

면역조직화학적 염색 방법에 따른 상피세포 성장 수용체 단백질(EGFR)의 발현정도의 차이 및 EGFR의 발현정도와 EGFR 유전자의 돌연변이와의 상관관계에 대한 고찰

대구보건대학¹, 영남대학교의료원², 계명대학교동산의료원³, 경북대학교병원⁴, 대구가톨릭대학교의료원⁵, 대구파티마병원⁶

윤인숙¹·김극준²·이은희²·석상희²·김상희³·김현용⁴·송호정⁵·이태종⁶

Differential Expression of EGFR Protein by Immunohistochemical Staining Methods and the Relationship Between the Degree of EGFR Protein Expression and EGFR Gene Mutation

In-Sook Yoon¹, Keuk-Jun Kim², Eun-Hwa Lee², Sang-Hee Seok², Sang-Hee Kim³, Hyun-Yong Kim⁴, Ho-Jung Song⁵, and Tae-Jong Lee⁶

Department of Clinical Pathology, Daegu Health College, Daegu 702-722, Korea¹

Department of Pathology, Yeungnam University Medical Center, Daegu 705-717, Korea²

Department of Pathology, Keimyung University Dongsan Medical Center, Daegu 700-712, Korea³

Department of Pathology, Kyungpook National University Hospital, Daegu 700-721, Korea⁴

Department of Pathology, Daegu Catholic University Medical Center, Daegu 705-718, Korea⁵

Department of Pathology, Fatima Hospital, Daegu 701-724, Korea⁶

In the last 5 years the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) has emerged as one of the most important targets for drug development in oncology. Monoclonal antibodies targeting the external domain of EGFR have been shown to have clinical benefits in colorectal and head and neck cancer when combined with chemotherapy and/or radiation. Also the targeting of the epithelial growth factor receptor (EGFR) kinase domain using the closely related inhibitors gefitinib and erlotinib has generally been ineffective against solid tumors, many of which over express the receptor. We found that there were some differential expressions according to primary antibodies of the EGFR protein which being used as one of the histological tumor markers for non-small cell lung cancer (NSCLC). We also found that there are some differential expressions according to antibodies, the pH of the antigen retrieval (AR) buffer solutions and kinds of enzymes. There were some differential expressions according to the secondary antibodies and the detection systems. We analyzed the correlations between the immunohistochemical expressions of the EGFR protein and the gene mutations of the EGFR. The differences between automatic stainers and manual staining methods were also evaluated.

Key Words : Epidermal growth factor receptor (EGFR), Immunohistochemistry, Tyrosine kinase, Antigen retrieval (AR) buffer solution, Enzyme, Non-small cell lung cancer (NSCLC).

교신저자 : 윤인숙, (우) 702-722 대구광역시 북구 태전동 산 7번지

대구보건대학 임상병리과

Tel : 053-320-1305

E-mail : isyoon0100@hanmail.net

I. 서 론

면역조직화학적염색방법은 1941년 Coons 등에 의해서 보고된 이후 감염 및 신생물 질환에 대한 진단에 가치 있는 도구로 다양하게 사용되어져왔다(Ramos-Vara, 2005). 일차 항체의 종류에 따라서 항원부활을 시행하여 염색성이 향상된 것과 변화가 없는 것과 오히려 염색성이 감소된다는 결과 및 포르말린에 고정된 시간이 오래 될수록 염색성이 저하되며 또한 microwave를 이용하여 열처리하면 염색성이 좋다는 결과를 얻었다는 보고도 있으며 (Shi 등, 1991), 면역조직화학적 염색을 하기 위하여 파라핀블럭에서 절편을 잘라서 탈파라핀을 하고 실온에 오랫동안 방치하면 염색성이 저하된다는 보고도 있다(Lee 등, 2006). 최근 5년간 상피세포 성장 수용체(Epidermal Growth Factor Receptor: EGFR)는 종양학 분야에서 신약 개발을 위한 가장 중요한 목표로 대두되었다. EGFR의 외부영역을 목표로 한 단클론항체는 화학적 치료와 방사선 치료와 함께 잘록곤창자암, 두경부암종에서 임상적으로 큰 유익을 가져왔으며, 최근 다양한 고형암종에서 높게 발현되는 것으로 알려진 EGFR을 항암치료의 표적으로 하는 다양한 연구가 시행되어져 왔다. EGFR이 활성화되면 tyrosine kinase를 통한 세포내 신호전달경로를 통해 암세포의 증식이 유도되는데 각종 항암제는 이 tyrosine kinase를 억제함으로써 암세포 증식을 억제한다(Lee 등, 2004).

본 실험은 종합병원 규모에서 비소세포폐암의 조직학적 진단 표지자로 사용되는 EGFR 단백질의 면역조직화학적 염색시 다양한 변수와 차이가 있을 것으로 생각되어 일차항체의 제조회사에 따른 발현정도의 차이와 항원부활 완충용액(antigen Retrieval solution; AR solution)과 효소들의 종류 및 pH의 정도에 따른 발현의 차이 및 일차항체에 반응하는 이차 항체와 검출시스템에 따른 발현의 차이를 알아보고자 하였다. 또한 EGFR의 면역조직화학적 발현 정도와 유전자적 돌연 변이와의 상관관계, 그리고 수기 방법과 자동면역염색기와의 차이도 동시에 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 환자검체

면역조직화학적 검사를 위하여 2004년 영남대학교병원에서 폐암으로 수술 받은 후 adenocarcinoma로 진단받은 파라핀 포매된 폐암조직 중 EGFR에 양성인 조직과 음성인 조직을 각각 5장씩 박절하여 silane coated slide에 부착하여 60℃ 배양기에서 40분간 건조한 후 항원성유지를 위하여 탈파라핀 하지 않고 그대로 대구시내 5개 종합병원 병리과에 동시에 보냈으며, EGFR단백 발현정도와 EGFR 유전자 돌연변이와 상관관계를 보기 위하여 2006년부터 2007년에 걸쳐 영남대학교병원 병리과에 비소세포성폐암(NSCLC)으로 진단 받고 EGFR 유전자 돌연변이 검사를 의뢰한 환자의 절제된 파라핀 블럭 92 건을 순서대로 조사하였다.

2) 수동면역조직화학적 염색을 위한 항원부활 용액 (AR Solution)

가장 적합한 항원부활 용액을 찾기 위하여 citrate buffer pH 6.0(Zymed, USA), EDTA pH 8.0(Zymed, USA), pH 9.0(DakoCytomation, Denmark), pepsin (Zymed, USA), proteinase K(DakoCytomation, Denmark)를 사용하여 120℃에 10분간 고압증기 멸균하였다.

3) 대구시내 5개 종합병원에서 사용하는 EGFR 1차 항체의 제조회사와 항원부활방법 및 자동면역염색기의 검출시스템은 Table 1과 같다.

2. 면역조직화학적 염색법

Table 1에서 보는 바와 같이 1차 항체는 Zymed 3개소, Neomarker 1개소, Sigma 1개소였다. 5개 종합병원 중 1개 병원만 자동면역염색기를 사용하지 않고 수동으로 EnVision HRP 방법을 사용하였고, 3개병원이 자동면역염색기(Ventana Meical Systems, Inc., USA)를 사용하였으며 1개병원은 Bond Polymer Intense Detection System을 사용하였다. 발색은 DAB 용액을 사용하였고 Mayer

Table 1. Detection system and information of primary antibodies for EGFR

Hospital	Primary Ab.	Dilution Raio	AR Solution	Detection System
A	Zymed	1:100	pepsin, 10min	Dako REALTMEEnVision™ HRP
B	Neomarker	1:100	CC1, 12 min 95°C, 100°C	Ventana Medical Systems, Inc., USA
C	Sigma	1:6,000	CC1, 12 min in 95°C, 100°C	Ventana Medical Systems, Inc., USA
D	Zymed	1:200	protease 1, 4 min	Ventana Medical Systems, Inc., USA
E	Zymed	1:400	epitope retrieval solution I	BondMax, VISION-BIOSYSTEM

hematoxylin으로 대조염색하였다. 자동면역염색기에서는 Bluing solution을 사용하였다. EGFR 단백질 발현정도의 등급은 tyrosine kinase의 family인 Her2/neu와 같이 grade 0, grade 1, grade 2, grade 3으로 분류하였다.

3. 통계학적 분석

EGFR 단백질의 발현정도와 EGFR 유전자 돌연변이, 다형성과의 상관관계를 보기위하여 SPSS 12.0K를 이용하여 이변량분석법을 시행하였다.

III. 결 과

1. 항원부활완충용액별 EGFR 단백질의 수동 면역조직화학적 염색 결과

자동염색기에서는 항체와 검출방법과 환경이 다르므로 객관적인 결과의 기대가 어려워 수동으로 동일한 조건(120°C 10분)에서 6가지의 항원부활 완충용액과 함께 가열처리하여 EGFR 단백질의 면역조직화학적 발현정도를 관찰하였으며 그 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 pH 9.0에서 가장 좋은 결과를 얻었다. 그 다음은 proteinase K, pepsin 순으로 효소를 처리한 결과가 citrate buffer pH 6.0, EDTA pH 8.0, citrate buffer pH 6.0 용액에 90°C 40분간 처리한 결과 보다 발현정도가 높게 나타났다. 이 실험의 결과를 볼 때 조직학적 고정을 위하여 10% formalin을 사용하는데 이로 인하여 감추어진 항원결합부위(antigen binding fragment)를 항원부활완충용액의 pH와 온도, 각종 단백질을 분해하는 효소가 결정한다고 볼 수 있다. EGFR 단백질의 경우, pH는 산성보다 알칼리로 갈수

록 단백질 분해를 더 많이 하는 것으로 보였으며 단백을 많이 분해하는 만큼 조직학적 형태의 유지는 다소 떨어져 보였다. 이러한 결과는 새로운 항체들(novel antibodies)의 정도관리를 위해서는 반드시 양성과 음성 대조군을 사용하여 최소한 6가지의 항원부활완충용액과 열처리(어떤 종류는 열처리를 하지 않아야 하는 경우도 있음)를 하여 최적의 항원부활용액과 온도를 찾아내어야 할 것으로 사료된다.

2. EGFR 단백질의 자동면역조직화학적 염색기(Auto-immunohistochemical stainer)와 수동면역조직화학적 염색의 결과

각 병원별 면역조직화학적 염색결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 수동면역염색법(EnVision™ HRP, Fig. 2의 C, H)과 자동염색기의 검출(Fig. 2, A, F; B, G; D, I; E, J)방법에서 polymer를 이용하는 자동면역염색기와 별 다른 차이를 발견하지 못하였으나 검출방법에 따라서 일차항체의 희석배율을 증가시켜 원가절감에는 크게 기여하는 것으로 생각된다. 자동면역염색기를 사용한 1개소의 병원 중(Fig. 2, D and I)에서는 다소 과염색 되었다. 3개 병원에서 같은 장비로 염색하였는데 다른 결과를 보였다. 이것은 같은 장비에 염색을 하였지만 일차 항체의 순도나 품질에 따라서 발현의 차이가 다르게 나타난 결과로 해석되었다. 이 실험결과 일차항체의 선택이 아주 중요하다는 것을 시사한다. 어떤 병원에서는 3개의 같은 자동염색기를 사용하면서 protease를 4분간 처리하여 항원부활 완충용액으로 사용한 결과 좋은 결과를 볼 수 있었다(Fig. 2, B and G). 이것은 자동면역염색기라도 제조회사에서 제공하는 것만으로 부족하다는 것을 알 수 있었다. 또한 자동면역염색기에서 제공하는 항원부활완충용액 외에 사

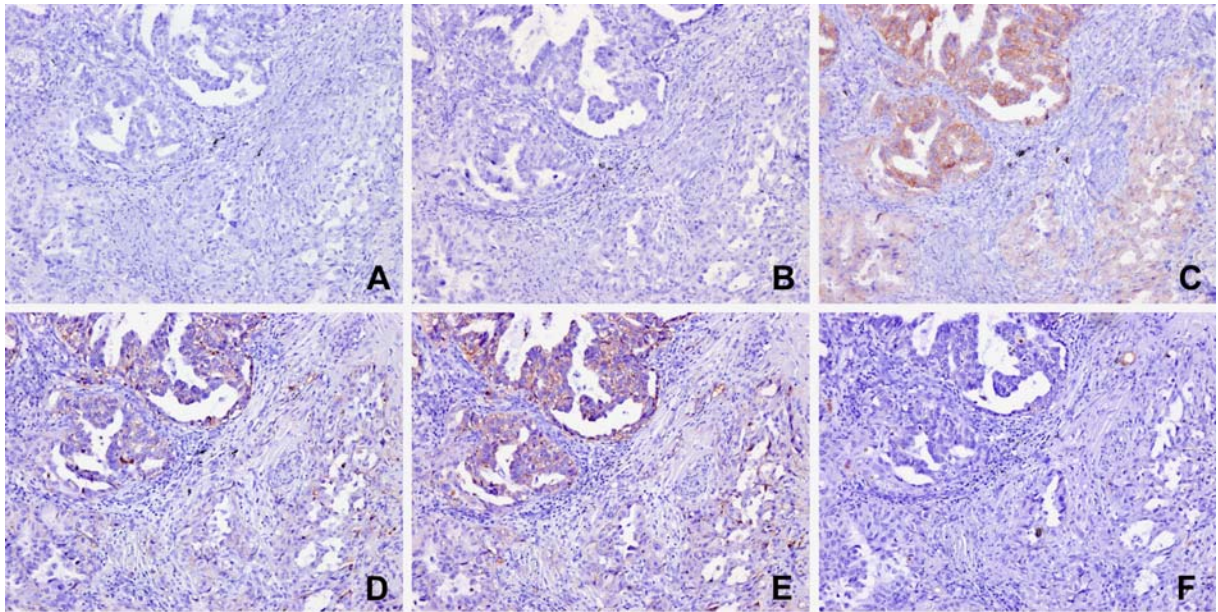


Fig. 1. Immunohistochemical expression of EGFR protein by antigen retrieval conditions ($\times 100$).
 A: Citrate Buffer 6.0, B: EDTA 8.0, C: pH 9.0, D: Pepsin, E: Proteinase K, F: 90°C 40min in Citrate Buffer 6.0

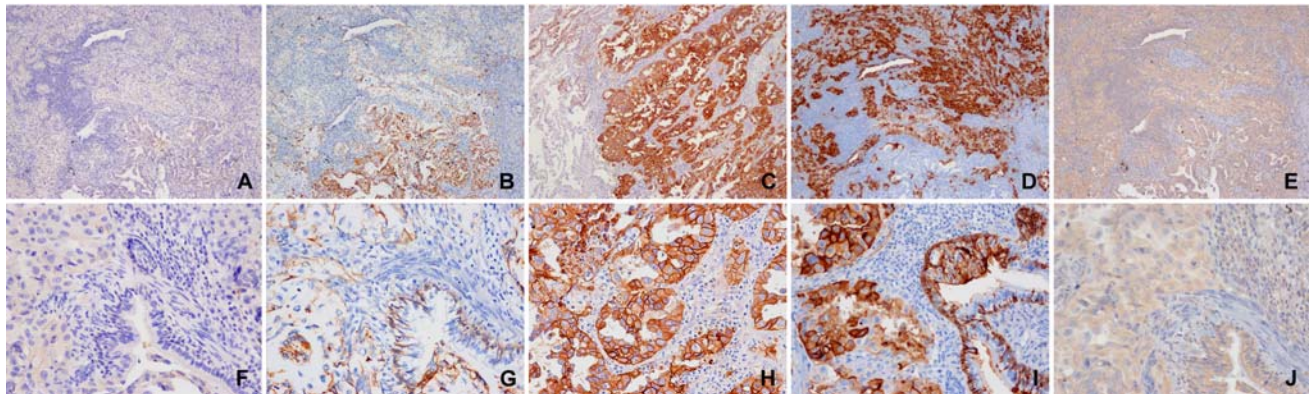


Fig. 2. Immunohistochemical expression of EGFR protein according to each hospital.
 A, B, C, D, E : $\times 40$, F, G, H, I, J : $\times 200$

용자가 효소(protease, proteinase-K, pepsin, trypsin) 등을 직접 제조하여 사용가능하도록 되어 있음에도 효소를 사용하지 않아서 결과가 잘 나오지 않는 경우도 있었다. 따라서 일차항체에서 제공하는 정보를 기초하여 항원부활 완충액을 사용하여야 하지만 가장 적합한 것은 아니라는 것 일 수도 있음을 시사한다.

3. EGFR 단백질의 발현정도와 돌연변이 정도와의 상관관계

Table 2와 같이 EGFR의 단백질발현정도가 높을수록 돌연변이가 일어난다는 것이 통계학적 유의성이 있는 것 ($p=0.000$)으로 나타났다. EGFR IHC Grade 3에서 각각 돌연변이 정도가 가장 높았고, 92예 중 adenocarcinoma 군에서 가장 높게(70%) 나타났으며 squamous cell car-

Table 2. Relationships between EGFR immunohistochemical expression and EGFR gene mutation in NSCLC

IHC grade	n	SCC	ADC	Others	Mutation
Negative	11(12%)	2(2.1%)	9(10%)	0	0
Positive	81(88%)	12(13%)	64(70%)	5(5%)	24(26%)
0	11	2	9	0	0
1	19	0	19	0	0
2	17	3	13	1	2
3	45	9	32	4	22
p value					0.000
Total	92	14	73	5	24

SCC; Squamous Cell Carcinoma, ADC; Adenocarcinoma

cinoma에서 13%로 나타났다. 기타 군에는 undifferentiated large cell carcinoma가 1예, carcinoma, non-small cell type, sarcomatoid feature가 1예, carcinoma, non-small cell type가 1예, undifferentiated large cell carcinoma가 1예, sarcomatoid carcinoma, cw giant cell carcinoma 1예가 포함되었다.

IV. 고 찰

면역조직화학적 염색을 시행함에 있어 다양한 조건들을 점검하고 시행하여야 한다. 가장 중요한 것은 조직의 고정상태 부터 점검하여야 하며 고정제로 인하여 숨겨진 항원항체의 결합부위를 부활하는 다양한 조건들, 즉 완충용액의 종류, pH, 효소의 처리 유무, 온도 등 다양한 조건하에서의 조절을 하는 일이다. 대조 조직도 항체제조회사에서 제공하는 조직을 양성대조군으로 하여 일차항체의 적당한 농도를 선택하여야 한다. 아무리 좋은 장비를 갖추고 있다고 하더라도 기본적인 전처리와 항원항체의 결합조건이 맞지 않으면 실패를 보기가 쉽다. EGFR 단백질 뿐만 아니라 파라핀포매 조직을 이용한 새로운 항체의 발현을 보기위한 면역조직화학적 염색을 시행 할 경우 항상 양성대조와 음성대조를 이용, 항원부활을 위한 최적의 완충액을 찾아내고 2차 항체 및 검출방법을 선택한 후 지속적인 정도관리를 하여야 할 것으로 사료된다. 아직도 많은 병원에서 불편하게 수동염색을 하고 있지만 판독에

는 불편함이 없는 것으로 판단되며 일정하게 염색이 되어야 하는 항상성은 자동염색기에 비교하여 떨어질 것으로 사료된다. 또한 검출방법도 자동면역염색기를 사용하는 병원이 증가되고 있는 추세이다. 가장 큰 차이점은 2차 항체의 구조자체가 다르다. 즉 수동염색의 biotin이 labeling된 2차 항체, dextran Ig PO complex 에 비교하여 자동염색기에는 대부분 polymer가 부착된 항체와의 차이가 특이도와 민감도를 다르게 하는 것이다. 최근에는 수동염색에 사용하는 polymer가 부착된 검출시스템도 상품화되어 판매되고 있다. 자동염색기를 이용하면 항상 일정한 염색성과 뛰어난 결과를 얻을 수 있다. 그러나 가장 기초적인 항원부활방법을 제대로 시행하지 않으면 아무리 좋은 장비에서 좋은 검출시스템을 갖추어도 결과는 엉터리로 나타날 수 있다. 본 실험에서 알 수 있었던 것은 자동염색기를 사용하는 ○○병원에서는 항원부활완충액(AR solution)을 다양하게 적용하여 최적의 조건을 찾아야 함에도 불구하고 장비회사에서 제공하는 항원부활용액만을 사용하여 좋은 결과를 얻지 못한 곳도 있었다. 항원부활완충용액을 사용하여야 할 경우, 일차항체 제조회사에서 추천하는 완충용액이나 효소를 사용하면 조건을 잡는데 도움을 주지만, 다른 완충용액과 조건에서 더 좋은 결과를 얻은 경우도 있었다. 인체조직에 진단용으로 사용되지 않는 동물실험용 항체의 경우에는 항원부활용액을 추천하지 않는 회사도 많다. 따라서 일차 항체의 특성을 잘 파악하여 항원부활완충용액을 선택하여야 하며 다양한 종류의 항원부활용액을 구비하여 최적의 조건을 찾아야만 할 것이다. 때로는 항원부활이나 효소처리가 불필요한 항체도 있다. 자동면역염색기를 사용함으로써의 장점은 polymer를 사용하여 biotinylated Ab보다 1차 항체의 희석비율을 몇 배로 높일 수 있어 원가가 절감되고 1차 항체의 조건 조절만 제대로 되면 노동력이나 질적인 면에서 수동염색보다 훨씬 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다. 또한 제조회사에 따라서 polymer의 크기도 중요한 요소 중의 하나이다. 이 실험 결과 면역조직화학적 염색 시 검사자는 면역학, 조직학, 화학이 합하여 만들어진 면역조직화학에 대한 정확한 지식을 갖추어야 한다는 것과 또한 조직세포화학차원에서 표준화와 정도관리가 정기적으로 반드시 시행되어야 할 것이다. PCR이나 FISH는 분자병리학회에서 정도관리를 하고 있으나

면역조직화학적 염색은 대한병리학회에서 정도관리를 하고 있기는 하지만 아주 드물게 시행되고 있어 정기적인 정도관리가 필요하다. EGFR의 경우 Immunohistochemistry 등급도 어떤 병원에서는 5 등급으로 분류하는 곳이 있고 어떤 병원에서는 4 등급으로 분류하는 곳이 있어 표준화가 필요할 것으로 사료된다.

EGFR 단백발현의 정도와 EGFR 유전자 돌연변이로 상관관계를 본 결과 통계학적 유의성이 있는 것($p=0.000$)으로 나타났다. Her2/neu의 발현정도와 FISH에서의 증폭 유무를 이용하여 환자의 치료에 적용하고 있는 것을 볼 때 이것은 EGFR 단백질의 면역조직화학적 염색결과가 조직학적 진단과 예후에 중요한 결과를 제공한다고 본다.

감사의 글

이 논문은 2006년 (주)성곤무역에서 지원하는 연구비로 이루어졌음.

본 연구비를 지원해주신 (주)성곤무역 윤무열 사장님께 감사드립니다.

참고 문헌

1. Lee HW, Park YR, Sim JH, Park RW, Kim WH, Kim JH. The Tissue Microarray Object Model: A Data Model for Storage, Analysis, and Exchange of Tissue Microarray Experimental Data. *Arch Pathol Lab Med* 130:1004-1013, 2006
2. Lee SW, Kim DR, Lee SD, Lee JS, Park YH, Ryoo BY, Kim HT, Park SH, Kim BS, Kim CH, Lee JC. The Efficacy of ZD1839 (IressaTM) in Patients with Advanced Non-small Cell Lung Cancer which has Progressed After Previous Chemotherapy. *Tuber Resp Dis* 57:161-167, 2004
3. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42:405-426, 2005
4. Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissues : An Enhancement Method for Immunohistochemical Staining Based on Microwave Oven Heating of Tissue Sections. *J Histochem Cytochem* 39:741-748, 1991