

## 위암에서 침윤과 전이의 새로운 생물학적 표지자로서 Urokinase-type Plasminogen Activator(uPA)의 발현

연세대학교 의과대학 외과학교실, 연세의대 암연구소, 연세의대 암센터 및 내과학교실

노성훈 · 조재용 · 라선영 · 정현철  
박준오 · 이종인 · 유내춘 · 김주항  
노재경 · 최진섭 · 민진식 · 김병수

= Abstract =

### Expression of Urokinase-type Plasminogen Activator, a New Biologic Marker of the Invasion and Metastasis in Gastric Cancer

Sung Hoon Noh, M.D., Jae Yong Cho, M.D., Sun Young Rha, M.D.  
Hyun Cheol Chung, M.D., Joon Oh Park, M.D., Chong In Lee, M.D.  
Nae Choon Yoo, M.D., Joo Hang Kim, M.D., Jae Kyung Roh, M.D.  
Jin Sup Choi, M.D., Jin Sik Min, M.D. and Byung Soo Kim, M.D.

*Institute for Cancer Research, Yonsei Cancer Center, Department of General Surgery,  
Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

Mortality in gastric cancer is related to invasion and metastasis. Evidence has accumulated that invasion and metastasis in solid tumors require the action of tumor associated proteases, which promotes the dissolution of the surrounding tumor matrix and the basement membrane. The serine protease urokinase-type plasminogen activator(uPA), which is elevated in solid tumors, appears to play a key role in these processes. We used enzyme-linked immunoabsorbent assays(ELISA) to test uPA antigen expression in tissue extracts of normal and cancer tissue of 160 gastric cancer patients. uPA level was significantly higher in cancerous tissue than normal gastric tissue(9.4 vs 5.3 ng/mg protein cytosol:  $p < 0.001$ ). When the uPA level was correlated to other prognostic parameters, uPA positivity is associated with grade of anaplasia( $p = 0.005$ ). Univariate analysis showed that a uPA positivity is significantly associated with short disease-free survival( $p = 0.005$ ). Multivariate analysis with known prognostic parameters revealed that the uPA positivity was an independent prognostic parameter for short disease-free survival. These data indicate that uPA is a potentially important prognostic factor in gastric cancer. Consequently, we suggest that modulation of uPA is needed to prevent invasion and metastasis in gastric cancer patients.

**Key Words:** uPA, Gastric cancer, Prognostic factor

\*본 연구는 1994년도 연세대학교 의과대학 일반과제(교수) 연구비에 의하여 이루어졌음.

## 서 론

위암 발생은 세계적으로 감소하는 추세이나, 우리나라에서의 경우는 아직도 암환자의 가장 많은 사망 원인이 되고 있다<sup>1)</sup>. 이러한 상황의 주요한 원인중의 하나가 일본은 수술만으로 95% 이상 5년 생존율을 유도할수 있는 조기 위암이 50%까지 보고되나, 우리나라에서는 아직까지 진행성 위암이 70%를 차지하기 때문이다<sup>1)</sup>. 진행성 위암의 경우 조기위암과는 달리 근치적 절제술 후에도 5년 생존율이 30~40%에 불과하며, 수술 후 조기에 재발하는 경우가 많다.

진행성 위암에서 수술 후 보조약물요법으로 5-fluorouracil, mitomycin, doxorubicin, etoposide, methotrexate, cisplatin등을 시행하고 있으나 수술만 단독으로 시행한 경우에 비해 뚜렷한 생존율의 증가가 아직 유도되지 못하며, 수술을 시행하지 못하는 경우에는 치료 반응율이 40% 정도로 보고되고 있어 아직도 그 결과가 만족할만 하지 못하다<sup>1~4)</sup>. 따라서 최근 생물학적 치료 혹은 유전자 치료에 의한 새로운 치료 방법의 도입, 새로운 약제 개발 및 고위험도군 선정을 위한 종양표지자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

위암에 의한 사망은 암의 침윤 및 전이와 관계가 깊은 바, 최근 고형암의 침윤과 전이과정에서 종양 관련 단백질 분해 효소의 역할에 대한 연구가 증가하였다. 즉, 암이 주위 조직으로 침윤하고, 종양 신생혈관의 생성이 일어나기 위하여는 먼저 주위 기저막의 용해가 첫 단계로서 필수적이며, 이과정에는 serine protease와 matrix-metalloproteinases(MMPs)가 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다<sup>5~6)</sup>. Matrix-metalloproteinases들은 배양 암세포주에서 그 활성도가 증가되어 있음이 관찰되면서, 암 조직의 matrix 용해에 대한 관심이 증가하게 되었는데, 이는 기저막의 주성분이 MMP의 substrate인 type IV collagen, laminin, proteoglycan, fibronectin 등으로 구성되어 있기 때문이다<sup>5~6)</sup>. 반면 serine protease는 모든 배양 내피 세포주에서 분비되며, tissue-type plasminogen activator(tPA)와 urokinase-type plasminogen activator(uPA) 두 가지가 있어, 이 중 tPA는 주로 혈전 용해에 관계

되고, uPA가 주로 암의 침윤에 관계하는 것으로 밝혀지고 있다<sup>7~10)</sup>.

uPA는 분자량 52,000인 serine protease의 일종으로 유방암을 비롯한 고형암에서 발현이 증가되어 있으며 기저막 분해 과정의 중추 역할을 한다. 종양세포는 uPA를 비활성화 형태의 proenzyme 즉 pro-uPA로 합성 분비하며, 이는 다시 plasmin등에 의해 활성화 형태로 전환된다. 활성화된 uPA는 plasminogen에서 plasmin으로의 전환을 더욱 증가시키며, 증가된 plasmin은 종양 주위의 기질을 구성하고 있는 fibrin, fibronectin, proteoglycan, laminin등을 파괴하고, type IV collagenase를 활성화 시켜 기저막의 중요 구성성분인 collagen type IV를 간접적으로 파괴시킨다<sup>11~13)</sup>. 대표적 예로, Hep-3 간암 세포주를 닭의 태아에 주입하고 항 uPA 항체 투여시는 태아 폐조직의 전이암 집락 형성이 감소되나, 항 tPA 항체투여시는 집락형성 정도에 변화가 없었다<sup>14~15)</sup>. 또한 plasmin의 억제제인 EACA( $\epsilon$ -amino caproic acid), uPA 억제제인 tranexamic acid등이 쥐에 생성된 유방암의 성장과 전이를 억제한이 관찰된바, 이들 단백질분해 효소가 이론적으로는 암의 침윤과 전이를 억제 시키는 생물학적 치료의 치료 목표가 될 수 있겠다.

최근 인체 종양 조직에서 uPA의 발현은 암 예후 인자로서의 가능성이 제시되었으며, 특히 ELISA(enzyme-linked immunoabsorbent assay)법에 의해 검색된 uPA의 면역 활성능(immunoreactivity)은 유방암에서 강력한 예후 인자로 제시 되었다<sup>16~18)</sup>. 본 연구에서는 한국 성인에서 가장 많은 위암 환자들을 대상으로 하여 정상 위조직과 위암 조직에서 uPA의 발현 여부를 ELISA법에 의해 비교하여 예후 인자로서의 가능성을 검토하였다.

## 대상 및 방법

### 1) 대상

1990년 1월부터 1994년 5월까지 연세의료원 및 연세 암센터에 내원하여 조직학적으로 위선암으로 진단 받고 위절제술을 시행한 환자중에서 수술 당시 종양 및 정상 조직의 채취가 가능하였던 환자 160예를 대상으로 하였다.

## 2) 방법

(1) **Cytosol preparation:** 조직 250 mg을 분쇄시킨 후 ultracentrifuge 시험관에서 homogenization buffer(4 ml)를 사용하여 10배 희석시켰다. Homogenizer를 사용하여 5초 이내로 조직을 homogenization한 다음 4°C에서 1시간 동안 100,000g로 원심 분리 시켰다. Cytosol의 상층액을 얼음위에 장치한 시험관내로 이동시키고 단백질량은 Lowry방법에 의해 정량하였다.

### ① 용액 준비;

가) **Stock buffer;** 1.211 g tris, 0.588 g EDTA, 1.21 g sodium molybdate를 800 ml의 증류수에 용해시킨 후, 실온에서 HCl을 이용하여 pH를 7.5로 맞추고 증류수를 첨가하여 총용량이 1L가 되게 한다 다음 2~8°C에 보관하여 사용하였다.

나) **Homogenization buffer;** 실험당일 stock buffer에 monothioglycerol(MTG)을 첨가하여 최종 농도가 1 mM이 되게 한 후 사용하였다. 먼저 농축된 MTG를 증류수를 사용하여 1:10으로 희석시킨 후 50 ml의 stock buffer에 희석된 MTG 50 ml를 첨가하여 잘 혼합하고 2~8°C에 보관하면서 사용하였다.

(2) **uPA의 측정:** Coating buffer는 1.59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2.93 g NaHCO<sub>3</sub>를 950 ml의 증류수에 용해시킨 후 pH를 9.6으로 조절하고 최종용량을 1L로 맞추어 사용하였다. Washing buffer는 29.2 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O를 950 ml의 증류수에 용해시킨 후 NaOH를 이용하여 pH를 7.2로 조절한 다음 10 ml의 Triton X-100를 첨가한 후 증류수로 최종용량을 1L가 되게 하여 사용하였다. Dilution buffer는 10 g의 bovine serum albumin을 증류수 1L에 용해시켜 사용하였다. Color buffer는 7.3 g citric acid·H<sub>2</sub>O, 11.86 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O를 950 ml의 증류수에 용해시킨 후 pH를 5.0으로 조절한 다음, 증류수를 첨가하여 최종용량이 1L가 되게 하여 사용하였다. Coating 항체는 monoclonal mouse anti-human uPA(Monozyme, Denmark)를 사용하였고, detecting 항체는 biotinylated monoclonal mouse anti-human uPA(Monozyme, Denmark)를 사용하였다. 발색과정은 horse-

raddish peroxidase(HRP) conjugated streptavidin(Monozyme, Denmark)을 사용하였으며, substrate로는 orthophenyldiamine을 사용하였다. uPA standard는 recombinant human uPA(Monozyme, Denmark)를 사용하였다. 방법을 요약하면, 먼저 coating 항체를 coating buffer로 희석한 후 100 µl를 각각 well에 분주하고 4°C에서 밤새 방치하였다. Washing buffer로 씻고 나서 200 µl의 dilution buffer로 20°C에서 30분간 반응시킨 다음, 3회 세척하였다. 100 µl의 검체를 각 well에 분주하고, 20°C에서 1시간 반응하였다. 3회 세척 후 HRP-conjugate 용액으로 20°C에서 1시간 반응시켰다. 다시 3회 세척 후 substrate 용액을 각 well에 분주한 다음, 빛을 차단한 상태에서 30분간 반응시켰다. 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 µl를 각 well에 분주하여 반응을 정지시키고 multiplate reader(BioRad)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. uPA의 정량은 cytosol 100 µl 내의 단백질량을 계산한 후 흡광도에 의해 계산한 표준 곡선에 흡광도의 값을 대입하여 uPA의 양을 ng/mg protein으로 계산하였다. 동일 환자에서 채취된 조직의 비교로서 암조직의 uPA level이 정상 조직의 uPA level보다 높은 경우를 uPA 고발현 군(uPA high expression)으로 정의하였다. 또한 uPA 양성군(uPA positive)은 대상군 160에 정상 조직 uPA(평균값±2×표준편차)(11.5 ng/mg cytosol) 이상인 경우로 정의하였다. Intra 및 inter-assay variation은 10% 미만이었다.

(3) **조직학적 병기설정:** 암의 크기, 림프절전이 여부, 전이 림프절수 및 종양분화도 등을 조사하였으며, 환자의 병리학적 병기는 AJCC 및 JRSJC(Japanese Research Society for Gastric Cancer) 병기설정법에 의하여 결정하였다.

(4) **환자 추적 관찰:** 환자는 외래에서 추적 관찰하였으며, 재발은 조직검사 혹은 방사선과적인 진단 방법으로 확인 하였다. 무병 생존 기간은 수술일로부터 재발이 확인 되거나 최후 추적 관찰일까지, 전체 생존 기간은 수술일로부터 사망 또는 최후 추적 관찰일까지로 정하였다.

(5) **통계학적 처리:** 정상과 종양 조직의 uPA level 비교는 paired t-test를 이용 two-sided p value < 0.05를 의미 있는 것으로 하였다. uPA와 기

**Table 1. Characteristics of patients(n=160)**

Age		Tumor stage	
Median(Range)	55(27~86)	T1	7
Male: Female	113:47(2.4:1)	T2	46
Location		T3	87
Cardia	13	T4	20
Fundus	4	Nodal status	
Body	42	N0	44
Antrum	69	N1	60
Pylorus	32	N2	56
Differentiation		Metastasis	
Well	17	M1	133
Moderate	51	M1	27
Poor	92	Stage(T.N.M)	
Size(cm)		I	28
<5	70	II	36
5~10	77	IIIA	36
>10	13	IIIB	33
		IV	27

**Table 2. Levels of uPA in cytosolic extracts of paired gastric tissues according to tumor progression(n=160)**

T.N.M. stage	Normal tissue <sup>1</sup>	Cancer tissue <sup>1</sup>	p-value
Total(n=160)	5.3±3.1	9.4± 8.8	0.001
T			
T1(n=7)	5.5±4.5	7.6± 2.5	0.001
T2(n=46)	4.5±2.4	7.6± 4.9	0.001
T3(n=87)	5.3±2.5	10.4±10.9	0.00
T4(n=20)	5.7±6.0	9.9± 5.5	0.013
N			
N0(n=44)	5.1±2.7	10.7±10.1	0.001
N1(n=60)	4.9±2.6	7.7± 4.4	0.001
N2(n=56)	5.7±4.0	10.4±10.9	0.003
M			
M0(n=133)	5.2±2.6	9.2± 9.2	0.001
M0.0121(n=27)	5.6±5.0	10.6± 6.8	0.001
stage			
I(n=28)	5.5±3.3	8.4± 4.9	0.001
II(n=36)	4.7±2.1	10.1±11.2	0.001
IIA(n=36)	4.9±2.5	8.3± 4.5	0.001
IIB(n=33)	5.4±2.6	9.7±13.0	0.003
IV(n=27)	5.5±4.9	10.4± 6.6	0.001

<sup>1</sup>. mean value±standard deviation(ng/mg cytosol protein)

존의 예후 인자들과의 상호 연관성은  $\chi^2$ -test로 분석하였다. 무병 생존기간에 영향을 미치는 각 인자별 유의도 검정은 univariate 분석을 시행하여 Kaplan-Meier 방식으로 비교하였으며 생존기간의 유의도 비교는 log-rank 검정법을 이용하였다. 다중 변수 분석은 Cox proportional hazard model로 시행하였으며 유의도 및 비교 위험도를 분석하였다.

**결 과**

**1) 대상 환자들의 임상적 특징**

대상 환자는 총 160명으로 남자 113명, 여자 47명이었으며, 중앙 연령은 55세(범위 27~86세)였다. T 병기상 T<sub>1</sub> 7예(4.4%), T<sub>2</sub> 46예(28.8%), T<sub>3</sub> 87예(54.3%), T<sub>4</sub> 20예(12.5%)였으며, 림프절 전이가 없던 예가 44예(27.5%), N<sub>1</sub> 영역 림프절 전이가 60예(37.5%), N<sub>2</sub> 영역 림프절 전이가 56예(35.5%)였다. 타장기 전이 혹은 N<sub>3</sub> 영역 림프절 전이에 의해 M<sub>1</sub>으로 병기가 설정된 예가 27예(16.9%)였다. 병기 I 28예(17.5%), 병기 II 36예(22.5%), 병기 III 69예(43.1%), 병기 IV 27예(16.9%)였다. 그외 임상적 조건은 Table 1과 같다.

**2) 정상 위조직과 위암조직에서 uPA 발현 비교**

정상조직의 uPA치 5.3±3.1 ng/mg protein cytosol에 비해 종양조직의 uPA치는 9.4±8.8 ng/mg protein으로 종양조직에서 그 발현이 증가하였다(p<0.001). 암의 침윤도와 병기가 증가할수록 정상조직의 uPA 발현에는 변화가 없었으나, 위암조직의 uPA 발현은 증가하는 경향이었으나 유의성은 없었다(Table 2). uPA 양성군의 cut-off point를 정상 조직의 uPA(평균값+2×표준편차)로 정한 바, cut-off point는 11.5 ng/mg protein cytosol였다. 이기준에 의하여 uPA 양성군은 47예(27%)에서 관찰되었다. 동일 환자 조직에서 정상 조직의 uPA 값보다 종양조직의 uPA 값이 높게 발현된 군을 uPA 고발현군으로 정의할 경우, 91예(58.3%)에서 uPA의 고발현이 관찰되었다. T<sub>1</sub>병기에 비해 T<sub>2</sub>병기 부터 고발현군이 증가하는 경향을 보였으며, 병기 IV에서 고발현군의 빈도가 높은 경향이었으나 유의성은 없었다(p=0.08). 반면 병기에 따른 uPA 양성율은 차이가 없었

**Table 3. Comparison, of high expression and uPA positive rate according to tumor progression(n=160)**

T.N.M. stage	High expression <sup>1</sup> (%)	Expression positive <sup>2</sup> (%)
<b>T</b>		
T1	2/ 7(28.6)	2/ 7(28.6)
T2	26/46(56.5)	11/ 46(23.9)
T3	52/87(59.8)	23/ 87(26.4)
4	11/20(55.0)	6/ 20(30.0)
<b>N</b>		
N0	26/44(59.1)	15/ 44(34.1)
N1	34/60(56.7)	13/ 60(21.7)
N2	31/56(55.4)	14/ 56(25.0)
<b>M</b>		
M0	72/133(54.1)	33/133(24.8)
M1	19/27(70.4)	9/27(33.3)
<b>stage</b>		
I	16/28(57.1)	9/28(32.1)
II	18/36(50.0)	8/36(22.2)
IIIA	22/36(61.1)	10/36(27.8)
IIIB	16/33(48.5)	6/27(22.2)
IV	20/27(74.0)	9/27(33.3)

<sup>1</sup> uPA level of the cancer tissue was higher than the level of the paired normal tissue

<sup>2</sup> uPA level was higher than the level of mean +2 standard deviation of normal tissues

**Table 4. Association between uPA level in cytosolic extracts and other variables**

Variables <sup>1</sup>	uPA positive <sup>2</sup>	uPA high expression <sup>2</sup>
Age	0.453	0.784
Differentiation	0.041	0.504
Location	0.401	0.996
Tumor size	0.699	0.387
T	0.350	0.351
N	0.212	0.837
M	0.487	0.294
Stage	0.862	0.597

<sup>1</sup> Patients were subdivided with respect to each variable according to the criteria indicated in Table 1

Table 5. Multivariate analysis: disease-free survivals

Varialbes	Univariate analysis p-value	Multivariate analysis p-value	Relative risk
uPA positivity	0.0051	0.0003	3.6
T-factor	0.0001	0.0019	2.2
N-factor	0.0002	0.0306	1.7
M-factor	0.0007	0.0758	1.1

다(Table 3).

### 3) uPA와 다른 기존의 예후 인자들과의 연관성

Cytosol uPA level과 다른 기존의 예후 인자들과의 상관성을  $\chi^2$ -test로 비교시 uPA 양성율은 세포의 분화도와 상관관계를 보여 세포의 분화도가 나쁠수록 uPA의 양성율이 높았다( $p=0.04$ ). 그러나 나이, 종양의 크기, 위치, TNM stage에 따른 uPA의 양성율은 차이가 없었다. uPA의 고발현율은 기존의 예후 인자들과는 무관하였다(Table 4).

### 4) 예후인자로서 uPA의 임상적 의의

기존의 예후 인자들과 함께 univariate analysis와 multivariate analysis를 시행하여 uPA의 발현이 환자의 예후에 미치는 영향을 조사하였다. uPA 양성 및 음성군에 따른 2년 무병생존율 비교시, uPA 음성군 65%, 양성군 35%로 uPA 음성군에서 2년 무병 생존율이 증가하였으며( $p=0.005$ , Fig. 1), uPA 고발현에 따른 무병생존율의 차이는 관찰되지 않았다. uPA 양성유무를 TNM 병기와 함께 다중 변수 분석을 시행한 결과, 비교위험도 3.6으로 병기와 무관하게 독립적인 예후인자로 관찰되었다(Table 5).

## 고 안

위암의 사망은 암의 침윤과 전이와 관계가 깊으며, 이러한 암의 침윤과 전이는 암세포의 확산을 제한하고 있는 세포외 기질(extracellular matrix)에서부터 암세포들이 떨어져 나와 주위 결체 조직내로 들어간 다음 내피하 기저막(subendothelial basement membrane)을 파괴 시키고, 혈류 또는 림프관을 따라 퍼지는 일련의 과정을 통하여 이루어진다. 이 과정

중에 기저막과 기질을 구성하고 있는 단백질들의 peptide 결합을 비가역적으로 파괴하는 단백 분해효소가 매우 중요한 역할을 하며, 악성 세포들은 많은 양의 이들 단백 분해효소를 생산하여 표적 조직에 대한 침투력을 갖게 된다<sup>3-6)</sup>. 고형암의 침윤과 전이과정에는 여러가지 단백분해효소들인 plasmin, urokinase-type plasminogen activator(uPA), matrix-metalloproteinase(MMP)등과 이들의 억제제인 plasminogen activator inhibitors(PAIs), tissue inhibitors of matrix-metalloproteinase(TIMPs)가 관여된 바<sup>4)</sup>, 이는 정상조직과 종양 조직간의 paracrine pathway가 존재하고 있으며, 이들 단백분해효소와 억제제의 불균형의 정도가 암의 침윤과 전이능을 결정한다고 생각된다.

Huber등<sup>10)</sup>은 대장암과 Crohn's disease환자의 혈장에서 uPA의 발현여부를 비교 측정한 후, 염증 반응자체에 의해 Crohn's disease의 혈장내에도 uPA가 높게 발현되는 사실을 보고하였다. 또한 만성 염증성 대장질환 환자 및 급성 충수염 환자의 조직을 면역조직화학 염색에 의해 조사시에도 uPA가 발견되었다. 따라서 위암에서 종양 조직의 uPA 발현만을 서로 비교하는 것 보다는 같은 환자 정상조직의 uPA치와 비교하는 것이 종양의 침윤능을 예측 하는데 보다 타당하리라 사료되어 본 연구에서는 동일환자에서 정상조직과 암조직을 동시에 채취한 후, cytosol을 추출하여 uPA치를 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)법에 의해 측정하였다. uPA의 발현은 크게 두가지로 분류하여 분석한 바, 먼저 정상조직 160예에서 발현되는 uPA치를 이용하여 정상범위를 설정(평균 $\pm 2 \times$  표준편차)한 다음, 이 cut off치보다 높은 경우를 uPA 양성군으로 정하였다. 다른 한편으로는 자신의 정상 조직 uPA보다 높은

uPA를 위암조직에서 발현한 군을 uPA 고발현군으로 정하여, 위암에서 양성율 혹은 고발현율을 조사하고 이들의 환자의 예후, 암의 침윤도와외의 상관성등을 비교하여 새로운 생물학적 표지자로서의 가능성 타진과 위암의 진행 기전을 보다 이해하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

한국인 정상 위조직의 uPA 발현은  $5.3 \pm 3.1$  ng/mg protein cytosol(범위: 2.2~8.4)로 관찰되었으며, 종양조직에서는 uPA치가 보다 증가하였다. 그러나 정상조직의 uPA는 암의 침윤도(T-병기), 림프절 전이 및 타장기 전이, 병리학적 병기가 진행함에도 불구하고 큰 차이가 없었다(Table 2).

위암조직에서의 uPA는 모든 병기에서 증가되어 있음이 관찰된 바, 암의 발생 초기에 이미 uPA의 발현이 증가되는 것으로 생각되었으며 특히 T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub>병기에서 T<sub>3</sub>로 이행시 즉, 장간막 침윤 발생시에 보다 그 발현이 증가하는 경향을 관찰할 수 있었다(Table 2). 위암조직에서 uPA 고발현율은 56.9%에서 관찰되었으며 특히 T<sub>1</sub>병기에서 T<sub>2</sub> 병기로 진행시 고발현도가 증가하였으며, 타장기로 전이가 있는 M<sub>1</sub> 혹은 병기 IV에서 보다 고발현율이 증가하는 경향이 관찰되었다(Table 3). 이러한 결과는 근육층내로 위암세포가 침윤하는 과정에서 정상조직에 비해 위암조직내의 상대적 uPA 발현이 증가하며, 원격전이가 발생하는 경우에는 보다 더 균형의 변화가 심화된다고 하겠다. 면역조직화학적인 혹은 면역형광 염색법을 이용한 연구에서는 uPA는 종양과 인접한 부위 혹은 섬유아세포와 국소적으로 집중되는 부위에서 주로 uPA가 염색되며, 침윤 과정이 활발하게 일어나는 부위에 국소적으로 uPA가 강하게 활성화됨이 보고되어<sup>20)</sup>, 정상조직과 유관성이 있음이 제시된다고 하겠다. 반면 uPA 양성율은 26.3%에서 관찰되었으며, 암의 침윤도와 병기의 진행에 따라 uPA 양성율에는 큰 차이가 관찰되지 않았으나, 기존의 예후인자들과의 상관성을 비교시 위암의 조직 분화도가 낮을수록 uPA 양성율은 증가함이 관찰되었다. Nekarda등<sup>21)</sup>은 uPA의 발현과 조직 형태학적 인자와의 상관성 연구에서 인환세포형과 고분화선암 그리고 미만형 위암(WHO 분류)에서 유두형 선암, 저분화암 및 장형(Lauren 분류)에 비해 uPA가 낮게 발현됨을 보고하였다. 그러나 Takai등<sup>22)</sup>은 미분화암에서 uPA가 오히려 낮게 발현됨을 보고하였

고, Nakamura등<sup>23)</sup>은 uPA발현과 WHO 분류와는 무관함을 보고하였다. 따라서 아직까지 uPA발현과 종양의 특정 조직형태학적 특징과의 상관성을 단정적으로 연관지을 수는 없으며, 단지 종양주위의 미세환경과의 관계가 있음이 확인된다고 하겠다.

예후인자로서의 uPA의 임상적 의의를 조사하기 위하여 2년 무병생존율을 각인자별로 univariate분석시, uPA 양성율이 예후인자로 관찰된 반면, uPA 고발현율은 의의가 없었다. 유의한 인자들의 다변량 분석시에도 uPA 양성율은 독립적 예후인자로 관찰되어, 일단 uPA치가 절대적으로 증가시에는 예후가 불량함이 제시되었다(Table 5). 즉 암의 진행 초기에는 정상조직에 비해 암조직의 상대적 uPA 발현이 증가하나 일단 절대적 uPA치 증가가 발생하면 암의 침윤능이 증가하게 되고, 그 결과 예후가 불량하다고 하겠다. 이러한 결과는 동일병기에서는 uPA 발현시는 보다 예후가 불량함을 의미하며, uPA가 stage-oriented 치료개념의 기준으로 사용될 수 있음을 뜻한다 하겠다.

최근 Heiss등<sup>24)</sup>은 203예 위암 환자를 대상으로 uPA와 uPA-receptor(R), PAI-1 및 PAI-2를 면역조직화학 염색법으로 분석하여 PAI-1, uPA 및 uPA-R을 새로운 위암환자의 예후인자로 보고하였고, 특히 PAI-1이 독립적 예후인자로 보고하였다. 그러나 종양세포 주위의 내피세포, 섬유아세포 혹은 다른 기질 세포에 염색된 점이 고려되지 않았으며, 특히 uPA와 PAI-1이 같은 조직에서 어느 부위에 주로 염색 되는지는 명확하게 밝히지 않은 점이 그들 연구의 단점이나, 다른 연구에서 종양세포로부터 uPA와 PAI-1이 강양성 반응으로 관찰된 점은 이들의 활성화가 종양세포에서 활발히 일어나고 있음을 의미한다 하겠다<sup>25-27)</sup>. Nakarda등도 uPA와 이의 억제제인 PAI-1의 고발현과 기존의 예후 인자들과 다중변수 분석을 시행하여 uPA보다 PAI-1이 예후에 미치는 영향이 더 크다고 보고하였고<sup>21)</sup>, PAI-1의 경우 유방암에서 이미 림프절 전이가 없는 경우에 불량한 예후인자로 보고되었다<sup>17, 18, 28)</sup>. 이는 PAI-1의 역할이 uPA 수용체와 결합한 uPA의 활성화를 억제한다는 보고들<sup>29-33)</sup>과는 상반되나, Janicke등<sup>17-18)</sup>이 제안한 것처럼 원격지(distant foci)에 재착상(reimplantation) 되는데 PAI-1이 작용하기 때문으로 설명된다. 즉 암

의 전이가 발생하기 위해서는 새로운 tumor stroma의 형성이 필요하며 uPA가 이 과정에서 세포외 기질의 파괴를 정지시키기 때문이다. 더우기 정상조직에서는 내피세포(endothelial cell)와 혈소관에 PAI-1이 존재하므로 PAI-1의 증가는 신생 혈관 생성이 증가되어 있음을 나타내는 인자일 수 있고, 따라서 오히려 암의 전이를 촉진할 수 있다고 설명되기도 한다<sup>29-32)</sup>. 본 연구에서는 uPA 단독만 조사된 바, 추후 PAI-1 및 uPA-수용체에 대한 연구를 계속함으로써 위암에서 이들 단백질분해효소와 억제제의 작용 기전을 보다 이해할 수 있을 것으로 생각된다.

결론적으로 uPA는 정상 위조직에 비하여 초기 위암 조직에서부터 높게 발현되며, 암이 진행할수록 상대적 고발현율이 증가되고, 일단 절대적 발현율이 증가되어 uPA 양성군인 경우는 예후가 불량함이 관찰되었다. 따라서 위암 조직의 uPA는 독립적 예후인자로서 가능성이 제시되었으며, 이러한 단백질분해효소의 활성변화는 새로운 생물학적 치료의 target이 되어 stage-oriented 암치료법을 시행하는데 기초개념이 된다고 하겠다. 추후 uPA의 억제제인 PAI-1과의 불균형에 따른 위암 진행과 상관관계를 조사함으로써 생물학적 치료 target을 보다 구체화할 수 있을 것으로 생각된다.

### 참 고 문 헌

- 1) Ministry of Health and Social Affairs, Republic of Korea: Report of central cancer registry programme in Korea, 1 July 1989~30 June 1990, 3: 1, 1990
- 2) Kim JP: Gastric cancer-Recent advances in therapy. Med Prog 16: 5, 1994
- 3) Liotta LA, Rao CN, Barsky SH: Tumor invasion and the extracellular matrix. Lab Invest 49: 636, 1983
- 4) Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG: Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. Cell 64: 327, 1991
- 5) Liotta LA: Tumor invasion and metastasis-Role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award Lecture. Cancer Res 46: 1, 1986
- 6) Laiho M, Keski-Oja J: Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis: A review. Cancer Res 49: 2533, 1989
- 7) Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hanses J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L: Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. Adv Cancer Res 44: 139, 1985
- 8) Liotta LA, Goldfarb RH, Brundage R, Siegal GP, Terranova V, Garbisa S: Effect of plasminogen activator(urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. Cancer Res 41: 4629, 1981
- 9) Schmitt M, Janicke F, Graeff H: Tumor-associated fibrinolysis: the prognostic relevance of plasminogen activators uPA and tPA in human breast cancer. Blood Coagul Fibrinolysis 1: 695, 1990
- 10) Sappino AP, Huarte J, Belin D, Vassali JD: Plasminogen activators in tissue remodeling and invasion: mRNA localization in mouse ovaries and implanting embryos. J Cell Biol 109: 2471, 1989
- 11) Duffy MJ, Reilly D, O'Sullivan C, O'Higgins N, Fennelly JJ, Andreasen P: Urokinase-plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer. Cancer Res 50: 6827, 1990
- 12) Duffy M, O'Grady P, Devaney D, O'Siorain L, Fennelly JJ, Sijnen HJ: Urokinase-plasminogen activator: a marker for aggressive breast carcinomas. Cancer 62: 531, 1988
- 13) Foekens JA, Schmitt M, an Putten WLJ, Peters HA, Bontenbal M, Janicke F, Klijn JGM: Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients. Cancer Res 54: 6101, 1994
- 14) Ossowski L, Reich E: Antibodies to plasminogen activator inhibit human tumor metastasis. Cell 35: 611, 1983
- 15) Ossowski L: Plasminogen activator dependent pathways in the dissemination of human tumor cells in the chick embryo. Cell 52: 321, 1988
- 16) Bianchi E, Cohen RC, Da: A, Thor AT, Shuman MA, Smith HS: Immunohistochemical localization of the plasminogen activator inhibitor-1 in breast cancer. Int J Cancer 60: 597, 1995
- 17) Janicke F, Schmitt M, Ulm K, Gossner W,



- Graeff H: *Urokinase-type plasminogen activator antigen and early relapse in breast cancer. Lancet* 2: 1949, 1989
- 18) 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* 24: 195, 1993
- 19) Huber K, Kirchheimer JC, Sedlmayer A, Bell C, Ermler 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* 53: 1788, 1993
- 20) Skriver L, Larsson LI, Kielberg V, Nielsen LS, Andresen PB, Kristensen P, Dano K: *Immunocytochemical localization of urokinase-type plasminogen activator in Lewis lung carcinoma. J Cell Biol* 99: 752, 1984
- 21) 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* 54: 2900, 1994
- 22) Takai S, Yamamura M, Tanaka K, Kawanishi H, Tsuji M, Nakane Y, Hiol K, Yamamoto M: *Plasminogen activators in human gastric cancers: correlation with DNA ploidy and immunohistochemical staining. Int J Cancer* 48: 20, 1993
- 23) Nakamura M, Konno H, Tanaka T, Maruo Y, Nishino N, Aoki K, Baba S, Sakaguchi S, Tadada Y, Takada A: *Possible role of plasminogen activator inhibitor-2 in the prevention of the metastasis of gastric cancer tissues. Thromb Res* 65: 709, 1992
- 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* 13: 2084, 1995
- 25) Nishino N, Aoki K, Tokura Y, Sakaguchi S, Takada Y, Takada A: *The urokinase type of plasminogen activator in cancer of digestive tracts. Thromb Res* 50: 527, 1988
- 26) Sier CFM, Verspaget HW, Griffioen G, Ganesh S, Vloedgraven HJM, Lamers CBH: *Plasminogen activators in normal tissue and carcinomas of the human esophagus and stomach. Gut* 34: 80, 1993
- 27) Harvey SR, Lawrence DD, Madeja JM, Abbey SJ, Markus G: *Secretion of plasminogen activators by human colorectal and gastric tumor explants. Clin Exp Metastasis* 6: 431, 1988
- 28) Hansen JG, Christensen IJ, Rosenquist C, Brunner Nils, 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* 53: 2513, 1993
- 29) Levin EG: *Latent tissue plasminogen activator produced by human endothelial cells in culture: evidence for an enzyme-inhibitor complex. Proc Natl Acad Sci USA* 80: 6804, 1983
- 30) Lambers JW, Cammenga M, Konig BW, Mertens K, Pannekoek H, van Mourik JA: *Activation of human endothelial cell-type plasminogen activator inhibitor(PAI-1) by negatively charged phospholipids. J Biol Chem* 262: 17492, 1987
- 31) Laug WE: *Vascular smooth muscle cells inhibit plasminogen activators secreted by endothelial cells. Thromb Haemostasis* 53: 165, 1985
- 32) Loskutoff DJ, van Mourik JA, Erickson LA, and Lawrence D: *Detection of an unusually stable fibrinolytic inhibitor produced by bovine endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2956, 1983
- 33) Loskutoff DJ, Edgington TS: *Synthesis of a fibrinolytic activator and inhibitor by endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3903, 1977
- 34) Umehara Y, Kimura T, Yoshida M, Oba N, Harada Y: *Relationship between plasminogen activators and stomach carcinoma stage. Acta Oncol* 30: 815, 1991