

자궁경부암에서 Bcl-2, Bax, VEGF, PCNA 단백질의 발현 및 Apoptosis 양상과 선행항암화학요법 반응도와의 상관관계에 관한 연구

서울대학교 의과대학 산부인과학교실, 병리학교실*

김용범 · 박노현 · 박인애* · 이효표

=Abstract=

The Correlation of Neoadjuvant Chemotherapy Responsiveness with The Expression of Bcl-2, Bax, VEGF, PCNA and The Pattern of Apoptosis in Cervical Cancer

Yong-Beom Kim, Noh-Hyun Park, In-Ae Park*, Hyo-Pyo Lee

Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Pathology, College of Medicine,
Seoul National University, Seoul, Korea*

The purpose of this study was to identify the relationship between the clinical response to neoadjuvant chemotherapy and PCNA and VEGF protein expression, apoptosis and its related gene expression such as Bcl-2 and Bax in cervical cancer. We retrospectively reviewed 30 patients with locally advanced or bulky cervical cancer treated with three courses of neoadjuvant chemotherapy followed by radical hysterectomy or radiation therapy at Seoul National University Hospital from June 1995 to June 1998. The specimen were obtained before chemotherapy by colposcopy directed biopsy. The protein expressions of Bcl-2, Bax, VEGF and PCNA were examined by immunohistochemical staining and the apoptosis was examined by TUNEL staining. These results were compared with chemotherapeutical response which was evaluated by colposcopy or CT/MRI. There were 2 CR(complete response), 19 PR(partial response) and 9 NC(no change) and there was no progressive disease. There was no significant difference between responder and nonresponder according to the age, tumor size and FIGO stage. The 3 year survival rates of responder and nonresponder were 90.0% and 66.7% respectively and there was significant difference between two groups($p=0.015$). The expression of Bcl-2 and Bax was positive in 23.3%(7/30) and 46.7%(14/30). The expression of VEGF was positive in 83.3%(25/30). PCNA PI(positive index), defined as PCNA positive cells in percentage was more than 25.0% in 20 cases. Apoptotic index, defined as the number of the cells undergoing apoptosis per 1,000 tumor cells, ranged from 3 to 53(mean 22.3). Although there was no significant relationship between the clinical response to neoadjuvant chemotherapy and the expression of Bcl-2, Bax, VEGF and PCNA PI, apoptotic index was significantly higher in responder than nonresponder when the cutoff value of positive was defined as apoptotic index more than 5($p=0.032$). In conclusion, the evaluation of the pattern of apoptosis before neoadjuvant chemotherapy is potentially useful for the prediction of tumor response to neoadjuvant chemotherapy for cervical cancer.

Key Words: neoadjuvant chemotherapy, Bcl-2, Bax, VEGF, PCNA, apoptosis

서론

자궁경부암은 우리 나라의 부인암 중에서 가장 높은 발생빈도를 보이는 종양으로서 매년 약 5,000여명의 새로운 자궁경부암 환자가 발생하고 있고 전세계적으로는 약 43만 명의 새로운 자궁경부암 환자가 발생하고 있는 것으로 보고되고 있다. 1999년에 발표된 보건복지부의 한국인 암등록 조사자료 분석보고서에 의하면 1997년 한해동안 새로이 등록된 자궁경부암이 4,618명으로 전체 여성암의 14.2%를 차지하고 있고 위암의 17.0%에 이어 2위를 차지하고 있어 국민보건상 중대한 문제가 되고 있다.¹⁾ 자궁경부암의 발생과 이로 인한 사망률을 감소시키기 위하여 자궁경부세포진 검사 등을 이용하여 침윤성 자궁경부암으로 발전하기 이전의 전암단계에서 초기에 발견하여 치료하기 위한 노력이 지속되어 왔고 동시에 자궁경부암의 치료에 있어서는 고전적인 수술요법 이외에 일차방사선치료, 수술후 보조적인 방사선치료 그리고 항암화학요법뿐만 아니라 최근에는 동시항암화학방사선요법 등이 개발되어 생존율을 꾸준히 향상시켜왔다.^{2,3)} FIGO의 연례보고에 의하면 1979-1981년에 치료받은 환자의 5년 생존율이 임상병기 I기 75.7%, II기 54.6%, III기 30.6%이었으나, 1990-1992년에 치료받은 환자의 5년 생존율을 발표한 1998년도 연례보고를 보면 임상병기 Ia기 95.1%, Ib기 80.1%, IIa기 66.3%, IIb기 63.5%, III기 35.7%로 향상되었다.⁴⁾

그러나 자궁경부암 중에서 임상병기 Ib기, IIa기에서 임파절 전이의 증거가 없는 자궁경부암의 경우 수술 또는 방사선요법후 재발율이 10-20%에 불과한 반면, 국소적으로 진행되었거나 림프절 전이가 있는 환자에서는 60% 이상에서 재발하며 5년 생존율도 낮은 것으로 알려져있다.⁵⁻⁷⁾ 특히 병변 크기가 크거나 자궁방 결합조직 침윤이 있는 경우에는 재발의 가능성이 높으므로,⁸⁾ 보다 효과적인 치료법이 필요하며, 이러한 방법의 하나로 항암화학요법 특히 선행항암화학요법의 유용성이 관심을 끌고 있다. 수술이나 방사선 치료후의 보조적 항암화학요법은 기왕의 수술, 방사선 치료로 인한 종양조직의 섬유화 및 혈관변동 등의 요인으로 인하여 치료효과가 낮은 것으로 알려져 있어, cisplatin을 포함한

복합항암화학요법을 수술 전에 사용하는 선행항암화학요법(neoadjuvant chemotherapy)이 시도되었으며 치료효과를 증명하는 결과들이 제시되었다.⁸⁻¹¹⁾ 자궁경부암에 있어서 이러한 치료법의 이론적 근거는 악성종괴의 크기를 감소시켜 수술을 가능하게 하고 미세전이를 미리 조절하고자 하는 것인데, 종양에 대한 혈액 공급이 원활하고 저항성이 없는 상태에서 항암제를 투여함으로써 항암제의 효과를 높일 수 있으며 환자의 전신상태가 양호한 시기에 투여함으로써 독성 발생할 가능성을 줄일 수 있다.¹²⁾ 지금까지의 결과를 종합할 때 22-44%의 완전관해를 이 보고되고 있으며, 임상병기를 낮추고, 종양 크기를 감소시켜 수술을 가능하게 하고, 림프절 전이를 줄이며 2-3년 무병생존율을 증가시키는 것으로 알려져 있다.^{12,13)}

자궁경부암에서의 선행항암화학요법은 위와 같은 장점과 동시에 여러 가지 이론적 제한점도 있는데 치료 후 반응이 좋지 못하여 방사선치료를 시행하는 경우 항암제와 방사선치료 사이의 교차 저항성 및 민감도가 문제가 될 수 있으며, 치료 중 병변이 진행되는 경우 치료 시기가 늦어질 수 있고, 이후 방사선치료를 시행하게 되는 경우에 오히려 나쁜 결과를 초래할 수도 있다. 실제로 임상병기 IIb와 III기 자궁경부암 환자에서 선행항암화학요법 후 방사선치료의 효과에 대한 무작위 임상시험은 30-85%의 선행항암화학요법에 대한 반응율을 보고하고 있으나 골반내 종양의 조절 및 생존율의 향상 여부는 의심스러우며, 두정부 악성종양을 대상으로 한 연구에서도 국소조절이나 생존율에서 유용한 효과를 보이지 않는다는 결과들이 있다.¹⁴⁾ 항암제에 대한 반응에도 불구하고 생존율에 대한 효과가 불분명한 것은 항암제 치료에 완전관해가 이루어진다고 해도 최소한 108~109 정도의 암세포가 남아 있을 수 있으며, 항암제에 저항하는 클론의 지속적인 성장이 일어날 수 있기 때문으로 생각된다. 따라서 아직 국소적으로 진행된 자궁경부암에서 선행항암화학요법이 생존율을 향상시킨다고 결론 내리기는 어려운 실정이며 특히 항암제에 대한 반응이 좋지 않은 군에서의 효과에 관하여 논란의 여지가 있다. 그러나 선행항암화학요법에 대해서 “반응이 있었던 환자군”에서의 생존율 증가 효과는 뚜렷한 것으로 밝혀지고 있어,¹³⁾ 사전에 선행항암화학요법에 대한 반응

여부를 미리 예측할 수 있는 인자들이 있다면 선행 항암화학요법을 통하여 생존율의 향상을 확실히 기대할 수 있는 대상 환자를 선별하는데 도움이 될 수 있을 것이다.

선행항암화학요법을 시행하였을 경우의 반응율 및 생존율에 영향을 미치는 인자를 분석한 연구를 살펴보면 FIGO 임상병기, 병변의 크기 및 선행항암화학요법에 대한 반응 여부가 중요한 인자로 알려지고 있다.^{13,15)} 그러나 선행항암화학요법은 주로 종양의 크기가 크거나 국소적으로 진행된 자궁경부암 환자를 대상으로 하고 다른 인자들의 경우에도 치료가 종료된 후에야 비로소 알 수 있기 때문에 이러한 임상적 인자들만으로는 적절한 기준을 설정하기 곤란하다. 따라서 상기한 임상적 요인들 이외에 선행항암화학요법을 시행하기 전에 선행항암화학요법에 대한 반응 여부를 미리 예측할 수 있는 분자생물학적 인자들에 대한 연구의 필요성이 제기되었다.

일반적인 항암화학요법에서 반응도와 연관성이 있는 분자생물학적 인자들에 대한 연구는 다수 보고되고 있으며 이러한 표식자의 연구 대상으로는 세포증식능력을 평가하는 인자로서 유식세포분석(DNA flow cytometry)에 의한 핵산 양상, p53 등의 암유전자 및 여러 성장관련인자의 발현 정도 PCNA(proliferating cell nuclear antigen), Ki-67 등이 있고 신생혈관의 형성을 평가하는 인자로서 종양의 맥관형성의 밀도(microvessel density), VEGF(vascular endothelial growth factor) 발현 정도 등이 있고 세포사멸을 평가하는 인자로서 Bcl-2 및 Bax 등 apoptosis 관련유전자의 발현 정도 등이 있으며 그 외에 약제내성과 관련된 인자로서 p-glycoprotein 등이 있다. 그러나 자궁경부암에서 선행항암화학요법에 대한 반응도와 연관성이 있는 분자생물학적 인자들에 대한 연구는 1998년 Konishi 등이 약제 내성과 연관이 있는 유전자 산물인 p-glycoprotein과 세포증식을 나타내는 PCNA가 선행항암화학요법에 대한 반응도와 연관성이 있다고 보고한 외에는 거의 없는 실정이다.¹⁶⁾ 이중 약제내성과 연관된 인자들은 주로 항암화학요법 후에 나타나게 되므로 선행항암화학요법의 반응도를 예측하기 위한 인자로서는 적합하지 않다고 할 수 있다. 따라서 상기한 여러 인자들 중 세포의 증식, 신생혈관의 형성 그리고 세포사멸과

연관된 인자 중에서 선행항암화학요법의 반응도와 관련성이 있는 인자를 찾을 수 있다면 환자가 항암제에 어떠한 반응을 보일 것인가를 예견할 수 있는 지표를 마련할 수 있을 것이며 이러한 기준은 선행항암화학요법을 시행하기 전에 임상적으로 확실한 생존율의 향상을 기대할 수 있는 치료군을 선별하고, 불필요한 치료 및 생존율에 오히려 나쁜 영향을 줄 수 있는 환자를 미리 배제할 수 있는 지표로 사용됨으로써 환자의 치료방침을 정하는데 기초 자료로 사용될 수 있을 것이다. 즉, 기존에 밝혀진 임상적 요인들과 더불어 항암제 반응 여부를 미리 예견할 수 있는 분자생물학적 인자들을 밝힘으로써 향후 선행항암화학요법으로 분명한 생존율의 향상을 기대할 수 있는 환자군을 선별하여 보다 효과적인 치료 방침의 설정과 자궁경부암 환자의 생존율 향상에 기여할 수 있을 것이다. 이에 본 연구에서는 항암화학요법에 대한 반응도와 연관성이 있다고 알려진 여러 가지 분자생물학적 인자들 중에서 Bcl-2, Bax, VEGF, PCNA의 발현 및 apoptosis 양상과 선행항암화학요법 반응도와의 연관성에 대하여 알아보 고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

1995년 6월부터 1998년 6월까지 자궁경부암으로 진단받고 서울대학교병원 산부인과에 입원하여 3주기의 선행항암화학요법을 시행한 환자 중 선행항암화학요법 시행 전후에 각각 질확대경검사와 CT 혹은 MRI를 시행하여 반응여부를 평가할 수 있고 동시에 선행항암화학요법 시행 전의 조직을 얻을 수 있었던 환자 30명을 대상으로 하였다. 대상 환자들의 병리조직 슬라이드는 병리과에서 검토하여 세포 형태를 다시 확인하였고, 의무기록을 통하여 나이, 임상병기, 치료방법, 보조적 치료여부, 재발여부, 재발시의 치료 등을 검색하였고 현재까지 사망이 확인되지 않거나 추적관찰이 되고 있지 않은 환자들은 전화 및 서신을 이용하여 추가치료, 생존여부, 사망일 등을 확인하였다. 선행항암화학요법의 시행 선정기준은 과거에 자궁경부암으로 치료받은 경험이 없고 나이가 70세 이하인 환자로서 자궁경부암

임상병기 Ib기, IIa기에서 종괴의 장경이 4cm 이상인 경우와 임상병기 IIb기인 경우로 하였으며 임상병기 III기인 환자 한 명을 포함하였다. 선행항암화학요법은 FP(5-FU, cisplatin)제제 혹은 EP(epirubicin, cisplatin)제제를 사용하였고 FP제제를 투여했던 환자가 18명이었고 EP를 투여했던 환자가 12명이었다. 선행항암화학요법 후의 치료는 수술이 16례, 수술 후 보조방사선치료가 11례로 27례에서 수술이 시행되었고 일차방사선치료는 3례에서 시행되었다.

2. 선행항암화학요법

질확대경검사, 경정맥요조영술, 방광경검사, 직장경검사, CT 혹은 MRI 등을 시행하여 종괴의 크기 및 전이여부를 확인하였고 선행항암화학요법의 선정기준에 적합하다고 판정된 경우에 선행항암화학요법을 시행하였다. FP제제를 이용한 선행항암화학요법은 5-FU 1,000mg/m²를 항암화학요법 제 1일부터 제 5일까지 투여하였고 cisplatin 60mg/m²를 항암화학요법 제 1일에 투여하였다. EP제제를 이용한 선행항암화학요법은 epirubicin 110mg/m²와 cisplatin 60mg/m²를 제 1일에 투여하였다. 선행항암화학요법은 매 3주마다 시행하였고 연구 대상 환자들은 모두 3회의 선행항암화학요법을 시행하였다. 선행항암화학요법을 마친 후에는 다시 질확대경검사, 경정맥요조영술, CT 혹은 MRI 등을 시행하여 종괴의 크기 및 병변의 변화를 조사하고 치료 방법을 결정하였다.

3. 연구 방법

1) 선행항암화학요법에 대한 반응의 평가

선행항암화학요법에 대한 반응의 평가는 선행항암화학요법을 시행하기 전과 후의 종괴의 크기를 측정하여 비교한 후 정하였다. 종괴의 크기는 질확대경을 사용하여 평가하였고 종괴의 최장경의 길이와 이에 수직인 최장경길이를 곱한 값으로 정하였다(Miller et al., 1981). 질확대경으로 종괴의 크기를 측정하기 어려울 경우에는 CT 혹은 MRI의 소견을 참조하여 측정하였다. 평가 기준은 세계보건기구(WHO) 기준을 사용하였고 모든 병변이 소실된 경우를 완전반응(complete response, CR), 병변의 면적이 50% 이상 감소한 경우를 부분반응(partial response, PR), 25% 이상 증가하거나 새로운 병변이 출

현한 경우를 진행병변(progressive disease, PD), 그리고 부분반응과 진행병변의 사이에 해당하는 경우를 변화없음(no change, NC)으로 하였다. 본 연구에서는 완전반응 혹은 부분반응을 보인 경우를 반응군(responder)으로 정하였고 이외의 경우는 비반응군(nonresponder)으로 정하였다.

2) 면역조직화학검사

보관된 파라핀포매괴(Paraffin block)로부터 얻은 조직을 이용하여 Bcl-2, Bax, VEGF 그리고 PCNA의 면역조직화학검사와 TUNEL 염색을 시행하여 발현도를 측정한 후 선행항암화학요법의 반응도와의 연관성을 분석하였다.

가) 표본 채취

자궁경부암 환자의 원발병소조직을 이용하여 조직절편을 얻기 전에 미리 병리소견을 재확인하였다. 이중 종양조직이 적어도 60% 이상 함유된 파라핀포매괴를 3μm 두께의 절편으로 잘라 silane coated slide(DAKO, Denmark)에 고정하고 60℃의 오븐에서 하루동안 건조한다. 채취된 검체의 바로 옆 조직을 채취한 후 Hematoxylin-Eosin 염색을 하여 병리조직학적 소견을 판독한다. 교차오염을 방지하기 위하여 검체 종류를 바꿀 때마다 microtome blade를 xylene으로 세척한다.

나) Bcl-2, Bax, VEGF, PCNA

통상적인 포르말린 고정과 파라핀 포매를 거친 조직을 3μm 두께의 절편을 만들어 xylene을 3-5분 간씩 4번 거쳐 파라핀을 제거하였다. 100%, 95%, 75%의 에탄올에 차례대로 처리한 뒤 증류수에 넣어 흡수시키고 citrate 완충용액에 담가 극초단파 오븐처리를 한 후 TBS 완충용액에 담가 반응을 진행시켰다. 1차, 2차 항체의 비특이적 결합을 억제하기 위해 절편을 정상 염소혈청을 가하여 10분간 반응시킨 후 일차항체를 1시간 동안 반응시켰고 TBS로 3번 세척한 후 biotin과 결합된 이차항체(biotinylated rabbit anti-mouse immunoglobulin, DAKO, 1:400)에 30분간 반응시켰다. TBS로 3번 세척한 후 streptavidin-alkaline phosphatase (DAKO, 1:300)용액에 30분간 반응시키고 다시 TBS로 3번 세척하였다. Fast Red로 30분간 발색시킨 다음 증류수에 세척하였고

hematoxylin으로 3분간 대조 염색하고 봉입하였다. 면역조직화학검사에 사용된 일차 항체와 희석배율 그리고 반응시간을 Table 1에 요약하였다.

다) Apoptosis

Apoptosis 양상을 알아보고자 ApopTag™ In Situ Apoptosis Detection Kit(Oncor Inc., Gaithersburg, MD)을 이용하여 TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT) - mediated dUTP-biotin nick end labeling) 염색을 시행하였다. 파라핀 블록을 3 µm 간격으로 박절하여 만든 슬라이드를 xylene에 5분 간격으로 2회 세척하고, absolute ethanol에 5분 간격으로 2회 세척한 후 95%, 90%, 80%, 70%의 ethanol 순으로 각각 3분씩 세척하고 다시 PBS에 5분간 세척하였고 20 µg/ml의 proteinase K(PK, Oncor Inc., Gaithersburg, MD)를 슬라이드 위에 떨어뜨리고 실온에서 15분간 반응시킨 후 증류수로 2분간 4회 세척하였다. Endogenous peroxidase의 억제를 위하여 PBS로 희석하여 만든 2.0% H₂O₂에 실온에서 5분간 담가 놓은 후 다시 PBS로 5분간 2회 세척하였다. 슬라이드 위의 물기를 가볍게 털어 내고 조직 주위의 물기를 닦아낸 후 DAKO 펜으로 조직주위의 경계선을 긋고서 즉시 두방울의 equilibration buffer를 조직 위에 떨어뜨리고 plastic coverslip을 조직 위에 덮고 실온에서 20분간 반응시켰다. Coverslip을 벗기고, 부드럽게 턴 다음 주위의 물기를 닦고서 54 µl의 working strength TdT를 슬라이드 위에 떨어뜨리고 플라스틱 coverslip을 덮은 후 37℃ humidified chamber에 1시간 동안 반응시켰다. 37℃로 데워 놓은 working strength stop/wash buffer가 담긴 coplin jar에 슬라이드를 넣고 15초간 흔들어 준 다음 plastic coverslip을 조심스럽게 제거한 후 실온에서 10분간 반응시켰다. 슬라이드를 새로운 PBS에 5분씩 3회 세척한 후 두방울의 Anti-Digoxigenin-Peroxidase를 슬라이드 위에 떨어뜨리고 새 coverslip을 덮고 실온의 humidified

chamber내에서 30분간 반응시켰다. PBS에 5분씩 3회 세척한 후 DAB 용액을 조직이 충분히 덮이도록 떨어뜨리고 5분간 실온에서 반응시켰다. Coplin jar 내에서 증류수로 세척한 후 Auto Hematoxylin(Research Genetics)을 조직 위에 충분히 덮일 만큼 떨어뜨리고 30초간 대조염색을 하였다. Coplin jar내에서 증류수로 1분씩 3회 세척하고 건조시킨 다음 Histo-Mount를 두 방울 떨어뜨리고 coverglass를 덮어서 완성하였다.

라) 면역조직화학 염색 결과의 판독

숙련된 병리과 전문의에 의뢰하여 면역조직화학 검사 결과를 판독하였다. Bcl-2, Bax 그리고 VEGF 염색의 판독 기준은 면역반응을 시각적 강도(Visual intensity)에 따라 반정량적인 등급을 주어, 세포막 또는 세포질에 뚜렷한 과립상의 갈색염색이 나타나는 세포를 양성(positive), 반응이 전혀 없는 경우를 음성(negative)으로 하였다. PCNA의 발현 정도(PI, positive index)는 1,000개의 종양세포 중에서 양성인 세포를 세어서 백분율로 표시한 수치로 정의하였고 apoptosis의 발현 정도(AI, apoptotic index)는 TUNEL 염색 후 1,000개의 종양세포 중에서 보이는 apoptotic body를 포함하는 세포의 개수를 산정하여 정하였다.

3) 통계 분석

범주 변수의 통계처리는 Chi square test 혹은 Fisher's exact test(two-tailed)를 이용하였고, 연속 변수의 통계처리는 Student t-test를 이용하였으며 경향 분석은 Chi square test for trend를 이용하였다. 각 군의 누적생존율 산출은 Kaplan-Meier법을 이용하였으며, 두 군간의 생존율 비교에는 Log-rank법을 이용하여 분석하였다. 통계 분석은 SPSS for windows version 7.5를 이용하였으며 유의수준 0.05 미만을 의미가 있는 것으로 정하였다.

Table 1. Primary antibodies used in immunohistochemical staining

Primary antibody	Source	Dilution	Incubation	Company
Bcl-2	rabbit polyclonal IgG	1:100	2 hours	DAKO, CA, Denmark
Bax	rabbit polyclonal IgG	1:100	2 hours	DAKO, CA, Denmark
VEGF	mouse monoclonal IgG	1:50	overnight	DAKO, CA, Denmark
PCNA	mouse monoclonal IgG	1:300	2 hours	DAKO, CA, Denmark

연구결과

1. 대상환자의 임상적 특성

전체 연구대상 환자 30명의 임상적 특성을 Table 2에 요약하였다. 선행항암화학요법에 부분반응 이상의 효과를 보인 경우(responder, 반응군)가 21명이었고 병변의 변화가 없거나 오히려 진행한 경우(nonresponder, 비반응군)가 9명이었다. 반응군과 비반응군의 평균연령은 각각 53.8세(38세-66세) 그리고 52.2세(43-65세)로서 두 군간에 유의한 차이는 없었다. 종양의 평균크기는 반응군이 17.5cm³이었고 비반응군이 20.3cm³이었으며 두 군간에 유의한 차이는 없었다. 그 외에 조직학적 분포나 임상병기별 분포에 있어서도 두 군간에 유의한 차이는 없었다.

평균 추적기간은 30.7개월(10-52개월)이었고 전체 3년 생존률은 81.7%이었다. 그러나 반응군의 3년 생존률은 90.0%인 반면에 비반응군의 3년 생존률은 66.7%로서 반응군의 생존률이 비반응군의 생존률보다 유의하게 높았다($p=0.015$, Fig. 1)

2. Bcl-2, Bax, VEGF 단백질의 발현

전체 대상환자 30예 중 Bcl-2 단백질 염색은 7예(23.3%)에서 음성소견을 보였고 23예(76.7%)에서 양성소견을 보였으며(Fig. 2) Bax 단백질 염색은 14예(46.7%)에서 음성소견을 보였고 16예(53.3%)에서 양성소견을 보였다(Fig. 3). VEGF 염색은 대개 종양세포의 세포질에서 과립상으로 관찰되었고 종양 주위 및 종양 내부의 혈관내피세포에서도 발현되었으며 25예(83.3%)에서 음성소견을 보였고 5예(16.7%)에

서만이 양성소견을 보였다(Fig. 4). 그러나 반응군과 비반응군에서의 Bcl-2, Bax, VEGF 단백질 발현을 분석하였을 때, 유의한 차이는 없었다.(Table 3)

3. 세포증식과 apoptosis

PCNA 염색의 양성 소견은 종양세포의 핵 또는 세포질에 뚜렷한 과립상의 갈색염색이 나타나는 세포에서 관찰할 수 있었다(Fig. 5). TUNEL 염색에서 보이는 apoptotic body는 종양세포에서 핵의 모양이 용출되고 여러 조각으로 분절이 형성된 양상으로 관찰되었다(Fig. 6). PCNA 단백질의 염색 결과는 PCNA PI(positive index)에 따라 전체 암세포 중 5% 미만에서 염색된 경우를 (grade 1), 5-25%에서 염색된

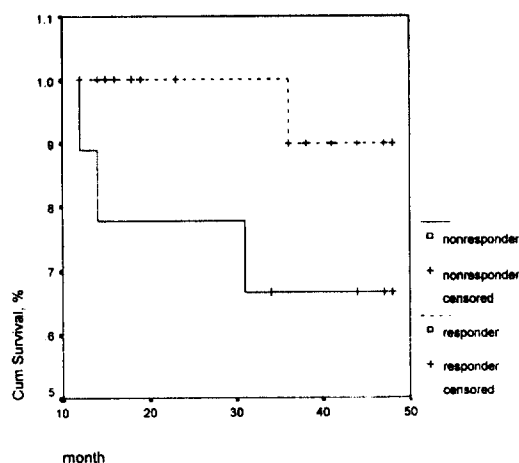


Fig 1. Overall survival according to response of neoadjuvant chemotherapy ($p=0.015$, Log rank test with Kaplan-Meier survival analysis).

Table 2. Clinical profiles of patients with cervical cancer

Characteristics	Responder	Nonresponder	p value	Statistics
Patient number	21	9	-	
Mean age(range, year)	53.8(38-66)	52.2(43-65)	0.642	student t-test
Mean tumor size(range, cm ³)	17.5(5-36)	20.3(5-42)	0.507	student t-test
Histology			0.143	Fisher's exact test
squamous cell ca.	19	6		
others	2	3		
Stage			0.873	Chi-square test
Ib2	2	1		
IIa	13	5		
IIb	5	3		
III	1	0		
3-year survival	90.0%	66.7%	0.015	Log-rank test

Fig 2. A: Immunohistochemical staining for Bcl-2 shows positive reaction in cervical carcinoma (DAB chromogen with hematoxylin counterstain, x100), B: Immunohistochemical staining for Bcl-2 shows positive reaction in pleomorphic cells in cervical carcinoma (x200).

경우를 (grade 2), 25-50%에서 염색된 경우를 (grade 3), 그리고 그 이상을 (grade 4)로 정하여 염색강도를 구분하였을 때 반응군과 비반응군에서 유의한 차이는 없었다. 그러나 TUNEL 염색의 결과는 AI(apoptotic index)에 따라 5 이하인 경우를 음성으로 정하고 그 이상을 양성으로 정하여 구분하였을 때, 반응군과 비반응군에서 유의한 차이를 보였다.($p=0.032$, Table 4)

고 찰

본 연구는 서울대학병원 산부인과에 입원하여 조직학적으로 자궁경부암으로 진단 받았던 환자들 중 선행항암화학요법을 시행하였던 환자들을 대상으

로 Fig 3. A: Immunohistochemical staining for Bax in cervical carcinoma (DAB chromogen with hematoxylin counterstain, x100), B: Immunohistochemical staining for Bax shows positive reaction in cytoplasm of the cells (x200).

로 apoptosis관련 유전자인 Bcl-2/Bax, 세포의 증식 정도를 반영하는 PCNA 그리고 신생혈관의 형성 정도를 반영하는 VEGF의 발현정도를 면역조직화학 점사를 통하여 파악하고, TUNEL 염색을 시행하여 apoptosis의 양상을 확인하여 선행항암화학요법의 반응여부와 이들과의 상호관계를 파악하고자 한 것이다. 이 연구를 통하여 환자가 선행항암화학요법에 어떠한 반응을 보일 것인가를 예견할 수 있는 지표를 마련할 수 있을 것이며 이러한 기준은 선행항암화학요법을 시행하기 전에 임상적으로 확실한 생존율의 향상을 기대할 수 있는 치료군을 선별하고 불필요한 치료 및 생존율에 오히려 나쁜 영향을 줄 수 있는 환자를 미리 배제할 수 있는 지표로 사용될 수 있을 것이다. 즉, 기존에 밝혀진 임상적 요인들과 더불어 항암제 반응 여부를 미리 예견할 수 있는 분자생물학적 인자들을 밝힘으로써 향후 선행항암화

학요법으로 분명한 생존율의 향상을 기대할 수 있는 환자군을 선별하여 보다 효과적인 치료 방침의 설정과 자궁경부암 환자의 생존율 향상에 기여할

수 있을 것이다.

현재 임상병기 Ib2기에서 임상병기 II기의 자궁경부암에서 선행항암화학요법을 시행하였을 때 반응률은 90% 이상으로 알려지고 있고 5년 생존률에 있어서도 80% 이상으로 알려지고 있다.^{13,15)} 반면에 본

Fig 4. A; Immunohistochemical staining for VEGF shows positive reaction in cytoplasm of the cells in cervical carcinoma (DAB chromogen with hematoxylin counterstain, x200). B; Immunohistochemical staining for VEGF shows positive reaction in the cytoplasm of vascular endothelial cell in cervical carcinoma (x200).

Fig 5. A; Immunohistochemical staining for PCNA shows positive reaction in cytoplasm of the cells in cervical carcinoma (DAB chromogen with hematoxylin counterstain, x100). B; Immunohistochemical staining for PCNA (x200).

Table 3. Results of immunohistochemical staining of Bcl-2, Bax and VEGF according to response of neoadjuvant chemotherapy.

Staining	Responder	Nonresponder	Total	p value*
Bcl-2				
Negative	6	1	7	0.393
Positive	15	8	23	
Bax				
Negative	11	3	14	0.439
Positive	10	6	16	
VEGF				
Negative	18	7	25	0.622
Positive	3	2	5	

* Fisher's exact test

연구에서는 선행항암화학요법에 부분반응 이상의 효과를 보인 환자가 임상병기 III기 1명을 포함한 전체 30명의 환자 중에서 21명인 반면, 부분반응 미만의 효과를 보인 환자가 9명으로 전체적인 임상적 반응률은 70.0%이었고 3년 생존률이 81.7%이었다. 이는 본 연구가 후향적인 연구로서 연구대상을 선택함에 있어서 모두 3주기의 선행항암화학요법을 시행한 환자 중 선행항암화학요법 시행 전후에 각각 질확대경검사와 CT 혹은 MRI를 시행하여 종양의 크기를 통하여 반응여부를 평가할 수 있고 동시에 선행항암화학요법 시행 전의 조직을 얻을 수 있었던 환자만을 대상으로 하였기 때문으로 보인다. 그러나 Panici 등(1998)의 연구에 의하면 선행항암화학요법에 대한 반응여부에 영향을 미치는 인자 중에는 임상병기, 종양의 크기, 조직학적 유형 등이 있는데¹³⁾ 본 연구에서도 이러한 인자들에 있어서 두 군

간에 차이가 없었고 오직 3년 생존률만이 차이를 보였으므로(Table 2), 본 연구에서 시행한 실험을 통하여 Bcl-2, Bax, VEGF, PCNA의 발현 및 apoptosis 양상에 있어서 두 군 사이에 유의한 차이가 있다면 이를 이용하여 선행항암화학요법을 시행하게 될 환자의 반응여부를 미리 예측하는데 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

일반적으로 증식정도가 높은 종양은 항암제 반응도가 높다고 알려져 있으며, 종양세포들의 증식능력을 평가하여 종양의 성장을 간접적으로 알기 위한 표지자에는 초기에 이용된 thymidine labeling index나 증식세포핵항원(proliferating cell nuclear antigen, PCNA), Ki-67 표지자 등이 있다. 특히 각종 조직의 증식정도를 알아보기 위하여 증식세포에서 나타나는 proliferation antigen에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 면역조직화학적 염색방법이 널리 쓰이고 있는데 PCNA는 S-phase 동안 세포핵에 존재하는 DNA polymerase delta에 결합하는 36-kd의 보조단백(accessory protein)으로 면역조직화학적 염색을 이용하여 비교적 간단히 발현 정도를 알 수 있다. PCNA는 DNA의 복제와 밀접한 관련이 있고 세포의 증식정도를 표현하며 세포증식의 조절에 중추적인 역할을 하는 것으로 알려지고 있다.¹⁸⁾ PCNA의 발현이 높을수록 환자의 예후가 불량하다는 보고가 많은데 Ishida 등(1993)이 비소세포암에서 PCNA 발현률이 5% 이상인 환자의 생존률이 5% 미만인 환자의 생존률보다 유의하게 낮다고 보고하였다.¹⁹⁾ 따라서 PCNA의 발현 정도는 악성종양에서 질병의 악성도 및 예후와 연관성이 있는 것으로 보이고 자궁경부암에서의 항암제 반응 여부를 예측할 수 있는

Fig 6. Apoptotic body detected by TUNEL staining shown as positive nuclear staining (x200).

Table 4. Results of immunohistochemical staining of PCNA and TUNEL staining according to response of neoadjuvant chemotherapy

Staining	Responder	Nonresponder	Total	p value	Statistics
PCNA ^a				0.893	Chi-square for trend Chi-square test
grade 1	1	0	1	0.924	
grade 2	6	3	9		
grade 3	7	3	10		
grade 4	7	3	10		
TUNEL ^b				0.032	Fisher's exact test
negative	3	5	8		
positive	18	4	22		

^a. grade 1; ≤5%, grade 2; 5-25%, grade 3; 25-50%, grade 4; >50%

^b. negative; AI ≤ 5, positive; AI >5

지표의 하나로서 연구 대상이 될 수 있다. 본 연구에서는 PCNA의 발현 정도에 따라 반응군과 비반응군 사이에 유의한 차이를 보이지 않았다. 특히 PCNA의 발현 정도에 따라 4군으로 나누어 경향분석을 시행한 결과에서도 유의한 차이를 보이지 않아 PCNA의 발현 정도는 선행항암화학요법의 반응도와 연관이 없는 것으로 보였다. 이는 Konish 등(1997)과 Fujiwaki 등(1997)이 보고한 연구와 다른 결과인데^{16,17)} 실제로 Vail 등(1996)도 non-Hodgkin's disease에서 PCNA의 발현은 항암화학요법에 대한 반응과 연관성이 없었다고 보고하였으며²⁰⁾ Hickey 등(1994)은 식도의 편평상피세포암에서 PCNA의 발현이 없는 환자에서 오히려 항암화학요법에 대한 반응률이 높았다고 보고한 바 있다.²¹⁾ 이러한 결과로부터 자궁경부암에서의 PCNA 발현 정도는 선행항암화학요법의 반응도와 연관이 없을 수도 있다는 사실을 알 수 있으며 향후 자궁경부암에서의 PCNA 발현 정도와 선행항암화학요법의 반응도와 연관성에 대한 정확한 규명을 위한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

종양이 성장하기 위해서는 혈액의 원활한 공급이 필수적이며 이러한 혈액공급을 위하여 신생혈관이 증식하게 된다. 혈관신생은 기존 혈관으로부터 새로운 혈관이 생성되는 일련의 과정을 말하며 개체의 발생, 배란, 염증 및 수복을 제외한 보통의 경우에는 관찰이 어렵지만²²⁾ 악성종양의 성장 및 전이는 신생혈관에 좌우된다고 알려져 있다.^{23,24)} 이러한 혈관신생에 관여하는 물질로는 transforming growth factor β (TGF- β), tumor necrosis factor α (TNF- α), fibroblast growth factor(FGF) 그리고 vascular endothelial growth factor(VEGF) 등이 있으며 이들은 종양세포나 자극 받은 혈관내피세포, 염증세포 등에서 분비된다.²⁵⁾ 이 중 VPF(vascular permeability factor)라고도 알려져 있는 VEGF는 45kd의 분자량을 가진 단백질로서 여러 가지의 종양에서 분비되며 종양의 혈관신생을 촉진하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 특히 전립선암에서 면역조직화학검사를 이용한 연구를 보면 전립선비대증이나 정상전립선에서보다 전립선암에서 유의하게 높다는 연구결과 보고가 있다.²⁶⁾ 그리고 혈관 생성을 억제하면 종양의 크기가 줄어들고 전이가 억제된다는 사실이 밝혀졌다.²⁷⁾ 혈관신생이 종양의 증식 및 전이 등의

악성도와 관련이 있다는 점을 고려하면 VEGF의 조직내 발현과 항암화학요법과는 밀접한 상관관계가 있을 것으로 생각된다. 그러나 본 연구에서는 VEGF 단백질의 발현 여부가 반응군과 비반응군 사이에 유의한 차이를 보이지 않아 자궁경부암에서 VEGF의 발현 정도는 선행항암화학요법의 반응도와 연관이 없는 것으로 보였다. 실제로 Boku 등(1998)이 말기 위암 환자에서 VEGF의 발현이 양성인 군에서 항암화학요법에 대한 반응률이 높았다고 보고한 반면,²⁸⁾ Maeda 등(1996)이 VEGF의 발현이 양성인 군에서 오히려 예후가 나빴음을 보고한 바 있어²⁹⁾ VEGF의 발현 여부 하나만을 놓고서 항암화학요법에 대한 반응도를 예측하기는 어려울 것으로 사료된다.

종양의 성장을 조절하는 인자로서 세포의 증식과 신생혈관의 증식 외에 또다른 중요한 인자로서 apoptosis 및 연관 인자들이 있다. Apoptosis의 조절에 관여하는 유전자는 매우 다양하게 보고되고 있으며, 크게 4군으로 나눌 수 있다. 첫째, Bcl-2 유전자 가계(gene family)에 속하는 Bcl-2(B-cell lymphoma/leukemia)유전자, Bax(Bcl-2-associated-x-gene)유전자, bcl-x(Bcl-2-related-gene-x)유전자가 있으며, 둘째, 산화 스트레스 반응 인자(oxidative stress response factor), 셋째, 전사 조절인자(transcriptional regulator), 넷째, 세포질성 단백질분해효소(cytoplasmic protease) 및 interleukin-1 β -converting enzyme(ICE) gene family가 있다. 이 중에서 Bcl-2 유전자는 proto-oncogene으로서 세포 사멸의 조절에 관여하는 인자로서 가장 잘 알려져 있으며, 이에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있다. Bcl-2 단백질은 Bax 단백질과 heterodimer를 형성하고 있어 상호간에 서로의 기능을 억제하고 있는데, Bax 단백질이 Bcl-2 단백질로부터 분리되면 직접적으로 혹은 Bcl-2의 다른 작용기전을 억제하는 간접적인 경로로 세포사멸의 기전에 관여하는 것으로 알려져 있다.³⁰⁾ Bcl-2 유전자는 t(14; 18) 전이를 가진 B세포 임파종에서 처음으로 밝혀졌고 Bcl-2 종양유전자는 B-cell leukemia/lymphoma-2 gene으로 염색체 18q21에 위치하고 있으며 세포내 미토콘드리아 막 단백질로서 세포의 발달, 성숙, 분화에서 역할이 있을 것으로 생각되지만 아직 정확한 생물학적 역할은 알려지지 않고 있다. 유방암의 80%이상에서 Bcl-2 유전자의 발현이 보고되었고,³¹⁾ 자궁경부암에서 Bcl-2 유전자의 발현이 증가할수록

예후가 좋지 않다는 보고가 있었으며,³²⁾ 자궁경부 상피내중양에서도 그 정도(grade)가 심할수록 Bcl-2 유전자의 발현이 증가함이 보고되었다.³³⁾ Bcl-2 유전자의 과발현에 의한 Bcl-2 단백질의 과생성은 종양 발생을 유도하며, 이는 Bcl-2 유전자가 과발현 될 경우 세포의 증식을 유도하기보다는 apoptosis를 억제하여 세포 사멸을 감소시키기 때문으로 생각되고 있다.³⁴⁾ 특히 자궁경부 전암병변과 침윤암에서 인유두종바이러스 16형과 18형에서 유래된 E6 단백질의 발현은 p53의 불활성화를 야기시켜서 apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있다.³⁵⁾ p53은 대표적인 종양억제유전자로 염색체 17번에 위치하고 있으며, 이 유전자의 변이는 인간에서 발생하는 암에서 가장 흔히 발견되는 유전자 변화이다.³⁶⁾ p53 종양유전자 산물은 정상적으로는 종양의 발생을 억제하지만, allelic loss나 점변이가 일어나면 wild-type p53 단백질의 특성인 세포성장억제 능력이 비활성화 되어 오히려 암의 발달을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 정상세포에서는 발현이 낮고 반감기가 짧아서 통상적인 면역염색법에서 발견하기가 어려우나, 암 세포나 변이세포 등에서는 반감기가 길어져, 고농도로 발현하는 것으로 알려져 있다.³⁷⁻³⁹⁾ 이러한 p53 종양유전자의 변이는 여러 부인악성종양에서 활발히 연구가 진행되고 있는데 난소암의 약 50%, 자궁체부암의 14%에서 점변이나 allelic loss를 보인다고 한 반면,^{40,41)} 자궁경부암에서는 5% 이하에서 보인다고 하였다.⁴²⁾ 방사선 치료나 항암제가 p53 유전자의 활성화를 통하여 apoptosis를 유발하며 wild type p53 유전자의 불활성화는 항암제에 대한 저항성을 증가시키는 것으로 알려져 있다.⁴³⁾ 그러나 자궁경부암에서 mutant type p53 유전자의 발생빈도는 매우 낮고 면역조직화학검사에 의한 p53 단백질의 과발현과 실제 mutant type p53 유전자와의 상관관계는 보고자마다 차이가 있으며 일정하지 않다.^{44,45)} 또한 p53의 과발현이 있는 경우 항암제에 대한 반응도가 좋다는 보고와 그렇지 않다는 보고가 있어서^{46,47)} 본 연구에서는 p53 단백질의 발현에 대한 연구는 시행하지 않았다. 본 연구에서 Bcl-2의 발현 여부는 반응군과 비반응군 사이에 유의한 차이를 보이지 않았는데 이는 Takei 등(1999)이 유방암에서 Bcl-2 단백질의 발현이 호르몬수용체의 분포와 종양세포의 분화도와는 연관성이 있지만 보조항암화학요법의 반응도와

는 연관성이 없었다고 보고하였고⁴⁸⁾ Scott 등(1998)도 직장암 환자에서 동시항암화학요법을 시행하였을 경우에 Bcl-2 단백질의 발현이 반응도와는 연관성이 없었다고 보고한 바 있어⁴⁹⁾ 자궁경부암에서도 Bcl-2 단백질의 발현 여부는 항암화학요법의 반응도와 연관성이 없는 것으로 보인다.

Bax 유전자에 의한 Bax 단백질은 Bax:Bax 동종이합체(homodimer)를 형성하여 세포의 사멸을 유도하므로 Bcl-2 단백질에 길항작용을 한다고 보고되고 있으며, 어떠한 apoptotic 자극에 대하여 세포가 사멸할 것인가 또는 계속 생존할 것인가에 대하여 Bcl-2와 Bax 유전자의 비율이 중요한 척도가 될 수 있을 것으로 제시되고 있다.³⁰⁾ Bcl-2 유전자는 모든 세포에 작용하여 세포 사멸을 억제할 수는 없으며, 또한 항상 단독으로 작용하지는 않는 것으로 생각되며, 오히려 Bcl-2 유전자 가계에 속하는 유전자 발현 단백질들이 서로 조절 작용을 하여 세포 사멸 유도 또는 억제를 하는 것으로 생각되고 있다. Tai 등(1998)이 상피성 난소암에서 Bax 단백질이 발현이 높은 군에서는 항암화학요법에 대한 반응이 매우 좋았다고 보고한 바 있고 항암제 내성을 가지고 있는 경우 Bcl-2/Bax ratio가 증가하는 것으로 알려져 있어 이를 이용하여 항암제 반응도와와의 관계를 파악할 수 있을 가능성이 있다.⁵⁰⁾ 그러나 본 연구에서 Bcl-2와 Bax의 발현 여부는 반응군과 비반응군 사이에서 유의한 차이를 보이지 않았다. 이는 apoptosis의 조절에 있어서 Bcl-2와 Bax가 동시에 작용하기 때문에 전술한 바와 같이 Bcl-2에 대한 본 연구의 결과와 마찬가지로 자궁경부암에서 Bax 단백질의 발현 여부는 항암화학요법의 반응도와 연관성이 없는 것으로 보인다. 반면에 apoptotic index를 통하여 평가한 apoptosis의 정도를 5%를 기준으로 양성과 음성으로 구분하였을 경우에 선행항암화학요법에 대하여 반응을 보인 군과 그렇지 않은 군 사이에 유의한 차이를 보였는데($p=0.032$) 이는 Scott 등(1998)이 직장암 환자에서 동시항암화학요법을 시행하였을 경우에 Bcl-2 단백질의 발현은 반응도와 연관성이 없었으나 apoptosis의 정도와 반응도 사이에는 유의한 연관성이 있다고 보고한 바 있어⁴⁹⁾ 자궁경부암에서도 Bcl-2 혹은 Bax 단백질의 발현 여부는 항암화학요법의 반응도와 연관성이 없지만 apoptosis의 정도와 반응도 사이에는 유의한 연관성이 있는 것으로 보이며

자궁경부암환자에서 선행항암화학요법을 시행할 경우에 종양조직으로부터 apoptosis의 정도를 미리 파악한다면 선행항암화학요법에 대한 반응 여부를 예측하는데 있어서 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

자궁경부암 환자에서 선행항암화학요법은 종양의 크기가 크거나 국소적으로 진행된 환자에서 시행하여 반응이 좋은 경우에 임상병기를 낮추고 종양 크기를 감소시켜 수술을 가능하게 하고, 림프절 전이를 줄이며 생존율을 증가시킬 수 있는 장점이 있는 반면에 선행항암화학요법 후 반응이 좋지 못하여 방사선치료를 시행하는 경우 치료 중 병변이 진행하게 되어 치료 시기가 늦어질 수 있고 오히려 나쁜 결과를 초래할 수도 있다. 이에 본 연구에서는 1995년 6월부터 1998년 6월까지 자궁경부암으로 진단을 받고 서울대학교병원 산부인과에 입원하여 3주기의 선행항암화학요법을 시행한 환자 중 선행항암화학요법 시행 전후에 각각 질확대경검사와 CT 혹은 MRI를 시행하여 반응여부를 평가할 수 있고 동시에 선행항암화학요법 시행 전의 조직을 얻을 수 있었던 환자 30명을 대상으로 항암화학요법에 대한 반응도와 연관성이 있다고 알려진 여러 가지 분자생물학적 인자들 중에서 Bcl-2, Bax, VEGF, PCNA의 발현 및 apoptosis 양상과 선행항암화학요법 반응도와 연관성에 대하여 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 선행항암화학요법에 대한 반응군 21명과 비반응군 9명 사이에 종양의 크기, 임상병기, 조직학적 유형에 따른 차이를 보이지 않았으나 3년 생존률은 유의한 차이를 보였다.

2. 선행항암화학요법에 대한 반응군과 비반응군 사이에서 Bcl-2, Bax, VEGF 그리고 PCNA의 발현 여부 및 발현 정도는 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

3. 반면에 선행항암화학요법에 대한 반응군과 비

반응군 사이에서 apoptotic index 5%를 기준으로 구분하였을 때 통계적으로 유의한 차이를 보여 향후 선행항암화학요법을 시행하는 경우 apoptosis 양상을 파악하여 선행항암화학요법에 대한 반응을 기대할 수 있는 치료군을 선별하는데 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

- 참고문헌 -

1. 한국중앙암등록본부, 보건복지부. 한국중앙암등록사업 연례 보고서(1997. 1. - 1997. 12.) 1999.
2. Morris M, Eifel PJ, Lu J et al. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Eng J Med.* 1999;340:1137-1143.
3. Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, et al. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Eng J Med.* 1999;340:1144-1153.
4. FIGO. Annual report on the results of treatment in gynecological cancer. *J Epi and Biostat* 1998;3;5-34.
5. DiSaia PJ. Surgical aspects of cervical carcinoma. *Cancer* 1981;48:548-559.
6. Petterson F.(Ed.) Annual report on the results of treatment in gynecological cancer. Stockholm, FIGO 1985;19.
7. Giaroli A, Sananes C, Sardi JE, et al. Lymph node metastases in carcinoma of the cervix uteri: response to neoadjuvant chemotherapy and its impact on survival. *Gynecol Oncol* 1990;39:34-39.
8. Kim DS, Moon H, Kim KT, et al. Two-year survival: preoperative adjuvant chemotherapy in the treatment of cervical cancer stages Ib and II with bulky tumor. *Gynecol Oncol* 1989;33:22-230.
9. Carlson JA, Jr. Chemotherapy of cervical cancer. *Clin Obstet Gynecol* 1990;33:910-916.
10. Dottino PR, Plaxe SC, Beddoe AM, et al. Induction chemotherapy followed by radical surgery in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1991;40:7-11.
11. Panici PB, Scambia G, Baiocchi G, et al. Neoadjuvant chemotherapy and radical surgery in locally advanced cervical cancer: Prognostic factors for response and survival. *Cancer* 1991;67:372-379.
12. Sardi J, Sananes C, Giaroli A, et al. Neoadjuvant chemotherapy in locally advanced carcinoma of the cervix uteri. *Gynecol Oncol* 1990;38:486-493.

13. Panici PB, Greggi S, Scambia G, et al. Long-term survival following neoadjuvant chemotherapy and radical surgery in locally advanced cervical cancer. *Eur J Cancer* 1998;34:341-346.
14. Cardenas J, Olguin A, Figueroa F, et al. Randomized neoadjuvant chemotherapy in cervical carcinoma stage IIb. PEC + RT versus RT. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1991;10:620.
15. Sardi J, Giaroli A, Sananes C, et al. Long-term follow-up of the first randomized trial using neoadjuvant chemotherapy in stage Ib squamous carcinoma of the cervix: the final results. *Gynecol Oncol* 1997;67:61-69.
16. Konishi I, Nanbu K, Mandai M, et al. Tumor response to neoadjuvant chemotherapy correlates with the expression of P-glycoprotein and PCNA but not GST- π in the tumor cells of cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1998;70:365-371.
17. Fujiwaki R, Takahashi K, Kitao M. Decrease in tumor volume and histologic response to intraarterial neoadjuvant chemotherapy in patients with cervical and endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 1997;65:258-264.
18. Robbins BA, Vega D, Ogata K, et al. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med* 1987;111:841-845.
19. Ishida T, Kanedo S, Akazawa K, et al. Proliferating cell nuclear antigen expression and argyrophilic nucleolar organizer region as factors influencing prognosis of surgically treated lung cancer patients. *Cancer Res* 1993;53:5000-5003.
20. Vail DM, Kisselberth WC, Obradovich JE, et al. Assessment of potential doubling time, argyrophilic nucleolar organizer regions, and proliferation cell nuclear antigen as predictors of therapy response on canine non-Hodgkin's lymphoma. *Exp Hematol* 1996;24:807-815.
21. Hickey K, Grehan D, Reid IM, et al. Expression of epidermal growth factor receptor and proliferating cell nuclear antigen predicts response of esophageal squamous cell carcinoma to chemotherapy. *Cancer* 1994;74:1693-1698.
22. Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? -G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 1986;46:467-473.
23. Folkman J. What is the evidence that the tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Inst* 1990;82:4-6.
24. Folkman J, Shing Y. Minireview, Angiogenesis. *J of Biol Chem* 1992;267:10931-10934.
25. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442-447.
26. Vartanian RK, Weidner N. Endothelial cell proliferation in prostatic carcinoma and prostatic hyperplasia: correlation with Gleason's score, microvessel density, and epithelial cell proliferation. *Lab Invest* 1995;73:844-50.
27. Teicher BA, Sotomayou EA, Huang ZD, et al. Antiangiogenic agents potentiate cytotoxic cancer therapies against primary and metastatic disease. *Cancer Res* 1992;52:6702-6704.
28. Boku N, chin K, Hosokawa K, et al. biological markers as a predictor for response and prognosis of unresectable gastric cancer patients treated with 5-fluorouracil and cis-platinum. *Clin Cancer Res* 1998;4:1469-1474.
29. Maeda K, Cheng Y, Ogawa Y, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996;77:858-863.
30. Oltvai Z, Milliman C, Korsmeyer SJ. bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-619.
31. Doglioni C, Dei Tos AP, Laurino L, et al. The prevalence of Bcl-2 immunoreactivity in breast carcinomas and its clinicopathological correlates, with particular references to oestrogen receptor status. *Virchows Arch* 1994;424:47-51.
32. Uehara T, Kuwashima Y, Izumo T, et al. Expression of the proto-oncogene Bcl-2 in uterine cervical squamous cell carcinoma: Its relationship to clinical outcome. *Eur J Gynecol Oncol* 1995;6:453-460.
33. Ter Harnsel B, Smedts F, Kuijpers J, Jeunink M, Trimbo B, Ramaekers F. BCL-2 immunoreactivity increases with severity of CIN: a study of normal cervical epithelia, CIN, and cervical carcinoma. *J Pathol* 1996;179(1):26-30.
34. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994 Jan;124(1-2):1-6.
35. Pan H, Griep AE. Altered cell cycle regulation in the lens of HPV 16 E6 or E7 transgenic mice: Implication for tumor suppressor gene function in development. *Gene Dev* 1994;8:1874-1879.
36. Vogelstein-B. Cancer. A deadly inheritance. *Nature*. 1990 Dec 20-27; 348(6303) :681-2.
37. Milner-J, Medcalf-EA, Cook-AC. Tumor suppressor p53: analysis of wild-type and mutant p53 complexes. *Mol-Cell-Biol*. 1991 Jan; 11(1): 12-9.
38. Lane DP; Benchimol S. p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes-Dev*. 1990 Jan; 4(1): 1-8.
39. Reich NC, Levine AJ. Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature*. 1984; 308(5955): 199-201.
40. Sheridan E, Hancock BW, Goyns MH. High incidence of mutations of the p53 gene detected in ovarian tumors

- by the use of chemical mismatch cleavage. *Cancer-Lett.* 1993 Jan 15; 68(1): 83-9.
41. Risinger JI, Dent GA, Ignar Trowbridge D et al. p53 gene mutations in human endometrial carcinoma. *Mol-Carcinog.* 1992;5(4): 250-253.
42. Fujita M, Inoue M, Tanizawa O, et al. Alterations of the p53 gene in human primary cervical carcinoma with and without human papillomavirus infection. *Cancer-Res.* 1992 Oct 1; 52(19):5323-5328.
43. Lowe SW, Rumey HE, Jacks T, et al. p53 dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993;74:957-967.
44. Borrensens AL, Helland A, Nesland J, et al. Papillomavirus, p53 and cervical cancer(letter) *Lancet* 1992;339: 1350-1351.
45. Kihana BM, Mayer AG, King BL, et al. New protein expression in benign, borderline and malignant ovarian neoplasms. *Gynecol Oncol* 1992;44:245-249.
46. Elledge RM, Allred DC. The p53 tumor suppressor gene in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1994;32:39-47.
47. Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 1994;266:807-810.
48. Takei H, Oyama T, Iino Y, et al. Clinical significance of immunohistochemical Bcl-2 expression in invasive breast carcinoma. *Oncol Rep* 1999 May-Jun;6(3):575-81.
49. Scott N, Jale A, Deakin M, et al. A histological assessment of the response of rectal adenocarcinoma to combination chemoradiotherapy: relationship to apoptotic activity, p53 and Bcl-2 expression. *Eur J Surg Oncol* 1998;24:169-173.
50. Tai YT, Lee S, Niloff E, et al. Bax protein expression and clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:2583-2590.