

정상 자궁내막 및 자궁내막선암 조직에서의 Heat Shock Protein(HSP)과 Estrogen Receptor(ER)에 대한 면역조직화학적 연구

고려대학교 의과대학 안암병원 해부병리과

조현이 · 김애리 · 이응석 · 김한겸 · 김인선

Immunohistochemical Study of Heat Shock Protein(HSP) and Estrogen Receptor(ER) in the Normal Endometrium and in Adenocarcinoma of the Endometrium

Hyuni Cho, M.D., Aeree Kim, M.D., Yung Suk Lee, M.D.
Han Kyeom Kim, M.D. and Insun Kim, M.D.

Department of Anatomical Pathology, Korea University Hospital

Heat shock protein(HSP), first found in the MCF-7 human breast tumor cell line is one of the estrogen-regulated proteins and its synthesis is stimulated by estradiol.

In this study, immunohistochemical staining was done for estrogen receptor(ER) and HSP on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections in twelve normal cyclic and twenty carcinomatous endometria.

1) During the proliferative and early secretory phases, the nuclei of surface and glandular epithelial cells and stromal cells had moderate to strong staining for ER, whereas during the mid and late secretory phases, the glandular epithelial and stromal cells had weak staining for ER. The surface epithelial cells had positive staining of variable intensity.

2) From the early proliferative to mid secretory phases, the glandular and surface epithelial cells showed a positive reaction of variable intensity for HSP. In the late secretory phase, the glandular and surface epithelial cells showed a weak positive or a negative reaction for HSP. During the menstrual cycle, the stromal cells remained negative for HSP.

3) In adenocarcinomas of the endometrium, 8 of 11(72.7%) well differentiated carcinomas were positive for both ER and HSP, while only 3 of 9(33.3%) moderately and poorly differentiated carcinomas were positive for ER and HSP.

In conclusion, ER and estrogen-regulated heat shock protein(HSP) were closely related in normal and carcinomatous endometria and the reactivity was decreased according to poor differentiation. (**Korean J Pathol 1995; 29: 205~211**)

Key Words: Heat shock protein, Estrogen receptor, Endometrium, Endometrial adenocarcinoma

서론

최근에는 유방암환자에서 홀몬치료를 위한 환자선택

접 수: 1994년 9월 12일, 게재승인: 1994년 11월 28일
주 소: 서울시 성북구 안암동 5가 126-1, 우편번호 136-071
고려대학교 의과대학 안암병원 해부병리과, 조현이

과 예후를 결정하는데 있어 estrogen receptor(ER)의 존재여부가 유용한 지표로써 받아들여지고 있다^{1,2)}. 그러나 홀몬에 대한 종양의 반응여부를 결정하는데 있어 홀몬과 그 수용체사이의 상호작용은 홀몬의 작용기전을 밝히는데 있어서 첫단계일 뿐이고 홀몬이 수용체에 결합한 후 많은 생화학적 그리고 생리적 반응들이 일어나게 된다³⁾. 이러한 반응들을 밝혀내기 위해서 종양이 postreceptor level에서도 여전히 홀몬에 대해

반응하는지 알아보는 것이 유용할 것이다. postreceptor level에서의 홀몬작용에 대한 여러 지표 가운데 estrogen-regulated proteins이 포함되는데 그 중의 하나가 heat shock protein(HSP)이다⁴⁾. HSP은 MCF-7 human breast tumor cell line의 세포질에서 최초로 발견된 단백질로 그 기능은 알 수 없으나 estradiol에 의해 그 합성이 촉진되며 주로 여성생식기와 ER과 PR(progesterone receptor)에 양성인 breast tumor cell lines에 존재하고 유방종양에서 HSP의 증가가 ER의 존재여부와 밀접한 관련이 있음이 밝혀졌다⁵⁻⁷⁾. 저자들은 정상 자궁내막에서 생리주기의 각 phases에 따른 ER 및 HSP의 변화양상을 살펴보고 악성 자궁내막에서 종양의 조직학적 분화도와 ER 및 HSP의 관련성과 상호관련성을 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

1987년부터 1993년 12월 사이에 고려대학교 안암병원에서 소파술 또는 전자궁적출술을 통하여 채취한 자궁내막조직을 재검토하여 파라핀 블록의 보관상태가 양호한 정상 12예와 자궁내막선암 20예를 선택하였다. 이중 정상 자궁내막조직은 증식기와 분비기의 초기, 중기, 말기에서 각각 2예씩 선택하였고 자궁내막선암은 고분화 11예, 중분화 6예, 저분화 3예를 선택하였다.

2. 방 법

통상적인 포르말린고정과 파라핀포매를 거친 조직을 6micrometer두께의 연속 절편을 만들어 xylene으로 3~5분간 탈파라핀하고 100%, 95%, 75% alcohol로 처리한 후 중류수로 흡수시킨 다음 한 절편은 HSP 또 다른 절편은 ER에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하였다.

1) **일차항체:** 단클론성으로 24~27KD의 HSP과 반응하는 BioGenex Laboratories의 항체와 Novocastra사의 ER에 대한 생쥐 단클론성 항체를 1:80과 1:2로 각각 희석하여 HSP과 ER염색에 사용하였다.

2) **면역조직화학적 염색:** 탈파라핀한 후 흡수시킨 절편을 0.3%과산화수소로 내인성 과산화 효소를 억제시킨 다음, pH7.6의 Tris완충액(TBS)으로 10분간 수세후 정상 염소혈청을 가하여 10분간 반응시켰다. 희석된 일차항체를 가한 다음 HSP은 상온에서 2시간, ER은 4°C에서 다음날 아침까지 반응시킨 뒤 TBS에서 수세하고 Biotin과 결합된 이차항체에 30분간 반응시켰다. TBS에 수세하고 streptavidin과 peroxidase가 결합된 용액을 30분간 반응시킨 후 3,

3'-diaminobenzidine(DAB)으로 5~10분간 양성대조세포가 갈색으로 염색될 때까지 발색시킨 다음 ethyl green으로 대조 염색하고 봉입하였다.

3) **염색반응의 결과 판정:** 염색의 결과 판독은 ER인 경우 핵이 갈색으로 염색된 세포를 양성으로 하였고 HSP은 세포질에 갈색으로 염색된 세포를 양성으로 간주하였다. 양성정도는 정상 자궁내막조직에서 염색되는 정도를 강양성, 중등도 양성, 약양성으로 구분하였다.

4) **통계학적 분석:** 연구결과에 대한 통계학적 유의성 검정은 Chi square test로 하였다.

결 과

1. 정상 자궁내막

증식기부터 초기분비기까지 표면 및 선상피세포들과 기질세포들은 ER에 대해 중등도에서 강양성의 염색강도를 보인 반면, 중기와 후기분비기에는 선상피세포들과 기질세포들은 약양성의 염색을 보였으며 표면상피세포들은 다양한 강도의 양성반응을 보였다. 또 HSP에 대해서는 표면 및 선상피세포들은 증식기에서 중기분비기까지는 다양한 강도의 양성반응을 보였고 후기분비기에 이르러서는 약양성 또는 음성반응을 보인 반면, 기질세포들은 생리주기에 상관없이 모두 음성반응을 보였다(Fig. 1, 2).

2. 자궁내막선암

전체 20예중 11예가 ER과 HSP에 대해 모두 양성반응을 보였고 5예는 ER과 HSP에 대해 모두 음성반응을 보였으며 ER 또는 HSP만 양성인 경우는 각각 1예씩으로 전체적으로 자궁내막선암에서 ER과 HSP의 발현일치율은 80%로 양자의 발현이 통계학적으로 유의하게(p=0.013) 일치함을 알 수 있었다. 한편 조직학적 분화도에 따라서는 고분화암종 11예 중 10예(90.9%)가 ER과 HSP의 발현이 일치한 반면 중분화 또는 저분화암종 9예 중에서는 6예(66.6%)가 일치하여 조직학적 분화도가 나쁠수록 ER과 HSP의 발현일치율이 감소함을 알 수 있었다. 또한 고분화암종 11예 중 8예(72.7%)가 ER과 HSP 모두에 대해 양성반응을 보인 반면(Fig. 3) 중분화 또는 저분화암종 9예 중에서는 단지 3예(33.3%)만이 ER과 HSP모두에 대해 양성반응을 보여(Fig. 4) ER과 HSP의 반응성은 조직학적 분화도가 나쁠수록 감소한다는 것을 알 수 있었다(P=0.079)(Fig. 5, Table 1).

고 안

최근에는 유방암에서 ER의 존재여부가 홀몬치료에 반응할 것으로 추정되는 환자를 가리기 위한 유용한

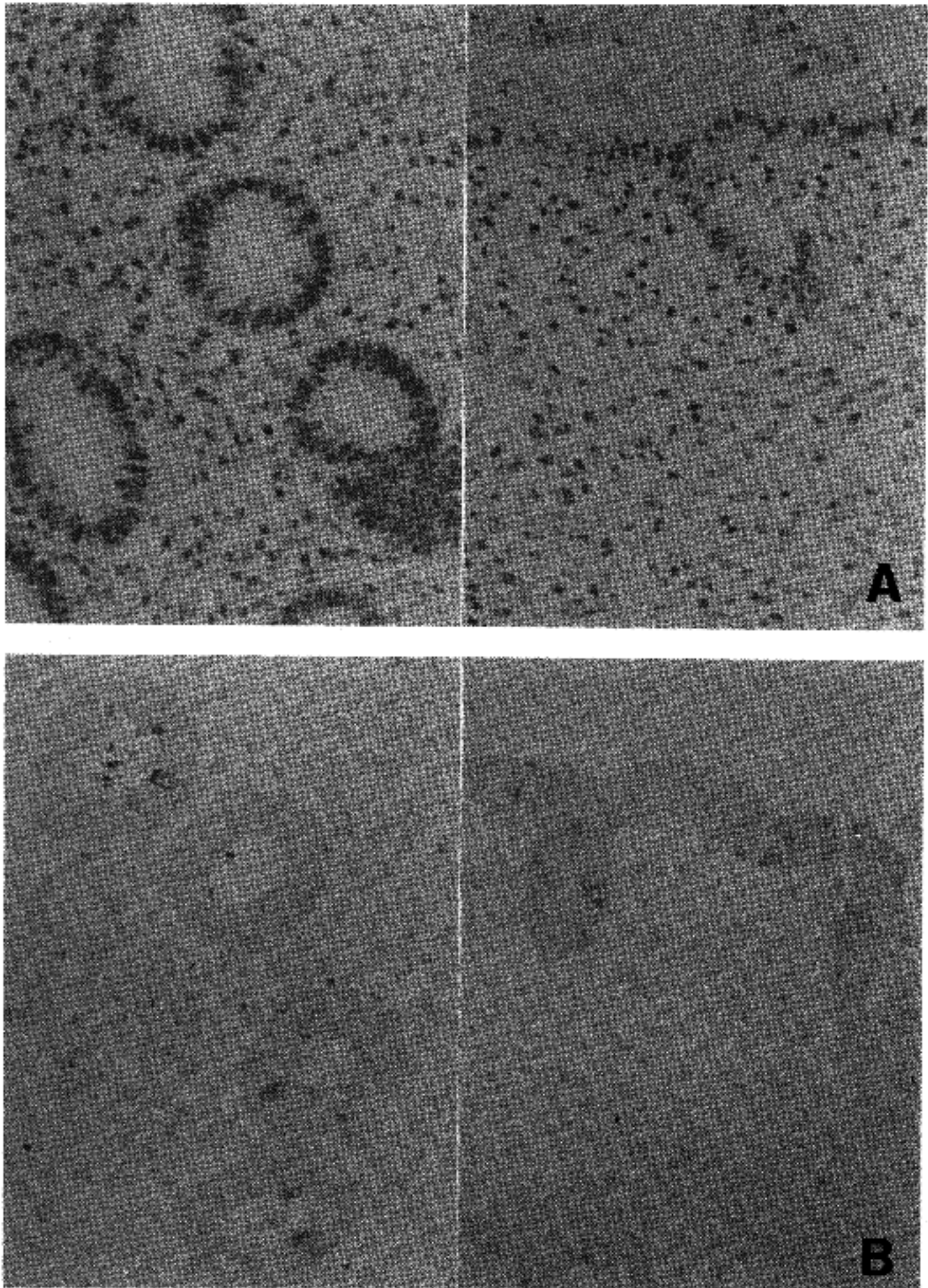


Fig. 1. Proliferative phase endometrium immunostained with antibodies for ER and HSP(ABC with ethyl-green counterstain). (A) The nuclei of surface and glandular epithelial cells and stromal cells have moderate to strong staining for ER. (B) The glandular and surface epithelial cells show positive reactions of variable intensity for HSP, but the stromal cells are negative for HSP.

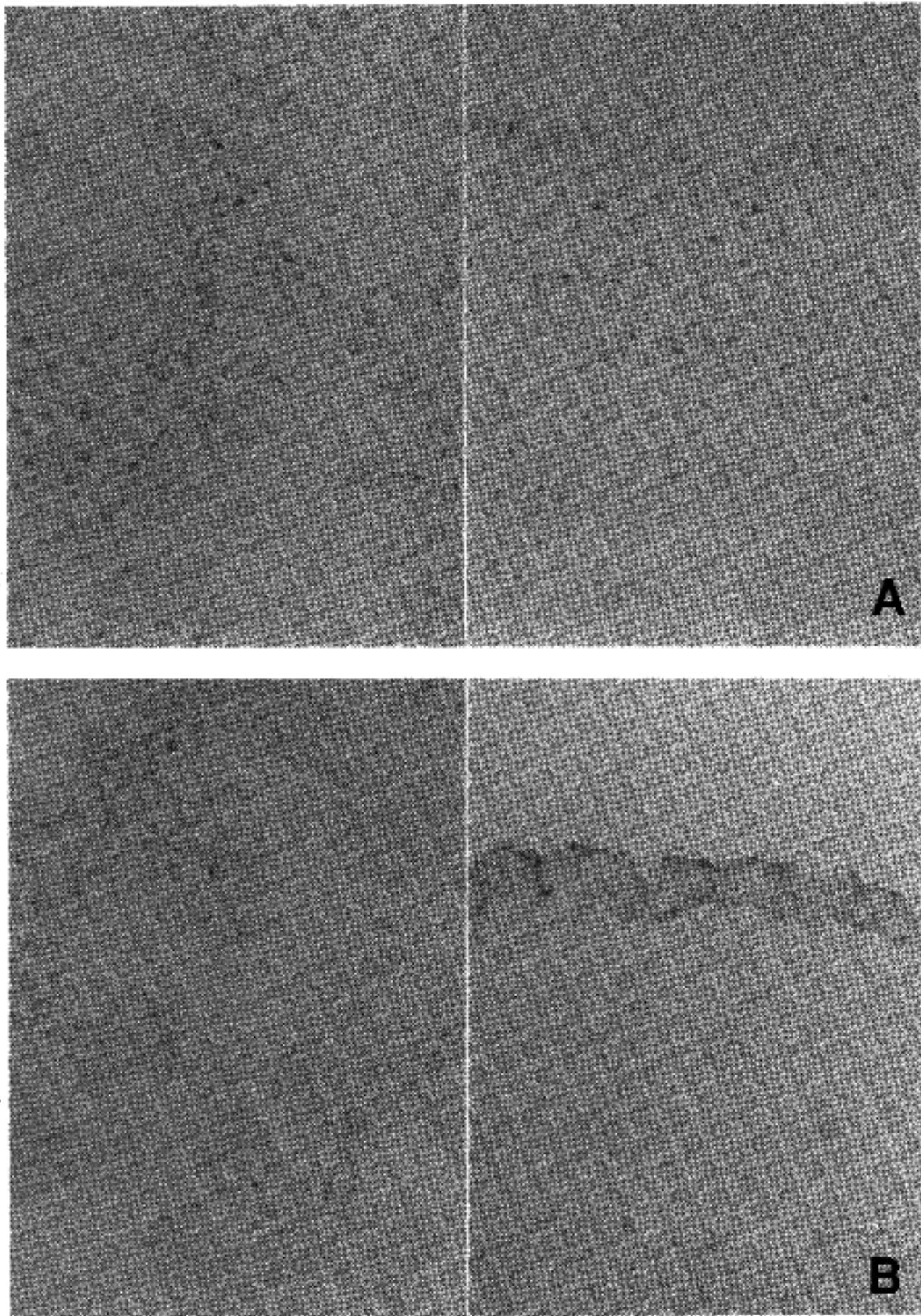


Fig. 2. Late secretory phase endometrium immunostained with antibodies for ER and HSP(ABC with ethyl green counterstain). (A) The nuclei of glandular epithelial cells and stromal cells show weak staining for ER and the nuclei of surface epithelial cells have positive staining of variable intensity. (B) The glandular and surface epithelial cells show weak positive or negative reaction for HSP. The stromal cells remained negative for HSP during the menstrual cycle.

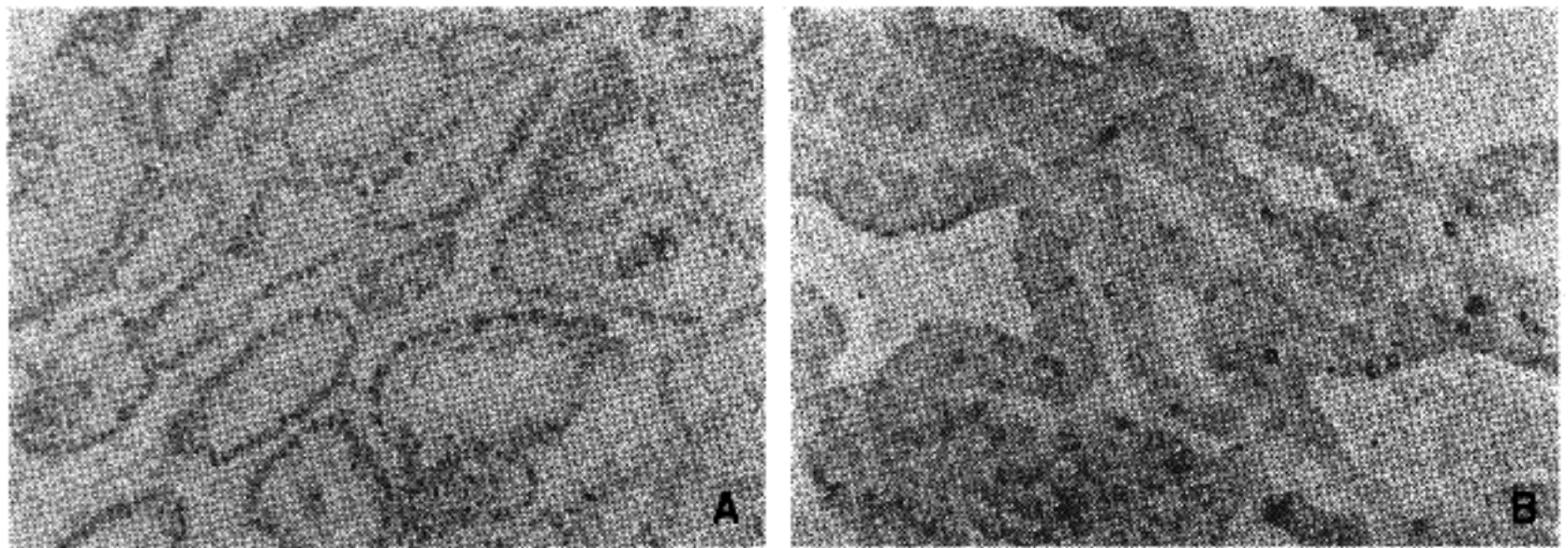


Fig. 3. Well differentiated adenocarcinomatous endometrium immunostained with antibodies for ER and HSP (ABC with ethyl green counterstain). The tumor cells are positive for ER(A) and HSP(B).

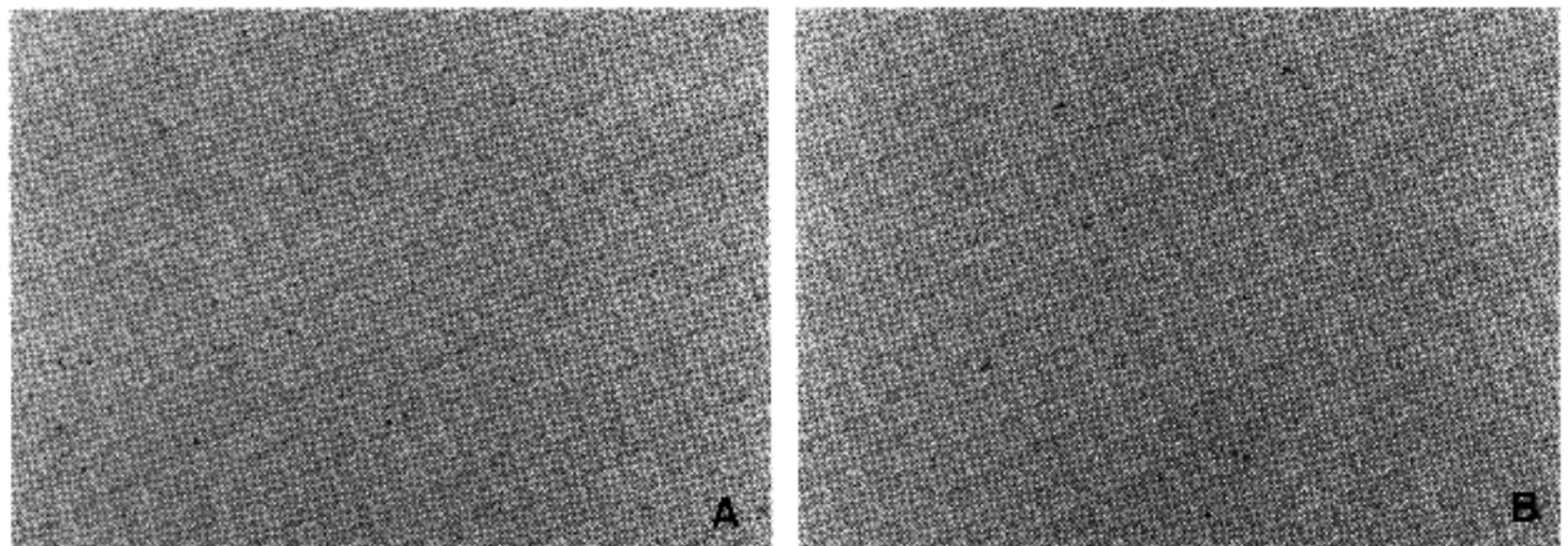


Fig. 4. Poorly differentiated adenocarcinomatous endometrium immunostained with antibodies for ER and HSP (ABC with ethyl green counterstain). The tumor cells are negative for ER(A) and HSP(B).

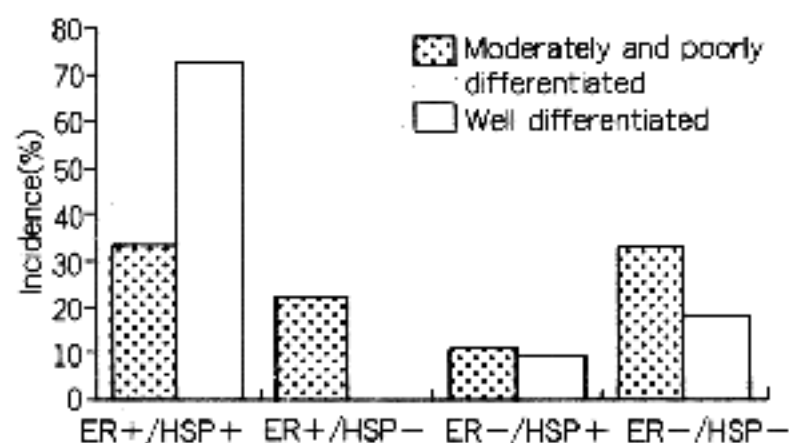


Fig. 5. Incidence of ER and HSP positivity according to tumor grade.

지표로써 이용되고 있으며^{1,7)}, ER이외에 PR과 같은 홀론수용체뿐만 아니라 다른 estrogen-regulated proteins이 유방암의 임상경과를 예측하기 위한 지표로써 제안되어져 왔다^{4,5,20)}. 그러한 지표들 중 HSP은 비교적 광범위하게 연구가 이루어져 왔으며 그중 몇몇 연구에 의하여 HSP의 발현이 ER의 발현과 상호관련되어 있다는 사실이 밝혀졌다^{2,6,11~15)}. 또한 estrogen에 반응하는 세포주에서 estrogen과 heat shock 양자 모두에 의해 HSP이 발현된다는 일부 연구결과는 HSP이 호르몬자극과 환경자극에 의해 조절된다는 것을 암시해 주고 있다¹²⁾.

HSP에 대한 면역조직화학적 연구결과 이는 주로 여성생식기와 ER 및 PR에 양성인 유방암 세포주에

Table 1. Comparison between expression of ER and HSP in endometrial adenocarcinoma

	Well differentiated carcinomas		Moderately and poorly differentiated carcinomas	
	ER Positive	ER Negative	ER Positive	ER Negative
HSP positive	8(72.7)	1(9.1)	3(33.3)	1(11.1)
HSP negative	0(0)	2(18.2)	2(22.2)	3(33.3)

numbers in parentheses, percentage

존재한다는 것이 밝혀졌으며⁵⁾, 정상 자궁내막의 경우 생리주기에 따라 표면 및 선상피세포와 기질세포들이 ER과 HSP에 대한 염색강도에 변화를 보인다는 사실이 알려졌다¹⁶⁾. Press등¹⁵⁾은 자궁내막상피와 기질에서 ER에 대한 염색강도가 분비기에 현저히 감소한다고 하였고, Ciocca등¹⁶⁾은 생리주기에 따른 HSP의 변화는 표면상피에서 가장 뚜렷이 관찰되며 분비기에 최대치에 이른다고 하였으며 자궁내막에서 HSP은 estrogen과 progesterone의 synergistic action에 의해 최대로 표현되는 것이라고 추측하였다. 본 연구에서는 ER에 대한 염색강도가 중기분비기 이후에 감소하였고 HSP에 대한 염색강도는 중기분비기까지는 다양하게 나타나다가 후기분비기에 감소하였다.

1985년 Adams에 의해 시행된 유방암에 대한 연구에서 HSP의 존재여부가 ER의 존재여부와 상호관련성이 있음이 밝혀진바 있는데⁶⁾, 자궁내막선암에서도 ER과 HSP의 존재여부가 서로 관련되어 있음을 본 연구를 통하여 알 수 있었다. 또한 Spona등²⁰⁾과 Geisinger등²¹⁾은 분화가 좋은 자궁내막선암에서는 ER과 PR이 흔히 발현된다고 하였으며, Ciocca등¹⁴⁾과 McGuire등¹⁶⁾은 자궁내막암에서 HSP의 존재여부는 종양의 분화도와 관련된다고 하였는데, 본 연구에서도 고분화암종의 72.7%에서 ER과 HSP이 양성으로 관찰되어 분화가 좋은 경우 ER뿐 아니라 HSP도 흔하게 관찰됨을 알 수 있었다. 따라서 저자들은 ER과 HSP이 자궁내막선암 환자에 있어 홀몬치료에 대한 반응도와 임상적 예후를 예측하는데 유용할 것으로 생각하며 그 유용성을 검증하기 위하여 향후 환자에 대한 추적조사를 통한 연구가 이루어져야 하리라고 본다.

결 론

저자들은 포르말린고정후 파라핀포매된 12예의 정상 자궁내막과 20예의 자궁내막선암조직을 대상으로 ER과 HSP에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1) 증식기와 초기분비기동안 표면 및 선상피세포의

핵들은 ER에 중등도 내지는 강양성을 보인 반면, 중기와 후기분비기의 자궁내막에서는 선상피세포와 기질세포들은 ER에 약양성을 보였으며 표면상피세포들은 다양한 강도의 양성반응을 보였다.

2) 초기증식기에서 중기분비기까지 표면 및 선상피세포들은 HSP에 대해 다양한 강도의 양성반응을 보였고 후기분비기에서는 표면 및 선상피세포들은 HSP에 대해 약양성 또는 음성반응을 보였다. 전 생리주기 동안 기질세포들은 HSP에 음성이었다.

3) 자궁내막선암에서 고분화암종 11예중 8예(72.7%)가 ER과 HSP모두에 양성이었으나 중분화 또는 저분화암종 9예 중에서는 단지 3예만(33.3%)이 ER과 HSP에 대해 양성이었다.

이상의 성적으로 ER과 HSP은 정상 자궁내막 및 자궁내막선암에서 서로 밀접하게 연관되어 있으며 선암의 경우 조직학적 분화도가 나쁠수록 ER과 HSP의 반응도는 감소한다는 사실을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) Allegra JC, Lippman ME, Thompson EB, Simon R, Bablock A, Green L, Hoff KK, Do HMT, Iatken SC, Warren R. *Estrogen receptor status: an important variable in predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. Eur J Cancer* 1980; 16: 323-31.
- 2) Canopy F. *Phosphorylation, glycosylation and proteolytic activity of the 42 kD estrogen-induced protein secreted by MCF cells. J Cell Biol* 1987; 104: 253-62.
- 3) Jensen EV, De Sombre. E. R. *The diagnostic implications of steroid binding in malignant tissues. Adv Clin Chem* 1977; 19: 57-89.
- 4) Brozert D, Silverman S, Lippman M. *Estrogen inhibition of a Mr 39,000 glycoprotein secreted by human breast cancer cells. Cancer Res* 1987; 47: 1234-8.
- 5) Ciocca DR, Adams DJ, Edwards DP, Bjercke RJ, McGuire WL. *Distribution of an estrogen-induced*

- protein with a molecular weight of 24,000 in normal and malignant human tissue and cells. *Cancer Res* 1983; 43: 1204-10.
- 6) Adams DJ, McGuire WL. Quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for the estrogen-regulated Mr 24,000 protein in human breast tumors: correlation with estrogen and progesterone receptors. *Cancer Res* 1985 45: 2445-9.
 - 7) Edwards DP, Adams DJ, Savage N, McGuire WL. Estrogen induced synthesis of specific proteins in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 93: 804.
 - 8) Osborne CK. The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer* 1980; 46: 2884-8.
 - 9) Sheen YY. Antiestrogen stimulation of the production of a 37,000 molecular weight secreted protein and estrogen stimulation of the production of a 32,000 molecular weight secreted protein in MCF-7 human breast cancer cells. *Endocrinology* 1987; 230: 1140-51.
 - 10) Prud'homme J-F. Monoclonal antibodies against native and denatured forms of estrogen-induced breast cancer protein(BCEI/pS2) obtained by expression in *Escherichia coli*. *Cancer Res* 1990; 50: 2390-6.
 - 11) Adams DJ. Detection of a Mr 24,000 estrogen-regulated protein human breast cancer by monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1983; 43: 4297-301.
 - 12) Fuqua SA. Induction of the estrogen-regulated "24K" protein by heat shock. *Cancer Res* 1989; 49: 4126-9.
 - 13) Sledge GW. Presence of an estrogen-regulated protein in endometrial cancer. *Obstet Gynecol* 1985; 66: 423-7.
 - 14) McGuire WL. An estrogen-regulated protein in normal and malignant endometrium. *J Steroid Biochem* 1986; 24: 155-9.
 - 15) Dressler. A new marker of maturation in the cervix: The estrogen-regulated 24K protein. *Obstet Gynecol* 1986; 68: 825-31.
 - 16) Ciocca DR. Evidence for modulation of a 24K protein in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57: 496-9.
 - 17) Ciocca DR. The presence of an estrogen-regulated protein detected by monoclonal antibody in abnormal human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60: 137-43.
 - 18) Ciocca DR. Localization of an estrogen-responsive protein in the human cervix during menstrual cycle, pregnancy, and menopause and in abnormal cervical epithelia without atypia. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 190: 6-6.
 - 19) Michael FP, Nancy A N-G, Martin B, Geoffrey LG. Estrogen receptor localization in the female genital tract. *Am J Pathol* 1986; 123: 280-92.
 - 20) Spona J, Ulm R, Bieglmayer C, Husslein P. Hormone serum levels and hormone receptor contents of endometria in women with normal menstrual cycles and patients bearing endometrial carcinoma. *Gynecol Obstet Invest* 1989; 10: 71-80.
 - 21) Geisinger KR, Marshall RB, Kute TE, Homesley HD. Correlation of female sex steroid hormone receptors with histologic and ultrastructural differentiation in adenocarcinoma of the endometrium. *Cancer* 1986; 58: 1506-17.