

In Situ Hybridization을 이용한 위암의 암화과정에 관한 세포유전학적 연구

충남대학교 의과대학 내과학교실, 계명대학교 의과대학 병리학교실*

김선영 · 배지연* · 서지원 · 이상숙*

=Abstract=

Interphase Cytogenetic Analysis of Gastric Carcinogenesis using Chromosome in Situ Hybridization

Sun Young Kim, M.D., Ji Yun Bae*, M.D., Ji Won Suh, M.D
and Sang Sook Lee*, M.D.

Department of Internal Medicine, Chungnam National University, Taejeon

*Department of Pathology, Keimyung University, Taegu**

Gastric cancer development has been proposed to present a multistep process characterized by dysregulation of proliferation and differentiation and driven by an accumulation of genetic alterations in anatomic field repeatedly exposed to carcinogens. As a first part of research for gastric carcinogenesis and prevention, we probed 30 early gastric cancers and their adjacent normal tissue including premalignant lesions for numerical chromosome aberrations by nonisotopic, in situ hybridization using chromosome specific centromeric DNA probe for chromosome 17, to visualize the accumulation of genetic alterations during gastric carcinogenesis and to determine the extent of the genetically altered field. The mean chromosome index(CI) increased as the tissue passed from normal adjacent gland(NG) to intestinal metaplasia(IM) to cancer(EGC) (1.06, 1.12, 1.26). Moreover, the frequency of cells with chromosome polysomy (cells with 3 or more chromosome copies) increased as same pattern (4.2%, 9.4%, 20.2%). All cases with EGC, 28/30 cases with IM, 15/30 cases with NG showed significant polysomies(i.e., polysomy frequency > 3% of total populations). As a second part of investigation, 30 cases of gastric adenoma tissue were probe with same centromeric chromosome probes for 5 and 17, to visualize the genetic alteration of isolated benign or premalignant gastric lesion. The mean CI were 1.16 and 1.17, respectively and the frequency of polysomy were 7.6% and 4.0%, respectively. These findings of progressive genetic changes as the tumor develops support the concept of multistep carcinogenesis and field cancerization. Such genetic parameters could serve as biomarkers of intermediate end points for risk assessment of progression to malignancy or chemoprevention trials.

Key Words: Gastric carcinogenesis, In situ hybridization, Polysomy, Biomarker

* 본 연구는 1994년도 대한암연구재단-한국담배인삼공사 공익사업단 수탁연구비로 이루어졌음.

서 론

호흡기 및 상부소화기 계통암은 전세계를 통하여 중요한 공중보건학적 위험요소로서 알려져 있으나 불행히도 지난 20여년간의 수술요법, 방사선요법, 화학요법의 발전에도 불구하고, 장기 생존율은 그리 크게 나아진 점이 없는 현실이다^{1~2)}. 이런 관점에서 볼 때 발암원인과의 노출감소, 영양상태의 개선, 고위험군에 대한 화학요법적 예방법 등을 통한 암발생 자체의 감소를 유도하려는 시도가 더욱 관심을 가지게 되었다. 특히 화학요법적 예방법의 시도는 암발생의 제반 생물학적 성상 및 기전의 이해를 바탕으로 하여, 각 개인에 있어서 고위험군을 예견할 수 있는 지표나 화학요법제를 사용했을 때 암화과정이 정지되거나 반전됨을 알 수 있는 지표의 개발이 요체인 것으로 알려져 있다^{3~4)}. 이미 잘 알려져 있듯이 위암을 비롯한 몇종류의 암종은 소위 '다단계 암화과정'을 거치는 것으로서 유전적 변이의 축적에 따른 세포의 분화 및 증식의 조절 이상의 형태로 설명되어지고 있는 바⁵⁾, 조직에서의 세포조절능의 이상에 관한 표지자 뿐 아니라 일반적 또는 특수한 유전적 변이를 나타내는 표지자들도 이런 목적의 지표로서의 사용 가능성이 있음을 알게 되었다^{6~7)}.

한국에서 위암은 아직도 중요한 암종의 하나로서⁸⁾, 조기 발견하여 치료하기만 하면 상당히 좋은 완치율을 나타내므로 조기 발견이 매우 중요한 의미가 있다. 그러므로 여러 형태의 소의 '전암병변' 중에서 암발생 가능성이 높은 고위험군을 예견할 수 있는 어떤 지표가 있다면, 위암의 치료 및 예방에 더 좋은 결과를 기대할 수도 있을 것이다. 지금까지 알려진 바로는 위암의 암화과정에 관한 많은 유전학적 연구 특히 분자생물학적 연구가 있었지만 통일된 의견은 뚜렷하지 않으며, 각 단계와 관계된 유전적 변이의 특성화도 불확실한 것으로 나타나 있다^{9~11)}. 그러므로 본 연구는 최근에 소개된 Chromosome In Situ Hybridization 방법을 이용하여^{12~14)} 위암 조직 및 전암조직에서 세포유전학적 분석을 통하여 암화과정의 유전학적 성상을 이해하고 또 이 방법이 암발생 위험도를 예견해 줄 수 있는 지표로서의 가능성이 있는지를 규명해 보고자 시행하였다.

대상 및 방법

1) 표 본

조기위암 및 주위 정상조직에서의 염색체 변이의 존재 여부를 검증키 위하여 통상적인 방법의 포르말린 고정후 파라핀에 포매된, 주위 정상조직이 포함된 조기위암조직 30예를 사용하였고, 이단계 연구로서 위선종만 있는 조직 30예를 사용하여 염색체 변이 존재여부를 검증하였다.

2) 표본처리

6um의 두께로 조직절편을 취하여, poly-L-lysine 또는 Silane으로 처리된 슬라이드에 부착시킨 후 Xylene에 10분씩 2번, 에탄올에 5분씩 2번 담근 다음 공기중에서 말린다. 1M NaSCN 용액에 80도에서 10분간 대운다음, 10 mM citric acid(pH6.0)에서 1분간 전자레인지에서 가열하고 증류수로 5분간 2번 씻은후, 70%, 90%, 100% 에탄올에 각각 2분씩 담구어 탈수하여, 아세톤으로 고정하여 공기중에서 말린다.

표지자의 용이한 침투를 위하여 0.4% pepsin in 0.2N HCl 용액에 37도에서 30분간 처리한 다음 증류수로 5분씩 2번 씻는다.

3) DNA 표지자

염색체 중심절에 특이한 repetitive satellite DNA 표지자(Oncor, Gaithersburg, USA)를 사용하되 digoxigenin이 부착된 것으로 5번 및 17번 염색체 표지자를 구입하여 사용하였다.

4) In Situ Hybridization(ISH)

Hybridization mixture로서 100% formamide, 20XSSC, salmon sperm DNA, 37.5% dextran sulfate, chromosome probe 등을 적정 비율로 혼합한 용액 30ul를 준비된 슬라이드에 부은 다음 cover slip으로 덮고 고무필로 가장자리를 봉입하고 80도에서 10분간 denaturation과정을 거쳐서 37도의 배양기에서 하룻밤(16시간 정도)을 데운다. 그런 다음 formamide와 2XSSC 혼합 용액에서 2번 씻되 37도에서 15분간씩 흔들면서 시행한다. 다시 37도의 2XSSC 용액에서 15분간 2번, 0.5XSSC와 0.05

% Tween-20 혼합용액에 5분간 담가둔다.

5) 염 색

교잡된 표지자를 발색시키는 데는 indirect alkaline phosphatase 반응을 이용하였는데, 먼저 2% normal serum(pH 7.4)을 37도에서 15분간 방치한 다음 anti-digoxigenin-alkaline phosphatase (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)용액을 TBS에 1:250으로 희석하여 슬라이드에 첨가하여 37도의 온도로 습실에 2시간 둔 다음 TBS로 수세한다. 발색제로 Nitro Blue Tetrazolium (NBT) 용액을 슬라이드 위에 놓고 실온에서 적정시간 반응시킨 후 증류수로 수세하고, 1% Methyl green으로 대조 염색한 후 수용성 봉입제로 봉입하여 말린다.

6) 현미경 검사

매 조직 슬라이드당 400개 썬의 핵을 검사하여 염색체 수를 평균하며, 동일 조직군 내의 임파구를 내부 대조군으로 사용하여, 위암 세포군, 장형이형성군, 정상점막군의 염색체 수와 비율을 구하여 염색체 지수 (Chromosome Index) 구하므로 절편 제작 과정상의 손실효과를 교정한다. 또 각 군별의 과배수성의 빈도 여부를 조사하여 조직군과의 연관성을 검증한다.

7) 통계학적 검증

각군간의 과배수성의 유의성 검증을 위해서는 컴퓨터에 내장된 Minitab 프로그램으로 P값은 t-test로, 각 군간의 유의성 여부는 Duncan's multiple range test를 통해서 구했으며, 유의성은 P값이 0.05이하일 때로 하였다.

Table 1. Mean chromosome indices of number 17

Pathologic type	Mean chromosome index (range)
Normal gastric gland	1.06 (0.94-1.16)
Intestinal metaplasia	1.12 (0.94-1.31)
Early gastric cancer	1.26 (1.09-1.54)

P<0.01 between each groups

Table 3. Mean chromosome index gastric adenoma

	Chromosome 5	Chromosome 17
Gastric adenoma	1.16(1.02-1.45)	1.17(1.07-1.29)

Table 2. Mean frequency(%) of polysomy and polysomy frequency more than 3% of total cells

Pathologic type	Mean frequency of polysomy (range)*	Polysomy frequency* >3% of total cells
Normal gastric gland	4.2%(0.4-9.8)	15/30
Intestinal metaplasia	9.4%(1.0-26.3)	28/30
Early gastric cancer	20.2%(6.6-44.7)	30/30

*each groups were 30 cases, #P<0.001 between each groups

Table 4. Frequency of polysomy and polysomy frequency of gastric adenoma

Chromosome	Mean Frequency of polysomy	Polysomy frequency > 3% of total cells
5	7.6(2.3-33.6)	90(27/30)
17	4.0(0-8.9)	66.7(20/30)

P<0.005: 5 vs 17

결 과

1) 조기 위암 및 그 주변 조직에서의 염색체 변이

위암 및 주변 조직에서 17번 염색체의 숫자적 변이를 염색체 지수로 나타내면 내부 대조군으로서의 임파구에서는 1.0, 정상 점액선에서는 1.06, 장형 이형성에서는 1.12, 조기 위암에서는 1.16을 나타내었으며, 각 군간의 차이는 통계학적으로 의미있는 차이를 보였다 (Table 1). 17번 염색체의 과배수성을 나타내는 빈도의 평균치는 임파구는 1.3%, 정상 점액선은 4.2%, 장형 이형성은 9.4%, 조기 위암은 20.2%로서 이 역시 암조직으로 갈수록 의미있는 증가를 나타내었다 (Table 2). 또 30예 중에서 의미있는 염색체 과배수성(전체 세포 중 3% 이상의 세포에서 과배수성이 나타날 때)을 보이는 경우도 임파구는 0%, 정상 점액선은 50%, 장형 이형성은 93%, 조기 위암은 100% 모두에서 나타났다 (Table 3). 이들 각군에서의 염색체 수의 분포도는 그림 1에서 보여 주는데 이역시 암조직으로 갈수록 과배수의 빈도가 높음을 잘 나타내고 있다. 그림 3은 각군에서의 염색체 과배수성을 조직 절

편에서의 현미경사진으로 보여 주는 것으로서 이역시 암세포화 할수록 빈도가 높음을 나타내고 있다.

2) 위선종에서의 염색체 변이

2단계 실험으로 암세포가 없는 순수한 양성조직인 30예의 위선종 조직에서 5번 및 17번 염색체의 숫자적 변이를 조사한 바, 염색체 지수는 그 평균치가 각각 1.16, 1.17로서 과배수성이 존재함을 알았다. 과배수성을 나타내는 빈도의 평균치가 임파구는 0.3%이며 위선종에선 각각 7.6%, 4.0%을 나타내었으며, 의미있는 염색체 과배수성을 보이는 경우는 임파구는 하나도 없었고 5번 염색체의 경우는 90%에서, 17번 염색체의 경우는 66.7%로서 5번 염색체가 더 과배수성을 나타내었다 ($P < 0.01$). 그림 2는 위선종에서의 염색체 수의 분포도를 보여 주고 있는데, 대조군인 임파구에서의 염색체 과배수 빈도에 비해 높게 나타나고 있음을 알 수 있다. 그러나 염색체 5번과 17번 간의 빈도차이는 5번에서 의미있게 높은 것으로 나타났다 ($P < 0.005$). 그림 3은 위선종 조직절편의 현미경사진으로 염색체 과배수를 보여 주고 있다.

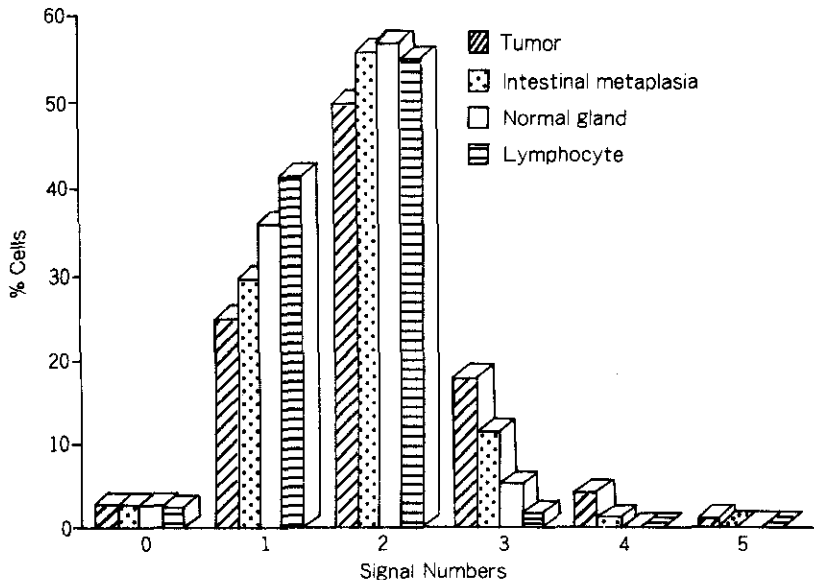


Fig. 1. Signal distribution per nucleus.

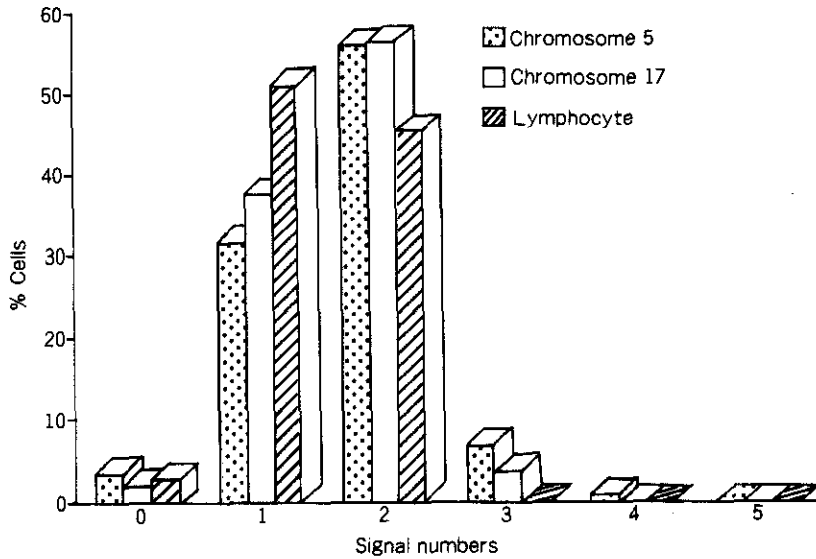


Fig. 2. Signal distribution per nucleus.

Fig. 3. CISH signals using centromeric probe on paraffin tissue section of early gastric cancer with adjacent tissue and gastric adenoma. A: early gastric cancer with infiltrating lymphocytes, B: Intestinal metaplasia, C: normal gastric gland, D: gastric adenoma. Arrows indicate nuclei with 3 or more signals (polysomy). (original magnification $\times 400$).

고 찰

위암의 암화과정에 관하여는 크게 표현형적(phenotypic) 관점과 유전형적(genotypic) 관점으로 나누어 생각해 볼 수 있다. 먼저 표현형적 관점에서, 일반적인 위암의 2가지 형태 즉 장형암(intestinal type)과 미만형암(diffuse type) 중에서 장형암을 그 대상으로 한다. 지금까지 알려진 바로는 표재성 위염에서 만성화 되면서 위축성 위염을 초래하고 다시 장형 이형성(intestinal metaplasia)으로 변한 다음 이형성(dysplasia)을 거쳐 암세포로 된다고 추정된다¹⁵⁾. 이런 표현형적 변이는 필연적으로 유전적 관점과 결부되어 각 변화과정마다 특별한 유전적 변이와 연계되어서 나타나는데 아직 명확히 규명된 사항은 없고 Trimet¹⁶⁾, K-ras¹⁷⁾, p53¹⁸⁾, APC 및 DCC^{19, 20)} 등이 관여하리라 추정되고 있다. 따라서 본 연구는 위암의 암화 과정에 관한 유전적 변이의 개관을 좀 더 잘 알기 위하여 시도되었는데 특히 관심의 대목은 다단계 암화과정상의 각 단계마다에서의 유전적 변이가 발암물질에 노출된 조직들과 어떤 관계가 있는나란 점이다. 이런 목적을 위해서는 특정 염색체의 중심질을 찾을 수 있는 DNA표지자를 사용한 In Situ Hybridization 방법으로 조기 위암의 주변조직 즉 조직학적으로는 정상적인 곳과 장형 이형성을 이룬 부분 및 암세포화 한 부분 등에서 어떤 염색체의 숫자적 변이가 있는지를 일차적으로 알아 보았고, 이차적으로는 암세포가 존재하지 않는 선종만 있는 경우를 대상으로 하여 이 경우에도 염색체 변이가 있는지 알아 보았다.

본연구는 우선적으로 몇가지 중요한 소견을 나타내는데, 첫째, 암세포에 이웃해 있는 조직학적으로는 정상인 조직에서도 염색체의 숫자가 증가하는 유전학적 변이를 나타내었다는 점이다. 이런 염색체의 과배수 현상은 정상인의 위점막 조직이나 임파구에서는 나타나지 않는 소견이다. 물론 이번의 결과만으로 염색체 과배수성을 단정 지을수는 없지만 대체적으로 염색체 수가 실제로 적게 나타날 수 있다는 점(조직처리상 표본 두께가 4~6um 이기 때문에 통상의 핵 크기보다 작아 핵 일부가 잘려 나간다는 점)에서 과배수성의 실제 수치와는 차이가 있을 수 있으나 그 경향은 차이가 없으므로 의미가 있다고 하겠다^{7, 14)}. 이런 염색체

숫자적 이상이 암세포 뿐 아니라 암세포 주위의 정상 조직이나 전암병변 등에서도 나타나게 된 점은 "Field Cancerization" 개념²¹⁾을 뒷받침하는 것으로서 두경부암에서 가장 잘 연구되어 있는데⁷⁾, 이번 연구의 결과로 위암에서도 같은 의미를 가진다 할 수 있겠다. 다만 그 변이의 정도나 양상이 암조직에서의 그것과 동일한가 또는 상이한가 하는 점은 앞으로 계속적으로 추궁되어야 할 문제이다. 즉 본연구에서는 17번 염색체만을 검색하였기 때문에 22쌍의 상염색체와 2종의 성염색체 모두를 대상으로한 연구가 추후 더 진행되어 각 조직학적 차이에 따른 특수한 염색체 변이가 있는지 또는 모든 염색체가 변이를 일으키는지를 규명해야 할 것이다. 이런 염색체 변이뿐 아니라 K-ras, p53 등도 위암세포 주변의 전암병변이나 양성 병변에서 발견된다고 보고되어 있다^{17, 18, 22)}. 그러므로 두경부 부위, 상부 위장관 및 호흡기 계통의 장기들은 발암원인에 노출되었을 때 그 노출부위 전체의 암화 즉 유전적 변이가 초래되며, 각개체 세포의 감수성 및 유전적 변이의 축적 정도에 따라 다단계의 형태학적 변이를 초래케 되며, 이런 유전적 변이를 나타내는 상피세포조직이 동일 계통상에 존재하는 한 초발암 또는 원발암이 제거되었다 할지라도, 발암원인에 노출된 다른 부위에서의 다발성 또는 재발성 암화과정 기전이 계속될 수 있으므로 암발생의 위험이 증가한다²³⁾.

본 연구의 결과에 의한 두번째 중요한 의미는 암조직에 인접한 양성 또는 전암조직의 유전적 변이의 정도가 정상조직에서 전암조직, 암조직으로 갈수록 심화되었다는 점으로 이 또한 다단계 암화과정상 필연적 현상이라 할 수 있다. 즉 17번 염색체의 과배수성이 염색체 지수(chromosome index)상 1.0, 1.05, 1.12, 1.26의 순으로 임파구, 정상 점액선, 장형 이형성, 조기 위암으로 갈수록 증가하였으며, 의미있는 염색체 변이의 빈도인 3% 이상의 세포수에서 염색체 과배수가 나타나는 경우가, 정상 점액선의 경우 50%, 장형 이형성에선 93%, 조기 위암에선 100% 모두에서 발견되어 이 역시 증가하는 결과이었다. 물론 이런 염색체 변이가 클론성 변이인지는 이번의 연구 결과로는 결론지을 수 없으며 이를 위해선 더 특이성을 지닌 염색체 또는 분자 생물학적 지표를 사용하거나 몇가지 염색체 변이를 동시에 검색함으로써 추후 규명해야 할 과제이다. 그러나 이결과는 조직학적 변이가 진행할수

록 유전적 불안정성이 진행된다는 점에서, 이런 유전적 불안정성에 대한 체계적 검색이 암발생 위험군에 대한 예견지표로서의 가능성을 제시한다 하겠다. 이런 점은 본 연구결과에는 포함되지 않았으나 다음 단계를 위한 예비실험에서 점점한 p53단백의 발현 정도도 이와 유사한 결과를 나타내는 것으로 보아 더욱 그런 가능성을 제시한다 할 수 있겠다.

위암조직 자체를 대상으로 고식적인 핵형분석 등의 방법으로 염색체 변이를 조사한 연구들에 의하면 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 17, 19, 22, Y염색체 등 많은 염색체들이 배수성 변이나 형태학적 변이를 보인다고 보고되어 있으며^{23~27)}, 본 연구에서와 같은 In Situ Hybridization 방법을 통한 연구보고는 매우 적는데^{28, 29)}, 1, 7, 17, X, Y염색체 등의 과배수성 또는 저배수성을 나타낸다고 되어 있다. 이렇듯 위암조직들이 다양한 염색체 변이를 나타내기 때문에 암발생에 필연적인 공통적 염색체 변이를 알기가 어려운데 그 이유로 일단 암화기전이 시작되면 염색체 불안정성이 증가되기 때문이거나³⁰⁾, 한 종양내에서도 서로 다른 성상의 암세포들이 섞여 있거나(intratatumoral heterogeneity) 다발성 암조직이기 때문이라고 설명되어져 왔다^{31~33)}. 그런데 본 연구의 결과에서처럼 이런 염색체 변이가 암조직 주위의 장형 이형성 부위에서도 나타났다면 염색체 변이의 복잡한 양상이 암이 생기기 이전에 이미 시작된다고 설명할 수 있겠다. 또한 Hittelman 등^{34, 35)}은 폐암에서 정상 폐조직과 동시에 PCC방법을 통한 염색체 변이를 검색한 결과 암조직에서와 같은 정도의 염색체 변이를 보였으며 암조직에서는 클론성 변이를 나타내었으나 정상 폐조직에서는 그렇지 않아, 유전적 변이 자체는 발암원인에 노출된 전 부위에서 나타날 수 있으나 일부 세포에서만 기능적으로 중대한(critical) 변이로 발전하여 클론성 변이를 초래하고 궁극적으로 암세포화 하는 것으로 추정하였다. 그러므로 이런 전암병변에서의 유전학적 변이의 다양성에 대한 좀 더 체계적인 연구가 진행되어 발암 위험군의 예견지표로서의 가능성을 높여야 할 것이다.

본 연구의 2단계 실험인 위선종에서의 염색체 변이에 대한 결과는 5번 및 17번 염색체 모두가 전 예에서 염색체 지수상으로 과배수성을 나타내었으며, 전체 세포 중 염색체 수가 3개 이상인 세포를 가진 경우가

각각 90%, 66.7%이었고, 둘다 그런 것은 57%이었다. 이것은 일단계 실험 결과와 또다른 의미를 가지는 것으로서, 암조직 주위의 양성 또는 전암조직은 발암원인에 동일하게 노출된다는 점에서 유전적 변이도 함께 나타날 수 있지만, 암조직이 없는 순수한 선종조직만 있는 곳에도 이미 유전적 변이가 나타났다는 점이다. 이미 p53이나 K-ras같은 다른 표지자들도 이들 선종에서 발현된다는 다른 보고가 있었으므로 이들의 발현 의미와 이런 염색체 변이가 암의 예견지표로서 어떤 의미를 가지는지 또는 어떤 중대한(critical) 유전적 변이가 더 축적되어야 암세포화 하는지 등의 연구는 앞으로 더 규명되어야 할 과제이다. 왜냐면 이미 이런 염색체 변이를 지표로 하여, 두경부 암의 암화과정상 전암조직에서 염색체 변이가 심하면 심할수록 암으로 발전되었다는 후향적 연구 결과에서³⁶⁾ 이들이 예견지표로서 사용될 수 있는 가능성이 제시되었기 때문이다. 따라서 이번의 연구 결과에서와 같이 과배수 이상의 경우에서 과배수가 있었으며 특히 5번 염색체의 경우 18%에서는 상당한 정도의 과배수가 있음이 나타났으므로 이들 특히 심한 과배수성을 나타내는 경우가 암의 발생과 관계될지는 지켜 보아야 할 것이다.

결 론

최근에 소개된 Chromosome In Situ Hybridization 방법을 이용하여 조기위암 및 주변의 전암조직과 위선종 각각 30예에서 염색체 변이 여부를 검색하여 위암의 암화과정의 유전학적 성상을 이해하고 또 이 방법이 암발생 위험도를 예견해 줄 수 있는 지표로서의 가능성을 검토한 결과, 암세포가 없는 조직에서도 이미 유전적 변이가 있음을 알게되었고, 또한 그러한 유전적 변이는 정상조직, 전암조직, 암조직으로 이행할수록 더욱 심화되었다는 사실을 알게 되었다. 이러한 결과들은 다단계 암화과정 및 Field Cancerization 개념에 부합한 소견이며, 이방법이 암발생 위험도를 예견하는 지표로서의 사용 가능성이 있음을 나타내었다. 따라서 이런 결과들을 토대로 비록 조직학적으로는 암이 아니나 이미 유전적 변이를 나타내는 조직들에서 어떤 유전적 변이들의 축적이 암발생에 필요하며, 어떤 지표들의 사용이 암발생율을 정확히 예견할 수 있는지를 검토키 위하여 전향적인 그리고

Case-Cohort 방법에 의한 추구 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Silverberg E, Boring CC, Squires T: *Cancer statics, 1990. CA Cancer J Clin* **40**: 9, 1990
- 2) Minna J: *Neoplasms of the lung. In Isselbacher KJ, Braunbald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS and Kasper DL(eds.), Principles of internal medicine, ed.13, pp1221-1229. New York: McGraw-Hill, 1994*
- 3) Lippman SM, Lee JS, Lotan R, Hittelman WN, Wargovich MJ, Hong WK: *Biomarkers as intermediate end points in chemoprevention trials. J Natl Cancer Inst* **82**: 555, 1990
- 4) Lee JS, Lippman SM, Hong WK, Ro JY, Kim SY, Lotan R, Hittelman WN: *Determination of biomarkers for intermediate end points in chemoprevention trials. Cancer Res(suppl)* **52**: 2707s, 1992
- 5) Fearon ER, Vogelstein B: *A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell* **61**: 759, 1990
- 6) Correa P, Shiao Y: *Phenotypic and genotypic events in gastric carcinogenesis. Cancer Res(suppl)* **54**: 1941s, 1994
- 7) Voravud N, Shin DM, Ro JY, Lee JS, Hong WK, Hittelman WN: *Increased polysomies of chromosomes 7 and 17 during head and neck multistage tumorigenesis. Cancer Res* **53**: 2874, 1993
- 8) 사망원인 통계원보: 인구동태 신고에 의한 집계. 통계청, 1994
- 9) Hirohashi S, Sugimura T: *Genetic alterations in human gastric cancer. Cancer cells* **3**: 49, 1991
- 10) Tahara E: *Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. J Cancer Res Clin Oncol* **119**: 265, 1993
- 11) Wright PA, Williams GT: *Molecular biology and gastric carcinoma. Gut* **34**: 145, 1993
- 12) Emmerich P, Jauch A, Hoffman M, Cremer T, Walt H: *Interphase cytogenetics in paraffin-embedded sections from human testicular germ cell tumor xenografts and in corresponding cultured cells. Lab Invest* **61**: 235, 1989
- 13) Kim SY, Lee KJ, Hong SC, Han PS, Lee JJ, Cho HJ, Kim AK, Kim JO, Lee MS: *Interphase cytogenetics of lung tumors using in situ hybridization: numerical aberrations. Kor J Intern Med* **9**: 55, 1994
- 14) Kim SY, Lee JS, Ro JY, Marion LG, Hong WK, Hittelman WN: *Interphase cytogenetics in paraffin sections of lung tumors by non-isotopic in situ hybridization. Am J Pathol* **142**: 307, 1993
- 15) Correa P: *Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. Cancer Res* **52**: 6735, 1992
- 16) Soman SR, Correa P, Ruiz BA, Wogan GA: *The TPR-MET oncogenic rearrangement is present and expressed in human gastric carcinoma and precursor lesion. Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 4892, 1991
- 17) Kihana T, Tsuda H, Hirota T, Shimosato Y, Sakamoto H, Terada M, Hirohashi S: *Point mutation of K-ras oncogene in gastric adenoma and adenocarcinoma with tubular differentiation. Jpn J Cancer Res* **82**: 308, 1991
- 18) Rugge M, Shiao Y-H, Correa P, Baffa R, DiMario F: *Immunohistochemical evidence of p53 overexpression in gastric epithelial dysplasia. Cancer Epidemiol Biomarker Prevent* **1**: 551, 1992
- 19) Sano T, Tsujino T, Yoshida K, Nakayama H, Nakamura Y, Kajiyama G, Tahara E: *Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 1q, 5q, and 17p in human gastric carcinomas. Cancer Res* **51**: 2926, 1991
- 20) Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, Ichii S, Nagase H, Kato Y, Yanagisawa A, Nakamura Y: *The APC gene, responsible for familial adenomatous polyposis, is mutated in human gastric cancer. Cancer Res* **52**: 3231, 1992
- 21) Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W: *"Field Cancerization" in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. Cancer* **6**: 963, 1953
- 22) Stemmermann GN: *Intestinal metaplasia of the stomach. Cancer* **74**: 556, 1994
- 23) Tzeng C, Meng C, Jin L, Hsieh H: *Cytogenetic studies of gastric adenocarcinoma. Cancer Genet Cytogenet* **55**: 67, 1991
- 24) Xiao S, Geng J, Feng X, Liu X, Liu Q, Li P: *Cytogenetic studies of eight primary gastric cancers. Cancer Genet Cytogenet* **58**: 79, 1992
- 25) Trigo MI, Martin MVS, Novales MA, Maravi J:

- Cytogenetic studies of five gastric carcinomas metastatic to the pleura. Cancer Genet Cytogenet* 75: 145, 1994
- 26) Panani AD, Ferti A, Malliaros S, Raptis S: Cytogenetic study of 11 gastric adenocarcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 81: 169, 1995
 - 27) Van Dekken H, Pizzolo JG, Kelsen DP, Melamed MR: Targeted cytogenetic analysis of gastric tumors by in situ hybridization with a set of chromosome-specific DNA probes. *Cancer* 66: 491, 1990
 - 28) Jeong WS, Lee KM, Lee GK, Sung RY, Song HG: Frequency and distribution of numerical chromosome aberrations in paraffin embedded gastric carcinomas. *Korean J Pathol* 28(5, suppl): A59(#45), 1994
 - 29) Schantz SP, Spitz MR, Hsu TC: Mutagen sensitivity in head and neck cancer patients: a biologic marker for risk of multiple primary malignancies. *J Natl Cancer Inst* 82: 1773, 1990
 - 30) Nowell PC: Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res* 46: 2203, 1986
 - 31) Jin Y, Heim S, Mandahl N, Biorklund A, Wennerberg J, Mitelman F: Multiple clonal chromosome aberrations in squamous cell carcinomas of the larynx. *Cancer Genet Cytogenet* 44: 209, 1990
 - 32) Jin Y, Heim S, Mandahl N, Biorklund A, Wennerberg J, Mitelman F: Unrelated clonal chromosome aberrations in carcinomas of the oral cavity. *Genes Chromosomes Cancer* 1: 209, 1990
 - 33) Heim S, Mandahl N, Mitelman F: Genetic convergence and divergence in tumor progression. *Cancer Res* 48: 5911, 1988
 - 34) Kim SY, Cheong N, Sohn HY, Lee JS, El-Naggar AK, Hong WK, Hittelman WN: Cytogenetic analysis (premature chromosome condensation) and quantitative DNA analysis of human lung tumors. *Proc Am Assoc Cancer Res* 31: 26 (#152), 1990
 - 35) Hittelman WN, Lee JS, Cheong N, Shin DM, Hong WK: The chromosome view of "field cancerization" and multistep carcinogenesis. Implications for chemopreventive approaches. In U Pastorino, WK Hong (eds.), *Chemoimmunoprevention of cancer*, pp41-47. New York: Georg Thieme Verlag, 1991
 - 36) Lee JS, Kim SY, Hong WK, Lippman SM, Ro JY, Gay ML, Hittelman WN: Detection of chromosomal polysomy in oral leukoplakia, a premalignant lesion. *J Natl Cancer Institute* 85: 1951, 1993