

유방암종에서 pS2 단백질발현과 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체와의 상관관계

가톨릭대학교 성 빈센트병원 임상병리과 및 ¹일반외과

장은덕·전정수¹

Expression of the pS2 Protein and Its Relation with Estrogen and Progesterone Receptor in Breast Cancer

Eundeok Chang and Chungsoo Chun¹

Department of Pathology and ¹General Surgery, St Vincent's Hospital, the Catholic University of Korea, Suwon 440-060, Korea

Expression of the pS2 protein in breast carcinoma is a useful guide to evaluate the prognosis and response to tamoxifen. The pS2 protein is an estrogen-regulated 60 amino acid protein which was originally discovered following the screening of cDNA libraries in MCF-7 breast carcinoma cells and is induced through estrogen-dependent transcription of the pS2 gene. The presence of the pS2 protein in breast cancer is considered as valuable as the receptor status, or even more so, in predicting the response to hormonal therapy. We have investigated the pS2 protein expression in 62 cases of primary breast cancer in order to know the relationship between the expression rate of the pS2 protein and hormonal receptor status using immunohistochemical procedures on formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. Concomitantly, both the estrogen receptors (ER) and progesterone receptors (PR) were examined using the immunohistochemical technique. Positive staining for the pS2 was seen in forty-nine cases (79%) of the tumors. Forty three cases (88%) of the pS2 positive tumors were ER positive and forty one cases (84%) of the pS2 positive tumors were PR positive ; forty six cases (93%) of pS2 positive tumors were positive for ER and/or PR. The pS2 status correlated significantly with the ER ($p < 0.0001$) and PR ($p < 0.001$). The results reveal a close association between the pS2 protein and either or both the ER and PR status. (**Korean J Pathol 1998; 32: 169 ~ 173**)

Key Words: Breast cancer, pS2 protein, ER, PR

서 론

유방암의 생물학적 특성을 나타내는 기준으로 예후 판정 및 호르몬 치료대상 선별에 유용하게 사용되는 에스트로겐 수용체 (estrogen receptor, ER) 및 프로게스테론 수용체 (progesterone receptor, PR)가 있다. 유방암 환

자의 호르몬 수용체 유무는 예후나 치료면에 있어서 중요한 역할을 한다는 것은 이미 널리 알려져 있다. ER과 PR이 모두 양성인 유방암에서는 치료에 75~80%의 높은 호전율을 보이나 ER 음성인 유방암의 경우 호르몬 치료에 대한 반응이 3~10% 미만으로 나타난다.¹ 그러나 ER과 PR의 유무만으로 호르몬 치료의 반응을 완전히 예견하지는 못한다. ER 양성 환자 중 약 절반에서, ER과 PR 양성 환자의 약 ¼에서는 호르몬 치료에 실패하며, ER과 PR 모두 음성인 환자에서도 11~13%는 호르몬 치료에 잘 반응함을 알았다.²

이와같이 유방암 환자에서 ER과 PR이 양성임에도 호르몬 치료에 실패한 경우 또다른 복잡한 체계의 조절 기능에 결여가 있음을 알 수 있다.³ ER과 PR만으로 예

접 수: 1997년 3월 12일, 게재승인: 1997년 12월 12일
주 소: 경기도 수원시 팔달구 지동 93, 우편번호 440-060
성 빈센트병원 병리과, 장은덕

ISSN : 0379-1149

*본 논문은 가톨릭대학 성 빈센트병원 임상의학 연구비와 중앙의료원인쇄보조비로 이루어졌음.

견하지 못하는 호르몬 치료의 반응 여부를 효과적으로 파악하는데 pS2 단백측정이 도움이 될 수 있다.²

pS2 단백질은 1982년 에스트로겐 수용체와 관련된 표지자를 조사하는 동안 유방암 세포주 MCF-7에서 처음 발견되었다.⁴ pS2 단백질은 에스트로겐에 의해서 조절되므로, 이 단백질 발현은 에스트로겐 조절의 기능적인 면을 반영하여, 호르몬 치료 반응을 더욱 정확하게 예견할 수 있다.²

국내에서 아직 pS2에 관한 연구가 적은 실정이며, 특히 에스트로겐 수용체와 프로그스테론 수용체와 관련을 분석한 연구는 없었다. 저자들은 pS2 단백질의 단클론항체를 이용한 면역조직화학염색으로 유방암에서 호르몬 수용체와의 관련 여부를 비교 검토하고 유방암 환자에서 예후 판정 및 치료에 이용하고자 본 실험을 시행하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구 대상

1994년 8월부터 1996년 10월까지 가톨릭대학교 성빈센트병원에서 유방암으로 수술받은 환자의 유방암 조직 62예를 대상으로 하였다. 62예 모두 여성이었으며 연령 분포는 24~82세로 평균 연령은 46.8세이었다. 조직학적으로는 침윤성 관상피암종이 43예, 침윤성 소엽암종이 3예, 침윤성 관암종과 소엽암종의 혼합형이 3예, 관상피내 암종이 8예, 수질성 암종이 4예, 관상 (tubular) 암종이 1예 이었다. 대조군으로는 ER과 PR에 양성반응을 보인 자궁내막암종 4예를 대상으로 하였다.

2. pS2 단백질과 ER 및 PR의 면역조직 염색방법

정상과 종양이 포함되는 대표적인 파라핀 포매 조직 표본 한개씩을 선택하여 ER과 PR의 단 클론항체 (MoAB, Dako kit, USA)를 사용하여 ABC 방법으로 염색을 다음과 같은 순서로 진행하였다. 파라핀 포매 조직은 4 μ m 두께로 잘라 슬라이드에 부착시켜 탈파라핀한 후 계열 알코올을 거쳐 함수시킨 후 증류수에 씻고

pH 6.0 citric acid 용액에 담귀 멸균기를 사용하여 121°C에 15분간 1회 적용하였다. Tris 완충액에 담근 후 H₂O₂를 떨어뜨려 5분간 내재된 peroxidase 활동을 저지시키고 다시 Tris 완충액으로 10분간 씻었다. 정상 말 혈청에 10분간 접촉시켜 비특이적 항체 결합을 억제시켰다. 일차 항체를 떨어뜨린 후 1시간 이상 37°C incubator에 방치하였다. Tris 완충액으로 10분간 씻고 이차항체로 20분간 염색하였다. 다시 증류수로 씻고 발색시약 (3-amino-9-ethylcarbazole, AEC)으로 5~10분간 염색하여 발색시켰다. 흐르는 물로 세척한 후 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 한 후 흐르는 물로 다시 씻고 crystal mount로 봉입하였다.

광학 현미경으로 관찰하여 ER은 핵에 갈색으로 선명하게 염색되었을 때 양성으로 판정하였고 PR은 핵 또는 세포질이 갈색으로 강하게 염색되었을 때 양성으로 판정하였다.

pS2 단백질도 ER 및 PR과 같은 방법으로 염색하였다. 쥐의 항 pS2 단 클론항체 (Mo AB, Dako kit, USA)를 사용하였고, 핵 주위의 세포질에 진한 갈색으로 염색되었을 때 양성으로 판정하였으며, 전체 종양 세포중 염색된 세포수의 비율이 70% 이상에서 강양성일 때를 양성으로 하였고 약한 반응을 나타낸 경우는 음성으로 판정하였다.²

3. 통계학적 분석

SAS/STAT의 χ^2 -test 분석을 이용하였다.

결 과

62예의 유방암중 49예 (79%)에서 pS2단백에 대해 양성반응을 보였다. 양성으로 판정된 예에서는 종양 세포의 약 2/3이상에서 세포질에 강한 염색반응을 보였다 (Fig. 1B).

ER 양성인 경우 핵에 반응을 보이며 (Fig. 1A, 2A & 3A), PR 양성인 핵 또는 세포질에 염색되며, pS2 단백질은 핵은 염색되지 않고 핵 주위의 세포질에 반응을 보

Table 1. The pS2 protein staining according to histologic type

Histologic types	No. of cases	Positive cases(%)
Infiltrating ductal carcinoma	43	35 (81%)
Infiltrating lobular carcinoma	3	2 (67%)
Infiltrating ductal and lobular carcinoma	3	3 (100%)
Intraductal carcinoma	8	5 (63%)
Medullary carcinoma	4	3 (75%)
Tubular carcinoma	1	1 (100%)
Total	62	49 (79%)

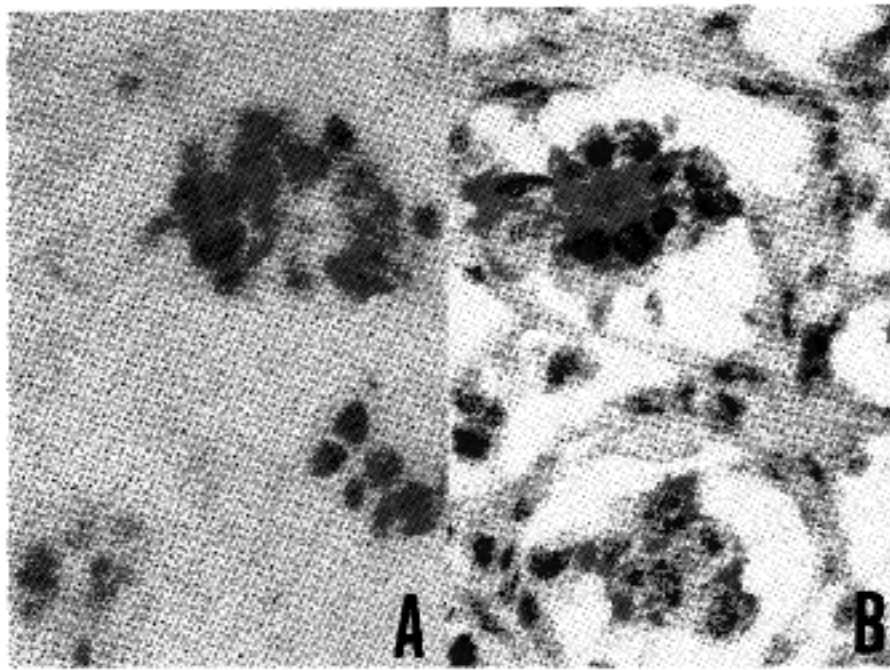


Fig. 1. Immunohistochemically, ER positive (A) and pS2 protein positive (B) stainings in breast carcinoma. pS2 protein is detected in the cytoplasm. The stroma cells are weakly stained.

었다 (Fig. 1B). 간질 세포는 양성반응을 보였으나, 종양 세포와 달리 약한 반응을 보였고, 정상 상피세포는 반응하지 않았다. 대조군으로 ER 양성인 자궁내막암 4예에서는 모두 pS2 단백질에 음성반응을 보였다 (Fig. 3A & B).

pS2 단백질에 대한 양성도를 조직학적 유형에 따라 비교해 보면 Table 1과 같다. 침윤성 관상피암종 43예중 35예 (81%)에서 양성반응을 보였고, 침윤성 소엽암종 3예중 2예 (67%)에서, 침윤성 혼합 관암종과 소엽암종은 3예 (100%) 모두에서, 관상피내 암종의 8예중 5예 (63%)에서, 수질성 암종의 4예중 3예 (75%)에서, 관상 (tubular) 암종의 1예 (100%)가 양성반응을 보였다 (Table 1).

pS2 단백질표현과 ER 및 PR 반응 결과와의 상관관계는 pS2 단백질 양성이며 ER 양성인 예는 43예 (88%)였으며, ER 음성은 6예 (12%)였다. pS2단백 양성이며 PR 양성인 예는 41예 (84%)였으며, PR 음성인 예는 8예 (16%)였다. pS2 단백질표현은 ER 및 PR 상태와 통계적으로 유의한 상관관계를 보였다 (Table 2).

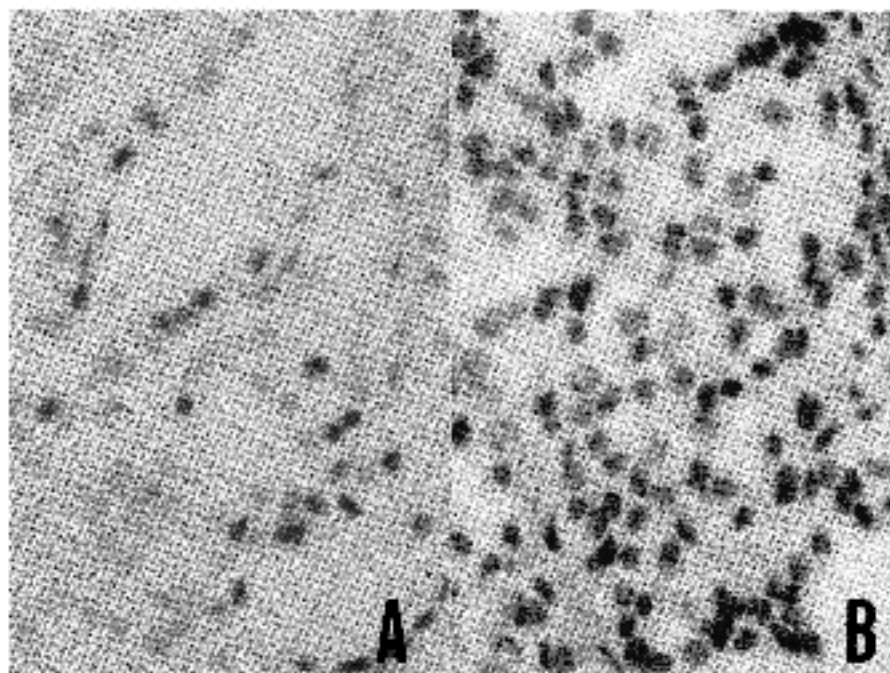


Fig. 2. ER positive (A) and pS2 protein negative (B) stainings in breast carcinoma.

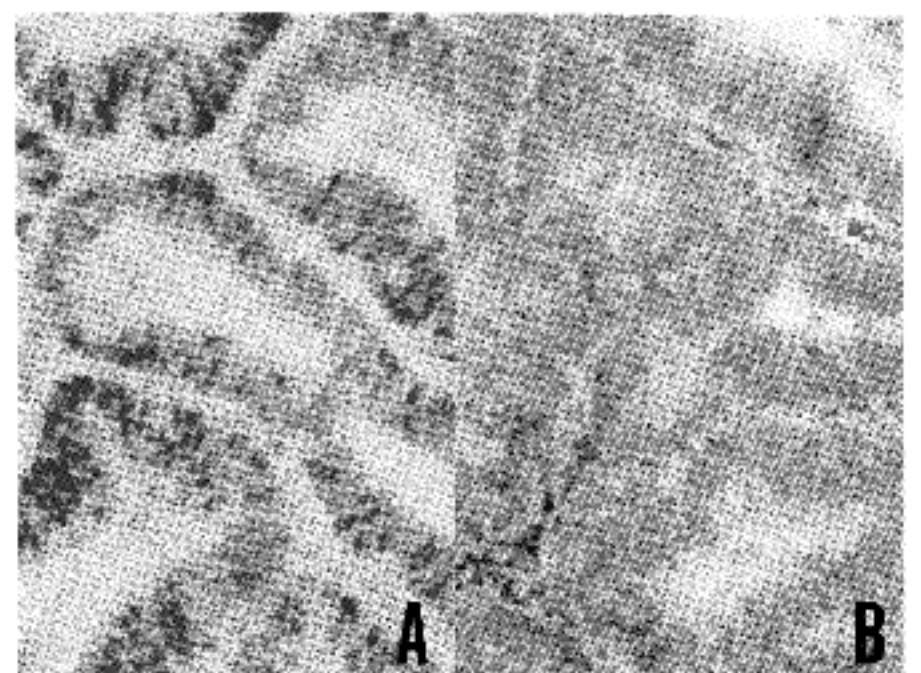


Fig. 3. ER positive (A) and pS2 protein negative (B) stainings in endometrial carcinoma.

Table 2. Correlation between pS2 protein, ER and PR status

	pS2 protein		p value
	Positive cases(%)	Negative cases(%)	
ER Positive	43 (88%)	7 (54%)	0.0001
ER Negative	6 (12%)	6 (46%)	
PR Positive	41 (84%)	8 (62%)	0.001
PR Negative	8 (16%)	5 (38%)	

*ER: Estrogen receptor PR: Progesterone receptor

고 찰

유방암 환자에서 호르몬 수용체 (ER이나 PR)는 예후나 치료를 결정하는 중요한 인자중의 하나로 임상에서 널리 이용되고 있다.^{3,5} 원발성 유방암의 55~65%가 호르몬 수용체를 가지고 있고 전이성 유방암에서는 45~55%에서 양성반응을 보이며, 특히 갱년기 이후에 발생한 유방암인 경우에 호르몬 수용체는 대체적으로 발현율이 높다고 한다.¹ 남성의 유방암에서는 90%가 호르몬 수용체를 가지고 있다.¹ 호르몬 수용체 양성인 유방암에서는 수술후 추가적인 치료를 하지 않은 경우에도 음성이며 종양 크기가 작은 경우보다 생존율이 높고, 특히 호르몬 수용체 양성인 환자는 tamoxifen과 같은 항호르몬 치료제에 양호한 반응을 보인다.³ 즉 호르몬 수용체 양성인 종양은 약 55%에서 항 호르몬 치료에 좋은 반응을 보이고 음성인 경우에는 3~10% 미만이며^{2,3} 항암요법도 세포에 대한 독성이 심하게 나타난다.⁶

에스트로겐과 프로게스테론 수용체는 유방조직과 같이 에스트로겐과 프로게스테론에 의해 그 성장이 지배되는 세포의 세포질 내에 존재하는 단백질성분으로, 세포 내에서 에스트로겐 혹은 프로게스테론과 결합하여 에스트로겐 혹은 프로게스테론 수용체 복합체를 형성하고, 이것이 핵내로 이동하여 target 유전자의 전사 (transcription)를 유도하며, 그 결과 생긴 여러 가지 단백질은 DNA 합성과 세포성장을 조절하는데 관여한다.⁷

pS2 유전자는 에스트로겐 조절 유전자로 유방암 세포주 MCF-7에서 처음 발견되었고,^{4,5,6} 60개의 아미노산인 다량의 시스테인 (cysteine)으로 구성되어 있으며, 6450 dalton의 물질로, 에스트로겐-의존성 전사에 의해 유도되었으며, 21번 염색체 장완에 위치하는 것으로 알려져 있다.⁴ pS2 단백질과 그의 mRNA의 확인은 파라핀 포매된 조직에서 면역조직 염색방법 또는 유방암 조직에서 방사성 면역분석법으로 가능하다.^{5,6} 구조상으로는 인슐린 유사성의 성장인자 (IGF-1)와 닮았으며, polypeptide의 일종으로, 장운동과 위축의 분비를 억제하는 것으로 알려진 췌장의 polypeptide 한 군과도 유사하다. pS2 단백질의 면역 특성은 표피성장인자 (EGF)와 유사하나⁵ 이 단백질의 기능은 아직 밝혀져 있지 않다.

이 유전자의 발현은 유방암 환자의 호르몬 치료에 좋은 지표가 되며,^{2,5,8} ER, PR과는 대조적으로 안정성이 있다고 증명되었다.⁵ pS2 단백질은 면역조직 염색방법으로 널리 이용되며, 주로 세포질에서 관찰할 수 있다. 핵주위에 축적되어 관찰되는 것은 이 단백질이 Golgi체에 위치함을 말해준다.⁵ pS2 단백질은 유방암 환자의 29~82%에서 관찰되며,⁹ 본 연구에서는 79%에서 양성반응을 보여 이는 Piggott등⁹의 연구 결과와도 일치하였다.

최근 연구에서 pS2 단백질은 양성 유방질환이나 악성 유방암종에서만 높은 특이성을 가진다고 하며,⁵ 정상 유방조직과 선종에서도 관찰할 수 있으나 그 염색강도나, 세포질 농도가 유방암종에서 보다 낮다.⁹ 그러나,

ER과 PR에 강한 양성을 보이는 자궁내막암에서는 관찰되지 않으며, 단지 소수의 난소 종양과 자궁경부암에서 양성반응을 보인다.⁵ 자궁내막암과 자궁경부암에서 각각 4%, 6% 관찰된다는 보고도 있다.¹⁰ 본 연구결과에서도 ER과 PR이 양성인 자궁 내막암 4예에서 pS2 단백질은 모두 음성이었다. pS2 단백질은 정상 위점막, 소장과 대장, 타액선과 전립선에서도 존재하며,⁹ 위궤양,¹¹ 위암, 췌장암과 대장암에서도 관찰할 수 있다.¹⁰ pS2 단백질이 위장관의 종양에서도 관찰되는 것은 이 단백질이 전적으로 에스트로겐에 의해서만 유발되는 것이 아니라, EGF (epidermal growth factor), 종양촉진자, 또다른 종양 단백질에 의해서도 활성화될 수 있다.^{10,12}

pS2 단백질의 구조가 IGF-1 (insulin-like growth factor 1)에 유사함은 성장인자로서의 기능이 있음을 암시한다.¹⁰ Henry등¹³은 pS2 단백질과 종양의 조직학적 등급 사이에 상당한 유의성이 있었다고 보고하였으나, 종양크기, 임파절 전이 여부, 나이와는 상관관계가 없었다.^{5,13} 또한 erb-B 2 종양 유전자나 Cathepsin D의 양성반응과도 상관관계가 없다.⁵ 그러나 pS2와 에스트로겐 수용체와의 상관관계는 모든 연구에서 유의하였다.^{2,5,6,11} Foekens등¹⁴은 pS2 단백질 발현이 유방암의 예후에 영향이 있으며, 임파절 전이와 무관하게 pS2 양성 환자는 음성 환자보다 오랜기간 생존하였으며 무병 생존기간이 길었다. 그러므로 pS2의 발현상태를 측정하는 것은 ER과 PR 양성군의 환자들이라도 예후를 아는데 도움을 준다. 즉, ER과 PR 양성이며 pS2 음성환자는, ER과 PR 양성이며 pS2 양성 환자군에 비해 재발률이 3배나 높고, 사망률은 15배나 높다.⁵

Henry등¹³도 pS2 발현상태로 호르몬 치료 반응을 예견할 수 있으며 pS2 양성환자의 67~76%가 호르몬 치료에 잘 반응하므로, ER 발현 상태보다 더욱 유익하다고 한다.

본 연구에서, 유방암 조직의 pS2 단백질에 대한 면역조직화학 염색결과는 ER 및 PR 상태와 유의한 상관관계를 나타내어, Crombach등⁵ 및 Detre등⁶의 연구결과와 일치하였다.

그러나, 수술후 추가적 보조요법과 호르몬 치료에도 불구하고 재발된 환자에서 pS2 단백질 발현상태를 검토함으로써 임상치료에 이용될 수 있으리라고 사료되며, 이에 대한 꾸준한 임상 추적 연구조사가 요구된다.

결 론

저자들은 가톨릭대학교 성 빈센트병원 병리과에서 진단된 유방암 조직 62예를 대상으로 유방암종에서 pS2 단백질의 발현과 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체와의 상관성을 알아보기 위하여 본 연구를 시도하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 62예의 유방암종에서 pS2 단백질에 대한 면역조직화학 염색을 시행하여 49예 (79%)에서 양성 반응을 보였

다. 양성도를 조직학적 유형에 따라 분류한 결과, 침윤성 관상피암종 43예중 35예 (81%), 침윤성 소엽암종 3예중 2예 (67%), 침윤성 혼합 관암종과 소엽암종은 3예 (100%), 관상피내 암종의 8예중 5예 (63%), 수질성 암종의 4예중 3예 (75%), 관상 (tubular) 암종의 1예 (100%)가 양성반응을 보였다.

2) pS2 단백질표현과 ER 및 PR 반응 결과와의 상관관계는 pS2 단백 양성이며 ER 양성인 예는 43 예 (88%)였으며, ER 음성은 6예 (12%)였다. pS2단백 양성이며 PR 양성인 예는 41예 (84%)였으며, PR 음성은 8예 (16%)였다. pS2 단백질표현은 ER ($p < 0.0001$)과 PR ($p < 0.001$) 상태와 통계적으로 유의한 상관관계를 보였다.

이상과 같은 결과를 종합하여, pS2 단백질이 호르몬 치료에 대한 반응여부를 예측할 수 있으며, 호르몬 치료에 반응하지 않는 환자군에 대해 이 단백질의 반응 여부로써 치료에 도움이 되리라고 본다.

참 고 문 헌

1. Wittliff J. Steroid-hormone receptors in breast cancer. *Cancer* 1984; 53: 630-43.
2. Nichols PH, Ibrahim NBN, Padfield JH, Cawthorn SJ. Correlation of pS2 expression of involved lymph nodes in relation to primary breast carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 1995; 21: 151-4.
3. Manni A. Endocrine therapy of metastatic breast cancer. *J Endocrinol* 1989; 12: 357-72.
4. Jeltsch JM, Roberts M, Schatz L, Garnier JM, Brown AMC, Chambon P. Structure of the human estrogen-responsive gene pS2. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 1401-14.
5. Crombach G, Ingenhorst A, Gohring UJ, et al. Expression of pS2 protein in breast cancer. *Arch Gynecol Obstet* 1993; 253: 183-92.
6. Detre S, King N, Salter J, MacLennan K, McKinna JA, Dowsett M. Immunohistochemical and biochemical analysis of the estrogen regulated protein pS2, and its relation with estrogen receptor and progesterone receptor in breast cancer. *J Clin Pathol* 1994; 47: 240-4.
7. 김애리, 김인선, 이갑노. 유방암에서 화상분석기를 이용한 DNA 배수성, 에스트로젠과 프로게스테론 수용체 및 Her-2/neu 종양단백의 표현에 관한 연구. *대한병리학회지* 1994; 28: 246-59.
8. Schwartz LH, Koerner FC, Edgerton SM, et al. pS2 Expression and response to hormonal therapy in patients with advanced breast cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 621-8.
9. Piggott NH, Henry JA, May FEB, Westley BR. Antipeptide antibodies against the pNR-2 estrogen-regulated protein of human breast cancer cells and detection of pNR-2 expression in normal tissues by immunohistochemistry. *J Pathol* 1991; 163: 95-104.
10. Luqmani YA, Ryall G, Shousha S, Coombes C. An immunohistochemical survey of pS2 expression in human epithelial cancers. *Int J Cancer* 1992; 50: 302-4.
11. Wright NA, Poulsem R, Stamp GW, et al. Epidermal growth factor (EGF/URO) induces expression of regulatory peptides in damaged human gastrointestinal tissues. *J Pathol* 1990; 162: 279-84.
12. Nunez AM, Jakowlev S, Briand JP, et al. Characterization of the estrogen-induced pS2 protein secreted by the human breast cancer cell line MCF-7. *Endocrinology* 1987; 121: 1759-65.
13. Henry JA, Piggott NH, Mallick UK, et al. pNR-2/ pS2 immunohistochemical staining in breast cancer: correlation with prognostic factors and endocrine response. *Br J Cancer* 1991; 63: 615-22.
14. Foekens JA, Rio MC, Sequin P, et al. Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein status. *Cancer Res* 1990; 50: 3832-7.