

정상 유방조직 및 유방암조직에서 에스트로겐 수용체-베타 mRNA의 발현

연세대학교 의과대학 ¹외과학교실, ²Brain Korea 21 Project, ³병리학교실
⁴한림대학교 및 ⁵포천중문 의과대학 외과학교실

박병우^{1,2} · 김기석² · 허민규² · 홍순원³ · 김승일⁴ · 이경식⁵

Expression of Estrogen Receptor- β mRNA in Various Mammary Tissues

Byeong-Woo Park, M.D.^{1,2}, Ki-Suk Kim, B.S.², Min-Kyu Heo, B.S.², Soon Won Hong, M.D.³, Seung-Il Kim, M.D.⁴ and Kyong Sik Lee, M.D.⁵

Departments of ¹Surgery, ²Brain Korea 21 Project, ³Pathology, Yonsei University College of Medicine, Department of Surgery, ⁴Hallym University and ⁵Pocheon ChungMoon University College of Medicine

Purpose: Estrogen signal transduction plays very important roles in both normal mammary development and neoplastic progression. Since the discovery of estrogen receptor- β (ER- β) there have been many controversial reports on the role of ER- β in breast carcinogenesis and progression, and prognostic implications. ER- β mRNA levels were investigated in various mammary tissues in order to verify the role of ER- β expression in breast carcinogenesis.

Methods: Using messenger RNA (mRNA) in situ hybridization, we examined ER- β expression in 60 paired normal and cancer tissues, 11 paired normal and benign breast tumor tissues, and 10 metastatic lymph nodes. We determined the intensity and extent (proportion of cells with positive hybridization) of the mRNA hybridization signals and gave scores 0 to 3; no hybridization (0), minimal (1), moderate (2), and strong (3) by the hybridization intensity and no hybridization (0), hybridization in less than 10% of cells (1), 10~50% (2), and more than 50% of cells (3) by the proportion of positively hybridized cells. Chi-square test, independent t-test or one-way ANOVA test was used for the statistical

analysis and differences were considered to be significant with a p-value of less than 0.05.

Results: There was no statistically difference in ER- β expression between normal and benign mammary tissues. ER β expression was significantly decreased in breast cancer and metastatic lymph node tissues compared with normal mammary and benign breast tumor tissues ($P < 0.01$). The intensity and extent of ER β expression were also significantly lower in breast cancer and metastatic lymph node tissues than in the normal mammary and benign breast tumor tissues ($P < 0.01$). In cases of positive hybridization, the sum of scores of intensity and area were also significantly higher in normal and fibroadenoma tissues than in cancer or metastatic lymph nodes ($P < 0.01$).

Conclusion: ER β transcription decreases in the process of breast cancer development, which suggests a protective role of ER β in breast carcinogenesis. (Journal of Korean Breast Cancer Society 2003;6:75-80)

Key Words: Breast cancer, Carcinogenesis, Estrogen receptor- β , In situ hybridization

중심 단어: 유방암, 발암, 에스트로겐 수용체-베타, 인시투보합법

서 론

성적 발달(sexual development)과 생식주기(reproductive cycle)에 에스트로겐 역할의 중요성은 잘 알려져 있으며, (1) 에스트로겐의 생물학적 효과는 에스트로겐 수용체 (Estrogen Receptor: ER)와 상호결합을 통해 이루어진다. ER은 리간드(ligand)에 의해 활성화되는 전사인자(transcription factor)로 1986년 클로닝된 후(now known as ER α), (2,3) 1996년 새로운 ER인 ER β 의 발견이 쥐와 사람의 조직에서 이루어졌다.(4-6) ER α and ER β 는 각각 6개의 도메인으로 구성되어 구조적으로 유사하고 특히 DNA-binding domain과 ligand-binding domain의 아미노산 동질성은 각각 95%와 55%로 보고되고 있으나 나머지 도메인의 동질성

책임저자 : 박병우, 서울시 서대문구 신촌동 134번지
☎ 120-752, 연세대학교 의과대학 외과학교실
Tel: 02-361-5564, Fax: 02-361-8289
E-mail: bwpark@yumc.yonsei.ac.kr

접수일 : 2003년 6월 6일, 게재승인일 : 2003년 6월 16일
본 연구는 연세대학교 의과대학 Brain Korea 21 Project for Medical Science 및 2002년도 한국유방암간담재단 학술연구비 지원으로 이루어졌음.

은 미미하며, (6) 각 유전자의 위치도 다르며, (7) 발현양상과 조직이 서로 다른 것으로 (8) 볼 때 ER α 와 ER β 는 에스트로겐을 통한 신호전달에 있어 서로 다른 기능을 할 것으로 여겨진다.

ER β 의 발견 이후 그 역할에 대한 연구가 진행되어 왔으나 그 결과는 항상 일치하지는 않았다. 예를 들어, 유방암발암에 있어 ER β 의 역할에 대해서도 발암억제자(protector) 역할을 한다는 보고(9-11)와 발암유도자(inducer) 역할을 한다는 보고가(12) 있으며, 임상-병리학적 인자와 상관성에 대한 연구에서도 양호한 인자와 상관성이 있다는 보고와(11) 나쁜 인자와 상관성이 있다는 보고가(16) 공존하고 있는 실정이다. 또한 예후 인자적 가치에 대해서도 양호한 예후 인자라는 보고와(10,11,14) 불량한 예후 인자라는 보고가(15,16) 있어 논란이 여전하다. 이렇게 서로 다른 결과의 원인은 대상환자의 선정방법, 환자의 수, ER β 의 검색방법의 차이에 기인한 바 크다고 할 수 있다. 현재까지 ER β 에 대한 훌륭한 항체의 개발이 이루어져 있지는 않으나 최근 ER β mRNA in situ hybridization의 결과와 면역조직화학염색법(immunohistochemistry)의 결과가 일치하였다는 보고가(17) 있었다.

따라서 mRNA in situ hybridization 결과가 항상 단백질상의 결과와 일치하지 않기 때문에 그 결과의 해석에 있어 문제가 제기되기도 하지만 Speirs 등(17)의 보고에 따라 ER β mRNA 수준과 단백질의 수준이 일치하는 것으로 보고 본 연구에서는 ER β mRNA in situ hybridization를 이용하여 다양한 유방조직(normal mammary, benign tumor, malignant tumor) 및 전이성 액와림프절에서 ER β 의 발현 정도를 측정하여 유방암 발암과 진행에 ER β 의 역할을 알아보고자 하였다.

방 법

1) 대상 조직

대상은 60명의 관상피 유방암 환자의 정상 및 유방암조직, 11명의 양성유방종양(섬유선종 및 섬유낭종성 변화) 환자의 정상 및 종양조직과 10명의 전이성 액와림프절 조직을 본 교실 조직은행에서 선정하였다. 모든 조직은 수술대에서 절취되어 곧바로 -80°C로 동결처리하였고 사용시까지 -80°C의 냉동고에서 보관하였다.

2) Oligonucleotide probes and ER β riboprobe 준비

ER β mRNA in situ hybridization에 사용할 sense and antisense oligodeoxynucleotide probes의 염기서열은 각각 다음과 같이 디자인하였다: 5'-TGT TAG CGA AGT GGG AAT GGT G-3' (positions 723-743, Genbank accession no. AB006590) and 5'-CAT CCC TGT CCA GAA CAA GA-3'; positions 1194-1175, Genbank accession no. AB006590)

사람 ER β cDNA를 template로 하고 디자인된 oligonucleotide primers를 이용하여 생성된 PCR산물(PCR product)을 pCRII TA cloning vector (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 subcloning하였다. Subclone된 ER β cDNA를 HindIII 또는 NotI으로 잘라 각각 antisense와 sense orientation의 oligo를 만들어 mRNA in situ hybridization에 이용하였다. Digoxigenin-labeling된 riboprobe를 이용하여 생산자의 교법에 따라 (Roche, Indianapolis, IN) transcription reaction을 수행하였다. labeling mixture는 1 mg의 template cDNA (in 13 ml of water), 2 ml의 NTP labeling mixture, 2 ml의 transcription buffer, 1 ml의 RNase inhibitor 및 2 ml의 T7 또는 SP6 polymerase로 이루어졌다. Transcription은 was performed for 2 hours at 37°C에서 2시간 수행하였고 37°C에서 약 15분간 2 ml의 RNase-free DNase를 처리한 후 spin columns를 이용하여 정제하였다.

3) mRNA in situ hybridization

in situ hybridization을 하기 위해 동결된 조직을 5mm 크기로 절편을 슬라이드 위에 만들어 labeled RNA probe를 함유한 30 ml의 hybridization buffer와 함께 58°C humid chamber에서 밤새 반응시켰다. Hybridization 후 조직절편은 상온에서 2x standard saline citrate (SSC)로 1회, 65°C에서 2x SSC로 1회 및 0.1x SSC로 1회 세척하였다. 슬라이드는 buffer I (100 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 7.5)으로 5분간 평형을 맞춘 후 anti-digoxigenin antibody conjugated to alkaline phosphatase (1 : 5,000)를 슬라이드에 점적하였고 상온에서 약 2시간 동안 반응시켰다. Buffer I으로 15분씩 2회 세척 후 조직절편은 for 15 minutes each, the sections were equilibrated with developing buffer (100 mmol/L Tris, 100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L MgCl₂, pH 9.5)으로 5분간 평형을 맞추었고 nitro blue tetrazolium (NBT/BCIP, Roche)으로 발색반응을 유도하였다.

4) mRNA in situ hybridization signals에 대한 grading

Hybridization signal은 병리의사가 슬라이드를 검사한 후 판정하였고 첫째, 반응의 강도(intensity)와 둘째, 반응의 범위(extent: percentage of cells giving a positive signal)에 따라 0~3으로 구분하였다. 반응강도는 no hybridization (0), minimal (1), moderate (2), or strong (3) (Fig. 1)로 분류하였고 반응범위는 no hybridization (0), hybridization signal in less than 10% of the cells (1), in 10~50% of the cells (2), or in more than 50% of the cells (3)로 분류하였다. ER β 발현의 양성판정은 반응강도가 grade 1 이상 또는 반응범위가 grade 2 (10% 이상) 이상인 경우로 정의하였다.

5) 통계학적 분석

통계검증은 SPSS 9.0을 이용한 Chi-square tests, indepen-

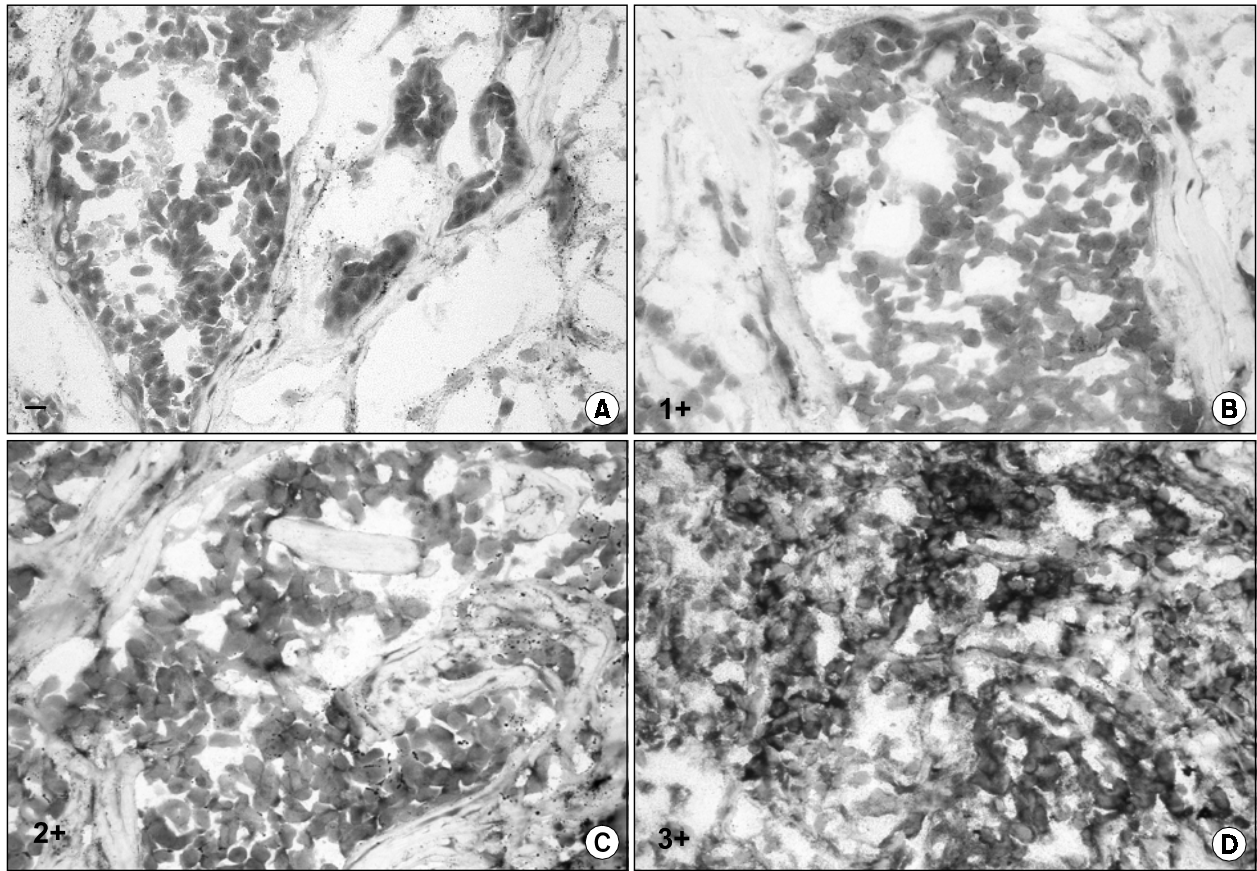


Fig. 1. In situ hybridization of ER β in invasive ductal carcinoma. A. There were no detectable specific mRNA hybridization signals. B. ER β mRNA hybridization signals, appearing blue as a result of nitro blue tetrazolium reaction, were detected in carcinoma cells with minimal intensity. C. ER β mRNA hybridization signals with moderate intensity. D. ER β mRNA hybridization signals with strong intensity.

Table 1. Expression of ER β mRNA in normal breast and breast cancers: Intensity and extent

	Intensity		P value	Extent		P value
	Negative	Positive		Negative	Positive	
Cancer	19 (31.7%)	41 (68.3%)	<0.05	25 (41.7%)	35 (58.3%)	<0.001
Normal	12 (16.9%)	59 (83.1%)		14 (19.7%)	57 (80.3%)	

dent t-test 및 one-way ANOVA test를 시행하였고 P값이 0.05 미만을 통계적 유의수준으로 정하였다.

결 과

1) ER β mRNA hybridization signals

Hybridization signal은 nitro blue tetrazolium 반응의 결과 푸른색으로 발색하여 상피세포의 세포질 내에서 발색양성반응을 보였다(Fig. 1, 2). Fig. 2에서 보듯이 정상유방조직과 양성유방종양조직에서는 대부분의 상피세포에서 강한 양성반응

을 보였으나 악성상피세포에서는 일부의 상피세포에서 낮은 강도의 양성반응을 보였다. Sense probe를 이용한 대조군에서는 hybridization signal이 관찰되지 않았다.

2) ER β 발현의 강도 및 범위

ER β signals 강도는 60예의 유방암조직 중 41예(68.3%)에서 양성이었고 71예의 정상유방조직 중 59예(83.1%)에서 양성반응을 보였으며, 35예(58.3%)의 유방암조직 및 57예(80.3%)의 정상유방조직에서 10% 이상의 상피세포가 ER β mRNA signals 양성을 보였다(Table 1). Both the in-

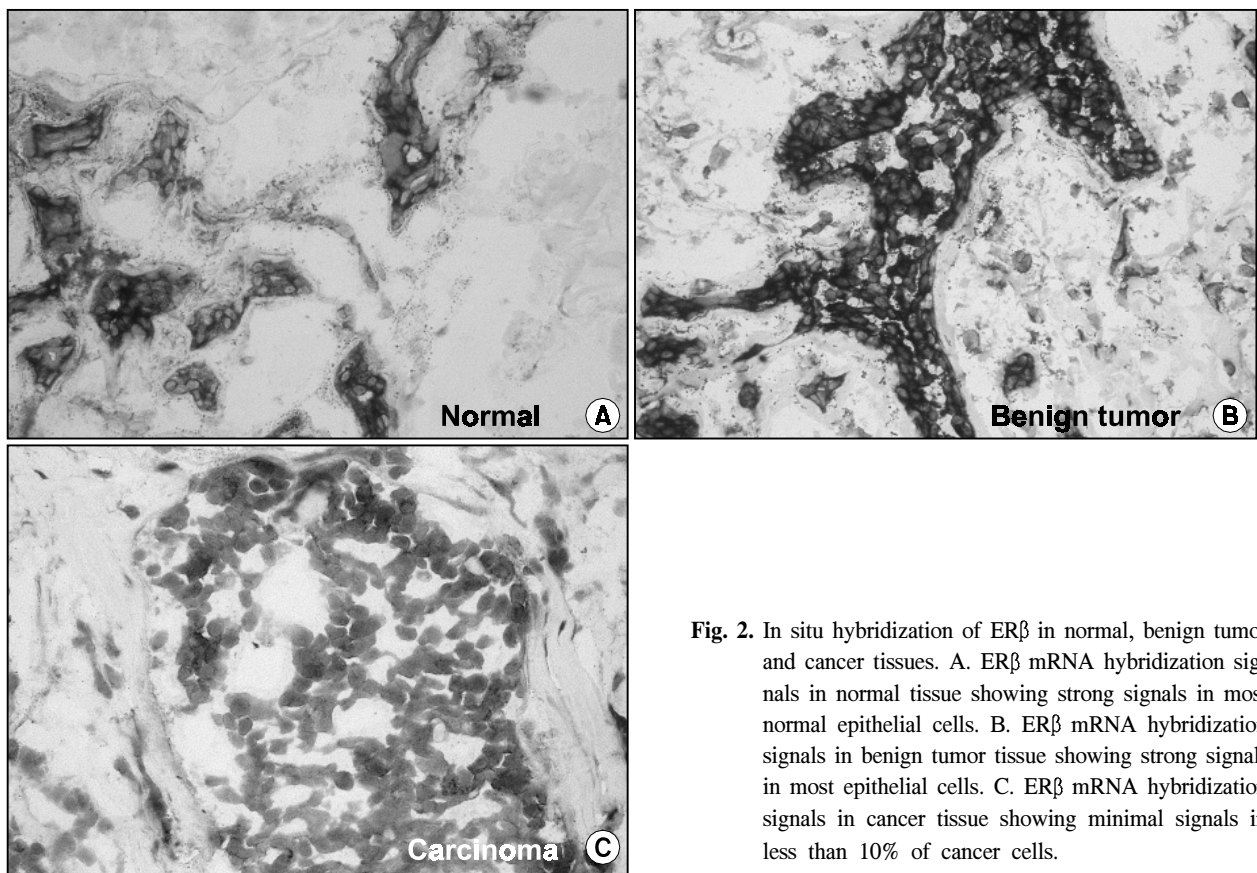


Fig. 2. In situ hybridization of ER β in normal, benign tumor and cancer tissues. A. ER β mRNA hybridization signals in normal tissue showing strong signals in most normal epithelial cells. B. ER β mRNA hybridization signals in benign tumor tissue showing strong signals in most epithelial cells. C. ER β mRNA hybridization signals in cancer tissue showing minimal signals in less than 10% of cancer cells.

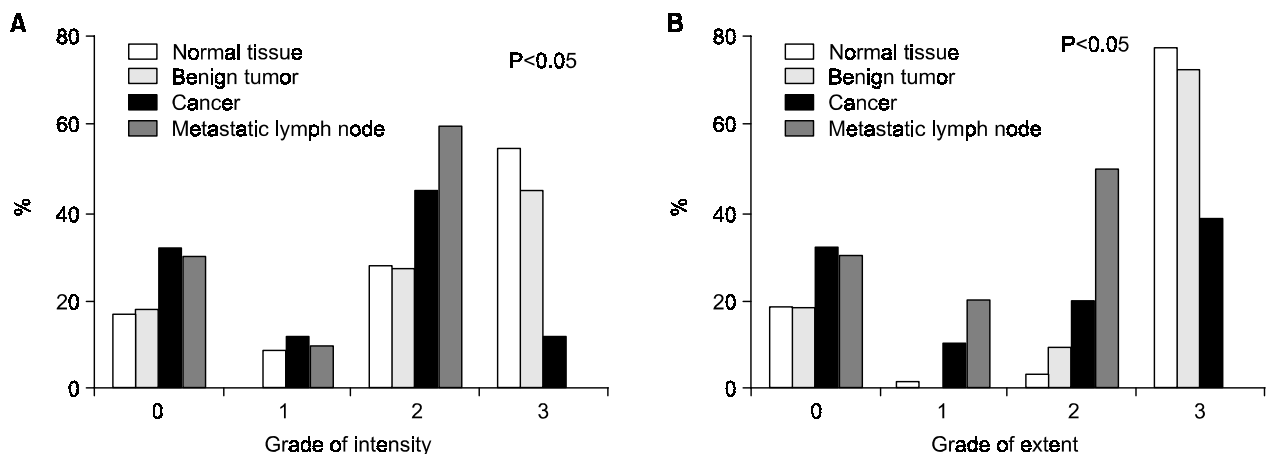


Fig. 3. Comparison of the intensity and extent of in situ hybridization signals in various breast tissues. Both the intensity (A) and extent (B) of ER β expression were significantly higher in normal or benign tumor tissues than in cancer or metastatic node tissues ($P < 0.05$).

tensity and extent of ER β 발현강도 및 발현범위 모두 유방암조직이나 전이성 림프절 조직에서보다 정상유방조직 또는 양성종양조직에서 유의하게 높았다(Fig. 3). 또한 The percentages of negative ER β 발현강도 및 발현범위의 정도를 합한 값은 정상유방조직 5.5, 양성종양조직 5.4, 유방암 조직 4.4 및 전이성 림프절조직 3.6이었고 발현음성빈도는

각각 18.3%, 18.2%, 31.7% 및 30.0%였다. 따라서 정상유방 조직과 양성종양조직에서의 ER β 의 발현의 차이는 없었으나 이들 조직은 유방암 또는 전이성 림프절 조직에 비해 유의하게 발현강도와 발현범위가 높았다($P < 0.05$, Table 2). 종합적으로 ER β 의 발현은 정상유방조직과 양성종양조직에서 발현강도와 발현범위가 유의하게 높은 결

Table 2. Expression score of ER β mRNA in various tissues

	Negative (%)	Positive * (Mean \pm SD)	P value
Normal tissue [†]	18.3	5.5 \pm 0.7	<0.05
Benign tumor [†]	18.2	5.4 \pm 0.8	
Cancer tissue	31.7	4.4 \pm 1.1	
Lymph node	30.0	3.6 \pm 0.5	

* = the sum of signal intensity and extent; [†] = 0.644.

과를 보여 유방암 발암에 있어 억제자(protector) 역할을 할 것으로 추정되었다.

고 찰

ER β 의 발견 이후 ER β 의 유방암 발암에서의 역할(9-12)과 에후인자와의 상관성(10,11,13-16)에 대한 연구가 진행되어 왔으나 서로 상반된 결과들을 보고하였다. 이렇게 서로 상반된 결과의 원인은 환자선택의 기준과 환자수 및 검색방법의 차이에 기인한 바가 크다고 생각된다. 몇몇 연구자들은 면역화학조직 염색법으로 동결조직(11,17)에서 또는 포르말린-포매 조직(8,18)에서 ER β 의 발현을 성공적으로 검색하였다고 보고하였다. 그러나 ER α 또는 Progesterone receptor (PR)에 대한 결과와 달리, 아직 ER β 에 대한 확실한 항체가 개발되어 있지 않고 조직준비방법의 표준화가 이루어져 있지 않아 ER β 에 대한 면역염색법에 의한 결과의 재현성(reproducibility)이 현재까지는 낮은 실정이며 따라서 이에 대한 해석에 신중함이 필요하다. 그럼에도 불구하고 ER β 에 대한 면역염색법의 결과와 mRNA 발현이 서로 일치하였다는 보고(17)가 있었다.

본 연구의 결과 ER β 발현강도와 발현범위 모두 정상유방조직과 양성종양조직에서 유방암조직이나 전이성 림프절조직에 비해 유의하게 발현이 높은 것은 유방암 발암과정에 있어 ER β 발현의 보호적 역할을 시사한다고 하겠다. 또한 발현강도와 범위의 정도를 볼 때 역시 정상 및 양성종양 조직에서 유의하게 높았고 유방암조직 및 전이성 림프절조직으로 진행될수록 그 발현이 낮아지는 경향을 볼 수 있었다(Table 2). 이 결과는 유방암 진행과정에 있어서도 일정한 역할을 할 것임을 시사한다. 이러한 결과는 ER β 의 발현이 정상유방조직(17,19) 및 양성종양조직(19)에서 현저하다는 기존의 보고의 뒷받침 받는 결과이다. 또 증식성 전구암단계(proliferative preinvasive mammary tumors)에서 ER β 의 현저한 감소 및 ER β 발현의 소실이 유방암 발암의 초기 단계임을 시사한 보고(9)와 함께 유방암 발암억제자 역할이 시사된다. 다른 한편으로는 증식기(proliferative phase)에 ER β transcription이 증가하였

는 관찰(10,12,20)과 함께 ER β 의 발현이 화학발암물질에 의한 유방암 발암과 진행에 관여한다(12)는 상반된 보고들이 있기 때문에 아직도 정확한 역할에 대한 연구가 필요한 실정이다. 그러나 Taylor 등(8)은 휴지기 정상 유선(glands of normal resting breast)에서 증가된 ER β 면역염색 반응을 관찰하여 증식기에 ER β transcription은 증가하지만 ER β translation은 감소한다고 하였다. 또 증식성 표지자인 Ki 67의 발현과 ER β 의 발현은 역상관관계가 있고 ER β knock-out mice에서 비정상적인 상피세포의 성장현상, Ki 67의 과발현 및 심한 낭포성 유방질환의 발생 현저하였다.(19) 이상의 결과들을 종합하면 여전히 논란은 있으나 본 연구의 결과와 마찬가지로 ER β 의 유방암발암 억제역할을 지지하는 연구결과가 더 타당한 것으로 생각된다.

대상 환자의 추적기간이 짧아 본 연구에서는 조사되지 못했지만 ER β 발현의 예후인자적 가치에 대해서 역시 논란이 많다. 즉, 양호한 예후인자라는 보고(11,14,18)와 불량한 예후인자라는 보고(15,21,22)가 있다. 그러나 Gustafsson 등(19)은 유방암에서 ER β 의 발현은 예후인자로 작용하지는 못하고 ER β 변형체(variant)에 대한 연구가 진행되면 각 수용체의 기능에 대한 보다 나은 정보를 제공할 수 있을 것으로 전망하였다. 최근 많은 변형체에 대한 보고가 이루어지고 있으며 특히 ER β cx 변형체는 ER α 의 역할을 분쇄하는 ER β 의 dominant negative form으로 지목되고 있어(23) 그 발현정도와 정확한 역할이 주목되고 있다. 본 연구에 이용된 probes는 여러 변형체를 구분할 수 없고 모든 변형체를 포함하는 ER β 의 발현정도를 밝힐 수 있을 뿐이므로 각 변형체의 정확한 발현양상이나 정도 및 그 역할에 대해서는 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로 ER β 의 발현은 정상유방조직에서 현저하였고 유방암조직이나 전이성 림프절조직에서는 그 발현빈도와 강도 및 범위가 유의하게 감소하는 것으로 미루어 유방암발암 및 진행과정에 있어 ER β 의 발현은 보호적 역할을 할 것으로 생각된다. 향후 추적조사결과를 포함하는 예후 인자와 상관성 및 변형체들에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) George FW, Wilson FD. Sex determination and differentiation. In: Knobil E, Neill JD (eds) The Physiology of Reproduction. Raven Press, New York, 1988, pp. 3-26
- 2) Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. Nature 1986;320:134-9.
- 3) Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. Science 1986;231:1150-4.

- 4) Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5925-30.
- 5) Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguere V. Cloning, chromosomal localization and functional analysis of the murine estrogen receptor- β . *Mol Endocrinol* 1997;11:353-65.
- 6) Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER- β : Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996;392:49-53.
- 7) Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, et al. Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4258-65.
- 8) Taylor AH, Al-Azzawi F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol* 2000;24:145-55.
- 9) Roger P, Sahla ME, Makela S, Gustafsson JA, Baldet P, Rochefort H. Decreased expression of estrogen receptor β protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res* 2001;61:2537-41.
- 10) Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH, Murphy LC. Altered estrogen receptor α and β messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Res* 1998;58:3197-201.
- 11) Jarvinen TA, Peltö-Huikko M, Holli K, Isola J. Estrogen receptor β is coexpressed with ER α and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. *Am J Pathol* 2000;156:29-35.
- 12) Hu YF, Lau KM, Ho SM, Russo J. Increased expression of estrogen receptor beta in chemically transformed human breast epithelial cells. *Int J Oncol* 1998;12:1225-1228.
- 13) Dotzlaw H, Leygue E, Watson PH, Murphy LC. Expression of estrogen receptor-beta in human breast tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2371-4.
- 14) Mann S, Laucirica R, Carlson N, Younes PS, Ali N, Younes A, et al. Estrogen receptor beta expression in invasive breast cancer. *Human Pathol* 2001;32:113-8.
- 15) Speirs V, Parkes AT, Kerin MJ, Walton DS, Carleton PJ, Fox JN, Atkin SL. Coexpression of estrogen receptor α and β : poor prognostic factors in human breast cancer? *Cancer Res* 1999;59:525-8.
- 16) Speirs V, Kerin MJ. Prognostic significance of oestrogen receptor beta in breast cancer. *Br J Surg* 2000;87:405-9.
- 17) Speirs V, Adams IP, Walton DS, Atkin SL. Identification of wild-type and exon 5 deletion variants of estrogen receptor β in normal human mammary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1601-5.
- 18) Skliris GP, Carder PJ, Lansdown MRJ, Speirs V. Immunohistochemical detection of ER β in breast cancer: towards more detailed receptor profiling? *Br J Cancer* 2001;84:1095-8.
- 19) Gustafsson JA, Warner M. Estrogen receptor β in the breast: role in estrogen responsiveness and development of breast cancer. *J Steroid Biochem & Mol Biol* 2000;74:245-8.
- 20) Vladusic EA, Hornby AE, Guerra-Vladusic FK, Lupu R. Expression of estrogen receptor β messenger RNA variant in breast cancer. *Cancer Res* 1998;58:210-4.
- 21) Speirs V, Malone C, Walton DS, Kerin MJ, Atkin SL. Increased expression of estrogen receptor β mRNA in tamoxifen-resistant breast cancer patients. *Cancer Res* 1999;59:5421-4.
- 22) Dotzlaw H, Leygue E, Watson PH, Murphy LC. Estrogen receptor- β messenger RNA expression in human breast tumor biopsies: Relationship to steroid receptor status and regulation by progestins. *Cancer Res* 1999;59:529-32.
- 23) Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, et al. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor β cx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res* 1998;26:3505-12.