

유방암에서 DNA Topoisomerase II- α 와 E2F-1의 면역조직화학적 발현과 임상 및 병리학적 연관성

중앙대학교 의과대학 외과학교실, ¹병리학교실

김향윤 · 임현묵 · 이태진¹ · 박성준 · 차성재 · 김범규

The Immunohistochemical Expression of DNA Topoisomerase II- α and E2F-1 in the Breast Carcinoma and Their Relationship with Clinicopathologic Factors

Hang-Yun Kim, M.D., Hyun-Muck Lim, M.D., Tae-Jin Lee, M.D., Sung-Jun Park, M.D., Sung-Jae Cha, M.D. and Beom-Gyu Kim, M.D.

Purpose: Clinical courses of breast cancer are very different, and concern for finding a predictable marker of breast carcinomas has increased. This study focused on the relationship between the expressions of DNA topoisomerase II- α as a proliferative marker, and E2F-1 as a transcription factor, with clinicopathological factors of infiltrating duct carcinomas of the breast.

Methods: We investigated the expressions of E2F-1 and DNA topoisomerase II- α in 43 patients with infiltrating ductal carcinomas using immunohistochemical staining, and the results were analyzed with regard to clinicopathological parameters.

Results: Among 43 infiltrating ductal carcinomas, 24 (55.8%) were immunohistochemically negative on E2F-1 and 19 (44.2%) were positive. The expression of E2F-1 correlated with increased tumor size, positive axillary lymph node metastasis and high stage. The topoisomerase II- α index correlated with increased tumor size, positive lymph node metastasis, high stage, high histological grade and negative estrogen receptor. The expression of E2F-1 and the topo II- α index were significantly correlated.

Conclusion: These results suggest that the expressions of DNA topoisomerase II- α and E2F-1 play some role as prognostic factors for infiltrating duct carcinomas of the breast, but much more study will be required. (J Korean Surg Soc 2003;64:93-100)

Key Words: Infiltrating ductal carcinoma, Breast, Topoisomerase II- α , E2F-1

중심 단어: 유방암, 유방, Topoisomerase II- α , E2F-1

Departments of Surgery and ¹Pathology, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

서론

유방암은 많은 여성들에 있어서 건강상의 주요한 관심사 중 하나이다. 유방암은 2000년 보건복지부 암등록에 의하면 여성암 중 두 번째로 발생빈도가 많은 암이며, 최근 새로운 다양한 방사선과적 검사의 발달로 인해서 작은 크기의 유방암이나 림프절 전이가 없는 유방암의 진단에 많은 도움을 주고 있다. 유방암의 임상경과는 환자마다 매우 다양하며 최근에 림프절 전이가 없는 유방암 환자의 경우에도 보조화학요법이 무병율(disease free survival rate)을 증가시킨다고 알려졌다. 하지만 림프절 전이가 없는 유방암 환자를 치료하는 데 있어서 과도한 치료가 필요한지는 아직 명확하지 않다. 어떤 유방암 환자들은 국소적인 치료로 충분하고 전신보조화학요법이 도움이 되지 않는 경우도 있다. 그러므로 유방암 환자의 임상경과를 예측할 수 있는 예후 인자가 중요한 관심사가 되었고, 현재까지 알려진 임상경과를 예측할 수 있는 예후인자로는 환자의 연령, 폐경 유무, 원발 종양의 크기, 림프절 전이 상태, 조직학적 아형 및 암 유전자, 암 억제유전자, 성장인자, 증식능력의 측정 등이 사용되고 있다. 특히 이 중에서 액와 림프절 전이 상태, 조직학적 아형, 원발 종양의 크기, 핵등급 및 조직등급, 호르몬 수용체 유무, 증식능력의 측정이 표준적인 예후인자로 쓰이고 있으며,⁽¹⁾ 최근 분자생물학적 연구 방법을 이용하여 p53, CD31, Ki-67, Pgp (P-glycoprotein), c-erbB-2, EGFR (epidermal growth factor receptor), cathepsin D, urokinase plasminogen activator, pS2 등이 새로운 예후인자로서 연구되고 있다. 암세포의 증식력은 암세포의 특징 중에서 병의 진행을 결정짓는 중요한 인자로서 치료에 따른 결과를 예측할

책임저자 : 임현묵, 서울시 중구 필동 2가 82-1
☎ 100-272, 중앙의대 부속 필동병원 외과
Tel: 02-2260-2159, 2160, Fax: 02-2275-7869
E-mail: limmhm@kornet.net
접수일 : 2002년 2월 28일, 게재승인일 : 2002년 11월 8일

수 있고 무병률(disease free survival rate) 및 생존율(overall survival rate)과도 밀접한 관계가 있다는 연구 결과들이 많이 나오고 있고 임상적으로 그 의미가 강조되고 있는데 이러한 세포 증식력을 측정하는 지표들은 MI (mitotic index), TLI (thymidine labeling index), BrdUrd (bromodeoxyuridine) labeling index, 유세포 분석을 통한 S-phase 측정, PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 등이 있고,(2) Ki-67과 Topoisomerase-II- α 등이 최근 세포 증식력 측정 및 예후인자로서 활발히 연구 중이다.

수년 전부터 세포주기와 관련된 핵 항원의 검출이 면역조직화학 염색에 의하여 세포 증식능을 측정하는 데 사용되어 왔다. Popov 등(3)은 Ki-67은 세포주기의 모든 단계에서 발현되는 핵 항원이고 MIB-1은 Ki-67에 대한 단일 항체로 종양의 성장 분획을 측정하는 데 이용되어 왔으며 최근 세포의 증식능을 측정하는 새로운 표지자로 DNA topoisomerase II- α 가 알려지게 되었다.(4) DNA topoisomerase는 DNA 합성, 전사, 염색체 분리와 재결합과 같은 DNA 대사의 중요 단계에서 DNA 형태를 변화시키는 효소로 알려져 있으며, 여기에는 크게 DNA topoisomerase I과 II의 두 종류가 있는데 이들의 기능은 서로 다르다고 한다. DNA topoisomerase I은 DNA의 한 가닥을 자르는 반면 DNA topoisomerase II는 동시에 두 가닥을 자르면서 그 기능의 수행을 위해 ATP를 필요로 한다. 최근에 α 와 β 로 불리는 DNA topoisomerase II의 두 isoform이 포유동물 세포에서 발견되었다.(5) DNA topoisomerase II- α 는 세포증식에 있어서 변화가 민감하여 빠른 증식을 할 때 높은 수준을 나타내며 느린 증식을 할 때는 비교적 일정한 수준을 유지한다고 알려져 있으며, 또한 S기에 있는 정상과 형질전환된 모든 세포에서 검출되며 비증식성 세포에서는 검출되지 않는다고 한다.(6) 이러한 DNA topoisomerase II- α 를 이용한 세포 증식능 검출이 현재까지 소수의 유방암(4)과 이행상피암종,(5) 선양낭성암종(6) 등에서 소수 보고되었으며, 세포의 증식능으로 환자의 예후를 평가하는 데 있어서 Ki-67보다 DNA topoisomerase II- α 가 더 의미가 있다는 연구들이 발표되고 있다.(7,8)

E2F는 DNA 합성에 관련된 많은 유전자들의 전사를 조절하는 전사 조절인자로 알려져 있는데 여기에 Rb가 결합하면 전사인자로서의 기능이 상실된다. Cyclin D1/CDK4 복합체는 Rb에 직접 결합하여 mid-G1기에서 late-G1기 동안 이를 인산화하는데 이렇게 Rb 단백질이 과인산화되어 E2F와 결합하지 못하게 되면 자유롭게된 E2F는 S기를 위하여 필수적인 유전자 발현을 촉진시키는 것이 가능하게 되어 세포주기는 G1기에서 S기로 진행하게 되는 것으로 알려져 있는데,(9) E2F 전사인자군은 c-myc, c-myb, proliferating cell nuclear antigen (PCNA)과 CDK2 kinase 등의 몇 가지 유전자의 발현을 조절한다. E2F 전사인자군에는 E2F1에서 6까지가 기술되어 있고, E2F1-3은 과발현 시 S기의 진행을 유발시키지만 E2F4-6은 그렇지 않다. E2F-1은 46 kDa의 아미노

산으로 구성되어 있으며 cyclin A binding domain을 가지고 있고, E2F-1의 과발현이 세포의 증식을 자극하고 종양을 유발시키는 것으로 알려져 있다.(10) Zhang 등(11)은 E2F-1이 인간 두경부 암종 세포주에서 침습성을 증가시키는 데 중요한 역할을 한다고 발표하였고, Banerjee 등(12)도 E2F-1의 높은 발현이 대장암종의 폐전이와 연관성이 있음을 발표하였다.

이에 본 연구는 유방암에서 세포주기의 G1기에서 S기로 진행시키는 전사인자 E2F-1과 세포의 증식기에만 발현됨으로써 세포의 증식능을 나타내는 Topo-II- α 에 대한 면역조직화학염색을 실시하여, 이들의 연관성과 기존에 알려져 있는 각종 예후인자들과의 연관성을 알아봄으로써 유방암에 있어 Topo-II- α 와 E2F-1의 예후인자로서의 임상적 의의를 조명해 보고자 한다.

방 법

1) 연구대상

1997년 4월부터 2000년 4월까지 외과학교실에서 유방암으로 수술을 받고 병리학적으로 침윤성 관암종으로 진단 받은 환자 중에서 조직보관 상태가 양호한 43예를 대상으로 포르말린에 고정된 파라핀 포매 조직을 이용하였다. 선택된 환자의 임상기록과 병리진단지 등을 검색하여 환자의 나이, 종양의 크기 및 림프절 전이 여부 등을 확인하였다.

2) 연구 방법

(1) **병리학적 분류:** 세포의 조직학적 악성도는 Bloom과 Richardson의 등급체계에 근거하여 핵의 다양성, 유사분열 활동성과 세관(tubule)형성 정도에 따라 1등급(고분화), 2등급(중분화) 그리고 3등급(저분화)으로 분류하였고, 핵등급은 Nottingham/Tenovus Breast Cancer Study에서 사용한 등급 기준에 따라 1등급(고분화), 2등급(중분화) 그리고 3등급(저분화)으로 분류하였다. 종양의 크기는 American Joint Committee on Cancer (AJCC)의 T 분류에 따라 2 cm 이하, 2.1~4.9 cm, 5 cm 이상으로 분류하였고, 림프절 전이는 그 수에 관계없이 전이 여부로 분류하였으며, 병기는 AJCC의 분류에 따랐다.

(2) **면역조직화학 염색:** 선택된 환자의 파라핀 포매조직을 4~5 μ m 두께로 박절하고 자일렌으로 5분간 3회의 탈파라핀 과정을 거친 후 무수 알코올, 90%, 75% 및 50% 에탄올에 각각 2분씩 처리하여 함수시켰다. 그 후 내인성 과산화 효소의 활성을 억제하기 위해 0.3% hydrogen peroxide-methanol에 10분간 처리 후 증류수로 세척한 다음 50 mM Tris 완충용액(TBS, pH 7.5)으로 수세 후 비특이성 반응을 제거하기 위해 30분간 염소혈청으로 처리하고, 여분의 용액을 제거한 다음 일차항체인 E2F-1 (Zymed Laboratories INC South San Francisco CA U.S.A., 1;10)과 Topoisomerase

(Zymed Laboratories INC South San Francisco CA U.S.A., 1:50), 에스트로겐 수용체(ER, Zymed Laboratories INC South San Francisco CA U.S.A., ER-7G5, 1:50), 프로그스테론 수용체(PR, Zymed Laboratories INC South San Francisco CA U.S.A. PR-2C5, 1:50)를 실온에서 2시간 작용시켰다. 일차항체 반응 후 TBS로 5분간 3회 수세한 다음 biotin이 부착된 이차항체(1:300, Zymed Laboratories INC South San Francisco CA U.S.A.)에 20분간 작용 후, 통상적인 avidin-biotin complex법으로 염색하였다. 발색제는 AEC를 사용하였고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색하였다.

(3) 면역조직화학적 결과 판정: E2F-1은 종양세포의 5%에서 핵에 갈색으로 염색이 되는 것을 양성으로 판정하였으며, topoII- α 는 종양세포 1,000개 중에서 진한 갈색으로 핵에 염색이 되는 세포의 수를 세어 백분율로 표기하였다. 에스트로겐 수용체와 프로그스테론 수용체는 종양 세포의 핵에 10% 이상 염색이 되는 경우를 양성으로 판정하였다.

(4) 통계처리: 환자의 나이, 종양의 크기, 조직학적 등급, 핵등급, 림프절 전이 여부, ER과 PR의 발현 여부와 E2F-1 발현과 Topoisomerase index와의 관련성을 Window용 SPSS (version 8.0) 통계 프로그램을 이용하여 Pearson Chi-Square test를 실시하였고, P값이 0.05 이하일 때 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

결 과

1) 임상소견

환자의 연령은 30세부터 73세로 평균 47.9세였으며 39세 이하 군이 6예(14.0%), 40세에서 49세 군이 20예 (46.5%), 50세에서 59세 군이 13예(30.2%), 60세에서 69세 군이 3예 (7.0%), 70세 이상이 1예(2.3%)이었다.

종양의 크기는 2 cm 이하 군이 13예(30.2%), 2.1 cm에서 4.9 cm 군은 23예(53.5%), 5 cm 이상 군이 7예(16.3%)이었다. 림프절 전이 여부는 전이가 있는 군이 20예(46.5%)였고, 전이가 없는 군이 23예(53.5%)이었다. AJCC에 의한 환자의 병기는 병기 I이 8예(18.6%), 병기 IIA가 17예(39.5%), 병기 IIB가 13예(30.2%), 병기 IIIA가 5예(11.7%)이었다(Table 1).

2) 조직학적 소견

총 43예의 침윤성 관암종을 Bloom and Richardson의 조직학적 등급기준에 따라 분류하였을 때 1등급이 11예(25.6%), 2등급이 20예(46.5%), 3등급이 12예(27.9%)이었다. 핵등급은 1등급이 11예(25.6%), 2등급이 22예(51.2%), 3등급이 10예(23.2%)이었다.

3) E2F-1의 발현 및 Topo II- α Index와 예후인자와의 상관관계

총 43예 중 E2F-1에 음성을 나타낸 예가 24예(55.8%), 양

성을 나타낸 경우가 19예(44.2%)(Fig. 1)였고 Topo II- α index의 평균은 17.37 ± 15.81 이었다.

종양의 크기에 따라서는 2 cm 이하 군에서 음성인 예가

Table 1. Data on case

No.	Size	LN	Stage	Hg	Ng	Er	Pr	Topo II- α	E2F-1
1	2	+	IIB	2	2	+	+	4.7	+
2	2	+	IIB	2	2	+	+	5	+
3	1	-	I	1	1	+	+	4	-
4	2	-	IIA	1	1	-	-	10	-
5	2	+	IIB	3	3	+	+	6.7	-
6	2	+	IIB	3	3	+	+	17.1	+
7	2	+	IIB	1	2	-	-	10	+
8	2	-	IIA	2	2	+	+	1	-
9	3	-	IIB	1	1	+	+	30.6	+
10	1	-	I	1	1	+	+	1	-
11	1	-	I	2	2	+	+	4	-
12	1	-	I	1	1	+	-	6	-
13	1	-	I	2	2	+	+	1	-
14	2	+	IIB	3	3	-	-	30.5	+
15	2	-	IIA	2	2	+	+	3.3	-
16	2	-	IIA	2	2	+	-	1.7	-
17	1	-	I	1	1	+	+	3.8	-
18	2	+	IIB	2	2	-	-	65	+
19	2	-	IIA	2	2	+	+	5	-
20	2	-	IIA	2	2	+	+	5	-
21	3	+	IIIA	2	2	-	-	25	+
22	3	+	IIIA	3	2	-	+	35	+
23	2	+	IIB	3	3	+	+	20.5	+
24	2	-	IIA	3	3	-	+	40.6	-
25	3	+	IIIA	3	2	-	+	45	+
26	3	-	IIB	2	1	+	+	15	+
27	2	+	IIB	1	3	+	+	33.3	+
28	1	+	IIA	3	3	+	+	31.9	+
29	1	+	IIA	3	2	+	+	5	-
30	2	+	IIB	3	3	+	-	36.2	+
31	1	-	I	2	1	+	-	8	-
32	2	-	IIA	1	1	-	-	10	-
33	2	-	IIA	2	2	+	+	25.4	-
34	1	-	I	2	2	-	+	10	-
35	1	+	IIA	3	2	-	-	32.5	-
36	1	+	IIA	3	3	-	-	32.2	-
37	2	-	IIA	1	1	+	+	4	-
38	2	-	IIA	1	1	+	+	8	+
39	1	-	I	2	2	+	+	6.7	-
40	3	+	IIIA	2	3	+	+	6	-
41	3	+	IIIA	2	2	+	+	51	+
42	2	-	IIA	2	2	+	+	25	-
43	2	+	IIB	2	2	+	-	25	+

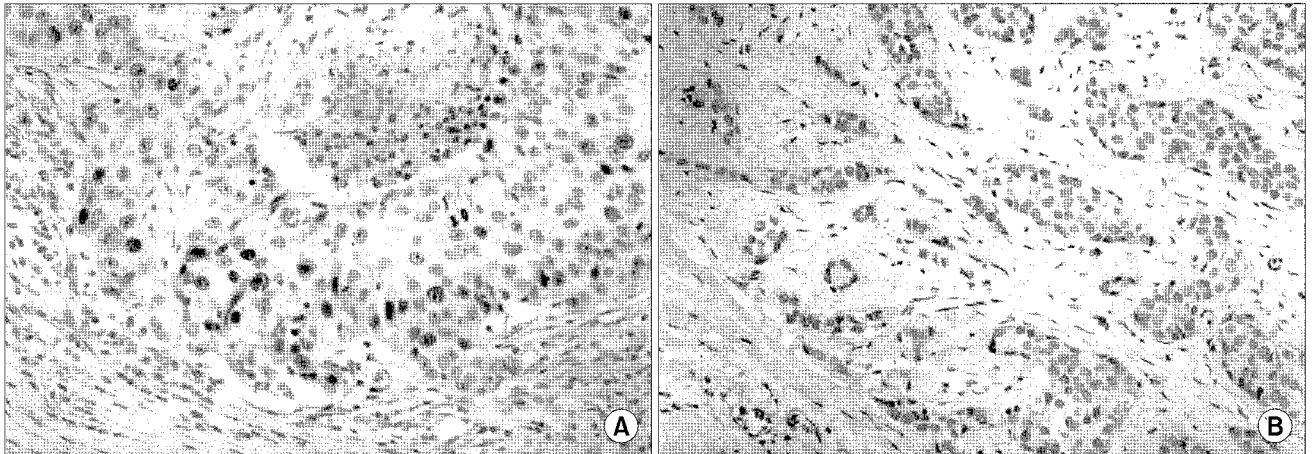


Fig. 1. Immunohistochemical stain of E2F-1 shows occasional nuclear staining (A) and negative staining (B) in infiltrating ductal carcinoma of breast (×200).

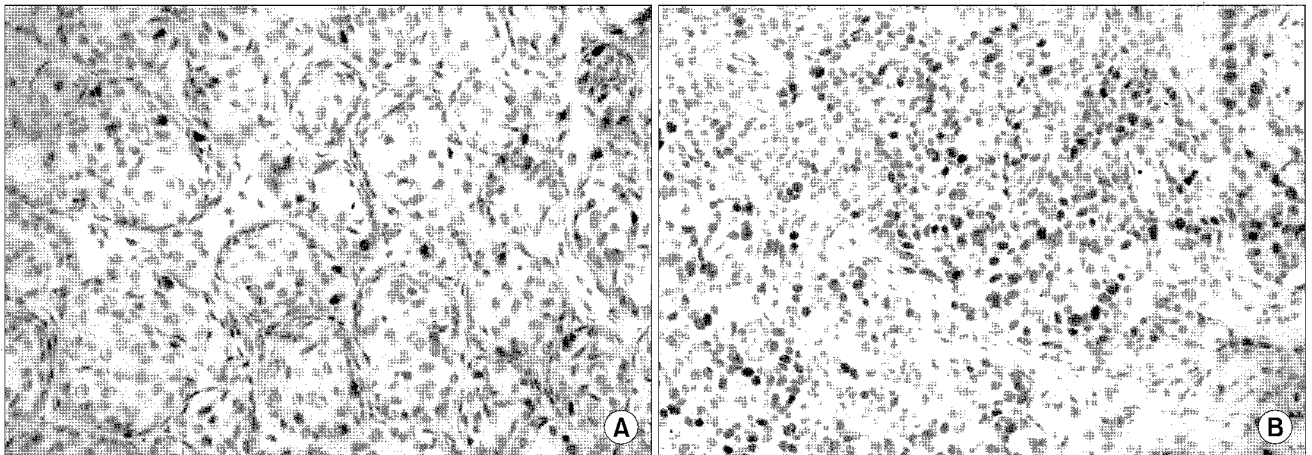


Fig. 2. Immunohistochemical stain of topoisomerase II-α shows frequently nuclear staining (A) and occasional staining (B) in infiltrating ductal carcinoma of breast (×200).

12예(92.3%), 양성인 예가 1예(7.7%)였고, 2.1~5 cm 군에서는 11예(47.8%)가 음성, 12예(52.2%)가 양성이었으며(Fig. 2), 5 cm 이상 군에서는 음성이 1예(14.3%), 양성인 6예(85.7%)로 크기가 증가함에 따라 통계학적으로 유의하게 E2F-1이 발현이 되는 예가 증가하였으며(P=0.002), Topo II-α index도 종양의 크기가 증가함에 따라 통계학적으로 유의하게 증가하였다(P=0.041)(Table 2). 림프절 전이 여부에 따라서는 전이가 없는 군에서 음성이 19예(82.6%), 양성인 3예(17.40%)였고, 전이가 있는 군에서는 음성이 5예(20.0%), 양성인 15예(80.0%)로 전이가 있는 군에서 E2F-1의 발현되는 예가 통계학적으로 유의하게 증가하였고(P=0.0001), Topo II-α index도 림프절 전이가 있는 군에서 통계적으로 유의하게 증가하였다(P=0.001)(Table 3). 병기에 따른 E2F-1 발현은 병기가 높아짐에 따라 E2F-1의 발현이 증가함을 보

Table 2. Association between E2F-1 & Topo II-α index and tumor size

Tumor size	E2F-1		Topo II-α index (mean ± S.D)
	(-)	(+)	
<2 cm	12 (92.3%)	1 (7.7%)	11.24 ± 12.20
2.1 cm ~4.9 cm	11 (47.8%)	12 (52.2%)	17.09 ± 16.03
5 cm <	1 (14.3%)	6 (85.7%)	29.66 ± 15.90
Total	24	19	
P-value	0.002		0.041

Table 3. Association between E2F-1 & Topo II- α index and LN metastasis

	E2F-1		Topo II- α index (mean \pm S.D)
	(-)	(+)	
LN metastasis			
(-)	19 (82.6%)	4 (17.4%)	9.96 \pm 10.52
(+)	5 (20.0%)	15 (80.0%)	25.88 \pm 16.79
P-value	0.0001		0.001

Table 4. Association between E2F-1 & Topo II- α index and tumor stage

	E2F-1		Topo II- α index (mean \pm S.D)
	(-)	(+)	
Tumor stage			
I	9 (100.0%)	0 (0.0%)	4.94 \pm 3.03
IIA	13 (81.3%)	3 (19.7%)	15.04 \pm 13.62
IIB	1 (7.1%)	13 (92.9%)	25.04 \pm 17.73
IIIA	1 (25.0%)	3 (75.0%)	27.75 \pm 16.64
P-value	0.0001		0.008

Table 5. Association between E2F-1 & Topo II- α index and histologic grade, and nuclear grade

	E2F-1		Topo II- α index (mean \pm S.D)
	(-)	(+)	
Histologic grade			
I	7 (63.6%)	4 (36.6%)	10.97 \pm 10.80
II	12 (60.0%)	8 (30.0%)	14.64 \pm 17.25
III	5 (41.7%)	7 (58.3%)	27.77 \pm 12.72
P-value	0.499		0.019
Nuclear grade			
I	8 (72.7%)	3 (27.3%)	9.13 \pm 8.10
II	12 (54.5%)	10 (45.5%)	17.75 \pm 18.40
III	4 (40.0%)	6 (60.0%)	25.57 \pm 12.09
P-value	0.316		0.054

여 통계적인 유의성이 있었고(P=0.0001), Topo II- α index도 병기가 높아짐에 따라 통계학적으로 유의하게 증가하는 양상을 보였다(P=0.008)(Table 4). 조직학적인 등급에 따른 E2F-1 발현의 차이는 없었으나(P=0.499), Topo II- α index는 등급이 높아짐에 따라 통계학적으로 유의하게 증가하는 양

Table 6. Association between E2F-1 & Topo II- α index and estrogen receptor, and progesterone receptor

	E2F-1		Topo II- α index (mean \pm S.D)
	(-)	(+)	
ER status			
(-)	6 (54.5%)	5 (45.5%)	30.53 \pm 16.79
(+)	18 (56.2%)	14 (43.8%)	12.84 \pm 12.85
P-value	0.922		0.001
PR status			
(-)	6 (46.2%)	7 (53.8%)	22.47 \pm 17.44
(+)	18 (60.0%)	12 (40.0%)	15.15 \pm 14.82
P-value	0.401		0.166

Table 7. Association between E2F-1 and Topo II- α index

E2F-1	Number	Topo II- α index (mean \pm S.D.)
(-)	24 (55.8%)	10.68 \pm 11.33
(+)	19 (44.2%)	25.82 \pm 16.86
P-value		0.001

상을 보였다(P=0.019). 핵등급에 따라서도 E2F-1 발현의 차이는 없었으며(P=0.316), Topo II- α index는 등급이 증가함에 따라 증가하는 양상을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다(P=0.054)(Table 5). 호르몬 수용체의 여부에 따른 E2F-1의 발현은 에스트로겐 수용체와 프로게스테론 수용체에 따른 발현의 차이는 없었고(ER P=0.922, PR P=0.401), Topo II- α index는 에스트로겐 수용체음성군에서 통계적으로 유의하게 감소하였고(P=0.001) 프로게스테론 수용체에서는 통계적 유의성이 없었다(P=0.166)(Table 6). E2F-1이 양성인 19예의 평균 Topo II- α index는 25.82 \pm 16.86이었으며 음성인 24예의 평균은 10.68 \pm 11.33으로 E2F-1이 양성인 군에서 통계학적으로 유의하게 Topo II- α index가 높았고(P=0.001)(Table 6), E2F-1의 발현과 Topo II- α index 상호간의 correlation coefficient는 0.396으로 통계학적으로 유의성이 있었다(P=0.001)(Table 7).

고 찰

종양에서 세포의 증식능을 평가하는 여러가지 방법 중에서 PCNA나 MIB-1에 대한 면역조직화학적 염색이 널리 이용되고 있다. MIB-1은 종양의 성장 분획을 측정하는 데 이용되는 Ki-67의 단일클론 항체이며, 이 Ki-67은 395 kDa와

354 kDa의 분자량을 갖는 인간 핵의 비히스톤 단백질과 반응하며, (13) 세포주기의 G0기를 제외한 G1, S, G2와 M기에서 모두 발현된다. (3) 많은 연구에서 Ki-67 발현과 다른 방법들을 이용한 세포 증식능은 높은 연관성을 보이고 있으며, (14) 이에 따라 Ki-67을 이용한 세포 증식능은 진단과 예후인자로서의 가치가 많은 종양에서 보고되어 있다. (15) 비교적 최근에 포르말린에 고정된 파라핀 포매 조직에서 Ki-67을 검출하는 MIB-1을 포함하는 새로운 단일클론 항체들이 개발되었다. (16) 한편 새로운 증식표지자로 연구되고 있는 DNA topoisomerase는 DNA의 합성, 전사, 염색체 분리와 재결합 등의 DNA 대사에 중요한 과정 동안 DNA의 구조변화에 관여하는 효소이다. (17) 이러한 DNA topoisomerase는 기능적으로 서로 다른 I과 II의 두 가지 유형이 있다. DNA topoisomerase I (이하 topo I)은 DNA의 한 가닥을 자르는 역할을 하지만 DNA topoisomerase II (이하 topo II)는 동시에 두 가닥을 자르며 그 기능을 수행하기 위해 ATP를 필요로 한다고 알려져 있으며, topo II는 포유류에서 각각 170과 180 kDa를 가지는 α 와 β 의 isoform이 증명되었으며 이들은 각각 염색체 17q21-22와 3q24에 위치한다. (18) 이 중 α -isoform은 anthracycline (doxorubicin, m-AMSA, mitoxantrone, etoposide)계 항암제의 target으로 작용하여 항암치료에 있어 중요한 역할을 담당하며 또한 대장암, 위암, 유방암, 림프종의 악성종양과 증식하는 세포의 세포주기 G1, S phase와 G2, M기에만 발현되어 세포 증식능을 알 수 있는 데 있어 중요한 역할을 담당한다. (19) 이들은 서로 높은 상동성을 가짐에도 불구하고 서로 독립적으로 조절되며 다른 성장과 기능을 가진다고 알려져 있다. Topo II- α 는 세포 증식에 민감하게 변화하여 급속한 증식기 동안에 높은 수준을 나타내며 세포가 성장을 멈추면 낮아지지만, topo II- β 의 발현은 세포주기 동안 일정하게 유지된다고 하였으며, (18) Lynch 등(4)은 topo II- α 가 S, G2, M기에서 발현된다고 보고하였다. 한편, 대략 160 kDa의 분자량을 가지면서 증식성 세포에서 잘 발현이 되는 Ki-S1이라는 단백질 항체가 알려지게 되었고, (20) 이것은 유방암종에서 예후인자로서의 가치가 있는 것으로 알려졌다. (21) 최근 이 Ki-S1이 topo II- α 와 동일한 것이 확인되었다. (22) Topo II- α 는 정상세포와 조직에서도 세포증식의 표지자로 알려져 있으며, (23) 각종 종양에서의 연구결과가 보고되어 있다. Staley 등(24)은 대장암종에서 topo II- α 에 대한 면역조직화학 염색을 실시하여 평균염색지수는 63.6이라고 발표하였으며, 염색지수는 Dukes' stage A, B, C에서 각각 55.9, 63.8, 67.6로 병기에 따른 유의성은 없다고 하였다. 또 Willman과 Holden(25)은 전립선의 양성과 전암성병변 및 악성병변에서 topo II- α 에 대한 연구를 실시하여 고분화도 암종에서는 염색지수를 1.5 ± 0.9 , 중등도 분화도에서는 3.1 ± 2.4 , 저분화도 암종에서는 6.7 ± 5.5 로 발표하면서 침윤성 암종에서의 염색지수는 평균 4.0이라고 하였으며 전암성 병변인 고등급의 전립선 상피

내 종양에서는 2.3, 양성 전립선증식증에서는 0.54였다고 보고하였다. 또한, Holden과 Townsend(7)는 topo II- α 와 MIB-1의 발현을 별아교세포종에서 비교한 연구에 의하면 topo II- α 의 염색지수는 환자의 2년 생존율과 연관성이 있었으나 MIB-1은 연관성이 없었다고 하였다. Nakopoulou 등(8)은 방광의 요로상피암종에서 topo II- α 에 대한 면역조직화학 염색을 실시하여 topo II- α 염색 지수와 조직학적인 등급 및 고유근층으로의 침윤여부와 연관성이 있으나, Ki-67과의 연관성은 없어서 세포증식에 있어서 서로 다른 경로와 기능을 가지는 인자라고 설명하면서, topo II- α 는 제한적인 환자 즉 표재성 암종에 있어서 치료의 방침을 결정하는 데 도움을 줄 수 있을 것이라고 하였다. 본 연구에서 topo II- α 는 종양의 크기, 림프절 전이 여부, 병기, 조직학적 등급, 에스트로겐 수용체 상태와 통계학적으로 유의성이 관찰되어 예후 인자로서의 가치가 있다고 판단된다.

한편, 전사인자인 E2F-1은 p16-cyclinD-Rb pathway의 downstream regulator이고 세포주기가 진행되는 데 필요한 요소이다. E2F-1의 과발현은 종양세포의 분화를 촉진시키기도 하고 억제하기도 하는 것으로 알려져 있다. 하나의 세포 주기에서 다른 주기로 이행하는 데에는 cyclins, cyclin-dependent kinase (Cdk), Cdk inhibitors, Rb, E2Fs 등 여러 가지 요소가 작용한다. 예를 들어 D-type cyclins는 Cdk4/Cdk6와 결합하여 활성화시키고 이들은 Rb gene을 부산물인 pRb를 인산화시키고 이 pRb의 인산화의 결과로 pRb-E2F 결합체에서 E2F가 유리된다. 이 유리된 E2F는 DNA 생성에 필요한 유전자의 전사를 촉진시키고 G1기에서 S기로 유도되는 데 필요한 요소이다. (11) Rabbani 등(26)은 방광암 환자에게서 임상추적 검사를 시행하였을 때 E2F 표현이 낮은 환자에서 더 좋은 예후를 나타냈다고 보고하였고, Zhang 등(27)은 높은 E2F의 표현이 고분위 암과 연관이 있고 유방암 환자에서 나쁜 예후를 나타냈다고 보고하였다. Zhang 등(11)은 E2F-1 gene의 transfer가 인간의 두경부 종양에서 침습도를 증가시키고 악성도가 높은 세포주일수록 E2F-1의 표현이 더 높아진다고 보고하였다. 본 연구에서는 유방의 침윤성 관암종으로 그 대상을 제한하였고, 면역조직학적 분석의 한계가 인정되기는 하지만 E2F에 양성을 나타내는 경우가 전체 43명의 환자에서 19명이었고 E2F-1은 종양의 크기가 크고 림프절 전이가 있으며 병기가 진행됨에 따라 통계학적으로 유의하게 발현되는 예가 증가하여 예후인자로서의 가치가 있다고 생각된다. 또한 E2F-1이 양성인 군에서 topo II- α index의 평균이 통계학적으로 유의하게 높았으며, 발현에 있어서 상호간에 통계학적으로 유의한 연관성이 관찰되어, 전사인자인 E2F-1과 증식표지자인 topo II- α 가 서로 연관성있게 발현되는 것으로 생각된다.

결론

1997년 4월부터 2000년 4월까지 중앙대학교부속 필동병원 외과학교실에서 유방의 침윤성 관암종으로 수술 받은 43예를 대상으로 E2F-1의 발현도 및 Topoisomerase II- α index를 조사하였고 기존의 예후인자들인 환자의 나이, 종양의 크기, 림프절 전이 여부, 조직학적 등급, 핵등급, 호르몬 수용체 여부 등과의 상관성을 비교 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

총 43예 중 E2F-1에 음성을 나타낸 예가 24예(55.8%), 양성인 경우가 19예(44.29%)였으며, 종양의 크기가 크고 림프절 전이가 있으며 병기가 진행된 경우에 있어서 E2F-1이 발현된 예가 증가하였으며, topo II- α index는 종양의 크기가 크고, 림프절 전이가 있으며, 조직학적 등급이 높고, 에스트로겐 수용체가 음성인 경우 통계학적으로 유의하게 증가하였다(P<0.05). 또한 E2F-1과 topo II- α 는 서로 연관성 있게 발현되었다.

이상의 결과로 유방의 침윤성 관암종에서의 E2F-1과 Topo II- α index는 다른 예후인자들과 상관관계가 있고 서로 연관성있게 발현되어 중요한 예후인자로 활용 가능성이 있다고 판단되었고 향후 이에 대한 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

REFERENCES

- 1) Beverly JL, Donald G Jr, Joseph AH. Human DNA topoisomerase II-alpha: A new marker of cell proliferation in invasive breast cancer. *Hum Pathol* 1997;28:1180-8.
- 2) Joseph AH, Jeannette JT. DNA topoisomerase II-alpha as a proliferation marker in astrocytic neoplasm of the central nervous system: correlation with MIB1 expression and patient survival. *Mod Pathol* 1999;12:1094-100.
- 3) Popov Z, Hoznek A, Colombel M, Bastuji-Garin S, Lefrere-Belda MA, Bellot J, et al. The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 1997;80:1472-81.
- 4) Lynch BJ, Guinee DG Jr, Holden JA. Human DNA topoisomerase II-alpha: a new marker of cell proliferation in invasive breast cancer. *Hum Pathol* 1997;28:1180-8.
- 5) Monnin KA, Bronstein IB, Gaffney DK, Holden JA. Elevation of DNA topoisomerase I in transitional cell carcinoma of the urinary bladder: correlation with DNA topoisomerase II-alpha and p35 expression. *Hum Pathol* 1999;30:384-91.
- 6) Hirabayashi S. Immunohistochemical detection of DNA topoisomerase type II α and Ki-67 in adenoid cystic carcinoma and pleomorphic adenoma of the salivary gland. *J Oral Pathol Med* 1999;28:131-6.
- 7) Holden JA, Townsend JJ. DNA topoisomerase II-alpha as a

- proliferation marker in astrocytic neoplasms of the central nerve system: correlation with MIB-1 expression and patient survival. *Mod Pathol* 1999;12:1094-100.
- 8) Nakopoupou L, Lazaris AC, Kavantzias N, Alexandrou P, Athanassiadou P, Keramopoulos A, et al. DNA topoisomerase II-alpha immunoreactivity as a marker of tumor aggressiveness in invasive breast cancer. *Pathobiology* 2000;68:137-43.
- 9) Kee KH, Oh YK. Expression of c-erbB-2, c-myc, c-fos, bcl-2, p53, PCNA, and TGF- α in transitional cell carcinoma of urinary bladder. *Korean Pathol* 2000;34:516-23.
- 10) Nakamura T, Monden Y, Kawashima K, Nuruke T, Nishimura S. Failure to detect mutations in the retinoblastoma protein-binding domain of the transcription factor E2F-1 in human cancers. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:1204-9.
- 11) Zhang SY, Liu SC, Johnson DG, Klein-Szanto AJ. E2F-1 gene transfer enhances invasiveness of human head and neck carcinoma cell lines. *Cancer Research* 2000;69:5972-6.
- 12) Banerjee D, Gorlick R, Liefshitz A, Danenberg PC, Danenberg PV. Levels of E2F-1 expression are higher in lung metastasis of colon cancer as compared with hepatic metastasis and correlate with levels of thymidylate synthase. *Cancer Research* 2000;60:2365-7.
- 13) Gerdes J, Li L, Schlueter C. Immunohistochemical and molecular biologic characterization of cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991;138:867-73.
- 14) Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Immunol* 1984;133:1710-5.
- 15) Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990;17:489-503.
- 16) Key G, Becker MHG, Duchrow M, Schlueter C, Gerdes J. New Ki-67 equivalent murine monoclonal antibodies (MIB1-3) prepared against recombinant parts of the Ki-67 antigen. *Anal Cell Pathol* 1992;4:181-7.
- 17) Berger JM, Gamblin SJ, Harrinson SC, Wang JC. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* 1996;379:225-32.
- 18) Drake FH, Hofmann GA, Bartus HF, Mattern MR, Crooke ST, Mirabelli CK. Biochemical and pharmacological properties of p170 and p180 forms of topoisomerase II. *Biochemistry* 1989;28:8154-60.
- 19) Rohit B, Rizwan N, Sharon M, Jason L, Jane G, Robert G, et al. Tyrosine kinase activation in breast carcinoma with correlation to HER-2/neu gene amplification and receptor overexpression. *Hum Pathol* 2001;32:1344-50.
- 20) Kreipe H, Heidebrecht HJ, Hansen S. A new proliferation-associated nuclear antigen detectable in paraffin-embedded tissues by the monoclonal antibody Ki-S1. *Am J Pathol* 1993;142:3-9.
- 21) Sampson SA, Kreipe H, Gillett CE. Ki-S1: A novel mono-

- clonal antibody which recognizes proliferating cells: evaluation of its relationship to prognosis in mammary carcinoma. *J Pathol* 1992;168:179-85.
- 22) Boege F, Andersen A, Jensen S, Ziedler R, Kreipe H. Proliferation associated nuclear antigen Ki-S1 is identical with topoisomerase II α . *Am J Pathol* 1995;168:179-85.
- 23) Heck MMS, Earnshaw WC. Topoisomerase II: a specific marker of cell proliferation. *J Cell Biol* 1986;103:2569-81.
- 24) Staley BE, Samowitz WS, Bronstein IB, Holden JA. Expression of DNA topoisomerase I and DNA topoisomerase II- α in carcinoma of the colon. *Mod Pathol* 1999;12:356-61.
- 25) Willman JH, Holden JA. Immunohistochemical staining for DNA topoisomerase II- α in benign, premalignant, and malignant lesions of the prostate. *Prostate* 2000;42:280-6.
- 26) Rabbani F, Richon V, Orlov I, Lu M, Drobnjak M, Dudas M, et al. Prognostic significance of transcription factor E2R-1 in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:874-81.
- 27) Zhang SY, Liu SC, Al-Saleem L, Holloran D, Babb J, Guo X, et al. A Proliferative marker of breast neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2000;9:395-401.
-