

유암조직에서 단세포군항체를 이용한 면역세포화학법에 의한 에스트로겐 수용체의 측정*

계명대학교 의과대학 외과학교실

김 인 호 · 손 수 상 · 강 중 신

계명대학교 의과대학 병리학교실

이 상 숙

=Abstract=

An Immunocytochemical Assay of Estrogen Receptor in Breast Cancers Using Monoclonal Antibodies

In Ho Kim, MD; Soo Sang Sohn, MD; Joong Shin Kang, MD

Department of Surgery, Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea

Department of Pathology, Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea

Estrogen receptor(ER) is an unique protein that specifically binds estrogens in tissue that responds to this hormone. In order for tissue to recognize estrogens, it is considered necessary for ER to be present. Receptor assay can be used in prediction of response of hormonal therapy in treatment of breast cancers.

Immunocytochemical assays(ICA) involve localization and staining of ER in tissues or cell preparations using monoclonal antibodies. Frozen sections from 13 human breast carcinomas were examined for the presence and distribution of ER-containing tumor cells using Abbott ER-ICA monoclonal antibodies and immunoperoxidase technique. Estrogen receptor was localized only in the nuclei in breast tumor cells in 6 cases. Several staining patterns were observed. Thus, an immunocytochemical assay for estrogen receptor may provide additional information for identifying hormonally responsive breast cancers.

Key Words : Breast cancer, Estrogen receptor.

서 론

에스트로겐 수용체(ER)는 조직내에 존재하는 에

스토로겐과 결합하는 독특한 단백이다. 즉 조직내에 존재하는 에스트로겐을 인지하려면 에스트로겐에 특수하게 결합하는 수용체가 있어야만 한다¹⁾. 조직 내에서 ER의 존재여부는 유방암이나 자궁내막암 환

* 이 논문은 1988년도 계명대학교 동산의료원 특수과제 연구비와 1990년도 을종연구비 및 조사연구비 보조로 이루어졌다.

자의 치료에서 홀몬 치료에 대한 반응을 미리 예견할 수 있으며 무병기간(disease-free interval)이나 생존 등 환자의 예후를 아는데 도움을 준다고 알려져 있다²⁾.

³⁾. 유방암의 ER측정 방법에는 sucrose density gradient centrifugation⁴⁾, dextran-coated charcoal⁵⁾에 의한 종양조직의 cytosol에서 ER을 측정하는 등 여러 방법이 개발되어 있으나 이들 방법은 일반 병리검사실에는 적합치 않다. Greene 등^{6,7)}에 의해 ER에 대한 monoclonal antibody가 생산됨에 따라 비로서 조직 내에 존재하는 ER을 직접인지하기에 이르렀다. 그리고 최근 연구결과에 의하면 Abbott ER-ICA에 의한 ER의 핵염색 정도와 기타 방법으로 측정된 cytosol의 ER 농도사이에 상당한 correlation이 있음이 인정되고 있다^{8,9)}. 그리고 ER의 단세포군형체를 이용한 면역 조직학적 검색으로는 다른 방법으로는 알 수 없는 ER의 유방암조직내의 분포 및 양을 알 수 있는 장점이 있다¹⁰⁾.

이에 저자들은 1985년부터 1986년까지 계명대학교 의과대학 동산병원에서 채취된 13명의 유방암 환자의 신선한 유방암 생검조직을 대상으로 ER-ICA(Abbott, U.S.A)를 사용하여 immunoperoxidase 법으로 유방 조직내 ER을 발현시켜 그분포양상을 재검색하고 이 결과를 종양의 크기와 조직등급, 종양간질내의 elastosis grade^{11,12)} 임파절의 상태 및 환자의 치료반응 및 예후와 비교분석하여 그 관계에 대해 알아 보고

자한다.

재료 및 방법

1985년부터 1986년까지 계명대학교 의과대학 동산병원에서 유방암으로 유방암절제수술을 받은 13명의 환자를 대상으로 하였다. 환자의 평균 나이는 33세였다. 2명은 재발암이었다.

유방조직은 절제 직후 동결절편으로 악성종양임을 확인하고 조직의 일부를 냉동시켜 -70°C에 사용직전까지 보관하였다.

Cryostat에서 종양조직으로부터 4-6μm의 연속 절편을 얻어 유리슬라이드위에 부착하였다. 그후 3.7% formaldehyde-PBS (phosphatebuffered saline)에 10-15분간 고정하고 PBS에 수세후 immunocytochemical 염색을 실시하였는데 이를 간단히 요약하면 다음과 같다(Fig 1).

유방암조직내 ER의 발현을 위해 Abbott에서 개발된 monoclonal anti ER (rat Ig G)을 1차 항체로 사용하여 30분간 습실내에서 부착하고 이차연결 항체(goose anti-rat Ig)으로 30분간 더 부착하였다. 그후 PAP (peroxidase/anti-peroxidase) complex로 30분 부착후 발색용 수매질용액 (diaminobenzidine, 4HCL)로 발색하고 Harris Hematoxylin으로 대조 염색한 후 광학현미경하에서 암세포내에 핵의 염색된

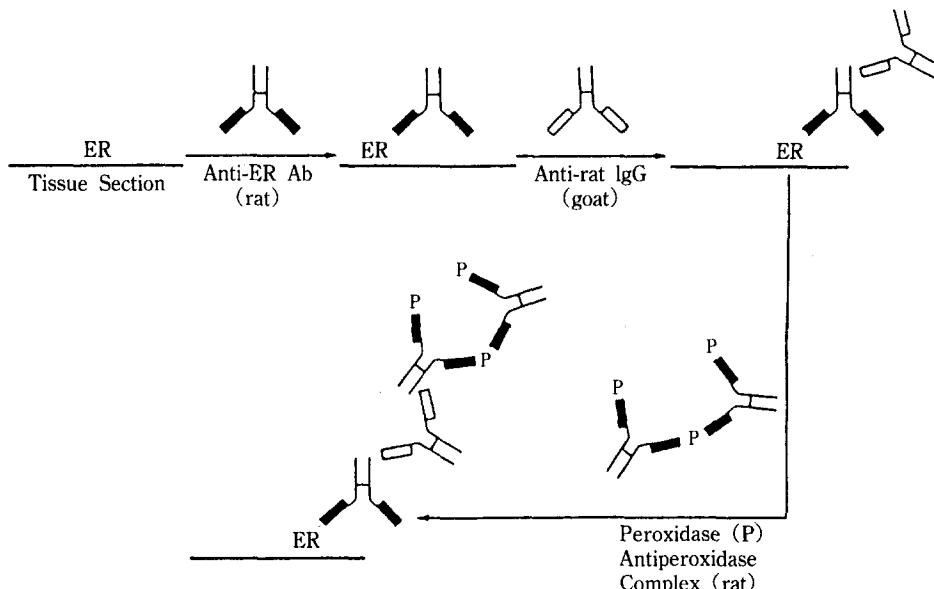


Fig 1. Immunocytochemical procedure for detection of estrogen receptor in frozen sections tissue.

정도를 검정하였다. 발현정도에 따라 아래의 기준에 따라 -, +, ++, +++로 판정하였다. 즉 양성반응을 보인 세포가 없을때 '-'로, 세포 한두개가 산발적으로 양성반응을 보이는 경우는 '+'로, 몇개의 세포들이 모여 집단적인 양성반응을 보일때 '++'로, 그리고 세포의 반수이상이 양성반응을 보일때 '+++'로 판정하였다. 그리고 발현양상에 따라 heterogeneous 또는 focal 여부를 기록하였다. 양성대조는 ABBOTT ER-ICA Monoclonal kit 내에 포함된 ER-positive 세포를 가진 control slide를 이용하였고 음성대조는 1차항원 대신에 control antibody (normal rat antibody) 또는 PBS를 사용하였다.

유방암 조직은 재검색하여 Fisher 등¹³⁾에 의해 기술된 병리조직학적 정의에 의해 재분류하였는데 11예가 infiltrating ductal carcinoma였고 1예가 papillary carcinoma, 1예가 signet ring cell carcinoma였다. Bloom과 Richardson¹⁴⁾에 의한 핵의 다형성 (pleomorphism)과 조직의 분화정도에 따라 종양의 조직등급을 매겼다. 즉 분화가 잘 된 경우 등급 I로, 중정도로 분화된 경우 II로, 미분화되었을때 III으로 하였다. Elastosis의 정도를 알기위해 Verhoeff and van Gieson stain을 실시하여 염색성에 따라 0-3까지 나누었다. 즉 0은 elastic 염색이 전연 안 될때, 1은 염색

성이 경한 경우, 2는 중정도일때, 3은 강한 염색성을 보일때로 하였다. 또한 임파절의 상태를 전이된 임파절의 수에따라 임파절전이가 없을때 I로, 임파절전이가 1-3개 사이일때 II로 4개이상일때 III으로 구분하였다. 통계 처리를 위해 elastosis grade는 편의상 0과 1,2와 3을 함께 구분하였다.

성 적

ER는 유방암의 종양세포의 핵에 갈색으로 염색되었다(Fig 2).

세포질에는 염색되지 않았다. 대부분의 경우 국소적으로 분포하였다. 다만 한예에서 미만성으로 염색되었다.

각 환자의 특성 및 ER의 염색 여부는 도표 1과 같다(Table 1).

총 13예중 6예가 ER에 양성으로 염색되었고 (46%) 7예가 전혀 염색되지 않았다. 총 13예중 2예가 사전에 수술한 후 1년과 3년후에 유방암이 재발된 환자였는데 이 2예가 다 ER이 음성이었다. 환자의 연령과 ER과는 아무런 관계가 발견되지 않았다. 또한 elastosis의 등급과 종양의 분화도와는 통계학상 유의성이 관찰되었다($P<0.0001$).

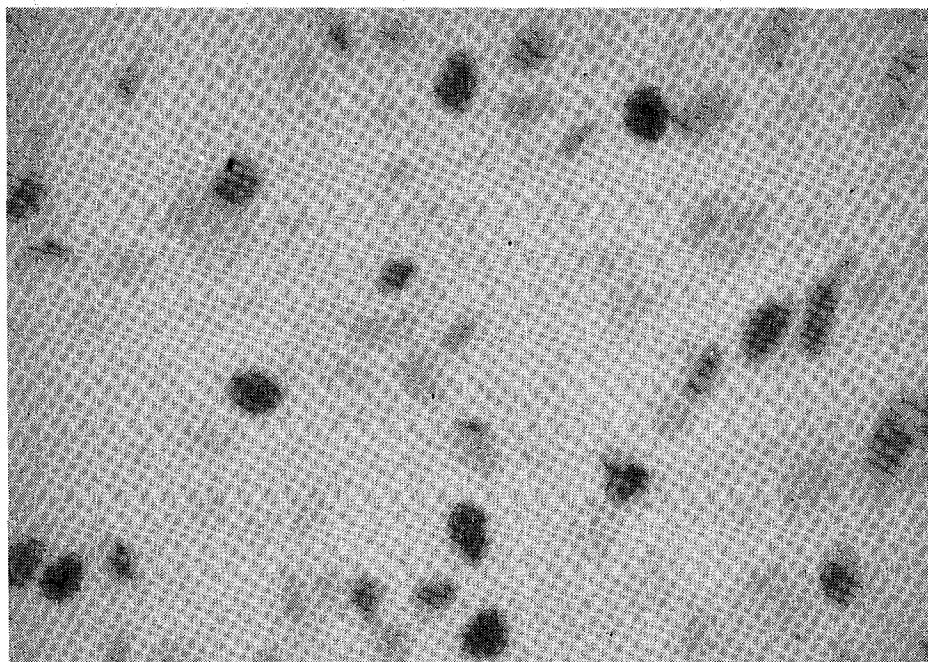


Fig 2. Immunohistochemical staining of a section of human breast cancer for estrogen receptor. ($\times 400$)

Table 1. Patients' characteristics and result of estrogen receptor by immunocytochemical assay

〈ER-positive Cases〉

Case	(LM No.)	Age (PMP)	Tumor status	Tumor size	Histologic Type	Histologic grade	Elastosis grade	LN status
1	S86-1974	30	primary	8.5 cm	DC*	III	1	III
2	S86-4262	36	primary	2.0 cm	Pap. Ca	II	1	II
3	S85-7512	38	primary	4.5 cm	DC	II	2	III
4	S86-2101	41	primary	4.0 cm	DC	III	3	I
5	S85-7761	49(P)	primary	4.5 cm	DC	II	2	II
6	S86-2296	55(P)	primary	3.0 cm	DC	III	2	III

〈ER-negative Cases〉

Case	(LM No.)	Age (PMP)	Tumor status	Tumor size	Histologic Type	Histologic grade	Elastosis grade	LN status
1	S86-4494	32	primary	3.0 cm	DC	II	2	I
2	S86-1229	33	recurrent	5.0 cm	DC**	III	1	III
3	S85-7710	33	primary	3.0 cm	DC	III	2	II
4	S86-219	34	primary	3.0 cm	DC#	II	1	III
5	S86-778	44	primary	3.0 cm	DC	III	1	I
6	S86-4376	46(P)	recurrent	5.5 cm	DC	III	3	III
7	S86-8566	58(P)	primary	5.0 cm	SRC*	III	2	II

DC* : Infiltrating ductal carcinoma; DC** : DC with vascular invasion; DC# : DC with Paget

SRC* : Signet ring cell carcinoma

고 찰

유방암은 서구인에 있어서는 여자에서 발생빈도가 가장 높은 암이나 대한암학회의 보고에 의하면 한국여성의 악성종양 발생빈도에 있어서 자궁경부암, 위암, 유방암의 순위이다¹⁵⁾. 유방암의 내분비 의존성은 잘 알려진 사실이며 1896년 Beaston¹⁶⁾이 2명의 폐경기후 여자에서 절제 불가능한 유방암환자에서 난소적출술후 현저한 증상의 호전을 가져왔다는 보고이래 1950년대에는 Huggins와 Bergenstal¹⁷⁾의 부신적출술 및 Luft와 Olivecrona¹⁸⁾의 뇌하수체 적출술등이 전이유방암에서 시행하여 효과를 보았다는 보고가 있었으며 1960년에는 내분비 요법이 심한 유방암에서 가장 좋은 치료 방법으로 대두 되었으나 그렇게 치료받은 환자의 약 25-30%에서만 효과를 나타내었다.

그래서 어떤 환자에서 내분비 요법이 가장 효과가 있는지 또 어떤 환자에서 다른 치료 방법이 필요한지를 예전하기위해 암조직내에 존재하는 스테로이드 수용체 측정에 관심을 기울이게 되었다. 1961 Folca¹⁹⁾

등이 내분비 요법으로 효과를 본 환자의 암조직이 실험실에서 에스트로겐을 많이 uptake 한다는 것을 알아내었으며 1970년 Jensen²⁰⁻²²⁾이 생체에서 에스트로겐이 유방암 조직에 특이하게 결합한다는 사실과 이런경우 내분비 요법이 효과가 있다는 상관관계를 잘 입증하였으며 그 이후 이를 에스트로겐 수용체는 유방암의 수술후 치료방법의 결정과 그 예후를 예견하는데 있어 매우 중요한 지표로써 유방암 치료에 필수불가결한 요소로 알려져 있다.

유방암의 에스트로겐 수용체 측정에는 서론에서 언급한바와 같이 sucrose density gradient method와 charcoal coated dextran method 등이 있으나 이는 힘이 많이 들며, 시행하는데 특별한 장비와 시약이 필요하므로 일반 병리 검사실에서는 적당치 않다. 최근 이러한 문제점들을 극복하며 단세포군 항체를 이용한 새로운 방법으로 에스트로겐 수용체를 측정하는 방법이 개발되어 상품화되었는데 이것이 면역조직화학 기법이다^{23,24)}.

이것의 장점은 쉽게 시행할 수 있고, 영구적이며 안정성이 있다.

조직절편에서 ER을 인지하는 면역조직화학기법의

개발은 ER단백에 대한 고도의 specificity와 avidity를 가진 monoclonal antibody의 생산에 의하여 이루어졌다²⁷⁾. 이 항체는 estrophilin을 선택적으로 결합한다고 면역화학적으로 특징지워졌다²⁷⁾. 이러한 항체를 면역세포화학기법에 적용함으로서 비로서 조직내에 존재하는 수용체를 확실히 나타내게 되었다²³⁾. 본 연구에서는 Abbott사에서 개발한 ER의 monoclonal antibody (H222)를 사용하였다. 신선한 조직을 동결절편으로 만들어 염색한 결과 단지 핵에서만 ER이 염색되었다. Target cell에 에스트로겐의 작용기전은 Gorski²⁶⁾, Jensen²⁶⁾에 의하면 세포질내의 ER이 에스토로겐과 결합한 후에 점차 활성화되어 핵으로 전위(translocate) 되어 핵에서 ER이 genome에 작용하게 된다.

저자들은 유방암조직에 있는 ER을 사람의 ER에 대한 monoclonal antibody로 면역조직화학적 방법으로 발현하였다. 이 방법은 조직내 ER의 존재를 알려 줄 뿐 아니라 ER target tissue 내의 ER의 위치까지도 알 수 있었다²⁷⁾.

조직내에서 ER의 존재여부는 유방암이나 자궁내막암 환자의 치료에서 홀몬치료에 대한 반응을 미리 예견할 수 있으며 무병 기간 (diseasefree interval)이나 생존 등 환자의 예후를 아는데 도움을 준다고 알려져 있다. Jensen 등²¹⁾의 연구결과에 의하면 ER이 없는 유방암 환자는 내분비 요법에 거의 반응하지 않으나 반면 ER을 갖는 대부분의 유방암 환자는 그러한 치료에 의해 효과를 보인다고 하였다. 이러한 소견은 그후 여러 학자들에 의해서도 확인되었다^{28,29)}. 그리하여 유방암의 치료에 ER의 존재 여부를 아는 것이 적절한 치료를 위한 중요한 지침이 되고 있다³⁰⁾.

본 실험에서 저자들은 Abbott ER-ICA에 의해 유방암 세포내의 핵속에 ER을 발현하였다. 이와 같이 ER의 단세포균항체를 이용한 면역조직화학적 검색으로는 다른 방법으로는 알 수 없는 ER의 유방암조직내의 분포 및 양을 알 수 있는 장점이 있다.

요 약

유방암 환자에서 에스트로겐 수용체의 측정은 환자의 평가와 치료에 중요하다. 많은 방법들이 있으나 그중 지금까지는 생화학적인 방법 즉 dextran coated chalocal 방법 혹은 sucrose density gradient 방법등이 이용되어 왔으나 최근 단세포균 항체를 이용한 에스트로겐 수용체의 측정이 개발되어 이용하기 쉽고

신뢰성이 있으며 기존의 생화학적 상관관계가 있으므로 임상에 널리 이용되고 있으며 이에 본원에서도 시행하여 좋은 결과를 얻었으나 수가 적으므로 계속적으로 시행해야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Stanford JL, Szklo M, Brinton L: Estrogen receptors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1986; 8: 42-59.
- Mc Carty KS, Hiatt KB, Budwit DA, et al: Clinical response to hormone therapy correlated with estrogen receptor analyses. Biochemical v Histochemical methods. *Arch Pathol Lab Med* 1984; 108: 24-26.
- Meredith JT, McBride RC, Cerezo L: Estrogen receptors in breast cancer. *J Florida MA* 1988; 22-28.
- Jensen EV, Smith S, De Sombre ER: Hormone dependency in breast cancer. *J Steroid Biochem* 1976; 7: 911-917.
- Korenman SG, Dukes BA: Specific estrogen binding by the cytoplasm of human breast carcinoma. *J Clin Endocrinol* 1970; 30: 639-645.
- Green GL: Application of immunochemical techniques to the analysis of estrogen receptor structure and function, in Litwack G(ed): *Biochemical Actions of Hormones*. New York, Academic Press, 1984, Vol 2, pp 207-239.
- Greene GL, Nolan C, Engler JP, et al: Monoclonal antibodies to human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 5115-5119.
- King WJ, De Sombre ER, Jensen, et al: A comparison of immunocytochemical and steroid-binding assays for estrogen receptor in human breast tumors. *Cancer Res* 1985; 45: 293-304.
- Mc Carty KS, Miller LS, Cox EB, et al: Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109: 716-721.
- O'Connell MD, Said JW: Estrogen receptors in carcinoma of the breast. A comparison of the dextran-coated charcoal, immunofluorescent, and immunoperoxidase techniques. *AJCP* 1988; 80: 1-5.
- Giri DD, Lonsdale RN, Dangerfield VJM, et al: Clinicopathological significance of intratumoral variations in elastosis grades and the oestrogen

- receptor status of human breast carcinomas. *J Pathol* 1987; 151: 297-303.
12. Glaubitz LC, Bowen JH, Cox EB, et al: Elastosis in human breast cancer. Correlation with sex steroid receptors and comparison with clinical outcome. *Arch Pathol Lab Med* 1984; 108: 27-30.
 13. Fisher ER, Gregorio RM, Fisher B: The pathology of invasive breast cancer: A Syllabus derived from findings of National Surgical Adjuvant Breast Project(Protocol No. 4). *Cancer* 1975; 36: 1-84.
 14. Bloom HJG, Richardson WW: Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1957; 9: 359-377.
 15. Central Cancer Registry: *One Year Report for Cancer Register in the Republic of Korea*, 1985.
 16. Beatson GT: On treatment of inoperable cases of carcinoma of mamma: Suggestions for new method of treatment with illustrated cases. *Lancet* 1986; 2: 404-407.
 17. Huggins C, Bergenstal PM: Inhibition of human mammary and prostatic cancer by adrenalectomy. *Cancer Res* 1952; 12: 134-141.
 18. Luft R, Olivecrona H, Ikkos D, et al: Hypophysectomy in management of metastatic carcinoma of breast, in Currie A (ed): *Endocrine Aspects of Breast Cancer; Proceeding of conference held at University of Glasgow*. Edinburgh, Livingston, 1958, pp 27-35.
 19. Folca PJ, Glascock RF, Irvine WT: studies with tritium labeled hexoestrol in advanced breast cancer. *Lancet* 1961; 11: 796-798.
 20. Jensen EV: Pattern of hormone-receptor interactions, in Griffiths K, Pierrepont CG (eds): *Some Aspects of Aetiology and Biochemistry of Prostatic Cancer*. Cardiff, Alpha omega alpha 1970, pp 151-159.
 21. Jensen EV, Block GE, Smith S, et al: Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy. *Natl Cancer Inst Monogr* 1971; 34: 55-67.
 22. Jensen EV, Desomber ER, Jungleblut PW: Estrogen receptors in hormoneresponsive tissue and tumors, in Wessler RW, Dao TL, Woods S (eds): *Endogenous factors influencing host-tumor balance*, chicago, University of Chicago press 1967; p 15-21.
 23. Press MF, Greene GL: Methods in Laboratory Medicine. An immunocytochemical method for demonstrating estrogen receptor in human uterus using monoclonal antibodies to human estrogenophilin. *Lab Invest* 1984; 408: 480-486.
 24. Press MF, King W, Greene GL: Immunocytochemical localization of estrogen receptors in the human endometrium using a monoclonal antibody against human estrogen receptor (abst). *Fed Proc* 1983; 42: 1178-1179.
 25. Gorski J, Toff D, Shyamata G, et al: Hormone receptors: Studies on the interaction of estrogen with the uterus. *Recent Prog Horm Res* 1968; 24: 45-54.
 26. Jensen EV, Suzuki T, Namuta M, et al: Estrogen-binding substances of target tissues. *Steroids* 1969; 13: 417-428.
 27. King WJ, Greene GL: Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 1984; 307: 745-747.
 28. Engelsman E, Persijn JR, Korsten CB, et al: Oestrogen receptors, in human breast cancer tissue and response to endocrine therapy. *Br Med J* 1973; 2: 750-756.
 29. Maase H, Engel B, Hohmeister H, et al: Estrogen receptors in human breast cancer tissue. *Am J Obstet Gynecol* 1972; 113: 377-380.
 30. Mc Guire WL, Carbone PP, Vollmer EP: *Receptors in Human Breast Cancer*. New York, Raven Press, 1975, pp 151-158.