

유방암에서 nm23 단백 발현양상과 예후인자 및 생존율과의 연관성[※]

계명대학교 의과대학 외과학교실

김태국 · 정기용

Expression of nm23 Protein and its Prognostic Significance in Breast Cancer

Tae Kug Kim, M.D., Ki Yong Chung, M.D.

*Department of Surgery,
Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea*

Abstract : There are many prognostic factors in breast cancer. Metastasis to the regional lymph nodes in breast cancer patients is the most important prognostic factor. In cases with no metastasis to the regional lymph nodes, tumor size, differentiation, nuclear grade, estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) expression, and expression of oncogenes have been reported as prognostic factors. nm23 Gene and its products are known to be inversely related to the potentials of metastasis in breast cancer, however the contradicting results have also been reported. The expression of nm23 protein by immunohistochemical stain was investigated in 61 breast cancer patients and analyzed in relation to other prognostic factors and survival rate. The nm23 protein was positively stained in 91.8% of the breast cancer specimens. The expression of nm23 protein was positively related to the pathologic stage but it was not statistically significant. The expression of nm23 protein was not correlated with 5-year survival rate. In conclusion, the expression of nm23 protein by immunohistochemical method in breast cancer patients was not shown to have any correlation to the pathologic stage and the survival rate.

Key Words : Breast cancer, nm23 Protein, Survival rate

※ 이 논문은 김태국의 의학석사 학위 논문임.

서론

유방암은 다른 장기의 암과 비교하여 예후가 좋은 암으로 알려져 있다. 유방암 환자의 재발과 생존율에 영향을 미치는 예후인자는 액와림프절 전이 여부가 가장 중요하고, 그 외에도 암종괴의 크기, 조직학적 형태, 핵분화도, estrogen receptor(ER)와 progesteron receptor(PR) 발현 여부 등이 있다. 최근에는 p53, HER-2/neu, epidermal growth factor receptor(EGFR) 등 유전자에 대해서도 활발히 연구되고 있다[1]. nm23(non-metastatic clone #23)은 1988년 Steeg 등[2]이 전이능력이 낮은 K-1735 murine melanoma 세포주에서 nm23 mRNA가 전이능력이 높은 K-1735 murine melanoma 세포주보다 10배 정도 많이 표현됨을 처음으로 보고하였다. 그 후 많은 보고에서 nm23 mRNA가 발현되는 유방암은 액와림프절로의 전이가 적으며 무병생존율 및 5년생존율이 좋은 것으로 보고되어 있다[1-3]. 반면에 Sawan 등[4]은 유방암에서 액와림프절 전이와 생존율이나 재발율은 nm23 mRNA 발현과 관계가 없다고 보고하였다. nm23은 염색체 17번 장완에 위치하고 있다. 사람에게는 nm23-H1과 nm23-H2 두 종류가 있는 것으로 알려져 있으며[5,6], nm23-H1이 주 기능을 하고, 이것의 산물인 nucleoside diphosphate kinase A(NDPK-A)가 여러 암종에서 정상 조직에 비하여 과발현된다고 알려져 있다[7,8]. 저자들은 61명의 유방암 조직의 파라핀 블록에서 면역조직화학적 염색을 시행하여 환자의 나이, 암의 크기, 액와림프절 전이, 병기 등 다른 예후인자들과 nm23 단백질 발현과의 관련성을 알아보고, 동시에 nm23 단백질 발현여부에 따른 생존율을 비교하여 그 임상적 의미를 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상 및 임상기록조사

1987년 1월부터 1989년 12월까지 계명대학교 동산의료원에서 유방암으로 진단받고 근치수술을 시행한 139례 중 파라핀 포매조직 보관상태가 양호하고, 1994년 11월까지 추적이 가능했던 61례를 대상으로 임상 및 병리기록에 의존하여 환자의 나이, 암의 크기 및 액와림프절 전이 상태 등을 기록하였으며 재발과 사망의 추적조사는 임상기록과 전화로 확인하였다.

2. 면역조직화학적 염색

면역조직화학적 방법으로 염색하여 nm23 단백질 발현 여부를 관찰하였다. 염색 방법은 우선 파라핀 포매된 유방암 조직을 4 μ m 두께로 조직절편을 만들어 유리 슬라이드에 붙인 후 xylene에 5분간 3회 처리하여 파라핀을 제거하고, 100%, 95%, 80% ethanol에 각각 2 분씩 처리하여 탈수 및 함수과정을 거쳤다. 내재성 과산화수소의 활성을 억제하기 위하여 실온에서 3% 과산화수소를 20분간 처리한 후 phosphate buffered saline(PBS, 0.01M, pH 7.2)에 수세하였다. 그 후 citrate buffer(10 mM, pH 6.0)에서 microwave로 가열 처리한 후 PBS로 다시 수세하였다. nm23 단클론 항체(NCL-nm23, Novocastra)를 1:100으로 희석한 용액을 37°C 항온기에서 1-2시간 동안 반응시킨 후 PBS로 수세하였다. 그 다음 이차 항체인 biotinylated anti-mouse, anti-rabbit, and anti-goat immunoglobulins(LSAB+ Kit, K0690, Dako)을 조직절편에 가해 실온에서 15분간 반응시키고 PBS로 수세하였다. 그 후 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)를 적당량 조직절편에 가하고 광학현미경하에서 염색 여부를 판단한 다음 증류수로 씻어 내고 Meyer's hematoxylin으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 유방암 조직의 nm23 단백질의 면역조직화학적 염색 결과의 평가는 갈색의 색소 침착이 핵이나 세포질에 조금이라도 보이면 양성으로, 그 외에는 모두 음성으로 표기하였다(Fig. 1&2).

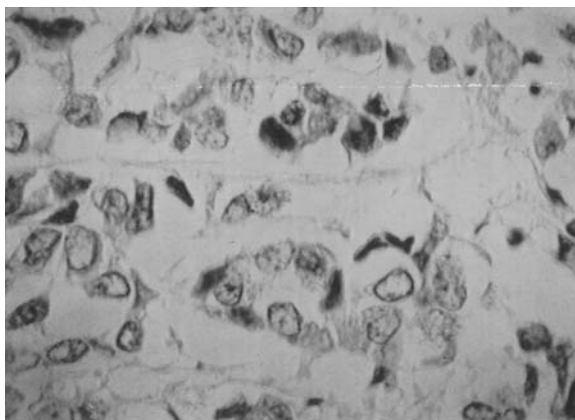


Fig. 1. Breast cancer: immunohistochemical stain of nm23 protein showing both nuclear and cytoplasmic positivity ($\times 200$).

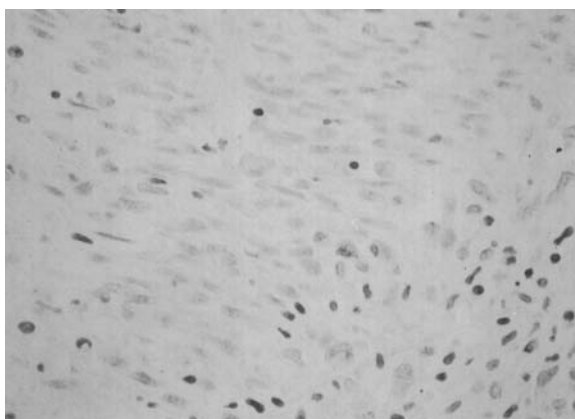


Fig. 2. Breast cancer: immunohistochemical stain of nm23 protein showing negative reactivity($\times 400$).

3. 통계학적 분석

여러가지 예후인자들과 nm23 단백 발현과의 관계를 Chi-Square법을 이용하여 검정하였고, 생존 분석은 Kaplan-Meier법을 적용하였으며, 통계학적 분석은 SAS R 1.0을 이용하였다.

성 적

61명의 유방암 환자의 임상적 조사결과는 Table 1에서 나타내었다. 대상자의 연령분포는

Table 1. Clinical features of 61 breast cancer patients

	Number of patient (%)
Age	
< 50	46 (75.4)
≥ 50	15 (24.6)
Tumor size (cm)	
≥ 2	6 (9.8)
2.1-5	35 (57.4)
> 5.1	20 (32.8)
LN metastasis	
none	18 (29.5)
1-3	15 (24.6)
4-10	18 (29.5)
> 11	10 (16.4)
Stage	
I	2 (3.3)
II	26 (42.6)
III	30 (49.2)
IV	3 (4.9)
Pathology	
Ductal carcinoma in situ	3 (4.9)
Invasive ductal carcinoma	47 (77.0)
Lobular carcinoma	5 (8.2)
Medullary carcinoma	4 (6.6)
Paget's disease	2 (3.3)

50세 미만이 46례(75.4%), 50세 이상이 15례(24.6%)였으며 평균연령은 44.6세였다. 암의 크기는 2 cm 이하 6례(9.8%), 2.1 cm 이상 5 cm 이하가 35례(57.4%), 5 cm 이상이 20례(32.8%)였다. 액와림프절 전이를 보면 전이가 없는 경우가 18례(29.5%), 1-3개가 전이된 경우가 15례(24.6%), 4-10개 전이가 18례(29.5%), 11개 이상 전이가 10례(16.4%)였다. 병기별로 보면 1기 2례(3.3%), 2기 26례(42.6%), 3기 30례(49.2%) 및 4기 3례(4.9%)였다. 병리조직학적으로는 도관상피내암 3례(4.9%), 침윤성도관암 47례(77.0%), 소엽암 5례(8.2%), 수양암 4례(6.6%), 파젯트병 2례(3.3%)였다.

nm23 단백질의 면역조직화학적 염색 결과는 음성인 경우가 5례(8.2%), 양성인 56례(91.8%)였다. nm23 단백질 발현여부와 환자의 나이, 암의 크기, 림프절 전이, 병기와는 연관성이 없었으나, 림프절전이에 따른 nm23 단백질 발현양상은 전이가 없는 경우가 15례(83.3%), 1-3개가 전이된 경우가 14례(93.3%), 4-10개가 17례(94.4%) 및 11개 이상이 10례(100%)로 림프절전이가 많이 이루어질수록 nm23 단백질 발현이 증가하는 경향을 보였으나 통계적 의의는 없었다($P=0.114$). 병기에 따른 nm23 단백질 발현 양성율을 보면 1기가 1례(50.0%), 2기가 23례(88.5%), 3기가 29례(96.7%), 4기가 3례(100%)로 병기가 증가될수록 nm23 단백질의 발현율이 증가하였으나 통계적 의의는 없었다(Table 2).

환자의 추적조사에서 평균추적기간은 53.7개월이었다. 61명 중 15례(24.6%)에서 재발을 보였고, 사망은 13례로 78.7%의 생존율을 보였다. nm23 단백질 발현이 음성일 때 5년무병생존율과 5년생존율은 각각 100%로 nm23 단백질이 발현하는 예의 5년무병생존율과 5년생존율인 44.1%, 74.0%보다 높았으나 통계적 유의성은 없었다(Table 3).

고 찰

유방암 환자의 예후에 가장 중요한 의미를 가지는 것은 액와림프절의 전이로 알려져 있다. 그러나 액와림프절 전이가 없는 경우에도 근처적절제수

Table 2. Relationship between nm 23 protein expression and prognostic factors

		Total	Expression of nm23 protein		P value
		No. (%)	Positive No. (%)	Negative No. (%)	
Age (yrs)					
	<50	46 (75.4)	42 (91.3)	4 (8.7)	0.937
	>51	15 (24.6)	14 (93.3)	1 (6.7)	
Tumor size (cm)					
	<2	6 (9.8)	5 (83.3)	1 (16.7)	0.104
	2.1-5	35 (57.4)	31 (88.6)	4 (11.4)	
	>5.1	20 (32.8)	20 (100)	0 (0)	
LN metastasis					
	0	18 (29.5)	15 (83.3)	3 (16.7)	0.114
	1-3	15 (24.6)	14 (93.3)	1 (6.7)	
	4-10	18 (29.5)	17 (94.4)	1 (5.6)	
	>11	10 (16.4)	10 (100)	0 (0)	
Stage					
	I	2 (3.3)	1 (50.0)	1 (50.0)	0.146
	II	26 (42.6)	23 (88.5)	3 (11.5)	
	III	30 (49.2)	29 (96.7)	1 (3.3)	
	IV	3 (4.9)	3 (100)	0 (0)	

LN: lymph node.

Table 3. Survival rates of breast cancer patients according to expression of nm23 protein

	nm23 protein		P value*
	Positive	Negative	
5YDFS# (%)	44.1 %	100 %	0.0709
5YSR [†] (%)	74.0 %	100 %	0.2683

* log rank test; # 5 years disease free survival rate; [†] 5 years overall survival rate.

술 후 보통 15-20%, 많게는 35%까지 재발율이 보고되고 있다[9]. 따라서 이들 환자들에서 예후에 영향을 미치는 다른 인자를 찾기 위하여 oncogene, growth factor 등에 대한 연구들이 이루어지고 있다.

nm23 유전자는 Steeg 등[1]에 의하여 처음 발견된 이래 많은 연구가 이루어지고 있다. *Dictyostelium discoideum*에서 발견된 nucleoside diphosphate kinase (NDPK)와 *Drosophila*에서의 Awd 유전자와 같은 것으로 알려져 있다[7,10]. 이들의 암세포에서 생리적, 생화학적 작용은 아직 일부분만이 알려져 있는데, Steeg 등[11]에 의하면 GTPase activating proteins(GAP)나 세포의 분화에 관여하는 세포내 단백질과 상호작용하거나 세포내 단백질의 phosphorylation과 관계가 있을 것이라고 하였고, nm23의 생리적 작용을 알아야 임상적으로 nm23 이용이 가능할 것이라고 주장하였다. nm23는 유방암의 전이능력을 억제한다고 알려져 있고, 여러 종양세포주를 이용한 실험에서 림프절 전이가 있는 경우 nm23 발현이 현저히 떨어지고, 림프절 전이가 없는 종양에서 nm23의 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다[1,2,5,12-14]. 반면, nm23-H1의 산물이 NDPK-A로 알려져 있는데 Sastre-Garau 등[15]은 유방암 조직에서 양성 조직보다 더 높은 NDPK를 측정하였으며 전이 능력의 표식인자가 될 수 없다고 보고하였다. 또한 Lacombe 등[16]은 nm23가 정상에 비해 고형암에서 높게 측정되며 유방암, 대장암, 자궁경부암등에서 비침윤성이나 침윤성 림프절 전이 유무와는 연관이 없다고 보고하고 있다. Sawan 등[4]도

197명을 대상으로 nm23가 다른 예후인자나 생존율과 전혀 연관이 없으며 오히려 액와림프절 전이가 있는 경우에 높게 측정되어서 nm23의 암의 억제능력은 조직에 특이한 현상일 것이라 하였다. 최근 Phillips 등[17]도 nm23-H1 발현은 유방암의 전이와 연관이 없다고 하였다. 국내의 보고에서는 림프절 전이가 된 경우 뿐 만 아니라 종양의 크기가 큰 경우에 nm23 발현이 감소했다는 보고[18]가 있는 반면 액와림프절 전이, 다른 병리학적 예후인자, 호르몬수용체, c-erbB-2, p53 및 EGFR과는 연관성이 없다는 보고[19]도 있다.

본 연구에서는 환자의 나이, 암의 크기, 액와림프절 전이, 병기가 증가할수록 nm23 단백질 발현율이 증가되는 양상을 보였으나 통계적 의의는 없었다. 이 사실은 처음 Steeg 등[1]이 말한 nm23가 암의 전이 능력을 억제한다는 주장과는 상반되는 결과이다. Bevilacqua 등[2]과 Hennessy 등[13]은 nm23 발현이 높을수록 무병생존율과 생존율이 높다고 보고하고 있으며, 재발율은 역상관계가 있다고 하였다. 반면에 Sawan 등[4]은 생존율이나 재발율과 nm23 발현은 연관성이 없다고 하였다. 본 연구에서도 Table 3에서 보듯이 nm23 발현이 음성인 경우에서 5년 무병생존율과 5년생존율이 높았으나 통계적 의의는 없었다. 저자의 결과나 여러 보고자들의 다양한 결과들은 먼저 효소능이 농도보다는 다른 요인에 의해 조절될 수 있으므로 NDPK와 nm23 단백질 발현율의 연관성이 없을 수 있다. 둘째, 암조직에서 효소능은 암조직내에 암조직이 아닌 간질세포, 내피세포, 림프구에 의해 희석되거나 간질에 있는 대량의 단백질에 의해 효소능이 저해된 결과일 수 있다는 것이다.

마지막으로 western blot으로 측정시 사용한 nm23-H2에 특이한 항체나 다크론 항체를 사용시 특이성이 문제가 되며 면역조직화학적 검사때는 유방암의 이형질성으로 인한 염색 강도가 달라서 판독상의 기준이 없다는 점 때문이라는 데 공감할 수 가지며 또한 약염색되는 경우와 강염색되는 것을 따로 구분하지 않은 것이 영향을 미쳤을 것으로 생각된다.

본 연구에서 nm23 단백질 발현 양성율은 91.8%로 국내의 이수정 등[19]의 91.5%, 한세환 등[18]의 92.1%와 비교할 때 큰 차이는 없었으나 외국의 Hennessy 등[13]의 50.8%, Sawan 등[4]의 81.2%와는 상당한 차이를 보인다. 저자나 국내의 보고에서는 nm23 음성율이 지나치게 낮기 때문에 적은 표본수로는 정확한 예후인자 분석이나 생존율 분석에 한계가 있다고 생각된다. 더구나 nm23 단백질의 면역조직화학적 연구가 모두 후향성 연구이고 저자들의 경우에도 139례의 유방암 환자 중 추적이 가능하고 병리표본이 온전히 보관된 61례만을 대상으로 하였기 때문에 대상에서 제외된 예들은 nm23 단백질이 음성으로 나오는 심각한 예들이 모두 사망하고 양성으로 나오는 예만 살아남았을 가능성을 배제하지 못하는 점 등을 고려하면 잘 고안된 전향성 연구가 이루어져야 한다고 사료된다.

이상에서 보는 바와 같이 유방암에서 nm23 발현의 의미는 저자에 따라 상당히 다르게 나타나며, 이것은 nm23 단백질 발현이 암의 전이능력을 억제한다는 Steeg 등[1]의 가설과는 달리 암의 전이와는 관련성이 없거나, 있더라도 간접적인 2차적 형태로 아주 미약한 것일 가능성이 있을 것으로 생각된다. 이는 잘 고안된 전향성 연구를 통해서 밝혀내야 할 것으로 생각되며, 암세포 전이 과정에서 nm23단백의 생리적, 생화학적 작용에 대한 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

요 약

유방암환자 61례를 대상으로 하여 nm23 단백질

발현과 다른 예후인자와의 비교 및 재발율과 생존율을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 단클론 항체를 이용한 단백질 발현 양성율은 91.8% (56/61례)였다. 기존의 유방암의 예후인자와의 연관성 조사에서 액와림프절 전이와 병기가 증가할수록 nm23 단백질 발현이 증가하는 경향을 보였으나 통계적 의미는 없었다. 5년무병생존율과 5년생존율은 nm23 음성일 때 더 높았으나 통계적 의미는 없었다. 암조직의 면역조직화학적 검사에 의한 nm23 단클론항체 발현여부에 따른 기존의 예후인자 및 생존율과의 관계는 일관성 있는 결과를 보여주지 않아 독립적인 예후인자로서 가치를 부여하기에는 미흡하며 앞으로 전향적 연구가 필요하다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, *et al.* Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1988;**80**:200-4.
2. Bevilacqua G, Sobel M, Liotta L, Steeg P. Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential. *Cancer Res* 1989;**49**:5185-90.
3. Hirayama R, Sawai S, Tagagi Y, Mishima Y, Kimura N, Shimada N, *et al.* Positive relationship between expression of anti-metastatic factor (nm23 gene product or nucleoside diphosphate kinase) and good prognosis in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991;**83**:1249-50.
4. Sawan A, Lascu I, Veron M, Anderson JJ, Wright C, Horne CH, *et al.* NDP-K/nm23 expression in human breast cancer in relation to relapse survival, and other prognostic factors. An immunohistochemical study. *J Pathol* 1994;**172**:27-34.
5. Gilles AM, Presecan E, Vonica A, Lascu I.

- Nucleoside diphosphate kinase from human erythrocytes. Structural characterization of the two polypeptide chains responsible for heterogeneity of the hexameric enzyme. *J Biol Chem* 1991;**266**:1167-9.
6. Leone A, McBride OW, Weston A, Wang MG, Anglard P, Cropp CS, *et al.* Somatic allelic deletion of nm23-H1 in human cancer. *Cancer Res* 1991;**51**:2490-3.
 7. Lacombe ML, Wallet V, Trollis H, Veron M. Functional cloning of a nucleoside diphosphate kinase from Dictyostelium discoideum. *J Biol Chem* 1990;**265**:10012-8.
 8. Stahl JA, Leone A, Rosengard AM, Porter L, King CR, Steeg PS. Identification of a second human nm23 gene, nm23-H2. *Cancer Res* 1991;**51**:445-9.
 9. Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fisher ER, Cruz AB, *et al.* Relation of number of positive axillary lymph node to the prognosis of patients with primary breast cancer. *Cancer* 1983;**52**:1551-7.
 10. Liotta LA, Steeg PS. Clues to the function of nm23 and Awd proteins in development, signal transduction, and tumor metastasis provided by studies of Dictyostelium discoideum. *J Natl Cancer Inst* 1990;**82**:1170-2.
 11. Steeg PS, La Rosa AD, Flatow U, Macdonald NJ, Benedict M, Leone A. nm23 and breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 1993;**25**:175-83.
 12. Barnes R, Masood S, Barker E, Rosengard A, Coggin D, Crowell T, *et al.* Low nm23 protein expression in infiltrating ductal breast carcinoma correlates with reduced patient survival. *Am J Pathol* 1991;**139**:245-50.
 13. Hennesy C, Henry JA, May FE, Westley BR, Angus B, Lennard TW, *et al.* Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer. An association with good prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1991;**83**:281-5.
 14. 송상용, 지제근, 한세환, 최국진. 유방암이 nm23 단백질발현(면역조직화학적 연구). *대한병리학회지* 1995;**29**:469-77.
 15. Sastre-Garau X, Lacombe ML, Jouve M, Veron M, Magdelenat H. Nucleoside diphosphate kinase/nm23 expression in breast cancer. Lack of correlation with lymph node metastasis. *Int J Cancer* 1992;**50**:533-8.
 16. Lacombe ML, Sastre-Garau X, Lascau I, Vonica A, Wallet V, Thierry JP, *et al.* Overexpression of nucleoside diphosphate kinase (nm23) in solid tumors. *Eur J Cancer* 1991;**27**:1302-7.
 17. Phillips KK, Welch DR, Miele ME, Lee JH, Wei LL, Weissman BE. Suppression of MDA-MB-435 breast carcinoma cell metastasis following the introduction of human chromosome 11. *Cancer Res* 1996;**56**:1222-7.
 18. 한세환, 노동영, 허진석, 최국진, 송상용, 지제근. 인체 유암조직에서 nm23-H1 단백질과 발현의 임상적 의미. *대한암학회지* 1994;**26**:936-42.
 19. 이수정, 서준덕, 김기영, 심민철, 권평보, 김동석. 유방암 환자에서 nm23 단백질 발현의 의미. *대한암학회지* 1996;**28**:451-60.