Journal of Korean Cancer
Association 27, 1, February, 1995

사람 위암세포에서 c-erbB-2 단백의 발현에 따른 자연살해세포의 세포독작용의 변화

이화여자대학교 의과대학 외과학교실 및 연세대학교 의과대학 외과학교실*

박병우 · 심강섭 · 노성훈* · 김충배* · 이경식*

= **Abstract** =

Natural Killer(NK) Cell Cytotoxicity According to the Expression of c-erbB-2 Protein in Human Gastric Cancer Cells

Byeong Woo Park, M.D., **Kang Sup Shim**, M.D., **Sung Hoon Noh**, M.D.
Choong Bai Kim, M.D. and **Kyong Sik Lee**, M.D.*

Departments of Surgery, Ewha Womans University College of Medicine
**Department of Surgery, Yonsei University College of Medicine*

Although there is still controversy to the relationship between c-erbB-2 protein expression and prognosis of the gastric carcinoma, there were many reports about the poor prognosis with the expression of c-erbB-2 in gastric carcinoma.

The mechanisms underlying this phenomenon are not known. However several possibilities such as acquired resistance to 5-Fluorouracil(5-FU) and resistance to the host immune system were suggested.

So we performed this study to evaluate whether c-erbB-2 expression can alter the natural killer(NK) cell cytotoxic activity.

Using single cell suspensions from primary gastric cancer tissues and malignant ascites due to stomach cancer, the immunohistochemical reactivity to c-cerB-2 protein was examined and we performed the tests for NK cell cytotoxic activity.

The c-erbB-2(+) cancer cells were significantly more resistant to NK cell cytotoxic activity than c-erbB-2(—) cancer cells. However there was no significant difference in the resistance to NK cell cytotoxic activity according to their immunohistochemical staining intensities.

These results suggest that the resistance to the NK cell cytotoxicity may be one of the possible mechanisms of the poorer prognosis of the c-erbB-2(+) gastric cancers.

Key Words: c-erbB-2 protein, Gastric cancer cell, NK cell cytotoxicity

서 론

사람의 암유전자 c-erbB-2는 원래 ethylnitrosourea에 의해 유도된 쥐의 신경아세포종(neuroblastoma)에서 발견된 transforming gene인 neu의 상응 암유전자[1]로 17번째 유전자의 장완(17q21)에 위치해 있다[2]. 이 유전자의 mRNA는 4.8 Kilobase이며 유전자산물은 tyrosine kinase family인 분자량 185,000 dalton의 당단백[1,3]으로 알려져 있고, 상피성장인자수용체(epidermal growth factor receptor; EGFR)와 구조적 유사성을 가지고 있어[4,5] 수용체와 같은 기능을 할 것으로 추측되고 있으나 아직 ligand에 대한 정보가 불충분하여 확실히 밝혀져

있지 않다.

유방암과 난소암의 경우 c-erbB-2 유전자의 과표현이 있는 환자의 예후가 불량하다[6~8]. 위암에서는 c-erbB-2 단백의 발현과 예후와의 상관성에 대해서는 아직까지 논란이 많으나 불량한 예후와 관련이 있다는 보고[9,10]가 많다.

c-erbB-2 유전자의 증폭에 의해 불량한 예후를 초래하는 기전은 아직 밝혀지지 않았으나 전이능 및 재발의 증가 뿐만 아니라 5-Fluorouracil에 대한 내성획득[11], 숙주의 면역방어능에 대한 저항성[12~14]등이 부분적으로 보고된 바 있다.

사람의 자연살해(natural killer; NK) 세포는 말초혈액 림프구의 10~15%를 차지하고, 형태학적으로는 대과립성림프구(large granular lymphocyte)이며[16], 기능적으로는 선행된 감작없이 또 대조직적합복합체(major histocompatibility complex; MHC)의 제한없이 표적세포 살해능을 가진 것으로 정의된다[17]. 이러한 NK세포의 생체내 기능은 종양세포의 파괴, 바이러스감염에 대한 저항, 조혈기능의 조절등으로 특히 숙주의 종양에 대한 면역감시(immunosurveillance)에 관여하는 주작동세포의 기능을 가지고 있다[17,18].

이와 같이 종양에 대한 숙주의 면역방어능의 중요성과 특히 NK세포의 역할은 인정되고 있으나 위암세포에서 c-erbB-2 단백 발현에 따른 NK세포 감수성에 미치는 영향에 대한 연구는 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 c-erbB-2 단백의 발현에 따른 숙주의 면역방ㅁㅇ어능에 대한 감수성의 변화를 조사하고자 비특이적 항종양 주효 세포인 NK세포의 c-erbB-2 단백 발현군과 비발현군에 대한 세포독성능을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

대상환자는 1993년 5월 1일부터 1994년 4월 30일까지 1년간 연세대학교 의과대학 세브란스병원에서 위암으로 진단받고 개복하여 근치적 혹은 고식적 위절제술을 시행한 환자중 순차적으로 선정된 133명과 같은 기간중 위암으로 인한 악성복수를 동반한 환자 17명으로부터 종양세포를 분리하여 c-erbB-2 단백 발현군 20예와 비발현군 20예를 대상으로 하였다.

1) 종양세포의 분리

종양세포는 수술로 확진된 위선암중 1 cm^3 이상의 종양조직을 채취할 수 있는 진행성 위선암 환자의 암세포와 조기위암 환자의 암세포 및 악성복수를 동반한 암종증 환자의 복수에서 분리된 위선암세포를 사용하였다. 요약하면 위선암 치료를 위해 절제된 위(stomach)조직으로부터 괴사된 조직, 지방조직 및 정상조직을 제거한 종양조직을 1 cm^3이상 무균적으로 채취하여 물리적 처치 및 효소 처치하여 단일 세포부유물(single cell suspension)을 얻어 사용하였다. 즉 종양조직을 400U/ml의 penicilin(Hazleton Biologic Inc., Denver, PA, U.S.A)와 400 μg/ml의 streptomycin(Hazleton Biologic Inc., Denver, PA, U.S.A)이 함유된 기본배지(RPMI1640, Hazelton Biologics Inc., Denver, PA, U.S.A)에 넣고 유리 petri dish에서 수술용 칼(#11)을 사용하여 1 mm^3정도 크기로 잘게 분쇄하여 효소 처리하였다. 효소 처리는 기본배지에 0.01% hyaluronidase type V(1500U/g, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, U.S.A), 0.1% collagenase type IV(163-230U/g, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, U.S.A) 및 0.002% deoxyribonuclease(100U/g, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, U.S.A)와 함께 37℃에서 16시간 동안 mechanical stirring으로 분해시킨 후 steel mesh(100um)를 통해 여과하고 칼슘과 마그네슘이 들어있지 않은 기본배지로 2회 세척한 후 ficoll-hypaque gradient(1.077g/ml; Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, U.S.A)와 부유물을 1 : 1 비율로 900g에서 30분간 원침하여 얻어진 세포를 기본배지로 3회 세척한 다음 trypan blue를 이용하여 세포의 생존여부를 확인한 후 일부는 면역조직화학 염색법으로 c-erbB-2 단백의 발현정도를 관찰하였고 나머지는 7일 내지 30일간 단기배양하여 NK세포 세포독성능 측정에 사용하였다. 또한 악성복수천자에 의해 채취된 삼출액은 heparin(50IU/ml)이 처리된 시험관에 무균적으로 채취하여 500g에서 10분간 원심분리한 후 ficoll-hypaque gradient를 사용하여 위와 같은 방법으로 세포를 분리한 후 종양조직에서 얻어진 세포와 동일한 검사를 시행하였다.

2) 면역조직화학적 염색법

Avidin-Biotin system법에 의해 ABC kit (DAKO Japan Co, Ltd. Kyoto, Japan)를 사용하여 시행하였으며, 이때 사용하는 단일클론항체는 사람의 c-erbB-2 단백에 대한 생쥐(mouse) 항체(mAB1 monoclonal Ab, Triton, CA, U.S.A)를 사용하였다. slide 표면에 graded alcohol(70%, 85%, 90%, 95%, 100%, 10분)을 사용하여 세포를 부착시킨 후, 암세포 표면의 비특이적 항체 수용체를 제거시키기 위해 kit내의 blocking 항체액 100 μl를 점적한 후 wet gauze를 도포한 humid chamber에 넣고 상온에서 30분간 반응시켰다. 반응시킨 slide는 세척하지 않고 기울여서 과다한 항체용액을 제거한 후 단클론항체 1:40 희석액을 100 μl 점적하였다. 일차항체를 점적한 slide를 다시 humid chamber에 넣고 상온에서 1시간 반응시킨 후 Ca^{++}과 Mg^{++}이 들어있지 않은 인산완충액(phosphate buffer solution; P.B.S, pH 7.6, JRH Bioscines, Kansas, U.S.A)에 각각 10분씩 3회 세척한후 2차항체를 부착시켰다. 2차항체로 peroxidase conjugated biotinylated antibody를 100 μl씩 점적한 후 humid chamber에 넣고 상온에서 30분간 반응시켰다. 이동안 ABC working solution을 5 ml의 P.B.S에 kit내의 reagent A, B를 각기 2방울씩 첨가한 후 충분히 혼합하여 만들었다. 2차항체 반응이 끝나면 P.B.S로 10분씩 3회 세척하고 ABC용액을 2방울씩 slide에 점적하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 역시 P.B.S로 10분간 3회 세척하였다. 끝으로 substrate와 발색제를 통과하여야 하므로 10 ml Tris/Cl buffer에 10 mg의 3'-3'-diaminobenzidine(DAB) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A)을 용해시키고 3% H_2O_2 80 μl를 첨가하여 빛을 차단하기 위하여 은박지로 싸두었다. 최종 세척이 끝난 slide를 DAB용액에 담근 후 2~10분간 발색반응을 보면서, 수시로 현미경하에서 갈색의 색소침착이 일어나는가를 관찰하여 양성대조군 slide에서 반응이 관찰되면 중단하였다. 이후 P.B.S로 10분, 증류수로 10분간 세척하고 공기중에서 건조시킨 후 hematoxyline 염색으로 counter staining하였다. 음성반응 대조군 slide는 동일한 세포주 slide에 1차항체만 점적하지 않고 나머지 모든 과정을 동일하게 시행하여 c-erbB-2 음성반응세포인 MDA-MB-231(human breast adenocarcinoma cell line, ATCC HTB 26)을 사용하였고 양성반응 대조군 slide는 양성반응 세포주인 SK-BR-3(human breast adenocarcinoma cell line, ATCC HTB 30)을 사용하여 비교하였다.

염색정도의 분류는 Tsuda등[19]의 분류와 장등[20]의 방법을 참고로 하여 광학현미경 관찰로 세포막 표면에 분명히 갈색으로 반응되고 50% 이상의 암세포에 염색된 경우는 +++ positive, 50% 미만의 암세포에 염색된 경우는 ++ positive로 분류하였으며 + positive는 갈색반응이 희미하고 세포막과 세포질 염색이 비교적 분명하지 않은 경우로 하였다.

3) NK세포의 독성능 검사

표준 표적세포(target cell)로 K562세포(Human Chronic Myelogenous Leukemia, ATCC CCl 243)와 위암환자에서 분리된 세포를 사용하여 4시간 및 18시간 ^{51}Cr 방출법으로 %세포독성(% cytotoxicity)을 측정하였다. 요약하면 주효세포(effector cell)인 정상성인의 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell; PBMC) 및 표적세포인 위암세포를 trypan blue 색소배제법으로 검사하여 살아 있는 세포가 95% 이상임을 확인한 후 10^6개의 표적세포에 0.01mCi/ml의 $Na_2{}^{51}CrO_4$(New England Nuclear, Boston, MA, U.S.A) 10 ml(100 μCi)를 첨가하여 37℃ 수조에서 1시간 반 동안 표지화(labelling)시키고 3회 세척하였다. 주효세포는 실험시마다 정상성인(2명의 동일한 공여자)의 정맥혈을 채취하여 세포배양용 배지인 RPMI 1640(Hazelton Biologics Inc., Denver, PA, U.S.A)으로 1:1 희석시킨 후, 1:1 비율의 ficoll-hypaque에 의한 비중변화도 원침법(density gradient centrifugation 500g, 30분)으로 단핵구를 분리하여 세포배양용 배지에 3회 세척하여 사용하였다.

주효세포: 표적세포(effector cell<E>: target cell(<T> ratio)를 12.5:1, 25:1 및 50:1의 세가지로 되도록 주효세포와 10^4개의 표적세포를 배양액에 넣어 각각 0.1 ml로 맞추고 96well round-bottomed microtiter plate(Corning, NY, U.S.A)에 함께 넣어 5% CO_2, 37℃에서 4시간과 18시간 배양

한 후 400 g에서 원심분리하여 상층액 0.05 ml을 채취하여 gamma counter(Packard Instrument Inc. IL, U.S.A)로 방사능량을 측정하였다. 이때 자연방출(spontaneous release)을 측정하기 위해서 주효세포가 들어 있지 않은 배양액만을 사용하였고 최대방출(maximal release)을 일으키기 위해서 0.25% Triton X-100(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A)을 사용하였으며, 자연방출이 15% 이상인 경우는 결과에서 제외하였다. % cytotoxicity는 다음의 공식으로 계산하였으며 모든 실험은 각 검체당 3well에 중복시행(triplicate)하여 그 평균값을 취하였다.

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{\text{experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{maximal release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

4) 통계학적 분석

수집된 자료는 unpaired student's t test를 이용하여 분석하였다.

결　　과

원발병소 및 악성복수에서 분리된 각각 20예의 c-erbB-2 단백 발현 세포와 비발현 세포에 대한 NK세포 독성능을 관찰한 결과 반응시간(4시간 및 18시간) 및 주효세포와 표적세포 비(12.5 : 1, 25 : 1, 50 : 1)에 관계없이 c-erbB-2 단백 발현군에서 NK세포에 대한 감수성이 유의하게($p<0.01$) 낮았다(Fig. 1, 2).

그러나 c-erbB-2 단백 발현군내에서 발현강도(+, ++, +++)에 따른 NK세포 독작용에 대한 감수성 차이는 없었다(Table 1, 2).

Table 1. The effect of staining intensities of c-erbB-2 protein on the NK cell cytotoxicity in gastric cancer cells#: results after 4 hours of incubation time

Stain Intensity	12.5 : 1*	25 : 1	50 : 1
+ (11)	−3.24±10.68	−1.86±9.32	−0.15±6.80
++ (4)	1.76±2.42	1.71±3.20	−4.45±11.82
+++ (5)	0.11±2.88	−4.45±11.82	−0.03±6.02
P$	>0.3	>0.3	>0.2

; % cytotoxicity, Values are mean±SD.
( ); number of tested samples
* ; effector cell: target cell ratio
$; P value by unpaired student's t-test

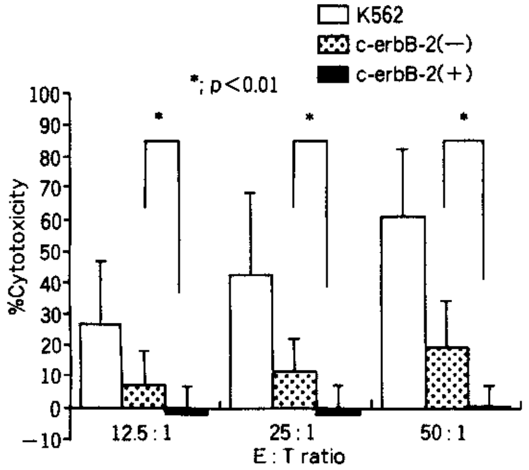

Fig. 1. The effect of c-erbB-2 protein expression on the NK cell cytotoxicity in gastric cancer cells: results after 4 hours of incubation time (The number of each group is 20.).

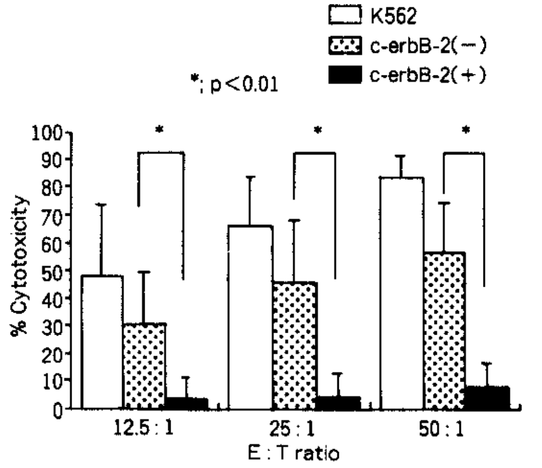

Fig. 2. The effect of c-erbB-2 protein expression on the NK cell cytotoxicity in gastric cancer cells: results after 18 hours of incubation time(The number of each group is 20.).

Table 2. The effect of staining intensities of *c*-erbB-2 protein on the NK cell cytotoxicity in gastric cancer cells#: results after 18 hours of incubation time

Stain Intensity	12.5 : 1*	25 : 1	50 : 1
+ (11)	2.23±4.60	6.75±6.48	8.81±8.20
++ (4)	3.16±9.41	−3.35±13.13	4.75±11.66
+++(5)	2.64±9.36	2.98±8.17	5.04±8.91
P$	>0.7	0.3	0.4

; % cytotoxicity, Values are mean±SD.
( ) ; number of tested samples
* ; effector cell: target cell ratio
$; P value by unpaired student's t-test

고 찰

c-erbB-2 유전자의 과표현에 의해 불량한 예후를 초래하게 되는 기전은 아직 밝혀지지 않았으나 전이능 및 재발의 증가 뿐 아니라 5-FU에 대한 내성획득, 숙주의 면역방어능에 대한 저항성 등이 보고되고 있다[11]. c-erbB-2 유전자 과표현시 Tumor Necrosis Factor(TNF)에 대한 저항성이 나타나는 현상은 유방암과 난소암 세포주의 계대배양시에도 관찰되었고[12~14] c-erbB-2 유전자가 과표현된 유방암과 난소암세포들은 Lymphokine Activated Killer(LAK) 세포의 세포독성능에 대한 저항성이 있음도 보고[15]된 바 있다. 즉 사람의 종양세포에 c-erbB-2 단백이 발현된 경우 숙주의 여러가지 세포독성기전에 저항을 유도함으로써 종양생장을 촉진시키는 것으로 생각된다.

이렇게 암유전자에 의해 변형된 세포에서 면역체계의 세포독작용 기전에 대한 저항성의 획득은 초기 종양세포가 숙주의 면역감시를 피하는 중요한 수단이 될 수 있다[21].

NK세포는 형태학적으로 대과립성 림프구(large granular lymphocyte)이고 표현형과 기능적으로 불균일(heterogenous)하다[16].

NK세포는 바이러스감염에 방어적 기능을 하고 동종골수이식 또는 동종장기이식의 거부반응에 관여하며 암종에 대한 면역감시기전에 관계하여 종양세포의 전이를 억제하는 기능을 하리라 생각된다[22]. 실험적으로 NK세포 활성도를 낮춘 생쥐나 쥐에서는 종양세포의 전신적 전이가 증가한다[23]. 사람에서도 가족적 유방암[24] 또는 악성흑색종[25] 환자의 가족, 친자같은 암의 고위험군에서 NK세포 세포독성능은 치료후 재발의 예견인자적 가치가 있다[26]고 하였다.

Lichtenstein등[27]은 세포주를 이용한 실험에서 c-erbB-2 발현 세포주군이 비발현 세포주군에 비해 현저히 NK세포 독작용에 대한 감수성이 낮았다고 하였고, 연세의대 암연구소의 고 등(미출판자료)은 c-erbB-2 유전자 증폭이 있는 유방암세포주(YCI-G-1, YCI-G-2)와 증폭이 없는 암세포주(YCI-G-3, YCI-G-8)를 이용한 실험에서 c-erbB-2 유전자 증폭이 없는 암세포주에서 유의하게 NK세포에 대한 감수성이 높았고 이 세포주에 c-erbB-2 유전자를 전이(transfection)시키면 NK세포에 대한 감수성이 현저히 감소하여 NK세포 세포독성능에 저항성을 보인다고 하였다.

본 연구에서는 c-erbB-2 단백발현에 따른 NK세포에 대한 감수성의 변화가 NK세포에 대한 저항성때문이 아니라 단순히 종양세포의 세포융해 운동성의 완만성(slower kinetics of lysis)때문일 가능성을 배제하기 위해 ^{51}Cr 방출법에 의한 NK세포 독작용에 실험을 4시간 및 18시간 반응시켜 시행하였다. c-erbB-2(+)군(20예)과 c-erbB-2(−)군(20예)의 NK세포에 대한 감수성을 비교할 때 4시간 및 18시간 반응 후 결과 모두 c-erbB-2(+) 세포군에서 유의한($p<0.01$) NK세포 독작용에 대한 감수성의 저하를 관찰하였다. 그러나 c-erbB-2 단백 발현강도(종양세포의 면역조직화학 염색의 강도)의 차이에 따라서는 NK세포 독작용에 대한 감수성의 차이는 없었다. 따라서 c-erbB-2 단백의 발현은 종양세포의 NK세포 세포독성능에 저항성을 보이는 요인으로 작용하는 것으로 추정되고 이것이 c-erbB-2 단백 발현에 따른 종양의 과격성 및 불량한 예후의 한 기전일 수 있다고 생각된다.

즉 종양세포에 c-erbB-2 유전자가 증폭되는 경우 숙주의 세포독성기전에 저항을 유도함으로써 종양세포 증식에 도움을 주는 것으로 생각되는데 Hudziak등[12] 및 Lichtenstein등[14]도 이러한 가능성을 보고하고 있다.

이러한 암유전자의 발현에 따른 NK세포 독작용에

대한 저항성의 기전은 첫째, 암유전자의 과표현에 따른 TNF에 대한 내성을 획득하고[12] 이와 관련된 대식세포[28]와 자연 세포독성세포(natural cytotoxic cells)[29]에 대해 내성을 초래함으로써 가능하다. 둘째, NK세포는 multidrug resistance 유전자인 mdr1의 속성이 표현되고 이 유전자같은 활성을 보이는데 실험적으로 이 다발성 약제내성을 역전시킴으로써 NK세포 독작용을 억제시킬 수 있다. 즉 MDR 활성도를 역전시키는 약제 −verapamil, cyclosporin A, chloroquine, solutol-HS15−는 양적 비례관계를 가지고 NK세포 독작용을 억제시킨다[30]. 따라서 c-erbB-2 단백이 발현된 종양세포는 이러한 속성의 물질을 분비함으로써 NK세포 독작용에 저항하는 가능성도 있다고 생각된다. 세째, NK세포는 종양표적세포에 대해 MHC-비제한적(non-MHC restricted) 세포독성능을 가진다고 알려져 왔으나[17], 이 NK세포 역시 특수 인지(specific recognition)에 의해 작용한다고 알려지고 있다[31]. NK세포에 대한 감수성을 결정짓는 표적구조에 대해서는 별로 알려진 바 없으나 몇몇 분자들(molecules)이 NK세포 인지와 살해에 관계있다[32,33]고 한다. 즉 암유전자의 발현으로 종양세포의 표면 항원의 변화가 초래됨으로써 NK세포에 대한 감수성의 변화가 나타날 수 있는 것이 세번째 가능성이라 하겠다. 따라서 향후 이러한 기전에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

이상의 결과를 볼 때 위암 세포에 c-erbB-2 유전자 단백의 발현에 따라 종양의 과격한 생물학적 특성과 불량한 예후를 초래하는 기전의 하나는 위암세포에 c-erbB-2단백 발현이 숙주의 NK세포에 대한 감수성의 저하를 유발함으로써 이루어진다고 사료된다.

참 고 문 헌

1) Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, Weinberg RA: *The neu oncogene: an erbB-related gene encoding a 185,000-Mr tumor antigen. Nature* ***312:*** *513, 1984*

2) Fukushige S, Matsubara K, Yoshida M, Sasaki M, suzuki T, Semba K, Toyoshima K, Yamamoto T: *Localization of a vovel v-erbB-related gene, c-erbB2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line. Mol Cell Biol* ***6:*** *955, 1986*

3) Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA: *The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. Nature* ***319:*** *226, 1986*

4) Coussens L, Yang-Feng TL. Liao YC, Cheu E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, Levinson A, Ullrich A: *Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. Science* ***230:*** *1132, 1985*

5) Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, Saito T, Toyoshima K: *Similarity of protein encoded by the human c-erbB2 gene to epidermal growth factor receptor. Nature* ***319:*** *230, 1986*

6) Slamon DJ, Clark GM. Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL; Human breast cancer: *Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science* ***235:*** *177, 1987*

7) Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA: *Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science* ***244:*** *707, 1989*

8) Wright C, Angus B, Nicholson S, Sainbury RC, Cahirns J, Gullick WJ, Kelly P, Harris AL, Wilson Horne CH: *Expression of c-erbB2 oncoprotein: a prognostic indicator in breast cancer. Cancer Res* ***49:*** *2087, 1989*

9) Yonemura Y, Ninomiya I, Yamaguchi A, fushida S, KImura H, Ohoyama S, Miyazaki I, Endou Y, Tanaka M, Sasaki T: *Evaluation of immunoreactivity for c-erbB2 protein as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer. Cancer Res* ***51:*** *1034, 1991*

10) Uchino S, Tsuda H, Maruyama K, Kinoshita T, Sasako M, Saito T, Kobayashi M, Hirohashi S: *Overexpression of c-erbB=2 protein in gastric cancer. Cancer* ***72:*** *3179, 1993*

11) Lippman ME, Weisenthal LM, Paik SM, Nagourney RA, Kern DH: *erbB-2 positive specimens form previously-untreated breast cancer patients have in vitro durg resistance profiles which resemble profiles of specimens obtained from patients who have previously failed combination chemotherapy. Proc ASCO* ***9:*** *88, 1990*

12) Hudziak RM, Lewis GD, Shalaby MF, Essalu TE,

Aggarwal BB, Ullrich A, Shepard HM: *Amplified expression of the HER2/ERBB@ oncogene induces resistance to tumor necrosis factor in NIH 3T3 cells. Proc Natl Acad Sci USA* ***85:*** *5102, 1988*

13) Shepard HM, Lewis GD: *Resistance of tumor cells to tumor necrosis factor. J Clin Immunol* ***8:*** *333, 1988*

14) Lichtenstein A, Berenson J, Gera JF, Waldburger K, Martinez-Maga O, Berek JS: *Resistance of human ovarian cancer cells to tumor necrosis factor and lymphokine-activated diller cells; Correlation with expression of HER2/neu oncogenes. Cancer Res* ***50:*** *7364, 1990*

15) Lichtenstein A, Fady C, Gera JF, Garduer A, Kelly D, Berenson J, Campbell V: *Resistance of HER2/neu over-expressing tumor lines to lymphocyte cytotoxicity. Proc ASCO* ***10:*** *1394, 1991*

16) Timonen T, Ortaldo JR, Hererman RB: *Characterization of human large granular lymphocytes and their relationship to natural killer and K cells. J Exp Med* ***153:*** *569, 1981*

17) Trinchieri G: *Biology of natural killer cells. Adv Immunol* ***47:*** *187, 1989*

18) Herberman RB, Ortaldo JR: *Natural killer cells: Their role in defense against disease. Science* ***214:*** *24, 1981*

19) Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, Tanaka Y, Hirota T, Tsugane s, Shiraishi M, Toyoshima K, Yamamoto T, Terada M, Sugimura T: *Immunohistochemical study overexpression of c-erbB-2 protein in human breast cancer: Its correlation with gene amplification and long-term survival of patients. Jpn J Cancer Res* ***81:*** *327, 1990*

20) 장우익, 양우익, 이종인, 김현수, 조미연, 박종구, 심영학: 위암에서 *c-erbB-2 protein, epidemal growth factor receptor protein overexpression* 및 *proliferating cell nuclear antigen expression*의 면역 조직화학검사의 의의. 원주의대 논문집 *5: 125, 1992*

21) Robertson MJ, Caligiuri MA, Manley TJ, Levine H, Ritz J: *Human natural killer cell adhesion molecules, Differential expression after activation and participation in cytolysis. J Immunol* ***145:*** *3194, 1990*

22) Ortaldo JR, Sharrow SO, Timonen T, Herberman RB: *Determination of surface antigens on highly purified human NK cells by flow cytometry with monoclonal antibodies. J Immunol* ***127:*** *2401, 1981*

23) Barlozzari T, Reynolds CW, Herberman RB: *In vivo role of natural killer cells: Involvement of large granular lymphocytes in the clearance of tumor cells in anti-asialo GM1-treated rats. J Immunol* ***131:*** *1024, 1983*

24) Strayer DR, Carter WA, Mayberry SD, Pequignot E, Brodsky I: *Low natural cytotoxicity of peripheral blood mononuclear cells in individuals with high familial incidences of cancer. Cancer Res* ***44:*** *370, 1984*

25) Hersey P, Edwards A, Honeyman M, McCarthy WH: *Low natural killer cell activity in familial melanoma patients and their relatives. Br J Cancer* ***40:*** *113, 1979*

26) Tarter PI, Steinberg B, Barron DM, Martinelli G: *The prognostic significance of natural killer cytotoxicity in patients with colorectal cancer. Arch Surg* ***122:*** *1264, 1987*

27) Lichtenstein A, Fady C, Gera JF, Gardner A, Chazin VR, Kelley D, Berenson J: *Effects of B2 microglobulin anti-sense oligonucleotides on sensitivity of HER2/neu oncogene-expressing and nonexpressing target cells to lymphocyte-mediated lysis. Cellular Immunol* ***141:*** *219, 1992*

28) Urban JL, Shepard HM, Rothstein JL, Sugarman BJ, Schreiber H: *Tumor necrosis factor: A potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. Proc Natl Acad Sci USA* ***83:*** *5233, 1986*

29) Patek PQ, Lin Y, Collins JL: *Natural cytotoxic cells and tumor necrosis factor activate similar lytic mechanisms. J Immunol* ***138:*** *1641, 1987*

30) Markham PN, Coon JS, Chong ASF, Gebel HM: *Natural killer cell cytotoxicity and the multidrug resistance gene. Tansplantation Proceedings* ***25(1):*** *96, 1993*

31) Ciccone E, Viale O, Pende D, Malnati M, Biassoni R, Melioli G, Moretta A, Long EO, Moretta L: *Specific lysis of allogeneic cells after activation of CD3 lymphocytes in mixed lymphocyte culture. J Exp Med* ***168:*** *2403, 1988*

32) Ando I, Hoon DSB, Suzuki Y, Saxton RE, Golub SH, Irie RF: *Ganglioside GM2 on the K562 cell line is recognized as a target structure by human natural killer cells. Int J Cancer* ***40:*** *12, 1987*

33) Hiserodt JC, Laybourn KA, Varani J: *Laminin inhibits the recognition of tumor target cells by murine natural killer(NK) and natural cytotoxic(NC) lymphocytes. Am J Pathol* ***121:*** *148, 1985*