大韓大腸肛門病學會誌:第11卷 第3號
K.C.P.S. Vol. 11, No. 3, September, 1995

결직장암에서 PCNA 발현의 의의

전남대학교 의과대학 외과학교실

구 원 회·김 영 진·김 신 곤

=Abstract=

Prognostic Significance of PCNA in Colorectal Cancer

Won Hoe Koo, M.D., **Young Jin Kim**, M.D. and **Shin Kon Kim**, M.D.

Department of Surgery, Chonnam University Hospital, Kwangju, Korea

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is an auxillary protein of DNA polymerase delta and tightly associated with sites of DNA replication. We studied the expression of PCNA in primary colorectal cancer to identify its significance as a prognostic factor.

The growth activity of 68 colorectal carcinomas was assessed by immunohistochemical staining for formalin-fixed, paraffin-embedded tissue with a monoclonal antibody against PCNA. The PCNA index was calculated as the percentage of positive cells relative to the 1,000 tumor cells. The correlation between the PCNA index and various clinicopathologic factors were assessed. The results were as follows:

1) The mean PCNA index of 68 tumors (mean±SD) was 66.6±27.4%.

2) There was no correlation between the PCNA index and sex, DNA ploidy pattern, state of tissue CEA, expression of MDR and mutant p53, and tumor location.

3) The PCNA index of adenocarcinoma (67.2±27.0%) was slightly higher than that of mucinous carcinoma (67.2±29.2%).

4) PCNA index was closely associated with c-myc, c-Ha-ras, lymphatic invasion and advanced stage.

These results indicate that PCNA index may be an useful indicator for evaluating the malignant potential of colorectal cancer and can be used as an independent prognostic factor.

Key Words: Colorectal cancer, PCNA, Prognosis, Immunohistochemistry

서 론

종양 세포의 성장속도를 나타내는 세포의 증식능은 그 종양의 악성도 및 환자의 예후를 추정할 수 있는 중요한 지표가 된다. 종양 세포의 악성도를 결정하기 위해 종양 세포의 증식능을 평가하는 방법으로 세포분열수측정, ^{3}H-thymidine을 이용한 자가 방사선법(autoradiography), 5-bromodeoxyuridine이나 5-iododeoxyuridine을 이용하는 방법[9], 유식세포 측정기(flow cytometry)를 이용한 DNA ploidy나 합성기 세포분획(S-phase fraction)측정등이 있으며[4,14], 최근에는 p105, Ki-67, DNA-directed DNA polymerase alpha, p120등의 단클론항체를 이용한 면역조직화학적 검색이 이용되고 있다[26]. 이중 PCNA

*본 논문의 요지는 1994년도 대한대장항문병학회 추계학술대회에서 발표되었음.

는 36kd의 분자량을 갖는 DNA polymerase delta의 auxillary protein으로 세포주기와 밀접한 연관이 있어 G1기에 증가하기 시작하여 S기에 최고조에 달하였다가, G2/M기에 감소하는 것으로 알려져 있으며, 이 항원의 합성정도는 세포의 증식 및 DNA 합성과 직접적인 관련이 있다[5,16,19].

결직장암 환자의 예후인자로는 연령, 종양의 크기, 국소침범정도, 림프절 전이여부, 혈관 및 신경조직 침윤 유무, DNA polidy pattern, C-myc 암유전자 발현[20], 조직학적 유형 및 병기등이 알려져 있으며[21,22], 최근에 결직장암에서 PCNA 발현정도를 측정하여 종양세포의 증식능을 평가하여 하나의 독립된 예후인자로의 이용성에 대해 연구가 활발히 진행되고 있다.

이에 저자들은 결직장암의 세포증식능을 PCNA에 대한 면역조직화학적 방법으로 검색하여 다른 예후인자와의 상관 관계를 확인함으로써, PCNA 반응도가 하나의 독립된 예후인자로 사용될 수 있는지를 규명해 보고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

결직장암으로 진단받고 전남대학교병원 외과에서 수술을 시행한 68명의 환자를 대상으로 하여 환자의 연령, 성별분포, 종양의 위치, C-myc, c-Ha-ras, mutant p53 암유전자, MDR 유전자의 발현, 림프절 전이여부, 조직학적 분류, Dukes 병기등을 조사하고, 절제된 조직에서 PCNA에 대한 면역조직화학적 검색을 시행하였다.

모든 절제된 조직은 Astler와 Coller[2]에 의해 수정된 Dukes병기를 이용하여 분류하였으며, Hematoxylin-eosin 염색절편을 이용하여 WHO분류[12]에 의해 고분화, 중등도 분화, 저분화 선암종과 점액성암종으로 분류하였다.

세포 증식능의 측정을 위한 PCNA에 대한 면역조직화학적 검색은 10% 중성 완충 포르말린에 고정후 제작된 파라핀 포매괴를 3 μm두께로 박절하여 Probe-on 슬라이드에 부착시킨 후 사용하였고, 염색의 전과정은 capillary gap action 원리를 응용한 Microprobe Immuno/DNA stainer(Fisher Co.)를 이용하였다. 파라핀 포매괴를 xylene을 이용 탈파라핀화와 함수과정을 거친후 무수알콜로 탈수시켰다. 탈수된 조직절편을 조직항원의 검출을 민감하게 하기 위해 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 다음, 일차항체인 PCNA(Dako)를 반응시켰다. 일차항체를 검출하기 위한 이차항체는 biotin이 부착된 antimouse IgG(Sigma)를 이용해 30분간 부치시킨 후 완충액으로 씻어낸 다음, streptavidin-alkaline phosphatase를 30분간 작용시킨후, 완충액으로 씻고 fast red TR salt를 이용해 발색시켜 양성 반응을 관찰하였다.

결과의 판정은 광학현미경으로 관찰하여 종양세포 1,000개당 양성세포수를 측정하여 PCNA 반응도를 산정하였다.

PCNA의 양성반응을 핵에 국한되어 나타났고, 미만성 혹은 과립상의 염색상을 보였으며, 종양 주위의 정상 점막세포에서도 부분적으로 약한 양성반응이 관찰되었으나, 반응도는 종양세포보다 낮았다. 또한 진기하고 큰핵을 갖는 대형세포의 핵에서 강한 양성반응이 관찰되었으며, 림프관 및 혈관내 침윤을 보인 경우 PCNA 반응도가 높았다.

결직장암의 각 예후인자와 PCNA 발현율과의 상관관계는 chi square analysis를 이용하였으며, $p < 0.05$를 통계학적으로 유의한 것으로 추정하였다.

결 과

본 연구에 이용한 총 68명의 환자중 남자는 39명, 여자는 29명으로 남녀비는 1.34 : 1이었으며, 평균연령은 56.6세였다. 종양의 평균크기는 5.65 cm이었으며, 평균 PCNA발현율은 66.6±27.4%였다.

종양의 발생부위는 직장이 41예(60.3%)로 가장 많았으며, 상행결장 9예(13.2%), S자결장 8예(11.8%), 하행결장 7예(10.3%), 횡행결장 3예(4.4%)순이었다.

조직학적 유형은 선암종이 57예(83.8%)로 대부분을 차지하였으며, 점액성암종은 11예(16.2%)였으며, 선암종중 고분화선암종 24예(42.1%), 중등도분화선암종 26예(45.6%), 그리고 저분화선암종이 7예(12.3%)였다. 총 68예중 42예(61.8%)에서 림프절 전이가 있었고, 7예(10.3%)에서는 간전이가 동반되었다.

변형된 Dukes병기중 C2가 28예(41.2%)로 가장 많았고, B2 20예(29.4%), C1과 D가 각각 7예(10.3%), B1이 6예(8.8%)를 차지하였다.

성별에 따른 PCNA 반응도는 남자가 71.3±19.1%로 여자의 58.5±31.3%보다 높았으나 두 군간에 통계학적인 의의는 없었다(Table 1).

조직에서 CEA양성을 보인 52예에서 64.1±27.6%의 PCNA 반응도를 보였고, CEA음성을 보인 7예에서는 72.1±29.6%를 보였다. DNA ploidy양상에 따라 보면 Diploidy를 보인 경우 67.9±25.5%, aneuploidy는 65.7±28.6%로 두군간에 통계학적 의의는 없었다(Table 2).

절제된 암조직에서 C-myc 암유전자의 발현을 보인 경우 18예에서 PCNA 반응도는 73.6±19.1%로 발현을 보이지 않은 경우 31예의 58.8±31.3%보다 유의있게 높게 나타난 반면($p<0.05$), c-Ha-ras 암유전자가 발현되지 않는 경우에서 77.5±23.6%의 PCNA 반응도를 보여 c-Ha-ras 암유전자가 발현된 경우의 59.7±28.3%보다 유의있게 높게 나타났다($p<0.05$) (Table 3).

종양세포가 항암제에 대해 내인성 또는 획득성 저항성을 나타내는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 MDR1 유전자[7]의 산물인 p-glycoprotein의 과잉발현을 보인 경우에서 59.7±28.0%의 PCNA 반응도를 보였으며, p-glycoprotein이 발현되지 않는 경우의 68.4±27.0%보다 낮았으나 통계학적 유의성은 없었다. Mutant p53 암유전자[3]가 발현된 27예에서의 PCNA 발현율은 71.7±19.6%로 발현되지 않은 경우의 65.4±34.0%보다 높았으나 역시 통계학적 유의성은 없었다(Table 4).

종양의 발생부위에 따른 PCNA반응도는 상행결장이 79.5±12.6%로 가장 높았고, S자결장74.8±20.5%, 직장 65.9±31.7%, 하행결장 57.1±29.5%, 횡행결장 38.1±15.2%였다. 직장에 발생한 경우와 결장에 발생한 경우와 결장에 발생한 경우의 PCNA 반응도는 각각 65.9±31.7%, 67.7±19.2%를 보였으며, 각군간에 통계적 유의성은 없었다(Table 5).

조직학적 유형에 따른 PCNA 반응도는 선암종이 67.2±27.0%, 점액성암종이 63.7±29.2%였다. 선암종의 경우 고분화선암종이 72.3±24.6%로 중등도분화선암종(66.8±26.8%)이나 저분화선암종(51.3±28.8%)보

Table 1. PCNA index in colorectal cancer according to sex

Sex	Cases	PCNa index(%)	p value
Male	39	71.3±24.0	NSD*
Female	29	58.5±31.3	
Mean PCNA index		66.6±27.4	

*: no significant difference

Table 2. PCNA index in colorectal cancer according to CEA & DNA ploidy pattern

Variables	Cases	PCNA index(%)	p value
CEA	52		
Positive	7	64.1±27.6	NSD*
Negative		72.1±29.6	
DNA ploidy	33		
Diploidy	28	67.9±25.5	NSD*
Aneuploidy		65.7±28.6	

*: no significant difference

Table 3. PCNA index in colorectal cancer according expression of oncogenes(I)

Variables	Cases	PCNA index(%)	p value
CEA			
Positive	18	73.6±19.1	$p<0.05$
Negative	31	58.5±31.3	
c-Ha ras			
Positive	35	59.7±28.3	$p<0.05$
Negative	14	77.5±23.6	

Table 4. PCNA index in colorectal cancer according expression of oncogenes(II)

Variables	Cases	PCNA index(%)	p value
MDR			
Positive	26	59.7±28.0	NSD*
Negative	25	68.4±27.0	
p53			NSD*
Positive	27	71.7±19.6	
Negative	12	65.4±34.0	

*: no significant difference

Table 5. PCNA index in colorectal cancer according to location

Location	Cases	PCNA index(%)	p value
Rectum	41	65.9±31.7	NSD*
Others*	27	67.7±19.2	

*: Ascending, transverse, descending, & sigmoid colon

*: no significant difference

Table 6. PCNA index in colorectal cancer according to histologic type

Type	Cases	PCNA index(%)	p value
Adenocarcinoma			
Well-diff.	24	72.3±24.6	
Moderately-diff.	6	66.8±26.8	NSD*
Poorly-diff.	7	51.3±28.8	
Mucinous carcinoma	11	67.2±29.2	

*: no significant difference

Table 7. PCNA index in colorectal cancer according to lymph node metastasis

Lymph node	Cases	PCNA index(%)	p value
Positive	42	73.4±22.1	p<0.01
Negative	26	55.7±31.3	

다 높게 나타났으며, 고분화 및 저분화 선암종에서 림프절 전이가 동반된 29예에서 74.1±22.3%로 림프절 전이가 없는 21예의 62.9±29.2%보다 다소 높게 나타났다(Table 6).

림프절 전이에 따른 PCNA 반응도는 림프절 전이가 동반된 경우 73.4±22.1%로 림프절 전이가 없는 경우의 55.7±31.3%보다 유의있게 높게 나타났다(p<0.01)(Table 7).

수정된 Dukes병기에 따른 PCNA 반응도는 Dukes'C가 74.7±22.8%로 Dukes'B의 55.7±31.3%보다 유의있게 높게 나타났으며(p<0.01), Dukes' A/B와 C/D를 나누어 관찰했을때 각각 55.7±31.3%, 73.4±22.1%로 진행된 병기일수록 높은 PCNA 반응도를 보였다(p<0.01)(Table 8).

Table 8. PCNA index in colorectal cancer according to stage

Stage	Cases	PCNA index(%)	p value
Dukes' B	26	55.7±31.3	B-C
Dukes' C	35	74.7±22.8	: p<0.01
Dukes' D	7	67.0±16.0	
A/B	26	55.7±31.3	p<0.01
C/D	42	73.4±22.1	

고 찰

종양 세포가 갖는 특징은 성장 속도가 빠르고, 국소 침윤성 및 타장기로의 전이능력등이 있는데 이중 성장 속도 즉 세포증식능은 종양의 악성도를 판정하는 독립적인 지표로써 이용되고 있다.

이러한 종양세포의 증식능을 평가하는 방법으로 세포분열수측정, ^{3}H-thymidine을 이용한 자가방사선법, 5-bromodeoxyuridine 또는 5-iododeoxyuridine을 이용한 방법[9], 유식세포측정기를 이용한 DNA ploidy나 합성기 분획세포측정등을 이용하거나[4,14], 최근에는 p105, Ki-67, DNA-directed DNA polymerase-alpha등의 단클론항체를 이용한 면역조직화학적 검색이 이용되고 있다[18,26].

하지만 이러한 방법들은 각기 장, 단점을 가지고 있어, 유사분열수측정은 비교적 간편한 방법이지만, 유사분열을 알아내기 힘들고, 관찰자간에 판독이 다를수 있으며, 조직의 부위에 따라 유사분열수가 다르기 때문에 정확한 방법이 못된다. ^{3}H-thymidine을 이용한 자가방사선법은 동위원소가 부착된 thymidine을 in vivo 또는 in vitro에서 부착시킬 경우에도 일정기간의 배양이 필요하며, 방사능에 노출될 위험성과 장시간이 소요된다는 단점을 가지고 있다.

5-bromodeoxyuridine이나 5-iododeoxyuridine을 이용하는 방법[9]은 ^{3}H-thymidine을 이용하는 것보다 시간은 적게 걸리지만, 신선동결조직이 필요하고, 생체내나 생체외에서 부착시켜야 하는 복잡성이 있다. 반면 유식세포측정기에 의한 DNA ploidy나 합성기

세포 분획이 측정은 많은 세포를 분석할 수 있고 자료가 객관적이지만, 장비가 고가이며 조직처리과정에서 조직의 구조가 파괴되고 비종양세포가 함께 측정되는 단점을 가지고 있다[4,14]. Ki-67등을 이용해 면역조직화학적 방법으로 세포증식능을 측정하는 방법은 조직의 구조를 파괴시키지 않은 상태에서 양성반응을 관찰할 수 있지만, 신성동결조직을 이용해야 하는 단점을 가지고 있다[26].

최근에 알려진 PCNA는 Robbins등[19]에 의해 파라핀 절편에서도 면역조직화학적 검색이 가능함이 알려졌고, Garcia등[5]에 의해 합성기세포분획과 PCNA 반응도사이에 상관과계가 있음이 보고된 이후 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. cyclin이라 불리우는 PCNA는 진핵세포의 핵내에 존재하며, DNA polymerase delta의 보조단백으로 36kd의 분자량을 가진 핵단백질이다[5,6,11,16,18]. 이것은 세포주기중 G1기 후반부(late Gi phase)와 융합기(S phase)에 합성되며, 반감기는 약 20시간으로 활발한 증식을 보이는 세포에서 발현되며, 정상에서도 소장의 상피세포나 정원세포(Spermatogonia)와 같은 활발한 핵분열을 일으키는 세포에서 관찰된다. 그러나, 정상세포에서의 PCNA발현은 조직을 포르말린으로 고정하게 되면 약 72시간후에는 관찰할 수 없게 되어 암세포와 같은 세포분열이 왕성한 조직에만 염색되게 된다. 또한 Yu등[26]은 종양세포에 인접한 정상세포에서도 PCNA발현율이 높으며 이것은 종양으로부터 분리되는 성장인자의 영향일 것이라고 보고하였다. 결국 PCNA는 세포주기에서 중요한 역할을 하는 단백중 하나로 phosphorylation에 의해 다른 단백질의 합성을 조절하는 cdc2 kinase를 세포분열이 필요한 시기에 활성화시키는 작용을 가지고 있어 cell kinetics를 연구하는데 도움이 되며, 파라핀 절편에서 측정이 가능하고, 이에 따라 종양의 다른 예후인자와 연관지어 후향적 조사를 할 수 있어 종양의 생물학적 특성을 비교 검토할 수 있다.

결직장암 조직에서 PCNA에 대한 염색상은 미만성 또는 과립상으로 핵에 국한되어 관찰되었으며, 이것은 PCNA가 세포주기의 G1기 후기에서부터 S기에 걸쳐 세포핵내에 축적하여 DNA polymerase delta가 세포주기의 G1기 후기에서부터 S기에 걸쳐 세포핵내에 축적하여 DNA polymerase delta의 보조인자로 작용하는 핵단백질이라는 Hall등[10]의 보고를 뒷받침해 주는 소견이었다. 또한 염증성 점막, 선종 및 암종세포의 반응도가 정상점막에 비해 높았다는 Al-Sheneber[1]등의 보고와 마찬가지로 정상점막에서의 PCNA반응도가 종양세포에서의 반응도보다 낮아, 종양세포의 증식능이 정상점막에 비해 높다는 것을 보여주는 소견이었다.

본 연구에서 PCNA 반응도는 66.6±27.4%였으며, 이것은 Al-Sheneber등[1]의 24%, Mayer등[17]의 17.5%, 손등[23]의 43.4%보다 높게 나타났으며, 이렇게 다른 보고보다 높게 나타난 것은 면역조직화학적 염색법의 개선에 의한 것으로 추측되었다.

결직장암의 예후인자로는 환자의 연령, 종양의 크기, 국소침범정도, 림프절 전이여부, 혈관 및 신경조직침윤유무, DNA ploidy pattern, C-myc 암유전자의 발현, 조직학적 유형 및 병기등이 알려져 있는데[7,13,14,21,22,24], 본연구에서 이들과의 상관관계를 검색해본 결과 림프절전이가 동반된 경우, 진행된 병기, 점액성암종보다는 선암종에서 통계학적으로 의의있는 높은 PCNA반응도를 보여 세포증식능이 높을수록 빠른 성장을 하며, 이러한 경우에서 높은 전이능력을 가져 예후가 불량할 것으로 추측되었으며, 이는 Bauer등[4]의 보고와 유사하였다. Mayer등[17]은 PCNA발현이 생존율과는 inverse relationship을 가진다고 하였고, Al-Sheneber등[1]은 PCNA발현이 결직장암 환자에서 재발과 생존율을 예측할수 있는 하나의 독립된 지표로 이용될 수 있다고 하였으며, Kubouchi등[15]과 Willett등[25]은 결직장암환자의 조직에서 DNA ploidy pattern과 PCNA 반응도를 측정함으로써 술전 방사선요법에 대한 반응정도를 예측할 수 있다고 보고하였다.

결론적으로 PCNA에 대한 면역조직화학적 검색방법은 결직장암의 악성도를 평가할 수 있는 실질적이고 중요한 방법이며, 치료방법의 결정에도 많은 도움이 될것으로 생각되며, 향후 추적관찰을 통해 암종의 재발 및 생존율과의 상관관계에 대한 규명이 필요할 것으로 사료된다.

결 론

결직장암으로 진단받고 전남대학교병원 외과에서 수

술을 시행한 68명의 환자의 절제된 조직표본에서 PCNA 반응도를 조사하고, 그것의 임상적 의의에 관한 연구를 시행하였다. 68명의 결직장암 환자의 파라핀 포매괴에서 PCNA에 대한 단클론항체를 이용하여 면역조직화학적 방법으로 종양의 증식능을 평가하였다. PCNA 반응도는 종양세포 1,000개당 양성세포수의 비로 산정하였으며, PCNA 반응도와 다른 예후인자와의 상관관계를 비교분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 68명의 결직장암환자의 평균 PCNA 반응도는 66.6±27.4%였다.

2) PCNA 반응도와 성별, DNA ploidy pattern, 조직에서의 CEA 상태, MDR 유전자와 mutant p53 암유전자의 발현 및 종양의 위치등과는 상관관계가 없었다.

3) 전체적으로 선암종에서의 PCNA 반응도(67.2±27.0%)가 점액성암종(67.2±29.2%)보다 높게 나타났다.

4) PCNA 반응도는 c-myc 암유전자가 발현된 경우, 림프절 전이를 보인경우 및 진행된 병리일수록 높게 나타났다.

결론적으로 PCNA 반응도가 결직장암의 악성도를 알려주는 하나의 독립된 예후인자로의 사용 가능성을 시사해 주었으며, 향후 추적조사를 통해 재발 및 생존율과의 상관관계를 규명해야 할 것으로 사료되었다.

REFERENCES

1) Al-Sheneber IF, Shibata HR, Sampalis J, et al: *Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal cancer. Cancer 71 (6): 1954, 1993*

2) Astler VB, Coller FA: *The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. Ann Surg 139: 846, 1954*

3) Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al: *Chromosome 17 deletions and p53 gene mutaions in colorectal carcinoma. Science 244: 217, 1989*

4) Bauer KD, Lincoln ST, Vera-roman JN, et al: *Prognostic implications of proliferative activity and DNA anuploidy in colonic adenocarcinomas. Lab Invest 57: 329, 1987*

5) Bravo R, Bravo HM: *Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. J Cell Biol 105: 1549, 1987*

6) Bravo R, Frank R, Blundell PA, et al: *Cyclin/PCNA is the auxillary protein of DNA polymerase-delta. Nature 326: 515-517, 1987*

7) Chapius PH, Dent OF, Fisher R, et al: *A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer. Br J Surg 72: 698, 1985*

8) Garcia RL, Coltvera MD, Gown AM: *Analysis of proliferative grade using anti PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues: comparison with flow cytometric analysis. Am J Pathol 134: 733, 1989*

9) Gratzner HG: *Monoclonal antibody to 5-bromo-and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. Science 218: 474, 1982*

10) Hall PA, Levison DA, Woods AL, et al: *Proliferalting cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. J pathol 162: 285, 1990*

11) Jaskulski D, DeRiel JK, Mercer WE, et al: *Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin. Science 240: 1544, 1988*

12) Jass JR, Sobin LH: *Histological typing of intestinal tumors. WHO International Histological Classification of Tumors. 2nd ed. Berlin-New York, Springer-Verlag, 1989*

13) Kim YJ, Park CS: *Expression of cellular oncogenes in colorectal cancer: c-myc, c-erb B2, and c-Ha ras. JKCPS 9: 323, 1993*

14) Kokal W, Sheiban K, Terz J, et al: *Tumor DNA content in the prognosis of colorectal carcinoma. JAMA 255: 3123, 1986*

15) Kubouchi T, Kimura K, Nakajima A, et al: *DNA ploidy and proliferating cell nuclear antigen positivity rate as predictive indication of effectiveness of preoperative radiation. Japanese Journal of Cancer & Chemotherapy 21(suppl 1): 82, 1994*

16) Mathews MB, BErustein RM, Franza BR, et al: *Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. Nature 309: 374, 1984*

17) Mayer A, Takimoto M, Fritz E, et al: *The prognostic significance of proliferating cell nuclear an-*

tigen, epidermal growth factor receptor, and mdr gene expression in colorectal cancer. Cancer 71: 2454, 1993

18) Prelich G, Tan CK, Kostura M, et al: *Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-alpha auxillary protein. Nature 326: 517, 1987*

19) Robbins BA, De la Vega D, Ogata K, et al: *Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. Arch Pathol Lab Med 111: 841, 1987*

20) Rowley S, Newbold KM, Gearty J, et al: *Comparison of DNA ploidy and nuclear expressed p62 c-myc oncogene in the prognosis of colorectal cancer. World J Surg 14: 545, 1990*

21) Scott NA, Rainwater LM, Wieand HS, et al: *The relative prognostic value of flow cytometric DNA analysis and conventional clinicopathologic criteria in patients with operable rectal carcinoma. Dis Colon Rectum 30: 513, 1987*

22) Shepherd NA, Saraga EP, Love SB, et al: *Prognostic factors in colonic cancer. Histopathology 14: 613, 1989*

23) Son SU, Jung WS, Chang MS, et al: *Expression of mutant p53 and PCNA in colorectal carcinoma and adenoma. Korean Journal of Gastroenetrology 26: 647, 1994*

24) Steinberg SM, Barkin JS, Kaplan RS, et al: *Prognostic indicators of colon tumors: The gastrointestinal tumor study group experience. Cancer 57: 1866, 1986*

25) Willett CG, Warland G, Cheek R, et al: *Proliferating cell nuclear antigen and mitotic activity in rectal cancer: Predictor of response to preoperative irradiation. Journal of Clinical Oncology 12: 679, 1994*

26) Yu CCW, Woods AL, Levison DA: *The assessment of cellular proliferation by immunohistochemistry: A review of currently available methods and their application. Histochem J 24: 121, 1992*