

위선암에서 Heregulin과 ErbB Family 단백질 발현과 임상·병리학적 예후인자와의 상관관계

성균관대학교 의과대학 강북삼성병원 외과, ¹고려대학교 의과대학 병리학교실

류창학 · 이주한¹ · 최종상¹

목적: Heregulin은 erbB3와 erbB4의 리간드로 작용한다. 그러나 위암에서 이들 단백질의 역할에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 저자들은 위암에서 heregulin과 erbB family 단백질 발현 빈도를 알아보고 이들 단백질 발현과 임상·병리학적 예후인자와 비교하고자 한다.

대상 및 방법: Tissue microarray와 면역조직화학염색 방법을 이용하여 heregulin과 erbB 단백질 발현을 검사하였다. 251예의 위암을 조기위암, 진행성 위암, 림프절 전이 여부 등에 따라 구분하였다.

결과: Heregulin, erbB1, erbB2, erbB3, erbB4 단백질은 각각 64%, 68%, 6%, 88%, 76%로 발현되었다. Heregulin, erbB2, erbB3, erbB4 단백질은 장형에서 더 높은 발현을 보였다. Heregulin과 erbB4 단백질은 진행성 위암에서 발현이 낮아졌다. ErbB2 단백질은 진행성 위암에서 발현이 증가되었다. Heregulin과 erbB family 단백질은 생존율과는 상관관계가 없었다. Heregulin과 erbB3 혹은 heregulin과 erbB4 단백질이 동시에 발현되는 군은 장형과 초기 병변에 더 많았다.

결론: Heregulin, erbB3, erbB4 단백질들은 주로 위암 초기 병변에 관여하는 것으로 추정된다.

중심 단어: 위암, Heregulin, ErbB family, 면역조직화학염색

서 론

ErbB family는 erbB1 (EGFR, HER1), erbB2 (HER2/neu), erbB3 (HER3), 그리고 erbB4 (HER4)로 구성되며, 모두 단량체 형태로 존재하는 transmembrane 단백질이다. ErbB family는 공통적으로 extracellular ligand-binding domain, transmembrane portion, intracellular protein tyrosine kinase domain을 가지고 있으며, epidermal growth factor (EGF), heregulin 등의 여러 리간드(ligand)들과 반응하여 세포 신호전달을 활성화시키고, 세포증식 및 이온통로 조절 등의 변화를 일으킨다.

다.(1) ErbB family는 구조적 유사성에도 불구하고, 서로 다른 독자적인 리간드에 반응한다. ErbB1은 EGF와 반응하나, erbB3와 erbB4는 heregulin에 반응한다.(2,3)

Heregulin은 여러 가지 다른 이름으로도 불리는데, Holmes 등(4)은 MDA-MB-231 유방암 세포주에서 추출하여 heregulin이라 명명하였고, Wen 등(5)은 H-Ras-transformed rat fibroblast에서 추출하여 neu differentiation factor (NDF)라고 명명하였다. Heregulin은 가용성(soluble)으로 분비되는 44-kDa의 성장인자로서 erbB3와 erbB4의 리간드로 기능할 뿐 아니라, erbB2와 heterodimer를 형성할 수도 있다.(3,6) Heregulin은 다양한 생물학적 기능을 유발하는 것으로 알려져 있는데 erbB receptor와 조직의 조합에 따라 세포 증식, 세포 분화 및 세포자멸사(apoptosis) 등에 관여하는 것으로 보고되고 있다.(7-9)

암종에서 heregulin과 erbB3 혹은 erbB4의 상호작용이 종양의 성장과 관련이 있다는 연구도 있으나, 아직 많은 부분이 밝혀져 있지 않다.(10-12) 최근에는 heregulin이 세포질에서의 역할 뿐 아니라, 핵에서 전위(translocation)되거나 축적되는 과정에서 erbB family와는 상관없이 독자적으로 종양 발생에 관여하는 것으로 보고되는 등 아직도 heregulin과 erbB family에 대해서는 많은 연구가 필요하다.(13)

위암에서도 heregulin과 erbB family에 대한 연구는 주로 erbB1과 erbB2에 대해 이루어져왔으나, erbB3와 erbB4에 대한 연구는 드물다.(14-25) Heregulin, erbB3, erbB4 단백질 등이 위암에서 발현이 증가되었다는 보고가 있으나,(24,25) 단백질 발현 정도와 위암의 임상·병리학적 예후인자들을 서로 비교한 연구는 아직 없다. 본 실험은 위암에서 erbB family (erbB1, erbB2, erbB3, erbB4) 단백질 발현과 erbB3와 erbB4의 리간드인 heregulin 단백질 발현을 면역조직화학적 방법으로 검사하여, 임상·병리학적 예후인자와 비교하고자 한다.

방 법

1) 연구재료

나이, 병기 등의 임상 기록은 병력지를 검토하여 조사하였다. 5년 생존율과 비교를 위하여 고려대학교 안암병원과

책임저자: 최종상, 서울특별시 성북구 안암동 5가 126-1
고려대학교 의과대학 병리학교실, 136-705
Tel: 02-920-6145, Fax: 02-953-3130
E-mail: jongchoi0404@naver.com

접수일 : 2006년 7월 24일, 게재승인일 : 2006년 7월 28일

구로병원에서 외과에서 근치적 수술을 받고 수술한 지 5년
이 지난 환자 중 추적조사가 가능한 환자를 대상으로 하였

다. 위암 환자 중 림프절 전이가 없는 조기위암 45예, 림프
절 전이가 있는 조기 위암 42예, 림프절 전이가 없는 82예,

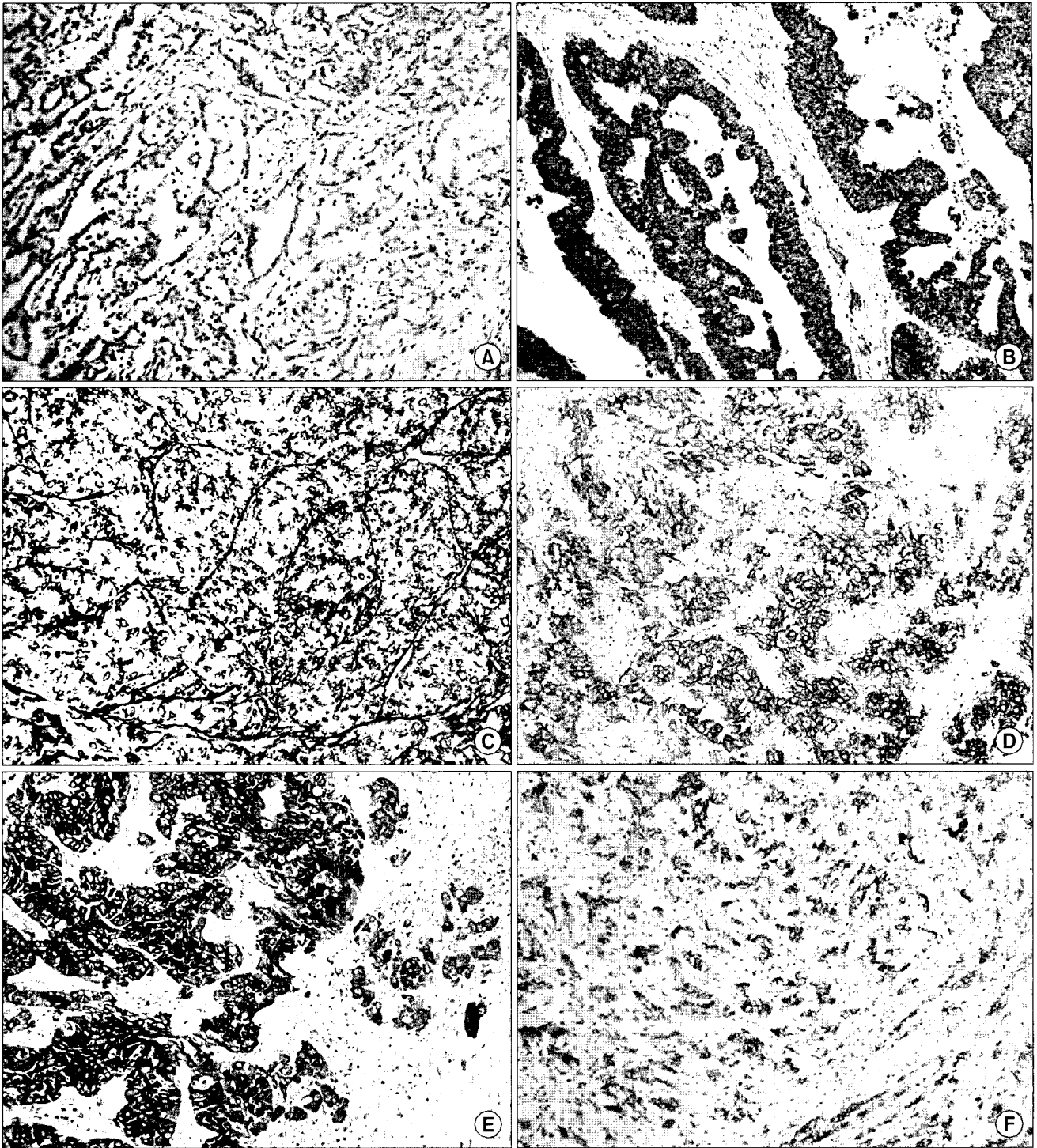


Fig. 1. Expression of heregulin and erbB4 proteins. (A) Negative expression of heregulin in gastric cancer (Heregulin immunoperoxidase stain, $\times 200$). (B) Positive expression of heregulin in gastric cancer (Heregulin immunoperoxidase stain, $\times 200$). (C) Positive expression of erbB1 in gastric cancer (ErbB1 immunoperoxidase stain, $\times 200$). (D) Positive expression of erbB2 in gastric cancer (ErbB2 immunoperoxidase stain, $\times 200$). (E) Positive expression of erbB3 in gastric cancer (ErbB3 immunoperoxidase stain, $\times 200$). (F) Positive expression of erbB4 in gastric cancer (ErbB4 immunoperoxidase stain, $\times 200$).

그리고 전이가 있는 진행성 위암 82예 등 총 251예를 대상으로 하였다.

2) 연구방법

(1) 임상조건: 연구대상 환자들의 병력지를 이용하여 조사하였다. 병변의 발생부위, 크기, 침윤정도 및 림프절 침윤 여부는 병리 검사보고서로 조사하였다. 임상병기는 TNM stage를 이용하였다.(26)

(2) 병리조직학적 검색: 종양의 조직학적 유형 분류는 Lauren의 분류(27)에 따라 암세포가 선구조를 형성하는 장형(intestinal type)과 미만성으로 침윤하는 미만형(diffuse type)으로 구분하였다.

(3) Tissue Micro-Array: 위선암 예의 병리 조직 슬라이드를 검경하여 적절한 부위를 선정하고 해당 파라핀 블록에서 trephine apparatus (Superbiochips Laboratories, Seoul, Korea)를 이용하여 직경 2 mm의 core tissue 생검편을 tissue array block에 옮겼다. 60편의 조직을 담은 각 tissue array block 6개를 만들었다. Core area에서 적어도 10% 이상이 위선암 부위인 것을 적정한 것으로 정의하였다. 각 블록에는 위점막의 체부, 진정부의 비종양성 점막을 포함하였고, 각 블록을 4 μm로 박절하고 파라핀을 제거한 후 탈수시켰다.

(4) 면역조직화학 검사: 4 μm 두께로 박절한 조직을 pH 7.6 Tris 완충액으로 수세 후 3% 과산화수소에 5분간 작용시켜 내인성 peroxidase의 작용을 차단시킨 후, Tris 완충액

으로 수세 및 정상 염소혈청으로 5분간 작용시켜 비특이적인 단백질결합을 차단하였다. Heregulin (7D5, 1 : 100, Neomarker, CA, USA), erbB1 (E-30, 1 : 200, DAKO, Denmark), erbB2 (polyclonal, 1 : 100, Zymed, CA, USA), erbB3 (SGP1, 1 : 20, Neomarker, CA, USA), erbB4 (polyclonal, 1 : 100, Neomarker, CA, USA) 단백질에 대한 일차항체를 40°C에서 20분간 반응시켰다. 다시 pH 7.6 Tris 완충액으로 수세한 후 biotin이 부착된 이차항체를 40°C에서 10분간 반응시킨 후 Tris 완충액으로 세척하고 streptavidin-peroxidase와 10분간 반응시켰다. Tris 완충액으로 세척하고 3-amino-9-ethyl carbazole로 발색시킨 후 10% Mayer's hematoxylin으로 대조염색하고 수세하였다.

(5) 면역조직 결과 판독(Fig. 1): Heregulin 단백질은 주로 세포질에서 점과 비슷한(dot-like) 형태로 발현되었는데, 위 점막에서는 내분비세포(endocrine cell)와 장 화생(intestinal metaplasia) 부위에서 발현되고 다른 세포에서는 발현되지 않았다. ErbB family (erbB1, erbB2, erbB3, erbB4) 단백질들은 주로 세포막을 따라 발현되었으나, 일부 세포에서는 세포질 내에서도 발현되었다. 위 점막에서 erbB2 단백질은 발현되지 않았으나, erbB1 단백질은 장화생 부위에서 발현되었고, erbB3와 erbB4 단백질은 주세포(chief cell)와 장 화생 부위에서 발현되었다. Heregulin과 erbB family 단백질에 대한 면역조직화학 검사 결과는 종양세포의 5% 미만이 염색된 경우는 음성으로, 5% 이상이 염색된 경우는 양성으로 판독하였다.

Table 1. Heregulin, erbB1, erbB2, erbB3, and erbB4 expression according to clinicopathologic parameters

Expression (total number)	Heregulin		ErbB1		ErbB2		ErbB3		ErbB4	
	Negative (n=90)	Positive (n=161)	Negative (n=81)	Positive (n=170)	Negative (n=235)	Positive (n=16)	Negative (n=30)	Positive (n=221)	Negative (n=61)	Positive (n=190)
Lauren classification										
Intestinal type	36 (40%)	99 (62%)	45 (56%)	90 (53%)	122 (52%)	13 (81%)	11 (37%)	124 (56%)	11 (18%)	124 (65%)
Diffuse type	54 (60%)	62 (38%)	36 (44%)	80 (47%)	113 (48%)	3 (19%)	19 (63%)	97 (44%)	50 (82%)	66 (35%)
P value	0.001		0.698		0.034		0.045		0.000	
Tumor depth										
EGC	20 (22%)	67 (42%)	30 (37%)	57 (34%)	84 (36%)	3 (19%)	10 (33%)	77 (35%)	13 (21%)	74 (39%)
AGC	70 (78%)	94 (58%)	51 (63%)	113 (66%)	151 (64%)	13 (81%)	20 (67%)	144 (65%)	48 (79%)	116 (61%)
P value	0.002		0.585		0.179		0.871		0.013	
Lymph node metastasis										
Negative	47 (52%)	81 (50%)	42 (52%)	86 (51%)	125 (53%)	3 (19%)	17 (57%)	111 (50%)	30 (49%)	98 (52%)
Positive	43 (48%)	80 (50%)	39 (48%)	84 (49%)	110 (47%)	13 (81%)	13 (43%)	110 (50%)	31 (51%)	92 (48%)
P value	0.771		0.851		0.015		0.509		0.744	
pTNM stage										
I, II	58 (64%)	120 (75%)	60 (74%)	118 (69%)	174 (74%)	4 (25%)	23 (77%)	155 (70%)	37 (61%)	141 (74%)
III, IV	32 (36%)	41 (25%)	21 (26%)	52 (31%)	61 (26%)	12 (75%)	7 (23%)	66 (30%)	24 (39%)	49 (26%)
P value	0.093		0.448		0.000		0.461		0.044	

EGC = early gastric cancer; AGC = advanced gastric cancer.

(6) 통계학적 분석: 통계 처리는 window용 SPSS version 10.0 프로그램을 이용하여 면역화학검사 결과와 Lauren 분류, 침윤정도, 림프절 전이 유무 및 임상병기와의 관계분석은 Cochran's와 Mantel-Haenszel 방법을 이용하여 검정하였다. 단백발현 차이에 따른 환자의 생존기간은 Kaplan-Meyer 법으로 구하였고, log-rank test를 이용하여 차이를 검정하였다. 모든 통계분석에서 P값이 0.05 이하일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

환자의 나이는 평균 56.9세였으며, 남자가 165명, 여자가 86명이었다. 장형이 135예, 미만형은 116예였다. 생존 추적 결과 추적 관찰 기간 평균값은 62개월이었으며, 94명(37%)이 사망하였고 157명(63%)이 생존하였다. 생존한 환자의 평균 추적기간은 71.4개월이었고, 사망한 환자의 평균 추적기간은 23.9개월이었다.

1) 단백 발현과 임상병리 인자와의 관계(Table 1)

위선암에서 heregulin 단백질은 161예가 양성으로 발현되었

Table 2. Prognostic significance of heregulin and erbB family expression by univariate analysis

	Number of death (n)	Months of survival (mean)	P value
Heregulin			0.071
Negative (n=90)	40	62.5	
Positive (n=161)	54	76.0	
ErbB1			0.649
Negative (n=81)	29	74.0	
Positive (n=170)	65	71.3	
ErbB2			0.138
Negative (n=235)	85	73.0	
Positive (n=16)	9	54.0	
ErbB3			0.092
Negative (n=30)	14	59.6	
Positive (n=221)	80	73.9	
ErbB4			0.151
Negative (n=61)	27	65.7	
Positive (n=190)	67	74.3	

Table 3. Clinicopathologic characteristics in coexpression of 'heregulin+erbB3' and 'heregulin+erbB4'

	Heregulin and erbB3		Heregulin and erbB4	
	Negative or one positive group (n=99)	Coexpression group (n=152)	Negative or one positive group (n=116)	Coexpression group (n=135)
Lauren type				
Intestinal (n=135)	40 (40%)	95 (63%)	41 (35%)	94 (70%)
Diffuse (n=116)	59 (60%)	57 (37%)	75 (65%)	41 (30%)
P value		0.001		0.000
Depth				
EGC (n=87)	24 (24%)	63 (41%)	26 (22%)	61 (45%)
AGC (n=164)	75 (76%)	89 (59%)	90 (78%)	74 (55%)
P value		0.006		0.000
Lymph node metastasis				
Negative (n=128)	51 (52%)	77 (51%)	59 (51%)	69 (51%)
Positive (n=123)	48 (48%)	75 (49%)	57 (49%)	66 (49%)
P value		0.894		0.969
Clinical stages				
I, II (n=178)	66 (67%)	112 (74%)	73 (63%)	105 (78%)
III, IV (n=73)	32 (33%)	28 (26%)	43 (37%)	30 (22%)
P value		0.232		0.010
Month of survival (mean)	61.0	75.7	65.2	78.3
P value		0.087		0.008

EGC = early gastric cancer; AGC = advanced gastric cancer.

고, erbB1 단백질은 170예가 양성으로 발현되었으며, erbB2 단백질은 16예가 양성으로 발현되었다. ErbB3 단백질은 221예가 양성으로 발현되었고, erbB4 단백질은 190예가 양성으로 발현되었다. Heregulin, erbB2, erbB3, erbB4 단백질은 미만형에 비해 장형에서 발현이 많았고, 이는 통계학적으로 유의하였다 ($P=0.001, 0.034, 0.045, 0.000$). Heregulin과 erbB4 단백질은 진행성 위암에서 발현이 감소되었다($P=0.002, p=0.013$). ErbB2 단백질은 림프절 전이가 있는 예에서 통계학적으로 유의하게 발현이 증가하였다($P=0.015$). ErbB4 단백질은 높은 병기에서 발현이 감소되는 양상을 보이는 반면($P=0.044$), erbB2 단백질은 병기가 높아질수록 발현이 증가되는 경향을 보였다($P=0.000$).

2) 단백질 발현에 따른 생존율(Table 2)

Heregulin과 erbB family 단백질 발현과 생존율과는 통계학적으로 유의한 상관관계가 없었다.

3) Heregulin과 erbB3 단백질이 동시에 발현되는 군의 임상병리학적 특징(Table 3)

152예(61%)에서 heregulin과 erbB3 단백질이 동시에 발현되었다. Heregulin과 erbB3 단백질이 동시에 발현된 예들은 통계학적으로 유의하게 장형에 많았고($P=0.001$), 조기위암에 더 높은 빈도를 보였다($P=0.005$). 그러나 림프절 전이, 임상병기 및 생존율과는 상관관계가 없었다.

4) Heregulin과 erbB4 단백질이 동시에 발현되는 군의 임상병리학적 특징(Table 3)

135예(54%)에서 heregulin과 erbB4 단백질이 동시에 발현되었다. Heregulin과 erbB4 단백질이 동시에 발현된 예들은 통계학적으로 유의하게 장형에 많았고($P=0.001$), 조기위암에 더 높은 빈도를 보였으며($P=0.001$), 임상병기가 낮은 예에서 더 높은 빈도를 보였고($P=0.010$), 생존율이 높았다($P=0.008$).

고 찰

위암에서 종양 진행의 생물학적 예측인자를 찾아내는 것은 환자의 치료 및 예후에 매우 중요하다. 특히 최근 분자생물학의 발전은 맞춤치료의 가능성을 높이고 있는데, 그 대표적인 물질들이 erbB family이다. 폐암에서 erbB1을 block시킬 수 있는 다양한 항암제들이 임상 시험을 진행하고 있으며, 유방암에서는 erbB2 signal에 관여하는 Herceptin이 erbB2 발현이 높은 환자 치료에 사용되고 있다.(28,29) 위암에서 Herceptin을 사용한 예들이 보고는 되고 있으나, 아직 그 효과가 명확하지 않다.(30) 또한 위암에서 상대적으로 erbB family에 대한 연구가 적으며, 주로 erbB1과 erbB2 단백질에 국한되어 왔다.(14-23) 따라서 저자들은 위암에서 heregulin과 erbB family 단백질의 발현 양상을 알아보고 이를 임상·병리학적 예후인자들과 비교하고자 하였다.

위암에서 erbB1 단백질 발현이 강할수록 나쁜 예후와 관련이 있다는 보고들이 많으나,(14-17) 예후와 상관이 없다는 연구 결과도 있다.(18) 본 연구 결과 erbB1 단백질 발현과 임상·병리학적 예후인자와는 상관관계가 없어 위암의 진행과 erbB1 단백질 발현 사이에는 더 많은 연구가 필요함을 시사하였다. 위암에서 erbB2 단백질 발현은 비교적 많은 연구가 이루어졌다.(19-23) Yonemura 등(19)은 260예의 위암에서 약 12%가 양성으로 발현된다고 보고하였고, Ougolkov 등(21)은 간 전이가 있는 위암 환자에서 erbB2 단백질이 높게 발현되어, erbB2 단백질 과발현이 있는 군은 전이가 발생할 가능성이 높다고 제시하였다. Vizoso 등(22)은 위암에서 erbB2 단백질 발현이 미만형보다는 장형에서 발현이 증가하였고, erbB2 단백질 발현이 증가할 경우 생존율이 유의하게 감소하였다고 보고하였다. 본 연구에서도 유사한 결과를 얻었는데, erbB2 단백질 발현은 장형에 많았고, 림프절 전이가 있는 예에 많았으며, 높은 임상 병기에 많았다.

위암에서 erbB3와 erbB4 단백질 및 이들 단백질의 리간드인 heregulin 단백질에 대한 연구는 드물다. Noguchi 등(24)은 위암 세포주에서 erbB3가 발현되는 것을 western blot과 RT-PCR로 관찰하였다. Kataoka 등(25)은 정상 위 조직에서 heregulin, erbB3, erbB4 mRNA가 발현되는 것을 RT-PCR로 확인하고, 위암 조직에서 erbB4 단백질이 발현되는 것을 면역조직화학 염색으로 확인하였다. 그러나 이들 단백질 발현과 위암 환자의 임상·병리학적 예후인자를 서로 비교한 연구는 아직 없다.

저자들은 본 연구를 통해 위암에서 heregulin, erbB3, erbB4 단백질 발현이 각각 64%, 88%, 76%로 높게 나타남을 확인하였다. 이러한 높은 발현율로 볼 때 위암의 발생과정 및 진행에 이들 단백질이 관여할 가능성이 높으며, 이들 단백질을 목표로 한 새로운 치료 방법이 가능함을 시사한다. 그러나 한 종양에서 erbB family receptor가 여러 개 발현된다는 것은 위암이 다른 암종에 비해 erbB family와 이와 관련된 리간드가 훨씬 복잡하게 관여하고 있을 가능성이 높음을 의미한다. 즉 위암의 erbB family를 이용한 치료는 폐암이나 유방암과는 달리 multiple erbB receptors를 차단해야만 효과가 있음을 시사한다고 할 수 있어 이후 더욱 많은 추가적인 연구가 필요하다.

이들 단백질 발현과 임상·병리학적 예후인자를 비교한 결과, heregulin, erbB3, erbB4는 미만형에 비해 장형에서 발현이 많았고, 이는 통계학적으로 유의하였다. 정상 위 조직에서도 장 화생이 발생하면 이들 단백질의 발현이 증가되는 것으로 보아, 이들 단백질 발현이 종양의 조직학적 분화에 따라 서로 다른 영향을 줄 수 있음을 시사하였다. Heregulin은 위암의 임상병기가 증가될수록 발현이 감소되었고, 조기위암에 비해 진행성 위암에서 발현이 감소하였다. Heregulin과 erbB3 혹은 heregulin과 erbB4가 동시에 발현되는 예들은 61%와 54%였다. 동시에 발현되는 군들은 장형에 많았고

조기위암에서 상대적으로 높은 빈도를 보였다. 따라서 heregulin과 관련된 pathway는 주로 조기위암과 임상병기가 낮은 예들에서 더 중요한 기능을 수행할 것이라 추정된다. 최근에는 heregulin 발현과 종양에 대한 연구가 기존의 erbB family에 대한 리간드로서 작용하는 세포질에서의 역할뿐 아니라, 핵에서 erbB family 발현과 상관없이 독자적으로 종양 발생에 관여할 가능성이 제시되고 있어,⁽¹³⁾ heregulin 발현이 위암의 예후인자 및 치료의 지표로 사용될 수 있는지에 대해서는 이후 더 많은 연구가 필요하다.

결 론

근치적 수술을 받고 수술한 지 5년이 지난 위암 환자 251명을 대상으로 heregulin과 erbB family 단백 발현을 비교한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. Heregulin, erbB2, erbB3, erbB4 단백질은 미만형에 비해 장형에서 발현이 증가하였다. Heregulin과 erbB4 단백질은 조기 위암에서 진행성 위암이 될 수록 발현이 감소되는 반면, erbB2 단백질은 림프절 전이가 있는 예와 진행성 위암에서 발현이 증가하였으나, 생존율에서는 각 단백질 사이에 뚜렷한 차이를 확인할 수 없었다. Heregulin과 erbB3 혹은 heregulin과 erbB4 단백질이 동시에 발현되는 군은 장형에 많았고 조기위암에서 상대적으로 높은 빈도를 보였다. 따라서 heregulin과 이와 연관된 단백질은 주로 위암 초기에 관여하는 것으로 추정된다.

REFERENCES

1. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990;61:203-212.
2. Plowman GD, Green JM, Culouscou JM, Carlton GW, Rothwell VM, Buckley S. Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180 erbB4. *Nature* 1993;366:473-475.
3. Tzahar E, Levkowitz G, Karunagaran D, Yi L, Peles E, Lavi S, Chang D, Liu N, Yayon A, Wen D, et al. ErbB-3 and ErbB-4 function as the respective low and high affinity receptors of all Neu differentiation factor/hergulin isoforms. *J Biol Chem* 1994;269:25226-25233.
4. Holmes WE, Sliwkowski MX, Akita RW, Henzel WJ, Lee J, Park JW, Yansura D, Abadi N, Raab H, Lewis GD, et al. Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science* 1992;256:1205-1210.
5. Wen D, Peles E, Cupples R, Suggs SV, Bacus SS, Luo Y, Trail G, Hu S, Silbiger SM, Levy RB, et al. Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* 1992;69:559-572.
6. Sliwkowski MX, Schaefer G, Akita RW, Lofgren JA, Fitzpatrick VD, Nuijens A, Fendly BM, Cerione RA, Vandlen RL, Carraway KL 3rd. Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem* 1994;269:14661-14665.
7. Lewis GD, Lofgren JA, McMurtrey AE, Nuijens A, Fendly BM, Bauer KD, Sliwkowski MX. Growth regulation of human breast and ovarian tumor cells by heregulin: evidence for the requirement of erbB2 as a critical component in mediating heregulin responsiveness. *Cancer Res* 1996;56:1457-1465.
8. Jones FE, Jerry DJ, Guarino BC, Andrews GC, Stern DF. Heregulin induces in vivo proliferation and differentiation of mammary epithelium into secretory lobuloalveoli. *Cell Growth Differ* 1996;7:1031-1038.
9. Daly JM, Jannot CB, Beerli RR, Graus-Porta D, Maurer FG, Hynes NE. Neu differentiation factor induces erbB2 down-regulation and apoptosis of erbB2-overexpressing breast tumor cells. *Cancer Res* 1997;57:3804-3811.
10. Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC, Aaronson SA. Isolation and characterization of erbB3, a third member of the erbB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:9193-9197.
11. Lemoine NR, Barnes DM, Hollywood DP, Hughes CM, Smith P, Dublin E, Prigent SA, Gullick WJ, Hurst HC. Expression of the erbB3 gene product in breast cancer. *Br J Cancer* 1992;66:1116-1121.
12. Travis A, Pinder SE, Robertson JF, Bell JA, Wencyk P, Gullick WJ, Nicholson RI, Poller DN, Blamey RW, Elston CW, et al. C-erbB-3 in human breast carcinoma: expression and relation to prognosis and established prognostic indicators. *Br J Cancer* 1996;74:229-233.
13. Breuleux M, Schoumacher F, Rehn D, Kung W, Mueller H, Eppenberger U. Heregulins implicated in cellular functions other than receptor activation. *Mol Cancer Res* 2006;4:27-37.
14. Gamboa-Dominguez A, Dominguez-Fonseca C, Quintanilla-Martinez L, Reyes-Gutierrez E, Green D, Angeles-Angeles A, Busch R, Hermannstadter C, Nahrig J, Becker KF, et al. Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor survival in gastric adenocarcinoma from Mexican patients: a multivariate analysis using a standardized immunohistochemical detection system. *Mod Pathol* 2004;17:579-587.
15. Garcia I, Vizoso F, Martin A, Sanz L, Abdel-Lah O, Raigoso P, Garcia-Muniz JL. Clinical significance of the epidermal growth factor receptor and HER2 receptor in resectable gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2003;10:234-241.
16. Prakash I, Mathur RP, Kar P, Ranga S, Talib VH. Comparative evaluation of cell proliferative indices and epidermal growth factor receptor expression in gastric carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol* 1997;40:481-490.
17. Jonjic N, Kovac K, Krasevic M, Valkovic T, Ernjak N, Sasso F, Melato M. Epidermal growth factor-receptor expression correlates with tumor cell proliferation and prognosis in gastric cancer. *Anticancer Res* 1997;17:3883-3888.
18. Sanz-Ortega J, Steinberg SM, Moro E, Saez M, Lopez JA, Sierra E, Sanz-Espocera J, Merino MJ. Comparative study of

- tumor angiogenesis and immunohistochemistry for p53, c-erbB2, c-myc and EGFR as prognostic factors in gastric cancer. *Histol Histopathol* 2000;15:455-462.
19. Yonemura Y, Ninomiya I, Yamaguchi A, Fushida S, Kimura H, Ohoyama S, Miyazaki I, Endou Y, Tanaka M, Sasaki T. Evaluation of immunoreactivity for erbB-2 protein as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer. *Cancer Res* 1991;51:1034-1038.
 20. Ross JS, McKenna BJ. The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. *Cancer Invest* 2001;19:554-568.
 21. Ougolkov A, Yamashita K, Bilim V, Takahashi Y, Mai M, Minamoto T. Abnormal expression of E-cadherin, beta-catenin, and c-erbB-2 in advanced gastric cancer: its association with liver metastasis. *Int J Colorectal Dis* 2003;18:160-166.
 22. Vizoso FJ, Corte MD, Alvarez A, Garcia I, del Casar JM, Bongera M, Gonzalez LO, Garcia-Muniz JL, Allende MT. Membranous levels of c-erbB-2 oncoprotein in gastric cancer: their relationship with clinicopathological parameters and their prognostic significance. *Int J Biol Markers* 2004;19:268-274.
 23. Tsigris C, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Diamantis T, Kalahanis N, Alexiou D. Clinical significance of soluble c-erbB-2 levels in the serum and urine of patients with gastric cancer. *Anticancer Res* 2002;22:3061-3065.
 24. Noguchi H, Sakamoto C, Wada K, Akamatsu T, Uchida T, Tatsuguchi A, Matsui H, Fukui H, Fujimori T, Kasuga M. Expression of heregulin alpha, erbB2, and erbB3 and their influences on proliferation of gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 1999;117:1119-1127.
 25. Kataoka H, Joh T, Kasugai K, Okayama N, Moriyama A, Asai K, Kato T. Expression of mRNA for heregulin and its receptor, ErbB-3 and ErbB-4, in human upper gastrointestinal mucosa. *Life Sci* 1998;63:553-564.
 26. Mullaney PJ, Wadley MS, Hyde C, Wyatt J, Lawrence G, Hallissey MT, Fielding JW. Appraisal of compliance with the UICC/AJCC staging system in the staging of gastric cancer. Union Internacional Contra la Cancrum/American Joint Committee on Cancer. *Br J Surg* 2002;89:1405-1408.
 27. Lauren P. The two histologic main types of gastric carcinomas: diffuse and so-called intestinal type carcinoma: an attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965;64:127-139.
 28. Ettinger DS. Clinical implications of EGFR expression in the development and progression of solid tumors: focus on non-small cell lung cancer. *Oncologist* 2006;11:358-373.
 29. Nahta R, Esteva FJ. Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Lett* 2006;232:123-138.
 30. Rebischung C, Barnoud R, Stefani L, Faucheron JL, Mousseau M. The effectiveness of trastuzumab (Herceptin) combined with chemotherapy for gastric carcinoma with overexpression of the c-erbB-2 protein. *Gastric Cancer* 2005;8:249-252.

= Abstract =

Expression of Heregulin and ErbB Family Proteins in Gastric Adenocarcinomas: Correlation with Clinopathologic Prognostic Factors

Chang-Hak Yoo, M.D., Ju-Han Lee, M.D.¹ and Jong Sang Choi, M.D.¹

Department of Surgery, Kangbuk Samsung Hospital, Sungkyunkwan University School of Medicine, ¹Department of Pathology, Korea University School of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Heregulin is a natural ligand for erbB3 and erbB4. However, very little is known about their roles in the gastric cancer. This retrospective study was performed to evaluate the frequencies of heregulin and erbB family protein expression and to compare their expressions with clinicopathologic parameters.

Materials and Methods: Immunohistochemical expressions of heregulin and erbB family proteins were examined with tissue micro-array slides. A total of 251 gastric adenocarcinomas were classified as early cancers and advanced cancers and as having and not having lymph node metastases.

Results: The positive rates of the heregulin, erbB1, erbB2, erbB3, and erbB4 protein stainings were 64%, 68%, 6%, 88%, and 76%, respectively. Intestinal type gastric adenocarcinomas showed higher expression of heregulin, erbB2, erbB3, and erbB4 proteins. Heregulin and erbB4 proteins showed lower expressions in advanced gastric carcinomas. However, erbB2 protein showed higher expression in advanced gastric carcinomas. The protein expressions of heregulin and erbB family proteins showed no relationship with survival rate. Co-expression groups of heregulin and erbB3 proteins or heregulin and erbB4 proteins showed higher expressions in intestinal type adenocarcinomas and early gastric carcinomas.

Conclusion: Heregulin, erbB3, and erbB4 proteins may play a role in the early stage of adenocarcinomas. (**J Korean Gastric Cancer Assoc 2006;6:181-188**)

Key Words: Gastric cancer, Heregulin, ErbB family, Immunohistochemistry