

p21 유전자의 발현이 방광암에 미치는 영향

The Effects of p21 on Bladder Cancers

Woneel Jung¹, In-Chang Cho, Yun-Sok Ha, Sung Hwan Jo,
Moon-Seon Park, Young Suk Lee, Seok Jung Yoon, Wun-Jae Kim

From the Department of Urology, ¹Cheongju St. Mary's Hospital, Department of Urology, Chungbuk National University College of Medicine, Cheongju, Korea

Purpose: p21 protein is an inhibitor of cyclin-dependent kinases, which may be able to arrest the cell cycle at the G1 phase by inhibiting DNA replication through the interaction with proliferating cell nuclear antigen. From experimental studies, p21 has been considered a tumor suppressor gene. Herein, the effects of p21 on the development, stage, grade, recurrence, progression and patient's survival in human bladder cancers were evaluated.

Materials and Methods: The mRNA expression levels of p21 were examined in 149 tumor specimens obtained from patients with primary bladder cancer and in 18 normal bladder mucosae using real-time polymerase chain reaction (PCR).

Results: p21 was significantly expressed in human bladder tumor tissues at high levels ($7.11 \pm 0.69 \text{ pg/ml}$), but was not expressed in the normal bladder mucosae. Compared with invasive bladder cancer (5.03 ± 0.95), the p21 expression levels were significantly enhanced in superficial bladder cancer ($7.96 \pm 0.88 \text{ pg/ml}$) ($p=0.0250$); whereas, the grade was not related to the expression of p21. The levels of p21 expression were enhanced in non-recurred (9.33 ± 1.38) and non-progressed (8.13 ± 0.86) compared with recurred (6.03 ± 0.75) and progressed (3.67 ± 0.52) patients (each $p < 0.05$). The level of p21 expression was significantly correlated with the disease free survival in patients the bladder cancers.

Conclusions: The enhanced expression of p21 is strongly associated with the development of bladder cancer. Moreover, increased expressions of p21 are also positively associated with the low rate of recurrence and progression of bladder cancer. Conversely, an enhanced expression of p21 provides a survival benefit for patients with bladder cancer. These results suggest that p21 might be useful as a marker in assessing tumor diagnosis, recurrence, progression and the survival in human bladder cancer patients. (Korean J Urol 2006;47:1149-1154)

Key Words: Cyclin-dependent kinase inhibitor p21, Bladder tumor, Polymerase chain reaction

대한비뇨기과학회지
제 47 권 제 11 호 2006

¹청주성모병원 비뇨기과, 충북대학교
의과대학 비뇨기과학교실

정원일¹ · 조인창 · 하윤석
조성환 · 박문선 · 이영숙
윤석중 · 김원재

접수일자 : 2006년 5월 24일
채택일자 : 2006년 7월 7일

교신저자: 김원재
충북대학병원 비뇨기과
충북 청주시 흥덕구 개신동
산 62번지
☎ 360-763
TEL: 043-269-6371
FAX: 043-269-6129
E-mail: wjkim@
chungbuk.ac.kr

본 연구는 산업자원부 지역산업기술개발사업 (중점기술개발사업)의 지원으로 수행되었음 (과제번호: 10018327).

서 론

방광암은 우리나라에서 가장 흔한 비뇨기계 종양이며 해마다 증가하는 추세에 있다.¹ 방광암의 90% 이상은 이행상피세포암이며, 이 가운데 60% 정도는 비교적 분화도가 좋은 표재성 방광암이다. 하지만 표재성 방광암 환자에서 경요도절제술만을 시행한 경우 재발이 빈번하며 또한 16-25%

에서는 고분화도의 방광암으로 진행하고 약 10%의 경우에는 병기의 진행 및 종양의 전이가 발생한다.² 따라서 경요도방광종양절제술 후 표재성 방광암의 재발과 병기의 진행을 예측하고 효과적으로 억제할 수 있는 진단 및 치료법이 필요하다.

방광암은 종양의 병기와 세포의 분화도, 혈관 또는 림프관 침범 유무, 상피내암 유무에 따라 예후가 달라진다. 이러한 인자들에 따른 방광암의 예후에 대해서는 널리 알려져

있지만 같은 범주의 방광암이라 할지라도 다양한 임상경과를 갖는 생물학적 원인은 아직 불분명하다. 조직학적으로 분화도가 높아 완치가 기대되는 암인데도 불구하고 진행 및 침습적 양상을 보일 수도 있는 반면, 조직학적으로는 예후가 불량한 암이지만 덜 침습적이며 완치되는 경우도 있다. 따라서 조직학적 검사만으로는 특정 암의 생물학적 특성을 평가하는 데 미흡하여 유전학적, 분자생물학적 특성을 밝히고 발암 과정을 밝히는 것이 중요하다.³

특히 종양유전자의 활성화나 종양억제 유전자의 비활성화 혹은 결손은 환자의 예후와 매우 밀접한 연관이 있을 것으로 추정되고 있다. 그 중에서 p21은 cyclin-dependent kinase inhibitor로서 G1과 S기 사이의 세포주기 진행을 저지시켜 손상된 DNA를 교정하는 역할을 수행하는 종양억제 단백질이다.

현재까지 p21의 발현과 방광암과의 관계에 관한 여러 연구는 있었으나 결과에 있어서 연구자마다 상당한 차이가 있으며 정확히 정립되어 있지 않다. 그 이유 중 하나는 기존에 발표된 연구결과들은 면역조직화학적 염색을 통한 실험 방법이 거의 대부분으로 이는 염색방법이나 판독자의 주관에 따라 결과 분석이 달라질 수 있고 염색 강도에 따라 정의한 등급으로만 나누어 분석할 수밖에 없으므로 보다 객관적인 평가가 이루어질 수 없었다.

이에 저자들은 기존의 정성적 분석과는 달리 방광암과 정상 방광조직에서 세포주기의 억제인자로 알려진 p21 mRNA의 발현량을 real-time polymerase chain reaction (PCR) 방법을 이용하여 정량적으로 측정한 후 발현량의 차이가 방광암의 발생, 병기, 분화도, 재발, 암의 진행 및 환자의 생존과 관련이 있는지를 비교 분석하였다.

대상 및 방법

1. 대상

1995년부터 2002년까지 충북대학교병원 비뇨기과에서 방광암으로 진단받고 경요도방광종양절제술이나 근치적방광전적출술을 시행 받은 환자 중에서 조직학적으로 요로상피암으로 확진되고 최소 3년 이상 추적 관찰이 가능했던 원발성 방광암 환자의 조직 149례와 전립선비대증 또는 방광과열 등 종양 이외의 양성 질환으로 수술을 시행 받은 후 병리조직학적으로 정상 방광조직으로 확인된 방광 조직 18례를 대상으로 하였다. 방광암 환자의 평균 나이는 64.4세, 남녀 비는 4.7:1이었으며, 대조군의 평균 나이는 64.8세, 남녀 비는 17:1이었다. 방광암의 병기는 표재성 방광암이 106례, 침윤성 방광암이 43례였으며, 분화도는 고분화도(등급 1-2)가 104례, 저분화도(등급 3)가 45례였다 (Table 1).

각 조직들을 채취 즉시 액체질소 안에서 동결시킨 후 분자생물학적 검사를 시행할 때까지 -80°C 냉동고에 보관하였다. 표재성 방광암에서 수술 후 병기의 진행 없이 반복하여 종양이 발생한 경우를 재발로 정의하였고, 적절한 치료 후에도 표재성 방광암이 침윤성 또는 전이성 방광암으로 되거나 침윤성 방광암이 전이성 방광암으로 되는 경우를 병기의 진행으로 정의하였다.

2. RNA extraction and reverse transcription of RNA

적당량의 조직을 1ml의 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, USA)에 넣고 조직분쇄기 (homogenizer)로 잘게 분쇄한 후 200μl의 chloroform을 첨가한 후, 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 모았다. 상층액에 500μl의 isopropanol을 첨가하고 10분 이상 진탕한 다음 12,000rpm에서 20분간 원심분리하였으며 다시 상층액을 제거한 다음 70% ethanol로 침전시켰다. 이를 다시 15,000rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 실온에서 건조하였다. 건조 후 diethyl-

Table 1. Demographic data of the 149 patients with a primary bladder transitional cell carcinoma

Parameters	No. of patients
Sex	
Male	123
Female	26
Age (years)	64.38±0.98*
Stage	
Superficial (106)	
Ta	16
T1	90
Invasive (43)	
T2	17
T3	20
T4	6
Grade	
Low-grade (104)	
G1	29
G2	75
High-grade (45)	
G3	45
Recurrence in superficial	
No recurred	62
Recurred	44
Progress	
No progress	115
Progress	34

*: year±standard deviation

pyrocarbonate (DEPC) 증류수를 첨가하여 사용할 때까지 -80°C 냉동고에 보관하였다. 추출된 전체 RNA는 분광광도계 (MBA2000, Perkin Elmer, Shelton, USA)를 이용하여 농도를 측정 후 1.1% RNA 젤에서 전기영동을 하여 RNA band를 확인하였다. cDNA를 합성하기 위하여 조직에서 추출한 RNA 0.5µg/µl를 DEPC 증류수로 희석한 후 사용하였다. First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 동일 양의 RNA 2µl에 DEPC 증류수 2µl를 넣고 65°C에서 10분간 처리한 후 얼음에 넣어 두었다. cDNA 합성 용액 3.5µl를 첨가하여 37°C에서 한 시간 동안 반응시킨 후 다시 72°C에 10분간 방치하였다. 반응 산물에 42.5µl의 증류수를 넣고 사용할 때까지 -80°C에서 보관하였다.

3. Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

방광암 조직에서 p21 유전자의 mRNA 발현량을 측정하기 위하여 실시간 연쇄중합반응 (real-time PCR)을 시행하였다. Real-time PCR은 Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, Australia) PCR 기계를 이용하였다. 실시간 연쇄중합반응은 SYBR Premix EX Taq (TAKARA BIO INC, Otsu, Japan)을 이용하여 Corbett Research에서 생산한 미세시험관 (micro tube) 안에서 진행하였다. p21 유전자를 증폭시키기 위하여 primer 5'-CGATGGAAGCTTCGACTTTGTCAC-3'와 5'-GGGCTTCCTCTTGGAGAAGATCA-3'를 사용하였다. PCR 반응액은 cDNA 1µl, 2xSYBR Premix EX Taq buffer 7.5µl, 양 방향의 primer 각각 0.5µl를 첨가하여 최종 15µl를 만든 후 PCR을 시행하였다.

p21 유전자의 발현을 정량화하기 위하여 우선 임의의 샘플에서 증폭된 PCR 산물을 이용하였다. PCR 산물은 2% agarose gel에서 전기영동을 시행하고 ethidium bromide로 염색한 후 자외선램프로 band를 확인하였다. 확인된 band를 gel에서 잘라낸 후 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였다. 정제과정은 다음과 같다. 절단한 gel을 1.5ml tube에 넣고 약 3배의 gel lysis buffer를 넣은 후 50°C에서 10분간 처리하여 gel을 완전히 녹였다. 13,000rpm으로 1분간 원심분리한 후 제조회사에서 제공한 필터로 정제하였다. 이 필터에 washing buffer를 넣고 다시 13,000rpm에서 3분간 원심분리하여 필터 내의 불순물을 제거하였다. 앞의 과정을 한 번 더 반복한 후 필터에 증류수 30µl를 첨가한 후 15,000 rpm으로 원심 분리하여 PCR 산물을 완전히 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 한양대학교 (주)바이오넥스에 의뢰하여 automated laser fluorescence sequencer (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Shelton,

USA)를 이용하여 염기서열분석을 시행하였다. 염기서열 결과를 통해 본 실험결과와 염기서열과 일치함을 확인하였다. 또한 정제된 PCR 산물을 spectrophotometer를 이용하여 농도를 측정 후 2pg/µl부터 0.2fg/µl까지 10배씩 연속적으로 희석하여 real-time PCR 정량에 필요한 표준곡선을 작성하였다. PCR 조건은 95°C에서 1분간 denaturation 후 40주기 동안 95°C에서 denaturation 2초, 60°C에서 annealing 20초, 72°C에서 extension 20초를 시행하였다. Melting program은 72-95°C 사이에서 45초마다 1°C씩 증가시켜 실행하였다. Spectral 결과는 Rotor-Gene Real-Time Analysis Software 6.0 Build 14 (Corbett Research, Mortlake, Australia)로 측정 및 분석하였다.

4. 통계학적 분석

Version 8.1 SAS statistical analysis program을 이용하여 p21 유전자 발현정도의 차이는 Student's t-test로 분석하였다. 무질병 생존분석은 단순로지스틱회귀분석을 이용하였고, 생존비교분석은 Kaplan-Meier life-test를 이용하였으며, p값이 0.05 미만인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

정상 방광점막에서는 전례에서 p21 유전자가 발현되지 않았으나 방광암 조직에서는 발현이 관찰되었으며 통계적으

Table 2. p21 expression levels

Tissue type	p21 expression levels (pg/ml)	p value
Development		<0.0001
Bladder tumor	7.11±0.69	
Normal bladder	0	
Stage		0.0250
Superficial tumor	7.96±0.88	
Invasive tumor	5.03±0.95	
Grade		0.7700
Low grade	6.94±0.59	
High grade	7.51±1.84	
Recurrence in superficial		0.0379
No recurred	9.33±1.38	
Recurred	6.03±0.75	
Progression		<0.0001
No progression	8.13±0.86	
Progression	3.67±0.52	

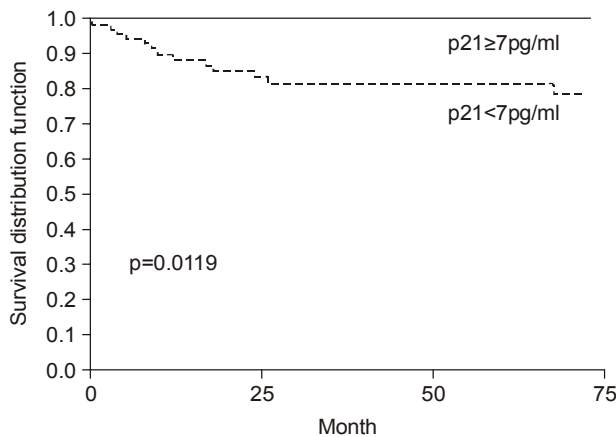


Fig. 1. Survival probabilities with respect to the level of p21; $\geq 7\text{pg/ml}$ and $< 7\text{pg/ml}$, in patients with a bladder tumor.

로 유의한 차이를 보였다. 방광암 조직에서는 표재성 방광암 ($7.96 \pm 0.88\text{pg/ml}$)에서 침윤성 방광암 ($5.03 \pm 0.95\text{pg/ml}$)에 비하여 유의하게 높게 발현되었다. 그러나 p21의 발현 정도는 방광암의 분화도와 관계가 없었다 (Table 2).

표재성 방광암 환자 중에서 수술 후 재발한 환자 44례와 재발하지 않은 환자 62례의 원발성 방광암 조직에서 p21 유전자 mRNA의 발현 정도를 비교하였다. 재발하지 않은 환자의 원발성 방광암 조직 ($9.33 \pm 1.38\text{pg/ml}$)에서의 p21의 발현양은 재발한 환자의 원발성 방광암 조직 ($6.03 \pm 0.75\text{pg/ml}$)에 비하여 통계적으로 유의하게 증가되어 있었다. 수술 후 병기가 진행하지 않은 환자의 원발성 방광암 조직 115례 및 병기가 진행한 환자의 원발성 방광암 조직 44례에서 p21 유전자의 발현 정도를 비교하였을 때, 병기가 진행하지 않은 원발성 방광암 조직 ($8.13 \pm 0.86\text{pg/ml}$)에서 병기가 진행된 원발성 방광암 조직 ($3.67 \pm 0.52\text{pg/ml}$)에 비하여 현저히 p21이 증가되어 있었다 (Table 2).

p21 유전자의 발현양이 7pg/ml 보다 큰 군에서 7pg/ml 보다 작은 군에 비하여 생존율이 높았다 (Log-Rank $p=0.0119$) (Fig. 1).

고 찰

과거에는 p21을 p53 의존형으로 세포주기를 조절하는 종양억제 유전자로만 생각하였다. 즉 p53 유전자 변이가 발생하면 p21 유전자의 발현이 없으므로 p21의 억제능력의 소실로 인하여 세포증식이 일어난다고 여겨졌다. 그러나 최근에 Stein 등⁴과 Korkolopoulou 등⁵은 p53 유전자의 돌연변이와 무관하게 p21 유전자의 발현이 있을 수 있으며 더 이상의 세포증식은 발생하지 않는 경우도 있다고 보고하였다. 즉

p53 비의존형 경로에 의해 p21이 발현되며 G1-S 세포주기 사이의 check point에 작용함으로써 세포정지를 유발하여 DNA가 복구될 수 있는 시간을 벌어 주거나 DNA 손상이 심한 경우에는 세포고사를 유발시킨다.

Clasen 등⁶은 정상 방광점막조직에서는 p21이 발현되지 않으며 병기가 CIS인 경우 47%, Ta인 경우 66%, T1인 경우 47%, T2 이상인 경우 33%에서 발현되었다고 하였다. Clasen 등⁶과 Malkowicz 등⁷은 p21이 표재성 방광암인 경우에 잘 발현되고 침윤성 방광암인 경우에는 드물게 발현된다고 하였다. Pfister 등⁸도 정상 방광 점막조직에서는 p21이 발현되지 않으며 방광암 조직의 85%에서 발현되었다고 하였다. 본 연구에서도 정상 방광 점막조직에서는 p21이 발현되지 않았으며 방광암 조직에서만 유의하게 발현되었다. 또한 표재성 방광암 조직에서 침윤성 방광암 조직에 비하여 p21이 높게 발현되었다. p21이 정상 방광 점막 조직에서는 발현되지 않고 방광암에서만 발현되며 표재성 방광암 조직에서 침윤성 방광암 조직에 비해 높게 발현된다는 점으로 미루어 볼 때 p21은 방광암의 진단에 가치가 있을 뿐 아니라 이미 형성된 종양에서 종양의 진행을 억제시키는 종양억제 유전자로서의 역할을 하는 것으로 추정된다.

분화도에 대해서 Chen 등⁹은 p21 유전자가 분화도와 관련이 있다고 하였으며 Korkolopoulou 등⁵과 Clasen 등⁶은 분화도가 낮을수록 p21이 잘 발현되며 침윤성 방광암인 경우에도 분화도가 낮을수록 분화도가 높은 경우보다 잘 발현되었다고 보고하였다. 반면에 Lipponen 등¹⁰에 의하면 p21의 발현은 분화도와는 아무런 관련이 없다고 하였다. 국내의 연구에서도 Lee 등¹¹은 분화도가 낮을수록 p21의 발현이 높았다고 하였으나 Jeong 등¹²은 p21의 발현은 분화도와 관련성이 없다고 하였다. 본 연구에서도 p21의 발현 양상과 분화도 사이에는 통계학적인 유의성이 없었다. 이와 같이 연구자에 따라 서로 다른 결과를 보이는 이유는 여러 가지가 있을 수 있다. 우선 매우 다양한 생물학적 특성을 갖는 방광암에서 서로 다른 환자군을 대상으로 한 연구는 다른 결과를 보일 수 있다. 병리학적으로 같은 부류의 방광암이라 할지라도 환자마다 서로 다른 임상 경과를 보이기 때문에 환자군이 다르다면 서로 다른 결과를 초래할 수 있다. 다른 가능성으로는 p21의 발현을 정량화하는 방법의 차이가 있다. 면역조직화학적 방법은 정성적인 검사로 검사자의 주관에 의하여 그 결과 및 해석에 상당한 차이를 보일 수 있다. Real-time PCR 방법은 비교적 정량적인 방법으로 본 연구에서도 이 방법으로 실험하였다.

p21 유전자의 발현이 표재성 방광암의 재발 및 병기의 진행에 미치는 영향에 대해서는 논란이 있다. Miao 등¹³은 p21 발현이 양성인 경우에는 재발률이 9%지만 p21 발현이 음성

인 경우에는 재발률이 67%로 증가하므로 p21 발현이 양성인 경우에는 좋은 예후지표라고 하였다. 하지만 재발 및 진행에 p21이 아무런 예후적 가치를 가지지 못한다는 보고도 있고^{14,15} 오히려 p21 발현이 양성일수록 재발 및 진행이 증가한다는 보고^{16,17}도 있다. 본 연구에서는 표재성 방광암 환자에서 재발과 진행이 없는 군에서 재발과 진행이 있는 군에 비해 p21의 발현이 높았다.

생존율에 대해서는 침윤성 방광암에서 p21 발현감소는 무병생존율을 단축시키는 예후인자이며 p21의 발현은 방광암 환자에서 화학요법치료에 대한 좋은 반응을 예측할 수 있는 지표가 될 수 있다는 보고도 있다.¹⁸ 또 생존율에 아무런 영향을 미치지 못하며 다른 종양억제 유전자와 연관해서도 생존율과 아무런 관련이 없다는 보고^{10,19}가 있는 반면에 그 반대로 생존율에 좋지 않은 예후 지표로 작용한다는 주장²⁰도 있다. 본 연구에서 p21 유전자의 발현양이 7pg/ml보다 높게 발현된 환자에서 7pg/ml보다 낮게 발현된 환자에 비하여 생존율이 높아 p21이 높게 발현될수록 예후가 좋다고 할 수 있다.

결 론

p21은 정상 방광 점막 조직에서는 발현되지 않고 방광암 조직에서만 발현되었다. 방광암 조직에서는 표재성이거나 재발이나 진행이 없을수록 침윤성이거나 재발이나 진행이 있는 군에 비하여 유의하게 높게 발현되었고, 높게 발현될수록 생존율이 증가하여 p21이 방광암의 진단, 재발, 진행 및 환자의 생존을 예측하는데 유용한 지표로 사용될 수 있을 것으로 생각한다.

REFERENCES

- Annual clinical statistics in KUA training hospital. Korean J Urol 2001;42:1349-60
- Lee R, Droller MJ. The natural history of bladder cancer. Implications for therapy. Urol Clin North Am 2000;27:1-13
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 1996;86:353-64
- Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, Esrig D, Freeman JA, Figueroa AJ, et al. Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. J Urol 1998;160:645-59
- Korkolopoulou P, Konstantinidou AE, Thomas-Tsagli E, Christodoulou P, Kapralos P, Davaris P. WAF1/p21 protein expression is an independent prognostic indicator in superficial and invasive bladder cancer. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2000;8:285-92
- Clasen S, Schulz WA, Gerharz CD, Grimm MO, Christoph F, Schmitz-Drager BJ. Frequent and heterogeneous expression of cyclin-dependent kinase inhibitor WAF1/p21 protein and mRNA in urothelial carcinoma. Br J Cancer 1998;77:515-21
- Malkowicz SB, Tomaszewski JE, Linnenbach AJ, Cangiano TA, Maruta Y, McGarvey TW. Novel p21WAF1/CIP1 mutations in superficial and invasive transitional cell carcinomas. Oncogene 1996;13:1831-7
- Pfister C, Larue H, Moore L, Lacombe L, Veilleux C, Tetu B, et al. Tumorigenic pathways in low-stage bladder cancer based on p53, MDM2 and p21 phenotypes. Int J Cancer 2000; 89:100-4
- Chen WC, Wu HC, Hsu CD, Chen HY, Tsai FJ. p21 gene codon 31 polymorphism is associated with bladder cancer. Urol Oncol 2002;7:63-6
- Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Ala-Opas M, Kosma VM. Expression of p21 (waf1/cip1) protein in transitional cell bladder tumours and its prognostic value. Eur Urol 1998;34: 237-43
- Lee H, Sohn HG, Ha DB, Kim KK, Lee KS. Expression of p21 protein in bladder cancer and its prognostic value. Korean J Urol 2000;41:826-32
- Jeong YB, Kim HJ, Lee DG. The clinical significance and relationship of p53 and p21 in bladder cancer. Korean J Urol 1999;40:1620-5
- Miao TJ, Wang Z, Sang N. Correlation between the expression of the p21 ras oncogene product and the biological behavior of bladder tumors. Eur Urol 1991;20:307-10
- Pfister C, Moore L, Allard P, Larue H, Lacombe L, Tetu B, et al. Predictive value of cell cycle markers p53, MDM2, p21, and Ki-67 in superficial bladder tumor recurrence. Clin Cancer Res 1999;5:4079-84
- Leissner J, Hohenfellner R, Thuroff JW, Koppen C, Wolf HK. Prognostic significance of histopathological grading and immunoreactivity for p53 and p21/WAF1 in grade 2 pTa transitional cell carcinoma of the urinary bladder. Eur Urol 2001; 39:438-45
- Shariat SF, Kim J, Raptidis G, Ayala GE, Lerner SP. Association of p53 and p21 expression with clinical outcome in patients with carcinoma in situ of the urinary bladder. Urology 2003;61:1140-5
- Chatterjee SJ, Datar R, Youssefzadeh D, George B, Goebell PJ, Stein JP, et al. Combined effects of p53, p21, and pRb expression in the progression of bladder transitional cell carcinoma. J Clin Oncol 2004;22:1007-13
- Koga F, Kitahara S, Arai K, Honda M, Sumi S, Yoshida K. Negative p53/positive p21 immunostaining is a predictor of favorable response to chemotherapy in patients with locally advanced bladder cancer. Jpn J Cancer Res 2000;91:416-23
- Jahnsen S, Karlsson MG. Tumor mapping of regional immunostaining for p21, p53, and mdm2 in locally advanced bladder carcinoma. Cancer 2000;89:619-29

20. Garcia del Muro X, Condom E, Vignes F, Castellsague X, Figueras A, Munoz J, et al. p53 and p21 Expression levels predict organ preservation and survival in invasive bladder carcinoma treated with a combined-modality approach. Cancer 2004;100:1859-67
-