비근육침습성 방광 요로상피세포암에서 p53, c-erb-B2, Ki-67의 발현이 예후에 영향을 미치는가?

대구가톨릭대학교 의과대학 ¹비뇨기과학교실, ²병리학교실, ³경북대학교 의학전문대학원 생리학교실

강석현¹ · 정현진¹ · 양은경² · 박재신¹ · 오훈규³ · 김덕윤¹

Is the Expression of p53, c-erb-B2 and Ki-67 Influence the Prognosis of the Non-muscle Invasive Urothelial Bladder Cancer?

Seok Hyun Kang¹, Hyun Jin Jung¹, Eun Kyoung Yang², Jae Shin Park¹,
Hoon Kyu Oh³, Duk Yoon Kim¹

¹Department of Urology, School of Medicine, Catholic University of Daegu, ²Department of Physiology, School of Medicine, Kyungpook National University, ³Department of Pathology, School of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu, Korea

Purpose: The immunohistochemical markers can be used to predict prognosis more accurately for several cancers. In non-muscle invasive urothelial carcinoma, p53, c-erb-B2 and Ki-67 are applicable. We investigated a retrospective analysis of the relation between the markers and clinical prognostic factors of urothelial bladder cancer.

Materials and Methods: Data from 268 non-muscle invasive urothelial bladder cancer (Ta, T1) patients from one single center were collected. Immunohistochemical evaluation was carried out on 268 (p53, c-erb-B2, Ki-67) cases. Clinical prognostic factors are as follows; number of tumor, tumor invasiveness, tumor grade and recurrence. The sum of all positivity of 3 markers was made as a new factor and evaluation of correlation between this factor and prognostic factors was also done. Statistical analysis was done by chi-squares test and Pearson's correlation test.

Results: Through chi-square test, there were significant relations between all markers and tumor invasiveness ($p < 0.001$), tumor grade ($p < 0.001$). Number of tumor is significantly related with Ki-67 ($p = 0.043$). Recurrence is related with c-erb-B2 ($p = 0.010$) and Ki-67 ($p = 0.043$). There was also significant correlations between the sum of the markers and prognostic factors-tumor invasiveness ($p < 0.001$), tumor grade ($p < 0.001$) and recurrence ($p = 0.007$).

Conclusions: In this study, evaluated markers were closely related with clinical prognostic factors and may contribute to decision making on risk-assessment and management strategy for non-muscle invasive urothelial bladder cancer. (Korean J Urol Oncol 2016;14:69-75)

Key Words: Urinary bladder neoplasms, Immunohistochemistry, Risk assessment

Received May 17, 2016, Revised June 29, 2016,
Accepted July 25, 2016

Corresponding Author: Duk Yoon Kim, Department of Urology,
School of Medicine, Catholic University of Daegu, 33,
Duryugongwon-ro 17-gil, Nam-gu, Daegu 42472, Korea. Tel:
82-53-650-4663, Fax: 82-53-623-7507, E-mail: dykim@cu.ac.kr

서론

방광암은 가장 흔한 요로계 악성종양 중 하나로, 전세계적으로 남성의 경우 10만명 중 10명, 여성은 10만명 중 3명

의 유병률을 가지고 있으며 그 비율은 점차 증가하는 양상을 보이고 있다.¹ 대부분은 근육을 침범하지 않은 초기 종양으로 진단되나 잦은 재발과 근육침윤성으로 진행되는 위험성으로 인해 진단 후 경과 및 위험도 판정, 즉 예후에 대한 판단이 치료 계획 설정에 중요한 요인이 된다.² 방광암은 수술 후 1년내 재발할 확률 15-70%, 5년 내 진행 확률은 7-40%로 상당히 넓은 분포를 보인다.^{3,4} 따라서, 같은 방광암이라 하더라도 진행 및 재발에 있어 서로 다른 위험도를 가짐을 예상할 수 있다.⁵ 많은 연구들이 종양의 진행과 예후에 연관된 인자를 찾기 위해 진행되었으며, 병기, 악성도, 크기 등의 인자들이 방광암의 진행과 연관이 있음이 밝혀졌고, 세계보건기구 (WHO) 에서 이를 토대로 한 분류 체계를 정립하였다. 그러나, 이 인자들만으로는 임상적 경과 및 예후를 정확히 판단하는 것이 불가능하며,^{6,7} 조직학적 기준만을 근거로 요로상피의 병인을 이해하기 또한 매우 어렵다는 것이 밝혀지게 되었다.⁸ 따라서 예후와 더 밀접한 연관성을 가진 다른 인자들에 대한 연구가 진행되어 왔으며, 면역조직화학적 표지자 (immunohistochemical markers) 들이 여러 종류의 악성 종양에 있어 발생, 진행, 전이 등에 관여하는 것으로 밝혀지고 있다. 종양억제유전자 (tumor suppressor gene) 또는 발암유전자 (oncogene), 원암유전자 (proto-oncogene)의 형태로 존재하는 이들 표지자 중에는, 염색체 17p13.1에 위치하는 종양억제 유전자인 p53, 염색체 17q에 위치한 tyrosine kinase 수용체 그룹에 작용하는 성장인자인 c-erb-B2 (Her-2/ner), 세포 증식과 관련된 표지자인 Ki-67 등이 방광암의 진행과 연관이 되어 있다고 알려져 있다. 비근육침습성 방광암에서 이들 표지자는 추후 근육침습성으로 진행할 가능성을 알려 주는 지표로 이용될 수 있으며, 이를 통해 진행 이전에 조기 치료를 시행할 수 있을 것이다.²

본 연구에서는 이러한 표지자들 중 재발과 관련된 비근육침습성 방광암의 예후 인자들을 중점으로 하여, 다발성, 고유침습성, 등급과 같은 그 외의 예후 인자들과의 연관성이 있는지를 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

2006년 1월부터 2013년 3월 사이 본원에서 경요도적 방광 종양 절제술을 시행한 환자들 중 연구 기간 중 새로 진단된 환자를 대상으로 하였으며 268명이 연구에 포함되었다. 요로상피암 이외의 다른 종양으로 진단된 환자 및 재발 환자 (과거 첫 진단 이후 연구 기간 내 재발한 경우) 는 제외하였다. 모든 검체는 절제 이후 포르말린 처리 후 병리과에서 haematoxylin-eosin 염색과 면역조직화학 염색을 시행하였다. 본 연구는 본원 연구윤리심의위원회에 심의면제

청을 하여 승인받았다.

연구 대상이 된 모든 검체를 대상으로 염색은 p53 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA, dilution 1:200); c-erb-B2 (DAKO, Glostrup, Denmark, dilution 1:500); Ki-67 (Cell Marque, Rocklin, California, USA, dilution 1:200)을 사용하여 시행하였다 (Fig. 1).

염색 결과에 대한 판독은 병리학적 근거에 따라 아래와 같이 시행하였다. p53, Ki-67은 양성으로 판정되는 세포가 없을 때 (-), 양성 세포가 전체의 5% 미만일 때 (+), 5%-10% 일 때 (++) , 10% 이상일 때 (+++)로 판독하였으며, c-erb B2의 경우, 종양 세포 내에서 염색된 세포가 발견되지 않으면 (-), 종양 세포 내에 염색된 막 (membrane)이 보이나 부분적으로만 염색되었거나, 완전히 염색된 비율이 10% 이내일 경우 (+), 막 전체가 염색되나 전체를 둘러싼 특정한 형태를 띠는 부분이 10%에서 30% 사이일 경우 (++) , 특정한 형태로 저명하게 염색되는 부분이 30% 이상인 경우를 (+++)로 판독하였다.

또한 각 표지자의 양성도를 숫자로 환산 후 더하여 0-9점까지로 계산한 값을 새로운 변수 ‘표지자 합 (sum of the markers)’으로 설정한 후 이 변수와 예후 인자들과의 연관성도 비교하였다.

임상적 예후 인자로는 종양의 수 (단일성, 다발성), 침습도 (비침습성, 침습성; lamina propria 층 침범 여부로 구분), 등급 (저등급, 고등급), 및 재발 여부 (연구기간 내 첫 진단이 된 환자에서 연구 종료 시점까지 재발 여부를 의미함)의 4가지 인자를 사용하였다.

통계분석은 IBM SPSS v.21.0 (IBM, Madison Avenue, New York, USA) 프로그램을 사용하였으며, 분석 기법은 각 그룹별 차이를 확인하기 위해 Chi-square test를 시행하였고, 표지자 합과 예후 인자들과의 상관 관계는 Pearson's correlation test를 이용해 분석하였다. 모든 분석에서 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 를 기준으로 판단하였다.

결 과

1. 환자 분포

총 268명의 환자들 중, 남성은 205명 (76.9%), 여성은 62명 (23.1%)이었다. 종양의 수로 분류하면, 단일 종양은 151건 (56.3%), 다발성 종양은 117건 (43.7%)으로 나뉘었다. 또한 비침습성 종양은 79건 (29.5%), 침습성 종양은 189건 (70.5%)이었으며, 저등급 종양은 138건 (51.5%), 고등급 종양이 130건 (48.5%)이었다. 그리고 182건 (67.9%)은 초발성, 86건 (32.1%)는 재발성 종양이었다 (Table 1).

Fig. 1. Immunohistochemical stainings in urothelial carcinoma of bladder (A, B) Ki-67 immunohistochemistry. (A) Negative finding: The Ki-67 positive cells only in basal layer; magnification x200. (B) Positive finding: The positive cells in whole layer of tumor cells; magnification x200. (C, D) p53 immunohistochemistry. (C) Negative finding: Basally located positive cells; magnification x200. (D) Positive finding: Nuclear overexpression; was seen; magnification x200. (E, F) c-erb B2 immunohistochemistry. (E) Negative finding: No expression of the c-erb B2; magnification x100. (F) Positive finding: Membranous expression of c-erb B2 protein was seen; magnification x100.

2. 면역조직화학검사

본 연구에서는 3종의 면역조직화학 표지자 (p53, c-erb

B2, Ki-67)가 이용되었다. 세 개 표지자 모두에서 음성 (-) 보다는 양성 ((+)에서 (+++))의 비율이 높았으며 p53에 (-)로 나타난 경우는 13건 (4.9%), (+)는 39건 (14.6%), (++)는 99건

(36.9%), (+++)는 117건 (43.7%)로 확인되었다. c-erb B2 에서는 (-)가 26건 (9.7%), (+)가 64건 (23.9%), (++)는 81건 (30.2%), (+++)는 97건(36.2%)이었다. 마지막으로 Ki-67은 (-)가 14건 (5.2%), (+)는 108건 (40.3%), (++)는 86건(32.1%), (+++)는 60건 (22.4%)이었다 (Table 2).

3. 예후 인자들과의 관계

위에서 언급한 각 표지자들과 방광암의 예후 인자들 간의 연관성을 통계적으로 비교 분석하였다. 각 인자들과 종

Table 1. Demographic parameters of patients with urothelial bladder carcinoma

Parameters	Patients (%) (n=268)	Parameters	Patients (%) (n=268)
Sex		Tumor Grade	
Male	205 (76.9)	Low	138 (51.5)
Female	62 (23.1)	High	130 (48.5)
Number of Tumor		Recurrence	
Solitary	151 (56.3)	No recurred	182 (67.9)
Multiple	117 (43.1)	Recurred	86 (32.1)
Tumor Invasiveness			
Non-invasive	79 (29.5)		
Invasive	189 (70.5)		

Table 2. Numbers and results of immunohistochemical markers

	(-)	(+)	(++)	(+++)	Total
p53	13 (4.9)	39 (14.6)	99 (36.9)	117 (43.7)	268
c-erb B2	26 (9.7)	64 (23.9)	81 (30.2)	97 (36.2)	268
Ki-67	14 (5.2)	108 (40.3)	86 (32.1)	60 (22.4)	268

Table 3. Analysis of relation among immunohistochemical markers and conventional prognostic factors

(n=268)	Number of Tumor			Tumor Invasiveness			Tumor Grade			Recurrence		
	Solitary (%)	Multiple (%)	p-value	Non-invasive (%)	Invasive (%)	p-value	Low Grade (%)	High grade (%)	p-value	No Recurred (%)	Recurred (%)	p-value
p53	-	8 (3.0)	0.954	5 (1.9)	8 (3.0)	<0.001	5 (1.9)	8 (3.0)	<0.001	8 (3.0)	5 (1.9)	0.154
	+	21 (7.8)		20 (7.5)	19 (7.1)		31 (11.6)	8 (3.0)		27 (10.1)	12 (4.5)	
	++	57 (21.3)		37 (13.8)	62 (23.1)		65 (24.3)	34 (12.7)		75 (28.0)	24 (9.0)	
	+++	65 (24.3)		17 (6.3)	100 (37.3)		37 (13.8)	80 (29.9)		72 (26.9)	45 (16.8)	
c-erb B2	-	13 (4.9)	0.395	14 (5.2)	12 (4.5)	<0.001	16 (6.0)	10 (3.7)	0.001	20 (7.5)	7 (2.6)	0.010
	+	41 (15.3)		28 (10.4)	36 (13.4)		44 (16.4)	20 (7.5)		50 (18.7)	14 (5.2)	
	++	47 (17.5)		21 (7.8)	60 (22.4)		41 (15.3)	40 (14.9)		59 (22.0)	22 (8.2)	
	+++	50 (18.7)		16 (6.0)	81 (30.2)		37 (13.8)	60 (22.4)		54 (20.2)	42 (15.6)	
Ki-67	-	9 (3.4)	0.043	7 (2.6)	7 (2.6)	<0.001	11 (4.1)	3 (1.1)	<0.001	9 (3.4)	5 (1.9)	0.043
	+	71 (26.5)		49 (18.3)	59 (22.0)		90 (33.6)	18 (6.7)		84 (31.3)	24 (9.0)	
	++	40 (14.9)		19 (7.1)	67 (25.0)		32 (11.9)	54 (20.1)		52 (19.4)	34 (12.7)	
	+++	31 (11.6)		4 (1.5)	56 (20.9)		5 (1.9)	55 (20.5)		37 (13.8)	23 (8.6)	

양의 수와의 비교 분석 결과 Chi-square test에서는 p53 (p=0.954), c-erb B2 (p=0.395)는 특별한 연관성을 보이지 않았으나 Ki-67 (p=0.043)은 의미 있는 연관성을 보였고, 표지자의 양성도가 높을수록 다발성 종양이 늘어나는 경향을 보였다. 종양의 침습도는 Chi-square test 결과 세 가지 표지자 모두에서 의미 있는 연관성이 확인되었으며, (모두 p < 0.001) (Table 4) 고등급의 경우 표지자들이 더 많이 발현되었고, (p53 : p < 0.001; c-erb B2 : p=0.001; Ki-67 : p < 0.001) 재발 유무에 따른 p53의 연관성은 유의하지 않았으나 (p=0.154), c-erb B2 (p=0.010)와 Ki-67 (p=0.043)에서는 유의한 연관성을 보였다 (Table 3).

표지자 합과 예후 인자들 사이의 분석 결과는 다음과 같다. 종양의 수와의 비교에서 상관관계는 유의하지 않았으나 (상관계수 0.084, p-value=0.168), 종양의 침습도 (상관계수 0.401, p-value < 0.001) 및 종양 등급 (상관계수 0.471, p-value < 0.001) 에서는 유의한 상관관계를 보였으며 재발과도 유의한 상관관계를 보였다 (상관계수 0.165, p-value=0.007) (Table 4).

Table 4. Correlation analysis between the sum of the markers and prognostic factors

	Correlation Coefficient	p-value
Number of tumor	0.084	0.168
Tumor Invasiveness	0.401	<0.001
Tumor Grade	0.471	<0.001
Recurrence	0.165	0.007

고 찰

초기 방광암의 높은 재발과 근침윤성 종양으로의 진행 가능성은 정확한 치료 방침 및 예후예측인자의 중요성을 더욱 절실히 요구하는 원인이 되고 있다.^{2,9} 특히 고등급의 종양에서 초기에 방광전절제술을 시행함으로써 인한 부담이 치료지연에 의한 사망률의 증가보다 더 이익이 있을 수 있다는 의견까지 대두되고 있다.¹⁰

방광 요로상피암의 재발 또는 진행의 예측을 위해서 많은 연구 단체들이 종양 분류 체계를 만들기 위해 노력해 왔고, 그 결과로 WHO 분류체제와 같은 기준이 만들어졌다. 그러나, 이 기준만으로는 환자에 따른 다양한 결과를 설명하기 어렵고,¹¹ 구체적 정보를 더 얻기 위한 노력의 일환으로 개발된 것이 여러 종양표지자이다. 따라서 다른 종양의 연구 과정에서 밝혀진 표지자들이 방광암의 연구에도 적용되었고, 이 중 일부가 재발 및 진행과 연관성이 있음이 확인되고 있다.

p53은 염색체 17p13.1에 위치하는 종양억제 유전자(tumor suppressor gene)이다.^{12,13} 이 유전자는 세포의 자연사, 유전적 안정성 및 혈관신생의 억제에 관여하는 것으로 알려져 있으며,¹⁴ 변이가 발생한 p53 유전자는 정상 p53에 비해 세포핵 내에 장기간 존재하는 단백질을 생성한다. 이 축적된 단백질을 통해 우리는 유전자의 변이를 감지할 수 있다. p53 유전자의 과발현 및 그에 따른 생산물의 증가는 방광 요로상피암의 진행을 알리는 표지자로서의 역할을 하며,¹⁵ 나쁜 예후와 연관되어 있는 것으로 알려져 있다.^{14,16,17} 또한 p53은 병기와 무관하게 암특이 사망률(cancer-specific mortality)을 예측할 수 있는 지표가 된다는 연구 결과도 있다. 또한, 핵 내에서 p53이 발견된 경우 재발율이 상승하고 생존율이 감소한다는 보고도 있었다.¹⁸ 본 연구에서도 p53은 침습성, 고등급과 연관성이 높음을 확인할 수 있었다. 그러나 재발율과의 연관성은 유의성을 보이지 않았다. 기존의 연구 결과에서도 총 재발 위험도(overall risk of recurrence)는 1.6이나 27%의 연구에서 예후 예측에 유의한 것으로 분석되어 연구에 따라 유의성에는 차이가 있는 것으로 보고되어 있다.⁶

c-erb B2 (HER-2/neu로도 알려져 있다)는 원암유전자(proto-oncogene)로서, 염색체 17q에 위치한 타이로신 인산화효소(tyrosine kinase) 수용체 그룹에 작용하는 성장인자이다.¹⁹ 이 유전자의 과발현은 세포의 종양으로의 전환 및 진행과 관련이 있으며, 따라서 종양 등급, 병기, 치료에 대한 저항성 등 관련 예후 인자들과 밀접한 연관성이 있다.^{15,19,20} c-erb B2는 방광보다는 주로 유방 및 간의 악성 종

양과 관련되어 주로 연구가 이루어져 왔는데,^{18,21} 이 표지자와 방광암 사이에도 연관성이 있을 가능성이 높다는 사실이 여러 연구자들로부터 제시됨에 따라, 이 연관성을 확인하기 위한 연구도 진행되어 왔으나, 현재까지 일관된 결과가 도출되지는 않았다. c-erb B2의 발현과 높은 종양 등급 간에는 밀접한 연관성이 있다고 기술한 연구가 있는 반면,²² 이 표지자와 예후 간에는 연관성이 없다고 언급한 연구도 있었다.²³ 본 연구에서는 종양의 침습도, 등급, 재발성의 3가지 항목에서 유의한 연관 관계가 있음을 확인할 수 있었다.

Ki-67 항원은 세포 증식과 관련된 유용한 표지자로, 이 항원의 검출은 MIB-1 단일클론항체를 통해서 가능하다.¹⁵ 이 단백질은 세포 주기의 G1, S, G2, M기에서 발현되는데, Ki-67이 발현된 세포의 비율은 방광암의 재발, 등급 및 병기와 밀접한 연관이 있으며, 비근육침습성 방광암의 예후 인자로 이용하기 위해 많은 연구가 이루어져 왔다.²⁴⁻²⁸ 다른 연구 결과를 보면, FGFR3의 돌연변이와 Ki-67의 증식을 합쳐서 예후 예측 인자로서 사용을 시도하였는데, 이 결과 병리학적 병기에 상관없이 재발성, 진행성 및 암특이 생존율과 유의한 연관이 있었다.²⁹ 최근의 연구에서는 Ki-67 강양성을 보일 경우 종양 세포의 증식도가 증가하고, 따라서 침습도 및 진행 위험성이 높아진다는 결과가 있다.²⁴ 또한 다변량분석을 이용한 연구에서 Ki-67이 단독으로 진행성 및 생존율을 예측할 수 있는 인자로 이용될 수 있으나 재발과 관련하여서는 현재 단계에서는 그 근거가 부족하다는 의견을 기술하였다.² 본 연구에서는 종양의 수, 침습도, 등급, 재발성 모두와 Ki-67이 깊은 연관성이 있는 것으로 확인되었다.

두 개의 표지자를 같이 사용해 예후 인자로 이용하는 방법도 일부 연구에서 진행되고 있었다. CK20과 Ki-67을 병합해 예후 인자로 이용할 수 있다는 연구 결과가 발표된 바 있는데,⁵ 본 연구에서는 이에 착안하여 연구에 이용된 3가지 표지자의 양성도를 합하여 새로운 기준을 작성해 보았고, 그 결과 이 기준과 예후 사이에도 밀접한 연관성이 확인되었다.

결 론

비근육침습성 방광암은 재발하는 경우가 많고, 추후 근육침습성으로 진행할 가능성이 항상 존재하기에 초기에 예후를 예측하여 개별적인 치료적 접근을 할 수 있다면 환자의 예후 향상에 도움이 될 것이다. 본 연구에서 시행한 모든 표지자들은 방광암의 예후와 밀접한 연관이 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 현재까지 이루어진 여러 연구들과 본 연구의 결과를 종합해 볼 때, 이들 표지자를 독립적인 예후

인자로서 치료에 적용하는 것은 아직 어려울 것으로 생각된다. 이를 위해서는 좀 더 대규모의, 다기관 연구가 추후 진행되어야 할 것으로 보인다.

REFERENCES

1. Ferlay J, Randi G, Bosetti C, Levi F, Negri E, Boyle P, et al. Declining mortality from bladder cancer in Europe. *BJU Int* 2008;101:11-9
2. Bertz S, Otto W, Denzinger S, Wieland WF, Burger M, Stöhr R, et al. Combination of CK20 and Ki-67 immunostaining analysis predicts recurrence, progression, and cancer-specific survival in pT1 urothelial bladder cancer. *Eur Urol* 2014;65:218-26
3. Allard P, Bernard P, Fradet Y, Têtu B. The early clinical course of primary Ta and T1 bladder cancer: a proposed prognostic index. *Br J Urol* 1998;81:692-8
4. Kurth KH, Denis L, Bouffieux C, Sylvester R, Debruyne FM, Pavone-Macaluso M, et al. Factors affecting recurrence and progression in superficial bladder tumors. *Eur J Cancer* 1995;31A:1840-6
5. Ogata DC, Marcondes CA, Tuon FF, Busato WF Jr, Cavalli G, Czezko LE. Superficial papillary urothelial neoplasms of the bladder (pTa E pT1): correlation of expression of p53, Ki-67 and CK20 with histologic grade, recurrence and tumor progression. *Rev Col Bras Cir* 2012;39:394-400
6. Malats N, Bustos A, Nascimento CM, Fernandez F, Rivas M, Puente D, et al. P53 as a prognostic marker for bladder cancer: a meta-analysis and review. *Lancet Oncol* 2005;6:678-86
7. Millán-Rodríguez F, Chéchile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Vicente-Rodríguez J. Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer. *J Urol* 2000;163:73-8
8. Milord RA, Lecksell K, Epstein JI. An objective morphologic parameter to aid in the diagnosis of flat urothelial carcinoma in situ. *Hum Pathol* 2001;32:997-1002
9. Kiemeny LA, Witjes JA, Heijbroek RP, Verbeek AL, Debruyne FM. The clinical epidemiology of superficial bladder cancer. Dutch South-East Cooperative Urological Group. *Br J Cancer* 1993;67:806-12
10. Denzinger S, Fritsche HM, Otto W, Blana A, Wieland WF, Burger M. Early versus deferred cystectomy for initial high-risk pT1G3 urothelial carcinoma of the bladder: do risk factors define feasibility of bladder-sparing approach? *Eur Urol* 2008;53:146-52
11. Kiemeny LA, Witjes JA, Heijbroek RP, Verbeek AL, Debruyne FM. Predictability of recurrent and progressive disease in individual patients with primary superficial bladder cancer. *J Urol* 1993;150:60-4
12. Cina SJ, Lancaster-Weiss KJ, Lecksell K, Epstein JI. Correlation of Ki-67 and p53 with the new world health organization/international society of urological pathology classification system for urothelial neoplasia. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125:646-51
13. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991;351:453-6
14. Mumtaz S, Hashmi AA, Hasan SH, Edhi MM, Khan M. Diagnostic Utility of p53 and CK20 immunohistochemical expression grading urothelial malignancies. *Int Arch Med* 2014;7:36-43
15. Mallofré C, Castillo M, Morente V, Solé M. Immunohistochemical expression of CK20, p53, and Ki-67 as objective markers of urothelial dysplasia. *Mod Pathol* 2003;16:187-91
16. van der Kwast TH, Bapat B. Predicting favourable prognosis of urothelial carcinoma: gene expression and genome profiling. *Curr Opin Urol* 2009;19:516-21
17. López-Knowles E, Hernández S, Kogevinas M, Lloreta J, Amorós A, Tardón A et al. The p53 pathway and outcome among patients with T1G3 bladder tumors. *Clin Cancer Res* 2006;12:6029-36
18. Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen SC, et al. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med* 1994;331:1259-64
19. Lönn U, Lönn S, Friberg S, Nilsson B, Silfverswärd C, Stenkvist B. Prognostic value of amplification of c-erb-B2 in bladder carcinoma. *Clin Cancer Res* 1995;1:1189-94
20. Bassullu N, Turkmen I, Dayangac M, Yagiz Korkmaz P, Yasar R, Akyildiz M, et al. Predictive and prognostic significance of c-erb-B2, EGFR, PTEN, mTOR, PI3K, p27, and ERCC1 expression in hepatocellular carcinoma. *Hepat Mon* 2012;12(10 HCC):e7492
21. Ross JS, Fletcher JA. HER-2/neu(c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1999;112(1 Suppl 1):S53-67
22. Tsuji M, Kojima k, Murakami Y, Kanayama H, Kagawa S. Prognostic value of Ki-67 antigen and p53 protein in urinary bladder cancer: immunohistochemical analysis of radical cystectomy specimens. *Br J Urol* 1997;79:367-72
23. Trașcă E, Buzulică R, Nicolescu I, Trașcă ET. Immunohistochemical determinations in evaluating the prognostic in patient with urinary bladder tumors. *Rom J Morphol Embryol* 2006;47:175-79
24. Goyal S, Singh UR, Sharma S, Kaur N. Correlation of mitotic indices, AgNor count, Ki-67 and Bcl-2 with Grade and Stage in papillary urothelial bladder cancer. *Urol J* 2014;11:1238-47
25. Nakopoulou L, Vourlakou C, Zervas A, Tzonou A, Gakiopoulou H, Dimopoulos MA. The prevalence of bcl-2, p53, and Ki-67 immunoreactivity in transitional cell bladder carcinomas and their clinico-pathologic correlates. *Hum Pathol* 1998;29:146-54
26. van Tilborg AA, Bangma CH, Zwarthoff EC. Bladder cancer biomarkers and their role in surveillance and screening. *Int J Urol* 2009;16:23-30

27. Quintero A, Alvarez-Kindelan J, Luque RJ, Gonzalez-Campora R, Requena MJ, Montironi R, et al. Ki-67 MIB1 labelling index and the prognosis of primary TaT1 urothelial cell carcinoma of the bladder. J Clin Pathol 2006;59:83-8
28. Tsujihashi H1, Nakanishi A, Matsuda H, Uejima S, Kurita T. Cell proliferation of human bladder tumors determined by BrdU and Ki-67 immunostaining. J Urol 1991;145:846-9
29. van Rhijn BW, Vis AN, van der Kwast TH, Kirkels WJ, Radvanyi F, Ooms EC et al. Molecular grading of urothelial cell carcinoma with fibroblast growth factor receptor 3 and MIB-1 is superior to pathologic grade for the prediction of clinical outcome. J Clin Oncol 2003;21:1912-21