

에스트로젠 수용체 cDNA 이입 MDA-MB-231 유방암 세포주에서 타목시펜의 효과

가톨릭대학교 의과대학 외과학교실

서영진 · 정상설 · 박우찬 · 최승혜 · 오세정 · 조원일 · 이재학 · 김인철

= Abstract =

The Effect of Tamoxifen on the Estrogen Receptor cDNA-lipofected MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells

Young Jin Suh, M.D., Sang Seol Jung, M.D., Woo Chan Park, M.D.,
Seung Hye Choi, M.D., Se Chung Oh, M.D., Woun Il Cho, M.D.,
Jae Hak Lee, M.D. and In Chul Kim, M.D.

Department of Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Background: The loss of estrogen and progesterone receptors appears to be associated with a progression to less-differentiated and hormone-independent tumors. The gain of hormone independency over time even in estrogen receptor-positive tumors has become another obstacle to endocrine therapy for breast cancer. We tried to regain the hormone dependency in estrogen receptor-negative breast cancer cells by lipofecting estrogen receptor cDNA. **Materials and Methods:** The mutant human estrogen receptor cDNA (pSG5-HE0) was lipofected into estrogen receptor-negative human breast cancer cell line MDA-MB-231, in an attempt to restore their sensitivity to antiestrogen. Then the effects of 17β -estradiol and tamoxifen were studied by counting viable cell numbers after treating the lipofected cell line with either one or together. **Results:** The cell growth was most profoundly inhibited in 4 days after lipofection with mutant human estrogen receptor cDNA, which was overcome after that day. Tamoxifen, as an antiestrogen, showed a growth inhibitory effect slightly strong over combined conditions of tamoxifen and 17β -estradiol compared to estrogen-treated group and to control. **Conclusions:** The temporary induction of estrogen receptor by lipofection with pSG5-HE0 on estrogen receptor-negative human breast cancer cell line MDA-MB-231 showed negative growth control on these cells by tamoxifen, indicating that liposome-mediated estrogen receptor transfection may be used as a novel therapeutic strategy for hormone independent human breast cancers in the near future. (Korean J of Breast Cancer 1998;1:192~202)

Key Words: Breast cancer, Estrogen receptor, Gene therapy, Tamoxifen, Lipofection

서 론

연락처: 서영진, 442-060, 경기도 수원시 팔달구 지동 93
가톨릭대학교 성빈센트병원 외과
Tel: (0331) 240-2149, Fax: (0331) 247-5347

유방암의 발생과 성장에 에스트로젠이 결정적인

역할을 한다는 사실을 알게 되면서, 에스트로젠 길항제는 호르몬-의존성 유방암을 치료하는데 상당히 중요한 역할을 담당하게 되었다¹⁾. 유방암 세포수용체인 에스트로젠 수용체(estrogen receptor : ER)에 결합한 에스트로젠이 유방암의 발생과 성장을 유발한다는 가설이 인정된 이후, 에스트로젠 길항제의 하나인 타목시펜은 현재 임상적으로 가장 널리 쓰이는 약물로서 비(非) 스테로이드성 triphenylethylene이며, 에스트로젠 수용체에 대하여 에스트로젠과 경쟁적으로 결합하여 ER-양성 유방암 세포주의 성장을 억제하는 효과를 보이고²⁾, 실험동물에 유발시킨 호르몬-의존성 유방암의 퇴행을 일으키며³⁾, ER-양성 여성 유방암 환자에서 암의 성장을 억제한다⁴⁾. 또한 ER-양성 환자의 60%가 타목시펜 치료에 반응하고, ER-음성 유방암 환자인 경우 20%만이 타목시펜을 이용하는 내분비요법에 반응한다⁵⁾. 이는 ER이 유방암의 진행을 저지하는 타목시펜의 역할을 매개한다는 것을 시사한다⁶⁾.

호르몬-비의존성 표현형이 발현(expression)되면 타목시펜-저항성이 나타나는데, 그 기전에 대해서는 정확히 알려지지 않았지만 여러가지 가설들이 제시되고 있으며, ER 유전자 중에서 exon 5의 소실로 유전자 구조가 변해서 전사가 조기에 종결되기 때문이라는 주장이 널리 인정받고 있다⁷⁾. 이러한 조기 전사종결 등 유전자 변이로 인해서 불완전한 ER이 발현되고 그 결과 ER의 기능에 결함이 초래됨으로써 타목시펜에 저항성을 나타내는 것으로 지금까지 생각되고 있다. 유방암에서 기능적으로 완전한 ER의 발현을 유도하기 위한 실험이 ER-음성 유방암 세포주를 대상으로 실행되었으며, 정상 형태(wild type)의 ER 유전자를 이입(transfection) 해 본 실험이 보고되었으나, 예상과는 달리 오히려 타목시펜에 의해서 유방암의 성장이 촉진되는 결과를 보였다. 유전자상의 점 돌연변이가 있어도 해당 단백질의 기능에는 이상이 없는 경우를 볼 수 있으므로, 유방암에서도 이를 응용해 볼 소지는 있다고 본다. 그러나 정상적인 ER 기능을 수행하는 변이 ER 유전자를 이입시켜서 ER-음성 유방암 세포주에서 ER을 일시 발현시킨 후 타목시펜의 반응을 알아본 실험은 아직 없었다.

저자는 공격적이고 전이능이 강한 호르몬-비의존성 ER-음성 유방암 세포주에 변이 ER 유전자를 이입함으로써 ER-양성 표현형을 증가시켜서 보다 공격성이 덜하며 전이능이 약한 호르몬-의존성 암으로의 변화를 유도하여, 정상 ER 유전자를 이입했던 경우와 달리 타목시펜을 이용하는 내분비요법의 반응성을 높일 수 있는지를 알아보고자 하였다. 이를 위하여 물리적 유전자 이입매개체(vector)인 liposome을 이용해서 변이 ER 유전자를 이입한 ER-음성 인간 유방암 세포주에서 타목시펜(tamoxifen : TMX)과 17 β -estradiol (E2)이 변이 ER 유전자가 이입된 유방암 세포의 성장에 미치는 효과를 알아보았다.

재료 및 방법

1. 세포주 배양

인간 유방암 세포주 중에서 ER-음성이면서 ER mRNA가 발현되지 않는 MDA-MB-231 세포주⁸⁾를 한국 세포주 연구재단에서 분양받아 사용하였다. 이 세포주를 10% fetal bovine serum (FBS)(Life Technologies, Grand Island, NY., USA)과 gentamicin (50 μ g/ml)(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM)/F-12 (Life)로 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기(#6100-220, Precision Scientific, Chicago, IL., USA)에서 계대배양하였다.

세포 배양 실험을 위해서 6-well culture plate (Corning Co., Corning, NY., USA)에 3 \times 10⁵ 세포/well를 접종한 후 배양하였고, trypan blue 염색법을 이용하여 세포의 생존 여부를 확인했으며⁹⁾, 생존 세포 수는 Neubauer hemocytometer (Levy Ultr Plane, Palo Alto, CA., USA)를 이용해서 계수하였다.

2. 인간 태반 알칼리 인산화 효소(Human placental alkaline phosphatase : ALP) 및 ER cDNA 제조

본 연구에서 사용한 표지유전자인 ALP를 함유하는 plasmid (RSVh APT40)는 8.107 kb로 pBR322 골격에 RSV (Rous sarcoma virus) promoter가 삽입된 plasmid¹⁰⁾로 미국 Michigan 대학교 Nabel 교수로부터

터 기증받았고, pSG5-HE0는 pSG5 골격에 1.8 kb의 ER 기능분절(functional domain) E 내부에 위치하는 아미노 말단에서 400번째 아미노산인 glycine이 valine으로 치환된 변이 인간 ER cDNA가 들어 있는 plasmid¹¹⁾로 프랑스 Strasbourg 소재 Pasteur 대학교의 Chambon 교수로부터 기증받아서 사용하였다. 이들 plasmid를 transformation-competent *E. coli*에 CsCl법으로 이입해서 충분한 양을 얻은 후¹²⁾, Qia-gen maxi kit (Qiagen, Chatsworth, CA., USA)의 column 방법을 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다.

3. 이입된 ALP유전자의 발현 확인

본 연구에서 표지유전자(reporter gene)로 사용한 ALP 유전자의 세포주 내로의 이입을 확인하기 위해 조직염색방법을 변형한 염색법을 사용하였으며¹³⁾ 그 방법을 간단히 기술하면 다음과 같다. ALP 유전자 이입 48시간 후 배양이 완료된 세포주를 phosphate-buffered saline (PBS)(Life)으로 세척한 후에 PBS 1 ml를 첨가하여 4℃에서 5분간 방치한 다음, 고정액(2% formaldehyde (Sigma), 0.2% glutaraldehyde (Sigma)가 함유된 PBS 용액) 2 ml를 첨가하여 65℃에서 60분간 반응시키는 불활성화 과정을 실시하였다. 다음으로 NBT/BCIP 용액(Life) 1 ml를 각 well에 첨가하고 37℃에서 배양해서 발색반응을 유도하여 유전자 이입을 확인하였다.

4. 인간 유방암 세포주로의 ER 유전자의 이입

유전자 이입에 사용한 liposome은 DOSPER™ (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)로서, 이는 polycationic liposomal reagent로 화학명칭은 1,3-di-oleoyloxy-2-(6-carboxy-spermyl)-propylamid (C₅₈H₁₁₃O₁₃N₅)이다. 먼저 MDA-MB-231 세포주를 6-well culture plate에 3×10⁵ 세포/well로 접종한 후, 바닥면의 60-70%를 차지할 정도가 되도록 단층으로 배양하였다. 배양 후 Opti-MEM (Life) 1 ml로 2회 세척한 다음 배양액 1 ml를 첨가하여 세포의 건조를 막는 동안, DOSPER™와 이입시킬 유전자를 Opti-MEM 50 µl로 각각 희석시킨 후에 혼합하여 15분간 실온에 방치해서 Dosper/DNA 복합체 형성을 유

도한 후, 이 복합체를 각 well에 60 µl씩 첨가한다. 이 상태로 준비된 세포주를 6시간 배양시킨 후(37℃, 5% CO₂), 각 well에 배지 1 ml를 첨가하고 다시 24시간 배양시킨 다음, 이전의 배양액을 버리고 Opti-MEM으로 2회 세척하고, 새로운 배양액 2 ml를 첨가해서 24시간 배양한다(37℃, 5% CO₂). 유전자 이입 후 매 48시간마다 배양액과 TMX와 E2 등 나머지 약제들도 모두 새로 갈아 주었다.

5. 세포 배양 실험

세포 배양 실험에 사용한 배지는 DMEM/F-12 (Life)였다. 이 배양액에서 외인성 estrogen의 영향을 95% 이상 제거하기 위해서 charcoal (Sigma), dextran (Sigma) 과 sulfatase (Sigma)로 처리한 5% 비활성화 FBS를 첨가하였으며¹⁴⁾ 세균에 의한 배지의 오염을 막기 위해서 gentamicin (50 µg/ml)을 모든 배지에 넣었고, 배양액에 첨가한 실험 약제는 tamoxifen (Sigma)과 17β-estradiol (Sigma)이었으며, 이들 약제를 최종 농도가 1 µM과 1 nM이 되도록 하나씩 또는 함께 넣었고, 이들 약제를 첨가하지 않고 세포 성장에 영향을 주지 않는 0.05% ethanol만 넣어준 경우를 대조군(mock-transfected)으로 설정하였다¹⁵⁾. 모든 경우에 배양액과 첨가제는 48시간 마다 새로 갈아 주었고, 유전자 이입부터 48시간 간격을 두고 살아 있는 유방암 세포의 수를 hemocytometer를 이용하여 세수하였으며, 배양 실험은 동일한 조건하에서 3회 반복하였다.

6. ER RNA의 분석 및 ER 단백질 발현의 확인

ER 유전자 이입 확인은 ER mRNA 발현 확인을 통해서 실시하였다. 즉, 각 검체로부터 guanidinium thiocyanate 추출방법¹⁶⁾을 따라서 전체 RNA를 분리하여, Version 3.3 cDNA Cycle kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 cDNA를 제조하였다. 이렇게 제조된 cDNA를 가지고 역전사효소 중합효소 반응(RT-PCR)을 통해서 이입된 ER 유전자 발현을 확인하였다. 이 때 사용한 oligonucleotide primers (Bioneer, 청원, 한국)는 사람의 정상 ER 유전자의 1584-1603 bp 부위(sense : CATCATCTCGGTTC-GCATG)와 1853-1872 bp 부위(antisense : CTGTA-

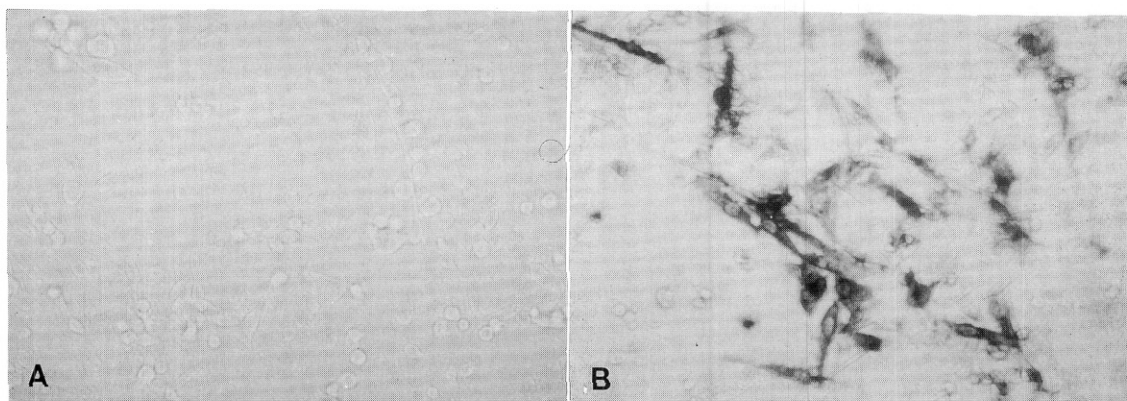


Fig. 1. Histochemical staining of the (A) mock- and (B) ALP-transfected MDA-MB-231 ER-negative human breast cancer cells. The dark brown cells indicate positively stained cells (Original magnification; $\times 400$).

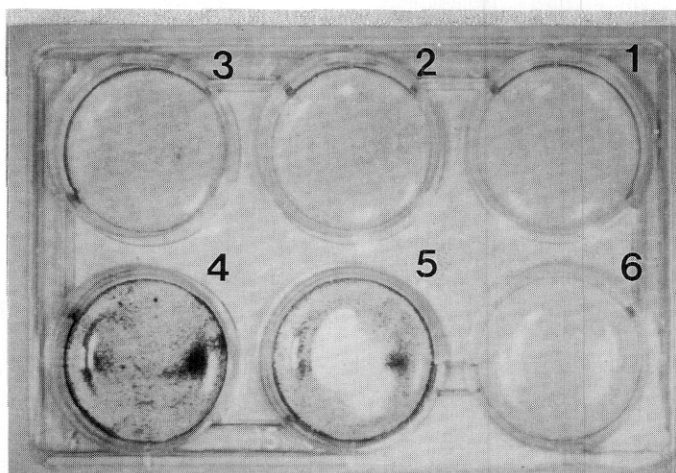


Fig. 2. Determination of transfection efficiency of liposome and DNA complex using histochemical stain. 1, mock-transfected control; 2, 1 μ g; 3, 1.5 μ g; 4, 2 μ g; 5, 3 μ g; 6, 5 μ g of DNA each. The amounts of liposome was fixed to 10 μ l in each well.

CAGATGCTCCATGCC)를 사용하여, 나타나는 band의 크기가 289 bp가 되도록 하였다¹⁷⁾. RT-PCR 반응은 denaturation (93 $^{\circ}$ C, 1분), annealing (50 $^{\circ}$ C, 30초), polymerization (72 $^{\circ}$ C, 1분)의 35 cycles로 automated DNA thermal cycler (#PTC100, MJ Research Inc., Watertown, MA, USA)를 사용하여 실시하였고, 그 결과는 1.2% agarose gel (Life)에서 확인하였다.

또한 세포 표면에서 ER 단백질의 발현을 확인하기 위하여 사람 ER 단클론 항체(H222)를 이용해서 immunoblotting을 시행하였다¹⁸⁾. 여기에 사용한 일

차 항체인 H222는 Chicago 대학 Ben May Institute의 Greene 박사로부터 기증받은 것이고, 이차 항체로는 anti-rat IgG 다클론항체(Pierce, Rockford, IL., USA)를 사용하였다.

먼저 nitrocellulose paper를 block한 후 일차, 이차 항체를 차례대로 결합시킨 다음, horse raddish peroxidase (HRP)-Streptavidin 복합체(Life)와 반응시키고 diaminoben-zidine (DAB)(Life)으로 발색시켜 65 kDa 크기의 ER band를 확인하였다¹⁹⁾.

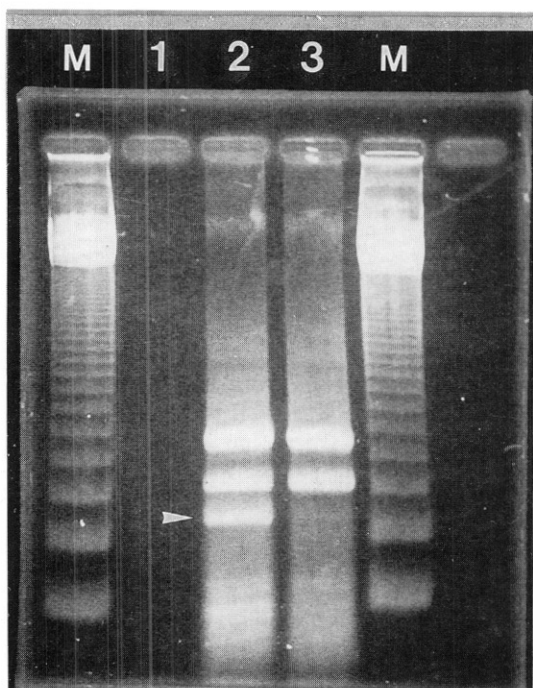


Fig. 3. Expression of ER gene (white arrow head; 289 bp) in MDA-MB-231 ER-negative human breast cancer cells following lipofection of pSG5-HE0. PCR analysis was performed on cDNA synthesized from RNA obtained in ER- (lane 2) and mock-transfected (lane 3) cell lines. M denotes 123 standard size marker (Life), lane 1 is H₂O as a negative control.

7. 통계학적 방법

통계에 사용한 프로그램은 SPSS for Windows (SPSS Inc., Version 6.0)이었으며, 세 번의 배양 실험에서 얻어진 값들을 이용해서 분산분석을 하였고, 신뢰도 95%로 *P* 값이 0.05 미만인 경우를 의미 있다고 보았다.

동일한 억제 처리 조건하에서 첫날부터 6일까지의 생존 세포수 사이의 비교는 t-test를 시행했으며, 각 측정일에서 처리한 억제간의 비교는 one-way ANOVA 검사를 이용하였다.

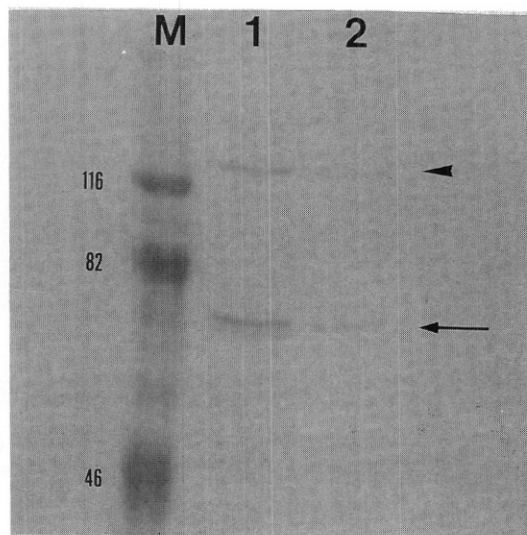


Fig. 4. Expression of ER protein from cells grown in culture media on the day 4 (lane 1) and the day 6 (lane 2). M denotes standard size marker (Biorad, Hercules, CA., USA). Black arrow indicates normal ER protein (65 kDa), black arrow head shows ER variant (=120 kDa).

결 과

1. ALP 유전자를 이용한 유전자 이입 및 이입 효율 확인

ALP 유전자의 암세포주로의 이입을 확인하기 위하여 NBT/BCIP를 이용한 조직화학 염색을 시행하고, 이를 현미경하에서 확인하였으며(Fig. 1), Dosper와 plasmid DNA의 적정 비율을 알아보기 위해서 Dosper 농도는 10 μ l로 고정하고 plasmid DNA 농도를 0, 1, 1.5, 2, 3, 5 μ g로 변화시켜 유전자 이입을 비교하니 2 μ g DNA를 첨가했을 때(well 4) 이입 효율이 가장 높게 나타났다(Fig. 2).

2. 유방암세포주로의 ER 유전자 이입의 확인

ALP 유전자를 이용한 결과에서 판명된 liposome/DNA 복합체의 적정 농도 비율에 따라서, ER 유전자를 ER-음성 MDA-MB-231 세포주에 이입하는 실험을 시행하였다. 표지유전자인 ALP 유전자와는 달리 ER 유전자의 이입은 이입이 완료된 세포주에서

Table 1. Cell growth influence in the presence of tamoxifen and 17 β -estradiol

Condition	Cell No. ($\times 10^5$ cells)		
	Day 2	Day 4	Day 6
Control	5.9 \pm 0.4	5.9 \pm 0.6	11 \pm 0.1
Tamoxifen	5.1 \pm 0.6	4.3 \pm 0.3	6.3 \pm 0.3
17 β -Estradiol	5.5 \pm 0.3	5.4 \pm 0.3	7.8 \pm 0.1
TMX*+E ₂ [†]	4.6 \pm 0.3	4.4 \pm 0.3	5.2 \pm 0.2

* TMX, Tamoxifen; [†] E₂, 17 β -Estradiol; [‡], MDA-MB-231 cells were seeded in wells at 3×10^5 cells/well. Tamoxifen and estradiol were added to a final concentration of 1 μ M and 1 nM, respectively, at 24 hours after lipofection. Media containing appropriate additives were changed every 48 hours. Total incubation was for 6 days; [§], Survived cell numbers are the mean of three experiments \pm Standard Deviation; ^{||}, Culture Media; DMEM/F-12+charcoal-dextran and sulfatase-treated 5% heat inactivated fetal bovine serum+gentamicin.

전체 RNA를 분리하여 RT-PCR과정을 실시하여 확인하였다. 유전자가 이입된 세포주에서는 289 bp 크기의 band가 확인되었다(Fig. 3).

3. ER 유전자 단백질의 유방암세포주에서의 발현 확인

ER 단백질의 발현은 ER 단클론 항체(H222)를 사용하여 발색시키는 immunoblotting을 통해서 확인하였다. 즉, 일차 항체인 H222를 세포에서 추출한 단백질과 반응시켰고 그 결과 65 kDa 크기의 band가 이입세포주에서 나타나는 것을 알 수 있었으나²⁰⁾, 약 120 kDa 크기의 예상치 않았던 band도 함께 관찰되었다(Fig. 4).

4. Tamoxifen과 17 β -estradiol 및 병합처리 배양액에서의 유방암 세포주의 성장억제 효과

배양 2일째에서는 대조군과 실험군이 큰 차이가 없었고(P=0.1710), 4일째가 되면 대조군에 비해 TMX-처리군과 병합처리군에서 성장억제 효과를 볼 수 있었으며(P=0.0203), 6일째에서는 대조군에 비해

서 나머지 세 실험군에서의 세포성장이 저조했고, E2-처리군보다 TMX- 또는 병합-처리군에서 세포성장 억제 효과가 두드러졌다(P=0.0000)(Table 1).

고 찰

유방암의 수술 후 치료방침 결정 및 예후를 판단하는데 정보를 제공해주는 인자들로는 임상적 병기 인자들과 ER과 프로게스테론 수용체(progesterone receptor : PR) 등 세포 수용체를 들 수 있으나²¹⁾, 최근에는 분자생물학적 지표에 관해서 많은 연구가 진행되고 있다^{22,23)}. 지금까지 알려진 많은 예후 예측인자들 중에서 ER과 PR이 병기와 예후 예측에 있어서 비교적 상관관계가 높아 임상적으로 가장 널리 이용되고 있으나, PR의 발현은 ER에 의해서 조절되고²⁴⁾, 전사과정에 자가조절기전도 존재하므로²⁵⁾, ER 단백질의 발현 여부가 유방암에서의 내분비치료 반응 여부를 결정짓는다고 할 수 있다²⁶⁾. 또한 ER 단백질 양성 여부가 유방암의 내분비요법-저항성과 인과관계에 있다기 보다는, 그 이하 분자수준에서의 결합 여부가 상호 연관성을 더 정확하게 반영한다는 증거가 실험적으로 제시된 이후²⁷⁾, 유전자 수준에서의 연구가 촉진되어 왔는데, Walter 등²⁸⁾이 ER cDNA 염기 서열을 밝혀낸 이후로 ER 유전자의 염색체상 위치와 물리적 구조에 대한 많은 정보를 알게 되었다. ER은 주로 세포질에 위치하는 특이 단백질이지만 핵내에도 존재하며, 에스트로젠이 작용하게 될 표적기관을 형성한다. 그러나, 단백질 수준의 ER과 PR의 상태와 유전자 수준의 상태가 서로 다른 경우가 존재하기 때문에 많은 의문이 생겨났으며, 단백질 검사상 ER-양성이지만 PR-음성인 경우는 기능적으로 ER-음성이라 할 수 있고, 반대로 ER-음성이지만 PR-양성인 경우 호르몬-비의존성 표현형으로 볼 수 있는데, 이 경우 아직까지 일치된 견해가 없지만, 유방암 조직 자체가 균질하지 않은 것에 기인한다고 여겨지므로²⁹⁾, 단백질 검사보다는 유전자, 즉 mRNA 또는 mRNA 전사 직후의 ER과 PR 상태를 평가하는 것이 바람직하다⁷⁾.

최초로 유방암의 수술 후 보조 내분비 요법에 도입된 에스트로젠 길항제는 1-p-2-(diethylamino)-

ethoxy-phenyl-2-(p-methoxyphenyl)-1-phenylethanol로 MER-25라는 이름으로 불렸지만, 지금은 타목시펜이 가장 널리 쓰이고 있다⁶⁾. 타목시펜은 분자량이 371.53인 비스테로이드성 항에스트로젠 약제로 화학명은 trans-1-(4-beta-demethylamino ethoxyphenyl)-1,2-diphenylbut-1-ene이며, 1971년에 최초로 소개된 이래 여러 임상실험을 통해서 그 효과를 인정받았고¹⁾, 이들은 에스트로젠과 경쟁적으로 ER에 결합함으로써 에스트로젠과 ER의 결합을 방해한다. 그렇지만, 타목시펜은 순수한 형태의 에스트로젠 길항제가 아니므로 약간의 에스트로젠 항진작용도 지니고 있다³⁰⁾.

ER-양성 유방암도 타목시펜 투여 초기에는 높은 반응을 보이다가 점차 내성을 보이는 경우가 늘어서 30-40%에서 표현형이 변화하는데³¹⁾, 그 기전은 아직까지 완전히 밝혀지지는 않았으나, Jordan³²⁾은 ER의 소실, 세포질에서의 타목시펜 대사산물 불안정화, 수용체 변이, 세포내 신호전달체계 변화 등을 그 원인으로 보았으며, McGuire 등³³⁾은 유방암에서 ER의 변형들을 발견했으며, 특히 검사 대상인 ER-음성/PR-양성 환자의 절반에서 exon 5의 유전자 결손이 나타나는 것을 확인하였다. 이들이 확인한 변이 중 exon 5의 결손은 에스트로젠이 없이도 계속해서 암의 성장을 촉진하는 표현형을 만들었고, exon 7의 결손은 정상적인 ER의 기능을 방해했다⁷⁾. Roodi 등³¹⁾은 ER-음성 표현형은 ER 유전자 coding region의 변이가 원인이 아니라 전사 또는 전사 이후 단계에서 ER이 불충분하게 발현된 결과라고 주장했지만, Dorssers와 van Agthoven³⁴⁾은 유전적 변이가 호르몬-비의존형을 에스트로젠 길항제에 저항성을 띄는 호르몬-비의존형으로 변형할 수 있음을 보였는데, 이런 변화들이 호르몬-비의존성 표현형의 발현을 유도하고, 그 결과 타목시펜의 성장억제 효과를 감소시킨다고 여겨진다³⁵⁾. 그러므로 ER의 정상적 발현이 억제되거나 또는 미미한 수준인 경우는 먼저 ER의 발현을 정상적인 수준에 가깝게 유도하는 것이 우선 요구된다³⁶⁾.

Petrangeli 등³⁷⁾이 ER 유전자 이입이 새로운 치료의 하나로서 그 가치가 있다고 역설한 이후, Garcia와 Rochefort³⁸⁾ 그리고 Long과 Rose³⁹⁾에 의해서 ER-

음성 유방암 세포주에 ER을 이입하면 세포주의 전이능이 약해지고 침윤정도가 감소함을 알게 되었다. 저자는 ER cDNA의 이입이 유전자요법의 하나로 자리잡을 수 있기 위해서는 임상에 적용할 수 있어야 한다는 생각으로, 자가면역반응이 없으며 생식선 세포로 이동하지 않아서 새로운 문제를 야기할 가능성이 없고, 독성이 없으며 동물실험 결과 혈청에 변화를 유발하지 않는 것이 확인된 liposome⁴⁰⁾을 이입 매체로 선택하였다.

지금까지 보고된 *in vitro* 실험은, 이입된 세포주만 선택하기 위해서, 대상 세포주에 ER plasmid와, hygromycin 등 항생제를 이용한, selection plasmid를 동시에 이입하고, 이입된 세포주만을 고른 후 이들 선택한 세포들을 다시 배양해서 약제 반응성이나 기타 ER-의존성 인자의 발현에 대한 연구를 해 왔다. 정상적으로 ER의 발현은 일정 수준에 이르면, 더 이상의 ER mRNA 발현을 억제하는 자가조절 현상을 보인다⁴¹⁾. 그러나 이 때 에스트로젠이 추가로 공급되면 ER의 발현이 계속해서 증가하는 현상을 볼 수 있고⁴²⁾, Gaben과 Mester⁴³⁾는 이를 BALB/C 쥐에서 실험적으로 증명했다. 그러나 항구적으로 ER이 표현되도록 조작한 비(非) 암세포주와 암세포주를 상대로 한 실험에서는 에스트로젠의 작용이 반대로 나타났는데^{44,45)}, 이 작용은 세포 주기를 G₀에서 정지시켜서 더 이상의 세포증식이 일어나지 못하도록 하기 때문이라고 생각되지만¹⁹⁾, 이들 실험들은 모두 ER이 지속적으로 표현되고 있는 세포를 대상으로 했기 때문에 결합 가능한 ER의 숫자가 많아서 세포 성장에 이르게 하기에는 투여된 에스트로젠의 양이 절대적으로 부족한 때문이라 생각된다. 반면에 ER-양성, -음성 세포가 섞여 있는 이질적 세포에 타목시펜을 투여하면, 숫자는 적지만 에스트로젠과 결합해서 기능을 발현하는 ER에서 타목시펜과 에스트로젠의 경쟁적인 결합이 일어나므로 세포성장이 억제된다고 생각된다. Bettuzzi 등⁴⁶⁾은 유방암 자체가 이질적인 세포들의 집합체이기 때문에 이러한 균질한 세포주를 대상으로 하는 실험은 현실과 다소 상이한 결과만을 도출할 수 있다고 하였고, Hafner 등⁴⁷⁾은 항에스트로젠 제제의 작용을 알아보기 위한 실험모형으로는 안정적 발현이 유지되는 세포주보다는 일시적

으로 ER이 발현되는 세포주가 더 적절하다고 주장했기 때문에, 저자는 일시적 발현을 유도하는 liposome을 이입매개체로 선정하고, 이입 세포주를 분리하지 않고 혼재된 상태의 세포주를 상대로 타목시펜과 에스트로젠이 세포주 성장에 미치는 영향을 알아보았다.

Sluyser⁴⁸⁾는 타목시펜-저항성 기전에는 크게 두 가지가 있으며, 첫째 활성을 잃어 버린 ER이 더 이상의 정상적 ER의 발현을 억제하거나, 둘째 ER의 변이로 인해서 전사과정이 비정상적으로 이루어지고 이어서 전사 후 번역단계까지 정상과 다른 경로를 지나게 되면서 저항성 세포주가 형성된다고 주장했다²⁰⁾. 이러한 저항성을 최소화하기 위해서 유전자를 이입시킨 후 여러가지 약제의 반응을 확인해 본 실험이 있었다^{49,50)}. 그러나, 점 돌연변이나 exon의 결손이 없는 정상 ER cDNA를 ER-음성 유방암 세포주에 이입해 보니 기대와 달리 타목시펜이 아닌 에스트로젠에 의해서 세포의 성장이 오히려 억제되는 현상을 보였는데⁵¹⁾, 이 결과는 Bettuzzi 등⁴⁶⁾이 CHO 세포주에 pSG5-HE0를 이입하여 ER의 기능이 정상적으로 유지된다고 보고한 것과 비교하면, 타목시펜-저항성 세포주의 발현에 관여하는 ER-비의존성 기전이 존재할 가능성을 암시한다⁵²⁾.

배양 4일까지 지속되던 타목시펜의 효과는 4일을 지나면서 사라졌고, 에스트로젠에 의한 세포주 성장은 4일을 지나면서 현저해져서 타목시펜이 에스트로젠의 효과를 억제하다가 억제력이 떨어지면 에스트로젠의 작용이 더 우월하게 나타나는 것을 알 수 있었으며, 병합군에서도 동일한 양상을 보았다. 이들 결과를 종합하면 타목시펜의 성장 억제력은 이입 후 4일까지 최고에 다다르고 그 이후 성장 억제력은 줄어드는 반면에 에스트로젠의 성장촉진력은 증가된다고 볼 수 있고, 병합처치시에도 마찬가지로 결과를 볼 수 있으므로, lipofection을 이용한 ER요법은 이입 4일까지 효과를 볼 수 있어서, 매 4일마다 지속적인 ER cDNA의 이입이 이루어진다면 계속적인 성장 억제 효과를 기대할 수 있다고 본다.

정상적으로 나타나는 ER 단백질의 크기는 65 kDa이지만, 유전자 축약(truncation)으로 인한 42 kDa 크기의 ER 변이체가 보고되었고⁷⁾, 반대로 유전

자 중첩으로 인한 80과 77 kDa 크기의 변이체도 보고되었으나^{53,54)}, 이번 실험에서는 이입 세포에서 지금까지 보고되지 않은 약 120 kDa 크기의 ER 변이체를 확인할 수 있었다. 그러나 이 변이체가 가지는 의미는 이번 실험으로는 알 수 없었다. 이번 실험 결과를 토대로 향후 *ex vivo* test를 포함하는 전임상 연구를 거쳐서 임상에 적용할 수 있으리라고 기대한다. 다만 lipofection에 의한 ER의 발현유도가 PR의 발현유도로 이어지는지, 유도된다면 어느 정도까지 발현되는지, ER 발현에 의해서 유도되는 PR과 PR을 직접 이입한 경우에 어떤 차이가 있는지를 더 알아보아야 한다. 아직까지 *in vitro* study와 달리 내인성 에스트로젠의 효과를 완전히 배제할 방법이 없는 *ex vivo*와 *in vivo* study의 경우에 그 결과를 예측하기 힘들지만, liposome을 이용한 인간 ER cDNA의 이입은 내분비요법에 반응하지 않는 유방암 환자의 치료에 적용할 가능성이 있다고 생각한다.

결 론

유방암에서 스테로이드 수용체의 하나인 에스트로젠 수용체(estrogen receptor : ER)의 발현 유무는 환자의 예후 예측과 수술 후 보조요법의 선택에 많은 영향을 미친다. ER-양성인 경우는 내분비요법의 적응이 되므로 항에스트로젠 제제인 타목시펜을 사용하게 되며, 특히 폐경기 여성에서 그 반응 정도가 우수하다. 그러나 ER-음성인 경우 타목시펜에 대한 치료반응이 낮고, ER-양성인 환자도 장기간의 타목시펜 요법 이후에 ER 표현형이 음성으로 전환되는 현상을 나타내므로 환자를 치료하는데 상당한 문제를 초래한다.

저자는 ER mRNA와 ER 단백질이 발현되지 않는 ER-음성 인간 유방암 세포주(MDA-MB-231)를 대상으로 변이된 인간 ER cDNA (pSG5-HE0)를 물리적 vector인 liposome을 이용해서 이입시켜서 ER 단백질을 일정 시간 동안 발현시키면서 타목시펜과 에스트로젠이 이 세포주의 성장에 미치는 효과를 알아보았다.

세포 배양 4일째가 되면서 유방암 세포성장이 가장 많이 억제되고, 6일째에는 에스트로젠을 처리하

는 경우에도, 타목시펜이나 병합처치의 결과보다는 못하지만, 세포성장이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 시간이 경과함에 따라서 처치한 억제효과는 0일을 기준으로 할 때 6일째에서는 타목시펜의 억제효과가 거의 대부분 사라졌다고 여겨지며, 에스트로젠-처리군은 4일째가 지나면서 성장이 가속되었고, 병합처리군은 성장속도는 낮으나 지속적인 세포 성장을 보였다.

이상의 결과를 근거로 저자는 lipofection으로 ER을 발현하게 된 세포주가 ER-음성 세포주와 혼재하게 되는 상황에서 타목시펜의 처리로 세포의 성장을 억제할 수 있으며, 그 효과는 이입 후 4일에 가장 크며 그 이후에 성장억제 효과가 점차 사라진다는 것을 알게 되었으며, pSG5-HE0의 lipofection으로 인해서 65 kDa 크기의 정상 ER 단백질과 함께 지금까지 보고되지 않은 120 kDa 크기의 ER 단백질의 발현을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) Plowman PN: Tamoxifen as adjuvant therapy in breast cancer. *Drugs* 46:819-833, 1993
- 2) Allegra JC, Lippman ME: Growth of a human breast cancer cell line in serum-free hormone-supplemented medium. *Cancer Res* 38:3823-3829, 1978
- 3) Rorke EA, Katzenellenbogen BS: Antitumor activities and estrogen receptor interactions of the metabolites of the antiestrogens C1628 and U23,469 in the 7,12-dimethylbenz (a)anthracene-induced rat mammary tumor system. *Cancer Res* 41:1257-1262, 1981
- 4) Manni A, Trujillo JE, Marshall JS, Brodkey J, et al: Antihormone treatment of stage IV breast cancer. *Cancer* 43:444-450, 1979
- 5) Dorssers LCJ, Veldscholte J: Identification of a novel breast-cancer-anti-estrogen-resistance (BCA-R2) locus by cell-fusion-mediated gene transfer in human breast-cancer cells. *Int J Cancer* 72:700-705, 1997
- 6) Lerner LJ, Jordan VC: Development of antiestrogens and their use in breast cancer: eighth Cain Memorial Award lecture. *Cancer Res* 50:4177-4189, 1990
- 7) Castles CG, Fuqua SAW, Klotz DM, Hill SM: Expression of a constitutively active estrogen receptor variant in the estrogen receptor-negative BT-20 human breast cancer cell line. *Cancer Res* 53:5934-5939, 1993
- 8) Ottaviano YL, Issa J-P, Parl FF, Smith HS, et al: Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 54:2552-2555, 1994
- 9) Glikman P, Manni A, Demers L, Bartholomew M: Polyamine involvement in the growth of hormone-responsive and -resistant human breast cancer cells in culture. *Cancer Res* 49:1371-1376, 1989
- 10) Henthorn P, Zervos P, Raducha M, Harris H, et al: Expression of a human placental alkaline phosphatase gene in transfected cells: use as a reporter for studies of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6342-6346, 1988
- 11) Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, et al: Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to *v-erb-A*. *Nature* 320:134-139, 1986
- 12) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TE: Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: 1989, Vol. 1, pp 82~84
- 13) Lin WC, Culp LA: Selectable plasmid vectors with alternative and ultrasensitive histochemical marker genes. *Biotechniques* 11:344-351, 1991
- 14) Eckert RL, Katzenellenbogen BS: Effects of estrogens and antiestrogens on estrogen receptor dynamics and the induction of progesterone receptor in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 42:139-144, 1982
- 15) 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* 45:1525-1531, 1985
- 16) Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-

- phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem* 162:156-159, 1987
- 17) 서영진, 정상설, 김인철: 유방암의 estrogen 수용체 유전자 검출. *대한암학회지* 28:796-805, 1996
- 18) Greene GL, Nolan C, Engler JP, Jensen EV: Monoclonal antibodies to human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:5115-5119, 1980
- 19) Wang W, Smith R 3rd, Burghardt R, Safe SH: 17 β -estradiol-mediated growth inhibition of MDA-MB-468 cells stably transfected with the estrogen receptor: cell cycle effects. *Mol Cell Endocrinol* 133:49-62, 1997
- 20) Sluysen M: Mutations in the estrogen receptor gene. *Hum Mut* 6:97-103, 1995
- 21) Hähnel R, Woodings T, Vivian AB: Prognostic value of estrogen receptors in primary breast cancer. *Cancer* 44:671-675, 1979
- 22) Fehm T, Maimonis P, Weitz S, Teramoto Y, et al: Influence of circulating c-erbB-2 serum protein on response to adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 43:87-95, 1997
- 23) Silvestrini R, Veneroni S, Benini E, Daidone MG, et al: Expression of p53, glutathione S-transferase- π , and Bcl-2 proteins and benefit from adjuvant radiotherapy in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 89: 639-645, 1997
- 24) Read LD, Katzenellenbogen BS: Characterization and regulation of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer Treat Res* 61:277-299, 1992
- 25) Ree AH, Landmark BF, Eskild W, Levy FO, et al: Autologous down-regulation of messenger ribonucleic acid and protein levels for estrogen receptors in MCF-7 cells: an inverse correlation to progesterone receptor levels. *Endocrinology* 124:2577-2583, 1989
- 26) Sheikh MS, Garcia M, Pujol P, Fontana JA, et al: Why are estrogen-receptor-negative breast cancers more aggressive than the estrogen-receptor-positive breast cancers? *Inva Metas* 14:329-336, 1994-95
- 27) Raam S, Robert N, Pappas CA, Tamura H: Defective estrogen receptors in human mammary cancers: their significance in defining hormone dependence. *J Natl Cancer Inst* 80:756-761, 1988
- 28) Walter P, Green S, Greene G, Krust A, et al: Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7889-7893, 1985
- 29) Badia E, Duchesne M-J, Fournier-Bidoz S, Simar-Blanchet A-E, et al: Hydroxytamoxifen induces a rapid and irreversible inactivation of an estrogenic response in an MCF-7-derived cell line. *Cancer Res* 54:5860-5866, 1994
- 30) Jordan VC: Long-term tamoxifen treatment for breast cancer. The University of Wisconsin Press, Wisconsin, 1994, pp 59-60
- 31) Roodi N, Bailey LR, Kao W-Y, Verrier CS, et al: Estrogen receptor gene analysis in estrogen receptor-positive and receptor-negative primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 87:446-451, 1995
- 32) Jordan VC: Molecular mechanisms of antiestrogen action in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 31:41-52, 1994
- 33) McGuire WL, Chamness GC, Fuqua SA: Estrogen receptor variants in clinical breast cancer. *Mol Endocrinol* 5:1571-1577, 1991
- 34) Dorssers LCJ, van Agthoven T: Genetic mechanisms of estrogen-independence in breast cancer. *Path Res Pract* 192:743-751, 1996
- 35) Graham ML 2d, Smith JA, Jewett PB, Horwitz KB: Heterogeneity of progesterone receptor content and remodeling by tamoxifen characterize subpopulations of cultured human breast cancer cells: analysis by quantitative dual parameter flow cytometry. *Cancer Res* 52:593-602, 1992
- 36) Zhang QX, Borg Å, Wolf DM, Oesterreich S, et al: An estrogen receptor mutant with strong hormone-independent activity from a metastatic breast cancer. *Cancer Res* 57:1244-1249, 1997
- 37) Petrangeli E, Lubrano C, Ortolani F, Ravenna L, et al: Estrogen receptors: new perspectives in breast cancer management. *J Steroid Biochem Mol Biol* 49:327-331, 1994
- 38) Garcia M, Rochefort H: Oestrogènes et cancer du sein: des mécanismes d'action aux applications

- cliniques. *Ann d'Endocrinol* 56:543-545, 1995
- 39) Long BJ, Rose DP: Invasive capacity and regulation of urokinase-type plasminogen activator in estrogen receptor (ER)-negative MDA-MB-231 human breast cancer cells, and a transfectant (S30) stably expressing ER. *Cancer Lett* 99:209-215, 1996
- 40) Nabel EG, Gordon D, Yang Z-Y, Xu L, et al: Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: lack of autoimmunity and gonadal localization. *Hum Gene Ther* 3:649-656, 1992
- 41) Piva R, Bianchini E, Kumar VL, Chambon P, et al: Estrogen induced increase of estrogen receptor RNA in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 155:943-949, 1988
- 42) Barton MC, Shapiro DJ: Transient administration of estradiol-17 β established an autoregulatory loop permanently inducing estrogen receptor mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7119-7123, 1988
- 43) Gaben A-M, Mester J: BALB/C mouse 3T3 fibroblasts expressing human estrogen receptor: effect of estradiol on cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* 176:1473-1481, 1991
- 44) Maminta MLD, Molteni A, Rosen ST: Stable expression of the human estrogen receptor in HeLa cells by infection: effect of estrogen on cell proliferation and c-myc expression. *Mol Cell Endocrinol* 78:61-69, 1991
- 45) Lundholt BK, Madsen MW, Lykkesfeldt AE, Peterson OW, et al: Characterization of a nontumorigenic human breast epithelial cell line stably transfected with the human estrogen receptor (ER) cDNA. *Mol Cell Endocrinol* 119:47-59, 1996
- 46) Bettuzzi S, Robinson A, Fuchs-Young R, Greene GL: Estrogen and progesterone receptor structure and action in breast cancer cells. *Cancer Treat Res* 61:301-315, 1992
- 47) Hafner F, Holler E, von Angerer E: Effect of growth factors on estrogen receptor mediated gene expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 58:385-393, 1996
- 48) Sluysen M: Hormone resistance in cancer: the role of abnormal steroid receptors. *Crit Rev Oncogenesis* 5:539-554, 1994
- 49) Sheikh MS, Shao Z-M, Chen J-C, Li X-S, et al: Expression of estrogen receptors in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells: modulation of epidermal growth factor-receptor (EGF-R) and transforming growth factor α (TGF α) gene expression. *J Cell Biochem* 54:289-298, 1994
- 50) Catherino WH, Jordan VC: The biological action of cDNAs from mutated estrogen receptors transfected into breast cancer cells. *Cancer Lett* 90:35-42, 1995
- 51) Jeng M-H, Jiang S-Y, Jordan VC: Paradoxical regulation of estrogen-dependent growth factor gene expression in estrogen receptor (ER)-negative human breast cancer cells stably expressing ER. *Cancer Lett* 82:123-128, 1994
- 52) Charlier C, Chariot A, Antoine N, Merville M-P, et al: Tamoxifen and its active metabolite inhibit growth of estrogen receptor-negative MDA-MB-435 cells. *Biochem Pharm* 49:351-358, 1995
- 53) Pink JJ, Jiang S-Y, Fritsch M, Jordan VC: An estrogen-independent MCF-7 breast cancer cell line which contains a novel 80-kilodalton estrogen receptor-related protein. *Cancer Res* 55:2583-2590, 1995
- 54) Pink JJ, Fritsch M, Bilimoria MM, Assikis VJ, et al: Cloning and characterization of a 77-kDa oestrogen receptor isolated from a human breast cancer cell line. *Br J Cancer* 75:17-27, 1997