

자궁 경부암에서 EGFR 발현에 관한 *In Situ* mRNA Hybridization 및 면역조직화학적 염색을 이용한 비교연구

전남대학교 의과대학 병리학교실

고 향 미 · 박 창 수 · 정 상 우

In situ mRNA Hybridization and an Immunohistochemical Study of EGFR in Uterine Cervix Cancer

Hyang Mi Ko, M.D., Chang Soo Park, M.D. and Sang Woo Juhng, M.D.

Department of Pathology, Chonnam University Medical School

Epidermal growth factor receptor(EGFR) is an intergral membrane protein. Overexpression or mutation of EGFR may play a role in carcinogenesis. Recently, many molecular biologic techniques have been used to study expression of oncogenes. One of them, *in situ* mRNA hybridization, using paraffin embedded blocks, offers a unique means to allow precise localization within histological preparations, and also overcomes problems relating to translation defects and abnormal translation.

In order to confirm the usefulness of epidermal growth factor receptor as a tumor marker, and to compare the expression of EGFR between *in situ* mRNA hybridization and an immunohistochemical study, *in situ* mRNA hybridization was performed along with an immunohistochemical study for EGFR in paraffin sections of 84 uterine cervix carcinomas. A positive reaction for EGFR was observed mainly in the cytoplasm of tumor cells. The vascular muscle layer and uterine muscle tissue around the cancer nest revealed a positive reaction in immunohistochemical stain for EGFR, with a negative reaction for EGFR mRNA. In the cancer nests, the immunohistochemical positive reaction for EGFR was strong in differentiated cells and keratin pearls, but a strong positive reaction for EGFR mRNA was localized in undifferentiated cells. The overall positive of immunostaining for EGFR was 77% for uterine cervix carcinoma; 71% for carcinoma *in situ*, 71% for microinvasive carcinoma, and 89% for invasive carcinoma. The overall positivity of EGFR from *in situ* mRNA hybridization was 94% of the uterine cervix carcinoma; 93% for carcinoma *in situ*, 93% for microinvasive carcinoma, and 96% for invasive carcinoma.

From these results, EGFR is a useful tumor marker for uterine cervix carcinoma, and *in situ* mRNA hybridization has greater sensitivity and specificity than immunohistochemistry. (Korean J Pathol 1995; 29: 343~351)

Key Words: Cervix carcinoma, EGFR, *In situ* mRNA hybridization, Immunohistochemistry

접 수: 1994년 10월 13일, 게재승인: 1994년 12월 26일

주 소: 광주시 동구 학동 5, 우편번호 501-190

전남대학교 의과대학 병리학교실, 고향미

서 론

Epidermal growth factor(EGF)는 세포의 성장을 촉진하는 물질로 세포막에 위치하는 epidermal growth factor receptor(EGFR)에 결합하여 작용한다¹⁻⁴. EGFR은 막통과단백으로 존재하는 위치에 따라 세포막외 부위, 세포막 부위, 세포질 부위의 3가지로 구분되며 세포질 부위는 tyrosine kinase의 활성화와 관련이 있다고 알려져 있다^{5,6}.

근래에 EGFR이 외음부 종양세포에서 유래한 A431 세포주로부터 추출됨에 따라 v-erbB와 유사성이 거론되었고 발암인자로서의 가능성이 제시되었으며⁷⁻¹⁰, 유방¹¹⁻¹³, 비뇨생식기계¹⁴, 두경부 및 폐종양^{15,16}등에서 정상조직에 비하여 높게 발현된다고 보고되어 암 표지자의 하나로 추정되고 있다.

EGFR의 발현에 관한 연구는 주로 동결절편이나 파라핀 절편을 이용한 면역조직 화학적 염색을 이용하여 세포내 단백을 확인하고 있으나¹⁷⁻¹⁹ 대사과정이 불안정한 세포나 mRNA로부터 번역과정이 용이하지 않는 경우에는 검출되지 않으므로 유전자 수준에서 EGFR의 발현을 확인하는 것이 민감성과 특이성을 갖는 연구방법이다. 최근에는 분자생물학의 발달과 더불어 blotting technique, polymerase chain reaction(PCR)과 *in situ* hybridization 등이 활발히 이용되고 있다. 이러한 검사방법중 blot법이나 PCR법은 핵산을 추출하는 과정에서 정상세포나 염증세포의 핵산이 포함될 수 있다고 한다. 그러나 *in situ* mRNA hybridization은 면역조직화학적 염색과 같이 형태학적 구조가 유지된 상태에서 양성신호(positive signal)를 확인함으로써 이러한 단점을 보완할 수 있는 특이성이 높은 검사 방법이다. 그러므로 동일한 절편에서 *in situ* mRNA hybridization과 면역조직화학적 염색을 동시에 시행한다면 EGFR의 발현 여부를 보다 명확히 판정할 수 있을 것으로 사료되었다.

이에 저자들은 자궁경부암을 대상으로 EGFR에 대한 *in situ* mRNA hybridization 및 면역조직화학적 염색을 시행하여 암표지자의 가능성을 확인하고 두 검사방법 사이에 민감성의 차이를 알아보려고 본 실험을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

본 연구에 이용한 자궁경부암의 생검조직은 상피

내암 28예, 미세침윤암 28예, 침윤암 28예등 총 84예를 대상으로 하였으며 EGFR에 대한 발현 양상을 *in situ* mRNA hybridization 및 면역조직화학적 방법으로 비교 검색하였다.

2. 방 법

1) 조직학적 검색: 헤마톡실린 - 에오신 염색 표본을 이용하여 상피내암, 미세침윤암, 침윤암으로 분류하여 검체를 선택하였다.

2) 면역조직화학적 염색: 실험에 이용한 파라핀 절편의 제작은 파라핀 포매괴를 5 μ m 두께로 연속절편을 만들어 probe-on 슬라이드에 부착시킨 후 충분히 건조시켰다. 염색의 전과정은 probe-on 슬라이드를 맞대어 생기는 capillary action gap의 원리를 이용한 microprobe immuno/DNA 염색기(Fisher Co.)를 이용하여 실시하였다. 파라핀 절편이 부착된 슬라이드는 탈파라핀과 함수과정을 거쳐 일차항체인 EGFR1(Dako) 항체를 1:20으로 희석하여 20분간 부치시킨 후 완충액으로 씻어냈다. 일차항체의 검출을 위한 이차항체는 biotin이 부착된 anti-mouse IgG를 이용하여 10분간 부치시켰고 완충액으로 씻은 후 avidin-horseradish peroxidase(HRP)에 10분간 작용시켰으며 양성반응의 관찰을 위하여 diaminobenzidine(Research Genetics)으로 발색시켰다. 헤마톡시린으로 대조염색을 시행하고 universal mount(Biomed)로 봉입한 후 양성반응을 현미경으로 검색하였다. 음성대조군은 일차 항체 대신 항체 희석액을 반응시켜 실험에 이용하였다.

3) *In situ* mRNA hybridization: 조직절편의 제작 및 염색기는 면역조직화학적 염색과 동일하며 탈파라핀 과정과 함수과정을 거쳐 mRNA가 잘 노출될 수 있도록 pepsin(Research Genetics)에 100 $^{\circ}$ C에서 3분간 부치시켰다.

EGFR mRNA의 검출을 위하여 21 base pair의 EGFR mRNA probe(Research Genetics)를 이용하였다. EGFR mRNA probe를 조직절편과 반응시켜 65 $^{\circ}$ C에서 30분간 hybridization을 하였으며, hybridization이 끝난 후 비특이적인 결합을 한 probe를 제거하기 위해서 2X SSC로 2번 씻어냈으며 avidin-alkaline phosphatase에 10분간 작용시켰다.

Alkaline phosphatase의 발색은 Fast Red TR salt를 이용하였으며 헤마톡시린으로 대조염색을 한 후 universal mount로 봉입하였다. 양성대조군은 poly A에 대한 상보적인 배열인 poly T를 이용하였으며 음성대조군은 probe대신 hybridization cocktail을 반응시켜 실험에 이용하였다.

4) EGFR 염색 결과의 판정: 염색된 슬라이드를 3명의 병리 전공의들에 의해서 판독한 후 염색의 강도에 따라 강한 양성반응(3+), 중등도의 양성반응(2+), 약한 양성반응(1+) 그리고 음성반응(-)으로 구분하였다. 음성인 경우는 종양세포보다 배경염색이 진하거나 동일한 경우로 정하였다.

5) 통계학적 검색: Spearman의 순위상관을 구하여 염색의 반응정도와 조직학적 유형사이의 상관관계를 알아 보았다.

성 적

1. EGFR mRNA에 대한 *in situ* hybridization

EGFR mRNA에 대한 양성반응은 적색으로 세포질에서만 관찰되었다. 정상 편평상피에서는 기저세포층과 극세포층이 강한 양성반응을 나타냈고 표층은 음성이었다(Fig. 1). 암소 주위 정상 근육 조직에서는 음성이었고 자궁 경관성 조직에서 예비세포만이 양성이었다(Fig. 2). 이형증식 세포에서도 정상 편평상피에 비하여 강한 양성 반응이 관찰되었다(Fig. 3A, 3B).

각화성 암종의 경우 분화된 세포와 각화성 물질은

약한 양성반응을 보인 반면, 암소내 미분화 세포와 다형성 세포에서는 강한 양성 반응을 보였다(Fig. 4).

2. EGFR mRNA에 대한 양성률

총 84예중 EGFR mRNA에 대한 양성반응은 79예로서 94.0%의 높은 발현율을 보였다(Table 1).

상피내암과 미세침윤암은 28예중 26예가 양성으로 92.9%의 양성률을 보였고 침윤암은 28예중 27예가 양성으로 96.4%의 양성률을 보였다. 각각에서 50% 이상이 강한 양성반응(+++)을 보였고, 상피내암, 미세침윤암, 침윤암에 따른 차이는 보이지 않았다.

3. EGFR에 대한 면역 조직 화학적 염색

EGFR에 대한 염색소견상 양성반응은 세포질에서 갈색으로 관찰되었다. 정상 편평상피에서는 표층이 기저 세포층과 극세포층에 비하여 강한 양성반응을 나타냈다(Fig. 5). 암소 주위 경관성 조직에서 양성반응을 보였으며 특히 혈관 주위 근육과 경부근육조직에서 강한 양성반응을 나타냈다(Fig. 6). 이형증식 세포에서도 정상 상피세포에 비하여 강한 양성반응이 관찰되었다(Fig. 7A, 7B).

각화성 암종에서 분화된 세포와 각화성 물질에서

Table 1. The positivity of EGFR *in situ* hybridization for EGFR mRNA in uterine cervix carcinoma

| Type | No. of cases | EGFR mRNA | | | | Positivity |
|----------|--------------|-----------|----------|----------|-----------|------------|
| | | 0 | + | ++ | +++ | |
| CIS | 28 | 2(7.1%) | 3(10.7%) | 5(17.9%) | 18(64.3%) | 26(92.9%) |
| Micro | 28 | 2(7.1%) | 4(14.3%) | 8(28.6%) | 14(50.0%) | 26(92.9%) |
| Invasive | 28 | 1(3.6%) | 3(10.7%) | 6(21.4%) | 18(64.3%) | 27(96.4%) |
| Total | 84 | 5(6.0%) | | | | 79(94.0%) |

Table 2. Immunoreactivity for EGFR in uterine cervix carcinoma

| Type | No. of cases | EGFR mRNA | | | | Positivity |
|----------|--------------|-----------|----------|----------|-----------|------------|
| | | 0 | + | ++ | +++ | |
| CIS | 28 | 8(28.6%) | 4(14.3%) | 6(21.4%) | 10(35.7%) | 20(71.4%) |
| Micro | 28 | 8(28.6%) | 3(10.7%) | 8(28.6%) | 9(32.1%) | 20(71.4%) |
| Invasive | 28 | 3(10.7%) | 4(14.3%) | 5(17.9%) | 16(57.1%) | 25(89.3%) |
| Total | 84 | 19(22.6%) | | | | 65(77.4%) |

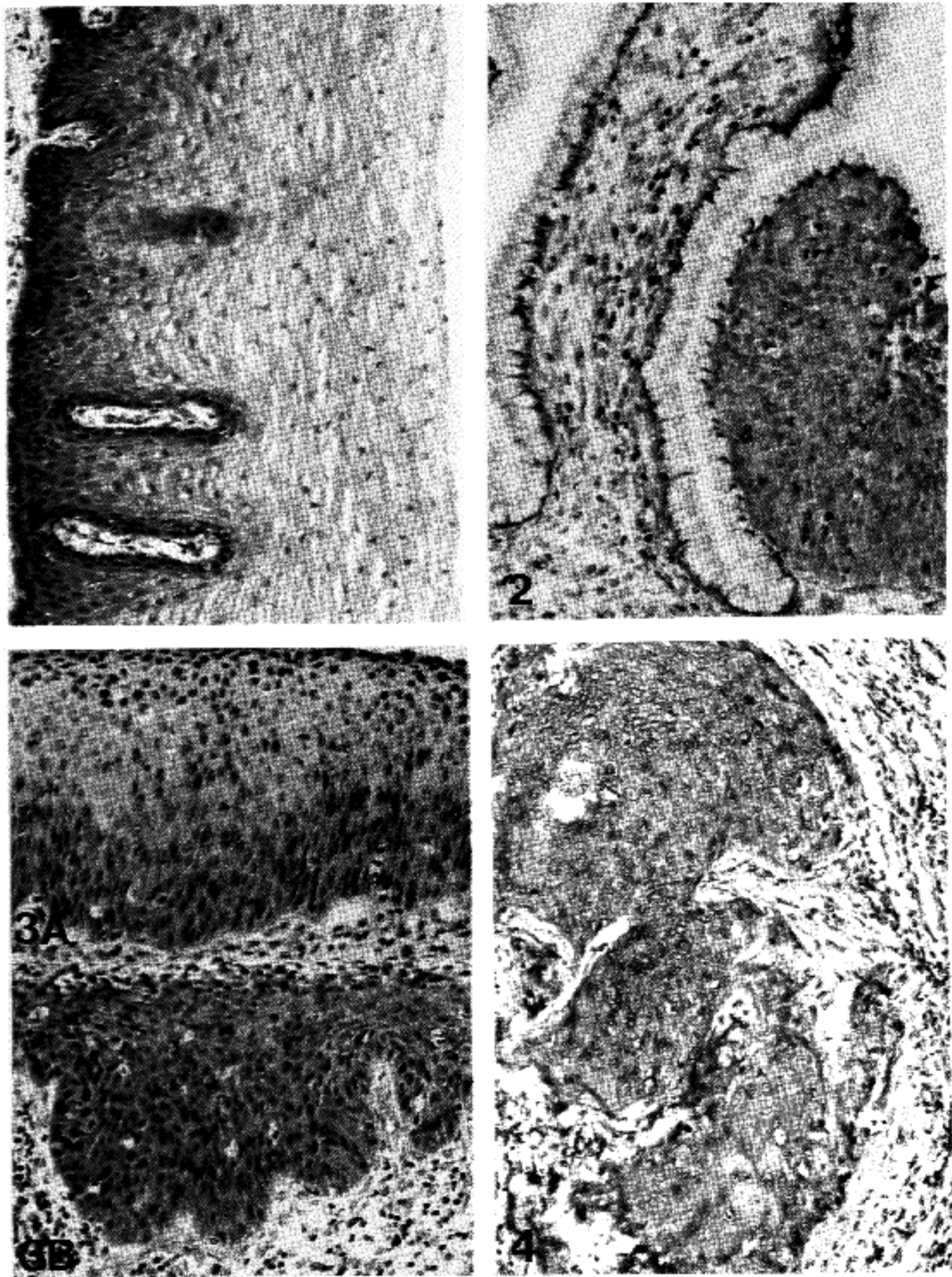


Fig. 1. Positive reaction is noted in the basal cell and prickle cell layers of normal squamous cell epithelium. EGFR *in situ* mRNA hybridization
Fig. 2. Reserve cells of the endocervical glands and tumor cells are positive. EGFR *in situ* mRNA hybridization
Fig. 3a, 3b. Moderate(3a) and severe(3b) dysplastic cells reveal a positive reaction. EGFR *in situ* mRNA hybridization
Fig. 4. Most infiltrating tumor cells show a strong positive reaction. EGFR *in situ* mRNA hybridization

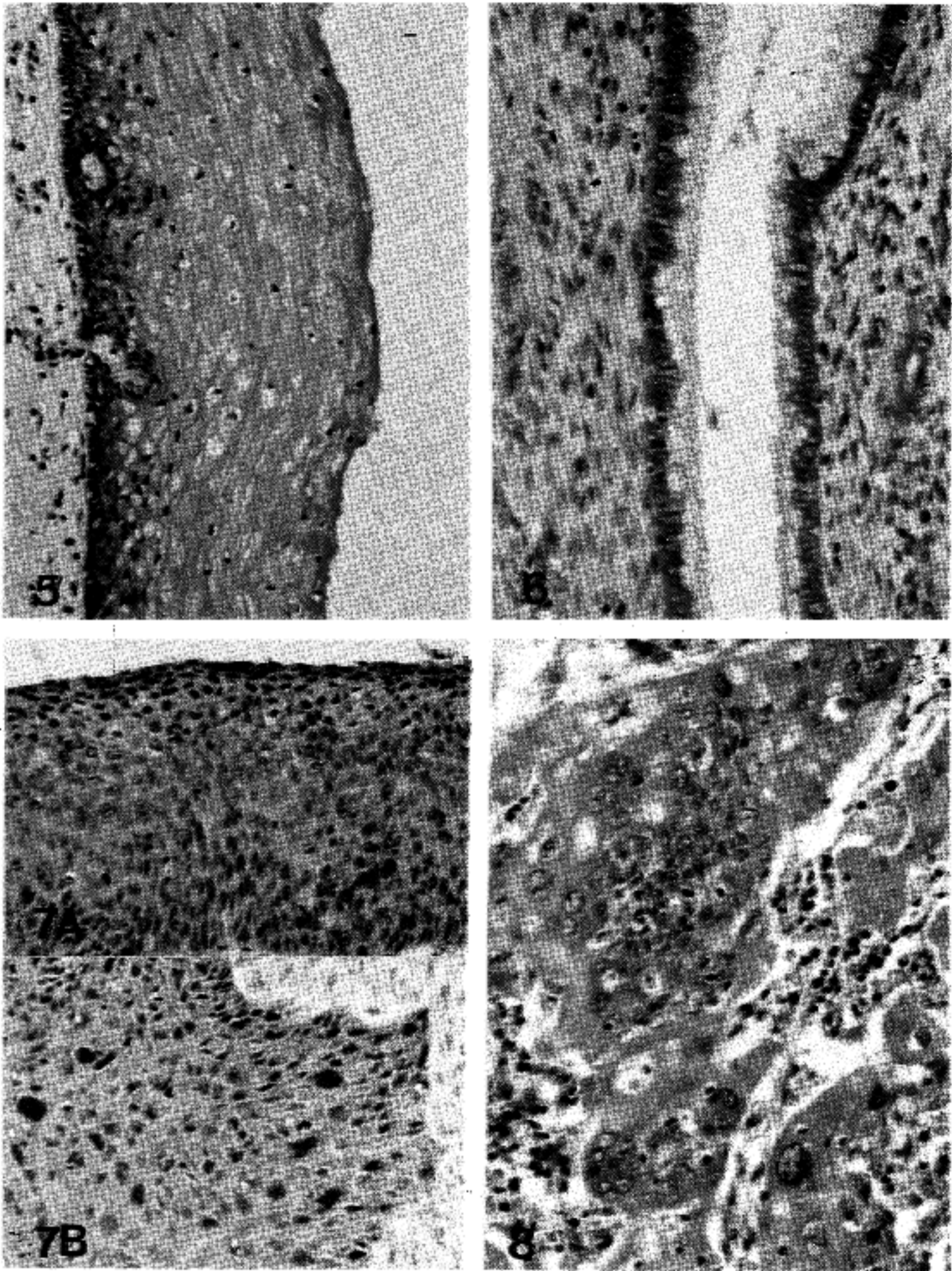


Fig. 5. A positive reaction of the superficial layer is stronger than the basal cell and prickle cell layers in normal squamous cell epithelium. Immunohistochemistry of EGFR

Fig. 6. Reserve cells of the endocervical glands are positive. Immunohistochemistry of EGFR

Fig. 7a, 7b. Moderate(7a) and severe(7b) dysplastic cells reveal a positive reaction. Immunohistochemistry of EGFR

Fig. 8. Most tumor cells revealed a strongly positive reaction in invasive carcinoma. Immunohistochemistry of EGFR

강한 양성반응을 보인 반면, 암소내 미분화 세포에서는 약한 양성반응을 보였다. 침윤세포암의 경우 다형성 세포를 포함한 대부분의 종양세포에서 강한 양성반응을 보였다(Fig. 8).

4. EGFR에 대한 양성률

총 84예중 EGFR에 대한 양성반응은 65예에서 관찰되어 77.4%의 발현율을 보였다(Table 2). 상피내암은 28예중 20예가 양성으로 71.4%의 양성률을 보였고, 미세침윤암은 28예중 20예가 양성으로 71.4%의 양성률을 보였다. 침윤암은 28예중 25예가 양성으로 89.3%의 양성률을 보였다. 침윤암에서는 상피내암이나 미세침윤암에 비하여 50%이상이 강한 양성반응을 보였다.

5. EGFR mRNA와 EGFR에 대한 염색강도의 비교

염색 결과가 일치하는 경우는 31예로 36.9%의 일치율을 보였고, EGFR mRNA에 대한 염색 강도가 강한 경우는 40예로 47.6%였으며 EGFR염색이 강한 경우는 14예로 16.7%이었다. EGFR에 음성반응을 보이면서 EGFR mRNA에 양성반응을 보인 경우는 16예로 19.0%이었고, 반대의 경우는 2예로서 2.4%이었다(Table 3).

Table 3. Comparison of the staining intensity for EGFR between *in situ* mRNA hybridization and immunohistochemistry

| EGFR | EGFRmRNA | | | |
|------|----------|---|----|-----|
| | 0 | + | ++ | +++ |
| 0 | 3 | 7 | 3 | 6 |
| + | 0 | 1 | 3 | 7 |
| ++ | 1 | 1 | 3 | 14 |
| +++ | 1 | 1 | 10 | 24 |

Table 4. Comparison of positivity for EGFR mRNA and EGFR in the keratinizing and non-keratinizing squamous cell carcinoma of the uterine cervix

| Type | No. of cases | EGFR mRNA | | | | Positivity(%) | EGFR | | | | Positivity(%) |
|------------------|--------------|-----------|---|---|----|---------------|------|---|----|-----|---------------|
| | | - | + | + | + | | - | + | ++ | +++ | |
| Keratinizing | 10 | 1 | 1 | 5 | 3 | 9(90) | 1 | 3 | 2 | 4 | 9(90) |
| Non-keratinizing | 18 | 0 | 2 | 1 | 15 | 18(100) | 2 | 1 | 3 | 12 | 16(88.9) |

6. 각화성암과 비각화성암에서 EGFR mRNA와 EGFR에 대한 양성률의 비교

침윤 상피세포암중에서 각화성암이 10예, 비각화성암 18예였다. 각화성암에서 EGFR mRNA와 EGFR에 대한 양성률은 90%로 같았으며, 비각화성암에서는 EGFR mRNA에 대한 양성률이 100%로 EGFR에 대한 88.9%보다 높게 관찰되었다(Table 4).

고찰

Epidermal growth factor(EGF)는 유사분열물질로서 세포의 성장을 촉진시키며 epidermal growth factor receptor(EGFR)와 결합하게 된다^{20,21}. EGFR은 거의 모든 정상 세포에 존재하며 그 수는 세포마다 다양하여 림프구에서는 소수인 반면 편평세포에서는 다수가 발현된다고 한다²². 또한 편평상피암 세포를 배양한 경우에 정상편평세포에 비하여 더 많은 수의 EGFR이 발현되었고 조직에서도 같은 결과를 보임으로써 EGFR은 편평상피암의 발생에 중요한 역할을 할 것으로 추측되었다²⁷.

EGFR의 증가는 유전자의 증폭이나 7번 염색체 단완의 전위에 의한 것으로 알려져 있으며 Northern이나 Western blotting을 이용하여 EGFR mRNA나 단백질의 증가를 관찰하였다²⁴. 그러나 생검조직에서는 정상세포나 염증세포가 섞일 수 있는 단점 때문에 종양세포에 특이성을 관찰할 수 있는 면역조직화학적 염색을 이용하여 EGFR 단백을 검출하고 있다. 최근 유전자 발현에 있어서 *in situ* hybridization을 이용한 mRNA의 검출이 가능해지면서 여러 실험에 유용되고 있는데 종래의 면역조직화학적 염색이 가지는 장점과 더불어 *in situ* mRNA hybridization의 장점으로 ① stringency의 증가로 유전자 산물의 검출에 특이성이 높고 ② 단백질의 검출에 비해서 mRNA는 번역(translation)중의 결합이나 비정상적인 posttranslational modification을 피할 수 있고, ③ 호르몬과 같이

세포내 저장된 물질의 경우 검출이 용이하지 않아 위음성의 가능성이 높는데 이러한 점을 보완해 주고, ④ 민감성이 높으며, ⑤ 세포에서 더 좋은 국소화를 볼 수 있다는 점이다^{24,25}. 또한 동결절편이 아닌 파라핀 절편을 이용하면 이러한 장점은 후향적인 연구에도 도움이 될 수 있다.

본 연구에서는 자궁경부암을 대상으로 동일한 파라핀 연속절편에서 *in situ* mRNA hybridization과 면역조직화학적 염색을 동시에 시행하여 EGFR mRNA와 단백질의 발현 양상의 차이점을 비교하고 앞으로 암표지자로서의 이용 가능성을 알아 보고자 하였다.

Wada등²⁶은 유방암을 대상으로 시행한 면역조직화학적 염색상 양성반응을 세포질과 세포막으로 구분하였는데, 본 연구에서는 *in situ* mRNA hybridization과 면역조직화학적 염색상 EGFR에 대한 양성반응이 암세포의 세포질에서만 관찰되었다. EGFR이 세포막 단백질이면서 세포질 염색이 되는 이유로는 ligand와 결합후에 빠르게 일어나는 EGFR의 내재화 때문일 것으로 추측하고 있으나²⁷ 아직까지 확실하지 않다. 또한 이들은 혈관의 내피세포를 양성대조로서 이용하였으나 본 연구에서 혈관의 내피세포는 EGFR과 EGFR mRNA에 모두 음성이었다. 반면 면역조직화학적 염색상 혈관벽 근육 및 간질조직내의 근육이 강한 양성 반응을 나타내어 자궁근종과 근육이 EGFR을 함유한다는 Hofmann등²⁸의 보고와 일치하나 같은 증례에 대한 *in situ* mRNA hybridization의 경우 근육 세포에서 양성 반응이 관찰되지 않았다. 또한 *in situ* mRNA hybridization 염색시 정상 편평상피에서 기저세포층과 극세포층에서 각질층보다 더 강한 양성반응을 보였고 이는 정상 편평상피에서 기저층이 EGFR을 많이 함유하고 있다고 보고한 Gusterson 등²⁹의 성적과 일치되었으나 면역조직화학적 염색상 위와는 반대의 결과가 관찰되었다. 이는 증식하고 있는 암세포나 기저세포층에서 EGFR mRNA의 생성이 활발한 반면 성숙된 근육세포나 각질층에서는 이미 생성된 EGFR 단백을 많이 함유하기 때문으로 생각되었다. 암소내에서도 *in situ* mRNA hybridization상 가장자리의 미분화 세포나 다형성의 세포가 종양의 분화가 잘된 세포나 각화성 물질보다 더 강한 양성반응을 보여 면역조직화학적 염색의 결과와는 상반되었다.

Cowley등³⁰은 배양된 편평상피세포에서 정상 편평상피세포에 비하여 4~7배 정도 EGFR의 발현율이 높은 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 종양세포와 이형성증 세포의 양성반응이 정상 상피에 비하여 강하게 관찰되었다.

본 연구에서 총 84예에 대한 EGFR 단백질의 양성 발현율은 77.4%인데 비하여 EGFR mRNA의 발현율은 94.0%로 높게 관찰되어 대부분의 자궁경부암에서 EGFR 양성발현을 관찰할 수 있었다. 이는 편평상피암에서 EGFR이 더 높게 표현된다는 Hendler¹⁵, Gulick³¹등의 보고와 일치하였고 나³²등이 자궁경부암을 대상으로 연구 보고한 면역조직화학적 결과와 비교해 볼 때 EGFR mRNA의 발현율이 높음을 알 수 있었다.

면역조직화학적 염색상 상피내암은 71.4%, 미세침윤암 71.4%, 침윤암 89.3%이었고 *in situ* mRNA hybridization상 상피내암은 92.9%, 미세침윤암 92.9%, 침윤암 96.4%로서 상피내암, 미세침윤암, 침윤암에서 EGFR 양성률의 유의있는 차이와 염색강도의 차이를 관찰할 수 없는 것으로 보아 종양의 진전도와 연관성을 찾을 수는 없었다($p>0.05$).

면역조직화학적 염색과 *in situ* mRNA hybridization에서 모두 음성인 3예는 조직의 과고정으로 인하여 검출이 안되었을 가능성과 Yasui등³³이 주장한 EGFR의 이질성 때문으로 생각되었다. EGFR 검출에 있어서 *in situ* mRNA hybridization의 양성률이 높고 또한 면역조직화학적 염색에 음성이면서 *in situ* mRNA hybridization에서는 양성인 경우가 16예나 되어 *in situ* mRNA hybridization이 민감성이 높은 검사방법임을 인정할 수 있었다.

이상의 성적은 EGFR이 자궁경부암에서 높게 발현됨을 보여 종양 표지자로서의 가능성을 제시하였다. 면역조직화학적 염색에 비하여 *in situ* mRNA hybridization을 이용한 경우 EGFR 양성률이 더 높았으며 종양세포에 대한 특이성도 높게 관찰되어 면역조직화학적 검색보다 민감성과 특이성이 더 높은 검사방법임을 보여주었다.

결 론

84예의 자궁경부암 조직을 대상으로 EGFR 발현에 관하여 면역조직화학적 염색과 *in situ* mRNA hybridization 검색을 시행하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1) EGFR 발현에 대한 면역 조직화학적 및 *in situ* mRNA hybridization 염색 소견상 양성반응은 암세포의 세포질에서 관찰되었다.

2) EGFR 면역조직화학적 염색시 암소 주위 혈관의 근육 및 근육조직에서 양성반응이 관찰된 반면 EGFR *in situ* mRNA hybridization에서는 음성이었다.

3) 암소 내 미분화 세포에서 분화된 세포나 각화성 물질보다 면역조직화학적 염색상 더 약한 양성반

응을 보인 반면 *in situ* mRNA hybridization상 더 강한 양성 반응이 관찰되었다.

4) EGFR에 대한 면역조직화학적 염색상 양성반응은 65예에서 관찰되어 77.4%의 양성률을 보였으며, 상피내암에서 71.4%, 미세침윤암에서 71.4%, 침윤암에서 89.3%로서 침윤암이 가장 높은 양성률을 보였다.

5) EGFR mRNA는 79예에서 검출되어 94.0%의 양성률을 보였으며, 상피내암에서 92.9%, 미세침윤암에서 92.9%, 침윤암에서 96.4%의 양성률을 보였다.

이상의 결과로 미루어 EGFR은 자궁경부암의 표지자일 가능성이 높았으며 *in situ* mRNA hybridization이 면역조직화학적 염색보다 민감도와 특이성이 높은 검사방법임을 인정할 수 있었다.

참 고 문 헌

- Anzano MA, Roberts AB, Smith JM, Sporn MB, DeLarco JE. Sarcoma growth factor from conditioned medium of virally transformed cells is composed of both type α and type β transforming growth factors. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80: 6264-8.
- Stoscheck CM, King LE Jr. Characteristics of EGF and its receptor and their relationship to transforming proteins. J Cell Biochem 1986; 31: 135-52.
- Todaro GJ, Fryling C, DeLarco JE. Transforming growth factors produced by certain human tumor cells; polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 5258-62.
- Tam JP. Physiological effects of transforming growth factor in the newborn mouse. Science 1985; 229: 673-5.
- Carpenter G. Epidermal growth factor. Handb Exp Pharmacol 1981; 57: 90-126.
- Soberquist AM, Carpenter G. Developments in the mechanism of growth factor action; activation of protein kinase by epidermal growth factor. Fed Proc 1983; 42: 2615-20.
- Betsholtz C, Heldin CH, Nister M, Ek B, Westerman A, Westermark B. Synthesis of a PDGF-like growth factor in human glioma and sarcoma cells suggests the expression of the cellular homologue of the transforming protein of simian sarcoma virus. Biochem Biophys Res Commun 1983; 117: 176-82.
- Chinkers M, Cohen S. Purified EGF receptor-kinase interacts specifically with antibodies to Rous sarcoma virus transforming protein. Nature 1981; 290: 516-9.
- Downward J, Yarden Y, Scrace G, Totty N, Stockwell P, Ullrich A, Schlessinger J, Waterfield MD. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erbB oncogene protein sequences. Nature 1984; 307: 521-7.
- Hamburger AW, White CP, Brown RW. Effect of epidermal growth factor on proliferation of human tumor cells in soft agar. J Natl Cancer Inst 1981; 67: 825-30.
- Fitzpatrick SL, LaChance MP, Schultz GS. Characterization of epidermal growth factor receptor and action on human breast cancer cells in culture. Cancer Res 1984; 44: 3442-7.
- Osborne CK, Hamilton B, Titus G, Livingstone RB. Epidermal growth factor stimulation of human breast cancer cells in culture. Cancer Res 1980; 40: 2361-6.
- Osborne CK, Hamilton B, Nover M. Receptor binding and processing of epidermal growth factor by human breast cancer cells. J Clin Endocrinol Metab 1982; 55: 86-93.
- Messing E. Growth factors and human bladder tumours. J Urol 1984; 131: 111-2.
- Hendler FJ, Ozanne BW. Human squamous cell lung cancers express increased epidermal growth factor receptors. J Clin Invest 1984; 74: 647-51.
- Sherwin SA, Minna JD, Gazdar AF, Todaro GJ. Expression of epidermal and nerve growth factor receptors and soft agar growth factor production by human lung cancer cells. Cancer Res 1981; 41: 3538-42.
- Henzen-Logmans SC, Bans EMJ, Klijn JGM, van der Burg MEL, Foekens JA. Epidermal growth factor receptor in ovarian tumours; correlation of immunohistochemistry with ligand binding assay. Br J Cancer 1992; 66: 1015-21.
- Christensen ME, Therkildsen MH, Hansen BL, Hansen GN, Bretlau P. Immunohistochemical detection of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinomas. Acta Otolaryngol 1992; 112: 734-8.
- Sporn MB, Roberts AB. Autocrine growth factors and cancer. Nature 1985; 313: 745-7.
- Schlessinger J, Schreiber AB, Levi A, La I, Libermann T, Yarden Y. Regulation of cell proliferation by epidermal growth factor. CRC Crit Rev Biochem 1983; 14: 93-111.
- Robinson RA, Branum EL, Volkenant ME, Moses HL. Cell cycle variation in I-labelled epidermal growth binding in chemically transformed cells. Cancer Res 1982; 42: 2633-8.

22. Ozanne B, Shum A, Richards CS, Cassells D, Grossman D, Trent J, Gusterson B, Hendler F. Evidence for an increase of EGF receptors in epidermoid malignancies: Growth factor and transformation. Cold Spring Harbor Laboratory 1985; 41-9.
 23. Gusterson B, Cowley G, Smith JA, Ozanne B. Cellular localization of human epidermal growth factor receptor. Cell Biol Int Rep 1984; 8: 649-58.
 24. Markovic B, Kwan YL, Nicholls EM, Walsh C, Crouch RL. A sensitive method for the detection of Poly-A tails of mRNA using a biotin-labelled heteropolymer of dT: rA. J Pathol 1992; 167: 369-73.
 25. Shaw PAV, Pringle JH. The demonstration of a subset of carcinoid tumors of the appendix by *in situ* hybridization using synthetic probes to proglucagon mRNA. J Pathol 1992; 167: 375-80.
 26. Wada T, Yasutomi M, Yamada k, Kunikata M, Higashiyama H. Shrestha P, Mori M. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor in benign and malignant lesions of the breast. Acta Histochem Cytochem 1991; 24: 449-55.
 27. Longman SC, Barns EM, Klijn JG, van der Burg MEL, Foekens JA. Epidermal growth factor receptor in ovarian tumors: correlation of immunohistochemistry with ligand binding assay. Br J Cancer 1992; 66: 1015-21.
 28. Hofmann GE, Rao CHV, Barrows GH, Schultz GS, Sanfilippo JS. Binding sites for epidermal growth factor in human uterine tissue and leiomyoma. J Clin Endocrinol Metab 1984; 58: 880-4.
 29. Gusterson B, Cowley G, Smith JA, Ozanne B. Cellular localization of human epidermal growth factor receptor. Cell Biol Int Rep 1984; 8: 649-58.
 30. Cowley G, Smith B, Gusterson B, Hendler F, Ozanne B. The amount of EGF receptor is elevated on squamous cell carcinoma: Cancer Cell. Cold Spring Harbor Laboratory 1984; 5-8.
 31. Gullick WJ, Marsden JJ, Whittle N, Ward B, Bobrow L, Waterfield MD. Expression of epidermal growth factor receptors on human cervical, ovarian and vulval carcinomas. Cancer Res 1986; 46: 285-92.
 32. 나경현, 조규혁. 자궁경부암의 Epidermal growth factor receptor 표현에 관한 연구. 대한병리학회지 1989; 32: 767-74.
 33. Yasui W, Sumiyoshi H, Hata J, Kameda T, Ochiai A, Ito H, Tahara E. Expression of epidermal growth factor receptors in human gastric and colonic carcinoma. Cancer Res 1988; 48: 137-41.
-