

## 대장선암에서 DNA 배수성, p53단백 및 상피세포성장인자 수용체 발현양상과 수술후 조기재발과의 상관관계에 관한 연구

고려대학교 의과대학 외과학교실

이 은 숙 · 배 정 원 · 황 정 웅

= Abstract =

### Cell Proliferation Status, p53 Protein and Epidermal Growth Factor Receptor(EGFR) Expression-Correlation with Early Recurrence in Colorectal Adenocarcinoma

Eun Sook Lee, M.D., Jeong Won Bae, M.D. and Cheung Woung Whang, M.D.

*Department of Surgery, Korea University, College of Medicine*

Due to increasing incidence of colorectal carcinoma in Korea, this condition becomes a burden to practitioner on their daily work and at same time it became a one of major challenging subject in medical reserach field in Korea. However survival rate of the disease has not improved since 1950 and there are nothing much offer for this patient othert than operation with few exception such as chemotherapy.

To improve survival rate of colorectal cancer, many researches have been focus on histopathologic feature and molecular biology recently. Histopathologic staging of the resected tumor is the most importnat prognostic factor up to now. But it is not enough to be used with full confidence in clinical practice. That is why other prognostic factors have been intensively searched and few them are tumor DNA content, p53 protein and epidermal growth factor receptor(EGFR) which are products of molecular biology.

But there are no many researches on clinical efficacy of these new prognostic factors. We carried out this study to see if DNA content, p53 protein and EGFR expression were independent prognostic factors in colorectal carcinoma.

To analyse DNA content of cancer, flow cytometry was used. The p53 protein and EGFR expression were identifiy by immunohistochemical staining using monoclonal and polyclonal antibody. The materials subjected for this study were 56 paraffin-embedded colorectal carcinoma, which were collected from January of 1989 to December of 1990 at department surgery of Korea University Hospital. These patients, who were able to be followed at least 2 years after operation, were elected for this study. Of 56 cases, 31(55.4%) showed DNA aneuploidy, 27(48.2%) and 30(53.6%) showed positive expression of p53 protein and EGFR.

Recurrent and advanced stage tumors were more likely to demonstrate DNA aneuploidy, however these difference did not reach statistical significance. Positive expression of p53 did not correlate any other clinical and pathologic parameters. Positive expression of EGFR statis-

tically correlate with recurrency in stage B.

These data suggest that tumor DNA content and EGFR expressions are important prognostic and adjuvant therapeutic indicator in patients with stage B colorectal carcinoma patients.

**Key Words:** p53 protein, EGFR, DNA content

## 서 론

대장암은 소화기계 암중에서는 비교적 예후가 좋아, 근치적 질제후 5년 생존율이 50~60%로 보고되고 있다<sup>1-4)</sup>. 그러나 아직도 환자의 절반이상이 재발하고<sup>5)</sup>, 재발의 80% 이상이 3년내에 발생하여<sup>6)</sup> 결국에는 대부분의 환자들이 원격전이로 인해 사망하게 된다. 이러한 이유로 과거부터 대장암의 재발과 예후를 예측하기 위하여, Dukes씨 분류법, 세포의 분화도, 전암의 점액분비 상태, 혈관 및 신경의 침윤정도, 암종의 크기, 환자의 연령 및 발생부위등을 측정지표로 이용하여 왔다. 이중 입파절 전이 및 대장벽의 침윤정도에 근거를 두어 분류한 Dukes 분류법이 예후와 가장 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 왔으나, Dukes C군에 속하는 암종을 가진 환자들 중에서도 1/3가량이 장기간 생존하는가 하면, Dukes B군 환자의 1/3이 조기에 사망하는 등<sup>7)</sup> 재발 및 예후 측정 지표로서의 부족함이 많았다.

이러한 이유로 최근에는 새로운 예후 인자를 찾고자 하는 노력들이 활발하게 전개되고 있으며, 특히 종양의 세포 생물학적 악성도 측정을 위하여 암세포의 증식능력, DNA함량, 증식인자(growth factors), 수용체 상태(receptor status), 암유전자(oncogenes) 및 대사물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 세포 증식능력을 평가하는 방법에는 세포분열 수를 세는 방법, Ki67 항체를 이용한 면역 효소방법<sup>8)</sup>, Ag-NORs (nucleolar organizer regions) 방법<sup>9-10)</sup>, Thymidine labelling bromodeoxyuridine incorporation 및 유세포 측정(flow cytometry)에 의한 DNA함량 측정법<sup>10)</sup> 등이 있는데, 최근 유세포 측정기의 발달로 핵 DNA함량이 암의 악성도 측정의 새로운 지표로서 관심을 모으고 있다<sup>10-11)</sup>.

한편 분자생물학의 발달에 힘입어 정상 세포가 암세포로 형질 전환을 하는 여러 단계 및 이에 관여하는

물질들이 밝혀지고 있다. 이들중 p53은 17번 염색체 short arm에 위치하는 유전자로<sup>12-13)</sup> 정상적으로는 세포증식 및 형질전환을 억제하나, 이 유전자에 변형이 생기면 억제능력을 상실할 뿐만 아니라 C ras-gene과 협력하여 암을 유발하는 세포내 암유전자(cellular oncogene)로 알려지고 있다. 변형된 p53 유전자(mutant p53)에서 생산하는 단백질은 정상 유전자에서 생산하는 단백질에 비해 안정된 단백질로 면역효소염색으로 쉽게 규명할 수 있어서, p53단백 발현 유무로 p53유전자의 변형 유무를 간접적으로 판명할 수 있다<sup>14)</sup>. 이러한 p53단백 발현이 암의 발생 뿐만아니라, 전이 및 재발과도 관계한다는 보고들이 있다<sup>15-17)</sup>. epidermal growth factor receptor(이하 EGFR 이라 칭함)는 암유전자(proto-oncogene) C-erb B의 산물로 세포막에 위치하여, 세포의 성장 및 증식에 관여하는 물질인 EGF(epidermal growth factor)와 결합하여 tyrosine kinase를 활성화 시킴으로서, DNA, RAN 및 단백질 합성에 관여하여 궁극적으로 세포분열에 관계한다<sup>18-19)</sup>. 일반적으로 암의 조직학적 분화도가 나쁠수록 p53단백 및 EGF수용체 발현율이 증가하는 것으로 보고되고 있다<sup>20-22)</sup>.

이러한 DNA함량, 세포주기, p53단백 및 EGF수용체 발현이 대장직장암에서 예후인자로서 기존에 사용하던 병리조직학적 병기와 어떤 연관성이 있는나 알아 보고 각각 단독으로 혹은 서로 병합하여 재발 및 예후 측정의 지표로서의 가치가 있는지를 연구하기 위하여 임상적사항을 역행적으로 수집하여 작성하였다.

## 재료 및 방법

### 1) 재 료

1989년 1월부터 1990년 12월까지 고려대학교 부속 병원 외과에서 대장직장암으로 수술한 환자 96예를 대상으로 수술전 방사선 요법이나 유도화학 요법을 받은 6예를 제외하고 남은 90예중 2년 이상 추적 조사

가 가능하였고, 대장직장암의 파라핀 포매조직 이용이 가능하였던 56예를 연구대상으로 하였다.

## 2) 방 법

모든 환자를 나이에 따라 30세 미만, 30세 이상에서 60세 미만, 60세 이상의 세군으로 분류하였고 세포 분화도면에서는 WHO 분류법에 기초하여<sup>23)</sup> 고분화암, 중분화암, 저분화암군으로 분류하였다. 종양의 위치에 따라 S-결장 및 직장암군과 나머지 대장암군으로, 수술전 혈중 CEA값이 5.0 ng/dl 이상인군과 5.0 ng/dl 미만인군으로 분류하였다. Newland등<sup>24)</sup>이 Dukes씨 병기분류법에 기초하여 만든 병기 분류법에 따라 종양이 점막내에 위치할 때는 병기 A, 대장의 전층을 잠식 하였으나 임파절 전이가 없을 때는 병기 B, 임파절 전이가 있을 때는 병기 C, 그리고 수술후에도 종양의 일부가 남아 있거나 원격 전이가 있을 때는 병기 D로 분류하였다. 또 1992년 12월까지 추적 조사 중 2년내 재발한 경우와 재발하지 않은 경우로 나누었다.

(1) 유세포 측정법: 파라핀 포매조직을 50  $\mu$ m 두께로 잘라 13 $\times$ 100 mm 시험관에 넣고 4 ml의 histoclear(National Diagnostics, Somerville, NJ)를 넣은후 10분간 방치하였다. histoclear를 따라내고 거른 조직을 다시 시험관에 넣고 100% 에탄올 3 ml를 넣고 혼든 후 10분간 방치하였다. 상기 과정을 다시 한번 반복한 후에 95%, 70% 에탄올에서 각각 20

분간, 50% 에탄올에서 12시간 거친후 인산중화용액(phosphate buffer solution)에서 1시간씩 2회 반응시켰다. 그 후 0.5% 펩신 2 ml를 넣고 혼든 다음에 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 항온으로 반응시킨후 얼음에서 1분간 차갑게 하였다. 1,500 rpm에 10분간 원심침전하여 인산중화용액로 10분간 3회 씻어내고 citrate buffer 100  $\mu$ l를 가한후, trypsin 900  $\mu$ l를 넣어 37 $^{\circ}$ C 중탕에서 10분간 반응시켜 단백질을 제거하고, RNA 분해효소 750  $\mu$ l를 넣어 역시 37 $^{\circ}$ C 중탕에서 10분간 반응시켜 RNA를 제거하였다. 다음에 35 micron의 나일론망으로 여과한후 propidium iodide용액 750  $\mu$ l를 가하고 외부빛을 차단하여 4 $^{\circ}$ C 냉장고에서 10분간 반응 시킨후 유세포측정기(FACScan, Beckton Dickinson, USA)로 20000개의 세포를 분석하여 이를 CellFIT software program을 이용하여 DNA 배수성(ploidy), DNA Index(DI), S-phase값을 구한후 DI가 1.0인 경우를 이배수성(diploid), 1.0이 아닌 경우를 비배수성(aneuploid)로 정의하였다(Fig. 1, 2).

(2) 면역조직화학 염색법: 파라핀 포매 조직을 6  $\mu$ m 두께의 절편 두개를 만들어 한 절편은 hematoxylin-eosin염색을 하여 종양세포를 확인하였고 다른 한 절편은 labelled streptavidin biotin kit (DAKO LSAB Kit, Peroxidase System 40, K680, DAKO Corp.)를 사용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. p53단백 일차항체는 쥐에서 생성한 단

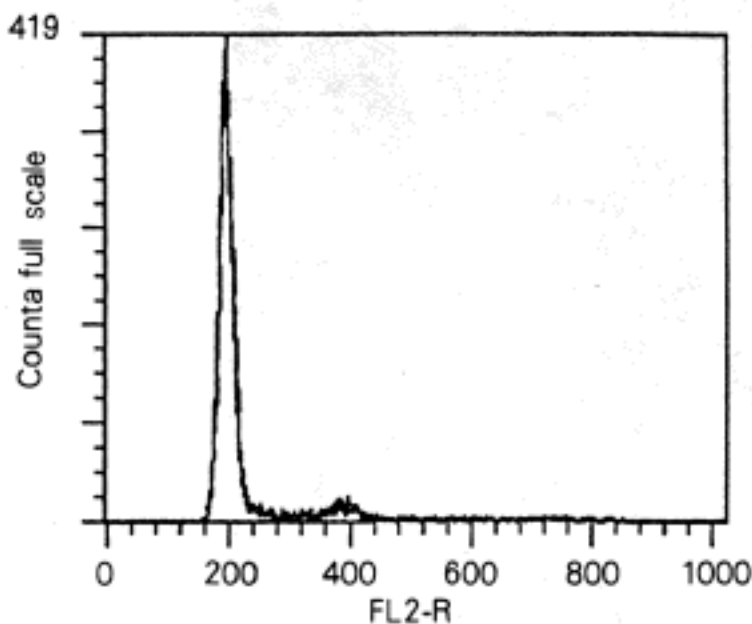


Fig. 1. Diploid histogram.

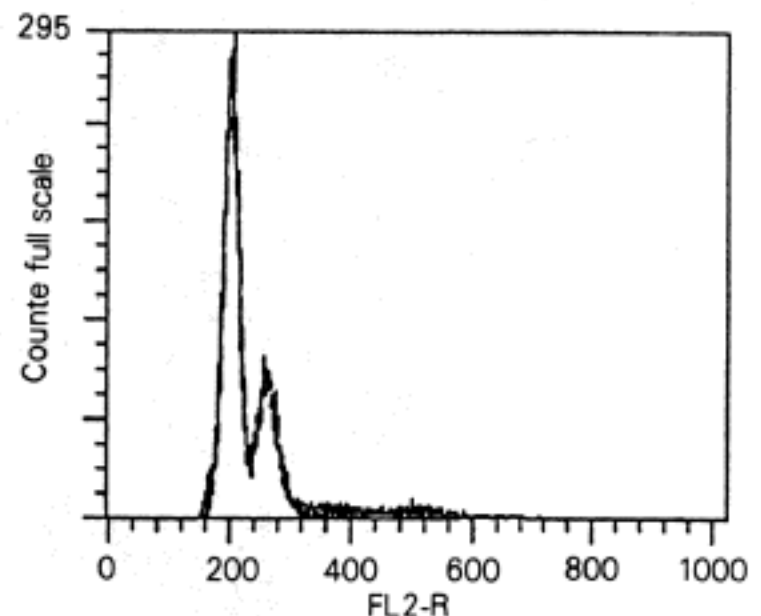


Fig. 2. Aneuploid histogram.

일클론성 항체(clone DO7, Novocastra Lab., Ltd.)를 1:200으로 희석하여 사용하였고, EGFR 일차항체는 인간의 EGFR 단백질의 세포외 영역(extra-

cellular domain)의 12개의 합성 다당체를 이용하여 토끼에서 생성한 다클론성 항체(Ab-4, Oncogene Science, Inc.)를 1:2로 희석하여 사용하였다. p53단

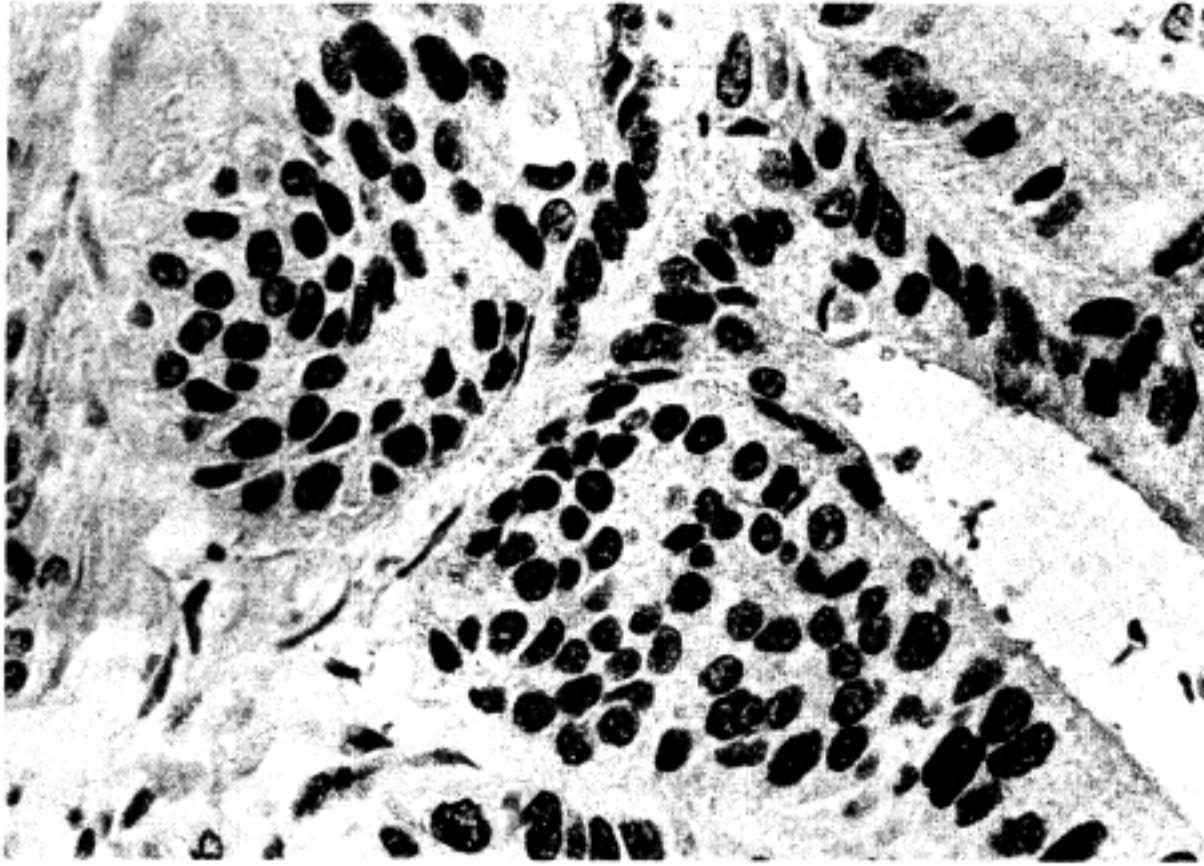


Fig. 3. Positive nuclear staining with anti-p53 protein antibody( $\times 400$ ).

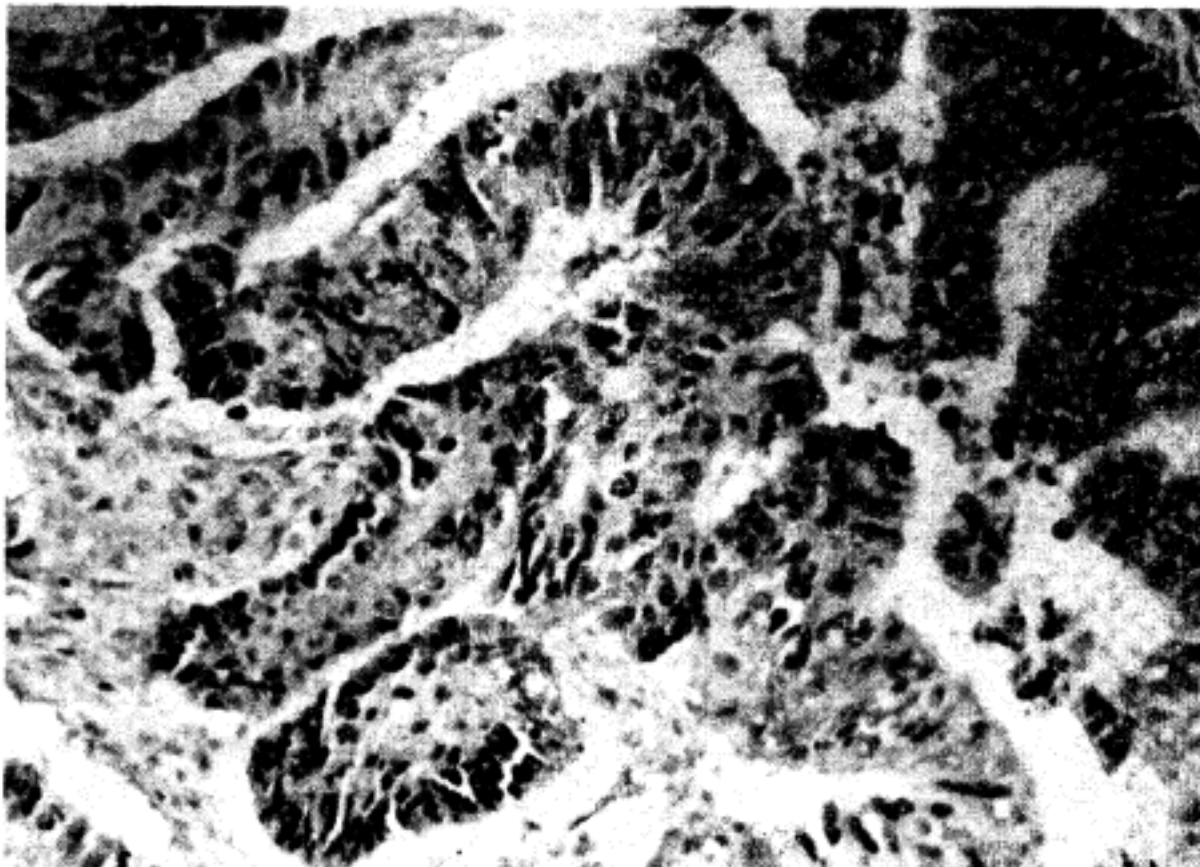


Fig. 4. Negative nuclear staining with anti-p53 protein antibody( $\times 400$ ).



-이은숙 외 2인: 대장선암에서 DNA 배수성, p53단백 및 상피세포성장인자 수용체 발현양상과  
수술후 조기재발과의 상관관계에 관한 연구-

백 염색과정은 파라핀 절편을 슬라이드에 부착시켜 60℃ 보온기에서 60분간 처리하고, xylene으로 5분간 2회 파라핀을 제거한후 100%, 95%, 80%, 70%에

탄올에서 순차적으로 각각 3분씩 처리한 다음 증류수를 함유시켰다. 내인성 과산화효소의 활성을 억제시키기 위하여 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-메탄올로 20분간 처리후 0.05

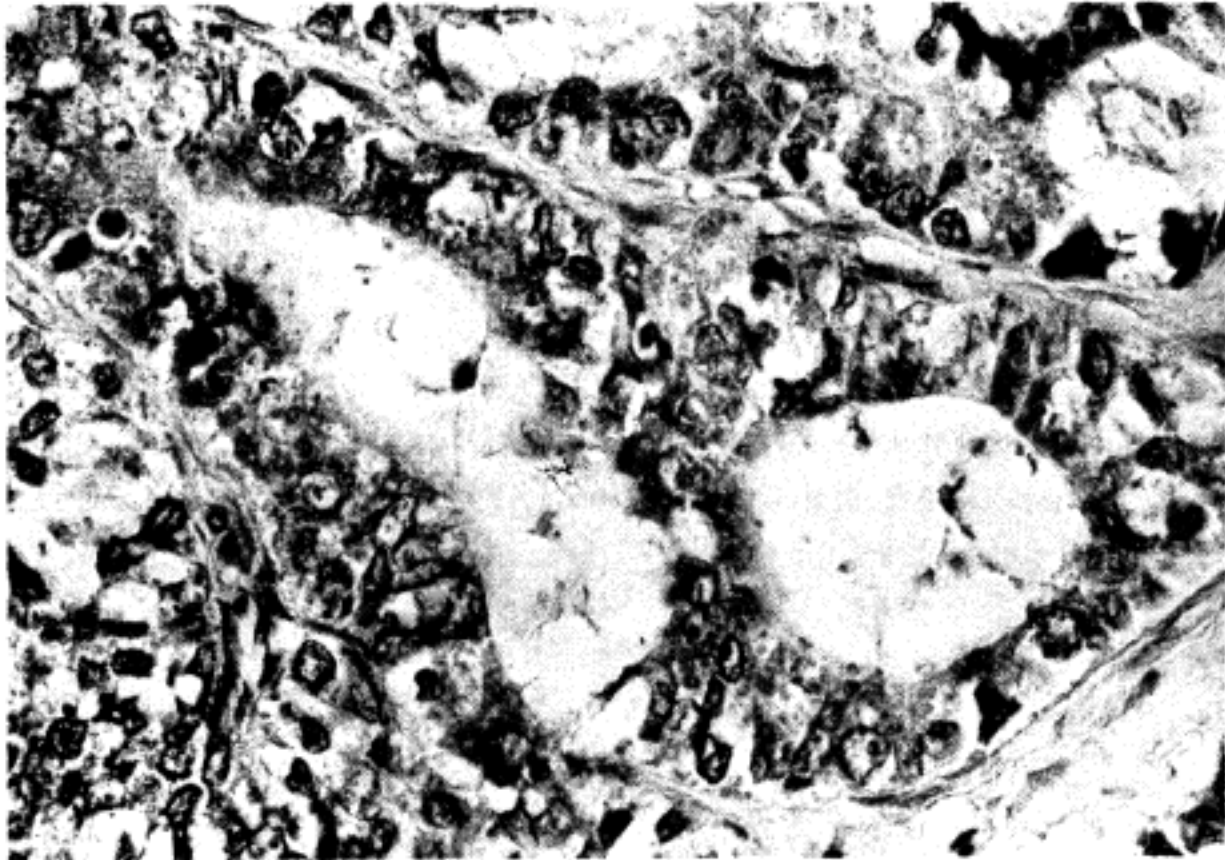


Fig. 5. Positive cytoplasmic and membrane staining with anti-EGFR antibody( $\times 400$ ).

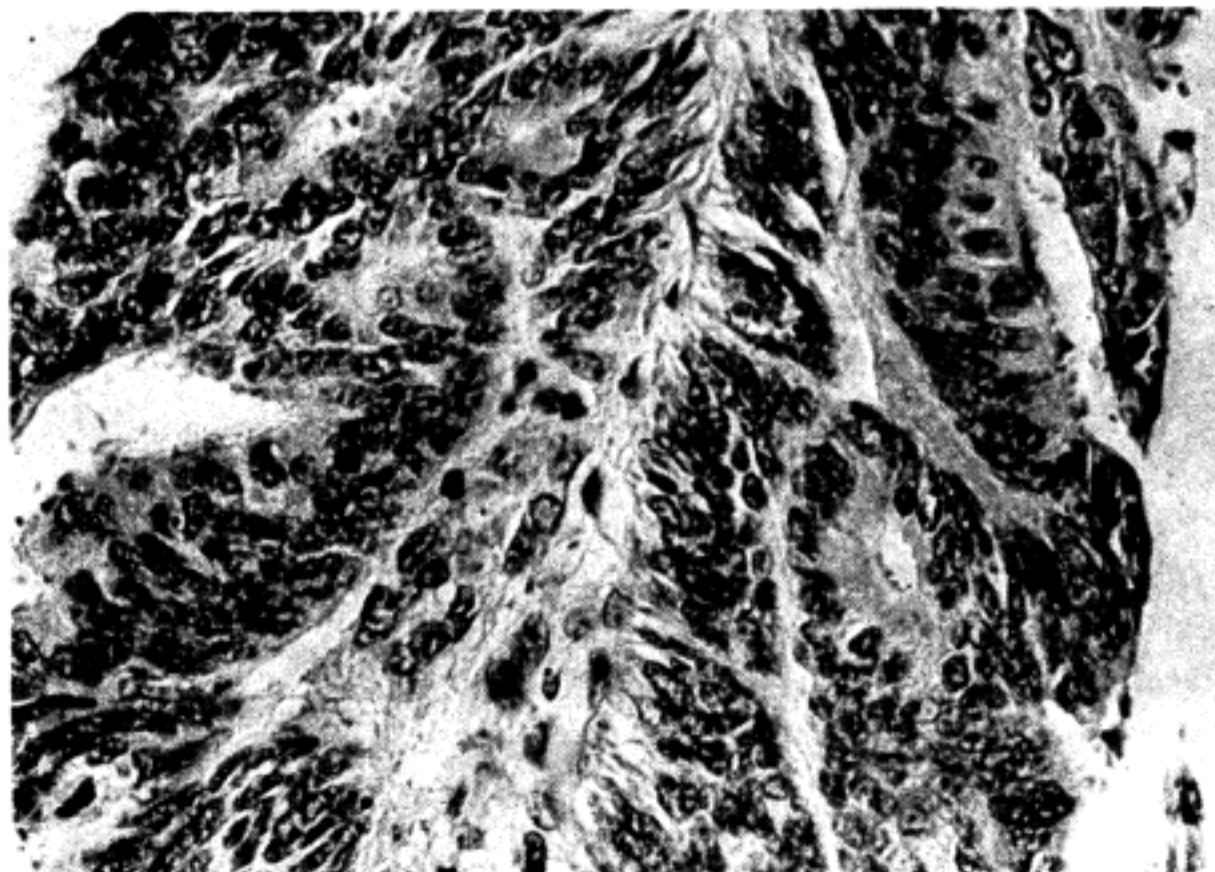


Fig. 6. Negative cytoplasmic and membrane staining with anti-EGFR antibody( $\times 400$ ).

% 사포닌(saponin) 용액에 30분간 반응시킨 다음, 0.05 M Tris/HCL buffer(pH 7.6)로 3회 세척하였다. 일차 및 이차 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위하여 습한 용기에 옮겨 정상 염소혈청으로 20분간 처리 후 0.5 M Tris/HCL buffer로 세척하였다. 일차항체를 가하고 4°C에서 12시간 반응 시킨 후 3회 세척하였다. Biotin과 결합된 이차항체를 가하고 30분간 반응시켰다. 수세후 streptavidin-horseradish peroxidase를 가하고 10분간 반응 시킨 후 충분히 세척한 다음 DAB(3-3'-diaminobenzidine 4HCl, Sigma)로 양성세포가 갈색으로 염색될 때까지 발색 시킨 다음 hematoxylin으로 대조염색하고, 에탄올과 xylene으로 처리한 다음 glycerol(Code No. C563, DAKO Corp.)로 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 음성대조용으로 염색시 일차 항체 대신 0.05 M Tris/HCL buffer로 도포시킨 표본을 사용하였다. EGFR염색은 사포닌용액 처리를 하지않고, 일차 항체를 가한후 실온에서 1시간 반응시키는 것 외에는 p53 단백질 염색과 동일한 과정을 거쳐 염색하여 관찰 하였다.

(3) 염색 반응의 결과 판정: 면역조직화학적 방법으로 염색된 조직표본을 광학현미경으로 관찰하여, p53 단백질은 세포핵에 갈색과립을 보이는 세포가 있으면 양성으로(Fig. 3), 없으면 음성으로 판정하였다(Fig. 4). EGFR은 정상 대장점막의 세포막 및 세포질에도 발현되므로, 정상 대장점막의 염색성 정도와 비교하여 표본조직이 현저하게 염색을 보일 경우는 양성(Fig. 5), 비슷하거나 약한 경우는 음성으로 판정하였다(Fig. 6).

(4) 통계 검증: 모든 통계 검증은 SAS program 을 이용하였다. DNA 배수성, p53단백 및 EGFR양성율을 환자의 나이, 세포 분화도, 병변의 위치, 수술 전 혈중 CEA값, 병기 및 2년내 재발군과 재발하지 않은 군에 따라 각각 비교 분석하기 위하여 Chi-square검사를 시행하여 p값이 0.05미만일때 의의 있는 것으로 판정하였다. 다변수 검증은 Canonical correlation analysis 및 LISREL estimates를 이용하여 각 변수간의 상관관계 및 의의도를 측정하였다.

## 결 과

### 1) 임상적 및 조직학적 검색

대장선암 56예중 나이별로는 30세 미만은 3예, 30세 이상에서 60세 미만은 34예, 60세 이상은 19예였다. 조직학적 분화도면에서는 고분화암 3예, 중분화암 44예, 미분화암 9예로 대부분이 중분화암이었다. 위치별로는 우측대장암 15예, 횡행대장암 1예, 좌측대장암 4예, S-결장암 8예 그리고 직장암 28예였다. 수술전 혈중 CEA값이 5.0 ng/dl 이상은 31예, 5.0 ng/dl 미만인 경우는 25예였다. 병기별 분포는 병기 B 21예(35.7%), 병기 C 28예(50%) 및 병기 D는 7예(12.5%)였다. 병기 D를 제외한 49예중 2년내 재발은 28예(57.1%)에서 있었으며, 병기 B 21예중 10예(47.6%)에서, 병기 C 28예중 18예(64.3%)에서 재발하였다(Table 1).

### 2) 임상 및 조직 소견과 유세포측정

총 56예중 비배수성은 31예(55.4%), 이배수성은 25예(44.6%)였으며, 평균 DNA index(DI)는 1.38 ±

Table 1. Clinicopathological characteristics

n = 56

		No. of cases
Age	below 30	3
	30~60	34
	over 60	19
Histologic grade	well	3
	moderate	44
	poor	9
Site	right colon	15
	transverse colon	1
	left colon	4
	sigmoid colon	8
CEA	rectum	28
	≥5.0	31
Stage	<5.0	25
	A	0
	B	21
	C	28
	D	7

0.44였다(Table 2). 환자의 나이에 따른 DNA 배수성은 30세 미만군이 3예에 불과하여 다른 나이군과 비교가 곤란하였으나, 60세 이상 22예중 15예(68.2%)에서, 30세 이상 60세 미만군 31예중 15예(48.4%)에서 비배수성으로 나이가 많은군에서 비배수성이 높았으나 통계적 유의성은 없었다(Table 3). 조직학적 분화도에서는 고분화암 3예는 모두 이배수성이었으며, 중분화암군과 저분화암군에서 비배수성이 차지하는 비율은 각각 59.1% 및 55.7%로 차이가 없었다(Table 4). 종양의 위치에 따라 S-결장 및 직장암군과 나머지 대장암군으로 나누어 비교하면 S-결장 및 직장암군 36예중 22예(61.1%), 나머지 대장암군 20예중 9예(45%)에서 비배수성을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Table 5).

수술전 혈중 CEA값이 높은 군과 높지않은 군의 비교에서는 CEA값이 5.0 ng/dl 이상인 31예중 20예(64.5%)에서, 5.0 ng/dl 미만인 25예중 11예(44%)에서 비배수성을 보여 CEA값이 높은 군에서 비배수성

이 차지하는 비율이 높았으나 유의한 차이는 없었다(Table 6). 병기별 비교에서는 병기 B 21예중 9예(42.9%), 병기 C 28예중 17예(60.7%), 병기 D 7예중 5예(71.4%)에서 비배수성으로 병기가 나팔수록 비배수성이 차지하는 비율은 커졌으나 통계적 유의성은 없었다(Table 7). 2년내 재발군 28예중 17예(60.7%), 재발하지 않은 군 21예중 9예(42.9%)에서 비배수성을 보여 재발군에서 비배수성이 높았으나 통계적 유의성은 없었다. 각 병기별로 재발군과 재발하지 않은 군을

**Table 2.** DNA ploidy, DI, p53 protein and EGFR  
n=56

		No. of cases(%)
DNA Ploidy	Aneuploid	31(55.4)
	Diploid	25(44.6)
DNA index(DI)	(mean±SD)	1.38±0.44
p53 Protein	Positive	27(48.2)
	Negative	29(51.8)
EGFR	Positive	30(55.4)
	Negative	26(44.6)

**Table 3.** Correlation of age with ploidy, p53 protein and EGFR

	Age<30	30≤Age<60	Age≥60
Aneuploid	1(33.3)	15(48.4)	15(68.2)
Diploid	2(66.7)	16(51.6)	7(31.8)
p53(+)	1(33.3)	15(48.4)	11(50)
p53(-)	2(66.7)	16(51.6)	11(50)
EGFR(+)	1(33.3)	15(48.4)	14(63.6)
EGFR(-)	2(66.7)	16(51.6)	8(36.4)

**Table 4.** Correlation of histologic grade with ploidy, p53 protein and EGFR  
n=56(%)

	Well	Moderate	Poor
Aneuploid	0(0)	26(59.1)	5(55.5)
Diploid	3(100)	18(40.9)	4(44.5)
p53(+)	2(66.7)	20(45.5)	5(55.5)
p53(-)	1(33.3)	24(54.5)	4(44.5)
EGFR(+)	1(33.3)	26(59.1)	3(33.3)
EGFR(-)	2(66.7)	18(40.9)	6(66.7)

**Table 5.** Correlation of tumor site with ploidy, p53 protein and EGFR  
n=56(%)

	Recto-sigmoid	Other site
Aneuploid	22(61.1)	9(45)
Diploid	14(38.9)	11(55)
p53(+)	11(30.6)	12(60)
p53(-)	25(69.4)	8(40)
EGFR(+)	19(52.7)	11(55)
EGFR(-)	17(47.3)	9(45)

**Table 6.** Correlation of CEA with ploidy, p53 protein and EGFR  
n=56(%)

	CEA>5.0	CEA≤5.0
Aneuploid	20(64.5)	11(44)
Diploid	11(35.5)	14(56)
p53(+)	16(51.6)	11(44)
p53(-)	15(48.4)	14(56)
EGFR(+)	13(41.9)	17(68)
EGFR(-)	18(58.1)	8(32)

**Table 7.** Correlation of stage with ploidy, p53 protein and EGFR  
n=56(%)

	B	C	D
Aneuploid	9(42.9)	17(60.7)	5(71.4)
Diploid	12(57.1)	11(39.3)	2(28.6)
p53(+)	10(47.6)	14(50)	3(42.9)
p53(-)	11(52.4)	14(50)	4(57.1)
EGFR(+)	12(57.1)	14(50)	4(57.1)
EGFR(-)	9(42.9)	14(50)	3(42.9)

**Table 8.** Correlation of recurrency with ploidy, p53 protein and EGFR  
n=49(%)

	Recurrent	Non-recurrent
Aneuploid	17(60.7)	9(41.9)
Diploid	11(39.3)	12(57.1)
p53(+)	14(50)	10(47.6)
p53(-)	14(50)	11(52.4)
EGFR(+)	18(64.3)	8(38.1)
EGFR(-)	10(35.7)	13(61.9)

나누어 비교하여도 같은 병기에서 재발군이 재발하지 않은 군에 비해 비배수성이 높았으나 유의성은 없었다 (Table 8).

### 3) 임상 및 조직 소견과 p53단백

총 56예중 27예(48.2%)에서 p53단백 양성하였고, 29예(51.8%)에서 음성이었다(Table 2). 환자의 나이, 종양의 분화도, 수술전 혈중 CEA값, 종양의 병기, 재발유무등에 따라 p53단백 양성율을 비교하면 각각의 비교군에서 약 50%에 가까운 일정한 양성율을 나타내었다(Table 3, 4, 6, 7, 8). 종양의 위치별 비교에서 직장 및 S-결장암군 36예중 11예(30.6%)에서, 나머지 대장암군 20예중 12예(60%)에서 p53단백 양성을 보였다(Table 5).

### 4) 임상 및 조직 소견과 EGFR

총 56예중 EGFR 양성은 30예(53.6%), EGFR 음성은 26예(46.4%)였으며(Table 2) 환자의 나이, 종양의 분화도, 수술전 혈중 CEA값, 종양의 병기, 재발유무등에 따라 EGFR 양성율을 비교하면 각각의 비교

**Table 9.** Correlation of recurrency with EGFR in stage B  
n=21(%)

	EGFR(+)	EGFR(-)
Recurrent	8(80)	2(20)
Non-recurrent	4(36.4)	7(63.6)

(p<0.04)

군에서 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Table 3, 4, 5, 6). 각 병기별 EGFR 양성율은 병기 B는 57.1%, 병기 C는 50%, 병기 D는 57.1%로 병기별 양성율은 차이가 없었으나(Table 7), 재발군과 재발하지 않은군에서의 양성율은 각각 38.1% 및 64.3%로 유의한 차이가 있었다(p<0.05)(Table 8). 특히 병기 B 조기재발군 10예중 8예(80%)에서 양성인데 비해 재발하지 않은군 11예중 4예(36.4%)에서 양성을 보여 유의한 차이를 보였다(p<0.04)(Table 9).

## 고 안

현재까지 대장암의 절제수술후 재발과 예후에 영향을 주는 몇가지 예측인자들이 밝혀져있다. 그중 조직병기가 주 예측인자로, 이에 따라 부가치료요법의 병행 여부가 결정되어 왔다. 병기외 독립적인 예측인자로 는 성별<sup>24,25</sup>, 환자의 증상유무<sup>25,26</sup>, 조직학적 분화도<sup>27,28</sup>, 혈관 및 신경침윤정도<sup>29,30</sup> 등이 알려져 있으나 많은 부분이 주관적 판단에 의존하기 때문에 보다 객관적이며 재현성 있는 방법을 찾기 위한 연구가 진행되어 왔다. 예를 들어 tritiated thymidine을 이용한 autoradiograph방법<sup>31</sup>) Bromodeoxy Uridine(Brd U)<sup>32</sup>) 또는 Ki67 항체를 이용한 면역효소염색<sup>7</sup>), Nucleolar Organizer Region에 대한 은호기성을 보는 Ag-NORs염색법<sup>8,9</sup>), Proliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA) 염색법<sup>33,34</sup>) 및 유세포 측정에 의한 DNA함량 측정법등이 소개되어 왔다<sup>10,11,35,36</sup>). 그러나 tritiated thymidim을 이용한 radio-labeling은 신선한 조직을 사용해야 하며, 방사능물질을 다뤄야 한다는 단점이 있고, Brd U나 Ki67 항체를 이용한 방법 역시 신선한 조직을 이용해야 하며, Ag-NORs 및 PCNA 염색법은 그 방법은 매우 간편하나 판독시 시간이 많이 소요되며, 주관적 판단이 개입되는 단점이



있다.

유세포 측정법은 1930년대 Moldvan<sup>37)</sup>이 현미경하에서 모세관을 통하여 개개의 세포를 측정할 때 발견해 왔으며, Van Dilla 등<sup>38)</sup>이 형광색소를 이용한 방법으로 세포 측정 속도를 증가시켰다. 그 원리는 세포 부유액에 광선을 조사하면 세포에 도달한 빛은 세포의 크기를 반영하는 전방 산란광과 세포의 생물학적 특성을 나타내는 측방 산란광의 2가지 빛으로 변하여 이 두가지 빛에서 나오는 형광량을 감지기가 수집하여 분석한다. 전형적인 유세포 측정기는 레이저 광원, 시료실과 광학기기, 광충격파를 디지털신호로 변환시키는 장치, 자료의 수집과 분석을 종합하여 관리하는 컴퓨터 부품으로 구성되어 있다<sup>37)</sup>.

유세포 측정을 이용한 세포의 DNA 함량 분석의 원리는 세포 분열상 각 주기에 있는 세포들은 상이한 DNA 함량을 가지고 있어서 DNA에 결합하는 flurochrome을 이용하여 반응 시키면 각 세포 주기에 속하는 세포들의 백분율을 산출해 낼 수 있다는 사실에 근거를 두고 있다. 정상세포는 정배수성(euploid)하에 있고 세포주기중 휴지기인 G<sub>0</sub>+G<sub>1</sub>기의 세포는 2n 염색체의 DNA 함량을 가지고 있지만 DNA 합성기(S-phase)에 들어가면 DNA 함량이 증가하여 합성후기나 세포 분열초기에는 4n의 DNA 함량을 가지게 된다. 유세포 측정법에서의 DNA index는 검사시료의 G<sub>0</sub>+G<sub>1</sub>세포의 DNA 함량을 표준시료의 G<sub>0</sub>+G<sub>1</sub>세포의 DNA 함량으로 나눈 것을 말하며 DNA index가 1인 것을 이배수성(diploid)이라고 하고 1이 아닌 것을 비배수성(aneuploid)이라고 한다.

DNA 함량을 측정할 때 신선 조직에 비해 파라핀 포매조직은 diploid 표준을 결정 하기가 어렵고, flurochrome과 결합에 있어서 효소 처리로 인해 세포내 이물질이 발생하여 DNA histogram에 첨가될 수 있고, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 해상력이 떨어 진다는 몇가지 문제점이 있지만<sup>39)</sup> 신선 조직과 상응한 결과를 보이며 후향적 연구가 가능하다는 장점이 있어 최근 대장암 환자의 임상적 경과와 파라핀 포매조직의 DNA 함량과의 관계 규명에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. DNA histogram의 분석에는 여러가지 방법이 있으며, Kenneth 등<sup>40)</sup>은 증식능을 평가하는데는 DNA 배수성 보다는 S-phase값이 더욱 중요하다 하여, S-

phase값이 20% 이상인 경우를 고증식 상태(high proliferative state)로 구분하여 이 경우에 원격 전이가 많고 예후가 좋지 않다고 하였다. 그러나 Stefan 등<sup>41)</sup>은 DNA 배수성이 간접적으로 증식 상태를 나타내며 비배수성에서 월등히 S-phase값이 높고, 파라핀 조직에서는 배수성 측정이 보다 정확하다고 주장하였다. 본 연구에서도 비배수성인 경우에 S-phase값이 월등히 높아 비배수성인 예에서는 S-phase값으로 굳이 증식능을 비교할 필요가 없었고, 이배수성을 보인 25예 중 S-phase값이 20% 이상인 고증식 상태는 4예에 불과하여 비교 관찰이 곤란하여, 이배수성과 비배수성으로만 구분하였다.

DNA 배수성과 Dukes씨 병기를 비교하면 대부분의 연구에서 병기와 배수성과는 무관한 것으로 보고되나<sup>42-44)</sup>, Tribukait 등<sup>45)</sup>은 Dukes씨 병기 B군에 비해 C군에서 유의하게 비배수성이 높은 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 병기가 B, C, D로 진행할수록 비배수성은 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다. 종양의 분화도, 환자의 나이 및 수술전 CEA값과 DNA 배수성과는 연관 관계를 찾지 못하였으나, 고분화암 3례는 모두 이배수성이었다. Nigel 등<sup>46)</sup>은 직장 및 S-결장 암이 우측대장암에 비해 유의하게 비배수성이 높다 하였으나 저자의 경우에는 유의한 차이가 없었다.

Wolley 등<sup>46)</sup>이 전향적 연구로 대장암에서 이배수성 암종을 가진 환자의 5년 생존율이 65%인데 비해 비배수성 환자는 단지 8%임을 보고하며 DNA 배수성이 독립적인 예후 예측인자로 주장하였다. Arimitage<sup>47)</sup>, Kolkal<sup>48)</sup>, Goh<sup>49)</sup> 및 Quirke 등<sup>50)</sup>도 파라핀 포매조직에서 DNA 배수성을 측정하여 예후와 비교해 본 결과 5년 생존율 및 무질병 생존율(disease free survival rate)이 이배수성인 경우에 유의하게 증가한다고 하였다. 그러나 Rognum 등<sup>51)</sup>은 신선조직에서 이배수성 및 비배수성인 경우 5년 생존율에 차이가 없었으며, Melamed 등<sup>52)</sup>은 3년 생존율을 비교해 본 결과 이배수성인 경우 53%인데 비해 비배수성인 경우에는 67%로 상반되는 결과를 보여 DNA 배수성 자체는 예후인자로서의 가치가 없다고 주장하였다. 저자의 경우에는 2년내 재발율이 이배수성인 예에서는 47.8%, 비배수성인 예에서는 65.4%로, 비배수성에서 높은 재발율을 보였으나 통계적 유의성은 없었다.

한편 정상 세포가 악성 세포로 형질 전환시 관계하

는 여러 인자중, 최근 들어 세포내 암유전자(Proto-Oncogene)가 많이 알려지고 있다<sup>33)</sup>. 암유전자는 정상적으로 단백질을 생성하여 세포표면의 수용기, 세포내의 신호 전달자 또는 성장인자의 역할을 함으로써 세포의 성장과 분열을 조절하는 중요한 기능을 갖는다. 이러한 암유전자는 여러가지 발암원의 내적 혹은 외적 자극에 의하여 유전자 증폭(gene amplification), 점돌연 변이(point mutation), 혹은 유전자 전위(chromosomal translocation)등에 의하여 활성화 되어 과다한 단백 산물을 생성하여 세포의 증식 및 분열을 자극하는 우성 암유전자(dominant acting oncogene)<sup>34)</sup>와, 과다한 세포 증식과 분열을 억제해야 하는 본연의 기능을 소실하여 종양을 유발하는 억제 유전자(antioncogene or tumor suppressor gene)<sup>35)</sup>가 있다. 그러나 단일 암유전자는 성장조절에 관여하는 능력이 한정되어 있어 적어도 두개 이상의 암유전자의 협동 작용에 의하여 세포 증식의 활성화에 참여하게 된다<sup>20)</sup>.

대장암은 선종에서 선암으로 진행되는 과정이 비교적 자세하게 알려져 있는데<sup>51)</sup> 우성 암유전자(dominant-acting-oncogene)로는 K-ras, C-src, C-myc 등이 잘 알려져 있고<sup>54, 56~58)</sup>, 억제 유전자로는 DCC (deleted in colorectal carcinoma gene)<sup>56, 59)</sup>, APC (adenomatous polyposis coli gene)<sup>20, 56, 60)</sup>, p53 gene<sup>12, 14, 20, 61, 62)</sup> 등이 알려져 있다. 이중 p53은 17번 염색체 short arm에 위치하고 있는 유전자로, p53 유전자의 변이를 관찰하는 여러가지 직간접적인 방법이 있지만 p53단백 발현 유무를 관찰하여 간접적으로 변이를 추측할 수 있다. 정상적인 p53(wild type p53) 유전자에서 생성되는 p53단백은 소량일 뿐만 아니라 생화학적으로 불안정하여 검출이 되지 않는데 비해, 변형된 p53(mutant p53) 유전자에서 생성하는 p53단백은 양도 증가되어 있고 안정되어 단일 클론 항체를 이용하여 면역조직화학 염색으로 쉽게 발현된다<sup>12, 13)</sup>. p53단백은 주로 뇌암, 폐암, 유방암, 대장암등에서 관찰되며 암종의 공격성이나 예후와도 관계가 있다는 보고들이 있으나<sup>12, 14)</sup>, 서로 상반된 결과들이 많아서 논란의 여지가 많다.

Davidoff등<sup>15)</sup>은 유방암에서 p53단백 과다발현은 말기암, 전이암 및 프로세스테론 수용체 발현이 없는 경우와 연관되어 있어 하나의 예후인자로서 가치가 있

다고 주장하였고, Hamilton등<sup>20)</sup>은 p53단백 발현 정도와 대장암의 원격전이 재발 및 예후와도 관계가 깊어 발현정도가 높을수록 전이가 많고 예후가 좋지 않다고 하였다. 그러나 Purdie등<sup>16)</sup>, Rodrigues등<sup>17)</sup>은 암종에서 p53단백 과다발현은 보이나, 환자의 나이, 종양의 위치, 조직 분화도, 병기 및 DNA ploidy등과 무관하다고 보고 하였다. 본 연구에서는 48.2%에서 p53단백 양성을 보였으나, 병기 및 2년내 재발 유무와도 무관하였고 여러 임상병리학적 측도들과도 무관하였다. 이러한 결과로 보아, p53 유전자 변이는 종양의 발생에는 관여하나 종양의 공격성, 재발 및 예후와는 관계가 없는 것으로 생각되었다. 그러나 이러한 면역조직화학적 염색에 의한 p53단백 발현 양상은 p53 유전자의 변형을 짐작하는 간접적인 방법이므로 Southern blot이나 Northern blot을 이용하여 DNA 및 mRNA의 변형을 직접 관찰하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

EGFR은 150~170 KDa 당단백으로(glycoprotein)으로 1980년대초 avian erythroblastosis virus의 oncogene erb-B 단백질과 유사한 펩타이드가 인체세포에서 발견된후 인체내에서 V-erb와 상동성을 가지고 있는 C-erb 단백질이 EGFR로 알려지고<sup>63)</sup>, 이는 EGF나 TGF- $\alpha$ 등과 결합하여 세포내 tyrosine kinase를 활성화시켜 세포증식에 관여하는 물질로 알려져 왔다<sup>18)</sup>. 그 구조는 성장인자와 결합하는 외부영역(extracellular domain), 세포막을 관통하는 짧은 경막영역(transmembrane domain), 수용체와 결합된 신호를 세포내로 전달을 맡는 세포내 영역(intracellular domain)으로 구성되어 있다. EGFR은 주로 피부, 유방, 위장관, 비뇨생식기등의 증식성인 상피세포에서 관찰될 뿐만아니라 유방암<sup>21, 22)</sup>, 뇌암<sup>44)</sup>, 방광암<sup>65)</sup>, 폐암<sup>66)</sup>, 자궁암<sup>67)</sup>, 난소암<sup>67)</sup> 및 후두암<sup>68)</sup>등에서 관찰된다.

Stainsbury등<sup>22)</sup>, Joel Lundy등<sup>69)</sup>은 유방암에서 EGFR 발현정도와 에스트로젠 및 프로세스테론 수용체 발현과는 역비례 관계를 보이고, 액와임파절 침윤암에서 EGFR 발현정도가 높다고 하였다. 또한 Cambia등<sup>68)</sup>도 후두암에서 비슷한 주장을 하였다. 그러나 Reynolds등<sup>70)</sup>은 자궁내막암에서 조직학적 분화도가 나쁠수록 도리어 EGFR함량이 도리어 감소하는 것을 보고하면서, 그 기전으로는 세포가 일단 암으로

변하면 정상조절 기능을 소실하고, 암세포에서 분비되는 EGF 자체가 자가분비 성장억제작용(autocrine regulation)으로 EGFR을 감소시키며 변형된 세포가 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor)를 분비하여 EGFR과 결합하기 때문등으로 설명하고 있으나, 대부분의 보고에서 EGFR 발현 정도가 높을수록 조직학적 분화도가 낮고, 전이성암인 경우가 많아 예후가 좋지 않다고 보고되고 있다.

본 연구에서는 EGFR 발현이 기존의 예후인자들과 상관관계는 없었으나, 병기 B군의 2년내 재발율과 EGFR 양성은 유의한 상관관계를 보였다. EGFR 양성과 재발은 유의한 상관관계가 있지만 재발 예측인자로서는 문제점이 있었다. 그 이유는 EGFR은 정상 대장 점막에서도 발현될 뿐만 아니라, 암세포에서도 부위에 따라 염색 정도가 차이가 있어 관찰자에 따라 주관성이 개입될 가능성이 많이 있었다. 이러한 단점은 EGFR 정량적 분석방법으로 극복될 수 있을 것으로 생각되나, 정량적 분석에 비해 면역조직화학 염색 방법은 가격이 저렴하고, 어느 검사실에서나 손쉽게 염색이 가능하며, 암종내에서도 양성조직과 암조직을 구분하여 검사할 수 있는 장점이 있어 객관적인 평가기준을 설정하면 의의도는 훨씬 증가할 것으로 사료되었다.

결론적으로 DNA 배수성은 비록 통계적 유의성은 없었지만 병기가 진행함에 따라 비배수성이 증가하고, 비배수성에서 재발이 많아 예후 예측지표로서의 가능성이 보였다. p53단백은 본 연구에서는 종양의 공격성, 재발 및 예후와는 관계가 없는 것으로 생각되나 이러한 면역조직화학 염색에 의한 p53단백 발현 양상은 p53 유전자의 변형을 짐작하는 간접적인 방법이므로 직접적인 방법으로 p53 유전자의 변형을 관찰하는 연구가 진행된후에 정확한 평가가 가능할 것으로 생각되었다. EGFR은 객관적인 평가기준을 설정하면 임상에서 병기 B군의 재발 예측지표로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료되었다.

## 결 론

저자는 1989년 1월부터 1990년 12월까지 고려대학교 부속병원 외과에서 대장직장암으로 수술한 환자 96예를 대상으로 수술전 방사선 요법이나 유도화학 요

법을 받은 6예를 제외하고 남은 90예중 2년 이상 추적 조사가 가능하였고 대장암의 파라핀 포매조직 이용이 가능하였던 56예를 대상으로, 유세포 측정법으로 DNA함량 및 세포주기를 측정하고 면역조직화학 염색방법으로 p53단백 및 EGFR 발현 양상을 관찰하여, 기존의 예후지표와의 연관성 및 2년내 재발 예측지표로서의 가치가 있는지를 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 병기가 B, C, D군으로 진행함에 따라 비배수성이 차지하는 비율이 42.9%, 60.7%, 71.4%로 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다.

2) 재발군에서 DNA 비배수성 출현률이 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다.

3) DNA ploidy, p53단백 및 EGFR 염색반응 양성은 서로간의 상관관계는 없었다.

4) p53단백은 환자의 나이, 종양의 분화도, 종양의 위치, 수술전 CEA값, 병기 및 재발등 어느것과도 상관관계가 없이 비교군간에 거의 일정한 양성을 나타내었다.

5) EGFR은 환자의 나이, 종양의 분화도, 종양의 위치, 병기 및 수술전 CEA값과 서로간의 유의한 상관관계는 없었다.

6) EGFR 양성은 병기 B군의 재발과 강한 상관관계가 있었다.

이상과 같은 결과로 볼때 조직 병기가 재발 및 예후 추정에 있어 가장 중요한 예측지표임에는 논란의 여지가 없으나, DNA 배수성 및 EGFR 발현이 부가적인 재발 예측인자로는 의의가 있을 것으로 생각되며 특히 병기 B군 암종의 수술술식 결정이나 수술후 부가요법의 병행여부 결정에는 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

## REFERENCES

- 1) Dukes CE: *Cancer of the rectum: an analysis of 1000 cases. J Pathol Bacteriol* 50: 527, 1940
- 2) Whittaker M, Goligher JC: *The prognosis after surgical treatment for carcinoma of the rectum. Br J Surg* 63: 384, 1976
- 3) Corman ML, Veidenheimer MC, Coller JA: *Colorectal carcinoma: a decade of experience at the Lahey Clinic. Dis Colon Rectum* 22: 477, 1979



- 4) Dixon AR, Maxwell WA, Holmes J, Thornton T: *Carcinoma of the rectum: a 10-year experience. Br J Surg* 77: 510, 1990
- 5) Neville R, Fielding LP, Amendola C: *Local tumor recurrence after curative resection for rectal cancer. A ten-hospital review. Dis Colon Rectum* 30: 12, 1987
- 6) Carlsson U, Lasson A, Ekelund G: *Recurrence rates after curative surgery for rectal carcinoma, with special refernce to their accuracy. Dis Colon Rectum* 30: 431, 1987
- 7) Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H: *Production of monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer* 31: 13, 1983
- 8) 김준미, 김인선, 백승룡: 정상조직과 증식성 및 종양성 병변에서의 nucleolar organizer regions. 대한병리학 회지 23: 208, 1989
- 9) Hall PA, Crocker J, Watts A, Stansfeld AG: *A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. Histopathol* 12: 373, 1988
- 10) Barlogie B, Raber MN, Schumann J, Johnson TS, Drewinko B, Swartzendruber DE, Cohde W, Andreff M, Freireich EJ: *Flow cytometry in clinical cancer reserach. Cancer Res* 43: 3982, 1983
- 11) Temple WJ, Sugarbaker EV, Thornthwaite JT, Hensley GT, Ketcham AS: *Correlation of cell cycle analysis with Dukes staging in colon cancer patient. J Surg Reserach* 28: 314, 1980
- 12) Ostrowski JL, Sawan A, Henry L, Wright C, Henry JA, Hennesy C, Lennard TJ, Angus B, Hornf CHW: *p53 expression in human breast cancer related to survival and prognostic factors: on immunohistochemical study. J Pathol* 164: 75, 1991
- 13) Cattoreth G, Rilke F, Andreola S, Amato L, Deha D: *p53 expression in breast cancer. Int J Cancer* 41: 178, 1988
- 14) Baker SJ, Markowitz S, Feron ER, Willson JKV, Vogelstein B: *Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild type p53. Science* 249: 912, 1990
- 15) Davidoff AM, Herndon II JE, Glover NS, Kerns BM, Pencc JC, Iglehart JD, Marks JR: *Relation between p53 overexpression and established prognostic factors in breast cancer. Surgery* 110: 259, 1991
- 16) Purdie CA, Gardy JO, Piris J, Wyllie AH, Bird CC: *p53 ecxpression in colorectal tumors. Am J Pathol* 138: 807, 1991
- 17) Rodrigues NR, Rowan A, Smith MEF, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP: *p53 mutations in colorectal cancer. Proc Natl Acad Sci* 87: 7555, 1990
- 18) Velu TJ, Beguinot L, Vass WC, Willingham MC, Merlino GT, Pastan I, Lowy DR: *Epidermal growth factor-dependent transformation by a human EGF receptor proto-oncogene. Science* 238: 1408, 1987
- 19) Damjanov I, Mildner B, Knowles BB: *Immunohistochemical localization of the epidermal growth factor receptor in normal human tissues. Lab Invest* 55: 558, 1986
- 20) Stanley R, Hamilton SR: *Molecular genetic alteration as potential prognostic indicators in colorectal carcinoma. Cancer Supple* 69: 1589, 1992
- 21) Battaglia F, Scambia G, Rossi, et al: *Epidermal growth factor receptor in human breast cancer: correlation with steroid hormone receptors and axillary lymph node involvement. Eur J Cancer Clin Oncol* 24: 1685, 1988
- 22) Sainsbury JRC, Farndon JR, Needham GK, Malcolm AJ, Harris AL: *Epidermal growth factor receptor as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. Lancet* 2: 1398, 1987
- 23) Watanabe H, Jass JR, Sibir LH: *Histological typing of esophageal and gastric tumors. In World Health Organization Interanation Histological Classification of Tumors. Berlin Springer-Verlag* 20: 26, 1989
- 24) Godwin JD, Brown CE: *Some prognostic factors in survival of patients with cancer of the colon and rectum. J Chron Dis* 28: 441, 1975
- 25) McDermot FT, Hughes ESR, Phil E, Milne BJ, Price AB: *Comparative results of surgical management of single carcinomas of the colon and rectum: a series of 1939 patients managed by one surgeon. Br J Surg* 68: 850, 1981
- 26) Ohman U: *Prognosis in patients with obstructing colorectal carcinoma. Am J Surg* 143: 742, 1982
- 27) Newland RC, Chapuis PH, Pheils MT, Macpherson JG: *The relationship of survival to staging and grading of colorectal carcinoma: A prospective study of 503 cases. Cancer* 47: 1424, 1981
- 28) Phillips RKS, Hittinger R, Blesovsky L, Fry JS, Fielding LP: *Large bowel cancer. Br J Surg* 72: 698, 1985



- 29) Chapuis PH, Dent OF, Fisher R, Newland RC, Pheils MT: *A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer. Br J Surg* 72: 698, 1985
- 30) Knudsen JB, Nilsson T, Sprechler M, Joansen A, Christensen N: *Venous and nerve invasion as prognostic factors in postoperative survival of patients with resectable cancer of the rectum. Dis Colon Rectum* 26: 613, 1983
- 32) George K, Harry WC: *Autoradiographic study of human nervous system tumors. Arch Pathol* 80: 38, 1965
- 32) Naghasima T, DeAmond JJ, Murovic J, Hoshino T: *Immunohistochemical demonstration of S-phase cells by antibromodeoxyuridine monoclonal antibody in human brain tissues. Acta Neuro-pathol(Berl)* 67: 155, 1985
- 33) Mathews MD, Bernstein RM, Franza BR, Garrels JJ: *Identity of the proliferating nuclear antigen and cyclin. Nature* 309: 374, 1984
- 34) Takasaki T, Deng JS, Jan EM: *A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation: Its distribution on synchronized cells. J Exp Med* 154: 1899, 1981
- 35) Kokal WA, Duda RB, Azumi N, Sheibani K, Kemeny MM, Terz JJ, Harada JR: *Tumor DNA content in primary and metastatic colorectal carcinoma. Arch Surg* 121: 1434, 1986
- 36) Jones DJ, Moore M, Schofield PF: *Prognostic significance of DNA ploidy in colorectal cancer: a prospective flow cytometric study. Br J Surg* 75: 28, 1988
- 37) Steinkamp JA: *Flowcytometry. Rev Sci Instrum* 55: 1375, 1984
- 38) Lovett EJ, Schnitzer B, Keren DF, Flint A, Hudson JJ, McClatchey KD: *Application of flow cytometry to diagnostic pathology. Lab Invest* 50: 115, 1984
- 39) Merkel DE, Mcquire WL: *Ploidy-Proliferative activity and prognosis. Cancer* 65: 1194, 1990
- 40) Kenneth DB, Sarah TL, Jose MV, Carl BW, Joan SC, Marcia LM: *Prognostic implications of proliferative activity and DNA aneuploidy in colonic adenocarcinoma. Lab Invest* 57: 329, 1987
- 41) Stefan OE, Rogers G: *Prognostic value of DNA content in colorectal carcinoma. Cancer* 60: 1282, 1987
- 42) Daniel LH, Robert EP, Mark E, Victor F, Raymond RT: *DNA ploidy and cell cycle analysis of colorectal carcinoma by flow cytometry. Am J Clin Pathol* 93: 615, 1990
- 43) Nigel AS, Harry SW, Charles GM, Stephen SC, Robert WB, Michael ML: *Colorectal cancer-Dukes' stage, tumor site, preoperative plasma CEA level, and patient prognosis related to tumor DNA ploidy pattern. Arch Surg* 122: 1375, 1987
- 44) 임채용, 채권목: 대장 및 직장암에서 DNA ploidy의 예후인자로서의 의의. *외과학회지* 41: 467, 1991
- 45) Tribukait B, Hammarberg C, Rubio C: *Ploidy and proliferation patterns in colorectal adenocarcinomas related to Dukes' classification and to histopathological differentiation. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect* 91: 89, 1983
- 46) Wolley RC, Schreiber K, Koss LG, Karas M, Sherman A: *DNA distribution in human colon carcinomas and its relationship to clinical behavior. J Natl Cancer Inst* 69: 15, 1982
- 47) Armitage NC, Robins RA, Evans DF, et al: *the influence of tumor cell DNA abnormalities on survival in colorectal cancer. Br J Surg* 72: 828, 1985
- 48) Kokal W, Sheibani K, Terz J, Harada R: *Tumor DNA content in the prognosis of colorectal carcinoma. JAMA* 225: 3123, 1986
- 49) Goh HS, Jass JR, Atkin WS, Cuzick J, Northover JMA: *Value of flow cytometric determination of ploidy as a guide to prognosis in operable rectal cancer: a multivariate analysis. Int J Colorectal Dis* 2: 17, 1987
- 50) Quirke P, Dixon MF, Clayden AD, et al: *Prognostic significance of DNA aneuploidy and cell proliferation in rectal adenocarcinomas. J Pathol* 151: 285, 1987
- 51) Rognum TO, Thorud E, Lund E: *Clinical behavior in large bowel carcinoma patients with different DNA ploidy pattern. 14th International cancer Congress. Budapest, Abstract* 2439, 1986
- 52) Melamed MR, Enker WE, Banner P, Janov AJ, Kessler G, Daryznkiewicz Z: *Flowcytometry of colorectal cancer with three year follow-up. Dis Col Rect* 29: 184, 1986
- 53) Weinberg RA: *Oncogenes, Antioncogenes, and the molecular basis of multi-step carcinogenesis. Cancer Res* 49: 3713, 1989
- 54) Land H, Parada LF, Weinberg RA: *Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. Science* 222: 771, 1983

- 55) Fearon ER, Vogelstein B: *A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell* 61: 759, 1990
- 56) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al: *Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Engl J Med* 319: 525, 1988
- 57) Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, et al: *Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. Nature* 327: 293, 1987
- 58) Bos JL: *Ras oncogenes in human cancer: A review. Cancer Res* 49: 4682, 1989
- 59) Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, et al: *p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. Cancer Res* 50: 7717, 1990
- 60) Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, et al: *Identification of a chromosome 18q gene which is altered in colorectal cancer. Science* 247: 49, 1990
- 61) Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL: *Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. Lancet* 335: 675, 1990
- 62) Nigro JM, Baker SJ, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devillee, P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, Vogelstein B: *Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. Nature* 342: 705, 1989
- 63) Xu YH, Richert N, Ito S, Merlino GT, Pastan I: *Characterization of epidermal growth factor receptor gene expression in malignant and normal human cell lines. Proc Natl Acad Sci* 81: 7308, 1984
- 64) Libermann TA, Razon N, Bartal AD, Yarden Y, Schlessinger J, Soreq H: *Expression of epidermal growth factors in human brain tumors. Cancer Res* 44: 753, 1984
- 65) Neal DE, Marsh C, Bennett MK, et al: *Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumors. Lancet* 1: 366, 1985
- 66) Veale D, Ashcroft T, Marsh C, Gibson GJ, Harris AL: *Epidermal growth factor receptors in non small cell lung cancer. Br J Cancer* 55: 513, 1987
- 67) Bauchnecht T, Kohler M, Janz I, Pflieger A: *The occurrence of epidermal growth factor receptors and the characterization of EGF-like factors in human ovarian, endometrial, cervical, and breast cancer. J Cancer Res Clin Oncol* 115: 193, 1989
- 68) Scambia G, Pierluigi BP, Battaglia F, et al: *Receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in primary laryngeal tumors. Cancer* 67: 1347, 1991
- 69) Lundy J, Schuss A, Stanick D, McCormack ES, Kramer S, Sorvillo JM: *Expression of neu protein, epidermal growth factor receptor, and transforming growth factor alpha in breast cancer: correlation with clinicopathologic parameters. A J Pathol* 138: 1527, 1991
- 70) Reynolds RK, Talavera F, Roberts JA, Hopkins MP, Jairan MKM: *Characterization of epidermal growth factor receptor in normal and neoplastic human endometrium. Cancer* 66: 1967, 1990