

Tissue Microarray를 이용한 유방암의 HER-2/neu 유전자 분석 및 예후 인자들과의 상관관계

한림대학교 의과대학 외과학교실, ¹연세대학교 의과대학 외과학교실

송 창 수 · 김 승 일¹ · 박 찬 흔

The Analysis of HER-2/neu Gene Status and Correlation with Other Clinico-Pathologic Factors for Breast Cancer Using Tissue Microarray

Chang Soo Song, Seung Il Kim¹, and Chan Heun Park

Department of Surgery, Kangdong Sacred Heart Hospital, Hallym University, Seoul, ¹Department of Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: The main clinical significance of HER-2/neu gene amplification is derived from its use as (a) a prognostic indicator, (b) a predictive factor for the sensitivity to chemotherapy, and (c) the identification of cases that are eligible for a specific therapy targeting the HER-2/neu protein. Over-expression of HER-2/neu has been shown to be associated with a poor prognosis for patients with node-positive breast cancer and also possibly for patients with node-negative breast cancer. The purpose of this work was to analyze the HER-2/neu gene amplification and correlate it with other clinico-pathologic parameters.

Methods: The study population consisted of 194 patients with breast cancer who had been treated with curative surgery at the Kangdong Sacred Hospital, Seoul, Korea from 1995 to 2000. Paraffin-embedded tissue samples from the primary tumors were obtained from the hospital archives and the tissue microarray was then constructed. We analyzed the amplification of HER-2/neu gene by the two-color FISH (Fluorescence in situ hybridization) method, and we correlated the results with other clinico-pathologic parameters such as tumor size, stage, histologic grade, lymph node status and hormonal receptor status.

Results: For 44 cases (22.7%) of a total 194 cases, the HER-2/neu gene was amplified. HER-2/neu gene amplification was positively correlated with TNM stage and lymph node status, and it was inversely correlated with estrogen receptor positivity.

Conclusion: For breast cancer, the analysis of the HER-2/neu gene by FISH based on a tissue microarray may be useful. (*Journal of Korean Breast Cancer Society* 2004; 7:251-255)

Key Words: HER-2/neu, Breast cancer, FISH, Tissue microarray

중심 단어: HER-2/neu 유전자, 유방암, FISH, Tissue microarray

서 론

HER-2/neu 유전자는 구조적으로 epidermal growth factor receptor (EGFR)와 상동한 구조를 가지는 원발암 유전자로서, 세포막에 존재하며 리간드와 결합하는 세포 외 영역과 단백질 활성화를 일으키는 세포 내 영역으로 구성된 수용체 형태의 암단백질로 부호화되어 있다.(1-3) 기능적으로 HER-2/neu 단백질은 tyrosine kinase 활성도를 가지고 tyrosine residue의 인산화를 통해 세포증식 신호를 증폭시키는 역할을 하고 있다.(4) HER-2/neu 암유전자는 염색체 17q21에 위치하고 있으며 수술적으로 절제된 유방암의 10~30%에서 증폭된다고 알려져 있다.(5,6)

HER-2/neu 유전자 증폭의 임상적 중요성은 첫째, 예후 인자로서, 둘째, 항암 치료 효과에 대한 예측인자로서, 셋째, HER-2/neu 단백질을 대상으로 한 치료에 적합한 환자를 확인한다는 점을 들 수 있다.(7) HER-2/neu 유전자의 증폭이나 단백질의 과발현은 림프절 전이 양성인 유방암 환자에 있어서 나쁜 예후 인자로 잘 알려져 있으며, 림프절 전이 음성인 환자에서도 나쁜 예후와 관련이 있을 것으로 생각된다.(5,8,9) HER-2/neu의 변화는 tamoxifen 치료와 cyclophosphamide, methotrexate, fluorouracil (CMF) 항암

책임저자 : 박찬흔, 서울시 강동구 길동 445
134-701, 한림대학교 강동성심병원 외과
Tel: 02-2224-2222, Fax: 02-2224-2570
E-mail: Chanheun1@yahoo.co.kr

접수일 : 2004년 9월 1일, 게재승인일 : 2004년 12월 3일
본 논문의 요지는 2003년 제56회 추계외과학술대회에서 구연되었음.

화학요법에 저항성을 보이며,(10-13) anthracyclin을 포함한 항암요법에 대해서는 민감도가 증가하는 양상을 보이는 것으로 보고되고 있다.(14-16) HER-2 단백질에 대한 단클론성 항체인 Trastuzumab (Herceptin[®], Genentech, Inc, CA, USA)가 여러 임상적 연구에서 종양의 성장을 억제한다고 보고 되었고,(17,18) 이러한 효과는 다른 항암제와 병합하여 사용한 경우 더욱 증가될 수 있다고 하였다. 특히 종양 세포에서 HER-2/neu 항원이나 유전자 증폭이 강한 환자에 있어서 이러한 효과가 더욱 두드러지게 나타나고 있다.(19,20)

유방암에서 HER-2/neu에 대한 많은 연구들은 파라핀 블록 전체를 박절하여 수행되었는데, 많은 검체가 포함되는 연구에 있어서 보관된 종양 블록을 일일이 조사하는 것은 매우 힘든 일이다. Tissue microarray (TMA)는 수백개의 조직검체를 동시에 분석이 가능하게 하는 고처리량의 기술이며,(21) fluorescence in situ hybridization (FISH)을 이용하여 수많은 포르말린 고정 조직에 대해 유전자 복제 수에 대한 연구를 가능하게 하였다.

본 연구에서 저자들은 유방암 환자들에 있어서 TMA를 구축하고 FISH를 이용하여 HER-2/neu 유전자의 상태를 알아보고 다른 임상병리학적 인자들과의 상관관계를 분석하였다.

방 법

1) 연구 대상

1995년부터 2000년 까지 강동성심병원에서 근치적 수술을 받은 유방암 환자 중 진료 기록과 파라핀 블록의 보관 상태가 양호한 194예를 대상으로 하였다. 대상 환자의 종양의 크기, 임상 병기, 조직학적 등급, 액와 림프절 전이 유무, 호르몬 수용체 유무 및 HER-2 유전자 증폭의 정도에 대해서 조사 분석하였다.

2) 연구 방법

(1) **TMA:** 보관 상태가 양호한 종양의 파라핀 블록을 이용하여 TMA를 구축하였다. 간략하게 설명하면 tissue-arraying instrument (Beecher Instrumedics, Silver Springs, MD, USA)를 이용하여 종양 조직을 심을 파라핀 블록에 구멍을 뚫고, donor 블록의 종양 부위에서 지름 0.6 mm의 원기둥 모양의 조직들을 얻었다. 저자들은 하나의 종양 블록마다 종양의 중심부에서 1개, 종양의 변연부에서 2개씩 모두 3개의 core를 채취하였다. Tissue core biopsy들은 recipient paraffin block의 예정되어진 부위에 배열되었다.

(2) **FISH:** Microtome과 adhesive-coated-tape sectioning system (Instrumedics Inc., Hackensack, NJ, USA)을 이용하여 TMA 블록을 5 μ m 두께로 잘랐다. 녹색의 chromosome 17 centromeric probe와 오렌지 색의 HER-2 probe (17q11.2-

q12)을 이용하여 2-color FISH (Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA)를 시행하였다. 모든 사례에서 오렌지 신호가 녹색 신호에 비해 2배 이상인 경우에 증폭된 것으로 판독하였다.

(3) **면역조직화학적 염색:** 호르몬 수용체 검사를 위하여 다클론 항체(polyclonal antimouse antibody, Novocastra Co.)를 이용하여 면역조직화학적 검사를 시행하였다. 판독은 핵이 갈색으로 염색된 정도를 분석하여 10% 이상 염색된 경우를 양성, 10% 이하로 염색된 경우를 음성으로 판독하였다.

(4) **통계학적 분석:** Statistical Package for the Social Science (SPSS)를 이용하여 임상, 병리, 경과 등을 포함한 환자들의 모든 정보를 분석하였고, 기존의 예후인자들과 HER-2/neu 유전자 증폭과의 상관관계는 chi-square 방법을 이용하였으며, 통계학적 유의성은 $P < 0.05$ 를 기준으로 하였다.

결 과

전체 환자는 194명으로 모두 여자이며 나이는 25세에서 86세로 평균 연령은 47.7세였다. 모두 근치적 유방절제술

Table 1. General characteristics of patient

Age	47.7 \pm 11.2 (25~86)	
Pathologic tumor size (cm)	3.0 \pm 2.0 (0.5~13)	
Axillary lymph node metastasis (N=193)		
0	117	(60.6%)
1~3	26	(13.4%)
4~10	27	(13.4%)
>10	23	(11.9%)
Stage (N=189)		
0	7	(3.7%)
I	38	(20.1%)
II	97	(51.3%)
III	47	(24.8%)
ER status (N=175)		
Positive	87	(49.7%)
Negative	88	(50.3%)
PR status (N=171)		
Positive	62	(36.2%)
Negative	109	(63.8%)
Histologic grade (N=84)		
I	16	(19.1%)
II	41	(48.8%)
III	27	(32.1%)

ER = estrogen receptor; PR = progesterone receptor.

을 시행했으며 종양의 평균 크기는 3.0 cm였다. 병기분류 II인 경우가 97예(51.3%)로 가장 많았고, 림프절 전이 음성인 117예(61.6%)였다. 에스트로겐 수용체 양성률은 전체 175명 중에서 87예(49.7%)였고 프로게스테론 수용체 양성률은 171명 중에서 62예(36.2%)였다. 조직학적 등급은 2등급이 전체 84명 중 41예(48.8%)로 가장 많았다(Table 1).

194예의 유방암 중 HER-2/neu 유전자의 증폭은 44예(22.7%)에서 관찰되었다. HER-2/neu 유전자 증폭은 종양의 크기와 연관성이 없었다. 액와 림프절 전이가 있었던 76예 중 24예(31.6%)에서 HER-2/neu 유전자 증폭이 관찰되었고 액와 림프절 전이가 없었던 117예 중에서는 20예(17.1%)에서 HER-2/neu 유전자 증폭이 관찰되어 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($P=0.019$). 특히 림프절 전이가 11개 이상인 23예 중 13예(56%)에서 HER-2/neu 유전자 증폭이 관찰되어 림프절 전이 수에 따른 상관관계를 보였다. 조직학적 등급의 경우 1등급에서는 12.5%, 2등급 이상에서는 25.0%에서 HER-2/neu 유전자의 증폭이 관찰되었으나 유의성은 없었다(Table 2). 에스트로겐 수용체 양성인 경우 HER-2/neu 유전자 증폭이 수용체 양성에서 13.8%에서 관찰되었고 수용체 음성인 경우에는 35.2%에서 관찰되어, HER-2/neu 유전자 증폭이 있는 경우 에스트로겐 수용체 양성인 경우가 유의하게 낮았다($P=0.001$). 반면 프로게스테론 수용체 양성인 경우에서 HER-2/neu 유전자 증

폭이 18.9%에서 관찰되었고 수용체 음성에서는 30.3%로 관찰되어 유사한 결과를 보였지만 유의성은 없었다($P=0.086$, Table 2).

고 찰

HER-2/neu 유전자는 처음 생쥐에서 화학적으로 유도된 신경모세포종의 전환성 암유전자로 밝혀졌다.(22) 유방암의 10~30%에서 HER-2/neu 단백질이 과발현된다고 알려져 있으며, 이런 경우 약 90~95%에서 유전자의 증폭이 과발현의 직접적인 원인이 된다. HER-2/neu 유전자는 tyrosine kinase 활동을 가진 세포질 영역, 세포막 영역, 유방암 세포 표면에서 떨어져 나가는 것으로 보이는 세포외 영역으로 구성되어 있다. HER-2/neu 암유전자는 HER-2/neu를 과발현하는 암들의 임상적인 침습성에 관여할 것으로 생각된다.(23)

Yokota 등(24)은 인간에서 발생하는 침윤성 선암종에서 HER-2/neu 유전자가 증폭된다는 것을 발표하였다. 수술적 치료 후 조기 재발이 HER-2/neu 유전자 증폭과 연관되어 있으며 암의 크기 및 림프절 전이와 함께 임상적 경과에 독립적으로 영향을 미친다는 것을 1987년에 Slamon 등(5)이 유전자가 유방암에게 미치는 병리적, 임상적 의의로서 처음으로 발표하였다. 일본 연구에서는 HER-2/neu 유전자의 복제 개수가 림프절 전이가 있는 유방암에서 나쁜 경과를 보이는 것과 연관 있다고 발표하였다.(25,26)

HER-2/neu 암유전자 및 암단백질의 과발현과 기존의 예후인자들, 즉 연령, 종양의 크기, 조직학적 등급, 액와 림프절 전이 유무, 호르몬 수용체, DNA 배수성 등과의 관계에 대한 연구보고서는 많으나, 현재까지도 연관관계에 대한 일관성이 없어 논란이 있다. 현재 유방암에서는 환자의 경과 예측 및 치료를 선택할 때에 임상적으로 암 전이 정도와 액와 림프절 전이 정도 및 에스트로겐 수용체 유무가 가장 중요한 예후인자로 알려져 있다. 이에 저자들은 HER-2/neu 유전자의 증폭 정도 및 이러한 임상 병리학적 요인과의 연관성을 연구하고자 하였다.

국내에서는 Choi 등(27)이 한국의 젊은 유방암환자에 있어서 HER-2 유전자의 증폭 및 과발현이 47.5%로 높은 비율로 관찰된다고 보고한 바 있으며, Park 등(28)은 TMA를 이용한 FISH 검색으로 HER-2/neu 유전자의 증폭을 24~28%로 보고하였다. 본 연구에서는 194예의 유방암 조직 중에서 44예(22.7%)에서 HER-2/neu 유전자 증폭이 관찰되어 다른 연구들과는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

본 연구에서는 HER-2/neu 유전자 증폭은 림프절 전이 및 종양의 병기와 연관성이 있었으며, 에스트로겐 수용체의 양성률과 역상관계가 있었다. Rosenthal 등(29)은 153예의 유방암을 분석하여 림프절 전이가 없는 경우보다 림프절 전이가 있는 경우에서 HER-2/neu 유전자의 증폭이

Table 2. Association of HER-2/neu oncogene amplification with clinicopathologic parameters

		HER-2/neu status		P
		Not amplified (%)	Amplified (%)	
T stage (N=193)	0	7 (70.0)	3 (30.0)	>0.05
	1	33 (80.5)	8 (19.5)	
	over 2	109 (76.8)	33 (23.2)	
Lymph node (N=193)	0	97 (82.9)	20 (17.1)	0.000
	1~3	23 (88.5)	3 (11.5)	
	4~10	19 (70.4)	8 (29.6)	
	over 11	10 (43.5)	13 (56.5)	
TNM stage (N=189)	0	6 (85.7)	1 (14.3)	0.011
	I	32 (84.2)	6 (15.8)	
	II	80 (82.5)	17 (17.5)	
	III	28 (59.6)	19 (40.4)	
Tumor grade (N=84)	1	14 (87.5)	2 (12.5)	>0.05
	2, 3	51 (75.0)	17 (25.0)	
ER (N=175)	Negative	57 (64.8)	31 (35.2)	0.001
	Positive	75 (86.2)	12 (13.8)	
PR (N=172)	Negative	76 (69.7)	33 (30.3)	0.086
	Positive	43 (81.1)	19 (18.9)	

ER = estrogen receptor; PR = progesterone receptor.

높다고 보고한 바 있다. 또한 같은 연구에서 HER-2/neu 유전자의 증폭이 병기 1, 2 군보다 병기 3, 4 군에서 높다고 보고하였다.

종양 조직 내의 에스트로겐 수용체의 양은 유방암 환자의 치료 요법을 결정하는 데 매우 중요하다. HER-2/neu 유전자의 발현이 에스트로겐 수용체의 발현과 역상관계에 있으며, (30) HER-2/neu 과발현 유방암은 호르몬 치료에 저항성을 가지는 것으로도 보고되고 있다. (31) 300명의 환자를 대상으로 한 연구에서 호르몬 수용체 양성/HER-2/neu 과발현 양성인 전이성 유방암환자들이 호르몬 수용체 양성/HER-2/neu 과발현 음성인 환자들에 비해 반응이 적은 것으로 보고하였다. (32) 본 연구에서도 HER-2/neu 유전자 증폭은 에스트로겐 수용체와 역상관관계를 가지는 것으로 나타났다.

조직병리학적 분야에서 HER-2/neu 유전자의 증폭 및 단백질 과발현은 높은 조직학적 등급과 강한 상관관계가 있다고 보고되고 있다. (33,34) 본 연구에서도 조직학적 등급이 높을수록 HER-2/neu 유전자의 증폭이 높게 나타났으나 통계학적 유의성은 없었다. Tsuda 등 (34)은 조직학적 등급이 3인 침윤성 유방암에서 HER-2/neu 유전자 증폭이 흔히 관찰된다고 보고하였다. HER-2/neu의 변화는 종양의 크기나 림프절 전이와는 무관하며 조직학적 등급과 강한 상관관계를 가진다고 한다. (7) 따라서 현재 HER-2/neu 유전자의 증폭은 유방암의 전이보다는 침습성이 강한 종양세포 표현형을 만들어내는 데 관여한다고 생각된다. 그러나 HER-2/neu 유전자는 조직학적 등급 3인 침윤성 유방암의 30%에서만 관찰되기 때문에, p53 유전자 변형과 염색체 7q, 11p, 17p, 17q의 이형접합체의 소실 등과 같은 다른 유전자의 변형이 유방암의 침습성에 함께 관여하는 것으로 생각된다. (7)

TMA 분석은 유방암 전체 절편의 분석과 비교하여 적절하다고 알려져 있다. Zhang 등 (35)은 하나의 0.6 mm 크기의 조직이 전체 조직 절편을 대표할 수 있다고 보고하였다. 본 연구에서는 하나의 블록마다 3개씩의 조직을 채취함으로써 위양성이나 위음성 발생의 오류를 줄이고자 하였다.

결 론

유방암 조직에서 TMA를 구축하고, FISH를 이용한 HER-2/neu 유전자 증폭 결과의 분석이 효율적으로 이루어졌다고 판단된다. HER-2/neu 유전자 증폭은 림프절 전이, 종양의 병기와 연관성이 있었으며, 에스트로겐 수용체 양성율과는 역상관계가 있었다. 저자 등은 대량의 종양 조직을 대상으로 분자생물학적 인자의 분석에 있어 TMA의 유용성을 보고하는 바이며, 특히 유방암 조직에서 FISH를 통한 HER-2/neu 유전자 증폭의 분석은 예후 및 예

측인자로서 임상적으로 중요한 정보를 얻을 수 있다고 사료된다.

REFERENCES

- 1) Schechter AL, Hung MC, Vaidyanathan L, Weinberg RA, Yang-Feng TL, Francke U, et al. The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 1985;229:976-8.
- 2) Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 1986;319:226-30.
- 3) Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Senba K, Nomura N, Miyajima N, et al. Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 1986;319:230-4.
- 4) Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 1986;232:1644-6.
- 5) 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.
- 6) Clark GM, McGuire WL: Follow-up study of HER-2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res* 1991; 51:944-8.
- 7) Hitoshi T. Prognostic and predictive value of c-erbB-2 (HER-2/neu) gene amplification in human breast cancer. *Breast Cancer* 2001;8:38-44.
- 8) Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-12.
- 9) Birner P, Oberhuber G, Stani J, Reithofer C, Samonigg H, Hausmaninger H, et al. Evaluation of the United States Food and Drug Administration-approved scoring and test system of HER-2 protein expression in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:1669-75.
- 10) Elledge RM, Green S, Ciocca D, Pugh R, Alled DC, Clark GM, et al. HER-2 expression and response to tamoxifen in estrogen receptor positive breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Clin Cancer Res* 1998;4:7-12.
- 11) Berry DA, Muss HB, Thor AD, Dressler L, Liu ET, Broadwater G, et al. HER-2/neu and p53 expression versus tamoxifen resistance in estrogen receptor positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2000;18:3471-9.
- 12) Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Fuqua SAW, et al. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95: 353-61.
- 13) Stal O, Sullivan S, Wingren S, Skoog L, Rutqvist LE, Car-

- stensen JM, et al. C-erb-2 expression and benefit from adjuvant chemotherapy and radiotherapy of breast cancer. *Eur J Cancer* 1995;31A:2185-90.
- 14) Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, et al. C-erb-2 expression and response to adjuvant chemotherapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* 1994;330:1260-6.
- 15) Thor AD, Berry DA, Budman DR, Muss HB, Kute T, Henderson IC, et al. Erb-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:13456-60.
- 16) Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Yothers G, Park C, Wickerham DL, et al. HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol B-15. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1991-8.
- 17) Pietras RJ, Fendly BM, Chazin VR, Pegram MD, Howel SB, Slamon DJ. Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 1994;9:1829-38.
- 18) Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Patron V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-92.
- 19) Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER-2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999;17:2639-48.
- 20) Perez EA, Roche PC, Jenkins RB, Reynolds CA, Halling KC, Ingle JN, et al. HER2 testing in patients with breast cancer: poor correlation between weak positivity by immunohistochemistry and gene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Mayo Clin Proc* 2002;77:148-54.
- 21) Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature* 1998;4:844-7.
- 22) Padhy LC, Shih C, Cowing D, Finkelstein R, Weinberg KA. Identification of a phosphoprotein specifically induced by the transforming DNA of rat neuroblastomas. *Cell* 1982;28:865-71.
- 23) Choi DH, Lee MH, Ahn YH, Lee DW, Shin DB, Carter D, et al. Characteristics of HER-2/neu oncogene in Korean women with early-onset breast cancer by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Korean Breast Cancer Society* 2003;6:255-62.
- 24) Yokota J, Yamamoto T, Toyoshima K, Terada M, Sugimura T, Battifora H, et al. Amplification of c-erbB-2 oncogene in human adenocarcinomas in vivo. *Lancet* 1986;1:765-7.
- 25) Tsuda H, Hirohashi S, Shimoto Y, Hirota T, Tsugane S, Yamamoto H, et al. Correlation between long-term survival in breast cancer patients and amplification of two putative oncogene-coamplification units: hst-1/int-2 and c-erbB-2/ear-1. *Cancer Res* 1989;49:3104-8.
- 26) Tsuda H, Sakamaki C, Tsugane S, Fukutomi T, Hirohashi S. A prospective study of the significance of gene and chromosome alterations as prognostic indicators of breast cancer patients with lymph node metastases. *Breast Cancer Res Treat* 1998;48:21-32.
- 27) Choi DH, Shin DB, Lee MH, Lee DH, Dhandapani D, King BL, et al. A comparison of five immunohistochemical biomarkers and HER-2/neu gene amplification by fluorescence in situ hybridization in white and Korean patients with early onset breast carcinoma. *Cancer* 2003;98:1587-95.
- 28) Park KM, Han SW. A single institute's experience of standardization for the HER2 status by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry on a primary breast cancer tissue microarray. *J Kor Breast Cancer Soc* 2004;7:27-31.
- 29) Rosenthal SI, Depowski PL, Sheehan CE, Ross JS. Comparison of HER-2/neu oncogene amplification detected by fluorescence in situ hybridization in lobular and ductal breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002;10:40-6.
- 30) Wright C, Angus B, Nicholson S, Sainbury JR, Cairns J, Gullick WJ. Expression of c-erbB-2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res* 1989;49:2087-90.
- 31) Newby JC, Johnston SR, Smith IE, Dowsett M. Expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 during the development of tamoxifen resistance in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3:1643-51.
- 32) Leitzel K, Teramoto Y, Konrad K, Chinchilli VM, Grossberg H, Harvey H, et al. Elevated serum c-erbB-2 antigen levels and decreased response to hormone therapy of breast cancer. *J Clin Oncol* 1995;13:1129-35.
- 33) Berger MS, Locher GW, Saurer S, Gullick WJ, Waterfield MD, Groner B, 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;48:1238-43.
- 34) Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, Hirota T, Tsugane S, Watanabe S, et al. Correlation between histologic grade of malignancy and copy number of c-erbB-2 gene in breast carcinoma. A retrospective analysis of 176 cases. *Cancer* 1990;65:1794-800.
- 35) Zhang DH, Salto-Tellez M, Putti TC, Do E, Koay ES. Reliability of tissue microarrays in detecting protein expression and gene amplification in breast cancer. *Mod Pathol* 2003;16:79-85.