

폐암세포주에 대한 p53 및 p16^{INK4a}의 복합종양억제유전자요법의 효과

서울대학교 의과대학 내과학교실, 서울대학교 의학연구원 폐연구소
서울대학교병원 임상의학연구소 유전자치료연구소

최승호, 박경호, 설자영, 유철규, 이춘택, 김영환, 한성구, 심영수

= Abstract =

Enhanced Growth Inhibition by Combined Gene Transfer of p53 and p16^{INK4a} in Adenoviral Vectors to Lung Cancer Cell Lines

Seung Ho Choi, M.D., Kyung-Ho Park, M.S., Ja Young Seol, M.S.,
Chul-Gyu Yoo, M.D., Choon-Taek Lee, M.D., Young Whan Kim, M.D.,
Sung Koo Han, M.D., And Young-Soo Shim, M.D.

Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine

Lung Institute of Medical Research Center, Seoul National University

Gene Therapy Laboratory of Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea

Background : Two tumor suppressor genes, *p53* and *p16*, which have different roles in controlling the cell cycle and inducing apoptosis, are frequently inactivated during carcinogenesis including lung cancer. Single tumor suppressor gene therapies using either with *p53* or *p16* have been studied extensively. However, there is a paucity of reports regarding a combined gene therapy using these two genes.

Methods : The combined effect of *p53* and *p16* gene transfer by the adenoviral vector on the growth of lung cancer cell lines and its interactive mechanism was investigated.

Results : An isobologram showed that the co-transduction of *p53* and *p16* exhibited a synergistic growth inhibitory effect on NCI H358 and an additive effect on NCI H23. Cell cycle analysis demonstrated the induction of a synergistic G1/S arrest by a combined *p53* and *p16* transfer. This synergistic interaction was again confir

'본 연구는 1998년 서울대학교병원 호흡기내과 지정연구비(04-1998-005-0)의 지원에 의해 이루어졌음.

Address for correspondence :

Choon-Taek Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine,
28 Yongon-Dong, Chongno-Gu, Seoul 110-744, Korea

Phone : 02-760-2634 Fax : 02-762-9662 E-mail : ctlee@snu.ac.kr

med in a soft agar clonogenic assay.

Conclusion : These observations suggest the potential of a *p53* and *p16* combination gene therapy as another potent strategy in cancer gene therapy. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 50 : 67-75)

Key words : Adenovirus, Interaction, Isobologram, *p53*, *p16*, Lung cancer.

서 론

폐암은 전 세계적으로 암 사망의 주요 원인이 되고 있다. 최근 비약적인 항암치료, 방사선치료 및 수술의 발전에도 불구하고 폐암환자의 실질적인 생명의 연장은 미약하다¹. 그러나 최근의 암의 발생에 대한 유전학적 연구의 발전은 새로운 치료법의 개발 가능성을 제시하여 주고 있다. 유전자치료는 이에 대표적인 예이다. 현재까지 여러 종류의 유전자치료가 임상에 시도되고 있으며 그 중 종양억제유전자치료법이 대표적인 유전자치료법으로 알려져 있다.

종양억제유전자요법이란 발암과정 중에 비활성화된 유전물질 즉 종양억제유전자를 암세포에 다시 넣어 주어 그 기능을 회복시켜 암세포의 사멸을 유도하는 치료법으로 *p53* 및 *p16*이 가장 많이 연구되고 있다².

대표적인 종양억제유전자인 *p53*의 비활성화는 폐암을 포함한 여러 암에서 가장 흔히 발견되는 변이이며³ 또 다른 종양억제유전자인 *p16*은 변이, 소실, 및 hypermethylation 등을 통해 비활성화 되며 폐암 특히 비소세포폐암에서 많이 관찰된다. 특히 *p53* 및 *p16*의 변이는 폐암에서 동시에 관찰되는 경우가 많이 있다⁴.

암유전자치료시 *p53*의 주된 작용기전은 apoptosis의 유도 및 *p21^{WAF}*의 유도를 통한 세포주기의 억제에 있다^{5,6}. *p16*은 *INK4* family에 속하는 대표적인 cell cycle kinase inhibitor로 cyclin D/*CDK4,6* 복합체에 주로 억제작용을 하여 세포주기를 G1/S 위치에서 억제시키는 역할을 한다^{7,8}.

본 연구에서는 이러한 두 종양억제유전자의 작용을 이용하여 이 두 유전자를 동시에 암세포에 이입하고 그 복합효과를 관찰하고자 하였다.

이미 Sandig 등은 아데노바이러스 벡터를 이용하

여 *p53*와 *p16*을 암세포에 동시에 이입하여 암세포에 apoptosis의 유도가 상승적으로 일어나고 이는 *p16*에 의한 *pRb*의 인산화 저하가 암세포를 *p53*과 같은 apoptosis 유도인자에 더욱 예민해지도록 만들기 때문이라고 설명하였다.

본 연구에서는 *p53* 및 *p16*이 모두 비활성화된 폐암세포주를 대상으로 아데노바이러스를 이용하여 *p53* 및 *p16*을 동시에 이입하여 세포성장억제에 대한 상호작용을 isobologram을 이용하여 검증하고 세포주기 및 체외 종양형성능에 미치는 영향을 연구하였다.

대상 및 방법

1. 세포주

NCI H358 및 NCI H23의 두 종류의 인체 비소세포 폐암세포주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)으로부터 구입하였다.

NCI H358(기관지폐포세포암주) 및 NCI H23(폐선암주)은 *p16* 단백질은 생산하지 않으며 *pRb*는 정상적으로 생산하는 세포주이며 NCI H358은 *p53*가 완전소실(homozygous deletion)되어 있으며 NCI H23은 *p53*에 점돌연변이가 있는 세포주이다. 세포는 5% CO₂ 배양기내에서 10% 우태혈청을 포함한 RPMI1640 배양액에서 배양하였다.

2. 유전자재조합 아데노바이러스-p53(adenovirus-p53) 및 아데노바이러스-p16(adenovirus-p16) 제작

Adenovirus-p53 및 adenovirus-p16은 본 연구실에서 이미 제작되어 그 효과를 보고하였다^{10,11}. 간단히

설명하면 p53 및 p16의 cDNA의 전체 염기를 각각 아데노바이러스 제작용 shuttle 벡터인 pAC CMVpLpA(미국 Texas Southwestern Medical Center의 Robert Gerard 교수로부터 제공 받음)의 pUC19 polylinker의 적당 제한효소 위치에 클로닝한 후 각각의 pAC CMV-p53 및 pAC CMV-p16을 pJM17과 함께 인산칼슘침전방법으로 293 cell에 이입하고 세포독성 현상(cytopathic effect : CPE)이 나타나 재조합 아데노바이러스가 생산될 때까지 배양하였다. 생산된 아데노바이러스는 plaque assay를 통해 순수분리 후 DNA 염기분석 및 Western blot 분석을 통해 성질을 확인하였다. 본 아데노바이러스는 E1부위의 아데노바이러스 게놈이 소실되고 CMV promotor를 가진 스스로는 복제할 수 없는 아데노바이러스이다. 고농도의 아데노바이러스 농축액은 CsCl 초원심분리법을 이용하여 준비되었다¹². 대조 아데노바이러스로 adenovirus- β -gal 혹은 adenovirus-null을 사용하였다.

3. Western blot 분석을 이용한 p53 및 p16 단백질의 생산 확인

NCI H358 및 NCI H23세포주를 20moi(multiplicity of infection)의 adenovirus-p53 및 adenovirus-p16로 1시간 동안 감염 후 감염 안된 바이러스를 제거 후 완전배지에서 48시간 동안 배양 후 단백질을 추출하였다. Western blot 분석은 Amersham사의 ECL system을 이용하여 시행하였다.

4. Adenovirus-p53 및 adenovirus-p16의 단독 투여가 암세포성장에 미치는 영향

Adenorus-p53 혹은 adenovirus-p16을 NCI H358 및 NCI H23에 단독으로 투여 시 암세포의 성장에 미치는 영향을 알기 위해 96 well 배양판에 암세포를 5×10^3 /well로 분주 후 24시간 배양한 다음 adenovirus-p53을 0, 1, 5, 10, 20, 50, 및 100moi

로 1시간 동안 감염 후 완전배양액내에서 96시간 배양 후 세포의 성장을 MTT assay를 이용하여 측정하였다.

5. Adenovirus-p53 및 adenovirus-p16의 복합투여가 암세포성장에 미치는 영향 분석

위의 두 종류의 폐암세포주를 각각 96 well 배양판에 well 당 5×10^3 개의 세포를 분주한 후 24시간 후 adenovirus-p53를 0, 5, 10, 20, 50, 75, 100 moi로, adenovirus-p16은 역시 0, 5, 10, 20, 50, 75 및 100moi의 농도로 모두 adenovirus-p53 및 adenovirus-p16의 농도의 조합하에 well에 감염시켰다. 한 종류의 농도의 조합을 3 well에 실시하였다. 96시간 동안 5% CO₂ 배양기에서 배양 후 세포의 농도를 MTT 분석을 통해 측정하였다. 암세포 성장에 대한 adenovirus-p53 및 adenovirus-p16의 상호작용은 isobologram을 통해 분석하였다^{13,15}.

6. 유세포분석기를 이용한 세포주기의 변화 분석

Adenovirus-p53 및 adenovirus-p16에 의한 세포주기의 변화를 알기 위해 암세포주를 adenovirus-p53(20moi), adenovirus-p16(20moi) 및 adenovirus-p53(10moi)+adenovirus-p16(10moi)의 세 군으로 감염시켰다. 48시간 배양 후 미국 Becton Dickinson사의 CycleTest™ Plus Reagent Kit의 프로토콜을 따라 DNA histogram을 시행하여 세포주기의 변화를 분석하였다.

7. Soft agar clonogenic assay를 이용한 체외 종양 형성능 분석

NCI H358 및 NCI H23세포주를 adenovirus-p53(20moi), adenovirus-p16(20moi) 및 adenovirus-p53(10moi)+adenovirus-p16(10moi)의 세 군으로 나누어 감염시킨 후 세포를 떼어낸 후 6 well 배양

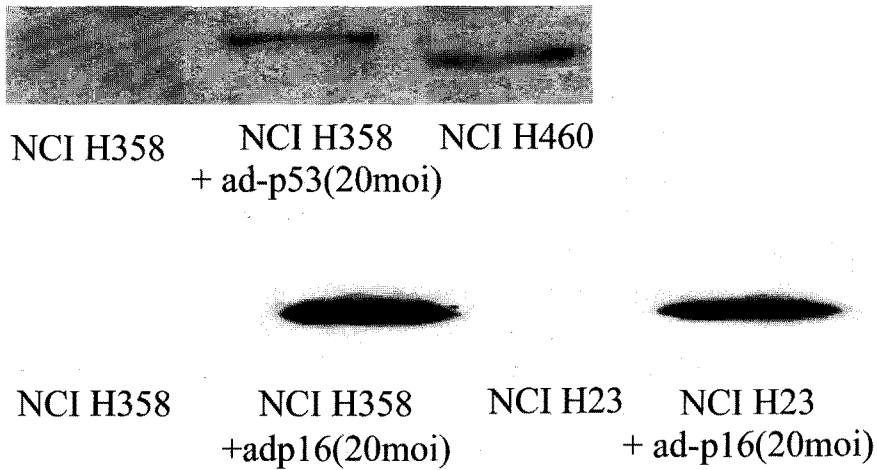


Fig. 1. Western blot assay for p53 and p16 in adenovirus-p53 and adenovirus-p16 transduced lung cancer cell lines. (a) Production of p53 from adenoviurs-p53 transduced NCI H358 was detected. NCI H460 expressed endogenous p53. (b) Production of p16 from adenovirus-p16 transduced NCI H358 and NCI H23 which do not express endogenous p16.

판에 1% agarose underlay를 깔고 위에 0.2% agarose에 5×10^3 개의 암세포를 섞은 후 분주한 다음 3주간 배양 후 125 μ m이상의 콜로니를 측정하여 체외 종양형성능을 측정하였다¹⁶.

결 과

1. Adenovirus-p53 및 adenovirus-p16으로 감염된 폐암세포주로부터 p53 단백질 및 p16단백의 생산확인

Western blot 분석을 통해 adenovirus-p53 혹은 adenovirus-p16으로 감염된 NCI H358 및 NCI H23 세포에서 p53 단백질 및 p16 단백질이 생산되고 있음을 확인 할 수 있었다(Fig. 1).

2. Adenovirus-p53 및 adenovirus-p16 단독 투여 시 암세포 성장에 미치는 영향

Adenovirus-p53 및 adenovirus-p16 단독 투여시

두 폐암세포주에서 투여 농도에 비례하여 성장이 억제됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 2).

3. Adenovirus-p53 및 adenovirus-p16의 복합 투여의 효과

Adenovirus-p53와 adenovirus-p16간의 상호 작용을 알기 위해 0, 1, 5, 10, 10, 50, 100moi의 농도의 모든 조합으로 두 바이러스를 투여 후 세포의 성장을 MTT 방법으로 측정된 상호 작용을 isobologram을 이용하여 분석한 결과 NCI H358에서는 상승작용 (synergistic)을, NCI H23에서는 부가적 작용 (additive)을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

4. 세포주기에 대한 p53와 p16의 영향

유세포분석기를 DNA histogram에서 두 세포주 모두에서 adenovirus-p16은 adenovirus-p53 보다는 더 강력한 G1/S 억제현상을 보였다. Adenovirus-p16과 adenovirus-p53를 동시에 각각 10moi씩 투

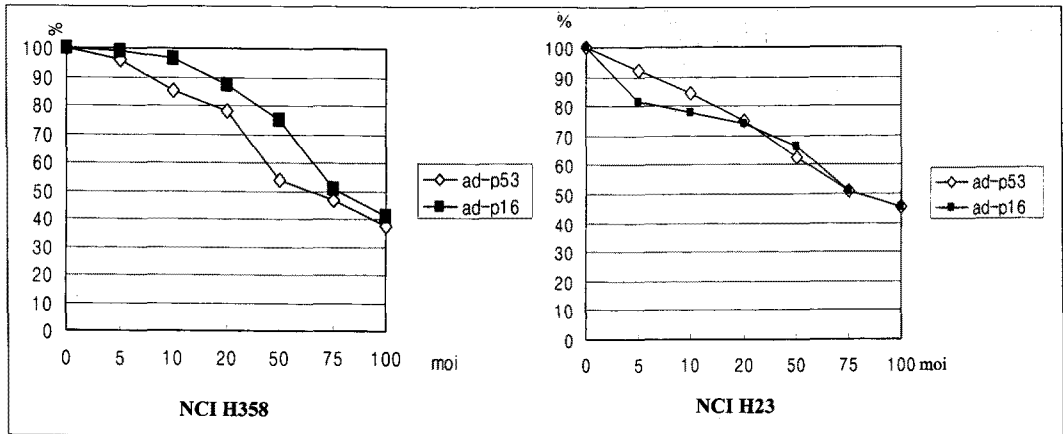


Fig. 2. Dose-response curve of adenovirus-p53 and adenovirus-p16 induced growth suppression in NCI H358 and NCI H23.

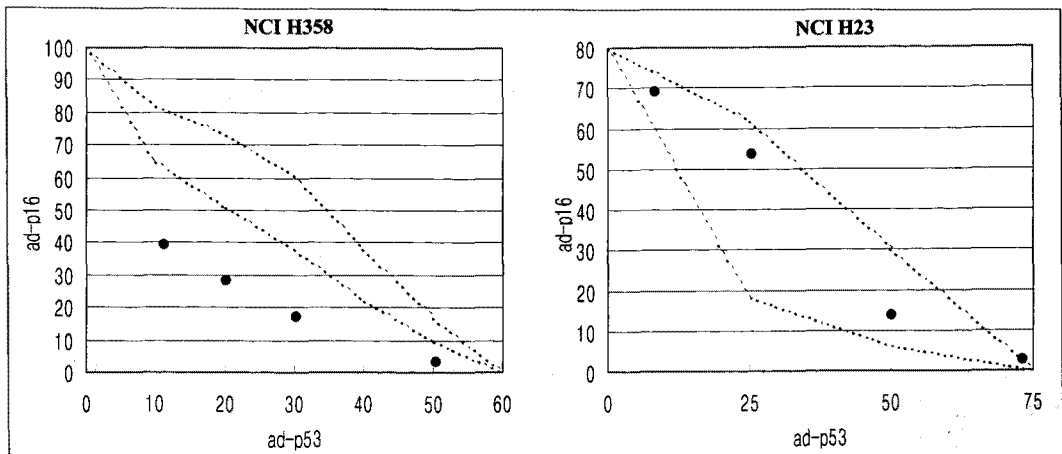


Fig. 3. Isobologramic analysis of interaction between adenovirus-p53 and adenovirus-p16 in NCI H358 and NCI H23. The area within dashed line is the envelope of additivity. The left lower area from the envelope is the area of synergy. The synergistic interaction was found in NCI H358 but additive interaction was found in NCI H23. (Round dots mean actual dose combinations of ad-p53 and ad-p16 resulting IC50)

여한 경우는 adenovirus-p53(20moi) 나 adenovirus-p16(20moi)를 단독으로 투여한 경우보다 약간 강한 G1/S 억제현상을 보였다. Adenovirus-p53에 비해 adenovirus-p16의 세포주기억제 효과가 현저한 점으로 보아 adenovirus-p53(10moi)와 adenovirus-p16(10moi)를 복합투여한 경우가 adenovirus-p16(20moi) 단독 투여한 경우보다 G1/S

억제가 강력한 점은 서로간의 상승작용을 의미한다 (Fig. 4).

5. 체외 종양형성능력의 억제

체외종양형성 능력의 변화를 알기 위해 시행한 soft agar clonogenic assay에서 adenovirus-p53(20moi)

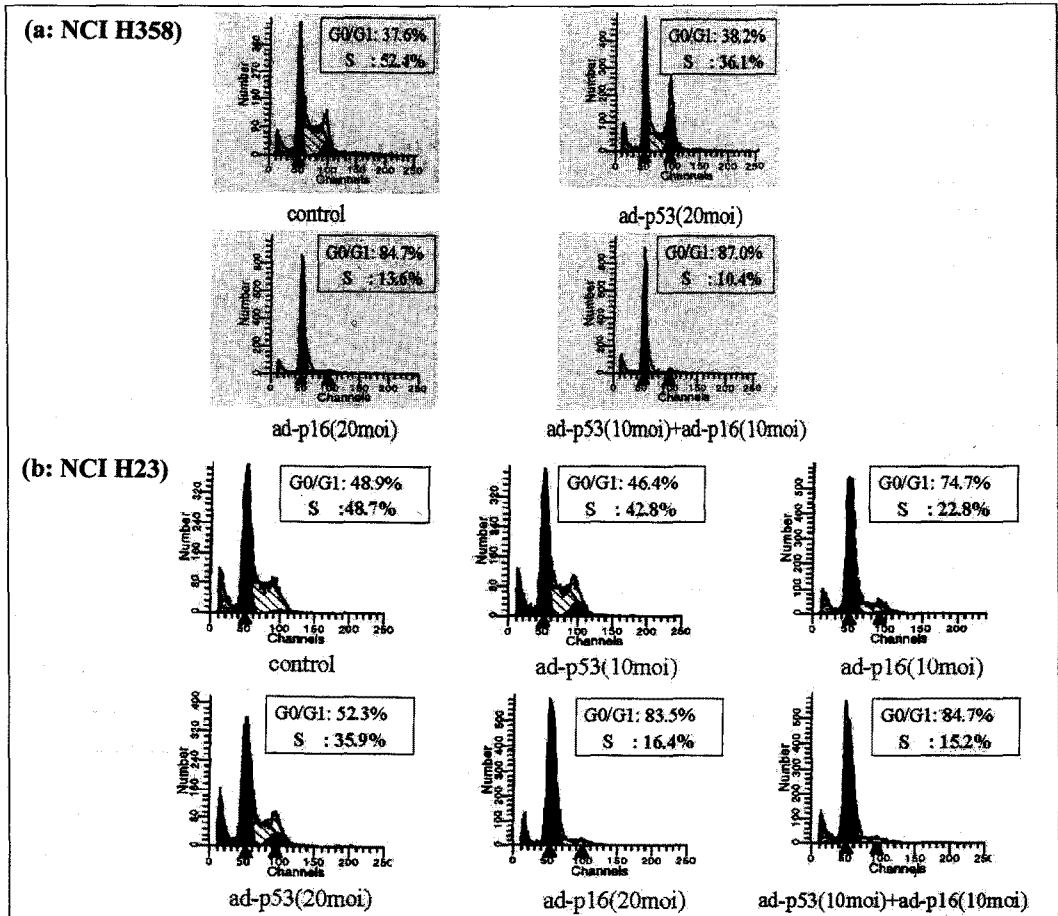


Fig. 4. The change of cell cycle analyzed by flow cytometry in adenovirus-p53 and adenovirus-p16 transduced NCI-H358(a) and NCI H23(b).

Flow cytometric analysis shows marked increase in G0/G1 phase and concomitant decrease in S phase in both cell line. Cell cycle arrest is more prominent in combined adenovirus-p53 and adenovirus-p16 transduced cell line.

및 adenovirus-p16(20moi)으로 처리한 폐암세포주는 종양형성능력이 현저히 감소하였고 adenovirus-p53(10moi) 및 adenovirus-p16(10moi)를 동시에 투여한 경우 단독 투여시보다 더 강력한 억제현상을 관찰할 수 있었다(Table 1).

고 찰

종양억제유전자요법은 현재 여러 말기 암환자를 대상

으로 한 임상연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중 p53와 p16은 가장 많이 연구되고 임상에 적용되고 있다. 그러나 우수한 동물실험 결과에 비해 임상연구에서의 효과는 미약하다. 이를 극복하기 위한 방법으로 두 종류 이상의 유전자를 같이 처리하는 복합유전자요법이 연구되고 있다. 복합유전자요법에는 서로 완전히 기전이 다른 유전자를 복합하거나 서로 기전이 비슷한 유전자를 복합하는 방법이 있다. 본 연구에서는 서로 비슷한 기전을 가진 두 종류의 종양억제 유전

Table 1. Showing the suppression of colony formation in soft agar clonogenic assay by adenoviruses-p53 and -p16. The combined transduction with both adenovirus-p53 (10moi) and -p16 (10moi) induced stronger suppression than a single transduction using either adenovirus-p53 (20moi) or -p16 (20moi). (Number of colonies)

	Control	Adenovirus-p53 (20moi)	Adenovirus-p16 (20moi)	Ad-p53(10moi)+ ad-p16(10moi)
NCI H358	630 ± 40	48 ± 11	40 ± 6	27 ± 4*
NCI H23	402 ± 89	161 ± 32	38 ± 11	16 ± 5*

*Statistically significant than ad-p53 and ad-p16 ($p < 0.05$ by unpaired t test)

자요법의 복합투여효과를 연구하였다².

p53는 앞에서 설명한대로 손상을 받은 세포에 apoptosis를 유도하거나 p21^{WAF}의 유도를 통한 G1/S 정지를 간접적으로 일으킨다^{5,6}. p21^{WAF}는 WAF family에 속하는 세포주기억제인자이며 p16은 INK4 family의 대표적인 세포주기억제인자로 이 둘이 복합적으로 작용시 세포주기의 진행을 여러 단계에서 억제할 수 있어 더 효율적인 것이라고 생각된다^{17,18}. 본 연구의 결과에서도 adenovirus-p53(20moi)이나 adenovirus-16(20moi)을 단독투여시 유도되는 G1/S arrest보다 adenovirus-p53(10moi) 및 adenovirus-p16(10moi)를 동시에 투여한 경우의 G1/S arrest가 더 현저하였다. 특히 주된 작용이 G1/S arrest인 adenovirus-p16을 20moi의 농도로 투여한 것 보다 adenovirus-p16을 10moi만 사용하고 adenovirus-p53을 10moi만 사용하여 총 adenovirus의 용량을 20moi로 같이 한 경우가 동등하거나 더 강력한 효과를 보인 점은 p53와 p16의 상호작용이 상승적으로 일어났음을 의미한다.

본 연구에서 직접 규명되지는 않았지만 p53에 의한 apoptosis의 유도에도 p16에 의한 G1/S 정지가 상승적 작용을 한다는 사실이 증명되어 있다. Sandig 등⁹은 adenovirus-p53와 adenovirus-p16을 이용한 복합 실험에서 p16에 의한 pRb의 인산화 저하가 세포를 p53과 같은 apoptosis 유도 인자에 대한 민감성을 높일 것이라 주장하였다. 이는 Kinoshita 등은 연구에서도 제시되었다¹⁹.

본 연구에서는 p53와 p16의 상호작용을 다른 각도

에서 연구하였다. p53에 의한 apoptosis의 유도와 간접적인 G1/S 정지 및 p16에 의한 G1/S 정지가 궁극적으로 세포 성장의 억제를 유도하므로 두 종양억제 유전자의 상호 작용을 isobologram으로 측정하였다. Isobologram은 유사한 효과를 나타내는 두 종류의 약제를 복합 사용시 상호작용을 검증하는 방법으로 약제를 단독 투여시의 억제농도-반응곡선에서 복합투여시 반응을 추론하여 상호작용을 측정하는 방법이다¹³⁻¹⁵. 본 연구에서는 p53 및 p16의 활성이 억제되어 있는 두 폐암세포주를 대상으로 검사한 결과 NCI H358에서는 상승작용을, NCI H23에서는 부가적 작용을 보임을 관찰 할 수 있어 p53 및 p16의 복합투여의 이론적 타당성을 검증할 수 있었다.

이러한 세포성장 억제 및 세포주기 억제에서의 상호작용은 soft agar clonogenic assay를 통한 체외 종양형성능 검사에서도 증명되었다. 즉 adenovirus-p53(10moi) 및 adenovirus-p16(10moi)의 복합투여가 20moi의 adenovirus-p53 혹은 adenovirus-p16의 단독 투여보다 강력한 종양형성능력의 억제를 보였다.

체외에서 폐암세포주를 이용한 검사라는 제한점은 있으나 이상의 결과는 두 종류의 종양억제유전자를 이 두 종류의 유전자 기능이 소실된 암세포에 투여함으로써 세포주기 억제 및 암세포의 성장을 억제하는 상승 또는 부가적인 효과를 보여 우수한 전임상 결과에도 불구하고 임상연구에서 한계를 보이고 있는 p53 단독 종양억제유전자 요법^{20,21}의 새로운 돌파구가 될 가능성을 보여 주었다. 특히 비소세포폐암에서 p53 및

p16의 종양억제유전자의 기능이 동시에 소실되어 있는 경우가 많아 이 복합유전자요법의 좋은 대상이 되리라 생각된다.

요 약

배 경 :

대표적인 종양억제유전자인 p53 및 p16은 세포주기 조절 및 자연괴멸 유도에서 서로 다른 역할을 하고 있으며 폐암에서는 동시에 비활성화 되어 있는 경우가 흔하다. 이 종양억제유전자를 동시에 이입시 서로 상호작용을 통해 효과가 증진되리라 기대되고 있다.

방 법 :

본 연구에서는 p53 및 p16을 아데노바이러스 벡터를 이용하여 폐암세포주에 동시에 이입하여 그 상호작용을 관찰하였다. 복합투여시 세포성장곡선을 분석하여 isobologram을 이용한 상호작용을 검증하고 세포주기의 변화 및 체외종양형성능의 변화도 관찰하였다.

결 과 :

Isobologram을 이용한 분석에서 adeno-virus-p53와 adenovirus-p16의 복합투여는 NCI H358에서는 상승적인 성장억제를, NCI H23에서는 부가적인 성장억제를 보였다. 유세포분석기를 이용한 세포주기의 분석 및 체외종양형성능 검사에서도 p53 및 p16의 복합투여시 단독 투여보다 강한 억제효과를 보였다.

결 론 :

이러한 상승적인 p53 및 p16의 상호작용은 이 복합요법이 새로운 유전자치료법으로 발전할 수 있는 가능성을 보였다.

참 고 문 헌

1. Ginsberg RJ, Kris MG, Armstrong JG : Cancer of the lung. In : DeVita VTJ, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Cancer : Principles and practice of oncology. 5th ed. Philadelphia : Lippincott, Inc.; 1997. p. 858-911.

2. Lee C-T, Kubba S, Coffee K, Carbone DP. Chapter 17. Gene therapy. In : Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH, Turrisi AT, Minna JD, editors. Lung cancer, Principle and practice. 2nd ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p. 318-33.
3. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. Nature 1989;342:705-8.
4. Otterson GA, Kratzke RA, Coxon A, Kim YW, Kaye FJ. Absence of p16INK4 protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wild type RB. Oncogene 1994;9:3375-8.
5. Jacks T, Weinberg RA. Cell cycle control and its watchman. Nature 1996;265:643.
6. el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. Cancer Res 1994;54:1169-74.
7. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. Science 1994;264:436-40.
8. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. Nature 1994;368:753-6.
9. Sandig V, Brand K, Herwig S, Lukas J, Bartek J, Strauss M. Adenovirally transferred p16INK4/CDKN2 and p53 genes cooperate to induce apoptotic tumor cell death. Nature Med 1997;3: 313-9.
10. 김미숙, 권희충, 홍석일, 이춘택, 이승훈. 신경교종 세포주에서 아데노바이러스 벡터를 이용한

- wild type p53 유전자의 전달효과. 대한암학회지 1998;30:1026-33.
11. Lee JH, Lee CT, Yoo CG, Hong YK, Kim CM, Han SK, et al. The inhibitory effect of adenovirus-mediated p16^{INK4a} gene transfer on the proliferation of lung cancer cell line. *Anticancer Res* 1998;18:3257-61.
 12. Becker TC, Noel RJ, Coats WS, Gerard RD. Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells. *Methods Cell Biol* 1994;43:161-89
 13. Barenbaum MC. What is synergy? *Pharmacol Rev* 1989;41:93-141.
 14. Steel GG, Peckham MJ. Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1979;5:85-91.
 15. Horio Y, Hasegawa Y, Sekido Y, Takahashi M, Roth JA, Shimokata K. Synergistic effects of adenovirus expressing wild-type p53 on chemosensitivity of non-small cell lung cancer cells. *Cancer Gene Ther* 2000;7:537-44.
 16. Lee C-T, Wu S, Gabrilovich D, Chen H, Nadaf-Rahrov S, Ciernik IF, Carbone DP. Antitumor effects of an adenovirus expressing antisense insulin-like growth factor I receptor on human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1996;56:3038-41.
 17. Hall M, Peters G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res*, 1996;68:67-108.
 18. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Dev.*, 1999;13:1501-12.
 19. Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Mishina T, Akie K, Nishi M, Hiroumi H, et al. Altered p16^{INK4} and retinoblastoma protein status in non-small cell lung cancer: potential synergistic effect with altered p53 protein on proliferative activity. *Cancer Res* 1996;56:5557-62
 20. Zhang WW, Fang X, Mazur W, French BA, Georges RN, Roth JA. High-efficiency gene transfer and high-level expression of wild-type p53 in human lung cancer cells mediated by recombinant adenovirus. *Cancer Gene Ther* 1994;1:5-13
 21. Swisher SG, Roth JA, Nemunaitis J, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:763-71