

ORIGINAL ARTICLE

유방의 침윤성 유관암에서 cyclin D1, bcl-2의
발현: 그 연관관계와 임상적 의미홍영기 · 백승삼¹ · 정민성 · 윤호성한양대학교 의과대학 외과학교실 · ¹병리학교실Expression of Cyclin D1 and bcl-2 in Infiltrative Ductal Carcinoma of the Breast:
Their Correlations and Clinical implicationsYoung Ki Hong, Seung Sam Baik¹, Min Sung Chung, Ho Sung YoonDepartments of Surgery and ¹Pathology, Hanyang University Hospital, College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Cyclin D1 and bcl-2 are involved in cell proliferation and apoptosis in tumor development and are commonly expressed in breast cancer. But there are few clinical reports on the correlation between cyclin D1 and bcl-2 expression. This study was designed to analyze the correlations of cyclin D1 and bcl-2 and their clinical implications in breast cancer.

Methods: Immunohistochemical expression of cyclin D1 and bcl-2 were studied in 342 infiltrative ductal carcinoma cases and were compared with clinicopathologic parameters such as age, tumor size, histologic grade, lymph node status, p53, c-erbB2 and hormone receptors.

Results: Cyclin D1 expression was found in 86 of 342 cases (25.1%). Bcl-2 was positive in 227 of 342 cases (66.4%). Bcl-

2 overexpression was associated with the high expression of cyclin D1 ($p=0.001$). Correlation was detected between both cyclin D1 and bcl-2 and hormone receptor positivity ($p<0.001$). There was a reverse correlation between bcl-2 and histologic grade, p53, c-erbB2. And the bcl-2 overexpression group showed better disease free survival rates at 3-year follow up.

Conclusion: Higher expression of cyclin D1 was associated with bcl-2 overexpression. Positive estrogen receptor expression was associated with high cyclin D1 and bcl-2 expression. Bcl-2 tends to correlate with a positive clinical outcome.

Key Words : Bcl-2, Breast cancer, Cyclin D1, Prognosis

중심단어 : 유방암, 예후, Bcl-2, Cyclin D1

서 론

유방암은 임상적, 생물학적으로 다양한 특성을 나타내는 종양이며, 임상적 경과와 환자의 환자에서 매우 다양하게 나타난다. 그 예후를 예견하기 위해 많은 인자들이 발견되었고 사용되고 있다. 예후인자로는 환자의 성별, 연령, 폐경 유무 등의 임상적 특성

과 종양의 크기, 림프절 전이 유무, 조직학적 분화도, 에스트로젠 수용체(estrogen receptor, ER)와 프로그스테론 수용체(progesterone receptor, PR) 등의 종양의 특성, 또한 종양유전자, 종양억제유전자, 증식 계수, DNA 배수성 등 종양의 진행과 관련된 종양표지자 등이 있고 이 중 종양의 크기, 림프절 전이 유무가 가장 중요한 예후 인자로 알려져 있다.

Cyclin D1은 세포주기 조절에 관여하는 cyclin 단백질계열 중 종양발생과 가장 관련이 깊은 것으로 알려져 있으며 cyclin D1 유전자는 11q13에 위치하여 유전자 증폭이나 과발현으로 망막모세포종 유전자(retinoblastoma gene, Rb) 단백을 인산화시켜 Rb 단백질의 세포주기 억제기능이 불활성화되면 세포주기상 G1상태가 S상태로 이행되는 과정을 촉진하여 세포의 증식을 유도한다. 종

책임저자 : 정민성

133-792 서울시 성동구 행당동 17, 한양대학교 서울병원 외과

Tel: 02-2290-8460, Fax: 02-2281-0224

E-mail : acts123@hanmail.net

접수일 : 2008년 9월 5일 게재승인일 : 2008년 11월 5일

*본 논문은 2008년 제6차 EBCC (European Breast Cancer Conference)에서 포스터 전시됨.

양세포 내에서 cyclin D1의 발현은 이러한 세포주기 조절단백이 종양발생에 기여함을 암시한다. (1) 유방암에서는 약 20%에서 cyclin D1의 유전자 증폭(amplification)과 34-81%에서 단백질 과발현이 관찰된다. (2,3)

세포자멸사(apoptosis)를 억제하는 bcl-2 유전자는 원형 종양 유전자(protooncogene)의 일종으로 18q21에 위치하며 그 산물인 bcl-2 단백질은 형질내세막(endoplasmic reticulum), 미토콘드리아와 핵막 등에 존재하면서 시토카인과 함께 세포자멸사를 억제하여 세포의 수명을 연장시켜 클론의 팽창과 이차적인 유전적 변화 및 악성 전환의 기회를 높임으로써 암을 유발한다. (4,5) 유방암에서도 bcl-2가 발현되고 예후 인자로서의 중요성이 보고되고 있으며, (6,7) bcl-2는 정상 유방 상피에서 거의 항상 발현되지만 유방암에서는 60-80% 정도 발현되어 유방암의 발생 또는 진행에 관여되는 것으로 생각되며 좋은 예후와 연관이 있다는 연구가 있다. (8,9)

유방암과 관련된 임상병리학적 인자로서 cyclin D1과 bcl-2 각각에 대한 많은 연구보고들이 있었지만 두 지표 사이의 연관관계에 대해서는 몇몇의 실험연구만 있을 뿐 임상연구에 관한 발표는 드물었다. 유방암 세포주를 이용한 연구에서 cyclin D1이 bcl-2의 과발현에 의해 활성화된다는 결과와 함께 cyclin D1과 bcl-2간의 상관관계에 대해 명시하였고, (10) 다른 연구에서는 cyclin D1과 bcl-2가 예후 인자로서의 가능성에 대한 언급이 있어, (11) 유방암에서 이 두 지표와 연관된 세포증식과 세포자멸사 억제 사이의 연결 기전의 가능성을 가정하여 본 연구에서는 침윤성 유관암 환자의 cyclin D1과 bcl-2의 발현 정도를 면역조직화학염색을 통해 알아보고 두 지표 사이의 상관관계를 확인하며, 기존의 예후 인자들과의 상관성을 비교하여 cyclin D1과 bcl-2의 임상적 의미를 찾고자 하였다.

방 법

1. 연구 대상

2000년 12월부터 2007년 12월까지 한양대학교 병원 외과에서 침윤성 유관암으로 진단받고 수술을 시행한 360명의 유방암 환자 중 추적 관찰이 미비한 18명의 환자를 제외한 342명의 환자를 대상으로 하였다. 수술 전에 화학 요법이나 방사선 요법을 받은 환자는 연구 대상에서 제외하였다. 선택한 환자의 임상 기록과 병리 조직검사 보고서 등을 토대로 환자의 임상병리적 특징과 예후인자 그리고 재발률에 대해 후향적으로 분석하였다.

모든 환자는 여성이었고 평균추적기간은 36±22개월이었다.

2. 면역조직화학염색 및 판정

침윤성 유관암 환자의 면역조직화학적 단백질 발현 정도를 확인하기 위하여 조직을 포르말린으로 고정시킨 후 파라핀에 포매된 종양 조직절편을 5 μm 두께로 박절한 후 조직 절편 슬라이드를 제작하였다. 조직 절편 슬라이드 내에 존재하고 있는 파라핀을 제거하기 위하여 탈파라핀 과정을 시행하였고 내인성 페록시다아제 활성(endogenous peroxidase activity)을 제거하기 위하여 슬라이드 표본을 3% 과산화수소로 10분간 처리한 후 증류수로 5분 동안 2회 세척하였다. 항원 복구를 위하여 구연산염 완충물(citrate buffer [pH 6.0])에 담가 압력용기에서 약 10분간 처리한 후 실온에서 냉각시키고, 증류수로 5분간 2회 수세하였다. 그 후 Tris buffer에 5분 동안 담가둔 후 비특이적 반응을 제거하기 위해 5% normal goat serum를 20분간 조직 슬라이드에 점적하였다. 여기에 침윤성 유관암에 연관된 단백질 표지자에 대한 1차 항체인 monoclonal anti-human IgG ER (Immunotech, Marseille, France), PR (Immunotech, Marseille, France), p53 (Novocastra Lab., Newcastle, UK), c-erbB-2 (Im-

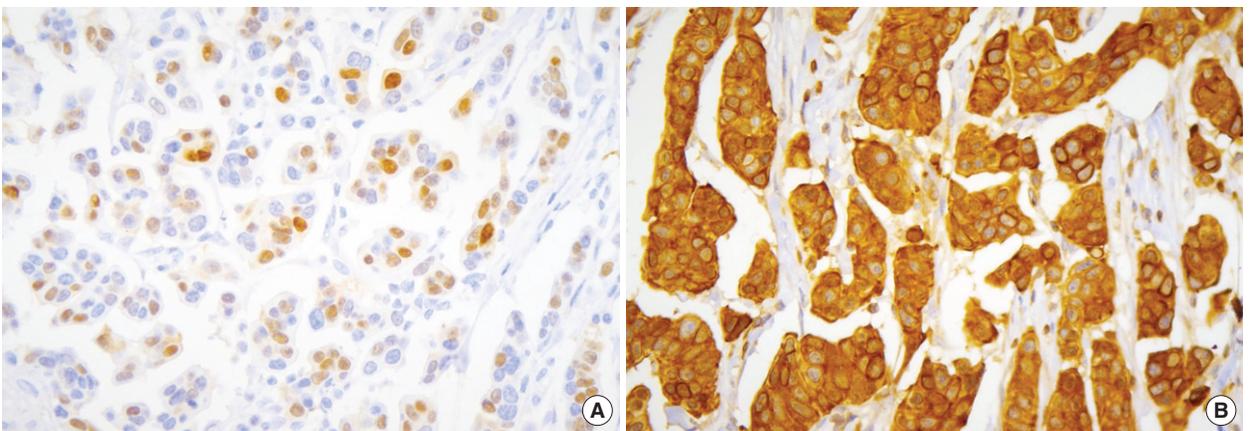


Fig 1. Immunohistochemical staining for cyclin D1 and Bcl-2. (A) Immunohistochemical nuclear staining of cyclin D1 expression of infiltrative ductal carcinoma (×200). (B) Immunohistochemical cytoplasmic staining of bcl-2 expression of infiltrative ductal carcinoma (×200).

munotech, Marseille, France), bcl-2 (Novocastra Lab., Newcastle, UK), cyclin D1 (Novocastra Lab., Newcastle, UK)를 각각 1시간 동안 반응시켰다.

그 후, Tris buffer로 5분씩 3회 세척하고, 연결 항체에 비오틴 (biotin)이 부착된 goat anti-mouse IgG (Vector laboratories, Burlingame, USA)로 20분 동안 반응시켰다. 그리고 나서 페록시다아제가 결합된 streptavidin (DAKO, Carpinteria, USA)에 20분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 슬라이드를 Tris buffer로 세척 후 발색제인 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (DAKO, Carpinteria, USA)으로 5분 동안 발색 반응을 시켰다. 발색이 끝난 후 슬라이드를 증류수에 2분씩 3회 세척하고 마지막으로 Mayer's hematoxylin에 10초간 대조염색한 후, Canada balsam으로 봉입하고 광학현미경으로 관찰하였다.

각 항체반응에 대한 평가는 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, p-53 및 cyclin D1 단백질은 핵 내에 명확하게 염색된 세

포가 보이는 경우 양성으로 판정하였고, c-erbB-2 및 bcl-2는 세포질 내에 양성 반응을 보이는 경우를 양성으로 판정하였다. 또한 각 항체 모두에 대해서 10배율 시야를 검색하여 전체 세포 중 염색된 세포의 평균이 10% 이상일 때 양성으로 정하였다(Fig 1).

3. 통계학적 분석

Cyclin D1, Bcl-2의 발현과 다른 기존의 예후 인자나 종양표지자 등 임상병리학적 인자들의 상관관계를 chi-square test로 검정하였다. 3년간의 무병생존율(Disease free survival: 수술 후 환자가 재발없이 생존하는 기간) 생존곡선은 Kaplan-Meier 방법에 의하여 산출하였고, 이의 유의성은 log-rank test로 검정하였다. 또한 Cox-proportional hazards model을 통해 유방암과 관련된 여러 인자들과 3년간의 무병생존율 사이의 다변량 분석을 시행하였다. 모든 통계 검증은 p값이 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 인정하였고 통계학적 분석은

Table 1. General characteristics & clinicopathologic parameter of patients (n=342)

Variable	Number of patients (N=342)
Age	
<50	170 (49.7%)
≥50	172 (50.3%)
Tumor size	
≤2 cm	178 (52.0%)
>2 cm	164 (48.0%)
LN involvement	
Negative	189 (55.3%)
Positive	153 (44.7%)
Histologic grade	
I/II	205 (70.2%)
III	87 (29.8%)
ER	
Negative	125 (36.5%)
Positive	217 (63.5%)
PR	
Negative	139 (40.6%)
Positive	203 (59.4%)
p53	
Negative	204 (59.6%)
Positive	138 (40.4%)
C-erbB-2	
Negative	213 (62.3%)
Positive	129 (37.7%)
Cyclin D1	
Negative	256 (74.9%)
Positive	86 (25.1%)
Bcl-2	
Negative	115 (33.6%)
Positive	227 (66.4%)

LN=lymph node; ER=estrogen receptor; PR=progesterone receptor.

Table 2. Correlation between clinicopathological factors and expression of cyclin D1, bcl-2 in infiltrative ductal carcinoma (n=342)

Characteristics	Cyclin D1 expression (N=342)	p-value	Bcl-2 expression (N=342)	p-value
Age		0.237		0.237
<50	38/170 (22.4%)		118/170 (69.4%)	
≥50	48/172 (27.9%)		109/172 (63.4%)	
Tumor size		0.491		0.002
≤2 cm	42/178 (23.6%)		132/178 (74.2%)	
>2 cm	44/164 (26.8%)		95/164 (57.9%)	
LN involvement		0.257		0.295
Negative	43/189 (22.8%)		130/189 (68.8%)	
Positive	43/153 (28.1%)		97/153 (63.4%)	
Histologic grade		0.324		<0.001
I/II	51/205 (24.9%)		153/205 (74.6%)	
III	17/87 (19.5%)		43/87 (49.4%)	
ER		<0.001		<0.001
Negative	14/125 (11.2%)		39/125 (31.2%)	
Positive	72/217 (33.2%)		188/217 (86.6%)	
PR		0.002		<0.001
Negative	23/139 (16.5%)		64/139 (46.0%)	
Positive	63/203 (31.0%)		163/203 (80.3%)	
P53		0.940		0.045
Negative	51/204 (25.0%)		144/204 (70.6%)	
Positive	35/138 (25.4%)		83/138 (60.1%)	
C-erbB-2		0.153		0.023
Negative	48/213 (22.5%)		151/213 (70.9%)	
Positive	38/129 (29.5%)		76/129 (58.9%)	
Bcl-2		0.002		-
Negative	17/115 (14.8%)		-	
Positive	69/227 (30.4%)		-	

LN=lymph nodes; ER=estrogen receptor; PR=progesterone receptor.

SPSS 15.0 for Windows를 이용하였다.

결 과

1. 대상 환자와 임상병리학적 인자(Table 1)

환자의 연령은 22세부터 83세로 평균 50.2세였으며, 50세 미만 군이 170예(49.7%), 50세 이상은 172예(50.3%)였다. 종양의 크기가 2 cm 이하인 경우가 178예(52%), 2 cm를 초과하는 경우는 164예(48%)였고, 림프절 침범이 없는 경우가 189예(55.3%), 있는 경우는 153예(44.7%)였다. 조직학적 등급의 경우 총 342예 중 50예에서는 검사가 미비하여 292예만이 확인되었다. 분류 시 I/II 등급이 205예(70.2%), III등급이 87예(29.8%)였다. 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체는 각각 217예(63.5%)와 203예(59.4%)에서 양성으로 관찰되었고, 종양표지자 중 p53, c-erbB-2는 138예(40.4%), 129예(37.7%)에서 양성 소견을 보였다. 마지막으로 cyclin D1은 86예(25.1%)에서 양성을 bcl-2는 227예(66.4%)에서 양성이었다.

2. Cyclin D1 단백질 및 bcl-2 단백질의 발현과 임상병리학적 인자들과의 상관성(Table 2)

Cyclin D1 단백질은 면역조직화학 염색에서 종양세포의 핵과 종양주변의 일부 비종양성 상피세포의 핵에서 염색되었으며(Fig 1), 86명(25.1%)에서 발현되었고 256명(74.9%)에서 음성이었다. 에스트로겐 수용체 양성인 217예 중 72예(33.2%), 프로게스테론 수용체 양성인 203예 중 63예(31%)에서 양성으로 두 호르몬 수용체의 발현과 cyclin D1 단백질은 통계학적으로 유의한 연관성이 있었다(에스트로겐 수용체; $p < 0.001$, 프로게스테론 수용체; $p = 0.002$). 하지만 그 밖의 임상병리학적 인자들과는 상관관계가

확인되지 않았다.

Bcl-2 단백질은 면역조직화학 염색상 종양조직의 세포질에 염색되었으며(Fig 1), 227예(66.4%)에서 양성, 115예(33.6%)에서 음성 소견이 관찰되었다. Bcl-2 단백질은 종양의 크기가 작을수록 ($p = 0.002$), 조직학적 등급이 낮을수록($p < 0.001$) 더 많이 발현되며 통계학적으로 유의하였다. 에스트로겐 수용체 양성 217예 중 188예(86.6%)에서 양성, 프로게스테론 수용체 양성인 203예 중 163예(80.3%)에서 양성 소견을 보이며 두 호르몬 수용체와 bcl-2의 상관 관계에서 유의한 결과를 보였다(에스트로겐 수용체; $p < 0.001$, 프로게스테론 수용체; $p < 0.001$). 또한 p53, c-erbB-2와 bcl-2 단백질의 발현은 역의 상관관계를 보이며 통계학적으로 유의하였다($p53$; $p = 0.045$, c-erbB-2; $p = 0.023$).

3. Cyclin D1, bcl-2 단백질발현의 관계 및 3년 무병생존율 비교

본 연구에서 확인하고자 했던 cyclin D1과 bcl-2 단백질의 상호 발현을 분석한 결과 bcl-2 단백질의 발현 시 cyclin D1 단백질이 양성으로 발현되는 통계학적으로 유의한 상관관계가 확인되었다($p = 0.002$)(Table 2). 환자의 추적 조사기간은 평균 36.6개월이었고 3년 이상 추적 조사한 환자들은 176명이었다. Cyclin D1 단백질과 bcl-2 단백질 발현의 3년간 무병생존율을 분석해본 결과(Fig 2), cyclin D1 음성인 256명 중 23명에서, 양성인 86명 중 6명에서 3년 내 재발이 확인되었고 cyclin D1 발현여부에 따른 재발의 차이가 통계학적으로 유의하지 않았다($p = 0.632$). 반면 bcl-2는 음성인 115명 중 16명에서, 양성인 227명 중 13명에서 3년 내 재발이 확인되었으며, bcl-2 양성인 환자들이 음성인 환자들에 비해 추적관찰 기간 중 더 적은 재발률을 보이며 통계학적으로 유의한 결과를 보였다($p = 0.009$). 3년 무병생존율과 임상병리학적 인자들과의 다변량 분석에서는 림프절 전이가 존재할 경우와 프로게

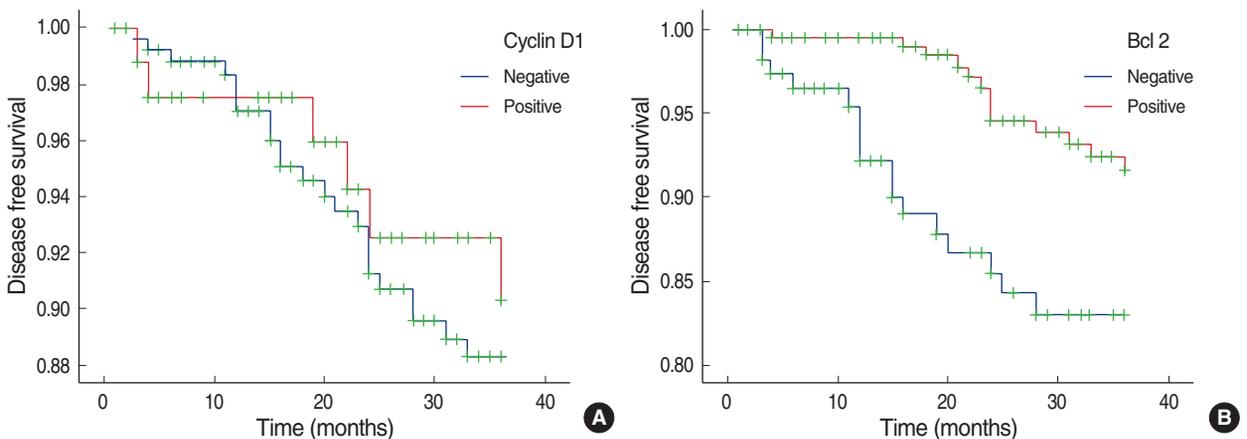


Fig 2. Three year disease free survival with expression of cyclin D1 & bcl-2. (A) Three year disease free survival of cyclin D1 ($p = 0.632$), (B) Three year disease free survival of bcl-2 ($p = 0.009$).

스테론 수용체 발현이 음성일 경우 3년 무병생존율에서 재발률을 높이는 독립적인 예후인자로서의 유의성을 보였다(Table 3).

4. Cyclin D1, bcl-2 단백질발현의 조합과 임상병리학적 인자들과의 상관성 및 3년 무병생존율 비교(Table 4)

Cyclin D1, bcl-2의 발현조합과 각 임상병리학적 인자들과의

Table 3. Cox multivariate analysis at 3 yr-disease free survival in invasive ductal carcinomas

	Hazards ratio	95% confidence interval	p-value
Old age (≥50 yr)	1.619	0.735 3.567	0.232
Larger tumor size (>2.0 cm)	1.274	0.573 2.831	0.553
Lymph node involvement	3.938	1.644 9.435	0.002
Poor histologic grade (Grade III)	2.104	0.974 4.544	0.058
ER expression	1.748	0.542 5.635	0.350
PR expression	0.324	0.113 0.926	0.035
p53 expression	1.862	0.862 4.019	0.113
C-erbB-2 expression	1.241	0.581 2.648	0.577
Cyclin D1 expression	0.747	0.278 2.004	0.562
Bcl-2 expression	0.506	0.195 1.312	0.161

ER=estrogen receptor; PR=progesterone receptor.

Table 4. Correlations between clinicopathological factors and expression of cyclin D1 and bcl-2 in combination

Characteristics	CD1(-)/Bcl2(-) (N=98)	CD1(+)/Bcl2(-) (N=17)	CD1(-)/Bcl2(+) (N=158)	CD1(+)/Bcl2(+) (N=69)	p-value
Age					0.142
<50	48/98 (49.0%)	4/17 (23.5%)	84/158 (53.2%)	34/69 (49.3%)	
≥50	50/98 (51.0%)	13/17 (76.5%)	74/158 (46.8%)	35/69 (50.7%)	
Tumor size					0.008
≤2 cm	41/98 (41.8%)	5/17 (29.4%)	95/158 (60.1%)	37/69 (53.6%)	
>2 cm	57/98 (58.2%)	12/17 (70.6%)	63/158 (39.9%)	32/69 (46.4%)	
LN involvement					0.296
Negative	53/98 (54.1%)	6/17 (35.3%)	93/158 (58.9%)	37/69 (53.6%)	
Positive	45/98 (45.9%)	11/17 (64.7%)	65/158 (41.1%)	32/69 (46.4%)	
Histologic grade					0.001
I/II	45/84 (53.6%)	7/12 (58.3%)	109/140 (77.9%)	44/56 (78.6%)	
III	39/84 (46.4%)	5/12 (41.7%)	31/140 (22.1%)	12/56 (21.4%)	
ER					<0.001
Negative	75/98 (76.5%)	11/17 (64.7%)	36/158 (22.8%)	3/69 (4.3%)	
Positive	23/98 (23.5%)	6/17 (35.3%)	122/158 (77.2%)	66/69 (95.7%)	
PR					<0.001
Negative	65/98 (66.3%)	10/17 (58.8%)	51/158 (32.3%)	13/69 (18.8%)	
Positive	33/98 (33.7%)	7/17 (41.2%)	107/158 (67.7%)	56/69 (81.2%)	
P53					0.170
Negative	53/98 (54.1%)	7/17 (41.2%)	100/158 (63.3%)	44/69 (63.8%)	
Positive	45/98 (45.9%)	10/17 (58.8%)	58/158 (36.7%)	25/69 (36.2%)	
C-erbB-2					0.025
Negative	53/98 (54.1%)	9/17 (52.9%)	112/158 (70.9%)	39/69 (56.5%)	
Positive	45/98 (45.9%)	8/17 (47.1%)	46/158 (29.1%)	30/69 (43.5%)	

CD1=cyclin D1; LN=lymph nodes; ER=estrogen receptor; PR=progesterone receptor.

상관성을 분석해본 결과, 종양의 크기, 조직학적 분화도, 에스트로겐 수용체 및 프로게스테론 수용체 등의 호르몬 수용체, c-erbB-2 등과 통계학적으로 유의한 연관성을 보였다. 호르몬 수용체의 발현은 두 인자 모두 양성인 cyclin D1(+)/bcl-2(+)인 경우에 높은 발현율이 발견되었다($p<0.001$). 작은 크기의 종양은 cyclin D1(-)/bcl-2(+)인 경우에서 가장 많은 분포를 보이며 유

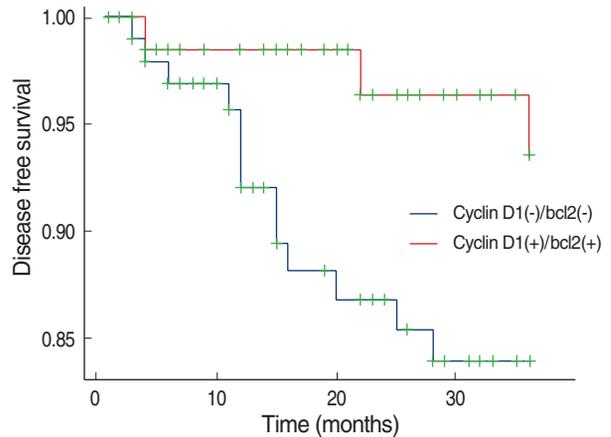


Fig 3. Three year disease free survival with expression of cyclin D1 & bcl-2 in combination ($p=0.061$).

의하였고($p=0.008$), 조직학적 분화도는 cyclin D1(+)/bcl-2(+)
인 경우에 좋은 조직학적 소견을 보였다($p=0.001$). c-erbB-2는
cyclin D1(+)/bcl-2(-)인 경우 더 잘 발현되는 특징을 보여주었
다($p=0.025$). 아울러 발현조합 중 두 지표가 모두 양성인 경우와
모두 음성인 경우의 3년 무병생존율을 비교하였다(Fig 3). 두 지
표가 모두 양성인 환자에서 모두 음성인 환자보다 재발률이 적었
으나 통계적으로 유의하지는 않았다($p=0.061$).

고 찰

발표된 연구들에 따르면 유방암의 약 35-80%에서 cyclin D1
단백의 발현이 나타나는데, 본 연구에서는 cyclin D1 단백질은
25.1%에서 발현 소견을 보여 다른 연구들에 비해 발현 정도가 적
었다.(2,3,12) Cyclin D1 단백질의 발현은 유전자의 증폭 정도와
깊은 관련이 있고, 이는 다른 유전자 증폭에 의해 유도되거나 돌
연변이나 염색체 전이에 의해 발생할 수 있다고 알려져 있으나
cyclin D1의 발현은 유전자의 증폭 없이도 에스트로겐 수용체 양
성인 세포에서 유도될 수 있다. 이는 세포주를 이용한 실험에서 유
방암 세포가 에스트로겐에 의해 cyclin D1이 유도될 수 있어,(13)
에스트로겐 수용체 양성인 유방암은 유전자 증폭이 없이도 cyclin
D1 발현이 유도될 수 있고 에스트로겐 수용체는 더 많은 cyclin
D1을 합성시킬 수 있다고 알려져 있다.(14) 본 연구에서도 cyclin
D1의 발현이 에스트로겐 수용체 및 프로게스테론 수용체의 발현
과 유의한 상관성을 가지는 것으로 나타났다. 몇몇 연구에서는 위
에서 말한 것처럼 cyclin D1의 발현이 두 호르몬 수용체의 발현과
상관관계가 있으며, 좋은 예후와 관련이 있는 것으로 보고되
지만,(15) 오히려 다른 연구들에서는 cyclin D1이 나쁜 예후와 관련
이 있다거나 생존율과는 상관이 없다는 견해가 더 지배적이다.
(12,16-18) 본 연구의 cyclin D1과 관련된 3년 무병생존율에서
도 통계적으로 유의한 결과를 보이지 않았고($p=0.632$), cyclin
D1은 c-erbB-2와 상관관계가 있다는 연구가 있어,(16,17) 본 연
구에서 분석한 결과 두 인자만의 관계에서는 유의한 결과를 보
이지 않았다($p=0.153$).

Leek 등(19)은 bcl-2 단백질이 정상 유방조직에서는 97%, 유관
상피내암에서는 91%, 침윤성 유방암종에서는 79%에서 발현되
었다고 발표하고 있으며 본 연구의 침윤성 유방암 환자들 중에서
는 66.4%가 발현되었다. Park 등(20)은 bcl-2 발현이 에스트로
겐 수용체 및 프로게스테론 수용체 발현에 의존적이며 좋은 조직
학적 분화도와 상관관계를 보임을, Kang 등(21)도 bcl-2의 발현
은 호르몬 수용체의 발현 유무, 좋은 조직 등급, 작은 크기의 종양,
p53과의 역의 상관관계 등과 통계학적 유의성을 보임을 발표하
였다. Wang 등(22)은 유방암 세포주에 대한 연구에서 에스트로

겐 bcl-2 mRNA의 발현을 증가시키며, 이러한 bcl-2 mRNA
의 발현은 항에스트로겐제제인 타목시펜에 의해 차단되는 것으로
보아 bcl-2 유전자는 에스트로겐과 에스트로겐 수용체와의 반응
에 의해 조절된다고 발표하였다. 결과에서 언급한 것처럼, bcl-2
와 에스트로겐 수용체 및 프로게스테론 수용체 발현의 연관성($p<$
0.001) 및 비록 결과가 미비한 50명의 환자가 제외되기는 했지만
좋은 조직학적 분화도와의 연관성($p<0.001$)이 본 연구에서도 확
인되었다. 또한 작은 크기의 종양($p=0.002$) 및 p53과의 역의 상
관관계($p=0.045$)도 관찰되었다.

Bcl-2의 예후와 관련된 몇몇 연구에서는 bcl-2는 세포자멸사
를 억제하고 세포의 수명을 연장시켜 종양 형성에 기여함으로써
나쁜 예후를 보일 것으로 생각하지만, 다른 연구에서는 오히려 좋
은 예후를 보이는 것으로 알려져 있고(23,24) 이에 대한 정확한
기전은 알려져 있지 않지만 bcl-2 발현에 의해 유사분열 속도가
낮은 클론에서 이차적인 유전자 결함이 더 천천히 생겨 이로써 종
양이 서서히 자라기 때문이라고 추측되기도 하며,(25) 호르몬 수
용체 및 좋은 조직학적 등급과의 관계 등이 영향이 있을 것으로도
보여진다. 본 연구에서도 작은 크기의 종양과 bcl-2의 연관성이
관찰되었으며 확인한 3년 무병생존율에서 bcl-2 양성인 경우가
음성인 경우보다 무병생존 확률이 통계적으로 유의하게 높게 나
타났다($p=0.009$). 이는 bcl-2 단백질 발현이 재발이 없거나 5년
이상의 생존과 연관성이 있다는 Hurlimann 등(26)의 결과와 어
느 정도 일치하는 부분이 있다. 확인해야 할 점은 많은 연구들에
서 발표된 것처럼 bcl-2가 비교적 병의 초기에 발현된다면 bcl-
2의 발현여부는 단지 초기에 발견된 종양이라는 점을 말해줄 뿐
예후에 영향을 미치는 병리학적 의미의 인자는 아닐 수 있다. 이
런 경우 bcl-2의 발현이 좋은 예후를 보인다는 결론에는 종양이
초기에 발견되어 치료 후 무병생존기간을 늘릴 수 있는 leadtime
bias가 가해졌을 가능성을 배제할 수는 없고 후향성 연구로 진행
되어 이러한 bias의 개입이 가능할 수 있지만 본 연구 결과에서
보이듯 bcl-2와 에스트로겐 수용체 및 프로게스테론 수용체와의
연관성, p53과 c-erbB-2와의 역의 상관관계, 작은 크기의 종양
과의 연관성 등 bcl-2 자체가 예후에 영향을 미쳤을 가능성도 배
제할 수는 없을 것으로 보인다.

본 연구에서 확인한 3년 무병생존율과 관련된 여러 임상병리학
적 인자들의 다변량 분석에서는 유방암의 림프절 전이 여부($p=$
0.002)와 프로게스테론 수용체의 발현 여부($p=0.035$)가 독립적
인 예후인자로서의 유의성이 확인되었고, Kaplan-Meier 생존
곡선상 3년 무병생존율에서 의미있는 결과를 나타냈던 bcl-2는
비록 hazards ratio가 1보다 작아 발현되는 경우가 발현되지 않
는 경우보다 재발률이 떨어지는 것으로 보이나 다변량 분석상 통
계적인 유의성은 없었다($p=0.161$). Cyclin D1 역시 통계적인 유

의성은 없어($p=0.562$), cyclin D1과 bcl-2는 3년 무병생존율에 영향을 미치는 독립적인 예후인자로서의 가치는 떨어지는 것으로 생각된다. 본 연구의 결과에서는 종양의 크기나 나이 같은 기존의 독립적인 예후 인자가 다변량 분석상에서는 유의성을 보이지 않았는데, 이는 연구에서 대상이 된 환자의 수가 충분치 않은 점, 추적 관찰 기간이 짧은 점, 50명의 환자에서 조직학적 등급의 결과가 미비한 점, 생존율이 아닌 무병생존율로 예후를 확인한 점 등의 미흡한 점에 의한 결과의 한계점이라 생각되며 추후 대규모의 무작위 대조연구(large randomized & controlled study) 등을 통해 확인되어야 할 부분이라 생각된다.

서론에서 언급했던 가정처럼 본 연구에서는 cyclin D1과 bcl-2의 높은 상관관계를 보여주고 있다($p=0.002$). 앞서 말했듯이 유방암에서 cyclin D1과 bcl-2 사이의 상관관계에 대한 임상논문은 거의 확인할 수 없었다. Lin 등(10)의 연구에 따르면, cyclin D1 발현에는 세포외간질(extracellular matrix)에의 세포 응착(cell adhesion)에 의해 발현되는 focal adhesion kinase (FAK)가 필수적이며, bcl-2 단백질은 세포자멸사를 지연시킴으로써 세포 간의 간격이 줄어들어 세포간 응착을 심화시키고 이에 의해 FAK를 활성화시켜 cyclin D1 발현을 가속화하리라는 가정에 실험을 진행한 결과, 세포 응착과는 관계없이 bcl-2는 cyclin D1 promoter와 FAK를 활성화시켜 cyclin D1 발현을 촉진하는 것으로 보고되었다. 이는 유방암에서 세포 응착과 관계없는 독립적인 bcl-2에 의한 cyclin D1의 활성화 기전이 있음을 보여주고 있으며 유방암에서 두 지표가 대표하는 세포의 증식과 세포자멸사 억제 간의 연관성을 생각하게 해준다.

Cyclin D1과 bcl-2의 상호 간의 높은 연관관계와 함께 임상병리학적 인자들과의 연관성을 살펴보면 공통적으로 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체 발현과의 높은 상관관계를 확인할 수 있었는데 이는 cyclin D1이나 bcl-2가 모두 에스트로겐 등의 호르몬 및 호르몬 수용체와 깊은 관련이 있다는 많은 연구 결과를 반영하고 있다.(12,13,19-21) 두 인자 모두 좋은 예후와 관련된 호르몬 수용체 발현과 연관성이 높다는 특징과 함께 두 인자의 발현이 좋은 예후 인자일 수 있다는 연구를 기초로, (11) 본 연구에서 cyclin D1과 bcl-2에 대해 3년 무병생존율을 확인한 결과 bcl-2에서만 의미있는 결과를 보였다. 이러한 결과를 토대로 cyclin D1과 bcl-2의 발현조합이 임상병리학적 가치가 있을 수 있는지에 대해 비교, 분석하였고 두 인자의 발현조합은 기존의 예후인자인 종양의 크기, 조직학적 등급, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, c-erbB-2와의 연관성을 보여주었다. 호르몬 수용체 발현은 두 인자가 모두 양성인 cyclin D1(+)/bcl-2(+인) 군에서 높은 유의성을 보였으며, 또한 bcl-2(+인) 환자군 중에서만 비교 시 cyclin D1(-)인 군보다 (+)인 군에서 통계적으로 유의하게 호

르몬 수용체 발현이 증가되는 결과를 보였다. 비록 50명의 환자에서 결과가 미비하였지만 좋은 조직학적 등급 역시 cyclin D1(+)/bcl-2(+인) 군에서 유의하게 높게 발현되었고 종양의 크기는 cyclin D1(-)/bcl-2(+인) 경우에 작은 크기가 많은 것으로, c-erbB-2는 cyclin D1(+)/bcl-2(-)인 경우 높게 발현되는 소견이 보였다. 두 인자가 모두 음성인 환자군과 모두 양성인 환자군의 3년 무병생존율을 분석한 결과 비록 양성인 군에서 음성보다 적은 재발률을 보이는 하나 통계학적으로 유의한 결과는 보이지 않았다($p=0.061$). 비록 본 연구에서 통계학적 유의성은 없었으나 기존의 예후인자와의 의미있는 관계를 보았을 때 cyclin D1 및 bcl-2 각각뿐 아니라 두 단백질의 발현과 예후와 관련된 좀 더 대규모의 무작위 대조연구들이 필요할 것으로 생각된다.

결론

침윤성 유방암으로 진단받고 수술을 시행받은 후 추적 관찰이 가능했던 342명을 대상으로 cyclin D1과 bcl-2의 발현을 및 연관성, 임상병리학적 인자와의 상관관계 등을 비교하여 본 결과 cyclin D1과 bcl-2는 모두 호르몬 수용체의 발현과 관계가 있었다. 또한 bcl-2는 종양의 크기가 작을수록, 조직학적 등급이 좋을수록, p53 단백질과 c-erbB-2가 음성일수록 잘 발현되는 특징을 보였다. Bcl-2가 양성이었던 유방암은 3년 무병생존율에서 더 좋은 결과를 보여 유방암 환자의 예후 예측에 도움을 줄 것으로 생각되나, 다변량 분석의 결과를 종합해볼 때 cyclin D1과 bcl-2 모두 독립적인 예후인자로서의 가치는 떨어지는 것으로 나타났다.

본 연구는 세포 증식과 세포자멸사 억제에 대표되는 cyclin D1과 bcl-2의 연관성에 관한 실험연구를 토대로 임상적으로 접근하였고 cyclin D1과 bcl-2 단백질 발현 사이의 의미있는 연관관계가 확인되었다. 이는 유방암의 발생 및 진행과정에서 세포의 증식과 세포자멸사 억제 간의 연관가능성을 생각하게한다. Bcl-2가 세포응착과 관계없이 cyclin D1을 활성화시키는 독립적인 경로가 있다는 보고에 대해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각되며, cyclin D1과 bcl-2 각각뿐 아니라 이 두 단백질의 발현조합에서 예후 인자로서의 가능성을 확인하기 위한 대규모의 무작위 대조연구 등도 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Dowdy SF, Hinds PW, Louie K, Reed SI, Arnold A, Weinberg RA. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. Cell 1993;73:499-511.
2. Bartkova J, Lukas J, Muller H, Luthoft D, Strauss M, Bartek J.

- Cyclin D1 expression and function in human breast cancer. *Int J Cancer* 1994;57:353-61.
3. Zukerberg LR, Yang WI, Gadd M, Thor AD, Koerner FC, Schmidt EV, et al. Cyclin D1 (PRAD1) protein expression in breast cancer: approximately one-third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene. *Mod Pathol* 1995;8:560-7.
 4. Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:5214-8.
 5. Lu QL, Abel P, Foster CS, Lalani EN. Bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Human Pathol* 1996;27:102-10.
 6. Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG, Benini E, Boracchi P, Mezzetti M, et al. The bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:499-504.
 7. Zhang G, Tsuda H, Adachi I, Fukutomi T, Yamamoto H, Hirohashi S. Value of cancer-related oncoprotein expression as prognostic factors in breast cancers with one to three axillary lymph nodes positive. *Jpn J Cancer Chemother* 1996;23:66-74.
 8. Gee JM, Robertson JF, Ellis IO, Willsher P, McClelland RA, Hoyle HB, et al. Immunocytochemical localization of bcl-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. *Int J Cancer* 1994;59:619-28.
 9. Joensuu H, Pylkkanen L, Toikkanen S. Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer. *Am J Pathol* 1994;145:1191-8.
 10. Lin HM, Lee YJ, Li G, Pestell RG, Kim HR. Bcl-2 induces cyclin D1 promoter activity in human breast epithelial cells independent of cell anchorage. *Cell Death Differ* 2001;8:44-50.
 11. Arýkk AT, nal B, Han . Expressions of cyclin D1, p53, bcl-2, and bax in infiltrative ductal carcinoma of the breast: correlations with clinicopathologic characteristics. *Breast J* 2006:391-2.
 12. Zhang SY, Caamano J, Cooper F, Guo X, Klein-Szanto AJ. Immunohistochemistry of cyclin D1 in human breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1994;102:695-8.
 13. van Diest PJ, Michalides RJ, Jannink L, van der Valk P, Peterse HL, de Jong JS, et al. Cyclin D1 expression in invasive breast cancer. Correlations and prognostic value. *Am J Pathol* 1997;150:705-11.
 14. Musgrove EA, Hamilton JA, Lee CS, Sweeney KJ, Watts CK, Sutherland RL. Growth factor steroid and steroid antagonist regulation of cyclin gene expression associated with changes in T-47D human breast cancer cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 1993;13:3577-87.
 15. Lim SC. Role of COX-2, VEGF and cyclin D1 in mammary infiltrating duct carcinoma. *Oncol Rep* 2003;10:1241-9.
 16. Lebeau A, Unholzer A, Amann G, Kronawitter M, Bauerfeind I, Sendelhofert A, et al. EGFR, HER-2/neu, cyclin D1, p21 and p53 in correlation to cell proliferation and steroid hormone receptor status in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 2003;79:187-98.
 17. Hwang TS, Han HS, Hong YC, Lee HJ, Paik NS. Prognostic value of combined analysis of cyclin D1 and estrogen receptor status in breast cancer patients. *Pathol Int* 2003;53:74-80.
 18. Michalides R, Hageman P, van Tinteren H, Houben L, Wientjens E, Klomp maker R, et al. A clinicopathological study on overexpression of cyclin D1 and p53 in a series of 248 patients with operable breast cancer. *Br J Cancer* 1996;73:728-34.
 19. Leek RD, Kaklamanis L, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. Bcl-2 in normal human breast and carcinoma, associated with estrogen receptor-positive, epidermal growth factor-negative tumors and in situ cancer. *Br J Cancer* 1994;69:135-9.
 20. Park SH, Kim H, Song BJ. Down regulation of bcl2 expression in invasive ductal carcinomas is both estrogen- and progesterone-receptor dependent and associated with poor prognostic factors. *Pathol Oncol Res* 2002;8:26-30.
 21. Kang HJ, Kim SW, Yun YK, Oh SK, Choe KJ, Noh DY. Expression of p53, c-erbB2, bcl-2, cathepsin D in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *J Breast Cancer* 2001;4:144-51.
 22. Wang TT, Phang JM. Effects of estrogen on apoptotic pathways in human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Res* 1995;55:2487-9.
 23. Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croce CM. Down regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res* 1994;54:2095-97.
 24. Hellemans P, van Dam PA, Weyler J, van Oosterom AT, Buytaert P, van Marck E. Prognostic value of bcl-2 expression in invasive breast cancer. *Br J Cancer* 1995;72:354-60.
 25. Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tungekar MF, Dunnill MS, Pierce CB, et al. Bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 1993;329:690-4.
 26. Hurlimann J, Larrinaga B, Vala DL. Bcl-2 protein in invasive ductal breast carcinomas. *Virchows Arch* 1995;426:163-8.