J Korean Surg Soc 2010;79:180-188
DOI: 10.4174/jkss.2010.79.3.180

□ 원 저 □

침윤성 유방암과 주변 정상 관상피세포에서의 COX-2 발현의 의의

성균관대학교 의과대학 강북삼성병원 외과학교실

김준호 · 박용래

Expression of COX-2 in Cells of Invasive Ductal Carcinoma and Adjacent Non-Cancerous Ductal Epithelia in Human Breast

Jun Ho Kim, M.D., **Yong Lai Park,** M.D.

Department of Surgery, Kangbuk Samsung Hospital, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Cyclooxygenase-2 (Cox-2) is an inducible enzyme that converts arachidonic acid to prostaglandins. Aberrant expression of Cox-2 and prostaglandins has been observed in many cancers, including colon and breast cancers, and 40% of human breast cancers show overexpression of Cox-2. The aim of this study was to analyze the role of Cox-2 expression in breast cancers.

Methods: The expression of Cox-2 and HER2 was examined in 56 breast tissue samples including microscopically normal epithelium and invasive ductal carcinomas (IDC) using immunohistochemical (IHC) methods. Frozen breast cancers and adjacent non-cancerous tissue (ANCT) pairs (n=30) were analyzed for Cox-2 and HER2 mRNA expression by RT-PCR. The results were compared with the prognostic parameters of breast cancer including tumor grade, growth pattern, lymph node metastasis, estrogen receptor status and Ki-67 labeling index.

Results: Cytoplasmic Cox-2 expression was detected in 39 of 56 (69.6%) IDC and the Cox-2 expression in IDC was closely associated with HER2 expression (P=0.023). However, the expression of Cox-2 was not associated with other prognostic parameters of breast cancer ($P>0.05$). The Cox-2 mRNA showed high expression levels in IDC (25/30, 83.3%) as well as ANCT (22/25, 88%).

Conclusion: The association between the expression of Cox-2 and HER2 suggests that Her2/neu gene induces the Cox-2 expression in breast cancer and overexpression of Cox-2 is involved in breast cancer development. Though the cells of ANCT are normal in morphology, their molecular alteration (overexpression of Cox-2) suggests that these cells have transformed already. **(J Korean Surg Soc 2010;79:180-188)**

Key Words: Cyclooxygenase-2, HER2, Invasive ductal carcinoma
중심 단어: Cyclooxygenase-2, HER2, 침윤성 관암종

서 론

유방암의 발생률이 유관상피세포의 단순증식(ductal hyperplasia), 비정형 증식(atypical ductal hyperplasia), 그리고 관내암종(ductal carcinoma in situ)으로 진행할수록 증가한다는(*1*) 사실은 형질전환된 세포(transformed cell)가 이러한 과정을 통해 침윤성 관암종(invasive ductal carcinoma, IDC)으로 진행한다는 것을 의미한다.(*2*) 하나의 정상세포가 악성으로 형질전환이 되기 위해서는 어떠한 원인에 의해서든 유전자나 세포 내 물질의 변화가 발생하고 그것이 지속될 때 가능하다. 이와 같이 단계적인 병변에 대해 각 세포내의 유전자나 세포내의 물질들에 관해서 선택적으로 연구를 하

책임저자: 박용래, 서울시 종로구 평동 108
㉾ 110-746, 강북삼성병원 외과
Tel: 02-2001-2132, Fax: 02-2001-2131
E-mail: yonglai@samsung.com
접수일 : 2010년 4월 27일, 게재승인일 : 2010년 6월 3일

게 되면 종양의 생성과 종양의 진행에 대한 기전을 이해하는데 유리하다.

최근에는 레이저를 이용하여 조직에서 원하는 세포만을 선택적으로 획득하는 방법들이 실용화 되어 특정세포에서 특정 유전자나 특정 물질의 발현을 정확하게 측정할 수 있게 되었다. 레이저 미세절제술(laser capture microdissection, LCM)을 이용하여 각 단계에 속하는 세포들을 선택적으로 획득하고, 그 세포들로부터 원하는 유전자나 세포 내 물질들의 발현을 비교하여서, 그러한 변화가 종양의 생성이나 진행에 얼마나 영향을 미치는가를 확인할 수 있다.

본 연구에서는 최근 발생률과 사망률이 증가하고 있는 국내의 유방암에서 Cox-2의 발현양상을 알아보았다. 그 동안 동물실험이나 세포주를 이용한 Cox-2의 발현에 관한 해외 연구는 다수 존재하였지만, 사람의 유방에서 발생한 암세포에 대한 Cox-2의 발현에 대한 국내 연구는 아직 드물다. IDC와 그 주변에 존재하는 형태학적으로 정상으로 보이는 유관 상피세포(adjacent noncancerous tissue, ANCT)에서 LCM를 이용하여 선택적으로 필요한 세포들을 획득하고, 반정량적 역전사 중합효소 연쇄반응(semiquantative RT-PCR, RT-PCR)을 이용해 mRNA의 발현을 비교 분석하였다. 동시에 보관되어 있는 파라핀 블록을 이용하여 종양에 대한 면역조직화학염색(immunohistochemical stain, IHC)을 통해 단백질의 발현도 알아보았다. 또한 이것들이 이미 유방암의 임상-병리학적 예후인자들로 알려져 있는 종양의 분화도, 성장양식, 림프절 전이, 에스트로겐 수용체, 세포의 증식표지지수(Ki-67) 및 종양 단백질로 알려져 있는 HER2 발현 등과는 어떠한 연관성이 있는가에 대한 연구도 시행하였다. 이를 통해 Cox-2가 유방암의 생성과 진행에 어떻게 관여하는지를 알아보고자 하였다. 또한 Cox-2의 발현이 유방암의 새로운 예후 인자로서의 가치를 가지고 있는가도 살펴보고, 또 Cox-2 억제제가 암의 예방이나 치료에 어떻게 이용되어야 하는가에 대한 고찰도 하고자 한다.

방 법

1) 환자와 검체

2001년 12월부터 2004년 12월 사이에 성균관대학교 의과대학 강북삼성병원 외과에서 IDC로 근치적 유방절제술을 시행 받았던 환자의 검체 중, 보관이 양호한 56건의 검체를 선정하였다. 헤마톡실린-에오신으로 염색된 조직의 유리슬라이드를 검경하여, 종양의 분화도를 Modified Bloom and Richardson grade system에 따라 분류하였고, 종양의 성장양식은 확장성과 침윤성으로 분류하였다. 종양의 림프절 전이는 기존의 보고서를 통해 파악하였다. RT-PCR을 위한 신선 조직은 2002년 10월에서 2004년 12월 사이에 절제된 30예의 유방조직에서, 일정양의 조직을 정상과 종양부위로 구분하여 액화질소통에 보관하였던 검체들을 사용하였다.

2) 면역조직화학염색

10% 중성 포르말린 고정과 파라핀 포매를 거친 조직을 약 4 μm 두께로 박절한 뒤 100% xylene으로 5분간 파라핀을 제거하고, 증류수로 함수시킨 후 Cox-2 (LabVision Corp, Fremont, CA, USA), HER2 (Zymed, San Francisco, CA, USA), Ki-67 (Zymed, San Francisco, CA, USA), ER (Dako, Carpinteria, CA, USA)에 대하여 면역조직화학염색을 시행하였다. 항원성 회복을 위해 10 mM의 citrate buffer에 조직을 담근 후 약 10분씩 2회 반복하여 마이크로파로 처리하였다. 4^{o}C의 인산화 완충식염수(PBS)에 5분간 처리한 후, 내인성 과산화효소의 활성 억제를 위해 3% 과산화수소를 처리 후 세척하였다. 일차 항체인 Cox-2 (1 : 100), HER2 (1 : 50), Ki-67 (1 : 50), ER (1 : 100)을 상온에서 2시간 반응시킨 뒤 PBS액으로 세척하였다. 2차 항체인 바이오틴이 붙은 연결항체(LSAB kit; Dako, Carpinteria, CA, USA)로 20분간 처리한 뒤 PBS로 세척하였다. 스트렙트아비딘(Zymed, San Francisco, CA, USA)과 과산화효소가 결합된 용액으로 30분간 처리한 뒤, 3,3-diaminobenzidine tetrachloride (DAB, sigma)로 발색시켰다. Mayer 헤마톡실린으로 대조염색을 시행하고 광학현미경으로 관찰하였다. 음성 대조군은 일차 항체대신 PBS를 첨가하여 시행하였다. Cox-2는 세포질에 갈색으로 염색된 것을 양성으로 판정하였으며, 세포질에 양성인 세포가 10% 미만인 경우를 0으로, 10% 이상의 세포가 약한 염색을 보일 때를 1+, 10% 이상의 세포가 중등도의 염색을 보일 때를 2+, 10% 이상의 세포가 강한 염색을 보일 때를 3+로 판정하였다(Fig. 1). HER2는 세포막에 염색된 것을, Ki-67과 ER은 핵에 염색된 것을 양성으로 판정하였으며, Ki-67은 핵에 염색된 것 중 전체의 10% 미만을 저 표지, 10% 이상을 이상을 고도 표지로 판독하였다. ER은 10% 이상을 양성으로 그 이하를 음성으로 판정하였다.

3) 레이저 미세절제술과 RNA 추출

액화질소통에 보관 중이던 정상부위와 종양 부위 각 30예의 신선조직을 동결박절기를 이용해 5 μm두께로 박절하

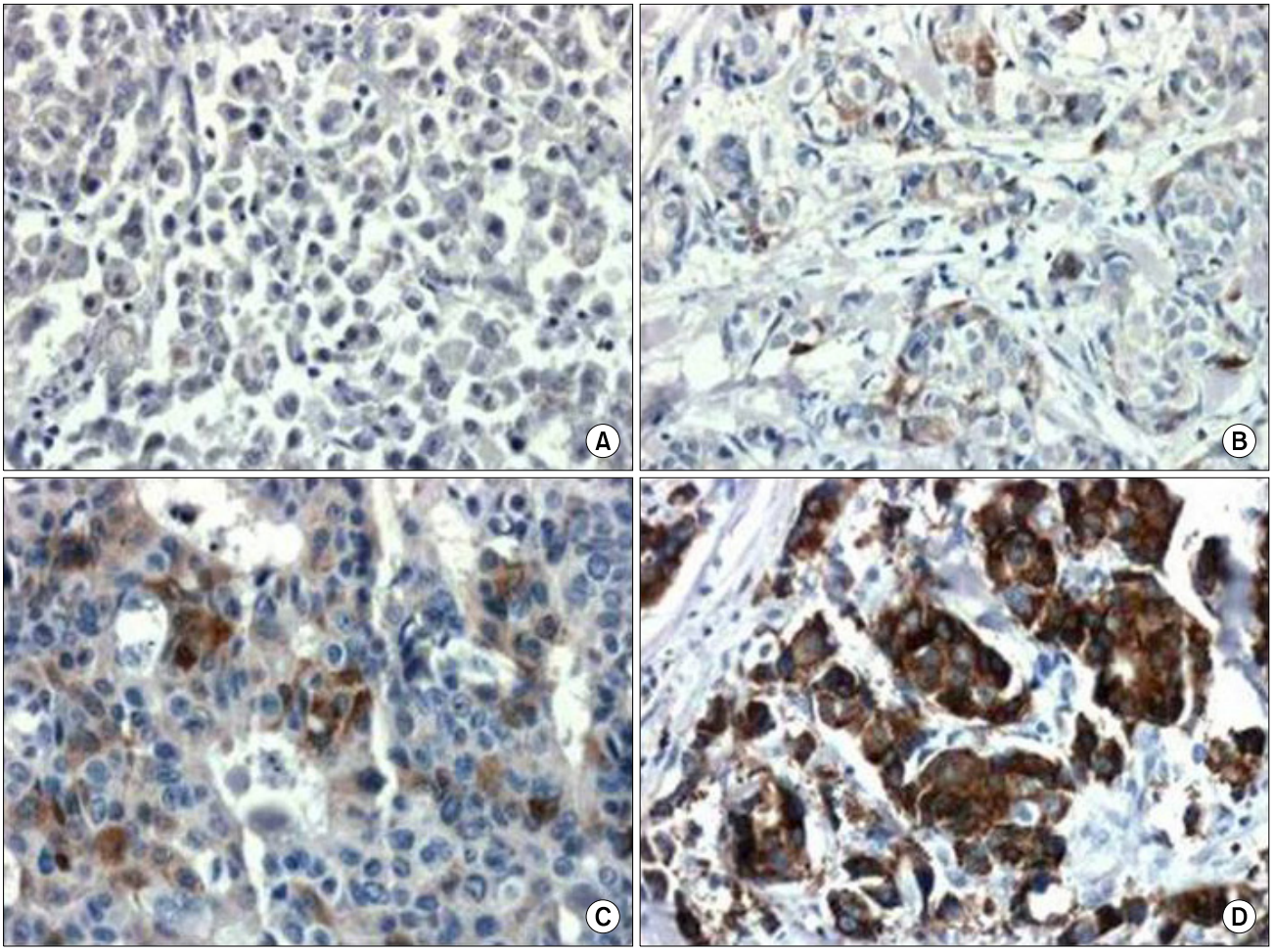

Fig. 1. Photographs showing the degrees of cytoplasmic protein expression of Cox-2; 0 (A), 1+ (B), 2+ (C) and 3+ (D).

고, RNase로 처리한 유리슬라이드(AntiRNase Pretreated, Fisher Scientific)에 올렸다. 상온에서 녹인 뒤 70% 알코올에서 고정시키고, diethyl pyrocarbonate (DEPC) 수용액으로 제작된 Mayer 헤마톡실린-에오신 염색용액으로 염색한 뒤, 다단계의 알코올로 탈수과정을 거쳤다. 5분간 xylene으로 처리한 뒤, 공기 중에서 말린 후, 미세절제술 시행까지 실리카겔이 들어있는 건조한 보관함에 보관하였다. LCM은 CaptureTM이라고 하는 세포모음용기를 사용하는 PixCell II system (Arcturus, Mountain View, CA, USA)을 사용하여 원하는 세포만을 선택적으로 획득하였다(Fig. 2). 정상조직과 종양조직 각각 30예 중, 정상 세포는 25예에서, IDC 세포는 30예 모두에서 세포를 획득할 수 있었다. LCM 시행 즉시 PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus, Mountain View, CA, USA)를 이용해 설명서에 따라 획득한 세포로부터 전체 RNA를 추출하였다. 간략히 설명하면, LCM을 통해 획득된 세포들을 50 μ1의 추출완충액으로 42°C에서 30분간 배양하였다. 70% 알코올 50 μ1를 섞고 추출용기에서 거른 후, 원심분리 후 추출용기를 세척하여 전체 RNA를 추출하였다.

4) 반정량적 역전사 중합효소 연쇄반응

추출한 전체 RNA에 SuperScript III First Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용해 설명서에 따라 cDNA를 합성하였다. 잠재적인 genomic DNA의 오염을 막기 위해서 RNA 검체를 DNase (1 U DNase free, Invitrogen)로 처리하고, 50 μM의 oligo (dT) 12～18 primer, 10 mM dNTP, 그리고 전체 RNA를 65°C에서 5분간 배양하였다. RT buffer, 25 mM Mgcl2, 0.1 M DTT, RNaseOUT (40 U), SuperScript III Reverse Transcriptase (22 U)를 50°C에서 50분간 반응시킨 후, 85°C에서 5분간 배양시켜 반응을 종결시켰다. RNA를 제거하기 위해 합성된 cDNA는 RNase H와 37°C

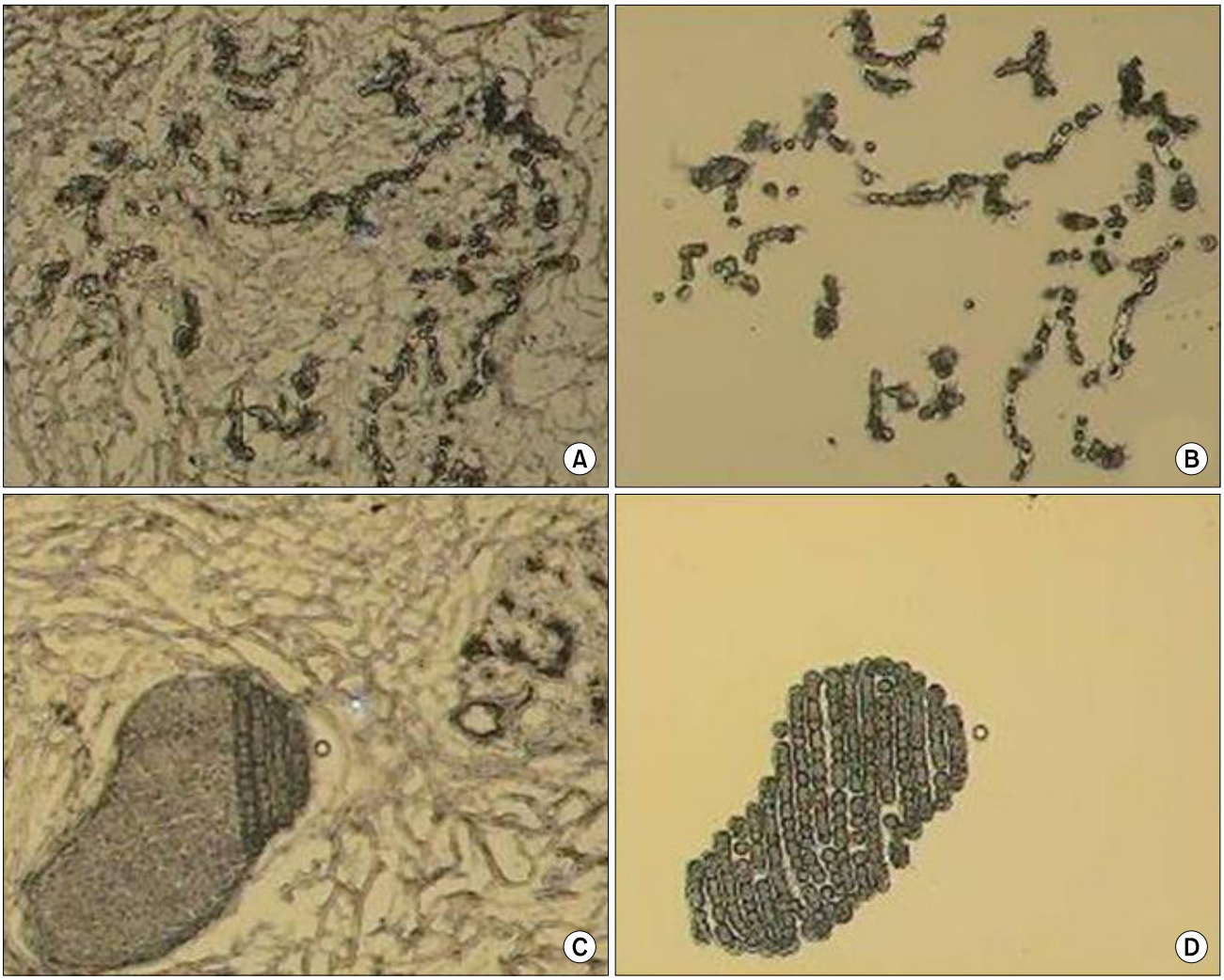

Fig. 2. Photographs showing laser capture microdissection from adjacent non-cancerous tissue (A) and the cells collected in CapsureTM (B). Microdissection from cancer (C) and the cells collected (D).

Table 1. Oligonucleotide primer sequences used

Cox-2*	Sense P	5'-GCTCAGCCATACAGCAAATCC-3'
	Antisense P	5'-GGGAGTCGGGCAATCATCAG-3'
HER2	Sense P	5'-GAGATCTTGAAAGGAGGGGTCT-3'
	Antisense P	5'-CGTCCGTAGAAAGGTAGTTGTAGG-3'
β-actin	Sense P	5'-AAGAGAGGCATCCTCACCCT-3'
	Antisense P	5'-TACATGGCTGGGGTGTTGAA-3'

*Cox-2 = cyclooxygenase-2.

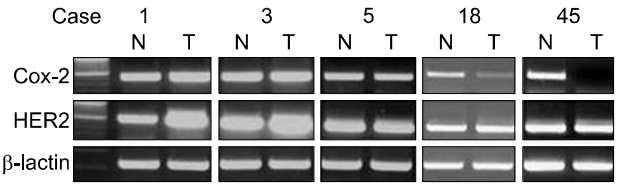

Fig. 3. Photomicrograph showing representative RT-PCR results for Cox-2 and HER2 in normal epithelium (N) and IDC (T).

에서 20분간 반응시켰다. 역전사반응의 최종량은 20 μl로 하였다. 각 PCR 반응에서는 4 μl의 cDNA와, 2X Universal PCR Master Mix (ABgene, Surrey, UK), 그리고 10 pmol의 각 시발체들을 사용하였다(Table 1). 전변성을 94°C에서 5분간 시행한 뒤, PCR은 94°C에 1분, 60°C 1분, 72°C 1분으로 38회 반응시키고, 마지막으로 72°C에서 10분간 배양하였다. PCR 이후 각 검체에서 20 μl를 1.5%의 아가로스겔에 전기연동 시키고, Image Analyzer (Vilber Lourmat, Marne La Vallée, France)로 관찰한 뒤, β-actin으로 표준화하여 상대적인 mRNA의 발현을 측정하였다(Fig. 3).

Table 2. Correlation between Cox-2 expression and clinicopathological variables of breast cancers

	Total		Cox-2* (−)		Cox-2 (+)		P-value
	No.	%	No.	%	No.	%	
Age (yrs)	28～77 (mean: 50.7±9.5)						
Histologic grade							
1	11	19.6	3	27.3	8	72.7	0.748
2	22	39.3	8	36.4	14	63.6	
3	23	41.1	6	26.1	17	73.9	
Growth pattern							
Expansive	19	33.9	5	26.3	14	73.7	0.637
Infiltrating	37	66.1	12	32.4	25	67.6	
Lymph node metastasis							
No	28	50.0	9	32.1	19	67.9	0.771
Yes	28	50.0	8	28.6	20	71.4	
Ki-67 labeling index							
Low (＜10%)	34	60.7	9	26.5	25	73.5	0.432
High (≥10%)	22	39.3	8	36.4	14	63.6	
Estrogen receptor							
Negative	29	51.8	7	24.1	22	75.9	0.294
Positive	27	48.2	10	37.0	17	63.0	
HER2							
Negative	41	73.2	16	39.0	25	61.0	0.023
Positive	15	26.8	1	6.7	14	93.3	

*Cox-2 = cyclooxygenase-2.

5) 통계 분석

통계적 분석은 각 지표 값들 사이의 연관성을 알아보기 위해 PASW Statistics 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 program을 이용하여, Chi-square test와 Fisher's exact test를 시행하였으며, P값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 하였다.

결 과

1) 종양의 분화도, 성장양식, 림프절 전이

전체 56예 중 분화도 1에 속하는 것이 11예(19.6%), 분화도 2는 22예(39.3%), 그리고 분화도 3은 23예(41.1%)였다. 성장양식은 확장성이 19예(33.9%), 침윤성 성장양식을 보인 것은 37예(66.1%)였다. 액와 림프절 전이는 전체 56예 중, 전이가 없었던 것이 28예(50%), 전이가 있었던 경우가 28예(50%)였다(Table 2).

2) 면역조직화학염색

전체 56예 중 29예(51.8%)가 ER 음성이었으며, 27예(48.2%)는 ER 양성이었다. 증식표시지수(Ki-67 labeling index)는 34예(60.7%)에서 저 표지였으며, 고도의 표지지수를 보인 것은 22예(39.3%)였다(Table 2).

Table 3. Protein expression of Cox-2 and HER2

	ANCT*		IDC†	
	No.	%	No.	%
Cox-2‡				
0	47	83.9	17	30.4
1+	9	16.1	16	28.6
2+	0	0	12	21.4
3+	0	0	11	19.6
HER2				
0	56	100	39	69.6
1+	0	0	2	3.6
2+	0	0	3	5.4
3+	0	0	12	21.4

*ANCT = adjacent non-cancerous tissue; †IDC = invasive ductal carcinoma; ‡Cox-2 = cyclooxygenase-2.

Cox-2의 발현은 전체 56예 중, 종양 주변의 정상세포에서 9예(16.1%)가 1+를 보였고 나머지(83.9%)는 모두 0이었다. 종양세포에서는 0이 17예(30.4%), 1+가 16예(28.6%), 2+는 12예(21.4%), 그리고 3+도 11예(19.6%)였다(Table 3). 종양

Table 4. mRNA expression of Cox-2* and HER2

	ANCT† (n=25)		IDC† (n=30)	
	No.	%	No.	%
Cox-2				
None	3	12	5	16.7
Expression	22	88	25	83.3
HER2				
None	0	0	0	0
Expression	25	100	30	100

*Cox-2 = cyclooxygenase-2; †ANCT = adjacent non-cancerous tissue; †IDC = invasive ductal carcinoma.

Table 5. Comparisons of Cox-2* and HER2 mRNA expression between ANCT† and IDC† (relative RT-PCR using β-actin internal standards)

	Cox-2 mRNA expression		HER2 mRNA expression	
	No. (n=25)	%	No. (n=25)	%
Higher in ANCT	12	48	7	28
Higher in IDC	12	48	18	72
None in both	1	4	0	0

*Cox-2 = cyclooxygenase-2; †ANCT = adjacent non-cancerous tissue; †IDC = invasive ductal carcinoma.

의 분화도에 따른 Cox-2의 양성(1+ 이상)률은 분화도 1, 2, 3에서 각각 8예(72.7%), 14예(77.3%), 17예(73.9%)였다. HER2 단백은 정상세포에서는 발현되지 않았고, 종양세포에서는 0이 39예(69.6%), 1+가 2예(3.6%), 2+는 3예(5.4%), 그리고 3+는 12예(21.4%)였다(Table 3). DACO 판독규정에 의해 0과 1+를 음성으로, 2+ 이상을 양성으로 판정했을 때 전체에서 양성은 15예(26.8%)였고 분화도에 따른 분포는 분화도 1, 2, 3에서 각각 2예(18.2%), 7예(31.8%), 6예(26.1%)였다. Cox-2의 발현과 기존의 유방암에 대한 예후인자로 알려져 있던 종양의 분화도, 종양의 성장양식, 림프절 전이, 에스트로겐 수용체, 세포의 증식표지지수 등과는 통계적으로 유의한 연관성을 찾을 수가 없었으나 HER2 발현이 높을수록 Cox-2 발현율이 높은 것으로 나타났다(P=0.023)(Table 2).

3) mRNA 발현

Cox-2는 전체 25예의 정상세포 중 22예(88%)에서 발현되었고, 전체 30예의 종양세포 중 25예(83.3%)에서 발현되었다. HER2는 정상세포 25예 모두와 종양세포 30예 모두에서 발현되었다(Table 4). 정상세포와 종양세포간의 비교가 가능했던 25예 중 Cox-2는 12예(48%)의 종양세포에서 mRNA 발현이 주변 정상세포에서의 발현보다 높게 나타났고, 1예(4%)에서는 정상과 종양세포 모두에서 발현되지 않았다. HER2는 25예 중 18예(72%)에서 종양세포에서의 발현이 주변 정상세포에서의 발현보다 높게 나타났다(Table 5).

고 찰

세포막의 인지질에서 인산지질분해효소(phospholipase) A2s (PLA2s)의 작용에 의해 아라키돈산(arachidonic acid)이 만들어 지고, 시클로옥시게나아제(cyclooxygenase, Cox)의 작용에 의해 프로스타글란딘(prostaglandin, PG) H2가 생성되며 이어서 다양한 종류의 PG들이 만들어지게 된다.(*3*) 현재까지 두 종류의 Cox가 밝혀져 있는데, Cox-1과 Cox-2는 비슷한 구조에도 불구하고 그 조절과 기능이 크게 다르다. Cox-1은 모든 조직에 본질적으로 존재하면서 PG의 생성을 조절하여, 위점막의 유지, 신혈류의 조절, 그리고 혈소판의 응집과 같은 인체의 정상적인 생리기능을 담당하고 있다. 반면 Cox-2는 염증이나 세포분열을 촉진시키는 자극 등에서 반응하여 유도되고, 그 결과 염증과 종양조직에서 PG의 생성을 증가시킨다. Cox-1 유전자는 모든 세포에 기본적으로 존재하는 유전자(housekeeping gene)이지만, Cox-2 유전자는 자극에 의해 발현되는 유전자(inducible gene)이다.(*3,4*) 성장인자(GF), 사이토카인(CK), 종양유전자(oncogene), 종양촉진자(tumor promoters)들은 Ras와 단백질 키나제 C (PKC) 등을 통해서 Cox-2의 전사를 촉진시킨다. AP-1, NF-IL6, NF-kB, NFAT, PEA3 등도 Cox-2의 전사를 촉진시킨다.(*5*) 반면에 돌연변이가 일어나지 않은(wild-type) p53이나 APC 유전자와 같은 종양억제 유전자들에 의해서는 Cox-2의 발현이 억제되는 것으로 알려져 있다.(*6*) 즉 Cox-2의 발현은 종양유전자와 종양억제 유전자에 의해서 조절되며,(*7*) 이미 여러 종양조직에서 Cox-2의 발현이 보고되고 있다.(*8-11*)

본 연구에서는 RT-PCR을 이용하여 유방암세포 및 인접 정상 관상피세포에서 Cox-2와 HER2의 mRNA의 발현과 IHC을 이용한 단백질의 발현에 관한 연구를 시행하였다. ANCT에서는 Cox-2 mRNA가 88%에서, IDC에서는 83.3%에서 발현되었다.

이러한 결과는 Half 등(*12*)의 ANCT와 IDC 모두에서 100%의 Cox-2 발현을 보였다는 보고보다는 낮은 mRNA의 발현율이었다. 정상세포에서는 Cox-1과는 달리 Cox-2가 발

현되지 않는다는 많은 연구 결과들에 비춰볼 때,(*3,4*) 본 연구에서 보인 ANCT는 형태학적으로는 정상세포로 보이지만, 이미 세포 내부에는 종양과 관련한 mRNA나 단백질들이 발현되고 있다는 것을 알 수 있었다. Deng 등(*13*)과 Lakhani 등(*14*)이 보고한 유방의 ANCT에서도 IDC와 유사한 loss of heterozygoty (LOH)가 발견되고 있다는 것과 같은 맥락이라 생각한다. 이와 같이 ANCT에서 종양과 유사한 다양한 유전자의 이상이 관찰되는 것은 이미 기관지암, 림프종 등에서도 보고되고 있다.(*15,16*) 즉, 종양 주변에 존재하는 세포들도 이미 종양과 유사한 유전자의 변이가 시작되고 있는 것이며, 이것은 종양의 완전한 절제에도 불구하고 종양이 쉽게 재발하는 이유를 잘 설명하여 주는 것이다.(*14*) 특히 mRNA의 발현이 ANCT에서 더 높게 관찰된 것은 Cox-2가 종양생성의 초기단계에 주로 작용한다는 것과 종양이 단계적으로 진행한다는 것을 설명할 수 있는 결과로 생각한다.(*12,14*)

Erb-B 수용체는 epidermal growth factor receptor인 Erb-B1, HER-2/neu인 ErbB-2, 그리고 Erb-B3 (HERBB3)와 Erb-B4 (HERBB4)의 4종이 있다.(*17*) Erb-B는 정상유방의 발생과 성장에 관여한다고 한다. 쥐를 이용한 실험에서 epidermal growth factor-like ligands와 neuregulin들이 유방 소엽의 발달을 자극하고,(*18,19*) Erb-B1의 부족은 유방에서 선의 발달에 장애를 초래한다는 보고가 있다.(*20*) 유방조직에서 HER2의 과발현은 정상세포를 악성세포로 형질전환을 시킬 뿐 아니라,(*21*) 세포의 이형성, 전이, 재발, 그리고 항암치료에 대한 저항 등과 같은 악성예후인자들과 연관되어 있다.(*22*)

HER2 단백질을 생성하는 역할을 담당하는 HER2/neu 유전자는 여러 종양에서 Cox-2의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다. Vadlamudi 등(*23*)은 결장암에서 HER2/HER3의 경로의 활성이 Cox-2 촉진자의 활성을 유도하고, 그 결과로 Cox-2의 mRNA와 단백질의 발현을 촉진시킨다고 보고하였다. Subbaramaiah 등(*24*)은 유방암 세포주에 HER2를 핵내 주입하였더니 HER2가 ras/raf/MARK의 신호전달체계를 자극하고, AP-1의 결합을 촉진시켜 Cox-2의 발현을 증가시켰다는 결과를 보고하였다.

본 연구에서는 IDC에서 Cox-2와 HER2 발현 사이에 깊은 연관성이 존재한다는 결과를 보여 Vadlamudi 등(*23*)과 Subbarmaiah 등(*24*)의 연구보고와 일치하는 결과를 보였다. 하지만 Half 등(*12*)과 Witton 등(*25*)은 HER2와 Cox-2 사이에서 연관성을 찾을 수 없다고 보고하기도 하였다. 따라서 이들 관계에 대한 더 많은 연구가 필요하다고 생각한다.

본 연구에서는 또한 Cox-2의 발현이 기존의 유방암에 대한 예후인자로 알려져 있던, 종양의 분화도, 종양의 성장양식, 림프절 전이, 에스트로겐 수용체, 세포의 증식표지지수 등과는 통계적으로 유의한 연관성을 찾을 수가 없었다. Witton 등(*25*)과 Tan 등(*26*)은 Cox-2의 발현이 유방암의 나쁜 예후인자들과의 연관성이 있다고 주장하였다. 하지만 Half 등(*12*)이나 Ranger 등(*27*)과 같은 많은 연구들은 본 연구와 마찬가지로 Cox-2의 발현이 다른 예후인자들과 연관성이 없다고 보고하고 있다.

Liu 등(*28*)은 쥐를 사용한 실험에서 유방의 관상피세포에서 Cox-2의 과발현이 유방종양을 발생시켰다는 결과를 통해, Cox-2의 과발현이 유방종양의 발생기전에 아주 중요하다고 주장하였다. 그는 이 실험에서 Cox-2에 의해 발생된 종양세포에서는 전세포자멸사와 관련된 단백질(proapoptotic proteins)인 Bax, Bcl-xL 등이 감소되는 반면, 항세포자멸사와 관련된 단백질인 Bcl-2는 증가하는 것을 밝혀내고, Cox-2가 세포자멸사를 억제하여 종양을 생성시킬 수 있다고 주장하였다. 이와 관련하여 Piazza 등(*29*)은 NSAID가 세포자멸사를 촉진하여 항암효과를 일으킬 수 있다고 주장하였다.

본 연구를 통해 IDC는 물론이고, 형태학적으로는 정상으로 보이는 ANCT에서도 Cox-2가 발현된다는 점에서 종양의 치료를 위해서는 종괴가 만져지기 이전부터 종양의 예방을 위한 대비가 필요하다고 생각한다. Sharpe 등(*30*)은 NSAID의 규칙적인 복용이 유방암의 발생을 예방할 수 있다고 주장하였다.

결 론

본 연구는 국내 유방암 환자의 종양세포와 종양주변에 존재하는 정상으로 보이는 관상피세포에서 Cox-2 발현을 알아보는 것이었다. 첫째, 다른 많은 보고와 마찬가지로 유방암세포에서 Cox-2의 발현이 증명되었다. 둘째, 종양 주변의 관상피세포는 형태상 정상상피세포로 보였지만, Cox-2 mRNA의 발현이 종양세포에서 보다 더 흔히 관찰되었다. 따라서 종양주변의 관상피세포도 mRNA 발현의 관점에서 볼 때 이미 형질전환의 과정에 있는 세포라고 생각하였다. 셋째로, 종양세포에서 Cox-2와 HER2 발현 사이에는 통계적으로 의미 있는 연관성이 증명되었다. 결론적으로 아직 유방암의 발생과정에서 Cox-2의 역할이나 예후인자로서 가치에 대해 의견이 분분하나 향후 보다 많은 연구를 통해

명확한 기전이 밝혀질 것으로 기대한다. 현재 유방암의 예방 또는 항암치료에 Cox-2 작용을 억제하는 NSAID 사용의 효과에 대한 많은 연구들이 진행 중이며, 그 결과가 기대되는 바이다.

REFERENCES

1) Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. N Engl J Med 1985;312:146-51.
2) Cardiff RD, Muller WJ. Transgenic mouse models of mammary tumorigenesis. Cancer Surv 1993;16:97-113.
3) Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. Pharmacol Rev 2004;56:387-437.
4) Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. FASEB J 1998;12:1063-73.
5) Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. Annu Rev Biochem 2000;69:145-82.
6) Araki Y, Okamura S, Hussain SP, Nagashima M, He P, Shiseki M, et al. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways. Cancer Res 2003;63:728-34.
7) Wu T. Cyclooxygenase-2 and prostaglandin signaling in cholangiocarcinoma. Biochim Biophys Acta 2005;1755:135-50.
8) Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. Gastroenterology 1994;107:1183-8.
9) Ristimäki A, Honkanen N, Jänkälä H, Sipponen P, Härkönen M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. Cancer Res 1997;57:1276-80.
10) Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schrör K. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. Cancer Res 1999;59:198-204.
11) Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, Muramatsu H, Kozaki K, Nakamura S, et al. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. Cancer Res 1998;58:3761-4.
12) Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. Cancer Res 2002;62:1676-81.
13) Deng G, Lu Y, Zlotnikov G, Thor AD, Smith HS. Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas. Science 1996;274:2057-9.
14) Lakhani SR, Chaggar R, Davies S, Jones C, Collins N, Odel C, et al. Genetic alterations in 'normal' luminal and myoepithelial cells of the breast. J Pathol 1999;189:496-503.
15) Sozzi G, Miozzo M, Tagliabue E, Calderone C, Lombardi L, Pilotti S, et al. Cytogenetic abnormalities and overexpression of receptors for growth factors in normal bronchial epithelium and tumor samples of lung cancer patients. Cancer Res 1991;51:400-4.
16) Limpens J, de Jong D, van Krieken JH, Price CG, Young BD, van Ommen GJ, et al. Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. Oncogene 1991;6:2271-6.
17) Pinkas-Kramarski R, Eilam R, Alroy I, Levkowitz G, Lonai P, Yarden Y. Differential expression of NDF/neuregulin receptors ErbB-3 and ErbB-4 and involvement in inhibition of neuronal differentiation. Oncogene 1997;15:2803-15.
18) DiAugustine RP, Richards RG, Sebastian J. EGF-related peptides and their receptors in mammary gland development. J Mammary Gland Biol Neoplasia 1997;2:109-17.
19) Normanno N, Ciardiello F. EGF-related peptides in the pathophysiology of the mammary gland. J Mammary Gland Biol Neoplasia 1997;2:143-51.
20) Schroeder W, Biesterfeld S, Zillessen S, Rath W. Epidermal growth factor receptor-immunohistochemical detection and clinical significance for treatment of primary breast cancer. Anticancer Res 1997;17:2799-802.
21) Krane IM, Leder P. NDF/heregulin induces persistence of terminal end buds and adenocarcinomas in the mammary glands of transgenic mice. Oncogene 1996;12:1781-8.
22) Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. Eur J Cancer 2001;37(Suppl 4):S9-15.
23) Vadlamudi R, Mandal M, Adam L, Steinbach G, Mendelsohn J, Kumar R. Regulation of cyclooxygenase-2 pathway by HER2 receptor. Oncogene 1999;18:305-14.
24) Subbaramaiah K, Norton L, Gerald W, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3. J Biol Chem 2002;277:18649-57.
25) Witton CJ, Hawe SJ, Cooke TG, Bartlett JM. Cyclooxygenase 2 (COX2) expression is associated with poor outcome in ER-negative, but not ER-positive, breast cancer. Histopathology 2004;45:47-54.
26) Tan KB, Yong WP, Putti TC. Cyclooxygenase-2 expression: a potential prognostic and predictive marker for high-grade ductal carcinoma in situ of the breast. Histopathology 2004;44:24-8.
27) Ranger GS, Jewell A, Thomas V, Mokbel K. Elevated expression of cyclooxygenase-2 in breast cancer and ductal carcinoma in situ has no correlation with established prognostic markers. J Surg Oncol 2004;88:100-3.
28) Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. J Biol Chem 2001;276:18563-9.
29) Piazza GA, Rahm AL, Krutzsch M, Sperl G, Paranka NS,

Gross PH, et al. Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis. Cancer Res 1995;55:3110-6.

30) Sharpe CR, Collet JP, McNutt M, Belzile E, Boivin JF, Hanley JA. Nested case-control study of the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on breast cancer risk and stage. Br J Cancer 2000;83:112-20.