The Korean Journal of Pathology
2007; 41: 296-306

난소의 경계성 및 악성 표면상피종양에서 c-erbB-2, EGFR, p53 발현 및 Ki-67 지수에 관한 연구

민경환 · 박문향

한양대학교의과대학 병리학교실

The Expression of c-erbB-2, EGFR, p53 and Ki-67 in Ovarian Borderline Tumors and Carcinomas of the Ovary

Kyueng-Whan Min and Moon-Hyang Park

Department of Pathology, Hanyang University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : An ovarian surface epithelial tumor is a heterogenous disease, and various biological and molecular factors are important for its development and progression. Several findings support EGFR or c-erbB-2 as adverse prognostic indicators for an ovarian carcinoma. **Methods :** We reviewed the histological and clinical findings of 52 carcinomas (17 endometrioid, 16 serous, 13 mucinous and 6 clear cell tumors), and 26 borderline (10 serous and 16 mucinous) tumors. Expression of c-erbB-2, EGFR, p53, and Ki-67 was evaluated on paraffin-embedded tissue from a primary ovarian tumor by immunohistochemical methods. **Results :** Expression of c-erbB-2 was found in 7.6% of tumors and expression of EGFR was found in 9.6% of tumors by immunohistochemical analysis. No significance was found between c-erbB-2 and EGFR expression as indicators of a poor prognosis. The expression of p53 and Ki-67 (>50%) correlated with the grade and type of tumor in the ovarian cancers. p53 and Ki-67 overexpression (>50%) was absent in the borderline ovarian tumors, whereas ovarian carcinomas showed expression of both p53 and Ki-67. **Conclusion :** Expression of c-erbB-2, EGFR, p53, and Ki-67 as determined by immunohistochemical analysis did not correlate with prognostic significance. However, p53 and Ki-67 expression may be used as markers to predict aggressive behavior, and to differentiate between malignant and borderline epithelial ovarian tumors. Further large-scale studies are required to clarify the significance of c-erbB-2 and EGFR expression in ovarian tumors.

Key Words : Ovarian neoplasms; Receptor; erbB-2; Epidermal Growth Factor; p53 Antigen; Ki-67 Antigen

접 수 : 2007년 1월 26일
게재승인 : 2007년 8월 27일

책임저자 : 박 문 향
우 133-791 서울시 성동구 행당동 17
한양대학교 의과대학 병리학교실
전화: 02-2260-8249
Fax: 02-2296-7502
E-mail: parkmh@hanyang.ac.kr

난소의 표면상피종양은 모든 원발성 난소종양 가운데 약 50%를 차지하며, 이 중 약 86%가 악성이다. 상피종양의 빈도는 다양하여, 양성이 57%, 경계영역성 종양이 10%, 그리고 암종이 33% 정도다.[1] 일반적으로 난소 암종은 다른 부인과 종양보다 높은 사망율을 보이는 질환이다. 환자들은 대부분 이미 어느 정도 병기가 진행된 상태에서 진단이 되는데, 이는 적절한 종양 표지자가 부족하고 초기 증상도 없는 경우가 많아 조기 진단이 어렵기 때문이다. 난소암종의 예후인자로는 FIGO 병기, 종양의 조직학적 분화도, 잔존 종양의 크기 등이 알려져 있다. 또한 혈청 CA-125치, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 성장인자 등과 같은 생화학적 표지자들이 예후인자로 알려져 있다. 난소암종의 위험인자로서 유전적 난소암종 증후군이나 식이, 약물, 호르몬 대체요법 등 환경적인 요소들이 거론되어 왔고, 난소암종 발생기전에 여러 종양유전자의 변이가 관련되어 있다고 알려져 있다.

성장인자 중 53개의 아미노산으로 구성된 표피성장인자(epidermal growth factor, EGF)는 변환성장인자 알파(transforming growth factor-alpha, TGF-α)와 구조적으로 유사하며, 둘 다 특정한 하나의 표피성장인자 수용체(EGFR)를 통해 생리적 활동을 매개한다. 이 수용체는 리간드(ligand) 결합 부위가 있는 세포 외 도메인과 타이로신 키나아제 활성을 보이는 경막과 세포질 도메인으로 구성되어 있으며, 세포 내에서 타이로신 키나아제의 활성화로 DNA 복제와 세포 분열을 촉진한다. 그러므로 EGFR은 사람의 여러 암종에서 발현하여 종양화 과정

에 영향을 미치는 중요한 인자로 생각되고 있다. EGFR이 활성화되면 세포증식, 신생혈관형성 세포의 운동성 및 세포자연사의 억제를 유도한다. EGFR 과발현은 진행된 암종 및 불량한 예후와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 폐의 비소세포암 환자에서도 분자생물학적 및 면역조직화학적 방법으로 EGFR의 돌연변이, 유전자 증폭이나 과발현을 찾아내어 Gefitinib 등 EGFR 타이로신 키나아제에 특이한 억제제를 이용한 치료의 적합성을 결정하고 있다.[2,3] 폐암 이외에도 난소암종과 세포주에서 EGFR의 존재가 예후인자로 보고된 바 있다.[4]

표피성장인자 수용체 가계(EGFR family)에는 네 가지 상동성 수용체, 즉 표피성장인자수용체(EGFR/HER1/ErbB1)와 HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) 및 HER4 (ErbB4)가 있다. ErbB2 수용체는 c-erbB-2와 HER-2/neu로도 알려져 있다.[5] 유방암의 15-40%에서 c-erbB-2 유전자가 과발현하며, 이런 예는 생존율이 낮고 예후가 불량하다. 최근에는 c-erbB-2 유전자를 표적으로 만든 Trastuzumab (Herceptin®)이라는 약물이 개발하여 유전자 치료를 모색하고 있다.[6]

난소암종에서 EGFR의 이상 발현은 19-77%로 다양한 빈도로 보고되었고,[7,8] c-erbB-2 발현은 약 4-66%까지 다양한 빈도로 보고하고 있다.[8-10] 대부분 연구에서 유방암이나 난소암에서 EGFR과 c-erbB-2치가 증가하면 불량한 예후를 시사한다고 하였다.[11,12] 그러나 난소암종에서 c-erbB-2 유전자의 기능과 이 유전자의 발현이 예후에 미치는 영향은 유방암에서보다는 다양한 결과를 보이며 예후와의 연관성도 논란이 있어 아직까지 예후인자로서 가치가 있는지에 대해서는 충분한 연구가 이루어지지 않은 실정이다.

p53 유전자는 여러 암의 진행 과정에서 과발현하는 암억제유전자의 하나로 *p53*의 변이는 암형성 과정 후기에 나타나는 현상으로 알려져 있으며 소화기계 암종 등 여러 악성 종양에서 p53 단백이 과발현한다는 사실이 알려져 있다. 여러 난소의 악성 종양에서 p53 과발현이 예후에 미치는 영향에 대해서도 연구자에 따라 다양한 의견을 보인다.[10,13] 그러므로 난소암종에서 p53을 포함한 여러 원형암유전자들의 과발현이 예후와 어떤 관련이 있는지 규명하는 것이 중요하다.

또한 악성 종양세포는 일반적으로 정상 조직이나 양성 난소종양에 비해 세포분열이 왕성하며, 세포증식 속도가 빠른다. 그리하여 증식세포핵항원(Proliferating nuclear antigen, PCNA)이나 Ki-67에 대한 면역조직화학적 방법으로 증식지수를 평가하여 경계영역성 종양과 암종을 비교하거나, Ki-67과 PCNA의 면역조직화학적 염색에 의한 증식지수를 성장인자수용체인 EGFR이나 c-erbB-2와 같은 유전자의 변화된 발현을 알아봄으로써 난소암종의 중요한 생물학적 표지자를 찾으려고 시도하고 있다.[4,13,14]

본 연구에서는 난소의 상피성 암종과 경계영역성 상피종양의 대표적인 파라핀 포매조직을 선택한 후 c-erbB-2, EGFR, p53에 대한 발현과 Ki-67 지수를 면역조직화학염색을 통하여 분석하고, 난소암종 환자의 FIGO 병기, 조직학적 유형, 조직학적 분화도 등 임상병리학적 소견에 따른 발현을 비교하여 환자의 예후와 연관성이 있는지를 알아보고, 여러 인자들이 환자에 미치는 영향을 규명함으로써 예후인자로서 효율성을 알아보고자 하였다.

재료와 방법

연구 재료

1992년 1월부터 2005년 12월까지 한양대학교병원 병리과에서 진단된 경계영역성 및 악성 상피난소종양 중 표본이 적절한 78예를 대상으로 하였다. 환자의 병리 진단지를 참조하여 모든 유리슬라이드 표본을 재검토하였다 조직학적 유형에 따라 분류하면 내막모양암종이 17예, 장액낭샘암종이 16예, 점액낭샘암종이 13예, 투명세포암종이 6예였고, 경계영역성 상피종양으로는 장액낭샘종 10예와 점액낭샘종 16예의 대표적인 표본을 선택하였다. 수술 당시 난소암종의 FIGO 병기, 조직학적 유형, FIGO 분화도 및 Universal grading system에 따라 분화도를 정하였으며, 본 연구 결과에서 분화도라고 한 것은 Universal grading system에 의한 결과를 다른 결과들과 통계적으로 분석한 것이다 (Fig. 1), 대상 환자의 의무기록와 추적조사를 통해 임상양상과 생존 기간을 조사하여, c-erbB-2, EGFR, p53 발현 및 Ki-67 지수와 연관성을 분석하였다.

연구 방법

면역조직화학염색

선택된 파라핀 포매 조직을 4 μm 두께로 박절하여 Snowcoat X-tra slide (Surgipath, Richmond, IL, USA)에 부착하여 탈파라핀과 함수 과정을 거친 절편은 조직 내에 있는 과산화효소를 제거하기 위해 3% H_2O_2에서 10분간 반응 시킨 후 물로 씻어냈다. 항원을 복구하기 위해 0.1 M 구연산 완충액(pH 6.0)을 이용해 압력밥솥에 5분간 처리한 후 물로 씻어내고, 다시 Tris 완충액(pH 7.6)으로 세척한 후 비특이 반응을 제거하기 위해 5% 정상 염소 혈청에 10분간 반응시켰다. 면역조직화학염색은 과산화효소가 결합된 Streptavidin-biotin-complex (ABC)방법을 이용하여 시행하였다. 일차항체는 단클론 항체인 c-erbB-2 (CB11, Novocastra, Newcastle, UK), EGFR (EGFR.25, Novocastra, Newcastle, UK), p53 (DO-7, Novocastra, Newcastle, UK) 및 Ki-67에 대한 MIB-1 단클론 항체(MM1, Novocastra, Newcastle, UK)를 1:100 희석하여 각각 실온에서 60분간 반응시켰다. 그런 다음 Biotin이 결합된 이차항체 goat anti-mouse IgG (DAKO, Capinteria, CA, USA)로 실온에서 20분간 반응시키고 Tris 완충액으로 다시 세척하였다. 과산화효소(peroxidase)가 결합된 streptavidin에 20분간 반응시킨 후 3,3'-diaminobenzi-

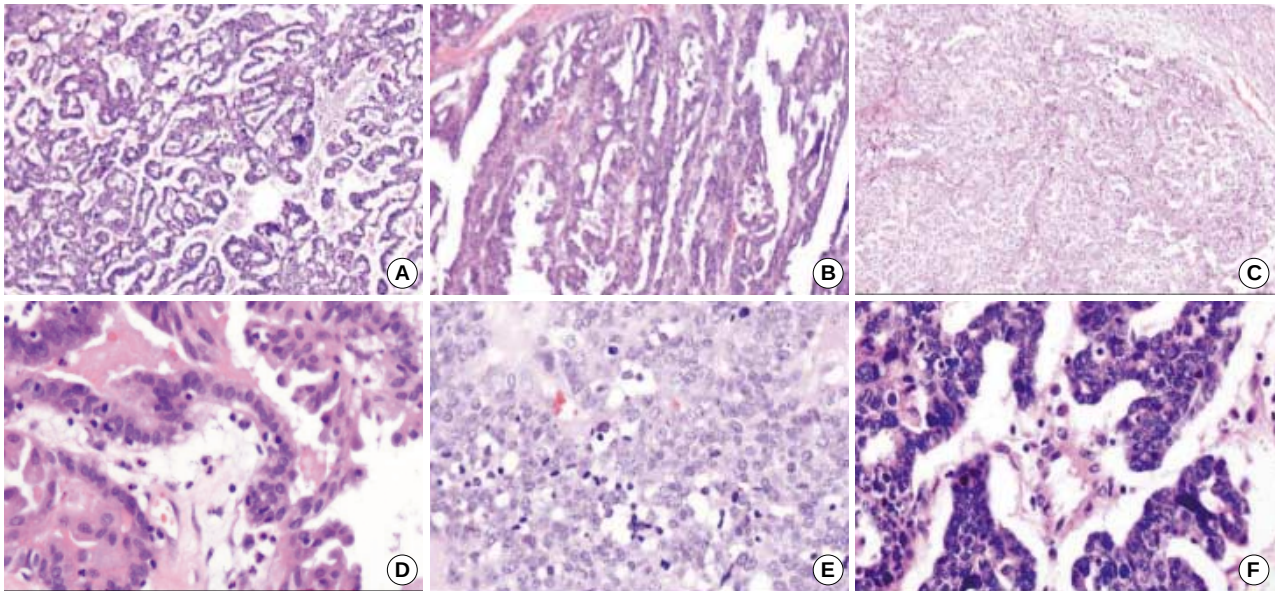

Fig. 1. Universal grading system by predominant architectural pattern and cytologic atypia. (A) Uniform roundness of glandular spaces in endometrioid carcinoma is shown. (B) Papillary growth pattern shows fibrovascular cores within the papillae in serous cystadenocarcinma. (C) Solid growth pattern illustrating solid sheets and foci of microcystic degeneration in serous cystadenocarcinoma is shown. (D) Nuclear grade 1 exhibits small, regular, and lack prominent nucleoli, marked hyperchromasia or bizarre form in serous cystadenocarcinoma. (E) Nuclear grade 2 demonstrates variation of nuclei, small prominent nucleoli and lack bizarre nuclei in endometrioid carcinoma. (F) Nuclear grade 3 shows marked variation of nuclei, giant nucleoli, and several large bizarre nuclei in endometrioid carcinoma.

Table 1. Histologic and clinical characteristics of the surface epithelial ovarian tumors

	Carcinoma (N=52)				Borderline (N=26)	
	Endometrioid (N=17)	Serous (N=16)	Mucinous (N=13)	Clear cell (N=6)	Serous (N=10)	Mucinous (N=16)
Age (year)	32-62	40-70	19-79	43-66	24-46	16-78
≤30	0	0	5	0	1	7
31-40	3	2	3	0	5	4
41-50	6	9	1	3	4	1
51-60	6	3	2	2	0	1
≥61	2	2	2	1	0	3
Mean age	48.59	48.63	41.54	53.17	38.10	39.31
FIGO stage						
I	4	2	11	5	8	16
II	6	3	-	-	2	-
III	6	9	2	1	-	-
IV	1	2	-	-	-	-
Universal histological grade[a]						
1	3	5	7	1	10	16
2	7	5	6	5	-	-
3	7	6	-	-	-	-
Survival status						
Death	11	11	6	1	1	5
Alive	6	5	7	5	9	11

[a]Universal histological grade: grade 1 (score 3-5), grade 2 (score 6-7), grade 3 (score 8-9).

dine을 가하여 갈색으로 발색시켰다. 그런 다음 Mayer's hematoxylin으로 10초간 대조염색한 후 Canada balsam으로 봉입하였다. 양성 대조는 침윤성 유방암종을 이용하였고, 음성 대조로는 일차항체를 완충액으로 대치한 후 동일한 방법으로 시행하였다.

면역조직화학염색의 결과 판정

c-erbB-2와 EGFR 면역반응은 유방암에서 평가하는 방법에 따라 세포막에 전혀 염색되지 않거나 10% 미만으로 불완전하게 염색된 것을 음성, 불완전하지만 10% 이상 염색된 것을 1+,

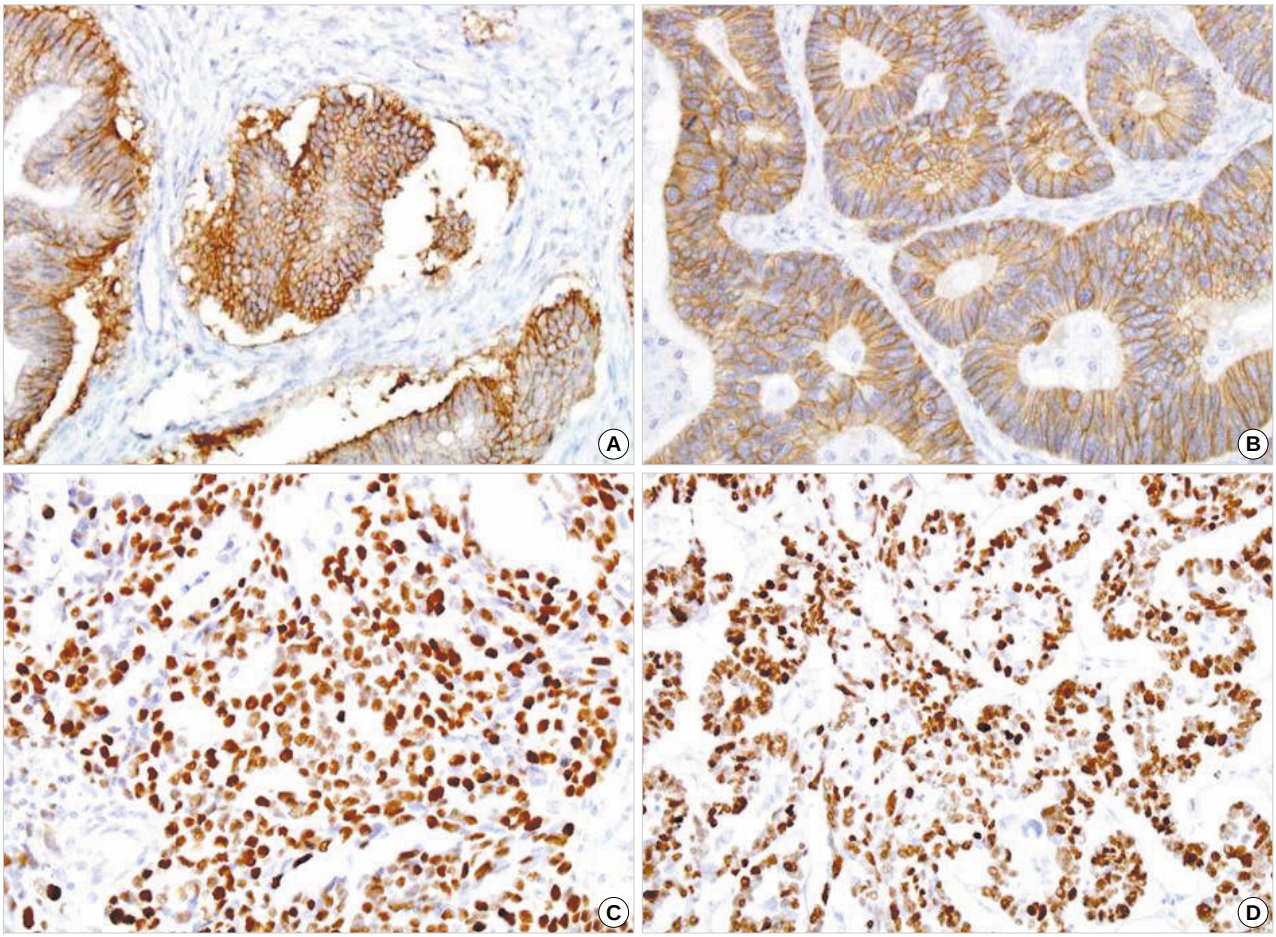

Fig. 2. Immunohistochemical staining for overexpression of c-erbB-2, EGFR, p53, and Ki-67. (A) c-erbB-2 overexpression in case of mucinous cystadenocarcinoma is noted. (B) Diffuse positive membranous staining for EGFR in case of mucinous cystadenocarcinoma is seen. (C) p53 overexpression (>50%) is demonstrated in case of endometrioid carcinoma. (D) The increased Ki-67 positive cells (>50%) in case of endometrioid carcinoma is noted.

10% 이상에서 완전하게 염색되어 중등도 염색을 보이는 경우를 것을 2+, 10% 이상에서 강하게 염색된 것을 3+로 나누어 판독하였다(Fig. 2A). c-erbB-2와 EGFR은 세포막에 2+ 이상 염색된 것을 양성으로 판독하였고, 세포질에만 약하게 염색된 경우는 제외하였다(Fig. 2B).

p53 단백과 Ki-67의 면역반응은 종양세포의 핵에 갈색으로 진하게 염색된 세포의 수를 세어서 종양세포 수의 백분율로 표시하여 그 정도를 0 (≤10%), 1+ (11-25%), 2+ (26-50%), 3+ (>50%)로 등급을 나누었으며(Table 2)(Fig. 2C, D),[13] 본 연구에서는 50% 이상인 예를 양성으로 판정하여 생존율을 비교하였다. 모든 예는 환자에 대한 정보를 알지 못하는 상태에서 두 명의 병리의사가 판독하였다.

통계학적 분석

난소암종 환자의 생존율은 난소암종 진단 시점부터 사망한 시점까지로 계산하였으며, 생존율은 Kaplan-Meier 방법과 log-rank 검정법을 이용하여 분석하였다. c-erbB-2, EGFR, p53 및 Ki-67의 발현 정도와 임상 및 병리학적 예후인자들과 비교분석하기 위해 카이제곱검정법과 Fisher의 정확검정법을 사용하였으며, 이에 따른 독립적인 효과를 평가하기 위해 다변량 분석(Cox's proportional hazard regression model)을 시행하였다. 모든 결과는 $p<0.05$인 경우 통계적 유의하다고 판정하였다. 모든 통계는 SPSS 프로그램(SPSS 12.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA)을 사용하여 분석하였다.

결 과

표면상피난소종양의 임상 및 조직학적 양상

내막모양샘암종 환자 17명의 나이는 32세에서 62세까지로 평균 48.6세였으며 50-60대가 많았다. 장액낭샘암종 환자 16명의 나이는 40세에서 70세 사이로 평균 48.6세였으며 50대가 가장 많았다. 점액낭샘암종 환자의 나이는 19세에서 79세까지로 평균

Table 2. Comparison of c-erbB-2, EGFR, p53 and Ki-67 expression according to histologic type of surface epithelial ovarian tumors

	Carcinoma (N=52)				Borderline (N=26)	
	Endometrioid (N=17)	Serous (N=16)	Mucinous (N=13)	Clear cell (N=6)	Serous (N=10)	Mucinous (N=16)
c-erbB-2						
0	15	16	12	5	10	16
1+	2	–	–	–	–	–
2+	–	–	–	1	–	–
3+	–	–	1	–	–	–
EGFR						
0	15	16	11	5	9	16
1+	2	–	1	1	1	–
2+	–	–	–	–	–	–
3+	–	–	1	–	–	–
p53						
0	6	8	6	6	10	16
1+	2	1	2	–	–	–
2+	–	–	1	–	–	–
3+	9	7	4	–	–	–
Ki-67						
0	5	7	9	–	10	12
1+	–	1	1	2	–	2
2+	3	1	2	3	–	2
3+	9	7	1	1	–	–

Table 3. Correlation between clinicopathologic parameters and expression of c-erbB-2, EGFR, p53 and Ki-67 in surface epithelial ovarian carcinomas (n=52)

Clinicopathologic variables	c-erbB-2			EGFR			p53			Ki-67		
	Positive	Negative	p value	Positive	Negative	p value	Positive	Negative	p value	Positive	Negative	p value
Age												
≤50 yo.	1	31		3	29		13	19		10	22	
>50 yo.	3	17	0.122	2	18	0.941	7	13	0.688	8	12	0.523
FIGO Stage												
I-II	1	30		5	26		11	20		8	23	
III-IV	3	18	0.146	0	21	0.055	9	12	0.595	10	11	0.108
Histologic types												
Endometrioid	2	15		2	15		9	8		9	8	
Serous	0	16		0	16		7	9		7	9	
Others	2	17	0.924	3	16	0.651	4	15	**0.050**	2	17	**0.008**
Universal histologic grade												
1	1	15		1	15		3	13		2	14	
2	1	22		4	19		9	14		7	16	
3	2	11	0.394	0	13	0.656	8	5	**0.020**	9	4	**0.002**
Tumor size												
≤10 cm	2	15		1	16		8	9		5	12	
>10 cm	2	33	0.447	4	31	0.529	12	23	0.379	13	22	0.586
Laterality												
Unilateral	4	27		5	26		11	20		9	22	
Bilateral	0	21	0.090	0	21	0.055	9	12	0.595	9	12	0.309
Survival status												
Death	2	27		2	27		11	18		10	19	
Alive	2	21	0.602	3	20	0.460	9	14	0.930	8	15	0.982

41세였다. 투명세포암종 환자 6명의 나이는 43세에서 66세 사이로 평균 53세였고 50-60가 많았다. 경계영역성 장액낭샘종 환자는 평균 연령이 38세였으며 40대에 5명, 50대에 4명, 30세 이하에서 1명으로 암종에 비해 젊은 연령 분포를 나타냈다. 경계영역성 점액낭샘종 환자는 16세에서 78세까지 광범위하게 분포하였으며, 평균 연령이 39세였다.

FIGO 병기에 분류하면 I기가 22명(42%), II기가 9명(17%), III기가 18명(35%), IV기가 3명(6%)이었다. 내막모양암종 환

자는 II기와 III기가 각각 6명으로 많았고, 장액낭샘암종 환자는 III기가 9명으로 가장 많았다. 점액낭샘암종 환자는 I기가 11명, III기가 2명으로 비교적 낮은 병기를 나타내었다. 경계영역성 장액낭샘종 환자는 I기가 8명, II기가 2명이었고, 경계영역성 점액낭샘종 환자는 16명 모두 I기였다.

FIGO 분화도 방법에 따라 분류하면 분화도 1이 13명, 분화도 2가 17명, 분화도 3이 22명으로 분화가 나쁜 증례가 많은 편이었는데, 특히 내막모양샘암종(12/17예, 70%)과 장액낭샘암종(8/16예, 50%) 환자에서 FIGO 분화도가 나쁜 예가 많았다. Universal grading system (Fig. 1) 방법에 따라 분류하면 분화도 1이 16예(31%), 분화도 2가 23예(44%), 분화도 3이 13예(25%)로 분화도 2가 가장 많았다. 점액낭샘암종과 투명세포암종에서는 분화도 3인 예가 하나도 없었다. 경계영역성 종양 26예는 FIGO 및 Universal grading system 평가에서 모두 분화도 1에 해당하였다(Table 1).

악성 상피난소종양 환자 중 35명이 사망하였으며, 경계영역성 난소상피종양 환자는 6명(17%)이 사망하였으며, 평균 생존 기간은 악성 상피난소종양이 4.9년(1,789일)인 반면, 경계영역성 상피종양은 8년으로 난소암종 환자들이 사망한 수가 많았고 생존 기간도 짧았다.

c-erbB-2 발현과 예후인자들 간의 연관성

c-erbB-2의 면역조직화학염색 결과 경계영역성 종양 26예는 모두 음성이었으며, 상피난소암종 4예(8%)에서 세포막을 따라 발현하였다(Fig. 2A). 내막모양암종 2예에서 1+ (10%), 점액낭샘암종 1예에서 3+ (70%), 투명세포암종 1예에서 2+ (70%)로 발현하였다(Table 2). FIGO 병기, 조직학적 유형, Universal grading system, 종양의 크기, 양측성 등 임상 병리학적 인자들과 비교한 결과 통계적 유의성은 없었다. 종양의 Universal grading system에 따라서 비교하면 분화도 1에서 1예(6%), 분화도 2가 1예(4%), 분화도 3이 2예(15%)로 분화가 나쁠수록 과발현하는 경향이 보였다(Table 3).

EGFR의 발현과 예후인자들 간의 연관성

EGFR의 면역조직화학염색 결과 경계영역성 종양에서는 1예만 발현한 반면, 암종에서는 5예(10%)의 표면상피난소암종에서 발현하였다(Fig. 2B). 내막모양암종 2예에서 1+ (15%), 점액낭샘암종 2예에서 각각 1+ (15%), 3+ (90%) 투명세포암종 1예에서 1+ (10%)로 발현하였으며, 장액낭샘암종에서는 발현하지 않았다(Table 2). FIGO 병기, Universal grading system, 종양의 크기에 따른 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 연령, 양측성 및 생존 여부와 EGFR의 발현 간에도 차이가 없었다(Table 3).

p53 발현과 예후인자들 간의 연관성

난소의 표면상피암종과 경계영역성 종양을 p53 발현 정도와 유형에 따라 비교하였다(Table 2). 난소표면상피암종에서는 조직학적 유형에 따라 p53 발현이 차이를 보였고 Universal grad-

Table 4. Differential expression of c-erbB-2, EGFR, p53 and Ki-67 between borderline and malignant surface epithelial ovarian tumors

	c-erbB-2 (%)			EGFR (%)			p53 (%)			Ki-67 (%)		
	Positive (N=4)	Negative (N=74)	p value[a]	Positive (N=16)	Negative (N=62)	p value	Positive (N=20)	Negative (N=58)	p value	Positive (N=18)	Negative (N=64)	p value
Borderline	0 (0%)	26 (100%)		1 (3.8%)	25 (96.2%)		0 (0%)	26 (100%)		0 (0%)	26 (100%)	
Malignant	4 (7.7%)	48 (92.3%)	0.149	5 (9.6%)	47 (90.4%)	0.37	20 (38.5%)	32 (61.5%)	<0.001	18 (34.6%)	34 (65.4%)	<0.001

[a], χ^2 test.

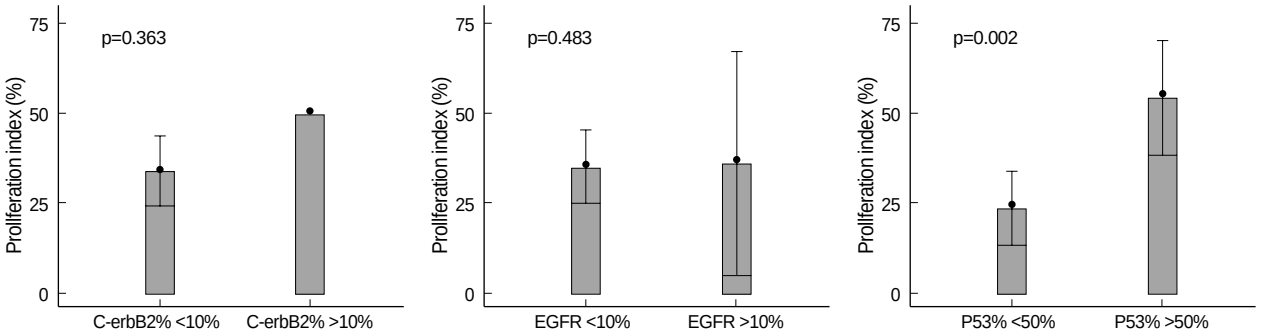

Fig. 3. Correlation of c-erbB-2, EGFR and p53 with Ki-67 labeling index in surface epithelial ovarian carcinoma. Overexpression of p53 is well correlated with Ki-67 proliferation index in epithelial ovarian carcinoma (p=0.002).

ing system에 의한 분화도가 높을수록 통계적으로 유의한 차이를 나타냈다(p=0.050, p=0.020)(Table 3). p53은 내막모양암종 9예(53%), 장액낭샘암종 7예(44%), 점액낭샘암종 13예 중 4예(31%)에서 3+ (>50%)로 발현하였으나, 투명세포암종 6예에서는 모두 발현하지 않았다. 경계영역성 장액낭샘종 및 점액낭샘종 종양 모두 p53에 음성으로 암종과 유의한 통계적 차이를 보였다(p<0.001)(Table 4).

Ki-67 지수와 c-erbB-2, EGFR, p53 발현 간의 연관성

악성과 경계영역성 상피난소종양의 유형에 따른 Ki-67 지수의 차이는 Table 2와 3에 요약되어 있다. Ki-67 지수는 조직학적 유형과 Universal grading system에 의한 분화도에 따라 유의한 차이가 있었다(p=0.008, p=0.002). 그러나 연령, FIGO 병기, 종양의 크기, 양측성 및 생존 여부에 따라서는 유의한 차이가 없었다(Table 3).

Ki-67 증식지수와 c-erbB-2, EGFR 및 p53 발현 간의 연관성을 비교한 결과 c-erbB-2, EGFR은 두 군 간에 통계적 차이가 없었으나, p53이 과발현된 군에서는 Ki-67 지수가 높아져 통계적으로 유의한 연관성을 보였다(p=0.002)(Fig. 3). 또 Ki-67 지수는 경계영역성 난소종양에서 음성 혹은 낮은 지수를 보여 암종에 비해 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p<0.001)

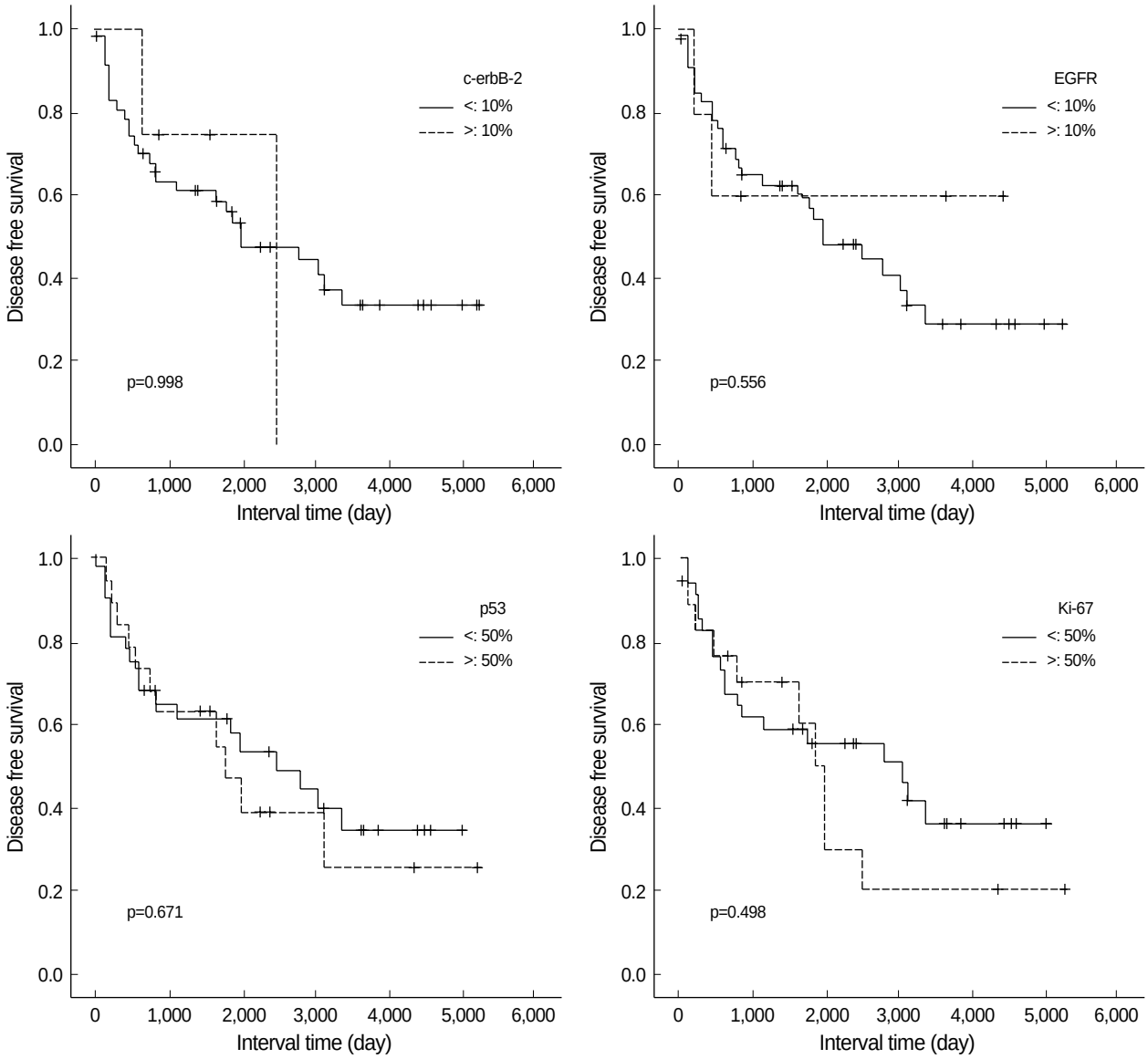

Fig. 4. Kaplan-Meier analysis of overall survival of 52 patients with epithelial ovarian carcinoma according to c-erbB-2, EGFR, p53, and Ki-67 expression status. There is no statistically significant difference in the prognosis of ovarian carcinoma according to the expression of c-erbB-2 (p=0.998) and EGFR (p=0.556), p53 (p=0.671) and Ki-67 (p=0.498).

Table 5. Univariate and multivariate survival analysis of 52 patients with surface epithelial ovarian carcinomas

Overall survival	Significance univariate[a]	Significance multivariate[b]	HR	95% CI
Age (≤50 vs >50 years)	0.033	0.071	2.315	0.930-5.765
Stage (I, II vs III, IV)	0.011	0.690	1.252	0.415-3.775
Grade (1, 2 vs 3)	0.309	0.534	0.740	0.286-1.911
Size (≤10 vs >10 cm)	**0.008**	**0.046**	0.368	0.138-0.983
Bilaterality	**0.006**	0.169	2.110	0.728-6.112
c-erbB-2 (negative vs positive)	0.998	0.546	0.564	0.088-3.616
EGFR (negative vs positive)	0.556	0.926	0.927	0.189-4.558
p53 (negative vs positive)	0.678	0.353	0.625	0.232-1.683
Ki-67 (negative vs positive)	0.498	0.183	2.088	0.707-6.164

[a], log-rank test; [b], Cox regression hazard model; Grade, Universal histologic grade.

(Table 4).

임상병리학적 소견, c-erbB-2, EGFR, p53 발현 및 Ki-67 지수와 생존율의 연관성

전체 환자의 생존율과 환자의 연령, FIGO 병기, Universal grading system, 종양의 크기, 양측성을 비교하였고, c-erbB-2, EGFR 발현, p53 및 Ki-67 양성과 음성군을 생존 기간과 비교하여 분석하였다. Kaplan-Meier의 생존곡선을 비교한 결과 c-erbB-2, EGFR 및 p53 양성군과 음성군 사이에는 차이가 없었다. Ki-67지수는 50% 이하인 군과 이상인 군 사이에 다소 차이를 보여 Ki-67 지수가 높을수록 생존율이 낮게 나타났으나, 두 군 간에 통계적 차이는 없었다(Fig. 4). Log-rank 검정법으로 시행한 단변량 분석 결과 연령(p=0.033), FIGO병기(p=0.011), 종양의 크기(p=0.008)와 양측성 여부(p=0.006)에 따라 생존율에 유의한 차이를 보였으나, 다변량 분석에서는 종양의 크기(p=0.046)만 통계적으로 유의한 차이를 보였다. c-erbB-2, EGFR 발현, p53 및 Ki-67 양성 여부와 생존율 간에는 통계적 유의성이 없었다(Table 5).

고 찰

EGFR과 c-erbB-2 (HER-2/neu)는 EGF 성장 신호경로(signaling pathway)를 활성화하고 세포의 성장을 촉진하며, 결과적으로 세포의 분열, 이주, 부착, 분화 및 세포자멸사 같은 세포 내의 다른 과정을 유도한다.[16]

여러 장기의 암종에서 c-erbB-2와 EGFR에 대한 연구가 보고되었고, 난소암종에서 EGFR 발현이 암종의 예후에 미치는 영향에 대한 연구도 보고되었다.[17,18]

이 중 c-erbB-2 유전자 증폭은 사람의 유방암종과 난소암종에서 불량한 예후인자로 알려져 왔다.[11] Tyson 등[9]에 따르면 c-erbB-2는 난소암종 87예(4%)에서 발현되었으며 이는 유전자의 증폭, 재배열이나 과발현을 시사한다고 하였다. 난소암종에서 다른 원형암유전자의 발현을 동시에 연구한 결과 c-fos, c-myc, n-myc, c-fms 및 c-Ha-ras 원형암유전자가 다양한 정도로 발현되었다. 이들은 연구한 원형암유전자 중 c-erbB-2, c-fms, c-myc, n-myc, c-fos, c-Ha-ras의 증폭이나 재배열은 앞으로 난소암종의 예후인자로서 연구할 가치가 있다고 하였다. c-erbB-2 (c-erbB-2) 유전자 증폭에 대한 연구 결과는 종양에 따라서 다양할 뿐 아니라 난소종양에서의 발현율은 4-66%까지 다양하게 보고하였다.[11,19,20] 본 연구에서는 c-erbB-2가 8%만 발현하여 낮은 발현율을 나타내었고 경계영역성 난소상피종양에서는 한 예도 나오지 않았다. 그러나 Wong 등[20]은 난소종양 중 경계영역성 난소종양에서는 15%, 암종에서는 48%까지 발현되었다고 보고하였고, Afify 등[21]은 Stage I은 22%(2/9), stage III는 72% (10/14)에서 유전자 증폭이 관찰되어 통계학적으로 유의한 차이를 보였다고 하였다. 환자의 예후와 연관성을 시사하는 연구에서, c-erbB-2의 발현이 높은 병기(late stage, III-IV)는 77%인 데 비해 낮은 병기(early stage, I-II)는 21%로 차이를 보였다.[19] 그러나 이런 유전자 증폭이나 과발현 정도는 분석 방법에 따라 차이가 생길 수 있을 것으로 생각한다. Berchuck 등[21]은 동결절편을 이용하여 시행한 면역조직화학적 방법으로 c-erbB-2 단백의 과발현을 연구하였는데 진행된 난소암종 73예 중 23예(32%)에서 과발현되었다. 또 이 군의 예후는 나머지 환자군의 평균 생존 기간(32.8개월)보다 매우 짧아(15.7개월) 유의한 차이를 보였고, 통상의 항암치료에 반응이 낮았다고 하였다. 그러나 반대 결과를 보고한 연구도 있다. Neilson 등[10]은 본 연구와 유사하게 난소암종에서 p53, c-erbB-2 및 EGFR 과발현에 대한 연구를 시행하였는데 단변량 분석에서 p53 양성은 전형적인 예후인자들과는 통계적으로 유의한 차이를 보였으나, c-erbB-2 양성군이 오히려 생존 기간이 긴 것으로 나타났고, EGFR은 생존율과는 차이가 없었다. 그러나 다변량 분석에서는 p53 양성이면서 분화가 나쁜 군에서 생존율에 유의한 차이가 나타났다. c-erbB-2 양성군에서도 종양의 분화도에 따라 차이를 나타냈는데 c-erbB-2 양성이면서 분화가 나쁜 군이 중등도 분화를 보이는 군보다 사망률이 높게 나타났다. 본 연구에서는 c-erbB-2의 발현이 환자의 예후와 연관성이 없었다.

유방암종에서 c-erbB-2 (HER-2/neu) 발현에 대해서는 현재까지 많은 연구가 이루어졌다. c-erbB-2가 과발현하는 유방암에서 recombinant humanized anti-erbB2/HER-2 단클론성 항체인 Trastuzumab (Herceptin®)이 치료 효과가 있을 것으로 보고한 연구도 있다.[22] Trastuzumab이 항신생혈관형성의 성질을 가지고 있어 치료 효과가 나타날 것으로 생각한 것이다.

현재 난소암종에서 표적치료를 개발하려는 목적으로 세포의 성장을 조절하는 상피성장인자의 역할을 알아보기 위해 여러 가지 상피난소암종에서 EGFR의 발현을 연구하고 있으며, 유방암에서와 비슷하게 에스트로겐과 프로게스테론 호르몬 수용체의 연관성도 연구하고 있다. 난소암종에서 호르몬 수용체인 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체와 EGFR의 연관성에 대한 연구도 다양한 결과를 보였고, 각 연구에서 호르몬 수용체를 검사한 방법도 차이가 있었다.[23,24]

본 연구에서는 52예의 상피성 난소암종에서 면역조직화학방법으로 c-erbB-2는 8%에서 발현하였고, EGFR은 10%에서 발현하여 문헌보고에 비해 낮은 빈도를 나타냈다. 경계영역성 난소종양 26예에서는 c-erbB-2는 모두 음성이었고, EGFR은 1예(4%)에서만 발현하였다. c-erbB-2의 발현율은 연령이 많고, FIGO 병기가 높으며, 조직학적 분화도가 나쁜 예에서 비교적 높게 나타났다. 그러나 기타 임상병리적 소견들도 통계적으로 유의한 연관성은 없었으며, EGFR 발현도 여러 임상 병리적 인자들과 유의한 연관성이 없었다.

폐의 비소세포암에서 EGFR 발현은 불량한 예후인자로 알려져 있다.[2] 그러나 여러 종류의 암에서 EGFR의 의의에 대해 다양한 결과가 나오는 것은 연구방법에서 EGFR 발현을 평가하는 기준의 차이 때문일 수 있다. 면역조직화학염색은 가장 흔히 이용하는 방법으로 알려져 있으나, 일차항체의 선택이나 희석배수가 다르기 때문에 차이가 나타날 수 있다. 이러한 방법의 예민도는 항체의 농도에 따라 다를 수 있다. 또한 조직을 고정하였는지, 동결 보존하였는지 여부에 따라, 그리고 항원회복 방법 등에 따라서도 그 결과가 다를 수 있다.[26] 양성세포의 수를 구분하는 기준도 임의적이며 연구자마다 다양하였다. 면역조직화학염색에서는 양성과 음성을 구분하는 기준점을 정하는 것이 중요하다. 또 면역조직화학염색 결과를 정량적으로 평가하기 위해서는 분자생물학적 방법들이 필요하지만, 면역조직화학염색법은 조직 구조를 유지하여 항원의 위치를 알아볼 수 있고 일상적으로 활용하는 데 경제적인 면에서 효과적인 방법으로 볼 수 있다. 방사성 리간드결합분석(Radioligand binding analysis)은 한층 더 정량적으로 분석하는 방법이지만 종양이 없는 간질세포들이 검사에 포함될 수 있다는 단점이 있다. EGFR을 측정하는 데 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)과 면역조직화학적 방법으로 좋은 결과를 보고하였다.[25] 그러나 효소면역측정법은 종양과 정상 조직을 신선한 상태나 동결조직 상태로 측정해야 한다는 단점이 있다.

현재 난소암종에서 EGFR의 이상 발현율은 19-77%로 다양하게 보고하고 있다.[7,8,10,17,26] 대부분의 연구는 유방암이나 난소암종에서 EGFR과 c-erbB-2가 증가하면 불량한 예후를 보인다고 하였다.[11,12] 반면, 난소암종에서 EGFR의 발현이 생존율의 감소와 연관성이 없다는 연구 결과도 있다.[27,28] 본 연구에서도 c-erbB-2와 EGFR이 각각 4예와 5예의 난소암종에서 발현하여 낮은 빈도를 보였으며, 환자의 연령, FIGO 병기, 조직학적 유형, 분화도, 종양의 크기, 양측성 및 생존 여부 등 모든 인자 간에 통계적으로 유의한 연관성은 없었다. 이러한 결과에는 연구된 대상 환자의 수가 적고 면역조직화학염색을 오래 보관된 파라핀 조직에서 시행한 점, 기술적 문제, 판정기준이 까다로운 점 등이 영향을 미쳤을 것으로 생각한다. 향후 더 많은 예들을 모아서 FISH나 CISH 방법 또는 다른 분자생물학적인 기술을 병용하여 연구할 필요가 있다고 생각한다.

p53 유전자는 1979년 처음 기술되었고, 종양억제유전자로 알려져 있고, 세포자멸사 등을 포함하는 다양한 조절기능이 있다.[29] 세포자멸사와 관련된 분자들은 상피난소종양에서 병으로 진행되는 과정을 알려줄 가능성과 새로운 치료의 표적이나 예후인자로서 연구하고 있다. *p53* 돌연변이가 상피난소암종의 40-60%에서 발생하는 것으로 알려져 있으며,[30] 종양의 분화도, 조직학적 유형 및 항암약제민감성 등과 연관성이 밝혀지고 있다.

본 연구에서도 내막모양암종(52%)과 장액낭샘암종(43%)에서 p53 단백이 50% 이상의 세포에서 양성으로 과발현하였으나 투명세포암종에서는 한 예도 발현하지 않아 종양의 유형에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보였으며, 분화가 나쁠수록 p53 발현이 증가하였다. 그러므로 p53 발현은 조직학적 유형과 분화도에 따라 유의한 차이를 나타내어 불량한 예후와 연관이 있음을 확인하였다. 그러나 환자의 연령, FIGO 병기, 종양의 크기 및 양측성에 따라서는 유의한 차이를 보이지 않았다. Gomes와 Andrade[29]의 연구에서 p53은 주로 장액낭샘암종에서 분화가 나쁜 예(분화도 2와 분화도 3)와 고령의 환자에서 높은 발현율을 보였다. 이들은 장액낭샘암종에서 p53 발현이 유의하게 높게 나타난 것으로 미루어, 연령이 높아짐에 따라 노화된 세포에서 이러한 인자의 발현이 증가하고 DNA-결합 핵심 도메인에서 과오돌연변이가 나타나면 발암성을 갖게 될 것으로 추정하였다. p53 돌연변이주는 돌연변이의 빈도를 증가시키고, 분화를 차단하며, 전이능이 증가하게 된다. 그러므로 p53 변이는 암 발생과 종양으로 진행하는 과정을 촉진하는 동시에 여러 가지 변이된 p53 분자들을 만든다. 따라서 변이된 p53이 축적되면 난소암종에서 분화 능력을 소실하는 것과 연관될 수 있다.

Ki-67의 발현은 다양한 종양에서 진단이나 예후에 활용되고 있다. 그러나 난소암종에서 EGFR 가계나, 호르몬 수용체 및 Ki-67에 대한 면역조직화학염색 결과로 서로의 연관성 및 예후를 분석한 결과는 다양하게 보고하고 있다.[26] 본 연구에서는 Ki-67 지수가 내막모양암종과 장액낭샘암종에서 높게 나타났으며, 조직학적 분화도가 증가함에 따라 발현율이 증가하여 조직학적 유형과 분화도에 따라 유의한 차이가 있었다. 그러나 연령, FIGO 병기, 종양의 크기 및 양측성에 따라서는 유의한 차이를 나타내지 않았다. Ki-67 증식지수와 c-erbB-2, EGFR 및 p53 발현 간의 연관성을 비교한 결과 c-erbB-2 음성군보다 양성군에서 높은 증식지수를 보였지만 통계적 유의성은 없었다. EGFR 발현도 두 군 간에 차이가 없었다. 그러나 p53이 높게 발현된 군에서 통계적으로 유의한 연관성을 보였다(Fig. 3).

본 연구에서 52예의 표면상피난소암종과 26예의 경계영역성 난소종양을 비교한 결과 c-erbB-2은 경계영역성 난소종양에서는 발현되지 않은 반면 표면상피난소암종 4예에서는 발현되었으나 통계적으로 유의성은 없었다. EGFR도 경계영역성 난소종양에서는 1예에서만 발현된 반면 표면상피난소암종은 5예에서 발현되어 차이가 있었으나 통계적 유의성은 없었다. p53은 표면상피난소암종 20예에서만 발현하여 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 또한 Ki-67 지수도 표면상피난소암종 18예에서만 3+(>50%)로 나타나서 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다. 그러므로 p53 과발현과 Ki-67 지수는 난소의 경계영역성 종양과 악성 상피성 암종 간의 차이가 뚜렷하여 두 군 간의 감별진단에 보조적인 자료로 활용할 수 있을 것으로 생각한다.

요약하면 난소암종 환자에서 병리학적 소견은 환자의 진단과 생존율 예측 인자를 찾는 데 활용될 가능성이 있고, 특히 p53과 Ki-67은 분화도가 나쁜 난소암종에서 과발현하여 후에 환자의 예후를 예측하는 표지로 활용될 가능성이 있다. 본 연구에서는 c-erbB-2와 EGFR 발현 여부에 따라 환자의 생존율에 통계적으로 유의한 차이가 나타나지는 않았다. 그러나 난소암종에서 c-erbB-2와 EGFR에 대한 면역조직화학적 검사를 통해 성장인자에 대한 항체를 이용한 면역치료가 가능한 환자군을 구분하는데 이용 가능한 방법으로 생각한다. 그러나 향후 더 많은 상피성 난소종양 환자를 대상으로 하여 c-erbB-2, EGFR, p53의 발현에 대한 분자생물학적 및 면역조직화학 연구와 ki-67 지수 등에 대한 전향적인 연구를 시행하여, 난소암종 환자의 예후를 예측하는 인자로 활용이 가능성을 알아보아야 하겠고, 이결과를 토대로 하여 새로운 표적치료가 가능한 환자군을 선택하는데 이런 표지자들이 사용가능할 것인지에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 생각한다.

참고문헌

1. Bingham C, Roberts D, Hamilton TC. The role of molecular biology in understanding ovarian cancer initiation and progression. Int J Gynecol Cancer 2001; 11: 7-11.
2. Meert AP, Martin B, Delmotte P, *et al*. The role of EGF-R expression on patient survival in lung cancer: a systematic review with meta-analysis. Eur Respir J 2002; 20: 975-81.
3. Han SW, Kim TY, Hwang PG, *et al*. Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. J Clin Oncol 2005; 23: 2493-501.
4. Goff BA, Shy K, Greer BE, Muntz HG, Skelly M, Gown AM. Overexpression and relationships of HER-2/neu, epidermal growth factor receptor, p53, Ki-67, and tumor necrosis factor alpha in epithelial ovarian cancer. Eur J Gynaecol Oncol 1996; 17: 487-92.
5. Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. FEBS Letters 1997; 410: 83-6.
6. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, *et al*. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER-2 for metastatic breast cancer that overexpression HER2. N Engl J Med 2001; 344: 783-92.
7. Kohler M, Bauknecht T, Grimm M, Birmelin G, Kommoss F, Wagner E. Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha expression in human ovarian carcinomas. Eur J Cancer 1992; 28: 1432-7.
8. Skirnisdottir I, Seidal T, Sorbe B. A new prognostic model comprising p53, EGFR, and tumor grade in early stage epithelial ovarian carcinoma and avoiding the problem of inaccurate surgical staging. Int J Gynecol Pathol 2004; 14: 259-70.
9. Tyson FL, Boyer CM, Kaufman R, *et al*. Expression and amplification of the HER-2/neu (c-erbB-2) protooncogene in epithelial ovarian tumors and cell lines. Am J Obstet Gynecol 1991; 165: 640-6.
10. Nielsen JS, Jakobsen E, Holund B, Bertelsen K, Jakobsen A. Prognostic significance of p53, Her-2, and EGFR overexpression in borderline and epithelial ovarian cancer. Int J Gynecol Pathol 2004; 14: 1086-96.
11. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, *et al*. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science 1989; 244: 707-12.
12. Scoccia B, Lee YM, Niederberger C, Ilekis JV. Expression of the ErbB family of receptors in ovarian cancer. J Soc Gynecol Investig 1998; 5: 161-5.
13. Anreder MB, Freeman SM, Merogi A, Halabi S, Marrogi AJ. p53, c-erbB2, and PCNA status in benign, proliferative and malignant ovarian surface epithelial neoplasms: a study of 75 cases. Arch Pathol 1999; 123: 310-16.
14. Khalifa MA, Lacher DA, Lage JM, *et al*. Immunohistochemical assessment of proliferation markers and altered gene expression in archival specimens of ovarian epithelial tumors. Cancer Detect Prev 1997; 21: 532-9.
15. Silverberg SG. Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. Int J Gynecol Pathol 2000; 19: 7-15.
16. Linggi B, Carpenter G. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. Trends Cell Biol 2006; 16: 649-56.
17. Skirnisdottir I, Sorbe B, Seidal T. The growth factor receptors HER-2/neu and EGFR, their relationship, and their effects on the prognosis in early stage (FIGO I-II) epithelial ovarian carcinoma. Int J Gynecol Pathol 2001; 11: 119-29.
18. Psyrri A, Kassar M, Yu Z, *et al*. Effect of epidermal growth factor receptor expression level on survival in patients with epithelial ovarian cancer. Clin Cancer Res 2005; 11: 8637-43.

19. Wong YF, Cheung TH, Lam SK, *et al*. Prevalence and significance of HER-2/neu amplification in epithelial ovarian cancer. Gynecol Obstet Invest 1995; 40: 209-12.
20. Afify AM, Werness BA, Mark HF. HER-2/neu oncogene amplification in stage I and stage III ovarian papillary serous carcinoma. Exp Molecular Pathol 1999; 66: 163-9.
21. Berchuck A, Rodriguez GC, Kamel A, *et al*. Epidermal growth factor receptor expression in normal ovarian epithelium and ovarian cancer. I. Correlation of receptor expression with prognostic factors in patients with ovarian cancer. Am J Obstet Gynecol 1991; 164: 669-74.
22. Orlando L, Cardillo A, Ghisini R, *et al*. Trastuzumab in combination with metronomic cyclophosphamide and methotrexate in patients with HER-2 positive metastatic breast cancer. BMC Cancer 2006; 6: 225.
23. van der Burg ME, Henzen-Logmans SC, Foekens JA, *et al*. The prognostic value of epidermal growth factor receptors, determined by both immunohistochemistry and ligand binding assays, in primary epithelial ovarian cancer: a pilot study. Eur J Cancer 1993; 29: 1951-7.
24. Berns EM, Klijn JG, Henzen-Logmans SC, Rodenburg CJ, van der Burg ME, Foekens JA. Receptors for hormones and growth factors and (onco)-gene amplification in human ovarian cancer. Int J Cancer 1992; 52: 218-24.
25. Pfeiffer P, Nexo E, Bentzen SM, Clausen PP, Andersen K, Rose C. Enzyme-linked immunosorbent assay of epidermal growth factor receptor in lung cancer: comparisons with immunohistochemistry, clinicopathological features and prognosis. Br J Cancer 1998; 78: 96-9.
26. Henzen-Logmans SC, Fieret EJ, Berns EM, van der Burg ME, Klijn JG, Foekens JA. Ki-67 staining in benign, borderline, malignant primary and metastatic ovarian tumors: correlation with steroid receptors, epidermal-growth-factor receptor and cathepsin D. Int J Cancer 1994; 57: 468-72.
27. Meden H, Marx D, Raab T, Kron M, Schauer A, Kuhn W. EGF-R and overexpression of the oncogene c-erbB-2 in ovarian cancer: immunohistochemical findings and prognostic value. J Obstet Gynaecol 1995; 21: 167-78.
28. Baekelandt M, Kristensen GB, Trope CG, Nesland JM, Holm R. Epidermal growth factor receptor expression has no independent prognostic significance in advanced ovarian cancer. Anticancer Res 1999; 19: 4469-74.
29. Gomes CP, Andrade LA. PTEN and p53 expression in primary ovarian carcinomas: immunohistochemical study and discussion of pathogenetic mechanisms. Int J Gynecol Cancer 2006; 16: 254-8.