

자궁 경부암에서 c-erbB-2의 발현과 S-100 양성 수지상세포의 분포에 관한 연구

순천향대학교 의과대학 산부인과학교실

신정옥 · 최승도 · 선우재근 · 배동한 · 김대중*

=Abstract=

Expression of c-erbB-2 and Distribution of S-100 Protein Positive Dendritic Cells in Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix

Jeong Ok Shin.M.D., Choi Seung Do.M.D., Jae-Gun Sunwoo.M.D.,

Dong Han Bae.M.D., Dae Jung Kim.M.D.*

Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Pathology*,
College of Medicine, Soonchunhyang University, Chunan, Korea

Objective : The aim of this study was to assess the relationship between disease progression and expression of c-erbB-2 and S-100 protein positive dendritic cells in Cervical cancer.

Study design : Tissues were analyzed from 100 patients. Each of them had invasive carcinoma(44), microinvasive(12), CIS(33), CIN(II) before treatment, c-erbB-2 oncoprotein expression and S-100 protein positive dendritic cell were confirmed by immunohistochemical staining. (Avidin-biotin complex method)

Results : C-erbB-2 immunostaining was significantly associated with disease progression ($p<0.05$). In case of CIN I, there was not noted stained specimen but in case of invasive carcinoma, 24 cases of stained specimen were noted. S-100 protein positive dendritic cell was not associated with disease progression of cervical carcinoma. ($p>0.05$)

Conclusions : According to our results, c-erbB-2 is possible factor in Carcinogenesis of cervical carcinoma with progression of it. and S-100 protein positive dendritic cell was not associated with disease progression of cervical carcinoma.

Key words : c-erbB-2, S-100 protein, Cervical carcinoma.

I. 서 론

일반적으로 자궁경부암은 자궁경부 상피내 종양이라는 전구병변단계를 거치면서 점차 진행되어 침윤암으로 진행되는 일련의 과정을 거치는 것으로 알려져있다. 우리나라의 경우 자궁경부암은 그 발생빈도가 전체 부인과여성의 악성종양중 가장 많은

22%를 차지하고 있으나^{1,2} 아직 그 발생원인이나 기전이 명확하게 밝혀져 있지 않고 있는 실정이며 조기성교, 다수의 성교대상자, 인종 및 사회경제적여건 등의 여러역학적 요인들이 제시되고 있고 직접적으로 성접촉에 의한 virus감염등이 제시되고있다.^{3,4,5}

최근 암유전자와 종양억제 유전자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 그원인을 면역학적인 불균형에서 찾으려는 시도가 이루어지고 있다.⁶

c-erbB-2종양유전자는 발암인자인 ethyl nitrosourea에 노출된 자궁내 태아세포의 세포막과 몇몇 암세포들에서 발현되는 단백질로⁷ 신경아세포종(neuroblastoma)을 일으키는 발암유전자로 Padhy등⁸에 의해 최초로 oncogene으로 명명되었다. 이 종양유전자는 인체의 여러종양에서 발암현상과 관련하여 종양유전자의 증폭(amplification)과 종양유전자 산물의 과발현(overexpression)이 증명되게 되었으며⁹ 유방암과 난소암, 자궁내막암에서 c-erbB-2의 과발현이 예후의 불량함과 연관이 있다고 보고하였다.^{10,11,12,13}

수지상세포는 면역반응에 관여하며 S-100단백을 발현하는 특징을 가지고 있다.¹⁴ 수지상세포의 침윤이 폐암, 위암, 기관지암등에서 관찰되며 모두 숙주 면역의 증강과 밀접한 관계가 있음이 보고되고 있다.^{15,16,17} 최근에는 자궁경부암에서 수지상세포의 침윤이 있는 경우 숙주 면역의 증강으로 예후가 좋다고 보고되고 있다.^{18,19}

이에 저자는 자궁경부의 편평상피세포암에서 c-erbB-2의 발현과 S-100단백양성 수지상 세포의 면역학적 발현에 관한 연구를 통해 병리학적 예후인자와의 연관성을 규명하고자 한다.

II. 연구 대상 및 방법

1. 연구대상

1998년 1월부터 2000년 5월까지 순천향 대학교 천안병원 산부인과를 방문한 환자중 punch biopsy, conization, 및 hysterectomy를 시행한 자궁경부 상피내종양 및 편평상피암으로 진단된 환자중 임상기록이 구비되어 있고 파라핀조직이 양호한 100예를 대상으로 하였다.

2. 방법

Paraffine 포매절편을 5 μ m 두께로 박절한후 조직슬라이드를 57 $^{\circ}$ C oven에서 1시간고정 후 xylene과 grade alcohol을 이용하여 파라핀을 제거한후 탈수하였다. 내인성 peroxidase를 제거하기 위해 3% 과산화수소수(3% H₂O₂)에 30분간 작용시킨후 증류수에 세척하였다. Nonspecific background staining를 감소하기 위해 Normal serum(Zymed, laboratories inc Pluse kit sanfrancisco)을 10분간 반응시킨 후 수세하지 않고

일차항체를 반응시켰다. 일차항체중 c-erb-2 다클론 항체를 4 $^{\circ}$ C에서 overnight동안 반응시켰고, S-100단클론항체를 1:50으로 희석하여 실온에서 1시간동안 반응시켰다. PBS로 3회 3분씩수세하고 Secondary antibody (Zymed, laboratories inc Pluse kit sanfrancisco)를 20분간 작용시켰다. 그후 PBS buffer(PH 7.4)로 3분씩 3회 수세하고, Streptavidine(zymed, laboratories inc pluse kit sanfrancisco)을 20분간 작용시켰다. PBS buffer(PH 7.4)로 3분씩 3회 수세하고, DAB Kit (DAB tetrahydrochloride substrate substrate kit zymed) 5-10분간 발색하고 수세하였으며 hematoxyline에 5분간 핵 염색하여 탈수 투명과정을 거쳐 permount로 봉입 후 검경하였다. c-erbB-2 단백질의 염색 반응의 판정은 종양세포의 세포막이 진한 갈색으로 염색된 경우에 양성으로 판정하였으며, 종양세포가 가장 많고 염색이 잘된 지역을 선택한 후 1000개의 종양세포에서 양성인 세포수를 백분율로 환산한 후, 염색이 미약하거나 음성인 경우를 -, 50%이하인 경우를 1+, 50% 이상인 경우를 2+로 각각 분류하였다.(Fig 1)

S-100양성수지상세포는 종양내 침윤이 현저히 증가하거나 혹은 소수의 침윤이 있을때 양성으로 판정하였고 종양내 침윤이 관찰되지 않은 경우는 음성으로 판정하였다.(Fig 2) 통계학적 검증은 Chi-square test를 시행하였고 p<0.05를 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

Fig 1. Squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Many cancer cells are positive for c-erbB-2 oncoprotein and show a surface membrane staining pattern(x400)

III. 결 과

1. 대상환자의 특성

100예의 조직소견중 침윤성 자궁경부암 44예, 미세침윤성 자궁경부암 12예, 자궁경부상피내암 33예, 중증자궁경부 상피내종양(CIN III)2예, 중등도 자궁경부 상피내종양(CINII)8예, 경증 자궁경부 상피내종양(CINI) 1예 었다. 대상환자의 연령분포는 26세에서 81세였고 평균연령은 42세였다.(Table 1)

2. c-erbB-2의 발현

c-erbB-2의 발현을 100예중 41예에서 발현되었다.(41%) 침윤성 자궁경부암에서는 44예중 24예에서 발현되었고(54.5%), 미세침윤암에서는 12예중 3예에서 발현되었다.(25%) 상피내암에서는 33예중 11예에서 발현되었고(33.2%) 상피내종양에서는 11예중 3예에서 발현되었다.(36.6%) 발현율은 자궁경부상피내종양에서부터 침윤성 자궁경부암으로 질병

이 점점 진행 할수록 높게 나타났고($p<0.05$) (Table 2) 통계학적 유의성이 있는 것으로 나타났다.

나이에 따른 발현율은 서로 상관관계를 보이지 않았다. ($P>0.05$) (Table 3)

Fig 2. Langerhans' cell S-100 protein positive cells were characterized by the cytoplasmic processes among the cancer cells(x400)

Table 1. Characteristics of patients.

Histopathology	No. of Cases	Age(range)
CIN I	1	40
CIN II	8	42.7(29-72)
CIN III	2	33.0(32-34)
CIS	33	41.6(26-66)
microinvasive Cx ca	12	46.7(26-81)
Invasive Cx. ca	44	50.0(26-80)
Total	100	42.0(26-81)

Table 2. Immunohistochemical staining of c-erbB-2.

Group(n)	negative(%)	1+	2+
CIN I(1)	1(100)	0	0
CIN II(8)	7(87.5)	1(12.5)	0
CIN III(2)	0	2(100)	0
CIS(33)	22(66.6)	8(24.2)	3(9.0)
microinvasive cx ca(12)	9(75)	3(25)	0
Invasive cx ca(44)	20(45.4)	18(40.9)	6(13.6)
Total	59(59)	32(32)	9(9%)

negative : 염색이 미약하거나 음성인 경우

1+ : 50%이하인 경우

2+ : 50%이상인 경우

Table 3. expression of c-erbB-2 by age

Age	No	negative	1+	2+
40≤	37	22	12	3
41-50	26	18	6	2
51-60	28	18	8	2
61≥	9	1	6	2
Total	100	59	32	9

negative : 염색이 미약하거나 음성인 경우

1+ : 50%이하인 경우

2+ : 50%이상인 경우

3. 수지상세포의 발현.

S-100단백양성 반응은 100예중 51예에서 관찰되었다.(51%)

침윤성자궁경부암에서는 44예중 24예에서 관찰되었고(54%), 미세침윤암에서는 12예중 3예에서 관찰되었다.(25%)

상피내암에서는 33예중 19예에서 (57%), 상피내종양에서는 11예중 5예에서 관찰되었다.(45%)

상피내종양에서 침윤암으로의 등급이 증가할수록 통계학적 유의성이 없는 것으로 나타났다. ($P>0.05$)

이상의 결과를 종합할때 c-erbB-2는 자궁경부암이 진행됨에 따라 발현이 증가한 반면 S-100양성수지상세포의 분포는 특이한 증가를 보이지 않고 있다.

IV. 고 찰

최근 종양의 발생원인에 대한 여러 연구중 유전자에 대한 연구가 어느분야 보다도 활발히 진행되고 있다.²⁰ 약 90여종이상의 유전자들이 규명되고 있으며 종양유전자와 종양억제 유전자로 대별될 수 있다.

이중 c-erbB-2 종양유전자는 원래 ethyl nitrosourea에 의해 유도된 쥐의 신경아세포종(neuroblastoma)에서 발견된 transforming gene인 neu의 상동 암유전자로 인체에 있어서는 염색체 17번의 장완(17q21)에 위치해있다.²¹ 이 유전자의 mRNA는 4.8 Kilobase이며 유전자산물은 tyrosine kinase family인 분자량 185,000 dalton의 당단백으로 알려져있고 표피성장

인자 수용체(epidermal growth factor receptor ; EGFR)와 구조적 유사성을 가지고 있는 것으로 보고되고있다. c-erbB-2 유전자는 인체의 선암 즉 유방암²², 대장암, 난소암등²³에서 과발현 및 증폭되는데 임상적으로 c-erbB-2 유전자는 유방암의 약 15-40%²⁴, 난소암의 약 1/3에서 과발현이 일어난다고 보고되고있다.²⁵ 또한 c-erbB-2 유전자의 과발현은 유방암 및 난소암에서 불량한 예후나 암의 침범정도와 관련이 있다는 다수의 보고들^{26,27}이 있으나 이와 의견을 달리하여 c-erbB-2 유전자의 과발현이 예후 예측인자로서 이용되기에는 많은 제한점을 가지고 있다고 보고한 연구들도 있다.²⁸

이 암유전자는 인체의 여러종양에서 발암현상(carcinogenesis)과 관련하여 암유전자의 증폭(amplification)과 유전자산물의 과발현(overexpression)이 증명되게 되었으며 그후 많은 연구업적들이 종양과 c-erbB-2와의 상관관계에 대하여 진행되어 왔다. Singleton 등 (1994)은 난소암 환자에서 c-erbB-2 암유전자의 발현빈도는 임상적 예후인자와 상관관계가 없다고 한 반면 Palx 등(1990)은 유방암에 있어 c-erbB-2의 발현이 액와임파절전이, 호르몬수용체(estrogen/progesterone), 종양의 크기, 임상병기 및 예후와 관련이 있는 독립적인 예후인자라고 보고하였고 자궁내막암에 있어서도 불량한 예후와 상관관계가 있음이 보고되고 있다. 또한 Hale 등(1992)에 의하면 자궁경부 편평상피세포암에서 c-erbB-2의 과발현과 불량한 예후와 관련이 있다고 보고하고있다. 또한 c-erbB-2와 예후인자와의 관련성은 난소암에서 Berchuck²⁹등(1990)에 의하면 c-erbB-2과발현과 예후인자 (연령, 조직학적 분화도)사이에 상관 관계가

없음이 보고되었다.³⁰

자궁경부암에서도 **c-erbB-2**의 과발현이 연령 및 임상병기 또는 종양크기 등과 유의한 연관성이 없음을 보고하고 있다. 자궁경부암에 있어서 **c-erbB-2** 암유전자의 과발현(**overexpression**)은 0%에서 38%까지 다양한 연구결과가 보고되고 있다. (Table 4). 이것은 각기 사용된 연구방법이 서로 차이가 있으며 과발현 판정기준이 상이하였기때문에 나타난 결과로 생각되어진다.

본연구에서도 **c-erbB-2**의 발현율은 41%로 관찰되었고, 특히 침윤성 자궁경부암의 경우 54.5%로 발현율이 높게 나타났다.

최근 종양의 예후를 예측하는 인자로 면역학적인 예측인자를 찾으려는 시도가 증가하고 있다. 암종물에서 림프구의 침윤은 암종물에 대한 숙주방어기전으로 생각되어 예후가 좋을수 있다 하였다.^{14,18} 하지만 어떤 림프구의 침윤이 예후에 더 좋은지는 정확히 밝혀지지 않고 있으며 T-림프구의 침윤이 B-림프구의 침윤보다는 예후에 좋은영향을 미친다는 보고가 있다.

S-100단백발현을 특징으로하는 수지상세포는 대

식세포와 함께 면역반응에 관여하는 비림프구성 단핵구세포로 형태학적으로 수지상돌기를 가지고 있다. 이 수지상세포는 T-림프구의 침윤과 관련이 있으며³¹ 최근 몇몇의 연구자들에 의하면 동물실험에서 방사선 치료의 반응에 있어 면역체계가 중요한 관련이 있음이 밝혀졌다.^{32,33} 면역학적인 자극이 암세포의 괴사를 촉진 시키며 방사선 치료후 잔류 암세포의 제거에 기여한다고 하였다.³⁴ 따라서 수지상세포의 침윤은 숙주의 암세포에 대한 면역력을 증강시킨다고 하겠다. 이 수지상 세포의 침윤은 T-림프구의 침윤과 밀접한 관계가 있으며 선암에서는 B-림프구의 침윤과 종양세포의 **HLA-DR** 표출과 특히 관련이 있으나 이는 예후에 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있다. 설령 T-림프구나 B-림프구가 침윤되어 있다할지라도 면역반응은 복잡한 일련의 과정을 거쳐야 하므로 수지상 세포에 의한 항원에 대한 인식이 그 효과를 초래하는 첫걸음이라고 할 수 있다. 따라서 자궁경부암이나 폐암 및 위암에서 수지상세포의 침윤은 예후가 좋은 인자라 하였다.^{15,16} 신체의 여러부위에서 종양들은 T-림프구에 의해 감지될 수 있는 특이한 항원을 표출하고 있다.

Table 4. expression of S-100 protein positive dendritic cell

Histopathology	negative	positive
CIN I	1	0(0)
CIN II	4	4(50%)
CIN III	1	1(50%)
CIS	14	19(57%)
microinvasive Cx ca	9	3(25%)
Invasive Cx ca	20	24(54%)
Total	49	51(51%)

Table 5 . Previous studies of overexpression in cervical carcinoma

Authors	No. of patients	Method of analysis	No. of overexpression
Brumm et al.(1990)	8	Immunohistochemistry	2(25%)
Berchuck et al(1990)	26	Immunohistochemistry	1(4%)
Milde-Langosch et al(1991)	4	Northern blotting	0(0%)
vanDam et al.(1991)	18	Flow-cytometry	7(38%)
Hale et al.(1992)	62	Immunohistochemistry	24(38%)
Kihana et al(1994)	44	Immunohistochemistry	11(25%)
Lee et al.(1995)	30	Immunohistochemistry	7(23%)

따라서 암종물의 면역학적치료에 타겟으로 작용할 수 있다.³⁵ 수지상세포는 백혈구는 아니나 T-림프구에 대해 항원을 표시해줄 수 있는 강력한 능력을 가지고 있어 신체의 여러부위에 침투하여 면역반응을 유발할수 있다 하였다. 본연구에서는 자궁경부암에서의 수지상세포의 발현을 조사함으로써 병리학적 예후와의 연관성을 규명하고자 하였으나 S-100단백 양성반응은 51%로서 침윤성자궁암(54%), 미세침윤암(25%), 상피내암(57%) 상피내종양(45%)등으로 상피내종양에서 침윤암으로 진행하면서 발현율과의 연관성은 찾을 수 없었으며 향후 더 많은 예의 수지상세포의 발현을 관찰하는것이 필요할것으로 사료된다.

V. 결 론

최근 3년간 순천향대학교 천안병원 산부인과를 내원한 100명의 환자를 대상으로 얻은 자궁경부상피내 종양, 상피내암, 미세침윤암, 침윤성 자궁경부암 조직에서 c-erbB-2의 발현과 S-100 양성 수지상세포의 발현을 연구한 결과는 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 전체 c-erbB-2의 발현율은 41%였다
2. 자궁경부암의 진행에 따른 c-erbB-2의 발현율과의 상관관계는 유의성이 있었다. ($P<0.05$)
3. 나이에 따른 c-erbB-2의 발현율은 유의성이 없었다($P>0.05$)
4. S-100단백양성 반응은 100예중 51예에서 관찰되었다.(51%)
5. S-100단백양성 반응은 상피내종양에서 침윤암으로의 등급이 증가함에 따라서는 통계학적 유의성은 없었다.($P>0.05$)

이상의 결과를 종합해보면 본 연구에서 c-erbB-2 발현은 침윤성 자궁경부암으로 진행할수록 발현율은 통계학적 유의성을 나타내었으나 S-100단백양성 반응은 향후 더 많은 예의 관찰이 필요할것으로 사료된다.

- 참고문헌 -

1. Siager A, Jordan JA. The management of premalignant disease. *clin, Obstet, Gynecol*, 1978;5:629
2. 대한부인종양 콜포스코피학회, 부인종양학 도서출판 칼빈서적 1996;1.
3. Catalano LW Jr, Johnson LD, Herpes virus antibody and carcinoma in situ of the cervix, *JAMA* 1971; 217:447.
4. Aurelian L. Strandberg JD, Meledoz LV. et al. Herpes virus type 2 isolated from cervical cancer cells growth in tissue culture, *science* 1974;174:704-707.
5. Jorodan SW, Key CR, Carcinoma of the cervix, in South western American indians; Results of a cytologic detection program. *Cancer* 1981;47:2523-2532.
6. Baker VV, Hather KD, Shingleton HM, amplification of the C-myc proto-oncogene in cervical carcinoma, *J surg oncol* 1988;39:225-228.
7. Kuniyuki oka, Takashi Nakano, Tatsuo Arai, c-erbB-2 oncoprotein expression is associated with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the cervix, *cancer* 1994;73:668-671.
8. Padhy LC, Shin C, Cowing D. et al. Identification of a phosphoprotein specificity induced by the transforming DNA of rat neuroblastomas cell 1982;28:865-871.
9. van de Vijlter MJ, Peter JL, Mooi WJ. et al. Neu-protein overexpression in breast cancer *N Engl J Med* 1988; 319:1239-45.
10. Wright C, Angus B, Nicholson S. et al. Expression of c-erbB-2 oncoprotein : a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res* 1989;49:2087-2090.
11. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA. et al. Studies of HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science(Wash DC)* 1989;244:707-712.
12. Walker RA, Gullick WJ, Varley JM. An evaluation of immunoreactivity for c-erbB-2 protein as a marker of poor short-term prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1989;60:426-429.
13. King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel c-erbB related gene in human mammary carcinoma.
14. Takashi nakano, kuniyuki oka, roles of Langerhans' cells and T-lymphocytes infiltrating Cancer tissues in patients treated by radiation therapy for cervical cancer. *National institute of radiologic science.*
15. Furukawa T, Watanabe S, Kodama T, Sato Y, Shimosat Y, Suematsu K. T-zone histiocytes in adenocarcinoma of the lung in relation to postoperative prognosis. *Cancer* 1985;56:2651-6.

16. Tsujitani S, Furukawa T, Tamada R, Okamura T, Yasumoto Y, Sugimachi K. Langerhans cell and prognosis in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1987;59:501-5.
17. Nomori H, Watanabe S, Nakajima T, Shimamoto Y, Kameya T. Histiocytes in nasopharyngeal carcinoma in relation to prognosis. *Cancer* 1986;57:100-5.
18. Nakano T, Oka K, Arai T, Morita S, Tsunemoto H. Prognostic significance of Langerhans' cell infiltration in radiation therapy for squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Arch Pathol Lab Med* 1989;113:507-11.
19. Oka K, Nakano T, Arai T. Adenocarcinoma of the cervix treated with radiation alone; prognostic significance of S-100 protein and vimentin immunostaining. *Obstet Gynecol* 1992;79:347-50.
20. West KP, Warford A, Fray L, Allen M, Campbell AC, Lauder I. The demonstration of B-cell, T-cell and myeloid antigens in paraffin sections. *J Pathol* 1986;159:89-101.
21. Fukushige S, Matsubara K, Yoshida M, et al. Localization of a novel v-erbB-2 related gene. c-erbB-2 on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line. *Mol Cell Biol* 1986;6:955.
22. Barnes DM, Lammie GA, Millis RR, et al. A immunohistochemical evaluation of c-erbB-2 expression in human carcinoma. *Br J Cancer*. 1988;58:448-452.
23. Kihana T, Tsuda H, Teshima S, Nomoto K, Tsugane S, Sonoda T, et al. Prognostic significance of the overexpression of c-erbB-2 protein in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1994;73:148-53.
24. Berchuk A, Rodriguez G, Kamel A, et al. Expression of epidermal growth factor receptor and HER-2/neu in normal and neoplastic cervix and vagina. *Obstet Gynecol* 1990;76:381-387.
25. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Expression of c-erbB-2 oncoprotein; a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res* 1989;49:2087-90.
26. Hale RJ, Buckley CH, Fox H, et al. Prognostic value of c-erbB-2 expression in uterine cervical carcinoma. *J Clin Pathol* 1992;45:594-596.
27. Harris RWC, Brinton LA, Cowdel RH, et al. Characteristics of Women with dysplasia or carcinoma in situ of the Cervix uteri. *Br J Cancer* 1980;42:359-369.
28. Sasano H, Garrett CT. Oncogenes in gynecological tumors. *Current Topics Pathol* 1992;85:357-371.
29. Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, et al. overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 1990;50:4087-4091.
30. 조윤경 · 목정은, 악성 및 양성 난소종양에서 HER-2/neu 유전자의 발현 정도와 과도발현이 예후에 미치는 영향. *대한산부회지* 1994;37:1624-1636.
31. Shimokawara I, Imamura M, Yamanaka N, Ishii Y, Kikuchi K. Identification of lymphocyte subpopulations in human breast cancer tissue and its significance. *Cancer* 1982;49:1456-64.
32. Suit HD, Sedlacek R, Wagner M, Orsi L. Radiation response of C3H fibrosarcoma enhanced in mice stimulated by *Corynebacterium parvum*. *Nature (London)* 1975;255:493-4.
33. Mukai M, Ando K, Koike S, Nagao K. Effect of combination therapy of radiation and local administration of OK-432 on a murine fibrosarcoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989;17:125-30.
34. Hayashi Y. Enhancing effect of irradiation on carcinoma of the uterine cervix by administering protein-bound polysaccharide kureha (PSK): quantitative nuclear DNA analysis following irradiation. *Acta Obstet Gynecol Jpn* 1988;40:179-86.
35. Wangxue chen; Natalie Rains; *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 7/1/00, Vol 15, 698-705.