

## ORIGINAL ARTICLE

유방암 세포주에 에스트로겐 및 항에스트로겐  
처치에 따른 Coregulators, MAP Kinase 활성화  
및 세포주기 조절인자 p27/kip1의 변화\*박세호<sup>1</sup> · \*허민규<sup>2</sup> · 이미정<sup>2</sup> · 김주희 · 박병우<sup>1,2</sup><sup>1</sup>연세대학교 의과대학 외과학교실, <sup>2</sup>Brain Korea 21 ProjectChanges of Coregulators, MAP Kinase Activity and p27/kip1 with Estrogen or  
Antiestrogen Treatment in Breast Cancer Cell Line\*Seho Park<sup>1</sup>, \*Min Kyu Heo<sup>2</sup>, Mi Jeong Lee<sup>2</sup>, Joo-hee Kim<sup>1</sup>, Byeong-Woo Park<sup>1,2</sup>Department of <sup>1</sup>Surgery, Yonsei University College of Medicine; <sup>2</sup>Brain Korea 21 Project for Medical Science, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

**Purpose:** Estrogen, various polypeptide hormones and growth factors are associated with the development and progression of breast cancer. Coregulatory proteins are also associated with estrogen receptor (ER) transcriptional activity and tamoxifen resistance. Therefore, it is necessary to investigate the change of coregulator mRNAs and various cell proliferation proteins and cell cycle-related proteins after treatment with estrogen or antiestrogen.

**Methods:** MCF-7 cells were maintained in dextran-coated charcoal stripped 10% Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). To measure the change of the coactivators' (src-1, P/CAF, CBP, AIB1) mRNAs and corepressors' (SMRT, N-coR) mRNAs, multiple PCR was carried out using specific primers. In addition, intracellular proteins related to cell proliferation and cell cycle regulation were measured by performing Western blotting after treatment with estrogen or tamoxifen. The change of mitogen activated protein kinases was also measured by performing Western after tamoxifen treatment for 4 weeks.

**Results:** Coactivator mRNAs expression rapidly decreased

in 15 min after estrogen treatment but this recovered to the initial level in 3 hr. The pattern was similar for the case of tamoxifen treatment. Corepressor mRNAs expression rapidly decreased in 15 min after estrogen treatment and it remained at a lower level until 24 hr after estrogen treatment. With tamoxifen treatment, the initial response was similar to the cases of estrogen treatment, but the expression gradually increased 3 hr after tamoxifen treatment. Treatment of estrogen induced intracellular concentrations of c-myc and Ki-67 and it increased nuclear translocation of NF- $\kappa$ B and phospho-ERK and it decreased the intracellular cell cycle suppressor p27/kip1. Tamoxifen treatment increased nuclear p27/kip1 but it decreased c-myc, NF- $\kappa$ B and phospho-ERK. Long-term (4 weeks) treatment of tamoxifen was associated with decrease of activated ERK and p38 but there was no change in phospho-Akt level.

**Conclusion:** Estrogen induced cell proliferation and the survival pathway-related factors, but it decreased the cell cycle suppressor p27/kip1. Long-term treatment with antiestrogen tamoxifen might decrease the MAPK activities in ER $\alpha$ -expressing tumor cells.

## 책임저자 : 박병우

120-752 서울시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 외과

Tel: 02-2228-2100, Fax: 02-313-8289

E-mail : bwpark@yuhs.ac

접수일 : 2008년 3월 6일 게재승인일 : 2008년 5월 6일

\*공동 1저자임.

\*\*본 연구는 2006년도 연세대학교 의과대학 교수연구비의 지원으로 이루어 졌음.

Key Words : Estrogen receptor, Coregulatory protein, Tamoxifen, p27/kip1, MAP kinase

중심단어 : 에스트로겐 수용체, 조절단백, 타목시펜, p27/kip1, MAP kinase

## 서 론

고농도의 에스트로겐 및 장기간 에스트로겐에 노출이 유방암 발생에 중요한 역할을 한다는 것은 잘 알려져 있다. 에스트로겐 수용체(ER)가 발암유전자의 발현과 세포성장에 밀접하게 관련되어 있다고 추정하고 있지만, (1) 아직까지도 유방암의 발암기전은 명확하게 규명되어 있지 않다. 에스트로겐은 유선의 성장과 분화에 필수적인 요소이며, 세포증식과 생존에 관련된 유전자의 발현을 조절하는 핵 수용체인 에스트로겐 수용체에 결합하여 유전자의 전사활성에 영향을 미친다. 이러한 리간드-수용체 복합체의 형성은 수용체 단백질의 입체구조의 변화를 유발하게 되고 활성화시킨다. 활성화된 수용체 단백질은 세포핵으로 이동하여 유전자 전사조절 부위에 결합하고 유전자 발현 및 세포분열, 단백질 합성에 관여하여 조직의 분화 및 성장에 직접적인 영향을 미친다. 또한 다른 DNA 결합 전사인자와 상호 작용하여 간접적인 전사 활성화에도 영향을 미친다.

유방암이 호르몬 의존성 암이라고 밝혀진 이래, 에스트로겐의 세포 내 농도를 감소시키거나 그 효과를 억제하려는 요법이 발전되어 왔고, 많은 항에스트로겐제가 개발되었다. 하지만 이러한 약제들의 작용은 에스트로겐 수용체를 통한 에스트로겐 작용의 억제뿐 아니라, 여러 성장인자에 의한 자극과 연관되므로 지속적인 투여로 인한 저항성이 문제로 제시되었다. (2-4) 이러한 항호르몬치료 내성의 기전으로 보조인자(cofactor)의 차별적 발현이 제시되었고, (5) 에스트로겐 수용체를 통한 전사활성에 관여하는 다양한 보조인자의 유도 및 발현 변화로 인한 조직 특이성 및 약제 내성에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다. (6, 7)

에스트로겐 수용체와 에스트로겐(E2) 결합으로 에스트로겐 수용체의 형태학적 변형이 일어나 리간드 결합 도메인(ligand binding domain)에 coactivator의 결합이 일어나게 되어 표적유전자의 전사활성이 시작된다. (8-10) 한편 항호르몬제인 타목시펜은 수용체와 결합하여 에스트로겐 수용체의 다른 형태학적 변형을 일으키고 coactivator의 결합위치를 봉쇄하고 corepressor와 결합이 일어나도록 하는데 이러한 일은 histone deacetylases (HDACs) silence 유전자 전사를 통해 이루어진다. (10) Coactivator AIB1 유전자를 과발현 시킨 형질전환 생쥐(transgenic mice)에서 유방암 발생이 유도되었고, (11) 타목시펜 치료군 중 AIB1 과발현 유방암 환자의 무병생존율이 낮은 것을 볼 때, coactivator의 과발현이 타목시펜의 항호르몬 활성의 억제와 상관성이 있음을 시사한다. (12) 한편 coactivator와 반대로 타목시펜 치료 중 corepressor의 감소 역시 타목시펜 저항성과 관계될 수 있다. (13)

성장인자 수용체 HER2 및 에스트로겐 수용체 동시 과발현 유방암의 경우 예후가 불량하고, (14, 15) 그 기전의 하나는 ER-

HER2 신호전달의 상호 교차(cross talk)로 인한 세포증식의 증가와 타목시펜 저항성 발생으로 제기되고 있다. 즉, 에스트로겐 수용체는 성장인자 신호전달계(growth factor pathway)를 활성화시키고 성장인자 신호전달계는 에스트로겐 수용체 신호전달계를 활성화시킨다. 또 PI3 kinase 신호전달계는 다양한 insulin, IGF, EGF family 등 다양한 성장인자를 통한 세포생존 및 증식 신호전달을 매개한다. (16) 이렇게 에스트로겐 수용체 신호전달계와 성장인자수용체 신호전달계 간 상호교차(cross talk)가 일어나며, coregulatory 단백질의 변화가 에스트로겐 수용체 전사활성 및 타목시펜 내성과 상관성이 있다는 증거가 제시되고 있다. 따라서 에스트로겐과 타목시펜 처리 시 유방암 세포에서 이러한 보조인자의 변화, 신호전달계 및 세포주기 관련 단백질의 변화를 파악하여 타목시펜 내성 기전의 연구 및 유방암의 항호르몬 치료에 기여 하고자 본 연구를 하였다.

## 방 법

### 1. 세포주 및 세포 배양

American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입한 에스트로겐 수용체-양성 유방암 세포주 MCF-7을 10% fetal bovine serum (FBS, Life Technologies, Rockville, MD, USA), 100 unit/mL penicillin G-sodium, 100  $\mu$ L/mL streptomycin sulfate와 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma, St. Louis, MO, USA)에서 배양하였다. 호르몬 치료를 위해 dextran-charcoal 처리된 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO/BRL., Gaithersburg, MD, USA)에 위와 동일한 항생제를 포함한 phenol red free DMEM (Sigma)을 사용하였다. Dextran-charcoal stripped FBS 제조는 FBS에 activated charcoal 0.5% (w/v)와 dextran 0.005% (w/v)이 되도록 첨가한 후 55°C에서 1시간 동안 방치하면서, 15분마다 15분씩 진탕과 55°C 배양을 반복한 후 3,000 rpm으로 원심 분리하여 상층액을 따로 분주하였다. 다시 0.5% (w/v)의 activated charcoal과 0.005% (w/v) dextran을 첨가하고 1시간 동안 55°C에서 방치하면서 15분마다 15분씩 진탕하여 반응한 후 원심 분리하였다. 이러한 과정을 2회 반복하여 여분의 에스트로겐을 제거한 FBS를 0.2  $\mu$ m filter (Nalgene, Rochester, MN, USA)로 여과하여 사용 시까지 -70°C에 분주하여 보관하였다.

### 2. RT-PCR

#### 1) 역전사(Reverse transcription)

MCF-7 유방암 세포주에 에스트로겐 및 타목시펜을 시간별로

처리한 후, Trizol Reagent (Gibco BRL)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. First-strand cDNA 합성에는 Superscript II reverse transcriptase (GIBCO/BRL)를 사용하였다. 1  $\mu$ g의 정제된 RNA를 oligo dT primer (GIBCO/BRL)를 이용하여 역전사를 시켰다.

## 2) Multiple PCR

만들어진 cDNA를 주형으로 하여, coactivator (SRC-1, CBP, AIB1, P/CAF) 및 corepressor (SMRT, N-CoR)에 특이적인 각각의 primer (Table 1)를 사용하여 95°C 3분, 28 cycles (95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 30초), 72°C에서 5분간 반응시켰다. PCR internal control은 GAPDH를 사용하였으며 3회의 반복 실험으로 비슷한 결과를 보였다. 전기 영동된 사진은 TINA 2.10 (Raytest, Straubenhardt, Germany)으로 분석하여 시간에 따른 발현 변화를 조사하였다.

## 3. 총 단백질 및 핵 단백질의 분리

### 1) 총 단백질 분리

총 단백질은 다음과 같이 분리하였다. 4주간 타목시펜을 처리한 에스트로겐 수용체 양성 유방암 세포주 MCF-7을 배양 접시에서 10 mL의 phosphate buffered saline (PBS; 8 g sodium acetate, 0.2 g potassium chloride, 0.2 g potassium dihydrogenphosphate 및 2 g disodium hydrogenphosphate, pH 7.4)로 세척한 후 0.02% (w/v) 트립신 1 mL를 첨가하고 37°C에서 5분간 처리하여 세포를 떼어낸 후 원심 분리하여 수확하였다. 상층액을 버린 세포 침전물에 0.2 PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 100 sodium orthovanadate, 5  $\mu$ g/mL

proteinase inhibitors cocktail (pepstatin, leupeptin, chymostatin, antipain)이 함유된 면역 침전 완충용액(70  $\beta$ -glycerophosphate [pH 7.2], 2 magnesium chloride, 1 EGTA [ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid], 1 DTT [dithiothreitol], 0.5% Triton X-100) 1 mL를 첨가하고 세포를 다시 부유시킨 다음 얼음에서 30분 동안 방치하여 10초간 초음파 분쇄기를 이용하여 세포를 깨뜨린 후 10,000 rpm으로 10분간 원심 분리하고 그 상층액을 취하여 총 단백질 분획으로 사용하였다.

### 2) 핵 단백질 분리

세포의 핵단백질은 다음과 같이 분리하였다. 에스트로겐 및 타목시펜을 처리한 세포 배양 접시를 10 mL의 PBS로 2회 세척한 후 0.02% (w/v) 트립신 1 mL를 첨가하고 37°C에서 5분간 처리하여 세포를 떼어낸 후 수확하여 15초간 원심 분리를 시행하고 상층액을 버린 후 400  $\mu$ L의 완충용액 A (10 HEPES [pH 7.9], 10 KCl, 0.1 EDTA, 0.1 EGTA, 1 DTT, 1 PMSF, 0.1 sodium orthovanadate, 5  $\mu$ g/mL proteinase inhibitors cocktail)를 첨가하여 얼음에 15분간 방치하여 세포를 불린 다음 25  $\mu$ L의 10% NP-40을 첨가하고 20초간 진탕한 후 원심 분리를 시행하여 핵 침전물을 얻었다. 이 핵 침전물에 완충용액 C (20 HEPES, pH 7.9, 0.4 M NaCl, 0.1 EDTA, 0.1 EGTA, 1 DTT, 1 PMSF, 0.1 sodium orthovanadate, 5  $\mu$ g/mL proteinase inhibitors cocktail) 50  $\mu$ L를 첨가한 후 4°C에서 15분간 진탕한 뒤 4°C에서 10,000 rpm으로 5분간 원심 분리하고 상층액을 취하여 -70°C에 보관하였다가 핵 단백질 분획으로 사용하였다. 단백질의 정량은 Bradford 방법을 이용하였다. (17)

Table 1. Primer used in multiple polymerase chain reactions

		Sequence	Size
Coactivator			
SRC-1	Sense	5'-CTCTAGTGATGGCAAACCTC-3'	282 bp
	Antisense	5'-TGTAAGAGCCGGTGTAGAAT-3'	
P/CAF	Sense	5'-ACAAGAAGATCCTGATGTGG-3'	300 bp
	Antisense	5'-ATGTGAGGAAGTTCAGGATG-3'	
CBP	Sense	5'-AAGCTCTGTTTGCTTTTGAG-3'	281 bp
	Antisense	5'-GTGGCAATGGAAGATGTAAT-3'	
AIB1	Sense	5'-CAGAAGGCAGGATTATATGG-3'	216 bp
	Antisense	5'-GCTGAAGCTGCATTCTAAGT-3'	
Corepressor			
SMRT	Sense	5'-GACGGTATTGAACCTGTGTC-3'	216 bp
	Antisense	5'-GTTGATCTCTTGCTTCTGG-3'	
N-CoR	Sense	5'-AGTTGAGGATCATGGAGTTG-3'	256 bp
	Antisense	5'-ATGGTAATCCCTTCTGAAT-3'	

bp=base pair.

4. Western blot 면역 염색

1) 사용한 항체

ER $\alpha$  (Novocastra Laboratories, Newcastle, UK), Ki-67 (Dako, Carpinteria, CA, USA), c-Myc (Santa Cruz Technology, Santa Cruz, CA, USA), p27 (Santa Cruz Technology), Anti-phospho-p44/42 MAP kinase [(Thr202/Tyr204); Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA], Anti-phospho-Akt (Ser 473, Cell Signaling Technology), Anti-phospho-p38 (Cell Signaling Technology),  $\alpha$ -tubulin (Oncogene Science, Cambridge, MA, USA; 1:500)에 대한 항체를 일차 항체로, 이차 항체는 horse-radish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-mouse IgG (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA; 1:3,000) 또는 HRP conjugated goat anti-rabbit IgG (Bio-Rad Laboratories; 1:3,000)을 일차 항체에 맞게 각각 사용하여 단백질의 양적 변화를 확인하였다.

2) Western blot

세포추출액을 6-10% SDS-PAGE (acrylamide:bis-acrylamide=39:1)를 이용하여 단백질을 분리시킨 후 nitrocellulose membrane에 전달(transfer)하였다. 단백질이 전달된 막은 5% nonfat dried milk가 포함된 TBST (20 mM Tris-Cl, pH7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)용액에 30분 동안 흔들면서 담가두어 blocking시킨 후, 15분간 3번씩 TBST 용액으로 수세하였다. 다시 막을 적절한 양의 일차항체와 5%의 nonfat dried milk가 포함된 TBST 용액에 상온에서 흔들면서 2시간 동안 담가둔 후 15분간 3회 TBST 용액으로 씻어 주었다. 이렇게 씻은 막을 HRP가 결합되어 있는 적절한 양의 2차 항체와 5% nonfat dried milk가 포함된 TBST 용액을 상온에서 흔들며 1시간 동안 담가둔 후 다시 15분간 3번씩 TBST 용액으로 씻어주었다. 막은 enhanced chemiluminescence (ECL); Amersham, Berking-

hamshair, UK)을 이용하여 현상하고 결과를 판독하였다.

결 과

1. 에스트로겐 또는 타목시펜 처리에 따른 보조인자 발현의 시간적 변화

에스트로겐 및 타목시펜 처치시 시간에 따른 cofactor mRNA의 발현 변화는 cDNA를 주형으로 하여 각각의 특이적 primer를 사용하여 multiple-PCR을 수행하였다(Table 1). Coactivator (SRC-1, P/CAF, CBP, AIB1)와 corepressor (N-coR, SMRT)의 mRNA의 발현 변화는 리간드 및 시간에 따라 상이한 결과를 보였지만, 비교적 짧은 시간(15-30 min) 내에 급격한 발현 감소를 보였다. Coactivator인 SRC-1, AIB1, P/CAF, CBP는 에스트로겐 처리에 따라 그 mRNA 발현이 감소하였다가, 3시간 후 원래의 상태로 회복하였다가 다시 감소하는 주기적인 발현 변화를 보였다. 타목시펜을 처리하는 경우 에스트로겐 처치 때와 비슷한 변화 양상을 보였으나, 3시간 이후의 변화는 뚜렷하지 않았다 (Fig 1). 한편 corepressor인 N-coR 및 SMRT는 에스트로겐을 처리하는 경우 coactivator mRNA의 변화와 비슷하게 3시간 주기로 감소와 원상회복을 반복하였으나, 타목시펜을 처리하는 경우 corepressor mRNAs는 발현이 점차 증가하는 경향을 보였다(Fig 2).

2. 에스트로겐 및 타목시펜 처리에 따른 세포내 단백질 발현의 변화

에스트로겐 및 타목시펜 처리에 따른 Ki-67, ER $\alpha$ , c-Myc, p27/kip1 단백질 분자들의 발현양상은 Western blot을 이용하여 조사하였다. 튜블린(Tubulin)은 internal loading control로 사용하였다. 에스트로겐에 의해 세포증식 표지자인 Ki-67의 증가가 나타났고, ER $\alpha$ 는 세포 내 전체 단백질의 양은 감소하였으나 단백질의 대부분이 핵 내에서 나타났으나(Fig 3A) TGF $\beta$ 1

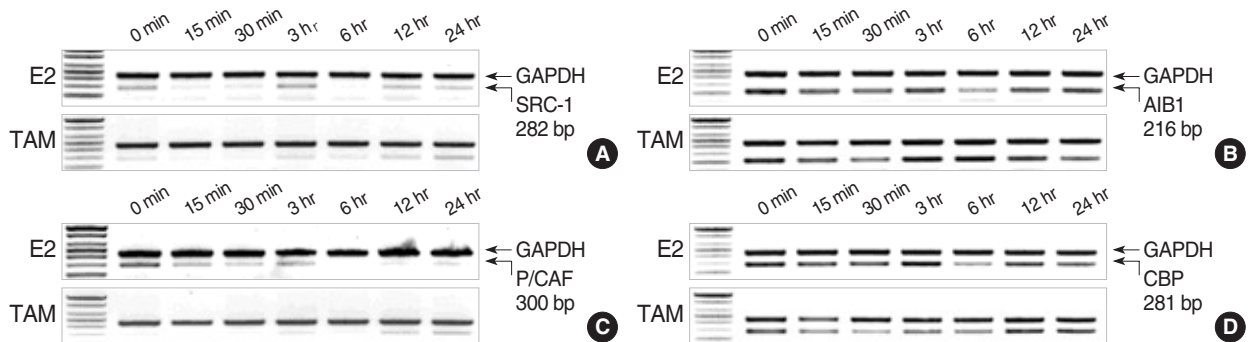


Fig 1. Sequential change of the mRNA expression of coactivators in MCF-7 cells after treatment of estrogen or tamoxifen. Coactivator mRNAs expression rapidly decreased in 15-30 min after estrogen treatment, but recovered to initial level in 3 hr. With tamoxifen treatment, the pattern was similar as in case of estrogen treatment.

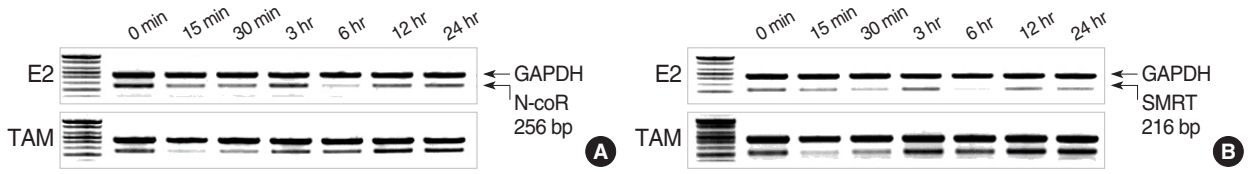


Fig 2. Sequential change of the mRNA expression of corepressors in MCF-7 cells after treatment of estrogen or tamoxifen. Corepressor mRNA expression rapidly decreased in 15-30 min after estrogen treatment and remained lower level until 24 hr after estrogen treatment. With tamoxifen treatment, initial response was similar as in cases of estrogen treatment, but the expression gradually increased since 3 hr after tamoxifen treatment.

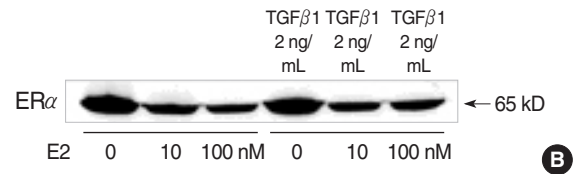
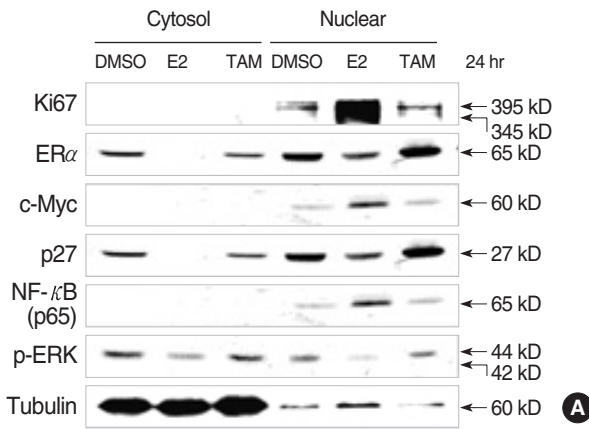


Fig 3. Expression of various proteins in MCF-7 cells after 24 hr-treatment of estrogen (10 nM) or tamoxifen (1 μM) or DMSO. (A) Nuclear expression of Ki-67, c-Myc, and cytosolic expression of phospho-ERK increased but both nuclear and cytosolic expression of p27/kip1 decreased after estrogen treatment. There was no significant change after tamoxifen treatment. (B) ERα expression was downregulated with treatment of estrogen, but there was no change of ERα expression with additional TGFβ1 treatment.

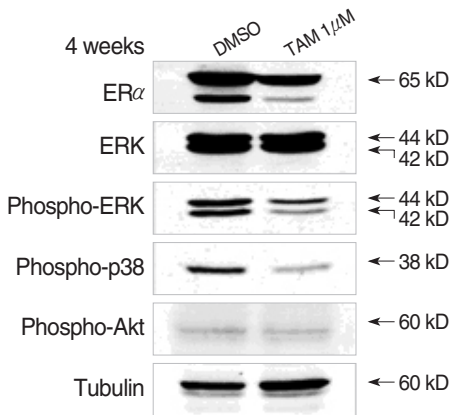


Fig 4. The change of MAP kinases activities in MCF-7 cells after 4 weeks-treatment with tamoxifen (1 μM) or DMSO. The activity of ERK and p38 was decreased after 4 weeks-treatment with tamoxifen but the change of Akt activity was not remarkable.

에 의한 단백질의 감소는 확인할 수 없었다(Fig 3B). 또한 에스트로겐 처리에 따라 c-myc과 같은 세포 증식에 관련된 유전자의 발현 증가와 NF-κB의 한 소단위(subunit)인 p65 단백질의 핵으로의 이동이 증가 했으나, 세포주기 조절인자 p27/kip1 단백질의 감소가 나타났다.

타목시펜에 의한 ERα 단백질의 변화는 뚜렷하지 않았고, 대조군에 비해 뚜렷한 단백질 발현의 변화가 나타나지 않았으나 에스트로겐 투여군에 비해 세포증식 신호전달체 단백질 발현의 감소, 세포

주기 조절 단백질인 p27/kip1의 증가를 보였다.

### 3. 4주간 지속적인 타목시펜 처리에 따른 단백질 발현의 변화

MCF-7 유방암 세포에 타목시펜을 4주간 처리하였을 때, ERK와 p38과 같은 MAP kinase 계열 단백질의 활성화가 감소되었고 phospho-Akt에서는 큰 변화를 보이지 않았다(Fig 4).

## 고 찰

EGFR family의 성장인자 수용체 과발현 유방암의 경우 타목시펜 치료에 반응도가 감소하며, (18-21) 이 경로를 차단하면 타목시펜 반응도가 회복된다. (22-25) 그러나 coactivator AIB1 단백질 및 HER2 과발현이 동시에 일어난 에스트로겐 수용체-양성 유방암 환자가 타목시펜 치료를 받은 경우 불량한 무병생존율을 보여, (12) HER2 과발현 자체가 타목시펜 저항성의 직접적인 요인이 아니라 coactivator의 발현이 중요한 요소임을 시사하였다. 즉, HER2 및 coactivator AIB1의 과발현이 일어난 유방암 세포 환경에서는 타목시펜의 처리는 HER2 신호전달체의 MAPKs의 활성화를 통하여 coactivator AIB1의 인산화를 유도하고, (26) 세포증식이 활성화되는 결과를 초래할 수 있다고 생각된다.

에스트로겐 및 타목시펜에 의한 보조인자 mRNA의 발현 변화는 약물 처리 후 단시간(15-30분) 내에 뚜렷한 감소를 보이는 것이

공통적으로 나타났고, 에스트로겐 처치의 경우 3시간이 지나서 다시 원상회복하였다가 다시 감소하는 주기적인 현상을 보였다. 이러한 변화의 기전은 밝혀지지 않았으나 세포가 외부자극에 의해 필요한 유전자의 발현을 위해서 적절한 시기에 보조인자의 빠른 발현변화를 유도하는 것으로 추측된다. 한편, N-coR, SMRT와 같은 corepressor는 타목시펜에 의해 증가하는 경향을 보여 타목시펜이 에스트로겐 수용체와 결합하여 corepressor를 통해 전사억제를 일으킴을 뒷받침하였다. 이러한 보조인자의 미약한 변화가 미치는 세포 내 현상을 정확하게 설명할 수는 없었지만, 시간에 따라 상이한 발현변화를 보여 앞으로 세포 또는 조직 특이적인 발현 양상과 장기간 타목시펜 노출에 따른 변화에 대해 추가적인 조사가 필요할 것이다.

에스트로겐에 의한 세포 내 단백질 발현의 변화는 호르몬 의존성 MCF-7 세포에서 에스트로겐에 의해 Ki-67 및 c-myc과 같은 세포증식 유전자의 발현이 증가하는 반면, 세포주기 억제제인 p27/kip1의 감소와 ER $\alpha$  단백질의 뚜렷한 감소가 나타났다. 또 세포질 내에서 phospho-ERK 증가가 유도되었고, 마찬가지로 핵에서도 활성화된 phospho-ERK가 대조군에 비해 증가하였다. 이상의 결과는 에스트로겐에 의해 세포증식 표지자인 Ki-67와 NF- $\kappa$ B의 핵으로 이동, p27/kip1의 감소, MAP kinase의 활성화, c-myc의 증가 등의 세포증식 신호전달계의 활성화와 세포주기 억제제의 감소를 통해 세포증식의 결과를 유도하는 것으로 보인다. ER $\alpha$  단백질의 감소는 proteasome-의존 분해 (degradation)가 일어나는 기존 보고와 일치하고, 에스트로겐 반응 조직에서 생리화학적 반응을 조절하여, 궁극적으로 에스트로겐 반응 유전자의 발현을 제한하는 것으로 알려졌다.(27-29) 한편 TGF $\beta$ 1에 의한 ER $\alpha$ 의 단백질 조절도 알려져 있으나,(28, 30, 31) 에스트로겐에 의한 감소가 뚜렷하여 본 연구에서는 관찰할 수 없었다.

p27/kip1 단백질의 활성화는 subcellular localization 및 단백질 농도에 의해 조절되는 세포주기 음성 조절인자이며, 많은 암에서 발현 저하가 보고되었다.(32-34) 본 연구에서 타목시펜에 의한 ER $\alpha$  단백질의 발현변화는 뚜렷하지 않았고, 다른 단백질의 발현 역시 대조군에 비해 뚜렷하지 않았으나 에스트로겐 투여군에 비해 세포증식 신호전달계 단백질 발현의 감소, 세포주기 조절 단백질인 p27/kip1의 증가를 보여 이러한 단백질 발현 조절을 통해 세포주기를 조절하고 세포증식 억제를 유도함을 시사하였다

MCF-7 세포주에 dextran-charcoal 처리된 10% FBS를 사용한 phenol red DMEM에 타목시펜이 1  $\mu$ M의 농도로 첨가하고, 계대 배양하면서 4주간 처리한 경우, 대조군에 비해 세포사멸 신호전달계의 phospho-Akt에서는 큰 변화를 보이지 않았지만, ERK 및 p38 등과 같은 세포증식 신호전달계의 MAP kinase

단백질의 활성화가 감소되어 Zhang 등(35)과 유사한 결과를 보였다. 즉, 항에스트로겐 타목시펜을 일정 기간 처리하는 경우 세포증식 단백질의 억제를 관찰할 수 있고 이는 내성 발생 때까지 지속될 것으로 생각된다.

따라서 향후 장기간 타목시펜 처리에 따른 에스트로겐 수용체 보조인자(coactivators & corepressors)에 대한 변화와 세포 내 단백질 변화에 대한 연구를 통해 타목시펜 내성의 기전을 밝히는 노력이 필요하겠다.

## 결론

에스트로겐 및 타목시펜에 의한 보조인자의 mRNA 발현은 짧은 시간 이내에 감소를 보였고, 3시간이 경과하면서 원래의 발현 정도를 회복하였다. 또한 N-coR, SMRT와 같은 corepressor가 타목시펜에 의해 시간에 따라 증가하는 경향을 보였다. 한편, 에스트로겐 및 타목시펜에 의한 세포 내 단백질의 변화는 에스트로겐에 의해 Ki-67의 증가 및 NF- $\kappa$ B의 핵으로 이동, c-myc의 증가, p27/kip1의 감소 등과 같이 세포증식 활성화가 유도되었고, 타목시펜에 의해서는 대조군과 비교하여 큰 변화를 보이지 않았으나 에스트로겐 투여군에 비해 세포증식 신호전달계 단백질 발현의 감소, 세포주기 조절 단백질인 p27/kip1의 증가를 통해 세포주기 조절 및 세포증식 억제를 유도함을 시사하였다. 또 일정 기간 동안(4주)의 타목시펜 처리하는 경우 MAP kinase 단백질의 활성화도가 감소되어 내성이 발생할 때까지 세포증식 단백질의 억제와 ER-EGFR 간 상호 교차 억제를 시사하였다.

## 참고문헌

1. Dubik D, Dembinski TC, Shiu RP. Stimulation of c-myc oncogene expression associated with estrogen-induced proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Res* 1987;47:6517-21.
2. Ignar-Trowbridge DM, Pimentel M, Parker MG, McLachlan JA, Korach KS. Peptide growth factor cross-talk with the estrogen receptor requires the A/B domain and occurs independently of protein kinase C or estradiol. *Endocrinology* 1996;137:1735-44.
3. Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ, Picard D. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J* 1996;15:2174-83.
4. Wiesen JF, Young P, Werb Z, Cunha GR. Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development. *Development* 1999;126:335-44.
5. Normanno N, Di Maio M, De Maio E, De Luca A, de Matteis A,

- Giordano A, et al. Mechanisms of endocrine resistance and novel therapeutic strategies in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005;12: 721-47.
6. Girault I, Lerebours F, Amarir S, Tozlu S, Tubiana-Hulin M, Lidereau R, et al. Expression analysis of estrogen receptor alpha coregulators in breast carcinoma: evidence that NCOR1 expression is predictive of the response to tamoxifen. *Clin Cancer Res* 2003;9:1259-66.
  7. Graham JD, Bain DL, Richer JK, Jackson TA, Tung L, Horwitz KB. Nuclear receptor conformation, coregulators, and tamoxifen-resistant breast cancer. *Steroids* 2000;65:579-84.
  8. Danielian PS, White R, Lees JA, Parker MG. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J* 1992;11:1025-33.
  9. Parker MG. Structure and function of estrogen receptors. *Vitam Horm* 1995;51:267-87.
  10. Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, et al. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 1998;95: 927-37.
  11. Torres-Arzayus MI, Font de Mora J, Yuan J, Vazquez F, Bronson R, Rue M, et al. High tumor incidence and activation of the PI3K/AKT pathway in transgenic mice define AIB1 as an oncogene. *Cancer Cell* 2004;6:263-74.
  12. Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA, et al. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:353-61.
  13. Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzel T, Torchia J, Mullen TM, Schiff R, et al. Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2920-5.
  14. Newby JC, Johnston SR, Smith IE, Dowsett M. Expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 during the development of tamoxifen resistance in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3:1643-51.
  15. Nicholson RI, Hutcheson IR, Harper ME, Knowlden JM, Barrow D, McClelland RA, et al. Modulation of epidermal growth factor receptor in endocrine-resistant, oestrogen receptor-positive breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2001;8:175-82.
  16. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296:1655-7.
  17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
  18. Benz CC, Scott GK, Sarup JC, Johnson RM, Tripathy D, Coronado E, et al. Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res Treat* 1993;24:85-95.
  19. Dowsett M. Overexpression of HER-2 as a resistance mechanism to hormonal therapy for breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2001;8: 191-5.
  20. Piccart M, Lohrisch C, Di Leo A, Larsimont D. The predictive value of HER2 in breast cancer. *Oncology* 2001;61:73-82.
  21. Mass R. The role of HER-2 expression in predicting response to therapy in breast cancer. *Semin Oncol* 2000;27:46-52.
  22. Kurokawa H, Lenferink AE, Simpson JF, Pisacane PI, Sliwkowski MX, Forbes JT et al. Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer Res* 2000;60:5887-94.
  23. Nicholson RI, Hutcheson IR, Harper ME, Knowlden JM, Barrow D, McClelland RA, et al. Modulation of epidermal growth factor receptor in endocrine-resistant, estrogen-receptor-positive breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2002;963:104-15.
  24. Witters LM, Kumar R, Chinchilli VM, Lipton A. Enhanced antiproliferative activity of the combination of tamoxifen plus HER-2-neu antibody. *Breast Cancer Res Treat* 1997;42:1-5.
  25. Witters L, Engle L, Lipton A. Restoration of estrogen responsiveness by blocking the HER-2/neu pathway. *Oncol Rep* 2002;9:1163-6.
  26. Fond de Mora J, Brown M. AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 2000; 20:5041-7.
  27. Lewandowski S, Kalita K, Kaczmarek. Estrogen receptor $\beta$ : potential functional significance of a variety of mRNA isoforms. *FEBS Lett* 2002;524:1-5.
  28. Nawaz Z, Lonard DM, Dennis AP, Smith CL, O'Malley BW. Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *PNAS* 1999;96:1858-62.
  29. Tschugguel W, Dietrich W, Zhegu Z, Stonek F, Kolbus A, Huber JC. Differential regulation of proteasome-dependent estrogen receptor alpha and beta turnover in cultured human uterine artery endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2281-7.
  30. Knabbe C, Lippman ME, Wakefield LM, Flanders KC, Kasid A, Derynck R, et al. Evidence that transforming growth factor beta is a

- hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell* 1987;48:417-28.
31. Petrel TA, Brueggemeier RW. Increased proteasome-dependent degradation of estrogen receptor-alpha by TGF-beta1 in breast cancer cell lines. *J Cell Biochem* 2003;88:181-90.
32. Ekholm SV, Reed SI. Regulation of G1 cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12: 676-84.
33. Slingerland J, Pagano M. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol* 2000;183:10-7.
34. Barnes A, Pinder S, Bell J, Paish E, Wencyk P, Robertson J, et al. Expression of p27kip1 in breast cancer and its prognostic significance. *J Pathol* 2003;201:451-9.
35. Zhang CC, Shapiro DJ. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by estrogen or by 4-hydroxytamoxifen is coupled to estrogen receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2000; 275:479-86.