대한임상검사학회지 : 40권 제1호, 41-47,
2008
ISSN 1738-3544

대장암에서 17, 18번 염색체의 이형접합성 소실

세명대학교 임상병리학과

이 재 식

Loss of Heterozygosity (LOH) on 17th and 18th Chromosome from Colorectal Carcinoma

Jae-Sik Lee

Department of Clinical Laboratory Science, Semyung University, Jecheon 390-711, Korea

Colorectal carcinoma is occurred frequently to Korean and so ranked the fourth from various cancers. Due to western dietary life, this cancer has been increased continually. Therefore, the study will be needed to find a candidate gene involved in the development and progression of colorectal carcinoma and to diagnose and treatment helpfully. The striking feature from cancer suppressor genes is known for LOH (loss of heterozygosity), which is the method to find allele genetic loss or mutation of cancer cell. The purpose of this study was designed to find a carcinogenic gene from colon cancer using microsatellite marker on 17th and 18th chromosome from 30 subjects. The LOH was investigated in order of D18S59 57% (17/30), TP53CA 50% (15/30), D18S68 47% (14/30), D18S69 43% (13/30). The genetic mutation depends on loci of colorectal carcinoma was shown higher with 2.44 from colon cancer than with 1.25 from right colorectal carcinoma ($p<0.032$). The genetic mutation with lymph nodes was investigated higher with 2.69 at mutated group than with 1.14 at non-mutated group ($p<0.003$). At genetic mutated pattern depends on disease stage, there was higher significant difference at III-IV stage 2.50 than that of I-II stage 1.17, respectively ($p=0.015$). There was no difference at comparison between histological classification and serological CEA increase. The loss on 18q21 found in this study is highly recurrence loci and was observed 43% for Korean with high recurrence. Therefore, LOH is a very useful tool to detect 18q21 loci in clinical application, prior to the treatment of colorectal carcinoma. After the operation of colorectol carcinoma, the efficient application using LOH at operated part tissue which is designed to protect the recurrence as well as its cure will be needed.

Key Words : LOH (loss of heterozygosity), Colorectal carcinoma, Suppressor gene, Microsatellite marker, Chromosome

I. 서 론

대장암은 서구사회에서 흔히 발병하는 악성종양이며, 미국의 경우 사망률 2위에 해당된다(Gupta 등, 2005). 한국인에 있어서 대장암의 발생률과 사망률도 지난 10년간의 통계에 의하면, 어떤 장기보다 높은 증가율을 나타내고 있으며, 1999년 이후 현재까지 4번째로 많이 발생되는 암으로써, 생활양식의 서구화 등으로 인해 매년 증가 추세에 있다(송 등, 2007).

일반적으로 대장암 발생의 중요 위험자로서 식습관 등

교신저자 : 이재식, (우) 390-711 충북 제천시 신월동 579, 세명대학교 임상병리학과
Tel : 043-649-1418, 011-248-3865
E-mail : jslee0215@semyung.ac.kr

의 환경적 요인과 유전적 요인 등이 있다. 암 발생에 대한 유전적 요인으로서 분자생물학적 변화는 암 유전자와 암 억제 유전자 사이의 단계적 유전자 변화에 의한 것으로 알려져 있다. 즉 암 유전자가 활성화되거나 암 억제 유전자가 불 활성화되면 이들 간의 균형을 상실하게 되어 비정상적인 세포의 성장이 촉진되며, 이 결과로 암이 발생하는 것으로 알려져 있다.

지금까지 보고된 바에 의하면 대장암과 관련된 발암 유전자로 *K-ras, c-met, c-src,* 암 억제 유전자로 *DCC, APC, p53* 등이 보고되고 있으며, *DCC* 유전자의 이형접합성 소실(loss of heterozygosity, 이하 LOH)이 예후와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Font 등, 2001).

암 억제 유전자들의 가장 큰 특징으로 LOH가 알려지고 있는데, LOH란 정상세포와 비교하여 암세포의 경우에 한 대립 유전자가 결손 되어 있거나 결손은 되지 않았어도 변이가 일어나는 경우를 지칭하는 것으로 LOH를 통하여 대장암에서의 암 억제 유전자의 loci를 찾고자 하는 노력들이 시도되어 왔다(Zenklusen 등, 1995; Garcia-Patiño 등, 1998; Forslund 등, 2001; Kambara 등, 2001).

최근 대장암의 진단과 치료방법의 발달로 수술 후, 방사선 치료와 항암치료 등의 보조적 치료요법을 통해 생존율이 많이 향상되었음에도 불구하고 재발률이 30~40%로 높게 나타나고 있다(송 등, 2007).

따라서 대장암 발생 환자의 재발의 위험 및 악성도와 연관된 새로운 예후 인자를 파악하여 보조적 항암치료에 사용하는 것이 도움이 되는 만큼, 염색체 17p, 18q 부위의 microsatellite marker 4개를 이용한 LOH로, 대장암 발암 기전에 중요한 역할을 할 수 있는 유전자 및 치료와 예후 결정에 도움이 되는 유전자를 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

LOH 분석을 위해서, 2000~2001년 부산의 K병원에서 수술 받은 대장암 환자 30예의 조직을 제공받아 실험에 사용하였다. LOH 분석에는 동일 환자의 종양 조직과 정상 조직에서 각각 얻은 DNA를 이용하였으며 환자의 임상 양상을 제시하였다(Table 2). 대상 중 남자가 14예, 여자는 16예이었고, 평균연령은 55세(32~80)이다. 병기별로는 stage I이 2예, stage II가 10예, stage III이 15예, stage IV가 3예였으며, 대장암의 병기 결정은 AJCC(American Joint Committee on Cancer) 기준에 따랐다. 조직형 별로는 고분화형이 17예, 중분화형이 8예, 저분화형이 3예, 점액성 암이 2예였다.

2. DNA의 추출

종양조직과 정상조직을 가위로 잘게 자른 후 Genomic DNA purification kit(Promega, USA)로 DNA를 추출하였다. 먼저 nuclei lysis 용액에 잘게 자른 조직과 10 mg/mL의 proteinase K 용액을 넣고 55℃ 항온수조에서 하룻밤 방치 시켜 조직을 완전히 용해시켰다. 다음 RNase을 넣어 RNA를 제거하였고, protein precipitation solution으로 단백질을 침전시켰다. 상청액을 조심히 옮겨 100% ethanol을 넣어 DNA가 보이면, 75%, 95% ethanol 순으로 세척하였다. 세척한 DNA를 말린 후, DNA rehydration 용액으로 잘 녹여서 DNA를 추출하였다. DNA 농도는 실험에 적합하도록 0.1~0.9 mg/mL으로 조절하였으며, A_{260} ratio는 1.6~1.8에 해당되는 것만 실험에 사용하였다.

3. Microsatellite oligonucleotide primer 합성

원하는 primer의 cytogenetic localization을 여러 문헌과 Genbank에서 검증된 염기서열을 찾았다(Table 1). 또한 primer sequence로 PCR에서의 2차 구조 형성을 예측하는 program으로 안정적이고 sequence가 긴 것으로 primer를 고안하였다. Primer의 합성은 GenoTech(Korea)에 의뢰하였다.

4. PCR에 의한 microsatellite의 증폭

주형이 될 유전체 DNA의 농도가 50 ng/μL 되도록 TE buffer로 희석한 후 사용하였으며, PCR premix(Bioneer, Korea) tube에 주형 DNA 100 ng, forward, reverse primer를 각각 10 pmol 넣은 후, 3차 멸균 증류수로 20 μL가 되도록 반응 부피를 맞추어 PCR을 시행하였다. 각 primer에 대한 최적 결합 온도를 찾기 위해 조건을 바꿔가며,

Table 1. Primer sequence of the microsatellite markers

Name	Cytogenetic localization	Primer sequence	Annealing temp (℃)
TP53CA	17p	5'-ACTGCCACTCCTTGCCCCATT-3' 5'-AGGGATACTATTCACCCCGAGGTG-3'	57
D18S59	18p11.32-18p11.31	5'-GGGGCACAAGACAGATAGAT-3' 5'-CCTACCAGAATGTGAACGAC-3'	56
D18S68	18q12-18q22.1	5'-ATGGGAGACGTAATACACCC-3' 5'-ATGCTGCTGGTCTGAGG-3'	60
D18S69	18q21-18q21.3	5'-CATTAGCAGTCTGGAAATCCTC-3' 5'-CGCTATTGTACTGAAAACCTGA-3'	56

Table 2. Mean number of chromosomal losses and total number of events per tumor in colorectal carcinoma according to the location, the level of serum CEA, histological type and stage.

Variables	Cases	Deletion
Location		
Right colon	12	1.25
Rectum	18	2.44
p-value		0.032
Serum CEA		
≤5 (ng/mL)	16	1.93
>5 (ng/mL)	14	2.00
p-value		0.91
Differentiation		
Well	17	1.88
Moderate to poor	13	2.08
p-value		0.735
Lymph node		
Negative	14	1.14
N1-3	16	2.69
p-value		0.003
Stage		
Ⅰ-Ⅱ	12	1.17
Ⅲ-Ⅳ	18	2.50
p-value		0.015
Total	30	

얇고 확실한 band가 보일 때까지 반복 실험을 하였다. PCR은 94℃에서 5분간 초기 열 변성을 시행한 다음, 94℃ 변성 30초, primer별 최적 결합 온도(Table 1)에서 30초, 72℃ 합성 30초로 30회 순환시켰으며, 마지막 합성은 72℃에서 5분간 시행하였다. PCR product의 재현성을 확인하고자 각 primer별로 3회 이상 PCR을 시행하였고, 2% agarose gel 상에서의 크기와 band를 비교하였다. 각 primer별로 재현성이 확인된 후 실험에 사용하였다.

5. DNA sequencing gel 및 전기영동

DNA sequencing gel은 acrylamide/bis-acrylamide, urea (Sigma, USA), 1× TBE를 사용하여 6% polyacrylamide gel을 만들었다. Gel plate의 크기는 33 cm × 40 cm × 4 mm 이고, 전기영동은 Model S2 sequencing gel eletrophoresis apparatus(Life Technologies, USA)를 사용하였다. 전기영동 buffer는 1× TBE를 사용하였으며 준비된 gel은 1시간이상 pre-run하였다. PCR product와 loading solution(95% formamide, 10 mM NaOH, bromphenol blue, xylene blue)을 2:1 비율로 섞어서 94℃에서 5분간 변성시킨 다음, 얼음에서 급냉한 후 loading하였으며, 1,500 V에서 3시간 이상 전기영동 하였다.

6. Silver 염색 및 판정

전기영동이 끝난 gel은 silver 염색 kit(Bioneer, Korea)를 사용하였고, 4단계 고정(fixing), 강화(enhancing), 염색(staining), 현상(developing) 과정을 거쳐 현상된 gel plate는 건조 후, computer scanner에서 영상을 받아 자료로 보관하였다. 각 해당 band의 밀도를 측정하여 정상세포보다 암세포에서 한 allele이 50% 이상 감소된 경우를 LOH로 판정하였다.

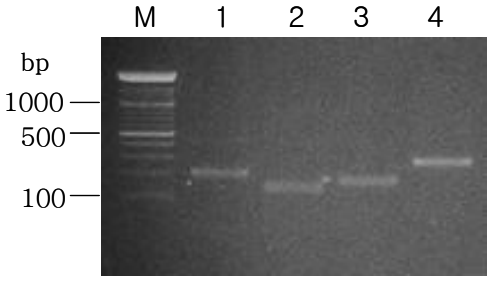
7. 통계학적 분석

비교유전자 교잡법에 의해 확인된 유전자 변화의 수와 대장암의 위치, 조직학적 분화도, 림프절 전이, 병기별, 혈청 CEA 증가 변수와의 상관관계를 비교하였다. 이는 통계(SPSS)프로그램을 사용하여 검증하였으며, p-value가 0.05이하인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

III. 결 과

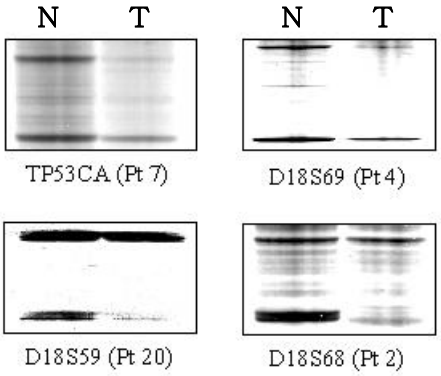
1. Loss of heterozygosity 발현

Table 1에 표시 된 microsatellite marker들을 사용하여 tumor와 normal DNA를 주형으로 PCR을 시행하고, 각 marker마다 예상되는 크기의 PCR산물이 증폭되는지를 관찰하였다. 그 결과 각 marker마다 예상되는 범주 내의 PCR산물이 관찰되어 microsatellite marker에는 이상이 없음을 알 수 있었다(Fig. 1).



M : DNA size marker
1 : TP53CA 2 : D18S59
3 : D18S68 4 : D18S69

Fig 1. PCR products of microsatellite markers



N : normal tissue, T : tumor tissue

Fig 2. Loss of heterozygosity at chromosome in colorectal carcinoma by silver stain

LOH의 검출 결과를 microsatellite marker별로 비교하여 보

면, D18S59 57%(17/30), TP53CA 50%(15/30), D18S68 47%(14/30), D18S69 43%(13/30)순으로 관찰되었다(Fig. 2).

2. 대장암 위치, 림프절 변이, 병기, 조직학적 분류, 혈청 CEA의 차이

대장암 위치에 따른 유전자 변이 양상은 우측 대장암에 비해 직장암에서 결실(deletion)이 1.25개:2.44개로서 높았으며($p<0.032$), 림프절 변이에 따른 유전자 변이 양상은 전이가 있는 군이 없는 군보다 2.69개:1.14개로 높았다($p<0.003$). 병기별에 따른 유전자 변이 양상은 I-II 병기보다 III-IV 병기에서 1.17개:2.50개로 유의한 차이점이 나타났으며($p<0.015$), 조직학적 분류 및 혈청 CEA 증가군에 대한 비교는 큰 차이가 없었다(Table 2).

IV. 고 찰

한국인에 있어서 대장암 장기 부위별 발생 빈도는 1987년 5.9%에서 1999년 9.9%, 2007년 11.2%로 증가 추세이며 4대 암의 하나로 등록되었다(윤 등, 2007). 이는 미국이나 서유럽 국가들처럼 서구화되는 식생활 등으로 인해 빠른 속도로 지속적인 증가가 예상된다. 따라서 대장암의 발생과 진행에 관계되는 유전자를 찾아 진단과 더불어 치료에 도움을 주기 위한 노력이 필요 하며, 많은 실험들이 국내외에서 시도되고 있다(Zenklusen 등, 1995; Garcia-Patiño 등, 1998; Forslund 등, 2001; Kambara 등, 2001).

이형접합성 소실 실험방법의 원리는 인체 게놈 상의 염색체에 풍부하게 분포되어 있고, 높은 다양성과 다형성을 보이는 microsatellite를 이용한다. 즉 반복 염기서열의 특징을 이용하며, 필요로 하는 염색체 위치의 marker를 제작하여 사용한다. 방법은 추출된 종양 DNA와 정상 DNA를 중합연쇄반응으로 증폭한 후, product를 sequencing gel에 분주하여 전기영동을 하고, silver stain하여 각 band간의 밀도의 비를 측정한, 종양 유전자 수(copy)의 변화를 측정하는 것이다(Bocker 등, 1997).

대장암은 다른 암에 비해서 유전적 요소에 의한 암의 발병 과정이 잘 알려지고 있다. Vogelstein의 대장암 다단계 발병 모델에 의하면, 정상 상피가 5q 염색체의 변이 또는 결손 시 *APC* 유전자에 의해 과형성(hyperplastic epithelium)되어 초기 선종으로 진행된다. 이어서 DNA hypomethylation과 12p 염색체의 변이로 인한 *ras* 유전자에 의해 중기 선종으로 발전되고, 18q 염색체 결손으로 인한 *DCC* 유전자에 의해 후기 선종으로 진행된다. 후기 선종에서 17번 염색체 결손에 의한 *p53* 유전자의 손상 시 암으로 진행이 되며, 전이는 기타 유전자에 의해 이루어진다고 실험적인 사실을 근거로 보고하였다(Fearon와 Vogelstein, 1990; Forslund 등, 1991; Baisse 등 2001).

염색체 17p의 결손은 LOH에서 50%가 발견되었으며, 이것은 일반적으로 *p53* 유전자의 결손의 결과로 설명되어 진다. 실험 결과는 기존의 보고와 비슷한 빈도로 발견되었으며, *p53* 유전자의 점 돌연변이 및 대립 유전자의 소실은 대장암에서 높은 빈도로 나타나서 대장암의 발생 및 진행에 중요한 역할을 한다는 사실이 잘 알려져 있는데 본 연구에서도 재확인 하였다(Paredes-Zaglul 등, 1998; De Angelis 등, 1999). *p53* 유전자는 DNA의 특수한 부위에 결합, 유전자의 전사를 제어하여 세포의 분열과 성장을 억제한다. 세포 성장의 억제 기전으로 p53 단백은 cyclin-dependent kinase를 억제하는 21 kd인 WAF1 단백질 생성을 자극하여 세포분열 정지기 G1을 길게 하고 손상된 DNA를 복구시키며 대장암뿐만 아니라 위암, 폐암, 간암 등을 포함한 광범위한 암의 약 50%에서 유전자 변이가 있다(Macdonald 등, 1998). 산발성 대장암의 75%에서 하나의 대립 유전자 결손과 남은 대립 유전자의 돌연변이를 동반하고, LOH가 있는 대장암의 95%에서 점 돌연변이가 관찰되고 있다. 이번 실험 결과에서 LOH의 검출률이 높은 것은 결손의 작은 부위까지 확인 할 수 있는 LOH 실험의 특징에 기인한다고 사료된다(Forslund 등, 1991).

염색체 18q의 결손은 높은 빈도인 47%가 관찰되었으며, 이는 기존의 보고와 유사하다(Meijer 등, 1998; De Angelis 등, 1999; Nakao 등, 2001). 18q의 유전자는 *DCC*와 *DPC4*가 존재하는 것으로 잘 알려져 있는데, *DCC* 유전자의 변이로 기능을 상실하고, 정상의 18q의 대립 유전자가 소실되게 되면 암의 발생에 관여하게 된다(Cho와 Fearon, 1995). 18q의 이형접합성 소실은 림프절의 전이, 림프관의 침윤과 관계가 있다고 보고되었다(Kato 등,

1996). 또한 *DCC* 유전자의 이형접합성 소실은 예후와 밀접한 관계가 있다고 보고되고 있으며, 특히 Ⅱ기 환자의 독립적인 예후 인자로 보고되고 있다(Font 등, 2001). 이 유전자는 대장암과 췌장암 발생에 작용하는 것으로 알려져 있으며, 대장 후기 선종에서도 특징적으로 나타나는 사실에 근거해 볼 때 대장암으로 진행에 기인하는 유전자로 제시되어 진다(Ried 등, 1996). 또 한가지 18q21부위의 결손으로서, 이곳의 결손은 치료 후 특징적으로 재발을 야기 시키는 곳으로서, 결손을 보인 환자의 경우 82%가 재발하였다는 보고와(Jervaill 등, 1999), 이 곳의 LOH 결과에 따라 생존율의 차이가 심한 만큼, chemotherapy의 조절이 필요하다는 보고가 있다(Watanabe 등, 2001). 따라서 재발 위험군에 대한 치료방법 선정을 위한 지표로 적합하다고 판단된다. 18q21 부위의 유전자로서 최근에 알려진 *SMAD2* 와 18q21.1의 *SMAD4/DPC4*가 있는데 이들 유전자는 세포 표면으로부터 핵으로의 세포 성장 억제 신호를 조절하는 TGF-β의 pathway의 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 18q21에 선택적인 LOH marker(D18S69)를 사용하여 LOH 실험한 결과 43%가 검출되어 한국인의 대장암 환자에서도 재발 위험군이 높음을 알 수 있었다.

현재 종양 표지자가 많이 발견되었고 미국 FDA에서 공인한 종양 표지자도 14개가 사용되고 있지만 어느 것도 특징적으로 한가지의 암에만 적용되지 않고 있다. 이번 논문에서 이용한 CEA도 대장암에 특징적이라고는 하나 췌장암, 위암, 유방암, 간암, 폐암, 자궁암 등에서도 동반 상승되어 정확한 진단에는 제한을 받고 있다(배 등, 2007). 따라서 LOH는 실험에서 뿐만 아니라 임상에서도 유용한 새로운 검사방법으로 판단되며, 대장암 환자를 수술 후에 수술 부위 조직을 이용한 LOH를 시행하여 재발 위험군에 대한 치료방법 선정 등 임상에서 효율적으로 활용하는 것이 필요하다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Baisse B, Bouzourene H, Saraga EP, Bosman FT, Benhattar J. Intratumor genetic heterogeneity in advanced human colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 93(3):346-352, 2001.
2. Bocker T, Diermann J, Friedl W, Gebert J, Holinski-Feder E, Karner-Hanusch J, von Knebel-Doeberitz M, Koelble K, Moeslein G, Schackert HK, Wirtz HC, Fishel R, Rüschoff J. Microsatellite instability analysis : a multicenter study for reliability and quality control. *Cancer Res* 57(21):4739-4743, 1997.
3. Cho KR, Fearon ER. DCC: linking tumour suppressor genes and altered cell surface interactions in cancer? *Eur J Cancer* 31A(7-8):1055-1060, 1995.
4. De Angelis PM, Clausen OP, Schjølberg A, Stokke T. Chromosomal gains and losses in primary colorectal carcinomas detected by CGH and their associations with tumour DNA ploidy, genotypes and phenotypes. *Br J Cancer* 80(3-4):526-535, 1999.
5. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61(5):759-767, 1990.
6. Font A, Abad A, Monzó M, Sanchez JJ, Guillot M, Manzano JL, Piñol M, Ojanguren I, Rosell R. Prognostic value of K-ras mutations and allelic imbalance on chromosome 18q in patients with resected colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 44(4): 549-557, 2001.
7. Forslund A, Lönnroth C, Andersson M, Brevinge H, Lundholm K. Mutations and allelic loss of p53 in primary tumor DNA from potentially cured patients with colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 19(11):2829-2836, 2001.
8. Garcia-Patiño E, Gomendio B, Lleonart M, Silva JM, Garcia JM, Provencio M, Cubedo R, España P, Ramón y Cajal S, Bonilla F. Loss of heterozygosity in the region including the BRCA1 gene on 17q in colon cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 104(2):119-123, 1998.
9. Gupta AK, Melton LJ 3rd, Petersen GM, Timmons LJ, Vege SS, Harmsen WS, Diehl NN, Zinsmeister AR, Ahlquist DA. Changing trends in the incidence, stage, survival, and screen-detection of colorectal cancer: a population-based study. *Clin Gastroenterol*

Hepatol 3(2):150-158, 2005.

10. Jernvall P, Mäkinen MJ, Karttunen TJ, Mäkelä J, Vihko P. Loss of heterozygosity at 18q21 is indicative of recurrence and therefore poor prognosis in a subset of colorectal cancers. *Br J Cancer* 79:903-908, 1999.
11. Kambara T, Matsubara N, Nakagawa H, Notohara K, Nagasaka T, Yoshino T, Isozaki H, Sharp GB, Shimizu K, Jass J, Tanaka N. High frequency of low-level microsatellite instability in early colorectal cancer. *Cancer Res* 61(21):7743-7746, 2001.
12. Kato M, Ito Y, Kobayashi S, Isono K. Detection of DCC and Ki-ras gene alterations in colorectal carcinoma tissue as prognostic markers for liver metastatic recurrence. *Cancer* 77(8 Suppl):1729-1735, 1996.
13. Macdonald GA, Greenson JK, Saito K, Cherian SP, Appelman HD, Boland CR. Microsatellite instability and loss of heterozygosity at DNA mismatch repair gene loci occurs during hepatic carcinogenesis. *Hepatology* 28(1):90-97, 1998.
14. Meijer GA, Hermsen MA, Baak JP, van Diest PJ, Meuwissen SG, Beliën JA, Hoovers JM, Joenje H, Snijders PJ, Walboomers JM. Progression from colorectal adenoma to carcinoma is associated with non-random chromosomal gains as detected by comparative genomic hybridisation. *J Clin Pathol* 51(12):901-909, 1998.
15. Nakao K, Shibusawa M, Tsunoda A, Yoshizawa H, Murakami M, Kusano M, Uesugi N, Sasaki K. Genetic changes in primary colorectal cancer by comparative genomic hybridization. *Surg Today* 28(5): 567-569, 1998.
16. Paredes-Zaglul A, Kang JJ, Essig YP, Mao W, Irby R, Wloch M, Yeatman TJ. Analysis of colorectal cancer by comparative genomic hybridization: evidence for induction of the metastatic phenotype by loss of tumor suppressor genes. *Clin Cancer Res* 4(4):879-886, 1998.
17. Ried T, Knutzen R, Steinbeck R, Blegen H, Schröck E, Heselmeyer K, du Manoir S, Auer G. Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 15(4):234-245, 1996.
18. Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, Benson AB 3rd, Hamilton SR. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 344(16):1196-1206, 2001.
19. Zenklusen JC, Thompson JC, Klein-Szanto AJ, Conti CJ. Frequent loss of heterozygosity in human primary squamous cell and colon carcinomas at 7q31.1: evidence for a broad range tumor suppressor gene. *Cancer Res* 55(6):1347-1350, 1995.
20. 배병구, 홍성우, 장여구, 한구용, 백인욱, 이혁상. 결장직장암에서 수술 전 CEA와 CA19-9 측정의 예후적 가치. 대한대장항문학회지 23(5):338-343, 2007.
21. 송상현, 배병노, 이우용, 양근호, 김기환, 한세환, 김홍주, 김영덕, 김홍용, 김정연. 림프절 전이가 없는 결직장암에서 $p27^{kip1}$의 예후인자로서의 역할. 대한대장항문학회지 23(1):34-40, 2007.
22. 윤용식, 유창식, 정상훈, 최평화, 한경록, 김희철, 김진천. 건강증진센터에서 진단된 대장암의 특징. 대한대장항문학회지 23(5):321-326, 2007.