대한병리학회지 : 제23권 제 1 호 1989
Kor. J. Path., Vol. 23(1) : 85 - 93

유방의 양성 및 악성병변의 *ras* Oncogene 표현에 관한 연구

전남대학교 의과대학 병리학교실

남종희 · 이종현 · 박창수 · 조규혁

서 론

세포의 변형을 초래한다고 알려져 있는 암유전자(oncogene)는 영양아 세포와 같이 증식이 활발한 세포에서도 표현(expression) 되지만[1~4] 인체 고형종 암세포에서도 흔히 표현된다고 하여 암표지자의 가능성이 제시되었다[5,6].

이러한 암유전자는 체세포의 변이를 유발하여 세포내에 암유전자 산물(oncogene product)을 형성하게 되는데[7~10] 연구자들은 암세포 추출물에서 blot technique을 이용하여 암유전자 산물을 측정한 결과 정상세포에 비하여 증가됨을 보고하여 암유전자 산물은 암 표지자이며 암유전자 산물의 증가와 발암현상과의 관련성을 추측하였다[5,11].

최근에는 면역조직화학적인 방법으로 암세포내 유전자산물의 증명이 가능하게 됨에 따라 인체 고형종 특히 방광암이나 대장암등을 대상으로 전암병변 및 악성병변 등의 발현 양상을 관찰하여 악성전환과의 상관성을 규명하려는 연구 보고들이 있다[12~14]. 그러나 이러한 보고들은 학자들에 따라 그 결과가 다양하며 아직 까지 확실하게 규명되지 않고 있다.

이에 저자는 유방 질환에서 악성전환 및 악성도와 암유전자산물의 세포내 출현과의 상관성을 규명할 목적으로 유방의 양성 및 악성 병변을 대상으로 하여 세포성 암유전자 *ras* 산물을 면역조직화학적으로 검색하였다.

재료 및 방법

본 실험에서 이용한 유방질환은 46예로서, 섬유선종 5예, 섬유낭종증 5예, 관내상피암종 4예, 점액성 유선암종 2예, 침윤성 관상피암종 10예, 임파절에 전이된 침윤성 관상피암종 10예, 침윤성 관상피암종의 주변부 조직 10예이다.

1. 병리 조직학적 분류

섬유낭종증은 관확장형, 상피세포증식형, 선증식형 등으로 구분하였으며, 섬유선종에서는 상피세포의 증식이 현저한 예와 상피세포가 위축된 예를, 침윤성 관상피암종은 주위에 비교적 잘 유지된 유소엽이 관찰되는 예를 대상으로 하여 이의 피라핀 조직 절편을 면역조직화학적 염색에 이용하였다.

2. 면역조직화학적 염색

Biotin과 avidin 사이의 강한 결합력을 이용한 biotin-avidin system (BAS)에 의한 immunoperoxidase 염색법으로 암유전자 *ras* 산물을 염색하였다. 각 파라핀 포매괴에서 약 3 μm 두께의 조직절편을 만들어 xylene과 alcohol을 거쳐 증류수로 함수시켰고 1% periodic acid 수용액으로 15분간 처치하여 조직내의 내재성 peroxidase를 억제시켰으며 PBS (phosphate buffered saline, 10 mM, pH 7.6)로 세척하였다. 일차 및 이차 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위하여 조직을 산양 혈청에 20분간 작용시킨 후 human Ha-ras 합성 펩타이드에 대한 sheep anti-human ras IgG (Oncor)를 16시간 도포하였고 PBS로 세척하였다. 산양의 biotinylated anti-sheep IgG (Vector)를 link antibody로 하여 avidin DH-biotinylated horseradish peroxidase H complex (ABC, Vector)를 작용시킨 후 peroxidase의 기질액인 hydrogen peroxide와 발색제인 DAB (diaminobenzidine 4HCl, Sigma)를 첨가하였다. Hematoxylin 대조염색 후 통상적인 방법대로 탈수 과정을 거쳐 Canada balsam으로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다. 염색 때마다 일차항체 대신 PBS

본 논문의 요지는 1987년 5월 22일 대한병리학회 제12차 춘계학술대회에서 발표되었음

만을 도포시킨 표본을 음성 대조용으로, *ras* 산물 양성 암세포가 확인된 유방암 조직 표본을 양성대조용으로 하였다.

3. 암 유전자 *ras*산물 양성 세포율의 산정

세포성 암 유전자 *ras* 산물에 대한 면역조직화학적 염색을 시행한 조직 표본을 현미경으로 검경하여 실질세포 500개 중 출현하는 양성세포 수의 비를 산출하여 이를 양성 세포율(%)로 하였다.

성 적

1. 면역조직화학적 염색 성적

음성 대조군으로 이용한 정상 유방조직은 음성반응을 보였다. 섬유선종은 관상피세포가 1층 내지 2층 이상으로 구성되어 있었는데 *ras* 산물 양성세포는 상피세포의 층이 증가되어 있는 부위에서 더 많이 관찰되었지만 양성반응의 정도는 약하게 관찰되었다(Fig. 1)

섬유낭종증은 관확장형의 경우 상피세포가 위축되었고 *ras* 산물에 대한 반응은 음성반응을 보였으며 관내상피세포 증식형에서는 *ras* 산물 양성세포들이 관찰되었고 부분적으로 이러한 양성세포가 군집되기도 하였으며 근상피세포는 음성반응을 보였으며 양성 반응의 정도는 약하게 관찰되었다(Fig. 2).

침윤성 병변이 관찰되지 않는 관내상피암종에서는 암소의 구성 세포의 일부에서 양성반응을 보여주었으며 반응의 정도는 섬유낭종증에서와 같이 약한 양성반응을 보였다(Fig. 3).

정액성 유선암종은 암소가 점액질 사이에 위치하여 있었는데 암세포들은 거의 모두가 강한 양성 반응을 나타냈으며 양성반응은 세포질 뿐만 아니라 세포막에서도 관찰되었다(Fig. 4).

침윤성 관상피암종에서는 암소를 구성하는 대부분의 세포가 강한 양성반응을 보였으며 *ras* 산물 양성세포들은 군집을 형성하였다(Fig. 5). 한편 임파절에 전이된 침윤성 관상피 암소에서는 원발소에 비하여 더 강하고 균일한 양성반응을 나타냈으며 양성반응의 정도는 세포질에 비하여 세포막에서 더 강하게 관찰되었다(Fig. 6).

침윤성 관상피암종 실질의 주변부에 위치하는 비교적 정상적인 구조의 유소엽은 조직이나 섬유낭종증에서의 발현 정도와는 다르게 강한 양성반응을 보였다(Fig. 7, 8).

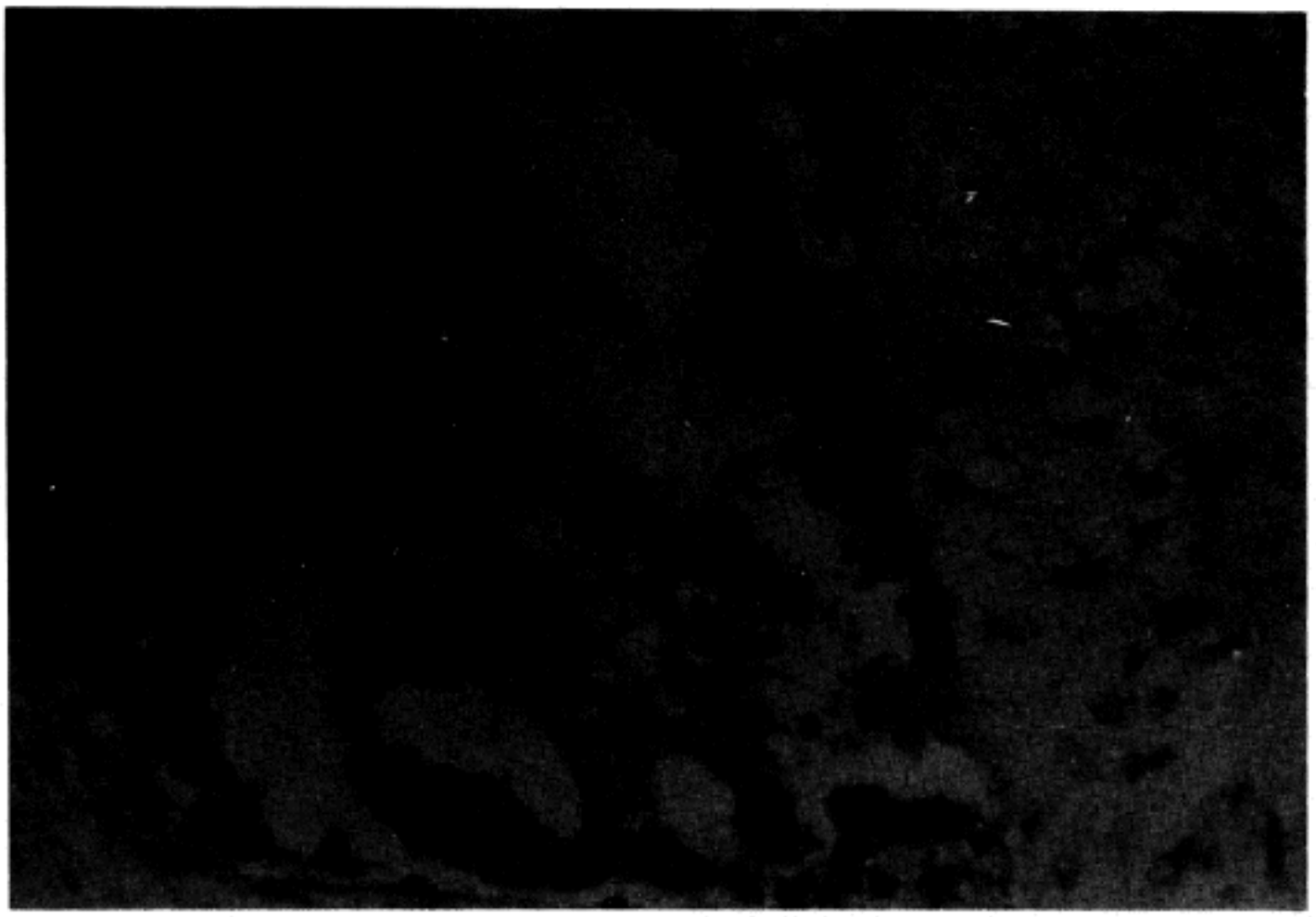

Fig. 1. Fibroadenoma, weakly positive to ras oncogene product. Immunohistochemical stain (x200).

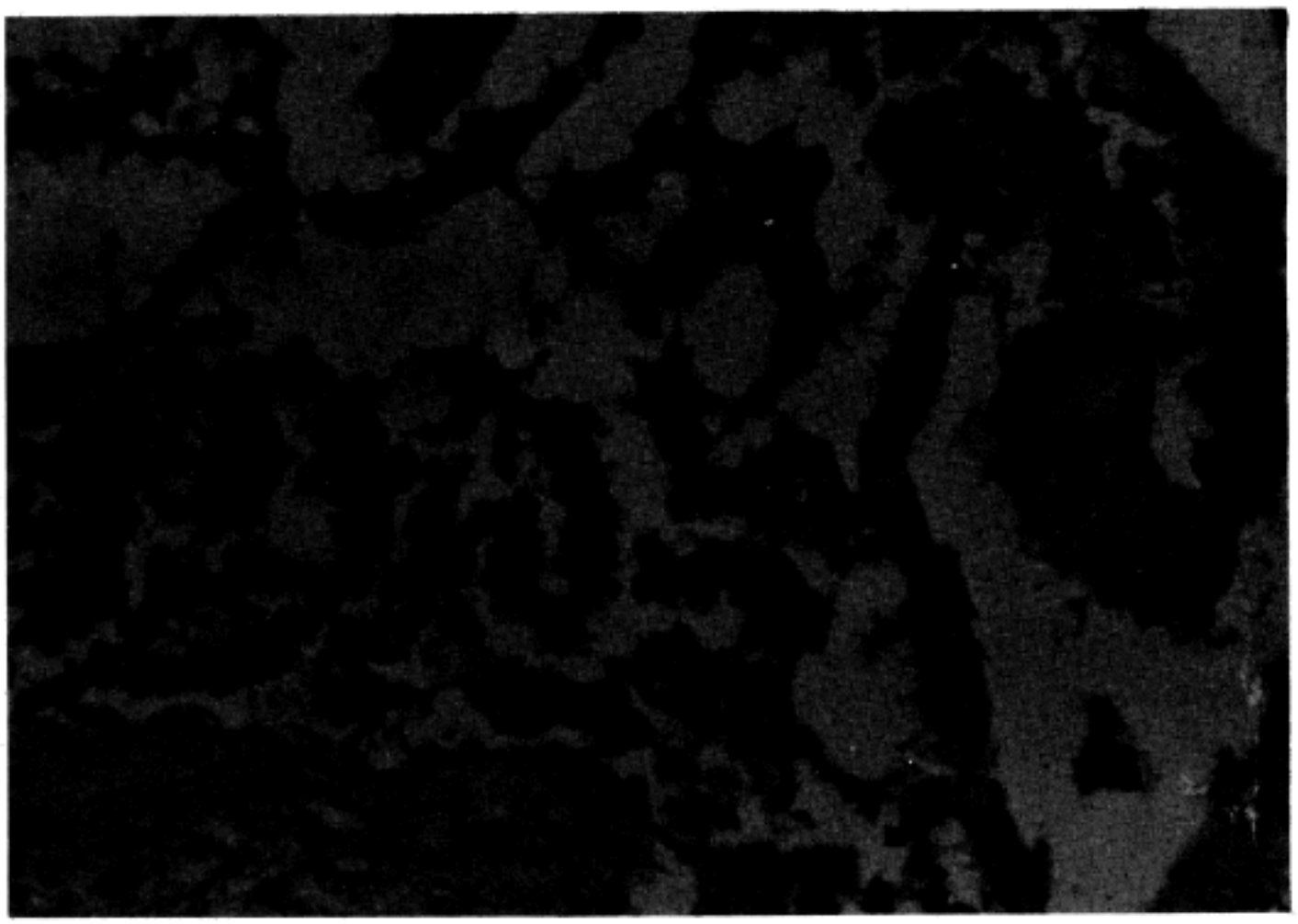

Fig. 2. Fibrocystic disease with epithelial cell hyperplasia, focal positive foci. Immunohistochemical stain (x200).

Fig. 3. Intraductal carcinoma, weakly and focally positive reaction. Immunohistochemical stain (x200).

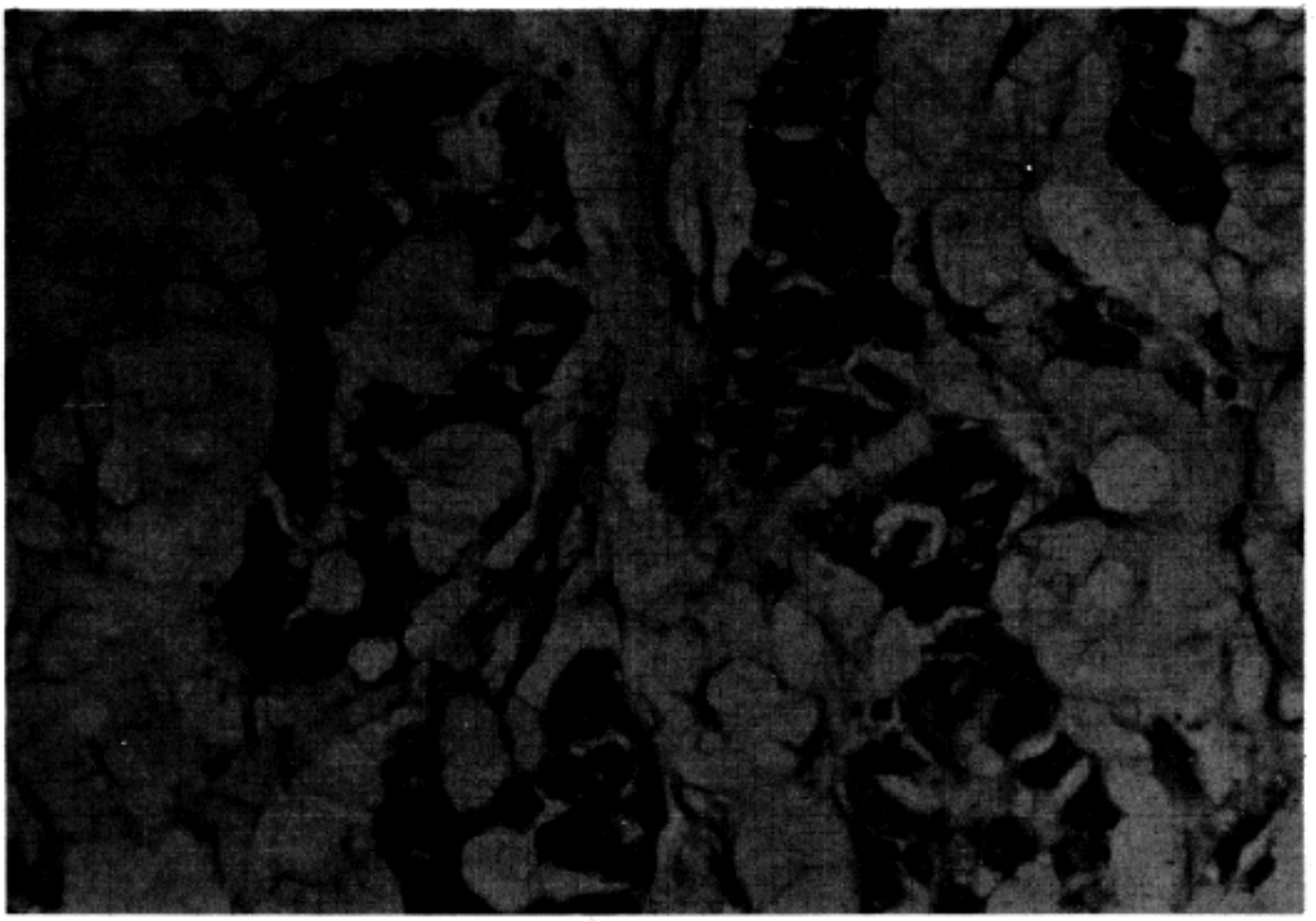

Fig. 4. Mucinous adenocarcinoma, strong and diffuse positive reaction in their cytoplasm and its membrane, Mucinous materials show negative. Immunohistochemical stain (x200).

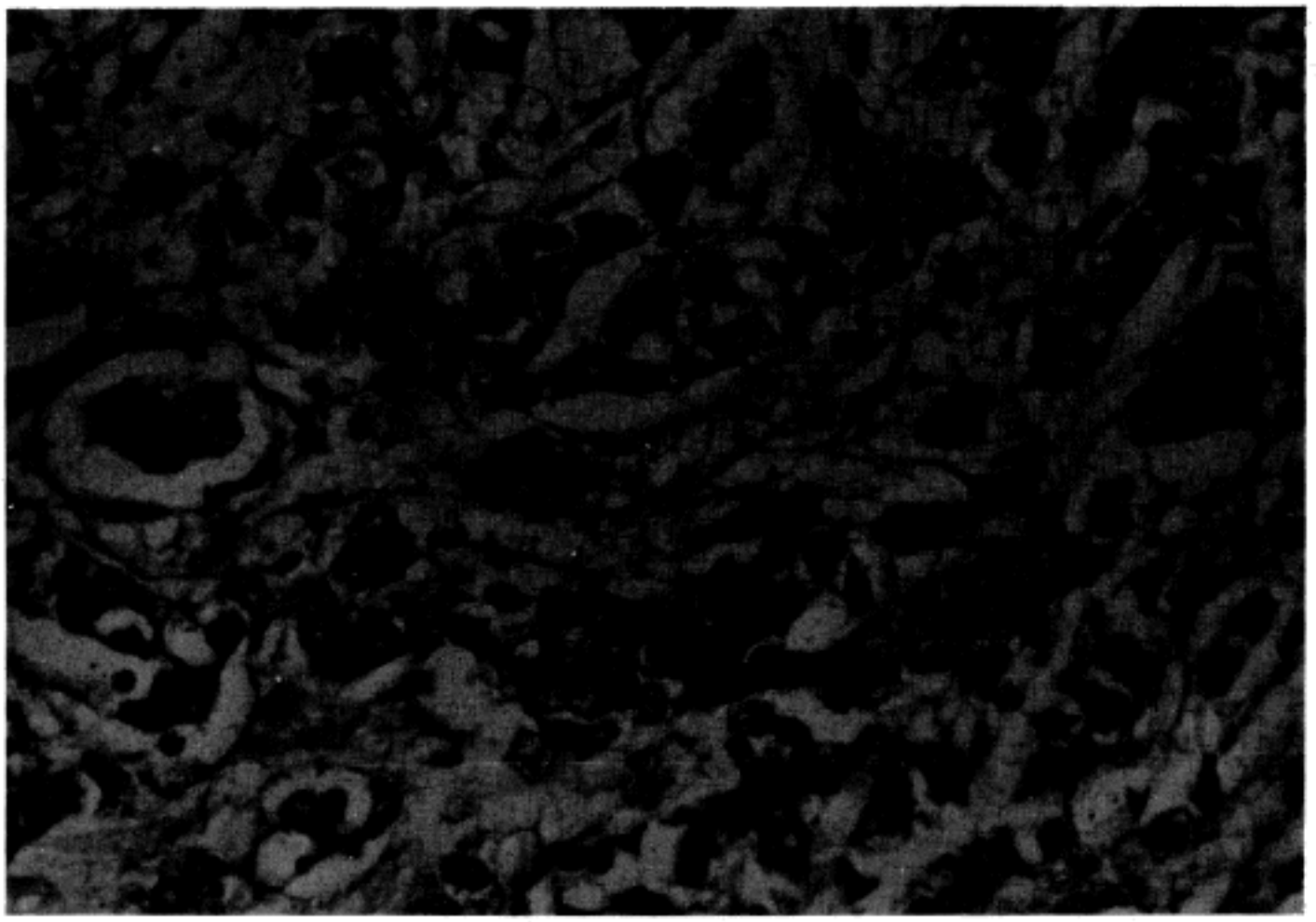

Fig. 5. Infiltrating ductal carcinoma, strong positive cells are mixed with some negative cells. Immunohistochemical stain (x200).

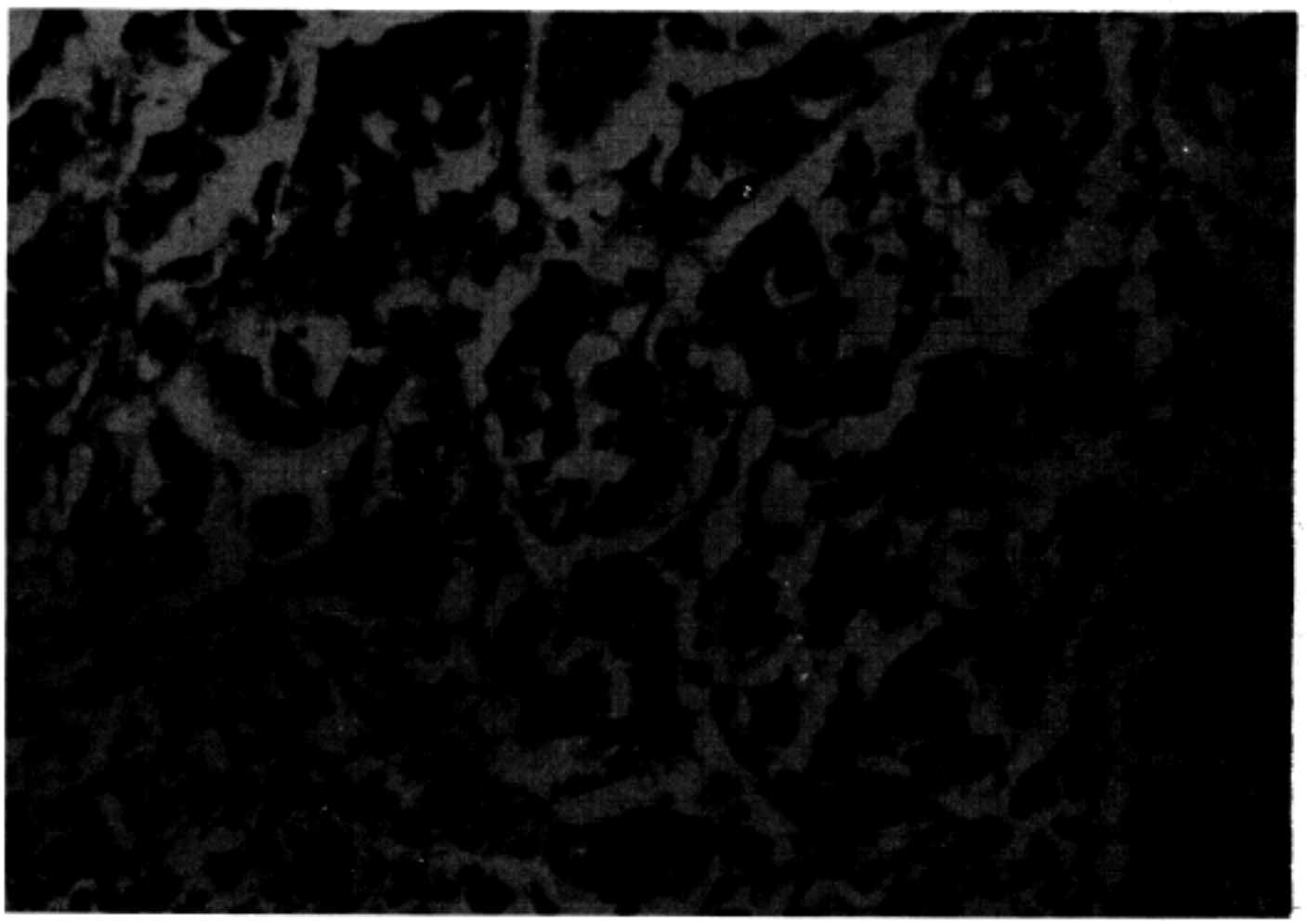

Fig. 6. Infiltrating ductal carcinoma, metastatic in lymph node, most of cells show strong positive reaction. Immunohistochemical stain (x260).

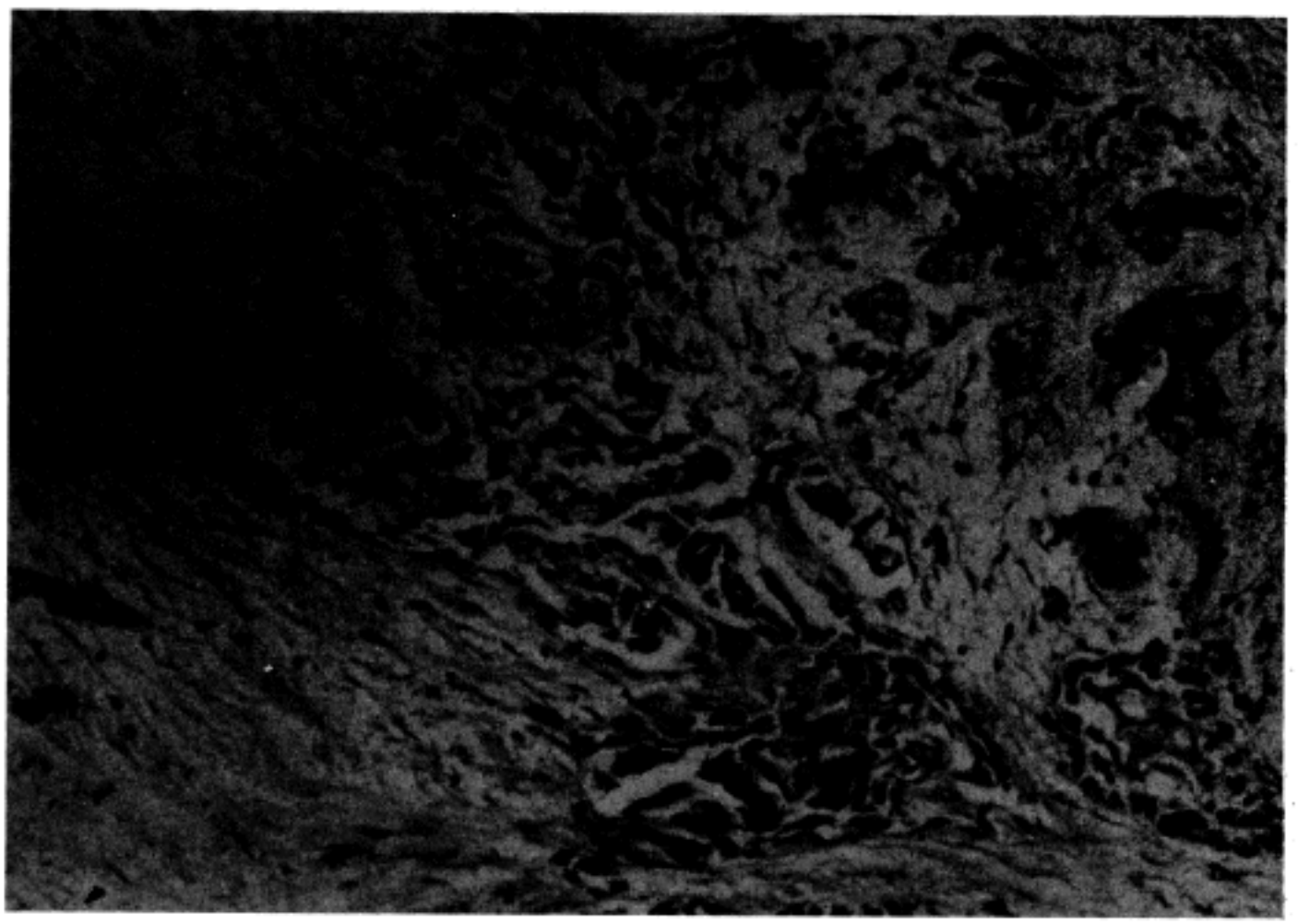

Fig. 7. Relatively normal lobule in surrounding area of infiltrating ductal carcinoma. Hematoxylin & Eosin (x100).

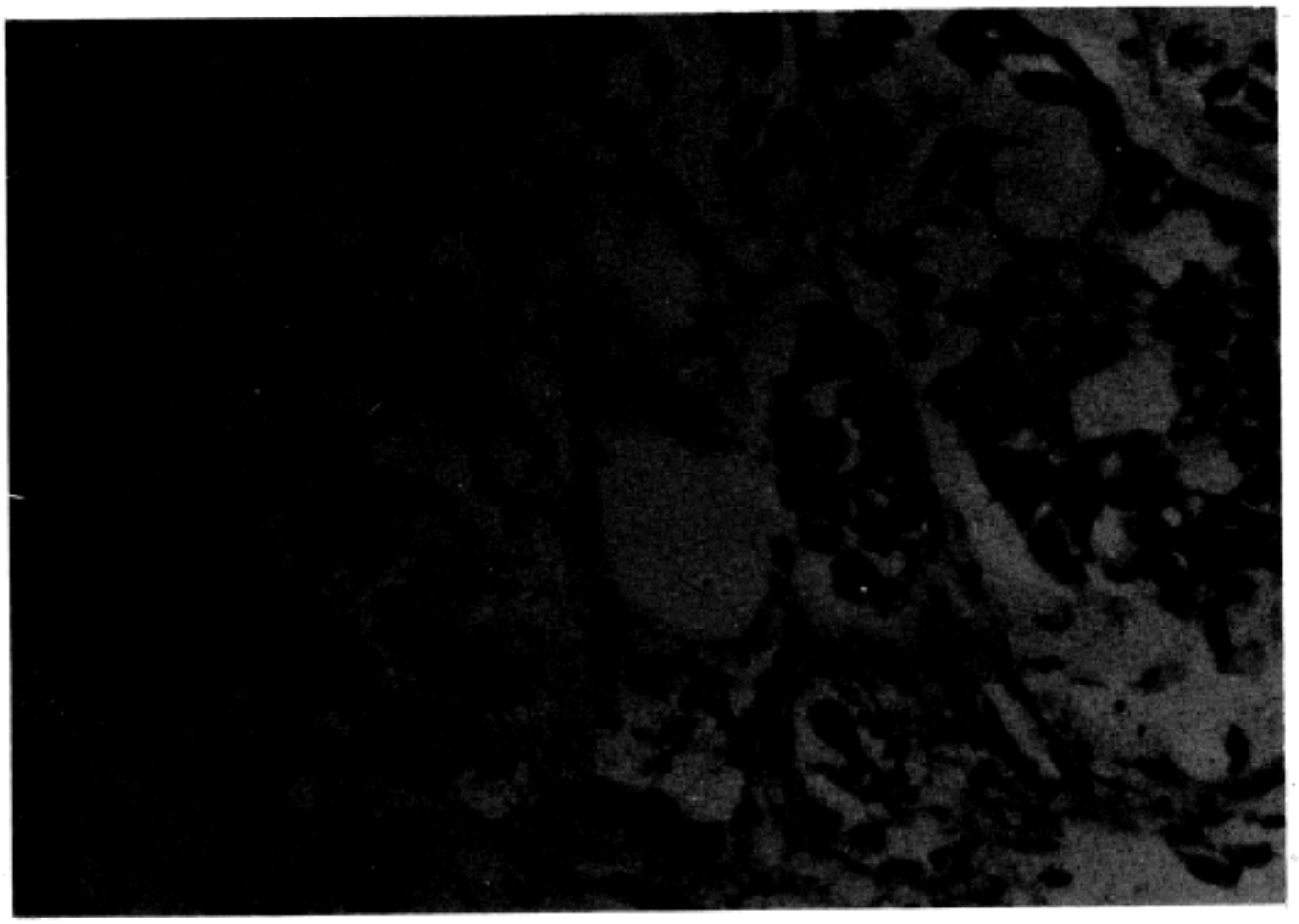

Fig. 8. Strong positive reaction is noted in the surrounding mammary lobules which revealed normal structure. Immunohistochemical stain (×200).

Table 1. The ratio of the positive cells for the Ha-*ras* oncogene product

No. of case	A	B	C	D	E	F	G
1	67.8	88.5	83.3	46.0	100.0	33.5	19.0
2	77.7	91.6	82.6	39.4	97.4	26.7	32.3
3	95.2	93.9	94.3	61.1		45.3	24.1
4	38.9	84.4	94.5	51.5		18.4	31.5
5	70.5	89.4	97.8			28.1	25.7
6	54.7	86.5	92.8				
7	63.8	73.4	94.5				
8	87.9	67.1	90.4				
9	69.1	91.6	81.5				
10	90.4	88.1	87.3				
Mean ± SD	71.6 ± 17.2	85.2 ± 8.5	89.7 ± 5.7	49.5 ± 9.2	98.7 ± 1.8	30.4 ± 9.9	26.5 ± 5.5

A ; Infiltrating ductal carcinoma
B ; Metastatic infiltrating ductal carcinoma
C ; Neighboring normal lobule in infiltrating ductal carcinoma
D ; Intraductal carcinoma
E ; Mucinous adenocarcinoma
F ; Fibrocystic disease
G ; Fibroadenoma

2. 양성 세포 출현율

유방의 양성병변의 *ras* 산물 양성세포율은 섬유선종이나 26.5±5.5%, 섬유낭종증이 30.4±9.9%로서 30% 내외의 비교적 낮은 양성율을 보였으며 관내상피암종은 49.5±9.2%로서 양성 병변에 비하여 약간 증가되었다. 침윤성 관상피암종은 71.6±17.2%로서 높게 관찰되었으며 침윤성 관상피암종의 임파절 전이소에서는 85.2±8.5%로서 원발소에 비하여 증가되었으며 침윤성 관상피암종 주변부의 정상 유소엽에서도 89.7±5.7%로 높은 양성율을 보였다. 한편 점액성 유선암종은 대부분의 암소세포들이 강한 양성을 보여 98.7±1.8%의 높은 양성율을 나타냈다(Table 1).

고 찰

세포성 암 유전자는 *ras*와 *myc* 그리고 *fos*등 여러가지 종이 알려져 있는데 대부분의 고형종 암세포에서는 주로 *ras*가 표현된다고 한다[5,15,16].

ras 암유전자로는 Ha-*ras*와 K-*ras* 및 N-*ras*등이 알려져 있는데 발병하는 장기에 따른 특이성이 있다고 한다[17].

이러한 암유전자의 암세포내 표현은 암세포 추출물에서 blot technique등으로 측정하여 왔으나 면역조직화학적인 증명이 가능하게 됨에 따라 암세포내 유전자 산물과 악성 전환의 연관성을 규명하는데 많은 진전이 있었다[12~14,18].

면역조직화학적 검색은 양성 병변 및 악성병변 그리고 전암병변 등을 동일한 조건하에서 파라핀 조직절편을 이용하여 관찰할 수 있고 암소(cancer nest) 주위의 정상적인 조직상의 변화를 검색할 수 있으며 특히 동일한 환자의 전암병변이 악성전환을 하였을 경우에는 동일한 세포 주위에서 암 유전자 산물의 관찰이 가능하게 되는 등 여러가지 장점이 있다.

본 연구에서는 전암 병변의 악성전환 가능성을 암유전자 산물의 변화와 연관시켜 추구할 목적으로 국내에서 증가추세에 있는 유방질환 즉 섬유선종이나 섬유낭종증의 양성병변과 관내상피암종이나 침윤성 관상피암종 등의 악성병변을 대상으로 하였다.

본 성적에서 암유전자 *ras* 산물에 대한 양성반응은 섬유선종이나 섬유낭종증의 양성병변 그리고 관내상피암종, 침윤성 관상피암종 순으로 증가되어 악성병변 그리고 관내상피암종, 침윤성 관상피암종 순으로 증가되어 악성병변이 양성병변에 비하여 강한 양성반응을 보여 주었는데 이러한 성적은 Hand등[12]과 Theillet등[17]의 성적과 일치되었다. 침윤성 관상피암종의 양성세포율이 71.6%로서 섬유낭종증 30.4% 및 섬유선종 26.5%에 비하여 높게 관찰되었던 점은 이와같은 사실을 뒷받침 해주었다. 또한 섬유낭종증의 선증식형에서 상피세포의 증식이 심한 부위에서는 *ras* 산물 양성세포가 군집됨을 관찰할 수 있었던 것으로 보아 세포내 암 유전자 산물의 증가는 전암병변일 가능성을 추측할 수 있으며, 이러한 가능성은 관상피세포의 비정형 과형성이나 관상피내 유두종을 장기간에 걸쳐 관찰할 때 암종으로 이행되는 경우가 많다는 기존의 연구들에서도 볼 수 있다[19~22]. 따라서 본 성적에서 나타난 소견은 이러한 보고들을 참조한다면 유의한 결과로 생각되었다.

침윤성 관상피암종 주변부에 위치하는 정상구조의 유소엽 및 말단관에서는 정상조직이나 양성병변에서와는 다르게 강한 양성반응을 보여주었으며 *ras* 산물 양성세포율 역시 89.7%로서 높게 관찰되었는데 이러한 소견은 정상 조직상 일지라도 악성병변으로 이행될 부위임을 예측할 수 있는 성적이었다. Russo등[23]은 실험적으로 백서에 유방암종을 일으킨 결과 유소엽의 말단과의 상피세포에서 암종의 발병을 관찰하고 말단과의 발암의 기원부임을 주장하였으며 Wellings등[24]과 Ohuchi등[25]도 유방암종은 유소엽말단관에서 기원한다고 하였다. 이러한 제학자들의 보고를 종합한다면 본 연구에서 관찰된 침윤성 관상피암종 주변부의 정상 요소엽 및 말단과의 강한 양성반응은 유방암종의 기원 부위임을 뒷 반침해 주는 소견으로 생각되었다.

침윤성 관상피암종에 있어서 임파절 전이소에서 원발소에 비하여 강한 양성을 보였던 점은 Ohuchi[25]의 성적과 일치되었으나 대장암의 경우 전이소에서 오히려 양성반응이 감소되었다는 Gallick등[26]의 보고와는 차이가 있었다. Ohuchi[25]는 전이소의 암세포가 암 유전자 *ras* 산물에 대한 면역조직학적 염색상 강한 염색 반응을 보인 것을 암유전자 *ras*의 활성도에 따른 차이라고 하였으며 이러한 사실은 암유전자 *ras* 산물의 출현이 암세포의 표현보다는 암병변의 진행을 뜻한다고 하였다[25]. Thor등[13]은 대장암의 경우 침윤된 암소의 깊이에 따라 양성반응이 증가됨을 보고하였는데 이와같은 사실로 암세포

내 *ras* gene의 활성이 증가되어 있음을 추측할 수 있었고 전이성 암소에서 강한 양성반응을 보였고 사실 역시 암세포의 악성도 및 *ras* gene의 활성이 증가되어 있음을 시사해주는 소견이라 하겠다.

한편 점액성 유선암종은 암소의 구성 세포들에서 강한 양성반응을 보여 주었던 반면 간질조직의 점액질은 음성반응을 보여 암세포의 분비물과 암유전자 산물과는 관련성이 없을 것으로 생각되었고 *ras* 산물 양성세포율이 98.7%로서 가장 높았던 것은 암유전자의 강한 활성과 높은 악성도를 의미하는 소견으로 생각되었다.

본 연구에서 양성반응 및 *ras* 산물 양성세포율은 양성 및 악성병변에 따라 그 차이가 관찰되었지만, 침윤성 암소의 구성세포들 중에는 음성반응을 보여주는 세포도 관찰되었는데 이러한 현상에 대하여 Theillet등[17]은 항원의 이질성 때문이라고 하였으며 일부 학자들은 암세포의 이질성을 주장한 바 있다[25,27].

그러나 유방병변의 암유전자 *ras* 산물에 대한 양성반응은 암세포들 간에 다소간의 이질성을 나타냈지만 전암병변 및 악성도의 관점에는 좋은 지표가 될 것으로 추측되었으며, 앞으로 환자의 연령에 따른 차이나 호르몬 수용체에 따른 차이를 규명한다면 좀 더 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료되었다.

결 론

세포성 암유전자 *ras* 산물의 암세포내 양적 변화와 악성 전환과의 상관성을 규명할 목적으로 유방 질환을 이용하여 세포성 암유전자 Ha-*ras* 산물에 대한 면역조직화학적 염색을 시행한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1) 세포성 암유전자 *ras* 산물에 대한 양성반응을 세포막 뿐 만 아니라 세포질에서도 출현하였다.

2) 세포성 암유전자 *ras* 산물의 양성세포율은 섬유낭종증이 30.4%, 섬유선종이 26.5%, 관내상피암종이 49.5%, 침윤성 관상피암종이 71.6%, 전이된 침윤성 관상피암종이 85.2%, 침윤성 관상피암종 주위의 비교적 잘 유지된 소엽이 89.7%였다. 이상의 결과로 미루어 세포성 암유전자 *ras* 산물의 출현율은 악성도가 높을수록 높은 것을 알 수 있으며, 침윤성 관상피암종 주위 유소엽의 높은 양성율은 그러한 조직에 이미 악성화 잠재력이 내재함을 의미한다고 사료된다.

3) 세포성 암유전자 *ras* 산물에 대한 양성반응은 암세포들 간에 다소의 이질성을 보였다.

참 고 문 헌

1) **Fausto N, Shank PR:** *Oncogene expression in liver regeneration and hepatocarcinogenesis. Hepatology 3: 1016, 1983*

2) **Muller R, Tremblay MJ, Adamson ED, Verma IM:** *Tissue and cell type-specific expression of two human oncogenes. Nature 304:454, 1983*

3) **Makino R, Hayashi K, Sugimura T:** *c-myc transcript is induced in rat liver at a very early stage of regeneration or by cycloheximide treatment. Nature 310:697, 1984*

4) **Goustin AS, Betsholtz C, Pfeifer-Ohlsson S:** *Coexpression of the sis and myc proto-oncogenes in developing human placenta suggests autocrine control of trophoblast growth. Cell 41:301, 1985*

5) **Land H, Paroda G, Weinberg R:** *Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. Science 222: 771, 1983*

6) **Pitot HC:** *Oncogenes and human neoplasia. Clin Lab Med, 6:167, 1986*

7) **Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M:** *A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by T24 human bladder carcinoma oncogene. Nature 300:149, 1982*

8) **Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI:** *Mechanism of activation of a human oncogene. Nature 300:143, 1982*

9) **Taparowsky E, Suard Y, Fasano O, Shimizu K, Goldfab M, Wigler M:** *Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. Nature 300:762, 1982*

10) **Der CJ, Cooper GM:** *Altered gene products are associated with activation of celluar ras genes in human lung and colon carcinomas. Cell 32:201, 1983*

11) **Glass II WF, Briggs RC, Hnilica LS:** *Identification of tissue specific nuclear antigens transferred to nitrocellulose form polyacrylamide gels. Science 211: 70, 1981*

12) **Hand PH, Thor A, Wunderlich D, Murao R, Caruso A, Schlom J:** *Monoclonal antibodies of predefined specificity detect activated ras gene expression in human mammary and colon carcinomas. Proc Natl Acad Sci 81:5227, 1984*

13) **Thor A, Hand PH, Wunderlich D, Caruso A, Muraro R, Schlom J:** *Monoclonal antibodies define different ras gene expression in malignant and benign colonic disease. Nature 311:562, 1984*

14) **Viola MV, Fromowitz F, Oravez S, Deb S, Schlom J:** *ras Oncogene p21 expression is increased in premalignant lesions and high grade bladder carcinoma. J Exp Med 161:1213, 1985*

15) **Slamon DJ, deKernion JB, Verma IM, Cline MJ:** *Expression of cellular oncogenes in human malignancies. Science 224:256, 1984*

16) **Tanaka T, Slamon DJ, Battifora H, Cline MJ:** *Expression of p21 ras oncoproteins in human cancers. Cancer Res 46:1465, 1986*

17) **Theillet C, Lidereau R, Escot C, Hutzell P, Brunet M, Gest J, Schlom J, Callahan R:** *Loss of a c-H-ras allele and aggressive human primary breast carcinomas. Cancer Res 46:4776, 1986*

18) **Viola MV, Fromowitz F, Oravez S, Finkel G, Lundy J, Hand P, Thor A, Schlom J:** *Expression of ras Oncogene p21 in prostate cancer. New E J Med 314:133, 1986*

19) **Kodlin D, Winger EE, Morgenstern NL, Chen U:** *Chronic mastopathy and breast cancer. A follow up study. Cancer 39:2603, 1977*

20) **Page DL, Vander Zwaag RR, Rogers LM, Williams LT, Walker WE, Hartmann WH:** *Relation between component parts of fibrocystic disease complex and breast cancer. J Natl Cancer Inst 61:1055, 1978*

21) **Page DL, Dupnot WD, Rogers MS, Rados MS:** *Atypical hyperplastic lesions of the female breast. A long term follow-up study. Cancer 55:2698, 1985*

22) **Dupont W, Page DL:** *Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. N Eng J M 312:146, 1985*

23) **Russo J, Tay LK, Russo IH:** *Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. Breast Cancer Res Treat 2:5, 1982*

24) **Wellings SR, Jensen SM, Marcum RG:** *An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible cancerous lesions. J Natl Cancer Inst 55:231, 1975*

25) **Ohuchi N, Thor A, Page DL, Hand PH, Halter SA, Schlom J:** *Expression of the 21,000 molecular weight ras protein in a spectrum of benign and malignant human mammary tissues. Cancer Res 46: 2511, 1986*

26) **Gallick G, Kurzrock R, Kloetzer W, Arlinghaus R, Gutterman J:** *Expression of p21 ras in fresh primary and metastatic human colorectal tumors. Proc Natl Acad Sci 82:1795, 1985*

27) **Kraus MH, Yuasa Y, Aaronson SA:** *A postition 12-activated H-ras Oncogene in all HS578T mammary carcinosarcoma cells but not normal mammary cells of the same patient. Proc Natl Acad Sci 81: 5384, 1984*

— Abstract —

The Expression of *ras* Oncogene in Benign and Malignant Lesions of Breast

Jong-Hee Nahm, M.D., **Jong-Hyun Lee**, M.D.
Chang-Soo Park, M.D. and **Kyu-Hyuk Cho**, M.D.

Department of Pathology, Chonnam University Medical School, Kwangju, Korea

To evaluate correlation between the amount of oncogene products in tumor cell extracts and malignant potentiality in breast tumor, immunohistochemical staining for the *ras* Oncogene products was performed in the sections of benign and malignant lesions of the breast.

The results obtained were as follows:

1) The positive reaction to *ras* Oncogene products was usually observed in the cytoplasm and cell membrane.

2) The ratio of positive reaction was 30.4% in epithelial hyperplasia of fibrocystic disease, 26.5% in fibroadenoma. 49.5% in intraductal carcinoma, 71.6% in infiltrating ductal carcinoma, 85.2% in metastatic infiltrating ductal carcinoma, and 89.7% in relatively preserved neighboring lobules of infiltrating ductal carcinoma.

In conclusion, the ras oncogene products are found by a significantly higher ratio in the more aggressive lesions, and the infiltrating ductal carcinoma might represent its potential of malignant transformation.

3) The expression of ras oncogene was heterogeneous in primary as well as metastatic mammary carcinomas.

Key Words: Breast, Oncogene, *Ras*, Immunobistochemistry, Monoclonal antibody