

장기 추적 관찰을 통한 유방암에서 세포자멸사(apoptosis)와 bcl-2 단백질 발현과 예후인자와의 상관관계

고려대학교 의과대학 병리학교실, ¹국립암센터 유방암센터

이 주 한 · 이 은 숙¹ · 김 철 환

Expression of bcl-2 and Apoptosis and Its Relationship to Clinicopathological Prognostic Factors in Breast Cancer - A Study with Long Term Follow-up

correlated with the survival rate.(*Journal of Korean Breast Cancer Society* 2004;7:92-97)

Key Words: Apoptosis , Bcl-2, Breast cancer, Prognosis
중심 단어: 세포자멸사, Bcl-2, 유방암, 예 후

Ju Han Lee, Eun-Sook Lee¹, and Chul Hwan Kim

Department of Pathology, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea; ¹Center for Breast Cancer, National Cancer Center, Gyeonggi-do, Korea

Purpose: The aims of this study were to evaluate the prognostic roles of bcl-2 and apoptosis in patients with breast cancer after long term follow-up, and the correlation with the known clinicopathological parameters.

Methods: 88 primary breast cancers were selected between March 1988 and February 1994. These cases were clinically followed up over 10 years (median follow-up 139 months). The immunohistochemical expression of bcl-2 protein and apoptosis were studied, and the findings compared to the clinicopathological parameters, such as estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and clinical stage.

Results: The bcl-2 protein was identified in 42 (47.7%) cases. The bcl-2 expression correlated positively with large tumor sizes, well differentiated tumors, and ER expression. No significant associations were seen between the apoptosis index and the clinicopathological parameters. The expression of bcl-2 and apoptosis were not correlated with the survival rate. The clinical stage and status of lymph node metastases were correlated with the survival rate, but no other clinicopathological parameters were correlated.

Conclusion: Long term follow-up for breast cancer patients revealed that the expression of bcl-2 and apoptosis was not

서 론

종양의 발생과 진행에서 세포자멸사(apoptosis)와의 관계에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 세포자멸사란 생리적으로 발생하는 예정된 세포의 죽음으로 원치 않는 세포가 제거되는 자연 과정을 말한다.(1) 세포자멸사는 세포자멸사를 억제하는 유전자와 유도하는 유전자들에 의해 조절된다. 세포자멸사의 발생에서 세포를 보호하며 세포 생존을 도모하는 bcl-2 유전자는 원형 종양 유전자(proto-oncogene)의 일종으로 B세포 백혈병과 여포성 림프종(follicular lymphoma)에서 종종 발견되는 t (14 : 18) 염색체 이상에 대한 연구에서 염색체 18q21에 위치하고 있다는 것이 확인되었다.(2-4) 그 산물인 bcl-2 단백질은 내형질세막(endoplasmic reticulum), 미토콘드리아와 핵막 등에 존재하면서 사이토카인과 함께 세포자멸사를 억제하여 정상 세포의 교체에 중요한 역할을 한다.(5,6) 세포자멸사는 종양의 발생에 있어서 중요한 역할을 하게 되는데, 세포자멸사를 조절하는 종양 유전자들의 변화에 의해 세포자멸사가 억제됨으로써 클론의 팽창(clonal expansion)이 일어나 종양이 발생하고, 이에 관련된 중요한 유전자로는 p53, bcl-2, c-myc 등이 있다.(7,8) 이러한 유전자들 중 bcl-2 유전자는 세포자멸사를 억제함으로써 세포의 수명을 연장시켜 종양 억제 유전자 혹은 세포증식과 연관된 유전자들의 유전적 결함의 기회를 증가하게 하여 암을 유발한다.(9,10) 정상적으로 bcl-2 유전자는 B 림프구 이외에도 호르몬에 의해 성장과 위축이 조절 받는 장기인 유방이나 stem cell 을 가지고 있는 장과 피부, 그리고 완전히 분화되어 오랜 수명을 가지는 신경세포 등에서 발견되고, 유방에서는 태아와 성인의 정상적인 유방조직에서 발현된다.(11,12) 유

책임저자 : 김철환, 서울특별시 성북구 안암동 5가 126-1
☎ 136-705, 고려대학교 안암병원 병리과
Tel: 02-920-5991, Fax: 02-920-5590
E-mail: chkap@korea.ac.kr

접수일 : 2004년 2월 17일, 게재승인일 : 2004년 5월 24일
고려대학교 교내특별연구비(과제번호 K0021100)지원을 받음.

방암에서 bcl-2 발현에 관한 연구에 따르면, 유방암에서 bcl-2의 발현은 에스트로겐 수용체(ER) 발현에 영향을 받으며,⁽¹¹⁾ p53 유전자에 의해 하향 조절되어 유방암에서 발현도가 떨어지는 것으로 보고되고 있다.⁽¹³⁾ Bcl-2의 발현은 ER의 발현과 잘 연관이 되어 유방암에서 bcl-2의 발현은 종양의 분화와 관련이 있다고 한다. 그러나, bcl-2 발현과 예후 인자와의 상관관계에 대한 연구에서는 서로 다른 결과들이 보고되고 있는데, bcl-2 발현이 잘 될수록 액와 림프절 전이가 있는 경우와 연관이 잘 된다는 보고가 있는가 하면,⁽¹⁴⁾ 림프절 전이 여부나 다른 예후 인자들과의 상관 관계가 없다는 보고도 있어,^(11,15) 유방암에서 bcl-2가 어떤 의미를 갖는 지에 대해서는 아직 논란이 많은 상태이다.

특히 bcl-2 및 세포자멸사와 관련된 기존의 연구들이 대부분 추적기간이 짧고 임상 병기와 같은 다른 예후 인자들과의 관계를 통해 비교하는 연구가 대부분이어서 실제로 장기 추적을 통해 유방암 환자의 생존율과 bcl-2 단백질 및 세포자멸사 발현이 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구는 거의 진행된 바가 없는 실정이다. 이에 저자들은 장기 추적 관찰을 통하여 bcl-2 단백질과 세포자멸사 발현이 생존율과 어떠한 관계를 갖는지를 연구하고자 하였다.

방 법

1) 연구 대상

1988년 3월부터 1994년 2월까지 고려대학교 의료원에서 침윤성 관암종으로 진단 받고 유방절제술이 시행된 예 중에서 적출된 종양 조직의 양이 bcl-2 단백질 및 세포자멸사(apoptosis) 검색에 충분한 양의 조직을 얻을 수 있으며 10년 이상 경과를 추적할 수 있었던 88예를 대상으로 하였

다. 유방암 환자들의 연령, 종양의 크기, 에스트로겐(ER) 및 프로게스테론 수용체(PR) 발현 여부, 임상 병기 등 기존의 임상병리학적 예후 인자들에 대한 기록은 임상기록 자료를 이용하였다.

2) 면역조직화학 검사

Bcl-2 단백질과 세포자멸사에 대한 면역조직화학 염색은 조직표본을 부착시킨 슬라이드를 구연산 완충액에서 700 wave 마이크로파로 5분간 2회 전처리하고 일차 항체로 bcl-2 단백질(Oncogene Science, U.S.A.) 및 Apotag (Oncogene Science, U.S.A.)을 1 : 20으로 희석하여 사용하여 통상적인 avidin-biotin complex (ABC) 방법을 이용하여 면역조직 염색을 시행하였다. 면역 조직 화학 염색 결과의 판독은 유방암 세포의 세포질에 전혀 염색되지 않은 경우를 음성으로, 그리고 유방암세포의 5% 이상에서 세포질에 과립상 또는 미만성으로 염색된 경우를 양성으로 판독하였다(Fig. 1). 세포자멸사의 경우, 단위 면적당(mm²) 양성 반응을 보이는 세포의 수를 세어 세포자멸사 지수(apoptosis index)를 산출하였다(Fig. 1).

3) 통계학적 분석

통계 처리는 Windows용 한글 SPSS version 10.0 프로그램(SPSS Korea Inc., 한국)을 이용하여, 임상병리학적 인자들과 bcl-2 단백질 발현 및 apoptosis와의 관계 분석은 Chi-square법을 이용하여 검정하였고, 환자의 생존기간에 따른 bcl-2 단백질 발현 및 apoptosis 발현 차이는 Kaplan-Meyer test와 Log-rank test를 이용하여 분석하였고, P값이 0.05 이하일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

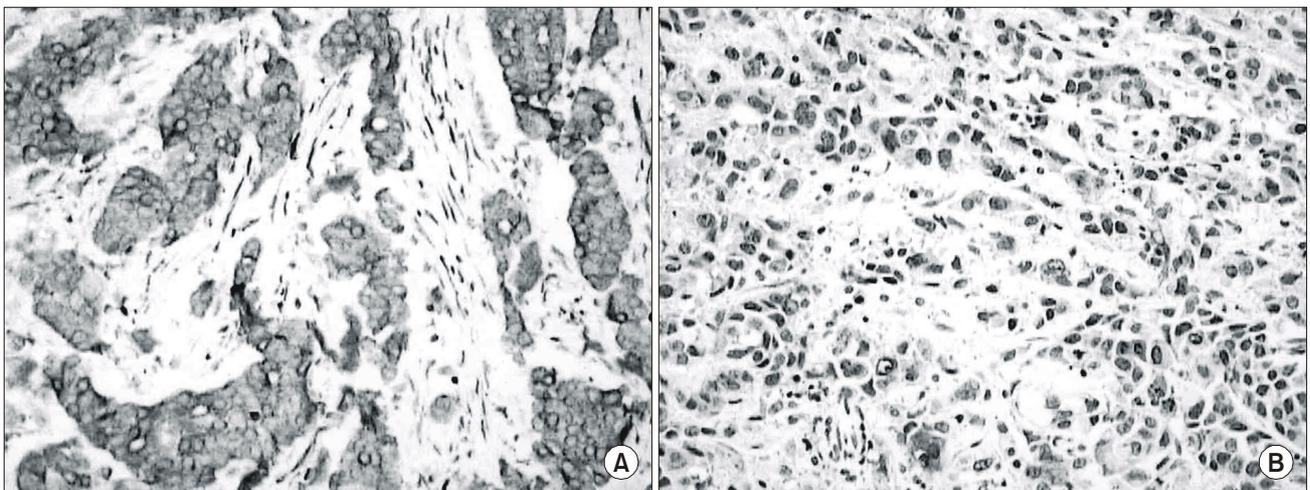


Fig. 1. Immunohistochemical expression of bcl-2 (A: ×100) and apoptosis (B: ×100).

결 과

1) 일반적 특징

대상 환자들의 연령은 25세부터 75세까지였고, 평균 연령은 47.2세이었다. 종양의 크기는 2 cm 이하가 19예(21.6%), 2 cm에서 5 cm 사이가 46예(52.3%), 5 cm을 넘는 예가 23예(26.1%)이었다. 액와 림프절 전이가 없었던 예가 44예(50.0%), 1~3개의 림프절 전이가 있는 예가 20예(22.7%), 4개 이상의 림프절에 전이한 예가 24예(27.3%)이었다. 병리조직학적 등급은 I등급이 19예(21.6%), II등급이 59예(67.0%), III등급이 10예(11.4%)이었다. 임상 병기는 제 I기가 12예(13.6%), 제II기가 47예(53.4%), 제III/IV기가 29예(33.0%)였다. ER은 음성이 23예(26.1%), 양성인 65예(73.9%)이었으며, PR은 음성이 18예(20.4%), 양성인 70예(79.6%)이었다. 추적 기간 중 28명(31.8%)이 유방암에 의해 사망하였으며, 사망하지 않은 사람의 평균 추적 일수는 139개월(범위: 120~191개월)이었다.

생존 분석 결과 생존 여부는 임상 병기(P<0.001, Fig. 2)와 액와 림프절 전이 상태(P=0.01)와는 통계학적으로 뚜렷한 상관 관계가 있었으나, 연령, 종양 크기, ER과 PR 발현 여부와는 뚜렷한 상관 관계가 없었다(P>0.05).

2) Bcl-2 단백질에 대한 면역조직화학 염색 결과(Table 1)

전체 88예 중 42예(47.7%)가 양성이었으며, 46예(52.3%)는 음성이었다. 추적 기간 중 bcl-2양성 42예에서 28예, bcl-2 음성 46예에서 31예가 생존하였다. Bcl-2 단백질의 발현은 종양의 크기가 커질수록 의미 있게 발현이 증가되었고(P=0.05), 종양의 분화도가 나쁠수록 발현도가 감소하였으며(P<0.001), ER 발현이 양성인 암종에서 발현이 높았

고(P=0.01), PR 발현과도 통계학적으로 유의하지는 않으나, PR 발현이 잘 되는 암종에서 더 높은 발현을 보이는 경향을 보였다(P=0.057). 그러나, 림프절 전이 여부(P>0.05)나 임상 병기(P>0.05)와는 통계학적인 상관 관계가 없었고 생존율과도 상관 관계가 없었다(P>0.05, Fig. 3).

Table 1. Correlation between Bcl-2 expression and clinicopathologic factors

Clinicopathologic factors		Bcl-2 expression		P value
		Negative	Positive	
Tumor size	<2 cm	11	8	0.05
	2~5 cm	28	18	
	>5 cm	7	16	
Lymph node metastasis	0	27	17	>0.05
	1~3	7	13	
	>4	12	12	
Grade	1	5	14	<0.001
	2	33	26	
	3	8	2	
Clinical stage	I	8	4	>0.05
	II	26	19	
	III/IV	12	17	
Estrogen receptor	Negative	17	6	0.01
	Positive	29	36	
Progesterone receptor	Negative	13	5	0.057
	Positive	33	37	

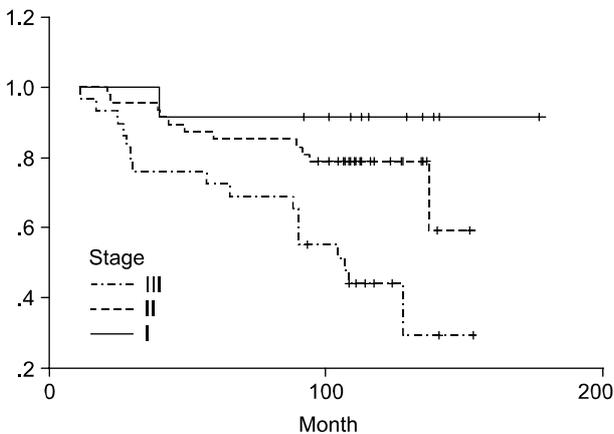


Fig. 2. Survival curve according to clinical stage. Overall survival curves for patients with breast carcinoma according to clinical stage (P<0.001).

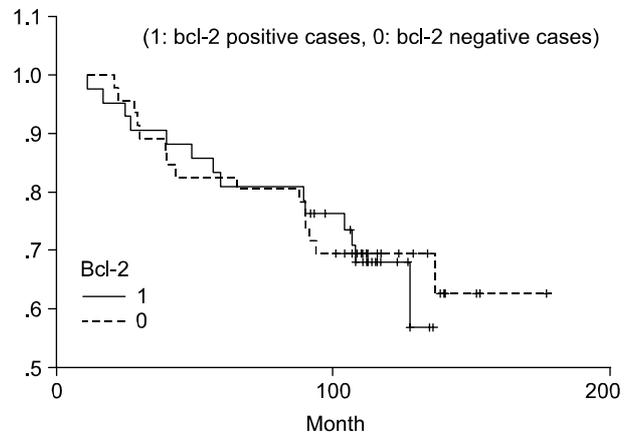


Fig. 3. Survival curve according to bcl-2 expression. Survival rates related to bcl-2 expression in breast carcinoma. Comparison between bcl2 positive and negative groups shows no different survival rate.

Table 2. Correlation between apoptosis and clinicopathologic factors

Clinicopathologic factors	Apoptosis index		P value
	≤20	>20	
Tumor size	<2 cm	12 7	>0.05
	2~5 cm	32 14	
	>5 cm	12 11	
Lymph node metastasis	0	30 14	>0.05
	1~3	13 7	
	>4	14 10	
Grade	1	13 6	>0.05
	2	37 22	
	3	7 3	
Clinical stage	I	9 3	>0.05
	II	30 17	
	III/IV	18 11	
Estrogen receptor	Negative	15 8	>0.05
	Positive	42 23	
Progesterone receptor	Negative	12 6	>0.05
	Positive	45 25	

Table 3. Correlation between bcl-2 expression and apoptosis

Bcl-2 expression	Apoptosis index		P value
	≤20	>20	
Negative	30	16	>0.05
Positive	27	15	

군과 20개 이상인 군 사이에서 종양의 크기, 분화도, 림프절 전이, 임상 병기 및 ER, PR 발현 여부와는 통계학적인 상관 관계가 없었고(P>0.05), 생존율과도 상관 관계가 없었다(P>0.05, Fig. 4).

4) Bcl-2 단백질과 세포자멸사의 상관관계(Table 3)

Bcl-2 단백질과 세포자멸사 사이에는 특별한 상관 관계가 관찰되지 않았다(P>0.05).

고찰

세포의 죽음은 괴사(necrosis)와 세포자멸사(apoptosis)로 분류할 수 있다. 괴사는 저산소 상태나 독소 등의 자극에 의한 병적 상태에서 발생하여, 괴사 과정에서 주로 염증 반응을 유발한다. 이에 비해 세포자멸사는 유핵 세포 사망의 가장 흔한 형태로 정상적 조직 크기의 보존, 성장 과정 중 조직의 개형, 조직의 위축 등 생체의 항상성 조절에 꼭 필요한 생리 기능인 동시에 악성 종양에서 암 세포 수를 조절하여 종양의 크기를 자가 조절하는 기능도 가지고 있는 것으로 알려져 있다.(1) 세포자멸사는 이를 촉진시키는 유전자와 이들 억제하는 유전자들, 특히 p53, bcl-2, c-myc, Bax, fos와 같은 몇몇 유전자가 정교하게 균형을 이루면서 일어나는데 이들의 균형이 깨지면 세포자멸사가 억제되고 종양이 발생하는 것으로 알려져 있다.(7,8,17) 세포자멸사가 억제되면 클론의 팽창과 이차적인 유전적 변화 및 악성 전환의 기회를 높임으로써 종양 발생이 일어난다. 암의 예후와 세포자멸사와의 관련성은 여러 종류의 암종에서 연구되어 왔는데, 유방암이나 폐암 등 대부분의 암종에서 세포자멸사가 많은 경우 환자의 생존기간이 짧고 종양이 진행되어 있다고 보고하였다.(18,19) 그러나, 유방암에서 세포자멸사에 관한 장기간의 추적 조사를 시행한 연구들은 다른 결과들을 보여주고 있는데, Liu 등(20)이 791명의 유방암 환자를 16.3개월 추적 조사한 결과에 따르면 종양의 크기, 림프절 전이 여부, 에스트로젠 수용체 발현 여부, c-erbB-2 발현 여부 등은 독립적인 예후인자이었으나, 세포자멸사 정도는 생존율과는 상관이 없었던 보고를 하였고, Kato 등(21)이 422명의 유방암 환자를 대상으로 20년 생존율을 조사한 결과 p53, 유사분열 정도,

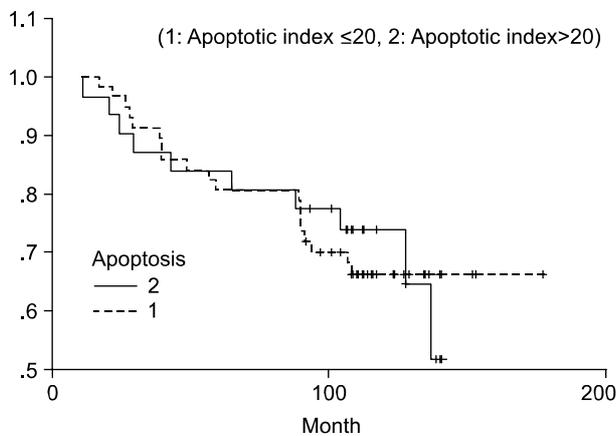


Fig. 4. Survival curve according to apoptosis expression. Survival rates related to apoptosis expression in breast carcinoma. There is no different survival rate between high and low apoptosis expression groups.

3) 세포자멸사에 대한 면역조직화학 염색 결과(Table 2)

세포자멸사 지수(apoptosis index)는 0개/mm²에서 246개/mm²까지 분포되었고 중간 값인 20개/mm²을 기준으로 많은 군과 적은 군으로 나누어 기존의 예후 인자들과 비교하였다.(16) 20개 이하인 경우가 57예(64.8%)였고, 20개 이상인 경우가 31예(35.2%)였다. 세포자멸사가 20개 이하인

괴사 정도 등이 독립적인 예후인자였으나, 세포자멸사 정도는 생존율과는 상관이 없었다. 본 연구 역시 유방암의 세포자멸사 정도와 여러 임상병리학적 예후 인자들과는 특별한 상관 관계가 없었으며, 생존율과도 상관관계가 없었다. 따라서 세포자멸사와 유방암 환자의 생존율과는 극히 제한적인 관계를 가지고 있을 것으로 판단되며, 세포자멸사 정도는 독립적인 예후인자라기 보다는 종양의 증식능을 반영하거나, 이후 항암제 치료나 방사선 치료의 지표로 활용하는 것이 더 타당할 것으로 보인다.

Bcl-2 유전자는 여포성 B세포 림프종에서 처음 발견되었으며 이때 bcl-2가 발현되는 기전으로는 14번과 18번 염색체의 상호 전좌로 인하여 bcl-2 유전자가 면역글로불린 중쇄 유전자와 융합 유전자를 형성하고 이로 인해 bcl-2 단백질이 과도하게 생성되는 것으로 밝혀졌다. 하지만 대부분의 고형암에서는 bcl-2 단백질이 과발현되는 기전이 알려져 있지 않으며, t (14 : 18) 염색체 상호전좌를 포함한 bcl-2 유전자의 큰 구조적 이상은 없는 것으로 알려져 있어 고형암에서 bcl-2 단백질 발현의 역할은 아직도 불분명한 상태로 다양한 인체 고형암에서 면역조직화학적 검사를 통한 bcl-2 단백질 발현과 암종과의 상관 관계에 대해 연구되고 있다.(22,23)

유방암에서도 bcl-2에 대한 연구가 활발하게 진행되어 왔는데, Leek 등(11)은 bcl-2 단백질이 정상 유방조직에서는 97%, 유방관 상피내암에서는 91%, 침윤성 유방암종에서는 79%에서 발현되었고, ER 발현 유무와 의미 있는 상관 관계를 가지고 있다고 하였고, Park 등(24)도 bcl-2 발현이 감소된 17예에서 ER과 PR 음성률이 각각 94.1%와 76.5%로 높게 나타났고 조직학적 분화도도 61.1%가 3등급을 보여, 유방암에서 bcl-2 발현이 ER과 PR 의존적이라고 주장하였다. Castiglione 등(25)은 bcl-2 발현과 steroid receptor 양성 상태, wild-type의 p53 발현 및 낮은 증식 지수 등이 유의한 통계학적 유의성을 보인다고 주장하였다. 이러한 연구들을 볼 때, bcl-2 발현은 ER, PR 발현 여부와 조직학적 분화도와 유의한 상관 관계를 가지는 것으로 보인다. 본 연구에서도 조직학적 분화가 나뉠수록 bcl-2의 발현은 감소하였고, ER과 PR의 발현이 양성일수록 bcl-2의 발현율이 높았다.

Bcl-2 발현과 세포자멸사 정도와도 뚜렷한 상관관계가 없었는데 이는 세포자멸사를 조절하는 인자가 bcl-2 이외에도 bcl-XL, Bax, Bad 등 다양한 요인들이 작용할 뿐 아니라, bcl-2가 세포자멸사를 조절하는 기전도 단순히 bcl-2 단백질 존재한다는 것이 중요한 것이 아니라, bcl-2의 phosphorylation이 기능적으로는 더 중요하기 때문인 것으로 생각된다.(26)

Bcl-2와 예후와의 관계에 있어서는 혼란스러운 점이 존재하는데, Sierra 등(14)은 액와 림프절 전이가 없는 유방암에서 전이가 있는 경우보다 bcl-2 단백질의 발현율이 높기

때문에, 유방암이 진행함에 따라 bcl-2 단백질이 소실된다고 주장하였다. 반면 Leek 등(11)은 액와 림프절 전이가 없는 유방암에서는 bcl-2 단백질 발현이 43%였고 전이가 있는 경우에는 61%로 정반대의 주장을 하였다. Hellemans 등(15)은 림프절 전이가 없는 유방암을 대상으로 연구한 결과 호르몬 수용체만이 bcl-2 단백질 발현과 유의한 상관 관계가 있을 뿐, 생존율에는 차이가 없는 것으로 보고하였다. Park 등(24)과 Castiglione 등(25)은 bcl-2 발현 감소가 나쁜 예후 인자라고 주장하였으나, 이는 조직학적 분화도를 기준으로 한 것이어서 실제 환자의 생존율과 비교한 예후 인자로 단정하기는 어렵다. 기존의 유방암에서 bcl-2 발현에 관한 연구 중 가장 오랜 기간의 추적 조사를 한 것은 Veronese 등(27)이 수행한 연구인데, 이들은 239예의 유방암 환자에서 평균 79개월(범위: 11~140개월)을 추적하였고, 생존율과 bcl-2 발현은 상관관계가 없다고 보고하였다.

유방암의 정확한 생존율을 알기 위해서는 10년 정도의 추적 조사가 필요하다는 점을 고려할 때, 대부분의 연구가 추적 기간이 짧아 유방암의 예후를 판단하기에는 무리가 따르므로 저자들은 10년 동안의 임상 추적 후 bcl-2 단백질과 세포자멸사 정도가 독립적인 예후인자로 작용할 수 있는지를 조사하고자 하였다. 유방암 환자에 대한 장기 추적 연구 결과, 실제 생존율과 밀접한 것은 임상 병기와 액와 림프절 전이 상태였고, bcl-2와 세포자멸사 정도는 영향을 미치지 않았다. 따라서, 지금까지 유방암에서 대부분의 bcl-2 관련 연구들의 결론인 조직학적 분화도를 중심으로 한 bcl-2 발현의 감소가 나쁜 예후 인자라고 하는 것은 다소 성급한 주장이라고 판단된다.

결 론

침윤성 관암종으로 진단받고 유방절제술이 시행된 환자 중 10년 이상(평균 139개월) 경과를 추적할 수 있었던 88예를 대상으로 bcl-2 단백질 및 apoptosis 발현과 생존율과의 상관관계를 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

Bcl-2 단백질 발현은 유방암의 약 반수에서 나타나고, 조직학적 분화도나 호르몬 상태를 나타내는 표지자 이외에 다른 임상병리학적 예후 인자들과의 연관성은 적은 것으로 나타났으며, 생존율을 예측하는 독립적인 예후인자라도 불충분한 것으로 판단된다. 세포자멸사 지수는 임상 병리학적 예후 인자들과 연관성이 없었으며, 생존율과도 통계학적으로 상관 관계가 없었다.

REFERENCES

- 1) Palumbo A, Yeh J. Apoptosis as a basic mechanism in the ovarian cycle: follicular atresia and luteal regression. J Soc

- Gynecol Invest 1995;2:565-73.
- 2) Yunis U, Oken MM, Kaplan MK. Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1982;307:1231-6.
 - 3) Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P. Cloning the chromosomal breakpoint of t (14 : 18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on chromosome 18. *Cell* 1985;41:899-906.
 - 4) Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis U. Cloning of the chromosome breakpoint of the neoplastic B cells with the t (14;18) chromosome translocation involved in B-cell neoplasm result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985;229:1390-3.
 - 5) Hockenbery DM, Zutter M. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6961-5.
 - 6) Poomipanit PB, Chen B, Oltvai ZN. Interleukin-3 induces the phosphorylation of a distinctive fraction of Bcl-2. *J Biol Chem* 1999;274:1033-9.
 - 7) Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Meta Rev* 1992;11:95-103.
 - 8) Wyllie AH. Apoptosis (The 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br J Cancer* 1993;67:205-8.
 - 9) Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:5214-8.
 - 10) Lu QL, Abel P, Foster CS, Lalani EN. Bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Human Pathol* 1996;27:102-10.
 - 11) Leek RD, Kaklamanis L, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. bcl-2 in normal human breast and carcinoma, associated with estrogen receptor-positive, epidermal growth factor-negative tumors and in situ cancer. *Br J Cancer* 1994;69:135-9.
 - 12) Nathan B, Anbazhagan R, Clarkson P, Bartkova J, Gusterson B. Expression of bcl-2 in the developing human fetal and infant breast. *Histopathology* 1994;24:73-6.
 - 13) Haldar S, Negrini M, Monne M, Savioni S, Croce CM. Downregulation of bcl-2 in breast cancer cells. *Cancer Res* 1994;54:2095-7.
 - 14) Sierra A, Lloveras B, Catellsague X, Moreno L, Garcia-Ramirez M, Fabra A. Bcl-2 expression is associated with lymph node metastasis in human ductal breast carcinoma. *Int J Cancer* 1995;60:54-60.
 - 15) Hellemans P, van Dam PA, Weyler J, van Oosterom AT, Buytaert B, van Marck E. Prognostic value of bcl-2 expression in invasive breast cancer. *Br J cancer* 1995;72:354-60.
 - 16) Wu J, Shao ZM, Shen ZZ, Lu JS, Han QX, Fontana JA, et al. Significance of Apoptosis and apoptotic-related proteins, Bcl-2, and Bax in primary breast cancer. *Breast Journal* 2000;6:44-52.
 - 17) Cox LS. Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities of p53 and p21^{cip1/WAF1/Sdi1}. *J Pathol* 1997;183:134-40.
 - 18) Lipponen PK, Aaltomaa S, Kosma VM, Syrjanen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer* 1994;30A:2068-73.
 - 19) Tormanen U, Eerola AK, Rainio P, Vahakangas K, Soini Y, Sormunen R, et al. Enhanced apoptosis predicts shortened survival in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1995;55:5595-602.
 - 20) Liu S, Edgerton SM, Moore DH 2nd, Thor AD. Measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their association with survival in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:1716-23.
 - 21) Kato T, Kameoka S, Kimura T, Tanaka S, Nishikawa T, Kobayashi M. p53, mitosis, apoptosis and necrosis as prognostic indicators of long-term survival in breast cancer. *Anticancer Res* 2002;22(2B):1105-12.
 - 22) Pilotti S, Collini P, Del Bo R, Cattoretti G, Pierotti MA, Rilke F. A novel panel of antibodies that segregates immunohistochemically poorly differentiated carcinoma from undifferentiated carcinoma of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol* 1994;18:1054-64.
 - 23) Baretton GB, Diebold J, Christoforis G, Vogt M, Muller C, Dopfer K, et al. Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenoma and carcinoma. *Cancer* 1996;77:255-64.
 - 24) Park SH, Kim H, Song BJ. Down regulation of bcl2 expression in invasive ductal carcinomas is both estrogen- and progesterone-receptor dependent and associated with poor prognostic factors. *Pathol Oncol Res* 2002;8:26-30.
 - 25) Castiglione F, Sarotto I, Fontana V, Destefanis M, Venturino A, Ferro S, et al. Bcl2, p53 and clinical outcome in a series of 138 operable breast cancer patients. *Anticancer Res* 1999;19:4555-63.
 - 26) Ruvolo PP, Deng X, May WS. Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia* 2001;15:515-22.
 - 27) Veronese S, Mauri FA, Caffo O, Scaioli M, Aldovini D, Perrone G, et al. Bax immunohistochemical expression in breast carcinoma: a study with long term follow-up. *Int J Cancer* 1998;79:13-8.