대한대장항문학회지 제 16 권 제 6 호
JKSCP Vol. 16, No. 6, 2000

국소진행된 직장암에서 p53, Bcl-2, Ki-67 발현상태에 따른 항암화학약물 및 방사선 치료 반응

연세대학교 의과대학 외과학교실, [1]병리학교실, [2]방사선종양학교실

김남규 · 박재균 · 양우익[1] · 윤성현 · 성진실[2] · 민진식

p53, Bcl-2 and Ki-67 Expression according to Tumor Response after Concurrent Chemoradiation Treatment for Advanced Rectal Cancer

Nam Kyu Kim, M.D., **Jae Kyun, Park,** M.D., **Woo Ik Yang,** M.D.[1]
Seong Hyeon Yun, M.D., **Jin Sil Sung,** M.D.[2] and **Jin Sik Min,** M.D.

Department of Surgery, [1]Pathology and [2]Radiation Oncology,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Concurrent chemoradiation treatment (CCRT) for locally advanced rectal cancer is an important modality for curative resection, but its tumor response shows wide spectrum. The aim of study is to investigate any correlation between a related genetic mutations, proliferative index and tumor response after CCRT. **Methods:** A twenty three patients with rectal cancer, which preoperatively staged as over T3N1 or T4 determined by transrectal ultrasonography and MRI. Enrolled patients were given 5 FU 450 mg/m^2 and leucovorin 20 mg/m^2 intravenously for 5 days during the first and fifth weeks of radiation therapy (45 54 Gy). 4 weeks after completion of scheduled treatment, surgical resection was performed. Tumor response was classified into CR (complete remission), PR (partial response: 50% of diminution of tumor volume and downstaging), NR (no response). Paraffin-embedded tissues obtained before chemoradiation treatment were studied with immunohistochemical staining of p53, Bcl-2 and Ki-67. The extent of tumor response was correlated with proliferative activity as measured by immunostaining of Ki-67 proliferative antigen and expression of p53 and bcl-2 oncoproteins (less than 10%: negative, 10 25%: +, 25 50%: ++, more than 50%: +++, Ki-67: to count a labeled cells per 1,000 cells). **Results:** All patients were resectable. CR was obtained in 4 (17.4%), PR in 10 (43.3%) and NR in 9 (39.2%). p53 mutation was noted in 16 (70%). p53 mutation was found in NR: 5 (31.3%), PR: 9 (56.2%), CR: 2 (12.5%), respectively. Bcl-2 expression was noted in 11 (48%). NR as in 4 (36.3%), PR: 3 (28.4%) and CR: 4 (36.3%), respectively. Ki-67 labeling index was NR: 615.4±446.2, PR: 663.2±296.4, CR: 765.5±188.3, respectively (CR+PR Vs NR, p=0.029). **Conclusions:** Immunohistochemical Expression of p53 and bcl-2 does not correlate with tumor response after CCRT, but Ki-67 labeling may be useful parameters for good radiosensitive tumor selected for CCRT. **(JKSCP 2000;16:436－443)**

Key Words: Rectal cancer, Preoperative chemoradiation, Tumor response, p53, Bcl-2, Ki-67
직장암, 수술 전 방사선 및 항암화학요법, 종양 반응

서 론

국소진행된 직장암의 경우 수술 전 방사선 항암 화학요법 및 방사선 병합치료는 종양의 병기하향을 유도하여 근치적 절제율을 높히고 수술 후 국소 재발을 억제하는 데 그 목적이 있다. 보고자에 따라 다르지만 수술 전 항암 약물 및 방사선 병합치료 후 절제율은 80% 이

책임저자 : 김남규, 서울시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 외과학교실(우편번호: 120-752)
(Tel: 02-361-5562, Fax: 02-313-8289)
(E-mail: namkyuk@yumc.yonsei.ac.kr)
본 논문의 요지는 1999년 제25회 대한암학회에서 구연하였음.
이 논문은 연세대학교 의과대학 암연구소 학술 연구비 보조로 진행되었음.

상, 종양의 완전 관해도 10 20%까지 보고하고 있다.[1-3] 그러나 일부 종양에서 수술 전 방사선 및 항암 약물 병합치료에 반응을 하지 않거나 종양이 진행되어 전신전이를 하는 경우가 있어 치료를 어렵게 하고 있다. 반응을 하지 않는 종양의 특징을 분자생물학적으로 규명하고자 하는 노력이 있어 왔는데 Willet등[4]은 증식능이 낮은 세포들이 이러한 병합치료에 별 반응을 안 하는 것을 관찰하여 이 세포군이 종양의 병기하향에 장애가 되는 요소라고 하였다. 이외 종양 내 p53, Bcl-2 유전자 등의 돌연변이가 치료반응과 관계 있다는 보고가 있다.[5,6] 본 연구는 방사선 항암 화학요법 전에 직장암내의 p53, bcl-2, ki-67 발현 상태와 방사선 및 항암 화학 요법후의 종양의 반응 정도와 상관 관계를 조사하여 이러한 치료 후 종양의 반응정도를 예측하는 지표를 제시하고자 하였다.

방 법

1) 연구대상

1997년 3월부터 1999 3월까지 연세대학교 부속 세브란스병원 외과에서 조직학적으로 확진된 진행성 직장암 23명을 대상으로 하였다. 수술 전 직장 수지검사상 암종괴가 직장 벽에 고정된 경우이거나 직장 초음파 검사상 직장 벽을 뚫었거나 주위 골반장기를 침범한 경우이고 주위로의 암전이가 의심되는 커진 림프절이 여러 개 있을 때를 대상으로 수술 전 항암 화학 및 방사선 치료를 하였다. 항암 화학요법은 5 FU 450 mg/m^{2}와 leucovorin 20 mg/m^{2}을 총 4,500 내지 5,040 cGy 방사선 조사시 첫 5일간과 마지막 5일간에 정맥주사하였다. 방사선 및 항암 약물 치료 전에 조직생검을 하여 보관하였다. 치료종결 후 직장 초음파 검사 및 MRI 검사하여 치료반응을 조사하며 약 4주나 6주 후에 근치적 목적으로 외과적 절제를 시행하였다. 수술 후 병리조직학적 소견과 상호 분석하여 종양이 완전소실된 경우를 완전 관해(complete remission), 종양의 직경이 50% 이상 감소된 경우 혹은 직장 벽 침윤도가 병기 하향되어 유동성이 많아진 경우를 부분 관해(partial remission), 종양의 크기 변화나 병기하향이 안된 경우를 무반응(no response)으로 정의하였다.

2) 면역조직화학적 염색 방법

파라핀에 포매된 조직블록을 연속절편하여 hematoxylin-eosin 염색하여 암세포가 많은 부위를 선택하여 염색할 슬라이드를 준비하였다. p53 (antimouse antibody, Dako, Carpinteria, CA, USA), Bcl-2 (antimouse antibody, Dako, Carpinteria, CA, USA), Ki-67 (M I B-1, immunotech, France) 및 LSAB kit (Dako, Carpinteria, CA, USA)을 이용하여 ABC (avidin-biotin complex immunoperoxidase technique) 방법으로 면역조직화학 염색을 실시하였다.

파라핀 포매조직을 5 μm 두께로 조직절편을 만들어 xylene과 alcohol로 탈파라핀과 함수 과정을 거쳤다. 이후 PBS (phosphate buffer saline)로 세척했다. 세포내 존재하는 peroxidase 활성도를 제거하기 위해 3% 과산화수소수로 처리하였다. Citrate acid buffer (pH=6.0)에 침수시킨 후 microwave에서 25분간 처리하였다. 조직을 식힌 후 PBS로 세척했다. 이후 1 : 10 tissue conditioner (LSAB kit: blocking agent)로 4분간 부치하여 조직항원과 항체간의 비특이적 결합을 막았다. p53, Bcl-2 단백의 항체를 Tris-HCl buffer 용액에 1 : 100으로 희석하여 4도에서 밤새 배양하였다. PBS로 세척 후 biotinylated goat antimouse antibody를 PBS에서 1 : 200으로 희석한 용액을 조직에 점적하고 60분간 부치한 후 PBS로 세척하였다. 발색제로 AEC chromogen을 10분간 부치시킨 후 hematoxylin으로 3분간 대조염색 시행 후 Dako glycerol mounting medium을 사용하여 현미경으로 관찰하였다.

Ki-67에 대한 M I B-1 monoclonal antibody를 이용하여 반응시켰다. 조직 슬라이드는 실온에서 10% normal goat serum에서 15분간 부치한 후 1 : 200으로 희석한 PBS 용액에서 4도에서 밤새 배양하였다. 1 : 400으로 희석한 biotinylated goat antimouse antibody를 30분간 배양하고 1 : 200으로 희석한 streptavidin-biotin peroxidase complex 용액으로 부치했다. AEC chromogen으로 10분간 부치한 후 hematoxylin으로 대조 염색 후 현미경으로 관찰했다.

3) 결과 판정

각 조직의 항체 발현도는 종양세포의 염색되는 p53 돌연변이 단백, Bcl-2 단백의 발현빈도, 발현강도 및 양상을 관찰하였다. 강도는 종양세포의 10% 미만이 양성인 경우를 음성, 10 25%인 경우를 약양성(+), 25 50%를 중등도 양성(++), 50% 이상은 강양성(+++)으로 등급을 정하였다. Bcl-2 단백의 발현의 대조군은 림파구의 Bcl-2 단백발현으로 하였다(Fig. 1, 2). Ki-67 발현은 고배율에서(×200 or ×400) ocular 10×10 mm grid을 이용하여 1,000개 세포 중 발현된 핵의 수를 측정하였다(Fig. 3).

통계학적인 분석은 Chi-square test로 유의성을 검정하였다.

p53 Immunohistochemical Staining

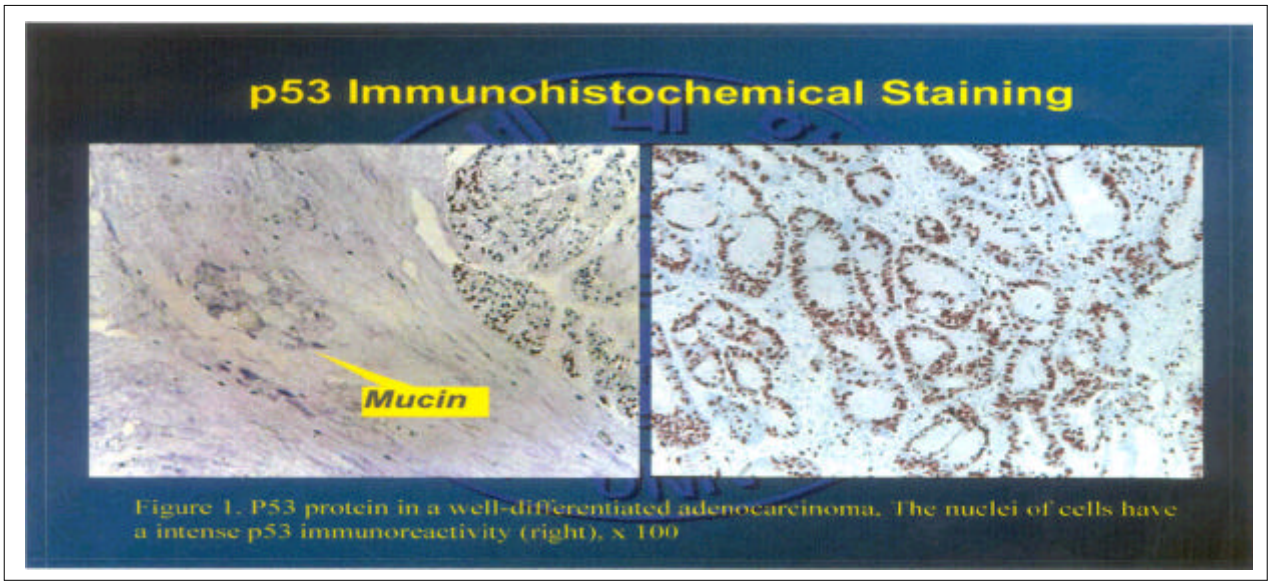

Fig. 1. p53 protein in a well-differentiated adenocarcinoma. The nuclei of cells have a intense p53 immunoreactivity (right), × 100.

Bcl-2 Immunohistochemical Staining

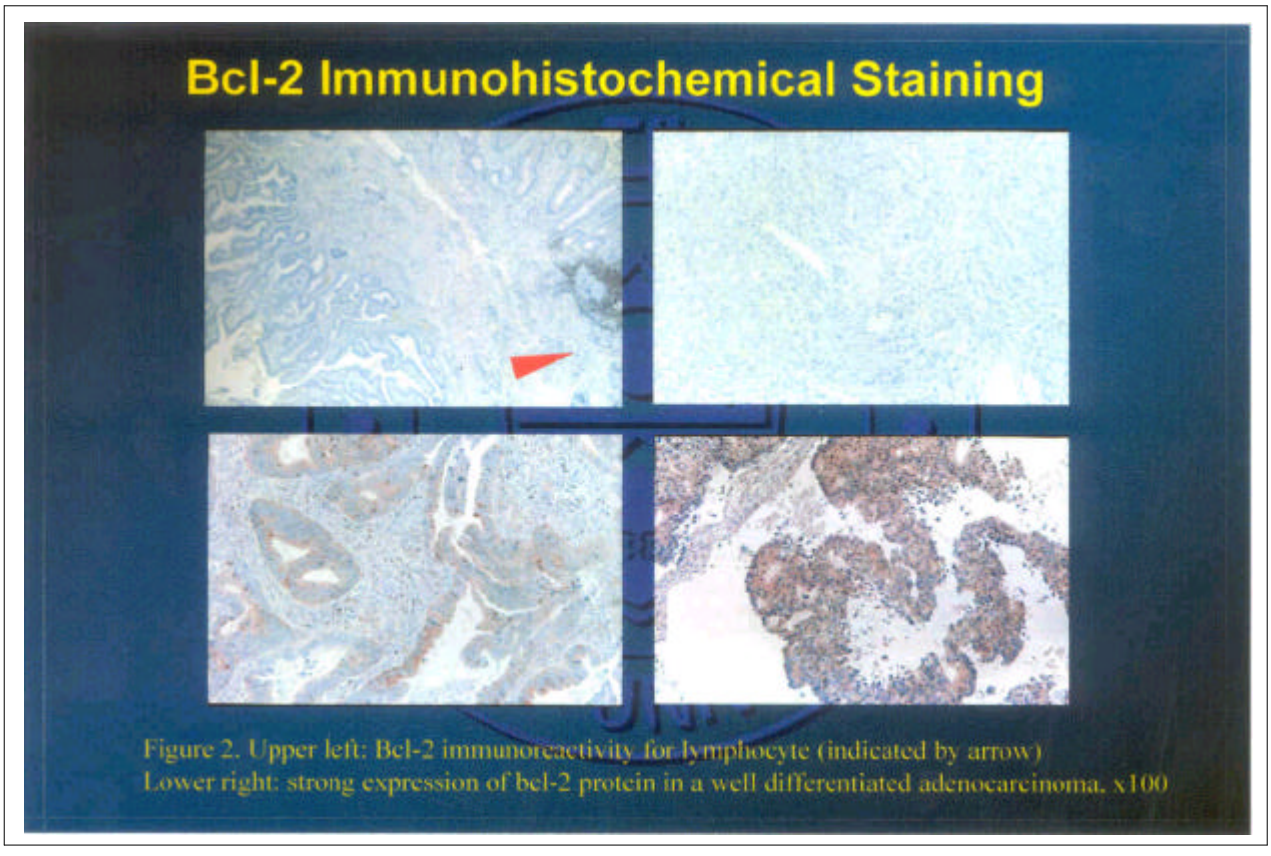

Fig. 2. Upper left: Bel-2 immunoreactivity for lymphocyte (indicated by arrow). Lower right: strong expression of bel-2 protein in a well differentiated adenocarcinoma. × 100.

Ki-67 Labeling Index
Counts of labelled cell per 1000 cells

Fig. 3. Low number of ki-67 positive cells (left) and high percentage of ki-67 stained cells: note prominent nucleolar positivity in a tumor cells (right), × 100.

Table 1. Tumor response after preoperative chemoradiation

Tumor response	No. of patients (%)
CR	4 (17.3)
PR	10 (43.4)
NR	9 (39.3)
Total	23 (100.0)

CR = Complete remission; PR = Partial response (50% diminution of tumor volume); NR = No response.

Table 2. p53 status of rectal cancer before concurrent chemoradiation treatment

p53*	NR N (%)	PR N (%)	CR N (%)	Total N (%)
(+)	5 (31.3)	9 (56.2)	2 (12.5)	16 (70)
(−)	4 (60)	1 (11.4)	2 (28.5)	7 (30)

CR = Complete remission; PR = Partial response (50% diminution of tumor volume); NR = No response.
*p = 0.638 between p53 status and tumor response.

결 과

1) 수술전 방사선 및 항암 화학요법 후 직장암의 치료반응

전체 23명 중 4명(17.3%)가 완전 관해(complete remission)를 보였고 10명(43.4%)이 부분 반응(partial response), 9명(39.3%)이 무반응(no response)이었다(Table 1).

2) 수술 전 방사선 항암 화학요법 전 직장암의 p53 발현 상태와 종양의 반응 정도

수술 전 방사선 및 항암 화학요법 전의 직장암의 p53 양성발현은 16/23 (70%)이었고 음성은 7/23 (30%)이었다. p53 양성발현 16예 경우 완전 관해가 2/16 (12.5%), 부분반응이 9/16 (56.2%), 무반응 5/16 (31.3%%)이었다. p53 음성인 7예 중 2예(28.5%)가 완전관해, 1예(11.4%)가 부분반응, 4예(60%)가 무반응이었다. p53 발현 상태와 종양의 반응 정도와는 상관관계가 없음을 관찰하였다(p=0.683)(Table 2).

3) 수술 전 방사선 항암 화학요법 전 직장암의 Bcl-2 발현 상태와 종양의 반응 정도

Bcl-2 발현의 양성은 11예(48%)이었다. 4예(36.3%)가 완전관해, 3예(28.4%)가 부분반응이었고 4예(36.3%)가 무반응이었다. Bcl-2 음성은 12예(52%)이었다. 완전관해는 없었고 무반응이 7예(58.3%), 무반응이 5예(41.7%)이었다. 유독 Bcl-2 강양성 4예가 완전관해를 보였다(p=0.799)(Table 3).

4) p53, Bcl-2 발현의 intensity와 종양의 반응과의 상관 관계

종양의 반응 정도에 따라 p53 양성의 강도, Bcl-2 양

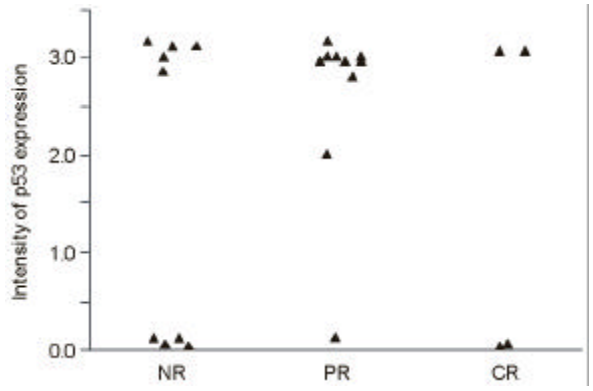

Fig. 4. Correlation between p53 expression and tumor response after CCRT in rectal cancer. CR: Complete remission, PR: Partial response, NR: No response.

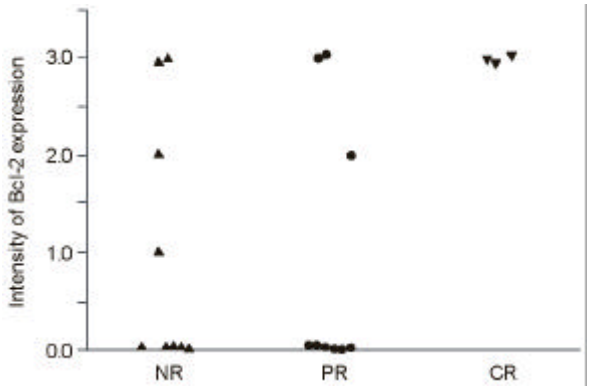

Fig. 5. Correlation between Bcl-2 expression and tumor response after CCRT in rectal cancer. CR: Complete remission, PR: Partial response, NR: No response.

Table 3. Bcl-2 status of rectal cancer before concurrent chemoradiation treatment

p53*	NR N (%)	PR N (%)	CR N (%)	Total N (%)
(+)	4 (36.3)	3 (28.4)	4 (36.3)	11 (48)
(−)	5 (41.7)	7 (58.3)	0	12 (52)

CR = Complete remission; PR = Partial response (50% diminution of tumor volume); NR = No response.
*p = 0.799 between Bcl-2 status and tumor response.

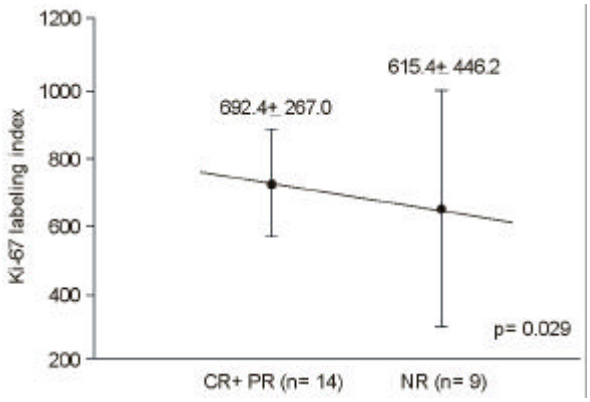

Fig. 6. Correlation between Ki-67 labeling index and tumor response after CCRT in rectal cancer. CR+PR: Complete remission+partical response, NR: No response.

성의 강도를 서로 비교하였다. 무반응 9예 중 p53 발현 5예는 모두 강양성(+++)이었다. 부분 반응은 10예 중 p53 발현 9예가 전부 강양성이었다(Fig. 4). 무반응 9예 중 Bcl-2발현 4예는 강양성 2예, 중등도 양성 1예, 약양성 1예 등이었다. 부분반응 10예 중 Bcl-2 발현은 2예가 강양성, 1예가 중등도 양성이었다. 완전 관해 4예의 경우 전 예에서 Bcl-2 강양성이었다(Fig. 5).

5) 수술전 방사선 항암 화학요법전 직장암의 Ki-67 labeling index (mean±SD)와 종양 반응정도

무반응 615.4±446.2, 부분반응 663.2±296.4, 완전관해 765.5±188.3이었다. 종양반응군(완전 관해와 부분반응)은 692.4±267.0, 무반응군은 615.4±446.2이었다 (p=0.029)(Fig. 6).

고 찰

국소 진행된 직장암의 치료로 수술 전 방사선 및 항암 약물 병합치료는 종양의 크기를 줄이고 직장벽에 고정되어 절제가 불가능한 종괴를 유동적이고 절제 가능하게 한다고 알려져 있다. 그러나 약 60 79%에서 종양의 치료반응을 보이고 90% 이상 절제율을 보고하고 있지만 종양이 치료 반응을 하지 않는 경우도 30% 정도 되는 것으로 알려져 있다.[1-3] 진행된 직장암에서 방사선 및 항암 약물 병합치료에 대한 치료 반응을 예측할 수 있으면 종양내 특징을 파악하여 반응이 없을 것으로 생각되면 불필요한 치료는 피할 수 있을 것으로 생각할 수 있다.[4-6] 따라서 이러한 종양의 치료 반응에 관계하는 인자들에 대한 연구가 보고되고 있다. Willet등[4]은 종양내 일부 암세포중 증식능이 낮은 세포군은 방사선 및 5 FU 항암 약물치료에 별 반응을 안하는 것을 관찰하였고 이것이 치료에 저항을 나타내는 것이라고 설명하였다. Fu등[5]은 종양의 방사선 감수성은 세포고사(apoptosis)를 통해 p53, p21 등이 관여한다는 가설하에 종양

의 p53, p21 면역조직화학 염색 결과 직장암의 방사선 및 항암치료 후 반응과 상호 관계를 조사하여 p53 양성, p21 음성 등의 분자생물학적 특성이 치료반응을 예견하는 데 도움이 된다고 하였다. 이러한 이론적 배경은 p53, p21 등이 세포주기(cell cycle)와 세포고사(apoptosis)를 조절한다고 알려져 있다. 즉 세포가 DNA손상을 입었을 때 p21 (cyclin-dependent kinase inhibitors)은 p53 유전자에 의해 활성화되어 G1 세포주기 정지나 세포고사를 일으킨다고 알려져 있다.[7,8]

p53이 방사선으로 인한 세포반응에 밀접한 관계가 있다는 실험적 보고가 많다.[9-11] p53 결손쥐의 흉선세포로 방사선조사로 인한 세포고사는 잘 안 된다고 하였고[9] 이후 p53 유전자 돌연변이가 방사선 조사치료 저항의 원인이라고 하며 방사선 조사로 인한 세포고사는 p53 유전자와 관계가 있다고 하였다.[10-12] 그러나 p53 유전자와 방사선의 감수성과 상호 관계가 없다는 보고도 있다.[13-15] Sakakura등[6]은 진행된 직장암에서 5 Fluorouracil 좌약을 넣고 방사선 및 온열치료 후 p53 유전자 상태에 따른 세포고사, 종양의 반응 정도를 조사한 결과 p53 돌연변이 radioresistant가 4/7 (57.1%), intermediately sensitive 7/13 (53.9%), radiosensitive가 3/8 (37.5%)으로 종양의 반응과 세포고사율이 p53 유전자 상태와 어느 정도 관계가 있으리라고 생각되나 통계적으로 의의는 없다고 하였다. 이러한 결과는 직장암의 치료 효과를 결정하는 다른 인자가 많이 있음을 시사하는 것이라고 할 수 있다. 따라서 p53 유전자 상태만으로 직장암의 방사선 종양의 감수성을 예측할 수는 없다고 할 수 있다. 저자 등의 경우도 p53 면역조직화학 염색 양성이 70%이었고 p53 돌연변이 경우 치료 반응한 예 11/14 (78%), 무반응이 5/9 (55%)로 차이가 없었다.

Ki-67 proliferative antigen 검사에 의한 종양의 증식능은 저자들의 경우 치료반응이 있는 경우가 없는 종양보다 더 높게 관찰되어 종양세포의 증식활동이 높은 경우에 더 방사선 및 항암 약물치료에 잘 반응을 하는 것을 알 수 있었다.

Lanza등은[16] ki-67 index를 대장암에서 계산하여 45세 미만의 환자나 점액성 선암에서 index 값이 보다 높게 나왔으나 암의 병기 및 병리학적 변수와는 상관관계가 없었다고 하였고, Du등[17]도 maltoma에서 ki-67 index가 높은 경우 세포고사율도 높게 나타난다고 하였다. 저자의 경우도 치료반응이 좋은 직장암에서 ki-67의 값이 무반응의 직장암보다 높게 나왔다. Bcl-2 유전자는 전립선, 대장 및 폐암 등에서 발현이 되며 대개 50%에서 발현된다고 알려져 있다. 이 유전자는 human follicular lymphoma 암발생에 관여하며 또한 소장 및 대장 상피세포 재생부위 등에서 표현되고 있으며 세포고사로부터 세포를 보호하는 단백질을 생성하고 있다.[18,19] 따라서 bcl-2 강 양성 종양은 일반적 방사선 및 약물치료에 잘 안 듣고, 예후가 안 좋은 것으로 알려져 있다.[20] 그러나 일부 암에서는 bcl-2 expression은 꼭 나쁜 예후와 관련이 있지는 않고 오히려 예후가 좋을 수도 있다는 보고가 있다.[21] Oefner등[21]은 bcl-2 expression과 대장암의 병기 및 생존율과 상관관계를 조사하였는데 bcl-2 종양단백 양성의 종양이 예후가 더욱 좋고 덜 공격적인 것으로 보고하였다. 이외 bcl-2가 양성인 경우 폐암, 유방암, 갑상선암 등에서도 예후가 좋다는 보고가 있다.[22,23] Krajewska등[24]은 bcl-2 양성은 용종보다 대장암에서 낮은데 미분화암일수록 보다 낮게 나오는 것을 관찰하였다. 즉 종양이 진행되면서 bcl-2 expression은 감소하면서 bcl-x protein expression은 증가한 것을 관찰하였다. Bcl-2가 오히려 좋은 예후와 관련이 있는 보고가 있는 것은 Bcl-X_L expression과 관계 있다고 해석하기도 한다.[24,25]

이러한 현상은 최근 Bcl-2 family gene member인 Bax gene으로 설명한다. 이 Bax 단백은 세포고사를 유발하는 것으로 알려져 있고 Bcl-2/Bax ratio가 종양의 세포고사 감수성에 중요하다고 한다.[26] 즉 Bax gene expression이 감소하고 Bcl-2 expression이 증가하면 종양은 항암제나 방사선에 저항이 있게 된다. Bcl-2 expression이 높은 데도 치료에 잘 반응하는 것은 DNA 손상 시 Bax protein 생산이 되고 이 Bax 단백이 높은 Bcl-2 expression을 극복하지 않는가 추측을 하기도 한다. 따라서 종양내 생성된 Bax 단백 표현의 양이 세포고사 즉 치료의 반응을 예측하는 데 중요할 것으로 사료된다. 저자들의 경우 Bcl-2 양성이 11/23 (48%), 이 중 종양반응이 7/11 (63.6%), 무반응이 7/12 (58.2%)로 차이가 없었다. 특히 강양성(+++)을 보인 4명의 환자는 모두 완전 관해를 보였다. Bcl-2 강양성인 경우 방사선 및 항암 약물치료 반응이 적어야 함에도 불구하고 종양의 완전 관해를 보인 경우는 Bax 단백 생성 때문인지 다른 이유 때문인지는 추후 연구해야 할 과제로 사료된다. 최근의 Charalambous등[27]은 위 림프종에서 p53, bcl-2 및 Bax 단백발현을 조사하였는데 Bax 단백발현만이 환자의 예후와 관계가 있음을 보고하였고 특히 Bcl-2 음성 및 Bax 양성인 경우 예후가 좋음을 강조하였다. 완전 관해를 보인 직장암은 아마 Bcl-2 family Bax expression 때문에 종양의 반응이 좋았을 것으로 사료되며 종양의 무반응이나 부분 반응인 경우는 Bcl-2 표현이 높고 낮음이 관여하기보다는 Bax 단백의 표현이 많고 적음, 즉 각 종

양의 Bcl-2/Bax ratio에 관련된 것이 아닌가 추측이 된다. 따라서 Bcl-2 단독 측정보다는 Bcl-2 family인 Bax 유전자 발현을 같이 검색하는 것이 치료 예후를 보다 정확히 예측할 수 있을 것으로 생각된다. Bcl-2와 이의 동종 유전자가 종양 안에서 여러 상호 과정을 거치는 것으로 알려져 있어 좀더 다양한 Bcl-2 family 유전자에 대한 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

결 론

진행된 직장암의 수술 전 항암 화학약물 및 방사선 치료시 종양의 반응은 약 60%에서 반응을 보였다. 이러한 종양의 치료 반응에 영향을 주는 예후 인자로 종양의 분자생물학적 특징을 찾고자 하였다. p53, Bcl-2 종양단백 발현, Ki-67 등을 조사한 결과 p53과 Bcl-2 발현은 종양반응과는 상관 관계가 없었고 다만 완전 관해된 종양에서 Bcl-2 과발현이 되어 그 기전에 대해서는 보다 연구가 필요할 것으로 사료되었다. Ki-67은 수술 전 항암 화학 약물 및 방사선 치료에 대한 종양 반응 예측 인자로 의의가 있을 것으로 사료되었다.

REFERENCES

1. 김남규, 손승국, 민진식, 성진실, 노재경. 국소 진행된 직장암의 수술 전 항암 화학약물 및 방사선 병행치료 효과. 대한대장항문학회지 2000;16:93-8.
2. Minsky BD, Cohen AM, Kemeny N, Enker WE, et al. Combined modality therapy of rectal cancer: decreased acute toxicity with the peroperative approach. J Clin Oncol 1992;10:1218-24.
3. Charis RS, Tuler DS, Anscher MS, Russell L, Dary BM, Hathorn J, et al. Preoperative radiation and chemotherapy in the treatment of adenocarcinoma of the rectum. Ann Surg 1995;221:778-87.
4. Willet CG, Hagan M, Daley W, Warland G, Shellito PC, Compton CC. Changes in tumor proliferation of rectal cancer induced by preoperative 5-Fluorouracil and irradiation. Dis Colon Rectum 1998;41:62-7.
5. Fu CG, Tominaga O, Nagawa H, Nita ME, Masaki T, Ishimaru G, Higuchi Y, Tsuruo T, Muto T. Role of p53 and p21/WAF1 detection in patient selection for preoperative radiotherapy in rectal cancer patients. Dis Colon Rectum 1998;41:68-74.
6. Sakakura C, Koide K, Ichikawa D, Wakasa T, Shirasu M, Kimura A, et al. Analysis of histological therapeutic effect, apoptosis rate and p53 status after combined treatment with radiation, hyperthermia and 5-fluorouracil suppositories for advanced rectal cancer. Br J Cancer 1998; 77(1):159-66.
7. Fan S, EL-Deiry S, Boe I, et al. p53 gene mutations are associated with decreased sensitivity of human lymphoma cells to DNA damaging agents. Cancer Res 1994;54: 5824-30.
8. Namba H, Hara T, Tukazaki T, et al. Radiation-induced G1 arrest is selectively mediated by the p53-WAF/CIP1 pathway in human thyroid cells. Cancer Res 1995;55: 2075-80.
9. Lowe SW, Schmit EM, Smith EW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation induced apoptosis in mouse thymocytes. Nature 1993;362:847-52.
10. Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy I vivo. Science 1994;266: 807-10.
11. Xia F, Wang X, Wang YH, et al. Altered p53 status correlates with differences in sensitivity to radiation induced mutation and apoptosis in two closely related human lymphoblast lines. Cancer Res 1995;55:12-5.
12. Lee JM, Bernstein A. p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90: 5742-6.
13. Brachman DG, Beckett M, Graves D, Haraf D, Vokes E, Weichselbaum RR. p53 mutation does not correlate with radiosensitivity in 24 head and neck cancer cell line Cancer Res 1993;53:3667-9.
14. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, Wyllie AH. Thymocytic apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. Nature 1993;362:849-52.
15. Slichenmeyer WJ, Nelson WG, Slebos RJ, Kastan MB. loss of a p53 associated G1 checkpoint does not decrease cell survival following DNA damage. Cancer Res 1993; 53:4164-8.
16. Lanza Jr. G, Cavazzini L, Borghi L, Ferretti S, Buccoliero F, Rubbini M. Immunohistochemical assesment of growth fractions in colorectal adenocarcinomas with monoclonal antibody ki-67. relation to clinical and pathologic variables. Path Res Pract 1990;186:608-18.
17. Du M, Singh N, Husseuin A, Isaacson PG, Pan L. Positive correlation between apoptotic and proliferative indices in gastrointestinal lymphomas of mucosa-associate lymphoid tissue (MALT). J Pathology 1996;178:379-84.
18. Fukunaga-Johnson N, Ryan JJ, Wicha M, Nunez G, Clarke MF. Bcl-2 protectss murine erythroleukemiacells from p53-dependent and independent radiation-induced cell death. Carcinogenesis 1995;16:1761-7.
19. Bronner MP, Culin C, Reed JC, Furth EE. The bcl-2 protooncogene and the gastrointestinal epithelial tumor and progression model. Am J Pathology 1995;146:20-6.
20. Reed JC. Bcl-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. Hematol Oncol Clin North Am 1995;

9:451-73.
21. Oefner D, Riehemann K, Maier H, Riedmann B, Nehoda H, Toetsch M, Boecker W, Jasani B, Schmid KW. Immunohistochemically detectable bcl-2 expression in colorectal carcinoma: correlation with tumor stage and patient survival. Br J Cancer 1995;72:981-5.
22. Leek RD, Kaklamamis L, Pezzella, Gatter KC, Harris AL. bcl-2 in normal human breast and carcinoma, associated with estrogen receptor positive, epidermal growth factor receptor -negative tumor and in situ cancer. Br J Cancer 1994;69:135-9.
23. Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tungekar MF, Dunnill MS, Pierce CB, Harris A, Gater HK, ad Mason D. Bcl-2 protein in non-small cell lung carcinoma. N Eng J Med 1993;329:690-4.
24. Krajewska M, Moss SF, Krajewski S, Song K, Holt PR, Reed JC. Elevated expression of Bcl-x and reduced Bak in primary colorectal adenocarcinoma. Cancer Res 1996; 56:2422-7.
25. Flohil CC, Janssen PA, Bosman F. Expression of bcl-2 protein in hyperplastic polyps, adenomas, and carcinomas of the colon. J Pathology 1996;178:393-7.
26. Reed JC. Bcl-2 family proteins: Strategies for overcoming chemoresistance in Cancer. Apoptosis: pharmacological implications and therapeutic opportunities. Advances in Pharmacology volume 41, New York: Academic press; 1997. p. 501-6.
27. Charalambous GK, Gomatos IP, Konstadoulakis MM, Messaris EG, Manouras AJ, Apostolou A, et al. Protein expression of bax, bcl-2 and p53 in patients with Non-Hodgkin's Gastric Lymphoma: prognostic significance. World J Surgery 2000;24:608-14.