

토끼 각장기의 Estrogen 수용체의 분포*

가톨릭대학 의학부 내과학교실

손 호 영 · 인 재 환 · 민 병 석

= Abstract =

The Distribution of Estrogen Receptor in Various Organs of Rabbit

Ho Young Son, M.D., Jae Whan In, M.D. and Byong Sok Min, M.D.

Department of Internal Medicine, Catholic Medical College

For clinical application of radioreceptor assay, we studied preliminarily the distribution of estrogen receptor in various organs of rabbit by a dextran-charcoal method using 6,7-³H-estradiol. The results were expressed as binding index, which is the ratio of specific estradiol receptor binding radioactivity to total radioactivity.

The materials consist of 5 female rabbits and 3 male rabbits.

The results were as follows:

1) Female rabbits

The binding index was highest in the uterine tissue. This binding index of the uterine tissue was 9.4 times that of the liver, 21.9 times that of the kidney, 24.6 times that of the brain, 28.1 times that of the lung and 65.7 times that of the muscle.

2) Male rabbits

The binding index was highest in the liver and decreased in the order of the kidney, the testis, the lung, the brain and the muscle.

It is suggested that the estrogen receptor is not confined to any specific target organ but is widely distributed in the various organs, to a different degree.

I. 서 론

호르몬 작용의 첫단계는 호르몬이 세포막 혹은 세포질내의 특이 수용체와 결합하는 것임은 이미 잘 알려진 사실이다. estrogen의 경우 현재 인정되고 있는 기전은 estrogen이 세포질내 수용체와 결합하여 "호르몬 수용체" 복합체를 형성하여 핵내로 이동하고, 핵 수용체와 결합함으로써 estrogen의 생물학적 반응이 일어나게 된다는 것이다. 최근 동위원소로 표시된 호르몬을 이용한 방사수용체측정법이 개발된후 이 방법을 이용한 임상응용이 활발히 진행되고 있으며 종래 방사면

역측정법의 일부 결점도 보완되고 있다. 특히 estrogen 수용체 측정은 유암환자에서 호르몬요법의 지침결정에 크게 기여하고 있다.

저자들은 방사수용체측정법의 임상응용을 위한 예비 실험으로 토끼 여러 장기의 estrogen 수용체의 분포상태를 관찰, 비교하여 이에 보고하고자 한다.

II. 대상 및 방법

A. 대 상

건강한 토끼 8마리(암컷 5마리, 수컷 3마리)의 자궁, 간, 폐, 신장, 근육, 대뇌, 고환 조직들을 대상으로 하였다.

B. 방 법

1) 동위원소 표시 호르몬

* 본 연구는 가톨릭중앙의료원 임상연구 조성비의 지원을 받았음.

본 논문의 요지는 제17차 대한핵의학회 학술대회(1978년 6월 2日)에서 발표되었음.

6,7-³H-estradiol (40,009MCI/mmol) (Radiochem, Amersham, Eng)를 이용하였다.

2) 조직

정맥내 공기주입으로 토끼를 죽인 후 즉시 각 장기의 적당량을 채취하여 dry ice에 얼린후 곧 -70°C 냉동기에 실험시까지 보관한 후 각 장기에서 일정량(600mg, wet weight)의 조직을 채취하였다.

3) Homogenization

Glass tube homogenizer를 사용하여, 채취된 각 조직 절편을 0.01M Tris, 0.0015M EDTA buffer, (pH 7.5)내에서 충분히 homogenize시켰다. homogenize 조작은 glass tube를 얼음물에 담근 상태에서 시행하였다.

4) 초원심분리

채취된 각 조직의 homogenate는 초원심분리기(Hitachi)를 사용하여 4°C하에서 100,000g로 50분간 초원심분리하여 그 상청액(cytosol)을 얻었다.

5) 배양

얻어진 각 조직의 cytosol 일정량(150μl)과 6,7-³H-estradiol 0.01μCi를 혼합하여 25°C에서 30분간 배양한후, 유리된 혹은 비특이적으로 결합된 6,7-³H-estradiol의 제거를 위해 0.05% dertran과 0.5% charcoal을 동량첨가, 혼합후 4°C에서 20분간 다시 배양하였다. 이 배양액을 3500rpm으로 10분간 원심분리하여 특이결합된 6,7-³H-estradiol을 포함한 상청액을 얻었다.

6) 방사능 측정

위의 상청액에 scintillator (ppo, popop, toluene) 10ml를 첨가 혼합후 liquid scintillation counter (Aloka LSC-651)를 이용하여 방사능을 측정하였다.

측정된 방사능은 모두 binding index로 표시하였다.

$$\text{Binding index} = \frac{\text{Binding radioactivity}}{\text{Total radioactivity}} \times 100\%$$

total radioactivity: ³H-estradiol present in the solution at the beginning of the incubation

7) 단백질 정량

각조직의 단백질농도는 Lowry의 방법에 따라 측정하였다.

III. 결 과

1) 암토끼 (Table 1)

각장기의 결합지수는 자궁(7.93/100mg wet weight, 1.97/mg protein) (이하, 단위 생략) 간(1.11, 0.21), 신장(0.49, 0.09), 폐(0.40, 0.07), 근육(0.13, 0.03), 대뇌(0.21, 0.08)로 산출되었고 이를 요약하면 자궁의

Table 1. The estradiol binding index of female rabbits

Organ	Binding index per 100mg wet weight	Binding index per mg protein
Uterus	7.93	1.97
Liver	1.11	0.21
Lung	0.40	0.07
Kidney	0.49	0.09
Brain	0.21	0.08
Muscle	0.13	0.03

Table 2. The estradiol binding index of male rabbits

Organ	Binding index per 100mg wet weight	Binding index per mg protein
Testis	0.46	0.10
Liver	1.84	0.43
Lung	0.32	0.06
Kidney	0.72	0.16
Brain	0.23	0.06
Muscle	0.20	0.05

결합지수(binding index/mg protein)는 간의 9.4배, 신장의 21.9배, 폐의 28.1배, 대뇌의 24.6배, 근육의 65.7배로 가장 높은 결합지수를 나타냈고 간, 신장, 대뇌, 폐, 근육의 순서로 결합지수가 감소하였다.

2) 숫토끼 (Table 2)

각장기의 결합지수는 고환(0.46/100mg wet weight, 0.10/mg protein) (이하, 단위생략) 간(1.84, 0.43), 폐(0.32, 0.06), 신장(0.72, 0.16), 근육(0.20, 0.05), 대뇌(0.23, 0.06)으로 산출되었으며 이들 각장기의 결합지수(binding index/mg protein)를 비교하면 간이 가장 높은 지수를 나타냈고, 신장 고환, 폐, 대뇌, 근육의 순서로 결합지수가 감소하였다.

IV. 고 찰

호르몬에 대한 표적기관은 그 호르몬에 대한 특이 수용체를 가지고 있음은 잘 알려진 사실이다. 즉, 스테로이드 호르몬에 대한 세포질내수용체와 핵타이드 호르몬에 대한 막수용체가 좋은 예가 된다. 특히 estrogen 수용체는 일반 스테로이드 호르몬의 대표적인 예로써 많은 연구가 있었다. Jensen과 Jacobson¹⁾은 쥐에 ³H-17β-estradiol을 주사후 이 호르몬이 다른 장기들에 비

해 자궁에 우선적으로 결합함을 관찰하고 자궁조직내에 estrogen 에 대한 특이 수용체가 존재함을 시사했다. Toft 와 Gorski 는²⁾ 쥐의 자궁조직에서 estrogen 과 특이하게 결합하는 액성인자가 존재함을 관찰하고 이 인자가 Jensen 과 Jacobson¹⁾이 주장한 estrogen 수용체와 일치함을 보고했다. 다음해 Toft, Gorski³⁾와 Koreman⁴⁾에 의해 in vitro, cell free system에서 estrogen 수용체의 측정이 이루어졌다. 이들의 실험이 현재의 estrogen 수용체측정법의 효시가 되었다고 할 수 있다. 현재까지 알려진 estrogen 수용체의 성질은 estrogen 작용기전의 첫단계에서 필수적인 것으로 estrogen 에 고도의 친화력(dissociation constant $K_d \sim 10^{10}$)을 가지고 있으며, 오직 생물학적으로 활성화된 estrogen 과만 결합하고, 열에 불안정하며, 비투석성이고, ammonium sulfate 에 의해 침전되며 결합부는 주로 단백질로 구성 되었다는 것이다^{5,6)}. estrogen 과 결합된 estrogen-수용체 복합체는 sedimentation coefficient 8S 에 해당하며⁷⁾ 핵내에서 발견되는 복합체는 5S 에 해당한다. 이는 세포질내의 Estrogen-수용체 복합체가 어떤 입체형태학적 변화를 일으킴에 기인 된다고 생각되고 있다⁸⁾. estrogen 수용체의 존재 및 그 기능과 화학적 성질이 확인 되면서 Estrogen의 작용기전에 대한 연구가 활발히 진행 되었다. 현재 인정되고 있는 estrogen 의 작용기전은 estrogen 이 단순확산으로 세포내에 들어와 세포질내의 특이수용체와 결합하여 estrogen-수용체 복합체를 형성하고⁷⁾ 이것이 입체형태학적 변화를 일으켜 활성형인 5S 형태로 핵내로 전이된다⁸⁾. 이때의 전이과정은 온도에 예민하여 25~37°C에서는 전이가 용이하게 일어나나 0°C에서는 전이가 되지 않는 소위 temperature dependent 한 성질을 나타낸다⁹⁾. 핵내로 전이된 estrogen-수용체 복합체는 chromatin 의 nonhistone 단백질에 결합되어¹⁰⁾ RNA polymerase 의 활성도를 증가시키고¹¹⁾ 이에 따라 m-RNA 가 생성되며 이 m-RNA 는 세포질내로 이동되어 ribosome 에서 새로운 단백을 합성하여 estrogen 의 생물학적 활성을 나타내게 된다는 것이다^{12,13)}. 지금까지 알려지고 있는 estrogen 수용체측정법은 dextran-charcoal 법, sucrose gradient 측정법, gel filtration 법과 전기영동법등이 있으며, 일반적으로는 dextran-charcoal 방법이 시설, 시간, 비용에서의 잇점으로 가장 많이 이용되고 있다¹⁴⁾.

estrogen 수용체측정법이 개발되고 그 방법이 용이해짐에 따라 이 방법의 임상응용은 광범할만 하다.

Evans¹⁵⁾ 등은 정상자궁에서 자궁내막이 자궁근층보다 estrogen 수용체의 농도가 높고 월경주기중 초기증식기에서 수용체의 농도가 가장 높고, 탈락시기에서 수용체의 농도가 가장 낮음을 관찰하였다. 그리고 자궁내

막암의 경우 잘 분화된 암이 미분화암보다 수용체의 농도가 높다고 보고했다. 저자들도 현재 진행중인 자궁조직에 대한 실험에서 상기 결과와 일부 일치하는 소견을 얻고있다.

한편, estrogen 수용체는 estrogen 의 표적 기관에만 국한된 것이 아니며 정도의 차이는 있으나 체내 다른 장기에서도 발견되었다¹⁶⁻¹⁹⁾.

저자들의 실험결과도 상기소견과 일치하는 결과를 보였다. 그러나 이번 실험에서는 수용체를 정량하지 않았으며, 핵수용체의 존재를 동시에 관찰하지 않았기 때문에 그 의의는 더 추구 해보아야 될 것으로 생각된다.

최근, 가장 특기할 사실은 estrogen 수용체측정법이 유암 환자에 대한 내분비요법 적용유무의 지침이 된다는 것이다. 유암의 치료면에서 내분비요법에 대한 반응은 여러 학자들에 의해 증명된 바있다. 그러나, 전체 유암중 이 내분비요법에 반응하는 경우는 1/3에 불과하다^{20,21)}. 즉, 나머지 2/3의 경우는 결국 불필요한 수술과 수술자체에 따른 위험성도 감수해야만 했다. 이에 따라 유암을 호르몬의존형과 비의존형으로 구분하게 되었고, 내분비요법 적용시 호르몬의존형과 비의존형을 미리 감별해야 될 필요성이 요구되었다. 이러한 문제점 해결에 크게 공헌한 것이 estrogen 수용체측정법의 개발이었다. 1970년 Koremman 과 Dukes²²⁾에 의해 유암조직에서 estrogen 수용체의 존재가 확인되었다. 그후 Jensen 등²³⁾은 유암환자에서 estrogen 수용체의 존재 유무에 따라 내분비요법에 대한 반응이 결정된다고 주장했다. 즉, estrogen 수용체 측정으로 호르몬의존형암(수용체 양성)과 비의존형암(수용체 음성)의 감별이 가능하게 되었다. estrogen 수용체 양성인 경우 내분비요법에 대한 반응율은 55%정도인 반면, 음성인 경우는 거의 대부분(92%)에서 반응하지 않음이 밝혀졌다²⁴⁻²⁸⁾. 따라서 유암 환자에서 estrogen 수용체를 측정함으로써 미리 비반응환자를 내분비요법 대상에서 제외 시킴으로써 상술한 불필요한 수술 및 그 위험성을 피할 수 있게 되었다. 그러나 estrogen 수용체 양성이나 내분비요법에 반응하지 않는 경우가 문제점으로 대두되고 있다. 최근, Kim 등²⁹⁾은 이에 대한 이유로써 estrogen-수용체 복합체가 핵내로 전이되지 못하는 경우와 이 복합체가 chromatin 에 결합하지 못함에 기인하는 가능성을 제시하고 있다. 그는 또한, MT-W9 계열의 쥐의 유암조직에서 estrogen 수용체 양성 이면서 호르몬 비의존성인 세포군의 존재를 확인하고 유암치료시 이들 estrogen 수용체 양성-호르몬 비의존성 세포군의 제거를 위해 내분비요법과 동시에 화학요법을 병용함이 타당할 것이라고 보고한 바 있다.

상술한 estrogen 수용체 측정의 유용성외에 Kiang

등³⁰⁾은 원발병소를 알수없는 전이성 악성종양을 가진 경우, estrogen 수용체 양성인 경우는 유암, 자궁암, 난소암의 악성진전에만 국한되기 때문에, estrogen 수용체 측정이 원발병소의 감별진단에 도움이 된다고 주장했다. 유암 치료후의 예후판정에도 estrogen 수용체의 유용성이 알려졌다. 즉, estrogen 수용체 음성인 경우 재발 및 조기재발의 가능성이 높다고 한다.³¹⁾ 또한 최근 소개되고 있는 항 estrogen 제제요법의 선택지침에도 estrogen 수용체의 유용성이 강조되고 있다.³²⁾

Fisher³³⁾등은 악성흑색종 조직에서 estrogen 수용체의 존재를 확인하고 악성흑색종의 치료에 내분비요법 적용가능성을 제시하였다.

상술한 바와 같이 estrogen 수용체 측정의 임상에서의 유용성이 강조되고 있으며 이번 저자들의 실험성적이 종래 알려진 사실들과 일치하는 소견을 관찰할 수 있었기에 estrogen 수용체측정법의 임상응용이 가능할 것으로 생각된다.

V. 결 론

방사수용체측정법의 임상응용을 위한 예비실험으로 토끼(암컷 5마리, 수컷 3마리) 여러장기의 estrogen 수용체의 분포상태를 관찰하였다. 실험방법은 토끼의 자궁, 간, 신장, 폐, 근육, 대뇌, 고환 조직의 homogenate와 6,7-³H-estradiol을 이용하여 dextran-charcoal 방법에 의하여 estrogen 수용체를 측정하고 결합지수를 산출, 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 암토끼

자궁의 결합지수가 가장 높았다.

자궁의 결합지수는 간의 9.4배, 신장의 21.9배, 대뇌의 24.6배, 폐의 28.1배, 근육의 65.7배로 산출되었다.

2. 수토끼

간의 결합지수가 가장 높게 산출되었고 신장, 고환, 폐, 대뇌, 근육의 순서로 지수가 감소하였다.

이상의 성적을 종합하면 estrogen 수용체는 자궁과 같은 특이표적기관에만 국한된 것이 아니고 정도의 차이는 있으나 체내 여러 장기에 광범위하게 분포되어 있는 것으로 추측된다.

REFERENCES

- 1) Jonsen, E.V. and Jacobson, H.I.: *Basic guides to the mechanism of estrogen action. Recent Progr. Hormone Res.*, 18:387-409, 1962.
- 2) Toft, D. and Gorski, J.: *A receptor molecule for estrogens: Isolation from the rat uterus and preliminary characterization. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 55:1574-1581, 1966.
- 3) Toft, D., Shyamala, G. and Gorski, J.: *A receptor molecule for estrogens: Studies using a cell-free system. Biochemistry*, 57:1730-1943, 1967.
- 4) Korenman, S.G.: *Radio-Ligand binding assay of specific estrogen using a soluble uterine macromolecule. J. Clin. Endocrinol.*, 28:127-130, 1968.
- 5) O'Malley, B.W. and Means, A.R.: *Female steroid hormones and target cell nuclei. Science*, 183:610-620, 1974.
- 6) Chan, L. and O'Malley, B.W.: *Mechanism of action of the sex steroid hormones (First of three parts). N. Engl. J. Med.*, 294:1322-1328, 1976.
- 7) Gorski, J., Toft, D. and Shyamala, G.: *Hormone receptors: Studies on the interaction of estrogen with the uterus. Recent Prog. Horm. Res.*, 24:45-80, 1968.
- 8) Jensen, E.V., Suzuki, T., Kawashima, T., Stumpf, W.E., Jungblut, P.W., and De Sombe, E.R.: *A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 59:632-638, 1968.
- 9) Jensen, E.V., Mohla, S. and Gorell, T.: *Estrophile to nucleophile in two easy step. J. Steroid. Biochem.*, 3:445-458, 1972.
- 10) Steggle, A.W., Spelsberg, T.C. and Glasser, S.R.: *Soluble complex between steroid hormones and target-tissue receptors bind specifically to target-tissue chromatin. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 68:1479-1482, 1971.
- 11) McGuire, W.L. and O'Malley, B.W.: *Ribonucleic acid polymerase activity of the chick oviduct during steroid-induced synthesis of a specific protein. Biochim. Biophys. Acta.*, 157:187-194, 1968.
- 12) Comstock, J.P., Rosenfeld, G.C. and O'Malley, B.W.: *Estrogen induced changes in translation, and specific messenger RNA levels during oviduct differentiation. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 69:2377-2380, 1972.

- 13) Chan, L. and O'Malley, B.W.: *Mechanism of the sex steroid hormone (Second of Three Parts)*. *N. Engl. J. Med.*, 294:1372-1381, 1976.
- 14) McGuire, W.L., Carbone, P.P., Seans, M.E. and Escher, G.C.: *Estrogen receptors in human breast cancer: an over view*. In *Estrogen Receptors in Human Breast Cancer*, ed. by McGuire, W.L., Carbone, P.P., and Vollmer, E.P. 1-7, 1975, Raven Press, New York.
- 15) Evans, L.H., Martin, J.D. and Hahnel, R.: *Estrogen receptor concentration in normal and pathological human uterine tissue*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 38:23-32, 1974.
- 16) Puca, G.A. and Brescian, F.: *Interactions of 6,7-³H-17-estradiol with mammary gland and other organs of the Cs H mouse in vivo*. *Endocrinology*, 85:1-10, 1969.
- 17) DeVries, J.R., Ludens, J.H. and Fanestil, D.D.: *Estradiol renal receptor molecules and estradiol-dependent antinatriuresis*. *Kidney Int.*, 2:95-100, 1972.
- 18) Arias, E. and Warren, T.C.: *An estrophilic macromolecule in chicken liver cytosol*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 230:550-559, 1971.
- 19) Mester, J. and Baulieu, E.E.: *Nuclear estrogen receptor of chick liver*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 261:236-244, 1972.
- 20) MacDonald I.: *Endocrine ablation in disseminated mammary carcinoma*. *Surg. Gynec. Obstet.*, 115:215-222, 1962.
- 21) Taylor, S.G., III: *Endocrine ablation in disseminated mammary carcinoma*. *Surg. Gynec. Obstet.*, 115:443-448, 1962.
- 22) Korenman, S.G. and Dukes, B.A.: *Specific estrogen binding by the cytoplasm of human breast carcinoma*. *J. Clin. Endocrinol.*, 30:639-645, 1970.
- 23) Jensen, E.V., Block, G.E., Smith, S., Kyser, K. and De Sembre, E.R.: *Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy*. *Natl. Cancer. Inst. Monograph.*, 34:55-79, 1971.
- 24) McGuire, W.L.: *Current status of estrogen receptors in human breast cancer*. *Cancer*, 36:638-644, 1975.
- 25) Engelsman, E., Persijn, J.P., Koesten, C.B. and Cleton, F.J.: *Oestrogen receptor in human breast cancer tissue and response to endocrine therapy*. *Brit. Med. J.*, 30:750-752, 1973.
- 26) Leung, B.S., Fletcher, W.S., Lindell, T.D., Wood, D.C. and Krippaehne, W.W.: *Predictability of response to endocrine ablation in advanced breast carcinoma*. *Arch. Surg.*, 106:515-519, 1973.
- 27) Hahnel, R. and Twaddle, E.: *Estimation of the association constant of the estrogen receptor complex in human breast cancer*. *Cancer Res.*, 33:559-566, 1973.
- 28) McGuire, W.L.: *Estrogen receptors in human breast cancer*. *J. Clin. Invest.*, 52:73-77, 1973.
- 29) Bronn, D.G., Untae Kim., DiVecchia, L. and Hinton, J.P.: *Estrogen receptor level in Hormonally progressive mammary tumors*. personal communication, 1976.
- 30) Kiang, D.T. and Kennedy, B.J.: *Estrogen receptor assay in the differential diagnosis of diagnosis of adenocarcinomas*. *J. A. M. A.*, 238:32-34, 1977.
- 31) Knight, W.A., III., Livingston, R.B., Gregory, E.J., and McGuire, W.L.: *Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast carcinoma*. *Cancer Res.*, 37:4669-4671, 1977.
- 32) Legha, S.S., Davis, H.L. and Muggia, F.M.: *Hormonal therapy of breast cancer: New approaches and concept*. *Ann. Int. Med.*, 88:69-77, 1978.
- 33) Fisher, R.I., Neifeld, J.P. and Lippman, H.E.: *Oestrogen receptors in human malignant melanoma*. *Lancet*, Aug., 14:337-338, 1976.

