

대장 직장암에서 예후인자와 p53과 PCNA 발현양상과의 비교

순천향대학교 의과대학 외과학교실 및 병리학교실*

강종철 · 정성필 · 허경열 · 이문수
김형철 · 송옥평 · 김창진*

= Abstract =

Prognostic Value of p53 and Proliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA) in Colorectal Cancer

Jong Chul Kang, M.D., Sung Pil Jung, M.D., Kyung Yul Hur, M.D., Moon Soo Lee, M.D.
Hyung Chul Kim, M.D., Ok Pyung Song, M.D. and Chang Jin Kim, M.D.

Department of Surgery and Pathology, Soonchunhyang University College of Medicine*

Tumor development appears to arise as a result of the mutational activation of oncogenes and/or the mutational inactivation of tumor suppressor genes. It is that several genes were associated with colorectal tumorigenesis. Among these genes, p53 gene is located on the short arm of chromosome 17. Alteration of p53 gene may be associated with prognosis of colorectal cancer. There is a strong link between colonic proliferative rate and colon cancer risk. Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) has been thought to be a marker of cell proliferation, which appears in the cell nuclei during specific phase of the cell cycle. PCNA and p53 protein were detected in paraffin-embedded tissue from 48 colorectal carcinoma by immunohistochemical method and expression of PCNA and p53 protein were compared with clinicopathologic finding. The results were summarized as follows.

Below 60 years old age, p53 was expressed in 72.7%(16/22, $P < 0.05$). The p53 expression was increased in cases of poorly differentiation and left colon cancer. PCNA was expressed strongly in 66.7%(32/48) and expressed weakly in 33.3%(16/48). High grade of PCNA was increased in moderately differentiated carcinoma and left colon cancer. The p53 expression tended to be associated with age, but p53 and PCNA expression did not correlate with other prognostic factors.

Key Words: Colorectal cancer, p53, PCNA

서 론

최근 암 발생의 원인을 규명하는데 있어 유전자와의 관계에 많은 관심이 집중되고 있다. 암 발생은 여러

단계를 거쳐 이루어지게 되는데 대장 및 직장암에서도 예외라 할 수는 없다. 대장의 정상상피세포에서 선종(Adenoma) 그리고 선암(Aenocarcinoma)으로 발전되는 과정에 여러 유전자가 관여하게 되며, 대장 및 직장암은 이런 과정을 관찰할 수 있는 좋은 대상이 되

었다^{1,5,24,26,34}). 대장의 암성화 과정(Tumorigenesis)은 여러 암 유전자(Oncogene)와 암 억제유전자(Tumor suppressor gene)가 관여하게 되며, 이런 유전자에서 돌연변이(Mutation)나 결손(Deletion) 등이 일어나 암이 발생하게 된다³⁴). 17번 염색체의 단완에 위치한 p53유전자의 변형으로 생성되는 단백질 발현은 대장의 암성화 과정중 후기에 관여하고²⁶), 예후와도 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다^{23,27,28}). 그리고 대장세포의 증식율은 대장암 유발과 상당한 연관이 있고, PCNA(Proliferating Cell Nuclear Antigen)는 세포주기의 특정한 시기에 출현하여 세포 증식능을 나타내는 표지자(Marker)로 알려져 있다³⁶). p53과 PCNA는 단클론 항체를 이용하여 쉽게 발현양상을 관찰할 수 있다^{3,6,20,29}).

저자들은 대장직장암에서 17p의 p53유전자의 변형으로 생성된 p53단백과 PCNA의 발현양상이 기존의 임상 및 병리학적 예후인자와 비교하여 측정지표로 가치가 있는지를 연구하기 위하여 역행적으로 자료를 수집하여 조사하였다.

대상 및 방법

1) 대상

1993년 1월부터 1994년 12월까지 만 2년동안 순천향대학 천안병원에 입원하여 대장 및 직장암으로 진단 받고 근치적 절제술을 시행한 환자중 병력기록 및 파라핀 포매체의 보존상태가 양호한 대장 및 직장암 48예를 대상으로 하였다.

2) 방법

파라핀 포매 조직을 5 μ m 두께의 조직절편으로 만들어 Xylene과 알코올에 처리하고 증류수로 함수시킨 후 0.1M의 phosphate buffered saline(PBS, pH 4)으로 5분간 3회씩 세척하였다. 1차 및 2차 항체에 대한 비 특이적 결합을 억제시키기 위해 protein blocking agent(Bio Genex, U.S.A)에 20분 작용시킨 후 여분의 용액을 제거하였다. 1차 항체인 p53(Bio Genex, U.S.A)을 PBS로 80배 희석하여 Humidity chamber내에 있는 각각의 조직절편에 가하여 8시간동안 4 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 그후에 PBS로 3회에 걸쳐 세척한 후 biotin이 부착된 Antimouse

Goat항체(Bio Genex, U.S.A)를 작용시켜 실온에서 30분간 부란(incubation)하였고, 다시 PBS로 세척 후 alkaline phosphatase가 부착된 streptavidin(Bio Genex, U.S.A)과 실온에서 30분간 작용시켰다. 그후 PBS로 역시 3회 세척후 New Fuchsin으로 발색하였다. 발색된 슬라이드는 Mayer's hematoxylin으로 대조염색하였고 이를 탈수하여 Xylene으로 투명화시킨후 glycerol gelatin으로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다. 또한 이와 동일한 방법으로 1차 항체(Bio Genex, U.S.A)를 PBS로 160배 희석하여 염색한 후 PCNA 발현을 관찰하여 그 결과를 비교하였다.

3) 성적평가방법

면역조직화학적 방법으로 염색된 조직표본을 광학현미경으로 p53 단백을 관찰하여 세포핵에 갈색과립을 보이는 세포가 있으면 양성으로, 없으면 음성으로 판정하였다. PCNA 발현평가는 400배의 고배율하에서 3부위를 검사하여 관찰된 세포중에 포함된 발현세포의 비가 50% 이상을 차지하는 경우를 PCNA 고 발현군(high grade), 50% 이하를 차지하는 경우를 PCNA 저 발현군(low grade)으로 분류하였다.

4) 통계 검증

p53단백과 PCNA의 발현을 환자의 나이, 세포 분화도, 병변의 위치, 수술전 혈중 CEA값, 임파절 전이에 따라 각각 비교 분석하기 위해 Chi-square 검사를 이용하였다.

결 과

대장 및 직장암 환자 48예중 남자 27예(56.25%), 여자 21예(43.75%)이었고, 나이분포는 32세에서 88세로 평균연령은 60.1 \pm 12.1세이었다. p53발현 양성은 23예(47.92%), 음성은 25예(52.1%)이었다. PCNA 발현은 50%를 기준으로 하여 고 발현이 32예(66.67%), 저 발현이 16예(33.33%)로 관찰되었다(Table 1).

1) 환자의 나이와 p53, PCNA발현

60세 이하가 22예(45.8%), 61세 이상이 26예(54.2

Table 1. Characteristics of patients

Parameter	Class	Number(%)
Sex	Male	27(56.3)
	Female	21(43.7)
Age	below 60	22(45.8)
	above 61	26(54.2)
Histological cell differentiation	Well	15(31.3)
	Moderate	27(56.2)
	Poorly	6(12.5)
Anatomical site	Left colon	37(77.1)
	Right colon	11(22.9)
Lymph node metastasis	Positive	29(60.4)
	Negative	19(39.6)
Preoperative CEA	<5	25(52.1)
	≥5	23(47.9)
p53 expression	Positive	23(47.9)
	Negative	25(52.1)
PCNA expression	High grade	32(66.7)
	Low grade	16(33.3)

)이었다. 60세 이하의 군에서 p53발현이 16예(72.7%)로 60세 이하의 군에서 p53 발현이 많았으며, 61세 이상의 군에서 p53 발현 양성이 7예(26.9%)로 p53과 나이와는 통계학적 유의성을 관찰할 수 있었다 ($P < 0.05$). 나이에 따른 PCNA 발현은 고 발현군과 저 발현군에서 비슷한 분포를 보여 주었고, 통계학적 유의성은 없었다(Table 2).

2) 조직학적 세포 분화도와 p53, PCNA 발현

대장 및 직장암의 조직학적 세포분화 정도는 분화암(Well differentiation)이 15예(31.3%), 중분화암(Moderately differentiation)이 27예(56.2%), 미분화암(Poorly differentiation)이 6예(12.5%)로 관찰되었다. 세포 분화도가 좋을수록 p53 발현이 감소하고 양상을 보여주었으나, 통계학적 유의성은 없었다. PCNA의 경우는 분화암과 중분화암에서 고 발현군이 29예(69.0%)로 관찰되었으며, 특히 중분화암에서 PCNA의 고 발현군이 증가된 것을 관찰할 수 있었으나(21예, 77.8%), 통계학적 유의성은 없었다(Table 3).

Table 2. Correlation between age and p53, PCNA expression

Age	p53		PCNA	
	Positive(%)	Negative(%)	High grade(%)	Low grade(%)
below 60	16(72.7)	6(27.3)	14(63.6)	8(36.4)
above 61	7(26.9)	19(73.1)	18(69.2)	8(30.8)
P value	< 0.05		Not significant	

Table 3. Correlation between histologic cell differentiation and p53, PCNA expression

Cell differentiation	p53		PCNA	
	Positive(%)	Negative(%)	High grade(%)	Low grade(%)
Well	4(26.7)	11(73.3)	8(53.3)	7(46.7)
Moderate	15(55.6)	12(44.4)	21(77.8)	6(22.2)
Poorly	4(66.7)	2(33.3)	3(50.0)	3(50.0)
P value	Not significant		Not significant	

3) 해부학적 위치와 p53, PCNA 발현

대장 및 직장암의 해부학적 위치를 보면, 상행 결장암에서 8예(16.7%), 횡행 결장암 3예(6.3%), 하행 결장암 4예(8.3%), S자 결장암 12예(25.0%), 직장암 21예(43.8%)로 관찰되었다. p53 발현은 하행 결장암 3예(75.0%)에서 발현율의 증가를 보이나 통계학적 유의성은 없었다. PCNA 고발현군은 하행 결장암 4예(100%), S자 결장 8예(66.7%), 직장암 14예(66.7%)로 발현빈도가 높았으나 통계적 유의성은 없었다 (Table 4).

4) 임파절 전이와 p53, PCNA 발현

대장 및 직장암에서 임파절 전이가 있는 경우가 29예(60.4%), 없는 경우가 19예(39.6%)로 관찰되었다. p53 발현 양성은 임파절 전이가 있는 경우가 14예(48.3%), 없는 경우가 9예(47.4%)로 관찰되었고, PCNA 고발현은 임파절 전이가 있는 경우가 18예(62.1%), 없는 경우가 14예(73.7%)로 관찰되었다. 임파절 전이와 p53, PCNA 발현의 통계적 유의성은 없었다 (Table 5).

Table 4. Correlation between anatomical site and p53, PCNA expression

Anatomical site	p53		PCNA	
	Positive(%)	Negative(%)	High grade(%)	Low grade(%)
Ascending	2(25.0)	6(75.0)	4(50.0)	4(50.0)
Transverse	2(66.7)	1(33.3)	2(66.7)	1(33.3)
Descending	3(75.0)	1(25.0)	4(100)	0(0.0)
Sigmoid	5(41.7)	7(58.3)	8(66.7)	4(33.3)
Rectum	11(52.4)	10(47.6)	14(66.7)	7(33.3)
P value	Not significant		Not significant	

Table 5. Correlation between lymph node metastasis and p53, PCNA expression

Lymph node metastasis	p53		PCNA	
	Positive(%)	Negative(%)	High grade(%)	Low grade(%)
Positive	14(48.3)	15(51.7)	18(62.1)	11(37.9)
Negative	9(47.4)	10(52.6)	14(73.7)	5(26.3)
P value	Not significant		Not significant	

Table 6. Correlation between CEA and p53, PCNA expression

Preoperative CEA	p53		PCNA	
	Positive(%)	Negative(%)	High grade(%)	Low grade(%)
CEA < 5	12(48.0)	13(52.0)	15(60.0)	10(40.0)
CEA ≥ 5	11(47.8)	12(52.2)	17(73.9)	6(26.1)
P value	Not significant		Not significant	

5) 술전 CEA와 p53, PCNA 발현

대장 및 직장암의 술전 CEA값이 5 미만인 경우가 25예(52.1%)이었고, 5 이상인 경우가 23예(47.9%)이었다. p53 발현 양상은 CEA값이 5 이상에서 11예(47.8%), 5 미만에서 12예(48.0%)로 관찰되었고, PCNA 고발현은 CEA값이 5 이상에서 17예(73.9%), 5 미만에서 15예(16.0%)로 관찰되었다. CEA와 p53, PCNA 발현의 통계적 유의성은 발견할 수 없었다(Table 6).

고 찰

암의 발생은 암 유전자의 활성화 또는 종양 억제유전자의 비활성화에 의해 거의 모든 종양이 유발된다고 생각된다^{1,8,34}. 이전의 여러 보고에서는 각각의 종양에 하나의 특징적인 염색체의 결손을 강조하였으나, 암성화 과정은 여러 단계의 과정을 거쳐 암이 발생된다고 생각되며^{1,8,24}, 최근 분자생물학의 발달로 이를 확인할 수 있었다³. 대장 및 직장암은 적어도 두 개 이상의 염색체 이상이 관여한다고 하며³⁴, 최소 4~5개의 유전자가 관여한다는 보고도 있다³. 대장 및 직장의 암성화 과정은 정상대장 상피세포에서 DNA 합성의 변화로 시작하여 선종(adenoma), 선암(adenocarcinoma) 그리고 결국은 침투성 암(invasive carcinoma)으로 암이 발생하게 된다¹. 암성화 과정의 초기에 DNA의 hypomethylation, 5q 결손, MCC(Mutated in colorectal cancer)와 APC(Adenomatous polyposis coli gene)의 돌연변이가 관찰되고²⁶, 후기에는 18q의 DCC(deleted in colorectal carcinoma gene), 17p의 p53부위에서 결손(deletion)이 발견된다고 보고한 연구가 있다³⁵. 대장직장에서 K-ras 돌연변이, 5q, 17p, 18q의 결손에 관한 연구에서 K-ras 돌연변이와 5q 결손은 예후와 관계가 없고, 17p와 18q의 결손은 예후와 밀접한 관계가 있다고 한다^{21,27}. 17번 염색체의 단완에 위치하고 있는 p53 유전자는 10여년 전에 발견되었다¹⁸. 정상적인 상태의 p53 단백질은 소량일 뿐 아니라 생화학적으로 불안정하여 잘 검출되지 않으며 암세포와 같이 변성된 세포를 세포성장주기의 G1기에서 정지하게 하여 세포성장을 억제한다^{13,27}. 돌연변이형 p53단백은 양도 증가되어

있고 안정되어 단크론 항체를 이용하여 면역조직화학적 방법으로 쉽게 염색하여 발현상태를 관찰할 수 있다^{3,6,20}. p53단백의 발현은 암세포의 핵에서 갈색과립으로 염색되어 발견되고 정상적인 점막에서는 발견이 안된다. 이러한 사실로부터 종양발생의 간접적 지표로 사용할 수 있다^{26,27}. 최근 대장 및 직장암에서 p53 발현이 42%³²에서 55%²⁷로 보고되고 있고, 유방암³³, 폐암¹⁰, 위암¹¹, 방광암⁷, 식도암 및 난소암 등에서도 발현된다. 저자들이 얻은 수치는 47.9%로 기존의 보고^{27,32}와 유사하였다. p53 과다발현이 예후와 밀접한 관련이 있다는 보고²⁷와 기존의 예후인자(나이, 분화도, 병기, DNA ploidy 등)와 관련이 없다는 보고가 있다^{21,25}. Scott 등²⁷, Bell 등⁴, Remvicos 등²²은 위치에 따라 p53 발현의 차이가 있었는데 우측(상행 및 횡행 결장)보다 좌측(하행 및 S자 결장과 직장)에서 p53 발현이 높다고 하였다. Colin 등²¹은 우측과 좌측 대장에서 p53의 발현은 차이가 없다고 보고하였다. 저자들의 결과에서는 대장 및 직장암에서 나이가 적은 군(60세 이하)의 p53 발현이 증가한 것을 관찰할 수 있었고($p < 0.05$), 횡행과 하행 결장 그리고 직장에서 p53 발현이 높았다. 이는 Colin 등²¹의 주장과 같이 우측과 좌측의 종물이 생물학적으로 구분이 된다고 믿을 수 있었다. 돌연변이 p53 유전자가 빠른 증식과 낮은 분화도를 보이는 종양에서 발현되어 예후에 나쁘게 작용한다고 하였으나^{4,14,16,21,33,36}, Scott 등^{26,27}, Stanley 등²¹은 p53과 세포 분화도에서 유의한 차이가 없다고 보고하였다. 저자들의 보고에서는 세포 분화도가 좋을수록 p53 발현이 감소하는 양상을 보였으나, 통계학적 유의한 차이는 보이지 않았다. 병기가 p53 발현과 연관이 있다는 보고²⁸와 없다는 보고^{4,21,22,25,27}가 있다. 저자들의 보고에서는 임파절 전이와 p53 발현과 무관하였고 술전 CEA 값과도 무관하였다.

최근 세포주기와 관련된 또 다른 핵 단백질인 PCNA에 관한 연구결과들이 1984년 이후 보고되기 시작하였다¹⁵. PCNA는 세포주기중 S기 후기부터 G2기에 걸쳐서 분열중인 세포내의 핵에서 합성되는 36kD(kilodalton)의 핵 단백질로서 DNA 복제와 세포증식에 필요한 DNA polymerase δ (Delta)의 보조 단백질이다^{5,9,12}. PCNA는 세포의 증식능을 이해하는데 도움을 주는 표식자로서 생물학적 특정상 종양에서 부가적 예후판정 척도로 알려져 있으며^{5,9,12,19,36},

단크론 항체를 이용하여 면역조직화학적 방법으로 간단하고 저렴하게 검사가 가능하다²⁹⁾. Onno 등¹⁹⁾은 나이가 적을수록 발현이 증가한다고 하였으나, 저자들의 조사에서는 나이와 PCNA 발현과의 상관성을 관찰할 수 없었다. Tanaka 등³⁰⁾은 점막하층을 침범한 대장 및 직장암에서 임파절 전이가 있을 때, 세포 분화도가 낮을 때 PCNA 발현율이 더 높았다고 보고하였다. Teixeira 등³¹⁾은 임파절 전이가 있을 때, 간 전이가 있을 때, 그리고 세포 분화도가 낮을수록 침범암의 변연(Invasive cancer margin)에서의 PCNA 발현율이 높게 나타난다고 하였다. Al-Sheneber 등²⁾은 Duke 병기와 PCNA 발현율과는 연관이 없지만, 재발과 나쁜 생존율의 독립적인 예견자로 유용하다고 보고하였다. 저자들은 세포 분화도에서 분화암과 중분화암에서 PCNA 고발현군의 빈도가 높았고, 특히 중분화암에서 높게 관찰되었으나, 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. 해부학적 위치상에서 p53의 발현과 유사하게 하행 결장, S자 결장과 직장에서 고 발현군의 발현빈도가 높았으나 통계적 유의성은 없었다. 임파절 전이와 술전 CEA값에서도 통계적 유의성을 관찰할 수 없었다. 돌연변이 p53의 발현정도와 PCNA의 발현간의 상호연관성에 대한 보고로, Mereer 등¹⁷⁾은 p53 종양억제유전자에 의해 PCNA 발현이 억제된다고 보고하였으나, 저자들의 결과에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. 저자들의 보고에서 대장 및 직장암 환자의 추적 관찰기간이 충분치 못하여 재발이나 생존율에 대한 조사는 이루어지지 않았지만 기존의 보고와 같이 p53과 PCNA 발현이 재발이나 생존율과 연관이 있을 것으로 생각되며 아직도 논란이 많은 상태로 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

p53과 PCNA(proliferating cell nuclear antigen)가 대장 및 직장암의 기존 예후인자와 상관성이 있는지를 알아보기 위해 1993년 1월부터 1994년 12월까지 만 2년동안 순천향대학교 천안병원에 입원하여 대장직장암으로 수술받은 환자 48예를 대상으로 파라핀 포매괴를 이용하여 p53과 PCNA를 면역조직화학적 방법으로 검출하여 이를 기존의 대장 및 직장암의 예후인자중 나이, 성별, 세포 분화도, 임파절 전이, 술

전 CEA값과 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다. p53 발현은 23예(47.9%)이었고 60세 이하에서 16예(72.7%, P<0.05)이었다. 세포 분화도가 나쁠수록 그리고 좌측 대장암에서 p53 발현이 증가하였다. PCNA는 고발현이 32예(66.7%), 저발현이 16예(33.3%)이었다. 중분화암에서 그리고 좌측 대장암에서 PCNA 고발현율의 빈도가 증가하였다.

이상의 결과로 볼 때, p53은 나이와 상관성을 가지나, p53과 PCNA는 그 밖의 예후인자와 특별한 상관성이 없는 것으로 관찰되었으며, 임상 예후인자와의 관련성에 대한 연구가 향후 계속적이고 광범위한 추적 관찰을 통해 규명되어야 할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Alexander RJ, Buxbaum JN, Raicht RF: *Oncogene alterations in primary human colon tumors. Gastroenterology* 91: 1503, 1986
- 2) Al-Sheneber IF, Shibata HR, Sanpali J, et al: *Prognostic significance of PCNA expression in colorectal cancer. Cancer* 71(6): 1954, 1993
- 3) Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, et al: *Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild type p53. Science* 249: 912, 1990
- 4) Bell SM, Scott N, Cross D, et al: *Prognostic value of p53 over-expression and c-ki-ras gene mutation in colorectal cancer. Gastroenterology* 104: 57, 1993
- 5) Bravo R, Frank R, Blundell PA, et al: *Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-δ. Nature* 326: 515, 1987
- 6) Cattoretti G, Rilke F, Andreola S, et al: *p53 expression in breast cancer. Int J Cancer* 41: 178, 1988
- 7) Esrig D, Spruck CH, Nichols PW, et al: *p53 nuclear protein accumulation correlates with mutation in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. Am J Pathol* 143: 1389, 1993
- 8) Fearon ER, Vogelstein B: *A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell* 61: 759, 1990
- 9) Hall PA, Levison DA, Woods AL, et al: *PCNA immunolocalization in Paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulation expression in some neoplasms. J Pathol* 162: 285, 1990

- 10) Iggo R, Gatter K, Bartek J, et al: *Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. Lancet* 335: 675, 1990
- 11) Imazeki F, Omata M, Nose H, et al: *p53 gene mutations in gastric and esophageal cancers. Gastroenterology* 103: 892, 1992
- 12) Inoue T, Yamane T, Park Keunsik, et al: *Evaluation of proliferating cell in acute leukemia with antibody to PCNA and ki-67 monoclonal antibodies. Arch Pathol Lab Med* 117: 969, 1993
- 13) Levine AJ, Momand J, Finlay CA: *The p53 tumor suppression gene. Nature* 351: 453, 1991
- 14) Massimo P, Gordo WH: *Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in colorectal adenoma. Br J Cancer* 50: 683, 1992
- 15) Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR, et al: *Identify of the proliferating nuclear antigen and cyclin. Nature* 309: 374, 1984
- 16) Mcdermott FT, Hughes ESR, Phil E, et al: *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
- 17) Mereer WE, Shields MT, Lin D, et al: *Growth suppression induced by wild type p53 protein is accompanied by selective down regulation of PCNA expression. Proc Natl Acad Sci* 88: 1958, 1991
- 18) Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al: *Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. Nature* 342: 705, 1989
- 19) Onno T, Mark va Blankenstein: *Abnormal pattern of cell proliferation in the entire colonic mucosa of patients with clon adenoma or cancer. Gastroenterology* 92: 704, 1987
- 20) Ostrowski JL, Sawan A, Henly L, et al: *p53 expression in hyman breast cancer related to survival and prognostic factors: on immunohistochemical study. J Pathol* 164: 75, 1991
- 21) Purdie CA, O'Grady J, Piris J, et al: *p53 expression in colorectal tumors. Am J Pathol* 138: 807, 1991
- 22) Remvikos Y, Laurent P, Salmon RJ, et al: *Simultaneous monitoring of p53 protein and DNA content of colorectal adenocarcinomas by flow cytometry. Int J Cancer* 45: 450, 1990
- 23) Richard H, Pierre L, Sylviane O, et al: *Association of p53 mutation with short survival in colorectal cancer. Gastroenterology* 106: 42, 1994
- 24) Robert A Weinberg: *Oncogenes, antioncogenes and the molecular bases of multistep carcinogenesis. Cancer Research* 49: 3713, 1989
- 25) Rodrigues NR, Rowan A, Smith MEF, et al: *p53 mutations in colorectal cancer. Proc Natl Acad Sci* 87: 7555, 1990
- 26) Scott N, Bell SM, Sagar P, et al: *p53 expression and k-ras mutation in colorectal adenomas. Gut* 34: 621, 1993
- 27) Scott N, Sagar P, STewart J, et al: *p53 in colorectal cancer: clinicopathologic correlation and prognostic significance. Br J Cancer* 63: 317, 1991
- 28) Stanley R, Hamilton SR: *Molecular genetic alteration as potential prognostic indicators in colorectal carcinoma. Cancer Supple* 69: 197, 1992
- 29) Start RD, Cross SS, Clelland C, et al: *Delay in fixation does not affect the immunoreactivity of PCNA. J Pathol* 168: 197, 1992
- 30) Tanaka S, Haruma K, Tatsuta S, et al: *PCNA expression correlates with the metastatic potential of submucosal invasive colorectal carcinoma. Oncology* 52(2): 134, 1995
- 31) Teixeira CR, Tanaka S, Haruma K, et al: *PCNA expression at the invasive tumor margin predicts malignant potential of colorectal carcinomas. Cancer* 73(9): 575, 1994
- 32) Van Dan Berg FM, Tigges AJ, Schipper MEI, et al: *Expression of nuclear oncogene p53 in colon tumors. Am J Pthol* 157: 193, 1989
- 33) Visscher DW, Sarkar FH, Wykes S, et al: *Clinicopathologic significance of p53 immunostaining in adenocarcinoma of the breast. Arch Pathol Lab Med* 117: 973, 1993
- 34) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al: *Genetic alterations during colorectal tumor development. N Engl J Med* 319: 525, 1988
- 35) Weinberg RA: *The action of oncogenes in the cytoplasm and nuclear. Science* 230: 70, 1985
- 36) Yamada K, Yoshitake K, Sato M, et al: *PCNA expression in normal preneoplastic & neoplastic colonic epithelium of the rat. Gastroenterology* 103: 160, 1992