

유방암 환자의 혈액 및 암조직에서 생물학적 치료의 Target으로서 Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA), uPA Receptor, Plasminogen Activator Inhibitor-1의 발현

연세대학교 의과대학 ¹연세 암센터, ²내과학교실,
³외과학교실, ⁴병리학교실, ⁵노원 을지병원 내과

라선영^{1,2} · 박준오^{1,2} · 공수정⁵ · 박세호³ · 유내춘^{1,2} · 양우익⁴
노재경^{1,2} · 민진식^{1,3} · 이경식³ · 김병수¹ · 정현철^{1,2}

Clinical Relevance of Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA), uPA Receptor, Plasminogen Activator Inhibitor-1 Co-expression from Tissue and Serum of Breast Cancer as Targets of Biotherapy

Sun Young Rha, M.D.^{1,2}, Joon Oh Park, M.D.^{1,2}, Soo Jung Gong, M.D.⁵
Se Ho Park, M.D.³, Nae Choon Yoo, M.D.^{1,2}, Woo Ick Yang, M.D.⁴
Jae Kyung Roh, M.D.^{1,2}, Jin Sik Min, M.D.^{1,3}
Kyong Sik Lee, M.D.³, Byung Soo Kim, M.D.¹
and Hyun Cheol Chung, M.D.^{1,2}

¹Yonsei Cancer Center, Departments of ²Internal Medicine,
³General Surgery, ⁴Pathology, Yonsei University College of Medicine;
⁵Department of Internal Medicine, Eulji Medical Center, Seoul, Korea

Purpose: We measured and compared the uPA, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and uPA receptor (uPAR) levels in breast cancer tissues and blood of the patients to evaluate their clinical relevance for biotherapy.

Materials and Methods: uPA, PAI-1 (Monozyme, Netherland), uPAR (American Diagnostics, USA) levels were measured by ELISA assay in 192 breast cancer tissues, in 18 normal breast tissues and in 163 blood from breast cancer patients.

Results: There was a tendency of uPA increment from ductal carcinoma *in situ* while increment of PAI-1 and uPAR occurred from T₁. With the progression of cancer, uPA, PAI-1, uPAR tended to decrease; however, the uPA/uPAR, uPA/PAI-1 ratios remained unchanged. There was a correlation of uPA expression between normal and cancer tissues ($\gamma^2=0.49$). Correlation of uPA and PAI-1 was found in normal tissue and

책임저자 : 정현철, 서울시 서대문구 신촌동 134, CPO Box 8044, 연세대학교 의과대학 연세 암센터, 120-752

Tel: 82-2-361-7652, Fax: 82-2-393-3652, E-mail: unchung8@yumc.yonsei.ac.kr

이 논문은 1997년 한국학술진흥재단 학술연구조성비로 지원되었음.

접수일 : 1998년 12월 2일, 게재승인일 : 1999년 3월 18일

stage I cancer tissue while correlation of uPAR and PAI-1 was found with cancer progression. Between cancer tissue and blood significant correlations were found in uPA, PAI-1, uPAR levels.

Conclusion: uPA, PAI-1, uPAR levels in cancer tissue elevated from the early stage maintaining correlative expressions with cancer progression. A positive correlation between cancer tissue and blood level suggested the applicability of the levels of uPA, PAI-1 or uPAR for detecting patients for biotherapy.

Key Words: uPA, uPAR, PAI-1, Breast cancer, Tissue, Blood

서 론

보건복지부의 통계에 따르면 우리나라의 유방암 발생빈도(12.5%)는 여성암중 자궁경부암(22.1%), 위암(15.4%)에 이어 세 번째로 많이 발생한다(1). 전향적 연구에 의하면 유방암은 수술후 조기에 보조 치료를 시행함으로써 10%정도 장기생존율이 증가되었다(2,3). 그러나 약물 치료에도 불구하고 여전히 재발하는 환자 군이 있어, 보다 강력한 항암제를 사용하거나(4), 새로운 예후인자의 발견(5), 혹은 새로운 치료 개념의 도입(6) 등이 연구되고 있다.

유방암 수술후 보조치료를 시행할 대상환자를 선정하는 기준이나, 치료후 재발률이 높은 고위험도군을 선정하는 기준으로 응용이 가능한 종양표지자(biological end-point)를 개발하거나, 이 종양표지자를 억제하는 생물학적 치료를 개발하는 것은 임상적으로 매우 중요한 과제이다. 유방암에서 현재까지 연구된 예후인자는 1) 종양분화인자(에스트로젠 수용체, 프로세스테론 수용체, DNA ploidy) 2) 종양 악성도(종양성장인자, p53 유전자 돌연변이, neu 암 유전자 발현) 3) 종양침윤성(임파절 전이 정도, cathepsin D, laminin) 4)종양증식능(S-phase, thymidine kinase, topoisomerase)등이 있다. 이러한 예후인자들 중에서 임상적으로는 임파절 전이 정도가 가장 대표적 인자로 사용되고 있다.

암 세포주를 통한 연구에서 암의 침윤과 전이

과정에는 여러 가지 단백질효소와 그 억제물질이 복합적으로 작용함이 규명되었다. 그리고 암 조직에서 uPA가 증가시에는 환자의 예후가 불량함이 폐암(7), 대장암(8), 위암(9) 및 유방암(10)에서 관찰되었으며, 유방암에서는 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)의 발현과 tamoxifen 치료 효과와의 상관성도 관찰되었다(11). 그리고 대장암(12) 난소암(13), 간암(14)에서는 혈액내의 uPA, PAI-1 및 urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR)가 증가됨도 보고되었다. 특히 uPA가 유방암에서 신생혈관생성을 유도함이 확인되어(15), uPA 자체가 과생성된 uPA와 PAI-1를 혈관내로 유입시키는 통로를 형성할 가능성도 제시되었다. 그러나 이들 연구결과에서는 정상조직에 비해 암 조직에서 uPA계(uPA, PAI-1, uPAR)가 증가됨만 확보되었으며, 암의 진행 병기에 따른 uPA, PAI-1, uPAR의 발현 변화에 대한 연구결과는 아직 없다. 현재는 uPA계를 억제하는 약제를 개발함으로써 암의 전이를 억제하는 연구도 광범위하게 시행되며 이들 제제는 암세포를 직접살해하는 것이 아니고 증식을 억제하거나 전이를 억제하는 제제들이다.

이와같이 생물학적 활성을 선택적으로 억제하는 약제는 모든 암환자에서 효과적이기보다는 공격대상이되는 활성이 발현되는 환자에게 선택적으로 투여시에 보다 효과적으로 암의 증식과 전이를 억제할것으로 기대된다. 따라서 본 연구에서는 한국의 유방암 환자 암 조직에서 암 병기의 진행에 따른 uPA계의 발현을 조사하여 uPA계를 조

절하는 생물학적 치료가 필요한 대상 환자를 선정할 수 있는지 그 가능성을 조사하고, 아울러 기존의 예후인자들과 이들과의 상관성을 비교하여 임상적 응용성을 조사하였다. 마지막으로 유방암 환자의 혈장내 uPA계를 측정하고 조직에서의 발현과 직접 비교함으로써 혈장을 이용하여 보다 간편하고 용이하게 임상적으로 적용할 수 있는지를 검토하였다.

대상 및 방법

1) 대상

1994년 1월부터 1996년 12월까지 연세의료원 및 연세 암센터에 내원하여 조직학적으로 유방암으로 진단된 후 암 조직과 혈액이 조직은행에 보관된 환자 192예를 대상으로 하였다. 이 중 18예의 환자에서는 정상 유방조직을 채취하여, uPA와 PAI-1을 측정하였으며, 163예의 환자에서는 혈액을 채혈하여 uPA, PAI-1, uPAR을 측정하였다. 대상환자의 중앙연령은 48세(범위 25~65세)였으며, 7예는 원격장기에 전이가 있어 수술을 시행하지 못하고 조직검사만 시행하였다. 환자의 중앙추적 관찰기간은 37개월(범위 6~66개월)이었다. 그외 환자의 임상적 특성은 Table 1과 같다.

2) 방법

(1) **혈액채취:** 혈액은 수술전 말초혈액을 heparinized 시험관에 채취하고 혈장을 분리한 다음 섭씨 영하 80°C에 보관하면서 실험하였다.

(2) **조직 세포질 준비:** 호르몬 수용체를 추출하는 방법을 응용하여 채취하였다. 간략하면, 조직 250 mg을 분쇄시킨후 ultracentrifuge 시험관에서 균질화 용액을 사용하여 10배 희석시켰다. 균질화기로 조직을 5초 이내에 균질화한 다음 4°C에서 1시간 동안 100,000 x g로 원심분리시켰다. 상층액(세포질)을 채취하여 uPA와 PAI-1을 측정하였다. 침전물(pellet)은 4°C의 완충용액(20 mM Tris-HCl pH 8.5, 125 mM NaCl, 1% Triton X-100) 1 ml에 용해시킨 다음 4°C, 105,000 x g에서 45분간 원심

분리하여 침전 추출물(pellet extract)을 얼음위에 설치한 실험관으로 옮기고(16), 단백질량은 Lowry 방법(17)으로 정량한 다음 uPAR을 측정하였다.

① **용액준비;** Stock buffer는 1.211 g tris, 0.588 g EDTA, 1.21 g sodium molybdate를 800 ml의 증류수에 용해시킨후, 실온에서 HCl을 이용하여 pH를 7.5로 맞추고 증류수를 첨가하여 총용량이 1L가 되게한 다음 2~8°C에 보관하면서 사용하였다. Homogenization buffer는 실험당일 stock buffer에 monothioglycerol (MTG)을 첨가하여 최종농도가 1 mM이 되게한 후 사용하였다. 먼저 농축된 MTG를 증류수를 사용하여 1 : 10으로 희석시킨후 50 ml의 stock buffer에 희석된 MTG 50 ml을 첨가하여 잘 혼합하고 2~8°C에 보관하면서 사용하였다. Coating buffer는 1.59 g Na₂CO₃, 2.93 g NaHCO₃를 950 ml의 증류수에 용해시킨후 pH를 9.6으로 조절하고 최종용량을 1 L로 맞추어 사용하였다. Washing buffer는 29.2 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.2 g KH₂PO₃·2H₂O 950 ml의 증류수에 용해시킨후 NaOH를 이용하여 pH를 7.2로 조절한 다음 용량을 1 L가 되게하여 사용하였다. Dilution buffer는

Table 1. Patient characteristics

Age (years)	
median	48
range	25~65
T factor	
T0	6
T1	26
T2	130
T3	22
T4	8
N factor	
N0	99
N1	83
N2	10
Stage 0	6
I	19
II	134
III	26
IV	7

10 g의 bovine serum albumin을 증류수 1 L에 용해시켜 사용하였다. Color buffer는 7.3 g citric acid H₂O, 11.86 g Na₂HPO₄·2H₂O를 950 ml의 증류수에 용해시킨후 pH를 5.0으로 조절한 다음 증류수를 첨가하여 최종용량이 1 L가 되게하여 사용하였다.

② uPA-1, PAI-1, uPAR ELISA assay; Coating 항체는 마우스 단클론항체(Monozyme, Denmark, uPA과 PAI-1; American Diagnostics, USA, uPAR)를 사용하였고, detecting 항체는 biotinylated 단클론 항체를 사용하였다. 발색은 horseradish peroxidase (HRP) conjugated streptavidin과 orthophenyldiamine을 사용하였다. 표준시료는 인형 재조

합 uPA, PAI-1 (Monozyme, Denmark), uPAR(American Diagnostics, USA)을 사용하였다. 본 연구에서 사용한 uPA에 대한 단클론 항체는 single chain, two-chain uPA를 모두 감지할 뿐 아니라 uPA/PAI-1 complex도 감지한다. PAI-1에 대한 항체 역시 free active PAI-1과 inactive PAI-1, PAI-1/uPA complex를 모두 감지한다. 방법을 간략하면, coating 항체를 coating buffer로 희석한 후, 100 µl씩을 각각 well에 분주하고 4°C에서 밤새 방치하였다. Washing buffer로 세척한 다음 200 µl의 dilution buffer로 20°C에서 30분간 반응시킨 다음 3회 세척하였다. 100 µl의 검체를 각 well에 분주하고

Table 2. Levels of uPA, PAI-1 and uPAR in cancer and normal tissues

	Normal tissue (n=18)	Cancer tissue (n=192)	p-value
uPA (pg/mg protein)	150 ± 122	168 ± 139	0.59
PAI-1 (pg/mg protein)	92 ± 50	215 ± 179	0.004
uPAR (ng/mg protein)	—*	3.1 ± 1.6	—*
uPA/PAI-1 ratio	1.7 ± 1.0	1.5 ± 2.5	0.34
uPA/uPAR ratio	—*	67.6 ± 63.4	—*

*: not checked

Table 3. Levels of uPA, PAI-1, uPAR based on clinical stages

	uPA (pg/mg protein)	PAI-1 (pg/mg protein)	uPAR (ng/mg protein)	uPA/PAI-1 ratio	uPA/uPAR ratio x 1000
T-factor					
T0	196 ± 140	167 ± 106	2.8 ± 1.4	1.5 ± 1.5	77 ± 47
T1	187 ± 205	267 ± 261	3.5 ± 2.1	1.2 ± 1.2	68 ± 66
T2	169 ± 127	204 ± 163	3.1 ± 1.5	1.6 ± 2.9	70 ± 68
T3	160 ± 131	290 ± 184	3.1 ± 1.8	1.5 ± 1.6	59 ± 43
T4	90 ± 47	274 ± 142	2.9 ± 1.6	0.4 ± 0.3	46 ± 41
N-factor					
N0	163 ± 126	221 ± 183	3.3 ± 1.7	1.5 ± 3.2	62 ± 56
N1	182 ± 156	216 ± 181	3.0 ± 1.6	1.4 ± 1.4	76 ± 72
N2	110 ± 88	145 ± 113	2.7 ± 1.2	1.5 ± 2.8	55 ± 52
Stage 0					
I	221 ± 153	171 ± 108	3.3 ± 1.6	1.9 ± 1.9	77 ± 44
II	151 ± 144	227 ± 203	3.2 ± 1.5	1.0 ± 0.9	54 ± 52
III	172 ± 129	218 ± 187	3.2 ± 1.7	1.6 ± 2.8	69 ± 66
IV	169 ± 194	193 ± 150	2.8 ± 1.2	1.6 ± 2.1	66 ± 59
IV	108 ± 61	223 ± 111	1.9 ± 0.9	0.5 ± 0.2	80 ± 67

20°C에서 1시간 반응하였다. 3회 세척후 기질 용액을 각 well에 분주한 다음 빛을 차단한 상태에서 30분간 반응시켰다. 1 M H₂SO₄, 100 μl를 각 well에 분주하여 반응을 정지시키고, 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. Intra- 및 inter-assay variation은 10% 미만이었다. 암 조직내 uPA와 PAI-1 발현의 양성기준은 정상조직에서 발현되는 uPA와 PAI-1의 평균+2×표준편차 이상인 경우로 정하였다. uPAR은 정상조직의 값이 없어 암조직에서 발현되는 값의 중앙값 이상인 경우를 uPAR의 발현증가 군으로 정하였다.

③ 병리학적 병기; 암의 침윤도, 임파절 전이 여부, 병기 및 분화도를 조사하였으며, 병리학적 병기는 AJCC 기준(18)에 의하였다.

④ 통계학적 처리; 정상조직과 암조직의 uPA, PAI-1 값의 비교는 paired t-test를 이용하여 two-sided p-value 0.05 이하를 유의하게 정하였으며, 상관성은 Pearson's correlation으로 구하였다. 기존에후인자들과의 상관성은 Mann-Whitney U 검정을 이용하였다.

결 과

1) 정상 유방조직과 유방암 조직에서 uPA와 PAI-1의 발현

정상 유방조직에 비해 유방암 조직에서 uPA의 발현에는 큰 차이가 없었으나, PAI-1의 발현은 증가하였다(Table 2).

2) 임상적 병기에 따른 유방암 조직의 uPA, uPAR, PAI-1의 발현 변화

uPA, PAI-1, uPAR 발현의 절대값은 암이 진행할수록 감소하는 경향이었으나 그 시기는 서로 다르게 관찰되었다(Table 3). uPA는 정상조직에 비해 DCIS에서 그 발현이 증가하였다가 종양의 크기가 증가할수록 발현이 감소하는 경향이였다(Fig. 1A). 반면, PAI-1과 uPAR은 T₁에서부터 증가하였다가 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 PAI-1의 발현은 종양의 크기보다는 임파절 전이 정도

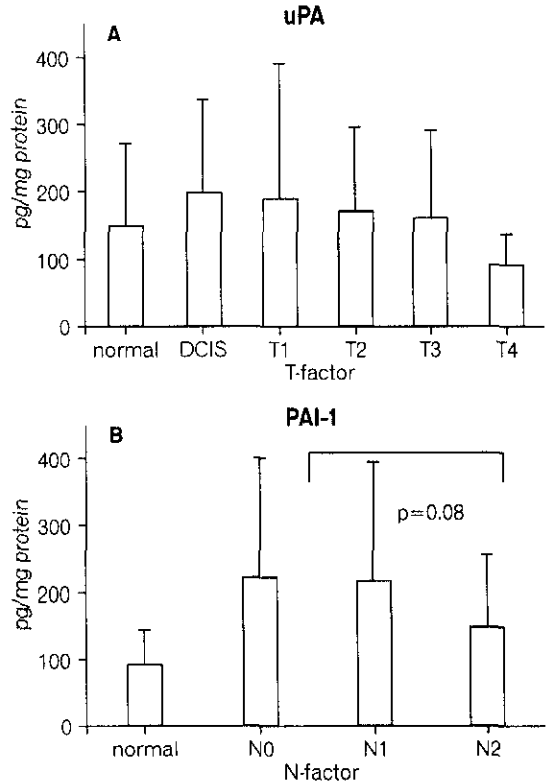


Fig. 1. Changes of uPA, PAI-1 levels according to clinical stages

와 상관성이 관찰되어 임파절 전이가 증가할수록 감소하는 경향이였다(p=0.08)(Fig. 1B). uPA와 PAI-1의 암조직내 양성율을 비교시, uPA의 양성율 역시 DCIS에서부터 증가후 감소하는 경향인 반면 PAI-1의 양성율은 T₁에서부터 증가하는 경향이였다. uPAR의 증가율도 T₁에서부터 증가하였다(Table 4).

3) 정상 및 유방암 조직에서 uPA, uPAR, PAI-1의 상관성 비교

정상조직에서는 uPA와 PAI-1의 발현에서만 상관성이 관찰되었다 ($\gamma^2=0.88$)(Fig. 2A). 정상조직과 유방암 조직을 비교시에는 uPA의 발현에서만 두 군사이의 상관성이 관찰되었다($\gamma^2=0.49$, Fig. 2B). 반면 유방암 조직에서는 PAI-1과 uPAR 사이에서만 상관성이 관찰되었다($\gamma^2=0.36$, Fig. 2C).

Table 4. Positivity rate of uPA, PAI-1 and increased expression rate of uPAR in cancer tissues according to clinical stages

	uPA (%)	PAI-1 (%)	uPAR (%)
T factor			
0	1/6 (17%)	2/6 (33%)	2/6 (33%)
1	3/26 (12%)	13/26 (50%)	16/26 (62%)
2	12/130 (9%)	51/130 (39%)	67/127 (53%)
3	2/22 (9%)	9/22 (41%)	10/21 (48%)
4	0/8 (0%)	6/8 (75%)	4/8 (50%)
N factor			
0	9/99 (9%)	41/99 (41%)	55/97 (57%)
1	9/83 (11%)	38/83 (46%)	40/82 (49%)
2	0/10 (0%)	2/10 (20%)	4/9 (44%)
Metastatic node number			
0	9/99 (9%)	40/99 (40%)	55/97 (57%)
1~3	5/39 (13%)	16/39 (41%)	22/39 (56%)
4~9	3/25 (12%)	12/25 (48%)	14/25 (56%)
≥ 10	1/22 (5%)	9/22 (41%)	6/20 (30%)

*positivity rate of uPA and PAI-1: greater than mean $\pm 2 \times$ S.D., increased expression rate of uPAR: greater than median uPAR value (Material and methods 참조)

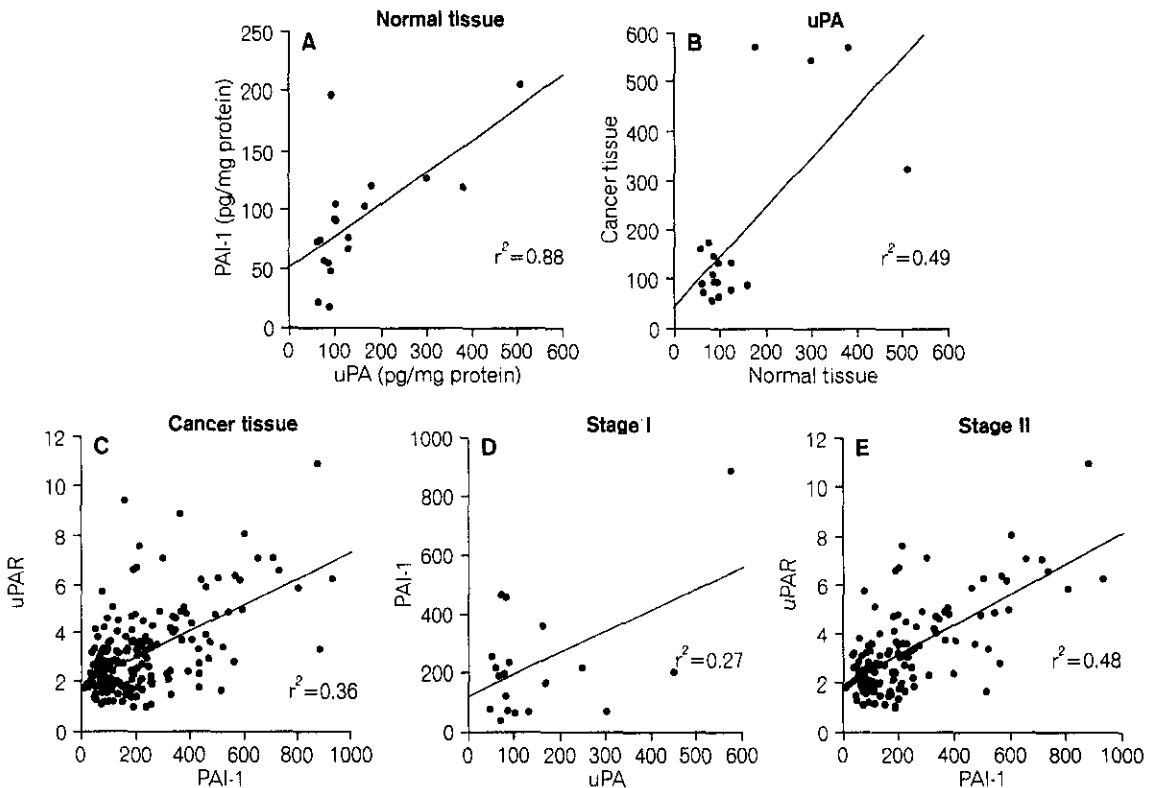


Fig. 2. Correlation of uPA, PAI-1, uPAR between normal and cancer tissues

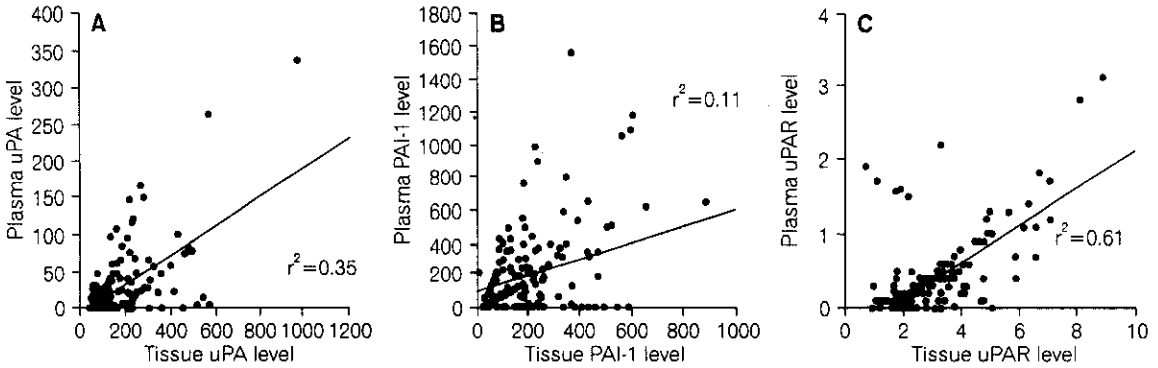


Fig. 3. Correlation of uPA, PAI-1, uPA levels between tissue and plasma

특히 병기별 비교시 병기 I에서는 uPA와 PAI-1의 발현에 상관성이 없었으나(Fig. 2D), 병기 II에서는 PAI-1과 uPAR의 발현에서 상관성이 관찰되었다(Fig. 2E).

4) 유방암 조직과 혈액에서 uPA, uPAR, PAI-1의 상관성 비교

혈액과 조직에서의 상관성은 uPAR이 가장 높게 관찰되었으며($\gamma^2=0.61$, Fig. 3A), uPA($\gamma^2=0.35$, Fig. 3B), PAI-1($\gamma^2=0.11$, Fig. 3C)의 순서였다.

5) uPA, uPAE, PAI-1의 발현에 따른 재발률 비교

추적기간이 짧아 32예(16.7%)에서 재발하여 충분한 비교를 하기 어려웠으나 비교적 초기 병기에서 PAI-1의 발현 양성시에 재발이 증가하는 경향이였다. 즉, T₁의 경우 PAI-1 음성 13예에서는 재발 예가 없었던 반면, 양성인 13예중 3예(23.1%)에서 재발하였다(p=0.07). 병기 I에서도 PAI-1 발현이 음성이었던 10예에서는 재발 예가 없었으나 양성이었던 9예중 3예(33%)가 재발하였다(p=0.08).

고 찰

암의 침윤과 전이는 암조직의 증식을 제한하고 있는 기저막을 파괴시키고, 주위 결체 조직과 혈류 또는 임파선을 따라 암세포가 퍼져나가는 일

련의 과정을 통하여 이루어진다. 이 과정은 기저막과 기질을 구성하고 있는 단백질들의 peptide 결합을 비가역적으로 파괴하는 단백 분해효소에 의해 이루어지며, 암 세포는 이 단백 분해효소를 생산하여 조직에 대한 침투력을 갖게 된다. 단백 분해효소들중 plasmin은 fibrin clot을 용해시키며, 세포외 기질을 파괴하고, 비활성화 형태의 다른 효소와 호르몬 등을 활성화 형태로 변환시켜 태아의 발생, 상처 치유, 배란 등에 관여할 뿐 아니라 암 세포의 침윤과 전이에도 관여하는 것으로 밝혀졌다(19). uPA는 단쇄구조(single-chain)의 비활성형인 zymogen (pro uPA)형태로 분비되며, 세포표면의 수용체와 결합한 후 섬유소용해효소에 의해 활성형인 복쇄구조(two-chain)의 uPA로 생성되는 정제어고리(positive feedback loop)에 의해 활성화가 조절된다. 또한 uPA의 단백분해능은 인체 내의 억제물질(natural inhibitor)인 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)과 PAI-2에 의해 조절된다(20). PAI-1은 유리형(free form)의 uPA와 혹은 수용체와 결합한 uPA를 모두 억제시키며, uPA/PAI-1 복합체의 세포내로 이동과 파괴는 uPA 수용체와의 결합에 의해 조절된다(21). 따라서 암조직에서는 uPA와 PAI-1의 불균형이 발생하면 침윤도 및 전이능이 증가한다. uPA의 세포표면 수용체(분자량: 55,000~60,000)는 섬유아세포, 단핵세포와 대식세포, 바이러스에 의해 형질전환된 세포, 섬유성 육종, 상피 세포암에서 주로 발견된다. 이 수

용체는 단쇄 또는 복쇄구조의 uPA 모두와 결합하지만 구조적으로 성장인자 영역(domain)을 갖는 A 사슬과 결합하여야 상피 세포암의 증식이 유발되는데, 이 결과로 미루어 암세포들은 많은 양의 uPA를 생성, 분비하여 자기자극(autocrine) 경로에 의해 성장을 촉진시키며 아울러 전이 능력을 증강시킬 수 있다.

본 연구결과 유방암 조직내 uPA, uPAR, PAI-1 발현의 개인차는 매우 다양하였다. uPA는 유방암 조직에서 정상조직에 비해 증가한 경향만 관찰된 반면, PAI-1은 암조직에서 발현이 현저하게 증가하였다. 이러한 결과는 저자들이 위암에서 관찰한 결과와 유사하였다(22). 위암의 경우 암조직에서 정상조직에 비해 uPA의 발현이 보다 증가하였으나 그 정도는 유방암에서 관찰된 바와 같이 PAI-1의 증가에는 미치지 못하였다. 또한 저자들은 위암과 유방암 조직을 이용하여 동일한 방법에 의해 연구를 시행하였음에도 불구하고 uPA와 PAI-1의 발현정도는 유방암과 위암에서 서로 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 이와같은 연구결과와의 차이는 암조직과 주위조직과의 상호작용(paracrine pathway)이 위암에서 더 활성화되어 있음을 의미한다 하겠다. 따라서 암조직에서 정상조직에 비해 증가되어 uPA와 PAI-1의 발현이 증가되는 유형은 위암과 유방암에서 공통으로 관찰되는 현상이나, 그 발현의 증가정도는 주위 미세환경의 영향을 받을 것으로 판단하였다. 본 연구에서는 정상조직의 세포질이 충분하지 못하여 정상조직의 uPAR 값을 조사하지 못하였고, 따라서 정상조직과 암조직에서 uPAR의 변화는 조사할 수 없었다.

암조직에서 임상적 병기변화에 따른 uPA, PAI-1, uPAR의 변화를 조사하였다. uPA의 경우 암 진행의 초기엔 ductal carcinoma in situ (DCIS)에서부터 정상보다 증가하는 경향이 관찰되었으며, 이는 위암의 경우 조기위암에서부터 증가되었던 소견(22)과 동일하였다. 반면 PAI-1과 uPAR은 T₁ 병기부터 즉, 기저막 용해가 발생한 이후부터 증가하는 경향이 관찰되어 이들의 발현시기가 암의 진행시기에 따라 서로 다른 가능성을 확인할 수 있

었다. 위암에서 관찰되었던 소견과 상이한 점은 위암에서의 T 병기가 진행하여도 uPA와 PAI-1의 발현에는 차이가 없었던 반면 유방암에서는 T 병기가 진행함에 따라 uPA, uPAR, PAI-1의 발현이 감소하여 이들의 변화가 주로 유방암 진행의 초기에 발생함을 확인하였다. 그러나 uPA/PAI-1과 uPA/uPAR의 비값은 T 병기가 진행함에도 큰 차이가 없어 실제 작용하는 활성비에는 큰 차이가 없었다. 이상의 관찰된 소견을 종합하면 DCIS에서부터 uPA의 발현이 증가되고 이에 따라서 T₁ 병기에서부터는 PAI-1과 uPAR의 발현이 증가하나 T 병기가 진행할수록 전체 발현도는 감소하는 반면 uPA/PAI-1과 uPA/uPAR의 균형은 지속적으로 유지되고 있음을 알 수 있었다. 특히 PAI-1과 uPAR의 변화는 T 병기보다는 N 병기 및 병리학 적 병기와 보다 잘 일치하였다. 즉 N₂ 이상으로 병기가 진행되는 경우 이들의 발현이 감소한 바, 이들 두 인자는 전이의 초기단계에 주로 작용할 가능성을 관찰하였다. 이러한 현상은 uPA, PAI-1의 양성을 혹은 uPAR 고발현율로 비교시에도 동일하게 관찰되었다. 따라서 이들의 발현을 억제하는 치료는 주로 유방암의 초기단계에서 투여해야 보다 효과적으로일 것으로 가정할 수 있었다.

정상유방 조직과 유방암 조직사이에서 상호보완작용(reciprocal paracrine pathway)의 존재 가능성을 보다 조사하기 위해 정상조직과 암조직에서 이들의 발현을 비교하였다. uPA의 경우 동일환자에서 채취한 정상조직과 암조직에서 높은 상관성이 관찰되어, 위암에서와 마찬가지로 이의 발현에는 주위 정상조직과 상호작용이 있을 가능성을 확인할 수 있었다. 반면 PAI-1의 발현에는 상관성이 없었다. 이러한 차이는 uPA가 주로 유방조직에서 발현되는 반면, PAI-1은 유방조직 외에도 혈소판, 내피세포 등 발현장기가 다양하기 때문이거나, PAI-1이 보다 독립적인 생물학적 인자(biological factor)로 작용할 가능성을 시사한다 하겠다(23). 이점을 보다 확인하기 위하여 정상조직에서 uPA, uPAR, PAI-1의 상관성을 조사한 결과, uPA와 PAI-1의 발현에서만 상관성이 관찰되었고

이 상관성은 병기 I의 암조직에서도 동일하게 관찰되었다. 그러나 병기 II 이상 진행된 경우 uPA와 PAI-1의 상관성은 소실되는 반면, PAI-1과 uPAR의 상관성이 높게 관찰되기 시작하였다. 이 점은 병기가 진행하고 uPA의 발현에 변화가 나타나기 시작하면 uPA 활성을 조절하는 PAI-1과 uPAR이 서로 유기적으로 발현됨을 의미한다 하겠다. 따라서 이들 uPA, PAI-1, uPAR의 발현은 원발병소에 따라서 혹은 암의 진행정도에 따라, 서로 유기적 상관성을 유지하면서 발현함을 관찰하였다.

uPA, uPAR, PAI-1의 암 예후인자로서 가능성은 소화기암(24,25), 유방암(26) 등에서 보고되었다. 특히 Harvey등(27)은 종양의 외식편(explant)으로부터 plasminogen activator가 발현됨을 관찰하였고, Huber등(9)은 대장암 환자의 혈액에서 uPA가 관찰됨을 보고하여 혈액에서 관찰되는 uPA, PAI-1이 종양표지자로서 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다. 따라서 본 연구에서는 혈액에서 관찰되는 이를 인자의 유용성을 조사하기 위하여 동일한 환자의 혈액과 조직에서 uPA, uPAR, PAI-1의 값을 비교하였다. 그 결과, 위암에서와 동일하게 유방암 조직과 말초혈액 사이의 uPA값 상관성을 관찰할 수 있었다. 그리고 위암의 경우 PAI-1은 상관성이 없었으나, 유방암에서는 PAI-1과 uPAR 모두 중등도 이상의 상관성을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 차이는 위암의 경우 원발병소에서 uPA, uPAR, PAI-1이 분비된 다음 일부가 간문맥을 지난 후에 말초혈액에서 채취되는 반면, 유방조직에서 분비된 uPA, PAI-1, uPAR은 말초혈액에서 바로 채취되는 차이에서 기인할 가능성이 있다 하겠다. 따라서 유방암 환자의 혈액에서 관찰되는 uPA, PAI-1, uPAR은 조직내의 발현소견을 대변할 수 있어 추후 이들을 임상적으로 응용할 수 있을 것으로 판단된다. 그러나 여성의 혈액내에는 정상적 혈관생성이 발생하는 생리현상에 따라 이들 인자의 혈액내 소견이 변화할 수 있으므로(28), 혈액의 소견을 임상적으로 이용시에는 여성의 생리주기에 따른 보정이 반드시 필요하다 하겠다.

본 연구에서 사용한 uPA에 대한 단클론 항체는 single chain, two-chain uPA를 모두 감지할 뿐 아니라 uPA/PAI-1 complex도 감지한다. PAI-1에 대한 항체 역시 free active PAI-1과 inactive PAI-1, PAI-1/uPA complex를 모두 감지할 수 있으므로 uPA/PAI-1과 uPA/uPAR 비를 조직과 혈액에서 비교하였다. 그 결과 uPA/uPAR비는 조직과 혈액에서 상관성이 관찰되었으나 uPA/PAI-1비는 상관성을 확인할 수 없었다(자료 미제시). 이점은 혈액내의 uPAR의 발현이 PAI-1 보다는 조직내의 발현을 보다 안정되게 대변하고 있음을 의미한다 하겠다.

유방암에서 이들 인자의 예후인자로서 가치를 조사하기 위해 단변수 분석과 다변수 분석을 시행한 바, 이들이 독립적 예후인자로 관찰되지 않았으며, 병기와 임파절 전이정도가 독립적 예후인자로 제시되었다(자료미제시). 본 연구의 대상환자들에 대한 중앙 추적기간이 아직은 36개월 밖에 안되고 재발이 발생한 예도 32예에 불과하여 최종적 결론을 유도할 수는 없었다. 아울러 동일 병기에서 이를 발현차에 따른 재발률을 비교시에도 아직 의미있는 차이를 관찰할 수 없어 추후 충분한 시간이 경과후 이점에 대한 추가적 분석이 요하리라 생각된다.

결 론

유방암의 uPA, uPAR, PAI-1의 발현은 암진행의 초기에 주로 증가하였으며 그 증가시기는 다르지만 서로 상관성을 유지하면서 변화하였다. 따라서 유방암 환자에서 uPA 계의 불균형을 교정하는 생물학적 치료를 시행하고자 계획되는 수술전 혈액에서 관찰되는 uPA, uPAR, PAI-1을 이용하여 대상 환자를 선정한 다음 초기 병기 환자에서 시행시에 보다 치료효과를 증가시킬 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Cancer registry programme in Republic of Korea. Mi-

- nistry of Health and Social Affairs, Republic of Korea: 1991.
2. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy: 133 randomized trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 74,000 women. *Lancet* 1992; 339: 1-15.
 3. Bonadonna G, Valagussa P. Adjuvant systemic therapy for resectable breast cancer. *J Clin Oncol* 1985; 3: 259-275.
 4. Buzzoni R, Bonadonna G, Valagussa P, Zambetti M. Adjuvant chemotherapy with doxorubicin plus cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in the treatment of resectable breast cancer with more than three positive axillary nodes. *J Clin Oncol* 1991; 9: 2134-2140.
 5. Folkman J. Angiogenesis and breast cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12: 441-443.
 6. Djasoo T, Lippman ME, Rochefort M, Namer M. Breast cancer: When tumor markers become targets for drugs. *Ann Oncol* 1993; 4: 195-197.
 7. Pedersen H, Grondal-Hansen J, Francis D, Osterlind K, Hansen HH, Dano K, Brunner N. Urokinase and plasminogen activator type-1 in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer Res* 1994; 54: 120-123.
 8. Ganesh S, Sier CFM, Griffioen G, Vloedgraven HJM, de Boer A, Welvaart K, van de Velde CJH, van Krieken JHJM, Verheijen JH, Lamers CBHW, Verspaget HW. Prognostic relevance of plasminogen activators and their inhibitors in colorectal cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 4065-4071.
 9. Noh SH, Rha SY, Chung HC, Park JO, Lee CI, Yoo NC, Kim JH, Roh JK, Choi JS, Min JS, Kim BS. Expression of urokinase-type plasminogen activator, a new biologic marker of the invasion and metastasis in gastric cancer. *J Korean Cancer Assoc* 1996; 28: 226-234.
 10. Duffy MJ, Reilly D, O'Sullivan C, O'Higgins N, Fennelly JJ, Lijen H. Urokinase-plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res* 1990; 50: 6827-6829.
 11. Foekens JA, Look MP, Peters HA, van Putten WLJ, Portengen H, Klijn JGM. Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1: predictors of poor response to tamoxifen therapy in recurrent breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 751-756.
 12. Huber K, Kirchheimer JC, Sedlmayer A, Bell C, Ermiler D, Binder BR. Clinical value of determination of urokinase-type plasminogen activator antigen in plasma for detection of colorectal cancer: comparison with circulating tumor-associated antigens CA 19-9 and carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* 1993; 53: 1788-1793.
 13. Casslen B, Bossmar T, Lecander I, Astedt B. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in blood and tumor fluids of patients with ovarian cancer. *Eur J Cancer* 1994; 30A: 1302-1309.
 14. Song KS, Lee A, Choi JR, Kwon OH. Diagnostic efficacy of plasma urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-2 in differentiation of hepatocellular carcinoma from cirrhosis. *Throm Haemost* 1995; 74: 864-867.
 15. Hildenbrand R, Dilger I, Horlin A, Stutte HJ. Urokinase plasminogen activator induces angiogenesis and tumor vessel invasion in breast cancer. *Path Res Pract* 1995; 191: 403-409.
 16. Descotes F, Ville G, Bobin JY, Barbier Y, Saez S. Tissue extraction procedures for investigation of urokinase plasminogen activator (uPA) and its inhibitors PAI-1 and PAI-2 in human breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 49: 135-143.
 17. Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis FA, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
 18. Beahrs OH, Meyers MH. Manual for staging of cancer, 4th ed. Philadelphia, Lippincott, 1992.
 19. Markus G. The relevance of plasminogen activators to neoplastic growth. *Enzyme* 1988; 40: 158-172.
 20. Andreasen PA, Georg B, Lund LR, Riccio A, Stacey SN. Plasminogen activator inhibitors: hormonally regulated serpins. *Mol Cell Endocrinol* 1990; 68: 1-19.
 21. Cubellis MV, Wun TC, Blasi F. Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1. *EMBO J* 1990; 9: 1079-1085.
 22. Chung HC, Park JO, Kwon HJ, Kim TS, Chung HC, Gong SJ, Lee HY, Rha SY, Yoo NC, Kim JH, Roh JK, Noh SH, Min JS, Kim BS. Clinical significance of urokinase-type plasminogen activator (uPA) expression from serum and tissue of gastric cancer patients. *J Korean Cancer Assoc* 1997; 29: 765-773.
 23. Janike F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Hofler H, Graeff H. Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 24: 195-208.
 24. Heiss MM, Babic R, Allgayer H, Gruetzner KU, Jauch KW, Loers U, Schilderberg FW. Tumor-associated

- proteolysis and prognosis: New functional risk factors in gastric cancer defined by the urokinase type plasminogen activator system. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2084-2093.
25. Nekarda H, Schmitt M, Ulm K. Prognostic impact of urokinase type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 2900-2907.
 26. Hansen JG, Christensen IJ, Rosenquist C, Brunner N, Mouridsen HT, Dano K, Blichert-Toft M. High levels of urokinase type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinoma are associated with poor prognosis. *Cancer Res* 1993; 53: 2513-2521.
 27. Harvey SR, Lawrence DD, Madeja JM, Abbey SJ, Markus G. Secretion of plasminogen activators by human colorectal and gastric tumor implants. *Clin Exp Metastasis* 1988; 6: 431-450.
 28. Chung HC, Rha SY, Park JO, Yoo NC, Kim JH, Roh JK, Min JS, Lee KS, Kim BS, Kim JJ. Physiological and pathological changes of plasma urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1, and urokinase-type plasminogen activator receptor levels in healthy females and breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 49: 41-50.