

침윤성 유방암종에서 예후인자로서의 GLUT1 단백질의 발현

경희대학교 의과대학 외과학교실, ¹해부병리과

안형준 · 이길연 · 이상목 · 고석환 · 홍성화 · 오수명 · 김윤화¹

Prognosis of GLUT1 Expression in Human Breast Carcinoma

Hyung Joon Ahn, M.D., Kil Yeon Lee, M.D., Sang Mok Lee, M.D., Suck Hwan Koh, M.D., Sung Wha Hong, M.D., Soo Myung Oh, M.D. and Youn Wha Kim, M.D.¹

Departments of Surgery, ¹Pathology, Kyung Hee University Hospital, Seoul, Korea

Purpose: An increase of glucose uptake and glycolytic metabolism has been reported in malignant cells as compared with normal cells and tissues. We hypothesized that human erythrocyte glucose transporter-1 (GLUT1) expression is increased in breast carcinoma and may be correlated with long term clinical outcome.

Methods: Two hundred ninety formalin fixed, paraffin embedded sections of infiltrating ductal carcinomas of the breast were immunostained with anti-GLUT1.

Results: Among the known clinicopathological prognostic factors, GLUT1 expression was correlated positively with histological grade ($p=0.000$) and tumor size ($p=0.003$). In a multivariate analysis, lymph node involvement and GLUT1 expression were statistically significant prognostic factors. The cumulative survival rates of GLUT1 expression and LN involvement were statistically significant ($p=0.0061$, $p=0.0009$) respectively. Our results suggest that 1) GLUT1 expression is correlated with histological grade and tumor size, and 2) GLUT1 expression correlates with a poorer prognosis in patients with infiltrating ductal carcinoma of the breast.

Conclusion: The results of our study suggest that immunohistochemical staining of GLUT1 expression is strongly associated with neoplastic progression in breast carcinoma, and that GLUT1 expression has value in estimating the prognosis

of patients with breast carcinoma. (Journal of Korean Breast Cancer Society 2001;4:167-171)

Key Words: Breast cancer, GLUT1 expression, Prognosis
중심 단어: 유방암, GLUT1 발현, 예후

서론

악성 종양세포에서 포도당 섭취율과 혐기성 해당작용은 정상세포나 조직에 비하여 증가되어 있는 것으로 알려져 있고, (1) 이러한 당섭취는 세포막에 존재하는 당수송체 (glucose transporter)에 의해 주로 이루어지고, 이러한 단백질은 혈액과 조직간의 당유통을 촉진시킨다. 현재까지 7종의 당수송체 유전자가 알려져 있으며, (2) 그 중 GLUT1은 적혈구, 혈뇌장벽(blood-brain barrier) 내피, 간조직, HepG2 간암세포주, 말초신경의 신경외초, 태반 및 태아조직에서 발견되며, (3) 고친화성 당수송체 단백질로 알려져 있다. GLUT2는 주로 간에 존재하며, GLUT3은 뇌조직에, GLUT4는 인슐린작용조직에 풍부하다. GLUT5는 주로 과당 수송을 담당하고, (4) GLUT6은 유전자는 알려져 있으나 단백질로 발현이 안되기 때문에 가성유전자(pseudogene)라고도 한다. GLUT7은 미소체의 당수송을 담당하고, GLUT8은 최근에 발견되었으며, 고환조직에서 발현된다. (5) GLUT1 mRNA는 혈뇌장벽, 간조직, 적혈구 그리고 태반 등 많은 조직에서 존재하며, (2) 또한 식도, 대장, (6) 위, (7) 폐, (8) 췌장 (9) 그리고 두경부종양 (10) 등에서 증가되어 있다. 그리고, GLUT1 당수송체 단백질의 과발현은 대장암, (11,12) 유방암, (13,14) 갑상선암, (15) 폐암, (16,17) 위암, (7) 두경부암, (18) 방광암, (19) 신장암, (20) 간암, (21) 자궁내막암, (22) 그리고 바렐 식도암 (23) 등에서 보고되고 있다. 이러한 GLUT1의 발현은 여러 장기에서 악성 종양의 발생의 잠재적인 표지자로서의 가능성을 시사하고 GLUT1의 발현의 정도는 악성 종양의 생물학적 특성과 연관성이 있을 것으로 보여진다. 그러나 현재까지 유방암에서의 GLUT1의 발현에 관한 연구는 별로 알려져 있지 않다. 이에 저자들은 본 연구에서 GLUT1의 발현과 유방암의 여러 가지 임상병리학적 예후인자들과의 연관성을 알아보고, 유방암 생

책임저자 : 고석환, 서울시 동대문구 회기동 1번지
☎ 130-702, 경희대학교 의과대학 외과학교실
Tel: 02-958-8265, Fax: 02-966-9366
E-mail: kohsh@khmc.or.kr

접수일 : 2001년 7월 9일, 게재승인일 : 2001년 9월 19일
본 논문의 주요내용은 2001년 춘계 외과학술대회에서 구연되었음.

존율에 있어서 예후인자로서의 의미를 알아보고자 하였다.

방 법

1) 연구대상

본 연구의 대상은 1983년 3월부터 1998년 12월까지 경희의료원 외과학교실에서 침윤성 유방암종으로 근치적 유방절제술 및 액와림프절제술을 시행한 290명의 환자를 대상으로 하였다. 본 환자군에서는 유방 상피내암이나, 보존적 유방절제술을 시행받은 경우는 제외되었다. 290명 중에서 31명을 제외한 259명에서 추적관찰이 가능하였으며 환자의 생존유무는 외래추적관찰과 통계청자료 분석을 이용하였다. 생존을 분석시에 259명 중 1997년, 1998년도에 수술받은 39명을 제외하고 220명이 사용되었다. 현재 259명 중 78명이 사망하였으며, 181명이 생존하고 있는 상태이다. 환자군의 평균연령은 47.6세(21~77세)이고, 평균 종양의 크기는 3.38 cm (0.5~15.0 cm)이다. 림프절 전이양상이 155예이며 음성이 135예였으며, 조직학적 등급은 1등급이 123예, 2등급이 139예 그리고 3등급이 28예였다. 한명의 병리의사가 H&E염색 슬라이드를 판독하였고, 조직학적 등급은 Bloom-Richardson체계의 Nottingham modification을 사용하였다.

2) 면역조직화학적 연구

면역염색은 DAKO사의 LSAB kit를 이용하여 streptavidin-biotin immunoperoxidase 법을 사용하였다. 파라핀 포매 조직을 5 μ m 두께로 절편한 후 poly-L-lysine으로 처리한 슬라이드에 부착하여 58°C 온도에서 1시간 방치한 후 xylene으로 탈파라핀을 하고 100%, 90%, 80%, 70% 알코올에 순서대로 재함수하였다. 조직 내에 함유되어 있는 내인성 peroxidase를 비활성화시키기 위해 10분간 0.3% H₂O₂로 처리하고, 30분간 차단혈청을 작용시켜 비특이성 단백질과의 반응을 방지하였다. 간단히 설명하면, 일차항체로 GLUT1 단클론항체(DAKO, Carpinteria, LA, USA)를 1:200으로 희석하여 슬라이드에 적용한 후 대기온도에서 2시간 동안 항온습조에서 방치하였다. Tris-buffered saline으로 세척한 후, biotinylated link antibody를 30분간 적용하고 그 후 streptavidin peroxidase를 30분간 반응시켰다. 각 과정마다 Tris-buffered saline으로 5분간 2회씩 세척하였다. 발색시약으로 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Research Genetics, Huntsville, USA)를 10분간 반응시키고 Mayer hematoxylin으로 대조 염색하여 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

양성대조군으로 조직 내의 정상적혈구를 이용하였다. 음성대조군은 GLUT1 항체 처리없이 말 혈청을 이용하여 염색하였다. GLUT1 면역염색은 항체에 양성물 보인 세포의 비율로 단계적으로 나누었다. 면역반응이 없는 경우를

0등급, 10% 미만인 경우를 1등급, 10~50%인 경우를 2등급, 50% 이상인 경우를 3등급으로 정의하였다.

3) 통계학적 검색

통계분석은 χ^2 test를 통해 유방암 환자에서 GLUT1 발현율과 나이, 종양의 크기, 조직학적 분화도 그리고 림프절 전이유무를 비교하였고 Cox의 propotional hazard model를 이용하여 유방암 환자의 예후와 관련된 인자들에 대하여 다변량 분석을 시행하였으며, Kaplan-Meier법으로 전체 생존율을 산출하였으며, 생존곡선의 비교는 log rank test를 사용하였고, p value가 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 의의가 있다고 판정하였다.

결 과

본 연구에서는 290명의 침윤성 유방암종 조직을 항 GLUT1 항체를 사용하여 면역화학염색을 시행하였다. 면역염색시 정상 유방조직이나 과증식된 유관에서는 GLUT1이 발현되지 않았으며, 290예의 유방암 조직에서 166예가 양성 발현을 보였으며(57.2%), GLUT1의 발현은 종양세포의 세포막에서 발현되었고(Fig. 1~4) 주로 악성 종양의 괴사부위나, 침윤된 부위의 중앙에서 발현되는 양상을 보였다. 양성 발현을 보인 166예 중, 각각 1등급은 101예(34.8%)에서, 2등급은 39예(13.4%)에서, 그리고 3등급은 26예(9.0%)였다. GLUT1의 발현과 다른 임상 병리학적 예후인자와의 연관성은 Table 1에 정리하였다. GLUT1의 발현은 종양의 크기와 조직학적 분화도에서 유의한 연관성을 보였다. 종양의 크기가 4.9 cm 이하에서는 GLUT1 양성발현이 243예 중 130예(53.5%)이며, 5 cm 이상에서는 47예 중 36예(76.6%)로 유의한 차이가 있었으며(p=0.003), 조

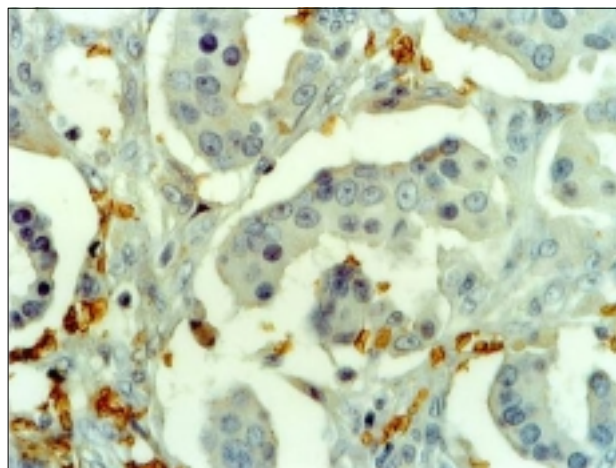


Fig. 1. Negative for GLUT1 staining in the tumor cells, positive staining in the internal control of red blood cell ($\times 400$).

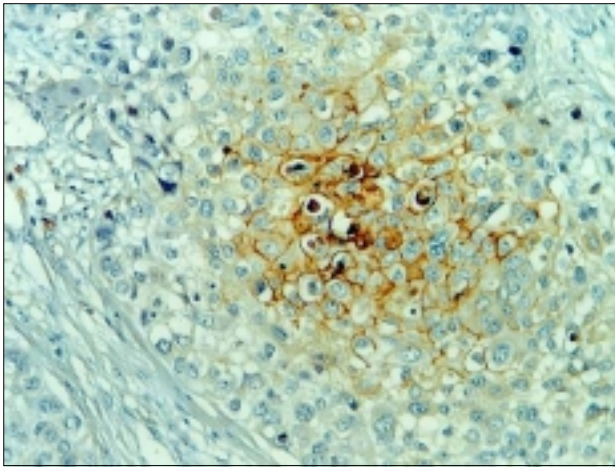


Fig. 2. Positive staining for GLUT1 in the membranous staining of the tumor cells (Grade 1) ($\times 200$).

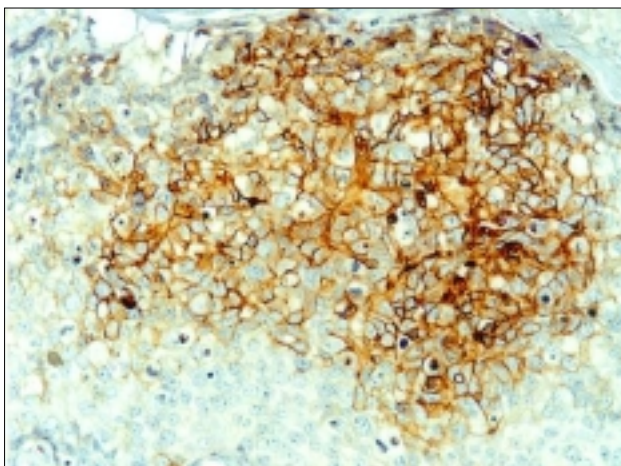


Fig. 3. Positive staining for GLUT1 in the membranous staining of the tumor cells (Grade 2) ($\times 200$).

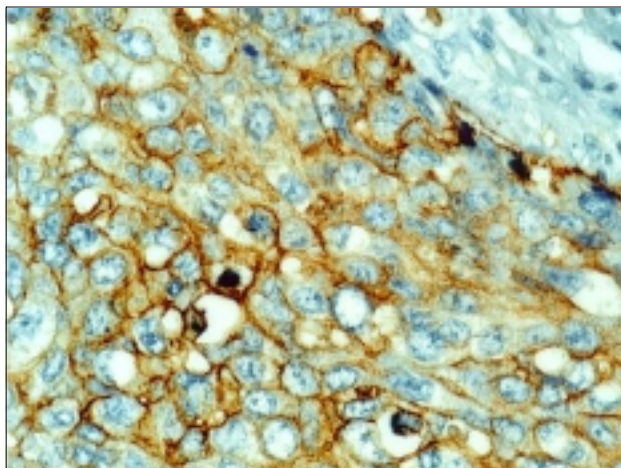


Fig. 4. Positive staining for GLUT1 in the membranous staining of the tumor cells (Grade 3) ($\times 400$).

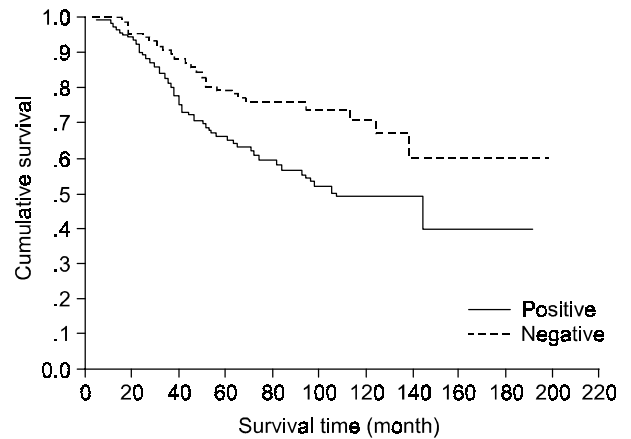


Fig. 5. Cumulative survival rate between positive and negative GLUT1 expression in breast cancer patients ($p=0.0061$).

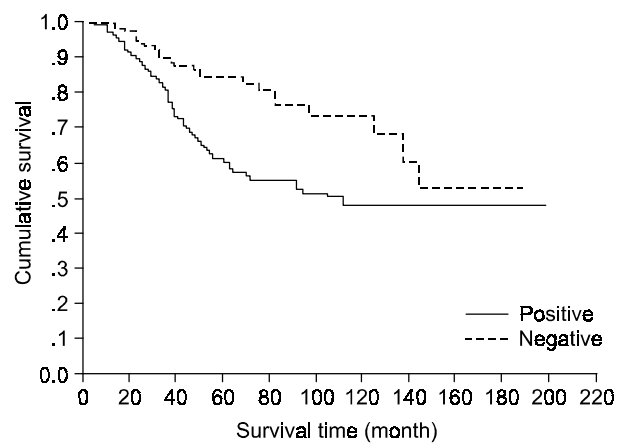


Fig. 6. Cumulative survival rate between positive and negative lymph node involvement in breast cancer patients ($p=0.0009$).

직학적 분화도에서는 1등급이 123예 중 56예(45.5%), 2등급이 139예 중 84예(60.4%), 그리고 3등급은 28예 중 26예(92.9%)로 분화도가 높을수록 GLUT1의 발현율도 의미있게 증가하였다($P=0.000$). 환자의 연령과 림프절의 전이유무에 따른 연관성은 보이지 않았다. Cox model을 이용한 다변량 분석시에 림프절의 전이와 GLUT1 발현시에 유방암환자에서 통계학적으로 의미있는 예후인자임을 확인할 수 있었다(Table 2). GLUT1 발현을 0, 1, 2, 3으로 나눈 경우 생존율에서 큰 차이가 없어서 통계학적 분석을 위해서 GLUT1을 양성발현군과 음성발현군으로 나누어서 사용하였다. Kaplan-meier법을 이용한 전체 생존을 분석시 GLUT1 양성발현군의 평균 생존기간은 115개월이며, 음성발현군은 149개월로 양성발현군에서 의미있게 낮았다($p=0.0061$) (Fig. 5). 림프절 전이 양성군과 음성군에서도 120개월, 144개월로 림프절 전이양성군에서 의미있는 결과를 보였다

Table 1. Expression of GLUT1 and clinicopathological features related to known prognostic factors

Clinicopathological finding (n=290)	GLUT1 expression		p value
	Positive staining (%) (n=166)	Negative staining (%) (n=124)	
Age(yr)			0.940
≤49 (170)	97 (57.1)	73 (42.9)	
≥50 (120)	69 (57.5)	51 (42.5)	
Lymph node involvement			0.309
Negative (135)	73 (54.1)	62 (45.9)	
Positive (155)	93 (60.0)	62 (40.0)	
Histologic grade			0.000
I (123)	56 (45.5)	67 (54.5)	
II (139)	84 (60.4)	55 (39.6)	
III (28)	26 (92.9)	2 (7.1)	
Tumor size			0.003
≤4.9 (243)	130 (53.5)	113 (46.5)	
≥5.0 (47)	36 (76.6)	11 (23.4)	

*p value = tested by χ^2 -test.**Table 2.** Association of various factors with overall survival, as determined by the Cox Proportional Hazards model

Prognostic factor	p value	Hazard ratio	95% CI*
Age (≤49 or ≥50)	0.6158	1.128	0.704~1.807
Lymph node involvement (Positive or Negative)	0.0008	0.423	0.256~0.700
Histologic grade (I or II, III)	0.0883	1.510	0.940~2.483
Size (≤4.9 or ≥5.0 cm)	0.3207	1.358	0.743~2.483
GLUT1 (Positive or Negative)	0.0435	0.595	0.359~0.985

*CI = confidence interval.

(p=0.0009)(Fig. 6).

고 찰

악성 종양세포에서 당섭취율과 당분해대사는 정상세포나 조직에 비하여 증가되어 있는 것으로 알려져 있다. 유방암에서 GLUT1 면역 염색을 시행한 보고가 있는데, Younes 등(13)의 보고에서 GLUT1 양성 발현은 118예 중 49예(48%)에서 양성 발현을 보였고, Brown 등(14)의 보고에서도 12예 모두에서 양성 발현을 보였으나, 이는 검색수가 적어 의의가 없다 하겠다. 본 연구에서는 290예 중

166예에서(57.2%) GLUT1 양성 발현이었고, Younes의 보고와 유사한 결과를 나타내었다. 본 연구에서 124예에서 GLUT1이 발현되지 않았고, 이러한 현상은 다음 2가지의 설명으로 가능하며, 첫 번째로는 당수송체 단백질이 폐암 환자에서 예후와 관련있는 GLUT3과 같은 다른 종류의 GLUT으로 발현될 가능성과, (16) 두 번째로 GLUT1이 면역화학염색으로 검출되기에 너무 낮은 역가를 가진 경우로 설명하고 있다. 또한 유방암을 포함한 다른 악성세포에서 GLUT1이 검출되는 기전에는 첫째로, 증가된 당분해대사와 동반하는 GLUT1 발현은 ras 또는 src 종양유전자의 세포 배양에서 GLUT1 발현이 관찰되듯이(24) 악성종양세포의 본질적인 특징이며, 또 다른 이유로 종양의 국소 저산소증으로 인한 종양 세포의 혐기성 당대사와 GLUT1이 발현을 설명하고 있다. 면역 염색시에 종양의 중심부로 갈수록 GLUT1의 발현이 증가되는 현상은 이러한 설명을 뒷받침하고 있다.(25) 본 연구에서 GLUT1의 발현율은 조직학적 분화도가 높을수록, 종양의 크기가 클수록 유의한 증가를 보였다. Younes 등의 보고에 의하면 조직학적 분화도와 Ki-67에서 의미있는 결과를 보고하였으며, 다만 종양의 크기에서는 유의한 관계가 없는 것으로 보고하였다. 최근에 대장, (12) 폐, (16) 방광(26) 등의 악성종양에서 GLUT1의 발현이 불량한 예후를 가진다는 보고들이 있으며, 본 연구에서도 다변량 분석을 통해 GLUT1의 발현이 유방암 환자의 사망과 유의한 연관성이 있음이 확인되었으며, 양성 발현군과 음성 발현군의 전체 생존율에서도 각각 115개월, 149개월로 통계적으로 유의한 결과를 보여 주었다. 본 연구 이전에 아직 유방암에서의 GLUT1의 발현과 예후와의 연관성에 대해서 보고된 바는 없으며, 몇몇 연구에서 GLUT1의 발현과 다른 장기의 악성종양의 예후와 관련이 있다고 보고하고 있다. Younes 등(11)은 53예의 대장암 환자에서 GLUT1의 발현이 83%이었으며, 발현율이 전체 종양의 50% 이상일 때 림프절 전이가 의미있게 높았다고 보고하며, Haber 등(12)은 다변량분석을 통해 112예의 대장암 환자에서 Dukes 병기분류와 독립적으로 GLUT1 고발현군(50% 이상 면역염색)이 저발현군(50% 이하)보다 사망률이 2.3배나 높다고 보고하였다.

결 론

본 연구에서 유방암 환자의 GLUT1 발현 양성은 조직학적 분화도, 종양의 크기에 따라 의미있는 상관관계를 보여 주었으며, 전체 생존율에 있어서도 양성 발현군이 음성 발현군보다 의미있는 결과를 나타내었다. 따라서 GLUT1의 발현은 유방암 환자에서 임상경과 판정시에 새로운 예후인자로서의 충분한 가치가 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) Isselbach KJ: Sugar and amino acid transport by cells in culture-differences between normal and malignant cells. *N Engl J Med* 286:929-33, 1972
- 2) Mueckler M: Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 219:713-25, 1994
- 3) Pardridge WM, Boado RJ, Farrell CR: Brain-type glucose transporter (GLUT1) is selectively localized to the blood-brain-barrier. *J Biol Chem* 265:18035-40, 1990
- 4) Leon ZSP, Golde DW, Concha II, Rivas CI, Lopez FD, Baselga J, et al: Expression of the fructose transporter GLUT5 in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci* 93:1847-52, 1996
- 5) Doege H, Schurmann A, Bahrenberg G, Braners A, Joost HG: GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J Biol Chem* 275:16275-80, 2000
- 6) Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H, Koh G, Yano H, Inagaki N: Overexpression of facilitative glucose transporters genes in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 56:622-9, 1990
- 7) Noguchi Y, Marat D, Yoshikawa T, Doi C, Fukuzawa K, Tsuburaya A, et al: Expression of facilitative glucose transporters in gastric tumors. *Hepatogastroenterology* 46:2683-9, 1999
- 8) Kurata T, Oguri T, Isobe T, Ishioka S, Yamakido M: Differential expression of facilitative glucose transporters (GLUT) genes in primary lung cancers and their liver metastasis. *Jpn J Cancer Res* 90:1238-43, 1999
- 9) Reske SN, Grillenberger KG, Glatting G, Port M, Hildebrandt M, Gansauge F, et al: Overexpression of glucose transporter 1 and increased FDG uptake in pancreatic carcinoma. *J Nucl Med* 38:1344-8, 1997
- 10) Mellanen P, Minn H, Grenman R, Harkonen P: Expression of glucose transporters in head and neck tumors. *Int J Cancer* 56:622-9, 1994
- 11) Younes M, Lechago LV, Lechago J: Overexpression of the human erythrocyte glucose transporter occurs as a late event in human colorectal carcinogenesis and is associated with an increased incidence of lymph node metastasis. *Clin Cancer Res* 2:1151-4, 1996
- 12) Haber RS, Rathan A, Weiser KR, Pritsker A, Itzkowitz SH, Bodian C, et al: GLUT1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma; A marker for poor prognosis. *Cancer* 83:34-40, 1998
- 13) Younes M, Brown RW, Mody DR, Fernandez L, Laucirica R: GLUT1 expression in human breast carcinoma: Correlation with known prognostic markers. *Anticancer Res* 15:2895-8, 1995
- 14) Brown RS, Wahl RL: Overexpression of GLUT1 glucose transporter in human breast cancer: An immunohistochemical study. *Cancer* 72:2979-85, 1993
- 15) Haber RS, Weiser KR, Pritsker A, Reder I, Burstein DE: GLUT1 glucose transporter expression in benign, and malignant thyroid nodules. *Thyroid* 7:363-7, 1997
- 16) Younes M, Brown RW, Stephenson M, Gondo M, Cagle PT: Overexpression of GLUT1 and GLUT3 in stage I nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival. *Cancer* 80:1046-51, 1997
- 17) Ito T, Noguchi Y, Satoh S, Hayashi H, Inayama Y, Kitamura H: Expression of facilitative glucose transporter isoforms in lung carcinomas: its relation to histologic type, differentiation grade, and tumor stage. *Mod Pathol* 11:437-43, 1998
- 18) Reisser C, Eichhorn K, Herold Mende C, Born AI, Bannasch P: Expression of facilitative glucose transport proteins during development of squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 80:194-8, 1999
- 19) Chang SG, Lee CH, Kim JI, Kim YW: Expression of the human erythrocyte glucose transporter in transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 55:448-52, 2000
- 20) Nagase Y, Takata K, Moriyama N, Aso Y, Murakami T, Hirano H: Immunohistochemical localization of glucose transporters in human renal cell carcinoma. *J Urol* 153:798-801, 1995
- 21) Burstein DE, Hytiroglou P, Miller L, Szporn A, Batheja N, Thung SN: GLUT1 transporter expression in cholangiocarcinoma. *Mod Pathol* 11:151A, 1998
- 22) Wang BY, Kalir T, Sabo E, Sherman DE, Cohen C, Burstein DE: Immunohistochemical staining of GLUT1 in benign, hyperplastic and malignant endometrial epithelia. *Cancer* 88: 2774-81, 2000
- 23) Younes M, Ertan A, Lechago LV, Somoana J, Lechago J: Human erythrocyte glucose transporter (GLUT1) is immunohistochemically detected as a late event during malignant progression in Barrett's metaplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6:303-5, 1997
- 24) Flier JS, Mueckler MM, Usher P: Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogene. *Science* 235:1492-5, 1987
- 25) Bashan N, Burdett E, Hundal HS, Klip A: Regulation of glucose transport and GLUT1 glucose transporter expression by O₂ in muscle cells in culture. *Am J Physiol* 262:C682- 90, 1992
- 26) Younes M, Juarez D, Lechago LV, Lerner SP: Glut 1 expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder is associated with poor patient survival. *Anticancer Res* 21: 575-8, 2001