

## 유방암에서 파라핀 포매조직을 사용한 Estrogen, Progesterone 수용체 염색의 임상적 가치

한림대학교 의과대학 병리학교실

안혜경·김윤정·박영의

### Clinical Value of Demonstration of Estrogen and Progesterone Receptors using Paraffin Wax Sections in Breast Carcinoma

Hye Kyung Ahn, M.D., Yun Jung Kim, M.D. and Young Euy Park, M.D.

Department of Pathology, Hallym University College of Medicine

This study aimed at assessing the usefulness of paraffin wax sections for demonstration of ER(estrogen receptor) and PR(progesterone receptor), using brief microwave processing rather than proteolytic predigestion. The receptor status of a breast cancer is often into consideration when planning treatment nowadays. As biochemical receptor assays require large amount of fresh tumor tissue and are not always available for all tumors, pathologists are now increasingly asked to provide a service for the assessment of the receptor status in tissue routine sections. Until recently, immunohistochemical demonstration of receptors was used in frozen sections.

Therefore, routinely processed paraffin wax sections of 25 cases of breast carcinoma with known ER and PR concentrations, estimated by the standard DCC(dextran-coated charcoal) biochemical assay, were examined using the ABC immunoperoxidase technique. The results were assessed semiquantitatively, using a five grade scoring system. Of the 25 cases examined, with DCC cutoff point being <10 fmol, 71% and 75% in positivity of each ER, PR receptor is concordant. Statistic analysis demonstrates high relationship between scoring system of IH method and DCC value in ER ( $R=0.6061$ ,  $p=0.001$ ) and PR ( $R=0.5832$ ,  $p=0.001$ ).

The IH method can provide easily assessed reliable positive information about ER, PR status of breast carcinoma using routinely processed paraffin wax sections. (**Korean J Pathol 1996; 30: 89~93**)

**Key Words:** Breast carcinoma, Estrogen receptor, Progesterone receptor Immunohistochemistry, Paraffin block

접 수 : 1995년 2월 17일, 게재승인 : 1995년 9월 12일  
주 소 : 서울시 영등포구 대림동 948-1, 우편번호 150-071  
강남성심병원 병리학교실, 안혜경

\*본 논문은 1994년도 한림대학교 의과대학 임상연구비로 이루어졌음.

## 서 론

유방암에서 수용체의 상태는 현재 치료의 방향을 결정하는데 중요한 역할을 하고 있다<sup>1</sup>. 과거부터 사용하던 생화학적 검사는 신선조직이 필요하고 또한 한 종목당 1 gm 이상의 양이 필요하기 때문에 모든 종괴에서 가능하지 않고 특히 작은 크기의 조기암의 발견이 증가하는 경향으로, 일반적으로 처리된 조직표본을 이용한 면역조직화학 염색으로 estrogen 수용체(ER), progesterone 수용체(PR) 여부를 판별 하는 것이 더욱 요구되고 있다. 얼마전까지는 이들 수용체 면역조직화학 염색은 동결 절편 조직으로만 가능하였으나 동결절편은 모든 유방암 조직 처리 과정에서 가능한 것이 아니고 또한 보관의 어려움이 있기 때문에 조직검사에서 일반적으로 사용되는 파라핀 포매 조직을 이용한 염색법이 발달되어 왔다<sup>2</sup>. 따라서 저자들은 단클론성 항체, Anti-Estrogen 수용체(ID5, DAKO Ltd, UK)와 Anti-progesterone 수용체(Immunotech S.A.)를 이용하여 파라핀 포매 조직에서 ER, PR 염색을 하였고 그 결과를 임상기록지에 기록된 생화학적 DCC방법에 의한 결과와 비교 분석하여서 면역조직화학 염색이 생화학적 방법을 대체할 수 있는지 알아보려고 하였다<sup>5</sup>.

## 방 법

저자들은 이미 기본적인 DCC 방법에 의한 ER, PR 결과를 가지고 있는 과거 4년 간의 유방암 조직 중에서 파라핀 포매 조직의 상태가 양호한 25예를 선택하였다. 이들은 모두 formalin에 고정되고 파라핀에 포매하는 해부병리과의 일반 처리 과정을 거쳐 보관되어 왔다. 이 조직을 2 micrometer로 절단하여 전하를 띤 plus slide에 부착, 37°C oven에서 하루 이상 건조시켰다. Xylene을 이용하여 탈랍(dewax)시키고 다단계 농도의 alcohol로 재수화(rehydration) 시킨후 단백분해(proteolytic) 처리과정 대신에 10 mM citrate buffer(pH 6.0)를 덮고 5분씩 2번 초단파 처리(700 W)를 하고 20분 동안 식혔다<sup>2,3</sup>. 3% hydrogen peroxidase로 내인성 peroxidase를 방지하고 tap water와 TRIS buffered saline(TBS)으로 흐르게 씻어내렸다. 정상 염소(goat) 혈장 처리후 미리 희석된 Anti-ER를 100 microliter로 60분 동안 처리하였다. TBS로 씻은 후 이차항체(universal antibody)를 투여하고 30분 동안 처리하였다. 그후 현미경으로 색을 관찰하면서 AEC로 발색시켰다. Mayer's hematoxylin으로

대조 염색하고 crystal mount를 사용하였다<sup>6</sup>.

이미 알려진 ER, PR 양성 예들을 다시 저자들의 방법으로 염색하여 양성반응을 보이는 것을 확인한 후에 양성 대조 예로 사용하였고 음성 대조 예는 같은 염색 절차중 일차항체를 사용하지 않고 염색한 것을 사용하였다.

양성판정은 핵에 적갈색으로 염색된 것만을 양성으로 하였고 세포질에 지저분하게 염색되어 핵 염색이 잘 구분되지 않는 경우나 세포질에만 염색된 것은 제외시켰다.

결과는 반 정량적으로 측정하였는데, 종괴 세포중 양성 반응을 보이는 세포의 비율을 4으로 나누어, 우발적 양성반응(occasional); 1/3이하 1점; 2/3이하를 2점; 거의 모든 세포가 염색된 것을 3점으로 하고 염색의 강도를 중등도 1점, 강도염색 2점으로 하였다(Table 1). 그 후 염색비율의 점수와 염색강도 점수를 곱해서 5 단계로 나누었는데, 전혀 염색이 안된 경우를 -; 드물게 양성세포가 있는 경우를 +; 전체 점수가 1인 경우 즉 1×1인 경우를 ++; 전체 점수가 2~4점인 경우 즉 1×2, 2×2, 2×1, 3×1인 경우를 +++; 전체 점수가 6점인 경우 즉 3×2를 ++++로 표시하였다(Table 2)<sup>4</sup>.

Table 1. Observation method

Score	Percentage of positive tumor cells	Staining intensity
1	occasional less than 1/3	— moderate
2	less than 2/3	strong
3	almost all	

Table 2. Immunohistology(IH) score

IH score	Percentage x intensity
—	
+	occasional
++	1×1
+++	1×2, 2×1, 2×2, 3×1
++++	3×2

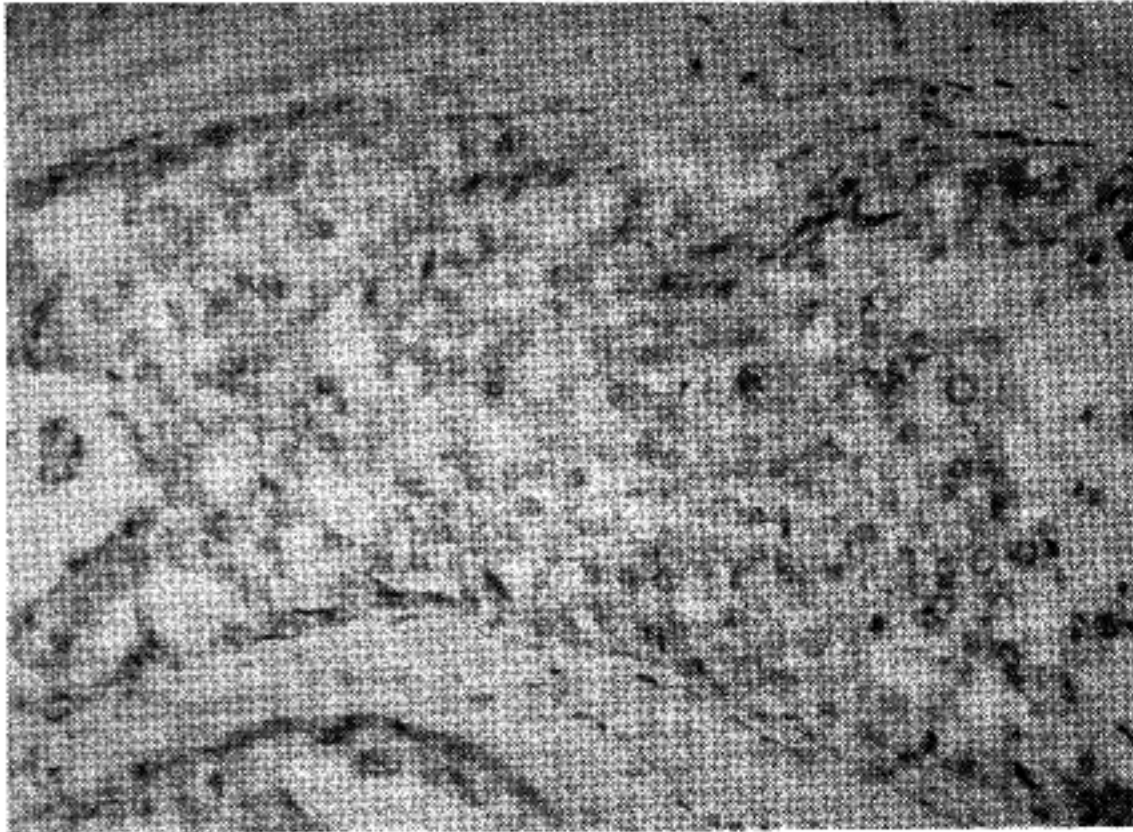


Fig. 1. ER positive case demonstrating +++ of score  $2 \times 2$  ( $\times 400$ ).

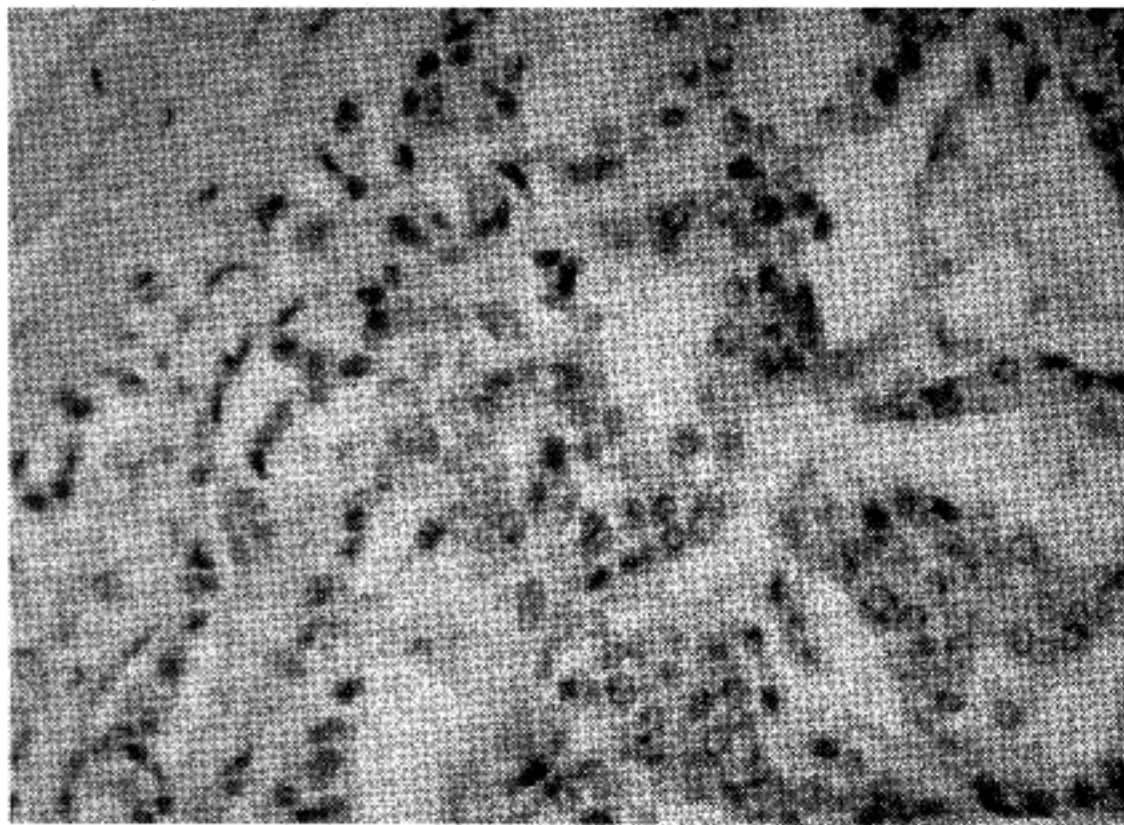


Fig. 2. PR positive case demonstrating + of score  $1 \times 1$  ( $< 400$ ).

### 결과 및 고찰

DCC방법으로 이미 결과가 나와 있고 그 최저 살라버리기(cutoff) 짙은 10 fmol 이하였다. 이 결과들 면역조직화학 염색 결과와 비교하면 면역조직화학 염색에서 양성으로 나온 경우는 일치율이 ER은

71%, PR은 75%였고, 면역조직화학 염색에서 음성으로 나온 경우는 일치율이 ER은 45%, PR은 65%였다 (Table 3, 4). 면역조직화학 염색에서 음성으로 나온 예 중에서 DCC 방법으로 양성인 예들 중 결과가 10~20 fmol 사이의 예가 ER은 3예, PR이 3예로 비교적 낮은 점수에 있는 경우가 많아서 염색의 정도가 식별할 수 있는 수준이하이거나 너무 부분적으

**Table 3.** Correlation between IH score and DCC mean and range value in ER receptor

IH scoring	No. of cases	DCC mean+SD
-	11	15.1+13.1
+	0	
++	3	32.3+43
+++	9	38.2+26.6
++++	2	127

SD=standard deviation R=0.5832, p=0.001

**Table 4.** Correlation between IH score and DCC mean & range value in PR receptor

IH score	No. of cases	DCC mean+SD
-	17	12.1+16.9
+	1	14
++	4	31.7+19.0
+++	1	7
++++	2	128.5+132.2

R=0.6061, p=0.001

로만 염색이 됐을 수도 있다고 추정되었다. 또한 DCC에서 양성인 예가 면역조직화학 염색에서 음성인 예는 ER보다 PR이 더 많은데 그 이유는 progesterone은 estrogen보다 빠르게 분해되고 그 수용체에 친화력이 낮기 때문으로 여겨진다<sup>7</sup>. 면역조직화학 염색에서 양성인 예가 DCC 방법으로 수치가 0인 예는 한 예도 없었고, 10 fmol 이하인 예는 ER이 그 수치가 각각 7, 7, 7, 8 fmol이었고 PR은 6, 7 fmol로서 모두 5 fmol 이상이었다.

SPSS/PC+ version 4.1을 이용한 단순상관 분석에서 ER은 R=0.5832, p=0.001, PR은 R=0.6061, p=0.001로 높은 상관성이 있는 것으로 나타났다.

5단계로 나눈 점수제는 DCC 방법의 수치와 통계적으로 상관관계가 있었고 염색강도와 양을 화상분석기(image analyzer)를 이용하여 측정한다면 좀더 손쉽고 확실히 알 수 있을 것이다<sup>8</sup>. 면역조직화학염색에서 양성으로 나온 예가 모두 DCC수치상 5 fmol 이상이었으므로 DCC의 잘라내기인 10 fmol을 5 fmol로 낮춘다면 모두 일치하므로 면역조직화학염색에서 양성으로 나온 경우는 그대로 치료에 적용할

수 있으리라고 생각된다. 그러나 면역조직화학염색에서 음성으로 나온 경우 중에는 DCC 수치가 높은 경우도 포함되어 있는데 그 이유는 파라핀 포매 조직의 보관상태, 보관기간, 또는 처음에 고정시킬 당시의 조직의 상태등에 기인 할 것으로 여겨진다. 유방암의 ER, PR의 가부를 결정하는 것은 일반적인 처리과정을 거친 파라핀 포매 조직에서도 가능하며, 염색의 질에 영향을 주는 단백질분해처리 과정을 대신에 초극단파 처리를 하는 것이 염색의 질을 향상시켰다.

## 결 론

유방암 조직 25 예에서 파라핀에 포매된 조직으로 ER, PR 수용체 여부를 IH 방법으로 염색하였고 그 결과를 현미경하에서 반 정량적으로 처리하여 DCC 방법에 의한 ER,PR 수용체 수치와 비교하였다.

IH 방법에서 양성으로 나온 경우는 DCC 방법으로 모두 5 fmol 이상인 예들로 IH 방법에 의한 결과를 치료에 적용할 수 있을 것으로 생각되고 IH 방법에서 음성으로 나온 경우는 다른 방법으로 확인 하는 것이 바람직할 것으로 생각된다. 통계적으로 IH 방법의 점수제와 DCC 수치는 상관성이 있어서 IH 염색을 판독할 때 점수제를 사용하는 것이 도움이 되리라고 추정된다.

## 참 고 문 헌

1. Scottish Cancer Trials Breast Group and ICRF Breast Unit, Guy's Hospital, London, Adjuvant ovarian ablation versus CMF chemotherapy in premenopausal women with pathologic stage II breast carcinoma: The scottish trial. *Lancet* 1993; 341: 1293-8.
2. Shinkaku IF, Said JW. Detection of estrogen receptors with monoclonal antibodies in routinely processed formalin-fixed paraffin sections of breast carcinoma. Use of DNase pretreatment to enhance sensitivity of the reaction. *Am J Clin Pathol* 1987; 87: 161-7.
3. Elias JM, Heimann A, Cain T, Margiotta M, Gallery H, Gomes C. Estrogen receptor localization in paraffin sections by enzyme digestion, repeated applications of primary antibody, and imidazole. *J Histotechnol* 1990; 13: 29-33.
4. P Sannino, S Shousha. Demonstration of estrogen receptors in paraffin wax sections of breast carcinoma using the monoclonal antibody ID5 and microwave oven processing; *J Clin Pathol* 1994; 47: 90-92.

5. Eugene RD, Elwood VJ. Estrophilin assays in breast cancer. *Cancer* 1980; 46: 2783-2788.
  6. Soomro S, Shousha S, Sinnett HD. Oestrogen and progesterone receptors in screen- detected breast carcinoma; an immunohistochemical study using paraffin sections. *Histopathology* 1992; 21: 543-7.
  7. Hoffman PG, Jones LA, Kuhn RW et al. Progesterone receptors; *Cancer* 1980; 46: 2801-2804.
  8. Jose ME, Patricia LK, Parula M et al. Improvement of the quantification of estrogen and progesterone receptors in paraffin-embedded tumors by image analysis. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 32-38.
-