

대장 직장선암에서 EGFR 및 VEGF 발현에 대한 면역조직화학적 분석

중앙대학교 의과대학 외과학교실 및 해부병리과*

이 상 혁 · 박 성 일 · 임 현 묵
박 성 준 · 차 성 재 · 박 언 섭*

= Abstract =

Immunohistochemical Analysis of the EGFR and VEGF Expression in Human Colorectal Adenocarcinoma

Sang Hyeog Lee, M.D., Seong Il Park, M.D., Hyun Muck Lim, M.D.
Seong Jun Park, M.D., Seong Jae Cha, M.D. and Eon Sub Park, M.D.*

Department of General Surgery and Pathology, College of Medicine
Chung Ang University, Seoul, Korea*

The EGFR has been proposed as a stimulator of cell growth in some neoplasms. The VEGF play an important role in angiogenesis of several tumors. This study aimed to determine the EGFR and VEGF expression in colorectal adenocarcinoma and to correlate the expression of these gene with variable prognostic factors. Significant relationship was observed between the EGFR and histopathologic differentiation or lymph node involvement. But EGFR had no relation to depth of invasiveness or serum CEA level. On the other hand, VEGF had only relation to histopathologic differentiation. VEGF had no relation to lymph node involvement, depth of tumor invasiveness or serum CEA level. We conclude that EGFR expression in human colorectal adenocarcinoma was significantly associated with prognosis. But VEGF expression was not associated with prognosis. More studies are needed to determine whether EGFR expression is a clinically valuable prognostic factor.

Key Words: Colorectal adenocarcinoma, EGFR, VEGF

서 론

대장 및 직장암종의 예후는 같은 병기에서도

책임저자 : 이상혁, 서울시 영등포구 영등포동 8가 82번지
크로바 아파트 3-308(우편번호: 150-038)
(Tel: 636-1561), 중대홍산병원 외과

각 종양의 특이한 생물학적 성상에 따라 달라지며 따라서 예후에 관계하는 인자들을 아는 것은 병의 경과를 예측하는데 도움이 될 뿐만 아니라 치료 방침을 정하는 데도 필요하다⁵⁴⁾. 최근에 암 유전자의 증폭이나 과발현, 종양 억제 유전자의 비활성화, DNA ploidy 및 암세포의 증식능과 예후와의 상관관계등 종양의 예후 인자에 대한 활

발한 연구가 진행되고 있다¹⁾. EGF (Epidermal Growth Factor) 는 유사분열물질로써 세포의 성장을 촉진하여 세포막에 존재하는 EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)와 결합하여 작용한다²⁾. EGFR은 170 KD의 당단백질 수용체로서 7번 염색체 단완에 위치하며 tyrosine kinase 활성화와 관련이 있고⁴⁵⁾ 그 내부 물질은 V-erb-B 암유전자와 밀접한 관련이 있다⁹⁾. EGFR은 여러 종양에서 다양한 정도로 발현되고 있어 암의 발생과 그 증식에 관여한다고 알려져 있다.

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)는 VPF (Vascular Permeability Factor) 라고도 불리며 인체의 여러 부위에서 생산되고 특히 blood supply 가 많이 필요로 하는 곳에서 높은 농도로 존재한다. VEGF는 Amino acid 숫자에 따라 VEGF₁₆₅, VEGF₁₂₁, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ 등 4개의 family로 구성되어 있으며¹¹⁾ 생체내에서 flt1⁴¹⁾와 flk-1(=kdr)^{26,29)}의 두 종류의 receptor가 발견되었다. 세포내 VEGF는 receptor와 결합하여 반응을 나타내며 내피세포의 성장을 자극하고 미세혈관의 permeability를 증가시켜 혈장 단백질의 혈관 밖으로의 이동을 유도하여 혈관 생성을 촉진하는 혈관 밖의 기질을 제공한다.

본 연구에서는 EGFR 및 VEGF에 대한 면역조직화학적 염색을 실시하여 대장 직장 선암에서 그들의 발현과 임파절의 전이 상태, 조직학적 분화도, 장막 침습여부 및 혈중 CEA 농도등 예후 인자와 비교 분석하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1) 연구 대상

본 연구에 이용한 연구 재료는 1990년 1월부터 1995년 12월까지 중앙 대학교 부속병원에서 대장 직장 선암으로 병리학적으로 진단되어 외과적 수술로 절제된 조직표본 중 종괴내의 출혈 및 괴사와 같은 2차적 변화가 초래된 것을 제외한 42예를 대상으로 하였다.

2) 연구 방법

(1) 임상 기록 재검토: 연구 대상 환자들의 임상 기록과 병리 결과지 등을 재검토하여 환자의 연령, 병기, 임파절 전이 상태, 조직학적 분화도, 그리고 장막침습 유무등을 조사하였다.

(2) 광학현미경적 검색: 10% 중성 포르말린에 고정, 파라핀에 포매된 조직을 H-E 염색한 다음 분화도를 관찰하였는데 선의 구조가 분명하여 세포의 모양이 장형화생시의 모양과 유사할 때 고분화형(well differentiation), 선의 구조가 거의 보이지 않을 때 저분화형(poorly differentiation), 그리고 중간단계일 경우를 중등도 분화형(moderately differentiation)으로 하였다. 그리고 병기 분류는 Dukes 분류법(Dukes' classification)에 따랐다.

(3) 면역조직화학적 염색 및 판독:

① 면역조직화학적 염색: 조직 절편을 항온기에 58~60°C로 30분 가온후 실온에서 탈파라핀화와 탈수를 시켰다. 내인성 과산화효소의 활성을 억제시키기 위해 3% 과산화수소수를 사용하여 30분간 처리후 tris 완충용액(tris 0.05M, PH7.6)에 씻고 protein blocking agent(Immuno-tech Co)를 가한후 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 일차항체를 가한후 실온에서 1시간 동안 반응시키고 다시 tris 완충 용액에 수세하였다. 일차항체로는 EGFR (Monosan co, clone 2E9, 1:50)과 VEGF(Santa Cruz Co, U.K sc#129, 1:50)을 사용하였다. 그 다음 이차항체(anti-rabbit IgG antibody: Immuno-tech Co)를 가하고 tris 완충용액에 씻고 peroxidase reagent를 가한 후 다시 tris 완충용액으로 씻고 3-amino-9-ethyl-carbazole in N, N-dimethyl formide(AEC)를 가하여 발색반응을 확인한 후 Mayer hematoxyline으로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

② 염색결과의 판정: 면역조직화학적 염색법에 의한 EGFR 및 VEGF 양성도에 대한 성적 평가는 광학 현미경하에서 연분홍색의 색소침착이 주위 배경보다 분명하게 염색되었을 경우를 양성으로 하였고, 염색범위에 따라 10~30% (+), 30~70%

(++), 그리고 70% 이상염색시 (+++)로 구분하여 표기하였다.

(4) 통계학적 분석: 통계학적 분석은 이양분포에 의한 z-test로 검정하였고 유의수준은 p-value < 0.01로 하였다

결 과

1) 임상소견

대상환자 42예의 성별은 남자가 24예 여자가 18예로 남녀비는 1.3:1 이었다. 연령분포는 28세부터 81세까지로 평균 연령은 남자가 53세, 여자

Table 1. Age and sex distribution in 42 cases of colorectal carcinoma

age/sex	male	female	Total
30 < 1	-	-	1
30 ~ 40	1	-	1
40 ~ 50	6	2	8
50 ~ 60	7	10	17
60 > 9		6	15
Total	24	18	42

가 61세였다(Table 1). 조직학적 분화도에 따른 분류는 고분화 12예, 중등도 분화 22예, 저분화 8예였다. 종양의 침습도에 따른 분류는 종양이 점막 하 까지 침습한 T1은 2예, 고유근층을 침습한 T2는 9예, 고유근층을 뚫고 장막하까지 침습한 T3는 8예 였고 장측 복막 또는 주변장기로 침습한 T4는 23예였다. 임파절 전이가 있었던 예는 23예, 임파절 전이가 없었던 예는 19예였다.

2) 면역조직화학적 염색 결과

(1) EGFR과 VEGF의 전반적인 염색성: 총 42예 중 EGFR 발현양성은 35예(83%), 발현음성은 7예(17%)였으며 VEGF 발현양성은 20예(48%), 발현음성은 22예(52%)였다(Table 2).

Table 2. Immunostaining reactivities for EGFR and VEGF in colorectal adenocarcinoma

Total cases(n=42)	EGFR	VEGF
positive	35(83%)	20(48%)
negative	7(17%)	22(52%)

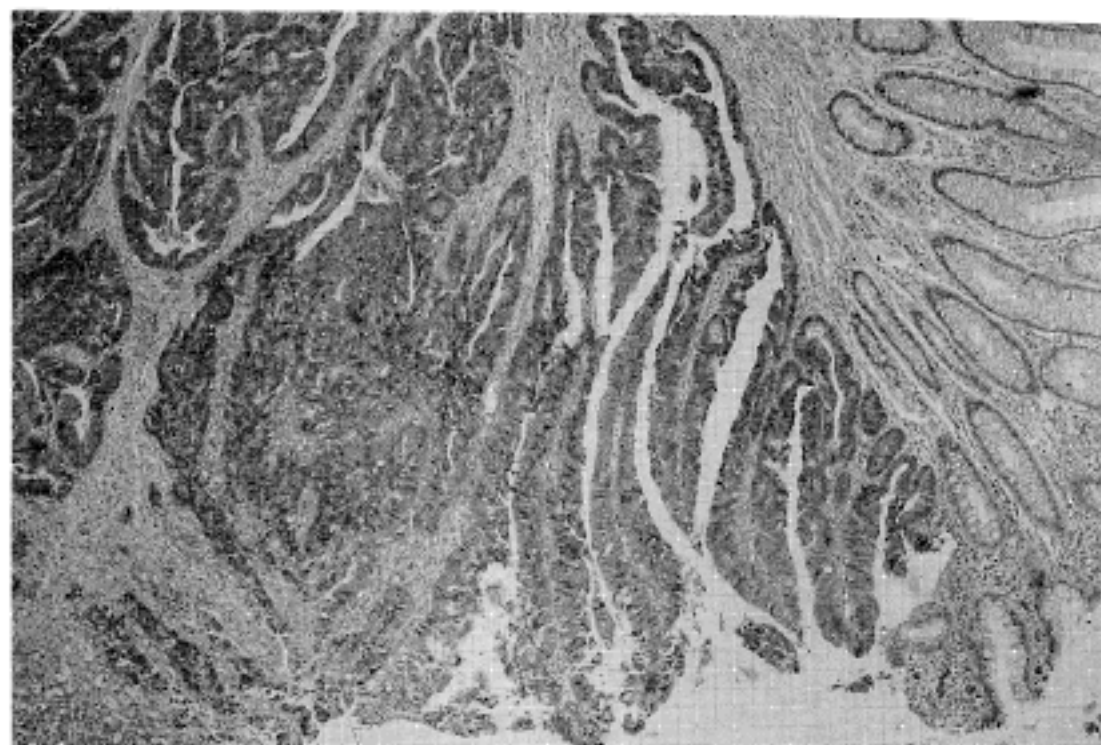


Fig. 1. Immunohistochemical staining, of EGFR showing strong expression in a neoplastic glands (ABC, x40).

(2) EGFR 및 VEGF의 발현과 조직학적 분화도와의 관계: EGFR 발현 양성인 경우는 고분화 12예 중 11예(92%), 중등도분화 22예중 20예 (91%), 저분화 8예중 4예(50%)로 각각 나타났으며, VEGF 발현 양성인 경우는 고분화 12예중 9예(75%), 중등도분화 22예중 8예(36%), 저분화 8예중 3예(37%)로 나타났다(Table 3). EGFR 발현의 경우 분화정도가 고분화 일수록 발현율이 높게 나타났고 ($p < 0.01$), VEGF 발현의 경우도 분화도가 높을수록 발현율이 높게 나타났다($p < 0.01$).

(3) EGFR 및 VEGF의 발현과 침습깊이와의 관계: 장막침습이 없는 11예중 EGFR 및 VEGF 발현양성은 각각 8예(73%), 5예 (45%)였고, 장막침습이 있는 31예(Figure-.) (Figure-)중 EGFR 및

VEGF 발현양성은 각각 27예 (87%), 15예(48%)로 EGFR 및 VEGF 발현은 장막 침습이 있는 군과 없는 군간에 통계적으로 유의한 차이는 없었으나 EGFR의 발현은 장막침습이 있는 군에서 발현이 더 많은 것으로 나타났다(Table 4).

(4) EGFR 및 VEGF의 발현과 임파절 전이와의 관계: 임파절 전이가 없는 19예중 EGFR 및 VEGF

Table 4. Expressions of EGFR and VEGF according to serosal involvement of adenocarcinoma

Depth of invasion\expression	EGFR*	VEGF**
serosal involvement(-) (n=11)	8(73%)	5(45%)
serosal involvement(+) (n=31)	27(87%)	15(48%)

*: not significant, **: not significant

Table 3. Expression of EGFR and VEGF according to differentiation

Differentiation\expression	EGFR*	VEGF**
well differentiation(n=12)	11(92%)	9(75%)
moderatelydifferentiation(n=22)	20(91%)	8(36%)
poorly differentiation(n=8)	4(50%)	3(37%)

*: $p < 0.01$, **: $p < 0.01$

Table 5. Expressions of EGFR and VEGF according to regional lymph node involvement

LN status\expression	EGFR*	VEGF**
LN negative(n=19)	13(68%)	10(53%)
LN positive(n=23)	22(96%)	10(43%)

*: $p < 0.01$, **: not significant



Fig. 2. intracytoplasmic staining reactivity of EGFR in a well differentiated adenocarcinoma (ABC, $\times 100$).

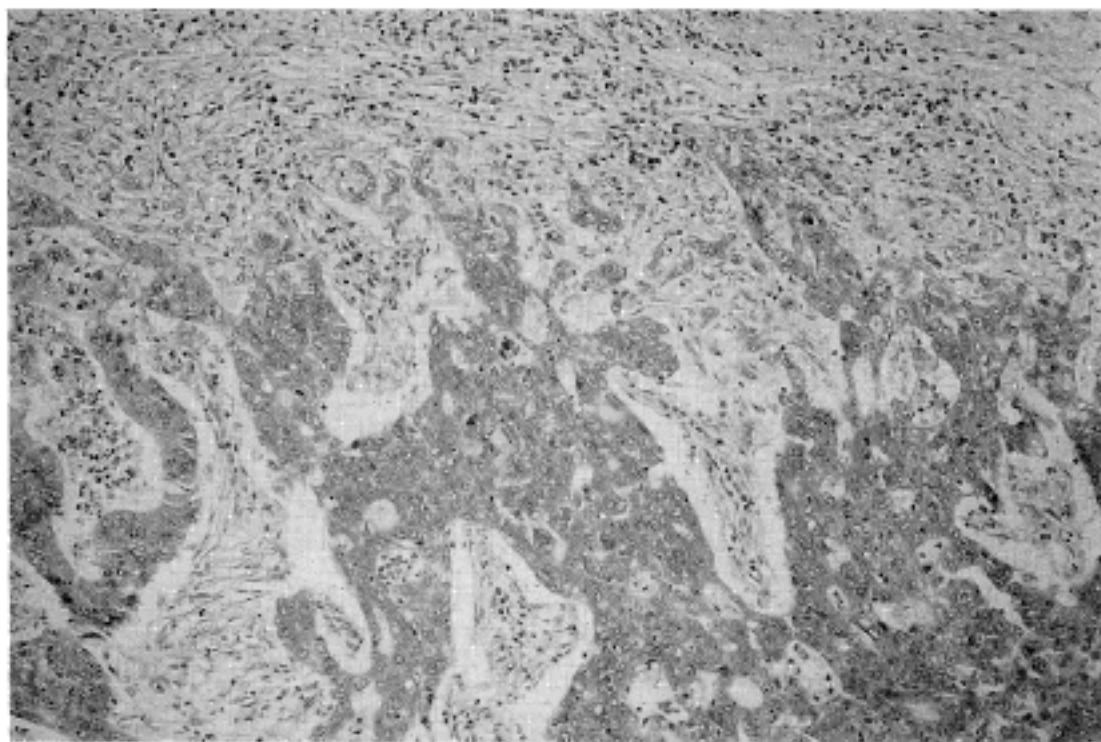


Fig. 3. Immunohistochemical staining of VEGF showing strong expression in a infiltrating adenocarcinoma (ABC, ×100).

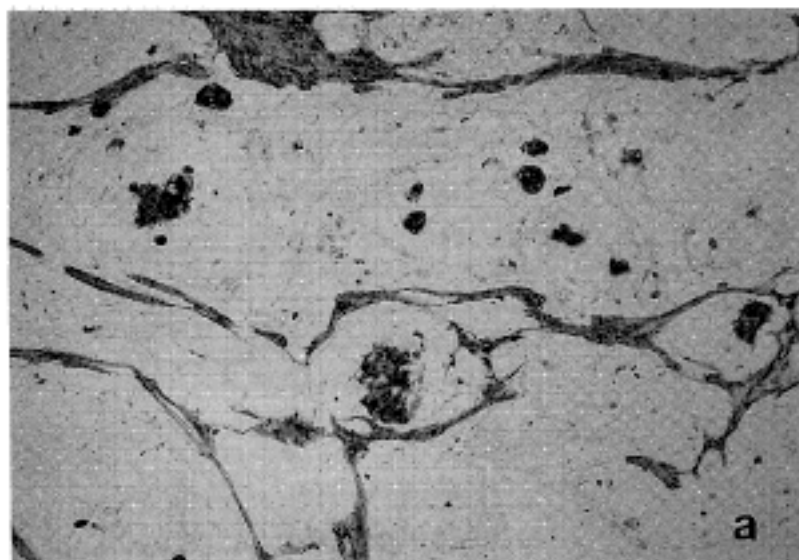


Fig. 4. a. Strong expression of EGFR in a adenocarcinoma cells floated in a mucin-pool (ABC, ×40) b. Negative staining reactivity for VEGF (ABC, ×40).

발현 양성은 각각 13예(68%), 10예(53%)였다. 그리고 임파절 전이가 있는 23예중 EGFR 및 VEGF의 발현양성은 각각 22예(96%), 10예(43%)로, VEGF 발현의 경우 임파절 전이가 있는 군과 없는 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었으며, EGFR 발현의 경우는 임파절 전이가 있는 군과 없는 군간에 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.01$) (Table 5).

(5) EGFR 및 VEGF의 발현과 CEA와의 관계: CEA level 5를 기준으로 하여 5.0이하인 24예중

Table 6. Expression of EGFR and VEGF according to CEA level

CEA level\expression	EGFR*	VEGF**
CEA < 5.0 (n=24)	20(83%)	12(50%)
CEA > 5.0 (n=18)	15(83%)	8(44%)

*: not significant, **: not significant

EGFR 및 VEGF 발현 양성은 각각 20예(83%), 12예(50%)였다. 그리고 5.0이상인 18예중 EGFR 및

VEGF 발현 양성은 각각 15예(83%), 8예(44%)로 EGFR과 VEGF의 CEA level에 따르는 발현도는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Table 6).

고 찰

대장 및 직장 암종의 예후인자로는 Dukes' 병기가 가장 중요하지만 그 이외에 환자의 연령, 종양의 크기, 장천공의 유무, 장폐쇄의 유무와 같은 임상소견과 조직학적 유형 및 분화도, 종양의 성장양상, 종양 주위의 림프구 침윤, 혈관, 임파관 및 신경조직 침윤과 같은 조직 소견이 있다.

Epidermal Growth Factor (EGF)는 유사분열 물질로 세포의 성장을 촉진시키며 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)과 결합하여 작용한다⁴⁵. EGFR은 170 kD의 당단백질 수용체로서 7번 염색체 단원에 위치하며 세포막에 존재한다. 3개의 영역으로 구성되어 있는데 안쪽영역은 고유의 tyrosine kinase 활성으로 핵분열 유발성 신호(mitogenic signal)를 매개하여 세포증식을 조절하고 또 tyrosine kinase부분이 v-erb-B암유전자와 90%염기배열이 동일한 정도로 아주 유사해서 EGFR이 어느 수준 이상으로 증가하면 종양으로 전환(transformation) 될 것으로 추정되고 있다^{45,9}. EGFR은 거의 모든 정상세포에 존재하며 그 수는 세포마다 다양하여 림프구에서는 소수인 반면 편평세포에서는 다수가 발현된다고 한다¹⁴. EGFR의 증가는 유전자의 증폭이나 7번 염색체단원의 전위에 의한 것으로 알려져 있으며 northern blotting이나 western blotting을 이용하여 EGFR mRNA나 단백질의 증가를 관찰하였다²⁷. EGFR이 세포막 단백질이면서 세포질 염색이 되는 이유는 ligand와 결합후 빠르게 일어나는 EGFR의 내재화 때문일 것으로 추측하고 있으나²⁵ 아직까지 확실하지 않다. EGFR은 편평상피암¹⁸, 방광암³⁰, 유방암³⁶이나 간엽조직 종양¹⁴에서도 그 발현도가 높은 것으로 보고되고 있다. 그러나 위장관 암종에 대해서는 위암에서 여러 예후인자와 관련이 있다는 보고가 있으나

대장암에서는 저자마다 보고에 큰 차이가 있어 아직 그 의미가 명확하지 않은 상태이다^{14,55,9,17}. Keretz등²²은 대장 및 직장 암종에서 EGFR발현율과 Dukes 병기, 조직학적 유형 및 분화도 사이에 아무 연관이 없다고 하고 단지 관찰자들 간에 차이에 의한 것이라고 하였고, Yasui⁵⁵, Scambia등³⁸도 병기나 조직학적 유형과 관계가 없다고 하였으나 Steele⁴⁷, Kluffinger²¹등은 Dukes병기 C에서 A나 B병기보다 발현율이 높았고 분화가 나쁠수록 높게 발현되어 예후와 관계된다고 하였다. 한편 Bradley³과 Yasui등⁵⁵은 대장직장암종에서 EGFR이 분화가 중등도 이상인 선암종이 저분화 선암종보다 EGFR발현율이 높다고 보고하였다. Mayer등²⁷은 EGFR의 염색강도와 기존의 예후인자 사이에는 아무연관이 없었으나 EGFR이 발현되는 범위와 생존기간 사이에 의미있는 상관관계가 있고 50%이상 양성이면 그렇지 않은 경우보다 더 나쁜 예후를 보인다고 하였다. 본연구에서는 대장 직장선암 총 42예중 EGFR발현 양성은 35예(83%)였으며 EGFR발현 음성은 7예(17%)였다. 장막침습이 있는 군에서 높게 발현되었으나 통계적 의미는 없었고 임파관 전이를 동반할 때 EGFR발현율이 높았고 ($p < 0.01$) 분화도에 있어서는 고분화일수록 EGFR발현율이 높았다. ($P < 0.01$) 이상과 같이 대장 직장암에서 EGFR의 발현은 분화도 임파관 전이와 상관관계가 있어 EGFR이 예후결정인자로서 임상적 가치가 있을 것으로 사료되나 본 연구와 다른 결과들^{22,55,38}도 보고되고 있어 EGFR이 예후 결정인자로서 인정받기 위해서는 앞으로 더 많은 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

한편 VEGF는 Senger⁴⁰, Keck¹⁹의 보고에 따르면 생체내에서 vascular leakage를 유도하는 기능 때문에 vascular permeability factor(VPF)라고도 불리는데 이는 인체의 여러부위에서 생산되는 heparin binding dimeric glycoprotein으로 1989년 Ferrarago Henzel에 의해 bovine pituitary follicle or folliculostellate cell에서 동정되었다¹². Angiogenesis는 종양의 성장과 전이에 중요한 역할을 하는데 이

는 종양세포에서 분비되는 성장인자에 의해 조절된다. Folkman과 Klagsbrun¹³⁾, Risau³⁴⁾는 몇몇 endothelial growth factor가 angiogenic activity를 갖는다고 보고하였다. 여기에는 fibroblast growth factor, platelet derived growth factor, vascular endothelial growth factor(VEGF)등이 포함된다. VEGF는 vassels로부터 얻은 vascular endothelial cell에 대하여 강력한 mitogenic activity를 보이지만 fibroblasts, lens epithelial cells, corneal endothelial cells, keratinocytes 또는 adrenal cortex cells에 대해서는 growth에 영향을 미치지 않는다고 보고하였다^{12,24)}. Plate³²⁾, Shveiki⁴²⁾에 따르면 빠르게 성장하는 종양인 glioblastoma multiforme에서 blood supply부족으로 인한 oxygen tension이 감소하면 종양은 VEGF를 분비하여 angiogenesis를 일으킨다고 보고하였다. Sato K³⁷⁾에 의하면 renal cell ca에서는 VEGF gene의 overexpression과 tumor의 grade, stage, size와 상관관계가 없다고 보고하였지만 Weidner⁵³⁾에 의하면 breast ca에서는 angiogenesis의 정도가 tumor의 metastasis 능력을 나타낸다고 보고하였다. 이 이외에도 bladder tumor⁶⁾, cervix tumor⁴⁴⁾ 그리고 cutaneous melanoma⁴⁶⁾에서도 vascularity가 중요한 prognostic factor가 된다고 보고 하였다. Lawrence F²³⁾에 의하면 VEGF m RNA의 overexpression은 breast ca의 angiogenesis와 연관된다고 보고하였다. 본 연구에서는 VEGF발현양성은 20예(48%)였고 발현음성은 22예(52%)였다. VEGF발현은 분화도가 높을수록 높게 발현되었으나 침습깊이나 임파절 전이, 혈중 CEA level과 VEGF사이에 상관관계가 없었다. Warren RS⁵²⁾에 따르면 대장직장암에서 VEGF overexpression은 간전이와 관련있다는 보고도 있고 anti-VEGF를 이용한 antineoplastic therapy도 시도되고 있다. 그러나 본 연구의 결과로는 VEGF는 예후인자로 생각되지 않으며 예후인자로 생각하기 위해서는 더 많은 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

결 론

중앙대학교 의과대학 부속병원 외과에서 1990년 1월부터 1995년 12월까지 대장 직장 선암으로 수술을 시행받은 후 병리조직학적으로 확진된 환자 중에서 조직 표본상 종괴내의 출혈, 괴사와 같은 2차적 변화가 초래되어 있는 예들을 제외한 42예를 대상으로 후향적 연구로써 EGFR 및 VEGF 발현과 대장 직장 선암의 조직학적 분화도, 침습깊이, 임파절 전이, 혈중 CEA level 등과의 상관관계를 알아보기 위하여 본 연구를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 총 42예중 EGFR 발현 양상은 35예 (83%) 발현 음성은 7예(17%)였으며 VEGF 발현 양성은 20예(48%), 발현 음성은 22예(52%)였다.

2) 조직학적 분화도가 높을수록 EGFR은 높은 양성률을 보였으며($P < 0.01$) VEGF도 조직학적 분화도가 높을수록 높은 양성률을 보였다($P < 0.01$).

3) EGFR, VEGF 모두에서 침습 깊이와 유의한 관계가 없었다.

4) EGFR은 임파절 전이가 있는 23예에서 임파절 전이가 없는 19예보다 더 높은 발현율을 보였다($P < 0.01$).

그러나 VEGF는 임파절 전이와 유의한 관계가 없었다.

5) EGFR, VEGF 모두 혈중 CEA level과는 유의한 관계가 없었다.

이상의 결과로 대장 직장 선암 환자에서 EGFR은 예후결정인자로서 임상적 가치가 있다고 사료되지만 VEGF는 예후결정인자로서 역할을 한다고 판단하기는 어려울 것으로 사료된다. 대장 직장 선암에서 EGFR이 가치있는 예후결정인자로 인정받기 위해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) 주영재, 김준미, 김영식, 김영배, 황태숙: 대장 및 직장암

- 종에서의 *Proliferating Cell Nuclear Antigen*과 *Epidermal Growth Factor Receptor*의 발현도와 다른 예후인자와의 관계에 대한 연구. *Journal of Korean Cancer Association* 28(3): June, 1996
- 2) Anzàno Ma, Roberts AB, Smith JM, Sporn MB, DeLarco JE: *Sarcoma growth factor from conditioned medium of virally transformed cells is composed of both type α and type β transforming growth factors.* *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 6264, 1983
 - 3) Bradley SJ, Garfinkle G, Walker E, Salem R, Chen LB, Steele JrG: *Increased expression of the epidermal growth factor receptor on human colon carcinoma cells.* *Arch Surg* 121: 1242, 1986
 - 4) Carpenter G: *Epidermal growth factor.* *Handb Exp Pharmacol* 57: 90, 1981
 - 5) Chinkers M, Cohen S: *Purified EGF receptor-kinase interacts specifically with antibodies to Rous sarcoma virus transforming protein.* *Nature* 290: 516, 1981
 - 6) Chodak, GW, Haudenschild C, Gittes RF, Folkman, J: *Angiogenic activity as a marker of neoplastic and preneoplastic lesions of the human bladder* *Ann Surg* 192: 762, 1982
 - 7) Christensen ME, Therkildsen MH, Hansen BL, Hansen GN, Bretlau P: *Immunohistochemical detection of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinomas.* *Acta Otolarygo* 112: 734, 1992
 - 8) De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT: *The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor.* *Science* 255: 989, 1992
 - 9) Downward J, Yarden Y, Scrace G, et al: *Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erbB oncogene protein sequences.* *Nature* 307: 521, 1984
 - 10) Downward J, Yarden Y, Scrace G, Totty N, Stockwell P, Ullrich A, Schlessinger J, Waterfield MD: *Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erbB oncogene protein sequences.* *Nature* 307: 521, 1984
 - 11) Ferrara N, K A Houch L B Jakeman, DW Leung: *Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins.* *Endocr Rev* 13: 18, 1992
 - 12) Ferrara N, Henzel WJ: *Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells.* *Biochem Biophys Res Commun* 161: 851, 1989
 - 13) Folkman, J: *The role of angiogenesis in tumor growth.* *Seminars in Cancer Biology* 3: 65, 1992
 - 14) Gusterson B, Cowley G, McIlhinney J, Ozanne B, Fisher C, Reeves B: *Evidence for increased epidermal growth factor receptors in human sarcomas.* *Int J Cancer* 36: 689, 1985
 - 15) Hamburger AW, White CP, Brwon RW: *Effect of epidermal growth factor on proliferation of human tumor cells in soft agar.* *J Natl cancer Inst* 67: 825, 1981
 - 16) Hemming AW, Davis NL, Klufftinger A, et al: *Prognostic markers of colorectal cancer: an evaluation of DNA content, epidermal growth factor receptor, and Ki-67.* *J Sur Oncol* 51(3): 147, 1992
 - 17) Hofman GE, Rao CHV, Barrows GH, Schultz GS, Sanfilippo JS: *Binding sites for epidermal growth factor in human uterine tissue and leiomyomas.* *J Clin Endocrinol Metab* 58: 880, 1984
 - 18) Ishitoya J, Toriyama M, Oguchi N, et al: *Gene amplification and overexpression of EGF receptor in squamous cell carcinomas of the head and neck.* *Br J Cancer* 59: 559, 1989
 - 19) Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT: *Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF* *Science* 246: 1309, 1989
 - 20) Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, et al: *Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF.* *Science* 246: 1309, 1989
 - 21) Klufftinger AM, Robinson BW, Quenville NF, Finley RJ, Davis NL: *Correlation of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 oncogene product to known prognostic indicators of colorectal cancer.* *Surg Oncol* 1(1): 97, 1992
 - 22) Koretz K, Schlag P, Moller P: *Expression of epidermal growth factor receptor in normal colorectal mucosa, adenoma and carcinoma.* *Virchows Archiv A Pathol Anat* 416: 343, 1990
 - 23) Lawrence FB, Brygida BP, Robert W, Jackman P, Kathi TM, Donald R, Senger P, James LC, Stuart JS: *Expression of vascular permeability factor (Vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer.* *Human Pathology Vol. 26, No. 1, January, 1995*
 - 24) Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al: *Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen.* *Science* 246: 1306, 1989
 - 25) Lonman Sc, Barns EM, Klijin Jg, van der Burg MEI, Foekens JA: *Epidermal growth factor receptor in ovarian tumors: correlation of immunohistochemistry*

- with ligand binding assay. *Br J Cancer* 66: 1015, 1992
- 26) Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR: A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9026, 1992
- 27) Markovic B, Kwan YL, Nicholls EM, Walsh C, Cruch RL: A sensitive method for the detection of poly-A tails of mRNA using a biotin-labelled heteropolymer of dT: rA. *J Pathol* 167: 369, 1992
- 28) Mayer A, Takimoto M, Fritz E, Schellander G, Kofler K, Ludwig H: The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and *mdr* gene expression in colorectal cancer. *Cancer* 71(8): 2454, 1993
- 29) Millauer BL, K Shawver, KH Plate, A Ullrich: High affinity VEGF binding and developmental expression suggest *Flk-1* as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72: 835, 1993
- 30) Neal DE, Marsh C, Bennett MK, et al: Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumours. *Lancet* *ii*: 366, 1985
- 31) Ozanne B, Shum A, Richards CS, Cassells D, Grossman D, Trent J, Gusterson B, Hendler F: Evidence for an increase of EGF receptors in epidermoid malignancies: growth factor and transformation. *Cold Spring Harbor Laboratory* 41, 1985
- 32) Plate KH, Greier G, Weich, HA & Risau W: Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 359: 845, 1992
- 33) Reifenberger G, Prior R, Deckert M, Wechsler W: Epidermal growth factor receptor expression and growth fraction in human tumours of the nervous system. *Virchows Arch A* 414: 147, 1989
- 34) Risau W: Vasculogenesis, angiogenesis and endothelial cell differentiation during embryonic development. In: *The Development of the Vascular System*, edited by RN Feinberg, GK Sherer & R. Auerbach, Basel, Karger pp. 58, 1991
- 35) Robinson RA, Branum EL, Volkenant ME, Moses HL: Cell cycle variation in I-labelled epidermal growth binding in chemically transformed cells. *Cancer Res* 42: 2633, 1982
- 36) Sainbury JRC, Nicholson S, Angus B, Farndon JR, Malcolm AJ, Harris AL: Epidermal growth factor receptor status of histological subtypes of breast cancer. *Br J Cancer* 58: 458, 1988
- 37) Sato K, Terada K, Sugiyama T, Takahashi S, Saito M, Moriyama M, Kakinuma H, Suzuki Y, Kato M: Frequent overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor Gene in Human Renal cell carcinoma. *Tohoku J Exp Med* 173: 355, 1994
- 38) Scambia G, Panici PB, Bellantone R, et al: Receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in primary colorectal tumors. *J Surg Oncol* 48(3): 183, 1991
- 39) Schlessinger J, Schreiber AB, Levi A, La I, Libermann T, Yarden Y: Regulation of cell proliferation by epidermal growth factor. *CRC Crit Rev Biochem* 14: 93, 1983
- 40) Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS & Dvorak HF: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983, 1983
- 41) Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M: Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (*flt*) closely related to the *fms* family. *Oncogene*, 5: 519, 1990
- 42) Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843, 1992
- 43) Sikora K, Chan S, Evans G, et al: C-myc oncogene expression in colorectal cancer. *Cancer* 59: 1289, 1987
- 44) Sillman F, Boyce J, Fruchter T: The significance of atypical vessels and neovascularization in cervical neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 139: 154, 1981
- 45) Soberquist AM, Carpena G: Developments in the mechanism of growth factor action: activation of protein kinase by epidermal growth factor. *Fed Proc* 42: 2615, 1983
- 46) Srivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K, Hughes L: The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.67-4.0mm thick) skin melanoma. *A J Pathol* 133: 419, 1988
- 47) Steele RJC, Kelly P, Ellul B, Eremin O: Immunohistochemical detection of epidermal growth factor receptors on human colonic carcinomas. *Br J Surg* 77(120): 1352, 1990
- 48) Steinberg SM, Barwick KW, Stablein DM: Importance of tumor pathology and morphology in patients

- with surgically resected colon cancer. *Cancer* 58: 1340, 1986
- 49) Stoscheck CM, King LE Jr: *Characteristics of EGF and its receptor and their relationship to transforming proteins. J Cell Biochem* 31: 135, 1986
- 50) Tam JP: *Physiological effects of transforming growth factor in the newborn mouse. Science* 229: 673, 1985
- 51) Todaro GJ, Fryling C, DeLarco JE: *Transforming growth factors produced by certain human tumor cells; polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. Proc Natl Acad Sci USA* 77: 5258, 1980
- 52) Warren RS, Yuan H, Matti MR, Gillett NA, Ferrara N: *Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. J Clin Invest Vol.* 95, April 1789, 1995
- 53) Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J: *Tumor angiogenesis and metastasis Correlation in invasive breast carcinoma. N Engl J Med* 324: 1, 1991
- 54) Wiggers T, Arends JW, Schutte B, Volovics L, Bosman FT: *A multivariate analysis of pathologic prognostic indicators in large bowel cancer. Cancer* 61: 386, 1988
- 55) Yasui W, Sumiyoshi H, Hata J, et al: *Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas. Cancer Res* 48: 137, 1988
-