

## 유방의 침윤성 관암종에서 TGF- $\beta$ 의 발현 및 맥관형성에 관한 면역조직화학적 분석

중앙대학교 의과대학 병리학교실 및 외과학교실\*

이태진 · 조남복 · 박언섭 · 유재형 · 박성준\*

### Immunohistochemical Analysis of TGF- $\beta$ Expression and Angiogenesis in Infiltrating Duct Carcinoma of the Breast

Tae Jin Lee, M.D., Nam Bok Cho, M.D., Eun Sub Park, M.D.,  
Jae Hyung Yoo, M.D. and Sung Jun Park, M.D.\*

Department of Pathology and Surgery\*, Chung-Ang University College of Medicine

Forty cases of infiltrating duct carcinoma of the breast were examined immunohistochemically for expression of TGF- $\beta$  and angiogenesis in order to analyze significant correlation with prognostic parameters including tumor size, axillary lymph node metastasis, clinical stage, histologic grade, estrogen receptor and progesterone receptor status. The TGF- $\beta$  expression was observed in tumors center and advancing edges of tumors. To determine microvessel density for angiogenesis, we stained endothelial cells for Factor VIII related antigen and counted microvessel within tumor. The results were as follows: 1) The strong immunohistochemical expression of TGF- $\beta$  and higher counts of microvessels were observed in advancing edges of tumors ( $p < 0.05$ ). 2) The TGF- $\beta$  expression in the advancing edges of tumors was closely related to clinical stage and presence of axillary lymph node metastasis ( $p < 0.05$ ). 3) The mean microvessel counts were significantly higher in tumors from patients with axillary lymph node metastasis and increased with increasing clinical stage ( $p < 0.05$ ). 4) The TGF- $\beta$  expression was not related to histologic grade, estrogen receptor and progesterone receptor status ( $p > 0.05$ ). Therefore, the results suggested that the TGF- $\beta$  expression and angiogenesis in infiltrating duct carcinoma of the breast may play an important part in prognostic factors, closely related to the lymph node metastasis and clinical stage. (Korean J Pathol 1996; 30: 557 ~ 569)

**Key Words:** Breast, Infiltrating duct carcinoma, TGF- $\beta$ , Angiogenesis, Metastasis, Clinical stage

## 서 론

유방암은 서양 여성에서 가장 많은 악성 종양이며<sup>1</sup>, 우리나라에서도 자궁암, 위암에 이어 세번째로 높은 발생 빈도를 보이고 있다<sup>2</sup>. 유방암은 개인에 따라 그 생존율에서 상당한 차이가 있기 때문에 재발 및 생존율을 정확히 예측할 수 있는 예후 인자들에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 지금까지 종양의 크기, 액와 림프절 전이 상태 등의 병리학적 인자가 가장 중요한 예후 인자로 알려졌고, 그밖에 조직학적인 유형과 악성도의 조직학적 등급, DNA 배수성, PCNA (proliferating cell nuclear antigen), AgNOR (Argyrophilic nucleolar organizer region), thymidine labeling index 등을 이용한 세포 증식능, 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체의 유무 등이 유방암의 생물학적 특성을 판정하는 기준으로 사용되고 있다<sup>3</sup>. 이와 함께 세포의 성장과 분화를 조절하는 성장 인자와 암의 발생 및 진행과의 연관성 및 예후 인자로서의 효용 가능성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>4</sup>. 이 중 TGF(transforming growth factor)는 1978년 DeLarco와 Todaro가 retrovirus에 의해 형질 전환된 섬유모세포 배양시 세포외 배지에서 형질전환을 발현시킬 수 있는 peptide로 발견한 것으로<sup>5</sup>, 그 인자는 두 개의 polypeptide 즉 7KDa의 단일 사슬로 표피 성장 수용체에 반응하는 TGF- $\alpha$ 와 독특한 수용체에 반응하는 25KDa의 분자량을 가지는 동일 이합체로 구성되어 있는 TGF- $\beta$ 로 분류된다<sup>6</sup>. TGF- $\beta$ 의 역할은 세포의 형질 전환 뿐만 아니라 발암과 배형성 및 면역반응, 맥관형성, 세포외기질의 형성에 관여한다고 알려졌고 생물학적인 활성도는 세포의 종류와 세포 분화의 정도 및 다른 성장 인자의 유무에 따라 다르게 나타난다고 하였다<sup>4</sup>. 또 TGF- $\beta$ 는 세포의 종류나 실험 조건에 따라 세포의 성장을 촉진시키거나 저해하며<sup>6</sup>, 정상과 암세포 모두에서 발현되는 것으로 보고되고 있다<sup>7,8</sup>. TGF- $\beta$ 는 유방과 다른 종류의 상피에서 증식의 중요한 조절 인자로 알려져 있지만 대부분의 연구에서는 정상과 암세포의 성장을 억제하는 것으로 알려졌다<sup>9,10</sup>. 반면 암종의 침윤과 전이를 결정하는 인자로 추정된다는 보고도 많이 나오고 있다<sup>11,12,13</sup>. Rosemary등<sup>11</sup>은 원발성 종양에서 TGF- $\beta$ 의 염색성과 림프절 전이 사이에 연관성이 있다는 연구결과를 발표하면서 원발성 유방암에서는 TGF- $\beta$ 가 성장의 조절보다는 침윤에 역할을 한다고 보고하였으며, Bakul등<sup>12</sup>은 유방암 조직의 중심부 보다 진행성 변연부에서 분비형 TGF- $\beta$ 가

많이 존재하고 있으며 임파절에 전이된 암세포에서도 분비형 TGF- $\beta$ 가 높은 증가를 보였다고 보고하고 있어 유방암에서의 TGF- $\beta$ 의 역할에 대해서는 계속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

한편, 원발성 종양과 전이성 집락의 성장에 맥관형성이 중요한 역할을 한다는 것이 알려졌으며<sup>14</sup> 몇 가지의 맥관형성인자가 분리되었는데 거기에는 angiogenin, angiotropin, EGF(epidermal growth factor), fibrin, HBGW(heparin-binding growth factor), lipid-derived angiogenic factor, nicotinamide, PD-ECGF(platelet-derived endothelial cell growth factor), TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , VEGF(vascular endothelial growth factor), TNF- $\alpha$  등이 증명되었다<sup>15</sup>. 그 중 TGF- $\beta$ 는 in vitro 에서 혈관 내피 세포의 증식을 억제하는 것으로 알려졌지만 in vivo에서는 새로운 모세 혈관의 형성을 증가시키는 것으로 보고되었다<sup>16</sup>. 실제적으로 맥관형성의 영향에 의한 신혈관의 증가를 Factor VIII related antigen을 이용한 면역조직화학적 방법으로 수치화함으로써 맥관형성과 전이와의 연관성에 대한 연구가 유방암<sup>14</sup>과 전립선암<sup>17</sup>등에서 실시되고 있다.

본 연구에서는 유방암 조직에서 TGF- $\beta$ 에 대한 면역조직화학적 염색을 실시하여 TGF- $\beta$ 의 부위별 발현 양상을 점수화하여 유방암의 크기, 액와 림프절 전이상태 및 임상적병기, 조직학적 등급, 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체 상태에 따라 비교 분석함으로써 TGF- $\beta$ 의 발현과 유방암의 각 예후 인자의 상관 관계를 밝히고자 하였다. 또한 Factor VIII related antigen의 면역조직화학적 염색을 실시하고 맥관형성을 수치화하여 유방암의 각 예후 인자 및 TGF- $\beta$ 의 발현과 비교하여 보았다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

1987년 1월부터 1995년 2월까지 중앙대학교 부속 병원에서 세침흡인세포검사 혹은 절제 생검으로 진단을 받고 변형 근치 유방절제술 및 액와 림프절 절제술을 시행받은 침윤성 관암종 환자 중에서 40예를 선택하여 대상으로 하였다.

### 2. 방 법

- 1) 임상 기록 재검토: 연구 대상 환자들의 임상 기록과 병리 보고서 등을 재검토하여 연령, 임상적 병기 및 수술후의 병의 진행 과정등을 조사하였다.
- 2) 병리조직학적검색: 육안 검사는 통상적으로 절단면에서 종양의 크기를 측정하고 절제된 액와부

지방 조직에서 림프절을 찾았으며 10% 포르말린에 고정 후 통상 H&E 염색을 하여 조직학적인 진단과 전이된 림프절 수를 세었다. 조직학적인 등급은 Bloom과 Richardson의 기준에 따랐다<sup>18</sup>.

- ① 세관 형성의 결여를 기준으로한 역분화: 1 to 3
- ② 핵의 크기, 모양 및 염색성의 변화: 1 to 3
- ③ 과염색성과 유사 분열의 빈도: 1 to 3

으로 구분하여 총 점수가 3,4,5는 I 등급, 6,7은 II 등급, 8,9는 III등급으로 구분 하였다.

**3) 면역조직화학적 염색 및 판독:**

**(1) TGF-β:**

① 일차 항체: Santa Cruz Biochemistry(TGF-β2(V) : Cat#SC-90)사에서 공급된 것으로 사람에서 추출한 TGF-β를 토끼에 면역시켜 얻은 polyclonal rabbit antibody를 1:50으로 희석하여 사용하였다.

② 면역조직화학적 염색: 조직 절편을 항온기에 58~60°C로 30분 가온 후 실온에서 탈파라핀화와 탈수를 시켰다. 내인성 과산화효소의 활성을 억제시키기 위해 3% 과산화수소수를 사용하여 30분간 처리 후 tris 완충용액(tris 0.05M, PH7.6)에 씻고 protein blocking agent를 가한 후 실온에서 1 시간동안 반응 시켰다. 일차 항체를 1:50으로 희석하여 가한 후 실온에서 12시간 동안 반응시키고 다시 tris 완충 용액에 씻었다. 이차항체를 가하고 tris완충용액으로 씻고 peroxidase reagent를 가한후 다시 tris 완충용액으로 씻고 AEC(3-amino-9-ethyl-carbazole in N, N-dimethyl formide)를 가하여 발색반응을 확인한 후 Mayer hematoxyline으로 대조 염색을 하여 흐르는 물에 씻은 후 Glycerol mounting medium 으로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

③ 염색결과의 판정: 유방암종에서의 TGF-β의 발현과 주위 조직과 연관성이 있는 부분에서의 TGF-β의 발현을 비교하기 위해 암종의 중심부(tumor center)와 진행성 변연부(advancing edge)로 나누어 염색성을 비교 하였다. 반정량적 분석을 위하여 저배율 시야에서 염색정도가 비교적 높은 부위 10 곳을 선택하여 염색강도(intensity)를 0에서 3까지 4 단계로 나누어 그 평균치를 구하였다. 또한 각 부위에서 100개 내지 200개의 세포를 세어 양성세포의 비율을 구하였고 염색강도 × 양성세포의 비율로 염색지수(staining index)를 구하여 비교 분석 하였다<sup>7,28,29</sup>.

**(2) Factor VIII-related antigen:**

① 일차항체: Dako(Rabbit anti-human Factor VIII related antigen, Code No: L1809)사에서 공급된 것으로 인간의 혈장에서 추출된 factor VIII-related antigen을 토끼에 면역시켜 얻은 anti-rabbit monoclonal antibody

를 사용하였다.

② 염색 및 판정: 면역조직화학적 염색은 TGF-β와 같은 방법으로 실시하였으며 결과의 판정 역시 종양의 중심부와 진행성 변연부로 구분하여 비교 분석 하였다. TGF-β의 발현을 관찰한 10개의 시야 중에서 비교적 혈관 분포가 많은 부위 3곳을 선정하여 200배 시야에서 미세혈관의 수를 세어 그 평균치를 구하였다. 적혈구보다 대략 8배 이상 크거나 두꺼운 근육안에 있는 혈관과 경화성 부위에 있는 혈관은 제외하였으며 단일 내피세포나 내피세포의 집락은 내강의 유무에 관계없이 포함 시켰다<sup>35</sup>.

(3) 에스트로겐 수용체와 프로게스테론 수용체: TGF-β와 Factor VIII-related antigen과 같은 전단계 처리를 거친 후 생쥐에서 만든 항인체 ER monoclonal 항체(Dako사, Code No: M7047)와 PR monoclonal 항체(Immunotech사, Code No: 1408)를 각각의 조직절편에 가하고 18시간 동안 반응 시킨 후 위와 같은 방법으로 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 염색 결과의 판정은 염색정도에 따른 구분없이 연분홍색의 색소 침착이 핵에 나타나면 양성으로 그 이외에는 모두 음성으로 판정하였다.

4) 통계학적분석(statistical analysis): 각 지수는 평균±표준편차로 표기하였으며 통계학적 처리는SPSS 통계 프로그램을 이용하여 ANOVA, t-test를 실시하여 p값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 의미가 있는 것으로 판정하였다.

**결 과**

**1. 임상소견**

연령 분포는 22세에서 72세까지로서 평균 50.3세였고 40~50대가 67%를 차지하였다. 1995년 3월까지 추적조사한 결과 4예에서 수술 후 20~53개월에

**Table 1.** Stage according to tumor size and lymph node status

Stage	Tumor size (cm)	Lymph node status
I	< 2	(-)
IIA	2-5	(-)
	< 2	(+)
IIB	> 5	(-)
	2-5	(+)
III	> 5	(+)

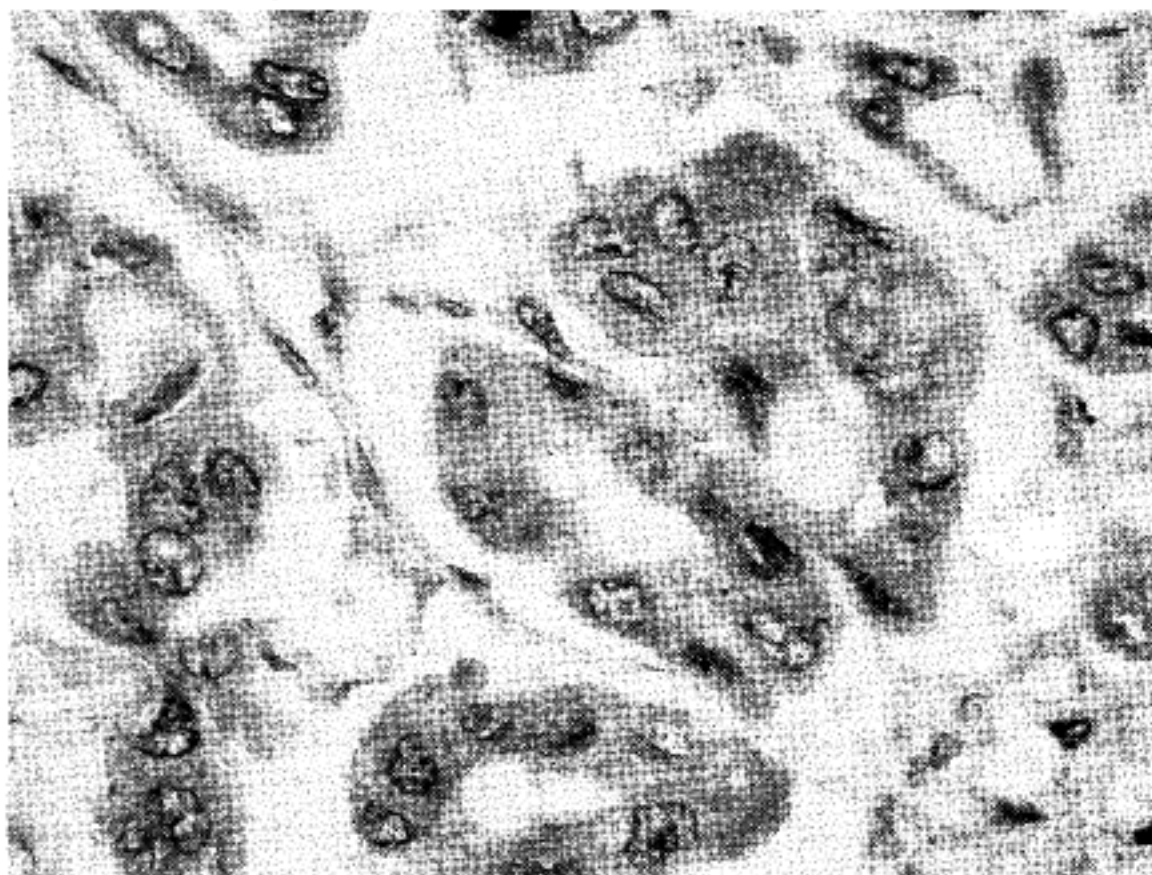


Fig. 1. The strong positivity of TGF-β is seen in the neoplastic ductal epithelium.

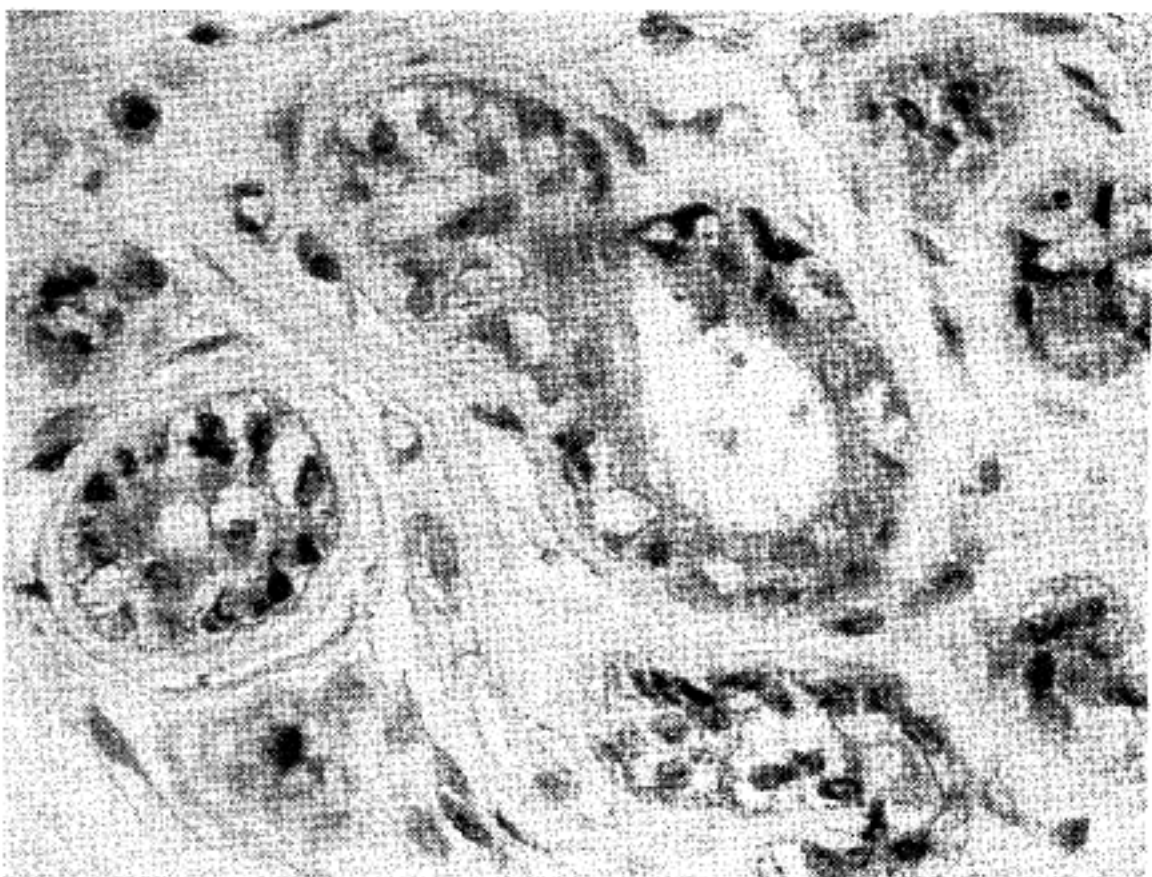


Fig. 2. The weak positivity of TGF-β is seen in the normal ductal epithelium.

배와 간에 원위성 전이가 발생하였고 간에 전이가 발생한 1예는 수술 53개월 후에 사망하였다. 이상의 원위성 전이가 일어난 예의 유방암의 병기 모두 IIB 이상이었고 ER-/PR-이었다.

## 2. 병리학적 검색

병기는 육안적인 검색에 의한 종양의 크기와 액

와 림프절 전이 유무에 따라 분류하였다(Table 1) 액와 림프절 전이를 동반하면서 종양의 크기가 2~5 cm인 stage IIB 군이 19예로 전체의 48%를 차지하였고 종양의 조직학적인 등급은 grade II가 28(70%)로 가장 많았다(Table 2).



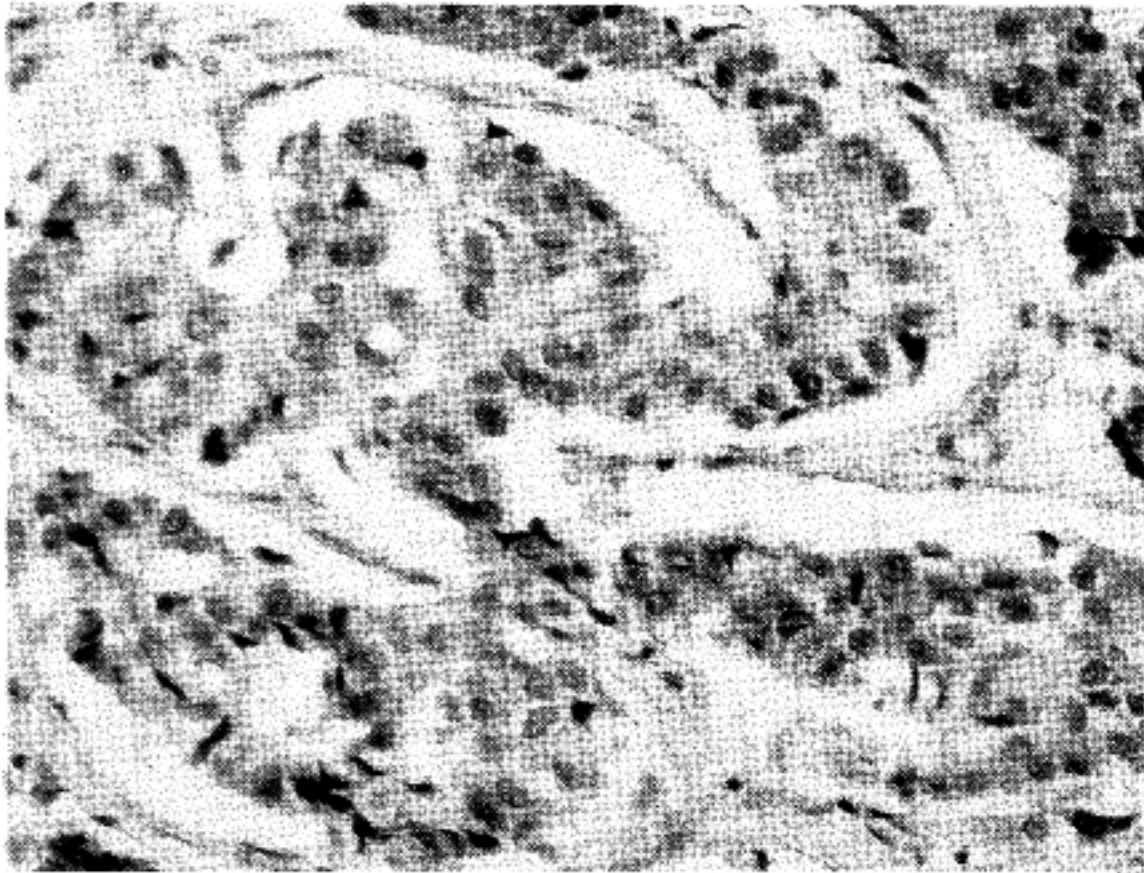


Fig. 3. The intermediate positivity of TGF- $\beta$  is seen in the infiltrating duct carcinoma with metastasis of axillary lymph node at the tumor center.

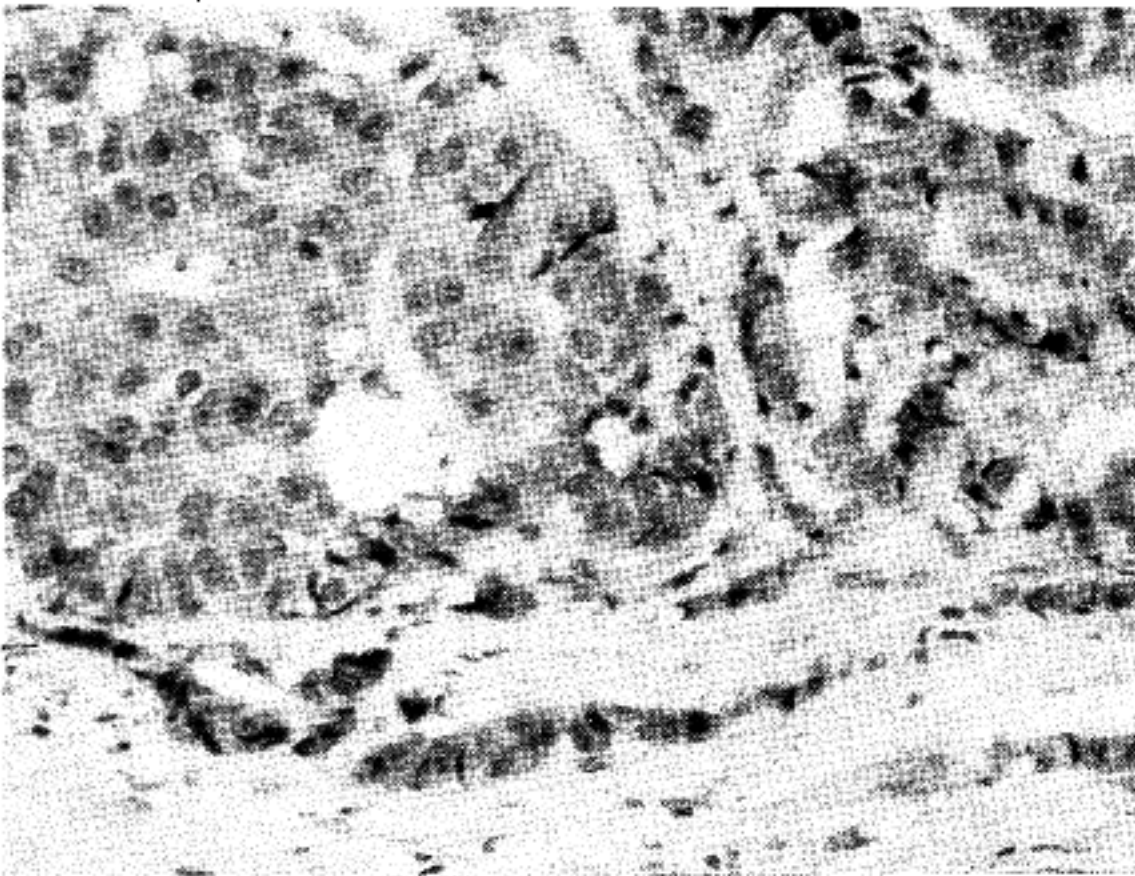


Fig. 4. The intermediate positivity of TGF- $\beta$  is seen in the infiltrating duct carcinoma with metastasis of axillary lymph node at the advancing edge.

### 3. 면역조직화학적 염색의 결과

#### 1) TGF- $\beta$ 의 염색 결과

(1) 전반적인 TGF- $\beta$ 의 염색성: 대부분의 종양세포에서 미만성으로 양성반응을 보였고(Fig. 1) 종양의 중심부 보다는 종양의 진행성 변연부에서 더 강한

양성반응을 보였다(Table 2, Fig. 5 & 6). 종양 주위의 정상 관상피에도 미만성으로 악양성 내지 중등도의 양성반응을 보였다(Fig. 2). 양성인 세포들은 주로 세포질에 갈색의 과립으로 관찰되었고 드물게 핵내에도 갈색의 과립이 관찰되었다.

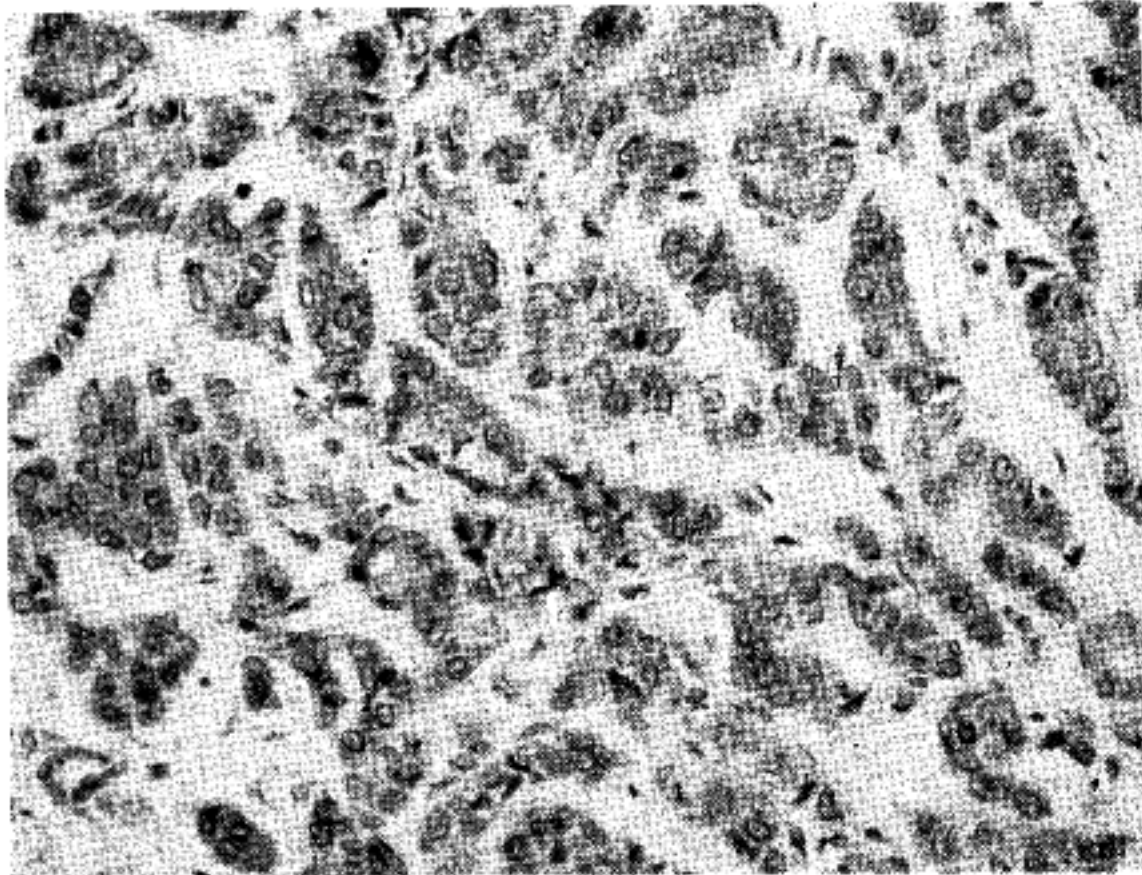


Fig. 5. The intermediate positivity of TGF-β is seen in the infiltrating duct carcinoma with metastasis of axillary lymph node at the tumor center.

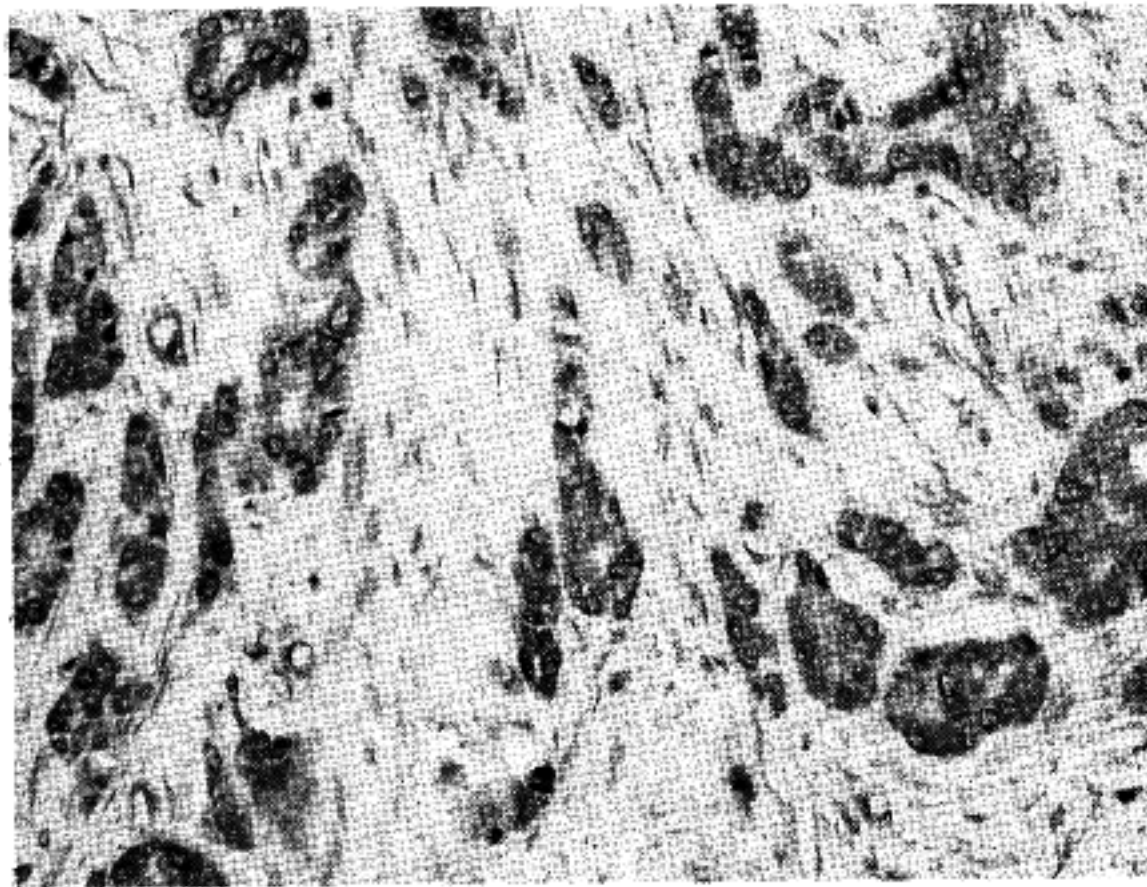


Fig. 6. The strong positivity of TGF-β is seen in the infiltrating duct carcinoma with metastasis of axillary lymph node at the advancing edge.

(2) 종양의 크기에 따른 비교: 종양의 중심부에서 종양의 크기가 2~5 cm인 군과 5 cm 이상인 군의 염색강도, 양성세포의 비율, 염색지수가 2 cm이하인 군 보다 높았지만 통계학적인 의미는 없었다. 종양의 진행성 변연부에서는 염색지수가 종양의 크기에 따라 통계학적으로 의미있게 증가하였다( $p < 0.05$ , Table

3).

(3) 액와 림프절 전이 유무에 따른 비교: 종양의 중심부에서는 액와 림프절 전이가 있는 군이 전이가 없는 군에 비해 염색강도, 양성세포의 비율, 염색지수가 차이가 없었지만 종양의 진행성 변연부에서는 염색강도와 염색지수가 액와 림프절 전이가

있는 군에서 통계학적으로 의미 있게 높았다(p<0.05, Table 3, Fig 4 & 6).

(4) 병기에 따른 비교: 종양의 중심부의 염색정도는 통계학적으로 의미가 없었지만 종양의 진행성 변연부에서는 염색지수가 병기가 높아질 수록 통계학적으로 의미있게 증가하였다(p<0.05, Table 3).

(5) 조직학적인 등급에 따른 비교: 조직학적인 등급에 따른 염색지수의 차이는 나타나지 않았다(p>0.05).

(6) 에스트로겐 수용체와 프로게스테론 수용체 상태에 따른 비교: ER-/PR+일때 TGF-β 염색지수가 가장 높았고 PR을 고려하지 않고 ER 상태 만으로 비교하였을 때는 ER-일때가 염색지수가 높았지만 통계학적인 의미는 없었다(p>0.05, Table 4).

**Table 2.** Staining index of TGF-β in the tumor center and advancing edge

	Intensity	Positive proportion	Staining index
tumor center	1.63 ± 0.63	72.38 ± 15.36	1.23 ± 0.65
advancing edge	2.35 ± 0.70*	82.63 ± 12.86*	2.01 ± 0.76*

\*p<0.05 : compared with tumor center

**Table 4.** Association between TGF-β staining index and ER/PR status

	Staining index		
	No	Tumor center	Advancing edge
ER (+) PR (+)	13	1.32 ± 0.64	1.77 ± 0.78
ER (+) PR (-)	16	1.27 ± 0.78	2.03 ± 0.34
ER (-) PR (+)	3	1.25 ± 0.64	2.07 ± 0.00
ER (-) PR (-)	9	1.05 ± 0.46	2.14 ± 0.88
ER (+)	29	1.29 ± 0.71	1.91 ± 0.74
ER (-)	11	1.05 ± 0.46	2.24 ± 0.81

p>0.05

**Table 3.** Association between TGF-β staining index and other prognostic parameters

	No.	Staining index			
		Tumor center	P-value	Advancing edge	P-value
Tumor size (cm)			NS		0.013
< 2	2	0.45 ± 0.08		0.93 ± 0.67	
2-5	30	1.28 ± 0.69		1.93 ± 0.74	
> 5	8	1.23 ± 0.50		2.54 ± 0.49	
Lymph node metastasis			NS		0.010
(-)	13	1.08 ± 1.30		1.57 ± 0.89	
(+)	27	1.30 ± 0.71		2.21 ± 0.60	
Stage			NS		0.001
I	2	0.45 ± 0.00		0.92 ± 0.67	
IIA	11	1.17 ± 0.45		1.57 ± 0.81	
IIB	20	1.37 ± 0.79		2.18 ± 0.62	
III	7	1.13 ± 0.46		2.49 ± 0.51	
Histologic grade			NS		NS
I	7	1.32 ± 0.73		2.11 ± 0.85	
II	28	1.24 ± 0.58		2.01 ± 0.75	
III	5	1.03 ± 1.02		1.82 ± 1.86	

NS : not significant



Table 5. Association between microvessel counts and other prognostic parameters

	No.	Microvessel counts ( per $\times 200$ field )			
		Tumor center	P-value	Advancing edge	P-value
Mean	40	50.70 $\pm$ 23.34		62.28 $\pm$ 27.76 <sup>*</sup>	
Tumor size (cm)			NS		NS
< 2	2	28.50 $\pm$ 4.95		34.50 $\pm$ 6.36	
2-5	30	51.23 $\pm$ 23.97		62.80 $\pm$ 29.24	
> 5	8	54.25 $\pm$ 22.21		67.25 $\pm$ 22.27	
Lymph node metastasis			0.01		0.01
(-)	13	33.38 $\pm$ 16.16		39.15 $\pm$ 16.94	
(+)	27	59.03 $\pm$ 21.78		73.40 $\pm$ 25.05	
Stage			NS		0.02
I	2	28.50 $\pm$ 4.95		34.50 $\pm$ 6.36	
IIA	11	30.64 $\pm$ 14.32		35.73 $\pm$ 14.38	
IIB	20	63.25 $\pm$ 19.54		78.30 $\pm$ 22.95	
III	7	75.71 $\pm$ 23.53		85.14 $\pm$ 23.81	
Histologic grade			NS		NS
I	7	45.86 $\pm$ 31.05		56.43 $\pm$ 30.17	
II	8	52.00 $\pm$ 22.55		64.50 $\pm$ 30.17	
III	5	50.20 $\pm$ 19.46		58.00 $\pm$ 22.51	

<sup>\*</sup>p<0.05: compared with tumor center

NS: not significant

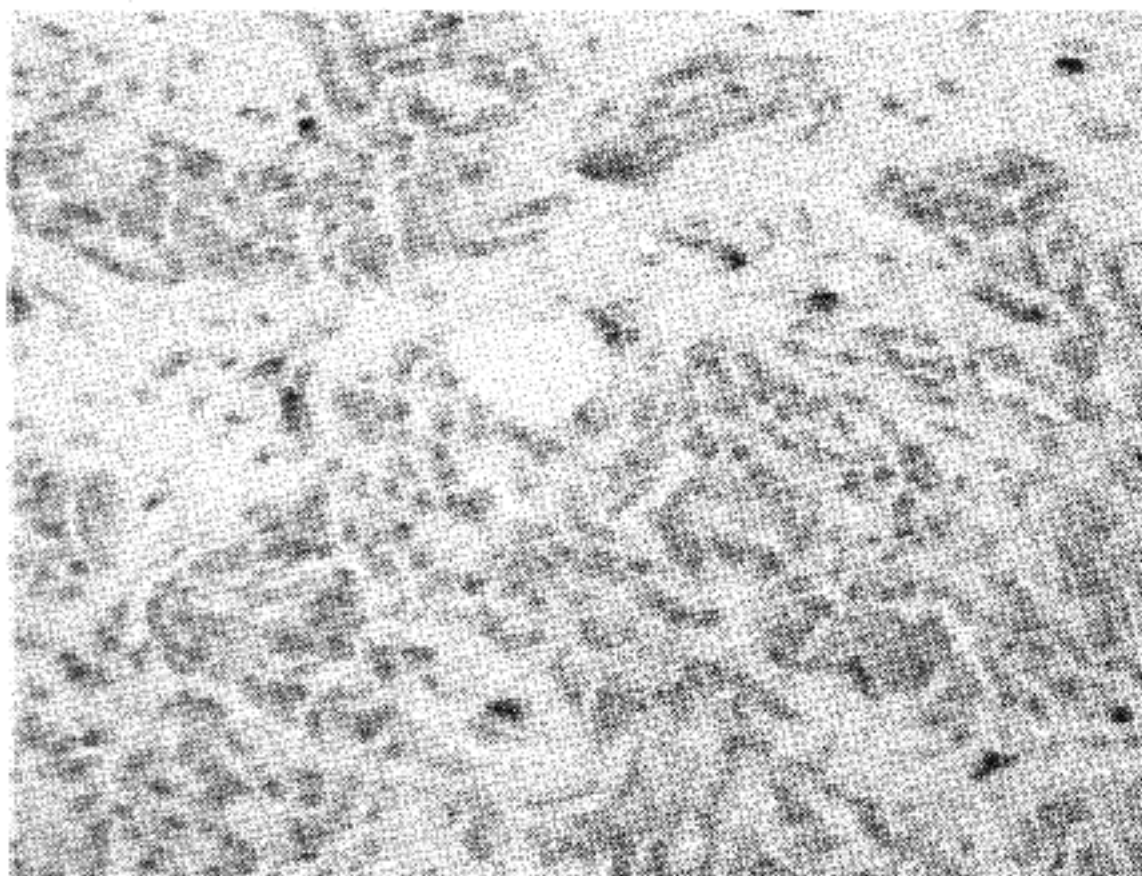


Fig. 7. Immunoperoxidase staining for Factor VIII related antigen in the infiltrating duct carcinoma without metastasis of axillary lymph node shows low density of microvessels at the tumor center.



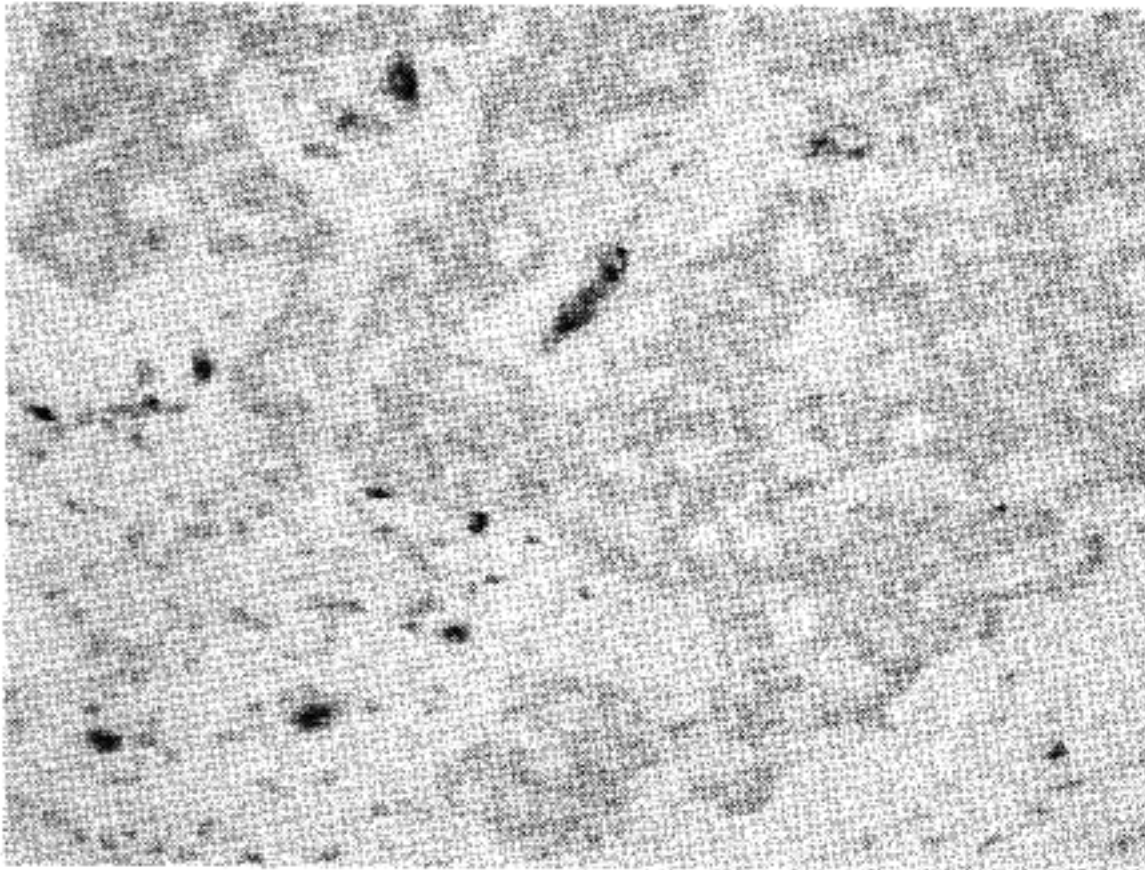


Fig. 8. Immunoperoxidase staining for Factor VIII related antigen in the infiltrating duct carcinoma without metastasis of axillary lymph node shows low density of microvessels at the advancing edge.

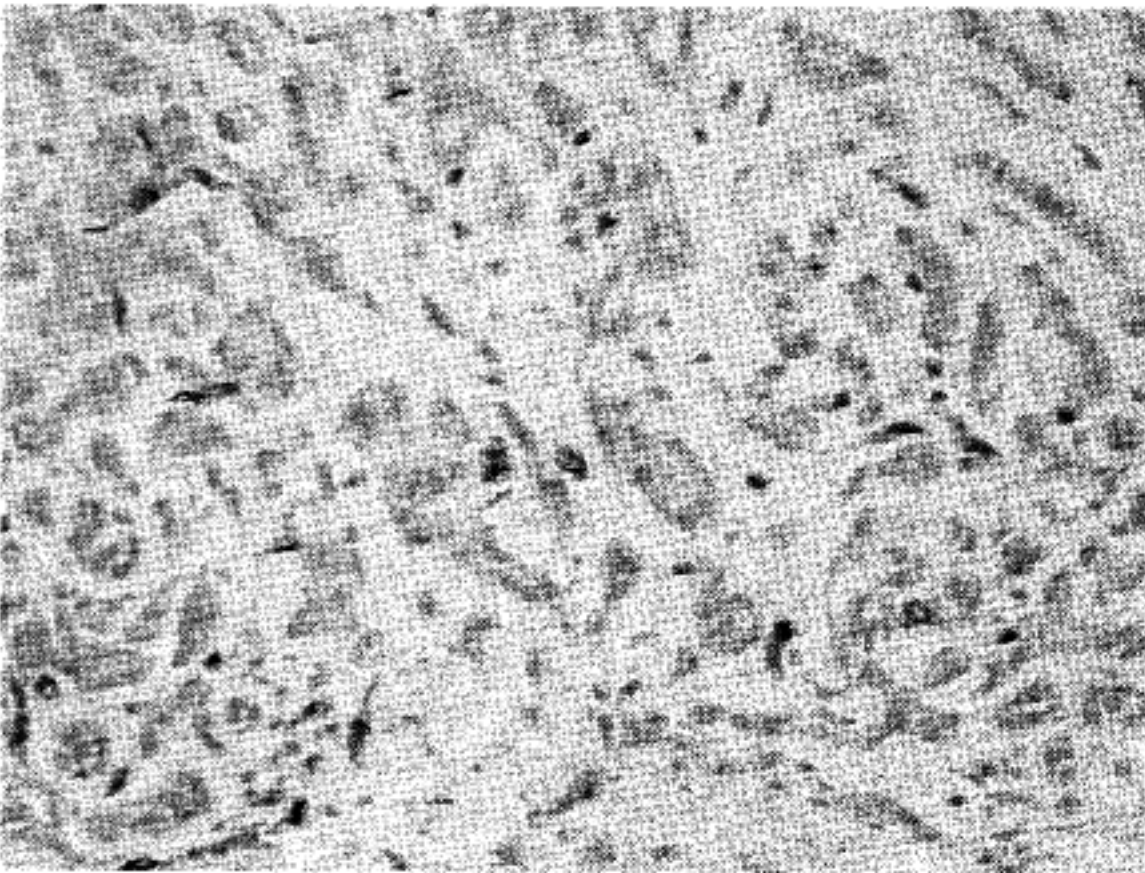


Fig. 9. Immunoperoxidase staining for Factor VIII related antigen in the infiltrating duct carcinoma with metastasis of axillary lymph node shows high density of microvessels at the tumor center.

2) Factor VIII-related antigen으로 염색된 미세혈관의 수: 200배 시야에서 미세혈관의 수는 종양의 진행성 변연부가 중심부보다 통계학적으로 의미있게 많았으며( $p < 0.05$ , Table 5) 종양의 크기, 조직학적인 등급에 따른 유의성은 없었다( $p > 0.05$ , Table 5). 액와 림프절 전이가 있는 군에서는 전이가 없는 군

에 비해 미세혈관의 수가 통계학적으로 의미있게 높았으며 병기와도 유의성이 있었다( $p < 0.05$ , Table 5, Fig. 7~10).

#### 고 찰

세포 종류와 배양 조건에 따라 세포의 성장에 다

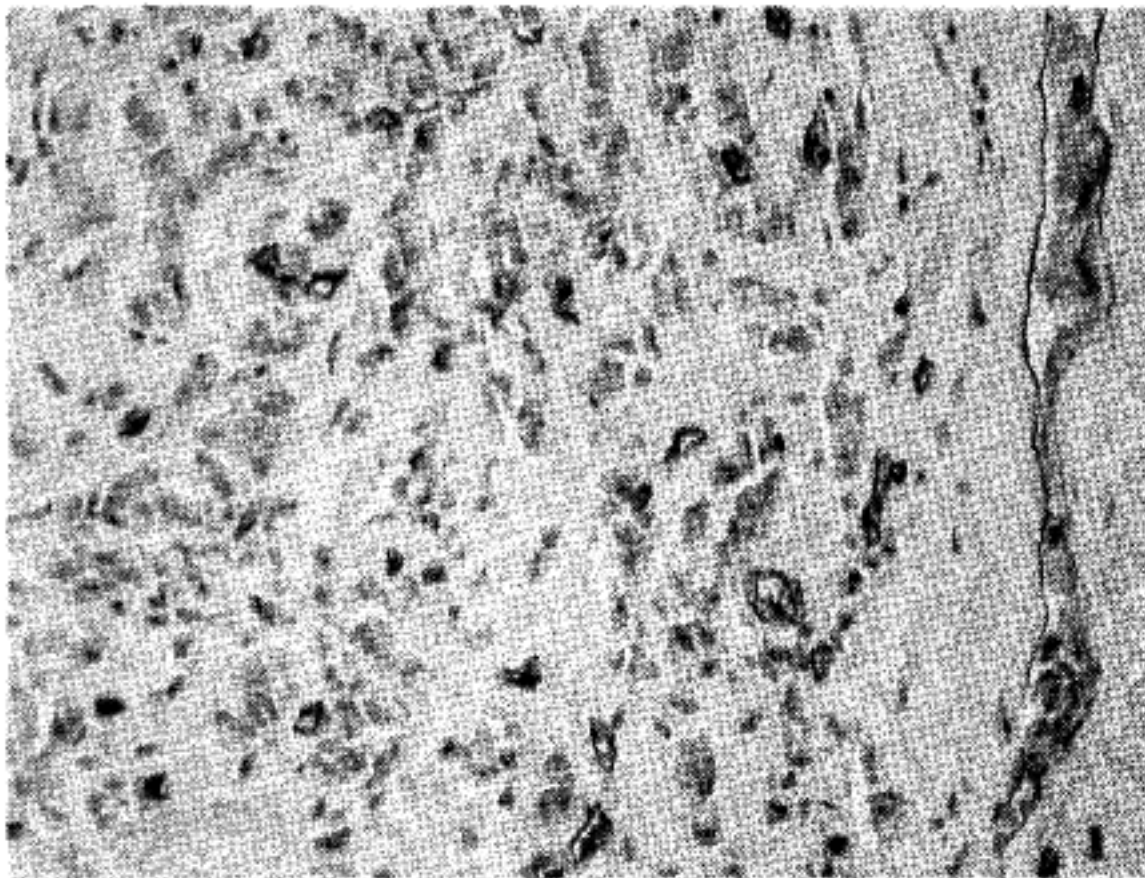


Fig. 10. Immunoperoxidase staining for Factor VIII related antigen in the infiltrating duct carcinoma with metastasis of axillary lymph node shows high density of microvessels at the advancing edge.

양한 영향을 미치는 것으로 알려진 TGF- $\beta$ 군에는 TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3,  $\beta$ 4,  $\beta$ 5의 유전자가 있으며<sup>9</sup>, TGF- $\beta$ 1과 TGF- $\beta$ 2는 포유류에서 TGF- $\beta$ 3는 포유류와 조류에서 TGF- $\beta$ 4와 TGF- $\beta$ 5는 조류와 양서류에서 각각 동정되었다. TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3의 유전자는 인간에서 염색체 19, 11, 14 번에 각각 존재함이 알려졌고 TGF- $\beta$ 2와 TGF- $\beta$ 3의 유전자는 TGF- $\beta$ 1과 대략 80% 정도의 유전자를 공유하고 있으며 TGF- $\beta$ 3는 TGF- $\beta$ 2와 72%의 유전자를 공유하고 있다. TGF- $\beta$ 는 비활성화된 형태로 세포에서 분비되며 몇가지의 물리화학적 작용이 비활성화된 TGF- $\beta$ 를 활성화시켜 수용체에 결합시킨다. In vivo에서는 일시적인 산성화(PH4 이하) 혹은 알칼리화(PH9 이상), sodium dodecyl sulfate, urea의 작용이 활성화에 관여하지만 in vitro에서는 정확히 알려지지 않았다<sup>6</sup>. 모든 정상 세포와 대부분의 암세포들은 TGF- $\beta$ 를 위한 세포 표면 막수용체나 결합단백질을 갖는다<sup>19,20</sup>. 세계의 서로 다른 TGF- $\beta$ 에 대한 당화 수용체 즉, type I (50~80 KDa), type II (115~140 KDa), type III (280~330 KDa)가 동정되었다<sup>20</sup>. TGF- $\beta$ 는 암의 발생과 진행에 관여한다고 알려졌는데 여기에는 증식과 분화과정, 기질단백질의 조절과 세포부착에 관여하는 integrin의 합성<sup>21,22,23</sup>, 면역반응의 조절<sup>24</sup>, 침윤과 운동성의 조절<sup>25</sup>, 전이<sup>11</sup> 등이 포함된다. TGF- $\beta$ 와 암과의 관계에 대한 연구는 유방암에서 많이 이루어졌으며 수막종<sup>26</sup>, 망막세포종<sup>27</sup>, 갑상선종<sup>28</sup> 및 위암<sup>5</sup>등에서 보고되었다.

Johnson 등<sup>26</sup>은 수막종을 염색하여 TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 모두가 발현됨을 보고하였고, Kimh 등<sup>27</sup>은 망막세포종에서 TGF- $\beta$ 가 암을 유발한다고 하였다. Jasani 등<sup>28</sup>도 갑상선에서의 면역조직화학적 염색을 통해 정상 갑상선 상피세포와 양성종양에서는 TGF- $\beta$ 가 발현 안 되지만 악성종양에서는 발현된다고 보고하였다. 이와 함께 follicular carcinoma 군과 minimal invasive cancer 보다 widely invasive carcinoma 에서 높은 발현 빈도를 보였지만 전체적으로 분화의 정도 및 임상적 병기와 TGF- $\beta$ 의 발현 사이에 유의성은 없다고 하였다. 유방암에서 Arteaga 등<sup>29</sup>은 TGF- $\beta$ 가 종양세포의 증식을 촉진 시키고 종양세포의 단백질 분해능을 증진시킴으로써 전이에 역할을 한다고 보고하였다. 또한 주위 조직에 영향을 주어 면역억제와 맥관 증식, 결합조직형성, 세포주위의 단백질 분해를 촉진시켜 암세포의 성장을 돕는다고 하였다. 본 연구에서 종양의 중심부보다는 진행성 변연부에서 염색강도, 양성세포의 백분율, 염색지수가 의미있게 높은 점으로( $p < 0.05$ , Table 2) TGF- $\beta$ 가 종양의 침윤성에 관여할 것으로 생각한다. 이와함께 종양의 크기에 따른 비교에서 종양의 중심부에서는 종양의 크기 증가에 따른 TGF- $\beta$ 의 염색지수에 통계학적인 의미가 없었지만 종양의 진행성 변연부에서는 TGF- $\beta$ 의 염색지수가 종양의 크기가 클수록 의미있게 증가하여 TGF- $\beta$ 는 원발성 유방암에서는 성장의 조절에도 관여함을 시사한다고 생각했다. 또한 액와 림

프절 전이가 있는 군에서 염색지수가 통계학적으로 의미있게 높아 TGF- $\beta$ 가 종양의 침윤성과 함께 전이에도 관여함을 알 수 있었다( $p < 0.05$ , Table 3).

한편, 본 연구에서는 에스트로겐 수용체 및 프로게스테론 수용체 상태와 TGF- $\beta$ 의 발현 사이에 통계학적인 유의성은 발견을 할 수 없었다. 다만 ER 음성군에서 ER 양성군 보다 염색지수의 평균이 높았다. 에스트로겐 수용체와 프로게스테론 수용체는 유방조직과 같이 에스트로겐과 프로게스테론에 의해 그 성장이 조절되는 세포의 세포질내에 존재하는 단백질성분으로 에스트로겐 수용체 및 프로게스테론 수용체와 결합하고 그것이 핵내로 이동하여 표적 유전자의 전사를 유도하며, 그 결과 생긴 단백질이 DNA합성과 세포성장을 조절하는데 관여하여 발암 기전에 중요한 역할을 한다고 한다. 에스트로겐 수용체는 유방암 환자의 50% 이상에서 양성을 보이며 에스트로겐 수용체양성인 환자는 재발이 적고 생존율이 높은 것으로 알려졌다<sup>30</sup>. 이렇게 호르몬의 영향을 받는 유방조직에서 TGF- $\beta$ 는 호르몬의 영향을 피하게 하고 혈관생성의 증가와 결체조직의 형성, 종양과 인접한 섬유모세포의 암세포 성장을 촉진시키는 활성도를 자극하고, 종양세포의 단백질 분해능을 촉진시킨다고 한다<sup>29</sup>. 한편 호르몬 의존성 유방암에서 estradiol은 TGF- $\beta$ 2 와 TGF- $\beta$ 3 mRNA 수준을 감소시키는 것으로 보고되고 있으며 antiestrogen Tamoxifen은 세포에서 분비되는 TGF- $\beta$ 의 활성도를 증가시킨다고 한다<sup>31</sup>. 이와 함께 호르몬 비의존성 유방암 세포에서도 TGF- $\beta$ 가 negative autocrine pathway에 역할을 하는 것으로 알려져 호르몬의 영향을 받는 유방암의 세포증식에서 TGF- $\beta$ 의 생물학적인 의미에 대해서는 계속적인 연구가 요구된다<sup>29</sup>. Bryan 등<sup>32</sup>은 원시 중간엽이나 신경외배엽에서 기원하는 신경모세포종, 유잉육종, 횡문근육종, 원시 신경외배엽성 종양등의 소아에서 발생하는 소세포 암종에서의 TGF- $\beta$  발현을 보고하면서 TGF- $\beta$  isoform에 차이가 있음을 보고하였다. 유방암에서 최근 TGF- $\beta$ 의 mRNA isoform에 대한 연구에 의하면 모든 isoform 발현과 림프절 상태에 대한 의미있는 연관성이 있기는 하지만 세가지 모두의 isoform이 발현되는 암종의 대부분에서는 림프절 전이가 있었던 반면 한개 이상의 isoform 이라도 발현이 안되는 암종에서는 림프절 전이가 없어 그 작용이 서로 다를 것이라는 것을 시사하였다. 동시에 각각의 isoform과 에스트로겐 수용체 상태와의 상관관계는 없었고 다만 에스트로겐 수용체 양성에서 TGF- $\beta$ 2와 TGF- $\beta$ 3가 잘 발현되지 않는 사실을 발견하였다<sup>32</sup>.

Stefan 등<sup>34</sup>은 TGF- $\beta$ 1 만이 암의 진행에 관계가 있음을 보고하였고, 또한 Walker 등<sup>33</sup>도 TGF- $\beta$ 1의 발현이 림프절 전이와 fibronectin, tenascin 증가, CD4 와 CD8 림프구의 분포가 달라져 CD8 이 증가하는 것, 종양과 연관된 대식구의 침윤에 상관성이 있다고 보고하였다. 본 실험에서는 TGF- $\beta$ 2를 사용하여 TGF- $\beta$ 1을 이용한 상기 저자들과 동일한 결과를 얻었으나 세가지 isoform을 동시에 염색하여 비교해 보는 연구가 필요하다고 생각한다.

또한, 본 실험에서는 Factor VIII related antigen을 이용하여 혈관내피세포를 염색, 맥관형성을 관찰한 결과 림프절 전이가 있는 군에서 의미있는 증가를 보여( $p < 0.05$ , Table 5) 맥관형성과 전이가 연관이 있음을 알 수 있었고 TGF- $\beta$ 의 염색지수가 높아 TGF- $\beta$ 의 분포가 많을 것으로 생각되는 종양의 진행성 변연부에 맥관형성이 통계학적으로 의미있게 높아( $p < 0.05$ , Table 5) TGF- $\beta$ 가 맥관형성에도 관여함을 알 수 있었다. Factor VIII related antigen은 항혈우병 인자(Factor VIII)의 세가지 기능적 구성체의 하나로 혈관의 내피세포에서 합성되며 거핵구, 혈소판, 비만 세포에서도 발견이 된다. Factor VIII related antigen은 내피세포의 증식에 있어서 거의 특이적 표지자로 사용되며<sup>35</sup> Factor VIII related antigen을 이용하여 종양의 맥관형성을 규명하고 각 예후인자와 비교해 보는 연구가 유방암과 전립선암 등에서 진행되어 왔다. 유방암에서 Noel 등<sup>17</sup>은 혈관형성이 임파절 전이와 연관성이 있어 예후인자로서의 가치가 있음을 보고하였고, Silvano 등<sup>36</sup>과 Masakazu 등<sup>37</sup>도 같은 결과를 발표하였다. 그러나 종양의 크기, 조직학적인 등급, 에스트로겐 수용체 상태 등과의 연관성에 대해서는 논란이 있어 Noel 등<sup>16</sup>은 암종의 크기와 조직학적인 등급과도 연관이 있다고 하였지만, Masakazu 등<sup>37</sup>은 종양의 크기, 에스트로겐 수용체의 상태, 조직학적인 등급과는 연관성이 없다고 보고한 바 있어 각 예후인자와의 연관성에 대해서는 계속적인 연구가 필요하리라 본다. 맥관형성에 관여하는 인자에는 angiogenin, angiotropin, EGF(epidermal growth factor), fibrin, HBGW(heparin-binding growth factor), lipid-derivated angiogenic factor, nicotinamide, PD-ECGF(platelete-derivated endothelial cell growth factor), TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , VEGF(vascular endothelial growth factor), VEGF(vascular endothelial growth factor), TNF- $\alpha$  등이 포함된다<sup>18</sup>. 그 중 TGF- $\beta$ 는 in vitro 에서 혈관내피세포의 증식을 억제하는 것으로 알려졌지만 in vivo에서는 새로운 모세혈관의 형성을 증가시키는 것으로 보고되었다<sup>15</sup>. 생쥐에 TGF- $\beta$ 를 피하



주사한 결과 강력한 맥관형성 효과가 나타나는 것이 보고되었고<sup>6</sup>, TGF- $\beta$ 가 종양 주변의 대식구를 자극하여 혈관생성인자의 분비를 촉진시킨다고 알려져 있지만<sup>38</sup>, 맥관형성에 있어서 TGF- $\beta$ 의 역할에 대해서는 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

### 결 론

본 연구는 40예의 유방의 침윤성 관암종 조직을 대상으로 TGF- $\beta$ 와 Factor VIII related antigen의 면역조직화학적 염색을 실시하여 그들의 발현과 유방암의 각 예후인자, 즉 종양의 크기, 액와 림프절 전이 상태, 임상적 병기, 조직학적 등급, 에스트로겐 수용체 및 프로게스테론 수용체 상태와의 관계를 비교 분석하였다. TGF- $\beta$ 의 발현은 종양의 중심부와 진행성 변연부로 나누어 관찰하였고, 맥관형성은 Factor VIII related antigen으로 혈관내피세포를 염색하여 미세혈관의 수를 세어 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 유방의 침윤성 관암종의 진행성 변연부에서 종양의 중심부 보다 더 높은 TGF- $\beta$ 의 발현과 더 많은 미세혈관의 수를 나타냈다( $p < 0.05$ ).

2) TGF- $\beta$ 의 발현은 진행성 변연부에서 종양의 임상적 병기 및 액와 임파절 전이와 통계학적으로 의미있게 연관성이 있었다( $p < 0.05$ ).

3) 종양의 미세혈관의 수는 액와 림프절 전이가 있는 군에서 없는 군에 비해 높았으며 임상적 병기가 높을수록 증가하였다( $p < 0.05$ ).

4) TGF- $\beta$ 의 발현은 조직학적인 등급, 에스트로겐과 프로게스테론 수용체 상태와는 연관성이 없었다( $p > 0.05$ ).

이와 같은 결과로 TGF- $\beta$ 의 발현과 맥관형성은 유방의 침윤성 관암종에서 예후인자인 임상적 병기 및 액와 임파절 전이 상태와 연관성이 있는 것으로 사료된다.

### 참 고 문 헌

1. Jone WB, Robert VPW. Breast cancer. *Cancer* 1995; 75: 257-269.
2. 이종석, 김사유. 한국인 유방암의 병리조직 형태와 이에 따른 임상양상. *대한암학회지* 1994; 26: 70-81.
3. 장은숙, 박관규. 유방암에서 호르몬 수용체, PCNA, Ag NOR 및 조직학적 소견간의 비교 연구. *대한병리학회지* 1993; 27: 605-617.
4. Roberts AB, Thompson NL, Heine U, Flanders C, Sporn MB. Transforming growth factor- $\beta$  : Possible

- roles in carcinogenesis. *Br J Cancer* 1988; 57: 594-600
5. 최영희, 채승완, 이민철, 심정원, 안혜경, 박혜림, 강구, 심형식, 박영희. 위선암 조직에서 Transforming growth factor- $\beta$  발현에 관한 면역조직화학적 분석. *대한병리학회지* 1994; 28:272-281.
6. Jone AB, Russette ML, Harold LM. The cell biology of Transforming growth factor- $\beta$ . *Biochemica et Biophysica Acte* 1990; 1032: 79-87.
7. Maureen TT, Peter JB, UTA B, Yunus AL, Jean CG, Trevor JP, R CC. Growth factor expression in normal, benign, and malignant breast tissue. *Br M J* 1988; 296: 1621-1624.
8. Deuel TF. Polypeptide growth factor; roles in normal and abnormal cells. *Annu Rev Cell Biol* 1987; 3: 443.
9. Sliberstein GB, Daniel CW. Reversible inhibition of mammary gland growth by Transforming growth factor- $\beta$ . *Science* 1987; 237: 291-293
10. Valverius EM, Walker JD, Bates SE, Stampfer MR, Clark R, Mclormick F, Dickson RB, Lippman ME. Production of and responsiveness to Transforming growth factor- $\beta$  in normal and oncogene-transformed human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1989; 49: 6269-6274.
11. Rosemary A, Walker and sheila J. Transforming growth factor- $\beta$ 1 in ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma of the breast. *Eur J Cancer* 1992; 28: 641-644.
12. Bakul ID, Paul AK, Arnold HG. Immunohistochemical localization of secreted Transforming growth factor- $\beta$ 1 to the advancing edges of primary tumors and to lymph node metastasis of human mammary carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 381-389.
13. MacCallum J, Bartlett JMS, Thompson AM, Keen JC, Dixon JM, Miller WR. Expression of Transforming growth factor- $\beta$  mRNA isoform in human breast cancer. *Br J Cancer* 1994; 69: 1006-1009.
14. Noei W, Joseph PS, william R, Weich MD, Judah F. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J M* 1991; 324: 1-8.
15. Christine HB, Bruce RZ. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochemica et Biophysica* 1990; 1032:89-118.
16. Judah F, Michael K. Angiogenic factor. *Science* 1987; 235: 442-446.
17. Noel W, Peter RC, Jonathan F, Walter B, Judah F. Tumor angiogenesis correlated with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143:

401-409

18. Bloom HJG and Richardson WW. Histologic grading and prognosis in the breast cancer. *Br J Cancer* 1957; 11: 359-377.
19. Ryan RJ, Moses HL. Specific binding to the cultured cells of 125I-labeled type beta Transforming growth factor human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 6757-6761.
20. Frolik CA, Wakefield LM, Smith DM, Sporn MB. Characterization of a membrane receptor Transforming growth factor- $\beta$  in normal rat kidney fibroblasts. *J Biol Chem* 1984; 259: 10995-11000.
21. Igotz RA, Massague J. Transforming growth factor- $\beta$  stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986; 261: 4337-4345.
22. Igotz RA, Endo T, Massague J. Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by Transforming growth factor- $\beta$ . *J Biol Chem* 1987; 262: 6443-6446.
23. Muller G, Behrens J, Mussbaumer U, Behlen P, Birchmeier W. Inhibitory action of Transforming growth factor- $\beta$  on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 5600-5604.
24. Kehrl JH, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowlew SB, Sporn MB, Fauci AS. Transforming growth factor- $\beta$  is an important immuno-modulatory protein for human B-lymphocytes. *J Immunol* 1986; 137: 3855-3860.
25. Coffey RJ, Shipley GD, Moses HL. Production of Transforming growth factor- $\beta$  by human colon cancer cell lines. *Cancer Res* 1986; 46: 1164-1169.
26. Jonson MD, Federspiel CF, Gold LI, Moses HL. Transforming growth factor- $\beta$  and Transforming growth factor- $\beta$  receptor expression in human meningioma cells. *Am J Pathol* 1992; 141: 633-642.
27. Kimch A, Wang XF, Weinberg RA, Cheifetz S, Massague J. Absence of Transforming growth factor- $\beta$  receptor and growth inhibiting response in retinoblastoma cells. *Science* 1988; 240: 196-199.
28. Jasani B, Wyllie FS, Wright PA, Lemonie NR, Williams ED, Waynford DT. Immunocytochemically detectable Transforming growth factor- $\beta$  association with malignancy in thyroid epithelial neoplasm. *Growth Factor* 1990; 2: 149-155.
29. Arteaga CL, Caffey RJ. Transforming growth factor- $\beta$  isoform in mammary neoplasm. *Human Pathol* 1992; 23: 1-3.
30. Ton VA, Mieke T, John AF, Lambert CJD, Sonja CHL. Differential expression of estrogen, progesterone, and epidermal growth factor receptor in normal, benign, and malignant human breast tissues using ductal staining immunohistochemistry. *Am J Pathol* 1994; 144: 1238-1246.
31. Bradley AA, Murray K, Rik D. Differential regulation of expression of three Transforming growth factor- $\beta$  species in human breast cancer cell lines by estradiol. *Cancer Res* 1990; 50: 299-303.
32. Bryan KM, Kathleen P, Roma SC, Sudesh K, Michael BS, Maria T. Expression of Transforming growth factor- $\beta$  isoform in small round cell tumor of childhood. *Am J Pathol* 1993; 142: 49-59.
33. Walker RA, Dearing SJ, Gallacher B. Relation of Transforming growth factor- $\beta$ 1 to extracellular matrix and stromal infiltrates in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer* 1994; 69: 1160-1165.
34. Stefan MG, Vincent AM, Therese AS, Leslie IG, Bradley AA. Immunohistochemical staining for Transforming growth factor- $\beta$ 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 6949-6952.
35. Juan R. Ackerman's surgical pathology. 7th. ed. ST Louis: The C.V. Mosby, 1989: 389.
36. Silvano B, Arthur KCL, MBBS, Ronald AD, Brian DW, BS, Gerald JH, MS, Mark LS. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Human Pathol* 1992; 23: 755-761.
37. Masakazu T, Jitsuo K, Takeshi T. Tumor angiogenesis in an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 55: 371-374.
38. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins pathologic basis of disease. 4th. ed Philadelphia: WB Saunders, 1994: 275.