

두경부 편평세포암에서 c-Met 단백질과 Ki-67 발현의 의의

조선대학교 의과대학 이비인후과학교실,¹ 병리학교실²
김 준¹ · 도남용¹ · 박준희¹ · 최지윤¹ · 임성철²

The Significance of c-Met and Ki-67 Expression in the Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Jun Kim, MD,¹ Nam Yong Do, MD,¹ Jun Hee Park, MD,¹ Ji Yun Choi, MD¹ and Sung Chul Lim, MD²

¹Department of Otolaryngology and ²Pathology, College of Medicine, Chosun University, Gwangju, Korea

Background and Objectives Various tumor markers have been studied in an attempt to evaluate and decide the optimal treatment of the patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). A nuclear antigen Ki-67 is a proliferative marker of tumor cells in all phases of cell cycle except G0. c-met gene, the tyrosine kinase receptor for hepatocyte growth factor, may play various roles in malignant transformation. The authors evaluated the prognostic significance of Ki-67 and c-Met in surgical specimens of HNSCC to determine the relationship with the various clinicopathological characteristics.

Materials and Methods Formalin-fixed paraffin-embedded surgical specimens were obtained from 54 patients with HNSCC. Ki-67 and c-Met expressions were analyzed by immunohistochemical staining and were compared with the clinicopathological characteristics such as, pathologic differentiation, tumor stage, clinical stage and lymph node metastasis.

Results Ki-67 and c-Met over-expression was detected in 66.7% and 90.7% in HNSCC. There was positive correlation of increased expression of Ki-67 with tumor stage and clinical stage, increased expression of c-Met with tumor stage, clinical stage, and nodal status. The expression of c-Met had a significant positive relationship with Ki-67 index ($p < 0.05$).

Conclusion Therefore, Ki-67 and c-Met are useful markers of tumor progression, aggressiveness and prognosis in HNSCC.

Korean J Bronchoesophagol 2010;16:39-46

KEY WORDS c-Met · Ki-67 · Head and neck squamous cell carcinoma · Prognosis.

서 론

두경부 암의 90% 이상은 편평세포암종이지만 진행

양상이 다양하여 예후의 예측이 어렵고 발생 부위별로 다양한 생물학적 특성과 전파경로를 가지기 때문에 치료에 어려움이 있다. 최근에는 경부 림프절전이, 임상적 병기, 조직학적 분화도 등 기존의 예후 인자뿐만 아니라 암의 발생과 진행에 관여하는 종양의 생물학적 성상을 치료방침 결정에 이용하려는 노력이 시도되고 있다.

Ki-67은 G0 기를 제외한 모든 세포주기에서 발현되

논문접수일: 2010년 6월 12일 / 심사완료일: 2010년 6월 18일
교신저자: 박준희, 501-717 광주광역시 동구 서석동 588
조선대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화: 062-220-3200 · 전송: 062-225-2702
E-mail: entjh28@chosun.ac.kr

는 핵내의 항원으로 세포의 증식능을 가장 잘 표지하는 것으로 알려져 있으며 여러 종양에서 예후를 판단하는데 도움이 된다고 한다.¹⁾

세포의 성장과 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 c-met 발암 유전자 산물인 c-Met 단백질은 암세포의 이동에 관여하는 운동인자 중 하나로서 tyrosine kinase 활성능을 가진 고친화성 수용체로서 종양이 발생할 때는 이 유전자에서 단백질 과발현이 일어난다는 보고가 있다.²⁾

이 연구에서는 두경부 편평세포암종 조직을 대상으로 c-Met 단백질과 Ki-67에 대한 항체로 면역조직화학적 염색을 시행하여 c-Met 단백질과 Ki-67의 발현 양상을 임상적 및 병리조직학적 예후 인자들과의 상관관계를 비교 검토하여 암종의 진행, 전이에 대한 이해와 진단적, 예후 인자로서의 가치를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

연구재료

2000년부터 2009년까지 약 10년 동안 조직검사로 확진된 두경부의 편평세포암 중 조직의 보관 상태가 양호한 54예로서 구강암 16예(남자: 여자=13 : 3, 전이군: 8예, 비전이군: 8예), 인두암 15예(남자: 여자=13 : 2, 전이군: 6예, 비전이군: 9예), 후두암 23예(남자: 여자=21 : 2, 전이군: 5예, 비전이군: 18예)를 대상으로 하였다.

연구방법

임상기록과 병리와 조직 슬라이드 화일을 대상으로 두경부 편평세포암종을 재검토하여 연구목적에 부합되는 대표적인 부위를 선택하여 10% 중성 포르말린에 충분히 고정된 다음, 파라핀 포매에 의해 4~5 μm 두께의 절편으로 제작하여 hematoxylin-eosin 이중 염색을 실시하였다. 임상병기는 AJCC TNM 분류에 따라 하였으며, 병리학적 분화도는 고분화(well differentiated), 중등도 분화(moderately differentiated) 및 저분화(poorly differentiated)로 분류하였다.

면역조직화학적 검사

10% 완충 중성 포르말린에 고정 후 제작한 파라핀 포매 조직을 4 μm 두께로 박절하여 X-tra™슬라이드

(Surgipath, Richmond, U.S.A.)에 부착하여 xylene에 탈 파라핀한 뒤 무수 알코올, 90%, 75% 및 50% 에탄올에 각각 2분씩 처리하여 합수시켰다. 항원성 회복을 위하여 citrate 완충액(10 mM, pH 6.0)에 슬라이드를 담가 전자오븐에 15분간 끓인 후 실온에 방치시켜 20분간 식힌 후 50 mM Tris 완충용액(TBS, pH 7.5)으로 수세하였다. 조직절편내의 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위하여 0.3% hydrogen peroxide-methanol에 10분간 처리 후 증류수로 세척 후 차단항체를 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 mouse monoclonal antibody Ki-67/MIB-1 (Immunotech, Marseille, France; 1 : 1,000)과 c-Met (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.; 1 : 100)을 실온에서 1시간 반응시켰다. Tris 완충액으로 세척하고 Polink-2 HRP plus mouse DAB detection system (Golden Bridge International, Inc., WA, U.S.A.)을 이용하여 술식에 따라 시행하였다. Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 시행하고, universal mount (Research Genetics, Huntsville, AL, U.S.A.)로 봉입하였다.

양성 대조군으로는 다른 실험에서 양성반응이 확인된 침윤성 유방암조직을 이용하였으며, 음성 대조군으로는 일차항체 대신 tris 완충액을 썼다.

면역조직화학적 염색의 판정

Ki-67 염색의 판정은 광학현미경하에서 핵단백질이 갈색으로 염색되는 경우를 양성으로 판정하되 종양세포의 20% 이내에서 핵 염색이 초래되는 경우(낮은 발현; 낮은 세포증식능)와 20% 이상의 종양세포 핵에서 양성 소견이 보이는 경우(높은 발현; 높은 세포증식능)로 분류하였다.

c-Met 단백질의 염색은 세포질내 갈색염색을 양성으로 판정하였는데 염색강도(intensity)와 염색범위(extent)를 병산하는 결합형 채점체계(combined scoring system)를 이용하였다. 염색강도는 다음과 같이 채점하였다: 0=음성, 1=약 양성, 2=중 양성, 3=강 양성. 염색범위는 전체 암조직 부위중 양성 염색부위의 백분율로 구분하였고 다음과 같이 채점하였다: 0, 양성 발현이 전혀 없는 경우; 1, 양성발현 1~10%; 2, 양성발현 11~50%; 3, 양성발현 51~80%; 4, 양성발현 81~100%. c-Met 단백질 염색에 대한 최종 점수는 염색강도와 염색범위 점수를 곱한 값(0~12점)으로 결

정하였으며 이 값이 4를 넘지 못하면(0~3점) 음성으로, 4를 넘으면(4~12점) 과발현으로 평가하였다.

통계학적 분석

통계학적 분석은 SPSS version 15.0을 이용하였다. 원발부위 병기, 임상 병기, 중앙 분화도, 림프절 전이 상태와 Ki-67과 c-Met 단백질 발현 양상 각각과의 상관관계는 χ^2 test로 검정하였고, 이들의 통계학적 유의 수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결 과

임상적 소견

연령 분포는 29~84세(평균연령: 62.2세)였으며, 남녀 성비는 47 : 7이었다. 원발부위 병기에 따라 분류하면 조기 병기(병기 I, II) 33 예(61.1%), 진행된 병기(병기 III, IV) 21예(38.9%)였으며, 임상적 병기에 따라 분류를 하면 초기 암(병기 I, II) 23예(42.6%), 진행 암(병기 III, IV) 31예(57.4%)였다. 그리고 이들 중 19예(35.2%)는 림프절 전이군, 35예(64.8%)는 림프절 비 전이군이었다. 병리학적 분화도에 따라 편평 세포암을 분류하면 고분화 32예(59.3%), 중등도 분화 15예(27.8%), 그리고 저분화 암 7예(12.9%)이다(Table 1).

Ki-67과 c-Met 단백질의 면역조직화학적 발현 양상

Ki-67은 핵단백질이 붉게 과립으로 염색되었는데 18예(33.3%)는 낮은 발현을, 36예(66.7%)는 20% 이상의 중앙 핵에서 양성반응을 보이는 높은 발현을 보였다(Fig. 1).

c-Met 단백질은 세포막(cell membrane)과 세포질(cytoplasm)에 염색되었는데, 기질세포에는 염색이 거의 없었고 주로 암세포에 강하게 염색이 되었으며 일부 정상 세포에도 약하게 염색이 되었다. 특히 암세포 내에서는 세포질에 미만형으로 강하게 염색된 경우가 가장 많았다. c-Met 단백질의 염색결과 19예(35.2%)는 11~50%의 염색범위를 19예는 51~80%의 염색범위를 보였고, 4예(7.4%)는 81%이상의 염색범위를 보였으며 음성반응을 보인 예도 5예(9.3%)있었다. 염색강도는 중 양성반응이 28예(51.9%), 강 양성반응이 13예(24.1%), 5예(9.3%)는 음성반응을 보였다(Fig. 2).

Table 1. Clinical, epidemiologic, and pathologic characteristics of 54 patients with head and neck squamous cell carcinoma

Characteristic	No. (%)
No. of patients	54 (100)
Age (yrs.)	
Mean	62.2
Range	29-84
Gender	
Male	47 (87.0)
Female	7 (13.0)
Tumor stage	
Early (I, II)	33 (61.1)
I	15
II	18
Advanced (III, IV)	21 (38.9)
III	9
IV	12
Clinical stage	
Early (I, II)	23 (42.6)
I	10
II	13
Advanced (III, IV)	31 (57.4)
III	11
IV	20
Degree of tumor differentiation	
Well differentiated	32 (59.3)
Moderately differentiated	15 (27.8)
Poorly differentiated	7 (12.9)
Lymph node metastasis	
Yes	19 (35.2)
No	35 (64.8)

원발부위 병기(Tumor stage)에 따른 발현 양상

Ki-67의 발현 양상은 조기병기는 33예 중 15예(45.5%)에서 높은 발현을 보였고, 진행된 병기는 21예(100%) 모두 높은 발현을 보여 병기가 진행될수록 유의하게 높은 발현을 보였다($p < 0.05$). c-Met 단백질에 대한 발현은 조기병기는 16예(48.5%)가 과발현을 보였으나 진행된 병기는 21예 모두 과발현을 보여 진행된 병기에서 통계적으로 유의하게 과발현이 높았다($p < 0.05$) (Table 2).

임상적 병기(Clinical stage)에 따른 발현 양상

Ki-67의 발현은 초기 암에서 23예 중 8예(34.8%)

가 높은 발현을 보였는데, 진행 암에서는 28예(90.3%)가 높은 발현을 보여 병기의 진행에 따라 유의하게 높은 발현이 증가되는 결과를 보였다($p < 0.05$). c-Met 단백질의 발현도 초기 암은 7예(30.4%)에서 과발현을 보였는데, 진행 암에서는 1예를 제외한 30예(96.8%)

가 과발현을 보여 통계적으로 유의하게 진행 암에서 과발현의 증가를 보였다($p < 0.05$) (Table 2).

림프절 전이유무에 따른 발현 양상

Ki-67의 발현은 전이가 없었던 군 35예 중 20예

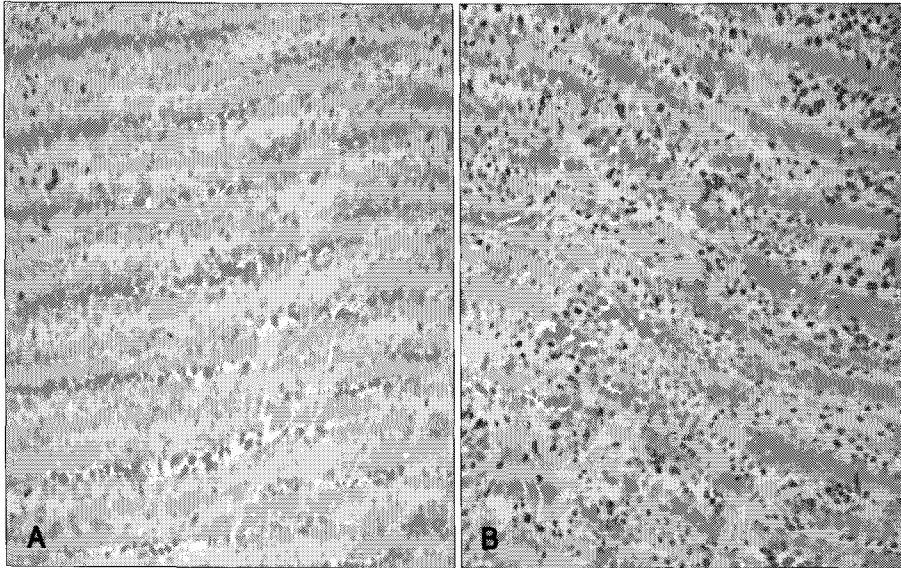


Fig. 1. Immunohistochemical staining of head and neck squamous cell carcinoma for Ki-67. A: Well differentiated squamous cell carcinoma showed low expression of Ki-67 in the nuclei of the cancer cells. B: Poorly differentiated squamous cell carcinoma showed high expression of Ki-67 in the nuclei of the cancer cells.

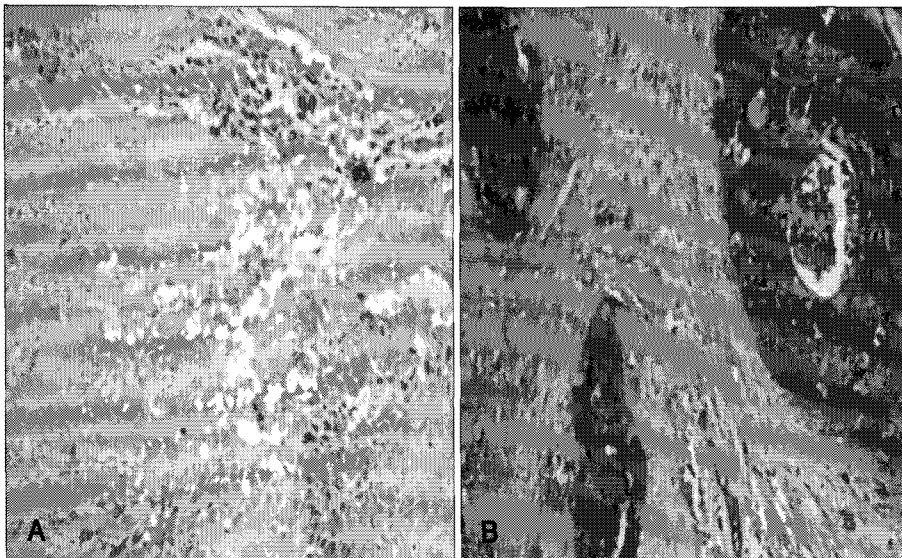


Fig. 2. Immunohistochemical staining of head and neck squamous cell carcinoma for c-Met. A: Immunohistochemical staining of well-differentiated squamous cell carcinoma for c-Met. Intermediately staining of c-Met in the cytoplasm of the cancer cells was identified. B: Immunohistochemical staining of poorly-differentiated squamous cell carcinoma for c-Met. Strong cytoplasmic expression of c-Met in the cancer cells was identified.

Table 2. Expression of Ki-67 and c-Met protein according to the tumor stage and clinical stage in head and neck squamous cell carcinoma

	Ki-67		c-Met	
	Low (n=18)	High (n=36)	Negative (n=17)	Over expression (n=37)
Tumor stage				
Early (n=33)	18	15	17	16
Advanced (n=21)	0	21	0	21
p value		*		*
Clinical stage				
Early (n=23)	15	8	16	7
Advanced (n=31)	3	28	1	30
p value		*		*

*: Statistically significant, $p < 0.05$. Early: Stage I and II, Advanced: Stage III and IV

Table 3. Expression of Ki-67 and c-Met protein according to the nodal status, pathologic grade and age in head and neck squamous cell carcinoma

	Ki-67		c-Met	
	Low (n=18)	High (n=36)	Negative (n=17)	Over expression (n=37)
Nodal status				
Negative (n=35)	15	20	16	19
Positive (n=19)	3	16	1	18
p value				*
Differentiation				
W/D (n=32)	14	18	14	18
M/D (n=12)	2	13	1	14
P/D (n=7)	2	5	2	5
p value				

*: Statistically significant, $p < 0.05$. W/D: well differentiated, M/D: moderately differentiated, P/D: poorly differentiated

(57.1%)에서 높은 발현을 보였고, 림프절 전이군 19예에서는 높은 발현이 16예(84.2%)로 대부분이 높은 발현을 보였으나 유의성은 없었다($p > 0.05$). c-Met 단백질의 발현은 전이가 없었던 군은 과발현이 19예(54.3%)이었으나, 림프절 전이군에서는 음성발현 1예(5.3%), 과발현 18예(94.7%)로 전이군에서 과발현이 통계적으로 유의하게 높았다($p < 0.05$) (Table 3).

병리학적 분화도에 따른 발현 양상

Ki-67의 발현양상은 고분화 암종은 18예(56.2%)에서 높은 발현을 보였고, 중등도분화 암종에서는 13예(86.7%)에서, 저분화 암종에서는 5예(71.4%)에서 높은 발현을 보였으나 분화도에 따른 유의성은 없었다($p > 0.05$). c-Met 단백질의 발현은 고분화 암종은 56.2%에서

과발현을 보였고, 중등도분화 암종에서는 14예(93.3%), 저분화 암종에서는 71.4%에서 과발현을 보였으나 분화도에 따른 유의성은 없었다($p > 0.05$) (Table 3).

Ki-67과 c-Met 단백질 발현의 상관관계

c-Met 단백질에 과발현을 보인 경우 Ki-67도 높은 발현을 보이는 경향을 보이고, c-Met 단백질의 발현이 음성발현을 보이는 경우 Ki-67도 낮은 발현을 하는 경향을 보여 Ki-67과 c-Met 단백질의 발현은 서로 유의한 상관관계를 보였다($p < 0.05$) (Table 4).

고찰

최근 종양의 병리학적 분화도, 림프절 전이 여부, 임

Table 4. Interrelation between the expression of Ki-67 and c-Met protein in head and neck squamous cell carcinoma

	c-Met		p value
	Negative	Over expression	
Ki-67			
Low expression	16	2	*
High expression	1	35	

*: Statistically significant, p<0.05

상 병기, 종양의 크기 등 기존의 예후 인자들 보다 객관적이고 신뢰할 수 있는 진단적, 예후적 표지자를 찾고자 하는 연구로서 암의 발생과정에 관여되는 여러 요인들인 세포신호전달, 성장, 세포사, 세포운동력, 혈관신생능력 및 세포주기 조절 담당 분자들의 이상 발현이나 기능이상 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

Ki-67은 면역조직화학적 염색으로 G0기를 제외한 모든 세포주기에서 발현한다고 하며,³⁾ Ki-67 항원은 종양세포에서 뿐만 아니라 림프절의 배중심(germinal center), 장 음와세포(intestinal crypt cells), 미분화된 정조세포(undifferentiated spermatogonia), 흉선 편도 등 증식기에 있는 정상 조직에서도 관찰된다.⁴⁾ 면역조직화학적 염색을 이용한 Ki-67 항원의 발현은 세포의 증식능을 나타내는 신뢰할 수 있는 표지자로 유방암, 전립선암종 그리고 구강 편평세포암에서 양성병변에 비해 Ki-67 지수가 유의하게 높게 발현한다는 보고가 있다.⁵⁻⁷⁾

Ki-67 발현과 예후인자와의 연관성에 관한 연구를 보면 유방암에서 병리학적 분화도와 생존률에 따라 Ki-67의 발현이 유의하게 증가한다고 보고와,⁸⁾ 뇌종양에서 Ki-67 발현이 증가함에 따라 조직학적 분화도가 낮아지고 사망률이 증가한다고 보고가 있다.⁹⁾ 또한 위암에서 Ki-67의 표지 지수가 높은 환자가 예후가 나쁘다는 보고도 있다.¹⁰⁾ 두경부 암의 예후와 관계에 대한 연구를 살펴보면, Acikalin 등은 후두의 편평세포암종에서 Ki-67은 병리학적 분화도와는 연관이 없었으나 원발부위 병기와 전이와는 유의한 상관 관계가 있다고 하였다.¹¹⁾ 국내 연구에서 하인두와 후두의 편평세포암종에서 병리학적 분화도가 낮을수록 Ki-67 표지 지수가 높게 관찰되어 세포의 증식이 활발히 일어난다고 하였고, 높은 경우 재발율도 유의하게 높았으나 병기 등 임상적 인자들과는 관련이 없다는 보고가 있다.¹²⁾ 그러나 두경부 편평세포암종에서 Ki-67 지수가 36이상

인군과 이하인 군의 생존율을 비교한 결과 유의한 차이가 없다는 연구가 있고,¹³⁾ 두경부 편평세포암종환자에서 임상적 병기, 병리학적 분화도, 방사선치료의 결과와 연관이 없다는 보고도 있다.¹⁴⁾

본 연구에서는 Ki-67은 36예(66.7%)에서 20% 이상의 종양 핵에서 양성발현을 보였으며, 원발부위 병기 및 임상적 병기가 증가할수록 Ki-67발현이 유의하게 증가하여 세포증식이 활발히 일어남을 예측할 수 있었다. 그러나 림프절 전이군에서 높은 발현이 증가하였고, 조직학적 분화도가 낮을수록 높은 발현이 증가하였으나 통계학적 유의성은 없었다.

c-met 유전자는 염색체 7q31에 위치하고 hepatocyte growth factor(HGF)라는 리간드와 작용하는 tyrosine kinase receptor로서 정상세포에서 c-met 유전자의 활성화는 세포의 증식, 상피세포의 해리와 이동 및 복잡한 구조를 형성하는 기능이 있으며, 세포의 발달과정에서는 상피세포의 성장, 조직손상의 방지 및 간세포의 재생 촉진 등의 기능을 한다.¹⁵⁾ 이 유전자의 산물인 c-Met 단백질은 tyrosine kinase activity를 갖는 190 kDa transmembrane heterodimer로서 돌연변이나 과발현을 통해 소화기관, 갑상선, 신장, 전립선, 췌장, 유방 등에서 종양의 발생에 관여한다.^{2,16,17)} 또한 단백질 분해 효소 등의 생성을 촉진시켜 종양의 전이능력을 향상시키기도 하며, 악성종양 세포에서는 c-Met 단백질 발현이 정상세포보다 증가하고, 발현이 증가된 군에서 세포주의 침습성이 증가하고 악성진행에 기여한다는 보고가 있다.^{18,19)}

c-Met 단백질 발현에 대한 연구에서 유방암에서 c-Met 단백질의 발현이 양호한 예후인자들과 연관이 있다는 보고도 있으나,¹⁷⁾ 유방암에서 조기재발이나 전이 등과 같은 악성 예후인자들과 관련이 있다는 상반된 보고도 있다.²⁰⁾ 두경부암에서 c-Met 단백질의 발현에 관한 연구에서, Lo Muzio 등은 c-Met단백의 발현과 두경부암 환자의 생존율 비교에서 발현한 환자의 생존율이 유의하게 나쁘다고 하였다.²¹⁾ 후두암 82예에 대한 연구에서 c-Met 단백질은 45예(54.9%)에서 발현되었고 림프절 전이군에서는 83.3%의 발현으로 통계적으로 유의한 차이가 있다는 보고가 있으며,²²⁾ 하인두암을 대상으로 70%에서 c-Met 단백질이 과발현 한다는 보고도 있다.²³⁾ 그러나 구강 및 구인두암에서 c-Met 단백질은 62.5%에서 발현을 보여 정상조직이나 이형성 군과 유

의한 차이를 보였으나 임상적 병리학적 인자와는 유의한 차이가 없었다는 보고도 있다.²⁴⁾

본 연구에서는 c-Met 단백질은 5예를 제외한 49예(90.7%)에서 발현을 보였고, 원발부위 병기 및 임상적 병기가 증가할수록 또한 림프절전이기가 있을 경우 c-Met 단백질 발현이 유의하게 증가하여 종양의 이동과 침습 등 암의 진행에 c-Met 단백질의 활성화가 관련이 있다고 생각되며 나쁜 예후와 관련이 있다고 보여진다. 또한 c-Met 단백질과 Ki-67의 발현의 상관관계를 분석한 결과 서로 유의한 상관관계를 보였다. 즉 c-Met 단백질의 발현 점수가 높은 경우 Ki-67도 높은 발현을 보이고, c-Met 단백질의 발현이 음성인 경우 Ki-67도 낮은 발현을 하는 경향을 보여 세포 증식능과의 관련이 입증된 Ki-67과 마찬가지로 c-Met 단백질의 발현도 세포의 침습성이 증가하고 악성진행에 관여함을 확인할 수 있었다.

결론

두경부 편평세포암종을 대상으로 c-Met 단백질과 Ki-67에 대한 항체로 면역조직화학적 염색을 시행한 결과 Ki-67은 66.7%에서 20% 이상의 종양 핵에서 양성 발현을 보였으며, 원발부위 병기, 임상적 병기와 유의한 연관이 있었다. c-Met 단백질은 90.7%에서 양성 발현을 하였으며, 원발부위 병기, 임상적 병기와 림프절 전이와 과발현은 유의한 연관이 있었다. 또한 c-Met 단백질의 발현 점수가 높은 경우 Ki-67도 높은 발현을 보여 Ki-67과 c-Met 단백질의 발현은 서로 유의한 상관관계를 보였다.

따라서 두경부 편평세포암종의 진행 및 전이 예후를 예측하는데 c-Met 단백질과 Ki-67의 발현은 유용한 정보를 제공할 수 있으리라고 생각된다.

REFERENCES

- 1) Choi G, Yoo KM, Yoo DH, Chae SW, Jung KY, Choi JO. Ki-67 index in the head and neck squamous cell carcinomas and tumor adjacent epithelia. *Korean J Otolaryngol* 1998; 41:760-6.
- 2) Chen YS, Wang JT, Chang YF, Liu BY, Wang YP, Sun A, et al. Expression of hepatocyte growth factor and c-met protein is significantly associated with the progression of oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 2004;33:209-17.
- 3) Gerdes J, Li L, Schlueter C. Immunohistochemical and mo-

- lecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67 study. *Am J Pathol* 1991;138:867-73.
- 4) Gerdes J, Becker MH, Key G. Immunohistological detection of tumor growth fraction in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol* 1992;168:85-7.
- 5) Gerdes J, Lelle R, Pickert H. Growth fractions in breast cancers determined with monoclonal antibody Ki-67. *J Clin Pathol* 1986;39:977-80.
- 6) Raymond WA, Leong AS-Y, Bolt JW, Millios J, Jose JS. "Growth fraction in human prostatic carcinoma determined by Ki-67 immunostaining." *J pathol* 1988;156:161-7.
- 7) Torres-Rendon A, Roy S, Craig GT, Speight PM. Expression of Mcm2, geminin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas. *Br J cancer* 2009;100:1128-34.
- 8) Gasparini G, Boracchi P, Verderio P, Bevilacqua P. Cell kinetics in human breast cancer Comparison between the prognostic value of the cytofluorometric S-phase fraction and that of the antibodies to Ki-67 and PCNA antigens detected by immunocytochemistry. *Int J Cancer* 1994;57:822-9.
- 9) Hopf NJ, Bremm J, Bohl J, Pernecky A. Image analysis of proliferating cells in tumors of the human nervous system: An immunohistological study with the monoclonal antibody Ki-67. *Neurosurgery* 1994;35:917-23.
- 10) Yonemura Y, Kimmura H, Ooyama S. Immunocytochemical staining of proliferating cells in endoscopically biopsied tissues of gastric carcinomas with monoclonal antibody Ki-67. *Oncoology* 1991;58:162-5.
- 11) Acikalin MF, Oner U, Tel N, Paşaoğlu O, Cakli H, Colak E. Prognostic significance of Ki-67 expression for patients with laryngeal squamous cell carcinoma primarily treated by total laryngectomy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2004;261:376-80.
- 12) So SH, Song BC, Jung YG. Prognostic significance of Ki-67 index and expression of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Korean J otolaryngology* 1999;42:603-9.
- 13) Kim SH, Choi BY, Hwang DJ. Expression of cyclin D1 protein and ki-67 index in advanced squamous cell carcinomas of head and neck and correlation with response to chemotherapy and radiotherapy. *Korean J otolaryngology* 1998;41:620-5.
- 14) Ogawa Y, Inomata T, Nishioka A. Changes in the Ki-67 labeling rates of head and neck squamous cell carcinomas during preoperative radiation therapy. *Oncology* 1992;49:450-3.
- 15) Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 2000;19:5582-9.
- 16) Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:915-25.
- 17) Nakopoulou L, Gakiopoulou H, Keramopoulos A. c-met tyrosine kinase receptor expression is associated with abnormal betacatenin expression and favourable prognostic factors in invasive breast carcinoma. *Histopathology* 2000; 36:313-25.
- 18) Jeffers M, Rong S, Woude GF. Hepatocyte growth factor/scatter factor-Met signaling in tumorigenicity and invasion/metastasis. *J Mol Med* 1996;74:505-13.
- 19) Matsumoto K, Matsumoto K, Nakamura T, Kramer RH. Hepatocyte growth factor/scatter factor induces tyrosine

- phosphorylation of focal adhesion kinase (p125FAK) and promotes migration and invasion by oral squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 1994;269:31807-13.
- 20) Yamashita J, Ogawa M, Yamashita S. Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer. *Cancer Res* 1994;54:1630-3.
 - 21) Lo Muzio L, Farina A, Rubini C, Coccia E, Capogreco M, Colella G, et al. Effect of c-Met expression on survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* 2006; 27:115-21.
 - 22) Sawatsubashi M, Sasatomi E, Mizokami H, Tokunaga O, Shin T. Expression of c-Met in laryngeal carcinoma. *Virchows Arch* 1998;432:331-5.
 - 23) Kim CH, Moon SK, Bae JH, Lee JH, Han JH, Choi EC, et al. Expression of HGF/c-Met in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Korean J Otorhinolaryngol* 2004;47:1135-41.
 - 24) Kim JH, Oh SJ, Jung YG, Ryo YS, Ahn HY, Shin HS, et al. Role of hepatocyte growth factor and c-met gene expression in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg* 2007;50:684-9.