

# 비소세포 폐암에서 HIF-1 $\alpha$ 의 발현: 예후 및 종양표지자와의 관련성

조성래\* · 변정훈\* · 김종인\* · 이봉근\* · 천봉권\*\*

## Expression of Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$ in Non-small Cell Lung Cancer: Relationship to Prognosis and Tumor Biomarkers

Sung Rae Cho, M.D.\*, Joung Hun Byun, M.D.\*, Jong In Kim, M.D.\*,  
Bong Geun Lee, M.D.\*, Bong Kwon Chun, M.D.\*\*

**Background:** Tissue hypoxia is characteristic of many human malignant neoplasm, and hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) plays a pivotal role in essential adaptive response to hypoxia, and activates a signal pathway for the expression of the hypoxia-regulated genes, resulting in increasing O<sub>2</sub> delivery or facilitating metabolic adaptation to hypoxia. Increased level of HIF-1  $\alpha$  has been reported in many human malignancies, but in non-small cell lung carcinoma the influence of HIF-1  $\alpha$  on tumor biology, including neovascularization, is not still defined. In present study the relationship of HIF-1  $\alpha$  expression on angiogenetic factors, relationship between the tumor proliferation and HIF-1  $\alpha$  expression, interaction of HIF-1  $\alpha$  expression and p53, and relationship between HIF-1  $\alpha$  expression and clinico-pathological prognostic parameters were investigated. **Material and Method:** Archival tissue blocks recruited in this study were retrieved from fifty-nine patients with primary non-small cell lung carcinoma, who underwent pneumonectomy or lobectomy from 1997 to 1999. HIF-1  $\alpha$ , VEGF (vascular endothelial growth factor), and p53 protein expression and Ki-67 labeling index in tumor tissues were evaluated, using a standard avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) immunohistochemistry. Relationship between the HIF-1  $\alpha$  expression and VEGF, p53 overexpression and correlation between the HIF-1  $\alpha$  expression and Ki-67 index were analyzed. Clinico-pathologic prognostic parameters were also analyzed. **Result:** HIF-1  $\alpha$  expression in cancer cells was found in 24 of 59 cases of non-small cell lung carcinoma (40.7%). High HIF-1  $\alpha$  expression was significantly associated with several pathological parameters, such as pathological TMN stage (p=0.004), pT stage (p=0.020), pN stage (p=0.029), and lymphovascular invasion (p=0.019). High HIF-1  $\alpha$  expression was also significantly associated with VEGF immunoreactivity (p<0.001), and aberrant p53 expression (p=0.040). but was marginally associated with Ki-67 labeling index (p=0.092). The overall 5-year survival rate was 42.3%. The survival curve of patients with a high HIF-1  $\alpha$  expression was worse than that of patients with low-expression (p=0.002). High HIF-1  $\alpha$  expression was independent unfavorable factors with a marginal significance in multivariate analysis performed by Cox regression. **Conclusion:** It is suggested that high HIF-1  $\alpha$  expression may be associated with intratumoral neovascularization possibly through HIF-VEGF pathway, and high HIF-1  $\alpha$  expression could be associated with lymph node metastasis and post operative poor prognosis in patients with non-small cell lung carcinoma.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2006;39:828-837)

**Key words:** 1. Carcinoma, non-small cell, lung  
2. Neoplasm marker  
3. Neoplasm proteins

\*고신대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Kosin University College of Medicine

\*\*고신대학교 의과대학 병리학교실

Department of Pathology, Kosin University College of Medicine

논문접수일 : 2005년 8월 17일, 심사통과일 : 2006년 7월 27일

책임저자 : 조성래 (602-702) 부산광역시 서구 압남동 34번지, 고신대학교 의과대학 흉부외과학교실

(Tel) 051-990-6237, (Fax) 051-254-5446, E-mail: srcho@kosinmed.or.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

## 서 론

악성종양에서 신생혈관 생성과 당분해의 증가는 저산소 상태의 미세환경을 나타내며, 이는 종양의 침습성, 전이, 환자의 예후와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 혈관에서 산소, 포도당, 기타 영양소 등은 제한된 범위 내에서 확산에 의하여 공급되기 때문에 성장하는 악성종양의 조직에서 신생혈관이 형성되지 않으면 종양세포들은 저산소증에 빠지게 되는데, 종양세포는 단지 몇 평방밀리미터의 크기 밖에 증식하지 않는다[1]. 저산소증에 빠진 세포는 산소의 저분압상태를 감지하여 저산소증 조절 유전자들을 발현시키려는 신호체계를 활성화시켜 적응하게 된다[2].

저산소증 상태에서 맥관형성의 유도과 같은 세포적응의 과정에는 hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) 단백질이 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 세포의 산소 분압이 떨어지면 HIF-1 유전자의 발현, mRNA의 전사와 단백질합성의 증가가 일어난다[3]. HIF-1 단백질은 HIF-1 $\alpha$ 와 HIF-1 $\beta$ 의 두 아단위로 구성된 이질 이량체의 전사인자로서 저산소증에 노출된 세포에서 산소의 항상성 유지에 중요한 역할을 한다[4]. HIF-1 $\beta$ 는 aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT)로 불리기도 하며, 세포내에서 정상적으로 존재하는 단백질이지만, HIF-1 $\alpha$  단백질은 세포가 저산소증에 노출되었을 때만 핵 내에 급속히 축적되는 단백질이다[5,6]. 세포가 저산소증에 빠지면 다양한 단백질, 즉 혈관내피세포 성장인자[5] 당원 수송체, 당분해 효소 aldolase A, enolase 1, lactate dehydrogenase A[7], erythropoietin[4], transferrin, heme oxygenase-1[8], inducible nitric oxide synthase 등[9]을 발현하여 적응하게 되는데, HIF-1 $\alpha$  단백질은 세포의 적응을 돕는 여러 단백질들의 발현과 관련된 유전자의 hypoxia response elements 부위에 결합하여 이들 유전자를 활성화시킨다. 따라서 HIF-1 $\alpha$ 의 활성화가 저산소증에 대한 세포적응에서 대단히 중요한 단계로 여겨진다[6]. 세포내에 축적된 HIF-1 $\alpha$  단백질은 일단 세포의 재산소화가 이루어지면 세포내 ubiquitin-proteasome 경로에 의해 신속히 분해되므로, HIF-1 단백질의 활성화는 HIF-1 $\alpha$  아단위에 의해 결정된다[6].

많은 악성종양의 조직 내부에는 저산소증의 부위가 존재하는 것으로 알려져 있으며, 저산소증에 빠져 있는 종양세포에서 HIF-1 $\alpha$  단백질이 발현되고, HIF-1 $\alpha$  의존성 유전자들이 활성화된다. 시험관내 연구와 동물실험에서도 저산소증은 악성종양의 전파와 치료에 대한 저항성 등과 같은 종양의 진행과 관계된 인자들에 중요한 영향을 줄 수 있다고 알려져 있다. 인체에 발생하는 여러 종류의 암,

즉 두정부 편평세포암[10], 식도암[11], 자궁경부암[12] 등에서 HIF-1 $\alpha$  단백질의 과발현이 보고되었고, 이는 불량한 예후와 관련이 있다고 한다. 종양세포의 저산소증은 종양세포의 증식능 및 신생혈관의 형성과 관련이 있으며, 종양세포의 Ki-67 labeling index와 VEGF 단백질 발현은 여러 종양을 가진 환자에서 나쁜 예후와 관련을 가지는 것으로 알려져 있다. 최근 비소세포 폐암에서 HIF-1 $\alpha$  단백질의 발현과 VEGF 등의 혈관생성인자의 과발현이 상관관계가 있으며 또한 불량한 예후를 시사하는 인자로 보고되었다[13]. 또한 HIF-1 $\alpha$  단백질의 발현이 종양의 진행과 예후와는 무관하며 단지 조직학적 유형에 따라서 발현의 정도가 다르다고 한다[14]. 동물실험과 인체에서 암의 생성 및 진행에 HIF-1 $\alpha$  단백질의 발현과 이상형 p53의 축적은 상관관계가 있다고 한다[15]. 그러나 비소세포 폐암에서 HIF-1 $\alpha$  단백질의 과발현이 신생혈관 생성과 이상형 p53의 축적 등 종양의 생태에 미치는 영향에 관한 연구는 부족하다.

따라서 본 연구에서는 비소세포 폐암에서 HIF-1 $\alpha$ 의 발현이 종양의 증식과 관련된 단백질, 특히 맥관형성과 관련된 단백질의 발현, 이상형 p53이 축적 및 증식지수와의 관계, 그리고 예후와 관련된 여러 임상적 표지자 및 병리학적 표지자와의 상관관계를 조사하고, 비소세포 폐암 환자의 수술 후 예후와의 관계를 알고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1) 대상

1997년 1월부터 1999년 12월까지 비소세포 폐암으로 진단 받고 전폐 절제술 혹은 폐엽 절제술을 실시 받은 환자 중 추적 관찰이 가능했고 파라핀 블록과 조직 검사 결과가 명확한 59명의 환자들을 대상으로 하였다. 환자의 연령 분포는 30세에서 73세로 중앙값은 61세였고, 성별 분포는 남자가 50명(84.7%), 여자가 9명(15.3%)이었다. 1999년 WHO 분류에 따른 비소세포 폐암 59예의 조직학적 유형은 편평세포암(squamous cell carcinoma, SCC)이 47예(79.7%), 선암(adenocarcinoma, AC)이 12예(20.3%)였다. 병리학적 병기는 American Joint Committee on Cancer (AJCC)의 TMN 분류 체계를 따라서 결정하였다[14]. TNM 병기는 I기가 26예(44.1%), II기가 12예(20.3%), III기가 21예(35.6%)였다. TNM 병기에 따른 원발종양의 T병기(T1, T2, T3, T4)와 림프절 전이 유무(N0, N1-2)는 환자의 병력지 또는 병리조직 검사를 참고하였다.

## 2) 방법

각 증례에서 종양의 변연부와 중앙부가 함께 있으며 비종양성 폐조직이 일부 있는 파라핀 블록을 한 개씩 선택한 뒤 4  $\mu$ m 두께의 연속 절편을 각각 5장씩 잘라서 1장은 hematoxylin-eosin 염색을 하였고, 나머지 조직절편은 2% 3-aminopropyletoxysil로 도포된 슬라이드(Probe-On Plus Microscope Slides, Fisher Scientific, Pittsburgh, USA)에 부착시킨 후 HIF-1  $\alpha$ , p53, Ki-67 항원에 대한 면역조직화학염색을 실시하였다. 일차 항체로서 HIF-1  $\alpha$  생쥐 단클론성 IgG1 (Clone ESSE122, Novus, Littleton, USA), 혈관내피세포성장인자(VEGF) 염소 다클론성 항체(Clone A20, Santa Cruz, California, USA), p53 생쥐 단클론성 항체(Clone DO-7, NeoMarkers, Fremont, CA, USA), 그리고 Ki-67 생쥐 단클론성 항체(Clone 7B11, Zymed, South San Francisco, CA, USA)를 각각 1 : 500, 1 : 50, 1 : 50, 1 : 50으로 희석하여 사용하였다.

## 3) 면역조직화학염색

각 증례의 파라핀 블록에서 얻어진 조직 절편은 10% xylene에서 탈파라핀하고 100%, 95%, 70% 알코올에서 차례대로 함수과정을 거친 후 흐르는 물에서 10분간 수세시켰다. 목적 항원 단백질의 항원노출의 향상을 위해 전자렌지(Samsung RE-400B, 700 W)에서 4분간 끓인 10 mM/L citrate buffer (pH 6.0)가 담긴 용기에 조직절편을 넣은 후, 전자렌지를 이용하여 마이크로파 조사를 4분간 세 차례 더 시켰다. 실온에서 냉각시킨 후 흐르는 물에서 10분간 충분히 수세시키고, 내인성 과산화수소의 억제를 위하여 3% 과산화수소수에 10분간 처리한 후 증류수로 세 차례 수세하고, pH 7.6의 Tris buffered saline (TBS; X10 immunoassay buffer, Biomed, Foster, USA)에 10분간 두었다. 상기한 일차 항체들 중에서 HIF-1  $\alpha$ 는 조직 절편과 함께 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. VEGF, p53 및 Ki-67은 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후의 면역조직화학염색과정은 HIF-1  $\alpha$ 에 대해서는 streptavidin-biotin-horseradish peroxidase 복합체 형성에 기초한 Catalysed Signal Amplification System (DAKO Co., Carpinteria, CA, USA)를 사용하였고, 제조사의 지침에 따라 실행하였다. VEGF, p53 및 Ki-67에 대해서는 streptavidin-biotin 복합체 형성에 기초한 LSAB Kit (DAKO, Carpinteria, CA, USA)를 사용하였으며, 그 과정은 일반적인 면역조직화학 염색과정과 동일하게 하였다. 면역염색 후 발색은 HIF-1  $\alpha$ 에 대해서는

3,3-diaminobenzidine (DAB, DAKO, Carpinteria, CA, USA)으로, VEGF, p53 및 Ki-67에 대해서는 3-amino-9-ethyl-carbazole (AEC, DAKO, Carpinteria, CA, USA)로 염색하였고, 대조염색은 Mayer hematoxylin을 사용하였다. Universal Mount (Biomed, Foster, USA)로 1차 봉입하고, xylene으로 희석시킨(50 : 50) malinol로 2차 봉입한 뒤 광학현미경(Olympus BX, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

음성 대조군은 염색과정에서 일차 항체 대신 정상 면양 혈청을 적용한 것을 제외하면, 전 과정에서 실험 예들과 동일하게 하였다. 양성 대조군으로 HIF-1  $\alpha$ 는 HIF-1  $\alpha$  양성 식도 편평세포암종 조직을 이용하였고, p53과 Ki-67은 p53 양성 및 Ki-67 양성 위암종 조직을 이용하였다.

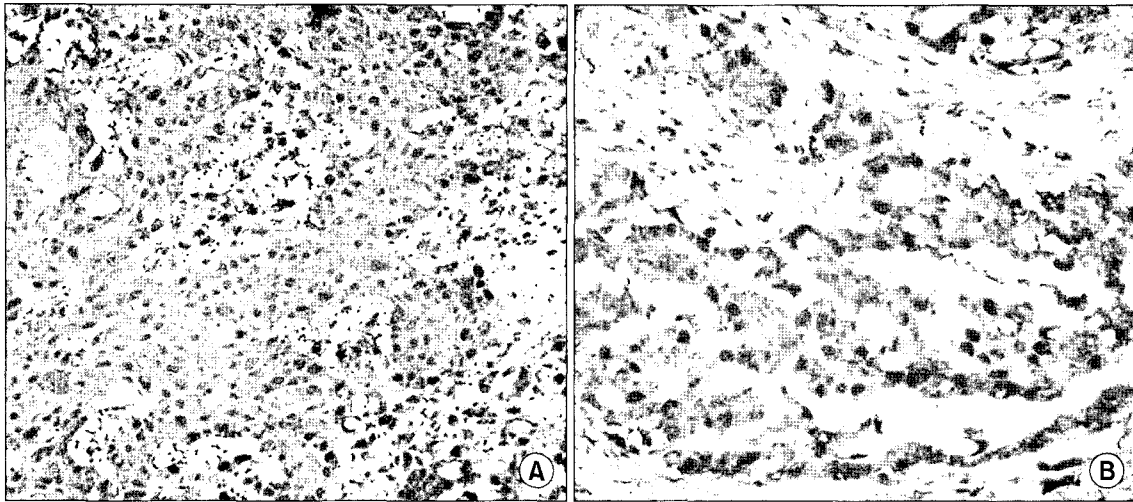
## 4) 염색결과의 판독

판독은 1명의 병리 전문의가 하였고 HIF-1  $\alpha$ , VEGF, p53은 400배 시야 5군데에서 관찰하였고 Ki-67은 양성 반응이 가장 현저한 부위에서 관찰하였다. HIF-1  $\alpha$ , VEGF의 %는 세포수의 백분율로 나타냈다.

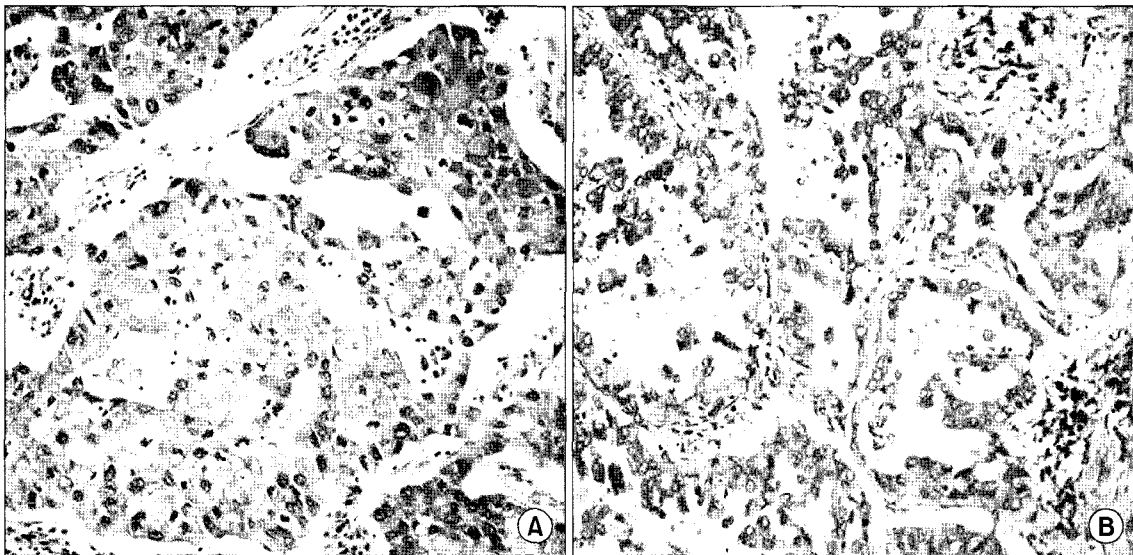
HIF-1  $\alpha$ 는 종양세포의 핵과 세포질에 염색되었다. HIF-1  $\alpha$ 의 염색결과는 다음과 같이 5단계로 구분하였다: 0, 염색되지 않음; 1+, 1% 미만의 종양세포 핵 염색; 2+, 1~10% 종양세포의 핵 염색 및 약한 세포질 염색; 3+, 10~50% 종양세포의 핵염색 및 분명한 세포질 염색; 4+, 50% 이상 종양세포 핵 염색 및 강한 세포질 염색. 3+ 및 4+를 과발현군으로, 1+ 및 2+는 저발현군으로 나누었다. VEGF 염색 결과는 염색된 세포수의 백분율에 따라 0~3 등급의 4단계 등급체계: 0, <1%; 1, 1~14%; 2, 15~29%; 3,  $\geq$ 30%로 나누었고, 염색 강도에 따라 0~3 등급의 4단계 등급체계: 0, 음성; 1+ (약); 2+, 중등도; 3+ (강)으로 나누었다. 각 증례에서 염색된 세포수의 등급과 염색 강도의 등급을 합한 값이 3 미만인 경우는 음성으로, 3 이상은 양성으로 판정하였다. p53은 10% 이상의 종양세포 핵에서 중등도 이상의 강도로 염색된 경우를 양성으로 판정하였다. Ki-67은 종양세포의 핵에서 적갈색의 염색 반응이 관찰될 때 양성세포로 인정하였다. 양성세포들이 출현하는 경우 양성반응이 가장 현저한 부위를 선별하여 400배 시야에서 종양세포 1,000개를 계수한 후 양성세포들의 백분율을 구하여 Ki-67 지수를 결정하였다.

## 5) 통계학적 분석

비소세포 폐암의 전 예에서 종양의 조직학적 유형, 병기, TNM-T병기, TNM-N병기, 늑막 침범의 유무 및 림프관/혈



**Fig. 1.** Immunostaining for HIF-1 $\alpha$ : The patterns of HIF-1 $\alpha$  expression in cancer cells are mixed nuclear/cytoplasmic. Clusters of cancer cells showing high HIF-1 $\alpha$  expression are most dense in the invading edge of tumor margins in squamous cell carcinoma (A,  $\times 200$ ) and in adenocarcinoma (B,  $\times 400$ ).



**Fig. 2.** Immunostaining for VEGF: Cancer cells show red-brown cytoplasmic staining for VEGF in a diffuse pattern in squamous cell carcinoma (A,  $\times 200$ ), and in adenocarcinoma (B,  $\times 200$ ).

관 침범의 유무 등 임상병리학적 변수와 HIF-1 $\alpha$  단백질 사이의 상관관계는  $\chi^2$  검정 혹은 Fisher 정확 확률 검정을 이용하여 분석하였다. HIF-1 $\alpha$  단백질과 VEGF의 발현 및 p53의 이상 발현은  $\chi^2$  검정을 이용하여 분석하였고, HIF-1 $\alpha$ 를 과발현군과 저발현군으로 나누어 두 군 간에 Ki67의 평균치가 통계적으로 유의한 차이가 있는지 알기 위해 독립 표본 t 검정을 하였다. 그리고 HIF-1 $\alpha$  단백질 발현에 따른

비소세포 폐암 환자들의 생존율의 차이는 Kaplan-Meier 분석 후 log-rank 검정으로 유의성을 평가하였고, 다변량 분석은 Cox 회귀 모형을 이용하여 분석하였다. 다변량 분석의 변수는 단변량 분석에서  $p < 0.05$ 인 변수 또는 병리학적 의미가 있다고 알려져 있는 변수가 선정되었다. 통계분석은 SPSS 프로그램(Windows 표준 버전 10.1, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였으며,  $p$ 값이 0.05 미만인 경

**Table 1.** Correlation between HIF-1 $\alpha$  expression and clinicopathologic characteristics in 59 cases of non-small cell lung carcinoma

Clinicopathologic characteristics	No. of cases	HIF-1 $\alpha$ expression		p value
		High (n=24)	Low (n=35)	
Gender				0.089
Male	50	18	32	
Female	9	6	3	
Histologic type				0.339
Squamous carcinoma	47	18	29	
Adenocarcinoma	12	6	6	
Pathological TNM stage				0.004
I	26	5	21	
II	12	5	7	
III	21	14	7	
pT-stage				0.020
T1	15	7	8	
T2	28	6	22	
T3	9	6	3	
T4	7	5	2	
pN-stage				0.004
N0	27	6	21	
N1-N2	32	18	14	
Visceral pleural involvement				0.703
Absent	38	15	23	
Present	21	9	12	
Lympho-vascular invasion				0.019
Absent	50	17	33	
Present	9	7	2	

우를 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1) HIF-1 $\alpha$ 의 과발현과 임상 병리학적 인자의 상관관계

HIF-1 $\alpha$  과발현은 59예 중에서 24예(40.7%)에서 관찰되었고, 종양세포의 핵 또는 세포질에 발현되었으나 종양조직에서 떨어져 있는 폐조직에서는 발현이 되지 않았다(Fig. 1).

HIF-1 $\alpha$ 의 과발현은 병리학적 TNM병기에서 1기는 26예 중 5예(19.2%), II기는 12예 중 5예(41.7%), III기는 21예 중 14예(66.7%)에서 보였고(p=0.004), T병기에서 T1이 15예 중 7예(46.7%), T2가 28예 중 6예(21.4%), T3가 9예 중 6예

**Table 2.** Association between HIF-1 $\alpha$  expression and VEGF expression, aberrant p53 accumulation, and proliferative index in 59 cases of non-small cell lung carcinoma

Parameters	No. of cases	HIF-1 $\alpha$		p value
		High (n=24)	Low (n=35)	
VEGF				<0.001
Positive	22	17	5	
Negative	37	7	30	
Aberrant p53				0.040
Positive	30	16	14	
Negative	29	8	21	
Ki-67 labeling index (%)	59	23.1 $\pm$ 9.8	18.8 $\pm$ 9.2	0.092

(66.7%), T4가 7예 중 5예(71.4%)에서 보였으며(p=0.020), 림프절 전이가 있는 32예 중 18예(56.2%)에서, 림프관/혈관 침범이 관찰되는 9예 중 7예(77.8%)에서 보여 통계학적으로 유의성이 있었다(p=0.004, p=0.019). 림프절 전이의 유무는 림프절 전이가 있는 경우가 환자의 예후에 영향을 주는 것으로 판단되어 N0군과 N1-2군으로 나누었다. 그러나 HIF-1 $\alpha$  과발현은 연령, 성별, 조직학적 유형, 장축축막 침범의 유무와는 상관성이 관찰되지 않았다(Table 1).

### 2) HIF-1 $\alpha$ 의 과발현과 VEGF, p53 및 Ki-67 지수와 의 상관관계

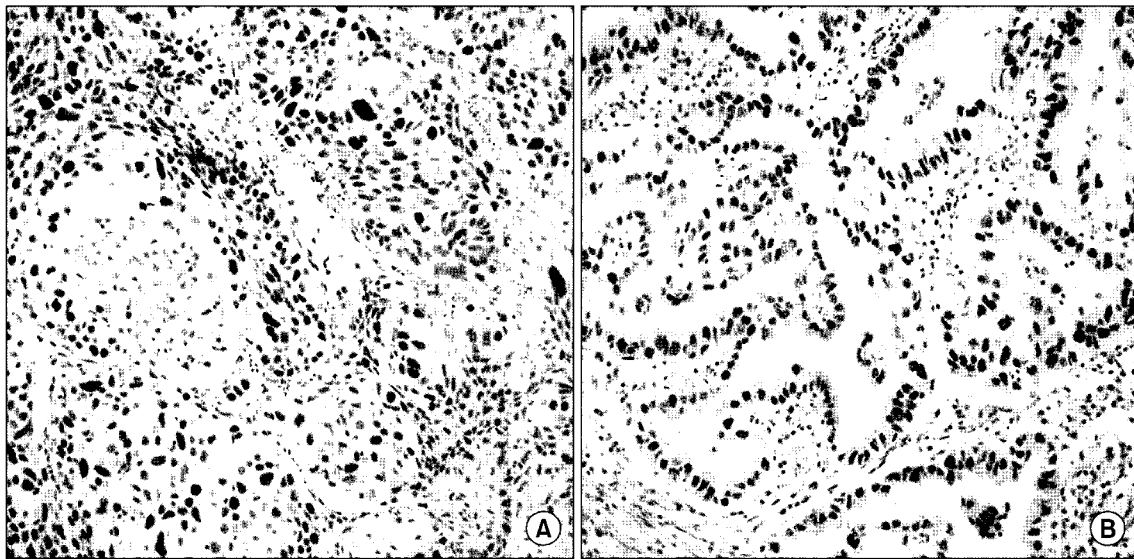
VEGF가 양성인 세포의 집단은 종양의 경계부에서 가장 강하게 관찰되었다(Fig. 2). VEGF는 59예 중 22예에서 발현되어 37.3%의 발현율을 보였다. VEGF가 발현되는 22예 중 17예(77.3%)에서 HIF-1 $\alpha$ 가 과발현되었고(p<0.001)(Table 2), p53은 59예 중 30예에서 발현되어 50.8%의 발현율을 보였으며(Table 3), p53이 발현되는 30예 중 16예(53.3%)에서 HIF-1 $\alpha$ 가 과발현되었고(p=0.040)(Table 2, Fig. 3), Ki-67 증식지수는 HIF-1 $\alpha$ 가 과발현되는 24예에서 23.1 $\pm$ 9.8, HIF-1 $\alpha$ 가 저발현되는 35예에서 18.8 $\pm$ 9.2로(Fig. 4), HIF-1 $\alpha$  과발현군에서 Ki-67 증식지수는 통계학적 유의성을 보이지 않았다(p=0.092)(Table 2).

### 3) HIF-1 $\alpha$ 의 발현에 따른 생존분석

본 연구의 대상인 비소세포 폐암 환자 59예에서 수술 후 최단 2개월부터 최장 91개월까지 생존여부를 추적 관찰하였다. Kaplan-Meier 생존분석에서 전체 5년 생존율은 42.3%

**Table 3.** Univariate and multivariate analysis of survival in 59 cases of non-small cell lung carcinoma

Factors	Odds ratio	95% confidence interval (CI)	p value
<b>Univariate</b>			
HIF-1 $\alpha$ (high vs. low)	2.630	1.383~5.001	0.003
Age ( $\geq 60$ yrs, $< 60$ yrs)	1.260	0.659~2.406	0.485
Gender (male vs. female)	1.326	0.584~3.010	0.501
pT status (T2-4 vs. T1)	1.824	0.837~3.976	0.131
pN status (N1-2 vs. N0)	2.808	1.440~5.476	0.002
Pleural invasion (positive vs. negative)	1.361	0.714~2.597	0.349
Lympho-vascular invasion (positive vs. negative)	1.933	0.846~4.417	0.118
VEGF (positive vs. negative)	0.895	0.465~1.723	0.740
Aberrant p53 (positive vs. negative)	1.220	0.646~2.304	0.539
<b>Multivariate</b>			
HIF-1 $\alpha$ (high vs. low)	2.041	1.014~4.235	0.050
pT status (T2-4 vs. T1)	1.589	0.683~3.694	0.282
pN status (N1-2 vs. N0)	2.171	1.061~4.443	0.034



**Fig. 3.** Immunostaining for p53: Cancer cells show dark red-brown nuclear staining for p53 in squamous cell carcinoma (A,  $\times 200$ ), and in adenocarcinoma. (B,  $\times 200$ ).

였다. 저발현군의 5년 생존율은 61%, 과발현군의 5년 생존율은 22%로 HIF-1 $\alpha$  과발현군의 5년 생존율은 HIF-1 $\alpha$  저발현군에 비해 유의하게 낮았다( $p=0.002$ )(Fig. 5). Cox 회귀 모형 다변량 분석에서 HIF-1 $\alpha$  과발현군은 저발현군에 비해 사망률이 2.041배 높고 N1-2병기 환자가 N0병기 환자에 비해 사망률이 1.589배 높았다( $p=0.050$ ,  $p=0.034$ ).

## 고 찰

본 연구에서 HIF-1 $\alpha$ 는 종양세포의 핵 및 세포질에서 발현되었다. 종양에 이웃한 정상 폐조직에서는 HIF-1 $\alpha$  단백질 발현되지 않았다. 구강인두암, 유방암, 폐암에서 HIF-1 $\alpha$

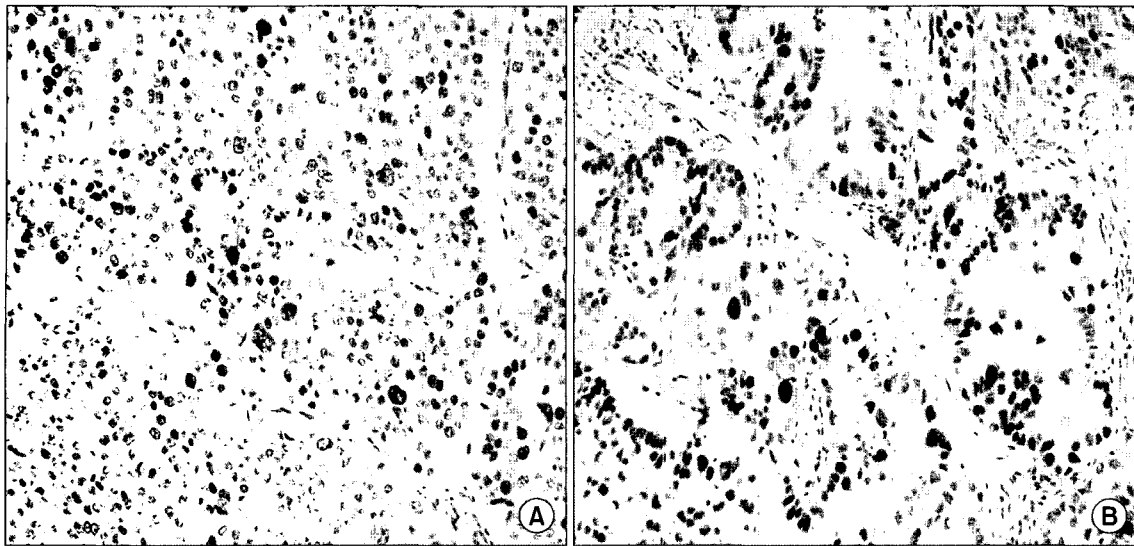


Fig. 4. Immunostaining for Ki-67: Cancer cells show dark red-brown nuclear staining for Ki-67 in a diffuse pattern in squamous cell carcinoma (A,  $\times 200$ ), and in adenocarcinoma (B,  $\times 200$ ).

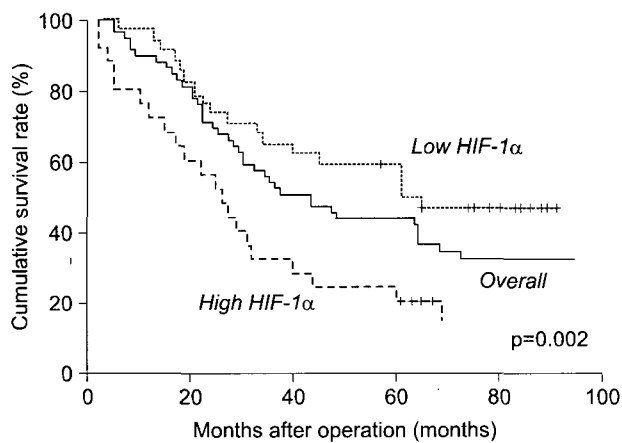


Fig. 5. Kaplan-Meier overall survival curves in patients with non-small cell lung carcinoma according to degree HIF-1 $\alpha$  expression.

가 종양세포의 핵에서만 발현된다는 보고도 있으나, 인체의 여러 암에서 HIF-1 $\alpha$ 가 종양세포의 핵 및 세포질 모두에서 발현된다고 한다[15,16]. 본 연구에서도 비소세포 폐암세포의 핵과 세포질 모두에서 HIF-1 $\alpha$ 가 발현되었으며, 이웃한 정상 폐조직에서는 발현되지 않았다. 많은 악성종양의 조직 내부에는 저산소증의 부위가 존재하며, 저산소증에 빠져 있는 종양세포에서 HIF-1 $\alpha$  단백질이 발현되는 것으로 알려져 있고, 또 저산소증이 HIF-1 $\alpha$  단백질의 ubiquitin-proteasome계에 의한 대사율을 감소시켜 HIF-1 $\alpha$  단백질의 반감기를 증가시킨다고 한다[17]. 본 연구에서 HIF-1 $\alpha$  과발현 세

포는 종양 괴사부위 주위에 밀집해 있으며, 이는 저산소증의 종양 미세환경이 직접 HIF-1 $\alpha$ 의 활성도를 높이는 데 기여하는 것을 시사한다고 할 수 있다. 또 괴사부위에서 떨어진 종양의 경계부에서도 HIF-1 $\alpha$ 의 과발현이 관찰되었으며, 이는 HIF-1 $\alpha$ 의 활성도를 조절하는 다른 기전이 존재하는 것을 시사한다고 할 수 있다.

종양세포에서 HIF-1 $\alpha$ 의 과발현이 유전적 변화와 관련이 있음을 보여주는 증거들이 있다. 인슐린양 성장인자(IGFs) 제1형과 제2형, 기초 섬유아세포 성장인자(bFGF), 표피 성장인자 등이 HIF-1 $\alpha$ 의 발현을 자극한다[18]. Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)와 serine-threonine 인산화효소 AKT (단백인산화효소 B)를 포함하는 신호전달체계가 활성화되면 HIF-1 $\alpha$  단백질의 합성이 매우 증가한다[19]. PTEN의 유전 코드를 담고 있는 종양억제인자의 기능상실성 변이와 마찬가지로, 성장인자-PI3K 신호전달체계를 활성화시키는 원종양유전자의 기능획득성 변이는 상기한 기전을 통하여 HIF-1 $\alpha$ 의 과발현을 야기한다[19]. v-Src 원종양유전자를 발현하는 종양세포는 저산소증과 비저산소증 상태에서 HIF-1과 VEGF를 과발현한다[20]. 그래서 면역조직화학염색에서 비소세포 폐암의 HIF-1 $\alpha$  과발현은 저산소증의 생리적 자극과 종양 특이성 유전적 변화의 결과에 대한 반응이다. 그러나 폐암에서 HIF-1 $\alpha$ 의 과발현에 연관된 유전적 변화가 어떤 것인지에 관한 연구는 더 이루어져야 한다.

종양세포의 높은 증식능은 산소와 에너지 대사의 증가를 요구하며, 그 결과로써 HIF 경로가 활성화되고 신생혈

관이 생성되어 산소의 공급이 증가한다. 또 HIF-1에 의하여 조절되는 유전자의 활성화는 산소결핍 미세환경에 에너지원을 공급하여 대사를 적응시킨다. Zhong 등[16]과 Bos 등[21]은 HIF-1  $\alpha$ 의 과발현이 종양세포의 높은 세포증식능과 유의성 있는 상관관계가 있다고 하나, 본 연구에서는 HIF-1  $\alpha$ 의 과발현은 종양세포의 세포증식능과 상관성의 경향을 보여주었다. 또한 HIF-1  $\alpha$ 의 과발현과 VEGF의 발현이 유의한 상관관계를 보여 주었다. 이는 저산소증의 미세환경에서 신생혈관의 생성으로 산소와 에너지원의 공급을 통한 세포적응을 시사한다고 할 수 있다.

본 연구에서 HIF-1  $\alpha$ 의 과발현은 이상형 p53의 축적과 상관관계가 있음을 보여주었다. Talks 등[15]과 Zhong 등[16]은 인체의 여러 암에서 HIF-1  $\alpha$ 의 과발현과 이상형 p53의 축적은 상관관계가 있다고 하였으며, Bos 등[21]은 이들 사이에 상관관계가 없다고 하였다. 그러나 최근 Zhang 등[22]은 비소세포 폐암에서 HIF-1  $\alpha$ 의 과발현이 이상형 p53의 축적과 상관관계가 있다고 보고하였다. 저산소증의 상태에서 HIF-1  $\alpha$ 는 종양억제단백인 p53과 상호작용을 한다. p53은 그 자체가 DNA-결합 전사인자이며, p53에 결합하는 ubiquitin protein ligase인 MDM2 (mouse double minute 2)에 의하여 ubiquitin화가 증가됨으로써 p53의 반감기는 증가하고 HIF-1  $\alpha$ 의 반감기는 감소하기 때문에 HIF-1  $\alpha$ 의 과발현이 나타난다고 한다. 종양세포에서 p53의 기능소실은 HIF-1  $\alpha$ 의 발현을 증강시키며 HIF-1 의존성 혈관내피성장인자의 전사도 증강시킨다.

본 연구에서 HIF-1  $\alpha$ 의 과발현은 비소세포 폐암에서 종양의 증식과 림프절 전이에 영향을 미치는 것을 시사하고 있다. 일부의 연구자들은 두경부암과 구강인두암 등의 다른 인체암에서 HIF-1  $\alpha$ 의 과발현이 임상적 표지자 및 병리학적 표지자와 유의한 상관성은 없다고 하였으나[23], 양일종 등[11]은 식도암종에서 HIF-1  $\alpha$ 의 과발현과 림프절 전이가 유의한 상관관계가 있으며 술 전 원발암병소의 조직검사서 림프절 전이 유무의 표지자로서의 유용성을 제시하고 있다. 양일종 등[11]의 결과는 본 연구의 결과와 일치하며, 비소세포 폐암종에서도 술 전 원발성 폐암종의 조직검사를 통하여 림프절의 전이 유무를 예측하는 표지자로서 가능성이 있다고 생각된다.

고형성 종양은 저산소증 부위를 포함하고 있으며, 종양의 저산소증은 임상적 예후의 주요한 결정인자이다. 본 연구에서는 HIF-1  $\alpha$ 의 과발현과 비소세포 폐암 환자의 전체적 생존율 사이에 유의한 상관관계가 있음이 관찰되었다( $p=0.002$ ). 인체암 중에서 식도암, 구강인두암, 두경부암

에서 HIF-1  $\alpha$ 의 과발현과 환자의 전체적 생존율 사이에 유의한 연관성이 있다고 보고하였다[13,23]. 또한 최근에 Giatromanolaki 등[13]은 비소세포 폐암에서 HIF-1  $\alpha$ 와 HIF-2  $\alpha$  중에서 HIF-1  $\alpha$ 의 과발현군의 예후가 나쁜 경향이 있다고 보고하였으며, 이러한 연구결과는 본 연구결과와 일치하였다. 추가적으로 비소세포 폐암 환자의 전체적 예후와 림프절 전이 사이에도 유의한 상관관계가 있었다. 그러나 VEGF의 발현 및 이상형 p53의 축적 등과 환자의 전체적 생존율 사이에는 유의한 상관관계가 없었다. 단변량 및 다변량 분석에서 HIF-1  $\alpha$ 의 과발현과 림프절 전이의 존재는 독립적인 불량한 예후 인자로서 가능성을 보여주었다.

본 연구의 제한점으로는 수술한 환자 중 추적관찰이 확실한 환자와 파라핀 블록과 조직검사의 결과가 명확한 환자만을 대상으로 하였고 병기별로 비슷한 수의 분포를 만들다 보니 2년 동안 수술한 모든 환자를 연구대상으로 하지 못했다는 데 있다. 따라서 향후 동기간의 모든 환자를 대상으로 많은 증례를 연구함으로써 보다 나은 결과를 도출할 수 있을 것으로 생각된다.

## 결 론

이상의 결과로 비소세포 폐암 환자에서 HIF-1  $\alpha$ 의 과발현은 수술 후 불량한 예후와 관련 가능성이 있는 표지자로 여겨진다.

## 참 고 문 헌

1. Dang CV, Semenza GL. *Oncogenic alteration of metabolism*. Trends Biochem Sci 1999;24:68-72.
2. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, et al. *Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing*. J Biol Chem 2000;275:25130-8.
3. Yu AY, Frid MG, Shimoda LA, Wiener CM, Stenmark K, Semenza GL. *Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung*. Am J Physiol 1998;275(4 Pt 1):L818-26.
4. Wang GL, Semenza GL. *General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia*. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:4304-8.
5. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. *Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1*. Mol Cell Biol 1996;16:4604-13.
6. Wiesener MS, Turley H, Allen WE, et al. *Induction of*



- endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 alpha.* Blood 1998;92:2260-8.
7. Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, et al. *Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1.* J Biol Chem 1996;271:32529-37.
  8. Hoetzel A, Vagts DA, Loop T, et al. *Effect of nitric oxide on shock-induced hepatic heme oxygenase-1 expression in the rat.* Hepatology 2001;33:925-37.
  9. Jung F, Palmer LA, Zhou N, Johns RA. *Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes.* Circ Res 2000;86:319-25.
  10. Beasley NJ, Leek R, Alam M, et al. *Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients.* Cancer Res 2002;62:2493-7.
  11. Yang JJ, Cho SR, Kim JJ, Lee HY, Chun BK. *Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in esophageal squamous cell carcinoma: Relationship to prognosis and tumor biomarkers.* Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2004;37:691-701.
  12. Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G. *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer.* Cancer Res 2000;60:4693-6.
  13. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, et al. *Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival.* Br J Cancer 2001;85:881-90.
  14. Lee CH, Lee MK, Kang CD, et al. *Differential expression of hypoxia inducible factor-1 alpha and tumor cell proliferation between squamous cell carcinomas and adenocarcinomas among operable non-small cell lung carcinomas.* J Korean Med Sci 2003;18:196-203.
  15. Talks KL, Turley H, Gatter KC, et al. *The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages.* Am J Pathol 2000;157:411-21.
  16. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, et al. *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases.* Cancer Res 1999;59:5830-5.
  17. Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. *Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway.* J Biol Chem 1999;274:6519-25.
  18. Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. *Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2.* Cancer Res 1999;59:3915-8.
  19. Zhong H, Chiles K, Feldser D, et al. *Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics.* Cancer Res 2000;60:1541-5.
  20. Jiang BH, Agani F, Passaniti A, Semenza GL. *V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression.* Cancer Res 1997;57:5328-35.
  21. Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, et al. *Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis.* J Natl Cancer Inst 2001;93:309-14.
  22. Zhang H, Zhang Z, Xu Y, et al. *The expression of hypoxia inducible factor 1-alpha in lung cancer and its correlation with P53 and VEGF.* J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci 2004;24:124-7.
  23. Aebersold DM, Burri P, Beer KT, et al. *Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha, a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer.* Cancer Res 2001;61:2911-6.

=국문 초록=

배경: 악성종양에서 신생혈관 생성 및 당분해의 증가는 저산소 상태의 미세환경을 나타내며, 이는 종양의 침습성, 전이 및 환자의 예후와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)는 당원 수송체, 당분해 효소, 혈관내피세포 성장인자 등의 유전자의 전사를 활성화한다고 알려져 있다. 그리고 HIF-1의 전사 활성도는 HIF-1  $\alpha$  아단위의 표현이 조절되는 정도에 의존한다. 비소세포 폐암에서 HIF-1  $\alpha$ 의 발현이 혈관 생성능, 종양세포 증식능 및 이상형 p53의 축적 등 종양의 생물학적 특성에 미치는 영향과 환자의 수술 후 예후와의 관계를 규명하고자 한다. 대상 및 방법: 1997년부터 1999년까지 비소세포 폐암으로 진단받고 전폐절제술 혹은 폐엽절제술을 시행 받은 59명의 폐암 환자들에서 얻어진 파라핀 조직 블록을 대상으로 하였다. ABC (avidin-biotin complex) 방법에 기초한 면역조직화학검사를 이용하여 암조직과 정상조직에서 HIF-1  $\alpha$ , VEGF (vascular endothelial growth factor), p53 단백질의 발현을 조사하고, Ki-67의 발현을 이용한 증식지수를 측정하였다. HIF-1  $\alpha$  발현과 환자의 생존기간을 포함한 임상적-병리학적 변수들과의 상관관계, VEGF, p53의 발현과 증식지수와의 상관관계를 분석하였다. 결과: HIF-1  $\alpha$ 의 과발현은 40.7% (24예/59예)였다. HIF-1  $\alpha$ 의 과발현은 병리학 적 TNM병기(p=0.004), T병기(p=0.020), N병기(p=0.004), 림프관/혈관 침범(p=0.019) 등과 관련이 있었다. 또 혈관내피세포 성장인자의 발현(p<0.001) 및 이상형의 p53의 발현(p=0.040)과 관련성이 있었다. Kaplan-Meier 생존분석에서 HIF-1  $\alpha$ 의 과발현이 있는 환자의 5년 생존율은 22%로 HIF-1  $\alpha$ 의 저발현 환자의 5년 생존율 61%에 비해 불량한 생존율을 보였고, 단변량분석과 다변량분석에서 HIF-1  $\alpha$ 의 발현은 불량한 예후를 나타내는 인자로 관찰되었다. 결론: 이상의 결과로 비소세포 폐암 환자에서 HIF-1  $\alpha$ 의 과발현은 종양내 신생혈관의 생성과 림프절 전이와 관련이 있는 표지자로 여겨지며, 수술 후 불량한 예후를 나타내었다.

- 중심 단어 : 1. 비소세포 폐암  
2. 종양 표지자  
3. 종양 단백질