

흰쥐 자궁에서의 Cytosolic Progesterone 수용체 측정에 관한 연구

연세대학교 의과대학 산부인과학교실·약리학교실¹

박찬규·박기현·서 경·이건수¹·윤미정¹·유경자¹

= Abstract =

Determination of Potimal Conditions for Cytosolic Progesterone Receptor Assay in Rat Uterus

T. K. Park, K. H. Park, K. Seo

Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei University College of Medicine

K. S. Rhee, M. C. Yun, K. J. Ryu

Department of Pharmacology, Yonsei University College of Medicine

The purpose of this study was to establish optimal conditions for progesterone receptor assay using rat uterus, thereby applying this system to understand action mechanism of progesterone in female reproductive organ and to evaluate physiological and pathological conditions in female reproduction.

The results obtained were as follows

1. ³H-R5020 seemed to be more stable than ³H-progesterone as a ligand.
2. Optimal incubation time for ligand and receptor binding was 4-5 hrs at 4°C.
3. For the separation of bound and free ligand, optimal charcoal incubation time was 20 mins.
4. 2-3 mg cytosolic protein/ml was optimal for the binding of ligand.
5. Endogenous progesterone did not influence binding of ligand and receptor unless endogenous progesterone levels were extremely high as in case of pregnancy.
6. Dissociation rate for progesterone receptor was 1.22 nM.
7. ³H-R5020 did not bind to corticoid binding globulin (CBG), suggesting that addition of cortisol to saturate CBG was not necessary as far as ³H-R5020 was used as a radioligand.

It is, therefore, considered that this assay system established with these conditions might be used for the research as well as clinical routine purposes.

서 론

Progesterone은 표적세포에 존재하는 progesterone receptor(PR)와 결합하여 핵 내에서 특정 유전자의 발현을 조절하므로써 생물학적 작용을 나타낸다고 알려져 있다(O'Malley and Means, 1974 ; Yamamoto and Alberts, 1976 ; Walters, 1985). 그러므로 progesterone의 작용을 이해하기 위해서는

*본 논문은 연세대학교 의과대학 1986년도 과별 project 연구비로 이루어졌음.

혈중 progesterone의 농도 뿐만 아니라 그의 receptor의 변화 양상도 고려해야 한다. 따라서 progesterone receptor를 측정하는 PR assay는 생리적·병리적현상을 이해하는 데 중요한 방법으로 대두되고 있다. 특히 steroid hormone의 의존성 종양을 판별하는 데는 종양 조직에서의 PR assay가 요구된다(Wittliff, 1984).

1970년대에 radioligand를 이용한 binding assay 방법이 개발된 이후 많은 연구자들이 PR assay를 시행하여 왔으나 기본적인 실험 방법은 유사하지만 거의 각기 다른 실험 조건을 이용하고 있다.

즉, Radioligand로서 ^3H -progesterone (Bayard et al, 1978), ^3H -R 5020 (Vu Hai, 1978), ^3H -ORG 2058 (Isomaa, 1979) 등 다양하게 사용하며, 반응용액에 과량의 cortisol을 첨가하기도 하고, 또한 반응시간도 2시간 (Bailly, 1980)에서 20시간 (Cao et al, 1985) 까지 다양하다. 그러므로 PR assay를 시작하려면 이런 조건들의 차이를 먼저 알아내어 가장 적절하다고 생각되는 조건을 선택하는 작업이 선행되어야 한다.

본인들은 여성 생식 과정에서 중요한 역할을 하는 progesterone의 receptor를 측정하므로써 여성 생식의 원리를 규명하고 병리적인 현상을 판단하는데 기여하고자 PR이 풍부하게 존재하며 쉽게 구할 수 있는 흰쥐의 자궁을 이용하여 PR assay를 정착시켰다. 본 연구에서는 먼저 radioligand로서 ^3H -progesterone과 ^3H -R 5020을 비교하였으며 radioligand와 receptor의 반응 시간, 단백질 농도의 증가에 따른 receptor 농도의 변화 및 cortisol binding globulin이 progesterone과 receptor와의 반응은 영향 등을 비교·분석하였다.

재료 및 방법

1) 실험 재료

Radioligand로서는 [17α -methyl- ^3H] R 5020 (87

Ci/m mol; NEN, USA)와 [1α , 2α - ^3H] progesterone (55 Ci/m mol; Amersham, UK)을 사용하였으며 nonradioactive ligand로서는 R 5020 (NEN), progesterone (sigma), cortisol (sigma)을 사용하였다.

PR은 생후 2개월 된 흰쥐 (sprague dawley 또는 wistar)의 자궁에서 추출하였으며, 전 실험을 통하여 TEDM G (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, dithiothreitol 1mM, sodium molybdate 20mM, glycerol 20% (v/v) pH 7.4) buffer를 사용하였다.

Ligand의 결합형과 유리형을 분리하기 위해서는 0.5% Charcoal (Norit A)을 0.05% dextran T-70 (Pharmacia)로 coating하여 만든 dextran-coated charcoal (DCC)을 사용하였다.

2) 실험 방법

(1) PR의 준비

모든 실험은 전 과정을 통하여 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 에서 행하였다. 흰쥐의 자궁을 적출하여 isotonic saline으로 혈액과 지방을 제거한 직후 assay를 행하거나 또는 액체 질소로 급속 냉동시켜 실험 직전까지 -70°C 에서 보관하였으며 보존기간은 2주일을 넘기지 않았다. 적출 자궁은 Polytron P-10을 이용하여 30초 간격으로 5초씩 2회 균질화한 후 $1,000 \times \text{g}$ 에서 10분 동안 원심분리하여 침전물을 제거하고 다시 $105,000 \times \text{g}$ 에서 1시간 동안 초원심분리

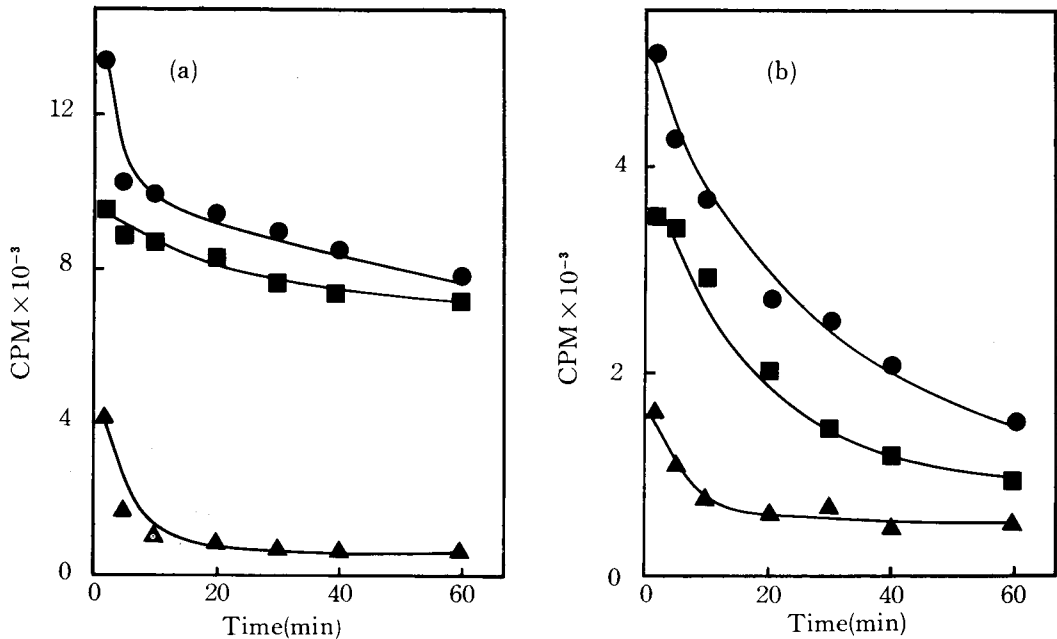


Fig. 1. Time-course of the dissociation by charcoal of the complex between ^3H -R 2020(a) or ^3H -progesterone(b) and binding proteins in rat uterine cytosol. Specific binding (■) was calculated as the difference between the total (●) and the non-specific (▲) binding.

하여 cytosol PR을 준비하였다. 한편 cytosol의 단백질 농도는 Lowry의 방법(Lowry et al, 1951)으로 측정하였다.

(2) PR의 측정

Cytosol 0.2ml에 0.1ml의 $^3\text{H-R5020}$ 혹은 $^3\text{H-progesterone}$ 을 섞은 후 4~5시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 radioligand의 유리형과 결합형을 분리하기 위하여 0.5ml의 DCC와 4°C에서 20분 동안 반응시키고 1,500×g에서 5분간 원심분리하여 상등액 0.5ml을 취하여 결합형의 방사능을 측정하였다.

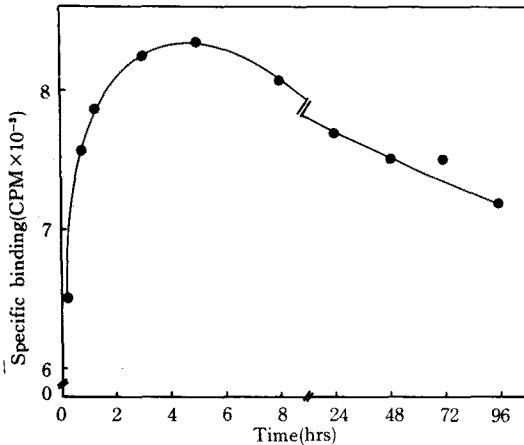
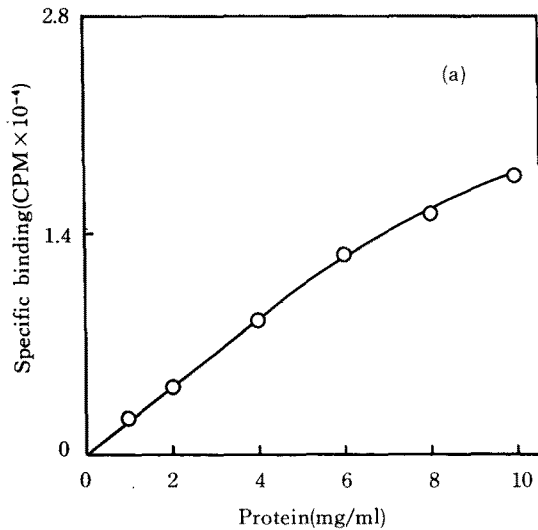


Fig. 2. Specific binding of $^3\text{H-R5020}$ to progesterone cytosolic receptor with various incubation times. 12 nM of $^3\text{H-R5020}$ was used for these experiments.



수용체 결합형의 방사능을 측정하기 위하여는 시료에 3ml의 counting fluid(toluene 667 ml, Triton X-100 333 ml, PPO 7g, POPOP 0.3g)를 넣고 혼합한 후 liquid scintillation counter(Packard, Tri-carb-300)에서 측정하였다. Counter의 counting efficiency는 38%였다.

(3) PR의 농도 계산

Cytosol PR의 농도와 Kd값은 saturation curve와 scatchard analysis에 의하여 계산하였으며(scatchard, 1949), 단백질 1mg당 들어있는 cytosol PR의 수로 나타내었다.

결 과

(1) DCC에 의한 결합형과 유리형의 분리

일반적으로 유리형과 결합형의 ligand를 분리하는 방법이 안정성을 유지할 수 있다. DCC를 이용하여 결합형과 유리형을 분리해 본 결과(Fig. 1), $^3\text{H-progesterone}$ 을 radioligand로 사용했을 경우 반응시간이 경과함에 따라 결합형의 급격한 감소가 일어나 60분을 반응시켰을 때 maximum specific binding의 46%까지 감소하였으나 $^3\text{H-R5020}$ 를 사용하였을 경우에는 비교적 완만한 감소가 관찰되었다. 그러므로 결합형과 유리형을 분리하기 위하여 DCC를 사용할 때에는 $^3\text{H-progesterone}$ 보다 $^3\text{H-R5020}$ 이 더 안정된 ligand임을 알 수 있었으며 유리형의 DCC 흡착이 15분 정도에 완성되었으므로 DCC와의 반응 시간은 20분이 적합한 것으로 나타났다.

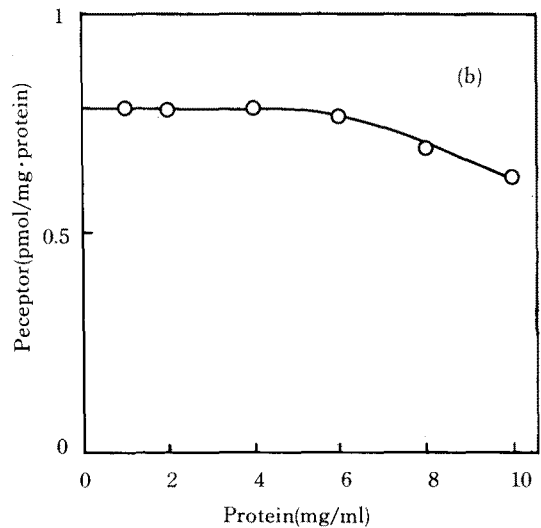


Fig. 3. Specific binding of $^3\text{H-R5020}$ with various cytosolic protein concentrations(a). Specific binding was converted to number of progesterone receptor per mg cytosolic protein(b). $^3\text{H-R5020}$ was incubated with different concentrations of cytosolic protein at 4°C for 4 hrs.

(2) 반응 시간

$^3\text{H-R5020}$ 가 cytosol PR과 결합하는 현상 즉, specific binding이 반응시간이 경과함에 따라 어떻게

변화하는가를 알아보았다(Fig. 2). Specific binding은 4~5시간 반응시켰을 때 최대치에 도달하였으며 그 이후에는 시간이 경과함에 따라 점차 감소하여 96시간이 지나면 최대치의 82%의 specific binding

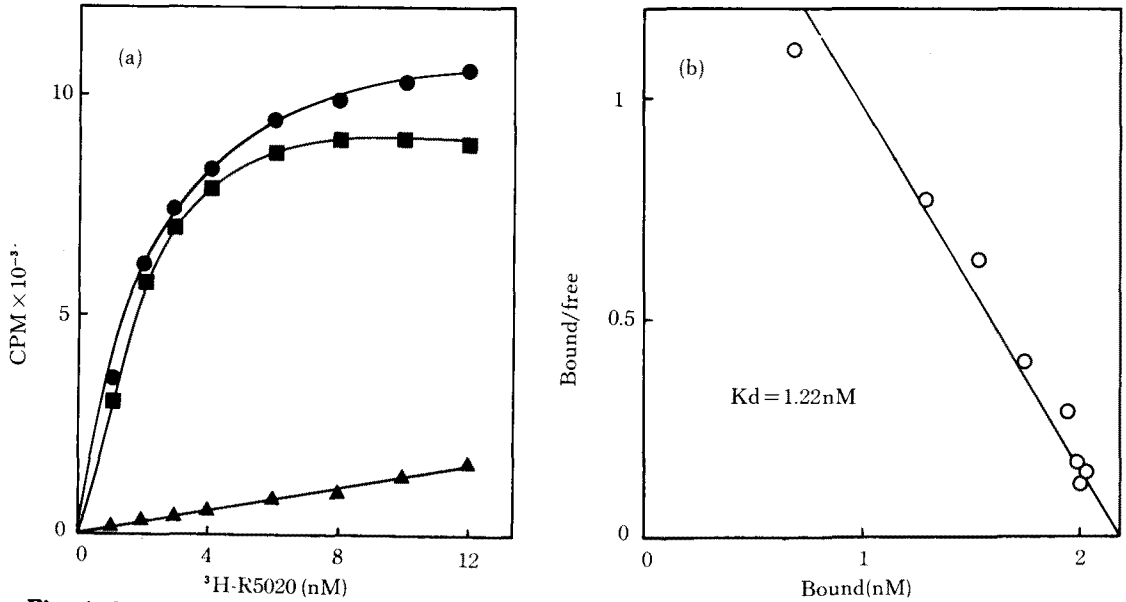


Fig. 4. Saturation curve; a) and scatchard analysis (b) of progesterone receptor. Cytosol was incubated various concentrations of $^3\text{H-R5020}$ at 4°C for 4 hrs. Specific binding (■) was calculated as the difference between the total (●) and the non-specific (▲) binding.

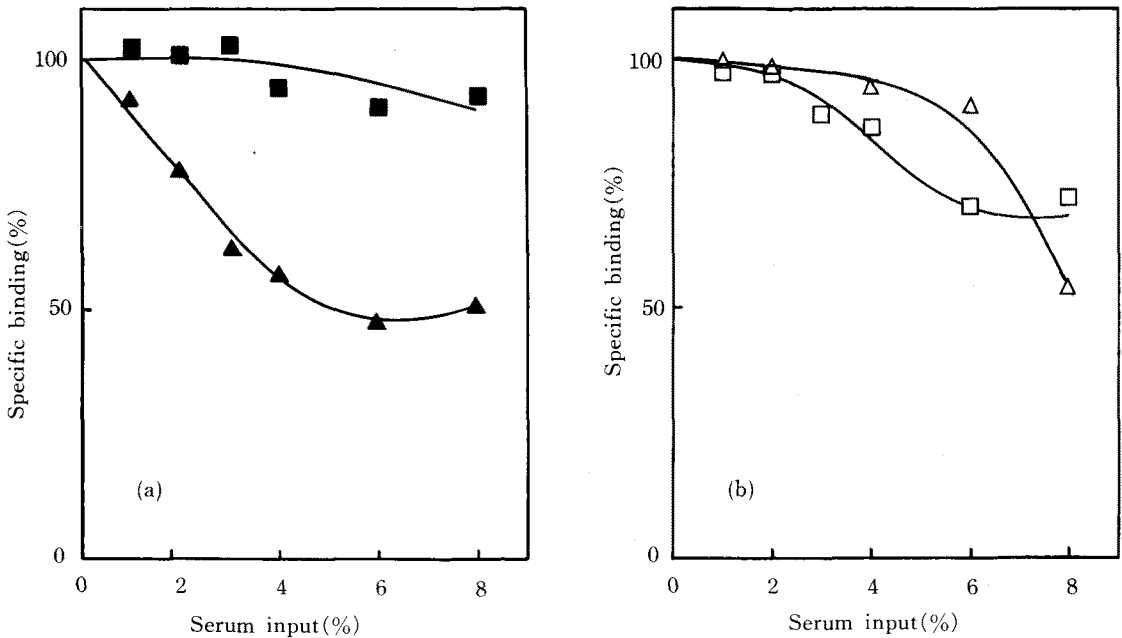


Fig. 5. Effect of serum (a) or/and cortisol (b) on specific binding of progesterone cytosolic receptor. ^3H -progesterone (▲, △) or $^3\text{H-R5020}$ (■, □) was incubated with progesterone cytosolic receptor and different concentrations of serum at 4°C for 4 hrs. $2\mu\text{M}$ of cortisol was additionally added to incubates in (b) experiment. Specific binding in the absence of serum was considered as 100%.

이 관찰되었다. 또한 24시간을 반응시켰을 경우에는 최대치의 90%의 specific binding이 나타났다.

(3) Cytosol의 농도

Cytosol에는 PR이외에도 progesterone과 결합할 수 있는 여러 물질들이 존재한다고 알려져 있으며 이런 물질과의 결합을 non-specific binding (N-SB)이라고 한다. Cytosol의 농도가 높을 수록 이런 물질들은 radioligand가 PR과 결합하는 것을 방해하여 PR의 농도를 부정확하게 측정하게 할 수 있다. Cytosol의 농도 변화에 따라 specific binding의 변화를 본 실험에 의하면 (Fig. 3), Cytosol의 단백질 농도가 4mg/ml까지는 PR의 specific binding이 cytosol의 농도와 정비례로 증가하여 단위 단백질당 PR의 양이 동일하게 측정되었으나, 그 이상의 단백질 농도에서는 단위 단백질당 PR의 양이 감소하였다. 그러므로 PR의 양을 정확히 측정하려면 cytosol의 단백질 농도는 4mg/ml이하로 유지하는 것이 필요하다.

(4) Cytosol PR의 saturation analysis

앞의 실험으로부터 증명되었던 최적 조건들을 이용하여 여러가지 농도의 $^3\text{H-R 5020}$ 과 Cytosol을 반응시켜 saturation curve와 scatchard plot을 얻었다 (Fig. 4). PR의 K_d 는 1.22nM로 나타났으며, cytosol을 초원심분리하기 직전에 DCC와 20분 동안 반응시켜 endogenous steroid를 제거하여도 K_d 값이나 PR 농도에는 변화가 없었다 (not shown). 또한 intra-assay coefficient variance는 5.8%로 나타났다 (not shown).

(5) Cortisol binding globulin(CBG)의 영향

CBG는 PR과 비슷한 affinity로 progesterone과 결합할 수 있는 단백질이며 이 때문에 정확한 PR assay를 방해한다고 알려져 있다 (Robel et al, 1981). CBG가 PR assay에 미치는 영향을 알아보기 위하여 반응 용액에 흰쥐의 혈청을 첨가한 결과 $^3\text{H-progesterone}$ 을 radioligand로 사용했을 경우 혈청 농도의 증가에 따라 specific binding이 급격하게 감소하였으나 $^3\text{H-R 5020}$ 을 사용했을 때는 혈청 농도가 4%에 이를 때까지도 specific binding에 변화가 없었다 (Fig. 5a).

그러나 이 때 2 μM 의 cortisol을 첨가하면 $^3\text{H-progesterone}$ 을 사용했을 경우 혈청만을 첨가했을 때 나타난 specific binding의 급격한 감소로부터 회복이 되었으나, $^3\text{H-R 5020}$ 을 사용했을 경우에는 오히려 감소 현상을 나타냈다 (Fig. 5b). 이러

한 결과로 보아 혈청 내의 CBG가 $^3\text{H-progesterone}$ 과 결합을 하나 radioligand로서 $^3\text{H-R 5020}$ 을 사용하면 혈청의 contamination에 의한 영향을 적게 받음을 알 수 있었다.

고 찰

PR assay의 원리 및 방법은 estrogen receptor (ER) assay와 동일이지만 PR이 progesterone과의 dissociation rate이 크고, progesterone에 대하여 PR과 거의 비슷한 affinity를 가지고 있는 CBG가 혈액 중 존재하므로 시료에 오염이 될 수 있는 등 여러가지 특성때문에 기술적으로 어려움이 따른다 (Robel et al, 1981). 그러나 합성 progesterone인 R5020이 개발된 이후 assay의 기술적인 어려움이 많이 극복되었다.

본 실험에서 나타난 바와같이 DCC를 이용하여 결합형과 유리형을 분리하였을 때, radioligand로서 $^3\text{H-progesterone}$ 을 사용했을 경우 receptor로부터의 급격한 분리때문에 반응 시간이 경과함에 따라 specific binding이 급격히 감소하는 것으로 나타났으나, $^3\text{H-R 5020}$ 을 사용했을 경우에는 비교적 안정한 반응을 나타냈다 (Fig. 1). 이는 R5020이 progesterone에 비하여 PR과의 dissociation rate가 낮다는 보고와 일치한다 (Robel, 1981). 반응 시간에 따른 specific binding의 변화를 관찰해 본 결과 4~5시간에 최대치에 도달하였으며, 그 이후 점차적으로 감소되었다는 결과는 PR이 ER에 비하여 불안정한 protein이라고 생각되어지며, 또한 cytosol의 단백질 농도가 4mg/ml까지는 cytosol의 농도와 정비례로 receptor의 농도가 증가하는 것이 관찰되어 졌는데, 이는 본인들이 행하고 있는 ER assay의 경우와 같은 결과이다 (Rhee et al, In Press). 그러나 cytosol의 단백질 농도가 1mg/ml이하일 경우에는 assay가 부정확하다고 알려져 있으므로 (Hai and Milgrom, 1978), Cytosol의 단백질 농도는 2~3mg/ml로 조절하는 것이 적당하다고 생각된다.

본 실험에서 Cytosol에 DCC를 처리하여 endogenous steroid를 제거했을 경우에도 K_d 값과 receptor 농도에 변화가 없다는 결과로 보아 estrous cycle 동안 흰쥐에서는 endogenous progesterone이 PR assay를 방해하지 않음을 알 수 있었다. 즉 estrous cycle에 따라 혈중 progesterone의 농도는 50ng/ml까지 증가하는 것으로 알려져 있는데 (Goodman, 1978).

본인들은 자궁 적출시 혈병을 제거하고 다시 cytosol을 buffer로 10배 정도 희석하여 사용하였으

므로 cytosol PR에 contamination된 progesterone 농도는 무시해도 무방하다고 생각된다. 그러나 임신을 하였을 경우 등 progesterone의 농도가 높다고 예상되는 경우에는 cytosol의 progesterone 농도를 측정하거나 혹은 DCC를 이용하여 endogenous progesterone 제거하는 작업이 필요하다(Robel et al, 1981).

본인들의 경험에 의하면 human endometrium 등 어떤 종류에서는 cytosol fraction으로부터 혈액을 제거하기가 매우 까다로우며, 또한 조심스럽게 흰 쥐의 자궁을 준비한다하더라도, 어느 정도의 혈액 성분이 섞이게 된다고 알려져 있다(Milgrom and Baulieu, 1970; Young and Cleary, 1974). 그러므로 CBG 등 혈장 단백질이 PR assay에 미치는 영향을 살펴보는 것이 중요하다.

본 연구에서는 radioligand로서 ^3H -progesterone을 사용했을 경우 반응 용액에 혈청을 첨가하면 specific binding이 급격하게 감소한다는 사실로부터 ^3H -progesterone이 CBG 등 혈장 단백질과 잘 결합함을 확인할 수 있었으며, 이때 과량의 cortisol을 반응 용액에 첨가시킴으로써 혈장 단백질에 의한 영향을 어느 정도 제거할 수 있음을 알 수 있었다. 그러나 ^3H -R 5020의 경우 혈청만을 첨가했을 때 specific binding에 거의 변화가 없었으나 설명할 수는 없지만 cortisol을 첨가하지 않았을 때가 cortisol을 첨가했을 때보다 오히려 혈장 단백질에 의한 영향을 적게 받음이 관찰되었다. 이는 R 5020이 R5020이 CBG 등 혈장 단백질과의 결합력이 낮다는 보고와 일치하며 이 때문에 PR assay에서 ^3H -R 5020을 radioligand로 사용할 경우에는 굳이 과량의 cortisol을 반응 용액에 첨가할 필요는 없다고 사료된다. 따라서 본인들은 이미 시행하고 있는 ER assay와 함께 본 연구에서 정착시킨 PR assay를 이용하여 생식기판에서의 steroid hormone의 작용기작을 규명하고 생리적·병리적 현상을 판단하며 나아가서 steroid hormone 의존성 종양을 판별하는 데도 기여할 수 있으리라고 기대한다.

결 론

본인들은 여성 생식과정에서 중요한 역할을 하는 progesterone receptor를 측정함으로써 여성 생식의 원리를 규명하고 병리적인 현상을 판단하는 데 기여하고자 PR이 풍부하게 존재하며 쉽게 구할 수 있는 흰 쥐의 자궁을 이용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. ^3H -progesterone 보다는 ^3H -R 5020이 좀 더 안

정된 ligand로 나타났다.

2. Receptor와 ligand와의 반응시간은 4~5시간, DCC와의 반응시간은 20분이 적당하다.

3. Cytosol의 단백질 농도는 2~3 mg/ml로 조절하며 cytosol내의 progesterone 농도가 매우 높은 것으로 기대되지 않으면 endogenous progesterone을 제거할 필요가 없다.

4. Progesterone receptor의 dissociation rate 은 1.22 nM이었다.

5. Radioligand로서 ^3H -R 5020을 사용했을 경우 CBG는 PR assay에 별로 영향을 미치지 않았다.

REFERENCES

- 1) Bailly, A., Le Fevre, B., Savoret, J-F, and Milgrom E.: *Activation and changes in sedimentation properties of steroid receptors. J Biol Chem* 255:2729, 1980.
- 2) Bayard, F., Damilano, S., Robel, P., and Baulieu, E.E.: *Cytoplasmic and nuclear estradiol and progesterone receptors in human endometrium. J Clin Endocrinol Metab* 46:635, 1978.
- 3) Cao, Z-D, Jones, M.S., and Harper, M.K.J.: *Progesterone and oestradiol receptor concentration and translation in uterine tissue of rabbits treated with indomethacin. J Endocrinol* 107:197, 1985.
- 4) Goodman, R.L.: *A quantitative analysis of the physiological role of estradiol and progesterone in the control of tonic and surge secretion of luteinizing hormone in the rat. Endocrinology* 102(1):142, 1978.
- 5) Hai M.T. and Milgrom, E.: *Characterization and assay of the progesterone receptor in rat uterine cytosol. J Endocrinol* 76:21, 1978.
- 6) Isomaa, V., Isotalo, H., Orava, M., and Janne, O.: *Regulation of cytosol and nuclear progesterone receptors in rabbit uterus by estrogen, antiestrogen, and progesterone administration. BBA* 585:24, 1979.
- 7) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.: *Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol. Chem* 193:265, 1951.
- 8) Milgrom, E. and Baulieu, E.E.: *Progesterone is uterus and plasma. I Binding in rat uterus 105,000 g supernatant. Endocrinology* 87:276m, 1970.
- 9) O'Malley, B.W. and Means, A.R.: *Female steroid hormones and target cell nuclei. Science* 183:610, 1974.
- 10) Park, C.K., Rhee, K.S., Cho, H.S., and Ryu, K.: *Determination of optimal conditions for cytosolic and nuclear estrogen receptor assay in rat uterus. Submit-*

- ted for publication. 1986.*
- 11) Robel, P., Mortel, R., and Baulieu, E.E.: *Estradiol and progesterone receptors in human endometrium. in "Biochemical actions of hormones" ed by Litwack G, Academic Press, 1981.*
 - 12) Scatchard, G.: *The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann NY Acad Sci 51:660, 1949.*
 - 13) Vu Hai, M.T., Logeat, F., and Milgrom, E.: *Progesterone receptors in the rat uterus: Variations in cytosol and nuclei during the oestrous cycle and pregnancy. J Endocrinol 76:43, 1978.*
 - 14) Walters, M.R.: *Steroid hormone receptors and the nucleus. Endocrine Rev 6:512, 1985.*
 - 15) Wittliff, J.L.: *Steroid-hormone receptors in breast cancer. Cancer 53:630, 1984.*
 - 16) Yamamoto, K.R. and Albert, B.M.: *Steroid receptors: Elements for modulation of eukaryotic transcription. Ann Rev Biochem 45:721, 1976.*
 - 17) Young, P.C. and Cleary, R.: *Characterization and properties of progesterone-binding components in human endometrium. J clin endocrinol Metab 39:425, 1974.*
-