

인체 유방암종에서 Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor, p27^{Kip1} 발현의 의의

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 진단병리과, ¹일반외과

송상용 · 김덕환* · 서연림 · 고영혜 · 김대식 · 남석진¹ · 양정현¹

Significance of the Expression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor, p27^{Kip1}, in Human Breast Cancer

Sang-Yong Song, Duck Hwan Kim, Yeon-Lim Suh, Young-Hyeh Ko, Dae Shick Kim, Seok Jin Nam¹, and Jung-Hyun Yang¹

Departments of Diagnostic Pathology and ¹General Surgery, Sungkyunkwan University College of Medicine, Seoul 135-710, Korea

p27^{Kip1} protein, a negative cell cycle regulator in G1 progression, has been reported to be related with human cancers including colon, breast and non-small cell lung carcinomas. To elucidate a possible prognostic indicator, we studied 49 cases of human breast carcinoma for expression of p27^{Kip1} protein using an immunohistochemical method, and compared these results with known prognostic parameters of the breast cancer. p27^{Kip1} protein was intensely stained in nuclei of carcinoma cells in 26 cases (53.1%). The expression rate of p27^{Kip1} protein was significantly higher in higher nuclear grade ($p < 0.05$), lower histologic grade ($p < 0.01$), lower N classification ($p < 0.001$) and lower clinical stage ($p < 0.05$) than in lower nuclear grade, higher histologic grade, higher N classification and higher clinical stage, respectively. p27^{Kip1} protein expression was significantly correlated with progesterone receptor status ($p < 0.05$) or cyclin D expression ($p < 0.05$). No statistical correlations were found between expression of p27^{Kip1} protein and other parameters including tumor size, estrogen receptor status, p53 overexpression and c-erbB-2 expression. The results suggest that reduced expression of p27^{Kip1} protein plays a role in biologically aggressive behavior of breast carcinoma and might contribute in predicting breast cancer patient's survival. (**Korean J Pathol 1998; 32: 1081 ~ 1088**)

Key Words: Breast neoplasm, p27, Cyclin-dependent kinase inhibitor, Prognosis

서 론

세포주기 조절 인자의 이상이 다양한 인체 암종들과

접 수: 1998년 5월 26일, 게재승인: 1998년 8월 13일
주 소: 서울시 강남구 일원동 50번지, 우편번호 135-710,
E-mail: yodasong@smc.samsung.co.kr
삼성서울병원 진단병리과, 송상용

이 연구는 성균관대학교 의과대학 및 삼성서울병원 임상연구비의 지원에 의하여 이루어졌음.

*김덕환의 현재 소속은 한림대학교 의과대학 병리학교실 강동성심병원 해부병리과임.

ISSN : 0379-1149

연관이 있다는 연구 결과는 이미 오래 전부터 잘 알려져 왔다. 그 중에서도 특히 cyclin과 cyclin-dependent kinase (cdk)들의 역할은 세포 주기 조절에 있어서 촉진 인자로서 작용하여 종양의 진행과 연관이 있다고 알려져 왔고, 이러한 cdk들의 작용은 다시 cdk 억제자 (cdk inhibitors: CKI)에 의하여 조절을 받는데, 이들 CKI는 두 종류로 나눌 수 있고, 종양 억제 인자로 작용할 수 있다고 보고되어 왔다.^{1~10} 제 1군에 속하는 것들은 p15^{Ink4B},¹ p16^{Ink4A},² p18^{Ink4C},³ p19^{Ink4D}이고,⁴ 제 2군에 속하는 것들은 p21^{Waf1/Cip1},^{5,6} p27^{Kip1},⁷⁻⁹ p57^{Kip2}이 있다.¹⁰

p27^{Kip1} 단백질은 접촉 억제 (contact inhibition)에 의하여 휴지기에 있는 세포나 transforming growth factor (TGF)-

β 처리를 한 세포에서 음성 성장 조절자의 역할을 하는 것으로 알려지기 시작했다.⁷⁻⁹ p27^{Kip1} 단백질은 cyclin-cdk 복합체들, 즉 cyclin D-cdk4, cyclin E-cdk2, cyclin A-cdk2 들에 부착하여 이들의 작용을 억제하는 기능을 갖고 있다.⁹ 따라서 세포 주기 중, G1 진행의 조절 인자로서 작용하며, 세포의 성장과 분화에서 중요한 역할을 한다.^{11,12} 흥미로운 사실은 p27^{Kip1} 단백질의 발현 대부분이 ubiquitin-proteasome에 의하여 매개되는 단백질 분해 기전에 의하여 후전사 단계 (post-transcriptional level)에서 조절되고, 다양한 종양에서 p27^{Kip1} 유전자 변이나 mRNA 변화가 없다는 점이다.¹³⁻¹⁷ 결국 p27^{Kip1}과 암종과의 관계에 대한 연구는 면역조직화학적 검사를 중심으로 이루어지고 있는 것이 최근의 연구 동향이다. 인체 암종 중에서는 유방암을 비롯하여 결장암과 비-소세포성 폐암 등에서 연관성이 보고된 바 있다.¹⁸⁻²²

유방암은 서구 여성에 가장 많은 암종이고, 한국 여성에 있어서는 자궁암과 위암에 이어 3위를 차지하고 있으며 최근 그 빈도가 증가하고 있는 중요한 암종이다.²³⁻²⁷ 이러한 중요성 때문에 다양한 생물학적 인자들, 즉 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 증식세포 핵항원, Ki-67, AgNOR, 표피성장인자 및 그 수용체, c-myc, c-erbB-2, BRCA1, bcl-2, p53, cyclin D1, nm23, cathepsin D 등의 변화와 유방암종 조직 또는 환자의 예후에 대한 다양한 연구가 이루어져 왔다.²⁵⁻²⁷ 현재까지 인체 유방암 조직에서 p27^{Kip1}의 역할은 환자의 예후와 음성적 연관성을 갖는 것으로 알려져 있다. 본 연구자들은 최근에 우리 나라의 유방암 조직을 대상으로 다양한 분자생물학적 인자들과의 연관성을 조사하여 발표한 바 있기 때문에 기존의 결과를 바탕으로 새로운 예후 관련 인자로 대두되고 있는 p27^{Kip1} 발현과의 연관성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구 재료

1995년 3월부터 1997년 2월까지 성균관대학교 의과대학 삼성서울병원에서 침윤성 유방암종으로 진단 받고 외과적으로 절제된 예 중, 수술 전 생검에 의하여 충분한 양의 종양 조직과 주변 비-종양 영역이 포함되어 있지 않고, 조직 보관 상태가 양호하지 않으며, 임상적 정보를 얻을 수 없는 예를 제외하였다. 그 중 임상적 병기가 4기인 예들은 수술 불가능성 때문에 수술 예가 매우 적기 때문에 이들을 제외한 49예를 최종 연구 대상으로 하였다.

2. 연구 방법

1) 임상소견: 연구 대상 환자들의 나이, 원경 전이 여부, 병기 등의 임상 기록은 병력지를 검토하여 조사하였다. 대상 환자들은 모두 변형 근치유방절제술과 림프선절제술을 시행받았다.

2) 병리조직학 검사: 외과적으로 절제된 조직은 신선 상태에서 육안 검사를 시행한 후, 1 cm 간격으로 연속 절단하여 12~24시간 동안 포르말린에 고정하였다. 종양의 크기를 재고 괴사와 출혈이 적은 총질 부위에서, 조직을 채취하여 통상의 조직 처리 방법에 따라 파라핀 포매 후 헤마톡시린-에오신 염색을 하였다. 암종의 조직학적 분류는 잘 알려진 WHO 분류에 따랐고, 조직학적 등급은 변형 Bloom과 Richardson법에 따라 세관 형성이 많고, 유사분열이 적으며, 핵 다형성이 거의 없는 경우를 I등급 (고분화)으로 하였고, 세관 형성이 거의 없고, 유사분열이 많으며, 핵 다형성이 심한 경우를 III등급 (저분화)으로 하였으며, 그 중간에 해당하는 경우를 II등급 (중등분화)으로 하였다.²⁸ 핵 등급은 Black법에 따라 큰 핵소체가 자주 보이고 핵막의 불규칙함이 심한 경우를 I 등급 (저분화)으로, 그렇지 않은 경우를 III등급 (고분화)으로, 중간을 II등급 (중등분화)으로 하였다.²⁹ 종양 주변에서 관내 암종 (in situ carcinoma)이 있거나, 림프관 또는 혈관 침범이 관찰되는 경우 모두 기록하였다. 종양의 침범 (T classification)과 림프절 전이 (N classification), 그리고 이를 기반으로 한 병기의 결정은 국제 암 연합위원회의 TNM 병기 (UICC-TNM) 4판을 참조하였다.³⁰

3) 면역조직화학 검사: 면역조직화학 검사를 위하여 침윤 암종 부위와 주변의 비-종양 조직이 포함된 포르말린 고정 파라핀 포매 블록을 선정하였다. 통상적인 면역조직화학 염색법인 streptavidin-biotin complex 방법을 시행하였고, DAKO TechMate™ 1000 자동염색기를 이용하였다. 사용한 일차항체는 p27^{Kip1} (Transduction Laboratory, monoclonal, 1 : 1000)이고, 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride로 5분간 발색한 후 메이어 헤마톡시린으로 대조 염색하여 현미경으로 관찰하였다. 음성 대조군으로는 일차 항체 대신 생리 식염수를 가한 조직을 관찰하였고, 양성 대조군으로는 종양 주변의 비-종양 상피 세포를 이용하였다. 양성의 판정은 분명한 갈색의 핵 염색이 전체 종양 세포 영역의 10% 이상일 때로 하였다. p27^{Kip1} 면역조직화학 염색은 2회 반복하여 동일한 결과를 얻었다.

다른 일차 항체들은 estrogen receptor (Immunotech, monoclonal, 1 : 50), progesterone receptor (Dako, polyclonal, 1 : 50), p53 (Zymed, monoclonal, BP53.12, 1 : 80), c-erbB-2 (Dako, polyclonal, 1 : 20), cyclin D1 (Novocastra, monoclonal, P2D11F11, 1 : 30) 등을 사용하였고, 기존의 논문에서 발표한 것과 같이 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, p53, cyclin D1 등은 분명한 갈색의 핵 염색이 종양 세포 영역의 10% 이상일 때, c-erbB-2는 분명한 갈색의 세포막 염색이 역시 종양 세포 영역의 10% 이상일 때를 양성으로 판정하였다.²⁶

4) 통계학적 분석: 통계학적 분석을 위하여 개인용 컴퓨터 통계 프로그램인 SPSS for Windows, 7.5.1 Release를 이용하여 Fisher's exact test, Chi-square, Linear by

linear association으로 검정하였다. 유의 수준은 p 값이 0.05 이하일 때로 하여 수치를 표시하였고, 0.05를 초과했을 때는 의미 없음 (NS: not significant)으로 판정하였다.

결 과

1. 임상소견 및 병리조직학적 특성 (Table 1)

대상 환자들의 나이는 30세부터 75세까지로 평균 연령은 47.8±11.4세이었다. 종양의 크기는 1 cm부터 9 cm까지 관찰되었고, 평균 크기는 3.6±1.8 cm이었다. 크기에 따라 나누었을 때, 2 cm 이하의 소형 유방암은 14예 (28.6%), 2 cm 초과 5 cm 이하는 28예 (57.1%), 5 cm 초과는 7예 (14.3%) 이었다.

연구 대상 암종은 대부분 침윤성 관암종으로 46예 (93.9%)이었고, 수질성 암종이 2예 (4.1%), 점액성 암종이 1예 (2.0%) 포함되었다. 핵 등급은 II등급이 26예

(53.1%)로 가장 많았고, I등급이 17예 (34.7%), III등급이 6예 (12.2%)의 순이었다. 조직학적 등급은 III등급이 가장 많아서 27예 (55.1%)이었고, II등급이 18예 (36.7%), I등급이 4예 (8.2%)의 순이었다. 겨드랑이 림프절 전이는 23예 (46.9%)가 음성이었고, N1, N2 각각 13예 (26.5%) 씩이었다. 임상적 병기는 II기가 26예 (53.1%)로 가장 많았고, III기가 13예 (26.5%), I기가 10예 (20.4%)이었다.

면역조직화학 검사에서는 에스트로겐 수용체의 발현이 57.1% (28예), 프로게스테론 수용체의 발현이 42.9% (21예), p53 단백 발현이 32.7% (16예), c-erbB-2 발현이 65.3% (32예), cyclin D1 발현이 55.1% (27예)이었다. 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, p53 단백, cyclin D1 등의 발현은 모두 핵에서 관찰할 수 있었고, c-erbB-2만이 세포막 염색으로 관찰되었다.

2. p27^{Kip1} 발현과 병리학적 예후 인자와의 상관 관계 (Table 2)

p27^{Kip1}의 발현은 연구 대상 49 예의 유방암 조직 중 26 예 (53.1%)에서 양성을 보였다. 거의 대부분의 대상 예들에서 비-종양 조직이 포함되었고, 관 상피 세포의

Table 1. General characteristics of studied cases (n=49)

Parameters	No. of cases	%
Tumor size		
0~2 cm	14	28.6
2~5 cm	28	57.1
5~ cm	7	14.3
Nuclear grade		
I	17	34.7
II	26	53.1
III	6	12.2
Histologic grade		
I	4	8.2
II	18	36.7
III	27	55.1
Lymph node		
N0	23	46.9
N1	13	26.5
N2	13	26.5
Stage		
I	10	20.4
II	26	53.1
III	13	26.5
Positive immunoreactivity		
ER	28	57.1
PR	21	42.9
p53	16	32.7
c-erbB-2	32	65.3
Cyclin D1	27	55.1
p27	26	53.1

ER: estrogen receptor
PR: progesterone receptor

Table 2. Relationship between p27 expression and clinicopathologic parameters in breast carcinoma

Parameters	p27 immunoreactivity		p-value
	Negative	Positive	
Samples (n=49)	23	26	
Tumor size			NS
0~2 cm	4	10	
2~5 cm	16	12	
5~ cm	3	4	
Nuclear grade			0.034
I	10	7	
II	13	13	
III	0	6	
Histologic grade			0.006
I	0	4	
II	6	12	
III	17	10	
Lymph node			0.000
N0	4	19	
N1	7	6	
N2	12	1	
Stage			0.020
I	2	8	
II	12	14	
III	9	4	

NS: not significant

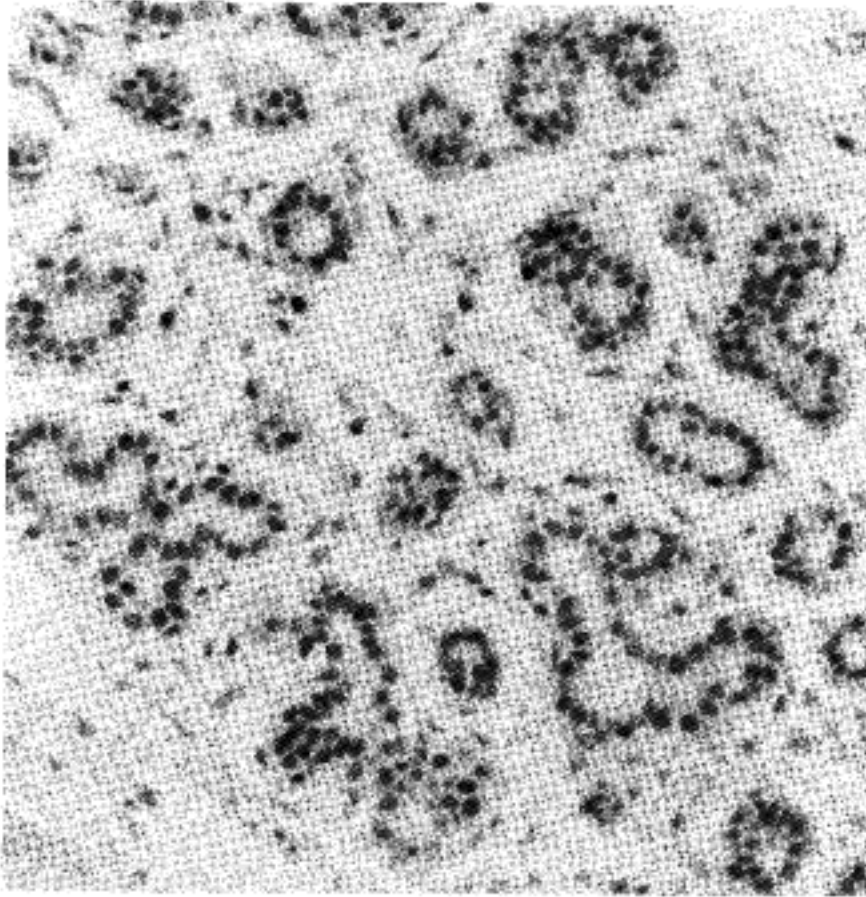


Fig. 1. Benign or normal ductal epithelial cells and myoepithelial cells show diffuse, intense, nuclear immunoreactivity against anti-p27^{Kip1} antibody.

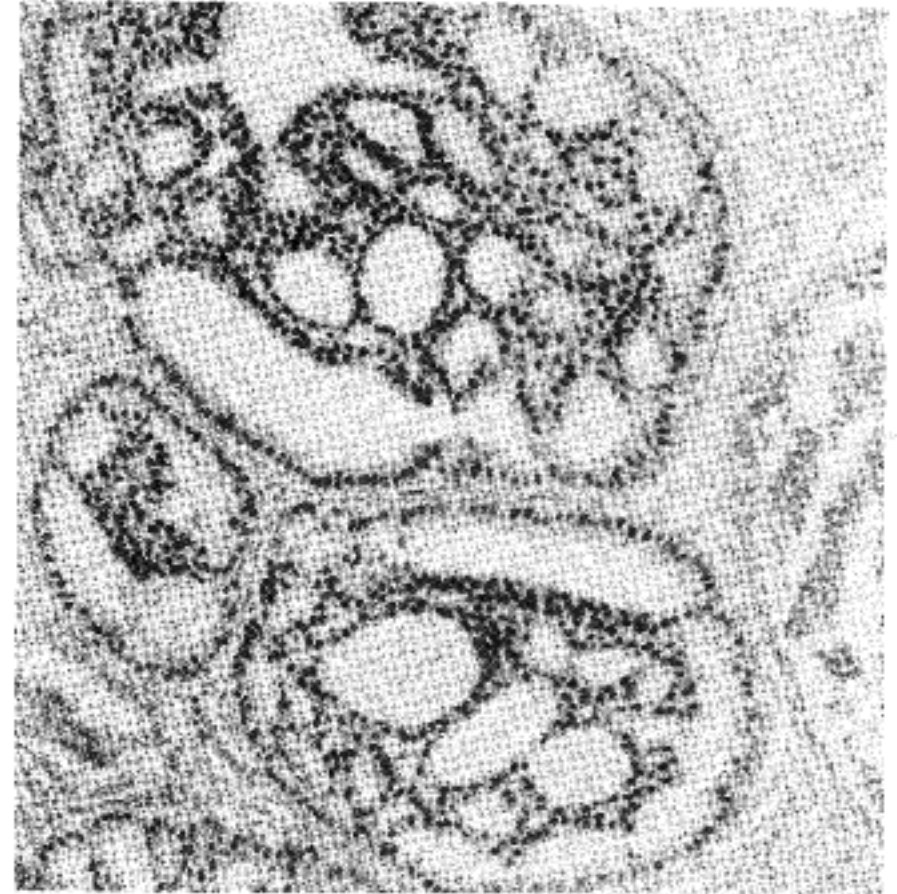


Fig. 2. Immunohistochemically, p27^{Kip1} protein expression is demonstrated in duct carcinoma in situ lesion.

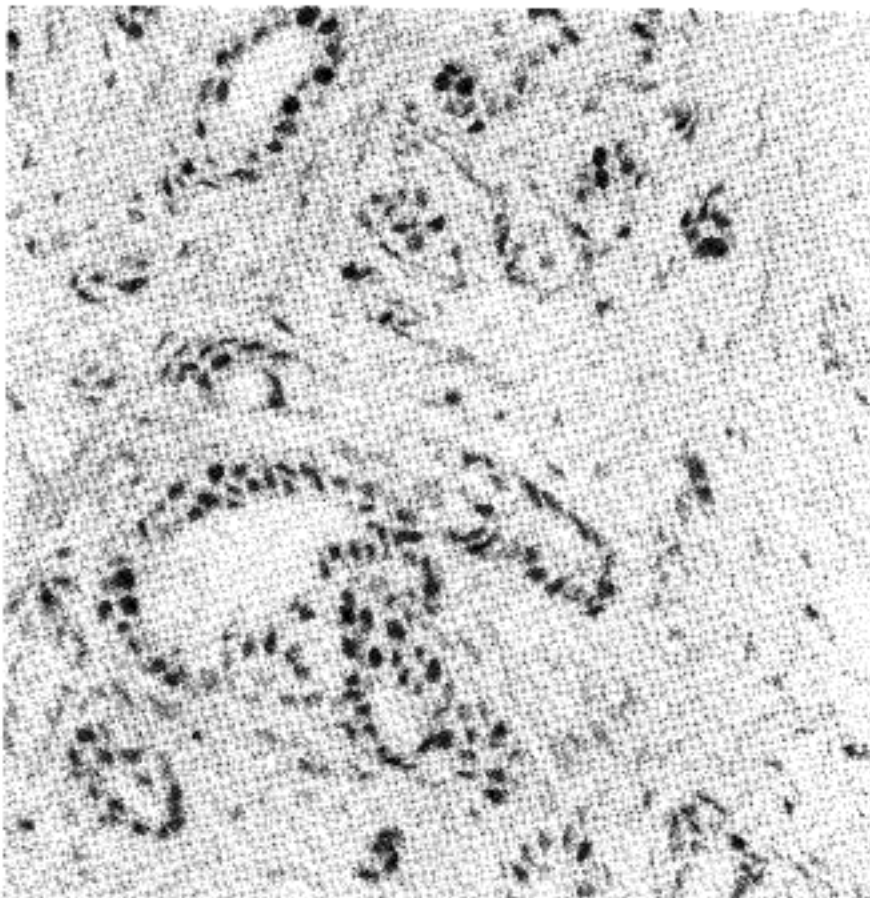


Fig. 3. Infiltrating duct carcinoma cells with well differentiated histology show diffuse, intense, nuclear immunoreactivity against anti-p27^{Kip1} antibody.

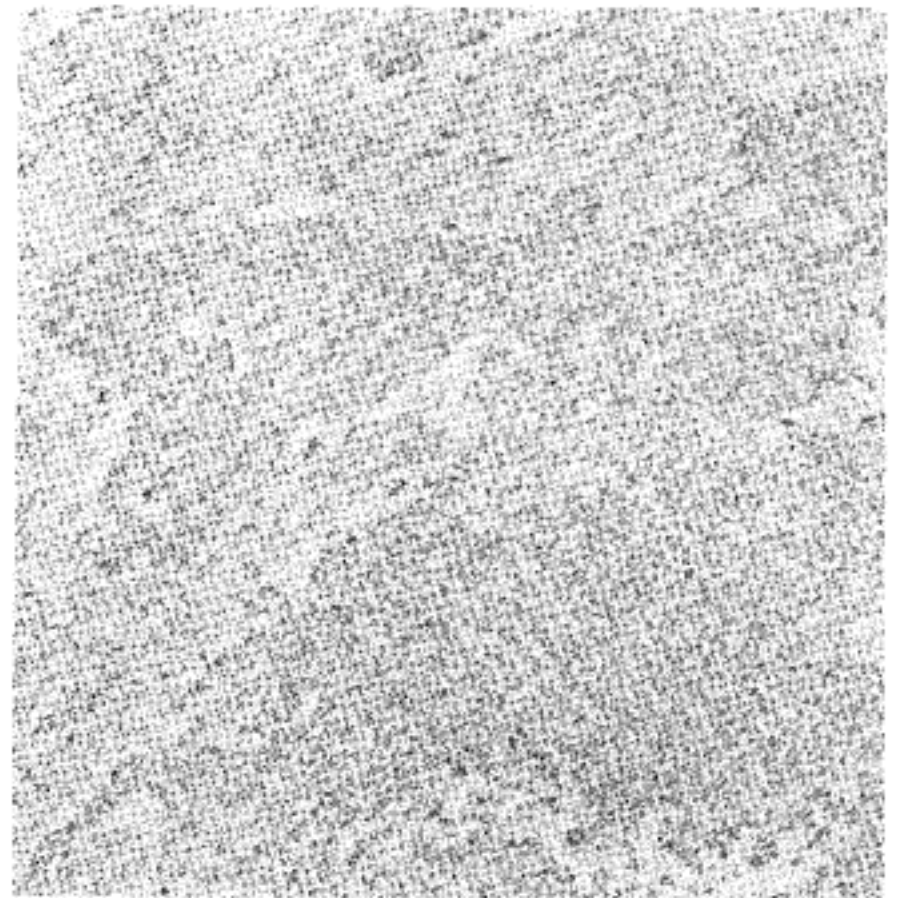


Fig. 4. Poorly differentiated infiltrating duct carcinoma cells do not show immunohistochemical expression of p27^{Kip1} protein.

핵에서 뚜렷한 양성 반응을 관찰할 수 있었다. 암종에서 양성률과 음성을 구분하기 어려운 경우는 없었다. 대개의 경우 10~70%의 종양 세포들이 양성 반응을 보였으며, 림프구와 혈관 내피 세포를 제외한 비특이적 염

색은 거의 없었다. 수질성 암종은 1예는 양성, 다른 1예는 음성이었고, 점액성 암종 1예는 양성이었다. 한편, 일부의 예에서 관내암종 (duct carcinoma in situ), 위성 결절들이 포함되었고 대개 양성 반응을 보였다. 유방암

의 조직학적 분류와 제자리 관암종, 위성 결절에 따른 p27^{Kip1} 발현은 증례의 부족으로 통계학적 분석을 시도하지 않았다.

종양의 크기가 2 cm 이하인 소형 암종의 경우, p27^{Kip1} 발현율은 71.4%로써 2 cm 초과인 경우의 발현율 45.7%보다 상당히 높았으나 통계적인 유의성은 없었다. 핵 등급에 따라서는 p27^{Kip1} 발현율이 III등급일 때 100%, II등급일 때 50%, I등급일 때 41.2%로 통계적으로 뚜렷한 차이를 보여 주었다 ($p < 0.05$). 조직학적 등급에 따른 p27^{Kip1} 발현율은 I등급일 때 100%, II등급일 때 66.7%, III등급일 때 37%로 역시 통계적인 차이를 보였다 ($p < 0.01$). 림프절 전이에 따른 p27^{Kip1} 발현율의 차이는 N0일 때 82.6%, N1일 때 46.2%, N2일 때 7.7%로 역시 통계적으로 유의한 차이를 보였다 ($p < 0.001$). 병기에 따른 p27^{Kip1} 발현은 I병기에서 80%, II병기에서 53.8%, III병기에서 30.8%로써 역시 통계적으로 유의한 차이를 보여 주었다 ($p < 0.05$).

3. p27^{Kip1} 발현과 다른 면역조직화학적 예후 인자와의 상관 관계 (Table 3)

에스트로겐 수용체가 음성일 때와 양성일 때의 p27^{Kip1} 발현율은 각각 38.1%와 64.3%로써 차이가 있었으나 통계적인 유의성은 없었다. 반면에 프로게스테론 수용체의 경우 음성일 때와 양성일 때의 p27^{Kip1} 발현율은 각

각 39.3%와 71.4%로써 통계적으로 유의한 차이를 보였다 ($p < 0.05$). p53 단백질 발현이 음성일 때와 양성일 때의 p27^{Kip1} 발현율은 각각 60.6%와 37.5%, c-erbB-2 발현이 음성일 때와 양성일 때의 p27^{Kip1} 발현율은 각각 70.5%와 43.8%로써 모두 통계적인 유의성을 찾을 수 없었다. 그러나, cyclin D1의 발현은 음성일 때와 양성일 때의 p27^{Kip1} 발현율이 각각 36.4%와 66.7%로써 통계적으로 유의한 상관 관계를 보였다 ($p < 0.05$).

고 찰

본 연구 결과를 주목하면 유방암 조직에서의 p27^{Kip1} 단백질 발현이 다른 면역조직화학적 예후 관련 인자들에 비해 기존의 병리학적 예후 관련 인자와 연관성이 높음을 쉽게 알 수 있다. 특히 유방암의 빈도가 높은 서구의 연구 결과들에서는 다양한 면역조직화학적 예후 인자들이 암종의 진행이나 환자의 예후와 연관성이 높다고 보고되어 왔으나, 국내의 연구 결과에서는 연구자들마다의 결과의 차이때문에 그리 주목할 만한 결과를 보여 주지 못해 왔다.^{25,26,31-35} 아직까지 이러한 결과 차이의 원인에 대해서는 분석이 이루어지지 않았으나, 유방암의 원인 중에 유전학적 요소와 환경적 요소가 상당히 관여하는 것으로 미루어 서구 여성과 우리 나라 여성이 이들 요소들에 차이를 보였기 때문일 것으로 추측할 수 있다.

본 연구 결과에서 p27^{Kip1} 단백질 발현은 암종의 크기를 제외한 다른 병리학적 예후 인자들과 통계적으로 유의한 상관 관계를 보여 주었다. 이와 같이 p27^{Kip1} 단백질 발현이 종양의 진행이나 분화에 관여하는 것은 이 물질이 세포 주기 조절 단계에서 중요한 역할을 하기 때문이다. 포유류 세포의 주기 조절에서 중요한 곳은 바로 G1/S 이행 단계이고, 이 시점에서 다양한 cyclin들과 cdk들의 조절 작용이 이루어진다. 이들은 복합체 형태로 작용을 하게 되는데, 대표적인 복합체들로는 cyclin E-cdk2, cyclin D-cdk4 or cdk6, cyclin A-cdk2 등이 있다. 이 복합체에서 cdk는 촉매 단위의 역할을 하고, cyclin은 조절 단위의 역할을 한다. 이들 복합체를 억제하여 조절 기능을 하는 것이 CKI인데, 이는 두 군으로 나누어진다. Ink4 군은 비교적 선택적으로 cdk4/cdk6 작용을 조절하는 반면, Cip1/Kip1 군은 다양한 cdk들의 키나제 작용을 조절하는 것으로 알려져 왔다.²¹ p27^{Kip1} 단백질은 바로 Cip1/Kip1 군에 속하며 세포 성장의 음성 조절자로서의 역할을 하기 때문에, 유전자 타격 (knock-out) 생쥐에서 다양한 장기의 과형성과 뇌하수체 종양을 관찰할 수 있고,³⁶⁻³⁸ 이러한 작용 때문에 p27^{Kip1}은 종양 억제자로 간주되고 있다. 따라서 본 연구에서 보인 유방암의 여러 가지 병리학적 진행 인자들과 p27^{Kip1} 단백질 발현의 연관성은 예측할 수 있는 결과였다. 이와 관련된 연구 결과들은 이미 서구에서는 인체 조직과 암 세포주 실험을 통하여 알려져 있다.¹⁷⁻²¹

Table 3. Relationship between p27 expression and other immunohistochemical parameters in breast carcinoma

Parameters	p27 immunoreactivity		p-value
	Negative	Positive	
Samples (n=49)	23	26	
ER			NS
Negative	13	8	
Positive	10	18	
PR			0.025
Negative	17	11	
Positive	6	15	
p53			NS
Negative	13	20	
Positive	10	6	
c-erbB-2			NS
Negative	5	12	
Positive	18	14	
Cyclin D1			0.033
Negative	14	8	
Positive	9	18	

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

p27^{Kip1} 단백질 발현과 다른 여러 가지 분자생물학적 예후 인자들과의 연관성은 아직까지 연구가 계속되고 있는 분야이다. Cyclin D1이나 cyclin E와의 연관성은 작용 기전을 고려하면 쉽게 이해할 수 있는 사항이고 인체 유방암 조직을 이용한 연구에서도 그 자료들이 제시되어 왔다.^{20,21} p27^{Kip1} 단백질과 cyclin D1은 상호 조절적으로 작용하는 것으로 생각되어지고 있다.²¹ 즉, 생물학적 악성도가 매우 높은 암종이나 그 세포주에서 p27^{Kip1} 단백질 발현이 높은 경우가 있는데, 이런 경우 종양 세포가 cyclin D1을 과량 생산하여 p27^{Kip1}의 성장 억제자로서의 역할을 상쇄할 수 있다는 점이다. 또한 TGF- β 처리를 할 경우 p27^{Kip1}-cyclin D1-cdk 복합체가 감소하여 자유 p27^{Kip1}이 증가할 수 있지만 이 때는 p27^{Kip1}-cyclin E-cdk 복합체가 증가하기 때문에 이들 세포 주기 조절에 관여하는 인자들의 작용은 상호 조절적인 관점에서 이해하여야 한다. 본 연구자들의 과거 연구와²⁶ 본 연구에서도 cyclin D1 발현이 단독으로는 호르몬 수용체를 제외한다면 예후 인자들과 연관 관계를 보이지 않았지만 본 연구에서 p27^{Kip1} 단백질 발현과 cyclin D1 발현이 통계학적인 연관성을 보여 주었고, p27^{Kip1} 발현 역시 호르몬 수용체의 발현과 상호 연관성을 보여 주었기 때문에, 호르몬-p27^{Kip1}-cyclin D1-cdk 복합체의 고리 작용 (loop reaction)이 유방암의 진행과 환자의 예후에 영향을 줄 가능성을 시사하는 소견으로 사료되었다.

유방암에서 에스트로겐 수용체와 프로게스테론 수용체의 발현 역시 p27^{Kip1} 단백질 발현과 연관이 있다는 보고는 어렵지 않게 찾을 수 있으나,^{18,19} 이에 대한 설명은 발견하기 힘들다. 정확한 기전은 알 수 없고 이론의 여지가 있기는 하지만, cyclin들이 에스트로겐의 영향을 받을 수 있고,³⁹⁻⁴³ 암 세포주 실험에서 cdk2, p27^{Kip1}, p21^{Cip1}의 작용이 프로게스테론에 의하여 조절된다는 연구 결과가 제시되었기 때문에 이들 호르몬과 호르몬 수용체들이 밀접한 연관성을 가질 것을 예상할 수 있다.⁴⁴ 간접적인 증거로는 유전자 타격 생쥐 연구에서 볼 수 있듯이 과증식이 일어나는 장기들이 내분비계와 연관되어 있다는 점이다.³⁶⁻³⁸ 본 연구에서는 cyclin D1의 발현과 프로게스테론 수용체의 발현이 p27^{Kip1} 단백질 발현과 통계적인 유의성을 보여 기왕에 보고된 결과들과 일치하였고, 에스트로겐 수용체의 경우 p=0.063의 통계학적인 경계 영역에 있었기 때문에 증례의 축적에 따라 그 의미가 변할 가능성을 배제할 수 없었다. p53 단백질이나 c-erbB-2의 발현과 p27^{Kip1} 단백질 발현은 아직까지 유의한 상관 관계에 대한 보고가 없고,¹⁸ 본 연구에서도 전혀 통계학적인 유의성이 없었다.

본 연구에서 여러 가지 면역조직화학적 인자들의 발현율 (ER; 57.1%, PR; 42.9%, p53; 32.7%, c-erbB-2; 65.3%, Cyclin D1; 55.1%, p27; 53.1%)은 기존의 보고들과 크게 다르지 않아 본 연구의 재료와 방법이 무리가 없음을 보여 주었다. 다만 우려되는 점은 아직까지 p27^{Kip1} 단백질 발현의 평가 방법이 연구자마다 다르다는

점이다. Porter등²⁰은 염색 강도와 영역에 따라 6구분하여 0~1을 저 발현군으로, 2~6을 고 발현군으로 구분하여 연구하였고, Tan등¹⁸과 Catzavelos등¹⁹은 염색된 종양 세포가 전체의 50% 이하일 때를 저 발현군, 50%를 넘을 때를 고 발현군으로 구분하여 연구하였다. Frederdsdorf등²¹만이 본 연구와 유사하게 음성과 양성으로 양분하여 연구를 수행하였다. 이들 연구와 본 연구의 차이점은 물론 생존 분석이 본 연구에서 없었다는 점이다. 따라서 생존 분석을 위하여 이들 연구자들이 저 발현군과 고 발현군을 나누었는지의 여부는 본 연구에서 아직 생존 분석을 시행할 만한 추적 조사 기간이 없었기에 언급할 수 없는 사항이다. 참고적으로 사용한 일차 항체는 Porter등²⁰과 Frederdsdorf등²¹은 각자의 일차 항체를 사용하였고, Tan등¹⁸과 Catzavelos등¹⁹은 본 연구자와 같은 회사, 같은 종류의 일차 항체를 사용하였으나, Tan등¹⁸의 경우 희석 배수가 1:200이었고, Catzavelos등¹⁹은 본 연구자와 같이 1:1000으로 희석하여 사용하였다. Tan등¹⁸이나 Catzavelos등¹⁹과 같이 고/저 발현군으로 구분하지 않은 이유는 첫째, 본 연구에서는 비특이적 배경 염색이 거의 없었고, 둘째, 양성과 음성의 양분법이 쉬워서 누구나 재현할 수 있다고 믿었으며, 셋째, 염색을 2회 실시하여 동일한 결과를 얻었고, 넷째, 50% 이상의 고 발현군의 증례가 10개 미만으로 통계 처리가 곤란하였기 때문이다. 향후 증례 수의 축적과 생존 분석 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 사료되었다.

여러 가지 병리학적 인자 중에서 림프절 전이의 경우, p27^{Kip1} 단백질 발현율이 N0일 때 82.6%, N1일 때 46.2%, N2일 때 7.7%로써 다른 어느 인자보다 밀접한 연관 관계를 보인 점은 두 가지 측면의 고찰이 가능하다. 첫째는 향후 생존 분석에서도 중요한 예후 인자로 나타날 가능성이 높다는 점이고, 둘째는 p27^{Kip1}의 작용이 유방암 진행의 후기에서 주로 역할을 할 가능성을 시사한다는 점이다. 이는 상대적으로 초기 단계인 T 분류와의 상관 관계가 경계성 영역의 p값을 보였다는 점에서 이 가정이 옳을 가능성을 시사하는 결과로 사료되었다.

결 론

49예의 침윤성 유방암 조직을 대상으로 p27^{Kip1} 단백질 발현에 대한 면역조직화학 검사를 시행하여 그 발현 양상을 관찰하였고, 기존의 예후 인자들인 종양의 크기, 핵 등급, 조직학적 등급, 림프절 전이, 병기, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, p53 단백질, c-erbB-2, cyclin D1 등의 발현과의 관계를 분석하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1) p27^{Kip1} 단백질 발현은 연구 대상 49예의 유방암 조직 중 26예 (53.1%)에서 암 세포의 핵에 양성을 보였다. 주변의 비-종양 관 상피 세포와 제자리 관암종에서도 뚜렷한 핵 염색을 관찰할 수 있었다.

2) p27^{Kip1} 단백질 발현은 핵 등급 (III; 100%, II; 50%, I; 41.2%, p<0.05), 조직학적 등급 (I; 100%, II; 66.7%, III; 37%, p<0.01), 림프절 전이 (N0; 82.6%, N1; 46.2%, N2; 7.7%, p<0.001), 병기 (I; 80%, II; 53.8%, III; 30.8%, p<0.05) 와 유의한 상관관계를 보였다. 그러나 종양의 크기는 p27^{Kip1} 단백질 발현과 유의한 상관관계를 보이지 않았다.

3) p27^{Kip1} 단백질 발현은 프로게스테론 수용체 (p<0.05), cyclin D1 (p<0.05)의 발현과 유의한 상관관계를 보였으나, 에스트로겐 수용체, p53 단백질, c-erbB-2의 발현과는 유의한 상관관계를 보이지 않았다.

p27^{Kip1} 단백질 발현의 감소는 낮은 핵 등급, 높은 조직학적 등급, 많은 림프절 전이, 높은 임상 병기와 연관되어 유방암의 악성도와 음성적 상관 관계를 보임을 알 수 있었다. 이와 같은 결과를 바탕으로 p27^{Kip1} 단백질 발현이 유방암 조직에서 면역조직화학적으로 자주 나타나며, 기존의 여러 가지 예후 인자들과 유의한 상관관계를 갖기 때문에 향후 유방암 환자의 예후의 지표로서 중요한 역할을 할 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- Hannon GJ, Beach D. p15^{INK4B} is a potential effector of TGF-β-induced cell cycle arrest. *Nature* 1994; 371: 257-61.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; 366: 704-7.
- Guan K-L, Jenkins CW, Li Y, et al. Growth suppression by p18, a p16^{INK4/MTS1} and p14^{INK4/MTS2}-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type Rb function. *Genes Dev* 1994; 8: 2939-52.
- Hirai H, Roussel MF, Kato J, Ashmun RA, Sherr CJ. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2672-81.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805-16.
- Xiong Y, Hannon GJ, Zhang GJ, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; 366: 701-4.
- Polyak K, Lee M-H, Erdjument-Bromage H, et al. Cloning of p27^{Kip1}, a cyclin-dependent kinase and a potent mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994; 78: 59-66.
- Polyak K, Kato J, Solomon MJ, et al. p27^{Kip1}, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994; 8: 9-22.
- Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994; 78: 67-74.
- Matsuoka S, Edwards M, Bai C, et al. P57^{Kip2}, a structurally distinct member of the Cip1 cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Gene Dev* 1995; 9: 650-62.
- Kranenburg O, Scharnhorst V, Van der Eb A, Zantema A. Inhibition of cyclin-dependent kinase activity triggers neuronal differentiation of mouse neuroblastoma cells. *J Cell Biol* 1995; 131: 227-34.
- Ciaparrone M, Yamamoto H, Yao Y, et al. Localization and expression of p27^{Kip1} in multistage colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 1998; 58: 114-22.
- Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, et al. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 1995; 269: 682-5.
- Hengst L, Reed SI. Transitional control of p27^{Kip1} accumulation during the cell cycle. *Science* 1996; 271: 1861-4.
- Ponce-Castaneda MV, Lee M-H, Latres E, et al. p27^{Kip1}: chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors. *Cancer Res* 1995; 55: 1211-4.
- Kawamata N, Morosetti R, Miller CW, et al. Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/Kip1 in human malignancies. *Cancer Res* 1995; 55: 2266-9.
- Loda M, Cukor B, Tam SW, et al. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 1997; 2: 231-4.
- Tan P, Cady B, Wanner M, et al. The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57: 1259-63.
- Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, et al. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27^{Kip1} protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med* 1997; 3: 227-30.
- Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, et al. Expression of cell-cycle regulators p27^{Kip1} and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat Med* 1997; 3: 222-5.
- Fredersdorf S, Burns J, Milne AM, et al. High level expression of p27^{Kip1} and cyclin D1 in some human breast cancer cells: inverse correlation between the expression of p27^{Kip1} and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6380-5.
- Spirin KS, Simpson JF, Takeuchi S, Kawamata N, Miller CW, Koeffler HP. p27/Kip1 mutation found in breast cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 2400-4.
- 김인철. 유방암의 조기진단. *대한의학협회지* 1992; 4: 479-83.
- 대한민국 보건사회부. 한국인 암등록 조사자료 분석 보고서

- (1991. 7. 1~1992. 6. 30), 3월, 1993년.
25. 송상용, 지제근, 한세환, 최국진. 유방암의 nm23 단백 발현. -면역조직화학적 연구-. 대한병리학회지 1995; 29: 469-77.
 26. 김덕환, 남은숙, 신형식 등. 유방암종 101예의 Cyclin D1 발현의 분석. 대한병리학회지 1998; 32: 266-72.
 27. Han S, Yun I-J, Noh D-Y, Choe K-J, Song S-Y, Chi JG. Abnormal expression of four novel molecular markers represents a highly aggressive phenotype in breast cancer. Immunohistochemical assay of p53, nm23, erbB-2, and cathepsin D protein. J Surg Oncol 1997; 65: 22-7.
 28. Elston CW. Grading of invasive carcinoma of the breast. In: Page DL, Anderson TJ, eds. Diagnostic histopathology of the breast. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987; 300-11.
 29. Black MM, Speer FD. Nuclear structure in cancer tissue. Surg Gynecol Obstet 1957; 105: 97-102.
 30. Beahrs OH, Henson DE, Hutter RV, Kennedy BJ, eds. Manual for staging of cancer. 4th ed. Philadelphia. JB Lippincott, 1992: 149-52.
 31. 정민희, 이승철, 손윤경, 서인수. 유방의 침윤성 관암종에서 nm23 단백질의 면역조직화학적 분석. 대한병리학회지 1997; 31: 145-51.
 32. 정화숙, 성노현. 침윤성 유방암에서 CD34 염색을 이용한 미세혈관의 양적 측정 및 그 유용성 평가. 대한병리학회지 1997; 31: 298-307.
 33. 이승철, 손윤경,곽정식, 정운복, 김정완. 유방 침윤성 관암종의 CD44 발현도와 예후 인자들과의 관계. 대한병리학회지 1997; 31: 635-43.
 34. 강행지, 박찬필, 박찬금. 유방암종에서 E-Cadherin 세포 부착 분자의 발현과 암종의 조직학적 분화도 및 호르몬 수용체와의 상관관계에 대한 연구. 대한병리학회지 1997; 31: 1172-9.
 35. 김진아, 김원일, 심상인, 강창석, 이교영, 김영신. 유방암종에서의 nm23 및 E-cadherin 단백질의 발현. 대한병리학회지 1998; 32: 29-34.
 36. Fero ML, Rivikin M, Tasch M, et al. A syndrome of multi-organ hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis and female sterility in p27^{Kip1}-deficient mice. Cell 1996; 85: 733-44.
 37. Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, et al. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27^{Kip1}. Cell 1996; 85: 721-32.
 38. Nakayama K, Ishida N, Shirane M, et al. Mice lacking p27^{Kip1} display increased body size, multiple organ hyperplasia, retina dysplasia, and pituitary tumors. Cell 1996; 85: 707-21.
 39. Zuckerberg LR, Yang WI, Gadd M, et al. Cyclin D1 (PRAD1) protein expression in breast cancer: approximately one-third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene. Mod Pathol 1995; 8: 560-7.
 40. van Diest PJ, Michalides R, Jannink I. Cyclin D1 expression in invasive breast cancer. Correlation and prognostic value. Am J Pathol 1997; 150: 705-11.
 41. Gillett C, Smith P, Gregory W, et al. Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer. Int J Cancer 1996; 69: 92-9.
 42. Michalides R, Hageman P, van Tinteren H, et al. A clinicopathological study on overexpression of cyclin D1 and p53 in a series of 248 patients with operable breast cancer. Br J Cancer 1996; 73: 728-34.
 43. Mushgrove EA, Hamilton JA, Lee CSL, Sweeney KJE, Watts CKV, Sutherland RL. Growth factor steroid and steroid antagonist regulation of cyclin gene expression associated with changes in T47D human breast cancer cell cycle progression. Mol Cell Biol 1993; 13: 3577-87.
 44. Groshong SD, Owen GI, Grimison B, et al. Biphasic regulation of breast cancer cell growth by progesterone: role of the cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27 (Kip1). Mol Endocrinol 1997; 11: 1593-607.