

## 유방암에서 화상분석기를 이용한 DNA 배수성, 에스트로젠과 프로제스테론 수용체 및 Her-2/neu 종양단백의 표현에 관한 연구

고려대학교 의과대학 해부병리과

김애리·김인선·이갑노

### Assessment of DNA Ploidy, Estrogen and Progesterone Receptor Status and Her-2/neu Oncoprotein Expression in Breast Carcinoma by Image Analysis

Aeree Kim, M.D., Insun Kim, M.D. and Kap-no Lee, M.D.

*Department of Pathology, Korea University Hospital*

In 41 cases of breast cancers, the aneuploidy measured by Image Analyzer was compared with that of flow cytometric analysis, and estrogen and progesterone receptor(ER/PR) and Her-2/neu oncoprotein were immunohistochemically stained and measured by Image Analyzer. In ER/PR, the positive nuclear area(PNA, %) was measured, and in Her-2/neu, the content of oncoprotein was expressed as pg/cell. To assess the usefulness of these parameters as a prognostic factor, the author evaluated the results in relation with tumor size, nuclear grade and lymph node metastasis.

The obtained results are summarized as follows:

1) The detection rate (90%) of aneuploidy by image analysis was higher than that (70%) of flow cytometric analysis. The concordance rate of both method was 80%.

2) The positivity of ER was 73% and PR was 34%, and the high PNA of ER and PR was related with high nuclear grade. There was an inverse correlation of the ER PNA with tumor size and PR PNA with negative lymph node.

3) Her-2/neu oncoprotein overexpression was found in only 2 cases and another two showed borderline overexpression. All four cases had DNA tetraploidy.

From the above results, it was concluded that the image analyzer could be used in DNA analysis and in quantitation of immunostained ER/PR and Her-2/neu oncoprotein, providing the important information in the management of the breast cancer patients. (**Korean J Pathol 1994; 28: 246~259**)

**Key Words:** Image analyzer, Breast cancer, DNA ploidy, Hormone receptor, Her-2/neu oncoprotein

접 수: 1993년 7월 26일, 게재승인: 1993년 12월 24일

주 소: 서울시 구로구 구로동 80번지, 우편번호 152-050

고려대학교 구로병원 해부병리과, 김애리

## 서 론

유방암은 서양인 여성의 악성 종양 발생 빈도의 수위를 차지하며, 근래에 들어 우리 나라에서도 유방암의 발생이 증가하고 있다<sup>1)</sup>. 유방암의 예후는 그 병기에 따라 다르고, 조기유암인 경우 10년 생존율이 75%를 넘지만 나머지는 재발과 전이를 하게 되어 조기에 사망하기도 한다. 이러한 환자들에 대하여는 근치적 목적의 수술이나 방사선치료와 같은 일차적 치료 후 재발 방지로 근치율을 상승시키기 위한 보조적 요법을 시행하게 된다. 따라서 보조요법이 필요한 고위험군의 환자를 선별하기 위한 여러가지 인자의 선택과 방법의 개발이 필요하게 되었다. 현재까지는 종양의 크기, 전이된 림프절의 수 등의 병리학적 병기가 가장 중요한 예후인자로 알려졌고, 그 밖에 조직학적 유형과 악성도의 등급<sup>2-4)</sup>, 핵분화도, DNA 배수성<sup>5-7)</sup> PCNA(proliferating cell nuclear antigen), AgNOR(argyrophilic nuclear organizer region), thymidine labeling index 등을 이용한 세포 증식능, 에스트로젠 수용체 및 프로세스테론 수용체의 유무<sup>8-11)</sup>, cathepsin-D<sup>12)</sup>, 표피성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor, EGFR)<sup>13)</sup> 등 유방암의 생물학적 특성을 판정하는 기준 척도로서 예후판정 및 호르몬 치료 대상 선별에 유용하게 사용되는 것은 잘 알려진 사실이다. 최근 분자생물학의 발전으로 발암기전에 관여하는 여러 가지 유전단백이나 종양유전자들이 밝혀지고 있는데, Her-2/neu 종양 유전자와 같은 종양원성 유전자(proto-oncogene)는 세포의 성장과 분화에 관여하는 정상 세포의 유전자로서 이 유전자의 구조변화, 증폭, 과발현 등이 발암기전에 관여한다고 한다.

에스트로젠과 프로세스테론 수용체는 유방조직과 같이 에스트로젠과 프로세스테론에 의해 그 성장이 지배되는 세포의 세포질 내에 존재하는 단백질성분으로 세포 내에서 에스트로젠 혹은 프로세스테론과 결합하여 에스트로젠 혹은 프로세스테론 수용체 복합체를 형성하고 이것이 핵 내로 이동하여 target 유전자의 전사를 유도하며, 그 결과 생긴 여러 가지 단백질은 DNA 합성과 세포성장을 조절하는데 관여한다. 에스트로젠과 프로세스테론 수용체의 검색은 sucrose density gradient analysis나 dextran-coated charcoal method<sup>14)</sup>과 같은 생화학적 방법과 동결 조직이나 파라핀

포매조직을 이용한 면역조직학적 염색등이 있다<sup>15,16)</sup>. 또 최근 들어 면역조직화학적 염색을 시행한 조직의 화상분석기를 이용한 정량 분석이 시도되고 있는데 이 방법은 더 객관적이고 정확한 검색을 가능하게 하며, 위의 생화학적 방법과 좋은 상관관계를 보여준다고 한다<sup>17-20)</sup>.

종양세포의 증식력 평가 방법 중 유세포 측정기나

화상 분석기를 이용하여 측정할 수 있는 종양 세포의 DNA 함량에 따른 배수성이나 증식기 분획(S-phase fraction)이 중요한 예후인자로 대두되고 있다<sup>21-24)</sup>.

Her-2/neu 종양유전자 (또는 c-erbB-2)는 표피성장인자(EGF)의 유전자와 관련이 있는 종양원성 유전인자(proto-oncogene)로서, 유전자 산물의 정확한 기능은 아직 확실하지 않으나 구조적으로 표피 성장인자(EGF) 수용체와 비슷한 185~190kd의 경세포막 단백질이다<sup>25,26)</sup>. Her-2/neu 유전자의 증폭은 Her-2/neu mRNA와 유전단백의 증가를 초래하며, 유방암 환자에서 생존율이 낮아지는 것과 깊은 연관이 있다<sup>27-29)</sup>. 또한 이들의 검출방법은 분자생물학적 방법 외에도 면역조직화학적 염색을 이용하여 간단히 통상 고정조직이나 동결조직에서 인식할 수 있다.

본 연구에서는 41예의 유방암 조직을 이용하여 유세포 측정기와 화상 분석기를 이용한 DNA 배수성 검사를 비교하고, 에스트로젠과 프로세스테론 수용체 및 Her-2/neu 종양 단백질에 대한 면역효소염색을 시행하여 그 발현정도를 화상분석법으로 분석하고 조직의 핵분화도, 림프관 전이 및 종양 크기 등과 같은 예후인자들과의 상관관계를 알아보았다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

1992년 1월부터 1993년 2월까지 고려대학교 부속 병원에서 변형근치 유방절제술 혹은 유방보존술 및 액와 림프관 절제술을 시행한 예중 신선조직의 이용이 가능한 원발성 유방암 41예를 대상으로 하였다.

### 2. 연구 방법

**1) 육안 및 광학현미경적 검색:** 육안 검색은 통상적으로 절단면에서 종양의 크기를 측정하고, 절제된 액와부 지방조직에서 림프절을 찾아 전이된 림프절의 수를 세었으며 조직학적 진단은 통상적으로 헤마톡실린-에오진 염색을 하여 진단하였다.

악성도는 Black에 의한 핵분화도에 따른 분류를 이용하였는데, 핵이 균일하면서 염색질의 응집이 없고 핵소체가 없거나 불분명한 경우 핵등급 3-4로, 핵의 다형성 및 염색질의 응집과 핵소체가 뚜렷한 경우 핵등급 0-1로, 그 중간을 핵등급 2로 분류하였다<sup>30)</sup>.

#### 2) DNA 분석:

**(1) 화상 분석:** 세포 날린된 유리 슬라이드를 실온에서 30분 내지 2시간 건조시킨 다음 10% 중성 완충 포르말린에 30분간 고정한 후 실온에서 다시 건조시켰다. 5M HCl 용액에서 1시간 가수분해 시키고 자력 교반기(magnetic stirrer) 위에 올려 놓은 상태에서 Schiff시약으로 1시간 동안 염색한 후 수세하고 탈수하여 봉입한 다음 CAS 200 Image Analyzer DNA

ploidy 프로그램을 이용하여 분석하였다. 이 때 200 개 이상의 세포를 분석하였고 슬라이드에 포함된 정상 림프구와 정상 조직세포의 DNA 양을 내부기준을 삼고 프로그램에 들어 있는 표준세포의 DNA 양을 7.18pg으로 하여 검사하는 세포의 DNA 지수를 구하였다.

**(2) 유세포 분석;** 신선한 조직을 citrate 완충용액이 담긴 케트리 접시에서 가위와 면도날을 이용하여 잘게 분쇄한 후 53  $\mu$ m 구멍크기를 갖는 나일론 망을 사용하여 세포 부유 액을 여과하였다. 여과한 세포 부유 액에서 세포 수를  $2 \times 10^6$ /ml로 맞춘 다음 부유 액 50  $\mu$ l를 Falcon 튜브에 옮기고 여기에 트립신 용액을 450  $\mu$ l 가하면 10분간 실온에서 작용시킨다. 다시 RNAase 용액 375  $\mu$ l를 가하여 10분간 실온에서 반응시킨 다음 propidium iodide 375  $\mu$ l를 가하고 10분간 암소에서 반응시킨 후 FACScan으로 DNA 양을 측정하였다. 기계의 작동을 위하여 chicken RBC를 propidium iodide로 염색하여 표준물질로 이용하였다. 조직 내 림프구나 정상 세포를 내부표준으로 정하고 각 검체마다 20000개 이상의 세포의 DNA 함량을 측정하여 Cellfit 프로그램으로 분석하였다.

**(3) 히스토그램 분석;** 유세포 측정법으로 얻어진 결과를 분석할 때 하나의 뚜렷한  $G_0/G_1$  peak를 가진 경우를 이배수성(diploidy) 이라고 하였고 하나 이상의 뚜렷한  $G_0/G_1$  peak를 보이며 이에 대응하는  $G_2/M$ 이 있을 때를 비배수성(aneuploidy)으로 정의하였다. 이 중 핵산지수가 0.95 이하일 때는 저이배수성(hypodiploidy) 이라고 하고, 1.05보다 크고 1.95보다 작을 때를 과이배수성(hyperdiploidy)이라고 하였으며,  $G_2/M$  peak가 전체 세포의 20% 이상이고 핵산지수가 1.95에서 2.05사이에 있으며 8N 부위에  $G_2/M$  peak가 관찰될 때를 사배수성(tetraploidy)이라고 정의하였다. 핵산지수가 2.05 이상일 때는 과사배수성(hypertetraploidy)이라고 하였다. 또한 두개 이상의 비배수성 peak가 있을 때를 다배수성(multiploidy)으로 하였다. DNA 지수는 이배수성  $G_0/G_1$  peak에 대한 비배수성  $G_0/G_1$  peak의 평균 channel의 비율로 계산되었다.

화상분석기로 분석할 때 표준세포의 DNA 양(7.18 pg)을 기준으로 하여  $G_0/G_1$  peak의 핵산지수가 0.90에서 1.10에 속할 때를 이배수성으로 하고 핵산지수가 1.11에서 1.79일 때를 과이배수성이라 하였으며 1.80에서 2.20사이를 사배수성이라 하였다. 2.20이상인 경우는 과사배수성이라 정의 하였다.

**3) 에스트로젠 수용체(ER) 및 프로제스테론 수용체(PR) 검색:**

**(1) 에스트로젠 수용체(ER) 염색;** ER염색은 Novocastra사의 생쥐 단클론성 항체와 DAKO사의 LSAB kit를 사용하였는데, 동결절편 조직을 4 $\mu$ m 두께로 자르고, 즉시 Zamboni용액에서 10분간 고정시

킨 후 Tris완충용액(TBS)에 10분간 수세하였다. 정상 염소 혈청에 10분간 반응시킨 후 1차 항체를 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 다음날 아침까지 반응시킨 다음 TBS에 씻고, biotin이 결합된 이차 항체에서 30분 반응시키고 TBS로 수세하고, streptavidin과 peroxidase 결합체에 30분간 반응시키고 증류수에 수세한 후 Diaminobenzidine용액에서 발색시키고 ethyl green에 대조염색한 후 봉입하였다.

**(2) 프로제스테론 수용체(PR) 염색;** PR염색은 CAS사의 progesterone receptor kit을 이용하여 염색하였는데, 동결절편은 즉시 picric acid paraformaldehyde(PAF)에서 15분간 고정시키고 phosphate 완충용액(PBS)에 수세하고, 0.3% 과산화수소수에 15분간 담근 후, 정상 토끼 혈청과 상온에서 20분간 반응시켰다. 1차 항체를 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 다음날 아침까지 반응시킨 후 PBS에 수세하고, 토끼의 항새쥐 IgG와 30분간 반응시키고 PBS에 수세하였다. peroxidase와 항peroxidase결합체와 30분간 반응시키고 PBS에 씻은 다음 Diaminobenzidine 용액에 담겨 암소에서 발색시켰다. 흐르는 증류수에 2~3분간 씻고, ethyl green으로 대조염색을 하고 봉입하였다.

**(3) ER/PR 염색판정:**

① 광학현미경적 판정; 에스트로젠과 프로제스테론 수용체에 대한 면역조직화학적 염색의 판정은 각 병변을 저 배율로 관찰하여 양성으로 염색된 부분이 전 절편에서 몇 %가 염색되었는지를 관찰한 다음, 고 배율에서 세포핵의 염색정도를 관찰하여 임의로 전 절편의 5% 이하에서 염색반응을 보이면서 염색정도가 약양성인 예를 1+, 5~25%에서 염색반응을 보이면서 염색정도가 중등도 양성인 예를 2+, 25% 이상에서 염색반응을 보이면서 세포핵의 염색정도가 강양성인 예를 3+로 구분하였다.

② 화상분석기를 이용한 판정; CAS 200 화상분석기의 Quantitative ER/PR 측정 프로그램을 이용하였다. 음성 대조염색 슬라이드를 이용하여 표준화한 후, 각 검체의 핵역치와 항체역치를 정하고, 양성으로 염색된 세포핵의 면적을 전체 핵 면적에 대한 백분율(positive nuclear area: PNA)로 표시하였다.

**4) Her-2/neu 유전 단백질에 관한 검색;** Her-2/neu 유전 단백질 염색; 급냉동시켜 영하 70 $^{\circ}$ C에 보관한 유방암 조직을 4 $\mu$ m 두께로 동결절편하여 CAS사의 her-2/neu oncoprotein kit와 Quantitative DNA kit를 이용하였다.

동결절편을 즉시 10% 중성 완충 포르말린에 상온에서 60분간 고정시킨 후 TBS에 수세한 뒤 3~5분간 흐르는 증류수에 씻고 Her-2/neu calibration slide와 함께 kit의 정상 염소 혈청과 20분간 반응시키고, TBS로 씻은 후 1차 항체를 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 밤동안 반응시켰다. 다음 날 TBS로 가볍게 씻은 후 biotin이 결합된 염소의 항새쥐 IgG와 20분간 반응시키고

TBS에 씻고, Alkaline phosphatase가 결합된 항체와 15분간 반응시킨 뒤 TBS에 담가 두고, red chromogen 용액을 만들어 5~7분간 암소에서 발색시킨 후 앞에 기술한 방법과 같이 DNA 염색을 하고 봉입하였다.

**(2) Her-2/neu 염색 판정:**

① 광학 현미경적 검색; 저배율로 관찰하여 양성으로 염색된 부분이 전 절편에서 몇 %가 염색되었는지 관찰한 다음, 고 배율에서 세포질과 세포막의 염색 정도를 관찰하여 전 절편의 5%이하에서 염색반응을 보이면서 염색정도가 약양성인 예를 1+, 5~25%에서 염색반응을 보이면서 염색정도가 중등도 양성인 예를 2+, 25% 이상에서 염색반응을 보이면서 염색정도가 강양성인 예를 3+로 구분하였다.

② 화상분석기를 이용한 Her-2/neu종양단백 염색의 결과 판정; CAS 200 화상분석기의 Quantitative oncogene product 측정 프로그램을 이용하였는데, 분석하고자 하는 검체와 함께 염색한 대조세포(SKBR 3)를 이용하여 표준화하였고, 각 예의 핵역치와 세포질 역치를 정한 후, 10개의 고배율 시야를 측정하여 각 세포당 표현되는 종양단백의 양을 대조세포의 양의 백분율로 표시하였다.

**3. 통계학적 분석**

1) DNA 배수성: 화상분석법과 유세포 측정법과의 차이는 각 방법으로 구한 DNA 지수간에 피어슨 상관계수를 구하여 비교하였다.

2) ER, PR, Her-2/neu 염색: 광학현미경을 통한 염색정도와 화상분석기를 이용한 positive nuclear area(%)간의 상관관계 사이에 피어슨 상관계수를 구하여 비교하였다.

3) 핵분화도, 림프절 전이 여부, 종양의 크기, ER과 PR 양성율 등과 DNA배수성, Her-2/neu 종양단백 염색의 양성율은 Chi-square 값을 구하여 검증하였다.

**연구 결과**

**1. 환자의 임상 및 병리학적 소견**

연령 분포는 26세에서 80세로 평균 47.4±12.6세였고 40~50대가 57%로서 과반수를 차지하였다. 41예의 유방암중 40예가 침윤성 도관암, 1예가 비침윤성 도관암이었다. 림프절 전이여부를 알 수 있었던 38예중 23예에서 림프절에 전이가 있었으며, 종양의 크기를 알 수 있었던 40예에서 크기가 2cm이하인 것이 7예, 2~5cm인 것이 21예, 5cm 이상인 예가 12예였다. 핵분화도는 고악성군 등급 0~1인 예가 15예, 저악성군 등급 3~4에 해당하는 예가 4예, 등급 2인 예가 22예였다.

**2. 유방암의 배수성**

1) 화상분석기와 유세포측정기를 이용한 DNA 배수성 결과 비교(Table 1): 총 41예 중 두 방법으로 검사가 가능하였던 40예의 결과를 비교하여 보면 화상분석기를 이용하여 측정된 종양의 배수성은 비배수성 종양이 36예로 전체의 90%, 이배수성종양이 4예로 10%였다. 비배수성 종양을 세분하였을 때 과이배수성 종양이 14예, 사배수성 종양이 14예, 과사배수성 종양이 3예, 다배수성 종양이 5예였다. 유세포측정기를 이용한 종양의 배수성은 이배수성 종양이 12예(30%), 비배수성 종양이 6예, 과사배수성 종양이 2예, 다배수성 종양이 3예였다. 따라서 40예 중 32예가 일치하여 80%의 일치율을 보였고(Fig. 1, 2) 두 방법간에 배수성이 일치하지 않은 8예 모두가 유세포 측정법에서는 이배수성종양으로 분석되었으나 화상분석법을 이용하였을 때 비배수성이었으며, 그중 3예는 이배수성에 가까운 핵산 지수를 보였고(Fig. 3), 2예는 사배수성이었으며, 1예는 사배수성에 가까운 핵산 지수를 보였다. 그러나 비배수성을 세분하였을 때는 18예(45%)만이 일치하였다. 두 방법으로 측정된 핵산 지수는 좋은 일

**Table 1.** DNA content: Image analysis versus flow cytometry

IA	FCM	Diploidy	Aneuploidy				Total
			HD	T	HT	M	
Diploidy		4	0	0	0	0	4
Aneuploidy	HD	6	7	1	0	0	14
	T	2	6	4	1	1	14
	HT	0	1	1	1	0	3
	M	0	3	0	0	2	5
Total		12	17	6	2	3	40

HD: hyperdiploidy, T: tetraploidy, HT: hypetretetraploidy, M: multiploidy, IA: image analysis  
FCM: flow cytometry



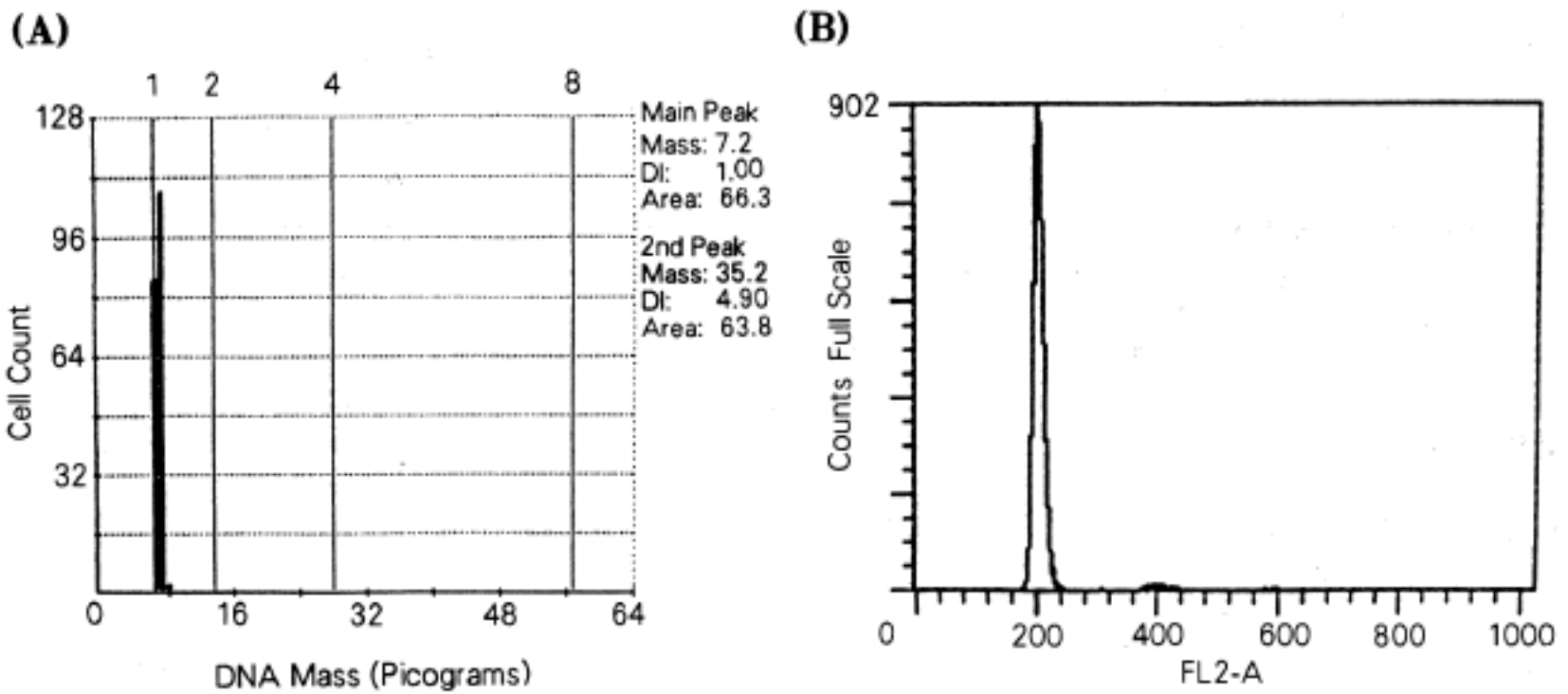


Fig. 1. Diploid DNA pattern in both image(A) and flow cytometric analysis(B).

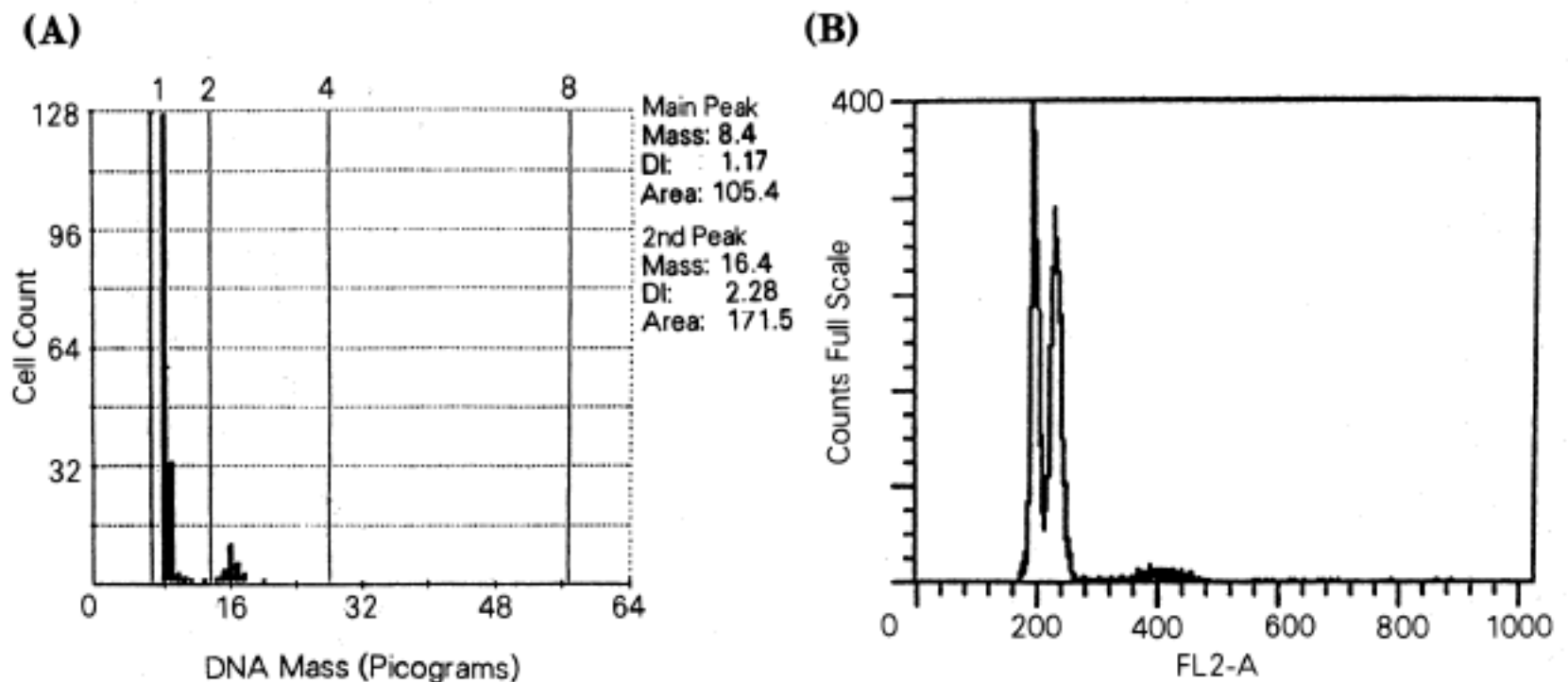


Fig. 2. Aneuploid DNA pattern in both image(A, DI: 1.17) and flow cytometric analysis(B, DI: 1.18).

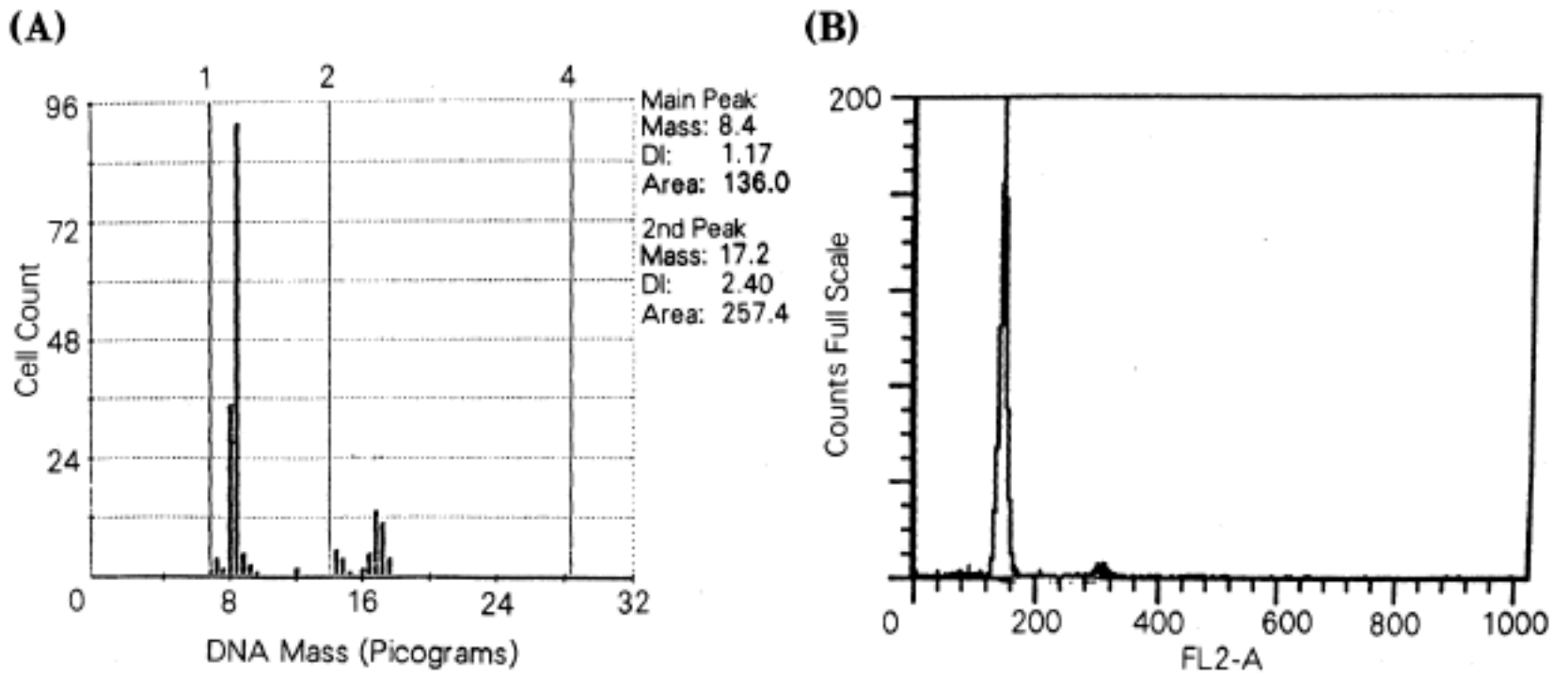
치 율을 보여주었다( $r=0.74, p<0.0001$ )(Fig. 4).

2) 배수성과 림프절 전이 여부 및 전이된 림프절의 수, 핵분화도 및 종양 크기와의 상관관계(Table 2): 림프절 전이가 있었던 23예 중 20예(82.6%)가 비배수성이었고 림프절 전이가 없는 16예 중 15예(93.7%)가 비배수성으로 DNA 배수성과 핵산지수는 림프절 전이 여부나 전이 림프절의 수에 상관없이 없었다. 핵분화도와 배수성과의 관계는 핵분화도가 0~1인 15예 중 14예(93%), 핵분화도가 2인 22예 중 19예(86%), 핵분화도가 3~4인 4예(100%) 모두가 비배수성 종양이어서 핵분화도에 따른 배수성의 차이는 없었다. 배

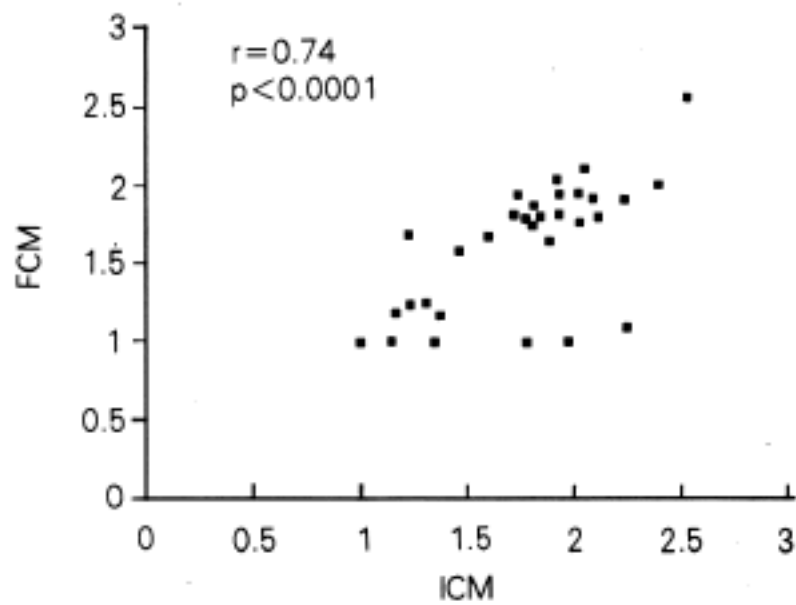
수성과 종양의 크기와의 관계는 종양의 크기가 2 cm 이하인 7예 모두가 비배수성 종양이었으며, 2~5 cm 인 종양 21예 중 20예가, 5 cm 이상인 종양 12예 중 9예가 비배수성 종양으로 크기에 따른 배수성의 차이도 없었다.

### 3. 에스트로젠과 프로제스테론 수용체의 표현

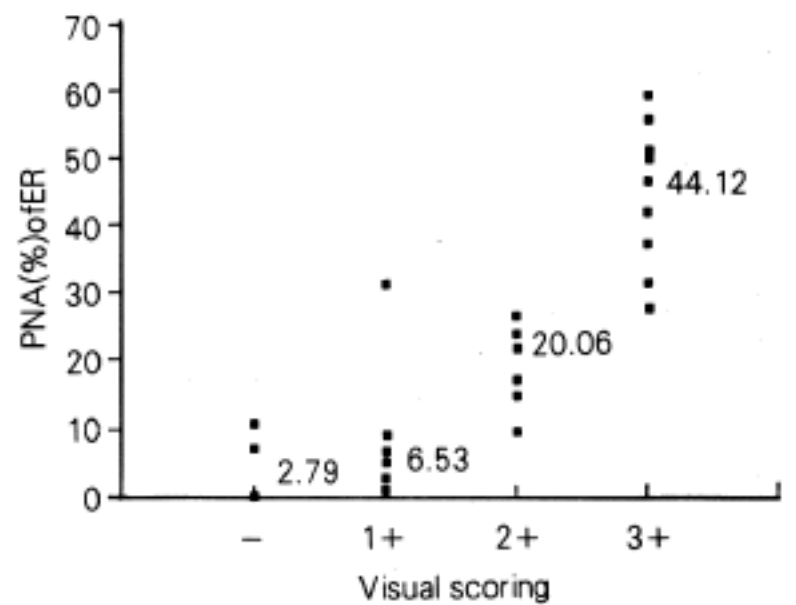
1) 에스트로젠 수용체(ER): 광학현미경으로 관찰하였을 때 에스트로젠 수용체에 대한 면역조직화학적 염색에서 음성반응을 보인 예가 7예였으며, 1+가 10예, 2+9예, 3+15예였다(Fig. 5). 화상분석기를 이용한



**Fig. 3.** DNA histograms showing aneuploid pattern in image(A, DI: 1.17), but diploidy in flow cytometric analysis(B).



**Fig. 4.** Comparison of DNA index between image and flow cytometric analysis.



**Fig. 5.** Comparative scatterogram between visual scoring and positive nuclear area of estrogen receptor.

정량적 측정시 positive nuclear area(PNA)가 1% 미만인 5예, 1% 이상 5% 미만인 6예, 5%이상 15% 미만인 7예, 15% 이상 30% 미만인 8예, 30% 이상이 15예였다. 음성 반응을 보인 예의 PNA는 평균 2.79% ( $\pm 4.35$ ), 1+는 6.53% ( $\pm 8.99$ ), 2+는 20.06% ( $\pm 5.85$ ), 3+는 44.12% ( $\pm 10.12$ ) 이어서(Table 3), 광학현미경으로 분석한 염색정도가 강해짐에 따라서 유의하게 증가하였다( $r=0.87$ ,  $p<0.0001$ ). PNA가 5% 이상인 예들 양성으로 판정하였을 때 30예(73%)가 양성, 11예(27%)가 음성이었다.

ER의 PNA와 림프절 전이여부 및 전이 림프절의 수, 핵분화도 및 종양 크기와의 상관관계를 보면 림프절 전이여부나 전이 절의 수와는 관계가 없었으나 PNA가 30% 이상인 예들은 핵분화도가 높음을 알 수 있었고, 종양의 크기가 5cm 이상인 경우는 PNA가 낮다는 사실을 알 수 있었으나 통계적인 유의성은 없었다(Table 4).

**2) 프로제스테론 수용체(PR):** 광학현미경을 이용한 프로제스테론 수용체에 대한 면역조직화학적 염색에서 1+가 11예, 2+가 2예, 3+가 3예였으며, 음성으로

**Table 2.** Correlation of DNA ploidy and lymph node status, nuclear grade and tumor size.

		No of Metastatic LN				Nuclear Grade			Tumor Size(cm)				Total
		0	1~3	>3	UK	0~1	2	3~4	<2	2~5	>5	UK	
DNA ploidy	D	1	2	1		1	3			1	3		4
	HD	6	5	4		4	10	2	3	7	4	1	15
	T	5	3	4	2	6	6	1	3	6	5		14
	HT	2	1			2	1			3			3
	M	2	1	4		2	2	1	1	4			5
Total		16	12	11	2	15	22	4	7	21	12	1	41

D: diploidy, HD: hyperdiploidy, T: tetraploidy, HT: hypertetraploidy, M: multiploidy, UK: unknown

**Table 3.** Positive nuclear area(%) of immunohistochemical staining for hormone receptor according to visual scoring

		Visual Scoring			
		-	1+	2+	3+
Image Analysis (PNA, %) M±SD	ER*	N=27	N=10	N=9	N=15
		2.79	6.53	20.06	44.12
		±4.35	±8.99	±5.85	±10.12
	PR*	N=25	N=11	N=2	N=3
2.41		7.24	12.95	61.17	
		±3.67	±8.90	±0.29	±36.48

ER: estrogen receptor, PR: progesterone receptor, PNA: positive nuclear area, M±SD: mean±standard deviation, N: number

\* r=0.87(p<0.0001), \*\* r=0.74(p<0.0001)

**Table 4.** Correlation between PNA of hormone receptors and lymph node status, nuclear grade and tumor size

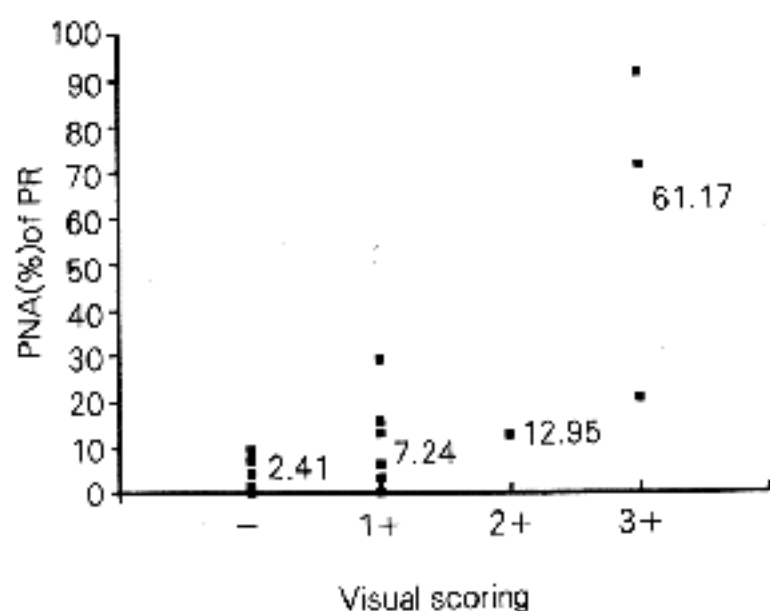
		No of Metastatic LN				Nuclear Grade			Tumor Size				Total
		0	1~3	>3	UK	0~1	2	3~4	<2	2~5	>5	UK	
ER (PNA, %)	<5	6	2	2	1	5	4	2	4	2	5		11
	5~15	3	2	2		3	4		1	3	3		7
	15~30	2	4	1	1	4	4		1	6	1		8
	>30	5	4	6		3	10	2	1	10	3	1	15
PR (PNA, %)	<5	9	10	7	1	13	13	1	5	15	7		27
	5~15	4	1	3	1	2	6	1		5	3	1	9
	15~30	1	1	1			2	1		1	2		3
	>30	2					1	1	2				2
Total		16	12	11	2	15	22	4	7	21	12	1	41

ER: estrogen receptor, PR: progesterone receptor, PNA: positive nuclear area, LN: lymph node, UK: unknown

**Table 5.** Correlation between Her-2/neu oncoprotein expression and lymph node status, nuclear grade and tumor size

Her-2/neu	No of Metastatic LN				Nuclear Grade			Tumor Size				Total
	0	1~3	>3	UK	0~1	2	3~4	<2	2~5	>5	UK	
<1 %	11	4	8	1	9	12	3	4	14	5	1	24
1~5 %	1	7	2		4	8	1	2	6	5		13
5~10%		1		1	1	1		1		1		2
>10%			1		1	1			1	1		2
Total	16	12	11	2	15	22	4	7	21	12	1	41

LN: lymph node, UK: unknown



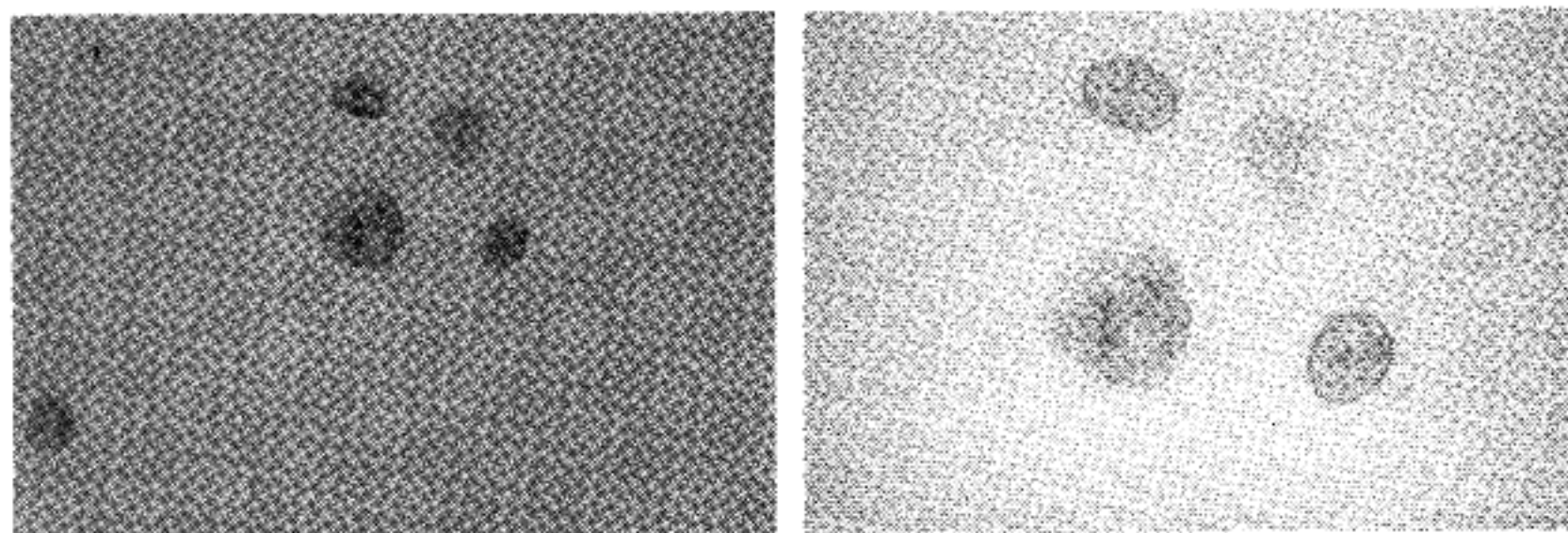
**Fig. 6.** Comparative scatterogram between visual scoring and positive nuclear area of progesterone receptor.

반응한 예가 25예였다(Fig. 6). 화상분석기를 이용한 정량적 검색에서 positive nuclear area(PNA)가 1% 미만인 17예, 1%이상 5% 미만인 10예, 5%이상 15%미만이 9예, 15%이상 30%미만이 3예, 30%이상인 2예였다. 음성인 집단의 PNA의 평균치가 2.41% ( $\pm 3.67$ ), 1+는 7.24% ( $\pm 8.9$ ), 2+는 12.95% ( $\pm 0.29$ )였고, 3+는 61.17% ( $\pm 36.48$ )이었다(Table 3). 염색상도에 따라 PNA는 유의하게 증가되었고( $r=0.74$ ,  $p=0.0001$ ), 5%이상을 양성으로 판정하였을 때, 양성인 14예(34%), 음성이 27예(66%)였다.

PNA가 30%까지였던 예들에서 림프절 전이여부 및 전이 설의 수와는 상관관계가 없었으나 30%이상인 2예는 림프절 전이가 없었다. 핵분화와의 관계는 PNA가 높을수록 핵분화도가 높은 것을 알 수 있었으나 통계적인 유의성은 없었고, 크기와는 무관하였다(Table 4).

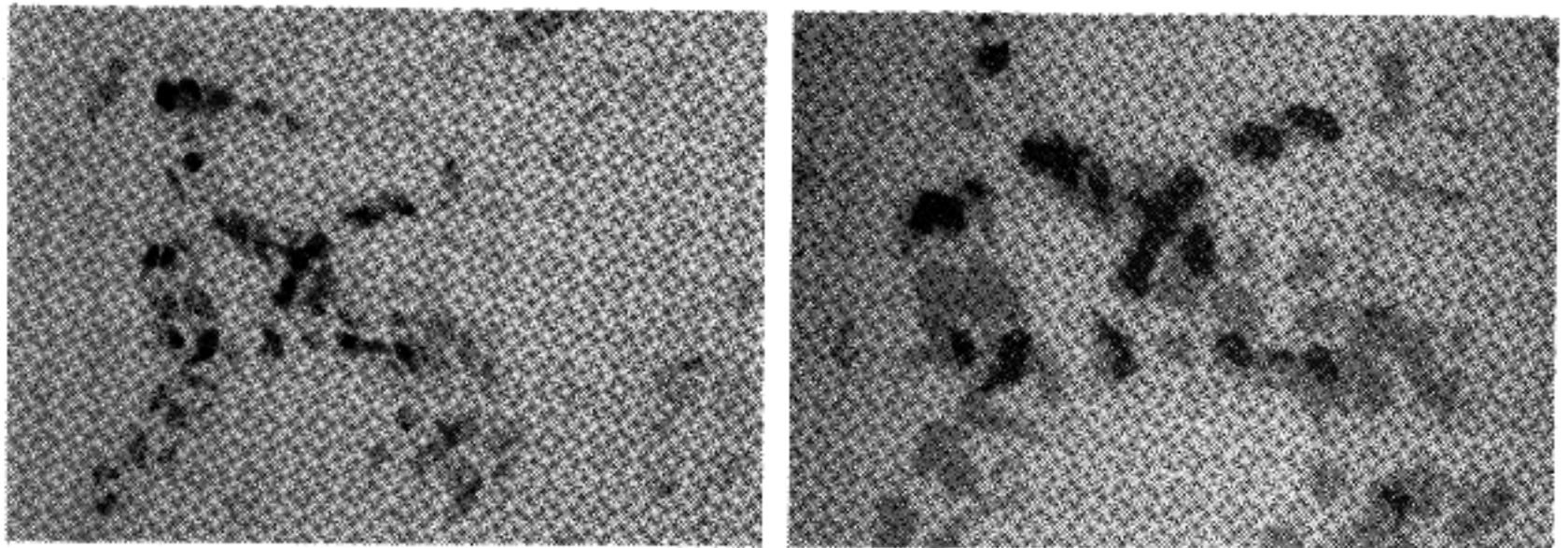
### 3. Her-2/neu 종양단백의 표현

광학현미경을 이용한 검색에서 Her-2/neu 종양단

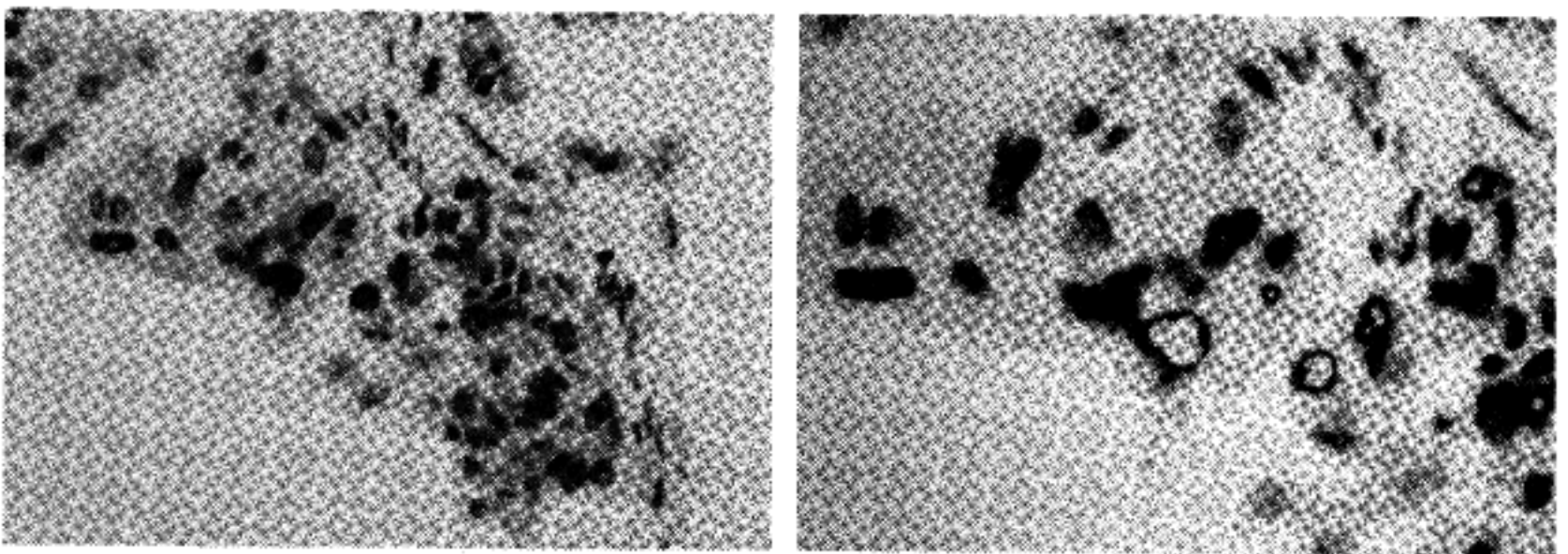


**Fig. 7.** DNA measurement by Image Analyzer: Feulgen-stained touch imprint(left) and the image on the analyzer(right). The prominent unstained nucleoli are seen.





**Fig. 8.** Quantitation of Estrogen and Progesterone receptor: Many ER-positive brown nuclei and negative green nuclei(LSAB-peroxidase, left), and the image showing brown positive nuclear area and negative green nuclear area(right).



**Fig. 9.** Quantitation of Her-2/neu Oncoprotein: Membranous and cytoplasmic red staining on the tumor cells and Feulgen-stained nuclei(LSAB-AP stain, left)and the image showing red Her-2/neu positive cytomeric area and black Feulgen stained nuclei(right).

백에 대한 면역조직화학적염색에 양성인 예는 23예, 음성인 예가 18예였고, 화상분석으로 분석된 경우 SKBR3 cell line에서의 세포당 함유하고 있는 종양 단백질 양에 비교한 각 예의 함유량은 1%이상인 17예였는데, 이중 2예만이 10%이상의 과발현을 보였고 2예는 5% 이상 10% 미만의 집단에 속했다.

Her-2/neu 종양단백의 표현 여부 및 표현 정도는 림프절 전이와는 관계가 없었으나 5% 이상의 과발현을 보인 4예가 핵분화도가 낮은 군에 속하였으며, 10% 이상의 과발현을 보인 2예는 종양의 크기가 큰 군에 속하였고(Table 5), 에스트로젠과 프로게스테론 수용체가 음성이었다. 또 DNA 배수성과의 비교에서 5

%이상의 과발현을 보인 4예 모두가 사배수성 종양이었다.

### 고 안

유방암은 미국의 경우 여성 암 중 27%로서 가장 많은 빈도를 보이고 우리나라에서는 여성 암 중 7~9%로 자궁암, 위암 다음으로 흔한 발생빈도를 보이며<sup>2)</sup>, 그동안 유방암에 대한 여러 가지 치료방법의 개선 및 발전에도 불구하고 유방암 환자의 생존율은 만족할 만한 진전이 없다. 전통적으로 종양의 크기, 액와 림프절의 전이여부 및 환자의 계경상태가 예후인자로 사용되

어 왔다. 그러나 최근에는 초기 발견 당시 액와 림프절이 축진 안되고 종양의 크기가 작을 때 발견되는 경향이 많아져 이런 경우 림프절과 종양의 크기로 예후를 예견하기가 불가능하여지고 액와림프절의 전이가 없는 조기유암의 경우도 약 25~30%의 환자에서 재발이 일어나게 되는 바 액와 림프절이 음성인 고위험군의 환자를 선별하기 위한 여러가지 방법들이 모색되고 있다. 현재 DNA 배수성과 예후는 밀접한 관계가 있다고 알려져 있으며, Merkel등<sup>32)</sup>과 Friedlander등<sup>33)</sup>은 고형종양 중 유방암, 결장암, 폐암, 신세포암, 방광암 및 흑색종에서 비배수성일 경우에 이배수성에 비해서 예후가 나쁘다고 하였다. Clark등<sup>32)</sup>은 림프절에 전이가 없는 유방암에서 이배수성 종양과 비교했을 때 비배수성 종양이 더 저조한 무병생존율을 보인다고 하였다. 종양의 배수성은 유세포추정기를 이용하여 측정할 수 있으나 화상분석기를 이용하여도 측정할 수 있다. 화상분석기를 이용한 측정은 소수의 비정상 세포도 형태학적으로 확인하여 분석할 수 있기 때문에 소수의 세포집단을 놓치는 일이 적어 생검조직의 양이 적은 경우나 세침 흡입으로 얻은 검체도 적용할 수 있는 장점이 있으나, 변이계수(CV)가 커서 이배수성에게 가까운 종양세포 집단은 구별하기 어려운 단점이 있다<sup>34)</sup>. 반면에 유세포 분석기를 이용한 분석에서는 소수의 비배수성 세포들이 다수의 이배수성 세포들 사이에서 소실될 가능성은 있으나 많은 수의 세포를 분석하기 때문에 통계학적인 의의는 더 크며 Synovec등<sup>35)</sup>은 공기 중에서 건조시킨 도말 표본으로 측정하였을 때 histogram의 peak가 0.5N씩 오른쪽으로 이동한다고 하였고, 따라서 2.5N에 위치한 peak까지 이배수성으로 판정하라고 하였다. 그러나 이러한 장 단점들에도 불구하고 화상분석기와 유세포 측정기를 이용한 DNA 측정 간에 75~91%의 좋은 상관관계가 증명되고 있다<sup>36-39)</sup>. 본 연구에서 화상분석법과 유세포추정법으로 구한 DNA 지수는 두 방법 간에 유의한 차이가 없는 것을 보여주었다. 또 배수성 판정시 화상분석법에서는 상기 기술한 점들을 감안 하여 DNA 지수가 0.9~1.10에 해당되는 예를 이배수성으로 판정하였을 때 두 가지 방법간의 일치율은 80%로서 다른 보고들과 비슷한 결과를 나타내어서, 배수성검사에 있어서 화상분석기의 사용이 유세포분석기를 대신할 수 있는 좋은 방법임을 보여주었다.

과거에는 핵분화도로써 예후를 예측하기도 하였다. Fisher등<sup>40)</sup>은 5년 무병생존율이 good nuclear grade인 경우 80%인데 반해, poor nuclear grade인 경우 64%였다고 하며, 또 T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>인 환자의 20년 후 재발율도 good nuclear grade인 경우 17%, poor nuclear grade인 경우 30%였다는 보고<sup>41)</sup>가 있고 여러 가지 예후인자들 중에 가장 유용하다고 밝혔으나 주관적인 판단에 의존하기 때문에 관찰자들 간에 재현율이 낮은 것이 단점으로 대두되고 있다<sup>42)</sup>. 따라서 보

다 객관적이며 재현성이 있는 방법인 유세포추정기나 화상분석기를 이용한 DNA함량과의 비교가 필요하였고, Falleniuse등<sup>43)</sup>은 핵분화도가 나빠질수록 DNA 함량이 많아진다고 보고하였다. 본 연구에서는 핵분화도에 따른 DNA 함량의 차이는 없었다.

유방암의 발암과정에서 중요한 역할을 한다는 에스트로젠과 프로세스테론 수용체의 양이 유방암 환자의 예후를 예견하는데 있어서 사용되고 있으며 특히 폐경기 환자에서 에스트로젠 수용체가 있는 경우 무병생존율이 높다고 한다. 즉 에스트로젠 수용체가 있는 경우 호르몬치료에 약 50%가 반응하는데 반하여, 에스트로젠 수용체가 없는 경우 호르몬치료에 거의 반응하지 않는다고 알려져있다<sup>8,9,11,43)</sup>. 그러나 에스트로젠 수용체가 존재하는 종양에서도 40%가 호르몬치료에 반응을 보이지 않은 반면 약 10% 정도의 에스트로젠 수용체 음성인 환자에서도 호르몬치료에 반응을 한다고 한다. 이러한 것들은 에스트로젠 수용체가 같은 종양 내에서도 균일하게 존재하지 않으며, 에스트로젠 수용체가 내인성 혹은 외인성 에스트로젠과 결합하거나 검사의 표준화가 어렵기 때문인 것으로 설명되지만<sup>44)</sup> 호르몬 수용체의 양에 따라서도 치료에 반응하는율이 달라지기 때문에 정량적인 분석이 요구되고 있다<sup>45)</sup>. 즉 에스트로젠 수용체의 함량이 100 fmol/mg 이상인 경우 호르몬 치료의 관해율은 81%에 달한다. 그러나 생화학적인 측정에는 충분한 신선조직이 필요할 뿐 아니라 정확히 종양 부위에서 검체를 채취해야 하고, 비용이 많이 드는 단점이 있다. 최근 화상분석기를 이용하여 에스트로젠 수용체에 대한 면역조직화학적 염색의 정량적인 측정이 시도되고 있는데<sup>17-19,44-46)</sup> 에스트로젠 수용체의 경우 positive nuclear area나 QIC SCORE[(positive percentage × positive stain intensity) ÷ 10]등을 구하여 다른 정량분석이나 면역조직화학적염색의 정도와 비교한 보고들을 참고하면 Bacus등<sup>17)</sup>은 QIC SCORE가 18이상이면 에스트로젠 수용체의 양이 10 fmol/mg이상이라고 하였고 Bad-dourae등<sup>44)</sup>은 positive nuclear area가 18%이상을, El-Badawy등<sup>19)</sup>은 1%이상을, Esteban등<sup>45)</sup>은 5%이상인 경우를 10 fmol/mg이상의 에스트로젠 수용체를 함유한다고 한다. 본 연구에서는 에스트로젠과 프로세스테론 수용체에 대한 positive nuclear area로써 semiquantitation은 하였으나 생화학적 정량분석과의 비교를 하지않았기 때문에 positive nuclear area로부터 호르몬 수용체의 절대값은 구할 수가 없었다. 정확한 cut-off value는 고정방법이나 염색에 사용한 일차 항체의 종류에 따라 달라질 것으로 생각된다.

프로세스테론의 중요성에 관하여는 아직도 논쟁이 많은데, 에스트로젠 수용체가 양성인 환자에서 프로세스테론 수용체가 양성인 경우 호르몬 치료의 관해율은 74%인 반면, 프로세스테론 수용체 음성인 경우 관해율은 28%에 지나지 않는다고 하며, Fisher등<sup>40)</sup>은

PR의 양이 10 fmol/mg 이상이면 환자의 생존율이 높아진다고 하였으며 혹자는 PR의 양이 종양의 크기보다 더 중요한 예후인자라고 하였다<sup>20</sup>. 그러나 환자의 생존율이 PR의 양보다는 ER의 양에 더 영향을 받는다는 견해가 일반적이다. 그리고 호르몬 수용체 이외의 종양의 분화도, 증식력 등의 다른 인자들과 함께 분석한 연구에서는 PR과 ER의 예후인자로서의 가치는 감소되는 것으로 밝혀지고 있다<sup>20, 41</sup>. Larsimont 등<sup>42</sup>은 유방암에서 에스트로젠 수용체 함량과 세포형 태학적 변수(핵의 크기, 모양, DNA 함량, 염색체 이상)와의 관계를 알아 보았는데 에스트로젠 수용체가 존재하지 않는 유방암에서는 에스트로젠 수용체가 존재하는 유방암과 비교해서 핵이 크고 DNA 함량이 많았고 또 염색체 이상도 유의하게 농축 되었으며 증식 지수도 높게 나타났다고 보고했다. 본 연구에서는 호르몬 수용체 존재유무와 배수성과 상관관계를 보이지 않았고, PNA가 높은 군에서 핵분화도가 높은 경향이 있었다. 본 연구는 종양의 신선조직을 이용한 전향적 연구로 환자의 생존율과 호르몬 수용체의 양을 비교할 수 없었기 때문에 생존율 대신 간접적으로 배수성과 비교하였으나 배수성과 호르몬 수용체의 양과는 상관관계가 없었고, 이것은 비배수성 종양이 전 연구 대상의 90%로 높은 비율을 차지하였기 때문으로 분석된다.

악성종양에서 Her-2/neu의 중요성은 그 종양 산물이 유방, 타액선의 병변이나 그밖에 다른 선암에서 발견되면서 대두되기 시작했다. Her-2/neu protooncogene은 인체의 종양에서 확인된 암유전자로서 17번 염색체의 p21에 위치하며<sup>43</sup>, Her-2/neu 종양단백은 성장인자의 수용체 역할을 하는 당단백으로서 표피성장인자 수용체와 구조적으로 비슷하다<sup>25</sup>. 유방암에서 Her-2/neu 종양 유전자의 증폭은 약 10~40%의 예에서 나타나며, 유전자 증폭이 동반된 유방암에서 erbB-2 mRNA의 과발현은 32~128배로 증가되어 있다고 한다<sup>44</sup>. Berger 등<sup>26</sup>은 유전자 증폭 외에 Her-2/neu 단백을 증가시키는 다른 기전이 있음을 제시하여 Her-2/neu 유전단백 염색법이 유전자 증폭을 검사하는 것보다 더 효과적이며 적절하다고 주장하였으며, Her-2/neu 유전단백에 대한 면역조직화학염색의 판정 기준인 강양성 혹은 약양성, 또는 분명하게 세포질막에 염색이 되었는가 하는 등의 주관적 기준<sup>45</sup>에 의존하지 않아도 되는 장점이 있다. 또, 면역조직화학염색의 장점인 조직학적인 관찰을 함께 할 수 있어서 생화학적인 방법을 이용하였을 때 종양이 아닌 부분에서 측정할 가능성을 배제할 수 있었다<sup>26</sup>. Slamon 등<sup>27</sup>은 전이된 림프절의 수와 Her-2/neu 종양유전자 증폭의 정도 사이에 상관관계가 있음을 보여주었고, 후에 Her-2/neu 종양유전자 증폭이 림프절 전이가 있는 환자 군에서 독립적인 예후인자임을 보여주었다. 또 다른 연구에서도 Her-2/neu 종양 유전자의

증폭이 림프절 전이가 있는 환자에서 나쁜 예후를 예측할 수 있다고 하였다<sup>33-36</sup>. Paterson 등<sup>37</sup>은 림프절 전이가 없는 환자중 후에 재발한 환자군에서 Her-2/neu 종양유전자가 의미 있게 증폭된 것을 보고 이 종양유전자의 증폭이 림프절에 전이가 없는 환자에서 중요한 예후인자로 사용될 수 있음을 시사하였다. Paik 등<sup>46</sup>은 초기 유방암의 Her-2/neu에 대한 면역조직화학 염색을 이용한 실험에서 나쁜 핵분화도를 보이는 종양 중 29%에서 유전자의 증폭이 일어난 반면에 좋은 핵분화도를 보이는 경우 12%에서만 유전자의 증폭이 발견되었으며 5년 생존율도 Her-2/neu 유전자의 증폭이 일어난 환자에서 65%인데 반해 증폭이 일어나지 않은 환자는 85%임을 보여주었다. Gullick 등<sup>38</sup> Tsuda 등<sup>39</sup>은 Her-2/neu 종양단백의 과발현은 종양의 분화가 나빠지는 것과는 관계 있었으나 에스트로젠 수용체 존재여부 림프절 전이, 종양의 크기와 관련이 없었다고 하였으나 유전자의 과발현 유무가 무병생존율의 현저한 차이를 보였다. 여러가지 문헌 보고를 종합하여 볼때 Her-2/neu 종양 유전자의 증폭은 예후를 예견할 수 있었으나 좀 더 명확한 예후인자로서의 위치는 림프절 전이가 없는 더 많은 환자와 오랜 추적기간을 통한 연구가 필요할 것으로 보인다. 본 연구에서 SKBR3 cell line을 대조세포로 이용해, 이 대조세포를 기준으로한 상대적 정량분석을 하였고, Bacus 등<sup>20</sup>의 연구결과를 기준으로 SKBR3 cell line이 함유한 종양단백의 10%이상인 예를 종양단백의 과발현으로 분석하였다. 본 연구에서는 2예에서 Her-2/neu의 과발현이 발견되었는데, 이 2예의 배수성은 모두 사배수성 종양이었고 모두 에스트로젠과 프로제스테론에 음성이었지만 Her-2/neu 종양단백이 사배수성이거나 호르몬 수용체 존재여부와 관계 있다고 결정지을 수 없었다.

본 연구에서 시도한 화상분석법을 이용한 배수성 검사나 면역조직화학적 결과 판정은 적은 양의 조직, 즉 생검으로 얻은 작은 조직 절편이나 세침흡입검사를 통해 검체를 얻은 경우 도말 표본 만으로도 결과를 알 수 있는 장점 외에 정량분석이 가능하며, 종양세포만을 측정할 수 있고, 다른 조직학적인 점을 고려할 수 있다는 점에서 유용하였으나, 호르몬 수용체 검사에서는 다른 생화학적인 정량분석과 비교하여 정확한 cut-off value를 정해야 좀더 정확한 정량분석이 가능할 것이며, 앞으로 호르몬 수용체에 대한 정량분석은 임상적으로 유용한 검사방법이 될 것으로 사료된다.

### 결 론

유방암 예후 판정인자로서의 DNA 배수성, 에스트로젠과 프로제스테론 수용체 및 Her-2/neu 종양단백 발현 정도의 역할을 알아보기 위하여 유방암 41예를 대상으로 화상분석법과 유세포 측정법으로 DNA 배수



성 검사를 시행하고, 면역화학염색법으로 염색된 에스트로젠 및 프로세스테론 수용체와 Her-2/neu 종양단백을 화상분석기를 이용하여 정량분석한 결과를 종양의 크기, 핵분화도 및 림프절 전이여부와 비교, 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) DNA 배수성검사서 화상분석법에서는 40예 중 36예에서 비배수성을 보여 90%에 해당하였으나 유세포측정법으로는 28예로써 70%에 해당하여 DNA 비배수성의 검출율은 화상분석법에 의한 경우에 더 높음을 알 수 있었으며, 두 방법의 일치율은 80%였다.

2) 에스트로젠 수용체 염색에서 positive nuclear area(PNA)가 5%이상인 예를 양성으로 하였을 때 30예(73%)가 양성이었고, 에스트로젠 수용체는 림프절 전이와는 관계가 없었으나 PNA가 30%이상인 예들은 핵분화도가 높았고, 종양의 크기가 5 cm이상인 경우는 PNA가 낮았다.

3) 프로세스테론 수용체 염색의 positive nuclear area(PNA)가 5%이상인 경우를 양성으로 하였을 때 14예(34%)가 양성이었으며 PNA가 30%이상인 예는 림프절 전이가 없었고, 핵분화도는 PNA가 높을 수록 좋았으나, 종양의 크기와는 상관관계가 없었다.

4) Her-2/neu 종양단백의 면역효소염색에 대한 광학현미경적 검색에서 41예 중 23예가 양성(53.6%)이었으나, 화상분석법을 이용한 정량분석에서는 2예에서 SKBR3 cell line이 함유한 종양단백의 10%이상의 과발현을 보였고, 2예에서는 5~10%에 속하였다. 이들 4예 모두 사배수성 종양이었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 유방암에서 화상분석법을 이용한 DNA 배수성검사는 유세포 측정법을 대신할 수 있는 좋은 방법으로 생각되며, 호르몬 수용체 및 종양단백에 대한 화상분석법을 이용한 측정은 객관성 있는 정량적인 검색을 가능하게 하여 앞으로 유방암 환자의 치료 및 예후판정에 중요한 정보를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

### 참 고 문 헌

- 1) 유근영, 안윤옥, 박병주. 의료보험자료를 이용한 암 입원양상의 연차적 변화. 서울의대잡지 1988; 29: 45-53.
- 2) Henson DE, Ries L, Freedman LS, Carriaga M. Relationship among outcome, stage of disease and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. Cancer 1991; 68: 2141-9.
- 3) Fisher ER, Redmond C, Fisher B, Bass G. Pathologic findings from the national surgical adjuvant breast and bowel project(NSABP). Cancer 1990; 65: 2121-8.
- 4) Parl FF, Schmidt BP, Dupont WD, Wanger RK. Prognostic significance of estrogen receptor status

- in breast cancer in relation to tumor stage, axillary node metastasis, and histopathologic grading. Cancer 1984; 2237-47.
- 5) Fallenius AG, Auer GU, Carstensen JM. Prognostic significance of DNA measurements in 409 consecutive breast cancer patients. Cancer 1988; 62: 331-41
- 6) Auer G, Eriksson E, Azavedo E, Caspersson T, wallgren A. Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinomas in humans. Cancer Res 1984; 44: 394-6.
- 7) Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, McGuire WL. Predictions of survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. N Engl J Med 320: 627-33.
- 8) Vollenweider-Zerargui L, Barrelet L, Wong Y, Lemarchand-Béraud T, Gomez F. The predictive value of estrogen and progesterone receptors' concentrations on the clinical behavior of breast cancer in women. Cancer 1986; 57: 1171-80.
- 9) Anderson J, Poulsen HS. Immunohistochemical estrogen receptor determination in paraffin-embedded tissue: prediction of response to hormonal treatment in advanced breast cancer. Cancer 1989; 64: 1901-8.
- 10) McCarty KS Jr, McCarty KS. Steroid hormone receptors in the regulation of differentiation. Am J Pathol 1977; 86: 705-44.
- 11) Williams MR, Todd JH, Ellis IO, Dowle CS, Haybittle JL, Elston CW, Nicholson RI, Griffiths K, Blamey RW. Oestrogen receptors in primary and advanced breast cancer: an eight year review cases. Br J Cancer 1987; 55: 67-73.
- 12) Wong WW, Vijayakumar S, Weichselbaum RR. Prognostic indicators in node-negative early stage breast cancer. Am J Med 1992; 92: 539-48.
- 13) Moe RE, Moe KS, Porter P, Gown A M, Ellis G, Tapper D. Expression of Her-2/neu oncogene protein product and epidermal growth factor receptors in surgical specimens of human breast cancers. Am J Surg 1991; 161: 580-3.
- 14) Møster J, Robertson DM, Feherty P, Kellie AE. Determination of high-affinity receptor sites in uterine supernatant preparations. Biochem J 1970; 120: 831-6.
- 15) King WJ, Greene GL. Monoclonal antibodies localize estrogen receptors in the nuclei of target cells. Nature 1984; 307: 745-7.
- 16) McCarty KS Jr, Miller LS, Cox E B, Konrath J, McCarty KS. Estrogen receptor analysis: correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. Arch Pathol Lab Med 1985; 109: 716-21.

- 17) Bacus S, Flowers JL, Press MF, Bacus JW, McCartney KS. *The evaluation of Oestrogen receptor in primary breast carcinoma by computer-assisted image analysis. Am J Clin Pathol* 1988; 90: 233-9.
- 18) Masada CT, Wisecarver JL, Haven M, Linder J. *Quantitative immunohistochemistry of hormone receptors in breast carcinoma. Lab Invest* 1990; 62: 63A.
- 19) El-Badawy N, Cohen C, DeRose PB, Sgoutas D. *Immunohistochemical estrogen receptor assay: Quantitation by image analysis. Mod Pathol* 1991; 4: 305-9.
- 20) Bacus SS, Bacus JW, Slamon DJ, Press MF. *Her-2/neu oncogene expression and DNA Ploidy Analysis in breast Cancer. Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 164-9.
- 21) Sigursson H, Baldetorp B, Borg A, Dalberg M, Fernö M, Killander D, Olsson H. *Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. N Engl J Med* 1990; 322: 1045-53.
- 22) McGuire WL. *DNA flowcytometry and other prognostic factors in breast carcinoma. Cancer Invest* 1990; 8: 245-6.
- 23) Clark GM, Owens MA, McGuire WL. *A new S-phase model predicts recurrence for aneuploid as well as diploid in node negative breast cancer patient. Proc Am Soc Clin Oncol* 1991; 10: 49.
- 24) Dressler LG, Eudey L, Gray R. *DNA flow cytometry measurements are prognostic for time to recurrence in node negative breast cancer patients. Proc Am Soc Clin Oncol* 1990; 9: 81.
- 25) Schecher AL, Stern DF, Vaidyanathan L. *The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-M tumor antigen. Nature* 1984; 312:513-6.
- 26) Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, Levinson A, Ullrich A. *Tyrosine Kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. Science* 1985; 230: 1132-9.
- 27) Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF. *Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science* 1989; 244: 707-12.
- 28) Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. *Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the Her-2/neu oncogene. Science* 1987; 235: 177-82.
- 29) Van De Vijver MJ, Peterse JL, Mooi WJ, Wisman P, Lomans J, Dalesio O, nusse R. *Neu-protein overexpression in breast cancer. N Engl J Med* 1988; 319: 1239-45.
- 30) Black MM, Speer FD. *Nuclear structure in cancer tissues. Surg Gyn Obst* 1957; 105: 97-102.
- 31) 김인철: 유방암의 조기진단. *대한의학협회지* 1992; 35: 479-83.
- 32) Merkel DE, McGuire WL. *Ploidy, Proliferative activity and prognosis: DNA flow cytometry of solid tumors. Cancer* 1990; 65: 1194-1205.
- 33) Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW. *Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumors. J Clin Pathol* 1984; 37: 961-74.
- 34) McFadden PW, Cloiwy LJ, Daehnert K, Hause LL, Koethe SM. *Image analysis confirmation of DNA aneuploidy in flowcytometric distribution having a wide coefficient of variation of G0/G1 peak. Am J Clin Pathol* 1990; 93: 637-42.
- 35) Synovec MS, Frierson HF, Pirruccello SJ, Linder J. *Comparison of DNA ploidy by microspectrophotometric image analysis versus flow cytometry. Lab Invest* 1989; 60: 94A.
- 36) Wilber DC, Zakowski MF, Kosciol CM, Sojda DF, Pastuszak WT. *DNA ploidy in breast lesions: A comparative study using two commercial image analysis system and flowcytometry. Anal Quan Cytol Histol* 1990; 12: 28-34.
- 37) Dawson AE, Norton JA, weinberg DS. *Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry. Am J Pathol* 1990; 136: 1115-24.
- 38) Lee AKC, Dugan J, Hamilton WM, Cook L, Heatley G, Kamat B, Silverman ML. *Quantitative DNA analysis in breast carcinomas: A comparison between image analysis and flow cytometry. Mod Pathol* 1991; 4: 178-82.
- 39) Bauer TW, Tubbs RR, Edinger MG, Suit PF, Gephardt GN, Levin HS. *A prospective comparison of DNA quantitation by image and flow cytometry. Am J Clin Pathol* 1990; 93: 322-26.
- 40) Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Caplan R, and other contributing NSABBPI. *Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients. J Clin Oncol* 1988; 6: 1076-87.
- 41) Rosen PP, Groshen S, Saigo PE, Kinne DW, Hellman S. *Pathological prognostic factors in stage I and Stage II breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 yrs. J Clin Oncol* 1989; 7: 1239-51.
- 42) Fallenius AG, Franzen SA, Auer GU. *Predictive values of nuclear DNA content in breast cancer in relation to clinical and morphologic factors. A retrospective study of 227 consecutive cases. Cancer*



- 1988; 62: 521-30.
- 43) Osborn CK, Yochmowitz MG, Knight WA, McGuire WL. *The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. Cancer* 1980; 46: 2884-8.
- 44) Baddoura FK, Cohen C, Unger ER, DeRose RB, Chenggis M. *Image Analysis for quantitation of estrogen receptor in formalin-fixed paraffin-embedded sections of breast carcinoma. Mod Pathol* 1991; 4: 91-5.
- 45) Esteban JM, Battifora H, Warsi A, Bacus S. *Quantitation of estrogen receptors on paraffin-embedded tumors by image analysis. Mod Pathol* 1991; 4: 53-7.
- 46) McClelland RA, Finlay P, Walker KJ, Nicholson D, Robertson JFR. *Automated quantitation of immunocytochemically localized estrogen receptors in human breast cancer. Cancer Res* 1990; 50: 3545-50.
- 47) Iarsimont D, Kiss R, D'olne D, Launoit Y, Mattheiem W, Paridaens R, Pasteels JL, Gompel C. *Correlation between nuclear cytomorphometric parameters and estrogen receptor levels in breast cancer. Cancer* 1989; 63: 2162-8.
- 48) 김병식, 노동영, 최국진, 이진국, 박성희, 김용일, 박주배. 유방 환자에 있어서 *c-erbB-2* 단백질 과발현과 림프절 전이, 종양의 크기, 나이 및 생존율과의 관계. *대한암학회지* 1991; 23: 20-7.
- 49) Paik S, Hazan R, Fisher ER, Sass RE, Fisher B, Redmond C, Schlessinger J, Lippman ME, King CR. *Pathologic findings from the national surgical adjuvant breast and bowel project: prognostic significance of *erbB-2* protein overexpression in primary breast cancer. J Clin Oncol* 1990; 8: 103-12.
- 50) Berger MS, Locher GW, Sauer S. *Correlation of *c-erbB-2* gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. Cancer Res* 1988; 48: 1238-43.
- 51) Bacus SS, Ruby SG, Weinberg DS, Chin D, Ortiz R, Bacus JW. *Her-2/neu oncogene expression and proliferation in breast cancers. Am J Pathol* 1990; 137: 103-11.
- 52) Baak JPA, Chin D, van Diest PJ, Ortiz R, Matze-Cok P, Bacus SS. *Comparative long-term prognostic value of quantitative Her-2/neu Protein expression, DNA ploidy, and morphometric and clinical features in paraffin-embedded invasive breast cancer. Lab Invest* 1991; 64: 215-23.
- 53) Tsuda H, Hirokashi S, Shimasato Y, Hirota T, Tsugane S, Yamamoto H, Miyajima N, Toyoshima K, Yamamoto T, Yokota J, Yoshida T, Sakamoto H. *Correlation between long-term survival in breast cancer patients and amplification of two putative oncogene coamplification units: *hst-1/int-2* and *c-erbB-2/ear-1*. Cancer Res* 1989; 40: 3104-8.
- 54) O'reilly SM, Barnes DM, Campjohn RS, Bartkova J, Gregory WM, Richards MA. *The relationship between *c-erbB-2* expression, S-phase fraction and prognosis in breast cancer. Br J Cancer* 1991; 63: 444-6.
- 55) Lovekin C, Ellis IO, Locker A, Robertson JFR, Bell J, Nicholson R, Gullick WJ, Elston CW, Blamey RW. **c-erbB-2* oncoprotein expression in primary and advanced breast cancer. Br J Cancer* 1991; 63: 439-43.
- 56) McCann AH, Dervan PA, O'Regan M, Gullick WJ, Tobin BMJ, Carney DN. *Prognostic significance of *c-erbB-2* oncoprotein and estrogen receptor status in human breast cancer. Cancer Res* 1991; 51: 3296-303.
- 57) Paterson MC, Dietrich KD, Danyluk J, Paterson AHG, Lees AW, Jamil N, Hanson J, Jenkins H, Krause BE, McBlain WA, Slamon DJ, Fourney RM. *Correlation between *c-erbB-2* amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. Cancer Res* 1991; 51: 556-67.
- 58) Gullick WJ, Love SB, Wright C, Bernes DM, Gusterson B, Harris AL. *Altman *C-erbB-2* protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patient with involved and uninvolved lymph nodes. Br J Cancer* 1991; 63: 434-438.