

미성숙 쥐 자궁에서 Tamoxifen의 Antiestrogen 효과에 관한 연구: I. 세포질 내 및 핵 내 Estradiol 수용체 농도의 변화에 관하여

이효종 · 조충호* · 박무현

경상대학교 농과대학 수의학과 · 서울대학교 수의과대학*

(1985.8.12 接受)

A Study on Antiestrogenic Effects of Tamoxifen in Immature Rat Uterus; I. Effects on Concentrations of Cytosol and Nuclear Estradiol Receptor

Hyo-jong Lee, Choong-ho Jo* and Moo-hyun Park

Department of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University.

College of Veterinary Medicine, Seoul National University*

(Received August 12, 1985)

Abstract: The present study has been carried out to elucidate the antiestrogenic effects of tamoxifen in uteri of immature rats.

Immature female Sprague-Dawley rats were allocated into 4 groups and injected with 5µg of estradiol-17β, 50µg of tamoxifen, a combination of both, or vehicle only subcutaneously three times after an interval of 24 hours respectively. The concentrations of cytosol estradiol receptor in uterus were measured by DCC method before and 1, 3, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after the above treatments and those of nuclear estradiol were measured by protamine exchange method 72 hours after the above treatments.

The results obtained were summarized as follows:

1. The binding affinity of tamoxifen to estradiol receptor in uterine cytosol was lower than that of estradiol-17β, accordingly the translocation of estradiol receptor into the nucleus was found to be delayed.
2. Tamoxifen caused the retention of estradiol receptor in nucleus over 24 hours and inhibited the replenishment of the receptor from nucleus to cytosol in uterus.

서 론

일반적으로 peptide 또는 amine 호르몬은 세포막을 통과하지 못하므로 cyclic nucleotide를 2차 전달인자로 하여 그 작용을 매개토록 하고 있으나 steroid 호르몬은 분자 구조가 비교적 작으며 지방친화성을 가지고 있어서 그의 표적 기관의 세포 안으로 쉽게 들어감으

로써 고유한 작용을 일으키는 것으로 알려져 있다.

1962년 Jensen과 Jacobson²³⁾은 tritium으로 표지된 estradiol-17β가 쥐의 표적 기관에 특이하게 결합됨을 관찰함으로써 estrogen의 작용 기전에 관한 관심이 집중되었다.

혈류를 통하여 표적 기관에 도달한 steroid 호르몬은 확산에 의하여 세포 안으로 들어가서 세포질에 존재하

고 있는 특이한 수용체 단백질과 높은 진화도로서 결합하여 ($K_d=2 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-9} M$) steroid-수용체 결합체를 이룬다.^{15,17,22} 세포질에서 수용체 단백질은 8S (~236,000 mol wt)로 추출되나 0.3M KCl로 처리하면 4S subunit (~75,000 mol wt)로 변환되었다가 Ca^{++} -dependent factor에 의하여 5S subunit (~140,000 mol wt)로 다시 변환되어 핵과의 진화도가 높아져서 steroid와 같이 핵 안으로 이행되는 것으로 믿어지고 있다.^{21,28,44,45} 그리하여 세포질 내 수용체 농도는 감소하며 상대적으로 핵 내 수용체 농도는 증가하게 된다. 핵 내로 이행된 steroid-수용체 단백질 결합체는 chromatin과 결합하여 유전자에 영향을 주게 되는데, 특히 RNA polymerase의 활성을 높혀줌으로써 RNA 합성이 촉진된다.^{16,18,43} 핵 내의 DNA로부터 전사된 RNA는 세포질로 이행되어 단백질 합성을 촉진함으로써^{1,18,19} 세포의 비대가 일어나며, 그 후 DNA 합성이 촉진됨으로써^{8,30,32} 세포의 증식이 일어나는 것으로 풀이되고 있다.

estrogen이 표적기관에서 이러한 일련의 작용을 일으키기 위하여서는 우선적으로 표적 기관에서의 수용체 단백질의 수준에 깊이 좌우되는데, 자궁, 질, 유선, 뇌하수체 및 시상하부에서는 높은 수준으로 나타나고 간, 신장, 부신 및 난소에서는 낮은 수준으로 나타난다고 한다.^{4,11,27,43,48,49} 뿐만 아니라 동물 및 사람의 유암 세포에서 그리고 전이성 유암 환자로부터 유래한 MCF-7 cell line에서 estrogen 수용체가 발견되었고^{29,36,56} estrogen 수용체와 호르몬 요법에 의한 효과와는 직접적인 관련이 있다는 사실이 입증되었다.^{21,37,40}

tamoxifen(trans-1-(p-B-dimethylaminoethoxyphenyl)-1,2-diphenyl but-1-ene)은 triphenylethylene계의 non-steroid성 물질로서 쥐에 투여하였을 경우 착상의 실패, 질 상피세포의 각질화 방지, 자궁 중량의 증가 억제 등 강한 항 estrogen 작용이 있음이 1966년 Harper와 Walpole¹⁹에 의하여 최초로 밝혀진 이래 유암의 치료 목적으로 널리 사용되기 시작하였다.^{10,31,46,47,55} 그러나 그 치료효과는 유암 세포가 estrogen 수용체를 일정한 수준 이상(>10 fmol/mg cytosol protein) 함유하고 있을 경우에 기대할 수 있다고 한다.^{2,40,41}

tamoxifen은 쥐에서 투여 초기에는 자궁 중량의 증가 및 세포질 내 estrogen 수용체의 핵 내 이행에 있어서 그 자체만으로도 estrogen을 투여하였을 때의 효과와 대등하게 나타난다고 하며^{12,34} 생쥐에 투여하였을 경우에는 estradiol의 효과와 같아서 길항작용을 나타내지 않는다고 한다.^{19,55} 그러나 닭에서는 이 물질이 순수한 antiestrogen 효과를 나타낸다고 한다.⁵¹

이와 같이 tamoxifen은 쥐에서 estrogen에 대하여 부분적 agonist로서의 기능이 있으며 또한 대상 동물에 따라 그 기능이 다른 것으로 보고되고 있으나 그 이유에 대하여서는 아직도 정확한 설명이 뒤따르지 못하고 있다.

tamoxifen, nafoxidine 및 clomiphene 등 non-steroidal antiestrogen 물질은 estrogen의 표적 기관에서 estrogen과는 경쟁적으로 그 수용체와 결합함으로써 estrogen 그의 수용체와 결합하는 것이 저해당할 뿐만 아니라, 이러한 antagonist들은 estrogen 수용체와 결합한 다음 핵 안으로 이행되어 오랜 동안 정체함으로써 수용체의 replenishment를 억제하여 estrogen의 작용을 방해하는 것으로 믿어지고 있다.^{8,24,25,28,55}

그러나 근년에 와서 tamoxifen estrogen 수용체와 결합하는 부위 및 친화도에 관하여 많은 논란이 있다.^{5,23,26,50,52}

본 실험은 미성숙 쥐에 estradiol-17 β 와 tamoxifen을 각각 혹은 동시에 주사하고 자궁에서의 세포질 내 및 핵 내 estradiol 수용체 농도의 변화를 조사함으로써 tamoxifen의 항 estrogen 효과를 추적하고자 하였다.

재료 및 방법

공시동물 : 본 실험에서는 21~25 일령의 45~50g인 Sprague-Dawley계의 미성숙 암쥐를 사용하였다. 실험 동물은 20~25°C의 실온에서 1일 12시간씩(09:00~21:00) 광선을 허용하였으며 물(수도물)과 사료(삼양사 펠릿사료)는 자유로이 급식시키면서 사육하였다.

완충액 및 시약 : 본 실험에 사용한 완충액의 조성은 다음과 같으며 pH 7.4(4°C)에서 사용하였다.

(1) Tris-EDTA-dithiothreitol(TED)완충액 : Tris 10 mmol/l, EDTA 2mmol/l 및 dithiothreitol 0.5mmol/l 이 함유되게 만들었다.

(2) Tris-EDTA-dithiothreitol-glycerol(TEDG) 완충액 : Tris 10mmol/l, EDTA 2mmol/l, dithiothreitol 0.5mmol/l, 및 glycerol 10%(V/V) 함유되게 만들었다.

(3) Tris-KCl-dithiothreitol(TKD) 완충액 : Tris 10 mmol/l, KCl 0.6mol/l 및 dithiothreitol 0.5mmol/l이 함유되게 만들었다.

(4) Saline 완충액 : NaCl 150mmol/l 및 Tris-HCl 10mmol/l이 함유되게 만들었다.

본 실험에 사용한 시약은 모두 G.R. grade이었다. estradiol-17 β , tamoxifen, DL-dithiothreitol, bovine serum albumin(Fraction V), DNA(salmon testis), diethylstilbestrol, Norit A charcoal, protamine sulfate,

Dextran T-70 등은 Sigma사 제품을, 그리고 방사능 표지 estradiol-17 β [(2, 4, 6, 7-³H(N))-estradiol, 112.0 Ci/mmol] 및 Atomlight는 New England Nuclear사 제품을 사용하였다.

실험군의 배치 및 약물투여 : 본 실험에서 실험군의 배치 및 약물투여 방법은 다음과 같다.

각 실험군에는 미성숙 암 쥐 144마리씩을 완전입의 배치하였다.

1) estradiol-17 β (E2) 투여군 : estradiol-17 β 5 μ g을 polyethylene glycol, 증류수 및 ethanol의 4.5 : 4.5 : 1의 비율(V/V)로 혼합된 부형제에 녹혀 암쥐의 경부피하에 24시간 간격으로 3일간 계속 주사하였다.

2) tamoxifen(TAM) 투여군 : tamoxifen 50 μ g을 위와 같이 혼합된 부형제에 녹혀 암쥐의 경부피하에 24시간 간격으로 3일간 계속 주사하였다.

3) estradiol-17 β 와 tamoxifen(E2+TAM) 동시 투여군 : 위와 같은 부형제에 녹인 estradiol-17 β 5 μ g과 tamoxifen 50 μ g을 암쥐의 경부피하에 24시간 간격으로 3일간 계속 주사하였다.

4) 대조군 : 부형제만 0.2ml씩 암쥐의 경부피하에 24시간 간격으로 3일간 계속 주사하였다.

자궁의 적출 및 보관 : 주사 전 및 최초 주사로 부터 1, 3, 6, 12, 24, 48 및 72시간마다 각 실험군에서 18마리씩을 침수 방혈하고 3분 이내에 개복하고 자궁을 적출하여 주위 지방조직과 인대를 분리하였다. 적출한 자궁은 즉시 액체질소 통에 넣어 수용체 정량, DNA 전량 및 단백질 정량에 사용될 때까지 보관하였다.

estradiol 수용체 정량 : 수용체 정량을 위한 시료제작 과정은 Fig. 1과 같다.

1) 세포질 시료 제작 : 액체질소 통에 보관하였던 자궁은 2~4마리분을 묶어서 2mm \times 2mm의 크기로 가위로 자른 다음 20%(W/V)의 균등질로 만들기 위하여 TEDG 완충액을 적당량 가하여 빙조 안에서 glass homogenizer로 15초 마쇄한 후 45초 쉬는 과정을 4회 반복한 다음 4°C에서 800 \times g로 30분간 원심시켜(Chilspin, MSE, U.K.) 침사물은 핵 내 수용체 정량에 사용하였다. 상등액은 다시 4°C에서 105,000 \times g로 1시간 초원심분리하여(preparative Ultracentrifuge, L5-75B, Beckman, U.S.A.) 세포질 내 수용체 정량에 사용하였다.

2) 핵질 시료 제작 : 상기의 세포질 시료 제조과정에서 얻은 핵 분획에 대하여 핵막을 파괴시키기 위하여 TKD 완충액 3.5ml를 첨가하여 빙조 안에서 1시간 진탕하였다. 이 재료 중 DNA 정량을 위해 2ml씩 남기고 나머지는 4°C에서 4,000 \times g로 30분간 원심하여 그

상층액을 얻었다. 이 상층액은 TED 완충액으로 6배 희석한 다음 핵 내 수용체 정량에 사용하였다.

3) 세포질 내 estradiol 수용체 정량 : McGuire 등의 방법(1977)⁴¹⁾에 따라 수용체와 결합하지 않은 free estradiol을 흡착하는 성질을 가진 dextran-coated charcoal(DCC)을 이용하여 세포질 내 estradiol 수용체 함량을 정량하였다.

즉 시험관 두 개를 한 조로 하여 Scatchard-plot 분석을 위해 다섯 조의 실험을 준비하고, 4개조는 TEDG 완충액에 녹인 방사능 표지 estradiol(2, 4, 6, 7-³H-estradiol)을 각각 25, 50, 100 및 200fmol씩 되게 넣고 1개조는 비특이성 결합체의 정량용으로 미리 ethanol 10 μ l에 용해해 둔 estradiol competitor diethylstilbestrol(DES)을 40pmol되게 넣었다. 이들 5개조의 시험관에 단백질 함량이 2mg/ml 되도록 TEDG 완충액으로 희석된 세포질 분획 200 μ l씩 첨가한 다음 4°C에서 1시간 동안 정치시켰다가 DES가 첨가된 제 5조의 시험관에 200fmol의 방사능 표지 estradiol을 넣었다. 모든 시험관들은 잘 진탕하여 4°C에서 18시간 반응시킨 다음 각 시험관에 0.5% Dextran-coated charcoal 부유액(0.5% Norit A charcoal, 0.05% Dextran T-70)을 300 μ l씩 첨가하여 잘 진탕하였다. 그 다음 빙조 안에서 15분간 정치시켰다가 4°C에서 1,500 \times g로 10분간 원심시켜 그 상층액을 scintillation vial에 옮겨 담고 Atcmlight(NEN, U.S.A.)를 5ml씩 가하였다. 이것을 vortex mixing한 다음 상온에서 12시간 방치한 후 liquid scintillation counter(Tri-Carb 300, Packard, U.S.A.)를 이용하여 방사능을 측정하여 estrogen 수용체와 결합한 방사능 표지 estrogen의 양을 측정하였다.

4) 핵 내 estradiol 수용체 정량 : 핵 내 estradiol 수용체 정량은 Zava 등의 방법(1976)에 따라 수용체를 침전시키는 성질을 가진 protamine sulfate를 이용하여 실시하였다.

즉 핵질시료 500 μ l씩을 250 μ l의 protamine sulfate용액(1mg/ml TED 완충액)이 들어 있는 5개조의 시험관에 넣고 vortex mixing한 다음 4°C에서 10~15분간 반응시켜 4개조의 침전물에는 방사능 표지 estradiol을 25, 5, 1.0 및 2.0nmol 되게 넣었다. 나머지 1개조에는 방사능 표지 estradiol 2.0nmol과 DES(100 μ l의 TED 완충액) 용액 200nmol을 같이 넣었다. 이들 각 시험관은 37°C에서 2.5시간 동안 가끔 흔들어 주면서 반응시키고 4°C에서 1시간 냉각시킨 다음 TED 완충액으로 3회 씻어내었다. 이 침전물에 무수 에탄올 1ml를 넣고 30°C의 항온 수조에 30분간 놓아 두었다가 800 \times g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 scintillation

vial에 담고 5ml의 Atomlight를 넣은 다음 5분간 liquid scintillation counter로 방사능을 측정하였다.

5) 수용체 함량의 계산: 세포질 내 및 핵 내 estradiol 수용체 함량을 계산하기 위하여 각 시험관조의 결합치에서 비특이성 결합치를 감하여 각 시험관조의 특이성 결합치를 산출하였다. 이들 각 시험관조마다 특이성 결합과 비 특이성 결합의 비율을 구하여 각 특이성 결합농도에 대한 Scatchard-plot를 전개하여 수용체 함량을 계산하였다.

세포질 내 수용체 함량은 단백질 단위 중량(mg)당의 양으로 그리고 핵 내 수용체 함량은 DNA 단위 중량(mg)당으로 환산하였다.

6) Deoxyribonucleic acid(DNA) 정량 및 단백질 정량: DNA 정량은 salmon testis DNA를 표준액으로 하여 Burton법(1956)²⁾에 따라 정량하였다. 그리고 단백질 정량은 bovine serum albumin(fraction V)을 표준액으로 하여 Lowry방법(1951)³⁾으로 정량하였다.

결 과

1. 세포질 내 estradiol 수용체 농도의 변화

세포질 내 estradiol 수용체 농도에 대한 tamoxifen의 antiestrogen 효과를 측정하기 위하여 estradiol-17 β 및 tamoxifen을 각각 혹은 동시에 미성숙 암쥐의 경부 피하에 24시간 간격으로 연속 3회 주사하고 주사 전 그리고 첫 주사 후 1, 3, 6, 12, 24, 48 및 72시간만에 적출된 자궁에서의 세포질 내 단백질 mg당 estradiol 수용체 농도의 변화를 측정 한 결과는 다음과 같다.

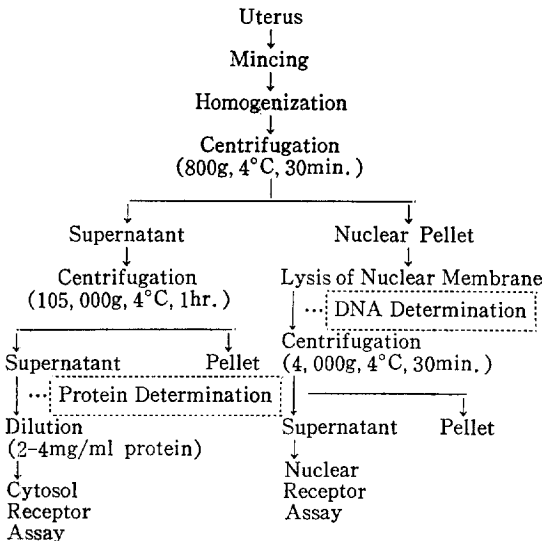


Fig. 1. Flow chart of sample preparation for uterine cytosol and nuclear estradiol receptor assay.

1) estradiol-17 β 투여군: E2 투여군에서 자궁 세포질 내 estradiol 수용체 농도는 주사 전에 359 ± 28 fmol이었으나 주사 1시간 후에 그 농도는 11 ± 3 fmol로서 급격히 감소하였다. 이는 대조군의 그것(374 ± 33 fmol)의 3.13%에 해당하였고 두군간에는 유의적인($p < 0.01$) 차이가 있었다. 주사 3시간 후에 그 농도는 60 ± 12 fmol으로서 주사 1시간 후의 농도에 비하여 약간 증가하였으나 대조군의 18.27%에 해당하는 수준이었고 역시 교도의 유의성($p < 0.01$)을 나타내었다. 그 이후 estradiol 수용체 농도는 점차 증가하다가 12시간 후에는 그 농도가 주사 전에 비하여 약 절반의 수준까지 상승하였고 24시간 후에는 그 농도가 331 ± 12 fmol로서 주사 전의 농도와 같은 수준으로 회복되었다. 24시간 간격으로 계속 estradiol을 주사하였을 경우에 그 수용체 농도는 처음 주사 시로부터 48시간 후에 249 ± 9 fmol이었고 72시간 후에는 187 ± 9 fmol로서 대조군의 그것에 비하여 유의적으로($p < 0.01$) 낮아지는 경향을 나타내었다 (Table 1. 및 Fig. 2. 참조).

2) tamoxifen 투여군: TAM 투여군에서 자궁 세포질 내 estradiol 수용체 농도는 주사 전에 343 ± 11 fmol이었으나 주사 1시간 후에는 106 ± 11 fmol로 감소하였다. 이는 대조군의 그것(374 ± 33 fmol)의 28.53%에 해당하는 수준이었다($p < 0.01$). 주사 3시간 후에는 그 농도가 14 ± 2 fmol로서 E2 투여군에 비하여 수용체의 감소현상이 보다 늦게 나타났다. 주사 6시간 후에는 그 농도가 5 ± 1 fmol로서 최소치에 이르렀으며 그 이후부터는 다소 증가하는 경향을 나타내었지만 대조군의 10% 전후에 미치는 낮은 수준을 유지하였다 (Table 1. 및 Fig. 2. 참조).

3) estradiol-17 β 와 tamoxifen의 동시 투여군: E2 + TAM 투여군에서 자궁 세포질 내 estradiol 수용체 농도는 주사 전에는 366 ± 10 fmol이었으나 주사 1시간 후에는 6 ± 2 fmol로 급격히 감소하였다. 그 이후 세포질 내 estradiol 수용체는 대조군의 10% 이하에 해당하는 낮은 농도를 계속 유지하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 estradiol-17 β 를 주사하였을 경우에는 자궁 세포질 내 estradiol 수용체 농도는 주사 전의 수준으로 점차 회복되는 경향을 나타내었으나 이 두 가지 약물을 동시에 주사하였을 경우에는 이러한 경향을 나타내지 아니하고 오히려 tamoxifen을 단독 주사하였을 경우와 같이 계속 낮은 수준을 유지하였다 (Table 1. 및 Fig. 2. 참조).

2. 핵 내 estradiol 수용체 농도의 변화

핵 내 estradiol 수용체 농도에 대한 tamoxifen의 antiestrogen 효과를 측정하기 위하여 estradiol-17 β 및

Table 1. Antiestrogenic Effect of Tamoxifen on the Concentration of Cytosol Estradiol Receptor in Immature Rat Uteri

Treatment	Hours after injection							
	0	1	3	6	12	24	48	72
Control	368±12	374±33	329±27	370±16	361±26	284±11	329±15	323±23
Estradiol-17β	359±28	11±03	60±12	101±13	173±20	331±12	249±09	187±09
Tamoxifen	343±11	106±11	14±02	5±01	16±03	33±09	25±03	33±05
Estradiol-17β+Tamoxifen	366±10	6±02	9±01	5±01	6±01	30±03	18±03	28±04

Each value represents the mean±SE for six observations.

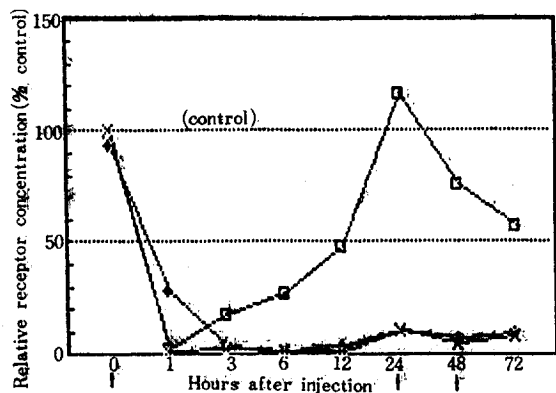


Fig. 2. Antiestrogenic effect of tamoxifen on cytosol estradiol receptor concentration in immature rat uteri.

▨ : estradiol-17β ◆ : tamoxifen
 × : estradiol-17β+tamoxifen † : injection

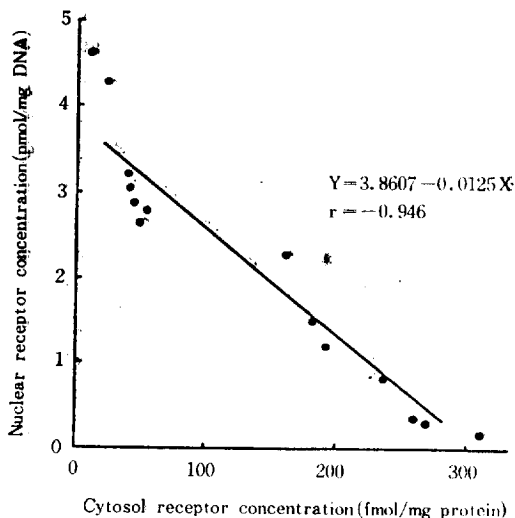


Fig 4. Correlation between cytosol and nuclear estradiol receptor concentration in immature rat uteri at 72 hours after treatments.

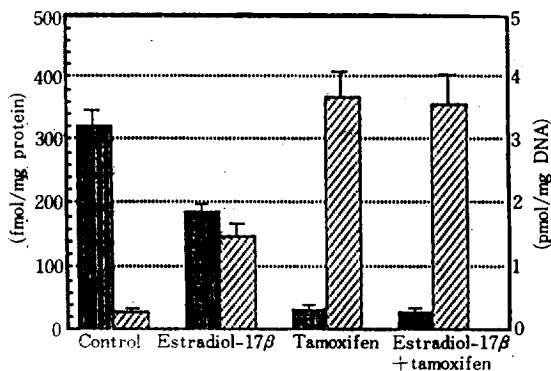


Fig. 3. Concentration of cytosol and nuclear estradiol receptor in immature rat uteri at 72 hours after treatment.

◆ : cytosol estradiol receptor ▨ : nuclear estradiol receptor

tamoxifen을 각각 혹은 동시에 24시간 간격으로 미성숙 암쥐의 경부 피하에 연속 3회 주사하고, 첫 주사 후 72 시간만에 적출된 자궁에서의 핵내 DNA mg당 estradiol 수용체 농도의 변화를 측정할 결과는 다음과 같다.

1) **estradiol-17β 투여군** : E2 투여군에서 핵 내 estradiol 수용체 농도는 1.48 ± 0.27 pmol로서 대조군의 그것 (0.27 ± 0.02 pmol)에 비하여 월등히 ($p < 0.01$) 높았다 (Fig. 3. 참조).

2) **tamoxifen 투여군** : TAM 투여군에서 핵 내 estradiol 수용체 농도는 3.67 ± 0.42 pmol로서 가장 높았으며 E2 투여군에 비하여 유의적인 ($p < 0.05$) 차이를 나타내었다 (Fig. 3. 참조).

3) **estradiol-17β와 tamoxifen의 동시 투여군** : E2+TAM 투여군에서 핵 내 estradiol 수용체 농도는 3.54 ± 0.48 pmol로서 E2 투여군에 비하여 역시 유의적인

($p < 0.05$) 차이를 나타내었다. 그러나 TAM 투여군에 비하여는 동일한 수준으로서 유의적인 차이는 없었다 (Fig. 3. 참조).

4) 세포질 내 estradiol 수용체 농도와 핵 내 estradiol 수용체 농도와의 상관관계: 첫 주사 시로부터 72시간 후 각 처리군에서의 세포질 내 estradiol 수용체 농도와 핵 내 estradiol 수용체 농도와의 상관관계를 분석한 결과 유의적으로 ($p > 0.001$) 음의 상관관계 ($r = -0.946$)를 나타내었다 (Fig. 4. 참조).

고 찰

미성숙 쥐의 자궁에서 세포질 내 및 핵 내 estradiol 수용체 농도에 대한 tamoxifen의 antiestrogen 효과를 조사하였던 바 E2 투여군에서 주사 1시간 후에 세포질 내 estradiol 수용체 농도는 $11 \pm 3 \text{ fmol/mg protein}$ 이었다. 이는 대조군의 3.18%에 해당하는 수준으로서 급격한 감소 현상을 나타내었다. 그러나 TAM 투여군에서는 이 시기에 그 농도가 $106 \pm 11 \text{ fmol/mg protein}$ 으로서 E2 투여군에 비하여 유의적으로 ($p < 0.01$) 높았다 (Fig. 2. 참조).

이러한 차이는 미성숙 쥐에서 이 시각에 관찰한 보문을 접하지 못하여 정확한 비교 검토가 어려우나, Nicholson 등⁴²⁾은 DMBA로 유발시킨 쥐의 유선 암종에서 estradiol-17 β 를 투여하였을 경우 세포질 내 수용체는 주사 2시간 후에 최소치에 이르렀으나, tamoxifen을 투여하였을 경우에는 주사 4시간 후에 최소치에 이르렀다고 한다. 또한 Wakeling과 Slater⁵⁴⁾는 *in vitro* 시험에서 쥐 자궁의 estrogen 수용체와의 상대 친화도를 조사하였는데, 0°C에서 tamoxifen의 estrogen 수용체와의 친화도는 estradiol-17 β 의 38.2%에 해당하였다고 한다. 이러한 사실로 미루어 보아 수용체 단백질에 대한 이 두 물질의 친화도는 서로 다른 것으로 판단된다.

즉, tamoxifen은 estradiol-17 β 보다 세포질 내 수용체와 결합하는 친화도가 낮았으며, 따라서 tamoxifen-수용체 결합체의 핵 내 이행도 늦었다.

주사 3시간 후 E2 투여군에서 세포질 내 estradiol 수용체 농도는 다시 증가하기 시작함으로써 수용체의 replenishment 현상을 나타내었다. 주사 12시간 후에는 주사 전에 비하여 약 절반(47.9%)의 수준으로 회복되었으며, 24시간 후에는 주사 전의 수준으로 복귀되었다. 그러나 TAM 투여군과 E2+TAM 투여군에서는 세포질 내 수용체 농도는 대조군의 10% 전후에 미치는 낮은 수준에서 지속적으로 유지되었다 (Fig. 2. 참조).

Dix와 Jordan¹⁴⁾은 미성숙 쥐에 tamoxifen 25 μg 을 12시간 간격으로 계속 주사하고 자궁 세포질 내에서 estrogen 수용체 농도를 조사하였던 바, 주사 후 90시간까지 지속적으로 낮은 농도(0.58—0.17pmol/uterus)를 유지하였다고 한다. Bowman 등⁶⁾은 난소 절제된 쥐에서 tamoxifen을 7.0mg/kg을 주사하였던 바, 세포질 내 수용체 농도는 감소하였다가 4~8일 사이에 대조군의 수준으로 복귀하였다고 하며, 0.7mg/kg을 주사하였던 바, 그 농도는 2~4일 사이에 대조군의 수준으로 복귀하였다고 한다.

Clark와 Peck⁹⁾은 미성숙 쥐에 estradiol 2.5 μg 을 1회 주사하고 자궁 핵내 수용체 농도의 변화를 조사하였는데, 주사 1시간 후 그 농도는 1.2pmol/uterus까지 급격히 상승하였다가 그 이후 점차 감퇴되어 24시간 후에는 주사 전의 수준으로 복귀함을 확인하였다. 그러나 Koseki 등⁵⁴⁾은 난소 및 부신 절제된 쥐에 tamoxifen 50 μg 을 1회 피하 주사하였더니, 핵 내 수용체 농도가 서서히 상승하여 96시간까지 높은 수준을 유지하였다고 한다.

본 실험에서는 estradiol-17 β 5 μg 과 tamoxifen 50 μg 을 각각 혹은 동시에 24시간 간격으로 연속 3회 피하 주사하였던 결과임으로 E2 투여군에서는 핵 내 estradiol 수용체의 세포질 내 복귀가 일어날 수 있었으나 TAM 투여군과 E2+TAM 투여군에서는 수용체의 복귀가 억제된 것으로 추정되며 이러한 결과는 상기 연구자들의 보고 내용과 부합되었다. 그러므로 tamoxifen은 estradiol 수용체와 결합하여 핵 내에 오래 정체함으로써 estradiol 수용체의 replenishment를 방해하는 것으로 풀이된다.

결 론

본 연구는 미성숙 쥐의 자궁에서 tamoxifen의 antiestrogen 효과를 규명하기 위하여 수행되었다.

실험동물은 estradiol-17 β 투여군, tamoxifen 투여군, estradiol-17 β . tamoxifen 동시 투여군 및 대조군으로 나누었다. 실험군은 estradiol-17 β 5 μg , tamoxifen 50 μg , 혹은 상기 용량의 두 가지 약물을 동시에 그리고 대조군은 부형제 0.2ml씩을 암쥐의 경부 피하에 주사하고, 주사 전, 첫 주사 후, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 및 72시간만에 자궁을 적출하였다.

적출된 자궁에서의 세포질 내 estradiol 수용체 농도는 DCC법으로 그리고 핵 내 estradiol 수용체 농도는 protamine exchange 법으로 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. tamoxifen은 estradiol-17 β 보다 세포질 내 estradiol

수용체와 결합하는 친화도가 낮았으며, 따라서 estradiol 수용체의 핵 내 이행이 지연되었다.

2. tamoxifen. estradiol 수용체를 핵 내에서 24시간 이상 정체시켰고, estradiol 수용체의 세포질 내로의 replenishment를 방해하였다.

참 고 문 헌

1. Aizawa, Y. and Mueller, G.C.: The effect *in vivo* of estrogens on lipid synthesis in the rat uterus. *J. Biol. Chem.* (1961) 236:281.
2. Allegra, J.C., Lippman, M.E., Thompson, E. B., Simon, R., Barlock, A., Green, L., Huff, K.K., Do, H.M.T., Aitken, S.C. and Warren, R.: Relationship between the progesterone, androgen and glucocorticoid receptor and response rate to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Cancer Res.* (1979) 39:1973.
3. Anderson, J.N., Peck, E.J. and Clark, J.H.: Estrogen-induced uterine responses and growth: Relationship to receptor estrogen binding by uterine nuclei. *Endocrinology* (1975) 96:160.
4. Aten, R.F., Weinberger, M.J. and Eisenfeld, A. J.: Estrogen receptor in rat liver: translocation to the nucleus *in vivo*. *Endocrinology* (1978) 102: 433.
5. Borgna, J.L. and Rochefort, H.: Hydroxylated metabolites of tamoxifen are formed *in vivo* and bound to estrogen receptor in target tissue. *J. Biol. Chem.* (1981) 256:859.
6. Bowman, S.P., Leake, A. and Morris, I.D.: Hypothalamic, pituitary and uterine cytoplasmic and nuclear oestrogen receptors and their relationship to the serum concentration of tamoxifen and its metabolites, 4-hydroxytamoxifen, in the ovariectomized rat. *J. Endocrinol.* (1982) 94:167.
7. Burton, K.: A study of the condition for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* (1956) 62:315.
8. Capony, F. and Rochefort, H.: *In vivo* effect of anti-estrogens on localisation and replenishment of estradiol receptors. *Mol. Cell Endocrinol.* (1975) 3:223.
9. Clark, J.H. and Peck, E.J.: Nuclear retention of receptor oestrogen complex and nuclear acceptor sites. *Nature* (1970) 260:635.
10. Cole, M.P., Jones, C.P.A. and Todd, I.D.H.: A new antiestrogenic agent in late breast cancer. *British J. of cancer* (1971) 25:270.
11. Cutler, G.B. Jr., Barnes, K.M., Sauer, M.A. and Loriaux, D.L.: Estrogen receptor in rat adrenal gland. *Endocrinology* (1978) 102:252.
12. Davies, P., Syne, J.S. and Nicholson, R.I.: Effects of estradiol and the antiestrogen tamoxifen on steroid hormone receptor concentration and nuclear ribonucleic acid polymerase activities in rat uteri. *Endocrinology* (1979) 105:1336.
13. De Anglo, A.B. and Gorski, J.: Role of RNA synthesis in the estrogen induction of a specific uterine protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1970) 66:693.
14. Dix, C.J. and Jordan, V.C.: Modulation of rat uterine steroid hormone receptors by estrogen and antiestrogen. *Endocrinology* (1980) 107:2011.
15. Giannopoulos, G., and Gorski, J.: Estrogen-binding of the rat uterus: Different molecular forms associated with nuclear uptake of estradiol. *J. Biol. Chem.* (1971) 246:2530.
16. Gorski, J.: Early estrogen effects on the activity of uterine ribonucleic acid polymerase. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* (1964) 239:889.
17. Gorski, J. and Gannon, F.: Current models of steroid hormone action, a critique. *Ann. Rev. Physiol.* (1976) 38:425.
18. Hamilton, T.H., Widnell, C.C. and Tata, J. R.: Sequential stimulation by estrogen of nuclear RNA synthesis and DNA-dependent RNA polymerase activities in rat uterus. *Biochem. Biophys. Acta.* (1965) 108:168.
19. Harper, M.J.K. and Walpole, A.L.: Contrasting endocrine activities of cis and trans isomers of a series of substituted triphenylenes. *Nature(Lond.)* (1966) 212:87.
20. Horwitz, K.B. and McGuire, W.L.: Nuclear mechanism of estrogen action: Effects of estradiol and anti-estrogens on estrogen receptors and nuclear receptor processing. *J. Biol. Chem.* (1978) 253:8185.
21. Jensen, E.V., Numata, M., Brecker, P.I. and De Sombre, E.R.: Hormone receptor interaction as a guide to biochemical mechanism. In: *The*

- Biochemistry of Steroid Hormone Action. Ed.: R.M.S. Smellie. (1971) pp.133. Academic Press, London and New York.
22. Jensen, E.V. and Jacobson, H.I.: Basic guides to the mechanism of estrogen action. Recent Progr. Hormone Res. (1962) 18:387.
 23. Jordan, V.C. and Bowser-Finn, R.A.: Binding of Hmonhydroxy-tamoxifen by immature rat tissues *in vivo*. Endocrinology (1982) 110:1281.
 24. Jordan, V.C. and Dowse, L.J.: Tamoxifen as an antitumor agent: Effect on oestrogen binding. J. Endocrinol. (1976) 68:297.
 25. Jordan, V.D., Collins, M.M., Rowsby, L. and Prestwich, G.: A monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent antioestrogenic activity. J. Endocrinol. (1977) 75:305.
 26. Katzenellenbogen, B.S.: Estrogen and antiestrogen action studies in reproductive target tissues and tumors. Advances in Experimental Medicine and Biology (1979) 117:111.
 27. Katzenellenbogen, B.S.: Dynamics of steroid hormone receptor action. Ann. Rev. Physiol. (1980) 42:17.
 28. Katzenellenbogen, B.S. and Gorski, J.: Estrogen action *in vitro*: Induction of the synthesis of a specific uterine protein. J. Biol. Chem. (1972) 247:1299.
 29. Katzenellenbogen, B.S., Katzenellenbogen, J.A., Ferguson, E.R. and Krauthammer, N.: Antiestrogen interaction with uterine estrogen receptors: Studies with a radiolabeled anti-estrogen (C.I-628). J. Biol. Chem. (1978) 253:697.
 30. Kaye, A.M., Sheratzky, D. and Lindneer, H. R.: Kinetics of DNA synthesis in immature rat uterus: Age dependence and estradiol stimulation. Biochem. Biophys. Acta. (1972) 261:475.
 31. Kiang, D.T. and Kennedy, B.J.: Factors affecting estrogen receptors in breast cancer. Cancer (1977) 40:1571.
 32. Kirkland, J.L., Mukku, V.R., Hardy, M. and Stancel, G.M.: Hormonal control of uterine growth: Alterations in luminal epithelial deoxyribonucleic acid synthesis after intraluminal application of estrogen. Endocrinology (1984) 114: 969.
 33. Koseki, Y., Zava, D.T., Chamness, G.C. and Mcguire, W.L.: Progesterone interaction with estrogen and antiestrogen in the rat uterus: Receptor effects. Steroid (1977) 30:169.
 34. Koseki, Y., Zava, D.T., Chamness, G.C. and McGuire, W.L.: Estrogen receptor translocation and replenishment by the antiestrogen tamoxifen. Endocrinology (1977) 101:1104.
 35. Kurl, R.N. and Morris, I.D.: Differential depletion of cytoplasmic high affinity oestrogen receptors after the *in vivo* administration of the antiestrogens clomiphene, Mer-25 and tamoxifen. Br. J. Pharmacol. (1978) 62:487.
 36. Lippman, M.E. and Bolan, G.: Oestrogen-responsive human breast cancer in long term tissue culture. Nature (1975) 256:592.
 37. Lipsett, M.B. and Lippman, M.E.: Endocrine responsive cancers of man: In Textbook of Endocrinology 6th ed., edit by Williams, R.H., Saunders Co. (1981)
 38. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. (1951) 193:265.
 39. McGuire, W.L.: Estrogen receptors in human breast cancer. J. Clin. Invest. (1973) 52:73.
 40. McGuire, W.L., Pearson, D.H. and Segaloff, A.: Predicting hormone responsiveness in human breast cancer. In: Estrogen receptors in Human Breast cancer, W.L. McGuire, P.P. Carbone and E.P. Vollmer edi. (1975) p.17. Raven Press, New York.
 41. McGuire, W.L., Garza, M.D.L. and Chamness, G.C.: Evaluation of estrogen receptor assay in human breast cancer tissue. Cancer Res. (1977) 37:637.
 42. Nicholson, R.I., Davies, P. and Griffiths, K.: Effects of oestradiol-17 β and tamoxifen on nuclear oestradiol-17 β receptors in DMBA-induced rat mammary tumours. Eur. J. Cancer. (1977) 13: 201.
 43. Noteboom, W.D. and Gorski, J.: An early effects of estrogen on protein synthesis. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1963) 50:250.
 44. Notides, A.C., Hamilton, D.E. and Auer, H.

- E.: A kinetic analysis of the estrogen receptor transformation. *J. Biol. Chem.* (1975) 150:3945.
45. Notides, A.C. and Nielsen, S.: The molecular mechanism of the *in vivo* 4S to 5S transformation of the uterine estrogen receptor. *J. Biol. Chem.* (1974) 249:1866.
 46. Patterson, J.S., Batterby, L.A. and Bach, B. K.: Use of tamoxifen in advanced male breast cancer. *Cancer Treat. Rep.* (1980) 64:801.
 47. Pritchard, K.I., Thomson, D.B., Myers, R.E., Sutherland, D.J.A., Mobbs, B.G. and Meakin, J.W.: Tamoxifen therapy in premenopausal patients with metastatic breast cancer. *Cancer Treat. Rep.* (1980) 64:787.
 48. Schrader, W.T. and O'Malley, B.W.: Laboratory methods manual for hormone action and molecular endocrinology (4th ed.). (1980) P.1, Monography.
 49. Stone, G.M., Baggett, B. and Donnelly, R.B.: The uptake of tritiated oestrogen by various organs of the ovariectomized mouse following intravenous administration. *J. Endocrinology* (1963) 27:271.
 50. Sudo, K., Monsma, F.J. Jr, and Katzenellenbogen, B.S.: Antiestrogen-binding sites distinct from the estrogen receptor: Subcellular-localization, ligand specificity and distribution in tissue of the rat. *Endocrinology* (1983) 112:425.
 51. Sutherland, R., Mester, J. and Baulieu, E.E.: Tamoxifen is a potent "pure" antiestrogen in the chick oviduct. *Nature (Lond.)* (1977) 267:434.
 52. Sutherland, R.L. and Foo, M.S.: Differential binding of antiestrogen by rat uterine and chick oviduct cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1979) 91:183.
 53. Terenius, L.: Structure-activity relationships of antiestrogen with regard to interaction with 17β -estradiol in the mouse uterus and vagina. *Acta. Endocrinol. (Copenh.)*. (1971) 66:431.
 54. Wakeling, A.E. and Slater, S.R.: Estrogen-receptor binding and biologic activity of tamoxifen and its metabolites. *Cancer Treat. Rep.* (1980) 64:741.
 55. Ward, H.W.C.: Antiestrogen therapy for breast cancer: A trial of tamoxifen at two dose levels, *British Med. J.* (1973) 1:13.
 56. Zava, D.T., Chamness, G.C., Horwitz, K.B. and McGuire, W.L.: Human breast cancer: Biologically active estrogen receptors in the absence of estrogen. *Science* (1977) 196:663.
 57. Zava, D.T., Harrington, N.Y. and McGuire, W.L.: Nuclear estradiol receptor in the adult rat uterus: A new exchange assay. *Biochemistry* (1976) 15:4292.