

비소세포폐암 환자에서 Ki-67 단백질 발현증가의 임상적 의의

이헌재* · 이 건* · 임창영* · 김광일**

Clinical Significance of Increased Ki-67 Protein Expression in Non-small Cell Lung Cancers

Hyeon Jae Lee, M.D.*, Gun Lee, M.D.*, Chang Young Lim, M.D.*, Kwang Il Kim, M.D.**

Background: The Ki-67 protein is a biomarker associated with cell proliferation and a valuable negative prognostic factor in non-small cell lung cancer. We investigated the Ki-67 protein expression in resected non-small cell lung cancer to evaluate the impact on clinicopathological characteristics and postoperative prognosis. **Material and Method:** Using monoclonal antibody Ki-67, we immunohistochemically examined 38 surgically resected non-small cell lung cancers to determine Ki-67 Labeling Index (LI). We analysed the differences of clinicopathological characteristics and postoperative recurrence and survival between High Ki-67 Group (LI ≥ 20%) and Low Ki-67 Group (LI < 20%). **Result:** The Ki-67 LIs were heterogenous and a mean values was 20.0 ± 20.05%. There were no significant differences in age, sex, smoking, TNM stage, and vascular invasion between High Ki-67 Group and Low Ki-67 Group. A High Ki-67 Group was significantly associated with squamous cell type, poor differentiation, and lymphatic invasion (p ≤ 0.05). High Ki-67 Group showed a trend of lower survival (median 47.2 vs. 96.5 months, p=0.312) and lower disease-free survival (median 18.2 vs. 72.3 months, p=0.327) than Low Ki-67 Group. **Conclusion:** These results indicate that increased Ki-67 protein expression may be a negative prognostic factor and showed a trend of shortened survival and disease-free survival. To evaluate the pivotal role of Ki-67 protein expression, a long-term follow-up and further study are required.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2006;39:376-381)

Key words: 1. Lung neoplasm
2. Neoplasm marker
3. Immunohistochemistry

서 론

폐암 중 많은 부분을 차지하는 비소세포폐암은 진단 당시 이미 완전 절제가 불가능한 경우가 많고, 완전 절제를 실시한다 하더라도 술 후 재발이 많아 장기 생존율이 낮

다[1-3]. 이에 따라 비소세포폐암의 수술 후 재발 및 장기 생존에 관한 예후를 예측할 수 있는 인자를 찾기 위한 연구가 많이 있어왔다. 암세포가 정상세포와 구분되는 중요한 특징 중 하나는 세포증식의 증가인데, 여기에는 세포 주기를 조절하는 유전자의 변형이 중요한 기전이 된다

*포천중문의과대학교 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Pochon CHA Medical University

**포천중문의과대학교 병리학교실

Department of Pathology, Pochon CHA Medical University

논문접수일 : 2006년 1월 17일, 심사통과일 : 2006년 3월 2일

†본 논문은 대한흉부외과학회 제37차 추계학술대회에서 발표되었음.

책임저자 : 이헌재 (463-712) 경기도 성남시 분당구 야탑동 351번지

(Tel) 031-780-5856, (Fax) 031-780-5857, E-mail: hjlee@cha.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

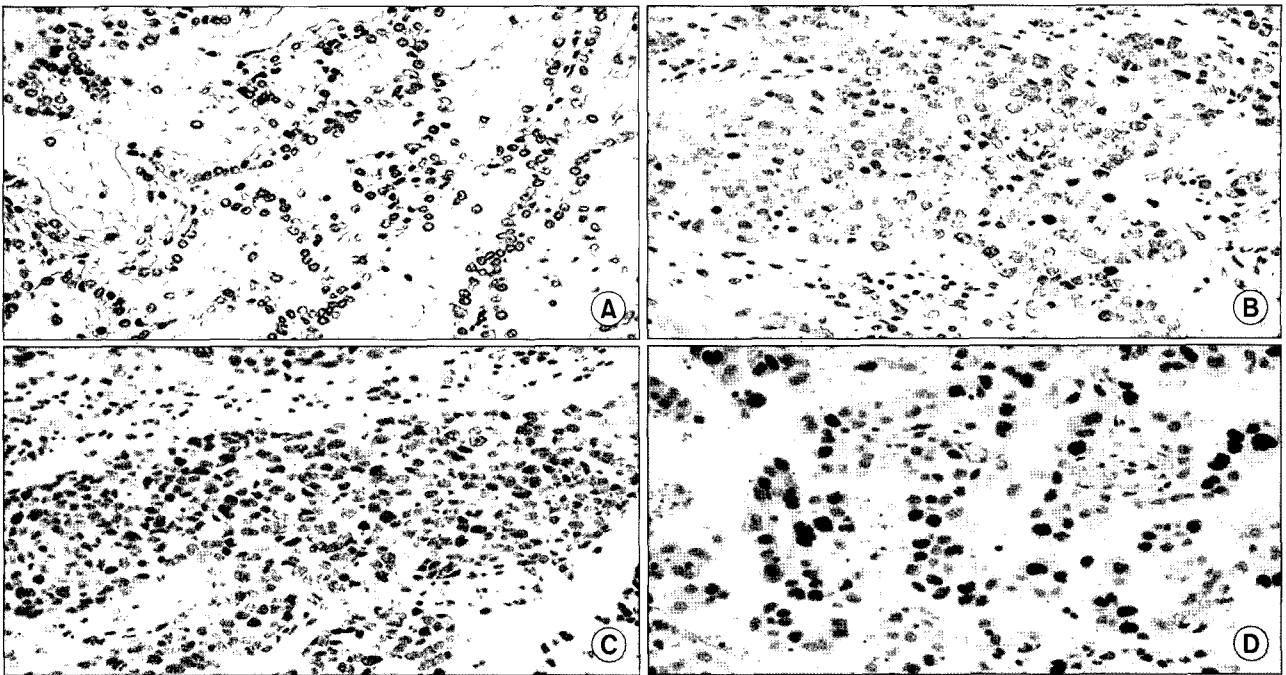


Fig. 1. Immunohistochemical staining ($\times 400$). (A) Grade 0, (B) Grade 1, (C) Grade 2, (D) Grade 3.

[4,5]. 최근에는 비소세포폐암 환자에서 세포주기조절 유전자의 변형, 또는 그 결과로 발생하는 세포주기조절 단백질 발현의 변화를 생물표식자(biomarker)로 이용하여 환자의 예후예측과 치료방침 결정에 도움을 주기 위한 연구가 이루어지고 있다[6-10]. Ki-67 단백질은 증식기의 세포에서만 발현되는 핵단백질로, 세포의 증식활성도를 나타내는 유용한 생물표식자로 알려져 있다[11,12]. 특히 중앙세포에서는 Ki-67 단백질이 많이 증가하며[13-15], 비소세포폐암을 포함한 많은 암종에서 환자의 예후에 나쁜 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[16,17]. 저자들은 폐절제술을 실시한 비소세포폐암 환자들에서의 Ki-67 단백질 발현을 조사하여, Ki-67 단백질 발현증가가 환자의 술 전 임상특성과 술 후 재발과 생존에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1) 연구대상

이 연구는 1995년 10월부터 2004년 12월까지 본 병원에서 비소세포폐암을 진단 받고, 근치를 목적으로 폐엽절제술 이상의 수술을 시행 받은 환자 38명을 대상으로 하였다. 수술 전 화학요법을 시행한 환자는 연구 대상에서 제외

외하였다. 전체 환자를 Ki-67 단백질 증가군과 비증가군으로 분류하여 술 전 환자의 임상특성, 조직병리소견, 술 후 생존기간 및 무병생존기간(disease-free interval)을 비교하였다. 술 후 생존기간은 수술소견과 조직병리소견을 통해 종양이 완전절제된 것으로 판정된 환자 33명을 대상으로 구하였다. 최종 관찰시점은 2005년 7월 말로 하였으며 3명을 제외한 환자에서 추적관찰이 가능하였다.

2) 연구방법

(1) **Ki-67 단백질 면역조직화학염색:** 비소세포폐암 환자의 포르말린 고정 파라핀 포매 조직을 $5\mu\text{m}$ 두께로 잘라 유리 슬라이드에 붙인 후 0.01 M citrate buffer (pH 6.0)에 넣고 전자렌지에서 10분간 가열해 항원성을 증가시켰다. 3% H_2O_2 를 처리하여 내인성 peroxidase를 억제했고, 5% 가토혈청으로 비특이적 항원항체 반응을 억제했다. 면역조직화학염색은 Vectastain ABC elite kit (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)를 사용했고, 발색제는 3'-deaminobenzidine tetrahydrochloride (Vector laboratories)를 사용했다. 본 연구에서는 단클론항체 Ki-67 (1 : 100, Dako, Copenhagen, Denmark)을 일차항체로 사용하였다.

(2) **Ki-67 Labeling Index:** Ki-67 단백질 발현정도의 판정을 위해 단클론항체 Ki-67에 염색된 중앙세포의 핵염색

Table 1. Patients characteristics

| Characteristics | n (%) |
|----------------------|------------------|
| Age (years) | 59.6±7.8 (45~78) |
| Sex | |
| Male | 32 (84.2%) |
| Female | 6 (15.8%) |
| Cell type | |
| Squamous | 18 (47.4%) |
| Adenocarcinoma | 17 (44.7%) |
| Others | 3 (7.9%) |
| Differentiation | |
| Well | 11 (28.9%) |
| Moderate | 16 (42.2%) |
| Poorly | 11 (28.9%) |
| Stage I | 13 (34.2%) |
| II | 17 (44.7%) |
| III | 8 (21.1%) |
| Op. procedure | |
| Lobectomy | 26 (68.4%) |
| Bilobectomy | 3 (7.9%) |
| Pneumonectomy | 9 (23.7%) |
| Op. result | |
| Complete resection | 33 (86.8%) |
| Incomplete resection | 5 (13.2%) |

상을 400배 현미경 시야에서 관찰하였다. 발현 정도는 핵염색상이 전혀 없으면 Grade 0, 희미한 경우를 Grade 1, 증가된 경우를 Grade 2, 매우 강하면 Grade 3으로 판정하였고, Grade 0, 1은 음성으로, Grade 2, 3은 양성으로 분류하였다(Fig. 1). 1,000개 이상의 종양세포에서 핵염색상을 관찰하여 양성으로 분류된 세포의 비율을 Labeling Index로 표시하였다. Labeling Index가 20% 이상이면 Ki-67 증가군, 20% 미만이면 Ki-67 비증가군으로 분류하였다.

(3) 통계분석: 두 군의 술 전 임상특성과 조직병리소견의 비교에는 student t-test와 카이제곱검정 또는 Fisher's exact test를 이용하였다. 두 군의 술 후 생존기간과 무병생존기간은 Kaplan-Meier 방법을 이용하여 구하였고, Log-rank test를 실시하여 차이를 비교하였다. p-value가 0.05 이하일 때 통계적 의의가 있다고 평가하였다.

결 과

1) 임상 특성

총 38명의 환자 중 남자는 32명, 여자는 6명이었으며, 평균 연령은 59.6±7.8세(범위: 45~78세)였다. 종양을 조직학적으로 분류하면 편평상피암 18명, 선암 17명, 기타

Table 2. Relationship between K-67 labeling index and various characteristics

| Characteristics | High group* | Low group† | p value‡ |
|--------------------|-------------|------------|----------|
| No. of patients | 18 | 20 | |
| Age | | | 0.841 |
| Mean±SD | 59.3±8.8 | 59.8±7.1 | |
| Sex | | | 0.663 |
| Male | 16 | 16 | |
| Female | 2 | 4 | |
| Smoking | | | 1.000 |
| Yes | 14 | 15 | |
| No | 4 | 5 | |
| Cell type | | | 0.050 |
| Squamous | 12 | 6 | |
| Non-squamous | 6 | 14 | |
| Differentiation | | | 0.036 |
| Well | 2 | 9 | |
| Non-well | 15 | 11 | |
| T-status | | | 0.587 |
| T1 | 1 | 2 | |
| T2 | 12 | 15 | |
| T3 | 5 | 3 | |
| N-status | | | 0.442 |
| N0 | 8 | 13 | |
| N1 | 6 | 4 | |
| N2 | 4 | 3 | |
| Stage | | | 0.304 |
| I | 4 | 9 | |
| II | 9 | 8 | |
| III | 5 | 3 | |
| Lymphatic invasion | | | 0.038 |
| Yes | 6 | 1 | |
| No | 12 | 19 | |
| Vascular invasion | | | 0.117 |
| Yes | 6 | 2 | |
| No | 12 | 18 | |

*Ki-67 Labeling Index ≥20%; †Ki-67 Labeling Index <20%; ‡student t-test and Chi-square test or Fisher's exact test.

조직형 3명이었으며, 분화도는 고분화 11명, 중분화 16명, 저분화 11명이었다. TNM 병기는 I기 13명, II기 17명, III기 8명이었다. 시행된 수술은 폐엽절제술 26명, 이폐엽절제술 3명, 전폐절제술 9명이었고 이 중 종양의 완전 절제가 33명, 불완전 절제가 5명에서 이루어졌다(Table 1). 완전절제환자의 중앙 추적기간은 36.6개월(범위: 4.8~96.5개월)이었다.

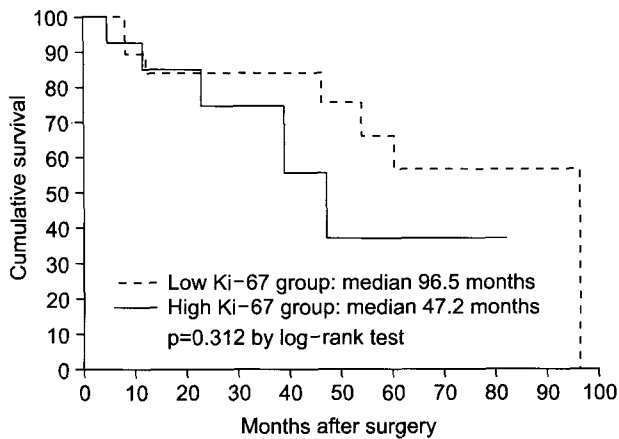


Fig. 2. Survival curves according to Ki-67 protein expression.

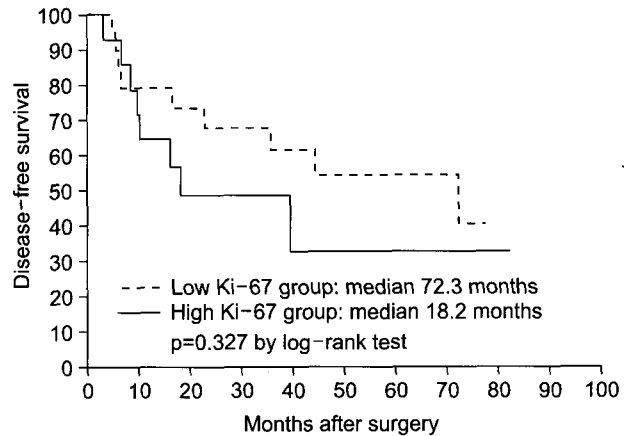


Fig. 3. Disease-free survival curves according to Ki-67 protein expression.

2) Ki-67 단백질 발현과 임상적 특성

Ki-67 단백질이 종양세포 핵 내에 발현되는 양상을 면역조직화학염색을 통하여 관찰하였다. 전체 환자의 평균 Labeling Index (LI)는 $20.0 \pm 20.1\%$ 로 불균질한 분포를 보였다. LI 20%를 분류 기준으로 하였을 때 LI가 20% 이상인 Ki-67 증가군은 18명, LI가 20% 미만인 Ki-67 비증가군은 20명이었다. 두 군 간의 나이, 성별, 흡연, TNM 병기, 혈관침윤은 통계적 차이가 없었다($p > 0.05$). 반면에 증가군은 비증가군에 비해 편평상피암이 많고 분화도가 나쁘며 림프관침윤이 많았다($p \leq 0.05$)(Table 2).

3) 생존기간, 무재발 생존기간

완전절제가 이루어진 33명 환자의 추적기간 동안 재발이 17명, 폐암으로 인한 사망이 12명에서 발생하였다. Ki-67 증가군은 중앙 생존기간이 47.2개월, 중앙 무병생존기간은 18.2개월로, 비증가군의 96.5개월, 72.3개월보다 짧은 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다($p = 0.312$, $p = 0.327$, 각각)(Fig. 2, 3).

고 찰

비소세포폐암은 완전 절제를 실시하더라도 수술 후 재발이 많아 장기 생존율이 낮다[1-3]. 따라서 비소세포폐암 환자 중 수술 후 재발 및 그에 따른 조기 암 사망이 예상되는 고위험환자를 예측하여 그에 따른 적절한 수술 전, 수술 후 치료를 시행하는 것이 중요하다. 최근에는 세포주기를 조절하는 유전자의 변형, 또는 그 결과로 발생하는 단백

질 발현변화를 생물지표자로 이용하여, 비소세포폐암 환자의 예후 예측과 치료방침 결정에 도움을 주기 위한 연구가 이루어지고 있다[7-10]. 본 연구는 수술 절제된 비소세포폐암 조직에서, 단백질의 발현증가가 폐암환자의 임상적 병리적 양상과 수술 후 예후에 미치는 영향을 알아보기 위해 시행되었다. 본 연구에서 저자들은 Ki-67 단백질 발현증가가 편평상피암, 낮은 세포분화도, 그리고 림프관침윤과 관계가 있는 것을 확인하였다. 또한 통계적 유의성을 갖지는 못하였으나 Ki-67 단백질 발현증가가 생존기간과 무병생존기간에 나쁜 영향을 미치는 경향을 보이는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 기존의 연구에서 Viberti 등[18], Mehdi 등[19]이 Ki-67 단백질 발현의 증가는 편평상피암, 낮은 세포 분화도와 관계가 있으며, 생존기간과 무병생존기간이 짧아지는 경향을 보인다고 보고한 것과 비슷한 결과이다. Ki-67 단백질의 발현정도는 비소세포폐암의 세포형에 따라 유의한 차이를 보인다[16,18-20]. 따라서 모든 세포형의 비소세포폐암을 연구대상으로 한 Kawama 등[20]은 $26.3 \pm 14.0\%$ (범위 1~61%), Hommura 등[16]은 $36.7 \pm 27.3\%$ (범위 0~97%), 본 저자 등은 $20.0 \pm 20.1\%$ (범위 0~75%)의 매우 불균질한 Ki-67 단백질 발현 양상을 보였다. 이와 같이 대상 환자의 세포형 구성비에 따라 단백질 발현이 매우 불균질하고 많은 차이를 보일 수 있기 때문에 각 연구의 결과를 직접 비교하는 것은 문제가 있을 것으로 생각된다. Ki-67 단백질을 생물지표자로 이용하는 면역조직화학염색은 검체의 획득이 쉽고, 염색과정이 쉽고, 검사비용이 비싸지 않다는 장점이 있다. Ki-67 단백질이 생물지표자로 임상에서 널리 이용되기 위해서는 표

준화된 염색방법과 염색결과를 객관적으로 판정할 수 있는 단일화된 기준을 설정해야 한다는 문제가 아직 남아 있기는 하지만, 수술 후 조직에서 Ki-67 단백질의 증가소견을 보이는 고위험 환자에서는 술 후 보조치료의 실시와 집중적인 경과 관찰이 필요할 것으로 생각된다.

결 론

이상의 연구를 통해 비소세포폐암 환자 중 편평상피암에서 Ki-67단백질의 증가가 많이 나타나며 Ki-67 단백질의 증가는 세포 분화도의 악화 및 임파침윤의 증가와 관계 있다는 것을 알 수 있었다. 또한 Ki-67의 증가는 생존 기간과 무병생존기간의 감소를 초래하는 것을 관찰할 수 있었으나 통계적 유의성이 부족하여 향후 지속적인 연구가 필요할 것이다.

참 고 문 헌

1. Lad T, Rubistein L, Sadeghi A. *The benefit of adjuvant treatment for resectable locally advanced non-small cell lung cancer.* J Clin Oncol 1988;6:9-17.
2. Ginsberg RJ, Vokes EE, Raben A. *Non-small cell lung cancer.* In: DeVita VT Jr, Hellman S, Steven A. *Cancer principles & practice of oncology.* 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1997;858-910.
3. Socinski MA. *Adjuvant therapy of resected non-small cell lung cancer.* Clin Lung Cancer 2004;6:162-9.
4. Hunter T, Pines J. *Cyclins and cancer.II. Cyclin D and CDK inhibitors come of age.* Cell 1994;79:573-82.
5. Sherr CJ. *Cancer cell cycles.* Science 1996;274:1672-7.
6. Minna JD, Sekido Y, Fong KM, Gazdar AF. *Molecular biology of lung cancer.* In: DeVita VT Jr, Hellman S, Steven A. *Cancer: principles & practice of oncology.* 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1997;849-57.
7. Gupta AK, Harris EER, Barnhard EJ, et al. *Overview of cell cycle and apoptosis.* In: Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH, Turris AT, Minna JD. *Lung cancer. Principle and practice.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2000;5-67.
8. Forgacs E, Zochbauer-Muller S, Olan E, Minna JD. *Molecular genetic abnormalities of human lung cancer.* Pathol Oncol Res 2001;7:6-13.
9. Dobash Y, Shoji M, Jiang SX, Kobayashi M, Kawakubo Y, Kameya T. *Active cyclinA-CDK2 complex, a possible critical factor for cell proliferation in human primary lung carcinoma.* Am J Pathol 1998;84:49-53.
10. Kawabuchi B, Moriyama S, Hirinaka M, et al. *p16 inactivation in small-sized lung adenocarcinoma; its association with poor prognosis.* Int J Cancer 1999;84:49-53.
11. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H. *Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.* J Immunology 1984;133:1710-5.
12. Scott RJ, Hall PA, Haldane JS, et al. *A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction.* J Pathol 1991;165: 173-8.
13. Gerdes J, Stein H, Pilen S, et al. *Prognostic relevance of tumor-cell growth fraction in malignant non-Hodgkin's lymphomas.* Lancet 1987;2:448-9.
14. Hall PA, Gregory W, Richards MA, d'Ardenne AJ, Lister TA, Stansfield AG. *The prognostic significance of Ki67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma.* J Pathol 1988; 54:223-35.
15. Hall PA, Levison DA. *Assessment of cellular proliferation in histological material.* J Clin Pathol 1990;43:184-92.
16. Hommura F, Dosaka-Akita H, Mishina T, et al. *Prognostic significance of p27KIP1 protein and Ki-67 growth fraction in non-small cell lung cancers.* Clin Cancer Research 2000; 6:4073-81.
17. Niemiec J, Kolodziejewski L, Dyczek S. *EGFR LI and Ki-67 LI are independent prognostic parameters influencing survivals of surgically treated squamous cell lung cancer patients.* Neoplasma 2005;52:231-7.
18. Viberti L, Papotti M, Abbona GC, Celano A, Filosso PL, Bussolati G. *Value of Ki-67 immunostaining in preoperative biopsies of carcinomas of lung.* Hum Pathol 1997;28:189-92.
19. Mehdi SA, Ezzell JE, Newman NB, Kohman LJ, Graziano SL. *Prognostic significance of Ki-67 immunostaining and symptoms in resected stage I and II non-small cell lung cancer.* Lung cancer 1998;20:99-108.
20. Kawama H, Tamaru J, Tanaka T, et al. *Role of p27kip1 and cyclin dependent kinase 2 in the proloferation of non-small cell lung cancer.* Am J Pathol 1998;153:505-13.

=국문 초록=

배경: Ki-67 단백질은 세포의 증식활성도를 나타내는 생물표식자로, 비소세포폐암 환자에서 Ki-67 단백질의 증가는 예후에 나쁜 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이 연구는 비소세포폐암으로 폐절제술을 실시한 환자에서 Ki-67 단백질의 발현정도를 조사하여, 단백질의 발현증가가 환자의 임상적 병리적 양상과 술 후 재발과 생존기간에 미치는 영향을 알아보기 위해 시행되었다. **대상 및 방법:** 근치적 폐절제술을 실시한 38명의 비소세포폐암 조직에서 단클론항체 Ki-67로 면역조직화학염색을 실시하여 Ki-67 Labeling Index (LI)를 구하였다. 환자를 Ki-67 증가군(LI \geq 20%)과 Ki-67 비증가군(LI $<$ 20%)으로 분류하여, 두 군의 술 전 임상적 병리적 특성, 술 후 생존기간 및 무병생존기간을 비교하였다. **결과:** Ki-67 LI는 불균질한 분포를 보였고 평균 LI는 20.0 \pm 20.1%였다. Ki-67 증가군과 비증가군 간에 나이, 성별, 흡연, TNM 병기, 혈관침윤은 유의한 차이가 없었다. 그러나 증가군은 비증가군에 비해 편평상피암이 많고, 분화도가 나쁘며, 임파침윤이 많았다($p\leq 0.05$). 증가군은 중앙 생존기간(47.2 vs. 96.5개월)과 중앙 무병생존기간(18.2 vs. 72.3개월)이 비증가군보다 짧았으나 통계적 유의성은 없었다 (각각 $p=0.312$, $p=0.327$). **결론:** 이상의 연구를 통해 비소세포폐암 환자에서의 Ki-67 단백질 발현증가는 수술 후 환자의 예후에 나쁜 인자로 작용하여 생존기간과 무병생존기간이 짧아지는 경향을 보였으나 통계적 유의성이 부족하여 향후 지속적인 연구가 필요할 것이다.

- 중심 단어 :** 1. 폐종양
2. 종양표식자
3. 면역조직화학