

유방암 조직에서 면역조직화학염색을 통한 MDR1, MRP1, Topoisomerase II α 의 발현과 예후인자 및 Histoculture Drug Response Assay (HDRA)를 이용한 항암제 감수성 결과와의 연관관계 분석

¹한림대학교 의과대학 외과학교실, ²홍성희 여성외과, ³한양대학교 의과대학 외과학교실, 울산대학교 의과대학 ⁴병리학교실, 외과학교실

강희준¹ · 홍성희² · 손병호 · 윤호성³ · 공경엽⁴ · 안세현

Correlation of Immunohistochemical Expression of MDR1, MRP1, Topoisomerase II α with Prognostic Factors and Histoculture Drug Response Assay (HDRA) Result in Breast Carcinoma

Hee Joon Kang¹, Sung Hee Hong², Byung Ho Son, Ho Sung Yoon³, Gyung Yub Gong⁴, and Sei Hyun Ahn

¹Department of Surgery, Hallym University College of Medicine, ²Hong Sung Hee Women Clinic, ³Department of Surgery, Hanyang University College of Medicine, Departments of ⁴Pathology and Surgery, Ulsan University College of Medicine

Purpose: Drug resistance plays an important role in the failure of chemotherapy in breast cancer. The purpose of the study was to investigate the chemosensitive and chemoresistance indices of breast carcinomas and see if the in vitro chemosensitivity test correlated with the prognostic indices. **Methods:** The immunohistochemical expressions of MDR1, MRP1 and topoisomerase II α (topo II α) were studied and then correlated these with the in vitro chemosensitivities using the histoculture drug response assay (HDRA) and clinicopathological factors in 51 breast carcinomas.

Results: In the breast carcinomas examined, the immunohistochemical expressions of MDR1, MRP1 and topo II α

were strongly observed in 26 (51.0%), 16 (32.0%), 15 (31.3%) carcinomas, respectively. The MRP1 was more frequently expressed in poorly differentiated carcinomas ($P=0.006$), and those of MDR1 and topo II α were more frequently observed in tumor overexpressing *cerbB2* ($P=0.038$, $P=0.036$). The expression of MDR1 was related to that of topo II α ($P=0.015$). Comparing these markers with the in vitro chemosensitivities to cyclophosphamide, 5-FU, adriamycin, taxol and taxotere, no correlations were found between the expression of MDR1, MRP1, and topo II α but from the chemosensitivity using the HDRA, the growth inhibition rate for cyclophosphamide was higher in MRP1 expressing carcinomas ($P=0.009$).

Conclusion: MDR1, MRP1 and topo II α were all found to be associated with the poor prognostic indices, but assessment of their immunohistochemical expressions did not allow for prediction of the response to chemotherapy by the in vitro chemosensitivity test in breast carcinomas. (*Journal of Korean Breast Cancer Society* 2004;7:228-235)

Key Words: Breast cancer, Prognostic factor, Chemoresistance, Chemosensitivity, HDRA, MDR1, MRP1, Topoisomerase II α

중심 단어: 유방암, 예후인자, 항암제내성, 항암제 감수성 검사, MDR1, MRP1, Topoisomerase II α

서론

책임저자 : 안세현, 서울시 송파구 풍납동 388-1
138-736, 울산대학교 의과대학 외과학교실
Tel: 02-3010-3490, Fax: 02-474-9027
E-mail: ahnsh@amc.seoul.kr

접수일 : 2004년 10월 12일, 게재승인일 : 2004년 11월 18일
본 논문은 2002 아산생명과학 연구소의 지원을 받아 이루어졌음(과제번호; 2002-022).

유방암은 현재 서구사회의 여성에서뿐만 아니라 한국여성에서도 가장 높은 발생률을 나타내는 악성종양이다. 항암치료는 유방암의 여러 병기에서 중요한 치료의 수단으로 사용되는데, 근치적 유방절제술 후에도 50%의 환자는 결국 재발을 경험하지만 술 후 보조 항암요법으로 환자의 생존율을 높일 수 있기 때문이다.(1) 또한 초기 발견 당시

수술적 절제가 불가능한 국소진행성 유방암인 경우에도 선행유도화학요법을 시행하면 높은 관해를 유도할 수 있고, 이후 수술적절제와 방사선 치료 등의 방법으로 국소 조절이 가능하기 때문이다. 그러나 결국 35%의 환자는 유방암으로 사망하게 되는데 원격전이가 발견된 경우 1차 화학요법에서 50~70%의 관해율을 얻을 수 있을지라도, (2) 재발하는 경우 2차 화학요법에서는 20~30%의 관해율로 반응도가 떨어지게 되어 결국 원격 전이된 환자는 화학요법에 반응하지 않는 유방암으로 사망하게 되며, 화학요법에 반응하지 않는 유방암세포 클론의 발생이 원인으로 생각된다.

다약제 항암제 내성(multiple drug resistance: MDR)이란 암세포들이 단일약제에 노출된 이후 anthracyclines, vinca alkaloids, epipodophyllotoxins, taxanes 등의 다양한 구조 및 다양한 작용기전을 가진 화학요법제제들에 대한 저항성을 획득하게 되는 현상으로 성공적인 항암치료를 방해하는 중요한 현상이다. 대부분의 보고된 논문에서 P-glycoprotein (Pgp)에 대한 연구를 포함하고 있는데 Sanfilippo 등(3)과 Keith 등(4)은 in vitro에서 adriamycin에 대한 저항성과 Pgp 발현과의 상관관계를 보고하였으며, Verelle 등(5)은 17명의 진행성 유방암에 대한 연구에서 Pgp의 높은 발현이 doxorubicin, vincristine, cyclophosphamide, 5-FU를 포함한 다약제 선행유도화학요법에 대한 불량한 반응과 낮은 생존을 보고하였다.

MDR1 Pgp는 energy-dependent drug efflux pump로 작용한다는 것을 van Kalken 등(6)이 밝혀냈고, 최근에 Cole 등(7)이 발견한 MRP와 마찬가지로 ATP-binding cassette transporter군에 속한다. MDR1과 마찬가지로 MRP는 세포막에서 drug efflux pump로 작용하며,(8) MRP에는 MRP1 이외에 MRPs2-8 등이 후에 발견되었으나 각각의 단백질의 특정 역할에 대해서는 자세히 밝혀져 있지는 않다. 유방암에서 MDR1의 예후, 예측 인자로서의 역할에 대한 연구보고로서는 아직 상반된 결과가 많으나 항암제 치료를 받지 않은 유방암 조직에서 41%의 발현율을 보이지만 이전에 항암치료를 받은 유방암 조직에서는 그 발현율이 증가한다고 한다.(9) 진단 당시의 MDR1의 발현정도와 장기 간에 걸친 선행유도화학요법 또는 술 후 보조 항암요법 후의 MDR1의 발현정도를 비교한 연구에서 항암치료를 받기 전의 MDR1의 발현 정도가 예후를 판정하는데 도움이 되리라는 보고가 있다.(10,11) MRP1은 치료받지 않은 유방암에서 상당량이 발현되며,(9,10) 원발성 유방암에서 MRP1의 발현량은 무병생존기간 및 전체생존율과 역의 상관관계가 보고되었으며,(12,13) T1 병기의 유방암 및 림프절 전이가 없는 유방암에서 술 후 CMF 보조 항암요법으로 치료받은 환자의 전체생존율을 결정하는 예측인자라는 연구 보고와, 재발한 유방암에서 불량한 예후인자라는 보고가 있다.(13,14) 그러나 MRP1의 경우와는 달리

MDR1 발현과 예후, 예측 인자로서의 역할은 아직은 모호한 단계이다.

DNA topoisomerase II는 anthracyclines와 epipodophyllotoxins의 항암제의 대상 목표로서 유방암 조직 내 topoisomerase IIa (topo IIa)의 발현이 높으면 anthracyclines 항암치료를 잘 반응하는 것으로 알려져 있으며 *cerbB2*의 과발현과 종종 동반되기 때문에,(15) *cerbB2* 과발현된 유방암이 anthracyclines 항암치료를 잘 반응하는 이유 중의 하나로 설명되기도 한다. 그러나 Cardoso 등(16)은 국소진행성 유방암 환자를 대상으로 한 연구에서 anthracycline 항암치료의 효과는 *cerbB2*의 발현과는 관계가 없고 topo IIa의 발현이 anthracycline 항암치료의 효과를 예측할 수 있는 인자라고 보고하였다. 정 등(17)은 topo IIa의 발현이 종양의 크기가 크고, 림프절 전이가 있으며, 병기가 높고, 조직 분화도가 나쁠수록 발현이 증가한다고 보고하여 topo IIa는 예측인자로서 뿐만 아니라 예후인자로서의 가치도 있을 것으로 생각된다. Topo IIa는 MDR에도 관여하는 것으로 생각되는데, in vitro 연구를 통하여 발현의 감소, 기능의 감소, 기능의 변화 등 전형적인 MDR의 기전과는 다르다고 보고되었다.(18)

이에 본 연구자들은 유방암 조직에서 MDR1, MRP1, topo IIa의 발현정도와 원발암의 임상적 특징 및 예후인자와의 관계를 알아보고, 이들 표지자의 발현 정도에 따른 항암제 감수성 및 항암제 내성의 정도를 in vitro 항암제 감수성검사를 통하여 확인해 보고자 한다.

방 법

1) 대상

2002년 6월부터 2002년 9월까지 서울아산병원 유방암 클리닉에 내원한 원발성 유방암 환자 중 이전에 항암치료 및 방사선 치료를 받지 않았으며 수술 후 항암치료가 예상되는 51명의 환자를 대상으로 하였고, 이들 환자의 연령은 26세에서 75세까지 평균 50세였다. 이들 환자들에 대하여 근치적 수술 및 조직 생검을 시행하였으며, 수술 후 이들 환자의 병기는 AJCC (5th ed.)에 의한 병기보고를 예후인자로서의 정확성을 좀 더 반영하기 위하여 2002년 개정된 AJCC (6th ed.)분류법에 따라 재분류하였다.

근치적 절제 혹은 절개 생검 후 얻어진 유방암 조직 중 150 mg 이상의 암 조직을 HBSS (Hank's balanced salt solution; Gibco, Gaithersburg, MD)배지에 넣어 4°C 상태로 보관하며, 보관된 조직은 24시간 이내에 항암제 감수성 검사를 위한 조직배양에 사용되었다. 나머지 조직은 병리조직 검사 및 면역조직화학검사를 위하여 포르말린에 보관하였다.

2) 실험방법

(1) 면역조직화학염색: 포르말린에 고정하고 파라핀으로 포매된 조직을 이용하여 면역조직화학염색을 일반적인 Streptavidine-Biotin 검색법으로 시행하였다. 일차항체는 ER (ER1DO, 1 : 100 dilution, Immunotech, Marseille, France), PR (PR10A9, 1 : 200 dilution, Immunotech), p53 (DO-7, 1 : 1600 dilution, DAKO, Glostrup, Denmark), cerbB2 (CB11, 1 : 100 dilution, Novocastra, Newcastle, UK), MDR1 (JSB-1, 1 : 20 dilution, Chemicon, Temecula, CA, USA), MRP1 (MRPm5, 1 : 20 dilution, Chemicon), topo II α (KIS1, 1 : 400 dilution, Chemicon)를 사용하였다. 음성 대조군으로는 일차항체 대신 antimouse IgG를 반응시킨 슬라이드를 동일한 과정을 거쳐 염색하였다. 양성반응의 판정은 ER, PR, p53의 경우 세포핵이 전체 종양세포 중 10% 이상에서 염색될 때 양성으로 판정하였으며, cerbB2는 제조사의 지침에 따라 세포막과 세포질에 강하게 염색될 때, MDR1, MRP1은 세포막과 세포질이 전체 종양세포 중 10% 이상에서 강하게 염색될 때 양성으로 판정하였고 topo II α 의 경우 세포핵이 전체 종양세포 중 10% 이상에서 강하게 염색될 때 양성으로 판정하였다.

(2) 항암제 감수성 검사: 본 연구에 사용된 in vitro 항암제 감수성 검사는 Hoffman 등(19)과 국내에서는 강 등(20)이 보고한 HDRA(histoculture drug response assay) 및 MTT end point assay를 이용하였다.

① HDRA; HBSS 배지에 보관되었던 조직을 잘게 잘라 10~15 mg 정도의 크기로 만든 후(직경 0.5 mm), 조직 염색방법을 통하여 살아있는 조직을 선택한다. 24 well에 준비된 collagen sponge gel (Gel Foam[®]; Pharmacia & UpJohn, UK)위에 올려놓고 20% FCS이 섞인 RPMI 1640배양액 (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 넣은 상태에서 하루 동안 처리한다. 이틀째에 항암제인 cyclophosphamide 20 μ g/ml (Sigma), 5-FU 300 μ g/ml (Sigma), adriamycin 6 μ g/ml (Sigma), taxol 75 μ g/ml (Sigma), taxotere 50 μ g/ml (Aventis Pharma, S.A. France) 등을 처리하여 72시간 동안 배양한다. 정상 대조군의 경우는 약제를 처리하지 않고 PBS를 넣어 배양한다.

② MTT end point assay; 약제 처리 3일 후 배양액을 제거하고 각각의 well에 0.1 mg/ml collagenase (type I)를 포함하는 HBSS와 5 mg/ml의 PBS에 녹여진 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma)를 각각 100 μ l씩 넣어주고 37°C에서 4시간 동안 배양한다. 이후에 배양액을 제거하고 0.5 ml의 DMSO를 넣어 추출한 추출물을 각각 10 μ l씩 plate에 옮긴 후 540 nm에서 분광 흡광계(SPECTRAMax340 PC, Molecular Devices)로 흡광도를 측정한다. 측정된 흡광도는 다음의 공식을 이용하여 성장 저해도(inhibition rate: IR)를 계산한다.

$$\text{Inhibition Rate (IR)}(\%) = (1-T/C) \times 100$$

T: 항암제를 처리한 well의 조직 g당 흡광도

C: PBS를 처리한 대조군 well의 조직 g당 흡광도

3) 자료 분석

MDR1, MRP1, topo II α 의 상호간의 발현의 관계와 다른 예후인자와의 관계는 chi-square test와 Spearman's correlation coefficient에 의하여, MDR1, MRP1, topo II α 의 발현양상과 항암제 감수성검사를 통한 각각의 항암제 약제에 의한 성장저해도와와의 관계는 independent sample T-test에 의하여 SPSS 11.0 (SPSS, Chicago, IL, USA)를 이용하여 분석하였고, 통계적 유의수준은 $P < 0.05$ 로 정하였다.

결 과

1) 환자의 특성

본 연구의 대상이 된 51명의 환자의 임상적 특징은 조직검사에서 침윤성 유방암으로 수술 받은 후 병리학적으로 확인된 환자로 50예의 침윤성 유방암, 1예의 수질암(medullary carcinoma)이 있었다. 이들의 병기는 AJCC분류법에 따르면 I기가 1예, II기가 21예, III기가 25예, VI기가 3예 있었으며, 림프절 전이가 없었던 군은 11예, 전이가 확인된 군은 40예가 있었다(Table 1).

2) 종양의 특성 및 MDR1, MRP1, topo II α 의 발현

종양의 조직분화도를 SBR (Scarff-Bloom-Richardson)분류법에 따라 구분하면, HG I/II인 군이 20예, HG III인 군은 30예였다. 호르몬 수용체는 전체의 암종 중 ER, PR 양성

Table 1. AJCC staging

Patient number		51	%
Primary tumor	T1	10	19.6
	T2	28	54.9
	T3	7	13.7
	T4	6	11.8
Nodal status	N0	11	21.6
	N1	14	27.5
	N2	9	17.6
	N3	17	33.3
Stage	I	1	2.0
	IIA	13	25.5
	IIB	9	17.6
	IIIA	10	19.6
	IIIB	1	2.0
	IIIC	14	27.5
	IV	3	5.9

Table 2. Tumor characteristics and MDR1, MRP1, topoiso-merase IIa expression

Characteristics		Number (%)	Unknown
HG	I/II	20 (40.0)	1
	III	30 (60.0)	
ER	Negative	26 (51.0)	
	Positive	25 (49.7)	
PR	Negative	32 (62.7)	
	Positive	19 (37.3)	
p53	Negative	32 (64.0)	1
	Positive	18 (36.0)	
cerbB2	Negative	30 (60.0)	
	Positive	20 (40.0)	
MDR1	Negative	25 (49.0)	
	Positive	26 (51.0)	
MRP1	Negative	34 (68.0)	1
	Positive	16 (32.0)	
topo IIa	Negative	33 (68.7)	3
	Positive	15 (31.3)	

HG = histologic grade; ER = estrogen receptor; PR = progesteron receptor; topo IIa = topoisomerase IIa.

Table 3. Prognostic factors and MDR1, MRP1, topoiso-merase IIa expression

Prognostic factor		Marker expression		
		Number of expression/total	number positive	
		MDR1	MRP1	topo IIa
T	1	5/10	5/10	4/9
	2	17/28	5/27	10/27
	3	3/7	4/7	0/7
	4	1/6	2/6	1/6
P-value		NS	NS	NS
N	0	4/11	3/10	2/10
	1	9/14	4/14	6/14
	2	5/9	2/7	2/9
	3	8/17	7/17	5/15
P-value		NS	NS	NS
HG	I/II	9/20	2/20	7/19
	III	17/30	14/29	8/28
P-value		NS	0.006	NS

topo IIa = topoisomerase IIa; NS = not significant.

인 경우가 각각 49.0%, 37.3%였으며, p53은 전체의 36.0%, cerbB2는 40.0%에서 발현양성으로 판정되었고, MDR1은 전체 51예 중 26예(51.0%)에서 발현양성으로, MRP1은 검

Table 4. Tumor markers and MDR1, MRP1, topoiso-merase IIa expression

Tumor marker		Marker expression		
		Number of expression/total	number positive	
		MDR1	MRP1	topo IIa
ER	Positive	13/25	5/24	8/23
	Negative	13/26	11/26	7/25
	P-value	NS	NS	NS
PR	Positive	10/19	5/19	6/18
	Negative	16/32	11/31	9/30
	P-value	NS	NS	NS
p53	Positive	8/18	8/17	5/16
	Negative	18/32	8/32	10/31
	P-value	NS	NS	NS
cerbB2	Positive	14/20	8/19	9/18
	Negative	12/30	8/30	6/29
	P-value	0.038	NS	0.036

ER = estrogen receptor; PR = progesteron receptor; topo IIa = topoisomerase IIa; NS = not significant.

사가 시행된 50예 중 16예(32.0%)에서, topo IIa는 검사가 시행된 48예 중 15예(31.3%)에서 발현양성으로 판정되었다(Table 2).

3) 예후인자와 MDR1, MRP1, topo IIa의 발현과의 관계

MDR1, topo IIa의 발현양상은 T, N병기 및 조직분화도와 관련이 없는 것으로 분석되었고, MRP1의 발현은 T, N 병기와는 관련이 없었으나 조직 분화도가 나쁜 HG III에서 발현이 많은 것으로 관찰되었다(P=0.006)(Table 3).

4) 종양표지자와 MDR1, MRP1, topo IIa의 발현과의 관계 및 MDR1, MRP1, topo IIa발현의 상호관계

ER, PR, p53, cerbB2의 발현양상과 MDR1, MRP1, topo IIa 발현의 상관관계를 분석하여 보았을 때, MDR1, MRP1, topo IIa의 발현은 ER, PR, p53과의 상관관계가 관찰되지 않았으며, MRP1의 발현은 cerbB2와의 연관성이 없었지만 MDR1과 topo IIa는 cerbB2가 양성인 경우에 발현이 많이 관찰되었고 통계적인 유의성도 확인할 수 있었다(P=0.038, P=0.036)(Table 4). MDR1과 MRP1, MRP1과 topo IIa의 발현은 서로 상관관계가 관찰되지 않았지만, MDR1이 발현 양성인 경우 topo IIa의 발현양성이 많이 관찰되었으며 통계적인 유의성도 확인할 수 있었다(P=0.015)(Table 5).

5) MDR1, MRP1, topo II α 발현과 항암제 감수성 검사 결과의 상관관계

HDRA 방법을 통한 항암제 감수성 검사에서 항암제인 cyclophosphamide, 5-FU, adriamycin, taxol, taxotere에 의한 유방암 조직에 대한 성장 저해도의 평균은 각각 20.0%, 29.8%, 34.6%, 38.0%, 29.6%였다. 항암제 중 cyclophosphamide에 의한 성장 저해도가 가장 낮았고, taxol에 의한 성장 저해도가 가장 높았으며 그 다음이 adriamycin이었다.

Table 5. Correlation of MDR1, MRP1, topo II α expression

Marker	Marker expression		
		Number of positive expression/total number MRP1	topo II α
MDR1	Positive	10/26	12/26
	Negative	6/24	3/22
	P-value	NS	0.015
MRP1	Positive		5/15
	Negative		10/33
	P-value		NS

topo II α = topoisomerase II α ; NS = not significant.

종양 표지자인 p53, cerbB2 및 MDR1, MRP1, topo II α 의 발현에 따른 성장 저해도를 보았을 때, p53의 발현유무에 따른 각각의 항암제에 의한 성장저해도의 차이는 보이지 않았고, cerbB2의 발현유무에 따른 adriamycin의 성장저해도의 차이 및 다른 항암제에 의한 성장 저해도의 차이도 관찰되지 않았다. MDR1 발현유무에 따른 각각의 항암제에 의한 성장저해도의 차이는 관찰되지 않았고, MRP1이 발현양성일 때 adriamycin, taxol, taxotere에 의한 성장저해도의 차이는 없었으며, 5-FU에 의한 성장저해도가 감소하는 경향이었으나 통계적인 유의성은 없었고(P=0.106), 오히려 cyclophosphamide에 의한 성장 저해도가 높았다(P=0.009). Topo II α 의 발현이 양성일 때 cyclophosphamide에 의한 성장저해도가 감소하는 경향이었으나 통계적인 유의성은 없었고(P=0.118), 다른 약제에 의한 성장저해도의 차이도 관찰되지 않았다(Table 6).

고 찰

유방암 조직은 유방암세포뿐만 아니라 다양한 양의 간질세포로 이루어져 있기 때문에 MDR1, MRP1, topo II α 의 유방암 세포 특이적인 발현을 보기 위해서는 유방암 조직에서 RNA를 추출하여 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 이용해 정량하기 보다는 면역조직화학염색을 통하여

Table 6. MDR1, MRP1, topo II α expression and chemosensitivity

Marker		Inhibition rate* (number)				
		CTX	5-FU	DXR	Taxol	Taxotere
p53	Positive	21.1 (18)	35.7 (18)	35.3 (18)	32.7 (18)	31.6 (18)
	Negative	19.3 (28)	26.4 (30)	33.4 (32)	40.2 (32)	29.0 (27)
	P-value	NS	NS	NS	NS	NS
cerbB2	Positive	22.3 (20)	31.6 (20)	33.7 (20)	36.8 (20)	31.6 (19)
	Negative	18.2 (26)	28.6 (28)	34.4 (30)	37.9 (30)	28.9 (26)
	P-value	NS	NS	NS	NS	NS
MDR1	Positive	18.3 (25)	28.8 (26)	37.4 (26)	36.3 (26)	33.0 (25)
	Negative	22.1 (22)	31.0 (23)	31.6 (25)	39.9 (25)	25.6 (21)
	P-value	NS	NS	NS	NS	NS
MRP1	Positive	28.8 (16)	23.9 (15)	34.0 (16)	37.3 (16)	27.3 (14)
	Negative	15.5 (30)	33.4 (33)	34.5 (34)	38.2 (34)	31.3 (31)
	P-value	0.009	NS	NS	NS	NS
topo II α	Positive	13.7 (14)	27.1 (15)	31.6 (15)	42.9 (15)	33.8 (14)
	Negative	22.2 (30)	32.2 (31)	36.0 (33)	36.6 (33)	27.5 (29)
	P-value	NS	NS	NS	NS	NS
Total		20.0 (47)	29.8 (49)	34.6 (51)	38.0 (51)	29.6 (46)

*Mean inhibition rate (%), CTX = cyclophosphamide; DXR = adriamycin; topo II α = topoisomerase II α ; NS = not significant.

유방암 세포 특이적인, 그중에서도 암세포의 세포기관 중의 어느 부위에서 발현하는가를 보는 것이 연구의 목적에 타당하다고 생각되어 본 연구에서는 MDR1, MRP1, topo IIa의 발현양상을 결정하는 데 면역조직화학염색의 방법을 사용하였고, 포르말린에 고정되고 파라핀으로 포매된 조직에서도 항원의 검출이 가능한 단클론성 항체(monoclonal antibody)인 MDR1 (JSB-1, Chemicon), MRP1 (MRPm5, Chemicon), topo IIa (KIS1, Chemicon)를 사용하였다.

본 연구에서 MDR1의 발현 양성률은 51%로 항암제 치료를 받지 않은 유방암 조직에 대하여 면역조직화학염색 및 western blot을 이용한 31종의 논문연구 결과를 메타분석한 Trock 등(9)의 41.2%와 큰 차이를 보이지 않았으며, 특히 면역조직화학염색을 통한 연구결과인 MDR1 발현양성률 49.5%와 근접한 결과를 관찰할 수 있었다. MRP1의 양성률은 32.0%로 항암제 치료를 받지 않은 유방암 조직을 대상으로 한 연구에서 Leonessa 등(10)이 보고한 49%의 평균 발현율 보다는 낮았고 Nooter 등(13,14)이 보고한 20~40%와는 비슷하였지만, Linn 등(23)의 연구의 80%보다는 낮았는데, 이들의 MRP1 발현연구에서 사용된 반응항체가 MRPr1으로 파라핀으로 포매된 조직에서 강한 반응을 보이는 반면 본 연구에서 사용된 MRPm5는 중등도의 반응을 보이는 것이 한 원인으로 생각된다.(21) Topo IIa의 발현 양성률은 31.3%로 Martin-Richard 등(22)이 항암제 치료를 받지 않은 유방암조직에서의 발현인 31.0%와 비슷하였다.

MDR1의 발현과 예후인자와의 관계를 보면, Linn 등(23)은 진행된 암이나 종양의 크기가 커짐에 따라 발현이 증가되는 것을 보고하였으나, Larkin 등(24)은 MDR1의 발현과 종양의 크기, 림프절 전이 여부, 호르몬 수용체 발현 여부, 조직분화도와는 상관이 없음을 보고하여 유방암에서 MDR1의 예후인자로서의 역할은 뚜렷하지 않다고 하였으며, 본 연구에서도 MDR1의 발현과 위의 예후인자들과의 상관관계를 찾지 못하였으나 MDR1의 발현은 cerbB2의 발현양상과 양의 상관관계가 관찰되었다($P=0.038$). MRP1의 발현과 위에 열거한 예후인자들과는 관계가 별로 없는 것으로 보고되었는데,(13,14) Filipits 등(12)은 조직분화도와 관련이 있다고 보고하였고 본 연구에서 MRP1의 발현은 종양의 크기, 림프절 전이 여부, 호르몬 수용체 발현 여부와는 관계없었지만, 조직분화도가 나쁜 종양에서 발현이 자주 관찰되었다($P=0.006$). Topo IIa의 발현과 예후인자와의 관계로서 정 등(18)은 topo IIa의 발현이 진행된 병기, 림프절 전이, 나쁜 조직분화도, 에스트로겐 수용체 음성과 관련이 있다고 하였고, Nakopoulou 등(25)은 병기와 림프절 전이 유무와는 관계가 없지만, 나쁜 핵등급, 호르몬 수용체 음성, p53변이, 증식지표인 Ki-67의 높은 발현, cerbB2 과 발현 등 불량한 예후인자와 관련이 있다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 cerbB2 발현양상의 연관관

계를 관찰할 수 있었으나($P=0.036$) 다른 예후인자와의 상관관계는 통계적인 유의성을 발견하지 못했는데, MDR1과 MRP1에서와는 달리 topo IIa의 발현양상을 결정하는 기준이 각 연구마다 상이한 것이 한 원인으로 생각된다.

MDR1과 MRP1, MRP1과 topo IIa발현의 상관관계는 관찰되지 않았으나, MDR1과 topo IIa는 모두 cerbB2의 발현과 관련이 있었으며, MDR1과 topo IIa는 서로 발현양상의 상관관계가 관찰되었는데 MDR1이 발현양성일 때 topo IIa가 발현양성이 많이 관찰되었다($P=0.015$). Topo IIa와 cerbB2의 연관성은 많은 논문에서 보고되었는데, topo IIa의 유전자는 cerbB2 유전자와 염색체상에서 물리적으로 매우 근접하여 있는 17q12-q21에 존재하기 때문에 종종 유전자의 중복이 동시에 일어나기 때문으로 설명된다.(15,22) MDR1과 cerbB2의 관계에 대해서는 관계가 없다는 보고도 있으나, Schneider 등(26)은 수술적으로 치료가 가능한 유방암 조직에서 MDR1의 발현은 cerbB2와 관련이 없어 보이지만, 국소진행성 유방암에서는 유의성이 보인다고 하였으며, 본 연구의 대상이 된 환자는 병기 IIIA 이상이 28명으로 전체의 55.0%를 차지하여 국소진행성 유방암 환자가 상대적으로 많았는데, 본 연구에서 MDR1과 cerbB2과의 연관관계가 관찰된 한 이유로 생각된다. MDR1과 topo IIa와의 연관관계가 보인 이유로서 Y-box 단백질(YB-1)과의 연관성을 들 수 있을 것으로 생각된다. YB-1은 Y-boxes와 작용하는데 Y-boxes는 PCNA (proliferating cell nuclear antigen)이나 topo IIa의 promotor에 위치에 존재하며 YB-1은 MDR1의 유전자인 *mdr1*의 전사과정에 중요한 조절단백으로 작용하여 항암제내성에 관계할 뿐 아니라 PCNA, topo IIa 등과 작용하여 세포증식 및 전이 등 암조직의 악성화와 관련이 있다고 한다.(27,28) 이러한 연유로 MDR1, topo IIa, cerbB2가 상호 연관관계를 가지는 것으로 추론되나 이 부분에 대해서는 좀 더 연구가 필요할 것으로 생각한다.

항암제 감수성 검사를 측정하기 위하여 HDRA의 방법을 사용하였는데 이 방법은 암 조직을 배양하는 데 자연적인 3차원 환경을 유지하는 것으로 Hoffman 등(19)은 이러한 3차원적인 구조의 유지가 암세포배양과 항암제에 대한 반응을 정확히 측정하는데 매우 중요하다고 보고하였고, 강 등(20)은 기존의 항암제 감수성측정 방법은 검사의 검사 가능성도, 검사의 재현성에서 문제가 있지만, 이 방법은 이러한 단점을 보완할 수 있는 검사법임을 보고하였다. 그러나 본 연구에서 기존의 연구를 통하여 알려진 MDR1, MRP1발현과 cyclophosphamide, 5-FU, anthracycline, taxane계의 항암제 내성과의 관계 및 cerbB2, topo IIa발현과 anthracycline계의 항암제에 대한 감수성과의 연관관계를 찾을 수 없었고, 오히려 MRP1의 발현이 양성일 때 cyclophosphamide에 의한 항암제 감수성이 증가하는 것으로 관찰되었다. 본 연구에서 사용된 항암제의 농도는

maximum tolerated doses (MTDs)로 BALB/c nu/nu mice에 투여 후 조직에 함유된 각 약제의 농도를 측정하여 본 실험에 사용하였는데, 항암제 감수성 검사를 위하여 쓰여진 각각의 항암제의 농도가 실제로 임상에 적용되는 용량에서 암 조직 내의 농도를 정확히 반영하지 못했을 가능성과 항암제의 효과를 반영할 수 있는 조직배양의 기간이 너무 짧지 않았나 생각한다.

결 론

51명의 유방암 환자를 대상으로 암 조직에서의 MDR1, MRP1, topo II α 의 발현양상과 예후인자, 종양 표지자와의 관계 및 in vitro 항암제 감수성결과를 분석하였다. MRP1은 암조직의 나쁜 분화도와 관련이 있었고($P=0.006$), MDR1과 topo II α 는 cerbB2의 발현과 연관이 있음을 관찰하여($P=0.038$, $P=0.036$), 이들의 발현은 종양의 악성도와 관련이 있었다. 그러나 예상되었던 MDR1, MRP1, topo II α 발현에 따른 in vitro 항암제 감수성결과의 차이는 관찰하지 못하였고 오히려 MRP1 발현 양성일 경우 cyclophosphamide에 의한 항암제 감수성이 증가되었는데, 향후 본 연구의 대상이 된 환자를 추적하여 실제로 이들 인자의 발현과 항암제 내성, 또는 감수성에 따른 재발과 생존율에 대한 임상연구를 통하여 다시 확인하는 과정이 필요하다고 생각한다.

REFERENCES

- 1) Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immunotherapy: 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. *Lancet* 1992;339:1-15, 71-84.
- 2) Porkka K, Blomqvist C, Rissanen P, Elomaa I, Pyrhönen S. Salvage therapies in women who fail to respond to first-line treatment with fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide for advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 1994;12:1639-47.
- 3) Sanfilippo O, Ronchi E, De Marco C, Di Fronzo G, Silvestrini R. Expression of P-glycoprotein in breast cancer tissue and in vitro resistance to doxorubicin and vincristine. *Europ J Cancer* 1991;27:155-8.
- 4) Keith WN, Stallard S, Brown R. Expression of mdr1 and gst- π in human breast tumors: comparison to in vitro chemosensitivity. *Br J Cancer* 1990;61:712-6.
- 5) Verelle P, Meissonnier F, Fonck Y, Feillel V, Dionet C, Kwiatkowski F, et al. Clinical relevance of immunohistochemical detection of multidrug resistance of P-glycoprotein in breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:111-6.
- 6) van Kalken CK, Pinedo HM, Giaccone G. Multidrug resistance from the clinical point of view. *Europ J Cancer* 1991;27:1481-6.
- 7) Cole SPC, Bhardaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992;258:1650-4.
- 8) Zaman GJR, Flens MJ, van Leusden MR, de Hass M, Mulder HS, Lankelma J, et al. The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:8822-6.
- 9) Trock BJ, Leonessa F, Clark R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta analysis of mdr-1/gp170 expression and its possible functional significance. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:917-31.
- 10) Leonessa F, Clarke R. ATP-binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2003;10:43-73.
- 11) Chevillard S, Pouillart P, Beldjord C, Asselain B, Beuzeboc P, Magdelenat H, et al. Sequential assessment of multidrug resistance phenotype and measurement of S-phase fraction as predictive markers of breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 1996;19:292-300.
- 12) Filipits M, Malaueri R, Suchomel RW, Stranzi T, Dekan G, Kaider A, et al. Expression of the multidrug resistance protein (MRP1) in breast cancer. *Anticancer Res* 1999;19:5043-9.
- 13) Nooter K, de la Riviere GB, Klijn J, Stoter G, Foekens J. multidrug resistance protein in recurrent breast cancer. *Lancet* 1997;349:1885-6.
- 14) Nooter K, de la Riviere GB, Look MP, van Wingerden KE, Henzen-Logmans SC, Scheper RJ, et al. The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1997;76:486-93.
- 15) Harris LN, Yang L, Liotcheva V. Induction of topoisomerase II activity after erbB2 activation is associated with differential response to breast cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2001;7:1497-1504.
- 16) Caroso F, Durbecq V, Larsimont D, Paesmans M, Leroy JY, Rouas G, et al. Correlation between complete response to anthracycline-based chemotherapy and topoisomerase II- α gene amplification and protein overexpression in locally advanced/metastatic breast cancer. *Int J Oncol* 2004;24:201-9.
- 17) Jung TS, Kim BG, Cha SJ, Park SI, Lim HM, Park SJ, et al. Expression of topoisomerase II- α and c-erbB-2 in breast cancer. *J Kor Breast Cancer Soc* 2002;5:135-41.
- 18) Giaccone G. DNA topoisomerases and topoisomerase inhibitors. *Pathol Biol* 1994;42:346-52.
- 19) Hoffman RM. In vitro assays for chemotherapy sensitivity. *Crit Rev Oncol Hematol* 1993;15:99-111.
- 20) Kang HJ, Ko CD, Yoon HS, Kim MB, Ahn SH. The reliability of hitoculture drug response assay (HDRA) in chemosensitivity tests for breast cancer. *Cancer Res Treat* 2001;

- 33:392-97.
- 21) Scheffer GL, Kool M, Heijn M, de Hass M, Pijnenborg ACLM, Wijnholds J, et al. Specific detection of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, and MDR3 p-glycoprotein with a panel of monoclonal antibodies. *Cancer Res* 2000;60:5269-77.
- 22) Martin-Richard M, Muñoz M, Albanell J, Colomo L, Belle M, Rey MJ. Serial topoisomerase expression in primary breast cancer and response to neoadjuvant anthracyclin-based chemotherapy. *Oncology* 2004;66:388-94.
- 23) Linn SC, Pinedo HM, van ARK-Otte J, van der Valk P, Hoekman K, Honkoop AH, et al. Expression of drug resistant proteins in breast cancer in relation to chemotherapy. *Int J Cancer* 1997;71:787-95.
- 24) Larkin A, O'Driscoll L, Kennedy S, Purcell R, Moran E, Crown J, et al. Investigation of MRP-1 protein and MDR-1 p-glycoprotein expression in invasive breast cancer: A prognostic study. *Int J Cancer* 2004;112:286-94.
- 25) Nakopoulou L, Lazaris AC, Kavantzias N, Alexandrou P, Athanassiadou P, Keramopoulos A, et al. *Pathobiology* 2000; 68:133-43.
- 26) Schneider J, Rubio MP, Barbazan MJ, Rodriguez-Escudero FJ, Seizinger BR, Castresana JS. P-glycoprotein, HER-2/neu, and mutant p53 expression in human gynecologic tumors. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:814-6.
- 27) Janz M, Harbeck N, Dettmar P, Berger U, Schmidt A, Jürchott K, et al. Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factor of HER2, UPA, PAI-1. *Int J Cancer* 2002;97:278-82.
- 28) Oda Y, Ohishi Y, Saito T, Hinoshita E, Uchiumi T, Kinukawa N, et al. Nuclear expression of Y-box-binding protein-1 correlates with P-glycoprotein and topoisomerase II α expression, and with poor prognosis in synovial sarcoma. *J Pathol* 2003;199:251-8.