

Gynecomastia 조직에서 면역화학염색법에 의한 Estrogen Receptor α , β 와 Progesterone Receptor의 발현

가톨릭대학교 의과대학 의정부성모병원 외과학교실 및 ¹임상병리학교실

박순철 · 김기환 · 안창혁 · 김정수 · 전해명 · 이은정¹ · 정상설

Estrogen Receptor α , β and Progesterone Receptor Expression in Gynecomastia Using Immunohistochemical Staining

Sun Cheol Park, M.D., Kee Hwan Kim, M.D., Chang Hyeok Ahn, M.D., Jeong Soo Kim, M.D., Hae Myung Jeon, M.D., Eun Jung Lee, M.D.¹ and Sang Seol Jung, M.D.

Purpose: Gynecomastia is a common male breast abnormality and primarily occurs in puberty and senescence. The obvious etiological role of hormonal changes in gynecomastia, plus the discovery of estrogen receptor in normal and neoplastic breast, has spurred several investigations of ER content in male gynecomastic tissues. The results have been inconsistent and the fraction of ER-positive specimens has varied from 0~90%.

Methods: Immunohistochemical hormonal receptor analysis using monoclonal estrogen receptor (ER) α , β and progesterone receptor (PR) was performed on the breast tissues of 58 patients with gynecomastia between January 1995 and January 2000 in the Department of Surgery, Uijongbu St. Mary's Hospital. These results were statistically compared with clinical data.

Results: 48 cases (82.8%) were ER α positive and 55 cases (94.8%) were ER β positive and PR positivity was noted in 55 cases (94.8%). There was negative relationship between ER α and age, PR and location.

Conclusion: This study demonstrates that intracellular steroid receptors are present in most gynecomastic tissues. Additionally, it supports the general assumption that estrogen and progesterone may be two of the hormones responsible for the development of gynecomastia. (J Korean Surg Soc 2001;60:268-272)

Key Words: Gynecomastia, Estrogen receptor α , β , Progesterone receptor

중심 단어: 여성형 유방, 에스트로젠 수용체 알파, 베타, 프로제스테론 수용체

Departments of Surgery and ¹Clinical Pathology, Uijongbu St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea, Uijongbu, Korea

서 론

Gynecomastia는 성인 남자에서 40~65%의 빈도를 보이며 50~60대에 가장 흔히 나타나는 질환으로(1,2) estrogen과 androgen의 비가 여러 요인에 의해 상승하는 것으로 알려져 있다.(3,4) Jesen과 Jacobsen에 의해 estrogen이 세포질 단백질인 estrogen receptor에 매개되어 생물학적 효과가 나타난다고 처음 기술된 후, 1986년 보고된 ER은 현재 ER α 로 명명되고 있으며,(5) 1995년에 ER의 isoform인 ER β 가 rat의 전립선에서 처음 보고되었다.(6) 대부분의 gynecomastia는 65% 정도가 주로 사춘기 시기에 발생하는데,(7,8) 일반적인 병적요인외에 순환하는 androgen : estrogen의 비율의 불균형과 여러 hormone 수용체의 비정상적인 수준이 원인이 된다고 알려져 있다.(2,4) 유방암의 치료에서도 유방 절제 후 병변의 임상병리학적 예후 인자들의 지표에 따라 선택되어지는 여러 보조 치료 중 유방조직의 호르몬 수용체의 존재여부가 중요한 역할을 하는데, 이는 치료의 반응여부를 예측하는 지표와 유방암 예후인자로서도 중요하다.(9) 보고자에 따라 gynecomastia에서의 ER의 발현정도는 실험방법에 따라 0~100%로 큰 차이를 보이며,(10-12) 호르몬수용체의 면역화학염색법은 생화학적 방법보다 더욱 정확한 것으로 보고되었다.(13) 저자들은 gynecomastia 조직에서 문헌상 다양한 차이를 보이는 ER에 대하여 그 subtype (α , β)과 PR에 대한 면역화학염색법을 이용한 임상적 발현빈도를 알아보고 임상적인 일반적 특성과의 연관성이 있는지에 관하여 조사해 보고자 하였다.

책임저자: 김정수, 경기도 의정부시 금오동 65-1
☎ 480-130, 가톨릭대학교 의정부성모병원 외과
Tel: 031-820-3048, Fax: 031-847-2717
접수일 : 2001년 1월 2일, 게재승인일 : 2001년 1월 8일

방 법

1) 대상

1995년 1월부터 2000년 1월까지 의정부 성모병원 외과 학교실에서 gynecomastia로 진단받고, 수술을 시행했던 61예 중 자료검색과 조직사용이 가능하였던 58예의 환자의 파라핀포매조직을 추출하였다. 대상환자의 임상기록을 검토하여 그 일반적 임상적 특성을 분석하였다. 환자들은 전원 남자였으며 평균연령은 42세였고(12~74세), 적출 조직의 크기는 평균 4.15 cm (1.5 cm~10×7×2.5 cm), 수술 전까지의 증상 발현 기간은 평균 9.7개월(7일~10년), 종양의 위치별로는 일측이 50예 우측이 24예(41.4%), 좌측이 26예(44.8%)였고, 양측은 8예(13.8%)였다(Table 1). 간질환이나 심장질환 혹은 신장질환 환자가 6예(10.3%)였고, 당뇨병환자는 3예(5.2%)가 있었고, 39예(67.2%)는 특발성이었다.

2) 방법

Gynecomastia 조직을 중성 포르말린 용액에 고정하여 파라핀에 포매하고 4 μ m 두께로 잘라 probe on plus 슬라이드에 부착시켰다. Xylene으로 3분간 3회 담구어 파라핀을 제거한 후, 100%, 85%, 70%, 50% 알코올에 3분씩 처리 후 증류수에 넣어 함수화하였다. 10 mM Citrate 용액에 넣어 121°C에서 10분간 가압멸균한 후 조직 표본 위에 Pe-

roxidase-Blocking solution을 떨어뜨려 10분간 두어 내인성 peroxidase를 저지시키고, TBS용액으로 씻어 non-immune serum과 실온에서 10분간 반응시킨 후, 1 : 50으로 희석한 Anti-Estrogen receptor (Zymed, San Francisco, CA), Anti-Progesterone receptor (Zymed, San Francisco, CA) Anti-Estrogen receptor β (Upstate biotechnology)와 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. TBS용액으로 씻은 후 2차항체인 biotinylated polyvalent antibody (Histostain-Plus, Zymed, San Francisco, CA)를 실온에서 10분간 반응시켜 TBS용액으로 씻고 streptavidine peroxidase와 10분간 반응시켰다. TBS용액으로 씻고 발색시약인 DAB로 5분간 반응시킨 후 물로 세척하였다. Hematoxylin으로 15초간 대조염색하고 알코올과 Xylene으로 탈수시켜 canada balsam으로 봉입하여 현미경으로 검경하였다. 각 환자의 조직상 유전자의 반응을 그 염색정도와 범위를 10%, 50%를 기준으로 하여 -, +, ++로 나누어 2명의 의사가 판독하여 분류하였고(Fig. 1) 임상적 자료에서 일반적 특성간의 상관관계는 Spearman의 순위상관 계수로 알아보고, 일반적 특성과 다른 유전자의 분석은 다중 로지스틱 회귀분석으로 조사하였다.

결 과

전체 gynecomastia 조직에 대한 ER α 의 양성률은 82.7%를 보였고 ER β 의 양성률은 94.8%를 보였으며 PR의 양성률은 94.8%를 나타내었다. 호르몬수용체간의 관계를 보면 ER α 양성 시 ER β 의 양성률은 93.7%를 나타냈고 PR의 양성률은 95.8%였다. ER β 양성 시 ER α 의 양성률은 81.8%, PR의 양성률은 94.5%를 보였다(Table 2). 그러나 각 수용체간의 통계적 유관성은 보이지 않았다. 면역화학염색법에서의 각 유전자의 발현을 -, +, ++로 분석한 내용에서 일반적 특성과 각 유전자간의 상관관계를 Spearman의 순위 상관계수로 보면, 일반적 특성에서 나이와 증상의 발현기간이 통계적으로 유의하게($\rho=0.0489$) 나이가 젊은 연령에서 수술까지의 유병기간이 짧았다. 종양의 크기와 증상발현 기간의 관계에서도 기간이 길수록 종양의 크기가 증가되었다($\rho=0.0056$). 각 유전자의 발현에 영향을 미치는 일반적 특성과 다른 유전자의 영향에 대한 분석은 다중 로지스틱 회귀분석으로 조사하였는데, ER α 에 영향을 주는 변수는 연령으로서 연령이 증가될수록 음성이 증가하였다. PR은 종양의 위치로 볼때 발현 양성(+)의 경우에 오른쪽이 왼쪽이나 양측보다 높은 것으로 나타났다 [odd ratio 2.46 (1.279,4.732)]. 하지만, ER β 에는 영향을 주는 유의한 변수는 없었다. 다중 로지스틱 회귀분석으로 조사한 일반적 특성과 다른 유전자의 분석에서 ER α 에 대하여는 연령과 위치변수가 영향을 주는 변수로, ER α 의 발현이 연령 증가에 따라 음성(-)이 많았다. 위치는 왼쪽이 오른쪽이나 양측에 비해 승산비가 0.4 (0.143, 1.050)로

Table 1. Patients characteristics

	No. (%)	P-value
Age		0.0489
<30	18 (31%)	
<60	21 (36.2%)	
≥60	19 (32.8%)	
Size		0.0056
<3 cm	11 (19%)	
<6 cm	38 (65.5%)	
≥6 cm	9 (15.5%)	
Duration		NA
<1 mon	24 (45.3%)	
<6 mon	16 (30.2%)	
<1 yr	6 (11.3%)	
≥1 yr	7 (13.2%)	
Side		NA
Rt	24 (41.4%)	
Lt	26 (44.8%)	
Both	8 (13.8%)	

NA = not applicable.

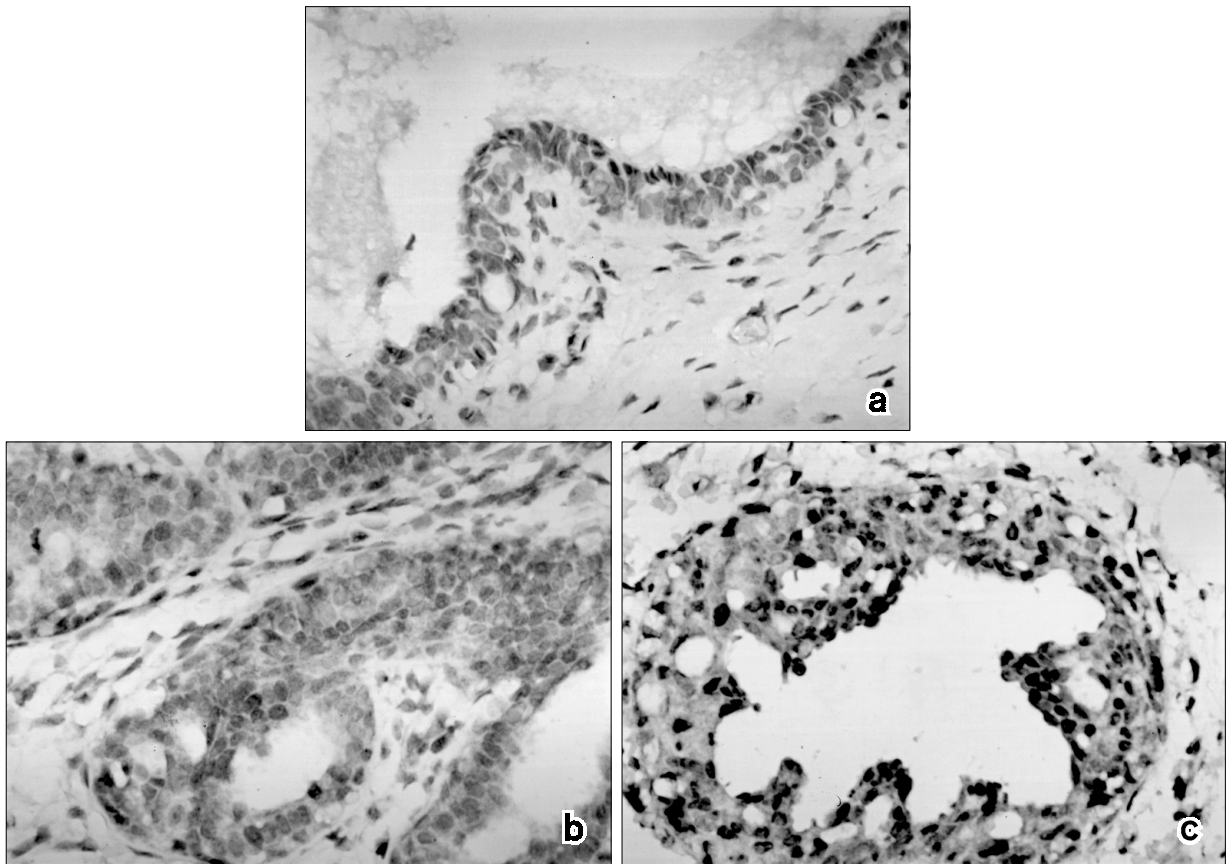


Fig. 1. Immunohistochemical staining of ER β in gynecomastia specimens. The immunostaining shows negatively non-stained (a), moderate stained nucleus (b) and strong positively stained nucleus in tissues (c). ($\times 400$).

Table 2. Estrogen and progesteron receptors status

	ER α	ER β	PR
-	10 (17.2%)	3 (5.2%)	3 (5.2%)
+	36 (62.1%)	34 (58.6%)	29 (50%)
++	12 (20.7%)	21 (36.2%)	26 (44.8%)
Total	58	58	58

높았다. 그러나, PR이나 ER β 에 대하여서는 통계적으로 영향을 주는 유의한 변수는 없었다.

고 찰

Gynecomastia는 성장기에 흔히 나타나는 남성의 유선이 과대 발육하는 질환으로서 다양한 연령대에서 관찰되며, 이는 primary 혹은 secondary gonadal disorder나 간 경화, 갑상선 기능항진증, 여러 부신질환, estrogen 혹은 gonadotropin secreting tumor같은 다양한 질환이나, 여러 약제 등

에 의해서도 유발된다고 알려져 있다.(2,4) 유방조직에서의 ER, PR의 검사는 종래의 생화학적 방법인 Dextran Coated Charcoal (DCC) 방법이 있는데, 이는 신선조직을 필요로 하고 특수기구를 검색시에 필요로 하는 단점이 있으나, 최근에는 ER에 대한 단크론항체를 이용한 면역조직화학적 방법(Immunohistochemical method)은 신선조직, 동결조직 뿐 아니라 고정조직이나 적은 양의 조직으로도 측정이 가능하다.(14) 이 두 방법의 결과는 보고자에 따라 두 결과의 차이는 있으나, ER 양성발현의 경우 대개 80% 내외로 보고하는데, 이러한 결과의 차이는 ligand binding assay가 세포 전체의 수용체를 측정된 것이 아닌, cytosol의 수용체만을 측정하기 때문이며, 면역조직화학적 방법은 ER과 ER자체의 heterogeneity, 세포의 주기 상태에 따라 염색정도가 다르기 때문이라고 한다.(15) Estrogen receptor는 진행성 유방암 환자의 내분비 치료의 반응정도를 가늠하는 가장 유용한 표지자이며 progesteron receptor의 측정방법이 보고된 후 호르몬수용체의 병합한 결과가 더욱 임상적으로 정확한 평가가 가능하게 되었다.(16) 유방암 환자의 50% 이상에서 발견되는 이러한 ER의 역할이 estradiol과 결합함으로써 세포분열을 유발한다는 것이 보

고된 이후(17) ER 양성 환자의 70% 이상이 anti-estrogen therapy에 반응함으로서 ER이 breast tumor의 성장과 밀접한 관계가 있음을 알게 되었다. 또한 anti-estrogen 약제인 Tamoxifen과 anti-androgen 약제인 Danazol이 gynecomastia에 효과가 있음이 보고되었다.(18,19) 최근의 연구에서는 지방조직의 aromatase의 증가된 활성도가 국소적 estrogen 농도증가에 중요한 영향을 미치며, 이는 ER의 증가없이 gynecomastia를 유발하고 남성 유방암의 발전에 관여한다고 보고하였다.(12,20) Steroid에 의존하는 조직의 성장과 기능의 조절은 순환하는 steroid가 특별한 수용체에 결합하여 세포핵내에서 순차적으로 결합하고, mRNA에 전해져서 일어난다는 것이 최근 널리 알려진 사실이다.(21) 최근의 연구는 gynecomastia 조직에 ER이 존재하며, estrogen의 유방조직에의 영향과 gynecomastia의 생태병리사이의 관련성에 대하여 보고하는데, puberty시기에 상대적 estrogen 우위가 testosterone이 성인 수준에 도달하기 전에 estrogen이 먼저 성인 수준으로 증가하는데 있다고 보고하였다.(7,22) 장년 및 노년기에서는 estrogen의 변화가 없는데 반해, testosterone은 감소하여 이것이 한 원인이라고 하였다.(23) Gynecomastia에서 ER, PR 양성반응(+)은 유방암에서보다 의미있게 높게 나타나고, 유방암과는 달리 gynecomastia에서는 androgen receptor와 ER, PR사이의 상당히 의미있는 연관성이 관찰되었으나(12) 본 연구에서는 ER과 PR사이의 연관이 나타나지 않았는데 이는 높은 양성률에 의한 것으로 생각된다. ER β 는 1996년 Kuiper등(6)에 의하여 쥐의 prostate에서 발견되어 보고되었으며 이미 알려진 estrogen의 기능을 바꾸어 놓았는데, 이는 다른 장기에 영향을 미치는 estrogen의 최종 생물학적 효과에 중요한 전기를 마련하였다. ER β 는 ER α 와 DNA의 96%의 동일성을 보이고 수용체접합부위의 58%가 동일성을 나타낸다.(24) 또한 N-terminal activation function regions는 단지 21%의 amino acid의 동일성을 갖고 있으며 분포 조직이나 결합 특성에서 ER α 과 큰 차이를 보이고 있다.(6,21) ER β 와 ER α 가 한 유방암에서 같이 발현되는 경우가 림프질의 전이율이나 중양의 higher grade의 경향을 보이는 것은, 어떤 유방암 환자에서 anti-estrogen therapy가 실패하는 경우 ER β 가 과발현(overexpression)을 보이는 것으로 설명이 될 수 있으며, 이는 ER β 가 유방암의 별도의 유용한 예후인자가 될 수 있음을 말해준다.(24) ER β 도 원래의 485 amino acids를 갖는 ER β -485 외에도 18 amino acid residue를 더 갖는 ER β -503과,(25) 61 C-terminal amino acid가 26 unique amino acid residue로 바뀌면서, 특별한 ligand의 결합 능력이 없이 estrogen-sensitive한 receptor의 활성화 능력이 없고, ER β 보다는 오히려 ER α 의 transactivation을 억제하는 ER β cx도 발견되었다.(26) ER β 는 주로 prostate와 ovary에 존재하나, CNS와 cardiovascular, 폐와 신장, 유선 등에도 존재한다. estrogen은 유방의 발달에 중요한 인자로서 ER α 가 결

여된 암쥐는 혈중 estrogen의 농도가 높음에도 정상적인 유선의 발달이 결여됨을 보여준다.(27) 유방조직의 발달에 관련된 다른 호르몬수용체로는 growth hormone receptor와 prolactin receptor가 보고되었으며,(28) 이외에도 apolipoprotein D가 모든 gynecomastia에서 양성으로 발현되어 연관성을 시사하는 보고가 있었다.(29) Gynecomastia는 이러한 여러 가지 호르몬의 영향에 기인하는 것으로 보이며 특히 ER이 중요한 역할을 담당하며 ER α 와 ER β 가 모두 유방조직생성에 상당한 연관이 있는 것으로 생각된다.

결 론

Gynecomastia로 진단된 남성환자 58예에서 시행한 ER α , ER β , PR의 발현정도는 각 48예(82.8%), 55예(94.8%), 55예(94.8%)로 나타났으며, 이는 여러 보고와 비교할 때 약간의 차이를 보였다. 각 호르몬수용체와 일반적 특성과의 관계는 ER α 의 경우 연령과 위치변수가 연관있게 나타났으며, PR은 위치변수와 유관한 관계를 보였다. ER β 의 경우는 통계학적으로 유의한 영향을 미치는 일반적 특성은 없었으나 상당한 정도의 발현을 보여 gynecomastia의 형성이나 발전에 밀접한 관계를 보이는 것으로 생각되며 ER, PR 등의 각 호르몬수용체와의 연관성과 의의에 대한 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Williams MJ. Gynecomastia. Its incidence, recognition and host characterization in 447 autopsy cases. *Am J Med* 1963;34:103-12.
- 2) Niewoehner CB, Nuttall FQ. Gynecomastia in a hospitalized male population. *Am J Med* 1984;77:633-8.
- 3) Bannayan GA, Hajdu SI. Gynecomastia. Clinicopathologic study of 351 cases. *Am J Clin Path* 1972;57:431-7.
- 4) Braunstein GD. Gynecomastia. *NEJM* 1993;328:490-5.
- 5) Green S, Walter P, Kumer V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P. Human estrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 1986;320:134-9.
- 6) Kuiper GGJ, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5925-30.
- 7) Lee PA. The relationship of concentrations of serum hormones to pubertal gynecomastia. *J Ped* 1975;86:212-15.
- 8) Nydick M, Bustos J, Dale JH, Rawson RW. Gynecomastia in adolescent boys. *JAMA* 1961;178:449-54.
- 9) Knight WA, Livingston RB, Gregory EJ, Mcguire WL. Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. *Cancer Res* 1997;37:4669-71.
- 10) Contesso G, Delanie JC, Guerinet F, Maylevin F, Bohnon C. Estrogen and progesterone receptors in male breast disease.

- Nouv Press Med 1977;6:1951-53.
- 11) Pacheco MM, Oshima CD, Lopes MP, Widman A, Franco EL, Brentani MM. Steroid hormone receptors in male breast disease. *Anticancer Res* 1986;6:1013-17.
 - 12) Sasano H, Kimura M, Shizawa S, Kimura N, Nagura H. Aromatase and steroid receptors in gynecomastia and male breast carcinoma: an immunohistochemical study. *J Clin Endocrin Metabol* 1996;81:3063-7.
 - 13) Anderson J, Ørntoft TF, Anderson JA, Poulsen HS. Gynecomastia. Immunohistochemical demonstration of estrogen receptors. *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect A* 1987; 95:263-7.
 - 14) Alberts SR, Ingle JN, Roche PR, Cha SS, Wold LE, Farr Jr GH, et al. Comparison of estrogen receptors determination by a biochemical ligand-binding assay and immunohistochemical staining with monoclonal antibody ER1D5 in females with lymph node positive breast carcinoma entered on two prospective clinical trials. *Cancer* 1996;78:764-72.
 - 15) Helin H, Isola J, Helle M, Koivula T. Discordant results between radioligand and immunohistochemical assays for steroid receptors in breast carcinoma. *Br J Cancer* 1990;62:109-12.
 - 16) Nomura Y, Yamagata J, Takenaka K, Tashiro H. Steroid hormone receptors and clinical usefulness in human breast cancer. *Cancer* 1980;46:2880-3.
 - 17) Masiakowski P, Breathnach R, Bloch J, Gannon F, Krust A, Chambon P. Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCH-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res* 1982;10:7895-903.
 - 18) Ting AC, Chow LW, Leung YF. Comparison of tamoxifen with danazol in the management of idiopathic gynecomastia. *Am Surgeon* 2000;66:38-40.
 - 19) Scott S, Arnold M. Tamoxifen as treatment for gynecomastia and mastonychia resulting from hormonal deprivation. *J Urol* 1998;159:1309-10.
 - 20) Miller WR, O'Neil J. The importance of local synthesis of estrogen within the breast. *Steroids* 1987;50:537-48.
 - 21) Nilsson S, Gustafsson JA. Estrogen receptor transcription and transactivation. Basic aspects of estrogen action. *Breast Cancer Res* 2000;2:360-6.
 - 22) Large DM, Anderson DC. Twenty-four hour profiles of circulating androgens and estrogens in male puberty with and without gynecomastia. *Clin Endocrin* 1979;11:505-21.
 - 23) Vermuelen A. Testicular hormonal secretion and aging in males. In: Grayhark JT, Wilson JD, Schebenske MJ. Benign prostatic hyperplasia. DHEW publication No. 76-1113 (NIH); 1976. p.177.
 - 24) Speirs V, Parkes AT, Kerin MJ, Walton DA, Carleton PJ, Fox JN, et al. Coexpression of estrogen receptor alpha and beta: poor prognostic factors in human breast cancer? *Cancer Res* 1999;59:525-8.
 - 25) Hanstein B, Liu H, Yancisin MC, Brown M. Functional analysis of a novel estrogen receptor β isoform. *Mol Endocrinol* 1999;13:129-37.
 - 26) Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Kosoi T, Ouchi Y, et al. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor β cx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res* 1998;26:3505-12.
 - 27) MacGillivray MH, Morishima A, Conte F, Grumbach M, Smith EP. Pediatric endocrinology update: an overview. *Horm Res* 1998;49:2-8.
 - 28) Mertani HC, Garcia-Caballero T, Lambert A, Gerard F, Palayer C, Boutin JM, et al. Cellular expression of growth hormone and prolactin receptors in human breast disorders. *Intern J Cance* 1998;79:202-11.
 - 29) Serra Diaz C, Vizoso F, Lamelas L, Medrano J, Rodriguez C, Gonzales O, et al. Expression and clinical significance of apolipoprotein D in male breast cancer and gynecomastia. *Br J Surg* 1999;86:1190-7.