

정상 유방 조직과 유방암 조직에서 에스트로겐 수용체-베타 및 변형체 발현의 의의

연세대학교 의과대학 ¹Brain Korea 21 Project, ³외과학교실, ²한림대학교 의과대학 외과학교실

김기석¹ · 허민규¹ · 김승일² · 박병우^{1,3}

Expression of Estrogen Receptor- β and Its Variants in Normal Mammary and Tumor Tissues

Ki-Suk Kim¹, Min-Kyu Heo¹, Seung-Il Kim² and Byeong-Woo Park^{1,3}

¹Brain Korea 21 Project and ³Department of Surgery, Yonsei University College of Medicine, ²Department of Surgery, Hallym University College of Medicine

Purpose: Since the discovery of estrogen receptor- β (ER- β), five C-terminal variants of ER- β were identified. We designed this study to investigate the pattern and clinical implications of ER- β and its splicing variants expression in normal and malignant mammary tissues.

Methods: Using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), we examined the expression levels of ER- α and ER- β and its five splicing variants (β 1, β 2, β 3, β 4, β 5) in 50 paired normal and cancer tissues. We measured the densities of RT-PCR products using Tina version 2.10 (Raytest, Germany). Firstly, the incidence and intensity of ER- α and ER- β and its five splicing variants were compared. Then the expression of ER- β mRNA splicing variants was also analyzed with regard to the ER- α protein expression measured by immuno-histochemical staining and the menopausal status of the patients. Chi-square test and paired samples t-test were used for statistical analysis. Differences were considered to be significant with a p-value of less than 0.05.

Results: The expression of ER- β mRNA variants in

normal breast and cancer tissues were as follows: ER- β 2 (100%/100%), ER- β 4 (76%/74%), ER- β 5 (32%/58%), and ER- β 1 (14%/16%). ER- β 3 was not detected at all. In terms of intensity, we observed a significant decrease of ER- β 2 ($P < 0.001$) and an increase of ER- β 5 ($P = 0.004$) in the mRNA expression levels among breast cancers compared to the corresponding normal breast tissues. Compared to the corresponding normal tissues, a significant decrease of ER- β 2 in cancer tissues was observed in patients with ER- α -positive ($P < 0.001$), with age over 50 ($P = 0.01$), and under 50 ($P = 0.04$) as well, but not in patients with ER- α -negative ($P = 0.48$). ER- β 4 also significantly decreased in patients with ER- α -positive ($P = 0.004$) and with age over 50 ($P = 0.07$). ER- β 5 showed a significant increment only in patient aged over 50 ($P = 0.04$).

Conclusion: ER- α mRNA expression significantly increases but ER- β mRNA expression decreases in the cancer tissues compared to the corresponding normal tissues. Among ER- β variant forms, ER- β 2 is predominant in both normal and malignant mammary tissues and ER- β 4, ER- β 5, and ER- β 1 in descending order but ER- β 3 does not express in mammary tissues. The decrease of ER- β 2 and ER- β 4 expression is prominent in cancer tissue especially in ER- α -positive cancers, which suggests that ER- β 2 and ER- β 4 may possess a regulatory function in mammary carcinogenesis. Further investigations to verify the roles of ER- β variants are mandatory. (*Journal of Korean Breast Cancer Society* 2003;6:161-167)

Key Words: Breast cancer, Estrogen receptors, ER- β variant, Carcinogenesis

중심 단어: 유방암, 에스트로겐 수용체, ER- β 변형체, 유방암 발암

책임저자 : 박병우, 서울특별시 서대문구 신촌동 134번지

☎ 120-752, 연세대학교 의과대학 외과학교실

Tel: 02-361-5564, Fax: 02-313-8289

E-mail: bwpark@yumc.yonsei.ac.kr

접수일 : 2003년 7월 24일, 게재승인일 : 2003년 9월 13일

본 논문의 요지는 2003년도 춘계 한국유방암학회 학술대회에서 구연되었음.

본 논문은 2002년도 연세대학교 의과대학 교수연구비의 지원으로 이루어졌음.

서 론

두 종류의 에스트로겐 수용체인 에스트로겐 수용체 α (ER- α)와 에스트로겐 β (ER- β)는 다양한 에스트로겐의 생물학적인 기능을 중개하는 중요한 매개자다.(1-3) 그러

나 이들의 역할은 아직까지 완전하게 규명되지 않았다. 특히 최근에 발견된 ER- β 의 경우에는 더욱 그러하다. 반면에 그들의 특이적인 발현양상이나 knock-out mouse를 이용한 실험에서의 다양한 결과들을 종합하여 볼 때 이러한 두 수용체가 서로 다른 생물학적인 기능을 하리라 생각된다.(4-7)

ER- β 의 발견 이후 유방암 발암과 예후인자와의 상관성 및 예후에 대한 영향에 대한 여러 상반된 연구 결과들이 발표되었다. 즉 ER- β 의 발현이 유방암 발암인자(8) 혹은 발암억제인자(9-11)라는 보고가 있으며, 예후에 대한 영향에서도 양호한 예후인자(10-12) 또는 불량한 예후인자(13,14)라는 상반된 보고가 있다. 이렇게 상반된 결과의 원인으로서는 대상 환자의 수와 범위, 검색방법 등의 차이가 클 것으로 생각되고 한편으로는 ER- β 변형체에 대한 올바른 이해와 검색의 부족도 한 원인으로 생각된다.

ER- β 는 염색체 14q22-24에 위치하고 10여 종류의 엑손이 결실된 변형체가 발견되었으며(15) 염기의 삽입이 이루어진 변형체도 보고되었고(16) 두 개의 다른 전사 개시 부위를 가지고 있는 경우도 발견되었다.(17) 특히 ER- β 의 C-말단 스플리싱 변형체는 C-말단에서 교대 스플리싱에 의하여 모두 5가지의 변형체(β 1, β 2, β 3, β 4, β 5)가 만들어진다.(18,19) 이들 C-말단 스플리싱 변형체는 유방조직에서의 발현빈도가 높고 모두 같은 아미노산의 위치(469번 아미노산)에서 분화하며 ER- β 1을 제외한 다른 C-말단 변형체는 DNA 결합과 coactivator 동원에 필수적인 activation function domain2 (AF2)이 다른 아미노산으로 치환되어 있어(17) 라이간드 결합 친화성에 영향을 미칠 수 있어 이들의 발현과 예후와 상관성 및 항에스트로젠 제제에 대한 내성에도 연관성이 있을 수 있다.

따라서 이 스플리싱 변형체의 발현에 대한 연구의 필요성이 제기되며, 본 연구에서는 RT-PCR를 시행하여 정상 유방조직 및 유방암 조직에서 ER- α , ER- β , 그리고 ER- β 의 C-말단 스플리싱 변형체(β 1, β 2, β 3, β 4, β 5)의 발현양상을 분석하여 ER- β 변형체의 정상 및 악성 유방조직 내 발현양상 및 이들의 유방암 발암에 대한 역할을 고찰하고자 하였다.

방 법

1) 대상

모두 50명의 유방암 환자의 유방암 조직과 같은 환자의 정상유방조직을 세브란스병원 유방암 조직뱅크에서 선택하였으며 환자의 임상-병리학적 소견은 환자의 의무기록을 검토하였다.

2) Total RNA 추출 및 역전사

(1) 총 RNA 추출: 유방조직은 액체질소에 담근 후 사용

전까지 -80°C 냉동고에 보관되어 있던 유방조직을 운반하여 실험실에서 total RNA를 분리하였다. RNA는 막자사발에 액체질소를 이용하여 조직을 분쇄한 후 Trizol Reagent (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 추출하였다. 간단히 요약하면 1 ml의 Trizol을 시료에 넣고 30초간 볼텍싱한 후에 상온에서 5분간 두었다. 남아있는 단백질을 200 μ l의 chloroform을 첨가하여 30초간 섞어주고 상온에서 3분간 둔 이후에 12,000 \times g, 4°C 에서 15분간 원심분리하여 제거하였다. Aqueous phase는 500 μ l의 isopropanol을 넣고 15초간 섞어주고 상온에서 10분간 둔 이후에 10분간 12,000 \times g, 4°C 에서 원심분리하여 침전시켰다. RNA pellet은 75% 에탄올을 이용하여 씻어주고 5분간 7,500 \times g, 4°C 에서 원심분리하였다. RNA pellet은 공기 중에서 말린 후 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 물 100 μ l로 녹인 후 사용 전까지 -80°C 냉동고에 보관하였다.

(2) 역전사: First-strand cDNA 합성은 Superscript II reverse transcriptase (Gibco BRL)를 사용하였다. 1 μ g의 정제된 RNA를 oligo dT primer (Gibco BRL)를 이용하여 역전사를 시켰다. 간단히 요약하면, 1 μ l 10 mmol/L dNTP mix (Promega, Southampton, UK), 4 μ l 5x first-strand buffer (Gibco BRL), 2 μ l 0.1 mol/L dithiothreitol, 그리고 1 μ l Superscript II (200 units)를 넣은 후 여기에 미리 65°C 에서 5분간 둔 이후에 얼음에서 식힌 1 μ l (500 ng)의 oligo dT primer와 10.5 μ l의 RNA (1 μ g)를 넣어 준 후 총 20 μ l를 42°C 에서 50분간 반응시켰다.

3) 중합효소연쇄반응(PCR) 및 Primers

ER- β 의 C-말단 splicing 변형체를 검출하기 위하여 triple-primer PCR method를 이용하였다.(20) 간략히 기술하면 sense primer ER- β 1U 5'-CGA TGC TTT GGT TTG GGT GAT-3'와 antisense primer ER- β 1L 5'-GCC CTC TTT GCT TTT ACT GTC-3'는 268 bp 단편의 ER- β 1 변형체 (GenBank accession no. AB006590 and X99101)를 검출하기 위하여 사용하였고 sense primer ER- β 1U와 antisense primer ER- β 2L 5'-CTT TAG GCC ACC GAG TTG ATT-3'은 214 bp 단편의 ER- β 2 변형체 (GenBank accession no. AF051428), 529 bp 단편의 ER- β 4 변형체 (GenBank accession no. AF061054), 그리고 295 bp 단편의 ER- β 5 변형체 (GenBank accession no. AF061055)를 검출하기 위하여 사용하였다. PCR cycling 조건은 95°C 3분, 40 cycles (95°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30초), 그리고 72°C 에서 5분간 반응시켰다.

Triple-primer PCR 결과 ER- β 2, ER- β 1, ER- β 5는 검출이 되었으나 ER- β 4와 ER- β 3는 검출되지 않았다. 그래서 sense primer ER- β 4-SE 5'-TGG GAA TAC ACT GAG CTT TGA G-3'와 ER- β 2L는 294 bp 단편의 ER- β 4 변형체 (GenBank accession no. AF061054)를 검출하기 위하여 사

용하였고, sense primer ER- β -SE 5'-AGT ATG TAC CCT CTG GTC ACA GCG-3'와 antisense primer ER- β -AS 5'-GCA GTC AAG GTG TCG ACA AAG GCT GC-3'는 400 bp 단편의 ER- β 변형체를 검출하기 위하여 사용하였다. 그리고 sense primer ER- β -SE 5'-GAT GAT GTC CCT GAC CAA GT-3'와 antisense primer ER- β -AS 5'-CAT CCC TGT CCA CAA CAA GA-3'는 모든 C-말단 스플리싱 변형체를 검출하기 위하여 모든 변형체에 공통적으로 보존된 213 bp 단편을 검출하기 위하여 사용하였다. PCR cycling 조건은 95°C 3분, 40 cycles (95°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30초), 그리고 72°C에서 5분간 반응시켰다. Sense primer ER- α -SE 5'-TGC CAA GGA GAC TCG CTA-3'와 antisense primer ER- α -AS 5'-TCA ACA TTC TCC CTC CTC-3'는 263 bp 단편의 ER- α (GenBank accession no. NM-000125)를 검출하기 위하여 사용하였다. PCR cycling 조건은 95°C 3분, 35 cycles (95°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30초), 그리고 72°C에서 5분간 반응시켰다.

역전사 효율은 glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase (GAPDH)를 이용하여 확인하였고 sense primer GAPDH-SE 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'와 antisense primer GAPDH-AS 5'-GCC TGC TTC ACC ACC TTC TT-3'를 사용하였다. PCR cycling 조건은 95°C 3분, 30 cycles (95°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30초), 그리고 72°C에서 5분간 반응시켰다. PCR cycle을 제외한 나머지 반응조건은 다음과 같다. 1 μ l의 역전사 mixture를 총 20 μ l로 반응시켰으며 반응물의 농도는 10 mM Tris-HCl (PH 8.0), 50 mM KCl, 2.0 mM MgCl₂, 0.2 mM deoxy-ribonucleotide-triphosphate (dNTPs), 8 pmol의 각각의 primer를 사용하였고 여기에 0.6 unit의 Ex Taq DNA polymerase (Takara, Ohtsu, Japan)를 넣었다.

4) Triple-primer PCR 방법의 확인

간단히 요약하면 ER- β 1, ER- β 2, ER- β 5가 모두 발현이 되는 유방조직의 cDNA를 이용하여 위에서 설명한 동일한 방법으로 triple-primer PCR를 시행한 이후 전기영동하고 각각의 ER- β 1, ER- β 2, ER- β 5 PCR 생성물을 겔에서 오래된 후 QIAquick™ gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 정제하였고 pGEM-T Easy vector system (Promega, Madison, USA)을 이용하여 각각의 변형체를 클로닝하였다. pGEM-T Easy vector의 클로닝 부위의 앞뒤에는 각각 T7과 Sp6 promotor가 위치하고 있어 T7 primer, 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'와 Sp6 primer, 5'-GAT TTA GGT GAC ACT ATA G-3'를 가지고 각각 ER- β 1, ER- β 2, ER- β 5가 클로닝된 vector를 주형으로 써서 PCR을 시행하였다. 각각 증폭된 PCR 생성물은 전기영동을 한 이후에 QIAquick™ gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 정제하였고 Ultraspec2000 (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)를 이용하여

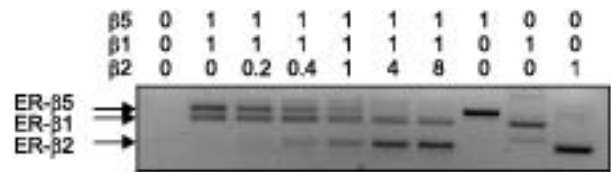


Fig. 1. Validation of triple-primer polymerase chain reaction. Spiked cDNA preparations, containing various amounts (indicated above the autoradiogram) of ER- β 5, ER- β 1, ER- β 2 purified PCR products (β 5, β 1, β 2) were amplified by triple primer PCR, and PCR products were separated on an acrylamide gel. The autoradiogram shows the PCR products obtained.

정량하였으며 ER- β 1, ER- β 2, ER- β 5 PCR 생성물의 양을 변화시키고 한 튜브에 3가지의 primer를 모두 넣은 후 PCR을 시행하여 triple-primer PCR이 정상적으로 이루어지는지를 분석하였다(Fig. 1).

5) PCR 생성물의 분석 및 통계처리

Triple-primer PCR를 시행한 이후에 20 μ l의 PCR 생성물을 6X loading buffer (30% glycerin, 0.025% (w/v) bromophenol blue) 4 μ l에 섞어준 후, 4% Metaphor agarose (Cambrex Bio Science, Rockland, ME, USA)를 이용하여 2시간 동안 Tris-Borate-EDTA Buffer (TBE)에서 전기영동하였다. 다른 PCR 생성물은 2% agarose를 이용하여 Tris-Acetate-EDTA Buffer (TAE)에서 전기영동하였다. 전기영동을 한 이후에 agarose gel은 ethidium bromide (5 μ g/ml)에 염색시킨 후 자외선에서 관찰하였다. 모든 전기영동사진은 TIFF 파일로 저장하였고 에스트로겐 수용체의 발현강도는 TINA 2.10 (Raytest, Germany)으로 분석하였으며 ER- α , ER- β , ER- β 변형체 mRNA의 발현강도의 차이는 SPSS 11.0 (SPSS Inc, Chicago, USA)을 이용하여 paired sample t test에 의하여 통계 처리하였다. 모든 자료는 mean \pm standard error로 표시하였고 통계적 유의수준은 P value 0.05 미만으로 정의하였다.

결 과

1) 정상 및 유방암 조직에서 ER- α , ER- β , ER- β 변형체 mRNA 발현빈도

ER- α mRNA는 정상 및 유방암 조직에서 모두 발현되었으며 ER- β 는 정상 조직에서는 모두 발현되었으나 유방암 조직에서는 50예 중 46예(92%)에서 발현되었다.

ER- β mRNA 스플리싱 변형체의 발현은 ER- β 1은 유방암 조직에서 16%, 정상조직에서 14% 발현되었고, ER- β 2는 정상 및 유방암 조직 모두 100%의 발현빈도를 보였으며, ER- β 3는 정상 및 유방암 조직에서는 발현이 없었으

며, ER- β 4는 정상 조직 76%, 유방암 조직 74%, ER- β 5는 정상조직 32% 및 유방암 조직 58%의 발현을 보여 정상 및 유방암 조직에서 발현 빈도의 유의한 차이는 없었으나 유방 조직에서 ER- β 변형체 mRNA의 발현빈도는 차이가 있어 ER- β 2의 발현이 가장 현저하였으며 ER- β 4, ER- β 5, ER- β 1의 순으로 발현되었고 ER- β 3는 관찰되지 않았다 (Table 1).

2) 정상 및 유방암 조직에서 ER- α 와 ER- β mRNA 및 변형체 발현강도 차이

정상 및 유방암 조직에서 ER- α 및 ER- β mRNA의 발현 양상의 차이가 있어, ER- α 는 정상 조직에 비해 유방암 조직($P < 0.001$)에서 발현강도가 높았으며, ER- β 는 정상 조직에 비해 유방암 조직($P < 0.001$)에서 발현강도가 유의하게 낮았다 (Table 2, Fig. 2). 그러나 ER- β 변형체의 발현강도는 ER- β 5의 경우 유방암 조직에서 정상 조직보다 강도의 증가를 보였으나 ER- β 1, ER- β 2, ER- β 4의 발현은 유방암 조직에서 상대적으로 낮았다 (Fig. 2, Table 3).

Table 1. Incidence of ER- α , ER- β , and ER- β variant mRNA expression

Receptors	Normal tissue (%)	Cancer tissue (%)
ER- α	50 (100)	50 (100)
ER- β	50 (100)	46 (92)
ER- β 1	7 (14)	8 (16)
ER- β 2	50 (100)	50 (100)
ER- β 3	0 (0)	0 (0)
ER- β 4	38 (76)	37 (74)
ER- β 5	16 (32)	29 (58)

3) 유방암 조직 내 ER- α 단백질발현 및 폐경상태에 따른 정상 및 유방암 조직에서 ER- α 와 ER- β mRNA 발현강도 차이

환자군을 면역조직화학염색에 의한 ER- α 단백질발현 결과를 기준으로 ER- α 양성유방암과 ER- α 음성유방암으로, 폐경상태를 고려하여 50세 이상과 50세 이하로 나누어서 ER- β mRNA의 발현강도의 차이를 다시 분석하였다.

ER- β 는 정상조직에 비해 ER- α 음성유방암 조직($P = 0.02$) 및 ER- α 양성 유방암 조직($P < 0.001$) 모두에서 유의하게 낮은 발현강도를 보였고, 50세 이상의 유방암 조직($P < 0.001$) 및 50세 이하($P = 0.01$) 모두에서 유의하게 발현이 낮았다. 종합적으로 ER- β mRNA 발현은 특히 ER- α 양성 유방암 조직에서, 또 50세 이상의 환자의 유방암 조직에

Table 2. A relative expression of ER- β in breast cancer tissue according to ER- α expression and patient age

Status	Ratio*	Mean \pm se [†]	P value
Total	0.53	-0.42 \pm 0.08	<0.001
ER- α (+)	0.47	-0.54 \pm 0.13	<0.001
(-)	0.63	-0.30 \pm 0.12	0.02
Age > 50	0.50	-0.53 \pm 0.19	<0.001
\leq 50	0.55	-0.37 \pm 0.09	0.01

*represents the value calculated by division of the ER- β intensity expressed in cancer tissue by that in corresponding normal tissue, [†] represents the value calculated by subtraction of the ER- β intensity expressed in cancer tissue by that in corresponding normal tissue. A minus quantity (-) means the intensity of normal tissue is stronger than that of corresponding cancer tissue.

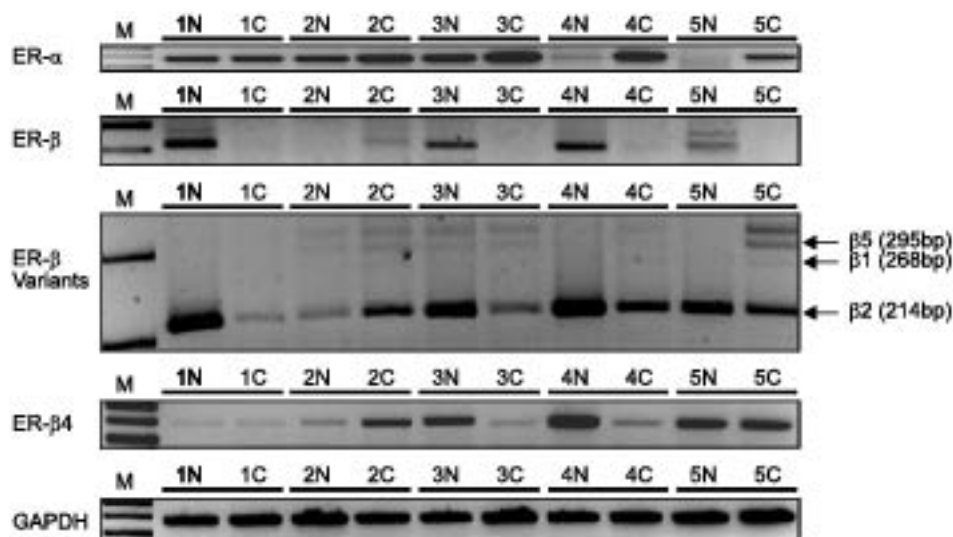


Fig. 2. Expression pattern of ER- α , ER- β and ER- β variants mRNA in normal mammary and their corresponding cancer tissues. N represents normal tissue and C represents cancer tissue. Reverse transcription efficacy was controlled by assessment of GAPDH expression.

Table 3. A relative expression of ER- β variants in breast cancer tissue according to ER- α expression and patient age

Status	ER- β 2			ER- β 4			ER- β 5		
	Ratio	Mean \pm se*	P value	Ratio	Mean \pm se	P value	Ratio	Mean \pm se	P value
Total	0.86	-0.22 \pm 0.07	0.01	0.95	-0.12 \pm 0.11	0.27	1.44	+0.37 \pm 0.11	0.01
ER- α (+)	0.76	-0.43 \pm 0.08	<0.001	0.67	-0.25 \pm 0.08	0.004	1.34	+0.31 \pm 0.20	0.139
(-)	0.95	-0.09 \pm 0.13	0.48	0.88	-0.1 \pm 0.23	0.6	1.35	+0.20 \pm 0.13	0.178
Age >50	0.78	-0.41 \pm 0.14	0.01	0.65	-0.54 \pm 0.21	0.07	1.78	+0.60 \pm 0.25	0.04
\leq 50	0.88	-0.18 \pm 0.08	0.04	0.92	-0.068 \pm 0.13	0.6	1.2	+0.16 \pm 0.15	0.29

*represents the value calculated by subtraction of the ER- β intensity expressed in cancer tissue by that in corresponding normal tissue. A minus quantity (-) means the intensity of normal tissue is stronger than that of corresponding cancer tissue. A positive quantity (+) means the intensity of normal tissue is weaker than that of corresponding cancer tissue.

서 발현강도의 저하가 뚜렷하였다(Table 2).

4) ER- α 단백발현 및 폐경상태에 따른 정상 및 유방암 조직에서 ER- β mRNA 변형체발현강도 차이

ER- β 2는 정상조직에 비해 ER- α 양성 유방암 조직에서 발현강도가 유의하게 낮았으나($P<0.001$) ER- α 음성 유방암 조직에서는 발현강도의 차이가 없었다($P=0.48$). 그리고 50세 이상($P=0.01$) 및 50세 이하($P=0.04$) 환자 유방암 조직 모두 유의한 발현의 저하가 있었으나 50세 이상(폐경 후 여성)의 유방암 조직에서 발현의 저하가 더욱 뚜렷하였다(Table 3).

ER- β 4는 정상 및 유방암 조직 간 발현강도 변화가 유의하지 않았으나($P=0.27$), ER- α 양성 유방암($P=0.004$)과 50세 이상 환자($P=0.07$)에서 유의한 발현강도의 저하를 보였고 ER- α 음성 유방암 조직($P=0.6$)과 50세 이하 환자의 유방암 조직($P=0.6$)에서는 발현강도의 유의한 차이는 없었다(Table 3).

이와는 반대로 ER- β 5는 정상조직에 비해 50세 이상 환자의 유방암 조직에서 발현강도가 높았으나($P=0.04$), 50세 미만 환자의 유방암 조직에서는 통계적 유의성을 볼 수 없었고($P=0.29$), ER- α 양성유방암 조직($P=0.139$)에서 ER- α 음성유방암 조직($P=0.178$)보다 더 높은 발현강도를 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Table 3).

고 찰

본 연구결과 정상조직에 비해 유방암 조직에서 ER- α 의 발현은 증가하고 반대로 ER- β 의 발현은 유의하게 감소하여 유방암 발생과정 중 ER- α 의 증가와 ER- β 의 감소가 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 기존 연구 결과를(13,21-23) 뒷받침하였다. 즉 ER- α 의 발현의 증가는 유방암의 발암의 원인 또는 발암의 결과로 여겨지고, 유방암 조직에서 ER- β 발현의 감소는 ER- β 의 유방암 발암억제

실패를 시사한다고 하겠다. 즉 저자들이 이미 발표한 ER- β 의 발현이 유방암 발암을 억제하는 역할을 할 것이라는 보고(24)를 뒷받침하였다.

정상 및 유방암 조직에서 ER- β 변형체 발현양상은 ER- β 2 (100%/100%), ER- β 4 (76%/74%), ER- β 5 (32%/58%), ER- β 1 (14%/16%)의 순으로 발현빈도의 차이가 있었으나 각 변형체의 정상 및 유방암 조직 간 발현 빈도의 뚜렷한 차이는 없었다. 그러나 ER- β 5의 경우 정상조직보다 유방암 조직에서 발현빈도가 상대적으로 높았으며 모든 유방암 조직에서 ER- β 3의 발현은 관찰되지 않아 조직 특이적인 발현양상을 보였다. ER- β 2의 경우 정상조직에 비해 유방암조직에서 발현강도가 낮아 Iowa 등의 연구 결과와(23) 일치하였으나 ER- β 4 및 ER- β 1의 경우 Tong 등(25)이 최근에 보고한 ER- β 4 (100%) 그리고 ER- β 1 (40%) mRNA가 검출 빈도보다는 상대적으로 낮은 발현빈도를 보여주었다. 이렇듯 실험에 사용된 검체 수, 실험방법, 그리고 환자군의 차이에 따라 실험결과와 차이를 보여주고 있다.

전체적으로 정상 및 유방암 조직간 ER- β 변형체 발현강도는 유방암 조직에서 ER- β 2의 유의한 감소($P=0.003$) 및 ER- β 5의 유의한 증가($P=0.001$)가 관찰되었으나 ER- β 4의 차이는 관찰되지 않았다($P=0.274$). ER- β 2는 모든 조직에서 가장 높은 발현강도를 보였으며 유방암 조직에서의 급격한 감소는 유방암 발암억제 역할의 가능성을 시사하며 ER- β 5는 발현빈도와 더불어 발현강도가 증가하여 유방암 발암에 있어 유도 역할의 가능성을 시사하였으나 ER- β 5 역시 ER- α 와 heterodimer를 이루어 전사억제 역할을 하는 것으로 볼 때(26) 발암에서의 유도역할보다는 발암의 결과 또는 생체 내 다른 기전이 있음을 시사하며 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

유방암 조직 내에서 ER- α 단백발현에 따른 ER- β 변형체의 발현양상의 차이를 분석한 결과 ER- α 단백발현 양성인 경우 유방암 조직에서 ER- β 2 ($P<0.001$) 및 ER- β 4 ($P=0.004$)의 유의한 감소가 관찰되었으나 ER- β 5의 유의한

차이는 없었고($P=0.139$), ER- α 단백질 발현 음성인 경우 정상 및 유방암 조직 간 ER- β 변형체 발현강도의 차이는 유의하지 않았다. 폐경 후 환자의 경우 ER- $\beta 2$ ($P=0.01$), ER- $\beta 4$ ($P=0.07$)의 감소 및 ER- $\beta 5$ 의 증가($P=0.04$)가 뚜렷하였으나 폐경 전 환자의 경우 ER- $\beta 2$ 의 감소($P=0.04$)만이 관찰되었다.

이상의 결과를 볼 때 ER- α 단백질 발현 증가 및 ER- β 의 감소 특히 ER- $\beta 2$ 와 ER- $\beta 4$ mRNA의 감소가 유방암 발암기 전에 관여하리라 생각되나, 이는 ER- α 단백질 발현이 있는 유방암의 발암기 전에 한정될 수 있음을 시사하였다. 즉 ER- α 단백질 발현이 없는 유방암의 경우 호르몬과 관계 없는 기전이 유방암 발암에 관여할 것으로 생각되며 이에 대한 연구가 필요할 것이다. 또한 환자의 폐경상태에 따라 ER- β mRNA 발현양상의 차이가 있는 것으로 볼 때 각 변형체의 역할이 다를 수 있음을 시사하였고 ER- $\beta 5$ 의 역할에 대해서는 발암기 전 또는 유방암 예후 관련성에 대한 연구가 필요하리라 생각된다.

ER- $\beta 4$ 는 정상 조직과 유방암 조직 간 발현강도 차이는 없었으나 유방암 조직 내 ER- α 단백질 발현 및 폐경상태에 따라 분석한 결과 50세 이상의 유방암과 ER- α 양성 유방암조직에서 유방암 조직에서 정상 조직보다 발현강도의 유의한 저하를 보였으며 이러한 결과는 ER- $\beta 2$ 의 발현양상과 일치하였다.

ER- $\beta 1$, ER- $\beta 2$, ER- $\beta 5$ 의 3가지의 변형체 모두 ERE에 결합할 수 있으나 ERE에 구조를 일으킬 만큼 강하게 결합하는 것은 ER- $\beta 1$ 밖에 없다고 알려졌다.(26) 그러므로 ER- $\beta 1$ 을 제외한 변형체들은 아마도 직접적으로 ERE에 결합하여 전사조절을 나타내는 것보다 ER- α 와 heterodimer를 이루어 ER- α 의 전사조절을 억제하는 것으로 보인다.(17,26,27)

따라서 본 연구의 결과를 종합하면 유방암 조직 내 ER- α 단백질 발현 및 폐경상태에 따라 ER- β mRNA 변형체 발현양상에 차이를 보였으며, ER- α 양성 유방암 조직에서 ER- β 특히 ER- $\beta 2$ 와 ER- $\beta 4$ 의 발현 감소가 발암과정에 깊이 연관되어 있는 것으로 생각된다.

결 론

정상 및 악성 유방 조직에서 ER- β 변형체 mRNA의 발현빈도는 차이가 있어 ER- $\beta 2$, ER- $\beta 4$, ER- $\beta 5$, ER- $\beta 1$ 의 순으로 발현되었고 ER- $\beta 3$ 는 관찰되지 않았다. ER- β 의 발현은 정상조직에 비해 유방암 조직에서 유의하게 감소하였으며 특히 ER- α 양성 유방암 및 50세 이상 유방암 조직에서 ER- $\beta 2$ 와 ER- $\beta 4$ 의 감소가 뚜렷하여 이들의 유방암 발암억제에 대한 역할의 가능성을 시사하였다. 또 유방암 조직의 ER- α 단백질 발현 양상 및 폐경상태에 따라 ER- β 변형체 발현의 차이가 있는 것으로 볼 때 ER- α 단

백 양성과 음성, 폐경기 전후에 발생하는 유방암은 발암기전의 차이가 있음을 시사하며 앞으로 ER- β 변형체의 역할에 대한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

REFERENCES

- 1) Warner M, Nilsson S, Gustafsson JA. The estrogen receptor family. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999;11:249-54.
- 2) Ogawa S, Chester AE, Hewitt SC, Walker VR, Korach KS, Pfaff DW, et al. Abolition of male sexual behaviors in mice lacking estrogen receptors α and β ($\alpha\beta$ ERKO). *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:14737-41.
- 3) Hilakivi-Clarke L. Estrogens, BRCA1 and breast cancer. *Can Res* 2000;60:4993-5001.
- 4) Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:11162-6.
- 5) Kregel JH, Hodgins JB, Couse JF, Enmark E, Gustafsson JA, Smithies O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor β . *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:15677-82.
- 6) Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, et al. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors. *Science* 1999;286:2328-31.
- 7) Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 2000;127:4277-91.
- 8) 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;12:1225-8.
- 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, Peltto-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) 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.
- 13) Speirs V, Parkes AT, Kerin MJ, Walton DS, Carleton PJ, Fox JN, et al. Coexpression of estrogen receptor α and β : poor prognostic factors in human breast cancer? *Cancer Res* 1999;59:525-8.
- 14) Speirs V, Kerin MJ. Prognostic significance of oestrogen

- receptor beta in breast cancer. *Br J Surg* 2000;87:405-9.
- 15) Poola I, Abraham J, Baldwin K. Identification of ten exon deleted ER β mRNAs in human ovary, breast, uterus and bone tissues: alternate splicing pattern of estrogen receptor β mRNA is distinct from that of estrogen receptor. *FEBS Lett* 2002;516:133-8.
- 16) Lu B, Leygue E, Dotzlaw H, Murphy LJ, Murphy LC, Watson PH. Estrogen receptor β mRNA variants in human and murine tissues. *Mol Cell Endo* 1998;138:199-203.
- 17) Lewandowski S, Kalita K, Kaczmarek. Estrogen receptor β : potential functional significance of a variety of mRNA isoforms. *FEBS Lett* 2002;524:1-5.
- 18) Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Lehmann JM, Willwon TM, et al. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247:75-8.
- 19) Scobie GA, Macpherson S, Millar MR, Groome NP, Romana PG, Saunders PT. Human oestrogen receptors: differential expression of ER alpha and beta and the identification of ER beta variants. *Steroids* 2002;67:985-92.
- 20) Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH, Murphy LC. Expression of estrogen receptor β 1, β 2, and β 5 messenger RNAs in human breast tissue. *Cancer Res* 1999;59:1175-9.
- 21) Dotzlaw H, Leygue E, Watson PH, Murphy LC. Estrogen receptor-beta messenger RNA expression in human breast tumor biopsies: relationship to steroid receptor status and regulation by progestins. *Cancer Res* 1999;59:529-32.
- 22) Kobayashi S, Inoue S, Ogawa S, Gustafsson JA, Iwase H. Evaluation of oestrogen receptor β wild type and variant protein expression and relationship with clinicopathological factors in breast cancers. *Euro J Cancer* 2002;38:380-6.
- 23) Iwao K, Miyoshi Y, Egawa C, Ikeda N, Noguchi S. Quantitative analysis of estrogen receptor- β mRNA and its variants in human breast cancers. *Int J Cancer* 2000;88:733-6.
- 24) Park BW, Kim KS, Heo MK, Ko SS, Hong SW, Yang W, et al. Expression of estrogen receptor-in normal mammary and tumor tissues: is it protective in breast carcinogenesis? *Breast Cancer Res Treat* 2003;80:79-85.
- 25) Tong D, Schustr E, Seifert M, Czerwenka K, Leodolter S, Zeillinger R. Expression of estrogen receptor beta isoforms in human breast cancer tissues and cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment* 2002;71:249-55.
- 26) Peng B, Lu B, Leygue E, Murphy LC. Putative functional characteristics of human estrogen receptor-beta isoforms. *J Mol Endocrinol* 2003;30:13-29.
- 27) Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Ouchi Y, Muramatsu M. Molecular cloning and characterization of human estrgen receptor β cx: potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res* 1998;26:3505-12.