

유방조직에서 티로신 활성화소 수용체인 EphA2, c-met 및 c-erbB-2의 발현

민수기 · 조현득 · 조성진 · 박혜림
신형식 · 박영익 · 염범우¹

한림대학교 의과대학 병리학교실
¹고려대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2004년 7월 28일
게재승인 : 2004년 11월 11일

책임저자 : 염 범 우
우 136-705 서울시 성북구 안암동 5가 126-1
고려대학교 의과대학 병리학교실
전화: 02-920-6141
Fax: 02-953-3130
E-mail: bwyeom@yahoo.co.kr

The Expressions of Tyrosine Kinase Receptors, EphA2, c-met and c-erbB-2 in the Human Breast

Soo Kee Min, Hyun Deuk Cho, Seong Jin Cho, Hye-Rim Park, Hyung Sik Shin, Young Euy Park and Bom Woo Yeom¹

Department of Pathology, College of Medicine, Hallym University, Chuncheon; ¹Department of Pathology, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

Background : Tyrosine kinase receptor (TKR) is an important protein for normal-development, growth and tumorigenesis in human tissues. The purpose of this study was to evaluate the effect of TKR in the progression of breast cancer. **Methods :** The expressions of EphA2, c-met and c-erbB-2 were examined, by using immunohistochemical methods and RT-PCR, in samples of breast tissue that included 111 samples of normal epithelium, 34 samples of ductal carcinoma in situ (DCIS), and 109 samples of invasive ductal carcinomas (IDC). The results were compared with the prognostic parameters of breast cancer including the tumor grade, growth pattern, lymph node metastasis and the expressions of ER, PR, p53 and Ki-67. **Results :** The protein expressions of the three TKRs were higher in DCIS and IDC than in normal epithelium. The protein expression of EphA2 was correlated with a tumor grade, a labeling index of Ki-67, and the protein expression of c-met. Overexpression of c-erbB-2 was correlated with lymph node metastasis. The mRNA levels of the three TKRs were correlated with each other in normal tissue and IDC. The level of c-met mRNA was higher in the low grade tumors. **Conclusions :** The three TKRs may play roles in the tumorigenesis of human breast cancer. The overexpressions of EphA2 and c-erbB-2 may be a poor prognostic parameter in breast cancers.

Key Words : EphA2; c-met; erbB-2; Tyrosine kinase receptors; Breast cancer

유방암 조직에서, 침윤성 관암종(Invasive ductal carcinoma, IDC) 주변에 유관상피세포의 단순 증식과 비정형 증식, 그리고 관내암종(Ductal carcinoma in situ, DCIS) 등이 함께 관찰되는 것을 볼 수 있다. 이처럼 여러 단계의 조직조건이 같은 조직 내에서 동시에 존재한다는 것은, 유방암이 이러한 과정을 거쳐 정상세포에서 IDC로 진행한다는 것을 의미한다. 이와 같이 정상조직에서 일련의 병변들을 거쳐 IDC로 진행하는 것은, 세포내의 각종 유전자, 단백질, 그리고 이들 사이를 매개하는 물질들의 상호작용의 결과이다.¹ 티로신 활성화소 수용체(Tyrosine kinase receptor, TKR)는 세포의 발생과 성장 및 종양의 생성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 일련의 TKR들은 암의 진행과 연계되고, 이들의 과발현은 암 진행의 표지자로 인정되기도 한다.¹⁻³

본 연구에서는 유방의 정상조직이 DCIS를 거쳐 IDC로 진행되는 과정에서, EphA2, c-met, c-erbB-2 이 세 가지 종류의 TKR들이 어떻게 발현되는지를 알아보려고 하였다. 또한 이들의

발현 양상을 기존 유방암의 병리학적 예후인자들, 즉 종양의 분화도, 종양의 성장양식, 액와 림프절 전이 및 p53, 에스트로겐 수용체(ER)와 프로게스테론 수용체(PR) 등의 발현, 그리고 ki-67의 증식표지자수 등과 비교분석하여, 유방암에서 이들 TKR들이 예후표지자로서의 가치가 있는지를 알아보려고 하였다.

재료와 방법

환자와 검체

2000년 5월부터 2003년 12월까지 한림대학교 성심병원에서 DCIS와 IDC로 진단 받은 뒤, 근치적 유방절제술을 시행 받은 환자 중, 파라핀 블록의 보관이 양호한 111건의 검체를 선정하였다. 4 μm 두께로 박절되고 헤마톡실린-에오신으로 염색된 절편

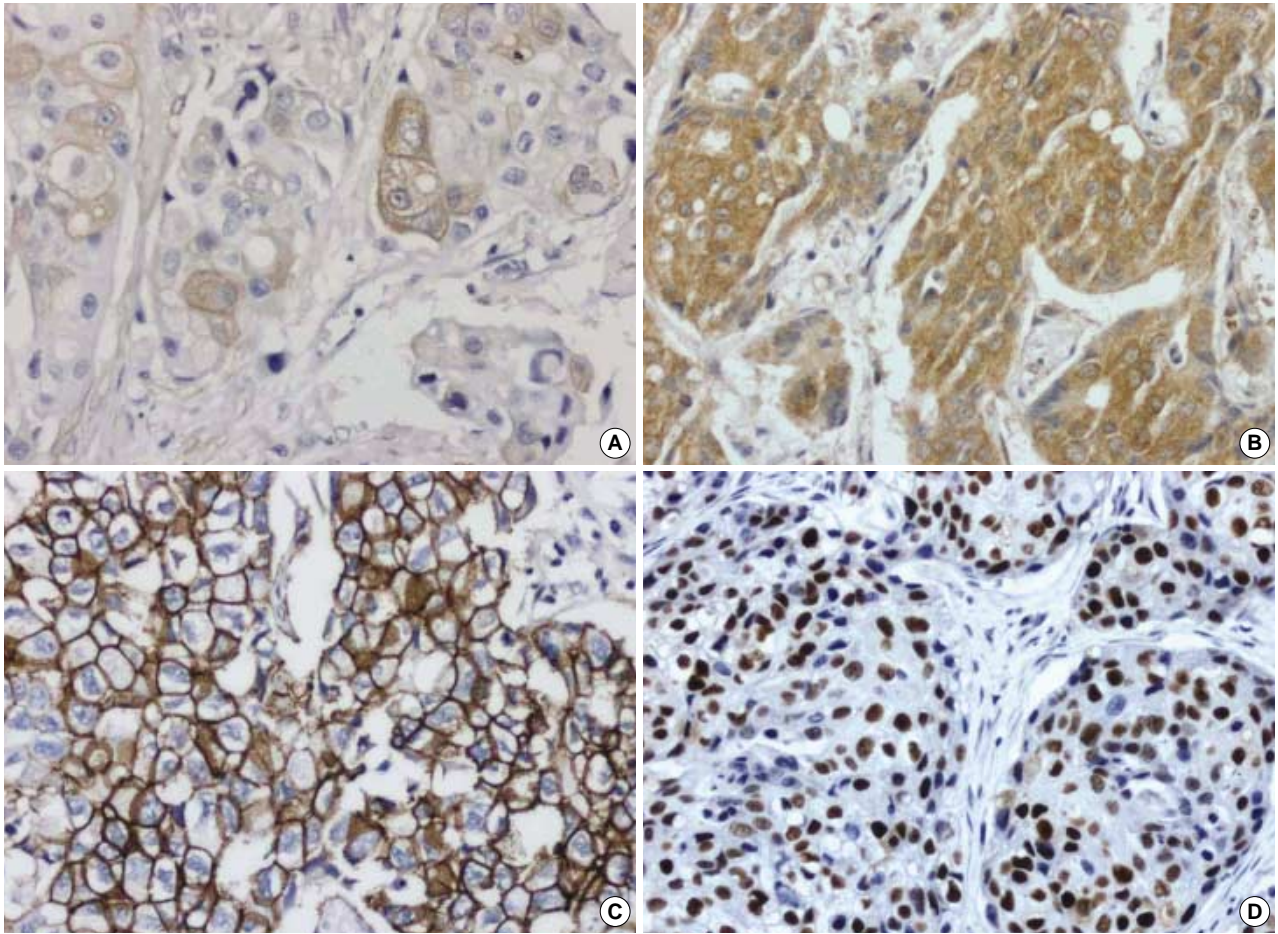


Fig. 1. Immunohistochemical stainings for tyrosine kinase receptors in intraductal carcinoma. (A) EphA2 in the cytoplasm and along the cell membrane. (B) c-met in the cytoplasm. (C) c-erbB-2 along the cell membrane. (D) Immunostaining for p53 in the nuclei of intraductal carcinoma cells.

을 재검경하여, 종양의 분화도를 modified Bloom and Richardson grade system⁴에 따라 분류하였고, 종양의 성장 양식은 확장성과 침윤성으로 분류하였다. 그리고 종양의 크기와 림프절 전이는 기존의 보고서를 통해 파악하였다. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 위한 신선 조직은 2002년 10월부터 2003년 12월 사이에 절제된 50예의 유방조직에서, 일정양의 조직을 정상과 종양 부위로 구분하여 액화질소통에 보관하였던 검체들을 사용하였다.

면역조직화학염색

10% 중성 포르말린 고정과 파라핀 포매를 거친 조직을 4 μm 두께로 연속절편을 만들어 100% 크실렌으로 3-5분간 탈파라핀하였다. 그리고 증류수로 함유시킨 후 EphA2 (Upstate Biologicals, USA), c-met (Novocastra, UK), c-erbB-2 (Zymed, USA), p53 (Zymed, USA), Ki-67 (Zymed, USA), ER (DAKO, USA), PR (DAKO, USA)에 대하여 면역조직화학염색을 시행하였다. 우선 항원성을 회복시키기 위해 10 mM의

citrate buffer에 조직절편을 담근 후 약 10분 정도 2회 반복하여 마이크로파로 처리하였다. 4°C의 인산화 완충식염수(PBS)에 5분간 처리한 후, 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위해 3%의 과산화수소를 도포하고 세척하였다. 일차 항체인 EphA2 (1:50), c-met (1:50), c-erbB-2 (1:50), p53 (1:50), Ki-67 (1:50), ER (1:100), PR (1:100)을 상온에서 2시간 반응시킨 후 PBS액으로 세척하였다. 이차 항체인 바이오틴이 붙은 연결항체(LSAB kit, DAKO, USA)와 20분간 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. 스트렙타비딘(Zymed, USA)과 과산화효소가 결합된 용액에 30분간 반응시키고, 3,3-diaminobenzidine tetra-chloride (DAB, sigma)로 발색시켰다. Meyer 헤마톡실린으로 대조염색을 시행하고, 흐르는 물에 세척하여 실온에 건조시킨 후 봉입하고 광학현미경으로 관찰하였다. EphA2의 양성 대조군으로는 전립선 선암 조직을, c-met의 양성 대조군으로는 정상 간 조직을 사용하였고, 음성 대조군은 일차 항체대신 PBS를 첨가하여 시행하였다. 판정은 DAKO사에서 Hercep test 시 권장하는 등급체계에 따라, EphA2와 c-met은 세포질과 세포표면에 양성인 세포를, 그리고 c-erbB-2는 세포막에 염색된 세포를 기준으

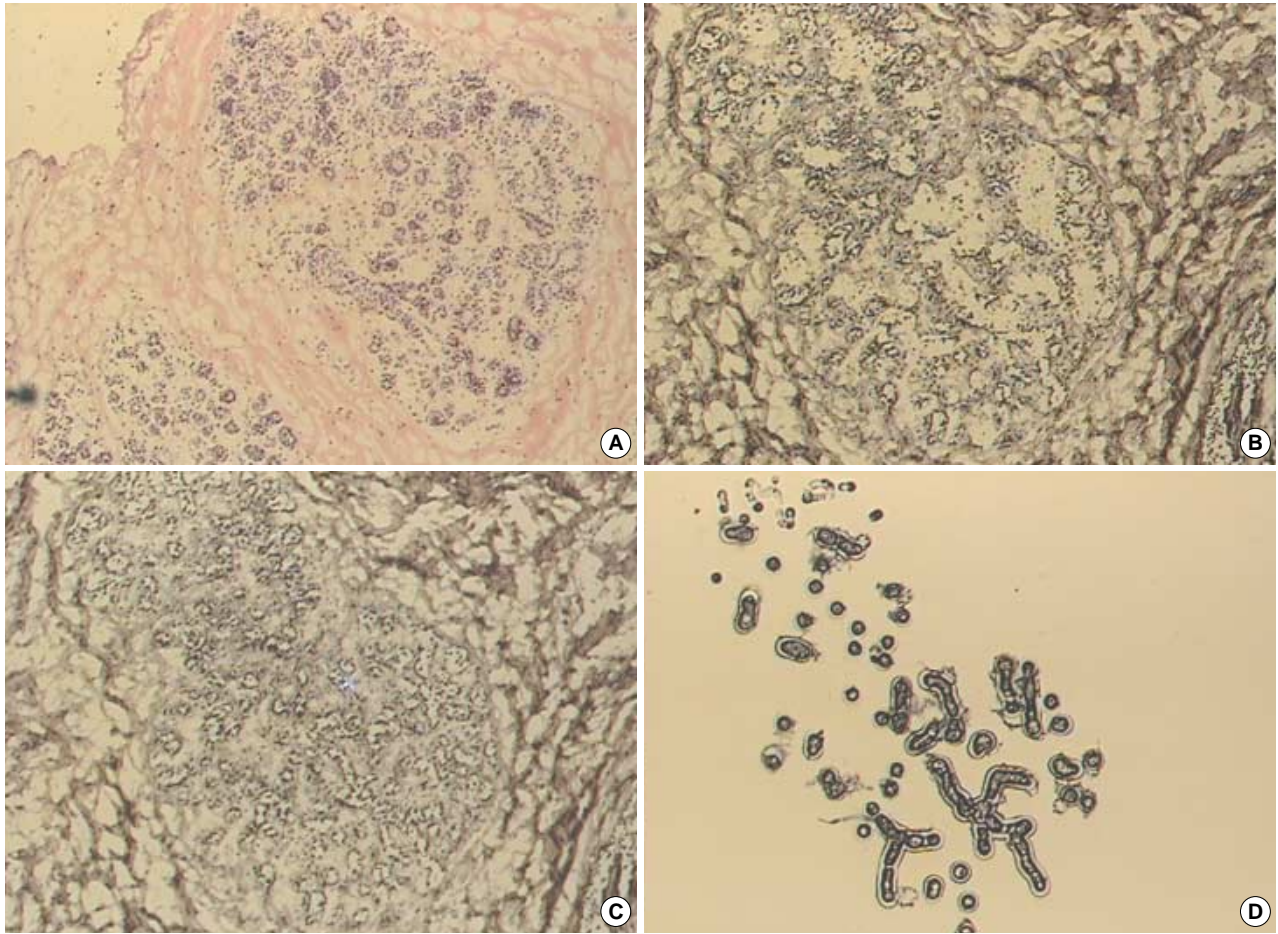


Fig. 2. Photomicrographs showing a map slide with a coverslide. (A) High resolution is preserved. (B) Uncovered and dried slides for dissection with a laser pointer at the center as a guide. (C) The residual tissue after dissection. (D) Collected cells on the CapsureTM.

로하였다. 10% 미만인 양성인 경우를 0, 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. p53과 ER, PR은 핵에 염색된 세포가 10% 이상인 것을 양성, 그 이하를 음성으로 판정하였다. 그리고 Ki-67은 핵에 염색된 것 중 전체의 1% 미만을 표지지수 0, 10%까지를 1+, 30%까지를 2+, 30% 이상을 3+로 판독하였다(Fig. 1).

레이저 미세절제술과 RNA 추출

액화질소통에 보관 중이던 정상 조직과 종양 조직 각 50예의 신선조직을 동결박절기를 이용해 5 μm 두께로 박절하고, 항 RNase로 처리한 유리슬라이드(AntiRNase Pretreated, Fisher Scientific)에 올렸다. 상온에서 녹인 후 70% 알코올에서 고정시키고, DEPC (diethyl pyrocarbonate) 수용액으로 제작된 Mayer 헤마톡실린과 에오신 염색용액으로 염색한 뒤, 다단계의 알코올로 탈수과정을 거쳤다. 5분간 크실렌으로 처리하고, 공기 중에서 말린 후, 미세절제술 시행까지 실리카겔이 들어 있는 건

조한 보관함에 보관하였다. 레이저 미세절제술(laser capture microdissection, LCM)은 CapsureTM이라고 하는 세포모음용기를 사용하는 Pixcell II system (Arcturus, USA)을 사용하여 용기당 2,000-2,500개의 원하는 세포만을 선택적으로 획득하였다. 간단히 설명하면, 연속절편으로 제작된 보통의 조직 슬라이드(map slide)를 사용하여 획득하고자 하는 세포의 위치를 파악하고, 획득하고자 하는 조직이 포함된 슬라이드로부터 레이저를 이용하여 원하는 세포만을 자른 뒤, CapsureTM이라는 용기에 절제된 세포만을 모았다(Fig. 2). 정상조직과 종양조직 각각 50예 중 부적절한 검체를 제외하고, 종양세포를 획득할 수 있었던 검체가 33예였다. 그중 정상세포와 IDC 세포를 구분하여 획득할 수 있었던 검체가 26예였고, 정상세포, DCIS 세포, IDC 세포를 구분하여 획득할 수 있었던 검체가 7예였다. LCM 시행 즉시 PicoPure RNA isolation kit (Arcturus, USA)를 이용해 설명서에 따라 획득한 세포로부터 전체 RNA를 추출하였다. 간략히 설명하면, LCM을 통해 획득된 세포들을 50 μL 의 추출완충액으로 42°C에서 30분간 처리하고 70% 알코올 50 μL 를 섞어 추출용기에서 거른 후, 원심분리 후 추출 용기를 세척하여 전

Table 1. Oligonucleotide primer sequences used

EphA2	sense P : 5'-CTCACACACCCGTATGGCAA-3'
	antisense P : 5'-GGCTCTCAGATGCCTCAAAC-3'
c-met	sense P : 5'-ACTCCCCCTGAAAACCAAAGCC-3'
	antisense P : 5'-GGCTTACTTTCGGGCACTTAC-3'
c-erbB2	sense P : 5'-GAGATCTTAAAAGGAGGGGTCT-3'
	antisense P : 5'-CGTCCGTAGAAAAGGTAGTTGTAGG-3'
β -actin	sense P : 5'-AAGAGAGGCATCCTCACCCCT-3'
	antisense P : 5'-TACATGGCTGGGGTGTGAA-3'

체 RNA를 추출하였다.

반정량적 역전사 중합효소 연쇄반응

추출한 전체 RNA에 SuperScript III First Strand Synthesis System (Invitrogen, USA)을 이용해 설명서에 따라 cDNA를 합성하였다. 잠재적인 genomic DNA의 오염을 막기 위해서 RNA 검체를 DNase (1U DNase free, Invitrogen)로 처리하고, 50 μ m의 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°C에서 20분간 반응시켰다. 역전사반응의 최종양은 20 μ L로 하였다. 각 PCR 반응에서는 4 μ L의 cDNA와, 2X Universal PCR Master Mix (ABgene, UK), 그리고 10 pmol의 각 시발체(Bioneer, Korea) 들⁵⁻⁷을 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 μ L를 1.5%의 아가로스겔에 전기연동시키고, Image Analysis System (Vilber Lourmat, France)을 사용하여 β -actin으로 표준화한 상대적인 mRNA의 발현을 측정하였다.

통계

통계적 분석은 각 지표 값들 사이의 연관성을 알아보기 위해 SAS 프로그램을 이용하여, Spearman 상관계수와 Pearson 상관계수를 구하였다. p값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 하였다.

결 과

형태학적 예후인자

종양의 분화도는, 전체 111예에서 순수한 DCIS만 존재하는 2

Table 2. Statistical correlation between various parameters

Parameters	vs. parameters	p	r
Tumor Grade	Tubule formation	<0.0001	0.63375
	Nuclear grade	<0.0001	0.70134
	Mitosis	<0.0001	0.86590
	Proliferation index (ki-67)	0.0017	0.29734
	ER	0.0035	-0.27883
	EphA2 (IHC)	0.0173	0.22765
	Growth pattern	<0.0001	-0.36474
	EphA2 (mRNA)	0.0603	-0.33579
	c-met (mRNA)	0.0293	-0.38548
	c-erbB-2 (mRNA)	0.0818	-0.31230
Growth pattern	Tumor grade	<0.0001	-0.36474
	ER	0.0094	0.24897
	EphA2 (IHC)	0.0343	-0.20293
	c-met (mRNA)	0.0537	0.34429
	c-erbB-2 (IHC)	0.0376	0.19762
LN metastasis	Proliferation index	<0.0001	0.40190
	Nuclear grade	0.0302	0.20768
ER	Tumor grade	0.0035	-0.27883
	PR	<0.0001	0.48551
PR	ER	<0.0001	0.48551
	Tumor grade	0.0017	0.29734
Proliferation index	p53	<0.0001	0.40190
	EphA2 (IHC)	0.0219	0.21747
	Tubular formation	0.0088	0.24988
EphA2 (IHC)	Proliferation index	0.00219	0.21747
	c-met (IHC)	0.0041	0.27047
c-met (IHC)	EphA2 (IHC)	0.0041	0.27047
c-erbB-2 (IHC)	Nuclear grade	0.00232	0.21737
	LN metastasis	0.0376	0.19762

p, p-value; r, correlation coefficient; IHC, Immunohistochemical stain; ER, Estrogen receptor; PR, progesterone receptor; LN, Lymph node.

예를 뺀 109예 중, 분화도 1에 속하는 것이 30예(27.5%), 분화도 2는 35예(32.1%), 그리고 분화도 3은 44예(40.4%)였다. 종양의 성장 양식은 DCIS 2예를 제외한 109예의 IDC 중 확장성 성장 양식을 보인 것이 36예(33%), 침윤성 성장 양식을 보인 것은 73예(67%)였다. 액와 림프절 전이는 전체 111예 중, 전이가 없었던 것이 57예(51.4%), 1-3개의 전이를 보이는 것은 25예(22.5%), 4개 이상의 전이를 보이는 것은 29예(26.1%)였다(Table 2).

면역조직화학염색

EphA2

EphA2의 단백발현은 정상세포에서 0은 100예(90.1%), 1+는 9예(8%), 2+는 2예(1.8%)였고, 3+는 없었다. 또한 IDC 주변에 존재하는 34예의 DCIS 중, 0이 13예(38.2%), 1+가 8예(23.5%), 2+는 5예(14.7%), 그리고 3+는 8예(23.5%)였다. IDC는 전체 109예 중, 0이 56예(51.4%), 1+가 15예(13.8%), 2+는 19예(17.4%), 그리고 3+도 19예(17.4%)였다. 정상세포, DCIS, IDC에서 발현이 2+ 이상인 것은 각각 1.8%, 38.2%, 34.8%로,

Table 3. EphA2, c-met and c-erbB-2 expressions in breast tissue (%)

	0	1+	2+	3+	Total No.
EphA2					
Normal	100 (90.1)	9 (8.0)	2 (1.8)	0 (0.0)	111
DCIS	13 (38.2)	8 (23.5)	5 (14.7)	8 (23.5)	34
IDC	56 (51.4)	15 (13.8)	19 (17.4)	19 (17.4)	109
c-met					
Normal	34 (30.6)	42 (37.8)	24 (21.6)	11 (9.9)	111
DCIS	1 (2.9)	5 (14.7)	13 (38.2)	15 (44.1)	34
IDC	14 (12.8)	24 (22.1)	48 (44.0)	23 (21.1)	109
c-erbB-2					
Normal	111 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	111
DCIS	27 (79.4)	2 (5.9)	2 (5.9)	3 (8.8)	34
IDC	76 (69.7)	5 (4.6)	6 (5.5)	22 (20.2)	109

DCIS, Ductal carcinoma in situ; IDC, Invasive ductal carcinoma.

정상세포에 비해 종양세포에서의 발현이 현저히 많았다(Table 3). 종양의 분화가 나쁠수록(p=0.0173), 선을 형성하지 않을수록(p=0.0088), 그리고 세포의 증식표지지수가 높고(p=0.00219), c-met의 단백발현이 높을수록(p=0.0041) EphA2의 단백발현이 높았다(Table 2).

c-met

c-met의 단백발현은 정상세포에서 0은 34예(30.6%), 1+는 42예(37.8%), 2+는 24예(21.6%), 그리고 3+는 11예(9.9%)였다. DCIS에서는 0이 1예(2.9%), 1+가 5예(14.7%), 2+는 13예(38.2%), 그리고 3+는 15예(44.1%)였다. IDC에서는 0이 14예(12.8%), 1+가 24예(22.1%), 2+는 48예(44.0%), 그리고 3+는 23예(21.1%)였다. 정상세포, DCIS, IDC에서 발현이 2+ 이상인 것은 각각 31.5%, 82.3%, 65.1%로, 정상세포에 비해 종양세포에서의 발현이 많았다(Table 3). EphA2의 단백발현이 높은 경우 c-met의 단백발현도 높았다(p=0.0041)(Table 2).

c-erbB-2

c-erbB-2 단백질은 정상세포에서는 발현되지 않았고, DCIS에서 0이 27예(79.4%), 1+가 2예(5.9%), 2+도 2예(5.9%), 그리고 3+는 3예(8.8%)였다. IDC에서는 0이 76예(69.7%), 1+가 5예(4.6%), 2+는 6예(5.5%), 그리고 3+는 22예(20.2%)였다. 다른 TKR들과 마찬가지로 정상세포, DCIS, IDC에서 발현이 2+ 이상인 것은 각각 0%, 14.7%, 25.7%로, 종양세포에서의 발현이 많았다(Table 3). 핵의 다형성이 심할수록 c-erbB-2의 단백발현이 높았고(p=0.00232), c-erbB-2의 발현이 2+ 이상인 경우에서 액와 림프절 전이가 많았다(p=0.0376)(Table 2).

p53, Ki-67, ER, PR

p53 발현은 전체 111예 중 음성 반응을 보인 것이 62예(55.9%)였고, 양성 반응을 보인 것은 49예(44.1%)였다. 세포의 증식표지지수가 클수록(p<0.0001), 그리고 핵의 다형성이 심할수록

Table 4. Correlation between mRNA expressions of three TKRs in normal epithelium and IDC (n=26, *n=33)

mRNA	EphA2		c-met		c-erbB-2	
	N	T	N	T	N	T
EphA2						
N r	-	0.33652	0.41274	0.16564	0.48850	0.15835
p	-	0.0928	0.0361	0.4187	0.0113	0.4397
T r	0.33652	-	0.47285	0.53444*	0.47384	0.60866*
p	0.0928	-	0.0147	0.0014*	0.0145	0.0002*
c-met						
N r	0.41274	0.47285	-	0.52861	0.48207	0.49127
p	0.0361	0.0147	-	0.0055	0.0126	0.0108
T r	0.16564	0.53444*	0.52861	-	0.43759	0.61236*
p	0.4187	0.0014*	0.0055	-	0.0254	0.0002*
c-erbB-2						
N r	0.48850	0.47384	0.48207	0.43759	-	0.66519
p	0.0113	0.0145	0.0126	0.0254	-	0.0002
T r	0.15835	0.680866*	0.49127	0.61236*	0.66519	-
p	0.4397	0.0002*	0.0108	0.0002*	0.0002	-

N, Normal epithelium; T, IDC; r, correlation coefficient; p, p value; n, Number of case.

(p=0.0302) p53의 발현이 많았다. 증식표지지수는 전체 111예 중 표지지수가 0인 것은 26예(23.4%), 1+는 46예(41.4%), 2+는 28예(25.2%), 그리고 3+는 11예(9.9%)였다. 종양의 분화가 나쁠수록(p=0.0017), p53의 발현이 많을수록(p<0.0001), EphA2의 단백발현이 많을수록(p=0.0219) 세포의 증식표지지수가 높았다. ER의 발현에서는 54예(49.1%)가 음성, 56예(50.9%)는 양성이었다. 1예는 면역조직화학염색을 시행하지 못하였다. 종양의 분화도가 나쁠수록 ER의 발현이 소실되었고(p=0.0035, r=-0.27883), ER과 PR의 발현 사이에는 통계적 유의성을 보였다(p<0.0001, r=0.48551). PR은 전체 111예 중 81예(73.6%)가 양성, 29예(26.4%)는 음성이었다. 1예는 면역조직화학염색을 시행하지 못하였다. ER과 PR의 발현 사이에는 통계적 유의성을 보였다(p<0.0001)(Table 2).

TKR의 mRNA 발현

26예의 정상세포 중 4예에서만 c-met의 mRNA 발현이 관찰되지 않았다. 26예의 IDC 세포 중에서는 1예에서 EphA2의 mRNA가 5예에서 c-met의 mRNA가 관찰되지 않았으나, c-erbB-2의 mRNA는 모두에서 관찰되었다. Pearson 상관관계의 분석 결과 정상세포와 IDC 각각에서 EphA2, c-met, c-erbB-2의 발현 사이에는 모두 통계적으로 유의한 상관관계가 있는 것으로 나타났다(Table 4). 정상세포와 IDC를 비교할 수 있는 26예 중, IDC에서 mRNA의 과발현은 EphA2가 10예(38.5%), c-met은 12예(46.2%), 그리고 c-erbB-2는 19예(73.1%)가 관찰되었다(Fig. 3). 정상세포, DCIS, 그리고 IDC 사이의 비교가 가능한 7예 중, DCIS에서 mRNA의 발현이 정상세포에서보다 많았던 것은 EphA2가 2예(28.6%), c-met은 4예(57.1%), 그리

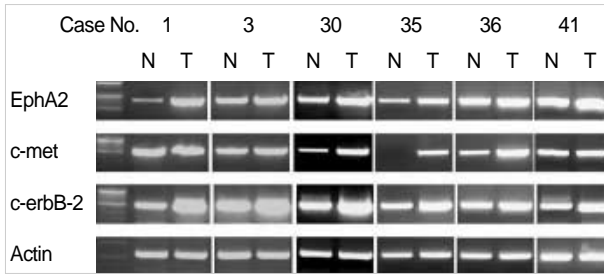


Fig. 3. Photomicrograph showing representative RT-PCR results for TKRs in normal epithelium (N) and IDC (T).

고 c-erbB-2는 3예(42.9%)였다(Fig. 4). IDC에서 획득한 EphA2의 mRNA ($p=0.0603$, $r=-0.33576$), c-met의 mRNA ($p=0.0293$, $r=-0.38548$), c-erbB-2의 mRNA ($p=0.0818$, $r=-0.3123$) 발현은 종양의 분화가 나빠질수록 감소하였으나, c-met에서만 통계적으로 유의하였다(Table 2).

고 찰

TKR는 신호전달체계의 초기에 관여하는 물질로서, 리간드의 결합이나 또는 리간드 없이 세포질 외의 잔기가 동중 또는 이형 이합체(Homodimer or heterodimer)를 형성하고, 세포질 내에 존재하는 잔기의 자가인산화 과정을 거쳐 활성화된다.^{1,2,8} 이들 인산화된 티로신 잔기에 직접 또는 다른 매개 단백질의 중재를 거쳐 이차 신호전달자들이 결합하게 되면, 세포표면의 자극이 핵에 도달하고 유전자의 활성을 통해 세포는 그 기능을 발휘한다.^{1,9}

Eph는 가장 큰 족을 이루는 TKR로,⁸ 마름뇌의 분절, 축삭의 성장, 신경능선의 이동, 혈관의 생성, 악성 형질전환된 세포의 전이 등에 관여한다.^{10,11} 정상상피세포에서는 세포의 성장 조절과 이동 및 혈관생성에 관여하며, 결장암, 폐암, 간암, 전립선암, 유방암 및 흑색종 등의 종양에서 과발현된다.^{2,8} 모든 Eph 수용체는 Ephrin이라고 불리는 리간드를 가진다.^{2,12,13} 그러나 형질전환된 세포들에서는 리간드의 결합이 EphA2의 기능에 반드시 필요한 것은 아니며, 오히려 리간드는 EphA2의 기능을 억제하는 방향으로 작용한다고 한다. 즉, 정상 상피세포에서는 EphA2 수용체는 인산화되지만, 형질전환된 세포에서는 EphA2가 인산화되지 않은 형태로 존재한다.^{5,13,14} Andres 등¹²은 유방암 세포를 이용한 쥐의 실험에서, 세포의 분화가 나쁜 침윤성 종양에서는 EphA2의 과발현이 잘 관찰되지만, 분화가 좋고 전이가 없는 종양에서는 잘 나타나지 않는다고 하였다. 그러나 이러한 연구들은 주로 세포주를 이용한 것들로, 수술로 절제된 사람의 유방조직에서 이루어진 연구는 매우 드물다.

c-met은 hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF)라는 리간드와 작용하는 TKR이다. 정상세포에서 c-met의 활성은 세포의 증식, 상피세포의 해리와 이동 및 복잡한 구조를

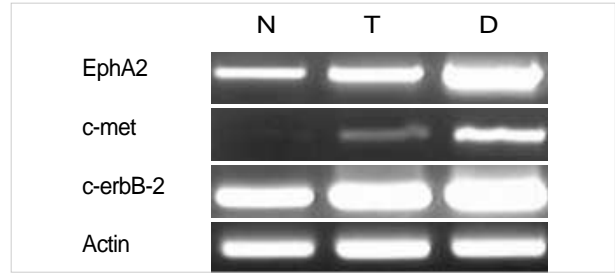


Fig. 4. Photomicrograph showing RT-PCR results for TKRs in normal epithelium (N), IDC (T), and DCIS (D) in case No. 38.

형성하는 기능이 있으며, 세포의 발달과정에서는 상피세포의 성장, 조직손상의 방지 및 간세포의 재생 촉진 등의 기능을 한다.¹⁵ 돌연변이나 과발현 등을 통해¹⁶ 소화기관, 갑상선, 신장, 전립선, 췌장, 유방 등에서 종양의 발생에 관여한다.^{17,18} 또한 단백질분해 효소 등의 생성을 촉진시켜 종양의 전이능력을 향상시키기도 한다.¹⁹ 유방암에서의 c-met의 과발현에 관한 연구는 아직 논란이 있다. Nakopoulou 등¹⁸은 c-met의 과발현이 양호한 예후인자들과 연관이 있다고 보고하는 반면, 다른 문헌들에서는 조기재발이나 전이 등과 같은 악성예후인자들과 관련된다고 하였다.²⁰

erb 수용체는 epidermal growth factor receptor인 erbB1, her2/neu인 erbB2, 그리고 erbB3 (her3)와 erbB4 (her4)의 4종이 있다.²¹ erbB는 정상유방의 발생과 성장에 관여한다. 쥐를 이용한 실험에서 epidermal growth factor-like ligands와 neuregulin들이 유방 소엽의 발달을 자극하고,^{22,23} erbB1의 부족은 유방에서 선의 발달에 장애를 초래하였다.²⁴ 유방조직에서 erbB2의 과발현은 정상세포를 악성세포로 형질전환을 시킬 뿐 아니라,^{25,26} 세포의 이형성, 전이, 재발, 그리고 항암치료에 대한 저항 등과 같은 악성예후인자들과 연관되어 있다.^{27,28}

본 연구에서 EphA2, c-met, 그리고 c-erbB-2의 단백질발현(2+이상)은 모두 정상세포에 비해 종양세포에서 현저히 증가하였다. 이것은 Zelinski 등⁸이 주장한, TKR의 과발현은 세포의 악성형질전환을 유발한다는 것을 뒷받침하는 결과라고 생각된다. 따라서 유방세포에서 이들 TKR들의 증가는 부가적인 세포 내의 반응을 거쳐 악성세포로의 형질전환을 초래하는데 기초적인 역할을 했을 것이라 생각한다.

반면, mRNA의 발현은 각 TKR 간에 차이가 있었다. EphA2의 경우는 단백질발현과 유사한 결과를 보였지만, c-met에서는 오히려 단백질보다 낮은 발현율을, c-erbB-2에서는 높은 발현율의 결과를 보였다. White 등²⁹과 Braidotti 등³⁰에 의하면 이와 같은 단백질과 mRNA 발현의 차이는 검체의 순수성, 즉 종양세포와 섞인 다른 세포들의 영향, mRNA의 안정성, 그리고 단백질의 안정성의 차이 등에 의한다고 하였다. 본 연구에서는 LCM의 과정을 통하여 검체의 순수함은 확보할 수 있었으므로, 이러한 결과는 mRNA와 단백질의 안정성의 차이에 의한 것이라고 생각하였다.

DCIS와 IDC 간의 TKR들의 단백질과 mRNA의 발현을 비교하여 보았을 때, c-met에서는 DCIS에서 단백질과 mRNA 모두가 IDC에서보다 높게 발현되었다. 그리고 종양의 분화가 나빠질수록 c-met mRNA의 발현이 감소하였다. 반면, c-erbB-2에서는 IDC에서 단백질과 mRNA의 발현이 DCIS에서보다 높았다. 이것은 c-met이 종양의 생성 초기에 그 역할을 하며, c-erbB-2는 종양이 점차 악성화 되어가는 것과 연관성을 가지는 것이라 생각하였다. EphA2의 경우는 DCIS와 IDC 간의 비교에서 증감이 교차되어 판단하기가 어려웠다.

형태학적 예후인자들과의 관계에서 EphA2는 종양의 분화가 나빠질수록, 그리고 세포의 증식표지자수가 높을수록 그 단백질 발현이 증가하였다. c-met에서는 형태학적 예후인자들과의 관계에서 특이한 연관성을 찾을 수는 없었으나, c-erbB-2는 단백질 발현이 높을수록 핵의 다형성이 심해지고 핵외립프질 전이가 많았다. 이 결과는 DCIS와 IDC 간의 비교에서 언급한 것, 즉, c-met은 종양의 생성 초기에 그 역할이 중요하여 아직 형태학적 특이성이 표현되지 않은 것이고, c-erbB-2 역시 종양의 악성화와 관련될 것이라는 생각과 잘 부합되는 결과라고 생각하였다.

본 연구에서 상관계수를 이용한 TKR들의 발현 사이의 연관성을 알아보았을 때, IDC에서의 단백질 발현은 EphA2와 c-met 사이에서, 그리고 정상세포와 IDC 각각에서의 mRNA 발현은 EphA2, c-met, c-erbB-2 모두에서, 서로 간에 밀접한 상관성이 있었다. 이것은 세포의 기능에서 볼 때, 일련의 TKR들이 서로 관련을 가지고서 세포에 작용할 것이라는 예측을 확인한 결과라고 생각한다. 그러나 위에서 언급하였듯이 각각의 TKR들은 DCIS나 IDC와 같이 종양 진행의 각 시기에 따라 다소의 차이가 있었고, 형태학적 예후인자들과의 관계에서도 각각의 특징을 가지고 있었다. 이 TKR들은 발현에 있어서 통계적 상관성을 가지지는 않지만, 각각이 어떠한 순서로, 어느 시기에 그 작용을 최상화하는지에 대한 구체적 규명을 위해서는 분자생물학적 고찰이 뒤따라야 할 것이다.

결론적으로 본 연구에 사용된 세 가지의 TKR인 EphA2, c-met, 그리고 c-erbB-2의 발현은 유방의 정상세포에서보다 종양 세포에서 높다는 것을 알 수 있었다. 또한 이들 세 가지 TKR의 단백질과 mRNA 발현은 정상세포와 종양세포에서 각각 통계적 상관성이 있었다. 또한 c-met은 종양의 생성 초기에, EphA2와 c-erbB-2는 종양의 악성화 단계에 관여하여 유방암의 진행을 조절하는 것이라 볼 수 있다. 그러나 이를 증명하기 위해서는 좀더 체계적인 연구가 뒤따라야 할 것이다.

감사의 글

실험에 도움을 주신 포천 중문 의과대학교 차병원 분자생식생리학 연구실 이경아 교수님과 박창은 선생님께 감사드립니다.

참고문헌

- Cooper GM. The cell: A molecular approach. 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer, 2000; 523-70.
- Walker-Daniels J, Hess AR, Hendrix MJ, Kinch MS. Differential regulation of EphA2 in normal and malignant cells. *Am J Pathol* 2003; 162: 1037-42.
- Holder N, Klein R. Eph receptors and ephrins: Effectors of morphogenesis. *Development* 1999; 126: 2033-44.
- Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grades in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19: 403-10.
- de Saint-Vis B, Bouchet C, Gautier G, Valladeau J, Caux C, Garrone P. Human dendritic cells express neuronal Eph receptor tyrosine kinases: role of EphA2 in regulating adhesion to fibronectin. *Blood* 2003; 102: 4431-40.
- Imazumi Y, Murota H, Kanda S, *et al.* Expression of the c-Met proto-oncogene and its possible involvement in liver invasion in adult T-cell leukemia. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 181-7.
- Alaoui-Jamali MA, Song DJ, Benlimame N, *et al.* Regulation of multiple tumor microenvironment markers by overexpression of single or paired combinations of erbB receptors. *Cancer Res* 2003; 63: 3764-74.
- Zelinski DP, Zantek ND, Stewart JC, Irizarry AR, Kinch MS. EphA2 overexpression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2001; 61: 2301-6.
- Dickson RB, Lippman ME. Growth factors in breast cancer. *Endocr Rev* 1995; 16: 559-89.
- George SE, Simokat K, Hardin J, Chisholm AD. The VAB-1 Eph receptor tyrosine kinase functions in neural and epithelial morphogenesis in *C. elegans*. *Cell* 1998; 92: 633-43.
- Nakamoto M, Bergemann AD. Diverse roles for the Eph family of receptor tyrosine kinases in carcinogenesis. *Microsc Res Tech* 2002; 59: 58-67.
- Andres AC, Reid HH, Zurcher G, Blaschke RJ, Albrecht D, Ziemiecki A. Expression of two novel eph-related receptor protein tyrosine kinases in mammary gland development and carcinogenesis. *Oncogene* 1994; 9: 1461-7.
- Eph nomenclature committee (Flanagan JG, Gale NW, Hunter T, Pasquale EB, Tessier-Lavigne M): Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. *Cell* 1997; 90: 403-4.
- Walker-Daniels J, Riese DJ 2nd, Kinch MS. c-Cbl dependent EphA2 protein degradation is induced by ligand binding. *Mol Cancer Res* 2002; 1: 79-87.
- Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF. Met receptor tyrosine

- kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 2000; 19: 5582-9.
16. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 915-25.
 17. Tuck AB, Park M, Sterns EE, Boag A, Elliott BE. Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma. *Am J Pathol* 1996; 148: 225-32.
 18. Nakopoulou L, Gakiopoulou H, Keramopoulos A, *et al.* c-met tyrosine kinase receptor expression is associated with abnormal beta-catenin expression and favourable prognostic factors in invasive breast carcinoma. *Histopathology* 2000; 36: 313-25.
 19. Jeffers M, Rong S, Woude GF. Hepatocyte growth factor/scatter factor-Met signaling in tumorigenicity and invasion/metastasis. *J Mol Med* 1996; 74: 505-13.
 20. Yamashita J, Ogawa M, Yamashita S, *et al.* Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 1630-3.
 21. 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.
 22. 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.
 23. Jones FE, Jerry DJ, Guarino BC, Andrews GC, Stern DF. Heregulin induces in vivo proliferation and differentiation of mammary epithelium into secretory lobuloalveoli. *Cell Growth Differ* 1996; 7: 1031-8.
 24. 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.
 25. 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.
 26. Di Fiore PP, Pierce JH, Fleming TP, *et al.* Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell* 1987; 51: 1063-70.
 27. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001; 37 (Suppl 4): S9-15.
 28. Chazin VR, Kaleko M, Miller AD, Slamon DJ. Transformation mediated by the human HER-2 gene independent of epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 1992; 7: 1859-66.
 29. White SL, Gharbi S, Bertani MF, Chan HL, Waterfield MD, Timms JF. Cellular responses to ErbB-2 overexpression in human mammary luminal epithelial cells: comparison of mRNA and protein expression. *Br J Cancer* 2004; 90: 173-81.
 30. Braidotti P, Nuciforo PG, Mollenhauer J, *et al.* DMBT1 expression is down-regulated in breast cancer. *BMC Cancer* 2004; 4: 46.