

放射線免疫法에 의한 乳房癌細胞內的 Estrogen 과 Progesterone 受容體의 測定

全南大學校 醫科大學 核醫學室

金 支 烈

= Abstract =

The Determinations of Estrogen and Progesterone Receptor in Breast Cancer Cell by Radioimmunoassay Method

Chi Yeul Kim, M.D. Ph. D.

Division of Nuclear Medicine, Chounnam University Medical School

The estrogen and progesterone receptors which are bound to the cytoplasmic protein of cancer cells were measured in 20 patients with the early breast cancer by means of radioimmunoassay using charcoal.

1. The patients with estrogen receptor positive were 13(65%) of 20 cases and with progesterone receptor positive were 7 cases(35%) in the early breast cancer.

2. Coexistence of estrogen and progesterone receptor positive was noted in 7 cases(35%). The cases of estrogen receptor positive and progesterone receptor negative were 6 cases(33.3%), while there were no cases of estrogen receptor negative with progesterone receptor positive.

3. Coincidence of estrogen and progesterone negative was noted in 7 cases(35%). Conclusively, it is considered that the measurement of estrogen and progesterone receptors has relevance as predictive value, in the response to hormonal manipulations and chemotherapy for breast cancer patients.

近來 女性에서 乳房癌患者의 發生率이 增加되고 있으며, 이에 對한 治療는 外科的인 方法이 主宗을 이루고 있으나 많은 例에서 手術後 1~2년內에 再發되어 化學療法 및 放射線照射등 여러가지 方法으로 治療하고 있지만 아직도 큰 效果는 없는 實情이다. Estrogen 受容體와 progesterone 受容體는 乳房癌細胞內的 蛋白質과 結合되어 있으며 estrogen 受容體는 進行中인 乳房癌患者에서 內分泌療法에 對한 效果를 豫測하는 要素가 되고, 또 Disease-Free Interval(DFI)의 指針에 중요한 것으로 알려져 있다^{1~3)}.

Pregesterone 受容體는 乳房癌細胞에 存在하고 또 子宮內의 estrogen 에 의해서 合成 조절하여 진다고 한

다^{4~6)}.

著者는 1980년 11월부터 1981年 1月까지 美國 New York 의 Methodist Hospital 에서 初期 乳房癌患者 20 例를 對象으로 乳房癌細胞 蛋白質과 結合된 estrogen 과 progesterone 受容體를 放射線免疫法으로 測定하여 다음과 같은 成績을 얻었기에 報告하는 바이다.

成 績

外科的 저출술이 可能했던 初期 乳房癌患者 20例를 對象으로 乳房癌細胞 蛋白質과 結合된 estrogen 受容體(以下 ER 라 칭함)와 progesterone 受容體(以下

Table 1. Status of Estrogen and Progesterone Receptor in Breast cancer cell by Radioimmunoassay

| | ER ⁺ | PgR ⁺ | ER ⁻ | PgR ⁻ |
|----|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
| 1 | | | - | - |
| 2 | | | - | - |
| 3 | + | + | | |
| 4 | + | + | | |
| 5 | + | | | - |
| 6 | + | | | - |
| 7 | + | | | - |
| 8 | | | - | - |
| 9 | | | - | - |
| 10 | + | + | | |
| 11 | | | - | - |
| 12 | + | + | | |
| 13 | + | + | | |
| 14 | + | | | - |
| 15 | | | - | - |
| 16 | + | + | | |
| 17 | | | - | - |
| 18 | + | | | - |
| 19 | + | + | | |
| 20 | + | | | - |

* ER: Estrogen Receptor
PgR: Progesterone Receptor

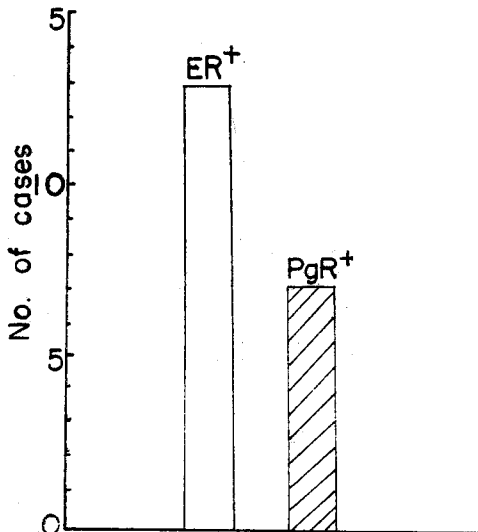


Fig. 1. Positive Estrogen and Progesterone Receptor in Breast cancer cell.

PgR 라 칭함)를 放射線免疫法으로 測定하여 다음과 같은 成績을 얻었다(Table 1).

1. Estrogen 受容體가 陽性인 경우는 13例(65%)이었고, progesterone 受容體가 陽性인 경우 7例(35%)이었다.

2. Estrogen 受容體와 progesterone 受容體가 모두 陽性인 경우는 7例(35%)이었으며 ER 가 陽性이면서 PgR 가 陰性인 경우는 6例(33%)이었으나 ER 가 陰性이면서 PgR 가 陽性인 예는 없었다.

3. ER 와 PgR 가 모두 陰性인 경우는 7例이었다.

即 初期 乳房癌患者에서 ER 의 陽性은 13例(65%)로 가장 많았으나 PgR 의 陽性은 7例(35%)로 낮은 率을 보였다. PgR 의 陰性 13例(65%)로 ER 의 陰性 7例(35%)보다 約 2倍가 더 높은 率을 보였다(Fig. 1).

實驗對象 및 方法

初期 乳房癌患者 20例를 對象으로 하였으며, 乳房癌을 外科의 切除한 後 그 乳房癌組織 약 5gr 을 即時 -20°C 에 貯藏하였다.

試 藥

1. Homogenization buffer(0.01 M tris-HCl, pH 7.4)

Trizma HCl.....1.18(MW 158)

Trizma base.....0.4 g(MW 121.1)

EDTA 0.0015 M.....0.558 g(MW 372)

Dithiothreitol, 0.0015 M.....0.07715 g(MW 154.3)

Distilled Water.....1000 ml

2. Dextran-Coated Charcoal(Stoch Solution)

Acid Washed Charcoal(Norita).....2.5 g

Dextran T-40.....25 mg

Homogenization buffer.....100 ml

Homogenization buffer 와 1 : 10 dilution 해서 使用한다.

3. Unlabeled Estradiol 과 Promegestone Solutions
Stoch Solution: 2,4,6,7-Estradiol 27.7 mg 와 Promegestone 32.65 mg 의 각각에 무수 ethanol 10 ml 로 용해시킨다.

Working solution: Estradiol 과 promegestone-용액 10 ml 를 Homogenization buffer(희석 1 : 1000) 10 ml 에 용해시킨다.

4. Tritiated Estradiol and Promegestone Solutions
Stoch Slouision: NET-317 Estradiol/2,4,6,7-³H(N)

/MW 27.4, specificity activity 90~100 Ci/mmol 과 NET-555 promegestone/17 α -methyl-³H/MW 326.5, spe. act. 87~97 Ci/mmol 에 1 \times 10⁻⁶M 부수 ethanol 을 용해시킨다.

5. Working Solution

溶液 A: 0.1 ml 의 stoch solution 에 4.9 ml homogenization buffer 를 용해시킨다.

溶液 B: 溶液 A 1 ml 에 4 ml Homogenization buffer 를 용해시킨다.

溶液 C: 溶液 B 1 ml 에 4 ml Homogenization buffer 를 용해시킨다.

實驗方法

1. 乳房癌組織 1~2 gr 을 細分하게 나누어 Homogenization buffer 2.5 cc 을 넣고 약 1분간 grinding 해서 Ice box 에 넣어둔 후 20~30分以內에 4°C 超遠心分離器에 40,000 rpm 에서 30分간 원심분리한후 上清液(cytosol)을 취한다.

2. 細胞質 蛋白質 測定

上記의 細胞質液을 Bio-RAD protein assay 로 용액을 희석하고 1:5 Wattman papper #4로 여과한 연후 25 ml 을 취하고 여기 Bio-RAD 시약 5 ml 加한후 spectrometer (wave length 595 nm)로 測定한다.

$$\text{Protein count} \times 4 = \text{ng protein/ml}$$

또 3 mg protein/ml 하기 위해서 4 ml Homogeneous buffer 로 희석시킨다.

3. Estrogen 과 progesterone assay

① Binding: 시험관 A: 200 μ l cytosol 에 50 μ l 의 ³H-labeled ligand 을 加한다.

시험관 B: 200 μ l cytosol 과 50 μ l ³H-labeled 을 30分間 4°C 에 恒溫處理 한연후에 50 μ l 을 취해서 20 μ l cytosol 에 加한다.

시험관 A,B 를 4°C 에 18時間(overnight) 恒溫處理 한후 미리 4°C 에 30分間 恒溫處理한 Charcoal 을 50 μ l 를 加하고 3~5회 흔들린 후 원심분리계 2,000 rpm 2~3分間 원심분리한 후 上清液 500 μ l 을 취해서 Aquasol-2을 5 ml 加해서 liquid scintillation counter 로 측정하였다.

다음과 같은 방법으로 성적을 얻었다.

$$1. B/F = \frac{\text{Sample binding cpm} - \text{Blank cpm}}{\text{Total cpm} - (\text{sample binding cpm} - \text{Blank cpm})}$$

2. Binding sites in f mole

$$= \frac{\text{Sample cpm} - \text{Blank cpm}}{\text{count of 1 p mol (SFD cpm Mean)}} \times 7,500$$

3. Competition

$$= \frac{\text{Competition cpm} - \text{blank cpm}}{\text{Specimen binding cpm} - \text{blank cpm}} \rightarrow A$$

실제 Competition 100 - A = B

4. Protein Calculation (f moles/mg protein)

$$= \frac{\text{binding site in f mole}}{\text{original test 3 mg}}$$

5. 曲線測定 the slope Kd = 1/slope 로 계산하였다. 다음과 같은 기준으로 陽性을 판정하였다.

- a. Kd: 2 \times 10⁻⁹ or less
- b. Competition > 60%
- c. Binding site > 6 fmol/mg protein

$$d. \text{Slope} = \frac{\text{Maximum Volume of B/F in grap}}{\text{Maximum binding site in f mol volume}}$$

考 按

ER 는 乳房癌細胞內의 蛋白質과 結合되어 있고, 이 ER 는 乳房癌患者에서 豫後와 內分泌治療의 效果를 豫測하는 指標가 되는 重要한 Marker 로 알려져 있다.^{1,2)}

PgR 는 乳房癌細胞內에 存在하고 子宮內 estrogen 에 依하여 合成調節되며^{4~6)}, Zava 等⁷⁾은 PgR 가 ER 를 通해서 estrogen 作用을 調節하고 McF-7 cell 에서 50~100 f mole/mg 인 cytosol protein 이라고 밝혀졌다. Estrogen 및 progesterone 受容體 兩者가 陽性인 경우는 ER 가 陽性이고 PgR 가 陰性인 경우보다 內分泌治療에 2倍以上 效果가 있다고 한다.^{8,9)}. 一般의閉經以前의 患者에서 乳房癌이 더 많으며, 閉經期 女性에 比해서 內分泌療法에 效果가 적다고 한다. 따라서 閉經以前의 女性들은 ER 가 陰性인 경우가 많으며 따라서 內分泌療法에 對한 效果도 적다. 또한 ER 가 陰性이고 淋巴節 浸潤이 陽性인 경우는 18個月內 50%以上에서 再發된다고 한다.¹⁰⁾. Walt¹¹⁾ 등은 ER 가 陰性인 乳房癌患者는 ER 가 陽性일 경우보다 生存率이 짧다고 하였으며, Knight¹²⁾ 등은 145名의 治療可能한 轉移性 乳房癌患者에서 ER 가 陽性일 경우보다 陰性인 例에서 더 빨리 再發하였다 하였다. McGuire¹³⁾ 등은 110例의 乳房癌患者에서 ER 陽性率은 70%이었다고 報告하였는데 이는 著者の 65%와 비슷한 成績을 보이고 있다. 一般의閉經 많은 學者들은 ER 陽性인 患者의 50~70%에서 모든 內分泌療法에 效果로 보인 反面에 ER 가 陰性인 患者에서는 겨우 10%에서만 效果를 보인다고 알려져 있다²⁾. 따라서 ER 가 陰性인 患者는 早期手術,

hormone 治療, antiestrogen 또는 副腎切除術等에도 治療效果가 없는 것으로 알려져 있다. ER는 乳房癌細胞內에서 estrogen을 활성화 한다는 것은 이미 알려진 事實이다^{4~6}). 따라서 乳房癌細胞內 estrogen 存在는 細胞質內 受容體에서 estrogen과 함께 連續的으로 結合되며 核內의 複合因子에 傳達되고 또한 生成된 progesterone은 腫瘍細胞內에 도달한다고 한다.

McGuire 등은 乳房切除와 浸潤된 淋巴節除去手術을 施行하였던 患者에서 淋巴浸潤(N⁺)과 N⁺ER⁻ 患者는 강력한 複合化學療法를 받아도 쉽게 再發되며 生存期間이 짧고, N⁺ER⁺인 患者群은 壽命 延長등 豫後가 좋았다고 한다.

以上과 같이 乳房癌患者에서 乳房切除手術을 施行한 後 癌細胞內 蛋白質과 結合된 ER와 PgR의 存在는 內分泌治療와 Antiesterogen, 複合化學療法治療에 對한 效果를 示唆해 주는 Marker로서 利用되고 있다.

結 論

初期 乳房癌患者 20例에서 乳房癌細胞內에 蛋白質과 結合된 ER와 PgR를 charcoal을 利用한 放射性免疫法으로 測定하였다.

1. Estrogen 受容體가 陽性인 경우는 13例(65%)이었고, progesterone 受容體가 陽性인 경우 7例(35%)이었다.

2. Estrogen 受容體와 progesterone 受容體가 모두 陽性인 경우는 7例(35%)이었으며 ER가 陽性이면서 PgR가 陰性인 경우는 6例(33%)이었으나 ER가 陰性이면서 PgR가 陽性인 예는 없었다.

3. ER와 PgR가 모두 陰性인 경우는 7例이었다.

以上の 初期 乳房癌患者의 癌細胞內 蛋白質과 結合된 ER와 PgR를 測定함으로써 乳房癌患者에서 內分泌療法, 複合化學療法와 antiestrogen 治療 效果에 對한 豫後를 決定하는데 指針이 된다고 생각된다.

REFERENCES

- 1) McGuire, W.L., Horwitz, K.B., Zava, D.T., and Garola: *Steroid receptors and the management of cancer, estrogen and progesterone receptors in human breast cancer*, CRC Press, Boca Raton Florida, Vol.1, 1979. p.31
- 2) McGuire, W.L., Pearson, O.H., and Segaloff, A.: *Predicting hormone responsiveness in human breast cancer, in estrogen receptors in human breast cancer*, edited by McGuire, W.L., Carbone, P.P., and Vollmer, E.P., Raven Press, New York, 1975, p.17
- 3) McGuire, W.L., *Physiological principles underlying endocrine therapy of breast cancer: Advances in research and treatment, Vol.1*, edited by McGuire, W.L., Plenum Press, New York, 1977, 217.
- 4) Horwitz, K.B. and McGuire, W.L.: *Specific progesterone receptor in human breast cancer, Steroids*. 25:497, 1975.
- 5) Horwitz, K.B., McGuire, W.L., Pearson, O.H. and Segaloff, A.: *Predicting response to endocrine therapy in human breast cancer: a hypothesis*, *Science*. 189, 726, 1975.
- 6) Horwitz, K.B., and McGuire, W.L.: *Estrogen and progesterone: their relationship in hormone dependent breast cancer, in progesterone receptors in normal and neoplastic tissue*, edited by McGuire, W.L., Raynaud, J.P. and Baulieu, E. E., Raven Press, New York, 1977, 103.
- 7) Zava, D.T., and McGuire, W.L.: *Estrogen receptor: unoccupied sites in nuclei of a breast tumor cell line*, *J. Biol. Chem.*, 252:3703, 1977.
- 8) McGuire, W.L., Horwitz, K.B., Pearson, O.H. and Segaloff, A.: *Current status of estrogen and progesterone receptors in breast cancer*, 39:2934, 1977.
- 9) Bloom, N., Tobin, E., and Degenshein, G.A.: *Clinical correlations of endocrine ablation with estrogen and progesterone receptors in advanced breast cancer, in progesterone receptors in normal and neoplastic tissue*, edited by McGuire, W.L., Raynaud, J.P., and Baulieu, E.E., Eds. Raven Press, New York, 1977, 125.
- 10) Knight, W.A., W.A., Livingston, R.B., Gregory, E.J., and McGuire, W.L.: *Estrogen receptor: an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer*, *Cancer Res*, 37:4669, 1977.
- 11) Walt, A.J., Singhakawinta, A., Brooks

S.C., and Cortez, A.: *The surgical implication of estrophile protein estimations in carcinoma of the breast, Surgery, 80:506, 1976.*

12) McGuire, W.L.: *Current status of estrogen receptors in human breast cancer, Cancer, 36: 638, 1975.*
