

# 유방암에서 안드로겐 수용체, bcl-2 단백질, Rb 단백질의 발현과 예후인자와의 상관관계에 관한 연구

고려대학교 의과대학 병리학교실 및 <sup>1</sup>생명공학원

조 현 득 · 김 영 식 · 김 인 선<sup>1</sup>

## Expression of Androgen Receptor, bcl-2 Protein and Rb Protein in Breast Cancers as Related to Prognostic Factors

Hyun Deuk Cho, Young Sik Kim, and Insun Kim<sup>1</sup>

Departments of Pathology, College of Medicine, and <sup>1</sup>Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-705, Korea

Breast cancer is the most common malignancy of women in industrialized countries and the third in Korean women. There have been a lot of studies on biologic behaviors as well as on the prognostic factors of the breast cancer. In this study, the expression of hormone receptors (estrogen receptor ; ER, progesterone receptor ; PR, and androgen receptor ; AR), *bcl-2* and Rb proteins were immunostained on 60 infiltrating ductal carcinomas of the breast. The results were evaluated in relation with the age, histologic grade, tumor size, and status of lymph node metastasis. The expression of ER and PR had a significant inverse correlation with the histologic grade ( $p < 0.001$ ). The expression of AR was significantly correlated with the expression of ER ( $p = 0.039$ ) and PR ( $p = 0.009$ ), but not with other factors such as age, histologic grade, tumor size, and status of lymph node metastasis. There was no relationship between *bcl-2* protein expression and other prognostic factors, except with the expression of ER. Rb protein expression had a significant positive relationship with PR ( $p = 0.05$ ) and the degree of positivity was correlated with histologic grade ( $p = 0.002$ ). In conclusion, this result suggests that expression of AR is well correlated with ER and PR. *bcl-2* has no prognostic value. The significance of Rb protein expression remained to be studied. (Korean J Pathol 1998; 32: 443~452)

**Key Words:** Breast carcinoma, Hormone receptors, Androgen receptor, *bcl-2*, Rb

### 서 론

유방암은 산업화된 나라의 여성에서 가장 흔한 악성 종양이며 우리나라에서도 자궁암, 위암에 이어 세번째로 많은 여성의 악성종양으로서<sup>1</sup> 발병률이 증가추세를 보이고 있다. 유방암은 환자에 따라 생존율의 차이가

크기 때문에 유방암에 대한 연구는 주로 재발 및 생존율을 정확히 예측하기 위한 새로운 예후인자의 발견과 이의 응용에 초점이 맞추어져 있다.<sup>2</sup> 유방암의 발생에 관여한다고 알려진 에스트로겐, 프로게스테론과 종양의 이들 수용체는 예후와 치료에 밀접한 연관이 있음이 잘 밝혀진 예후인자들이다. 따라서 에스트로겐 수용체 (Estrogen Receptor; ER), 프로게스테론 수용체 (Progesterone Receptor; PR)의 발현을 조절하거나 이들과 연관이 있는 암유전자와 다른 호르몬 수용체를 밝혀내는 것은 유방암의 발생기전을 더 확실히 규명하고 예후 판정과 치료 방침 결정에 더 많은 도움을 줄 뿐 아니라 암발생 예방

접 수: 1997년 9월 9일, 게재승인: 1998년 4월 18일  
주 소: 서울시 성북구 안암동 5가 126-1, 우편번호 136-705  
고려대학교 의과대학 병리학교실, 조현득  
ISSN : 0379-1149

이나 조기 발견 등에도 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

유방암에서 안드로겐과 안드로겐 수용체 (Androgen Receptor; AR)의 기능에 대한 지금까지의 연구 보고에 의하면 AR가 발현된 유방암 세포에 안드로겐을 주면 종양의 퇴행과 성장 억제가 일어난다고 한다.<sup>3</sup> 따라서 AR의 발현과 기존의 ER, PR 발현과의 관계를 밝히는 것은 예후를 추정하고 호르몬 치료에 대한 반응을 예측하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 지금까지 AR의 발현을 측정할 때는 신선조직을 분쇄하여 dextran-coated charcoal법<sup>4,5</sup>으로 측정하였는데 이 방법은 조직의 채취와 보관상의 어려움이 있을 뿐 아니라, 발현되는 AR가 악성종양 세포에 의한 것인지 비종양성 조직에 의한 것인지 감별이 되지 않는 단점이 있다.<sup>5,6</sup> 면역조직화학적 염색은 이러한 단점들을 보완할 수 있고 비교적 방법이 간단하며 파라핀 포매 조직을 이용한 후향적 연구가 가능하다는 장점이 있다. 그러나 면역조직화학적 연구, 특히 파라핀 포매 조직에서의 AR에 대한 연구<sup>5</sup>는 아직 드물다.

최근 유방암에서 *bcl-2*의 발현과 에스트로겐 호르몬 수용체의 관계, 예후인자들과의 관계에 대한 보고<sup>2,7-12</sup>에 따르면 유방암에서 *bcl-2*의 발현은 에스트로겐 수용체의 발현의 영향을 받으며<sup>8</sup> p53 유전자에 의해 하향조절 (down regulation)되어 유방암에서 발현도가 떨어진다고 한다.<sup>12</sup> *bcl-2* 유전자는 정상적으로 태아와 성인의 유방조직에서 발견되며<sup>8,13</sup> 그 발현이 ER의 발현과 잘 연관이 되므로<sup>8,14</sup> 유방암에서 *bcl-2*의 발현은 종양의 분화와 관련이 있는 것으로 생각되고 있으나 *bcl-2*의 발현 정도와 예후인자와의 상관관계에 대해서는 아직 많은 연구가 이루어지지 않았다.

종양억제 유전자인 Rb 유전자는 종양억제 유전자의 원형으로서 G1기에서 세포 주기를 조절하여 종양 발생을 억제하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으나<sup>17</sup> 유방암에서는 활발한 연구가 이루어지지 못했다.

본 연구는 유방암의 예후 판정과 치료 반응 예측에 관한 지표로 잘 알려진 ER과 PR 외에 이런 성호르몬의 발현과 관계있는 것으로 생각되는 AR과 *bcl-2* 유전자, 그리고 중요한 종양 억제유전자인 Rb 유전자의 발현이 기존에 알려진 성 호르몬 수용체 (ER, PR) 발현과 예후인자 (연령, 종양의 조직학적 등급, 액와 림프절 전이 수, 종양 크기)와 어떤 관련이 있는지를 면역조직화학적 염색을 통하여 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

고려대학교 의과대학 안암병원에서 1993년 부터 1997년 사이에 유방암으로 진단받고 종괴적출술이나 유방 절제술을 받은 환자들 중 파라핀 포매 조직의 보관 상태가 양호한 60예를 대상으로 하였다. 연구의 일관성을 위해 침윤성 관암으로 병리진단을 받은 증례만을 선정

하였다. 재발한 예와 술전에 화학요법이나 방사선요법을 받은 예는 연구대상에서 제외하였다. 임상적 예후인자들로는 선정된 증례들의 병리보고서를 검토하여 환자의 연령, 종양의 Bloom & Richardson등급, 액와 림프절 전이 수, 그리고 종양의 크기를 선정하였다.

환자의 연령은 25세에서 79세까지로 평균 연령은 48.9세였다. 연령에 따라서는 39세 이하가 12예 (20%), 40에서 49세가 22예 (36.7%), 50에서 59세가 18예 (30%), 그리고 60세 이상이 8예 (13.3%)였다. 종양의 조직학적 등급은 Bloom과 Richardson의 분류에 따랐고, I등급 10예 (16.7%), II등급 39예 (65%), III등급 11예 (18.3%)의 분포를 보였다. 액와 림프절 전이 유무는 48예에서 확인이 가능하였는데 전이 림프절의 수를 0개, 1개에서 3개, 4개 이상으로 나누었을 때, 림프절 전이가 없는 경우가 24예 (50%)였고 1개에서 3개가 16예 (33.3%), 4개 이상이 8예 였다. 종양의 크기는 44예에서 확인이 가능하였는데 0.8 cm에서 5.0 cm의 분포를 보였다. 종양의 가장 큰 길이를 기준으로 하였으며 1 cm 이하, 1.1 cm에서 2 cm사이, 2.1 cm에서 5 cm사이로 나누었을 때 각각 4예 (9.1%), 14예 (31.8%), 26예 (59.1%)였고 평균 크기는 2.56 cm이었다.

### 2. 면역조직화학적 염색

면역조직화학적 염색을 위해 포르말린 고정 파라핀 포매 조직을 4  $\mu$ m 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시킨 후 항온기에서 67°C에서 한시간 가온하고 통상의 방법으로 탈파라핀하고 각각 다른 농도의 알콜로 함수한 후에 증류수로 수세한다. 내인성 과산화효소의 활성을 억제시키기 위해 3% 과산화수소수를 사용하여 10분간 처리한 후 tris 완충용액 (Tris 3.025 g, NaCl 40 g, 1 M HCl 22 ml in H<sub>2</sub>O 5L, pH 7.4)에 씻는다. 항원 회복을 위해 citrate 완충용액 3 L (sodium citrate 14.7 g, 1 M HCl 27 ml in H<sub>2</sub>O 5L, pH 6.0)를 pressure cooker에 채우고 가온하여 끓을 때 슬라이드를 넣고 압력이 최고 (103 kPa)에 도달한 후부터 2분간 더 끓인 다음 찬물에 담그어 압력을 내리고 뚜껑을 열어 슬라이드를 꺼낸다. 그 후 차단항체를 실온에서 10분간 반응시킨 후 일차항체를 실온에서 한시간 반응시킨다. 사용한 일차 항체는 estrogen receptor (ZYMED, 61133469, prediluted), progesterone receptor (ZYMED, 60831835, prediluted), androgen receptor (BioGenex, MU 256-UC A402, 1:20), *bcl-2* protein (DAKO, M887 101, 1:50), Rb protein (Pharmingen, Q512753, 1:100)에 대한 단클론항체였다. 양성 대조군으로서 ER과 PR에 대해서는 유방암 조직편을, AR는 전립선 (비후조직과 선암조직), *bcl-2*단백과 Rb단백은 구개 편도조직을 사용하였다. 이들 양성 대조군들은 매 실험마다 항상 양성으로 염색되었다. 음성대조군으로는 1차항체 대신 생리식염수를 사용하여 동일한 방법으로 염색하였다. 다음에 Tris 완충액으로 수세하고 biotin결합된 2차항체를 가하여 실온에서 40분 반응시켰

다. 다시 Tris 완충액으로 수세한 후 peroxidase결합된 streptavidin 용액을 가하여 20분 간 반응시키고 Tris 완충액으로 수세하고 발색제인 DAB 용액을 가하여 10분 간 반응시킨다. 이후 Harris' hematoxylin으로 대조염색하고 알콜로 탈수한 후 봉입하였다.

3. 각 항체에 대한 양성 판정 및 평가

ER, PR, AR, Rb 단백질은 핵에서 분명한 양성반응을 보이는 경우를 양성으로 판정하였고, bcl-2 단백질은 세포질에서 양성반응을 보이는 경우에 양성으로 판정하였다. 염색의 판정은 대물렌즈 40배 배율로 10시야 이상을 검경하여 전체 관찰된 종양 세포 수에 대한 양성 염색 종양 세포의 백분율로 표시하였다. ER, PR, AR에 대해서는 종양 세포의 20% 이상이 양성으로 염색되는 경우를 양성으로 판독하였고<sup>5</sup> bcl-2도 다른 연구와 마찬가지로 10%를 기준으로 하였다.<sup>10,15</sup> Rb에 대해서는 연구자마다 차이가 있으나 Sawan등<sup>16</sup>이 제시한 10%를 기준으로 정하였다.<sup>16</sup>

4. 통계 검증

연구결과에 대한 통계적 유의성의 검증은 Chi square test로 하였으며 p 값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로

유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. ER과 PR에 대한 염색과 임상 예후 인자와의 상관관계 (Table 1, 2)

비종양성 조직 및 종양조직에서 ER과 PR은 선상피와 관상피의 핵에 국한되어 골고루 염색되었다 (Fig. 1). 60예 중 ER은 31예가 양성 (51.7%), PR은 35예가 양성 (58.3%)이었다. ER과 PR의 양성여부를 종양의 조직학적 등급과 비교하였을 때 각각의 수용체는 종양의 조직학적 등급이 높아질수록 양성인 예가 적어지는 경향을 보였으며 이는 통계적으로 유의한 관계를 보였다 (p<0.001). 또한 ER과 PR을 각각 염색정도에 따라 0~5% (-), 6-20% (±), 21~50% (1+), 51~100% (2+)로 세분하여 종양의 조직학적 등급과 비교하여 보면 등급의 증가에 따른 염색률의 감소가 의의있게 나타났다 (ER; p=0.003, PR; p=0.005). 그러나 ER과 PR양성 여부는 환자의 연령, 전이 림프절의 수 및 종양의 크기와는 연관이 없었다.

Table 1. Relationship of ER with clinicopathological variables

Category	ER+ (≥20%)	ER- (<20%)	p value	ER Positive rate (%)				p value
				0~5	6~20	21~50	51~100	
Positive rate (%)	31 (51.7%)	29 (48.3%)						
Age (yr)								
≤39 (n=12)	4	8	0.272	6	2	0	4	0.443
40~49 (n=22)	12	10		9	2	1	10	
50~59 (n=18)	12	6		6	0	3	9	
≥60 (n=8)	3	5		5	2	1	2	
Grade								
I (n=10)	8	2	<0.001	1	1	1	7	0.003
II (n=39)	23	16		14	3	4	18	
III (n=11)	0	11		11	0	0	0	
Positive nodes								
0 (n=24)	12	12	0.825	10	2	2	10	0.135
1~3 (n=16)	8	8		8	1	1	6	
≥4 (n=8)	3	5		4	1	0	3	
Tumor size (cm)								
1.0 (n=4)	3	1	0.517	1	0	0	3	0.723
1.1~2.1 (n=14)	6	8		8	0	1	5	
≥2.1 (n=26)	14	12		11	2	1	12	

Table 2. Relationship of PR with clinicopathological variables

Category	PR+ (≥20%)	PR- (<20%)	<i>p</i> value	PR Positive rate (%)				<i>p</i> value
				0~5	6~20	21~50	51~100	
Positive rate (%)	35 (58.3%)	25 (41.7%)						
Age (yr)								
≤39 (n=12)	4	8	0.075	7	2	1	2	0.267
40~49 (n=22)	15	7		6	1	3	12	
50~59 (n=18)	13	5		4	2	2	10	
≥60 (n=8)	3	3		5	0	0	3	
Grade								
I (n=10)	9	1	<0.001	0	2	1	7	0.005
II (n=39)	25	14		13	2	5	19	
III (n=11)	1	10		9	1	0	1	
Positive nodes								
0 (n=24)	16	8	0.557	7	2	1	14	0.774
1~3 (n=16)	8	8		7	1	2	6	
≥4 (n=8)	5	3		3	1	0	4	
Tumor size (cm)								
1.0 (n=4)	3	1	0.416	1	0	1	2	0.783
1.1~2.1 (n=14)	7	7		5	2	1	6	
≥2.1 (n=26)	18	8		8	1	2	15	

Table 3. Relationship of AR with clinicopathological variables

Category	AR+ (≥20%)	AR- (<20%)	<i>p</i> value	AR Positive rate (%)				<i>p</i> value
				0~5	6~20	21~50	51~100	
Positive rate (%)	48 (80.0%)	12 (20.0%)						
Age (yr)								
≤39 (n=12)	9	3	0.192	2	1	2	7	0.886
40~49 (n=22)	15	7		5	2	3	12	
50~59 (n=18)	17	1		1	1	3	13	
≥60 (n=8)	7	1		1	1	0	6	
Grade								
I (n=10)	8	2	0.307	1	1	1	7	0.167
II (n=39)	33	6		4	3	4	28	
III (n=11)	7	4		4	1	3	3	
Positive nodes								
0 (n=24)	21	3	0.186	3	2	6	13	0.397
1~3 (n=16)	10	6		4	2	1	9	
≥4 (n=8)	6	2		2	0	0	6	
Tumor size (cm)								
1.0 (n=4)	4	0	0.361	0	0	1	3	0.775
1.1~2.1 (n=14)	12	2		2	0	2	10	
≥2.1 (n=26)	19	7		6	2	3	15	

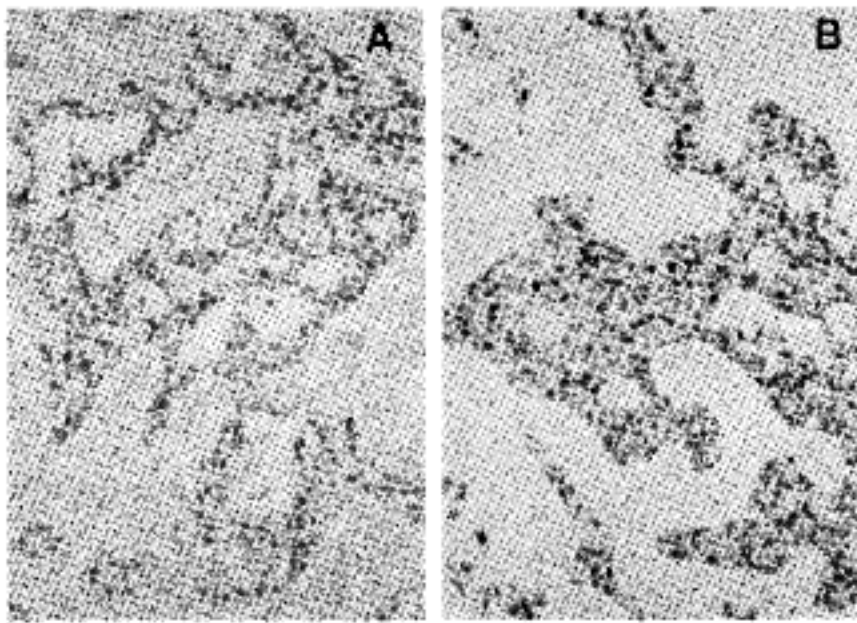


Fig. 1. Immunohistochemical stain for estrogen receptor (A) and progesterone receptor (B) in infiltrating ductal carcinoma of the breast.

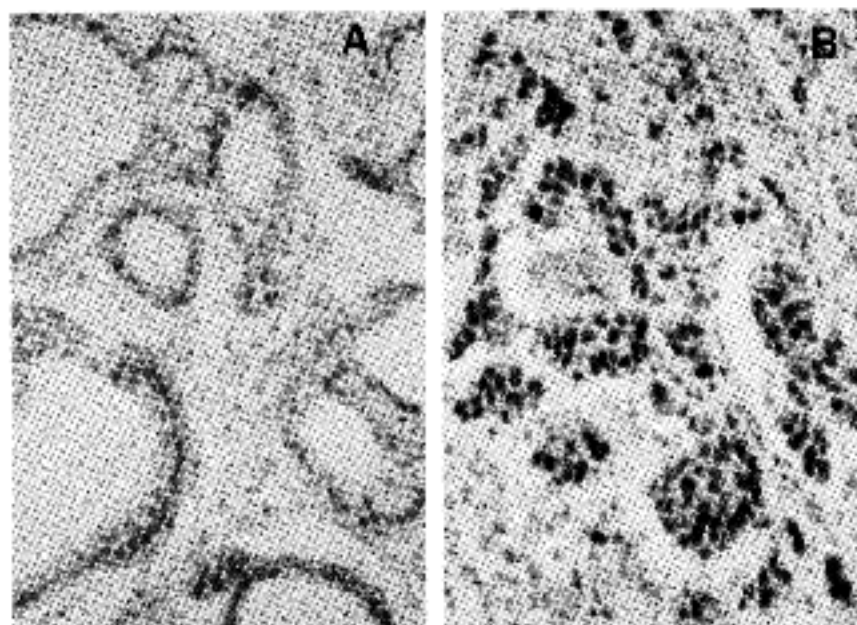


Fig. 2. Immunohistochemical stain for androgen receptor in normal duct of the breast (A) and infiltrating ductal carcinoma (B).

2. AR에 대한 염색과 예후인자와의 관계 (Table 3)

비종양성 조직 및 종양조직에서의 AR은 선상피와 관상피의 핵에 국한되어 골고루 염색되었으며 48예 (80%)가 양성이었다 (Fig. 2). AR은 연령이 증가함에 따라 양성률이 증가하였으며 특히 50세 이후에 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다 ( $p=0.19$ ). 조직학적 등급과 양성률간의 상관관계도 통계적 유의성은 없었다. 진이 림프절 수와 종양 크기와의 통계적 유의성은 없었다.

3. bcl-2단백에 대한 염색과 예후인자와의 관계 (Table 4)

bcl-2는 비종양성 조직의 선상피와 관상피의 세포질에 염색이 되었고 또한 간질의 림프구의 세포질에도 염

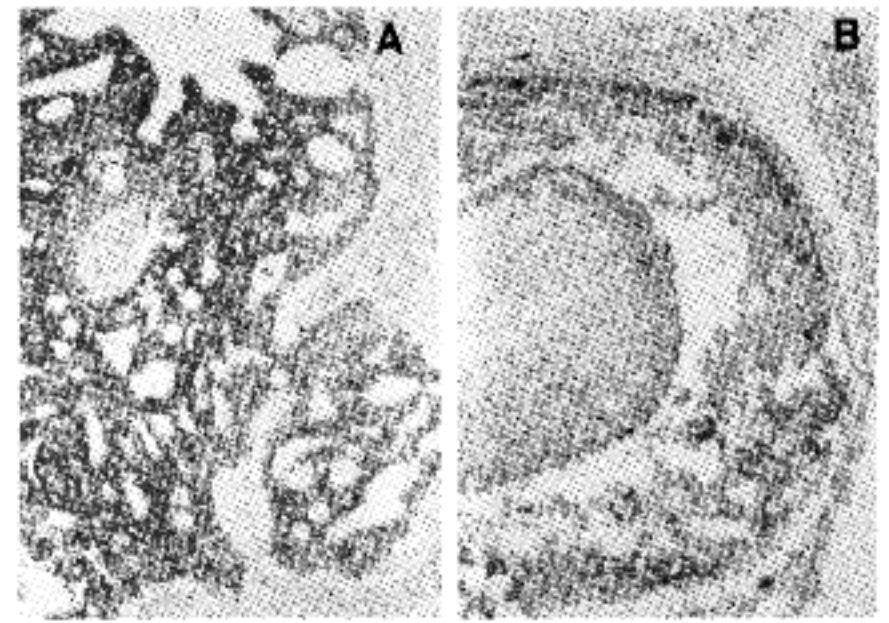


Fig. 3. Immunohistochemical stain for bcl 2 showing cytoplasmic staining (A) and for Rb protein showing nuclear staining (B), respectively.

색되었으며 (Fig. 3A), 31예 (51.7%)가 양성이었다. bcl-2의 양성도는 연령, 조직학적 등급, 그리고 진이 림프절의 수에 따른 차이를 보이지 않았다. 단지 종양의 크기가 증가할 수록 음성인 경우가 많아 1 cm 이하에서는 4예가 모두 양성이었으나 2.5 cm 이상에서는 26예 중 15예가 음성이었다. 그러나 이들의 통계적 유의성은 없었다 ( $p=0.088$ ).

4. Rb 단백질에 대한 염색과 예후인자와의 관계 (Table 5)

Rb는 비종양성 조직 및 종양조직의 선상피와 관상피의 핵에 국한되어 골고루 염색되었으며 (Fig. 3B), 간질에 침윤된 림프구의 핵에도 강하게 염색되었다. Rb에 대한 염색은 44예 (73.3%)가 양성이었다. 양성인 경우와 음성인 경우를 연령, 조직학적 등급, 진이 림프절 수, 그리고 종양 크기와 비교하였을 때 연관성이 없었다. 그러나 염색성도에 따라 0~5% (-), 6~20% (+), 21~50% (1+) 및 51~100% (2+)로 나누었을 때는 조직학적 등급이 증가할수록 염색률이 증가하였고 이는 통계적으로 유의하였다 ( $p=0.002$ ).

5. 호르몬수용체 발현과 bcl-2 및 Rb 단백질과의 상호 관계 (Table 6)

ER과 PR 두 수용체 간의 발현은 유의있게 연관되어 ( $p<0.001$ ) ER과 PR이 모두 양성인 예가 28예 (46.7%), ER과 PR이 모두 음성인 예가 22예 (36.7%)로 83.4%에서 ER과 PR의 발현이 동일한 양상을 보였다. 또한 ER과 PR은 각각 AR과 유의있게 연관되어 발현되었다. 즉, ER이 양성이면 AR도 양성, ER이 음성이면 AR도 음성인 관계가 유의있게 나타났으며 ( $p=0.039$ ), 이는 PR도 마찬가지였다 ( $p=0.009$ ). bcl-2 역시 ER과 PR의 발현과 유사하게 나타나는 경향을 보였으나 ER과의 상관관계

Table 4. Relationship of *bcl-2* with clinicopathological variables

Category	bcl-2+ (≥10%)	bcl-2- (<10%)	<i>p</i> value	bcl-2 Positive rate (%)				<i>p</i> value
				0-5	6-20	21-50	51-100	
Positive rate (%)	31 (51.7%)	29 (48.3%)						
Age (yr)								
≤39 (n=12)	7	5	0.824	5	0	3	4	0.757
40-49 (n=22)	12	10		9	2	5	6	
50-59 (n=18)	9	9		9	0	2	7	
≥60 (n=8)	3	5		4	1	2	1	
Grade								
I (n=10)	6	4	0.804	4	1	0	5	0.447
II (n=39)	20	19		17	2	9	11	
III (n=11)	5	6		6	0	3	2	
Positive nodes								
0 (n=24)	11	13	0.109	12	1	4	7	0.287
1-3 (n=16)	11	5		5	1	5	5	
≥4 (n=8)	2	6		5	1	1	1	
Tumor size (cm)								
1.0 (n=4)	4	0	0.088	0	0	1	3	0.424
1.1-2.1 (n=14)	6	8		7	1	2	4	
≥2.1 (n=26)	11	15		14	1	5	6	

Table 5. Relationship of Rb with clinicopathological variables

Category	Rb+ (≥10%)	Rb- (<10%)	<i>p</i> value	Rb Positive rate (%)				<i>p</i> value
				0-5	6-20	21-50	51-100	
Positive rate (%)	44 (73.3%)	16 (26.7%)						
Age (yr)								
≤39 (n=12)	8	4	0.353	2	2	6	2	0.430
40-49 (n=22)	18	4		3	4	9	6	
50-59 (n=18)	11	7		7	1	6	4	
≥60 (n=8)	7	1		1	0	6	1	
Grade								
I (n=10)	8	2	0.618	0	5	4	1	0.002
II (n=39)	27	12		11	2	15	11	
III (n=11)	9	2		2	0	8	1	
Positive nodes								
0 (n=24)	19	5	0.492	4	2	11	7	0.379
1-3 (n=16)	10	6		6	3	6	1	
≥4 (n=8)	6	2		1	1	3	3	
Tumor size (cm)								
1.0 (n=4)	3	1	0.984	1	1	2	0	0.194
1.1-2.1 (n=14)	11	3		2	3	7	2	
≥2.1 (n=26)	20	6		6	0	11	9	

Table 6. Relationship between receptors

	ER + (n*)	ER - (n)	PR + (n)	PR - (n)
PR +	28	7		
PR -	3	22		
p-value	<0.001			
AR +	28	20	32	16
AR -	3	9	3	9
p-value	0.039		0.009	
bcl-2 +	21	10	21	10
bcl-2 -	10	19	14	15
p-value	0.009		0.129	
Rb +	25	19	29	15
Rb -	6	10	6	10
p-value	0.243		0.050	

\*n=No. of patients

만이 유의성이 있었다 ( $p=0.01$ ). Rb 또한 ER과 PR의 발현과 유사하게 나타났으나 bcl-2와는 반대로 PR과 유의성을 보였다 ( $p=0.05$ ). ER, PR, AR이 모두 양성인 예는 25예로 전체의 42%였다. 세가지 호르몬 수용체들이 모두 양성인 경우는 bcl-2도 양성인 경우가 많았으나 ( $p=0.04$ ) Rb에 대해서는 유의있는 관계를 관찰할 수 없었다. 한편 AR, Rb, bcl-2 상호간에 유의있는 관계는 관찰되지 않았다.

ER, PR, AR 중 하나라도 양성인 경우와 세개 모두 음성인 경우를 나누어 예후인자와 비교해 보았을 때 연령과 조직학적 등급이 연관이 있었다. 즉 연령이 증가할수록 호르몬 수용체가 양성인 경우가 많아졌으며 ( $p=0.035$ ) 세 수용체 모두 음성인 경우 조직학적 등급이 높아 통계학적인 유의성을 보였다 ( $p=0.001$ ).

## 고 찰

현재 유방암에서 예후인자로 이용되고있는 것들에는 종양의 크기, 액와 림프절 전이 상태, 종양의 조직학적인 유형과 악성도의 조직학적인 등급, DNA 배수성, 종양 세포 증식능, 암유전자 발현, 그리고 ER과 PR 등의 호르몬 수용체 등이 있다. 이들 중 ER과 PR은 예후를 예측하고 호르몬 치료의 적용 여부를 결정하는데 중요하므로 임상적으로 많이 연구되고 있다.<sup>18,19</sup> ER과 PR 양성도와 종양의 조직학적 등급 사이에는 역상관관계가 잘 성립되는 것으로 밝혀져 있어서 ER과 PR의 발현은 분화의 증거로 생각된다. 또한 액와 림프절 전이가 있는 환자에서는 ER과 PR 유무 여부가 예후판정에 중

요한 인자가 된다고 알려졌다.<sup>20-24</sup> 특히 ER과 PR이 양성인 폐경기 여성에게 tamoxifen 등의 에스트로겐 호르몬 치료를 하면 치료성적이 좋다고 알려져있기 때문에 ER과 PR 유무는 임상적으로 흔히 적용되는 중요예후인자이다. ER과 PR의 유무를 알아내기 위한 방법으로 예전에는 cytosol extracts를 이용한 생화학적 분석법인 dextran-coated charcoal (DCC)법<sup>25</sup>을 사용하였으나 이 방법은 신선조직을 이용해야하기 때문에 조직을 얻고 보관하기가 쉽지 않을 뿐만 아니라 악성종양이 아닌 양성 질환에서도 호르몬 수용체가 검출될 수 있으며 조직과 세포 내 수용체의 존재위치를 확인할 수 없다는 등의 단점을 가지고 있다.<sup>6</sup> 이러한 단점들을 극복하기 위해 최근에는 면역조직화학염색을 이용하고 있다. ER과 PR의 면역조직화학 염색법은 DCC법의 결과와 잘 일치하며 유방암의 종양유전자나 다른 예후 인자에 대한 연구에서 예후인자의 표준으로서 사용되고 있다.<sup>25,26</sup> 본 연구에서도 ER과 PR 발현이 서로 유의있게 연관되었다. 또한 여러 연구들의 보고와 마찬가지로 ER, PR 발현과 종양 등급과의 연관성도 관찰할 수 있었으나 환자의 연령, 액와 림프절 전이 개수 및 종양 크기와는 상관이 없었다.

ER과 PR 외에 종양의 발생기전을 이해하고 예후를 측정하기 위해 여러 종양 유전자, 종양억제 유전자, apoptosis 관련 유전자, 기타 다른 호르몬 수용체 등이 연구되고 있다. 안드로젠 수용체는 ER이나 PR과 같은 호르몬 수용체로 유방암에 관련된 몇몇 연구가 이루어진 바 있다.<sup>5,27,28</sup> 안드로젠은 사람의 유방암 세포주에서 AR를 통해 세포성장억제능을 보인다. 한 임상 실험에서는 진행성 유방암 환자에게 합성 안드로젠을 주었을 때 환자의 25%에서 치유를 보인다고 보고하였다.<sup>29</sup> 또 AR 측정으로 환자의 예후, 호르몬 치료의 반응을 예측할 수 있다는 연구가 있다.<sup>27</sup> AR의 유무를 알기 위해서는 ER 및 PR과 마찬가지로 면역조직화학염색을 이용하는 것이 더 편리하고 유용한 방법이겠으나 아직 면역조직화학 염색을 이용한 연구가 드물다. Isola<sup>5</sup>는 76예의 유방암 조직에서 AR에 대한 면역조직화학염색을 시행하였는데 이들은 신선동결조직을 사용하였으며 79%에서 양성반응을 보였으나 포르말린 고정 파라핀 포매한 조직에서는 양성으로 염색된 예가 없었다고 보고하였다. 본 연구에서는 포르말린 고정 파라핀 포매한 조직을 이용하였으며 60예의 종양 중 48예가 양성으로 염색되어 80%의 양성률을 보였다. 이는 양성률로는 비슷한 결과이지만 Isola<sup>5</sup>가 신선동결조직을 사용한 것에 비하여 본 연구에서는 파라핀 포매 조직을 이용하여 신선조직과 유사한 결과를 얻었으므로 본 실험의 의미가 크다 하겠다.

AR과 ER 및 PR의 연관성에 대한 몇몇 연구에서 Isola<sup>5</sup>와 Soreide<sup>30</sup>은 AR과 ER 및 PR이 유의있게 연관된다고 하였고 Langer<sup>28</sup>은 PR과 연관이 있고 ER과는 연관성이 없다고 발표하는 등 보고자마다 약간의 차이는 있으나 대체적으로 AR과 ER이 연관성이 있다고 보

고하고 있다.<sup>27</sup> 본 연구에서는 AR과 ER, AR과 PR이 의미있게 연관성이 있는 것으로 확인되었다. 한편 AR과 다른 예후인자와의 연관성에 대해서는 보고자마다 차이가 많으나 액와림프절 전이도나 DNA 배수성, 종양병기 등과는 연관성이 없어서 예후인자로서의 의미는 그다지 크지 않은 것으로 보고되고 있다.<sup>5,28,30</sup> 이에 비해 ER은 DNA 비배수성이나 c-erb-B2 과발현과 잘 연관되므로<sup>31</sup> 두 호르몬 수용체가 연관되어 발현되더라도 종양 생태에 미치는 영향은 틀릴 것으로 생각되고 있다. 본 실험에서는 AR 발현도와 환자 연령, 조직학적 등급, 액와 림프절 전이 여부, 종양 크기 등의 예후인자 사이에 연관성이 없는 것으로 나타났다. 그러나 AR의 발현을 ER 및 PR과 조합하여 세 수용체 중 하나라도 발현된 경우와 세 수용체 모두 발현되지 않은 경우를 비교해보면 환자의 연령 ( $p=0.035$ )과 조직학적 등급 ( $p < 0.001$ )이 통계적 유의성을 가지는 것으로 나타났다. 즉 연령이 증가할수록, 그리고 등급이 낮을수록 호르몬 수용체의 발현율이 높았다. 본 실험에서 AR의 양성률 (80%)이 ER이나 PR의 양성률 (각각 51.7%, 58.3%)보다 더 높은 것은 Isola<sup>5</sup>와 다른 연구자들의 실험 성적과 같은 결과이다. 실제로 유방암에서 가장 많이 발현되는 호르몬 수용체는 AR이며<sup>5</sup> 또한 말기 유방암 환자에서 second-line 호르몬 치료에 안드로겐 투여시 효과를 보인다고 한다.<sup>3</sup> 또한 PR 음성인 유방암에서 프로그스테론을 사용하여도 효과를 얻을 수 있으며<sup>32</sup> 이는 프로그스테론이 안드로겐 수용체를 매개로 작용하기 때문이라는 보고<sup>33</sup>가 있는 점으로 미루어 AR에 대한 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 아울러 본 실험에서 AR의 발현이 ER 및 PR과 잘 연관되었으므로 우선 ER과 연관이 있다고 알려진 예후인자인 DNA 배수성, c-erb-B2 등과의 연관성을 알아보는 실험도 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

*bcl-2* 유전자는 apoptosis를 방해하여 암발생에 관여한다고 알려진 유전자이다.<sup>34</sup> 정상적으로 *bcl-2* 유전자는 B 세포 외에도 호르몬에 의해 성장과 위축이 조절받는 장기인 유방이나 stem cell을 가지고 있는 장과 피부, 그리고 완전히 분화되어 오랜 수명을 가지는 신경세포 등에서 발견된다.<sup>8</sup>

최근 유방암에서 *bcl-2*의 발현과 에스트로겐 호르몬 수용체의 관계, 예후인자들과의 관계에 대한 보고에 의하면,<sup>27-12</sup> 유방암에서 *bcl-2*의 발현은 에스트로겐 수용체 발현에 영향을 받으며<sup>8</sup> p53 유전자에 의해 하향조절(down regulation)되어 유방암에서 발현도가 떨어지는 것으로 생각된다.<sup>12</sup> *bcl-2*의 발현은 ER의 발현과 잘 연관이 되어 유방암에서 *bcl-2*의 발현은 종양의 분화와 관련이 있다고한다. 그러나 *bcl-2*의 발현과 예후인자와의 상관관계에 대한 연구에서는 서로 다른 결과를 보고하였다. 즉 Sierra<sup>11</sup>은 *bcl-2*의 발현이 액와림프절 전이와 상관있다고 보고하였고 Hellemans<sup>9</sup>은 액와림프절 전이가 있는 환자에서 나쁜 예후와 연관이 있다고 보고하

였으나 Russel<sup>8</sup>을 비롯한 다른 연구자들은 림프절 전이 유무나 다른 예후인자들이 *bcl-2*의 발현과 연관이 없다고 보고하였다. 본 연구에서는 *bcl-2*의 발현은 ER ( $p=0.01$ )과 유의하게 연관되었으며 PR ( $p=0.13$ )의 발현과는 통계적 유의성은 없었지만 비교적 유사한 발현 양상을 보였다. 또한 세 호르몬 수용체가 하나라도 양성인 경우와 세가지 모두 음성인 경우를 나누어서 비교한 결과 *bcl-2*와 유의하게 연관이 되었다 ( $p=0.037$ ). 그러나 환자의 연령, 조직학적 등급, 림프절 전이 및 종양 크기와는 연관이 없었다.

Rb 유전자는 소아 종양인 망막모세포종에서 처음 발견된 종양억제 유전자로<sup>35</sup> 환자의 일부에서 이차적으로 연부조직 육종이 생기는 것이 발견되었으며<sup>36</sup> 또한 다른 원발성 종양에서도 Rb 유전자의 구조적 이상이 발견되어 Rb 유전자가 암발생에 미치는 영향에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다. Rb 유전자의 이상이 있는 경우 그 산물의 생산이 감소하거나 기능이 소실되어 종양 발생에 관여한다고 하는데 유방암에서의 Rb 유전자 발현의 예후인자적 가치에 대해서는 연구가 부족한 상태이긴 하나 몇몇 보고에 의하면 예후와는 별 연관성이 없는 것으로 알려지고 있다.<sup>37,38</sup> Rb의 발현과 호르몬 수용체의 연관성은 별로 연구되지 않았는데 본 실험에서는 Rb 유전자와 PR이 의미있게 연관이 되었으나 ( $p=0.05$ ) ER과는 연관성이 없었다 ( $p=0.24$ ). 이런 결과에 대해서 본 실험만으로는 그 의미를 알 수 없으나 Pietiläinen<sup>39</sup>의 연구에서도 통계적 유의성은 없었지만 ER ( $p=0.2$ )에 비해 PR ( $p=0.07$ )이 더 연관이 깊은 것을 보고한 것과 같은 경향을 보이므로, 이에 대한 연구를 통해 유방암에서 ER과 PR 발현에 차이가 생기는 원인을 설명할 수 있는 근거를 발견할 가능성이 있을 것으로 생각된다. 한편 예후인자와의 비교에서는 Rb의 발현과 환자의 연령, 전이 림프절 수, 종양 크기와는 연관성이 없었다. 그러나 Rb의 발현을 표6과 같이 세분하여 보면 조직학적 등급과의 상관관계를 관찰할 수 있었는데, 즉 종양 등급이 증가할수록 염색 정도가 높아지는 경향을 보였고 이는 통계적으로 유의하였다 ( $p=0.002$ ). 이런 결과는 ER과 PR에서는 종양등급이 높아질수록 염색률이 낮아지는 것과는 반대의 현상이며 종양억제 유전자로서 처음 알려지게 된 망막모세포종이나 그 후 다른 종양에서 알려진 바와도 반대되는 결과이다. 그러나 최근 림프종을 비롯한 연구<sup>40</sup>에서는 종양의 악성도가 증가함에 따라 Rb가 감소하는 것이 아니라 오히려 증가하는 경우가 있다고 보고하였다. 이들은 Ki-67으로 측정한 종양 세포의 증식능이 증가할수록 Rb의 발현도 증가하였다고 보고하면서 그 설명으로 Rb가 세포의 종양 성장을 억제하기 위해 세포분열이 왕성할 때 이를 억제하기 위하여 Rb단백도 함께 증가할 것이라는 주장을 하였다. 한편 종양의 악성도가 증가함에 따라 Rb 발현이 감소하는 경우는 Rb 돌연변이나 결손, 전사 소실 등의 기전으로 인한 것으로 설명하고 있다. 본 실험에서 나타난



경향이 이들의 관찰과 같은 유사한 것인지는 본 실험 만으로는 알 수 없으나 이는 앞으로 세포 증식능 인자와 관련한 실험을 통해 더 연구해 볼 가치가 있는 것으로 생각된다. 본 실험에서는 Rb가 조직학적 등급 외의 예후인자들과는 연관이 없었지만 ER과는 연관되지 않고 PR과 연관된다는 점에서 유방암에서 PR과 Rb간의 상관성과 ER과 PR 발현의 차이에 대한 더 많은 연구가 필요하다고 생각되었다.

## 결 론

유방의 침윤성 관암을 대상으로 성호르몬 수용체인 ER, PR 및 AR의 발현과 함께 *bcl-2* 단백질과 Rb 단백질에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하여 이들 상호관계를 비교검토하고 기존의 예후인자로 알려진 연령, 조직학적 등급, 액와림프절 전이 수 및 종양의 크기 등과 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) ER과 PR의 발현은 서로 유의있게 연관되었으며( $p < 0.001$ ), 조직학적 등급이 높을 수록 음성을 보여 상관관계가 있었으나 (ER;  $p=0.003$ , PR;  $0.005$ ), 연령, 림프절 전이 및 종양의 크기 등과는 상관관계가 없었다 (각각 ER;  $p=0.272, 0.825, 0.517$ , PR;  $p=0.075, 0.557, 0.416$ ).

2) AR의 발현은 ER ( $p=0.039$ )이나 PR ( $p=0.009$ )과 유의있게 연관되었으나 연령, 종양의 조직학적 등급, 림프절 전이 및 종양 크기와는 상관관계가 없었다 (각각  $p=0.192, 0.307, 0.186, 0.361$ ).

3) *bcl-2* 단백질의 발현은 ER의 발현과 유의한 상관관계를 보였으나 ( $p=0.01$ ) 연령, 조직학적 등급, 림프절 전이 및 종양의 크기 모두와 통계적 유의성이 없었다 (각각  $p=0.824, 0.804, 0.109, 0.088$ ).

4) Rb 단백질의 발현은 ER과는 연관이 없었으나 PR과는 상관관계가 있었으며 ( $p=0.05$ ) 조직학적 등급이 증가함에 따라 발현이 증가하였다 ( $p=0.002$ ). 그러나 연령, 림프절 전이 및 종양의 크기와는 상관관계가 없었다 (각각  $p=0.353, 0.492, 0.984$ ).

이상의 성적으로 ER과 PR은 조직학적 악성도와 역관계를 갖고 있음을 알 수 있었고 AR은 통상적으로 처리된 조직에서도 면역조직화학적 염색이 가능하며 그 양성률이 ER과 PR의 발현과 잘 연관되므로 예후인자로서의 가치 뿐 아니라 호르몬 치료 대상 선정에 이용될 수 있으리라 생각하였다. *bcl-2*는 아직 예후인자로서의 가치를 인정하기가 어렵고 Rb는 조직학적 등급이 증가함에 따라 발현이 증가하나 앞으로 종양증식능과의 비교를 통한 연구가 있어야 할 것이다.

## 참 고 문 헌

1. 이종석, 김사유. 한국인 유방암의 병리조직 형태와 이에 따른 임상양상. 대한암학회지 1994; 26: 70-81.
2. Friedrich K, Dimmer V, Haroske G, et al. Expression of p53

and *bcl-2* in correlation to clinicopathological parameters, hormone receptor status and DNA ploidy in breast cancers. Path Res Pract 1995; 191: 1114-21.

3. The Cooperative Breast Cancer Group. Progress report: results of studies by the cooperative breast cancer group 1956 ~ 1960. Cancer Chemother Rep 1961; 11: 109-41.
4. Grill HJ, Moebius U, Manz B, Pollow K. Determination of androgen receptors. Steroid Biochem 1983; 19: 1687.
5. Isola JJ. Immunohistochemical demonstration of androgen receptor in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. J Pathol 1993; 170: 31-5.
6. Lea OA, Kvinnsland S, Thorsen T. Improved measurement of androgen receptors in human breast cancers. Cancer Res 1989; 49: 7162-7.
7. Silvestrini R, Venirioni S, Daidone MG. The *bcl-2* protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. J Natl Cancer Inst 1994; 86: 499-504.
8. Leek RD, Kaklamanis L, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. *bcl-2* in normal human breast and carcinoma, associated with oestrogen receptor-positive, epidermal growth factor-negative tumors and *in situ* cancer. Br J Cancer 1994; 69: 135-9.
9. Hellemans P, van Dam PA, Weyler J, van Oosterom AT, Buytaert B, van Marck E. Prognostic value of *bcl-2* expression in invasive breast cancer. Br J Cancer 1995; 72: 354-60.
10. Silvestrini R, Benini E, Venirioni, et al. p53 and *bcl-2* expression correlates with clinical outcome in a series of node-positive breast cancer patients. J Clin Oncol 1996; 14: 1604-10.
11. Sierra A, Lloveras B, Castellsaguè X, Moreno L, Garcia-Ramirez M, Fabra A. *bcl-2* expression is associated with lymph node metastasis in human ductal breast carcinoma. Int J Cancer 1995; 60: 54-60.
12. Haldar S, Negrini M, Monne M, Savioni S, Croce CM. Down regulation of *bcl-2* in breast cancer cells. Cancer Res 1994; 54: 2095-7.
13. Nathan B, Anbazhagan R, Clarkson P, Bartkova J, Gusterson B. Expression of *bcl-2* in the developing human fetal and infant breast. Histopathology 1994; 24: 73-6.
14. Doglioni C, Dei Tos AP, Laurino L, Chiarelli C, Barbareschi M, Viale G. The prevalence of *bcl-2* immunoreactivity in breast carcinomas and its clinicopathological correlates with particular reference to oestrogen receptor status. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 1994; 424: 47-51.
15. Simon R, Altman RG. Statistical aspects of prognostic factor studies in oncology. Br J Cancer 1994; 69: 979-85.
16. Sawan A, Randall B, Angus B, et al. Retinoblastoma and p53 gene expression related to relapse and survival in human breast cancer: an immunohistochemical study. J Pathol 1992; 168: 23-8.

17. Chellappan JA, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the Rb protein. *Cell* 1991; 65: 1053-61.
18. Hähnel R. Progesterone receptor assay in the management of breast and other cancers. *Rev Endocr Rel Cancer* 1985; 20: 5-11.
19. Rosen PP, Menedez-Botet CJ, Nisselbaum JS, et al. Pathological review of breast lesions analyzed for estrogen receptor protein. *Cancer Res* 1975; 35: 3187-94.
20. Ruder AM, Lubin F, Wax Y, Geier A, Alfundary E, Chetrit A. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer patients. Epidemiologic characteristics and survival differences. *Cancer* 1989; 64: 196-202.
21. Crowe JP, Hubay CA, Pearson OH, et al. Estrogen receptor status as a prognostic indicator for stage I breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1982; 2: 171-6.
22. Nomura Y, Miura S, Koyama H, et al. Relative effect of steroid hormone receptors on the prognosis of patients with operable breast cancer. A univariate and multivariate analysis of 3089 Japanese patients with breast cancer from the Study Group for Breast Cancer Society on hormone receptors and prognosis in breast cancer. *Cancer* 1992; 69: 153-64.
23. Kinne DW, Ashkari R, Butler A, Menedez Botet CJ, Rosen PP, Schwartz M. Estrogen receptor in breast cancer as a predictor of recurrence. *Cancer* 1981; 47: 364-7.
24. Maki HS, Hoehn JL. Influence of estrogen receptors on survival and recurrence in patients with breast cancer without lymph node metastases. *Arch Surg* 1989; 124: 377-80.
25. Wilbur DC, Wilis J, Mooney RA, Fallon MA, Moynes R, di Sant'Agnese PA. Estrogen and progesterone receptor detection in archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue from breast carcinoma: a comparison in immunohistochemistry with the dextran-coated charcoal assay. *Mod Pathol* 1992; 5: 79-84.
26. Tesch M, Shawwa A, Henderson R. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor status in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 8-12.
27. Bryan RM, Mercer RJ, Bennet RC, et al. Androgen receptor in breast cancer. *Cancer* 1984; 54: 2436-40.
28. Langer M, Kubista E, Schemper M, Spona J. Androgen receptors, serum androgen levels and survival of breast cancer patients. *Arch Gynecol Obstet* 1990; 247: 203-9.
29. Bryan RM, Mercer RJ, Bennet RC, et al. Oestradiol receptor values in breast cancer and response of metastases to therapy. *Aust NZ J Surg* 1984; 54: 3-6.
30. Soride JA, Lea OA, Varhaug JE, Skarstein A, Kvinnsland S. Androgen receptors in operable breast cancer: relation to other steroid hormones, correlations to prognostic factors and predictive value for effect of adjuvant tamoxifen treatment. *Eur J Surg Oncol* 1992; 18: 112-8.
31. Kallioniemi OP, Holli K, Visakorpi T, Koivula T, Helin H, Isola J. Association of c-erb-B2 protein overexpression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and long-term survival in breast cancer. *Int J Cancer* 1991; 49: 650-5.
32. Alexieie-Figusch J, Teulings F, Hop W, Blonk-van der Wijst J, Glise H. Steroid receptors in megestrol acetate therapy. *Recent Results. Cancer Res* 1984; 91: 254-8.
33. Bullock LP, Bardin CW, Sherman MR. Androgenic and antiandrogenic and synandrogenic actions of progestins: role of steric and allosteric effects with androgen receptors. *Endocrinology* 1978; 103: 1768-82.
34. Tusimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t (14; 18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226: 1097-9.
35. Yunis JJ, Ramsay N. Retinoblastoma and sub-band deletion of chromosome 13. *Am J Dis Child* 1978; 132: 161.
36. Abramson DH, Ellsworth RM, Kitchen FD, et al. Second non-ocular tumors in retinoblastoma survivors: Are they radiation-induced? *Ophthalmology* 1984; 91: 1351-5.
37. Lee EY, To H, Shew JY, et al. Inactivation of retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science* 1988; 241: 218-21.
38. T'Ang A, Varley JM, Chrkalorty S, et al. Structural rearrangement in retinoblastoma gene in human breast carcinoma. *Science* 1988; 242: 263-6.
39. Pietiläinen T, Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Kosma V-M, Syrjänen K. Expression of retinoblastoma gene protein in breast cancer as related to established prognostic factors and survival. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 329-33.
40. Juan CM, Miguel AP, Margarita SB. Retinoblastoma (Rb) gene product expression in lymphomas. Correlation with Ki-67 growth fraction. *J Pathol* 1993; 169: 405-12.