

유방암 환자에서 Sialosyl-Tn Antigen의 발현과 기존 예후 인자간의 연관관계

동아대학교 의과대학 외과학교실, 병리학교실¹, 임상병리학교실², 내과학교실³

권용태 · 조세현 · 김영훈 · 김상순 · 홍숙희¹ · 김정만² · 최석렬³

= Abstract =

Expression of Sialosyl-Tn Antigen in Breast Cancer & Its Correlation with Prognostic Parameters

Yong-Tae Kwon, Se-Heon Cho, Young-Hoon Kim, Sang-Soon Kim,
Sook-Hee Hong¹, Jung-Man Kim² and Seok-Reyol Choi³

Departments of General Surgery, Pathology¹, Clinical Pathology² and
Internal Medicine³, Dong-A University College of Medicine

To determine whether the expression of Sialosyl-Tn antigen may have its putative relationship as an established or potentially useful clinicopathologic prognostic parameter in breast cancer, we evaluated 110 patients with invasive breast carcinoma, using formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. STn antigen was detected by the HB-STn antibody using an avidin-biotin-peroxidase method. The parameters studied were tumor size, nodal status, stage, histologic grade, ER/PR expression, DNA ploidy and S-phase fraction. STn expression was observed in 42 patients (38.2%) with breast cancer. The expression rate of STn was associated with axillary node metastasis. A tendency towards an association between STn expression and tumor size or TNM stage. There was no relationship between STn expression and histologic grade, ER/PR expression, DNA ploidy and S-phase fraction. We conclude that the detection of STn expression may be useful for predicting lymph node metastasis. (Korean J of Breast Cancer 1998;1:208~214)

Key Words: Sialosyl-Tn, Breast cancer, Prognostic factors

서 론

Sialyl-Tn (STn) 항원은 점액성 당단백에 대한 탄수화물로 구성된 항원으로 유방암과 다른 선암세포 및 정상세포의 일부에서 발현되는 것으로 알려져 있다¹⁾. STn 항원은 정상 유방조직에서는 발현되지 않

으나 양성파 악성종괴에서는 양쪽 다 다양한 수준으로 발현된다. 악성 유방조직에서 STn 항원의 발현율은 16-85%로 다양한데, 이는 항원검출 방법이나 사용된 시약의 차이에 따라 차이가 있는 것으로 생각된다.

STn과 같은 탄수화물 관련 항원은 종괴의 크기 및 전이의 정도와 관련이 있는 것으로 알려져 있다^{2,3)}. 즉 여러 악성 종양에서 STn 항원의 조직 발현도와 혈중 수치가 환자의 예후와 연관이 있다고 보고되고 있다. 현재까지는 STn 항원의 발현이 대장암과

연락처: 권용태, 602-103, 부산시 서구 동대신동 3가 1번지
동아대학교 의과대학 외과학교실
Tel: (051) 240-5916

난소암의 경우에는 예후와 크게 연관이 없는 것으로 밝혀졌다^{4,5)}.

본 연구에서는 유방암 환자에서 STn 항원의 발현 정도를 알아보고, 대상환자군의 나이, 원발병소의 크기, 전이된 림프절의 개수, 병기, 유방암 세포의 조직학적 분화도, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, DNA ploidy, S-phase fraction, 재발 및 전이의 연관성을 비교 분석하여 STn 항원의 발현이 유방암 환자에서 정립된 예후인자로 사용 가능한지, 또 STn 항원의 면역화학적 검출 방법이 질병경로 예측에 유용한지를 살펴보았다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 1990년 6월부터 1996년 12월까지 본원에서 유방암을 진단받고 유방절제술을 시행받은 166명의 환자 중에서 술전 일차 보조 치료를 받은 환자를 제외한 110명을 대상으로 하였다.

2. 연구 방법

환자의 임상 기록지로부터 대상환자군의 나이, 원발병소의 크기, 전이된 림프절의 개수, 병기, 유방암

세포의 조직학적 분화도, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, DNA ploidy, S-phase fraction, 재발 및 전이 등을 조사하였다.

1) 병 기

임상 병기는 액와 림프절 전이 유무 및 전이된 림프절의 수와, 암종의 크기는 American Joint Committee on Cancer and the International Union Against Cancer가 정한 TNM 분류법에 기초하여 분류하였다.

2) 병리조직학적 검색

병리조직 검사를 위해 의뢰되었던 유방조직의 육안 및 현미경 소견의 기록을 검토하였다. 유방암의 조직학적 분류는 WHO 분류를 기준으로 하였으며, 침윤성 관상암의 조직학적 등급은 Elston과 Ellis의 Modified Bloom and Richardson법을 사용하여 점수를 계산하여 고분화성, 중등도 분화성, 저분화성 관상암종으로 나누었다.

3) 면역 조직 화학적 염색 방법

수술로 절제된 110명의 유방암 조직의 Hematoxylin-eosin 염색표본을 재검색하여 종양의 조직형과

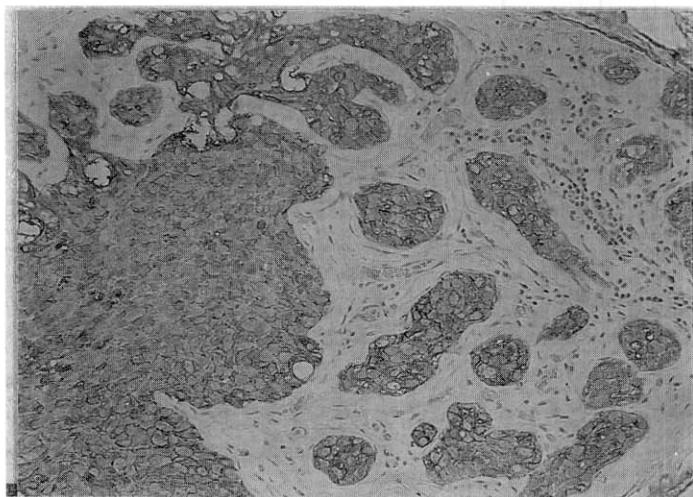


Fig. 1. The immunohistochemical staining for sialosyl-Tn antigen by DAKO-HB-STn1(Dako, USA). It shows strong positive cytoplasmic and membranous staining pattern in a ductal carcinoma of the breast.

등급을 정하고, 종양을 대변할 수 있는 가장 대표적인 파라핀 포매 블록 하나 혹은 2개를 선택하였다. Sialosyl-Tn 당단백 검출을 위해 사용된 일차항체는 DAKO-HB-STn1 (Dako, USA)이다.

먼저 외과적으로 절제된 유방암 조직을 10% 중성 포르말린용액에 고정하여 파라핀에 포매하고 4μm 두께로 잘라 organosilane으로 표면처리된 슬라이드에 부착시켰다. 크실렌에서 파라핀을 제거한 후 여러단계의 알코올을 거쳐 합수시켰다. 3% H₂O₂를 떨어뜨려 5분간 두어 내인성 peroxidase 활동을 저지시킨 후 일차항체 DAKO-HB-STn1을 100배 희석하여 실온에서 한시간 반응시킨 후 PBS 완충액으로 5분간 2번 씻었다. 2차 항체인 biotinylated polyvalent antibody로 30분간 반응시켜 PBS 완충액으로 씻은 후 streptavidine peroxidase로 30분간 염색하였다. 다시 PBS 완충액으로 씻고 발색시약(AEC)으로 10분간 염색한 후 물로 세척하고 hematoxylin으로 3분간 대조염색을 한 후 다시 물로 씻고 crystal mount로 봉입하여 현미경으로 검경하였다.

3. 면역 조직화학적 염색의 판독

염색된 유방암 조직을 광학현미경에서 관찰하여 종양세포의 세포질이 적갈색으로 염색되면 양성반응으로 판독하였다. 종양 주위에 남아있는 정상 유방조직의 관상피세포는 전혀 염색이 되지 않았다 (Fig. 1)

각 종양조직에서 종양세포 전부가 염색이 안되거나 종양세포의 5% 미만에서 염색된 종양은 당단백질 발현(-) 종양으로 하였고, 염색강도에는 관계없이 5% 이상 50% 이하의 종양세포가 염색되면(+) 종양, 50% 이상에서 염색되면(++) 종양으로 하였다.

4. 통계학적 분석

STn항원의 발현과 대상환자군의 나이, 원발병소의 크기, 전이된 림프절의 개수, 병기, 유방암 세포의 조직학적 분화도, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, DNA ploidy, S-phase fraction 재발 및 전이의 연관성을 알아보기 위해 미국 North Carolina 주의 SAS institute에서 개발된 SAS system (Statistical package SAS for release 6.08)을 이용하여 비교 분석하였고, *p* value 0.05 미만인 경우를 통계학적으로

Table 1. Comparison of immunoreactivity of STn by tumor size, number of metastatic lymph node and stage

	No. of cases (%)	STn expression (%)			Significance (<i>p</i> value)
		-	+	++	
Tumor size					<i>p</i> >0.05
<2 cm	24	20 (83.3)	2 (8.3)	2 (8.3)	
2-5 cm	78	42 (53.8)	22 (28.2)	14 (17.9)	
>5 cm	8	6 (75.0)	0 (0.0)	2 (25.0)	
No. of metastatic lymph node					<i>p</i> <0.05
0	52	30 (57.7)	10 (19.2)	12 (23.1)	
1-3	31	25 (80.6)	3 (9.7)	3 (9.7)	
≥4	27	13 (48.1)	11 (40.7)	3 (11.1)	
Stage					<i>p</i> >0.05
I	12	10 (83.3)	1 (8.3)	1 (8.3)	
II _A	47	26 (57.4)	11 (23.4)	10 (21.3)	
II _B	29	17 (58.6)	7 (24.1)	5 (17.2)	
III _A	18	15 (83.3)	2 (11.1)	1 (5.6)	
III _B	4	0 (0.0)	3 (75.0)	1 (25.0)	
Total	110	68 (61.8)	24 (21.8)	18 (16.4)	

Table 2. Comparison of immunoreactivity of STn by histologic grade, menopausal status, and estrogen/progesterone receptor

	No. of cases (%)	STn expression (%)			Significance (p value)
		-	+	++	
Histologic grade					$p>0.05$
Well	32 (29.0)	22 (68.8)	8 (25.0)	2 (6.3)	
Moderate	56 (50.9)	33 (58.9)	10 (17.9)	13 (23.2)	
Poor	22 (20.0)	14 (63.6)	5 (22.7)	3 (13.6)	
Estrogen receptor					$p<0.05$
Negative	47 (50.0)	26 (55.3)	13 (27.7)	8 (17.0)	
Positive	47 (50.0)	33 (70.2)	9 (19.1)	5 (10.6)	
Progesterone receptor					$p>0.05$
Negative	33 (35.1)	17 (51.5)	10 (30.3)	6 (18.2)	
Positive	61 (64.9)	41 (67.2)	13 (21.3)	7 (11.5)	

Table 3. Comparison of immunoreactivity of STn by DNA ploidy and S-phase fraction

	No. of cases (%)	STn expression (%)			Significance (p value)
		-	+	++	
DNA ploidy					$p>0.05$
Aneuploidy	19 (59.4)	10 (52.6)	6 (31.6)	3 (15.8)	
Diploidy	13 (40.6)	10 (76.9)	3 (23.1)	0 (0.0)	
S-phase fraction					$p>0.05$
Low	19 (59.4)	11 (57.9)	6 (31.6)	2 (10.5)	
High	13 (40.6)	9 (69.2)	3 (23.1)	1 (7.7)	

Table 4. Comparison of immunoreactivity of STn by relapse

	No. of cases (%)	STn expression (%)			Significance (p value)
		-	+	++	
Relapse					
Positive	18 (16.4)	10 (55.6)	4 (22.2)	4 (22.2)	$p>0.05$
Negative	92 (83.6)	59 (64.1)	19 (20.7)	14 (15.2)	

로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

본 실험에 사용된 환자는 전부 110명으로 대상환자 모두 여자였으며, 전 환자 모두가 절제 생검 혹은 절편 생검으로 확진한 후에 근치적 유방 절제술을

시행하였다.

110명 중 STn 양성 반응은 42명(38.2%)에서 보였으며, STn 양성군과 음성군의 평균연령은 각각 49세와 46세였다. 69명(62.7%)이 폐경 전 환자였고 41명(37.3%)이 폐경 후 환자였다.

원발 병소의 크기와 STn 항원 발현과의 관계는 2 cm 이하, 2 cm 이상 및 5 cm 미만, 5 cm 이상의 양

성률이 각각 16.7%(4/24), 46.2% (36/78), 25.0% (2/8)로 나타났으며, 종양크기에 따른 STn 발현은 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p>0.05$)(Table 1). 전이된 림프절의 개수와 STn 항원 발현과의 상호관계는 0개, 1-3개, 4개 이상 전이된 예에서 STn 양성률이 각각 42.3% (22/52), 19.4% (6/31), 51.9% (14/27)로 전이된 림프절의 수가 많을수록 높은 STn 양성률을 보였는데 이는 통계적 유의성이 있었다($p<0.05$)(Table 1). 각병기 I, II_A, II_B, III_A, III_B에서 STn 양성률은 각각 16.7% (2/12), 44.7% (21/47), 41.4% (12/29), 16.7% (3/18), 100% (4/4)로 나타났으며 각병기간 발현을 차이는 통계적 유의성이 없었다($p>0.05$)(Table 1).

유방암 세포의 조직학적 분화도와 STn 항원 발현과는 통계적 유의성이 없었다($p>0.05$)(Table 2). 110명 중 94명에서 에스트로겐 수용체 및 프로게스테론 수용체를 조사하였는데 이들 수용체의 발현과 STn 발현과는 통계적 유의성이 없었다($p>0.05$)(Table 2).

또한 32명에서 DNA ploidy 및 S-phase fraction을 조사하였는데 이들과 STn 발현과는 통계적 유의성이 없었다($p>0.05$)(Table 3).

110명 중 재발된 경우가 18명 있었는데 STn 양성군과 음성군이 각각 44.4%(8/18), 55.6% (10/18)로 나타났으나 통계적 유의성은 없었다($p>0.05$)(Table 4).

고 찰

점액은 상피세포에서 분비되는 불균질의 탄수화물 분자를 가지는 고분자 당단백질로 점소 폴리펩타이드의 세린 또는 트레오닌 잔기에 여러종류의 과당류 분지 중 한끝이 O-glycosidic linkage로 연결되어 있다¹⁾. 점액의 생성과 분비는 선상피 세포조직의 일반적인 특징으로, 악성상피세포 뿐만 아니라 정상조직에서도 분비되며, 이러한 점액의 당화이상은 여러 종류의 암에서 발생하는 것으로 알려져 있다.

암관련 점액은 정상점액과 두 가지 면에서 차이가 있다. 첫째, 정상점액은 점막 표면으로 분비되는데 반하여 암관련 점액은 혈중으로 분비되며, 둘째, 암관련 점액은 항원적 측면에서 변성된 분지로 인하

여 정상점액과 차이를 보이고 있다.

대부분의 암세포는 점액분자를 생성하여 분비하며, 또한 암관련 점액들은 암세포의 구성요소인 당단백질로서 존재한다⁶⁾. 즉 암세포가 이들 점액분자를 생성 분비하기도 하고 또한 이들 점액 분자들이 세포막의 구성 성분으로서 존재하고 있다. 이들 당단백질은 암세포에서 어느 정도 거리를 가지고 돌출된 탄성을 가진 막대기들의 형태로 존재하여 림프구와 같은 면역세포가 암세포로 접근하는 것을 방해한다⁷⁻⁹⁾. 그러므로 결국 암세포막에 존재하고 있거나 또는 암세포에서 분비된 암관련 점액들은 면역세포의 공격으로부터 암세포를 방어하는 것으로 알려져 있다^{7,10,11)}. 암관련 점액을 생성하는 암세포에는 어떤 glycosyltransferase가 결핍되어 있기 때문에¹²⁾ 암관련 점액에서는 종종 불완전한 glycosylation이 생기게 된다⁶⁾. 그래서 결국 짧아진 탄수화물 side chains 등이 형성되게 되고 또한 Sialosyl-Tn과 Thomsen-Friedenreich (TF) determinant같은 정상적으로는 잠복된 O-Linked core carbohydrate determinant가 노출되게 된다¹³⁾. Tn은 점액분자의 core peptide내에서 첫번째 core sugar α GalNAc과 O-linked 형태로 세린 또는 트레오닌과 결합되어 있다. 즉 galactosyl transferase가 결핍되어 있으므로 Tn은 galactose 대신에 sialic acid와 주로 결합하여 Sialosyl-Tn을 형성하게 된다^{1,4,14)}. 이들 모든 세가지 epitopes 즉 Tn, TF, STn은 인체 암세포에서 강하게 발현되며^{1,4,13)} 인체암의 진행과 전이에 관련되어 있다고 믿어진다^{4,13-15)}.

STn의 발현은 난소암, 위암 및 대장암에서 침윤성과 연관이 있으며 또한 표면에 STn을 발현하는 것이 악성세포의 전이성을 증가시키는 것으로 알려져 있다^{2,4,18,20,24)}. 최근에는 Kakeji 등²⁾에 의해서 유방암에서 STn 발현과 림프절 전이간의 연관성도 증명되고 있다¹⁶⁾. STn은 ER 양성인 경우에는 역상관계로 ER양성인 경우는 대개 고분화성이며 침윤성이 감소하고²³⁾ 또한 ER은 유방상피조직에서 분화 정도의 척도로 간주된다¹⁸⁾. STn양성인 경우에는 높은 조직학적 등급을 나타내는 경향이 있다^{17,21)}. Cho 등¹⁷⁾은 유방암에서 STn 발현이 비배수체, 높은 S-phase fraction, 고핵등급과 연관이 있다고 보고하

고 있으며, 그외 Miles 등¹⁹⁾은 STn 발현이 원발병소의 크기, 전이된 림프절의 갯수, 조직학적 분화도 및 호르몬 상태와 큰 연관은 없지만 림프절 양성인 유방암 환자에서 항암화학요법에 반응하지 않는 포식자임을 보여주었으며 또한 STn 양성집단에서의 생존율이 훨씬 감소되어 있다고 보고하고 있다. 이상에서와 같이 유방암에서의 STn 발현과 기존 예후인자간의 연관성을 시도하는 연구보고는 별로 많지 않으며^{17,19,21)} 또한 정확히 밝혀진 것도 없어서 본 저자는 STn 발현과 기존예후인자간의 연관성 측면에서 접근을 시도하여 STn 항원의 발현이 유방암 환자에서 정립된 예후인자로 사용 가능한지와 질병경로 예측에 유용한지를 밝혔다.

결론

1990년 6월부터 1996년 12월까지 6년 7개월간 동아대학교 병원에서 침윤성 유방암으로 진단받고 유방 절제술을 시행받은 166명의 환자 중에서 충분한 양의 종양조직이 포함되어 있으면서 파라핀 블록의 보관 상태가 양호하고 술전 일차 보조 치료를 받은 환자를 제외한 110명을 대상으로 새로운 예후 인자로 알려진 Sialyl-Tn 항원을 면역 조직 화학적 방법으로 염색하였다.

전통적인 예후인자인 폐경 유무, 림프절 전이 수 및 종양의 크기 외에도 에스트로겐/프로게스테론 수용체 유무, 병기, 병리학적 등급, DNA ploidy, S-phase fraction 등의 차이에 따른 STn 항원의 발현 빈도와와의 연관성을 분석하였다. 연구결과 전체 STn 항원의 발현율은 38.2% (42/110)였으며, STn 항원의 발현은 전이된 림프절의 갯수와 관련($p<0.05$)이 있으나 원발 병소의 크기와 병기와는 통계학적 의미가 없었다($p>0.05$).

참고문헌

- 1) Itzkowitz SH, Yuan M, Montgomery CK, et al: Expression of Tn, sialosyl Tn and T antigens in human colon cancer. *Cancer Res* 49:197-204, 1989
- 2) Kakeji Y, Maehara Y, Morita M, et al: Correlation

- between sialyl-Tn antigens and lymphatic metastasis in patients with Borrmann type IV gastric carcinoma. *Br J Cancer* 71:191-195, 1995
- 3) Hakomori SI: Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingoglycolipid metabolism. *Cancer Res* 56:5309-5318, 1996
- 4) Itzkowitz SH, Bloom EJ, Kokal WA, et al: Sialosyl-Tn: A novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients. *Cancer* 66:1960-1966, 1990
- 5) Kobayashi H, Terao T, Kawashima Y: Serum sialyl Tn as an independent predictor of poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 10:95-101, 1992
- 6) Hanisch FG, Uhlenbruck G, Egge H, et al: A B72.3 second generation monoclonal Ab (CC49) defines the mucin-carried carbohydrate epitope Gal β (1 \rightarrow 3)[NeuAc α (2 \rightarrow 6)]GalNAc. *J Biol Chem* 370:21-26, 1989
- 7) Jentoff N: Why are proteins O-glycosylated?: *Trends Biochem Sci* 15:291-294, 1990
- 8) Parry G, Beck JC, Moss L, et al: Determination of apical membrane polarity in mammary epithelial cell cultures: the role of cell-cell, cell-substratum and membrane-cytoskeleton interaction. *Exp Cell Res* 188:302-311, 1990
- 9) Wong RCK, Remold-O' Donnell E, Vercelli D, et al: Signal transduction via leukocyte antigens CD43 (sialophorin): Feedback regulation by protein kinase C. *J Immunol* 144:455-460, 1990
- 10) Codington JF, Finn DM: Cell-surface macromolecular and morphological changes related to allotransplantability in the TA3 tumor. Nowtony A (ed) *Biomembranes*, Plenum press, New York, 1983, pp207-242
- 11) Fung PYS, Longenecker BM: Specific immunosuppressive activity of epiglycanin, a mucin-like glycoprotein secreted by a murine mammary adenocarcinoma (TA3-Ha). *Cancer Res* 51:1170-1176, 1991
- 12) Zhuang D, Yosefi S, Dennis JW: Tn antigen and UDP-Gal: GalNAc α -R β -3galactosyl-transferase ex-

- pression in human breast cancer. *Cancer Biochem Biophys* 12:185-198, 1991
- 13) Springer GF: T and Tn, general carcinoma auto-antigens. *Science* 224:1198-1206, 1984
- 14) Kjeldsen T, Clausen H, Hironhashi S, et al: Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed to the tumor-associated O-linked sialosyl 2-6- α -N-acetylgalactosaminyl (sialosyl Tn) epitope. *Cancer Res* 48:2214-2220, 1988
- 15) Price MR, Clarke AJ, Robertson JFR, et al: Detection of polymorphic epithelial mucins in the serum of systemic breast cancer patients using the monoclonal antibody, NCRC-11. *Cancer Immunol Immunother* 31:269-272, 1990
- 16) Brooks SA, Leatham AJC: Prediction of lymph node involvement in breast cancer by detection of altered glycosylation in the primary tumor. *Lancet* 338:71-74, 1991
- 17) Cho SH, Sahin A, Hortobagyi GN, et al: Sialyl-Tn antigen expression occurs early during human mammary carcinogenesis and is associated with high nuclear grade and aneuploidy. *Cancer Res* 54:6302-6305, 1994
- 18) David L, Nesland JM, Clausen H, et al: Simple mucin-type carbohydrate antigens (Tn, Sialosyl-Tn and T) in gastric mucosa, carcinomas and metastasis. *APMIS* 100(Suppl. 27):162-172, 1992
- 19) Miles DW, Happerfield LC, Smith P, et al: Expression of sialyl-Tn predicts the effect of adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer. *Br J Cancer* 70:1272-1275, 1994
- 20) Miles DW, Linehan J, Smith P, et al: Expression of sialyl-Tn in gastric cancer: correlation with known prognostic factors. *Br J Cancer*, 71:1074-1076, 1995
- 21) Reed W, Bryne M, Clausen H, et al: Simple mucins (T, sialosyl-T, Tn and sialosyl-Tn) are not diagnostic for malignant breast lesions. *Anticancer Res* 14:609-616, 1994
- 22) Schmitt FC: Multistep progression from an oestrogen-dependent growth towards an autonomous growth in breast carcinogenesis. *Eur J Cancer* 31A:2049-2052, 1995
- 23) Snead DRJ, Bell JA, Dixon AR, et al: Methodology of immunohistological detection of oestrogen receptor in human breast carcinoma in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue: a comparison with frozen section methodology. *Histopathology* 23:233-238, 1993
- 24) Werther JL, Macmurray SR, Bruckner H, et al: Mucin-associated sialosyl-Tn antigen expression in gastric cancer correlates with an adverse outcome. *Br J Cancer* 69: 613-616, 1994