

유방암 세포와 간암세포에 있어서 에스트로겐 수용체의 전사조절기능에 대한  
Xenobiotic 핵 수용체 (Constitutive Androstane Receptor, Steroid and  
Xenobiotic Receptor, Peroxisome-Proliferator-Activated  
Receptor  $\gamma$ )의 영향 비교분석

민 계 식\*

진주산업대학교 미생물공학과

Comparison and Analysis between Human Breast Cancer Cells and Hepatoma Cells  
for the Effects of Xenobiotic Nuclear Receptors (Constitutive Androstane Receptor,  
Steroid and Xenobiotic Receptor, and Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ )  
on the Transcriptional Activity of Estrogen Receptor

Gyesik Min\*

Department of Microbiological Engineering, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea

Abstract

The purpose of this study was to examine the effects of xenobiotic nuclear receptors, CAR, SXR, and PPAR  $\gamma$  on the transcriptional activity of estrogen receptor in human breast cancer cell lines and compare with those in human hepatoma cell line. Two different breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231 were cultured and effects of CAR, SXR, and PPAR  $\gamma$  on the ER-mediated transcriptional activation of synthetic (4ERE)-tk-luciferase reporter gene were analyzed. Consistent with the previous report, CAR significantly inhibited ER-mediated transactivation and SXR repressed modestly whereas the PPAR  $\gamma$  did not repress the ER-mediated transactivation. However, in breast cancer cells neither of the xenobiotic receptors repressed the ER-mediated transactivation. Instead, they tend to increase the transactivation depending on the cell type and xenobiotic nuclear receptors. In MCF-7, SXR but neither CAR nor PPAR  $\gamma$  slightly increased ER-mediated transactivation whereas in MDA-MB-231, CAR and PPAR  $\gamma$  but not SXR tend to increase the transactivation of the reporter gene. These results indicate that the effects of ER cross-talk by the CAR, SXR, and PPAR  $\gamma$ , are different in breast cancer cells from hepatoma cells. In conclusion, the transcriptional regulation by estrogen can involve different cross-talk interaction between estrogen receptor and xenobiotic nuclear receptors depending on the estrogen target cells.

**Key words** – Estrogen Receptor, CAR, SXR, PPAR  $\gamma$ , Breast Cancer Cells

---

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : 055-751-3396, Fax: 055-751-3399  
E-mail: g-min@jinju.ac.kr

## 서 론

에스트로겐 호르몬은 여성의 번식기관의 발달과 그들의 생리적 기능을 유지하는데 중요한 역할을 할 뿐 아니라 과다한 분비나 표적세포의 과민반응 혹은 신호전달체계의 이상으로 유방암과 같은 통제되지 않는 세포분열을 일으키는 이상을 초래하기도 한다[16]. 유방암은 여성에게 발생하는 암 중 높은 사망률을 보이고 있으며[14], 아직까지 그 원인과 치료요법이 뚜렷하게 알려져 있지 않다. 따라서 병의 초기진단과 치료제개발을 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 절반이상의 유방암세포들은 에스트로겐 수용체를 발현하고, 종양의 진행에 에스트로겐이 관여를 하고있기 때문에 에스트로겐 수용체가 암 치료의 중요한 표적단백질분자로 연구되어지고 있다[5,14]. 에스트로겐의 생리적 작용은 핵에 존재하는 호르몬 수용체에 의해 매개되는데 이는 여러 가지 다른 핵 수용체들과의 상호작용을 통해 표적유전자의 발현을 조절하게 된다[4,9,10,12,13]. Ligand와 결합한 에스트로겐 수용체는 표적 DNA의 Estrogen Responsive Element (ERE)에 직접 결합하거나 ERE에 결합하고 있는 다른 전사조절인자들과 결합하여 간접적으로 DNA에 영향을 주게된다[19]. 에스트로겐 수용체는 Ligand와 결합함으로써 구조의 변화를 초래하게 되고 이는 다시 각 표적세포 내 다른 생리적 요구에 따라서 특이적인 전사촉진인자 혹은 억제인자들을 불러와 표적유전자의 전사를 조절 통제하게 된다[8].

지금까지 발표된 보고에 따르면, 여러 가지 다양한 핵 수용체뿐만 아니라 전사조절인자들이 에스트로겐 수용체에 의해 매개되는 전사활성을 조절하는 것으로 알려져 있다[4,9,10,12,13]. 최근에, 에스트로겐에 의해 매개되는 신호전달기전을 조절할 가능성이 있는 세 가지 종류의 Xenobiotic 수용체인 Constitutive Androstane Receptor (CAR), Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR), 그리고 Peroxisome Proliferator Activated Receptor- $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ )등이 밝혀져 주목을 끈다. 이러한 xenobiotic 수용체들은 스테로이드 호르몬과 같은 생체내부 활성 화합물질뿐만 아니라 약물이나 환경공해물질과 같은 외부화합물질들과 작용하는 세포들의 생리적 반응을 매개함으로써 스테로이드 호르몬의 항상성과 신체 내 약물의 대사에 중요한 역할을 한다 [1,2,3,5,6,11,].

최근의 연구보고에 의하면, CAR (Constitutively activated Androstane Receptor)가 Cytochrome P450 2B 유전자와 같은 steroid hydroxylase의 전사조절을 통하여 스테로이드의 항상성 유지에 영향을 미치는 것으로 알려졌다 [25]. 종래의 다른 핵 수용체와는 달리 CAR는 리간드에 의존되지 않는 constitutive한 전사촉진 활성을 가지고 있으며, Testosterone의 대사물질인 androstenol과 androstanol에 의해 활성이 억제된다[6]. 이러한 androstane들은 CAR로부터 GRIP (Glucocorticoid Receptor Interacting Protein) 혹은 SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator-1)과 같은 전사활성조절인자들을 방출하여 CAR의 전사활성을 억제하는 것으로 보고되어 있다[6,15]. 이와는 달리 CAR의 agonist인 TCPOBOP 혹은 Phenobarbital 혹은 높은 농도의 에스트로겐을 처리했을 때, 세포질에 위치해 있던 CAR 단백질은 핵으로 이동되어 RXR (Retinoid X Receptor)과 복합체를 형성하고 전사촉진 인자들 (SRC-1 혹은 GRIP)과 결합작용이 촉진되어 표적유전자의 인식염기서열에 결합함으로써 전사촉진을 일으킨다[15]. CAR의 생리적 전사조절작용은 Cytochrome P450 유전자에 국한되지 않고 퍼록시좀의 산화에 관여하는 유전자의 PPRE (Peroxisome Proliferator Response Element)나 Retinoic Acid Response Element에 의해 조절되는 유전자 등과 같이 다양하고 복잡한 기능의 유전자들에 관여함으로써[23], CAR에 의해 매개되는 신호전달기전은 단순하지 않고 다른 전달체와 복잡하게 상호결되어 있을 것으로 추정된다. 특히 최근의 연구결과, 인체 간암세포에서 유래된 HepG2 세포배양에서 CAR는 전사촉진인자인 p160 member와 상호작용을 통해서 에스트로겐 수용체에 의해 매개되는 전사활동을 억제함을 밝혀낸 바 있다[16]. 또한, 억제 조절인자 (Corepressors)중의 하나인 Short Heterodimer Partner (SHP) 단백질이 CAR와 결합한다는 보고는 SHP이 estrogen receptor (ER)와 결합하여 estrogen에 의한 ER의 활성을 억제한다는 결과와 함께 흥미로운 주목을 끈다[21]. 이러한 결과는 CAR가 ER과 경쟁적으로 SHP에 결합하여 ER의 신호전달기전을 조절할 수 있다는 가능성을 시사하기 때문이다. 하지만 이러한 CAR의 에스트로겐 수용체에 대한 전사조절 효과가 유방암 조직세포에서도 일어나는지는 아직 알려져 있지 않다. 분화된 각각의 조직세포는 동일한 화학적 자극에도 다양하게 반응하는 데, 이는 수용체의 특이성, 표적세포 고유의 신호

전달조절기전 및 전사조절인자의 발현여부 등에 기인하기 때문이다. PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) family는 서로 밀접하게 관련된  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  세 종류의 유전자산물을 포함하며 peroxisome의 증식과 지방의 항상성유지에 관여한다[11]. PPAR  $\alpha$ 는 강한 친화력으로 ERE에 결합하여 에스트로겐의 표적유전자 발현을 억제하고, PPAR  $\gamma$ 는 유방암과 지방암 조직세포에서 PPAR  $\gamma$ 의 agonist인 thiozolidinedione (TZD) 혹은 생리적 리간드인 Prostaglandin에 의해 세포의 증식을 억제하고 분화를 촉진한다[11]. 또한, PPAR ligand와 9-cis-retinoic acid 또는 all trans retinoic acid와 같은 retinoids를 동시에 처리할 경우 협동작용에 의해 유방암 세포의 증식을 억제할 뿐 아니라 세포의 사멸을 촉진한다고 보고된 바 있다[5]. SXR (Steroid X Receptor)은 다양한 스테로이드 호르몬의 산화적 대사촉매에 관여함으로써 스테로이드 호르몬의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는데, 이는 estrogen receptor의 agonist (estrogen)뿐만 아니라 antagonist (tamoxifen) 혹은 식용 estrogen (phytoestrogen)에도 활성반응을 나타내기 때문에 에스트로겐 수용체와 함께 유방암 세포증식의 조절에 관여할 것으로 추정된다[1,2]. 하지만 에스트로겐에 의해 매개되는 유전자의 발현조절에 있어서, PPAR  $\gamma$  혹은 SXR과 estrogen receptor사이의 cross-talk이 유방암 세포에서 일어나는 지는 아직 보고된 바 없다.

지금까지 많은 연구에 의해서 estrogen 호르몬이 유방암의 발생과 진전에 관여한다는 사실을 뒷받침 할 수 있는 여러 가지 증거가 제시되어 왔지만, 암화에 관여하고 있는 estrogen의 분자생물학적 작용기전에 대해서는 아직 명확히 알려져 있지 않다. 많은 연구결과보고에 의하면, 유방암 세포의 발암현상은 다양한 핵 수용체들과 이들 각각의 신호전달경로들 사이의 기능적 상호교류 (Functional Cross-talk)에 의해 조절되는 것으로 추측되고 있다[4,9,10,12,13]. 그러므로, 유방암세포의 성장과 증식에 관여하는 신호전달 경로 중에서 estrogen의 작용을 조절할 수 있는 핵 수용체를 밝혀내고, 이러한 수용체와 estrogen receptor사이의 어떠한 기능적 상호교류가 일어나는지를 규명하는 것은 암화와 관련된 estrogen의 분자생물학적 작용기전을 이해하는데 중요한 진전을 가져올 수 있을 것이다. 따라서 본 연구의 목적은 유방암세포 내에서 estrogen의 작용이 xenobiotic nuclear receptor에 의해 조절되는지를 규명하기 위

하여, 두 종류의 유방암세포인 estrogen receptor가 발현되는 MCF-7세포와 ER의 발현이 일어나지 않는 MDA-MB-231세포를 배양하여, 에스트로겐에 의해 전사가 촉진되는 보고유전자의 발현이 CAR, SXR, 그리고 PPAR  $\gamma$ 에 의해서 어떻게 영향을 받는지를 조사하고 그 결과를 간암 세포에서의 반응과 비교 분석하였다.

## 재료 및 방법

### Ligand 및 Plasmid 조합구성

Constitutive Androstane 수용체의 리간드인 TCPOBOP는 B. Kemper로부터 제공받았고, estrogen receptor의 리간드 17-beta-estradiol과 Mox-estrol, SXR의 리간드 rifampicin, 그리고 PPAR  $\gamma$ 의 리간드 prostaglandin 등은 Sigma (U.S.A.)로부터 구입되었다. 생쥐의 간 cDNA Library로부터 Polymerase 연속반응에 의해서 mouse CAR1 cDNA를 분리한 다음 염기서열분석에 의해 CAR1 단백질의 codon 염기서열임을 확인하였다. 포유동물 세포 내에서의 CAR의 발현을 위해서, CAR cDNA를 함유한 BamH1/EcoR1 PCR fragment를 pGEX2TK (Pharmacia Corp. U.S.A.) vector에 주입하여 pGEX2TK-mCAR1을 구성한 다음, pGEX2TK-mCAR1으로부터 BamH1과 EcoR1으로 분리된 CAR1 cDNA를 동일한 제한효소들로 자른 pcDNA3 (Invitrogen)에 결합시켜 pcDNA3-mCAR1을 합성하였다. 포유동물세포 내 발현plasmid인 pCMXSXR, pSG5-PPAR $\gamma$ , pCMVhER  $\alpha$ 와 보고유전자 plasmid, 4(ERE)tk-luciferase등은 J.K. Kemper로부터 제공받았다.

### 세포 배양

두 가지 유방암세포, MCF-7과 MDA-MB-231에 대하여 각각의 성장에 적합한 배양액을 선택하여 계대배양을 유지하고 transfection에 적절한 배양조건을 확립하였다. 먼저 Estrogen 수용체를 발현하는 MCF-7-K1 세포의 배양유지에는 Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) 배양액을 기본으로 하여 10 ug/ml Phenol Red, 5% charcoal-dextran striped calf serum (CDCS), 100 units/ml Penicillin, 100 ug/ml Streptomycin, 25 ug/ml Gentamycin 및 6 ng/ml Bovine insulin을 첨가하고, Estrogen 수용체를 발현하지 않는 MDA-MB-231 세포의 배양을 위해서는

Leibovitz's L-15 기초배양액에 10 ug/ml Phenol Red, 5% Charcol-dextran으로 처리된 Calf Serum, 100 units/ml Penicillin, 100 ug/ml Streptomycin, 25 ug/ml Gentamycin, 3.75 ng/ml Hydrocortisone, 6 ng/ml Bovine insulin, 16 ug/ml Glutathione을 첨가하여 배양하였다. Human HepG2 세포배양에는 10% charcoal-dextran-stripped fetal calf serum, 100 units/ml penicillin과 0.01% streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하였다. 각 세포의 transfection을 위해서는 위의 세포유지배양 후 약 70~80% confluency에 도달했을 때 Phenol Red, Hydrocortisone, insulin, Glutathione을 제거한 배양액에서 3~5 일간 Weaning시킨 다음 24-well plate에 옮겨 80~95% 이상 confluency에 도달할 때까지 배양하였다.

#### Transfection

Transfection은 이미 보고된[15] LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) 방법을 따랐으며, 24-well에서 배양된 80~95%이상의 confluency에 도달한 세포에 대해서, 250 ng (Hep G2) 혹은 500 ng (MCF-7, MDA-MB-231)의 4(ERE) tkLuc reporter plasmid, transfection의 효율에 따른 normalization을 위한 10 ng/well의 pRL-SV40 plasmid, 2.5 ng (Hep G2) 혹은 30 ng (MDA-MB-231)의 hER $\alpha$  expression plasmid (pCMV-hER $\alpha$ ), 그리고 다양한 양 (10~250 ng)의 xenobiotic 핵 수용체 CAR, SXR, PPAR $\gamma$ 의 expression plasmid (pcDNA3-CAR, pCMXSXR, pSG5-PPAR $\gamma$ )를 첨가하였다. 수용체에 대한 리간드의 영향을 조사하기 위해서 10 nM 17-beta-estradiol (MCF-7, MDA-MB-231) 혹은 Mox-estrol (Hep G2), 5 uM TCPOBOP, 10 uM rifampicin, 20 uM prostaglandin, 등을 각각의 수용체 ER, CAR, SXR, 그리고 PPAR $\gamma$ 에 대하여 첨가하였다. DNA를 transfection한 후 18-24시간이 지난 뒤 각각의 리간드가 함유된 신선한 배양액으로 교체한 다음 추가로 24 시간 동안 배양시켰다.

#### Dual Luciferase 활성측정

Promega Biotech. (U.S.A.)에서 제공되는 Dual Luciferase Assay Protocol에 따라서 Firefly Luciferase와 Renilla Luciferase를 측정하는 다음 각 시료에 대해 Firefly

Luciferase의 값을 Renilla Luciferase의 값으로 나누어 transfection의 효율차이에 따른 변이를 제거함으로써 각 sample의 Renilla Luciferase value에 대한 표준화를 시행하였다.

## 결과 및 고찰

#### Hep G2 세포에서의 ER과 CAR, SXR, PPAR $\gamma$ cross-talk

Estrogen receptor (ER)와 xenobiotic orphan nuclear receptors인 CAR, SXR, 그리고 PPAR $\gamma$ 사이 기능적인 상호작용 (cross-talk)이 있는지를 알아보기 위하여, 먼저 이전에 보고된 바와 같이[16] Hep G2세포에서 일어나는 xenobiotic 핵 수용체에 의한 ER 전사활성의 변화를 조사함으로써 실험조건에 적합성을 확인함과 동시에 유방암세포에 대한 실험대조 군으로 비교하는 데 사용하고자 하였다. 약 95%의 confluency에 도달한 Hep G2세포에 human ER 포유동물 발현plasmid, 각각의 xenobiotic orphan nuclear receptor 발현plasmid, 그리고 synthetic 4ERE-tk-luciferase reporter plasmid를 transiently cotransfection하였다. 간세포에서는 endogenous estrogen이 대사과정을 거쳐 쉽게 활성이 소실되기 때문에 이를 방지하기 위하여 대사에 저항성이 있는 moxestrol을 estrogen receptor에 대한 ligand로 사용하였다. Fig. 1에서 보는바와 같이, ER과 CAR expression plasmid를 Hep G2세포에 동시에 transfection시켰을 때, 10 nM의 moxestrol을 처리함으로써 estrogen receptor의 매개에 의한 4ERE-tk-luciferase의 활성이 ethanol과 비교하여 100배 이상 증가되었다 (Fig. 1A). 이와는 달리, CAR에 대한 agonist인 TCPOBOP를 처리하였을 때는 luciferase의 활성이 전혀 증가되지 않았다. 따라서, 본 실험의 assay system에서 TCPOBOP는 hER $\alpha$ 에 대한 ligand가 아닐 뿐 아니라 CAR가 ERE (Estrogen Response Element)를 함유한 promoter의 활성을 촉진하지 못함을 의미한다. 한편, TCPOBOP와 moxestrol을 동시에 처리하였을 때는 TCPOBOP가 moxestrol에 의해 증가된 ER transactivation의 효과를 70% 이상 억제하였다 (Fig. 1A). ER과 SXR expression plasmid를 동시에 transfection 시켰을 때, 10 nM의 moxestrol에 의해서는 ER transactivation에 의한 luciferase의 활성이 100 배 이상 증가되

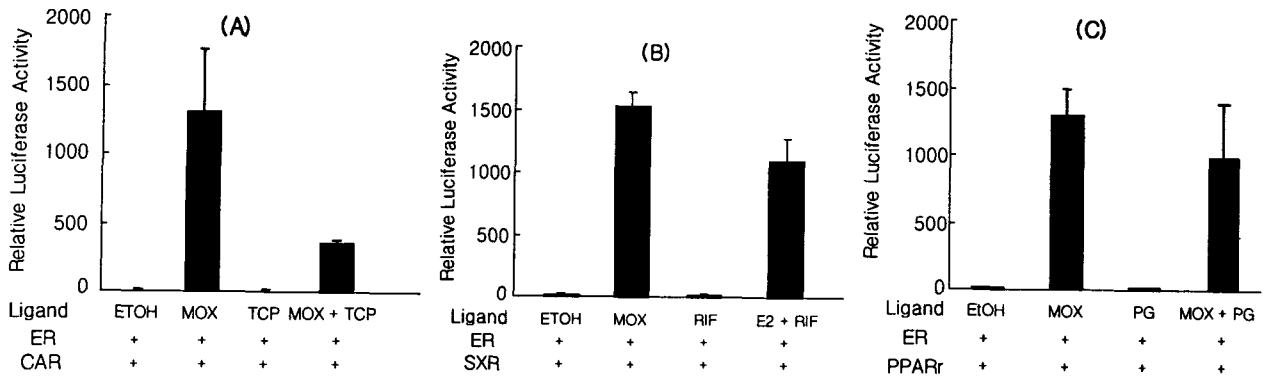


Fig. 1. Functional cross-talk between the ER and xenobiotic orphan nuclear receptors, CAR, SXR, and PPAR $\gamma$  in Hep G2 cells. Hep G2 cells were transfected with 250 ng of 4ERE-tk-luciferase vector, 10 ng of pRLSV40 for the internal control for transfection efficiency, and 2.5 ng of CMV-hER $\alpha$  in the presence of 10 ng of pcDNA3-CAR (A), pCMX-SXR (B) or pSG5-PPAR $\gamma$  (C). Ligands were added for 24 h after transfection as indicated: 10 nM of moxestrol (MOX) for ER, 5  $\mu$ M of TCPOBOP (TCP) for CAR, 10  $\mu$ M of rifampicin (RIF) for SXR, or 20  $\mu$ M of prostaglandin (PG) for PPAR $\gamma$ . The cells were harvested for dual luciferase assays. The values for firefly luciferase were normalized by dividing by Renilla luciferase values. The standard errors of the mean were calculated from 3 independent determinations.

였지만 SXR의 ligand인 rifampicin에 의해서는 4ERE-tk-luciferase의 활성에 영향을 주지 않았다 (Fig 1B). 따라서, rifampicin도 hER $\alpha$ 에 대한 ligand로서 기능을 하지 않을 뿐 아니라 SXR이 ERE (Estrogen Response Element)를 함유한 promoter의 활성을 촉진하지 못함을 의미한다. 하지만, rifampicin과 moxestrol을 동시에 처리하였을 때는 rifampicin에 의한 SXR의 activation의 결과로 ER-mediated transactivation을 약 30% 억제하였다 (Fig. 1B). CAR와 SXR의 transfection 결과에서와 유사하게, ER과 PPAR $\gamma$  expression plasmid를 동시에 transfection 시켰을 때에도, 10 nM의 moxestrol에 의해서는 ER transactivation에 의한 luciferase의 활성이 100배 이상 증가되었지만 PPAR $\gamma$ 의 ligand인 prostaglandin에 의해서는 4ERE-tk-luciferase의 활성에 영향을 주지 않았다 (Fig 1C). 따라서, prostaglandin이 hER $\alpha$ 에 대한 ligand로서 기능을 하지 않을 뿐 아니라 PPAR $\gamma$ 가 ERE (Estrogen Response Element)를 함유한 promoter의 활성을 촉진하지 못함을 의미한다. 하지만 CAR와 SXR과는 달리, Prostaglandin에 의한 PPAR $\gamma$ 의 activation이 ER-mediated transactivation에는 거의 영향을 미치지 못하였다 (Fig. 1C). 그러므로, Hep G2세포에 있어서 조사된 세 가지 xenobiotic nuclear receptor 중 CAR가 moxestrol에 의해 활성화 된 ER의 4ERE-tk-

luciferase reporter transactivation을 가장 현저히 억제하였으며, SXR에 의해서도 ER과의 기능적 cross-talk 작용에 의해 ER transactivation을 감소시켰다. 반면, 이전에 보고된 바와 일치하게[16], ligand에 의해 활성화 된 PPAR $\gamma$ 은 ER transactivation에 영향을 미치지 않았다.

#### MCF-7 세포에 있어서 ER transactivation에 대한 CAR, SXR, PPAR $\gamma$ 의 영향

Estrogen에 의한 ER의 transactivation 효과를 최대화하기 위하여 Phenol Red와 insulin을 제거한 배양액에서 약 3~5일 동안 Weaning시킨 후 약 80%의 confluency에 도달한 MCF-7 유방암세포에 각각의 xenobiotic orphan nuclear receptor 발현plasmid, 그리고 synthetic 4ERE-tk-luciferase reporter plasmid를 transiently cotransfection하였다. MCF-7 유방암세포는 endogenous estrogen receptor를 발현하기 때문에 human ER plasmid DNA는 transfection에서 제외되었다. Endogenous estrogen receptor의 매개에 의한 4ERE-tk-luciferase의 활성이 10 nM의 17- $\beta$ -estradiol 처리에 의해 15 배 증가되었으나 TCPOBOP에 의해서는 ethanol에 의한 반응과 차이가 나지 않았다 (Fig. 2A). 이와 같이 Estrogen hormone에 의한 ER transactivation 효과가 비교적 낮은 이유는 뚜렷하지 않으나 배

양된 세포의 weaning condition 또는 낮은 transfection 효율에 기인한 것으로 추정된다. Hep G2세포에서와는 달리, estradiol과 TCPOBOP를 동시에 처리하였을 때에도 CAR expression plasmid의 transfection 여부와 상관없이 TCPOBOP가 17-beta-estradiol에 의해 증가된 ER transactivation의 효과를 억제하지 않았다 (Fig. 2A). Transfection된 CAR의 양을 250 ng까지 증가시켜도 estrogen에 의한 synthetic 4ERE-tk-luciferase의 transactivation의 효과를 변화시키지 못하였다 (Fig. 2A). Estradiol과 rifampicin을 동시에 처리하였을 때, 10 ng의 transfection된 SXR expression plasmid는 CAR의 ER에 대한 효과와 유사하게 (Fig. 2A) ER transactivation의 효과를 억제 혹은 변화시키지 못하였지만, 50 ng 이상의 SXR plasmid를 transfection하였을 때에는 오히려 estrogen에 의한 ER transactivation 효과를 약 20% 촉진하였다 (Fig. 2B). MCF-7 유방암세포에 대한 CAR의 ER transactivation효과와 마찬가지로 Prostaglandin에 의해 활성화된 PPAR  $\gamma$  역시 estrogen에 의해 촉진된 ER의 synthetic 4ERE-tk-luciferase transactivation 효과를 변화시키지 못하였다 (Fig. 2C). 이러한 결과는 MCF-7 유방암세포에서는 CAR, SXR, PPAR  $\gamma$  과 같은 xenobiotic nuclear receptor에 의한 ER transactivation 효과가 Hep G2와는 다르게 나타나며, estrogen receptor에 의해 매개되

는 estrogen의 전사활성 조절기전이 Hep G2세포와는 다른 경로를 포함하고 있음을 시사한다.

MDA-MB-231 세포에 있어서 ER transactivation에 대한 CAR, SXR, PPAR  $\gamma$ 의 영향

MCF-7 세포와는 달리, MDA-MB-231세포는 estrogen receptor를 발현하지 않는 유방암세포이기 때문에, xenobiotic nuclear receptor에 의해서 영향을 받는 estrogen receptor의 전사활성기전이 endogenous ER을 발현하는 유방암세포와는 다를 가능성이 있다는 가정을 두고 ER expression plasmid를 transfection한 다음 estrogen에 의한 synthetic 4ERE-tk-luciferase의 transactivation 효과를 조사하였다. MCF-7 유방암세포에서와 같이, estrogen에 의한 ER의 transactivation효과를 최대화하기 위하여 Phenol Red, Hydrocortisone, insulin, 그리고 Glutathione을 제거한 배양액에서 약 3~5일 동안 Weaning시킨 후 약 80%의 confluency에 도달한 MCF-7 유방암 세포에 hER  $\alpha$  expression plasmid, 각각의 xenobiotic orphan nuclear receptor 발현plasmid, 그리고 synthetic 4ERE-tk-luciferase reporter plasmid를 transiently cotransfection하였다. Exogenous estrogen receptor의 매개에 의한 4ERE-tk-luciferase의 활성이 10 nM의 17-beta-estradiol에 의해 8배

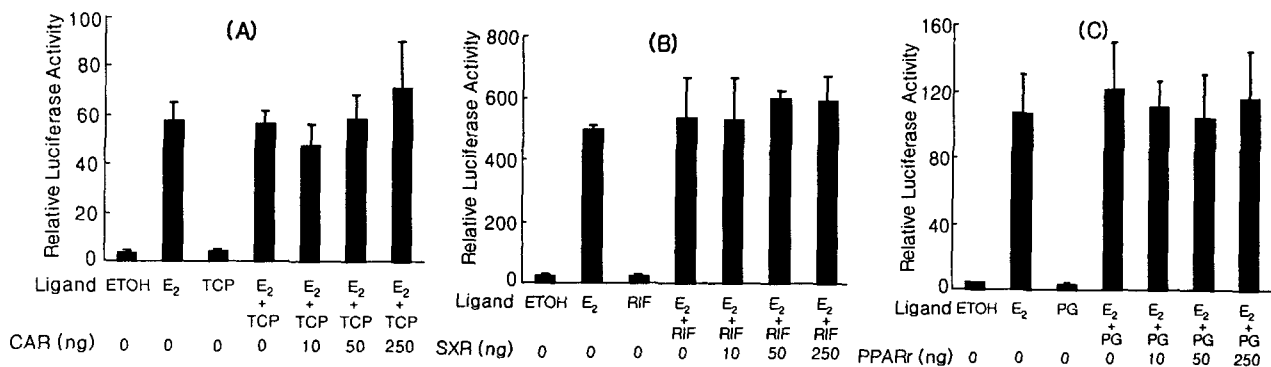


Fig. 2. Effects on the ER transactivation by xenobiotic orphan nuclear receptors, CAR, SXR, and PPAR  $\gamma$  in MCF-7 cells. MCF-7 cells were transfected with 500 ng of 4ERE-tk-luciferase vector and 10 ng of pRLSV40 for the internal control for transfection efficiency in the absence or presence (10~250 ng) of pcDNA3-CAR (A), pCMX-SXR (B) or pSG5-PPAR  $\gamma$  (C). Ligands were added for 24 h after transfection as indicated: 10 nM of 17- $\beta$  estradiol (E<sub>2</sub>) for ER, 5  $\mu$ M of TCPOBOP (TCP) for CAR, 10  $\mu$ M of rifampicin (RIF) for SXR, or 20  $\mu$ M of prostaglandin (PG) for PPAR  $\gamma$ . The cells were harvested for dual luciferase assays. The values for firefly luciferase were normalized by dividing by Renilla luciferase values. The standard errors of the mean were calculated from 6 independent determinations.

증가되었으나 TCPOBOP에 의해서는 ethanol에 의한 반응과 차이가 나지 않았다 (Fig. 3A). 특히 Hep G2 또는 MCF-7 유방암세포에서와는 달리, estradiol과 TCPOBOP를 동시에 처리하였을 때 50 ng의 transfection된 CAR expression plasmid는 estrogen에 의해 증가된 ER transactivation효과를 약 15% 촉진시켰다 (Fig. 3A). MCF-7 유방암세포에서와는 달리, estradiol과 rifampicin을 동시에 처리하였을 때 SXR expression plasmid의 transfection 여부와 상관없이 rifampicin은 17-beta-estradiol에 의해 증가된 ER transactivation의 효과를 변화시키지 못하였다 (Fig. 3B). PPAR $\gamma$  expression plasmid를 transfection하지 않은 상태에서도 17- $\beta$ -estradiol과 prostaglandin을 동시에 처리하였을 때, prostaglandin이 17- $\beta$ -estradiol에 의해 증가된 ER transactivation의 효과를 약 25% 촉진시켰다 (Fig. 3C). 이는 endogenous PPAR $\gamma$  단백질이 MDA-MB-231 세포에서 발현될 뿐만 아니라 estrogen에 의해 매개되는 유전자의 발현을 조절할 수 있는 가능성을 시사한다. 외부로부터 PPAR $\gamma$  expression plasmid를 transfection시켰을 때에도 더 이상 증가하지 않고 endogenous PPAR $\gamma$  과 동일한 촉진효과를 보였다 (Fig. 3C). 이에 대한 이유는 분명하지 않으나 MDA-MB-231 유방암세포에서는 endogenous estrogen receptor가 발현되지 않는다는 점과, ER이 다른 핵 수

용체들과 다양하고 복잡한 cross-talk에 관련 할 수 있는 가능성을 감안 할 때 PPAR $\gamma$  단백질의 발현을 증가시키도 ER과의 cross-talk interaction에 한계가 발생할 수 있을 것으로 추정된다.

Estrogen 수용체에 의해 매개되는 전사활성이 다른 핵 수용체 혹은 전사조절인자에 의해 조절될 수 있다는 증거가 많이 보고되어 있다. 갑상선호르몬 수용체와 PPAR $\gamma$  핵 수용체는 높은 친화력에 의하여 ER과 경쟁적으로 Estrogen Responsive Element (ERE)에 결합하여 유전자의 발현을 억제시키고[7,18], Xenobiotic 핵 수용체인 aromatic hydrocarbon 수용체는 배양된 사람의 유방암과 간세포에서 ER의 활성을 조절하는 것으로 보고되어 있다[4,20]. 또한 Progesterone 수용체 isoform A와 B는 estrogen 수용체가 전사조절기구와 서로 결합하는 작용을 저지함으로써 ER의 활성에 대한 강한 억제조절인자로 알려져 있다[12]. 이와는 달리 epidermal growth factor와 insulin-like growth factor와 같은 polypeptide growth factor들은 ER의 활성을 억제하기보다는 estrogen에 의한 ER 전사활성을 촉진하는 것으로 알려져 있다[22]. 여기서는 사람의 간암세포인 Hep G2와 두 가지 형태의 유방암세포인 MCF-7과 MDA-MB-231을 사용하여 estrogen receptor의 활성이 xenobiotic 핵 수용체인 CAR, SXR, 그리고 PPAR $\gamma$ 에 의해서 어떻게 조절

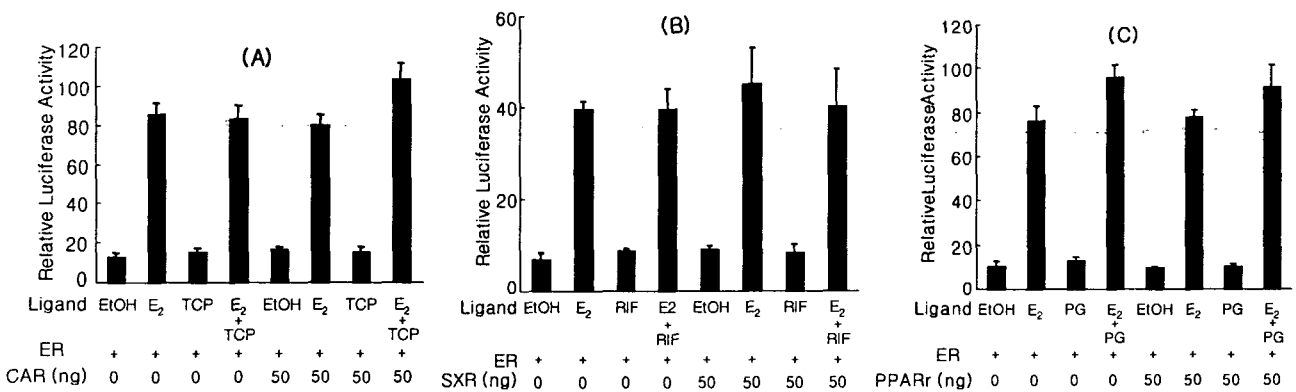


Fig. 3. Effects on the ER transactivation by xenobiotic orphan nuclear receptors, CAR, SXR, and PPAR $\gamma$  in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were transfected with 500 ng of 4ERE-tk-luciferase vector, 10 ng of pRLSV40 for the internal control for transfection efficiency and 30 ng of CMV-hER $\alpha$  in the absence or presence (50 ng) of pcDNA3-CAR (A), pCMX-SXR (B) or pSG5-PPAR $\gamma$  (C). Ligands were added for 24 h after transfection as indicated: 10 nM of 17- $\beta$ estradiol (E<sub>2</sub>) for ER, 5  $\mu$ M of TCPOBOP (TCP) for CAR, 10  $\mu$ M of rifampicin (RIF) for SXR, or 20  $\mu$ M of prostaglandin (PG) for PPAR $\gamma$ . The cells were harvested for dual luciferase assays. The values for firefly luciferase were normalized by dividing by Renilla luciferase values. The standard errors of the mean were calculated from 6 independent determinations.

되는가를 조사하였다. 간 조직은 스테로이드 화합물을 대사 할 뿐만 아니라 신체 내에서 에스트로겐이 작용하는 중요한 표적기관들 중의 하나이다[16]. 간세포는 estrogen receptor 뿐만 아니라 CAR, SXR과 같은 여러 고아 핵 수용체들과 이들의 heterodimeric 동반자인 RXR을 다량 발현하는 것으로 알려져 있다[11]. 따라서 이들 고아 핵 수용체에 의하여 steroid hormone의 항상성이 조절 될 수 있는 가능성을 시사하고 있다[16]. 이에 대한 한가지 방법으로, xenobiotic 핵 수용체들이 간세포 내 에스트로겐의 대사를 변화시킬 수 있는 cytochrome P450 약물대사 효소의 발현을 유도하여 에스트로겐의 활성을 조절할 수 있다. 또 하나의 다른 기전으로서 핵 수용체들 사이의 상호작용에 의하여 에스트로겐의 작용에 직접적으로 영향을 미칠 수 있다는 점이다. 특히 두 번째 기전에 대한 가능성의 예로서, 이들 핵 수용체들이 에스트로겐 수용체의 작용에 필수적인 p160 전사촉진조절인자인 SRC-1과 상호작용을 함으로써 두 수용체의 조절경로에 공통적인 교차점이 존재한다는 보고가 있었다[17,24]. 여기서 보고된 실험의 결과, 최근에 보고된 연구결과와 일치하게[16], xenobiotic nuclear receptor가 간세포에서 일어나는 에스트로겐 수용체의 신호전달경로에 영향을 줄 수 있음을 확인하였다. PPAR  $\gamma$ 를 제외한 핵 수용체 CAR와 SXR은 ER의 전사활성 효과를 현저하게 또는 어느 정도 각각 감소시켰다. 이러한 결과는 특히 CAR와 ER사이에서 기능적 조절을 위한 cross-talk이 존재할 뿐만 아니라, 이러한 조절기능은 CAR의 전사활성에 기인함을 보여준다. 하지만 Hep G2 세포에서와는 달리 유방암 세포에서는 조사된 세 가지의 xenobiotic 핵 수용체가 ER의 전사활성에 그다지 영향을 미치지 않거나 유방암 세포의 종류와 각각의 수용체에 따라서 다소 촉진하는 경향을 나타내었다. 유방암 세포는 그 종류에 따라서 estrogen receptor의 발현정도가 다르게 나타날 뿐만 아니라 암세포의 성장을 위한 에스트로겐의 의존성도 차이가 나기 때문에 동일한 수용체에 대해서도 전사조절반응이 상이하게 나타날 수 있을 것으로 사료된다. MCF-7세포에서는 CAR와 PPAR  $\gamma$ 를 제외한 SXR이 ER의 transactivation 효과를 약간 촉진한 반면 MDA-MB-231세포는 SXR을 제외한 CAR와 PPAR  $\gamma$ 에 의해 ER의 transactivation 효과가 약간 증가되는 경향을 보였다. 이러한 결과는 유방암세포에서는 CAR, SXR, PPAR  $\gamma$ 과 같은 xenobiotic nuclear receptor에

의한 ER transactivation 효과가 간암세포와는 다르게 나타나며, 유방암의 종류에 따라서 endogenous CAR, SXR, PPAR  $\gamma$  수용체가 다르게 발현됨으로써 이들에 대한 반응이 서로 상이한 특징을 나타낼 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 estrogen receptor에 의해 매개되는 estrogen의 전사활성조절기전이 표적세포에 따라 다른 경로를 포함 할 수 있음을 시사한다. 그러나, 본 실험에서 사용된 estrogen receptor에 대한 enhancer는 인위적으로 합성된 ERE이기 때문에 실제로 세포 내 존재하는 endogenous 표적유전자의 response element에 의해서 일어나는 전사기전과는 차이가 있을 수 있음을 여전히 배제할 수 없다. 그러므로, 향후 xenobiotic 핵 수용체에 대한 보다 다양하고 전략적인 in vivo 접근을 통하여 유방암 세포의 암화에 대한 분자생물학적 기전을 이해하고 나아가 암환자의 진단과 부작용이 적은 치료제 개발에 공헌 할 수 있을 것으로 기대된다.

## 요 약

지금까지 estrogen 호르몬이 유방암의 발생과 진전에 관여한다는 사실을 뒷받침 할 수 있는 여러 가지 증거가 제시되어 왔지만, 암화에 관여하고 있는 estrogen의 분자생물학적 작용기전에 대해서는 아직 명확히 알려져 있지 않다. 유방암 세포의 발암현상은 다양한 핵 수용체들과 이들 각각의 신호전달경로들 사이의 기능적 상호교류 (Functional Cross-talk)에 의해 조절되는 것으로 추측되고 있다. 그러므로, 유방암세포의 성장과 증식에 관여하는 신호전달경로 중에서 estrogen의 작용을 조절할 수 있는 핵 수용체를 밝혀내고, 이러한 수용체와 estrogen receptor사이에서 어떠한 기능적 상호교류가 일어나는지를 규명하는 것은 암화와 관련된 estrogen의 분자생물학적 작용기전을 이해하는 데 중요한 진전을 가져올 수 있다. 따라서 본 연구의 목적은 유방암세포 내에서 estrogen의 작용이 xenobiotic nuclear receptor에 의해 조절되는지를 규명하기 위하여, 두 종류의 유방암세포인 estrogen receptor가 발현되는 MCF-7세포와 ER의 발현이 일어나지 않는 MDA-MB-231세포를 배양하여, 에스트로겐에 의해 전사가 촉진되는 보고유전자의 발현이 CAR, SXR, 그리고 PPAR  $\gamma$ 에 의해서 어떻게 영향을 받는지를 조사하고 그 결과를 간암세포에서의 반응과 비교 분석하였다. 최근에 보고된 연구결과와 일치하게, xenobi-



otic nuclear receptor가 간세포에서 일어나는 에스트로겐 수용체의 신호전달경로에 영향을 줄 수 있음을 확인하였다. PPAR $\gamma$ 를 제외한 핵 수용체 CAR와 SXR은 ER의 전사활성 효과를 현저하게 또는 어느 정도 각각 감소시켰다. Hep G2세포에서와는 달리 유방암세포에서는 조사된 세가지의 xenobiotic 핵 수용체가 ER의 전사활성에 그다지 영향을 미치지 않거나 유방암세포의 종류와 각각의 수용체에 따라서 다소 촉진하는 경향을 나타내었다. MCF-7세포에서는 CAR와 PPAR $\gamma$ 을 제외한 SXR이 ER의 transactivation 효과를 약간 촉진한 반면 MDA-MB-231세포는 SXR을 제외한 CAR와 PPAR $\gamma$ 에 의해 ER의 transactivation 효과가 약간 증가되는 경향을 보였다. 이러한 결과는 유방암세포에서는 CAR, SXR, PPAR $\gamma$ 과 같은 xenobiotic nuclear receptor에 의한 ER transactivation 효과가 간암세포와는 다르게 나타나며, 유방암의 종류에 따라서 endogenous CAR, SXR, PPAR $\gamma$ 수용체가 다르게 발현됨으로써 이들에 대한 반응이 서로 상이한 특징을 나타낼 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 estrogen receptor에 의해 매개되는 estrogen의 전사활성조절기전이 표적세포에 따라 다른 경로를 포함 할 수 있음을 시사한다.

### 감사의 글

본 연구는 2002학년도 진주산업대학교 기성회 연구지원비 및 2002년 과학기술부 한국과학재단 지정 동물생명산업 지역협력연구센터 (과제번호:R12-2002-053-01002-0) 연구지원비에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사 드립니다.

### 참 고 문 헌

1. Blumberg, B. and R. M. Evans. 1998. Orphan nuclear receptors--new ligands and new possibilities. *Genes Dev.* **15**, 3149-3155.
2. Blumberg, B., W. Jr. Sabbagh, H. Juguilon, J. Jr. Bolado, CM. van. Meter, E. S. Ong and R. M. Evans. 1998. SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev.* **15**, 3195-3205.
3. Clay, C. E., A. M. Namen, G. Atsumi, M. C. Willingham, K. P. High, T. E. Kute, A. J. Trimboli, A.

- N. Fonteh, P. A. Dawson and F. H. Chilton. 1999. Influence of J series prostaglandins on apoptosis and tumorigenesis of breast cancer cells. *Carcinogenesis.* **20**, 1905-1911.
4. Duan, R., W. Porter, I. Samudio, C. Vyhldal, M. Kladde and S. Safe. 1999. Transcriptional activation of c-fos protooncogene by 17beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Mol. Endocrinol.* **13**, 1511-1521.
5. Elstner, E., C. Muller, K. Koshizuka, E. A. Williamson, D. Park, H. Asou, P. Shintaku, J. W. Said. D. Heber and H. P. Koeffler. 1998. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptorgamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **21**, 8806-8811.
6. Forman, B. M., I. Tzameli, H. S. Choi, J. Chen, D. Simha, W. Seol, R. M. Evans and D. D. Moore. 1998. Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. *Nature.* **8**, 612-615.
7. Glass, C. K., J. M. Holloway, O. V. Devary and M. G. Rosenfeld. 1988. The thyroid hormone receptor binds with opposite transcriptional effects to a common sequence motif in thyroid hormone and estrogen response elements. *Cell.* **29**, 313-323.
8. Katzenellenbogen, B. S. and J. A. Katzenellenbogen. 2000. Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2**, 335-344.
9. Keller, H., F. Givel, M. Perroud and W. Wahli. 1995: Signaling cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor and estrogen receptor through estrogen response elements. *Mol. Endocrinol.* **9**, 794-804.
10. Kharat, I. and F. Saatcioglu. 1996. Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor. Cross-talk between aryl hydrocarbon- and estrogen-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* **3**, 10533-10537.
11. Kliewer, S. A., J. M. Lehmann and T. M. Willson. 1999. Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse. *Science.* **30**, 757-760.
12. Kraus, W. L., K. E. Weis and B. S. Katzenellenbogen. 1995. Inhibitory cross-talk between steroid hormone

- receptors: differential targeting of estrogen receptor in the repression of its transcriptional activity by agonist- and antagonist-occupied progestin receptors. *Mol. Cell Biol.* **15**, 1847-1857.
13. McKay, L. I. and J. A. Cidlowski. 1998. Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol. Endocrinol.* **12**, 45-56.
  14. Menck, H. R., J. M. Jessup, H. J. Eyre, M. P. Cunningham, A. Fremgen, G. P. Murphy and D. P. Winchester. 1997. Clinical highlights from the National Cancer Data Base. *CA. Cancer J. Clin.* **47**, 161-170.
  15. Min, G., J. K. Kemper and B. Kemper. 2002. Glucocorticoid receptor-interacting protein 1 mediates ligand-independent nuclear translocation and activation of constitutive androstane receptor *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **277**, 26356-26363.
  16. Min, G., H. Kim, Y. Bae, L. Petz and J. K. Kemper. 2002. Inhibitory cross-talk between estrogen receptor (ER) and constitutively activated androstane receptor (CAR). CAR inhibits ER-mediated signaling pathway by squelching p160 coactivators. *J. Biol. Chem.* **13**, 34626-34633.
  17. Moore, L. B., D. J. Parks, S. A. Jones, R. K. Bledsoe, T. G. Consler, J. B. Stimmel, B. Goodwin, C. Liddle, S. G. Blanchard, T. M. Willson, J. L. Collins and S. A. Kliewer. 2000. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J. Biol. Chem.* **19**, 15122-15127.
  18. Nunez, S. B., J. A. Medin, O. Braissant, L. Kemp, W. Wahli, K. Ozato and J. H. Segars. 1997. Retinoid X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor activate an estrogen responsive gene independent of the estrogen receptor. *Mol. Cell Endocrinol.* **14**, 27-40.
  19. Paech, K., P. Webb, G. G. Kuiper, S. Nilsson, J. Gustafsson, P. J. Kushner and T. S. Scanlan. 1997. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science.* **277**, 1508-1510.
  20. Ricci, M. S., D. G. Toscano, C. J. Mattingly and W. A. Jr. Toscano. 1999. Estrogen receptor reduces CYP1A1 induction in cultured human endometrial cells. *J. Biol. Chem.* **5**, 3430-3438.
  21. Seol, W., B. Hanstein, M. Brown and D. D. Moore. 1998. Inhibition of estrogen receptor action by the orphan receptor SHP (short heterodimer partner). *Mol. Endocrinol.* **12**, 1551-1557.
  22. Smith C. L. 1998. Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol. Reprod.* **58**, 627-632.
  23. Sugatani, J., H. Kojima, A. Ueda, S. Kakizaki, K. Yoshinari, Q. H. Gong, I. S. Owens, M. Negishi and T. Sueyoshi. 2001. The phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR. *Hepatology.* **33**, 1232-1238.
  24. Tzamelis, I., P. Pissios, E. G. Schuetz and D. D. Moore. 2000. The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. *Mol. Cell Biol.* **20**, 2951-2958.
  25. Wei, P., J. Zhang, M. Egan-Hafley, S. Liang and D. D. Moore. 2000. The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature.* **19**, 920-923.

(Received June 2, 2003; Accepted June 17, 2003)