

## 위암종의 예후인자와 CD44 단백 발현과의 상관성에 관한 연구

전북대학교 의과대학 병리학교실

이 호 · 김형철 · 문우성 · 강명재

### A Study of the Correlation between Prognostic Factors of Human Gastric Carcinomas and the Expression of CD44

Ho Lee, M.D., Hyung-Chul Kim, M.D., Woo Sung Moon, M.D.  
and Myoung Jae Kang, M.D.

Department of Pathology, Chonbuk National University College of Medicine, Chun-Ju, Korea

This study was performed to investigate the relationship between CD44 expression and depth of, tumor invasion histopathologic differentiation, tumor size, lymph node metastasis, and proliferating capacity of tumor cells in the gastric carcinoma. In 20 cases of early gastric carcinoma (EGC) and 40 cases of advanced gastric carcinoma (AGC), the immunohistochemical staining for CD44v3, CD44v5, and PCNA gave the following results. 1) In all 60 cases, the positive rates for CD44v3 and CD44v5 were 18.3% and 71.7%, respectively. 2) CD44v5 was expressed in 45% of EGC and 85% of AGC. 3) Larger tumors exhibited higher positive rates for CD44v5. 4) There were 28 cases of lymph node metastases out of 43 cases of CD44v5- positive primary gastric carcinomas (65.1%), and there were 4 cases of lymph node metastases out of 17 CD44v5-negative cases (23.5%). 5) There was no relationship between CD44v5 expression and PCNA index. Because the tumors that exhibit deep invasion, and large in size and have lymph node metastases tend to have more frequent expression of CD44v5, CD44v5 may be one of the useful prognostic markers for gastric carcinoma. (Korean J Pathol 1997; 31: 873~883)

**Key Words:** CD44, Gastric carcinoma, Prognostic markers

### 서 론

위암종은 세계에서 가장 흔한 암종의 하나이고 우리나라 전 인구에서 발생하는 악성 종양중 가장 흔

접 수: 1997년 4월 19일, 게재승인: 1997년 7월 7일  
주 소: 전주시 덕진구 금암동 산 2-20, 우편번호 560-180  
전북대학병원 해부병리과, 이 호  
ISSN : 0379-1149

한 암으로서 이의 진단과 치료에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 위암종은 다른 암종에서와 같이 조기 진단 및 적절한 치료가 중요하며, 암세포 침윤의 깊이, 조직학적 분화도, 림프절 전이 유무 등이 예후와 밀접한 관계를 가진다.

종양의 전이능력 평가에 이용될 수 있는 새로운 표지자에 대한 지속적인 연구 결과의 하나로 CD44 당단백의 중요성이 제기되고 있다<sup>1,2</sup>. CD44는 세포 표면 부착 분자로서 세포와 세포, 그리고 세포와 기

질의 부착에 중요한 역할을 하며 많은 종류의 세포에서 발현된다<sup>3</sup>. 림프구에서 발현되는 CD44는 Hermes항원으로 알려져 있으며 이는 림프구가 림프절에 있는 고내피정맥 (high endothelial venule)에 부착하여 귀환하는데 중요한 역할을 한다<sup>4,5</sup>. 또한 다른 막 당단백질에 의하여 나타나는 부착기능을 조절할 수 있으며 주요 transmembrane hyaluronate 수용체로서 작용하기도 한다<sup>6</sup>.

인간의 CD44 유전자의 구조는 약 60Kb의 길이에 걸쳐 최소 20 exon이 분포하는 것으로 밝혀졌다<sup>7</sup>. RNA 접합과정 중 exon 5에서 exon 16 (variant exon v1-v10) 사이에서 선택적인 재조합이 이루어져 적어도 10개의 exon이 존재한다. 이 중 v3에서 v10 사이에는 각각의 에피토프 (epitope)에 특이하게 반응하는 단클론 항체 VFF11, VFF8, VFF 7, VFF9, VFF14가 있다 (Fig. 1). 현재까지 선택적으로 재조합된 exon들은 17type의 다른 조합으로 존재한다<sup>8</sup>.

Günther등<sup>9</sup>은 흰쥐에서 CD44의 한 변형의 발현에 의하여 전이성과 비전이성 선암종 세포주를 구별하였다고 보고하였으며, 사람에서 발생하는 종양들이 CD44의 다양한 변형을 발현하며 이것이 종양의 전이를 촉진시킨다는 연구결과도 접할 수 있다<sup>10-14</sup>. Horst등<sup>15</sup>은 미만성 대세포 악성 림프종에서 CD44발현이 종양의 파종 및 불량한 예후와 상관관계가 있다고 하였다. 이와같이 CD44의 발현은 종양의 전이 및 환자의 예후와 관련이 있을 것으로 생각되어진다.

한편, 종양의 세포증식능은 그 종양의 생물학적 특성의 규명 및 치료방법의 선택 그리고 악성도 및 예후판정에 중요한 인자의 하나로 알려져 있다. 이러한 종양의 세포증식능을 측정하기 위한 다양한 방법이 이용되어 왔으나, 이 가운데 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)<sup>16-18</sup>에 대한 면역조직화학적 염색은 파라핀 포매조직으로 짧은 시간 동안에 시행할 수 있기 때문에 세포증식능의 측정에 유용한 방법으로 이용된다. PCNA 단백질 발현은 세포주기와 밀접한 관계가 있으며 G1 말기에 증가하기 시작하여 S기에 최대가 되고 G2와 M기에 다시 감소한다<sup>19,20</sup>.

저자는 위암종의 기존 예후인자-종양 침윤의 깊이, 조직학적 분화도, 종양의 크기, 림프절 전이 유무, 종양 세포의 증식능-와 CD44에 대한 면역조직화학적 염색양상과의 관련성을 추구함으로써 CD44의 위암종 예후인자로서의 유용성 및 이들 사이의 상관관계를 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

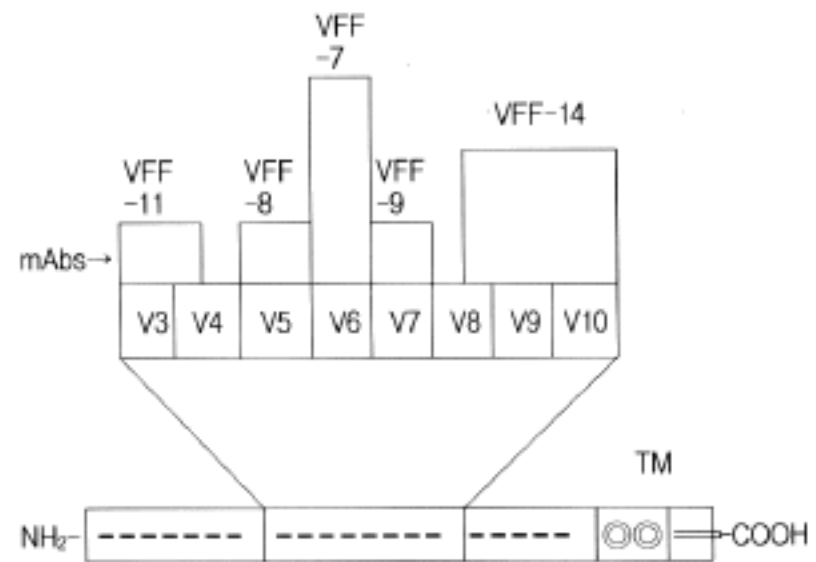


Fig. 1. Schematic representation of a CD44 splice variant. This putative variant carries the variant exons V3 to V10. The variant region is inserted within the extracellular domain close to the transmembrane region. The columns indicate the approximate locations of the epitopes for the monoclonal antibodies VFF-11, VFF-8, VFF-7, VFF-9, and VFF-14 (Cited from Cancer 1995; 75: 1065-71).

## 재료 및 방법

### 1. 재료

연구재료로써는 1995년 1월부터 12월까지 1년간 전북대학교병원에서 위암종으로 위절제술을 시행한 조기 위암종과 진행 위암종의 수술검체를 이용하였다. 조기 위암종은 종양세포가 위점막만을 침범한 경우와 점막하층까지 침범한 경우를 각각 10예, 진행 위암종은 근층을 침범한 경우, 장막하층을 침범한 경우, 장막을 침범한 경우 및 장막외층을 침범한 경우를 각각 10예씩하여 모두 60예를 대상으로 하였으며, 림프절 전이가 있는 경우는 전이 림프절을 연구대상에 포함시켰다. 연구대상 60예의 병리조직학적 소견은 Table 1과 같다.

절제된 위는 통상의 방법으로 제작한 파라핀 절편으로 헤마톡실린-에오신 염색을 시행한 후 보관하였는데, 이들은 저자에 의하여 재검토되었고, 조직학적 소견 이외의 자료는 조직검사의뢰서의 기록 및 사상(mapping)자료를 이용하였다.

본 연구는 암종의 크기, 조직학적 분화도, 암세포 침윤의 깊이 및 림프절 전이 등의 예후인자와 CD44 단백질 발현과의 상관관계, 그리고 CD44 단백질과 PCNA 단백질 발현의 면역조직화학적 염색양상을 비교 검토하였다.

Table 1. Histologic diagnosis of 60 cases examined

Type	Number of cases
Early gastric carcinoma	20
Tubular adenocarcinoma, WD	4
Tubular adenocarcinoma, MD	12
Tubular adenocarcinoma, PD	3
Signet ring cell carcinoma	1
Advanced gastric carcinoma	40
Tubular adenocarcinoma, WD	0
Tubular adenocarcinoma, MD	17
Tubular adenocarcinoma, PD	18
Signet ring cell carcinoma	3
Mucinous adenocarcinoma	2

WD: well differentiated, MD: moderately differentiated, PD: poorly differentiated

## 2. 면역조직화학적 염색

포르말린 고정 후 파라핀에 포매된 조직을 이용하였으며, CD44단백과 PCNA 단백질에 대한 면역염색을 시행하였다.

CD44에 대한 면역염색은 조기 위암종 및 진행 위암종 60예와 암세포 전이가 있는 림프절을 대상으로 실시하였으며 CD44v3에 대한 단클론항체 BBA11 (R&D systems)과 CD44v5에 대한 단클론항체 VFF8 (Bender MedSystems)을 면역조직화학적 염색의 일차 항체로 사용하였으며, Microprobe System을 이용하여 avidin-biotin-complex (ABC) 법으로 다음과 같이 염색하였다.

1) 각각의 파라핀 포매 조직에서 4 $\mu$ m 두께의 조직박편을 만들었다.

2) Xylene과 알콜을 거쳐 증류수로 함수시킨 후 automation buffer (Biomed)로 세척하였다.

3) 1차항체인 CD44v3 단백질 항체는 1:1000, CD44v5 단백질 항체는 1:80으로 각각 희석하여 도포하고, 37°C oven에서 밤새 부치시킨 후 완충액으로 세척하고 조직 주위의 과다한 완충액은 닦아내었다.

4) 2차 항체를 30분간 부치시킨 후 완충액으로 세척하고 avidin-horseradish-peroxidase를 도포하여 37°C oven에서 30분간 부치시켰다.

5) 완충액으로 세척하고 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC)로 발색시킨 후 헤마톡실린으로 대조염색하고 crystal mount (Biomed)로 봉입하였다.

PCNA 단백질에 대한 면역염색은 모든 원발병소를

대상으로 시행하였으며 항 PCNA 단클론항체 (DAKO, Copenhagen, Denmark)를 면역염색용 1차항체로 사용하였다.

CD44 단백질과 같이 Microprobe System을 이용하여 ABC 법으로 염색하였는데 1차항체를 1:50으로 희석하여 도포하고 37°C oven에서 60분간 부치시킨 것외에는 모두 같은 방법으로 시행하였다.

## 3. 염색결과의 판정

CD44v3 단백질과 CD44v5 단백질의 면역조직화학적 염색 결과는 저배율 ( $\times 100$ )상에서 암소를 구성하고 있는 종양세포의 5% 이상이 염색되는 경우를 양성, 5% 미만인 경우를 음성으로 판정하였다. 또 염색강도는 약양성과 강양성의 두가지로 분류하였다.

PCNA 단백질에 대한 면역조직화학적 염색 후 광학 현미경하에서 시야를 임의로 선정하여 고배율 (400배)로 5곳을 촬영하여 한 예당 400~500개의 세포를 대상으로 관찰하였다. PCNA 단백질에 대한 면역조직화학적 염색 결과, 일반적으로 핵에 양성반응을 보이는 세포와 음성반응을 보이는 세포의 구별이 용이하였다. 그러나, 일부 시야에서 핵과 세포질의 염색상의 차이가 없는 세포들이 관찰되었는데 이러한 세포들은 음성반응을 보이는 것으로 판정하였다. 사진상에서 세 사람이 독립적으로 양성반응을 보인 핵을 세어 그 평균값을 이용하였으며 PCNA 표지지수<sup>32</sup>는 다음의 공식에 따라 계측한 전체 상피세포중 PCNA에 양성으로 반응한 세포를 백분율로 표시하였다.

PCNA labeled index(%)=

$$\frac{\text{No. of PCNA-positive cells}}{\text{No. of total counted cells}} \times 100$$

## 4. 통계학적 분석

통계처리가 가능한 항목과 그의 결과에 대해서만 선별적으로 chi square test에 의한 통계처리를 실시하였다.

## 결 과

### 1. CD44v3 단백질과 CD44v5 단백질의 면역조직화학적 염색

위암종 주위의 정상 점막의 표면 상피세포, 위저선과 유문선을 구성하는 선상피세포에서 국소적으로 약양성 반응을 보였다. 장상피화생을 보이는 위선의 상피세포에서도 양성반응을 보였으나 잔세포 (gob-

Table 2-1. Details of cases and CD44 variants 3 and 5 expression in gastric adenocarcinoma and metastatic lymph node

Case	Age/Sex	Size(cm)	Gross	Pathology	Invasion depth	v3	v5	LN metastasis	
								v3	v5
1	59/M	1.2	EGCIb	MD	MU	-	-	×	
2	55/M	0.8	EGCIc	WD	MU	-	-	×	
3	55/F	3.8	EGCIc	WD	MU	-	+	×	
4	61/M	2.0	EGCIc	WD	MU	-	-	×	
5	56/M	2&1	EGCIc	MD	MU	-	-	×	
6	38/F	0.4	EGCIc	PD	MU	-	-	×	
7	71/F	1.5	EGCIc	PD	MU	-	-	×	
8	58/F	1.0	EGCIc	MD	MU	-	+	×	
9	45/F	3.5	EGCIa	MD	MU	-	-	×	
10	76/M	3.0	EGCIb	MD	MU	-	-	×	
11	70/M	1.0	EGCIb	MD	SM	-	+	×	
12	68/M	2.3	EGCIc	MD	SM	+	+	×	
13	30/M	2.5	EGCIc	PD	SM	-	-	×	
14	66/M	3.0	EGCIII	MD	SM	-	+	-	+
15	67/M	3.5	EGCIc	MD	SM	-	+	×	
16	56/M	3.5	EGCIc + III	signet	SM	-	-	×	
17	57/M	4.5	EGCI	MD	SM	-	++	-	++
18	46/F	2.0	EGCIc	MD	SM	-	++	×	
19	49/M	2.5	EGCIc	MD	SM	-	+	×	
20	39/M	0.5	EGCIc	WD	SM	-	-	×	
21	50/M	4.5	Bo III	PD	PM	-	-	×	
22	61/M	2.0	Bo III	PD	PM	+	+	×	
23	53/M	2.0	Bo III	PD	PM	-	++	-	+
24	53/M	3.5	Bo III	MD	PM	-	+	-	+
25	73/M	2.0	Bo III	MD	PM	-	++	+	++
26	61/F	6.0	Bo II	PD	PM	-	+	-	-
27	45/M	5.0	Bo II	PD	PM	-	+	×	
28	60/F	4.0	Bo III	MD	PM	-	+	×	
29	59/M	3.5	Bo III	PD	PM	-	-	×	
30	66/F	3.5	Bo III	PD	PM	-	+	+	

WD: well differentiated tubular adenocarcinoma, MD: moderately differentiated tubular adenocarcinoma, PD: poorly differentiated tubular adenocarcinoma, MU: mucosa, SM: submucosa, PM: proper muscle layer, EGC: early gastric carcinoma, Bo: Borrmann type, +: weak staining intensity, ++: strong staining intensity, -: negative reaction, ×: no lymph node metastasis.

let cell)는 모두 음성이었다. 위벽의 평활근, 혈관벽의 근섬유, 신경섬유 등은 국소적으로 양성반응을 보였으며, 혈관내피세포 및 혈관내에 존재하는 적혈구와 종양세포 주위에서 관찰되는 림프구에서도 양성반응이 드물게 관찰되었다. 이형성증을 보이는 선조직에서는 정상 점막 상피보다 염색되는 범위가 넓고 염색성이 증가하는 경향을 보였다.

위암종 원발병소와 전이 림프절에 대한 CD44v3

단백과 CD44v5 단백질의 면역염색 결과는 Table 2-1 및 2-2와 같다. 전체적으로 CD44v5 단백질이 CD44v3 단백질보다 현저히 높은 양성률을 보였으나, 이들 둘 사이에서 염색성의 차이는 관찰할 수 없었다. 그러나 위암종의 종양세포는 정상 또는 이형성증을 보이는 점막상피보다 비교적 강한 염색성을 보였다. 종양세포에서 CD44 단백질이 염색되는 양상은 3가지 형태로 보였으며, 그들은 대부분 세포질에 염색되었고

**Table 2-2.** Details of cases and CD44 variants 3 and 5 expression in gastric adenocarcinoma and metastatic lymph node

Case	Age/Sex	Size(cm)	Gross	Pathology	Invasion Depth	v3	v5	LN metastasis	
								v3	v5
31	57/M	4.0	Bo III	MD	SS	-	++	+	++
32	70/M	4.0	Bo III	PD	SS	-	++		×
33	52/M	7.0	Bo III	MD	SS	-	+	-	+
34	52/M	5.0	Bo III	MD	SS	+	+	+	+
35	68/M	8.0	Bo III	MD	SS	+	++		×
36	49/M	8.0	Bo II	MD	SS	-	-	-	+
37	51/M	4.5	Bo III	MD	SS	-	++	-	++
38	75/M	5.3	Bo III	MD	SS	-	++	++	++
39	63/M	12.0	Bo IV	signet	SS	+	++	-	+
40	44/F	4.5	Bo III	PD	SS	-	+	-	+
41	59/M	5.5	Bo II	MD	SE	-	+	+	+
42	56/M	5.0	Bo III	PD	SE	-	++		×
43	61/M	1.5	Bo II	MD	SE	-	+		×
44	64/F	9.0	Bo II	PD	SE	-	+	-	+
45	53/F	9.0	Bo III	signet	SE	+	+	+	+
46	63/M	0.6	Bo III	MD	SE	-	+		×
47	62/M	10.0	Bo III	PD	SE	-	+	+	++
48	55/M	9.0	Bo III	mucinous	SE	-	-	-	-
49	60/M	11.0	Bo III	MD	SE	+	++	+	++
50	56/F	6 & 5	Bo III	PD	SE	++	++	++	++
51	76/M	9.0	Bo II+III	PD	SI	-	+	+	+
52	75/M	10.0	Bo III	PD	SI	-	-	-	-
53	39/M	8.0	Bo III	PD	SI	+	++	+	+
54	58/F	8.0	Bo IV	MD	SI	++	++	-	-
55	61/F	9.0	Bo III	MD	SI	+	++	-	-
56	36/M	7.5	Bo III	PD	SI	-	+	+	+
57	69/F	9.0	Bo II	MD	SI	-	+	+	+
58	53/M	11.0	Bo III	mucinous	SI	-	-	-	-
59	60/M	9.0	Bo III	signet	SI	-	+	-	+
60	64/M	5.0	Bo III	PD	SI	-	++	-	-

MD: moderately differentiated tubular adenocarcinoma, PD: poorly differentiated tubular adenocarcinoma, SS: subserosa, SE: serosa, SI: extraserosa, Bo: Borrmann type, +: weak staining intensity, ++: strong staining intensity, -: negative reaction, ×: no lymph node metastasis.

(cytoplasmic staining, Fig. 2A), 일부에서는 세포막에 (membranous staining, Fig. 2B), 그리고 드물게는 핵에서 양성반응을 보였다 (nuclear staining, Fig. 2C). 그러나 대부분 한 종양에서 두가지 이상의 염색양상이 관찰되었으며, 종양의 침윤깊이나 조직학적 분화도에 따른 염색양상의 차이는 없었다.

1) 침윤깊이에 따른 CD44 발현 양상: 위암종 원 발병소에서 종양세포 침윤깊이에 따른 CD44 단백

발현양상은 Table 3과 같다. CD44v3 단백질은 전체 60예중 11예 (조기 위암종 20예중 1예, 진행 위암종 40예중 10예)에서 양성반응을 보여 18.3%의 양성률을 보였다. 조기위암에 비하여 진행위암에서 높은 양성률을 보였고, 진행위암의 장막하 침윤, 장막 침윤 및 장막외 침윤군은 각각 30%로써 모두 같은 양성률을 보였으며 이들은 1예에서만 발현된 근층 침윤군보다 높은 양성률을 보였다.

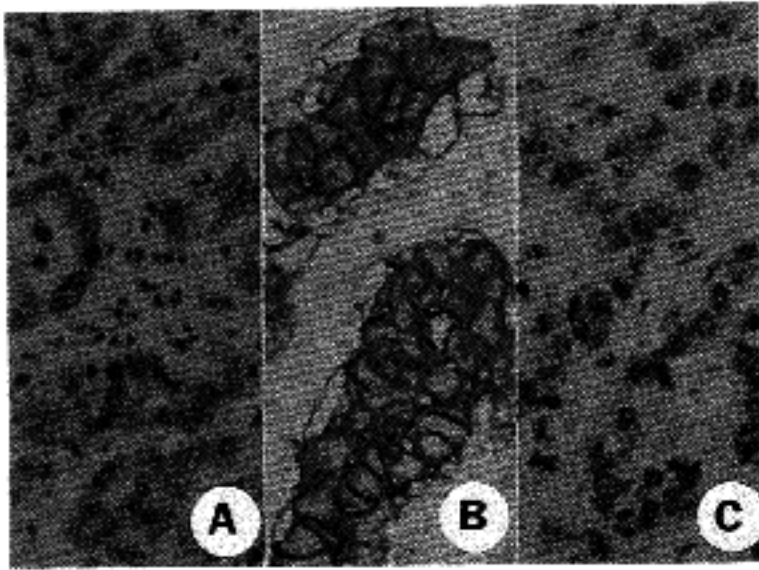


Fig. 2. Immunohistochemical stainings for CD44v3 show cytoplasmic staining pattern (2A), membranous or peripheral staining pattern (2B), and for CD44v5 shows nuclear staining pattern (2C). (ABC method)

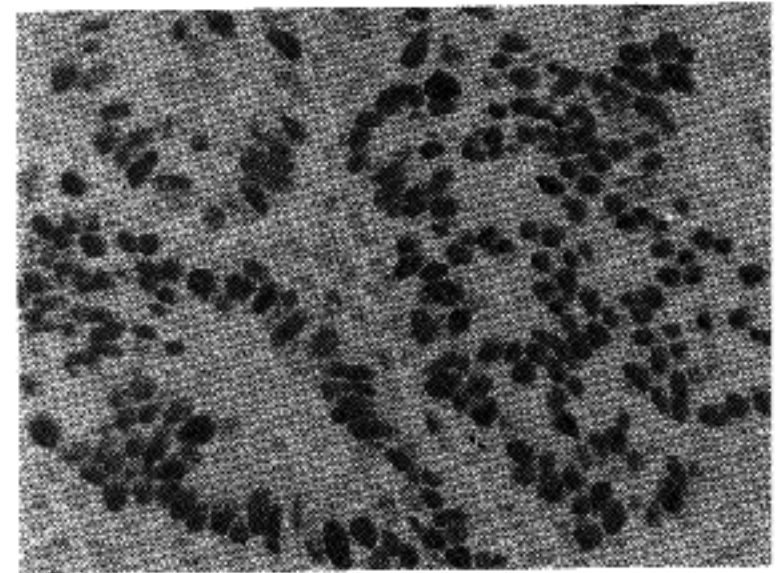


Fig. 4. Immunohistochemical staining for PCNA in moderately differentiated tubular adenocarcinoma showing strong positively stained carcinoma nuclei. (ABC method)

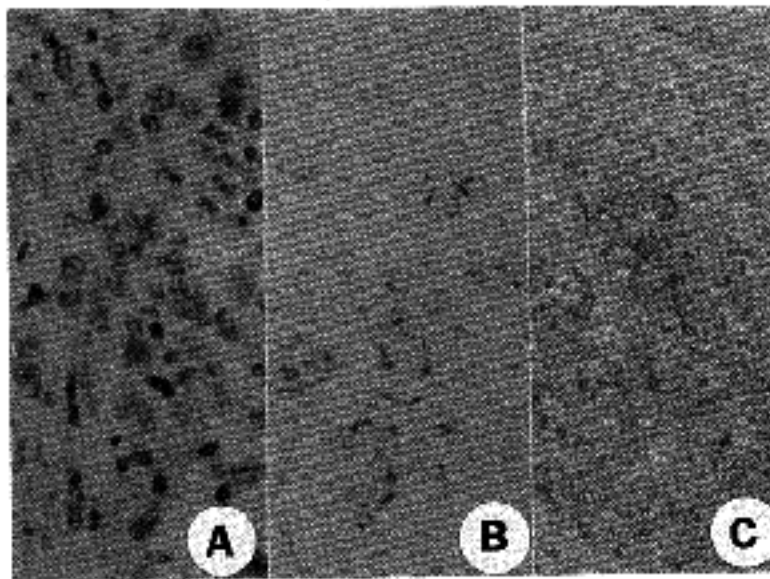


Fig. 3. Positive immunohistochemical staining for CD44v5 in signet ring cell carcinoma (3A) and for CD44v3 in the nodular metastatic tumor cells (3C), but negative for CD44v3 or CD44v5 in mucinous adenocarcinoma (3B). (ABC method)

CD44v5 단백질은 전체 60예중 43예 (조기 위암종 20예중 9예, 진행 위암종 40예중 34예)에서 양성 반응을 보여 71.7%의 양성률을 보였다. 조기 위암종은 점막하 침윤군이 70%의 양성률을 보여 20%의 양성률을 보인 점막 침윤군보다 높은 양성률을 보였다. 진행 위암종에서는 침윤깊이에 따른 기 준의 양성률은 유사하였으며, 침윤깊이에 따른 종양세포 염색 강도의 차이는 관찰되지 않았다.

2) 조직학적 유형에 따른 CD44 단백질 발현 양상: 종양의 조직학적 유형에 따른 CD44 단백질 발현양상은

Table 3. Expression of CD44v3 and CD44v5 according to the invasion depth of gastric carcinoma

	CD44v3	CD44v5
EGC	1/20	9/20
MU	0/10	2/10
SM	1/10	7/10
AGC	10/40	34/40
PM	1/10	8/10
SS	3/10	9/10
SE	3/10	9/10
SI	3/10	8/10
Total	11/60	43/60

EGC: early gastric carcinoma, MU: mucosa, SM: submucosa, AGC: advanced gastric carcinoma, PM: proper muscle, SS: subserosa, SE: serosa, SI: extraserosa.

Table 4. Expression of CD44v3 and CD44v5 according to histologic type of gastric carcinoma

Type	CD44v3(%)	CD44v5(%)
Tubular adenocarcinoma, WD	0/4	1/4(25.0)
Tubular adenocarcinoma, MD	6/29(20.7)	24/29(82.8)
Tubular adenocarcinoma, PD	3/21(14.3)	15/21(71.4)
Signet ring cell carcinoma	2/4(50.0)	3/4(75.0)
Mucinous adenocarcinoma	0/2(0)	0/2(0)

WD: well differentiated, MD: moderately differentiated, PD: poorly differentiated.

Table 4와 같다. CD44v3 단백질은 중등도 분화형 관상 선암종 29예중 6예, 저분화형 관상 선암종 21예중 3예, 인환세포암종 4예중 2예에서 각각 양성반응을 보였으며 (Fig. 3A), 고분화형 관상 선암종 4예와 점액성 선암종 2예에서는 모두 음성이었다 (Fig. 3B).

CD44v5 단백질은 고분화형 관상 선암종 4예중 1예, 중등도 분화형 관상 선암종 29예중 24예, 저분화형 관상 선암종 21예중 15예, 그리고 인환세포암종 4예중 3예에서 각각 양성반응을 보였으며, 점액성 선암종 2예에서는 음성이었다. CD44v3 단백질은 인환세포암종에서 50%, CD44v5 단백질은 중등도 분화형 관상 선암종에서 82.8%로써 가장 높은 양성률을 보였다.

3) 림프절 전이 유무에 따른 CD44 단백질 발현 양상: 림프절 전이 유무에 따른 CD44 단백질 발현 양상은 Table 5와 같다. 전체 위암종 60예중 32예 (조기 위암종은 20예중 2예, 진행 위암종은 40예중 30예)에서 림프절 전이가 관찰되어 53.3%의 전이를 보였다. CD44v3 단백질은 위암종 원발병소에서 양성반응을 보인 11예중 8예에서 림프절 전이가 있어 72.7%의 전이를 보였으며, 음성반응을 보인 49예중 24예에서 림프절 전이가 있어 49%의 전이를 보였다. CD44v5 단백질은 위암종 원발병소에서 양성반응을 보인 43예중 28예에서 림프절 전이가 있어 65.1%의 전이를 보였으며, 음성반응을 보인 17예중 4예에서 림프절

전이가 관찰되어 23.5%의 전이를 보였다. CD44v3 단백질 발현과 림프절 전이의 유무와는 통계학적 관련성은 없으나 ( $p=0.15$ ), CD44v3 단백질에 양성인 경우 음성인 경우보다 약 3배의 림프절 전이가 있음을 알 수 있다 (odds ratio=2.78). 그러나 CD44v5 단백질발현과 림프절 전이와는 통계학적으로 관련성이 있음을 알 수 있다 ( $p=0.003$ ).

4) 종양 크기에 따른 양성률: 종양 크기는 2.0 cm 미만, 2.0~5.0 cm, 5.0 cm 초과종양의 세군으로 분류하여 CD44v3 단백질과 CD44v5 단백질에 대한 면역염색 결과를 분석하였다 (Table 6). 크기에 따른 CD44v3 단백질 양성률은 2.0 cm 미만, 2.0~5.0 cm, 5.0 cm 초과종양에서 각각 6.7%, 8.7% 및 36.4%를 보였으며, CD44v5 단백질은 2.0 cm 미만, 2.0~5.0 cm, 5.0 cm 초과종양에서 각각 53.3%, 74.0% 및 81.8%의 양성률을 보여 CD44v3 단백질과 CD44v5 단백질 모두 종양의 크기가 커짐에 따라 발현율이 증가하였다. 통계학적으로는 CD44v3 단백질과 CD44v5 단백질 모두 2.0 cm 미만과 5.0 cm 초과종양사이에서만 관련성이 있었다 ( $p=0.02$ ).

5) 원발병소와 전이된 림프절에서의 발현 양상 비교: 림프절에 전이가 있는 32예중 14예에서 CD44v3 단백질이 발현하였으며, 이중 9예는 원발병소에서 음성하였고, 5예는 양성이었다. CD44v5 단백질은 림프절

Table 5. Expression of CD44v3 and CD44v5 according to lymph node metastases in gastric carcinoma

		LN metastasis		LN metastasis rate (%)
		Positive	Negative	
CD44v3	Positive	8	3	8/11(72.7)
	Negative	24	25	24/49(49.0)
CD44v5	Positive	28	15	28/43(65.1)
	Negative	4	13	4/17(23.5)

Table 7. PCNA-labeled index according to CD44v5 expression in gastric carcinoma

	PCNA-labeled index (%)		
	CD44v5(+)	CD44v5(-)	mean ± SD
EGC	66.5 ± 4.2	68.0 ± 4.7	67.3 ± 4.5
AGC	71.7 ± 4.5	66.3 ± 5.1	69.0 ± 4.8

EGC: early gastric carcinoma, AGC: advanced gastric carcinoma. ( $p>0.1$ )

Table 6. Expression of CD44v3 and CD44v5 according to tumor size of gastric carcinoma

	CD44v3			CD44v5		
	Positive	Negative	Positiverate(%)	Positive	Negative	Positiverate(%)
2.0 cm >	1	14	1/15( 6.7)	8	7	8/15(53.3)
2.0~5.0 cm	2	21	2/23( 8.7)	17	6	17/23(74.0)
5.0 cm <	8	14	8/22(36.4)	18	4	18/22(81.8)

에 전이가 있는 32예 중 25예에서 발현되었으며, 이 중 1예를 제외하고는 모두 원발병소에서 양성이었다.

양성반응을 보인 전이된 림프절에서의 CD44 단백질 발현양상 (Fig. 3C)은 원발병소에서와 같이 세포질, 세포막 및 핵에서 반응을 보였으나 각 예별로 염색 양상의 일관성은 관찰할 수 없었다. 염색강도는 원발병소보다 약한 반응성 보인 극히 일부를 제외하고는 원발병소와의 차이가 없었다.

## 2. PCNA 단백질에 대한 면역조직화학적 염색

PCNA 단백질에 양성인 세포들은 종양세포의 핵이 적갈색으로 염색되는 양상을 보였다 (Fig. 4). 평균 PCNA 표지지수는 조기위암에서 CD44v5 단백질 양성인 예와 음성인 예에서 각각 66.5% ( $66.5 \pm 4.2$ )와 68% ( $68 \pm 4.7$ )이었으며, 진행위암에서 CD44v5 단백질 양성인 예와 음성인 예에서 각각 71.7% ( $71.7 \pm 4.5$ )와 66.3% ( $66.3 \pm 4.8$ )를 보였다. 전체적으로 진행성위암이 조기위암보다, 그리고 CD44v5 단백질 양성인 예가 음성인 예보다 약간 높았으나 통계학적인 관련성 ( $p > 0.1$ )은 없었다.

## 고 찰

CD44 단백질은 정상세포에서 여러가지 기능을 가지고 있는 다형태의 경막성 단백질 (multiform transmembrane protein)이다. CD44는 기저막의 hyaluronate에 세포를 고정시킴으로써 정상적인 상피 극성을 증진시킨다는 가설이 제기되고 있으나 CD44 단백질의 상피 변형 (epithelial variant)의 역할은 잘 알려져 있지 않다<sup>21</sup>. 최근에는 CD44 단백질이 세포외 기질과의 상호작용에 의하여 종양의 전이에 중요한 역할을 한다는 연구결과가 보고된 바 있다. Gunthert 등<sup>9</sup>은 백서 췌장과 유방의 암세포주가 전이성 표현형 (metastatic phenotype)을 나타내기 위해서는 고농도의 CD44 isoform이 필요하다고 주장하였으며, 비호지킨 림프종에서 CD44 단백질의 과발현은 광범위한 전이 및 불량한 예후와 관련있다는 보고<sup>14,15,22</sup>도 접할 수 있다. Joensuu 등<sup>23</sup>은 유방암에서 CD44 단백질의 면역조직화학적 검색 결과 CD44 단백질 발현은 다수의 핵분열 및 저분화와 같은 악성도가 높은 조직학적 소견과 관련있다고 보고하였다. 이와같이 CD44 단백질의 발현은 종양의 전이 및 생물학적 악성도와 밀접한 관계가 있다는 여러 연구결과에 의하여 CD44 단백질이 인체에 발생하는 종양의 예후인자의 하나로서 이용될 수 있음을 시사하고 있다.

본 연구에서 시행한 CD44 당단백에 대한 염색 결

과 전체 60예중 CD44v3는 11예에서 발현되고, CD44v5는 43예에서 발현되어 각각 18.3%와 71.7%의 양성률을 보여 CD44v3가 낮은 양성률을 보였다. 위암종에서 CD44v3 단백질에 대한 단클론항체 VFF11를 이용한 다른 연구자들의 면역조직화학적 연구결과를 보면, Heider 등<sup>24</sup>은 42예, Ham 등<sup>25</sup>은 64예의 위암종에서 CD44v3 단백질이 단 1예도 발현하지 않았다고 하였다. 그리고 이들은 CD44v5 단백질에 대한 단클론항체 VFF8은 각각 39예 (92.9%)와 54예 (84.4%)에서 발현하여 본 연구결과보다 높은 양성률을 보였다. 이와같이 연구자에 따라 상이한 CD44 단백질 발현율을 보이는 원인으로 연구대상이 되는 검체의 실제적 차이 및 염색방법의 차이 등을 고려해볼 수 있다. 이외에도 염색결과의 해석에 차이가 있을 수 있는데, Heider 등<sup>24</sup>은 본 연구와 같이 종양세포의 5% 이상에서 발현된 경우를 양성으로 판정하였으나, 다른 연구자들<sup>25-27</sup>은 이와 유사한 연구에서 양성으로 판정한 기준을 제시하지 않아 연구결과의 비교분석이 용이하지 않다.

Heider 등<sup>13</sup>은 면역조직화학적 연구에 의하여 대장의 선종성 용종과 선암종에서 CD44 단백질 변형이 강하게 발현되었으나, 정상 대장점막의 음와에서는 극소적으로 약하게 발현되었다고 보고하였으며, Washington 등<sup>27</sup>은 위암종의 CD44 단백질 발현에 관한 연구에서 침윤성 위암종이 가장 강한 염색성을 보였고, 점막 내암, 이형성조직, 장상피화생 및 정상점막의 순서로 염색성이 감소한다고 보고하여, 장 및 위점막상피에서 세포의 악성도와 세포의 염색성사이에 상관관계가 있음을 시사하였다. 본 연구에서도 정상 선조직, 장상피화생 및 이형성증을 보이는 점막상피 사이에서는 음성 및 양성반응을 보인 세포들간에 염색강도의 차이를 관찰할 수 없었던 반면, 위암종 조직에서는 양성반응을 보이는 세포에서 대조적으로 강한 염색상을 보여 뚜렷한 염색강도의 차이를 볼 수 있었다.

CD44 단클론항체에 양성반응을 보인 개개의 종양 세포는 세포질염색 (cytoplasmic staining), 세포막염색 (membranous staining) 및 핵염색 (nuclear staining) 등 3가지의 염색양상을 보였으며, 세포질염색상이 가장 흔하였고, 핵염색상이 가장 드물었다. Washington 등<sup>27</sup>은 정상세포에서 CD 단백질은 막항원 (membrane antigen)이기 때문에 순수한 세포질염색상은 비특이적이라고 하였으며, 암세포에서 세포질염색이 나타나는 것은 암세포가 세포막에 모두 결합할 수 없을 정도로 많은 양의 CD44 단백을 생산하거나 비정상적인 형태의 CD44 단백질 분자가 생성되기 때문이라고 주장하였다. 또 이들은 위암종에 대한 CD44 면역염색



결과 세포막염색을 보인 환자와 세포막염색을 보이지 않은 환자의 치료후 평균 생존기간이 각각 13개월과 26.7개월로써 세포막염색이 관찰되는 경우 나쁜 예후를 보인다고 하였다. 그러나 Mirecka등<sup>28</sup>은 위암종에 대한 CD44 면역염색에서 본 연구결과와 같이 세포막보다는 세포질에 흔히 염색되고 두가지 염색양상이 대부분 한 조직에서 관찰되었으며, 세포막염색은 생물학적 활성과 무관하며 단지 일시적인 현상에 지나지 않는다고 하였다. 본 연구는 대부분 예에서 2가지 이상의 염색양상이 한 조직내에서 혼재하는 경향을 보였기 때문에, 염색양상과 위암의 예후인자를 관련지어 비교하기는 어려웠다.

CD44 단백 발현율은 위벽에서 종양세포 침윤의 깊이에 따른 차이를 보였으며, CD44v3 단백질은 조기 위암종 20예중 1예, 진행 위암종 40예중 10예에서, CD44v5 단백질은 조기 위암종 20예중 9예, 진행 위암종 40예중 34예에서 양성반응을 보여 진행 위암종이 조기 위암종에 비하여 각각 50.0%와 18.9% 높은 양성률을 보였다. 조기 위암종중에서 종양세포가 점막하층까지 침윤한 예가 점막만을 침윤한 예보다 CD44 단백질 발현율이 현저하게 높았으나, 진행 위암종에서는 근층, 장막하, 장막 및 장막외 침윤군사이에서 발현율의 차이가 거의 없었다. Hong등<sup>29</sup>은 101예의 위암종에 대하여 암세포 침윤깊이에 따른 CD44v6 단백질 발현에 관한 연구를 하였으며 암세포 침윤깊이의 분류는 TNM분류<sup>30</sup>에 의하여 시행하였다. 즉 암세포가 점막에서 장막하층까지 침윤한 군 (T1/2)과 장막 및 주위 장기를 침범한 군 (T3/4)으로 나누어 연구한 결과 T1/2군에 비하여 T3/4군에서 통계학적으로 유의한 높은 발현율을 보임으로써 암세포 침윤깊이의 분류방법이 본 연구와는 상이하지만 본 연구결과를 뒷받침해주는 소견을 보였다.

위암종의 조직학적 소견에 따른 CD44 단백질 발현에 관한 연구에서 Mayer등<sup>26</sup>은 61예의 위암종을 각각 장형 (intestinal type)과 미만형 (diffuse type)으로 분류하고, 또 관상형, 점액형 및 유두형을 포함하는 선암종군과 인환세포암종의 두 군으로 분류하여 시행한 연구결과 각각 장형 선암종군에서 통계학적으로 유의성 있는 높은 양성률을 보였다. Heider등<sup>24</sup>도 장형 선암종은 25예 모두에서, 미만형은 17예중 14예에서 CD44v5 단백질이 발현하여 Mayer등<sup>26</sup>과 유사한 결과를 보였다. 한편 Ham등<sup>25</sup>은 관상형은 49예중 41예, 점액형은 4예중 2예에서 양성반응을 보였으나 인환세포암종은 10예 모두에서 양성반응을 보여 상기 연구자들과 상이한 결과를 보였다. 이들은 다시 관상 선암종을 고, 중등도 및 저분화형 선암종으로

분류하여 CD44v5 단백 발현율을 추구한 결과 각각 37%, 86% 및 96%의 양성률을 보임을 보고하였다. 본 연구 결과는 중등도 분화형 및 저분화형 관상 선암종과 인환세포암종에서는 약 70~80%, 고분화형 관상 선암종에서는 25%의 발현율을 보였고 점액성 선암종에서는 2예 모두 음성반응을 보여 관상 선암종의 분화도에 따른 CD44v5 단백 발현율은 Ham등<sup>25</sup>의 성적과 유사하였다. 즉 관상 선암종에서는 분화도가 나쁠수록 CD44의 발현율이 증가하는 경향이였다. 그러나 인환세포암은 Heider등<sup>24</sup>은 100%, 본 연구에서는 75%, 그리고 Mayer등<sup>26</sup>은 28.6%에서 양성반응을 보여 연구자들에 따라 큰 차이를 보였다. 점액성 선암종의 경우도 연구자에 따른 발현율의 차이가 있었으며 연구대상이 단지 각각 4예에 불과하기 때문에 그 유의성에 대하여는 논하기 어려울 것으로 사료된다.

위암의 예후와 관련있는 인자로서 암세포의 위벽 침윤깊이나 조직학적 소견외에 림프절 전이유무를 들 수 있다. Mayer등<sup>26</sup>은 림프절 전이가 없는 환자 (N0) 11예중 3예에서, 림프절 전이가 있는 환자 (N1/2) 51예중 27예에서 CD44 단백질이 발현되어 통계학적으로 의의는 없으나 CD44 단백질 발현율이 높을수록 림프절 전이율이 높은 경향을 띠는 연구결과를 보고하였다. 본 연구에서도 CD44v3 단백질과 CD44v5 단백질의 발현율이 높을 수록 림프절 전이율이 높은 경향을 나타내는 성적을 얻었으며, 특히 CD44v5 단백질에서는 통계학적 유의성을 확인할 수 있었다. Guo등<sup>31</sup>은 위암 및 대장암 환자의 혈청에서 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 이용한 연구결과 용해성 CD44 (soluble CD44) 단백질 농도가 정상인에 비하여 증가되어 있으며, 특히 전이된 환자에서는 통계학적 의의가 있는 CD44 단백질 농도의 증가를 보고하여 종양의 전이와 CD44 단백질 발현과의 상관성을 알 수 있다. 한편 이들은 암환자의 혈청 CD44 단백질 농도 증가는 종양세포에 의한 CD44 단백질 분자의 능동적인 산포 (active shedding)에 의하여, 또 죽어가는 종양세포들이 CD44 단백질 분자를 방출하거나 종양세포에 존재하는 CD44 단백질이 단백질분해성 효소작용에 의하여 순환계로 방출됨으로써 초래된다고 하였다.

종양의 크기 역시 예후와 관련있는 인자로서 Mayer등<sup>26</sup>은 종양의 크기를 5 cm 이하와 이를 초과하는 군으로 나누어 CD44 단백질 발현율을 연구한 결과 이들 사이에 통계학적 의의가 있음을 보고하였다. 본 연구에서는 종양 크기를 2.0 cm 미만, 2.0~5.0 cm, 5.0 cm 초과종양의 세군으로 분류하여 CD44v3 단백질과 CD44v5 단백질에 대한 면역염색 결과를 분석하였

는데, CD44v3 단백질과 CD44v5 단백질 모두 2.0 cm 미만과 5.0 cm 초과종양 사이에서 통계학적 의의가 있었으며 각각의 군사이에서는 종양의 크기가 커짐에 따라 발현율이 증가하여 종양 크기와 CD44 단백질 발현율과의 관련성을 시사하였다. 그러나, Mirecka 등<sup>28</sup>은 위암을 대상으로 한 연구에서 CD44v5 단백질 및 CD44v6 단백질의 염색성과 종양의 크기를 비교하여 CD44v6 단백질에서만 상관성이 있다는 결과를 얻었으며, CD44 단백질 발현율의 관계는 고려하지 않았다. 따라서 CD44 단백질 발현율, CD44 단백질 염색성 및 종양의 크기등과 같은 위암 예후인자 사이의 관계에 관한 종합적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또 종양의 악성도를 예측할 수 있는 인자중의 하나인 세포 증식능 (PCNA 표지지수)과 CD44 단백질 발현도사이의 상관관계에 대한 다른 연구보고를 접할 수는 없지만, 본 연구결과에 의하여 PCNA 표지지수와 CD44 단백질 발현도사이에는 통계학적 의의나 어떠한 상관관계도 없음을 알 수 있다.

결론적으로 CD44v3 단백질과 CD44v5 단백질에 대한 연구결과 유사한 성적을 얻었으나 CD44v3 단백질보다 민감성이 현저하게 높은 CD44v5 단백질을 이용하는 것이 신뢰도가 높은 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대되며, 위암종 세포의 침윤이 깊고, 종양의 크기가 크며, 림프절 전이가 있는 군에서 CD44v5 단백질 발현율이 증가하는 경향을 나타내기 때문에 CD44v5 단백질은 위암의 유용한 예후인자로 사료되나, CD44v5 발현도와 종양세포 증식능과는 무관한 것으로 사료된다.

## 결 론

위암종에서 CD44 단백질 발현과 암세포 침윤깊이, 조직학적 분화도, 종양의 크기, 림프절 전이 유무, 종양세포 증식능 등과의 상관관계를 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다. 조기위암 20예, 진행위암 40예를 대상으로 CD44v3, CD44v5 및 PCNA 단백질의 항체에 대한 면역조직화학적 염색을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 전체 연구대상 60예중 CD44v3 단백질과 CD44v5 단백질은 각각 18.3%와 71.7%의 양성률을 보였다.
- 2) CD44v5 단백질은 조기위암의 45%와 진행위암의 85%에서 각각 발현되었다.
- 3) 종양의 크기가 커질수록 CD44v5 단백질의 발현율이 증가하는 경향을 보였다.
- 4) CD44v5 단백질은 위암 원발병소에서 양성반응을 보인 43예중 28예 (65.1%), 음성반응을 보인 17예중

4예 (23.5%)에서 림프절 전이를 보였다.

5) CD44v5 단백질 발현도와 평균 PCNA 표지지수 사이에는 상관관계나 통계학적 의의가 관찰되지 않았다 ( $p > 0.1$ ).

이상의 결과에 의하여 위암종의 침윤이 깊고, 종양의 크기가 크며, 림프절 전이율이 높을수록 CD44v5 단백질 발현율이 증가하는 경향을 나타내기 때문에 CD44v5 단백질은 위암의 유용한 예후인자로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Gunthert U. CD44: A multitude of isoforms with diverse functions. *Curr Top Microbiol Immunol* 1993; 184: 47-63.
2. Underhill C. CD44: The hyaluronan receptor. *J Cell Sci* 1992; 103: 293-8.
3. Picker LJ, Nakache M, Butcher EC. Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adhesion molecules on diverse cell types. *J Cell Biol* 1989; 109: 927-37.
4. Haynes BF, Telen MJ, Hale LP, Denning SM. CD44-A molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol Today* 1989; 10: 423-8.
5. Berg EL, Goldstein LA, Jutila MA, et al. Homing receptors and vascular addressins: Cell adhesion molecules that direct lymphocyte traffic. *Immunol Rev* 1989; 108: 5-18.
6. Miyake K, Underhill CB, Lesley J, Kincade PW. Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J Exp Med* 1990; 172: 69-75.
7. Sreaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 12160-4.
8. Herrlich P, Zoller M, Pals ST, Ponta H. CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes. *Immunol Today* 1993; 14: 395-9.
9. Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991; 65: 13-24.
10. Hofmann M, Rudy W, Zoller M, et al. CD44 splice variants confer metastatic behaviour in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res* 1991; 51: 5292-7.
11. Matsumura Y, Tarin D. Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 1992; 340: 1053-8.

12. Tanabe KK, Ellis LM, Saya H. Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinomas and metastases. *Lancet* 1993; 341: 725-6.
13. Heider KH, Hoffmann M, Horst E. A human homologue of the rat metastasis associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J Cell Biol* 1993; 120: 227-33.
14. Koopman G, Heider KH, Horst E, et al. Activated human lymphocytes and aggressive non-Hodgkin's lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. *J Exp Med* 1993; 177: 897-904.
15. Horst E, Meijer CJLM, Radaszkiewicz T, Ossekoppele GJ, van Krieken JHJM, Pals ST. Adhesion molecules in the prognosis of diffuse large cell lymphoma: expression of a lymphocyte homing receptor (CD44), LFA-1 (CD11a/18) and ICAM-1 (CD54). *Leukemia* 1990; 4: 595-9.
16. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Antibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978; 121: 2228-34.
17. Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 1987; 326: 515-7.
18. Prelich G, Tan CK, Kostura M, et al. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. *Nature* 1987; 326: 517-20.
19. Takasaki Y, Deng JS, Tan EM. A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation: Its distribution in synchronized cells. *J Exp Med* 1981; 154: 1899-909.
20. Celis JE, Celis A. Cell cycle dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: Subdivision of S phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 3262-6.
21. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990; 61: 1303-13.
22. Jalkanen S, Joensuu H, Soderstrom KO, Klemi P. Lymphocyte homing and clinical behavior of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Invest* 1991; 87: 1835-40.
23. Joensuu H, Klemi P, Toikkanen S, Jalkanen S. Glycoprotein CD44 expression and its association with survival in breast cancer. *Am J Pathol* 1993; 143: 867-74.
24. Heider KH, Dammrich J, Skroch-Angel P, et al. Different expression of CD44 splice variants in intestinal and diffuse type. Human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. *Cancer Res* 1993; 53: 4197-207.
25. Harn HJ, Ho LI, Chang JY. Differential expression of the human metastasis adhesion molecule CD44V in normal and carcinomatous stomach mucosa of Chinese subjects. *Cancer* 1995; 75: 1065-71.
26. Mayer B, Jauch KW, Gunthert U, et al. De novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet* 1993; 342: 1019-22.
27. Washington K, Gottfried MR, Telen MJ. Expression of the cell adhesion molecule CD44 in gastric adenocarcinoma. *Hum Pathol* 1994; 25: 1043-9.
28. Mirecka J, Marx D, Schauer A. Immunohistochemical localization of CD44variants 5 and 6 in human gastric mucosa and gastric cancer. *Anticancer Res* 1995; 15: 1459-66.
29. Hong RL, Lee WJ, Shun CT, Chu JS, Chen YC. Expression of CD44 and its clinical implication in diffuse type and intestinal type gastric adenocarcinomas. *Oncology* 1995; 52: 334-9.
30. Kennedy BJ. The unified international gastric cancer staging classification system. *Scand J Gastroenterol* 1987; 2 (Suppl 133): s11-3.
31. Guo YJ, Liu G, Wang X, et al. Potential use of soluble CD44 in serum as indicator of tumor burden and metastasis in patients with gastric or colon cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 422-6.
32. Jain S, Filipe MI, Hall PA, Wasecm N, Lane DP, Levison DA. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 1991; 44: 655-9.