

국소 진행성 유방암 환자의 혈청 내 예후 인자에 대한 Proteomics 분석

류진우¹, 김형지, 김동희, 송인호, 박지영, 황철호², 김성룡³

¹천안 충무병원 유방클리닉, 단국대학교 의과대학, ²단국대학교 생명과학대학, ³순천향대학교 의과대학

The Proteomics Approaches to Find Bio-Markers in Serum of Locally Advanced Breast Cancer Patients.

Jin Woo Ryu¹, Hyung Jee Kim, Dong Hee Kim, In Ho Song, Ji Young Park², Cheol Ho Hwang², Sung Yong Kim³

The Proteomics Research Group in Cheonan, Korea. ¹Breast Clinic, Chungmoo general hospital, College of Medicine, ²Bio-Resources, Dankook University. ³College of Medicine, Soonchunhyang University, Seoul, Korea

Purpose: Breast cancer continues to be a major cause of death, despite the advances in the study of many prognostic factors. Although many prognostic factors have been studied, none reliably predict the response to treatment. This uncertainty in the prognostic factors could be overcome by defining the changes, occurring in patients at either the gene or protein level. Herein, attempts were made to examine the protein repertoire of patients using Proteomics.

Materials and Methods: Using conventional Proteomics, the high resolution 2-D electrophoresis followed by computational image analysis (Melanie program) and protein identification with mass spec-

trometry (MALDI-TOF), the serum of locally advanced breast cancer patients (stage III) was analyzed, and attempts were made to define the differences between recurred (or metastasis) patients, and disease free patients of more than 4-years duration after surgery.

Results: In the 2-D electrophoresis of serum, about 1,000 spots were gained in each gel, with the up and down expressed protein spots compared to the normal control protein map. Six of seven patients had Cytokeratin 9 in their peripheral blood. In the serum of recurred patients (one of two), no Haptoglobin-related proteins were detected. All five un-recurred patients had normal or elevated level of serum Haptoglobin-related proteins.

Conclusions: The reduction of Haptoglobin-related proteins indicated the humoral immuno-depression in recurred patients. These findings may suggest the continuation of proper humoral immunity was

책임저자: 류진우

330-090, 충남 천안시 쌍용동 542-3 천안 충무병원 유방·갑상선 클리닉

Tel: 041-570-7616, Fax: 041-570-7685, E-mail: breast4ryu@paran.com

접수일: 2005년 10월 14일; 게재승인일: 2006년 2월 21일

본 논문의 요지는 2005년 5회 ABCS in Tokyo에서 발표하였음.

본 연구는 2005년 한국유방건강재단 학술연구비지원을 받았음.

important in the prevention of cancer recurrences or metastasis after surgery, especially in locally advanced breast cancer patients, which may suggests the value of immunotherapy in breast cancer patients to obtain good results.

(J Breast Cancer 2005;9: 25-30)

Key Words breast cancer, serum, proteome analysis, proteomics

중심단어 유방암, 혈청, 단백질 분석, 단백질체학

Table 1. Clinical characteristics of seven cancer patients.

Age(yr)	Stage	TTP(Month)	Location	TTF(Month)
50	III A	47	Bone, Liver	-
44	III A	24	Lung	-
56	III A	-		60
41	III A	-		54
51	III C	-		55
43	III A	-		67
42	III A	-		61

TTP = Time To disease Program; TTF = Time To disease Free.

Table 2. Up and down expressed proteins in human serum cancer sample.

Accession No.	Calculated pl/Mw (kDa)	Apparent pl/Mw (kDa)	Protein identified	Est'd Z*
HPHU1	6.1/38.95	5.16/50	Haptoglobin precursor	2.38
HPHU1	6.1/38.95	5.33/48	Haptoglobin precursor	1.64
AAC27432.1	6.1/38.75	5.52/48	Haptoglobin	2.35
CAA82315	5.2/62.34	5.91/21	Cytokeratin 9	2.41
CAA82315	5.1/62.20	6.29/21	Cytokeratin 9	1.68

pl/Mw = isoelectric point/ molecular weight.

* The "Z score" is estimated when the search result is compared against an estimated random match population. For instance, a Z score of 1.65 for a search means that the search is in the 95th percentile. Conceptually, this "95th percentile" is different from "95% confidence" that the search is a correct identification.

(<http://129.85.19.192/profound/help.html#ZSCORE>)

Table 3. The expression differences between recurred and un-recurred patients' serums.

Group	Haptoglobin spots			Cytokeratin spots	
Control	0.901	1.124	0.891	0.402	1.047
Re-1	0.267	0.401	0.867	-	0.340
Re-2	1.810	1.585	1.485	0.136	0.801
Unre-1	0.957	0.957	1.296	0.010	0.620
Unre-2	0.578	0.516	0.775	0.060	0.437
Unre-3	0.898	1.030	0.574	0.053	0.529
Unre-4	1.260	1.120	0.995	0.309	0.881
Unre-5	1.450	1.350	1.110	-	-

Re= Recurred or metastatic patient; Unre= Un-recurred or non-metastatic patient.

서론

국소 진행성 유방암은 American Joint Committee on Cancer (AJCC)의 분류 기준에 따라 병기 III에 속하는 환자로 정의된다. (1) 우리나라의 경우 최근 들어 유방암에 대한 교육 및 여성들의 관심 증가로, 유방 검진이 일반화되면서 조기 유방암의 발견 빈도가 증가하며, 국소 진행성 유방암의 빈도는 감소하는 추세에 있으나, 아직도 상당수의 환자에서 병기 III의 유방암 진단을 받고 있으며, 한국 유방암학회의 조사에 의하면 2004년 새로 발생한 유방암 환자 중 14.6%가 병기 III의 진단을 받았다. 조기 유방암이 아닌 진행성 유방암의 치료에 대한 근본적 개념의 변화는, 유방암을 진단할 당시 이미 미세 전이를 포함한 전신 전이가 이루어진 상태라는 것이다. 병기 III기의 국소 진행성 유방암은 진단시 림프절 전이를 포함한 전신적 원격 전이가 존재하며, 치료는 국소 치료보다 전신 요법을 도입한 병합 치료 요법이 시행된다. 수술 및 방사선 치료를 포함한 국소 치료 방법만으로는 대다수의 환자가 (약 80% 까지) 전신전이로 인하여 사망하게 된다. (2) 이런 이유로 수술, 방사선 치료, 항암 요법, 및 항암 호르몬 치료 요법이 모두 포함된 병합 요법이 생존율을 증가시키는 것은 사실이다. 그러나 병기 III의 유방암의 경우 통상적인 5년 생존율은 50%에 불과한 매우 불량한 예후를 보이는 경우로, 생존율을 향상시키기 위한 병합요법의 여러 가지 방법 등에 대한 연구들이 이루어지고 있으나 총 생존율에는 차이가 없는 것으로 보고된다. (3)

본 연구는 현재 사용되는 병합 치료 요법 등에 부가하여 생존율의 향상 등 치료 성적을 발전시킬 수 있는 치료 목표를 발견하고자 하였으며, 국소 전이성 유방암환자에서 수술 후 4년 이상 임상 및 검사상 재발 및 전이가 없는 환자와, 수술 후 4년 이내에 국소 재발 및 전신 전이가 발견되어 치료받은 환자들의 혈청내 단백질을 비교 분석하여, 의미 있는 예후 인자를 밝혀 보고자 시행하였다.

방법

1. 실험재료

국소 진행성 유방암 환자에서 수술 후 4년 이내 재발 및 전이가 확인된 2예 및 4년 이상 임상 및 검사에서 전이, 재발이 없었던 환자 5예에서 말초 혈액을 채취하여 혈청을 분리하고 단백질을 분석을 시행하여 두 군 간의 차이를 비교하였다.

2. 단백질 추출

Serum 과 solution I (10% SDS, 3.5% DTT)을 잘 섞어서 95 °C에서 5분 동안 끓인다. 얼음에서 5분 동안 식힌 후 Lysis buffer (7M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS, 0.2% Ampholyte (Bio-lyte 3-10, Bio-rad), 25 mM Tris-HCl

비재발군은 5예 모두에서 정상 대조군과 유사하거나 과발현을 보였으며, 재발군의 경우 2예 중 1예에서 매우 약한 발현을 보이는 차이를 보였다(Fig 3).

고 찰

유방암은 국내에서 최근 급격히 증가하는 여성암으로 한국 유방암학회 조사 자료를 보면 1996년 3,801명에서 2002년 약 2배인 7551명의 발생 빈도를 보인다.(4) AJCC 병기 분류에 따른 국소진행성 유방암 (3기 이상 유방암)은 개발 도상 국가들의 경우 발생 유방암의 약 30%로 보고 된다. 우리나라의 경우 2002년 발생 국내 유방암 환자 중 3기 유방암은 792명 (12.5%)으로 많은 환자들이 불량한 예후를 보이게 된다. 3기 유방암의 경우 진단시 이미 미세 전이를 포함한 전신적 원격전이가 있는 것으로 인식되며, 이로 인하여 5년 생존율이 50% 정도로 매우 불량한 예후를 보이게 되어, 생존율 향상을

위한 항암 치료 방법 및 예후 인자에 대한 연구들이 관심 있게 이루어지고 있다. 과거의 경우 Haagensen 등이 주장한 수술 후 불량한 예후인자등인 피부부종 및 흉벽 침윤 등의 인자는 국소적 인자로 현재는 통용되지 않는 개념이며, 예후 인자로 현재 인정되는 것들은 액와부 림프절 전이 개수가 가장 중요하며, 진단시 임상 병기 및 3기 유방암의 경우 유도화학요법의 반응률, 진단시 폐경상태 등이 의미 있는 예후인자로 보고 된다.(5)

최근에는 유방암 예후 인자에 대한 분자 생물학적 기초 연구가 많이 이루어졌다. 종양 유전자, 종양억제 유전자, 및 기타 세포내 신호전달 과정에 관여하는 유전자들의 변이 및 기능에 대한 연구들이 수없이 많이 이루어져 왔으며, 연구를 통한 생존율 향상을 위하여 새로운 치료제의 개발을 실행하고자 노력하였다. 그러나 유전자 연구 (Genomic Research)에 대한 한계가 있으며, 한계의 극복을 위한 연구로 유전자의 실제 기능을 담당하는 단백질에 대한 직접적인 연구가 필요하며, 생물학적 예후인자 지표들 (Biomarkers)을 발굴하여 앞으로 임상 적용, 생존율 향상을 위한 신약물 개발 및 치료법 이용까지 많은 연구가 이루어져야 한다. 기능체 단백질에 대한 직접적인 연구 방법으로 Proteomics (단백질체학) 기법이 발달하였다. 기본적인 방법은 2-DE 전기영동 (2-Dimension Electrophoresis)을 이용하여 단백질을 분리하고, 그 후 Melanie 등을 이용한 생물정보학 (Bioinformatics) 기법을 이용하여 대조군과 비교하고, MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight)을 이용하여 질량분석을 통한 유전체 분석을 시행하였다. 현재는 분석의 한계를 더 극복하고자 ICAT (Isotopic coded affinity tags technology), MudPIT (Multidimensional protein identification technology), SELDI-TOF (Surface enhanced laser desorption ionization-time of flight) 방법 등이 부가되어 이용되며, 정상 조직과 순수한 유방암 조직의 단백질 비교 분석을 위하여 LCM (Laser Capture Microdissection technique) 등이 사용된다.(6)

유방암 조기 발견을 위한 혈청 단백질 검사로 Li 등(7)은 SELDI-TOF를 이용한 혈청내 Biomarkers를 보고하였으며, 최근까지 혈청내 암 표지자로 사용되는 CA 15-3은 민감도 23%, 특이도 69%로 FDA (Food and Drug Administration, USA)에서는 유방암 치료 후 재발의 평가에 한하여 사용할 것을 승인하였다.(8) Bisca 등(9)은 수술전 조직 진단의 방법으로 침 생검 조직에서 단백질을 분석하여 섬유종과 비교하여 유방암에서 달리 표현되는 단백질들을 관찰하여 보고하였다. 유방암의 진행 및 분자생물학적 특징을 다량으로 분석하기 위한 기법으로 Somiari 등(10)은 침윤성

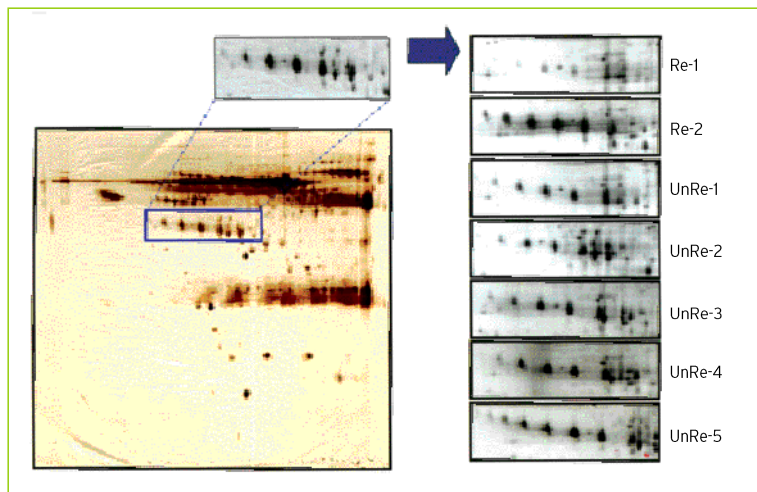


Fig 2. Haptoglobin β chain proteins in protein expression. The changes were compared among the normal, the recurrent (Re), and the un-recurred (UnRe) patients.

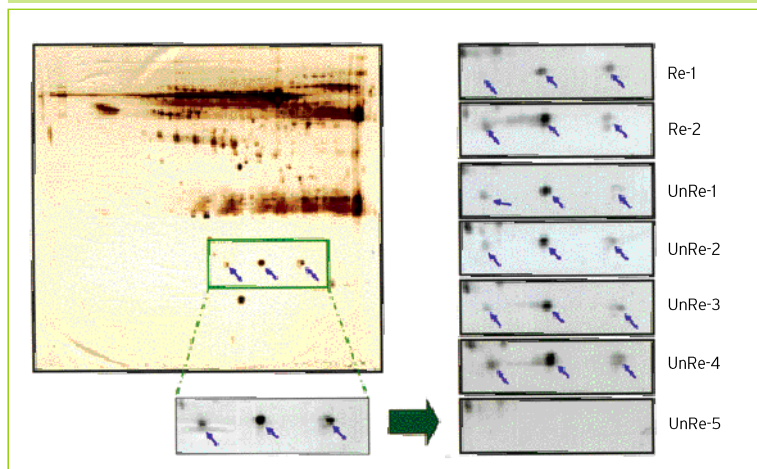
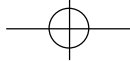


Fig 3. Cytokeratin 9 proteins in protein expression. The changes were compared among the normal, the recurrent (Re), and the un-recurred (UnRe) patients.



cancer. Cancer Lett 2004;210:245-53.

13 Goncalves A, Esterni B, Bertucci F, Chabannon C, Cabizolles M, Bardou VJ, et al. Postoperative serum pro-

teomic profiles may predict metastatic relapse in high-risk primary breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. Oncogene 2006; 25:981-9.
