

## 사람의 침윤성 유방암종에서 Heregulin mRNA 및 Her-2/neu 단백질의 발현과 림프절 전이, DNA 배수성의 관계

연세대학교 의과대학 병리학교실, <sup>1</sup>외과학교실, 성균관대학교 의과대학 삼성제일병원  
<sup>2</sup>해부병리과, <sup>3</sup>외과, <sup>4</sup>내과 내분비연구실

김의정<sup>2</sup> · 정우희 · 이희대<sup>1</sup> · 이성공<sup>3</sup> · 문인걸<sup>4</sup> · 이광길

### Correlation of Heregulin mRNA and Her-2/neu Protein Expression with Node Metastasis and DNA Ploidy Pattern in Human Invasive Breast Carcinoma

Yee Jeong Kim<sup>2</sup>, Woo Hee Jung, Hyde Lee<sup>1</sup>, Sung Kong Lee<sup>3</sup>,  
In Gul Moon<sup>4</sup>, and Kwang Gil Lee

Departments of Pathology and <sup>1</sup>Surgery, Yonsei University College of Medicine  
Departments of <sup>2</sup>Pathology, <sup>3</sup>Surgery and <sup>4</sup>Endocrinology, Sungkyunkwan University  
College of Medicine, Samsung Cheil Hospital

The Her-2/neu protooncogene encodes a transmembrane tyrosine kinase that is structurally homologous to the receptor for epidermal growth factor. Its amplification and overexpression are associated with poor prognosis in breast cancer patients. Neu differentiation factor is a ligand for Her-2/neu protooncogene and was detected in ras-transformed rat fibroblasts. Heregulin (human homologue of neu differentiation factor) is a 44-kilodalton glycoprotein that stimulates tyrosine phosphorylation and induces growth arrest or stimulation and differentiation in human breast cancer cell lines. In this study we examined the expression of heregulin mRNA by nested reverse transcription (RT) PCR with fresh tissue, Her-2/neu protein, ICAM-1 and steroid receptors by immunohistochemistry, and DNA ploidy pattern by flow cytometry with paraffin-embedded tissue in invasive breast carcinoma. We compared the data with nodal status, lymphovascular invasion, steroid receptor status and DNA ploidy pattern. For RT-PCR to heregulin mRNA, 38 cases of fresh breast cancer tissue were obtained. Total 68 cases of invasive breast carcinoma tissue were fixed in formalin, which were used for routine histology, immunohistochemistry and flow cytometry. The results are as follows; 1) Heregulin mRNA was expressed in 86.1% of patients with invasive breast carcinoma and 100% of patients with benign breast lesion using nested RT-PCR analysis. 2) Her-2/neu protein was overexpressed in 50.0% of tumors using immunohistochemistry. The expression of Her-2/neu protein was significantly correlated with high counts of lymph nodes with metastasis ( $p < 0.05$ ), and high nuclear grade ( $p < 0.05$ ). 3) Her-2/neu protein overexpression was significantly correlated with a high DNA index ( $p < 0.05$ ). All of the tumors showing Her-2/neu protein overexpression and no heregulin mRNA expression revealed near tetraploid DNA content. However, both Her-2/neu overexpression and heregulin mRNA expressing tumors revealed near tetraploidy in 38.9% and diploidy in 50.0%. Based on these results, heregulin mRNA expression rate was 86.1% in human invasive breast carcinoma. Her-2/neu protein overexpression is associated with high positive lymph node number and DNA index. Statistically significant reverse correlation with lymph node metastasis is not present. (**Korean J Pathol 1998; 32: 563~573**)

**Key Words:** Invasive breast carcinoma, Heregulin mRNA, Her-2/neu protein, Flow cytometry, Prognostic factor

접 수: 1998년 2월 5일, 게재승인: 1998년 6월 29일

주 소: 서울 강남구 도곡동 146-92, 우편번호 135-270, 영동세브란스병원 해부병리과, 정우희

ISSN : 0379-1149

\*본 연구는 1993년도 연세대 학술연구비 지원으로 이루어졌음.

## 서 론

유방암의 예후를 평가하는데 이용되는 인자는 여러 가지가 있으며, 이들은 유방암의 치료 및 추적관찰에 매우 중요하고 생존율에 독립적인 영향을 미치는 인자와 예후에 영향을 미치나 생존율에 독립적인 영향을 미치지 못하는 인자로 나누어진다. 특히 유방암의 병기, 림프절 전이, 종양의 크기, 종양의 조직학적 분류, 핵등급, 맥관 침습 및 스테로이드 수용체 유무는 잘 알려진 예후인자이며, 이 중 특히 종양의 크기와<sup>1,2</sup> 림프절 전이 유무는<sup>3</sup> 가장 중요하며 독립적인 예후인자이다.<sup>4</sup> 최근까지 연구된 유방암의 예후인자들 외에 학문적인 흥미를 끄는 것은 유방암 환자 중 림프절 전이가 없는 환자도 30%가 재발한다는 사실이다. 즉, 림프절 전이가 없는 환자라 하더라도 부가적 치료를 하지 않아도 되는 양호한 예후군과 부가적 치료를 요하는 불량한 예후군의 구별이 필요하며, 이를 위하여 보조적 예후인자들의 개발에 많은 연구가 집중되어 왔다. 널리 받아들여지는 새로운 예후인자들에는 종양세포내 DNA양, 종양세포의 증식분획, Her-2/neu와 p53 암유전자, cathepsin-D, 종양 신생혈관 형성정도가 있으며,<sup>5</sup> 이 중 활발한 임상연구 대상의 하나가 Her-2/neu 암유전자이다. Her-2/neu 암유전자의 증폭 및 과발현은 유방암의 발암기전에 작용하며, neu, Her-2 또는 c-erbB-2 등으로 불리운다.<sup>6</sup>

Her-2/neu 암유전자는 transmembrane tyrosine kinase를 coding하는 암유전자로서 표피성장인자수용체 (epidermal growth factor receptor, EGFR)와 구조적 동질성을 갖는다.<sup>7,8</sup> Her-2/neu 암유전자와 단백질은 뇌에서 그 존재가 증명되어 신경형성에 중요한 역할을 할 것으로 생각되었다. 그러나 여러 선암종에서 Her-2/neu 암유전자의 비정상적 과발현을 보이는 사실이 보고되었으며,<sup>9</sup> 여러 장기의 선암종에서 Her-2/neu 암유전자가 과발현되면 전이의 가능성이 높고 불량한 예후를 보이는 것이 밝혀졌다.<sup>10,11</sup> Her-2/neu 암유전자의 발현은 림프절 전이,<sup>10,12</sup> 종양의 크기, 높은 핵등급,<sup>13,14</sup> 혈행성 전이<sup>11</sup>와 같은 불량한 예후인자와 상관관계를 보이므로 Her-2/neu 암유전자는 항종양치료를 위한 생물학적 치료의 표적이 되고 있다. 따라서 Her-2/neu 암유전자에 대한 여러 항체가 개발되었으며,<sup>9,15</sup> 그 중의 하나인 neu differentiation factor (NDF)는 유방암 세포에서 Her-2/neu 암유전자의 타이로신 인산화를 강화시켜 세포의 분화를 촉진시킨다고 한다.<sup>16</sup>

NDF는 *ras* 암유전자에 의해 변형된 쥐의 섬유모세포에서 처음 발견된 후, 최근에 유방암 세포주에서도 존재가 확인되었다.<sup>16</sup> 이는 Her-2/neu 암유전자에 대한 단클론성 항체로서 표피성장인자군의 새로운 일원이 되었으며,<sup>17</sup> 사람에서의 상동체는 heregulin으로 명명되었다. Heregulin이 유방암의 예후, 림프절 전이 유무 및 종양세포의 증식에 미치는 영향에 대해서는 아직 상반된 보고가 있지만<sup>18-20</sup> 대체로 종양세포의 형태학적인

분화와 유단백의 분비를 유발하는 기능적인 분화를 유도한다는 것에는 일치된 견해를 보이고 있다.<sup>8</sup>

유세포측정기를 이용한 유방암 세포의 배수성 분석은 예후를 평가하는데 유용한 방법이며, 신선조직, 동결조직 뿐만 아니라 파라핀 포매조직으로 후향적 연구를 성공적으로 수행할 수 있다는 장점이 있다.<sup>2</sup> 일반적으로 유방암의 50~60%가 비배수성을 보이며 비배수성인 종양은 불량한 예후인자들 및 낮은 생존율과 연관이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>22</sup> Her-2/neu 암유전자가 과발현되는 경우 사배수성에 가까운 DNA지수와 연관이 있다는 보고<sup>23,24</sup>가 있는 반면 Her-2/neu 암유전자의 과발현이 DNA 배수성과 무관하다는 보고도 있다.<sup>4</sup>

Heregulin의 발현을 및 예후인자로서의 사용 가능성을 사람의 유방암 조직을 대상으로 한 연구를 보면, 1993년 Bacus등<sup>8</sup>은 17예의 유방암 신선 조직의 역전사 증합효소 연쇄반응으로 9예인 53%에서 heregulin mRNA를 발견했으며, 이 중 7예인 88%에서 림프절 전이가 없어서 heregulin mRNA의 발현이 림프절 전이를 억제한다고 보고한 바 있다. 그러나 1995년 Normanno 등<sup>25</sup>은 60예의 유방암 신선조직에 northern blot을 시행하여 25%에서 heregulin mRNA를 발견했으며 그 발현 여부에 따른 림프절 전이유무에 차이가 없다는 상반된 보고를 하였다. 따라서 본 연구에서는 사람의 침윤성 유방암종 신선 조직에서 heregulin mRNA의 발현을 살펴보고 파라핀 포매조직에서 Her-2/neu 단백질의 과발현을 살펴보고 각각의 발현 여부에 따라 림프절 전이 유무, 전이 림프절의 수, 종양세포의 핵등급, 맥관침습성, 스테로이드 수용체 유무 및 DNA 배수성의 비교 등을 통해 Her-2/neu 단백질이 과발현되는 환자에서 heregulin이 양호한 예후를 예측할 수 있는 인자로서의 사용가능성이 있는지 알아보려고 본 연구를 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구 재료

침윤성 유방암종으로 전 유방 또는 부분 유방적출술 및 액와림프절 제거술을 시행 받은 예들을 대상으로 하였다. Her-2/neu 단백질에 대한 면역조직화학적 검색은 침윤성 유방암종의 파라핀 포매조직 68예를 이용하였다. 이 중 수술 중에 침윤성 유방암종의 신선조직을 얻을 수 있었던 38예를 대상으로 heregulin mRNA에 대한 역전사 증합효소 연쇄반응을 실시하였다. 대조군으로 3예의 양성 유방조직을 이용하였는데 섬유낭성 질환, 섬유선종, 종양주변의 정상 유방조직 각각 1예씩이었다.

### 2. Heregulin mRNA 검출을 위한 역전사 증합효소 연쇄반응 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

1) RNA 추출: 침윤성 유방암종 조직 및 양성 유방병변 조직을 수술 직후 채취하여 액체질소에 담근 후 영

하 80°C에서 동결하였다가 Chomczynski 방법<sup>26</sup>을 변형하여 상품화된 Tri reagent<sup>®</sup> (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA) kit의 방법에 따라 RNA를 추출하였다. 냉동된 조직 중 0.5 cm<sup>3</sup> 크기로 절단한 조직편을 액체질소에서 막자사발로 분쇄한 후 Tri reagent<sup>®</sup> 1 ml와 microcarrier<sup>®</sup> (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA) 3 µl를 넣고 혼합하여 상온에서 5분간 방치하였다. 0.2 ml의 chloroform을 넣은 후 15초 간 세게 흔들고 10분간 상온에 두었다가 4°C에서 12,000 g로 15분간 원심분리하고, 수용성 상층액을 피펫으로 새 시험관에 조심스럽게 옮겼다. 0.5 ml의 isopropanol을 넣고 vortexing하여 상온에 10분간 보관했다가 분간 12,000 g로 원심 분리하여 RNA를 침전시켰다. 상층액을 따라버리고 75% ethanol 1 ml를 넣고 섞은 후 원심 분리하여 RNA pellet을 세정하고, 상층액을 다시 제거한 후 상온에서 RNA pellet을 건조시킨 후 diethyl pyrocarbonate로 처리된 증류수에 녹여서, 분광광도계 (150~20, Hitachi Co., Tokyo, Japan)로 260 nm의 분광광도에서 농도를 측정하고 영하 80°C에 보관하였다.

2) 역전사 반응(reverse transcription reaction): 총 RNA 3 µg, oligo(dT) primer 100 pmol, dNTP (각 nucleotide 500 µM), 1x 역전사반응 완충용액 (10 mM Tris[pH8.4], 50 mM KCl, 1 mM DTT), 5 unit RNase inhibitor, 200 unit MMLV 역전사효소 (BRL Co., Grand Island, NY, USA)를 넣고 총 부피를 20 µl로 만들어 37°C에서 1시간 가온 후 다시 95°C에서 5분간 가온하여 반응을 정지시켰다. 증합효소 연쇄반응을 시행할 때까지 영하 20°C에 보관하였다.

3) Nested PCR: 첫 번째 PCR은 상기한 complementary DNA (cDNA)산물과 heregulin 유전자의 외측 primer쌍은 heregulin-α의 염기서열 244-263과 609-628에 해당하는 primer를 사용하여 다음과 같은 조건으로 수행하였다. cDNA합성물 2 µl, 외측 primer 각 25 pmol, dNTP (각 nucleotide 200 µM), 1x PCR 완충용액 (10 mM Tris[pH 8.4], 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100), 1 unit Taq polymerase (Dynazyme Co., Rijhitontuntie, Finland)를 혼합하여 총 부피가 50 µl 되게 한 후 9600 Thermocycler (Perkin Elmer Co., Norwalk, CT, USA)에서 95°C에서 50초간 denaturation, 53°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 40초간 extension의 반복과정을 35회 실시한 후 마지막 회는 72°C에서 7분간 가온하였다. 두 번째 PCR은 첫 번째 PCR 산물 1 µl와 첫 번째 PCR primer 보다 내측에 위치한 염기서열 275-294와 583-602에 해당하는 primer를 사용하여 상기와 같은 조건에서 반응시켰다. PCR 산물은 agarose gel (3% NuSieve 3:1 [FMC Bioproducts, Thomaston, USA])에서 전기영동하여 0.5 µg/ml의 ethidium bromide로 염색한 후 300 nm UV 발광기 (Fotodyne Co., New Berlin, USA)에서 328 bp의 DNA 띠를 확인하였다.

4) 직접 핵산 염기서열 분석 (direct DNA sequencing): 염기서열 분석은 nested RT-PCR후 전기영동한 agarose gel에서 분리된 DNA띠를 절단하여 Jetsorb (Genomed Co., Triangle Park, NC, USA)로 정제한 후 Sanger<sup>27</sup>의 방법에 따른 직접 핵산 염기서열 방법 (direct double strand DNA sequencing)으로 분석하였다. 즉 정제된 240 ng DNA와 280 ng PCR primer 중화제, 2 µl의 5배 염기서열 완충용액 (200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM NaCl)을 혼합하여 총 부피가 10 µl되게 하여 95°C에서 3분간 가온한 후 즉시 ethanol-얼음에 옮기고 이후 과정은 Sequenase version 2.0 DNA sequencing kit (United States Biochemical, Cleveland, OH, USA)의 방법에 따라 수행하였다.

### 3. 면역조직화학 염색

유방암 조직을 10% 중성 포르말린에 고정한 후 파라핀에 포매하고 4 µm 두께로 박절하여 양이온 코팅된 슬라이드 (ProbeOn<sup>™</sup> Plus Microscopic Slides: Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)에 붙였다. Xylene으로 10분간 탈파라핀과정을 거친 후 알코올로 합수과정을 수행하고 Tris 완충용액 (10X Immunoassay buffer<sup>®</sup>: Biomed Co., Foster city, CA, USA)에 10분간 세척하였다. 일차 항체로는 Her-2/neu 단백 (C-erbB-2, Dako, Glostrup, Denmark), ICAM-1 (CD-54: Zymed, San Francisco, CA, USA), estrogen receptor (Dako, Glostrup, Denmark), progesterone receptor (Dako, Glostrup, Denmark)를 이용하였다. 항원성 회복 (antigen retrieval)을 위하여 pH 6.0의 citrate 완충용액에 슬라이드를 담근 후 극초단파로 10분간 끓였다.<sup>28</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 내부의 peroxidase 활성도를 억제시킨 후 정상 혈청을 blocking reagent로 사용하여 20분간 상온에서 처리하였다. 일차 항체로 60분간 처리한 후 Tris 완충용액으로 수세하고 2차 항체로 30분간 처리한 후 다시 Tris 완충용액으로 수세하고, streptavidin에 20분간 처리한 후 다시 Tris 완충용액으로 수세하였다. 이 과정은 labelled streptavidin biotin (LSAB) kit (Dako Co., Carpinteria, CA, USA)를 이용해서 수행하였으며, acetyl ethyl carbazol (AEC) (Dako Co., Carpinteria, CA, USA)로 발색한 후 hematoxylin으로 대조염색하고 crystal mount (Biomed Co., Foster, CA, USA)로 봉입하였다. Her-2/neu 단백질은 세포막에 과립상으로 염색된 경우만을 양성으로, ICAM-1은 세포질에 염색된 경우를, 스테로이드 수용체는 핵에 염색된 경우만을 양성으로 판독하였다.

### 4. 유세포 분석

종양세포의 DNA 배수성을 측정하기 위해 파라핀에 포매된 조직을 50 µm 두께로 잘라, HistoClear (National Diagnostics, Manville, NJ, USA)로 탈파라핀시키고, 농도 차등을 둔 알코올 (graded alcohol)의 합수과정을 거쳐서 0.5% 펩신에 소화시켰다. 원심분리와 vortexing의

과정을 통하여 단일세포부유액으로 만들었다. 여기에 0.25% 리보핵산 효소를 가하고 60  $\mu$ m 나이론 메쉬에 여과시킨 후 0.025% propidium iodide로 염색하였다. Epics XL (Coulter Electronic Inc., Hialeah, FL, USA)을 이용하여 histogram을 만들고, DNA 지수를 측정하였다.

5. 일반 조직학적 검색

10% 중성 포르말린에 고정된 후 파라핀에 포매된 조직을 4  $\mu$ m 두께로 박진하여 통상적인 hematoxylin-eosin 염색을 하였다. 조직학적으로 종양의 핵등급, 혈관 및 림프관 침습 유무, 액와 림프관 전이 여부 및 전이된 림프관의 수를 검색하였다. 조직학적 분화도는 Bloom과 Richardson의 변형된 등급체계<sup>29</sup>의 핵등급을 적용하였다.

6. 통계학적 분석

통계학적 검색은 PC-SAS version 6.04 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)로 student t-test, Fisher's exact test 및 Mantel-Haenszel chi square test를 시행하여 95%의 유의수준으로 검정하였다.

결 과

1. 역전사 중합효소 연쇄반응에 의한 heregulin mRNA의 발현

역전사 반응 후에 시행한 nested PCR에서 31예가 양

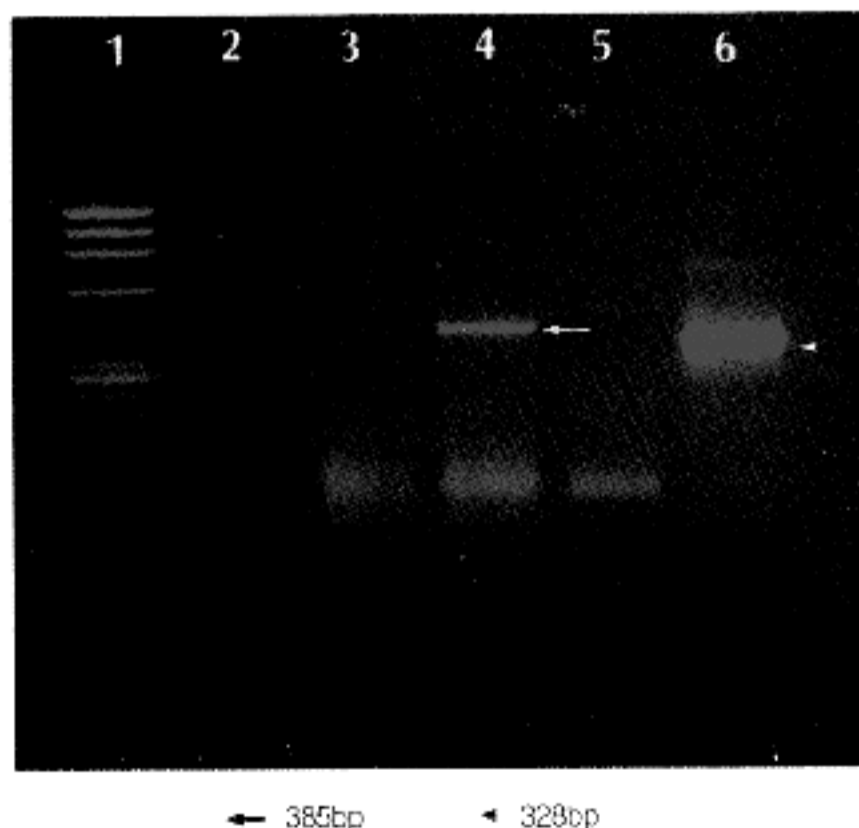


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of product of reverse transcription-polymerase chain reaction to heregulin. The first PCR shows DNA band of 385bp in the 4th lane and the second PCR DNA band of 328bp in the 6th lane. lane 1:  $\phi$  X174 RF DNA Hae III, 2: negative control, 3: the first PCR negative, 4: the first PCR positive, 5: the second PCR negative, 4: the second PCR positive

성, 5예가 음성으로 86.1%에서 heregulin mRNA가 발현되었다 (Fig. 1). PCR 산물을 확인하기 위하여 실시한 직접염기서열 분석에서 heregulin-a의 염기서열 중 454에서 495에 해당하는 염기가 확인되었다.

2. 면역조직화학 염색을 이용한 Her-2/neu 단백질, ICAM-1, 스테로이드 수용체의 발현

Her-2/neu 단백질의 과발현은 68예 중 34예인 50.0%에서 관찰되었으며, 세포막을 따라 과립상으로 진하게 염색되었다 (Fig. 2). ICAM-1은 총 36예 중 9예인 25.0%에서 양성반응을 보였으며, 유방암의 상피세포의 세포질에 약하지만 미만성으로 염색되었다. 또한 주변의 소혈관 내피세포 및 백혈구에도 강하게 발현되었다. 에스트로겐 수용체는 68예 중 49예인 72.1%에서, 프로게스테론 수용체는 56예인 82.4%에서 양성반응을 보였는데 양성관정은 핵의 30% 이상이 염색된 경우로 하였다<sup>31</sup>

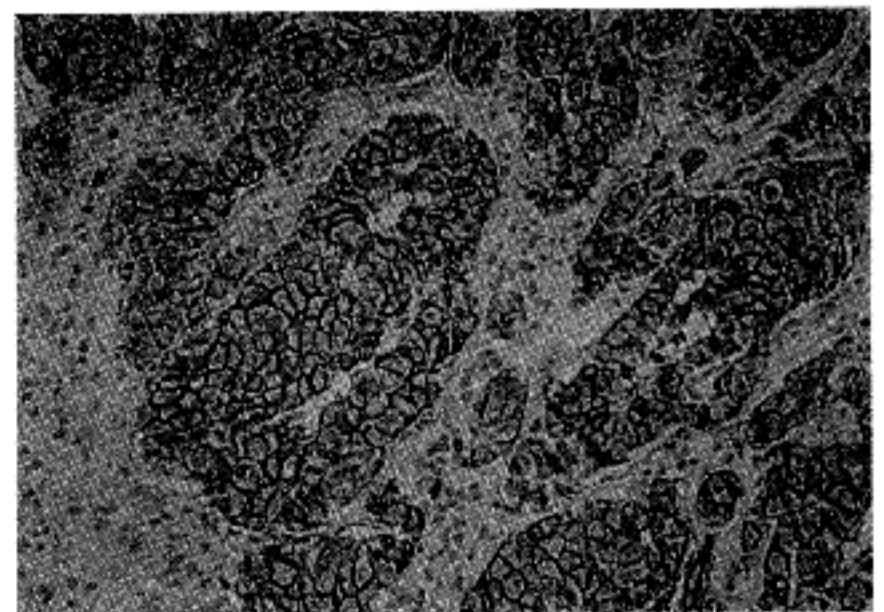


Fig. 2. Immunohistochemistry for Her-2/neu protein in paraffin embedded tissue reveals strongly positive granular staining along the cell membranes (LSAB, AEC).

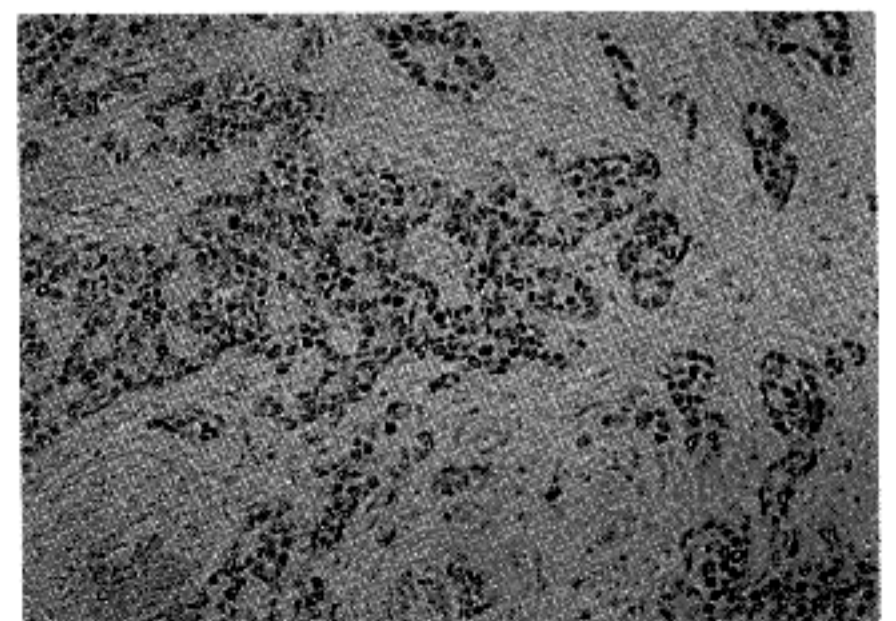


Fig. 3. Immunohistochemistry for estrogen receptor in paraffin embedded tissue reveals strongly positive nuclei of breast cancer cells (LSAB, AEC).

(Fig. 3).

### 3. Her-2/neu 단백질의 과발현과 다른 예후인자와의 비교

Her-2/neu 단백질이 과발현되는 경우 림프절 양성률이 57.0%, 맥관 침습률이 28.6%, 에스트로겐 수용체 양성률이 76.2%로 Her-2/neu 단백질의 과발현이 없는 경우에 비해 림프절 양성률, 맥관침습률 및 에스트로겐 수용체 양성률이 높은 경향을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다. 그러나 Her-2/neu 단백질이 과발현되는 경우 전이된 림프절의 수는 통계학적으로 유의하게 많은 경향을 보였다 (Table 1).

Her-2/neu 단백질이 과발현되는 경우 핵등급이 III인 경우가 76.5%, I인 경우가 8.8%인데 반해 Her-2/neu 단백질의 과발현이 없는 경우 핵등급이 III인 경우가 44.1%, I인 경우가 35.3%로 Her-2/neu 단백질의 과발현은 Mantel-Haenszel chi square 검정에서  $p=0.004$ 로 높은 핵등급과 유의한 상관관계가 있었다 (Table 2).

Her-2/neu 단백질이 과발현되는 경우 ICAM-1의 양성률은 33.3%로 Her-2/neu 단백질의 과발현이 없는 경우의 13.3%에 비해 ICAM-1의 발현율이 높은 경향을 보였다. 특히 heregulin mRNA가 음성인 경우 5예 전부에서 ICAM-1이 발현되지 않은 반면 heregulin mRNA 양성

**Table 1.** Lymph node metastasis, angioinvasion and steroid receptor positivity according to the overexpression of Her-2/neu protein

	Her-2/neu protein- 34/68(50.0%)	Her-2/neu protein+ 34/68(50.0%)
Lymph node metastasis	15/34(44.1%)	14/34(41.2%)
Angioinvasion	10/34(29.4%)	10/34(29.4%)
Estrogen receptor	25/34(73.5%)	24/34(70.6%)
Progesterone receptor	28/34(82.4%)	28/34(82.4%)
Number of lymph nodes with metastasis <sup>a</sup>	3.56 ± 6.76 <sup>b</sup>	1.38 ± 2.94

<sup>a</sup>: Mean ± SD, <sup>b</sup>:  $p < 0.05$ (student t-test), + : positive, - : negative

**Table 2.** Nuclear grade of tumor cells according to the overexpression of Her-2/neu protein

Nuclear grade	Her-2/neu protein <sup>a</sup>	
	Positive	Negative
I	3( 8.8%)	12(35.3%)
II	5(14.7%)	7(20.6%)
III	26(76.5%)	15(44.1%)

<sup>a</sup>:  $p < 0.05$ (Mantel-Haenszel chi square test)

인 경우에는 ICAM-1의 발현율이 29.0%로 현저히 높았으나 통계학적으로 유의하지는 않았다 (Table 3).

### 4. Heregulin mRNA의 발현과 다른 예후인자와의 비교

Heregulin mRNA가 양성인 경우 림프절 양성률은 48.4%, 맥관침습률은 25.8%, 에스트로겐 수용체 양성

**Table 3.** Positivity of ICAM-1 according to the expression of Her-2/neu protein and heregulin mRNA

	ICAM positivity <sup>a</sup>
Her-2/neu positive	7/21(33.3%)
HRG positive	7/12(38.9%)
HRG negative	0/ 3( 0.0%)
Her-2/neu negative	2/15(13.3%)
HRG positive	2/13(15.4%)
HRG negative	0/ 2( 0.0%)
Total	9/36(25.0%)

<sup>a</sup>:  $p > 0.05$ (Mantel-Haenszel chi square test)

ICAM: intercellular adhesion molecule, HRG: heregulin

**Table 4.** Lymph node metastasis, angioinvasion and steroid receptor positivity according to the expression of heregulin mRNA

	Heregulin+ 31/36(86.1%)	Heregulin- 5/36(13.9%)
Lymph node metastasis <sup>a</sup>	15/31(48.4%)	3/5(60.0%)
Angioinvasion <sup>a</sup>	8/31(25.8%)	1/5(20.0%)
Estrogen receptor <sup>a</sup>	22/31(71.2%)	4/5(80.0%)
Progesterone receptor <sup>a</sup>	29/31(93.5%)	4/5(80.0%)

<sup>a</sup>:  $p > 0.05$ (Mantel-Haenszel chi square test), + : positive, - : negative

**Table 5.** Nuclear grade of tumor cells according to the expression of heregulin mRNA

Nuclear grade	Heregulin mRNA expression <sup>a</sup>	
	Positive	Negative
I	3( 8.8%)	1(20.0%)
II	4(14.7%)	0( 0.0%)
III	24(77.4%)	4(80.0%)

<sup>a</sup>:  $p > 0.05$ (Mantel-Haenszel chi square test)

률은 71.2%로 heregulin mRNA 음성인 경우에 비해 림프절 전이율이 낮고, 맥관침습율과 에스트로겐 수용체 음성률이 높은 경향을 보였으나 통계학적인 의의는 없었다 (Table 4). Heregulin mRNA가 발현되는 군에서 핵등급 III에 해당하는 예가 77.4%, I에 해당하는 예가 9.7%였으며, heregulin mRNA가 발현되지 않는 군에서는 핵등급 III에 속하는 예가 80.0%, I에 해당하는 예가 20.0%로 두 군 사이에 유의있는 차이를 보이지 않았다 (Table 5).

5. 유세포분석

총 36예의 침윤성 유방암종의 유세포분석결과 19예

인 52.8%에서 이배수성 (Fig. 4A), 3예인 8.3%에서 사배수성 (Fig. 4B)을 보였다. 11예인 30.6%에서 저사배수성 비배수성 (hypotetraploid aneuploidy)(Fig. 4C)을 보였으며, 3예인 8.3%에서 과사배수성 비배수성 (hypertetraploid aneuploidy)(Fig. 4D)을 보였는데 이들은 모두 Her-2/neu 단백질이 과발현되는 종양이었다.

Her-2/neu 단백질이 과발현되는 경우 DNA 지수는  $1.55 \pm 0.53$ , Her-2/neu 단백질이 발현되지 않는 경우는  $1.21 \pm 0.34$ 로 student t-test에서 Her-2/neu 단백질의 발현유무에 따라 DNA 지수가 유의한 차이를 보였다 ( $p=0.02$ ). Heregulin mRNA가 양성인 경우 DNA 지수는  $1.38 \pm 0.49$ , 음성인 경우  $1.71 \pm 0.50$ 로 heregulin mRNA 양성

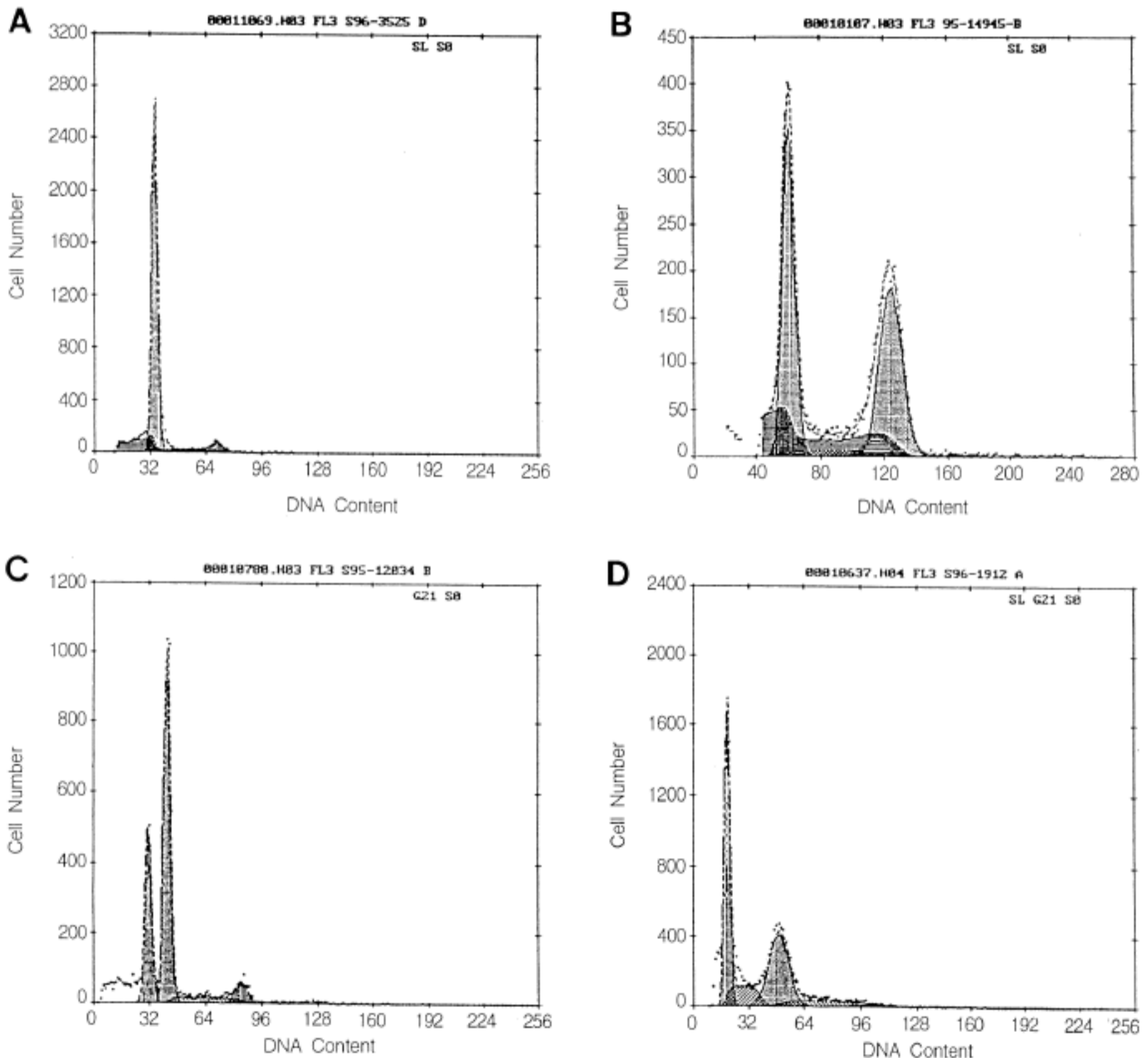


Fig. 4. Flow cytometry findings of infiltrating mammary cancers embedded in paraffin. A) diploidy with DNA index of 1.000, B) Tetraploidy with DNA index of 2.045, C) hypotetraploid aneuploidy with DNA index of 1.333, D) hypertetraploid aneuploidy with DNA index of 2.500.

인 경우 DNA 지수가 낮은 경향을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 보이지 않았다 ( $p>0.05$ )(Table 6).

Her-2/neu 단백질 과발현되는 경우 이배수성이 42.9%, 사배수성이 14.3%, 비배수성이 42.9%로 Her-2/neu 단백질 음성인 경우에 비해 이배수성이 적고, 비배수성이 많은 경향을 보였다. 특히 DNA 지수가 1.8 이상으로 사배수성 및 사배수성에 가까운 비배수성을 보이는 빈도가 Her-2/neu 단백질 과발현되는 경우 47.6%, 과발현되지 않는 경우 13.3%로 Her-2/neu 단백질의 과발현이 사배수성 및 사배수성에 가까운 비배수성과의 연관성이 많은 특징을 보였다. Her-2/neu 단백질 과발현되는 예 중 heregulin mRNA가 음성인 경우 전 예가 사배수성 및 사배수성에 가까운 비배수성을 보이는데 반해 Her-2/neu 단백질 과발현되면서 heregulin mRNA가 양성인 경우 50.0%에서 이배수성을 보였다 (Table 7).

고 찰

종양의 생물학적 경과를 여러 가지 임상적, 생화학적인 기준과 함께 형태학적 기준에 따라 다양하여 그 경과 추정에 한계가 있다. 따라서 종양의 예후를 예측하기 위하여 객관적인 인자들에 대한 연구가 많이 진행되어

왔다.<sup>31</sup> 이 중 임상연구에 많이 적용되는 것 중의 하나가 Her-2/neu 암유전자이다.<sup>6</sup> Transgenic mouse에서 Her-2/neu 암유전자의 과발현은 선암종을 비롯한 여러 암종을 유발하며,<sup>32</sup> 변형(transformation)의 기전은 밝혀지지 않았으나 그 유전자의 증폭과 과발현이 다양한 종류의 선암종에서 관찰된다.<sup>10,33-35</sup> Her-2/neu 암유전자의 과발현은 특히 유방암 환자에서 불량한 예후와 관련이 있기 때문에,<sup>10,12,13,36</sup> 항종양 치료의 목표가 되고 있다.<sup>37-39</sup> 또한 흥미로운 것은 Her-2/neu 암유전자의 과발현이 있는 경우 특정한 항종양 화학요법제에 반응하지 않아서,<sup>40</sup> Her-2/neu 암유전자는 예후인자 뿐만 아니라 치료의 반응에 대한 예측인자로서의 가능성도 조명되고 있다.<sup>5</sup> Her-2/neu 암유전자에 대한 결합물질은 유방암 세포에서 Her-2/neu 암유전자의 타이로신 인산화를 증가시키고, 종양의 성장을 증진시키거나 현저히 억제하는 기능이 있으며 유증을 분비하는 세포로 분화시키는 작용이 있다.<sup>4</sup> 이러한 이유로 이 결합물질은 NDF로 명명되었으며<sup>15,18</sup> 사람에서는 유방암 세포에서 heregulin이라는 상동체가 발견되었다.<sup>16</sup>

본 연구는 사람의 침윤성 유방암종의 신선조직 38예를 이용하여 nested RT-PCR기법으로 heregulin mRNA의 유무를 검사하였다. 사람의 유방암종 검체를 시료로 한 두 연구 중 RT-PCR 기법을 적용한 한 연구에서는 유방암종 신선조직 검체중 17예 중 8예인 52.9%에서 양성을 보였으며,<sup>8</sup> 60예의 유방암종 신선조직을 이용하여 northern blot 검사를 이용한 또 다른 실험에서는 15예인 25.0%에서 heregulin mRNA가 검출되었으나 heregulin transcript의 발현수준이 매우 낮았다고 한다.<sup>25</sup> 본 실험에서는 heregulin이 86.1%의 매우 높은 빈도로 발현되었으며, 양성 유방병변 3예에서도 모두 발현되었다. 본 실험에서 이렇게 높은 빈도로 발현된 이유는 nested-PCR 방법을 사용하여 민감도가 높아진 것으로 생각되며, heregulin이 미량이지만 상당수의 유방암과 대부분의 양성 및 정상 유방조직에서 발현될 것으로

Table 6. DNA index according to the expression of Her-2/neu protein and heregulin mRNA

	DNA index <sup>a</sup>
Her-2/neu positive	1.55 ± 0.53
Her-2/neu negative	1.21 ± 0.34 <sup>b</sup>
Heregulin positive	1.38 ± 0.49
Heregulin negative	1.71 ± 0.50

<sup>a</sup>: Mean ± SD, <sup>b</sup>:  $p < 0.05$ (student t-test)

Table 7. DNA ploidy according to the expression of Her-2/neu protein and heregulin mRNA

	0.95-1.05	1.06-1.89	1.90-2.10	2.11 >	1.80 >
Her + (21 cases)	9(42.9%)	6(28.6%)	3(14.3%)	3(14.3%)	10( 47.6%)
HRG + (18 cases)	9(50.0%)	5(27.8%)	2(11.1%)	2(11.1%)	7( 38.9%)
HRG - ( 3 cases)	0( 0.0%)	1(33.3%)	1(33.3%)	1(33.3%)	3(100.0%)
Her - (15 cases)	10(66.7%)	5(33.3%)	0( 0.0%)	0( 0.0%)	2( 13.3%)
HRG + (13 cases)	9(69.2%)	4(30.8%)	0( 0.0%)	0( 0.0%)	2( 15.4%)
HRG - ( 2 cases)	1(50.0%)	1(50.0%)	0( 0.0%)	0( 0.0%)	0( 0.0%)
Total (36 cases)	19(52.8%)	11(30.6%)	3( 8.3%)	3( 8.3%)	12( 33.3%)

Her: Her-2/neu protein, HRG: heregulin, +: positive, -: negative

추정된다.

본 연구에서는 파라핀에 포매된 유방암종 조직의 면역조직화학 염색을 이용하여 68예 중 34예인 50.0%에서 Her-2/neu 단백질의 과발현을 보였다. Her-2/neu 암유전자의 발현율은 검사방법에 따라 다양성을 보이며 유방암종의 30% 내외에서 관찰된다.<sup>5</sup> Her-2/neu 암유전자를 검색하는 여러 가지 방법이 있는데, 그의 DNA, RNA 및 단백질의 과발현은 강한 일치율을 보여서,<sup>23</sup> southern blot, northern blot, western blot 및 면역조직화학 염색 사이에 90% 이상의 일치율을 보이거나, western blot은 불일치율이 비교적 높다.<sup>12</sup> 따라서 연구자에 따라서는 Her-2/neu 암유전자의 증폭보다는 유전단백의 과발현을 나타내는 면역조직화학 검사가 더 임상적 유용성이 있다고 한다.<sup>4</sup> 본 연구와 같이 파라핀 포매조직을 이용한 Her-2/neu 단백질의 과발현도 예후인자로서의 가치가 있으며,<sup>13</sup> 파라핀 포매조직을 이용할 때에는 극초단파로 항원성을 회복시킨 후에 시행하면 분명한 세포막염색을 보는데 많은 도움이 된다.

예후인자로서 스테로이드 수용체의 중요성은 수년간 많은 논란의 대상이 되어왔으나 현재는 호르몬 치료의 임상적 반응에 대한 예측인자로서 중요성이 더 높게 평가되고 있다.<sup>5</sup> 최근까지 생화학적 방법이 표준적인 검사방법이었으나 현재는 면역조직화학 염색검사가 더 각광을 받고 있다.<sup>42,43</sup> 면역조직화학 염색은 신선조직뿐 아니라 파라핀 포매조직과 세침흡인검체 같은 다양한 검체로도 검사가 가능하며<sup>44,45</sup> 또한 매우 작은 양의 검체만으로도 가능하고 생화학적 검사와 일치율이 높으므로<sup>46,47</sup> 최근에는 최선의 검사방법으로 인식되고 있다. 본 실험에서도 에스트로겐 수용체 및 프로게스테론 수용체는 각각 72.1%와 82.4%의 양성률을 보였으며, 이는 생화학적 검사결과와 비교적 일치하는 자료이다.<sup>30,47</sup> Her-2/neu 단백질의 발현이 스테로이드 수용체의 음성 결과와 관련된다는 보고가 있으나<sup>48</sup> 본 연구에서는 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체 양성률은 heregulin mRNA나 Her-2/neu 단백질의 발현 여부에 따라 차이를 보이지 않았다.

혈관이나 림프관이 종양세포에 의해서 침범되는 경우 그것이 혈관인지 림프관인지 구별하는 것이 쉽지 않으므로 본 연구에서도 혈관 및 림프관 침습을 모두 합하여 맥관침습으로 간주한 결과 29.4%에서 맥관침습이 관찰되었다. Her-2/neu 단백질의 과발현이 유방암 환자에서 혈행성 전이에 대한 예측인자라는 보고<sup>11</sup>와는 달리, Her-2/neu 단백질의 과발현이나 heregulin mRNA의 발현에 따른 맥관침습률에는 차이가 없었다.

ICAM-1은 90Kd의 세포막 당단백으로 악성종양 뿐만 아니라 염증에서도 중요한 역할을 하며<sup>49,50</sup> 혈관내피세포나 상피세포 같은 표적세포와 세포융해성 결합을 형성한다.<sup>51</sup> 염증이거나 면역반응의 장소에서 cytokine이 ICAM-1의 발현을 증가시키며,<sup>52</sup> ICAM-1은 조혈세포 뿐만 아니라 혈관내피세포, 피부 섬유모세포, 흑색종과

여러 종류의 암세포에도 존재한다.<sup>53</sup> ICAM-1은 유방암 세포에서는 NDF에 의해 발현이 유도되며, protein kinase C의 작용에 관여할 것으로 예상된다.<sup>8</sup> 따라서 본 연구에서도 heregulin과 ICAM-1의 발현의 연관성을 보고자 ICAM-1에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였다. 그러나 동결절편을 이용한 ICAM-1에 대한 염색에서 64.7%의 양성률을 보였던 반면,<sup>8</sup> 본 실험에서는 파라핀 포매조직을 사용하여 25.0%의 양성률을 보였다. Heregulin이 음성인 경우 ICAM-1이 발현되지 않았으며, heregulin이 양성인 경우 29.0%에서 ICAM-1이 발현되었으나 통계학적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다. 본 실험에서는 파라핀 포매조직에서도 이용 가능한 일차항체를 사용하여 극초단파로 항원성을 회복하여 실험하였는데도 양성률이 현저히 낮았으며, 더구나 heregulin 음성인 예가 적어 통계학적 처리에서 유의한 관련을 얻지 못했으나 더 많은 수의 증례를 모아서 표본 선택의 오류를 줄이고, 동결절편조직을 이용하면 유의한 연관성을 보이리라 기대된다. ICAM-1이 Her-2/neu 암유전자가 과발현되는 난소종양에서는 세포독성 T-림프구와 대식구를 동원시켜 종양의 림프계의 침입을 억제하여 종양에 대한 방어인자로 작용할 것으로 예상된다,<sup>54</sup> 본 실험에서는 ICAM-1의 발현유무에 따라 림프절 전이율의 차이를 볼 수 없었다.

유방암 환자의 생존율에 대한 독립적인 예후인자로 전이된 림프절의 수, 에스트로겐 수용체 및 Her-2/neu 암유전자가 제시된 이후<sup>10</sup> Her-2/neu 암유전자의 발현은 종양의 핵등급,<sup>13,14</sup> 종양의 크기, 림프절 전이<sup>10,12</sup> 같은 불량한 예후인자들과 연관된다는 보고와 함께, Her-2/neu 암유전자와 생존율, 림프절 전이 여부와의 사이에 의미있는 연관관계가 없다는 보고도 있다.<sup>6,11,14</sup> 본 연구에서는 Her-2/neu 단백질이 양성인 경우 림프절 전이율, 맥관침습률, 스테로이드 수용체 양성률에는 차이가 없었으나 전이된 림프절의 수는 통계적으로 유의하게 많은 경향을 보여서 Her-2/neu 단백질의 과발현이 림프절 전이유무보다는 전이된 림프절의 수와 관계가 있는 것으로 나타났다.

Her-2/neu 단백질의 과발현이 종양의 높은 핵등급과 관련성이 있다는 보고처럼<sup>13,14</sup> 본 실험에서도 Her-2/neu 단백질이 과발현되는 군에서 핵등급이 통계적으로 유의하게 높아서 Her-2/neu 단백질의 과발현이 종양의 불량한 분화와 연관됨을 알 수 있었다. Heregulin mRNA의 발현에 따른 종양의 핵등급의 차이는 없어서 heregulin mRNA의 존재 유무가 종양세포의 분화에 미치는 영향은 알 수 없었다.

유세포 분석은 파라핀 포매조직을 이용하여 후향적 연구가 가능하며 예후를 평가하는데 훌륭한 인자로 받아들여지고 있으나 시간과 노력이 많이 드는 문제가 있다. 일반적으로 유방암의 50~60%가 비배수성을 보이며, 비배수성을 보이는 경우 다른 불량한 예후인자와의 관련 및 질병없는 기간과 전체생존율의 감소와 연관되



지만,<sup>22,55</sup> 예후에 중요한 영향을 미치는 독립된 예후인자는 아니다.<sup>5</sup> Her-2/neu 단백질의 과발현은 유방암에서 과배수성 DNA 형태와 관련을 보이며, 특히 사배수성 및 사배수성에 가까운 비배수성을 나타내는 경우가 흔하다는 보고와<sup>23,24</sup> Her-2/neu 암유전자와 DNA 배수성과 연관관계가 없다는 상반된 보고가 있다.<sup>4</sup> 본 연구에서도 Her-2/neu 단백질이 과발현되는 경우 통계학적으로 유의하게 DNA 지수가 높았으며, 사배수성에 가까운 DNA 양을 보이는 경우가 많았다. 이것은 Her-2/neu 단백질과 heregulin mRNA가 Her-2/neu 암유전자가 과발현되는 환자에서 비배수성을 저지하는 경향이 있지 않을까 의심하게 한다.

Heregulin이 림프절 전이와 역관계가 있으며 종양의 증식을 억제하고 종양세포의 분화를 유발한다는 보고로 유방암에서 예후인자로서의 이용가능성과 아울러 Her-2/neu 암유전자를 가진 유방암에서 항종양 치료제로서의 가능성이 기대되고 있다. 본 연구는 사람의 침윤성 유방암종 신선조직에 대한 전향적 연구이므로 생존율이나 재발율과 같은 자료와의 연관관계를 보지 못하고, 유방암종에서 중요한 예후인자로 받아들여지고 있는 액와 림프절 전이유무와 전이된 림프절의 수, 맥관침습성, 스테로이드 수용체 유무와 같은 다른 예후인자와 간접적인 비교를 하였다. 본 연구 결과 Heregulin mRNA가 발현되는 경우 액와 림프절 전이율이 낮은 경향을 보였으나 통계학적으로 유의한 연관성을 밝혀내지 못하였는데 이는 heregulin mRNA 음성인 예가 너무 적어서 자료의 통계분석에 어려움이 많았으며, 본격적인 연구를 위해서는 더 많은 증례에 대한 대규모의 연구가 필요하리라 생각된다. 또한 상당히 많은 빈도로 heregulin mRNA가 발현하므로 그 존재 유무 뿐 아니라 그 농도에 대한 정량적인 연구가 시행되면 heregulin의 농도에 따라 다른 예후인자와 의미 있는 관련성을 찾을 수도 있을 것으로 기대된다.

## 결 론

사람의 침윤성 유방암종 신선조직으로 heregulin mRNA에 대한 역전사 증합효소 연쇄반응을 실시하고, 같은 환자의 파라핀 포매조직을 이용하여 Her-2/neu 단백질, ICAM-1, 스테로이드 수용체에 대한 면역조직화학 염색 및 DNA 배수성을 알기 위한 유세포 분석을 시행하였다. Heregulin mRNA의 양성률은 86.1% 이었다. Her-2/neu 단백질이 과발현되는 경우 전이 림프절의 수, DNA 지수 및 종양세포의 핵등급이 의미 있게 높은 반면 heregulin mRNA가 발현되는 경우 림프절 전이율, 전이된 림프절의 수 및 DNA 지수가 낮고 ICAM-1의 발현율이 높은 경향을 보였으나 통계학적인 유의성은 없었다. 이로 보아 Her-2/neu 단백질의 과발현은 종양의 불량한 분화 및 림프절 전이와 연관되는 것으로 생각된다. 그러나 heregulin이 종양세포의 분화 및 림프절 전이에

미치는 영향을 밝혀내지 못해서 heregulin의 예후인자 또는 치료제로서의 이용가능성을 평가하려면 좀 더 대규모의 연구가 필요하리라 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63: 181-7.
2. Page DL. Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favorable prognostic types. *Am J Surg Pathol* 1991; 15: 334-49.
3. Fisher ER. The impact of pathology on the biologic, diagnostic, prognostic and therapeutic considerations in breast cancer. *Surg Clin North Am* 1984; 64: 1073-93.
4. Tavassoli M, Quirke P, Farzaneh F, Lock NJ, Mayne LV, Kirkham N. C-erbB-2/c-erbA co-amplification indicative of lymph node metastasis and c-myc amplification of high tumor grade in human breast carcinoma. *Br J Cancer* 1989; 60: 505-10.
5. Schnitt SJ, Connolly JL. Evaluation of breast biopsy specimens: A clinically oriented approach. United States-Canadian division of the international academy of pathology annual meeting, Toronto, 1995; 38-50.
6. Perren J. C-erbB-2 oncogene as a prognostic marker in breast cancer. *Br J Cancer* 1991; 63: 328-32.
7. Wen D, Peles E, Cupples R, et al. Neu differentiation factor: A transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* 1992; 69: 559-72.
8. Bacus SS, Gudkov AV, Zelnick CR, et al. Neu differentiation factor (heregulin) induces expression of intercellular adhesion molecule 1: Implication for mammary tumors. *Cancer Res* 1993; 53: 5251-61.
9. Samanta A, Le Vea CM, Dougall WC, Quian X, Greene MI. Ligand and p185c-neu density govern receptor interactions and tyrosine kinase activation(receptor dimerization/interactions of p185c-neu receptors/neu-activating factor). *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1711-5.
10. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer correlation of relapse and survival with amplification of the Her-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-82.
11. De Potter CR, Beghin C, Marker AP, Vandekerckhove DD, Roels HJ. The neu-oncogene protein as a predictive factor for haematogenous metastasis in breast cancer patients. *Int J Cancer* 1990; 45: 55-8.
12. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the Her-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707-12.
13. Berger MS, Locher GW, Sauer S, et al. Correlation of

- c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res* 1988; 1238-43.
14. Guillick WJ, Love SB, Wright C, et al. c-erbB2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *Br J Cancer* 1991; 63: 434-8.
  15. Peles E, Bacus SS, Koski RA, et al. Isolation of the neu/Her-2 stimulatory ligand: a 44kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells. *Cell* 1992; 69: 205-16.
  16. Holmes WE, Silwkovski MX, Akita RW, et al. Identification of heregulin, a specific activator of p185<sup>erbB2</sup>. *Science* 1992; 256: 1205-10.
  17. Normanno N, Ciardiello F, Brandt R, Salomon DS. Epidermal growth factor-related peptides in the pathogenesis of human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 29: 11-27.
  18. Bacus SS, Stankovski I, Huberman E, et al. Tumor-inhibitory monoclonal antibodies to the Her-2/neu receptor induce differentiation of human breast cancer cells. *Cancer Res* 1992; 52: 2580-9.
  19. Harwerth IM, Wels W, Schlegel J, Muller M, Hynes NE. Monoclonal antibodies directed to the erbB-2 receptor inhibit in vivo tumor cell growth. *Br J Cancer* 1993; 68: 1140-5.
  20. Marte BM, Jeschke M, Graus-Porta D, et al. Neu differentiation factor/heregulin modulates growth and differentiation of HC11 mammary epithelial cells. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 14-23.
  21. Beerman H, Kluin M, Hermans J, van de Velde CJH, Cornelisse CJ. Prognostic significance of DNA-ploidy in a series of 690 primary breast cancer patients. *Int J Cancer* 1990; 45: 34-9.
  22. Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, McGuire WL. Prediction of relapse of survival in patients with node-negative breast cancer by flow cytometry. *N Engl J Med* 1989; 320: 627-33.
  23. Bacus SS, Bacus JW, Slamon DJ, Press MF. Her-2/neu oncogene expression and DNA ploidy analysis in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 164-9.
  24. 김애리, 김인선, 이갑노. 유방암에서 화상분석기를 이용한 DNA 배수성, 에스트로젠과 프로제스테론 수용체 및 Her-2/neu 종양단백의 표현에 관한 연구. *대한병리학회지* 1994; 28: 246-59.
  25. Normanno N, Kim, N, Wen DD, et al. Expression of messenger RNA for amphiregulin, heregulin, and cripto-1, three new members of the epidermal growth factor family, in human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 35: 293-7.
  26. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9.
  27. Sanger F, Niklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-7.
  28. Leong A, Milios J. Comparison of antibodies to estrogen and progesterone receptors and the influence of microwave-antigen retrieval. *Appl Immunohistochem* 1993; 1: 282-8.
  29. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. 1. The value of histological grade in breast cancer: Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19: 403-10.
  30. O'Keane JC, Okon E, Moroz K, Burke B, Sheahan K, O'Brien MJ. Antiestradiol immunoperoxidase labeling of nuclei, not cytoplasm in paraffin sections, determines estrogen receptor status of breast cancer. *Am J Surg Pathol* 1990; 14: 121-7.
  31. Bacus SS, Zelnick CR, Plowman G, Yarden Y. Expression of the erbB-2 family of growth factor receptors and their ligands in breast cancers. Implication for tumor biology and clinical behavior. *Am J Clin Pathol* 1994; 102 (Suppl 1) S13-S24.
  32. Suda Y, Aizawa S, Huruta Y, et al. Induction of a variety of tumors by c-erbB2 and clonal nature of lymphomas even with the mutated gene val659-glu659. *EMBO J* 1990; 9: 181-90.
  33. van de Vijver M, van de Bersselaar R, Divilee P, Cornelisse C, Peterse J, Nusse R. Amplification of the neu (c-erbB-2) oncogene in human mammary tumors is relatively frequent and is often accompanied by amplification of the linked c-erbA oncogene. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 2019-23.
  34. Varley JM, Swallow JE, Brammar WJ, Whittaker JL, Walker RA. Alterations to either c-erbB-2(neu) or c-myc protooncogenes in breast carcinomas correlate with poor short-term prognosis. *Oncogene* 1987; 1: 423-30.
  35. Venter DJ, Ysui NL, Kummur S, Guillick WJ. Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: Immunohistological assessment correlated with gene amplification. *Lancet* 1987; 2: 69-72.
  36. Zhou D, Battifora H, Yokota J, Yamamoto T, Cline MJ. Association of multiple copies of the c-erbB-2 oncogene with spread of breast cancer. *Cancer Res* 1987; 47: 6123-5.
  37. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullich A. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 1165-72.
  38. McKenzie SJ, Marks PJ, Lam T, et al. Generation and characterization of monoclonal antibodies specific for the human neu oncogene product, p185. *Oncogene* 1989; 4:

- 543-8.
39. Taglibue E, Centis F, Campiglio M, et al. Selection of monoclonal antibodies which induce internalization and phosphorylation of p185HER2 and growth inhibition of cells with HER2/NEU gene amplification. *Int J Cancer* 1991; 47: 933-7.
  40. Muss HB, Thor AD, Berry DA, et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant chemotherapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* 1994; 330: 1260-6.
  41. Stancovski I, Hurwitz E, Leitner O, Ullrich A, Yarden Y, Sela M. Mechanistic aspects of the opposing effects of monoclonal antibodies to the ERBB2 receptor on tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8691-5.
  42. Esteban JM, Ahn C, Battifora H, Felden B. Predictive value of estrogen receptors evaluated by quantitative immunohistochemical analysis in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1994; 102(Suppl 1): S9-S12.
  43. Pertshuck LP, Kim DS, Nayer K, et al. Immunohistochemical estrogen and progestin receptor assays in breast cancer with monoclonal antibodies. *Cancer* 1990; 66: 1663-73.
  44. Battifora H. Immunohistochemistry of hormone receptors in routinely processed tissues. The new gold standard. *Appl Immunohistochem* 1994; 2: 143-5.
  45. Battifora H, Mehta P, Ahn C, Esteban JM. Estrogen receptor immunohistochemical assay in paraffin-embedded tissue. A better gold standard? *Appl Immunohistochem* 1993; 1: 39-45.
  46. Parl FF, Posey YF. Discrepancies of the biochemical and immunohistochemical estrogen receptor assays in breast cancer. *Hum Pathol* 1988; 12: 960-6.
  47. Andersen J, Thorpe SM, King WJ, Rose C, Christensen I, Rasmussen HS. The prognostic value of immunohistochemical estrogen receptor analysis in paraffin-embedded and frozen section versus that of steroid-binding assay. *Eur J Cancer* 1990; 26: 442-9.
  48. Ciocca DR, Fujimura FK, Tandon AK, et al. Correlation of Her-2/neu amplification and expression with other prognostic factors in 1103 breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1279-82.
  49. Barton RW, Rothlein R, Ksiazek J, Kennedy C. The effect of anti-intercellular adhesion molecule-1 on phobol-ester-induced rabbit lung inflammation. *J Immunol* 1989; 143: 1278-82.
  50. Johnson JP, Stade BG, Holtzman B, Schwable W, Riethmuller G. De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 641-4.
  51. Makgova MW, Sanders ME, Luce GEG, et al. ICAM-1 is a ligand for LFA-1 dependent adhesion of B, T and myeloid cells. *Nature* 1988; 331: 86-8.
  52. Rothlein R, Czajkowski M, O'Neil MM, Martin SS, Mamolf E, Merluzzi VJ. Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies. *J Immunol* 1988; 141: 1665-9.
  53. Vogetseder W, Feichtinger H, Schulz TF, et al. Expression of 7F7-antigen, a human adhesion molecule identical to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in human carcinomas and their stromal fibroblasts. *Int J Cancer* 1989; 43: 763-73.
  54. Fady C, Gardner AM, Gera JF, Lichtenstein A. Interferon-induced increase in sensitivity of ovarian cancer targets to lysis by lymphokine-activated killer cells: selective effects on HER-2/neu-overexpressing cells. *Cancer Res* 1992; 52: 764-9.
  55. Visscher DW, Zarbo RJ, Greenawald KA, Crissman JD. Prognostic significance of morphological parameters and flow cytometric DNA analysis in carcinoma of the breast. *Pathol Annu* 1990; 25P: 171-210.
-