

대장암조직에서 아포토시스 검출 방법에 관한 연구*

이화여자대학교 의과대학 외과학교실, 해부병리학교실, ** 의과학연구소
김광호 · 심강섭 · 김성숙** · 구혜수** · 박응범

= Abstract =

Study of Detection Method of Apoptosis in Colorectal Cancer Tissue

Kwang-Ho Kim · Kang-Sup Shim · Sung-Sook Kim**
Heasoo Koo** · Eung-Bum Park

*Department of Surgery and Pathology, ** Medical Research Center, College of Medicine,
Ewha Womans University*

Objectives : Apoptosis is a specific mode of cell death recognized by a characteristic pattern of morphological, biochemical, and molecular changes. There are several methods of detection of apoptosis. Morphological changes involve a characteristic pattern of chromatin and cytoplasm. The landmark of apoptosis is endonucleolysis, with nuclear DNA initially degraded at the linker sections to fragments equivalent to single and multiple nucleosomes. Detection of DNA fragments in situ using the terminal deoxyribonucleotidyl transferase(TDT)-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling(TUNEL) assay is increasingly applied to investigate apoptosis. We studied the detection method of apoptosis morphologically and by using TUNEL assay and examined the correlation of p53 expression and apoptosis.

Methods : Forty-five cases of colorectal cancer were selected. The number of apoptotic bodies was expressed as a number per 100 cancer cells. The TUNEL assay was performed with in situ Apoptag kit®.

Results : The mean number of the apoptotic bodies was 2.28 in the patients who survived over 5 years after curative resection and 3.55 in the patients who died within 5 years($p=0.001$). There was a relationship between the number of apoptotic bodies which were measured by morphologic study and the results which were measured by TUNEL assay. There was no relationship between p53 expression and apoptosis.

Conclusion : These results suggest that the frequency of apoptotic bodies may be a prognostic factor for colorectal cancer and apoptosis could be measured by morphological study without special study.

KEY WORDS : Colorectal cancer · Apoptosis · Apoptotic body · TUNEL assay.

*이 논문의 요지는 1996년 추계외과학술대회에서 구연 발표하였음.

*본 연구는 1995년도 이화여자대학교 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

서론

세포사 특히 아포토시스가 종양발생과정에서 중요한 역할을 한다는 사실이 여러 연구에 의하여 밝혀져 현재 *bcl-2*¹²⁾와 *abl*³⁾종양유전자가 아포토시스를 억제하는 반면 *p53*종양억제유전자가 종양의 발생을 억제하고 아포토시스를 촉진시킨다고 알려져 있다⁴⁾⁵⁾⁶⁾. *Bcl-2*가 과발현되고 *abl* kinase 활동이 활성화되며 *p53*유전자의 기능이 상실되는 것을 여러종류의 암에서 관찰할수 있어 아포토시스가 감소하는 것이 암 발생의 원인요소로 작용할수 있을 것으로 생각된다. 아포토시스를 측정하는 방법으로는 전자현미경을 통해 핵 및 염색질의 변화를 관찰하거나 apoptotic body를 광학현미경하에서 찾아내는 형태학적 접근방법이 가장 기본적이며 손쉬운 방법으로 이용되고있다. 그외에 아포토시스를 측정할수 있는 방법으로는 ApopTag-Peroxidase Kit⁷⁾⁸⁾을 이용하여 측정하는 방법과 유세포분석기 등을 이용하여 좀더 정량적으로 분석하는 방법⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾등이 이용되고 있다. 저자들은 in situ apoptosis detection kit을 이용하여 검출한 결과와 형태학적으로 apoptotic body를 검출한 결과를 비교하여 서로간의 상관관계를 조사해

보며 *p53* 종양억제유전자의 발현과 아포토시스의 발현과의 상관 관계를 알아보고자 본연구를 시작하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

1989년 1월 부터 1992년 12월사이에 대장암으로 근치적 절제술을 시행받은후 추적조사가 가능한 45명의 환자를 대상으로 하였다.

2. 방 법

1) Apoptotic body의 검출

대장암조직을 10% buffered formalin에 고정한 후 paraffin에 포매시킨 다음 2 μ m간격으로 박절하여 Hematoxylin-Eosin 염색을 실시하였다. 매 슬라이드 마다 400배율 하에서 암세포 100개당 apoptotic body의 수를 각기 다른 다섯시아에서 세어 평균을 구하였다. Apoptotic body는 염색체가 농축된 것처럼 보이는 호염기성 물질이 호산성의 세포질내에서 농축되어 보이는 경우와 호산성의 세포질내에 농축된 염색체가 여러 조각으로 보이는 경우와 세포질이 없이 농축된 염색체만 보이는 경우로 하였다(Fig. 1).

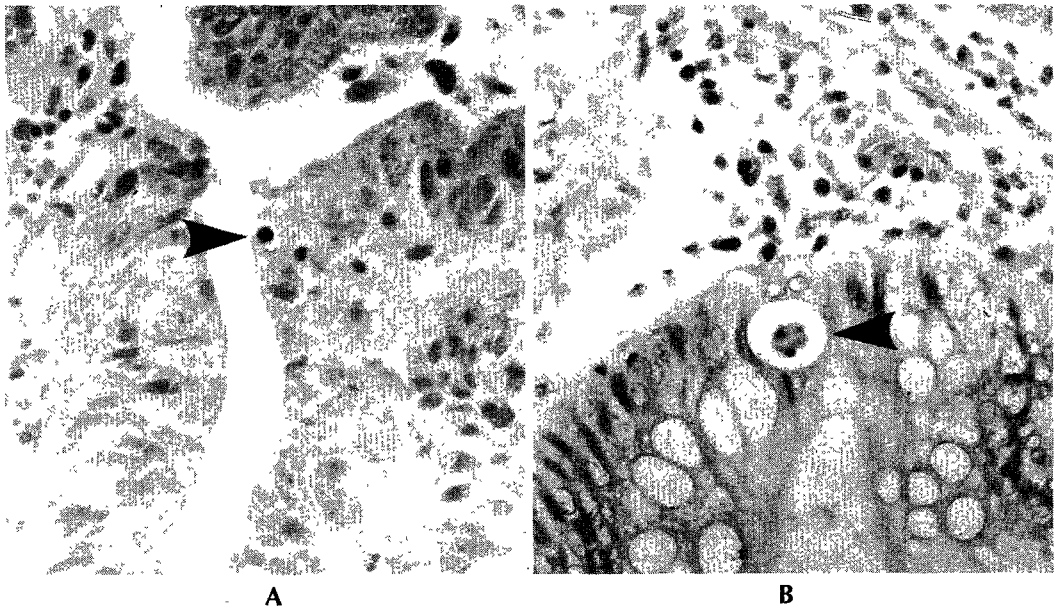


Fig. 1. Different appearances of apoptotic bodies in colorectal cancer. A) One apoptotic body(arrow) characterized by a single pyknotic nucleus surrounded by shrunken cytoplasm($\times 200$). B) Apoptotic body appears as cytoplasmic fragments containing condensed chromatin(arrow)($\times 200$).

2) In situ apoptosis detection kit(TUNEL) 방법

파라핀 포매조직을 5 μ m두께의 절편으로 만들어 슬라이드에 부착시킨후 60도 보온기에서 60분간 처리하고 xylene으로 5분간 3회 파라핀을 제거한후 100%, 95%, 70% 에탄올에서 순차적으로 각각 3분씩 처리한 다음 증류수를 합수시켰다. 내인성 과산화효소의 활성을 억제시키기 위하여 3% H₂O₂에 슬라이드를 3분간 담군후 증류수로 5분간 3회 세척하였다. 조직의 단백질을 제거하기 위하여 Proteinase K를 떨어뜨린후 실온에서 15분간 반응시키고 증류수로 2분간 4회 세척하였다. 조심스럽게 주변의 수분을 제거한후 equilibration buffer를 2방울 조직위에 떨어뜨린후 plastic coverslip으로 조직을 덮은후 실온에서 15초정도 두었다. 조심스럽게 plastic coverslip을 제거한후 남아있는 용액을 제거한 후 working strength TdT enzyme을 각 슬라이드위에 54 μ 씩 떨어뜨린후 plastic coverslip으로 조직위를 덮고 건조되는 것을 방지하기 위하여 humidified chamber에서 37도에서 1시간동안 배양하였다. Plastic coverslip을 제거하고 미리 준비한 working strength stop/wash buffer에 담구어 37도에서 10분간 두었다. Plastic coverslip을 제거후 PBS buffer에 5분간 3회 세척하고 anti Digoxigenin perox-

idase를 조직위에 두 방울씩 떨어뜨린후 plastic coverslip으로 덮은후 humidified chamber에 넣어 실온에서 30분간 두었다. Plastic coverslip을 제거한후 PBS buffer에 5분간 3회 세척한후 AEC 용액을 조직위에 떨어 뜨린후 5분간 발색상태를 관찰하여 적당한 상태가 되게 한후 증류수로 씻어 내었다. Hematoxylin으로 대조염색후 100% buthanol과 xylene으로 처리한 다음 glycerol로 봉입후 광학현미경으로 관찰하여 염색정도에 따라 판정하였다(Fig. 2). 판정은 염색이 되지 않는 경우를 1등급으로 하였으며 10% 미만에서 세포가 염색되는 경우를 2등급, 10%에서 50%사이에서 염색이 되는 경우를 3등급으로 하였으며 50%이상에서 염색이 되는 경우를 4등급으로 판정하였다.

3) p53단백염색

동일한 방법으로 파라핀포매조직을 처리한후 쥐에서 생성한 단일클론성 항체(Novocastra Lab., Ltd)를 1 : 200으로 희석하여 염색하여 판정하였다(Fig. 3). 판정은 동일한 방법으로 하였다.

4) 통계적처리

통계검증은 SAS program을 이용하여 Chi-square 검사를 시행하였다.

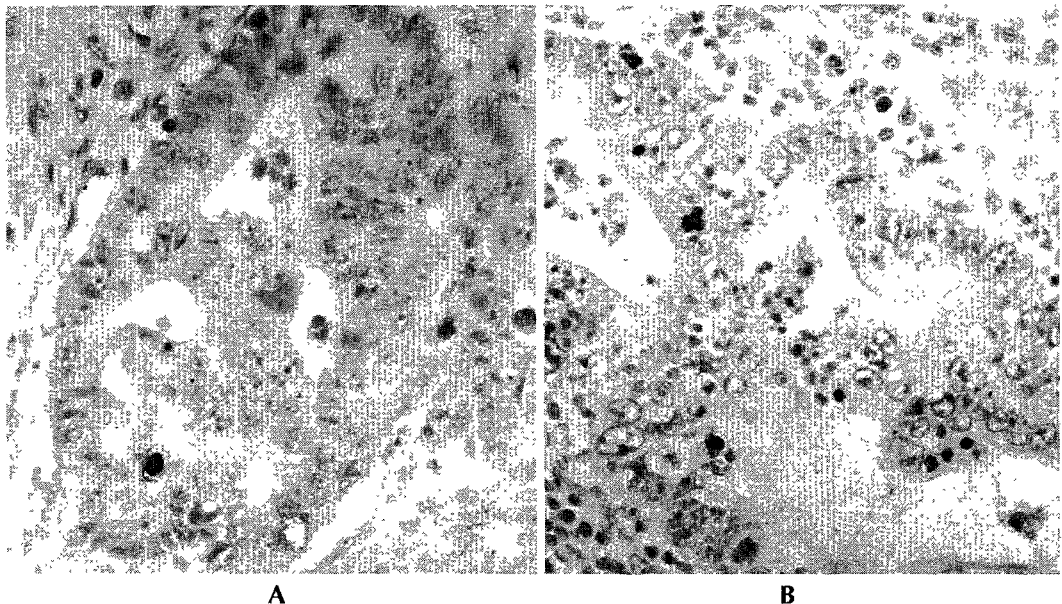


Fig. 2. DNA fragmentation detected by the TUNEL assay in apoptosis. A) A grade 1 of colorectal carcinoma was expressed as poorly stained(X200). B) Grade 3 was expressed as strongly stained(X200).

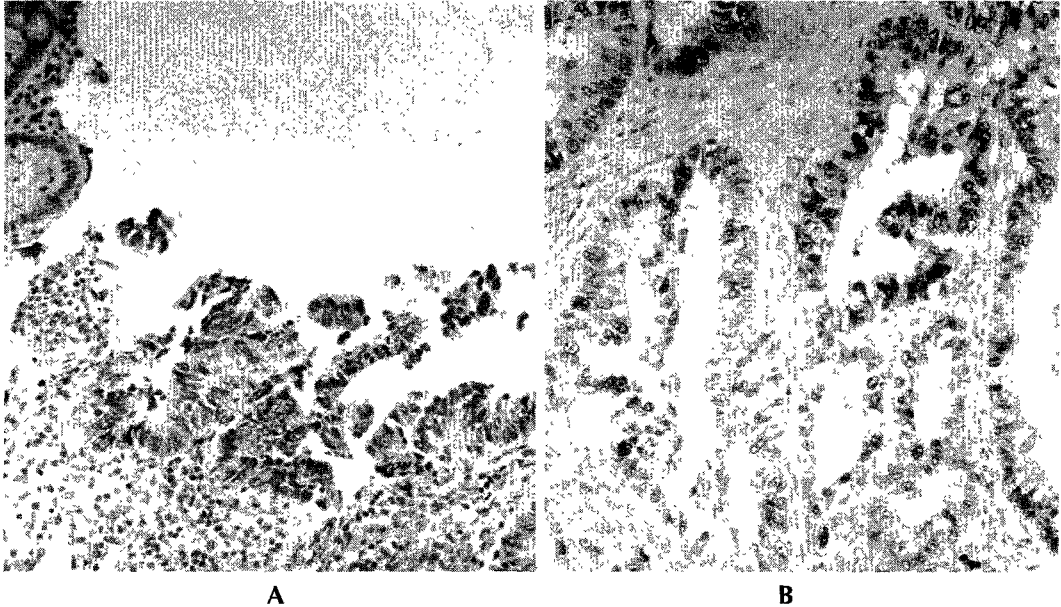


Fig. 3. A) Negative nuclear staining with anti-p53 protein antibody(X200). B) Positive nuclear staining with anti-p53 protein antibody(X200).

결 과

1. 임상 및 조직학적 특성

환자는 남자가 27명 여자가 18명이었으며 연령분포는 30대가 6명, 40대가 8명, 50대가 16명, 60대 7명, 70대가 8명이었다. 부위별로는 상행결장암이 6예, 횡행결장암이 2예, 하행결장암이 1예, S상결장암이 8예, 직장암이 28예로 직장암이 가장 많았다. 암조직의 병리조직학적 분류는 고분화암이 16예, 중등도 분화암이 25예, 저분화암이 4예이었으며 Dukes 분류에 의하여 병기 A가 3예, B가 20예, C가 21예, D가 1예이었다(Table 1, 2).

2. 병기별 및 조직학적 분류에 따른 apoptotic body의 빈도

Dukes 병기 A에서 apoptotic body의 평균갯수는 1.93개 였으며 Dukes 병기 B 에서는 2.66개, Dukes 병기 C에서는 2.76개였다. 암조직의 병리조직학적분류에 의하여 고분화암에서는 2.51개 였으며 중등도분화암에서는 3.01개 였고 저분화암에서 2.15개 였다(Table 3).

3. 수술후 5년 생존에 따른 apoptotic body의 빈도

대장암수술후 5년내 사망한 환자는 17명으로 이러한

Table 1. Clinical characteristics

Sex	No.(%)
Male	27(60)
Female	18(40)
Age	No.(%)
30 - 40	6(13)
40 - 50	8(18)
50 - 60	16(35)
60 - 70	7(16)
>70	8(18)
Location	No.(%)
Right colon	6(13)
Transverse colon	2(4)
Left colon	1(2)
Sigmoid colon	8(18)
Rectum	28(63)

Table 2. Pathologic characteristics

Differentiation	No.(%)
Well	16(35)
Moderate	25(56)
Poor	4(9)
Stage	No.(%)
A	3(7)
B	20(45)
C	21(46)
D	1(2)

Table 3. Number of apoptotic body according to the Duke stage and differentiation

Stage	Mean no. of apoptotic body
A	1.93
B	2.66
C	2.76
Differentiation	Mean no. of apoptotic body
Well	2.51
Moderate	3.01
Poor	2.15

Table 4. Number of apoptotic body according to the survival

	Mean no. of apoptotic body	p value
Died(n=17)	3.55	0.001
Alive(n=28)	2.28	

환자의 암조직에서의 apoptotic body의 평균개수는 3.55개였으며 5년이상 생존한 환자 28명의 암조직에서의 apoptotic body의 평균개수는 2.28개로 통계적으로 유의하게 5년내 사망한 환자에서 apoptotic body의 개수가 증가하였다($p=0.001$) (Table 4).

4. TUNEL 방법을 이용한 아포토시스의 검출과 apoptotic body의 비교

TUNEL방법으로 측정된 결과 grade 1이 6예, grade 2가 4예, grade 3이 3예, grade 4가 3예였으며 같은 조직에서의 apoptotic body의 평균개수와 비교하여 보았을 때 상관관계가 있었다(Fig. 4).

5. Apoptotic body와 p53발현과의 관계

Apoptosis와 p53의 발현과는 유의한 상관관계가 없었다(Fig. 5).

고 안

아포토시스는 형태적인 특성, 생화학적특성, 분자생물학적특성으로 감지되는 세포사의 특이한 형태이다^{12) 13)14)}. 이러한 형태의 세포사가 최근 종양학에서 많은 연구가 되고 있다¹⁵⁾. 종양세포에 방사선조사시¹⁶⁾¹⁷⁾ 고온요법시¹⁸⁾, 여러 가지 종류의 항암제투여시¹⁹⁾²⁰⁾ 그리고 성장요소를 제거하였을때²¹⁾²²⁾ 종양세포에서의 아포토시스의 유발이 보고되고 있다. 그리고 종양학에서 흥미있는 사실은 어떤 종양에서는 세포의 성장율이 증가하는 것보다는 이러한 아포토시스가 일어나는 세포의 능력

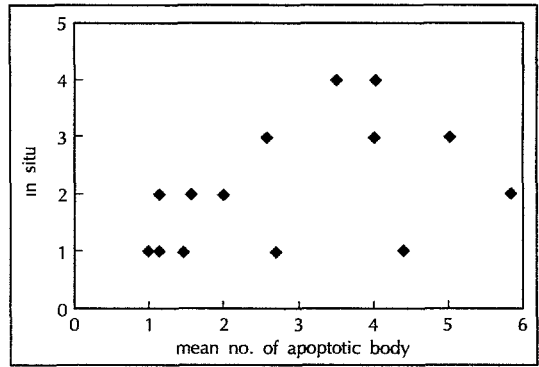


Fig. 4. Correlation between apoptotic body and in situ.

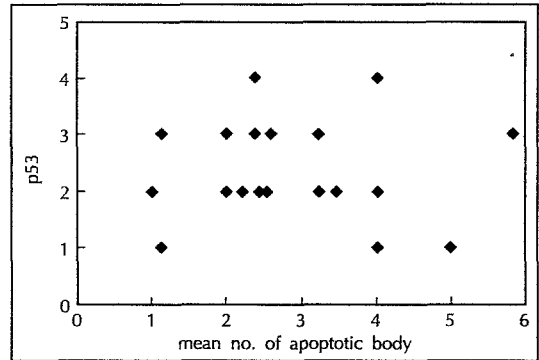


Fig. 5. Correlation between apoptotic body and p53.

이 없어 졌을 때 암의 발생과 관계가 있다고 하여²³⁾²⁴⁾ 종양의 발생에 있어서 p53 종양억제유전자, bcl-2 종양 유전자와의 상관관계가 많이 연구되고 있다. 그외에 아포토시스는 암의 발생과정에 있어서 작용하는 것 뿐만 아니라 그 발현자체가 암의 예후인자로서의 역할에 관하여서도 연구가 이루어지고 있어 종양세포에서의 아포토시스의 검출에 대하여 많은 연구가 되고 있다.

아포토시스를 검출하는 방법에는 여러 가지가 있다. 제일 간단한 것으로는 형태학적변화를 관찰하는 것으로 세포질과 염색질이 농축되어 보이는 특이한 형태적 변화가 나타나는데 이를 apoptotic body라고 하며 주위의 암세포와 구별되어 보인다¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾. 아포토시스가 일어나게 되면 특징적으로 핵내 소체의 분해(endonucleolysis)가 일어나게 되어 핵내 DNA가 분해되어 단일 또는 다발성의 nucleosome의 조각으로 나누어 진다¹⁴⁾. 이런 조각들을 agarose gel에서 전기영동 시켰을 때 특징적인 계단현상(DNA ladders)을 나타내게 되어²⁵⁾ 확인 할수 있다. 또 세포내 DNA의 변성에 예민하고 빛을 산란시키는 성질을 이용하여 유세포분석을 통하여 아

포토시스를 측정할 수 있다⁶⁾. 그외에 apoptotic DNA fragmentation 동안에 두가닥의 DNA의 분열이 일어나므로 이곳에 terminal deoxyribonucleotidyl transferase(TdT)의 촉매작용을 이용하여 digoxigenin-conjugated dUTP를 부착시키고 다시 발색물질을 부착시켜 면역화학요법으로 염색하여 확인하는 방법을 이용하고 있다(TUNEL assay)²⁶⁾. 저자들의 경우 Duker 병기 A 일 때 apoptotic body의 개수가 평균 1.93개, B 일 때 2.66개, C인 경우 2.76개였다. 조직학적 분화도에 따라서는 고분화암인 경우 2.51개, 중등도분화암인 경우는 3.01개, 저분화암인 경우는 2.15개였다. 3년내 사망한 환자에서는 3.55개였으며 3년이상 생존한 환자에서는 2.28개로 암의 병기가 증가할수록 apoptotic body의 개수가 증가하는 것을 볼수 있었으며 생존율이 낮은 경우에서 apoptotic body의 개수가 증가하는 것을 관찰하여 수술후 예후가 나쁜 경우 암조직에서의 apoptotic body의 개수가 증가하는 것을 볼수 있어 아포토시스의 기본개념과는 다르나 악성도가 높은 암의 경우 아포토시스가 많이 일어나는 것으로 보아 그에 반하여 세포의 증식도 왕성하게 일어나 상대적으로 증가한 아포토시스를 능가하여 이런 결과가 나타나지 않았나 생각된다.

Aihara등²⁷⁾도 전립선암 39예에서 apoptotic body의 빈도와 Gleason grade 사이에 연관관계가 있어 아포토시스가 증가하는 경우 전립선암의 악성화가 증가된다고 주장하였고 Leoncini등²⁸⁾도 non-Hodgkin's lymphoma에서 조직학적 분류에 상관없이 독립적으로 아포토시스가 증가하는 경우 예후가 나쁘다고하여 저자들의 경우와 비슷한 결과를 보고하였다. TUNEL 방법으로 측정된 아포토시스의 결과와 apoptotic body의 개수를 비교한 결과가 서로 비슷한 분포를 나타내어 비교적 간단한 형태학적 관찰로 아포토시스를 측정하는 것이 임상에서 도움이 될것으로 생각된다. 대장암의 발생과정에 있어서 여러 가지 유전자들의 변화가 작용하여 암유발유전자가 활성화 되고 암억제유전자가 억제된다는 사실은 이미 밝혀진 것으로²⁹⁾ 대부분의 대장암은 양성 선종의 크기가 증가하고 이행성과정을 거쳐서 대장암으로 발전하게 된다. Bedi등³⁰⁾은 아포토시스의 지속적인 억제에 의하여 정상 대장조직이 암조직으로 변형하게 되며 대장암에서의 아포토시스의 억제는 종양의 성장과 암의 전파를 유발하고 항암치료제에 내성

을 나타내게 한다고 보고하였다. Shaw등⁵⁾은 대장암세포주에 wild type의 p53을 주입하여 아포토시스를 유발시켜 암세포가 억제되는 사실을 보고하여 대장암의 발생과 억제에 아포토시스가 중요한 역할을 한다고 주장하였으나 저자들의 경우 p53의 발현과 아포토시스의 발현과는 아무런 상관관계를 발견할 수가 없어 더 많은 예를 가지고 계속적인 연구가 필요할 것 같다.

이상의 결과 대장암에서 아포토시스를 TUNEL 방법을 이용하여 측정한 결과와 간단한 형태학적 방법으로 측정한 결과가 비슷한 분포를 보이고 아포토시스가 수술후 예후예측인자로 사용될수 있어 임상에서 손쉽게 이용할수 있을 것으로 생각되며 p53과 bcl-2와의 상관관계는 계속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

1989년 1월 부터 1992년 12월사이에 대장암으로 근치적 절제술을 시행받은후 추적조사가 가능한 45명의 환자를 대상 대장암조직의 Hematoxylin-Eosin 염색을 통하여 apoptotic body를 광학현미경하에서 400배율하에서 관찰하여 암세포 100개당 평균개수를 세었으며 TUNEL 방법을 이용하여 면역화학적염색을 통하여 염색정도를 판정하여 대장암에서 아포토시스의 정도를 판정하여 다음과 같은 결과를 얻었다. Duker 병기 A 일 때 apoptotic body가 평균 1.93개, B 일 때 2.66개, C인 경우 2.76개였으며 분화도에 따라서는 고분화암인 경우 2.51개, 중등도분화암인 경우는 3.01개, 저분화암인 경우는 2.15개였다. 5년내 사망한 환자에서는 3.55개였으며 5년이상 생존한 환자에서는 2.28개였다. 형태학적으로 관찰한 apoptotic body의 수와 TUNEL 방법에 의하여 관찰한 apoptotic body와의 관계를 비교하였을 때 서로 상관관계를 볼수 있어 임상에서 간단히 형태학적으로 apoptotic body의 수를 세어 아포토시스를 측정하여 예후예측인자로 사용할수 있으리라 사료되며 아포토시스와 p53의 발현과의 관계를 보았을 때 특별한 상관관계를 발견 할 수 없어 bcl-2의 발현과 더불어 아포토시스와의 관계에 대하여 좀더 연구가 되어야 하겠다.

References

- 1) Korsmeyer SJ : Bcl-2 : A repressor of lymphocyte de-

- ath. Immunol Today* 1992 ; 13 : 285-288
- 2) Reed JC : *Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. J Cell Biol* 1994 ; 124 : 1-6
 - 3) McGahon AJ, Cotter TG, Green DR : *The abl oncogene family and apoptosis. Cell Death Diff* 1994 ; 1 : 77-83
 - 4) 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
 - 5) Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J : *Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. Proc natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 4495-4499
 - 6) Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M : *Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibited by interleukin-6. Nature* 1991 ; 352 : 345-347
 - 7) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA : *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol* 1992 ; 119 : 493-501
 - 8) Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z : *Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assay. Cancer Res* 1993 ; 53 : 1945-1951
 - 9) Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz M, Lassota P, et al : *Features of apoptosis cells measured by flow cytometry. Cytometry* 1992 ; 13 : 795-808
 - 10) Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Wyllie AH : *Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis(programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. Biochim Biophys Acta* 1992 ; 1133 : 275-285
 - 11) Tenford WG, King LE, Fraker PJ : *Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis associated chromatin degradation by flowcytometry. Cytometry* 1992 ; 13 : 137-143
 - 12) Arends MJ, McGregor AH, Wyllie AH : *Apoptosis is inversely related to necrosis and determines net growth in tumors bearing constitutively expressed myc, ras, and HPV oncogenes. J Pathol* 1994 ; 144 : 1045-1053
 - 13) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR : *Apoptosis : A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer* 1972 ; 26 : 239-257
 - 14) Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D : *Chromatin cleavage in apoptosis : Association with condensed chromatin morphology and dependence on macronuclear synthesis. J Pathol* 1984 ; 142 : 67-77
 - 15) Williams GT : *Programmed cell death : Apoptosis and oncogenesis. Cell* 1991 ; 65 : 1097-1098
 - 16) Foster TH, Allan DJ, Gobe GC, Harmon BV, Walsh TP, Kerr JFR : *β radiation from tracer doses of ^{32}P induces massive apoptosis in Burkitt's lymphoma cell line. Int J Radiat Biol* 1992 ; 3 : 365-367
 - 17) Potten CS : *Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to irradiation. Nature* 1992 ; 269 : 518-520
 - 18) Harmon B, Corder AM, Collins RJ, Gobe GC, Allen J, Allan DJ, et al : *Cell death induced in a murine mastocytoma by 42-47C heating in vitro : Evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. Int J Radiat Biol* 1990 ; 58 : 845-850
 - 19) Kaufmann SH : *Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin and other cytotoxic anticancer drugs : A cautionary note. Cancer Res* 1989 ; 49 : 5870-5878
 - 20) Krishan A, Frei E : *Morphological basis for the cytolytic effect of vinblastine and vincristine on cultured human leukemia lymphocytes. Cancer Res* 1975 ; 35 : 497-501
 - 21) Askew D, AshmunR, Simmons S, Cleveland J : *Constitutive c-myc expression in IL-3 dependent myeloid cell line suppressed cell cycle arrest and accelerates apoptosis. Oncogene* 1992 ; 6 : 1915-1924
 - 22) Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, et al : *Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. Cell* 1992 ; 69 : 119-128
 - 23) Allan DJ, Howell A, Roberts SA, Williams GT, Watson RJ, Coyne JD, et al : *Reduction in apoptosis relative to mitosis in histologically normal epithelium accompanies fibrocystic change and carcinoma of the premenopausal human breast. J Pathol* 1992 ; 167 : 25-31
 - 24) Kerr KM, Lamb D : *A suggested explanation for paradoxically slow rate of growth of basal carcinoma that contain numerous mitotic figures. J Pathol* 1984

; 107 : 41-50

- 25) Oberhammer F, Fritsch G, Schmied M, Pavelka M, Printz D, Purchio T, et al : *Condensation of the chromatin at the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease. J Cell Sci 1993 ; 104 : 317-326*
- 26) Kraupp BG, Nedecky BR, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W : *In situ detection of fragmented DNA(TUNEL Assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death : A cautionary note Hepatology 1995 ; 21 : 1465-1468*
- 27) Aihara M, Truong LD, Dunn JK, Wheeler TM, Scardino PT, Thompson TC : *Frequency of apoptotic bodies positively correlates with gleason grade in prostate cancer. Hum Pathol 1994 ; 25 : 797-801*
- 28) Leoncini L, Del Vecchio MT, Megha T, Barbini P, Galieni P, Pileri S, et al : *Correlations between apoptotic and proliferative indices in malignant non-hodgkin's lymphomas. Am J Pathol 1993 ; 142 : 755-763*
- 29) Fearon ER, Vogelstein BA : *A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990 ; 61 : 759-767*
- 30) Bedi A, Pasricha PJ, Akahtar AJ, Barber JP, Bedi GC, Giardiello FM : *Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. Cancer Res 1996 ; 55 : 1811-1816*