

사람 위암세포에서 c-erbB-2 단백질발현의 의의

연세대학교 의과대학 외과학교실
이화여자대학교 의과대학 외과학교실*

이 경 식 · 박 병 우*

= Abstract =

Expression of c-erbB-2 Protein in Human Gastric Cancer Cells

Kyong Sik Lee, M.D. and Byeong Woo Park, M.D.*

Department of Surgery, Yonsei University College of Medicine
*Department of Surgery, Ewha Womans University College of Medicine**

C-erbB-2 is one of the most well known oncogenes in human malignant tumors and it is expressed about 8~20% in gastric carcinoma. But there is still controversy about the correlation between the c-erbB-2 overexpression and the prognosis of the gastric carcinoma.

So we studied the prognostic value of the c-erbB-2 overexpression by comparing the c-erbB-2 overexpression and known prognostic factors of the gastric carcinoma.

With single cell suspensions of normal gastric mucosa, primary gastric cancer tissues and malignant cells from asites arised from gastric carcinomas, the immunoreactivity to c-erbB-2 protein was examined. The results were as follows;

1) The c-erbB-2 protein was expressed only in cancer cells not in cells from normal mucosa. The expression frequency is significantly higher in metastatic tissues(malignant ascites) than those of primary sites.

2) The c-erbB-2 expression discrepancy between differentiated carcinomas and poorly differentiated carcinomas was not significant but these were significantly higher than that in signet ring cell carcinomas.

3) The c-erbB-2 expression frequency was significantly higher in serosal invasive carcinomas than that in serosal non-invasive carcinomas.

4) The c-erbB-2 expression frequency was significantly higher in tumor sizes of larger than 3 cm in diameter than that of less than 3 cm.

5) There were no statistically significant discrepancy along with the lymph node metastasis and stages, but the more lymph nodes metastasis and the higher stages, the more c-erbB-2 expression was noted.

These results suggest that the c-erbB-2 overexpression is associated with aggressive cancer biologic behavior.

Key Words: c-erbB-2 oncogene, Single cell suspension, Gastric cancer cell

* 본 논문은 1993학년도 연세대학교 교수연구비의 지원으로 이루어진 논문임.

서 론

사람의 암유전자 c-erbB-2는 원래 ethylnitrosourea에 의해 유도된 쥐의 신경아세포종(neuroblastoma)에서 발견된 transforming gene인 neu의 상응 암유전자²⁴⁾로 17번째 유전자의 장완(17q21)에 위치해 있다⁹⁾. 이 유전자의 mRNA는 4.8 kilobase이며²⁾ 유전자산물은 tyrosine kinase 족인 분자량 185,000 dalton의 당단백^{2,24)}으로 알려져 있고, 상피성장인자수용체(epidermal growth factor receptor; EGFR)와 아미노산 배열에서 약 50%정도 동일한 구조적 유사성을 가지고 있다^{5,36)}. 따라서 c-erbB-2는 수용체와 같은 기능을 할 것으로 추측되고 있으나 아직 ligand에 대한 정보가 불충분하여 확실히 밝혀져 있지 않다.

c-erbB-2 단백질의 발현 빈도는 암세포의 종류에 따라 차이가 많은데, 유방암 및 난소암에서 가장 높아 약 20~30%에서 관찰되며^{15,26,27)}, 결장 및 직장암 4%, 방광암 2%, 비소세포폐암(non-small cell lung cancer) 1% 등으로 보고¹⁵⁾ 되고 있고, 위선암조직에서도 면역조직화학 염색방법으로 약 8~20%에서 표현을 관찰할 수 있다^{12,42)}.

유방암과 난소암의 경우 c-erbB-2 유전자의 과표현이 있는 환자의 예후가 불량하다^{26,27,28)}. 위암에서는 c-erbB-2 유전자의 증폭이나 위암의 병리조직학적 형태와 관련이 있고^{8,38,39)} 불량한 예후와도 관련이 있다는 보고^{32,42)}가 있다. 이에 반해 분화위암에서 c-erbB-2 단백질 발현 빈도가 높은 경향은 있으나 통계학적으로 유의한 수준은 아니며^{20,23,41,42)} 예후와도 상관성이 없다는 보고^{20,23,29)}도 있다. 이와 같이 위암에서 c-erbB-2 단백질의 발현과 여러 가지 예후인자와의 상관성에 대해서는 아직까지 논란이 많다.

본연구에서는 위암에서 c-erbB-2 단백질의 발현에 대한 임상적의의를 확인하고자 전향적 방법으로 위암의 병리조직학적 형태, 종양의 침윤정도, 림프절전이정도, 종양의 위치, 종양의 크기 그리고 병기에 따른 원발위암병소의 c-erbB-2 단백질의 발현 정도를 조사하고 또한 전이성 병소로 취급되는 위암으로 인한 악성복수에서 암세포를 분리하여 c-erbB-2 단백질의 발현 정도를 조사하여 분석하여 위암의 예후인자와의 상관성을 살

펴보고자 하였다.

재료 및 방법

대상환자는 1993년 5월 1일 부터 1994년 4월 30일까지 1년간 연세대학교 의과대학 세브란스병원에서 위암으로 진단받고 개복하여 근치적 혹은 고식적 위절제술을 시행한 환자중 순차적으로 선정된 133명과 같은 기간중 위암으로 인한 악성복수를 동반한 환자 17명을 대상으로 하였다.

1) 종양세포의 분리

종양세포는 수술로 확진된 위선암중 1 cm³이상의 종양조직을 채취할 수 있는 진행성 위선암 환자의 암세포와 조기위암 환자의 암세포 및 악성복수를 동반한 암종중 환자의 복수에서 분리된 위선암세포를 사용하였다. 요약하면 위선암 치료를 위해 절제된 위(stomach)조직으로부터 괴사된 조직, 지방조직 및 정상조직을 제거한 종양조직을 1 cm³이상 무균적으로 채취하여 물리적 처치 및 효소 처치하여 단일 세포부유물(single cell suspension)을 얻어 사용하였다. 즉 종양조직을 400 U/ml의 penicillin(Hazleton Biologic Inc., Denver, PA, U.S.A)와 400 µg/ml의 streptomycin(Hazleton Biologic Inc., Denver, PA, U.S.A)이 함유된 기본배지(RPMI1640, Hazleton Biologics Inc., Denver, PA, U.S.A)에 넣고 유리 petri dish에서 수술용 칼(#11)을 사용하여 1 mm³정도 크기로 잘게 분쇄하여 효소 처리하였다. 효소 처리는 기본배지의 0.01% hyaluronidase type V(1500U/g, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, U.S.A), 0.1% collagenase type IV(163-230U/g, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, U.S.A) 및 0.002% deoxyribonuclease (100 U/g, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, U.S.A)와 함께 37°C에서 16시간 동안 mechanical stirring으로 분해시킨후 steel mesh(100 µm)를 통해 여과하고 칼슘과 마그네슘이 들어있지 않은 기본배지로 2회 세척한후 ficoll-hypaque gradient(1.007 g/ml; Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, U.S.A)와 부유물을 1:1 비율로 900 g에서 30분간 원침하여 얻어진 세포를 기본배지로 3회 세척한 다음

trypan blue를 이용하여 세포의 생존여부를 확인한 후 면역조직화학 염색법으로 c-erbB-2 단백질의 표현 정도를 관찰하였고 악성복수천자에 의해 채취된 삼출액은 heparin(50 IU/ml)이 처리된 시험관에 무균적으로 채취하여 500 g에서 10분간 원심분리후 ficoll-hypaque gradinet를 사용하여 위와 같은 방법으로 세포를 분리한 후 종양조직에서 얻어진 세포와 동일한 검사를 시행하였다.

2) 면역조직화학적 염색법

Avidin-Biotin system법에 의해 ABC kit (DAKO Japan CO., Ltd. Kyoto, Japan)를 사용하여 시행하였으며, 이때 사용하는 단일클론항체는 사람의 c-erbB-2 단백질에 대한 생쥐(mouse) 항체(mAb1 monoclonal Ab, Triton, CA, U.S.A)를 사용하였다. slide 표면에 graded alcohol(70%, 85%, 90%, 95%, 100%, 10분)을 사용하여 세포를 부착시킨 후, 암세포 표면의 비특이적 항체 수용체를 제거시키기 위해 kit내의 blocking 항체액 100 μ l를 점적한 후 wet gauze를 도포한 humid chamber에 넣고 상온에서 30분간 반응시켰다. 반응시킨 slide는 세척하지 않고 기울여서 과다한 항체용액을 제거한 후 단일클론항체 1:40 희석액을 100 μ l 점적하였다. 일차항체를 점적한 slide를 다시 humid chamber에 넣고 상온에서 1시간 반응시킨 후 Ca^{++} 과 Mg^{++} 이 들어있지 않은 인산완충액(phosphate buffer solution; P.B.S pH 7.6, JRH Bioscines, Kansas, U.S.A)에 각각 10분씩 3회 세척한 후 2차항체를 부착시켰다. 2차항체로 peroxidase conjugated biotinylated antibody를 100 μ l씩 점적한 후 humid chamber에 넣고 상온에서 30분간 반응시켰다. 이동안 ABC working solution을 5 ml의 P.B.S에 kit내의 reagent A, B를 각기 2방울씩 첨가한 후 충분히 혼합하여 만들었다. 2차항체 반응이 끝나면 P.B.S에 10분씩 3회 세척하고 ABC용액을 2방울씩 slide에 점적하여 실온에서 30분간 반응시킨후 역시 P.B.S로 10분간 3회 세척하였다. 끝으로 substrate와 발색제를 통과하여야 하므로 10 ml Tris/Cl buffer에 10 mg의 3'-3'-diaminobenzidine(DAB)(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A)을 용해시키고 3% H_2O_2 80 μ l를 첨가하여 빛을 차단 하기 위하여 은박지로 싸두었

다. 최종 세척이 끝난 slide를 DAB용액에 담근후 2~10분간 발색반응을 보면서, 수시로 현미경하에서 갈색의 색소 침착이 일어나는가를 관찰하여 양성대조군 slide에서 반응이 관찰되면 중단하였다. 이후 P.B.S로 10분간 세척하고 공기중에서 건조시킨 후 hematoxyline 염색으로 counter staining하였다. 음성반응 대조군 slide는 동일한 세포주 slide에 1차항체만 점적하지 않고 나머지 모든 과정을 동일하게 시행하여 c-erbB-2 음성반응세포인 MDA-MB-231(human breast adenocarcinoma cell line, ATCC HTB 26)을 사용하였고 양성반응대조군 slide는 양성반응 세포주인 SK-BR-3(human breast adenocarcinoma cell line, ATCC HTB 30)를 사용하여 비교하였다.

염색정도의 분류는 Tsuda 등³⁰⁾의 분류와 장 등¹⁾의 방법을 참고로 하여 광학현미경 관찰로 세포막 표면에 분명히 갈색으로 반응되고 50% 이상의 암세포에 염색된 경우는 +++ positive, 50% 미만의 암세포에 염색된 경우는 ++ positive로 분류하였으며 + positive는 갈색반응이 희미하고 세포막과 세포질 염색이 비교적 분명하지 않은 경우로 하였다.

3) 통계학적 분석

수집된 자료는 X^2 test를 이용하여 분석하였다.

결 과

위암환자의 정상 위점막세포(20예)에서는 c-erbB-2 단백질 양성염색이 한 예에서도 관찰되지 않았으나, 원발병소 133예중 31예(32.3%) 및 진행된 위암에 의한 악성복수 17예중 9예(52.9%)에서 c-erbB-2 단백질 양성염색이 관찰되어 세 군간 c-erbB-2 단백질 발현빈도에 유의한 차이가 있었다(표 1). 특히 발현 강도에 있어서도 악성복수의 암세포에서 현저하게 강한 염색을 나타내었다.

위암세포의 조직학적 특성에 따른 c-erbB-2 단백질 발현 빈도를 관찰한 결과 중등도 이상 분화암(moderately to well differentiated carcinoma) 47예중 15예(31.9%), 저분화암(poorly differentiated carcinoma) 55예중 15예(27.3%) 및 인환세포암(signet-ring cell carcinoma) 31예중 1예(3.2%)에서만

표 1. 위암세포의 근원에 따른 c-erbB-2 단백질의 발현

세포근원	-*	+	++	+++	합 계	p*
정상점막세포(a)	20	0	0	0	20	0.034, a vs b
원발병소(b)	102	22	7	2	133	0.021, b vs c
악성복수(c)	8	2	2	5	17	0.0008, a vs c
합 계	130	24	9	7	170	

*; 면역조직화학 염색강도

*; 각 관찰군을 X² test로 비교했을 때의 p값임

표 2. 종양의 조직학적 형태에 따른 c-erbB-2 단백질의 발현

조직학적 형태	-*	+	++	+++	합 계	p*
분화암(a)	32	11	3	1	47	0.768, a vs b
저분화암(b)	40	10	4	1	55	0.014, b vs c
인환세포암(c)	30	1	0	0	31	0.005, a vs c
합 계	102	22	7	2	133	

*; 면역조직화학 염색강도

*; 각 관찰군을 X² test로 비교했을 때의 값임

표 3. 종양의 위벽침윤도에 따른 c-erbB-2 단백질의 발현

T 병기	-*	+	++	+++	합 계	p*
T1	20	3	2	0	25	0.927, T1 vs T2
T2	24	5	0	0	29	0.049, T vs T3
T3	28	13	5	2	48	0.112, T1 vs T3
EGC	20	3	2	0	25	0.349
AGC	52	18	5	2	77	
serosa(-)	44	8	2	0	54	0.019
serosa(+)	28	13	5	2	48	

*; 면역조직화학 염색강도

*; 각 관찰군을 X² test로 비교했을 때의 p값임

c-erbB-2 단백질의 발현을 보여 인환세포암에서는 유의하게 낮은 결과를 볼 수 있었다(표 2). 따라서 이후의 여러 분석은 인환세포암 31예를 제외한 102예를 대상으로 시행하였다.

종양의 위벽 침윤정도에 따른 c-erbB-2 단백질 발현 빈도는 종양이 점막 또는 점막하층까지 국한된 경우(T1) 25예중 5예(20%), 장막을 침윤하지 않고 근육층까지만 침윤한 경우(T2) 29예중 5예(17.2%) 및 장

막이상의 침윤(T3)이 있는 48예중 20예(41.7%)에서 c-erbB-2 단백질의 발현을 보여 점막하층까지 국한된 조기위암과 근육층 이상 진행된 위암에서 c-erbB-2 단백질 표현의 차이는 유의하지 않았으나 장막침윤의 유무에 따라 유의한 차이가 있음을 알 수 있었다. 특히 장막이상의 침윤이 있는 경우 ++이상의 강한 염색의 빈도 역시 현저하게 높음을 알 수 있었다(표 3).

종양의 국소영역 림프절전이에 따른 c-erbB-2 단백질

표 4. 종양의 림프절 침윤도에 따른 c-erbB-2 단백질 발현

N 병기	-*	+	++	+++	합 계 ¹	p [*]
림프절전이 음성군	27	5	3	0	35	0.386
림프절전이 양성군	44	16	4	2	66	
림프절전이 음성군	27	5	3	0	35	0.195
N1 림프절 전이군	24	7	1	0	32	
N2 림프절 전이군	20	9	3	2	34	
림프절전이 음성군	27	5	3	0	35	0.455
1~3개 림프절 전이군	18	8	1	0	27	
4~10개 림프절 전이군	17	5	0	1	23	
11개 이상 전이군	9	3	3	1	16	

*; 면역조직화학 염색강도

*; 각 관찰군을 X² test로 비교했을 때의 p값임

¹; 림프절절제술을 시행하지 않은 1예를 제외한 101예임

표 5. 종양의 TNM 병기에 따른 c-erbB-2 단백질 발현

TNM 병기	-*	+	++	+++	합 계	p [*]
Stage I	26	3	2	0	31	0.125
Stage II	16	7	0	0	23	
Stage III	30	11	5	2	48	

*; 면역조직화학 염색강도

*; 각 관찰군을 X² test로 비교했을 때의 p값임

표 6. 종양의 크기에 따른 c-erbB-2 단백질 발현

종양크기	-*	+	++	+++	합 계	p [*]
<3 cm(a)	30	2	2	0	34	0.031, a vs b
3~6 cm(b)	29	11	2	0	42	0.236, b vs c
>6 cm(c)	13	8	3	2	26	0.0013, a vs c
합 계	72	21	7	2	102	

*; 면역조직화학 염색강도

*; 각 관찰군을 X² test로 비교했을 때의 p값임

의 발현빈도는 전이가 없었던 35예중 8예(22.9%), 1군(N2)이상 영역 림프절 전이가 있던 34예중 14예(41.2%)에서 양성염색이 관찰되어 림프절침윤범위에 따라 c-erbB-2 단백질 발현 빈도의 차이는 있었으나 통계적으로는 유의하지 않았다. 또 전이된 림프절의 수에 따른 c-erbB-2 단백질 발현 빈도의 관찰에 있어서

도 전이된 림프절의 수가 많을수록 c-erbB-2 단백질 발현 빈도가 높았으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(표 4).

종양의 병기에 따른 c-erbB-2 단백질 발현 빈도는 제 1병기 31예중 5예(16.1%), 제 2병기 23예중 7예(30.4%) 및 제 3병기이상 48예중 18예(37.5%)에서

표 7. 종양의 위치에 따른 c-erbB-2 단백질의 발현

종양위치	-	+	++	+++	합 계	p*
분문부	18	4	2	0	24	0.281
체 부	15	1	1	1	18	
유문부	39	16	4	1	60	
합 계	72	21	7	2	102	

*; 면역조직화학 염색강도

†; 각 관찰군을 X² test로 비교했을 때의 p값임

관찰되어 병기의 진행에 따라 c-erbB2 단백질 발현 빈도가 증가됨은 관찰할 수 있었으나 통계적으로 유의하지 않았다. 그러나 발현강도의 경우 ++이상 발현 빈도는 제 3병기 이상의 경우 현저하게 높게 나타났다(표 5).

종양의 크기에 따른 c-erbB-2 단백질의 발현 빈도는 종양의 크기가 직경 3 cm이하인 33예중 3예(9.1%), 3~6 cm의 43예중 14예(32.6%), 6 cm이상인 26예중 13예(50%)에서 양성염색을 보여 크기에 따라 유의한 c-erbB-2 단백질 발현이 있음을 알 수 있었다(표 6). 종양의 위치에 따른 c-erbB-2 단백질의 발현 빈도의 차이는 유의하지 않았다(표 7).

고 찰

사람의 암유전자 c-erbB-2의 산물은 아미노산 배열의 50%가 상피성장인자수용체(epidermal growth factor receptor; EGFR)와 동일하고 tyrosine kinase domain에 있는 아미노산의 경우 80% 이상이 동일하여²⁾ c-erbB-2 수용체 역시 EGFR과 유사하게 강력한 성장촉진인자로 작용하리라 생각된다¹⁵⁾. 이와 같이 c-erbB-2는 EGFR 유전자와 구조적으로 유사하나 두 유전자 산물의 길이가 각각 185 kD 및 17 kD로 서로 다르고 유전자의 위치가 각각 17번째 및 7번째 염색체로 서로 다를 뿐만 아니라⁹⁾, c-erbB-2 유전자는 명백한 ligand의 존재없이 과표현이나 점 돌연변이(point mutation)에 의해 활성화될 수 있고^{7, 25)} EGFR 게놈(genome)의 증폭은 주로 상피 세포암에서 관찰되지만³⁷⁾ c-erbB-2 유전자의 증폭은 선암에서만 제한적으로 관찰된다^{26, 28, 40, 44)}는 차이가 있다.

암유전자의 활성화 기전은 돌연변이(mutation), 증

폭(amplification), 과표현(overexpression), 전위(translocation)등으로 알려져 있는데²¹⁾ c-erbB-2 유전자의 활성화기전은 유전자 증폭 혹은 과표현에 의한 것으로 추측한다.

c-erbB-2 단백질의 면역조직화학적 염색결과는 유전자증폭과 밀접한 상관 관계가 있다고 보고되고^{10, 17)} 있으나, 다른 연구^{4, 33)}에서는 유전자증폭 없이도 상당한 염색을 관찰할 수 있다고 보고하고 있다. 즉 고농도의 암단백은 대부분 유전자 증폭과 상관관계가 있지만 정상 유전자복사에서 중등도의 발현은 일어날 수 있다¹³⁾. 따라서 c-erbB-2 단백질에 대한 특이적 항체를 이용한 종양세포 세포막에 대한 면역조직화학적 염색법이 c-erbB-2 유전자 증폭의 믿을 만한 지표로 이용될 수 있고^{6, 11, 19)} Southern blotting에 의한 DNA 분석에 비해 간단하고 널리 적용할 수 있는 장점이 있다⁴²⁾. 특히 Berger등⁴⁾은 명백한 c-erbB-2 유전자 증폭없이도 c-erbB-2단백의 발현이 일어날 수 있기 때문에 c-erbB-2단백의 발현을 유도하는 다른 기전이 있다고 주장하고 암유전자의 복사수를 분석하는 것 보다 암단백을 조사하는 것이 더욱 적절하다고 하였다. 따라서 본 연구에서도 단클론항체를 이용한 면역조직화학적 염색법을 이용하여 c-erbB-2 단백질발현을 조사하였다.

Mori등^{17, 18)}은 태아 위선세포(fetal gastric glandular cells)의 세포막에서 c-erbB-2 단백질의 발현과 성인 위장세포에서 희미한 염색을 관찰하였다고 하였으나, Falck와 Gullick⁹⁾은 126예의 위암에서 주변의 정상 또는 화생(metaplastic) 및 이행성(dysplastic) 점막에 대한 조사에서 c-erbB-2 단백질의 유의한 양성염색을 관찰하지 못하였다고 하였다. Uchino등³²⁾ 역시 장화생의 동반 유무에 관계없이 정상 위

점막에는 유의한 c-erbB-2 단백질 발현은 없다고 하였다. 이밖에 여러 연구^{24,42)}에서도 암세포 이외의 정상 세포에서는 c-erbB-2 단백질 발현을 발견하지 못했다. 본 연구의 결과 역시 20예의 정상 위점막세포에서 유의한 c-erbB-2 단백질 발현은 없었다. 따라서 c-erbB-2 단백질 발현은 암세포에 특이적으로 나타는 것으로 생각된다.

대부분 유방암에서는 c-erbB-2 유전자 증폭이나^{13,43)} 면역조직화학적 염색에 있어 원발 병소와 전이 병소간 일치하는 결과를 보고하고 있으나 위암의 전이 병소는 원발병소보다 c-erbB-2 유전자 증폭이나^{13,43)} 면역조직화학적 염색에 있어 원발 병소와 전이 병소간 일치하는 결과를 보고하고 있으나 위암의 전이 병소는 원발병소보다 c-erbB-2 암유전자 증폭의 빈도가 훨씬 높고³¹⁾, 전이된 림프절에서의 c-erbB-2 암유전자의 증폭은 원발 병소보다 유의하게 높게 나타난다^{16,22,31)}. 이렇게 c-erbB-2 유전자 증폭이 원발병소보다 전이병소에서 더 높게 발견되는 것은 c-erbB-2 유전자 증폭이 위암생성(stomach cancer carcinogenesis)에 있어 초기 사건(initial event)이 아니라 종양의 진행(tumor progression)과 전이에 관계되는 후발 사건(late event)으로 일어나는 것임을 시사한다^{14,22,31)}.

본 연구의 결과에서도 원발병소보다 전이병소인 악성복수에서의 암세포에서 c-erbB-2 단백질 발현 빈도가 유의하게 높고 그 염색 강도도 훨씬 높게 나타난 것으로 보아 c-erbB-2 단백질 발현은 종양의 전이에 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다고 할 수 있겠다. 또 과도한 국소침윤에 의한 전이 병소라 할 수 있는 악성복수의 암세포에서 그 발현이 유의하게 높을 뿐만 아니라 종양의 크기에 따라 또 암의 국소 침윤 정도에 따라 그 발현이 유의하게 높은 것으로 미루어 볼 때 c-erbB-2 단백질 발현은 종양의 과격한 국소생물학적 행태(local aggressive behavior)와 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다.

유방암에서 c-erbB-2 단백질 발현과 세포분화도의 관계에 대해 관련이 없다는 보고^{34,44)}도 있으나 저분화암에서 유의하게 발현의 빈도가 높다^{3,4)}고 한다. 반대로 위암에서는 위암세포의 병리조직학적 특성에 따라 c-erbB-2 단백질 발현 빈도에 현격한 차이가 있음을 보고하고 있는데 대체로 저분화암 및 인화세포암(signet ring carcinoma)보다 분화암에서 유의하게 높은

발현의 경향을 보고^{5,17,27,40)}하고 있다.

본 연구의 결과 인화세포암에서는 분화암 또는 저분화암에 비해 유의하게 c-erbB-2 단백질 발현 빈도가 낮게 나타났으나, 분화암과 저분화암간에는 c-erbB-2 단백질 발현의 차이가 없었다. 따라서 위암세포의 조직학적 특성과 c-erbB-2 단백질 발현과는 유의한 상관관계가 있다고 사료된다. 위암의 조직발생(histogenesis)을 고려해 볼 때 저분화암은 첫째, solid nest 또는 focal tubular structure(응집형-cohesive type)나 둘째, scattered manner(비응집형-non-cohesive type)로 성장하는 두 가지 형태로 구분할 수 있는데, p53 단백질 핵내 축적 빈도는 유두상세포암, 중등도 이상 분화암 및 응집형(cohesive type)의 저분화암에서 40% 정도로 높은 반면 인화세포암과 비응집형(noncohesive type)의 저분화암에서는 거의 발견되지 않는 차이가 있는데 이로 미루어 서로 다른 유전적 변형(abnormalities)이 이러한 두 가지 조직학적 형태-응집형과 비응집형 또는 장형(intestinal type)과 미만형(diffuse type)-의 위암 생성과 성장에 독립적으로 관련이 있음을 시사한다³²⁾.

본 연구의 결과 인화세포암에서 c-erbB-2 단백질 발현이 현저히 낮은 것은 암종조직발생의 근원적 차이로 설명할 수 있겠고, 저분화암의 c-erbB-2 단백질 발현 빈도가 대상 55예중 15예로 다른 연구에 비해 높은 것은 Uchino등³²⁾의 설명과 같이 본 연구 대상 중 cohesive type의 저분화암이 많이 포함되어있거나 본 연구에서는 종양세포의 획득과정이 신진위암세포를 분리하여 c-erbB-2 단백질 발현을 검사하는 방법을 이용하였기 때문에 원래 저분화암에 포함된 항원이 그대로 잘 보존된 결과일 수 있다고 생각된다.

c-erbB-2 단백질 발현과 유방암의 림프절전이와 상관성이 있다는 보고^{4,10,26,35,44)}는 많다. 위암에서 역시 c-erbB-2 유전자 증폭은 림프절전이 또는 수와 관련이 있다^{4,26,33)}고 하며 Mizutani등¹⁶⁾은 조기위암에서 c-erbB-2 단백질 발현된 예는 모두 림프절전이가 있었다고 하였다. Yonemura등^{41,42)}은 조기위암에서 c-erbB-2 단백질 발현이 있는 경우 림프절전이의 위험성이 3배 높으나 위벽침윤도, 종양의 크기 및 혈관침윤도 등과는 상관관계가 없다고 하였다. 또 Uchino등³²⁾은 위암에서 c-erbB-2 단백질 발현은 종양의 국소침윤, 종양의 위치와 상관관계가 없으며 림프절전이

가 있는 경우 c-erbB-2 단백질의 발현 빈도가 높게 나타나긴 하였지만 통계적 유의성은 없었다고 하였다.

유방암에서 종양의 크기와 c-erbB-2 단백질의 발현과 관계가 없다는 보고^{26,35)}도 있으나, van der Vijver 등³³⁾은 종양의 크기가 2 cm 이상인 경우 c-erbB-2 단백질 발현의 빈도가 유의하게 높다고 하였고, 이는 c-erbB-2 단백질의 발현이 종양의 성장율(tumor growth rate)과 관련이 있음을 시사한다고 하였다.

본 연구의 결과 장막침윤여부에 따라 c-erbB-2 단백질 발현의 유의한 차이가 있었고 림프절전에 따라서는 통계적으로 유의한 수준은 아니었으나 림프절전이 군이 원발병소에서 멀어질수록, 또 림프절 전이 수가 증가할 수록 발현의 빈도가 증가하는 경향을 보였다. 또 종양의 크기에 따라서는 종양의 크기가 3 cm보다 큰 경우 유의하게 높은 빈도의 발현을 나타내었다,

본 연구는 전향적 연구로 현재 대상환자의 생존율을 비교할 수는 없지만 연구 결과 c-erbB-2 단백질의 발현과 여러 예후인자와 유의한 상관성으로 볼 때 위암에서 c-erbB-2 단백질의 발현은 종양의 과격한 생물학적 형태 및 예후와 밀접한 관계가 있을 것으로 추측된다.

이상의 결과로 볼 때 첫째, 위암에서 c-erbB-2 단백질의 발현은 종양의 위벽침윤도, 종양의 크기 및 악성 복수의 암세포에서 유의하게 높은 결과를 보여 종양의 과격한 성장양식과 밀접한 관련이 있다고 생각된다. 둘째, 위암의 병리조직학적 형태에 따라 저분화암 및 분화암사이에는 c-erbB-2 단백질 발현의 유의한 차이가 없었으나 인환세포암에서는 현저하게 낮게 나타난 결과를 볼 때 c-erbB-2 단백질의 발현은 위암의 조직학적 특이성이 있다고 생각되고 그 이유는 종양의 형태학적 차이에 따른 암단백 항원성의 차이 또는 세포분화도에 따른 암세포 발생기전(carcinogenesis)의 차이로 추정된다. 셋째, 위암의 가장 중요한 예후인자인 림프절 및 병기와의 관계에서 통계적으로 유의한 차이는 없었지만 림프절 전이의 범위가 넓을수록, 림프절 전이의 수가 많을수록, 또 병기가 진행될수록 c-erbB-2 단백질 발현의 빈도가 높은 경향은 관찰할 수 있었다. 따라서 위암에서 c-erbB-2 단백질의 발현은 종양의 과격성의 지표 및 예후인자적 가치를 가졌다고 생각된다.

따라서 향후 더 많은 조사대상에 대한 계속적인 추적조사가 필요하다고 생각되며 c-erbB-2 단백질 발현에 따른 불량한 예후의 기전을 밝히려는 연구가 필요하다

고 본다.

REFERENCES

- 1) 장우익, 양우익, 이종인, 김현수, 조미연, 박종구, 심영학: 위암에서는 c-erbB-2 protein, epidermal growth factor receptor protein overexpression 및 proliferating cell nuclear antigen expression의 면역조직화학 검사의 의의. 원주의대 논문집 5: 125, 1992
- 2) Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA: The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. Nature 319: 226, 1986
- 3) Barnes DM, Lammie GA, Millis RR, Gullick WL, Allen DS, Altman DG: An immunohistochemical evaluation of c-erbB-2 expression in human breast carcinoma. Br J Cancer 58: 452, 1988
- 4) Berger MS, Locher GW, Saurer S, Gullick WJ, Waterfield MD, Groner B, Hynes NE: Correlation of c-erbB2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. Cancer Res 48: 1238, 1988
- 5) Coussens L, Tang-Feng TL, Liao YC, Cheu E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, Levinson A, Ullrich A: Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. Science 230: 1132, 1985
- 6) Czerniak B, Herz F, Koss L: DNA distribution patterns in early gastric carcinomas: A feulgen cytometric study of gastric brush smears. Cancer 59: 113, 1987
- 7) Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, Aaronson SA: erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. Science 237: 178, 1987
- 8) Falck VG, Guillick WJ: c-erbB2 oncogene product staining in gastric adenocarcinoma. An immunohistochemical study. J Pathol 159: 107, 1989
- 9) Fukushige S, Matsubara K, Yoshida M, Sasaki M, Suzu10)0ki T, Semba K, Toyoshim oncogenamoto T: Localization of a novel v-erbB-related gene, c-erbB2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line. Mol Cell Biol 6: 955, 1986
- 10) Gusterson BA, Gullick WJ, Venter DJ, Powles TJ, Elliott C, Ashley S, Tidy A, Harrison S: Immunohistochemical localization of c-erbB2 in

- human breast carcinomas. *Mol Cell Probes* **2**: 388, 1988
- 11) Hoshino T, Nagashima T, Cho KG, Murovic JA, Hodes JE, Wilson CB, Edwards MSB, Pitts LH: S-phase fraction of human brain tumors in situ measured by uptake of bromodeoxyuridine. *Int J Cancer* **38**: 369, 1986
 - 12) Jain S, Filipe I, Gullick WJ, Morris RW: c-erbB-2 proto-oncogene expression and its relationship to survival in gastric carcinoma: An immunohistochemical study on archival material. *Int J Cancer* **38**: 668, 1991
 - 13) Lacroix H, Iglehart JD, Skinnerr MA, Kraus MH: Overexpression of c-erbB-2 of EGF receptor proteins present in early stage mammary carcinoma is detected simultaneously in matched primary tumors and regional metastases. *Oncogene* **4**: 145, 1989
 - 14) Lemoine NR, Jain S, Silverstre F, Lopes C, Hughes CM, Gullick WJ, Isabel Filipe M: Amplification and overexpression of the EGF receptor and c-erbB-2 protooncogenes in human stomach cancer. *Br J Cancer* **64**: 79, 1991
 - 15) McCann A, Dervan PA, Johnston PA, Gullick WJ, Carney DN: c-erbB-2 oncoprotein expression in primary human tumor. *Cancer* **65**: 88, 1990
 - 16) Mizutani T, Onda M, Tokunaga A, Yamanaka N, Sugisaki Y: Relationship of c-erbB-2 protein expression and gene amplification to invasion and metastasis in human gastric cancer. *Cancer* **72**: 2083, 1993
 - 17) Mori S, Akiyama T, Morishita Y, Shimizu S, Sakai K, Sudoh K, Toyoshima K, Yamamoto T: Light and electron microscopical demonstration of c-erbB2 gene product-like immunoreactivity in human malignant tumors. *Virchows Arch B* **54**: 8, 1987
 - 18) Mori S, Akiyama T, Yamada Y, Morishita Y, Sugawara I, Toyoshima K, Yamamoto T: C-erbB-2 gene product, a membrane protein commonly expressed on human fetal epithelial cells. *Lab Invest* **61**: 93, 1989
 - 19) Nagashima T, DeArmond SJ, Murovic J, Hoshino T: Immunocytochemical demonstration of S-phase cells by anti-bromodeoxyuridine monoclonal antibody in human brain tumor tissues. *Acta Neuropathol* **67**: 155, 1985
 - 20) Noguchi Y, Tsuburaya A, Makino T, Fukuzawa K, Nomura K, Yoshikawa T, Imada T, Amando T, Matsumot A: Predictive value of c-erbB-2 and DNA ploidy patterns in gastric carcinoma recurrence. *Int Surg* **78**: 107, 1993
 - 21) Pimentel E: *Oncogenes and Cancer*. In Pimentel, eds. *Oncogenes*. Florida, CRC Press, 1986, 159
 - 22) Ranzani GN, Pellegata NS, Previdere C, Sargoni A, Vio A, Maltoni M, Amadori D: Heterogenous protooncogene amplification correlates with tumor progression and presence of metastasis in gastric cancer patients. *Cancer Res* **50**: 7811, 1990
 - 23) Sasano H, Date F, Imatani A, Asaki S, Nagura H: Double immunostaining for c-erbB-2 and p53 in human stomach cancer cells. *Human Pathol* **24**(6): 584, 1993
 - 24) Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, Weinberg RA: The neu oncogene: an erbB-related gene encoding a 185,000-Mr tumor antigen. *Nature* **321**: 513, 1984
 - 25) Segatto O, King CR, Pierce JH, DiFiore PP, Aaronson SA: Different structural alterations upregulate in vitro tyrosine kinase activity and transforming potency of the erbB-2 gene. *Mol Cell Biol* **8**: 5570, 1988
 - 26) Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL: Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **234**: 177, 1987
 - 27) Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA: Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244**: 707, 1989
 - 28) Tal M, Wetzler M, Josefberg Z, Deutch A, Gutman M, Assaf D, Kris R, Shiloh Y, Givol D, Schlessinger J: Sporadic amplification of the HER/neu protooncogene in adenocarcinomas of various tissues. *Cancer Res* **48**: 1517, 1988
 - 29) Tateishi M, Toda T, Minamisono Y, Nakasaki S: Clinicopathological significance of c-erbB-2 protein expression in human gastric carcinoma. *J Surg Oncol* **49**: 209, 1992
 - 30) Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, Tanaka Y, Hirota T, Tsugane S, Shiraiishi M, Toyoshima K, Yamamoto T, Terada M, Sugimura T: Immunohistochemical study overexpression of c-erbB-2 protein in human breast cancer: Its correlation with gene amplification and long-term survival of patients. *Jpn J Cancer Res* **81**: 327, 1990

- 31) Tsujino T, Yoshida K, Nakayama H, Shimosato T, Tahara E: *Alteration of oncogenes in metastatic tumors of human gastric carcinoma. Br J Cancer* **62**: 226, 1990
- 32) Uchino S, Tsuda H, Maruyama K, Kinoshita T, Sasako M, Saito T, Kobayashi M, Hirohashi S: *Overexpression of c-erbB-2 protein in gastric cancer. Vancer* **72**: 3179, 1993
- 33) van der Vijver MJ, Peterse JL, Mooi WJ, Wisman P, Lomans J, Dalesio O, Nusse R: *Neu-protein overexpression in breast cancer association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. N Engl J Med* **319**: 1239, 1988
- 34) van de Vijver M, van der Berselaar R, aãã P, Cornelisse Cããããããããã J, Nusse R: *Amplification of the neu(c-erbB2) oncogene in human mammary tumors is relatively frequent and is often accompanied by amplification of the c-erbA oncogene. Mol Cell Biol* **7**: 2019, 1987
- 35) Wright C, Angus B, Nicholson S, Sainbury RC, Cahirns J, Gullick WJ, Kelly P, Harris AL, Wilson Horne CH: *Expression of c-erbB2 oncoprotein: aprognostic indicator in breast cancer. Cancer Res* **49**: 2087, 1989
- 36) Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, Saito T, Toyoshima K: *Similarity of protein encoded by the human c-erbB2 gene to epidermal growth factor receptor. Nature* **319**: 230, 1986a
- 27) Yamamoto T, Kamata N, Kawano H, Shimizu S, Kuroki T, Toyoshima K, Rikimaru K, Nomura N, Ishizaki R, Pastan I, Gamou S, Shimizu N: *High incidence of amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human squamous cell lines. Cancer Res* **46**: 414, 1986b
- 38) Yokota J, Wada M, Yoshida T, Noguchi M, Terasaki T, Shimosato Y, Sugimura T, Terada M: *Heterogeneity of lung cancer cells with respect to the amplification and rearrangement of myc family oncogenes. Oncogene* **2**: 607, 1988a
- 39) Yokota J, Yamamoto T, Miyajima N, Toyoshima K, Nomura N, Sakamoto H, Yoshida T, Terada M, Sugimura T: *Genetic alterations of the c-erbB-2 oncogene occur frequently in tubular adenocarcinoma of the stomach and are often accompanied by amplification of the v-erbA homologue. Oncogene* **2**: 283, 1988b
- 40) Yokota J, Yamamoto T, Toyoshima K, Terada M, Sugimura T, Battifora H, Cline MJ: *Amplification of c-erbB2 oncogene in human adenocarcinomas in vivo. Lancet* **i**: 765, 1986
- 41) Yonemura Y, Ninomiya I, Ohoyama S, Fushida S, Kimura H, Tsugawas K, Kamata T, Yamaguchi A, Miyazaki I, Endou Y, Tanaka M, Sasaki T: *Correlation of c-erbB-2 protein expression and lymph node status in early gastric cancer. Oncology* **49**: 363, 1992
- 42) Yonemura Y, Ninomiya I, Yamaguchi A, Fushida S, Kimura H, Ohoyama S, Miyazaki I, Endou Y, Tanaka M, Sasaki T: *Evaluation of immunoreactivity for c-erbB2 protein as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer. Cancer Res* **51**: 1034, 1991
- 43) Zhou DJ, Ahuja H, Cline MJ: *Proto-oncogene abnormalities in human breast cancer: c-erbB2 amplification does not correlate with recurrence of disease. Oncogene* **4**: 105, 1989
- 44) Zhou D, Battifora H, Yokota J, Yamamoto T, Cline MJ: *Association of multiple copies of the c-erbB2 oncogene with spread of breast cancer. Cancer Res* **47**: 6123, 1989