

## 대장암의 침습적 경계면에서 EGFR 발현의 임상병리학적 의의

강여주 · 정찬권 · 최영진 · 이교영  
김형진<sup>1</sup> · 강원경<sup>1</sup> · 오승택<sup>1</sup>

가톨릭대학교 의과대학 병원병리학교실 및  
<sup>1</sup>외과학교실

접수 : 2009년 7월 16일  
게재승인 : 2009년 9월 21일

책임저자 : 정 찬 권  
우 137-701 서울시 서초구 반포동 505  
가톨릭대학교 서울성모병원 병리과  
전화: 02-2258-1622  
Fax: 02-2258-1628  
E-mail: ckjung@catholic.ac.kr

### Clinicopathologic Significances of EGFR Expression at Invasive Front of Colorectal Cancer

Yeo-Ju Kang · Chan-Kwon Jung · Yeong-Jin Choi · Kyo-Young Lee  
Hyung-Jin Kim<sup>1</sup> · Won-Kyung Kang<sup>1</sup> · Seong-Taek Oh<sup>1</sup>

Departments of Hospital Pathology and <sup>1</sup>Surgery, The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, Korea

**Background :** Epidermal growth factor receptor (EGFR) is frequently expressed in the invasive front of colorectal cancer (CRC), but its clinicopathologic significance remains unclear. We investigated the clinical value of the EGFR expression at the invasive front of CRC. **Methods :** We performed an immunohistochemical analysis in order to examine the expression and distribution of EGFR in 214 cases of CRC. The EGFR status was considered positive when  $\geq 1\%$  of the tumor cells had membranous staining. **Results :** Overall, an EGFR expression was observed in 144 (67%) cases and it had no significant relationship with the clinicopathologic parameters. However, an EGFR expression at the invasive front was correlated with lymphatic invasion, lymph node metastasis and a high level of serum carcinoembryonic antigen ( $p = 0.028$ ,  $p = 0.043$ , and  $p = 0.045$ , respectively). For the budding-positive CRCs liver metastases were found in the cases with an EGFR expression at the budding, but no liver metastasis occurred in the EGFR negative cases at the budding ( $p = 0.030$ ). **Conclusions :** An EGFR expression at the invasive front has clinicopathologic significances in patients with CRC. An EGFR expression at tumor cell budding is a pathologic marker that suggests the high potential for liver metastasis in CRC.

**Key Words :** Colorectal neoplasms; EGFR protein, human; Biological markers; Neoplasm metastasis; Immunohistochemistry

Epidermal growth factor receptor (EGFR)는 표피성장인자(epidermal growth factor)의 수용체 단백질로서 receptor tyrosine kinase family의 일종이다. EGFR은 세포막에 존재하며, 리간드와 결합하는 세포 외 영역, 친 지질성 세포막 영역, tyrosin kinase 활성이 있는 세포 내 영역으로 구성되어 있으며,<sup>1</sup> EGFR (ErbB1), Her2/neu (ErbB2), Her3 (ErbB3), Her4 (ErbB4) 등 4개의 비슷한 EGFR family 단백질에 속한다.<sup>2,3</sup>

또한 EGFR은 폐암, 유방암, 대장암, 두경부 악성 종양, 난소암, 방광암, 자궁경부암 등 다양한 악성 종양에서 발현이 증가되는데,<sup>4-7</sup> 대장암에서 EGFR의 발현율은 25-77%로 연구자들에 따라 다양하며, 임상병리학적 의의 또한 상반된 결과가 많다.<sup>8</sup> 이와 같은 다양한 결과는 EGFR 항체의 종류 및 실험 조건의 차이 그리고 대상 종류의 다양성으로 인해 발생할 뿐만 아니라, 동일한 실험 조건 내에서도 EGFR 염색의 양성 판독 기준에 의

해 많은 차이가 있을 수 있다.

종양 세포 발아(tumor cell budding)는 병변의 침습적 경계면(invasive front)에서 샘 구조를 가지는 종양의 군집과 분리되어져 있는 미분화 종양 세포들의 현미경적 군집을 말한다.<sup>9</sup> 대장암에서 종양 세포의 발아는 높은 재발률과 낮은 5년 생존율 및 림프절 전이와 관련성이 높아 중요한 예후 인자로 간주되고 있다.<sup>9-15</sup> 그러나 종양 세포의 발아가 있는 대장암 내에서도 다양한 임상 경과를 보일 수 있어 이러한 종양에 대한 예후를 예측할 수 있는 지표에 대한 연구가 필요한 실정이다.

이에 저자들은 대장암에서 EGFR 발현 유형을 조직학적 위치에 따라 세분하고, 이에 따른 임상병리학적 특징을 분석하고자 하였다. 또한 종양 세포의 발아가 있는 대장암을 대상으로 종양 세포 발아에서 EGFR 발현 유무에 대한 임상병리학적 의의를 분석하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 연구 재료

2006년 1월부터 2008년 7월까지 가톨릭대학교 서울성모병원에서 외과적 수술을 받은 대장암 환자를 연속적으로 무작위 수집하여 이중 수술전 방사선요법이나 유도 화학요법을 받은 예를 제외한 214예를 대상으로 하였다. 수술 검체는 10% 중성 포르말린에 고정한 후 통상적인 방법으로 파라핀 블록을 제작, 혈마 톡실란-에오신 염색을 시행하였다. 해당 증례의 병리학적 소견은 유리 슬라이드를 모두 재검토하여 확인하였다.

### 면역조직화학염색

유리 슬라이드 재 검색을 통해 종양의 침윤 깊이가 가장 깊은 파라핀 블록을 한 개 선정해 EGFR (Clone E30, M723901, Dako, Carpinteria, CA, USA)에 대한 면역조직화학염색을 시행하였다. 즉 파라핀 표면 조직을  $4\text{ }\mu\text{m}$  두께로 박절하고, 탈파라핀 한 후 에탄올로 수화하였으며, 감추어진 항원을 노출시키기 위해 microwave vacuum histoprocessor (RHS-1, Milestone, Bergamo, Italy)를 이용, 조직 절편을 구연산 완충액(pH 6.0)에 담가  $121^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 처리하였다. 이때 내인성 과산화효소를 억제시키기 위해 3% 과산화수소로 10분간 처리한 후 증류수로 씻어 냈다. 일차 항체의 희석은 비 특이적 염색을 감소시키는 성분이 함유된 antibody diluents (Dako)를 이용하였는데, 일차 항체(1:50 희석)를 실온에서 30분간 반응시키고 씻어낸 후 Envision plus system (Dako)를 이용하여 30분간 처리하였다. 그리고 diaminobenzidine (Dako)으로 5분간 처리하여 발색시키고 혈마 톡실란으로 대조염색하였다. EGFR은 수용체의 세포 외 부위를 인식하기 때문에 세포막 염색을 보이는 경우만 양성

으로 판독하되, 시야 제조사의 지침서에 따라 염색의 강도와는 무관하게 종양 세포의 1%라도 염색되면 양성으로 간주하였다.

### 판독과 통계학적 분석

면역화학염색 결과는 병리의사 두 명이 독립적으로 판정하되, 판정이 일치하지 않을 때는 광학현미경으로 재검하였다.

종양 내 부위별 EGFR 발현 양상에 따른 임상병리학적 특성을 파악하기 위해 종양을 크게 표층, 중간층, 침습적 경계 면으로 구분하고, 이에 따른 EGFR 발현율을 조사하여 다음과 같이 3집단으로 세분하였다. 즉 1) 종양의 전 범위에서 EGFR 음성, 2) 종양 표층이나 중간층의 EGFR 발현 유무와는 무관하게 침습적 경계 면에서 EGFR 양성(종양 전반에 걸쳐 양성인 경우도 포함됨), 3) 침습적 경계 면을 제외한 나머지 종양 부위(상층부나 중심부)에서만 EGFR 양성(Fig. 1).

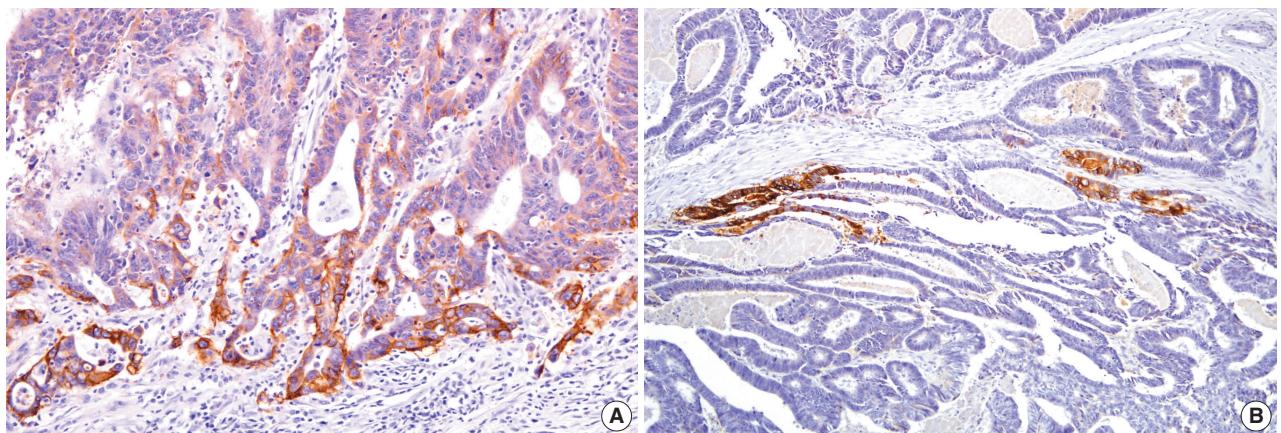
종양 세포 발아는 침습적 경계 면에서 격리된 종양 세포 혹은 5개 미만의 종양 세포로 구성된 작은 군집이 200배율 시야에서 10개 이상 관찰될 때를 양성으로 판정하였다.<sup>9</sup> 수술 전 혈청 carcinoembryonic antigen (CEA) 수치는 211명에서 확인이 가능하였고, 5.0 ng/dL 미만군과 5.0 ng/dL 이상군으로 분류하여 비교하였다.

통계학적 처리는 Window용 SPSS ver. 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여,  $\chi^2$  test로 검증하였으며, p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

## 결과

### 임상병리학적 특성

전체 214예 대장암 환자들의 연령은 34세에서 89세까지 분포하



**Fig. 1.** Immunohistochemical expression patterns of epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal carcinomas. (A) Immunoreactivity for EGFR is exclusively noted at the invasive front (group 2). (B) EGFR is only expressed at the middle region of the adenocarcinoma, but not at the invasive front (group 3).

였는데, 이중 남자가 121명, 여자가 93명(남자:여자 1.3:1)이었다. 종양의 병기는 29명이 1기, 52명이 2기, 99명이 3기, 34명이 4

**Table 1.** Correlation between clinicopathologic parameters and EGFR expression in 214 colorectal cancer patients

	EGFR expression		p-value
	Negative (%)	Positive (%)	
Age (yr)			0.315
< 65	43 (35)	78 (65)	
≥ 65	27 (29)	66 (71)	
Gender			0.228
Male	44 (36)	78 (64)	
Female	26 (28)	66 (72)	
Gross type			0.204
Fungating	7 (27)	19 (73)	
Ulcerofungating	45 (28)	74 (62)	
Ulceroinfiltrative	18 (26)	51 (74)	
Histologic type			0.062
Adenocarcinoma	63 (31)	139 (69)	
Mucinous carcinoma	7 (58)	5 (42)	
Differentiation			0.387
Well or moderately	61 (32)	131 (68)	
Poorly	9 (41)	13 (59)	
Depth of invasion			0.476
T1	2 (18)	9 (82)	
T2	11 (42)	15 (58)	
T3	45 (33)	90 (67)	
T4	12 (29)	30 (71)	
Tumor budding			0.000
Absent	61 (45)	75 (55)	
Present	9 (11)	69 (89)	
Lymph node metastasis			0.293
Absent	32 (37)	55 (63)	
Present	38 (30)	89 (70)	
Liver metastasis			0.655
Absent	60 (33)	120 (67)	
Present	10 (29)	24 (71)	
pTMN stage			0.873
1	11 (38)	18 (62)	
2	18 (35)	34 (65)	
3	31 (31)	68 (69)	
4	10 (29)	24 (71)	
Lymphatic invasion			0.450
Absent	32 (36)	58 (64)	
Present	38 (31)	86 (69)	
Venous invasion			0.235
Absent	65 (34)	126 (66)	
Present	5 (22)	18 (78)	
Perineural invasion			0.981
Absent	56 (33)	115 (67)	
Present	14 (33)	29 (67)	
CEA <sup>a</sup> (ng/dL)			0.153
< 5	51 (36)	91 (64)	
≥ 5	18 (26)	51 (74)	

<sup>a</sup> Preoperative serum levels of CEA were measured in 211 patients of colorectal cancer.

EGFR, epidermal growth factor receptor; TMN, tumor-node-metastasis; CEA, carcinoembryonic antigen.

기였으며, 조직학적 유형은 샘암종이 202예, 점액암종이 12예였다. 또한 종양이 림프관과 혈관을 침범한 경우는 각각 124예 (58%)와 23예(11%)였으며, 림프절 전이는 127예(59%)에서 관찰되었고, 추적 관찰 기간 중에 종양이 다른 장기로 전이한 경우는 34예(16%)였다.

#### EGFR 발현과 임상병리학적 특성(실험 1군 대 실험 2, 3군의 비교 분석)

EGFR에 대한 면역조직화학염색을 시행한 전체 214예 중 144 예(67%)가 EGFR에 양성을 보였다. EGFR 발현은 종양 세포 발아와 유의한 상관관계가 있었으나( $p<0.001$ ) (Fig. 1), 그 외 나이, 성별, 종양의 육안 형태, 조직학적 유형, 분화도, 침윤 깊이, 림프관 침범, 혈관 침범, 신경 주위 침범, 림프절 전이, 원격 전이, 병기, 혈청 CEA 수치와는 관련성이 없었다(Table 1).

#### 침습적 경계면에서 EGFR 발현 여부에 따른 임상병리학적 특성(실험 2군 대 실험 1, 3군의 비교 분석)

종양 내에서 발현되는 조직학적 위치를 고려하지 않고 EGFR 발현을 판독한 결과 분석에서는 EGFR 발현이 아무런 임상병리학적 의의를 보이지 않았으나, 저자들은 EGFR 발현이 주로 침습적 경계면에서 강하게 발현되는 점에 고려하여 종양의 침습적 경계면에서 EGFR이 발현되는 실험 2군이 실험 1, 3군에 비해 어떤 임상병리학적 특성을 보이는지를 비교 분석하였다. 즉 침습적 경계면에서 EGFR 양성인 종양은 림프관 침범을 보이는 경우, 림프관 내에서도 EGFR 발현이 잘 유지되었다(Fig. 2). 또한 전체 종양 214예에서 121예(53%)가 침습적 경계면에서 EGFR 양성을 보였는데(실험 2군), 침습적 경계면에서 EGFR이 발현되는 실험 2군은 그렇지 않은 실험 1, 3군에 비해 케양침윤형( $p=0.028$ ), 림프절 전이( $p=0.043$ ), 림프관 침범( $p=0.028$ )이 더 흔하였고,

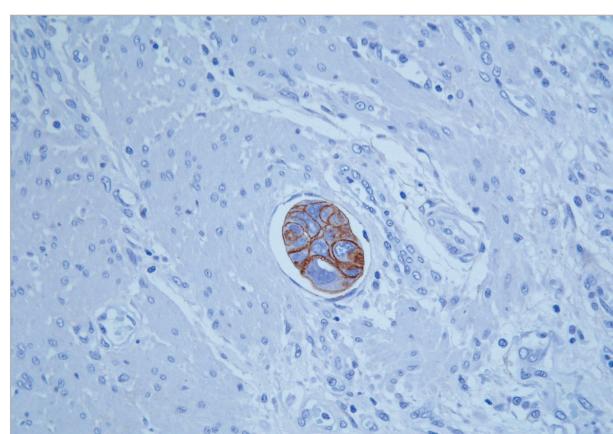


Fig. 2. A tumor cell nest in lymphatic vessel is positive for epidermal growth factor receptor.

**Table 2.** Correlation between clinicopathologic parameters and EGFR expression at invasive front in 214 colorectal cancer patients

	EGFR expression at invasive front			p-value
	Negative (%)	Positive (%)		
Age (yr)			0.074	
< 65	59 (49)	62 (51)		
≥ 65	34 (37)	59 (63)		
Gender			0.777	
Male	52 (43)	70 (57)		
Female	41 (45)	51 (55)		
Gross type			0.028	
Fungating	12 (46)	14 (54)		
Ulcerofungating	60 (50)	59 (50)		
Ulceroinfiltrative	21 (30)	48 (70)		
Histologic type			0.285	
Adenocarcinoma	86 (43)	116 (57)		
Mucinous carcinoma	7 (58)	5 (24)		
Differentiation			0.799	
Well or moderately	84 (44)	108 (56)		
Poorly	9 (41)	13 (59)		
Depth of invasion			0.343	
T1	5 (45)	6 (55)		
T2	12 (46)	14 (54)		
T3	63 (47)	72 (53)		
T4	13 (31)	29 (69)		
Lymph node metastasis			0.043	
Absent	45 (52)	42 (48)		
Present	48 (37)	79 (62)		
Liver metastasis			0.770	
Absent	79 (44)	101 (56)		
Present	14 (41)	20 (59)		
pTMN stage			0.407	
1	14 (48)	15 (52)		
2	27 (52)	25 (48)		
3	38 (39)	61 (61)		
4	14 (41)	20 (59)		
Lymphatic invasion			0.028	
Absent	47 (52)	43 (48)		
Present	46 (37)	78 (63)		
Venous invasion			0.658	
Absent	84 (44)	107 (56)		
Present	9 (39)	14 (61)		
Perineural invasion			0.813	
Absent	75 (44)	96 (56)		
Present	18 (42)	25 (58)		
CEA <sup>a</sup> (ng/dL)			0.045	
< 5	68 (48)	74 (52)		
≥ 5	23 (33)	46 (67)		

<sup>a</sup>Preoperative serum levels of CEA were measured in 211 patients of colorectal cancer.

EGFR, epidermal growth factor receptor; TMN, tumor-node-metastasis; CEA, carcinoembryonic antigen.

혈청 CEA 수치가 더 높았다( $p=0.045$ ) (Table 2).

**Table 3.** Correlation between clinicopathologic parameters and expression of EGFR at tumor cell budding in 214 colorectal cancer patients

	Tumor cell budding (%)			p-value
	Absent	Present	EGFR (-) EGFR (+)	
Depth of invasion				0.598
T1-T2	21 (57)	4 (11)	12 (32)	
T3-T4	115 (65)	13 (7)	49 (28)	
Lymph node metastasis				0.083
Absent	63 (72)	5 (6)	19 (22)	
Present	73 (58)	12 (9)	42 (33)	
Liver metastasis				0.030
Absent	117 (65)	17 (9)	46 (26)	
Present	19 (56)	0 (0)	15 (44)	
pTMN stage				0.161
1-2	58 (72)	5 (6)	18 (22)	
3-4	78 (59)	12 (9)	43 (32)	
Lymphatic invasion				0.040
Absent	66 (73)	5 (6)	19 (21)	
Present	70 (56)	12 (10)	42 (34)	
Venous invasion				0.213
Absent	122 (64)	17 (9)	52 (27)	
Present	14 (61)	0 (0)	9 (39)	
Perineural invasion				0.711
Absent	111 (65)	13 (8)	47 (27)	
Present	25 (58)	4 (9)	14 (33)	
CEA <sup>a</sup> (ng/dL)				0.026
< 5	97 (68)	7 (5)	38 (27)	
≥ 5	37 (54)	10 (14)	22 (32)	

<sup>a</sup>Preoperative serum levels of CEA were measured in 211 patients of colorectal cancer.

EGFR, epidermal growth factor receptor; TMN, tumor-node-metastasis; CEA, carcinoembryonic antigen.

### 종양 세포의 발아가 있는 대장암에서 EGFR 발현에 따른 임상병리학적 특성

본 연구 결과에서 EGFR의 발현은 종양 세포의 발아 형성과 밀접한 상관관계가 있었기 때문에 저자들은 종양 세포 발아가 있는 종양만을 대상으로 종양 세포 발아에서 EGFR 발현의 임상병리학적 역할을 규명하고자 하였다.

전체 214예 중에서 종양 세포 발아가 있는 종양은 78예였으며, 이 중 61예(78%)에서 EGFR이 발현되었다(Table 3, Fig. 3). 종양 세포 발아가 있는 종양에서의 EGFR 발현은 간 전이, 림프관 침범이 더 흔하였고, 혈청 CEA 수치가 유의하게 높았다(각각,  $p=0.030$ ,  $p=0.040$ ,  $p=0.026$ ) (Table 3).

### 고찰

대장암에서 EGFR 발현의 임상병리학적 의의는 보고자에 따

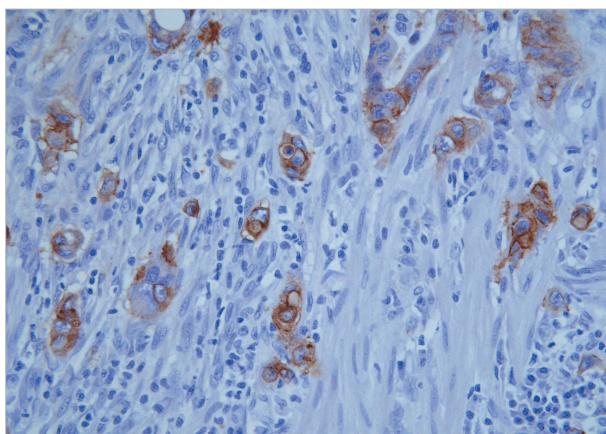


Fig. 3. Epidermal growth factor receptor is strongly expressed at the tumor cell budding.

라 서로 다르며, 그 의미 또한 아직 명확하지 않은 상태다.<sup>16-19</sup> Steele 등<sup>20</sup>과 Kluftinger 등<sup>21</sup>은 분화가 나쁠수록 Duke A나 B 병기보다 C병기에서 EGFR 발현율이 높아 나쁜 예후와 관련성이 있다고 보고하였으나, Koretz 등<sup>22</sup>, Scambia 등<sup>23</sup>, Yasui 등<sup>24</sup>은 Duke 병기, 조직학적 유형 및 분화도는 EGFR 발현과 아무 연관성이 없다고 보고하였다. 또한 Bradley 등<sup>25</sup>과 Yasui 등<sup>24</sup>은 EGFR 발현이 중등도 이상 분화된 샘암종에서 더 높다고 보고하였다.

이는 여러 연구에서 전체 종양의 몇 %가 염색되는 경우에 양성으로 판정하는지에 대한 EGFR 염색 판독 기준에 차이가 있어 1%, 5%, 10%, 20% 등의 다양한 기준이 사용되었기 때문에 이러한 EGFR 염색 판독 기준에 따라 다양한 임상적 결과의 차이가 나타나는 것으로 생각된다. 본 연구에서는 EGFR 발현의 기준을 1% 이상 종양 세포가 염색될 때로 간주하여 분석하였다.

본 연구에서 EGFR의 전체 발현율은 67%로 다른 연구 결과와 유사하였으며, EGFR 발현이 종양 세포 발아 형성과 유의한 상관관계를 보여 EGFR 발현이 미분화 종양 세포 군집인 종양 세포 발아를 형성하는 기전과 관련이 있을 것으로 추측된다. EGFR 발현의 판독에 있어 종양 내 위치적 특성을 고려하지 않고 분석하였을 경우, 특별한 임상적 의의를 찾을 수 없었으나 침습적 경계면에서 발현되는 양상은 림프절 전이, 림프관 침습, 혈청 CEA 수치와 유의한 연관성을 보였다. 이와 같은 임상병리학적 지표와 관련성은 Goldstein과 Armin<sup>8</sup> 연구 결과와 유사하였다.

종양 세포의 발아는 종양 세포의 미분화나 해리 등의 침윤과 전이의 첫 번째 사건을 나타내는 형태학적 발현이라고 할 수 있는데,<sup>26-28</sup> 대장암에서 종양 세포의 발아는 저분화도, 림프절 전이, 혈관 침윤, 원격 전이, 재발, 낮은 생존율 등과 관련성이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>9-15,29</sup> 그러나 종양 세포 발아가 있는 모든 종양들이 항상 나쁜 예후를 보이는 것은 아니기 때문에, 저자들은 EGFR 발현 유무를 통해 종양 세포 발아가 있는 대장암의 임상병리학적 차이를 분석하고자 하였다. 종양 세포의 발아

에서 EGFR이 발현되는 종양은 그렇지 못한 종양에 비해 간 전이 비율이 월등히 높았고, EGFR이 발현되지 않은 종양은 간 전이를 일으키지 않았다(Table 3). 따라서 종양 세포 발아가 있는 종양이라 할지라도 EGFR이 발현되지 않는 경우에는 간 전이 위험이 낮을 것으로 추측되는데, 이에 대한 정확한 기전은 후속적인 대규모 연구를 통해 밝혀지리라 생각된다.

대장암에서 면역화학염색을 통한 EGFR의 발현 유무는 EGFR 표적 치료를 위해 필요한 검사로 간주되고 있지만, 환자의 예후를 예측하는 임상적 의의를 찾기 위해서는 단순히 발현 유무만 볼 것이 아니라 종양 내 발현 위치를 고려하여 종양의 침습 경계면에서 EGFR 발현 유무를 확인하는 판독법이 적용되어야 할 것으로 판단된다.

## 참고문헌

- Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1990; 265: 7709-12.
- Yarden Y, Slwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 127-37.
- Baselga J. Targeting the epidermal growth factor receptor with tyrosine kinase inhibitors: small molecules, big hopes. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2217-9.
- Kim ES, Khuri FR, Herbst RS. Epidermal growth factor receptor biology (IMC-C225). *Curr Opin Oncol* 2001; 13: 506-13.
- Park SH, Ha SY, Lee JL, et al. Epidermal growth factor receptor mutations and the clinical outcome in male smokers with squamous cell carcinoma of lung. *J Korean Med Sci* 2009; 24: 448-52.
- Kim JM, Hwang TY, Kang SH, Lee SJ, Bae YK. Prognostic significance of basal markers in triple-negative breast cancers. *J Breast Cancer* 2009; 12: 4-13.
- Cho EY, Han JJ, Choi YL, Kim KM, Oh YL. Comparison of Her-2, EGFR and cyclin D1 in primary breast cancer and paired metastatic lymph nodes: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *J Korean Med Sci* 2008; 23: 1053-61.
- Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer* 2001; 92: 1331-46.
- Ueno H, Price AB, Wilkinson KH, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. A new prognostic staging system for rectal cancer. *Ann Surg* 2004; 240: 832-9.
- Okuyama T, Oya M, Ishikawa H. Budding as a useful prognostic marker in pT3 well- or moderately-differentiated rectal adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2003; 83: 42-7.
- Tanaka M, Hashiguchi Y, Ueno H, Hase K, Mochizuki H. Tumor

- budding at the invasive margin can predict patients at high risk of recurrence after curative surgery for stage II, T3 colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1054-9.
12. Okuyama T, Nakamura T, Yamaguchi M. Budding is useful to select high-risk patients in stage II well-differentiated or moderately differentiated colon adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1400-6.
  13. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology* 2002; 40: 127-32.
  14. Okuyama T, Oya M, Yamaguchi M. Budding (sprouting) as a useful prognostic marker in colorectal mucinous carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2002; 32: 412-6.
  15. Park KJ, Choi HJ, Roh MS, Kwon HC, Kim C. Intensity of tumor budding and its prognostic implications in invasive colon carcinoma. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 1597-602.
  16. McKay JA, Murray LJ, Curran S, et al. Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. *Eur J Cancer* 2002; 38: 2258-64.
  17. Prewett MC, Hooper AT, Bassi R, Ellis LM, Waksal HW, Hicklin DJ. Enhanced antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody IMC-C225 in combination with irinotecan (CPT-11) against human colorectal tumor xenografts. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 994-1003.
  18. Kopp R, Rothbauer E, Mueller E, Schildberg FW, Jauch KW, Pfeiffer A. Reduced survival of rectal cancer patients with increased tumor epidermal growth factor receptor levels. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1391-9.
  19. Doger FK, Meteoglu I, Tuncyurek P, Okyay P, Cevikel H. Does the EGFR and VEGF expression predict the prognosis in colon cancer? *Eur Surg Res* 2006; 38: 540-4.
  20. Steele RJ, Kelly P, Ellul B, Eremin O. Immunohistochemical detection of epidermal growth factor receptors on human colonic carcinomas. *Br J Cancer* 1990; 61: 325-6.
  21. Kluftritter AM, Robinson BW, Quenville NF, Finley RJ, Davis NL. Correlation of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 oncogene product to known prognostic indicators of colorectal cancer. *Surg Oncol* 1992; 1: 97-105.
  22. Koretz K, Schlag P, Möller P. Expression of epidermal growth factor receptor in normal colorectal mucosa, adenoma, and carcinoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1990; 416: 343-9.
  23. Scambia G, Panici PB, Bellantone R, et al. Receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in primary colorectal tumors. *J Surg Oncol* 1991; 48: 183-7.
  24. Yasui W, Sumiyoshi H, Hata J, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas. *Cancer Res* 1988; 48: 137-41.
  25. Bradley SJ, Garfinkle G, Walker E, Salem R, Chen LB, Steele G Jr. Increased expression of the epidermal growth factor receptor on human colon carcinoma cells. *Arch Surg* 1986; 121: 1242-7.
  26. Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1993; 36: 627-35.
  27. Prabhudesai A, Arif S, Finlayson CJ, Kumar D. Impact of microscopic extranodal tumor deposits on the outcome of patients with rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1531-7.
  28. Gabbert H. Mechanisms of tumor invasion: evidence from in vivo observations. *Cancer Metastasis Rev* 1985; 4: 293-309.
  29. Morodomi T. Clinicopathological studies of advanced rectal cancers: prediction of the degree of lymph node metastasis from histopathological finding of pre-operative biopsy specimens. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1988; 89: 352-64.