

대장암에서 Thymidylate Synthase가 예후에 미치는 영향

고려대학교 의과대학 외과학교실

민병욱 · 홍정훈 · 이경범 · 문홍영

Significance of Thymidylate Synthase Expression in Colorectal Cancer

Byung Wook Min, M.D., Jeong Hoon Hong, M.D., Kyung Bum Lee, M.D. and Hong Young Moon, M.D.

Purpose: Thymidylate synthase (TS) is the target enzyme for 5-fluorouracil (5-FU). It is known that TS is related to response, and resistance, following chemotherapy due to colorectal cancer. The object of this study was to identify the clinical significance of TS as a prognostic factor, and its influence on 5-FU based chemotherapy in colorectal cancer.

Methods: We performed a retrospective study on 105 consecutive patients who were operated on, at the Department of Surgery, Korea University, College of Medicine, for colorectal cancer between Jan. 1994 and Dec. 1995. We used formalin fixed, paraffin embedded tissues of resected specimens for our study. For the semi-quantitative study, the specific monoclonal antibody, TS106, was used for immunohistochemical staining. Interpretation of the immunohistochemical staining, for intratumoral TS expression, was divided into 4 grades: intensity 0, 1+, 2+, 3+ were defined as, a total absence of TS immuno staining, less than 25%, 25~50% and more than 50%, of tumor staining positive, respectively. Grades 0, 1+, and 2+ were regarded as low TS expression groups and 3+ regarded as a high TS expression group. We then analyzed 5-year survival rates, according to Dukes' stage, and whether systemic chemotherapy was performed, or not, according to TS expression.

Results: Of the 105 patients, 91 (86.7%) showed TS expression, 21 (20%) with high TS expression and 84 (80%) were low TS expression. As Dukes' stage advanced, the incidence of high expression of TS increased ($P=0.048$). In Dukes' stage B2, 5-year survival rates for the low TS expressed group was better than for the high TS expressed group ($P=0.0052$). In patients who received postoperative

chemotherapy, 5-year survival rates for the low TS expressed group were better than for the high TS expressed group ($P=0.049$).

Conclusion: These data suggest the expression of intratumoral TS, studied by immunohistochemical staining, is relevant to the prognosis of colorectal cancer, especially Dukes' stage B2. It is also related to the response rate of 5-FU based systemic chemotherapy in colorectal cancer. (*J Korean Surg Soc* 2002;62:408-414)

Key Words: Colorectal cancer, Prognostic factor, Thymidylate synthase (TS)

중심 단어: 대장직장암, 예후인자, Thymidylate synthase (TS)

Department of Surgery, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea

서론

대장암은 국내에서 남녀 모두 4번째로 빈도가 많은 암종으로 1980년대 이후 생활습관이 서구화됨에 따라 발생률이 꾸준히 증가하고 있다. 지난 15년간의 통계를 보면 대장암은 전체 암에서 차지하는 비율이 5.9%에서 8.8%로 증가하여 82년 대비 49.2%나 증가하였다.(1) 이는 우리 식생활의 서구화에 기인한다고 볼 수 있으며, 증가속도가 더욱 가속화될 것으로 예견된다.

대장암 환자는 외과적 절제가 가능한 시기에 진단되어 근치적 수술을 받으나, 그중 절반 이상의 환자는 암의 국소 혹은 원격장기 재발로 사망하게 되며, 이처럼 재발률이 높은 이유는 근치적 수술 후에도 국소 또는 원격장기에 미세 암병소가 존재하기 때문이라고 한다.(2) 이러한 잔존 암세포를 항암화학요법으로 파괴하여 치유율을 향상시키려는 시도들이 꾸준히 이루어져 왔으며 이 중 Duke's B2 및 C 대장암 환자에서 수술 후 5-FU와 Levamisole 혹은 Leukovorin의 병용요법은 재발률을 감소시키고 생존율을 향상시키는 것으로 알려져 있다.(3,4)

대장암의 전신적 화학요법의 전반적인 반응률은 30% 정

책임저자 : 문홍영, 서울시 구로구 구로동길 97번지
☎ 152-703, 고려대학교 구로병원 외과
Tel: 02-818-6673, Fax: 02-859-5941

접수일 : 2001년 12월 28일, 게재승인일 : 2002년 4월 26일
본 논문은 2001년 춘계외과학회에서 구연 발표된 것임.

도이며, 생존기간의 중앙치는 15개월 정도라고 보고하고 있다.(5,6) 인체내에서의 Thymidylate Synthase (TS) enzyme pathway는 체내 대사물질인 deoxyuridine monophosphate (dUMP)가 DNA합성에 필수 효소인 thymidylate synthase (TS)의 작용에 의해 deoxythymidine monophosphate (dTMP)로 전환되어 DNA를 합성하는 과정이며(Fig. 1), 대장암에서 가장 보편적으로 이용되는 항암제인 5-fluorouracil (5-FU)은 대사길항제로 체내에서 fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP)로 대사되어 dUMP 대신 TS와 결합하여 dTMP의 생산을 억제시켜 암세포의 DNA합성을 방해하는 효과를 나타낸다. TS는 5-FU의 표적효소로 암세포내 TS 효소치는 5-FU에 대한 반응률과 역비례 관계에 있다고 하며,(7,8) 암세포의 5-FU에 대한 저항성과도 관련이 있다고 한다.(9,10) 본 연구에서는 대장암 환자를 대상으로 대장암 조직내 TS의 발현 정도가 환자의 생존율과 항암화학요법의 효과에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

방 법

1) 대상

본 연구는 1994년 1월부터 1995년 12월까지 고려대학교 의과대학 부속병원에서 대장암으로 수술을 시행한 105명의 환자를 대상으로 하였으며, 이들 환자의 중앙조직내 TS 존재 여부를 알아보기 위하여 TS106 단클론성 항체를 이용한 면역조직화학 염색법을 시행하였다. 연구의 대상이 된 105명의 환자들의 임상적 특징은 남성이 61명, 여성이 44명이었으며, 평균연령은 56.5세이었다. 종양의 위치는 우측결장암이 28예, 횡행결장암이 8예, 좌측 및 S상 결장암이 19예, 그리고 직장암이 50예이었다. 환자들의 병기별 분포는 Dukes' A가 1예, B1이 10예, B2가 42예, C1이 3예, C2가 33예, D가 16예이었다(Table 1). 술 후 보조항암화학치료는 5-FU를 사용하여 28일 주기로 6회를 시행하였으며, 105명의 환자 중 수술 후 보조항암화학치료를 시행한 경우가 68예, 시행하지 않은 경우가 37예이었다. 수술 후 보조항암화

학치료를 시행한 68예의 환자 중 56명의 환자가 Dukes' B2 및 C2이었다. 대상환자의 추적조사는 외래 및 전화망을 이용하여 2000년 12월까지 시행하였으며, 추적기간은 11개월에서 67개월로 평균 37.4개월이었다.

2) 면역조직화학 염색

면역조직화학 염색을 위해 절제된 조직의 일부를 포르말린에 고정, 파라핀 포매된 조직을 4µm의 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시킨 후 67°C에서 한 시간 가온하고 통상의 방법으로 탈파라핀한 후 점차 낮은 농도의 알코올을 거쳐 증류수로 수세하였다. 내인성 과산화효소의 활성을 억제시키기 위해 3%의 과산화수소수를 사용하여 10분간 처리한 후 Tris 완충용액(Trizna base 1.21 g, Nacl 16 g, H₂O 2 L, pH 7.4)에 씻었다. 그 다음에 차단항체를 20분간 반응시킨 후 일차항체인 단클론성 TS106 (MAB4130, Chemicon International, Inc)을 4°C에서 18시간 반응시켰다. 이를 Tris 완충액으로 수세하고 biotin이 결합된 2차 항체(Vector Universal Elite kit)를 가하여 실온에서 40분간 반응시켰다. 그 후 다시 Tris 완충액으로 수세한 후 과산화효소가 결합된 streptavidin 용액을 가하여 20분간 반응시키고 또 한 번 Tris 완충액으로 수세하고 발색제인 3-amino-9-ethyl-carbazole (AEC) 용액을 가하여 10분간 반응시켰다. 이 후 Harris' hematoxylin으로 대조염색하고 알코올로 탈수한 후 봉입하였다.

3) 면역조직화학 염색의 판독

TS의 발현정도를 TS106의 염색정도에 따라 반정량적으로 판독하였으며, Johnston 등(11)이 제안한 분류법에 따라 시

Table 1. Clinical characteristics of 105 patients

Characteristic	No. of patients (%)
Age (years)*	56.53±13.44
Sex	Male 61, Female 44
Location of tumor	
Right colon	28 (23.8)
Transverse colon	8 (7.6)
Left & sigmoid colon	19 (19.0)
Rectum	50 (49.5)
Stage (Modified Dukes')	
A	1 (1)
B1	10 (9.5)
B2	42 (40)
C1	3 (2.9)
C2	33 (31.4)
D	16 (15.2)

* = mean value±standard deviation.

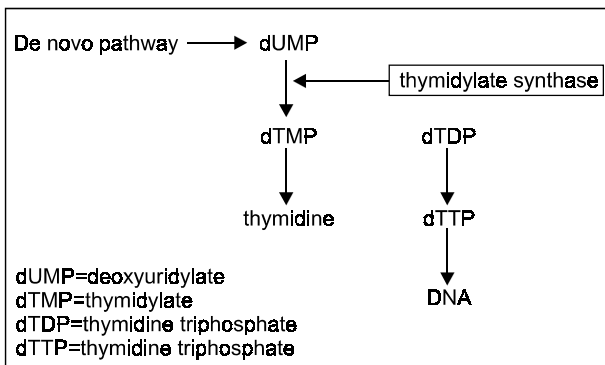


Fig. 1. The thymidylate synthase enzyme pathway.

각적 강도에 따라 0, 1+, 2+, 3+로 구분하였는데, 0은 TS10에 염색이 되지 않은 경우로 하였으며, 1+는 전체 암세포의 25% 미만에서 양성인 경우, 2+는 25~50%의 암세포에서 염색되거나 중등도로 염색된 경우, 3+는 50% 이상의 암세포에 염색되거나 가장 강하게 염색된 경우로 정의하였다. 또한 TS의 발현정도를 2군으로 나누어 염색의 강도가 0에서 2+까지를 저발현군으로, 그리고 3+를 고발현군으로 구분하였다.

4) 분석

대장암의 병기는 modified Dukes' staging 분류법에 의해 분류하였으며, 병기별 TS 발현정도의 차이, TS 발현정도에 따른 생존율을 비교 분석하였다. 또한 TS 발현을 저발현군과 고발현군으로 나누어 두 군 간의 생존율 및 항암치료의 반응을 비교 분석하였다. 모든 자료의 분석은 SPSS 9.0 통계 프로그램을 이용하였으며, 단변량 분석에는 Chi-square test

를 이용하였으며 P<0.05를 통계학적으로 유의하다고 판정하였다. 항암화학치료에 대한 반응률 및 생존율의 비교분석은 Kaplan-Meier method를 이용하여 알아보았으며, 생존율의 비교는 log rank test로 검정하였다.

결 과

1) TS의 발현정도와 병기와의 관계

TS 발현정도를 보면 발현이 되지 않은 0의 경우가 14예, 1+ 39예, 2+ 31예, 그리고 3+ 21예로 모두 91예(86.7%)에서 발현을 보였으며 병기에 따른 발현정도의 차이는 통계적 유의성이 없었다(Table 2).

TS 발현정도를 두 군으로 나누었을 때 저발현군이 84예(80%), 고발현군이 21예(20%)이었으며, 병기에 따른 저발현군과 고발현군의 빈도는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 3). 하지만 대상 예가 적어 통계적 분석이 가능하지 않은 Dukes' A와 C1을 제외하고 TS의 발현정도를 높은 군과 낮은 군으로 나누어 비교를 하였을 때 B1인 경우, TS 고발현군이 10%, B2 14.2%, C2 18.2%, 그리고 D인 경우가 37.5%로 병기가 진행할수록 TS 고발현군의 빈도가 통계적으로 유의하게 증가하였다(Table 4).

Table 2. Incidence of thymidylate synthase expression in relation to stage

Stage	Thymidylate synthase expression			
	0	1+	2+	3+
A	0	1	0	0
B1	1	2	6	1
B2	7	14	15	6
C1	0	1	0	2
C2	3	17	7	6
D	3	4	3	6
Total	14	39	31	21

P=0.649

Table 3. Incidence of low and high expression of thymidylate synthase by stage

Stage	TS low	TS high
A (n=1)	1 (100%)	0 (0%)
B1 (n=10)	9 (90%)	1 (10%)
B2 (n=42)	36 (85.8%)	6 (14.2%)
C1 (n=3)	1 (33.3%)	2 (66.7%)
C2 (n=33)	27 (81.8%)	6 (18.2%)
D (n=16)	10 (62.5%)	6 (37.5%)
Total	84 (80%)	21 (20%)

P=0.100

Table 4. Incidence of low and high expression of thymidylate synthase by stage (except Dukes' A and C1)

Stage	TS low	TS high
B1 (n=10)	9 (90%)	1 (10%)
B2 (n=42)	36 (85.8%)	6 (14.2%)
C2 (n=33)	27 (81.8%)	6 (18.2%)
D (n=16)	10 (62.5%)	6 (37.5%)

P=0.048

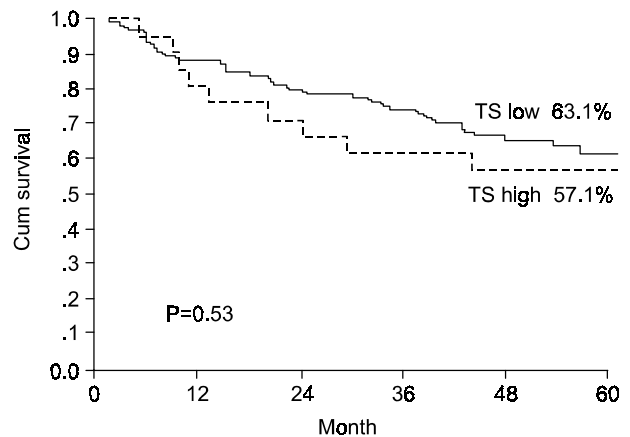


Fig. 2. 5-year survival rates according to thymidylate synthase expression.

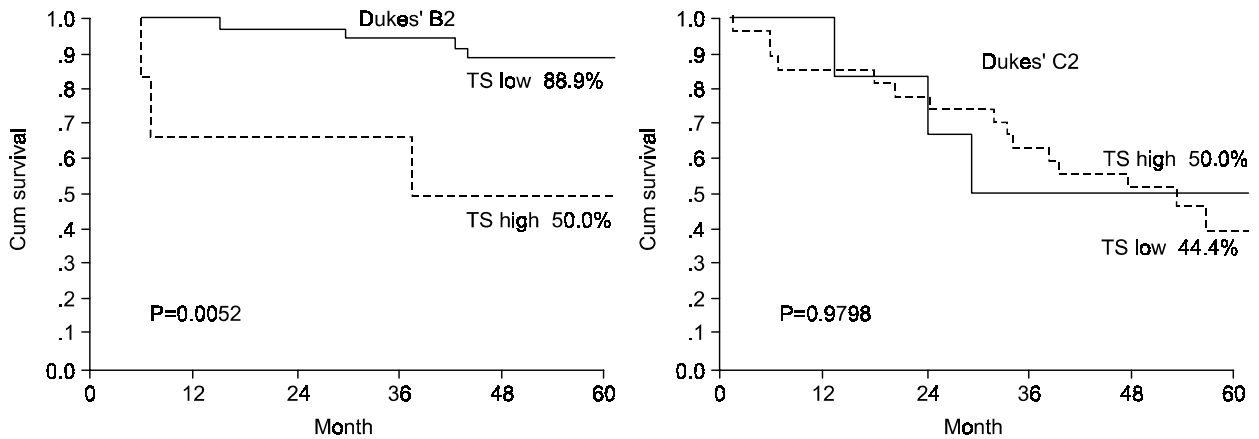


Fig. 3. 5-year survival rates in relation to thymidylate synthase expression in Dukes' B2 and C2.

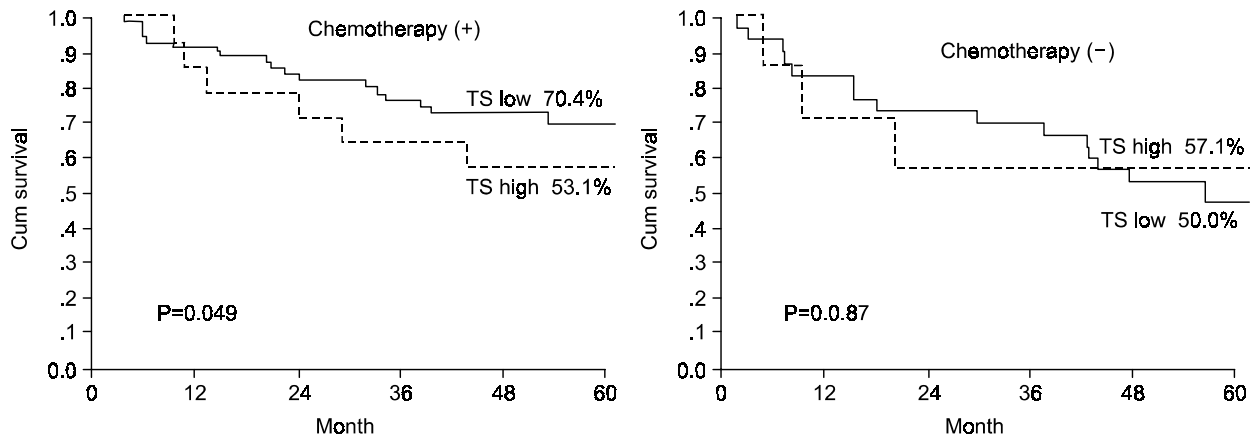


Fig. 4. 5-year survival rates by thymidylate synthase expression according to chemotherapy.

2) TS 발현정도와 생존율과의 관계

TS 저발현군 및 고발현군에서 5년 생존율을 비교한 결과, 저발현군의 경우 63.1%, 고발현군의 경우 57.1%로 TS 저발현군에서 높은 생존율을 보였지만 통계적 유의성은 없었다($P > 0.05$)(Fig. 2).

병기별 생존율의 비교는 30예 이상인 Dukes' B2와 C2에서 시행하였으며, B2의 경우 TS 저발현군의 5년 생존율이 88.9%, 고발현군이 50.0%로 통계적으로 유의한 차이를 보였으나, C2의 경우에는 저발현군이 44.4%, 고발현군이 50.0%로 통계적인 유의성이 없었다(Fig. 3).

3) TS 발현정도와 항암화학치료성적과의 관계

수술 후 보조항암화학치료를 시행한 68예를 대상으로 TS 발현정도에 따른 생존율의 차이를 알아보았다. TS 저발현군의 5년 생존율이 70.4%이었으며, 고발현군의 5년 생존율은 53.1%로 TS 저발현군이 생존율이 통계적으로 유의하게

높았다($P=0.049$). 보조항암화학요법을 시행하지 않은 군에서는 50.0%와 57.1%로 오히려 TS 고발현군에서 생존율이 높은 양상을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 4).

고 찰

대장암의 근치적 치료방법은 수술적 절제이나 근치적 수술 후에도 50% 정도가 국소 및 원격 재발이 발생하게 되며, (2) 이에 대한 치료로서 전신 항암화학치료가 이용되고 있다. 대장암의 경우 병기 분류 방법으로 Dukes' 병기 분류법이 예후를 예측할 수 있는 대표적인 방법이며, Dukes' C인 경우 수술 후 보조항암화학치료가 적극적으로 추천되고 있다. 하지만 같은 병기 내에서도 동일한 방법으로 치료를 하여도 그 성적이 달라 여러 가지 다양한 예후예측인자들에 대한 연구가 이루어져 왔다. Sialosyl-Tn antigen과 같은 mucin 분자내 glycoprotein의 발현이나, flow cytometry를 이용한 cellular DNA content에 대한 연구가 이루어져 왔으

며, (12-14) 최근에는 ras gene과 같은 oncogene의 이상과 종양억제 유전자인 p53에 대한 연구가 대장암의 예후에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 이루어져 왔다. (15-17) 그러나 아직까지 기존에 확인되었던 병기나 세포분화도 및 종양의 혈관 침습 유무, 림프절 침습 범위 등을 제외하고는 이점이 많은 상황이다.

본 연구에서 저자는 대장암의 예후를 예측할 수 있는 인자의 하나로서 면역조직화학적 염색법으로 비교적 쉽게 확인할 수 있는 종양내 Thymidylate Synthase가 어떠한 가치가 있는지 알아보았다.

Thymidylate Synthase는 대장암에 있어서 가장 보편적으로 사용하고 있는 5-FU의 표적 효소로 알려져 있으며, Johnston 등(11)은 직장암 환자의 TS 발현정도가 조직 분화도와는 관련이 없으나 Duke 병기와는 비례관계를 보이고 C병기 이하에서 TS 발현정도에 따른 생존율의 차이를 관찰하여 TS가 직장암 환자에서 하나의 독립된 예후인자임을 주장하였다. 또한 Lenz 등(18)은 위선암에 있어서 Thymidylate Synthase mRNA를 다중효소연쇄반응을 이용하여 정량분석한 결과 TS mRNA level이 높을수록 5-FU 항암화학치료에 대한 반응도가 저하되고, 생존율도 낮음을 보고하였다. TS에 대한 면역조직화학적 염색법에 의하여 stage II 대장암 환자에서 TS 발현정도가 높을수록 생존율과 재발률이 높다는 보고도 있다. (19) Edler 등(20)은 대장암의 예후인자 분석에서 다변량 분석상 Dukes' 병기와 종양조직내의 TS 발현정도가 예후에 관련이 있다고 하였다.

본 연구에서는 TS 발현정도에 따른 5년 생존율의 비교에 있어서 전체적으로 발현이 낮은 군에서 생존율이 높았지만 통계적으로 유의한 값은 얻지 못하였다. 하지만 병기별 분석을 한 결과 Dukes' B2 병기에서 TS 저발현군의 5년 생존율이 88.9%, 고발현군이 50.0%로 통계적으로 유의하게 TS 발현정도가 낮은 경우 생존율이 높은 것을 확인하였다. 이는 같은 병기의 대장암에서, 특히 Dukes' B2에서 동일한 치료를 한 경우 각각 그 치료성적 및 생존율에 영향을 미치는 기타 예후인자들 중 TS가 의미 있는 예후인자임을 시사한다고 할 수 있겠다.

TS의 발현정도가 생존기간에 영향을 주는 이유는 정확히 밝혀지지는 않았으나 TS가 5-FU의 표적효소이고 5-FU를 포함한 항암치료의 반응률과 관련이 있는 것 이외에 TS가 암세포의 분열과 증식에 관여하는 DNA합성효소의 하나이므로 TS치가 암세포 증식과 관련이 있을 것으로 보인다. 이는 이전의 연구에서 G₀기에서 S기로의 세포증식과정에서 TS치가 20배 이상 증가되는 것이 관찰되었고, (21) Pestalozzi 등(22)도 암세포의 증식에 TS의 발현정도가 관여하는 것을 보고하였다. Chu 등(23)은 암세포내에서 TS가 ribonucleo-protein 복합체의 일부로 c-myc mRNA와 결합하는 것을 관찰하였는데 이는 TS가 다른 암 유전자의 조절과정에 관여한다는 것을 의미하는 것으로, TS를 하나의 독립적 예후인

자로 생각할 수 있음을 의미한다.

5-FU 항암화학치료를 시행하게 되면 세포내에서 일련의 과정들이 진행되게 된다. 일단 체내 대사물질인 5-fluorouridine-5'-triphosphate (FUTP)로 대사되어 RNA내로 혼입되면서 RNA를 파괴하는 과정과, 5-FU가 fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP)로 대사되어 deoxyuridine monophosphate (dUMP)대신 TS와 결합함으로써 deoxythymidine triphosphate (dTTP)의 생산을 저해하여 DNA 합성을 방해하는 주된 과정으로 항암효과를 가지게 된다. TS의 역할이 이루어지고 나면 세포들은 toxic metabolites들의 영향을 극복하려고 시도하게 된다. 세포내에서 지속적으로 dUMP의 생산이 증가되나, 반대로 소비가 감소되어 dUMP의 세포내 축적이 이루어지며 결국 TS와의 결합체의 형성률을 감소시킨다. 이러한 과정을 통하여 세포내 DNA 합성에 필수적인 유리 TS를 유지하기 위하여 TS 활성도가 변이 효소의 합성과 함께 증가하게 된다. 이렇게 증가된 TS의 활성도가 결국 5-FU 항암화학치료에 대한 저항성을 나타내게 되며, 암종의 치료성적과도 연관이 되는 것으로 보고 있다. (24) Johnston 등(25)은 대장암과 위선암에 있어서 TS gene의 발현정도가 5-FU 항암화학치료의 효과에 영향을 미친다고 보고하였으며, 전이성 대장암 환자를 대상으로 한 전향적 연구에서 암조직내 TS mRNA나 TS 단백질이 항암제에 반응이 좋은 군에서 더 낮은 결과를 보인다고 하였다. (26)

본 연구에서는 TS 발현정도가 낮은 군의 경우 5-FU 항암화학치료를 시행한 경우의 5년 생존율이 70.3%, 시행하지 않은 경우가 50.0%로 항암화학치료를 시행한 군의 생존율이 통계적으로 유의하게 높았으며, TS 발현정도가 높은 군에서는 유의한 차이를 볼 수 없었다. 항암화학치료를 시행한 예만을 대상으로 분석한 결과 TS 발현정도가 낮은 군의 5년 생존율이 70.4%, 높은 군이 53.1%로 역시 TS 발현정도가 낮은 군에서 생존율이 통계적으로 유의하게 높았다. 이러한 분석을 토대로 종양조직내의 TS 발현정도가 대장암의 수술 후 항암화학치료에 대한 반응에 관여한다고 할 수 있겠다. 그러나 항암화학치료에 대한 반응률이 환자의 생존율과 반드시 일치하지 않기 때문에 본 연구의 결과만으로 TS 발현정도와 항암화학치료의 반응도에 대한 관련여부는 추후 지속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

저자는 본 연구를 통해 대장암 종양조직내 TS 발현정도가 대장암의 예후 및 수술 후 항암화학치료에 대한 반응률에 연관이 있음을 확인할 수 있었으며, 특히 Dukes' B2의 경우 통계적으로 유의한 생존율의 차이를 확인할 수 있었다. 하지만 모든 병기를 포함하는 분석이 대상에의 부족으로 이루어지지 못해 앞으로 더 많은 예를 대상으로 전향적 연구를 시행하여 대장암 종양조직내 TS 발현정도가 전체 생존율에 미치는 영향과 수술 후 항암화학치료에 대한 영향을 확인하여 대장암의 수술 후 항암화학치료의 시행여부 및 약제의 선택, 투여 용량 등의 결정에 유용한 수단으로

사용할 수 있는지를 확인할 필요가 있다고 생각한다.

결 론

본 연구는 대장암 중앙조직내 TS의 발현정도가 대장암에 있어 그 예후를 예측하고 수술 후 항암화학치료의 효과를 평가할 수 있는 인자로서의 역할에 대하여 알아보았다. 결과적으로 Dukes' B2 병기에서 TS 저발현군의 5년 생존율이 통계적으로 유의하게 고발현군보다 높음을 확인할 수 있었으며, 술 후 항암화학치료에 대한 반응률에 있어서도 TS의 발현정도가 낮은 군에서 더 높다는 것을 확인할 수 있어 대장암 중앙내 TS 발현이 대장암의 예후인자로서의 가치와 화학요법의 치료효과를 기대하는 데 도움이 되리라 판단된다. 그러나 TS 발현이 독립적으로 대장암의 예후예측인자로서 가치 및 수술 후 항암화학치료에 대한 반응을 평가할 수 있는 인자로서의 역할을 확인하기 위해 더 많은 예에서 전 병기를 포함하는 분석이 필요하다고 하겠다.

REFERENCES

- 1) Central Cancer Registry Center in Korea. Annual Report of the Central Cancer Registry in Korea (1997. 1. 1~1997. 12. 31). Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea, 1999.
- 2) Skibber JM, Minsky BD, Hoff PM. Cancer of the colon. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA (eds.): Cancer: Principles & Practice of Oncology, 6th ed JB Lippincott Co; 2001. p.1216-71.
- 3) Bruckner HW, Motwani BT. Chemotherapy of advanced cancer of the colon and rectum. *Semin Oncol* 1991;18:443-61.
- 4) Hamilton JM, Sznol M, Friedman MA. 5-Fluorouracil plus levamisole: effective adjuvant treatment for colon cancer. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA (eds.). *Important Advances in Oncology* 1990, JB Lippincott Co, 1990. p 115-30.
- 5) Kane MJ. Adjuvant systemic treatment for carcinoma of the colon and rectum. *Semin Oncol* 1991;18:421-42.
- 6) Moertel CG. Chemotherapy for colorectal cancer. *New Engl J Med* 1994;330:1136-42.
- 7) Washtien WL. Increased levels of thymidylate synthase in cells exposed to 5-fluorouracil. *Mol Pharmacol* 1984;25:171-7.
- 8) Johnston PG, Drake JC, Trepel J, Allegra CJ. Immunological quantitation of thymidylate synthase using the monoclonal antibody TS 106 in 5-fluorouracil-sensitive and -resistant human cancer cell lines. *Cancer Res* 1992;52:4306-12.
- 9) Chu E, Drake JC, Koeller DM, Zinn S, Jamis-Dow CA, Yeh GC, et al. Induction of thymidylate synthase associated with multidrug resistance in human breast and colon cancer cell lines. *Mol Pharmacol* 1991;39:136-43.
- 10) Berger SH, Jehn CH, Johnson LF, Berger FG. Thymidylate synthase overproduction and gene amplification in fluorodeo-

- xyuridine-resistant human cells. *Mol Pharmacol* 1985;28:461-7.
- 11) Johnston PG, Fisher ER, Rockette HE, Fisher B, Wolmark N, Drake JC, et al. The role of thymidylate synthase expression in the prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with recral cancer. *J Clin Oncol* 1994;12:2640-7.
- 12) Itzkowitz SH, Bloom EJ, Kokal WA, Modin G, Hakomori S, Kim YS. Sialosyl-Tn: a novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients. *Cancer* 1990;66:1960-6.
- 13) Witzig TE, Loprinzi CL, Gonchoroff NJ, Reiman HM, Cha SS, Wieand HS, et al. DNA ploidy and cell kinetic measurements as predictors of recurrence and survival in stage B2 and C colorectal cancer. *Cancer* 1991;68:879-88.
- 14) Silvestrini R, D'Agnano I, Faranda A, Costa A, Zupi G, Cosimelli M, Quagliuolo V, et al. Flow cytometric analysis of ploidy in colorectal cancer: a multicentric experiences. *Br J Cancer* 1993;67:1042-6.
- 15) Schroy PC 3rd, Brown Shimer S, Kim K, Johnson KA, Murnane MJ, Yang S, et al. Detection of p21ras mutations in colorectal adenomas and carcinomas by enzyme-linked immunosorbent assay. *Cancer* 1995;76:201-9.
- 16) Smith DR, Ji CY, Goh HS. Prognostic significance of p53 overexpression and mutation in colorectal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 1996;74:216-23.
- 17) Poller DN, Baxter KJ, Shepherd NA. p53 and Rb 1 protein expression: are they prognostically useful in colorectal cancer? *Br J Cancer* 1997;75:87-93.
- 18) Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Danenberg PV, Groshen S, Cohen H, et al. Thymidylate synthase mRNA level in adenocarcinoma of the stomach: a predictor for primary tumor response and overall survival. *J Clin Oncol* 1996;14:176-82.
- 19) Lenz HJ, Danenberg KD, Leichman CG, Florentine B, Johnston PG, Groshen S, et al. p53 and thymidylate synthase expression in untreated stage II colon cancer: associations with recurrence, survival and site. *Clin Cancer Res* 1998;4:1227-34.
- 20) Edler D, Kressner U, Ragnhammar P, Johnston PG, Magnusson I, Glimelius B, et al. Immunohistochemically detected thymidylate synthase in colorectal cancer: an independent prognostic factor of survival. *Clin Cancer Res* 2000;6:488-92.
- 21) Navalgund LG, Rossano C, Muench AJ, Johnson LF. Cell cycle regulation of thymidylate synthase gene expression in cultured mouse fibroblasts. *J Biol Chem* 1980;255:7386-90.
- 22) Pestalozzi BC, McGinn CJ, Kinsella TJ, Drake JC, Glennon MC, Allegra CJ, et al. Increased thymidylate synthase protein levels are associated with proliferation but not cell cycle phase in asynchronous human cancer cells. *Br J Cancer* 1995;71:1151-7.
- 23) Chu E, Voeller DM, Jones KL, Takechi T, Maley GF, Maley F, et al. Identification of a thymidylate synthase ribonucleo-protein complex in human colon cancer cells. *Mol Cell Biol* 1994;14:207-13.

- 24) Spears CP, Gustavsson BG, Berne M, Frosing R, Bernstein L, Hayers AA. Mechanism of innate resistance to thymidylate synthase inhibition after 5-fluorouracil. *Cancer Res* 1988;48: 5894-900.
- 25) Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV, et al. Thymidylate synthase gene and protein expression correlated and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res* 1995;55:1407-12.
- 26) Leichman CG, Lenz HJ, Leichman L, Danenberg K, Baranda J, Groshen S, 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.
-