

## 유방의 관상피내암종 조직에서 MMP-2와 MMP-9의 발현 및 VEGF 발현과 미세혈관밀도와의 연관성

인제대학교 의과대학 외과학교실, <sup>1</sup>병리학교실

박주상 · 정수진<sup>1</sup> · 김태현 · 이진용 · 윤혜경<sup>1</sup>

### Relationship between Matrix Metalloproteinase (MMP)-2, 9 Expressions and VEGF Expression and Microvessel Density in Ductal Carcinoma in Situ of the Breast

Ju Sang Park, M.D., Soo Gin Jung, M.D.<sup>1</sup>, Tae Hyun Kim, M.D., Jin Yong Lee, M.D. and Hye Kyong Yoon, M.D.<sup>1</sup>

**Purpose:** MMPs are involved in the degradation of the extracellular matrix, which is an important step in tumor invasion and metastasis. Among the MMPs, a positive correlation between the expressions of MMP-2 and MMP-9, and the aggressive behavior of breast carcinomas has been reported, but the role of the MMP-2 and MMP-9 expressions in DCIS is still not known. Angiogenesis has a crucial role in tumor growth and metastasis. The aim of this study was to investigate the relationships between the expressions of the MMPs, the angiogenic factor (VEGF) and the microvessel density (MVD) in a ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast.

**Methods:** 42 cases of DCIS, diagnosed at the Busan Paik Hospital, between 1992 and 2002, were the subjects of this study. The rates of MMP-2 and 9 expressions and VEGF were evaluated using immunohistochemistry, and the MVD was measured by CD 34 immunohistochemical staining. The statistical analyses between the expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF and the MVD, patient's age (more than 50 years old, less than 50 years old), histological subtype (comedo or non-comedo) and nuclear grade (I, II, III), and their correlation were examined.

**Results:** The expressions of MMP-2 and MMP-9 were noted in 20 (47.6%) and 22 (52.4%) of the 42 cases, respectively. There were no significant relationships between the expressions of MMP-2 and MMP-9 and the patient's age

and histological subtype, but the expression rate of MMP-9 showed an increased tendency in cases with nuclear grades II and III compared with the cases with nuclear grade I ( $P=0.0863$ ), but no significant difference between the MMP-2 expression and the nuclear grades was noted. The VEGF was expressed in 47.6% of the cases, and the mean MVD was 21 per x200 field, with 13 (30.9%) of the 42 cases showing increased MVD. The VEGF expression rate showed an increasing tendency in the cases younger than 50 years old ( $P=0.1011$ ), but no significant differences according to the histological subtype and nuclear grades were seen. There were no relationships between the MVD and the clinico-pathological factors. The MVD showed an increasing tendency in cases with a non-comedo histological type compared to the comedo type ( $P=0.0536$ ). No positive correlation between the expression of VEGF and MVD was noted. No significant relationship between expressions of MMP-2 and VEGF and the MVD were seen, but the rate of MMP-9 expression was significantly higher in the VEGF-positive cases ( $P=0.0293$ ), however, no relationship between MMP9 expression and MVD was found.

**Conclusion:** The expressions of MMP-2 and MMP-9 in DCIS are suggestive of their involvement in the development of breast cancers. However, with non-invasive lesions, and the positive correlation between the MMP-9 and VEGF expressions and the nuclear grades, means that the expression of MMP-9 may represent the biological behavior of DCIS, but the role of MMP-2 expression is still uncertain in the development of breast carcinomas. (*J Korean Surg Soc* 2003;65:190-197)

**Key Words:** MMP-2, MMP-9, VEGF, Microvessel density, Ductal carcinoma in situ

**중심 단어:** 관상피내암종, MMP-2, MMP-9, VEGF, 미세혈관밀도, 유방

Department of Surgery, <sup>1</sup>Pathology, In Je University College of Medicine, Busan, Korea

책임저자 : 박주상, 부산시 진구 개금동

☎ 614-735, 부산백병원 일반외과 의국

Tel: 051-890-6352, Fax: 051-898-9427

E-mail: shulsang@hanmail.net

접수일 : 2003년 3월 17일, 게재승인일 : 2003년 6월 23일

## 서 론

생활의 서구화와 더불어 질병의 양상이 차츰 서구화되어 감에 따라 국내 여성에서 유방암의 발생빈도도 점차 증가하고 있으며 관상피내암종의 발생률도 점차 증가하여 최근에는 전체 유방암 환자의 19% 정도를 차지한다고 한다.(1) 유방암의 예후를 결정하는 인자들에 대한 연구는 비교적 활발하여 종양의 크기와 림프절 전이 유무가 중요한 예후인자로 알려져 있으며,(2) 조기 유방암종 중 재발 가능성이 높은 고위험군을 구별할 수 있는 보조적 예후인자로서 DNA 배수성, 증식 분획,(3) 에스트로젠과 프로게스테론 수용체의 존재유무,(4) Her-2/neu와 p53 등의 종양 유전자 및 종양 억제 유전자의 역할과 침윤에 연관된 cathepsin D나 matrix metalloproteinases (이하 MMPs라 함)와 같은 단백분해효소에 관한 연구가 활발히 진행되어왔다.(5,6)

최근에는 고형성 종양의 예후인자로 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 단백분해효소와 종양의 침윤성 성장 및 전이와의 관계에 대한 논의가 활발하다. MMPs는 내인성 단백분해효소로서 주로 분해하는 기질에 따라 크게 gelatinase, stromelysin, interstitial collagenases, elastase와 세포막에 존재하는 막형 (membranous) MMP (MT-MMP)로 구분되는데(7) 이 중 분자량 72kDa의 MMP-2 (gelatinase A)와 분자량 92 kDa의 MMP-9 (gelatinase B)가 기저막의 주요 성분인 제 4형 교원질 분해에 가장 중요한 역할을 하며(8) 침윤성 유방암의 경우 MMP-2와 MMP-9가 종양 조직 및 주변 기질 부위에서 발현되며, MMP-2 및 MMP-9 발현은 림프절 전이, 짧은 생존율, 높은 재발률과 연관성이 있다고 알려져 있으나(9) 관상피내암종에 대한 연구는 부족한 실정이다.

종양은 신생혈관을 통해서 성장에 필요한 영양분을 쉽게 얻을 수 있으며, 다른 장기로 전이할 수 있는 경로에 쉽게 도달할 수 있기 때문에 종양의 신생혈관 생성 능력은 종양의 성장과 전이에 매우 중요한 역할을 한다. 이러한 신생혈관형성에 관여하는 인자 중 vascular endothelial growth factor (VEGF) family는 VEGF, VEGF-B, VEGF-C와 placental growth factor로 분류되며, 발생 과정의 초기에 나타나는 혈관형성과 종양에서의 신생 혈관의 성장에 중심적인 역할을 한다고 알려져 있다.(10) 유방암 조직에서도 VEGF 발현과 미세혈관밀도가 나쁜 예후를 나타내는 독립적인 인자로 생각된다는 보고가 있으며,(11) 관상피내암종에서도 VEGF는 중요한 혈관형성인자로서 미세혈관밀도와 유의한 상관관계를 보인다는 보고가 있다.(1)

최근 MMPs와 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)가 맥관형성과 연관이 있다는 보고도 있으며,(11) 따라서 유방암종의 전이 및 재발과 밀접한 연관성이 있다는 보고가 발표되었다.(12) 두경부 편평세포암종을 이용한 연구에서 MMP-9와 VEGF 발현이 상호 연관성을 가지고 혈관 신

생에 관여한다는 보고와 두경부 편평세포암종에서 MMP-9의 발현이 미세혈관밀도 및 VEGF 발현과 유의한 연관성을 보이는 것은 MMP-9의 발현이 혈관 침윤을 나타내는 신생관생성의 조절인자로 작용함을 시사한다고 하였다.(13)

본 연구는 유방의 관상피내암종 조직에서 MMP-2 및 MMP-9의 발현을 면역화학적 방법으로 조사하여 환자의 나이, 관상피내암종의 조직학적 유형, 핵 등급에 따른 MMP-2 및 MMP-9 발현율을 비교하여 관상피내암종에서의 MMP-2 및 MMP-9 발현의 의의 및 생물학적 특징을 알아보려고 하였으며, 혈관생성 인자인 VEGF의 발현과 미세혈관 밀도를 조사하여 MMP-2 및 MMP-9 발현과의 연관성을 조사함으로써 관상피내암종의 침윤성 성장 및 전이와 연관된 상기 인자들이 종양 발달과정에 어떻게 관여하는지 알아보려고 하였다.

## 방 법

### 1) 연구대상

1992년 1월에서 2002년 6월까지 종양 절제술 및 근치적 유방 절제술 후 부산백병원 병리과에 의뢰되어 유방의 관상피내암종으로 진단된 증례 중 파라핀 포매 조직의 보존이 양호한 42예를 대상으로 하였다.

### 2) 연구방법

(1) 임상적 인자 조사 및 병리학적 검색: 수술 당시 환자의 나이를 조사하여 50세 미만과 50세 이상으로 구분하였다. 선택된 증례의 H&E 슬라이드를 검경하여 관상피내암종의 조직학적 양상에 따라 면포형(comedo), 고형(solid), 미세유두형(micropapillary), 유두형(papillary), 사상형(cribriform)으로 구분하였으며,(14) 상기 유형 중 한 가지 유형이 75% 이상을 차지하는 경우에는 주된 유형으로 분류하였고, 그렇지 않은 경우는 혼합형으로 간주하였다. 조직학적으로 다시 면포형이 부분적으로 있으며 면포형으로, 전혀 포함되지 않은 경우를 비면포형으로 대별하였다. 핵 등급은 관상피내암종의 생물학적 악성도를 나타내는 인자로서(15) Consensus Conference Committee(16)의 분류에 따라 핵이 균일하며 정상 관상피세포의 핵과 비슷한 크기이며 미세한 염색질을 보이는 경우를 저등급(I), 핵의 다형성이 심하고 크기가 정상 관상피세포의 핵에 비해 2.5배 이상이며 공포성의 불규칙한 염색질과 크고 분명한 핵소체를 여러 개 보이거나 분명한 유사 분열이 자주 관찰될 경우 고등급(III), 저등급과 고등급의 중간 정도의 핵의 변화를 보이면 중등급(II)으로 하였다.

(2) 면역조직화학검사: 적절한 파라핀 포매 조직을 연속적으로 4~5 $\mu$ m 두께의 절편을 5개 이상 얻어 organic saline 이 처리된 유리슬라이드에 부착시키고 탈파라핀 과정과 합수과정을 거친 후 마이크로웨이브 오븐을 이용하여 처리하

고, 내인성 peroxidase의 작용 방지를 위해 3% 과산화수소수를 이용하여 10분간 처리하였으며, 면역조직화학염색을 위해 LSAB (labelled streptavidin biotin) kit (DAKO, Carpinteria, US)를 이용하였다. 먼저 blocking serum으로 20분간 처리한 후 MMP-2 (Quartett, Germany), MMP-9 (Neomarkers, Fremont, USA)와 VEGF (Santa Cruz, Santa Cruz, USA), CD34 (Neomarkers, Fremont, USA)에 대한 일차 항체를 사용하며, 발색은 diaminobenzidine (DAB)와 AEC (acetyl ethyl carbazole)을 이용하여 1~10분간 실온에서 발색될 때까지 두며, Mayer hematoxylin으로 대조염색하고 봉입하였다.

(3) 면역조직화학염색의 판독: MMP-2와 MMP-9는 염색 강도와 무관하게 종양의 50% 이상의 세포질에 발현을 보이는 양성으로 판정하였다. VEGF 발현도 염색 강도와 무관하게 종양세포의 세포질에서 50% 이상 발현될 경우 양성으로 판독하였다. CD34 면역조직화학염색에서 관상피내암종 주변에서 혈관 밀도가 높은 세 부위를 택하여 광학현미경 200배 시야에서 관상피내암종 변화를 보이는 관 주위에 분포하는 혈관의 수를 세어 증례별 평균치를 구하였다. 혈관 중에서 6~8개 이상의 적혈구가 들어갈 만한 큰 직경의 혈관, 두꺼운 근육층이 있는 혈관은 제외하였고, 괴사, 염증 및 경화가 있는 부위는 수복반응으로 인한 이차적인 혈관의 증식인 것으로 보고 제외하였다. 또한 한 개의 혈관 내피세포 또는 내강이 없는 내피세포의 소집단은 세포 하나 하나를 각각 한 개의 혈관으로 간주하여 계산하였다.(17) 전체 대상 예에서 상기 방법으로 산정한 미세혈관밀도의 평균치를 구하여 평균 미만인 경우와 이상인 경우로 구분하여 분석하였다.

(4) 통계학적 분석: MMP-2와 MMP-9 발현과 환자의 나이 및 조직학적 유형, 핵 등급과의 연관성을 조사하였다. 또한 VEGF 발현과 미세혈관밀도도 환자의 나이 및 조직학적 유

형, 핵 등급과 비교하였으며, 또한 MMP-2와 MMP-9 발현과 VEGF 발현, 미세혈관밀도와의 상호 연관성을 SAS (ver 8.0) 프로그램을 이용하여 분석하였으며, Chi-square 검정법 및 Fisher's exact test로서 해석하여 P값이 0.05 미만인 경우 유의하다고 판정하였다.

결 과

1) 임상인자 및 병리조직학적 특징

환자의 나이는 50세 미만인 경우가 36예로 50세 이상인 경우 6예보다 많았다. 42예 중 15예(35.7%)가 두 가지 이상의 조직학적 유형이 섞인 혼합형이었고, 한 가지 유형만으로는 고행형이 9예(21.4%)로 가장 많았고, 면포형 7예(16.6%), 사상형과 유두형이 각각 6예(14.3%)와 5예(11.9%)였다. 혼합형 중 면포형과 사상형이 함께 있는 것이 6예로 가장 많았고, 그 외 사상형과 유두형, 고행형과 면포형이 혼합된 예들이었다. 면포형과 비면포형으로 나누었을 때 면포형은 15예(35.7%), 비면포형은 27예(64.3%)였다. 핵 등급은 전체 42예 중 20예(47.6%)가 중등급(II)이었고, 고등급(III)이 15예(35.7%), 저등급(I)이 7예(16.7%)였다.

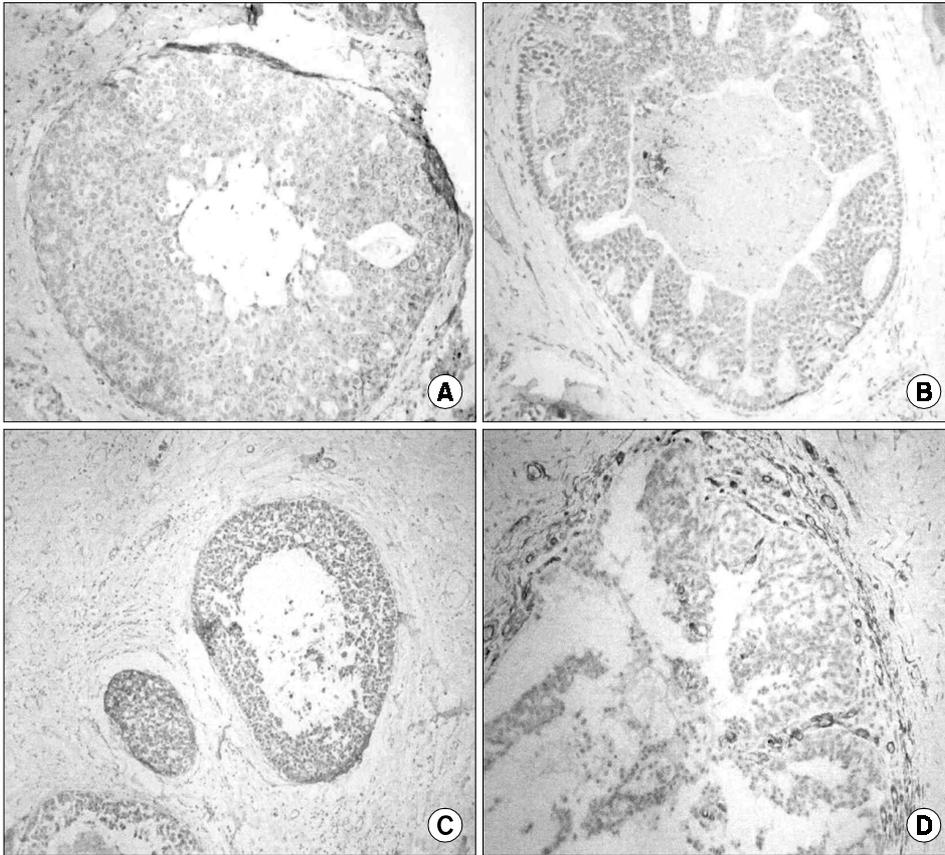
2) MMP-2와 MMP-9의 발현

MMP-2는 42예 중 20예(47.6%)에서 양성 반응을 보였으며, 50세 미만의 MMP-2 발현율은 46.2%, 50세 이상인 경우 50.0%로서 환자의 나이에 따른 MMP-2 발현율의 차이는 없었다. 조직학적 유형이 면포형인 경우의 MMP-2 발현율은 53.3%, 비면포형은 44.4%로서 현저한 차이가 없었으며, 핵 등급 I의 MMP-2 발현율은 57.1%, II는 30.0%, III는 66.7%로서 핵 등급에 따른 MMP-2 발현율의 유의한 차이도 없었다 (P=0.0852) (Table 1, Fig. 1).

Table 1. Comparison of MMP-2 and MMP-9 expressions according to the clinico-pathologic parameters in ductal carcinoma in situ

No. of cases	MMP-2 expression			MMP-9 expression		
	++ (%)	- <sup>†</sup>	P-value	++ (%)	- <sup>†</sup>	P-value
Age (years)						
<50	36	17 (47.2)	19	19 (52.8)	17	0.3347
≥50	6	3 (50.0)	3	3 (50.0)	3	
Histologic type						
Comedo	15	8 (53.3)	7	8 (53.3)	7	0.2512
Non-comedo	27	12 (44.4)	15	14 (51.8)	13	
Nuclear grade						
I	7	4 (57.1)	3	1 (14.3)	6	0.0868
II	20	6 (30.0)	14	12 (60.0)	8	
III	15	10 (66.7)	5	9 (60.0)	6	

\*+= positive; <sup>†</sup> - = negative.



**Fig. 1.** Immunoreactivity for MMP-2, MMP-9, VEGF and CD34 in ductal carcinoma in situ. Positive reactions for MMP-2 (A) and MMP-9 (B) are seen in the cytoplasm of tumor cells. VEGF expression is noted in the cytoplasm of tumor cells (C), and increased angiogenesis is found around DCIS lesion on CD 34 immunostain (D) (LSAB method, ×200).

**Table 2.** Comparison of VEGF immunoreactivity and microvessel density according to the clinico-pathologic parameters in ductal carcinoma in situ

	No.	VEGF expression			Microvessel density		
		Neg. (n=22)	Pos. (%) (n=20)	P-value	Low* (n=29)	High† (%) (n=13)	P-value
Age (years)							
< 50	36	17	19 (52.8)	0.1011	24	12 (33.3)	0.2943
≥ 50	6	5	1 (16.7)		5	1 (16.7)	
Nuclear grade							
I	7	4	3 (42.9)	0.4841	5	2 (28.6)	0.8604
II	20	12	8 (40.0)		13	7 (35.0)	
III	15	6	9 (60.0)		11	4 (26.7)	
Histologic type							
Comedo	15	6	9 (60.0)	0.2311	13	2 (13.3)	0.0536
Non-comedo	27	16	11 (40.7)		16	11 (40.7)	

Neg = negative; Pos = positive; \*Low = less than average microvessel density; † High = more than average microvessel density.

MMP-9 발현은 42예 중 22예(52.4%)에서 관찰되었으며, 50세 미만인 경우 52.8%, 50세 이상인 경우 50.0%로서 나이에 따른 MMP-9 발현율의 유의한 차이는 없었고, 면포형인 경우 53.3%, 비면포형인 경우 51.8%로서 역시 유의한 차이

가 없었으나 핵등급 I인 경우 MMP-9 발현율은 14.3%인 반면 핵등급 II, III인 경우 각각 60.0%로서 핵 등급이 높을수록 MMP-9 발현율이 높은 경향을 보였다(P=0.0863) (Table 1, Fig. 1).

3) VEGF 발현과 미세혈관밀도

VEGF 발현은 42예 중 20예(47.6%)에서 관찰되었다. 50세 미만인 경우의 VEGF 발현율은 52.8%로서 50세 이상인 군의 16.7%보다 높은 경향을 보였다(P=0.1011). 면포형의 VEGF 발현율은 60.0%, 비면포형은 40.7%로서 면포형의 VEGF 발현율이 높았으나 유의한 차이는 아니었다. 핵 등급이 I, II인 경우의 VEGF 발현율은 42.9%, 40.0%로서 핵 등급 III인 경우의 60.0%보다 낮았으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Table 2, Fig. 1).

미세혈관밀도는 2개에서 70개로 다양했으며 평균은 21개이었다. 50세 미만인 경우에서 미세혈관밀도가 증가한 경우는 33.3%인 반면 50세 이상인 군은 16.7%로서 50세 미만인 군에서 다소 많았으나 나이에 따른 현저한 차이는 없었다. 면포형에서 미세혈관밀도가 평균 이상인 빈도는 13.3%, 비면포형은 40.7%로서 비면포형에서 높은 경향을 보였다(P=0.0536). 핵 등급 I인 경우 미세혈관밀도가 평균 이상인 빈도는 28.6%, 핵 등급 II인 경우 35.0%, 핵 등급 III인 경우 26.7%로서 핵 등급에 따른 미세혈관밀도의 차이는 없었다(Table 2, Fig. 1).

VEGF 양성인 20예 중 미세혈관밀도가 평균 이상인 경우는 6예(30%), VEGF 음성인 22예 중 미세혈관밀도가 평균 이상인 경우는 7예(31.8%)로 VEGF 발현과 미세혈관밀도

Table 3. Relationship between VEGF expression and microvessel density in ductal carcinoma in situ

		No. of cases	Microvessel density		P-value
			Low (n=29)	High (%) (n=13)	
VEGF	Positive	20	14	6 (30.0)	0.8987
	Negative	22	15	7 (31.8)	

증가와 유의한 연관성은 없었다(Table 3).

4) MMP-2, 9 발현과 VEGF 발현 및 미세혈관밀도의 연관성

VEGF 양성인 군의 MMP-2 발현율은 50.0%, VEGF 음성인 군의 MMP-2 발현율은 45.0%로서 VEGF 발현과 MMP-2 발현의 연관성은 없었다. VEGF 양성인 군의 MMP-9 발현율은 70.0%, VEGF 음성인 군의 MMP-9 발현율은 26.4%로서 VEGF 양성인 군에서 MMP-9 발현이 유의하게 높았다(P=0.0293).

미세혈관밀도가 평균 이상인 경우의 MMP-2 발현율은 46.2%, 평균 이하인 군은 47.3%로서 미세혈관밀도와 MMP-2 발현율의 유의한 차이는 없었으며, 미세혈관밀도가 평균 이상인 경우의 MMP-9 발현율은 53.9%, 평균 이하인 군은 51.7%로서 미세혈관밀도와 MMP-9 발현율의 유의한 차이도 없었다(Table 4).

고찰

종양 세포가 침윤 혹은 전이하는 기전은 매우 복잡한 생화학적, 세포 생물학적 과정을 거치게 되는데 이 중 종양세포가 단백분해효소를 분비하여 기저막을 분해하는 과정이 가장 중요한 첫 번째 단계이다.(18) 따라서 기저막 또는 세포외기질 등을 구성하는 단백질의 분해가 종양의 침윤 및 전이를 결정하는 중요한 요소가 된다. 단백분해효소에는 plasminogen urokinase 활성화에 속하는 serine계 단백분해효소, cathepsin D, L과 같은 cysteine 단백분해효소, 그리고 아연 의존성 MMPs 등이 있다.(19) 이 중 MMPs는 정상 유방의 발육과정에 관여하여 세포외기질의 개형(remodeling) 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(20) 유방암 중에서도 MMPs가 중요한 역할을 담당할 것으로 생각되어 이에 대한 많은 연구가 이루어지고 있는데, 특히 MMP-2와 MMP-9는 제4형 교원질을 분해하여 유방암중에서 기저막 및 세포외 기질 파괴에 중요한 역할을 한다고 알려져 있

Table 4. Correlation between MMP-2 and MMP-9 expressions and VEGF expression and microvessel density in ductal carcinoma in situ

	MMP-2 expression			MMP-9 expression		
	Pos. (%) (n=20)	Neg. (n=22)	P-value	Pos. (%) (n=20)	Neg. (n=22)	P-value
VEGF						
Negative (n=22)	11 (50.0)	11	0.7459	8 (36.4)	14	0.0293
Positive (n=20)	9 (45.0)	11		14 (70.0)	6	
MVD *						
Low (n=29)	14 (48.3)	15	0.8987	15 (51.7)	14	0.8987
High (n=13)	6 (46.2)	7		7 (53.9)	6	

\*MVD = microvessel density; Neg = negative; Pos = positive.

다.(20)

Talvensaari 등(9)은 100예의 림프절 전이 양성인 폐경기 침윤성 유방암 환자의 조직에 대하여 MMP-2에 대한 면역염색을 시행하고 재발률과 비교하여 보았을 때 MMP-2 음성인 환자보다 양성인 환자에서 5년 생존율이 낮았으므로 MMP-2가 폐경기 이후 림프절 전이가 있는 환자에서 나쁜 예후를 나타내는 인자라고 하였다. Brummer 등(21)은 침윤성 암종뿐만 아니라 전암성 병변에서도 MMP-2가 발현되며 침윤성 암종으로 진행될수록 발현율이 높았으며, MMP-2의 활성도를 조사한 보고에 의하면 전체 중 활성형 MMP-2의 비율이 관상피내암종에서 가장 높으므로 유방암의 발달 초기에 MMP-2의 활성도가 증가되고, 후기에는 MMP-2의 생성 증가로 발현율이 높아진다고 하였다.(6) MMP-9 또한 종양의 침윤과 조직의 개형 과정에서 기저막과 세포외기질을 분해시키는 역할을 하며 림프절 전이가 없는 침윤성 유방암 환자에서 MMP-9 양성인 경우 재발과 사망률이 현저히 낮아 독립적인 예후 추정인자로 볼 수 있다는 보고가 있으며(22) 유방암의 초기단계인 관상피내암종에서는 pro-MMP-9의 생성이 증가되고 종양이 진행될 수록 MMP-9의 활성화가 일어난다고 한다.(23)

본 연구 결과 관상피내암종에서 MMP-2와 MMP-9의 발현율은 각각 47.6%와 52.4%로서 주변의 정상 유방조직에 비하여 분명한 과발현을 보였으며 주로 세포질에서 관찰되었다. 면역조직화학염색을 사용한 연구이므로 발현한 MMPs의 활성상태는 알 수 없었지만 기질 침윤이 없는 관상피내암종에서도 기질분해에 관여하는 MMPs의 발현이 있는 것은 MMPs가 유방암에서 침윤 및 전이 등의 진행된 단계뿐 아니라 초기 단계부터 생성되고 있음을 나타내는 소견으로 이전 연구들과 일치하는 결과였다.(7,21,23) 또한 관상피내암종의 생물학적 특성과 연관성이 있는 환자의 나이, 조직학적 유형, 핵 등급과 MMP-2와 MMP-9 발현율을 비교한 결과 나이가 50세 미만인 경우 MMP-2와 MMP-9 발현율이 조금 높았고, MMP-9의 경우 핵 등급이 높을수록 발현율이 점차 증가하는 양상을 보였으나 일반적으로 생물학적으로 악성도가 높다고 하는 면포형보다 비면포형에서 MMP-9 발현율이 오히려 높게 나와 MMP-2와 MMP-9 발현과 생물학적 특징 간의 유의한 연관성을 찾기 어려웠다.

종양의 발달과정 중 전이 단계에서 맥관 형성이 중요하며, 정상 조직의 혈관과는 달리 새로이 생성된 모세혈관들은 단절된 기저막으로 인해 빈틈이 생겨 종양세포들이 빠져나가기 용이하게 되며,(24) 혈관형성인자가 종양의 전이 및 침윤에 중요한 역할을 하게 된다. 혈관형성인자 중 VEGF는 거대 분자의 혈관 투과성을 높이고, 혈관 내피세포의 강력한 유사분열인자일 뿐 아니라 혈관 내피세포의 이동과 혈관의 내강 구조 형성을 증가시키며 분화된 혈관 상태를 유지시키기 때문에 종양의 신생 혈관형성과 함께 만성 염증과 상처치유 과정을 촉진하는 데도 관여하는 물질

로 알려져 있다.(25) 유방암 조직에서 VEGF 발현과 미세혈관밀도가 예후를 나타내는 다른 인자들과 유의한 연관성을 보이므로 나쁜 예후를 나타내는 독립적인 인자로 볼 수 있다는 보고가 있으며,(11) 관상피내암종에서도 VEGF는 중요한 혈관형성인자로서 미세혈관밀도와 유의한 상관관계를 보인다는 보고가 있다.(1) Engels 등(26)은 관상피내암종에서 혈관의 분포를 도관 사이 기질에 산재하여 증가된 경우와 개개의 도관의 기저막 근처로 혈관 밀도가 증가된 양상을 보이는 두 가지 경우로 구분하였다. 즉 주변의 조직구나 혈관내피세포를 통해 간접적으로 혈관생성 인자가 유리되어 혈관 생성이 일어난다는 것과 종양 세포 자체에서 유리된 혈관생성인자에 의해 일어난다는 두 가지 기전을 설명하였다. 하지만 신생 혈관의 증식 양상과 생존율과는 유의한 차이가 없다고 보고하였으며,(26) 또한 종양의 크기와 신생혈관생성이 연관이 있다는 보고도 있다.(27)

본 연구에서 VEGF의 발현율은 47.6%이었으며, 생물학적 특성 예측인자인 핵 등급이나 조직학적 유형과는 유의한 상관관계를 보이지 않았으나 50세 미만인 경우 발현율이 높은 경향을 보였다. 또한 미세혈관밀도는 2에서 70까지 다양하게 관찰되었으며 평균 21.7개였고, 비면포형인 경우 면포형에 비해 높은 발현율을 보였는데, 이는 면포형에서 비면포형보다 혈관 밀도가 높았다는 Guidi 등(28)의 보고와는 차이가 있었다. 미세혈관밀도와 VEGF 발현율 사이의 연관성이 있다는 보고(1)가 있었으나 본 연구에서는 유의한 연관성도 찾을 수 없었는데 아마도 연구대상이 충분하지 않았던 점과 주로 도관을 에워싸는 기질에서 혈관의 개수를 산정하였는데 연구자에 따라 미세혈관밀도의 측정 방법의 차이 때문일 것으로 추정되었다.

종양 내의 단백분해효소는 종양의 침윤뿐만 아니라 혈관 신생과 같은 다양한 기질 반응에 관여하는데 Kurizaki 등(11)은 유방암에서 MMP-2 발현과 VEGF 발현이 서로 상관관계가 있고, MMP-9 발현과 미세혈관밀도가 연관성이 있으므로 MMP-2와 MMP-9가 혈관의 성장을 조절하고, 혈관 신생에 협조적으로 작용한다고 보고하였다. Kim 등(29)은 결직장의 선암종에서 MMP-2와 MMP-9 발현이 혈관신생과 유의한 상관관계를 보인다고 하였으며, VEGF에 의해 유도된 트롬빈에 의해 MMPs의 생성이 증가되어 기저막이 용해됨으로써 종양의 혈관생성이 이루어진다는 연구도 있다.(30) 본 연구에서 MMP-2 발현과 VEGF 발현, 미세혈관밀도와는 유의한 상관관계를 보이지 않았으나 MMP-9 양성인 22예 중 VEGF가 발현된 예가 14예(70.0%)로 통계학적으로 유의한 정의 상관관계를 나타내어 MMP-9이 종양의 침윤 뿐 아니라 혈관생성에도 중요한 역할을 한다는 기존의 연구들에 일치하는 결과를 나타내었다.

요약하여 침윤이 없는 관상피내암종에서도 MMP-2와 MMP-9 발현이 반수에서 관찰되므로 세포외 기질 분해, 즉 침윤과정에 직접적으로 관여하는 MMP-2,9의 생성이 비침

윤성 암종에서부터 시작되고 있음을 알 수 있었다. 그러나 관상피내암종의 생물학적 특성을 시사하는 환자의 나이, 조직학적 유형, 핵 등급과는 연관성은 현저하지 않으므로 추후 더 많은 증례를 대상으로 규명해야 할 것으로 생각한다. 또한 본 연구처럼 면역조직화학염색으로 MMP의 활성형과 비활성형을 구별하여 검출하지 못하는 한계가 있고, 암종의 전이 및 침윤성과의 상관관계에 대해 활성형이 중요하다고 제시되고 있으므로(22) zymography 방법에 의하여 MMP의 활성형과 비활성형을 구별하여 측정하고, 종양의 크기 및 치료방법, 치료 후 예후에 대한 추적관찰 등에 대한 임상적인 연구가 뒷받침된다면 MMP-2와 MMP-9의 전암성 병변에서의 역할을 규명하는 데 도움을 줄 것이라 생각한다.

**결 론**

1992년부터 2002년까지 부산백병원에서 종괴 절제술 및 근치적 유방절제술 후 관상피내암종으로 진단받은 42예를 대상으로 면역조직화학적 방법으로 MMP-2와 MMP-9와 VEGF의 발현율을 조사하였고, CD34에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 종양의 미세혈관밀도를 산정하였다. MMP-2와 MMP-9 발현과 환자의 나이, 조직학적 유형 및 핵 등급과 MMP-2와 MMP-9 발현 및 VEGF 발현과 미세혈관밀도와의 연관성을 통계학적으로 조사하였다.

결론적으로 유방의 관상피내암종의 MMP-2 및 MMP-9의 발현율이 각각 47.6%, 52.4%로 기질 침윤이 없는 관상피내암종에서도 MMP-2와 MMP-9가 종양세포에서 생성됨을 알 수 있었다. MMP-9 발현율이 핵 등급이 증가할수록 높으며, MMP-9 발현 양성인 경우 VEGF 발현 양성인 경우가 많으므로 MMP-9가 VEGF와 함께 관상피내암종의 생물학적 성상을 나타내는 표지자로 생각된다. 그러나 MMP-2 발현은 임상적 및 병리학적 인자뿐만 아니라 VEGF 발현 및 미세혈관밀도 증가와의 연관성은 보여주지 않아 관상피내암종의 생물학적 특성을 나타내는 표지자로 생각하기 어려웠다.

**REFERENCES**

- 1) Hieken TJ, Farolan M, D'Alessandro S, Velasco JM. Predicting the biologic behavior of ductal carcinoma in situ: an analysis of molecular markers. *Surgery* 2001;130:593-600.
- 2) Page DL. Prognosis and breast cancer; Recognition of lethal and favorable prognostic types. *Am J Surg Pathol* 1991;15:334-49.
- 3) Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, McGuire WL. Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N Engl J Med* 1989;320:627-33.

- 4) Pail FF, Schmidt BP, Dupont WD, Wagner RK. Prognostic significance of estrogen receptor status in breast cancer in relation to tumor stage, axillary node metastasis and histopathologic grading. *Cancer* 1984;54:2237-42.
- 5) Slamon DJ, Clark GM, Wong SG. Human breast cancer; correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82.
- 6) Henry JA, Mc Carthy AL, Angus B, Westley BR, May FE, Nicholom S, et al. Prognostic significance of the estrogen-regulated protein, cathepsin D in breast cancer. *Cancer* 1990; 65:265-271.
- 7) Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. Metalloproteinase: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res* 2000;2:252-7.
- 8) Hanemaaijer R, Verheijen JH, Maguire TM, Visser H, Toet K, Mc Dermott E, et al. Increased gelatinase-A and gelatinase-B activities in malignant vs. benign breast tumors. *Int J Cancer* 2000;86:204-7.
- 9) Talvensaari-Mattila A, Paakko P, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with the risk for a relapse in postmenopausal patients with node-positive breast carcinoma treated with antiestrogen adjuvant therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2001;65: 55-61.
- 10) Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins pathology basis of disease. 6th ed. Philadelphia, WB Saunders, 1999. pp303.
- 11) Kurizaki T, Toi M, Tominaga T. Relationship between matrix metalloproteinase expression and tumor angiogenesis in human breast carcinoma. *Oncol Rep* 1998;5:673-7.
- 12) Ueno H, Nakamura H, Inoue M, Imai K, Noguchi M, Sato M, et al. Expression and tissue localization of membrane-type 1,2 and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 1997;57:2055-60.
- 13) Reidel F, Gotte K, Schwalb J, Bergler W, Hormann K. Expression of 92-kDa type IV collagenases correlation with angiogenic markers and poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2000;17:1099-105.
- 14) Mc Divitt RW, Stewart FW, Berg JW. Tumors of the breast. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1968, pp22-50.
- 15) Silverstain MJ, Poller DN, Waisman JR, Colburn WJ, Barth A, Gierson ED, et al. Prognostic classification of breast ductal carcinoma in situ. *Lancet* 1995;345:1145-7.
- 16) The Consensus Conference Committee. Consensus Conference on the classification of ductal carcinoma in situ. *Cancer* 1997;80:1798-1802.
- 17) Walui S, Furusato M, Itoh T, Sasaki H, Akiyama A, Kinoshito I, et al. Tumor angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study. *J Pathol* 1992;168:257-62.
- 18) Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative

- regulation. *Cell* 1991;64:327-36.
- 19) Tryggvason K, Hoyhtya M, Pyke C. Type IV collagenases in invasive tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1993;24:209-18.
  - 20) Benaud C, Dickson RB, Thompson EW. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;50:97-116.
  - 21) Brummer O, Athar S, Riethdorf L, Loning T, Herbst H. Matrix-metalloproteinases 1, 2, and 3 and their tissue inhibitors 1 and 2 in benign and malignant breast lesions: an in situ hybridization study. *Virchows Arch* 1999;435:566-73.
  - 22) Scorilas A, Karameris A, Arnogiannaki N, Ardavanis A, Bassilopoulos P, Trangas T, et al. Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients. *Br J Cancer* 2001;84:1488-96.
  - 23) Rha SY, Kim JH, Roh JK, Lee KS, Min JS, Kim BS, et al. Sequential production and activation of matrix-metalloproteinase-9 (MMP-9) with breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat* 1997;43:175-81.
  - 24) Weider N, Folkman J, Pozza F. Tumor angiogenesis : A new significant and independent prognostic indicator in early stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1875-87.
  - 25) Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18:4-25.
  - 26) Engles K, Fox SB, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL. Distinct angiogenic patterns are associated with high-grade in situ ductal carcinomas of the breast. *J Pathol* 1997;181:207-12.
  - 27) Claus EB, Chu P, Howe CL, Davison TL, Stern DF, Carter D, et al. Pathobiologic findings in DCIS of the breast: morphologic features, angiogenesis, HER-2/neu and hormone receptors. *Exp Mol Pathol* 2001;70:303-16.
  - 28) Guidi AJ, Fischer L, Harris JR, Schnitt SJ. Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:614-9.
  - 29) Kim TS, Kim YB. correlation between expression of matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and angiogenesis in colorectal adenocarcinoma. *J Korean Med Sci* 1999;14:263-70.
  - 30) Zucher S, Mirza H, Conner CE, Lorenz AF, Drews MH, Bahou WF, et al. Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A action and cell proliferation. *Int J Cancer* 1998;75:780-6.
-