

인체대장암에서의 Cyclin 유전자의 발현

계명대학교 의과대학 미생물학교실¹, 가정의학교실², 면역학교실³, 외과학교실⁴, 의과학연구소⁵

백원기^{1,5} · 문성희² · 서성일^{1,5} · 박종욱^{3,5}
배 옥 석^{4,5} · 최 병 길^{3,5} · 서 민 호^{1,5}

= Abstract =

Expression of Cyclin Genes in Colorectal Carcinomas

Won-Ki Baek, M.D.^{1,5}, Seong-Hee Moon, M.D.², Seong-Il Suh, M.D.^{1,5}
Jong-Wook Park, M.D.^{3,5}, Ok-Suk Bae, M.D.^{4,5}, Byung-Kil Choi, M.D.^{3,5}
and Min-Ho Suh, M.D.^{1,5}

*Departments of Microbiology¹, Family Medicine², Immunology³, General Surgery⁴,
and Institute for Medical Science⁵*

A fundamental cause of cancer is changed properties of genetic material, which may deregulate normal development of the tissue or provide selective growth advantage to the tumor cell. This deregulation of cell proliferation results from altered production of a handful of proteins that play key roles in progression through the eucaryotic cell cycle. Cyclins are prime cell cycle regulators and are central to the control of major check points in eucaryotic cells. Cyclins were first identified in marine invertebrates on the basis of their dramatic cell cycle periodicity during meiotic and early mitotic divisions. More than 30 cyclins sequences are now available for comparison. Cyclins function by forming a complex with and activating a family of cyclin-dependent protein kinases(CDKs), at various stages in the cell cycle. They fall into three categories: A-type, B-type, and G1 cyclins (cyclins C, D1-D3, and E).

In this study, the abundance of cyclins(A, B, C, D1, E) mRNA expression in normal colon(n=6), primary(n=6) and metastatic(n=1) colorectal carcinomas, and 3 colon cancer cell lines were investigated by RT-PCR method. Expression of examined cyclin genes(A, B, C, D1 and E) were increased in all cancer tissues and cell lines. Gene expression of cyclin D1 in 1 cancer tissue and its metastatic cancer tissue, and cyclin E in cell lines(C2A, HT-29) were remarkably increased.

Key Words: Colorectal cancer, Cyclin, RT-PCR

서 론

암은 조직침습성과 전이성 등의 여러가지 세포표현

형의 변화를 동반하는 비조절적 세포 증식으로 규명할 수 있으며, 세포의 비조절적 증식은 여러가지 암유전자(protooncogene), 항암유전자(tumor suppressor gene)들의 변화에 기인한다고 알려져 있다. 암유

전자의 산물은 대부분이 세포성장과 분열을 유도하는 성장인자(growth factor), 성장인자 수용체(growth factor receptor), 세포내 신호전달계(intracellular signalling pathway) 또는 전사조절에 관여하는 각종 인자들로서, 유전자의 증폭, 재배열, 돌연변이 등으로 인한 구조의 변화나, 양적인 증가가 일어남으로서 비조절적인 세포분열 및 증식을 야기하여 발암과정에 관여한다¹⁴⁾. p53 유전자나 Rb 유전자등의 항암 유전자는 세포분열을 억제하는 기능을 가진 유전자로서 유전자의 돌연변이나 결실이 일어나면 암의 발생을 유도한다⁵⁾. 암의 발생은 대부분 이러한 암유전자나 항암유전자의 변화가 단계적으로, 복합적으로 관련되는 다단계암화과정(multistep carcinogenesis)으로 이루어진다고 알려져 있다⁵⁾.

세포의 분열은 G1, S, G2, M phase로 구성되는 일련의 과정 즉 세포주기를 거쳐 이루어지며 최근 이러한 세포분열주기를 조절하는 유전자들이 밝혀지고 있다. cyclins과 cyclin dependent kinases(CDKs)는 최근 밝혀진 세포분열주기 조절 인자들로서, cyclin은 세포분열주기의 각 주기에서 발현이 특이적으로 증가했다가 감소하며 cdk들과 결합하여 세포주기조절에 관여하는 것으로 알려졌다. 인체세포의 cyclin들은 A type, B type, G1 cyclins(C, D1-D3, E) 등이 밝혀져 있다¹⁶⁾. cyclin A는 DNA 합성 시작 직전부터 출현하여 prophase까지 증가하다가 metaphase에 소멸되며, CDK2와 결합한다. cyclin B은 S phase 후반부터 증가하기 시작하여 metaphase에 갑자기 소멸되며 CDK2와 결합하고, cyclin C는 G1 phase 중반부에서 발현된다고 알려져 있다. D type cyclin은 D1-D3가 있으며 이 중 D1은 G1 phase 후반부에 가장 발현이 증가하며 CDK2, CDK4, CDK5와 결합하여 G1-S 전이에 관련된다고 생각되고 있다. cyclin E는 G1 phase 중반부터 증가하여 G1 phase후반/S phase초반에서 가장 많은 발현이 이루어지며 CDK2와 결합하는 것으로 알려져 있다²¹⁾.

이러한 cyclin들과 암화과정의 관련성은 여러가지 측면에서 연구되고 있다^{1,7-9,18,20)}. 현재 많은 암유전자들이 성장인자(growth factor)와 cell cycle을 연결하여 세포분열기전을 자극하는 신호전달계의 구성원으로 밝혀졌으며, 항암유전자들은 세포주기조절기전을

동하여 세포분열을 억제함으로써 발암을 억제한다고 밝혀지고 있다¹⁹⁾. 또한 특히 몇 종류의 암에서는 cyclin 유전자의 구조적 변화나 과발현이 암화와 관련이 있는 것으로 밝혀져 현재 cyclin을 암유전자로 보고 있기도 하다. 이러한 예로서는 간암, 부갑상선선종(parathyroid adenoma), 유방암 등을 들 수 있다. 간암에서는 Hepatitis B virus가 chromosome의 cyclin A 유전자 부위에 integration되어 있음을 보고한 예가 있으며²⁶⁾, parathyroid adenoma에서는 유전자재배열에 의해 parathyroid hormone 유전자(PTH gene)와 연결되어 암을 유발한다고 알려졌던 PRAD1(parathyroid adenoma 1 gene) 유전자가 cyclin D1 유전자임이 밝혀졌다²²⁾. 유방암에서는 cyclin E 유전자의 증폭과 발현증가가 발암과 관계가 있음이 보고되어 있다^{12,13,24)}.

저자들은 대장암에서 cyclin 유전자들의 발현이상을 조사하기 위하여 대장암환자에서 분리한 대장암 조직과 배양된 대장암 세포주에서 RNA를 분리하여 RT(Reverse Transcription)-PCR(Polymerase Chain Reaction) 방법으로 cyclin mRNA의 반정량적 분석을 시행하였다.

대상 및 방법

1) 대장암 세포주 및 조직

계명대학교 동산의료원에서 수술중 적출된 정상대장 조직 및 대장암조직 6예와 전이암조직 1예를 액체질소에 보관하면서 사용하였으며, 세포주는 한국세포주은행에서 분양받은 HT-29, SNU-C1, SNU-C2A를 사용하였다.

2) RNA 분리

조직은 100 mg에 RNazol B(Biotechx laboratories, Inc.)를 2 ml 넣고 homogenizer로 15,000 rpm에서 3분 정도 조직을 파쇄시키고, 세포주는 3.5 cm petri dish당 1 ml의 RNazol B를 넣고 3~4번 피펫을 통과시킨 후, 세포 용해액 2 ml당 0.2 ml의 chloroform을 넣고 15 초간 잘 혼합하고 4°C에 5분간 두었다. 이것을 12,000 rpm, 4°C로 15분 원심하여 상층액을 새 tube로 옮긴 후 동량의 2-propanol을 넣고 -70°C에 2시간 방치하였다. 이를

12,000 rpm에서 4°C로 15분 원심하여 RNA 침사를 얻은 후 75% cold ethanol로 세척하고 Speedvac concentrator(Savant Co, U.S.A.)에서 5분간 건조시킨 다음 여기에 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 처리된 증류수 100 μ l를 넣어 녹인후 UV spectrophotometer로 농도 및 순도를 측정하고 -70°C에 보관하였다³⁾.

3) cDNA 합성

분리된 RNA 2 μ g을 oligo dT(16mer)를 사용하여 40 μ l 용량으로 역전사(reverse transcription)를 시행하였다. 반응혼합액의 조성은 RNA 2 μ g, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 1 mM dATP, 1mM dTTP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 1 U/ μ l RNase inhibitor(Perkin-Elmer Corporation), 2.5 U/ μ l MuLV reverse transcriptase(Perkin-Elmer Corporation), 2.5 μ M oligo d(T)₁₆로, 반응 조건은 42°C 1시간, 99°C 5분, 5°C 5분으로 하였다.

4) mRNA의 반정량적 분석을 위한 PCR

PCR은 10X reaction buffer(15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl) 5 μ l와 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP 각 1 μ l씩, 0.25 μ Ci의 alpha-³²P dCTP 그리고 30 μ M sense 및 antisense primer(Table 1)를 각각 1 μ l를 넣은 mixture에 1 μ l의 반응시킨 cDNA reaction mixture와 2.5 unit의 Taq polymerase(Perkin Elmer corporation)를 넣은 후 증류수로 50 μ l로 용량을 맞추고 30 μ l의 mineral oil을 증충한 후 DNA thermal cycler(Perkin Elmer corporation)를 사용하여 PCR을 시행하였다. DNA denaturation은 95°C 1분, annealing은 60°C 1분, extension은 72°C 2분으로 하여 GAPDH 유전자 증폭을 위해서는 22 cycle, cyclin A, B, C, D1, E 유전자들의 증폭을 위해서는 28 cycle을 시행하였다.

5) 전기영동 및 Autoradiography

증폭된 PCR 산물 10 μ l를 5% polyacrylamide gel에 전기영동한 후 x-ray film에 15시간 감광시킨

후 현상하였다. 현상된 film의 band는 GS300 scanning densitometer(Hoefer Scientific Instruments)를 사용하여 density를 측정하였다.

결 과

정상 대장조직의 RNA를 대상으로 cyclin A, B, C, D1, E와 GAPDH의 PCR primer들로 RT-PCR을 시행한 후 전기영동하여, 각각 615bp, 585bp, 510bp, 402bp, 638bp, 300bp의 PCR 증폭 산물이 생성됨을 확인한 후 실험을 시행하였다.

반정량적 분석을 위한 PCR의 적정 cycle수와 적정 RNA 농도를 결정하기 위하여 cycle수를 달리하면서, 그리고 template RNA 농도를 달리하면서 RT-PCR을 시행하였다. 적정한 PCR cycle수를 결

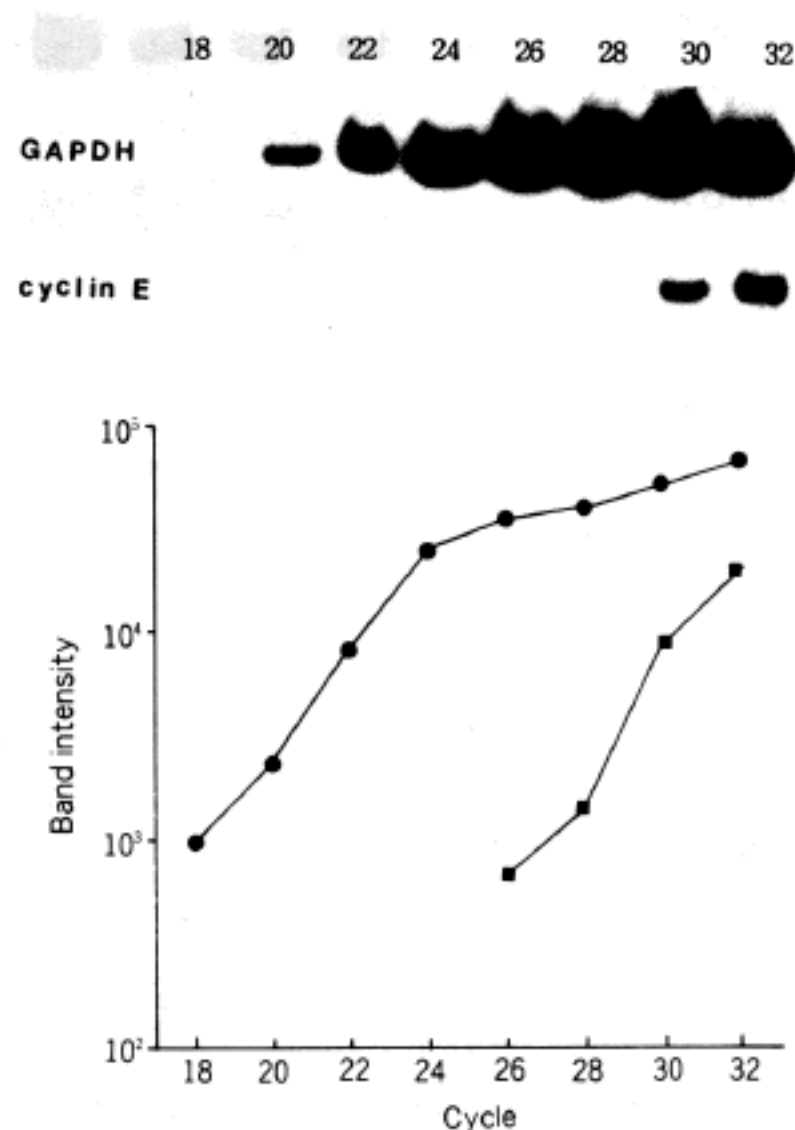


Fig. 1. Number of cycles and increase of PCR product measured by band intensities. 100 ng of total RNA was reverse transcribed and the GAPDH(●) and cyclin E(■) cDNAs were amplified for 18~32 cycles PCR.

정하기 위하여 100 ng의 total RNA를 template로 사용하여 cDNA로 역전사시킨 후 18~32 cycle의 PCR을 시행하였다(Fig. 1). 그 결과 GAPDH는 18~24 cycle사이에서 cyclin E는 26~32 cycle 사이에서 적절한 증폭비율을 보여 GAPDH는 22 cycle, cyclin들은 28 cycle의 PCR이 적정한 것으로 나타났다.

적정한 total RNA 농도를 결정하기 위하여 역전사 방법으로 cDNA로 전환시킨 25, 50, 100, 200, 400, 800 ng의 total RNA를 사용하여 GAPDH와 cyclin E를 각각 22, 28 cycle로 PCR을 시행하였

다(Fig. 2). 그 결과 25~800 ng의 역전사된 total RNA template의 증가에 어느 정도 비례하여 PCR 증폭산물이 증가하여 PCR을 이용한 mRNA의 반정량적 분석이 가능함을 보였으며 또한 약 100 ng의 total RNA를 template로 사용하는 것이 적정한 것으로 보였다.

이상의 기본 실험 결과를 바탕으로 정상 대장 조직, 대장암 조직, 전이대장암 조직 및 대장암 세포주에서 분리한 RNA를 대상으로 cyclin A, B, C, D1, E 유전자의 발현에 대한 반정량적 RT-PCR을 시행하였다(Fig. 3). 증폭된 PCR 산물을 polyacrylamide

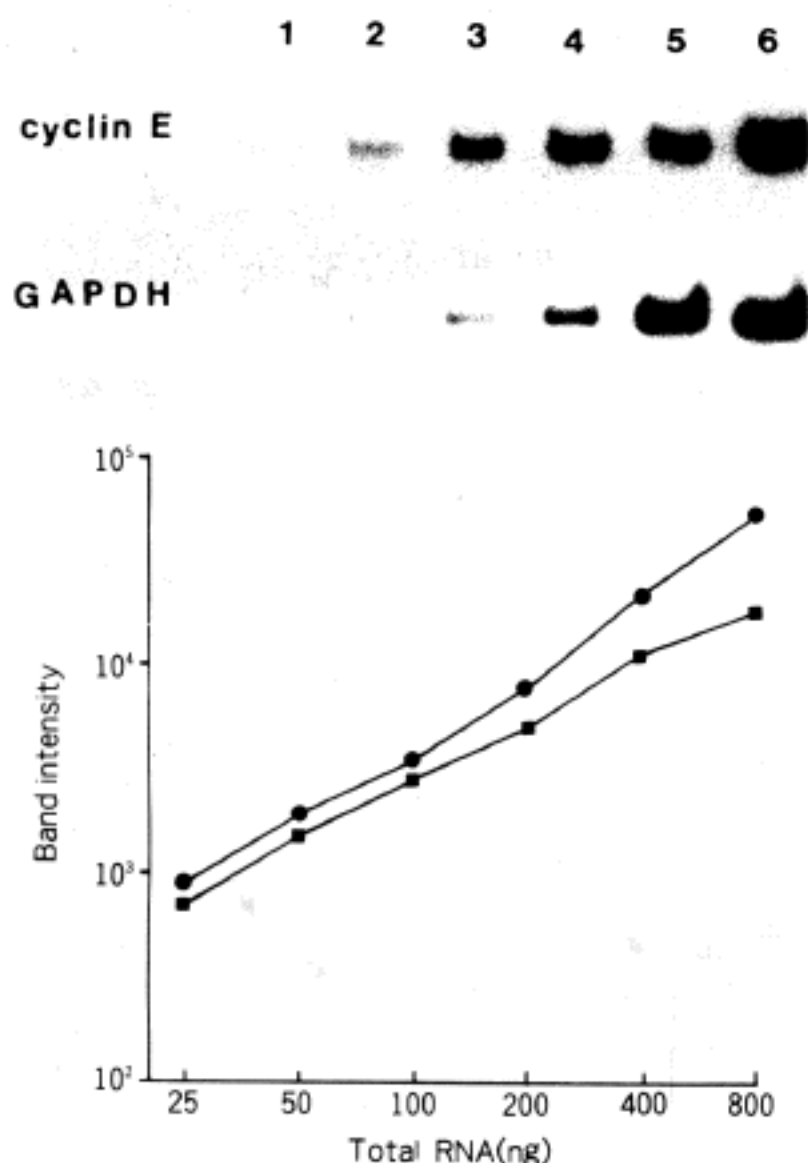


Fig. 2. Amplifications starting from serial dilutions of total RNAs. Serial dilutions of reverse transcribed total RNA(lane 1, 25 ng; lang 2, 50 ng; lane 3, 100 ng; lane 4, 200 ng; lane 5, 400 ng; lane 6, 800 ng) were subjected to amplifications of cyclin E cDNA(●, 28 cycles) and GAPDH(■, 22 cycles).

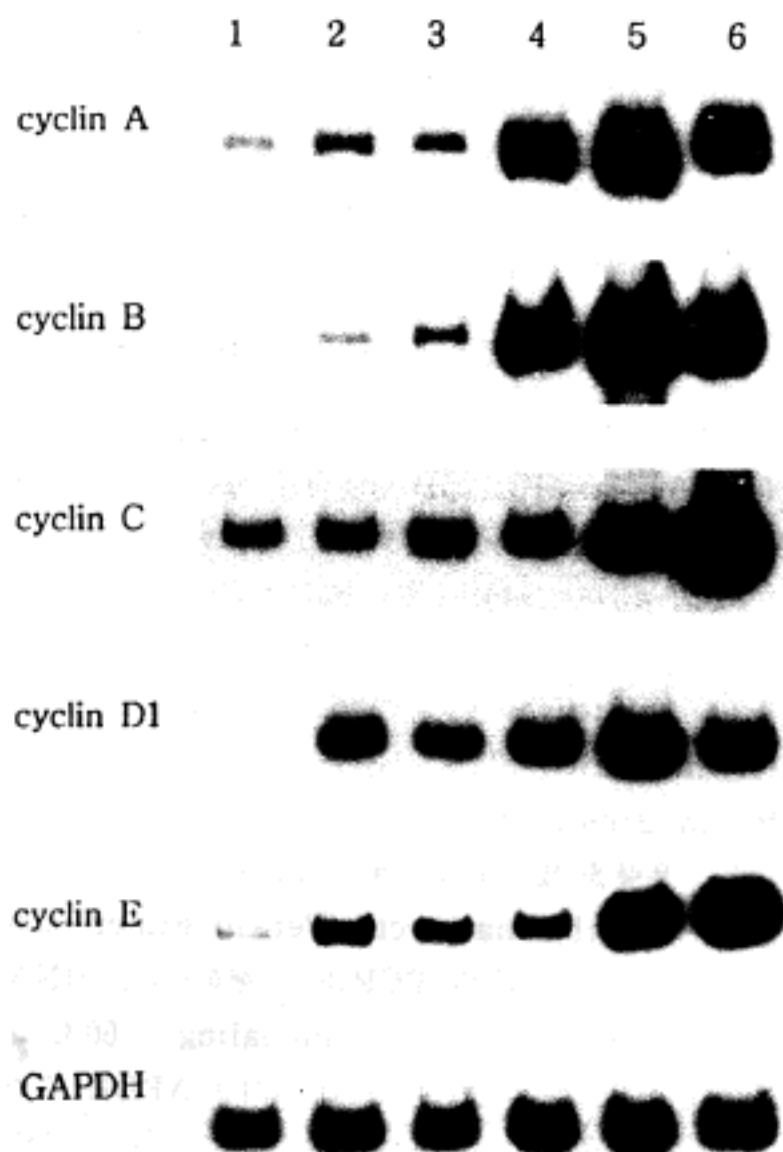


Fig. 3. RT-PCR analysis of cyclin A, B, C, D1, E and GAPDH mRNA expression in normal colon (lane 1), primary(lane 2) and metastatic(lane 3) colorectal carcinomas, and colon cancer cell lines(lane 4, C1; lane 5, C2A; lane 6, HT-29).

Table 1. PCR primers

Gene		Sequence	Size of product(bp)
Cyclin A	sense	5' CAGAA TGAGA CCCTG CATTG GGCTG 3'	615
	antisense	5' CAGAT TTAGT GTCTC TGGTG GGTTG 3'	
Cyclin B	sense	5' CCATT ATTGA TCGGT TCATG CAGA 3'	585
	antisense	5' CTAGT GGAGA ATTCA GCTGT GGTA 3'	
Cyclin C	sense	5' CCTGT ATTAA TGGCT CCTAC ATGTG TG 3'	510
	antisense	5' GGTTG CCATC TCTTT TCTCT CATCG A 3'	
Cyclin D1	sense	5' ACCTG GATGC TGGAG GTCTG 3'	402
	antisense	5' GAACT TCACA TCTGT GGCAC A 3'	
Cyclin E	sense	5' GGAAG GCAAA CGTGA CCGTT 3'	638
	antisense	5' GGGAC TTAAA CGCCA CTTAA 3'	
GAPDH	sense	5' CGTCT TCACC ACCAT GGAGA 3'	300
	antisense	5' CGGCC ATCAC GCCAC AGTTT 3'	

Table 2. Ratio of expression of cyclin genes¹

	Genes				
	Cyclin A	Cyclin B	Cyclin C	Cyclin D1	Cyclin E
Tissue samples					
1	2.6	1.3	— ²	5.8	1.9
2	2.9	1.3	—	1.5	2
3	1.1	3.5	—	3.0	2.8
4	1.7	—	—	3.2	2
5	1.7	—	—	4.8	2.9
6	1.4	4	1	9.3	2.2
7 ³	1.5	4.9	1.4	7.2	2.3
Cell lines					
C1	5.1	14.2	1.1	7.9	1.8
C2A	5.5	25.3	1.9	12.2	8
HT-29	4.4	23.5	2.6	8.9	11.1

¹The ratios of RT-PCR products of colorectal cancer tissues and cell lines to normal colon tissues were measured by densitometry.

²non-tested.

³Metastatic cancer tissues.

gel로 전기영동하고 이를 x-ray film에 노출하여 얻은 autoradiogram을 densitometer로 분석하여 cyclin 각각의 density를 GAPDH의 density를 control로 하여 보정한 후 정상대장조직의 cyclin 발현양과의 비율을 계산하였다(Table 2). cyclin A, B, C, D1, E는 실험한 대장암 조직과 세포주 모두에서 발현이 전반적으로 증가한 것으로 나타났으며 발현 증가 비율이 대장암 조직에 비하여 세포주에서 더 높게 나타났다. 대장암 조직 중 1예와 그의 전이암 조직에서는 cyclin D1의 발현이 특이적으로 증가하여 나타났으며, 세포주 중에서는 C2A와 HT-29 세포주에서 cyclin E 발현의 급격한 증가를 보이고 있었다.

고 안

이 연구에서는 RT-PCR 방법을 사용하여 대장암에서 5종의 cyclin(A, B, C, D1, E) 유전자 발현양상을 반정량적으로 조사하였다. RT-PCR 방법은 최근 개발되어 각종 실험에서 없어서는 안될 중요한 방법으로 부각된 PCR 방법의 여러가지 응용법 중의 하나로 mRNA를 cDNA로 역전사한 후 PCR을 시행하는 것으로서 유전자의 구조나 발현 연구 등에 많이 사용되고 있다. 그러나 대부분의 실험에서 단지 질적인 분석(qualitative analysis)에만 사용되고 있다. RT-PCR을 사용한 mRNA 발현양의 정량적 분석(quantitative analysis)은 PCR의 특성상 불가능한 것으로 알려져 있다. PCR은 이론적으로는 template를 1 cycle(n=cycle number)당 2^n 으로 증폭 시킴으로 정량적 분석이 가능할 것 같으나 실질적으로는 $N = N_0(1+eff)^n$ 의 공식(N, 증폭량; N_0 , 최초 template양; eff, 증폭효율; n, cycle 수)이 적용되기 때문이다. 이러한 단점을 극복하고 정량적 PCR을 시행하기 위하여 competitive RT-PCR 방법이 고안되었으나^{23,25)} 이는 internal control로 사용할 수 있도록 특정유전자가 cloning된 plasmid DNA가 필요하므로 과정이 복잡하여 실질적으로는 cytokine mRNA정량용으로 kit화 되어 사용되고 있을 뿐이다. 그러나 완전한 정량적 분석이 아닌 반정량적 분석(semiquantitative analysis)은 가능하다고 생각되어 여러 연구자들에 의해 시행되고 있다^{4,17,27,28)}. 이 연구에서는 RT-PCR 방법으로 대장암에서 cyclin

mRNA 발현변화를 조사하기 위하여, 먼저 RT-PCR 방법에 의한 반정량적 분석의 가능성을 실험적으로 조사하였다. PCR cycle수와 template 농도를 달리하면서 RT-PCR을 시행한 결과 GAPDH 유전자의 PCR은 18~24 cycle, cyclin 유전자는 26~32 cycle에서 적절한 증폭비율을 나타내었으며, 이들 cycle 수에서 total RNA농도를 달리하면서 시행한 RT-PCR에서 실험한 25~800 ng의 total RNA 농도범위에서 비교적 일정한 증폭비율을 보였다. 이러한 실험 결과들로 볼 때 이 실험에서 사용한 isotope incorporation을 이용한 RT-PCR의 반정량적 분석은 적절한 cycle수에서 정밀하게 시행된다면 가능하다고 생각되었다.

예비실험의 결과를 바탕으로 대장암에서의 5종의 cyclin 유전자의 발현양상을 RT-PCR방법으로 실험하였다. 실험결과 대장암조직과 세포주 모두에서 cyclin A, B, C, D1, E 발현의 비정상성이 있는 것으로 나타났다. 이러한 cyclin유전자의 비정상적 발현양상이 대장암에서 발암과정의 원인인자로 작용하는 것인지 암세포의 일반적 특징인 분열속도의 증가에 의한 이차적인 현상인지는 이 실험으로는 알 수 없으나 breast cancer, esophageal cancer 등의 암에서 cyclin유전자의 증폭과 이에 따른 과발현을 보고하고 있어^{10,11,13)} 일차적인 원인인자라는 가능성을 완전히 배제할 수는 없다. 그러나 대장암에서 cyclin 유전자의 증폭이나 재배열이 드물게 나타나는 것으로 알려져 있어¹⁵⁾ 이 실험에서 나타난 많은 발현이상도 cyclin유전자 염기서열구조의 이상에 동반되어 나타난 것이라고 보기는 또한 어렵다. 이 실험에서 특히 cyclin D1발현이 많이 증가되어 나타난 대장암조직 일례 및 그 전이암조직과 cyclin E의 발현증가가 뚜렷했던 세포주 C2A, HT-29은 각각의 cyclin 발현증가가 다른 예들에 비하여 급격한 증가를 보여 유전자 구조 이상이 있거나 발현 조절기전의 변화의 가능성을 시사하는 것으로 생각된다²⁾. cyclin의 발현이 세포주에서 대장암조직에 비하여 전반적으로 증가되어 나타난 것은 세포주화 할 때에 수반되는 유전적 변화라기보다는 세포주기의 활성 즉 세포분열주기에 있는 세포가 조직에 비하여 많은 비율을 차지하기 때문이라 생각된다.

결론적으로 볼 때 대장암의 발생에는 cyclin유전자가 원인 또는 그 결과(암화현상)에 의해서 발현 이상

이 동반되며 이러한 변화는 암화과정에서 중요한 변화라고 생각되며 앞으로 암화과정에서의 cyclin 유전자에 대한 연구가 chromosome 구조상의 변화나 염기서열의 변화 그리고 mRNA 및 단백질의 변화를 연계하여 연구하여야 할 것으로 생각된다. 또한 근래에 p53, Retinoblastoma(Rb) 유전자의 단백 산물들과 cyclin과의 관계가 밝혀지고 있으므로 이들과 연관시켜 연구함으로써 더 많은 세포주기에 대한 이해가 이루어 질 것으로 생각되며, 이러한 세포주기와 암화과정과의 관련이 밝혀짐으로서 새로운 암치료법의 개발 방향이 제기될 것으로 생각된다.

결 론

세포의 분열은 G1, S, G2, M phase로 구성되는 일련의 과정을 거친 후 G0 phase로 가거나, 다시 G1 phase로 연결되어 세포분열이 일어남은 이미 잘 알려진 사실이다. 최근에는 이러한 세포분열 각 phase에서 특징적으로 발현되어 세포주기조절에 관여하는 유전자들이 밝혀지고 있다. 이들 유전자들은 cyclin으로 분류되며 CDK(cyclin dependent kinase)와 같이 작용하여 세포주기의 각 phase에서 일어나는 일련의 과정을 조절하는 것으로 밝혀졌다. 암에서는 세포분열이 증가되어 있으며 이러한 비정상적 세포분열은 세포의 분열과 성장을 유발하는 여러가지 유전자의 이상 즉 암유전자의 활성화나 항암유전자의 비활성화 등의 기전을 통하여 이루어진다고 밝혀져 있다. 최근 세포주기조절 유전자들 즉 cyclin, cdk 등이 밝혀짐으로서 발암기전이 이들 유전자들과 연관되어 많이 연구되고 있다. 이 연구에서는 대장암 발암과정과 cyclin과의 관계를 조사하기 위하여 RT-PCR을 사용한 cyclin mRNA의 반정량적 분석을 시행하여 대장암에서의 cyclin A, B, C, D1 그리고 E의 발현이상을 조사하였다.

먼저 RT-PCR을 사용한 mRNA반정량적 분석의 가능성을 조사한 실험에서 template total RNA 농도와 PCR cycle수를 적정하게 사용함으로써 RT-PCR이 mRNA 반정량적 분석에 응용이 가능한 것으로 나타났다. 대장암조직 7례와 대장암세포주(C1, C2A, HT-29)를 사용하여 5종 cyclin의 발현양상을 조사한 결과, 실험 대상 모두에서 정도의 차이는 있

나 대부분 cyclin의 발현 증가가 있는 것으로 나타나 대장암의 발생에는 cyclin 유전자가 원인 또는 그 결과(암화현상)에 의해서 발현 이상이 동반되며 이러한 변화는 암화과정에서 중요한 변화라고 사료되었다. 특히 1례의 대장암조직과 그 전이조직에서 cyclin D1의 발현이 크게 증가되어 있었으며, 세포주 C2A와 HT-29에서는 cyclin E의 발현이 뚜렷하게 증가되어 있어 이들에 있어서는 유전자 증폭이나 mRNA stability의 증가 등의 가능성이 시사되어 앞으로 southern blot analysis나 western blot 등으로 유전자 구조의 변화나 단백질발현의 변화등과 연계하여 연구하여야 할 것으로 생각된다. 또한 근래에 p53, Retinoblastoma(Rb) 유전자의 단백 산물들과 cyclin과의 관계가 밝혀지고 있으므로 이들과 연관시켜 연구함으로써 더 많은 세포주기에 대한 이해가 이루어 질 것으로 생각되며, 이러한 세포주기와 암화과정과의 관련이 밝혀짐으로서 새로운 암치료법의 개발 방향이 제기될 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Bartek J, Staskova Z, Draetta G, et al: *Molecular pathology of the cell cycle in human cancer cells. Stem Cells 1(suppl 1): 51, 1993*
- 2) Bartkova J, Lukas J, Strauss M, et al: *The PRAD-1/Cyclin D1 oncogene product accumulates aberrantly in a subset of colorectal carcinomas. Int J Cancer 58(4): 568, 1994*
- 3) Chomczynski P, Sacchi N: *Single-step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162(1): 158, 1987*
- 4) Dukas K, Sarfati P, Vaysse N, et al: *Quantitation of changes in the expression of multiple genes by simultaneous polymerase chain reaction. Anal Biochem 215(1): 66, 1993*
- 5) Evans HJ, Prosser J: *Tumor-suppressor genes: Cardinal factors in inherited predisposition to human cancers. Environ Health Perspect 98(1): 25, 1992*
- 6) Fearon ER, Vogelstein B: *A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61(5): 759, 1990*
- 7) Gong J, Ardel B, Traganos F, et al: *Unscheduled expression of cyclin B1 and cyclin E in sev-*

- eral leukemic and solid tumor cell lines. *Cancer Res* 54(16): 4285, 1994
- 8) Hartwell LH, Kastan MB: *Cell cycle control and cancer. Science* 266: 1821, 1994
- 9) Hunter T, Pines J: *Cyclins and cancer. Cell* 66(6): 1071, 1991
- 10) Jiang W, Kahn SM, Tomita N, Zhang Y, Lu S, Weinstein IB: *Amplification and expression of the human cyclin D genes in esophageal cancer. Cancer Res* 52(10): 2980, 1992
- 11) Jiang W, Zhang Y, Kahn SM, et al: *Altered expression of the cyclin D1 and retinoblastoma genes in human esophageal cancer. Proc Natl Acad Sci USA* 90(19): 9026, 1993
- 12) Keyomarsi K, O'Leary N, Molnar G, et al: *Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. Cancer Res* 54(2): 380, 1994
- 13) Keyomarsi K, Pardee AB: *Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA* 90(3): 1112, 1993
- 14) Koorey DJ, McCaughan GW: *Tumor suppressor genes and colorectal neoplasia. J Gastroenterol Hepatol* 8(2): 174, 1993
- 15) Leach FS, Elledge SJ, Sherr CJ, et al: *Amplification of cyclin genes in colorectal carcinomas. Cancer Res* 53(9): 1986, 1993
- 16) Lock LF, Wickramasinghe D: *Cycling with CDKs. Trends Cell Biol* 4: 404, 1994
- 17) Lucibello FC, Sewing A, Brusselbach S, et al: *Deregulation of cyclins D1 and E and expression of cdk2 and cdk4 in senescent human fibroblasts. J Cell Sci* 105: 123, 1993
- 18) Lukas J, Pagano M, Staskova Z, et al: *Cyclin D1 protein oscillates and is essential for cycle progression in human tumor cell lines. Oncogene* 9(3): 707, 1994
- 19) Marx J: *How cells cycle toward cancer. Science* 263: 319, 1994
- 20) Morisaki T, Uchiyama A, Yuzuki D, et al: *Interleukin 4 regulates G1 cell cycle progression in gastric carcinoma cells. Cancer Res* 54(4): 1113, 1994
- 21) Motokura T, Arnold A: *Cyclins and oncogenesis. Biochim Biophys Acta* 1155(1): 63, 1993
- 22) Motokura T, Bloom T, Kim HG, et al: *A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. Nature* 350: 512, 1991
- 23) Siebert PD, Larrick JW: *Competitive PCR. Nature* 359: 557, 1992
- 24) Thomas T, Thomas TJ: *Regulation of cyclin B1 by estradiol and polyamines in MCF-7 breast cancer cells. Cancer Res* 54(4): 1077, 1994
- 25) Wang A, Doyle MV, Mark DF: *Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA* 86(24): 9717, 1989
- 26) Wang J, Chenivesse X, Henglein B, et al: *Hepatitis B virus integrated in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. Nature* 343: 555, 1990
- 27) Yokoi H, Natsuyama S, Iwai M, et al: *Non-radioisotopic quantitative RT-PCR to detect changes in mRNA levels during early mouse embryo development. Biochem Biophys Res Commun* 195(2): 769, 1993
- 28) Yoshimoto M, Itoh F, Yamamoto H, et al: *Expression of MMP-7(PUMP-1) mRNA in human colorectal cancers. Int J Cancer* 54(4): 614, 1993