



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2009년 2월

박사학위논문

김윤성 유방관암종에서 Pin-1 및
VEGF-C 발현에 대한 해석

조선대학교 대학원

의학과

김 병 철

침윤성 유방관암종에서 Pin-1 및 VEGF-C 발현에 대한 해석

Interpretation of Pin-1 and VEGF-C expression in breast
infiltrating duct carcinoma

2009년 2월 25일

조선대학교 대학원

의학과

김 병 철

침윤성 유방관암종에서 Pin-1 및 VEGF-C 발현에 대한 해석

지도교수 조 현 진

이 논문을 의학박사학위신청 논문으로 제출함.

2008년 10월 일

조선대학교 대학원

의학과

김 병 철

김 병철의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 김성환 인

위 원 조선대학교 교수 조현진 인

위 원 조선대학교 교수 민영돈 인

위 원 조선대학교 교수 김권천 인

위 원 조선대학교 교수 임성철 인

2008년 12월 일

조선대학교 대학원

목 차

Abstract.....	1
서론.....	2
재료 및 방법.....	4
결과.....	7
고찰.....	11
결론.....	17
참고문헌.....	19

표 목 차

Table 1. The clinicopathologic data according to the expression pattern of Pin-1, VEGF-C, p53 and cyclin D1 in mammary infiltrating duct carcinoma..... 26

Table 2. Interrelation between the Pin-1 and Cyclin D1 immunoexpression statuses in mammary infiltrating duct carcinoma (%)...... 27

Table 3. Multivariate analysis on disease-related survival (Cox proportional hazard model) according to the clinicopathologic variables in mammary infiltrating duct carcinoma..... 28

도 목 차

Figure 1. Immunohistochemical staining for Pin-1 in mammary infiltrating duct carcinoma.....	30
Figure 2. Immunohistochemical staining for VEGF in mammary infiltrating duct carcinoma.....	31
Figure 3. Immunohistochemical staining for p53 protein in mammary infiltrating duct carcinoma.....	32
Figure 4. Immunohistochemical staining for cyclin D1 in mammary infiltrating duct carcinoma.....	33
Figure 5. Cumulative survival curve by lymph node metastasis.....	34
Figure 6. Cumulative survival curve by tumor size.....	35

Abstract

Interpretation of Pin-1 and VEGF-C expression in breast infiltrating duct carcinoma

Kim, Byung-Chul

Advisor: Prof. Cho, Hyun-Jin, Ph.D.

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

Pin-1 has been shown to regulate several phases of the cell cycle and is strikingly overexpressed in many human cancers. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C is a potent lymphangiogenic factor produced by tumor and stromal cells. However, little is known about the roles of Pin-1 and VEGF-C in breast carcinoma.

p53 protein and cyclin D1 overexpressions have been shown to play a role as prognostic factors in many human cancers. To better understand the roles of Pin-1 and VEGF-C in breast carcinoma, the author evaluated the immunohistochemical expressions of Pin-1 and VEGF-C in relationship with p53 protein or cyclin D1 overexpression and clinicopathologic parameters in 128 mammary infiltrating duct carcinomas.

There were positive expression in 100% of Pin-1, 88% of VEGF-C, 35% of p53 protein, and 66% of cyclin D1 in breast carcinoma. There were statistically significant correlation of positive expression of Pin-1 with tumor grade ($p < 0.01$) and lymph node metastasis or cyclin D1 overexpression ($p < 0.05$, respectively). Significant correlation was observed between VEGF-C and tumor grade, lymph node metastasis or clinical stage ($p < 0.01$, respectively).

These results indicate that elevated Pin-1 or VEGF-C expressions is more common in infiltrating duct carcinomas with poor prognostic characteristics and is partly associated with an unfavorable outcome. Given the role of cyclin D1 overexpression in oncogenesis of breast, these results suggest that overexpression of Pin-1 and VEGF-C may promote tumor progression and metastasis.

Key Words: Pin-1, VEGF-C, p53 protein, Cyclin D1, Breast, Carcinoma, Prognosis

서 론

유방암은 최근 발생률이 계속 증가추세에 있으며 여성암중 1위를 차지하고 있으며 진단과 치료방법이 발전함에도 불구하고 여성 암사망 원인중 수위를 차지한다(보건복지가족부·국립암센터, 2008). 유방암의 예후를 좌우하는 인자들 중에서 종양의 크기와 림프절전이 유무가 가장 중요한 독립적 예후 인자로 밝혀져 있는데(Page, 1991; Fisher, 1984), 재발 가능성이 높은 고 위험군을 구별할 수 있는 보조적 예후인자로서 DNA 배수성, 증식 분획(Clark et al., 1989), 여러 가지 수용체(Henderson et al., 1982; Parl et al., 1984), Her-2/neu와 p53 등의 종양유전자 및 종양억제 유전자의 역할(Slamon et al., 1987; Cattoretti et al., 1988)에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다.

최근에 알려진 peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase (PPIase) Pin-1은 표피성장인자(epidermal growth factor)를 통한 인산화과정을 거쳐 핵에서 세포질로 이동하여 세포사를 초래하여 세포주기를 조절하는데 기여한다. 그러나 Pin-1은 각종 장기의 종양발생(oncogenesis)에 깊이 관여하는 것으로 밝혀지면서 이에 대한 관심이 집중되고 있다. Pin-1은 특정 단백질의 *cis/trans* isomerization을 촉진하며, 이를 통한 구조변화는 많은 Pin-1 기질에 큰 영향을 미칠 수 있다(Liou et al., 2002; Lu et al., 1999-A; Lu et al., 1999-B; Ryo et al., 2002). 이 중에서도 중요한 종양유전자단백(oncogenic protein)인 β -catenin과 cyclin D1이 이와 같은 방법으로 Pin-1에 의하여 조절되는 것으로 밝혀졌다(Ryo et al., 2001; Wulf et al., 2001). Pin-1의 과발현이 각종 암의 발생과 관련성이 있으며 종양 등급과 비례하는 것으로 보고되고 있는데, 이는 Pin-1이 인산화된 c-Jun과 결합하여 세포의 cyclin D1 mRNA와 단백을 상승시키는 반면 내인성 Pin-1의 억제제는 인산화된 c-Jun의 transcriptional activity를 감소시킨다(Wulf GM et al., 2001).

림프관은 암의 전이에 있어 중요한 통로이며 림프절 전이는 각종 암의 불량한 예후를 결정짓는 가장 중요한 예후인자이다. 암의 전이에 대한 여러 연구중에서 최근 신생 림프관 형성(lymphangiogenesis)에 관한 연구가 활발한데 이는 중요한 림프관 성장인자인 VEGF-C와 -D의 발견에 기인하지만 이들의 정확한 역할은 자세하게 밝혀지지 않았다

(Stacker et al., 2004; Zhang et al., 2008). VEGF family에 속하는 VEGF-C는 림프관 내피세포에 대한 특이 표지자로 알려진 VEGF receptor-3 (VEGFR-3, Flt-4)에 대한 리간드로서 림프관 증식을 초래한다(Joukov et al., 1996; Jeltsch et al., 1997). VEGF-C는 생리적인 혈관형성, 각종 혈관형성질환의 발생 및 진행을 조절함은 물론 종양 림프관 신생을 촉진하여 각종 암세포의 전파 및 림프절 전이를 유발하는 것으로 보고되고 있다(Cao et al., 1998; Mandriota et al., 2001).

Pin-1과 VEGF-C가 각종 종양의 형성, 진행 및 전이에 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 알려져 있으나 유방암에서 이들의 연구보고는 흔하지 않다. 이에 저자는 유방의 침윤성 관암종을 대상으로 면역조직화학 염색을 통하여 이들 각각의 발현과 임상 병기, 환자 생존 기간, 환자의 나이, 종양의 크기, 조직학적 등급 및 림프절 전이 수를 포함한 여러 가지 임상 및 조직학적 자료를 토대로 비교 검토하고 cyclin D1 및 p53과의 관계도 검토하고자 하였다. 또한 종양의 진행 및 환자의 예후에 어떠한 영향을 미치는가에 대한 통계검증을 하였고, 이를 토대로 예방 및 치료의 효율적 접근을 모색하고자 한다.

재료 및 방법

1. 연구재료

본 연구에 사용된 증례는 1990년 1월부터 1996년 6월까지 조선대학교 부속병원에서 유방의 침윤성 관암종으로 절제술을 시행한 여성 환자 중 파라핀 포매조직이 비교적 잘 보존된 128예를 대상으로 하였다. 생존율 상관성 조사는 환자의 생존 추적이 불가능한 5예를 제외한 123예를 대상으로 하였으며, 수술전에 화학요법이나 방사선치료를 받은 경우는 연구대상에서 제외하였다. 증례의 임상기록과 병리과 진단지 등을 재검토하여 환자의 나이, 종양의 크기, 림프절 전이 수 및 임상 병기를 확인하고 생존 여부를 전화 및 서신을 통하여 확인하였다. 환자는 최초 진단 후 최소 1개월부터 최고 116개월간 추적하였다(39개월 이하; 22예, 40-59개월; 52예, 60-79개월; 24예, 80-99개월; 24예, 100개월 이상; 6예).

2. 연구방법

1) 병리학적 분류

세포의 조직학적 등급은 Bloom과 Richardson의 방법을 변형한 Nottingham/Tenovus Breast Cancer Study에서 사용한 등급 기준(Elston & Ellis, 1991)을 사용하였다. 종양의 크기는 American Joint Committee on Cancer의 T분류에 따라 2 cm 이하(T_1), 2.1~5 cm (T_2), 5.1 cm 이상(T_3)으로 분류하였고(Greene et al., 2002), 액와부 림프절의 전이여부는 Fisher 등(1984) 기준에 따라 전이가 없는 경우(N_0), 1~3개에 전이가 있는 경우(N_1), 4개 이상의 림프절에 전이가 있는 경우(N_2)로 분류하였다. 임상병기는 American Joint Committee on Cancer Staging (Greene et al., 2002)에 따라서 분류하였다.

2) 면역조직화학적 염색

10% 완충 중성 포르말린에 고정 후 제작한 파라핀 포매 조직을 4 μ m 두께로 박절하

여 X-traTM슬라이드(Surgipath, Richmond, U.S.A.)에 부착하여 xylene에 탈파라핀한 뒤 무수 알코올, 90%, 75% 및 50% 에탄올에 각각 2분씩 처리하여 함수시켰다. 항원성 회복을 위하여 citrate 완충액 (10mM, pH 6.0)에 슬라이드를 담가 전자오븐에 15분간 끓인 후 실온에 방치시켜 20분간 식힌 후 50mM Tris 완충용액(TBS, pH 7.5)으로 수세하였다. 조직절편내의 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위하여 0.3% hydrogen peroxide-methanol에 10분간 처리 후 증류수로 세척하고 차단항체를 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 일차항체인 Pin-1 rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A., 1:400 희석), VEGF-C goat polyclonal antibody (N-19, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A., 1:50 희석), p53 mouse monoclonal antibody (DO-7, Dako, Glostrup, Denmark, 1:200 희석) 그리고, cyclin D1 rabbit polyclonal antibody (H-295, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A., 1:100 희석)를 반응시켰다. Pin-1과 p53은 37°C에서 1시간, VEGF-C 및 cyclin D1은 4°C에서 밤새도록 반응시켰다. 이후 Tris 완충액으로 세척하고 VEGF-C는 goat ImmunoCruzTM staining system(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.), 그 외 Pin-1, p53 및 cyclin D1은 Histostain-Plus kits, broad spectrum(Zymed, San Francisco, CA, U.S.A.)을 이용하여 비오틴이 함유된 이차항체를 실온에서 10분간 반응시킨 후 Tris 완충액으로 수세하고, HRP(horseradish peroxidase)가 결합된 streptavidin용액을 10분간 반응시켰다. Tris 완충액으로 세척 후 HRP substrate로 발색하였다. Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 시행하고, universal mount (Research Genetics, Huntsville, AL, U.S.A.)로 봉입하였다.

매 염색시 VEGF-C의 양성대조는 조기대반 조직을, Pin-1 및 p53 발현의 양성 대조는 다른 연구에서 발현이 확인된 대장암 조직을 이용하였으며, mantle cell lymphoma로 확진된 증례를 cyclin D1의 양성 대조로 이용하였다. 음성 대조군은 1차 항체를 정상 goat serum으로 대체한 것으로 하였다.

3) 염색 결과의 판정

Pin-1에 대한 염색은 핵내에 반응을 보이는 경우를 양성 반응으로 판정하였는데, 반응 정도에 따라 강 양성(3+, strong positive), 중등도 양성(2+, moderate positive), 약 양성(1+, weak positive) 및 음성(1, no staining)으로 구분하였다(Nakashima et al., 2004).

VEGF-C에 대한 염색은 세포질내 염색반응을 보이는 경우 양성반응으로 판정하였는데, 면역염색이 시행된 검체를 대상으로 전체 종양세포를 평가하여 염색이 관찰되지 않으면 음성(-), 종양의 <5%에서 양성세포가 국소적으로 관찰되면 1+, 5-20%인 경우 2+, >20%에서 미만성 양성인 경우 3+로 판정하고, 2+와 3+를 강양성 군(high expression group), 1+를 약양성 군(low expression group)으로 재분류하였다(Zhang et al., 2008).

Cyclin D1과 p53의 염색정도 판정은 광학현미경하에서 핵단백질이 붉은 갈색으로 염색되는 경우를 양성으로 판정하되 종양세포 영역의 5% 이내에서 핵 염색된 경우를 음성(-)으로, 5-10%의 종양세포 핵이 염색된 경우 약한 과발현(1+), 11-50% 양성 염색의 경우 중등도 과발현(2+), 50% 이상은 강한 과발현(3+)으로 분류하였다(Lim & Lee, 2002).

4) 통계학적 분석

통계학적 분석은 SPSS(statistical package for the social sciences), Windows, version 12(SPSS, Korea)를 이용하였는데, 임상 병기, 연령, 종양 등급, 종양 크기, 림프절 전이 상태와 Pin-1, VEGF-C, p53 및 cyclin D1 발현 양상과의 상관관계, Pin-1, VEGF-C, p53 및 cyclin D1 상호간의 발현 양상간의 상관관계, Pin-1, VEGF-C, p53 및 cyclin D1 발현 양상과 생존 여부와의 상관 관계는 χ^2 test로 검정하였고, Kaplan-Meier 생존율 분석은 Wilcoxon rank test를 이용하여 통계 분석하였다. 그리고, 이들의 통계학적 유의 수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. 임상 소견

환자의 연령은 25~79세(평균; 49세)로, 각 연령대별 분포는 39세 이하 군이 24예(19%), 40~49세 군은 46예(36%), 50~59세 군은 37예(29%), 60세 이상 군은 21예(16%)이었다. 종양의 크기는 0.5~8.5cm(평균; 2.7cm)이었으며 2cm이하 군은 56예(44%), 2.1~5.0cm 군은 62예(48%), 5.1cm 이상 군은 10예(8%)이었다.

2. 조직학적 소견

Nottingham/Tenovus Breast Cancer Study의 조직학적 등급 기준에 의하여 종양을 분류하였을 때 1등급 31예(24%), 2등급 61예(48%), 3등급이 36예(28%)이었다. 림프절 전이 여부는 림프절 전이가 없는 군이 71예(56%), 1~3개 전이된 경우 23예(18%), 4개 이상 전이된 군이 34예(27%)이었다. 종양의 임상 병기는 1기 34예(27%), 2기 77예(60%), 그리고 3기 17예(13%)이었다.

3. Pin-1, VEGF-C, p53 및 cyclin D1의 면역조직화학적 발현 양상

Pin-1은 종양주변의 정상 유방조직에서도 약한 염색(1+)이 핵에서 관찰되었다. 침윤성 관암종의 경우 대부분 중등도 또는 강한 양성(2+ 또는 3+)이 관찰되었으며 주변에 관내암종(DCIS)이 존재하는 경우 이는 대부분 약 양성(1+) 소견을 보였다. 침윤성 관암종의 경우 연구대상 128예중 음성소견을 보이는 증례는 없었으며, 14예는 약양성, 32예는 중등도 양성, 82예(64%)는 강양성 소견을 보였다 (Fig. 1).

VEGF-C는 종양세포의 세포질에서 관찰되었는데 정상유방조직에서는 관찰되지 않았다. 연구대상 128예중 16예는 음성, 112예(87.5%)는 양성이었다 이 중 34예는 1+, 50예는 2+, 28예는 3+ (강양성 군: 78예, 약양성 군: 34예)를 보였다. VEGF-C 양성 증례들의 종양 등급 분포를 살펴보면 grade I 21예(67.7%), grade II 55예(90.2%), grade III 36예(100%)이었다 (Fig. 2).

p53 단백질은 종양세포의 핵에서만 양성소견이 관찰되고 주변의 정상조직에서는 관찰되지 않았다. 연구대상 128예중 45예(35.2%)에서 양성을 보였는데 6예는 1+, 13예는 2+, 26예는 3+를 보였다. p53 양성 증례들의 종양 등급 분포를 살펴보면 grade I 2예(6.5%), grade II 27예(44.3%), grade III 16예(44.4%) 이었다 (Fig. 3).

그리고, cyclin D1은 종양세포의 핵에서만 양성소견이 관찰되고 주변의 정상조직에서는 관찰되지 않았다. 연구대상 128예중 85예(66%)가 과 발현을 보였는데, 이들 중에서 약한 과 발현은 28예(22%), 중등도 과 발현은 22예(17%), 그리고 강한 과 발현은 35예(27%)에서 관찰되었다. cyclin D1 과 발현을 보이는 증례들의 종양등급 분포를 살펴보면 grade I 9예(29.0%), grade II 46예(75.4%), grade III 30예(83.3%) 이었다 (Fig. 4).

4. Pin-1 발현과 임상병리학적 지표와의 상관 관계

Pin-1의 발현과 종양 등급 및 림프절 전이 정도는 통계학적 유의성이 있었으나(각각 $p < 0.01$, $p < 0.05$), 환자의 연령, 종양 크기 및 임상 병기와는 유의한 상관 관계가 없었다. 즉 Pin-1 양성 발현을 보이는 경우, 특히 강 양성을 보이는 경우 종양의 조직학적 등급이 상승하고, 림프절 전이가 증가하는 소견을 보였다 (Table 1).

5. VEGF-C 발현과 임상병리학적 지표와의 상관 관계

VEGF-C 발현과 조직학적 등급, 림프절 전이 정도, 그리고 임상병기와는 유의성이 있었으나(각각 $p < 0.01$), 환자의 연령 및 종양 크기와는 유의한 상관관계가 없었다. 즉, VEGF-C가 양성 발현을 보이는 경우, 특히 강 양성을 보이는 경우 종양의 조직학적 등급이 상승하고, 림프절 전이가 증가하며, 종양의 임상병기가 증가하는 소견을 보였다 (Table 1).

6. p53 단백질 발현과 임상병리학적 지표와의 상관 관계

p53 단백질 발현과 종양 등급과는 통계학적으로 유의한 상관성이 있었으나($p < 0.05$), 환자의 연령, 림프절 전이 정도, 종양 크기 및 임상병기와는 유의한 상관관계가 없었다. 즉, 종양 등급이 상승할수록 p53 단백질 발현이 강하게 증가하는 소견을 보였다 (Table 1).

7. Cyclin D1 발현과 임상병리학적 지표와의 상관 관계

Cyclin D1 발현과 종양 등급 그리고 림프절 전이 정도는 유의한 상관성이 있었으나 (각각 $p < 0.05$), 환자의 연령, 종양 크기 및 임상병기와는 유의한 상관관계가 없었다 (Table 1).

8. Pin-1, VEGF-C, p53 단백질과 cyclin D1 발현의 관계

Pin-1이 강 양성일 때 cyclin D1은 강 양성 33예, 중등도 양성 19예, 약양성 16예, 음성 14예였다. Pin-1이 중등도 양성일 때 cyclin D1은 강 양성 2예, 중등도 양성 5예, 약양성 8예, 음성 17예였다. Pin-1이 약 양성일 때 cyclin D1은 강 양성 0예, 중등도 양성 1예, 약 양성 4예, 음성 12예였다. 이처럼 Pin-1이 강하게 발현될 때 cyclin D1 발현은 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$). 그러나, Pin-1, VEGF-C, p53 발현 사이, 그리고 VEGF-C, p53, cyclin D1 발현 사이에는 통계학적 유의성은 없었다 (Table 2).

9. Pin-1, VEGF-C, p53 단백질, cyclin D1 발현과 생존율, 생존 기간과의 관계

Pin-1, VEGF-C 및 p53 단백질은 염색 강도에 따라 생존율 및 생존 기간에 약간의 차이를 보였다. 즉, 양성 발현, 특히 강 양성 발현을 보이는 경우 생존율 및 생존 기간이 감소되는 경향을 보였으나, 통계학적 의의는 없었다.

Cyclin D1의 과 발현에 따른 생존 여부의 변화는 통계학적으로 유의하여($p < 0.05$), cyclin D1이 비 발현되는 경우 추적기간 중에 76%가 생존하였으나, 과 발현을 보이는 경우는 63%가 생존하여 cyclin D1의 발현이 생존율과 유의한 상관관계가 있음을 보였다. 그러나, cyclin D1의 세부적인 발현 양상과 생존 기간 변화간에는 유의한 차이가 없었다.

10. 임상병리학적 지표와 생존기간과의 상관 관계

추적조사가 이루어진 환자들의 5년 생존율은 72%였다. 생존기간과 환자의 연령, 종양크기, 종양 등급, 림프절 전이 유무, 림프절 전이정도, 임상 병기의 상관관계를 검토한 결과 종양의 크기 및 림프절 전이유무는 생존율 및 생존 기간에 통계적으로 유의한 영향

을 미쳐 생존기간의 단축을 초래하였다. 그러나, 환자의 연령, 종양등급, 림프절 전이정도 및 임상 병기는 생존 기간과 유의한 상관 관계를 보이지 않았다(Table 3).

연령에 따른 5년 생존율 및 평균 생존기간은 각각 39세 이하군 59%, 71개월, 40-49세군 70%, 77개월, 50-59세군 83%, 87개월, 60세 이상군 57%, 74개월로 연령에 따른 생존율 및 생존기간은 통계학적으로 유의성이 없었다($p>0.05$).

종양 등급에 따른 5년 생존율 및 평균 생존기간은 각각 1등급 87%, 89개월, 2등급 66%, 77개월, 3등급 71%, 80개월로 조직학적 등급에 따른 5년 생존율 및 생존기간은 통계학적으로 유의성이 없었다($p>0.05$).

림프절 전이에 따른 5년 생존율 및 평균 생존기간은 각각 림프절 전이가 없는 군 80%, 85개월, 1-3개 전이가 초래된 군 64%, 75개월, 4개 이상 전이가 초래된 군 63%, 76개월로 림프절 전이가 없는 군과 림프절 전이가 초래된 군간에는 생존율의 유의한 차이가 있었으나($p<0.05$)(Fig 5), 전이된 림프절 수에 따른 비교에서는 통계적 유의성이 없었다($p>0.05$).

종양의 크기에 따른 5년 생존율 및 평균 생존기간은 각각 종양의 크기가 2 cm 이하군 86%, 91개월, 2-5 cm 군 74%, 84개월, 5 cm 이상군 32%, 49개월로 종양의 크기에 따른 5년 생존율 및 생존기간은 통계학적으로 유의성이 있어($p<0.05$), 종양의 크기가 클수록 생존율 및 생존 기간이 의미있게 감소하였으며 종양의 크기가 5 cm 이상인 경우 현저한 차이를 보였다(Fig 6).

그러나 환자의 연령, 종양크기, 종양 등급, 림프절 전이 유무, 림프절 전이정도, 임상 병기와 생존 기간에 대한 다변량 분석방법인 Cox 회귀모형 결과 림프절 전이 여부만 의미가 있었는데, 림프절 전이가 없는 군에 비하여 1-3개 전이가 초래된 군은 2.2배, 4개 이상 전이가 초래된 군은 6.2배 정도 통계적으로 유의한(신뢰구간 1.16~33.17) 사망률 증가를 보였다.

고찰

Pin-1은 DNA 복제 검문소(replication checkpoint)는 물론 G₁/S와 G₂/M과 같은 몇몇 세포주기 포인트를 조절하는 것으로 알려져 있고(Lu et al., 2002; Lu et al., 1996; Wulf et al., 2001; Ryo et al., 2001; Liou et al., 2002; Winkler et al., 2000), 인체에 발생하는 많은 악성종양에서 현저하게 발현이 증가하며 어떤 인산화 단백(phosphoproteins)의 안정성에 관여하는 것으로 보고되었다(Wulf et al., 2001; Ryo et al., 2001; Liou et al., 2002). Pin-1이 없는 세포는 DNA 손상에 의하여 초래되는 세포주기 검문소(cell-cycle checkpoints)에 중대한 결함이 초래된다. 그리고 DNA 손상은 p21의 전사 활성화(transcriptional activation)와 세포 주기 정지(cell cycle arrest)에 중추적 역할을 담당하는 p53의 안정화와 축적을 일으킨다. DNA 손상은 Pin-1과 p53의 상호작용을 강화하게 되는데 이는 Pin-1의 WW 도메인과 p53의 Ser/Pro motifs에 의하여 결정된다. 더욱이 Pin-1은 p53의 안정성과 p21 promoter로의 전사 활성을 조절하기 때문에 Pin-1 knock-out 세포나 Pin-1 결손 종양세포의 경우 DNA 손상 후에도 p53이나 p21의 증가가 거의 초래되지 않는다(Wulf et al., 2002).

Pin-1의 억제제는 자멸사(apoptosis)를 초래하며 Pin-1의 과발현은 cyclin D1 단백을 증가시키고 이의 promoter를 활성화 시킨다. 더욱이 Pin-1은 활성화된 JNK나 종양원성(oncogenic) Ras에 의하여 Ser67/73-Pro motifs에 인산화가 초래된 c-Jun과 결합하게 되고, Pin-1은 활성화된 Ras나 JNK와 협력하여 cyclin D1 promoter를 향한 c-Jun의 전사 활성을 증가시킨다. 따라서, 유방암에서 Pin-1의 과발현은 Ras와 c-Jun의 작용을 통하여 cyclin D1을 증가시켜 종양발생(oncogenesis)과 종양 성장(tumor growth)에 중추적 역할을 할 것으로 판단된다(Wulf et al., 2001). 본 연구에서 Pin-1의 과발현은 종양 등급 및 림프절 전이 정도와 통계학적 유의성이 있었으나, 종양 크기 및 임상 병기와는 유의한 상관 관계가 없었다. 그리고 Pin-1과 cyclin D1의 상관관계를 검토한 결과 Pin-1이 강하게 발현될 때 cyclin D1 발현도 유의하게 증가하였다.

한편 Pin-1은 종양주변의 정상 유방조직에서도 약한 염색(1+)이 핵에서 관찰되었지만 침윤성 관암종의 경우 대부분 중등도 또는 강한 양성(2+ 또는 3+) 발현이 관찰되어

Pin-1의 과발현이 종양과 밀접한 관계가 있을 것으로 판단되며, 종양 주변에 존재하는 관내암종(DCIS)의 경우 대부분 약 양성(1+) 소견을 보여 종양 형성단계에서 보다 종양 진행과정에서 보다 더 중요한 역할을 할 것으로 추정된다.

혈관의 형성 없이 단순히 확산에 의해 산소 및 영양분을 공급받고 종괴가 성장할 수 있는 임계 크기는 직경 1-2mm 이며, 3-5mm³ 이상 성장할 수 없다(Folkman, 1986; Zatterstrom et al., 1995). 따라서 종양이 더욱 더 커지거나 주변에 새로운 집락을 형성하고, 림프절이나 타 장기로 전이를 일으키기 위해서는 종괴 내 그리고, 종괴 주변에 새로운 혈관 형성을 하여야 한다. 이렇게 형성된 신생 혈관들은 기존의 정상 혈관과는 대조적으로 혈관 벽이 약하여 암세포가 쉽게 침습할 수 있고, 림프절 전이의 통로로 제공된다. 또한 전이된 종양이 성장하기 위해서도 신생 혈관 형성이 필수적이다. 따라서, 종양의 신생 혈관 기전을 정확히 이해하고, 이를 토대로 종양의 예후를 예측하고, 치료에 응용하기 위한 많은 연구와 시도들이 진행되고 있지만 정확히 밝혀져 있지는 않다.

혈관 형성을 촉진하는 인자들로는 여러 가지가 알려져 있는데, acidic fibroblast growth factor (aFGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor- β (TGF- β), VEGF, platelet derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF), interleukin-8, hepatocyte growth factor, proliferin 등이 있는데(Keck et al., 1989; Senger et al., 1983; Folkman et al., 1992; Dvorak et al., 1979), 이 중에서 VEGF는 혈관 내피세포에 선택적으로 작용하여 강력한 유사분열을 일으키는 물질로 종양 신생혈관 형성에 가장 중요하며 강력한 인자로 알려져 있다. VEGF와 상동 구조(structural homology)를 갖는 내피세포 성장인자들이 속속 새롭게 밝혀지고 있는데 VEGF family에 속하는 VEGF-C는 림프관 내피세포에 대한 특이 표지자로 알려진 VEGF receptor-3 (VEGFR-3, Flt-4)에 대한 리간드(ligand)로서 림프관 증식을 초래한다(Joukov et al., 1996; Jeltsch et al., 1997). VEGF-C는 생리적인 혈관형성, 각종 혈관형성질환의 발생 및 진행을 조절함은 물론 종양 림프관 신생을 촉진하여 각종 암세포의 전파 및 림프절 전이를 유발하는 것으로 보고되고 있다(Cao et al., 1998; Mandriota et al., 2001). 방광에 발생한 이행세포암의 경우 VEGF-C 발현은 림프절 전이 및 불량한 예후를 예견하게 하는 유용한 인자로 밝혀진 바 있고(Suzuki et al., 2005), 유방암에서 VEGF-C나 COX-2의 강

한 발현은 통계적으로 유의한 재발율과 사망률을 초래하였으며, VEGF-C와 COX-2의 동시발현은 림프관 형성(lymphangiogenesis)과 관련되는데, 이는 COX-2가 VEGF-C 발현을 상승시켜 림프관 형성 과정(lymphangiogenesis pathway)을 경유하여 림프절 전이를 촉진할 것으로 판단된다(Zhang et al., 2008). 또한 COX-2가 VEGF나 cyclin D1 발현과 유의한 관련성이 있으며 이는 종양등급, 림프절 전이 및 종양 크기에 유의한 영향을 미치며 COX-2와 VEGF 발현은 유의하게 동시발현(coexpression)을 보였다(Lim, 2003). 교모세포종(glioblastoma)에서 저산소증에 빠진 종양 세포에 의해 VEGF 분비가 촉진되어 신생혈관 증식을 일으키기 밝혀진 후(Horak et al., 1992), 실험적으로도 암세포 배양 시 VEGF가 혈관 내피세포의 증식에 중요한 역할을 하고 있음이 밝혀졌다(Viglietto et al., 1995). VEGF는 주로 산소 분압 저하에 의해 발현이 증가되며, 그 외에도 EGF, TGF- β , keratinocyte growth factor 등의 cytokine과 *p53* 등의 종양 억제 유전자에 의해 발현이 조절된다(Frank et al., 1995; Dameron et al., 1994; Kieser et al., 1994). 그러나, VEGF-C가 이들에 의하여 어떤 영향을 받는지에 대한 연구는 아직 많지 않다.

본 연구의 경우 VEGF-C 발현은 종양 등급, 림프절 전이 및 임상병기와 통계적으로 유의한 관련성이 있었으나 Pin-1, p53 단백 및 cyclin D1 발현과는 유의한 상관관계가 없었다. 그리고 VEGF-C 발현은 염색 강도에 따라 생존율 및 생존 기간에 약간의 차이를 보였다. 즉, 양성 발현, 특히 강 양성 발현을 보이는 경우 생존율 및 생존 기간이 감소되는 경향을 보였으나, 통계학적 의의는 없었다.

종양억제유전자인 *p53*은 세포의 핵내에 존재하여 세포주기 조절에 관여하는데 세포에 스트레스가 가해지거나 DNA 손상이 발생하면 세포주기를 G1 단계에 정지시키고 DNA를 수복하며 다른 여러 종양억제유전자들을 활성화시켜 세포의 증식과 변형(transformation)을 억제하는 기능을 담당한다. 그러나 이 유전자에 돌연변이가 발생하면 손상된 DNA를 수복하기 전에 세포주기를 S 단계로 진입시켜 염색체 재배열이나 유전자 증폭을 일으켜 종양형성을 하게 된다(Dergham et al., 1997; Bukholm et al., 1997). *p53* 유전자는 인체에 발생하는 각종 암에 가장 흔하게 초래되는 유전자 변화 대상이다(Zambetti & Levine, 1993; Chang, 1993). 돌연변이형 p53 단백질의 축적은 유방, 폐, 소화관 등에 발생하는 각종 악성종양에서 발생하는 것으로 밝혀졌다(Rodrigues et al., 1990;

Cattoretto et al., 1988; Iggo et al., 1990; Bartek et al., 1991). 유방암의 경우 10~40%에서 돌연변이형 p53 단백질의 축적이 관찰되는데 이는 estrogen 수용체 음성, 표피성장인자 수용체 양성, 그리고 종양의 핵등급이 고등급일수록 증가하는 것으로 밝혀져 종양의 생물학적 특성 및 환자의 예후 판정에 도움을 줄 것이라 여겨진다(Bukholm et al., 1997; Cattoretto et al., 1988). 본 연구의 경우 35%에서 p53 단백질의 발현이 관찰되었고 종양 등급이 높을수록 발현이 증가하여 불량한 예후와 연관될 것으로 생각되나 환자의 생존율과는 유의한 상관관계가 없었다. 이전의 연구에 따르면 종양 등급과는 유의한 상관관계가 있으나 림프절 전이와는 유의한 상관관계가 없어 독립된 예후인자는 아닐 것이라는 추론이 있는가하면 종양 등급 및 림프절 전이 유무가 p53 단백질 발현이나 환자의 생존 기간과 상관관계가 있다는 상반된 결과가 보고되었다.

세포주기 조절에서 cyclin-cdk(cyclin-dependent kinase) 복합체와 cdk 억제 단백질사이의 균형에 의한 일련의 활성화, 불활성 과정은 종양의 형성에 매우 중요하며, 세포주기 진행과정 중 G1/S 이행단계가 가장 중요하다. 이 단계에 필수적인 복합체가 cyclin D1-cdk4이다(Weinberg, 1995; Cordon-Cardo et al., 1995). Cyclin D1은 염색체 11q13에 위치하며 이 유전자의 재배열 및 증폭에 의한 과발현이 여러 종양에서 관찰되었다. Cyclin 계열 중 종양 형성과 가장 관련이 있다고 보고된 cyclin D1은 G1기에 주로 발현하며, Rb (retinoblastoma) 단백질과 접촉하여 Rb 단백질이나 다른 종양 억제유전자의 기능을 억제하여 세포의 변형을 유도할 수 있다(Dowdy et al., 1993).

Cyclin D1은 각종 암, 특히 유방암 발생에 중추적 역할을 담당하는데 cyclin D1의 과발현은 세포의 변형을 유발하지만 cyclin D1 발현의 억제는 종양세포의 성장정지를 일으킨다(Alt et al., 2000; Hinds et al., 1994). 더욱이 생쥐 유선에서 cyclin D1의 transgenic overexpression은 유선증식(mammary hyperplasia)를 일으키고 결국 선암종을 유발한다(Wang et al., 1994). 더욱 중요한 것은 생쥐에서 cyclin D1 유전자를 파괴시키면 Ha-ras나 c-Neu/HER2가 유선에서 종양 발생을 초래시킬 수 있는 능력을 완전하게 억제시킨다는 것이다(Yu et al., 2001). 이런 결과들은 cyclin D1이 Ha-ras나 c-Neu에 의해 초래되는 유방종양 형성과정에 필수적인 하류 표적(down-stream target)임을 시사하는데, 이 종양 형성과정에 주요 기전은 pSer/Thr-Pro motifs의 인산화 과정이다. 흥미롭게도 단

백질에서 pSer/Thr-Pro motifs는 두 가지의 완전히 다른 *cis*와 *trans* 구조로 존재하는데 이들의 전환은 prolyl isomerase Pin-1의 촉매작용에 의하여 이루어진다(Lu et al., 1996; Lu et al., 1999(A); Ranganathan et al., 1997; Zhou et al., 1999). 인산화가 초래된 후 Pin-1에 의한 단백질의 형태변화(conformational change)는 이들의 촉매활성(catalytic activity), 탈인산화(dephosphorylation), 단백질-단백질 상호작용 등에 큰 영향력을 미치게 된다(Hsu et al., 2001; Liou et al., 2002; Lu et al., 1999(B); Ryo et al., 2001). 따라서 인산화 의존(phosphorylation-dependent) prolyl isomerization은 인산화 신호전달체계상 결정적 조절 기전이다(Lu et al., 2002). 본 연구에서도 Pin-1이 강하게 발현될 때 cyclin D1 발현이 유의하게 증가하여 이 전 연구내용과 잘 부합되는 결과로 평가된다.

cyclin D1의 과발현이 장기 및 보고자에 따라 상이한 결과를 보여 연부조직 육종의 경우는 과발현이 나쁜 예후와 관련이 있고(김 등, 1998), 유방암의 경우는 좋은 예후와 연관이 있다는 보고(Gillett et al., 1994; Bates et al., 1994)가 있는 반면 상관관계가 없다는 보고와(van Diest et al., 1997; Michalides et al., 1996), 두경부의 편평상피 암종에서는 나쁜 예후와 관련이 있다고 보고되고 있다(Akervall et al., 1997). 유방암종의 10~20%에서 cyclin D1 유전자 증폭이 발견되나 cyclin D1 단백질의 과발현은 35~80% 정도로 나타나 보고자에 따라 매우 다양하다(Bartkova et al., 1994; Zhang et al., 1994; Zukerberg et al., 1995). 이처럼 cyclin D1 단백질의 과발현이 유전자 증폭 빈도에 비해 높은 것은 cyclin D1 단백질의 발현이 유전자 증폭 이외의 기전에 의해 초래될 수 있다는 것을 의미하며, 이는 돌연 변이나 전위 등에 의해 일어나며 호르몬 특히 에스트로겐에 대한 민감도의 증가에 기인될 수도 있다(van Diest et al., 1997). 세포주를 이용한 실험에서 유방암세포는 에스트로겐에 의해 cyclin D1이 유도될 수 있어 에스트로겐 수용체 양성인 세포는 유전자 증폭없이도 cyclin D1 발현이 유도될 수 있고(Musgrove et al., 1993), 에스트로겐 수용체 양성의 경우는 더욱 많은 cyclin D1을 합성시킬 수 있다(Kim et al., 1998). 본 연구의 경우 cyclin D1의 과발현이 85예(66%)에서 관찰되었고, cyclin D1과 Pin-1 발현간에는 유의한 상관관계가 있었으나, VEGF-C 및 p53 발현과는 유의한 상관관계가 없었다. 또한 cyclin D1과 여러 임상 병리학적 지표와의 상관관계를 검증한 결과 연령, 종양의 크기, 임상병기 등과는 유의성이 없었으나, cyclin D1의 발현 강도와 림프절 전이 유무 및 종

양등급간에는 유의성이 있었다. Cyclin D1의 미발현, 과발현에 따른 생존 여부 및 생존 기간의 변화는 cyclin D1 이 과발현되는 경우 통계학적으로 유의하게 생존율 및 생존 기간이 증가하였으나, cyclin D1의 과발현 정도에 따른 생존 기간의 변화는 유의하지 않아 cyclin D1은 그 발현 여부가 생존율 및 생존 기간에 영향을 미치는 예측 인자로서의 가치가 있을 것으로 판단된다.

그 외 여러 가지 임상 병리학적 지표와 생존 기간과의 관계를 통계학적으로 검증한 결과 생존기간과 환자의 연령, 종양크기, 조직학적 등급, 림프절 전이 유무, 림프절 전이정도, 임상 병기의 상관관계를 검토한 결과 종양의 크기 및 림프절 전이유무는 생존율 및 생존 기간에 통계적으로 유의한 영향을 미쳐 생존기간의 단축을 초래하였다. 그러나, 환자의 연령, 종양등급, 림프절 전이정도 및 임상 병기는 생존율 및 생존 기간과 유의한 상관 관계가 없었다.

결 론

p53 단백질 및 cyclin D1은 각종 종양의 형성 및 진행에 중요한 관계가 있는 것으로 알려져 있으나 Pin-1과 VEGF-C의 유방암에서의 역할에 관한 연구보고는 흔하지 않다. 이에 저자는 유방의 침윤성 관암종 128예를 대상으로 면역조직화학 염색을 하여 그 동안 유방암을 대상으로 비교적 많은 연구 보고가 이루어진 p53 단백질 및 cyclin D1 분석 결과와 함께 Pin-1과 VEGF-C 발현양상, 임상 병기, 환자 생존 기간, 나이, 종양의 크기, 조직학적 등급 및 림프절 전이 수와 같은 여러 가지 임상병리학적 자료를 비교 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Pin-1은 종양주변의 정상 유방조직에서도 약한 염색(1+)이 관찰되었으나 침윤성 관암종의 경우 89%(114/128)에서 중등도 이상(2+ 또는 3+)의 강한 염색을 보였다. Pin-1 발현과 종양등급($p<0.01$) 및 림프절 전이 정도($p<0.05$)는 통계학적 유의성이 있었다.
2. VEGF-C는 종양주변의 정상 유방조직에서는 관찰되지 않았으나 침윤성 관암종의 88%(112/128)가 양성인데, 61%(78/128)는 강양성(2+ 또는 3+) 이었다. VEGF-C 발현과 종양등급, 림프절 전이 정도 및 임상병기는 통계학적 유의성이 있었다(각각 $p<0.01$).
3. p53 단백질은 종양주변의 정상 유방조직에서는 관찰되지 않았으나 침윤성 관암종의 35%(45/128)가 양성이었다. p53 단백질 발현과 종양등급과는 통계학적으로 유의성이 있었다($p<0.05$).
4. Cyclin D1은 종양주변의 정상 유방조직에서는 관찰되지 않았으나 침윤성 관암종의 66%(85/128)가 양성이었다. Cyclin D1 발현과 종양 등급 그리고 림프절 전이 정도는 통계학적으로 유의성이 있었다 (각각 $p<0.05$).
5. Pin-1과 cyclin D1 발현은 통계학적으로 유의성이 있었다($p<0.05$).
6. Cyclin D1 발현과 생존 여부는 통계학적으로 유의성이 있었다($p<0.05$).
7. 종양 크기 및 림프절 전이유무는 생존율 및 생존 기간과 통계학적으로 유의성이 있었다 (각각 $p<0.05$).

이상의 연구 결과로 미루어 Pin-1과 VEGF-C는 유방암의 진행 및 전이에 관여하여 불량한 예후를 초래하며 기존에 알려진 바와 같이 p53 단백질과 cyclin D1 역시 불량한 예후인자로 확인되었다. 또한 Pin-1 및 VEGF-C에 대한 많은 연구가 추가되어야 하겠지만

Pin-1과 cyclin D1 발현이 밀접한 연관성이 있고, VEGF-C 발현과 종양등급, 림프절 전이 정도 및 임상병기간 통계학적 유의성이 있어 향후 항암치료 전략설정에 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- Akervall JA, Michalides RJ, Mineta H, Balm A, Borg A, Dictor MR, Jin Y, Loftus B, Mertens F, Wennerberg JP. Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. *Cancer* 79: 380-90, 1997
- Alt JR, Cleveland JL, Hannink M, Diehl JA. Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes Dev* 14:3102-14, 2000.
- Bártek J, Bártková J, Vojtěšek B, Stasková Z, Lukás J, Rejthar A, Kovarík J, Midgley CA, Gannon JV, Lane DP. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 6:1699-703, 1991.
- Bartkova J, Lukas J, Muller H, Lutzhoft D, Strauss M, Bartek J. Cyclin D1 expression and function in human breast cancer. *Int J Cancer* 57:353-61, 1994
- Bates S, Parry D, Bonetta L, Vousden K, Dickson C, Peters G. Absence of cyclin D/cdk complexes in cells lacking functional retinoblastoma protein. *Oncogene* 9:1633-40, 1994
- Bukholm IK, Nesland JM, Kåresen R, Jacobsen U, Børresen AL. Relationship between abnormal p53 protein and failure to express p21 protein in human breast carcinomas. *J Pathol* 181:140-5, 1997.
- Cao Y, Linden P, Farnebo J, Cao R, Eriksson A, Kumar V, Qi JH, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:14389-94, 1998.
- Cattoretti G, Rilke F, Andreola S, D'Amato L, Delia D. p53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 41: 178-83, 1988
- Chang F, Syrjänen S, Kurvinen K, Syrjänen K. The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 88:174-86, 1993.
- Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, McGuire WL. Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N Eng J Med* 320:627-33, 1989
- Cordon-Cardo C. Mutation of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for

human neoplasia. *Am J Pathol* 147:545-60, 1995

Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265: 1582-4, 1994

Dergham ST, Dugan MC, Joshi US, Chen YC, Du W, Smith DW, Arlauskas P, Crissman JD, Vaitkevicius VK, Sarkar FH. The clinical significance of p21(WAF1/CIP-1) and p53 expression in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 80:372-81, 1997.

Dowdy SF, Hinds PW, Louie K, Reed SI, Arnold A, Weinberg RA. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* 73:499-511, 1993

Dvorak HF, Orenstein NS, Carvalho AC, Churchill WH, Dvorak AM, Galli SJ, Feder J, Bitzer AM, Rypysc J, Giovinco P. Induction of a fibrin-gel investment: an early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor secreted by products. *J Immunol* 122: 166-74, 1979

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19:403-10, 1991

Fisher ER, Sass R, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Project for Breast Cancers (protocol No. 4). X. Discriminants for tenth year treatment failure. *Cancer* 53:712-23, 1984

Fisher ER. The impact of pathology on the biologic, diagnostic, prognostic and therapeutic considerations in breast cancer. *Surg Clin North Am* 64:1073-93, 1984

Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 267: 10931-4, 1992

Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue. *Cancer Res* 46: 467-73, 1986

Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implication for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 270: 12607-13, 1995

Gillett C, Fantl V, Smith R, Fisher C, Bartek J, Dickson C, Barnes D, Peters G.

Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res* 54: 1812-7, 1994

Greene FL, Page DL, Fleming ID (eds), *AJCC cancer staging manual*, 6thed. New York: Springer-Verlag, 2002

Henderson BE, Ross RK, Pike MC, Casagrande JT. Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res* 42:3232-9, 1982

Hinds PW, Dowdy SF, Eaton EN, Arnold A, Weinberg RA. Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:709-13, 1994.

Horak E, Leek R, Klenk N, Lejeune S, Smith K, Stuart N. Angiogenesis assessed by platelet endothelial cell adhesion molecule antibodies, as an indicator of node metastasis and survival in breast cancer. *Lancet* 340: 1120-4, 1992

Hsu T, McRackan D, Vincent TS, Gert de Couet H. *Drosophila* Pin1 prolyl isomerase Dodo is a MAP kinase signal responder during oogenesis. *Nat Cell Biol* 3:538-43, 2001.

Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* Mar 335:675-9, 1990.

Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 276:1423-5, 1997.

Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 15:290-98, 1996.

Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246: 1309-12, 1989

Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marme D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 9: 963-9, 1994

Kim SH, Lewis JJ, Brennan MF, Woodruff JM, Dudas M, Cordon-Cardo C.

Overexpression of cyclin D1 is associated with poor prognosis in extremity soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res* 4:2377-82, 1998

Lim SC. Role of COX-2, VEGF and cyclin D1 in mammary infiltrating duct carcinoma. *Oncol Rep* 10:1241-9, 2003.

Lim SC, Lee MS. Significance of E-cadherin/beta-catenin complex and cyclin D1 in breast cancer. *Oncol Rep* 9:915-28, 2002.

Liou YC, Ryo A, Huang HK, Lu PJ, Bronson R, Fujimori F, Uchida T, Hunter T, Lu KP. Loss of Pin1 function in the mouse causes phenotypes resembling cyclin D1-null phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:1335-40, 2002.

Lu KP, Hanes SD, Hunter T. A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* 380:544-7, 1996.

Lu KP, Liou YC, Zhou XZ. Pinning down proline-directed phosphorylation signaling. *Trends Cell Biol* 12:164-72, 2002.

Lu PJ, Wulf G, Zhou XZ, Davies P, Lu KP. The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* 399:784-8, 1999(A).

Lu PJ, Zhou XZ, Shen M, Lu KP. Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* 283:1325-8, 1999(B).

Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J* 20:672-82, 2001.

Michalides R, Hageman P, van Tinteren H, Houben L, Wientjens E, Peterse J. A clinicopathologic study on overexpression of cyclin D1 and p53 in a series of 248 patients with operable breast cancer. *Br J Cancer* 73:728-34, 1996

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 T47D human breast cancer cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 13:3577-87, 1993

Nakashima M, Meirmanov S, Naruke Y, Kondo H, Saenko V, Rogounovitch T, Shimizu-Yoshida Y, Takamura N, Namba H, Ito M, Abrosimov A, Lushnikov E, Roumiantsev P, Tsyb A, Yamashita S, Sekine I. Cyclin D1 overexpression in thyroid tumours from a radio-contaminated area and its correlation with Pin1 and aberrant beta-catenin expression. *J Pathol* 202:446-55, 2004.

Page DL. Prognosis and breast cancer: Recognition of lethal and favorable prognostic types. *Am J Surg Pathol* 15:334-49, 1991

Parl FF, Schmidt BP, Dupont WD, Wagner RK. Prognostic significance of estrogen receptor status in breast cancer in relation to tumor stage, axillary node metastasis and histopathologic grading. *Cancer* 54:2237-42, 1984

Ranganathan R, Lu KP, Hunter T, Noel JP. Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell* 89:875-86, 1997.

Ryo A, Nakamura M, Wulf G, Liou YC, Lu KP. Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC. *Nat Cell Biol* 3:793-801, 2001.

Ryo A, Liou YC, Wulf G, Nakamura M, Lee SW, Lu KP. PIN1 is an E2F target gene essential for Neu/Ras-induced transformation of mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol* 22:5281-95, 2002.

Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:7555-9, 1990.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascitic fluid. *Science* 219: 983-5, 1983

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* 235: 177-82, 1987

Stacker SA, Hughes RA, Achen MG. Molecular targeting of lymphatics for therapy. *Curr Pharm Des* 10:65-74, 2004.

Suzuki K, Morita T, Tokue A. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression predicts lymph node metastasis of transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Urol* 12:152-8, 2005.

van Diest PJ, Michalides RJ, Jannink L, van der Valk P, Peterse HL, Meijer CJ, Baak JP. Cyclin D1 expression in invasive breast cancer. Correlations and prognostic value. *Am J Pathol* 150:705-11, 1997

Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M, Cerutti J, Romano A, Trapasso F. Upregulation of vascular endothelial growth factor and down regulation of placenta growth factor associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines. *Oncogene* 11: 1569-79, 1995

Wang TC, Cardiff RD, Zukerberg L, Lees E, Arnold A, Schmidt EV. Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature* 369:669-71, 1994.

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323-30, 1995

Winkler KE, Swenson KI, Kornbluth S, Means AR. Requirement of the prolyl isomerase Pin1 for the replication checkpoint. *Science* 287:1644-7, 2000.

Wulf GM, Liou YC, Ryo A, Lee SW, Lu KP. Role of Pin1 in the regulation of p53 stability and p21 transactivation, and cell cycle checkpoints in response to DNA damage. *J Biol Chem* 277:47976-9, 2002.

Wulf GM, Ryo A, Wulf GG, Lee SW, Niu T, Petkova V, Lu KP. Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. *EMBO J* 20:3459-72, 2001.

Yu Q, Geng Y, Sicinski P. Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* 411:1017-21, 2001.

Zambetti GP, Levine AJ. A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *FASEB J* 7:855-65, 1993.

Zatterstrom UK, Brun E, Willen R, Kjellen E, Wennerberg J. Tumor angiogenesis and prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 17: 312-8, 1995

Zhang SY, Caamano J, Cooper F, Guo X, Klein-Szanto AJ. Immunohistochemistry of cyclin D1 in human breast cancer. *Am J Clin Pathol* 102:695-8, 1994

Zhang XH, Huang DP, Guo GL, Chen GR, Zhang HX, Wan L, Chen SY. Coexpression of VEGF-C and COX-2 and its association with lymphangiogenesis in human breast cancer. *BMC Cancer* 8:4, 2008.

Zhou XZ, Lu PJ, Wulf G, Lu KP. Phosphorylation-dependent prolyl isomerization: a novel signaling regulatory mechanism. *Cell Mol Life Sci* 56:788-806, 1999.

Zuckerberg LR, Yang WI, Gadd M, Thor AD, Koerner FC, Schmidt EV, Arnold A. Cyclin D1(PRAD1) protein expression in breast cancer: approximately one-third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene. *Mod Pathol* 8:560-7, 1995

김덕환, 남은숙, 신형식, 류진우, 고재향, 오영륜, 송상용, 김대식, 이민철. 유방암종 101예의 Cyclin D1 발현의 분석. *대한병리학회지* 32:266-72, 1998

보건복지가족부 · 국립암센터, 암통계, 2008 www.cancer.go.kr

Table 1. The clinicopathologic data according to the expression pattern of Pin-1, VEGF-C, p53 and cyclin D1 in mammary infiltrating duct carcinoma

	Pin-1				VEGF-C				p53				Cyclin D1			
	3+ (n=82)	2+ (n=32)	1+ (n=14)	- (n=0)	3+ (n=28)	2+ (n=50)	1+ (n=34)	- (n=16)	3+ (n=26)	2+ (n=13)	1+ (n=6)	- (n=83)	3+ (n=35)	2+ (n=22)	1+ (n=28)	- (n=43)
Age(yr.)																
≤39(n=24)	17	6	1	0	5	11	7	1	5	2	1	16	7	5	6	6
40-49(n=46)	28	11	7	0	9	18	12	7	9	5	2	30	14	9	11	12
50-59(n=37)	22	10	5	0	10	12	10	5	8	5	0	24	9	6	7	15
≥60(n=21)	15	5	1	0	4	9	5	3	4	1	3	13	5	2	4	10
Grade	§				§				*				*			
I(n=31)	8	8	15	0	1	9	11	10	1	0	1	29	3	2	4	22
II(n=61)	41	21	0	0	9	25	21	6	14	9	4	34	16	18	12	15
III(n=36)	33	3	0	0	18	16	2	0	11	4	1	20	16	2	12	6
Positive nodes	*				§								*			
0(n=71)	36	22	13	0	2	27	27	15	11	6	3	51	20	8	17	26
1-3(n=23)	15	7	1	0	6	14	3	0	7	3	2	11	1	9	4	9
≥4(n=34)	31	3	0	0	20	9	4	1	8	4	1	21	14	5	7	8
Tumor size(cm)																
<2.0(n=56)	36	11	9	0	11	20	15	10	10	4	3	39	15	12	12	17
2.0-5.0(n=62)	39	19	4	0	14	25	18	5	13	5	1	43	18	9	14	21
>5.0(n=10)	7	2	1	0	3	5	1	1	3	4	2	1	2	1	2	5
Stage					§											
I(n=34)	22	9	3	0	2	14	8	10	7	3	2	22	11	3	8	12
II(n=77)	47	19	11	0	17	32	23	5	15	7	3	52	19	18	16	24
III(n=17)	13	4	0	0	9	4	3	1	4	3	1	9	5	1	4	7

*: statistically significant p value <0.05 , §: statistically significant p value <0.01

Table 2. Interrelation between the Pin-1 and Cyclin D1 immunoexpression statuses in mammary infiltrating duct carcinoma (%)

		Pin-1				p value
		3+ (n=82)	2+ (n=32)	1+ (n=14)	- (n=0)	
Cyclin D1	3+ (n=35)	33 (94.3)	2 (5.7)	0	0	<0.05
	2+ (n=22)	19 (86.4)	5 (22.7)	1 (4.6)	0	
	1+ (n=28)	16 (57.1)	8 (28.6)	4 (14.3)	0	
	- (n=43)	14 (32.6)	17 (39.5)	12 (27.9)	0	

Table 3. Multivariate analysis on disease-related survival (Cox proportional hazard model) according to the clinicopathologic variables in mammary infiltrating duct carcinoma

Variable	Hazard ratio	95% confidence intervals
Age	0.991	0.961 - 1.023
Tumor grade	1.223	0.727 - 2.057
Positive nodes	2.041	1.260 - 3.305
Tumor size	2.107	1.279 - 3.472
Stage	0.689	0.308 - 1.542

Legends for figures

Figure 1. Immunohistochemical staining for Pin-1 in mammary infiltrating duct carcinoma. High grade carcinoma demonstrated strong positive nuclear staining (A) but, lower grade carcinoma demonstrated weak positive nuclear staining (B). ABC method, counterstained by hematoxylin.

Figure 2. Immunohistochemical staining for VEGF in mammary infiltrating duct carcinoma. High grade carcinoma demonstrated strong positive cytoplasmic staining (A) but, lower grade carcinoma demonstrated weak positive cytoplasmic staining (B). ABC method, counterstained by hematoxylin.

Figure 3. Immunohistochemical staining for p53 protein in mammary infiltrating duct carcinoma. High grade carcinoma demonstrated strong positive nuclear staining (A) but, lower grade carcinoma demonstrated weak positive nuclear staining (B). ABC method, counterstained by hematoxylin.

Figure 4. Immunohistochemical staining for cyclin D1 in mammary infiltrating duct carcinoma. High grade carcinoma demonstrated strong positive nuclear staining (A) but, some high grade carcinoma demonstrated weak positive nuclear staining (B). ABC method, counterstained by hematoxylin.

Figure 5. Cumulative survival curve by lymph node metastasis.

Figure 6. Cumulative survival curve by tumor size.

Figure 1

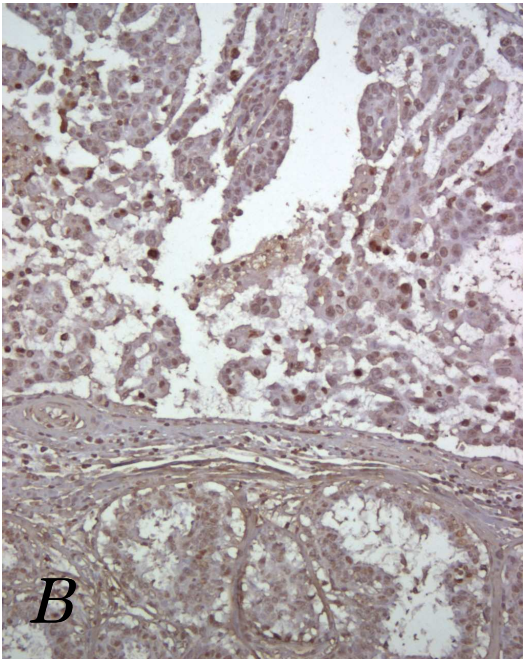
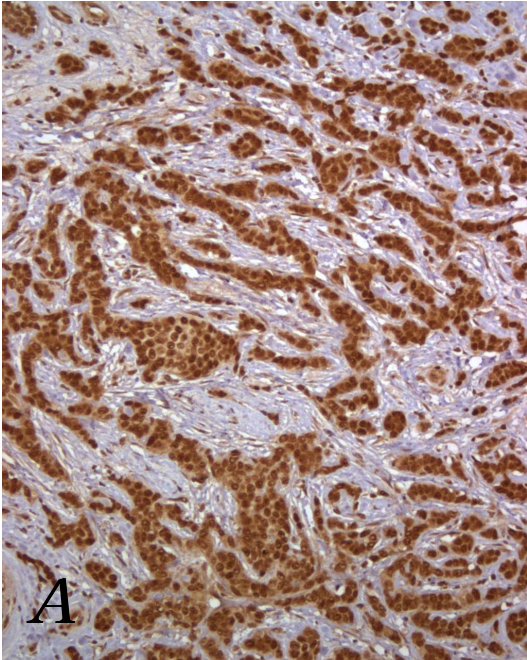


Figure 2.

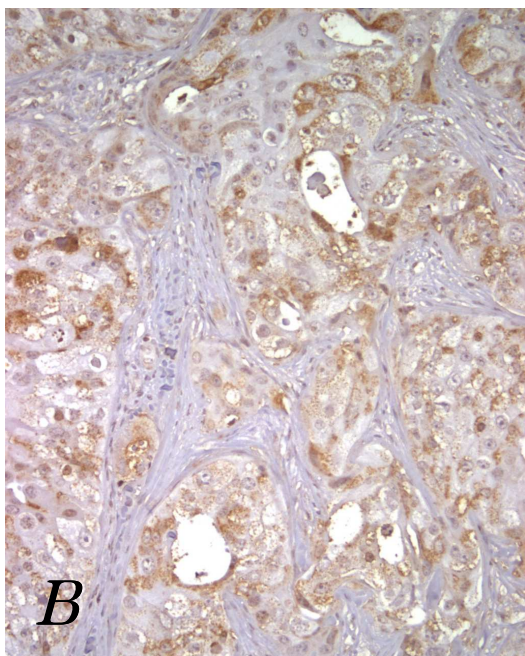
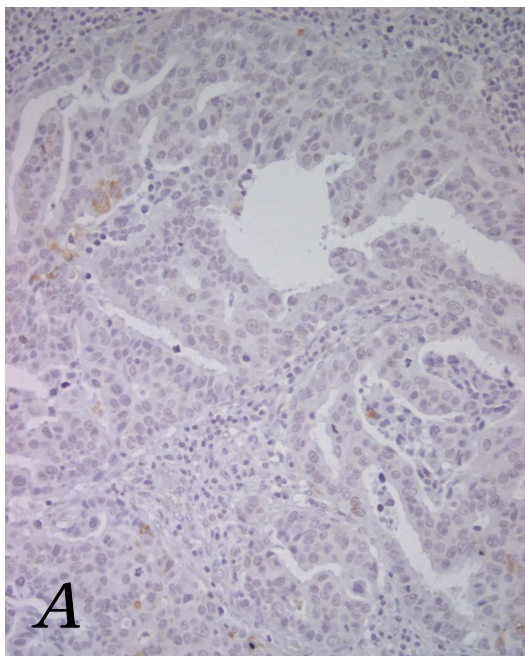


Figure 3.

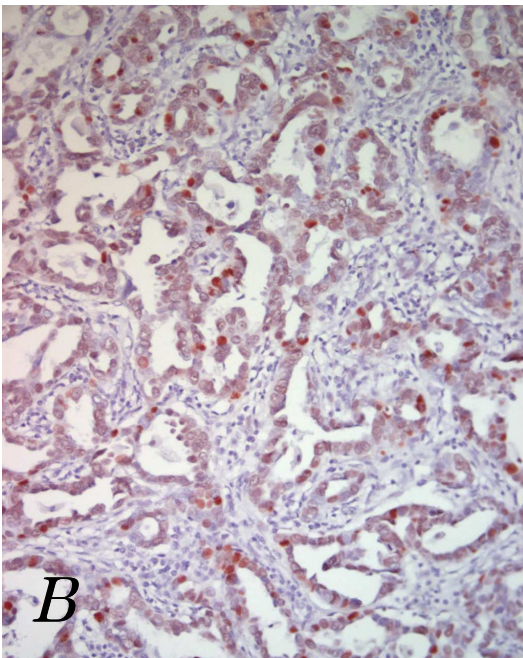
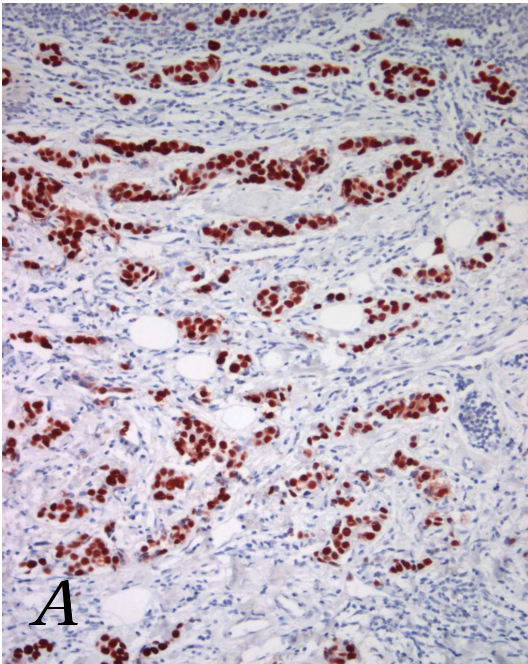


Figure 4

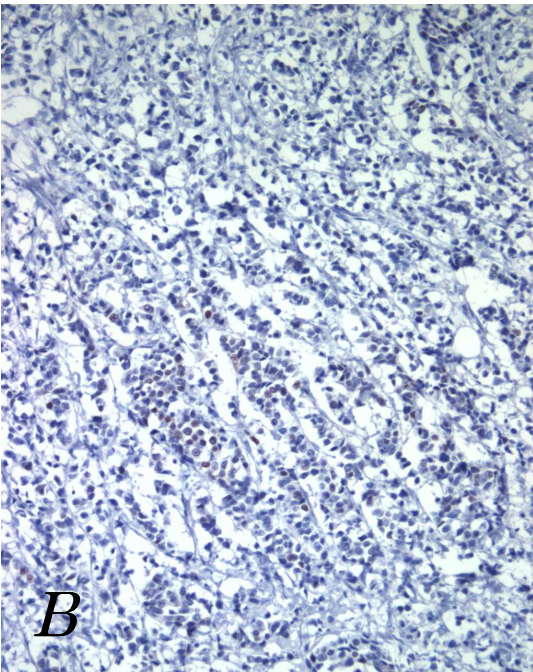
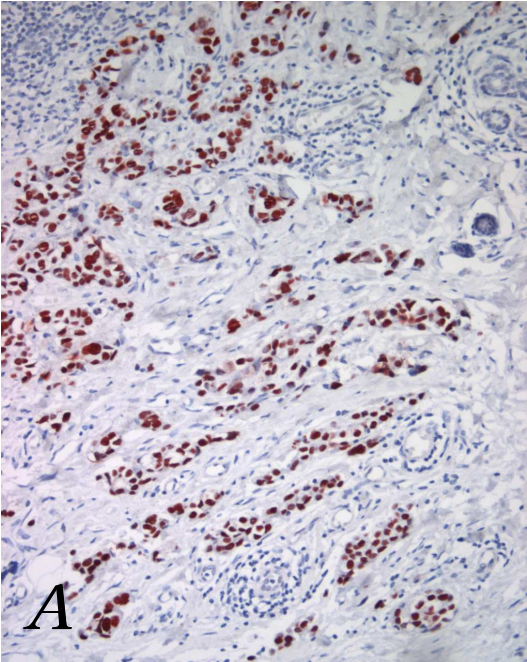


Figure 5.

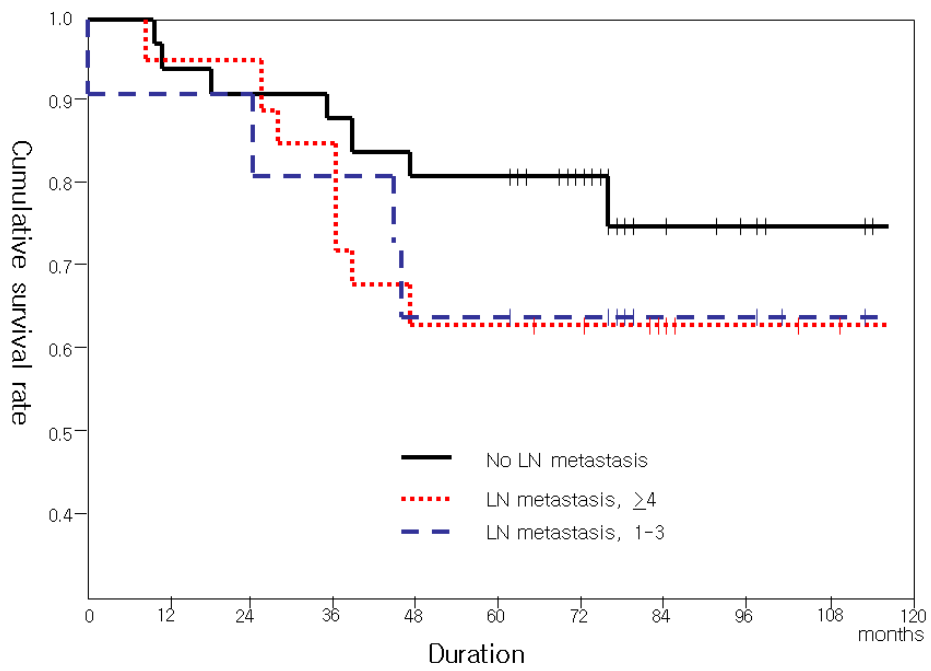
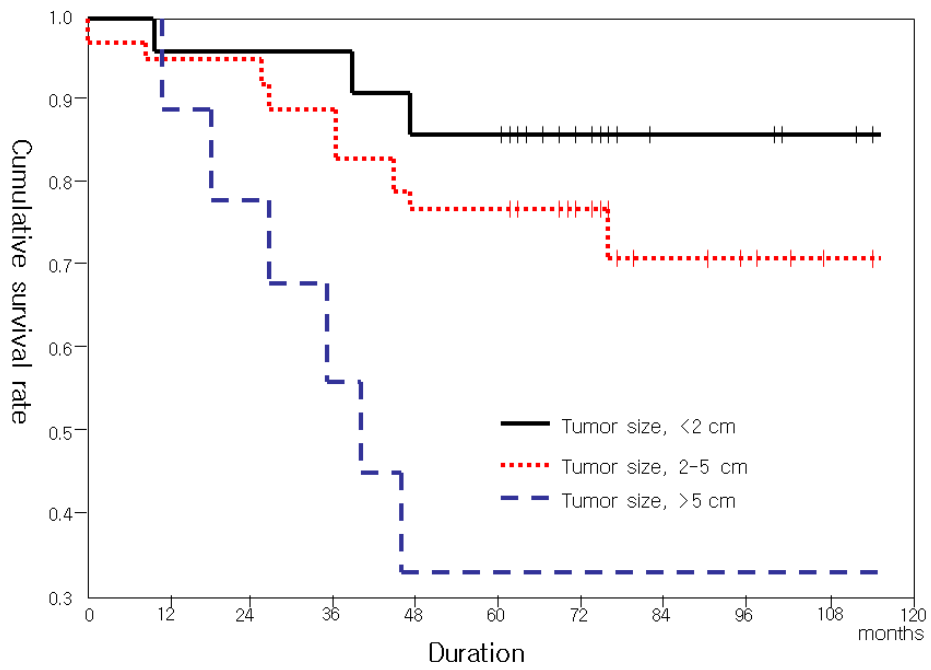


Figure 6.



저작물 이용 허락서

학 과	의학과	학 번	20067586	과 정	박 사
성 명	한글:김 병 철 한문 :金 柄 徹 영문 :KIM BYUNG CHEOL				
주 소	광주 동구 계림동 두산위브@ 111동 1003호				
연락처	E-mail : drbckim@gmail.com				
논문제 목	한글 : 침윤성 유방관암종에서 Pin-1 및 VEGF-C 발현에 대한 해석				
	영문 : Interpretation of Pin-1 and VEGF-C expression in breast infiltrating duct carcinoma				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억 장치에의 저장, 전송 등을 허락함.
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(0) 반대()

2009년 2월

저작자: 조 태 응 (인)

조선대학교 총장 귀하