

면역세포화학적 방법을 이용한 폐암세포의 Carcinoembryonic Antigen (CEA) 및 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) 검색에 관한 연구

연세대학교 의과대학 내과학교실

천선희 · 김세규 · 정현철 · 장 준
손 희 영 · 김 성 규 · 이 원 영

홍부외과학교실

이 두 연

아주대학교 의과대학 병리학교실

이 기 범

서 론

Carcinoembryonic antigen (이하 CEA)은 oncodevelopmental tissue glycoprotein으로 대장 및 직장암, 유방암, 폐암 환자의 혈청에서 검출되어 진단 및 치료경과의 관찰에 이용되고 있다^{1,2)}. 이중 폐암환자의 경우 약 50%에서 혈청내 CEA의 검출이 보고^{3~5)}된 바 있으나 종양 세포내의 존재는 Sun등⁶⁾의 보고 이외엔 드물다. 이는 악성 상피성 종양세포에서만 예외적으로 검출될 수 있고 여타의 종양, 악성 중피 종양(mesothelial malignancy) 및 염증 세포에서는 나타나지 않으므로 폐암세포의 연구에 적용할 경우 좋은 지표가 될 수 있으리라 추측할 수 있다.

Epidermal growth factor receptor (이하 EGFR)은 170-KD glycoprotein으로 상피세포의 세포막에 존재하는 수용체로써 침샘에서 분비하는 Epidermal growth factor (이하 EGF)와 반응하여 상피세포의 증식 및 분화를 조절하는 물질이다^{7,8)}. 이러한 EGFR은 인체 세포 내에 존재하는 proto-oncogene인 c-erb-B의 산물로 알려져 있으며, 상피세포암에서 증가된 EGFR

발현과 더불어 EGFR 또는 그와 관련된 gene의 비정상적인 발현이 상피세포암의 발생에 관여하리라 보고있다^{9,10)}.

원발성 폐암은 조기발견의 예가 적고, 치료성적이 매우 불량할 뿐 아니라 세포유전학적, 분자생물학적 연구의 결과도 대단히 산발적이고 다양하여 어떤 규칙성을 발견하기 힘들어서 현재에 이르기까지 종양 발생 및 진행에 관한 세포학적 연구 결과가 충분치 못한 상태이다. 저자들은 폐절제술을 시행받은 폐암환자를 대상으로 CEA 및 EGFR 단클론 항체(monoclonal antibody)를 사용하여 한국인 폐암에서의 암 세포 유형별 CEA와 EGFR의 존재 유무 및 발현정도와 예후에 미치는 영향을 살펴 보았다.

대상 및 방법

1. 대 상

연구대상은 1986년 1월부터 1989년 12월까지 본원에서 원발성 폐암 진단 후 폐절제술을 시행받고 생존 여부와 치료 성적을 알고있는 원발성 폐암 환자로써 paraffin block을 확인하여 각각 8매의 슬라이드를 제작하였다. 소세포암의 조직은 얻지 못하여 비소세포암만을 대상으로 하였다.

接 受 : 91年 10月 21日

*본 논문은 1991년도 연세대학교 의과대학 교수연구비의 일부 보조로 이루어 졌음.

2. 방 법

면역세포화학적 염색은 Hsu 등¹¹⁾이 고안한 ABC method를 이용 하였으며, CEA 와 EGFR 각각 대조군 을 포함하여 슬라이드 4매씩 염색하였다.

5 μ m 두께로 만든 슬라이드를 deparaffinization하 기 위하여 100% xylene에 각각 10분씩 3회에 걸쳐 통과시 킨 다음 100%, 95% 및 75% ethanol에 각각 10분씩 담 가서 rehydration 을 시키고 PBS (Gibco Labora- tories, Grand Island, NY)에 세척하였다. 조직내에 포 함되어 있는 중성구(neutrophil) 등이 갖고 있는 en- dogenous peroxidase activity 를 제거하기 위하여

30% H₂O₂ 5 μ l을 첨가한 50 ml methanol에 5분간 담 근 후 PBS에 세척하였다.

암세포 표면에 존재하는 nonspecific antibody bind- ing site를 포화 시키기 위하여 ABC kit (Vector, Burlingame, CA)의 blocking antibody solution 100 μ l를 조직위에 점적하여 humid chamber (150 mm Culture dish 에 wet gauze를 도포한 것)에 넣고 37°C 배양기에 20분간 두었다. 배양후 슬라이드를 세척하지 않고 기울 여서 과다한 항체 용액을 제거한 후 CEA를 염색할 슬라 이드에는 일차 항체(primary antibody)로 mono- clonal mouse anti-CEA IgG (Amersham Interna- tional, Amersham, U.K.) 1 : 200 희석액을 50 μ l 점적

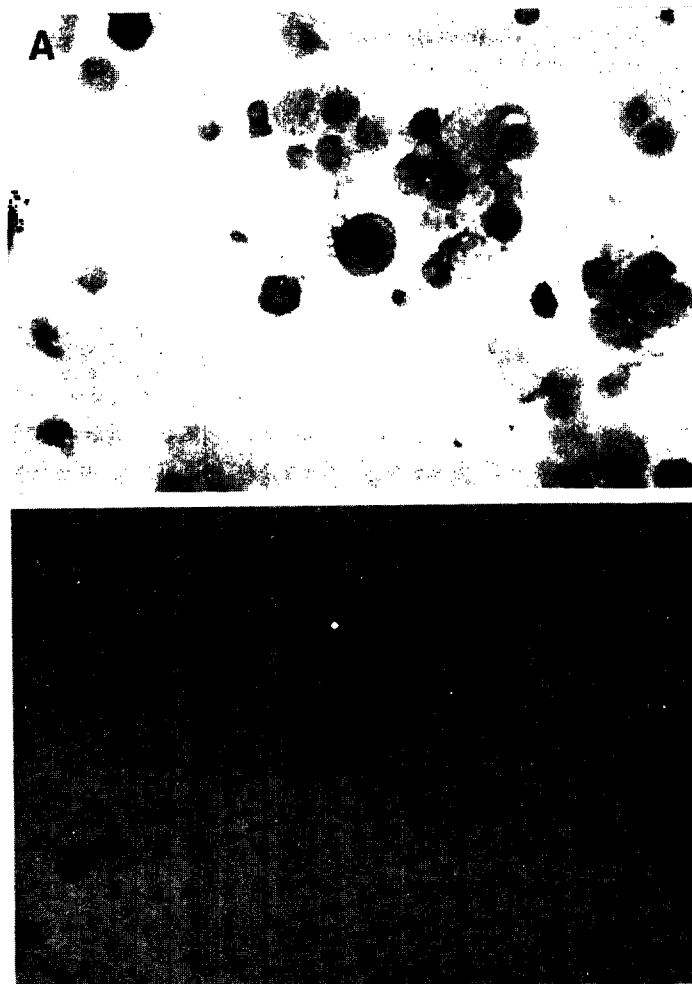


Fig. 1. A. CEA positive C4 cells (brownish stained) (\times 200).
B. EGFR positive A431 Cells (\times 200)

하고, EGFR을 염색할 슬라이드에는 monoclonal mouse anti-EGFR IgG (Amersham International, Amersham, U.K.) 1 : 30 희석액을 50 μ l 점적하였다. 대조군 슬라이드는 동일한 조직절편 슬라이드로써 일차 항체만 점적하지 않고 나머지 모든 과정은 동일하게 시행하였다.

1차 항체를 도포한 후 CEA를 염색할 슬라이드는 37°C에서 30분간, EGFR을 염색할 슬라이드는 4°C에서 16시간 배양한 후 PBS에 각각 10분씩 3회 세척하고 이차 항체인 peroxidase-conjugated biotinylated antibody (Vector, Burlingame, CA)를 10 μ l씩 각각 CEA, EGFR 및 대조군 슬라이드에 점적한 후 humid chamber에 넣고 37°C에서 30분간 배양하였다.

이차 항체 배양이 끝나면 PBS에 10분씩 3회 세척하고 ABC reagent 용액을 100 μ l씩 조직에 점적한 후 실온에서 30분간 배양하고 PBS에 10분씩 3회 세척하였다.

최종 세척이 끝난 슬라이드를 DAB (3'-3'-diaminobenzidine; Sigma Chemical co., St. Louis, MO) 용액에 담그어 2내지 10분간 발색반응을 본 이후 PBS에 10분, 증류수에 10분간 세척하고 공기중에서 건조시켰다.

Counter stain은 H & E 염색으로 하였다.

본 연구를 위한 실험수기의 숙달과 일차항체의 적절한 희석배수를 알기 위하여 CEA에 대하여서는 C4 cell (colon cancer cell line), EGFR에 대하여서는 A431 cell (human vulvar carcinoma cell line)을 이용하여 cytocentrifuge 슬라이드를 만들고 상기 과정을 거쳐 면역세포화학적 염색을 시행하여 기대한 결과를 얻었다 (Fig. 1).

3. 판 독

병리학자를 포함한 2인의 판독자가 별도로 현미경하에서 슬라이드를 검토하여 대조군과 비교, CEA 및

EGFR 양성 및 음성군을 판정하였다. 같은 표본내에서 양성 및 음성 암세포가 공존할 경우 Cerny 등¹²⁾의 방법에 따라 0=neagtive, +=<25% positive, ++=26~50% positive, +++=51~75% positive 와 ++++=76~100% positive로 grading system을 적용하였다.

4. 통계 처리

생존율은 Kaplan-Meier Method를 이용하여 1년 생존율, 2년생존율 및 3년생존율을 구하였으며, 각 군별 생존율의 유의성 여부는 Log-rank test를 이용하였다.

결 과

한국인 폐암에서 CEA 발현율은 100예중 96예가 양성으로 96%이었으며, grading system을 적용한 암세포 유형에 따른 CEA 발현율은 grade 1 혹은 2+가 편평상피세포암(epidermoid carcinoma) 63예중 46예인 73%, 미분화암(undifferentiated carcinoma) 6예중 3예인 50%, 대세포암(large cell carcinoma) 4예 모두인 반면에 선암(adenocarcinoma) 27예중 25예인 93%가 grade 3혹은 4+로 선암의 CEA 발현율이 가장 높았다 (Table 1, Fig. 2).

EGFR 발현율은 100예중 26예가 양성으로 26%이었으며, 암세포 유형에 따른 EGFR 발현율은 편평상피세포암 63예중 19예인 30%, 선암 27예중 4예인 14%, 미분화암 6예중 3예인 50%가 양성을 나타내었고 대세포암은 4예 모두 음성이었으며, grading system 적용시 모두 1혹은 2+로 전반적인 발현 정도가 낮았다 (Table 2, Fig. 3).

대상 환자의 평균 추적기간은 2년(1~41개월)으로 전체 환자의 1년생존율은 85%, 2년생존율은 68%, 3년생

Table 1. CEA Positivity by Histologic Subtypes of Lung Cancer

	0	+	++	+++	++++	Total +
Epidermoid (n=63)	3 (5)	28 (44)	18 (29)	9 (14)	5 (8)	60 (95)
Adeno (n=27)	0	0	2 (7)	4 (15)	21 (78)	27 (100)
Large (n= 4)	0	3 (75)	1 (25)	0	0	4 (100)
Undiff (n= 6)	1 (17)	1 (17)	2 (33)	0	2 (33)	5 (83)

* parenthesis means percentage in each subtype

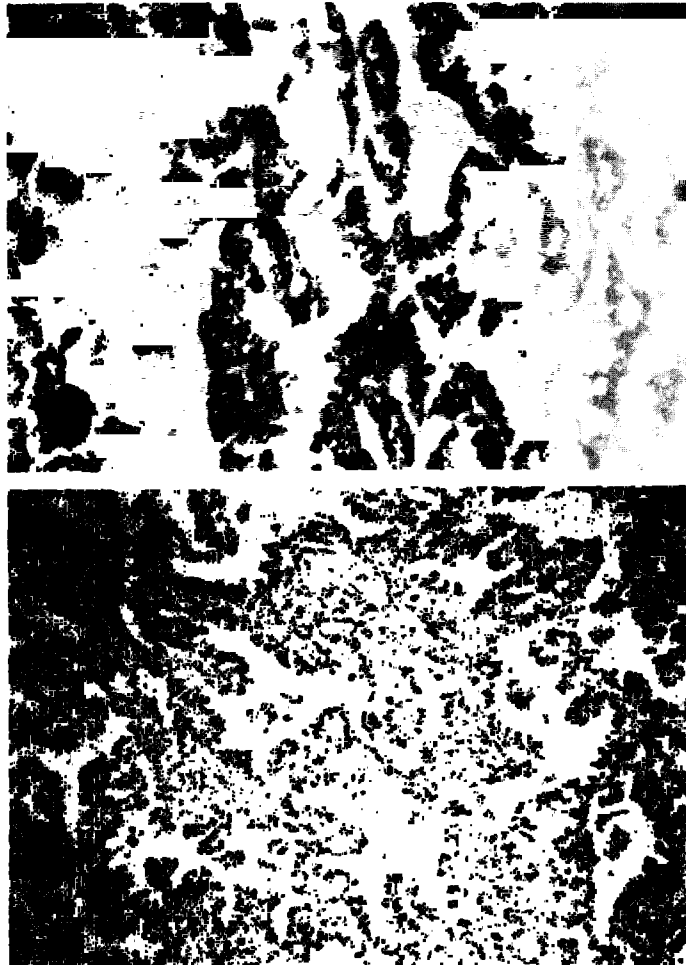


Fig. 2. A. Lung Adeno (Bronchioloalveolar) Cancer. Immunoperoxidase stain for CEA ($\times 100$). Notice that almost all the neoplastic cells are deeply stained, indicating the presence of the CEA antigen in their cytoplasmic membrane.
B. absence of primary antibody staining with same tissue ($\times 100$).

존율은 54%이었다. EGFR 발현 음성군 74예의 1년 생존율은 84%, 2년생존율은 66%, 3년생존율은 49%이었고, EGFR 발현 양성군 26예의 1년생존율은 85%, 2년생존율은 73%, 3년생존율은 62%로 EGFR 발현 유무에 따른 생존율에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. CEA 발현 양성군중 grade 1+인 32예의 1년생존율은 79%, 2년생존율 61%, 3년생존율은 51%이었고, grade 2+인 23예의 1년 생존율 75%, 2년생존율 68%, 3년생존율은 68%이었으며, grade 3+인 13예의 1년 생존율 100%, 2년생존율 79%, 3년생존율은 63%이었고,

grade 4+인 28예의 1년생존율은 92%, 2년생존율은 67%, 3년 생존율은 28%로 CEA 발현 정도에 따른 생존율에도 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

고 안

폐암의 발생과 진행, 전이 등에 대하여서는 많은 연구 활동에 비하여 소득이 적은 편으로 폐의 소세포암 (small cell carcinoma)에서는 Peng 등¹³⁾이 del-3p가 암 발생의 주요 기전일 것으로 보고하여 다른 학자

Table 2. EGFR Positivity by Histologic Subtypes of Lung Cancer

	0	+	++	Total +
Epidermoid (n=63)	44 (70)	16 (25)	3 (5)	19 (30)
Adeno (n=27)	23 (86)	2 (7)	2 (7)	4 (14)
Large (n= 4)	4 (100)	0	0	0
Undiff (n= 6)	3 (50)	3 (50)	0	3 (50)

* Parenthesis means percentage in each subtype



Fig. 3. A. Lung Epidermoid Cancer. Immunoperoxidase stain for EGFR ($\times 200$). The staining pattern clearly represent cytoplasmic membrane EGFR expressions.
B. absence of primary antibody staining with same tissue ($\times 100$).

들^{14,15)}의 지지를 받아 인정된 것에 비해 비소세포암 (non-small cell carcinoma)에 관하여서는 공통된 보 고가 없는 실정이다. 1980년대 후반에 들어서 growth factor에 관한 관심이 높아지면서 몇몇 학자들이 폐암

세포에서 EGFR이 증가되어 있음을 면역세포화학적¹²⁾으로 혹은 분자 생물학적 정량^{7,9,16,17)}으로 증명하였고 Lee등¹⁸⁾이 단기 배양한 비소세포 폐암에서 Trisomy 7이 있음을 보고하였는데, EGFR (c-erb B) gene이 7번 염색체에 위치하고 있기 때문에 이는 비정상한 관상을 끌게 되었다. Koprowski등¹⁹⁾이 흑색종(melanoma)에서 이와 유사한 보고를 한바 있었으므로 Lee등의 보고는 폐암에서 다른 보고자들의 지지가 없었음에도 불구하고 관심의 대상이 되었다. 이와는 달리 CEA는 1960년대 중반부터 알려져서^{1,20)} 대장직장암(colorectal cancer), 유방암(breast cancer) 및 폐암의 진단과 치료 효과 측정에 사용되어 왔으며 단클론 항체를 이용한 면역세포화학적 염색법으로 폐암 세포내의 항체 검출이 1970년대 이후 보고됨^{16,21)}에 따라 폐암의 진단 특히 악성 흉막 삼출(pleural effusion)시 중피 종양(mesothelial malignancy)과의 감별에 이용되었다. 상술한 두 암 표식자는 폐암의 세포 유형에 따라 발현 양상이 다르며, 같은 유형의 세포에 있어서도 환자에 따라 양성군과 음성군이 있고, 양성군의 종양조직 내에도 양성인 암세포와 음성인 암세포가 공존해 있어서^{6,12,21)} 이러한 heterogenous한 양상은 암세포의 유형, 분화 정도 및 현재 우리가 알지 못하고 있는 기타 어떤 요인에 의하여 결정되는 것이 아닌가 하는 추측을 낳게 한다.

CEA는 Gold등^{1,20)}에 의하여 내배엽에서 유래된 종양 관련 항원(tumor-associated antigen)으로 태아의 위장 조직(fetal gastrointestinal tissue)에 존재하는 것으로 알려졌으며, LoGerfo 등, Concanmon 등 및 Vincent 등³⁻⁵⁾이 modified radioimmunoassay를 이용하여 폐암 환자의 혈청에서 CEA level이 증가되어 있음을 보고하였다. 그러나 혈청 CEA level이 진단 당시 폐암의 병기나 환자의 생존율과 상관관계가 없었고 비특이적 소견을 보였으므로 폐암 환자의 진단 및 치료에 효과적으로 사용되지 못하였으며 이는 혈청 CEA의 존재가 환자에게 발생된 암의 metabolic properties를 반영하는 것이며 암의 크기나 전이와는 특별한 관계가 없다는 사실에 기인된다.

Pascal등²¹⁾은 폐암의 deparaffinized 조직에 immunoperoxidase method를 사용하여 선암에서 73%, 편평상피세포암에서 22%, 미분화암에서 50%의 CEA 발현율을 보고하였으며, 암 세포 유형에 따라 차이가 있어 기관지 폐포 세포암(bronchoalveolar cell car-

cinoma)을 포함한 선암에서 발현율이 가장 높고 잘 분화된 편평상피암의 각질화(keratinize)된 부위에서도 발현되는 것을 보고하였다. 본 연구에서 전체 폐암의 CEA 발현율은 96%이었으며 암세포 유형별로는 편평상피세포암 95%, 기관지폐포세포암을 포함한 선암 100%, 대세포암 100%, 미분화암 83%로 비특이적이었으나 grading system을 적용 하였을 경우 편평상피암의 73%, 대세포암의 100%, 미분화암 50%가 grade 1 혹은 2+인 반면에 선암의 93%가 grade 3혹은 4+로 Pascal등의 보고에서 처럼 선암에서 가장 높은 발현율을 나타내었다(Table 1, Fig. 2).

Kuhajda등²²⁾은 CEA 발현이 없는 정상 유방 조직과는 달리 유방암 조직에서 CEA 발현율이 높고, infiltrating ductal carcinoma의 경우 CEA에 강하게 염색될 수록 액와부 임파선 전이율이 높다고 하였으나, Robertson등²³⁾은 유방암의 CEA 염색 정도와 조직학적 grade, 임파선 전이 및 생존율과는 특별한 관계를 찾아 볼 수 없었는데 이는 혈청 CEA에서와 마찬가지로 암세포에서 CEA의 발현이 비특이적이기 때문으로 생각된다.

EGF는 상피세포의 증식 및 분화를 촉진 시키는 분자량이 작은 polypeptide로 상피세포 세포막에 존재하며 이미 알려진 cellular proto-oncogene인 C-erb-B oncogene과 sequence가 유사한 specific glycoprotein receptor인 EGFR에 결합함으로써 세포 증식 작용을 나타낸다^{8,10)}. 상피세포암에서 EGFR의 발현이 증가되어 있다는 보고들은 EGFR및 이와 연관된 gene의 비정상적인 발현이 상피 세포암의 발생에 관련 되었을 가능성을 시사하여 주며, 유방암 및 방광암에서는 암의 invasiveness와 EGFR 발현과의 상관관계가 보고되었다^{24,25)}.

Cerney등¹²⁾은 폐암 환자의 기관지내시경을 통하여 조직 검사된 cryostat frozen 절편에 EGFR에 대한 immunoperoxidase 염색을 시행하여 비소세포암에서 80% 이상의 EGFR 발현율을 보고하였으며, 소세포암 15예 모두에서 EGFR 발현이 없었다고 보고하였다. Sobol등²⁶⁾은 수술 및 부검시 얻은 fresh frozen 조직에 immunoperoxidase 염색을 시행하여 편평상피암 및 대세포암에서 100%, 선암에서 62%의 EGFR 발현율과 비소세포암에서는 EGFR이 발현되지 않음을 보고하여, immunohistochemical 염색법으로 사용하여 조직의

EGFR의 발현을 검사함으로써 비소세포암과 소세포암을 구별할 수 있을 가능성을 시사하였다. 본 연구에서는 수술로 적출된 폐암 조직의 paraffin block으로 제작한 슬라이드에 immunoperoxidase 염색을 시행하였으며, 소세포암의 조직은 얻지 못하여 비소세포암만을 대상으로 하였다. 한국인 비소세포암에서 EGFR의 발현율은 26%이었으며, 암세포 유형에 따른 EGFR 발현율은 편평상피세포암 30%, 선암 14%, 대세포암 4예중 0%, 미분화암 50%로 외국의 보고에 비하여 상당히 낮은 발현율을 보였다(Table 2, Fig. 3). 이러한 낮은 EGFR 발현율이 한국인 폐암에서의 특성인지 아니면 기술적인 문제이거나 혹은 본 연구의 경우 외국에서 fresh frozen 조직을 사용한 것과는 달리 paraffin block을 사용한 것에서 오는 차이 인지에 대하여서는 추후 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

암 환자에서 EGFR의 예후 인자로서의 가능성에 관한 연구를 살펴보면, Ozawa등²⁷⁾은 식도암 환자를 대상으로 하여 EGF 결합능이 높은 군 즉 EGFR이 많은 군이 적은군에 비하여 유의하게 생존율이 낮다고 보고하였다. Yasui등²⁸⁾은 위암 환자를 대상으로 EGFR 발현율을 초기 위암에서 3.8%, 진행된 위암에서 33.8%로 보고하였으며, EGFR 발현과 암의 병기 및 invasion 깊이와 유의한 상관관계가 있다고 하여 EGFR이 발현될 경우 예후가 나쁘다고 보고하였다. 본 연구에서도 EGFR 발현 유무에 따라 생존율을 살펴 보았으나 차이가 없었으며, 이는 외과적 수술을 시행한 폐암 환자를 대상으로 한 생존율 조사에서 평균 추적기간이 2년으로 너무 짧기 때문이 아닌가 생각되며 더 긴 기간동안의 추적 조사가 필요 하리라 생각된다.

이상으로 한국인 비소세포암에서 CEA와 EGFR이 발현함을 확인 하였으나 CEA와 EGFR 발현 유무 및 발현 정도가 폐암 생존율의 예후 인자로 작용할 가능성 여부에 대하여서는 추후 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경 : Carcinoembryonic antigen은 oncodevelopmental tissue glycoprotein으로 대장 및 직장암, 유방암, 폐암 환자의 혈청에서 검출되어 진단 및 치료 경과의 관찰에 이용되고 있으며, Epidermal growth factor receptor는 상피세포의 세포막에 존재하는 수용

체로써 EGF와 반응하여 상피세포의 분화와 증식을 조절하는 물질로 인체 세포 내에 존재하는 proto-oncogene인 c-erb-B의 산물이며, 증가된 발현과 더불어 EGFR 또는 그와 관련된 gene의 비정상적인 발현이 상피세포암의 발현에 관여하리라 보고있다.

방 법 : 1986년 1월부터 1989년 12월까지 연세대학교 의과대학 세브란스 병원에서 원발성 폐암 진단 후 폐절제술을 시행 받고 생존 여부와 치료 성적으로 알고있는 원발성 비소세포 폐암 환자를 대상으로 CEA와 EGFR에 대한 면역세포화학적 염색을 시행하였다.

결 과 :

1) 한국인 비소세포 폐암에서 CEA 발현율은 96%이었으며, EGFR 발현율은 26%이었다.

2) 암세포 유형에 따른 EGFR 발현율은 편평상피암 30%, 선암 14%, 미분화암 50%이었으며, 대세포암은 4예 모두 음성 이었고, grading system 적용시 1 혹은 2+로 발현 정도가 낮았다.

3) Grading system을 적용한 암세포 유형에 따른 CEA 발현율은 편평상피암 22%, 선암 93%, 미분화암 33%가 3 혹은 4+로, 선암의 CEA 발현율이 가장 높았다.

4) 대상환자의 평균 추적 기간은 2년(1~41 개월)으로, 1년생존율은 85%, 2년생존율은 68%, 3년 생존율은 54%이었으며, EGFR 과 CEA의 발현 정도에 따른 생존율에는 차이가 없었다.

결 론 : 한국인 비소세포 폐암에서도 CEA와 EGFR이 발현함을 확인 하였으며, EGFR의 발현 유무가 폐암 생존율의 예후인자로 작용할 가능성 여부에 대하여서는 추후 연구가 필요할 것으로 생각된다.

= Abstract =

Carcinoembryonic Antigen and Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Defined by Immunohistochemical Stain

Seon Hee Cheon, M.D., Se Kyu Kim, M.D.
Hyun Cheol Chung, M.D., Joon Chang, M.D.
Hee Young Sohn, M.D., Sung Kyu Kim, M.D.
and Won Young Lee, M.D.

*Department of Internal Medicine, Yonsei University,
College of Medicine, Seoul, Korea*

Doo Yun Lee, M.D.

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery

Kyi Beom Lee, M.D.

*Department of Pathology, Aju University,
College of Medicine, Suwon, Korea*

Background: Carcinoembryonic antigen (CEA) was defined as an endodermally derived tumor-associated antigen that was also present in fetal gastrointestinal tissues. This antigenic material has been demonstrated in the blood of a large number of patients with other neoplasms, including those arising in the lung.

Epidermal Growth Factor (EGF) usually stimulate the growth and proliferation of a variety of cell types through binding to a specific cell surface receptor, a 170-KD glycoprotein, EGFR. A part of the EGFR has been found to be homologous to the product of the avian erythroblastosis virus oncogene, c-erb-B. Many squamous cell carcinoma cell lines show high levels of EGFR expression and the EGFR apparently plays an important role in the growth of squamous cell carcinoma.

Methods: We have collected paraffin blocks of 100 patients with non-small cell lung cancer who were treated with surgical resection and assessed their CEA and EGFR expression with monoclonal antibodies against the CEA or EGFR by immunohistochemical stain (ABC method).

Results:

1) The expression of CEA was 96% and the expression of EGFR was 26% in the Korean non-small cell lung cancer.

2) EGFR immunoreactivity was detected in 19 (30%) of the 63 epidermoid carcinomas, in 4 (14%) of the 27 adenocarcinomas and in 3 (50%) of the 6 undifferentiated carcinomas, while no EGFR immunoreactivity was found in large cell carcinomas. By using the grading system, the EGFR expression grades were low as grade 1 or 2+.

3) CEA immunoreactivity by using the grading system was 3 or 4+ in 14 (22%) of the 63 epidermoid carcinomas, in 25 (93%) of the 27 adenocarcinomas and in 2 (33%) of the 6 undifferentiated carcinomas. So the highest prevalence of intracellular CEA was seen in the adenocarcinomas, including the bronchoalveolar type.

4) The median follow-up duration was 2 years (1-41 months) and the 1-year survival rate was 85%, the 2-year survival rate 68% and the 3-year survival rate 54%. A correlation was not demonstrated between the expression rate of CEA or EGFR and the survival rate of lung cancer patients.

Conclusions: CEA and EGFR expression in Korean non-small cell lung cancer were observed. But further studies need to be performed to determine whether EGFR expression can be prognostic of lung cancer or not.

Key Words: Lung cancer. Immunohistochemical stain, CEA, EGFR

REFERENCES

- 1) Gold P, Freedman SO: *Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. J Exp Med* 122:467, 1965
- 2) Reynoso G, Chu TM, Holyoke D: *Carcinoembryonic antigen in patients with different cancers. JAMA* 22: 361, 1972
- 3) LoGerfo P, Herter FP, Braun J: *Tumor associated antigens with pulmonary neoplasms. Ann Surg* 175: 495, 1972
- 4) Concannon JP, Dalbow MH, Liebler GA: *The carcinoembryonic antigen assay in bronchogenic carcinoma. Cancer* 34:184, 1974
- 5) Vincent RG, Chu TM, Fergen TB: *Carcinoembryonic antigen in 228 patients with carcinoma of the lung. Cancer* 36:2069, 1975
- 6) Sun NCJ, Edgington TD, Carpentier CL, McAfee W, Terry R, Bateman J: *Immunohistochemical localization of carcinoembryonic antigen (CEA), CEA-S and*

- nonspecific cross-reacting antigen (NCA) in carcinoma of lung. Cancer* 52:1632, 1983
- 7) Hwang DL, Tay YC, Lin SS, Lev-Ran A: *Expression of Epidermal growth factor Receptors in human lung tumors. Cancer* 58:2260, 1986
 - 8) Carpenter G, Cohen S: *Epidermal growth factor. Ann Rev Biochem* 48:193, 1979
 - 9) Merlino GT, Xu YH, Richert N, Clark AJL, Ishii S, Banks-Schlegel S, Pastan I: *Elevated epidermal growth factor receptor copy number and expression in a squamous carcinoma cell line. J Clin Invest* 75:1077, 1985
 - 10) Downward J, Yarden Y, Mayes E: *Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. Nature* 307:521, 1984
 - 11) Hsu SM, Raine L, Fanger H: *Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique: A comparison between ABC and Unlabelled antibody (PAP) procedures. J Histochem* 29:577, 1981
 - 12) Cerny T, Barnes DM, Hasleton P, Barber PV, Healy K, Gullick W Thatcher N: *Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in human lung tumors. Br J Cancer* 54:265, 1986
 - 13) Peng JW, Bunn PA, Kao S, Lee EC, Carney DN, Gazdar AF, Minna JD: *A nonrandom chromosomal abnormality, del-3p (14-23) in human small lung cancer. Cancer Genet Cytogenet* 6:119, 1982
 - 14) Sozzi G, Betozlio MG, Borrello MG, Giani S, Pilotti M, Porta GB: *Chromosomal abnormality in a patient with small cell lung cancer. Cancer Genet Cytogenet* 27:45, 1987
 - 15) Water JJ, Ibson JM, Twentyman PR, Bleehen NM, Rabbitts PM: *Cytogenetic abnormality in human small cell lung carcinoma cell line characterized for myc gene amplification. Cancer Genet Cytogenet* 30:213, 1988
 - 16) Sakiyama S, Nakamura Y, Yasuda SI: *Expression of epidermal growth factor receptor gene in cultured human lung cancer cells. Jpn J Cancer Res* 77:965, 1986
 - 17) Hendler FJ, Ozanne BW: *Human squamous cell cancers express increased epidermal growth factor receptors. J Clin Invest* 74:647, 1984
 - 18) Lee JS, Pathak S, Hopwood B, Tomasovic B, Mullin TD, Baker FL, Spizler G, Neidhart JA: *Involvement chromosome 7 in primary lung tumor and nonmalignant normal lung tissue. Cancer Res* 47:6349, 1987
 - 19) Koprowski H, Herlyn M, Balaban G, Parmiter A, Ross A, Nowell P: *Expression the receptor for epidermal growth factor correlates with increased dosage of chromosome 7 in malignant melanoma. Somatic Cell and Molecular Genetics* 11:297, 1985
 - 20) Gold P, Gold M, Freedman SO: *Cellular location of carcinoembryonic antigen of the human digestive system. Cancer Res* 28:1331, 1968
 - 21) Pascal RR, Mesa-Tejada R, Bennett SJ, Garces A, Fenoglio CM: *Carcinoembryonic antigen; Immunohistologic identification in invasive and intraepithelial carcinomas of the lung. Arch Pathol Lab Med* 101:568, 1977
 - 22) Kuhajda FP, Offutt LE, Mendelsohn G: *The distribution of carcinoembryonic antigen in breast carcinoma. Cancer* 52:1257, 1983
 - 23) Robertson JFR, Ellis IO, Bell J, Todd JH, Robins A, Elston CW, Blamey RW: *Carcinoembryonic antigen immunohistochemistry in primary breast cancer. Cancer* 64:1638, 1989
 - 24) Sainbury JR, Sherbet GV, Farndon JR: *Epidermal growth factor receptors and estrogen receptors in human breast cancer. Lancet* 1:364, 1985
 - 25) Neal AE, Bennett MK, Hall RR: *Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer: Comparison of invasive and superficial tumors. Lancet* 1:366, 1985
 - 26) Sobol RE, Astarita RW, Hofeditz C, Masui H, Fairshter R, Royston I, Mendelsohn J: *Epidermal growth factor receptor expression in human lung carcinoma defined by a monoclonal antibody. JNCI* 79:403, 1987
 - 27) Ozawa S, Ueda M, Ando N, Shimizu N, Abe O: *Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer* 63:2169, 1989
 - 28) Yasui W, Hata J, Yokozaki H, Nakatani H, Ochiai A, Ito H, Tahara E: *Interaction between epidermal growth factor and its receptor in progression of human gastric carcinoma. Int J Cancer* 41:211, 1988