

Proliferating Cell Nuclear Antigen : Relation to Histologic Grade and Prognosis

고신대학교 의과대학 산부인과학교실

신승화 · 박은동

= Abstract =

The measurement of tumor cell proliferation is becoming increasingly recognized in defining prognostic groups. Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immunolocalization can be used as an index of cell proliferation and may define the extent of departure from normal growth control.

PCNA is considered to be marker of cell proliferation. The aim of this study was to evaluate the expression of PCNA in epithelial ovarian cancer as well as the possible correlation with degree of differentiation, tumor stage and overall survival.

The material consisted of 35 epithelial ovarian cancer.

The PCNA labelling index (LI) ranged from 7.5% to 92.5% with a median value of 46.7%

PCNA labelling index (LI) is 30% in grade 1, 63% in grade 2, and 100% in grade 3 in epithelial ovarian cancer($P < 0.05$). Also, a positive correlation was found between PCNA labelling index (LI) and clinical stage ($P < 0.05$).

The estimated 3 year survival in patients with a tumor LI below the median(low proliferative group) was higher than those with a tumor LI greater than the median(high proliferation group) (87.5% VS 50%, $P < 0.05$).

Key words : Epithelial ovarian cancer, PCNA, PCNA labelling index

I. 서 론

정상적인 세포는 세포주기에 의해 조절되고 악성 세포는 세포증식의 혼란으로부터 발생된다. 또한 정상적인 세포 주기의 조절로부터 이탈한 정도가 악성도를 반영한다.

이미 상피성 난소암에서 병기와 수술후 잔류 종양의 크기가 예후에 영향을 미친다는 것은 알고 있는 사실이다.¹⁻³⁾ 또한 상피성 난소암에서 조직학적 분류는 종양의 침습성에는 연관성이 없으나 세포의 조직학적 분화도는 암의 진행성에 중요한 지표가 된다.⁴⁾

최근에 와서는 상피성 난소암에서 DNA 배수체가 암의 진행에 미치는 영향에 대해서 연구되었고 고형성 종양에서 높은 증식능과 암의 침습성과의 관계가 있다는 것이 밝혀졌다. 결국 정상적인 세포주기에서의 이탈은 세포주기 조절과 관련된 비정상적 항원의 발현을 측정함으로써 알 수 있고 이러한 항원 중의 하나가 PCNA(Proliferating Cellular Nuclear Antigen)이다.

PCNA는 Miyachi 등에 의해 1978년에 명칭되었고⁵⁾ 이와는 독립적으로 1980년에 Bravo와 Celis는 cyclin이라 하였는데⁶⁾ 결국 이것은 같은것으로 밝혀졌다. 이것은 세포핵 내에 있는 DNA-polymerase-delta에 대한 보조 단백질로서 36KDa 분자량을 가지고 DNA 복제, DNA 재생 세포주기 진행에 필수적이고 세포주기중 G1 후기부터 S기 전반에 걸쳐서 합성된다.^{7,8)} 그러므로 PCNA는 세포 내에 축적되고 정상세포에서 PCNA immunolocalization은 증식세포를 염색함으로써 해서 세포증식 정도를 알 수 있다.⁹⁾ 암조직에서 PCNA 면역조직화학적 염색의 정도는 종양의 침습성을 나타내고 종양의 증식도를 나타낸다.¹⁰⁾

PCNA 면역조직화학적 염색법의 중요한 장점은 신선조직이나 파라핀 포매체나 적용될 수 있다는 것이다.

상피성 난소암에서 몇 개의 명확한 예후인자가 있는데 그것은 병기, 조직학적 분화도, 첫 수술후 잔류암 종괴의 직경등이나 이것으로 부가적인 치료를 결정하는 데는 충분하지 않다.

II. 연구대상 및 방법

1. 연구대상

1986년 1월에서 1992년 12월까지 고신의대 산부인과에서 가능한 많은 암조직을 제거하는 수술후 platinum을 포함한 항암화학요법을 시행하고 추적 가능하였던 상피성 난소암 환자 35예를 대상으로 하였고 평균 추적기간은 36개월로 하였다. 또한 수술후 첫 항암화학요법은 6회로 하였고 잔류암이 있는 경우 적당한 시기에 2차 추시 개복수술을 하고 그 결과에 따라 적절한 치료를 하였다.

임상적 병기는 FIGO(International Federation of

Gynecology and Obstetrics) 분류법에¹¹⁾ 따라 4기로 분류하였다.

2. 연구지표

PCNA와 조직학적 분화도, 임상병기, 2차 추시 개복수술의 결과, 재발률 및 3년 생존율과의 관련성을 살펴보았다.

3. 연구방법

1) 병리조직학적 검색

외과적으로 절제된 상피성 난소 악성종양 조직을 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 고정한 후 통상의 조직표본 제작법에 따라 탈수, 투명, 침투의 과정을 거친후 파라핀 포매하고 4-5 μ m의 두께로 박절한 후 hematoxylin-eosin 염색을 시행하였고 광학현미경하에서 검경하였다. 각 중례는 WHO 분류법¹²⁾을 따라 크게 장액성 난소암, 점액성 난소암, 자궁내막양 난소암으로 구분하고 악성종양의 분화도는 Hains and Taylor¹³⁾(1987) 기준에 따라 1등급, 2등급 3등급으로 분류하였다.

2) 면역조직화학적 염색

파라핀 포매체를 4-5 μ m 두께로 잘라 크실렌에서 탈파라핀한 후 100%, 90%, 80% 및 70% 에탄올에 순서대로 1분씩 함수시키고 중류수에 수세한 후 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척하였다. 1:50으로 희석한 PCNA 단클론항체(PC10, Da Ko. Denmark)를 도포하여 실온에서 2시간 동안 방치시킨뒤 PBS로 세척하고 조직주위의 과다한 완충액은 닦아내었다. Anti-mouse biotinylated IgG 2차항체를 도포하여 30분간 방치시켰다. 다시 PBS로 세척한 후 발색제 amino ethicarbazole(AEC)를 도포하였다. Mayer hematoxylin에 3분간 대조 염색후 crystal mount로 봉입하여 현미경으로 검경하였다.

3) 면역조직화학적 검색

결과의 판정은 염색된 각종 종양조직을 광학 현미경의 400배 시야로 관찰하여 핵에 적갈색의 과립이 있을 때 PCNA의 발현세포로 판정하였으며 반응의 강도가 가장 낮은 부위에서부터 가장 높은 부위까지 4장의 사진을 찍어 각 부위에서 종양세포수를 나타난 종양 세포수를 헤아려 이들을 합산하여 총 1,000개의 종양세포 중 PCNA 양성세포수를 구하여 다음과 같이 PCNA 표지 지수를 구하였다

(Fig 1-3).

$$\text{PCNA 표지지수(\%)} = \frac{\text{양성으로 나타난 중양 세포수}}{\text{헤아린 전체 중양 세포수}} \times 100$$

Fig. 1. Immunohistochemical stain for PCNA by using PC 10 antibody : WHO grade 1 epithelial ovarian cancer

Fig. 2. Immunohistochemical stain for PCNA by using PC 10 antibody : WHO grade 2 epithelial ovarian cancer

4) 통계처리

조직학적 분화도, 임상적병기, 재발률, 2차 추시 개복술결과, 조직학적 분류에 따른 각각의 PCNA 표지지수를 구한 뒤 상관관계를 알아보기 위해 IBM-PC의 SPSS PC+Program을 이용하여 비교분석하여 P value가 0.05 이하인 경우 통계적으로 유

Fig. 3. Immunohistochemical stain for PCNA by using PC 10 antibody : WHO grade 3 epithelial ovarian cancer

의한 것으로 간주하였다.

생존은 개월 수로 나타내고 처음 병이 발견된 날에서 사망할 때까지나 추적이 불가능할 때까지로 하고 Wilcoxon Survival Curve로 구하였다.¹⁴⁾

5) PCNA 표지지수의 결정

평균치는 46.7%였고 평균치 이상인 경우 고중식능군이라 하였고 평균치 이하인 경우 저중식능군으로 하였다.

III 결 과

1. 조직학적 분화도에 따른 PCNA 표지지수

연령별 분포는 17세에서 63세까지였고 평균 연령은 46.7세이다.

상피성 난소암 35예 중 조직학적 분화도가 1등급이 23예(66%), 2등급이 8예(23%), 3등급이 4예(11%)였고 조직학적 분화도에 따른 PCNA 표지지수가 각각 39%, 52%, 79.3%로 나타나 분화도가 나쁠수록 PCNA 표지지수가 증가하고 또한 고중식능군의 비율도 증가하는 것을 알 수 있다(Table 1). 조직학적 분화도에 따른 PCNA 표지지수는 통계학적으로 유의성있게 나타났다.

2) 임상적 병기에 따른 PCNA 표지지수

병기별 PCNA 표지지수를 살펴보면 1기 15예에서 33.7%, 2기 5예에서 50%, 3기 8예에서 51.8%, 4기 7예에서 64.4%로 병기가 높을수록 세포분열도가 높은 것을 보여준다. 또한 병기가 높을수록 고중

Table 1. Mean PCNA Labelling Index according to the Histological Grade

Histological grade	No of patients	Mean value(%) PCNA Labelling Index	proliferation group	P-value
1	23	39	H : 7(30%) L : 16	0.013
2	8	52	H : 5(63%) L : 3	
3	4	79.3	H : 4(100%) L : 0	
Total	35	46.7		

H : high proliferation group

L : low proliferation group

식능군의 비율도 높아지는 것을 알 수 있다. 이것은 통계학적으로 유의성이 있는것으로 나타났다 (Table 2).

Table 2. Mean PCNA Labelling Index according to the Clinical Stage

Clinical Stage	No of patients	Mean value(%) PCNA Labelling Index	proliferation group	P-value
1	15	33.7	H : 4(27%) L : 11	0.0138
2	5	50	H : 2(40%) L : 3	
3	8	51.8	H : 5(63%) L : 3	
4	7	64.4	H : 5(71%) L : 2	
Total	35	46.7		

H : high proliferation group

L : low proliferation group

3. 조직학적 분류에 따른 PCNA 표지지수

장액성 난소암의 경우 점액성 난소암이나 자궁내막양 난소암보다 PCNA 표지지수가 높고 고중식능군의 비율도 높은 것을 보여주고 있다. 그러나 통계학적 유의성은 없었다(Table 3).

4. PCNA와 표지지수와 2차 추시 개복술의 결과

Table 3. Mean PCNA Labelling Index according to the Histological Type

Histological type	No of patients	Mean value(%) PCNA Labelling Index	proliferation group	P-value
Serous	22	50.7	H : 12(54%) L : 10	0.1302
Mucinous	11	38.9	H : 4(36%) L : 7	
Endometroid	2	24	H : 0(0%) L : 2	

• serous : serous cyst adenocarcinoma or serous papillary adenocarcinoma

• mucinous : mucinous cyst adenocarcinoma

• Endometroid : endometroid carcinoma

2차 추시 개복술은 총 35예의 환자 중 1차 수술에서 잔류암이 있었던 14예에서 시행되었고 모두 platinum을 포함한 항암화학요법후(최소 6회) 치료 효과가 최고에 도달했다고 판단했을 때 시행하였다.

Table 4에서 보이는 바와 같이 2차 추시 개복술 결과 양성은 3예, 음성은 11예였으며, 양성군에 있어서 PCNA 표지지수가 음성군에 비해 높은 것으로 나타났다. 그러나 이 결과는 통계학적으로 유의성이 없었다

Table 4. Mean PCNA Labelling Index and Second-Look Laparotomy Result

Second look	No of patients	Mean value(%) PCNA Labelling Index	proliferation group	P-value
Positive	3	41.3	H : 1 L : 2	0.3887
Negative	11	29.8	H : 4 L : 7	

5. 재발률과 PCNA 표지지수

총 재발률은 17.1%였고, 고중식능군에서는 총 16예 중 3예로 18.7%, 저중식능군에서는 총 19예 중 3예로 15.4%의 재발률을 보이는데 각각의 PCNA 표지지수를 보면 80.8%와 39.1%로 현저한 차이를 보이고 있다. 그러나 이것은 통계학적으로 유의성이 없었다(Table 5).

Table 5. Mean PCNA Labelling Index and Recurrent Rate

Proliferation group	Recurrent rate(%)	Mean value(%) PCNA Labelling Index	P-value
H	18.7%(3/16)	80.8	0.1805
L	15.4%(3/19)	39.1	

H : High proliferation group

L : Low proliferation group

6. PCNA 표지지수와 생존율

PCNA 표지지수에 따른 3년 생존율을 살펴보면 전체적으로는 63%였고(Table 6, Fig 4) 고증식능군에 있어서는 50%, 저증식능군에서는 87.5%로 저증식능군에서 현저하게 생존율이 높은 것으로 나타났다. 또한 이것은 임상적으로 유의성이 있는 결과였다.

그러나 이것은 임상적 병기를 무시한 결과이므로 병기에 따라 고증식능군과 저증식능군으로 나누고 각각의 3년 생존율을 비교해 보았다(Table 7).

1기에서는 증식능에 관계없이 모두 3년 이상 생존하였고 2기에서는 고증식능군이 50%, 저증식능

Table 6. 3-Years Survival Date according to the Proliferation Group and Stage

Proliferation group	3-years S. R.(%)	P-value
H	50%(8/16)	0.0173
L	87.5%(14/19)	

H : High proliferation group

L : Low proliferation group

S. R. : Survival Rate

군이 67% 3기에서는 각각 20%와 33% 4기에서는 각각 40%와 0%로 나타났지만 대상의 수가 너무 적어 통계학적 의의는 없었다.

IV. 고 찰

이미 알려진 상피성 난소암의 예후인자로는 ① 병기 ② 조직학적 분화도 ③ 조직학적 분류 ④ 가능한 많은 암조직을 제거하는 수술후 잔여 종양의 크기 등이 있다.¹⁵⁾

근래에 와서는 세포분열과 DNA 양을 이용해 암의 예후를 예견하려는 노력이 계속되고 있다.

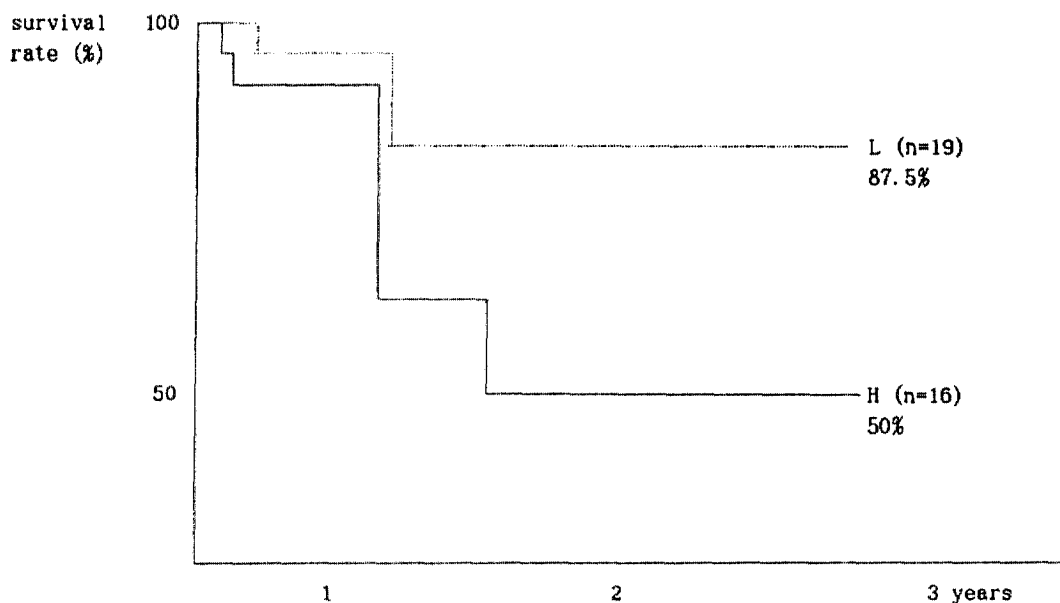


Fig. 4. Patient survival by PCNA labelling index

Low proliferation group ----

High proliferation group —

Table 7. 3-years Survival Date according to the Proliferation Group and Stage

Clinical stage	No of patients	Proliferation Group	3-years S. R.(%)	Total S. R.
1	15	H	100%(4/4)	100%
		L	100%(11/11)	
2	5	H	50%(1/2)	60%
		L	67%(2/3)	
3	8	H	20%(1/5)	25%
		L	33%(1/3)	
4	7	H	40%(2/5)	29%
		L	0%(0/2)	
Total			22/35	63%

악성종양에서 세포증식능은 매우 중요한 예후 인자로 알려져 있으며 세포증식능에 대한 측정방법 중 최근 유세포 측정기에 의한 합성기 세포분획, 면역조직화학적 염색, 그리고 은염색에 의한 Nuclear Organizer Regions(NORS) 수 등이 많이 이용되고 있으며 이들간의 상관관계를 규명하려는 연구들이 행해지고 있다. 이 중 유세포 측정기에서 얻어진 DNA 배수체는 세포증식능과 밀접한 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다.

면역조직화학적 방법에 의한 세포증식능의 검사는 최근 세포분열시 나타나는 표지자 중 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)과 ki-67 등에 대한 단클론 항체를 이용한 면역조직화학적 염색이 많이 이용되고 있으며, 이 방법은 종양조직의 구조가 유지되며 개개의 증식세포를 볼 수 있고 직접 그 정도를 헤아릴 수 있어 유세포 측정기에 의한 합성기 세포분획 측정방법보다 유리하다. 유세포 측정기에 의해 측정된 DNA 양은 난소암의 예후와 연관되고 이수체가 배수체보다 예후가 나쁘다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 또한 빠른 증식능을 가진 종양일수록 예후는 나쁘다.¹⁹⁾ 세포주기 조절의 혼란과 그에 따른 세포의 증식은 악성종양을 유발하고 정상적인 세포주기 조절에서 이탈한 정도에 따라 악성도가 결정된다. 이러한 이탈은 P53, Rb, PCNA 유전자와 같은 세포주기와 관련된 유전자에 발현을 측정함으로써 알 수 있다.^{11,20,21)} PCNA 유전자는 DNA 복제와 재생 그리고 세포주기 진행과 세포증식에 필수적이다.^{22,23)} 정상조직에서 PCNA 염색은 증식하고 있는 세포에

만 국한된다. 또한 PCNA는 세포주기 중 G1기 후기부터 S기 전반에 표현되고 여러 가설에서 G1기 후기가 세포 증식에 주된 역할을 한다고 한다.²⁴⁾

난소암에서 유세포 측정기에 의한 S기의 분획은 예후에 중요한 연관성을 가진다. 또 경계성 악성종양에서 유세포 측정기의 방법으로 봤을 때 S기의 분획이 악성종양에 비해 현저히 낮았다.²⁴⁻²⁷⁾ 또한 여러 연구에서 보면 PCNA 표지지수는 종양의 증식성을 보는 다른 방법 즉 유세포 측정기에 의한 S기 분획, thymidine이나, bromodeoxyuridine(BrdU)이나 ki67 등의 단클론 항체를 이용한 표지지수와도 관련이 있는것으로 나타났다.^{28,29)}

현재는 PCNA 면역조직화학적 염색으로 설명될 수 있는 악성종양이 많은데 위암에서 PCNA 표지지수가 평균치의 이상인가 이하인가에 따라 예후가 결정되었다.³⁰⁾ 또한 Lippohen과 Kskelin(1992)에 의하면 178명의 방광의 이행성 세포암에서도 PCNA 양성핵의 비율이 T status, N status, 조직학적 분화도와 관련이 있었다.³¹⁾ 또한 임파종에 있어서도 연구되었는데 PCNA 면역조직화학적 염색은 세포증식능의 지표로 사용되었다.^{32,33)} Oka 등(1992)에 의하면 방사선요법만을 시행한 자궁경부 악성종양에서 PCNA 표지지표가 예후를 결정하는 인자가 된다고 밝혔다.³⁴⁾

난소암의 대부분의 환자는 이미 진행된 상태에서 진단되고 가능한 많이 제거하는 수술 자체가 예후에 있어 중요하지만 실제로 항암화학요법을 시행하더라도 재발하는 것은 최근 몇 십 년 동안 어쩔 수 없는 사실이었다.

Thomas 등(1995)에 의하면 PCNA 표지지수가 높을수록 생존율이 낮았고 가능한 많이 제거하는 수술을 시행한 경우(잔괴종양<2cm) 평균 생존율은 2배 높다고 하였다.³⁶⁾

본 연구에서는 PCNA 표지지수는 병기, 조직학적인 분화도, 2차 추시개복수술의 결과와 관련성이 있음을 보였고 고증식능군에 있어서 재발률이 저증식능군에 비해 높으며, 2년 생존율에 있어서도 고증식능군에서는 50%, 저증식능군에서는 87.5%로 PCNA 표지지수가 예후인자가 될 수 있다고 하였다.

이러한 세포증식능에 관한 정보는 예후결정에 중요하고 적절한 치료에 대해 환자를 선택할 수 있게 한다. 궁극적으로 난소암의 생물학적 특징과 증식

능에 따라 결정된 악성 잠재도를 기초로 cytokine therapy나 radiolabelled monoclonal antibody therapy와 같은 보다 강력한 치료방법을 선택할 수 있게 된다.

V. 결 론

1986년 1월부터 1992년 12월까지 고신대의 산부인과에서 가능한 한 많은 암조직을 제거하는 수술 후 platinum을 포함한 항암화학요법을 시행하고 추적가능하였던 상피성 난소암 35예를 대상으로 조직학적 분화도, 임상적 병기, 조직학적 분류, 2차 추시개복술 결과, 재발률, 3년 생존율과 PCNA 단클론 항체를 이용한 면역조직화학적 방법에 의한 PCNA 표지지수와 상관관계를 살펴본 결과는 다음과 같았다.

1) 조직학적 분화도에 따른 PCNA 표지지수는 분화도가 나뉠수록 증가하였고 통계적으로 유의하였다($P<0.05$).

2) 임상적 병기에 따른 PCNA 표지지수는 병기가 높을수록 증가하였고 통계적으로 유의하였다($P<0.05$).

3) 장액성 난소암이 점액성 난소암이나 자궁내막암 난소암의 PCNA 표지지수보다 높은 경향을 보였으나 통계학적으로 유의하지 않았다.

4) 2차 추시개복술을 시행한 14예 중 3예에서 양성으로 나타났고 양성군에서 음성군에 비해 평균 PCNA 표지지수가 높았지만 통계학적 유의성은 없었다.

5) 총 35예 중 6예에서 재발하였고 고중식능군에서 3예, 저중식능군에서 3예였으며, 각 군에서 평균 PCNA 표지지수는 고중식능군에서 현저히 높았으나 통계학적 유의성은 없었다.

6) 고중식능군에서의 3년 생존율이 저중식능군에 비해 높았고 이것을 통계학적으로 유의성이 있었다.

이상의 결과를 토대로 상피성 난소암에서의 PCNA 표지지수는 병기, 조직학적 분화도에 따른 유의한 차이를 보이고 3년 생존율에서도 통계학적으로 유의한 영향을 미친다.

그러나 고중식능군에서 2차 추시개복술 결과가 양성이거나 재발률이 높은 경향을 보였지만 통계학적 유의성은 없었다. 그러므로 PCNA 표지지수는 형태학적 소견 조직학적 분화도, 병기, 임상적 고찰을 함께 고려해 본다면 상피성 난소암에서 예후를 평가할 수 있는 하나의 인자로서 활용할 가치를 가지고 있다고 사료된다. 그러나 이 연구의 대상이 된 35예의 환자에서 모두 수술후 platinum을 포함한 항암화학요법을 시행하였으므로 2차 추시개복술의 결과나 재발률이 항암화학요법의 반응도를 나타낸다고 볼때 PCNA 표지지수가 임상적 의의를 가지지 못했다. 그러나 대상의 수가 너무 적었으므로 좀더 많은 대상으로 한 결과가 필요한 것으로 사료된다

- References -

1. Redman JR, Petroni GR, Saigo PE, Geller NL, Hakes TB : Prognostic factors in advanced ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 1986;4:515-523.
2. Rodenburg CJ, Cornelisse CJ, Heintz PAM, Hermans J, Fleuren GJ : Tumor ploidy as a major prognostic factor in advanced ovarian cancer. *Cancer* 1987;59:317-323.
3. Richardson GS, Scully RE, Nikrui, et al. : Common epithelial cancer of the ovary. *N Engl J Med* 1985; 312:415-424.
4. Bolis G, Marsoni S, Belloni C, Bianchi U, Bolis PF, Bortolozzi G, Colombo N, et al. : Randomized comparison of cisplatin with cyclophosphamide/cisplatin and with cyclophosphamide/doxorubicin/cisplatin in advanced ovarian cancer. *Lancet* 1987; 8555:353-355.
5. Miyachi K, Fritzler M, Tan EM : Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978;121:2228-2234.
6. Bravo R, Celis JE : A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of the La cells. *J cell Biol* 1980;84:795-802.
7. Bravo R, Frank R, Blundell P, Macdonald Bravo H : Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase delta. *Nature* 1987;326:515-517.
8. Prehlich G, Kostura M, Marshak KDR, Matthews MB, stillman B : The cell-cycle regulated prolife-

- rating cell nuclear antigen is required for SV40 DNA replication in vitro. *Nature* 1987;326:471-475.
9. Sarraf CE, McCormick CSF, Brown CR, Price YE, Hall PA, Land DP, Alison MR : Proliferating cell nuclear antigen immunolocalisation gastrointestinal epithelia. *Digestion* 1991;50:85-91.
10. Hall PA, Levison DA, Oods AL, Yu CW, Kellock DB, Watkins JA, Barnes dm Gillett CE, Camplejohn R, Dover R, Waseem NH, Land DP : Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immunolocalization in paraffin sections : an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990;162:285-294.
11. International Federation of Gynecology and Obstetrics cancer committee : stage announcements. *Gynecol Oncol* 1986;25:383.
12. Seror SF, Scully RE, Sobin LH : 1973 Histologic typing of ovarian tumors. No 9. World Health Organization Geneva.
13. Haines and Taylor : Obstetrical and Gynecological Pathology. Vo 2, 3rd ed 1987:565-586.
14. Armitage P, Berry G : Statistical methods in medical research, third edition 450-453.
15. Omura GA, Brady MF, Homesley HD, Yordan E, Major FJ, Buchsbaum HJ, Park RC : Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma : The Gynecologic Oncology Group experience. *J Clin Oncol* 1991;9:1138-1150.
16. Friedlander M, Hedley D, Swanson C, and Russell P : (Gynecologic Oncology Group of the Clinical Oncology Society of Australia) : Prediction of long-term survival by flow cytometric analysis of cellular DNA content in patients with advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1988;6:282-290.
17. Murray K, Hopwood L, Volk D, Wilson J : Cytofluorometric analysis of the DNA content in ovarian carcinoma and its relationship to patient survival. *Cancer* 1989;63:2456-2460.
18. Kleini P, Joensuu H, Kihlholm P, Mäenpää J : Clinical significance of abnormal nuclear DNA content in serous ovarian tumors. *Cancer* 1988;62:2005-2010.
19. Tubiana M, Courdi A : Cell proliferation kinetics in human solid tumors : relation to probability of dissemination and long-term survival, Radiotherapy and Oncology. 1989;15:1-18.
20. Decaprio JA, Ludlow JW, Lynch D, Furukawa Y, Griffin J, Piwnicka-worms H, Huang CM, Livingston DM : The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell* 1989;58:1085.
21. Levine AJ, Monand J and Finlay C : The P53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991;351:453-456.
22. Jaskulski D, De Riel JK, Mercer WE, Calbretta B, Baserga R : Inhibition of cellular proliferation by antisense oligonucleotides to PCNA Cyclin. *Science* 1988;240:1544-1546.
23. Liu YC, Marraccino RL, Keng PG, Bambara RA, Lord EM, Chou WG, Zain SB : Requirement for proliferating cell nuclear antigen expression during stages of the Chinese hamster ovary cell cycle. *Biochemistry* 1989;28:2967-1974.
24. Avanzi GC, Porcu P, Brizzi MF, Chigo D, Bosia A, Pegoraro L : Interleukin-3-dependent proliferation of the human MO-7e cell line is supported by discrete activation of late G1 genes. *Cancer Res* 1991;51:1741-1743.
25. Rutgers DH, Wilsis, Schaap AH, van Lindert AC, DNA flow cytometry, histological grade, stage and age as prognostic factors in human epithelial ovarian carcinomas. *Pathol Res Pract*, 1987;182:207-213.
26. Kallioniemi OP, Punnonen R, Mattila J, Lehtinen M, Koivula T : Prognostic significance of DNA index, multiploidy and S-phase fraction in ovarian cancer. *Cancer* 1988;61:334-339.
27. Barnabei VM, Miller DS, Bauer KD, Murad TM, Rademaker AW, Lurain JR : Flow cytometric evaluation of epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1990;162:1584-1590.
28. Dawson AE, Norton JA, Weinberg DS, Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry. *Am J Pathol* 1990;136:1115-1124.
29. Allegranza A, Giraldo S, Arrigoni GL, Veronesi S, Mauri FA, Gambacorta M, Pollo B, Dall-Palma P, Barbareschi M : Proliferating cell nuclear antigen expression in central nervous system neoplasms. *Virchows Arch. A Pathol Anal Histopathol* 1991;419:417-423.
30. Jain S, Filipe MJ, Hall PA, Waseem NH, Lane DP, Levison DA : Prognostic value of PCNA in gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 1991;44:655-659.

31. Lipponen PK, Eskelin MJ : Cell proliferation of transitional cell bladder tumours determined by PCNA/cyclin immunostaining and its prognostic value. *Br J Cancer* 1992;66:171-176.
32. Kamel OW, EL Brun DP, Davis RE, Berry CJ, Warnke RA : Growth fraction estimation of malignant lymphomas in formalin-fixed paraffin-embedded tissue using anti-PCNA cyclin 19A2. Correlation with Ki67 labelling. *Am J Pathol* 1991;138:1471-1477.
33. Wood AL, Hall PA, Shepherd NA, Hambr AM, Wa-seem NH, Lane DP, Levison DA : The assessment of proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S+G2+M phase fraction(flow cytometric analysis) and prognosis. *Histopathology* 1991;19:21-27.
34. Oka K, Hoshi T, Arai T : Prognostic significance of the PC10 index as a prospective assay for cervical cancer treated with radiation therapy alone. *Cancer* 1992;70:1545-1550.
35. American cancer society : Cancer Facts and Figures. American Cancer Society : New York 1986.
36. Thomas H, Nasim MM, Sanrat CE, Aloson MR, Love S, Lambert HE, Price P : Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immunostaining-a prognostic factor in ovarian cancer. *British Journal of cancer* 1995;71:357-362.
37. Lynn C, Hartmann MD, Thomas J, et al. : Proliferating cell Nuclear antigen in epithelial ovarian cancer : Relation to results at second-look laparotomy and survival. *Gynecologic Oncology* 1992;47:191-195.
38. Nakopoulou L, Janinis J, Panagos G, Comin G, P Davaris P : Proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) in malignant and benign epithelial ovarian neoplasms and correlation with prognosis, *Eng. J cancer* 29A, 1993;11:1599-1601.
39. Silvestrini R, Daidone MG, Bolis G, et al. : Cell kinetics : A prognostic maker in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 1989;35:15-19.