

비소세포폐암 환자에서 Proliferating Cell Nuclear Antigen, c-erbB-2 및 c-fos 단백질 발현과 예후와의 상관관계

¹아주대학교 의과대학 호흡기내과학교실, 연세대학교 의과대학 ²내과학교실,
³병리학교실, ⁴흉부외과학교실, ⁵연세대학교 상경대학 응용통계학과, ⁶연세암센터,
⁷포천 중문외과대학교 병리학교실, ⁸연세대학교 의과대학 폐질환연구소

이이형¹ · 안중배^{2,6} · 신동환^{3,8} · 홍순원³ · 심정연⁷ · 정경영^{4,8}
김세규^{2,8} · 장 준^{2,8} · 김주황^{2,6} · 이원영^{2,8} · 김병수⁵ · 김성규^{2,8}

Prognostic Value of PCNA, c-erbB-2, c-fos in Patients with Non-small Cell Lung Cancer

Yi Hyeong Lee, M.D.¹, Joong Bae Ahn, M.D.^{2,6}, Dong Hwan Shin, M.D.^{3,8}
Soon Won Hong, M.D.³, Jeong Yeon Shim, M.D.⁷, Kyung Young Jung, M.D.^{4,8}
Se-Kyu Kim, M.D.^{2,8}, Joon Chang, M.D.^{2,8}, Joo Hang Kim, M.D.^{2,6}
Won Young Lee, M.D.^{2,8}, Byung Soo Kim, Ph.D.⁵ and Sung Kyu Kim, M.D.^{2,8}

¹Department of Pulmonary Medicine, Ajou University School of Medicine;
Departments of ²Internal Medicine, ³Pathology, ⁴Thoracic and Cardiovascular Surgery,
Yonsei University College of Medicine; ⁵Department of Applied Statistics,
Yonsei University College of Business; ⁶Yonsei Cancer Center;
⁷Department of Pathology, Pochon Joongmun Medical College;
⁸The Institute of Chest Diseases, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Oncogenes, tumor suppressor genes, and growth variables of tumors are important in the assessment of prognosis in lung cancer. The expression of PCNA, c-erbB-2 (HER-2/neu), and c-fos oncoprotein and their prognostic implications in surgically resected patients with non-small cell lung cancer were evaluated.

Materials and Methods: Seventy patients with non-small cell lung cancer were included and PCNA, c-erbB-2 and c-fos overexpression were evaluated by immunohistochemical stain using paraffin-embedded tissue.

Results: The mean proportion of PCNA positive cells was 18.6%, and there was no significant difference according to cell type and stage. The median survival time was significantly shorter in the group with high PCNA expression (>10%) as compared with the group with low PCNA expression (<10%) (37 months vs 16 months). Four (6.3%) of 64 cases demonstrated c-erbB-2 positivity. These were all adenocarcinoma cases. c-fos

protein was only rarely overexpressed (1/51).

Conclusion: PCNA expression was shown to be a useful prognostic parameter in resected non-small cell lung cancer while c-erbB-2 and c-fos oncoprotein were infrequently expressed.

Key Words: Lung cancer, PCNA, c-erbB-2, c-fos

서 론

비소세포폐암은 미국에서 남녀 모두에서 가장 흔한 암으로(1), 우리나라에서도 비소세포폐암의 발생이 급격히 증가하는 추세에 있으며 특히 사망률은 지난 10년간 남녀 모두에서 약 3배나 증가하였다(2). 현재까지 전체 비소세포폐암환자의 예후는 극히 불량하여 5년생존율은 12~13%에 불과하며 해부학적 병기가 동일한 환자에서도 수술 후 생존기간에 큰 차이가 있는데(3), 이는 병기, 조직형, 활동도(performance status)(3) 이외에 다른 예후인자가 있음을 시사한다.

증식세포 핵항원(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)은 36 kd의 핵단백으로 cyclin 또는 DNA polymerase δ 의 보조단백(auxiliary protein)으로 불리며, 그 합성은 세포주기와 관련되어 후기 G1기에 핵내에 나타나서 S기에 최고로 증가하며 G2, M기에 다시 감소한다(4). PCNA는 DNA의 복제와 밀접한 관련이 있으며 세포의 증식정도를 표현하며, 세포증식의 조절에 중추적인 역할을 할 것으로 추정되고 있다(4). PCNA 발현율이 높을수록 세포분열능력은 증가하고 종양의 분화정도는 불량하며, 비소세포폐암환자에서도 PCNA 발현율이 높을수록 생존기간이 짧다고 보고되고 있다(5). c-erbB-2 (HER2/neu) 유전자는 염색체 17q21에 위치하며 분자량이 185,000 dalton의 transmembrane glycoprotein (p185neu)을 생성한다(6). p185neu 단백질은 EGFR (epidermal growth factor receptor)와 구조적으로 유사하며, tyrosine kinase 활성도를 갖는 membrane-bound receptor로서 세포증식과 분화를 조절하는 역할을 할 것으로 추측되고 있다

(7). HER2/neu유전자의 증폭은 유방암의 25~30%, 난소암의 26%에서 보고되며(8), 이 유전자의 증폭 및 p185단백질 표현의 증가는 짧은 생존기간, 림프절전이 등의 불량한 예후와 연관된다고 보고되었다(8). 비소세포폐암에서는 약 30%에서 p185단백질의 과표현이 보고되며(9), 선암에서 p185단백질의 과표현이 불량한 예후와 연관된다고 보고되었으나(9) 아직 예후인자로서 유용성은 확실하지 않다. c-fos유전자는 55 kd의 단백질을 생성하여 세포핵 내에서 c-jun유전자의 생성물인 39 kd의 단백질과 복합체(AP-1)를 형성하며(10), AP-1 binding site를 함유하는 DNA element와 특수하게 결합하여 세포유전자의 표현(transcriptional expression)에 영향을 미친다(11). Volm등(12)은 비소세포폐암에서 c-fos 단백질이 과표현되는 경우 나쁜 예후와 연관된다고 보고하였으나 많은 환자를 대상으로한 연구는 거의 없다.

이에 저자들은 비소세포폐암에서 면역조직화학염색을 이용하여 PCNA, c-erbB-2 및 c-fos oncoprotein의 발현 유무를 평가하여, 이들 인자와 비소세포폐암환자의 수술 후 생존기간과의 관련성을 분석하여 비소세포폐암의 근치수술 후 예후인자로서의 유용성 여부를 평가하고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1) 대상

1987년 3월부터 1992년 12월까지 연세의대 세브란스병원에서 원발성 비소세포폐암으로 진단되어 근치적 폐절제술을 시행받고, 수술 후 2개월 이상 생존한 환자 70예를 대상으로 하였다. 폐암

Table 1. Patients characteristics

	Total	PCNA	
		Low expression	High expression
Number	70	32 (45.7%)	38 (54.3%)
Sex (M : F)	52 : 18	24 : 8	29 : 9
Mean age (range)	57 (25~73)	57 (25~71)	58 (25~73)
Histology			
epidermoid	38 (54.3%)	18 (56.3%)	20 (52.6%)
adenoca	23 (32.7%)	10 (31.3%)	13 (34.2%)
large cell	3 (4.3%)	1 (3.1%)	2 (5.3%)
adenosquamous	4 (5.8%)	1 (3.1%)	3 (7.9%)
undifferentiated	2 (2.9%)	2 (6.2%)	0 (0.0%)
Stage			
I	14 (20.0%)	9 (28.1%)	5 (13.2%)
II	15 (21.4%)	5 (15.6%)	10 (26.3%)
IIIa	37 (52.9%)	15 (46.9%)	22 (57.9%)
IIIb	4 (5.7%)	3 (9.4%)	1 (2.6%)

의 조직형 분류는 WHO의 기준을 적용하였고, 해부학적 병기는 American Joint Committee on Cancer Staging의 기준에 의하였으며, 이들의 임상적 특성은 Table 1과 같다.

2) 방법

(1) 증식세포 핵항원(PCNA): PCNA의 표현은 면역조직화학염색법으로 관찰하였으며 방법은 다음과 같다. 폐암 환자의 파라핀 포매 조직을 5 μ m 두께로 절단한 후 알코올로 탈파라핀화 시킨다. 암세포 표면의 비특이성 항체수용체를 제거시키기 위해 1 : 20으로 희석한 blocking antibody 100 μ m를 조직위에 점적한 후 37°C 배양기에서 20분간 배양한다. 배양후 항체용액을 제거하고, 단클론항체(pc10, novocastra, Newcastle, UK) 1 : 100 희석액을 100 μ m 점적한 후 37°C humid chamber에 넣고 30분간 놓아둔다. 이를 Tris buffer (PH 7.6)로 세척하고서 2차항체 peroxidase-conjugated biotinylated antibody (Vector, Burlingame, CA)를 100 μ m씩 점적한 후 37°C humid chamber에 넣고 37°C에서 60분간 놓아둔다. 2차 항체 처리가 끝나면 Tris

buffer로 세척하고 ABC 용액을 2방울씩 조직에 점적한 후 실온에서 30분간 배양하고 다시 Tris buffer로 세척한다. 세척된 슬라이드를 DAB 용액에 담근 후 2~10분간 발색시킨 다음 hematoxylin 염색으로 대조 염색한다.

면역조직화학염색 결과는 병리학자가 임상적 정보를 받지 않은 상태에서 슬라이드를 판독하였으며, 광학현미경하 증배율 시야에서 종양의 괴사가 없는 부위를 선택 검색하여 종양세포의 핵이 전체적으로 갈색으로 염색된 것을 양성으로 판정하였다. PCNA 발현율은 1,000개 세포중 양성으로 염색된 세포의 수를 전체세포에 대한 백분율로 표시하였으며 PCNA 발현율이 10% 이하인 경우 저 PCNA군으로 10% 이상인 경우는 고 PCNA군으로 분류하였다.

(2) c-erbB-2 유전자: 파라핀에 포매된 폐암조직을 이용하여 c-erbB-2 단백질에 대한 면역조직화학염색을 실시하였으며, 음성 대조군으로는 정상 폐조직을 이용하였다. 방법은 폐암조직절편을 58°C에서 1시간 동안 말린 다음 xylene으로 탈파라핀한 후 descending grade (100-70%) ethanol 용액으로 가수화시킨다. 조직절편을 증류수로 5분간 세척한 후 정상혈청과 함께 humid chamber에서 1시간 동안 놓아둔다. 그후 labeled streptoavidin biotin peroxidase (LSAB) kit (DAKO, Carpinteria, California, U.S.A.), 1 : 50으로 희석한 c-erbB-2 단클론항체(Triton, Alameda, California, U.S.A.)를 넣고 슬라이드를 실온에서 2시간 동안 놓아둔다. PBS (phosphate-buffered saline)으로 세척한 후 슬라이드를 biotinylated antimouse immunoglobulin에 30분간 놓아둔 후 다시 PBS로 세척하고 LSAB에 30분간 놓아둔다. 그리고 슬라이드를 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride (Sigma, St.Louis, Mo., U.S.A.); 0.015% hydrogen peroxide를 포함하는 0.5 mg/ml PBS로 염색한다. 그후 슬라이드를 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색한다. 검사결과는 세포막에 양성반응이 있거나 세포질과 세포막에 모두 양성반응이 있는 경우에 양성으로 판독하였으며, 슬라이드 전체가 음성이거나 세포질에만 양성반

응이 있는 경우는 음성으로 판독하였다.

(3) **c-fos 유전자:** c-fos 단클론항체(Triton, Alameda, California, U.S.A.)를 이용하여 c-erbB-2와 같은 방법으로 면역조직화학염색을 시행하였다. 결과판독은 세포핵에 양성반응이 있는 경우 양성으로 판독하였다.

(4) **대상 환자의 임상자료 수집:** 대상 환자의 임상기록을 후향적으로 분석하였으며, 환자의 수술 후의 질병상태, 생존여부와 생존기간 등의 추적관찰은 환자의 의무기록을 확인하였다. 의무기록으로 추적관찰이 불가능한 환자에 대하여는 추적관찰 엽서 및 전화를 이용하여 확인하였다.

(5) **통계처리:** 자료의 통계분석은 student's t test 및 Chi-square test를 이용하였으며, 대상환자의 전체생존율 및 무병생존율은 Kaplan-Meier method를 사용하였고 log-rank test로 유의성을 비교하였다. $p < 0.05$ 일때 유의성을 인정하였다. 구체적인 계산은 SPSS를 활용하였다. 생존기간은 수술일을 기준으로 하여 사망시점까지, 또는 마지막 생존확인시점까지로 하였다.

결 과

1) PCNA 단백질 발현

전체 70예 환자의 PCNA 면역조직화학염색의 발현율은 평균 18.6%였으며, 발현율은 Table 2와 같다. 전체 환자에서 조직형에 따른 PCNA 발현율은 편평상피암 21.5%, 선암 14.5%, 대세포암 12.6%로 통계학적으로 유의한 차이는 없었으며, 병기에 따른 PCNA 발현율은 제 I병기 9.7%, 제 II병기 27.4%, 제 IIIA병기 19.1%, 제 IIIB병기 12.0%으로 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 저 PCNA군은 32예(45.7%), 고 PCNA군은 38예(53.7%)가 분포하였으며 각 군의 성별, 나이, 조직형 및 병기 등의 임상적 특징은 Table 1과 같으며 조직형 및 병기에 따른 유의한 차이는 없었다. 전체중양생존기간은 저 PCNA군 37개월, 고 PCNA군 16개월로 저 PCNA군의 생존기간이 고 PCNA군의 생존기간에 비하여 통계학적으로 유의하게 길었

Table 2. Frequency distribution of PCNA immunoreactivity

PCNA	Number of patients
0~5	27 (38.6%)
5~10	5 (7.1%)
10~20	11 (15.7%)
20~30	8 (11.4%)
30~40	7 (10.0%)
40~50	5 (7.1%)
50~60	3 (4.3%)
60~70	2 (2.9%)
70~80	2 (2.9%)
Total	70 (100%)

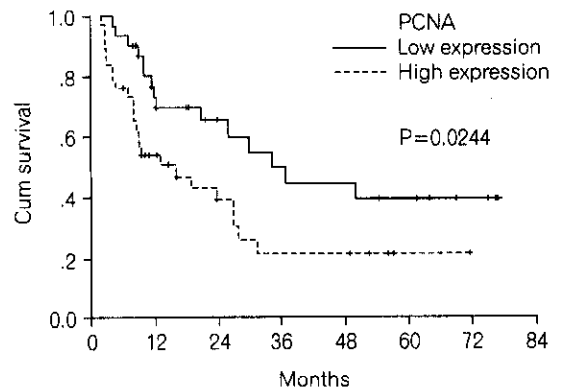


Fig. 1. Overall survival according to PCNA expression (p=0.0244)(Fig. 1).

2) c-erbB-2 단백질 발현

c-erbB-2단백질에 대한 면역조직화학염색은 64예에서 시행하였는데 이중 4예(6.3%)에서 양성이었다. 양성이 관찰된 4예 모두 선암으로, 선암에서 c-erbB-2의 양성률은 17.4%(4/23)이었다. 양성환자의 병기는 제 II기 1예, 제 IIIA기 3예였다. c-erbB-2단백질의 양성인 4예의 생존기간은 각각 24, 18⁺, 10⁺, 3개월, 무병생존기간은 각각 18⁺, 10⁺, 2, 1개월로 음성군의 중앙생존기간 26개월, 중앙무병생존기간은 15개월과 통계적으로 유의한 차이가 없었다(p=0.7706).

3) c-fos 단백질 발현

c-fos단백질에 대한 면역조직화학염색은 51예에서 시행하였으며 이중 1예(1.96%)에서 양성반응이 관찰되었다. 양성반응이 관찰된 1예의 조직형은 편평상피암이었으며, 이 환자의 전체생존기간은 8개월이었다. 양성군의 수가 적어 발현여부에 따른 생존기간의 차이를 분석하기는 불가능하였다.

고 찰

최근 악성종양에서 암유전자의 증폭 및 과표현(13), 종양억제 유전자의 비활성화(13), 암세포의 증식정도(4), DNA ploidy(14), 종양세포막의 항원표현(9) 등이 환자의 예후와 상관관계가 있음이 보고되고 있는데, 이러한 예후인자로 더욱 정확하고 객관적인 예후를 예측하여 예후가 불량한 군에 대하여 적극적인 항암치료를 시행하여 생존율의 향상을 기대할 수 있다. PCNA는 DNA polymerase δ 의 co-factor로서 세포주기 조절에서 핵심적인 역할을 하며, PCNA 면역조직화학염색은 종양조직에서 증식하는 세포를 판별할 수 있으므로 종양의 성장, 즉 악성도를 예측할 수 있다고 보고되었다(5). Fontanini등(5)은 비소세포폐암 40예에서 PCNA 발현율이 0~70% (중양치 15%)였고 PCNA 발현율과 병기, 종양의 크기, 조직형 및 세포의 분열수치(mitotic count)와는 무관하였다고 보고하였다. 반면에 Ishida등(15)은 비소세포폐암에서 PCNA 발현율 5% 이상이 33%였다고 보고하였고, Ogawa등(16)은 제 I 기 비소세포폐암에서 PCNA 발현율 20% 이상이 45%라고 보고하였는데 이는 연구자에 따라 조직보관방법, 면역조직화학염색시에 사용한 항체 및 염색방법, 또는 결과판독의 차이에 기인할 것으로 생각된다. PCNA 발현이 높을수록 환자의 예후는 불량하다는 보고가 많다(5,16,17). 비소세포폐암에서 Ebina등(17)은 PCNA 발현율이 50% 이상 환자군의 생존율이 이하군에 비하여 유의하게 짧았음을 보고하였고, Fontanini등(5)도 PCNA 발현율 25% 이상 환자군

의 생존율이 25% 이하군의 생존기간에 비하여 짧았고 해부학적 병기와 PCNA가 유의한 예후인자였다고 보고하였다. 또한 Ishida등(15)은 비소세포폐암에서 PCNA 발현율이 5% 이상 환자군의 생존기간이 5% 이하 군에 비하여 유의하게 짧았고, PCNA와 AgNOR (Arzytrophilic nucleolar organizing region)이 동시 양성인 경우 동시 음성인 환자군보다 5년생존율이 낮았으며(76% vs 20%), 특히 제 I 기 비소세포폐암에서도 PCNA, AgNOR이 동시 양성인 경우 5년생존율이 18%로 동시 음성군의 71%보다 현저하게 낮았다고 보고하였다. 본 연구결과 PCNA 발현율은 18.6%로 기존의 연구와 유사하였으며 병기나 조직학적 세포형과는 무관함을 보여주었다. 본 연구에서 PCNA 발현율 10%를 기준으로 저발현군과 고발현군으로 나누어 생존기간을 비교해볼 때 저 PCNA군에서 중앙생존기간이 37개월로 고 PCNA군의 16개월에 비하여 유의하게($p=0.0244$) 연장됨을 보여주어 PCNA 발현율이 기존의 해부학적병기 등의 예후인자와 함께 보조적 예후인자로 이용 가능할 것으로 생각된다.

PCNA 면역조직화학염색의 장점으로는 thymidine, BrDU labeling방법보다 세포와 조직의 형태가 유지되고, 방법이 비교적 간단하고 결과를 신속하게 알 수 있으며, 다수의 표본에서 측정하기 쉬우므로 세포의 실제 평균 증식도에 가깝고, 시험관과 생체에서 측정이 가능하다는 점이 있다(5). PCNA 면역조직화학염색에 사용되는 단클론 항체로는 19A2, PC10 등이 있다(5,17). 이들 중 19A2는 포르말린에 불안정한 epitope를 인지하지만, PC10은 포르말린 고정 후에도 보존되는 epitope를 인지하므로 고정된 조직표본에도 이용할 수 있고 종양세포의 증식도와 일치도가 크다고 보고되어(5,17) 저자들은 PC10 항체를 사용하였다. 특히 PC10은 생존결과와 치료실패의 원인을 알고 있는 환자의 표본에 적용할 수 있으므로 후향적인 연구가 가능하다는 장점이 있다(5). 그러나 파라핀조직에서 PCNA염색이 S-phase에만 특이하지 않고 mitotic index, s-phase fraction보다 높을 수 있고 PCNA가 세포의 증식과 정확하게 일

치하지 않을 가능성도 보고되었다(18).

c-erbB-2단백질은 EGFR과 함께 제 1형(EGFR-related) 성장인자 수용체에 속하는데, 이들 수용체는 정상세포의 성장과 종양발생과정에 중요한 역할을 한다(7). 본 연구결과 비소세포폐암에서 c-erbB-2단백질 양성률은 5.7%로 Harpole등(19)의 21%에 비하여 낮았으며 Pastorino등(20)의 4% (선암 6%, 편평상피암 2%)와는 유사하였다. 또한 선암에서의 양성률이 편평상피암에 비하여 높았고, 병기와 발현율과 무관한 점은 다른 보고들(19,20)과 같았다. Kern등(9)은 비소세포폐암중 편평상피암의 5/16, 선암의 10/29에서 p185neu 단백질이 과표현되었고, 선암에서는 p185의 표현이 고령, 짧은 생존기간과 연관관계가 있었고 다변이 생존분석상 해부학적 병기와 p185단백질 표현이 유의한 예후인자였으나, 편평상피암에서는 예후와 무관하였다고 보고하였다. Harpole등(19)도 제 I기 비소세포폐암환자에서 c-erbB-2단백질 표현이 독립적인 예후인자라고 보고하였고, Tateishi등(21)도 폐의 선암에서 HER-2/neu단백질 양성인 경우 5년 생존율이 음성군보다 유의하게 짧았다고(30% vs 50%) 보고하며 선암에서 HER-2/neu 표현이 유용한 예후인자라고 하였다. 그러나 Pastorino등(20)은 cryosection에서 p185 단백질 발현과 비소세포폐암 환자의 수술 후 예후와는 무관하였다고 보고한 바 있어 아직 예후인자로 이용되기는 어려울 것으로 생각된다. 본 연구결과 예후인자의 가능성을 판단하기에는 양성예수가 적었으므로 c-erbB-2 단백질발현과 예후와 상관관계를 규명하기 위하여 다수의 환자를 대상으로 한 추후 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 erbB-2단백질은 혈청(22) 및 비소세포폐암조직(23)에서 측정 가능하고 이 농도가 높을수록 환자의 수술 후 재발률이 높고 생존기간이 짧았다는 보고가 있으므로 수술 후 환자의 재발 진단 및 추후관찰에 이용될 수 있는 가능성도 있겠다.

비소세포폐암에서 c-fos 단백질 양성률은 3~60%로 매우 다양하게 보고되었는데(12,24,25) 본 연구결과 c-fos 양성은 1예로 매우 낮았다. 이 원

인으로는 본 연구에서 면역조직화학염색 시에 단클론항체를 사용한 방법상의 문제점이 있을 가능성을 배제할 수는 없겠으나, Demoly등(24)은 비소세포폐암에서 c-fos 양성률이 34예 중 1예로 매우 낮았다고 보고하였고 비소세포폐암 세포주에서 c-fos mRNA가 증가하지 않았다는 보고(26)도 있으므로 실제 비소세포폐암조직에서 c-fos 단백질의 표현이 증가하지 않았을 수도 있다. c-fos단백질 표현은 나쁜 예후와 관련된다는 보고가 있는데(12) 그 기전으로는 c-fos 단백질양성이 doxorubicin(27) 등에 대한 약제저항성의 유도와 연관될 것으로 보고되었다. Volm등(25)은 편평상피암에서 c-fos 양성률이 60%였고 c-fos 양성군의 중앙생존기간이 92주로 음성군의 260주 이상에 비하여 유의하게 짧았고, 림프선 전이와 독립적으로 강력한 예후인자라고 보고하였다. 그러나 c-fos발현과 예후와 관계에 대하여는 아직 보고가 많지 않으므로 임상적 유용성을 판단하기 위해서는 추후 연구가 필요하다.

결론적으로 PCNA단백질 발현은 기존의 해부학적 병기와 함께 보조적인 예후인자로 이용할 것으로 생각되며 c-erbB-2, c-fos단백질 발현과 예후와 상관관계에 대하여는 다수의 환자를 대상으로 한 추후 연구가 필요하다고 생각된다.

결 론

비소세포폐암 환자에서 PCNA 발현율은 18.6%이었으며 PCNA 발현율 10%를 기준으로 저 PCNA군이 38예, 고 PCNA군이 32예이었으며, 조직형 및 병기에 따른 유의한 차이는 없었다. 생존기간 분석에서 고 PCNA군의 중앙생존기간이 16개월로 저 PCNA군의 중앙생존기간, 37개월에 비하여 유의하게 짧아 수술후 보조적인 예후인자로 이용할 것으로 생각되며 c-erbB-2, c-fos단백질 양성률은 각각 6.3%, 1.96%로 낮아 예후와의 상관관계에 대하여는 다수의 환자를 대상으로 하는 추후연구가 필요하다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Boring CC, Squire TS, Tong T. Cancer statistics. *Ca: A Cancer J Clin* 1994; 44(1): 7-26.
2. Kim IS. Current status of the five major causes of death in Korea. *J Korea Med Assoc* 1995; 38: 132-145.
3. Ginsberg RJ, Kris MG, Armstrong JG. Cancer of the lung. In: Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer; Principle and practice of oncology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, 1993; 673-758.
4. Robbins BA, Vega D, Ogata K, Tan EH, Nakamura RM. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med* 1987; 111: 841-845.
5. Fontanini G, Macchiarini P, Pepe S, Ruggiero A, Hardin M, Bigini D, Vigniti S, Pingitore R, Angeletti CA. The expression of proliferating cell nuclear antigen in paraffin sections of peripheral, node-negative non-small cell lung cancer. *Cancer* 1992; 70: 1520-1527.
6. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 gene: A 185 kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 1986; 232: 1644-1646.
7. Prigent SA, Lemoine NR. The type 1 (EGFR-related) family of growth receptors and their ligands. *Prog Growth Factor Res* 1992; 4: 1-24.
8. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SC, Keith DE, Levin WJ, Stuart SC, Udove J, Ullrich A, Press MF. Studies of the HER-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707-712.
9. Kern JA, Schwartz DA, Nordberg JE, Weiner DB, Greene MI, Torney L, Robinson RA. p185^{neu} expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival. *Cancer Res* 1990; 50: 5184.
10. Verma IM. Protooncogene fos: A multifaceted gene. *Trends Genet* 1986; 2: 93-96.
11. Sassone-Corsi P, Lamph WW, Kamps M, Verma IM. Fos-associated cellular p39 is related to nuclear transcription factor AP-1. *Cell* 1988; 54: 553-563.
12. Volm M, Effert T, Mattern J, Wodrich W. Overexpression of c-fos and c-erbB-1 encoded proteins in squamous cell carcinomas of the lung of smokers. *Internat J Oncol* 1992; 1: 69-71.
13. Kern JA. Dominant oncogenes and tumor suppressor genes in human lung cancer. In: Fishman AP: *Update: Pulmonary diseases and disorders*. New York: McGraw-Hill, 1992: 433.
14. Miyamoto H, Harada M, Isobe H, Akida HD, Haneda H, Yamaguchi E, Kuzumaki N, Kawamaki Y. Prognostic value of nuclear DNA content and expression of the ras oncogene product in lung cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 6346-6350.
15. Ishida T, Kanedo S, Akazawa K, Tateishi M, Sugio K, Sugimachi K. 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.
16. Ogawa J, Tsurumi T, Yamada S, Koide S, Shohts A. Blood vessel invasion and expression of Sialyl Lewis^x and proliferating cell nuclear antigen in stage I non-small cell lung cancer. *Cancer* 1994; 73: 1177-1183.
17. Carey FA, Fabbroni G, Lamb D. Expression of proliferating cell nuclear antigen in lung cancer: A systematic study and correlation with DNA ploidy. *Histopathology* 1992; 20: 499-503.
18. Van Dierendonck JH, Wijsman JH, Keijzer R, Van de Verde CJH, Cornelisse C. Cell cycle related staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. Comparison with BrdUrd labeling and Ki-67 staining. *Am J Pathol* 1991; 138: 1165-1172.
19. Harpole DH, Herndon JE, Wolfe WG, Iglehart D, Mark JR. A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology, and oncoprotein expression. *Cancer Res* 1995; 55: 51-56.
20. Pastorino U, Andreola S, Tagliabue E, Pezzella F, Incarbone M, Sozzi G, Buyse M, Menard S, Pierotti M, Rilke F. Immunohistochemical markers in stage I lung cancer: Relevance to prognosis. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2858-2865.
21. Tateishi M, Ishida T, Mitsudomi T, Kaneko S, Sugimachi K. Prognostic value of c-erbB-2 protein expression in human lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 1991; 27: 1372-1375.
22. Osaki T, Mitsudomi T, Oyama T, Nakanishi R, Kosei Y. Serum level and tissue expression of c-erbB-2 protein in lung adenocarcinoma. *Chest* 1995; 108: 157-162.
23. Diez M, Pollan M, Maestro M, Torres A, Ortega D, Gomea A, Sanchez A, Hernanda A, Balibrea JL. Prediction of recurrence by quantification of p185^{neu}

- protein in non-small cell lung cancer tissue. *Br J Cancer* 1997; 75:684-689.
24. Demoly P, Chanez P, Pujol JL, Gauthier-Rouviere C, Michel FB, Godard P, Bousquet J. Fos immunoreactivity assessment on human normal and pathological bronchial biopsies. *Resp Med* 1995; 89: 329-335.
 25. Volm M, Rittgen W, Drings P. Prognostic value of erbB-1, VEGF, cyclin A, fos, jun and myc inpatients with squamous cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 1998; 77: 663-669.
 26. Goldsmith KT, Litinsky CM, Garver RI. Serum response heterogeneity among non-small cell lung cancer lines. *Am J Pathol* 1991; 139: 939-947.
 27. Volm M, Efferth T, Mattern J. Oncoprotein (c-myc, c-erbB-1, c-erbB-2, c-fos) and supressor gene product (p53) expression in squamous cell carcinomas of the lung. Clinical and biological correlations. *Anticancer Res* 1992; 12: 11-20.