



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตรวจหา p53 antibodies และ p53 gene mutation จาก DNA ที่อยู่ในซีรัมของผู้ที่
สูบบุหรี่จัดเพื่อการตรวจหามะเร็งปอดในระยะเริ่มแรก

โดย สุสิทธิ์ แสงกระจ่าง และคณะ

เสร็จสิ้นโครงการ มิถุนายน พ.ศ. 2546

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตรวจหา p53 antibodies และ p53 gene mutation จาก DNAที่อยู่ในซีรัมของผู้ที่
สูบบุหรี่จัดเพื่อการตรวจหามะเร็งปอดในระยะเริ่มแรก

คณะผู้วิจัย

สํานัก

- 1 ดร ศุภพร แสงกระจ่าง
- 2 นพ อติศักดิ์ หวพรม
- 3 นาว พิกุล ไหลศุมาลิน

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ
สถาบันมะเร็งแห่งชาติ
สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: PDF/61/44

ชื่อโครงการ: การตรวจหา p53 antibodies และ p53 gene mutation จาก DNAที่อยู่ในซีรัมของผู้ที่สูบบุหรี่จัดเพื่อการตรวจหามะเร็งปอดในระยะเริ่มแรก

ชื่อนักวิจัย: ดร. ศุภพร แสงกระจ่าง สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

E-mail address: sulee@health.moph.go.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี (1 กค. 2544- 30 มิย. 2546)

การเกิดมะเร็งหลายชนิดมักจะพบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิด p53 mutation ปัจจุบันพบว่า การเกิด mutation ของยีน p53 ทำให้มีการสะสมโปรตีน p53 ในเซลล์ และสามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโปรตีนดังกล่าวในร่างกายผู้ป่วยมะเร็ง ทำให้มีการตรวจพบ p53 antibodies (p53-Abs) ในซีรัม คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการตรวจหา p53-Abs ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งปอดจำนวน 133 ราย โดยวิธี Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่าผู้ป่วยจำนวน 25 ราย (18.8%) มี p53-Abs ในซีรัม การตรวจพบ p53-Abs พบว่าไม่ขึ้นกับอายุ หรือ เพศแต่มีความสัมพันธ์กับการมีเซลล์มะเร็งชนิด squamous cell carcinoma (31%) มากกว่าชนิด adenocarcinoma (13.6%)($p=0.052$) ส่วนการตรวจหา p53-Abs ในผู้ป่วยระยะต่างๆพบว่า ผู้ป่วยในระยะท้าย (stage III-IV) มีจำนวนผู้ป่วยที่มี p53-Abs มากกว่าผู้ป่วยในระยะต้น (stage I-II) ด้วยค่านัยสำคัญทางสถิติ $p=0.036$ ไม่พบความสัมพันธ์ของการมี p53-Abs กับอัตราการมีชีวิตรอดของผู้ป่วย นอกจากนี้อัตราการพบ p53-Abs ในซีรัมของผู้ที่สูบบุหรี่จัด (27.1%) จะพบได้มากกว่าผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ (13.6%) ($p=0.061$) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการตรวจพบ p53-Abs ในซีรัมอาจจะสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการศึกษาการเกิดมะเร็งปอดในผู้ที่อยู่ในกลุ่มเสี่ยงได้

คำหลัก: p53 แอนติบอดี, มะเร็งปอด, พยาธิสภาพทางคลินิก, การสูบบุหรี่

Abstract

Project Code: PDF/61/44

Project Title: Detection of p53 antibodies and p53 mutations in serum DNA of heavy smoker to detect early lung cancer

Investigator: Dr. Suleeporn Sangrajang

E-mail: sulee@health.moph.go.th

Project Period: 2 years (1 July 2001-30 June 2003)

Abnormalities of p53 gene can lead to the production of p53 antibodies (p53-Abs) in the serum of cancer patients. This study was designed to investigate the prevalence of p53-Abs in 133 lung cancer patients and the distribution of these antibodies to clinicopathologic features and smoking status. Twenty five (18.8%) lung cancer patients were found to have p53-Abs. The presence of p53-Abs did not correlate with sex or age but showed frequent association with tumors of squamous cell carcinoma (31%) in comparison with adenocarcinoma (13.6%) ($p=0.052$). There was a statistically significant difference in the incidence of p53-Abs between early disease group (stage I-II) and the advanced group (stage III-IV) ($p=0.036$), however, there was no relationship between the presence of p53-Abs and overall survival. Interestingly, the frequent of p53-Abs was higher in smokers (27.1%) than in non-smokers (13.6%), though the difference was of borderline of statistical significance ($p=0.061$). These findings suggested that p53-Abs could be a potential biomarker for the study of individual with lung cancer.

Key word: p53-antibodies, lung cancer, clinicopathologic feature, smoking

ความสำคัญที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งปอดเป็นปัญหาสำคัญในประชากรไทย และมีอัตราการตายสูงเป็นอันดับสองในผู้ป่วยชาย หนึ่งในสาเหตุที่สำคัญของการเกิดโรคมะเร็งปอดนั้นเชื่อว่าเกิดจากการสูบบุหรี่ ผู้ป่วยที่เป็นโรคในระยะเริ่มแรก มักจะไม่ปรากฏอาการของโรคให้เห็น ดังนั้นเมื่อผู้ป่วยมาพบแพทย์จึงมักจะเจอว่าผู้ป่วยนั้นมีอาการ การลุกลามของโรคแล้ว ในปัจจุบัน biomarker ได้มีบทบาทในการช่วยตรวจหามะเร็งระยะเริ่มแรก โปรตีน p53 เป็นหนึ่งใน biomarker ที่มีผู้สนใจและศึกษากันอย่างแพร่หลายเนื่องจาก ความผิดปกติของ gene นี้ มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิดรวมถึงมะเร็งปอดด้วย P53 เป็น tumor suppressor gene ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมวงจรชีวิตของเซลล์ โปรตีน p53 ที่ปกติจะตรวจไม่พบในร่างกายคน เนื่องจากโปรตีนนี้มีอายุสั้น แต่ถ้าหากมีความผิดปกติของยีนนั้นจะทำให้โปรตีนนั้นมีอายุยาวกว่าปกติได้ โดยทั่วไปการวิเคราะห์หาความผิดปกติของโปรตีน p53 นั้นนิยมทำกันอยู่ 2 วิธีคือ การตรวจหาโดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) หรือการตรวจหาโดย Immunohistochemistry ต่อมานักวิจัยหลายคณะก็แสดงให้เห็นว่า การสะสมโปรตีน p53 ที่ผิดปกติจะสามารถเห็นว่าการเกิดระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายของผู้ป่วยมะเร็ง ทำให้มีการตรวจพบ p53 antibody ในซีรัมของผู้ป่วย จึงได้มีผู้คิดค้นตรวจหาความผิดปกติของโปรตีนนี้โดยใช้เทคนิค ELISA ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วกว่า เนื่องจากไม่ต้องใช้ชิ้นเนื้อจึงเหมาะกับการปฏิบัติเป็นงาน Routine สำหรับการวินิจฉัยโรค

โครงการวิจัยนี้ประกอบด้วย 2 โครงการวิจัยย่อย ซึ่งมีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน งานวิจัยส่วนแรกคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะตรวจหาความผิดปกติของ p53 โดยการตรวจหา p53 antibody ในซีรัมของผู้ที่อยู่ในกลุ่มเสี่ยงต่อโรค คือ พวกที่สูบบุหรี่จัด และติดตามดูว่าผู้ที่พบ antibody นี้จะกลายเป็นผู้ป่วยมะเร็งปอดในเวลาต่อมาหรือไม่

โครงการวิจัยในส่วนที่ 2 จะเป็นการหา p53 gene mutation จาก DNA ถูกที่ปล่อยจากเซลล์มะเร็งและหลุดลอยไปในกระแสเลือด ซึ่งสามารถพบ DNA นี้ได้แม้แต่ก่อนมะเร็งที่มีขนาดเล็ก และอาจตรวจพบก่อนที่แพทย์จะวินิจฉัยโรคได้ ดังนั้นการตรวจพบความผิดปกติของ p53 gene ด้วยวิธีนี้ก็อาจเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ในการตรวจพบมะเร็งระยะเริ่มแรกได้

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยจะทำการเปรียบเทียบ p53 gene mutation ที่ได้จากจากซีรัมของผู้ที่สูบบุหรี่จัด เทียบกับชิ้นเนื้อมะเร็งหากบุคคลผู้นั้นป่วยด้วยโรคมะเร็งในเวลาต่อมา

ที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติมีประชาชนขอเข้ารับการตรวจร่างกายประจำปีโดยเฉพาะการตรวจหามะเร็งระยะเริ่มแรก ประมาณวันละ 200 คน คณะผู้วิจัยจึงเสนอการนำเทคโนโลยีเกี่ยวกับอนุชีววิทยามาประยุกต์ใช้ในการช่วยตรวจหามะเร็งระยะเริ่มแรก และเชื่อว่าการตรวจพบความผิดปกติของโปรตีน p53 ทั้ง 2 วิธีที่เสนอนั้น จะสามารถตรวจพบมะเร็งในระยะเริ่มแรกของผู้ที่อยู่ในกลุ่มเสี่ยงต่อโรคมะเร็งปอดได้

วัตถุประสงค์ของโครงการ

การหา p53 antibody ที่พบในซีรัม

1. เพื่อตรวจหาจำนวน p53 antibody ที่พบในซีรัมของผู้ที่อยู่ในกลุ่มเสี่ยง (คนที่สูบบุหรี่จัด) เพื่อจะได้ทราบว่า biomarker นี้ จะช่วยในการพบผู้ป่วยมะเร็งระยะเริ่มแรกได้หรือไม่
2. เพื่อตรวจหาความสัมพันธ์ของ p53 antibody ในผู้ป่วยมะเร็งปอดเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ต่อการวินิจฉัยโรค

การหา p53 gene mutation ในเลือดและชิ้นเนื้อ

1. เพื่อจะได้ทราบว่า การตรวจพบ p53 gene mutation จากซีรัมของผู้ที่อยู่ในกลุ่มเสี่ยง จะสามารถช่วยในการตรวจพบผู้ป่วยมะเร็งในระยะเริ่มแรกได้หรือไม่
2. เปรียบเทียบ p53 gene mutation ที่ได้จากซีรัมและชิ้นเนื้อของผู้ที่สูบบุหรี่จัดที่ป่วยเป็นมะเร็งในเวลาต่อมา เพื่อความเข้าใจที่ดีขึ้นถึงบทบาทของยีน p53 นี้ต่อการเกิดมะเร็ง

วัตถุและวิธีการวิจัย

การตรวจหา p53-Abs โดยวิธี ELISA

1. เตรียมโปรตีน p53 โดยการติดเชื้อ sf9 insect cell ด้วย baculovirus ที่มี gene p53 จากนั้นเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อมาจึงสกัดโปรตีน p53
2. เตรียม 96 well plate โดยทำการ coat หลุมด้วยโปรตีน p53 ควบคู่กับโปรตีน control คือโปรตีนที่ได้จาก sf6 insect cell ที่ไม่ถูก infect ด้วย baculovirus ทิ้งไว้ 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง
3. นำซีรัมคนไข้ผสม PBS (ที่มีนมผงอยู่ 5%) 100 เท่า เติมนสารละลายนี้ 100µl ต่อหลุมใน 96 well plate ล้างออกแล้วเติม antihuman IgG peroxidase conjugate จากนั้นใส่ tetramethybenzine เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสี อ่านค่าความเข้มข้นสีโดยเครื่อง spectrophotometer

การวิเคราะห์ข้อมูล

การหาความสัมพันธ์ของการตรวจพบ p53-Abs ต่อพยาธิสภาพทางคลินิกของคนป่วยโดยใช้ chi-squared test ส่วนการหาอัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยใช้ Kaplan-Meier method การแปลผลให้ค่านัยสำคัญทางสถิติ p น้อยกว่า 0.05 การวิเคราะห์ข้อมูลใช้โปรแกรมมาตรฐาน SPSS ในการคำนวณ

ผลการวิจัย

ความสัมพันธ์ระหว่าง p53-antibodies กับพยาธิสภาพทางคลินิก

1. จากผู้ป่วยจำนวน 133 รายตรวจพบ p53-Abs ในซีรัม 25 รายหรือคิดเป็นร้อยละ 18.8%
2. การตรวจพบ p53-Abs ในซีรัมไม่ขึ้นกับ เพศ อายุ ของผู้ป่วย
3. การตรวจพบ p53-Abs ในซีรัมจะพบในผู้ป่วยระยะท้าย (stage III-IV) (24.2%) มากกว่าผู้ป่วยในระยะต้น (stage I-II) (6.7%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p=0.036$
4. การตรวจพบ p53-Abs พบได้ในเซลล์ชนิด squamous cell carcinoma (31%) มากกว่าชนิด adenocarcinoma (13.6%) ด้วยค่า $p=0.052$

ความสัมพันธ์ของการตรวจพบ p53-Abs และการสูบบุหรี่

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีการตรวจพบ p53-Abs ในซีรัมของผู้ที่สูบบุหรี่ (27.1%) มากกว่าผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ (13.6%) ถึงแม้ว่าการตรวจพบนี้จะไม่มีค่าสำคัญทางสถิติ $p=0.061$ และไม่พบค่าสำคัญทางสถิติระหว่างการตรวจพบ ในซีรัมของผู้ที่สูบบุหรี่มากกว่าหรือน้อยกว่า 20 pack-years (pack-year คำนวณจากจำนวนซองของการสูบบุหรี่ต่อวันคูณด้วยจำนวนปีที่สูบ)

ความสัมพันธ์ของการตรวจพบ p53-Abs ต่ออัตราการอยู่รอดของผู้ป่วย

หลังจากใช้เวลา 2 ปี ในการติดตามการมีชีวิตอยู่ของผู้ป่วย พบผู้ป่วย 91 คนจาก 115 คน เสียชีวิตจากการป่วยหรือคิดเป็นร้อยละ 79 มีผู้ป่วยเพียง 5 ราย ที่มีชีวิตอยู่ หรือคิดเป็นร้อยละ 4 ส่วนอีก 19 ราย ไม่สามารถติดตามได้ ผลการสำรวจพบว่าผู้ป่วยที่มี p53-Abs ในซีรัม กับผู้ป่วยที่ไม่มี p53-Abs ในซีรัมมีอัตราการอยู่รอดไม่แตกต่างกัน

Table I The relationship between incidence of p53 autoantibodies with various pclinicopathologic features and smoking.

Feature	No. of cases examined	p53-Abs+ (%)	<i>p</i>
Sex			
Male	106	20 (18.9)	0.967
Female	27	5 (16.1)	
Age, y			
≤60	77	13 (16.9)	0.509
>60	56	12 (21.4)	
Stage			
I- II	30	2 (6.7)	0.036*
III-IV	95	23 (24.2)	
I	2	0	
II	28	2 (7.1)	
III	28	6 (21.4)	
IV	67	17 (25.4)	

[†] *p*-value for squamous cell carcinoma versus adenocarcinoma.

[#] *p*-value for smokers versus nonsmokers

Table II The incidence of p53 autoantibodies in study population.

Population	No. of cases examined	P53-Abs+ (%)	<i>p</i>
Healthy non smoker	100	1	0.002 ^f
Healthy smokers	100	4	
Lung cancer patients	133	25	

^f *p*-value for healthy smoker versus lung cancer patients

Table III p53 autoantibodies and survival in lung cancer patients

Variable	P53-Abs(+)		P53-Abs(-)
Stage I-II			
No. of cases (n)	2		28
Mean survival time	all censored		20
Analysis of variance (<i>p</i> value)		NA	
Stage III-IV			
No. of cases (n)	23		72
Mean survival time (months)	9		10
Analysis of variance (<i>p</i> value)		0.917	
Squamous cell carcinoma			
No. of cases (n)	9		20
Mean survival time (months)	11		11
Analysis of variance (<i>p</i> value)		0.760	
Adenocarcinoma			
No. of cases (n)	8		51
Mean survival time (months)	13		13
Analysis of variance (<i>p</i> value)		0.853	

NA= not applicable

วิจารณ์และสรุป

ในปัจจุบันมีการใช้ tumor markers หลายชนิดในการวินิจฉัย การพยากรณ์โรคหรือการติดตามการรักษา อย่างไรก็ตาม มีเพียงไม่กี่ markers ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทางคลินิกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการตรวจพบ antibodies ต่อโปรตีนในกลุ่มของ oncogene หรือ tumor suppressor gene เมื่อไม่นานมานี้ จึงเป็นเรื่องที่มีผู้ให้ความสนใจเป็นจำนวนมาก

ในกลุ่มประเทศยุโรปหรืออเมริกา ได้รายงานการตรวจพบ p53 antibodies ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม มีค่าระหว่างร้อยละ 11-26¹⁻³ สำหรับการศึกษา¹ ได้ตรวจพบ ผู้ป่วยที่มี p53 antibodies ในซีรัม จำนวน 25 รายในผู้ป่วย 133 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 18.8 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผู้ป่วยอื่นได้รายงานไว้ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีการตรวจพบ p53-Abs ในซีรัมของผู้ที่สูบบุหรี่ (27.1%) มากกว่าผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ (13.6%) ถึงแม้ว่าการตรวจพบนี้จะไม่มีค่าสำคัญทางสถิติ $p=0.061$ แต่ก็ชี้ให้เห็นแนวโน้มของความแตกต่าง

เมื่อไม่นานมานี้ Lubin และคณะ⁴ ได้รายงานการตรวจพบ p53 antibodies ในผู้ที่สูบบุหรี่จัด 2 ราย ซึ่งทั้ง 2 คน ได้ป่วยเป็นโรคมะเร็งในปีถัดมา และจากรายงานที่คล้ายๆกันของ Triver และคณะ⁵ ที่ตรวจพบ p53 antibodies ในคนปกติก่อนการวินิจฉัยโรคมะเร็งเต้านม มะเร็งปอดและมะเร็งต่อมลูกหมาก นอกจากนี้ Zalcm และคณะ⁶ ได้รายงานความสัมพันธ์ของระดับความเข้มข้นของ p53 antibodies ในซีรัมกับการตอบสนองการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็งปอด จากรายงานดังกล่าวจึงทำให้มีผู้สนใจในการนำการตรวจพบ p53 antibodies ในซีรัมมาประยุกต์ใช้ในงานทางด้านคลินิกมากขึ้น Soussi⁷ ได้รวบรวมการตรวจพบ p53 antibodies ที่ได้มีรายงานทั้งหมดตั้งแต่ปี ค.ศ. 1992-2000 และพบว่า การตรวจพบ p53 antibodies ในซีรัม มี specificity ต่อการตรวจพบโรคมะเร็งสูง ในคนปกติจะตรวจพบ p53 antibodies ในซีรัมไม่เกิน 1 คนใน 100 คน อย่างไรก็ตาม การตรวจพบความผิดปกติของ p53 ด้วยวิธีนี้จะมีค่า sensitivity ต่ำกว่าวิธีอื่นๆ

คณะผู้วิจัยมีความเห็นว่า ถึงแม้จำนวนการตรวจพบ p53 antibodies ในซีรัมจะให้ค่าไม่สูงนัก เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ แต่เนื่องจาก antibodies นี้มี specificity สูงต่อการเกิดโรคมะเร็งนี้ และวิธีการตรวจ ELISA เป็นวิธีการที่ได้สะดวกรวดเร็ว ราคาถูกและสามารถใช้ในการตรวจพบมะเร็งระยะเริ่มแรก หรือติดตามผลการรักษา รวมถึงการกลับคืนมาของโรคได้ p53 antibodies ที่ตรวจในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งจึงน่าจะเป็นอีก marker หนึ่งที่มีประโยชน์และสามารถนำไปใช้ในทางคลินิกได้ อย่างไรก็ตามควรรอผลงานวิจัยที่มีจำนวนผู้ป่วยตัวอย่างมากกว่านี้ ก่อนที่จะสรุปผลที่แน่ชัดของประโยชน์ในการที่จะนำการตรวจพบ p53 antibodies ในซีรัมมาใช้จริงในงานปฏิบัติทางคลินิก

หมายเหตุ : งานวิจัยส่วนนี้ได้เผยแพร่ในวารสาร Lung Cancer ดังรายละเอียดแนบท้ายภาคผนวก

References

1. Schlichtholz B, Tredaniel J, Lubin R, Zalcman G, Hirsch A, Soussi T. Analyse of p53 antibodies in sera of patients with lung carcinoma define immunodominant regions in the p53 protein. *Br J Cancer* 1994;69:809-816.
2. Lubin R, Schlichtholz B, Teillaud JL, Garay E, Bussel A, Wild C, Soussi T. p53 antibodies in patients with various types of cancer: assay, identification and characterization. *Clin Cancer Res* 1995;1:1463-1469.
3. Wild CP, Ridanpaa M, Anttila S, Lubin R, Soussi T, Husgafvel-Pursiainen K, Vanio H. p53 antibodies in the sera of lung cancer patients: comparison with p53 mutation in the tumor tissue. *Int J Cancer* 1995;64:176-181.
4. Lubin R, Zalcman G, Bouchet L, Tredaniel J, Legros Y, Gazals D, Hirsch A, Soussi T. Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Nat Med* 1995;1:701-702.
5. Trivers GE, De Benedetti VMG, Cawley HL, Caron G, Harrington AM, Bennett WP, Jett JR, Colby TV, Tazelaar H, Pairolero P, Miller RD, Haris CC. Anti-p53 antibodies in sera from patients with chronic obstructive pulmonary disease can predate a diagnosis of cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:1767-1775.
6. Zalcman G, Schlichtholz B, Tredaniel J, Urban T, Lubin R, Dubois I, Milleron B, Hirsch A, Soussi T. Monitoring of p53 autoantibodies in lung cancer during therapy: relationship to response to treatment. *Clin Cancer Res* 1998;4:1359-1366.
7. Soussi T. p53 antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res* 2000;60:1777-1788.

การตรวจหา p53-Abs ในผู้ที่อยู่ในกลุ่มเสี่ยง (ผู้ที่สูบบุหรี่จัด)

ในบรรดาผู้ที่สูบบุหรี่จัด (>20 pack-year) จำนวน 189 คน สามารถตรวจพบ p53-Abs ในซีรัมได้จำนวน 8 คน (4.2%) ส่วนผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ จำนวน 180 คน สามารถตรวจพบ p53-Abs ในซีรัมได้จำนวน 2 คน (1.1%) คณะผู้วิจัยได้ติดตามผู้ที่มี p53-Abs ในซีรัม ทั้ง 10 คนนี้ เพื่อมาตรวจร่างกาย และตรวจหา p53-Abs เป็นระยะ ในกลุ่มผู้ที่สูบบุหรี่จัด มีเพียง 4 คนที่ตอบไปรษณียบัตรว่าสุขภาพแข็งแรงดี และมีเพียงแค่ 1 คนเท่านั้นที่มาตรวจร่างกายอีกที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ และยังคงพบ p53-Abs ในซีรัม ในกลุ่มผู้ที่ไม่สูบบุหรี่มีเพียง 1 คน ที่มาตรวจร่างกายอีกหลังจาก 1 ปี แต่กลับไม่พบ p53-Abs ในซีรัมอีก จากการไม่ได้รับความร่วมมือจากอาสาสมัครโครงการทำให้การวิจัยในส่วนนี้ไม่สามารถสรุปผลการทดลองได้

คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาต่อเรื่องการนำการตรวจพบ p53-Abs มาใช้ประโยชน์ทางคลินิกในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม หนึ่งในโครงการวิจัยในเรื่องนี้เป็นโครงการที่ได้รับทุนสนับสนุนจากกรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งใช้เวลาในการวิจัย 2 ปี และใช้งบประมาณ 260,000 บาท แต่หลังจากดำเนินงานไปเพียง 1 ปี ได้รับเงินสนับสนุน 130,000 บาท ก็ได้รับแจ้งจากทางกรมการแพทย์ว่าไม่สามารถสนับสนุนทุนวิจัยในปีที่ 2 ได้เนื่องจากงบประมาณที่จำกัด คณะผู้วิจัยจึงได้นำเงินส่วนที่เหลือของ สกว. มาใช้ในการดำเนินการวิจัยต่อในโครงการมะเร็งเต้านมนี้ งานวิจัยในส่วนนี้ได้ดำเนินการจนเสร็จสิ้นโครงการ และได้เผยแพร่ในวารสาร Cancer Detection and Prevention

คณะผู้วิจัยได้ขอบคุณการสนับสนุนของ สกว. ใน acknowledgment (รายละเอียดดูได้จาก manuscript ภาคผนวก)

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ 2 ฉบับ

- 1.1 Sangrajrang S., Sornprom A., Chernrungrroj G', Soussi T. Serum p53 antibodies in patients with lung cancer: correlation with clinicopathological features and smoking. Lung Cancer 2003; 39:297-301.
- 1.2 Sangrajrang S., Apornwirat W., Cheirsilpa A., Thisuphakorn P., Kalalak A., Sornprom A., Soussi T. Serum p53 antibodies in correlation to other biological parameters of breast cancer. Cancer Detection and Prevention 2003; 27(3):182-186.

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

จากผลการทดลองทำให้แพทย์ และบุคลากรทางการแพทย์ ทั้งในสถาบันมะเร็งแห่งชาติและที่อื่นๆสนใจที่จะนำการตรวจหา p53-Abs โดยวิธี ELISA ที่สะดวกสามารถทำได้ไม่ซับซ้อนมาประยุกต์ใช้กับผู้ป่วยมะเร็ง

3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

นำเสนอผลงานในการประชุม The 4th HUGO Pacific Meeting and 5th Asia-Pacific Conference on Human Genetics ที่โรงแรม Ambassador City Jomtien, พัทยา, วันที่ 27-30 ต.ค. 2545



Serum p53 antibodies in correlation to other biological parameters of breast cancer

S. Sangrajrang, PhD^{a,*}, W. Arpornwirat, MD^a, A. Cheirsilpa, MD^a,
P. Thisuphakorn, MD^a, A. Kalalak, MD^a, A. Sornprom, MD^a, T. Soussi, MD^b

^a Research Division, National Cancer Institute, Rama VI Road Ratchatewi, Bangkok 10400, Thailand

^b Laboratoire de genotoxicologie des tumeurs, Institut Curie, 75248 Paris, France

Accepted 28 February 2003

Abstract

Breast cancer is the second most frequent cancer of Thai women. Mutation of *p53* is a common event in breast cancer. This alteration can result in cellular accumulation of p53 and may also found in serum p53 antibodies (p53-Abs). To clarify prognostic significance of these antibodies, we evaluated p53-Abs in 158 sera of patients with breast cancer. Thirty (19%) patients were found to have p53-Abs. The incidence of p53-Abs tended to be higher in patients with advanced disease group (stages III and IV) than patients with early disease group (stages I and II) ($P = 0.055$). Strong correlations were found between the presence of p53-Abs and p53 protein expression ($P < 0.001$) and lymph node status ($P = 0.021$). The presence of p53-Abs was associated with lack of estrogen (ER) receptor expression ($P = 0.035$) but was not related to progesterone receptor (PR) ($P = 0.567$). In addition, there was a statistically significant correlation between p53-Abs and proliferation associated antigen Ki-67 ($P = 0.006$), but no relation between c-erbB2 oncoprotein and p53-Abs was observed ($P = 0.112$). Additionally, no correlation was noted between the presence of p53-Abs and serum carcinoembryonic antigen (CEA) or carbohydrate antigen (CA15-3). Our findings indicate that p53-Abs appears to be a promising new parameter to evaluate the cellular biology and prognosis of breast cancer.

© 2003 Published by Elsevier Science Ltd. on behalf of International Society for Preventive Oncology.

Keywords: p53 antibodies; Breast cancer; ELISA

1. Introduction

Activation of p53 in response to cellular or genotoxic stress induces several responses, including DNA repair, senescence, differentiation, cell cycle arrest and apoptosis [1,2]. These functions are achieved, in part, by the trans-activational properties of p53, which activate a series of genes involved in cell cycle regulation. Mutation in the *p53* gene are found in 50% of all human malignancies. Most of the known *p53* gene alterations are missense mutations clustered in the evolutionarily highly conserved exons 4–8 [3,4]. These mutations result in a biologically inactive p53 protein that stably accumulates in the cell nucleus and can be detected by immunohistochemistry. In the absence of wild-type p53 protein, genetic aberrations are more likely

to accumulate leading to genetic instability and cell transformation.

It has been demonstrated that *p53* mutations can lead to the production of p53-Abs which can be detected in the sera of patients with various types of cancers [5]. These antibodies recognize immunodominant epitopes localized in the amino-terminus and, to a lesser extent, in the carboxy-terminus of human p53 [6–8]. Antibodies specific for the central region is always very low or absent [6]. The mechanism by which p53 is presented in the immune system is unknown. Isotyping of p53-Abs has shown that they correspond mainly to IgG1 and IgG2 subclasses [9], corresponding to a secondary immune response. The usefulness of anti-p53 serology for detection of *p53* gene alteration has been studied in several malignancies including breast cancer [10–15]. The present study was performed to evaluate the prevalence of p53-Abs in correlation to p53 accumulation, ER, PR, c-erbB2, Ki-67 protein's expression, and circulating tumor markers CEA, CA15-3, and to the conventional clinicopathological parameters.

* Corresponding author. Tel.: +66-2-246-1294; fax: +66-2-246-5145.

E-mail addresses: sulee@health.moph.go.th, sulees@hotmail.com

(S. Sangrajrang).

2. Materials and methods

2.1. Serum collection

Patients had donated a blood sample for routine clinical examination prior to any treatment and excess sera were kept frozen at -80°C and were used for the present analysis. For each patient, age, histopathological type and staging were recorded. Staging was defined according to the international TNM classification proposed by American Joint Committee on Cancer (AJCC) [16].

2.2. ELISA

p53 protein was prepared from recombinant baculoviruses by infecting Sf9 insect cell. The harvested cells were lysed, and protein was extracted. Ninety-six-well microtiter plates were coated with 100 μl of recombinant wild-type human p53 protein or control protein for 24 h at 37°C . Immunoplates were blocked with PBS containing 2% casein and 0.2% Tween 20 to detect non-specific interactions. Duplicate immunoplates were then incubated with patient serum (100 μl per well) diluted 1:100 in PBS containing 5% non-fat milk at room temperature for 1 h and with anti-human IgG peroxidase conjugate human diluted 1:5000. The anti-human peroxidase activity was then visualized with 100 μl of tetramethylbenzidine solution. The reaction was stopped by adding 100 μl of 1 M sulfuric acid. Plates were then read at 450 nm using a MR5000 (Dynatech Laboratories). The result was then validated by comparison of the optical density plot of this series compared to the negative control, and the cut-off point was defined as 1.6 times the negative control [9].

2.3. Immunohistochemistry (IHC)

Immunohistochemical analysis was performed on tissues using conventional peroxidase method. After undergoing dewaxing, inactivation of endogenous peroxidase, the sections were incubated with monoclonal antibodies in case of p53, Ki-67, ER, PR, (Dako, Denmark) and polyclonal antibody for c-erbB2 (Dako, Denmark) overnight at 4°C . Subsequently, detected with biotinylated horse anti-mouse or anti-rabbit IgG antibody and streptavidine-biotin-conjugated horse radish peroxidase (Dako, Denmark). Peroxidase activity was detected using diaminobenzidine tetrachloride. For p53, ER, PR and Ki-67 nuclear staining of invasive tumor cells was scored as positive. For c-erbB2 membranous staining of invasive tumor cells was scored as positive. The threshold for p53 was 5%, for ER and PR was 10% and Ki-67 was 13%. ELISA and IHC were performed independently by two of the authors (SS and AK, respectively).

2.4. Assay for CEA and CA15-3

For the analysis of CEA and CA15-3, we used commercially available kits (Roche, Mannheim, Germany).

The assay was performed according to the manufacturer's recommendations. The cut-off values were taken from the manufacturer's data, 5 ng/ml for CEA and 30.8 U/ml for CA15-3.

2.5. Statistical analysis

Data are presented as percentages or mean as appropriate. Statistical analysis of the data was performed using Microstat software. A χ^2 -test was performed to determine the association between the presence of p53-Abs and clinicopathological features of the patients. Statistical significance was assessed at 5% level.

3. Results

3.1. Relationship between the presence of p53-Abs and clinicopathologic features

Of the 158 sera assayed from breast cancer patients (116 for preoperative evaluation and 42 for pre-chemotherapy investigation), 30 (19%) were positive for circulating p53-Abs including 3 early breast cancer (Table 1). Table 2 shows the relationship between the presence of p53-Abs and various clinical/pathologic characteristics. The presence of p53-Abs was independent of patient age. There was a difference in the incidence of p53-Abs between the early disease group (stages I and II) (14.3%) and the advanced disease group (stage IV) (26.7%), although this difference did not reach statistical significance ($P = 0.055$). A statistically significant relationship was noted between the presence of p53-Abs and local-regional lymph node involvement ($P = 0.021$). All tumors were invasive ductal carcinoma histological subtype. All patients were sero negative for HIV and Hepatitis B (HBs).

3.2. Relationship between the presence of p53-Abs and nuclear accumulation of p53 protein

A total of 28 (43.8%) of the 64 tumor assayed for nuclear accumulation of p53 were IHC positive (Table 3). Twenty tumors (71.4%) of the p53-Abs positive patients with available tissue had been immunohistochemically stained for cellular p53 accumulation (overexpression). Six tumors (16.7%) of p53-Abs positive patients with available tumor tissue had IHC negative. A highly significant association was found between p53 protein accumulation in tumors and the presence of p53-Abs ($P < 0.001$).

3.3. Relationship between the presence of p53-Abs and other biomarkers

Association analysis between hormone receptor status revealed a negative association between p53-Abs and estrogen receptor (ER) ($P = 0.035$) (Table 4), however, p53-Abs

Table 1
p53 antibodies in 30 breast cancer patients

No.	Age (years)	Stage	p53 protein	ER	RR	c-erbB2	Ki-67	CEA (ng/ml)	CA15-3 (U/ml)
1	40	IIA	+	-	-	-	ND	1.5	8
2	39	IIIA	+	-	-	+	ND	2	9
3	49	IIIA	+	-	-	-	+	4.3	18.3
4	38	I	-	+	+	+	-	1.8	15
5	62	IIA	+	-	+	+	+	6.3	20.3
6	57	IIA	ND	ND	ND	+	ND	2	10
7	43	IIA	-	-	-	-	-	2.7	18
8	29	I	-	+	+	+	-	2.4	18.6
9	71	IIIA	+	+	-	+	+	3.4	13
10	51	IIIA	+	-	-	+	+	2	17
11	45	IIIA	+	-	-	-	+	1	23
12	52	IIIB	+	-	+	+	+	1.8	21
13	51	IIA	+	-	+	ND	ND	2	10
14	39	IIA	-	+	+	+	+	2.9	15
15	55	I	+	-	-	-	-	3.1	18
16	50	IIIA	+	-	-	-	-	1.7	122
17	38	IIIB	+	-	-	-	+	3.4	15
18	51	IIIA	ND	-	+	ND	ND	2.3	26
19	45	IV	+	-	-	-	-	1.5	10
20	43	IIIA	+	-	-	-	+	2	7.8
21	49	IIIA	ND	ND	ND	ND	ND	2.5	14
22	43	IIIB	+	-	-	+	+	1.6	18
23	72	IIIB	-	+	+	-	+	3.7	10
24	32	IIIA	+	+	+	+	+	1.4	128
25	51	IIIA	+	-	-	+	+	3.9	27
26	37	IIIB	+	-	-	-	+	1.8	19
27	41	IIA	-	-	-	+	-	1	23
28	46	IV	+	-	-	+	-	2	21
29	73	IIA	+	-	-	-	+	2.6	13
30	39	IIIA	ND	ND	ND	ND	ND	3.2	31

ND: not determined.

Table 2
Relationship between prevalence of p53-Abs with various clinicopathological features

Feature	No. of cases examined	p53-Abs (%)	P-value
Age (years)			
≤50	96	19 (19.8)	0.749
>50	62	11 (17.7)	
Stage			
I and II	98	14 (14.3)	0.055
III and IV	60	16 (26.7)	
Lymph node			
N+	86	22 (25.6)	0.021
N-	72	8 (11.1)	
Total	158	30 (19)	

Table 3
Relationship between the presence of p53-Abs and nuclear accumulation of p53 protein

Nuclear p53 staining	p53-Abs		P-value
	-	+	
p53+	8	20 (71.4)	<0.001
p53-	30	6 (16.7)	<0.001

Values in parentheses are percentages.

was not related to progesterone receptor (PR) expression ($P = 0.567$). The presence of p53-Abs was positively correlated with proliferation marker, Ki-67 ($P = 0.006$). No relationship was observed between p53-Abs and c-erbB2 oncoprotein expression ($P = 0.112$). Concerning the circulating tumor markers, there was no correlation between serum p53-Abs and CEA ($P = 0.668$) or CA15-3 ($P = 0.470$) statuses.

Table 4
Relationship between the presence of p53-Abs and other biomarkers

Various markers	p53-Abs		P-value
	-	+	
ER+	26	6 (18.8)	0.035
ER-	30	21 (41.2)	
PR+	11	9 (45)	0.567
PR-	30	18 (37.5)	
Ki-67+	12	15 (55.5)	0.006
Ki-67-	28	8 (22.2)	
c-erbB2+	27	14 (34.1)	0.0112
c-erbB2-	10	12 (54.5)	
CEA (mean ± S.D.; ng/ml)	2.3 ± 0.9 (n = 45)	2.5 ± 1.1 (n = 30)	0.668
CA15-3 (mean ± S.D.; U/ml)	21.4 ± 5.3 (n = 30)	20.6 ± 21.1 (n = 30)	

Values in parentheses are percentages.

4. Discussion

p53-Abs were originally described in 1982, by Crawford et al. [10] in the serum of 9% of breast cancer patients using a Western blotting method. Using ELISA, more than 15 studies have been performed recently in breast cancer [5]. The frequency of p53-Abs in breast cancer range from 15 to 20% but the majority of these studies were performed either in Europe or in US. No study have been performed in Thailand where the frequency of breast cancer is lower than in other countries. In the present study, we detected p53-Abs in 30 (19%) of 158 sera patients with breast cancer. The presence of p53-Abs is strongly associated to the group of tumors with p53 protein accumulation ($P < 0.001$) indicating that this immune response is triggered by the accumulation of p53 in the tumor as previously described in lung cancer [17]. The relationship between p53 mutation, p53 accumulation in the tumor and p53 antibodies in the sera have been analyzed in several multifactorial analysis. It is now clear that all p53 mutations will not lead to p53 accumulation as about 15% of p53 mutation are frameshift or nonsense mutations that will not lead to the synthesis of a stable protein [4]. On the other hand, the presence of p53 antibodies is almost invariably associated with p53 mutation in the tumor [18,19]. Patients with more advanced disease (stages III and IV) (26.7%) had a higher incidence of p53-Abs than in early disease (stages I and II) (14.3%), although the difference was not statistically significant ($P = 0.055$). We found that p53-Abs was associated with a lack of ER expression but was not related to PR suggesting that tumors eliciting antibody responses defined a subgroup with poor prognosis as previously described [20].

Few studies have analyzed the prognostic significance of coexpression of biomarkers. The observed association may further contribute to understanding of the biology of breast tumors. In breast cancer, the overexpression of p53 protein have been shown to be associated with rapid tumor cell proliferation [21] and overexpression of c-erbB2 [22]. Our result shows a good correlation between the presence of p53-Abs and Ki-67 expression, however, we have not found the relationship between c-erbB2 expression and p53-Abs. It should be noted that there was a difference between the frequency of c-erbB2 expression observed in this study (65%) and in the reports of Western authors (14–34%) [23,24]. The high prevalence of c-erbB2 expression (66%) was also reported in breast cancer in young Kuwaiti women [25]. Several research groups including our own found that there was no relationship between p53-Abs and CEA or CA15-3 statuses [26]. In addition, Takeda et al. [27] reported that the presence of p53-Abs was more significantly associated with stages 0, I and II colorectal cancer than was CEA.

Numerous studies have attempted to evaluate the clinical value of p53-Abs. Lubin et al. [28] showed that p53-Abs have been detected in two heavy smokers several years before clinical diagnosis of lung cancer. Similarly, Triver et al. [29] reported the presence of p53-Abs prior to a diagnosis

for breast, lung, and prostate cancer. This finding suggested that p53-Abs may facilitate the early diagnosis of cancer. In addition, p53-Abs can be used to monitor patients during treatment. Zalcman et al. [30] showed that there was a good correlation between the specific evolution of the p53-Abs titer and the response to chemotherapy in patients with lung cancer. This had raised the possibility that p53-Abs could be a good candidate biomarker for several cancers.

p53-Abs are found predominantly in human cancer patients with specificity of 96%, but the sensitivity of such detection is only 30%. Because p53 was not detected in sera from patients with non-malignant diseases (0.5–1%) [5], the authors nevertheless suggested that serological testing for p53-Abs, despite its low positive results, can be regarded as a specific method to identify subgroups of patients with cancer. The development of circulating serum antibodies against oncogene and tumor suppressor gene product represents an interesting model system for studying immune response in cancer patients. The simple and rapid ELISA procedure suggested the potential usefulness of p53-Abs in clinical implications. However, further investigations in larger prospective homogeneous series of patients are necessary before definitive conclusion.

Acknowledgements

This study was supported in part by Medical Services, Ministry of Public Health and Thailand Research Fund (TRF). The authors are grateful to all staff of the Pathology Division for supporting the tissue samples and In Patient Division for providing blood samples.

References

- [1] Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002;2:594–604.
- [2] Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307–10.
- [3] Soussi T, Dehouche K, Bérout C. p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Hum Mutat* 2000;15:105–13.
- [4] Soussi T, Bérout C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2001;1:233–40.
- [5] Soussi T. p53 antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res* 2000;60:1777–88.
- [6] Lubin R, Schlichholz B, Bengoufa D, et al. Analysis of p53 antibodies in patients with various cancers define B-cell epitopes of human p53—distribution on primary structure and exposure on protein surface. *Cancer Res* 1993;53:5872–6.
- [7] Schlichholz B, Tredaniel J, Lubin R, Zalcman G, Hirsch A, Soussi T. Analyses of p53 antibodies in sera of patients with lung carcinoma define immunodominant regions in the p53 protein. *Br J Cancer* 1994;69:809–16.
- [8] Vennegoor C, Nijman HW, Drijfhout JW, Vennie L, Verstraeten RA, vonMensdorff-Pouilly S. Autoantibodies to p53 in ovarian cancer patients and healthy women: a comparison between whole p53 protein and 18-mer peptides for screening purposes. *Cancer Lett* 1997;116:93–101.

- [9] Lubin R, Schlichtholz B, Teillaud JL, et al. p53 antibodies in patients with various types of cancer: assay, identification and characterization. *Clinical Cancer Res* 1995;1:1463-9.
- [10] Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 1982;30:403-8.
- [11] Davidoff AM, Iglehart JD, Marks JR. Immune response to p53 is dependent upon p53/TSP70 complexes in breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3439-42.
- [12] Labrecque S, Naor N, Thomson D, Matlashewski G. Analysis of the anti-p53 antibody response in cancer patients. *Cancer Res* 1993;53:3468-71.
- [13] Tilkin AF, Lubin R, Soussi T, et al. Primary proliferative t cell response to wild-type p53 protein in patients with breast cancer. *Eur J Immunol* 1995;25:1765-9.
- [14] Mudenda B, Green JA, Green B, et al. The relationship between serum p53 autoantibodies and characteristics of human breast cancer. *Br J Cancer* 1994;69:1115-9.
- [15] Peyrat JP, Bonneterre J, Lubin R, Vanlemmens L, Fournier J, Soussi T. Prognostic significance of circulating p53 antibodies in patients undergoing surgery for locoregional breast cancer. *Lancet* 1995;345:621-2.
- [16] American Joint Committee on Cancer. Manual for staging of cancer 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.
- [17] Winter SF, Minna JD, Johnson BE, Takahashi T, Gazdar AF, Carbone DP. Development of antibodies against p53 in lung cancer patients appears to be dependent on the type of p53 mutation. *Cancer Res* 1992;52:4168-74.
- [18] Hammel P, Leroy-Viard K, Chaumette MT, et al. Correlations between p53-protein accumulation, serum antibodies and gene mutation in colorectal cancer. *Int J Cancer* 1999;81:712-8.
- [19] Guinee DG, Travis WD, Tivers GE, et al. Gender comparisons in human lung cancer: analysis of p53 mutations, anti-p53 serum antibodies and c-erbB-2 expression. *Carcinogenesis* 1995;16:993-1002.
- [20] Schlichtholz B, Legros Y, Gillet D, et al. The immune response to p53 in breast cancer patients is directed against immunodominant epitopes unrelated to the mutational hot spot. *Cancer* 1992;52:6380-4.
- [21] Cattoretti G, Rilke F, Andreola S, D'amato L, Delia D. p53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 1988;41:178-83.
- [22] Naidu R, Yadav M, Nair S, Kutty KK. Immunohistochemical analysis of p53 expression in primary breast carcinomas. *Anticancer Res* 1998;18:65-70.
- [23] Cowan WK, Angus B, Henry J, Corbett IP, Reid WA, Home CH. Immunohistochemical and other features of breast carcinomas presenting clinically compared with those detected by cancer screening. *Br J Cancer* 1991;64:780-4.
- [24] Thor AD, Schwartz LH, Koerner FC, et al. Analysis of c-erbB-2 expression in breast carcinomas with clinical follow-up. *Cancer Res* 1989;49:7147-52.
- [25] Temmim L, Baker H, Sinowatz F. Immunohistochemical detection of p53 protein expression in breast cancer in young Kuwaiti women. *Anticancer Res* 2001;21:743-8.
- [26] Nakajima K, Suzuki T, Shimada H, Hayashi H, Takeda A, Ochiai T. Detection of preoperative serum anti-p53 antibodies in gastric cancer. *Tumor Biol* 1999;20:147-52.
- [27] Takeda A, Shimada H, Nakajima K, et al. Detection of serum p53 antibodies in colorectal cancer patients and the clinical significance of postoperative monitoring. *Gan To Kagaku Ryoho* 1999;26:339-44.
- [28] Lubin R, Zalcman G, Bouchet L, et al. Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Nature Med* 1995;1:701-2.
- [29] Tivers GE, De Benedetti VMG, Cawley HL, et al. Anti-p53 antibodies in sera from patients with chronic obstructive pulmonary disease can predate a diagnosis of cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:1767-75.
- [30] Zalcman G, Schlichtholz B, Trédaniel J, et al. Monitoring of p53 auto antibodies in lung cancer during therapy: relationship to response to treatment. *Clin Cancer Res* 1998;4:1359-66.

Serum p53 antibodies in patients with lung cancer: correlation with clinicopathologic features and smoking

Suleeporn Sangrajrang^{a,*}, Adisak Sornprom^b, Gun Chernrungrroj^c, Thierry Soussi^d

^a Research Division, National Cancer Institute, Rama VI road, Ratchatewi, Bangkok 10400, Thailand

^b Division of Surgery, National Cancer Institute, Rama VI road, Ratchatewi, Bangkok 10400, Thailand

^c Department of Medical Services, Ministry of Public Health, Nontaburi 11000, Thailand

^d Laboratoire de genotoxicologie des tumeurs, Institut Curie 75248 Paris, France

Received 4 July 2002; received in revised form 28 October 2002; accepted 4 November 2002

Abstract

Abnormalities of p53 gene can lead to the production of p53 antibodies (p53-Abs) in the serum of cancer patients. This study was designed to investigate the prevalence of p53-Abs in 133 lung cancer patients and the distribution of these antibodies to clinicopathologic features and smoking status. Twenty five (18.8%) lung cancer patients were found to have p53-Abs. The presence of p53-Abs did not correlate with sex or age but showed frequent association with tumors of squamous cell carcinoma (31%) in comparison with adenocarcinoma (13.6%) ($P = 0.052$). There was a statistically significant difference in the incidence of p53-Abs between early disease group (stage I–II) and the advanced group (stage III–IV) ($P = 0.036$), however, there was no relationship between the presence of p53-Abs and overall survival. Interestingly, the frequent of p53-Abs was higher in smokers (27.1%) than in non-smokers (13.6%), though the difference was of borderline of statistical significance ($P = 0.061$). These findings suggested that p53-Abs could be a potential biomarker for the study of individual with lung cancer.

© 2002 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: p53-antibodies; Lung cancer; Clinicopathologic features; Smoking

1. Introduction

Lung cancer is one of the most common cancer among Thai men [1]. Because lung cancer does not show any symptoms in early stage of the disease, the majority of Thai patients with this cancer are diagnosed with metastasis. Searching for prognostic indicators of lung cancer is an important clinical issue. The p53, tumor suppressor gene, is a critical regulator of normal development involved in cell cycle control pathways, such as growth arrest, differentiation and apoptosis [2]. The mutant p53 proteins have a much longer half-life than that of the wild-type protein and thus accumulate in tumors cells. The accumulated proteins can be released from the tumor cells, recognized by the immune

system in humans as a foreign protein and induce a humoral response with development of antibodies against the proteins. There is a generally a very good correlation between the presence of p53-Abs and p53 accumulation and/or mutation in the tumor [3]. Thus, the detection of p53-Abs can be used as a possible biomarkers for the occurrence of p53 gene mutation.

Cigarette smoking is the most important aetiology factor of lung cancer and account for more than 80% of lung cancer cases [4]. Cigarette smoke contains many known carcinogens, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Recent study has revealed that benzo[a]pyrene diol epoxide (BPDE), one of PAHs in cigarette smoking, preferentially forms DNA-adducts along exons of p53 gene in codons 157, 248 and 273, which are the major mutational hotspots in human lung cancer [5]. In this study, we reported the prevalence of p53-Abs in lung cancer patients, and the distribution of these antibodies to clinicopathologic features and smoking status.

* Corresponding author. Tel.: +66-02-246-1294; fax: +66-02-246-5145.

E-mail address: sulee@health.moph.go.th (S. Sangrajrang).

2. Materials and methods

2.1. Patients

The subjects in this study were recruited from National Cancer Institute (Bangkok) from May 1999 to January 2000. The primary lung cancer (133) were newly diagnosed and confirmed by pathology and radiology report and had not received any therapy including radiotherapy, chemotherapy and surgical resection. Most patients presented in advanced stage (stage III–IV), only 17 patients underwent thoracotomy. Of the 116 inoperable patients, 76 had been treated with chemotherapy, the remaining had been treated with radiotherapy. Patients donated a blood sample for a routine clinical examination and excess sera were kept frozen at -80°C and were used for the present analysis. For each patient, age, gender, histopathological type, staging, and smoking status were recorded. Staging was defined according to the international TNM classification proposed by the American Joint Committee on Cancer (AJCC) [6]. Control was obtained from healthy people who come to NCI for an annual physical check-up. For all samples a detailed history of smoking habits was recorded including daily consumption, age of commencement, duration of smoking, for ex-smoker, year since quitting smoking. Detailed information about smoking status, non-smokers were defined as never-smoker or those who had ever smoked <0.1 pack-year (pack per day $\times$ smoking year), whereas, smokers meant current smokers or ex-smokers of ≥ 0.1 pack-year.

2.2. ELISA

p53 antibodies were identified using an ELISA with plates coated either with p53 or a negative control. The sensitivity and the specificity of this assay have been already described in previous works [7,8].

2.3. Statistical analysis

The chi-squared test was used to compare the association between the presence of p53-Abs and several clinicopathologic parameters. The Kaplan–Meier method was used to estimate survival possibility as a function of time, and survival differences were analyzed by the log rank test. *P*-values of less than 0.05 were considered statistically significant. All data analysis were performed using a standard statistical program.

3. Results

3.1. Correlation of p53-Abs and clinicopathologic features

p53-Abs were detected in 25 (18.8%) patients of 133 patients with lung cancer. Table 1 shows the relationship between the presence of p53-Abs and various clinical/pathologic characteristics. Neither age nor sex was correlated with the presence of p53-Abs. Most patients presented in advanced stage, comprising 28 patients (22.4%) in stage III and 67 patients (53.6%) in stage IV. The prevalence of p53-Abs were 0% (0/2), 7.1% (2/28), 21.4% (6/28) and 25.4% (17/67) in stage I, II, III, and IV, respectively. There was a statistically significant difference in the incidence of p53-Abs between the early disease group (stage I–II) (6.7%) and the advanced disease group (stage III–IV) (24.2%) ($P = 0.036$) when stage I–II were considered to be early disease; stage III–IV were advanced disease. By histological types, the p53-Abs rate was higher in squamous cell carcinoma cases (31%) than in adenocarcinomas cases (13.6%) with a *P*-value of 0.052. Small cell lung carcinoma (SCLC)

Table 1
The relationship between incidence of p53 autoantibodies with various clinicopathologic features and smoking

Feature	No. cases examined	p53-Abs+ (%)	<i>P</i>
Sex			
Male	106	20 (18.9)	0.967
Female	27	5 (16.1)	
Age, y			
≤ 60	77	13 (16.9)	0.509
> 60	56	12 (21.4)	
Stage			
I–II	30	2 (6.7)	0.036*
III–IV	95	23 (24.2)	
I	2	0	
II	28	2 (7.1)	
III	28	6 (21.4)	
IV	67	17 (25.4)	
Histologic type			
Adenocarcinoma	59	8 (13.6)	0.052†
Squamous cell carcinoma	29	9 (31)	
Large cell carcinoma	4	–	
Small cell carcinoma	13	3 (23.1)	
Smoking status			
Nonsmokers	66	9 (13.6)	0.061‡
Smokers	59	16 (27.1)	
≤ 20 pack-years	26	7 (26.9)	
> 20 pack-years	33	9 (27.3)	
Total	133	25 (18.8)	

* *P*-value for early disease (stage I–II) vs. advanced group (stage III–IV).

† *P*-value for squamous cell carcinoma vs. adenocarcinoma.

‡ *P*-value for smokers vs. nonsmokers.

had the prevalence of p53-Abs at 23.1% (3/13). We did not find any evidence of p53-Abs in large cell lung cancer cases (0/4) because of the small sample size.

Table 2 shows that 25 of 133 lung cancer patients (18.8%) were positive for p53-Abs and five of 200 controls (2.5%) were positive. A significant difference between cases and controls was found ($P < 0.001$).

3.2. Relationship between the presence of p53-Abs and smoking status

There was a trend of increase of p53-Abs with smoking, nine of 66 non-smokers (13.6%) and 16 of 59 smokers (27.1%) among lung cancer patients, but the difference was of borderline statistical significance ($P = 0.061$) (Table 1). Furthermore, no association was obtained between the presence of p53-Abs and various smoking group. The number of smoker:non-smokers were 24:4 in squamous cell carcinoma group and 27:28 in adenocarcinoma group (data not shown).

3.3. Effect of p53-Abs on patient survival

We analyzed the association between p53-Abs and over all survival of 115 patients. At 2 years of follow up, 91 (79%) patients had died of the disease, 19 patients (16.5%) loss follow up, and only five patients (4%) still alive during this observation. As shown in Fig. 1, the Kaplan–Meier survival curve demonstrated that the presence of p53-Abs did not appear to be correlated with survival time ($P = 0.414$) by the log rank test). When a comparison was made within the group with early-stage (I–II), advanced stage (III–IV), squamous cell carcinoma, adenocarcinoma the effect of p53-Abs on survival was not statistically significant (Table 3).

4. Discussion

In the present study, we detected p53-Abs in 25 (18.8%) of 133 sera patients with lung cancer. This incidence is generally in accordance with previous reported from Western countries [7]. Different frequencies of p53 gene mutation and p53 protein overexpression among the histologic types of lung cancer have been

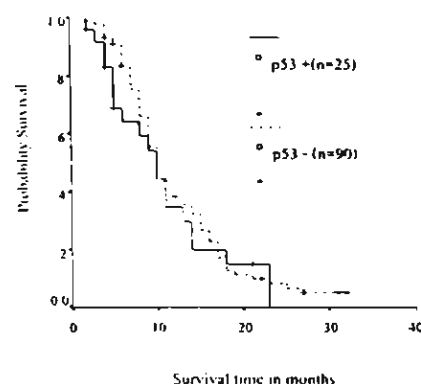


Fig. 1. Overall survival according to p53-Abs status.

Table 3
p53 autoantibodies and survival in lung cancer patients

Variable	P53-Abs(+)	P53-Abs(–)
Stage I–II		
No. of cases (n)	2	28
Mean survival time	All censored	20
Analysis of variance (P value)		NA
Stage III–IV		
No. of cases (n)	23	72
Mean survival time (months)	9	10
Analysis of variance (p value)		0.917
Squamous cell carcinoma		
No. of cases (n)	9	20
Mean survival time (months)	11	11
Analysis of variance (p value)		0.760
Adenocarcinoma		
No. of cases (n)	8	51
Mean survival time (months)	13	13
Analysis of variance (p value)		0.853

NA, not applicable.

reported in many studies [9,10]. Li et al. [11] showed that p53-Abs were more frequent in SCLC (42.9%) than those with squamous cell carcinoma (25%) or with adenocarcinoma (14.6%). A difference in prevalence of p53-Abs by histological type of lung cancer is also found in our study. In squamous cell carcinoma, nine of 29 (31%) patients had p53-Abs, whereas eight of 59 patients (13.6%) was found in adenocarcinoma ($P = 0.052$). Patients with SCLC might be expected to have higher incidence of p53-Abs, since the incidence of p53 mutation in SCLC is even higher than in squamous cell carcinoma [10]. However, they were only detected in 23.1% in our study, probably the small sample size of SCLC. The presence of p53-Abs is usually associated with poor prognosis and shorter survival for non small cell carcinoma (NSCLC) [12,13]. In other types of cancer, such as breast [14] colon [15] or head and neck [16], the presence of p53-Abs has been reported to be a marker of poor prognosis. Some groups have found no

Table 2
The incidence of p53 autoantibodies in study population

Population	No. cases examined	P53-Abs + (%)	P
Healthy non smoker	100	1	0.002*
Healthy smokers	100	4	
Lung cancer patients	133	25	

* P-value for healthy smoker vs. lung cancer patients.

such correlation [17] and others have a favorable prognosis [18,19]. In the present study, the presence of p53-Abs was significantly associated with patients in advanced disease (stage III–IV) (24.2%) than in early disease (stage I–II) (6.7%) ($P = 0.036$). However, there was no difference in survival time between patients having lung cancer with p53-Abs and those without p53-Abs.

Cigarette smoke is closely associated with p53 mutation and overexpression. Husgafvel-Pursiainen et al. [20] reported that there were different frequencies of p53 mutation by smoking status with p53 mutations increasing from non-smokers (25%) to ex-smokers (38%) to current smokers (55%). Li et al. [11] observed that there was a mild trend with the frequencies of p53-Abs increasing from non-smokers (14.3%) to ex-smokers (16.7%) to current smokers (19.1%), and heavy smokers (41 pack-years and more) had the highest prevalence of the antibodies (28.6%). Similarly, our study showed that smokers (27.1%) had a higher frequency of p53-Abs than non-smokers (13.6%) with a P -value of 0.061. Lubin et al. [21] and Trivers et al. [22] found that the p53-Abs could be detected in ex-smokers or current smokers as early as 15 months prior to the diagnosis of cancers of the lung, breast and prostate. This finding suggested that p53-Abs may facilitate the early diagnosis of cancer.

To date, numerous studies have attempted to evaluate the clinical value of p53-Abs. Zaleman et al. [23] showed that there was a good correlation between the specific evolution of the p53-Abs titer and the response to chemotherapy in patients with lung cancer. A similar situation was described in colorectal [24] and ovarian cancer [25]. This raises the possibility that p53-Abs could be a good biomarker for lung cancer.

In summary, in this study we have demonstrated a higher prevalence of p53-Abs in lung cancer patients in a pattern by histological types consistent with prior studies and the suggestion that this could be related to smoking. These results suggest that p53-Abs could be a potential biomarker for the study of individuals with lung cancer or at-risk for the development of lung cancer. However, this application has to be explored in further studies.

Acknowledgements

This study was supported by the Thailand Research Fund (TRF) and UICC International Cancer Technology Transfer Fellowships (ICRETT). The authors are grateful to all the staff of the Pathological Division for providing serum samples.

References

- [1] Martin N, Srisuko S. Lung. In: Deerasamee, S, Martin N, Sontipong S, Sriamporn S, Sriplung H, Srivatanakul P, editors. *Cancer in Thailand*, Vol. II (1992–1994). IARC Technical report No. 34. Lyon, 1999;49–52.
- [2] Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemia cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature (Lond)* 1991;352:345–7.
- [3] Cawley HM, Meltzer SJ, De Benedetti VM, et al. Anti-p53 antibodies in patients with barrett's esophagus or esophageal carcinoma can predate cancer diagnosis. *Gastroenterology* 1998;115:19–27.
- [4] Shopland DR. Tobacco use and its contribution to early cancer mortality with a special emphasis on cigarette smoking. *Environ Health Perspect* 1995;103:131–42.
- [5] Denissenko MF, Pao A, Tang MS, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in p53. *Science* 1996;274:430–2.
- [6] Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, et al. *Manual for Staging of Cancer*. New York: Lippincott-Raven, 1997.
- [7] Schlichtholz B, Tredaniel J, Lubin R, Zalcman G, Hirsch A, Soussi T. Analyse of p53 antibodies in sera of patients with lung carcinoma define immunodominant regions in the p53 protein. *Br J Cancer* 1994;69:809–16.
- [8] Lubin R, Schlichtholz B, Teillaud JL, et al. p53 antibodies in patients with various types of cancer: assay, identification and characterization. *Clin Cancer Res* 1995;1:1463–9.
- [9] Tor B, Moon WJ, Klaver SG, et al. Comparative analysis of p53 gene mutations and protein accumulation in human non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 1995;64:83–91.
- [10] Wild CP, Ridanpaa M, Anttila S, et al. p53 antibodies in the sera of lung cancer patients: comparison with p53 mutation in the tumor tissue. *Int J Cancer* 1995;64:176–81.
- [11] Li Y, Brandt-Rauf PW, Carney WP, Tenney DY, Ford JG. Circulating anti-p53 antibodies in lung cancer and relationship to histology smoking. *Biomarkers* 1999;4:381–90.
- [12] Harpole DH, Herndon JE, Wolfe WG, Iglehart JD, Marks JR. A prognosis model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology and protein expression. *Cancer Res* 1995;55:51–6.
- [13] Laudanski J, Burzykowski T, Niklinska W, Chyczewski K, Furman M, Niklinski J. Prognosis value of serum p53 antibodies in patients with resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 1998;22:191–200.
- [14] Peyrat JP, Bonnetere J, Lubin R, Vanlemmens L, Fournier J, Soussi T. Prognostic significance of circulating p53 antibodies in patients under-going surgery for locoregional breast cancer. *Lancet* 1995;345:621–2.
- [15] Houbiers JG, van der Burg SH, van de Watering LM, et al. Antibodies against p53 are associated with poor prognosis of colorectal cancer. *Br J Cancer* 1995;72:637–41.
- [16] Bourhis J, Lubin R, Roche B, et al. Analysis of p53 serum antibodies in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1228–33.
- [17] Mitsudomi T, Suzuki S, Yatabe Y, et al. Clinical implications of p53 autoantibodies in the sera of patients with non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1563–8.
- [18] Bergqvist M, Brattstrom D, Larsson A. p53 auto-antibodies in non-small cell lung cancer patients can predict increased life expectancy after radiotherapy. *Anticancer Res* 1998;18:1999–2002.
- [19] Lee JS, Yoon A, Kalapurakal SK, Ro J, Lee JJ, Tu N. Expression of p53 oncoprotein in non-small cell lung cancer: a favorable prognostic factor. *J Clin Oncol* 1995;13:1893–903.