

대장암의 예후 인자로서 Thymidylate Synthase 유전자 다형성의 의의

아주대학교 의과대학 외과학교실, ¹병리학교실, ²내과학교실, ³Petagen.Inc.

김주형 · 김영배¹ · 최진혁² · 김정미³ · 정수현³ · 서광욱

Thymidylate Synthase Gene Polymorphism as a Prognostic Factor for the Colorectal Cancer

Joo-Hyung Kim, M.D., Young Bae Kim, M.D.¹, Jin Hyuk Choi, M.D.², Jeong Mi Kim, Ph.D.³, Soo Hyun Jeong³, Kwang Wook Suh, M.D.

Department of Surgery, ¹Pathology, ²Internal Medicine, Ajou University School of Medicine, Suwon, ³Petagen.Inc., Seoul, Korea

Purpose: Thymidylate synthase (TS) expression in colorectal cancer is regarded as both a prognostic marker and a predictor of response to fluoropyrimidine-based therapies targeting TS. However, results from immunohistochemical staining of TS show wide discrepancies. The human TS gene promoter is polymorphic, having either double or triple tandem repeats of a 28-bp sequence. Here, we determined the significance of this polymorphism in predicting the clinical outcomes for patients with operable colorectal cancer treated by a curative resection.

Methods: The cases of 121 patients with stage II or III colorectal cancer, who underwent a curative resection, were reviewed. After DNA extraction from paraffin-embedded tissues, the promoter region of the TS gene was amplified by polymerase chain reaction.

Results: Sixty-eight subjects were homozygotes for the triple repeat variant (group A, L/L, 250-bp), and 53 subjects (group B) were either homozygotes for the double repeat variant (S/S, 220-bp) or heterozygotes (S/L, 220 and 250-bp). The difference between stage II and stage III patients was significant with regard to the 5-year actuarial survival (87% vs 63%, P=0.0320). Examining the survival according to the TS polymorphism, we found a significant difference between group A and B (80% vs 53%, P=0.0481). In patients with stage II disease, the difference in survival rates between group A and B did not reach statistical significance (43% vs 86%, P=0.1678). However, the difference was significant between group A and B for stage

III disease (77% vs 41%, P=0.0414).

Conclusions: We found the TS polymorphism to be a significant and independent prognostic factor for operable colorectal cancer. We think assay of the TS polymorphism can overcome the technical pitfalls of immunohistochemical staining and give more solid prognostic information in the treatment of colorectal cancer. *J Korean Soc Coloproctol* 2004;20:151-156

Key Words: Colorectal cancer, Thymidylate synthase gene polymorphism, Prognostic factor

대장암, Thymidylate synthase 유전자 이형성, 예후인자

서 론

진행성 대장암의 치료에서 근치 수술 후 보조 항암 화학 약물요법의 유용성은 이미 많은 임상 연구를 통해 효과가 증명되었으며,¹ 특히 fluoropyrimidine계의 약물요법은 대장암의 항암 치료에 필수적인 요소로 알려져 있다. Thymidylate synthase (TS)는 deoxyuridine monophosphate (d-UMP)를 deoxythymidine monophosphate (d-TMP)로 변환시키는 효소로서 DNA 생성과 보수에 반드시 필요한 물질이다.² TS는 대장암을 비롯한 인체 고형암 치료의 대표적인 항암 화학 약물인 5-fluorouracil (5-FU)의 표적물질이기도 하다. TS의 기질(substrate)인 5,10-methylene-tetrahydrofolate (THF) 역시 엽산의 대사산물로서 사이미딘과 퓨린의 생성 고리에 필수적이며, DNA methylation에 필요한 methyl 기를 제공하는 중요한 물질이다.³

대장암에서 암 조직 내에서의 TS 단백질의 발현은 예후인자로서뿐 아니라 5-FU 등의 항암 화학 요법에 대한 반응을 예측하는 인자로서 그 유용성에 대한 연구가 많이 이루어져 왔다.^{4,7} 이론적으로 TS 단백질의 발현 정도는 그 어떤 분자생물학적인 표지자들보다도 유의한 예후 인자가 될 수 있음에도 불구하고 많은 연구 보고들에서 일관성이 없는 결과들이 보고되고 있는데 이는 TS 단백

책임저자: 서광욱, 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5
아주대학교 의과대학 외과학교실(우편번호: 442-749)
Tel: 031-219-5208, Fax: 031-219-5755
E-mail: kwsuh@ajou.ac.kr

본 논문의 요지는 2004년 대한대장항문학회 춘계학술대회에서 구연 발표하였음.

질 발현의 정량적 분석을 위해서 단클론 항체를 이용한 면역조직화학 검사를 이용하기 때문인 것으로 생각된다.⁸ 특히 파라핀 포매조직을 이용하는 후향적인 연구에서 면역조직화학 염색법은 종양조직의 고정방법, 시약의 종류, 염색방법 등에 의한 기술적인 문제에 따른 염색 양상의 차이가 있을 수 있고 실제로 면역조직화학 염색을 이용한 많은 연구들이 상반된 결과를 보고하는 경향이 있다.⁹

인체의 TS 단백질을 제어하는 유전자는 다형성을 가지고 있는 것으로 보고되는데 그것은 28개의 염기쌍이 두 개 혹은 세 개의 tandem repeat를 보이는 것으로서 이 염기쌍은 59 terminal의 조절 유전자 내의 cap site로 downstream을 하게 된다.¹⁰ In vitro 실험에서 이 59 terminal에 링크되어 있는 보고유전자(reporter gene)의 활동도는 3개의 tandem repeat를 보이는 유전자가 두 개의 tandem repeat를 보이는 유전자보다 2.6배 높은 것이 밝혀진 바 있다. 따라서 TS 유전자 내의 다형성 영역이 TS 단백질의 발현에 직접적인 연관이 있으며 발현 정도와도 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다.¹¹ 따라서 저자들은 본 연구를 통해 TS 유전자의 다형성이 대장암의 예후인자로서 의의가 있는지를 알아보고자 하였다.

방 법

1) 환자의 선택

1994년 10월부터 2001년 12월까지 아주대학교병원 외과에서 대장암으로 진단받고 근치적 절제술을 시행 받은 환자들 가운데 동일한 외과의사로부터 수술이 시행되었고 수술 후 적어도 24개월 이상 추적이 가능했으며 TNM 병기에서 제2기 및 3기로 진단된 환자 121명을 대상으로 본 연구를 시행하였다. 제2기 환자는 49명, 3기 환자는 72명이었다. 대상 환자들 모두 수술 후 보조 항암 화학요법을 시행하였는데 제2기 환자들에 대해서는 12개월간 경구 5-FU 제제(deoxyfluridine, 매일 900 mg 3회 분복)를, 그리고 제3기 환자들에 대해서는 6주기의 5-FU와 leukovorin 주사요법을 1회 5일 4주 간격으로 시행하였다. 경구 5-FU는 수술 후 평균 20일째부터 투약을 시작하였으며, 주사요법은 수술 후 평균 15일에 첫번째 주기가 시작되었는데, Mayo/ NCCTG의 5-FU 연속투여 및 저용량 leuovorin protocol¹²을 바탕으로 하되 환자의 performance와 경제적 여건을 고려하여 5-FU의 주사용량은 하루용량을 800~1000 mg/m²으로 하여 지속적으로 점적하였으며, leukovorin (30 mg/m²)은 매일 5-FU 투여 30분 전에 정주되었다. 대상 환자들의 파라핀 포매조직 검체에서 TS 유전자

다형성을 검색하여 다형성 정도에 따른 장기 생존율의 차이를 비교 분석하였다.

2) 환자의 추적 및 재발의 진단

대상 환자들은 수술 후 첫 2년 동안 매 3개월마다, 2년 이후에는 6개월 간격으로 검진하였다. 환자의 검진은 매 3개월마다 이학적 검사 및 혈 중 암태아성 항원을 측정하였으며 1년마다 복부 전산화 단층촬영과 대장 조영술, 그리고 단순 흉부 촬영을 시행하였다. 원격전이와 국소재발 모두 원칙적으로 생검을 통해 조직진단이 가능했던 경우로 정의하였으나 원격전이의 경우 영상진단 소견에서 명백한 전이성 병변이 보이는 경우는 조직진단 없이 재발로 진단하였다. 혈중 CEA만 증가했던 경우(정상치 5 ng/ml 미만)는 재발에 포함시키지 않았다. 환자의 생사 여부는 의무기록과 전화상담을 통해 121예 모두에서 가능하였으며, 최종추적일은 수술일로부터 사망일까지로 정의하였다.

3) TS 유전자 다형성의 검색

아주대학교병원 병리과의 조직은행에서 대상 환자들의 파라핀에 포매된 종양조직을 구하여 QiaAmp 키트(QIAGEN Inc., Chatsworth, CA)로 DNA를 추출하였다. TS 유전자의 promoter 영역은 다음의 primer를 이용하여 연쇄 중합효소반응(polymerase chain reaction, PCR)을 시행하였다.

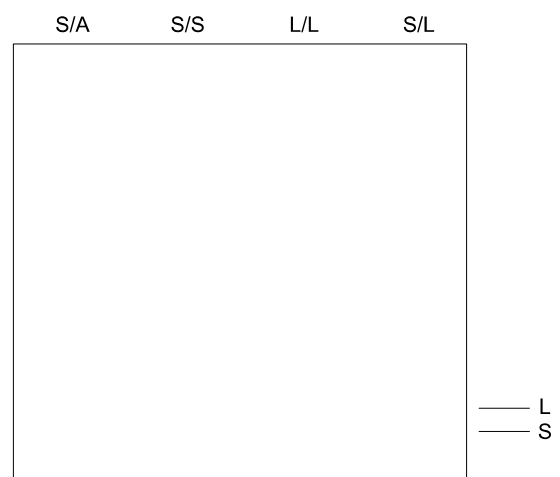


Fig. 1. The PCR findings of TS gene in colorectal cancer. 68 subjects were homozygotes for the triple repeat variant (L/L, 250-bp, Group A), 53 subjects (Group B) were either homozygotes for the double repeat variant (S/S, 220-bp), or heterozygotes (S/L, 220 and 250-bp).

Table 1. Study population (n=121)

All eligible patients	Group A (n=68)	Group B (n=53)	P-value	
Age	60.0 (22~83)	64.9 (22~83)	62.8 (24~79)	0.3153
Sex				0.4321
Male	70	40	30	
Female	51	28	23	
Stage				0.1876
II	49	24	25	
III	72	44	28	
Lymph node				0.1617
0	49	24	25	
1~3	38	29	9	
>3	34	15	19	

Primer 1 (sense): 5'-GTGGCTCCTGCGTTTCCCCC-3'

Primer 2 (antisense): 5'-GCTCCGAGCCGGCCACAGG-CATGGCGCGG-3'

1.25 mM MgCl₂를 함유한 반응액 25 ml를 thermal cylinder (PTC-100 TM, MJ Research Laboratories, W-tertontown, MA)에 이동하여 35 주기 동안 증폭하였다. 각 주기는 96°C에서 1분, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분 그리고 72°C에서 5분간 마지막 extension phase로 구성되었다. PCR 산물은 4% agarose gel에서 전기영동하여 분석하였다. triple tandem repeat (250 bp)가 homozygous한 경우를 L/L로 지칭하였으며 double tandem repeat (220 bp)가 homozygous한 경우를 S/S로, 그리고 220 bp와 250 bp가 heterozygous한 경우를 S/L로 각각 지칭하였다(Fig. 1).¹³

4) 통계학적 분석

각 군에서의 임상변수의 차이는 Chi-square test와 student t-test를 이용하여 P-value를 구한 후 P<0.05인 경우를 의의 있다고 판정하였고,¹⁴ 생존곡선은 Kaplan-Meier 방법¹⁵을 이용하였으며 통계적 검정은 log-rank test로 하였다.¹⁴

결 과

1) TS 다형성의 종류

대상 환자 121명 중 68예(56.2%)가 triple tandem repeat에 homozygous (L/L)했으며 53예(43.8%)가 heterozygous (S/L)하거나 double tandem repeat에 homozygous (S/S)하였다. TS 단백질의 표현이 비교적 강하게 나타나는 것으로

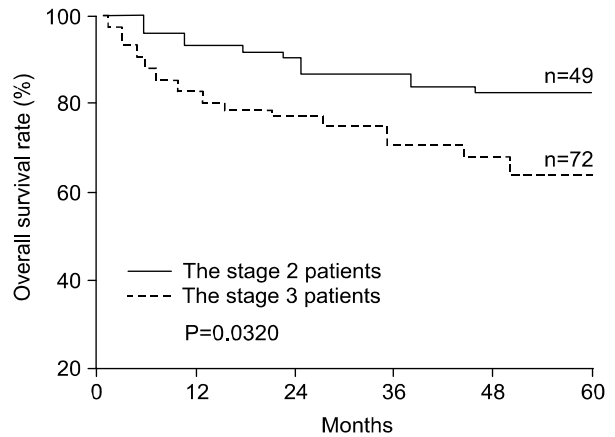


Fig. 2. Overall survival rate according to the stage (n=121).

알려진 L/L형과 비교적 낮게 발현되는 것으로 알려진 S/L 및 S/S형을 각각 A군 및 B군으로 나누어 보았을 때 두 군 간에 나이, 성별, 병기 및 림프절 전이개수 등에서는 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Table 1).

2) TS 다형성과 치료성적의 관계

수술 후 생존자의 중앙추적기간은 34.5개월이었다. 전체적인 5년 생존율은 제2기 대장암 환자군과 제3기 대장암 환자군 간에 통계학적으로 유의한 차이를 관찰할 수 있었다(87% vs 63%, P=0.0320, Fig. 2). TS 다형성과 5년 생존율을 비교하였을 때 B군(S/S 혹은 S/L)에서 A군(L/L)에 비해 통계학적으로 유의하게 높은 생존율을 관찰할 수 있었다(80% vs 53%, P=0.0481, Fig. 3). 제2기 환자군에서 A군과 B군 간에 유의한 생존율의 차이는 관찰되지 않았으나(86% vs 43%, P=0.1678, Fig. 4) 제3기 환자군에서

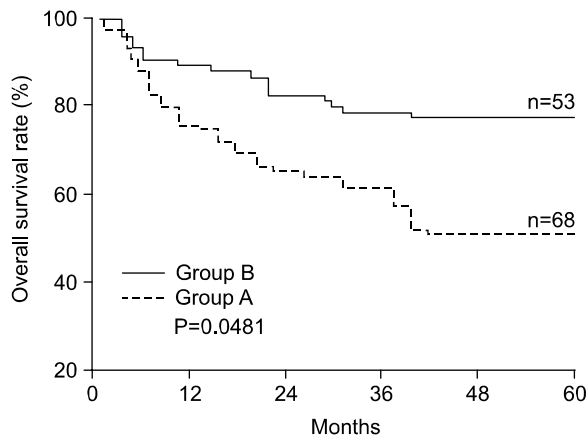


Fig. 3. Overall survival rate according to the TS polymorphism (n=121).

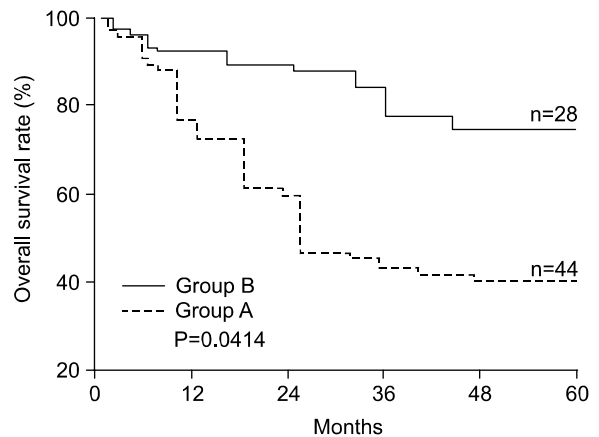


Fig. 5. Survival rate of stage 3 patients according to the TS polymorphism (n=72).

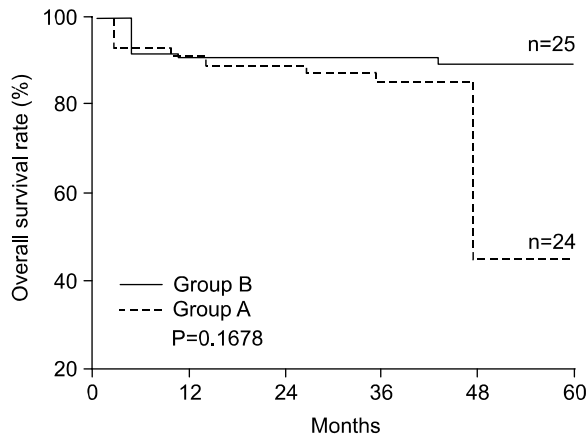


Fig. 4. Survival rate of stage 2 patients according to the TS polymorphism (n=49).

는 A군과 B군 간에 통계학적으로 유의한 생존율의 차이가 관찰되어(41% vs 77%, P=0.0414, Fig. 5) TS 유전자의 다형성은 특히 3기 병변에서 유의한 예후인자임을 알 수 있었다.

고 찰

대장암의 치료성적을 예측하는 데 가장 중요한 인자는 조직 병리학적 병기임은 두말할 나위 없지만, 같은 병기 내에서도 국소재발률이나 원격재발률이 다른 것을 설명하기 위해 좀 더 세분화되고 객관적인 예후인자들을 규명하기 위한 많은 연구가 시행되어 왔다. 임상적으로는 대장폐쇄증 여부¹⁶ 등이 부수적인 인자로 알려져 있고 현미경적으로는 암세포의 분화도¹⁷ 등이 유의한 예후인자로 알려진 바 있다. 최근 분자 생물학 기법이 발전되면서

대장암의 발암기전에 관여하는 것으로 알려진 18번, 17번, 8번 염색체 등의 유전자 결손여부, 그리고 극소위체 불안정성(microsatellite instability) 여부 등이 연구자들에 따라 차이는 있으나 비교적 유의한 예후인자로서 알려져 있다.¹⁸ 본 연구 역시 좀 더 객관화된 예후인자로서는 물론 치료에 직접적인 연관성을 가지는 인자를 분석하고자 TS의 발현여부를 예후와 비교분석한 결과 병리학적 병기가 가장 유의한 예후 인자임을 재확인하였고 TS 단백질을 제어하는 유전자 내의 다형성 여부가 유의한 예후인자임을 증명되어 임상적인 유용성을 가질 것으로 생각되었다.

TS 단백질은 deoxyuridylate를 thymidylate로 methylation 시키는 데 필요한 효소로서 이 효소는 DNA의 생성과 손상된 DNA를 보수하는 데 반드시 필요하다.² Pyrimidine 대사에서의 이러한 중요한 역할 때문에 지난 40여년 간 이 단백질은 항암 화학 요법의 주 표적이 되어 왔다. Fluoropyrimidine 계열의 항암제가 바로 이 단백질을 억제하는 약물로 개발되었고 TS 단백질을 표적으로 한 항염산 제제 등의 새로운 제제의 약제가 현재 개발 중이다. 몇몇 동물 실험과 임상 시험에서 TS 단백질의 상대적인 양이 TS를 표적으로 하는 항암제에 대한 세포의 감수성을 좌우한다는 사실이 알려졌고 이후 여러 연구들이 TS가 항암제에 대한 감수성을 예측하는 인자로서뿐만 아니라 대장암의 예후를 판정하는 독립적인 인자로서 역할을 할 수 있는가를 측정하여 왔다.^{4,5,7}

TS 단백질의 대장암에 대한 예후인자로서의 가능성에 대한 첫번째 임상 연구는 Johnston 등의 National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project R-01에 포함되었던 294명에 대한 후향적 연구였다.⁴ 단클론항체(TS 106)를 이용

하여 암 조직 내에서 TS 단백질의 표현을 면역조직화학 염색을 통해 분석한 연구에서 이들은 병기와 TS 단백질의 발현은 직접적인 상관관계를 보여 진행성 병변일수록 TS 단백질이 많이 발현되고 따라서 전반적인 예후는 불량해지는 데 비해 5-FU 치료는 오히려 TS 단백질이 많이 발현된 군에서 치료 반응이 높아 TS 고발현 군에서 무병 생존율이 유의하게 증가함을 보고하였다.⁴ 그러나 이후에 보고된 연구들의 결과들은 Johnston 등의 결과와 상이한 것들이 많아 종양 조직 내에 TS 단백질이 많이 표현될수록 예후가 불량한지 아니면 양호한지 결론을 내리기 어려울 뿐 아니라 fluoropyrimidine 항암제 치료에 대한 반응도 확실하지 않아 논란이 되고 있다.^{5,9}

TS가 이론적으로는 매우 매력적인 예후인자임에도 불구하고 보고자에 따라 그 유의성이 상이한 것은 TS 단백질을 측정하는 실험방법을 때문인 것으로 알려져 있다. 현재까지 세 가지의 대표적인 실험방법이 이용되어 왔는데, 그것은 삼중수소를 부착한 deoxyuridine monophosphate (d-UMP)를 이용하여 TS 단백질의 활성도(activity)를 측정하는 생화학적 분석법,¹⁹ TS 단백질의 존재 유무나 양상을 형태학적으로 확인할 수 있는 면역조직화학 염색법,⁴ 그리고 TS 제어 유전자로부터 전사된 전령(messenger) RNA를 측정하는 역전사 중합효소 반응법⁸ 등이다. 실험 방법에 따라라도 결과에 차이가 있는 것을 관찰할 수 있고 여기에는 기술적인 차이도 있지만 연구 대상이 그 수에 있어 부족하거나 대상군이 이질적인 경우가 많고 후향적인 연구가 대부분이다. 또한 대장암 치료의 근간이라 할 수 있는 수술적 치료가 아직 많은 기관에서 표준화되지 않아 수술이 이루어진 환자의 경우 치료범위나 정도가 달라질 수 있다는 심각한 bias의 위험을 가지고 있다. 본 연구에서는 이러한 문제들을 최대한 극복하기 위하여 단일기관에서, 한 명의 외과 의사에 의해 시행된 대장암 환자들을 선택함으로써 결과의 신뢰도를 높이고자 하였다.

TS 단백질의 발현 정도를 전반적인 대장암의 예후인자로 분석하는 것은 앞서 설명한 바와 같은 기술적, 임상적 어려움이 따르기 때문에 5-FU 치료 후의 반응 정도를 예측하는 연구가 많이 시행되고 있는데,^{7,20} 이런 연구에서는 비교적 빠른 관찰기간에 end point인 생존율을 비교하기 위하여 전이성 혹은 범발성 대장암 환자들을 대상으로 하는 것이 일반적이다. 전이성 혹은 범발성 대장암에 대한 5-FU 제제의 약물요법은 전반적인 반응률도 낮을 뿐 아니라 약물의 독성과 생존율이 환자들 간에 큰 차이가 있어서 치료 전에 5-FU에 대한 반응 여부를 예측하는 것은 큰 임상적 의의를 가진다. 최근에는 종양 조직 내

서의 TS의 전령 RNA를 측정함으로써 5-FU에 대한 반응과 생존율을 예측한 연구가 시행되었는데 이 연구들은 TS의 전령 RNA가 적게 발현될수록 5-FU에 대한 치료 반응이 우수하고 생존율도 유의하게 높았다고 보고하고 있는데⁸ Leichman 등²¹은 TS 전령 RNA 치가 4.1을 넘는 경우 5-FU 항암요법에 전혀 반응하지 않았다고 보고하기도 하였다. 이러한 결과들은 전이성 혹은 범발성 대장암 환자들에 대한 5-FU 치료 반응 여부로서 본 연구와 재료는 다르지만 L/L 유전형(genotype)인 경우가 예후가 불량한 사실은 본 연구의 결과와 유사함을 알 수 있었다.

종양 조직 내에서 TS 단백질이 발현되는 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았으나 최근의 연구에 의하면 p53 유전자의 변이와 TS 단백질의 발현 정도 간에 직접적인 상관관계를 관찰할 수 있었다고 하여 TS 단백질이 높은 경우에 예후가 불량한 이유를 p53 유전자의 변이로 설명하고 있다. Pullarkat 등¹³은 원발 대장암으로부터 간으로 전이된 증례들에 대해서 TS 전령 RNA를 측정하였는데, 간 내에서 전이성 암조직에서 인접된 정상 간조직에 비해 유의하게 높은 TS 전령 단백질의 발현을 관찰할 수 있었다고 보고하였다. 이런 결과를 바탕으로 TS 유전자의 이형성은 태생적으로 정해진 것이지만 암화과정 중에 DNA로부터 전사(transcriptional)되는 과정이나 전사 후(post-transcriptional) 과정 중에 과발현(overexpression)되는 것으로 추정하고 있다. 이러한 과발현에 p53 유전자의 변이 등이 관여할 것으로 생각된다. 뿐만 아니라 TS 유전자가 L/L형인 경우 TS 전령 RNA의 발현이 암조직에서만 증폭되는 것이 아니라 정상 조직에서도 S/L형이나 S/S형에 비해 증가되어 있는 것이 관찰되는데 이는 5-FU 치료 시 나타나는 독성의 차이를 설명할 수 있는 기전으로서 TS 전령 RNA가 증가된 정상세포들이 5-FU로부터 덜 손상받기 때문인 것으로 생각되고 있다.⁸ 본 연구에서는 대상환자들에서의 5-FU 치료 중의 독성발현 정도를 관찰하지는 않았으나 보고된 문헌들을 토대로 향후에는 독성 정도와 TS 발현간의 유의성을 조사하는 것이 임상적으로 의의가 있을 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서 저자들은 객관화된 예후인자로서는 물론 치료에 직접적인 연관성을 가지는 인자를 분석하고자 TS의 발현 여부를 근처적 절제가 시행된 121예의 대장암 환자들의 조직 표본에서 TS 유전자의 다형성 종류를 환자들의 생존율과 비교하였다. 유전자에서의 다형성이 전령 RNA를 통해 TS 단백질의 발현과 직접적인 관계가 있다

는 연구결과를 바탕으로 TS 유전자의 다형성이 근처적 절제가 가능했던 대장암 환자들에 대해서 독립적인 예후 인자로 역할을 할 수 있음을 확인하였다.

REFERENCES

1. Moertel DG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Goodman PJ, et al. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med* 1990;322:352-8.
2. Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, Duschinsky R, et al. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* 1957; 170:663-6.
3. Danenberg PV. Thymidylate synthetase-a target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* 1977;473 73-92.
4. Johnston PG, Fisher ER, Rockette HE, Fisher B, Wolmark N, Drake JC, et al. The role of thymidylate synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12:2640-7.
5. Edler D, Hallstrom M, Johnston PG, Magnusson I, Ragnhammar P, Blomgren H. Thymidylate synthase expression: an independent prognostic factor for local recurrence, distant metastasis, disease-free and overall survival in rectal cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:1378-84.
6. Lenz HJ, Danenberg KD, Leichman CG, Florentine B, Johnston PG, Groshen S, et al. p53 and thymidylate synthase expression in untreated stage II colon cancer: associations with recurrence, survival, and site. *Clin Cancer Res* 1998;4:1227-34.
7. 민병욱, 홍정훈, 이경범, 문홍영. 대장암에서 Thymidylate Synthase가 예후에 미치는 영향. *대한외과학회지* 2002;62: 408-14.
8. Tomiak A, Vicent M, Earle CC, Johnston PG, Kocha W, Taylor M, et al. Thymidylate synthase expression in stage II and III colon cancer: a retrospective review. *Am J Clin Oncol* 2001;24:597-602.
9. Yamachika T, Nakanishi H, Inada K, Tsukamoto T, Kato T, Fukushima M, et al. A new prognostic factor for colorectal carcinoma, thymidylate synthase, and its therapeutic significance. *Cancer* 1998;82:70-7.
10. Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struc Funct* 1995; 20:191-7.
11. Horie N, Chimoto M, Nozawa R, Takeishi K. Characterization of regulatory sequences and nuclear factors that function in cooperation with the promoter of the human thymidylate synthase gene. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1216:409-16.
12. Poon MA, O'Connell MJ, Wieand HS, Krook JE, Gerstner JB, Tschetter LK, et al. Biochemical modulation of fluorouracil with leucovorin:confirmatory evidence of improved therapeutic efficacy in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1991;9:1967-72.
13. Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2001;1:65-70.
14. Zar JH. *Biostatistical analysis*. Englewood-Cliffs NJ: Prentice-Hall; 1984.
15. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation for incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457-81.
16. Turunen MJ. Colorectal cancer obstruction: a challenge to improve prognosis. *Ann Chir Gynaecol* 1983;72:317-23.
17. Ponz de Leon M, Di Gregoric C. Pathology of colorectal cancer. *Dig Liver Dis* 2001;33:372-88.
18. Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2001;344:1196-206.
19. Etienne MC, Chazal M, Laurent Puig P, Magne N, Rosty C, Formento JL, et al. Prognostic value of tumoral thymidylate synthase and p53 in metastatic colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based chemotherapy: phenotypic and genotypic analysis. *J Clin Oncol* 2002;20: 2832-43.
20. 조상혁, 민영돈, 이태범, 최석민, 변익진, 최철희 등. 대장암과 위암세포에서 Thymidylate Synthase mRNA의 발현과 5-FU에 대한 내성과의 관계. *대한대장항문학회지* 2003;19: 67-73.
21. Leichman CG, Lenz HJ, Leichman L, Danenberg K, Baranda J, Groshen S, et al. Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted- infusion fluorouracil and weekly leucovorin. *J Clin Oncol* 1997;15:3223-9.