림프절 전이가 없는 결직장암에서 p27^{kip1}의 예후인자로서의 역할

인제대학교 의과대학 상계백병원 외과학교실, ¹병리학교실

송상현 · 배병노 · 이우용 · 양근호 · 김기환 · 한세환 · 김홍주 · 김영덕 · 김홍용 · 김정연¹

Prognostic Significance of p27^{kip1} Expression in Node Negative Colorectal Carcinoma

서 론

Sang Hyun Song, M.D., Byung Noe Bae, M.D., Woo Yong Lee, M.D., Keun Ho Yang, M.D., Ki Hwan Kim, M.D., Se Hwan Han, M.D., Hong Ju Kim, M.D., Young Duk Kim, M.D., Hong Yong Kim, M.D., Jung Yeon Kim, M.D.¹

Departments of Surgery, ¹Pathology, Sanggye Paik Hospital, Inje University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Dukes' A & B colorectal cancer patients are often excluded from adjuvant chemotherapy following potentially curative surgery because they are expected to have good long-term survival. However, actually 20~30% of these patients suffer from recurrent disease, so it would be helpful for these patients of recurrent disease to be able to select a high risk group. **Methods:** In 78 Dukes' A & B colorectal cancers, we investigated by immunohistochemistry the role of molecular markers, such as p27^{kip1}, p53, Ki-67, and Skp2, in identifying high-risk patients. **Results:** Patients with low p27^{kip1} expression showed poor overall survival compared to those with high p27^{kip1} expressions (55.3 versus 66.7 months, P=0.018). The only significant factor associated with p27^{kip1} expression was p53 expression. The low p27^{kip1} expression and positive p53 expression group had poor overall survival (54.3 months, P=0.036). **Conclusions:** In a node-negative colorectal carcinoma, the molecular marker p27^{kip1} does not play an independent prognostic role, but it may have prognostic significance in correlation with other markers such as p53, Ki-67, and Skp2. The assessment of molecular alterations may be useful to node-negative colorectal patients in identifying the high risk group that may benefit from adjuvant chemotherapy. J Korean Soc Coloproctol 2007;23:34-40

Key Words: Colorectal cancer, p27^{kip1}, Skp2, Prognosis
결직장암, p27^{kip1}, Skp2, 예후

대장암은 과거 서양에 비해 발생 정도가 낮았으나 1980년대 이후 식생활의 서구화 등으로 인해 그 발생이 꾸준히 증가되어 현재 암 사망률 4위의 종양이며 국내 전체 암 발생의 11.2%를 차지하며 계속 발생률이 증가 추세에 있다.¹ 최근 수술 수기의 발달과 방사선치료와 항암치료 등의 보조적 치료 요법의 발달로 생존율이 많이 향상되었음에도 불구하고 재발률이 30~40% 정도로 높은 편이며 이 경우 근치적 절제율도 매우 낮고 예후도 좋지 않다. 림프절 전이가 없는 대장암인 경우 근치적 수술만으로도 좋은 예후를 기대하기 때문에 보조적 항암치료를 고려하지 않는 경우가 많다.^{2,3} 그러나 이러한 대장암인 경우에도 20~30% 정도에서 재발하므로 전통적인 병기 분류만으로는 수술 후 치료 계획을 세우는 것은 한계가 있다. 따라서 재발의 위험 및 악성도와 연관된 새로운 예후 인자를 파악하여 림프절 전이가 없는 대장암인 경우에도 고위험군에 속할 경우 보조적 항암치료를 사용하는 것이 도움이 될 것으로 생각된다. 이러한 관점에서 최근에 종양의 형성 및 성장과 암종의 침윤에 관여하는 다양한 종양표지자에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.⁴

세포분열 주기의 변화는 성장조절 경로의 변화를 일으켜 종양성 전환의 원인이 되며, cyclin dependent kinase (CDK) 억제자로 불리는 많은 종류의 단백질이 cyclin-CDK 복합체에 결합하여 이것을 불활성화시킴으로써 세포주기 진행의 억제를 유도하는 것으로 밝혀졌다. 그 중에서 특히 p27^{kip1}은 세포 분열과정에서

접수: 2006년 11월 13일, 승인: 2007년 1월 5일
책임저자: 배병노, 137-707, 서울시 노원구 상계 7동 761-1
상계백병원 외과
Tel: 02-950-1017, Fax: 02-3391-4393
E-mail: bnbae@dreamwiz.com
본 논문은 2003년 인제대학교 학술연구 조성비 보조에 의한 것임.

Received November 13, 2006, Accepted January 5, 2007
Correspondence to: Byung Noe Bae, Department of Surgery, Sanggye Paik Hospital, 761-1, Sanggye 7-dong, Nowon-gu, Seoul 137-707, Korea.
Tel: +82-2-950-1017, Fax: +82-2-3391-4393
E-mail bnbae@dreamwiz.com

G1 단계에서 S 단계로의 조절에 관여하며 종양의 악성도를 결정하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. p27^{kip1}의 발현 감소는 대장암을 포함한 여러 암종에서 암의 악성도와 연관이 있으며 생존율이 낮은 것으로 보고되고 있다.⁵

p53 유전자는 인체 유전자의 17번 염색체의 단완에 위치하고 있으며, 정상에서는 세포의 증식과 전이를 억제하는 종양 억제 유전자로 작용한다. p53 종양 억제 유전자의 돌연변이는 세포분열과정 중 자연고사(apoptosis) 조절과정의 소실로 종양 발생기전의 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 모든 대장암 환자의 약 70%에서 발현된다.⁶ S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2)는 F-box 단백질이며 특히 p27^{kip1}과 결합하여 분해시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 최근 몇몇 연구에서 악성도가 높은 p27^{kip1} 저발현 대장암군에서 Skp2 발현과의 연관성이 통계학적으로 유의한 것으로 보고하고 있다.⁷ Ki-67은 현재 널리 사용되고 있는 세포 증식지표로서 세포 분열주기 중 G0 단계를 제외한 모든 단계에서 세포의 핵에서 발현되며 종양의 재발, 병기 그리고 악성도와 연관이 있는 것으로 보고하고 있다.⁸

본 저자는 림프절 전이가 없는 결직장암(colorectal cancer, Dukes' A & B)의 조직을 대상으로 p27^{kip1}이 예후에 미치는 영향을 알아보고자 본 연구를 시행하였다. 임상적 특징과 p53, Ki-67 및 Skp2 등이 p27^{kip1}과 어떤 연관성이 있는지, 또 그들이 예후에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

방 법

1) 대상

1993년 1월부터 1997년 12월까지 인제대학교 부속 상계백병원에서 결직장암으로 수술 받은 환자 중 림프절 전이가 없는 결직장암 환자를 대상으로 후향적 연구를 하였다. 이들 중 임상 기록 및 병리학적 기록을 조사하였고 6개월 이상 추적관찰이 가능하였던 78예를 선정하여 분석하였다. 임상소견을 살펴보면 남녀 구성은 남자 46명(59%), 여자 32명(41%)이었고, 중간 연령은 62세(23~86세)이었다. 수술 당시 Dukes' 병기 A가 10예, 병기 B가 68예였고 중간 추적기간은 41.9개월(7~74.5개월)이었다.

2) 면역조직화학염색

제작된 블록을 4 μ m 두께의 절편으로 만들어 xylene

으로 탈 파라핀시킨 후 점차적으로 낮은 농도의 알코올로 함수시켰다. 그런 다음 0.01 M citrate buffer (pH 6.0)에 넣고 가압증기멸균기(autoclave)에서 120°C로 15분간 가열하여 항원성을 증가시켰다. 내인성 peroxidase 활성을 제거하기 위해 20분간 3% hydrogen peroxide로 처리한 후 phosphate buffered saline (PBS) 완충액으로 5분간 세척하였다. 그 후 비 특이 항체 반응을 제거하기 위해 정상 토끼 혈청을 포함한 PBS에 20분간 방치한 후 이 슬라이드를 ABC kit (Vector ABC Elete kit, Berlingame, CA)를 이용하여 염색하였는데, 먼저 1 : 100으로 희석한 일차항체를 떨어뜨려 1시간 30분 동안 반응시켰고 이어서 biotinylated anti-mouse IgG (Vector)와 Avidin-peroxidase complex (Vector)로 처리하여 이차항체염색 및 표지항체염색을 하였다. 이후 0.01% diaminobenzidine으로 발색하였으며 Harris hematoxyline으로 대조염색을 하였다. 염색에 사용한 일차항체는 antihuman p53 protein (monoclonal, DAKO, Glostrup, Denmark), p27^{kip1} (monoclonal, DAKO, Glostrup, Denmark), Ki-67 (monoclonal, Dinona, Seoul, Korea), Skp2 (monoclonal, Zymed, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였다.

종양 억제 유전자인 p53은 돌연변이형을 사용하였다. 양성 대조군으로 p53, Ki-67, Skp2에 대해서는 양성 이 확인된 종양조직을, p27^{kip1}에 대해서는 정상 대장 상피조직을 사용하였으며, 음성 대조군은 염색 때 일차항체 대신 PBS를 사용하였고 나머지 모든 과정은 동일하게 하였다.

3) 판정

각 항체에 대한 면역조직화학염색의 결과는 핵에 갈색의 과립상이 중등도 이상으로 염색되는 세포를 양성으로 판정하였고, microarray slide 전체를 판독하였다. Ki-67의 결과는 갈색으로 염색된 핵을 양성으로 간주하여, 염색된 핵의 수를 평균 내어 백분율로 환산하고 이를 Ki-67 labeling index로 기록하였다. Ki-67의 과발현 여부를 구분하는 기준은 각 연구자마다 상이하 여 본 연구에서는 10% 이상을 양성, 10% 미만을 음성으로 하였다. p53과 p27^{kip1}의 면역조직화학염색 판정은 핵이 갈색으로 염색되는 발현이 p53은 10% 이상인 경우 양성, 10% 이하인 경우 음성으로 판정하였고, p27^{kip1}은 다른 여러 연구에서 판정기준이 5~50%로 다양하였으나 최근의 다른 연구에서처럼 중간값인 15%를 기준으로 하였다(Fig. 1). Skp2는 15% 이상인 경우 과발현, 15% 미만인 경우를 저발현군으로 나누었다.

Fig. 1. Immunohistochemical staining of p27^{kip1} in colorectal cancer. (A) Positive staining of p27^{kip1} (×200), (B) negative staining of p27^{kip1} (×200).

Fig. 2. Cumulative survival associated with expression of p27^{kip1}. Low expression of p27^{kip1} has poorer cumulative survival than high expression group (P=0.009).

모든 조직은 두 명의 병리학자들에 의해 판정되었으며, 모든 항체는 두 번의 면역조직화학염색을 시행하여 평균값으로 분석하였다.

4) 통계

결직장암에서 p27^{kip1}의 발현 여부와 여러 임상병리적 인자들 간에 연관성을 알아보기 위하여 카이 제곱 검사를 시행하였다. 생존율과 관계된 지표는 Kaplan-Meier 방법을 사용하고 Log rank 검사로 비교 분석하였다. 각각의 방법은 유의수준을 0.05 미만으로 하였다.

결 과

1) p27^{kip1}의 발현 양상

면역조직화학 염색을 이용한 p27^{kip1}의 발현 정도를 본 결과 15% 이하인 저발현군이 32예(41%), 15% 이상인 과발현군이 46예(59%)였다. 병기별 발현정도의 빈도는 통계적으로 차이가 없었다. 상관관계 분석 결과 p53의 발현 정도만이 p27^{kip1}의 발현과 유의한 차이(P=0.001)를 보였다.

2) p27^{kip1}의 발현 정도와 생존기간 및 재발과의 관계(Fig. 2)

전체 생존기간은 저발현군에서 53.6개월, 과발현군에서 66.7개월로 발현 정도가 낮을수록 유의하게 예후가 안 좋은 것으로 나타났다(P=0.009). 전체 78명의 환자 중에서 10명의 환자가 추적기간 동안 재발하였고 p27^{kip1} 저발현군에서 5명, 과발현군에서 5명이었다. 각각의 군 사이에는 통계학적 유의성이 없었지만(P=0.732) p27^{kip1} 저발현군에서 15.6%로 과발현군 10.9%보다 약간 높은 경향이 있었다.

3) p27^{kip1}의 발현 정도에 따른 p53, Ki-67 그리고 Skp2 사이의 상관관계

p27^{kip1} 저발현 및 p53 과발현군에서 가장 낮은 생존기간을 나타냈다(Fig. 3). 또한 Ki-67 발현 정도와 p27^{kip1} 발현 정도 사이에도 생존기간과 유의한 상관관계가 있었고, p27^{kip1} 저발현 및 Ki-67 과발현군에서 가장 낮

Fig. 3. Cumulative survival associated with p27^{kip1} and p53 expression. The group of low expression of p27^{kip1} and overexpression of p53 has poor cumulative survival ($P=0.074$).

Fig. 5. Cumulative survival associated with p27^{kip1} and Skp2 expression. The group of low expression of p27^{kip1} and high expression of Skp2 has poor cumulative survival ($P=0.029$).

Fig. 4. Cumulative survival associated with p27^{kip1} and Ki-67 expression. The group of low expression of p27^{kip1} and high expression of Ki-67 has poor cumulative survival ($P=0.099$).

Fig. 6. Cumulative survival associated with p27^{kip1}, Ki-67 and Skp2 expression. The subgroup that low expression of p27^{kip1}, low expression of Ki-67 and high expression of Skp2 has poor cumulative survival ($P=0.025$).

은 생존기간을 나타내었다(Fig. 4). p27^{kip1} 발현과 Skp2 발현 정도는 통계학적으로 유의하지는 않았으나 전체 생존기간 측면에서는 p27^{kip1}의 발현이 낮으면서 Skp2 발현이 높은 군에서 가장 낮은 생존율을 나타냈으며 통계학적으로 유의하였다(Fig. 5). p27^{kip1}, Ki-67 그리고 Skp2의 발현 정도에 따라 각각 8개의 하위 그룹으로 나누어 생존율을 분석한 결과 p27^{kip1} 저발현, Ki-67 저발현, 그리고 Skp2 과발현인 군에서 가장 생존율이 낮았으며 통계학적으로 유의하였다(Fig. 6).

고 찰

분자 생물학적 영역에서 세포 주기 단계를 조절하는

몇몇 인자의 이상이 인간의 결직장암을 포함한 여러 종양에서 관찰되고 있다. 하지만 결직장암에서 이러한 인자들이 예후에 미치는 영향에 대해서는 아직 논란의 여지가 있다. 여러 연구에 의하면 p27^{kip1} 발현이 낮은 결직장암에서 안 좋은 예후를 나타낸다고 하였다.^{5,9-14} Zhang과 Sun¹⁵은 조기 결직장암인 경우에만 예후와 관련이 있으며, Manne 등¹⁶은 stage III인 경우에만 관계가 있는 것으로 보고한 연구도 있었다. 본 연구에서는 림프절 전이가 없는 결직장암인 경우에 p27^{kip1}의 발현이 생존율과 유일하게 통계학적으로 유의한 관계에 있는 것으로 나타났다.

이와 같이 결과에 서로 차이가 있는 이유는 명확하지 않다. 연구에 사용한 항체가 서로 다르고 또한

p27^{kip1}의 발현이 세포 핵 내에서만 염색된 것과 세포질 내에서 염색된 것을 포함한 경우도 있어 고발현 및 저발현을 구분하는 척도가 서로 다르기 때문일 가능성이 높다. 또한 우측 결장암 환자에서 p27^{kip1}의 발현이 더 낮다고 보고하기도 하였고,¹⁴ Gunther 등¹⁷은 직장암인 경우에 p27^{kip1}의 과발현이 안 좋은 예후를 보인다고 보고하였다.

본 연구에서는 종양의 위치에 관계없이 림프절 전이가 없는 환자만을 대상으로 하였다. p27^{kip1}의 발현과 연관하여 다른 인자들의 발현을 분석해 보았을 때 p53의 발현만이 관계가 있음을 나타내었다(P=0.001). 이는 p27^{kip1}이 세포주기의 G1 단계에서 S 단계로의 진행 과정에 작용하여 세포 분열을 휴지기 상태로 만들어 종양형성을 억제하며, 돌연변이형 p53도 종양형성주기의 초기 단계에 작용하는 것으로 알려져 있어 두 인자들이 작용하는 단계가 서로 비슷하기 때문에 각각의 발현에 연관이 있는 것으로 생각된다.⁶

결직장암에서 p53의 역할은 많이 연구가 되었지만 아직 임상에서 예후를 예측하는 측면에서는 논란 중이다. Allegra 등⁵은 Dukes' 병기 B, C 대장암 환자에서는 p53이 예후와 연관이 있는 것으로 보고하였고, Gervaz 등¹⁸도 p53유전자의 돌연변이가 안 좋은 예후와 연관이 있다고 보고하였다. 그러나 Petersen 등¹⁹은 p53이 결직장암의 예후와 연관이 없는 것으로 보고하였다. 또 다른 몇몇 연구에 의하면 핵 내에 p53의 발현이 모든 병기의 결직장암에서 예후와 연관이 있는 것으로 보고하였다.^{20,21} 림프절 전이가 없는 결직장암을 대상으로 진행한 본 연구에서는 p53이 예후와 관련이 없는 것으로 나타났다. p27^{kip1}과 연관하여 보았을 경우에도 생존율과도 통계학적으로 유의하지는 않았다.

Skp2는 여러 연구에서 p27^{kip1}발현과 역 상관관계가 있는 것으로 보고하였다.⁷ 또한 Skp2는 정상 점막세포보다 악성암세포에서 발현이 증가하고 Skp2의 과발현이 결직장암의 림프절 전이, 암종의 침윤 및 나쁜 예후와 관련이 있다고 보고하였으며 림프절로 전이한 경우에 Skp2 발현은 증가하고, p27^{kip1}의 발현은 감소하며 증식지표인 Ki-67은 증가한다고 보고하였다.²² 본 연구에서 회귀 분석을 통하여 p27^{kip1}의 발현과 Skp2의 발현 정도 사이에 상관관계는 없었으며 Skp2와 Ki-67간의 상관관계도 보이지 않았다. 하지만 이러한 결과는 림프절 전이가 없는 결직장암을 대상으로 한 결과이며 p27^{kip1}의 과발현 및 저발현군과 Skp2 과발현 및 저발현군을 각각의 하위군으로 구분하여 생존율을 비교 분석하여 보았을 때 p27^{kip1} 저발현, Skp2 과발현군에서 가장

낮은 생존율을 나타냈고 통계학적으로 유의하였다.

암의 증식은 전체적인 암세포의 증가를 의미하고 결과적으로 이러한 종양세포의 증식능력이 암의 악성도를 반영한다는데 착안하여 증식능력을 나타내는 지표에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. Ki-67이 결직장암의 예후에 어떤 영향을 미치는가 하는 부분은 현재에도 논란의 대상이 되고 있다. Ki-67은 활발하게 분열하고 있는 세포들의 분포를 반영한다. 몇몇 연구에서는 직장암에서 Ki-67의 과발현이 예후가 좋은 것으로 보고한 반면,²³ Ki-67이 많이 발현하는 결직장암 환자가 예후가 나쁘다는 보고도 있다.²⁴ Allegra 등⁵은 Dukes' C 환자에서 Ki-67의 발현이 높은 군에서는 예후가 좋고 Dukes' B 환자에서는 Ki-67의 발현이 낮은 군에서 예후가 안 좋은 것으로 보고하였다. 본 연구에서 p27^{kip1}의 발현과 Ki-67의 발현 사이에 유의한 관계는 없었다. p27^{kip1}이 CDK (cyclin dependent kinase) 억제자로서 증식지표인 Ki-67과 연관이 있을 것으로 생각되나 본 연구에서는 서로 연관이 없는 것으로 나타났다. 그러므로 p27^{kip1}이 종양 발생에 CDK inhibitor로서 작용하는 것뿐만 아니라 다른 작용이 있을 것으로 생각된다. Palmqvist 등¹⁴은 p27^{kip1}의 다른 역할 중 세포-세포간, 세포-기질간 유착과 protease 활성화, TFG- β 신호 기전 그리고 세포 자연살해 기능에 관여하는 것으로 보고하였다.

여러 연구 결과들을 살펴보면 본 연구에서 다루고 있는 여러 표지 인자들이 주로 림프절 전이가 있는 stage III, IV 환자들에서 예후에 영향을 주는 것으로 보고하였고, 림프절 전이가 없는 stage I, II 환자들인 경우에는 중요성에 논란이 있는 것으로 보고하고 있다. 본 연구에서도 p27^{kip1}을 제외한 다른 표지 인자들은 예후와는 통계학적인 유의성이 없었으나 p27^{kip1}의 발현 정도와 각각의 표지 인자의 발현 정도로 분류한 하위 그룹에서는 생존율과 연관이 있는 것으로 나타났다.

결 론

본 연구의 결과 p27^{kip1}의 발현이 림프절 전이가 없는 결직장암에서 생존율과 연관이 있었다. Skp2, Ki-67, p53 각각은 생존율과 연관이 없는 것으로 나타났으나 p27^{kip1}과 관련하여서는 생존율과 연관이 있는 것으로 나타났다. 그러므로 림프절 전이가 없는 결직장암 환자들에서 예후가 안 좋을 것으로 예상되는 고위험군을 선별하는데 기여할 수 있을 것이며 그러한 고위험

군에게는 항암치료 등의 수술 후 보조적 치료가 필요할 것으로 생각된다. 본 연구에서는 p27^{kip1} 저발현, Skp2 고발현, 그리고 Ki-67 저발현인 군이 고위험군에 속하였다. 향후 림프절 전이가 없는 결직장암 환자들 중 고위험군에 속하는 환자들에서 보조적 항암치료가 예후에 영향을 미치는지에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Ministry of Health and Welfare of Korea Central Cancer Registry 2002. Annual report of the Korea Central Cancer Registry, 2003.
2. Sobrero A, Guglielmi A. Current controversies in the adjuvant therapy of colon cancer. *Ann Oncol* 2004;15 (Suppl 4):iv39-41.
3. Zaniboni A, Labianca R. Adjuvant therapy for stage II colon cancer: an elephant in the living room? *Ann Oncol* 2004;15:1310-8.
4. Buyse M, Piedbois P. Should Dukes' B patients receive adjuvant therapy? A statistical perspective. *Semin Oncol* 2001;28:20-4.
5. Allegra CJ, Paik S, Colangelo LH, Parr AL, Kirsch I, Kim G, et al. Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study. *J Clin Oncol* 2003;21:241-50.
6. Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, De Vita F, Castellano P, et al. Determination of molecular marker expression can predict clinical outcome in colon carcinomas. *Clin Cancer Res* 2004;10:3490-9.
7. Herskho D, Bornstein G, Ben-Izhak O, Carrano A, Pagano M, Krausz MM, et al. Inverse relation between levels of p27^{Kip1} and of its ubiquitin ligase subunit Skp2 in colorectal carcinomas. *Cancer* 2001;91:1745-51.
8. Scopa CD, Tsamandas AC, Zolota V, Kalofonos HP, Batistatou A, Vagianos C. Potential role of bcl-2 and ki-67 expression and apoptosis in colorectal carcinoma. a clinicopathologic study. *Dig Dis Sci* 2003;48:1990-7.
9. Yao J, Weng Eu KW, Seow-Choen F, Cheah PY. Down-regulation of p27 is a significant predictor of poor overall survival and may facilitate metastasis in colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 2000;89:213-6.
10. Belluco C, Esposito G, Bertorelle R, Del Mistro A, Fassina A, Vieceli G, et al. Absence of the cell cycle inhibitor p27^{Kip1} protein predicts poor outcome in patients with stage I-III colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 1999;6:19-25.
11. Tenjo T, Toyoda M, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T, Tanaka K, et al. Prognostic significance of p27^{kip1} protein expression and spontaneous apoptosis in patients with colorectal adenocarcinomas. *Oncology* 2000;58:45-51.
12. Hoos A, Nissan A, Stojadinovic A, Shia J, Hedvat CV, Leung DH, et al. Tissue microarray molecular profiling of early, node-negative adenocarcinoma of the rectum: a comprehensive analysis. *Clin Cancer Res* 2002;8:3841-9.
13. Thomas GV, Szigeti K, Murphy M, Draetta G, Pagano M, Loda M. Down-regulation of p27 is associated with development of colorectal adenocarcinoma metastases. *Am J Pathol* 1998;153:681-7.
14. Palmqvist R, Stenling R, Oberg A, Landberg G. Prognostic significance of p27^{Kip1} expression in colorectal cancer: a clinico-pathological characterization. *J Pathol* 1999;188:18-23.
15. Zhang H, Sun XF. Loss of p27 expression predicts poor prognosis in patients with Dukes' B stage or proximal colorectal cancer. *Int J Oncol* 2001;19:49-52.
16. Manne U, Jhala NC, Jones J, Weiss HL, Chatla C, Meleth S, et al. Prognostic significance of p27^{kip1} expression in colorectal adenocarcinomas is associated with tumor stage. *Clin Cancer Res* 2004;10:1743-52.
17. Gunther K, Jung A, Volker U, Meyer M, Brabletz T, Matzel KE, et al. p27^{kip1} Expression in rectal cancer correlates with disease-free survival. *J Surg Res* 2000; 92:78-84.
18. Gervaz P, Cerottini JP, Bouzourene H, Hahnloser D, Doan CL, Benhattar J, et al. Comparison of micro-satellite instability and chromosomal instability in predicting survival of patients with T3N0 colorectal cancer. *Surgery* 2002;131:190-7.
19. Petersen S, Thames HD, Nieder C, Petersen C, Baumann M. The results of colorectal cancer treatment by p53 status: treatment-specific overview. *Dis Colon Rectum* 2001;44:322-34.
20. Sun XF, Carstensen JM, Zhang H, Arbmán G, Nordenskjöld B. Prognostic significance of p53 nuclear and cytoplasmic overexpression in right and left colorectal adenocarcinomas. *Eur J Cancer* 1996;32A:1963-7.
21. Samowitz WS, Curtin K, Ma KN, Edwards S, Schaffer D, Leppert MF, et al. Prognostic significance of p53 mutations in colon cancer at the population level. *Int J Cancer* 2002;99:597-602.
22. Li JQ, Wu F, Masaki T, Kubo A, Fujita J, Dixon DA, et al. Correlation of Skp2 with carcinogenesis, invasion, metastasis, and prognosis in colorectal tumors. *Int J Oncol* 2004;25:87-95.
23. Hilska M, Collan YU, V. Jukka O. Laine, Kossi J, Hirsimäki P, Laato M, et al. The significance of tumor

markers for proliferation and apoptosis in predicting survival in colorectal cancer. Dis Colon Rectum 2005; 48:2197-208.

24. Chen YT, Henk MJ, Carney KJ, Wong WD, Rothen-

berger DA, Zheng T, et al. Prognostic significance of tumor markers in colorectal cancer patients: DNA index, S-phase fraction, p53 expression, and Ki-67 index. J Gastrointest Surg 1997;1:266-73.