

진행성 위암 환자의 위조직에서의 p16 유전자의 메틸화와 돌연변이

장희경^{1*}, 김영옥¹, 공은희¹, 신연명², 최경현²,

고신대학교 의과대학 병리학교실¹, 외과학교실².

Mutation and methylation of p16 Gene in the Gastric Tissues of Advanced Gastric Cancer patients

HeeKyung Chang^{1*}, YoungOK Kim¹, UnHee Kong¹, YeonMyeong Shin², KyungHeon Choi²

Department of Pathology¹ and General Surgery²,
Kosin University College of Medicine, 34 Amnam-Dong,
Suh-Ku, Busan, 602-702, Korea

Abstract

Background/Aims: p16 has been suggested to be a tumor suppressor gene and to be inactivated in many human cancers. The aberrant expression of this gene proteins may deregulate cell proliferation and may lead to tumor formation and progression. The aim of this study was to evaluate the patterns of p16 inactivation and its association with clinicopathological parameters in 16 cases of advanced gastric cancers having fresh and paraffin-embedded tissues. **Material and Methods:** p16 inactivation by immunohistochemistry, mutation by direct sequencing and methylation analysis by methylation-specific PCR in exon 1 and 2 in 16 cases of advanced gastric cancers. **Results:** Eight of 16 (50.0%) carcinoma tissues and 3 cases (18.8%) of non-neoplastic gastric tissues showed loss(inactivation) of p16 expression by immunohistochemistry. Eight cases of p16 inactivated carcinomas were composed of 3 mutations (18.8%) and 5(31.3%) methylations, and 3 cases of non-tumor gastric mucosa showed 1 mutation(6.3%) and 2 methylations(12.5%). Interestingly, one of 3 mutations showed also same mutation in adjacent nonneoplastic tissue, while 2 methylations were identified in non-neoplastic mucosal tissues without methylation in corresponding cancer tissues. The parameters histologic types and differentiation of tumors, sex, age, invasion depth, and vascular invasion did not correlate with p16 gene alteration, while nodal metastasis and perineural invasion showed positive correlation. **Conclusions:** These results suggest that p16 inactivation may have effects on the carcinogenesis of gastric mucosa and may serve as a prognostic biomarkers for the progression of carcinoma.

Key words : p16, methylation, mutation, advanced stomach cancer

서론

한국인에서 가장 많은 악성 종양인 위암은 내시경 검사 등의 조기 진단 기술의 발달과 생활 양식의 변화에도

불구하고 발생 빈도는 크게 감소되지 않고 있다. 구미인과는 달리 한국인에서 위암이 호발하는 이유를 식이 습관의 차이일 것으로 추측하고 있으나 과학적으로 위암의 발생 기전이 한국인에서 어떤 특성이나 차이가 있는지에 대해서는 아직 충분히 설명하지 못하고 있다[15]. 따라서 위암의 발생 기전, 발생 형태, 임상 경과상의 특징 등에 대한 보다 다양하고 객관적인 연구가 필요하다 하겠다.

교신 저자 : 장 희 경
602-702, 부산시 서구 암남동 34,
고신대학교 의과대학 병리학교실
전화: 051-990-6323
Fax: 051-241-7420
Email: changhkg@ns.kosinmed.or.kr

본 논문은 고신대학교 의과대학 기초임상의학공동연구 학술연구비에 의해 이루어진 것임.

주요한 유전자 프로모터 부분에 있는 정상적으로는 메틸화 되지 않는 CpG islands가 집중적으로 메틸화되면 전사 침묵(transcription silencing)을 가져오고 결국은 암 억제 유전자 기능이 상실하게 된다. 특히 이는 암의 후성적 발생기전(epigenetic mechanism)으로 비유전성 종양의 유전자 변형 일부를 설명할 수 있다[1,2,4].

Cyclin D가 CDK에 결합하는 장소에 경쟁적으로 작용하여 CDK4와 Cln D 복합체 형성을 억제하여 세포 주기 G1-S기로의 억제 작용을 하는 p16은 암억제 유전자로서 특히 Rb가 없는 세포에서 증가함이 밝혀져 세포 분열 조절에 Rb와 상보적인 역할을 한다고 추측되고 있으나 [18], 그 발현 조절에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다. 현재까지 몇 종류의 악성 종양에서 p16결손 및 돌연변이로 인한 p16 불활성화가 보고되고 있고, 메틸화에 의한 불활성화가 p16에서는 우세하다는 보고도 있어 [2,6,7,10,18]. 두경부암에서는 p16의 불활성화가 88%에 달한다는 보고도 있다[13]. 또한 이런 과정은 조직이나 세포에 특이한 요소들(tissue or cell-specific factors)에 의해서 매개될 것으로 생각되기 때문에 다양한 종류의 조직과 종양을 대상으로한 많은 연구가 필요하다 하겠다.

위암은 Lauren의 조직학적 유형 부류에 의하면 *H.pylori* 로 인한 만성 위염이 장형 화생을 거쳐 관상암으로 발생하는 장형암과 아직은 뚜렷한 암의 전구 병변 없이 de novo에서 발생하는 반지세포암이 주를 이루는 미만형암으로 분류할 있다. 최근에 p16의 발현 소실이 위암에서 보고되고 있어 p16의 불활성화의 원인을 밝히고자 promotor 부분에서 과메틸화 현상을 관찰하였고, 직접 염기 서열법에 의하여 돌연변이 유무를 관찰하고, 임상 예후인자들과 비교 분석하여 위암의 생물학적 표지자로서도 이용가능한지를 조사하였다.

재료 및 방법

재료

16례의 암으로 진단되고 위절제술이 시행된 후 즉시 얻어진 신선한 암조직과 암조직에서 2cm 이상 떨어진 육안적으로 이상이 관찰되지 않는 위점막 조직을 각각

채취하여 돌연변이와 메틸화 검사를 시행하였다. 신선한 조직을 채취한 후의 가검물을 10% 중성 포르말린에 고정시킨후 파라핀에 포매하여 블록을 만들었다. 이를 4 μ m씩 여러장 절취하여 헤마톡실린-에오진과 면역조직염색을 시행하였다.

병리조직학적 분석

헤마톡실린-에오진 염색에서 위암과 비종양 조직을 확인하였고, 위암인 경우는 암의 분화도, Lauren에 의한 조직학적 유형, 침범 깊이 (T3a: 위고유근육층, T3b: 장막하, T4: 장막까지 침범된 경우), 위벽내의 혈관 및 신경 조직 침범 유무, 림프절로의 전이 유무를 관찰하였다.

면역조직화학염색

p16 항체(clone F-12; Santa Cruz Biotechnology, Santa cruz, CA, U.S.A.)를 1: 100으로 희석하여 사용하여 Avidin-Biotin Complex(ABC)법으로 염색하였다. 이때, 절편들을 압축 용기(pressure cooker)에서 0.01 M citrate buffer(pH 6.0)에 침잠시키고 15분간 autoclave하여 antigen retrieval 시켰고, Mayer's hematoxylin으로 5분간 배경염색을 실시하였다.

DNA extraction and MSP

DNA mini kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 양식에 따라 DNA를 추출하였다. MSP는 CpZ WIZ p16 Amplification Kit(Intergen, New Heaven, CT, U.S.A.) 이후 DNA 샘플을 sodium bisulfite에 의해 변형시켰는데, 이는 모든 비메틸화된 cytosine을 uracil로 전환시키는 한편, 5-methylcytosine 은 그대로 유지된다. 사용한 primer는 unmethylated p16(5'-TTA TTA GAG GGT GGG GTG GAT TGT-3', 5'-CAA CCC CAA ACC ACA ACC ATAA-3')와 methylated p16(5'-TTA TTA GAG GGT GGG GCG GAT CGC-3', 5'-GAC CCC GAA CCG CGA CCG TAA-3')였다. PCR 반응물은 총 50 μ l로써 10ng modified genomic DNA, 1.5mM Mgcl2, 20pmol primer set, 0.2mM deoxy nucleotide triphosphate, PCR buffer, 1.25U ampliTaq gold polymerase(Perkin-Elmer, hoster city, U.S.A.)을 사용하였다. 반응 조건은 95°C에서 7분간 denaturation시키고, 95 °C 45초간 30cycles로 ampli-

cation 시키고, 65oC 45초간 annealing, 72oC에서 1분간 elongation 시키고 72oC에서 7분간 extension 시킨다. 각 PCR 산물을 2% agarose gel에서 전기 영동시키고, ethidium Bromide로 염색후 UV하에서 관찰한다. p16 메틸화 상태 (methylated, unmethylated)는 gel에서 PCR product 의 존재 유무를 판정하였다.

Sequencing

JETSORB gel extraction kit(Genomed, Bad Oeynhausen, Germany)를 사용하여 PCR 산물을 정제하고 subcloning 한후에 Automatic DNA sequencer(부경대학교)를 이용하여 sequencing 하고, 염기서열 분석은 NCBI(NIH, U.S.A.) Blast search program을 이용하였다.

통계분석

종양 조직에서의 p16 유전자 변형과 기존의 임상 및 병리학적 예후 인자와의 관련성 유무는 Chi-sequared test, Fisher's exact test를 이용하였다. 통계학적 의미는 $p<0.05$ 를 인정하였다.

결 과

1. 위암과 인접 비종양성 위점막조직에서의 p16 유전자 변형 상태

(1) 면역 조직화학염색 결과

포르말린에 고정된후 파라핀에 포매된 위암조직의 면역조직화학 염색에서 총 16예중 8예(50.0%)가 p16에 음성반응을 보였으며, 인접 비종양 점막조직에서는 3예(18.8%)에서 음성 반응을 보였다(Fig.1). 면역 조직 화학 염색에서 정상 위점막조직은 염색의 강도는 다소 차이가 있었으나, 양성 반응을 보였다.

(2) DNA sequencing 결과

점상돌연변이가 3예(18.8%)의 암조직에서 관찰되었으며, 이중 1예는 인접 위조직에서 같은 돌연변이가 관찰되었다(Fig.2). 3예 모두에서 돌연변이는 염기서열 1966-2055에서 (-C->T-) 로의 변이가 주로 관찰되었다. 그러나 Delion 현상은 관찰되지 않았다.

(3) Methylation 연구 결과

p16 promotor 부분의 메틸화이상은 5예(31.3%)의 암 조직에서 관찰되었다(Fig.3). 비종양성 위조직 2예(12.5%)에서 메틸화가 관찰되었다(Table 1.).

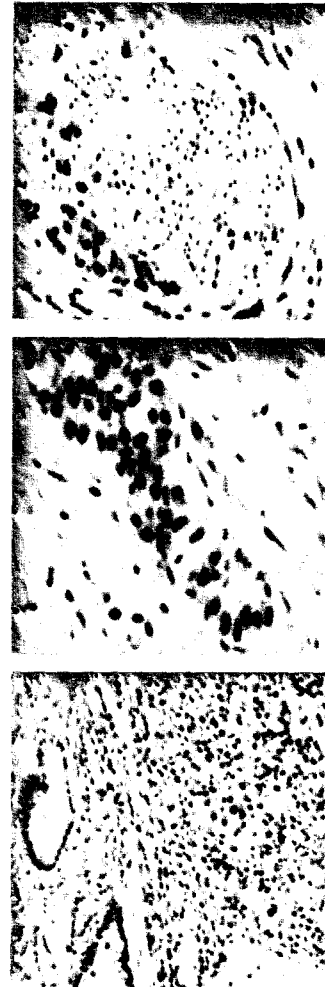


Fig.1: The immunohistochemistry for p16 shows negative (left) and positive(middle) reaction and positive neural invasion(right) in the gastric carcinomas. (ABC, x100, x200 x200)

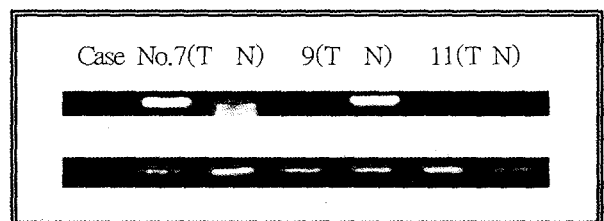


Fig.2 Methylation-specific PCR with methylated(145bp) and unmethylated(154bp) p16 primer sets. Cases 7 shows methylation in tumor tissue, in cases 9 shows methylation in adjacent gastric mucosal tissue and cases 11 show no

methylation.(T: tumor, N: non-tumor tissue)

Table 1. The status of p16 gene in the gastric carcinoma and adjacent gastric mucosal tissues.

	tissue of gastric carcinoma (n=16)	grossly normal tissue adjacent to gastric carcinoma
Immunohistochemistry		
Positive(activation)	8(50.0%)	13(81.2%)
Negative(inactivation)	8(50.0%)	3(18.8%)
Mutation	3(18.8%)	1(6.3%)
Methylation	5(31.3%)	2(12.5%)

+: case number 5,10,14

++: case number 14

*: case number 3,9,13,16,17

**: case number 5,10

2. 위암조직에서 p16 유전자 이상과 임상예후 인자의 관련성

연령, 성별, Lauren 조직학적 유형, 종양의 침습깊이, 분화도등과 p16 유전자 이상은 관련성이 없었다.

혈관 침범은 돌연변이와는 양의 상관성, 메틸화와의 역의 상관성의 경향을 보였으나, 통계학적으로 의미가 인정되지 않았다 ($p=0.097$).

림프절 전이와 신경조직의 침범과 p16 유전자 변형은 의미있는 관련성을 나타내었다($p=0.045$, 0.047). p16 유전자에 돌연변이가 일어난 3예 모두와 메틸화가 일어난 5예 모두가 림프절 전이가 있었으며, 돌연변이가 일어난 3예와 메틸화 4예(75%)에서 위벽내 신경 조직에 종양이 침범하였다.

고 찰

위암과 인접 비종양성 위점막조직에서의 p16 유전자 변형 상태의 면역 조직화학염색 결과는 포르말린에 고정된후 파라핀에 포매된 위암조직의 면역조직화학 염색에서 총 16예중 8예(50.0%)가 p16에 음성반응을 보였으며, 인접 비종양 점막조직에서는 3예(18.8%)에서 음성 반응을 보였다(Fig.1). 면역 조직 화학 염색에서 정상 위점막조직은 염색의 강도는 다소 차이가 있었으나, 양성 반응을 보였다. 이는 정상 조직에서 p16이 발현된다는 의미로 p16이 종양 억제 유전자중의 하나임을 지지하는 소견이다. 그러나, 악성 종양에서 음성 반응을 보인

다는 것은 여러 기전에 의해 p16이 불활성화되어 발현이 소실된다.¹⁶⁾ 다른 연구 결과에서는 30-60%정도의 p16 발현의 소실을 위암에서 보고하고 있는 데^{20,24)}, 본 연구 결과도 이들의 결과와 일치한다고 하겠다. 암조직 주위의 점막에서는 12.8%의 발현 소실을 보였는 데, 이는 육안적으로는 종양형성 전단계이나 분자수준에서는 이미 유전자 변화가 일어났다는 것을 의미한다. 그러나, 메틸화 자체는 가역성 반응으로 화학제등에 의해서 유발되거나 탈메틸화될 수 있고 최근에는 노화 현상으로 과메틸화가 일어난다는 보고도 있으나^{4,7)} 염증이나 위축이 심한 경우 메틸화가 많이 관찰된다는 저자들의 이전 연구 결과¹¹⁾를 뒷받침하는 결과로 메틸화가 연구당시의 조직 환경을 잘 반영한다고 볼 수 있다.

DNA sequencing 결과, 점상돌연변이가 3예(18.8%)의 암조직에서 관찰되었으며, 이중 1예는 인접 위조직에서 같은 돌연변이가 관찰되었다(Fig.2). 3예 모두에서 돌연변이는 염기서열 1966-2055에서 (-C->T-)로의 변이가 주로 관찰되었다. 그러나 Delion 현상은 관찰되지 않았다. 본 연구 결과는 Lee¹⁵⁾와 그 외 다른 몇몇 연구 결과^{8,19)}와 일치하는 결과이며, somatic mutation이 이미 비종양성 위점막 조직에서 관찰되었다는 결과는 돌연변이가 위암의 발생 초기에 이미 이루어지는 경우도 있다는 것을 시사해준다. 또한 돌연변이가 종양 발생 과정에서 여러 시기에 다발적으로 위점막에서 발생할 수 있음을 보여준다. Methylation 연구 결과, 메틸화이상은 5예(31.3%)의 암조직에서 관찰되었다(Fig.3). 비종양성 위조직 2예(12.5%)에서 메틸화가 관찰되었다(Table 1.). 위암에서 과메틸화 현상은 23%에서 75%까지 다양한 빈도로 보고되고 있는 데^{8,14)}, 저자들의 이전연구 결과¹¹⁾에서는 43%였다. 특히, 비종양성 점막조직에서만 메틸화가 2예가 관찰되었는 데, 이는 메틸화 자체가 가역성 반응으로 음식물중의 화학제성분등으로 인해서 유발될 수도 있다고 생각된다. 또한 이는 전암성 단계의 위점막에서도 메틸화가 관찰된다는 Kim등¹²⁾과 염증이나 위축이 심한 경우에도 비종양조직에서도 메틸화가 많이 관찰될 수 있다는 저자들의 이전 연구 결과¹¹⁾를 뒷받침하는 결과로 메틸화는 당시의 조직 환경을 잘 반영한다고 볼 수 있다. 최근에는 노화 현상으로 과메틸화가 일어난다는 보고도 있으나, 메틸화가 일어난 경우와 일어나

지 못한 경우에 연령간의 의미있는 차이는 없었다.

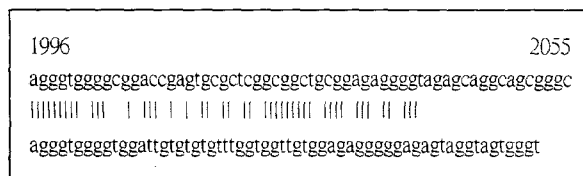


Fig. 3. Multiple point mutations are noted in case 13.

위암조직에서 p16 유전자 이상과 임상예후 인자와의 관련성 분석연구에서는 연령, 성별, Lauren 조직학적 유형, 종양의 침습깊이, 분화도등과 p16 유전자 이상은 관련성이 없었다. Ding등³⁾과 Rocco¹⁷⁾에 의하면 p16 유전자에 변형이 있는 경우는 종양 세포의 분화도가 나쁘다고 보고하였으나, 본 연구 결과에서는 통계학적인 의미가 없었다. 일부 연구자들은 Lauren 의 diffuse type에서 p16 변형이 많이 일어난다고 하였으나, 본 연구 결과에서는 intestinal type과 차이가 없었다^{16,17,19-25)}.

혈관 침범은 돌연변이와는 양의 상관성, 메틸화와는 역의 상관성의 경향을 보였으나, 통계학적으로 의미가 인정되지 않았다 ($p=0.097$). 본 연구자들은 위암환자에서 혈관 침범과 메틸화는 역의 상관성을 보인다고 이미 보고한 바 있는 데, 본 연구 결과도 증례수를 보다 많이 보충하면 통계학적으로 의미있는 결과를 얻을 수 있는 marginal significance 영역이므로 검정을 위해서는 추가 연구가 필요하다.

림프절 전이와 신경조직의 침범과 p16 유전자 변형은 의미있는 관련성을 나타내었다($p=0.045$, 0.047). p16 유전자에 돌연변이가 일어난 3예 모두와 메틸화가 일어난 5예 모두가 림프절 전이가 있었으며, 돌연변이가 일어난 3예와 메틸화 4예(75%)에서 위벽내 신경 조직에 종양이 침범하였다. 이는 p16 종양 억제 유전자가 불활성화되면 세포의 분열과 성장을 조장하게 되는 데, 덩어리가 커진 종양에서 전이를 하는 subclone이 형성되고 이 subclone들이 림프선에 들어가서 결국은 림프절로 전이하게 된다는 가설이 일반화되고 있는 데, 이때 subclone 형성에 p16이 관여하는 지에 대하여는 아직 밝혀지지 않았다. 림프절로 뚫고 들어가는 데는 세포외기질과 부착분자emdenh 관여하게 되는 데, 이들과 p16과의 관계도 아직은 정확히 규명되어 있지 않다. 위의 고유 근육층

사이에 존재하는 신경 세포로 특이하게 침범하는 tropism(지향성)에 p16이 관여하는 지도 아직은 알려진 바가 없다.

그러나, 림프절 전이와 신경조직 침범 모두는 환자가 예후가 나쁘리라고 추측케하는 인자이므로 앞으로 이방면에 대한 연구가 진행이 되면 p16의 유전자 변형은 같은 병기의 위암 환자라도 예후가 나쁠 것으로 예견할 수 있는 예후인자가 될 수도 있을 것이다. 뿐만아니라, 메틸화는 가역 변화이므로 p16 메틸화가 위암의 주 발생 기전인 환자에서는 탈메틸화제제를 암의 치료나 예방에 사용할 수 있을 지에 대한 연구도 필요하다 하겠다.

Table 2. Clinicopathological features of 16 gastric cancers according to the alterations of p16 gene.

features	total gastric cancers n=16	cases with mutation n=3	alterati methy n=5	p-value
Age(yr)	53±9.37	58.80±2.32	57.33±7.35	>0.05
Sex: Male	10	2	3	>0.05
Female	6	1	2	
Tumor Depth				>0.05
T3a	2	0	1	
T3b	6	2	2	
T4	3	1	2	
Lauren Classification of histologic types				>0.05
Diffuse	6	1	2	
Intestinal	10	2	3	
Differentiation				>0.05
well	3	0	1	
moderate	4	2	2	
poorly	9	1	2	
Lymph node metastasis				<0.05
presence	14	3	5	
absence	2	0	0	
Vascular invasion				>0.05
presence	9	1	3	
absence	7	2	2	
Perineural invasion				<0.05
presence	12	3	4	
absence	4	0	1	

결 론

한국인에서 가장 많이 발생하는 위암의 발생에 p16 유전자 단백질의 발현 상태를 조사하고 유전자의 불활성화 기전을 밝히고자 16예의 신선한 진행성 위암조직과

주위 비종양성 위점막 조직에서 p16 유전자의 메틸화와 돌연변이 상태를 조사하여 p16 유전자변형이 위암발생에 관여하는지를 조사하고, 임상 및 병리학적 특징들과의 관련성 유무도 분석하여, 위암의 예후 추정 인자로 사용할 수 있는 지도 연구한 결과, 면역 조직화학염색에서 암조직에서 8예(50.0%)의, 인접 위조직에서는 3예(18.8%)에서 p16발현의 소실을 보였고, 돌연변이는 3예(18.8%)의 암조직에서 관찰되었으며, 이중 1예에서는 인접 위조직에서도 같은 돌연변이가 관찰되었다. 메틸화 이상은 5예(31.3%)의 암조직에서 관찰되었다. 암조직에서 메틸화 이상이 없는 비종양성 위조직 2예(12.5%)에서 메틸화가 관찰되었다. 위암조직에서 p16 유전자 이상과 임상예후 인자와의 관련성에서 연령, 성별, Lauren 조직학적 유형, 종양의 침습깊이, 분화도등과 p16 유전자 이상은 관련성이 없었으나, 림프절 전이와 신경조직의 침범과 p16 유전자 돌연 변이와 메틸화는 의미있는 관련성을 나타내었다($p=0.045, 0.047$). 이상의 관찰 결과로써 위점막에서 암이 발생하는 과정에서 p16유전자는 암 발생 이전의 초기단계부터 관여하며, 돌연변이보다는 메틸화에 의해서 불활성화가 많이 발생하며, p16 유전자 변형은 림프절 전이와 신경 침범등 나쁜 예후를 예측할 수 있는 생물학적 표지자가 될 수 있으며, 이를 위한 많은 증례를 대상으로한 추가 연구가 필요하다고 하겠다.

References

- Baylin SB. Tying it all together: epigenetics, genetics, cell cycle, and cancer. *Science* 277: 1946-51, 1997.
- Burri N, Shaw P, Bouzourene H, Sordat I, Gille M, Schorderet D, Bosman FT, Chaubert P. Methylation silencing and mutation of the p14ARF and p16INK4a genes in colon cancer. *Lab Invest* 81: 217-29, 2001.
- Ding Y, Le XP, Zhang QX, Du P. Methylation and mutation analysis of 16 gene in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 9: 423-6, 2003.
- Esteller M.O. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promotor hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer* 36: 2294-2300, 2000.
- Fiocca R, Luinetti O, Villani L, Mastracci L, Quilici P, Grillo F, Ra GN. Molecular mechanism involved in the pathogenesis of gastric carcinoma: Interactions between genetic alteration cellular phenotype and cancer histotype. *Hepatogastroenterol* 48: 1523-30, 2001.
- Foukes WD, Flanders TY, Pollock PM, Mayward NK. The CDK 2A(p16)gene and human cancer. *Mol Med* 3: 5-20, 1997.
- Gazdar AF, Zochbauer MS, Virmani A, Kurie J, Minna JD. 2001. Promotor methylation and silencing of retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 93: 67-8, 2001.
- Gunther T, Schneider-Stock R, Pross M, Manger T, Malfertheine L, Lippert H, Roessner A. Alteration of the p16/MTS-tumor suppressor gene in gastric cancer. *Pathol Res Pract* 194: 809-13, 1998.
- He XS, Su Q, Chen ZC, He XT, Long ZF, Ling H, Zhang LR. Expression, deletion and mutation of p16 in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 7: 515-21, 2001.
- Hernan TG, Meio A, Lapidus RG, Issa JD, Davodson NE, Sidransky D, Baylio SB. Inactivity of the CDK/p16/MTS gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 55: 4525-30, 1995.
- Jang TJ, Kim DI, Shin YM, Chang HK, Yang CH. 2001. p16(INK4a) promotor hypermethylation of non-tumorous tissue adjacent to gastric cancer is correlated with gland atrophy and chronic inflammation. *Int J cancer* 93: 629-34, 2001.
- Kang GH, Shin YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY, Rhyu MG. 2001. CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res* 61: 2847-51, 2001.
- Kim HS, Chung WB, Hong SH, Kim JA, Na SY, Jang HI, Sohn YK, Kim JW. Inactivation of p16 in primary tumors and cell lines of head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cell* 10: 557-65, 2000.
- Lee TL, Leung WK, Chan MW, Ng EK, Tong JH, Lo KW, Chung S, Sung JJ, To KF. Detection of gene promotr hypermethylation in the tumor and serum of patients with gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 8: 1761-6, 2002.
- Lee YY, Kang SH, Shin JY, Jung CW, Lee KU, Choe KI, Kim BK, Koeffler HP, Bang YJ. Alterations of p16INK4a and p15INK4b genes in gastric carcinomas. *Cancer* 80: 1889-96, 1997.
- Myung N, Kim MR, Chung IP, Kim H, Jang JJ. Loss of p16 and p27 is associated with progression of human gastric cancer. *Cancer Lett* 153: 129-36, 2000.
- Rocco A, Nardone G, Tulassay Z, Staibano S, Malfertheiner P, Ebert MP. Loss of expression of tumor supressor p16(INK4a) promotor in human primary gastric cancer is related to the grade of differentiation. *Dig Dis* 10: 102-5, 2002.
- Russo A, Tong L, Lee JO, Jeffery PO, Pavletich NP. Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase by the tumor suppressor p16 INK4a. *Nature* 395: 237-43, 1999.
- Sasaki H, Ishizuka T, Igaki H, Terada M. Mutation frequency of the p16/CDKN2 gene and amplification of the cyclin E gene in human primary gastric carcinomas. *Nippon Rhinso*

- 54: 1049-53, 1996.
20. Skim YH, Kang GH, Ro JY. Correlation of p16 methylation with p16 protein loss in sporadic gastric carcinomas. *Lab Invest* 80: 689-95, 2000.
21. Song SH, Jong HS, Choi HH, Kang SH, Ryu MH, Kim NK, Kim WH, Bang YJ. Methylation of specific CpG sites in the promotor region could significantly down regulate p16(INK4a) expression in gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer* 87: 236-40, 2000.
22. Takaoka AS, Kakiuchi H, Itoh F, Hinoda Y, Kusano M, Chara M, Tsukakoshi H, Hosokawa M, Imai K. Infrequent alterations of the p16(MTS-1) gene in human gastric cancer. *Tumor Biol* 18: 95-103, 1997.
23. Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, Itoh F, Ohe-Toyota M, Imai K, Issa JP. Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res* 59: 5438-42, 1999.
24. Tsujie M, Yamamoto H, Tomita N, Sugita Y, Ohue M, Sakita I, Tanaka Y, Sekimoto M, Doki Y, Inoue M, Matsuura N, Monden T, Shioza. Monden M. Expression of tumor suppressor gene p16(INK4a) product in primary gastric cancer. *Oncology* 58: 126-36, 2000.
25. Zhou Y, Gao SS, Li YX, Fan ZM, Zhao X, Wei JP, Zou JX, Jiao LH, Bai YM, Wang LD. Tumor suppressor gene p16 and its expression in gastric cardia precancerous lesions from subjects at a high incidence area in northern china. *World J Gastroenterol* 8: 423-5, 2002.