



KR9800522

KAERI/RR-1775/97

유방암에서 bcl-2, p53유전자의 발현이 타목시펜에 의한 암세포의 아포토시스에 미치는 영향 및 호르몬 수용체와의 상관관계에 관한 연구

The role of the expression of bcl-2, p53 gene in tamoxifen-induced apoptosis of breast cancer cells and its relationship with hormon receptor status.

연구기관
원자력병원

~
한국원자력연구소

29 - 41

제 출 문

한 국 원 자 력 연 구 소 장 귀 하

본 보고서를 “ 유방암에서 bcl-2, p53유전자의 발현이 타목시펜에 의한 암 세포의 아포토시스에 미치는 영향 및 호르몬 수용체와의 상관관계에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998 . 1 . 20 .

연구 기관 명 : 원자력병원
연구 책임자 : 노 우 철
연구 원 : 함 용 호
감 수 위 원 : 진 수 일
 홍 석 일

요 약 문

I. 제목 : 유방암에서 bcl-2, p53 유전자의 발현이 타목시펜에 의한 암세포의 아포토시스에 미치는 영향 및 호르몬 수용체와의 상관관계에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

Bcl-2와 p53 유전자는 암세포의 아포토시스 과정에 관여하는 중요한 유전자이며 이중 p53은 아포토시스를 유발하는 것으로 알려져 있다. 아포토시스를 억제하는 bcl-2는 주로 혈액 림프종등에서 연구가 이루어져 왔으나 최근 연구에 의하면 유방암등 고형종양에서도 bcl-2가 발현되며 암발생 및 예후와 관계가 있는 것으로 보고되고 있다. 지금까지의 연구 결과에 의하면 bcl-2 양성은 ER양성, 좋은 조직학적 분화도와 관계가 있고 변이성 p53의 발현과 역비례관계가 있는 것으로 밝혀졌다. 그러나 이와 같은 결과는 bcl-2가 아포토시스를 억제하고 따라서 호르몬 치료등에 저항성이 있을 것으로 예측하는 바와 상반된 결과라 할 수 있다.

따라서 연구자들은 유방암에서 bcl-2, p53, 호르몬 수용체와 타목시펜에 의한 암세포의 아포토시스와의 관계를 종합적으로 규명하기 위하여 본 연구를 시행하였다,

III. 연구개발의 내용 및 범위

MCF-7(ER+, bcl-2+, p53-) 세포주와 MD MBA 468(ER-, bcl-2-, p53+)세포주를 에스트로겐을 제거한 상태에서 배양한 후 각각 에스트로겐(10^{-9} M) 및 타목시펜(10^{-5} M)을 첨가한 후 시간에 따른 bcl-2 및 변이성 p53단백의 변화를 Western blotting을 이용하여 측정하고 각 시점에서 세포의 아포토시스를 유세포분석을 이용하여 정량분석하였다. 다음 bcl-2, p53단백의 변화와 이에 따른 아포토시스와의 관계를 분석하였다.

IV. 연구개발결과

ER양성인 MCF-7 세포주에서는 에스트로겐 첨가시 시간의 경과에 따라 bcl-2단백의 증폭이 관찰되었으며 타목시펜 첨가시에는 bcl-2의 감소를 보였다. 변이성 p53단백의 변화는 관찰되지 않았다. ER 음성인 MB MDA 468세포주에서는 에스트로겐이나 타목시펜의 첨가에 따른 bcl-2, 변이성 p53단백의 변화는 관찰되지 않았다. 세포의 아포토시스는 MCF-7세포주에서 타목시펜을 첨가하였을 경우 시간의 경과에 따라 아포토시스가 증가함을 관찰할 수 있었다(0h; 0%, 6h; 5.7%, 24h; 13.4%, 48h; 97.6%). 위의 결과에서 ER+이며 bcl-2+, p53-인 암세포가 타목시펜 처리시에는 bcl-2-, p53-로 전환되고 따라서 ER-이며 bcl-2-, p53+인 암세포에 비해 타목시펜에 더욱 잘 반응하는 것으로 설명할 수 있으리라 생각된다.

V. 연구개발결과의 활용계획

위 연구를 통해 유방암에서 관찰되는 bcl-2와 ER과의 관계에 대한 의문점을 어느 정도 설명할 수 있으리라 생각되며 bcl-2가 호르몬 치료에 대한 반응을 예측할 수 있는 지표의 하나로 평가 받을 수 있으리라 생각된다.

S U M M A R Y

I. Project Title : The role of the expression of bcl-2, p53 gene in tamoxifen-induced apoptosis of breast cancer cells and its relationship with hormon receptor status.

II. Objective and Importance of the Project

Bcl-2 and p53 gene product have been both linked to apoptotic pathway. Mutant p53 can inhibit apoptosis. Bcl-2 gene, that functions by overriding apoptosis, has been studied mainly in hematolymphoid tumor. Recently however, it has been found that bcl-2 could be identified in solid tumors including breast cancer and play a role in oncogenesis and cancer prognosis.

From the available data, bcl-2 positivity is highly correlated with ER positivity, good histologic differentiation and inversely correlated with the expression of mutant p53. However, these results are paradoxical since bcl-2 is expected to counteract the tumor inhibitory effects of endocrine therapies as it is thought to prevent apoptosis.

So this study was performed to explain the paradoxical results which had been observed in clinical studies and to investigate the relationship of bcl-2, p53, ER and tamoxifen-induced apoptosis of breast cancer cells.

III. Scope and Contents of the Project

MCF-7 (ER+, bcl-2+, mutant p53-) cell line and MB MDA 468 (ER-, bcl-2-, mutant p53+) cell line were cultured in estrogen-free condition. Estrogen($17-\beta$ estradiol, 10^{-9} M) and tamoxifen(10^{-5} M) were added to the media respectively. The

changes of the bcl-2 and mutant p53 gene products were checked by Western blotting and the percents of apoptotic cells were calculated by flowcytometric analysis. Finally the relationship of the changes of bcl-2, p53 status, and tamoxifen-induced apoptosis were analyzed.

IV. Results and Porposal for Applications

In MCF cell line (ER+), we found that treatment with tamoxifen resulted in a decrease in bcl-2 protein level, but produced no change in mutant p53. In MB MDA 468 cell line (ER-) however, there were no changes of bcl-2 and mutant p53 level when estrogen or tamoxifen were added. Apoptotic cells increased with time-dependent pattern when tamoxifen was added to MCF cell line(0h; 0%, 6h; 5.7%, 24h; 13.4%, 48h; 97.6%). According to these results, ER+, bcl-2+, mutant p53- breast cancer cells, when treated with tamoxifen, were converted into bcl-2-, p53- cells which were more prone to apoptotic cell death than bcl-2-, mutant p53+ cells.

The clinical paradox which was mentioned above might be explained with this study and bcl-2 protein seems to be one of important factors that can predict the effect of hormon therapy.

목 차

제 1 장	서 론	7
제 2 장	국내외 기술개발 현황	10
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	11
제 4 장	연구개발목표 달성도 및 대외기여도	20
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	21
제 6 장	참고문헌	22

제 1 장 서 론

제 1 절 유방암에서 아포토시스와 bcl-2, p53의 관계

아포토시스(apoptosis)란 유전자 수준에서 조절되는 특이한 형태의 세포 사로 최근 종양학 분야에서 중요한 논점중의 하나가 되고 있다. 세포의 DNA가 어떤 원인에 의해 손상을 입었을 경우 p53단백질등의 매개하에 아포토시스가 유발되고 이는 손상된 세포의 계속적인 증식을 억제하는 항종양효과가 있을 것으로 생각되며 그 외 항암치료에 대한 반응을 예측할 수 있는 지표로서, 세포증식지수(proliferative index)와 함께 종양의 예후를 판정할 수 있는 지표로서 아포토시스에 대한 연구가 진행되고 있다^{2,9,23}.

Bcl-2와 p53유전자는 아포토시스 과정을 조절하는 가장 중요한 두가지 유전자로 알려져 있다. 18번 염색체 장완부에 위치한 bcl-2 유전자는 아포토시스 과정을 억제하는 것으로 알려져 있으며 주로 혈액림프종(hematolymphoid tumor)에서 연구가 이루어져 왔으나 최근 보고들에 의하면 폐암, 전립선암, 유방암, 신경아세포종등의 고형종양에서도 bcl-2 단백질 관찰되어 이에 대한 연구가 이루어지고 있다^{12,16}. 유방암에서도 많게는 약 70%에서 bcl-2의 발현이 관찰되지만 그 의미나 역할에 관하여는 많은 의문이 있다. 유방암에서 지금까지의 연구에 의하면 bcl-2 유전자의 발현은 ER 양성 과 상관관계가 있고 나아가 유방암의 예후와도 관계가 있는 것으로 보고되고 있다. 대부분의 연구에서 bcl-2 양성인 유방암은 ER 양성, 좋은 조직학적 분화도와 관계가 있으며 bcl-2 음성인 유방암은 ER 음성 및 나쁜 조직학적 분화도와 연관지어 지는 것으로 나타나고 있다. 그러나 이러한 결과는 bcl-2가 세포의 아포토시스를 억제하여 세포의 계속적인 증식을 이롭게 한다는 관점에서 볼 때 예측과 상반된 결과라 할 수 있다^{3,6,10,12,14,15}. 림프종을 비롯한 많은 종양에서 bcl-2는 아포토시스 과정을 억제하여 항암치료에 대한 저항성을 증가시키고² 특히, 전립선암의 경우 호르몬치료(androgen ablation therapy)

에 반응을 하지 않는 호르몬 비의존성 종양에서 bcl-2가 높게 나타남을 볼 때^{8,16)}, 유방암에서의 이러한 결과는 의외의 발견이라 할 수 있다.

p53 유전자는 정상적으로 아포토시스를 유발하는 역할을 하지만 변이성 p53의 과발현은 bcl-2와 마찬가지로 아포토시스 과정을 억제하는 것으로 알려져 있다. 유방암에서 bcl-2와 mutant p53의 과발현에 관한 연구에서는 두 가지가 서로 반비례 관계에 있음을 밝혀 bcl-2와 mutant p53은 기능면에서 상당부분 중복되어 있을 가능성을 시사하였고, mutant p53의 과발현이 bcl-2 유전자의 발현을 하향조정(down regulation)함을 주장하였다^{2,10,13,21)}.

제 2 절 호르몬 치료에 의한 유방암세포의 아포토시스

타목시펜은 대표적인 유방암의 호르몬 치료제로서, 보조요법으로 또는 전이성 유방암의 치료로 널리 사용되고 있으나 주로 ER 양성인 종양의 일부에서만 효과가 입증되어 있다. 이러한 타목시펜과 같은 항에스트로겐 제제는 유방암세포의 아포토시스를 유발하는 것으로 알려져 있고^{4,17,18)} 따라서, 아포토시스 과정을 억제하는 bcl-2의 발현은 호르몬 치료에 대한 저항성을 증가시키리라 생각할 수 있다. 마찬가지로 변이성 p53 유전자의 과발현도 타목시펜에 의한 암세포의 아포토시스에 저항성을 증가시키리라 생각된다.

제 3 절 유방암에서 호르몬 수용체와 bcl-2와의 관계

최근의 실험실 연구에서 bcl-2는 PR(progesteron receptor)과 마찬가지로 에스트로겐에 의해 유도됨이 밝혀졌다^{25,26)}. MCF-7과 같이 ER 양성인 세포주에 17- β estradiol을 첨가하였을 경우 bcl-2가 증가하고 아포토시스에 대한 저항성이 생기며 타목시펜과 같은 항에스트로겐을 투여하였을 경우 bcl-2가 감소함을 밝혔다. 따라서 ER 양성인 유방암에서 bcl-2의 발현이 높은 이유는 에스트로겐의 자극에 의한 것이며 타목시펜의 투여시에는 bcl-2가 감소

하고 아포토시스가 유발되는 것으로 생각할 수 있다. 그러나 전체적으로 좋은 예후를 보이며 타목시펜에 의한 아포토시스에 잘 반응하는 ER 양성인 종양과 아포토시스에 저항성이 높으리라 생각되는 bcl-2 양성인 종양간에 상관관계가 있다는 사실은 명확히 설명되지 않는다.

제 4 절 연구방향

따라서 유방암에서 호르몬 수용체와 bcl-2, p53 유전자의 발현, 타목시펜에 의한 아포토시스와의 관계를 종합적으로 규명할 필요가 있다고 생각된다. 연구자들은 ER+/bcl-2+/p53-인 세포주(MCF-7)와 ER-/bcl-2-/p53+인 세포주(MB MDA-468)을 이용하여 이들 세포주에서 에스트로젠 및 타목시펜 투여시에 bcl-2 및 p53단백의 변화를 측정하고 타목시펜에 의한 아포토시스와 비교하여 이들의 관계를 종합적으로 규명하고자 하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

아포토시스를 측정하는 방법으로는 세포의 형태학적인 관찰, 전기영동에 의해 fragmented DNA를 확인하는 방법등이 있으나 비특이적이고 정량분석이 힘들다는 등의 단점이 있어 최근 ELISA법, 유세포분석을 이용하는 방법등이 시도되고 있다^{1,9,23)}. 연구자는 최근 유세포분석을 이용하여 흉선세포의 아포토시스를 측정하는 실험을 하여 좋은 결과를 얻었다¹⁾.

유방암 세포의 아포토시스와 bcl-2, p53, ER등에 관한 최근연구에서 bcl-2는 PR과 마찬가지로 에스트로겐에 의해 유도됨이 밝혀졌다. 그러나 ER 양성인 세포주와 ER음성인 세포주를 대상으로 하여 p53, bcl-2, 타목시펜에 의한 아포토시스와의 관계를 종합적으로 규명한 연구는 아직 없는 상태이며, 국내에서는 유방암조직에서 bcl-2와 p53, 또는 ER 등의 관계를 면역조직화학법으로 측정한 극히 초보적인 연구가 몇 편 발표되었을 뿐 거의 전무한 실정이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구내용 및 범위

1. MCF-7세포주(ER+/bcl-2+/p53-)와 MB-MDA 468 세포주(ER-/bcl-2-/p53+)를 각각 배지 A (RPMI 1640, 5% FBS, 2mM glutamine, 100u/ml PCN, 100 μ g/ml streptomycin)에서 배양한다.
2. 실험 48시간 전에 세포주를 배지 B(phenolred free RPMI, dextran-coated charcoal treated FBS)에 옮겨 에스트로겐을 제거한 후 배양한다. (cell number: 1.5×10^6 /10ml of media)
3. MCF-7 및 MB-MDA 468에 각각 17- β estradiol(10^{-9} M)을 첨가하여 0, 6, 24, 48시간 후 bcl-2 및 p53 단백질의 변화를 western blotting으로 측정하고 각 시점에서 유세포분석을 이용하여 아포토시스를 정량분석한다.
4. MCF-7 및 MB-MDA 468에 각각 tamoxifen(10^{-5} M)을 첨가하여 0, 6, 24, 48시간 후 bcl-2 및 p53 단백질의 변화를 western blotting으로 측정하고 각 시점에서 유세포분석을 이용하여 아포토시스를 정량분석한다.
5. MCF-7 및 MB-MDA 468에 각각 17- β estradiol(10^{-9} M) 및 tamoxifen(10^{-5} M)을 첨가하여 0, 6, 24, 48시간 후 bcl-2 및 p53 단백질의 변화를 western blotting으로 측정하고 각 시점에서 유세포분석을 이용하여 아포토시스를 정량분석한다.

제 2 절 연구방법

1. bcl-2 및 p53 단백질 측정 (Western blotting)

가. 각시점에서 세포를 추출하여 lysis buffer(20mM Tris-Hcl pH 7.5, 150mM Nacl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate)로 처리한 후 단백질을 추출한다 (50 μ g).

나. 정량된 단백질을 동량의 sample buffer(SDS, β -mercaptoethanol, glycerol, bromophenol blue)에 넣어 95°C에서 3분간 가열 후 10mm 두께의 polyacryl amide gel에 loading하여 전기영동한다. 분자량 표준체를 같이 처리하여 동시에 시행한다.

다. 전기영동후 흡착지를 분리해 blocking solution(20ml Tris-Hcl pH 0.80, 137mM Nacl, Tween 20, 2% BSA)으로 상온에서 1시간 처리하여 비특이성 항체결합을 block시킨다.

라. Blocking solution을 버리고 TTBS로 세척한다.

마. 일차항체로 mouse monoclonal anti-bcl-2 antibody(CALBIOCHEM, 1:5000)와 mouse monoclonal anti-p53 antibody(Santa crutz biotechnology, 1:5000)를 사용하여 상온에서 2시간 처리한다.

바. 이차항체로 anti-mouse antibody(GAM-HRP,1:1000)를 이용하고 ECL 법을 이용하여(Western blott detector reagent) 현상한다.

2. 유세포분석을 이용한 아포토시스의 측정

가. 각 시점에서 세포 부유액을 원심분리(400g, 4분)하여 pellet을 얻는다

나. Pellet을 70% ethanol 2ml에 다시 부유시키고 -20°C에서 12시간 동안 고정시킨 후 원심분리하여(200g, 10분) pellet을 얻는다.

다. PBS로 세척하여 fragmented DNA를 제거한다.

라. 0.5ml PBS로 다시 녹인 후 RNase(1mg/ml,0.5ml) propidium iodide(1mg/ml, 0.5ml)를 차례로 첨가하여 어두운 곳에 15분간 둔다.

마. 유세포분석전까지 4°C의 어두운 곳에 보관한다.

사. 유세포분석을 실시하여 G0/G1 peak의 좌측의 sub-2n population을 정량한다.

제 3 절 연구결과

1. bcl-2 단백질

ER 양성인 MCF-7 세포주에서는 bcl-2 단백질이 관찰되었으며 E2(10^{-9} M) 첨가 시에는 시간이 6, 24, 48시간으로 경과함에 따라 bcl-2단백이 증폭되어 나타나고 tamoxifen(10^{-5} M) 첨가시에는 시간의 경과에 따라 감소함을 알 수 있었다. E2와 tamoxifen을 동시에 첨가한 경우에도 역시 시간이 경과함에 따라 bcl-2가 감소함을 볼 수 있었다. 반면에 ER 음성인 MB MDA 468 세포주에서는 bcl-2 단백질이 나타나지 않았고 E2나 tamoxifen의 첨가에 영향을 받지 않음이 관찰되었다(Fig. 1).

2. 변이성 p53 단백질

ER 음성인 MB MDA-468 세포주에서는 변이성 p53단백이 관찰되었으며 발현의 정도는 E2나 tamoxifen의 첨가에 영향을 받지 않음이 관찰되었다. ER양성인 MCF-7 세포주에서는 변이성 p53 단백질의 발현이 관찰되지 않았으며 역시 E2나 tamoxifen의 첨가에 의해 영향을 받지 않음을 알 수 있었다(Fig. 2).

3. 아포토시스

MCF-7 및 MB MDA 468 세포주에 E2(10^{-9} M), tamoxifen(10^{-5} M), E2+tamoxifen을 각각 첨가한 후 0, 6, 24, 48 시간이 경과한 후 각 시점에서 세포의 아포토시스를 유세포분석을 이용하여 정량분석하였다. MCF-7 세포주에 E2를 첨가하였을 경우 아포토시스는 일어나지 않았으며(Fig. 3), 타목시펜을 첨가하였을 경우 시간의 경과에 따라 아포토시스가 증가함이 관찰되었다(0h; 0%, 6h; 5.7%, 24h; 13.4%, 48h; 97.6%. Fig. 4). E2와 tamoxifen을 동시에 첨가하였을 경우에도 역시 시간의 경과에 따라 아포토시스가 증가함을 알 수 있었다(0h; 0%, 6h; 15.3%, 24h; 16.8%, 48h; 93.2%. Fig. 5). 반면에 ER 음성인 MB MDA 468세포주에서는 E2, tamoxifen, E2+tamoxifen 첨가시에 세포의 아포토시스는 관찰되지 않았다(data not shown).

4. ER, bcl-2, 변이성 p53단백과 타목시펜에 의한 암세포의 아포토시스와의 관계

위의 결과를 종합하여 볼 때, ER+, bcl-2+, 변이성 p53-인 유방암세포가 타목시펜 처리시에는 bcl-2-, 변이성 p53-로 전환됨을 알 수 있었고 이 조합은 ER-이며 bcl-2-, 변이성 p53+인 세포에 비하여 아포토시스가 잘 일어날 것으로 보이며 실제적으로 유세포분석을 이용한 측정 결과도 bcl-2-, 변이성 p53+인 세포에 비하여 아포토시스가 현저히 증가함을 보였다.

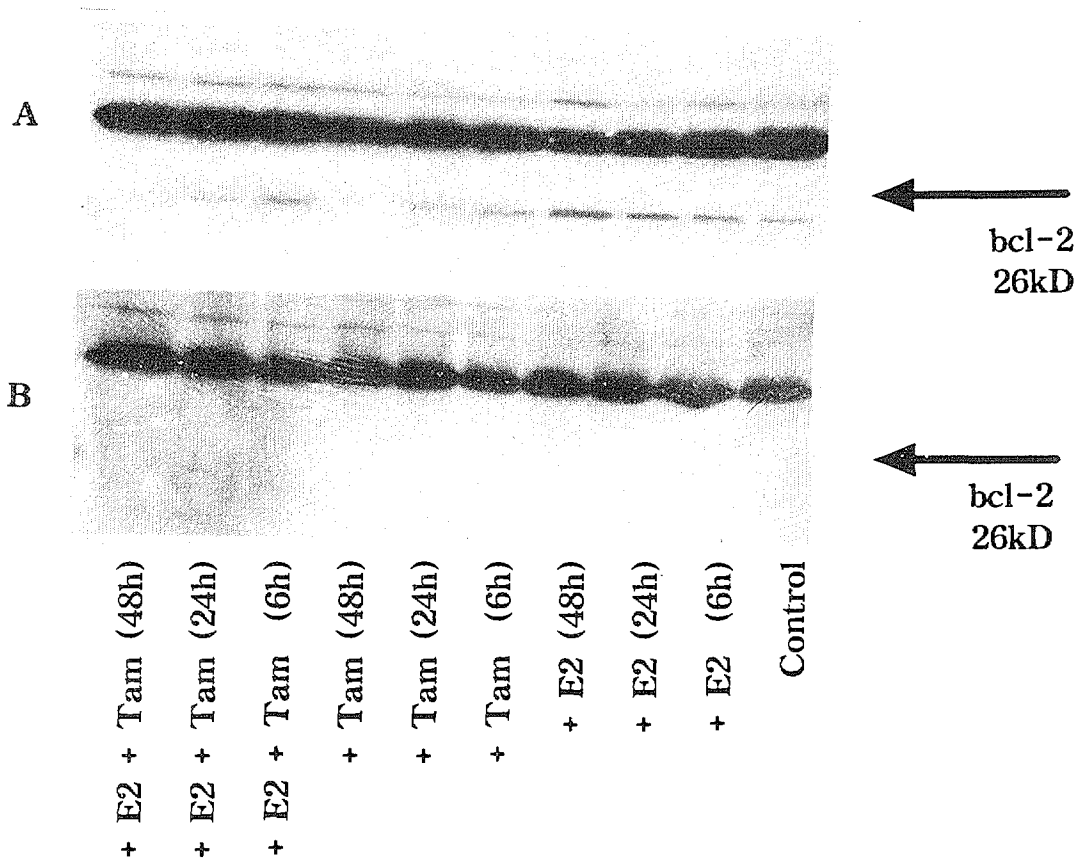


Fig. 1. Western blot detection of bcl-2 protein level after E2(10^{-8} M) and tamoxifen(10^{-5} M) treatment in MCF-7 cells (A) and MB MDA 468 cell (B). $50\mu\text{g}$ of total protein was extracted per well for SDS-PAGE. In MCF-7 cells, there was an increase of bcl-2 when treated with E2 and a decrease of the same protein when treated with tamoxifen. Bcl-2 protein was not detected in MB MDA 468 cells (E2: $17-\beta$ estradiol, Tam: tamoxifen).

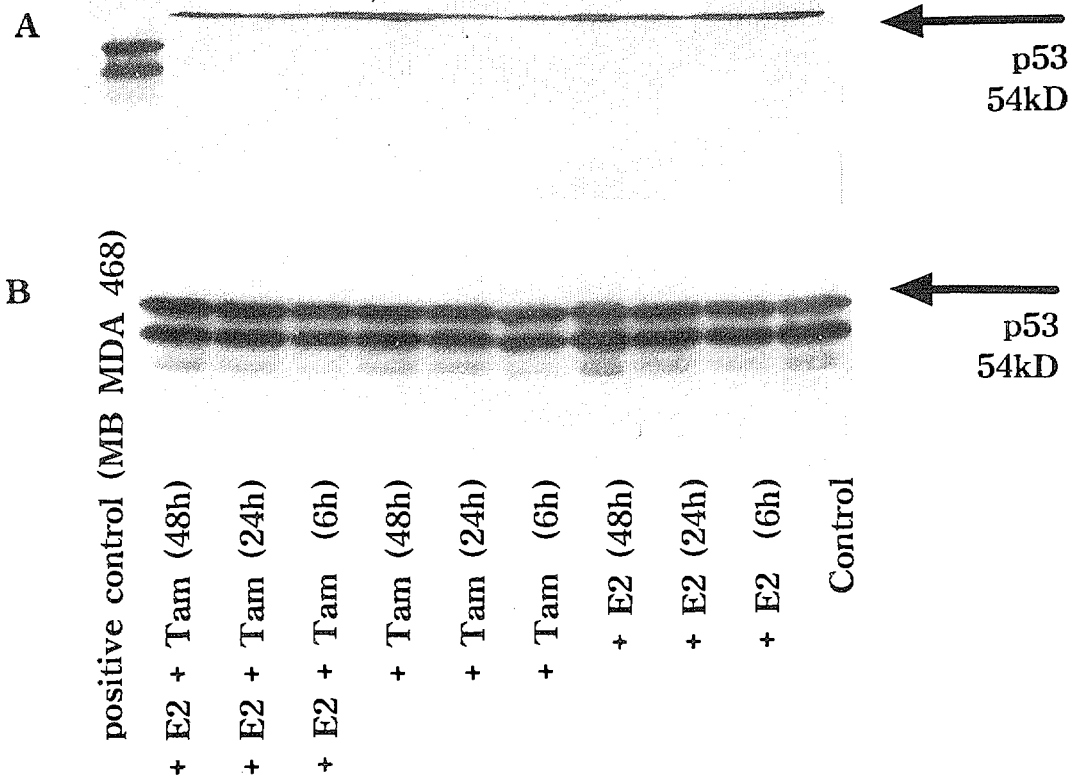


Fig. 2. Western blot detection of mutant p53 protein level after E2(10^{-9} M) and tamoxifen(10^{-5} M) treatment in MCF-7 cells (A) and MB MDA 468 cell (B). $50\mu\text{g}$ of total protein was extracted per well for SDS-PAGE. In MB MDA 468 cells, there was no change of mutant p53 protein level when treated with E2 or Tam. Mutant p53 protein was not detected in MCF-7 cells (E2: $17\text{-}\beta$ estradiol, Tam: tamoxifen).

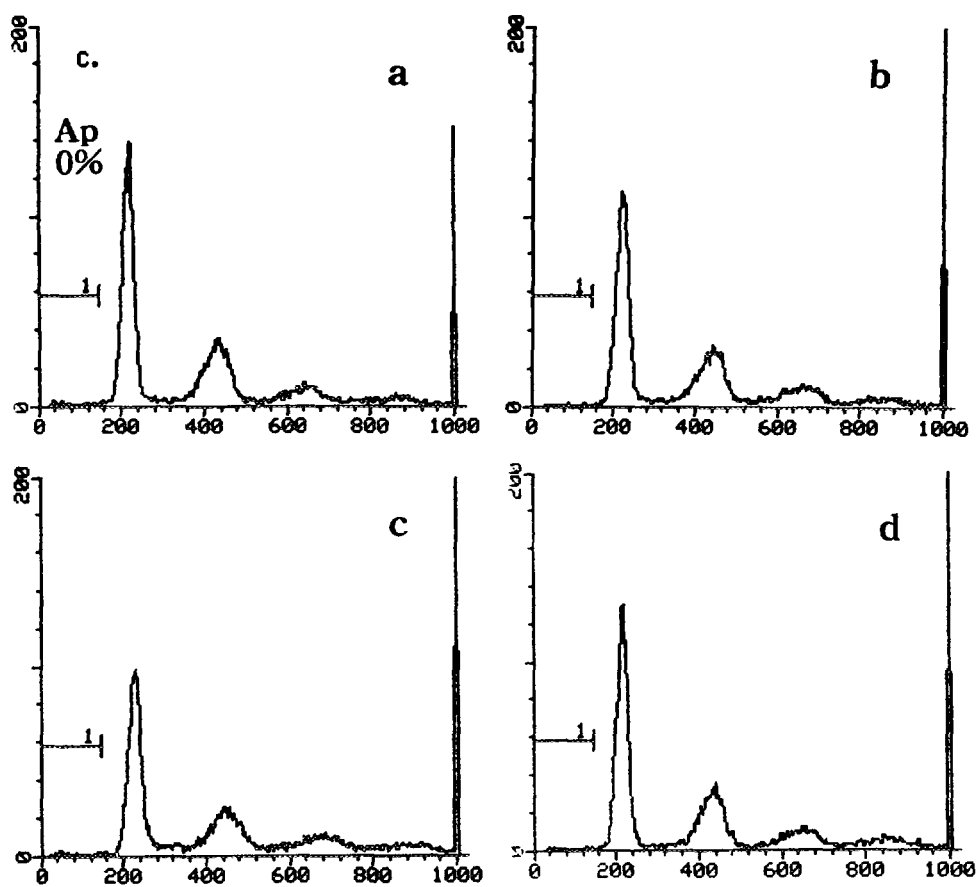


Fig. 3. DNA fluorescence flowcytometric profile of PI stained MCF-7 cells immediately after(a), after 6h(b), after 24h(c) and after 48h(d) incubation with E2(10^{-9} M). There were no apoptotic cells measured (E2: 17- β estradiol, Ap: apoptosis).

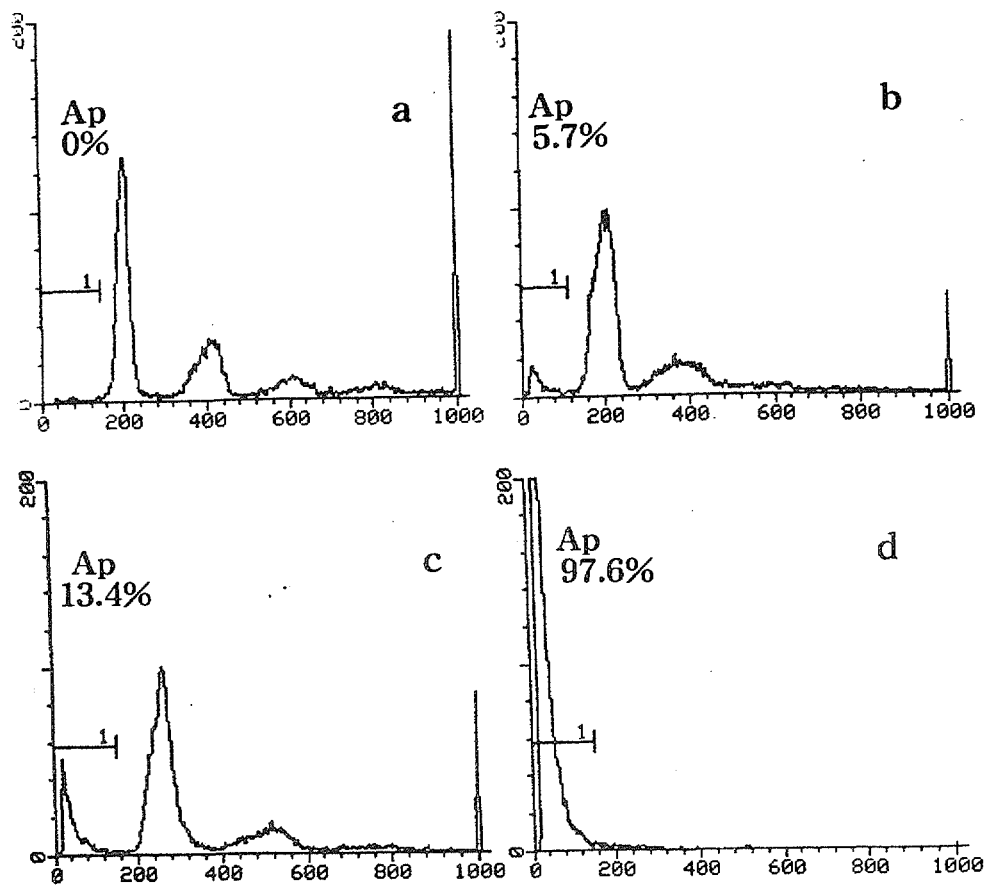


Fig. 4. DNA fluorescence flowcytometric profile of PI stained MCF-7 cells immediately after(a), after 6h(b), after 24h(c) and after 48h(d) incubation with tamoxifen(10^{-5} M). Apoptotic cells that could be recognized by their diminished stainability(Ap) increased with time-dependant pattern (Ap: apoptosis).

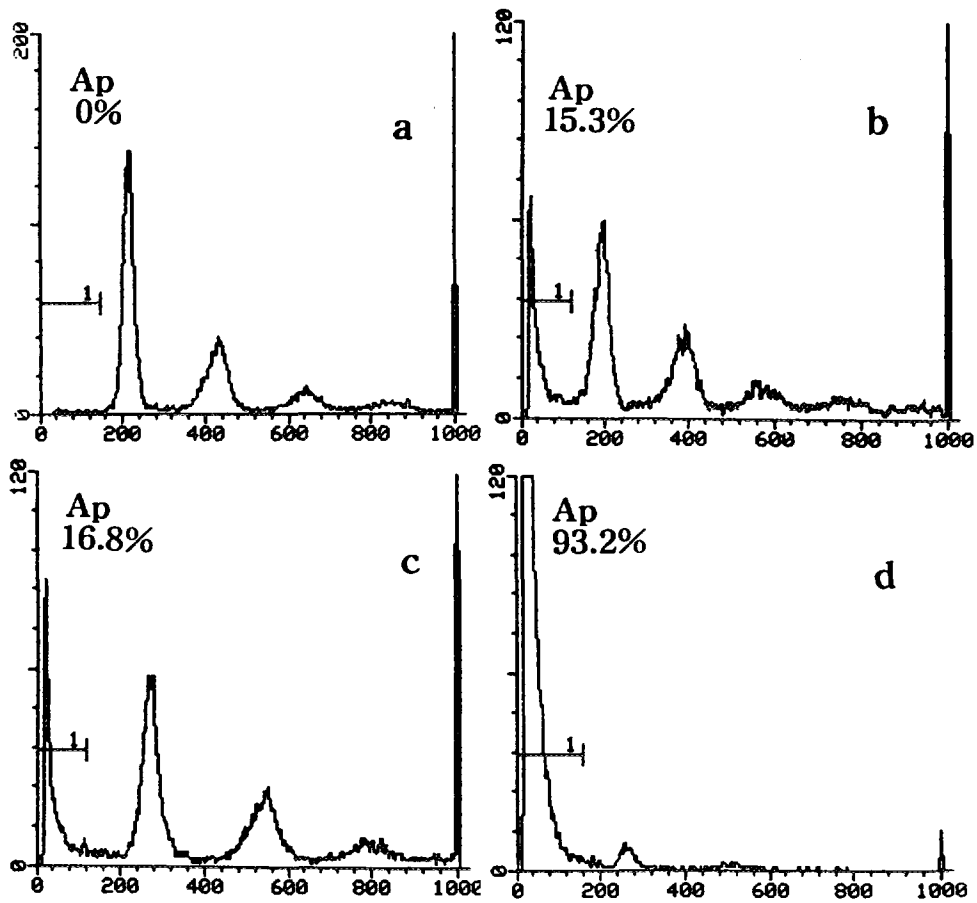


Fig. 5. DNA fluorescence flowcytometric profile of PI stained MCF-7 cells immediately after(a), after 6h(b), after 24h(c) and after 48h(d) incubation with E2(10^{-9} M) plus tamoxifen(10^{-5} M). Apoptotic cells that could be recognized by their diminished stainability(Ap) increased with time-dependant pattern (E2: 17- β estradiol, Ap: apoptosis).

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도

본 연구의 결과는 유방암에서 ER, p53, bcl-2와 타목시펜에 의한 아포토시스와의 관계를 설명하는데 도움이 될 수 있으리라 생각된다. Bcl-2는 아포토시스 과정을 억제하는 물질로 bcl-2양성인 종양은 타목시펜에 의한 암세포의 아포토시스에도 저항성이 있으리라 생각하였으나 실제 면역조직화화법을 이용한 많은 연구에서는 타목시펜 치료에 잘 반응하는 것으로 알려진 ER 양성인 종양과 연관성이 지어지고 있어 이 의문점을 해결하기 위한 연구가 진행되고 있다. 또한 bcl-2가 에스트로겐에 의해 유도되는 물질이고 bcl-2와 p53의 발현이 서로 역상관관계에 있음이 몇몇 연구를 통해 밝혀졌다. 그러므로 이에 착안하여 ER+/bcl-2+/p53-인 세포주가 타목시펜 처리후 bcl-2-/p53-로 바뀌고 이에 따라 세포의 아포토시스가 일어나며 ER-/bcl-2-/p53+인 세포주가 타목시펜 처리후 변화없이 bcl-2-/p53+인 상태를 유지하고 아포토시스에 저항성이 있다는 것을 밝히고자 하였으며 위의 결과를 토대로 임상적으로 관찰되는 결과에 대한 의문을 설명할 수 있으리라 생각된다. 또한 유방암에서 bcl-2는 ER, PR과 함께 호르몬 치료에 대한 반응을 예측할 수 있는 중요한 지표중의 하나로 생각되며 이에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

유방암에서 호르몬 치료에 대한 반응을 예측할 수 있는 지표로 현재까지는 ER 및 PR상태가 가장 중요한 인자로 알려져 있으나 실제로 호르몬 수용체 양성인 종양의 30~50%는 치료에 반응을 하지 않는 것으로 보고되고 있다. 따라서 bcl-2는 호르몬 치료에 대한 반응도를 더욱 정확히 예측할 수 있는 지표로서 이용가능성이 많다고 생각되어 이에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각되며, 나아가서 bcl-2 유전자의 조절에 의해 호르몬치료의 효율성을 더욱 높이기 위한 연구의 토대가 될 수 있으리라 생각된다.

제 6 장 참고문헌

1. 노우철, 노동영, 최국진: 유세포분석을 이용한 아포토시스의 검색법. 대한외과학회지 49: 911-921, 1995
2. Alnemri ES, Fernandes TF, Haldar S: Involvement of bcl-2 in glucocorticoid induced apoptosis of human B cell leukemia. Cancer Res 52: 491-495, 1992
3. Barbareschi M, Caffo O, Veronese S: Bcl-2 and p53 expression in node negative breast carcinoma. Human Path 27: 1149-1155, 1996
4. Bardon S, Vignon F: Steroid mediated cytotoxicity of antiestrogen and an antiprogesterin in breast cancer cells. Cancer Res 47: 1441-1448, 1987
5. Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ: Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. Cancer Res 55: 1811-1816, 1995
6. Bhagava V, Kell DL: Bcl-2 immunoreactivity in breast carcinoma correlates with hormone receptor positivity. Am J Path 145: 535-540, 1994
7. Brunner N, Bronzert D: Effect of growth and cell cycle kinetics of estradiol and tamoxifen on MCF-7 human breast cancer cells grown in vitro and in nude mice. Cancer Res 49: 1515-1520, 1989
8. Castle VP, Heidelberger KP: Expression of apoptosis suppressing protein bcl-2 in neuroblastoma is associated with unfavorable histology and N myc amplification. Am J Path 143: 1543-1550, 1993
9. Deisseroth AB, Devita VT: The Cell cycle. Cancer J 1: 15-21, 1995
10. Elledge RM, Green S, Howes L: Bcl-2, p53, and response to tamoxifen in estrogen receptor positive metastatic breast cancer: A southwestern oncology group study. J Clin Oncol 15: 1916-1922, 1997
11. Frankfurt OS, Sugarbaker EV: Synergistic induction of apoptosis in breast cancer cells by tamoxifen and calmodulin inhibitors. Cancer letters 97: 149-154, 1995

12. Gee JMW, Robertson JFR: Immunocytochemical localization of bcl-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. *Int J Cancer* 59: 619-628, 1994
13. Halder S, Negrini M, Monne M: Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res* 54: 2095-2097, 1994
14. Kandoz M, Siromachova M, Jacob D: Antagonism between estradiol and progestin on bcl-2 expression in breast cancer cells. *Int J Cancer* 68: 120-125, 1996
15. Lee WY, Jin YT, Tzeng CC: Reciprocal expression of bcl-2, p53 in breast ductal carcinoma. *Anticancer Res* 16: 3007-3012, 1996
16. McDowell TJ, Troncoso P: Expression of protooncogene bcl-2 and its association with emergence of androgen independent prostatic cancer. *Cancer Res* 52: 6940-6944, 1992
17. Perry RR, Kang Y: Effect of tamoxifen on growth and apoptosis of estrogen dependent and independent human breast cancer cells. *Ann Surg Oncol* 2: 238-245, 1995
18. Perry RR, Kang Y: Relationship between tamoxifen induced TGF- β expression, cytostasis and apoptosis in human breast cancer cells. *Br J Cancer* 72: 1441-1446, 1995
19. Ramani P, Lu QL: Expression of bcl-2 gene product in neuroblastoma. *J Pathol* 172: 273-278, 1994
20. Reed JC, Meister L, Tanaka S: Differential expression of bcl-2 protooncogene in neuroblastoma and other human tumor cell lines of neural origin. *Cancer Res* 51: 6529-6538, 1991
21. Silvestrini R, Veronesi S: The bcl-2 protein : prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node negative breast cancer patients *J NCI* 86: 449-504, 1994
22. Steck K, McDowell T: Flowcytometric analysis of apoptosis and bcl-2 in primary breast carcinoma: Clinical and biological implications.

Cytometry 24: 116-122, 1996

23. Stewart BW: Mechanism of apoptosis: Integration of genetics, biochemical and cellular indicator. J NCI 86: 1286-1296, 1995

24. Sumantran VN, Ealovega MW: Overexpression of bcl-Xs sensitize MCF-7 cells to chemotherapy induced apoptosis. Cancer Res 55: 2507-2510, 1995

25. Teixeira C, Reed JC: Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving bcl-2 expression in human breast cancer cells Cancer Res 55: 3902-3907, 1995

26. Wang TY, Phang JM: Effect of estrogen on apoptotic pathway in human breast cancer cell lines MCF-7. Cancer Res 55: 2487-2489, 1995

서 지 정 보 양 식

수행기관 보고서번호	위탁기관 보고서 번호	표준보고서 번호	INIS 주제코드
KAERI/RR-1775/97			
제목 / 부제	유방암에서 bcl-2, p53유전자의 발현이 타목시펜에 의한 암세포의 아포토시스에 미치는 영향 및 호르몬 수용체와의 상관관계에 관한 연구		
연구책임자 및 부서명	노 우 철 (일반외과)		
연구자 및 부서명	함 용 호 (분자종양학 연구실)		
발행지	서울	발행기관	한국원자력연구소부설 원자력병원
발행일	1998.1		
페이지	30개	도 표	유(0), 무()
크 기	26cm		
참 고 사 항			
비 밀 여 부	공개(0), 대외비(), ____급 비밀	보고서 종류	연구보고서
연구위탁기관	과학기술처	계약 번호	없음
초록(300단어 내외)	<p>유방암에서 bcl-2, p53, ER 및 타목시펜에 의한 암세포의 아포토시스와의 관계를 밝히기 위하여 본 연구를 수행하였다. MCF-7 (ER+/bcl-2+/p53-)과 MB MDA 468 (ER-/bcl-2-/p53+)인 세포주를 에스트로젠을 제거한 상태에서 배양한 후 각각에 E2(10⁻⁸M), 타목시펜(10⁻⁸M)을 첨가하고 시간의 경과에 따른 bcl-2와 변이성 p53단백의 변화를 western blot를 이용하여 관찰하였으며, 각시점에서의 아포토시스를 유세포분석을 이용하여 측정하였다. MCF-7 세포주에서는 타목시펜 첨가에 bcl-2단백의 감소를 보였으며 변이성 p53의 변화는 관찰되지 않았다. 반면 MB MDA 468세포주에서는 bcl-2와 변이성 p53 단백질이 타목시펜이나 에스트로젠 첨가에 영향을 받지 않음을 보였다. MCF-7세포주에 타목시펜을 첨가하였을 경우 시간의 경과에 따라 아포토시스가 증가함을 보였다. 이상의 결과로 볼 때, ER+/bcl-2+/ p53-인 세포가 타목시펜 처리시에는 bcl-2-/p53-로 바뀌고 이는 bcl-2-/p53+인 세포에 비하여 아포토시스가 더욱 잘 일어나리라 생각된다. 위 결과는 임상적으로 관찰되는 ER과 bcl-2와의 연관성을 설명하는데 도움이 되리라 생각하며 bcl-2단백은 유방암의 호르몬 치료에 대한 반응을 예측하는 지표로서 중요한 가치가 있다고 보여져 이에 관한 지속적인 연구가 필요하리라 생각된다.</p>		
주제명 키워드 (10단어 내외)	유방암, 아포토시스, bcl-2, p53, 호르몬수용체, 타목시펜		

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET

Performing Org. Report No.	Sponsoring Org. Report No.	Standard Report No.	INIS Subject Code
KAERI/RR-1775/97			
Title/Subtitle	The role of the expression of bcl-2 and p53 gene in tamoxifen-induced apoptosis of breast cancer cells and its relationship with hormon receptor status.		
Project Manager and Dept.	Woo Chul Noh, M.D. (Dept. of General Surgery)		
Researcher and Dept.	Yong Ho Ham (Dept. of molecular oncology)		
Pub. Place	Seoul	Pub. Org.	KCCH, KAERI
			Pub. Date
			Jan, 1998
Page	30	Fig. Table	Yes(o), No()
			Size
			26cm
Note			
Classified	Open(o), Outside(), Class	Report Type	Research report
Sponsoring Org.	MOST	Contract No.	No
Abstract (About 300 Words)	To investigate the relationship of bcl-2, p53, ER and tamoxifen -induced apoptosis of breast cancer cells, MCF-7(ER+/bcl-2+/p53-) and MB MDA 468(ER-/bcl-2-/p53+) cell line were cultured in estrogen-free condition. E2(10 ⁻⁸ M) and tamoxifen(10 ⁻⁶ M) were added to the media. The changes of bcl-2 and mutant p53 protein were checked by Western blot and apoptosis were measured by flowcytometry. In MCF-7 cells, we found that treatment with tamoxifen resulted in a decrease in bcl-2 protein level, but produced no change in mutant p53. In MB MDA 468 cell however, there were no changes of bcl-2 and mutant p53 protein level when E2 or tamoxifen were added. Apoptotic cells increased with time-dependent pattern when tamoxifen was added to MCF-7 cells. According to these result, ER+/bcl-2+/mutant p53- cells, when treated with tamoxifen, were converted into bcl-2-/mutant p53- cells which were more prone to apoptosis than bcl-2-/mutant p53+ cells. The paradoxical correlation of bcl-2 and ER which had been observed in clinical studies might be explained with this results and bcl-2 protein seems to be one of important factors that can predict the effect of hormon therapy.		
Subject Keywords (About 10 Words)	Breast cancer, Apoptosis, bcl-2, p53, ER, Tamoxifen		

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 기관고유사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

유방암에서 bcl-2, p53유전자의 발현이 타목시펜에 의한 암세포의 아포토시스에 미치는 영향 및 호르몬 수용체와의 상관관계에 관한 연구

1997年 12月 日 印刷

1997年 12月 日 發行

發行人 김 성 년

發行處 韓國 原子力 研究所

大田廣域市 儒城區 德津洞 150

印刷所 東 和 社

믿는마음 지킨약속 다져가는 신뢰사회