

위암에서 p53과 nm23 단백질의 면역조직화학적 연구

국립의료원 해부병리과

김덕환 · 김윤주 · 양성은 · 팽성숙
장희진 · 서정일 · 박효숙

Immunohistochemical Study of p53 and nm23-H1 Protein in Gastric Carcinoma

Duck Hwan Kim, M.D., Yoen Ju Kim, M.D., Seong Eun Yang, M.D.
Sung Suk Paeng, M.D., Hee Jin Chang, M.D., Jung Il Suh, M.D.
and Hyo Sook Park, M.D.

Department of Pathology, National Medical Center

The p53 gene, which resides on the short arm of chromosome 17, has been described as a tumor suppressor gene playing a role of G1 checkpoint monitoring DNA damage, but mutation of this gene has been shown in numerous types of human cancers. The nm23-H1 gene encodes human NDP(nucleotide diphosphate) kinase. The expression of nm23-H1 gene was postulated to inversely correlate with metastatic potential of malignant tumors. We examined immunohistochemical expression in 30 cases of stomach cancers including 10 cases each of early gastric cancers(EGC), advanced gastric cancers without lymph node involvement, and advanced gastric cancers with lymph node involvement, which were stained with mouse monoclonal antibody of p53(PB53-12) and nm23-H1. Positive nuclear staining of p53 was frequently found in advanced gastric cancers with lymph node involvement (80%). The lymph node positive group showed high expression of p53(80%), and low expression of nm23-H1(30%) than lymph node negative group. There was no significant correlation of p53 and nm23-H1 expression with tumor size, invasion depth, TNM stages, distant metastasis and histologic differentiation. Based on the present study, the expression of p53 and down regulation of nm23-H1 are thought to be correlated with tumor progression and lymph node involvement, and may be a useful prognostic factor in gastric cancers. (**Korean J Pathol 1996; 30: 587~594**)

Key Words: Gastric cancer, p53, nm23, Lymph node involvement, Prognostic factor

서 론

위암의 빈도는 서구에서는 많이 감소하였지만 한국에서는 여전히 높은 빈도를 보이고 있으며 남성의 경우에는 위암의 빈도가 암종중에서 28.3%로 1위를 차지하고 여성에서는 자궁경부암 다음으로 17.9%의 빈도를 보이고 있다¹. 그럼에도 불구하고 위암의 분자 유전학적 발암기전에 관한 연구는 확실하게 밝혀진 것은 없었다. 그러나 최근에 들어서면서 위종양의 진행과 분화도에 따라 일련의 유전자 변화를 보이며, 다양한 종양 유전자, 종양 억제유전자, 세포주기 조절과 DNA (Deoxyribose nucleic acid) 보수 유전자가 관련되는 것으로 보고되고 있다². 그중에 광범위하게 다양한 종양의 발생에 관여하는 것으로 알려진 p53과 악성종양의 전이 억제능력과 관련있는 것으로 알려진 nm23유전자에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. p53 종양유전자는 염색체 17p에 위치하면서 53,000달톤의 핵의 인단백질로 해독되며³ DNA에 결합하는 전사인자로 작용하여 세포분열을 역으로 조절한다. 세포분열시에 세포가 G1기에서 S기로 진행되는 것을 방해하여 DNA의 손상을 입은 세포가 곧바로 DNA 복제가 일어나는 것을 막기 위하여 손상된 유전자의 복구 및 apoptosis를 유발할 시간을 벌 수 있게 해준다⁴. p53유전자의 점 돌연변이나 결손 또는 유전자 재배열등이 대장, 유방, 폐, 뇌, 식도, 간, 방광, 종피종, 뼈 및 연부종양등의 여러 종양에서도 발견되었다⁵⁻¹⁴. 돌연변이 p53은 단백질의 성질이 변화되어 유전자의 손상을 입은 세포에 대한 항증식 작용이 소실되어 종양을 유발할 수 있다. 단백질의 안정성을 증가시켜 반감기가 증가되며 핵내에서 과다축적되어 면역조직화학 검사로 검출이 가능하다¹⁵. 최근에 p53의 유전자 변화가 위암의 발달에도 중요한 역할을 할 것이라고 생각되고 있고² 나쁜 예후와 연관성이 보고되었다¹⁶. 그러나 p53의 역할은 아직 논란의 여지가 있어서 위암에서 p53돌연변이의 보고된 빈도는 0~64%까지 다양하다¹⁷.

nm23은 전이억제 유전자로 높은 전이성을 갖는 쥐의 흑색종 세포에서 nm23의 감소된 표현에 근거하여 추출되었다¹⁸. 사람에서는 nm23 H1과 nm23 H2의 두가지 유전자가 있는데 88%가 상동이고 염색체 17q22에 존재하며 서로 18kb 떨어져 있으며 두가지 NDP(Nucleoside diphosphate) Kinase의 polypeptide로 해독된다¹⁹. 그 중에 nm23 H1이 유방암의 전이억제와 나쁜 예후와의 관련성이 알려져 있고²⁰ nm23의 감소된 표현이 간, 대장, 갑상선, 담낭의 암종, 악성

흑색종 외에도 위의 원발 전이나 질병의 경과와 연관성이 주장되었다²¹⁻²⁶. 이에 저자들은 30 예의 위암을 대상으로 림프절 전이를 포함한 병리학적 소견과 p53과 nm23의 면역조직화학적 표현과의 관계를 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1994년 국립의료원에서 위절제술을 시행한 위암 30예를 대상으로 하였고 절제된 위는 종양부위를 3×0.5 cm 크기의 격자의 mapping 용지에 복사하여 H&E 슬라이드로 종양의 크기 및 침습범위를 표시하였다. 10예의 조기 위암과 10예의 림프절 전이가 없는 진행성 위암과 10예의 림프절 전이가 있는 진행성 위암에 대하여 각 환자의 나이, 성별, 종양의 크기, 침습 정도, 원격 전이 여부를 조사하였고 조직학적 분화도는 well, moderate, poorly로 나누었다. 진행성 위암은 Borrmann²⁷의 분류에 따라 유형 I, II, III, IV로 나누었고 종양의 TNM기 결정은 AJCC (American Joint Committee on Cancer)²⁸에 의거하여 I, II, III, IV기로 하였다. 면역조직화학적 검사는 B-SA (Biotin Streptavidin Amplified system)검색법으로 시행하였다. 간략하면 4 μm 두께로 파라핀 포매조직을 박절하고 탈파라핀 과정을 거친후 p53 염색에서는 항체를 넣기전에 citrate buffer에서 3~4분간 microwave oven에서 열을 가하였다. 사용된 p53항체는 야생형과 돌연변이형 모두 검출할 수 있는 단클론성 항체인 BP53-12-1(Biogenex)을 사용하였고 nm23항체는 단클론성인 nm23Ab-1 (Oncogene Science)을 사용하였으며 각 조직절편에 1 내지 2 방울씩 도포하여 30분간 항온시켰다. 발색은 AEC(3-amino-9-ethylcarbazole)로 하였다. p53 염색의 판정은 종양 세포의 핵내에 명확한 갈색과립이 보이면 양성으로 하였고 nm23의 염색은 세포질에 명확한 염색을 보이는 것을 양성으로 하였다. 종양위 5%미만으로 미약한 염색이 보일때는 음성으로 간주하였다. Fisher-Exact test로 검정을 실시하였고 p값이 0.06 하인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

30예의 위암 환자의 평균 나이는 53.5세였고 남자 20명, 여자 10명이었다. 전체 30예중 p53은 16예(53%)에서 핵내에 명확한 염색을 보였고(Fig. 1), nm23은 15예(50%)에서 주로 세포질내에 염색을 보였으며 일부에서는 핵내 염색도 관찰되었다(Fig. 2). 위암종의

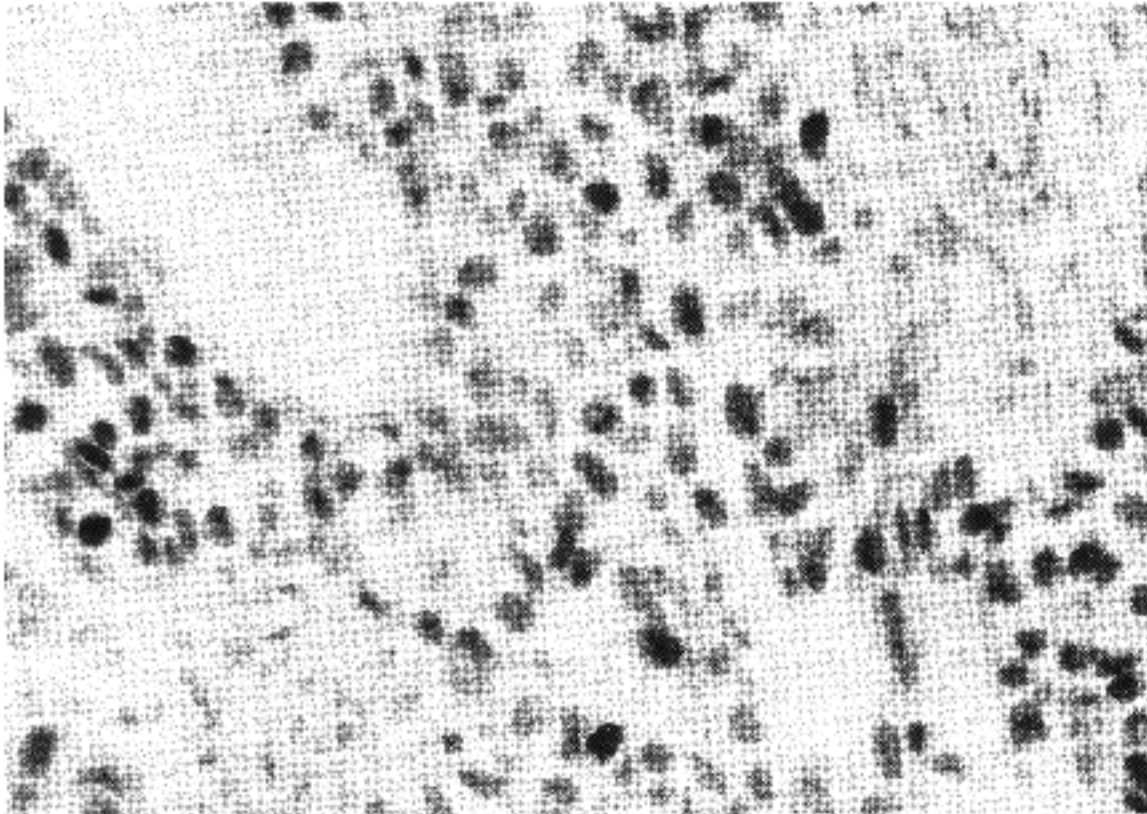


Fig. 1. Intranuclear immunostain for p53 gene product(ABC).



Fig. 2. Cytoplasmic immunostain for nm23 H1 protein(ABC).

Table 1. p53 and nm23 protein expression in relation to progression of tumor (n=30)

	No. of P53(+)/No. of cases	No. of nm23(+)/No. of cases
EGC	3/10(30%)	7/10(70%)
AGC(LN-)	5/10(50%)	5/10(50%)
AGC(LN+)	8/10(80%) (p=0.06)	3/10(30%) (p>0.06)

EGC:Early gastric cancer

AGC(LN-):Advanced gastric cancer without lymph node involvement

AGC(LN+):Advanced gastric cancer with lymph node involvement

진행에 따른 p53의 표현에서 조기 위암에서는 10예 중 3예(30%), 림프절 전이가 없는 진행성암 10예 중 5예(50%), 림프절 전이가 있던 진행성암 10예 중 8예(80%)에서 핵내에 명확한 염색을 보여 위암의 진행도가 증가함에 따라 p53 양성반응은 유의하게 높았다($p=0.06$). nm23의 염색에서도 조기위암 10예 중 7예(70%), 림프절 전이가 없는 10예 중 5예(50%), 림프절 전이가 있는 10예 중 3예(30%)에서 세포질에 명확한 염색을 보여 위암의 진행도에 따른 nm23의 반응은 역관계를 보였으나 수가 작아 통계적 유의성은 없었다(Table 1). 림프절 전이 여부에서 p53 양성반응은 림프절전이가 없는 20예 중 8예(40%)와 림프절 전이가 있는 10예 중 8예(80%)에서 관찰되었고 nm23 양성반응은 림프절 전이가 없는 20예 중 12예(60%)와 림프절 전이가 있는 10예 중 3예(30%)에서 관찰되어 림프절 전이군이 높은 p53양성율($p<0.05$)과 낮은 nm23 양성율($p=0.057$)을 보였다(Table 2). 조직학적 분화도에 따른 p53과 nm23의 양성율은 분화도가 좋은 군(4예)에서 각각 2예(50%)와 1예(25%), 중등도의 분화도를 보인 군(12예)에서는 7예(58%)와 6예(50%), 분화가 나쁜 군(14예)에서는 7예(50%)와 8예(57%)로 분화도에 따른 차이는 없었다. 원발전이는 30예 중 7예가 확인 되었는데 대장에 2예, 장간막에 2예, 간, 췌장과 늑막에 각각 1예가 있었다. p53양성은 원발 전이가 없는 23예 중 11예(48%)와 원발전이가 있는 7예 중 5예(71%)가 양성을 보였고 nm23은 전자에서는 12예(57%), 후자에서는 3예(43%)로 유의한 차이는 없었다. 그 외에 종양의 크기, 침습정도, TNM기, 진행성 위암에서의 Borrmann 유형과 p53, nm23 표현과는 상관성이 없었다(Table 2).

고 찰

위암은 세계에서 광범위하게 발병하고 있고 우리나라를 포함한 동아시아에 많은 것으로 되어 있다. 그럼에도 불구하고 위암의 발달과 진행에 대한 유전자적 변화에 대해서는 많이 알려진 바가 없었으나 종양의 발암현상의 기전을 명확히 하기 위해 일부 연구들이 활발해 지고 있다. 위암종의 발생 및 진행과 관련있는 것으로 보고되고 있는 종양 유전자는 c-met, D7S95, k-sam, erbB-2, TGF(Transforming growth factor)- α , EGF(Epidermal growth factor), Cyclin E, MTS1등이 있으며 종양 억제 유전자로는 APC(Adenomatous polyposis coli), DCC(Deleted in colon Cancer)와 p53등이 보고되고 있다².

그 중에 p53 종양 억제 유전자의 불활성화는 사람

Table 2. Association of p53 and nm23 staining with clinicopathologic parameters(n=30)

Parameters	p53 staining(%)	nm23 staining(%)
Tumor size(cm)		
<3	0/ 5(0)	3/ 5(60)
3.0~5.0	11/16(69)	7/16(44)
>5.0	5/ 9(56)	5/ 9(56)
	NS	NS
Differentiation		
well	2/ 4(50)	1/ 4(25)
Moderate	7/12(58)	6/12(50)
Poorly	7/14(50)	8/14(57)
	NS	NS
Depth of tumor invasion		
Mucosa	2/ 6(33)	3/6(50)
Submucosa	1/ 4(25)	4/4(100)
Muscle	2/ 4(50)	2/4(50)
Serosa	3/ 4(75)	3/4(75)
Omentum	8/12(67)	3/12(27)
	NS	NS
TNM stage		
I	4/14(29)	9/14(64)
II	5/ 7(71)	4/ 7(57)
III	4/ 5(80)	1/ 5(20)
IV	3/ 4(75)	1/ 4(25)
	NS	NS
Lymph node involvement		
Negative	8/20(40)	12/20(60)
Positive	8/10(80)	3/10(30)
	($p<0.05$)	($p=0.057$)
Distant metastasis		
Negative	11/23(48)	12/23(57)
Positive	5/ 7(71)	3/ 7(43)
	NS	NS
Borrmann type		
I	1/ 2(50)	1/ 2(50)
II	0/ 2(0)	2/ 2(100)
III	8/12(67)	3/12(25)
IV	4/ 4(100)	2/4 (50)
	NS	NS

NS; not significant

에서 발생하는 종양의 반수에서 발견될 정도로 광범위하게 일어나며 이런 점은 종양의 병인에 기본적으로 중요한 단계임을 시사한다²⁹. p53 유전자는 17번 염색체의 단완 13.1에 위치하며 조절부위를 포함하

여 11개의 exon으로 구성되어 있으며 393개의 아미노산으로 구성된 핵내 단백질로 해독된다³. p53 단백질의 기본적인 기능은 전사 조절자로서 특이한 유전자 서열에 상호작용하여 세포내의 유전자의 전사에 기여한다³⁰. p53의 종양억제 유전자로서의 기능은 두가지로 볼 수 있는데 하나는 p53이 G1기와 S기 경계에서 세포주기를 억류하는 것인데 이런 작용은 p53이 G1 cyclin-dependent kinase의 억제자인 21kd의 WAF1/CIP1 전자의 발현을 유도하여 실행된다³¹. 두 번째로는 p53이 apoptosis를 유발하는 것으로 세포내 실험에서 방사선 조사나 DNA를 손상시킬 수 있는 약제 투여로 p53 단백질과 전사 활동성의 증가는 p53이 DNA 보수와 유전자의 감시 체계에 참여하는 것을 암시해 준다^{4,32}. 돌연변이 p53에 의한 야생형 p53의 기능적인 제거가 종양으로의 변형에 중요한 단계이며 83%정도가 과오점돌연변이(missense point mutation)로서 주로 중심부의 소수성 영역에서 일어나며 exon 5~9 사이에서 많다^{3,33}. p53유전자의 점 돌연변이외에도 결손 또는 유전자 재배열등이 여러 종양, 즉 대장, 유방, 폐, 뇌, 식도, 간, 방광, 중피종, 뼈 및 연부종양에서도 발견되었다⁵⁻¹⁴. 돌연변이 p53을 검출하는 방법은 17번염색체의 단완에 대한 RFLP (restriction fraction length polymorphism) 분석으로 LOH(Loss of heterozygosity)를 보거나 SSCP(Single stranded conformational polymorphism)로 screening하여 유전자 서열검사를 시행하는 방법이 보다 정확하나 검사비가 비싸고 보통의 검사실에서는 하기 힘들다. 반면에 면역조직화학 검사는 시행이 용이하고 형태학적 변화와 p53 표현과의 연관성을 알아보기 쉽고 p53단백의 면역조직화학적 검사와 p53 유전자의 돌연변이간에 상관관계가 있음이 여러연구에서 밝혀진 바 있다^{3,34}. 야생형 p53 단백질은 보통 15~20분의 짧은 반감기를 가져서 통상의 면역조직화학 검사로 검출될 만큼 충분히 축적이 안되나 돌연변이 p53 단백질은 Heat shock protein(hsc 70)과 결합하여 수시간의 반감기를 갖는 안정된 입체구조로 변화되어 면역조직화학 검사에서 검출이 가능하다^{13,35}.

유전자의 돌연변이는 장기마다 다른 돌연변이원에 의해서 또는 같은 조직이라도 각기 다른 기능적인 선택으로 인해서 조직에 따라 또는 종양의 유형에 따라 물리적, 기능적으로 다른 돌연변이를 보인다³⁶. 대장암이나 식도암에서는 codon 175에서 돌연변이가 많고^{9,13} HBV양성인 간세포암은 58%에서 codon 249의 돌연변이가 발견되었으나³⁷ 위암에서는 p53 유전자의 codon196과 248의 돌연변이가 가장 많고 주로 CpG dinucleotide에 생기며 이러한 돌연변이는 nitric

oxide같은 발암인자에 의한 nucleotide의 탈아미노화에 의해 유발될 수 있는데 이러한 점이 조직학적 분화도에 상관없이 위암의 발생에 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다¹⁷. Tahara²는 p53의 돌연변이와 대립유전자 소실은 위암에서 조직학적 유형에 상관없이 60%이상, 위선종에서 30%, 장화생의 경우에는 10%정도 보여 위선종에서도 p53 돌연변이가 확인되는 점은 p53유전자의 돌연변이가 위의 발암현상에서 초기현상이라고 하였다. 또한 종양세포내에 p53의 축적이 나쁜 예후를 보인다는 보고도 있고¹⁶ 예후와 상관없이 없다는 보고도 있다³⁸. Fukunaga³⁹의 연구에서는 p53의 면역조직화학적 검사에서 위암의 TNM기, 침습정도, 림프절 전이, 간전이와는 상관성이 없었으나 장성 유형이(intestinal type) 미만성(diffuse)보다 높은 p53 표현을 보이고 분화도가 좋을수록 표현이 증가되어 조직학적 유형에 따라 다르다고 주장하였다. 본 연구에서는 p53의 표현은 종양의 크기, 조직학적 분화도, 침습정도, Borrmann 유형, TNM기와 원발전이와는 유의한 상관관계는 없었으나 림프절 전이 여부와 종양의 진행성에 따라 p53의 표현이 증가되는 경향이 있어 p53표현은 간접적으로 예후판정에 도움이 될 것으로 생각된다. 그러나 p53의 과오 점돌연변이 이외의 여러가지 기전, 즉 야생형 p53의 촉진자의 변화로 p53 단백질의 과표현을 유발하거나 다른 종류의 유전자나 단백질에 의해서 야생형 p53단백이 안정화되고 반감기가 길어져서 면역조직화학 염색에서 검출되는 위양성이 있을 수 있다⁴⁰. 또한 정지유전부호(stop codon)를 유발하는 nonsense 점 돌연변이로 인하여 돌연변이 p53 단백질의 핵내 축적이 없거나 유전자 소실로 인하여 p53단백이 암생기는 경우에도 위음성이 있을 수 있다^{40,41}. 이러한 위양성과 위음성은 소수이긴 하지만 p53의 돌연변이와 p53 유전자 생산물의 관련성에 대한 연구는 지속되어야 하겠다.

nm23은 전이억제 유전자로서 NDP kinase로 해독되며 ATP를 제외한 모든 nucleoside triphosphate를 세포에 공급하며 GTP를 G단백에 공급하여 세포의 신호전달에 참여할 것으로 생각되고 있다⁴². 그리고 c-myc를 전사시킬 수 있는 PuF(Purine binding factor)와 nm23-H2가 동종이라는 증거들과 nm23-H2 유전자 서열내에 leucine zipper motif가 있는 점이 nm23이 전사인자로 작용할 수 있다는 것을 암시하고 있다⁴³. nm23은 기능적으로 초파리의 Awd(abnormal wing disc)와 다른종의 유사한 동종유전자와 마찬가지로 분화와 발달에 역할을 하는 것으로 보인다⁴⁴. 또한 NDP kinase는 세포골격과 핵분열 방추의 미세

소관(microtubule)관련 단백질로 알려져 있고 미세소관의 형성과 해체에 역할을 하여 세포골격 상태에 영향을 줄 수 있다^{45,46}. 따라서 세포의 이동과 유착에 영향을 주어 nm23의 암세포의 전이능력과 관련성에 대한 부분적인 설명이 가능할 것이다. 그러나 NDP kinase와 미세소관과의 관계에 대한 부정적인 보고도 있어⁴⁷ 추가적인 연구가 필요한 부분이다. nm23-H1 유전자의 부호서열(coding sequence)의 결손이나 대립유전자 손실과 같은 유전자 변화가 종양의 전이에서 중요한 역할을 할 것으로 생각된다⁴⁸. nm23의 세포내 축적은 주로 세포질이지만 핵과 세포막에서도 보일 수 있다^{46,49}. nm23의 감소된 표현은 유방암외에도 악성 흑색종의 진행과 관련이 있고²⁶ 간세포암에서 원격 전이와의 관련성이 보고되었다²¹. 대장의 경우에는 nm23 대립유전자 소실이 대장암의 림프절 전이가 있는 대장암에서 보고되기도 하였으나²² nm23 단백질의 표현과 종양의 임상적 기수(stage)와 원격전이와 관련성이 없다는 보고도 있다³⁰. 갑상선의 유두상 암종의 림프절 전이와²⁴ 담낭암에서는 림프절 전이와는 상관이 없으나 국소 침습과의 관련성이 보고되었다²⁵.

위암의 경우에는 nm23과의 관계가 많이 알려져 있지 않으며 논란의 대상이 되고 있다. Kodera 등⁵¹은 nm23 유전자의 낮은 표현이 위암에서 장막 침습, 림프절 전이, 나쁜 예후와 연관이 있음을 보고하였고 Nakayama²³는 위암의 림프절 전이에서 전이암세포가 원발암보다 낮은 nm23 염색상을 보였고, 원발암보다 간전이에서 약한 염색상을 보이는 것으로 보고하였다. 본 연구에서도 nm23의 표현은 위암의 진행도, 침습 정도, 원격전이 여부와는 유의한 상관관계를 보여주지는 않았지만 림프절 전이가 있는 위암군이 림프절 전이가 없는 위암군보다 낮은 nm23 표현을 보여 nm23과 림프절 전이와는 역관계를 보인다는 것을 확인 할 수 있었다. nm23은 동물이나 시험관내 실험에서 전이 능력과 역관계를 보여주었고 사람의 일부종양에서도 nm23의 소실이 전이능력의 표지자로서의 연관관계를 보이거나 아직 nm23이 직접적으로 전이와 관계가 있다는 확고한 증거는 없다. 이런 직접적인 증거를 찾기위한 노력이 필요할 것이며 NDP kinase 활동성이나 nm23의 mRNA가 nm23 면역조직화학 염색이 일치하지 않는다는 보고도 있어^{30,52} 추가적인 분자생물학적인 연구가 뒷바침이 되어야 할 것이다.

결 론

위암 30예를 대상으로 p53과 nm23 단백질의 발현과

위암의 진행도 및 여러 병리학적 소견들간의 관계를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 전체 30예중 p53은 16예(53%)에서 핵내에 명확한 염색을 보였고, nm23은 15예(50%)에서 주로 세포질내에 염색을 보였으며 일부에서는 핵내 염색도 관찰되었다.

2) 위암종의 진행에 따른 p53의 표현에서 조기 위암에서는 10예중 3예(30%), 림프절 전이가 없는 진행성 암 10예중 5예(50%), 림프절 전이가 있던 진행성 암 10예중 8예(80%)의 핵내에 명확한 염색을 보여 위암의 진행도에 따라 p53 양성반응은 유의하게 높았다($p=0.06$).

3) 림프절 전이 여부에서 p53 양성반응은 림프절 전이가 없는 20예중 8예(40%)와 림프절 전이가 있는 10예 중 8(80%)예에서 관찰되었고 nm23 양성반응은 림프절 전이가 없는 20예중 12예(60%)와 림프절 전이가 있는 10예중 3예(30%)에서 관찰되어 림프절 전이군이 높은 p53양성율($p<0.05$)과 낮은 nm23 양성율($p=0.057$)을 보였다.

4) 조직학적 분화도, 원발전이, 종양의 크기, 침습 정도, TNM기와 진행성 위암에서의 Borrmann 유형과 p53, nm23 표현과는 상관성이 없었다.

이상의 결과로 P53과 nm23의 발현이 위암에서 종양의 진행도와 림프절 전이와 관련이 있음을 알 수 있었고 예후 인자로서 큰 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 대한민국 보건 사회부: 한국인 암등록 조사자료 분석 보고서(1991. 7. 1~1992. 6. 30), 3월, 1993년.
2. Tahara E. Gene alterations in human gastrointestinal cancers. The application to molecular diagnosis. *Cancer* 1995; 75: 1410-7.
3. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-6.
4. Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB. Wild type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7491-5.
5. Baas IO, Mulder JWR, Offerhaus GJA, Vogelstein B, Hamilton SR. An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. *J Pathol* 1994; 172: 5-12.
6. Osborne RJ, Merio GR, Mitsudomi T, et al. Mutations in the p53 gene in primary human breast cancers. *Cancer Res* 1991; 51: 6194-8.

7. Caamano J, Ruggeri B, Momiki S, Sickler A, Zhang SY, Kleinszanto AJP. Detection of p53 in primary lung tumors and nonsmall cell lung carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 1991; 139: 839-45.
8. Sidranski D, Mikkelsen T, Schwechheimer K, Rosenblum ML, Cavenee W, Vogelstein B. Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumor progression. *Nature* 1992; 355: 846-7.
9. Hollstein MC, Metcalf JA, Welsh JA. Frequent mutation of the p53 gene in human esophageal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9958-61.
10. Goldblum JR, Bartos RE, Carr KA, Frank TS. Hepatitis B and alterations of the p53 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 1244-51.
11. Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC, et al. Identification of p53 gene mutation in bladder cancers and urine samples. *Science* 1991; 252: 706-9.
12. Cote RJ, Jhanwar SC, Novick S, Pellicer A. Genetic alterations of the p53 gene are a feature of malignant mesothelioma. *Cancer Res* 1991; 51: 5410-6.
13. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 1989; 342: 705-8.
14. Mullegan LM, Matlashewski GJ, Scrabble HJ, Cavenee WK. Mechanism of p53 loss in human sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5863-7.
15. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc 70-p53 complex with altered half life. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 531-9.
16. Martin HM, Filipe MI, Morris RW, Lane DP, Silvestre F. p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1992; 50: 859-62.
17. Poremba C, Yandell DW, Huang Q, et al. Frequency and spectrum of p53 mutations in gastric cancer. a molecular genetic and immunohistochemical study. *Vichows Arch* 1995; 426: 447-55.
18. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L. Evidence for a novel gene associated with a low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 204-8.
19. Stahl JA, Leone A, Rosengard AM, Laura P, King CR, Steeg PS. Identification a second human nm23 gene, nm23H2. *Cancer Res* 1991; 48: 6550-4.
20. Bevilacqua G, Sobel ME, Liotta LA, Steeg PS. Association of low nm23 levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential. *Cancer Res* 1989; 49: 5185-90.
21. Nakayama T, Ohtsuru A, Nakao K, Shima M, Nakata K, Watanabe K. Expression in human hepatocellular carcinoma of nucleoside diphosphate kinase, a homologue of the nm23 gene product. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1349-54.
22. Leone A, McBride OW, Weston A. Somatic allelic deletion of nm23 in human cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 2490-3.
23. Nakayama H, Yasui W, Yokozaki H, Tahara E. Reduced expression of nm23 is associated with metastasis of human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84: 184-90.
24. Arai T, Watanabe M, Onodera M, et al. Reduced nm23-H1 messenger RNA expression in metastatic lymph nodes from patients with papillary carcinoma of the thyroid. *Am J Pathol* 1993; 142: 1938-44.
25. Fujii K, Yasui W, Shimamoto F, et al. Immunohistochemical analysis of nm23 gene product in human gallbladder carcinoma. *Virchow Arch* 1995; 426: 355-9.
26. Florenes VA, Aamdal S, Myklebost O, Maclandsmo GM, Bruland OS, Fodstad O. Levels of nm23 messenger RNA in metastatic malignant melanomas: Inverse correlation to disease progression. *Cancer Res* 1992; 52: 6088-91.
27. Borrmann R. Makroskopische Formen des vorgeschrittenen Magenkrebses. In *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*. Vol 4/1. Henke F, Lubarsch O, eds. Springer, 1926.
28. Beahrs OH, Henson DE, Hutter RVP, Myers MH. *Manual for staging of cancer*, 3rd ed. Philadelphia, Lippincott, 1988, 69-74.
29. Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 1992; 70: 523-6.
30. Kern SE, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Seymour A, Kinzler KW, Vogelstein B. Oncogenic forms of p53 inhibit p53 regulated gene expression. *Nature* 1992; 256: 827-30.
31. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 CDK-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805-16.
32. Zhan Q, Carrier F, Fornance AJ. Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agent and growth arrest. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 4242-50.
33. Milner J. Forms and functions of p53. *Semin Cancer Biol* 1994; 5: 211-9.
34. Davidoff AM, Humphrey PA, Iglehart JD, Marks JR. Genetic basis for p53 overexpression in human breast

- cancer. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 5006-10.
35. Reich NC, Oren M, Levine AJ. Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53. Mol Cell Biol 1983; 3: 2143-50.
 36. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene (review article). New Engl J Med 1993; 329: 1318-27.
 37. Scorsone KA, Zhou YZ, Butel JS, Slagle BL. p53 mutations cluster at codon 249 in hepatitis B virus-positive hepatocellular carcinoma from China. Cancer Res 1992; 52: 1635-8.
 38. Sasano H, Date F, Imatani A, Asaki S, Nagura H. Double immunostaining for c-erbB-2 and p53 in human stomach cancer cells. Hum Pathol 1993; 24: 584-9.
 39. Fukunaga M, Monden T, Nakanishi H, et al. Immunohistochemical study of p53 in gastric carcinoma. Am J Clin Pathol 1994; 101: 177-80.
 40. Wynford-Thomas D. p53 in tumor pathology: Can we trust immunohistochemistry? J Pathol 1992; 166: 329-30.
 41. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. Nature 1992; 358: 80-3.
 42. Bominaar AA, Molijn AC, Pestel M. Activation of G proteins by receptor-stimulated nucleoside diphosphate kinase in Dictyostelium. EMBO J 1993; 12: 2275-9.
 43. Postel EH, Berberich SJ, Flint J, Ferrone CA. Human c-myc transcriptional factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinases, a candidate suppressor of tumour metastasis. Science 1993; 261: 478-80.
 44. Wallet V, Mutzel R, Troll H. Dictyostelium nucleoside diphosphate kinase highly homologous to nm23 and Awd proteins involved in mammalian tumor metastasis and Drosophila development. J Natl Cancer Inst 1990; 82: 1199-1202.
 45. Nickerson JA, Wells WW. The microtubule-associated nucleoside diphosphate kinase. J Biol Chem 1984; 259: 11297-304.
 46. Rosengard AM, Krutzsch HC, Shearn A, et al. Reduced nm23/Awd protein in tumor metastasis and aberrant Drosophila development. Nature 1989; 342: 177-180.
 47. Melki R, Lascu I, Carlier MF, Veron M. Nucleoside diphosphate kinase does not directly interact with tubulin nor microtubules. Biochem Biophys Res Commun 1992; 1: 65-72.
 48. Wang L, Patel U, Ghosh L, Chen HC, Banerjee S. Mutation in the nm23 gene is associated with metastasis in colorectal cancer. Cancer Res 1993; 53: 717-20.
 49. Urano T, Furukawa K, Shiku H. Expression of nm23/NDP kinase proteins on the cell surface. Oncogene 1993; 8: 1371-6.
 50. Ayhan A, Yasui W, Yokozaki H. Reduced expression of nm23 protein is associated with advanced tumor stage and distant metastasis in human colorectal carcinomas. Virchows Arch B 1993; 63: 213-8.
 51. Kodera Y, Isobe KI, Yamauchi M, et al. Expression of nm23-H1 RNA levels in human gastric cancer tissue. Cancer 1994; 73: 259-65.
 52. Sastre-Garau X, Lacombe ML, Jouve M, Veron M, Magdelenat H. Nucleoside diphosphate kinase/nm23 expression in breast cancer. Lack of correlation with lymph node metastasis. Int J Cancer 1992; 50: 533-8.
-