

대장암에서 7, 20번 염색체의 Amplification

세명대학교 임상병리학과¹, 대구보건대학 임상병리과²

이 재 식¹ · 김 수 정²

Amplification on 7th and 20th Chromosome from Colorectal Carcinoma

Jae Sik Lee¹ and Su-Jung Kim²

Department of Clinical Laboratory Science, Semyung University, Jecheon 390-711, Korea¹

Department of Clinical laboratory Science, Daegu Health college, Daegu 702-722, Korea²

Colorectal carcinoma from various cancers is fourth ranked occurred to Korean. Due to western dietary life, this cancer has been increased continuously. Therefore, the further study will be needed to find a candidate gene involved in the development and progression of colorectal carcinoma as well as to diagnose and treatment helpfully. The purpose of this study was designed to find a carcinogenesis gene using microsatellite marker on chromosomes 7th and 20th from 30 colon cancer patients. The amplification was investigated in order of D20S97 57% (17/30), D20S101 57% (17/30), D20S119 53% (16/30), D7S483 50% (15/30), D7S495 47% (14/30), D7S498 47% (14/30). The genetic mutation pattern depends on loci of colorectal carcinoma was shown highly amplified with 3.77 from colon cancer than with 2.08 from right colorectal carcinoma ($P < 0.018$). The genetic mutation with lymph nodes was investigated higher with 4.13 at metastasized group than with 1.93 at non-metastasized group ($P < 0.001$). There was no difference at comparison between histological classification and serological CEA increase as well as on genetic mutated pattern depends on disease stage. It is suggested that the amplification on chromosomes 7q and 20q determines a pivotal role from first stage to metastasis cancer and also functions as an useful marker on diagnosis and treatment of colorectal carcinoma patients as well as follow-up checkup. Recently, the diagnosis and study using genetic analyzer are necessary for efficient application. Fortunately, several university hospitals run this genetic analyzer currently so it is expected that this method makes full use of clinical application

Key Words : Amplification, Colorectal Carcinoma, Microsatellite Marker, Chromosome

I. 서 론

대장암은 우리나라에서 많이 발병하는 4대 암의 하나로써, 경제적인 발전을 통한 생활양식의 서구화 등으로 인해 매년 증가 추세에 있다(송 등, 2007; 최 등, 2007). 대장암 발병의 원인을 찾기 위한 연구방법으로는, 염색

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

체 전체의 변화를 알 수 있는 세포유전학적인 방법과 염색체의 작은 부분을 알 수 있는 분자유전학적인 방법이 널리 이용되고 있으며, 이번 연구에서 사용된 분자유전학적인 방법으로는 microsatellite marker를 이용하여 PCR의 증폭산물로, 염색체의 작은 유전자 변형부위를 선별할 수 있는 장점이 있는 방법이다.

Microsatellite란 짧고 반복적인 DNA 염기서열로 모든 염색체에 고루 분포되어 있으며, 일반적으로 2 bp (CA repeats)의 반복에 의한 microsatellite는 100,000 bp 마다 한 번씩 일어나며, 이들의 반복 단위는 개인에 따라 다르므로 유전자 다형성을 나타낸다. 이 microsatellite를 분석할 때 정상조직과 비교하여 종양조직 내에서 염기 반복 단위가 누락 또는 첨가되어 길이가 변화하면서, 유전자의 다형성을 나타내는 것을 microsatellite instability(MSI)라고 한다.

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, LOH)이 예후와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 세포유전학적 연구는 검체 처리가 용이하지 못하고 세포 배양이 어려워, 염색체를 대상으로 한 연구 결과가 많지는 않으나, 염색체 7, 20의 증폭과 17, 18 결손 등이 나타난다고 보고되어 있다 (Bardi 등 1995; Meijer 등, 1998).

이에 저자는 대장암 환자의 염색체에서 특징적인 증폭을 나타낸 7번 20번 염색체의 microsatellite marker 6 개를 이용하여, 작은 부위에서의 유전자 변화를 검출하고, 대장암 발암 기전에 주요한 역할을 할 수 있는 유전자와, 치료 및 예후 결정에 도움이 되는 유전자를 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

Amplification 분석을 위해서, 2000~2001년 부산의 K병원에서 수술 받은 대장암 환자 30 예의 조직을 제공받아 실험에 사용하였다. Amplification 분석에는 동일 환자의 종양 조직과 정상 조직에서 각각 얻은 DNA를 이용하

였으며 환자의 임상양상을 제시하였다(Table 1). 대상 중 남자가 14 예, 여자는 16 예이었고, 평균연령은 55 세 (32~80)였다. 병기별로는 stage I이 2 예, stage II가 10 예, stage III이 15 예, stage IV가 3 예이었으며, 대장암의 병기 결정은 AJCC(American Joint Committee on Cancer) 기준에 따랐다. 조직형 별로는 고분화형이 17 예, 중분화형이 8 예, 저분화형이 3 예, 점액성 암이 2 예이었다.

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°C 항온수조에서 하룻밤 방치 시켜 조직을 완전히 용해시켰다. 다음 RNase를 넣어 RNA를 제거하였고, protein precipitation solution으로 단백질을 침전시켰다. 상층 액을 조심히 옮겨 100% ethanol을 넣어 DNA가 보이면, 75%, 95% ethanol 으로 세척하였다. 세척 한 DNA를 말린 후, DNA rehydration 용액으로 잘 녹여서 DNA를 추출하였다. DNA 농도는 실험에 적합하도록 0.1~0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 조절하였으며, ratio는 1.6~1.8에 해당되는 것만 실험에 사용하였다.

3. Microsatellite oligonucleotide primer 합성

원하는 primer의 cytogenetic localization을 여러 문헌과 Genbank(www.ncbi.nlm.nih.gov)에서 검증된 염기서열을 찾았다. 또한 primer sequence로 PCR에서의 2차 구조 형성을 예측하는 program으로 확인하여, 안정적이고 sequence가 긴 것으로 primer를 고안하였다. primer의 합성은 GenoTech(Korea)에 의뢰하였다.

4. Manual method

1) 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 μL 가 되도록 반응 부피를 맞추어 PCR을 시행하였다. 각 primer에 대한 최적 결합 온도를 찾기 위해 조건을 바꿔가며, 낮고 확실한 band가 보일 때까지 반복 실험을 하였다.

PCR은 94°C에서 5분간 초기 열 변성을 시행한 다음, 94°C 변성 30 초, primer별 최적 결합 온도에서 30 초, 72°C 합성 30 초로 30 회 순환시켰으며, 마지막 합성은 72°C에서 5분간 시행하였다. PCR product의 재현성을 확인하고자 각 primer별로 3 회 이상 PCR을 시행하였고, 2% agar gel 상에서의 크기와 band를 비교하였다. 각 primer별로 재현성이 확인된 후 실험에 사용하였다.

2) DNA sequencing gel 및 전기영동

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

3) 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 증가된 경우를 증폭(amplification)으로 판정하였다.

5. Genetic analyzer method

1) 형광 Microsatellite oligonucleotide primer 합성

Genetic analyzer에 사용될 형광 primer D20S119의 합성은 Applied Biosystem(USA)에 의뢰, 제작하여 사용하였다.

2) 형광 PCR에 의한 microsatellite의 증폭

PCR 반응액 조성은 AmpliTagGold PCR master mix (Applied Biosystem, USA) 10 μL, 주형 DNA 50 ng/μL,

형광 forward, reverse primer 각각 7.5 pmol을 넣은 후 3 차 멸균 증류수로 20 μL가 되도록 반응 부피를 맞추어 PCR을 시행하였다. 각 primer별로 조건을 바꿔가며 최적 결합 온도를 찾은 후, product의 재현성도 확인하였다. PCR은 95°C에서 10분간 초기 열 변성을 시행한 다음 96°C 변성 10 초, primer별 최적 결합 온도에서 30초, 70°C 합성 3분을 1 주기로 30 회 반복한 후 마지막 합성은 70°C에서 30분간 시행하였다. 장비는 자동 Thermal cycler(GeneAmp PCR system 9600, Perkin Elmer, USA)를 사용하였다.

c) Capillary를 이용한 전기영동

전기영동을 위한 반응액은 PCR product 0.5 μL, Genescan size standard (Applied Biosystem, USA) 0.5 μL, Formamide(Applied Biosystem, USA) 11 μL로서 총 12 μL 되도록 혼합하였다. 혼합액을 95°C에서 5분간 열 변성한 후 얼음 속에 두었다가, 이를 ABI 310 Genetic analyzer (Applied Biosystem, USA)의 capillary에 주입시켜 전기영동을 하였다.

d) Amplification의 분석

전기영동이 정상적으로 이루어졌는지를 먼저 log file을 통해 확인하였다. 다음 Genescan software를 이용하여, 검체별 tumor와 normal의 위치, 높이를 지정하였으며, Genotyper software에서 peak의 높이와 면적을 기준으로 amplification 유, 무를 분석하였다.

6. 통계학적 분석

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

III. 결 과

1. Amplification 발현

Table 2 에 표시 된 microsatellite marker들을 사용하여 tumor와 normal DNA를 주형으로 PCR을 시행하고, 각 marker마다 예상되는 크기의 PCR산물이 증폭되는지를 관찰하였다. 그 결과 각 marker마다 예상되는 범주내의 PCR산물이 관찰되어 microsatellite marker에는 이상이 없음을 알 수 있었다.

Amplification의 검출 결과를 microsatellite marker별로 비교하여 보면, D20S97 57%(17/30), D20S101 57%(17/30), D20S119 53%(16/30), D7S483 50%(15/30), D7S495 47%(14/30), D7S498 47%(14/30), 순으로 관찰되었다(Fig. 1, Fig. 2).

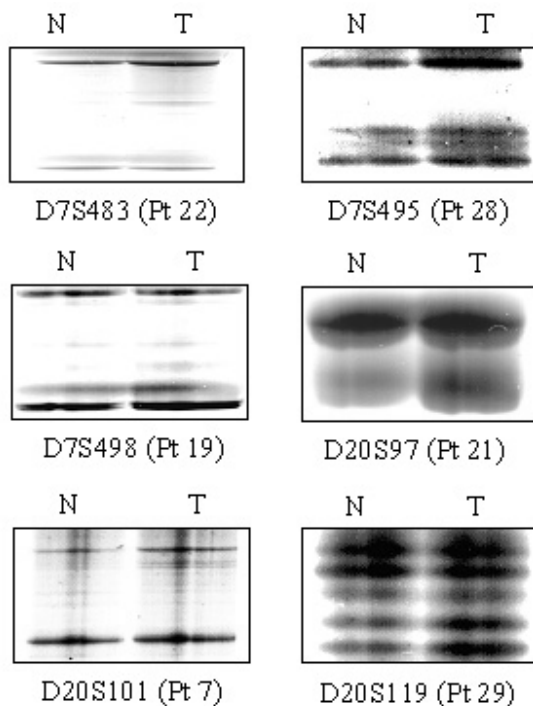


Fig 1. Amplification at various chromosome in colorectal carcinoma by silver stain(N : normal tissue, T : tumor tissue)

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

대장암 위치에 따른 유전자 변이 양상은 우측대장암에 비해 직장암의 증폭이 2.08 개 : 3.77 개로서 높았으며(P

<0.018), 림프절 변이에 따른 유전자 변이 양상은 전이가 있는 군이 없는 군보다 4.13 개 : 1.93 개로 높았다 (P <0.001). 병기별에 따른 유전자 변이 양상, 조직학적 분류나 혈청 CEA 증가군에 대한 비교는 큰 차이가 없었다 (Table 1).

Table 1. Mean number of chromosomal gains number of events per tumor in colorectal carcinoma according to the location, the level of serum CEA, histological type and stage.

Variables	Cases	Amplification
Location		
Right colon	12	2.08
Rectum	18	3.77
<i>P</i> -value		0.018
Serum CEA		
≤5 (ng/ml)	16	2.94
>5 (ng/ml)	14	3.29
<i>P</i> -value		0.638
Differentiation		
Well	17	2.71
Moderate to poor	13	3.62
<i>P</i> -value		0.216
Lymph node		
Negative	14	1.93
N1-3	16	4.13
<i>P</i> -value		0.001
Stage		
I - II	12	2.25
III-IV	18	3.67
<i>P</i> -value		0.098
Total	30	

IV. 고 찰

대장암도 한국인에 있어서 집중 관리가 필요한 고형암의 하나로 대두 되었으며, 더 이상 서양인에서만 특징적으로 나타나는 질병이 아닌 만큼, 외국의 연구사례를 바탕으로 한국인에서 나타나는 유전적인 특징에 대한 연구가 필요한 실정이다.

따라서 대장암의 발생과 진행에 관계되는 유전자를 찾아 진단과 더불어 치료에 도움을 주기 위한 노력이 필요되며, 많은 실험들이 국내, 외에서 시도되고 있다 (Zenklusen 등, 1995; Garcia 등, 1998; Forslund 등, 2001;

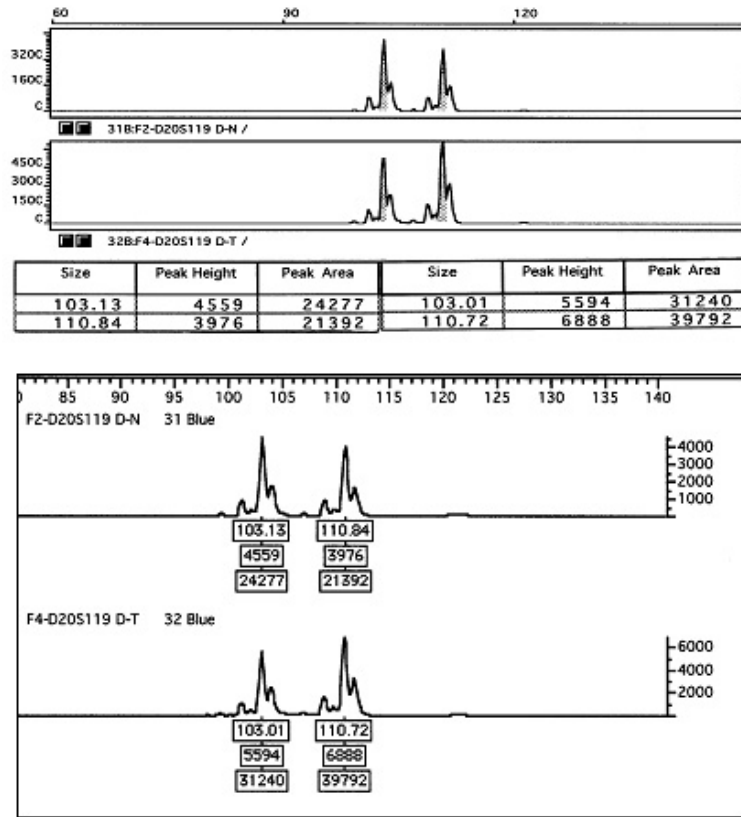


Fig. 2. Amplification at various chromosome in colorectal carcinoma by genetic analyzer (Genetic analyzer 310)

Kambara 등, 2001; 배 등, 2007; 송 등, 2007; 윤 등, 2007; 최 등, 2007).

분자유전학적 실험방법의 원리는 인체 게놈상의 염색

체에 풍부하게 분포되어 있고, 높은 다양성과 다형성을 보이는 microsatellite를 이용한다. 즉 반복 염기서열의 특징을 이용하며, 필요로 하는 염색체 위치의 marker를 제

Table 2. Primer sequence of the microsatellite markers

Name	Cytogenetic localization	Primer sequence	Annealing temp (°C)
D7S483	7 - 7	5'-GTGGTCATTAGCCTTGGCAAATC-3' 5'-CAGAGTTGTAAGCCATGAAAGTAG-3'	56
D7S495	7q31-7q35	5'-TGGCATTCATTACAATAGCC-3' 5'-AGCACCTGGTCCAATTTTCT-3'	53
D7S498	7q31-7qter	5'-AAAGACATGACACAAAAGGG-3' 5'-CCATTAGATTTAGCAATATGGAA-3'	54
D20S97	20pter-20qter	5'-GGGAGATGGAGAGTTGTTGC-3' 5'-TATACGCACCCATAACCACCA-3'	61
D20S101	20pter-20qter	5'-AATGGTGTGGGGCATGGAG-3' 5'-CCTTGGCTTGACCTGGAAAC-3'	60
D20S119	20 - 20	5'-AACTGACACAGTTTCAGTATCTCT-3' 5'-TTTTCCAGATTTAGGGGTGT-3'	55

작하여 사용한다. 방법은 추출된 종양 DNA와 정상 DNA를 중합연쇄반응으로 증폭한 후, product를 sequencing gel에 분주하여 전기영동을 하고, silver stain하여 각 band 간의 밀도의 비를 측정한다, 종양 유전자 수(copy)의 변화를 측정하는 것이다(Tina 등, 1997).

본 연구에서의 특징의 하나는 7q의 증폭이 두드러졌는데, 7q의 증폭은 암의 진행단계에 따라 다르게 나타나는 특징이 있다. 초기 암에서는 7cen-q11.2 부분이 증폭되며, 전이 시에는 7q21.1-35 부분이 증폭되는 특징으로 구분된다(Zenklusen 등, 1995). 이는 모든 암에 있어서 7q 부위에는 초기 종양 유전자로서 *c-met*가 작용한다고 알려지고 있으며, 초기 유방암과 전립선암에서도 빈번하게 나타난다(Tirkkonen 등, 1998). 7q의 증폭은 대장암 뿐만 아니라 대장 선종에서도 특징적으로 나타난다(Ried 등, 1996).

대장암에서 7q의 증폭은 외국의 문헌에 의하면 22%에서 71%까지 보고되고 있으며(Ried 등, 1996; Marcelo 등, 1998; Meijer 등, 1998; Nakao 등, 1998; Paredes-Zaglul 등, 1998; De Angelis 등, 1999; Nakao 등, 2001), 본 실험 결과 48%와 비교하여 볼 때 전체적인 7q의 검출율은 부합되는 결과를 나타냈다.

또한, 본 연구에서 간으로 전이된 3개의 검체를 대상으로, 전이 시에 나타나는 7q21.1-35 부위의 amplification marker, D7S495, D7S498로 확인한 결과, 간 전이된 2개의 검체에서 7q의 특징적인 증폭 67%를 발견할 수 있었다. 이것은 전이된 검체에서 7q의 증폭은 71%까지 보고된 것과(Meijer 등, 1998) 초기 암에 비해 전이 암에서 4배 증가하였다는 보고와(Nakao 등, 2001) 일치하는 결과이며, 7q의 증폭이 대장암의 진전과 전이에 관여함을 알 수 있었다.

20q의 증폭은 본 연구에서 뿐 아니라, 다른 보고에서도 공통적으로 관찰되고 있으며, 대장암 외에도 위암(Kallioniemi 등, 1992) 췌장암(Mahlamaki 등, 1997) 방광암(Savelieva 등, 1997) 유방암(Tirkkonen 등, 1998)에서 흔하게 발견된다. 또한 대장 선종에서 암으로 발전할 때에 증폭의 빈도가 2.5 배 증가됨으로서 암으로의 진전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Ried 등, 1996). 이 부위는 여러 유전자를 포함하고 있는데 즉, 20q11 부위에는 G1에서 S로의 cell cycle 활성화에 작용하는 *E2F1*

유전자와 estrogen receptor에 결합하여 estrogen의 transcription을 촉진시키는 *AIB1* 유전자가 20q12에 존재한다. 20q13에 있는 *BTAK/STK15* 유전자는 serine-threonin kinase를 생성하여 유방암, 난소, 전립선, 신경 세포종에서 동원체의 복제에 관여한다. 20q13.2에 위치한 *NABC14* 유전자는 대장 선종에서 대장암으로의 발생에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 유방암 발생의 강력한 발암 유전자로 알려져 있다. 이것은 이 유전자의 부위가 proto-oncogene 기능을 가질 가능성을 시사해 준다. 또한 20q의 증폭은 대장암에서 간으로의 전이시 뚜렷이 나타나며, 특히 *c-src* 유전자가 활성화되면 대장암에서 전이의 가능성이 높아진다고 보고되었다(Irby 등, 1999). 본 실험의 결과 전체 56%의 검출율에 비해, 간 전이 암에서 100%로 나타나 간 전이시 뚜렷이 증가함을 알 수 있었다. 이는 초기 암 26%의 검출율에 비해 간 전이 암에서 94%로 급격히 높아졌다는 보고와(Nakao 등, 2001) 일치하는 결과이다. 이상의 결과에 비추어 7q, 20q의 증폭은 초기 암에서 전이 암으로 진행하는데 있어 큰 역할을 하는 것으로 판단되며, 임상에서 대장암 환자가 수술 후, 예후 및 치료를 위한 좋은 marker가 될 것으로 사료된다.

이번 연구에서 사용된 분자유전학적 실험방법은 polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동 하는 수동 방법과 자동화된 장비에 capillary를 설치하여 전기영동 하는 genetic analyzer method로 구분된다. 수동 방법과 genetic analyzer method의 amplification 결과 비교로서, D20S119 marker에서 나타난 16개 모두가 일치하였는데, 이는 외국의 보고 95.8%에(Rolf 등, 2001) 비해 약간 더 높은 비율로 나타났다. Genetic analyzer의 장점은 size standard를 사용함으로써 정확한 size를 알 수 있고, 1 회에 96 개까지의 많은 검체를 running하는 것이 가능하다. 또한 결과를 그래프로 나타내기 때문에 peak, area를 score로 알 수 있는데, Fig 2에 제시된 amplification의 검출 결과 사진을 보면, 대립 유전자간의 차이를 누구나 쉽게 이해할 수 있다. 또한, 동일 검체로 반복 실험 시 재현성이 뛰어난 방법으로서, 다른 결과가 발생하는 오류가 오직 0.3%로 보고 된(Rolf 등, 2001) 정량방법으로서 guide line임을 확인할 수 있었다.

따라서, Genetic analyzer의 장점을 활용한 대장암의 진단 및 연구가 필요한 실정이며, 다행스럽게도 수개의 대

학병원에 이미 장비가 도입되어 운영 중인 만큼, 검사방법을 도입하여 임상에서 효율적으로 활용하는 것이 시급한 과제라고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Bardi G, Sukhikh T, Pandis N, Fenger C, Kronborg O, Heim S. Karyotyping characterization of colorectal adenocarcinomas. *Genes Chromosom Cancer* 12:97-109, 1995.
2. De Angelis PM, Clausen OPF, Schjolberg 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* 80:526-535, 1999.
3. Forslund A, Lonnroth C, Andersson M, Brevinge H, Lundholm K. Mutation and allelic loss of p53 in primary tumor DNA from potentially cured patients with colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 19:2829-2836, 2001.
4. Garcia E, Gomedio B, Lleonart M, Silva JM, Garcia JM, Provevencio M. Loss of heterozygosity in the region including the BRCA1 gene on 17q colon cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 104:119-123, 1998.
5. Irby RB, Mao W, Coppola D, Kang J, Loubeau JM, Trudeau W. Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. *Nat Genet* 21:187-190, 1999.
6. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818-821, 1992.
7. Kambara T, Matsbara N, Nakagawa H, Noyohara K, Nagasaki T, Yoshino T, Isozaki H, Sharp GB, Shimizu K. High frequency of low-level microsatellite instability in early colorectal cancer. *Cancer Res* 61:7743-7746, 2001.
8. Mahlamaki EH, Hoglund M, Gorunova ML, Karhu R. Comparative genomic hybridization reveals frequent gains of 20q, 8q, 11q, 12p and 17q and losses of 18q, 9p, and 15q in pancreatic cancer. *Genes Chromosom Cancer* 20:383-391, 1997.
9. Marcelo L, Larramendy, Arto K, Pauli P, Outi M, Reijo S, Markku A, Sakari K. Comparative genomic hybridization reveals differences in DNA copy number changes between sporadic gastric carcinomas and gastric carcinomas from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 106:62-65, 1998.
10. Meijer GA, Hermsen MAJA, Baak JPA, Diest PJ, Meuwissen SGM, Belien JAM. Progression from colorectal adenoma to carcinoma is associated with non-random chromosomal gains as detected by comparative genomic hybridization. *J Clin Pathol* 1:901-909, 1998.
11. Nakao K, Shibusawa M, Tsunoda A, Yoshizawa H, Murakami M, Kusano M. Genetic changes in primary colorectal cancer by comparative genomic hybridization. *Surg Today* 28:567-569, 1998.
12. Nakao K, Shibusawa M, Ishihara A, Yoshizawa H, Tsunoda A, Kusano M, Kurose A, Makita T, Sasaki K. Genetic changes in colorectal carcinoma tumors with liver metastases analyzed by comparative genomic hybridization and DNA ploidy. *Cancer* 15:721-726, 2001.
13. Paredes-Zaglul A, Kang JJ, Essig YP, Mao W, Irby R, Wloch M. Analysis of colorectal cancer by comparative genomic hybridization : Evidence for induction of the metastatic phenotype by loss of tumor suppressor genes. *Clin Cancer Res* 4:879-886, 1998.
14. Ried T, Knutzen R, Steinbeck R, Blegen H, Schrock E, Herselmeyer K. Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes Chromosom Cancer* 15:234-245, 1996.
15. Rolf I, Skotheim, Chieu B, Diep, Sigrid M, Kjetill S,

- Jakobsen, Ragnhild A, Lothe. Evaluation of heterozygosity/allelic imbalance scoring in tumor DNA. *Cancer Genet Cytogenet* 127:64-70, 2001.
16. Savelieva E, Belair CD, Newton MA, Devries S, Gray JW, Waldman F, Reznikoff CA. 20q gain associates with immortalization: 20q13.2 amplification correlates with genome instability in human papillomavirus 16 E7 transformed human uroepithelial cells. *Oncogene* 14:551-560, 1997.
 17. Tina B, Johannes D, Waltraut F, Johannes G, Elike H. Microsatellite instability analysis. A multicenter study for reliability and quality control. *Cancer Res* 57:4739-4743, 1997.
 18. Tirkkonen M, Tanner M, Karhu R, Kallioniemi OP, Isola J, Kallioniemi A. Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosom Cancer* 21:177-184, 1998.
 19. Zenklusen JC, Thompson JC, Klein 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* 55:1347-1350, 1995.
 20. 배병구, 홍성우, 장여구, 한구용, 백인욱, 이혁상. 결장직장암에서 수술 전 CEA와 CA19-9측정의 예후적 가치. *대한대장항문학회지* 23(5):338-343, 2007.
 21. 송상현, 배병노, 이우용, 양근호, 김기환, 한세환, 김홍주, 김영덕, 김홍용, 김정연. 림프절 전이 가 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.
 23. 최평화, 정상훈, 김정랑, 유창식, 김희철, 김진천. 서울 아산병원에서 최근 15년간 대장암의 임상 및 병리적 특성의 변화. *대한대장항문학회지* 22(6):387-395, 2007.