

## 인체 유방암에서 p27과 cyclin E 발현의 예후 인자로서 의의

서울대학교 의과대학 외과학교실, 병리학교실<sup>1</sup>

강한성 · 노동영 · 박인애<sup>1</sup> · 윤여규 · 오승근 · 최국진

= Abstract =

### The Prognostic Significance of p27 and cyclin E in Human Breast Cancer

Han Sung Kang, M.D., Dong-Young Noh, M.D., In Ae Park, M.D.<sup>1</sup>,  
Yeo Kyu Youn, M.D., Seung Keun Oh, M.D. and Kuk Jin Choe, M.D.

*Department of Surgery and Pathology<sup>1</sup>, Seoul National University, College of Medicine*

There is considerable need for reliable prognostic markers to guide clinicians in management decisions for the breast cancer. The cell cycle is governed by a family of cyclin-dependent kinases (Cdks), regulated by associated cyclin. p27, a cyclin dependent kinase inhibitors, regulates progression from G1 into S phase by inhibiting cyclin/cdks complex. This study was performed to evaluate the association between p27 expression, determined by immunohistochemical stain, and various histopathologic features in breast cancer. It was also determined whether p27 expression had the significance as the prognostic factor in the breast cancer patients. 45 patients who got the relatively good preserved paraffin blocks among the 100 patients was chosen for immunohistochemical staining against p27, cyclin E, c-erbB2, cathepsin D and p53 and reexamined their nuclear and histological grades from Jan. 1989 through Dec. 1992. As a results, the patients with negative expression of p27 had more metastatic axillary nodes than those with positive expression. ( $5.87 \pm 1.87$  vs  $1.14 \pm 0.54$ ,  $p=0.021$ ) p27 negative group got worse nuclear grade than p27 negative group but beyond statistical significance. (48.4% vs 28.6 %,  $p=0.281$ ) On univariate analysis, primary tumor size, status of axillary nodes and the expression of p27 were the significant prognostic factors affecting overall survival rates. In particular, p27 positive group had better outcomes on 5 years survival rate than p27 negative group. ( $92.31 \pm 7.39\%$  vs  $73.33 \pm 8.07\%$ ,  $p=0.0441$ ) but didn't affect the disease free survival with statistical significance. On multivariate analysis, the primary tumor size and axillary node were significant prognostic factors on overall and disease free survival. In conclusion, despite relatively small size of this study group, considering that p27 negative group got the more metastatic node and worse overall survival, p27 expression might be a novel prognostic indicator in the breast cancer. (Korean J of Breast Cancer 1998;1:241~250)

**Key Words:** Breast cancer, Prognostic factor, p27, Cyclin E

## 서 론

현재까지 유방암의 예후를 정확히 판단할 수 있는 종양 표지자를 찾으려는 많은 시도가 있었으나, 그 결과는 실망만 안겨주고 있다. 기존의 예후 인자들로 예후가 불량한 고위험군의 규명에 큰 성과를 거두고 있지 못하기 때문에, 고위험군을 밝혀낼 새로운 종양 표지자-종양 유전자를 포함한-의 필요성은 절실하다. 현재 임상적으로 이용되는 예후 인자는 병리학적 병기, 종양의 조직 등급, 일차 종양의 크기, 호르몬 수용체의 상태 및 액와 림프절 전이 여부 등이다.

cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI)의 하나인 p27은 cyclin E와 cyclin-dependent kinase (Cdk)와 결합하여 세포 주기 내에서의 진행을 억제하거나 조절한다<sup>1)</sup>. 즉 S기에 진행에 필요한 cyclin E/Cdk 결합물에 반응하여, G1기에서 S기로의 진행을 조절하는 역할을 한다. 흥미있는 것은 다른 세포 주기 조절자인 p16이나 p53과는 달리 p27이나 cyclin E는 돌연변이가 거의 관찰되지 않는다<sup>2,3)</sup>.

p27의 발현이 최근 중요하게 생각되는 이유는 성장 인자 결핍이나 접촉 억제(contact inhibition), TGF $\beta$ 와 같은 세포 주기에 영향을 줄 수 있는 신호에 따라, p27의 발현 정도가 조절되기 때문이다. 증기 G1에 관여하는 cyclin D-Cdk4/6 결합체는 후기 G1 및 S기로 들어가는 단계에서 cyclin E-Cdk2 혼합물로 변환시키는데, p27은 중요한 역할을 한다<sup>4)</sup>.

Porter 등은 젊은 연령 유방암 환자에서 p27이 발현되지 않을수록, 불량한 전체 생존율을 보였다고 한다<sup>5)</sup>. Tan 등에 의하면, 1 cm 미만의 유방암 환자를 대상으로 p27 발현의 예후적인 의미를 분석한 결과, p27 발현 음성군은 예후가 불량하였으며, 또한 액와 림프절에 전이되지 않은 환자군에서도 p27 음성군은 예후가 불량하다고 하였다<sup>6)</sup>.

본 연구에서는 유방암 환자에서 p27 발현과 cyclin E 발현 정도가 예후에 어떤 영향을 미치는지 조사하였고, p27 발현과 cyclin E 발현과의 상관 관계를 살펴보았다. 또한 기존의 예후 인자와 p27 발현과의 상관 관계를 살펴보았다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

1989년 1월부터 1992년 12월까지 서울대학병원 외과학교실에서 일차 유방암으로 수술을 시행한 총 385명의 환자 중 생존 여부가 확실히 밝혀진 325명의 환자에 대해 난수표 방식으로 100명을 선택하였다.

### 2. 연구 방법

총 100명의 의무 기록, 병리 기록지 등을 검토하여, 일차 종양의 크기, 전이 림프절 개수 및 조직 병리학적 병기를 살펴보았다. 100명의 환자 중 파라핀 보관 상태가 양호한 45명 환자들의 파라핀 블록으로 보관된 조직에 대해 면역 조직 화학 염색을 실시하였다. 또한 이들의 슬라이드를 재검하여, 조직학적 등급, 핵 분화 등급 등을 다시 판정하였다. 에스트로겐 수용체는 12예에서는 면역 조직 화학 염색으로, 33예에서는 방사선 면역 검사(radioimmunoassay) 방식으로 검색했다.

#### 1) 조직학적 분화도 판독

Bloom과 Richardson (1957)이 제창한 W.H.O.의 분류법에 따라서 판독하였다. 관형성(tubule formation), 과염색성(hyperchromatism)과 세포 분열(mitosis), 다형성증(pleomorphism) 등 세 가지 항목에 대해 1-3점의 점수를 정한 뒤, 총합이 3-5인 경우는 1등급, 6-7인 경우는 2등급, 8-9인 경우는 3등급으로 정하였다.

#### 2) 핵 분화도 판독

Black 등이(1955) 사용한 분류법을 사용하였다. Grade I은 작고 일정한 모양의 핵을 지니고, 세포 분열이 거의 관찰되지 않는 경우, Grade III는 불규칙한 모양의 핵을 지니고 한 시야당 많은 세포 분열의 소견을 보이는 경우, Grade II는 Grade I과 Grade III의 중간 단계로 정하였다.

### 3) 포르말린에 고정시킨 후 파라핀에 포매된 종양 조직 절편의 염색 준비 과정

종양 조직 절편을 microtome을 이용하여 5  $\mu$ m 두께로 자른 후 슬라이드 위에 놓고 Xylene으로 각각 10분씩 3회 씻어 파라핀을 제거한 후, 100%, 95%, 75% ethanol로 차례대로 각각 10분씩 2회 수화시켰다. 증류수로 씻고, Endogenous peroxidase activity를 억제하기 위해 0.3% hydrogen peroxide에 30분간 처리하였다. Phosphate buffered saline (PBS)으로 씻은 뒤 효소를 이용하여 검체를 처리하였다.

### 4) 각 종양 표지자에 대한 면역조직화학적 염색

파라핀이 제거된 조직 절편을 증류수 내에서 microwave를 5분간 2회 투사하였다. 증류수로 3회 씻어내고, endogenous peroxidase 활성을 억제하기 위해 0.3%  $H_2O_2$  in  $NaN_3/D.W$ 에서 15분간 반응시킨 후 다시 증류수로 3회 씻었다. 차단 항체로 염소 혈청을 사용하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 본 연구에 사용된 일차 항체는 p27 (mouse monoclonal antibody: Novo Castra Co., 1:30 희석) cyclin E (mouse monoclonal antibody: Novo Castra Co., 1:50 희석) c-erbB2 (mouse monoclonal antibody: Novo Castra Co., 1:100 희석) cathepsin D (polyclonal rabbit antibody: Novo Castra Co., 1:200 희석) p53 (DAKO-p53, DO-7, 1: 50 희석)을 사용하였다. ABC

(avidin biotin complex: avidin DH 2 drop, biotinylated horseradish peroxidase H 2drop) 염색을 30분간 시행한 뒤 PBS로 2회 세척하였다. PBS로 3회 씻어

Table 1. Patients' characteristics for immunohistochemistry

Category	No (%)
Age	
>45	30 (66.7)
≤45	15 (33.3)
Tumor size	
≤2 cm	14 (31.1)
2-5 cm	20 (44.4)
> 5 cm	11 (24.5)
Metastatic lymph nodes	
0	21 (46.6)
1-3	10 (22.2)
4-	14 (31.8)
ER	
Positive	19 (42.2)
Negative	26 (57.8)
Histologic grade	
I	5 (11.1)
II	21 (46.7)
III	19 (42.2)
Nuclear grade	
I	25 (55.6)
II	18 (40.0)
III	2 ( 4.4)

Table 2. Demographic and Clinical Features of Patients according to the p27 expression

	p27 (+)(N=14)	p27 (-)(N=31)	p-value
Age (mean±SD)	45.85±2.21	50.83±2.04	0.15*
Tumor size (mean±SD)	3.38±0.45	3.65±1.76	0.63*
Number of metastatic L/N (mean±SD)	1.14±0.54	5.87±1.87	0.021*
Poor nuclear grade (Grade 2, 3)	4/14 (28.6%)	15/31 (48.4%)	0.281 <sup>†</sup>
ER positivity	7/14 (40.7%)	11/27 (53.8%)	0.435 <sup>†</sup>
cyclin E	1/14 ( 7.1%)	3/31 (9.67%)	0.564 <sup>†</sup>
c-erbB2	7/14 (50.0%)	7/31 (22.6%)	0.065 <sup>†</sup>
cathepsin-D	7/14 ( 50%)	8/31 (25.8%)	0.11 <sup>†</sup>
p53	10/14 (71.4%)	14/31 (45.2%)	0.102 <sup>†</sup>

\*, student T test; <sup>†</sup>, fisher's exact test.

Table 3. Prognostic factors affecting on overall survival

Prognostic factor	5 YSR	p-value
Primary tumor		<0.0001
≤2 cm	86.48±2.31	
2-5 cm	82.37±1.93	
>5 cm	63.86±5.03	
No of metastatic axillary node		<0.0001
0	91.48±1.37	
1-3	84.32±3.32	
4-	64.37±5.06	
ER status		0.9123
(-)	71.96±5.96	
(+)	73.39±4.63	
Nuclear grade		0.390
well differentiated	78.60±9.51	
mod/poorly differentiated	71.40±9.16	
Histological grade		0.6894
well differentiated	82.96±8.98	
mod/poorly differentiated	77.01±7.04	
p27 expression		0.0441
p27 (-)	73.33±8.07	
p27 (+)	92.31±7.39	
Cyclin E		0.2843
Cyclin E (-)	82.58±6.47	
Cyclin E (+)	55.56±16.56	
c-erbB2		0.7711
c-erbB2 (-)	72.52±7.77	
c-erbB2 (+)	69.64±12.70	
Cathepsin D		0.1596
Cathepsin D (-)	80.00±10.33	
Cathepsin D (+)	75.39±8.10	
p53 overexpression		0.2966
p53 (-)	80.95±8.57	
p53 (+)	58.51±18.11	

낸 후 포식 항체로 peroxidase-conjugated streptavidin 을 사용하여 실온에서 30분간 반응시키고 PBS로 3 회 씻어낸 후 3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)로 염색하여 10-20분간 실온에서 반응시킨 후 증류수로 3회 씻었다. Hematoxylin으로 대조 염색하여 현미경 관찰을 하였다.

#### 5) 면역 조직 화학 염색 결과 판독

각 슬라이드당 일차 항체에 염색된 암종 세포를

전체 암종 세포들에 대한 비율로 양성여부를 판별하였다. 면역 조직 화학 염색 결과는 환자의 임상 특징을 모르는 해부 병리 의사에 의해 판독하였다. p53, p27, ER (45예 중 12예) 및 cyclin E는 핵 내에 명확하게 염색된 세포를 양성 염색 세포로 정의하였고, c-erbB2와 cathepsin D는 세포질 내에 염색된 경우를 양성 세포로 정하였다.

c-erbB2, cathepsin D, p53 및 ER은 전체 세포 중 10% 이상 염색된 경우를 양성으로 판별하였고, p27

Table 4. Prognostic factors affecting on disease free survival

Prognostic factor	5 YSR	p-value
Primary tumor		<0.0001
≤2 cm	83.76±9.70	
2-5 cm	78.69±2.01	
>5 cm	54.40±4.93	
No of metastatic axillary node		<0.0001
0	86.15±1.53	
1-3	77.41±3.48	
4-	60.10±5.02	
ER status		0.520
(-)	61.94±7.50	
(+)	70.39±4.70	
Nuclear grade		0.5241
well differentiated	75.37±8.76	
mod/poorly differentiated	70.40±10.35	
Histological grade		0.2327
well differentiated	75.66±10.56	
mod/poorly differentiated	72.99±9.40	
p27 expression		0.2735
p27 (-)	72.26±8.39	
p27 (+)	78.57±10.97	
Cyclin E		0.2473
Cyclin E (-)	79.53±6.90	
Cyclin E (+)	53.33±17.33	
c-erbB2		0.7711
c-erbB2 (-)	70.85±7.97	
c-erbB2 (+)	64.39±12.37	
Cathepsin D		0.1596
Cathepsin D (-)	79.33±6.44	
Cathepsin D (+)	68.01±8.84	
p53 overexpression		0.8376
p53 (-)	69.64±10.41	
p53 (+)	57.51±18.11	

과 cyclin E는 4단계(0-25%, 25-50%, 50-75%, 75%<)로 나누어, 25% 이상 염색된 경우를 양성으로 판정하였다<sup>9)</sup>.

#### 6) 통계학적 분석

각 군의 예후 인자에 대한 빈도 차이는 chi-square 방식이나 Fisher's exact 방식을 적절하게 사용하였고, 각군의 평균값의 차이는 student t test를 이용하여 비교하였다. 환자의 생존율은 Kaplan-Meier 방식

으로 구하였고, 각 예후 인자의 비교는 Log-rank 방식으로 분석하였다. 또한 다변량 분석은 Cox regression model을 이용하여 예후 인자들을 비교하였다. 통계적으로 유의한 p값은 0.05 이하로 정하였고, 본 연구에 이용한 통계 프로그램은 개인용 컴퓨터용 SPSS for Windows, Release 6.1을 이용하였다.

Table 5. Overall survival: multivariate analysis, Cox' regression model

Parameter	Relative risk (95% confidence interval)	p-value
Tumor size	1.31 (0.67-2.59)	0.013
Axillary node	1.27 (0.47-3.43)	0.001
Histological grade	0.35 (0.06-1.79)	0.208
p27	0.97 (0.73-2.90)	0.078
cyclin E	2.46 (0.67-9.04)	0.175
c-erbB2	0.60 (0.10-3.44)	0.569
cathepsin D	0.15 (0.10-1.24)	0.178
p53	0.54 (0.14-2.04)	0.364

Table 6. Disease free survival: multivariate analysis Cox' regression model

Parameter	Relative risk (95% confidence interval)	p-value
Tumor size	1.25 (0.68-2.28)	0.025
Axillary node	1.70 (0.63-4.63)	0.001
Histological grade	0.97 (0.22-4.27)	0.972
p27	0.69 (0.11-4.21)	0.694
cyclin E	3.06 (0.71-13.40)	0.130
c-erbB2	3.55 (0.67-18.75)	0.569
cathepsin D	0.11 (0.01-1.05)	0.103
p53	0.49 (0.14-1.79)	0.287

## 연구 결과

### 1. 대상 환자군의 특성

환자의 평균 연령은 49세이었고, 31세에서 82세까지 분포하고 있었다. 수술 방식은 변형 근치적 유방 절제술을 96예에서 시행하였고, 4예에서 근치적 유방 절제술을 시행하였다. 평균 종양의 크기는 3.2 cm 이었고, 평균 전이 액와 림프절의 수는 4.4개이었다. 환자들의 조직학적 분류를 보면, 침윤형 유관암이 91예, 관상피 내암이 5예, 수질암이 3예, 그리고 이형성 암종(metaplastic carcinoma)이 1예 있었다. 100명의 평균 관찰 기간 71개월이었고, 중앙 관찰 기간은 61개월이었다.

면역 조직 화학적 염색을 시행한 45명의 환자 중, p27 발현율은 31.1% (14/45), cyclin E의 발현율은 8.89% (4/45)이었다. 또한 c-erbB2 단백질의 발현율은 31.1% (14/45), cathepsin D의 단백질 발현율은 33.3%

(15/45), 그리고 p53 단백질 과발현은 55.5% (25/45)에서 보였다(Table 1).

### 2. p27 양성 환자군과 p27 음성 환자군의 특성 비교

p27 음성 발현군(n=31)과 양성 발현군(n=14) 사이에 여러 조직 병리학적 인자, 및 종양 표지자의 발현 빈도를 비교하였다. 양 군 사이에 평균 연령, 일차 종양의 크기는 서로 차이가 없었다( $p>0.05$ ). 그러나 평균 액와부 전이 림프절의 개수는 p27 양성군이  $1.14 \pm 0.54$ 개, p27 음성군이  $5.87 \pm 1.76$ 개로 p27 음성 발현군에서 통계적으로 유의하게 많은 전이 림프절을 지니고 있었다( $p=0.021$ ). 핵 분화 등급은 p27 음성군이 높은 빈도의 불량한 핵분화 등급을 지니고 있었으나, 통계적으로 유의한 차이는 없었다(48.4% vs 28.6%,  $p=0.281$ ).

cyclin E의 발현도는 p27 음성군이 9.67% (3/31), 양성군이 7.1% (1/14)로 p27 음성군에서 발현 빈도

가 높았으나, 통계적인 유의성은 없었다( $p=0.564$ ). 그 외 에스트로겐 수용체 발현도, c-erbB 2 단백질 발현도, cathepsin D 그리고 p53 단백질 과발현 빈도를 비교하였 때, 유의한 빈도 차이는 보이지 않았다 (Table 2).

### 3. 전체 생존율 및 무병 생존율에 영향을 주는 예후 인자 분석

중앙 관찰 기간 61개월간 Kaplan-Meier 방식으로 전체 생존율 및 무병 생존율을 조사하였다. 전체 생존율에 영향을 주는 인자는 일차 종양의 크기, 전이 액와 림프절 개수, 및 p27 발현 여부 등이었고, 에스트로겐 수용체 상태, 조직학적 등급, c-erbB2, p53, cathepsin D 및 cyclin E는 전체 생존율에 영향을 주지 못했다. p27 양성군( $n=14$ )은 5년 생존율이  $92.31 \pm 7.39\%$ 이며, p27 음성군( $n=31$ )은 5년 생존율이  $73.33 \pm 8.07\%$ 로, p27 양성군에서 통계적으로 유의하게 양호한 생존율을 보였다( $p=0.0441$ ). 반면 cyclin E 음성군( $n=41$ )은 생존율이 cyclin E 양성군( $n=4$ )에 비해 양호한 생존율을 보였으나, 통계적인 의미는 없었다( $82.58 \pm 6.47\%$  vs  $55.56 \pm 17.33\%$ ,  $p=0.2843$ ) (Table 3).

무병 생존율을 보면, 유의한 예후 인자는 일차 종양의 크기와 액와 림프절 전이 상태이었고 그 외 다른 인자는 의미있는 차이를 보이지 않았다. p27 음성군( $n=31$ )의 5년 무병 생존율은  $72.26 \pm 8.39\%$ 로 p27 양성군( $n=14$ )의  $78.57 \pm 10.97\%$ 에 비해 불량하였으나 통계적인 의미는 없었다( $p=0.2735$ ). 반면 cyclin E 양성군( $n=4$ )의 5년 무병 생존율  $53.33 \pm 17.33\%$ 이었고, cyclin E 음성군( $n=41$ )은  $79.53 \pm 6.90\%$ 로 cyclin E 양성군의 생존율이 저조하였으나, 통계적으로 의미있는 차이는 없었다( $p=0.2473$ ) (Table 4).

그러나 본 연구에 이용한 모든 변수들에 대해, Cox regression 모델을 이용한 다변량 분석에서는 일차 종양의 크기 및 액와 림프절 전이 상태만이 전체 생존율 및 무병 생존율에 영향을 주었다 (Table 5, 6).

## 고 안

종양 표지자는 기본적으로 환자의 예후를 측정하고, 임상에서 향후 치료 방침을 결정하기 위한 정보를 제공하는데 이용된다<sup>7)</sup>. 그러나 현재까지 어떤 경우에 종양 표지자가 치료나 예후를 정확히 나타내는 지표가 되는지 여부에 대한 지침조차 제대로 정립되어 있지 못하다<sup>8)</sup>. 유방암의 경우 지금까지 유방암의 예후를 설명하고자, 여러 종양 표지자에 대한 연구가 진행되었으나, 결과는 실망스러운 상태이다.

세포 증식은 정상 세포에서는 여러 양성 조절 물질과 음성 조절 물질들의 상호 작용에 의해 미세하게 조절된다. 악성 세포는 이와 같은 조절 기능이 상실되어 있기 때문에, 비조절적인 성장을 계속하게 된다. 최근 세포 주기에 관여하는 많은 물질이 밝혀졌다. 세포 주기로 이행을 촉진시키는 물질에는 Cdk (cell-cycle dependent kinase) 와 cyclin 등이 있고, 세포 주기로 진행을 억제하는 물질은 CKI (Cdk inhibitor)가 있다<sup>4,9)</sup>. CKI는 CIP/KIP 군과 INK4 군으로 분류되는데 CIP/KIP 군에는 p21과 p27이 속하고, INK4에는 p15와 p16 등이 속한다<sup>10-12)</sup>.

p27과 cyclin E는 G1에서 S기로 전환하는데 영향을 미치는 물질이다. cyclin E는 후기 G1기에 작용하는 cyclin의 아형으로, 단백질 kinase인 Cdk2와 함께 작용하여 세포 주기 S기로의 전환에 영향을 준다. p27은 cyclin E와 cyclindependent kinase (Cdk)와 결합하여 세포 주기로의 진행을 억제하거나 조절한다. 즉 p27은 S기로의 진행에 필요한 cyclin E/Cdk 결합물에 반응하여, G1에서 S기로의 진행을 조절하는 역할을 한다<sup>10-12)</sup>.

p27은 종양 억제 유전자의 역할을 하기 때문에, 휴식기의 세포에서는 다량 관찰되나, 세포 분열 신호에 의해 분열하는 세포에서는 감소된다고 한다<sup>13)</sup>. p27이 결핍된 생쥐는 뇌하수체 종양이나 증가된 체형을 지니게 된다<sup>14,15)</sup>.

현재까지 보고에 따르면, 세포 내, 실제 p27 단백질량과 mRNA량과는 서로 일치하지 않는다. 그 이유는 p27 단백질 발현 양상은 전사 후(posttranscriptional) 세포질 내에 단백질 이화 작용(proteolysis)에 의해 큰

영향을 받기 때문이다<sup>16)</sup>. Loda 등에 의하면, p27 발현이 낮은 경우 p27 단백에 대해, 특이적인 세포내 이화 작용이 촉진되었기 때문이라고 하였다<sup>17)</sup>.

Fredersdorf 등은 유방암, 대장암 등에서 p27이 발현되지 않을수록, 암종의 분화가 불량하기 때문에, p27 발현이 유용한 예후 인자라고 하였다<sup>18)</sup>. Catzavalo 등에 의하면, 유방암에서 면역조직 화학 염색에 의해 p27의 발현을 조사한 결과 핵 내 p27의 발현이 낮을수록 분화가 불량하고, 무병생존율이 저조하다고 하였다<sup>19)</sup>. 또한 p27의 발현이 저하될수록 세포간의 접착력(intercellular adhesion)이나 세포의 간질 특성(extracellular matrix properties)이 변화하여, p27의 발현이 떨어지면, 주변 림프절이나 원격 부위에 전이할 가능성이 높다<sup>20,21)</sup>. 본 연구에서도 일차 종양의 크기는 양군에서 유의한 차이가 없었으나, p27 음성군은 발현군에 비해 평균 전이 액와 림프절수가 통계적으로 유의하게 증가되어 있었다( $p=0.021$ ). p27 음성군의 경우 p27 발현군에 비해 높은 빈도의 불량한 핵분화 등급을 보였으나, 통계적인 의미는 없었다(48.4% vs 28.6%,  $p=0.281$ ).

Porter 등은 젊은 연령 유방암 환자에서 p27의 발현되지 않을수록, 불량한 전체 생존율을 보였다고 한다<sup>5)</sup>. 또한 cyclin E의 발현과 p27의 발현에 따라 4개의 아군으로 분류하였을 경우 예후 인자로서의 가치가 증가된다고 하였다. 단변량 분석에서 p27의 발현이 높고 cyclin E의 발현이 낮은 군에서는 70%의 10년 생존율을 보였으나, p27 발현이 낮고, cyclin E의 발현이 높은 경우에는 20%의 10년 생존율을 보였다고 한다. Tan 등에 의하면, 1 cm 미만의 유방암 환자를 대상으로 p27 발현의 예후적인 의미를 분석한 결과, p27 발현 음성군은 예후가 불량하였고, 또한 액와 림프절에 전이하지 않은 환자군에서도 p27 음성군은 예후가 불량하다고 하였다<sup>6)</sup>.

본 연구에서도 p27 음성군은 양성군에 비해 낮은 전체 생존율을 보였다. 그 이유는 일차 종양의 크기는 차이가 없었지만, p27 음성군은 양성군에 비해 통계적으로 의미있게 높은 림프절 전이 개수를 지니고 있었기 때문이라고 추정할 수 있다. 그러나 양 군 사이에 통계적으로 의미있는 무병 생존율의 차이는 보이지 않았다.

Cyclin E 양성군은 음성군에 비해 전체 생존율이나 무병생존율이 저조하였으나, 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 본 연구에서 모든 예후 인자들을 포함하여 다변량 분석을 시행하였을 때, 누적 생존율과 전체 생존율에 영향을 주는 인자는 일차 종양의 크기와 액와부 림프절의 전이 여부 등이 의미있는 예후 인자이었다. 본 연구가 상대적으로 적은 수의 환자를 대상으로 하였기 때문에, 이와 같은 결과가 나왔다고 생각된다. 본 연구에서 그 외 기존의 종양 표지자인 c-erbB2, p53, cathepsin D 등의 발현은 무병 생존율이나 전체 생존율에 영향을 주지 못했다.

요약해 보면 p27 음성군은 양성군에 비해 일차 종양의 크기는 서로 유의한 차이가 없지만, 액와 림프절 전이 개수가 통계적으로 유의하게 높았다. 또한 p27 음성군은 불량한 전체 생존율을 나타내는 점을 고려하면, p27의 발현 여부는 유방암에서 유용한 예후 인자로 작용하고 있었다. 다수의 조직에 대해 표준화되고 정량화된 방식으로 p27 발현에 대한 예후적인 의미를 찾는 것은 유용한 작업이 될 것이다.

## 결 론

유방암 환자에서 면역 조직 화학 방식으로 p27 발현과 cyclin E 발현이 예후 인자로서의 의미를 연구한 결과, 아래와 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1) 면역 조직 화학 염색을 시행한 결과 45명의 환자 중, p27 발현율은 31.1% (14/45)이었고, cyclin E의 발현율은 8.8% (4/45)이었다. 또한 c-erbB2 단백질의 발현율은 31.1% (14/45), cathepsin D는 33.3% (15/45), 및 p53 단백질 과발현은 55.5% (25/45)에서 보였다.

2) p27 양성군과 음성군은 일차 종양의 크기는 통계적으로 유의한 차이는 없었지만, p27 음성군은 양성군에 비해 통계적으로 유의하게 증가된 전이 액와 림프절을 가지고 있었다( $5.87 \pm 1.87$  vs  $1.14 \pm 0.54$ ,  $p=0.021$ ).

3) p27 음성군에서 불량한 핵분화 등급을 지니고 있었으나, 통계적으로 유의한 차이는 없었다(48.4% vs 28.6%,  $p=0.28$ ). 그 외 에스트로겐 수용체, c-erbB2 단백질, cathepsin D, p53 단백질 과발현의 빈도는



양군에서 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

4) 중간 관찰 기간 61개월간, 환자의 전체 생존율에 영향을 주는 인자는 단변량 분석 결과 일차 종양의 크기, 액와 림프절 상태 및 p27 발현 빈도 등이었다. p27 양성군은 5년 생존율이  $92.31 \pm 7.39\%$ 이며, p27 음성군은 5년 생존율이  $73.33 \pm 8.07\%$ 로, p27 양성군에서 통계적으로 의미있게 양호한 생존율을 보였다( $p=0.0441$ ). Cyclin E 음성군은 cyclin E 양성군에 비해 양호한 생존율을 보였으나, 통계적인 의미는 없었다( $82.58 \pm 6.47\%$  vs  $55.56 \pm 17.33$ ,  $p=0.2843$ ).

5) 무병 생존율에 유의한 예후 인자는 일차 종양의 크기와 액와 림프절 전이 상태이었다. p27 음성군은 p27 양성군에 비해 5년 무병 생존율은 불량하였으나 통계적인 의미는 없었다( $72.26 \pm 8.39\%$  vs  $78.57 \pm 10.97\%$ ,  $p=0.2735$ ). 반면 cyclin E 양성군도 cyclin E 음성에 비해 생존율이 저조하였으나, 역시 통계적인 의미는 없었다( $53.33 \pm 17.33\%$  vs  $79.53 \pm 6.90\%$ ,  $p=0.2473$ ).

6) 본 연구에 적용된 모든 변수들에 대해, Cox regression 모델을 이용한 다변량 분석에서는 일차 종양의 크기와 전이 액와 림프절 전이 상태만이 전체 생존율과 무병 생존율에 영향을 주었다.

이상의 결과로, 본 연구가 비록 대상 숫자는 적지만, p27 발현 여부는 유방암에서 유용한 예후 인자가 될 수 있으며, 다수의 조사 대상으로 표준화된 방식을 사용하면, 유방암 수술 후 환자의 예후를 예측하거나, 보조 화학 요법의 지표로 유용하게 이용될 것이다.

## 참 고 문 헌

- 1) Lees E: Cyclin dependent kinase regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6:877, 1994
- 2) Kawamata N, Morosetti R, Miller C, Park D, et al: Molecular analysis of the cyclin dependent kinase inhibitor gene p27/kip1 in human malignancies. *Cancer Res.*, 55:2266, 1995
- 3) Spirin KS, Simpson JE, Takeuchi S, Kawamata N, et al: p27/Kip1 mutation found in breast cancer. *Cancer Res.*, 56: 2400-2404, 1996
- 4) Draetta G: Cdc2 activation: the interplay of cyclin binding and Thr 161 phosphorylation. *Trends Cell Biol.*, 3:287, 1993
- 5) Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, et al: Expression of cell-cycle regulators p27 Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nature Medicine* 3(2):222-225, 1997
- 6) Tan P, Cady B, Wanner M, Worland P, et al: The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* 57:1259, 1997
- 7) Hayes DF: Tumor markers for breast cancer. *Ann Oncol* 4:807, 1993
- 8) Simon R: Design and conduct of clinical trials. In: Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer: Principle and practice of oncology*. 4th eds. Philadelphia: Lippincott, 418, 1993
- 9) Phines J: The cell cycle kinases. *Semin. Cancer Biol.* 5:305, 1994
- 10) Elledge SJ, Winston J, Harper JW: A question of balance: the role of cyclin kinase inhibitors in development and tumorigenesis. *Trend Cell Biol.*, 6:366, 1996
- 11) Peter M, Herskowitz I: Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell*, 79:181, 1994
- 12) Sherr CJ, Roberts JM: Inhibitors of mammalian G1 cyclin dependent kinases. *Genes Dev.*, 9:1149-1163, 1995
- 13) Poyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, et al: Cloning of p27kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *cell*, 78:59, 1994
- 14) Kiyokawa H, Kineman R, Manova-Todorova K, Soares V, et al: Enhanced growth of mice lacking the cyclin dependent kinase inhibitor function of p27kip1. *Cell* 85:721, 1996.
- 15) Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, et al: Mice lacking p27Kip1 display increased body size, multiple organ hyperplasia, retina dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 85:707, 1996

- 16) Patricia SS, Jeffrey SA. Cancer prognostics: Past, present and p27. *Nature Med.* 3(2):152, 1997
  - 17) Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, et al: Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinoma. *Nature Med.* 3: 231, 1997
  - 18) Fredersdorf S, Burns J, Milne AM, Packham G, et al: High level expression of p27 (kip1) and cyclin D1 in some human breast cancer cells: inverse correlation between the expression of p27 (Kip1) and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(12):6380, 1997
  - 19) Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung Yee, Wilson JA, et al: Decreased level of the cell-cycle inhibitor p27 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nature Med.* 3(2):227, 1997
  - 20) St. Croix B, Florenes VA, Rak JW, Flanagan M, et al: Impact of the cyclin dependent kinase inhibitor p27 kip1 on adhesion-dependent resistance of tumor cells to anticancer agents. *Nature Med.* 2:1204, 1996
  - 21) Zhu X, Zhu X, Ohtsubo M, Bülmer RM, et al: Adhesion dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J. Cell Biol.* 133:391, 1996
-