

위선암에서 Survivin과 KAI-1의 발현에 대한 연구

고려대학교 의과대학 병리학교실

이 주 한 · 김 병 수 · 최 종 삼

Expression of Survivin and KAI-1 in Gastric Adenocarcinomas

Ju-Han Lee, M.D., Byung-Soo Kim, M.D. and Jong-Sang Choi, M.D.

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

Purpose: The aim of this study was to investigate the impact of survivin expression and the decrease or loss of KAI-1 on the clinical stage and the survival rate in gastric adenocarcinomas.

Materials and Methods: Expressions of survivin and KAI-1 were immunohistochemically determined in 40 cases of gastric adenocarcinomas. The survivin and KAI-1 expressions were also analyzed by using western blots in 14 cases among them.

Results: Resected gastric cancer specimens from 40 patients (intestinal type: 15 cases and diffuse type: 25 cases) were evaluated immunohistochemically. Survivin protein expressions were significantly higher in diffuse types ($P=0.03$) and in advanced clinical stages (UICC TNM II and III, $P=0.02$). In contrast, a decrease or loss of KAI-1 expression had no statistically significant correlation with the Lauren classification or the clinical stage. Survivin protein positivity was associated with an unfavorable prognosis. Decrease or loss of KAI-1 was associated with a shorter disease free survival rate ($P<0.01$). The western blot data ($n=14$) indicated that neither survivin protein over-expression nor KAI-1 down-expression had an significant correlation with the Lauren classification or the clinical stage.

Conclusion: In gastric carcinomas, survivin over-expression and decrease or loss of KAI-1 were associated with unfavorable prognosis, being independent prognostic factors along with the clinical stage and the disease free survival rate. (J Korean Gastric Cancer Assoc 2003;3:44-49)

Key Words: Gastric adenocarcinoma, Survivin, KAI-1, Immunohistochemistry, Western blot

중심 단어: 위선암, Survivin, KAI-1, 면역조직화학염색, Western blot

서 론

위선암은 한국인의 전체 암종 중 20.9%를 차지하는 발생 빈도가 가장 높은 암종으로 이 종양의 진단 및 예후와 관련된 인자를 찾는 것은 매우 중요하다.(1) 위암의 예후를 결정하는 가장 중요한 인자는 종양의 침윤 정도와 림프절 및 원격 전이 여부에 따라 결정되는 TNM 병기이고, 그 외에도 조직학적 유형, 환자의 나이, DNA ploidy나 세포 증식 능력, *c-erbB-2* 단백, p53 단백 등이 예후 예측 인자로 연구되어 왔다.(2-8)

Survivin은 최근에 밝혀진 유전자로 IAP (inhibition of apoptosis) 단백 중 하나이고, bcl-2 family와는 다른 기전으로 세포자멸사(apoptosis)를 방해하는 것으로 알려져 있다.(9) Survivin 유전자는 염색체 17q25에 위치하고 있고, 3개의 intron과 4개의 exon으로 구성되어 있으며, 142개의 아미노산 배열을 가지고 있는데, 이 중에는 세포자멸사를 방해하는 baculovirus IAP repeat (BIR)가 포함되어 있다.(9-11) 세포자멸사를 억제하는 survivin의 역할 때문에 악성 종양에서도 survivin에 대한 연구가 이루어지고 있는데, 지금까지 보고된 바로는 survivin mRNA와 단백질 대부분의 암종에서 과발현되는 것으로 보고되고 있고, 특히 직장암이나, 비소세포성 폐암, 유방암 등에서 survivin의 과발현을 보이는 예들이 생존율이 더 낮다는 보고들이 있어, survivin의 예후인자로서의 중요성에 대한 연구가 계속되고 있다.(9,12-14)

KAI-1은 전립선암의 전이 억제 유전자로 처음 보고된 유전자로 염색체 11p11.2에 위치하며 267개의 아미노산 배열을 가지고 세포막에 존재하는 것으로 알려져 있다.(15) KAI-1은 TM4SF (transmembrane 4 superfamily)의 하나인 CD82, CD33과 동일한 것으로 세포분화, 분열, 활성화, 운동성 등을 조절하여 종양의 진행과 전이에서 중요한 역할을 하고 있다.(16) KAI-1은 전립선암뿐 아니라 다른 암종에서

책임저자 : 최종삼, 서울특별시 성북구 안암동 5가 126-1
고려대학교 의과대학 병리학교실, 136-705
Tel: 02-920-6145, Fax: 02-953-3130
E-mail: jongchoi@kumc.or.kr

접수일 : 2003년 1월 29일, 게재승인일 : 2003년 2월 10일

도 전이 억제인자로서의 역할에 대해 연구되고 있는데 췌장암, 비소세포성 폐암, 방광암, 유방암 등의 진행과정에 관여하는 것으로 알려져 있다.(17-20)

본 연구는 위암에서 survivin과 KAI-1 단백질의 발현 여부를 면역화학 염색에서 비교 관찰하고, western blot을 이용하여 survivin과 KAI-1 단백질의 유무를 확인하며, survivin의 발현과 KAI-1 단백질 발현의 감소 또는 소실이 생존율과 예후에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보려고 시행하였다.

방 법

1) 연구대상

1996년 11월부터 1999년 9월까지 고려대학교 안암병원에서 위선암으로 수술한 예 중 파라핀 포매조직의 보관 상태가 양호하여 면역조직화학 염색이 가능하고, 생존 여부가 확인된 40예를 대상으로 하였다. 위선암은 진행성 암이거나 조기 위암 중 림프절 전이가 있는 예들을 대상으로 하였다. 40예 중 동결 보관된 신선 조직이 있는 14예에서 western blot 분석을 시행하였다.

임상 및 병리 기록지를 중심으로 환자의 연령, 성별, 병기 등을 확인하였고, 전화를 통해 생존 여부 및 사망한 날짜를 확인하였다. 환자의 평균 추적기간은 29.8개월(범위 1~67개월)이었고, 40예 중 27예(67.5%)가 사망하였다. 40예의 평균 나이는 60.9세(범위 40~76세)이었으며, 남자 25예, 여자 15예로 남녀의 성비는 1.7 : 1이었다. 국제 암연합회(Union Internationale Contre le Cancer, UICC)의 TNM 병기(21)를 이용하여 분류하였으며, 병기 IB가 1예(2.5%), 병기 II가 5예(12.5%), 병기 IIIA가 3예(7.5%), 병기 IIIB가 25예(62.5%), 병기 IV가 6예(15%)였다. 37예가 진행성 위암이었고 3예가 림프절 전이가 있는 조기 위암이었다. Western blot에 사용된 14예는 병기 II가 3예(21.4%), III가 11예(78.6%)였다.

2) 연구방법

(1) 병리학적 검색: 40예를 재검경하여 Lauren의 분류에 따라 장형(intestinal type)과 미만형(diffuse type)으로 재분류하였다.

(2) 면역조직화학 염색: Survivin 단백질 (Santa Cruz, California, USA)과 KAI-1 단백질(Santa Cruz, California, USA)에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였다. 10% 중성 완충 포르말린에 고정된 후 제작한 파라핀 포매조직을 4 μ m 두께로 박절하여 xylene으로 2회 탈파라핀하고 에탄올로 처리한 후 증류수로 합수시켰다. 합수시킨 절편을 시트르산염 완충액(citrate buffer, pH 6.0)에 15분간 처리한 후 3% 과산화수소로 내인성 과산화효소의 작용을 억제시켰다. Tris 완충용액으로 수세한 후 일차항체로 survivin (1 : 100) 및 KAI-1 (1 : 100)을 이용하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 Tris 완충용액으로 수세하였다. Biotin과 결합된 2차항체(Zymed,

USA)에 30분간 1회 반응시킨 후 Tris 완충용액으로 수세하고 streptavidin과 peroxidase가 결합된 용액에 30분간 처리하였다. 이를 diaminobenzidine (DAB)으로 발색시킨 다음 Mayer's hematoxylin으로 대조염색하고 봉입하였다.

판독방법은 survivin 단백질은 핵이나 세포질에 갈색으로 염색되면 양성으로 판정하였고, KAI-1 단백질은 세포질에 갈색으로 염색되면 양성으로 판정하였다. 양성 세포의 양적 평가는 양성 세포가 없거나 5% 미만인 경우는 음성(negative), 양성 세포가 6~50%인 경우는 1+ (양성), 51% 이상인 경우는 2+ (강양성)로 분류하였다.

3) Western blot analysis

암 조직을 분쇄시킨 후 1 ml lysis buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.0, 1% (V/V) Nonidet P-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml leupeptin)를 이용, 시료를 분해(lysis)시켰다. 13,000 rpm, 4°C 조건하에서 원심분리를 통해 debris를 제거하고, Laemmli sample buffer를 넣고 5분 동안 끓인 후 정제된 위암 단백질 약 20 μ g을 10% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동을 시킨 후 nitrocellulose로 단백질을 전이시킨다. Tris buffered saline에 녹아있는 5% skimmed milk를 이용 membrane을 1시간 동안 상온에서 block시켰다. 일차항체인 survivin 단백질(Santa Cruz, California, USA) 및 KAI-1 단백질(Santa Cruz, California, USA)에 대한 각각의 항체를 1 : 1,000의 비율로 5% skimmed milk로 희석시킨 후 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 1차 항체 반응 후 PBS/Tween-20을 이용하여 5분씩 3회 씻어 준 후 적당량의 2차 항체와 반응시켰고 위와 동일한 방법으로 Membranes을 씻어주고 chemoluminescence (ECL; Amersham)를 이용 모든 단백질을 확인하였다. 동일 Membrane을 이용 2개의 단백질을 동시에 확인하기 위해 0.1 M glycerine pH 2.9을 이용 Membrane을 30분 동안 반응시킨 후 PBS/Tween-20으로 3회 씻어 주고 blocking 단계부터 위에서 언급한 과정을 재시행하였다.

4) 통계 분석

자료의 통계 처리는 SPSS 9.0 프로그램을 이용하였으며, 면역조직화학 염색 결과와 Lauren분류 및 임상병기와의 비교는 Chi-square test로 검정하여 P<0.05인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다. 생존율은 Kaplan-Meier 방법으로 산출하였으며, 생존 곡선은 Log-rank test로 비교하여 P값이 0.05 미만인 것을 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1) 병리학적 검색

40예를 Lauren 분류법에 따라 장형과 미만형으로 나누어 볼 때 장형은 15예(37.5%)였고, 미만형은 25예(62.5%)였다.

40예 중 western blot에 사용된 14예는 장형이 8예(57.1%), 미만형이 6예(42.9%)였다.

2) 면역조직화학 염색 소견

(1) Survivin 단백질 발현 양상(Fig. 1): Survivin 단백질이

Lauren 분류와 TNM 병기에 따른 발현 결과는 Table 1에 정리하였다. 미만형이 장형에 비해 survivin 단백질 발현이 통계적으로 유의하게 증가되었고(P=0.03), TNM병기가 높을수록 발현이 유의하게 증가되었다(P=0.02).

(2) KAI-1 단백질 발현 양상(Fig. 1): KAI-1 단백질이 Lauren

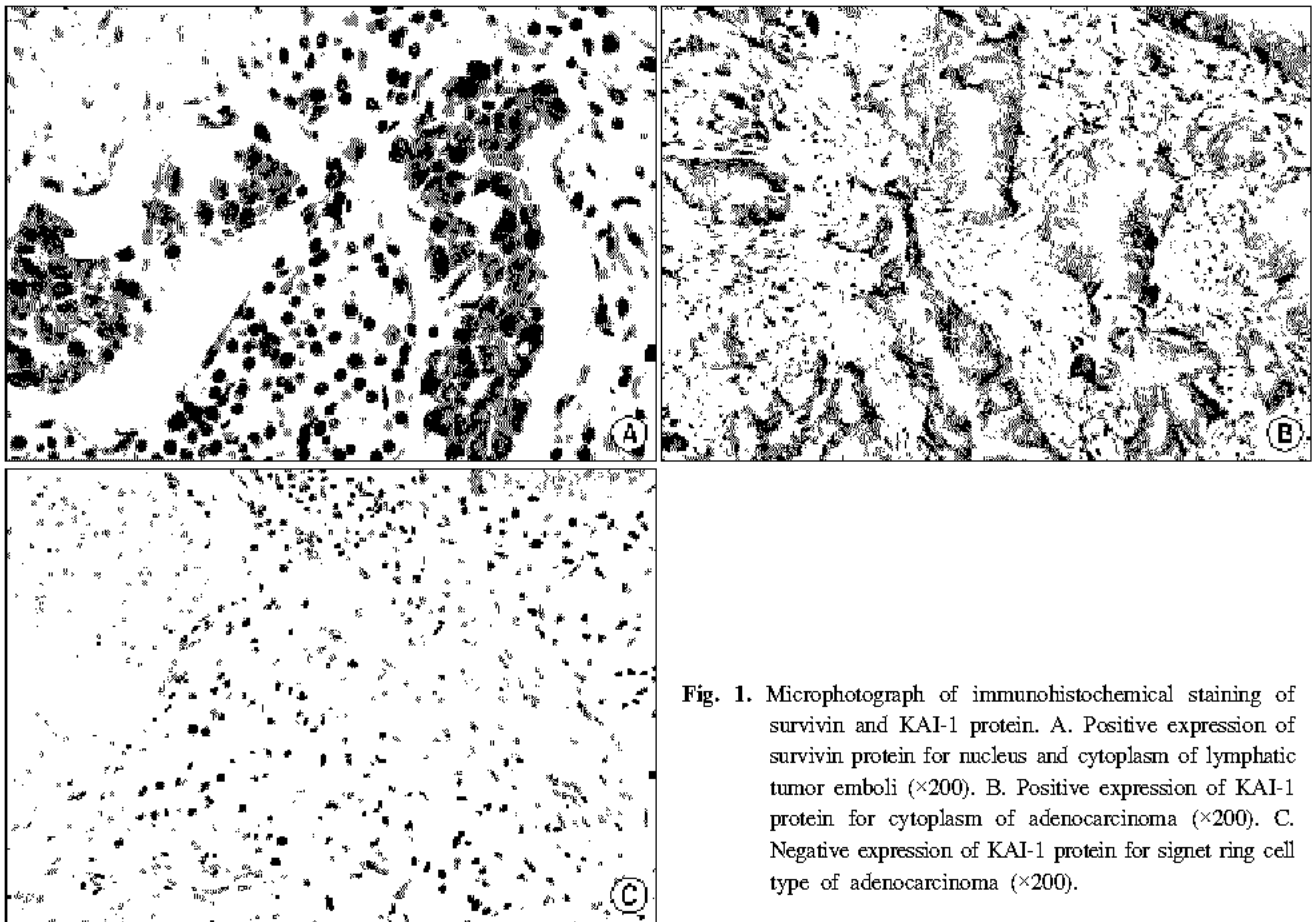


Fig. 1. Microphotograph of immunohistochemical staining of survivin and KAI-1 protein. A. Positive expression of survivin protein for nucleus and cytoplasm of lymphatic tumor emboli (×200). B. Positive expression of KAI-1 protein for cytoplasm of adenocarcinoma (×200). C. Negative expression of KAI-1 protein for signet ring cell type of adenocarcinoma (×200).

Table 1. Survivin expression related Lauren classification and TNM stage

Expression (Total number)	Negative (n=10)	Positive (+) (n=12)	Positive (++) (n=18)	P value
Lauren classification				0.03
Intestinal type	7 (70.0%)	2 (16.7%)	6 (33.3%)	
Diffuse type	3 (30.0%)	10 (83.3%)	12 (66.7%)	
UICC TNM stage				0.02
I	1 (10.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
II	3 (30.0%)	0 (0.0%)	2 (11.1%)	
III	6 (60.0%)	11 (91.7%)	11 (61.1%)	
IV	0 (0.0%)	1 (8.3%)	5 (27.2%)	

1+ = 6~50% positive tumor cells, 2+ = 51~100% positive tumor cells

Table 2. KAI-1 expression related to Lauren Classification and TNM stage

Expression (Total number)	Negative (n=7)	Positive (+) (n=15)	Positive (++) (n=18)	P value
Lauren classification				>0.05
Intestinal type	2 (28.6%)	4 (26.7%)	9 (50.0%)	
Diffuse type	5 (71.4%)	11 (73.3%)	9 (50.0%)	
UICC TNM stage				>0.05
I	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (5.6%)	
II	0 (0.0%)	1 (6.7%)	4 (22.2%)	
III	6 (85.7%)	11 (73.3%)	11 (61.1%)	
IV	1 (14.3%)	3 (20.0%)	2 (11.1%)	

1+ = 6~50% positive tumor cells, 2+ = 51~100% positive tumor cells

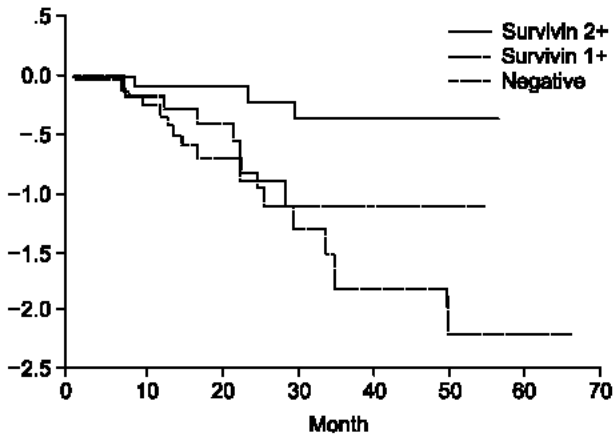


Fig. 2. Survivial analysis according to survivin expression.

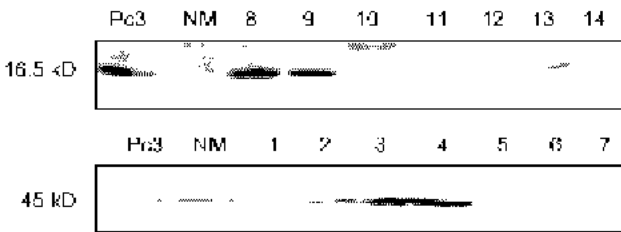


Fig. 3. Survivin and KAI-1 expression in western blot. Upper lane shows western blot of survivin protein. 8, 9, 13 show positive reaction. Lower lane shows western blot of KAI-1 protein. 2, 3, 4 show positive reaction, but 1, 5, 6, 7 show negative reaction. Pc 3: Human prostatic cancer cells (Positive control), NM: Normal stomach tissue, Sample Number 1:96-8252, 2:96-8423, 3:96-8937, 4:96-8944, 5:97-10059, 6:97-1921, 7:97-1982, 8:97-6351, 9:97-8728, 10:7-9699, 11:97-9768, 12:98-1130, 13:98-1171, 14:98-1178.

분류와 TNM 병기에 따른 발현 결과는 Table 2에 정리하였다. KAI-1 단백질 발현 양상과 Lauren 분류와 TNM 병기 사이에는 통계학적 상관 관계가 없었다($P > 0.05$).

3) 생존율과의 관계

Survivin 단백질 발현 양상에 따른 생존율을 보면 강양성으로 발현된 군들이 음성인 예들에 비해 생존율이 낮았고 이는 통계학적으로 유의하였다($P < 0.01$, Fig. 2). KAI-1 단백질 발현 양상에 따른 생존 분석 결과를 보면 강양성으로 발현된 예들이 양성으로 발현이 감소된 예들보다 생존율이 더 높았고 이는 통계학적으로 유의하였다($P < 0.01$).

4) Western blot analysis

14예에 대한 Western blot 결과 survivin 단백질과 KAI-1 단백질 발현의 양상은 Table 3과 Table 4에 정리하였다(Fig. 3). Survivin과 KAI-1 단백질의 발현 여부와 Lauren 분류 및 TNM

Table 3. Clinicopathological analysis of Survivin expression by western blot

	Negative (n=4)	Positive (n=10)	P value
Lauren classification			> 0.05
Intestinal type	3 (75.0%)	5 (50.0%)	
Diffuse type	1 (25.0%)	5 (50.0%)	
UICC TNM stage			> 0.05
II (n=3)	1 (25.0%)	2 (20.0%)	
III (n=11)	3 (75.0%)	8 (80.0%)	

Table 4. Clinicopathological analysis of KAI-1 expression by western blot

	Negative (n=8)	Positive (n=6)	P value
Lauren classification			> 0.05
Intestinal type	4 (50.0%)	4 (66.7%)	
Diffuse type	4 (50.0%)	2 (33.3%)	
UICC TNM stage			> 0.05
II (n=3)	1 (25.0%)	2 (20.0%)	
III (n=11)	7 (75.0%)	4 (66.7%)	

병기 사이에는 통계학적 상관 관계가 없었다($P > 0.05$).

고 찰

암의 발생과 성장, 전이에는 복잡하고 많은 과정들이 관여한다. 최근 유전학과 분자생물학적 연구가 진행되면서 암의 여러 가지 기전과 다양한 유전자에 대한 많은 연구가 진행되고 있으나, 아직 임상적 이용에는 제한적으로 이루어지고 있다. 정상 세포에 비해 암세포는 확연히 구분되는 몇 가지 특징이 있는데, 그중 종양 세포가 원발성 부위를 떠나 순환계를 통해 다른 부위로 이동하는 전이 과정과 세포자멸사 조절 기능이 마비되어 비정상적으로 지속적인 성장을 하는 기전 등이 그 대표적인 예가 될 것이다. 암의 여러 과정에 대한 많은 연구가 이루어지고 있으나, 실제 환자의 진단과 치료 과정에서는 아직 충분한 진전이 이루어지고 있지는 못한 상태이다. 대부분의 암에서 가장 예후를 결정하는 인자는 임상병기와 조직학적 분류이다. 위암의 예후인자도 임상병기가 가장 중요한데 본 연구에서도 생존율 분석 결과, 임상 병기가 I기에서 IV기로 높아질수록 생존율이 감소하였고, 임상병기 IV기는 임상병기 II기와 III기에 비해 통계학적으로 유의하게 생존율이 감소하였다. 이는 연구 대상 자체가 주로 진행성 위암을 대상으로 이루어졌기 때문에 추정되며 조기 위암을 포함할 경우 임상 병기에 따른 뚜렷한 차이를 보여줄 것으로 생각된다. Lauren 분류에 따른 생존율 차이를 보면 장형이 미만형보다 생존

율이 높았고, 통계학적으로 유의한 차이를 보이지는 못 하였으나, 조직학적 아형 분류가 예후를 예측할 수 있는 지표가 될 수 있음을 보여주었다.

세포자멸사를 억제하는 기전은 사립체 막으로부터 cytochrome c가 전위하지 못하게 하는 bcl-2 계통의 단백질이 관여하는 것으로 알려져 있는데, 이 외에도 Fap-1, decoy receptor (DR3, DR4), soluble Fas 등이 다양한 단백질이 정상 혹은 종양 세포들에서 세포자멸사를 억제하는 것으로 보고되고 있다.(22) 최근에는 IAP (inhibition of apoptosis) 단백질도 여러 단계에서 세포자멸사를 억제하는 것으로 밝혀졌는데, survivin은 Ambrosini 등에 의해 최초로 종양세포에서 발견된 IAP (Inhibition of apoptosis) 단백질 중 하나이다.(9)

Survivin은 세포 주기 중 G2-M 기에 발현되어 유사분열시 방추 단백질과 반응을 하여 세포자멸사를 억제하는 한편, 세포자멸사 경로의 다양한 지점인 caspase 9, caspase 3, caspase 7 등에서도 세포자멸사를 억제하는 작용을 가진 것으로 보고되고 있다.(23,24) 그러나, 다른 IAP 단백질이 정상 성인 조직에 광범위하게 존재하는 데 반해 survivin mRNA는 태아 조직에서만 존재하고 정상 성인에서는 태반과 흉선에만 존재한다는 점이 다른 IAP 단백질과 다른 점이다.(9,11) 최근 survivin mRNA와 단백질 대부분의 암종에서 과표현된다고 보고되고 있어 다양한 암종에서 예후인자나 치료로 사용하기 위한 다양한 연구들이 이루어지고 있다.(9,12-14) 위암에서 survivin을 예후 인자의 하나로 연구한 것은 매우 드문데, Lu 등(25)은 174예의 위암에서 면역조직화학 염색을 시행하여 survivin이 정상 조직에서 발현되지 않으나, 암종에서 발현되는 것을 확인하였다. Okada 등(26)은 133예의 위암을 면역조직화학 염색을 시행한 결과 핵과 세포질에서 각각 82%와 88%의 양성을 보였고, 핵에 양성을 보인 경우 예후가 더 좋다는 보고를 하기도 하였다. 본 연구의 경우 western blot 결과 survivin은 71.4%에서 단백질 발현을 보였고 면역조직화학 염색상 강양성 45%, 양성 30%로 발현되었다. survivin 단백질 발현은 장형보다는 미만성에서 더 강하게 발현되는 양상을 보였고, 통계학적으로 유의하였다($P=0.03$). 또한 임상 병기가 높을수록 survivin 단백질이 더 강하게 발현되는 양상을 보였고, 통계학적으로 유의하였다($P=0.02$). survivin 단백질에 대한 생존곡선 분석에서도 강양성과 양성으로 발현된 군들이 음성인 예들에 비해 생존율이 낮았고 이는 통계학적으로 유의하였다($P=0.05$, $P<0.01$). 이러한 결과를 통해 survivin 발현이 위암에서 독립적인 예후인자로 활용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

한편 KAI-1은 전립선, 폐, 유방 등 인체 정상 조직에서 발현되는 반면, 전립선 종양에서는 70%가 감소하고 전이가 된 경우는 거의 발현되지 않는 것을 관찰하여 전립선암의 전이억제 유전자로 처음 알려지게 되었다.(15) 최근 많은 연구들을 통하여 KAI-1 단백질 발현 감소가 전립선암뿐 아니라, 난소암, 방광암, 자궁내막암, 폐암 등에서 관찰되고 있

다.(17-20,27) 반면 위암에서는 KAI-1 단백질 발현의 역할에 대한 이견이 있다. Guo 등(28)이 식도암과 위암에서 *in situ* hybridization 검사와 northern blot으로 측정된 KAI-1 mRNA 발현은 종양의 분화, 병기, 전이 여부와 관련성을 보이지 않았다. 그러나 Hinoda 등(29)이 면역조직화학 염색을 통해 관찰한 KAI-1의 발현은 저등급(I, II) 위암에 비해 고등급(III, IV) 위암에서 감소되었다. 본 연구에서는 면역조직화학 염색 결과 KAI-1 단백질 강양성으로 발현되는 경우는 45%이었고, 양성으로 감소되는 경우는 37.5%이었으며, 음성으로 발현되지 않는 경우는 17.5%이었다. Western blot에서도 KAI-1 단백질은 43%에서 양성으로 발현되었고 57%에서는 발현이 관찰되지 않았다. KAI-1 단백질 발현과 임상병기나 조직학적 분류와는 상관관계가 없었으나, 생존곡선 분석상 강양성으로 발현된 예들이 양성으로 발현이 감소된 예들보다 생존율이 더 높았고 이는 통계학적으로 유의하여($P<0.01$), KAI-1 역시 위암에서 예후인자로 이용될 가능성이 있다는 것을 알 수 있었으나, 이를 확인하게 위해서는 좀 더 많은 증례에 대한 연구가 필요하리라 생각된다. Western blot상 survivin, KAI-1 발현 여부와 Lauren 분류나 임상병기 사이에서 통계학적 상관관계는 없었는데, 이는 western blot에 사용된 14예로는 개체수가 통계학적 분석을 수행하기에는 너무 적기 때문에 발생한 것으로 이후 더욱 많은 예에 대한 추가적인 실험과 면역조직화학 염색 결과와의 비교가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

진행성 위암과 림프절 전이가 있는 조기 위암 40예를 대상으로 하여 survivin과 KAI-1에 대한 면역조직화학염색과 western blot을 시행한 결과, Survivin 단백질 발현은 장형보다는 미만성에서 강하게 발현되었고, TNM 병기가 높을수록 강하게 발현되었으며, 생존곡선 분석상 강양성과 양성으로 발현된 군들이 음성인 예에 비해 유의하게 생존율이 낮았다. KAI-1 단백질 발현 양상은 Lauren 분류나 TNM 병기와는 상관관계가 없었으나, 생존곡선 분석상 강양성으로 발현된 예들이 양성으로 발현이 감소된 예들보다 유의하게 생존율이 더 높아, 위암 환자에서 survivin 단백질과 KAI-1 단백질의 발현 양상을 함께 평가하는 것이 환자의 예후와 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

REFERENCES

1. The 19th Annual report of the Central Cancer Registry in Korea (1998.1-1998.12). Central Cancer Registry Center in Korea, Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea, 2000;9-11.
2. Davessar K, Pezzullo JC, Kessimian N, Hale JH, Jauregui HO.

- Gastric adenocarcinoma. Prognostic significance of several pathologic parameters and histologic classification. *Hum Pathol* 1990;21:325-332.
3. Grabiec J, Owen DA. Carcinoma of the stomach in young persons. *Cancer* 1985;56:388-396.
 4. Dupont JB Jr, Lee JR, Burton GR, Cohn I Jr. Adenocarcinoma of the stomach. Review of 1,497 cases. *Cancer* 1978;41:941-947.
 5. Kimura H, Yonemura Y. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in advanced gastric cancer and its relationship with prognosis. *Cancer* 1991;67:2588-2593.
 6. Maeda K, Chung Y, Onoda N, Kato Y, Nitta A, Arimoto Y, Yamada N, Kondo Y, Sowa M. Proliferating cell nuclear antigen labeling index of preoperative biopsy specimens in gastric carcinoma with special reference to prognosis. *Cancer* 1994;73:528-533.
 7. Yonemura Y, Ninomiya I, Ohoyama S, Kimura H, Yamaguchi A, Fushida S, Kosaka T, Miwa K, Miyazaki I, Endou Y. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in gastric carcinoma. Immunoreactivity for c-erbB-2 protein is an independent indicator of poor short-term prognosis in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1991;67:2914-2918.
 8. Martin HM, Filipe MI, Morris RW, Lane DP, Silvestre F. p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1992;50:859-862.
 9. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997;3:917-921.
 10. Li F, Altieri DC. The cancer anti-apoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell-dependent expression. *Cancer Res* 1999;59:3143-3151.
 11. LaCasse E, Baird CS, Kormeluk RG, Mackenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998;17:3247-3259.
 12. Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyada M, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5071-5074.
 13. Monzo M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sanchez JJ, Maestre J, Martin C, Font A, Barnadas A, Abad A. A novel anti-apoptosis gene: reexpression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non small cell lung cancers. *J Clin Oncol* 1999;17:2100-2104.
 14. Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:127-134.
 15. Dong JT, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW. KAI 1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science* 1995;268:884.
 16. Helmer ME, Mannion BA, Berditchevski F. Association of TM4SF proteins with intrins: relevance to cancer. *Biochim Biophys Acta* 1996;7:1287(2-3):67-71.
 17. Guo X, Friess H, Graber HU, Kashiwagi M, Zimmermann A, Kore M, Buchler MW. KAI 1 expression is up-regulated in early pancreatic cancer and decreased in the presence of metastasis. *Cancer Res* 1996;56(21):4876-4880.
 18. Adachi M, Taki T, Ieki Y, Huang CI, Higashiyama M, Miyake M. Correlation of KAI 1/CD 82 gene expression with good prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1996;56(8):1751-1755.
 19. Yu Y, Yang JL, Markovic B, Jackson P, Yardley G, Barret J, Russel PJ. Loss of KAI 1 messenger RNA expression in both high grade and invasive human bladder cancers. *Clin Cancer Res* 1997;3(7):1045-1049.
 20. Huang CI, Kohno N, Ogawa E, Adachi M, Taki T, Miyake M. Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrence in breast cancer patients. *Am J Pathol* 1998;153(3):973-983.
 21. Sobin LH, Wittekind Ch. UICC TNM Classification of malignant tumors. 5th ed. New York: Wiley-Liss, 1997, p59.
 22. Adams JM, Cory S. The bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-1326.
 23. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998;396:580-584.
 24. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigno N, Oltersdorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998;58:5315-5320.
 25. Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel anti-apoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1998;58:1808-1812.
 26. Okada E, Murai Y, Mtsui K, Isizawa S, Cheng C, Masuda M, Takano Y. Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer Lett* 2001;163:109-116.
 27. White A, Lamb PW, Barrett JC. Frequent downregulation of the KAI1(CD82) metastasis suppressor protein in human cancer cell lines. *Oncogene* 1998;16(24):3143-3149.
 28. Guo XZ, Friess H, Maurer C, Berberat P, Tang WH, Zimmermann A, Naef M, Graber HU, Kore M, Buchler MW. KAI1 is unchanged in metastatic and nonmetastatic esophageal and gastric cancers. *Cancer Res* 1998;58(4):753-758.
 29. Hinoda Y, Adachi Y, Takaoka A, Mitsuuchi H, Satoh Y, Itoh F, Kondoh Y, Imai K. Decreased expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in gastric cancer. *Cancer Lett* 1998;17:129(2):229-234.