

구강 편평세포암에서 예후 및 경부임파절 전이와 관련한 증식인자의 발현에 관한 연구

팬준영 · 옥용주 · 윤필영 · 명 훈 · 황순정 · 서병무 · 최진영 · 이종호 · 정필훈 · 김명진
서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2006;32:101-106)

PROGNOSTIC VALUE OF PROLIFERATION FACTORS IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Jun-Young Paeng, Yong-Ju Ok, Pil-Young Yun, Hoon Myoung, Soon-Jung Hwang, Byoung-Moo Seo,
Jin-Young Choi, Jong-Ho Lee, Pill-Hoon Choung, Myung-Jin Kim
Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National University

Purpose: The purpose of this study is to evaluate the value of proliferation factors, Ki67 and PCNA, as prognostic markers predicting the survival and neck metastasis in patients with oral cancer.

Methods: 101 patients with HNSCCs, were followed retrospectively for a median period of 60 months(from 16 to 82 months). All tumors were resected surgically and examined by conventional light microscopy, immunohistochemistry. The age, sex, tumor location, clinical stage(size), metastasis, proliferative activity index(assessed by proliferating cell nuclear antigen(PCNA) and Ki67 immunoreactivity) were considered as potential prognostic factors and were correlated with patient survival.

Results: Ki67 staining results ranged from 5% to 80% of tumor cell nuclei, with a median of 25%. PCNA staining results ranged from 1% to 90% with a median of 50%. With a cut-off point of 25%, patients with lower Ki67 scores showed survival advantages over those with higher Ki67 scores (p=0.0089). With cut-off point of 50%, patients with lower PCNA scores showed survival advantages over those with higher PCNA scores (p=0.0104). Pathologically neck node positive patients(n=27) showed higher PCNA expression(p=0.02) than pathologically negative neck node patients(n=39).

Conclusions: The lower expressions of Ki67 and PCNA were associated with favorable prognosis such as higher survival rate and lower neck node metastasis.

Key words: Oral squamous cell carcinoma, Ki-67, PCNA, Prognostic value

I. 서 론

악성 종양에서 증식(proliferation)과 관련된 종양표지자의 발현이 증가하는 사실이 보고된 이후 10년 이상 증식관련 표지자와 종양의 발생 및 예후와 관련된 연구가 진행되어 왔다. 여러 가지 종양에서 많은 연구가 있었고, 증식능이 예후와 높은 관련성을 가지는 것으로 여겨져 왔다. 그러나 주로 이러한 증식 관련 표지자와 종양의 병기나 전암병소에서 이형성 정도와의 관련성에 대한 연구는 많았으나, 예후와 관련하여서는 의외로

연구된 바가 많지 않으며, 상반된 결과를 보이는 경우도 있다^{1,2)}. 특히 구강편평세포암에서도 세포증식능과 관련되어서 오랫동안 표지자로 사용되어 왔으나, 전암병소나 발암과정과 관련된 연구는 많았던 반면에, 정작 구강암 환자의 생존율 등 예후와 관련된 연구와 독립적인 표지자로서의 연구는 미미한 실정이다³⁾.

종양내에서 증식하는 세포의 수를 평가하기 위해서 사용되는 Ki-67과 PCNA는 여러 가지 암에서 예후 인자로 널리 사용되었다. Ki-67은 1984년 소개되었는데, 비용과 시간을 절약할 수 있으면서도 종양의 성장속도를 측정하는 정확한 방법이라는 면에서 선호된다. 일반적으로 증식능력은 G2와 M Phase에서 최고로 표현되고, 증식하지 않는 세포(G0 phase)에서는 존재하지 않는 세포핵항원을 인지하는 항체인 Ki-67에 의해 반영된다고 할 수 있다⁴⁾. 증식세포핵항원(proliferating cell nuclear antigen; PCNA)은 G1 phase 말기에 핵내에 나타나 S phase에 증가하여 G2와 M phase에 감소하는 또 다른 핵 내의 non-histone

김명진
110-768 서울시 종로구 연건동 275-1
서울대학교 치과병원 구강악안면외과
Myung-Jin Kim
Dept. OMFS, College of Dentistry, Seoul National University
275-1, Yeongeong-dong, Jongno-gu, Seoul 110-768, Korea
Tel: 82-2-2072-3820 Fax: 82-2-766-4948
E-mail: myungkim@plaza.snu.ac.kr

항원이다. 36-kDa의 분자로 세포 복제와 손상으로부터의 회복에 관여하는 요소로서 핵산의 대사에 중요한 역할을 한다. DNA polymerase δ 의 보조 단백질로서의 역할을 하며, S phase에 precessive chromosomal DNA synthesis에 필요하다. 또한 세포주기 조절과 체크 포인트 조절에 관여하는 세포 단백질과 상호작용을 한다⁵⁾.

한 종양 내에서도 나타나는 다양성(heterogeneity)와 종양의 증식 표지자와 종양의 병기와의 강한 상관관계로 인해, 이들 증식관련 표지자의 실질적인 예후와 관련된 의미는 여전히 연구될 가치가 있다고 할 수 있다. 예를 들면 한 종양내에서도 산소화(oxygenation) 정도 정도가 다양하여 종양증식 표지자의 면역조직화학적 소견에 영향을 끼친다⁶⁾. 이러한 여러 가지 이유들로 지금까지 종양 증식 표지자들이 종양의 임상적 양상과 확실한 관련성을 보여주지는 못했으며, 두경부 암종의 예후 예측 인자로서의 증식 표지자의 임상적 가치에 대해서는 아직도 논란거리가 있다. 몇몇 연구에서는 높은 증식수치를 보이는 종양이 생존과 재발시기에서 이롭지 못하다는 보고가 있는 반면, 다른 연구에서는 반대의 결과를 내놓기도 했다.

경부 임파절 전이는 구강암 환자의 가장 강력한 예후 관련 인자로 낮은 5년 생존율과 관련이 있으나, 미세전이의 가능성 때문에 수술 전에 이것을 완전히 파악하는 것이 현재로서는 어려운 상태이다. PCNA와 Ki-67의 표현은 분화도가 낮은 종양에서, 전이가 없는 환자와 비교할 때 전이가 있는 환자에서 유

의성있게 증가를 하였다. 게다가, 높은 PCNA 염색도는 환자의 짧은 생존기간과도 관련이 있었다. 이들 연구들은 PCNA와 Ki-67은 두경부 편평세포암에서 독립적인 예후 인자가 될 수 있다는 것을 나타낸다. 또한 이들의 면역 염색은 잠재적 전이(occult metastasis)의 위험성이 높으나, 임상적으로 경부임파절 전이가 없는 환자를 구별하는 데 사용될 수 있으며, 예방적 경부청소술에서 잇점을 가지고 있다. 그러나 PCNA 면역 염색과 경부 임파절 전이와의 관련성은 모든 보고에서 관찰되는 것은 아니다. 수술 전 조직검사서 PCNA와 Ki-67의 면역 염색의 효과는 아직 연구되지 않았다.

이 연구의 목적은 구강암 환자에서 p53등과 함께 대부분의 악성종양관련 병리검사서 기본적인 면역조직화학적 검사가 된 PCNA와 Ki-67이 생존율과 경부임파절 전이와 가지는 관련성을 연구하는 것이었다.

II. 대상 및 연구방법

환자

1996년 1월에서 2001년 12월까지 구강 상피세포암을 가진 101명의 환자를 서울대학교 치과병원 구강악안면외과 자료에서 추출하여 조사하였다. 환자의 임상적 특징은 Table 1과 같다.

Table 1. Patient characteristics

Patient characteristics	Number of patients	%
Age	18-78 (Mean : 58.18)	
Gender		
Male	72	71.3
Female	29	28.7
Tumor stage		
T1	27	26.7
T2	31	30.7
T3	15	14.9
T4	28	27.7
Metastasis		
pN0	39	59.1
pN+	27	40.9

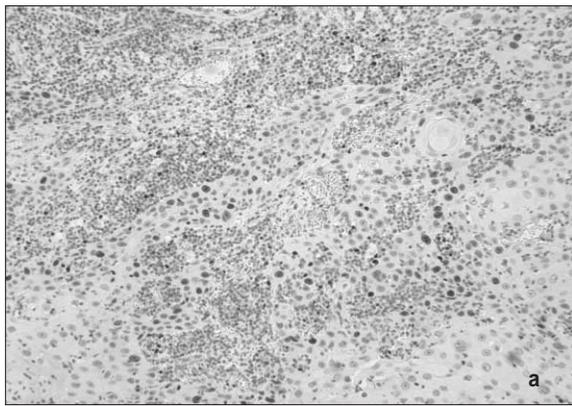
Table 2. The percentage of immunolabelled PCNA of the patients with neck metastasis was higher than those of the patients without metastasis

	No. of patients	Ki67 (Mean \pm SD)	PCNA (Mean \pm SD)
pN (-)	39	21.85 \pm 20.29	36.28 \pm 28.02
pN (+)	27	29.52 \pm 25.01	52.96 \pm 27.57
		P=0.193	P=0.020

환자의 평균 연령은 58세(18-78세)였다. 66명의 환자가 경부 청소술을 받았으며, 경부조직들은 임파절 전이를 조사하기 위해 병리과로 보내져 병리과 의사와 함께 육안적 검사로 임파절을 분리하여 검사를 시행하였다.

면역조직화학적 검사

조직은 10% 포르말린에 고정되어 파라핀 포매의 고전적인 과정을 거쳐 처리되었다. 4 μm의 절편은 streptavidin-biotin-technique (PCNA)과 APAAP method (MIB1)로 면역 염색되었다. DAKO Monoclonal Mouse Anti-human Ki67 Antigen, Clone MIB-1이 사용되었다. MIB-1 항체는 포르말린으로 고정되고 파라핀에 포매된 조직에서 Ki67을 표시하는 표준 monoclonal mouse로 확립되었다. PCNA는 AKO Monoclonal Mouse anti-proliferating cell Nuclear antigen인 Clone PC10이 사용되었다. 염색정도를 평가할 때는 각각의 조직에서 400배에서 1000개의 암세포 중 염색된 세포의 개수를 기록하여 비율을 구하였다(Fig. 1).



통계분석

생존율은 Kaplan-Meier 방법을 이용하여 평가하였으며, 생존율에 영향을 미치는 변수에 대해 Cox model의 logrank test를 이용하였다. 경부임파절 전이환자와 비전이 환자의 세포증식인자 발현은 unpaired t-test를 이용하였다.

III. 결 과

사망환자의 생존기간은 3개월에서 96개월로 평균 생존기간은 60개월이었다. 5년 생존율은 51.7%였다(Fig. 2, 3). 종양의 크기에 따른 생존율의 차이는 T stage1, 2와 3, 4로 나누어 비교해 보았을 때 유의한 차이가 있었다(p=0.0064). 5년 생존율도 T1, 2에서는 57.0%였으며, T3, 4에서는 38.2%였다.

Ki67은 종양세포 핵의 5%에서 80%정도가 염색이 되었고 중간값은 25%였다. PCNA의 경우 1%에서 90%까지 핵이 염색되었고 중간값은 50%였다. 25%를 기준으로 나누었을 때 더 낮은

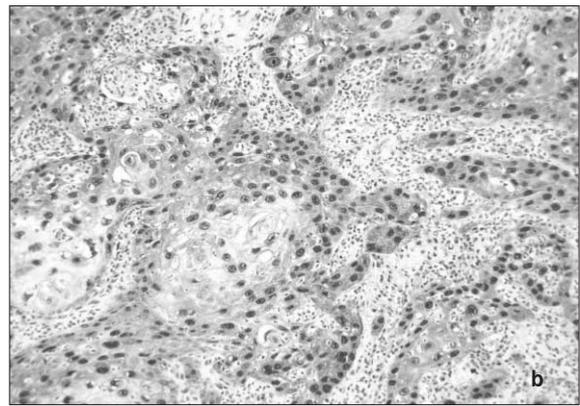


Fig. 1. Immunohistochemical stain a) Ki 67 b) PCNA (×400).

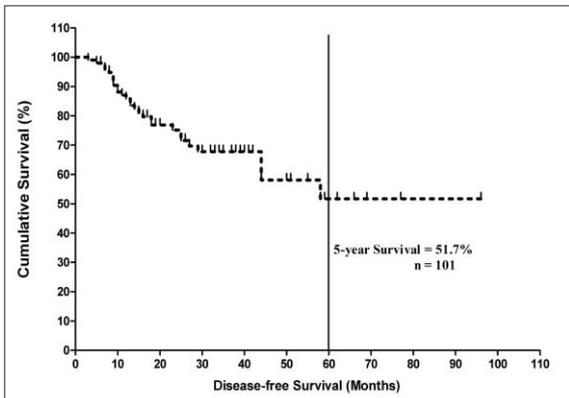


Fig. 2. Kaplan-Meier survival curve of all 101 patients. 5-year survival is 51.7%.

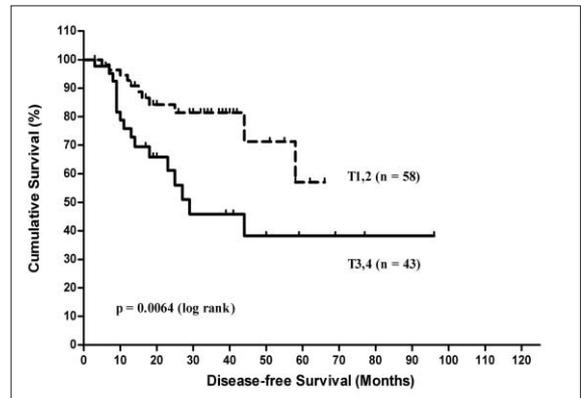


Fig. 3. Survival curve for the parameter T stage. T1 and T2 stage showed better survival curve than T3, T4 (p=0.0064).

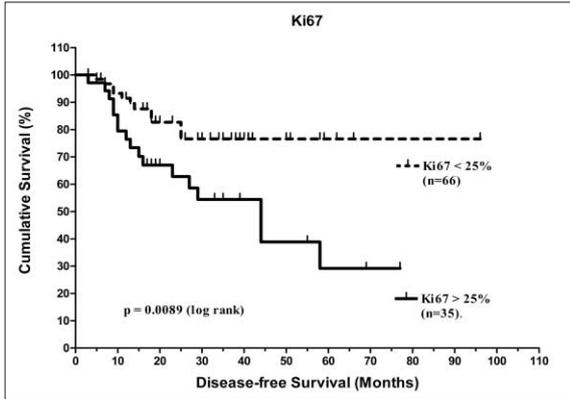


Fig. 4. Significantly better survival for patients with lower Ki67 scores (Ki67 < 25% of tumor cells) (p=0.0089).

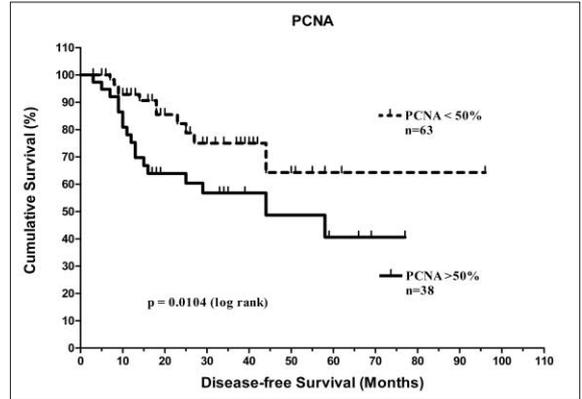


Fig. 5. Significantly better survival for patients with lower PCNA scores (PCNA < 50% of tumor cells) (p=0.0104).

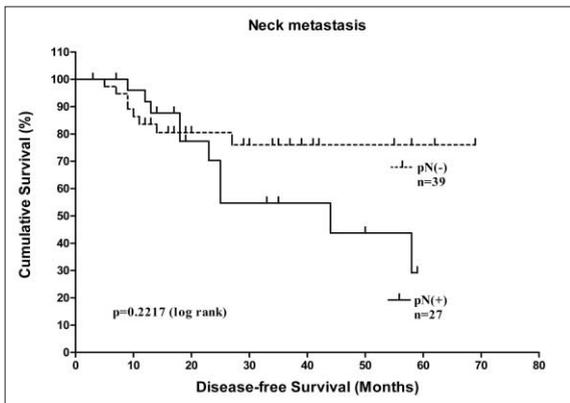


Fig. 6. The patients without neck metastasis had higher 5-year survival rate than those with neck metastasis. But the difference of survival curve was not significant.

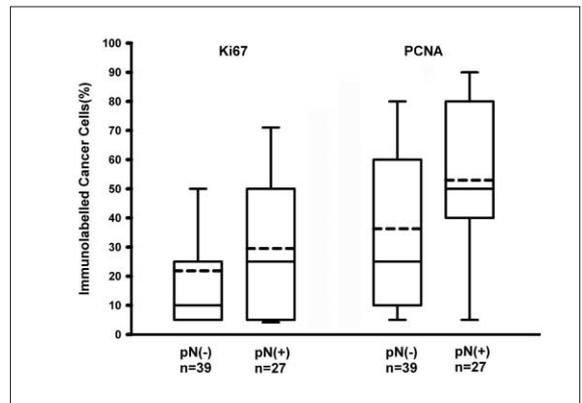


Fig. 7. Whiskers-boxes presentation of the percentages of PCNA- and of Ki67-immunolabeled cancer cells in biopsy specimens of patients with or without lymph node metastasis. (··· Mean value, — Median).

Ki67의 염색을 보인 환자의 경우, 기준값보다 높은 염색을 보인 환자보다 더 높은 생존율을 보였다(p=0.0089). PCNA의 경우도 기준값을 50%로 잡았을 때 낮은 염색을 보이는 환자와 높은 염색을 보이는 환자와 생존율의 차이를 보이는 것을 관찰할 수 있었다(p=0.0104) (Fig. 4, 5).

수술 후 경부청소술에서 나온 임파절의 조직병리학적인 검사에서 66명의 조직 중에서 27명의 환자가 임파절 전이를 보였다. 임파절 전이가 있었던 환자에서 생존곡선이 낮아지는 것을 관찰할 수 있으나, 통계적으로 유의하지는 않았다 (p=0.2217) (Fig. 6). 임파절 전이를 보이는 환자와 임파절 전이가 없는 환자의 원발부 조직의 PCNA와 Ki67의 염색을 비교해보면 임파절 전이를 보이는 환자(pN+)가 임파절 전이를 보이지 않는 환자(pN-)보다 더 염색정도가 많은 것을 관찰할 수 있으며 통계적으로는 PCNA에서 유의한 차이를 관찰할 수 있다

(p=0.023 for PCNA and p=0.082 for Ki67) (Fig. 7). PCNA와 Ki67의 상관관계를 살펴보았을 때 예상대로 양의 상관관계를 보인다 (r=0.614, n=98, P<0.001).

IV. 고 찰

세포의 증식(cell proliferation)은 종양을 일으키는 가장 중요한 기전중의 하나로 여겨진다⁷⁾. 세포의 증식능을 측정하는 방법은 대표적으로 Ki-67, PCNA, TH3/BrdU-Li/*Tpot*, DNA-SPF, AgNORs 등이 사용되나, 이중 환자의 조직에서 면역염색을 시행하여, 다른 병리학적 검사 시에 같이 조직에서 염색할 수 있다는 점에서, Ki67과 PCNA가 임상적으로 간편하고 유용한 표지자로 여겨져 왔다⁸⁾.

PCNA는 DNA polymerase-delta의 auxiliary protein으로 DNA 복

제에 관여한다. 보통 면역조직학적으로 나타나는 PCNA는 증양 조직의 성장하는 부분의 비율을 측정할 수 있게 한다. 1992년 microwave를 이용한 처리방법이 개발되어져서, 파라핀 블록에서 Ki67에 대한 monoclonal antibody(MIB1)의 사용이 가능하게 되었다⁵⁾. MIB1 monoclonal antibody는 세포 주기의 모든 활동적인 부분에 존재하는 핵의 non-histone protein과 반응하는 항체이다. Ki67 항체는 G1중기에서 M기에 표현되는 핵항원을 감지하여 세포 성장의 비율을 측정하는데 사용된다. 그러나 G1 세포는 약한 Ki67 염색정도를 보이고 분열이 끝난 세포에서는 빠르게 사라지기 때문에 성장비율을 저평가할 수 있는 여지가 있다. 증식인자의 예후와 관련된 가치는 여러 종류의 연구에서 밝혀졌다. Ki67은 유방암, 난소암, 식도 및 후두암에서 예후와 밀접한 관련성을 가지는 것으로 보고되었다^{9,12)}. 또한 두경부 종양에서도 Ki67과 생존율, 재발시기, 임파절 전이와의 관련성에 관한 연구가 진행되었다¹³⁻¹⁵⁾. 그러나 관련성이 없다는 상반된 연구도 보고되었다.

PCNA와 Ki67은 같은 세포증식과 관련된 이자이지만, 그 발현량은 차이를 보인다. 이번 연구에서도 PCNA와 Ki67이 높은 양의 상관관계를 보이고 있지만, PCNA가 Ki67보다 더 많이 염색되는 경향이 관찰되었다. 이것은 성장인자나 DNA 손상의 결과에서처럼, 세포의 분열과 관련된 세포주기 없이도 PCNA가 증가할 수 있다는 것과 관련이 있을 수 있다^{5,16)}. 또한 PCNA는 Ki67보다 더 긴 반감기(20시간 이상)를 가지고 있고, 분열 주기에 들어간 세포에 한정되어 나타나는 Ki67과는 달리 DNA 복제뿐 아니라 DNA 복구에도 PCNA가 필요하기 때문이다. Anti-PCNA clone PC10은 포르말린에 고정된 조직에서 이러한 복제와 관련 없는 PCNA를 detect할 수 있어 더 많은 염색 정도를 보이게 했을 것이다¹⁶⁾. 이러한 단점은 종양 표지자로서의 PCNA의 사용에 제약이 될 수 있다.

이번 연구에서는 증식인자 발현을 고저로 나누는 기준값으로 중간값인 25%(Ki67)와 50%(PCNA)를 설정하였다. 산술적 평균값은 예외적인 값과 값의 분포에 영향을 받을 수 있기 때문에 같은 수로 나누는 중간값을 기준으로 선택하는 것이 합리적이라고 판단되었다. 물론 이 연구의 결과를 이용한 예후 예측 시스템 등을 개발하기 위해서는 예후를 가장 확실히 구분할 수 있는 값을 통계적으로 분석하여 사용하는 것이 합당할 것이다. 그러나, 그러한 연구를 위해서는 좀더 많은 데이터의 축적이 필요하여, 이 연구에서는 중간값을 사용하기로 결정하였다.

Ki67과 PCNA 모두에서 생존율의 차이를 나타내고 있지만, 통계적으로는 Ki67에서 더욱 확실한 차이를 나타내는 것으로 나타났다. 생존곡선의 차이를 가장 잘 나타내는 기준값이 중간값과 다를 수 있기 때문에 단순한 비교는 어려우나, 세포증식 인자가 생존율에 영향을 줄 수 있는 독립적인 인자라고 할 수 있다.

세포의 증식은 종양의 침습성이나 전이성과도 관련이 있는 것으로 보고되었다. 구강암의 경우 하나의 경부 임파절 전이

를 보이더라도 5년 생존율에서 50% 이상 감소하는 것으로 보고되어진다¹⁷⁻¹⁹⁾. 이로 인해 경부임파절 전이여부를 치료 전에 확인하는 것은 구강암 치료의 중요한 검사에 들어가게 된다. 그러나, 수술 전에 주로 시행하게 되는 CT, MRI, ultrasonography 등은 경부임파절 전이에서 미세전이 혹은 잠재적 전이를 모두 평가하기에는 민감도와 특이도에서 한계를 가진다^{20,21)}. 이로 인해 개개인의 환자에서 경부임파절 전이를 예측하는 것이 어려우며, 종양의 크기나 종류, 위치 등에 따라 지금까지의 통계적인 데이터를 바탕으로 치료방법을 결정하게 된다. 이를 보완하기 위해 경부임파절 전이를 예측하기 위한 수 많은 연구가 진행되었으며, 그 중 원발부 종양의 표지자를 이용해 경부임파절 전이의 가능성을 예측하기 위한 노력도 있어왔다. 종양세포의 증식능은 기전적으로 경부임파절 전이를 일으키는 기전과는 거리가 있다고 할 수 있다. 하지만, 종양의 면역조직학적 검사에서 기본 검사처럼 되어버린 종양의 증식능이 예후에 영향을 미친다고 한다면, 예후와 밀접한 관련성을 가지는 경부임파절 전이와의 관련성에 대한 검사가 필요할 것으로 여겨진다.

PCNA와 Ki67에 염색된 종양세포의 비율은 laryngeal cancer와 hypopharyngeal cancer에서의 경부 임파절 전이와 관련된 예후인자로서의 가치가 있다고 보고되었다^{22,24)}. 즉 Ki67과 PCNA의 발현이 증가할수록 경부임파절 전이의 빈도가 증가하는 양상을 보인다²⁵⁾. 하지만 이러한 연구들은 대부분 laryngeal cancer를 대상으로 한 것으로, 두경부 종양의 95% 이상을 차지하는 편평세포암은 비슷한 예후 인자를 가지고 있지만, 해부학적 위치에 따라서 다양한 임상적 양상과 치료에 대한 반응을 보인다⁶⁾. 즉 같은 병기의 종양이라도 혀와 구강저의 편평세포암과 협점막의 편평세포암의 임상적 양상과 임파절 전이에서 차이를 보인다. 따라서 두경부암 특히 구강암은 위치에 따른 연구가 이루어져야 하며, 인두암과의 차별적인 연구가 있어야 할 것으로 판단된다.

이번 연구에서 임파절 전이를 보이는 환자의 5년 생존율은 29.2%로 임파절 전이를 보이지 않는 환자의 76.0%보다 현저히 낮은 것으로 나타났다. 이것은 이전의 연구와 일치하는 것으로 볼 수 있다. 그러나 생존곡선 자체는 통계적으로 현저한 차이를 보이지는 않았다($p=0.2217$). PCNA와 Ki67의 염색정도를 임파절 전이가 있는 환자와 없는 환자를 비교했을 때, 임파절 전이를 보이는 환자에서 임파절 전이가 없는 환자보다 유의하게 더 많이 발현되는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 PCNA에서 뚜렷한 차이를 볼 수 있었는데 이것은 PCNA의 특성으로 인해 더 수치의 영역이 넓었기 때문이라고 추측된다.

이러한 연구는 두경부 종양에서 PCNA와 Ki67이 독립적인 예후관련 표지자로서의 의미를 가진다고 할 수 있으며 이들 인자의 높은 염색 정도는 임상적으로 음성의 경부 임파절 전이를 보이는 환자에서 잠재적 전이(occult metastasis)의 가능성이 높다는 것을 시사하여, 예방적 경부청소술의 잇점이 있는 것이라고 판단된다고 할 수 있다.

V. 결 론

본 연구를 통해 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 세포증식인자인 Ki67과 PCNA는 발현 정도에 따라 생존율의 차이를 나타내었다.
2. 경부임파절 전이에서 생존율의 통계적 유의성을 확인할 수는 없었으나, 경부임파절 전이가 있는 경우 5년 생존율의 현저한 감소를 보였다.
3. 임파절 전이가 있는 경우 PCNA의 발현양이 임파절 전이가 없는 경우보다 유의하게 증가하였다.
4. 따라서, 한국인의 구강암에서 세포증식인자인 Ki67과 PCNA는 예후와 관련하여 생존율에 영향을 끼치며, 경부임파절 전이와 관련이 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Pich A, Chiusa L, Navone R: Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Ann Oncol* 2004;15(9):1319-29.
2. Tubiana M, Courdi A: Cell proliferation kinetics in human solid tumors: relation to probability of metastatic dissemination and long-term survival. *Radiother Oncol* 1989;15(1):1-18.
3. Schliephake H: Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer--a review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003;32(3):233-45.
4. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984;133(4):1710-5.
5. Kelman Z: PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 1997;14(6):629-40.
6. Tannapfel A, Weber A: Tumor markers in squamous cell carcinoma of the head and neck: clinical effectiveness and prognostic value. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001;258(2):83-8.
7. van Diest PJ, Brugal G, Baak JP: Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol* 1998;51(10):716-24.
8. Cattoretto G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, et al: Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992;168(4):357-63.
9. Kerns BJ, Jordan PA, Faerman LL, Berchuck A, Bast RC, Jr., Layfield LJ: Determination of proliferation index with MIB-1 in advanced ovarian cancer using quantitative image analysis. *Am J Clin Pathol* 1994;101(2):192-7.
10. Lam KY, Law SY, So MK, Fok M, Ma LT, Wong J: Prognostic implication of proliferative markers MIB-1 and PC10 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1996;77(1):7-13.
11. Veronese SM, Gambacorta M, Gottardi O, Scanzani F, Ferrari M, Lampertico P: Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer* 1993;71(12):3926-31.
12. Welkoborsky HJ, Hinni M, Dienes HP, Mann WJ: Predicting recurrence and survival in patients with laryngeal cancer by means of DNA cytometry, tumor front grading, and proliferation markers. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995;104(7):503-10.
13. Nylander K, Stenling R, Gustafsson H, Zackrisson B, Roos G: p53 expression and cell proliferation in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer* 1995;75(1):87-93.
14. Jacob R, Welkoborsky HJ, Mann WJ, Hofken F, Dienes HP, Freije JE: Heterogeneity of squamous cell carcinomas of the head and neck--analysis of tumor biologic factors and proliferation rates. *Laryngoscope* 1996;106(9 Pt 1):1170-5.
15. Youssef EM, Matsuda T, Takada N, Osugi H, Higashino M, Kinoshita H, et al: Prognostic significance of the MIB-1 proliferation index for patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1995;76(3):358-66.
16. McCormick D, Hall PA: The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology* 1992;21(6):591-4.
17. Johnson JT, Barnes EL, Myers EN, Schramm VL, Jr., Borochovit D, Sigler BA: The extracapsular spread of tumors in cervical node metastasis. *Arch Otolaryngol* 1981;107(12):725-9.
18. Som PM: Lymph nodes of the neck. *Radiology* 1987;165(3):593-600.
19. Grandi C, Alloisio M, Moglia D, Podrecca S, Sala L, Salvatori P, et al: Prognostic significance of lymphatic spread in head and neck carcinomas: therapeutic implications. *Head Neck Surg* 1985;8(2):67-73.
20. Feinmesser R, Freeman JL, Noyek AM, Birt D, Gullane P, Mullen JB: MRI and neck metastases: a clinical, radiological, pathological correlative study. *J Otolaryngol* 1990;19(2):136-40.
21. Ambrosch P, Kron M, Fischer G, Brinck U: Micrometastases in carcinoma of the upper aerodigestive tract: detection, risk of metastasizing, and prognostic value of depth of invasion. *Head Neck* 1995;17(6):473-9.
22. Liu M, Lawson G, Delos M, Jamart J, Chatelain B, Remacle M, et al: Prognostic value of cell proliferation markers, tumour suppressor proteins and cell adhesion molecules in primary squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003;260(1):28-34.
23. Franchi A, Gallo O, Boddi V, Santucci M: Prediction of occult neck metastases in laryngeal carcinoma: role of proliferating cell nuclear antigen, MIB-1, and E-cadherin immunohistochemical determination. *Clin Cancer Res* 1996;2(10):1801-8.
24. Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehulsing M, Eckel HE: Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. *Oral Oncol* 1999;35(6):583-9.
25. Boran C, Yildiz L, Kandemir B, Karagoz F, Baris S, Aydin O: Correlation of proliferating cell nuclear antigen and bcl-2 expression with tumor front grading and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Neoplasma* 2003;50(2):139-43.