

위암에서 에스트로겐 수용체에 관한 면역조직화학적 연구

계명대학교 의과대학 의과학교실¹, 병리학교실², 의과학 연구소³

손수상^{1,3} · 장은숙^{2,3} · 류승완¹ · 김인호^{1,3} · 권건영^{2,3} · 강중신^{1,3}

= Abstract =

Immunohistochemical Study of Estrogen Receptor in Human Gastric Cancer

Soo Sang Sohn, M.D.^{1,3}, Eun Sook Chang, M.D.^{2,3}, Seung Wan Ryu, M.D.¹,
In Ho Kim, M.D.^{1,3}, Kun Young Kwon, M.D.^{2,3} and Joong Shin Kang, M.D.^{1,3}

*Departments of Surgery,¹ Pathology² and Institute for Medical Science³,
Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea*

Background/Aims: In gastric cancer, the presence of estrogen receptor(ER) with variable percentages of positivity using different detection methods has been reported by several groups. The application of different detection methods may account for the difference in percentage of positivity. Although the presence of ER in gastric cancer has been demonstrated, their biologic and clinical significance in this cancer remain controversial. The aim of this study is to demonstrate ER immunohistochemically in routinely processed specimens. **Methods:** We studied ER in sixty cases of primary gastric carcinomas, 43 men(age ranged 34yrs-77yrs) and 17 women(24yrs-71yrs). They were operated for gastric carcinoma between 1990~1992. Immunohistochemical study for ER was carried out using an avidin-biotin technique with monoclonal ER1D5 antibody(Immunotech, France) on routinely formalin fixed and paraffin-embedded gastric cancer tissue of representative sections selected from gastrectomy specimen and also using same method with monoclonal antibody, NCL-ER-LH2(Novocastra, UK) on endoscopic biopsied tissue sections of 35 cases. **Results:** Our results showed no detectable ER in both gastrectomy and biopsy specimens, while in breast carcinoma for positive control revealed positive reaction. **Conclusions:** Even though the number of studied cases were not large enough but the following points support the our results; 1) in gastric cancer no ER is expressed comparing with those classic estrogen dependent tumor. 2) our result is proved not due to delayed fixation artefact or defect of monoclonal antibody. Therefore, we think that the reliability of our immunohistochemical technique and its result are insured. (Korean J Gastroenterol 1997; 30:173 - 178)

Key Words: Gastric cancer, Estrogen receptor, Immunohistochemical study.

접수: 1996년 12월 19일, 승인: 1997년 7월 7일

연락처: 손수상, 대구광역시 중구 동산동 194, 계명대학교 의과대학 의과학교실

* 본 논문은 계명대학교 의과대학 연구소 특수과제연구비(1994)로 이루어졌음

서 론

유방,^{1,2} 자궁내막³ 등 성호르몬 반응 장기들의 암은 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER)를 발현함이 잘 알려져 있으며, 이런 암들에서 내분비 요법을 시도하기 위해 성호르몬 수용체를 측정하는 것이 임상적으로 중요시 되고 있다. 위암에서도 tamoxifen으로 호르몬 치료를 시도한 논문들이 있으나 그 효과에 대해서는 보고들이 서로 상반되는 점이 있어 반박의 여지가 있다.^{4,5} 위암의 ER에 대해서 여러 저자군들이 그 검색 방법에 따라 다양한 비율의 ER 양성 위암을 보고 하였다.^{6,7} 동양권에서 나온 대부분의 논문들은 생화학적 방법들을 사용하여 비슷한 결과의 ER 양성 위암을 보고했으나^{4,6-11} 유럽 연구진들에 의해서 보고된 결과는 현저하게 상반적이다. 즉 위암에서 ER을 발견한 대부분의 연구는 생화학적 방법으로 실시한데 반해서 최근에 면역조직화학적 방법으로 시행한 소수의 연구에서는 음성 결과를 얻었다¹²⁻¹⁴고 하였다.

이상의 차이점을 중시하여 저자들은 단클론 ER 항체를 사용한 면역조직화학적 방법으로 우선 위암세포의 ER의 존재를 검사하고 나가서 이와 Lauren 분류¹⁵와의 관계를 알아보기로 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대상

1990년 11월에서 1992년 12월 사이에 계명대학교 동산병원에서 위암으로 확진되어 위절제 수술을 받은 환자 60명의 수술 후 절제 조직 60예와 이들의 수술전 생검 조직에서 검사에 적합한 35예를 검사 대상으로 하였다.

2. 방법

1) 항체

위절제 조직은 clone 1D5인 ER 단클론 항체; 1:100(Immunotech, France)을, 위내시경 생검 조직은 clone CC4-5인 ER 단클론 항체 NCL-ER-LH2; 1:100(Novocastra, UK)를 항체로 사용하였다.

2) 면역조직화학적 방법

파라핀으로 포매된 조직을 5μm 두께로 박절한 조직절편을 접착제 APES(Sigma A3648)를 바른 유리 슬라이드에 떠서 xylene과 알코올로 처리하고 중류수로 힘수시킨 뒤 내재성 파산화수소의 활성을 제거하기 위해 3% 파산화수소에 10분간 처리한 후 10 mM citrate buffer(pH 6.0)로 microwave에 10분간 끓인 다음 20분간 식혔다가 PBS로 5분씩 3번 세척하였다.¹⁶ 일차항체인 ER를 PBS로 100배 희석하여 습실(humidity chamber)내의 각각의 조직절편에 가하여 60분간 반응시켰다. 다시 PBS로 5분간 3회 세척하고 biotin이 표지된 이차항체를 조직 위에 놓고 실온에서 10분간 둔 다음 PBS로 3번 세척하고 다음 avidin-biotin 효소 복합체를 조직에 가하여 실온에서 10분간 반응시켰다. PBS로 3회 세척하고 DAB로 5~10분간 반응시켜 발색한 다음 물로 세척한 다음 광학현미경으로 관찰하였다. 양성 대조군으로 ER 양성이 유방암 조직을 사용하였다.

결 과

1. 성별 및 연령별 빈도 분포

관찰대상 60예중 남자가 41예(68.33%), 여자는 19 예(31.66%)로서 전체 남녀의 성비는 2.2:1로 남자에 많은 것으로 나타났다. 연령분포는 24~77세로서 중앙치는 57세였고 호발연령은 남자는 50대, 여자는 60대였다(Table 1).

Table 1. Distribution of Age and Sex in Gastric Carcinoma

Age	Male	Female	Total
	Intes /Diffu	Intes/Diffu	
20~29	0 (0/0)	1 (1/0)	1
30~39	2 (2/0)	2 (1/1)	4
40~49	8 (6/2)	0 (0/0)	8
50~59	14 (11/3)	5 (3/2)	19
60~69	13 (11/2)	7 (6/1)	20
70~79	6 (4/2)	2 (1/1)	8
Total	43 (34/9)	17 (12/5)	60

*Intes: Intestinal type gastric carcinoma

**Diffu: Diffuse type gastric carcinoma

2. 병리조직학적 소견

절제된 위암은 Lauren 분류법에 따르면 60예의 위암 중 46예가 장형(intestinal type), 14예가 미만형(diffuse type)이었다(Table 2). 위암 인접 점막에는 모든 예에서 염증소견이 있었고 대다수인 55/60 (91.7%)에서 림프여포 형성이 있었고 다양한 정도의 불완전형 장형화생이 있었으며, 이중 26/60(43.3%)은 순수히 불완전형 장형화생만이 있었고 29/60 (48.3%)는 불완전형에 완전형 장형화생이 초점성 내지 국소성으로 암과 직접 인접한 부위에서 조금 떨어져서 혼재해 있었다. 나머지 5/60(8.3%)만이 장형

Table 2. Lauren's Classification and ER Positivity

Type	ER positivity(%)
Intestinal type (n=46)	0
Diffuse type (n=14)	0

화생 없이 염증소견만 보였다.

3. ER에 대한 면역조직화학적 반응

Clone 1D5 단클론 ER 항체와 clone CC4-5 단클론 ER 항체로 검색한 결과 대조군인 유방 관상암세포에서는 뚜렷이 진한 갈색으로 핵이 양성으로 염색되었으나 위암의 모든 예에서 양성 반응이 없었다(Fig. 1).

고 칠

스테로이드 호르몬인 에스트로겐이나 프로제스테론은 표적 조직내의 핵 수용체들과 상호작용하며 호르몬수용체 복합체는 DNA와 결합하여 유전자 발현을 조절한다.¹⁷ 위조직내에서 성호르몬의 기능은 아직 명확치 않으며 성호르몬 자극에서부터 생물학적 반응에 이르는 과정 또한 아직 충분히 이해되지

Fig. 1. Immunohistochemical stain for ER. A: Gastric carcinoma. Positive staining for ER was not observed in any of the 60 gastric carcinoma. B: Breast ductal carcinoma for positive control. Positive staining for ER in the nuclei of cancer cells($\times 200$).

못하고 있는 실정이다. 위암세포들에서 면역반응하는 에스트라디올(estriadiol, E2)이 무엇을 의미하는지를 알아보기 위한 기존의 E2의 면역조직화학적 연구들은 E2 면역반응이 수용체 결합 E2를 의미한다고 주장하였다.¹⁸ 그리고 보고들에 의하면 약간의 위암에서 ER이 존재함은 종양세포에서 합성되었을 결합단백의 발생에 의한 것일 수 있고,¹⁹ 또 비표적 조직 종양에서 스테로이드 결합 단백의 존재는 스테로이드 수용체와 관계가 없다고 보며,¹⁹ 근래에 와서 에스트로겐은 위암세포 성장에 자극 혹은 억제적 영향을 미칠 수 있다는 상충된 결과를 인체 및 동물 실험연구를 통하여 보고하였다.²⁰ 모든 기존의 보고들이 위암세포의 세포질내 E2에 대해 양성 염색을 보여 주었으나 그것은 위암에서 면역 반응하는 E2가 수용체 결합형이 아닐 수도 있다. 왜냐하면 ER은 생화학적으로나 면역조직화학적으로 혹은 둘다의 방법으로 많은 조직의 핵 안에 존재한다고 보고되었기 때문이다.²¹⁻²³ Saitoh 등²⁴은 면역전자현미경상 E2는 활면소포체(SER)의 막과 수조(cisterna)를 따라 위치하고 있음을 밝혔고 또 E2의 면역 반응을 보인 증례를 포함한 위암 30예에서 어느 하나도 ER에 대해 면역 반응을 보이지 않았음을 보고한 바 있다. 이것은 위암 세포들이 ER을 안 가지고 있거나 검증 안되는 ER을 가지고 있음을 증명한 것이다. 따라서 보고된 E2에 대한 면역반응은 수용체와 E2와의 결합을 의미하지 않는다. 그리고 위암의 연속절편에서 검색하여 aromatase(P-450 arom)에 양성인 위암세포들에서 E2도 양성인 것으로 보아 P-450 arom 양성 위암세포에서 E2가 생성된다는 가능성이 입증되었고 위암에서 기존의 이미 보고된 면역반응성 E2는 수용체 결합형이 아닌 것임을 의미한다고 하였다.

지난 10년간 여러 연구진들이 위암이 흐르몬 수용체를 함유하고 있을 가능성에 대해서 관심을 가져왔다. 그래서 공격적인 종양을 위한 새로운 치료의 가능성을 나타내었다. 그러나 보고된 자료들은 대단히 모순되는 점이 많다. 많은 연구자들이 위암에서 흐르몬 수용체를 검색하는데 성공하였고 ER 양성 비율이 연구자들에 따라서 15%에서 66%의 범위로서 매우 다양한 결과를 나타내었다.^{6-11,19,23} 최근 5년간 4 연구군에 의해 위암에서 에스트로겐 수용체가 발

견되지 않았다는 논문들이 발표되었는데 이들 중 한 연구군이 동양에서,²⁴ 세 연구군이 서양에서^{12,14,25} 발표되었다. 저자들도 면역조직화학적 방법을 사용하여 위암환자 60명에서 절제 위암조직과 이들 환자들 중에서 35명의 환자의 내시경 생검조직을 검사하여 모두에서 ER이 전혀 발현되지 않았다. 양성 대조군인 유방암에서는 암세포의 핵에 뚜렷하게 갈색 염색되는 양성반응을 보였다. 그리하여 동양에서 Saitoh 등²⁴에 이어 ER 음성 위암을 두 번째로 보고하게 된 셈이 된다.

위절제 조직의 고정 과정에서 혹시나 조직의 크기가 커서 포르말린 침투 시간이 다소 걸리는 것을 감안하여 생검 직후 고정되는 생검 조직도 35예에서 절제 위조직과 같이 추가로 두 회사의 ER 항체를 각각 사용하여 중복 검사를 실시하였는데 양성 대조군은 모두 염색되었으나 위암에서는 모두 음성으로 반응하였다. 저자들이 조사한 바로는 위암 조직에서 anti-ER1D5와 NCL-ER-LH2을 각각 사용하여 면역조직화학적 방법으로 ER 검색을 시도한 것은 이 연구가 처음이라고 믿는다. 또 최근 ER 음성 위암의 보고들은 검사한 위암 증례수가 25예에서 50예인데 비해 본 연구는 60예로서 그 증례수가 가장 많다.

Chaubert 등¹⁴은 ERD5(ER과 관계 있는 비호르몬 성 결합 단백질)와 ER에 대한 양성 반응이 항상 일치하지 않으므로 ERD5를 ER의 항체 대신 사용할 수 없다고 하였으며 위암에서 ERD5의 기능 및 조절 기전에 대해서는 아직 확실히 알려져 있지 않다.²⁶⁻²⁸ 이 연구에서 검사한 위암 조직이 성별 상관 없이 모두 ER 음성으로 판정됨에 따라 최초 시도하였던 Lauren 분류법에 의한 형이나 그의 인접 점막의 염증 소견과도 아무런 상관 관계를 추리할 수 없었다. 원발성 위암에 ER 발현이 없다는 것을 밝히는 것은 임상적으로 ER 양성 유방암,^{29,30} 특히 소엽암종 또는 난소암³¹ 같은 종양이 위에 전이된 경우 감별 진단에 ER 발현이 도움을 줄 수 있다고 본다.

결론적으로 위암조직에서 면역조직화학적 방법으로는 ER이 검색되지 않았으며 이는 조직의 고정의 자연이나 단클론 ER 항체의 결합에 의한 위음성(false negative)은 아니라는 것을 확인할 수 있었다.

요 약

목적: 위암에서 에스트로겐 수용체(ER)의 양성을 은 보고에 따라 다양한데 이는 사용한 검색 방법이 다르기 때문이기도 하다. 위암에서 ER의 생물학적 및 임상적 의의에 대해서는 논쟁의 여지가 있다. 본 연구에서 저자들은 면역조직화학적 방법으로 통상적인 조직검사 과정으로 만들어진 파라핀 포매조직에서 ER을 검색하고자 했다. **대상 및 방법:** 1990년 11월~1992년 12월 사이에 시행한 위절제 조직 중 조직 보존 상태가 좋은 위암 절제 조직 60예와 생검을 시행한 35예의 위암을 대상으로하여 파라핀 포매 조직에서 clone 1D5인 ER 단클론 항체(Immunotech, France)와 clone CC4-5인 ER 단클론(Novocastra, UK)을 각각 사용하여 양성대조군인 유방암과 같이 면역조직화학적 염색을 시행하였다. **결과:** 대조군이 뚜렷한 양성 반응을 보인 반면 위암조직은 모두 음성을 보여 위암조직에는 ER이 존재하지 않음을 알 수 있었다. **결론:** 위암조직에서 면역조직화학적 방법으로는 ER이 검색되지 않았으며 이는 조직의 고정지연이나 단 클론 ER 항체의 결합에 의한 위음성을 배제할 수 있었다.

색인단어: 위암, 에스트로겐 수용체, 면역조직화학적 염색

참 고 문 헌

- 장은숙, 박관규. 유방암에서 호르몬 수용체, PCNA, AgNOR 및 조직학적 소견간의 비교 연구. 대한병리학회지 1993;27:605-617.
- Helzlsouer KJ, Couzi R. Hormones and breast cancer. Cancer 1995;76:2059-2063.
- 장은숙, 박관규. 자궁내막선암의 에스트로겐 수용체의 면역조직학적 분석. 계명의대논문집 1992;11:121-130.
- Harrison JD, Morris DL, Ellis IO, Jones JA, Jackson I. The effect of tamoxifen and estrogen receptor status on survival in gastric carcinoma. Cancer 1989;64:1007-1010.
- Harrison JD, Watson S, Morris DL. The effect of sex hormones and tamoxifen on the growth of human gastric and colorectal cancer cell lines. Cancer 1989;63: 2148-2151.
- Kojima O, Takahashi T, Kawakami S, Uehara Y, Matsui M. Localization of estrogen receptors in gastric cancer using immunohistochemical staining of monoclonal antibody. Cancer 1991;67:2401-2406.
- Matsui M, Kojima O, Uehara Y, Takahashi T. Characterization of estrogen receptor in human gastric cancer. Cancer 1991;68:305-308.
- Wu CW, Tsay SH, Chang TJ, et al. Clinicopathologic comparisons between estrogen receptor-positive and negative gastric cancers. J Surg Oncol 1992;51: 231-235.
- Wu CW, Chi CW, Chang TJ, Lui WY, Peng FK. Sex hormone receptors in gastric cancer. Cancer 1990;65:1396-1400.
- Tokunaga A, Nishi K, Matsukura N, et al. Estrogen and progesterone receptors in gastric cancer. Cancer 1986;57:1376-1379.
- Yokozaki H, Takekura N, Takanashi A, et al. Estrogen receptors in gastric adenocarcinoma: A retrospective immunohistochemical analysis. Virchows Arch A Pathol Anat Histol 1988;413:297-302.
- Linsalata M, Messa C, Russo F, Cavallini A, Di Leo A. Estrogen receptors and polyamine levels in human gastric carcinoma. Scand J Gastroenterol 1994;29:67-70.
- Johansson J, Thulin L, Ferno M, Andren-Sandberg A. Estrogen receptors in gastric cancer. Acta Oncol 1991;30:870-872.
- Chaubert P, Bouzourene H, Saraga E. Estrogen and progesterone receptors and pS2 and ERD5 antigens in gastric carcinomas from the european population. Mod Pathol 1996;9:189-193.
- Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal type carcinoma. Acta Pathol Microbiol Scand 1965;64: 31-49.

16. Shi SR, Key ME, Karla KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating on tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991;39:741-748.
17. Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley BW. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr Rev* 1990;11:201-220.
18. Nishi K, Tokunaga A, Shimizu Y, et al. Immunohistochemical study of intracellular estradiol in human gastric cancer. *Cancer* 1987;59:1328-1332.
19. Sica V, Nola E, Contieri E, et al. Estradiol and progesterone receptors in malignant gastrointestinal tumors. *Cancer Res* 1984;44:4670-4674.
20. Wu CW, Chang HM, Kao HL, et al. The nontransformed progesterone and estrogen receptors in gastric cancer. *Gastroenterology* 1992;102:1639-1646.
21. Charpin C, Martin PM, Jacquemier J, Lavaut MN, Pourreau-schneider N, Toga M. Estrogen receptor immunocytochemical assay(ER-ICA): Computerized image analysis system, immunolectron microscopy, and comparisons with estradiol binding assay in 115 breast carcinomas. *Cancer Res* 1986;46:4271-4277.
22. Greene GI, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 1986;231:1150-1154.
23. King WJ, Greene GL. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 1984;307:745-747.
24. Saitoh Y, Sasano H, Naganuma H, et al. De novo expression of aromatase in gastric carcinoma. *Pathol Res Pract* 1992;188:53-60.
25. Cameron B, Butler JA, Rutgers J, Vargas HI, Purtell M, Sheppard B. Immunohistochemical determination of the estrogen receptor content of gastrointestinal adenocarcinomas. *Am Surg* 1992;58:758-760.
26. Harrison JD, Jones JA, Ellis IO, Morris DL. Oestrogen receptor D5 antibody is an independent negative prognostic factor in gastric cancer. *Br J Surg* 1991;78:334-336.
27. Hurlimann J, Gebhard S, Gomez F. Oestrogen receptor, progesterone receptor, pS2 ERD5 HSP27, and cathepsin D in invasive ductal breast carcinomas. *Histopathology* 1993;23:239-248.
28. Smith CM, Benn DE, Reeve TS. Comparison of an estrogen related protein, the ERD5 antigen, with estrogen and progesterone receptors in breast cancer patients. *Pathology* 1987;19:219-222.
29. Battifora H. Metastatic breast carcinoma to the stomach simulating limitis plastica. *Appl Immunohistochem* 1994;2:225-228.
30. Deamant FD, Pombo MT, Battifora H. Estrogen receptor immunohistochemistry as a predictor of site of origin in metastatic breast cancer. *Appl Immunohistochem* 1993;1:188-192.
31. Ming SC. Tumor of the esophagus and stomach. In atlas of tumor pathology, 2nd series, fascicle 7. Washington, DC, Armed Forces of Pathology 1973; 253-255.