Overexpression of c-met Protein in Gastric Cancer and Role of uPAR as a Therapeutic Target

Hyun A Oh, M.D., Gu Lee, M.D., Hee Jung Kang, M.D., Yong Gil Kim, M.D., Sung Hwa Bae, M.D., Jae Lyun Lee, M.D., Kyung Hee Lee, M.D., Myung Soo Hyun, M.D. and Dong Suk Kim, M.D.¹

Departments of Internal Medicine and ¹Pathology, Yeungnam University College of Medicine, Daegu, Korea

Purpose: One of the members of the tyrosine kinase receptor family is the protein product of the c-met proto-oncogene, which is the receptor for hepatocyte growth factor (HGF). HGF is known as a potent mitogen and motogen for many kinds of carcinoma cells, and has been found to simulate the growth and progression of gastric cancer cells through HGF-receptors. In addition, the urokinase-type plasminogen activator (uPA) and receptor (uPAR) also play important roles in the invasion and metastasis.

Materials and Methods: The expression of c-met protein was investigated using immunohistochemical staining of 50 paraffin embedded gastric cancers, and by measuring the serum uPAR levels, before and after an operation, in gastric cancer patients using an ELISA assay.

Results: Of the 50 cases, 32 (64%) expressed the c-met protein. The c-met protein expression was significantly correlated with the TNM staging ($p < 0.05$), but the other prognostic factors were not significant variables. Accord-

ing to a Kaplan-Meier's plot, the one and three year overall survival rates were 94 and 70% in patients not expressing the c-met protein, and 81 and 33% in those that did, and the Survival curves revealed a significantly different prognosis ($p = 0.04$). Elevated serum uPAR levels (≥ 3257.8 pg/ml, control mean $\pm 2SD$) were observed in 9 (34.6%) of 26 gastric cancer patients, but in none of control subjects. Average serum uPAR levels were 2980.8 ± 616.2 pg/ml before the operation and 2404.7 ± 455.9 pg/ml after, and decreased significantly after surgical resection ($p < 0.05$). The serum uPAR level correlated significantly with lymph node metastasis and vessel invasion ($p < 0.05$).

Conclusion: The expression of c-met protein, and the level of uPAR, may be prognostic factors in gastric cancer. (Cancer Research and Treatment 2003;35:9-15)

Key Words: Stomach neoplasm, c-met, Urokinase-type plasminogen activator

서론

위암은 우리나라에서 발생 및 사망빈도가 가장 높은 악성 종양으로, 현재까지 완치를 기대할 수 있는 유일한 치료법은 외과적 절제술이다. 조기위암 상태에서 수술을 받을 경우 생존율이 90% 이상으로 좋은 결과를 보이지만 우리나라의 경우 70% 이상에서 진행된 상태로 수술을 받기 때문에 진행위암의 예후를 예측할 수 있는 인자를 밝혀내고 수술 후 치료방침을 결정하는 것이 중요하다고 할 수 있다(1). 위암의 예후인자는 원격전이, 위벽침윤도, 림프절 전이, 종양의 분화도, 육안적 분류 등이 있고 그중 병기가 가

장 의의가 있으나 동일한 병기의 환자에 있어서도 재발, 생존여부가 다양하여 새로운 예후 인자를 찾는 시도가 시행되었다. 이에 DNA ploidy, 증식활성, 암유전자의 증폭이나 과발현 등의 생물학적 인자들이 대두되었고(2), 최근 분자생물학의 발달에 힘입어 암의 발생은 축적된 유전자의 변화의 결과라는 것이 정설로 받아들여짐에 따라 암유전자, 암억제유전자 혹은 성장인자 및 그의 수용체를 암표식자나 예후인자로 이용하려는 연구들이 진행되고 있다. 암유전자는 Huebner와 Todaro가 처음 기술한 이래 여러 암종에서 발견되고 있으며(3) 특히 위암에서는 c-myc의 증폭 발현이 확인되었고(4,5), 이후 Starzy-Nska 등이 암억제유전자인 p53의 발현은 위암 환자의 불량한 예후와 상관관계가 있으며, Yokota 등은 암유전자 c-erbB-2의 발현은 암의 분화 정도와 관련이 있고 Steeg 등이 암전이 억제유전자 nm23의 저발현은 위암 환자의 나쁜 예후와 상관관계가 있다고 하였다(1).

최근에는 악성정도를 반영하는 생물학적 지표로서 성장인자와 그들의 수용체에 대한 연구가 진행 중이고 이 중

Correspondence: Kyung Hee Lee, Department of Internal Medicine, Yeungnam University College of Medicine, Daemyong-dong, Nam-gu, Daegu 705-035, Korea. (Tel) 053-620-3845, (Fax) 053-654-8386, (E-mail) lkhee@med.yu.ac.kr

Received October 14, 2002, Accepted November 22, 2002

This study was financially supported by Yeungnam University in the program 2002.

위암에서는 receptor tyrosine kinase의 변화가 중요한 역할을 수행한다고 알려진 이후 tyrosine kinase receptor family의 하나인 c-met에 대한 연구가 활발하다. C-met의 산물은 190 kD의 transmembrane tyrosine kinase로 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor)/scatter factor (HGF/SF)의 수용체로 작용하며(6), HGF/SF는 c-met을 표현하는 목표장기에서 세포의 증식, 이동, 침습에 관여한다. 즉, HGF/SF-Met 신호체계는 발생시기 동안 조직재생, 상처치유, 신생혈관형성 등에 관여하는 등 정상적인 생물학적 과정에도 중요한 역할을 수행하지만(7) 원발병소의 진행과 이차적인 전이에도 핵심적인 역할을 담당한다(8). C-met은 위암, 대장암, 간암 등에서 과발현됨이 보고되었고(9), c-met 종양단백이 높게 측정될 경우 간암에서 나쁜 예후를 시사하며(10), 위암에서 과발현시 암의 침윤 및 전이와 관련이 있다고 보고되고 있다(11).

Keizo 등은 위암에서 c-met뿐만 아니라 암의 침습과 관련이 있는 것으로 알려진 autocrine motility factor receptor (AMFR), urokinase type plasminogen activator receptor (uPAR) 등을 면역조직화학염색을 시행하여 그 발현을 비교하였는데, 2개 이상 발현되는 군에서 특히 복강내 전이, 림프절 전이가 많았으며 생존율이 낮아진다고 하였다(11). 특히 암의 침윤과 전이에 세포의 침습이란 과정이 반드시 필요하며 여기에 단백분해효소가 관여한다고 알려진 후 serine 단백분해효소인 urokinase-type plasminogen activator (uPA)와 그 수용체인 uPAR의 중요성이 대두되고 있으며, HGF/SF-Met 신호체계가 활성화되어 세포표면에 uPA-uPAR계가 발현되기 때문에(12) c-met과 uPAR의 관련성에 관한 많은 연구가 진행 중이다.

이에 본 연구에서는 위암으로 진단되어 수술 받은 환자의

파라핀 포매조직에서 면역조직화학염색법을 이용하여 c-met 종양단백의 발현 정도를 알아보고 예후와의 연관성을 비교 분석하고, 위암 환자의 혈청에서 효소면역분석법을 이용하여 수술 전후 uPAR농도를 측정하여 혈청 내 uPAR농도의 의의를 살펴보고자 한다.

대상 및 방법

1) 연구 대상

1998년 1월부터 1999년 12월까지 영남대학교 의과대학 부속병원에서 위암으로 진단되어 수술받은 환자 중 파라핀 포매조직의 보관 상태가 양호하고 임상 기록의 검토가 가능한 50예를 대상으로 면역조직화학염색을 시행하여 c-met 종양단백의 발현여부를 조사하였다. 연령분포는 22세에서 77세까지고 평균연령은 57세였으며 남자가 33명 여자가 17명이었다. 31명은 위아전절제술을 시행하였고 19명은 위전절제술을 시행하였으며 American Joint Committee on Cancer (AJCC, 1997)의 규정에 따라 병기를 분류하였을 때 I기가 3명, II기가 5명, III기가 19명, IV기가 23명이었다.

혈청 uPAR치를 보기위해 2001년 5월부터 7월까지 위암으로 확진된 환자 26명을 대상으로 하여 진단과 동시에 정맥혈을 채취하고 수술을 시행한 후 수술 후 7일째 다시 정맥혈을 채취하여 수술 전과 수술 후에 효소면역분석법을 이용하여 혈청 uPAR를 측정하였다. 26명의 환자 중 남자가 16명이고 여자가 10명이었고 연령분포는 31세에서 77세로 평균 연령은 55세였다. EGCA가 14명, I기가 2명, II기가 4명, III기가 5명, IV기가 1명이었다. 대조군은 종합건강검진센터를 방문한 건강인 20명을 대상으로 하였고 이 중 남자가 13

Fig. 1. Immunohistochemical stain for c-met. (A) c-met positive for gastric cancer tissue, (B) c-met negative for gastric cancer tissue (Avidin-biotin complex method, $\times 100$).

명, 여자가 7명이었으며, 연령분포는 36세에서 69세까지로 평균연령은 48세였다. 이들도 정맥혈을 채취하여 효소면역 분석법을 이용하여 혈청 uPAR을 측정하였다.

2) 조직에서 c-met 발현

(1) 면역조직화학염색법: 수술 후 얻은 조직을 10% 중성 완충 포르말린 용액에 고정하고 파라핀에 포매된 4 μ m 두께의 종양조직 절편에 파라핀을 제거하기 위해 xylene을 5분간 4회 작용시킨 후 95% 알코올로 4회 탈수하였다. 내인성 peroxidase반응을 차단하기 위해 methanol과 3% 과산화수소수에 10분간 처리한 후 조직항원과 항체 간의 비특이적 결합을 억제하기 위해 blocking agent로 10분간 처리하였다. 1 : 50으로 희석한 일차항체로 90분 동안 반응시킨 후 완충액(Tris buffered saline)으로 3회 세척한 뒤 이차항체를 15분간 반응시킨 후 완충액으로 3회 세척하였다. Avidin-HRP

(horse-radish peroxidase)에 15분간 반응시킨 후 AEC (3-amino-9-ethylcarbazole)로 발색을 시키고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 시행한 다음 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

(2) 염색 결과의 판정: 광학 현미경하에서 염색강도와는 상관없이 암세포의 50% 이상에서 세포막 및 세포질이 진한 적갈색으로 염색된 경우 양성으로 판정하였다(Fig. 1).

3) 혈청 uPAR 효소면역분석법

혈청내 uPAR 검사는 Quantikine human uPAR kit을 사용하여 colorimetric sandwich ELISA로 검사하였다. 환자군 및 대조군의 혈청을 희석액으로 적어도 5배 이상 희석한 뒤 uPAR와 반응하는 murine monoclonal antibody가 coating된 microplate well에 넣고 실온에서 2시간 동안 반응시킨 다음 완충액으로 4회 씻어내고 200 μ l의 horseradish peroxidase

Table 1. Relationship between c-met expression in tumor tissue and clinicopathologic features in patients with stomach cancer (n=50)

Clinicopathologic features	No	Expression of c-met		p-value*	Clinicopathologic features	No	Expression of c-met		p-value*
		Positive rate (%)	Negative rate (%)				Positive rate (%)	Negative rate (%)	
All patients	50	32 (64%)	18 (36%)		Serosa invasion				0.700
Age				0.527	Negative	17	12 (70.6%)	5 (29.4%)	
< 60	29	17 (58.6%)	12 (41.4%)		Positive	33	20 (60.67%)	13 (39.4%)	
> 60	21	15 (71.4%)	6 (28.6%)		L/N metastasis				0.730
Sex				0.813	Negative	10	7 (70%)	3 (30%)	
Male	33	22 (66.7%)	11 (33.3%)		Positive	40	25 (62.5%)	15 (37.5%)	
Female	17	10 (58.8%)	7 (41.2%)		Vascular invasion				1.000
Tumor size				0.211	Negative	17	11 (64.7%)	6 (35.3%)	
< 5 cm	14	11 (78.6%)	3 (21.4%)		Positive	33	21 (63.6%)	12 (36.4%)	
> 5 cm	36	21 (58.3%)	15 (41.7%)		Lymphatic vessel invasion				0.479
Histologic type				0.642	Negative	35	24 (68.6%)	11 (31.4%)	
Differentiated	45	28 (62.2%)	17 (37.8%)		Positive	15	8 (53.3%)	7 (46.7%)	
Undifferentiated	5	4 (75%)	1 (25%)		Neural invasion				0.612
Macroscopic type				0.523	Negative	24	14 (58.3%)	10 (41.7%)	
Bormann 1,2	15	11 (73.3%)	4 (26.7%)		Positive	26	18 (69.2%)	8 (30.8%)	
Bormann 3,4	35	21 (60.3%)	14 (40.7%)		Omentum invasion				0.723
Lauren				0.405	Negative	39	24 (61.5%)	15 (38.5%)	
Intestinal	9	7 (77.8%)	2 (22.2%)		Positive	11	8 (72.7%)	3 (27.3%)	
Diffuse	30	17 (56.7%)	13 (43.3%)		Stage				0.05
Intestinal & diffuse	11	8 (72.7%)	3 (27.3%)		Stage Ib	3	1 (33.3%)	2 (66.7%)	
Ming				0.410	Stage II	5	1 (20%)	4 (80%)	
Expanding	3	1 (33.3%)	2 (66.7%)		Stage IIIa	13	7 (53.8%)	6 (46.2%)	
Infiltrative	42	27 (64.38%)	15 (35.7%)		Stage IIIb	6	4 (66.7%)	2 (33.3%)	
Expanding & infiltrative	5	4 (80%)	1 (20%)		Stage IV	23	19 (82.6%)	4 (17.4%)	

*calculated by the chi-square test

conjugate를 각 well에 분주한 후 실온에서 2시간 반응시킨 후 다시 4회 씻어내었다. 200 μ l의 tetramethylbenzidine-H₂O₂ 기질용액을 넣고 실온에서 30분간 암실에서 반응시킨 후 2 N sulfuric acid stop solution 50 μ l을 넣어 반응을 정지시킨 다음 450 nm파장의 분광계에서 흡광도를 측정하였다.

4) 통계처리

c-met 종양단백의 발현에 따른 생존율의 비교는 Kaplan-Meier 방식으로 비교하였으며 생존기간의 유의도 비교는 log-rank 검정법을 이용하였고, 환자군과 대조군의 uPAR 측정치를 구하여 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었으며 각각의 평균치는 T-test로 검정하였다. 임상병리학적 소견과의 관계분석은 chi-square방법 혹은 Fisher's exact 방법을 이용하였고, 모든 통계는 p값이 0.05 이하인 경우를 유의하다고 하였다.

결 과

1) 조직에서 c-met 발현

총 50명의 환자에서 면역조직화학염색을 시행하여 c-met 종양단백의 발현여부를 관찰하였다. 전체 50예 중 32예(64%)에서 양성으로 발현되었고, 18예(36%)에서는 발현되지 않았다. C-met 종양단백의 발현과 임상병리학적 소견들과의 연관성을 보면 Stage Ib 33.3%, II 20%, IIIa 53.8%, IIIb 66.7%, IV 82.6%로 병기가 진행될수록 c-met 종양단백의 발현이 증가됨을 볼 수 있었고 통계학적으로 유의성이 있었다($p=0.05$). 그 외에 성별, 연령, 암의 크기 및 위치, 조직학

적 아형, 육안적 혹은 조직학적 소견, 임파절 전이, 암의 침윤도와는 통계학적으로 유의성이 없었다($p>0.05$)(Table 1). 대상환자 전체를 c-met 양성 발현군(32예)과 음성 발현군(18예)으로 나누어서 생존율을 비교하여 보았을 때 양성 발현군의 평균 생존기간은 28 ± 3 개월이고, 음성 발현군은 37 ± 3 개월이었다. 양성 발현군의 경우 1년 생존율은 81%, 2년 생존율은 54%, 3년 생존율은 33%이었고 음성 발현군의 경우 1년 생존율은 94%, 2년 생존율은 70%, 3년 생존율은 70%로 양성 발현군이 음성 발현군에 비해 생존율이 낮았으며 통계학적으로 유의한 차이를 볼 수 있었다($p=0.04$)(Fig. 2).

2) 혈청 uPAR

환자군 및 대조군의 혈청 uPAR의 농도는 ELISA방법으로 측정하였고 단위는 pg/ml로 표시하였다. 대조군 20명의 평균 uPAR농도는 2525.4 ± 366.2 (평균 $\pm$ 표준편차) pg/ml이었고 범위는 2,064 pg/ml에서 3089.7 pg/ml으로 cut-off level은 평균 $+(2\times$ 표준편차)로 하여 3257.8 pg/ml 이상을 양성으로 판정하였다. 수술 전 환자의 uPAR 양성률은 34.6% (9명/26명)이었다. 26명의 위암 환자의 수술 전 평균 uPAR농도는 2980.8 ± 616.2 pg/ml로 대조군과 큰 차이는 없었다($p=0.225$). 예후인자와의 상관관계를 분석한 결과 연령, 암의 크기 및 위치, 조직학적 아형, 육안적 혹은 조직학적 소견, 림프절 전이, 암의 침윤도와는 통계학적으로 유의성이 없었고 림프절 전이와 혈관침윤만이 통계학적으로 유의한 차이를 볼 수 있었다($p<0.05$)(Table 2). 또한 수술 전후에 따른 혈청 uPAR의 농도를 비교한 결과 4예를 제외하고는 모두 수술 후 혈청 uPAR의 농도가 감소하였고 평균농도는 수술 전 2980.8 ± 616.2 pg/ml에서 수술 후 2404.7 ± 455.9 pg/ml로 의

Fig. 2. Cumulative survival curves according to c-met protein expression in all cases (n=50). The survival rates between c-met positive expression group and c-met negative expression group were significantly different ($p=0.04$), tested with the log rank analysis.

Fig. 3. Serum concentration of uPAR in 26 patients with stomach cancer before and after surgery. The difference in mean value before 2980.8 ± 616.2 pg/ml, and after surgery, 2404.7 ± 455.9 pg/ml was significant ($p<0.05$).

Table 2. Serum concentration and positive rate of uPAR in patients with stomach cancer

Variable	No	Serum uPAR		p-value*	Variable	No	Serum uPAR		p-value
		Mean±SD (pg/ml)	Positive rate (%) [†]				Mean±SD (pg/ml)	Positive rate (%) ^b	
Control	20	2525.4±366.2	0.0 (0/20)		Serosa invasion				0.551
Stomach	26				Negative	23	2938.3±603.9	30.3 (7/23)	
Preop		2980.8±616.2	34.6 (9/26)		Positive	3	3307.1±744.0	66.7 (2/3)	
Postop		2404.7±455.9			L/N [‡] metastasis				0.039
Age				1.0	Negative	16	2954.7±624.9	42.8 (3/7)	
< 60	13	2937.7±625.7	30.7 (4/13)		Positive	10	3022.6±632.9	66.7 (6/9)	
> 60	13	3023.9±628.8	38.5 (5/13)		Vessel invasion				0.018
Sex				0.415	Negative	21	2918.1±549.7	20 (4/20)	
Male	16	3041.8±598.6	43.8 (7/16)		Positive	5	3244.2±868.8	83.3 (5/6)	
Female	10	2883.3±663.6	20 (2/10)		Lymphatic vessel				1.0
Size				0.379	invasion				
< 5 cm	16	2898.5±586.9	25 (4/16)		Negative	12	2943.0±685.7	33.3 (4/12)	
> 5 cm	10	3262.1±503.7	50 (5/10)		Positive	14	3013.3±574.2	35.7 (5/14)	
Histologic type				0.483	Neural invasion				1.0
Well	2	2637.0±855.1	0 (0/2)		Negative	13	2881.7±673.4	30.8 (4/13)	
Moderate	8	3092.1±570	50 (4/8)		Positive	13	3080.0±562.3	38.5 (5/13)	
Poorly	4	3064.4±969.4	50 (2/4)		Stage				0.600
Signet	10	2994.7±576.6	30 (3/10)		EGCA	14	2973.9±617.6	28.6 (4/14)	
Undifferentiated	2	2643.3±282.0	0 (0/2)		Stage Ib	2	2820.6±926.7	50 (1/2)	
Macroscopic type				0.651	Stage II	4	2990±334.3	25 (1/4)	
EGCA	14	2973.9±617.6	28.6 (4/14)		Stage IIIa	5	2989.7±890.7	40 (2/5)	
Bormann 1,2	6	3203.7±556.7	50 (3/6)		Stage IIIb	0			
Bormann 3,4	6	2774.2±697.0	33.3 (2/6)		Stage IV	1	3317.7	100 (1/1)	

*Calculated by the chi-square test, [†] positive serum ≥ 3257.8 pg/ml, [‡] lymph node

미있게 감소한 것을 관찰할 수 있었다(p=0.012)(Fig. 3).

고 찰

위암을 비롯한 각종 암은 복합적인 여러 단계의 발암과정을 거쳐 발생하지만 현재는 유전물질 즉 유전자의 변화에 의한 것이라는 것이 정설로 받아들여지고 있다. 암에 관계되는 유전자는 첫째 우성으로 작용하는 암유전자로서 돌연변이 또는 증폭에 의하여 활성화되어 암을 유발하는 것이고(13), 둘째는 열성으로 작용하는 항암유전자로 이 유전자가 소실되거나 유전자의 변화가 있어 작용을 하지 못할 때 암이 유발되는 것으로 항암억제유전자라고도 한다(14). 위암에서 발현되는 암유전자는 c-erbB-2, p53, Rb, 암의 전이와 관련된 nm23 및 암의 증식정도를 나타내는 Ki-67 등이 있으며, 증폭을 나타내는 유전자로는 c-met, K-sam, c-erbB-2 등이 있다.

이들 중에서 c-met 암유전자는 염색체 7번에 위치하고 있고 증폭의 기전에 의해 활성화되며 c-met 유전자 산물은 강력한 유사분열 물질로 알려진 hepatocyte growth factor (HGF)의 수용체로 작용한다. HGF는 세포의 이동, 증식, 침습, 신생혈관형성에 관여하고 간세포뿐만 아니라 여러 세포에서 세포분열 물질로 작용하며 세포독성 작용을 한다고 알려져 있다(15). C-met 유전자 산물은 190 kD의 heterodimer로 50 kD의 α -chain과 145 kD의 β -chain이 이황화결합(disulfide bond)에 의해 연결되어 있는데 α -chain과 β -chain의 N-terminal 부위는 세포면에 있으며 β -chain C-terminal 부위는 세포 내에 위치하여 HGF가 c-met에 결합하여 phosphorylation이 일어남으로써 생물학적 반응이 일어난다고 하였다(15). C-met 유전자는 위암 환자에서 활성화된다고 보고되었고(16), c-met의 과발현은 복강 내 전이, 림프절전이, 장막침범, 림프절 침범과 관련이 있으며 예후와도 관련이 있다고 한다(11).

위암조직에서 c-met 유전자의 증폭이 발견되는 빈도는 실험실 및 연구방법에 따라서 다르게 보고된다. Masakazu 등은 128명의 위암 환자를 대상으로 면역조직화학염색을 시행하여 59명(46.1%)에서 c-met 양성반응을 보이며 림프절 전이와 관련이 있다고 보고하였고(17), Keizo 등은 102명의 위암환자 중 43명(42%)에서 양성반응을 보이며 복강 내 전이와 관련이 있다고 보고하였다(11). 또한 Kaji 등은 154명의 위암조직에서 c-met 종양단백의 발현을 분석하여 28명(18%)에서 양성반응을 보이고, 병기가 증가할수록 발현율이 증가하며 MKN-45, TMK-1, MKN-28 세포주 실험을 통하여 c-met DNA에 대한 antisense oligodeoxynucleotide의 사용이 위암의 진행을 억제시킬 수 있다고 하여 치료의 좋은 목표로 임상적 의의를 보고하였다(18). 본 연구에서도 면역조직화학염색을 통하여 위암 환자에서 c-met 종양단백의 발현율을 알아보았는데 전체 50예 중 32예(64%)에서 양성반응을 보여 앞의 보고보다 높게 나타났다. 이처럼 면역조직화학염색을 이용한 연구에서 c-met의 양성률이 다양한 이유는 여러 가지가 있겠으나 우선 염색 양성률은 어떤 고정액을 사용하느냐에 따라서 달라지고 신선 냉동조직인지 파라핀 포매조직인지 또한 사용하는 항체나 염색방법에 따라서도 양성률이 다를 수도 있고 염색결과 판정기준이 다양하기 때문이다. 따라서 결과를 해석할 때 위양성에 대한 상당한 주의가 요망되며 염색 방법과 판정 기준의 표준화가 선행되어야 할 것이다. Keizo 등은 c-met의 발현이 30% 이상일 때 양성으로 판정하였으나 본 연구에서는 암세포의 염색강도와는 관계없이 세포질, 세포막에 50% 이상 염색될 때를 양성으로 판정하였으므로 양성률이 다르게 나타난 것으로 예상된다. 이처럼 면역조직화학염색을 이용한 암유전자의 발현유무에 관한 연구는 발현정도가 연구마다 다르게 나타나 절대적인 수치로 비교하는 것은 어렵지만, 많은 종류의 단클론 항체가 개발되어 상품화되었고 포르말린에 고정한 후 파라핀에 포매된 조직에서도 소실된 항원성을 회복하거나 감수성을 높여 항원성이 약해진 항원을 찾아내는 염색법의 개발로 인해 진단 및 연구분야에서 분자생물학적 기법과 함께 활발히 사용되고 있다(19).

간세포 성장인자는 운동성 및 분열성 활성능력을 가지는 사이토카인으로 그 수용체인 c-met과 결합함으로써 암의 침투, 증식, 이동, 전이, 혈관형성 등의 많은 생물학적 과정에 관여한다고 보고되고 있는데(20) 그러나 어떠한 기전으로 암세포 진행과 전이에 관계되는지는 명백하지 않지만, 활성화된 c-met이 과표현된 신장 상피세포 연구에서 기저막 용해에 중추적 역할을 하는 serine protease의 일종인 uPA 유전인자의 표현이 증가됨을 보여(21) uPA가 c-met의 활성화로부터 암의 침윤에 관계가 있다고 하였다. uPA는 비활

성 형태의 plasminogen으로 부터 활성화된 단백분해효소인 plasmin을 생성시키므로 기저막과 기질을 구성하는 peptide 결합을 비가역적으로 파괴시키는데 중추적 역할을 할 것으로 생각되며 uPAR는 uPA의 활성화에 반드시 필요하므로 uPAR는 세포의 단백 분해과정의 속도조절요소라 할 수 있겠다. uPAR는 분자량이 55,000~60,000 Da의 glycoprotein으로 glycosyl phosphatidylinositol (GPI)에 의하여 세포의 표면에 고정되어 있으며 암세포의 침윤에 중요한 역할을 하는 uPA의 활성화에 필수적이므로 uPAR 또한 암세포의 침윤과 깊은 관련이 있을 것이며 다음과 같은 결과(22)는 uPAR가 암세포의 전이와 침윤에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다. 첫째는 uPA와 uPAR를 같이 표현하는 LB6 mouse만이 chick embryo의 용모막에 효과적으로 침윤하며, 둘째는 human glioblastoma세포에 의한 in vitro 침윤은 anti-uPAR항체로 uPA가 수용체에 결합하는 것을 방해함으로써 억제되고, 셋째는 human melanoma 세포가 uPA를 분비하여도 수용체에 결합되지 않고는 세포침윤에 uPA를 효과적으로 이용하지 못한다는 점이다.

uPA, uPAR의 암 예후인자로서의 가능성은 위암, 유방암 등에서 보고되었고 Keizo 등은 위암 환자의 조직에서 면역조직화학 염색을 통하여 발현유무를 조사하여 암의 침윤뿐만 아니라 예후와 관련이 있다고 보고하였다(11). 우리나라에서는 2000년 공 등이 268명의 유방암 환자의 조직에서 ELISA방법을 이용하여 uPAR를 측정하여 조직의 uPAR의 발현정도가 TNM병기와 관련이 있으며 특히 T1병기에서 가장 높게 측정되고 초기암의 침윤에 중요한 인자로 작용한다고 보고하였다(23). 라 등은 유방암 환자의 혈액과 조직에서 uPA, uPAR를 측정하여 혈액에서 관찰되는 uPA, uPAR은 조직 내의 발현소견을 대변할 수 있다고 하였다(24). 즉, 혈청 내 uPAR치는 uPAR에 의해 매개되는 세포면 단백질 분해의 활성정도를 반영하므로, 본 연구에서는 위암 환자의 혈청에서 uPAR를 측정하여 대조군과 비교하고 수술전후에 어떠한 변화가 있으며 예후인자와는 어떠한 관계가 있는지 조사하였다. 총 26명의 위암환자를 대조군과 비교하였을 때 큰 차이를 볼 수 없었는데 이것은 대부분 uPAR는 침윤과 전이에 관계하는데 비해 대상에 포함된 환자가 대부분 조기위암환자였기 때문으로 생각한다. 수술 전후 uPAR농도를 비교한 결과 4예를 제외하고는 평균농도가 수술 전 2980.8 ± 616.2 pg/ml에서 수술 후는 2404.7 ± 455.9 pg/ml로 의미 있게 감소한 것을 볼 수 있었다($p < 0.05$). 위암 환자에서 uPAR와 예후인자의 상관관계를 살펴보면 복강내 전이, 장막침윤, 혈관침윤 등과 관계가 있으며, 세포의 기질을 파괴하는 특성 때문에 특히 원격전이 보다는 국소적 침범과 상관관계가 더 있다고 보고되고 있다(11). 본 연구에

서는 혈관침윤과 림프절 전이와는 상관관계가 있었으나 ($p < 0.05$) 다른 예후인자와의 관련성은 증명할 수 없었다.

c-met, uPAR 과발현이 다른 많은 보고들과 같이 불량한 예후와 연관이 있고 HGF/c-met 신호체계에 의한 uPA-uPAR 계의 활성이 암의 전이에 관계있다는 보고에 근거하여 향후 c-met 발현과 uPAR의 연관성을 확인하여 현재까지 진행성 위암인 경우 뚜렷하게 효과가 있는 항암화학요법 치료가 없으며 또한 부작용이 많아 적극적 치료로 이용하고 있지 않는 상황에서 암진행에 중요한 역할을 하는 인자를 규명하여 치료목표로서 임상적 적용의 기초자료로 쓰고자 한다.

결 론

암의 침윤과 전이에 관련이 있다고 보고되는 c-met과 uPAR를 위암 환자의 조직과 혈청에서 각각 측정한 결과 조직에서 c-met의 과발현은 환자의 병기가 증가할수록 높은 발현을 보였고, 혈청 uPAR치는 암의 혈관침윤과 림프절 전이와 관련이 있으며 수술 후에 의미있게 감소하였다. 따라서 c-met의 과발현 시 수술 후 보다 적극적인 치료를 시행하고, 침윤 정도와 관련이 있는 혈청 uPAR치를 수술 전 측정하여 상승 시에 uPAR 억제약물을 사용함으로써 환자의 치료효과를 증가시킬 수 있으리라 기대된다.

REFERENCES

- Noh SH, Yoo CH, Lee HY, Kim HG, Oh YH, Min JS. Prognostic significance of p53, c-erbB-2, nm23 and Ki-67 expression in patients with advanced gastric carcinoma. *J Korean Cancer Assoc* 1999;31:699-709.
- Yonemura Y, Ninomiya I, Yamaguchi A, Fushida S, Kimura H. Evaluation of immunoreactivity for c-erbB-2 protein a marker of poor short term prognosis in gastric cancer. *Cancer Res* 1991;51:1034-1038.
- Huebner RM, Todaro GJ. Oncogenes or RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969;64:1087-1094.
- Nakasato F, Sakamoto H, Mori M, Hayashi K. Amplification of the c-myc gene amplification in human stomach cancers. *Gann* 1984;75:737-742.
- Kodo T, Matsushima S, Sasaki A, Danjo Y, Kakinuma M. C-myc gene amplification in primary stomach cancer. *Jpn J Cancer Res* 1985;76:551-554.
- Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA. Identification of hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science (Washington DC)* 1991;251:802-804.
- Rubin JS, Bottaro DP, Aaronson SA. Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, the c-met proto-oncogene product. *Biochim Biophys Acta* 1993;1155:357-371.
- Jeffers M, Rong S, Vande Woude GF. Hepatocyte growth factor/scatter factor-Met signaling in tumorigenicity and invasion/metastasis. *J Mol Med* 1996;74:505-513.
- Park M, Dean M, Cooper CS, Schmidt M, O'Brien SJ, Blair DJ. Mechanism of met oncogene activation. *Cell* 1986;45:895-904.
- Ueki T, Fujimoto J, Suzuki T, Yamamoto H, Okamoto E. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met proto-oncogene in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997;25:862-866.
- Keizo T, Yakata Y, Naomi N, Yasuo H, Sachio F, Takashi F, Koichi H, et al. The relation between the growth patterns of gastric carcinoma and the expression of hepatocyte growth factor receptor (c-met) autocrine motility factor receptor (AMFR), and urokinase type plasminogen activator receptor (uPAR). *Cancer* 1998;82:2112-2122.
- Pepper MS, Matsumoto K, Nakamura T, Orci L, Montesano R. Hepatocyte growth factor increase urokinase-type plasminogen activator (u-PA) and urokinase-type plasminogen activator receptor (u-PAR) expression in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Biol Chem* 1992;267:20493-20496.
- Klein G, Klein E. Evolution of tumors and the impact of molecular oncology. *Nature* 1985;315:190-195.
- Knudson AG Jr. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 1985;45:1437-1443.
- Weidner KM, Hartmann G, Sachs M, Birchmoier W. Properties and functions of scatter factor/HGF and its receptor c-Met. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;8:229-237.
- Yonemura Y, Kaji M, Hirono Y, Fushida S, Tugawa K, Fujimura T, et al. Correlation between overexpression of c-met gene and the progression of gastric cancer. *Int J Oncol* 1996;8:555-560.
- Masakazu N, Hidetow S, Yukishige Y, Akihiko W, Mitsutoshi T, Jun Y, Masahiko M. Prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erbB-2 in human gastric carcinoma. *Cancer* 1999;85:1892-1902.
- Kaji M, Yonemura Y, Harada S, Liu X, Terada I, Yamamoto H. Participation of c-met in the progression of human gastric cancers: anti-c-met oligonucleotides inhibit proliferation of invasiveness of gastric cancer cells. 1996;3:393-404.
- Fan AG, Nakane PK. Immunohistochemistry with enzyme labeled antibodies. *J Immunol Meth* 1981;47:129-134.
- Rong S, Segal S, Anver M, Resau JH, Vande Woude GF. Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells. Induced by met-hepatocyte growth factor autocrine stimulation. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:4731-4735.
- Besser D, Bardelli A, Didichenoko S, Thelen M, Comoglio PM, Ronsetto C, Regamine Y. Regulation of the urokinase-type plasminogen activator gene by the oncogene tcr-met GRB2. *Oncogene* 1997;14:705-711.
- Park HW, Kook YH, Choi SB, Cha CY. Localization of urokinase type plasminogen activator receptor on tumor cells by immunohistochemistry. *J Korean Cancer Assoc* 1996;28:159-167.
- Gong SJ, Rha SY, Chung HC, Park JO, Yoo NC, Roh JK, Yang WI, Lee KS, Min JS, Kim BS, Chung HC. Clinical significance of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression in breast cancer tissues. *J Korean Cancer Assoc* 2000;32:53-59.
- Rha SY, Park JO, Gong SJ, Park SH, Yoo NC, Yang WI, Roh JK, Min JS, Lee KS, Kim BS, Chung HC. Clinical relevance of urokinase-type plasminogen activator (uPA), uPA receptor, plasminogen activator inhibitor-1 co-expression from tissue and serum of breast cancer as targets of biotherapy. *J Korean Cancer Assoc* 1999;31:256-266.