

유방의 침윤성 관암종에서 nm23 단백질의 면역조직화학적 분석

경북대학교 의과대학 병리학교실

정민희 · 이승철 · 손윤경 · 서인수

Immunohistochemical Analysis of nm23 Protein in Infiltrating Ductal Carcinoma of the Breast

Min Hee Jung, M.D., Seung Cheol Lee, M.D.
Yoon Kyung Sohn, M.D. and In Soo Suh, M.D.

Department of Pathology, Kyungpook National University School of Medicine

The nm23 gene was originally identified from murine melanoma cell lines of varying metastatic potential. A strong association has been observed between reduced expression of nm23 gene and acquisition of metastatic behavior in some tumor cells including breast cancer and melanoma, but not in others such as colon cancer, neuroblastoma, and cervical cancer. It was proposed that nm23 may function as a suppressor gene for tumor metastasis. It has recently been found that the sequence of nm23 and NDP-kinase(NDP-K) are identical. Mortality associated with human breast carcinoma is almost entirely due to subsequent metastasis, but the molecular basis of this metastasis is not understood. Elucidation of the genetic control of metastatic propensity of a tumor is important in determining prognosis and choice of therapy. The purpose of this study was to investigate the relationship of nm23 protein expression with axillary lymph node metastasis and other prognostic factors. Using an immunohistochemical technique and employing a polyclonal antibody to nm23 protein, we have determined nm23 expression in a series of 72 infiltrating ductal carcinomas of the breast. Immunostaining for the nm23 gene product have heterogenous cytoplasmic and nuclear staining in 61 patients(84.7%). Sections were scored according to relative abundance(1 = less than 25% of the cells, 2 = 26~75%, 3 = 76~100%). In 61 patients with positive immunostaining, the staining was scored as 1 in 41.6%, 2 in 18.0%, and 3 in 40.2%. The staining of tumor cells was greater than that in normal epithelial cells and stromal cells. No relationship was found between nm23 expression and lymph node metastasis, histologic grade, tumor size, estrogen receptors or progesterone receptors. Therefore, nm23 protein is increased in neoplastic tissues but no correlation with metastatic potential could be demonstrated. The biological mechanism of over-expression of nm23 in malignant cells and its role in tumor progression remain to be determined. (*Korean J Pathol* 1997; 31: 145~151)

Key Words: Breast, Infiltrating ductal carcinoma, nm23, Metastasis

접 수: 1996년 9월 12일, 게재승인: 1996년 11월 21일

주 소: 대구시 중구 삼덕 2가 50, 우편번호 700-412

경북대학교 의과대학 해부병리과, 정민희

서 론

원발종양의 세포가 타장기로 옮겨가 증식하는 능력에 대한 예측은 종양의 임상적 관찰에서 매우 중요하다. 특히 악성 종양 환자에게서 전이는 주된 사인이 되고 있다¹. 원발 종양 진단당시 전이의 증거가 없던 환자라 하더라도 임상적으로는 잠재된 미소전이의 확률이 50%에 달한다고 한다². 따라서 전이에 대한 정확한 예측은 환자의 치료에서뿐 아니라 예후 인식에도 커다란 도움을 준다^{3,4}. nm23 유전자는 1988년 Steeg 등이 쥐에서 높은 전이력과 낮은 전이력을 갖는 2개의 악성 흑색종 세포간의 감별 하이브리드 형성을 하던 중에 최초로 인지되었다⁵. 다른 여러 종양 실험에서 nm23 유전자의 mRNA 양을 비교하였을 때 전이력이 높은 세포군에서 낮은 세포군보다 그 양이 감소되어 있었다⁶. 또한 nm23 유전자 발현이 낮은 쥐의 악성 흑색종 세포군에 nm23 유전자를 주입시켰을 때, 원발 종양 형성과 암종의 전이력이 의미있게 감소하였다⁷. 이러한 보고들은 nm23 유전자가 종양의 전이 억제에 관여한다는 것을 시사한다. 사람의 nm23 유전자는 17번 염색체의 장완에 위치하고 17kD의 폴리펩타이드를 합성케 한다^{8,9}. Stahl 등은 이전의 것과 88%의 상동성을 갖는 새로운 nm23 유전자를 기술하였는데, 각기 nm23-H1과 nm23-H2로 명명하였다¹⁰. 최근에는 nucleoside diphosphate(NDP)-kinase의 아미노산 서열이 nm23의 단백질과 상당부분에서 일치함이 밝혀졌고^{11,12}, 이후 Gilles 등은 nm23-H1 및 nm23-H2가 각기 사람의 NDP-kinase A 및 NDP-kinase B와 동일하다고 하였다¹³. 사람에게 있어서도 nm23 유전자의 발현이 여러 암종에서 연구되었다. 간세포암종¹⁴, 악성 흑색종¹⁵ 및 위암¹⁶에서의 nm23 단백질의 발현은 종양의 전이력이나 나쁜 임상경과와 역상관 관계를 보였으나 소아의 신경모세포종, 대장암 및 폐암에서는 nm23의 발현과 전이력이 무관하게 나타났다¹⁷⁻¹⁹. 사람의 유방암에서는 nm23의 발현이 낮을수록 림프절 전이 빈도가 높고, 나쁜 예후를 가진다고 하였다^{3,4}. 그러나 보다 최근에 Sastre-Garau 등은 유방암에서 nm23의 발현과 림프절 전이가 상호간에 연관성이 없다고 보고하였다²⁰. 유방암은 여성의 암 발생 및 사인의 중요한 부분을 차지하며, 우리나라에서도 점차로 증가하는 추세이다. 따라서, 유방암에서의 전이력을 예측하는 것은 매우 중요하다고 하겠다. 본 연구는 유방암에서 nm23에 대한 면역조직검사를 시행하여, nm23 단백질의 발현과 림프절 전이 및 이전에 알려진

다른 예후인자들과의 관계를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

1992년부터 1994년 8월까지 경북대학교병원에서 근치적 유방 절제술, 변형근치유방 절제술 및 절제생검을 통해 진단된 여성 유방암 중 침윤성 관암종 72예의 파라핀에 포매한 표본을 연구대상으로 하였다. 연구 대상 환자의 나이는 17세부터 89세까지 분포되어 있었고 평균 연령은 48세였다. 조직학적 진단과 림프절 전이 여부는 통상의 병리학적 검색으로 판독하였다. 종양의 분화정도는 Bloom과 Richardson 방법에 의거하여 판단하였다. 면역조직화학적 검사를 이용하여 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체와 nm23 발현을 검사하였다.

2. 면역조직화학적 검사

면역 조직 화학적 검사를 위하여 10% 중성 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매한 조직 중 주위 정상 조직을 포함한 종양 조직편을 선택하여 4 μ m 두께로 박절하였으며 이들을 organosilane으로 도포된 슬라이드(Probe On Plus, Fisher Sci, 미국)에 부착하고 xylene에 탈파라핀한 후, 70퍼센트 알콜까지 점차로 낮은 농도 알콜에 함수하고 증류수로 세척하였다. 메탄올로 희석한 과산화수소수에 20분간 처리하여 내인성 과산화수소수를 제거하고, phosphate buffered saline(PBS, 0.01M, pH 7.4)으로 세 차례 세척하였다. 그 후 실온의 수조에서 normal serum(Vector Elite kit, Vector laboratories, 미국)과 30분간 반응시켜 비특이성 항원을 차단하고, 1:50으로 희석한 일차 항체인 nm23(nm23-H1 and nm23-H2, rabbit anti-Human, Dako Co, 미국)을 4°C의 수조에서 하룻밤동안 반응시켰다. 이어 PBS로 세 차례 세척하고, 이차 항체인 biotinylated antirabbit Ig G(Vector Elite kit, Vector laboratories, 미국)를 실온의 수조에서 반응시킨 후 30분간 방치하였다. PBS로 세 차례 세척한 뒤 ABC reagent(Vector Laboratories, 미국)를 가한 뒤 실온의 수조에서 45분간 반응시켰다. PBS로 두 차례 세척하고 tris buffer(0.05M, pH 7.6)에서 평형을 맞춘 뒤 0.05M tris buffer로 희석한 0.5 mg/ml 3',3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(Sigma chemicals, 미국) 용액(pH 7.6)에 0.03% H₂O₂를 혼합하여 조직과 반응시켰다. 3 내지 6분 후 증류수로 세척하고 헤마톡실린으로 20초간 대조 염색한 후 Permount로 봉입하였다. 에스트로겐 수용체와 프로게스테론 수용체

는 단클론 항체인 NCL-ER-LH1과 NCL-PGR(Novocastra Laboratories Ltd., 영국)를 사용하여 동결 절편에 염색하였다²¹.

3. 판독 및 통계학적 분석

염색된 슬라이드는 저배율(4X objective) 시야에서 한 절편에서 40 시야 이상 판독하였다. 염색된 부위의 백분율을 구하여 판독하였고 이를 등급 1에서 3까지 3가지 등급으로 나누었다. 즉 양성인 세포가 거의 없거나 소수의(25% 이내) 세포가 반응을 보였을 때는 등급 1, 25~75% 정도의 세포가 반응하였을 때를 등급 2, 75% 이상의 세포가 반응하였을 때를 등급 3으로 하였다. 침윤성 관암종에서의 예후 인자로 알려져 있는 액와 림프절 전이 유무, 조직 분화도, 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체, 종양의 크기 등을 반응의 정도와 교차표를 만들어 빈도를 분석하였고 Chi-Square법 및 Fisher's Exact Test를 이용하여 검정하였다.

결 과

nm23 염색의 진한 정도는 조직내에서 다양하게 나타났는데, 많은 예에서 진하게 염색되는 종양 세

포군에 인접하여 염색강도가 떨어지는 세포군이 존재하였다. 그러나, 전 예에서 정상 상피세포와 간질 세포보다 종양 세포에서 진하게 염색되었다. 면역조직 화학 검사시 흔히 나타나는 변연부의 염색 효과를 무시한다면 조직 절편의 중앙부와 변연부간의 염색 강도의 차이는 없었다. 중앙내에서는 핵 또는 세포질에 염색되었다. nm23 염색은 61예(84.7%)에서 양성을 나타내었고 11예(15%)에서는 전혀 염색되지 않았다. 염색성에 따라 나누어 볼 때 등급 1은 30예(41.6%), 등급 2는 13예(18.0%), 등급 3은 29예(40.2%)였다. 액와 림프절 전이는 42예(58.3%)에서 관찰되었는데, nm23의 발현 정도는 각기 등급 1이 15예(35.7%), 등급 2가 10예(23.8%), 등급 3이 17예(40.5%)였다 (Table 1). 림프절 전이가 없었던 30예(41.6%)에서는 등급 1이 15예(50.0%), 등급 2가 3예(10.0%), 등급 3이 12예(40.0%)를 보여 림프절 전이와 nm23의 발현은 통계학적으로 유의한 차이가 발견되지 않았다 ($p>0.05$). 조직학적 분화도는 grade I에서는 염색 강도의 등급 3이 가장 많은 수를 차지했고(36.4%), grade III에서는 등급 1이 8예(66.7%)에서 나타났다. 조직 분화도가 나쁠수록 낮은 염색성을 보이는 듯했으나, 통계학적으로 유의한 차이는 없었다($p>0.05$). 종양의 크기는 4 cm을 기준으로 하여 비교하였는데 통계

Table 1. Correlation of nm23 expression in infiltrating ductal carcinoma with clinicopathologic parameters

Clinicopathologic parameter	Total number(%)	nm23 expressivity			P value
		Grade 1(%)	Grade 2(%)	Grade 3(%)	
Nodal status					
positive	42(58.3)	15(35.7)	10(23.8)	17(40.5)	NS
negative	30(41.6)	15(50.0)	3(10.0)	12(40.0)	
Histologic grade					
I	11(14.5)	4(36.3)	3(27.2)	4(36.4)	NS
II	53(69.7)	18(33.9)	10(18.9)	25(47.1)	
III	12(15.8)	8(66.7)	2(16.7)	2(16.7)	
Tumor size					
< 4.0 cm	60(76.9)	25(41.7)	12(20.0)	23(38.3)	NS
≥ 4.0 cm	18(23.1)	9(50.0)	2(11.1)	7(38.9)	
ER					
positive	18(54.6)	9(50.0)	3(16.7)	6(33.3)	NS
negative	15(45.5)	4(26.7)	4(26.7)	7(46.7)	
PR					
positive	30(90.9)	11(36.7)	7(23.3)	12(40.0)	NS
negative	3(9.1)	2(66.7)	0(0.0)	1(33.3)	

NS: not significant ER: Estrogen receptor PR: Progesterone receptor

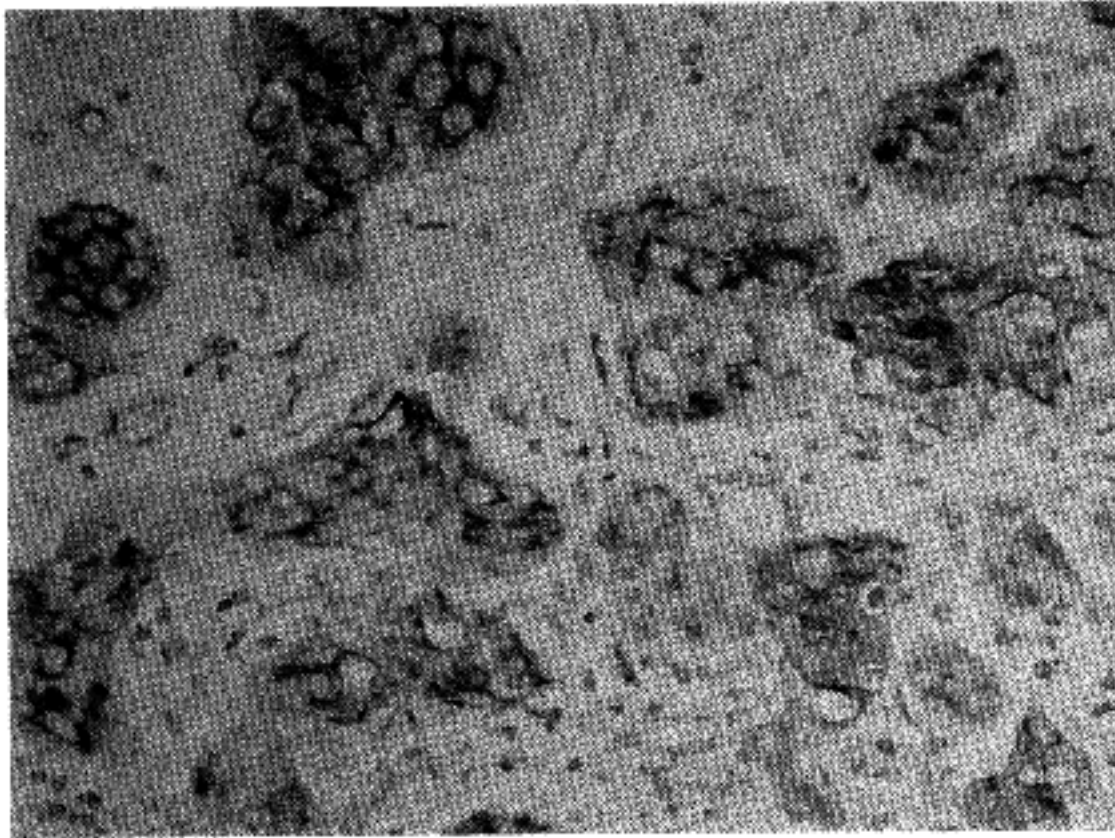


Fig. 1. Immunohistochemical staining of nm23 in infiltrating ductal carcinoma in breast. Diffuse cytoplasmic and nuclear expression is noted.

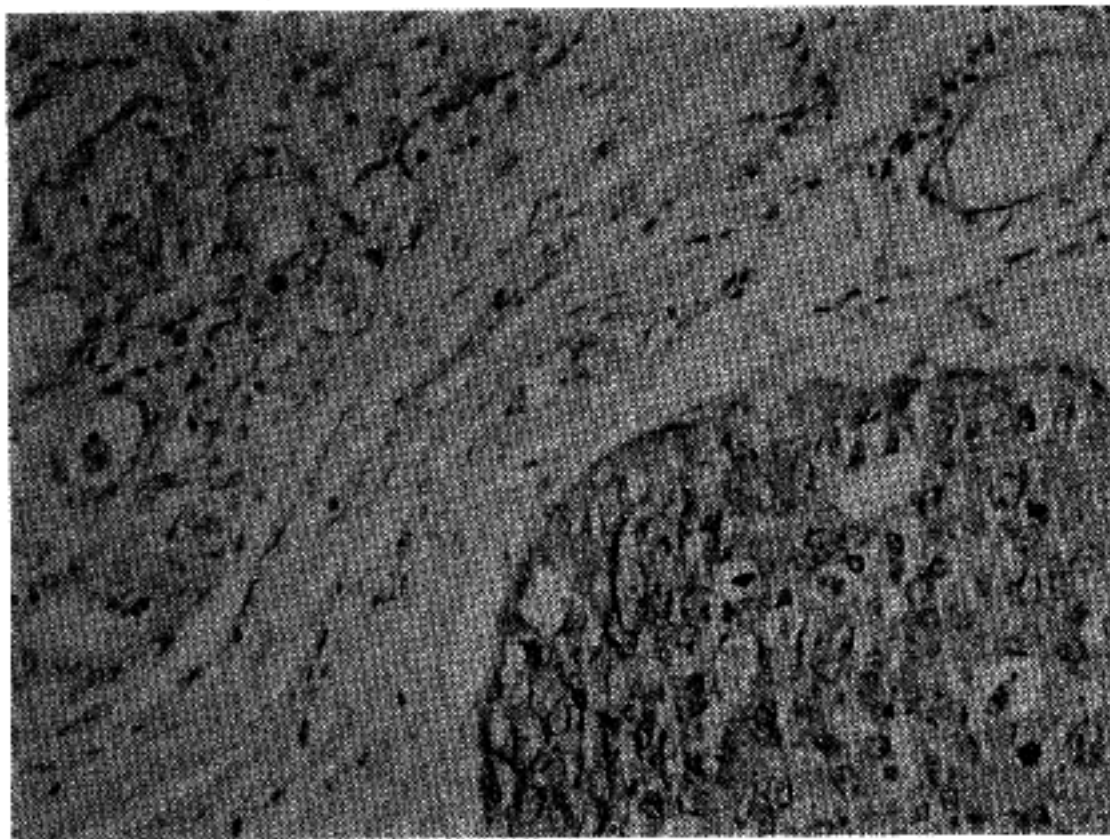


Fig. 2. Immunohistochemical staining of nm23 in infiltrating ductal carcinoma, showing nests of high-staining tumor cells among otherwise low-staining normal epithelium.

학적인 상관성이 드러나지 않았다($p>0.05$). 에스트로젠 수용체 양성은 등급 1이 우세하였고(50.0%), 수용체 음성은 등급 3이 우세하였다(46.7%). 반면 프로게스테론 수용체는 수용체 양성에서 등급 3이 높게 나타났고(40.0%), 수용체 음성은 등급 1이 우세하였으나(66.7%), 에스트로젠 및 프로게스테론 수용체와 nm23 발현 양상이 통계학적으로 유의하지는

않았다($p>0.05$). 따라서, 유방의 침윤성 관암종의 중요한 예후 인자로 보았던 림프관 전이 유무, 조직 분화도, 종양의 크기, 에스트로젠 및 프로게스테론 수용체와 nm23 염색 정도를 통계학적으로 분석해보았을 때, 각각에서 유의한 차이가 발견되지 않았다.

고 찰

유방암의 예후를 결정하는데는, 환자의 나이, 폐경 상태 및 염증 반응과 같은 숙주 인자와 종양의 크기, 분화도, 혈관 침윤, 림프절 전이, 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체, 배수성 및 S-phase 결정 정도를 포함하는 종양 인자가 혼합하여 관여한다²². 침윤성 관암종이 전파해 가는데 있어서 발암 초기의 종양 세포들은 먼저 관내에서 증식하기 시작한다. 이후 계속적인 증식으로 관벽을 뚫은 침윤성 암세포 집단은 마침내 전이를 일으킨다. 이러한 일련의 과정에는 다양한 유전자의 변형이 수반되는데²³, 종양의 형성 및 성장과 암종의 침윤에 관여하는 다양한 종양 표지자에 관한 연구가 선행되었다. 이 중 종양 형성 유전자로는 c-erbB-2, c-myc, int-2 등이 연구되었고, 종양 억제 유전자로는 p53, rb 및 nm23 등이 알려져 있다. p53과 rb 유전자 발현의 감소 혹은 소실은 종양이 숙주의 조절능을 벗어나 계속 성장해 가는 것과 관련이 있다. nm23 유전자 집단은 적어도 두 개의 대립 유전자를 포함하고 있는데 H1과 H2로 명명되며, 각기 19 및 17 kD의 단백질을 합성케 한다. 세포내에서 nm23-H1에 대한 대립 유전자의 소실이 사람의 유방, 신장, 대장 및 폐암에서 보고되었다²⁴. Stahl의 보고에 의하면 사람의 유방암에서 nm23-H2보다 nm23-H1의 감소가 보다 현저하다고 하였다¹⁰. 이 외에도 nm23 대립 유전자의 소실이나, 종양내에서 nm23 단백질의 감소가 종양 세포의 높은 전이력과 연관하다는 것이 많이 보고되고 있는데, 전이 단계 중에서도 종양 성장의 말기, 즉 전이 초기에 관여할 것으로 추측되고 있다²⁵. nm23의 역할은 뚜렷이 밝혀지지 않았지만 그 유전자 산물이 NDP kinase의 기능을 하여 핵산 합성에 소요되는 nucleoside triphosphates를 세포내에 공급하는 역할을 한다고 한다¹³. 많은 예에서 NDP kinase가 elongation factor²⁶, 미세소관²⁷, p21²⁸ 및 Gsc²⁹와 같은 GTP-binding protein에 GTP를 제공함으로써 단백질 합성, 유사분열 방추와 세포골격에 필요한 tubulin 중합 반응 및 신호 전달 체계에 관여할 것이라는 것을 시사하였다. 따라서 nm23의 과표현은 세포 기능의 복합적인 활성을 유도할 수 있을 것이다. 핵내에서 nm23의 역할에 대한 것으로는 nm23 단백질이 전사 인자에서 흔히 보여지는 leucine zipper motif를 포함하고 있다는 연구와¹⁰, 최근에는 nm23이 c-myc이나 다른 promoter에 존재하는 Puf site를 조절하는 전사 인자임을 입증하는 보고가 있다³⁰. 이 외에 핵

내에서 chaperone protein이나 핵 기질 성분으로서의 역할은 아직 뚜렷이 밝혀지지 않았다. 한편 세포막에서의 nm23은 G 단백질에 인접하여 위치한다고 하나, G 단백질을 활성화시키는 NDPK로서의 역할은 아직 논란의 여지가 있다³¹. 쥐의 악성 흑색종 세포와 사람의 유방암 세포에서 nm23의 과표현이 여러 cytokine에 대한 종양 세포의 감소된 반응성과 연관하였는데, 이는 nm23이 세포막에서 신호 전달 체계에 관여하는 단백질과 상호 작용한다는 것을 시사한다. 이들 cytokine으로는 transforming growth factor- β , insulin-like growth factor 및 platelet-derived growth factor등이 있는데^{7,12}, 특히 세포 유주에 관련하여 insulin-like growth factor와 platelet-derived growth factor에 세포의 반응성이 저하된 것은 전이 능력과의 관련성을 보여 준다.

nm23의 염색 양상은 여러 장기에서 다양하게 나타난다. 세포질에서의 염색성이 유방^{8,20}, 폐¹⁹ 및 간¹⁴에서 보고되었다. Sastre등²⁵은 유방암에서 세포막과 세포질의 염색성을 보고하였다. Rosengard등⁸은 유방암에서 western blot과 면역 조직 화학 검사를 실시하여 핵과 세포질에서 염색됨을 보였다. 본 예에서는 전체 72예 중 61예(84.7%)에서 정상 조직과 종양 조직 모두에서 핵과 세포질에 염색되었고, 그 중 등급 3이 29예(40.2%), 등급 2는 13예(18.0%), 등급 1은 30예(41.6%)로 나타났다. 또한 전 예에서 주위 정상 세포보다는 종양 세포에서 전하게 염색되었는데, 이전의 보고와 일치하는 소견이다²⁰. nm23의 염색 정도와 림프절 전이는 상호 연관성이 없는 것으로 나타났는데, Lacombe와 Sastre²⁰ 등의 보고에 일치한다. 그러나 nm23의 염색 정도가 림프절 전이와 역상관 관계를 보인다는 이전의 많은 보고와는 다른 결과를 보여, 결국 nm23이 전이를 예측하는 생물학적 표지자가 될 수 없음을 보여 주고 있다. 그러나 본 예에서 사용한 nm23은 nm23-H1과 nm23-H2를 공히 나타내는 다크론성 항체이다. 선행된 보고의 면역 조직 화학적 검사에서 사용된 항체는 모두 nm23-H1 subtype이었다는 것을 볼 때, nm23-H1에만 선택적으로 반응하는 정제된 다크론성 항체를 사용한다면 림프절 전이가 있었던 군에서 나타난 nm23의 높은 염색성이 저하될 수도 있을 것이다. 유방 이외의 장기에서, 본 예와 같이 nm23의 발현과 전이력이 무관함을 보여주는 것으로는 대장암¹⁸과 소아의 신경모세포종¹⁷ 등이 있는데, 후자에서는 나쁜 예후를 갖는 신경모세포종에서 오히려 nm23-H1의 과표현을 보였다. 이들은 각기 nm23-H1 유전자의 돌연변이를 입증하여 설명하고 있다³³. 즉 nm23의 발현의 저하

보다는 nm23의 변형이 종양의 전이력과 관계 있을 것이라는 것을 시사한다. 본 예에서도 정상 조직보다는 종양 조직에서 현저한 과표현을 보여 비정상적인 세포의 활성을 입증하고 있다. 그러나 전이를 예측할 수 있는 상관성은 나타나지 않고 있는데, 전이에 관여하는 복합적 과정과 일련의 반응을 유발하는 기전의 다양함을 볼 때, 하나의 유전자에 의해 이 모든 과정이 조절된다고 보기는 어렵고, 따라서 nm23이라는 단일 요인으로서 전이와 무관하다고 단정짓기는 곤란하다. 정상 세포보다 종양 세포에서 nm23이 과표현된 것과 종양의 진행에 기여하는 역할에 대해서는 분자 생물학적인 연구가 추가되어야 할 것으로 사료된다. 이 밖에 조직 분화도, 종양의 크기, 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체 등 다른 예후 인자와도 상관성이 없었는데, 선행된 많은 보고와 유사한 결과이다^{20,34}. 그 중 프로게스테론 수용체와의 조사에서는 수용체 음성을 보이는 증례수가 적어서 정확한 통계학적 검정이 어려웠으며, 더 많은 증례를 통한 재연구가 필요하다고 생각된다.

결 론

유방의 침윤성 관암종 72예를 대상으로 nm23 단백질의 면역 조직 화학적 검사를 실시하여 nm23의 발현과 림프절 전이, 조직 분화도, 종양의 크기, 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체를 포함한 예후 인자간의 관계를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 전체 72예 중 nm23은 61예(84.7%)에서 핵과 세포질에 염색되었고, 그 중 등급 3이 29예(40.2%), 등급 2는 13예(18.0%), 등급 1은 30예(41.6%)로 나타났다.

2) 전 예에서 정상 상피나 간질세포보다 종양 세포에서 염색성이 증가하였다.

3) nm23의 발현과 림프절 전이, 조직 분화도, 종양의 크기, 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체등과는 통계학적인 상관성이 없었다.

이상의 결과로 유방의 침윤성 관암종에서 nm23 단백질의 발현은 종양의 발생과 연관이 있음을 알 수 있었고, 림프절 전이를 비롯한 다른 예후 인자에 대하여서는 관련성이 없을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Sugarbaker EV. Patterns of metastasis in human malignancies. *Cancer Biol Rev* 1981; 2: 235-78.
2. Liotta LA, Stetler-Sevenson WG. Principles of mol-

- ecular biology of cancer: cancer metastasis. In: VT DeVita, S Helman, SA Rosenberg, *Cancer: Principles and Practice of Oncology* 1989; 1: 98-115.
3. Hennessy C, Henry JA, May FEB, Westley BR, Angus B, Lennard TWJ. Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer: An association with good prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 281-5.
4. Bevilacqua G, Sobel ME, Liotta LA, Steeg PS. Association of low nm23 RNA 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.
5. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor-metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1988a; 80: 200-4.
6. Steeg PS, Bevilacqua G, Pozzatti R, Liotta LA, Sobel ME. Altered expression of nm23, a gene associated with low tumor-metastatic potential, during adenovirus 2 Ela inhibition of experimental metastasis. *Cancer Res* 1988b; 48: 6550-4.
7. Leone A, Flatow U, King CR, et al. Reduced tumor incidence, metastatic potential, and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells. *Cell* 1991; 69: 2953-60.
8. Rosengard AM, Krutzsch HC, Shearn A, et al. Reduced nm23/awd protein in tumour metastasis and aberrant *Drosophila* development. *Nature* 1989; 342: 177-80.
9. Backer JM, Mendola CE, Kovesdi I, et al. Chromosomal localization and nucleoside diphosphate kinase activity of human metastasis-suppressor genes nm23-1 and nm23-2. *Oncogene* 1993; 8: 497-502.
10. Stahl JA, Leone A, Rosengard AM, et al. Identification of a second human nm23 gene, nm23-H2. *Cancer Res* 1991; 51: 445-9.
11. Wallet V, Mutzel R, Trolls H, et al. 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.
12. Biggs J, Hersperger E, Steeg P, et al. A drosophila gene that is homologous to a mammalian gene associated with tumor metastasis codes for a nucleoside diphosphate kinase. *Cell* 1990; 63: 933-40.
13. Gilles AM, Presecan E, Vonica A, Lascu I. Nucleoside diphosphate kinase from human erythrocytes. *J Biol Chem* 1991; 266: 8784-9.

14. Nakayama T, Ohtsuru A, Nakao K, et al. Expression in human hepatocellular carcinoma of nucleoside diphosphate kinase, a homologue of the nm23 gene product. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1349-54.
15. Florenes VA, Aamdal S, Myklebost O, Maelandsmo 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.
16. 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.
17. Hailat N, Keim DR, Melhem RF, et al. High levels of p19/nm23 protein in neuroblastoma are associated with advanced stage disease and with N-myc gene amplification. *J Clin Invest* 1991; 88: 341-5.
18. Haut M, Steeg PS, Wilson JK, Markowitz SM. Induction of nm23 gene expression in human colonic neoplasms and equal expression in colon tumors of high and low metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 712-6.
19. Higashiyama M, Doi O, Yokouchi H, et al. Immunohistochemical analysis of nm23 gene product/NDP kinase expression in pulmonary adenocarcinoma: lack of prognostic value. *Br J Cancer* 1992; 66: 533-6.
20. Sastre-Garau S, 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.
21. Henry L, Angus B, Andersson JJ, et al. New monoclonal antibodies to oestrogen and progesterone receptors: characterisation and clinical studies. (Manuscript in preparation.)
22. Porter-Jordan K, Lippman ME. Overview of the biologic markers of breast cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 1994; 8(1): 73-100.
23. Hiroko Y, Shunzo K, Hirotaka I, et al. Analysis of Oncogenes and tumor Suppressor genes in Human Breast Cancer. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84: 871-8.
24. Alvaro L, O.Wesley M, Ainsley W, et al. Somatic Allelic Deletion of nm23 in Human Cancer. *Cancer Res* 1991; 51(9): 2490-3.
25. 송상용, 지제근, 한세환, 최국진. 유방암의 nm23 단백질 발현. *대한병리학회지* 1995; 29: 469-77.
26. Ohtsuki K, Yokoyama M. Direct activation of guanine nucleotide binding proteins through a high-energy phosphate transfer by nucleoside diphosphate-kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 148: 300-7.
27. Nickerson JA, Wells WW. The microtubule-associated nucleoside diphosphate kinase. *J Biol Chem* 1984; 259: 11297-304.
28. Ohtsuki K, Ikeuchi T, Yokoyama K. Characterization of nucleoside diphosphate kinase-associated guanine nucleotide-binding proteins from HeLa S3 cells. *Biochem Biophys Acta* 1986; 882: 322-30.
29. Otero AD. Transphosphorylation and G protein activation. *Biochem Pharmacol* 1990; 39: 1399-404.
30. Postel EH, Berberich SJ, Flint SJ, Ferrone CA. Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. *Science* 1993; 261: 478-80.
31. Steeg PS, DeLa Rosa A, Flatow U, McDonald MJ, Benedict M, Leone A. nm23 and breast cancer metastasis. *Breast cancer Res Treat* 1993; 25: 175-87.
32. Leone A, Flatow U, VanHoutte K, Steeg PS. Transfection of human nm23-H1 into the human MDA-MB-435 breast carcinoma cell line: effects on tumor metastatic potential, colonization and enzymatic activity. *Oncogene* 1993; 8: 2325-33.
33. Wang L, Patel U, Ghosh L, banerjee S. mutation in the nm23 gene is associated with metastasis in colorectal cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 717-20.
34. Sawan A, Lascu I, Veron M, et al. NDP-K/nm23 expression in human breast cancer in relation to relapse, survival, and other prognostic factors: an immunohistochemical study. *J Pathol* 1994; 172(1): 27-34.