

□ 원 저 □

편평상피 폐암 및 주위 정상조직에서 p53 및 c-erbB2 발현의 의의[†]

고신대학교 의과대학 내과학교실, 흉부외과학교실*, 병리학교실**

송창석, 옥철호, 정용석, 장태원, 정만홍, 이재성*, 정혜진**, 허 방**, 허만하**

= Abstract =

p53 and c-erbB2 as the Immunohistochemical Markers in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Lung

Chang-Seuk Song, M.D., Chul-Ho Ok, M.D., Yong-Seuk Jung, M.D.,
Tae-Won Jang, M.D., Maan-Hong Jung, M.D., Jae-Seong Lee, M.D.,
Hae-Jeen Jung, M.D.,** Bahng Hur M.D.,** and Man-Ha Hur, M.D.**

Department of Internal Medicine, Chest Surgery, Pathology**, Medical College, Kosin University, Pusan, Korea*

Background : With the development of the molecular biological methods, studies of the early diagnosis of lung cancer and the detection in the preneoplastic state by using genetic probes in the high risk groups are widely investigated. In lung cancer, squamous cell carcinoma is considered to progress from the normal bronchial mucosa to the preneoplastic state, and finally to the invasive carcinoma. In this study, we investigated the expression of p53 and c-erbB2 in the normal bronchi and the cancer tissues in patients with squamous cell lung cancer to evaluate the possibility of using these immunohistochemical markers as the diagnostic and prognostic parameters of patients with squamous cell lung cancer.

Method : The normal and cancerous bronchial tissues of 25 patients with squamous cell carcinoma of the lung, surgically resected from May 1995 to November 1996, were immunohistochemically stained with the monoclonal antibodies to p53(DAKO-p53) and c-erbB2(phamingen 15821A) respectively. We compared the expression status of these markers between the normal bronchial mucosa and the tumor tissue, and also investigated the relationship between the expression status of these markers in tumor tissues and the pathological stage, and the survival time.

Results : The pathological stage was as follows; stage I, II were found in 5 patients respectively, stage IIIA was in 8 patients, stage IIIB was in 4 patients, and stage IV was in 3 patients. The expression rate of p53 in

[†] 이 연구는 1995년도 고신대학교 의과대학 기초 임상연구비 지원에 의한 결과임.

the squamous cell lung cancer was 48%, and it was not expressed in the normal bronchial mucosa. The expression status was increased as the pathological stage advanced($p=0.0091$ by test of trend). But there were no relationship between the expression of p53 and the median survival time. C-erbB2 did not yield a significantly meaningful result.

Conclusion : p53 was not found in the normal bronchial mucosa, but it was expressed in 48% of the tumor tissue. And the expression rate increased as the pathological stage advanced. So it would be helpful to apply the immunohistochemical stain with p53 in the bronchial biopsy specimen in the early diagnosis trial or staging of squamous cell lung cancer. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1999, 46 : 523-524)

Key words : p53, c-erbB2, Immunohistochemical stain, Squamous cell lung cancer.

서 론

폐암은 다른 종류의 암에 비해 조기진단이 어렵기 때문에 지난 20여년 동안에도 전체적인 생존율의 향상은 뚜렷하지 않아 현재에도 전체 폐암 환자의 10% 이하에서만 장기 생존이 가능하다¹⁾.

1980년대 미국 유수의 연구소에서 객담 세포진 검사와 흉부 X-선 사진을 이용해서 실시한 대규모의 조기진단 프로그램에서 이러한 검사를 실시할 경우에도 발견율은 높아지지만 전체적인 사망률을 낮추지는 못하였다고 보고하였다²⁻⁵⁾. 그러나 분자 생물학적인 연구의 발달로 조기 진단에 대한 개념이 바뀌기 시작하여, Mao 등은⁶⁾ 존스 홉킨스 병원에서 집단 검진 당시에 얻은 객담에서 폐암이 발생하기 몇 개월에서 일 년 전에 이미 기관지 상피 세포의 유전자 이상(ras 및 p53)이 생긴 것을 발견하였다. 그리고 최근에는 폐암으로 발병하기 전에 이미 여러 가지 다양한 유전자의 이상이 기관지 상피세포에서 진행되고 있는 것이 발견되고 있다⁷⁻¹⁴⁾. 따라서 폐암의 발병에 관여하는 이들 유전자들의 이상을 폐암으로 진행되기 전에 미리 발견하게 되면 폐암을 조기 진단하거나 예방적 치료를 하는데 중요한 정보를 제공하게 될 것으로 생각된다.

본 연구에서는 정상 기관지세포에서 전암성 병변를 거쳐서 폐암으로 비교적 단계적으로 진행되는 것으로 알려진 편평상피세포 폐암에서¹²⁾ 종양조직과 정상 기관지 조직에서 종양 억제 유전자의 하나인 p53과, 성

장인자의 receptor로 작용하는 c-erbB2의 각각의 발현 양상의 임상적 의의를 알아보았다.

대상 및 방법

1995년 5월부터 1996년 11월까지 15개월 동안 고신의대 부속 복음병원에서 편평상피 폐암으로 진단되어 수술을 받은 환자들 25명을 대상으로 후향적으로 조사하였다. 이들의 연령 분포는 48-72세이었고 남자 22명, 여자 3명이었다.

광학현미경적 검색을 위하여 수술 후에 10% 중성완화 포르말린에 고정, 파라핀에 포매된 블록 중 폐암의 원발 병소 부위와 인접 정상 기관지 조직 부위에서 얻은 조직으로 hematoxylin-eosin 염색을 실시하였다. 그 후에 각각의 조직에 p-53(DAKO-p53, DO-7)과 c-erbB2(phamingen 15821A)에 대한 단일클론성 항체를 이용하여 avidin-biotin peroxidase complex(ABC)법으로 면역조직화학염색을 시행하였으며 염색 전 microwave oven처리는 하지 않았다. 저배율에서 염색양상이 국소적 혹은 미만성 인지를 관찰하고 고배율에서 p-53은 핵에, c-erbB2는 세포막 및 세포질에 적갈색으로 염색되는 것을 양성으로 하였는데 p53은 정량적 측정을 하여 전체 세포의 5% 이상 염색된 경우를 양성으로 판정하였고 c-erbB2는 염색정도를 임의적으로 weak, moderate, strong으로 나눠서 구분하였다. 양성대조군은 p53은 대장암조

Table 1. Patients characteristics and the status of Immunohistochemical stain of p-53 and erbB2 in the Normal and tumor tissues of bronchi in patients with squamous cell carcinoma of lung.

No	Sex	Age	Survival(m)	Status	TNM	Stage	N-p53	T-p53	N-erbB2	T-erbB2
1	m	52	18	A	T1N0M0	I A	n	n	p. mod	p, focal
2	m	63	0.5	E	T1N0M0	I A	n	n	n	n
3	m	62	18	A	T2N0M0	I B	n	n	p, focal	n
4	m	68	11	A	T2N0M0	I B	n	n	n	n
5	m	64	8.5	A	T2N0M0	I B	n	p, 25%	n	n
6	m	51	19	A	T1N1M0	II A	n	n	n	n
7	m	68	7.5	E	T2N1M0	II B	n	n	n	p, strong
8	m	48	25	A	T2N1M0	II B	n	n	n	n
9	m	63	2	A	T2N1M0	II B	n	n	n	n
10	f	61	11	A	T3N0M0	II B	n	p, 50%	n	n
11	f	56	18	A	T1N2M0	III A	n	p, 30%	n	n
12	m	72	3	A	T2N2M0	III A	n	p, 30%	n	n
13	m	62	1	E	T2N2M0	III A	n	p, 30%	n	n
14	f	48	23	A	T2N2M0	III A	n	n	n	n
15	m	48	18	E	T3N1M0	III A	n	p, 80%	n	n
16	m	53	7	E	T3N2M0	III A	n	n	n	n
17	m	64	14	A	T3N2M0	III A	n	n	n	n
18	m	60	21.5	E	T3N2M0	III A	n	n	n	n
19	m	60	14	A	T2N3M0	III B	n	p, 60%	n	n
20	m	70	7.5	E	T4N0M0	III B	n	p, 70%	p. mod	n
21	m	48	15	A	T4N0M0	III B	n	p, 70%	n	p, weak
22	m	58	6	E	T4N0M0	III B	n	p, 100%	n	n
23	m	50	8	A	T2N0M0	IV	n	p, 5%	n	n
24	m	70	5.5	E	T2N2M0	IV	n	n	p, focal	n
25	m	67	14	A	T3N2M0	IV	n	p, 20%	n	n

A : alive, E : expired, n : negative, p : positive, N : normal bronchi, T : tumor tissue, mod : moderate, TNM system by Mountain CF(Chest 111 : 1710, 1997).

직으로, c-erbB2는 유방암조직으로 하였다. 그리고 생존기간은 진료기록지와 전화문의로 추적하였고 추적기간은 0.5-23 개월이었다.

통계분석은 SAS 6.04판을 사용하였으며 병기별 발현율의 차이는 linear-by-linear association으로 test of trend를 분석하였으며 생존율은 Kaplan-Meier법으로 구하였고 유의수준은 p값이 0.05이하인 경우로 하였다.

결 과

25명의 환자 중에서 병리적 병기 I, II는 각각 5명씩이었고, IIIA가 8명, IIIB가 4명, IV가 3명이었다. 종양조직에서의 p53의 발현은 12명(48%)에서 있었으나 정상조직에서는 한 예에서도 발현되지 않았다. C-erbB2는 종양조직에서 3예, 정상조직에서 4예에서 발현되었다(Table 1). 병기 I 과 II기인 군,

Table 2. The expression of p53 in the tumor tissues of patients with squamous cell lung cancer by the TNM Stage.

TNM Stage	p53 negative	p53 positive	Total
I, II	8	2	10
III A	4	4	8
III B, IV	1	6	7
Total	13	12	25

p=0.009 by test of trend the numeral is the number of patients.

병기 IIIA 군, 그리고 병기 IIIB 과 IV기인 세 군으로 나뉘서 p53의 발현율을 비교한 결과 각각 2명, 4명 및 6명에서 p53이 발현되어 병기가 진행될수록 발현율이 높아졌다(p=0.009 by test of trend, Table 2). C-erbB2는 전체적으로 발현율이 낮아 특별한 비교를 할 수 없었다. 수술 후 합병증으로 일개월내에 사망한 2번 및 13번 환자를 제외한 23명의 환자들을 대상으로 p53의 발현여부에 따른 생존율을 비교하였으나 두 군간의 유의한 차이는 없었다.

고 찰

폐암은 국내에서도 꾸준히 증가되는 종양으로서 조만간 암 발생빈도 수위를 차지할 것으로 전망된다. 그 발병원인이 흡연과 밀접한 관계가 있기 때문에 국가적인 금연정책과 교육으로 예방하는 것이 무엇보다 중요한데 이러한 정책이 이미 정착된 미국의 경우 남자들에서의 폐암 발생율은 이미 감소하고 있다¹⁵⁾. 그러나 발병한 경우에도 병기에 따른 생존율이 뚜렷이 차이나기 때문에 초기에 발견하는 것이 매우 중요하다. 1980년대 미국에서 정기적인 흉부 X-선 사진이나 세포진 검사를 통한 집단 검진이 폐암의 조기진단에 크게 성공적이지 못한 것이 밝혀진 후²⁻⁵⁾ 기관지 세포에 대한 분자 생물학적인 새로운 접근법을 통한 폐암의 발병과정과 조기진단에 대한 연구가 활발히 이루어지기 시작하였다.

폐암은 대다수에서 수 십 년간 발암물질에 노출된

후에 발생하기 때문에 기관지 상피세포의 여러 곳에서 동시에 다양한 병리적 변화가 관찰된다. 특히 편평상피암의 경우 발병과정이 정상상피세포에서 화성세포(metaplasia), 이형성세포(dysplasia), 상피내암종(carcinoma in situ)과정을 거쳐서 진행성 폐암으로 단계적으로 진행된다고 추정되는데, Kennedy 등은¹⁶⁾ 만성폐쇄성폐질환이 있고 40 pack-years 이상의 흡연력이 있는 632명을 대상으로 26 개월간 객담세포진 검사로 조사한 결과, 중등도 혹은 고도의 이형성이 26%에서, 그리고 2%에서는 상피내 암종이나 진행된 폐암을 발견할 수 있었다고 하였다. 그리고 폐암으로 진행하기 전단계에서도 이미 여러 가지 유전자 이상이나⁶⁻¹²⁾, 흡연이나 기타 발암 물질에 의한 직접적인 종양유전자나 종양억제유전자의 이상도 발견되기 때문에 폐암의 예방, 조기 진단 및 유전자 치료 등에 여러가지 biomarker를 사용한 연구들이 보고되고 있다¹⁷⁻²¹⁾. 종양세포에서 발견되는 이러한 유전자의 변화 중 일부는 종양의 예후인자로도 이용되고 있다²²⁻²⁴⁾.

Franklin은¹³⁾ 정상 기관지 세포에서 암으로 진행되는 여러 과정 동안에 기관지 세포의 형태학적 변화와 선행하는 유전자 변이를 조사하여 그 과정 동안에 세포내에서 생기는 변화에 대한 가설을 제안하면서, 종양의 세포형태를 구별하는데는 비 특이적이지만 정상세포와 종양세포를 구별하는데 도움이 되는 표지자로는 화성 세포로 진행될 때 나타나기 시작하는 *Ki-67*, 비정형세포에서 상피내 암종으로 진행되는 동안에 과다하게 표현되는 transferrin receptor, 그리고 유전자의 이상은 비정형 세포에서 나타나기 시작하지만 면역조직화학검사에서는 상피내 암종때 과량 발현되는 *p53* 등이 좋다고 하였다. Tockman은¹⁴⁾ 상피세포의 원암유전자, 종양억제유전자, DNA repair 유전자, 그리고 cell cycle checkpoints에 관계하는 인자 등에서 유전자의 돌연변이가 생기면서 암이 발생하는데 p31에 대한 단일 항체, Lewis X 항원, 염색체 소실, microsatellite의 이상 등이 조기진단에 도움이 되는 지표가 될 수 있다고 하였다. Jacobson 등도²⁵⁾ 분자학적인 종양 표지자로 *K-ras*, *p53*, *rb*, *myc*,

her-2/neu, 그리고 3번 유전자에 있는 몇 개의 종양 억제 유전자들이 비소세포폐암의 조기진단에 유용할 것이라고 하였고 이들 중에서 *ras*와 *p53* 돌연변이가 종양에 좀 더 특이성이 높다고 하였다. Miozzo 등은²⁶⁾ DNA의 microsatellite의 불안정이 폐암환자의 49%에서 발견되어 폐암의 조기진단에 도움이 될 것이라고 하였다. 그리고 가검물의 채취가 보다 쉬운 객담이나 기관지 폐포세척액을 이용한 분자생물학적 접근도 많이 연구되고 있다.^{6, 27, 28)} 또한 아직까지는 세포학적 검사보다는 진단율이 떨어지지만 혈청을 이용한 폐암의 진단도 연구가 진행 중인데 Ebert 등은²⁹⁾ 폐암환자의 혈청에서 CYFRA21-1, squamous cell carcinoma antigen, neuron specific enolase (NSE), 그리고 CEA를 측정하여 분석한 조사에서 비소세포폐암에서는 CYFRA21-1이, 소세포폐암에서는 NSE가 가장 유용한 표지자가 될 수 있다고 하였다.

조직 세포에 이용할 수 있는 여러 가지 분자생물학적 접근법 중에서 가장 쉽게 이용할 수 있는 것 중의 하나가 면역조직화학검사법이다. 판독시에 염색되는 정도에 따른 판독자의 주관이 개입되기 쉽고, 병리표본의 장기보존이 어렵고, 또 유전자의 돌연변이나 소실에 의해 단백질이 생산이 되지 않는 경우 위음성으로 나타날 수 있기 때문에³⁰⁾ 정확성이 그 만큼 떨어지는 검사법이기는 하지만 검사 방법이 표준화되어있고 비교적 경제적이어서 병리조직진단이나 임상연구에 현재 널리 이용되고 있다.

본 연구에서는 폐암절제술을 받은 25명의 편평상피암 환자를 대상으로 종양조직과 정상조직에서의 *p53*, *c-erbB2* 발현양상을 조직형태와 병기 및 환자의 생존기간에 따라 나눠서 조사하였다.

C-erbB2(혹은 *HER2/neu*) 유전자에 의해 생산되는 *c-erbB2*는 p185^{neu}로도 불리는데 세포의 증식과 분화에 관계하는 성장인자 type I receptor군에 속한다. 세포막 안 밖에 걸쳐서 존재하는데 세포막 안쪽에 위치한 부분은 tyrosine kinase와 유사한 작용을 하여 종양의 발생과 진행에 관여할 것으로 추정된

다.^{31, 32)} 대개의 정상세포에서는 발현되지 않고 유방암, 위암, 난소 및 방광암세포 등에서 발현되며, 폐암에서는 특히 선암에서 많이 발현된다.³³⁻³⁵⁾ Harpole 등은³⁶⁾ 271명의 병기 I 기에 해당하는 비소세포폐암 환자들을 대상으로 *c-erbB2*, *p53*, *KI 67* 등의 발현에 따른 5년 생존율을 조사하였는데 *c-erbB2*가 발현되는 경우 생존율이 낮아지고, 그 정도는 *p53*의 발현이 같이 있는 경우에서 가장 낮다고 하였다. 본 연구에서는 종양조직과 정상조직에서 각각 3예(12%)에서 발현되었는데 병기별 차이는 없었고 전체 증례수가 적고 발현이 낮아 다른 비교는 할 수 없었다.

p53 유전자는 DNA의 손상, 종양유전자의 활성화, 바이러스 감염, 저산소증, 발생기 산소 등에 반응하여 유전자의 transcription을 조절하여 세포 주기와 apoptosis를 조정한다. 또한 직접 DNA의 재생에도 관여하여 정상세포의 기능을 유지시켜주는 중요한 역할을 하는데 이러한 기능이 소실되면 여러 종류의 암의 발생할 수 있다.³⁷⁻³⁹⁾ *p53* 유전자의 이상은 폐암에서 흔히 관찰되는 소견인데 유전자 소실과 돌연변이 모두 생길 수 있다.^{30, 37, 40)} 돌연변이는 *k-ras*와 달리, 어느 부위에서도 생길 수 있지만 주로 exons 5-8 사이에서 많이 발생한다.^{41, 42)} Denissenko 등은¹⁸⁾ 담배 연기 속의 발암물질인 benzo(a)pyrene이 *p53* codons 중 유전자 돌연변이가 잘 생기는 부분에 친화성이 있다고 보고하였다. Greenblatt 등도³⁸⁾ 담배 속의 여러 가지 발암물질에 의해서 생길 것으로 추정되는 *p53* 유전자의 G-T transversion이 선암을 제외한 폐암에서는 그 빈도가 43-49% 정도인데 비해 담배와 직접적인 연관이 적은 것으로 알려진 선암에서는 약 13% 정도에서만 발생하고 오히려 C-T transversion이 56%를 차지한다고 하였다. *p53* 유전자의 돌연변이는 비소세포폐암의 경우 38-74%에서 발견되는데 예후와의 관계는 보고자에 따라서 다르다.^{23, 43, 47)}

p53 유전자의 과의 돌연변이(missense mutation)에 의해서 생산되는 *p53* 단백질은 반감기가 wild 형보다 훨씬 길기 때문에 면역조직화학염색법으

로 쉽게 발견할 수 있다. 그러나 p53 유전자의 이상이 있으면서도 p53이 발현되지 않는 경우가 있고 또 사용하는 단일항체에 따라서도 발현율이 달라지기 때문에³⁰⁾ 면역조직화학검사는 PCR법 등에 비하면 p53 유전자 이상의 발견율이 낮다. 그러나 Benett 등은⁹⁾ 면역조직화학법을 이용한 연구에서 p53가 정상기관지 세포에서는 0%, 화성 세포에서는 7%, 이형성 세포들 중에서 경도 25%, 중등도 32%, 고도에서는 69%에서, 그리고 상피내 암종에서는 57%, 현미경적 침윤 암에서는 70%, 진행된 침윤 암에서는 76%에서 발현된다고 보고하였다. 그 외에도 폐암의 전단계에서 p53의 이상이 발현된다는 여러 보고가 있는데 이것들은 p53의 변화가 폐암의 발생과정 중에 관여한다는 것과 아울러 폐암의 조기진단에 이용할 수 있는 중요한 지표인자가 될 수 있음을 시사한다^{7-14, 48)}.

본 연구에서는 편평상피세포암 환자 25명에서 정상 기관지 세포에서의 발현된 경우는 한 예도 없었고, 종양세포에서의 p53의 발현율은 48% (12/25)였다. 병기 I, II기 10명중에서는 2명에서, 병기 IIIA인 8명중에서 4명, IIIB 및 IV기 환자 7명에서 6명이 발현하여 병기가 진행될수록 발현율은 유의하게 증가함을 알 수 있었고 (test of trend, $p=0.009$) 이러한 성적은 Hiyoshi 등의⁴⁷⁾ 보고와 일치한다. 종양조직에서의 발현율이 48%로 다른 보고자들보다 약간 낮은 것은 검사방법의 차이 때문일 것으로 추정된다. p53의 발현율에 따른 생존율은 차이가 없었는데 이것은 대상환자의 수가 적고 또 추적기간이 짧았기 때문으로 생각된다. 그리고 전암단계에서의 조사는 증례 수가 적어서 실시하지 못하였다.

이상의 성적으로 육안으로 정상으로 보이는 기관지 상피세의 면역조직화학염색법에서 p53이 발현될 경우 정상세포의 단계를 벗어나서 화성화 및 이형화 세포로 진행되고 있다고 생각해 볼 수 있겠으며 이 경우는 철저한 금연교육과 정기적인 경과 관찰이 요망될 것으로 생각된다. 그리고 종양조직에서 p53의 발현율이 높을 경우에는 병기가 진행되었을

가능성이 높을 것으로 추정된다. 앞으로 객담이나 기관지폐포 세척액 등을 이용하여 p53이나 다른 biomarker의 이상을 더 쉽고 정확하게 발견할 수 있다면 보다 비침습적인 방법으로도 폐암의 고 위험군에 대한 조기진단과 예방치료를 할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

연구배경 :

폐암은 조기진단이 어려운 대표적인 종양이다. 최근 정상세포에서 악성조직으로 진행되는 각각의 과정에 대한 연구가 활발해지면서 폐암의 발생과 진행에 관계하는 여러 유전자와 염색체의 이상들이 발견되고 있다. 이에 근거하여 폐암 중에서도 객담 세포진검사나 기관지내시경 검사 등으로 진단이 용이하고, 조기진단의 의의가 높은 편평상피 폐암을 대상으로 종양세포와 인접 정상 세포에서의 p53 및 c-erbB2의 발현율과 그 의의를 알아보았다.

대상 및 방법 :

1995년 5월부터 1996년 11월까지 15개월 동안 편평상피 폐암으로 진단되어 폐절제술을 받은 25명의 환자를 대상으로 하여, 종양부위 및 그 인접 정상세포에서의 p53과 c-erbB2의 발현 여부를 면역조직화학적 검사법을 이용하여 조사하고 폐암의 병리적 병기 및 환자의 생존기간에 따른 발현율의 차이를 후향적으로 조사하였다.

결 과 :

25명의 환자 중에서 병리적 병기 I, II가 각각 5명, IIIA가 8명, IIIB가 4명 및 IV가 3명이었다. 종양 조직에서의 p53은 12명(48%), erb-B2는 3명(12%)에서 발현되었다. 인접 정상 기관지세포에서는 erb-B2는 3명(12%)에서 발현되었으나 p53은 한 예에서도 발현되지 않았다. 종양세포에서, 병기 II기 이하인 군 10명과 IIIA기 8명 및 IIIB와 IV기의 7명으로 나뉘서 비교한 결과 p53이 발현된 경우는 각각 2예, 4예 및 6예로 병기가 진행될수록 발현율은

유의하게 높아졌다($p=0.009$ by test of trend). 그러나 중앙세포에서 이들의 발현여부에 따른 생존기간은 차이가 없었다.

결론:

p53은 정상 기관지세포에서는 전례에서 발현되지 않았으나 폐종양조직에서는 발현율이 48%로 나왔으며, 발현율은 병기가 진행할수록 높아졌다. 따라서 기관지 생검조직에 p53을 이용한 면역조직화학적검사를 병행할 경우 편평상피세포 폐암의 경우 조기진단이나 병기 판정에 도움이 될 것으로 추정되나 더 많은 환자를 대상으로 한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Mountain CF : Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest* 111 : 1710, 1997
2. Berlin NI, Buncher CR, Fontana RS, Frost JK, Melamed MR : The National Cancer Institute Cooperative Early Lung Cancer Detection Program. Results of the initial screen (prevalence). *Early lung cancer detection : Introduction. Am Rev Respir Dis* 130 : 545, 1984
3. Frost JK, Ball WC Jr, Levin ML, Tockman MS, Baker RR, Carter D, Eggleston JC, Erozan YS, Gupta PK, Khouri NF, et al : Early lung cancer detection : Results of the initial (prevalence) radiographic and cytologic screening in the Johns Hopkins study. *Am Rev Respir Dis* 130 : 549, 1984
4. Flehinger BJ, Melamed MR, Zaman MB, Heelan RT, Perchick WB, Martini N : Early lung cancer detection : results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Memorial Sloan-Kettering study. *Am Rev Resp Dis* 130 : 555, 1984
5. Fontana RS, Sanderson DR, Taylor WF,

- Woolner LB, Miller WE, Muhm JR, Uhlenhopp MA : Early lung cancer detection : results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Mayo Clinic study. *Am Rev Resp Dis* 130 : 561, 1984
6. Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Tockman M, Sidransky D : Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res* 54 : 1634, 1994
7. Sozzi G, Miozzo M, Donghi R, Pilotti S, Carinani CT, Pastroino U, Della Porta G, Pierotti MA : Deletions of 17p and p53 mutations in preneoplastic lesions of the lung. *Cancer Res* 52 : 6079, 1992
8. Sundaresan V, Ganly P, Haselton P, Rudd R, Sinha G, Bleeheh NM, Rabbits P : p53 and chromosome 3 abnormalities, characteristic of malignant lung tumours, are detectable in preinvasive lesions of the bronchus. *Oncogene* 7 : 1989, 1992
9. Bennett WP, Colby TV, Travis WD, Borkowski A, Jones RT, Lane DP, Metcalf RA, Samet JM, Takeshima Y, Gu JR : p53 protein accumulates frequently in early bronchial neoplasia. *Cancer Res* 53 : 4817, 1993
10. Walker C, Robertson LJ, Myskow MW, Pendleton N, Dixon GR : p53 expression in normal and dysplastic bronchial epithelium and in lung carcinomas. *Br J Cancer* 70 : 297, 1994
11. Thiberville L, Payne P, Vielkinds J, LeRiche J, Horsman D, Nouvetr G, Palcic B, Lam S : Evidence of cumulative gene losses with progression of premalignant epithelial lesions to carcinoma of the bronchus. *Cancer Res* 55 : 5133, 1995
12. Chung GT, Sundaresan V, Hasleton P, Rudd R, Taylor R, Rabbits PH : Sequential molecular genetic changes in lung cancer development. *Oncogene* 11 : 2591, 1995

13. Franklin WA : The biology of bronchial premalignancy. *Semin Respir Crit Care* 17 : 309, 1996
14. Tockman MS : Advances in the early detection of lung cancer. *Semin Respir Crit Care* 17 : 335, 1996
15. Travis WD, Lubin J, Ries L, Devesa S : United States lung carcinoma incidence trends : declining for most histologic types among males, increasing for females. *Cancer* 77 : 2464, 1996
16. Kennedy TC, Proudfoot SP, Franklin WA, Merrick TA, Saccomanno G, Corkill ME, Mumma DL, Sirgi KE, Miller YE, Archer PG, Prochazka A : Cytopathological analysis of sputum in patients with airflow obstruction and significant smoking histories. *Cancer Res* 56 : 4673, 1996
17. Vahakangas KH, Samet JM, Metcalf RA, Welsh JA, Benner WP, Lane DP, Harris CC : Mutations of p53 and ras genes in radon associated lung cancer from uranium miners. *Lancet* 339 : 576, 1992
18. Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP : Preferential formation of beno(a)pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 274 : 430, 1996
19. Mao L, Lee JS, Kurie JM, Fan YH, Lippman SM, Lee JJ, Ro JY, Broxson A, Yu R, Morice RC, Kemp BL, Khuri FR, Walsh GL, Hittelman WN, Hong WK : Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* 89 : 857, 1997
20. Satoh Y, Ishikawa Y, Nakagawa K, Hirano T, Tsuchiya E : A follow-up study of progression from dysplasia to squamous cell carcinoma with immunohistochemical examination of p53 protein overexpression in the bronchi of ex-chromate workers. *Br J Cancer* 75 : 678, 1997
21. Katabami M, Dosaka-Akida H, Honma K, Kimura K, Fujino M, Uchida Y, Mikami H, Ohsaki Y, Kawakami Y, Kikuchi K : p53 and Bcl-2 expression in pneumoconiosis-related pre-cancerous lesions and lung cancers : frequent and preferential p53 expression in pneumoconiotic bronchiolar dysplasias. *Int J Cancer* 75 : 504, 1998
22. Scagliotti GV, Masiero P, Pozzi E : Biological prognostic factors in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 12 Suppl. 1 : S13-S25, 1995
23. Pastorino U, Andreola S, Tagliabue E, Pezzella F, Incarbone M, Sozzi G, Buyse M, Menard S, Pierotti M, Rilke F : Immunocytochemical markers in stage I lung cancer : relevance to prognosis. *J Clin Oncol* 15 : 2858, 1997
24. Graziano SL : Non-small cell lung cancer : clinical value of new biological predictors. *Lung Cancer* 17 Suppl. 1 : S37, 1997
25. Jacobson DR, Fishman CL, Mills NE : Molecular genetic tumor markers in the early diagnosis and screening of non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 6(Suppl. 3) : S3, 1995
26. Miozzo M, Sozzi G, Musso K, Pilotti S, Incarbone M, Pastorino U, Pierotti MA : Microsatellite alterations in bronchial and sputum specimens of lung cancer patients. *Cancer Res* 56 : 2285, 1996
27. Mao L, Lee DJ, Tockman MS, Erosan YS, Askin F, Sidransky D : Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 9871, 1994
28. Sidransky D : Importance of chromosome 9p loss in human lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 87 : 1201, 1995
29. Ebert W, Muley T, Drings P : Does the assessment of serum markers in patients with lung cancer aid in the clinical decision making process?

- Anticancer Res 16 : 2161, 1996
30. Bodner SM, Minna JD, Jensen SM, D'Amico D, Carbone D, Mitsudomi T, Fedorko J, Buchhagen DL, Nau MM, Gazdar AF, Linnoila RI : Expression of mutant p53 proteins in lung cancer correlates with the class of p53 gene mutation. *Oncogene* 7 : 743, 1992
 31. Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA : The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 319 : 226, 1986
 32. Yamamoto T, IKawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima H, Saito T, Toyoshima K : Similarity of protein encoded by the c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 319 : 230, 1986
 33. Kern JA, Schwartz DA, Nordberg JE, Weiner DB, Greene MI, Torney L, Robinson RA : p185neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival. *Cancer Res* 50 : 5184, 1990
 34. Tateishi M, Ishida T, Mitsudomi T, Kaneko S, Sugimachi K : Prognostic value of c-erbB-2 protein expression in human lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 27 : 1372, 1991
 35. Scagliotti GV, Leonardo E, Cappia S, Masiero P, Micela M, Gubetta L, Pozzi E : Epidermal growth factor receptor and neu-oncogene expression in lung cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 12 : 328, 1993
 36. Harpole DH, Herndon JE, Wolfe WG, Iglehart JD, Marks JR : A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology, and oncoprotein expression. *Cancer Res* 55 : 51, 1995
 37. Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rojenberg RK, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar AF, Minna JD : p53 : a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 246 : 491, 1989
 38. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC : Mutations in the p53 tumor suppressor gene : clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54 : 4855, 1994
 39. Harris CC : p53 tumor suppressor gene : from the basic research laboratory to the clinician abridged historical perspective. *Carcinogenesis* 17 : 1187, 1996
 40. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL : Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335 : 675, 1990
 41. Takahashi T, Takahashi T, Suzuki H, Hida T, Sekido Y, Ariyoshi Y, Ueda R : The p53 gene is very frequently mutated in small-cell lung cancer with a distinct nucleotide substitution pattern. *Oncogene* 6 : 1775, 1991
 42. Chiba I, Takahashi T, Nau MM, D'Amico D, Curiel DT, Mitsudomi T, Buchhagen DL, Carbone P, Piantadosi S, Koga H, Erissman PT, Slamon W, Holmes EC, Minna JD : Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. *Oncogene* 5 : 1603, 1990
 43. Kishimoto Y, Murakami Y, Shiraishi M, Hayashi K, Sekiya T : Abberations of the p53 tumor suppressor gene in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res* 52 : 4799, 1992
 44. Mitsudomi T, Lyama T, Kusano T, Ohsaki T, Nakanishi R, Shirakusa T : Mutations of the p53 gene as a predictor of poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer [abstract]. *Proc Am Asso Cancer Res* 34 : 516, 1993
 45. Reichel MB, Ohgaki H, Petersen I, Kleihues P :

- p53 mutations in primary human lung tumors and their metastases [abstract]. *Proc Am Asso Cancer Res* **34** : 534, 1993
46. Carbone DP, Mitsudomi T, Chiba I, Piantadosi s, Rusch V, Nowak JA, McIntire D, Slamon D, Gazdar A, Minna JD : p53 immunostaining positivity is associated with reduced survival and is imperfectly correlated with gene mutations in resected non-small cell lung cancer. *Chest* **106** : 377S, 1994
47. Hiyoshi H, Mastuno Y, Kato H, Shimosato Y, Hirohashi S : Clinicopathological significance of nuclear accumulation of tumor suppressor gene p53 product in primary lung cancer. *Jpn J Cancer Res* **83** : 101, 1992
48. Sozzi G, Carney D : Molecular biology of lung cancer. *Current Opinion Pul Med* **4** : 207, 1998