วารสารโรคมะเร็ง
THAI CANCER JOURNAL
ปีที่ 28 ฉบับที่ 1
มกราคม-มีนาคม 2551

การตรวจหา p53 Codon 72 Gene Polymorphism ในผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปาก

ดนัย ทิวาเวช*
สมจินต์ จินดาวิจักษณ์**
อนันต์ กรลักษณ์***
Takafumi Ishida****

บทคัดย่อ โรคมะเร็งช่องปากเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขซึ่งก่อความสูญเสียอย่างมหาศาลในประเทศไทยทุกปี การตรวจหาผู้ที่มีความเสี่ยงสูง และผู้ป่วยระยะเริ่มแรกของโรคมะเร็งช่องปากให้พบแต่เนิ่นๆ โดยใช้ตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรม (genetic risk factor) ตลอดจนการให้ความรู้แก่ประชาชนในการป้องกันตนเองจากปัจจัยเสี่ยง และให้การรักษาที่ถูกต้องโดยรวดเร็วนับเป็นกลยุทธ์สำคัญในการป้องกัน และควบคุมโรคร้ายนี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการวิจัยเพื่อค้นหา genetic risk factor ของโรคมะเร็งช่องปาก โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง p53 codon 72 gene polymorphism กับอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งช่องปากในคนไทย ด้วยการตรวจหาความถี่ของ genotypes ของ p53 codon 72 gene polymorphism (Arginine/Arginine, Arginine/Proline และ Proline/Proline genotypes) ในผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปาก 80 ราย ผู้ป่วยโรคเรื้อรังในช่องปาก 80 ราย และคนปกติที่มีอายุใกล้เคียงกับผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปาก 80 ราย โดยใช้วิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay พบว่าความถี่ของ p53 genotype ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปาก กับกลุ่มควบคุม ซึ่งรวมกลุ่มผู้ป่วยโรคเรื้อรังในช่องปาก และกลุ่มคนปกติ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และพบว่าผู้ที่มี Proline/Proline genotype มีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งช่องปาก สูงกว่าผู้ที่มี Arginine/Arginine genotype ถึง 2.8 เท่า (Odds ratio = 2.8, 95% confidence interval = 1.0-4.7) นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างของความถี่ของ p53 codon 72 gene polymorphism ระหว่าง clinical stages ในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปากอีกด้วย ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า p53 codon 72 gene polymorphism โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Proline/Proline genotype มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งช่องปาก และการตรวจหา p53 codon 72 gene polymorphismนี้ น่าจะนำไปใช้ประโยชน์เป็นตัวช่วยบ่งชี้ทางพันธุกรรมในการตรวจคัดกรองหาผู้ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดมะเร็งช่องปาก เพื่อจะได้พบมะเร็งช่องปากตั้งแต่ระยะเริ่มแรก รวมทั้งช่วยในการพยากรณ์โรคผู้ป่วยมะเร็งช่องปากด้วย *(วารสารโรคมะเร็ง 2551;28:24-33.)*

กลุ่มงานวิจัย **กลุ่มงานโสต ศอ นาสิก และกลุ่มงานชันสูตร สถาบันมะเร็งแห่งชาติ
****Unit of Human Biology and Genetics, Department of Biological Sciences, School of Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan

Abstract **Detection of p53 codon 72 gene polymorphism in patients with oral cancer**

by **Danai Tiwawech*, Somjin Chindavijak**, Anant Karalak*** and Takafumi Ishida******
****Research, **Otolaryngology and ***Pathology Division, National Cancer Institute, Bangkok 10400, Thailand. ****Unit of Human Biology and Genetics, Department of Biological Sciences, School of Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan.***

Oral cancer is a serious malignant disease that caused vastly losses in Thailand annum. The potential risk factor for predicting and screening of high-risk populations that developed early stage oral cancer followed by immediately intensive counseling and efficiency treatment is an important strategy to control this harmful cancer. To address on the genetic risk factor for oral cancer was investigated. The association between the p53 codon 72 gene polymorphism and oral cancer susceptibility in Thai people. The frequency of p53 codon 72 gene polymorphism (Arginine/Arginine, Arginine/Proline and Proline/Proline genotypes) in 80 oral cancer patients, 80 chronic oral disease patients and 80 age-matched healthy controls was determined by using a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay. Statistically significant difference in the overall genotype frequencies between cases and controls comprising chronic oral disease patients and healthy controls was observed (p <0.05). Proline/Proline genotype carriers had 2.8-fold increased risk for oral cancer as compared with Arginine/Arginine genotype carriers (Odds ratio = 2.8, 95% confidence interval = 1.0-4.7). Among oral cancer patients, statistical significant difference in p53 genotype frequencies between clinical stages was also observed. The results in this study suggest that the p53 codon 72 gene polymorphism may associate with oral cancer susceptibility in Thai population, particularly the Proline/Proline genotype carrier. The suggestion is that the detection of p53 polymorphism may be a useful tool for screening of the high-risk group as well as prognosis of oral cancer in Thai people. *(Thai Cancer J 2008;28:24-33.)*

บทนำ

โรคมะเร็งเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขของประเทศไทยซึ่งทำความสูญเสียทางเศรษฐกิจและทำลายชีวิตประชากรไปทุกปีเป็นจำนวนมาก จากสถิติของกระทรวงสาธารณสุขปี พ.ศ. 2543 ถึง พ.ศ. 2547 พบว่าโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการตายสูงเป็นอันดับที่ 1 ของสาเหตุการตายทั่วประเทศ และอัตราตายด้วยโรคมะเร็งมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นทุกปี โดยเพิ่มจาก 39,480 ราย เป็น 42,497, 45,834, 49,682 และ 50,818 ราย ตามลำดับ[1] มีรายงานว่าโรคมะเร็งช่องปากในชายไทยสูงเป็นอันดับที่ 4 หรือประมาณ 6.8 รายต่อแสนประชากร[2] จากสถิติของสถาบันมะเร็งแห่งชาติปี พ.ศ. 2548 พบว่า โรคมะเร็งช่องปากเป็นโรคที่พบได้บ่อยและโรคนี้เป็นสาเหตุของการตายที่ค่อนข้างสูงโรคหนึ่ง[3] เป็นที่น่าสังเกตว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปาก ที่ตรวจพบในสถาบันมะเร็งแห่งชาตินั้น ส่วนใหญ่เป็นโรคในระยะสุดท้ายซึ่งมีการพยากรณ์โรค และการตอบสนองต่อการรักษาไม่ดี ผู้ป่วยกลุ่มนี้มักเสียชีวิตภายในหนึ่งปีหลังจากตรวจพบมะเร็ง แต่อย่างไรก็ตามในผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปากระยะเริ่มแรกนั้น การผ่าตัดสามารถรักษาโรคให้หายขาดได้ และโรคมะเร็งช่องปากยังเป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศไทย โดยมีอัตราการเกิดของโรคมะเร็งชนิดนี้เพิ่มขึ้นทุกปี แต่อย่างไรก็ตามผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปากในระยะเริ่มแรกมีโอกาสรักษาให้หายขาดได้ ดังนั้นโรคมะเร็งช่องปาก จึงนับได้ว่าเป็นโรคที่มีความสำคัญซึ่งควรที่จะทำการควบคุมอย่างจริงจัง ด้วยเหตุผลดังกล่าวการตรวจหาผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปากให้พบโดยเร็วตั้งแต่เป็นโรคในระยะเริ่มแรกในกลุ่มคนไทยที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคมะเร็งช่องปากโดยอาศัยตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรม (genetic marker) แล้วติดตามตรวจหาโรคมะเร็งช่องปากระยะเริ่มแรกในกลุ่มคนที่มีความเสี่ยงสูงเหล่านี้อย่างละเอียดอีกครั้งหนึ่ง โดยใช้ specific tumor marker การตรวจทางด้านรังสีวินิจฉัย และการตรวจทาง physical

examination ทุกๆ 4 หรือ 6 เดือน จึงเป็นเรื่องจำเป็นเร่งด่วนในการป้องกันและควบคุมโรคร้ายนี้ในอนาคต

ปัจจุบันความเจริญก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีของอณูชีววิทยา (Molecular Biology) ทำให้ทราบว่าในมนุษย์และสัตว์นั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic polymorphism) ซึ่งมีผลทำให้มนุษย์แต่ละคน และสัตว์แต่ละชนิดมีความไวหรือความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งแตกต่างกัน[4] (cancer susceptibility) เช่น มนุษย์แต่ละคนจะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมของ gene ที่ทำหน้าที่ในการต้านการเกิดโรคมะเร็ง (เช่น p53 tumor suppressor gene) การเผาผลาญ (metabolism เช่น cytochrome P450 gene) และการทำลายพิษ (detoxification เช่น glutathione S-transferase gene) ของสารก่อมะเร็งชนิดต่างๆรวมทั้งมีการซ่อมแซม DNA ที่ถูกทำลายไปได้ไม่เหมือนกัน ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ค้นพบเหล่านี้นักวิทยาศาสตร์พบว่าสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นประโยชน์ในการทำนายและค้นหากลุ่มคนที่มีความเสี่ยงสูงของโรคมะเร็งซึ่งกำลังจะกลายเป็นผู้ป่วยโรคมะเร็งระยะเริ่มแรกในอนาคตได้หลายชนิด เช่น โรคมะเร็งปอด[5] กระเพาะอาหาร[6] ลำไส้ใหญ่[7] โพรงหลังจมูก[8] กระเพาะปัสสาวะ[9] เต้านม[10] และตับ[11] เป็นต้น เนื่องจากมีหลักฐานทางระบาดวิทยาโมเลกุล และในสัตว์ทดลองชี้ให้เห็นว่าการได้รับสารก่อมะเร็งได้แก่ สารอาฟล่าท็อกซินจากอาหารที่มีเชื้อรา *Aspergillus flavus* สารไนโตรซามีนจากควันบุหรี่ และสาร polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) จากอาหารหมักดองหรืออาหารที่ใส่ดินประสิว และจากอาหารประเภทเนื้อสัตว์ที่ปิ้ง ย่างจนไหม้เกรียมมีสีดำ เป็นปัจจัยสำคัญทำให้เกิดโรคมะเร็งช่องปากในคน[12-15] และพบว่า p53 codon 72 gene polymorphism มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิดซึ่งมีสาเหตุมาจากสารก่อมะเร็งดังกล่าว[16-23] จึงคาดว่า p53 codon 72 gene polymorphism นี้น่าจะมีบทบาทในการทำให้เกิดโรคมะเร็งช่องปากในคนไทยได้ ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง p53 codon 72 gene polymorphism กับการเกิดโรคมะเร็งช่องปากโดยใช้วิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) จึงเป็นเรื่องน่าสนใจอย่างยิ่งที่จะได้พิจารณานำการตรวจหา p53 codon 72 gene polymorphism นี้ไปใช้ประโยชน์ในการทำนาย และติดตามค้นหากลุ่มคนที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคมะเร็งช่องปากเพื่อจะได้ช่วยในการตรวจพบผู้ป่วยระยะเริ่มแรก ซึ่งเป็นระยะที่สามารถรักษาได้

p53 tumor suppressor gene บน chromosome 17p13 เป็น gene ต้านมะเร็งซึ่งพบว่ามีการกลายพันธุ์ (mutation) บ่อยมากในผู้ป่วยโรคมะเร็งแทบทุกชนิดโดยทั่วไป p53 gene ปกติ (Wild type) ทำหน้าที่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่มีพันธุกรรมผิดปกติ (มี DNA mutation) ด้วยการทำให้เซลล์ดังกล่าวเกิดการทำลายตัวเอง (apoptosis) ขึ้นก่อนที่เซลล์นั้นจะกลายไปเป็นเซลล์มะเร็ง จึงทำให้มะเร็งไม่สามารถเพิ่มจำนวนมากขึ้นได้ หาก p53 gene มีการกลายพันธุ์ (mutant type) เกิดขึ้นจะทำให้คุณสมบัติในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่มีพันธุกรรมผิดปกติขาดหายไปเป็นผลให้เซลล์ที่มีพันธุกรรมผิดปกติเหล่านี้สามารถแบ่งตัวได้ตลอดเวลาจนกลายเป็นมะเร็ง ในปัจจุบันมีรายงานว่า codon 72 gene polymorphism บน exon ที่ 4 ของ p53 gene ทำให้เกิด p53 gene variants เป็น 2 genotypes ซึ่งทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่มี arginine (CGC) (เกิดจาก Wild type ของ p53 gene) และ proline (CCC) (เกิดจาก mutant type ของ p53 gene)[24-28] จากการศึกษาพบว่าผู้ที่มี Arg/Arg genotype มีโอกาสเสี่ยงสูงในการเป็นโรคมะเร็งปากมดลูก[29] และเต้านม[30] ในขณะที่ผู้ที่มี Pro/Pro genotype จะมีโอกาสเสี่ยงสูงในการเป็นโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ[31] และปอด[32,33] ดังนั้น p53 codon 72 gene polymorphism นี้น่าจะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจหาความเสี่ยงที่จะเป็นโรคมะเร็งในคนปกติที่อยู่ในสภาพแวดล้อมเหมือนกันกับผู้ป่วยโรคมะเร็งได้ ในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับ p53 codon 72 gene polymorphism ในผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปาก ดังนั้นจึงน่าจะมีการศึกษาถึงประโยชน์ของ p53 codon 72 gene polymorphism

เพื่อนำไปใช้ในการทำนาย และติดตามค้นหาประชากรไทยที่มีความเสี่ยงสูงในการเกิดโรคมะเร็งช่องปาก รวมทั้งช่วยในการวินิจฉัยโรค เฝ้าระวังการกลับเป็นใหม่ของโรคระหว่างการติดตามผลการรักษา และพยากรณ์ความรุนแรงของโรคมะเร็งในผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปากในประเทศไทย วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง p53 codon 72 gene polymorphism กับอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งช่องปาก และศึกษาความเป็นไปได้ที่จะใช้ p53 codon 72 gene polymorphism เป็นตัวช่วยชี้วัดในการทำนาย และตรวจหาผู้มีโอกาสเสี่ยงสูงในการเป็นโรคมะเร็งช่องปาก รวมทั้งการพยากรณ์โรคมะเร็งช่องปากในคนไทย

วัตถุและวิธีการ

การเก็บตัวอย่าง

การวิจัยนี้เป็นแบบ case-control study โดยทำการเก็บเม็ดเลือดขาว (buffy coat)[18] [แยกออกมาจากเลือด 3 ml ซึ่งเจาะใส่ในหลอดเก็บเลือดที่มีสาร EDTA (anticoagulant) และปั่นที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที นาน 20 นาที] จากกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปากซึ่งมารับการตรวจรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ 80 ราย มีอายุตั้งแต่ 40-80 ปี และผู้ป่วยทุกรายมีประวัติไม่เคยได้รับการรักษามาก่อน ในขณะเดียวกันเก็บเม็ดเลือดขาวจากกลุ่มผู้ป่วยโรคเรื้อรังในช่องปาก และกลุ่มคนปกติที่มีอายุใกล้เคียงกับผู้ป่วยโรคมะเร็งในช่องปากซึ่งมารับการตรวจร่างกายประจำปีที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กลุ่มละ 80 ราย เพื่อใช้เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ กลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปากทุกรายได้รับการวินิจฉัยโรคทางพยาธิวิทยาว่าเป็นโรคมะเร็งช่องปากเท่านั้น ประกอบด้วยเพศชาย 43 ราย และเพศหญิง 37 ราย อายุเฉลี่ย 55ปี มีผู้ป่วยที่เป็น squamous cell carcinoma (SCC) 55 ราย และ adenocarcinoma (ADC) 25 ราย และมีผู้ป่วยโรคมะเร็งในช่องปาก stage I & II 20 ราย และ stage III & IV 60 ราย สำหรับกลุ่ม age-matched controls เป็นผู้ป่วยโรคเรื้อรังในช่องปาก และคนปกติที่ไปตรวจร่างกายประจำปีที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ และมีผลการตรวจร่างกาย และการตรวจเลือดเป็นปกติ ประกอบด้วยชาย 83 ราย และหญิง 77 ราย อายุเฉลี่ย 54 ปี ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างเม็ดเลือดขาวทั้งหมดไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปศึกษา

การสกัด DNA จากเม็ดเลือดขาว

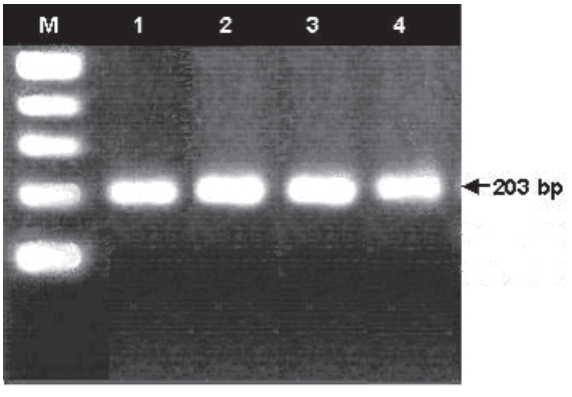
การสกัด DNA จากเม็ดเลือดขาวของกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งในช่องปาก ผู้ป่วยโรคเรื้อรังในช่องปาก และกลุ่มคนปกติใช้น้ำยาสำเร็จรูป (QIA amp® DNA Mini kit, Germany) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ เริ่มด้วยการใส่ buffy coat 200 µl ลงใน plastic tube 1.5 ml ที่มี 20 µl ของ QIAGEN Protease จากนั้นผสมให้เข้ากัน ตามด้วยการเติม buffer AL 200 µl และผสมให้เข้ากัน 15 วินาที แล้วนำไปแช่ใน water bath ที่ 56 °C นาน 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 6,000 xg/8,000 rpmนาน 1 นาที เมื่อปั่นเสร็จเติม 100% ethanol และผสมให้เข้ากัน 15 วินาที แล้วปั่นที่ 6,000 xg/8,000 rpm นาน 2 นาที อีกครั้งหนึ่ง จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ ใส่ใน QIAamp Spin Column แล้วปั่นที่ 6,000 xg/8,000 rpm นาน 1 นาทีตามด้วยการเติม buffer AW 1 500 µl ลงใน column แล้วปั่นที่ 6,000 xg/8,000 rpmนาน 1 นาที ต่อไปวาง column ลงใน collection tube อันใหม่ และเติม buffer AW 2 ลงใน column ดังกล่าวแล้วปั่นที่ 20,000 xg/14,000 rpm นาน 3 นาที นำ column วางใน collection tube อันใหม่ ปั่นที่ 20,000 xg/14,000 rpm นาน 1 นาที ขั้นสุดท้าย วาง column ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml แล้วเติม buffer AE 200 µl ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 6,000xg/8,000 rpm นาน 1 นาที จะได้ตัวอย่าง DNA อยู่ใน microcentrifuge tube นำ DNA ที่ได้ไปเก็บไว้ที่ 4 °C 1 คืน แล้วจึงเปลี่ยนไปเก็บที่ -40 °C จนกว่าจะนำไปใช้

การตรวจหา p53 codon 72 gene polymorphism ด้วยวิธี PCR-RFLP

ในการทำ PCR ใช้ primers 2 ตัวคือ 5'CCCGGACGATATTGAACA3' และ 5'AGAAGCCCAG-

ACGGAAAC3' เพื่อเพิ่มจำนวนของ p53 exon ที่ 4 โดยมีวิธีการทำโดยย่อดังนี้ เริ่มด้วยการนำ reaction mixture (50 µl) ไป incubate ที่ 94 °C นาน 9 นาที ก่อนการทำ PCR จากนั้นทำการเพิ่มจำนวน DNA โดยการทำ PCR ตามโปรแกรมดังต่อไปนี้ 94 °C นาน 1 นาที, 63 °C นาน 1 นาที และ 72 °C นาน 1 นาที เป็นจำนวน 40 รอบ แล้วตามด้วย 72 °C นาน 4 นาที เมื่อทำเสร็จ PCR แล้วนำผลผลิต p53 codon 72 gene ที่ได้ ไปทำ electrophoresis ใน 2.5% agarose gel ตามด้วยการย้อมโดยใช้ ethidium bromide และดูผลด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลตซึ่งผลผลิตที่ได้จาก PCR ของ p53 จะเป็นแถบของ DNA 1 แถบมีขนาด 203 bp (รูปที่ 1) ในการทำ PCR ทุกครั้ง ใช้ double distilled water เป็น negative control

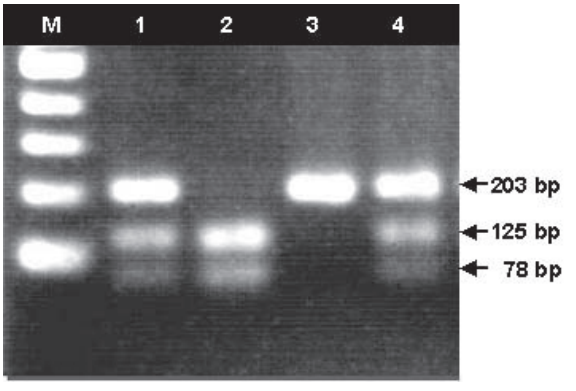
สำหรับการทำ RFLP นั้น เริ่มด้วยนำผลผลิตที่ได้จาก PCR ของ p53 codon 72 gene ซึ่งมีขนาด 203 bp ไปย่อยด้วยเอ็นไซม์ Acc II (ใช้น้ำยาของบริษัท Takara, Japan) ที่ 37 °C นาน 10-12 ชั่วโมง จากนั้นนำ p53 codon 72 gene ที่ย่อยแล้วไปทำ electrophoresis ใน 2.5% agarose gel ตามด้วยการย้อมโดยใช้ ethidium bromide และดูผลด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต เพื่อวิเคราะห์ผลที่ได้จาก PCR-RFLP เนื่องจากเอ็นไซม์ Acc II สามารถตัด sequence CGCG ของ Arg allele ได้ จึงทำให้เกิดแถบของ DNA 2 แถบ คือ ขนาด 125 bp และ 78 bp (Arg/Arg genotype) ในขณะที่ Pro allele จะไม่ถูกตัด และจะมีเพียงแถบของ DNA 1 แถบที่ขนาด 203 bp (Pro/Pro genotype) ส่วน Arg/Pro genotype มีแถบของ DNA 3 แถบคือ ขนาด 203 bp, 125 bp และ 78 bp (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 PCR product ของ p53 codon 72 gene polymorphism หลังจากผ่านการทำ gel electrophoresis บน 2.5% agarose gel และย้อมด้วย ethidium bromide ผลที่ได้คือเกิดแถบของ DNA 1 แถบ มีขนาด 203 base pair (bp), M คือ 100 bp DNA size marker

การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ใช้ χ^2 (Chi-square) test เปรียบเทียบความแตกต่างของความถี่ของ



รูปที่ 2 การวิเคราะห์ผลของ p53 codon 72 gene polymorphism ที่ได้จากการทำ PCR-RFLP หลังจาก PCR product ถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ AccII และผ่านการทำ electrophoresis บน 2.5% agarose gel และย้อมด้วย ethidium bromide ผลที่ได้มี 3 แบบคือ Arg/Pro genotype (lane 1: เกิดแถบของ DNA 3 แถบคือ 203 bp, 125 bp และ 78 bp), Arg/Arg genotype (lane 2: เกิดแถบของ DNA 2 แถบคือ 125 bp และ 78 bp) และ Pro/ Pro genotype (lane 3: เกิดแถบของ DNA 1 แถบคือ 203 bp), M คือ 100 bp DNA size marker.

genotype ของ p53 gene codon 72 gene polymorphism ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปาก ผู้ป่วยโรคเรื้อรังในช่องปาก และกลุ่มคนปกติในการวิจัยนี้ หาก P value มีค่าน้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าของ Odds ratio (OR) และ 95% confidence interval (CI) นั้นคำนวณเพื่อเปรียบเทียบความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งช่องปาก ระหว่างกลุ่มผู้ที่ Pro/Pro genotype และ genotype อื่น ๆ ในกลุ่มต่าง ๆ

ผลการวิจัย

ผลของการตรวจหา p53 codon 72 gene polymorphism ในกลุ่มคนปกติ กลุ่มผู้ป่วยโรคเรื้อรังในช่องปาก และกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปาก กลุ่มละ 80 ราย พบว่าโดยรวมความถี่ของ p53 genotypes ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปาก กับกลุ่มผู้ป่วยโรคเรื้อรังในช่องปาก และกลุ่มคนปกติ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปาก กับกลุ่มคนปกติ พบว่าผู้ที่มี Pro/Pro genotype มีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งช่องปาก สูงกว่าผู้ที่มี Arg/Arg genotype 2.6 เท่า (Odds ratio = 2.6, 95% confidence interval = 1.0-6.5) ในขณะที่ผู้ที่มี Arg/Pro genotype มีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งช่องปาก สูงกว่าผู้ที่มี Arg/Arg genotype 3.6 เท่า (Odds ratio = 3.6, 95% confidence interval = 1.6-8.0) (ตารางที่ 1)

เมื่อเปรียบเทียบ p53 codon 72 gene polymorphism ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปากกับกลุ่มคนปกติ และกลุ่มผู้ป่วยโรคเรื้อรังในช่องปาก พบว่าผู้ที่มี Pro/Pro genotype มีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งช่องปาก สูงกว่าผู้ที่มี Arg/Arg genotype 2.8 เท่า (Odds ratio = 2.8, 95% confidence interval = 1.0-4.7) ในขณะที่ผู้ที่มี Arg/Pro genotype มีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งช่องปากสูงกว่าผู้ที่มี Arg/

ตารางที่ 1 ความถี่ของ p53 codon 72 gene polymorphism ในกลุ่มคนปกติ ผู้ป่วยโรคเรื้อรังในช่องปาก และผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปาก

กลุ่ม (จำนวน)	p53 codon 72 polymorphism				
	Arg/Arg n (%)	Arg/Pro n (%)	OR 95%CI	Pro/Pro n (%)	OR 95%CI
คนปกติ (80)	19 (24)	49 (61)		12 (15)	
ผู้ป่วยเรื้อรัง (80)	20 (25)	43 (54)	1.6 0.7-3.8	17 (21)	1.4 0.5-3.6
ผู้ป่วยมะเร็งช่องปาก (80)	18 (23)	33 (41)	3.6 1.6-8.0**	29 (36)	2.6 1.0-6.5*

*p <0.05, **p <0.01

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่าง p53 codon 72 gene polymorphism กับกลุ่มศึกษา

กลุ่มศึกษา	p53 codon 72 polymorphism				
	Arg/Arg n (%)	Arg/Pro n (%)	OR 95%CI	Pro/Pro n (%)	OR 95%CI
คนปกติ+ผู้ป่วยเรื้อรัง	40 (25)	91 (57)		29 (18)	
ผู้ป่วยมะเร็งช่องปาก	18 (23)	33 (41)	2.2 1.4-2.8**	29 (36)	2.8 1.0-4.7*

*p <0.05, **p <0.01

ตารางที่ 3 ความถี่ของ p53 genotypes ในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปาก

กลุ่ม	จำนวน	p53 genotypes (จำนวน)				
		Arg/Arg n (%)	Arg/Pro n (%)	OR 95%CI	Pro/Pro n (%)	OR 95%CI
ผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปาก	80	18 (22.5)	33 (41.3)		29 (36.2)	
เพศ						
ชาย	43	10 (23.3)	17 (39.5)		16 (37.2)	
หญิง	37	8 (21.6)	16 (43.3)		13 (35.1)	1.0 (0.3-3.3)
Histological type						
SCC	55	14 (25.5)	19 (34.5)		22 (40.0)	
ADC	25	4 (16.0)	14 (56.0)		7 (28.0)	1.1 (0.3-4.5)
Clinical stage						
Stage I&II	20	7 (35.0)	10 (50.0)		3 (15.0)	
Stage III&IV	60	11 (18.3)	23 (38.3)	4.9 (1.0-22.6)*	26 (43.4)	5.5 (1.2-25.4)*

*p <0.05

Arg genotype 2.2 เท่า (Odds ratio = 2.2, 95% confidence interval = 1.4-2.8) (ตารางที่ 2)

นอกจากนี้ยังพบว่าในระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปากนั้น Pro/Pro genotype ในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปาก stage III&IV มีค่าสูงกว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปาก stage I&II ($p<0.05$) อีกด้วย และพบว่าผู้ที่มี Pro/Pro genotype มีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งช่องปาก stage III&IV สูงกว่าผู้ที่มี Arg/Arg genotype 5.5 เท่า (Odds ratio = 5.5, 95% confidence interval = 1.2-25.4) ในขณะที่ผู้ที่มี Arg/Pro genotype มีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งช่องปากสูงกว่าผู้ที่มี Arg/Arg genotype 4.9 เท่า (Odds ratio = 4.9, 95% confidence interval = 1.0-22.6) (ตารางที่ 3)

วิจารณ์

โรคมะเร็งช่องปากยังเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทย การตรวจวินิจฉัยให้พบผู้ป่วยตั้งแต่ระยะเริ่มแรกและให้การรักษาที่ถูกต้องทันทีจะทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสหายขาดจากโรคได้ การเฝ้าระวังการเกิดของโรคมะเร็งเพื่อให้การรักษาที่ถูกต้องและรวดเร็วทันทีนับว่ามีความสำคัญมากในการควบคุมโรคร้ายนี้ ดังนั้นแพทย์จำเป็นต้องมี genetic risk factor ที่ดีเพื่อใช้ช่วยในการตรวจคัดกรอง และวินิจฉัยค้นหาผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปากระยะเริ่มแรกให้พบโดยเร็วก่อนที่จะมีการแพร่กระจายของโรคมะเร็งไปยังอวัยวะส่วนอื่นๆ พร้อมทั้งใช้ช่วยในการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยแต่ละราย ซึ่งจะทำให้ผลการรักษาของแพทย์มีประสิทธิภาพสูงสุด

การตรวจหา p53 codon 72 gene polymorphism นับว่าเป็น genetic risk factor ที่ดี และน่าจะมีประโยชน์ทางคลินิกอย่างมาก แพทย์อาจจะนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองหาผู้ที่เป็นกลุ่มเสี่ยง และช่วยวินิจฉัยค้นหาผู้ป่วยโรคมะเร็งระยะเริ่มแรก พร้อมทั้งช่วยในการตัดสินใจเลือกวิธีรักษาให้กับผู้ป่วยโรคมะเร็งได้หลายชนิด เนื่องจาก p53 codon 72 gene polymorphism สามารถใช้ค้นหาผู้มีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และมีความสัมพันธ์กับระยะของโรคมะเร็ง[29-33] จากการศึกษาพบว่าผู้ที่มี Pro/Pro genotype ของ p53 codon 72 gene polymorphism มีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งสูงกว่าผู้ที่มี Arg/Arg genotype 2-3 เท่า และในผู้ป่วยโรคมะเร็งที่มี Pro/Pro genotype มักมีการพยากรณ์โรคไม่ดี และมีอัตราของการมีชีวิตรอดที่ต่ำ แพทย์จำเป็นต้องให้การรักษาผู้ป่วยเหล่านี้อย่างเร่งด่วน และใช้รูป

แบบการรักษาที่รุนแรง (aggressive forms of therapy) เช่น หากตรวจพบ Pro/Pro genotype ในผู้ป่วยโรคมะเร็ง ศัลยแพทย์จะทราบได้ทันทีว่าควรผ่าตัดให้ครอบคลุมก้อนมะเร็งทั้งหมดและควรผ่าตัดเนื้อเยื่อปกติโดยรอบก้อนมะเร็งออกไปด้วย และจะต้องให้เคมีบำบัดแก่ผู้ป่วยต่อไป พร้อมทั้งติดตามเฝ้าดูอาการของผู้ป่วยอย่างละเอียดรอบคอบตลอดเวลา จะเห็นได้ว่าการประยุกต์เอาการตรวจหา p53 codon 72 gene polymorphism มาใช้ในทางคลินิกนอกจากสามารถช่วยทำให้แพทย์ทำการรักษาผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นแล้ว ยังช่วยทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสหายขาดจากโรคและลดค่าใช้จ่าย ที่ไม่จำเป็นได้อย่างมากอีกด้วย

ผลของการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าสามารถตรวจพบ p53 codon 72 gene polymorphism ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปาก ผู้ป่วยโรคเรื้อรังในช่องปาก และคนปกติได้ด้วยวิธี PCR-RFLP assay และความชุกของการตรวจพบ p53 codon 72 gene polymorphism ในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปากมีค่าสูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างของ p53 codon 72 gene polymorphism ในระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคเรื้อรังในช่องปาก กับกลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่าผู้ที่มี Pro/Pro genotype และ Arg/Pro genotype มีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งช่องปากสูงกว่าผู้ที่มีArg/Arg genotype 2.6 เท่า และ 3.6 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ ความถี่ของการตรวจพบ p53 codon 72 gene polymorphism ในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปาก มีค่าสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคเรื้อรังในช่องปากรวมกับกลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย โดยพบว่าผู้ที่มี Pro/Pro genotype และ Arg/Pro genotype มีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งช่องปาก สูงกว่าผู้ที่มี Arg/Arg genotype 2.8 เท่า และ 2.2 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 2) แสดงว่า Pro/Pro genotype และ Arg/Pro genotype น่าจะมีประโยชน์นำไปใช้เป็นตัวช่วยบ่งชี้ทางพันธุกรรมในการตรวจคัดกรองหาผู้ที่เสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งช่องปาก ซึ่งผลของการวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานของ Shen และคณะ[34] ซึ่งพบว่า p53 codon 72 polymorphism นั้นมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งช่องปาก

ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงเชื่อว่าการตรวจหา p53 codon 72 gene polymorphism น่าจะนำไปประยุกต์ใช้เป็น genetic risk factor ช่วยในการตรวจหาผู้ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคมะเร็งช่องปากเพื่อให้ความรู้ในการป้องกันตนเองจากปัจจัยเสี่ยง และค้นหาผู้ที่เสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งช่องปาก เพื่อจะได้ตรวจพบโรคตั้งแต่ระยะเริ่มแรกที่ยังไม่มีอาการใด ๆ เพื่อให้การรักษาที่ถูกต้องโดยรวดเร็วได้ อย่างไรก็ตามควรตระหนักว่าการใช้ p53 codon 72 gene polymorphism เพียงอย่างเดียวเพื่อการตรวจคัดกรองหาผู้ที่มีความเสี่ยงสูงของโรคมะเร็งช่องปาก และการวินิจฉัยโรคมะเร็งช่องปากนั้นไม่เพียงพอ เนื่องจาก p53 codon 72 gene polymorphism ยังสามารถตรวจพบในโรคมะเร็งอีกหลายชนิด[16-23] ดังนั้นควรใช้ p53 codon 72 gene polymorphism ร่วมกับการตรวจสอบประวัติ ผลการตรวจร่างกาย ผลการตรวจทางพยาธิวิทยา และผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่น ๆ ของผู้ป่วย เพื่อช่วยทำให้การตรวจคัดกรองโรค และวินิจฉัยโรคมะเร็งช่องปากมีประสิทธิภาพมากขึ้น

จากผลของการวิจัยนี้ยังพบความแตกต่างของความถี่ของ p53 codon 72 gene polymorphism ระหว่าง clinical stages ในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปากอีกด้วย โดยพบว่าความถี่ของ p53 codon 72 gene polymorphism ในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปาก stage III & IV มีค่าสูงกว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปาก stage I & II ($p<0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ที่มี Pro/Pro genotype และ Arg/Pro genotype มีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งช่องปาก stage III & IV สูงกว่าผู้ที่มี Arg/Arg genotype 5.5 เท่า และ 4.9 เท่าตามลำดับ (ตารางที่ 3) แสดงว่า Pro/Pro genotype และ Arg/Pro genotype น่าจะมีประโยชน์นำไปใช้เป็นตัวช่วยบ่งชี้ทางพันธุกรรมในการพยากรณ์โรคของมะเร็งช่องปากในคนไทยได้ แต่อย่างไรก็ตาม ไม่พบว่าความถี่ของ p53 codon 72 gene polymorphism ในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องปาก

มีความแตกต่างกันในระหว่าง เพศ และผลทางพยาธิสภาพของชิ้นเนื้อเยื่อ แสดงว่า p53 codon 72 gene polymorphism ไม่สามารถใช้ช่วยในการบ่งบอกความแตกต่างเกี่ยวกับพยาธิสภาพของโรคมะเร็งช่องปากในผู้ป่วยได้

การศึกษานี้ไม่สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Kietthubthew และคณะ ซึ่งรายงานว่าไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง p53 codon 72 gene polymorphism กับโรคมะเร็งช่องปากในภาคใต้ของประเทศไทย[35] ทั้งนี้อาจเนื่องจากตัวอย่างที่นำมาศึกษานั้นมีความแตกต่างกันโดยพบว่าในการศึกษาของ Kietthubthew และคณะใช้ตัวอย่างที่ได้มาจากผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพเป็น squamous cell carcinoma เพียงชนิดเดียวแต่ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างที่ได้มาจากผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพรวมทั้ง squamous cell carcinoma และ adenocarcinoma นอกจากนี้ Bau และคณะ ได้ทำการศึกษาในกลุ่มคนไต้หวันพบว่าผู้ที่มี Arg/Arg genotype มีโอกาสเสี่ยงในการเป็นโรคมะเร็งช่องปากสูงกว่าผู้ที่มี Pro/Pro genotype[36] ซึ่งผลที่ได้ต่างจากผลการศึกษาในครั้งนี้ อาจเป็นเพราะจำนวน และชนิดของตัวอย่างที่ใช้ศึกษา รวมทั้งวิธีการ และน้ำยาที่ใช้มีความแตกต่างกัน

สรุปผลของการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า p53 codon 72 gene polymorphism โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Pro/Pro genotype มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งช่องปาก และการตรวจหา p53 codon 72 gene polymorphism นี้น่าจะนำไปใช้ประโยชน์เป็นตัวช่วยบ่งชี้ในการตรวจคัดกรอง หาผู้ที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรค และพยากรณ์โรคมะเร็งช่องปากในคนไทยได้ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาต่อไปโดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างมากขึ้นเพื่อเป็นการเปรียบเทียบ และยืนยันผลของการศึกษาครั้งนี้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณประจำปี พ.ศ. 2548–2549 จากกรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

เอกสารอ้างอิง

1. สถิติสาธารณสุข พ.ศ. 2547 กองสถิติสาธารณสุข สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงสาธารณสุข.
2. Sriplung H, Sontipong S, Martin N, et al. Cancer in Thailand. Vol III, 1995-1997. Bangkok: 2003. p. 157.
3. รายงานสถิติประจำปี พ.ศ. 2548 กองสถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.
4. Bartsch H, Hietanen E. The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure. Environ Health Perspect 1996;104(Suppl 3):569-77.
5. Nazar-Stewart V, Motulsky AG, Eaton DL, White E, Hornung SK, Leng ZT, et al. The glutathione S-transferase polymorphism as a marker for susceptibility to lung carcinoma. Cancer Res 1993;53: 2313-8.
6. Cai L, Yu SZ, Zhang ZF. Glutathione S-transferases M1, T1 genotypes and the risk gastric cancer: A case-control study. World J Gastroenterol 2001;7:506-9.
7. Gawronska-Szklarz B, Lubinski J, Kladny J, Kurzawski G, Bielicki D, Wojcicki M, et al. Polymorphism of GSTM1 gene in patients with colorectal cancer and colonic polyps. Exp Toxicol Pathol 1999; 51:321-5.
8. Nazar-Stewart V, Vaughan TL, Burt RD, Chen C, Berwick M, Swanson GM. Glutathione S-transferase M1 and susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1999; 8:547-51.
9. Srivastava DS, Kumar A, Mittal B, Mittal RD. Polymorphism of GSTM1 and GSTT1 genes in bladder cancer: a study from North India. Arch Toxicol 2004;78: 430-4.
10. van der Hel OL, Peeters PH, Hein DW, Doll MA, Grobbee DE, Kromhout D, et al. NAT2 slow acetylation and GSTM1 null genotypes may increase postmenopausal breast cancer risk in long-term smoking women. Pharmacogenetics 2003;13:399-407.
11. Deng ZL, Wei YP, Ma Y. Polymorphism of glutathione S-transferase mu 1 and theta 1 genes and hepatocellular carcinoma in southern Guangxi, China. World J Gastroenterol 2005;11: 272-4.
12. Beasley RP. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. Cancer 1988;61:1942-56.
13. Sugimura T. Carcinogenicity of mutagenic heterocyclic amines formed during the cooking process. Mutat. Res 1985;150:33-41.
14. Hecht SS. Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis. Proc Soc Exp Biol Med 1997;216:181-91.
15. Stadtlander CT, Waterbor JW. Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer. Carcinogenesis 1999;20:2195-208.
16. Sjalander A, Birgander R, Hallmans G, Cajander S, Lenner P, Athlin L, et al. p53 polymorphisms and haplotypes in breast cancer. Carcinogenesis 1996;17:

1313-6.
17. Wang YC, Chen CY, Chen SK, Chang YY, Lin P. p53 codon 72 polymorphism in Taiwanese lung cancer patients: association with lung cancer susceptibility and prognosis. Clin Cancer Res 1999;5:129-34.
18. Tiwawech D, Srivatanakul P, Karaluk A, Ishida T. The p53 codon 72 polymorphism in Thai nasopharyngeal carcinoma. Cancer Lett 2003;198:69-75.
19. Lai KC, Chen WC, Tsai FJ, Li SY, Jeng LB. Arginine and proline alleles of the p53 gene are associated with different locations of gastric cancer. Hepatogastroenterology 2005;52:944-8.
20. Perez-Perez GI, Bosques-Padilla FJ, Crosatti ML, Tijerina-Menchaca R, Garza-Gonzalez E. Role of p53 codon 72 polymorphism in the risk of development of distal gastric cancer. Scand J Gastroenterol 2005;40:56-60.
21. Shen H, Solari A, Wang X, Zhang Z, Xu Y, Wang L, et al. P53 codon 72 polymorphism and risk of gastric cancer in a Chinese population. Oncol Rep 2004;11:1115-20.
22. Lung FW, Lee TM, Shu BC, Chang FH. p53 codon 72 polymorphism and susceptibility malignancy of colorectal cancer in Taiwan. J Cancer Res Clin Oncol 2004;130:728-32.
23. Zhu ZZ, Cong WM, Liu SF, Dong H, Zhu GS, Wu MC. Homozygosity for Pro of p53 Arg72Pro as a potential risk factor for hepatocellular carcinoma in Chinese population. World J Gastroenterol 2005;11:289-92.
24. Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. Mol Cell Biol 1987;7:961-3
25. Miller C, Mohandas T, Woff D, Prokocimer M, Rotter V, Koeffer HP. Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. Nature 1986;319:783-4.
26. Ara S, Lee PSY, Hansen MF, Saya H. Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. Nucleic Acids Res 1990;18: 4961.
27. de la Calle-Martin O, Fabregat V, Romero M, Soler J, Vives J, Yague J. AccII polymorphism of the p53 gene. Nucleic Acids Res 1990;18:4963.
28. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type human p53 differ biochemically and biologically. Mol Cell Biol 1999;19:1092-100.
29. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus- associated cancer. Nature 1998; 393:229-34.
30. Papadakis EN, Dokianakis DN, Spandidos DA. p53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer. Mol Cell Biol Res Commun 2000;3:389-92.
31. Chen WC, Tsai FJ, Wu JY, Wu HC, Lu HF, Li CW. Distributions of p53 codon 72 polymorphism in bladder cancer—proline form is prominent in invasive tumor. Urol Res 2000;28:293-6.
32. Fan R, Wu MT, Miller D, Wain JC, Kelsey KT, Wiencke JK, Christiani DC. The p53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2000;9:1037-42.
33. Wang YC, Chen CY, Chen SK, Chang YY, Lin P. p53 codon 72 polymorphism in Taiwanese lung cancer patients: association with lung cancer susceptibility and prognosis. Clin Cancer Res 1999;5:129-34.
34. Shen H, Zheng Y, Sturgis EM, Spitz MR, Wei Q. P53 codon 72 polymorphism and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. Cancer Lett 2002;183:123-30.
35. Kietthubthew S, Sriplung H, Au WW, Ishida T, The p53 Codon 72 Polymorphism and Risk of Oral Cancer in Southern Thailand. Asian Pacific J Cancer Prev 2003;4, 209-14.
36. Bau DT, Tsai MH, Lo YL, Hsu CM, Tsai Y, Lee CC, Tsai FJ. Association of p53 and p21(CDKN1A/WAF1/CIP1) polymorphisms with oral cancer in Taiwan patients. Anticancer Res 2007;27:1559-64.