

비소세포 폐암종에서 Thymidylate Synthase의 발현

유진영 · 김수지¹ · 심병용² · 김성환¹
송소향³ · 조덕곤⁴ · 안명임⁵ · 김치홍³
조규도⁴ · 강석진 · 김훈교²

가톨릭대학교 의과대학 임상병리과
¹종양방사선과, ²종양내과, ³호흡기내과
⁴흉부외과, ⁵진단방사선과

접 수 : 2005년 6월 22일
게재승인 : 2005년 9월 26일

책임저자 : 강 석 진
우 442-723 경기도 수원시 팔달구 지동 93
성빈센트병원 병리과
전화: 031-249-7591
Fax: 031-244-6786
E-mail: sjkang@vincent.cuk.ac.kr

*본 연구는 성빈센트병원 2005년 임상의학
연구비와 폐암연구회 지원비로 이루어졌음.

Expression of Thymidylate Synthase in Non-Small Cell Lung Cancer

Jinyoung Yoo, Suzi Kim¹, Byoung Yong Shim², Sung Hwan Kim¹, So Hyang Song³,
Deog Gon Cho⁴, Meyung Im Ahn⁵, Chi Hong Kim³, Kyu Do Cho⁴, Seok Jin Kang
and Hoon Kyo Kim²

Departments of Pathology, ¹Oncologic Radiology, ²Oncology, ³Pulmonary Medicine, ⁴Thoracic Surgery and ⁵Diagnostic Radiology, The Catholic University of Korea, College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Thymidylate synthase (TS) catalyzes the methylation of deoxyuridine monophosphate (dUMP) to deoxythymidine monophosphate (dTMP), and this is an essential step in DNA biosynthesis. The present investigation was designed to determine the expression of TS in the patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and to assess the possible associations between the TS status and the p53 or proliferative index (PI). **Methods :** The archival tumor tissues from 56 previously untreated NSCLC patients were examined by immunohistochemistry for TS, p53 and Ki-67. **Results :** Forty-one men and 15 women (age range: 35 to 79 years, mean age: 62 years) were included in this study. The TS expression was high in 40 patients (71.4%) and low in 16 patients (28.6%). The aberrant expression of p53 was detected in 35 patients (62.5%). The mean PI for all the patients was 31.4 ± 12.1 . The TS-high tumors tended to be more poorly differentiated ($p=0.069$). The TS expression by a semiquantitative four-scale grading system was significantly correlated with the PIs ($p=0.003$). No correlation was established between the TS expression and the p53 status ($p=0.806$) or survival ($p=0.951$). **Conclusions :** TS was not confirmed to be a useful marker for determining the prognosis of NSCLC patients. However, our data suggest that the tumor cells with higher TS expression have a higher proliferative activity.

Key Words : Lung neoplasms; Thymidylate synthase; p53; Ki-67

원발성 폐암종은 침습성과 전이성이 매우 높은 종양으로 우리나라에서뿐만 아니라 전 세계적으로 사망률이 매우 높은 암종이다. 이 중 비소세포 폐암종(non-small cell lung cancer, NSCLC)이 전체 폐암종의 75%를 차지하며, 조기에 절제를 해도 재발률이 높을 뿐 아니라 항암제나 방사선치료를 병행해도 다른 종양보다 예후가 좋지 않다. 따라서 이러한 종양의 경과를 예측하기란 쉽지 않다.

종양에서 가장 중요한 예후 인자는 조직학적 병기지만 병기가 동일하다 해도 국소재발률이나 원격전이율이 다를 뿐 아니라, 병기가 동일한 환자들을 똑같이 치료해도 다른 임상적 경과를 보이는 경우가 있다. 그리하여 이를 설명하기 위해 최근 분자생물학 기법이 발전하면서 많은 연구가 시행되어 왔다. 특히, 예후 예측이나 화학요법 및 방사선치료 여부를 결정하는 데 도움이 될 만

한 일부 분자생물학적 인자들에 관한 연구 결과도 보고된 바 있다. 그렇지만 생물학적 양태를 결정하는 예후 인자 및 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았다.

Thymidylate Synthase (TS)는 dUMP를 메틸화시켜 dTMP를 형성케 촉매함으로써 DNA 합성에 필수적인 역할을 하는 효소다. dTMP는 dTDP를 거쳐 dTTP가 된다. dTTP는 DNA 복구에 중요한 물질이기 때문에, dTTP 형성이 억제될 경우 새로운 DNA를 합성하거나 복구할 수 없어 결국 세포주기가 멈추거나 세포가 죽게 된다.^{2,3} TS는 정상 세포뿐 아니라 암세포에서도 세포증식을 위해 필요한 효소로서, TS에 관한 연구는 주로 위장관암, 특히 대장암에서 많다. 대장암 조직 내에서 TS 발현의 차이는 5-FU의 약물 저항성과 밀접한 관련이 있고 예후와도 상관관계를 보인다. TS 발현이 높을수록 예후가 불량하므로 더욱 적

극적으로 치료해야 한다는 보고들이 있는 반면, 이와 상반되는 보고도 있다.⁴⁻⁹ 한편 NSCLC에서 TS 발현에 대한 연구는 매우 드문데, 최근 NSCLC 환자에게 수술 후 UFT (tegafur와 uracil의 1:4 조합, Taiho Pharmaceutical Co, Tokyo, Japan)를 경구 투여하면 효과가 있다는 연구 결과가 보고되었다.^{10,11}

TS의 발현 정도가 생존 기간에 영향을 미치는 정확한 기전은 밝혀지지 않았다. 그러나 TS가 세포의 분열과 증식에 관여하는 DNA 합성 효소의 하나이므로 암세포의 증식과 연관이 있을 것으로 보인다. 따라서 TS 과발현이 비정상적 세포증식의 결과인지, 혹은 TS 과발현이 직접적으로 세포 성장과 증식을 촉진하는 것인지 확인할 필요가 있다.

염색체 17p13에 위치하는 p53은 손상된 DNA를 복구하고 세포의 성장을 조절하는 기능을 할뿐만 아니라 세포분화와 세포자멸사에도 관여하는 매우 중요한 종양억제 유전자다.¹² 이 유전자가 소실되거나 변이가 일어나면 하나의 염기가 다른 것으로 대체되어 변이 단백을 생성한다. 이와 같이 변이된 단백질은 분자 형태에 변화를 일으켜 야생형 p53 단백질보다 안정성이 높아져 반감기가 길어지므로 종양세포 내에서 과발현된다. 야생형 p53 단백질은 전사과정을 조절하는 작용을 매개하여 세포주기를 G1기에 머물게 하여 세포증식을 억제하는 반면, 변이 단백질은 이 기능을 잃고 종양 형성에 기여하게 된다.¹³ p53 단백질의 과발현은 여러 종양에서 흔히 발견된다. 따라서 이들 종양의 발생 기전에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 몇몇 암종에서는 예후와도 상관관계가 있다고 하나 NSCLC에서는 아직 논란의 여지가 많다.¹⁴⁻¹⁷ 최근 연구에 따르면 TS 단백질과 p53 mRNA가 핵소체 내에 있는 생물학적으로 활발한 복합체를 형성하고, 5-FU 항암치료의 반응을 예측하는 데 TS 단백질 대신 p53 단백을 이용할 수 있다는 주장이 제기되고 있다.¹⁸⁻²⁰

이에 저자들은 NSCLC 환자를 대상으로 TS106 단클론 항체를 이용한 면역조직화학염색을 통해 NSCLC 조직 내 TS 발현 정도를 확인하고 p53 및 Ki-67의 상관성과 예후 인자로서의 의의를 알아보고자 하였다.

재료와 방법

연구 재료

가톨릭대학교 의과대학 성빈센트병원에서 2000년 1월부터 2001년 12월까지 개흉 생검이나 수술을 시행하여 폐의 원발성 비소세포 폐암종으로 진단한 환자 중 수술 전에 방사선요법이나 화학요법을 받은 환자는 제외하고, 조직의 고정 및 보관 상태가 양호하며 최근까지 추적관찰이 가능했던 56명의 환자를 대상으로 하였다. 전체 환자의 평균 추적 기간은 35개월(11-63개월)이었다. 모든 조직은 광학현미경으로 살펴본 후 병리 진단을 확인하였다.

연구 방법

면역조직화학염색

신선한 조직을 10% 중성 포르말린에 고정한 후 통상적인 표본 제작 방법에 따라 파라핀 포매괴를 제작해서 헤마톡실린-에오신 염색을 하여 진단에 이용하였다. 각 증례에서 출혈이나 괴사가 없는 대표적인 파라핀 블록을 한 개씩 선택한 뒤, 4 μm 두께의 연속 절편을 각각 4장씩 잘라서 특수 처리된 슬라이드(poly-L-lysine 도포)에 부착했다. 그 중 1장은 헤마톡실린-에오신 염색을 하고, 나머지 3장은 TS, p53, Ki-67 항원에 대한 면역조직화학염색을 시행하였다.

면역조직화학염색을 위하여 우선 80°C 오븐에서 한 시간 건조시킨 다음, 자일렌으로 실온에서 2분간 4회 탈파라핀하였다. 그런 다음 100% 알코올로 10초간 3회 처리하고, 10% citrate buffer (Zymed, San Francisco, USA)에 담가 120°C의 고압멸균기에서 15분간 가열한 후, 실온에서 20분간 방치하였다. 45°C의 세척 완충액으로 3분씩 3회 세척하고, 조직 내의 내인성 과산화효소를 제거하기 위하여 3% 과산화수소수에 45°C에서 5분간 반응시켰다. 이어서 세척 완충액으로 3회 씻어낸 후, 비특이 단백질의 결합을 제거하기 위하여 1:100으로 희석한 비면역 염소혈청(Zymed, San Francisco, USA)에 45°C에서 60분간 반응시켰다.

일차 항체는 TS106 (Zymed, San Francisco, USA), p53 (Zymed, San Francisco, USA), Ki-67 (Zymed, San Francisco, USA)에 대한 단클론 항체들로서, 각각 1:50으로 희석하여 4°C 냉장고에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후 이차 항체(biotinylated anti-mouse immunoglobulin antibody, Zymed, San Francisco, USA)로 10분간 반응시킨 후 세척 완충액으로 3분씩 세 차례 씻어냈다. 그런 다음 streptavidin peroxidase detection system (Zymed, San Francisco, USA)을 이용하여 biotin-avidin 특이 결합을 유도하였다. 다시 씻어낸 후 3,3'-diaminbenzidine tetrahydrochloride를 이용하여 10분간 발색한 다음 Meyer's hematoxylin (Zymed, San Francisco, USA)으로 대조염색을 하였다.

음성 대조군은 염색 때 일차 항체 대신 정상 면역 혈청을 첨가해 주고 나머지 모든 과정은 동일하게 하였다. TS와 p53은 양성 이 확인된 유방암 조직을, Ki-67은 편도 조직을 양성 대조군으로 하였다.

염색 결과 판독

판독은 두 명의 병리의사가 독립적으로 하였다. TS는 종양세포의 핵과 세포질 내에서 갈색으로 염색되었으며, Johnston 등의 방법을 이용하여 반정량적으로 판독하였다. 즉, 전혀 염색되지 않은 경우를 0, 25% 미만은 1+, 25-50%는 2+, 50% 이상은 3+로 구분하였다. 그런 다음 다시 TS의 발현 정도를 두 군으로 나누는데, 0~1+는 저발현군, 2+~3+는 고발현군으로 구분하였다. p53은 핵에 붉은 갈색으로 면역 반응이 나타나면서 광학현미경으

로 봤을 때 전체 중앙세포의 1% 이상인 경우를 양성으로 판독하였다. Ki-67은 중앙세포의 핵에 염색된 경우를 양성 세포로 판독하되, 400배 배율의 광학현미경으로 1,000개의 중앙세포를 세어 이 중 양성 세포를 백분율로 하여 세포증식능(proliferative index, PI)을 구하였다. 결과 판정은 두 명의 병리의사가 따로 시행한 후 평균치를 채택하였고, 각각의 수치와 평균값이 10% 이상 차이가 나는 경우에는 이중 광학현미경으로 재검하였다.

통계학적 분석

모든 자료는 SPSS version 11.5 통계 프로그램을 이용하여 분석하였다. 면역조직화학염색에 의한 TS, p53 단백질 발현, PI 간의 상관관계, 그리고 이들과 임상병리학적 지표들 사이의 상관관계는 Pearson's χ^2 test로 검정하였으며, 유의 수준은 0.05 이하로 하였다. 생존율은 Kaplan-Meier method를 이용하여 분석하였으며, 생존 기간에 대한 다변수 분석은 Cox regression model을

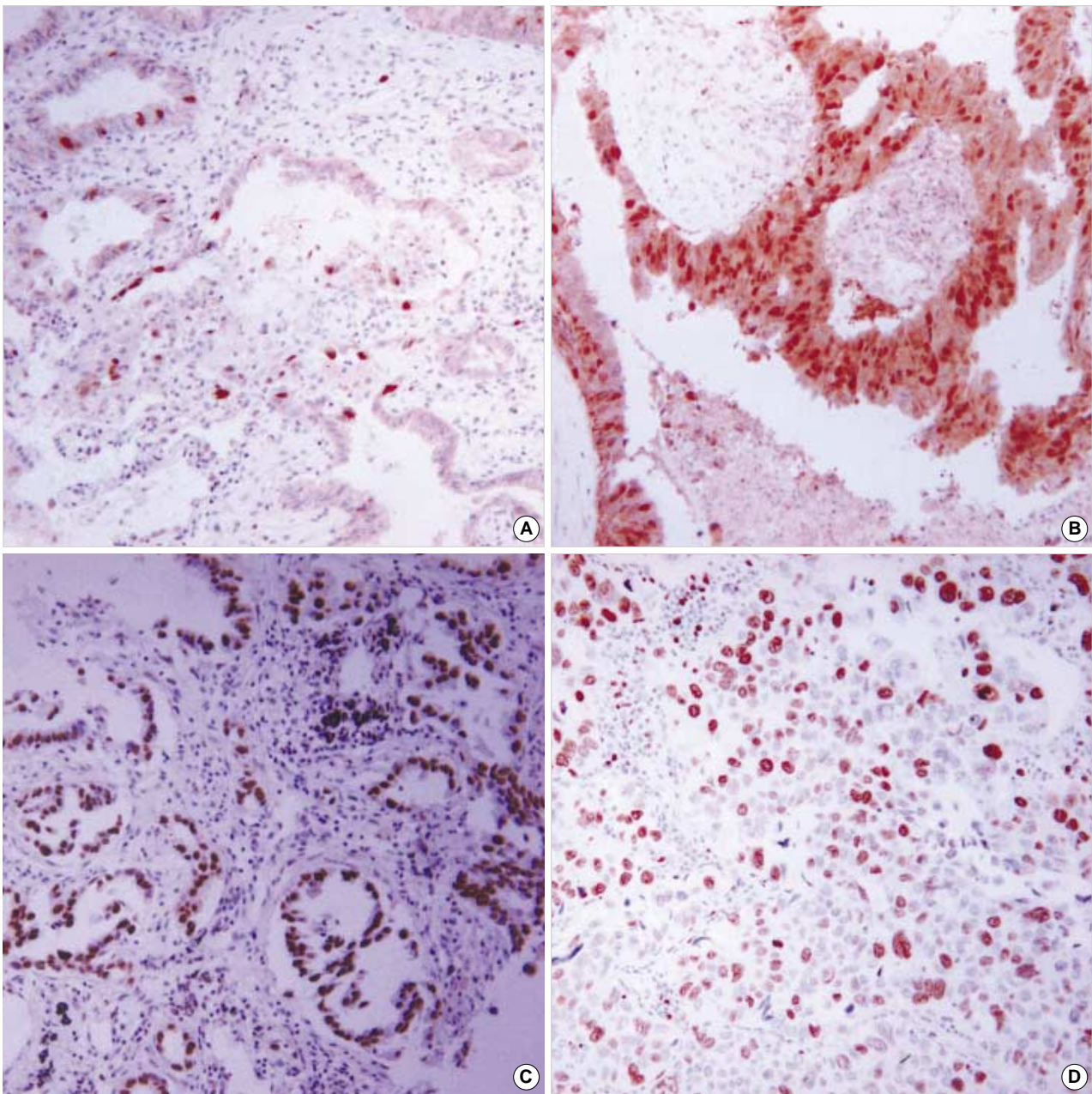


Fig. 1. Immunohistochemical staining for thymidylate synthase, p53 and Ki-67. (A) Tumor cells show scattered positivity for thymidylate synthase in a representative case of TS low group (Grade 1). (B) Tumor cells show strong and diffuse immunoreaction in a representative case of TS high group (Grade 3). (C) Strong nuclear reactivity for p53 is present in the majority of tumor cells. (D) Tumor cells demonstrate positive immunostaining for Ki-67.

Table 1. Relation between clinicopathologic variables and TS expression

Variables	Case No.	Low TS	High TS	p-value
Age, mean: year±SD	62.2±10.6	63.3±11.4	62.6±8.5	
<mean	23	6	17	NS
≥mean	33	10	23	
Gender				
Male	41	9	32	NS
Female	15	7	8	
Pathological stage				
I	12	4	8	NS
II	10	1	9	
III	21	8	13	
IV	13	3	10	
Histologic type				
Squamous cell	24	3	21	NS
Adenocarcinoma	21	11	10	
Large cell	11	2	9	
Differentiation				
Well	10	5	5	NS*
Moderate	28	8	20	
Poor	18	3	15	
p53				
Negative	21	7	14	NS
Positive	35	9	26	
Ki-67, mean±SD	31.4±12.1	24.1±9.1	34.1±3.5	
Low (<mean)	30	11	19	NS†
High (≥mean)	26	5	21	

*p=0.069; †p=0.068.

이용하여 시행하였다.

결 과

비소세포 폐암종 환자 56예의 연령 분포는 35세부터 79세였고 평균 연령은 62세였다(Table 1). 남자가 41예, 여자가 15예로 남자에서 높은 빈도를 보였다. 조직학적 유형에 따라 분류하면 편평세포암종이 24예(42.9%), 섬암종 21예(37.5%), 대세포암종 11예(19.6%)였다. American Joint Committee on Cancer의 기준에 따라 구분할 때 병기 I은 12예(21.4%), II는 10예(17.9%), III은 21예(37.5%), IV (동측, 비원발성 전이로 인해 M1으로 분류되었으나 수술 받은 환자)는 13예(23.2%)였다. 분화도에 따라 분류하면 고분화암은 10예(17.9%), 중분화암은 28예(50%), 저분화암은 18예(32.1%)였다.

면역조직화학염색 결과, TS 발현 정도를 보면 발현이 되지 않은 0이 2예, 1+가 14예, 2+가 24예, 3+가 16예로 모두 54예(96.4%)에서 발현하였다. TS 발현 정도를 두 군으로 나누면 저발현군이 16예(28.6%), 고발현군이 40예(71.4%)였다(Fig. 1A, B). 연령, 성별, 병기 또는 조직형에 따른 저발현군과 고발현군의 빈도는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 한편 고분화 암종 중 50% (5/10)가 TS 고발현군에 속한 반면, 중분화 암종은 71.4% (20/28), 저분화 암종은 83.3%(15/18)가 TS 고발현군

Table 2. Multivariate analysis of prognostic factors in 56 patients with NSCLC

Variables	Relative hazard	95% confidence interval	Log-rank test p-value
Age	1.026	0.569-2.449	0.315
Performance status	1.011	0.703-1.421	0.092
Complete resection (yes vs no)	1.765	0.971-2.305	0.012
Pathologic stage	1.144	0.827-1.875	0.037
Differentiation	0.714	0.418-1.265	0.623
TS (low vs high)	0.957	1.080-2.564	0.177
p53 (negative vs positive)	0.809	0.253-1.762	0.418
PI (low vs high)	0.949	0.036-1.732	0.125

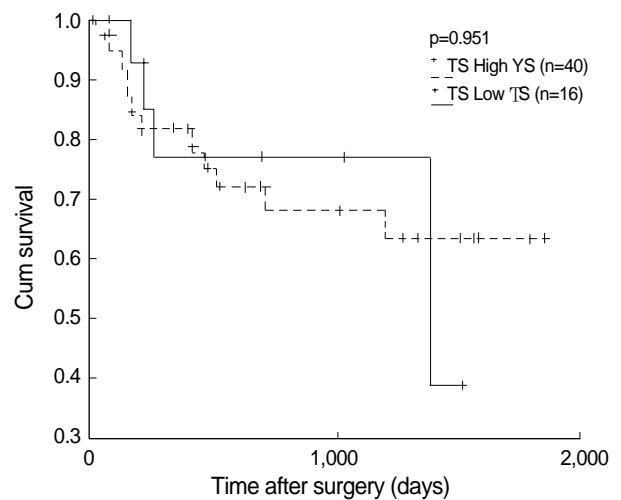


Fig. 2. Survival curves of NSCLC patients according to TS expression.

에 속했다. 즉 분화도가 나뉠수록 TS 발현 정도가 높았고 이런 차이는 통계적 유의 수준에 근접하였다(p=0.069).

p53 단백질은 35예(62.5%)에서 양성이었으며(Fig. 1C), TS 발현 정도(저발현군 vs 고발현군)에 따른 p53 발현 유무는 차이가 없었다(p=0.806). Ki-67로 염색해서 조사한 평균 PI는 31.4±12.1이었고(Fig. 1D), TS 발현에 따른 PI는 0인 경우 22.7±8.2, 1+인 경우 24.3±7.4, 2+인 경우 28.2±11.7, 3+인 경우 43.0±17.4로 발현 정도에 따라 유의한 차이를 보였다(p=0.003). 또한 PI가 평균 미만인 경우는 30예인데, 이 중 19예(63.3%)가 TS 저발현군에 속했다. PI가 평균 이상인 26예 가운데서는 21예(80.8%)가 고발현군에 속했으며, 이는 통계적 유의 수준에 근접하였다(p=0.068). 즉, TS 고발현군에서 Ki-67 발현율이 높은 경향이 있었다.

TS 저발현군과 TS 고발현군으로 나누어 생존율을 비교한 결과, 두 군의 생존율은 차이가 없었다(Fig. 2). 다변수(multivariate) 분석을 한 결과, 완전 절제 여부(p=0.012)와 병기(p=0.037)만이 독립적인 예후 인자로서 통계학적 유의성을 보였다(Table 2).

고찰

본 연구에서는 인체 NSCLC 56예를 대상으로 TS 발현, p53 발현, 세포증식능을 조사하였다. 면역조직화학염색 결과, 1) 대부분의 증례(96.4%)에서 TS 발현이 관찰되었고 발현 정도는 비교적 높았다. 2) TS 발현 정도에 따른 p53 발현의 차이는 없었으나, 분화도가 나쁜 군과 세포증식능이 높은 군에서 TS 고발현이 관찰되었다. 3) TS 발현 정도에 따른 환자의 생존율 차이는 없었으며, 다변수 분석에서 병기만이 독립적인 예후 인자로 확인되었다.

NSCLC에서 TS 발현에 관한 연구는 매우 드물어 그 자료가 극히 적다. 병기 I-IIIa NSCLC 예에서 54%의 TS 발현 양성률이 보고되었는데,²² 본 연구에서는 TS 발현 양성률은 96.4%, 그 중 TS 고발현은 71.4%였다. 이러한 결과는 Nakagawa 등^{23,24}의 연구 결과와 일치하는 것으로, 그들은 병기 I 샘암종과 병기 I 과 II인 NSCLC에서 각각 72.1%, 72.5%의 TS 고발현을 관찰하였다.

TS는 DNA의 합성이나 복구에 중요한 효소로서 정상세포나 암세포에서 발현되는데, 특히 세포증식이 많은 세포나 암세포에서 더 많이 발현된다. 여러 실험 결과에 따르면, 중앙 조직의 TS는 세포분열 과정 중 휴지기에서 합성기로 진행되는 세포증식 과정에서 약 20배 이상 증가하고,²⁵ TS 발현이 암세포의 세포증식능과 관련이 있다고 한다.²⁶ 그러나 실제 임상 연구는 많지 않을뿐더러 결과에 일관성이 없어 논란이 되고 있다. 방광암에서 TS 발현과 세포증식능은 양성의 관계를 보이나, 직장-대장암에서 TS 발현과 Ki-67 표지자수는 연관이 없다는 보고도 있다. 반면에 높은 세포증식능이 오히려 TS 저발현과 상관관계가 있다는 기술도 있다.^{14,19,27} 본 연구에서 TS 고발현군의 세포증식능은 TS 저발현군보다 높았으며, 다른 연구자도 NSCLC를 대상으로 이와 유사한 결과를 관찰하였다.²¹

TS는 ribonucleoprotein 복합체의 일부로 c-myc 유전자의 변형에 관여하는 등 다른 유전자의 조절에 관여하고 있다.²⁸ 이로 미루어 TS 발현과 세포증식능 사이에는 다른 여러 가지 암유전자들이 복합적으로 관여하는 것으로 보이며, 이 둘의 상관관계는 이러한 유전자들과의 연관성으로 인한 결과로도 생각할 수 있다. 한편, p53 발현도 TS 발현 정도와 통계적으로 유의한 차이가 있다는 보고가 있다.¹⁹ 그렇지만 본 연구와 Nakagawa 등²⁴의 연구에서는 유의한 차이가 없었다. 그러나 p53 과발현이 p53의 높은 활성도를 의미하는 것은 아니므로, 이를 확인하기 위해서는 p53 활성도와 p53 유전자 변이를 함께 조사하여야 할 것이다.

지금까지 여러 암종에서 암조직 내 TS 발현과 생존 기간 사이의 관련성을 연구하였는데, 특히 위암, 대장-직장암, 유방암, 두경부암 등에서 TS 발현이 생존 기간에 영향을 미치는 예측 인자로 제시되었다. 직장암에서 TS 발현이 높을수록 예후가 불량하다고 하였고, 위암, 대장암 환자를 대상으로 한 연구에서도 TS mRNA 수치가 낮은 군에서 유의하게 생존 기간이 길다고 하였

다.^{4,8} 그러나 TS 발현 정도가 항암화학요법에 대한 반응이나 재발 등과 관련이 없다는 보고⁹도 있어, TS 발현이 어떠한 역할을 하는지 더 연구할 필요가 있다.

폐암종에서 TS 발현이 예후 인자로서 유의성이 있는지를 밝히기 위한 연구는 매우 드물다. Shintani 등²²은 병기 I과 II인 NSCLC 환자 70예에서 TS mRNA 수치를 측정된 결과 TS mRNA 수치가 낮은 환자가 높은 환자보다 무병 생존율이 더 높았으며, Cox regression 분석으로 TS mRNA 수치를 생존 예측 인자로 추정하였다. 병기 I인 폐 샘암종만을 대상으로 한 다른 연구자²³의 결과에서도 TS 고발현군이 TS 저발현군보다 더 나쁜 예후를 보였다. 이는 저자들의 연구 결과와 다른 것으로, 본 연구에서는 TS 발현 정도에 따라 생존 기간에 차이가 나지는 않았다.

Nakagawa 등²⁴도 NSCLC에서 TS 발현 정도에 따른 생존 기간의 차이가 없다고 하였다. Huang 등²⁹은 폐 샘암종에서 TS 고발현군의 생존 기간이 TS 저발현군보다 짧았지만, 다른 조직형에서는 TS 발현 정도에 따라 환자의 예후에 차이가 나지는 않았다고 하였다. 폐암종은 조직학적으로 다양해서 조직학적 유형에 따라 TS의 발현이나 역할이 다를 수 있다. 본 연구에서 TS 발현은 조직학적 유형에 따라 다른 결과를 보였지만 통계적 유의성은 없었다. 또한 생존 기간에서도 조직형에 따른 유의한 차이는 없었다. 좀 더 신빙성 있는 결론에 도달하기 위해서는 더욱 많은 증례를 대상으로 연구하고 각 조직학적 유형별로 결과를 비교해야 할 것이다.

이상의 연구 결과, TS는 거의 모든 NSCLC에서 발현되었고 발현 정도가 대체적으로 높은 편이었다. 그리고 분화도가 나쁜 군과 세포증식능이 높은 군에서 TS의 발현율이 높은 경향을 보였다. 그러나 TS 발현 정도에 따른 생존율의 차이는 없었다.

참고문헌

- Hoffman PC, Mauer AM, Vokes EE. Lung cancer. *Lancet* 2000; 355: 479-85.
- Bertino JR, Banerjee D. Thymidylate synthase as an oncogene? *Cancer Cell* 2004; 5: 301-2.
- Rahman L, Voeller D, Rahman M, et al. Thymidylate synthase as an oncogene: a novel role for an essential DNA synthesis enzyme. *Cancer Cell* 2004; 5: 341-51.
- Leichman CG, Lenz HJ, Leichman L, 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.
- Peters GJ, Van der Wilt CL, Van Triest B, et al. Thymidylate synthase and drug resistance. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 1299-305.
- Shibata J, Aiba K, Shibata H, Minowa S, Horikoshi N. Detection and quantitation of thymidylate synthase mRNA in human colon adeno-

- carcinoma cell line resistance to 5-fluorouracil by competitive PCR. *Anticancer Res* 1998; 18: 1457-63.
7. Edler D, Kressner U, Ragnhammar P, *et al.* Immunohistochemically detected thymidylate synthase in colorectal cancer: an independent prognostic factor of survival. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 488-92.
 8. Takenoue T, Nagawa H, Matsuda K, *et al.* Relation between thymidylate synthase expression and survival in colon carcinoma, and determination of appropriate application of 5-fluorouracil by immunohistochemical method. *Ann Surg Oncol* 2000; 7: 193-8.
 9. Findlay M, Cunningham D, Morgan G, Clinton S, Hardcastle A, Aherne GW. Lack of correlation between thymidylate synthase levels in primary colorectal tumours and subsequent response to chemotherapy. *Br J Cancer* 1997; 75: 903-9.
 10. Wada H, Hitomi S, Teramatsu T, Adjuvant chemotherapy after complete resection in non-small-cell lung cancer. West Japan Study Group for Lung Cancer Surgery. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1048-54.
 11. Tanaka F, Miyahara R, Ohtake Y, *et al.* Advantage of post-operative oral administration of UFT (tegafur and uracil) for completely resected p-stage I-IIIa non-small cell lung cancer (NSCLC). *Eur J Cardiothorac Surg* 1998; 14: 256-62.
 12. Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4495-9.
 13. Yoo J, Lee HK, Kang CS, Park WS, Lee JY, Shim SI. P53 gene mutations and p53 protein expression in human soft tissue sarcomas. *Arch Pathol Lab Med* 1997; 121: 395-9.
 14. Allegra CJ, Parr AL, Wold LE, *et al.* Investigation of the prognostic and predictive value of thymidylate synthase, p53, and Ki-67 in patients with locally advanced colon cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1735-43.
 15. Hashimoto T, Tokuchi Y, Hayashi M, *et al.* p53 null mutations undetected by immunohistochemical staining predict a poor outcome with early-stage non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 1999; 59: 5572-7.
 16. Sjogren S, Inganas M, Norberg T, *et al.* The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 173-82.
 17. Bosari S, Viale G, Bossi P, *et al.* Cytoplasmic accumulation of p53 protein: an independent prognostic indicator in colorectal adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 681-7.
 18. Chu E, Copur SM, Ju J, *et al.* Thymidylate synthase protein and p53 mRNA form an in vivo ribonucleoprotein complex. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 1582-94.
 19. Wong NA, Brett L, Stewart M, *et al.* Nuclear thymidylate synthase expression, p53 expression and 5FU response in colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 2001; 85: 1937-43.
 20. Paradiso A, Simone G, Petroni S, *et al.* Thymidylate synthase and p53 primary tumour expression as predictive factors for advanced colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2000; 82: 560-7.
 21. Johnston PG, Fisher ER, Rockette HE, *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.
 22. Shintani Y, Ohta M, Hirabayashi H, *et al.* Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA levels in tumor tissues and the efficacy of 5-fluorouracil in patients with non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004; 45: 189-96.
 23. Nakagawa T, Tanaka F, Otake Y, *et al.* Prognostic value of thymidylate synthase expression in patients with p-stage I adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2002; 35: 165-70.
 24. Nakagawa T, Otake Y, Yanagihara K, *et al.* Expression of thymidylate synthase is correlated with proliferative activity in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 2004; 43: 145-9.
 25. Navalgund LG, Rossana C, Muench AJ, Johnson LF. Cell cycle regulation of thymidylate synthase gene expression in cultured mouse fibroblasts. *J Biol Chem* 1980; 255: 7386-90.
 26. Pestalozzi BC, McGinn CJ, Kinsella TJ, *et al.* Increased thymidylate synthase protein levels are principally associated with proliferation but not cell cycle phase in asynchronous human cancer cells. *Br J Cancer* 1995; 71: 1151-7.
 27. Allegra CJ, Parr AL, Wold LE, *et al.* Investigation of the prognostic and predictive value of thymidylate synthase, p53, and Ki-67 in patients with locally advanced colon cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1735-43.
 28. Chu E, Voeller DM, Jones KL, *et al.* Identification of a thymidylate synthase ribonucleoprotein complex in human colon cancer cells. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 207-13.
 29. Huang CL, Yokomise H, Kobayashi S, Fukushima M, Hitomi S, Wada H. Intratumoral expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in non-small cell lung cancer patients treated with 5-FU-based chemotherapy. *Int J Oncol* 2000; 17: 47-54.