

유방암에서 병기에 따른 다제약제내성, 혈관신생도, 종양 증식력의 발현도에 대한 연구

전남대학교병원 외과학교실

오용구 · 장재홍 · 윤정한 · 제갈영종

= Abstract =

The Relationship between Tumor Stage and the Expression of Multiple Drug Resistance, Neovascularization and Tumor Proliferative Activity in Breast Cancer

Oh Yong Gu, M.D., Chang Jae Hong, M.D., Yoon Jung Han, M.D.
and Jaegal Young Jong, M.D.

Department of Surgery, Medical School, Chonnam National University, Chonna, Seoul

Background: Breast cancer is supposed that its biological behavior should be changed in some relationship with the advancement of tumor. P-glycoprotein is the well-known nuclear protein which shows multiple drug resistance, and its expression means the resistance to various chemotherapeutic agents including anthracyclines. Angiogenesis was also suggested to have an important role in tumor progression and metastasis, which has been considered to be one of valuable independent prognostic factors. Tumor proliferative activity also has been thought to be very useful as a factor representing the biological behavior of tumor, but its role isn't fully understood yet. In this study we aimed to observe how these factors are expressed with any relationship according to the tumor stage and to find the feature of its expression in each stage and its clinicopathologic significances. **Materials and Method:** 62 cases of patients histologically proven into invasive ductal carcinoma, who were diagnosed and treated at the Department of Surgery, Chonnam National University Hospital, were selected. In order to estimate the staining results accurately, we classified the expression grades of Pgp into 5 classes according to the count of immunostained cells after immunohistochemical staining. Angiogenesis was determined by the mean count of microvessels measured by image analyzer moving more than 40 fields with 200 folds magnification after immunohistochemical staining for CD34. Tumor proliferative activity were presented in percentage by counting the positively immunostained cells in more than 500 tumor cells after immunohistochemical staining with Ki67. Statistical evaluation was done by Mann-Whitney test and we determined that the result showing p-value less than 0.05 is statistically significant. **Results:** The mean age was 49 years(from 33years to 82years) and the stage distribution was stage I : 4 patients, stage IIa : 25, stage IIb : 18, stage IIIa : 7, stage IIIb : 3, and stageIV : 5 patients. In spite of Pgp expression tended to increase as the stage

advanced, it did not show any statistically significant difference($p=0.165$). Although Ki67 score representing tumor proliferation activity was observed from 0% to 30.8%, any significant differences according to advancement of stage were not found($p=0.850$). Tumor angiogenesis also did not show any statistical difference according to advancement of stage($p=0.189$). **Conclusions:** We could not find any significant proportional correlation between the tumor stage and Pgp expression, tumor proliferative activity, and angiogenesis. Therefore, the clinicopathologic significances of these factors are supposed to determine an individual biological feature of the tumor irrespective of stages. (Journal of Korean Breast Cancer Society 2000;1:000~000)

Key Words: Breast cancer, Stage, Drug resistance, Proliferative activity, Angiogenesis

서 론

유방암은 현재 우리 나라 여성 종양 중 자궁암과 위암 다음으로 세 번째로 많은 발생빈도를 보이는 악성종양으로 환자수의 급증에 따른 국가적인 관심과 함께 서구 여성유방암과는 다르게 표현되는 한국 여성유방암의 생물학적 특성에 대한 연구의 필요성도 날로 증가되고 있다. 일반적으로 유방암에서도 그 병기가 진행됨에 따라 그 생물학적 태도가 변화되어질 것으로 판단되어진다¹⁾.

최근들어 유방암의 치료에서 중요한 영향을 줄 것으로 기대되는 유방암의 생물학적 특징과 관련된 인자중 P-glycoprotein(Pgp)는 다제약제내성을 나타내는 대표적인 핵단백으로서 이의 발현은 anthracycline제를 포함한 다양한 화학요법제에 대한 내성을 나타낸다. 혈관신생도 역시 종양의 진행과 전이에서 중요한 역할을 담당하는 종양 인자로서 유방암에서는 독립된 예후인자로서의 가치까지 인정받을 수 있는 중요한 인자로 생각되었으나 아직도 그 확실한 역할에 대하여는 의견이 제시되고 있다. 종양 증식력도 종양의 생물학적 태도를 나타내는 분명한 인자로 임상적으로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대되었으나 아직도 그 역할에 대해서는 확실한 정립이 이루어지지 못하고 있다. 종양증식력을 평가하는 인자로서 Ki 67은 세포 주기에 있는 세포 중 G0, 초기 G1을 제외한 후기 G1, S, M 그리고 G2에 있는 세포에서만 염색되는 핵항원으로서 증식 세포정도를 알 수 있는 척도가 된다.

이상에서 열거한 Pgp, 종양내 혈관신생도, 종양증식력 등은 유방암에서 그 병기가 진행되는 과정중 유방암의 생물학적 특징을 규정할수 있는 가능한 인자로 간주될수 있다.

이에 저자들은 이러한 인자들이 병기와 어떠한 관련성을 가지고 발현되는지를 관찰하여 각 병기별 발현현상의 특징과 함께 각 병기에서 이들 인자들의 임상병리학적 의미를 확인하고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

전남대학교병원 외과에서 침윤성 유관암으로 진단 받고 치료받은 환자들중 원발종양의 파라핀 포매피의 보존이 양호한 62례를 대상으로 하였다.

1. 면역조직화학적 염색

10% 중성포르말린에 고정후 제작된 파라핀 포매피로부터 3 μ m 두께의 연속절편을 만들고 이를 Probe-On 슬라이드에 부착 건조시켜 이용하고 전염색과정은 Microprobe system (Fisher, USA)를 이용하여 시행하였다. Slide holder에 파라핀 절편이 부착된 20장의 슬라이드를 채운 후 탈파라핀과 합수과정을 거쳐 일차항체인 Pgp 와 Ki 67, CD 34의 단클론 항체(Zymed, SanFrancisco, USA)를 primary anti-body diluent(Research Genetics, Huntsville, USA)로 이용하여 1:50으로 희석하여 12분간 부치시키고 완충액으로 세척하였다. 일차항체의 검출을 위한 이차항체는 biotin이 부착된 anti-mouse IgG

(Sigma, St. Louis, USA)를 이용하여 8분간 부치시킨 후 완충액으로 세척하였다. 양성 반응을 구분하기 위해 검출제와 발색제를 사용하였다. Streptavidin-horseradish peroxidase(Research Genetics, Huntsville, USA)와 3-amino-9-thyl-carbazole (AEC: Zymed, San Francisco, USA)를 이용하여 적갈색의 양성반응을 관찰하였고 검출제와 발색제의 부치 시간은 각각 8분으로 하였고 비특이적인 반응을 억제하기 위하여 발색제를 사용하기 전에 완충액으로 세척하였다. 발색과정이 끝난 후 헤마톡실린으로 대조염색을 시행하고 수성 봉입제인 Universal Mount (Research Genetics, Huntsville, USA)로 봉입하여 양성 반응을 관찰하였다. 음성대조군은 일차항체 대신 primary antibody diluent(Research Genetics, Huntsville, USA)만을 이용하였다.

2. 판정 방법

Pgp 발현양성은 염색의 강도에 관계없이 핵내와 세포질에 염색이 이루어진 것으로 하였고 양성발현 세포의 빈도에 따라 5등급으로 분류하였는데 등급 0은 양성발현세포가 전혀 관찰되지 않은 경우, 등급 I은 관찰 유관세포중 1-9%가 양성발현을 보인 경우, 등급 II는 10-29%에서 양성발현을 보인 경우, 등급 III는 30-49%에서 양성발현을 보인 경우, 등급 IV는 50% 이상의 세포가 양성발현을 보인 경우 등으로 규정하였다. 종양 내 혈관 신생도는 CD 34에 대한 면역 조직 화학적 염색 후 화상 분석 장치를 이용하여 200배율을 일정비율로 하여 40필드 이상 이동하면서 측정된 미세 혈관 수의 평균치로 결정하였다. 종양 증식력을 판정하기 위하여 시행한 Ki67의 면역조직화학적 염색 역시 양성판정은 염색 강도에 관계없이 핵내 염색이 이루어진 경우를 양성세포로 판정하고 500개 이상의 종양세포 중 양성 발현세포를 측정하여 백분율로 표시하였다.

3. 통계적인 검증

Mann-Whitney test를 이용하여 p value < 0.05 를 유의 있다고 판정하였다.

결 과

대상 환자의 평균 나이는 49(33-82)세였으며 대상 환자를 병기별 분류한 결과 병기 I은 4명, 병기 IIa는 25명, 병기 IIb는 18명, 병기 IIIa는 7명, 병기 IIIb는 3명, 그리고 병기 IV는 5명이었으며 병기 II기에 해당하는 환자가 전체의 69.4%를 차지하였다. 대상군에서 관찰된 Pgp 발현도는 0등급: 10례, I등급: 16례, II등급: 6례, III등급: 6례, IV등급: 24례의 분포를 보여 3등급이상의 고발현군이 전체의 48.4%를 차지하였다. 병기별로 비교한 결과 TNM 병기 IV기 5례중 4례가 Pgp발현등급 III과 IV를 보이고 병기별 Pgp발현은 진행된 병기일수록 발현도가 증가하는 경향을 보이기는 하였으나 통계적인 의미는 없었다 ($p=0.165$)(Table 1).

Ki67발현은 대상군에서 최소 0부터 최고 30.8까지 관찰되었으나 병기별 발현은 각 병기별로 공히 비슷한 수치를 보였고 병기 진행과 관련된 연관성은 확인할 수 없었다($p=0.850$)(Table 2).

종양 내 혈관 신생도와 병기와의 관계를 비교한 결과에서도 양자간에 통계적으로 의미 있는 연관관계를 보이지 않았으나 병기 I에서의 신생혈관의 평균치는 $75.3/\text{mm}^3$ 를 보이고 원격전이를 가진례에서의 원발종양에서는 신생혈관의 평균치가 $48.2/\text{mm}^3$

Table 1. Relationship Between Pgp Expression & TNM Stage

Expression grade Stage	0	I	II	III	IV	Total
I	2	1			1	4
IIa	4	8	1	3	9	25
IIb	2	3	5		8	18
IIIa	1	3		1	2	7
IIIb		1			2	3
IV	1			2	2	5
Total	10	16	6	6	24	62

* $p = 0.165$

expression grade 0: negative, I: 1-9%,

II: 10-29%, III: 30-49%, IV: 50% 이상

Table 2. Median Value of Ki 67 according to TNM Stage

Stage	Median value of Ki 67(%)
I	9.4±14.9
IIa	8.5±22.3
IIb	6.2±7.7
IIIa	9.0±9.0
IIIb	12.2±12.2
IV	6.7±16.5

* p=0.850.

Table 3. Median Value of Number of new Vessels according to TNM Stage

Stage	Median value of new vessels (New vessels/mm ³)
I	75.3±24.3
IIa	48.2±41.3
IIb	61.5±31.2
IIIa	58.0±61.4
IIIb	68.9±38.4
IV	48.2±22.6

* p=0.819.

를 보이는 등 오히려 암 진행초기의 원발종양에서의 신생혈관도가 다른 병기에 비해 비교적 높은 경향을 보이고 있었다(p=0.819)(Table 3).

고 찰

유방암에서 종양의 생물학적 특성을 규정하고 이들 생물학적 특성들의 병기별 변화를 관찰하여 각 병기에서의 치료원칙을 정하거나 예후를 추정할 수 있음은 유방암 환자에서 보다 효과적이고 일관된 치료계획을 확립하는데 매우 중요한 부분을 차지할 것으로 사료된다.

유방암의 예후는 병기에 따라 많은 차이를 보이며, 특히 액와림프절 전이는 가장 중요한 예후인자로 사용되어왔고 암 종괴의 크기는 액와림프절이 음성일 때 특히 중요한 것으로 알려져 있다. 그러나 액와림프절 전이가 없어서 재발의 저 위험 군으로

분류된 경우라 하더라도 10년 내 전신 재발이 30%에 이른다^{2,3)}. 최근 들어 액와림프절 전이가 없는 환자를 대상으로 고위험군을 찾기 위해 종양의 진행 및 난폭성과 관계된 생물학적 특성들에 대한 연구가 계속 진행되고 있다⁴⁾.

일반적으로 종양의 진행과 난폭한 생물학적 특성에 관련된 종양인자들의 발현은 종양의 크기 및 병기의 진행에 따라 증가될 것으로 기대된다. 따라서 본 연구에서는 병기에 따라 Pgp 발현도, 종양증식력, 혈관 신생도 등과 같은 종양인자들의 발현도를 관찰하여 이들이 병기가 진행됨에 따라 어떠한 일관된 관련성을 가지며 병기별 종양의 생물학적 특성을 결정하는지에 대하여 확인하고자 하였다.

P-glycoprotein(Pgp)은 인산화 기능에 의하여 세포내로 부터 약물을 유출하여 다약제내성기전에 관여한다고 알려져 있으며 산재된 병변을 가지고 있는 유방암 환자의 유방암 세포들에게 보조화약요법에 대한 내성을 전달하는데 중요한 역할을 담당하고 있다. Linn 등⁵⁾은 Pgp발현이 원발유방암조직에서보다 전이 병변에서의 발현이 더 빈번하게 관찰되었다고 하였고 또한 Pgp발현은 종양세포에서만 발현되는 것이 아니며 이형성을 보이는 기질내의 섬유아세포에서도 발현되고 있으며 이들 모두가 보다 심한 악성화 표현형의 표식자로 의의있음을 보고하였다. Yang 등⁶⁾과 Lehnert⁷⁾역시 원발유방암 세포자체에서는 Pgp가 의미 있는 정도까지 발현되지 않으며 따라서 Pgp가 다약제 내성에 의미있는 역할을 가지지 못할 것이라는 주장을 하기도 하였다. 그러나 Brotherick 등⁸⁾은 Pgp치가 종양의 조직학적 등급이나 액와림프절 전이와의 관계에서는 연관성을 보이지는 않지만 c-erbB2 및 c-myc 등의 종양인자들과의 연관성과 함께 고려하는 경우 예후판정 인자로서 의의가 있다고 주장하였다. 본연구에서도 Pgp의 발현도는 병기가 진행됨에 따라 특히 원격전이를 보인 예에서 그 발현도가 증가하는 경향을 보이는 하였으나 림프절 전이 여부 등을 포함하여 병기진행에 따른 발현도의 상관성에 있어서 의미 있는 연관성은 보이지 않았다.

Ki 67은 핵항원으로서 세포증식 정도를 아는 척도로 유방암에서 이견은 있으나 독립적인 예후 인

자로서 인정받으며 종양의 생물학적 특성을 규정하는 중요한 종양인자이다^{9,10,11}).

Ki 67의 발현치는 종양의 크기가 커지면서 함께 높아진다고 보고되고 있으나¹²), 본 연구에서는 병기에 따른 Ki 67 발현도가 통계적으로 유의있는 상관관계를 보이지는 않았다. 이는 Ki 67 검사수가 적을 뿐 아니라 Ki 67은 G0과 초기 G1을 제외한 광범위한 증식 세포를 반영하므로 종양의 크기 뿐만 아니라 림프절 전이여부까지 포함된 병기를 기준으로 하였기 때문일 것으로 판단된다. 그러나 흥미있는 소견으로 Ki67의 발현도와 Pgp발현도와의 의미있는 연관성을 가지고 있음을 확인할 수 있었는데 이는 Seymour 등¹³)에 의해서도 보고되었듯이 Pgp발현이 세포주기 의존성이며 신속한 주기변화를 하고 있는 세포들에서 고발현을 보인다는 주장과 일치하는 것으로 판단되었다.

혈관 신생은 새로운 혈관들이 형성되는 과정으로 가장 극적인 혈관 신생 의존을 보이는 대표적 질환이 암 종으로 알려져 있다¹⁴). 종양에서의 새로운 혈관들의 생성은 종양 자체의 확장을 위해서도 필요하며 종양 세포들의 전이를 위한 혈관계로의 필수적인 접근 경로로도 중요하다. 최근 들어 종양내 혈관신생도가 액와림프절 전이가 있는 환자의 예후에 관한 한 유력한 독립인자로서 의의가 있음을 인정받게 되었다⁴). 그러나 많은 연구자들이 종양내 혈관신생도와 임상적으로 존재하는 전이와의 관계에서 상호 관련성이 있다고 주장하는 반면¹⁵) 어떤 보고자들¹⁶)은 이러한 연관성을 부정하는 등 전이 및 종양 진행에 대한 혈관 신생도의 기여에 대하여는 아직도 확실한 정립이 이루어지지 못한 부분이 있다.

종양의 신생혈관 형성정도는 여러 가지 혈관 특이 항체를 이용하여 미세혈관의 수를 세어 보는 정량적인 분석을 주로 이용하는데 주로 이용되는 방법은 Factor VIII R Ag, CD31, CD34 등에 대한 단클론성 항체를 이용한 면역조직화학적 염색법이다. Martin 등의 보고에 의하면 CD31, CD34의 경우가 Factor VIII R Ag의 경우보다 더 많은 혈관을 확인할 수 있으며 CD31을 이용한 경우 CD34나 Factor VIII R Ag보다 염색신뢰성이 떨어졌다고 하였다. 따라서 CD34를 이용한 경우에 가장 의미 있는 결과

가 나왔고 highest microvessel density가 환자사망과 가장 연관성을 보였다고 하였다¹⁷). Siitonen 역시 CD34와 factor VIII을 이용한 경우 CD31에 비해 염색시행방법이 더 양호하여 선호한다고 하였다¹⁸). 이러한 이유로 본 연구에서도 CD34를 이용하였으며 미세혈관의 수와 병기와의 상호연관성을 분석하였다.

Aranda 등¹⁹)은 TNM system을 적용하여 분류한 경우에도 종양의 크기가 커질수록 혈관 개수의 증가경향을 보이기는 했지만 역시 통계적인 의의는 없었다고 하였다. 본 연구에서는 오히려 병기 I에서 다른 병기보다 비교적 높은 혈관 신생도를 보이는 경향이 있었으나 역시 통계적인 의의는 없었다. 이는 표본의 선택이 종양의 어느 부분 즉 중심부 또는 주변부중 어디에서 이루어졌는지에 따라 나타날 수 있는 차이일 것으로 사료된다.

이상으로 본 연구에서의 Pgp 발현, 종양 증식력 및 혈관신생도와 병기 사이에는 의의 있는 일관된 연관성은 확인할 수 없었다. 따라서 이들 인자의 임상병리학적 의의는 병기에 관계없이 각각 종양의 개별적인 생물학적 특징을 규정하는 것으로 판단되어진다.

결 론

병기별 Pap발현은 진행된 병기일수록 발현도가 증가하는 경향을 보이기는 하였으나 통계적인 의의는 없었다($p=0.165$). Ki67발현치로 표현되는 종양증식력은 대상군에서 최소 0부터 최고 30.8까지 관찰되었으나 병기별 발현은 공히 비슷하였고 병기 진행과 관련된 연관성은 확인할 수 없었다($p=0.850$). 종양내 혈관신생도는 병기 I에서 오히려 높은 경향(평균치: $75.3/\text{mm}^3$)을 보였으나 역시 병기별 통계적 연관성은 없었다($p=0.189$).

Pgp 발현, 종양 증식력 및 혈관신생도와 병기 사이에는 의의 있는 일관된 연관성은 확인할 수 없었다. 따라서 이들 인자의 임상병리학적 의의는 동일 병기내에서 각각 종양의 개별적인 생물학적 특징을 규정할 것으로 판단되어진다.

참 고 문 헌

- 1) National statistical office, Republic. of Korea: Annual report on the cause of death statistics (Based on vital registration). 18:20-258, 1997
- 2) McGuire W, Abeloff MD, Fisher B, Glick JH et al: Adjuvant therapy in node negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 13:97-115, 1989
- 3) Fisher B, Slack N, Katcher D, Wolmark N: Ten year follow-up results of patients with carcinoma of the breast in a cooperative clinical trial evaluating surgical adjuvant chemotherapy. *Surg Gynecol Obstet* 140:528-534, 1975
- 4) Gasparini G: Biological and clinical role of angiogenesis in breast cancer. *Breast Cancer Res & Treat* 36:103-107, 1995
- 5) Linn SC, Giaccone G, van-Diest PJ, Blokhuis WM et al: Prognostic relevance of P-glycoprotein expression in breast cancer. *Ann Oncol* 6(7):679-685, 1995
- 6) Yang X, Uziely B, Groshen S, Lukas J et al: MDR1 gene expression in primary and advanced breast cancer. *Lab Invest* 79(3):271-280, 1999
- 7) Lehnert M, de Giulio R, Twentymann PR: Sensitive and rapid bioassay for analysis of P-glycoprotein inhibiting activity of chemosensitizers in patient serum. *Clin Cancer Res* 2:403-410, 1996
- 8) Botherick I, Shenton BK, Egan M, Cunliffe WE et al: Examination of multidrug resistance in cell lines and primary breast tumours by flow cytometry. *Eur J Cancer* 32A(13):2334-2341, 1996
- 9) Ioachim E, Kamina S, Athanassiadou S, Agnantis NJ: The prognostic significance of epidermal growth factor receptor (EGFR), C-erbB-2, Ki 67 and PCNA expression in breast cancer. *Anticancer Res* 16:3141-3147, 1996
- 10) Oehler MK, Rehn M, Kristen P, Sutterlin M et al: Correlation of the EGF-receptor with cell kinetic and classical prognostic factors in breast cancer. *Anticancer Res* 17:3137-3140, 1997
- 11) Gupta GR, Datta BN, Bose SM, Joshi K: Correlation of the growth fraction, nucleolar organizer region counts and epidermal growth factor receptor with histomorphological prognostic criteria in breast cancer. *Indian J Pathol Microbiol* 40:3-10, 1997
- 12) Mink D, von Tongelen B, Villena Heinsen C, Heiss C et al: Breast cancer and prognostic factors. tumour size, degree of differentiation, proliferation kinetics and expression of steroid hormone receptors. *Eur J Gynaecol Oncol* 15(6):424-436, 1994
- 13) Seymour L, Bezvoda WR, Dansey RD: P-glycoprotein immunostaining correlates with ER and with high Ki67 expression but fails to predict anthracycline resistance in patients with advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 36(1):61-69, 1995
- 14) Gasparini G, Harris AL: Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol* 13:765-782, 1995
- 15) Horak ER, Leek R, Llenk N, LeJeune S et al: Angiogenesis assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 340:1120-1124, 1992
- 16) Goudling H, Al Rashid NA, Robertson JF, Bell JA et al: Assessment of angiogenesis in human breast carcinoma. *J Pathol* 173(Suppl):161A, 1994
- 17) Martin L, Green B, Renshaw C, Lowe D et al: Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. *Br J Cancer* 76: 1046-1054, 1997
- 18) Siitonen SM, Haapasalo HK, Rantala IS, Helin HJ et al: Comparison of different immunohistochemical methods in the assessment of angiogenesis: lack of prognostic value in a group of 77 selected node-negative breast carcinomas. *Mod Pathol* 8:745-752, 1995
- 19) Aranda FI, Laforga JB: Microvessel quantitation in breast ductal invasive carcinoma. Correlation with proliferative activity, hormonal receptors and lymph node metastases. *Path Res Pract* 192:124-129, 1996