

## 담낭 샘암종에서 Matrix Metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP)-1, TIMP-2의 발현

배종엽 · 최진섭<sup>1</sup> · 정현철<sup>2</sup> · 박찬일<sup>3</sup>  
박영년<sup>3</sup>

포천중문의과대학 구미 차병원 병리과  
연세대학교 의과대학 외과학교실  
암전이 연구센터, 연세 암센터  
병리학교실, BK21 의과학사업단

접 수 : 2002년 8월 21일  
게재승인 : 2002년 11월 29일

책임저자 : 박 영 년  
우 120-752 서울시 서대문구 신촌동 134  
연세대학교 의과대학 병리학교실  
전화: 02-361-5663  
Fax: 02-362-0860  
E-mail: young0608@yumc.yonsei.ac.kr

\*본 연구는 연세대학교 의과대학 2000년도  
교수연구비에 의하여 이루어졌음(과제번호:  
2000-02).

### Expression of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in Adenocarcinomas of The Gallbladder

Jong Yup Bae, Jinsub Choi<sup>1</sup>, Hyun Cheol Chung<sup>2</sup>, Chanil Park<sup>3</sup>  
and Young Nyun Park<sup>3</sup>

Department of Pathology, Kumi CHA Hospital, College of Medicine, Pochon CHA University, Kumi, Korea; <sup>1</sup>Department of General Surgery, <sup>2</sup>Cancer Metastasis Research Center, Yonsei Cancer Center and <sup>3</sup>Department of Pathology, College of Medicine, Brain Korea 21 Project for Medical Science, Yonsei University, Seoul, Korea

**Background :** Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 degrade type IV collagen and are antagonized by the tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-1, respectively. **Methods :** We studied by immunohistochemistry the expressions of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in 72 cases of adenocarcinoma of the gallbladder. **Results :** The MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 expressions were significantly higher in well/moderately differentiated adenocarcinomas than in poorly differentiated adenocarcinomas, in adenocarcinomas that had invaded the lamina propria/proper muscle than in those that had invaded the perimuscular connective tissue or beyond the serosa, and in adenocarcinomas with fungating growth than in those with infiltrative growth. The TIMP-2 expression showed a similar pattern without statistical significance. Regarding the status of lymph node metastasis, the MMP-2 expression was significantly higher in cases without lymph node metastasis. The MMP-2 and MMP-9 expressions were significantly related to those of TIMP-2 and TIMP-1, respectively, with regard to depth of invasion, differentiation, and growth patterns of the adenocarcinomas. **Conclusions :** MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 are suggested to play important roles in the progression to early invasion of adenocarcinomas, in which the function of MMP-2 is inhibited by TIMP-2.

**Key Words :** Gallbladder Neoplasms-Matrix Metalloproteinases-Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-Immunohistochemistry

일반적으로 종양의 발생은 최초의 유전적 변형에서 시작하여 점차적으로 국소 침윤과 전이를 할 수 있는 악성 종양으로 진행된다. 이는 종양세포가 기저막을 뚫고 침윤을 시작하여 기질을 통하여 이동한 후 기질 내 혈관의 내벽을 뚫고 종양 색전을 형성함으로써 이루어진다. 이런 종양 세포의 침윤과 전이 과정은 종양 세포와 주변 기질 간의 상호작용에 의해 이루어지며, 여기에는 기저막과 세포외 기질을 분해하는 단백분해효소가 작용한다.<sup>1-4</sup> 이 단백분해효소는 matrix metalloproteinases (MMPs), serine proteases, cystein proteases와 aspartic proteases로 크게 나눌 수 있으며, 이 중 MMPs는 가장 강력하고 중요한 단백

분해효소이다.<sup>1</sup> 지금까지 약 20종의 MMPs가 발견되었는데, 이 중 MMP-2와 MMP-9은 기저막을 형성하는 제4형 아교질섬유를 분해하는 효소로서 구강,<sup>5</sup> 식도,<sup>6</sup> 위,<sup>7</sup> 대장,<sup>8,9</sup> 간내 담도,<sup>10</sup> 췌장,<sup>11-13</sup> 요도,<sup>14</sup> 방광,<sup>15</sup> 난소<sup>16,17</sup> 종양의 국소 침윤이나 전이 과정과 관련한 많은 연구 보고가 있다.

MMPs의 조절은 크게 유전자 전사 조절과 전사 후 조절로 나눌 수 있다. 유전자 전사 조절은 매우 복잡한 과정을 거쳐 MMPs의 생산량을 조절할 수 있으며, MMPs의 활성을 조절하는 데는 전사 후 조절이 더 중요하게 작용한다.<sup>2</sup> 대부분 용해성 MMPs는 비활성형으로 분비되어 N-말단 전구영역이 분리된

다음 활성화되는데 여러 단백분해효소들이 이 전구효소의 활성화에 관여한다. 활성화된 MMPs는 주로 tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs)에 의해 억제된다.<sup>1,2,4</sup> TIMPs는 지금까지 4군이 알려져 있고 이 중 TIMP-1은 MMP-9을, TIMP-2는 MMP-2를 각각 대항함으로써 체장,<sup>13</sup> 폐,<sup>18</sup> 간<sup>19</sup> 종양에서 종양의 침윤이나 예후 인자들과 연관성을 보였다는 보고가 있다. 결국 이들 물질들의 상호작용에 의한 효과가 종양에서 침윤과 전이 및 환자의 예후와 밀접한 관련이 있을 것으로 기대된다.

담낭암종은 담도암 중에서는 가장 흔하고 서구에서보다 우리나라를 비롯한 동아시아에 더 흔하다. 최근 종양 세포와 기질의 상호작용에 관여하는 단백분해효소들이 여러 종양의 진행에 관련되어 있음이 활발히 연구되고 있으나 담낭암종에서는 아직 체계적인 연구가 없다. 따라서 본 연구에서 저자들은 담낭 샘암종에서 MMP-2, MMP-9, TIMP-1 및 TIMP-2에 대한 면역조직화학적 검색을 통하여 이들 효소들의 담낭암종의 진행에 기여하는 역할을 알아보고자 하였다.

## 재료와 방법

### 재료

1986년부터 2000년까지 연세대학교 신촌세브란스병원 외과에서 담낭 절제술을 받은 원발성 담낭 샘암종 72예를 대상으로 하였다.

### 병리조직학적 검색

종양의 대표적인 부분을 포함하는 파라핀 포매 조직을 4  $\mu$ m 두께로 박절하여 HE 염색을 시행하여 조직학적 소견을 관찰하였다. 침윤성 샘암종을 World Health Organization의 조직학적 분화도 기준<sup>20</sup>에 따라 고도, 중등도, 저분화 암종으로 나누었다. 종양의 국소 침윤 정도에 따라 고유 점막층 또는 근층까지 침범한 경우와 그 이상 침범한 예로 나누었다. 또 암종의 성장 양상에 따라 돌출형, 침윤형, 흔재형으로 나누었다. 같이 절제된 림프절에서 종양의 전이 여부를 확인하여 음성과 양성으로 나누었다.

### 면역조직화학 염색

10% 중성 포르말린 용액에 고정하고 파라핀 포매한 조직을 4  $\mu$ m 두께로 절편을 만들어 xylene으로 탈파라핀하고 고농도 알코올에서 저농도의 알코올을 거쳐 증류수로 흡수시켰다. 항원의 노출을 위하여 citric acid buffer에서 극초단파를 이용하여 1분 30초간 끓였다. 내인성 peroxidase의 활성을 억제하기 위하여 3% 과산화수소수로 15분간 처리하였다. 다시 증류수로 2분간 세척하고 Tris buffer로 10분간 처리하였다. 정상 염소 혈청

을 도포하여 비특이적 결합을 억제하였다. 일차 항체인 MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 (Oncogene, Boston, MA, U.S.A.)를 각각 1:50으로 희석하여 4°C에서 밤새 반응시켰다. 이차 항체를 12분간 처리하고 다시 Tris buffer에서 10분간 처리한 후 streptavidin-biotin universal detection system (Immunotech, Marseille, France)를 적용하였다. Tris buffer에 10분간 수세하고 DAB chromogen kit (Immunotech)로 발색한 다음 증류수로 수세하고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 하여 각 항원을 발현하는 세포와 부위를 조사하였다. 판독은 종양 세포의 10% 미만에서 약 양성이거나 염색이 되지 않는 예를 음성으로 하였다. 종양 세포의 10% 이상에서 염색된 예를 양성으로 하였다.

### 통계분석

SPSS 10.0 프로그램(SPSS Inc., Chicago, U.S.A.)을 이용하여 각 변수들 간의 유의성을 Pearson Chi-square test로 검정하여 p 값이 0.05 미만인 경우를 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

### 임상 및 병리조직학적 소견

환자의 평균 연령은 60.8세였고, 남자가 28명, 여자가 44명으로 남녀 비는 1:1.6이었다. 조직학적 분화도에 따라 고도 또는 중등도 분화 암종이 51예, 저분화 암종이 21예였다. 침윤 깊이에 따라 고유 점막층 또는 근층까지 침범한 예가 20예, 그 이상 침범한 예가 52예였다. 암종의 성장 양상에 따라 돌출형이 18예, 침윤형이 44예, 흔재형이 10예였다. 샘암종 중 림프절이 확인된 예는 41예였고, 이 중 음성이 23예, 양성이 18예였다.

### MMP-2에 대한 면역조직화학 염색

담낭 샘암종 72예 중 27예(37.5%)는 MMP-2에 음성이었으며, 45예(62.5%)는 양성이었다(Fig. 1)(Table 1). 침윤 정도에 따른 발현을 살펴보면, 고유 점막층 또는 근층까지 침윤한 경우가 20예이었는데 그 중 1예(5.0%)는 음성이었고, 19예(95.0%)는 양성이었다. 그 이상 침윤한 샘암종의 경우는 52예였으며 그 중 26예(50.0%)는 음성이었고, 26예(50.0%)는 양성이었으며 고유 점막층이나 근층까지 침윤한 예가 그 이상 침윤한 예보다 발현율이 높았다( $p < 0.05$ ). 분화도에 따라 고도 또는 중등도 분화 암종 51예 중 12예(23.5%)는 음성이었고 39예(76.5%)는 양성이었으며, 저분화 암종 21예 중 15예(71.4%)가 음성이었고, 6예(28.6%)가 양성으로 분화가 좋은 종양에서 더 높은 발현율을 보였다( $p < 0.05$ ). 분화가 나쁜 암종에서는 일

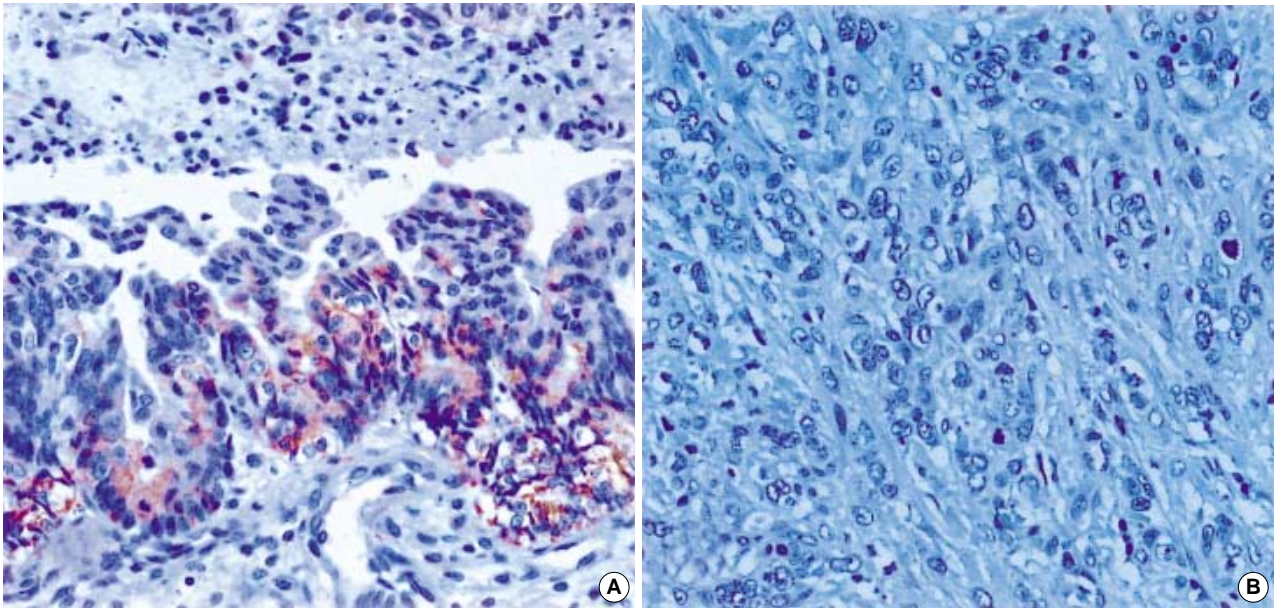


Fig. 1. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 expression is immunohistochemically positive in early stage (A) and negative in advanced stage (B) of invasive adenocarcinoma of the gallbladder.

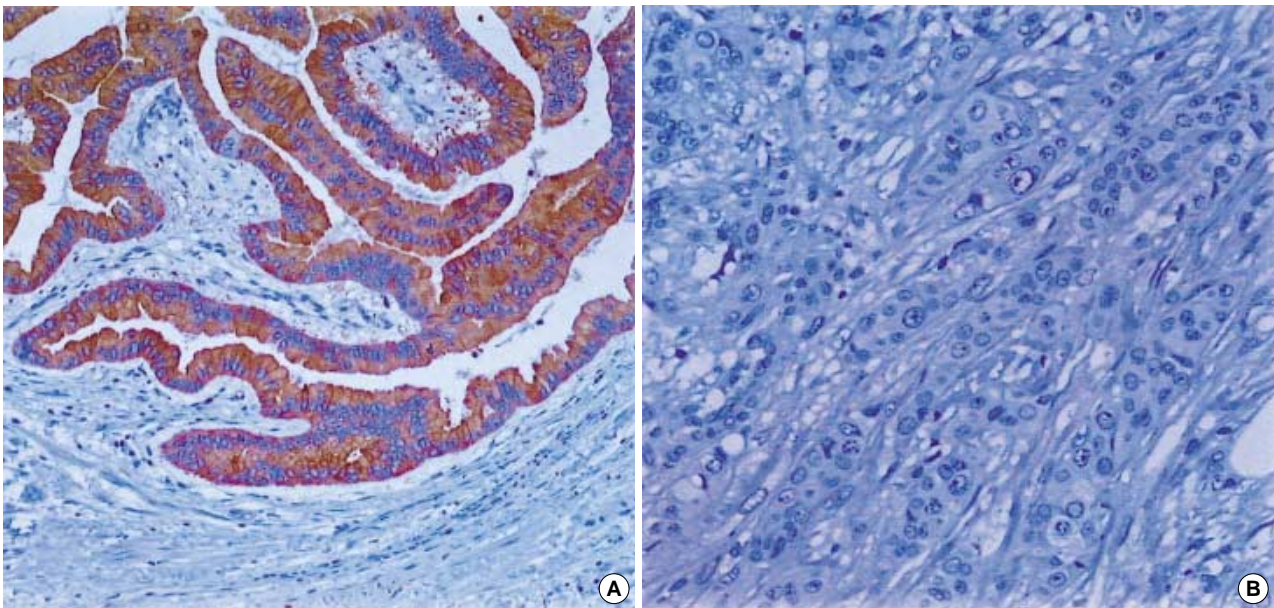


Fig. 2. Matrix metalloproteinase (MMP)-9 expression is immunohistochemically positive in well differentiated adenocarcinoma (A) and negative in poorly differentiated adenocarcinoma (B) of the gallbladder.

부 샘 구조의 침윤 전방부를 형성하는 부위에서 주로 양성을 보였다. 성장 양상에 따라 돌출형 18예 중에는 1예(5.6%)가 음성, 17예(94.4%)가 양성이고, 침윤형 44예 중에는 24예(54.5%)가 음성, 20예(45.5%)가 양성으로 돌출형이 침윤형보다 높은 발현율을 보였다( $p < 0.05$ ). 혼합형 10예 중에는 각각 음성이 2예(20.0%), 양성인 8예(80.0%)있었으며 침윤 초기에 해당하는 부위에서 강 양성을 보였다. 림프절 전이가 없었던 23예

에서는 5예(21.7%)가 음성, 18예(78.3%)가 양성이고, 전이가 있었던 18예에서는 10예(55.6%)가 음성, 8예(44.4%)가 양성으로 림프절 전이가 없는 예에서 발현율이 더 높았다( $p < 0.05$ ).

**MMP-9에 대한 면역조직화학 염색**

담낭 샘암종 72예 중 34예(47.2%)는 MMP-9 음성이었으며,

**Table 1.** Expression of MMP-2 in adenocarcinoma of the gallbladder

	MMP-2 immunoreactivity (%)	
	Positive	Negative
Depth of invasion*		
Lp/Pm (n=20)	19 (95.0)	1 (5.0)
S (n=52)	26 (50.0)	26 (50.0)
Differentiation*		
Well/Moderate (n=51)	39 (76.5)	12 (23.5)
Poor (n=21)	6 (28.6)	15 (71.4)
Growth pattern*		
Fungating (n=18)	17 (94.4)	1 (5.6)
Infiltrative (n=44)	20 (45.5)	24 (54.5)
Mixed (n=10)	8 (80.0)	2 (20.0)
LN metastasis*		
Positive (n=18)	8 (44.4)	10 (55.6)
Negative (n=23)	18 (78.3)	5 (21.7)
Unidentified LN (n=31)	19 (61.3)	12 (38.7)

MMP: matrix metalloproteinase, Lp: lamina propria, Pm: proper muscle, S: perimuscular connective tissue and beyond serosa, LN: lymph node. \*: p value<0.05.

**Table 2.** Expression of MMP-9 in adenocarcinoma of the gallbladder

	MMP-9 immunoreactivity (%)	
	Positive	Negative
Depth of invasion*		
Lp/Pm (n=20)	18 (90.0)	2 (10.0)
S (n=52)	20 (38.5)	32 (61.5)
Differentiation*		
Well/Moderate (n=51)	33 (64.7)	18 (35.3)
Poor (n=21)	5 (23.8)	16 (76.2)
Growth pattern*		
Fungating (n=18)	17 (94.4)	1 (5.6)
Infiltrative (n=44)	16 (36.4)	28 (63.6)
Mixed (n=10)	5 (50.0)	5 (50.0)
LN metastasis <sup>†</sup>		
Positive (n=18)	9 (50.0)	9 (50.0)
Negative (n=23)	15 (65.2)	8 (34.8)
Unidentified LN (n=31)	4 (12.9)	27 (87.1)

MMP: matrix metalloproteinase, Lp: lamina propria, Pm: proper muscle, S: perimuscular connective tissue and beyond serosa, LN: lymph node. \*: p value<0.05, <sup>†</sup>: p value≥0.05.

38예(52.8%)는 양성이었다(Fig. 2)(Table 2). 종양의 침윤 정도에 따른 발현은, 고유 점막층 또는 근층까지 침윤한 20예 중 2예(10.0%)는 음성이었고, 18예(90.0%)는 양성이었다. 그 이상 침윤한 예는 52예이었으며 그 중 32예(61.5%)는 음성이었고, 20예(38.5%)는 양성이었으며 고유 점막층이나 근층까지 침범한 예가 그 이상 침윤한 예보다 더 높은 발현율을 보였다( $p<0.05$ ). 분화도에 따라 고도 또는 중등도 분화를 보인 암종 51예 중에는 18예(35.3%)가 음성이었고, 33예(64.7%)가 양성

**Table 3.** Expression of TIMP-1 in adenocarcinoma of the gallbladder

	TIMP-1 immunoreactivity (%)	
	Positive	Negative
Depth of invasion*		
Lp/Pm (n=20)	17 (85.0)	3 (15.0)
S (n=52)	15 (28.8)	37 (71.2)
Differentiation*		
Well/Moderate (n=51)	30 (58.8)	21 (41.2)
Poor (n=21)	2 (9.5)	19 (90.5)
Growth pattern*		
Fungating (n=18)	16 (88.9)	2 (11.1)
Infiltrative (n=44)	9 (20.5)	35 (79.5)
Mixed (n=10)	7 (70.0)	3 (30.0)
LN metastasis <sup>†</sup>		
Positive (n=18)	6 (33.3)	12 (66.7)
Negative (n=23)	14 (60.9)	9 (39.1)
Unidentified LN (n=31)	12 (38.7)	19 (61.3)

TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinase, Lp: lamina propria, Pm: proper muscle, S: perimuscular connective tissue and beyond serosa, LN: lymph node. \*: p value<0.05, <sup>†</sup>: p value≥0.05.

**Table 4.** Expression of TIMP-2 in adenocarcinoma of the gallbladder

	TIMP-2 immunoreactivity (%)	
	Positive	Negative
Depth of invasion*		
Lp/Pm (n=20)	15 (75.0)	5 (25.0)
S (n=52)	9 (17.3)	43 (82.7)
Differentiation <sup>†</sup>		
Well/Moderate (n=51)	21 (41.2)	30 (58.8)
Poor (n=21)	3 (14.3)	18 (85.7)
Growth pattern*		
Fungating (n=18)	14 (77.8)	4 (22.2)
Infiltrative (n=44)	5 (11.4)	39 (88.6)
Mixed (n=10)	5 (50.0)	5 (50.0)
LN metastasis <sup>†</sup>		
Positive (n=18)	5 (27.8)	13 (72.2)
Negative (n=23)	10 (43.5)	13 (56.5)
Unidentified LN (n=31)	9 (29.0)	22 (71.0)

TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinase, Lp: lamina propria, Pm: proper muscle, S: perimuscular connective tissue and beyond serosa, LN: lymph node. \*: p value<0.05, <sup>†</sup>: p value≥0.05.

이었으며, 저분화 암종 21예 중에는 각각 16예(76.2%)가 음성이었고, 5예(23.8%)가 양성으로 분화가 좋은 종양에서 더 높은 발현율을 보였다( $p<0.05$ ). 분화가 나쁜 암종에서는 일부 샘 구조의 침윤 전방부를 형성하는 부위에서 주로 양성을 보였다. 성장 양상에 따라 돌출형 18예 중 1예(5.6%)가 음성이었고, 17예(94.4%)는 양성이었으며, 침윤형 44예 중에는 28예(63.6%)가 양성, 16예(36.4%)가 양성으로 돌출형이 침윤형보다 높은 발현율을 보였다( $p<0.05$ ). 혼합형 10예 중에는 각각 5

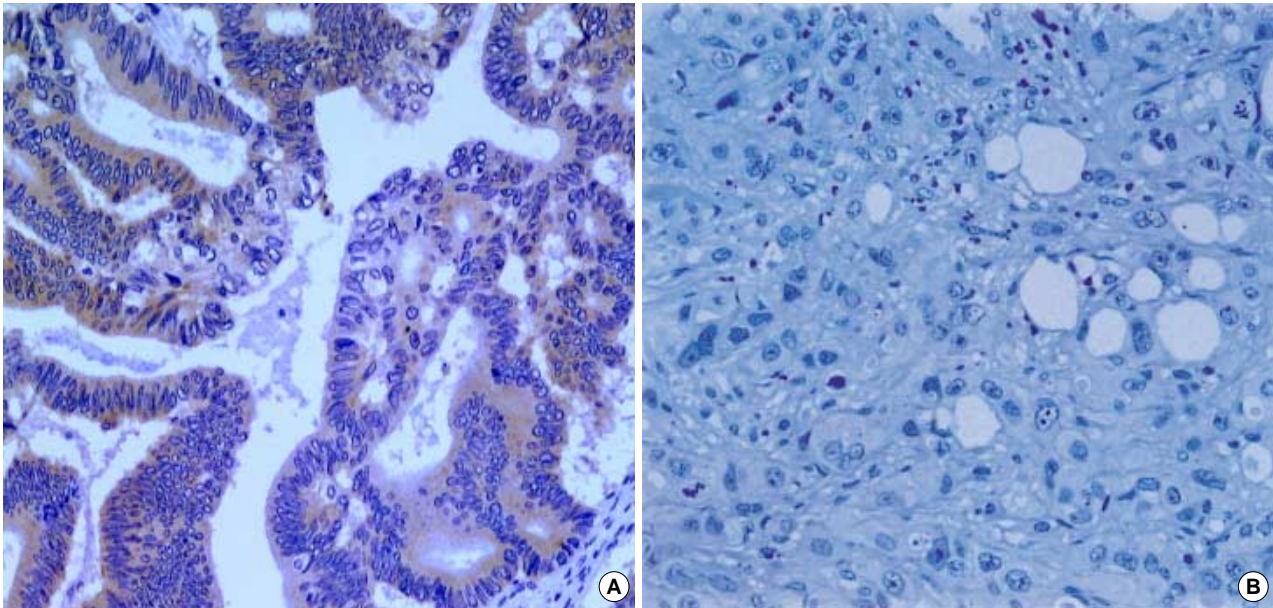


Fig. 3. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 expression is immunohistochemically positive in adenocarcinoma with fungating growth (A) and negative in adenocarcinoma with infiltrative growth (B) of the gallbladder.

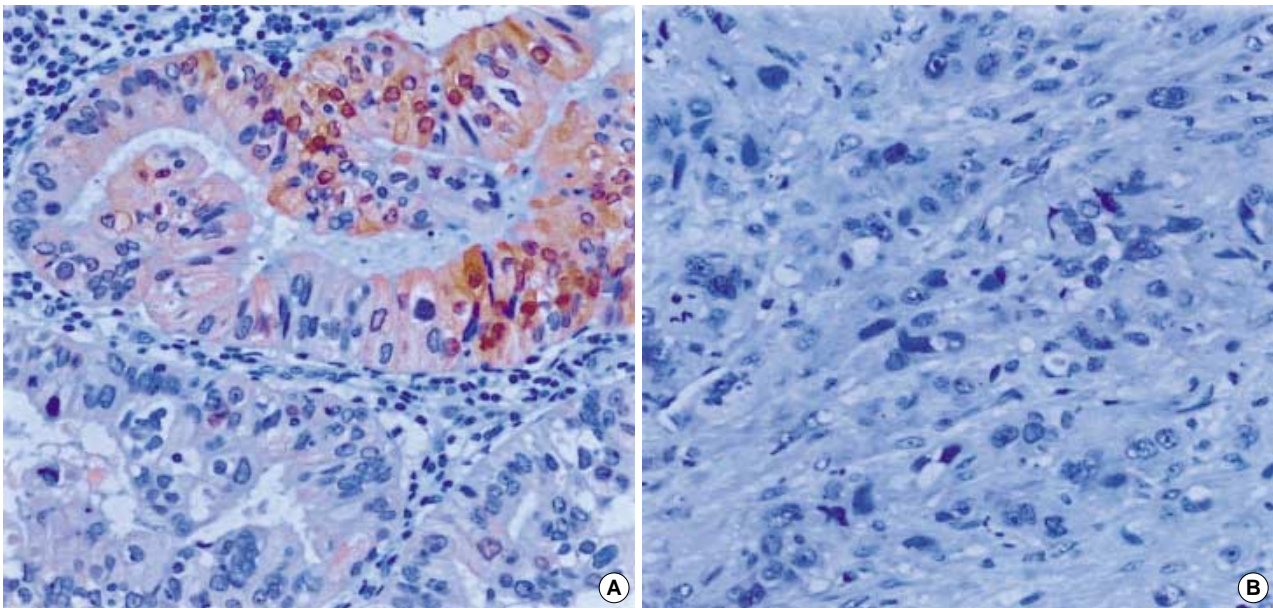


Fig. 4. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 expression is immunohistochemically positive in adenocarcinoma with invasion into the lamina propria (A) and negative in adenocarcinoma with invasion into the perimuscular connective tissue (B) of the gallbladder.

예(50.0%)가 음성, 5예(50.0%)가 양성으로 침윤 초기에 해당하는 부위에서 강 양성을 보였다. 림프절 전이가 없었던 23예 중에는 8예(34.8%)가 음성, 15예(65.2%)가 양성이었다고, 전이가 있었던 18예 중에는 9예(50.0%)가 음성, 9예(50.0%)가 양성으로 림프절 전이가 없었던 예에서 더 발현율이 높았으나 통계적 유의성은 없었다.

#### TIMP-1에 대한 면역조직화학 염색

담낭 샘암종 72예 중에 40예(55.6%)는 음성이었고, 32예(44.4%)는 양성이었다(Fig. 3)(Table 3). 침윤 정도에 따른 발현은 고유 점막층 또는 근층까지 침윤한 예가 20예였는데 그 중 3예(15.0%)는 음성이었고, 17예(85.0%)는 양성이었다. 그 이상 침윤한 예가 52예였으며 그 중 37예(71.2%)는 음성이었고,

**Table 5.** Relationship of MMP-2/TIMP-2 expression in adenocarcinoma of the gallbladder

	MMP-2/TIMP-2 immunoreactivity (%)			
	+/+	+/-	-/+	-/-
Depth of invasion*				
Lp/Pm (n=20)	14 (70.0)	5 (25.0)	1 (5.0)	0 (0.0)
S (n=52)	7 (13.5)	19 (36.5)	2 (3.8)	24 (46.2)
Differentiation*				
Well/Moderate (n=51)	18 (35.3)	21 (41.2)	3 (5.9)	9 (17.6)
Poor (n=21)	3 (14.3)	3 (14.3)	0 (0.0)	15 (71.4)
Growth pattern*				
Fungating (n=18)	13 (72.2)	4 (22.2)	1 (5.6)	0 (0.0)
Infiltrative (n=44)	5 (11.4)	15 (34.1)	0 (0.0)	24 (54.5)
Mixed (n=10)	3 (30.0)	5 (50.0)	2 (20.0)	0 (0.0)
LN metastasis <sup>†</sup>				
Positive (n=18)	4 (22.2)	4 (22.2)	1 (5.6)	9 (50.0)
Negative (n=23)	9 (39.1)	9 (39.1)	1 (4.3)	4 (17.4)
Unidentified LN (n=31)	8 (25.8)	11 (35.5)	1 (3.2)	11 (35.5)

MMP: matrix metalloproteinase, TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinase, Lp: lamina propria, Pm: proper muscle, S: perimuscular connective tissue and beyond serosa, LN: lymph node.

\*: p value < 0.05, †: p value ≥ 0.05.

15예(28.8%)는 양성으로 고유 점막층이나 근층까지 침윤한 예가 그 이상 침윤한 예보다 높은 발현율을 보였다( $p < 0.05$ ). 분화도에 따라 고도 또는 중등도 분화 암종 51예 중에 21예(41.2%)는 음성이었다고, 30예(58.8%)는 양성이었다. 저분화 암종 21예 중 19예(90.5%)는 음성, 2예(9.5%)는 양성으로 분화가 좋은 중앙에서 더 높은 발현율을 보였다( $p < 0.05$ ). 분화가 나쁜 암종에서는 일부 샘 구조의 침윤 전방부를 형성하는 부위에서 주로 양성을 보였다. 성장 양상에 따라 돌출형 18예 중에는 2예(11.1%)가 음성이었다고, 16예(88.9%)는 양성이었다. 침윤형 44예 중에 35예(79.5%)는 음성, 9예(20.5%)는 양성으로 돌출형이 침윤형보다 높은 발현율을 보였다( $p < 0.05$ ). 혼합형 10예 중에는 3예(30.0%)가 음성, 7예(70.0%)가 양성으로 침윤 초기에 해당하는 부위에서 강 양성을 보였다. 림프절 전이가 없었던 23예 중에는 9예(39.1%)가 음성이었다고, 14예(60.9%)는 양성이었다. 전이가 있었던 18예 중에는 12예(66.7%)가 음성, 6예(33.3%)가 양성으로 림프절 전이가 없었던 예에서 더 발현율이 높았으나 통계적 유의성은 없었다.

### TIMP-2에 대한 면역조직화학 염색

담낭 샘암종 72예 중 48예(66.7%)는 음성이었다고, 24예(33.3%)는 양성이었다(Fig. 4)(Table 4). 침윤 정도에 따라, 고유 점막층 또는 근층까지 침윤한 예가 20예였는데 그 중 5예(25.0%)는 음성이었다고, 15예(75.0%)는 양성이었다. 그 이상 침윤한 예는 52예였으며 그 중 43예(82.7%)는 음성이었다고, 9예(17.3%)는 양성으로 고유 점막층이나 근층까지 침윤한 예가

**Table 6.** Relationship of MMP-9/TIMP-1 expression in adenocarcinoma of the gallbladder

	MMP-9/TIMP-1 immunoreactivity (%)			
	+/+	+/-	-/+	-/-
Depth of invasion*				
Lp/Pm (n=20)	16 (80.0)	2 (10.0)	1 (5.0)	1 (5.0)
S (n=52)	12 (23.1)	8 (15.4)	3 (5.8)	29 (55.8)
Differentiation*				
Well/Moderate (n=51)	26 (51.0)	7 (13.7)	4 (7.8)	14 (27.5)
Poor (n=21)	2 (9.5)	3 (14.3)	0 (0.0)	16 (76.2)
Growth pattern*				
Fungating (n=18)	15 (83.3)	2 (11.1)	1 (5.6)	0 (0.0)
Infiltrative (n=44)	8 (18.2)	8 (18.2)	1 (2.3)	27 (61.4)
Mixed (n=10)	5 (50.0)	0 (0.0)	2 (20.0)	3 (30.0)
LN metastasis <sup>†</sup>				
Positive (n=18)	4 (22.2)	5 (27.8)	2 (11.1)	7 (38.9)
Negative (n=23)	13 (56.5)	2 (8.7)	1 (4.3)	7 (30.4)
Unidentified LN (n=31)	11 (35.5)	3 (9.7)	1 (3.2)	16 (51.6)

MMP: matrix metalloproteinase, TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinase, Lp: lamina propria, Pm: proper muscle, S: perimuscular connective tissue and beyond serosa, LN: lymph node.

\*: p value < 0.05, †: p value ≥ 0.05.

그 이상 침윤한 예보다 높은 발현율을 보였다( $p < 0.05$ ). 분화도에 따라 고도 또는 중등도 분화 암종은 51예였는데 30예(58.8%)는 음성이었다고, 21예(41.2%)는 양성이었다. 저분화 암종 21예 중에는 18예(85.7%)가 음성, 3예(14.3%)가 양성으로 분화가 잘된 중앙에서 높은 발현율을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. 분화가 나쁜 암종에서는 일부 샘 구조의 침윤 전방부를 형성하는 부위에서 주로 양성을 보였다. 성장 양상에 따라 돌출형은 18예였으며 4예(22.2%)는 음성이었다고, 14예(77.8%)는 양성이었다. 침윤형은 44예였으며 그 중 39예(88.6%)는 음성이었다고, 5예(11.4%)는 양성으로 돌출형이 침윤형보다 높은 발현율을 보였다( $p < 0.05$ ). 혼합형은 10예였으며 그 중 5예(50.0%)는 음성이었다고, 5예(50.0%)는 양성으로 침윤 초기에 해당하는 부위에서 강 양성을 보였다. 림프절 전이가 없었던 23예 중에는 13예(56.5%)가 음성이었다고, 10예(43.5%)는 양성이었으며, 전이가 있었던 18예 중에는 13예(72.2%)가 음성, 5예(27.8%)가 양성으로 림프절 전이와 TIMP-2의 발현과는 유의한 상관관계가 없었다.

### MMP-2와 TIMP-2의 발현 간의 관계

담낭 샘암종 72예 중에서 MMP-2가 음성인 예는 27예였고, 이 중 24예(88.9%)가 TIMP-2도 음성이었다. MMP-2가 양성인 45예 중 21예(46.7%)가 TIMP-2도 양성으로 이들 두 효소의 발현에 유의한 상관관계를 보였다( $p < 0.05$ ).

두 효소의 발현 양상은 침윤 깊이, 분화도, 성장 양상에서 유의한 차이를 보였다( $p < 0.05$ )(Table 5). 특히 침윤 깊이와 성장

양상은 MMP-2가 양성이고 TIMP-2가 음성인 예에서 두 효소가 모두 양성인 예보다 침윤성 성장이 증가하여, MMP-2와 TIMP-2가 모두 음성인 예에서 근층 이상 침윤한 예와 침윤형의 비율이 가장 높았다. 분화도는 MMP-2가 양성인 예에서 뚜렷이 나빠지는 양상이었다. 림프절 전이는 이들 효소의 발현 양상과 상관관계가 없었다.

### MMP-9과 TIMP-1의 발현 간의 관계

담낭 샘암종 72예 중 MMP-9이 음성인 예는 34예였고, 이 중 30예(88.2%)는 TIMP-1도 음성이었다. MMP-9이 양성인 38예 중 28예(73.7%)가 TIMP-1도 양성으로 이들 두 효소의 발현에 유의한 상관관계를 보였다( $p < 0.05$ ). 담낭 샘암종에서 이 두 효소의 발현 양상은 침윤 깊이, 분화도, 성장 양상과 유의한 차이를 보였다( $p < 0.05$ ) (Table 6). 이들 효소의 발현과 림프절 전이와는 유의한 상관관계가 없었다.

### 고찰

본 연구에서 MMP-2, MMP-9, TIMP-1 및 TIMP-2는 초기 침윤 암종에서 발현이 증가하다가 본격적인 심한 침윤을 보이는 예에서는 다시 발현이 감소하였다. 이러한 소견으로 이들 효소들은 침윤성 암종으로 진행되는 과정에서 초기에 주로 작용할 것으로 추정된다. 조직학적 분화도에 따른 이들 효소들의 발현이 분화가 나쁜 경우에 발현율이 낮은 결과를 보였다. 이는 폐 샘암종<sup>18</sup>에서 MMP-2가, 대장암종<sup>8</sup>에서 MMP-2와 MMP-9이 종양의 분화가 좋은 경우가 나쁜 경우보다 더 강하게 발현되는 것과 같은 결과이다. Sakamoto 등<sup>21</sup>도 간세포암종에서 MMP-9은 분화가 좋은 작은 암종에서 더 강하게 발현되었다고 보고하였다. 또 침윤성 샘암종에서 샘 구조를 잘 형성하지 않는 부위에서는 발현이 거의 안 되었으나, 샘 구조를 형성하는 부위에서는 샘 구조 내에서 침윤 전방부에 해당하는 세포들에서 다시 발현되었다. 이 사실은 이들 효소들이 샘 구조를 형성하지 않고 침윤이 진행되는 과정 중에는 발현이 일시적으로 억제되었다가 새로운 샘 구조의 침윤 전방부를 형성할 때 다시 발현이 증가되는 것으로 이해할 수 있다. 그리고 분화가 나쁜 샘암종에서는 주변 기질로 침윤하는 과정에 MMP-2나 MMP-9 외에 다른 기질분해효소들이 작용할 것으로 기대된다. Brinckerhoff 등<sup>22</sup>의 고찰에 의하면 MMP-2와 MMP-9이 주로 기저막의 파괴에 관여하는 것과는 달리 제 1형 또는 제 3형 아교질을 분해하는 효소인 membrane type 1-MMP (MT1-MMP), MMP-1, MMP-13 등이 일부 상피암종과 간엽 기원 육종에서 침윤 전방부의 종양세포와 기질에서 높게 발현됨을 보고하고 있어 최근 이들 간엽 교원질분해효소에 대한 관심이 고조되고 있다. 림프절 전이와의 관계에 있어서 MMP-2, MMP-9,

TIMP-1이 전이가 없는 군에서 발현율이 높았다. 이 결과는 이들 효소의 발현이 림프절 전이를 억제하기보다는 이들 효소가 림프절 전이가 있기 전 샘암종 진행 초기에 발현되기 때문으로 보는 것이 타당하겠다.

한편 다른 장기의 종양에서 MMPs와 TIMPs에 관한 연구들은 다소 다양한 결과를 보고하였는데, 췌장암종에서는 MMP-2의 mRNA 및 면역조직화학적 발현이 침윤성과 섬유증식과 관계가 있다고 보고되었다.<sup>12</sup> 종양의 병기나 조직학적 분화도와 관련하여 난소 종양에서 진행 암종일수록, 분화가 나쁠수록 MMP-2, MMP-9, TIMP-2의 면역조직화학적 발현율이 높았음이 보고되어 있다.<sup>16</sup> 이행상피 종양에 대해 Nakanishi 등<sup>14</sup>과 Papathoma 등<sup>15</sup>은 각각 MMP-2의 m-RNA 및 면역조직화학적 발현과, MMP-9의 면역조직화학적 발현이 침윤 정도와 조직학적 등급에 비례해서 증가함을 보고하여 본 연구 결과와 상이하였다. 또한 같은 담관계 종양이지만 간내 담도 암종에서 MMPs의 면역조직화학적 발현율이 주위로의 침윤이 심할수록 높았다는<sup>19</sup> 결과와도 달라 담낭암종과 간내 담도암종의 진행에 있어 분자생물학적 과정은 서로 다를 수 있음을 시사한다.

TIMPs는 MMPs에 대한 대항 작용으로 종양진행을 억제하거나 이와 관련된 임상병리학적 지표들과 연관이 있을 것으로 기대되었으나, 여러 장기 종양에서의 연구들에 의하면 더 다양하고 복잡한 결과들이 보고되었다. 간내 담도암종에서 침윤이 심할수록 TIMPs의 면역조직화학적 발현율이 높았고,<sup>19</sup> 간세포암종에서 TIMP-2 mRNA는 조직학적 등급이 높을수록 발현율이 높았다는 보고<sup>23</sup>가 있다. 비소세포성 폐암종에서 TIMP-1와 TIMP-2의 면역조직화학적 발현은 높은 병기일수록 높았다.<sup>18</sup> 췌장암종에서 Gong 등<sup>13</sup>의 연구에 의하면 TIMP-1 mRNA 발현은 피막 침윤과 림프절 전이와 상관관계를 보였으나, Yamamoto 등<sup>24</sup>의 연구에서는 TIMPs의 면역조직화학적 발현은 췌장암종의 임상병리적 지표와는 관계가 없음을 보고하였다. 난소 종양에서 면역조직화학적 및 mRNA 발현에 관한 연구에서 MMP-2, MMP-9, TIMP-2의 과발현과 TIMP-1의 하향 조절이 종양의 진행과 관련되었다.<sup>16</sup>

본 연구에서는 TIMP-1과 TIMP-2의 발현이 각각 MMP-9와 MMP-2의 발현과 대체로 병행하는 결과를 보였는데, 이는 이들 효소들이 작용할 때 상호작용을 하여, 담낭 샘암종의 초기 진행에 관여한다는 사실을 말해준다. MMP-2와 TIMP-2가 같은 종양에서 유사한 정도의 발현을 보이는 것은 증가된 MMPs의 활성을 대항하기 위한 생체의 노력으로도 볼 수 있다.<sup>4</sup> 이 사실은 본 연구의 MMP-2와 TIMP-2의 발현 양상과 병리학적 소견과의 비교 분석에서 MMP-2만 발현되는 군이 MMP-2와 TIMP-2 모두 발현되는 군보다 근층 이상 침윤한 예와 침윤성 성장을 보인 예가 뚜렷이 증가하는 양상을 보여, TIMP-2의 발현이 담낭 샘암종 초기에 MMP-2의 작용을 억제하는 것으로 이해할 수 있다. 그리고 TIMPs의 주된 생물학적 작용은 MMPs를 억제하는 것이지만 단순히 억제하는 기능 외에 활성

화에도 관여한다는 것이 최근 알려졌다. MMP-2가 활성화되는 방법으로는 proMMP-2가 MT1-MMP와 결합하여 N-말단 영역을 분리하는 과정에 TIMP-2가 같이 결합한다는 사실<sup>1,2,4</sup>이 MMP-2와 TIMP-2의 발현이 병행하는 이유에 대한 또 다른 설명이 될 수 있겠다. TIMP-1의 경우는 성장인자와 많은 구조적 동질성을 보여,<sup>4</sup> 최초의 TIMPs가 MMPs의 기질분해 작용을 억제함으로써 종양 진행을 억제할 것이라는 기대와는 달리 최근 종양의 성장과 진행을 촉진하는 작용 등 다양한 기능을 가지고 있음이 밝혀지고 있다.<sup>1,2,4</sup> 그 이외에 각각 효소들의 복잡한 작용과 상호작용이 존재하여 각각 효소들의 절대적인 양보다 서로의 상대적인 양에 의해 생물학적 효과를 나타낸다. 즉 고농도의 TIMP-2는 proMMP-2의 활성화를 억제하며, MMP-9/TIMP-1의 비율이 1보다 크면 MMP-9는 오히려 활성화된다.<sup>2</sup> MMPs와 TIMPs의 효소 활성의 정량적인 차이가 결국 이들 효소의 작용을 반영하므로 효소 활성치에 관한 정량적 비교를 하면 좀 더 정확한 생물학적 효과를 이해할 수 있을 것이다.

결론적으로, 본 연구에서 MMP-2, MMP-9, TIMP-1 및 TIMP-2는 담낭암종의 진행에 있어 침윤성 성장 초기에 주로 작용하며 종양의 분화가 나쁘고 침윤이 아주 심한 종양에서는 더 이상의 침윤에는 별로 관여하지 않음을 알 수 있었다. 그리고 MMP-2와 TIMP-2, MMP-9과 TIMP-1은 서로 상관관계를 가지며 동시에 발현하는 양상을 보여, 이들 효소는 담낭 샘암종의 초기 진행에 각각 독립적으로 작용하기보다는 상호작용이 이루어짐을 알 수 있었다. 특히 TIMP-2는 담낭 샘암종의 초기 진행에 MMP-2의 작용을 억제함을 알 수 있었다. 이들 효소들의 자세한 상호작용 결과를 알기 위해서는 각각 효소와 그 대항 효소의 활성치에 관한 정량적 연구가 더 필요할 것으로 생각한다.

## 참고문헌

- Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *J Pathol* 1999; 189: 300-8.
- Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumor invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1621-30.
- McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today* 2000; 6: 149-56.
- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1135-49.
- Hong SD, Hong SP, Lee JI, Lim CY. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol* 2000; 36: 207-13.
- Ohashi K, Nemoto T, Nakamura K, Nemori R. Increased expression of matrix metalloproteinase 7 and 9 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer* 2000; 88: 2201-9.
- Mori M, Mimori K, Shiraiishi T, *et al.* Analysis of MT1-MMP and MMP2 expression in human gastric cancers. *Int J Cancer* 1997; 74: 316-21.
- Kim TS, Kim YB. Correlation between expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and angiogenesis in colorectal adenocarcinoma. *J Korean Med Sci* 1999; 14: 263-70.
- Zeng ZS, Cohen AM, Guillem JG. Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 1999; 20: 749-55.
- Shirabe K, Shimada M, Kajiyama K, *et al.* Expression of matrix metalloproteinase-9 in surgically resected intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surgery* 1999; 126: 842-6.
- Koshiha T, Hosotani R, Wada M, *et al.* Detection of matrix metalloproteinase activity in human pancreatic cancer. *Surg Today* 1997; 27: 302-4.
- Ellenrieder V, Alber B, Lacher U, *et al.* Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression. *Int J Cancer* 2000; 85: 14-20.
- Gong YL, Xu GM, Huang WD, Chen LB. Expression of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of metalloproteinases and their local invasiveness and metastasis in chinese human pancreatic cancer. *J Surg Oncol* 2000; 73: 95-9.
- Nakanishi K, Kawai T, Sato H, *et al.* Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Hum Pathol* 2000; 31: 193-200.
- Papathoma AS, Petraki C, Grigorakis A, *et al.* Prognostic significance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in bladder cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 2009-14.
- Sakata K, Shigemasa K, Nagai N, Ohama K. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary. *Int J Oncol* 2000; 17: 673-81.
- Schmalfeldt B, Prechtel D, Harting K, *et al.* Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2396-404.
- Thomas P, Khokha R, Shepherd FA, Feld R, Tsao MS. Differential expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in non-small cell lung cancer. *J Pathol* 2000; 190: 150-6.
- Terada T, Okada Y, Nakanuma Y. Expression of immunoreactive



- matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in human normal livers and primary liver tumors. *Hepatology* 1996; 23: 1341-4.
20. Albores-Saavedra J, Henson DE, Sobin LH. The WHO histological classification of tumors of the gallbladder and extrahepatic bile ducts. A commentary on the second edition. *Cancer* 1992; 70: 410-4.
21. Sakamoto Y, Mafune KI, Mori M, *et al.* Overexpression of MMP-9 correlates with growth of small hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2000; 17: 237-43.
22. Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4823-30.
23. Theret N, Musso O, Turlin B, *et al.* Increased extracellular matrix remodeling is associated with tumor progression in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 2001; 34: 82-8.
24. Yamamoto H, Itoh F, Iku S, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human pancreatic adenocarcinomas: clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1118-27.