S5	<u>Sense</u> GCCTACCTTCCACAAATCTTTC <u>Anti-sense</u> TTGCTGGAGGGATACCTGTGTAC	55 ⁰ C
D3S1215	<u>Sense</u> ATATTCAGCGTGTGAGATACACA <u>Anti-sense</u> CATCTCACTCTGGAAGAGAAAATG	55 ⁰ C

PCR 條件 :95⁰C 5 min **1 cycle**95⁰C 1 min 、 Tm 1 min 45 sec 、 72⁰C 1 min 45 sec **35 cycle**72⁰C 10 min **1 cycle**

Table 5. Alterations of the p53 gene in lung cancer patients, along with clinicopathological parameters.

Patient No.	Age	Sex	Smoking habit	Tumor		p53 gene mutation				p53 protein overexpression
				Type ^a	Stage	Exon	Location	Types	Surrounding sequences ^b	
1	64	M	Yes	SQ	IIIa	4	Codon 88	1 bp del	<u>CCA</u> <u>[G]CC</u> <u>CCC</u> --> CCA CCC CC 87 88 89	--
2	72	M	Yes	SQ	IIIa	4	Codon 117	1 bp del	<u>TCT</u> <u>[G]GG</u> <u>ACA</u> --> TCT GGA CA 116 117 118	--
3	77	M	No	SQ	I	5	Codons 156 & 157	4 bp del	<u>ACC</u> <u>C[GC</u> <u>GT]C</u> <u>CGC</u> --> ACC CCC GC 155 156 157 158	--
4	69	M	Yes	SQ	IIIa	6	Codons 213 and 214	4 bp del	<u>TTT</u> <u>C[GA</u> <u>CA]T</u> <u>AGT</u> --> TTT CTA GT 212 213 214 215	--
5	37	F	No	SQ	I	7	Codons 243-246	8 bp del	<u>AT]G</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>A]TG</u> --> ATT G 243 244 245 246	--
6	69	M	Yes	SQ	I	7	Codons 251-254	12 bp del	<u>CCC</u> <u>[ATC</u> <u>CTC</u> <u>ACC</u> <u>ATC]</u> <u>ATC</u> --> CCC ATC 250 251 252 253 254 255	+
7	77	M	Yes	SQ	IIIa	7	Codon 261	1 bp del	<u>TCC</u> <u>A[G]</u> gtca --> TCC A gtca 260 261 Exon 7 intron 7	--
8	68	M	Yes	SQ	II	4	Codon 107	G:C --> C:G Tyr --> Stop	<u>TAC</u> --> <u>TAG</u>	--
9	63	M	Yes	SQ	IIIa	8	Codon 298	G:C --> T:A Glu --> Stop	<u>GAG</u> --> <u>TAG</u>	--
10	68	M	Yes	AD	IIIa	7	Codon 249	G:C --> T:A Arg --> Ser	<u>AGG</u> --> <u>AGT</u>	+
11	66	M	No	AS	IIIa	8	Codon 276	G:C --> T:A Ala --> Asp	<u>GCC</u> --> <u>GAC</u>	+

^a SQ: Squamous-cell carcinomas, AD: adenocarcinomas, AS: adenosquamous carcinomas.

^b Mutated base(s) is (are) shown along with the surrounding sequences. Bases encoded by same amino acid are underlined. Deletion mutation base(s) in parentheses of deletion was (were) deleted and point mutation bases underlined were substituted.

Table 6. Relationships between p53 gene mutations and clinicopathological parameters in 60 lung cancer patients.

Clinical parameters	Patients no.	No. (%) with <i>p53</i> mutations		P value ^a
		n	(%)	
Patient no.	60	11	18	
Age range (M±SD)	37-77 (65 ± 8)	37-77 (66 ± 11)		0.910
Sex				
Male	48	10	21	0.340
Female	12	1	8	
Smokers	43	8	19	0.934
Nonsmokers	17	3	18	
Tumor types ^b				
SQ	31	9	29	0.028 ^c
Non-SQ	29	2	7	
AD	24	1		
AS	3	1		
LC	1	0		
SCLC	1	0		
Tumor stages				
I+II	36	4	11	0.081
III+IV	24	7	29	

^a These results were analyzed by Pearson X^2 test except that age range between patients with and without *p53* gene mutation were analyzed by 2-sample t test.

^b SQ: Squamous-cell carcinomas, AD: adenocarcinomas, AS: adenosquamous carcinomas, LC: large-cell carcinomas, and SCLC: small-cell lung carcinoma.

^c This result was based on test comparing the frequency of *p53* mutation between SQ patients and all other non-SQ patients.

Table 7. Microsatellite instability in lung tumors

Case	sex	type ^a	age	stage	p53 mut	MI markers				
						D9S162	D17S5	D13S170	D9S126	D3S1215
15	M	SQ	72	IIIa	+	+		+	+	
11	M	SQ	68	I	-	+		+		+
19	M	SQ	57	I	-	+		+		+
43	M	SQ	70	II	-			+	+	+
88	M	SQ	75	I	-	+	+	+		
7	F	AD	68	I	-	+		+		
9	M	AS	68	IIIa	-		+		+	
26	M	SQ	73	IIIa	-	+			+	
27	M	SQ	66	II	-	+		+		
28	M	SQ	72	II	+	+		+		
29	M	AD	72	IIIa	+			+		+
49	M	AD	68	I	-	+				+
91	M	SQ	68	II	-	+		+		
109	M	SQ	68	IIIa	+	+		+		
1	F	SQ	40	I	+	+				
3	M	SQ	69	IIIa	-				+	
4	M	AS	67	II	-	+				
5	M	AD	51	IIIa	-			+		
10	M	AD	70	II	-			+		
22	F	AD	64	IIIa	-			+		
23	M	SQ	73	I	+			+		
30	M	SQ	73	IIIa	+	+				
33	M	SQ	70	IIIa	-			+		
35	M	AD	86	I	-			+		
39	F	AD	76	I	-			+		
40	M	AS	61	IIIa	-			+		
48	M	small	65	IV	-					+
90	M	AD	68	III	-	+				
95	M	AD	67	I	-			+		
98	M	AD	69	I	-			+		
100	M		75		-	+				
106	M	SQ	67	I	-			+		
108	M	SQ	62	IV	-		+			
110	M	SQ	82	I	+	+				
111	M	SQ	75	IIIa	+	+				

^a SQ: squamous carcinoma; AD: adenocarcinoma; small: small-cell lung cancer; AS: adenosquamous carcinoma.

^b +*: small intragenic deletion; +: other types of mutation.

Table 8. Clinical features of microsatellite instability-positive and –negative patients

	MI-positive	MI-negative	P value ^a
Sex			
Male	31	16	0.972
Female	4	2	
Age			
< 60	32	17	0.694
> 60	3	1	
Stage			
I+II	20	13	0.283
III+IV	15	5	
Type			
SQ	19	7	0.257
AD	11	10	
Others	4	1	
<i>P53</i> mut (+)	9	2	0.214
(--)	26	16	

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

Table 9. Frequency of codon 72 alleles of *p53* in different populations.

Population	Genotypes			Pro allele frequency	P value ^a	Reference
	Arg/Arg (%)	Arg/Pro (%)	Pro/Pro (%)			
Taiwanese	47 (30.9)	75 (49.3)	30 (19.7)	0.44		This study
Swedish Saamis	111 (72.5)	33 (21.6)	9 (5.9)	0.17	<10 ⁻³	Beckman et al, 1994
Spanish	92 (62.6)	47 (32.0)	8 (5.4)	0.21	<10 ⁻³	To-Figueras et al., 1996
Caucasians	31 (57.4)	15 (27.8)	8 (14.8)	0.29	0.002	Weston et al., 1994
Chinese	44 (37.6)	58 (49.6)	15 (12.8)	0.38	0.251	Beckman et al., 1994
Japanese	53 (34.9)	76 (50.0)	23 (15.1)	0.40	0.524	Murata et al., 1996
African-American	11 (14.9)	48 (64.9)	15 (20.3)	0.52	0.027	Jin et al., 1995

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

Table 10. Distribution of p53 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)
	Arg/Arg (%)	Arg/Pro (%)	Pro/Pro (%)			
Non-cancer control	47 (30.9)	75 (49.3)	30 (19.7)	152	1.00	1.00
Lung cancer	52 (33.8)	62 (40.3)	40 (26.0)	154	1.42 (1.08-1.88)	1.37 (1.02-1.85)
Sex						
Male	40 (35.7)	46 (41.1)	26 (23.2)	112	1.23 (0.68-2.22)	1.23 (0.89-1.70) ^c
Female	12 (28.6)	16 (38.1)	14 (33.3)	42	2.03 (1.38-2.99)	1.61 (1.05-2.47) ^c
Tumor type						
AD	20 (28.2)	31 (43.7)	20 (28.2)	71	1.60 (1.14-2.23)	1.48 (1.03-2.12)
SQ	25 (39.7)	27 (42.9)	11 (17.5)	63	0.86 (0.40-1.84)	0.74 (0.31-1.73)
AD (female)	7 (24.1)	10 (34.5)	12 (41.4)	29	2.87 (1.87-4.41)	2.45 (1.54-3.89) ^c
Tumor stage						
I + II	22 (28.2)	32 (41.0)	24 (30.8)	78	1.81 (1.31-2.49)	1.77 (1.25-2.50)
III + IV	26 (41.3)	24 (38.1)	13 (20.6)	63	1.06 (0.73-1.53)	0.98 (0.66-1.46)
Smoking habit						
Yes	31 (35.6)	38 (43.7)	18 (20.7)	87	1.06 (0.49-2.04)	1.14 (0.77-1.70)
No	18 (32.7)	20 (36.4)	17 (30.9)	55	1.92 (1.34-2.75)	1.70 (1.16-2.48)

^a Odds ratios were calculated by logistic regression method to measure the association of the Pro/Pro genotype and lung cancer risk.

^b adjusted by age and sex status.

^c adjusted by age status.

Table 11. Characteristics of lung cancer patients by *p53* genotype and age^a

Ages	Genotypes			Total
	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	
≥ 70	13 (29.5)	21 (47.7)	10 (22.7)	44
60 ~69	31 (40.8)	30 (39.5)	15 (19.7)	76
≤ 59	9 (30.0)	9 (30.0)	12 (40.0)	30

^a Patients with the Pro/Pro genotype had an OR of 2.53 (CI, 1.64-3.91) to be diagnosed as lung cancer at early ages (≤59) than those with the other genotypes.

Table 12. Distribution of *p53* polymorphism in patients who died within 6 months and in patients who still alive at the end of study^a

Characteristics	Genotypes distribution, n (%)					Risk estimates associated with Pro/Pro genotype			
				χ^2	P value	Arg/Arg		Arg/Pro	
	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro			OR	CI	OR	CI
Died within 6 months	8 (42.1)	3 (15.8)	8 (42.1)	6.03	0.049	1.58	0.47-5.35	5.78	1.30-25.71
Alive at the end of study ^b	19 (33.3)	26 (45.6)	12 (21.1)						

^a The Pearson χ^2 test was used to compare allelic distributions between the two groups. The mathematical modeling using logistic regression was used to calculate the relative risk of Arg/Arg or Pro/Pro genotype to Arg/Pro genotype.

^b Patients who were followed less than 6 months of postoperation were excluded in the analysis.

Table 13.—median survival of lung cancer patients stratified by various clinicopathological parameters in relation to p53 polymorphism

Characteristics	p53 genotypes	Cases	MST ^a (mo)	P values ^b	
Males	Arg/ Arg	31	25	0.074	
	Arg/ Pro	38	36		
	Pro/ Pro	22	20		
Females	Arg/ Arg	8	-- ^c	0.969	
	Arg/ Pro	7	--		
	Pro/ Pro	8	28		
Age	≤ 59	Arg/ Arg	6	14	0.756
		Arg/ Pro	5	21	
		Pro/ Pro	10	26	
	60 ~ 69	Arg/ Arg	25	25	0.075
		Arg/ Pro	24	--	
		Pro/ Pro	12	20	
≥ 70	Arg/ Arg	9	10	0.482	
	Arg/ Pro	15	21		
	Pro/ Pro	7	33		
Tumor types ^d	SQ	Arg/ Arg	22	28	0.046
		Arg/ Pro	22	--	
		Pro/ Pro	9	15	
	AD	Arg/ Arg	12	25	0.604
		Arg/ Pro	22	36	
		Pro/ Pro	15	28	
Tumor stages	I+II	Arg/ Arg	16	14	0.063
		Arg/ Pro	26	--	
		Pro/ Pro	21	28	
	III+IV	Arg/ Arg	23	27	0.187
		Arg/ Pro	18	19	
		Pro/ Pro	8	15	
N factors ^e	N--	Arg/ Arg	23	14	0.117
		Arg/ Pro	32	--	
		Pro/ Pro	23	28	
	N+	Arg/ Arg	14	25	0.138
		Arg/ Pro	10	19	
		Pro/ Pro	7	15	
Smokers	Arg/ Arg	27	25	0.085	
	Arg/ Pro	32	36		
	Pro/ Pro	15	17		
nonsmokers	Arg/ Arg	12	--	0.778	
	Arg/ Pro	13	24		
	Pro/ Pro	14	28		

^a MST, median survival time.

^b P values were calculated by the log rank test.

^c --, median survival not reached.

^d SQ, squamous-cell carcinomas; AD, adenocarcinomas.

^e N--, no metastasis to lymph nodes; N+, metastasis to lymph nodes.

Table 14. Univariate analysis of prognostic factors in 114 patients with lung cancers.

Variable	Risk ratio	P value
Sex	1.732 (male vs. female)	0.154
Age	1.189 (≤ 59 vs. 60~69)	0.634
	1.052 (≥ 70 vs. 60~69)	0.880
Smoking	1.373 (nonsmoker vs. smoker)	0.304
Tumor types	1.117 (AD vs. SQ)	0.722
Tumor stage	1.427 (III+IV vs. I+II)	0.210
N factors	1.723 (N+ vs. N-)	0.068
<i>p53</i> genotypes	2.280 (Pro/Pro vs. Arg/ Pro)	0.045
	1.796 (Arg/Arg vs Arg/Pro)	0.092

Abbreviations: SQ, squamous-cell carcinomas; AD, adenocarcinomas; N-, no metastasis to lymph nodes; N+, metastasis to lymph nodes.

Table 15. Distribution of polymorphism in *CYP1A1* and *GSTM1* genes by case/control status.

Genotypes	<i>P53</i> , n (%)			Genotypes	<i>CYP1A1</i> , n (%)			Genotypes	<i>GSTM1</i> , n (%)		
	Normal controls	Tumor cases ^a	Patients with <i>p53</i> mutation ^b		Normal controls	Tumor cases ^c	Patients with <i>p53</i> mutation ^d		Normal controls	Tumor cases ^e	Patients with <i>p53</i> mutation ^f
Arg/Arg	35 (30.9)	21 (30.7)	7 (63.6)	m1/m1	51 (38.1)	28 (47.5)	4 (36.4)	M1	58 (43.3)	28 (47.5)	4 (36.4)
Arg/Pro	61 (53.5)	23 (38.3)	2 (18.2)	m1/m2	62 (46.3)	19 (32.2)	4 (36.4)	Null	76 (56.7)	31 (52.5)	7 (63.6)
Pro/Pro	18 (15.8)	16 (26.7)	2 (18.2)	m2/m2	21 (15.7)	12 (20.3)	3 (27.3)				

^a The difference between normal controls and lung tumor cases was $X^2=4.481$; $df=2$; $P=0.106$.

^b The difference between lung tumor cases and patients with *p53* mutation was $X^2=3.269$; $df=2$; $P=0.195$.

^c The difference between normal controls and lung tumor cases was $X^2=3.337$; $df=2$; $P=0.189$.

^d The difference between lung tumor cases and patients with *p53* mutation was $X^2=0.506$; $df=2$; $P=0.776$.

^e The difference between normal controls and lung tumor cases was $X^2=0.289$; $df=1$; $P=0.591$.

^f The difference between lung tumor cases and patients with *p53* mutation was $X^2=0.460$; $df=1$; $P=0.498$.

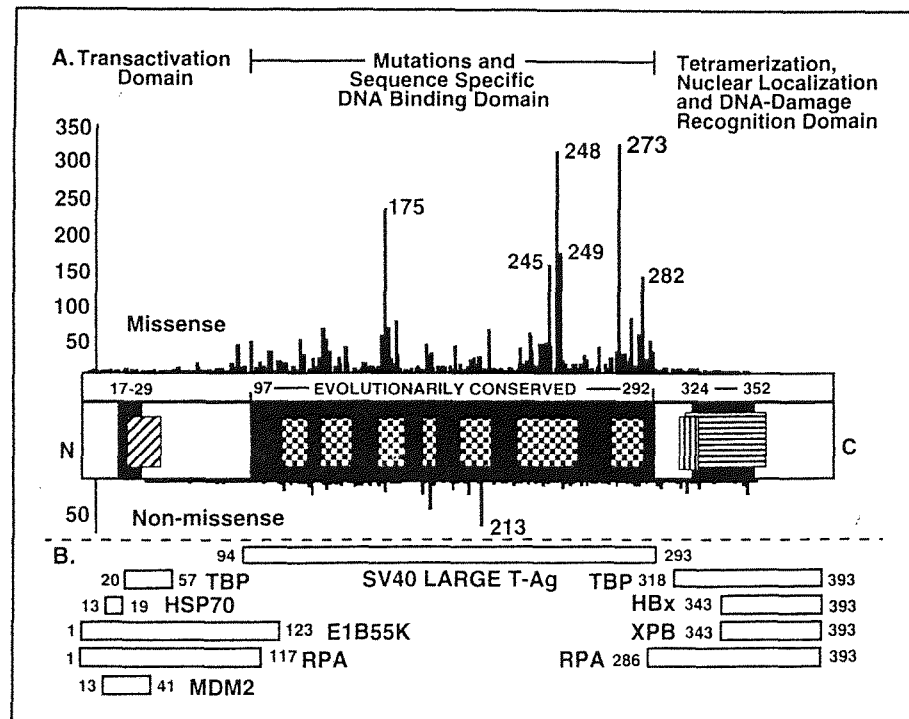
Table 16. Alterations of the *p53* gene in lung cancer patients along with polymorphism of *CYP1A1* and *GSTM1* genes.

Patient No.	Exon	<i>p53</i> mutation		Polymorphism ^b			Survival
		Location ^a	Type	<i>p53</i>	<i>CYP1A1</i>	<i>GSTM1</i>	
1	4	codon 88 <u>CCA</u> [G]CC CCC 87 88 89	1 bp del	Arg/Pro	m1/m1	Null	lived (36 mon)
2	4	codon 117 <u>TCT</u> [G]GG ACA 116 117 118	1 bp del	Arg/Arg	m2/m2	Null	lived (26 mon)
3	5	codons 156 and 157 <u>ACC C</u> [GC GT]C CGC 155 156 157 158	4 bp del	Pro/Pro	m2/m2	M1	died (33 mon)
4	6	codons 213 and 214 <u>TTT C</u> [GA CA]T AGT 212 213 214 215	4 bp del	Arg/Arg	m1/m2	Null	died (28 mon)
5	7	codons 243-246 <u>AT</u> [G GGC GGC A]TG 243 244 245 246	8 bp del	Arg/Arg	m1/m1	M1	died (14 mon)
6	7	codons 251-254 <u>CCC</u> [ATC CTC ACC ATC] ATC 250 251 252 253 254 255	12 bp del	Arg/Arg	m1/m2	Null	lived (14 mon)
7	7	codon 261 TCC A[G] gtca 260 261 Exon 7 intron 7	1 bp del	Arg/Arg	m1/m1	Null	died (28 mon)
8	4	codon 107 TAC->TAG Tyr->Stop	C->G	Pro/Pro	m1/m2	M1	died (7 mon)
9	8	codon 298 GAG->TAG Glu->Stop	G->T	Arg/Pro	m2/m2	M1	died (9 mon)
10	7	codon 249 AGG->AGT Arg->Ser	G->T	Arg/Arg	m1/m2	Null	died (25 mon)
11	8	codon 276 GCC->GAC Ala->Asp	C->A	Arg/Arg	m1/m1	Null	died (16 mon)

^a Mutated bases(s) is (are) shown along with the surrounding sequences. Base(s) in parentheses was (were) deleted and base underlined substituted.

^b For *p53* gene: Arg/Arg, homozygous wild type alleles; Pro/Pro, homozygous mutant alleles; Arg/Pro, heterozygous alleles. For *CYP1A1* gene: m1/m1, homozygous wild type alleles; m2/m2, homozygous mutant alleles; m1/m2, heterozygous alleles. For *GSTM1* gene: M1, presence of *GSTM1* gene; Null, absence of *GSTM1* gene.

Fig. 1. Schematic representation of p53 molecule. The human p53 protein consists of 393 amino acids with functional domains, evolutionarily conserved domains, and regions designated as mutational hotspots [reviewed in (4)]. **A**) Missense or nonsense mutation. Functional domains include the transactivation region (diagonally striped block), sequence-specific DNA binding region (amino acids 100-293), nuclear localization sequence (amino acids 316-325, vertically striped block), and oligomerization region (amino acids 319-360, horizontally striped block). Evolutionarily conserved domains (amino acids 17-29, 97-292, and 324-352; black areas) were determined using the MACAW (Multiple Alignment Construction and Analysis Workbench) program. Seven mutational hotspot and evolutionarily conserved regions within the large conserved domain are also identified (amino acids 130-142, 151-164, 171-181, 193-200, 213-223, 234-258, and 270-286, checkered blocks). Vertical lines above the schematic, missense mutations; lines below schematic, nonmissense mutations. The majority of missense mutations are in the conserved hydrophobic midregion of the protein that is required for the sequence-specific binding to DNA. The non-missense (nonsense, frameshift, splicing, and silent mutations) are distributed throughout the protein, determined primarily by sequence context. **B**) Protein-protein interactions: Cellular (e.g., TBP = TATA binding protein; hsp70 = heat-shock 70 protein; RPA = replicating protein antigen; MDM2 = multiple double minute protein; XPB = xeroderma pigmentosum group B DNA helicase), or viral oncoproteins (e.g., E1B55K = adenovirus protein E1B55K; SV40 large T ag = SV40 viral large T antigen; HBx = hepatitis B viral X protein) bind to specific areas of the p53 protein. Functional domains and protein binding sites (white bars underneath) were compiled from references [reviewed in (4)]. Taken from Harris (1996)



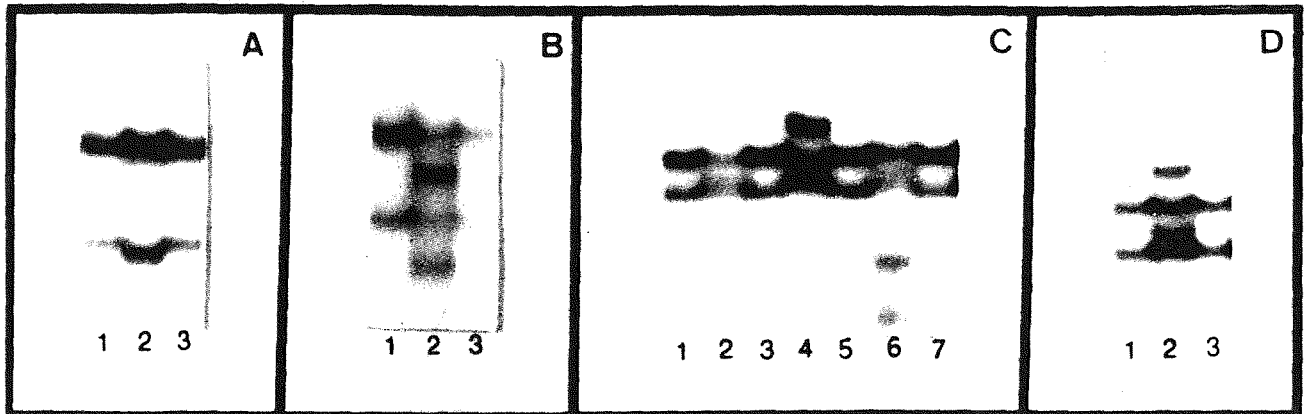


Fig. 2 Representative autoradiographs of PCR/SSCP analyses of patients exhibiting mutations in exons 5-8 of the *p53* tumor suppressor gene. Each lane contains PCR products from different patients. Patients exhibiting mutations are shown along with patients having normal migration patterns. (A) Band shift in lane 2 is 4 bp deletion of exon 5 in patient No.3; (B) Band shift in lane 2 is 4 bp deletion of exon 6 in patient No.4; (C) Band shift in lanes 2, 4, and 6 are mutations of exon 7 in patients No.7, 10, and 6, respectively; (D) Band shift in lane 2 is mutation of exon 8 in patient No.11.

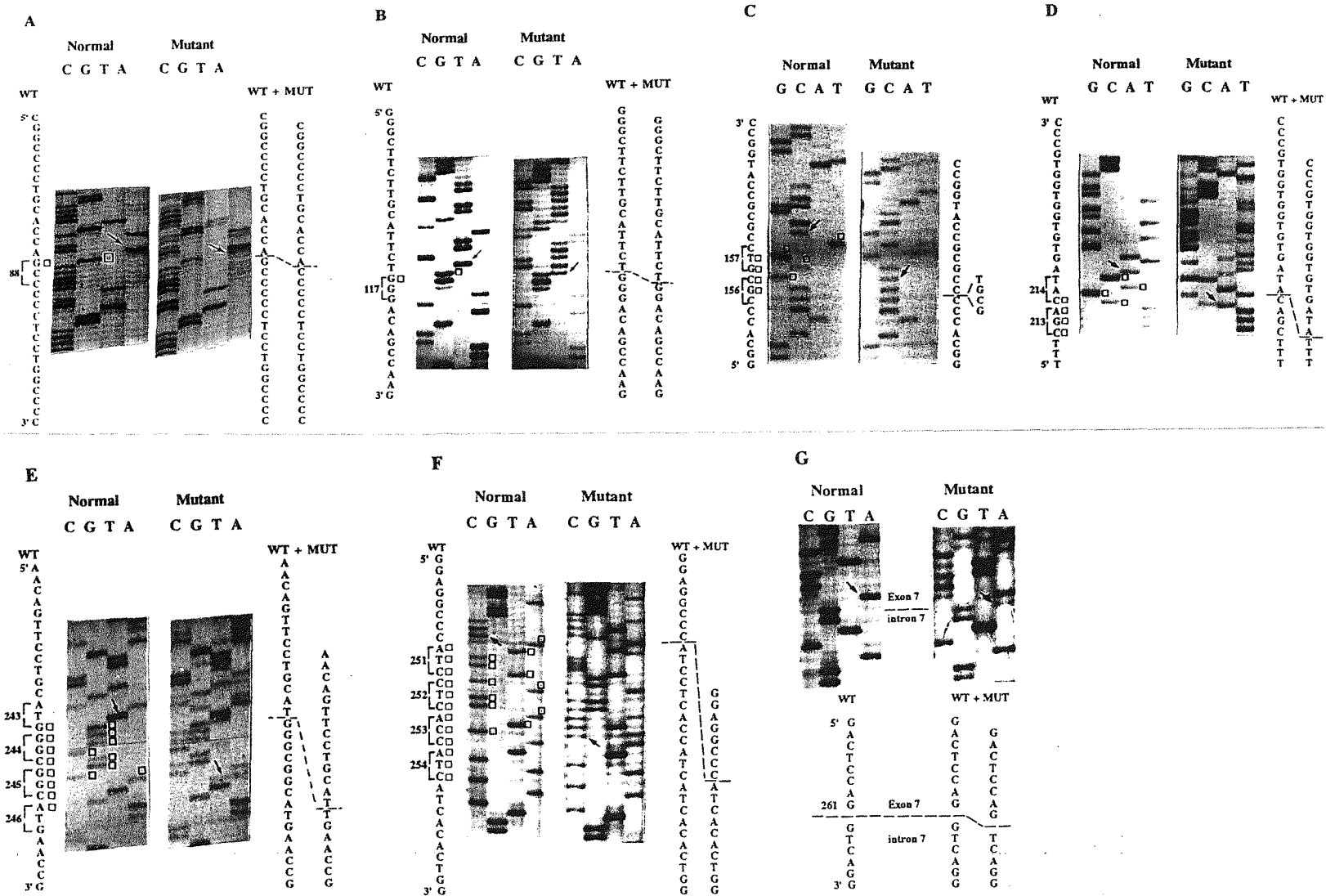


Fig. 3 Autoradiographs of sequencing analyses of patients exhibiting deletion mutations of the *p53* tumor suppressor gene. All sequences shown are of the sense strand. Some patients also exhibited wild-type alleles, which are also shown in the figure. (A) to (G) are from patients 1 to 7, respectively, and contain deletion mutations. Base(s) deleted are indicated by open squares. The areas around deleted base(s) are also shown.

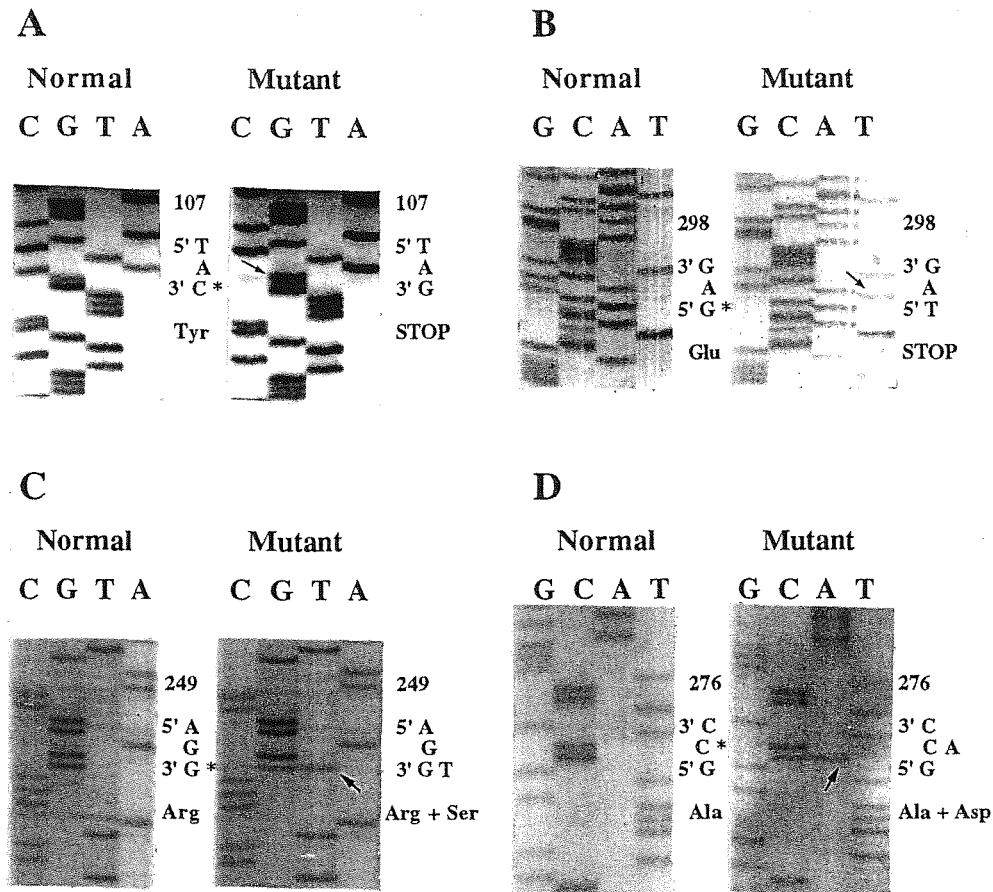


Fig. 4 Autoradiographs of sequencing analyses of patients exhibiting base substitutions of the *p53* tumor suppressor gene. All sequences shown are of the sense strand. Some patients also exhibited wild-type alleles, which are also shown in the figure. (A) and (B) are from patients No.8 and No.9, respectively, and contain nonsense mutations. (C) and (D) are from patients No.10 and No.11, respectively, and contain missense mutations. Base changes are indicated by arrows. The normal wild-type sequence and mutant sequence with encoded amino acids are also shown.

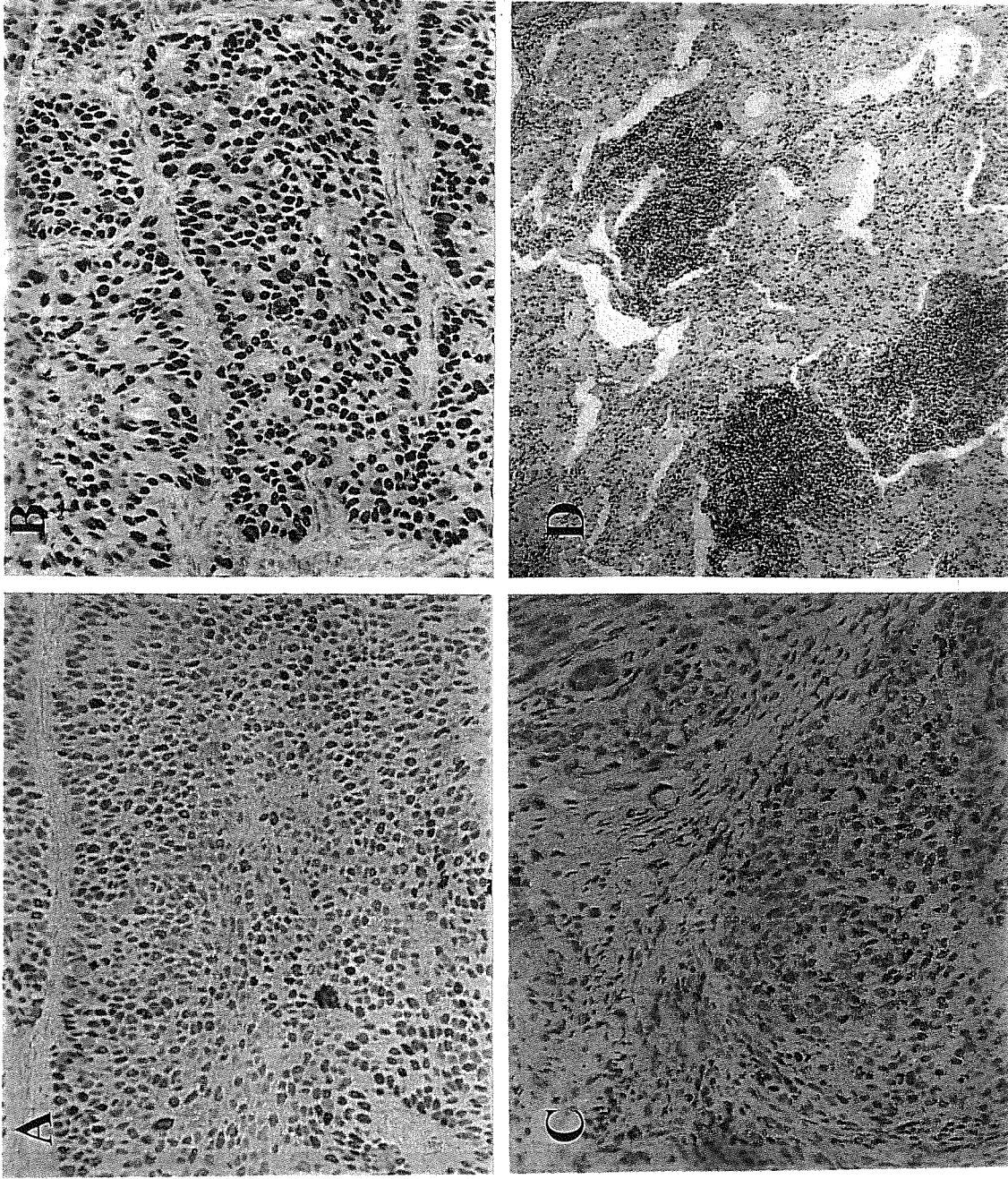


Fig. 5 Representative figures of immunohistochemical analysis of p53 protein using monoclonal antibody DO-7 in paraffin section of lung tumor specimens. (A) Nuclear immunoreactivity was found in more than 90% of cell nuclei and no positive stromal cells in patient No.6 containing a 12 bp in-frame deletion. (B) Nuclear immunoreactivity was found in 80% of cell nuclei and no positive stromal cells in patient No.11 containing a G:C→T:A transversion.(C) Negative immunostaining in tumor from patient No.8 containing a nonsense mutation. (D) Negative immunostaining tumors from patient No.3 containing a 4 bp deletion. (x 200 original magnification in A, B, and C; x 100 original magnification in D)

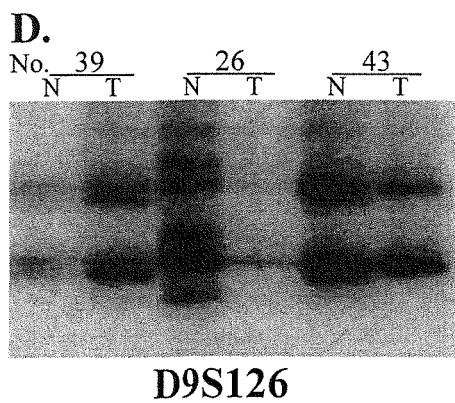
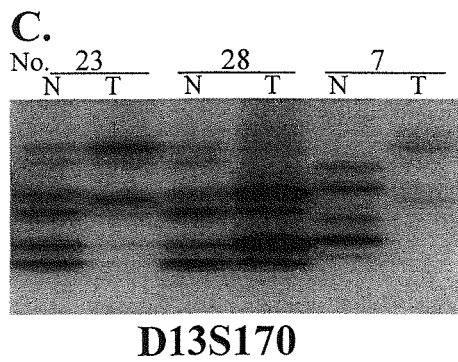
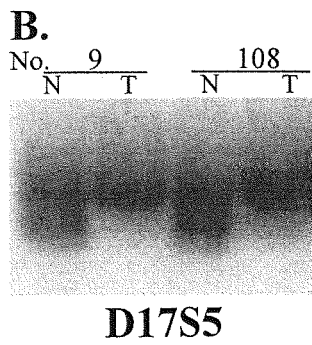
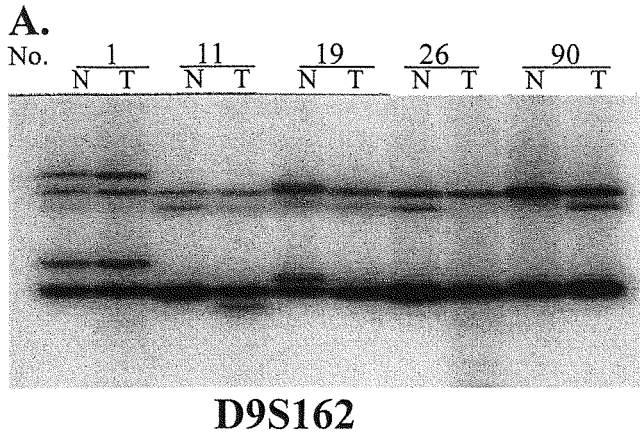


Fig. 6 Representative figures of microsatellite instability of dinucleotide repeat markers (A) D9S162, (B) D17S5, (C) D13S170, and (D) D9S126 in normal (N) and tumor (T) tissues of lung cancer patients.

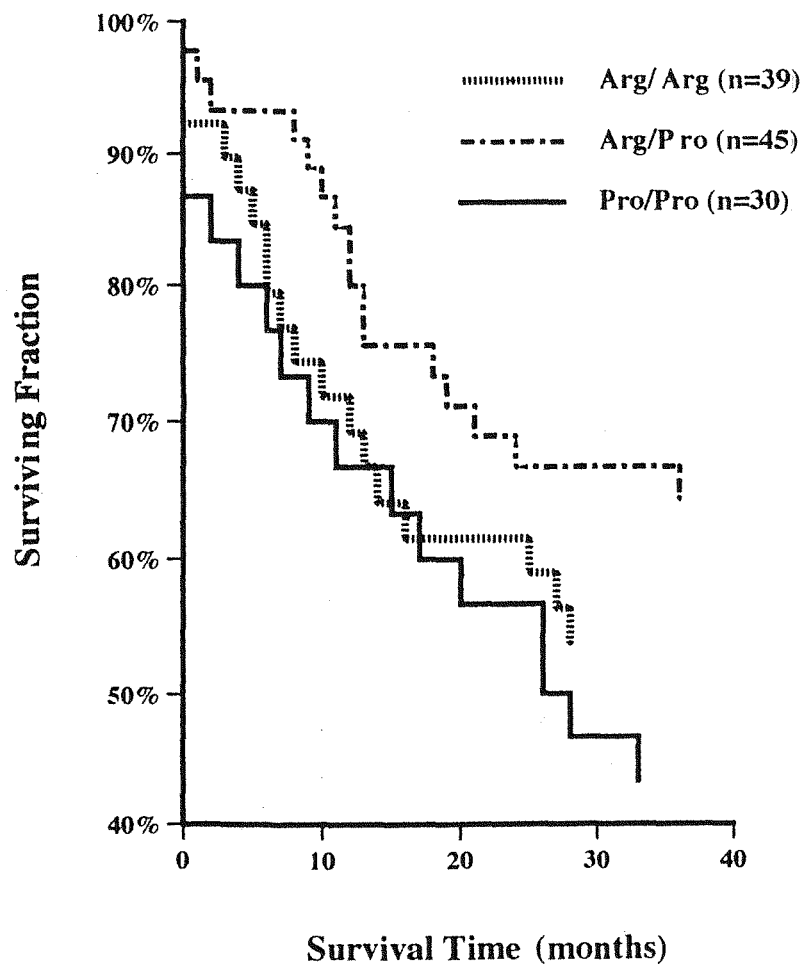


Fig. 7 The Kaplan-Meier survival curves with respect to *p53* codon 72 genotypes in 114 lung cancer patients. P-values were calculated using the log rank test. The estimated median survival times for patients with Pro/Pro, Arg/Arg, and Arg/Pro genotypes were 25, 26, and 36 months, respectively. The patients with Arg/Arg and Pro/Pro genotypes had worse prognoses than those with Arg/Pro genotype ($P=0.063$ and $P=0.088$, respectively).

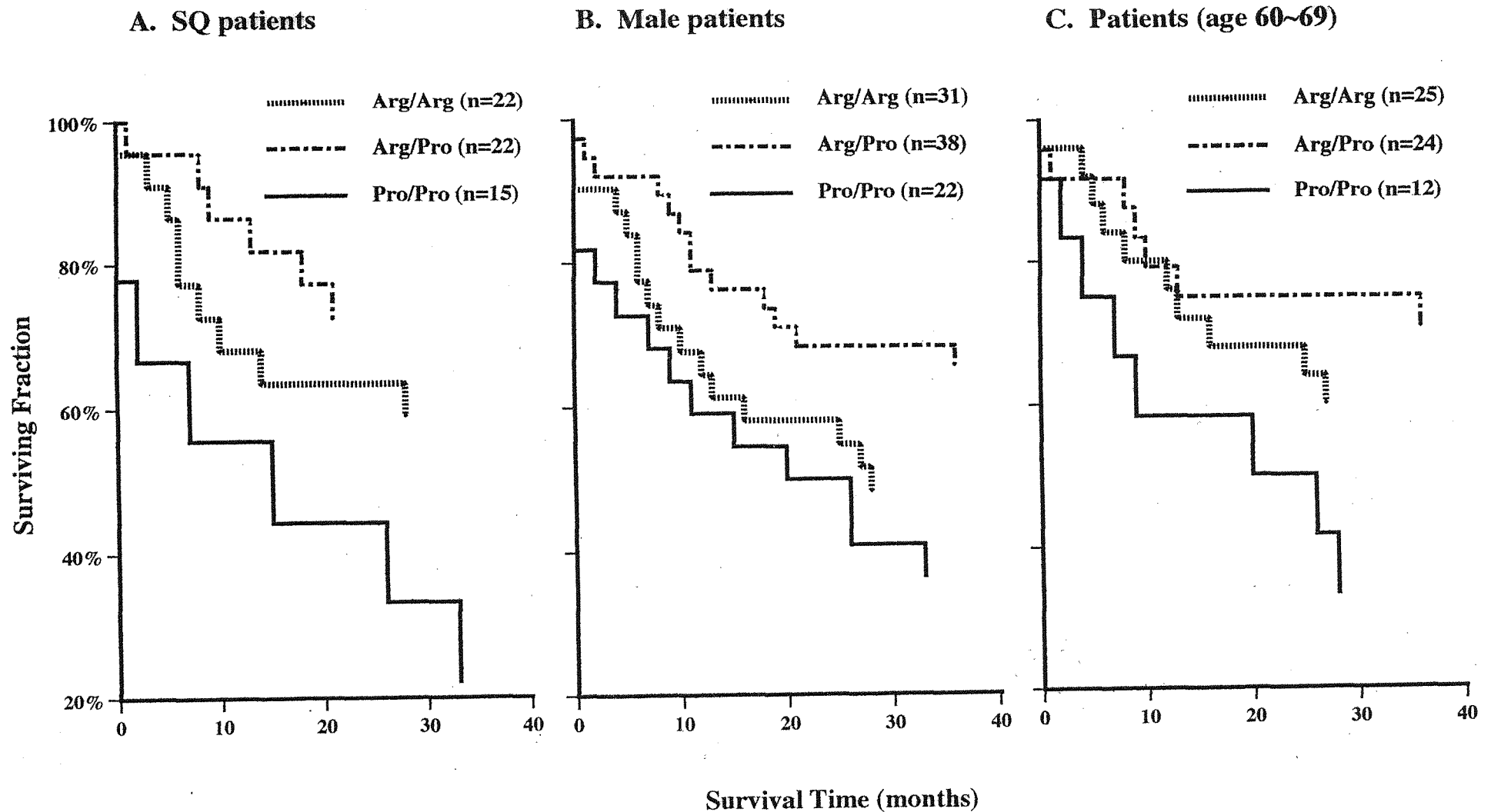


Fig 8 The Kaplan-Meier survival curves with respect to *p53* codon 72 genotypes in relation to clinicopathological parameters of lung cancer patients. (A) In patients with squamous-cell (SQ) carcinoma. The survival rate in patients with the Pro/Pro genotype was significantly lower than those with Arg/Pro genotype ($P=0.013$, using the log rank test). (B) In male patients. The survival rate in patients with the Pro/Pro genotype was lower than those with Arg/Pro genotype ($P=0.052$). (C) In patients of age among 60 to 69. The survival rate in patients with the Pro/Pro genotype was markedly lower than those with Arg/Pro genotype ($P=0.028$).

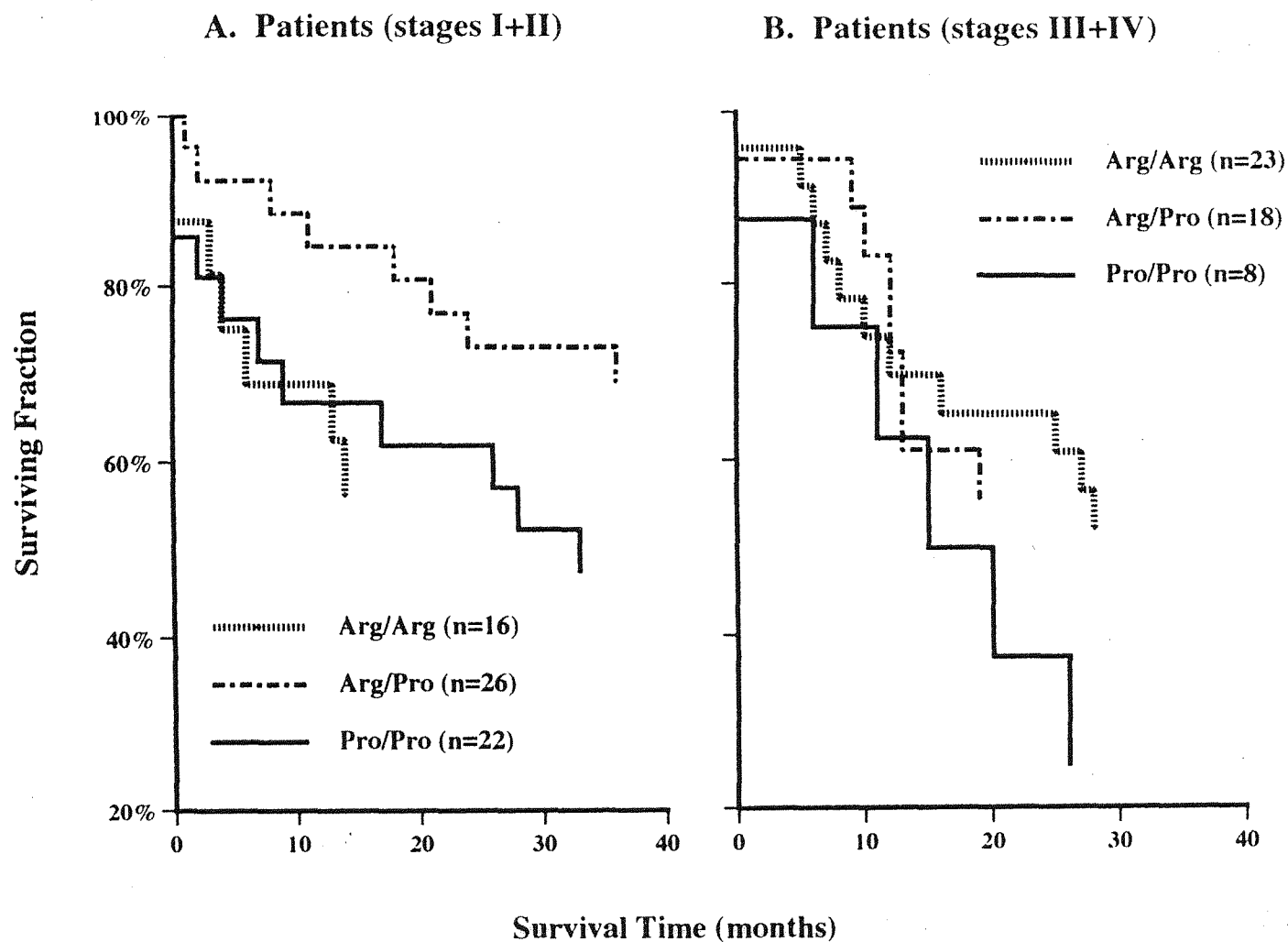


Fig. 9 The Kaplan-Meier survival curves with respect to *p53* codon 72 genotypes in relation to tumor stage of lung cancer patients. (A) In early-stage patients (stages I and II). The survival rates in patients with Pro/Pro and Arg/Arg genotypes were lower than those with Arg/Pro genotype ($P=0.057$, using the log rank test). (B) In late-stage patients (stages III and IV). The survival rate in patients with the Pro/Pro genotype was lower than those with Arg/Arg genotype ($P=0.052$).

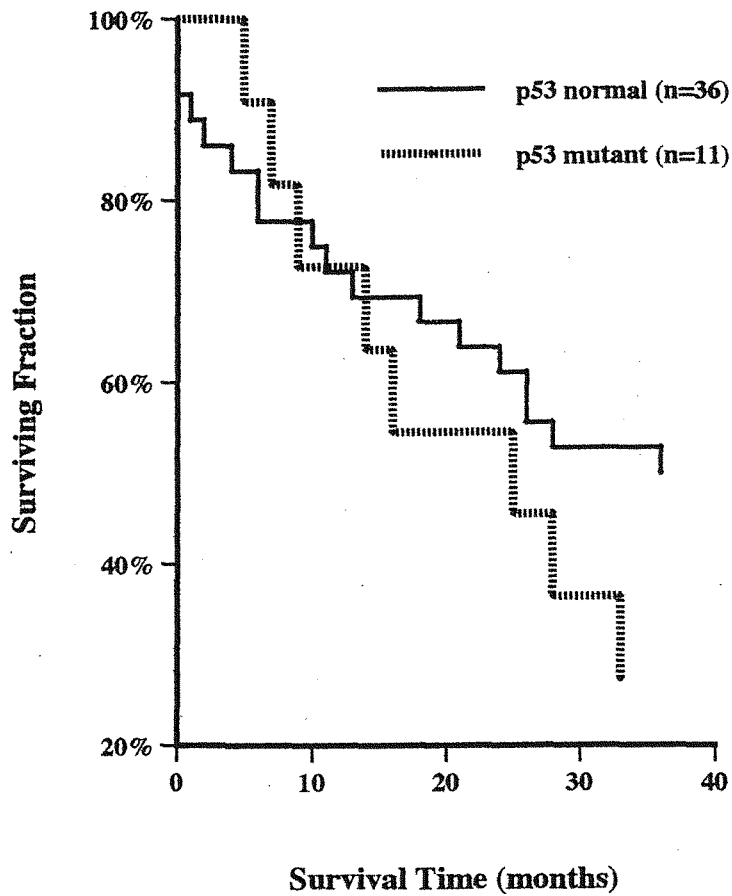


Fig. 10 The Kaplan-Meier survival curves with respect to *p53* gene mutations. The difference in the survival rates between patients with and without the *p53* gene mutation was examined by the log rank test and was not statistically significant ($P=0.3$).

柒、英文摘要

Lung cancer is the leading and second-leading cause of cancer deaths among women and men in Taiwan, respectively. However, the molecular mechanisms involved in lung tumorigenesis in Taiwan remain poorly defined. To gain insight into the role of the *p53* tumor suppressor gene and possible etiological factors in lung tumorigenesis in Taiwan, I investigated the mutation spectra of exons 4 to 11 in *p53* tumor suppressor gene of 60 lung cancer patients and the allelic distribution of *p53* codon 72 polymorphism in 154 normal healthy subjects and 152 lung cancer patients. These data were also correlated with clinical pathological characteristics and postoperative survival rate of patients.

The frequency of *p53* gene mutation was only 18% (11/60). However, distinct patterns of *p53* gene mutation were observed. In contrast to the frequent occurrence of missense mutations in *p53* gene reported in the literature, the majority (82%) of the mutations in lung cancer patients in Taiwan was non-missense mutations, i.e., deletions and nonsense mutations. Seven out of the eleven mutations detected (64%) were deletions of 1-12 bp at G:C base pairs, or at base pairs in the immediate vicinity of repetitive sequences and/or tandem repeat sequences. In addition, two patients (2/11, 18%) exhibited nonsense mutations. Notably, mutations occurred more frequently in-

patients suffering from squamous-cell carcinoma (SQ) and in-patients with stage III or IV of lung cancer. My data suggest that *p53* gene mutation involved in formation of SQ carcinoma and distinct environmental factor(s) and/or genetic factor(s) that specific induced short deletions in repeat sequences may be involved in lung tumorigenesis in Taiwan.

As regards the allelic distribution of *p53* codon 72 polymorphism, my data suggest that the proline (Pro) allele of the *p53* codon 72 polymorphism increased the risk of adenocarcinoma (AD) among female Taiwanese. The female patients with genotype Pro/Pro showed a significantly increased OR (2.87; CI, 1.87-4.41, P=0.01) of having AD lung cancer, compared to normal females with the other genotypes. A gradual increase in the Pro/Pro genotype was also observed as patients' age decreased. Patients with the Pro/Pro genotype had an OR of 2.53 (CI, 1.64-3.91; P=0.03) higher than those with the other genotypes to be diagnosed with lung cancer at the early ages.

I also found that patients with Pro/Pro genotype had worse prognoses compared to those with Arg/Pro genotypes, especially in three patient groups, i.e., SQ lung cancer, age among 60 to 69, and male patients. These differences were examined by the log rank test and were statistically significant (P=0.013, P=0.028, and P=0.052, respectively). In the patients of early stage of lung cancer, in whom identifying unfavorable prognostic factors is important, patients with Pro/Pro and Arg/Arg



genotypes had a tendency of worse prognoses than those with Arg/Pro genotype ($P=0.057$). My data suggested that *p53* codon 72 polymorphism may play a role in cancer susceptibility and prognosis in Taiwan.

In addition, we investigated the influence of polymorphism at the *p53*, cytochrome p450 *1A1* (*CYP1A1*), and glutathion S-transferase M1 (*GSTM1*) loci on *p53* gene mutation, as well as the association of *p53* gene mutation with prognosis in these lung cancer patients. There was no significant difference with the respect to the genotype distribution of *p53*, *CYP1A1*, and *GSTM1* between patients with and without *p53* mutations, though a tendency toward increasing frequency of the wild-type homozygote genotype of *p53* polymorphism was noted in lung cancer patients containing *p53* mutation. There was also no significant correlation between *p53* mutation and survival. The estimated median survival times for patients with and without *p53* mutation were 25 and 28 months, respectively. There was no significant correlation between *p53* mutation and survival. My data suggest that *p53* gene mutation was not associated with polymorphism of *p53*, *CYP1A1*, *GSTM1* genes, and it has no significant effect on the prognosis of lung cancer patients in Taiwan.

On the other hand, I analyzed the involvement of microsatellite instability (MI) in 53 lung cancer patients by using four microsatellite markers, D9S126, D9S162, D17S5, D13S170, and D3S1215. I found that 66% (35/53) of tumors exhibited MI. Note that

in the 7 patients containing intragenic deletion in *p53* gene, they all showed MI in the markers tested. These results could confirm our prediction i.e. MI may play an important role in tumor progression in SQ cancer patients in Taiwan.