

복막전이를 보이는 대장암에서 E-cadherin 단백질 발현 및 CDH1 유전자의 변이 검색

울산대학교 의과대학 외과학교실, ¹진단병리학교실 및 서울아산병원 대장항문클리닉

김희철 · 노선애 · 김정선¹ · 유창식 · 김진천

Loss of E-cadherin Function is Suggested to be Associated with Peritoneal Seeding in Colorectal Cancer

Hee Cheol Kim, M.D., Seon Ae Roh, M.S., Jung-Sun Kim, M.D.¹, Chang Sik Yu, M.D., Jin Cheon Kim, M.D.

Colorectal Clinic, Asan Medical Center and Departments of Surgery, ¹Pathology, University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: We investigated whether the loss of E-cadherin function was related to the peritoneal seeding in colorectal carcinomas.

Methods: Eleven patients who had undergone a palliative resection for a colorectal carcinoma, with peritoneal seeding, were enrolled onto the study. The primary tumors and seeding nodules were analyzed with regard to mutations in the expressions of the CDH1 and protein of E-cadherin using SSCP, direct sequencing and immunohistochemical staining.

Results: In the primary tumors, the E-cadherin was normally expressed in 9 of the 11 cases, with 2 cases showing a reduced expression. In the seeding nodules, the E-cadherin was normally expressed in 6 of the 11 cases, with 5 cases showing a reduced expression. The degree of E-cadherin expression in the seeding nodules was significantly decreased comparing to that in the primary tumors ($P < 0.001$). In the mutational analysis, there were no pathogenic mutations in either the primary tumors or the seeding nodules, with the exception of two silent changes in the ctgggt>ctaggt (intron 2) and GTG>GTA (codon 782).

Conclusion: The loss of E-cadherin expression might be related to peritoneal seeding. The functional derangement of E-cadherin in peritoneal seeding could possibly be caused by a mechanism, such as promoter methylation, rather than the mutation of the CDH1. J Korean Soc Coloproctol

2003;19:20-25

Key Words: Colorectal carcinoma, E-cadherin, Peritoneal seeding, CDH1

대장암, E-cadherin, 복막전이, CDH1

서 론

E-cadherin은 cadherin 단백질군의 한 종류인 당단백으로 주로 상피조직의 세포표면에서 Ca^{++} 의존성 방식으로 세포와 세포의 결합에 관여하며, 배형성(embryogenesis), 염증조직에서 세포의 이동, 세포의 분화 및 미분화 등과 밀접한 관련이 있다.^{1,2} E-cadherin 단백질의 세포외 도메인(domain)은 주위 타 세포의 E-cadherin과 동형성(homotypic) 결합을 하여 세포간 부착을 유지한다. E-cadherin의 세포질 내 도메인은 수종의 세포질 단백질인 catenin과 결합하는데 이와 같은 결합은 E-cadherin의 세포간 결합의 기능유지에 필수적이며, 이를 통하여 세포 내 actin filament와 연결된다.^{3,4} E-cadherin 단백질과 catenin과의 결합은 세포부착뿐 아니라 세포 내 신호전달과 연관되어, β -catenin의 경우 APC 단백질, axin, GSK-3와 사합체를 만들어 세포질 내 농도를 조절하며, APC 단백질의 기능이상이나 Wnt 경로의 신호전달에 의하여 β -catenin 세포질 내 농도가 증가될 경우 TCF/Lef의 전사요소(transcriptional factor)와 결합되어 핵으로 이동, 특정 유전자를 활성화시킨다. 이러한 신호전달체계는 대장암 발생과의 관련성이 입증되어 있고 β -catenin을 매개로 E-cadherin도 신호전달과정의 조절에 관여할 것으로 추정된다.^{4,5}

E-cadherin의 기능저하는 여러 암종에서 발견되고 있으며 기능저하를 보이는 암종의 경우 암세포의 간질 침투 및 림프절 전이가 증가되어 있고 예후가 불량한 것으로 보고되고 있다.⁶⁻⁸ E-cadherin의 기능저하는 여러 가지 기전에 의해서 이루어질 수 있는데

책임저자: 김희철, 서울특별시 송파구 풍납동 388-1
울산대학교 의과대학 외과학교실 및 서울아산병원
대장항문클리닉(우편번호: 138-736)
Tel: 02-3010-3937, Fax: 02-474-9027
E-mail: hckim@amc.seoul.kr

이 연구는 아산생명과학연구소의 연구비 지원(2000-234)에 의하여 이루어졌음.

E-cadherin 유전자(*CDH1*)의 변이와 촉진자부위 메틸화와 같은 epigenetic 변화, 후번역 변화(posttranslational process) 등이다.⁹⁻¹¹ 또한 E-cadherin과 결합하는 catenin의 기능변화에 의해서도 이차적으로 E-cadherin의 기능저하가 나타날 수 있다. *CDH1*의 변이는 미만성 위암(diffuse gastric cancer)과 소엽상 유방암(lobular breast cancer)에서 많이 보고되고 있으며,^{6,8} 주위조직으로 침윤하는 두 암종의 특이한 조직형과 E-cadherin 기능저하가 관련이 있을 것으로 여겨진다.

소화기암의 경우 복막전이는 비교적 흔한 형태의 전이양식이며 특히 위암의 전신전이의 방식 중 가장 빈번하다. 복막전이는 미만성 위암의 경우 특히 빈발하는데 이는 암종이 주위 조직을 심하게 침윤하고 장막을 광범위하게 포함하여 세포박탈을 일으키는 데 기인하는 바 크다.^{12,13} 대장암의 경우 복막전이는 위암에 비하여 비교적 드문 형태의 전이양식으로 전체 전이중 20% 미만으로 보고되고 있다.¹⁴

본 연구에서는 복막전이를 가지고 있는 대장암을 대상으로 원발암과 전이암 조직에서 E-cadherin의 발현을 살펴보고 기능저하의 기전으로 *CDH1*의 변이에 대해서 분석하고자 하였다.

방 법

1) 대상 환자

대상환자는 원발성 대장선암으로 수술 받은 환자 중 수술 시 복막전이가 확인되고, 원발부위의 암종에 대하여 고식적 절제술이 시행되어 원발병소와 전이병소의 조직을 확보할 수 있는 11예로 하였다. 복막전이 이외 기타 장기에 전이병소를 병발한 경우는 제외하였다. 11예 대상환자의 남녀 비는 7 : 4이었고, 중간연령은 53 (25~84)세이었다.

2) PCR-SSCP

DNA는 표준적인 방법에 의해서 추출하였다. 기존에 보고된 *CDH1* primer를 이용하여 PCR을 시행하였다.⁶ PCR 반응액은 최종농도가 1X PCR buffer (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 200µM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 0.2µM의 primer가 되게 하고 1 U의 taq polymerase를 넣어서 최종부피가 50µl가 되도록 하였다. Exon 1의 경우 높은 GC염기 비율 때문에 5% DMSO를 추가하였으며, Exon 4-5의 amplicon의 크기를 줄이기 위하여 PCR 산물을 SSCP전에 2 U의 *RsaI* 효소를 넣어서 분해하였다. PCR 산물 3µl를 formamide

stop buffer (95% formamide, 10 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol) 4µl를 넣고 혼합 후 94°C에서 5분간 변성시킨 후 얼음 속에서 급냉시켰다. 각 시료는 10% glycerol이 포함된 6% acrylamide 젤에 부하시켰다. 전기 영동 후 silver nitrate 염색을 시행하여 염색된 DNA band를 분석하였다.

3) 염기서열분석

SSCP 분석에서 비정상적인 영동을 보인 band에 대하여 염기서열 분석을 시행하였다. 염기서열 분석 시 primer는 SSCP와 동일한 것을 이용하였으며 ABI Ready Reaction Dye Terminator를 이용하여 반응시킨 후 ABI Prism 377 염기서열분석기를 이용하여 분석하였다.

4) 면역화학염색

E-cadherin 단백질의 세포 내 발현을 보기 위하여 면역조직화학염색을 시행하였다. 조직은 formalin-fixed par tissue의 block을 이용하였다. Endogenous peroxidase activity는 15분 동안 methanol 내 0.5% hydrogen peroxide에 배양시켜 차단하였다. 항원을 얻기 위해 heat induced epitope retrieval method를 이용하는데 30분 동안 15 psi의 pressure cooker에서 sodium citrate solution (0.1M, pH 6.0)에 조직절편을 가열하였다. 조직절편은 30분 동안 normal rabbit serum (Dako, Carpinteria, CA, U.S.A.)으로 배양한 후 E-cadherin에 대한 mouse monoclonal antibody (Takara, Shiga, Japan)로 실온에서 배양하였다.¹⁵ Phosphate buffered saline (PBS)으로 씻은 후 조직절편은 biotinylated anti-mouse secondary antibody (Dako, Carpinteria, CA, U.S.A.)와 horseradish peroxidase labeled streptavidin (Dako, Carpinteria, CA, U.S.A.)으로 각각 1 : 200 dilution으로 배양하였다.

세포막에서 E-cadherin 염색을 보이는 세포의 비율에 따라 0 (염색 안 됨), 1 (25% 이하의 세포 염색), 2 (50% 이하 세포 염색), 3 (75% 이하 세포 염색), 4 (75% 이상의 세포 염색)로 분류하였으며, 염색의 강도는 색채표준(4th ed., Dainippon Ink and Chemicals Inc., Tokyo, Japan)에 따라 약(밝은 갈색, No. 355), 중(갈색, No. 338), 강(갈색, No. 341)으로 분류하였다.¹⁶ 염색정도의 판정은 염색비율과 염색강도의 곱으로 하였으며 9~12 이상은 단백질의 정상 발현, 5~8는 정도의 발현감소, 1~4는 심한 발현감소로 판정하였다.¹⁷⁻¹⁹

5) 통계적 분석

Chi-square법 및 wilcoxon signed rank법을 이용하였으며, 분석은 IBM 방식 컴퓨터에서 SSCP (version 9.0, SSCP Inc.) 프로그램으로 하였다.

결 과

1) 임상적, 병리적 양상

대상군의 연령분포는 40대 이하가 4예, 41 이상 60세 이하가 2명, 61세 이상이 5예이었다. 원발암의 위치는 우결장 8예, 좌결장 2예, 직장 1예이었고 병기(AJCC, 1997)는 T3 10예, T4 1예로 우결장암의 십이지장 침습이 있는 경우이었다. 림프절 전이 상태는 N0 2예, N1 4예, N2 5예이었다. 세포형은 중분화암 5예, 저분화암 1예, 점소양 세포형이 5예이었다(Table 1). 8예에서 우

결장절제술, 1예에서 좌결장절제술, 1예에서 전방절제술, 1예에서 저위전방절제술이 시행되었다.

2) E-cadherin의 면역화학발현 양상의 분석

E-cadherin 단백질의 발현을 분석해 보면 원발암의 경우 단백질이 정상적으로 발현된 예가 9예, 발현이 감소한 경우가 2예이었으며, 전이병소의 경우 단백질이 정상적으로 발현된 예가 6예, 감소된 예가 5예로 이 중 1예의 경우 원발암에서 미약하게 발현되는 E-cadherin이 전이병소에서는 발현이 전혀 되지 않는 예이었다(Fig. 1). 정상 발현 군과 발현 저하 군으로 양분하여 원발병소와 전이병소의 E-cadherin 발현을 비교하였을 때 병소 간 발현군의 분포에 통계적인 의미를 찾을 수 없었으나(P=0.362)(Table 2), 병소 간 발현정도의 평균 비교시 전이병소에서 발현이 저하되는 양상을 보였다(P<0.001)(Fig. 2). 연령군에 따른 E-cadherin 단백질발현의 차

Table 1. Clinicopathologic characteristics and E-cadherin expression in primary tumors and seeding nodules

No	Sex	Age	Cell type*	T [†]	N [‡]	E-cadherin in primary tumor [§]	E-cadherin in seeding nodule	CDHI mutation
1	F	40	MUC	3	2	4	0	-
2	M	62	MUC	3	2	12	4	-
3	M	84	MD	3	2	12	12	Intron 2
4	M	25	MUC	32	8	2	-	-
5	M	63	MUC	3	1	12	8	-
6	M	27	MUC	3	12	12	-	-
7	F	53	MD	3	2	12	12	-
8	F	29	MD	3	1	12	12	-
9	M	78	PD	3	1	12	12	-
10	M	48	MD	3	0	12	9	Codon 782
11	F	66	MD	4	0	12	8	-

*MUC = mucinous cell type; MD = moderately differentiated; PD = poorly differentiated. [†]T3 means tumor invades into the subserosa, or into non peritonealized pericolic tissue and T4 to other organs. [‡]N1 = 1 to 3 lymph node metastasis; N2 = 4 or more lymph node metastases. [§]A weighted score obtained by multiplying percentage by the intensity.

Table 2. The membrane expression of E-cadherin in colorectal adenocarcinomas with peritoneal seeding

	Weighted score*				Reduced (%)
	Preserved	Reduced			
	9~12 (%)	5~8	1~4	0	
Primary tumor	9 (81.8)	1	1	0	2 (18.2)
Seeding nodule	6 (54.5)	2	2	1	5 (45.5)

*A weighted score was obtained by multiplying percentage by the intensity. Chi-square test (9~12 vs. 5~8, 1~4, and 0), P=0.362.

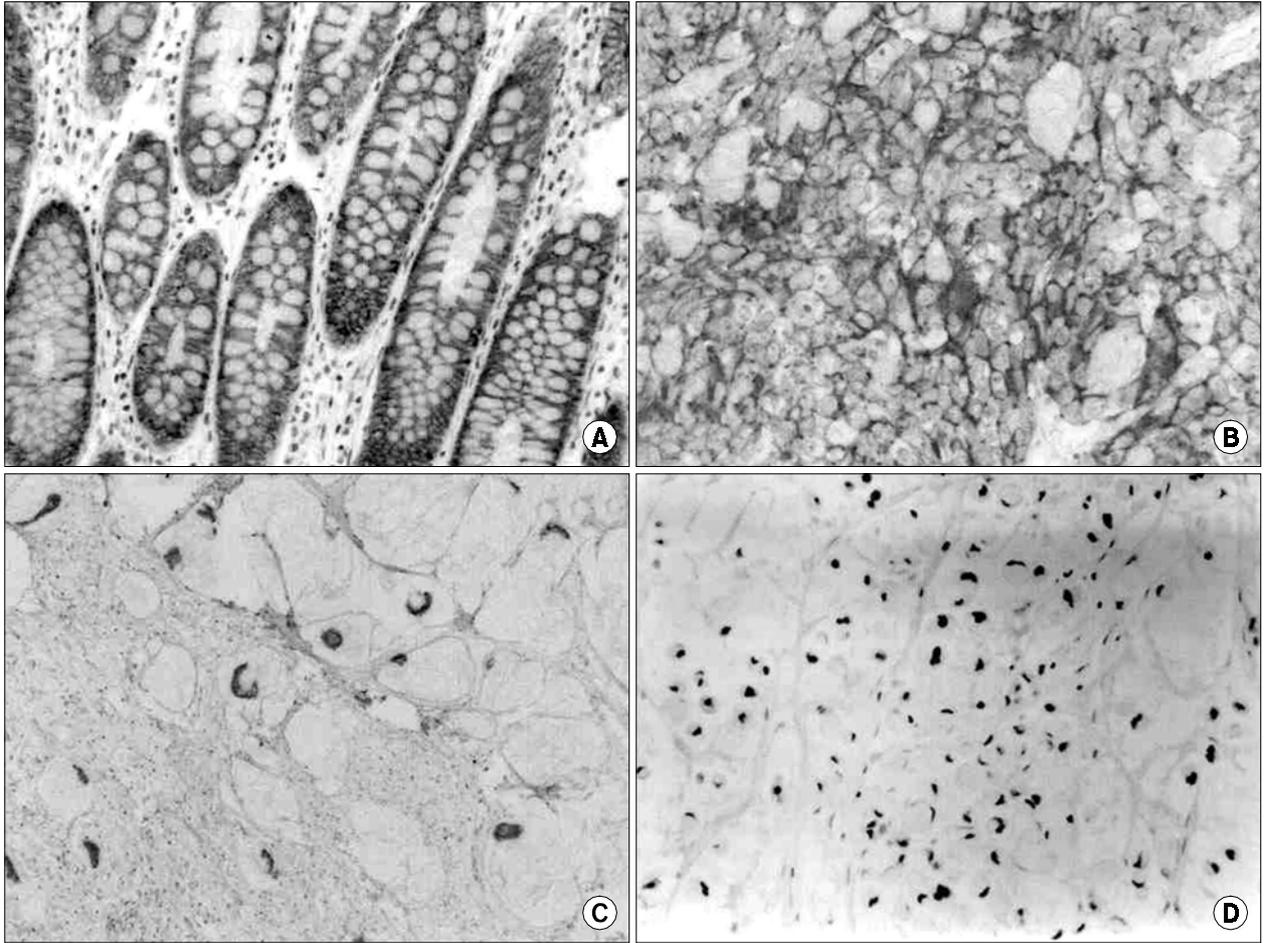


Fig. 1. (A) Normal mucosa showing uniformly membranous expression of E-cadherin (×200). (B) Preserved expression of E-cadherin (weighted score 12, ×200) (C) Reduced expression of E-cadherin (weighted score 2, ×200) (D) Absent expression of E-cadherin (×200).

이는 없었으며, 점소양 세포형인 5예의 경우 4예에서 단백질발현이 저하되거나 전이병소에서 단백질발현이 감소하는 양상을 보였으며, 중, 고분화 세포형의 경우 6예 중 1예에서만 단백질발현이 감소하였으나 통계적 차이(P=0.08)는 없었다.

3) CDH1의 변이

11예의 원발암과 복막전이 병소의 E-cadherin 유전자(CDH1) 분석상 2종의 염기변이가 각각 1예에서 발견되었으며 염기변이가 있는 환자의 경우 원발암과 전이병소에 동일하게 변이가 발견되었다. 이 중 1예는 intron 2의 ctgggt>ctaggt 변이였으며, 다른 1예는 codon 782 (exon 15)의 GTG>GTA (Val>Val)이었다 (Fig. 2). 2종의 변이는 모두 아미노산의 변화를 가지고 오지 않는 intron 변이 및 silent 변이였으며 2종 모두 이미 보고된 바 있는 변이었다.^{10,20} 변이를 가지고

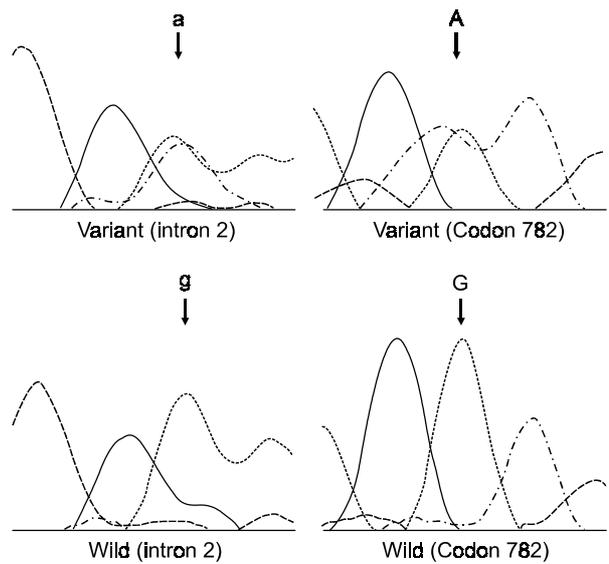


Fig. 2. Sequence chromatograms of the single base substitution of ctgggt>ctaggt (intron 2, A) and GTG>GTA (codon 782, B).

있는 2예의 원발암에서 E-cadherin은 정상적으로 발현하였다.

고 찰

E-cadherin은 상피세포간 부착에 주로 관여하는 물질로서 E-cadherin 유전자인 *CDH1*의 경우 암종의 진행과 전이와 관련이 있는 종양억제유전자로 여겨지고 있다. E-cadherin의 기능저하 시 세포 간의 부착능의 상실로 인한 암세포의 침윤성 증가와 전이능력이 상승된다고 보고되고 있으며 발암 및 암종의 진행, 전이에 관여한다.^{21,22} 또한 E-cadherin은 단순한 세포부착과 관련될 뿐 아니라 β -catenin, APC 단백질과 연관되어 세포내 신호전달과정에 영향을 미칠 수 있다.²³ 많은 종류의 암종에서 E-cadherin 단백질의 발현이상이 발견되고 있으며 유전자의 변이도 보고되고 있는데, 특히 소엽상 유방암과 미만성 위암에서 빈번한 유전자 변이가 나타난다. *CDH1*의 변이는 이들 암종의 분비선 구조의 소실이나 주위 기질의 광범위한 침윤 등 특이한 조직형과 연관이 있을 것으로 여겨진다.^{6,24}

미만성 위암의 경우 전이방식으로 복막전이와 빈번하며 미만성 위암에서 E-cadherin 유전자(*CDH1*)의 변이와 단백질 발현저하가 빈번하게 나타나는 점으로 보아 복막전이 양상과 E-cadherin과 연관을 추측할 수 있다. 또한 저자들은 대장의 인환세포암에서 E-cadherin의 발현을 분석하였을 때 인환세포암에서 고, 중분화선암에 비해 유의하게 E-cadherin의 발현저하를 관찰할 수 있었으며 인환세포암의 재발 및 전이의 양상의 경우 특이하게 복막전이가 많은 것을 관찰할 수 있어서 인환세포암 생성 및 전이양상과 E-cadherin 기능이상의 연관성을 점액성분의 역할과 관련지어 제시한 바 있다.¹⁹ 본 연구에서도 11예의 전이암 중 점소양 세포형이 5예로 많은 비율을 차지하고 있으며 특히 이와 같은 세포형의 경우 대부분 E-cadherin 발현이 감소되거나 전이암종에서 저하되는 양상을 보여 세포형과 복막전이, E-cadherin의 기능저하 간의 관련을 추론할 수 있었다.

본 연구에서 E-cadherin의 정상발현군과 발현저하군으로 나누어 전이병소와 원발병소 간 발현의 차이를 보았을 때 비록 전이병소에서 발현저하군이 많은 비율을 보였지만 통계적인 차이를 발견하지 못했다. 이는 증례의 부족도 한 원인일 수 있으며 더 많은 증례의 확보가 정확한 정보를 줄 수 있을 것이다. 그러나 발현 정도에 대한 평균값의 분석에서 원발암에 비해 전이

병소에서 E-cadherin 발현이 유의하게 줄어드는 것을 관찰할 수 있었으며, 특히 1예에서는 원발암에서 발현하는 단백질이 전이병소에서는 전혀 발현되지 않았다. 원발암과 전이암의 E-cadherin 발현변화를 보면 5예에서 발현이 감소하였고, 6예에서는 발현의 변화가 없었으며 전이암에서 원발암보다 강한 발현을 보이는 예는 없었다. 이러한 결과는 복막전이의 경우 상당수의 암종에서 전이과정 중 E-cadherin의 기능변화가 발생하고 이와 복막전이와 관련이 있을 수 있음을 제시해주는 것이다. 그러나 E-cadherin의 기능저하가 복막전이의 원인이 아니라 결과적인 부산물일 가능성도 상존한다. E-cadherin의 기능저하의 기전은 몇 가지 가능성을 유추할 수 있다. 첫번째는 원발암의 아클론(subclone)중 E-cadherin의 변이를 가지는 것이 선택적 장점을 가지게 되고 이러한 아클론이 주도적으로 복막전이를 유발할 가능성이 있고, 두번째는 원발암에 epigenetic 변화 혹은 후변역변화가 나타나고 이러한 변화가 E-cadherin의 기능저하를 유발하여 복막전이를 유발할 가능성이다. 그러나 전술한 바와 같이 전이암에서 E-cadherin의 기능저하는 복막전이암의 2차적인 단순부산물일 가능성을 이번 연구결과로는 배제할 수 없다.

본 연구에서 원발성 종양 및 전이병소의 유전자 검색결과 *CDH1*의 변이를 발견할 수 없었다. 비록 2종의 염기변화를 발견할 수 있었으나 이는 1예의 경우 intron 부위의 변화이고 1예의 경우는 아미노산의 변화를 초래하지 않는 염기치환이었다. 또한 염기변화를 보인 2예에서 원발암의 경우 모두 정상적인 E-cadherin의 발현을 보였으므로 2종의 염기변화는 단백질의 기능이상을 초래하는 기능성 유전자 변이는 아니다. 이와 같은 결과는 비록 적은 증례이지만 E-cadherin의 기능저하는 유전자의 변이 외 다른 기전에 의한 가능성을 제시해 준다. 즉 복막전이와 관련이 있는 E-cadherin의 기능이상은 변이가 아닌 전사 혹은 복사의 과정에서 단백질이나 RNA의 형성을 방해하는 기전에 의한 것으로 추정할 수 있으며 최근에 대장암에서 *CDH1*의 촉진자부위 메틸화가 보고된 바 있다.¹⁰

결 론

본 연구는 제한된 수의 증례와 더불어 복막전이와 관련된 E-cadherin의 기능이상의 기전에 대한 분석이 미흡한 바 있으며 이는 지속적으로 연구가 이루어져

야 할 부분이다. 그러나 E-cadherin의 기능이상과 대장암의 복막전이의 연관 가능성을 제시할 수 있으며, 기능이상의 기전은 유전자 변이 이외의 타 기전에 의할 것으로 추정할 수 있다.

REFERENCES

1. Takeichi M. The cadherin cell adhesion receptor family: roles in multicellular organization and neurogenesis. *Prog Clin Biol Res* 1994;390:145-53.
2. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996;84:345-57.
3. Overduin M, Harvey TS, Bagby S, Tong KI, Yau P, Takeichi M, et al. Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science* 1995;267:386-9.
4. Guilford P. E-cadherin down-regulation in cancer: fuel on the fire? *Mol Med Today* 1999;5:172-7.
5. Barth AI, Nathke IS, Nelson WJ. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:683-90.
6. Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C, et al. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J* 1995;14:6107-15.
7. Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Boyd J. Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. *Nat Genet* 1994;7:98-102.
8. Becker KF, Kremmer E, Eulitz M, Becker I, Handschuh G, Schuhmacher C, et al. Analysis of E-cadherin in diffuse-type gastric cancer using a mutation-specific monoclonal antibody. *Am J Pathol* 1999;155:1803-9.
9. Efstathiou JA, Liu D, Wheeler JM, Kim HC, Beck NE, Ilyas M, et al. Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity and loss of adhesion and of responsiveness to the motogenic trefoil factor 2 in colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2316-21.
10. Wheeler JM, Kim HC, Efstathiou JA, Ilyas M, Mortensen NJ, Bodmer WF. Hypermethylation of the promoter region of the E-cadherin gene (CDH1) in sporadic and ulcerative colitis associated colorectal cancer. *Gut* 2001;48:367-71.
11. Tamura G, Yin J, Wang S, Fleisher AS, Zou T, Abraham JM, et al. E-Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:569-73.
12. Moriguchi S, Maehara Y, Korenaga D, Sugimachi K, Nose Y. Risk factors which predict pattern of recurrence after curative surgery for patients with advanced gastric cancer. *Surg Oncol* 1992;1:341-6.
13. Maehara Y, Moriguchi S, Orita H, Kakeji Y, Haraguchi M, Korenaga D, et al. Lower survival rate for patients with carcinoma of the stomach of Borrmann type IV after gastric resection. *Surg Gynecol Obstet* 1992;175:13-6.
14. Obrand DI, Gordon PH. Incidence and patterns of recurrence following curative resection for colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1997;40:15-24.
15. Morita N, Uemura H, Tsumatani K, Cho M, Hirao Y, Okajima E, et al. E-cadherin and alpha-, beta- and gamma-catenin expression in prostate cancers: correlation with tumour invasion. *Br J Cancer* 1999;79:1879-83.
16. Kim JC, Han MS, Lee HK, Kim WS, Park SK, Park KC, et al. Distribution of carcinoembryonic antigen and biologic behavior in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1999;42:640-8.
17. Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR, Stephens LC, Lee JJ, Levin B. bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1995;55:237-41.
18. Hao X, Tomlinson I, Ilyas M, Palazzo JP, Talbot IC. Reciprocity between membranous and nuclear expression of beta-catenin in colorectal tumours. *Virchows Arch* 1997;431:167-72.
19. Kim HC, Kim HJ, Kim JC. Reduced E-cadherin expression as a cause of distinctive signet-ring cell variant in colorectal carcinoma. *J Korean Med Sci* 2002;17:23-8.
20. Kim HC, Wheeler JM, Kim JC, Ilyas M, Beck NE, Kim BS, et al. The E-cadherin gene (CDH1) variants T340A and L599V in gastric and colorectal cancer patients in Korea. *Gut* 2000;47:262-7.
21. Nigam AK, Savage FJ, Boulos PB, Stamp GW, Liu D, Pignatelli M. Loss of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1993;68:507-14.
22. Hugh TJ, Dillon SA, Taylor BA, Pignatelli M, Poston GJ, Kinsella AR. Cadherin-catenin expression in primary colorectal cancer: a survival analysis. *Br J Cancer* 1999;80:1046-51.
23. Wijnhoven BP, Dinjens WN, Pignatelli M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg* 2000;87:992-1005.
24. Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR, et al. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res* 1994;54:3845-52.