

# Tamoxifen에 대한 자궁내막암세포주의 시험관내 반응에 대한 연구

순천향대학교 의과대학 산부인과학교실  
이순곤 · 남선희 · 이권해

= Abstract =

## In Vitro Response of Uterine Endometrial Cancer Cell Lines to the Antiestrogen Tamoxifen

Soon Gone Lee, M. D., Sun Hee Nam, M. D., Kwon Hae Lee, M. D.

*Department of Obstetrics & Gynecology*

*College of Medicine, Soonchunhyang University, Seoul, Korea*

Medroxyprogesterone acetate(MPA) is one of the most commonly used hormonal agents for the treatment of advanced or recurrent endometrial adenocarcinoma. However, the progesterone receptor content of endometrial carcinoma varies directly to the degree of differentiation and inversely with stage of the tumor. Thus one would predict that MPA therapy would be less effective in advanced and poorly differentiated tumors. In addition, MPA has been shown to reduce progesterone receptor content of both normal and malignant endometrial cells, which could result in loss of hormone responsiveness.

Tamoxifen, which is often used in breast cancer therapy, has also been used in the treatment of patients with advanced and recurrent endometrial carcinoma. Tamoxifen is known to have some estrogenic effects at low concentration and one of these effects is induction of progesterone receptor both in normal and malignant endometrium. This property has focused interest on sequential or simultaneous use of tamoxifen and MPA in the therapy of endometrial carcinoma.

The growth inhibitory effects of MPA and tamoxifen were tested on six long-established endometrial carcinoma cell lines(HEC-1-A, HEC-1-B, RL 95-2, AN3CA, KLE) and on SCHE-1, a new endometrial carcinoma cell line established in our laboratory. MPA and tamoxifen were used in growth experiments either alone, simultaneously or sequentia-

---

Key words : Tamoxifen, Endometrial carcinoma cell lines

lly. The MCF-7 breast cancer cell line was used as a control.

Only 20% reduction in cell number was achieved after 10 days of exposure to the drug, even with the highest MPA concentration tested (10 $\mu$ m) in endometrial carcinoma cell lines.

But in MCF-7 cells, 60% reduction in cell number was achieved with the same concentration of MPA (10 $\mu$ m).

Ten days of feeding with 5 $\mu$ m tamoxifen produced a 96% reduction in cell number in MCF-7, a 91% reduction in HEC-1-A, a 88% reduction in HEC-1-B, a 98% reduction in AN3CA and a 71% reduction in KLE cultures. In SCHE-1 cultures a 83% reduction in cell growth was seen and no viable cells remained in RL 95-2 cultures after 10 days of feeding with a 5 $\mu$ M tamoxifen.

In AN3CA cultures, simultaneous exposure to 5 $\mu$ m tamoxifen and 5 $\mu$ m MPA resulted in partial reversal of the tamoxifen-induced growth inhibition.

In RL 95-2, HEC-1-A and HEC-1-B cultures, simultaneous use of these drugs had the same effect as tamoxifen alone, whereas in KLE and SCHE-1 cultures a slight additive growth inhibitory effect was observed.

All six endometrial carcinoma cell lines resumed logarithmic growth when medium containing tamoxifen was replaced with medium containing MPA. However, in KLE cultures recovery of logarithmic growth under these conditions was slower than that in the other endometrial carcinoma cultures. Our results show that MPA does not have growth inhibitory effects in these endometrial carcinoma cell cultures, whereas tamoxifen has been shown to have potent growth inhibitory effects on progesterone receptor-negative and therefore MPA-resistant endometrial carcinoma cells. These findings are of special importance since patients who are most likely to need adjuvant therapy for advanced or recurrent endometrial carcinoma are those with estrogen receptor and progesterone receptor negative tumors.

## I. 서 론

MPA는 진행되었거나 또는 재발된 자궁내막암의 치료에 가장 널리 이용되는 호르몬 제제 중의 하나이며 반응률은 30-35%<sup>1)</sup> 알려져 있다.

프로게스테론 수용체 양성인 자궁내막암의 경우에는 생체내, 시험관 내에서 모두 82-83%에서 MPA 치료에 반응하는 것으로 보고되었다.<sup>2)</sup> 그러나 자궁내막암의 프로게스테론 수용체 양은 암의 분화 정도에 따라 다양하며 암의 병기에 따라서도 다양하다.<sup>3)</sup>

따라서 MPA 치료는 진행된 그리고 잘 분화되지 않은 자궁내막암의 치료에 별로 효과가 없으리라고 예측할 수 있다. 게다가 MPA는 정상 자궁내막 세

포와 자궁 내막암 세포에서 프로게스테론 수용체 양을 감소시키는 것으로 보여지기 때문에<sup>4)</sup> 더 더욱 MPA에 대한 세포의 반응이 줄어드는 결과를 초래할 수 있다.

비스테로이드성 항에스트로겐 제제인 tamoxifen은 유방암의 치료에 널리 사용되어 왔으며 종종 진행된 그리고 재발된 자궁내막암의 치료에도 이용되어 왔다.<sup>5)</sup>

Tamoxifen은 저농도에서 약간의 에스트로겐 효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며 정상 자궁내막 세포와 자궁내막암 세포에서 프로게스테론 수용체를 유도한다고 보고되었다.<sup>6)</sup>

이와 같은 사실은 자궁내막암의 치료에 있어서 MPA와 tamoxifen을 교대로 또는 동시에 사용해

보는 흥미있는 근거가 된다.

Zaino 등<sup>7)</sup>은 nude mouse의 자궁내막암에서 MPA를 단독 사용했을 때보다 tamoxifen과 MPA를 교대로 사용했을 때보다 나은 효과가 있었다고 보고했다. 그러나 몇몇 임상적인 보고에 의하면 tamoxifen과 MPA를 교대로 혹은 동시에 사용했을 때나 MPA를 단독으로 사용했을 때나 반응률에 차이를 보이지 않았다고 보고하였다.<sup>6,8)</sup>

본 연구에서는 배양세포주를 이용하여 자궁내막암에 대한 MPA와 tamoxifen의 증식 억제 효과를 조사하였으며, MPA와 tamoxifen을 교대로 또 동시에 투여했을 때의 변화에 대해서도 연구하여 자궁내막암에 대한 호르몬 요법의 가능성을 알고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 배양세포주

이번 연구에 사용한 자궁내막암 세포주는 American Type Culture Collection(Rockville, MD)에서 공여받았으며 SCHE-1 세포주는 1993년 본 순천향 대학병원 산부인과학 연구실에서 수립한 세포주이다.<sup>9)</sup>

SCHE-1 세포주는 미분화 자궁내막선암으로부터 수립되었으며, HEC-1-A 세포주와 HEC-1-B 세포주는 1972년 Kuramoto 등<sup>10)</sup>에 의하여 중등도로 분화된 자궁내막선암으로부터, KLE 세포주는 1984년 Richardson 등<sup>11)</sup>에 의하여 미분화 자궁내막선암으로부터, RL 95-2 세포주는 1983년 Way 등<sup>12)</sup>에 의하여 중등도로 분화된 자궁내막선상피암으로부터 수립되었다.

AN3CA 세포주는 1964년 Dawe 등에 의하여 미분화 자궁내막암 환자의 임파절 내의 전이암세포로부터 수립되었다. 대조군으로 사용한 MCF-7 세포주는 유방암세포주로 1973년 Soule 등<sup>13)</sup>에 의해 흉막삼출액 내의 전이암세포로부터 수립되었다. 세포는 10% 태아우혈청이 들어 있는 Ham's F-10 배양액으로 배양하였다.

### 2. 호르몬 수용체에 대한 연구

Dextran-coated charcoal method<sup>14)</sup>에 의해 SCHE

-1 세포의 에스트로겐, 프로게스테론 수용체 분석을 실시하였다. 동결시킨 세포를 잘게 부수어 molybdate와 dithiothreitol(DTT)가 들어 있는 Tris-glycerol buffer(pH 7.6)에 용해시켰다.

세포를  $1 \times 10^9$ 개 이상으로 배양한 후 세포질 분획을 얻기 위하여, 균등액을 0°C에서 40,000 rpm, 40분 동안 원심분리했다.

핵분획을 얻기 위하여 균등액을 15,000 rpm에서 3시간 동안 원심분리했으며 완충제로 2번 세척했다. 그리고 KCl phosphate 완충제(0.4 fmol)를 가한 뒤 이 혼합액을 원심분리했다. 세포질분획과 핵분획에 <sup>3</sup>H-R 5020(Dupont Co. U.S.A., 0.16-5.0nM)을 넣은 뒤 실온에서 배양했다. 배양 후 수용체 결합 스테로이드(receptor-bound steroids)를 dextran-coated charcoal 위의 비결합 스테로이드(unbound steroid)가 흡수하도록 하여 분리하였다. 그리고 결합 방사능(bound radioactivity)을 liquid scintillation counter에서 측정하였다.

세포질 내의 총 단백질 양(in mg/ml)은 Coomassie Blue Dye binding Method<sup>15)</sup>에 의해 측정하였다. 얻어진 결과는 높은 친화력을 가진, 특이한 스테로이드 수용체의 결합능(binding capacity)을 구하기 위하여 Scatchard Plot Analysis에 의해 분석했다.

결과는 cytosol protein milligram당 특이적으로 수용체에 결합하는 스테로이드 호르몬의 양(fmoles)으로 나타내었으며 각 추출 protein 1mg당 9-10 fmoles 이상일 때 수용체 양성이라고 정하였다.

또한 면역세포조직 화학염색에 의해서도 배양세포 내의 호르몬 수용체의 존재 여부를 검토해 보았는데 Avidin-biotin peroxidase complex법(Vector lab., U.S.A.)<sup>16)</sup>에 의하여 시행하였다.

에스트로겐과 프로게스테론 수용체 발현을 보기 위한 면역세포조직 화학염색을 위하여 배양된 세포를 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)로 3회 수세 후 10% neutral buffered formalin에 고정하였다. 고정 후 PBS로 3회 수세 후 호르몬 수용체에 대한 1차 항체를 작용시키기 전에 10mM citrate 용액에 슬라이드를 담근 후 마이크로 전자파 오븐에서 5분간 끓였다. 그 후 실온에서 식힌 후 증류수로 3회 수세하였고, 다시 3회 PBS로 세척하였다.

Blocking 혈청으로는 goat normal serum을 사용

하였으며 에스트로겐과 프로게스테론 수용체에 대한 단주항체(BioGenex, USA)를 1 : 10으로 희석하여 슬라이드에 4℃에서 하루 밤 동안 부란시킨 후 PBS로 3회 세척하였고 그 후 biotin이 표식된 anti-mouse goat serum(BioGenex, USA)으로 실온에서 30분 부란시켰다. 그 후 streptavidin이 표식된 alkaline phosphate로 역시 30분 부란 후 PBS로 3회 수세하였고 그 후 new fuchsin으로 발색하고 탈수 후 xylene으로 투명화시켜 balsam으로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다. 음성대조군은 1차 항체대신 PBS로 부란하여 같은 과정을 거친 후 대조하여 관찰하였다.

### 3. 호르몬과 배양액

Tamoxifen citrate(Sigma, U.S.A.)는 70% 에탄올에 용해시켜 10% 태아 우혈청이 들어 있는 Ham's F-10 배양액을 이용하여  $10^{-6}$ ,  $2.5 \times 10^{-6}$ ,  $3.5 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $6.5 \times 10^{-6}$ ,  $7.5 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ M로 희석시켰다.

Medroxyprogesterone acetate(Sigma, U.S.A.)은 순수 에탄올에 용해시켜 10% 태아 우혈청이 들어 있는 Ham's F-10 배양액을 이용하여  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ M로 희석시켰다. 배양액 내의 에탄올의 최종 농도는 0.1%로 하였는데 0.1%의 에탄올은 세포의 증식이나 형태학적인 특성에 영향을 미치지 않는다고 보고되어 있다. 혈청 내에 있는 스테로이드의 영향을 배제하기 위하여 활성탄을 이용하여 스테로이드 호르몬을 흡수시켰다.<sup>17)</sup> 즉 태아 우혈청 100ml에 0.25 g의 활성탄(Sigma, U.S.A.)과 0.025g 텍스트란(clinical grade; Sigma)을 섞은 뒤 56℃에서 30분 동안 자기 교반을 이용하여 회전시킨 다음 원심분리하여 dextran-coated charcoal pellet을 분리시켰다. 이후 charcoal-dextran 처리된 태아 우혈청을 20- $\mu$ m의 sterilization unit(Nalge Co., Rochester, NY)에 여과시켜 -20℃에서 보관하였다.

### 4. 세포의 증식

직경 3.5cm의 배양접시에 각각  $5 \times 10^4$ 개/ml의 세포를 넣어 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 배양기 내에서 배양했다. 각 농도의 tamoxifen citrate와 medroxyprogesterone acetate를 첨가했으며 매일 3개의 배양접시 중의 세포수를 세어서(1개의 배양접시에 대하여 4회 계산) 이를 평균하여 세포수를 반대수(semi-log) 그래프

로 표시하였다.

3일 동안 배양하여 대수 증식기까지 세포가 자라도록 한 다음 약이 들어 있는 배양액을 매일 교환하여 영양분의 부족이 세포 증식에 영향을 미치지 못하도록 했고 세포가 약의 영향을 충분히 받도록 하였으며 연구를 위하여 배양액 내의 태아 우혈청의 최종 농도를 5%로 조절하였다. 세포증식 억제 효과는 dextran-charcoal 처리된 태아우혈청이 들어 있는 배양액으로만 배양했을 때의 세포수에 대한 약을 처리했을 때의 세포 수의 비율(%)로 표시하였다.

## III. 결 과

### 1. 배양세포 내의 프로게스테론 수용체량

HEC-1-A, HEC-1-B, RL 95-2, AN3CA, KLE, SCHE-1의 자궁내막선암 세포주에서 모두 10 fmols/mg protein 이하로서 의의있는 프로게스테론 수용체는 발견할 수 없었으며 대조군으로 사용한 MCF-7 세포주에서는 평균  $54 \pm 22.5$  fmols/mg protein의 프로게스테론 수용체를 함유하고 있었으며 면역세포조직 화학적 염색에서도 양성 반응을 보였다(Fig. 1).

### 2. MPA가 자궁내막암 세포주들과 MCF-7 세포주의 성장에 미치는 영향

HEC-1-A, HEC-1-B, RL 95-2 세포주의 경우 10일 이상 MPA에 노출시켰을 때 10 $\mu$ M의 고농도에서도 약 20% 정도의 세포수만이 감소됨을 보여주었다(Fig. 2).

AN3CA, KLE, SCHE-1도 같은 결과를 나타내었으며 대조군으로 사용한 프로게스테론 수용체 양성인 MCF-7 세포주에서는 같은 농도에서 약 60%의 세포수 감소를 보여주었다. 따라서 프로게스테론 수용체 음성인 자궁내막암 세포주의 세포증식이 MPA에 의해 억제되지 않음을 알 수 있었다(Fig. 3).

### 3. Tamoxifen이 자궁내막암 세포주들과 MCF-7 세포주의 성장에 미치는 영향

5 $\mu$ M의 tamoxifen을 10일 이상 투여했을 때 HEC-1-A는 91%, HEC-1-B는 88%의 세포수 감소를 보였으며 RC 95-2는 살아 있는 세포가 남아 있지 않

Fig. 1. Immunocytochemical staining of MCF-7 cell line with Anti-PR(左 : Before staining, 右 : After staining,  $\times 400$ )

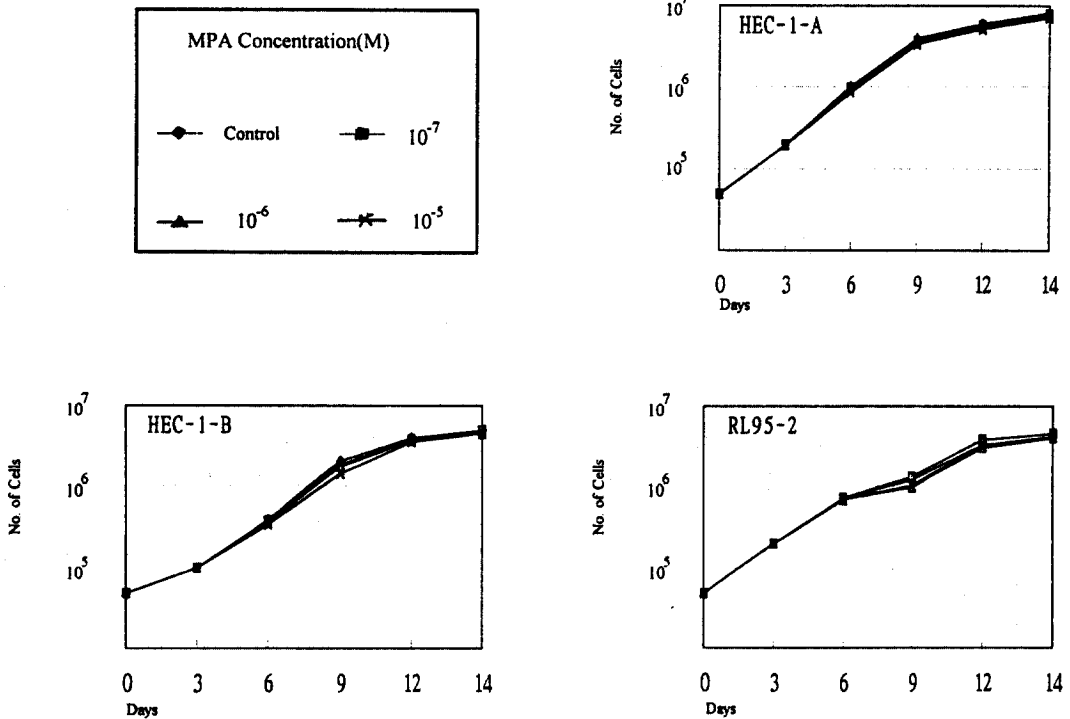


Fig. 2. Effect of medroxyprogesterone acetate on the growth of HEC-1-a, HEC-1-B and RL 95-2 cell lines.

았다(Fig. 4).

AN3CA는 98%, KLE는 71%, SCHE-1은 83%의 세포수 감소를 보였으며 대조군으로 사용한 MCF-7은 90%의 세포수 감소를 나타내었다(Fig. 5).

4. Tamoxifen과 MPA를 교대로 또는 동시에 사용했을 때 자궁내막암세포주와 MCF-7 세포주의 성장에 미치는 영향

HEC-1-A, HEC-1-B, RL 95-2에서는 tamoxifen과 MPA를 동시에 사용했을 때 tamoxifen 하나만을 처치했을 때와 같은 세포증식 억제 효과를 나타내었으며 tamoxifen을 MPA로 바꾸었을 때에는 세포증식이 다시 회복됨을 알 수 있었다(Fig. 6).

AN3CA는 tamoxifen과 MPA를 동시에 사용했을 때 tamoxifen에 의한 세포증식 억제 효과가 부분적으로 회복되었다.

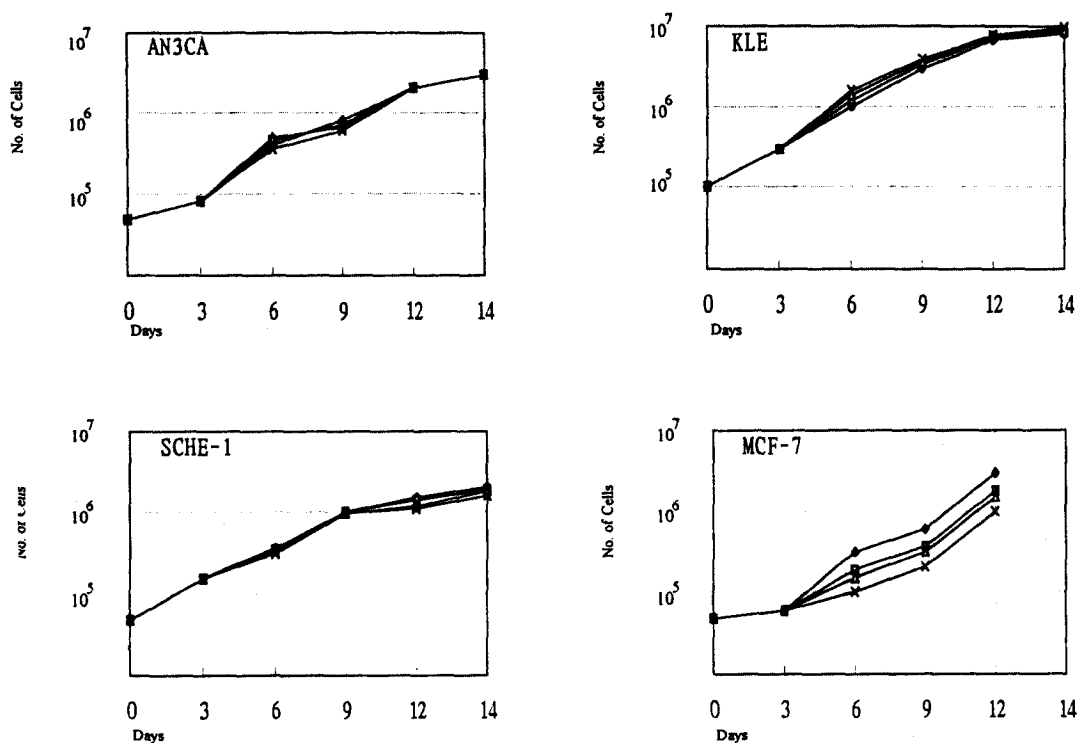


Fig. 3. Effect of medroxyprogesterone acetate on the growth of AN3CA, KLE, SCHE-1 and MCF-7 cell lines.

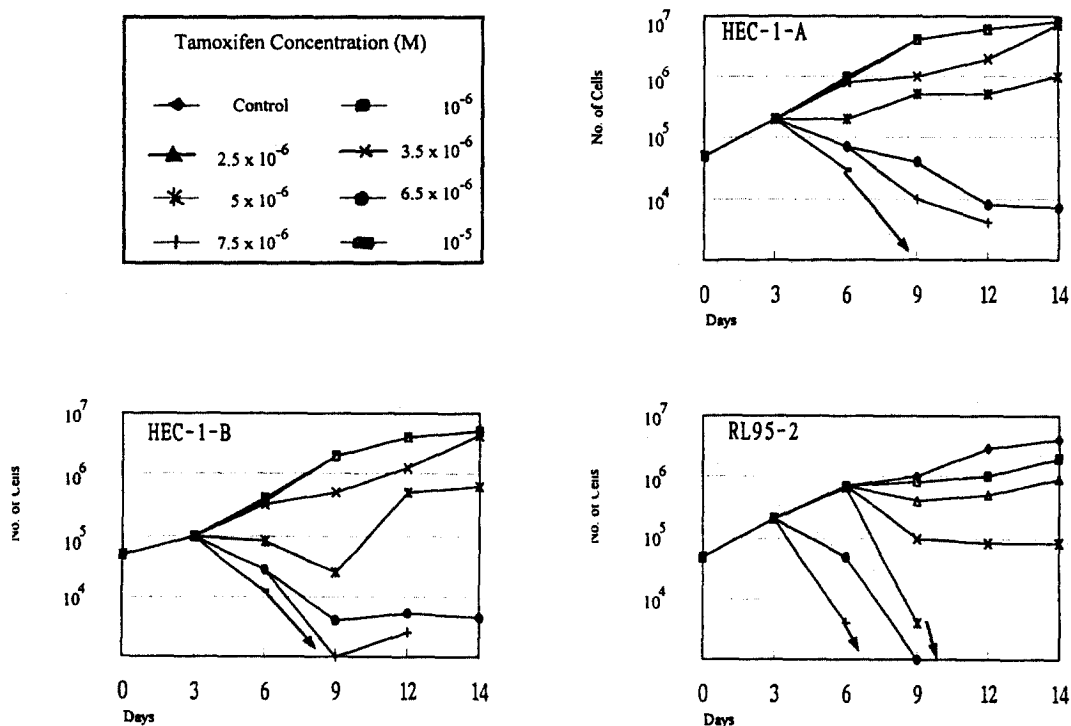


Fig. 4. Effect of tamoxifen on the growth of HEC-1-A, HEC-1-B and RL 95-2 cell lines.

- Tamoxifen에 대한 자궁내막암세포주의 시험관내 반응에 대한 연구 -

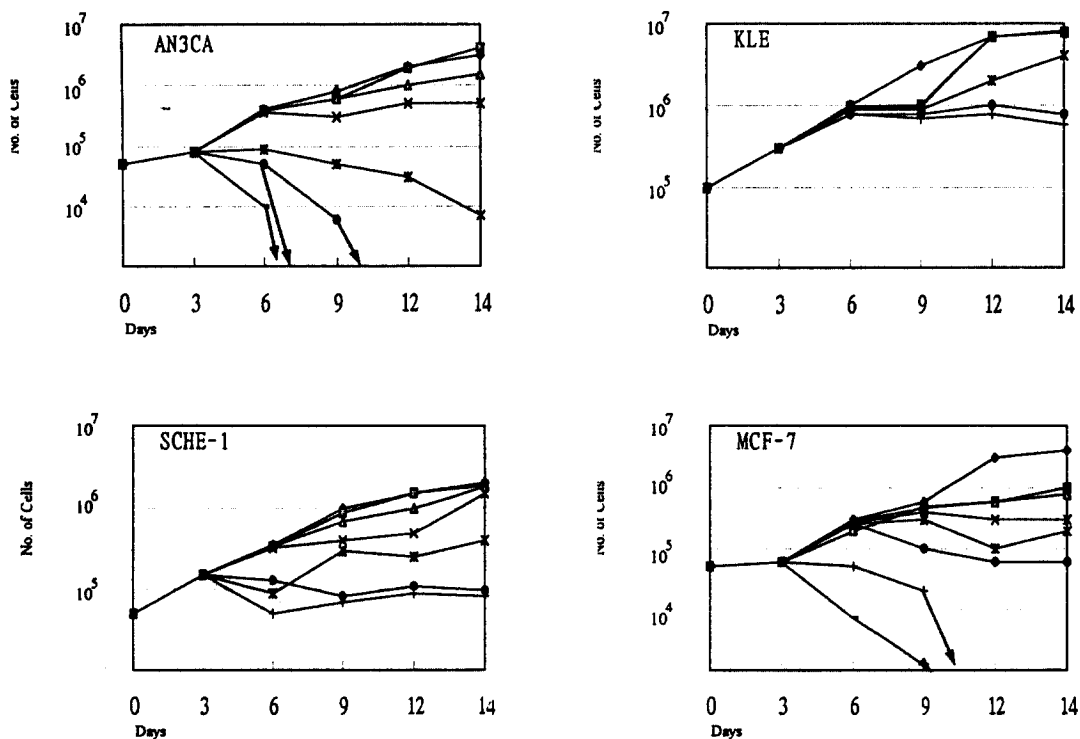


Fig. 5. Effect of tamoxifen on the growth of AN3CA, KLE, SCHE-1 and MCF-7 cell lines.

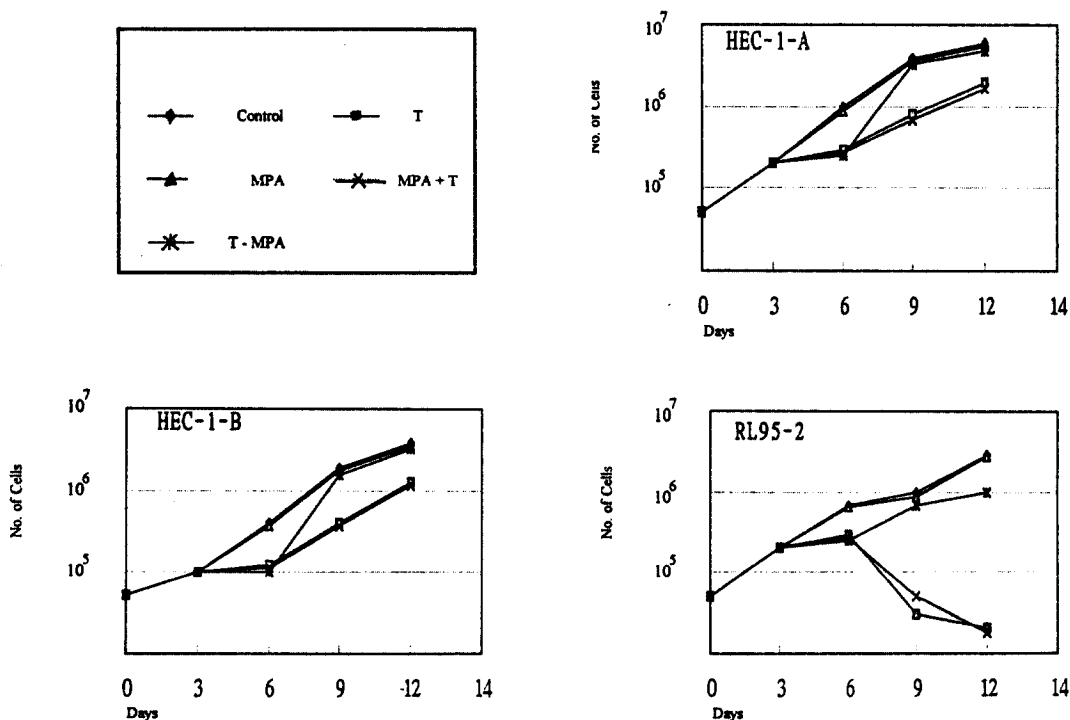


Fig. 6. Effect of  $5\mu\text{M}$  tamoxifen and  $5\mu\text{M}$  medroxyprogesterone acetate given sequentially or simultaneously on the growth of HEC-1-A, HEC-1-B and RL 95-2 cell lines.

AN3CA, KLE, SCHE-1에서 tamoxifen을 MPA로 바꾸었을 때에는 세포 증식이 다시 회복됨을 알 수 있었다.

또 KLE 세포주는 tamoxifen을 MPA로 바꾸었을 때에 세포증식이 회복되는 속도가 다른 세포주보다 느렸다. 즉 MPA와 tamoxifen을 동시에 혹은 교대로 사용했을 때에 자궁내막암 세포주에 대한 반응이 증가되지 않음을 알 수 있었다.

대조군인 MCF-7 세포주에서는 tamoxifen과 MPA를 동시에 사용했을 때에 tamoxifen에 의한 세포증식 억제 효과가 부분적으로 회복되었으며 tamoxifen을 MPA로 바꾸었을 때에는 세포 증식이 다시 회복되었다(Fig. 7).

#### IV. 고 찰

프로게스테론의 길항작용 없이 에스트로겐의 지속적인 자극과 자궁내막증식증의 발생 사이에 연관이 있음은 잘 알려져 있는 사실이지만<sup>18)</sup> 악성 전환을

일으키는 자극이 무엇인지는 아직 잘 모르는 상태이다. Peptide growth factor가 자궁내막암의 증식 조절에 관여한다고 알려져 있다. Epidermal growth factor(EGF)와 insulin-like growth factor I(IGF-I)이 유방암 세포주<sup>19,20)</sup>와 자궁내막암 세포주<sup>21)</sup>의 유사분열을 촉진시킨다고 보고되었으며 EGF가 EGF 수용체에 결합되면 생리주기 동안에 주기가 변하며 자궁내막증식기 동안에는 EGF와 EGF 수용체가 더 많이 결합한다고 보고하였다.<sup>22)</sup>

또한 Reynolds 등은 자궁내막암 조직에 EGF 수용체가 있음을 증명하였으며 EGF 수용체 양과 조직학적인 등급 사이에 역비례 관계가 있음을 보고하였다.<sup>23)</sup> 또한 IGF-I 수용체 양과 조직학적인 등급 사이에 비례관계가 있음이 보고되었다.<sup>24)</sup> 그러나 자궁내막암에서 insulin-like growth factor II(IGF-II), insulin, platelet-derived growth factor(PDGF)의 역할은 아직 미지수이다.

MPA는 진행된 자궁내막암의 치료에 있어서 확실한 역할을 가지고 있으나 tamoxifen의 치료적 가치에 대해서는 아직 미상이다.<sup>1,2)</sup> 이와 같은 호르몬

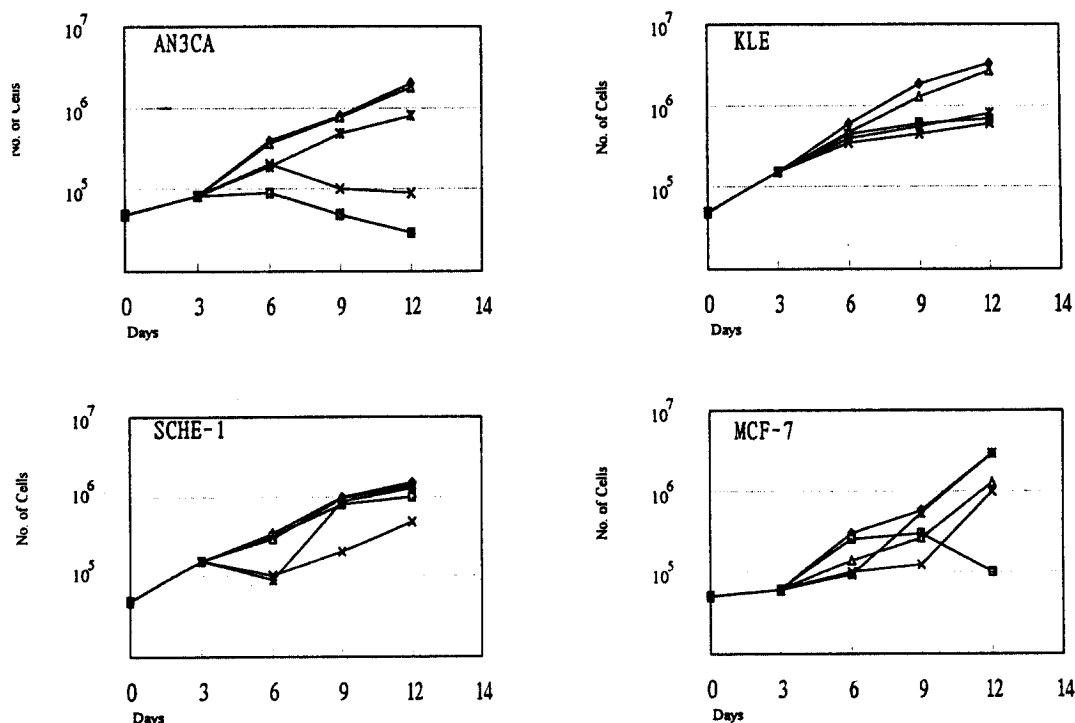


Fig. 7. Effect of  $5\mu\text{M}$  tamoxifen and  $5\mu\text{M}$  medroxyprogesterone acetate given sequentially or simultaneously on the growth of AN3CA, KLE, SCHE-1 and MCF-7 cell lines.



제제가 자궁내막암 세포의 증식 억제 효과를 나타내는 기전에 대해서는 아직 증명되지 않은 상태이다. 생체 내에서 관찰된 바에 의하면 이는 호르몬 제제의 암세포에 대한 직접적인 효과 때문이거나 간접적으로 혈중의 호르몬 양을 변화시켜 암세포의 증식 억제 효과를 나타낸다고 보고되고 있다.

MPA는 혈액 내의 에스트로겐 양을 감소시키고 테스토스테론의 대사를 증대시킨다고 알려져 있다.<sup>25)</sup> 결과적으로 안드로겐의 에스트로겐으로의 전환을 감소시킨다. MPA의 항암효과는 주로 프로게스테론 수용체를 통한 직접적인 효과와 뇌하수체/난소 그리고 뇌하수체/부신 축에 대한 간접적인 효과에 의해 나타난다.

MPA는 에스트로겐 수용체 합성을 방해하며 핵 내에 에스트라디올과 에스트로겐 수용체의 복합체가 머무는 시간을 감소시키며 세포질 내에서 에스트라디올을 에스트론으로 전환시키는 데 관여하는 17- $\beta$ -dehydrogenase의 활성을 증가시켜서 암세포의 에스트라디올에 대한 반응도를 감소시킨다.

또 MPA는 다른 세포질 내의 스테로이드 수용체 즉 글루코코르티코이드 수용체, 안드로겐 수용체와 결합한다. 또 종양세포의 증식에 대한 MPA의 간접적인 효과는 뇌하수체/난소 축를 통하여 일어나는데 이는 혈액 내에 FSH, LH, 에스트라디올, 에스트론, 테스토스테론의 감소로 증명할 수 있고 뇌하수체/부신 축을 통한 효과는 혈액 내에 ACTH, 코르티솔, 부신안드로겐의 감소로 증명할 수 있다.

따라서 MPA는 5- $\alpha$ -reductase를 활성화시켜 부신 안드로겐이 간에서 대사되는 것을 자극한다. 또 Dowsett 등<sup>26)</sup>은 MPA는 혈청 내의 성호르몬이 결합하는 글로부린을 감소시켜 결합되지 않은, 활성화된 성스테로이드 호르몬의 양에 영향을 미친다고 보고하였다.

또한 MPA는 프로게스테론 수용체에 대한 높은 친화력을 가지고 있어 그 결과 정상 자궁내막세포와 자궁내막암세포의 프로게스테론 수용체 양을 감소시킨다고 보고되었다.<sup>4)</sup>

암조직 내의 프로게스테론 수용체 양과 프로게스테론에 대한 반응 사이에는 깊은 연관이 있다고 보고되고 있는데 프로게스테론 수용체 양성인 경우에는 반응률이 82%인 반면 프로게스테론 수용체 음성인 경우에는 11%로 보고되었다.<sup>2)</sup>

암조직에 대한 프로게스테론의 반응은 세포 내의 프로게스테론 수용체에 의해 조종된다.<sup>27)</sup> 또 최근 자궁내막암 세포에 있어서는 프로게스테론에 대한 세포의 반응이 lipocortin의 발현에 의해 결정된다고 보고되었다.<sup>28-30)</sup>

Lipocortin-2(일명 annexin-2)는 칼슘 이온 의존성 양성<sup>31)</sup>으로 어떤 인지질을 결합하는 단백질의 하나로 세포체질(cytoskeleton)과 세포막의 상호작용,<sup>32)</sup> 유사분열을 일으키는 신호의 전달<sup>30,33)</sup>의 조절에 관여한다고 생각되어 진다. 또한 각 annexin은 특이한 조직과 세포에만 분포하기 때문에 그 독립적인 역할을 예측해 볼 수 있다.

글루코코르티코이드에 의하여 세포증식이 억제되는 세포는 모두는 아니지만 현재 주로 lipocortin 1이라고 알려져 있는 eicosanoid-suppressive factor가 세포 내에 혹은 세포 주위에 증가되어 일어난다고 보고되었다.<sup>34)</sup>

Eicosanoid는 세포증식을 조절하는 데 중요한 물질이라고 알려져 있으며 prostaglandin E<sub>2</sub>가 여기에 속한다.

자궁내막암의 기본적인 치료는 외과적인 수술이나 수술 후의 잔류암이나 재발된, 진행된 자궁내막암의 치료에는 호르몬 요법이 보통 사용되어 왔다.

이와 같은 경우에 프로게스테론에 대한 객관적인 반응률은 30-35%<sup>1,35)</sup>로 되어있지만 프로게스테론은 재발된, 전이된 자궁내막암 환자의 5년 생존율을 높이지는 못했다.<sup>36)</sup> 그리고 이와 같은 낮은 반응률은 많은 진행된 암이 잘 분화되지 않은 것이고 스테로이드 호르몬 수용체가 발현되지 않기 때문이라고 예상하였다.<sup>3)</sup>

또 같은 환자를 대상으로 프로게스테론 치료에 실패한 후에 tamoxifen을 사용해 보았는데 반응률은 약 20% 정도라고 보고하고 있다.<sup>5,37)</sup>

그러나 보고된 연구의 대부분에서 스테로이드 호르몬 수용체에 대한 결과는 없기 때문에 암조직 내의 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체 여부와 tamoxifen에 대한 반응 정도의 상관관계에 대한 결론을 끌어내기에는 불가능하다.

비스테로이드성 항에스트로겐 제제가 에스트로겐 수용체와 뚜렷이 다른 결합 장소와 결합한다는 증거를 제시하는 보고가 있다.<sup>38)</sup>

그러나 이 비스테로이드성 항에스트로겐 결합장

소가 tamoxifen이 암세포 증식 억제 효과를 나타내는데 있어서 어떤 역할을 하는지는 아직 미지수이다.<sup>38)</sup>

Grenman 등<sup>39)</sup>은 1990년 잘 분화되지 않은 자궁내막선암으로부터 UM-EC-2 세포주를 수립하였는데 이 UM-EC-2 세포주는 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체가 발현되지 않음에도 불구하고 tamoxifen에 대하여 세포증식 억제 효과를 보였다고 보고하였다.

즉 1 $\mu$ M의 tamoxifen은 50%의 세포증식 억제 효과를 보였고 2.5 $\mu$ M은 세포증식 억제를 나타냈으며, 5 $\mu$ M에서는 세포파괴 즉 약을 투여한 지 5-7일 후 암세포가 모두 죽었다고 보고하였다.

MCF-7 세포주는 tamoxifen의 항에스트로겐 효과를 연구할 때 많은 연구실에서 사용되어졌는데<sup>40)</sup> 5 $\mu$ M tamoxifen을 투여했을 때 항상 세포증식 억제 효과를 나타내었다.<sup>41)</sup>

유방암 세포주가 인간의 스테로이드 호르몬에 반응하는 암의 생물학을 연구하는 실험모델로 널리 이용되고 최근에 유방암과 자궁내막세포 사이에 스테로이드 호르몬에 대한 반응에 차이가 있음을 보고 하였으며<sup>42)</sup> 호르몬에 반응하는 암의 생물학에 있어서 세포 종류에 따른 특이성(cell-type-specificity)을 보고하였다.

최근의 보고에 의하면 호르몬 제제가 polypeptide growth factors와 이 수용체의 양을 조절하는 것처럼 보이며<sup>21,38,40,43)</sup> 이 growth factor가 에스트로겐과 항에스트로겐 제제의 수용체의 매개에 의하지 않은 효과에 관여한다고 보고하였다.

따라서 세포 증식에 있어서 스테로이드와 polypeptide 호르몬 사이의 연관관계에 대하여 연구한다면 흥미로운 것으로 여겨지며 tamoxifen과 같은 항 호르몬의 세포증식 조절기전을 이해하는 데 도움이 될 것으로 여겨진다.

과거부터 호르몬, 항호르몬 치료는 호르몬 의존성 조직에서 발생한 암 즉 유방암,<sup>44)</sup> 자궁내막암,<sup>45)</sup> 난소암,<sup>46)</sup> 전립선암 등<sup>47)</sup>의 치료에 이용되어 왔다.

호르몬치료는 다른 화학요법제에 비하여 비교적 독성이 적고 환자가 잘 견딜 수 있기 때문에 최근의 보고에 의하면 난소암,<sup>48)</sup> 후두암,<sup>49)</sup> 두경부암,<sup>50)</sup> 췌장암<sup>51)</sup>에서 항에스트로겐 제제의 세포증식 억제 효과에 대한 연구가 이루어지고 있다.

항에스트로겐 제제의 세포증식 억제 효과는 에스트로겐 수용체와의 결합을 통해서 이루어진다는 여러 보고가 있으며<sup>52)</sup> 항에스트로겐 제제를 에스트로겐 수용체 양성인 암에 사용하는 이론적인 근거가 된다.

그러나 에스트로겐 수용체 여부와 호르몬 치료에 대한 반응과의 상관관계는 완전치 못하여 에스트로겐 수용체 양성인 유방암의 25-50%에서 호르몬 치료에 반응하지 않는 반면 에스트로겐 수용체 음성인 유방암의 10-13%에서 양성반응을 보인다고 보고되었다.<sup>53)</sup>

시험관 내 연구에서도 tamoxifen의 세포증식 억제 효과는 암세포의 수용체 양과는 직접적인 연관관계가 없다.<sup>54)</sup>

이와 같은 사실은 항에스트로겐의 작용기전을 혼돈시킨다. 이와 같은 상반성은 스테로이드 수용체 분석의 방법론적인 어려움과 스테로이드 수용체의 발현에 영향을 미치는 여러 가지 요소 즉 사용한 배양액, 증식곡선의 어느 기(phase)에 있는 세포인지, 세포밀도, 수용체 분석이 시행된 실험실 때문이거나 에스트로겐 수용체를 통한 것이 아닌 다른 기전에 의한 것이기 때문일 것이다.

실제로 에스트로겐 수용체와 다른 항에스트로겐 결합장소를 가진 세포가 보고되고 있으며<sup>55,56)</sup> Singh 등<sup>57)</sup>은 tamoxifen에 내성인 또 tamoxifen에 감수성이 있는 MCF-7 세포주 사이에 chromatin acceptor site에 차이가 있다고 보고하였는데 항에스트로겐 제제에 대한 감수성과 내성이 수용체의 양뿐만 아니라 결합된 수용체가 어떻게 chromatin과 결합하는지, chromatin acceptor site가 결합된 수용체에 대하여 유용한지에 달려 있다고 하였다.

Tamoxifen 사용에 대한 최근의 보고는 1971년에 Cole<sup>58)</sup>이 전이성 유방암의 치료에 사용하면서부터이다. 항에스트로겐 제제는 경쟁적으로 에스트라디올이 특이한 에스트로겐 수용체에 결합하는 것을 방해하여 호르몬의 생물학적인 효과를 회색시킨다.<sup>59)</sup> 에스트로겐 수용체는 핵 내에 있으며 에스트라디올이 에스트로겐 수용체에 결합되면 에스트로겐 수용체-에스트라디올 복합체가 세포증식을 유발한다.<sup>60,61)</sup> 항에스트로겐 제제인 tamoxifen은 에스트라디올과 경쟁하여 에스트로겐 수용체에 결합한다.

핵 내의 tamoxifen-에스트로겐 수용체 복합체는

에스트로겐 작용을 완전히 차단하는 것에서부터 에스트로겐의 작용을 흉내내는 효과까지 아주 다양한 생물학적인 반응을 유발할 수 있다.<sup>62)</sup> 따라서 tamoxifen의 치료효과가 에스트로겐 수용체 작용에 의해 에스트로겐의 작용을 차단시키는 즉 항에스트로겐 작용에 의한 것이라고만 단정짓기는 어렵고<sup>63)</sup> 최근에 tamoxifen이 growth factor 기전을 통하여 그 작용을 한다는 보고가 있었다.

예를 들면 인간의 유방암 세포주인 MCF-7에서 tamoxifen을 포함한 항에스트로겐 제제가 에스트로겐 수용체 양성인 세포에 의하여 transforming growth factor  $\beta$ (TGF  $\beta$ )의 분비를 증가시켰으며 이는 인접세포의 증식을 방해하였다.<sup>43)</sup>

이와 같은 사실은 에스트로겐 수용체 음성인 암에서 tamoxifen이 효과를 나타내는 하나의 이론적인 근거가 된다. tamoxifen은 초기 유방암 환자에서 natural killer(이하 NK로 약칭) 세포를 활성화시켜 생물학적인 반응조절제(biological response modifier)로서도 작용한다.<sup>64)</sup>

그리고 이와 같은 NK 세포 활성화의 유도는 에스트로겐 수용체 양성과 음성 종양에서 다 일어난다. tamoxifen은 에스트로겐 수용체를 통하여 세포가 세포 주기의 G<sub>0</sub>(phase)에 머물게 한다.

또 tamoxifen은 세포파괴성 제제라기보다는 세포 증식 억제성 제제이다. 따라서 임상적으로 볼 때 오랫동안 사용할 수 있어 보다 좋은 결과를 가져올 수 있다.<sup>65)</sup>

Tamoxifen citrate(a triphenylethylene)와 cyproterone acetate(a synthetic steroid) 같은 약물은 각각 에스트로겐 수용체, 안드로젠 수용체와 결합하지만 호르몬의 작용을 나타내지 않으며<sup>66)</sup> 항호르몬이라고 불리운다. 그리고 적당한 수용체를 가진 세포에 증식 억제 효과를 나타낸다.<sup>66)</sup>

tamoxifen은 임상적으로 에스트로겐 수용체 양성인 유방암 특히 폐경기 이후의 환자에 효과적이다.<sup>67)</sup> 유방암 세포주 MCF-7과 ZR-75-1<sup>13,68)</sup>은 스테로이드 호르몬에 대한 특이한 수용체를 가지며<sup>13,69)</sup> 호르몬과 항호르몬이 세포의 증식과 생존 능력에 미치는 영향에 대한 효과를 연구할 때 사용될 수 있다.

Shapira 등<sup>49)</sup>은 두 개의 tamoxifen 수용체 즉 에스트로겐에는 높은 친화력을 가지나 tamoxifen에

대하여는 낮은 친화력을 가지는 수용체와 에스트로겐에는 낮은 친화력을 가지나 tamoxifen에는 낮거나, 에스트로겐과 같은 친화력을 가지는 수용체가 있다고 보고하였다.

즉 MCF-7 세포주는 양쪽 수용체를 다 가지고 있으며 후두암세포주는 주로 두 번째 수용체가 있을 가능성을 보고하였다.

따라서 본 연구자도 이후에는 자궁내막암 세포주에서 tamoxifen과 에스트라디올과의 상관 관계에 대해서 연구해 볼 필요가 있다고 생각하였다.

tamoxifen은 약의 농도, 종, 생물학적인 체제에 따라 에스트로겐의 효과와 항에스트로겐의 효과를 동시에 가지고 있는 복합체이다.<sup>7,70)</sup>

유방암 세포주를 이용한 시험관내 연구에서 tamoxifen의 에스트로겐에 대한 길항작용은 부분적으로 에스트로겐 수용체에 결합함으로써 조절된다고 보고하였다. 그러나 에스트로겐 수용체와는 다른 특이한 항에스트로겐 결합장소(antiestrogen binding site : AEBS)가 있다는 보고도 있다.<sup>71)</sup>

자궁내막선암의 치료에 tamoxifen을 사용했을 때의 결과는 여러 가지 복합적이다.

Swenerton 등<sup>72)</sup>은 7명의 자궁내막선암 환자 중 4명이 tamoxifen에 반응을 보였다고 보고하였고 Bonte 등<sup>5)</sup>은 17명의 환자 중 2명은 완전한 관해, 7명은 부분적인 관해를 보였다고 보고하였다.

그러나 Gynecologic Oncology Group에서 시행한 연구에 의하면 17명의 환자에서 모두 반응을 보이지 않았다고 보고하였다. 그러나 11명의 환자는 8-48주 동안 더 이상 암이 진행되지 않았다고 보고하였다.

또 이 환자들 중 5명은 자궁내막의 선상피암이었는데 이들 중 2명은 4-16주 동안 더 이상 암이 진행되지 않았다고 보고하였다.<sup>73)</sup>

따라서 불행히도 이와 같은 연구 보고로서는 tamoxifen의 치료효과에 대하여 판단을 할 수 없는 단계이다.

본 연구에서는 프로게스테론 수용체가 발현되지 않는 6개의 자궁내막암 세포주에서 tamoxifen과 MPA의 세포증식 억제 효과에 대하여 조사해 보았다.

자궁내막암 세포에 0.1-1 $\mu$ M의 MPA를 처리했을 때에는 세포증식 억제 효과를 나타내지 않았으며

10 $\mu$ M의 MPA를 처리했을 때 약 20% 정도의 세포 증식 억제 효과를 나타낼 뿐이었다.

이와 같은 우리의 연구결과는 Satyaswaroop 등,<sup>74)</sup> Ishiwata 등<sup>75)</sup>의 연구결과 즉 매우 높은 농도에서만 세포증식이 억제된다는 보고와 일치하였다.

또 김 등<sup>76)</sup>이 발표한 보고에 의하면 순천향대학 병원 산부인과학 연구실에서 수립한 자궁내막암 세포주 SCHE-1에 대하여 1 $\mu$ g/ml 이하의 프로그스테론(Sigma, U.S.A.)을 처리했을 때에는 세포에 영향을 미치지 않았으며 5 $\mu$ g/ml 이상에서는 농도에 비례하여 세포의 증식을 억제시켰으며 다핵성, 다핵소체성, 세포의 유두상배열, 선양세포구조 등의 형태학적인 변화도 초래함을 보고하였다.

반면에 대조군으로 사용된 MCF-7 세포주의 경우에는 10 $\mu$ M의 MPA를 처리했을 때 약 60% 정도의 세포증식 억제 효과를 보였다. 이와 같은 결과는 달리 해석하면 자궁내막암 세포주의 경우에는 프로그스테론 수용체가 계속적으로 나타나지 않는 반면에 MCF-7의 세포주의 경우에는 프로그스테론 수용체가 보다 안정되게 계속적으로 출현되고 있음을 의미한다.

본 연구에 사용된 tamoxifen의 농도는 유방암 세포주에서 tamoxifen에 의해 세포증식 억제 효과를 유발한 농도와 동일하며 5 $\mu$ M의 tamoxifen을 10일 동안 처리했을 때 70%에서 100%까지 세포증식 억제 효과를 보여주었다. 1 $\mu$ M의 tamoxifen을 사용하였을 때에는 세포증식 억제 효과를 보여주지 못했는데 이와 같은 성질은 Holinka 등<sup>17)</sup>이 Ishikawa 세포주에 1 $\mu$ M의 tamoxifen을 처리했을 때와 같은 결과였다.

MPA는 세포 내의 프로그스테론 수용체 양을 감소시켜 MPA의 세포증식 억제 효과를 감소시킨다고 보고되어져 왔다.<sup>77)</sup> 대조적으로 임상적인 연구<sup>6)</sup>나 nude mouse 실험에서 보여주듯이 tamoxifen은 자궁내막암 조직 내의 프로그스테론 수용체 양을 증가시킨다고 알려져 있다.

그러나 임상보고에 의하면 MPA와 tamoxifen을 교대로 혹은 동시에 처리했을 때가 MPA 단독 투여 때보다 세포증식 억제 효과에 있어서 더 좋지는 않았다고 보고하였다.<sup>6,8)</sup>

본 연구에서는 HEC-1-A, HEC-1-B, RL95-2에서는 tamoxifen과 MPA를 동시에 사용했을 때에

tamoxifen 하나만을 처리했을 때와 같은 효과를 나타내었으며 tamoxifen을 MPA로 바꾸었을 때에는 세포증식이 다시 회복됨을 알 수 있었다.

AN3CA는 tamoxifen과 MPA를 동시에 사용했을 때에 tamoxifen에 의한 세포증식 억제 효과가 부분적으로 회복되었는데 그 기전은 아직 불분명하나 MPA와 tamoxifen이 단일 수용체에 대하여 같은 효과를 가지지 않는다면 MPA와 tamoxifen이 단일 수용체에 대해 경쟁을 함으로써 나타난 결과라고 설명할 수도 있다.

KLE, SCHE-1은 tamoxifen과 MPA를 동시에 사용했을 때 약간 세포증식 억제 효과가 증가됨을 보여주었는데 이와 같은 사실은 MPA와 tamoxifen이 각기 다른 기전에 의해 작용됨을 시사해 준다. AN3CA, KLE, SCHE-1에서 tamoxifen을 MPA로 바꾸었을 때에는 세포증식이 다시 회복됨을 알 수 있었다.

또 KLE 세포주는 tamoxifen을 MPA로 바꾸었을 때에 세포증식이 회복되는 속도가 다른 세포주보다 느렸는데 KLE 세포주는 MPA에 약간의 반응을 나타내는 세포주였다.

즉 MPA와 tamoxifen을 동시에 혹은 교대로 사용했을 때에 자궁내막암 세포주에 대한 반응이 증가되지 않음을 알 수 있었는데 이와 같은 사실은 MPA와 tamoxifen이 서로 다른 기전에 의해 작용됨을 뒷받침해 준다.

대조군인 MCF-7 세포주에서는 tamoxifen과 MPA를 동시에 사용했을 때에 tamoxifen에 의한 세포증식 억제 효과가 부분적으로 회복되었으며 tamoxifen을 MPA로 바꾸었을 때에는 세포증식이 다시 회복되었다.

Mouridsen 등<sup>78)</sup>에 의하면 tamoxifen을 단독으로 사용했을 때가 tamoxifen과 MPA를 같이 사용했을 때보다 각각 45%, 26%로 반응률이 높다고 보고하였다. 또한 tamoxifen을 단독으로 사용했을 때가 혼합요법 때보다 부작용도 적다고 했다.

그리고 tamoxifen에 의한 자궁내막암 세포 내의 프로그스테론 수용체 양의 변화에 대한 연구도 화학적 방법, 면역 세포조직 화학적 염색법을 이용하여 앞으로 시도해 보아야 할 과제이다.

이번 연구에서는 tamoxifen이 프로그스테론 수용체 음성으로 MPA에 잘 반응하지 않는 자궁내막암

에 대해 강한 세포증식 억제 효과를 가짐을 보여줌으로써 프로게스테론 수용체 음성인 진행된 또 재발된 자궁내막암에서 tamoxifen의 중요성을 시사해주었다. 또한 진행된, 재발된 자궁내막암에서 보조적인 치료로서의 tamoxifen의 역할뿐 아니라 잘 분화되지 않은 자궁내막암에서 일차 화학요법제로서 높은 용량의 tamoxifen을 사용하는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

자궁내막암 세포주를 이용하여 MPA와 tamoxifen이 자궁내막암 세포의 증식에 미치는 영향과 MPA와 tamoxifen을 교대로 그리고 동시에 사용했을 때 자궁내막암 세포의 증식에 미치는 영향에 대하여 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

첫째, MPA는 프로게스테론 수용체 음성인 자궁내막암 세포주에 대해서 세포증식 억제 효과를 나타내지 않았다.

둘째, tamoxifen은 프로게스테론 수용체 음성인 자궁내막암 세포주에 대해서 강한 세포증식 억제 효과를 나타내었다.

셋째, tamoxifen과 MPA를 교대로 또 동시에 사용했을 때 자궁내막암 세포주에 대한 MPA의 반응성을 증가 시키지는 못하였다.

본 연구에서는 tamoxifen이 프로게스테론 수용체 음성이어서 MPA에 잘 반응하지 않는 자궁내막암 세포주에 대해 강한 세포증식 억제 효과를 가짐을 알 수 있었으며 프로게스테론 수용체가 음성인 경우 진행되었거나 또는 재발된 자궁내막암에서 tamoxifen의 중요성을 시사해 준다.

## - References -

1. Kohorn EI : Gestagens and endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1976;4:398-411.
2. Quinn MA, Cauchi M, and Fortune D : Endometrial carcinoma : Steroid receptors and response to medroxyprogesterone acetate. *Gynecol Oncol* 1985;21:314-319.

3. Kauppila AJI, Isotalo HE, Kivinen ST, Vihko RK : Prediction of clinical outcome with estrogen and progestin receptor concentrations and their relationship to clinical and histopathological variables in endometrial cancer. *Cancer Res* 1986;46:5380-5384.
4. Neumannova M, Kauppila A, Kivinen S, Vihko R : Short-term effects of tamoxifen, medroxyprogesterone acetate and their combination on receptor kinetics and 17- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in human endometrium. *Obstet Gynecol* 1985;66:695-700.
5. Bonte J, Ide P, Billiet G, Wynants P : Tamoxifen as a possible chemotherapeutic agent in endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 1989;11:140-161.
6. Carlson JA, Allegra JC, Day TG, Wittliff JI : Tamoxifen and endometrial carcinoma: Alterations in estrogen and progesterone receptors in untreated patients and combination hormonal therapy in advanced neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1984;149:149-153.
7. Zaino RJ, Satyaswaroop PG, Mortel R : Hormonal therapy of human endometrial adenocarcinoma in a nude mouse. *Cancer Res* 1985;45:539-541.
8. Bonte J : Hormone dependency and hormone responsiveness of endometrial adenocarcinoma to estrogens, progestogens and antiestrogens, in *Role of medroxyprogesterone in endocrine-related tumors*. I, Campio et al Eds, New York, Raven Press, Vol. H. 1983;1451-1456.
9. Kim SD, Lee SG, Nam KH, Lee KH, Cho TH : Study on the establishment and characterization of CA 125 producing cell line(SCHE-1) originating from a human endometrial adenocarcinoma and modulation of CA 125 production by Dibutyl cyclic adenosine monophosphate(dbc AMP) 대한산부회지 1994;37(4):756-768.
10. Kuramoto H, Tamura S, Notake Y : Establishment of a cell line of human endometrial adenocarcinoma in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1972;114:1012-1019.
11. Richardson GS, Dickersin GR, Atkins L, MacLaughlin DT, Raam S, Merk L, Bradley FM :

- KLE. A cell line with defective estrogen receptor derived from undifferentiated endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 1984;17:213-230.
12. Way DL, Grosso S, Davis JR, Surwit EA, Christian CD : Characterization of a new human endometrial carcinoma(RL95-2) established in tissue culture, *In Vitro* 1983;19:147-158.
13. Soule HD, Vasquez J, Long A, Alberts BM : A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1973;51:1409-1416.
14. McGuire WL, Horwitz KB, Pearson OH, Segaloff A : Current status of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer* 1977;39:2934-2947.
15. Lott JA, Stephan VA, Pritchard KA : evaluation of the Coomassie Brilliant Blue G-250 method for urinary protein. *Clin Chem* 1983;29:1946-1950.
16. 渡邊慶一, 中根一穂 : 酵素抗体法. 學際企劃 東京 1982:102-113.
17. Holinka C, Hata H, Kuramoto H, Gursipe E : Effects of steroid hormones and antisteroids on alkaline phosphatase activity in human endometrial cancer cells(Ishikawa line). *Cancer Res* 1986;46:2771-2774.
18. DiSaia PJ, Creasman WT : in *Clinical gynecologic oncology* S. Bircher, Ed., Mosby, St. Louis, 3rd ed. 1989:133.
19. Cullen KJ, Yee D, Sly WS, Perdue J, Hampton B, Lippman ME, Rosen N : Insulin-like growth factor receptor expression and function in human breast cancer, *Cancer. Res* 1990;50:48-53.
20. Karey KP, Sirbasku DA: Differential responsiveness of human breast cancer cell lines MCF-7 and T47D to growth factors and 17- $\beta$ -estradiol. *Cancer Res* 1988;48:4083-4092.
21. Korc M, Haussler CA, Trooman NS : Divergent effects of epidermal growth factor and transforming growth factors on a human endometrial carcinoma cell line. *Cancer Res* 1987;47:4909-4914.
22. Taketani Y, Mizuno M : cyclic changes in epidermal growth factor receptor in human endometrium during menstrual cycle. *Endocrinol Jpn.* 1988;35:19-25.
23. Reynolds RK, Talavera F, Roberts JA, Hopkins MP, Menon KMJ : Characterization of epidermal growth factor receptor in normal and neoplastic human endometrium. *Cancer* 1990;66:1967-1974.
24. Talavera F, Reynolds RK, Roberts JA, Menon KMJ : Insulin-like growth factor : receptors in normal and neoplastic human endometrium. *Cancer Res* 1990;50:3019-3024.
25. Pannuti G, Martoni A, Camaggi CM, et al. : In *Proceedings of the International Symposium on Medroxyprogesterone Acetate*. F Cavelli et al Eds, Excerpta Medica Amsterdam 1982:pp. 5-43.
26. Dowsett M, Anshumala L, Smith IE et al. : The effects of low and high dose medroxyprgesterone acetate on sex steroids and sex hormone binding globulin in postmenopausal breast cancer patients. *Br J Cancer* 1987;55:311-313.
27. Philipson KA, Elder MG, White JO : The effect of medroxyprogesterone acetate on enzyme activities in human endometrial cancer. *J Steroid Biochem* 1985;23:1059-1064.
28. Croxtall JD, Elder MG, White JO : Progestin regulation of protein synthesis in endometrial cancer. *J Steroid Biochem* 1988;31:207-211.
29. Croxtall JD, Elder MG, White JO : Hormonal control of proliferation in the Ishikawa endometrial adenocarcinoma cell line. *J Steroid Biochem* 1992; 35:665-669.
30. Croxtall JD, Flower RJ : Lipocortin-1 meditates dexamethasone-induced growth arrest of the A549 lung adenocarcinoma cell line. *Proc nat Acad Sci(Wash.)* 1992;89:3571-3575.
31. Croxtall JD, Pollard JW, Carey F, Forder RA, White JO : Colony stimulating factor-1 stimulates Ishikawa cell proliferation and lipocortin-2 synthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;42:121-129.
32. Burgoyne RD : Calpactin in exocytosis. *Nature (Lond)* 1988;20:331.
33. Zokas L, Clenney JR : The calpactin light chain is tightly linked to the cytokeletal form of calpactin-1. *J Cell Biol* 1987;105:2111-2121.
34. Flower RJ : Eleventh Gaddum memorial lecture.

- Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. *Br J Pharmacol* 1988;94(4):987-1015.
35. Kauppila A : Progestin therapy of endometrial, breast, and ovarian carcinoma ; A review of clinical observations. *Acta Gynecol Scand* 1984;63:441-450.
36. Annual Report of the Treatment in Gynaecological Cancer, International Federation of Gynecology and Obstetrics. Stockholm 1988:20.
37. Quinn MA, Campbell JJ : Tamoxifen therapy in advanced/recurrent endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1989;32:1-3.
38. Sheen YY, Simpson DDM, Katzenellenbogen BS : An evaluation of the role of antiestrogen-binding sites in mediating growth modulatory effects of antiestrogens : studies using t-butyl-phenoxyethyl diethylamine, a compound lacking affinity for the estrogen receptor. *Endocrinology* 1985;117:561-564.
39. Grenman SE, Worsham MJ, Van Dyke DT, England B, McClatchey KD, Babu VR, Roberts JA, Maenpaa J, Carey TE : Establishment and characteristics of UM-EC-2, a transfer-sensitive estrogen receptor-negative human endometrial carcinoma cell line. *Gynecol Oncol* 1990;37:188-199.
40. Katzenellenbogen BS, Norman MJ, Eckert RL, Peltz SW, Mangel WF : Bioactivities. estrogen-receptor interactions. and plasminogen activator-inducing activities of tamoxifen and hydroxytamoxifen isomers in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 1984;44:112-119.
41. Grenman SE, Roberts JA, England BE, Gronroos M, Carey TE : In vitro growth regulation of endometrial carcinoma cells by tamoxifen and medroxyprogesterone acetate. *Gynecol Oncol* 1988;30:239-250.
42. Jamil A, Croxtall JD, White JO : The effect of antioestrogens on cell growth and progesterone receptor concentration in human endometrial cancer cells(Ishikawa). *J mol Endocrinol* 1991;6:215-221.
43. Kasid A, Derynck R, Kickson RB : Evidence that transforming growth factor  $\beta$  is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell* 1987;48:417-428.
44. Baum M, Brinkley DM, Dossett JA, McPherson K, Patterson JS, Rubens RD, Smiddy FG, Stoll BA, Wilson A, Richards D, Ellis SH : Controlled trial of tamoxifen as single adjuvant agent in management of early breast cancer. *Lancet* 1985;1:836-840.
45. Hald I : The use of tamoxifen(Nolvadex) in endometrial cancer. *Rev Endocrine-Related Cancer Suppl* 1981;8:9-15.
46. Myers AM, Moore GE, Major FJ : Advanced ovarian carcinoma : Response to antiestrogen therapy. *Cancer* 1981;48:2368-2370.
47. Ekman P, Snochowski M, Zetterberg A, Hogberg B, Gustafsson JA : Steroid receptor content in human prostatic carcinoma and response to endocrine therapy. *Cancer* 1979;44:1173-1181.
48. Runge HM, Gunther T, Neulen J, Geyer H, Pfeleiderer A : In vitro responsiveness of ovarian epithelial carcinomas to endocrine therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 1986;16:58-63.
49. Shapira A, Virolainen E, Jameson JJ, Ossakow SJ, Carey TE : Growth inhibition of laryngeal UM-SCC cell lines by tamoxifen. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1986;112:1151-1158.
50. Grenman R, Virolainen E, Shapira A, Carey TE : In vitro effects of tamoxifen on UM-SCC head and neck cancer cell lines : Correlation with the estrogen and progesterone receptor content. *Int J Cancer* 1987;39:77-81.
51. Benz C, Hollander C, Miller B : Endocrine-responsive pancreatic carcinoma : Steroid binding and cytotoxicity studies in human tumor cell lines. *Cancer Res* 1986;46:2276-2281.
52. Coesy E, Borgna JL, Rochefort H : Tamoxifen and metabolites in MCF-7 cells : Correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth. *Cancer Res* 1982;42:347-323.
53. Vollenweider-Zerargui L, Barrelet L, Wong Y, Le-Marchant-Berand T, Gomez F : The predictive value of estrogen and progesterone receptors concentrations on the clinical behavior of breast cancer in women. *Cancer* 1986;57:1171-1180.
54. Reddel RR, Murphy LC, Hall RE, Sutherland RL :

- Differential sensitivity of human breast cancer cell lines to the growth inhibitory effects of tamoxifen. *Cancer Res* 1983;45:1525-1531.
55. Murphy LC, Sutherland RLA : High-affinity binding site for the antioestrogens, tamoxifen and CI628, in immature rat uterine cytosol which is distinct from the oestrogen receptor. *J Endocrinol* 1981;91:155-161.
  56. Watts CKW, Murphy LC, Sutherland RL : Microsomal binding sites for non-steroidal anti-estrogens in MCF-7 human mammary carcinoma cells. *J Biol Chem* 1984;259:4223-4229.
  57. Singh RK, Ruh MF, Butler WB, Ruh TS : Acceptor sites on chromatin for receptor bound by estrogen versus antiestrogen in antiestrogen-sensitive and -resistant MCF-7 cells. *Endocrinology* 1986;118:1087-1095.
  58. Cole MP, Jones CTA, Todd IDH : A new antiestrogenic agent in late breast cancer, An early appraisal of ICI. 1971;46:474., *Br J Cancer* 1971;25:270-275.
  59. Jordan VC : Biochemical pharmacology of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* 1984;36:245-276.
  60. King WJ, Greene GL : Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 1984;307:745.
  61. Welshons WV, Lieberman ME, Gorski J : Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. *Nature* 1984;307:747.
  62. Furr BJA, Jordan VC : The pharmacology and clinical uses of tamoxifen, *Pharmacol. Ther* 1984;25:127-205.
  63. Wakeling AE: Cellular mechanisms in tamoxifen action on tumours. *Rev Endocrinol Related Cancer* 1988;30:27-33.
  64. Berry J, Green BJ, Matheson DS : Modulation of natural killer cell activity by tamoxifen in Stage I postmenopausal breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987;23:517-520.
  65. Jordan VC, Mirecki DM, Gottardis MM : Continuous tamoxifen treatment prevents the appearance of mammary tumors in a model of adjuvant therapy. In : Salmon SE and Jones eds. *Adjuvant therapy of cancer*, vol 4, Grune & Stratton : New York 1984:273.
  66. Neumann F : Use of cyproterone acetate in animal and clinical trials : Hormones and antagonists. *Gynecol Obstet Invest* 1972;2:150-179.
  67. Veronesi A, Frustaci S, Tirelli U, et al. : Tamoxifen therapy in postmenopausal advanced breast cancer : Efficacy at the primary tumor site in 46 evaluate patients. *Tumor* 1981;67:235-238.
  68. Engel LW, Young NA, Tralka TS, et al. : Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. *Cancer Res* 1978;38:3352-3361.
  69. Horwitz KB, Costlow ME, McGuire WL : MCF-7 : A human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids* 1975;26:785-795.
  70. Jordan VC, Fritz NF, Torney DC : Endocrine effects of adjuvant chemotherapy and long-term tamoxifen administration on node-positive patients with breast cancer. *Cancer Res* 1987;47:624-630.
  71. Sutherland RL, Murphy LC, Hall RE, Reddel RR, Watts CKW, Taylor LW : Effects of antioestrogens on human breast cancer cells in vitro : Interactions with high affinity intracellular binding sites and effects on cell proliferation kinetics, in *Progress in cancer research and therapy*, F. Bresciani, et al. Eds., Raven Press, New York 1984;31:193-212.
  72. Swenerton KD, Shaw D, White GW, Boyes DA : Treatment of advanced endometrial carcinoma with tamoxifen. *N Engl J Med* 1979;301:105.
  73. Slavik M, Petly WM, Blessing JA, Creasman WT, Homesley HD : Phase II clinical study of tamoxifen in advanced endometrial adenocarcinoma : A gynecologic oncology group study. *Cancer Treat Rep* 1984;68:799-811.
  74. Satyaswaroop PG, Frowt A, Gupride E : Metabolism and effects of progesterone in the human endometrial adenocarcinoma cell line HEC-1. *Steroids* 1980;35:21-37.
  75. Ishiwata I, Nozawa S, Okumura H : Effects of 17  $\beta$ -estradiol and progesterone on growth and mor-



- phology of human endometrial carcinoma cells in vitro. *Cancer Res* 1977;37:4246-4249.
76. Kim MK, Lee SG, Bae DH, Cho TH : Study on the establishment and characteristics of the human endometrial adenocarcinoma cell line and effects of sex steroid hormone on its growth and morphological changes, *순천향대학논문집*. 1994;17(2):663-684.
77. Janne O, Kauppila A, Kontula K, Syrjaia P, Vihko R : Female sex steroid receptors in normal, hyperplastic and carcinomatous endometrium : The relationship to serum steroid hormones and gonadotropins and changes during medroxyprogesterone acetate administration. *Int J Cancer* 1979;24:545-554.
78. Mouridsen HT, Palshof T, Rose C : Therapeutic effect of tamoxifen alone versus tamoxifen in combination with gestagen and oestrogen in advanced breast cancer. In : Henningsen B, Linder F, Steichele C, eds. *Endocrine treatment of breast cancer*, Springer-Verlag : New York 1980:169-177.
-