

유방암 골수 미세전이와 Plasminogen Activator Inhibitor-1의 관계

전남대학교 의과대학 외과학교실, ¹임상병리학교실

윤 정 한 · 제갈영종 · 서 순 팔¹

The Relationship between Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Bone Marrow Micrometastases in Breast Cancer

Jung Han Yoon, M.D., Young Jong Jaegal, M.D. and Soon Pal Suh, M.D.¹

Departments of General Surgery and ¹Clinical Pathology, Chonnam National University, College of Medicine, Gwangju, Korea

Purpose: Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) is the principal physiological urokinase-type plasminogen activator and is thought to regulate the overall invasive and metastatic behaviors of cancer cells. Although the occurrence of bone marrow micrometastases is an independent prognostic factor in breast cancer, its pathomechanism is not yet fully revealed until. We hypothesize that PAI-1 has a major role in the development of bone marrow micrometastases in breast cancer. Accordingly, we attempted to establish a correlation between PAI-1 activity in tumor tissues and bone marrow micrometastases in breast cancer. Additionally, we studied the relationship between PAI-1 level and selected clinicopathological characteristics such as tumor size, lymph node metastases, and steroid receptor positivity.

Methods: we used the RT-PCR targeting mRNA of cytokeratin 19 to detect bone marrow micrometastases and an ELISA kit to estimate PAI-1 activity in frozen tumor tissues.

Results: (1) The median PAI-1 level was 13.55 ng/ml \pm 16.38 in the cases with bone marrow metastases, and 6.02 ng/ml \pm 10.85 in the cases without bone marrow micrometastases. The difference was statistically significant (p-value=0.0165). (2) PAI-1 levels did not show any significant differ-

ences according to lymph node status, variation of tumor size or the expression status of the steroid receptors.

Conclusion: PAI-1 is considered to have a role to hematogenous metastases of breast cancer cells. However, further study is recommended to reveal its significance as an independent prognostic factor for breast cancer. (*Journal of Korean Breast Cancer Society* 2001;4:192-197)

Key Words: Breast cancer, PAI-1, Bone marrow micrometastases

중심 단어: 유방암, PAI-1, 골수 미세전이

서 론

유방암의 연구 중 가장 중요한 논제 중의 하나는 전이 또는 재발과 관련된 생물학적 인자를 확인하여 재발의 고 위험군을 찾아내거나 새로운 치료목표로 정립할 수 있는 나 하는 것이다. 사실 암침윤과 전이는 복잡한 기전에 의해 이루어지며 이 과정에서 세포외기질의 분해가 중요한 역할을 할 것으로 간주되고 있다. 세포외기질의 분해는 여러 단백분해효소 체계의 연합된 작용에 의해 이루어지며 plasminogen 활성화의 urokinase pathway에 의한 plasmin 유리, matrix metalloproteases, 다른 extracellular proteases 등이 관여한다. Urokinase-type plasminogen activator (u-PA)와 이들의 수용체, 그리고 이들의 억제제(plasminogen activator inhibitor-1 : PAI-1)들은 모두 plasminogen이 섬유용해(Fibrinolysis) 과정에서 주도적인 역할을 하는 효소인 plasmin으로의 활성화를 조절하는데 관여하고 있다.(1) Plasmin은 type IV collagenase, gelatinase, stromelysin 등과 같은 이른바 matrix prometalloproteinase들을 활성형으로 바꾸어 준다. Plasminogen activator의 활성화는 그들의 특이적 억제제들인 PAI-1과 PAI-2들에 의해 직접적으로 조절된다. 최근 들어 악성종양내 u-PA와 PAI-1의 수치가 환자들의 예후와 관련된다는 보고들이 있다.(2)

Plasmin은 또한 laminin, fibronectin, type IV collagen들로 구성된 세포외단백들을 분해하고 single chain u-PA를 그 활성형인 two chain u-PA로 전환시킨다. 이러한 소견들은 u-PA와 PAI-1이 종양의 침윤과 전이에서 중요한 역할을

책임저자 : 윤정한, 광주광역시 동구 학 1동 8번지

☎ 501-757, 전남대학교병원 외과

Tel: 062-220-6456, Fax: 062-227-1632

E-mail: jhyoon@chonnam.ac.kr

접수일 : 2001년 8월 22일, 게재승인일 : 2001년 10월 11일

본 연구논문은 2000년도 전남대병원 임상연구비 연구비 지원을 받아 이루어진 것임.

담당하리라는 충분한 예측을 하게 한다.

지금까지의 보고에 의하면 종양조직내 PAI-1의 높은 발현이 다양한 악성종양에서 환자들의 불량한 예후와 관련 있다고 알려져 있으며 PAI-1이 종양세포의 침윤과 혈관신생도에 필수적으로 관여한다는 기초보고도 있다. 유방암에서도 PAI-1이 지금까지 알려진 고전적 예후인자와는 별도로 독립적인 강력한 예후인자라는 보고가 있으며, (3) 실험적 연구에 의해서도 PAI-1은 직접적으로 종양침윤에 관여한다고 알려져 있다. (1) 그러나 PAI-1이 림프절 전이유무와는 관계없이 예후인자로 인정 받을 수 있는 이유가 유방암의 보다 중요한 전이형태인 혈행성전이에서 어떠한 순 상관성을 가지며 이러한 전이과정에 직접적으로 어떠한 역할을 하고 있기 때문인지 또는 전이와는 상관없는 별개의 과정에 의한 것인지 등에 대한 관찰보고는 이루어지지 못하고 있다. 따라서 본 연구에서는 유방암조직에서의 PAI-1 발현과 유방암에서의 골수 미세전이와의 연관성을 관찰함으로써 PAI-1 발현이 실제 원격전이의 임상양상에서 어떠한 역할을 가지고 있는지 확인하고 다른 임상병리학적 인자들과 어떠한 관련성을 가지고 있는지도 확인하고자 하였다.

방 법

1) 연구대상

전남대학교병원 외과에서 유방암으로 진단받고 치료받은 환자들 중 원발종양의 신선동결조직이 잘 보존되어 있으면서 골수미세전이에 대한 검색이 이루어진 52명의 환자들을 대상으로 하였다.

2) 연구방법

종양내 PAI-1의 임상적 의미를 확인하기 위한 검색인자로서 유방암의 가장 중요한 전이형태인 림프성 전이의 결과인 액와림프절 전이 유무 및 혈행성전이의 중요한 형태인 골수미세전이 유무에 따른 측정치를 비교하였고 그 외 연령, 폐경여부, 종양의 크기, 스테로이드 수용체 발현유무 등의 임상병리학적 인자들에 따른 수치 역시 비교하였다.

(1) 림프절 전이관찰: 파라핀포매괴를 이용한 통상적인 H&E 염색을 통하여 관찰하였다.

(2) 스테로이드 수용체 발현 관찰: 면역조직화학적 염색법을 이용하여 고배율상 관찰되는 시야에서 10% 이상의 종양 세포들이 양성발현을 보이는 경우에 수용체 양성으로 판단하였다.

(3) 골수미세전이 관찰: 검색에 사용한 골수는 유방절제술 중 확보된 시야에서 흉골로부터 골수천자침을 이용하여 10 ml 썬을 채취하였으며 유방암세포의 골수내 미세전이 여부를 확인하기 위하여 다음과 같은 RT-PCR 방법

을 이용하였다.

① MCF-7 세포주의 배양과 유방암 환자로부터의 골수 확보: 대조군으로 이용할 human mammary cell line인 MCF-7 세포(ATCC HTB22)를 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 그리고 유방암 환자로부터 채취한 골수는 Ficoll/Hypaque를 통한 원심분리 후 interphase의 세포만을 추출하여 보관하였다.

② RNA 추출: RPMI 1640배지에서 배양한 MCF-7 세포를 $450 \times g$ 으로 원심분리한 후 FBS로 세척하였다. 골수추출물 역시 $1,030 \times g$ 으로 5분간 원심분리한 후 새로운 시험관으로 buffy coat를 옮기고 잔존해 있는 적혈구는 RBC lysis buffer (0.15 mol/L ammonium chloride, 0.01 mol/L potassium bicarbonate, 0.1 mol/L edathamil)을 가하여 10분간 흔들어 용해시켰다. Trypan blue exclusion 방법으로 세포의 숫자와 생존율을 검사하고 백만내지는 천만개의 세포를 $500 \mu l$ 의 (4 mol/L-guanidine-isothiocyanate, 0.5% Sarkosyl, 25 mmol/L sodium citrate, pH 7.0)과 0.1 mol/L 2-mercaptoethanol에 부유시킨 다음 $-70^{\circ}C$ 에서 냉동시켰다. 그리고 시료를 녹혀 phenol/chloroform/isoamyl alcohol로 추출하고 95% ethanol과 3 mol/L sodium acetate (pH 5.2)로 핵산을 침전시켰다.

③ 역전사 반응: $10 \mu l$ 의 RNA, $4.25 \mu l$ 의 DEPC H_2O , $0.5 \mu l$ 의 random primer를 섞어 $70^{\circ}C$ 에서 10분간 반응시킨 후 얼음에 2분간 방치시켰다. 여기에 1.5의 dNTP, $0.5 \mu l$ 의 RNasin, $5 \mu l$ 의 $5 \times$ reaction buffer, $2.5 \mu l$ 의 100 mmol dithiothreitol, $1 \mu l$ 의 MMLV를 가하여 $42^{\circ}C$ 에서 1시간 반응시키고 $70^{\circ}C$ 에 10분간 방치하여 반응을 마쳤다.

④ 종합효소연쇄반응에 의한 Keratin 19 DNA의 증폭: Perkin Elmer (GeneAmp PCR system 9600)을 이용하여 실시하였다. Two step PCR을 시행하기 위하여 1쌍의 primer A,B (5'-AAGCTAACCATGCAGAACCCTCAACGACCGC-3', 5'-TTATTGGCAGGTCAGGAGAAGAGCC-3')와 1쌍의 nested primer C,D (5'-TCCCGCGACTACAGCCACTACTACAG-ACC-3', 5'-CGCGACTTGATGTCCATGAGCCGCTGGTAC-3')를 합성하였다.

1차 PCR은 cDNA $5 \mu l$ 에 각각 10 mmol Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol KCl, 0.001% (w/v) gelatin, 200 μ mol dNTP, 50 mmol $MgCl_2$ 와 primer A,B 그리고 1.25 U taq DNA polymerase를 가하여 총 $25 \mu l$ 을 분리한 후 기본적으로 다음의 3단계를 35주기 반복함으로써 DNA를 증폭시켰다. Denaturation 단계는 $95^{\circ}C$ 에서 50초, Annealing과 Polymerization 단계는 $72^{\circ}C$ 에서 2분 30초간 시행하고 polymerization을 충분히 해주기 위하여 위의 35주기의 마지막 주기에서는 $72^{\circ}C$ 에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 반응혼합액중에서 $1 \mu l$ 만을 사용하여 10 mmol Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol KCl, 0.001% (w/v) gelatin, 200 μ mol dNTP, $MgCl_2$ 와 nested primer C, D 그리고 1.25 U taq DNA poly-

merase를 가하여 총 25 μ l의 혼합반응액을 준비한 뒤 2차 PCR의 35주기 반응을 반복하였다. 반응이 끝난 후 각 μ l의 반응 혼합액 중 12 μ l를 취하여 1%의 agarose gel에서 loading하였다. 이때 low range DNA size standard로 ϕ 174를 Hae III로 잘랐다. 그리고 80V의 일정한 전압에서 1시간 동안 전기영동을 실시한 다음 한천상에서 이동한 DNA band를 Ethidium bromide 염색에 의하여 자외선 투시기상에서 관찰하고 UV photographic apparatus (polaroid, cambridge, MA)를 이용하여 사진을 찍었다. 그리고 대조군으로 설정된 MCF 세포주에서와 같이 745 bp에서의 band가 확인된 예를 골수내전이 있는 것으로 판단하였다(Fig. 1).

(4) PAI-1 분석

① 검체의 보관: 적출된 유방암조직은 가능한 한 지방조직, 괴사부위 및 혈액성분을 제거한 후 액체질소통에 보관하여 본 연구에 이용하였다.

② Cytosol에서 PAI-1 정량

ㄱ) Cytosol의 제작: 냉동보관된 검체를 4°C 냉장실에서 검체물을 0.5~1.0 mm 정도의 크기로 잘게 자른 다음 5 ml homogenization buffer (1 mM monothioglycerol, 0.01M Tris base, 5.00 mM Sod. molybdate, 1.50 mM EDTA, pH 7.4, 4°C)를 가하고 빙조상에서 Homogenizer를 이용, 18,000 rpm에서 5초간 마쇄한 후 30초간 휴지하는 방법으로 4~5분간 마쇄 한 다음 초원심분리기를 이용 4°C하에서 100,000 g로 1시간 원심하여 그 상청액을 분리하였다.

ㄴ) 단백질 정량: Cytosol내의 단백질 정량은 Bio-Rad protein assay법을 이용하여 시행하였다.

ㄷ) PAI-1 정량: Biopoll로부터 구입한 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kit (TintElize PAI-1, sweden)를 이용하여 분석하였다. 이때 동량의 표본들을 N-well (coded blue)과 A-well (coded yellow-green)에 첨가하며 N-well에는 well p표면에 동정된 PAI-1 단클론항체들과

non-related structures들을 겨냥한 용해성 항체(non-immune antibodies)가 함유되도록 하였고 분석의 전과정은 실온에서 시행하였다. 최종 PAI-1 함량은 cytosol단위단백량에 대한 PAI-1의 양은 microtest plate-spectrophotometer로 492 nm에서의 absorbance를 읽어 ng/mg protein으로 산정하였다.

(5) 통계적 검증: Mann-Whitney U 또는 Wilcoxon Rank-Sum test를 이용하였으며 $p < 0.05$ 인 경우에 통계적인 의의가 있다고 판정하였다.

결 과

측정결과 PAI-1 치는 최소 0.21 ng/ml protein, 최대 70.09 ng/ml protein였다. 우선 연령군에 따른 PAI-1치의 차이여부를 확인하였지만 40세를 기준으로 검색한 결과 유의하는 차이를 보이지 않았다. 폐경여부에 따른 PAI-1치의 비교에서도 역시 폐경 전과 폐경 후에서의 유의하는 차이를 확인할 수 없었다(Table 1). 전이 형태와 관련된 PAI-1치는 골수전이를 보인 군의 평균치 13.55 ng/ml protein가 골수전이가 없었던 군의 6.02 ng/ml protein에 비해 통계적으로 유의하는 차이를 보였지만(p value=0.0165), 림프절 전이유무에 따른 차이는 없었다(Table 2). 종양크기에 따른 PAI-1치는 종양의 크기가 커질수록 높아지는 경향을 보이기는 하였지만 역시 통계적인 의의는 없었다(Table 3).

스테로이드 수용체 발현유무와의 관계에서는 에스트로겐 수용체와 프로그스테론 수용체 모두에서 음성발현의 경우가 양성발현의 경우에 비해 PAI-1치가 다소 높은 경향을 보이기는 하였지만 통계적인 의의는 없었다(Table 4).

Table 1. Mean PAI-1 levels in relation to clinical parameters

Clinical parameter	Mean PAI-1 level	p-value
Age (years)		
< 40	4.85 \pm 3.83	$p > 0.1$
≥ 40	8.41 \pm 14.48	
Menopause		
Yes	9.38 \pm 14.44	$p > 0.1$
No	6.84 \pm 11.73	

Table 2. Mean PAI-1 level in relation to metastatic pattern

Site	Metastases		p-value
	Yes	No	
Bone marrow	13.55 \pm 16.38	6.02 \pm 10.85	0.0165
Lymph node	6.62 \pm 10.5	7.63 \pm 13.2	0.4445

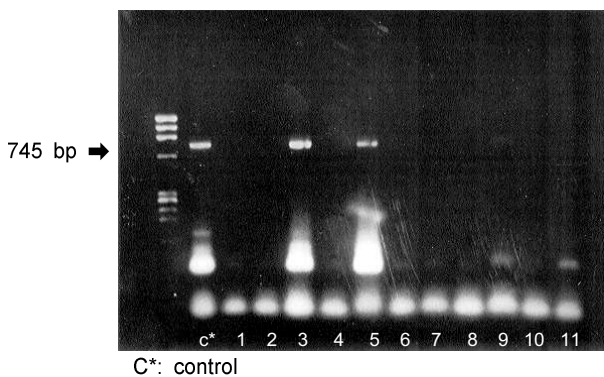


Fig. 1. RT-PCR results of bone marrows; Cases (3 and 5) showing the same as 745 bp band appeared in the control (MCF-7 cell) can be diagnosed into the cases with bone marrow micrometastases.

Table 3. PAI-1 level in relation to tumor staging

Stage	PAI-1 level	p-value
T1	3.26 ± 3.19	>0.1
T2	7.82 ± 12.6	
T3	9.52 ± 15.8	

Table 4. PAI-1 level in relation to steroid receptor expression

Steroid receptor	Expression		p-value
	Positive	Negative	
Estrogen receptor	4.11 ± 3.27	6.32 ± 5.68	0.473
Progesteron receptor	5.29 ± 3.85	6.34 ± 6.1	0.959

고 찰

주변의 조직으로의 침윤과 원격전이를 일으키는 유방암의 능력은 인접해 있는 구조물들을 분해하는 능력과 아주 밀접되어 있다. 이러한 능력으로서 암세포들은 림프관이나 혈관내로 스며들어가 퍼지게 되는 것이다. 이러한 과정에서 중요하다고 알려진 단백분해효소들 중 가장 중심적인 역할을 담당하고 있는 효소가 urokinase-type plasminogen activator (uPA)이며 이 효소의 활성을 조절하고 있는 단백효소억제제로 plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1)과 type 2 (PAI-2)가 있다.

PAI-1은 379 아미노산으로 구성된 당단백으로 인간에서 tPA와 uPA의 주요한 생리적 억제제이다. 특히 PAI-1이 세포표면으로부터 단백분해 활성 제거를 촉진시키고 결합되지 않은 uPA를 세포표면으로 재 순환시키는 기능을 담당하고 있음을 볼 때 암세포의 전반적인 침윤성 그리고 전이능을 조절하고 있다고 인정되고 있다.(4) Cytosol을 이용하여 urokinase와 tissue-type plasminogen activators 및 그 inhibitor들을 감수성 높게 측정하고자 하는 분석법은 Grebenschikov 등(5)에 의해 발표되었는데 본 연구자의 분석법도 그 방법을 응용한 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

유방암 조직에서 측정되는 PAI-1 수치는 보고자에 따라 조금씩 달라 Sweep 등(6)은 최저 0.49 ng/ml, 최고 3.89 ng/ml로 보고한데 비하여 de Witte 등(7)은 최저 0.14 ng/ml, 최고 48.62 ng/ml protein으로 보고하였고 Pierga 등은 최저 0.5 ng/ml, 최고 68 ng/mg protein이었다고 하였다. 이에 비해 Kute 등(8)은 0~9.16 interim units/mg protein 범주이며 평균치 1.14, 중앙치 0.72로 보고하였다. 본 연구에서는 최저 0.21 ng/ml protein, 최고 70.09 ng/ml protein으로서

Pierga의 보고치와 유사하였다. 사실 지금까지 보고된 PAI-1 수치들은 사용되는 ELISA kit의 항체가 연구자마다 다르고 조직추출물의 준비과정에서도 일치되는 기준방법이 없어 검사기관에 따라 이렇듯 차이가 날 수 밖에 없었다. Sweep 등(6)은 정확한 분석을 위해서는 external quality assurance (QA)가 꼭 필요하다고 주장하고 이러한 기준법의 설정으로 실험실간 편차를 PAI-1의 경우 최대 42.1%에서 19.1%로 줄일 수 있다고 하였다. 또한 PAI-1 검출장소가 세포질(cytosol)에서 이루어진 것이 초원심분리 후 얻어진 청정제 추출물에서 측정된 것보다 더 예후인자로서의 의미를 더 가지고 있다고 보고하였다.(7) 따라서 본 연구에서도 PAI-1 측정은 cytosol추출물에서 이루어졌으며 비교적 신뢰도가 높고 널리 보편화되어 있는 ELISA kit를 이용한 PAI-1 측정을 시도하였다. PAI-1치가 양성종양과 악성질환에서 차이가 있다는 보고는 Fersis 등(9)에 의해 먼저 이루어졌다. 즉, 양성 유방종양의 수치는 평균 1.28 ng/mg인데 비하여 악성종양에서는 8.6 ng/mg이었다고 보고하면서 전통적인 예후인자들인 액와림프절 전이, 종양의 크기, 폐경 여부와 PAI-1 수치와는 유의 있는 연관성을 보이지 않아 PAI-1이 독립적인 예후인자로 활용될 수 있으리라 주장하였다. Sumiyoshi 등(10)은 유방암조직에서의 PAI-1 항원치가 양성종양인 섬유선종에서 보다 높게 측정되었음은 물론 유방암내에서도 림프절 전이가 진행될수록 수치가 증가되고 있음을 보고하였다. 이러한 PAI-1의 태도를 예후인자로서 적극 활용하고자 하는 연구가 이루어졌는데 Kute 등(8)은 림프절전이가 없는 유방암 환자들을 대상으로 cathepsin D와 함께 검토한 결과 중앙치보다 더 낮은 PAI-1치를 보이는 경우 5년내 재발률(13%)이 더 높은 경우의 재발률(40%)에 비해 월등히 차이 있음을 보고하였다.

Janicke 등(11)도 종양추출물에 대한 ELISA 측정으로 검색한 결과 높은 PAI-1치가 불량한 예후에 대한 독립적이고 의미 있는 인자임을 보고하였다.

Grondahl 등(3)은 림프절전이 양성환자만을 대상으로 cytosol 추출물에서 측정하여 보고하였는데 역시 PAI-1수치의 고발현을 보이는 군에서 더 짧은 무병생존과 전체생존을 보였다고 하였으며 이러한 소견은 폐경 후 환자에서 저명하였다고 하였다. 따라서 PAI-1은 폐경 후 환자에서 생존과 관련된 독립적인 예후인자가 될 수 있다고 주장하였다.

이에 비해 Thomssen 등(12)은 액와림프절 전이 음성인 유방암에서 보조화학요법이 필요 없는 저위험군을 결정하는데 있어 cathepsin-L과 함께 PAI-1이 중요한 결정인자가 될 수 있다고 하였다. Foekens 등(13) 역시 PAI-1치가 림프절 전이여부에 관계없이 종양의 전이능을 예견할 수 있는 인자이며 metastases-related protease uPA 및 cathepsin D와 순 상관관계를 가지고 있다고 하였다. Grondahl 등(3)

에 의하면 여타 임상병리학적 인자들에 의해 재발의 저위험군으로 분류되었다 하더라도 PAI-1 수치가 0.8 interim units/mg protein보다 높은 경우, 낮은 경우에 비해 사망의 상대적 위험도가 2.2배 더 높았다고 보고하였다. 이렇듯 PAI-1이 기존의 알려진 여러 임상병리학적 또는 분자생물학적 인자들과는 독립적으로 인정될 수 있는 예후인자들 중의 하나가 될 수 있다는 점은 여러 보고에 의해 확실히 인정될 수 있었지만 과연 어떠한 기전의 결과로 중요한 예후인자로 자리매김 할 수 있는 지에 대한 설명은 명확히 이루어지지 못하였다.

특히 최근 들어 그 의미가 부각된 골수미세전이와 PAI-1의 관련성에 대한 연구는 아직 이루어지지 않고 있었다. 따라서 본 연구는 림프성 전이와는 별개의 기전으로 이루어지며 유방암 전이의 가장 중요한 경로 중의 하나인 혈행성전이와 중앙내 PAI-1 측정치를 비교하여 과연 PAI-1이 유방암의 전이형태에서 실질적으로 어떠한 연관성을 가지고 있는지 확인하고자 한 것이다.

Knoop 등(14)은 PAI-1이 종양의 크기, 이형성의 정도, 스테로이드 수용체 상태, 전이 림프절 개수 등과 상관관계가 가지고 있으며 고농도인 경우 원격전이를 예견하는 데는 의의 있으나, 국소재발의 예측과는 관련이 없었다고 하였다. 이때 cut-off point로 설정된 PAI-1의 중앙치는 11.1 ng/mg protein이었다.

이에 비해 Harbeck 등(15)은 다변량 분석을 통하여 PAI-1과 림프절전이 여부가 전체생존율을 결정하는데 가장 중요한 인자가 되어진다고 하였고 특히 PAI-1은 첫 재발 후 생존을 예측하는데 가장 의의 있는 예후인자가 된다고 하였고 log-rank 통계검증에 의해 PAI-1의 적절한 cut-off point를 14 ng/mg으로 규정하였다. Thomssen(12) 역시 림프절전이 음성환자중 재발의 고위험군을 나타내는 인자로서 PAI-1 치가 14 ng/ml 이상인 경우를 가장 중요한 인자들 중의 하나임을 보고하였다.

이렇듯 고위험군의 선정 시 확인된 14 ng/ml라는 수치는 본 연구에서 골수전이 양성군에서의 PAI-1 수치인 13.55 ng/ml에 거의 일치한다. 따라서 앞서 보고한 원격전이를 예측하는 인자 또는 재발 고위험군을 나타내는 인자로서의 PAI-1의 의미는 결국 골수전이와 연관되어 있는 것으로 추측된다.

유방암에서 PAI-1의 의미에 대하여는 예후적인 관점과 아울러 기타 다른 임상병리학적 인자들과의 연관성에 대해서도 아직 확실한 정립이 이루어지지 못하고 있다. Knoop 등(14)은 연령, 폐경 여부, 종양의 크기에 따른 PAI-1치의 차이는 없었으나, 분화정도, 스테로이드 수용체의 발현, 림프절전이 정도, 림프절막 침윤여부에 따른 PAI-1의 통계적인 차이가 있음을 보고하였다. 이에 비해 de Witte 등(7)의 보고에서 PAI-1 수치는 연령이나 폐경 상태, 림프절전이 여부와는 관계가 없었으나 종양의 크기와는 관계가

있어 종양의 크기가 클수록 수치가 증가하였다고 하였다. 또한 조직학적 등급이 낮으면 PAI-1 수치가 높았고 호르몬 수용체 양성군에서는 낮아졌다고 하였다.

Grondahl Hansen 등(3)은 폐경여부에 따라 분류하면서 각종 임상병리학적 인자들과 PAI-1수치의 연관성을 검토하였는데 폐경전 유방암에서는 연령, PR 발현, 림프절 전이여부에서는 의미 있는 차이를 보이지 않았지만 ER 발현과 종양크기에 따른 차이는 의의가 있었다고 하였다. 이에 비해 폐경 후 유방암에서는 ER, PR 발현 유무에서만 의의 있는 차이를 보였다고 하였다.

본 연구에서도 연령 및 폐경여부, 종양의 크기, 스테로이드 수용체 유무, 그리고 림프절전이 유무 등과 PAI-1의 관련성을 비교하였다, 그 결과 종양의 크기가 증가할수록 또는 스테로이드 수용체 발현이 없을수록 PAI-1 수치가 높아지는 경향을 관찰할 수 있었으나 통계적인 의의는 없었다. 따라서 보다 많은 증례수의 확보와 함께 기타 다른 임상병리학적 인자들과의 연관성을 확인하기 위한 추가적인 연구가 계속 필요할 것으로 판단된다.

결론

유방암조직에서 측정된 PAI-1 수치와 골수미세전이 및 예후와 관련된 임상병리학적 인자들과 관련성을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 골수미세전이를 보인 군에서의 PAI-1 평균치는 $13.55 \text{ ng/ml} \pm 16.38$, 골수 미세전이가 없는 군에서의 PAI-1 평균치는 $6.02 \text{ ng/ml} \pm 10.85$ 로서 통계적으로 의의 있는 차이를 보였다($p\text{-value}=0.0165$).

2) 연령, 폐경여부, 림프절 전이 유무, 종양의 크기, 스테로이드 수용체 발현의 양성여부에 따른 PAI-1 치는 통계적으로 어떠한 연관성도 보이지 않았다.

결론적으로 유방암조직에서 측정된 PAI-1 치는 유방암의 골수미세전이 발생과 연관성을 가지고 있으며 그외 예후와 관련된 추가적인 임상병리학 인자들과의 연관성에 대하여는 보다 많은 증례 확보에 따른 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

REFERENCES

- 1) Bell WR: The fibrinolytic system in neoplasia. *Semin Thromb Hemosta* 22:459-78, 1996
- 2) Stephens RW, Brunner N, Janicke F, Schmitt M: The urokinase plasminogen activator system as a target for prognostic studies in breast cancer. *Breast Cancer Res & Treat* 52:99-111, 1998
- 3) Grondahl Hansen J, Hilsenbeck SG, Christensen IJ, Clark GM, Osborne CK, Brunner N: Prognostic significance of PAI-1 and uPA in cytosolic extracts obtained from node-positive breast

- cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 43:153-63, 1997
- 4) Chapman HA: Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr Opin Cell Biol* 9:714-24, 1997
- 5) Grebenschikov N, Geurts Moespot A, De Witte H, Heuvel J: A sensitive and robust assay for urokinase and tissue type plasminogen activators (uPA and tPA) and their inhibitor type I (PAI-1) in breast tumor cytosols. *Int J Biol Markers* 12:6-14, 1997
- 6) Sweep CGJ, Geurts-Moespot J, Grebenschikov N, de Witte JH, Heuvel JJTM: External quality assessment of trans-european multicentre antigen determinations (enzyme-linked immunosorbent assay) of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its type 1 inhibitor (PAI-1) in human breast cancer tissue extracts. *Br J Cancer* 78:1434-41, 1998
- 7) de Witte JH, Sweep CGJ, Klijn JGM, Grebenschikov N, Peters HA, Look MP, et al: Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor (PAI-1) in cytosols and pellet extracts derived from 892 breast cancer patients. *Br J Cancer* 79:1190-98, 1999
- 8) Kute TE, Grondahl-Hansen J, Shao SM, Long R, Russell G, Brunner N: Low cathepsin D and low plasminogen activator type 1 inhibitor in tumor cytosols defines a group of node negative breast cancer patients with low risk of recurrence. *Breast Cancer Res & Treat* 47:9-16, 1998
- 9) Fersis N, Kaufmann M, Kramer MD, Wittmann G, Wallwiener D, Bastert G: Prognostic significance of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in primary breast carcinoma. *Geburtshilfe Frauenklinik* 56:28-34, 1996
- 10) Sumiyoshi K, Baba S, Sakaguchi S, Urano T, Takada Y, Takada A: Increase in levels of plasminogen activator and type 1 plasminogen activator inhibitor in human breast cancer; possible role in tumor progression and metastasis. *Thromb Res* 63:59-71, 1991
- 11) Janicke F, Schmitt M, Graeff H: Clinical relevance of the urokinase-type and tissue-type plasminogen activators and their type 1 inhibitor in breast cancer. *Semin Thrombo Hemostasis* 17:303-12, 1991
- 12) Thomssen C, Oppelt P, Janicke F, Ulm K, Harbeck N, Hofler H, et al: Identification of low-risk node-negative breast cancer patients by tumor biological factors PAI-1 and cathepsin-L. *Anticancer Res* 18:2173-80, 1998
- 13) Foekens JA, Schmitt M, van-Putten WL, Peters HA, Kramer MD, Janicke F: Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 12:1648-58, 1994
- 14) Knoop A, Andreassen PA, Andersen JA, Hansen S, Laenkholm AV: Prognostic significance of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in primary breast cancer. *Br J Cancer* 77:932-40, 1998
- 15) Harbeck N, Thomssen C, Berger U, Ulm K: Invasion marker PAI-1 remains a strong prognostic factor after long-term follow-up both for primary breast cancer and following first relapse. *Breast Cancer Res Treat* 54:147-57, 1999