

## ORIGINAL ARTICLE

ADVIA Centaur<sup>®</sup>TM Automated Immunoassay  
을 이용한 유방암 환자의 혈청 Her-2/neu 검사와  
면역화학염색법을 이용한 Her-2/neu 소견과의  
관련성이정선 · 민원기 · 박은화 · 임우성 · 최성림 · 손병호 · 김성배<sup>2</sup> · 안진희<sup>2</sup> · 안세현울산대학교 의과대학 서울아산병원 외과학교실 · <sup>1</sup>진단검사의학교실 · <sup>2</sup>종양내과학교실Correlation between the Her-2/neu Status as Determined by Immunohistochemical Analysis and the Serum Her-2/neu Concentration as Determined by the Use of ADVIA Cencaur<sup>®</sup> Automated Immunoassay in Breast Cancer PatientsJung-Sun Lee, Won Ki Min<sup>1</sup>, Eun Hwa Park, Woo-Sung Lim, Sung-Lim Choi, Byung-Ho Son, Sung-Bae Kim<sup>2</sup>, Jin-Hee Ahn<sup>2</sup>, Sei-Hyun AhnDepartments of Surgery, <sup>1</sup>Laboratory Medicine, and <sup>2</sup>Oncology, University of Ulsan, College of Medicine and Asan Medical Center, Seoul, Korea

**Purpose:** Serum Her-2/neu is extracted from the extracellular domain of the Her-2/neu tyrosine kinase to serum. We evaluated the correlation between the Her-2/neu status as determined by immunohistochemical analysis (IHC) and the serum Her-2/neu concentration in a population of Korean women with breast cancer.

**Methods:** Serum Her-2/neu levels were examined from 254 female patients with primary breast cancer and 38 patients with metastatic breast cancer. Serum Her-2/neu levels were measured by the use of a chemiluminescence immunoassay (ADVIA centaur<sup>®</sup> system) during the preoperative period. The level of Her-2/neu in all of the breast cancer tissue samples was determined by IHC, and samples with an IHC grade +2 were subject to fluorescence in situ (FISH). When tissue samples exhibited IHC grade +3 or showed amplification of Her-2/neu as determined by FISH analysis, Her-2/neu was considered overexpressed. The cut-off value for serum Her-2/neu level was 10.2 ng/mL.

**Results:** The mean serum Her-2/neu level was 10.1 ng/mL in primary breast cancer samples. The serum Her-2/neu concentration significantly correlated with expression of Her-2/neu as determined by tissue IHC analysis (grade 1/3,  $9.33 \pm 1.7$  ng/mL; grade 2/3,  $8.89 \pm 1.6$  ng/mL; grade 3/3,  $12.37 \pm 4.0$  ng/mL,  $p < 0.001$ ). Increased serum HER-2/neu levels were associated with the lymph node status ( $p = 0.003$ ) and hormone unresponsiveness ( $p < 0.001$ ), tumor size ( $p < 0.01$ ) and age group ( $p < 0.001$ ). In metastatic breast cancer samples, the mean serum Her-2/neu level was 13.6 ng/mL. Elevated serum Her-2/neu levels were seen in 71.7% of metastatic breast cancer samples. The serum Her-2/neu level correlated with expression of Her-2/neu in metastatic tissue as determined by IHC analysis ( $p < 0.001$ ) rather than with the Her-2/neu status of the primary breast cancer ( $p = 0.16$ ).

**Conclusion:** Serum Her-2/neu appears to be correlate with tissue Her-2/neu expression in primary and metastatic breast cancer where Her-2/neu is overexpressed. Further studies to determine levels of serum Her-2/neu are required to determine cutoff values and the clinical application of the finding for breast cancer patients in Korea.

책임저자 : 안세현

137-736 서울시 송파구 풍납동 388-1, 울산의대 서울아산병원 외과

Tel: 02-3010-3490, Fax: 02-474-9027

E-mail : ahnsh@amc.seoul.kr

접수일 : 2008년 1월 21일 게재승인일 : 2008년 6월 2일

\*본 연구는 2007년도 한국유방건강재단이 실시하는 일반과제 연구지원으로 시행되었음.

Key Words : Her-2/neu, Breast cancer, Immunohistochemistry

중심단어 : Her-2/neu, 유방암, 면역조직화학검사

## 서 론

Her-2/neu 유전자는 인체의 17번 염색체에 위치하며, 185 kDa 크기의 세포막 성장인자 수용체 단백질의 발현을 담당한다. 세포 내 신호전달 체계에서 신호의 증폭을 통해 세포의 증식과 분화에 관여한다. Her-2/neu 종양단백의 구조는 세포 내 tyrosine kinase 영역, 막 통과영역, 세포 외 영역으로 구성되어 있다. 암 조직에서 Her-2/neu 종양 유전자의 증폭과 Her-2/neu 종양 단백질의 과발현은 유방암, 난소암, 폐암, 위암 등의 예후와 예측 인자로 알려져 있다. 특히 유방암 환자에서 항암화학요법의 치료 반응을 예측할 수 있을 뿐만 아니라, 항암내분비요법의 내성과 연관있는 것으로 알려져 있다. (1) Her-2/neu 수용체에 대한 단클론 항체인 trastuzumab의 전이성 유방암에 대한 치료효과가 알려지면서 치료 대상을 선택하기 위해 Her-2/neu 상태를 평가하는 것은 중요해지기 시작하였다.

유방암의 Her-2/neu를 검사하는 방법은 유전자 수준부터 혈청 단백질 검사까지 다양하다. 임상적으로 주로 사용되는 방법은 면역 조직 화학 검사법(Immunohistochemistry)과 형광동소교잡법(Fluorescence in-situ hybridization, FISH)이 있다. (2, 3) Her-2/neu 검사를 조직면역화학검사방법으로 하는 경우, 상피내암인 경우 34%, 상피내암을 동반한 침윤성 암인 경우 17%, 침윤성 암인 경우 12%에서 Her-2/neu 과발현을 발견할 수 있다. (4) 면역조직화학검사는 Her-2/neu 세포막단백질에 대한 항체를 이용하는 방법으로 비교적 쉽고 간단하며 저렴하여 널리 사용되고 있지만, 세포막 염색의 강도를 판정함에 있어 객관성이 부족하여 임상적인 적용에 신중을 가해야 한다. 형광동소교잡법은 Her-2/neu 유전자 탐침을 이용하여 증폭된 유전자를 형광 발색시켜 그 결과를 확인하는 방법으로 객관적인 결과를 얻을 수 있으나, 비용이 많이 드는 문제가 있어 사용에 제한이 있다.

혈청 내 Her-2/neu 세포외도메인을 측정하는 검사방법이 개발되면서 혈청을 이용한 검사의 유용성에 관한 연구가 진행되어 왔다. 1991년 Narita 등(5)이 최초로 유방 양성 질환과 원발성, 전이성 유방암에서 혈청 Her-2/neu를 ELISA방법으로 측정한 이후 최근 Her-2/neu 세포외도메인을 정량적으로 측정하는 ADVIA centaur<sup>®</sup> TM automated immunoassay이 개발되게 되었다. 현재 유방암 환자에서 혈청 Her-2/neu 측정의 관심은 예후인자, (6, 7) 항호르몬 치료 반응의 예측인자, (8, 9) 항암치료의 치료 반응에 대한 예측인자로서의 역할에 대한 것이다. (12, 13) 이 외에도 종양 표지자로서, 조기 재발진단을 위한 연구들도 있다. (14)

국내에서도 유방암 발생증가와 Her-2/neu에 대한 관심이 증가되면서 혈청 Her-2/neu 연구에 관한 연구가 최근 증가되고

있다. Kim 등(15)은 ADVIA centaur<sup>®</sup> TM automated immunoassay을 이용하여 건강한 한국 여성 200명의 혈청 Her-2/neu를 검사하여 정상 참고치 5.6-12.0 ng/mL, 정상 한계치를 12.0 ng/mL로 보고하였다. Kong 등(16)도 동일한 검사방법으로 원발성 유방암 86명과 건강한 여성 93명을 검사하였고, 정상한계치를 10.2 ng/mL로 보고하였다. 원발성 유방암 86명의 환자 중 정상한계치 이상으로 혈청 Her-2/neu가 상승한 경우는 5명 (6%)이었다. 조직면역화학검사와 형광동소교잡법을 이용한 Her-2/neu 상태와 혈청Her-2/neu의 관련성은 보이지 않았다.

본 저자는 한국인 원발성, 전이성 유방암의 평균 혈청 Her-2/neu와 Her-2/neu 상승과 관련된 임상병리학적 소견 및 면역조직화학검사를 이용한 Her-2/neu 결과와 관련성을 알아보고자 연구를 실시하였다.

## 방 법

### 1. 연구 기간 및 대상

서울 아산병원에서 2007년 4월 1일부터 9월 30일까지 유방암 수술 및 진단을 받은 원발성 유방암 환자 254명과 재발한 환자 38명을 대상으로 하였다.

원발성 유방암 환자들은 모두 침윤성 유방암이었다. 외부병원에서 절제 생검을 받거나 수술 전 유도항암요법을 받은 환자는 제외되었다. 원발성 유방암 환자의 경우 수술 후 조직 병리학적 검사를 통하여 종양의 크기, 전이된 림프절 갯수, 다발성 유방암 여부, 조직 등급, 핵 등급, 림프혈관성 침범, 조직학적 아형을 검사하였고, 면역조직화학염색을 통하여 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, Her-2/neu, p53 검사를 시행하였다. 조직 내 Her-2/neu 과발현의 기준은 면역조직화학염색에서 3등급이거나, 2등급이며 형광동소교잡법에서 유전자 증폭이 나타난 경우로 정의하였다.

종양의 크기는 침윤성 유방암의 크기로 정하였으며, 조직학적 아형은 WHO 분류에 따라 1) 침윤성 유선암(Invasive ductal carcinoma, NOS), 2) 침윤성 소엽암(Invasive lobular carcinoma), 3) 기타 mucinous, tubular, papillary carcinoma, 4) Extensive intraductal component (EIC) 80% 이상이 상피내암인 침윤성 암종, 5) 미세유두암종으로 분류하였다.

재발한 환자는 수술 후 재발까지의 기간, 전이된 장기의 수, 원발암의 조직 병리학적 소견을 조사하였고, 재발 당시 조직검체를 얻을 수 있는 환자들의 Her-2/neu와 혈청 Her-2/neu, 원발성 유방암 진단 시 Her-2/neu를 상호 비교하였다. 재발 양상을 국소 구역재발과 전신 전이, 국소 구역재발과 전신 전이가 동시에 일어난 경우로 나누어 혈청 Her-2/neu와 관련성을 조사하였다.

## 2. 면역조직화학검사

각 증례의 파라핀 포매 조직에서 조직 소견을 대표하는 부위를 현미경으로 확인하고, 그 부위에서 직경 3 mm 크기의 편치를 이용하여 조직을 얻어 한 블록당 30예의 조직을 배역하였다. 파라핀에 포매되어 있는 조직 블록을 4  $\mu$ m 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시켜 탈파라핀화 및 함수과정을 거쳐 증류수로 세척한 후 10 mm 구연산완충액(citrate buffer, pH 6.0)에 넣고 Microwave에서 15분간 끓인 뒤 트리스 완충액(Tris buffer)으로 세척한 뒤 3% 과산화 수소로 10분간 처리하였다. 다시 트리스 완충액으로 세척하고 정상역제 혈청에 20분간 반응시킨 후 상품화된 Her-2/neu 검사 kit (DAKO HerceptTest™, Milan, Italy)로 실온에 2시간 동안 반응시켰다. 트리스 완충액으로 세척한 후 streptavidin-peroxidase를 실온에서 30분간 처리하였다. 세척 후 발색제 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)를 8분간 처리하여 발색시킨 후 헤마톡실린으로 대조 염색하여 봉입하였다.

결과는 암세포의 세포막의 염색 정도에 따라서 점수를 매겨 판정하였으며, 전체 암세포 중에서 10% 미만이 염색되는 경우는 0으로 판정하였고, 10% 이상의 세포가 염색되는 경우 세포막 일부가 염색되는 경우 1+, 세포막 전체가 중등도로 염색되는 경우 2+, 세포막 전체가 강하게 염색되는 경우를 3+로 하였고, 3+ 이상의 결과를 양성으로 판정하였다. 2+인 경우는 FISH를 통하여 Her-2/neu 유전자의 증폭을 검사하였다.

호르몬 수용체는 Benchmark automatic immunostaining device (Ventana medical system, Tucson, USA)를 사용하며 에스트로겐 수용체(1:50 dilution; Donna, Seoul, Korea), 프로게스테론 수용체(1:100 dilution; Donna)에 대한 항체로 염색하였고, 판독은 핵염색 강도와 비율에 따라 각각 0-3으로 나누어 점수를 매긴 뒤 그 두 점수를 합하여 최종 점수를 판정하였다. 0점은 음성, 1-3점은 약양성, 4-5점은 중증도 양성, 6-7점은 강양성으로 정하였고, 호르몬 수용체 양성은 에스트로겐 수용체 또는 프로게스테론 수용체가 4점 이상인 경우로 정하였다.

## 3. Her-2/neu 유전자 증폭을 위한 FISH 검사

파라핀에 포매되어 있는 조직 블록을 4  $\mu$ m 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시키고, 탈파라핀화 및 함수과정을 거쳐 상용화된 Her-2 DNA probe kit (Vysis inc, Downers Grove, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 실험을 진행하였다. 우선 희석된 wash buffer로 2분간 처리한 후 95-99°C에서 pretreatment solution으로 10분간 처리를 하고 wash buffer로 3분간 2회 세척하였다. Pepsin Reagent를 10분간 처리한 후 wash buffer로 3분간 2회 세척한 후 탈수시켰다. Her-2/CEN-17 probe mix를 82°C에서 5분간 처리한 후 45°C humidified hybridization

chamber에서 14-20시간 동안 배양한 후 stringent wash buffer로 65°C에서 10분간 처리하였다. 다시 wash buffer로 3분간 2회 세척한 후 탈수시키고 DAPI (4'-6-diamidine-2-phenylindole)가 포함된 형광 봉입제용액을 슬라이드에 적용한 후 판독하였다. 정상세포에서는 17번 염색체의 동원체부위에 CEN-17 DNA probe가 결합하여 1-2개의 녹색 형광신호를 보이고, Her-2 유전자 부위에서 Her-2 DNA probe와 결합하여 1-2개의 붉은 형광신호를 보이는데, Her2/CEN-17비가 2보다 큰 경우 HER2 유전자 증폭이 있는 것으로 판단하였다.

## 4. 혈청 Her-2/neu 검사

혈청 Her-2/neu 검사는 특이적으로 결합하는 두 개의 단 클론 항체를 사용한 직접 화학 발광 면역 분석법에 의한 two-site Sandwich assay이다. 두 개의 항체는 Lite 시약에 있는 AE에 표지된 항체 monoclonal mouse antibodies (TA-1)과 fluorescein conjugate 시약에 있는 fluorescein에 표지된 monoclonal mouse antibody (NB-3)이다. 이 두 항체는 Her-2/neu 세포외도메인에 특이적으로 결합한다. Solid phase는 정제된 anti-fluorescein monoclonal mouse capture antibody로 구성되어 있으며 이 항체는 Matrix Metalloprotease (MMP)와 공유 결합하여 산과 염기가 분주되어 화학반응을 일으킨다. 원발성 유방암 환자는 수술 전, 전이성 유방암 환자는 방사선학적, 조직학적 재발이 확인된 뒤 SST tube에 5 cc 정도 채혈하여 Chemiluminescence immunoassay (ADVIA centaur® system, Bayer Healthcare, Chicago, USA) 검사를 시행하였다. 정상 한계치는 외부 병원에서 동일한 방법으로 검사한 원발성 유방암 환자의 정상 한계치(10.2 ng/mL)로 정하였다.

## 5. CA 15-3 측정

혈청 CA15-3은 원발성 유방암인 경우 수술 전 검사를 시행하였고, 전이성 유방암인 경우 진단 당시 채혈하여 ELISA (ES300/Elecsys 2010; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)를 이용하여 측정하였다. 상용 중인 대조혈청(Preci controls; Roche Diagnostics)과 비교하여 오차는 6% 미만으로 정하였다. CA 15-3 농도는 정상한계치 30 U/L로 하여 정량화하였다.

## 6. 통계 분석

통계처리는 SPSS 10.0 통계 프로그램을 이용하였으며, 유의수준은  $p < 0.05$  이하로 하였다. 혈청 Her-2/neu와 호르몬 수용체, 액와부 림프절 전이, 나이 및 핵 등급 등과의 관련성은 chi-square test를 이용하였다. 전이성 유방암 환자인 경우 Fisher exact 검정법을 이용하였다. 종양의 크기, CA15-3 등과 같은

연속형 변수는 student t-test를 이용하여 계산하였다. 면역조직화학검사를 이용한 Her-2/neu 상태와 혈청 Her-2/neu의 ROC 곡선을 구하여 정상 한계치 10.2 ng/mL의 특이도와 민감도를 구하였다.

## 결 과

### 1. 원발성 유방암 환자 및 병리학적 특징

환자의 평균 연령은  $48.8 \pm 9.7$  (27-81)세이며, 연령군별 분류로는 35세 미만 환자가 4.3% (11명), 35세 이상 50세 미만 환자가 58.7% (149명), 50세 이상인 환자가 37% (94명)를 차지하였다. 폐경 이전 환자는 188명(74%), 폐경 후 환자는 66명(26%)이었다.

Table 1. Clinicopathologic finding of primary breast cancer

Clinicopathologic finding		Number of patients (%)
Stage	I	100 (39.4)
	II	105 (41.3)
	III	49 (19.3)
Operation method	BCO	124 (48.3)
	MRM	121 (47.6)
	MRM+Reconstruction	9 (3.5)
Her-2/neu (IHC)	0/3	117 (46.1)
	1/3	44 (17.3)
	2/3	33 (13.0)
	3/3	60 (23.6)
Her-2/neu (FISH) (Number of total patients=63)	No amplification	54 (85.7)
	Amplification	9 (14.2)
LN metastasis	-	147 (57.9)
	+	107 (42.1)
Hormone receptor	Negative	76 (29.9)
	Positive	178 (70.1)
Lymphovascular invasion	-	186 (73.2)
	+	68 (26.8)
Nuclear grade	1	9 (3.5)
	2	146 (57.5)
	3	99 (39.0)
Histology	Invasive ductal carcinoma, NOS	196 (77.2)
	Invasive lobular carcinoma	5 (2.0)
	Mucinous ca/tubular carcinoma	8 (3.1)
	Invasive ductal carcinoma with predominant intraductal component	41 (16.1)
	Invasive ductal carcinoma with Micropapillary component	4 (1.6)

IHC=immunohistochemistry; FISH=fluorescent in situ hybridization; BCO=breast conserving operation; MRM=modified radical mastectomy; LN=lymph node; NOS=not otherwise specified.

었다. 동시성 양측성 유방암은 10명(3.9%)이며, 가족력이 있는 경우는 11명(4.3%), 다발성 유방암은 51명(20.1%)이었다. 평균 유방암의 크기는  $2.12 \pm 1.3$  cm이고, 1기가 100예(39.4%), 2기가 105예(41.3%), 3기가 49예(19.3%)이었다. 림프절 전이가 있는 경우가 107예(42.1%)였으며, 호르몬 수용체 양성인 경우는 178예(70.1%)이었다. 면역조직화학검사상 Her-2/neu 과발현 또는 형광 동소교잡법에서 Her-2/neu 증폭이 있는 경우는 69예(27.1%)이었다. 림프혈관 침윤이 있는 경우는 68예(26.8%)이며, 핵 등급이 3등급인 경우는 99예(39.0%)이었다. 평균 CA 15-3은  $9.3 \pm 5.98$  U/L이었다(Table 1).

### 2. 원발성 유방암의 혈청 Her-2/neu의 분포

평균 혈청 Her-2/neu는 10.11 ng/mL (3.3-33.0 ng/mL)이며, 정상 한계치 미만인 환자 수는 149명(58.7%)이며, 이상인 경우는 105명(41.3%)이었다(Fig 1).

### 3. 원발성 유방암의 면역조직검사를 통한 Her-2/neu 결과와 혈청 Her-2/neu의 관련성

면역조직화학검사를 통한 조직 내 Her-2/neu 발현강도와 혈청 내 Her-2/neu 농도와 상관관계가 있었다( $p < 0.001$ ) (Table 2, Fig 2). 그러나 면역조직화학검사와 동소교잡법을 이용하여 Her-2/neu 과발현 유무와 구분한 경우 과발현이 없는 환자의 30.8% (57예)에서 정상한계치 이상을 보이며, 과발현이 있는 환자의 30.4% (21예)에서 정상한계치 이하를 보였다(Table 3). ROC 곡선을 통하여 조직 내 Her-2/neu 과발현 유무를 예측하는 혈청 Her-2/neu의 민감도와 특이도는 각각 74.0%, 69.1%이었다(Fig 3).

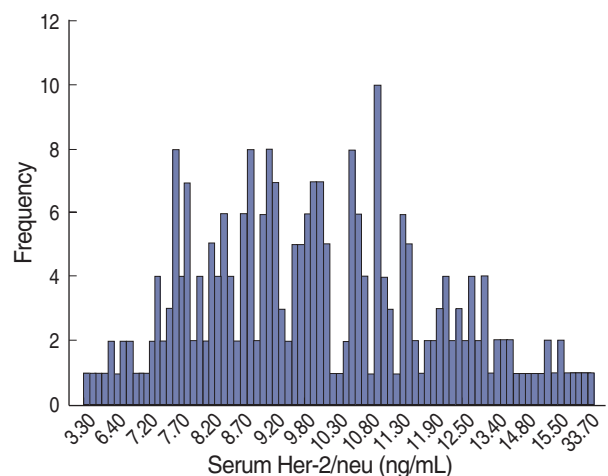


Fig 1. Distribution of serum Her-2/neu in primary breast cancer patients.

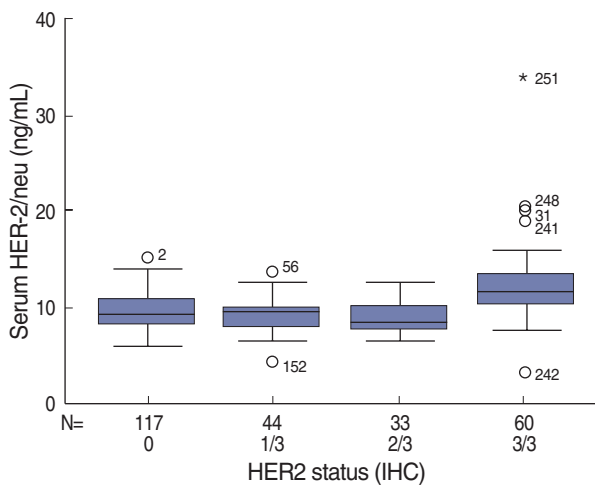


**Table 2.** Correlation between serum Her-2/neu concentration and Her-2/neu status (IHC)

Her-2/neu (IHC)	No. of patients	Mean of serum Her-2/neu (ng/mL)	SD	p-value*
0/3	117	9.59	1.7	<0.001
1/3	44	9.33	1.7	
2/3	33	8.89	1.6	
3/3	60	12.37	4.0	
Total	254	10.11	2.7	

IHC=immunohistochemistry.

\*ANOVA test.

**Fig 2.** Distribution of serum Her-2/neu according to tissue Her-2/neu analysis (IHC) with grade 0/3 (n=117), grade 1/3 (n=44), grade 2/3 (n=33), and grade 3/3 (n=60). The means (SD) were as follows: grade 0/3, 9.5 (1.7) ng/mL; grade 1/3, 9.3 (1.7) ng/mL; grade 2/3, 8.8 (1.6) ng/mL; grade 3/3, 12.3 (4.0) ng/mL. There was significant difference between groups ( $p<0.001$ ).

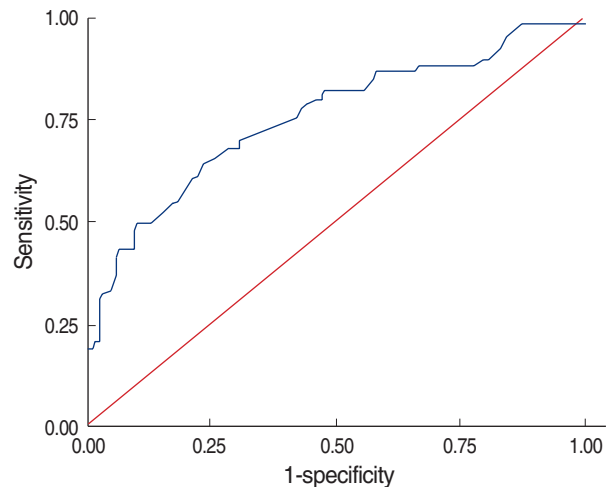
#### 4. 혈청 Her-2/neu와 임상병리학적 소견과의 관련성

연령군별로 분류할 때 젊은 연령의 여성에서( $p<0.001$ ), 환자의 폐경 여부에 따라 구분할 때 폐경 후 환자에서 혈청 Her-2/neu가 상승되었다( $p<0.001$ ).

액와 림프절 전이가 있는 경우( $p=0.032$ ), 종양의 크기가 클수록( $p<0.01$ ), 호르몬 수용체 음성( $p<0.001$ ), 핵 등급이 고등급일수록( $p<0.001$ ), CA15-3이 높을수록( $p=0.047$ ) 통계학적으로 유의하게 혈청 Her-2/neu가 높았으며, 림프 혈관성 침윤유무( $p=0.20$ )와는 관련성이 없었다(Table 4). 조직학적 아형에 따라서는 미세 유두암종을 포함한 침윤성 유방암 환자가 적은 수이기 는 하지만 평균 혈청 Her-2/neu 수치가  $17.7 (\pm 10.80)$  ng/mL로 4명의 모든 환자가 정상 한계치 이상이었다(Table 5).

**Table 3.** Distribution of tissue Her-2/neu overexpression according to cutoff value

		Serum Her-2/neu (%)		Total
		<10.2 ng/dL	≥ 10.2 ng/dL	
Her-2/neu overexpression	-	128 (69.2)	57 (30.8)	185
	+	21 (30.4)	48 (69.3)	69
Total		149	105	254

**Fig 3.** ROC curve of serum Her-2/neu ECD concentration for differentiation of tissue Her-2/neu overexpression. AUC for serum Her-2/neu ECD was 0.73 (95% confidence interval; 0.66-0.80).

#### 5. 재발 암의 임상병리학적 특징

평균 나이는 46세이며, 평균 무병 생존기간은 35.1개월이었다. 원발암 당시 유방보존수술을 받은 환자는 12명(31.6%), 유방절제술을 받은 환자는 25명(65.8%), 수술적 치료를 거부한 환자는 1명(2.6%)이었다. 병기별 분류는 0기인 환자가 3명(7.9%), 1기는 6명(15.8%), 2기는 16명(42.1%), 3기는 8명(21%), 4기는 5명(13.1%)이었다.

재발 양상은 국소구역재발만 있는 경우는 20명(52.6%), 전신 전이와 동반된 경우는 16명(42.1%), 전신전이만 있는 경우는 2명(5.3%)이었다. 국소 구역 재발로 수술이 가능한 환자는 15명(39.5%)이었다.

재발한 병소에서 얻은 검체로 면역조직화학검사를 시행 가능한 환자는 21명으로 Her-2/neu의 발현이 3등급인 경우는 8명(21.2%)이었다. 진단 당시 종양 표지자인 CA15-3의 평균은 8.56 U/L로, 정상 한계치 이상 상승된 경우는 없었다.

#### 6. 재발 암의 혈청 Her-2/neu 검사

평균 혈청 Her-2/neu 수치는 13.6 ng/mL이며, 정상 한계치

**Table 4.** Correlation of serum Her-2/neu concentration and clinicopathologic variables

	Number of patients	Serum Her-2/neu (ng/mL) (Mean $\pm$ SD)		p-value
Age				<0.001 <sup>†</sup>
<35	11	12.4	7.5	
35-50	149	9.5	2.3	
>50	94	10.6	2.1	
Menopausal status				0.003*
Pre	188	9.8	2.8	
Post	66	10.9	2.2	
LN metastasis				0.032*
-	147	9.8	3.1	
+	107	10.5	2.2	
Hormone receptor status				<0.001*
-	76	11.4	3.6	
+	178	9.5	2.0	
LVI				0.20*
-	186	9.9	2.8	
+	68	10.4	2.7	
NG				<0.001 <sup>†</sup>
1	9	8.1	1.2	
2	146	9.8	2.9	
3	99	10.6	2.5	
HG				0.015 <sup>†</sup>
Unknown	3	8.6	1.2	
1	6	8.5	0.9	
2	146	9.7	3.0	
3	99	10.7	2.4	

LN=lymph node; LVI=lymphovascular invasion; NG=nuclear grade; HG=histologic grade.

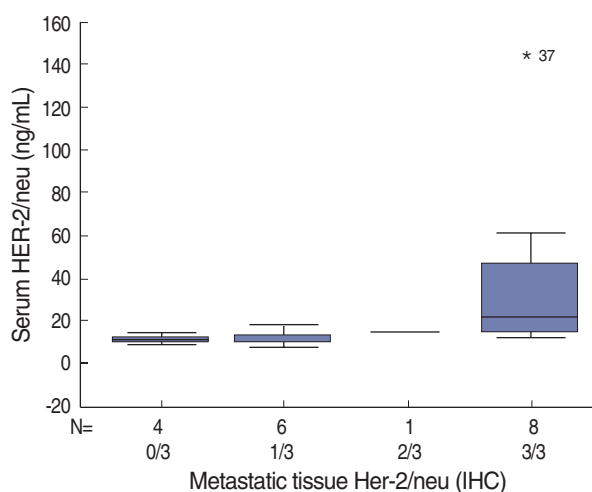
\*chi-square test; <sup>†</sup>ANOVA test.

이상인 경우는 27명(71.1%)이었다. 재발양상에 따른 혈청 Her-2/neu 수치의 분포를 보면 국소 구역 재발한 환자 중 60%, 전신 전이를 동반한 환자 중 83.3%가 한계치 이상으로 상승되었다. 원발성 유방암과 재발 암의 조직 내 Her-2/neu 검사 결과를 모두 아는 경우는 18명으로 이 중 원발성 유방암과 재발 암의 Her-2/neu 결과가 동일한 경우는 61.1%이며, 원발성 유방암에서 Her-2/neu가 3등급인 10명의 환자 중 2명(20%)은 재발 시 과발현이 나타나지 않았다. 원발성 유방암 당시 과발현이 없는 환자 중에서 재발 시 Her-2/neu 과발현이 나타난 경우는 없었다. 전이성 유방암 환자에서 혈청 Her-2/neu는 원발성 유방암과 재발 암 조직 내 Her-2/neu 과발현과 상관관계는 원발성 유방암 당시 Her-2/neu 발현여부와는 상관이 없었고( $p=1.66$ ), 재발 암인 경우 재발한 조직 내 Her-2/neu 발현 여부와 관련이 있었다( $p<0.001$ ) (Table 6, Fig 4). 재발 병소와 혈청 Her-2/neu 관련성을 보면 국소 구역 재발한 암보다 다발성 장기 전이를 보이는 경

**Table 5.** Correlation of Serum Her-2/neu concentration according to tumor subtype

Subtype	No. of patients	Serum Her-2/neu (ng/mL) (Mean $\pm$ SD)	SD
IDC	196	9.9	2.1
ILC	5	8.9	2.5
Tubular/mucinous carcinoma	8	9.2	1.1
IDC with predominant intraductal component	41	10.2	3.1
Micropapillary carcinoma	4	17.7	10.8

SD=standard deviation; IDC=invasive ductal carcinoma; ILC=invasive lobular carcinoma.



**Fig 4.** Serum Her-2/neu ECD concentration according to tissue Her-2/neu status in 18 patients with metastatic breast cancer with grade 0/3 (n=4), grade 1/3 (n=6), grade 2/3 (n=1), and grade 3/3 (n=8). The means (SD) were as follows: grade 0/3, 10.9 (1.8) ng/mL; grade 1/3, 11.13 (3.7) ng/mL; grade 2/3, 13.9 ng/mL; grade 3/3, 40.2 (16.1) ng/mL. There was significant difference between groups ( $p<0.001$ ).

우에서 높게 상승되었다. 전이성 조직 내 Her-2/neu 과발현이 있는 9명 중 모두 혈청 Her-2/neu 상승을 보였으나 전이 병소 조직 내 Her-2/neu 발현이 없는 9명의 환자 중 4명에서 혈청 Her-2/neu가 상승되었다.

## 고 찰

Her-2/neu 종양 유전자의 증폭에 따른 Her-2/neu 종양단백의 과발현은 유방암 환자의 25-30%에서 나타난다. (17) Her-2/neu 종양 유전자 및 단백질의 검사방법에는 유전자 증폭을 측정하는 방법, mRNA의 전사를 측정하는 방법, Her-2/neu 수용체 단백질을 측정하는 방법, Her-2/neu의 세포외도메인을 측정

**Table 6.** Comparison of Her-2/neu status (IHC) between primary breast cancer and metastatic site with serum Her-2/neu

Case	Her-2 (IHC) in primary	Metastatic site	Her-2 (IHC) in metastasis	Serum Her-2 (ng/mL)
1	2+	Breast	0	9.1
2	3+	Ipsilateral axilla	0	11.2
3	0	Breast	0	13.4
4	1+	Breast	1+	
5	2+	Breast	1+	6.9
6	3+	Ipsilateral SCLN, axilla	1+	9.3
7	0	Ipsilateral SCLN	1+	10.0
8		Axilla	1+	13.7
9	0	Breast	1+	17.4
10	2+	Breast	2+	13.9
11	3+	Ipsilateral IMLN	3+	11.8
12	3+	Breast	3+	13.6
13	3+	Breast	3+	14.5
14	3+	Lung, liver, bone	3+	15.5
15	3+	Chest wall, liver	3+	26.7
16	3+	Liver, bone	3+	32.7
17	3+	Chest wall	3+	61.2
18	3+	Ipsilateral axilla, SCLN, liver	3+	146.1

IHC=immunohistochemistry; SCLN=supraclavicular lymph node; IMLN=internal mammary lymph node.

하는 방법이 있다. Her-2/neu 수용체 단백질 발현을 정량 또는 정성 측정하는 방법은 면역조직화학검사법이나 western blot에 의해 측정이 가능하며, 보존 조직에서 항 Her-2/neu 항체에 의한 면역조직화학검사법이 가장 보편적으로 사용되는 방법이다. 혈액 내 순환하는 Her-2/neu 세포외도메인을 측정하는 방법은 효소면역측정법(EIA)과 CLIA법이 개발되어 자동분석기로 측정이 가능하다. (18)

혈청 Her-2/neu 세포외도메인을 검사하는 방법은 조직을 이용한 검사가 일회성이라는 점에 비해 반복적으로 검사를 할 수 있으며, 객관적인 판독이 어려운 조직면역화학검사와는 달리 정량적인 측정이 가능하며, 종양이 제거된 후에도 검사가 가능하다는 장점을 가지고 있다. 혈청 Her-2/neu 세포외도메인을 검사하는 방법은 6가지 알려져 있다. 전이성 유방암 환자의 치료와 추적 관찰의 목적으로 미국 FDA로부터 승인을 받은 방법은 Automated Lummo-IHER-2/neu test (Bayer Health Care, Tarrytown, USA), Oncogene Science manual microtiter plate Her-2/neu test (Oncogene science, Cambridge, USA), ADVIA Cencaur® Her-2/neu assay (Bayer Health Care)로, 세 가지 방법 모두 Her-2/neu에 위치한 NB-3와 TA-1에 대한 단쇄 포균 항체를 이용하여 혈청에서 97-115 kDa의 Her-2/neu 세포외도메인을 정량적으로 측정한다. (19) 이 방법으로 검사한 기준결과는 정상 한계치를 15.0 ng/mL로 보았으며, 혈청 Her-2/neu가 한계치 이상 상승하는 경우는 원발성 유방암에서 10% 미만, 전이성 유방암에서는 50% 이상에서 나타났다. (20)

혈청 Her-2/neu의 임상적인 적용에 대한 다양한 연구가 있다. Isola 등(21)은 Her-2/neu 과발현 유방암 환자에서 질병의 진행 정도를 추적 관찰하는 데 이용할만하다고 하였고, 진행성 유방암과 조기 유방암에서 불량한 예후와 관련이 있다고 하였다. 전이성 유방암 환자의 고용량 항암치료할 때 혈청 Her-2/neu가 상승된 경우(15.9개월)는 이하인 경우(29.8개월)보다 통계적으로 유의하게 전체 생존율이 낮았다. 혈청 Her-2/neu가 15 ng/mL 이상 증가한 전이성 유방암 환자에서는 호르몬 요법의 반응률이 23%로 정상 혈청 값을 가진 환자들의 반응률이 45%인 것에 비해 낮았으며, 치료 반응의 평균 기간, 치료 실패까지 걸리는 시간 및 평균 생존율이 모두 감소하였다. (22) Trastuzumab 치료 시, 혈청 내 Her-2/neu는 trastuzumab의 생물학적 작용에는 직접적인 영향을 미치지 않으면서 혈청 Her-2/neu가 높을 경우에 trastuzumab의 치료 효과가 큰 것으로 나타났다. 또한 trastuzumab 치료 과정 중 혈청 Her-2/neu 검사치의 변화를 측정한 결과 유방암의 임상진행과정과 일치함으로써 치료 효과를 판단하고 예측하는데 이용할 수 있게 되었다. (23)

혈청 Her-2/neu, carcinoembryonic antigen (CEA), CA 15-3의 유용성에 관한 연구에서, 완치되었던 원발성 유방암 환자 200명을 1-4년(평균 2.2년)간 추적 관찰한 결과 89명의 환자에서 전이가 나타났는데 그 중 정상 한계치 이상으로 측정값이 상승한 경우는 Her-2/neu는 28%, CEA 30%, CA 15-3은 47%였다. 전이가 나타난 경우에서 국소 부위 재발을 제외하고 원격전이만 고려했을 경우에는 Her-2/neu의 민감도는 31%까지 높게

나타났고, 이때 세 검사법의 전체 민감도는 76%였다. 종양표지자인 CA 15-3과 CEA를 함께 조사하면 민감도와 특이도가 증가된다고 하며, Her-2/neu 과발현이 있는 환자에서는 혈청 Her-2/neu가 전이를 초기에 진단하는데 유용하다고도 하였다.(24)

전이성 유방암에서 혈청 Her-2/neu 수치는 종양의 부피와 관련있다. 국소 구역 재발인 경우 다른 종양 표지자들의 진단적 민감도는 낮은 반면, 혈청 Her-2/neu는 국소 구역재발 및 전신전이 모두에서 관련성을 보인다. 국소 구역재발만 있는 경우와 전신전이가 동반된 경우 혈청 Her-2/neu의 상승 빈도는 각각 19%, 68%이었다.(25)

원발성 유방암에서 수술 전 혈청 Her-2/neu와 관련된 인자로 병기, 종양의 크기, N stage, 림프혈관성 전이 여부, 조직학적 등급이었고, 환자의 폐경여부, 유방암의 세부 분류, 호르몬 수용체 여부 등과 관련이 없다고 하였다.(26) Molina 등(27)은 원발성 유방암에서는 종양의 크기와 액와부 림프절 전이와는 관련이 없고 호르몬 수용체 음성과 관련이 있다고 하였다. 국소재발과 진행성 유방암에서는 혈청 Her-2/neu와 종양의 크기(5 cm 이상), 림프절 전이(3개 이상의 전이)와 관련이 있다고 하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다.

국내에서 시행된 혈청 Her-2/neu에 관한 연구는 건강한 여성의 혈청 Her-2/neu 참고치를 알기 위해 ADVIA Cencaur<sup>®</sup> Her-2/neu assay 검사법을 이용하여 혈청 Her-2/neu를 측정하였는데 이들이 산출한 Her-2/neu의 참고치 범위의 상한치는 12.0 ng/mL였다. 이 검사 방법의 제작회사인 Bayer Health Care 에서 제시하고 여러 외국연구에서 사용한 참고치의 상한선인 15.0 ng/mL와 차이가 있었다. 또한 연령별 참고치 범위가 차이가 있어, 20대가 6.1-10.9 ng/mL, 30대가 5.3-11.4 ng/mL, 40대가 5.0-12.5 ng/mL, 그리고 50대가 6.3-12.6 ng/mL이었다.(15) 본 연구는 원발성 유방암의 혈청 Her-2/neu와 조직면역화학검사를 이용한 Her-2/neu 검사 결과의 관련성을 보여준 국내 최초 보고이다. 적은 수의 전이성 유방암 환자가기는 하나, 기존의 연구가 전이성 유방암 환자의 전이성 조직을 얻기 어려운 경우 원발성 암조직 내 Her-2/neu를 이용한 것에 비해, 본 연구에서는 전이성 조직 내 Her-2/neu 상태와 혈청 Her-2/neu와의 관련성을 보고하였다.

본 연구는 원발성 유방암의 정상한계치를 국립암센터의 연구 결과를 토대로 10.2 ng/mL로 조사하였는데, (16) 원발성 유방암의 혈청 Her-2/neu가 상승한 경우는 41.3%로 국립암센터의 6%와는 많은 차이를 보여 환자군의 차이가 없는 상황에서 기관간의 차이가 발생한 점에 대해서도 추가적인 연구가 시행되어야 할 것으로 생각된다. 또한 원발성, 전이성 유방에서 특이도가 낮은 검사로 면역조직화학검사를 이용한 Her-2/neu 상태를 예측

하는 검사로는 한계가 있으며, 아직까지는 혈청 Her-2/neu 검사값에 제한적인 의미를 두는 것이 필요하다.

원발성 유방암과 재발성 유방암의 조직을 모두 조사할 수 있는 환자의 비율이 높고, 정도화된 면역조직화학검사 및 형광 동소교잡법을 시행할 수 있는 장점이 있는 본 연구기관에서 여러 임상영역에서 혈청 Her-2/neu의 유용성을 연구할 수 있으리라 본다.

## 결론

ADVIAR centaur<sup>®</sup>TM automated immunoassay를 이용한 혈청 Her-2/neu 검사는 정상 한계치를 10.2 ng/mL로 볼 때, 원발성 유방암의 면역조직화학검사를 이용한 Her-2/neu 상태를 특이도 69.1%, 민감도 74.0%로 예측할 수 있었다. 혈청 Her-2/neu 상승은 젊은 연령에 발병한 경우, 종양의 크기가 클수록, 액와 림프절 전이가 있는 경우, 호르몬 수용체 음성인 경우와 관련이 있었다. 전이성 유방암에서는 혈청 Her-2/neu는 원발암의 Her-2/neu 상태보다는 전이성 조직의 Her-2/neu 상태와 관련성이 있었다.

## 참고문헌

1. Ross JS, Fletcher JA. The Her-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cell* 1998; 16:413-28.
2. Lal P, Salazar PA, Hudis CA, Ladanyi M, Chen B. Her-2 testing in breast cancer using immunohistochemical analysis and fluorescence in situ hybridization. *Am J Clin Pathol* 2004;121:631-6.
3. Schaller G, Evers K, Papadopoulos S, Ebert A, Buhler H. Current use of Her2 test. *Ann Oncol* 2001;12:S97-100.
4. Narita T, Funahashi H, Satoh Y, Takashi H. C-erbB2 protein in sera of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1992;24:97-102.
5. Ali SA, Leitzel K, Chinchilli VM, Engle L, Demers L, Harvey HA, et al. Relationship of serum Her-2/neu and serum CA 15-3 in patients with metastatic breast cancer. *Clin Chem* 2002;48:1314-20.
6. Harris LN, Liotcheva V, Broadwater G, Ramirez MJ, Maimonis P, Anderson S, et al. Comparison of methods of measuring HER-2 in metastatic breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001;19:1698-706.
7. Hayes DF, Yamauchi H, Broadwater G, Cirincione CT, Rodrigue SP, Berry DA, et al. Circulating HER-2/erbB-2/c-neu (HER-2) extracellular domain as a prognostic factor in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:2703-11.



8. Yamauchi H, O'Neil A, Gelman R, Carney W, Tenny D, Hosch S, et al. Prediction of response to antiestrogen therapy in advanced breast cancer patients by pretreatment circulating levels of extracellular domain of the HER-2/c-neu protein. *J Clin Oncol* 1997;15:2518-25.
9. Classen S, Kopp R, Possinger K, Weidenhagen R, Eiermann W, Wilmanns W. Clinical relevance of soluble c-erbB2 for patients with metastatic breast cancer predicting the response to second line hormone or chemotherapy. *Tumor Biol* 2002;23:70-5.
10. Muller V, Witzel I, Pantel K, Krenkel S, Luck HJ, Neumann R, et al. Prognostic and predictive impact of soluble epidermal growth factor receptor (sEGFR) protein in the serum of patients treated with chemotherapy for metastatic breast cancer. *Anticancer Res* 2006;26:1479-87.
11. Mehta RR, McDermott JH, Heiken TJ, Marler KC, Patel MK, Wild LD, et al. Plasma c-erbB2 levels in breast cancer patients: Prognostic significance in predicting response to chemotherapy. *J Clin Oncol* 1998;16:2409-91.
12. Schoendorf T, Hoopmann M, Warm M, Neumann R, Thomas A, Gohring UJ, et al. Serologic concentrations of HER-2/neu in breast cancer patients with visceral metastasis receiving trastuzumab therapy predict the clinical course. *Clin Chem* 2002;48:1360-2.
13. Hoopmann M, Neumann R, Tanasale T, Schondorf T, HER-2/neu determination in blood plasma of patients with HER-2/neu overexpressing metastatic breast cancer; a longitudinal study. *Anticancer Res* 2003;23:1031-4.
14. Isola JJ, Holli K, Oksa H, Teramoto Y, Kallioniemi OP. Elevated erbB2 oncoprotein levels in preoperative and follow-up serum samples define an aggressive disease course in patients with breast cancer. *Cancer* 1994;73:652-8.
15. Kim JW, Kim SY, Lee HS, Woo HD, Son DM, Lim CW, et al. Establishment for reference range of serum Her-2/neu in Korean healthy women. *J Breast Cancer* 2006;9:301-8.
16. Kong SY, Kang JH, Kwon Y, Kang HS, Chung KW, Kang SH, et al. Serum Her-3 concentration in patient with primary breast cancer. *J Clin Pathol* 2006;59:373-6.
17. Watanabe N, Miyamoto Y, Tokuda Y, Kubota M, Ando Y, Tajima T, et al. Serum c-erbB2 in breast cancer patients. *Acta Oncol* 1994;33:901-4.
18. Carney WP, Neumann DR, Lipton A, Leitzel K, Ali S, Price CP. Potential clinical utility of serum Her-2/neu oncoprotein concentrations in patients with breast cancer. *Clin Chem* 2003;49:1579-98.
19. Cook GB, Neaman IE, Goldblatt JL, Cambetas DR, Hussain M, Luftner D, et al. Clinical utility of serum Her-2/neu testing on the Bayer Immuno 1 automated system in breast cancer. *Anticancer Res* 2001;21:1465-70.
20. Brandt-Rauf PW, Pincus MR, Carney WP. The c-erbB2 protein in oncogenesis: molecular structure to molecular epidemiology. *Crit Rev Oncog* 1994;5:313-29.
21. Isola JJ, Holli K, Okasa H, Teramoto Y, Kallioniemi OP. Elevated erbB-2 oncoprotein levels in preoperative and follow-up serum samples define an aggressive disease course in patients with breast cancer. *Cancer* 1994;73:652-58.
22. Willsher PC, Beaver J, Pinder S, Bell JA, Ellis EO, Blamey RW, et al. Prognostic significance of serum c-erbB2 protein in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1996;40:251-5.
23. Kostler WJ, Schwab B, Singer CF, Neumann R, Rucklinger E, Brodowicz T, et al. Monitoring of serum HER-2/neu predicts response and progression-free survival to trastuzumab-based treatment in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:1618-24.
24. Molina R, Jo J, Zanon G, Filella X, Farrus B, Munoz M, et al. Utility of C-erbB2 in tissue and in serum in the early diagnosis of recurrence in breast cancer patients: comparison with carcinoembryonic antigen and CA15.3. *Br J Cancer* 1996;74:1126-31.
25. Anderson TI, Paus E, Nesland JM, McKenzie SJ, Borresen AL. Detection of c-erbB2 related protein in sera from breast cancer patients. *Acta Oncologica* 1995;34:499-504.
26. Imoto S, Kitoh T, Hasebe T. Serum c-erbB2 levels in monitoring operable breast cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1999;29:336-9.
27. Molina R, Jo J, Filella X, Zanon G, Pahisa J, Munoz M, et al. C-erbB2 oncoprotein in the sera and tissue of patients with breast cancer. Utility in prognosis. *Anticancer Res* 1996;16:2295-300.