

위암중에서 대장 선종성 용종증 유전자의 돌연변이

가톨릭 의과대학 병리학교실 및 미생물학교실*

박 원 상 · 유 문 간* · 이 석 형
정 연 준* · 김 금 통* · 김 주 성

Mutation of Adenomatous Polyposis Coli Gene in Human Stomach Cancer

Won-Sang Park, M.D., Mun-Gan Rhyu, M.D., Sug-Hyung Lee, M.D., Yun-Jun Chung, M.D.
Gum-Ryong Kim, M.D and Choo-Soung Kim, M.D.

Department of Pathology and Microbiology, Catholic University Medical College

Recently the adenomatous polyposis coli(APC) gene, a tumor suppressor gene, was identified and the cDNA was cloned from chromosome 5q21. Allelic deletion or point mutation of tumor suppressor genes(TSGs) has been considered as an important mechanism in development of human tumor.

Point mutations affecting APC gene are seen in the hereditary syndrome, adenomatous polyposis and spordic colon cancer. However, the mutation of APC gene and other TSGs have not been described in gastric cancer. In order to identify the mutation of exon 11 of APC gene for gastric cancer, we amplified DNA extracted from paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction(PCR) and digested the PCR products with restriction enzyme Rsa I.

We examined the DNA extracted from paraffin-embedded 44 gastric cancer tissues with lymph nodes. Eighteen(41%) among 44 were informative for the study exon 11 of the APC gene, and we found loss of heterozygosity(LOH) for APC in 6/18(33.3%).

These data suggest that the point mutation or the base change of APC gene commonly occurs in gastric cancer. We conclude that the mutation of APC gene is strongly connected with development of human gastric cancer. (**Korean J Pathol 1993; 27: 34~39**)

Key Words: Tumor suppressor gene, APC gene, gastric cancer, LOH(Loss of Heterozygosity)

서 론

1971년 Knudson¹⁾은 어린이의 망막모세포종이 세포 지놈에서 두번의 연속적인 돌연변이에 의해 생긴다고 보고하였다. 이에 의하면 가족성의 망막모세포종은 부모에게서 한번의 돌연변이가 일어난 세포 지놈을 그

후손이 받았을 경우나 생식발생(gametogenesis) 동안 돌연변이가 일어난 후, 그 후손에서 또 한번의 세포 돌연변이가 일어날 때 이 종양이 발생한다. Rb 유전자로 알려진 이 유전자가 처음 발견된 이후 여러 가지의 종양억제 유전자가 밝혀져 있으며 새로운 종양억제 유전자의 발견 및 여러 종양과의 관계에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다. 이들 유전자는 현재까지 정상 생리적 상태에서 기능에 대해서는 잘 모르지만 성장조절에 영향을 미치는 것은 확실하다. 그 이유로 여러 종양에서 이들 유전자의 불활성화가 발견되고 있고 이들 유전자를 종양세포에 넣어주었을 경우 종양세포들이 정상적인 세포로 환원되기 때문이다. 여러가지 분자 수준에서의 상해가 이들 유전자의 불활성화를 유

접 수: 1992년 7월 17일, 게재승인: 1992년 9월 30일
주 소: 서울시 서초구 반포동 505번지, 우편번호 137-701
가톨릭 의과대학 병리학교실, 박원상

*본 논문은 가톨릭 중앙의료원 학술조성기금으로 이루어졌음.

발할 수 있는데, 첫번째가 대립유전자의 결손, 두번째는 유전자의 촉진자(promotor)나 코딩 부위에서의 점 돌연변이(point mutation)이다. 이중 대립유전자의 결손은 이형접합성의 상실(loss of heterozygosity)로 알게 된다²⁾. 이형접합성의 상실은 염색체 혹은 염색체 수준 이하에서의 결손으로 인하여 종양억제 유전자의 한 대립형질이 불활성화되는 것을 말하는 것이며 이러한 이형접합성의 상실이 새로운 종양억제 유전자의 발견이나 현재까지의 종양에서 종양억제 유전자들 검색하는데 중요한 방법 중의 하나이다³⁻⁵⁾.

이형접합성의 상실을 연구함에 있어 사용되고 있는 Southern blotting은 완전하고 많은 양의 DNA를 필요로 하고 있어⁶⁾ 파라핀 포매된 조직의 경우에는 부적당하다.

Adenomatous polyposis coli(APC) 유전자는 대장 선종성 용종증과 대장암의 지놈 DNA에서 돌연변이를 보이는데 세포 유전학적 검사 및 가계 조사를 통하여 그 위치가 염색체 5q21인 것과 이들의 염기서열이 알려져 있다⁷⁻¹³⁾. APC 유전자의 돌연변이는 대장암 이외에도 몇몇 암에서 보고되고 있지만 한국에서 특히 빈도가 높은 위암에서의 연구는 없는 상태이다. 저자들은 DNA의 양이 적거나 약간의 변성이 있어도 이형접합성의 상실을 찾을 수 있는 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)과 제한 분절 길이 다형성(restriction fragment length polymorphism)을 이용하여 위암조직과 림프절에서 APC 유전자 엑손 11의 이형접합성의 상실을 Rsa I 제한효소를 이용하여 검색하였다.

재료 및 방법

1. 시 료

위암으로 진단 받은 44명의 위암 조직과 같은 환자의 림프절 조직을 이용하였다. 파라핀 포매된 조직을 10 μ m 두께로 여러장 자른 다음 1장은 hematoxylin-eosin염색을 하였다. 염색된 슬라이드에 종양 부분을 현미경하에서 표시한 후 염색되지 않은 슬라이드 위에 놓고 종양 부분을 칼로 끊어내었다. 염색하지 않은 슬라이드는 탈파라핀을 하여 사용하였으며, 현미경하에서 종양 부분내에 정상적인 림프구나 혈관등의 기질세포들이 많은 경우에는 종양 부분이 전체의 70% 이상되는 곳만을 선택하여 사용하였다. 끊어낸 조직에서 바로 DNA 추출을 시행하였다. 림프절은 이형접합성의 상실을 알아보기 위한 정상 대조군으로 사용하였는데 모두 전이성 암이 없는 림프절들을 사용하였으며 이형접합성의 상실을 검색하는 것이므로 림프절에서 동형접합성(homozygote)을 보이는 경우는 이 검색에서 제외시켰다.

2. DNA 추출

파라핀절편에서 끊어낸 조직은 Goelz 등¹⁴⁾이 사용한 방법을 이용하였으며 단백분해효소 K와 sodium dodecyl sulfate(SDS)로 추출하였다. 즉 조직을 500 μ l의 용해용액(SDS-단백분해효소 K)이 있는 Eppen-dorf 튜브에 넣고 52°C에서 밤새 방치하였다. 용해용액에 의해 용해가 잘 되었음을 확인한 다음 phenol-chloroform 방법으로 DNA를 추출하였으며 0.02 volume의 NaCl과 2.5 volume의 100% 에탄올을 가하여 -30°C에서 2 시간동안 방치한 다음 12,000 rpm으로 원심분리하여 침전시켰다. DNA의 농도는 광비색계로 260 nm에서 측정하였으며 순도는 280 nm에서의 비율로 환산하였다.

3. 중합효소 연쇄반응

APC 유전자 엑손 11을 증폭시키기 위하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였는데 이때 형판으로는 파라핀 포매된 조직에서 추출한 DNA를 사용하였다. Rsa I 제한 효소에 의한 제한 분절 길이 다형성 주위의 시발체(primer)는 Cyclon plus DNA synthesizer(Milligen Bioresearch, U.S.A.)로 합성하였는데 이때 상류 시발체(upstream primer)는 5'-GGAGTACAG-GCCATTGCAGA-3', 하류 시발체(downstream primer)는 5'-GGCTACATCTCCAAAAGTCAA-3'로 하였다¹⁵⁾.

4. 중합효소 연쇄반응의 적정 조건

1 μ l의 형판 DNA에 시발체를 각각 20 pmol이 되도록 넣은 다음, 75 μ M의 삼인산 디옥시뉴클레오타이드(deoxynucleotide triphosphate), 10X 반응 완충용액(100mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂)과 2.5 unit의 Taq 중합효소를 첨가하여 증폭시켰다. 중합효소 연쇄반응은 30회 주기를 실시하였으며 각 주기는 95°C에서 1분, 56°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 실시하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물은 8% 폴리아크릴아마이드 겔상에서 133 염기쌍임을 확인하고 1 μ l Rsa I 제한 효소로 37°C에서 3시간 동안 소화시켰다. 소화시킨 다음 8% 폴리아크릴아마이드 겔에서 120 볼트로 2시간 동안 전기영동을 실시하였다.

결 과

1. DNA 추출

추출된 DNA는 1% 아가로스 겔에서 전기영동을 실시하여 그 손상 정도와 순도가 어느 정도인지를 관찰하였다. 전기영동의 결과는 고정용액, 고정때까지의 시간 등에 따라서 다양한 형태를 나타내고 있어 중합효소 연쇄반응의 적정 조건을 찾아내기가 어려웠으나 추출

된 DNA는 대부분 평균 1,000 염기쌍 정도의 분자량을 나타내고 있었으며 양은 100~500 μ g 정도였다. 실질적으로 중합효소 연쇄반응을 위하여는 대체로 완전한 DNA가 요구되고 있으나 포르말린 고정으로 인하여 일부 파괴된 DNA라 하더라도 성공적으로 APC 유전자 엑손 11을 증폭시킬수 있었다(Fig. 1). 이러한 결과는 일부 파괴된 DNA가 있다하더라도 중합효소 연쇄반응은 성공적으로 실시할 수 있다는 것을 보여주는 것이다.



Fig. 1. Specific PCR products were located at 133 bp: Even though DNA was seriously degraded as many as 500 bp, DNAs from paraffin embedded blocks were successfully amplified without any non-specific products(m: pBR322 DNA digested with Hae III).

2. 위암 환자 조직에서 Rsa I 제한 효소에 의한 소화

44예의 위암 환자 림프절에서 추출한 DNA를 이용하여 상기와 같이 중합효소 연쇄반응을 실시한 다음 Rsa I 제한 효소로 소화시킨 결과 Rsa I 제한효소에 대한 인식부위의 여부에 따라 3가지 형태의 띠를 보여 주었다(Fig. 2). Rsa I 제한효소에 대한 인식부위가 없는 경우에는 133 염기쌍이 나누어지지 않고 한 띠만을 나타내고 있었으며 인식부위가 있는 DNA의 경우에는 85과 48의 염기쌍을 보이는 두 띠로 나타났다. 이형접합성을 나타내는 경우에는 일부의 DNA는 인

Table 1. Genotype frequency(%) of APC gene exon 11 in lymph nodes and cancer area of gastric cancer patients

RFLP type	L/N(%)	Cancer
one band	1(2.2)*	5/18
two bands	25(56.8)*	1/18
three bands	18(41) [#]	0/18
Total	44	6/18

*: Non-informative case, [#]informative case
L/N: lymph node

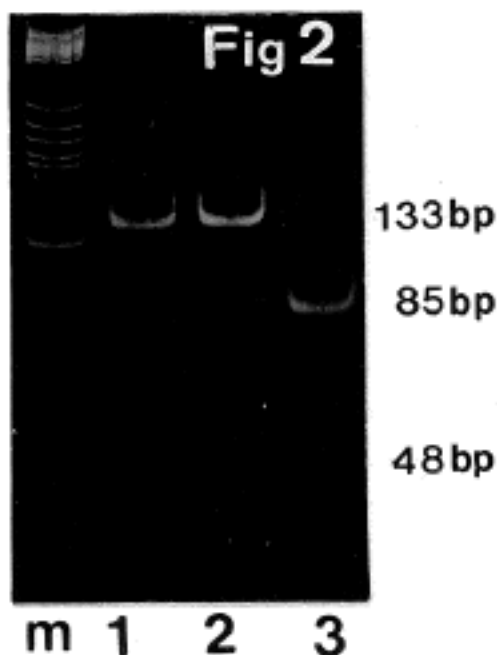


Fig. 2. Three kinds of electrophoretic patterns of PCR products digested by Rsa I enzyme. Undigested allele was seen as single 133 bp band (lane 2) while digested allele as 85 bp and 48 bp bands(lane 3). Heterozygotes showed 3 bands(133 bp, 85 bp and 48 bp) at lane 1.

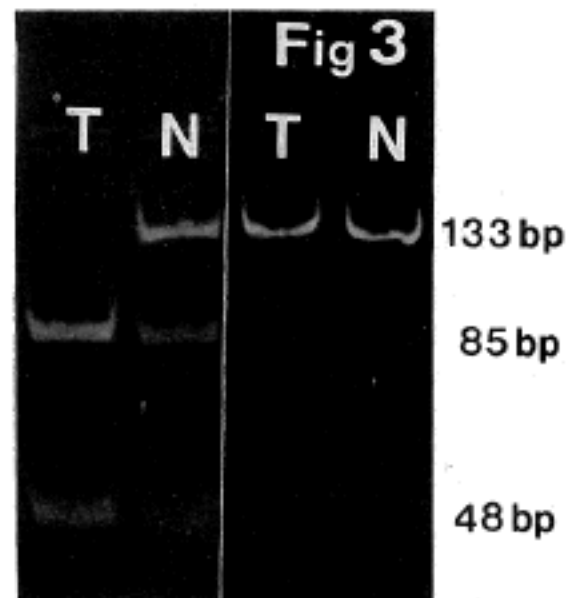


Fig. 3. LOH(loss of heterozygosity) affecting exon 11 of APC. Loss of the undigested allele(band at 133 bp) or digested allele(85 bp & 48 bp) was seen in the tumor DNA relative to the normal DNA(T: gastric cancer, N: normal lymph nodes).

식부위가 없어 나뉘지 못한 133 염기쌍을 나타내고 일부는 인식부위가 존재함으로 인하여 85와 48염기쌍을 나타내게 되므로 이들은 3개의 띠를 보여주고 있었다. 위암 환자의 림프절에서 3개의 띠를 형성하는 이형접합성을 형성한 예가 18/44(41%), 하나의 띠는 1/44(2.2%) 그리고 두개의 띠는 25/44(56.8%)였다 (Table 1).

림프절에서 이형접합성을 형성한 경우만이 종양에서 이형접합성의 상실 검색에 필요하므로 이형접합성을 보인 18예에서만 위암 조직 DNA를 추출하여 상기와 중합 효소연쇄 반응을 시행하였다. 그 결과 18예 중 6예(33.3%)에서 이형접합성의 상실을 관찰할 수 있었는데, 5예는 Rsa I에 대한 인식부위가 없었고 1예에서는 인식 부위가 있는 동형접합성을 나타내었다(Fig. 3).

고 찰

종양억제 유전자의 돌연변이에 관한 연구에 있어서 전통적인 방법인 Southern blotting은 제한 분절 길이 다형성에 의한 대립형질의 분석을 하는 것으로 완전히 유지된 많은 분자량의 DNA를 필요로 한다. 그러므로 파라핀에 포매된 조직의 경우에는 Southern blotting을 적용시키기에는 무리이다. 이에 저자들은 중합효소 연쇄반응과 제한 분절 길이 다형성을 이용하여 APC 종양억제 유전자를 검색하는데 정확하며 믿을 만한 결과를 얻을 수가 있었다. 이러한 방법은 이미 식도암이나 폐암의 경우에 이형접합성의 상실에 관한 연구에 적용되었으며 그 타당성이 증명되어 있으므로¹⁶⁻¹⁸⁾, 수년간 파라핀에 포매된 조직이라 하더라도 검색에는 큰 무리가 없다고 할 수 있다. 또한 한 환자에서 시간의 변화에 따른 유전자의 변화를 관찰하는 것도 가능하므로 이 방법은 종양억제 유전자에 관한 연구 이외에도 DNA를 이용한 분자생물학적 연구에 있어 필수적인 방법이라고 생각된다.

현재까지 밝혀진 종양억제 유전자로는 APC 이외에도 MCC(mutated colon cancer), DCC(deleted colon cancer), NF-1(neurofibromatosis), Rb (retinoblastoma), p53, WT(Wilms' tumor), erbA 유전자 등이 알려져 있으며 이들의 정상 생리적 기능이나 돌연변이 연구는 많은 사람들에 의해 시행되고 있다. 이중 APC 유전자는 처음 대장암과 가족성 선종성 용종증 환자에서 발견되었는데 이는 가족성 선종성 용종증 환자의 용종 조직에서 여러 돌연변이를 보이고 있어, 대장 절막이 용종으로 될때 이미 체세포 돌연변이가 일어났음을 알 수 있었다^{19,20)}. 이러한 APC 유전자는 사람의 여러 종양에서 돌연변이가 발견되고 있는 상황인데 대장암 이외에도 폐암에서 33%¹⁶⁾, 폐양성 대장염²¹⁾ 그리고 식도암에서도 40%¹⁸⁾의 돌연변이를 보이고 있어 이 유전자가 대장암, 폐암 및 식

도암에서 종양 억제 유전자로 작용하고 있다고 사료된다. Su등²²⁾은 ethylni-trosourea로 처리한 쥐에서 다발성 장종양이 발생하였으며, 이들 종양은 사람의 APC 유전자와 해당하는 mAPC(murine APC)의 돌연변이에 의한 것이었다고 보고하면서 APC 유전자와 종양발생과의 관련성 연구에 중요한 모델을 제시하였다.

저자들이 정상 건강인 52명에서 APC 유전자의 이형접합성을 조사한 결과 18/52(36%)로 나타나고 있었으며²³⁾, 위암 환자에서의 이형접합성은 18/44(41%)를 나타내고 있었다. 정상인의 말초혈액 림프구 및 림프절에서의 이형접합성 빈도는 보고에 따라 다소 차이를 보이고 있는데 Boynton등¹⁵⁾은 식도암 환자에서 67%, D'Amico등¹⁶⁾은 30예의 폐암 환자에서 33%의 이형접합성의 빈도를 보고하고 있다. 저자들의 경우에는 41%의 이형접합성을 보이고 있었으며, 이형접합성의 상실이 33.3%에서 발견되었기 때문에 APC 유전자의 돌연변이가 위암의 발생에 있어 밀접하게 관여하고 있다고 할 수 있다. 물론 다른 종양억제 유전자 및 여러가지 요인들이 위암의 발생에 관여할 것으로 사료되므로 이에 관한 연구는 차후에 보충되어야 하겠다.

파라핀에 포매된 조직에서 DNA를 이용한 종양억제 유전자 및 다른 연구를 함에 있어서 반드시 해결하여야 할 문제점은 종양이 성장에 필수적으로 관여하는 정상 기질조직의 오염이다. 이로 인하여 파라핀 포매된 조직에서의 결과가 과소 평가될 수도 있으나 이는 DNA 양에 따른 핵 식별²⁴⁻²⁶⁾ 및 이미 알려져 있는 세포주와 개개 환자의 종양 세포를 배양하는 방법을 통하여 이 문제를 해결할 수 있으리라고 생각된다. 저자들의 경우에 있어서는 핵 식별이 현실적으로 불가능하여, 정상 세포들의 혼입을 가능한한 줄이기 위한 방법으로 종양 부분이 슬라이드상에서 70% 이상되는 것만을 선택하였다.

종양에서 APC 유전자를 비롯한 다른 종양억제 유전자의 구조적 이상이나 돌연변이, 이들의 정상 생리적 기능, 위점막에서의 DNA 변화 그리고 치료적 측면에서 이러한 종양억제 유전자를 종양세포들에 넣어 줄 방법등에 관하여는 앞으로 많은 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

결 론

위암 환자의 파라핀 포매 조직에서 DNA를 추출한 다음, 중합효소 연쇄반응 및 제한 분절 길이 다형성의 방법을 통하여 APC 유전자의 돌연변이를 이형접합성의 상실로 검색한 결과 파라핀 포매된 조직의 DNA라 하더라도 중합효소 연쇄반응에서 좋은 성적을 얻을 수 있었으며, 이 방법을 통한 위암 환자의 돌연변이 검색에서는 림프절에서 18/44(41%)의 이형접합성을 보였고, 이들의 종양 조직에서 이형접합성의 상실은 6

/18(33.3%)에서 관찰할 수 있었다. 이러한 소견들로 보아 APC 유전자의 돌연변이가 위암의 발생과 밀접한 연관성을 가진다고 할 수 있으며, 파라핀 포매 조직에서 이형접합성의 상실을 연구하고자 할 때 중합효소 연쇄반응 및 제한 분절 길이 다형성의 방법은 하나의 효과적인 방법이라 하겠다.

(시료 모집에 많은 도움을 주신 성모병원의 강창석, 이교영 선생님과 대전 성모병원의 황호원 선생님께 감사드립니다.)

참 고 문 헌

- 1) Knudson AG. *Mutation and cancer-Statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci 1971; 68: 820-23.*
- 2) Weinberg RA. *Tumor suppressor gene. Science 1991; 254: 1138-46.*
- 3) Kinzler KW, Nibert MC, SULK, Vogelsterin B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, Mckechnic D, Finniear R, Markham A, Groffen J, Boguski MS, Altschul SF, Horiee A, Ando H, Miyoshi Y, Miki T, Nishisho I, Nakamura T. *Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. Science 1991; 253: 661-5.*
- 4) Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simon JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, Vogelsterin B. *Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancer. Science 1990; 247: 49-56.*
- 5) Kinzler KW, Nibert MC, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hamilton SR, Hedge P, Markham A, Carlson M, Joslyn G, Groden J, White R, Miki Y, Miyoshi Y, Nishisho I, Nakamura Y. *Identification of a gene location at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. Science 1991; 251: 1366-70.*
- 6) Southern EM. *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 1975; 98: 503-17.*
- 7) Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P, Markham A, Krush AJ, Perterson G, Hamilton SR, Nibert MC, Nibert MC, Levy DB, Bryan TM, Preisinger AC, Smith KJ, Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B. *Mutation of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. Science 1991; 253: 665-9.*
- 8) Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn GG, Steven J, Spiro L, Robertson M, Sargent J, Le Paslier D, Abderrahim H, Cohen D, Leppert M, White R. *Identification and characterization of the familial adenomatous coli gene. Cell 1991; 66: 589-600.*
- 9) Joslyn G, Carlson M, Thliveris A, Albersten H, Gelbert L, Samowitz W, Groden J, Steven J, Spiro L, Robertson M, Sargeant L, Krapcho K, Wolff E, Burt T, Hughes JP, Warrington J, Mcpherson J, Le Paslier D, Abderrahim H, Cohen D, Leppert M, White R. *Identification of deletion mutation three new genes at the familial polyposis locus. Cell 1991; 66: 601-13.*
- 10) Herrera L, Kakati S, Gibas L, Pietrzak E, Sandburg AA. *Gardner's syndrome in a man with an interstitial deleting of 5q. Am J Med Genet 1986; 25: 473-6.*
- 11) Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJR, Ellis A, Gorman P, Lucidbello FC, Murday VA, Rider SH, Scambler P, Sheer D, Solomon E, Spurr NK. *Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. Nature 1987; 328: 614-6.*
- 12) Leppert M, Dobbs M, Scarnbler P, O'Connell P, Nakamura Y, Stauffer O, Woodward W, Burt R, Hughes J, Gardner E, Latherop M, Wasmuth J, Lalouel JM, White R. *The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5. Science 1987; 238: 1411-3.*
- 13) Nakamura Y, Lathrop M, Leppert M, Dobbs M, Wasmuth J, Wolff E, Carlson M, Fujimoto E, Krapcho K, Sears T, Woodward S, Hughes J, Burt R, Gardner E, Lalouel JM, White R. *Localization of the genetic defect in familial adenomatous polyposis within a small region of chromosome 5. Am J Hum Genet 1988; 43: 638-44.*
- 14) Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. *Purification of DNA from formaldehyde and paraffin embedded human tissue. Biochem Biophys Res Commun 1985; 130: 118-26.*
- 15) Boynton RF, Blount PL, Yin J, Brown VL, Huang Y, Tong Y, McDaniel T, Newkirk C, Resau JH, Raskind WH, Haggitt RC, Reid BJ, Meltzer SJ. *Loss of heterozygosity involving the APC and MCC genetic loci in the majority of human esophageal cancers. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 3385-8.*
- 16) D'Amico D, Carbone DP, Hohnson BE, Meltzer SJ, Minna JD. *Polymorphic sites within the MCC and APC loci reveal very frequent loss of heterozygosity in human small cell lung cancer. Cancer Res 1992; 52: 1996-9.*
- 17) Boynton RF, Huang Y, Blout PL, Reid BJ, Rasking WH, Haggih RC, Newkirk C, Resau JH, Yin J, McDaniel TK, Meltzer SJ. *Frequent loss of heterozygosity at the retinoblastoma locus in human esophageal cancer. Cancer Res 1991; 51: 5766-9.*
- 18) Meltzer SJ, Yin J, Huang Y, McDaniel TK,

- Newkirk C, Iseri O, Vogelstein B, Resau JH. *Reduction to homozygosity involving p53 in esophageal cancers demonstrated by polymerase chain reaction single-strand conformational polymorphism analysis. Cancer Res 1991; 51: 3056-8.*
- 19) Soloman E, Voss R, Hall V, Bodmer WF, Jass JR, Jeffreys AJ, Lucibello FC, Patel I, Rider SH. *Chromosome 5 allele loss in human colorectal carcinoma. Nature 1987; 328: 616-9.*
- 20) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL. *Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Engl J Med 1988; 319: 525-32.*
- 21) Greenwald BD, Harpaz N, Yin J, Huang Y, Tong Y, Brown VL, McDaniel T, Newkirk C, Resau JH, Meltzer SJ. *Loss of heterozygosity affecting p53, Rb and mcc/apc tumor suppressor gene loci in dysplastic and cancerous ulcerative colitis. Cancer Res 1992; 52: 741-5.*
- 22) Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, Preisinger AC, Moser AR, Luongo C, Gould KA, Dove WF. *Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. Science 1992; 256: 668-70.*
- 23) Rhyu MG, Park WS, Jung YJ, Kim GR, Kim CS. *The Rsa I polymorphic site within exon 11 of APC (adenomatous polyposis coli) gene determined by digestion of PCR products in human gastric cancer. Korean J Microbiol 1992; 27: 189-96.*
- 24) Boynton RF, Huang Y, blount PL, Reid BJ, Raskind WH, Haggih RC, Newkirk C, Resau JH, Yin J, McDaniel TK, Meltzer SJ. *Frequent loss of heterozygosity at the retinoblastoma locus in human esophageal cancers. Cancer Res 1991; 51: 5766-9.*
- 25) Blount PL, Ramel S, Raskind WH, Haggitt RC, Sanchez CA, Dean PJ, Rabinovitch PS, Reid BJ. *17p allelic deletion and p53 protein overexpression in Barrett's adenocarcinoma. Cancer Res 1991; 51: 5482-6.*
- 26) Burner GC, Loeb LA. *Mutations in the KRAS2 oncogene during progressive stages of human colon carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 2403-7.*