

유방암에서 Bcl-2 및 p53에 대한 면역화학염색의 임상적 연관성

연세대학교 의과대학 ¹외과학교실, ²병리학교실

구 자 윤¹ · 이 회 대¹ · 정 우 회²

Clinicopathological Correlation of Bcl-2 and p53 Immunohistochemistry in Breast Cancer

Ja Yun Koo, M.D.¹, Hy-De Lee, M.D.¹ and Woo-Hee Jung, M.D.²

Department of ¹General Surgery, ²Pathology, Yonsei University College of Medicine

Purpose: Bcl-2 and p53 are known to act as a regulator of apoptosis in breast cancer and we evaluated the significance of these gene expressions and correlation with prognostic factors in breast cancer.

Materials and Methods: In order to investigate the expression of Bcl-2 and p53, we analyzed immunochemistry staining from paraffin blocks in a series of 80 women with breast cancer. Expression was then compared with the established indicators of prognosis.

Results: Bcl-2 positivity was 45% and p53 was 32.2%. No relationships could be observed between bcl-2 and node status, tumor size and also between p53 and node status, differentiation, tumor size. Strong positive relationships were seen between bcl-2 and estrogen receptor(ER)($p < 0.0001$), progesterone receptor(PR)($p < 0.001$). p53 also showed relationships with ER and PR($p < 0.05$) Histologic($p < 0.05$) and nuclear grade($p < 0.05$) showed relationships with bcl-2 but not with p53. Inverse relationship was noted between p53 and ER, PR($p < 0.05$). Inverse relationship was also found between bcl-2 and p53 expression($p < 0.001$).

Conclusion: This study suggest that there may be a possibility that bcl-2 and p53 expressions can affect tumor growth and prognosis in breast cancer patients.

Key Words: Breast cancer, Bcl-2, p53

서 론

유방암은 우리 나라에서도 서구의 경우와 마찬가지로

가지로 지속적인 증가추세를 보여 여성 암의 3위를 차지하고 있다. 유방암의 발생이 복합적 인자에 의해 기인되듯이 그 예후 또한 복잡한 요인들에 관련되어 있다. 임상경과가 환자에 따라 상이한 현상은 여러 암들의 공통된 특징이지만 유방암이 지니는 특성을 여러 각도에서 관찰하면 상당히 많은 예후인자들을 발견할 수 있으며 이러

책임저자 : 이회대, 서울시 강남구 도곡동 146-93,
연세대학교 의과대학 영동세브란스병원, 135-720
접수일 : 1997년 5월 10일, 게재승인일 : 1997년 6월 13일

한 예후인자들의 분류는 생존율 및 재발율의 예측성이라는 장점뿐만 아니라 수술후 추가적인 치료를 결정하는 판단인자로도 적용할 수 있기 때문에 더욱 큰 의미가 있다. 이전의 종양발생에 관한 연구가 세포증식의 이상에 주로 초점을 맞추었으나 최근에는 세포의 사망에 관한 조절 이상이 암 발생에 중요한 역할을 하는 것중의 하나로 인식되고 있다. 이러한 개념은 Bcl-2(B cell leukemia and lymphoma) gene의 발견으로 입증되고 있다(1,2). 실제로 Bcl-2발현 종양은 호르몬 치료로 큰 효과를 보지만 유방암의 경우는 좋은 예후를 가져오는 요인들, 즉 low mitotic count, low level expression of epidermal growth factor receptor, 높은 등급의 조직학적 분화도, p53 단백질의 결핍과 연관되어 나타나며 Bcl-2양성종양이 음성인 경우보다 상대적으로 단기에후가 좋은 편이다(3). 또한 p53 유전자는 종양억제유전자이며 17번염색체의 단원에 위치하는데 이들은 서로 암발생과정에 상관관계를 가질 것으로 생각된다(4,5).

유방암환자에서의 apoptosis의 억제인자인 Bcl-2와 종양억제인자인 p53과의 연관관계를 규명하고 다른 다양한 예후인자와의 연관성을 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1) 재 료

연세대학교 의과대학 영동세브란스병원에서 1995년부터 1996년까지 유방암으로 유방절제술을 시행한 환자 중 Bcl-2와 p53의 면역조직화학 염색에 필요한 파라핀 블록 보존이 양호하고 조직의 양이 충분한 각각 55명과 53명을 대상으로 하였다.

2) 방 법

(1) 임상기록검토: 환자들의 진단시 연령, 수술 방법, 폐경여부, 에스트로겐과 프로게스테론수용체의 발현 등을 조사하였다.

(2) 병리조직학적 검색: 10% 중성 포르말린에 고정 후 파라핀에 포매하여 보관된 블록을 연속

절편하여 hematoxylin-eosin염색을 시행한 후 조직학적 분류는 변형된 세계보건기구(World health organization)분류에 따르고 핵등급 및 조직학적등급은 Bloom and Richardson numerical scoring system에 따라 분류하였다(6).

(3) Bcl-2의 면역조직학적 검색: 각 예의 조직표본 중 조직학적 분류형을 대표할만한 블록을 2개 이상 선택하여 4 μ m두께로 연속 절편하였다. 이 절편을 xylene(2 \times 15 minutes)에서 파라핀을 제거한 후 0.05 mol/L Tris-buffered saline(TBS)을 pH 7.40 to 7.60 through a graded ethanol series (3 \times 5 minutes in each solution). TBS(3 \times 5 minutes)에서 washing후 슬라이드는 10 mM sodium citrate buffer at pH 6.0에 넣어 microwave oven at 650W (2 \times 5 minutes)에서 가열한 후 상온에서 20분간 두었다. TBS(3 \times)와 ascending alcohol series에서 세척 후 endogenous peroxidase(0.3% H₂O₂ \times 30 minutes)로 하였다. 다시 descending alcohol series를 통해 TBS로 옮긴 후 avidin-biotin complex method로 염색하였다. Normal horse serum(Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA)로 slides를 배양하여 비특수염색을 제거한 후 슬라이드를 primary mouse MAbs for Bcl-2(clone 124, DAKO) diluted in 1 : 80와 함께 BSA 에서 4°C로 밤새 배양하였다. Horse biotinylated antimouse IgG in 2% BSA 를 상온에서 30분간 절편에 첨가한 후 streptavidin-peroxidase conjugate(Vector Laboratories)와 함께 상온에서 30분간 배양, 3,3'-diaminobenzidine(Polyscience Inc., Warrington, PA)로 5분간 염색하였다. 모든 배양은 humidified chamber에서 시행하였다. 마지막으로 slight Mayer hematoxylin counterstain을 시행 후 dehydration 및 mounting을 시행하였다. Primary antibodies를 첨가하지 않은 절편을 2% BSA in TBS로 처리하여 negative control로 삼았다. Follicular lymphoma의 절편을 Bcl-2에 대한 positive control로 삼았다. 추가로 정상 유방조직을 Bcl-2에 대한 monoclonal antibody로 염색하였다. 모든 슬라이드는 임상결과나 병리 조직적 자료를 모르는 상태에서 면역염색에 대한 평가를 하였다.

Fig. 1. Breast carcinoma cells with a positive cytoplasmic staining for Bcl-2, $\times 400$ magnification.

Fig. 2. Breast carcinoma cells with a positive nuclear staining for p53, $\times 400$ magnification.

Bcl-2에 대한 염색은 다음과 같이 4단계로 분류하여 10% 이상의 cytoplasmic staining을 보이는 경우를 양성으로 하였다(Fig. 1).

- ①: no staining
- ①: slight staining in lower than 10% of cells
- ②: moderately strong staining in more than 10%

③: strong staining in almost all cells

(4) p53 발현의 면역조직화학적염색: 각 예의 조직 표본 중 조직학적 분류형을 대표할만한 블록을 2개 이상 선택하여 4 μm 두께로 연속 절편하였다. p53의 면역조직화학적염색은 mouse anti-human cellular phosphoprotein p53(ZYMED)를 이용하였다.

파라핀을 제거한 조직절편을 mouse anti-p53을 antibody diluent에서 1 : 50으로 희석한후 실온에서 30분간, 4°C에서 밤새 배양한 후 면역반응의 결과를 보기 위하여 Avidin conjugated alkaline phosphatase로 40°C에서 15분간 biotin-avidin 특이결합을 유도하고 색소신호증강액(pH 9.0 0.1 M Tris 완충액)으로 30초간 3회 처리한후 hematoxylin으로 대조염색하였다.

p53에 대한 면역조직학적염색은 5%미만의 염색도를 보이면 음성으로 처리하였고 5%이상의 경우에만 양성으로 처리하였다(Fig. 2).

(5) 통계처리: 수집된 자료는 SPSS 통계프로그램을 이용하여 개인용 컴퓨터로 분석하였다. Bcl-2 및 p-53의 발현유무에 따른 여러 예후인자와의 연관성은 chi-square test를 이용하여 비교하였다.

결 과

Bcl-2의 경우는 53예중 24예에서 양성반응을 보여 45%의 검출률을 나타내었다.

Estrogen receptor와는 Bcl-2의 경우는 강력한 연관관계를 보였는데($p < 0.0001$) estrogen receptor 양성인 경우 Bcl-2 양성률이 높은 것으로 나왔으며 progesterone receptor의 경우도 연관성을 보였다($p < 0.001$). 반면 종괴의 크기나 임파선전이여부는 Bcl-2의 발현과 연관성을 보이지 않았다. 조직학적 등급 및 핵등급에서 Bcl-2는 연관성을 보였다($p < 0.05$).

그 결과 p53의 양성도는 전체 56예중 18예에서 양성반응을 보여 32.2%의 검출률을 나타내었다.

Table 1. 유방암에서 Bcl-2 및 p53 발현과 임상적, 병리적 연관성

		Bcl-2 발현		p53 발현	
		양성	음성	양성	음성
핵등급	1, 2	15	9	7	8
	3	6	15	19	14
		$p < 0.05$		NS	
조직학 등급	1, 2	16	8	7	8
	3	3	15	19	11
		$p < 0.05$		NS	
림프관 침범	양성	22	3	1	2
	음성		25	15	33
		NS		NS	
림프절 전이	0개	14	14	11	18
	1~ 3	6	3	1	9
	4~ 9	1	5	1	5
	10	2	7	5	5
		NS		NS	
PR	양성	18	7	5	22
	음성	6	21	13	15
		$P < 0.001$		$p < 0.01$	
ER	양성	20	6	3	24
	음성	4	22	15	13
		$P < 0.0001$		$p < 0.05$	
종괴크기	<2 cm	7	4	9	3
	2~5 cm	16	19	12	25
	> cm	1	6	3	4
		NS		NS	

Table 2. 유방암에서 Bcl-2와 p53발현의 연관성

Bcl-2 발현	p53 발현	
	양성	음성
양 성	2	22
음 성	15	14

p=0.00076

p53은 핵등급 및 조직학적등급과는 연관성이 없었고 림프절전이여부 및 종괴의 크기와도 연관성이 없었으나 estrogen receptor 및 progesterone receptor와는 역관계를 보여 각각의 호르몬 수용체 양성의 경우 p53의 음성이 많아지는 경향을 보였다. Bcl-2의 발현과 p53의 발현은 역관계를 보였는데($p < 0.05$) Bcl-2의 양성군은 p53 음성으로 나타났고 Bcl-2 음성의 경우 p53 양성이 많아지는 역관계를 보였으며 통계학적으로도 의의가 있었다($p < 0.05$)(Table 1, 2).

고 찰

Bcl-2 gene은 B cell leukemia와 non-Hodgkin's follicular lymphoma에도 자주 보이는 t(14;18) chromosome translocation을 연구하던 중 1984년에 보고되었다(1,2). Bcl-2유전자는 apoptosis(programmed cell death)를 억제하는 26 KD integral membrane 종양 단백을 encode 하는 것으로 알려져 있으며 악성 림프종에서 처음 발견된 이래 다수의 종양에서 발현되고 있음이 밝혀졌다(7,8). 면역조직화학적 Bcl-2의 검출은 많은 상피성 암에서 보고되고 있는데 nasopharynx cancer(80%), 유방암(75%), 전립선암(76%)에서 고농도의 발현을 보인다(3,9,10). Bcl-2는 cell death suppressor로 작용하며 변형된 gene expression이 세포증식에는 영향없이 세포생존을 향상시킬 수 있다(11). 본 연구에서는 53예의 검사중 23예에서 Bcl-2에 대한 면역조직화학 염색에서 양성반응을 보여 45%의 양성률이 관찰되었는데 대부분의 연구에서 유방암에

서는 Bcl-2 양성률이 40~60%인 것과 유사한 결과이다. 또한 유방암조직주위의 정상유방조직에서는 강한 양성반응을 보였다.

p53은 53-kDa의 단백질로 SV40 transformed cell에서 분리되었는데(12) 유방암에서는 대개 15~50%에서 양성률을 보인다(13~16). p53에는 wild type 과 mutant type이 존재한다. Wild type p53은 세포증식과정중 G1에서 S phase로의 전환시 check point로 작용하여 apoptosis로의 진행여부를 결정한다(17,18). 또한 정상세포에서는 p53 단백질의 면역화학반응이 없으나 종양에서는 돌연변이형의 p53 유전자가 발현되어 p53이 높게 나타난다(19~21). 본 연구에서 p53은 32.2%(56예중 18예)에서 양성반응을 보였다.

Bcl-2와 p53의 연관성은 유방암세포주에서 두 protein간의 역관계설정인데 이는 p53에 의하여 Bcl-2가 down regulation 될 것이라는 가설이 나왔고(22) 이후 유방암에서 Bcl-2와 p53는 역관계로 결과가 발표되었다(5,23,24). 본연구에서도 Bcl-2 양성인 경우는 p53 양성이 2예, Bcl-2음성인 경우는 p53양성이 22예로 강한 역관계를 보였으나 Bcl-2음성의 경우는 p53양성이 15예, p53음성이 14예로 약간의 차이를 보였다.

저자들의 연구에서도 Bcl-2는 histologic grade 및 nuclear grade와도 연관관계를 보여 cell differentiation과 연관성이 있다는 가설과 일치점을 찾을 수 있다(25). Bcl-2 reactivity는 well differentiated tumor에서 더욱 우세한 것으로 보아 Bcl-2의 존재는 종양의 진행과정을 down regulation 하여 분화도의 상실을 감소시킬 수 있음을 시사한다(3,29). 이 가설은 ER 음성 Bcl-2음성, poor histological grade인 경우에서 뒷받침해주고 있는데 이러한 종양의 경우 Bcl-2의 apoptosis 억제가 요구되지 않는 경우로 호르몬과 무관한 증식인자에 의해 반응할 것이다(29). 그러나 Bcl-2가 다양한 분화능력으로 분화 및 발생에 많은 영향을 주지만 bcl-2 knockout mice에서 상피분화와 발생이 진행되는 점으로 볼 때 bcl-2 gene family를 포함한 다양한 유전자가 연관됨을 추측할 수 있다(26).

Bhargava등은 Bcl-2 발현과 호르몬수용체 양성 은 강력한 연관관계를 보이는데 ER positive는 96%, ER과 PR 모두 양성인 경우는 87.5%의 발현을 보였고 Bcl-2 음성의 경우는 93%가 ER과 PR 모두 음성인 경우였다. 이렇게 Bcl-2와 estrogen receptor와의 연관성은 많이 보고되었는데 둘다 높은 발현을 보이는 경우 hormonal treatment 에 반응이 좋은 것으로 알려져 있다(27,28). 이상의 결과에서 Bcl-2 발현이 유방암의 호르몬조절과 연관 가능성이 있다는 가설을 뒷받침해 주고 있다.

대부분의 연구에서 p53은 Ki-67 고발현, estrogen receptor의 결핍등과 연관되고(30) high tumor grade와도 강한 연관관계를 가지는 것으로 알려져 있다(16). p53은 대부분의 암에서 변형이 있을 경우 더욱 공격적인 양상을 가지고 조기전이 많으며 5년생존율이 낮은 것으로 알려져 있다. 특히 유방암에서도 p53의 과다발현이 예후가 좋지 않은 것으로 알려져 있다(24,31,32). 그러나 저자들의 경우 p53은 histologic grade 및 nuclear grade와 연관성이 없고 hormonal receptor와는 연관있는 것으로 나왔다. p53은 항암제나 ionizing radiation에 의한 DNA 손상시 유발되는 programmed cell death의 작용을 일으키는데(33,34) 정상 p53의 기능이 정지되면 세포사망에 대한 저항력이 증가하고 항암제와 ionizing radiation에 대한 감수성의 감소를 유발시킬 수 있다. 여기에서 p53의 검사로 항암제 및 방사선치료에 대한 반응도를 예측하는 연구가 진행중인데 p53돌연변이가 없으면 항암치료에 잘 반응하고 만일 돌연변이가 있으면 항암제의 독성을 피하면서 고용량화학요법 등의 대상으로 삼는 참고가 될 수도 있을 것이다(35).

Silversterini등은 림프절 전이가 없는 유방암의 경우 Bcl-2와 p53가 역관계를 유지하며 주로 p53에 연관되어 생존을 및 재발률의 예후인자로서의 역할을 하지만, 림프절전이가 있는 경우는 Bcl-2와의 연관성이 줄어들어 p53의 과발현이 5년생존율 및 재발률의 감소를 가져오고 이때 Bcl-2의 영향은 약화된다고 하였다. 또한 재발 고위험군에서는 p53의 과발현이 progesterone 수용체의 결핍

과 동반되고 재발 위험이 낮은 군에서는 Bcl-2의 과발현이 PR의 발현이나 낮은수준의 Thymidine labelling index와 동반되어 나타난다고 하였다(24,36).

세포수의 증가가 종양의 가장 특징적 소견으로 이는 세포증식의 증가나 세포사망의 감소 혹은 둘다에 기인한다. 이전의 종양발생(oncogenesis)에 관한 연구도 세포증식의 이상에 주로 초점을 맞추었으나 세포의 사망과 생존에 관한 조절의 이상이 같은 의미를 갖는 것으로 인식되고 있다.

이상에서 Bcl2와 p53은 각각 재발 고위험군 및 저위험군의 예측인자로의 가능성이 높으며 특히 항암치료제의 적합군 및 새로운 치료법의 대상선정을 위한 기준으로의 가능성이 있다고 할 수 있다. 어떤 표지자(marker)가 임상에서 기본검사로 쓰이려면 여러 기관에서 이 방법을 사용하여야 하며 예후의 좋고 나쁨을 결정할 수 있는 기준치를 여러 결과에서 결정하여야 하는데 다른 예후인자에 대한 한 예후인자의 가치를 다변량분석을 통해 규명하여야 하고 생존율 및 무병생존율의 통계학적인 차이가 적당한 크기의 환자군에서 전향적 연구를 통하여 규명되어야 한다. Thymidine labeling index(TLI), S-phase fraction(SPF)나 ploidy 등 새로운 예후 인자 중 어느 것도 이러한 criteria에 충족되는 것이 없어 이 인자들을 부적절하게 사용하게되면 실제보다 예후가 나쁜 것으로 판단하여 부적절한 치료를 하게 되거나 환자의 고통을 가중시킬 수가 있다. 이러한 측면에서 Bcl-2와 p53의 연관관계의 규명은 여러 다양한 상황에서 의 예후인자 및 치료반응 예측인자의 확립에 기여하리라 기대된다.

결 론

유방암에서 Bcl-2는 에스트로겐수용체 및 프로게스테론수용체와 강한 연관관계를 보여($p < 0.001$) hormonal regulation의 과정에 관여함을 추측할 수 있고, 핵등급 및 조직학적 등급은 Bcl-2와는 연관성을 보여($p < 0.05$) tumor differentiation에도 연

관성이 있음을 알수있었으나 p53은 연관성이 없었다($p < 0.05$).

또한 종양의 크기 및 림프절 전이여부는 bcl-2 와 p53 모두 연관관계를 보이지 않았으나 이 두 유전인자가 역상관관계를 보이면서($p < 0.05$) hormonal regulation에 관여하는 점은 이들의 상호관계의 규명이 유방암의 발암기전 및 호르몬치료에서의 역할을 이해하는데 기여하리라 본다.

참 고 문 헌

1. Yunis JJ, Oken MM, Kaplan ME, Ensrud KM, Howe RR. Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1982; 307: 1231-1236.
2. Tsujimoto Y, Finger IR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14, 18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226: 1097- 1099.
3. Joensuu H, Pylkkanen L, Toikkanen S. Bcl-2 protein expression and long term survival in breast cancer. *Am J Pathol* 1994; 145: 1191-1198
4. Hurlimann J, Larrinaga B, Vala DL. bcl-2 protein in invasive ductal carcinomas. *Virchows Archiv* 1995; 426: 163-8.
5. Miller C, Monhandas T, Wolf D, Prokocimer M, rotter V, Koeffler HP. Human p53 localized to short arm of chromosome 17. *Nature* 1986; 319: 783-784.
6. Bloom HJG, Richardson WW. Historical grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1957; 11: 358-377.
7. Korsmayer SJ. Bcl-2: an antidote to programmed cell death. *Cancer Surveys* 1992; 15: 105-118.
8. Hockenbery DM. The Bcl-2 oncogene and apoptosis. *Semin Immunol* 1992; 4: 413-420.
9. Lu QL, Elia E, Lucas S, Thomas JA. Bcl-2 proto-oncogene expression in Epstein-Barr virus associated nasopharyngeal carcinoma *Int J Cancer* 1993; 53: 29-35.
10. Colombel M, Symmans F, Gil S, O'Toole KM, Chopin D, Benson M, Olsson CA, Korsmeyer S, Buttyan R. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein Bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancer. *Am J Pathol* 1993; 143: 390-400.
11. Reed JC, Tsujimoto Y, Alpers JD, Croce CM, Nowell PC. Regulation of Bcl-2 proto-oncogene expression during normal human lymphocyte proliferation. *Science* 1987; 236: 1295-1299.
12. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261-263.
13. Coles C, Condie A, Chetty U, Steel CM, Evans HJ, Prosser J. p53 mutations in breast cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 5291-8.
14. Elledge RM, Fuqua SAW, Clark GM, Pujol P, Allred DC. The role and prognostic significance of p53 gene alterations in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 27: 95-102.
15. Sjogren S, Mats Inganas M, Norberg T, Lindgren A, Nordgren H, Holmberg L, Bergh J. The p53 gene in breast cancer: Prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 173- 82.
16. Ostrowski J, Sawan A, Wright HC, Hennessy HC, Lennard TJW, Angus B, Horne HW. p53 expression in human cancer related to survival and prognostic factors: an immunohistochemical study. *J Pathol* 1991; 164: 75-81.
17. Vogelstein B, Kinzler KW. P53 function and dysfunction. *Cell* 1992; 70: 523-526.
18. Marx J: How p53 suppresses cell growth. *Science* 1993; 262: 1644-1645.
19. Cattoretti G, Rilke France, Andreola S, D'Amato L, Delia D. p53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 1988; 41: 178-183.
20. Banks L, Matlashewski G, Crawford L. Isolation of human-p53 specific monoclonal antibodies and their use in the studies of human p53 expression. *Eur J Biochem* 1986; 159: 529-534.
21. Bartek J, Bartkova J, Vojtesek B, Staskova Z, Rejthar A, Kovarik J, Lane DP. Patterns of expression of the p53 tumour suppressor in human breast tissues and tumours in situ and in vitro. *Int J Cancer* 1990; 46: 839-844.
22. Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croce CM. Down regulation of bcl-2 y p53 in breast cancer cells. *Cancer Res* 1994; 54: 2095- 2097.
23. Gorczyca W, Markiewski M, Kram A, Tuziak T, Domagala W: Immunohistochemical analysis of bcl-2 and p53 expression in breast carcinomas: their correlation with Ki-67 growth fraction. *Virch Archiv* 1995; 426: 229-233.
24. Silvestrini R, Benini E, Veronesi S, Daidone MG, Tomasic G, Squicciarini P, Salvadori B. p53 and bcl-2 expression correlates with clinical outcome in a series

- of node-positive breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1604-1610.
25. Lu PJ, Lu QL, Rughetti A, Taylor-Papadimitriou J. bcl-2 overexpression inhibits cell death and promotes the morphogenesis, but not tumorigenesis of human mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 1995; 129: 1363-1378.
 26. Boise LM, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB. bcl-x, bcl2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; 74: 597-608.
 27. Gee JMW, Robertson JFR, Ellis IO. Immunocytochemical localization of bcl-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. *Int J Cancer* 1994; 59: 619-628.
 28. Leek RD, Kaklamanis K, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. bcl-2 in normal breast carcinoma, association with estrogen receptor positive, epidermal growth factor receptor negative tumours and in situ cancer. *Brit J Cancer* 1994; 69: 135-139.
 29. Bhargava V, Kell DI, Rijn MVD, Earnke RA. Bcl-2 immunoreactivity in breast carcinoma correlates with hormone receptor positivity. *Am J Pathol* 1994; 145: 535-540.
 30. Cattoretti G, Rilke F, Andreola S, D'Amato L, Delia D. p53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 1988; 41: 178-183.
 31. Mazars R, Spinardi L, BenCheikh M, Simony-Lafontaine J, Jeanteu P, Theillet C. p53 mutations occurs in aggressive breast cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 3918-3923.
 32. Iwaya K, Tsuda H, Hiraide H, Tamaki K, Tamakuma S, Fukutomi T, Mukai K, Hirohashi S. Nuclear p53 immunoreaction associated with prognosis with prognosis of breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 1991; 82: 835-840.
 33. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; 74: 957-967.
 34. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993; 362: 847-849.
 35. Chang F, Syrjanen S, Syrjanen K. Implications of the p53 tumor suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol* 1995; 3: 1009-1022.
 36. Silvestrini R, Veroni S, Daidone MG, Benini E, Boracchi P, Mezzetti M, DiFronzo G, Rilke F, Veronesi U. The Bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer in patients *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 499-504.