

## 유방암에서 Cyclooxygenase-2 발현의 예후인자적 가치

한림대학교 의과대학 외과학교실, <sup>1</sup>연세대학교 의과대학 병리학교실

설진원 · 김승일 · 박찬흔 · 박철재 · 양우익<sup>1</sup>

### Prognostic Value of Elevated Cyclooxygenase-2 Expression in Breast Cancer

Jin Won Seol, M.D., Seung Il Kim, M.D., Chan Heun Park, M.D., Ph.D., Chul Jae Park, M.D. and Woo Ick Yang, M.D., Ph.D.<sup>1</sup>

**Purpose:** Cyclooxygenase-2 (Cox-2) is the rate-limiting enzyme in the conversion of arachidonic acid to prostaglandins and can be induced by various agents such as growth factors and tumor promoters. Cox-2 contributes to carcinogenesis and tumor growth. This study was performed to demonstrate the correlation between elevated expression of Cox-2 and pathologic factors in breast cancer.

**Methods:** Cox-2 expression was analyzed immunohistochemically in paraffin-embedded tumor samples from 40 patients with breast cancer. Cox-2 expression was defined as negative or positive. The correlation between Cox-2 expression and pathologic factors (tumor size, axillary lymph node metastasis, TNM stage and histologic grade) was analyzed.

**Results:** Cox-2 was highly expressed in proportion to tumor size, but the difference was not significant ( $P > 0.05$ ). High Cox-2 expression was observed in the presence of axillary lymph node metastasis and TNM stage III, but was not significant ( $P > 0.05$ ). The Cox-2 expression rate was significantly associated with high histologic grade (I: 42.9%, II: 50.0%, III: 80.0%) ( $P = 0.046$ ).

**Conclusion:** Elevated levels of Cox-2 expression were associated with large tumor size, presence of axillary lymph node metastasis, high TNM stage and high histologic grade, and can therefore be a possible marker for poor prognosis. Due to the small number of cases, we couldn't confirm the statistical significance except in terms of histologic grade. Further prospective studies with a large number of cases are required. (*J Korean Surg Soc* 2003;65:377-381)

**Key Words:** Breast cancer, Cyclooxygenase-2, Prognostic factors

**중심 단어:** 유방암, Cyclooxygenase-2, 예후인자

Department of Surgery, Hallym University College of Medicine, <sup>1</sup>Department of Pathology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

### 서 론

Cyclooxygenase-2 (Cox-2)는 arachidonic acid에서 prostaglandins (PG)이 합성되는 과정에 관여하는 효소로 체내에서 주로 염증반응에 관여를 한다.(1,21,22) Cox-2를 억제하는 약제들은 항염증작용 뿐만 아니라 위장관암, 폐암, 유방암 등의 발생 및 증식을 억제하는 것으로 알려져 있는데, 이는 종양의 혈관생성 억제와 세포사멸의 조장에 의한 기전으로 보고되고 있다.(1) 유방암 조직에서도 Cox-2의 발현이 보고된 이후 Cox-2 및 Cox-2억제제의 역할에 대해 세포주 및 동물 모델을 이용한 여러 연구결과들이 보고되고 있으며,(1) Cox-2 발현의 예후인자적 가치에 대한 임상연구를 비롯하여 Cox-2 억제제를 이용한 유방암의 예방 및 치료약제로서의 가능성이 연구되고 있다.(2) Cox-2 발현은 종양의 크기가 클수록, 조직학적 등급이 높을수록, 호르몬 수용체가 음성일 때 증가하며, 또한 분화도가 높을수록, p53 발현이 높을수록 증가한다고 보고되고 있다.(8)

저자들은 유방암에서 Cox-2 발현율을 조사하고 기존의 병리조직학적 인자들과의 상관관계를 분석하고자 본 연구를 진행하였다.

### 방 법

1990년 1월부터 1991년 6월까지 한림대학교 의과대학 강동성심병원에서 유방암 진단하에 수술 받은 환자 중 파라핀포매 조직의 상태가 양호한 40예 환자의 파라핀포매 조직을 이용하여 Cox-2의 종양 내 발현율을 특이항인 단일클론성항체(specific antihuman monoclonal antibody)를 사용한 면역조직화학염색법을 이용하여 측정하였다.

면역조직화학염색은 파라핀포매 조직을 4 $\mu$ m로 절단하

책임저자 : 박찬흔, 서울시 강동구 길동 445  
☎ 134-010, 강동성심병원 외과  
Tel: 02-2224-2226, Fax: 02-2224-2570  
E-mail: hhh@hallym.or.kr

접수일 : 2003년 7월 3일, 게재승인일 : 2003년 9월 5일

여, xylene으로 탈파라핀한 후 알콜로 재수화(rehydrated)하였다. 절단면은 항원복구를 위해 0.01 M Na-citrate 완충액 (pH 6.0)을 이용해 820 wtts 극초단파 오븐에서 20분 동안 전처치를 하였다. 20분 동안 냉각 후 슬라이드를 3% 수소과산화물에 10분 동안 담그어 내인성 과산화 효소의 활동을 억제하였다. Cox-2 특이항인 단일클론성항체(Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI)는 실온에서 0.1% sodium azide와 0.5% 우형 혈청 알부민이 함유된 말초혈액에서 1 : 200으로 희석하여 사용하였다. 그 후, 절단면은 biotinylated horse antimouse immunoglobulin (1 : 200; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)으로 처치 후 avidin-biotin peroxidase complex (Vectastain ABC complex; Vector Laboratories Inc.)와 diaminobezidine (Vector Laboratories Inc.)로 발색하였다. Harris hematoxylin으로 대비염색을 시행하였다.

Cox-2의 발현정도는 각각 음성 및 양성으로 분류하였으며 암세포의 세포질 염색이 10% 이상인 경우를 양성으로 하였다. Cox-2의 발현정도와 기타 병리학적 인자들(원발종양의 크기, 액와림프절 전이여부, TNM 병기 및 종양의 조직학적 분류)과의 상관관계를 분석하였다. 자료의 분석은 chi-square test를 이용하였다.

**결 과**

**1) 대상환자의 일반적 특성**

유방암 환자 40예의 연령분포는 27세에서 73세까지였으며, 평균연령은 45.2세였고, 원발종양의 크기는 1 cm 이하가 3예(7.5%), 1 cm에서 2 cm 사이가 10예(25.0%), 2 cm 이상이 27예(67.5%)였다(Table 1). 액와림프절 전이여부는 음성이 28예(70.0%), 양성인 12예(30.0%)로 각각 조사되었다. TNM 병기는 I이 14예(35.0%), II가 22예(55.0%), III이 4예(10.0%)였다.

종양의 조직학적 등급은 Bloom & Richardson 분류법을 이용하였으며 I이 7예(18.9%), II가 10예(27.0%), III이 20예(54.1%)의 분포를 보였다(Table 1). Cox-2의 발현은 15예(37.5%)에서 음성, 25예(62.5%)에서 양성을 보였다(Table 1, Fig 1).

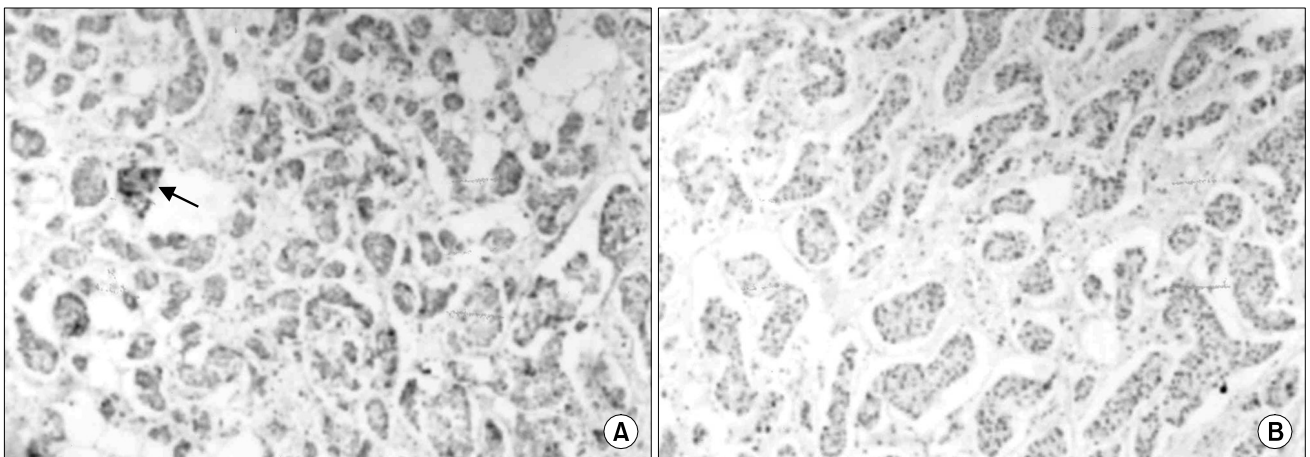
**2) 원발종양의 크기에 따른 Cox-2 발현율**

원발종양의 크기에 따른 Cox-2 발현율의 비교 결과, 1cm 이하에서 Cox-2 발현율은 33.3%, 2 cm 이상에서 Cox-2 발현율은 66.7%로 원발종양의 크기가 클수록 Cox-2의 발현이 증가하는 경향을 보였으나 통계적 의의는 없었다(P>0.05) (Table 2).

**Table 1.** General characteristics of patients (n=40)

Age	No (%)	TNM stage by *AJCC	No (%)
<50	24 (60.0)	I	14 (35.0)
≥50	16 (40.0)	II	22 (55.0)
		III	4 (10.0)
		† HG (n=37)	
Tumor size		I	7 (18.9)
≤1	3 (7.5)	II	10 (27.0)
1 <, ≤2	10 (25.0)	III	20 (54.1)
>2	27 (67.5)		
		‡ ALN status	
		Cox-2	
		Negative	15 (37.5)
		Positive	25 (62.5)

\*AJCC = American Joint Committee on Cancer; † HG = Histologic grade; ‡ ALN = Axillary lymph node.



**Fig. 1.** Immunohistochemistry in the breast tumor tissue using Cox-2 specific monoclonal antibody: A) Positive: pigmentation (arrow) in cytoplasm (H-E stain, ×400), B) Negative.

**Table 2.** Association of Cox-2 immunopositivity with clinicopathological parameters

Clinicopathological parameters	COX-2 positive no (%)	P-value
Tumor size		
≤1	1 (33.3)	>0.05
1<, ≤2	6 (60.0)	
>2	18 (66.7)	
*ALN status		
(-)	16 (57.1)	>0.05
(+)	9 (75.0)	
TNM stage		
I	7 (50.0)	>0.05
II	15 (68.2)	
III	3 (75.0)	
HG		
I	3 (42.9)	=0.046
II	5 (50.0)	
III	16 (80.0)	

\*ALN = Axillary lymph node; HG = Histologic grade.

**3) 액와림프절 전이여부에 따른 Cox-2 발현율**

액와림프절 전이여부에 따른 Cox-2 발현율의 비교 결과, 전이가 되지 않은 경우 Cox-2 발현율은 57.1%, 전이가 된 경우 Cox-2 발현율은 75.0%로 액와림프절 전이가 있을수록 발현이 증가하는 경향을 보였으나 통계적 의의는 없었다( $P > 0.05$ )(Table 2).

**4) TNM 병기에 따른 Cox-2 발현율**

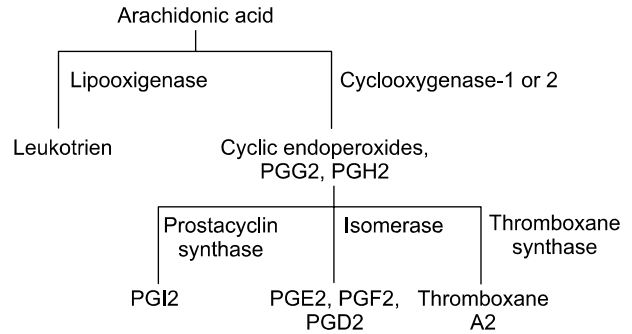
TNM 병기에 따른 Cox-2의 발현율의 비교 결과, 병기 I에서 Cox-2 발현율은 50.0%, 병기 II에서 Cox-2 발현율은 68.2%, 병기 III에서 Cox-2 발현율은 75.0%로 TNM 병기가 높을수록 Cox-2의 발현율도 높아짐을 볼 수 있으나 통계적 의의는 없었다( $P > 0.05$ )(Table 2).

**5) 조직학적 등급에 따른 Cox-2 발현율**

조직학적 등급에 따른 Cox-2 발현율의 비교 결과, 등급 I에서 Cox-2 발현율은 42.9%, II에서 Cox-2 발현율은 50.0%, III에서 Cox-2 발현율은 80.0%로 조직학적 등급이 높을수록 유의하게 높은 발현율을 보였다( $P=0.046$ )(Table 2).

**6) Cox-2 발현에 따른 생존율분석**

전체 40예 중 35예에서 추적 관찰이 가능하였으며 평균 추적기간은 67.3개월, 중간 추적기간은 73.0개월이었다(범위 1~151개월). Kaplan-Meier 생존율 분석을 이용한 결과 Cox-2 발현에 따른 무병생존율은 차이가 없는 것으로 분석



**Fig. 2.** Arachidonic acid pathway.

되었다( $P > 0.05$ )(data not shown).

**고찰**

Cyclooxygenase-2 (Cox-2)는 arachidonic acid로부터 prostaglandin (PG)과 thromboxane (TX)의 합성과정에 관여하는 효소이며, 이는 성장인자(growth factor), cytokines, 그리고 내독소(endotoxin)와 같은 여러 요소들에 의해 유발된다.(1,3) Fig. 2는 arachidonic acid 대사과정을 보여주며 Cox enzyme 은 PG 생산의 속도제한 단계(rate-limiting step)에 관여하고 있다. Cox-1은 주로 항상성 유지(homeostasis)와 세포조절 기능(cell regulatory function)에 관여하고, Cox-2는 염증반응 기능(proinflammatory function)에 관여한다고 알려져 있다.(1) 그 외 Cox-2의 역할로는 신장 조직에서 발현되어 prostanoids를 형성하고, 이온 조절에 관여하여 신체의 항상성을 유지하게 된다. 뇌 조직에서도 발현되어 체온 및 수면 조절에 관여한다. 또한 췌도세포(pancreatic islet cells)에서 발현되어 당의존적 인슐린 분비를 억제하게 되며, 혈관 평활근 세포에서는 염증반응과 세포증식을 억제하는 기능을 하며, 호흡기에서는 기도세포의 과증식을 억제하여 천식과 같이 기도세포가 과증식되는 질환을 예방하는 역할을 한다.(2) 한편 Cox-2는 다양한 암과 전암 병변에서 과발현되어 있는데, 그 기전은 PG생성을 증가시키고, 전암물질(pro-carcinogen)을 발암물질로 전환시키며, 세포사멸(apoptosis)을 억제하고, 혈관형성을 조장하고, 암세포 침습을 증가시키는 기능 등을 통해 발암현상에 관여하는 것으로 생각되고 있다.(3)

Cox-2는 위장관암, 유방암, 폐암 및 방광암 등에서도 과표현된다고 보고되고 있다.(4,5) 위암에서는 83%, 대장암에서는 85%,(6) 유방암에서는 56%, 폐암에서는 90%,(7) 방광암에서는 65%(4) 정도까지 Cox-2 단백질의 상향조절(up regulation)이 관찰된다고 보고되고 있으나 그 기전은 아직 명확하지 않다.

연구보고에 의하면 Cox-2의 과발현이 PGE2의 생합성을 증가시키고 혈관형성을 야기하여 암을 유발시키는 것으로 설

명하고 있다. PGE<sub>2</sub>는 장기에서 특히 더욱 강한 효과를 보이는데 이는 암세포 성장 및 암세포의 침습을 증가시킨다.(3)

Cox-2 발현의 증가는 위장관 종양에만 특이한 것이 아니라 유방암에서도 과발현이 보고되고 있다.(8,9) 유방암 환자에서 얻은 파라핀포매 조직을 Cox-2 특이항인 단일클론성 항체를 이용하여 면역조직화학염색법으로 측정하였을 때 중등도 또는 강한 Cox-2 면역반응이 암세포의 세포질에만 국한되어 나타나며, 간질에서는 음성 또는 약한 양성 소견을 보인다.(8)

Cox-2의 발현은 유방암의 예후에 영향을 미치는 여러 병리학적 인자와도 연관이 있는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서도 나타난 바와 같이 Cox-2 발현의 증가는 나쁜 예후를 나타내는 요소들과 상관관계를 가지는데, 본 연구에서는 조직학적 등급만 유의성이 확인되었으나 다른 연구 결과에 의하면 원발 종양의 크기, 액와림프절 전이여부, 조직학적 등급 등과 유의한 상관관계를 가진다고 보고하고 있다.(8) 이 연구들에 의하면 큰 원발종양의 크기, 액와림프절 전이의 양성, 높은 조직학적 등급, 호르몬 수용체 음성, p53 발현의 증가, HER-2의 증폭, 진행된 분류병기 등에서 Cox-2 과발현이 관찰된다고 보고하고 있다.(8) 또한 Cox-2가 Distant Disease-free survival (DDFS)와도 연관을 보이는데, 본 연구에서는 연구 대상의 수가 적어 Cox-2 발현에 따른 무병 생존율이 차이가 없는 것으로 나타났으나 다른 연구에 의하면 Cox-2 발현이 낮은 군에서는 5년 DDFS가 83%, Cox-2 발현이 높은 군에서는 73%로 유의하게 DDFS가 낮다는 보고가 있다.(8)

유방암에서 Cox-2의 상향조정에 대한 기전은 명확히 알려지지 않았지만, Cox-2발현이 비암세포보다 암세포에서 활발하며, p53과 같은 암억제 유전자의 비활성화와 HER-2와 같은 암유발 유전자의 활성화가 Cox-2 발현과 관련이 있다고 추정된다.(8)

한편 Cox-2가 인체에서 암의 발생과 증식에 관여함에 따라 Cox-2를 억제하여 암의 예방 및 치료에 이용하려는 연구들이 진행되고 있다. 최근 들어 실험적 임상연구에서 아스피린 및 비스테로이드성 항염증제(NSAIDs) 등이 식도암, 위암, 대장암, 유방암, 폐암 및 방광암 등의 발생률을 감소시킨다고 보고하였다.(3) NSAIDs는 Cox 의존적, Cox 비의존적인 기전으로 암발생을 억제하게 되는데, 아직 명확한 기전이 밝혀져 있지 않다. 현재까지 알려진 바에 의하면 Cox 의존적 기전으로는 Cox-2에 의해 생성되는 PG의 생성 억제를 통해 DNA 합성과 세포분화에 관여하는 PG의 기능을 방해하는 것이다. 이로써 암조직의 혈관 생성을 억제하고, 암세포 성장을 막게 된다. 또한 Cox 효소는 PG의 생성 뿐만 아니라 다른 세포들간의 반응에도 관여하는데, 예를 들어 Cox 효소는 발암물질-DNA 부가물(carcinogen-DNA adducts)을 생성하는데 이 부가물의 생성이 NSAIDs에 의해 억제된다.(1) Cox 비의존적 기전으로는 Cox-2를 억제하지 않고 세포사멸을 조장시켜 암세포 성장을 억제하는 것이

다. 현재까지 여러 연구에서 규칙적인 NSAIDs의 사용, 특히 Cox-2 선택적 억제제가 대장암을 비롯한 일부 위장관암의 예방에 효과가 있음을 보고하고 있는데,(10) 아직까지 유방암에서 Cox-2 억제제의 예방적 효과가 입증되지 않았으나 그 가능성은 제시되고 있다.

## 결 론

유방암에서 Cox-2는 원발종양의 크기가 클수록, 액와림프절 전이가 많을수록, TNM 병기 및 종양의 조직학적 등급이 높을수록 발현율이 높은 경향을 보여 Cox-2은 높은 발현율 자체가 나쁜 예후의 지표로 판단되며 따라서 Cox-2의 임상적 유용성의 가능성을 보고하며 향후 좀더 많은 환자를 대상으로 한 전향적 연구가 필요하리라 생각된다.

## REFERENCES

- 1) Shaheen NJ, Straus WL, Sandler RS. Chemoprevention of gastrointestinal malignancies with nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Am Can Sci* 2002;94:950-61.
- 2) Mechell JA, Warner TD. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol* 1999;128:1121-32.
- 3) Xu X-C. Cox-2 inhibitors in cancer treatment and prevention, a recent development. *Anti-cancer Drugs* 2002;13:127-37.
- 4) Ristimaki, A, Nieminen O, Saukkonen K, Hotakainen K, Nordling S, Haglund C. Expression of cyclooxygenase-2 in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Am J Pathol* 2001;158:849-53.
- 5) Marrogi AJ, Travis WK, Welsh JA, Khan MA, Rahim H, Tazelaar H, et al. Nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:4739-44.
- 6) Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3336-40.
- 7) Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woennier BM, Khan KN, Masferrer J, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer (Phila)* 2000;89:2637-45.
- 8) Ristimaki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 2002;62:632-5.
- 9) Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst (Bethesda)* 1998;90:455-60.
- 10) Kawamon T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS. Chemopreventive activity of Colocoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1998;58:409-12.
- 11) Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H, Shinomiya N. Expression

- of cyclooxygenase-2 protein in gastric adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 1998;69:168-72.
- 12) Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:135-8.
  - 13) Khuder SA, Mutugi AB. Breast cancer and NSAID use: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2001;84:1188-92.
  - 14) Harris RE, Alshafie GA, Scibert K, Abou-Issa A. Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor. *Cancer Res* 2000;60:2101-3.
  - 15) Coogan FP, Rao RS, Rosenberg L, Palmer JR, Strom BL, Zauber AG, et al. The relationship of nonsteroidal antiinflammatory drug use to the risk of breast cancer. *Prev Med* 1999;29:72-6.
  - 16) Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBots RN, et al. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994;107:1183-8.
  - 17) Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998;93:705-16.
  - 18) Rosenberg L, Palmer JR, Zouber AG, warshuer ME, Stolley PD, Shaprio S, et al. A hypothesis: nonsteroidal anti-inflammatory drugs reduce the incidence of the large-bowel cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:355-8.
  - 19) Marks F, Furstenberger G, Muller-Decker K. Metabolic targets of cancer chemoprevention: interruption of tumor development by inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Recent Results Cancer Res* 1999;151:45-67.
  - 20) Van Rees BP, Ristimaki A. Cyclooxygenase-2 in carcinogenesis of the gastrointestinal tract. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:897-903.
  - 21) Gately S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:19-27.
  - 22) Sawaoka H, Tsuji S, Tsuji M, Gunawan ES, Sasaki Y, Kawano S, et al. Inhibition of angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab Invest* 1999;79:1469-77.
  - 23) Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mechanism underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:681-6.
  - 24) Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leany KM, Smith WG, et al. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase-2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3228-32.
  - 25) Egan KM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Rosner BA, Coditz GA. Prospective study of regular aspirin use and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:988-93.