

## 유방의 침윤성 관암종에서 신생혈관형성과 Cathepsin-D의 발현

영남대학교 의과대학 병리학교실 및 외과학교실\*

배영경 · 서대홍 · 김동석 · 이수정\*

### Tumor Angiogenesis and Cathepsin-D Expression in Invasive Ductal Carcinoma of the Breast

Young Gyung Bae, M.D., Dae Hong Suh, M.D., Dong Sug Kim, M.D.  
and Soo Jung Lee, M.D.\*

Department of Pathology and General Surgery\*, Yeungnam University College of Medicine

This study was conducted to assess the prognostic value of tumor angiogenesis and Cathepsin-D in breast carcinoma, by correlating them with other clinicopathologic prognostic factors. In order to estimate microvessels within the tumor, an immunohistochemical method using monoclonal antibodies for factor VIII-related antigens (DAKO-vWf, F8/86) was used, and they were counted (per  $\times 200$  field) in the most active areas of neovascularization. For the expression of Cathepsin-D, an immunohistochemical method using monoclonal antibodies (Novocastra, NCL-CDm) was performed. The microvessel count ranged from 8 to 346 per  $\times 200$  field and the mean ( $\pm$ SD) was  $72.46 \pm 54.96$ . The microvessel count was correlated with the estrogen receptor status, and it was also correlated with the tumor size when it was graded into four groups (1~33, 34~67, 68~100, >100), but was not correlated with other clinicopathologic parameters. Cathepsin-D was expressed in 40% (46/115) of the cases, but it was statistically correlated with the tumor size only. In conclusion, the expression of Cathepsin D and the degree of angiogenesis in breast cancer showed a correlation with the tumor size only. Therefore, they do not appear to be good prognostic parameters, according to the present study. (Korean J Pathol 1997; 31: 735~744)

**Key Words:** Angiogenesis, Cathepsin-D, Breast Cancer, Prognosis

### 서론

악성 종양의 생물학적 특성인 침윤과 전이의 기

전에 대한 분자생물학적 연구가 이루어지면서 이 과정에 관여하는 여러 인자들이 밝혀지게 되었고, 수술후 재발이나 예후를 예측할 수 있는 인자를 찾으려는 노력들이 있어왔다. 왜냐하면 수술후 재발 위험이 높은 환자들을 미리 선별하여 적극적인 치료를 함으로써 생존율을 높이는데 보다 정확한 지표로 이용 가능하기 때문이다. 실제로 유방암의 경우 림프절 전이가 없는 환자의 70~80%에서 근처적

접 수: 1996년 12월 17일, 게재승인: 1997년 4월 22일  
주 소: 대구광역시 남구 대명동 317-1, 우편번호 705-030  
영남대학교 의과대학 병리학교실, 배영경

수술만으로 장기 생존을 보여주어 모든 환자에서 부가적인 전신 항암요법을 투여하는데는 논란의 여지가 남아 있다. 따라서 수술 후 항암요법이 필요한 소수의 고위험군을 선별하는데 정확한 지표가 필요하게 되었다. 그 중 유방암을 대상으로 하여 종양내 신생혈관 형성정도<sup>1-10</sup>와 리소솜 단백질 분해효소인 Cathepsin-D 발현양상<sup>11-29</sup>이 예후추정인자로서의 의의가 있는지에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다.

신생혈관 형성은 이미 존재하는 혈관으로부터 새로운 혈관이 자라나는 것을 의미하며 이는 종양이 점진적으로 성장해 나가기 위한 중요한 생물학적 과정일 뿐만 아니라 종양세포의 전이를 위한 통로로서의 역할을 한다<sup>30,31</sup>. 신생혈관형성은 복잡한 다단계 과정으로 혈관 내피세포의 증식뿐만 아니라 기존의 혈관에서 새로운 혈관이 발아하기 용이하도록 단백질 분해효소에 의한 기저막과 세포외 기질의 분해, 그리고 혈관 내피세포의 이주와 분화 등의 과정을 필요로 한다<sup>32,33</sup>.

Cathepsin-D는 유방암에서 가장 잘 규명된 단백질 분해효소로서 1980년 Westley와 Rochefort에 의해 에스트로겐에 반응하는 MCF-7 유방세포에서 52kDa의 당단백 형태로 처음 발견되었다. 이후 이것이 Cathepsin-D의 전구체로서 중간형태인 42kDa 단백을 거쳐 34kDa의 lysosomal aspartic endoprotease Cathepsin-D로 최종 활성화됨이 밝혀졌다<sup>24</sup>. Cathepsin-D의 작용이 산성환경에서 자가활성되어 단백질분해과정을 촉발시키고 기저막과 세포외기질, 결합조직을 분해할 뿐만 아니라 nude mice에 Cathepsin-D cDNA를 transfection 시켰을 때 종양세포의 전이성향이 증가하는 점 등으로 보아 Cathepsin-D가 종양세포의 이주, 침윤 및 전이에 관여하는 한 요인일 가능성이 제시되었고 이것의 과표현이 나쁜 예후와 관련이 있을 것으로 보고되었다<sup>19,21,23,24</sup>. 그러나 유방암에 있어서 Cathepsin-D의 예후인자로서의 의의에 대해서는 많은 연구들에서 서로 상반된 결과들을 보여 주어 아직 확실히 규명되어 있지 않은 것으로 생각된다<sup>19,24</sup>.

이에 저자들은 유방암의 침윤성 관상피암을 대상으로 면역조직화학적 방법을 이용하여 종양내 신생혈관 형성정도를 측정하고 Cathepsin-D 효소의 발현양상을 관찰하여, 이를 이미 알려진 임상 및 병리조직학적 예후인자들인 나이, 병기, 종양의 크기, 림프절 전이상태, 조직학적 등급, 에스트로겐 및 프로그스테론 수용체 유무등과의 상관 관계를 조사하여 예후에 미치는 영향을 알아보고자 한다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 연구대상

1987년부터 1994년까지 영남대학교 의과대학 병리학교실에서 진단된 유방의 침윤성 관상피암 중례 중 슬라이드와 파라핀 블록이 온전하게 보존된 115예를 연구대상으로 하였다.

### 2. 연구방법

1) 임상 및 병리조직학적 소견: 임상기록 및 병리보고서를 검토하여 환자의 나이, 종양의 크기 및 림프절 전이상태 등을 기록하였고 병기는 TNM 분류법<sup>34</sup>에 따랐다. 환자의 연령은 수술 당시의 연령을 기준으로하여 50세 미만군과 50세 이상군으로 나누었고 종양의 크기는 장경을 기준으로 TNM 분류법<sup>34</sup>에 의해 2.0 cm 이하, 2.1~5.0 cm 그리고 5.0 cm보다 큰 경우로 나누었다. 림프절 전이상태는 전이가 있는 군과 없는 군으로 나누었고 전이가 있는 군은 다시 1~3, 4~9 그리고 10개 이상인 군으로 세분하였다. 조직학적 등급은 modified Bloom-Richardson의 기준<sup>35</sup>을 이용하여 조직학적 분화도, 핵다형성의 정도 및 유사분열 세포수에 따라 점수를 산정하고 전체적인 조직학적 등급은 SBR(Scarff-Bloom-Richardson) 등급에 따라 위의 세등급의 점수를 합한 점수를 기준으로 3, 4, 5점은 1등급, 6, 7점은 2등급 그리고 8, 9점은 3등급으로 구분하였다(Table 1).

#### 2) 면역조직화학적 염색과 판정기준

(1) 혈관염색과 신생혈관수의 측정: 각 증례당 형태학적으로 가장 잘 보존된 파라핀 블록 한 개를 선택하여 4 μm 두께로 절편을 만들어 100% xylene으로 파라핀을 제거한 후 100%, 90% 및 75% 알콜로 재수화하였다. 3% 과산화수소수를 15분간 작용시킨후 Tris 완충액으로 3회 세척한 다음 protein blocker(Zymed, USA)를 30분간 도포하였다. 일차 항체는 factor VIII-관련항원에 대한 monoclonal antibody(vWf-F8/86, DAKO, USA)를 사용하였으며 상온에서 1시간 동안 반응시킨후 Tris 완충액으로 3회 세척하였다. 그 후 이차 항체인 universal secondary antibody(Zymed, USA)를 상온에서 10분간 도포한 후 Tris 완충액으로 3회 세척하였다. 이어서 streptavidin-HRP(Zymed, USA)로 10분간 도포한 후 3회 세척하였다. DAB(Diaminobenzidine tetrachloride)를 2~3분간 도포하여 발색한 후 10% Mayer's hematoxylin으로 대조염색 하였다. 신생혈관수의 측정은 Bosari등<sup>4</sup>의 방

**Table 1.** Criteria for histologic grade of invasive ductal carcinoma**A. Criteria for histologic grade of differentiation**

- Score 1: >75% of tumor cells arranged in tubules  
 2: 10-75% of tumor cells arranged in tubules  
 3: <10% of tumor cells arranged in tubules

**B. Nuclear pleomorphism**

- Score 1: uniform nuclei in size and shape, relatively small, have dispersed chromatin pattern  
 2: somewhat pleomorphic nuclei, intermediate size, have nucleoli  
 3: relatively large nuclei, have prominent or multiple nucleoli, coarse chromatin pattern, and vary in size and shape

**C. Mitotic index**

locate most mitotically active areas of tumor

- Score 1: <10 mitoses per 10 HPF  
 2: 10-19 mitoses per 10 HPF  
 3: ≥20 mitoses per 10 HPF

**D. SBR(Scarff-Bloom-Richardson) grade**

Sum of score on A, B and C

Grade I: 3-5

II: 6 or 7

III: 8 or 9

HPF: high power field.

법에 따라 세정액 및 모세혈관만을 포함시켰으며, factor VIII-관련항원에 양성이며 인접 세포군과 명백하게 분리되는 한 개의 내피세포 혹은 내피세포군을 하나의 혈관으로 세었고, 내강을 가진 경우 적혈구를 8개 이상 포함하거나 근육층을 가지는 큰 혈관은 제외하였다. 각 증례에 대한 임상 및 병리학적 정보가 없는 상태에서 시행하였으며 염증이나 괴사, 섬유화가 심한 부위는 제외시켰고 저배율 시야에서 탐색한 후 종양의 변연부중 혈관이 가장 많은 부위를 200배 시야에서 3회 측정하였으며 그 중 가장 많은 수를 선택하였다.

**(2) Cathepsin-D의 염색:** 혈관염색과 같은 방법으로 면역조직화학적 염색을 시행하였으며 일차 항체는 mouse monoclonal antibody인 NCL-CDm(Novocastra, U.K.)을 1:100으로 희석하여 사용하였다. 종양세포의 일부분에서라도 세포질내에 분명히 갈색의 과립상으로 염색된 경우 양성으로 판정하였다. Cathepsin-D의 발현은 양성과 음성 두가지로 구분하였으며 염색된 세포의 수나 염색강도에 따른 구분은 하지 않았다. 탐식세포에 의한 양성반응은 조직학적 형태로 구별하였으며 종양의 괴사가 있는 부위는 판독하지 않았다.

**(3) 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체:** 파라핀 포매 조직으로부터 면역조직화학적 염색을 시행하여 수용체 발현 유무를 관찰하였다. 파라핀 제거와 재수화 과정을 거친후 0.21% citric acid 용액에 슬라이드를 넣고 5 분간 극초단파 처치를 하였고 protein blocker(Zymed, USA)를 30분간 도포하였다. 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체에 대한 일차항체는 각각 ER-IL(Novocastra, U.K.)과 PGR-IL(Novocastra, U.K.)을 희석하지 않고 사용하였다. 그 후 이차항체, streptavidin-HRP, DAB 및 대조염색은 혈관염색과 동일한 방법으로 하였다. 종양세포의 일부분에서라도 핵이 분명히 갈색으로 염색되면 양성으로 판독하였고 세포질내 갈색으로 염색된 예에서는 핵내에도 함께 염색된 경우만 양성으로 판정하였다.

**3) 자료 분석:** 기존의 유방암의 예후인자인 나이, 병기, 종양의 크기, 림프절 전이상태, 조직학적 등급, 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체 유무등과 Cathepsin-D 발현 양상과의 관련성은 SPSS/PC+ 프로그램을 이용하여 Chi-Square test로 분석하였으며, 이들 예후인자들과 신생혈관수와는 비모수적 통계방법중 Chi-Square test, Mann-Whitney U test 및 Kruskal-Wallis one-way ANOVA로 분석하였고 p-value

0.05 이하이면 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

**결 과**

**1. 환자의 연령 및 종양의 크기**

침윤성 관상피암으로 진단된 115예의 연령분포는 29세에서 82세까지로 평균 47세였으며 50세 미만군이 72예, 50세 이상군이 43예였다. 종양의 크기는 2.0 cm 이하군이 42예, 2.1~5.0 cm에 속하는 군이 61예였으며 5.0 cm보다 큰 군은 12예였다(Table 2).

**2. 병리조직학적 소견**

림프절 전이가 없는 군이 55예, 전이가 있는 군이 60예였으며 전이된 림프절 수가 1~3개인 군이 26예, 4~9개인 군이 16예 그리고 10개 이상인 군이 18예였다. 병기는 stage I군이 21예, IIA가 49예, IIB가 21예, III가 21예 그리고 IV가 3예였다. 조직학적 분화도, 핵의 다형성 정도 및 유사분열 세포수에 따른 점수를 합한 SBR등급은 1, 2 및 3등급이 각각 14, 53 및 48예였다(Table 2).

**Table 2.** Clinicopathologic findings of 115 invasive ductal carcinomas

		No. of cases (%)
Age (yrs)	<50	72(62.6)
	≥50	43(37.4)
Tumor size (cm)	≤2.0	42(36.5)
	2.1~5.0	61(53.0)
	>5.0	12(10.4)
	AN metastasis (No.)	
	0	55(47.8)
	1~3	26(22.6)
	4~9	16(13.9)
	≥10	18(15.7)
Stage	I	21(18.3)
	II <sub>A</sub>	49(42.6)
	II <sub>B</sub>	21(18.3)
	III	21(18.3)
	IV	3( 2.6)
SBR grade	I	14(12.2)
	II	53(46.1)
	III	48(41.7)

AN: axillary node, SBR: Scarff-Bloom-Richardson

**Table 3.** Comparison between cathepsin-D expression, microvessel count and clinicopathologic parameters in 115 invasive ductal carcinomas

		Cathepsin-D		p value	Microvessel count (mean ± SD)	p value
		(+)(%)	(-)(%)			
Age(yrs)	<50	33(46)	39(54)	NS	76.21 ± 9.73	NS
	≥50	13(30)	30(70)		66.19 ± 45.87	
Tumor size(cm)	≤2.0	20(48)	22(52)	p < 0.05	80.33 ± 49.04	p = 0.06
	2.1~5.0	18(30)	43(70)		62.11 ± 47.68	
	>5.0	8(67)	4(33)		97.50 ± 91.83	
AN metastasis	0	17(31)	38(69)	NS	79.22 ± 64.25	NS
	1~3	14(54)	12(46)		61.42 ± 36.15	
	4~9	9(56)	7(44)		77.56 ± 55.29	
	≥10	6(33)	12(67)		63.22 ± 45.59	
	Stage	I	8(38)		13(62)	
	II <sub>A</sub>	18(37)	31(63)	72.27 ± 49.04		
	II <sub>B</sub>	9(43)	12(57)	81.85 ± 78.46		
	III	9(43)	12(57)	52.33 ± 36.31		
	IV	2(67)	1(33)	69.67 ± 65.65		
SBR grade	I	6(43)	8(57)	NS	89.57 ± 100.61	NS
	II	24(45)	29(55)		71.74 ± 48.36	
	III	16(33)	32(67)		68.27 ± 42.82	

NS: not significant, AN: axillary node, SBR: Scarff-Bloom-Richardson.

### 3. 신생혈관수

신생혈관수는 8개에서 346개까지 다양하게 측정되었으며 평균  $72.46 \pm 54.96$ 이었다(Fig. 1). 50세 미만인 군에서  $76.21 \pm 59.73$ 으로 50세 이상군의  $66.19 \pm 45.87$ 보다 높았으나 통계학적 유의성은 없었다( $p > 0.05$ ). 종양의 크기가 5.0 cm보다 큰 군은  $97.50 \pm 91.83$ 로 2.0 cm 이하인 군과 2.1~5.0 cm인 군의

$80.33 \pm 49.04$ ,  $62.11 \pm 47.68$ 보다 높았으나 통계학적 유의성은 없었다( $p = 0.06$ ). 그러나 신생혈관수를 1~33, 34~67, 68~100 그리고 100개 이상인 군으로 나누었을 때는 종양의 크기와의 관련성이 있었다( $p < 0.05$ , Table 5). 림프절 전이상태, 병기, SBR등급(Table 3) 및 프로게스테론 수용체 유무 등에 따른 신생혈관수는 통계학적 유의성이 없었으나, 에스트로겐 수용체 음성인 환자보다 양성인 환자에서  $83.04$



Fig. 1. Cathepsin-D immunostaining. Positive reaction shows numerous coarse cytoplasmic granules in breast cancer cells ( $\times 200$ ).

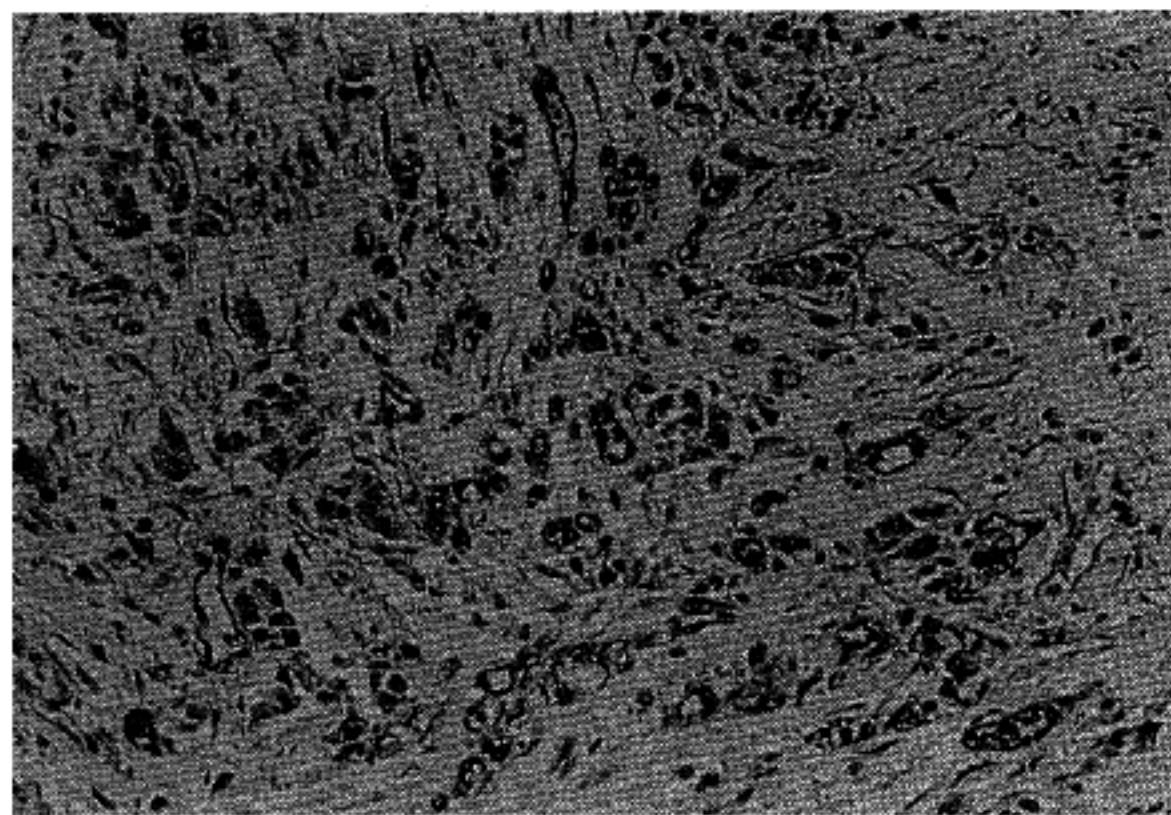


Fig. 2. Immunostaining for factor VIII-related antigen showing the microvessels at the margin of the invasive ductal carcinoma ( $\times 200$ ).

**Table 4.** Comparison between cathepsin-D expression, microvessel count and ER, PR positivity in 115 invasive ductal carcinomas

		Cathepsin-D		p value	Microvessel count (mean $\pm$ SD)	p value
		(+)(%)	(-)(%)			
ER	(+)	22(39)	35(61)	NS	83.04 $\pm$ 60.52	p < 0.05
	(-)	24(41)	34(59)		62.07 $\pm$ 47.14	
PR	(+)	32(47)	36(53)	NS	77.76 $\pm$ 59.77	NS
	(-)	14(30)	33(70)		64.79 $\pm$ 46.71	

ER: estrogen receptor, PR: progesterone receptor, NS: not significant.

**Table 5.** Comparison between microvessel count and clinicopathologic parameters in 115 invasive ductal carcinomas

		Microvessel count				p value
		1~33 (n=31)(%)	34~67 (n=25)(%)	68~100 (n=31)(%)	>100 (n=28)(%)	
Age(yrs)	<50	19(61.3)	14(56.0)	21(67.7)	18(64.3)	NS
	$\geq$ 50	(38.7)	11(44.0)	10(32.3)	10(35.7)	
Tumor size(cm)	$\leq$ 2.0	3( 9.7)	15(60.0)	14(45.2)	10(35.7)	p < 0.05
	2.1~5.0	26(83.9)	7(28.0)	14(45.2)	14(50.0)	
	>5.0	2( 6.4)	3(12.0)	3( 9.6)	4(14.3)	
AN metastasis	0	13(41.9)	10(40.0)	19(61.3)	13(46.4)	NS
	1~3	7(22.6)	9(36.0)	5(16.1)	5(17.9)	
	4~9	4(12.9)	4(16.0)	2( 6.5)	6(21.4)	
	$\geq$ 10	7(22.6)	2( 8.0)	5(16.1)	4(14.3)	
Stage	I	1( 3.2)	7(28.0)	7(22.6)	6(21.4)	NS
	II <sub>A</sub>	13(41.9)	10(40.0)	15(48.4)	11(39.3)	
	II <sub>B</sub>	7(22.6)	4(16.0)	4(12.9)	6(21.4)	
	III	9(29.1)	3(12.0)	5(16.1)	4(14.3)	
	IV	1( 3.2)	1( 4.0)	0( 0.0)	1( 3.6)	
SBR grade	I	6(19.3)	2( 8.0)	2( 6.4)	4(14.3)	NS
	II	14(45.2)	12(48.0)	12(38.7)	15(53.6)	
	III	11(35.5)	11(44.0)	17(54.9)	9(32.1)	

NS: not significant, AN: axillary node, SBR: Scarff-Bloom-Richardson.

$\pm$ 60.52로 유의있게 높았다(p < 0.05, Table 4).

#### 4. Cathepsin D

Cathepsin-D에 대한 면역조직화학적 염색결과 115예중 46예(40%)에서 양성 반응을 보였고 종양세포의 세포질 및 간질에 있는 조직구의 세포질에도 흔히 과립상으로 염색되었다(Fig. 2). 환자의 나이가

50세 미만인 군은 46%에서, 50세 이상인 군은 30%에서 양성으로서 Cathepsin-D의 발현이 50세 미만인 군에서 높게 나타났으나 통계학적 유의성은 없었다(p > 0.05). 그리고 종양의 크기가 2.0 cm 이하인 군의 48%, 2.1~5.0 cm인 군의 30% 그리고 5.0 cm보다 큰 군의 67%에서 양성되었고 이는 통계학적으로 유의하였다(p < 0.05). 그러나 림프절 전이상태, 병기,

Table 6. Comparison between microvessel count and ER, PR positivity in 115 invasive ductal carcinomas

		Microvessel count				p value
		1~33 (n=31)(%)	34~67 (n=25)(%)	68~100 (n=31)(%)	>100 (n=28)(%)	
ER	(+)	11(35.5)	10(40.0)	20(64.5)	16(57.1)	NS
	(-)	20(64.5)	15(60.0)	11(35.5)	12(42.9)	
PR	(+)	18(58.1)	13(52.0)	17(54.8)	20(71.4)	NS
	(-)	13(41.9)	12(48.0)	14(45.2)	8(28.6)	

ER: estrogen receptor, PR: progesterone receptor, NS: not significant.

SBR등급(Table 3), 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체 유무등은 Cathepsin-D 발현과 관련성이 없었다(Table 4).

## 고 찰

유방암에서 종양내 신생혈관수가 종양의 전이, 환자의 예후와 관련성이 있음을 보고한 연구들 중 Weidner등<sup>1</sup>은 종양내 신생혈관형성이 림프절 전이가 없는 조기 유방암 환자에서 무병 생존율과 전체 생존율을 추정할 수 있는 독립적이고 중요한 예후인자라고 하였다. Toi등<sup>5,7</sup>은 종양내 신생혈관수는 종양의 크기 및 에스트로겐 수용체 상태 등과는 관련이 없으나 림프절 전이상태와 관련이 있다고 하였으며 무병 생존율을 나타내는 독립적인 예후인자로서 가치가 있다고 하였다. Bosari등<sup>4</sup>은 유방암에서 종양내 신생혈관수와 종양의 재발 또는 원격 전이와의 관계를 추적 조사한 결과 림프절 전이가 없는 환자에서는 신생혈관수가 유일하게 전체 생존율에 영향을 미치는 예측 기준이라고 하였다. 그리고 Horak등<sup>3</sup>은 종양내 신생혈관 형성 정도와 관련이 있는 인자는 종양의 크기와 조직학적 분화도이며 이들 두 인자와 전이의 관련성은 신생혈관형성으로 설명될 수 있다고 하였다. 그리고 어떤 이유에서든 림프절을 박리하지 못한 환자에서 신생혈관수의 측정이 보다 적극적인 치료를 요하는 고위험군을 선별하는데 유용한 지표가 된다고 하였다. 국내에서의 연구결과를 보면 김등<sup>9</sup>은 종양의 신생혈관수는 림프절전이, 종양의 크기 및 병기와 관련이 있다고 하였고, 이등<sup>10</sup>은 신생혈관수는 림프절전이 및 병기와 관련이 있어서 액와 림프절전이가 있는 군에서 없는 군보다 그리고 병기가 높을수록 신생혈관수가 유의있게 많

다고 하였다. 그러나 이들이 주장하는 종양내 신생혈관수의 중요성을 입증하지 못하는 연구들도 있는데 Axelsson등<sup>8</sup>은 신생혈관수는 종양의 크기, 조직학적 등급, 에스트로겐 수용체 상태, p53 단백질, 림프절전이 및 환자의 나이 등과 관련이 없으며 생존율에 미치는 영향도 없다고 하였다. Khanuja등<sup>6</sup>의 연구에서도 신생혈관수가 전이나 재발을 예측할 수 있는 인자로서의 가치를 입증할 수 없었다고 하였다. 본 연구에서는 종양내 신생혈관수가 Horak등<sup>3</sup>의 연구결과에서와 같이 종양의 크기와 관련성을 보여 주었지만 에스트로겐 수용체 양성인 군에서 음성인 군보다 신생혈관수가 유의있게 높았고, 통계학적 유의성은 없지만 림프절 전이가 있는 군에서 전이가 없는 군보다 더 낮게 측정되어 신생혈관수가 유의한 예후인자가 될 수 없음을 보여 주었다.

이러한 연구 결과들의 차이는 첫째, 보고자마다 연구 방법이 다르기 때문으로 생각한다. 대부분의 연구에서 면역조직화학적 방법에 의해 혈관을 염색하고 종양내 혈관이 가장 많은 부위에서 신생혈관수를 측정하였다는 점은 유사하나 혈관내피세포 염색을 위해 사용된 항체가 factor VIII-related antigen, CD34, JC70등으로 다르므로 혈관내피세포의 발현 정도에 차이가 있었을 것으로 생각한다. 또 종양을 포함하는 모든 파라핀 블록을 대상으로 염색을 시행해서 가장 신생혈관형성이 활발한 부위에서 신생혈관의 수를 세어야 하나 실제로는 여러개의 파라핀 블록 중 하나만을 선택해서 염색을 하기 때문에 모든 예에서 선택된 파라핀 블록에서의 신생혈관수가 그 종양을 대표하였다고 보기는 어렵다. 혈관수 측정방법에 있어서도 각 연구마다 달라 측정된 현미경시야도 1~5군데까지 다양하였고, 그 중 가장 많은 수를 선택하기도 하고 평균을 선택하기도 하

었다. 둘째, 병리의사간의 경험에 따른 오차를 들 수 있다. 최근에는 신생혈관수를 측정하는데 전산화 영상 분석기(computerized image analysis system)를 이용함으로써 병리의사간의 오차를 줄이려는 노력이 시도되고 있다<sup>38,39</sup>. 셋째, 파라핀의 보관 상태 및 기간도 결과에 영향을 미쳤을 것으로 생각하는데, 본 연구에서는 보관 기간이 1년에서 9년으로 다양하여 항원성이 일정하지 않았을 것으로 생각한다. 따라서 예후인자로서의 가치를 정립하기 위해서는 재현성 있는 방법의 개발이 중요하다고 생각하였다.

Cathepsin D에 대한 연구 방법에 따른 결과들을 살펴보면 cytosol assay를 통한 대부분의 연구에서 종양내 Cathepsin-D의 고농도는 높은 재발율과 짧은 생존율을 보여 나쁜 예후와 관련이 있으며<sup>12-14,16,17,20</sup>, 나이, 종양의 크기 및 병기 등과의 관련은 없다고 하였다<sup>12-14,16,20</sup>. 또 Cathepsin-D는 특히 림프절 전이가 없는 유방암 환자에서 종양의 재발과 사망을 추정할 수 있는 독립적인 예후인자가 될 수 있다고 하였다<sup>12,14</sup>. 면역조직화학적 방법을 이용한 연구들에서 Cathepsin-D의 양성율은 36%에서 90%로 다양하였으며<sup>15,18,22,23,25-29</sup>, 본 연구에서는 40%의 양성율을 보였는데 이러한 차이는 조직의 보관상태, 사용한 항체의 종류와 염색방법의 차이, 그리고 양성판정기준의 차이 등에 기인할 것으로 생각한다. Henry등<sup>15</sup>은 에스트로겐 수용체의 양성 발현군에서 Cathepsin-D의 발현은 좋은 예후와 관련이 있다고 하였으며 이는 에스트로겐 수용체와의 상호 연관성에 기인한 것으로 보았다. 그러나 Domagala등<sup>18</sup>은 Cathepsin-D 발현이 생존에 미치는 영향은 없고 기존의 예후인자들과의 관련성도 없었으며 Cathepsin-D의 예후인자로서의 의의는 Cathepsin-D의 존재 유무에 있는 것이 아니라 합성과정과 관련이 있을 가능성을 제시하였다. 즉 procathepsin-D의 합성에는 에스트로겐과 성장인자가 영향을 미치는데, 에스트로겐 수용체 양성 발현군에서 활성화된 에스트로겐 수용체에 의해 직접적으로 전사조절되어 Cathepsin-D가 발현될 경우 좋은 예후와 관련되고 Cathepsin-D의 발현이 고농도의 autocrine growth factor에 의해 자극을 받게 되면 나쁜 예후와 관련될 것으로 설명하고 있다. 대부분의 연구들에서 에스트로겐 수용체 상태와 Cathepsin-D 발현과의 관련성이 입증되지 못하였기 때문에 Cathepsin-D의 합성과 분비는 에스트로겐에 의해서만 조절되는 것이 아닐 가능성이 있을 것으로 생각한다. Isola등<sup>21</sup>은 Cathepsin-D의 발현은 종양의 크기와만 관련이 있었고 낮은 생존율을 보여주어 나쁜 예후를 나타내는 독립적

인 예후인자로 의의가 있다고 하였으며 Winstanley등<sup>23</sup>은 Cathepsin-D의 발현은 액와 림프절 전이와 관련이 있고 낮은 생존율을 보여 주어 나쁜 예후와 관련이 있다고 하였다. 그러나 Kandalajt등<sup>22</sup>은 Cathepsin-D의 발현은 병기, 핵등급 및 림프절 전이 등과 강한 연관성을 보이기 때문에 독립적인 예후인자가 될 수 없다고 하였다. 또 Cathepsin-D는 이미 알려진 예후인자와 관련이 없으며<sup>18,26,28,29</sup>, 직접적으로 예후와도 관련이 없다는 연구 결과도 있다<sup>18,25,27-29</sup>. 본 연구에서는 Cathepsin-D의 발현이 종양의 크기와만 관련이 있었는데 이는 Isola등<sup>21</sup>이 보고한 결과와 같다.

이러한 다양한 연구결과들이 나오게 된 이유로서 첫째, 연구방법의 차이를 들 수 있다. Cytosol assay는 Cathepsin-D의 농도를 측정하기 때문에 탐식 세포와 간질 세포내의 Cathepsin-D가 포함된 채 측정되는 단점이 있는 반면 면역조직화학적 방법은 이를 배제할 수 있다. 다만 면역조직화학적 방법에 있어서도 조직의 보관 상태, 사용한 항체의 종류와 희석배율, 염색 방법 및 판독기준 등의 차이들이 결과에 영향을 미칠 수 있다. 둘째, 대상군 선정에 있어서의 문제점을 들 수 있다. 즉 수술후 치료가 연구기관마다 차이가 있을 수 있고 또 대체로 추적기간이 짧아 정확한 생존율을 산출하기가 어렵다. 그러므로 Cathepsin-D가 예후에 미치는 영향을 정확히 평가하기 위해서는 좀 더 많은 증례를 대상으로 장기간 동안 통일된 판독 기준으로 평가해야 할 것으로 생각한다.

본 연구에서는 Cathepsin-D의 발현이 종양의 크기와만 관련이 있고 다른 예후인자들과의 관련성이 없어서 예후추정인자로서의 가치에 대해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각한다.

## 결 론

유방암에서 종양내 신생혈관 형성 정도와 단백질 분해효소인 Cathepsin-D의 발현이 예후인자로서의 의의가 있는지를 알아보기 위해 1987년부터 1994년까지 8년 동안 영남대학교 의과대학 병리학교실에서 진단된 침윤성 관상피암 115예를 대상으로 면역조직화학적 방법을 통해 factor VIII-관련항원에 대한 항체를 사용하여 혈관 내피세포를 염색하여 종양내 신생혈관수를 측정하고 Cathepsin-D를 면역조직화학적 방법으로 염색하고 발현을 관찰하여 종양내 신생혈관수와 Cathepsin-D 발현 양상과 이미 알려진 예후인자인 나이, 병기, 종양의 크기, 림프절 전이상



태, 조직학적 등급, 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체 유무등과 관련성이 있는지 알아 보았다.

종양내 신생혈관수는 8~346개까지 다양하게 측정되었으며 평균  $72.46 \pm 54.96$ 개였다. 종양내 신생혈관수는 양성 에스트로겐 수용체와 관련성이 있었으며 신생혈관수를 1~33개, 34~67개, 68~100개 그리고 100개보다 많은 군으로 등급을 나누어 분석한 경우 종양의 크기( $p < 0.05$ )와만 관련성이 있었다. 115예 중 46예(40%)에서 Cathepsin-D 효소의 발현이 관찰되었고 Cathepsin-D의 발현은 종양의 크기( $p < 0.05$ )와만 관련성이 있었다.

결론적으로 종양내 신생혈관 형성정도와 Cathepsin-D의 발현은 단지 종양의 크기와만 관련성이 있었으므로 본 연구에서는 이들이 예후인자로서 유용한 지를 입증할 수 없었으며 진정한 예후인자로서의 가치에 대해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

### 참 고 문 헌

- Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8.
- Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: A new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1875-87.
- Horak ER, Leek R, Klenk N, et al. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastasis and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340: 1120-4.
- Bosari S, Lee AK, Delellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992; 23: 755-61.
- Toi M, Kashitani J, Tominaga T. Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 55: 371-4.
- Khanuja PS, Fregene T, Gimotty P, George J, Pienta KJ. Angiogenesis does not predict recurrence in patients with primary breast cancer. *Proc. ASCO* 1993; 12: 66.
- Toi M, Inada K, Suzuki H, Tominaga T. Tumor angiogenesis in breast cancer: Its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36: 193-204.
- Axelsson K, Ljung BM, Moore DH, et al. Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 997-1008.
- 김남훈, 박문향. 유방암의 종양 신생혈관형성과 전이의 연관성에 대한 연구. *대한병리학회지* 1995; 29: 740-5.
- 이태진, 조남복, 박언섭, 유재형, 박성준. 유방의 침윤성 관암종에서 TGF- $\beta$ 의 발현 및 맥관형성에 관한 면역조직화학적 분석. *대한병리학회지* 1996; 30: 557-69.
- Mandelonde T, Khalaf S, Garcia M, et al. Immunoenzymatic assay of Mr 52,000 cathepsin D in 182 breast cancer cytosols: Low correlation with other prognostic parameters. *Cancer Res* 1988; 48: 462-6.
- Spyratos F, Maudelonde T, Brouillet JP, et al. Cathepsin D: An independent prognostic factor for metastasis of breast cancer. *Lancet* 1989; ii: 1115-8.
- Thorpe SM, Rochefort H, Garcia M, et al. Association between high concentration of Mr 52,000 cathepsin D and poor prognosis in primary human breast cancer. *Cancer Res* 1989; 49: 6008-14.
- Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Chirgwin JM, McGuire WL. Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N Engl J Med* 1990; 322: 297-302.
- Henry JA, Mccarthy AL, Angus B, et al. Prognostic significance of the estrogen-regulated protein, cathepsin D in breast cancer. An immunohistochemical study. *Cancer* 1990; 65: 265-71.
- Duffy MJ, Brouillet JP, Reilly D, et al. Cathepsin D concentration in breast cancer cytosols: correlation with biochemical, histological, and clinical findings. *Clin Chem* 1991; 37: 101-4.
- Duffy MJ, Reilly D, Brouillet JP, et al. Cathepsin D concentration in breast cancer cytosols: correlation with disease-free interval and overall survival. *Clin Chem* 1992; 38: 2114-6.
- Domagala W, Striker G, Szadowska A, Dukowicz A, Weber K, Osborn M. Cathepsin D in invasive ductal NOS breast carcinoma as defined by immunohistochemistry. *Am J Pathol* 1992; 141: 1003-12.
- Rochefort H. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer. *Acta Oncol* 1992; 31: 125-30.
- Pujol P, Maudelonde T, Daures JP, et al. A prospective study of the prognostic value of cathepsin D levels in breast cancer cytosol. *Cancer* 1993; 71: 2006-12.
- Isola J, Weitz S, Visakorpi T, et al. Cathepsin D expression detected by immunohistochemistry has independent prognostic value in axillary node negative breast cancer. *J Clin Oncol* 1993; 11: 36-43.
- Kandalaf PL, Chang KL, Ahn CW, Traweck ST, Mehta P, Battifora H. Prognostic significance of im-

- munohistochemical analysis of cathepsin D in low-stage breast cancer. *Cancer* 1993; 71: 2756-63.
23. Winstanley JHR, Leinster SJ, Cooke TG, Westley BR, Platt-Higgins AM, Rudland PS. Prognostic significance of cathepsin-D in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 1993; 67: 767-72.
  24. Cardiff RD. Cathepsin D and breast cancer: useful?. *Hum Pathol* 1994; 25: 847-8.
  25. Ravdin PM, Tandon AK, Allred DC, et al. Cathepsin D by western blotting and immunohistochemistry: Failure to confirm correlations with prognosis in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12: 467-74.
  26. 박광화, 박병우, 이경식, 이광길. 면역조직화학적 염색에 의한 cathepsin D의 발현과 다른 유암 예후인자와의 비교. *대한병리학회지* 1994; 28: 612-9.
  27. Armas OA, Gerald WL, Lesser ML, Arroyo CD, Norton L, Rosen PP. Immunohistochemical detection of cathepsin D in T<sub>2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> breast carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1994; 18: 158-66.
  28. Castiglioni T, Merino MJ, Elsner B, et al. Immunohistochemical analysis of cathepsin D, B, L in human breast cancer. *Hum Pathol* 1994; 25: 857-62.
  29. Yukashi I, Shunzo K, Hirotaka I, et al. Clinical significance of cathepsin D assay in breast cancer tissues. *J Surg Oncol* 1995; 60: 221-6.
  30. Mahadevan V, Hart IR. Metastasis and angiogenesis. *Acta Oncol* 1990; 29: 97-103.
  31. Bicknell R, Harris AL. Novel growth regulatory factors and tumor angiogenesis. *Eur J Cancer* 1991; 27: 785-9.
  32. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64: 327-36.
  33. Hart IR, Saini A. Biology of tumor metastasis. *Lancet* 1992; 339: 1453-7.
  34. American joint committee on cancer. Manual for staging of cancer. Philadelphia: J B Lippincott 1992: 152.
  35. Dalton LW, Page DL, Dupont WD. Histologic grading of breast carcinoma: A reproducibility study. *Cancer* 1994; 73: 2765-70.
  36. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent(Editorial)? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.
  37. Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 1995; 147: 9-19.
  38. Fox SB, Leek RD, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KL, Harris AL. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: Comparison of microvessel density, chalkley count, and computer image analysis. *J Pathol* 1995; 177: 275-83.
  39. Barbareschi M, Gasparini G, Morelli L, Forti S, Palma PD. Novel methods for the determination of the angiogenic activity of human tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36: 181-92.
-