

## 냉동절편을 이용한 돼지 자궁내 에스트로겐 수용체의 측정

한양대학교 자연과학대학 생물학과 · 한국에너지연구소 방사선응용연구실\*

윤용달 · 박철홍 · 이영근\*

### A Method for the Determination of Estrogen Receptor Level in Frozen Sections of Porcine Uterus

Yong-Dal Yoon, Chor-Hong Park and Young-Keun Lee\*

*Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University  
Radiation Application Department, Korea Advanced Energy Research Institute\**

#### = Abstract =

The present study was designed to develop a new method for the determination of estrogen receptor in porcine uterus using frozen sections. Cryostat sections were incubated with  $^3\text{H}$ -estradiol( $^3\text{H-E}_2$ ) in the presence or absence of diethylstilbestrol(DES) and the radioactivity of  $^3\text{H-E}_2$  bound to estrogen receptor(ER) was detected. The level of specific estrogen receptor was determined by Scatchard analysis. The highest ratio of specific binding against total binding was achieved in 3 sections(5mm $\times$ 5mm) which was corresponded to 100 $\mu\text{g/ml}$  protein concentration. Optimal binding was obtained during incubation with  $^3\text{H-E}_2$  for 30 minutes at 23 $^\circ\text{C}$  after treatment of sections with acetone for 20 seconds. Three time-washing of sections was proved to be appropriate for the removal of unbound  $^3\text{H-E}_2$ . 200-fold molar excess of DES was substituted for the binding of  $^3\text{H-E}_2$  to ER sufficiently(binding efficiency of 54.8%). ER was saturated with 4nM of  $^3\text{H-E}_2$  and its dissociation constant was 0.1nM. ER assay using frozen sections(Histological radioreceptor assay, HRRA) was significantly correlated with radioreceptor assay for estradiol(RRA,  $r=0.976$ ,  $p<0.05$ ). The present method has been proved a simple and reliable method for the preparation of small tissue samples, particularly for the specialized part of tissue, and for researches on reproductive physiology and pathology.

#### 서 론

Steroid hormone은 뇌하수체-시상하부-생식 기관으로 이어지는 내분비조절 축에 의해 분비되고 혈액을 통해 생식기관 및 그 부속기관으로 이동한 후 확산에 의해 세포내로 침투되며(Peck et al., 1973; Muller and Wotiz, 1979), 핵으로 이동한 다음 수용체와 결합하여 활성화된다. 활성화된 호르몬-수용체 복합체(hormone-receptor complex)는 핵내 염색질(chro-

본 연구는 1989년도 한국과학재단(KOSEF)의 일부 지원에 의한 것임.

matin)의 acceptor sites에 부착하여 리보핵산 합성, 단백질 합성 등 다양한 생물학적 반응을 유발시킨다(Jensen and Jacobsen, 1962; Gorski and Gannon, 1976; Anderson, 1984; Moudgil, 1987; Roy and Clark, 1987; Rories and Spelsberg, 1989). 그러므로 자궁을 포함한 표적기관 및 조직에 대한 steroid hormone수용체 수준의 측정은 steroid hormone이 표적조직이나 세포의 대사에 미치는 영향에 대한 분자적 수준에서의 이해를 위해 매우 중요한 의미를 갖는다. 또한 사람의 유방암, 전립선암 등의 암조직에서 에스트로겐 수용체(estrogen receptor;ER)의 변화가 조기진단의 기준으로 활발히 사용됨에 따

라 Estrogen Radioreceptor Assay(ERRA)의 중요성이 강조되고 있다(Lee, 1978; Ekman et al., 1979; McGuire, 1980; James, 1984; Sheridan et al., 1988). 그러나 ERRA 방법은 세포 및 조직학적 재료제작과 동시에 시행하기 어려우며 특히 작은 표본에 있어서는 측정에 한계가 있기 때문에 사람, 소, 토끼, 흰쥐 및 생쥐에서 비교적 큰 조직에만 적용되고 있다. 이러한 단점은 포유류를 비롯한 척추동물에 있어서 호르몬의 작용기작에 대한 이해를 어렵게 만들고 있다.

이러한 문제점을 해결하기 위하여 labelled ligand를 이용하여 ER의 조직학적 존재부위를 찾거나(histological localization; Walker et al., 1980), 또는 표식자-항체방법(ligand-antibody method; Nenci et al., 1980) 등이 시도되었으나 조직화학적 방법(histochemistry)과 생화학적 측정방법(biochemical assay)에 의한 결과 사이에 좋은 상관관계를 얻지 못했다(Panko et al., 1982; Penney and Hawkins, 1982). 즉, 형광을 부착시킨 스테로이드 표식자(Fluorescin-labelled steroid)로는 한정된 수의 결합부위를 확인하기 어려우며(Chamness et al., 1980; Dexenbichler et al., 1982), 낮은 결합 친화력(binding affinity), 수용액 상태에서의 불안정성과 같은 단점 때문에 결합부위가 효과적으로 정량되기 어렵다. 최근 ER에 대한 단일클론항체(monoclonal antibody)가 분리, 정제되고, 이를 이용한 ER의 정량방법 및 면역조직화학적 검출방법이 개발되어 여러 조직에 적용되고 있으나 체내에서 활성을 갖는 ER과의 결합여부가 아직 불분명한 상태이므로 실험단계에 이르지 못하는 못하고 있는 실정이다(King and Greene, 1984).

이러한 ER측정의 난점을 해결하기 위하여 조직학적 냉동절편에서 ER을 정량하는 방법이 개발되어야 한다. 즉 냉동절편에서 ER측정은 작은 재료 및 특정부위만을 재료로 시행될 수 있고 수용액 상태에 있어서 불안정한 수용체에 대한 연구도 가능하며, 조직학적인 판정도 아울러 시행될 수 있기 때문에 기존의 방법에 있어서의 한계성을 극복할 수 있다는 장점을 가질 것으로 판단된다. 따라서 본 연구도 실험동물로 많이 사용되고 있는 돼지 및 흰쥐의 자궁을 재료로 냉동절편을 이용한 ER측정법을 개발하기 위해 반응 및 결합효율 등의 조건을 최적화하고 이 방법을 정립한 후 기존의 ERRA와의 상관관계를 알아보기 위해 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

미성숙인 돼지의 자궁부위를 도축장(서울 마장동, 우성농역 주식회사)에서 도살 직후 적출하여 얼음상자(0°C)에 넣은 다음 30분 이내에 실험실로 운반하였다. 조직은 0.154M 생리식염수(4°C)로 세척 후 일정한 크기로 잘라 즉시 급냉(liquid nitrogen)시켜 사용전까지 냉동보존(deep freezer, -70°C)하였다. 흰쥐는 대한 실험동물 기기센터에서 분양받은 생후 8주된 Sprague-Dawley 계를 사용하였으며 얼음상자에서 난소 및 자궁부위를 적출하여 지방을 제거한 후 사용하였다.

### 2. 시약 및 완충용액

본 실험에서는 완충용액으로 TEGD buffer 즉; 10mM Tris-HCl(Sigma), 1.5mM EDTA(Sigma), 10% (W/V) glycerol(Merck), 그리고 1.5mM dithiothreitol(Sigma)의 조성으로 1N HCl을 사용하여 pH를 7.4로 적정하여 사용하였다.

Labelled ligand로 <sup>3</sup>H-estradiol(sp. act. 169 Ci/mmol, New England Nuclear, NEN)를 사용하였고, competitive inhibitor로 17 $\beta$ -estradiol과 diethylstilbestrol(DES)를, cross reactivity 측정을 위한 steroid hormone으로 progesterone(P<sub>4</sub>), testosterone(T), dihydrotestosterone(DHT), cortisol, corticosterone, estrone(E<sub>1</sub>), 그리고 estriol(E<sub>3</sub>)을 사용하였다.

Scintillation fluid는 toluene(Mallinkrodt) 500 ml, Triton X-100(Shinhyo Pure Chemical) 250 ml에 3.75g의 POP(Sigma)와 0.047g의 POPOP(Sigma)를 용해시켜 제조하였다.

### 3. 실험 방법

#### 1. 냉동절편내 수용체 수의 측정

조직절편을 cryostat(Amercian Optical, Model 975C) 안에서 5mm×5mm의 크기로 trimming한 다음 8 $\mu$ m의 두께로 lumen에 평행하게 잘라 1, 2, 3, 4, 5개 그리고 40 $\mu$ m의 두께로 1개를 각각 cover glass에 부착시킨 후 상온에서 10분 동안 건조시켰다. 조직내 endogenous steroid를 제거하기 위하여 100 $\mu$ l의 acetone(Merck)을 cover glass위에 떨어뜨려 20초 동안 반응시킨 후 기울여 따른 다음 즉시 evaporation시켰다.

Labelled ligand solution의 농도를 4nM로 하고 competitive inhibitor로서 200배의 DES를 사용하여 23°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 냉장완충용액을 담은 Pasteur pipette으로 세번 씻어낸 다음 완충용액이 담긴 glass jar(Columbia type, Arther Thomas)에 넣어 10분씩 3번 씻어냈다.

Washing을 마친 cover glass는 10ml의 scintillation fluid가 담긴 scintillation vial(20ml capacity, Wheaton)에 넣어 30초간 충분히 vortex-mixing한 다음 30분-1시간 동안 방치한 후 액체섬광계수기(Tri-Carb Scintillation Spectrometer, Model 4530, counting efficiency;54%)로 측정하였다. 단백질 정량은 bovine serum albumin (BSA, Sigma)를 표준용액으로 Lowry등(1951)의 방법을 따라 시행하였다. 단백질 정량을 위해 glass tube(13×200mm)에 조직절편을 넣은 후 1N sodium hydroxide(NaOH)용액 1ml을 넣어 50°C incubator에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 상온에서 mixed stock reagent 1ml을 각각 tube에 넣고 15분간 반응시켰으며 Folin-Ciocalteu's reagent를 각각 3ml씩 넣고 vortex-mixing한 후 45분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 용액의 흡광도를 540nm의 파장에서 UV-VIS Spectrophotometer(Shimadzu, Model UV 150-02)로 측정했다.

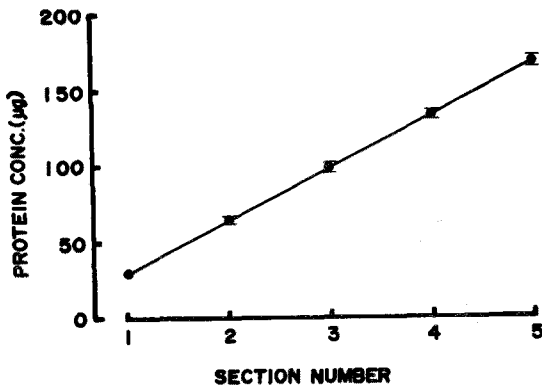


Fig. 1. Relationship between the number of frozen section and protein concentration in porcine uterus. The correlation coefficient of linear regression is 0.99( $p < 0.001$ ). The equation of the line of regression is  $y = 30.6x + 2.07$  and the vertical bars represent the standard error of mean (SEM).

## 2. Estrogen Radioreceptor Assay에 의한 동일조직의 estrogen receptor 수준의 측정

적출한 조직을 0.5g당 1ml의 완충용액을 넣고 homogenizer(Teflon-coated type, Wheaton)를 사용하여 얼음상자(4°C)속에서 30초 간격으로 15초씩 3회 균질화한 다음 1,500×g로 4°C에서 10분간 원심분리(Refrigerated centrifuge, Heraeus Christ)하였다. 이때 상등액을 다시 105,000×g로 1시간 동안 원심분리(Ultra-centrifuge, Beckman)하여 cytosolic receptor를 얻었다.

Cytosol내 receptor수준을 측정하기 위하여 cytosol fraction 200µl(1-2mg/ml protein)에 100µl의  $^3\text{H-E}_2$ (1-8nM)을 넣고 4°C에서 18시간 동안 반응시켰으며 nonspecific binding을 측정하기 위하여 200배의 DES가 첨가된 용액과 반응시켰다. 반응이 끝난 후 유리형과 결합형을 분리하기 위하여 Dextran-coated charcoal(DCC, 0.075g, Sigma; activated charcoal, 0.75g, Sigma)용액 300µl를 넣고 4°C에서 15분간 반응시킨 후 원심분리기에서 1,500×g로 5분간 원심분리하여 상등액을 scintillation vial에 넣어 결합형의 방사능을 측정하였다.

수용체의 정량을 위하여 액체섬광계수기에 의해 측정된 결과를 Scatchard analysis(1949)의 방법에 따라 Receptor Analysis Programme

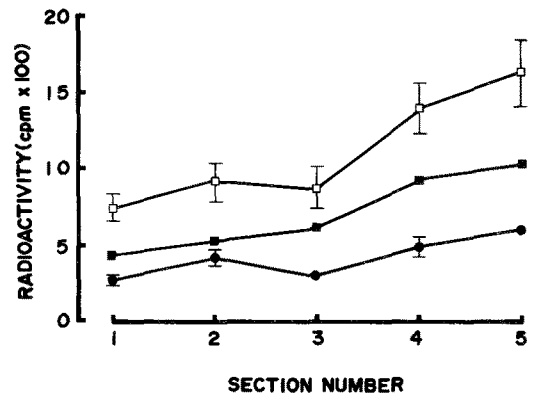


Fig. 2. Influence of protein concentration on  $^3\text{H}$ -estradiol binding to frozen sections of porcine uterus. Sections were incubated with 4nM  $^3\text{H-E}_2 \pm 800\text{nM}$  DES in triplicate for 2 hours at 4°C. After washing three times with buffer, the section-bound radioactivity was determined. □-□, Total binding(TB); ■-■, Specific binding(SB); ●-●, Nonspecific binding(NSB). The vertical bars indicate the SEM.

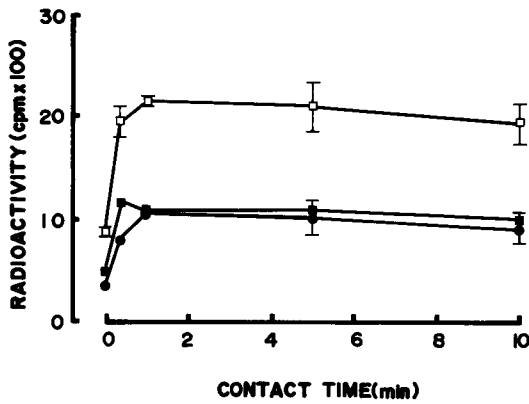


Fig. 3. Effect of acetone treatment on removal of endogeneous steroids for the reduction of non-specific binding. Sections were treated with acetone for varying time (20 seconds to 10 minutes) and then incubated with  $^3\text{H-E}_2 \pm \text{DES}$ .  $\square$ — $\square$ , Total binding (TB);  $\blacksquare$ — $\blacksquare$ , Specific binding (SB);  $\bullet$ — $\bullet$ , Nonspecific binding (NSB). The vertical bars indicate the SEM.

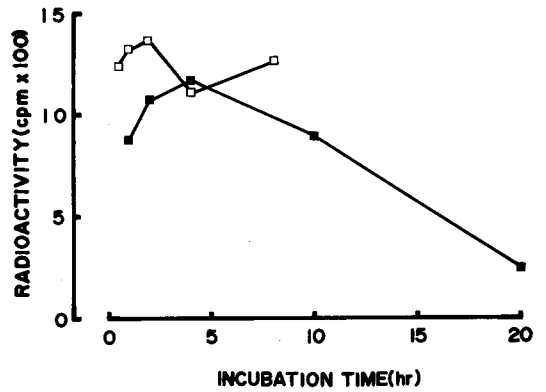


Fig. 4. Effect of incubation temperature on  $^3\text{H}$ -estradiol binding to frozen sections of porcine uterus. The uterine sections were incubated with  $4\text{nM } ^3\text{H-E}_2 \pm 800\text{nM DES}$  at  $4^\circ\text{C}$  (1 to 20 hours) and  $23^\circ\text{C}$  (30 minutes to 8 hours). Specific bindings after incubation at  $4^\circ\text{C}$  ( $\blacksquare$ — $\blacksquare$ ) or  $23^\circ\text{C}$  ( $\square$ — $\square$ ) were given as difference between TB and NSB.

(Combiccept 2000CA, Packard Instrument)를 사용하여 수행하였다.

본 실험에 있어 모든 결과는 Student's t test로 통계처리하였으며  $p < 0.05$ 인 경우를 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

### 1. 적정절편 수의 결정

돼지의 자궁을 cryostat section에 의해 냉동절편 (조직크기  $5 \times 5\text{mm}$ ,  $8\mu\text{m}$ )을 만들어 cover glass에 올리고 각 절편 수에 따른 단백질의 양을 정량하여 절편 수와 단백질량과의 상관관계를 구하여 Fig. 1에 나타내었다. 절편당 단백질 농도는  $32\mu\text{g}/\text{section}$ 이었으며 5절편까지 비례하여 증가 하였다 ( $p < 0.001$ ).

단백질량에 따른 binding의 정도를 1-5절편 ( $30$ - $150\mu\text{g}/\text{section protein}$ )의 구간으로 조사한 결과 절편 수가 증가함에 따라 total binding (TB) 및 specific binding (SB), 그리고 non-specific binding (NSB)이 증가하는 경향을 보였다 ( $p < 0.1$ , Fig. 2).

절편두께에 따른 binding의 영향을 알아보기 위해  $8\mu\text{m}$ 두께의 5절편과 동일한 단백질량을 가진  $40\mu\text{m}$ 두께 1절편을 가지고 실험한 결과 TB ( $1400 \pm 43\text{cpm}$ , Mean  $\pm$  SEM) 및 SB ( $698 \pm 58\text{cpm}$ )에 있어 큰 차이가 없었다.

### 2. Acetone처리효과 및 적정시간 측정

Incubation하기 전에 수용체 측정에 저해요인이 되는 조직내 endogenous steroids에 대한 acetone의 추출효율 및 적정 접촉시간을 측정하기 위하여 3개의 조직절편이 부착된 cover glass를 일정시간 동안 건조시킨 다음  $100\mu\text{l}$ 의 acetone에 20초, 1분, 5분, 10분간 반응시켰다. Acetone을 처리하지 않은 군에 비해 처리군에서는 처리 후 1분까지 TB 및 SB가 증가하였으며 10분까지 일정한 수준을 유지하였다 (Fig. 3). SB에 대한 TB의 비율 (SB/TB, binding efficiency)은 20초에서 0.59로서 가장 높았다.

### 3. Incubation의 적정온도 및 시간결정

Incubation의 과정에 있어 온도와 반응시간이 binding에 대하여 미치는 영향을 측정하기 위하여 acetone에 20초 이상 처리 후  $4^\circ\text{C}$ ,  $23^\circ\text{C}$ 에서 각각 20시간까지 처리하였다 (Fig. 4).  $4^\circ\text{C}$ 군에서 4시간까지 TB가  $1585 \pm 36\text{cpm}$ 에서  $2109 \pm 13\text{cpm}$ 으로 증가하였으나 ( $p < 0.05$ ) 그 이후에서는  $973 \pm 54\text{cpm}$ 으로 감소하는 경향을 보였으며 ( $p < 0.1$ ), SB는 역시 4시간까지 증가하는 양상을 보였고 ( $p < 0.1$ ), 4시간 이후에서 20시간까지는 감소하였다 ( $p < 0.025$ ).  $23^\circ\text{C}$ 군에서는 SB가 2시간까지 증가하는 경향을 보였으며 SB/TB는 0.62로 가장 높게 나타났다. 그리

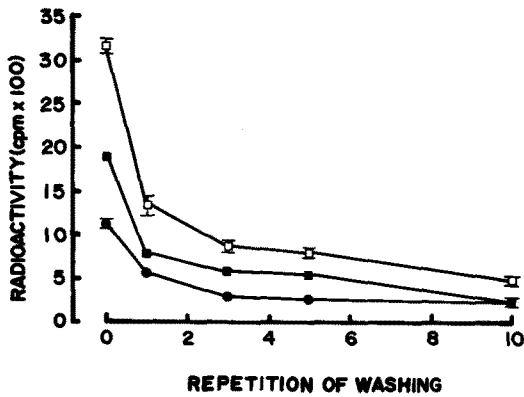


Fig. 5. Effect of washing on  $^3\text{H}$ -estradiol binding to frozen sections of porcine uterus. Sections of porcine uterus were overlaid with  $4\text{nM } ^3\text{H-E}_2 \pm 800\text{nM DES}$  in triplicate. After incubation ( $23^\circ\text{C}$ , 30mins), section-bound radioactivity was determined.  $\square-\square$ , Total binding (TB),  $\blacksquare-\blacksquare$ , Specific binding (SB); and  $\bullet-\bullet$ , Nonspecific binding (NSB). The vertical bars indicate the SEM.

고 10시간 이후에서는 감소하는 양상을 보였다 (Fig. 4).

#### 4. 세척횟수 결정

적정 washing condition을 설정하기 위하여  $23^\circ\text{C}$ 에서 30분 동안 incubation한 후 Pasteur pipette으로 3번 씻은 group, 그리고 glass jar에 1, 3, 5 그리고 10번 dipping한 group들을 scintillation fluid가 담긴 scintillation vial에 넣어 액체섬광계수기로 측정하였다. Incubation후 완충용액으로 잔여 반응용액을 세척한 결과, 1회 세척한 군에서 binding이 3152cpm에서 1337 cpm으로 유의한 감소를 보였으나 ( $p < 0.05$ ), 3회 이후에는 일정한 수준을 유지하였다 (Fig. 5).

#### 5. Competitive inhibitor로서 Diethylstilbestrol의 효과 및 적정농도

Nonspecific binding의 정도를 알아봄으로써 적합한 competitive ligand와 그 농도를 결정하기 위해서 competitive ligand로서  $17\beta\text{-E}_2$  또는 DES를 각각 100배, 200배, 500배, 1,000배 그리고 10,000배의 농도로 처리하여 incubation시켰다. Competitive ligand로서 DES를 사용한 경우  $17\beta\text{-E}_2$ 에 비해 NSB가 상대적으로 낮은 양상을 보였다 ( $p < 0.01$ ). DES를 10,000배까지 처리하였을 때 100배 이상의 농도군에서 DES를 처리하지 않은 군에 비해 NSB가 크게 감소하

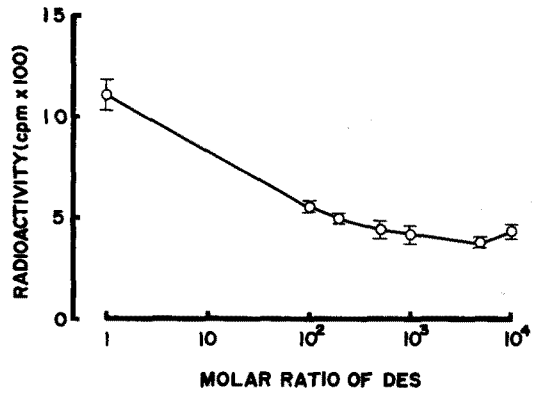


Fig. 6. Effect of the molar ratio of diethylstilbestrol on nonspecific binding of  $^3\text{H}$ -estradiol to frozen sections of porcine uterus. Sections on cover glass were incubated with  $4\text{nM } ^3\text{H-E}_2 \pm \text{DES}$  (100-, 200-, 500-, 1,000-, 5,000-, and 10,000-fold excess). The bindings of  $^3\text{H-E}_2$  to the sections are plotted as the molar ratio of DES indicated on the  $x$  axis. The vertical bars represent the SEM.

Table 1. Ligand specificity of  $^3\text{H}$ -estradiol binding to frozen sections of porcine uterus

Competitive Ligand (200-fold molar excess)	Section Bound (fmol/mg protein)	Residual Specific Bound (%)
None	$204 \pm 4$	100
Estrone	$43 \pm 1.2$	12
Estradiol	$21 \pm 0.2$	0
Diethylstilbestrol	$20 \pm 1$	0
Estriol	$32 \pm 0.5$	5
Testosterone	$206 \pm 18$	100
Dihydrotestosterone	$201 \pm 8$	98
Progesterone	$183 \pm 11$	90
Cortisol	$194 \pm 15$	95
Corticosterone	$190 \pm 13$	93

Serial sections of porcine uterus ( $100\mu\text{g}$  tissue protein per coverglass) were incubated (20hr,  $4^\circ\text{C}$ ) in triplicate with  $100\mu\text{l}$  buffer containing  $4\text{nM } ^3\text{H-E}_2$  alone or with 200-fold excess of radioinert ligand. Results are represented as Mean  $\pm$  SEM.

였으며 ( $p < 0.05$ ) 그 이상의 농도에서는 차이가 없었다 ( $p < 0.1$ , Fig. 6).

#### 6. Ligand specificity의 측정

Estrogen receptor의 ligand specificity를 측정하기 위하여 조직표본을  $^3\text{H-E}_2$ 용액과 200배의

17 $\beta$ -E<sub>2</sub>, DES, T, DHT, E<sub>1</sub>, E<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>, cortisol 그리고 corticosterone 용액에 각각 반응시켜 상대적 결합량을 구하였다. 조직표본에 있어 ER에 대한 <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub>의 binding은 E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub> 그리고 DES에 의해서만 치환되었고 다른 steroid hormone에 의해서는 치환되지 않았다(Table 1).

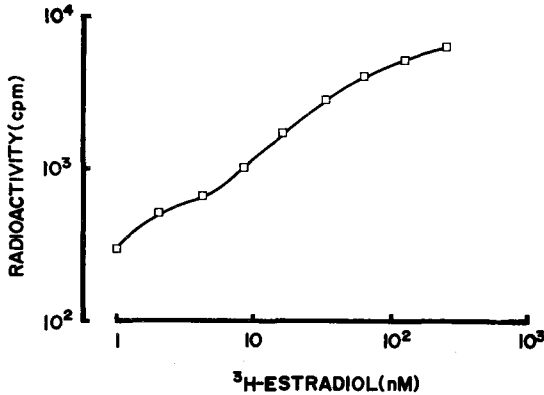


Fig. 7. Saturation kinetics of <sup>3</sup>H-estradiol binding to estrogen receptors in frozen sections of porcine uterus. Three sections(5mm×5mm;100 $\mu$ g/ml protein) were incubated with 100 $\mu$ l of <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub>(0.25 to 256nM range)  $\pm$ 200-fold excess of DES (50nM to 51.2 $\mu$ M). After incubation for 30minutes at 23 $^{\circ}$ C, cover glasses were washed three times with buffer and the bound radioactivities were determined. Results are represented as Mean  $\pm$  SEM.

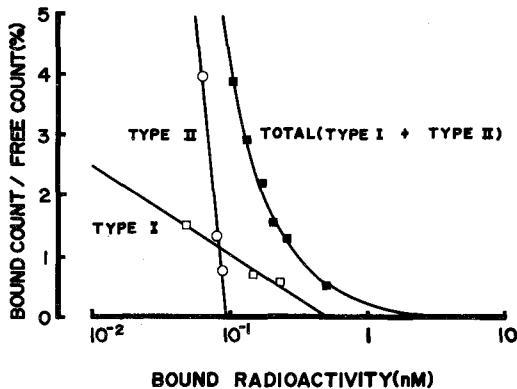


Fig. 8. Scatchard analysis of <sup>3</sup>H-estradiol binding to frozen sections of porcine uterus. Six levels of the bindings(0.5, 2, 8, 32, and 128nM) were presented on this figure. The section-bound radioactivity and the free count were calculated from the total count of each level. The percent values of bound count over free count were plotted against the bound radioactivity. Two lines with different dissociation constant appeared by Scatchard analysis.

## 7. Estrogen receptor의 saturation kinetics

조직 100 $\mu$ g protein에 있어 4nM <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub>에서 saturation을 보였으며 16nM이상에서는 다시 binding이 증가하였다(Fig. 7). 이를 Scatchard analysis한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. Type I 수용체(Kd=0.09nM)의 수준은 196fmol/mg protein이었고 type II 수용체(Kd=0.6nM)는 1.1fmol/mg protein의 수준이었다. 전체 수용체 수준은 1.3fmol/mg protein을 보였으며 이를 결정하는 선은 hyperbolic 형태를 보였다.

## 8. Estrogen Radioreceptor Assay에 의한 동일 조직에서의 ER수준의 측정

냉동절편에서의 ER 측정법과 ERRA 결과를 비교하여 Table 2에 요약하였다. 돼지 자궁 및 흰쥐의 자궁과 난소에서 냉동절편을 이용한 ER 측정 결과는 196, 275 그리고 482fmol/mg protein으로 cytosol내 ERRA 결과인 127, 151, 그리고 289fmol/mg protein에 비하여 높은 수준을 보였다. 또한 돼지 자궁조직은 흰쥐의 자궁 및 난소에 비하여 낮은 ER수준을 보였다.

## 고찰

냉동절편을 이용한 ER의 측정에 있어 돼지 자궁을 재료로 사용한 경우 5mm×5mm의 크기로 trimming한 조직은 8 $\mu$ m 두께로 cover glass당 3-5절편(100-200 $\mu$ g protein)이 정량에 적합한 것으로 나타났다. 이는 기존의 ERRA에 비해

Table 2. Comparison of the estrogen receptor levels determined by biochemical method with those in frozen sections of rat ovary and uterus, and porcine uterus

Tissue	Frozen Sections		Cytosol	
	Binding Sites (fmol/mg protein)	Kd (nM)	Binding Sites (fmol/mg protein)	Kd (nM)
Porcine Uterus	196	0.09	127.0	0.10
Rat Uterus	275	0.14	151.0	0.13
Rat Ovary	482	0.40	289.0	0.36

Serial frozen sections of porcine and rat uterus were incubated in duplicate with 0.5 to 8nM <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub> and with 200-fold excess of radioinert ligand (DES).

1/1000정도의 양이므로 극소량의 조직이나 세포군의 정량에도 적합한 것으로 사료된다. 즉 특이한 분화조직이나 발생기관에서의 ER 측정도 가능하다고 생각된다.

ERRA의 경우 조직내 endogenous steroids를 제거하기 위하여 incubation과정 전에 DCC와 반응시켰는데, 예비 실험 결과 DCC가 절편의 표면에 흡착되는 단점때문에 사용이 불가능하였다. 본 실험에서 acetone을 사용하여 제거할 수 있는지의 여부를 알아보았다. 조직을 acetone에 20초 정도 처리시키는 것으로 충분히 endogenous steroids를 제거할 수 있었다.

돼지자궁을 재료로 한 냉동절편에서의 ER 측정은 23°C의 온도에서 가장 높은 결합효율을 나타냈다. 이는 ERRA방법에 있어 동일 온도 조건에서의 반응시간인 2-4시간 보다 훨씬 짧은 기간이며 De Goeij(1984)등이 보고한 rat 및 calf의 경우(2시간)보다 더욱 빠른 시간에 수용체가 측정될 수 있음을 보였다. 잔여 반응 용액을 3회 이상 buffer로 세척한 경우 절편에 있어 binding이 더 이상 감소하지 않고 일정한 것으로 보아 3번 정도 반복 세척하면 충분한 것으로 판단된다.

Nonspecific binding의 결정을 위하여 DES의 영향을 살펴볼 때 100-10,000배의 농도에서 SB가 더 이상 증가하지 않는 것으로 보아 HERRA에서도 200배 농도에서  $^3\text{H-E}_2$ 의 결합이 충분히 치환되는 것으로 사료된다. 조직표본에 대한 ligand specificity의 측정에서 estrogen에 의해서만  $^3\text{H-E}_2$ 의 특이결합이 치환됨에 따라 이 방법에서의 ER정량이 estrogen에 특이성을 갖는 수용체만 정량됨을 알 수 있었다. 돼지자궁을 재료로 한 냉동절편에서의 ER의 saturation kinetics는 4nM  $^3\text{H-E}_2$ 농도에서 포화상태를 보였으나 그 이상의 구간에서는 다시 binding이 증가하여 256nM 구간까지 sigmoid curve를 그리고 복합곡선(complex curve)을 보였다. 이는 두개의 서로 다른 유형의 결합부위, 즉 high affinity, low capacity를 갖는 type I 결합부위와 low affinity, high capacity를 갖는 type II 결합부위를 가진 수용체가 heterogenous하게 존재한다는 증거를 나타내는 것으로 최근 Lubahn(1985)등이 돼지자궁내 ER의 전기영동 분석결과 보고한 ER의 heterogeneity에 대한 암시를 확증하는 결과로 사료된다. 또한 각 type의 결합부위가  $^3\text{H-E}_2$ 의 농도구간을 달리함으로써 Scatchard analysis에 의해 따로 정량될

수 있으며 각 type에 의한 binding을 vectorial summation함으로써 total receptor의 수준을 측정할 수 있을 것으로 사료된다(Notboom and Gorski, 1965; Toft and Gorski, 1966; O'Malley and Means, 1974; Clark and Markaverich, 1982; Rories and Spelsberg, 1989).

돼지의 자궁과 rat의 난소 및 자궁을 재료로 하여 실험한 결과를 살펴볼 때, 냉동절편에서의 ER 측정 결과와 ERRA방법에 의한 결과 사이에 유의한 상관관계( $r=0.976$ )를 보이며 두 실험에 있어 수용체의 해리상수(Kd value)가 거의 일치하는 것으로 살펴볼 때, 이는 냉동절편에서의 ER 측정이 ERRA와 동일한 유형의 수용체를 검출함을 알 수 있다. 또한 각 실험 재료의 측정결과를 비교해 보면 냉동절편에서의 ER 측정법이 ERRA보다 높은 결합 부위를 나타냈다. 이는 아마도 ERRA의 경우 시료준비과정(homogenization and centrifugation)도중 핵내 수용체의 제거 또는 수용체의 붕괴 및 손실에 의한 영향 때문일 것으로 사료된다.

이러한 점들을 고려해 볼때, 돼지자궁 조직을 재료로 사용한 냉동절편에서의 ER 측정법은 정립되었다고 보며, 따라서 여러 steroid hormone수용체를 측정함으로써 그 작용기작을 규명할 수 있고 특정종양의 진단 및 치료에 매우 유용한 방법이 될 것으로 여겨진다.

## 참 고 문 헌

- Anderson, J.N.: *The effect of steroid hormones on gene transcription. In: Biological Regulation and Development. Eds. R.F. Goldberger, K.R. Yamamoto, Plenum, New York pp. 169-212, 1984.*
- Chamness, G.C., Mercer, W.D. and McGuire, W. L.: *Are histochemical methods for estrogen receptor valid? J. Histochem. Cytochem. 28:792-798, 1980.*
- Clark, J.H. and Markaverich, B.M.: *Heterogeneity of estrogen binding sites in the cytosol of the rat uterus. J. Biol. Chem. 253:2630-2634, 1982.*
- De Goeij, A.F.P.M., Vollenberg, M.P.W., Hondius, G.G. and Bosman F.T.: *Radiochemical determination of estrogen receptors in cryostat sections of target tissues. J. Steroid Biochem. 21(2): 127-134, 1984.*
- Dexenbichler, G., Weiss, P. and Piegger, R.: *Criti-*

- cal evaluation of histochemical "receptor" assays. In: XI International Congress on Clinical Chemistry (Kaiser, E., Gabl, F., Muller, M. and Bayer, M., editors), W. DeGruyter, Berlin. pp. 473-479, 1982.
- Ekman, P., Snochowski, M., Zetterberg A., Hogberg, B. and Gustafsson, J.: Steroid receptor content in human prostatic carcinoma and response to endocrine therapy. *Cancer* 44: 1173-1181, 1979.
- Gorski, J. and Gannon, F.: Current models of steroid hormone action: A critique. *Ann. Rev. Biochem.* 28: 425-450, 1976.
- James, L.W.: Steroid-hormone receptors in breast cancer. *Cancer* 53: 630-643, 1984.
- Jensen, E.V. and Jacobsen, H.I.: Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Rec. Prog. Horm. Res.* 18: 387-414, 1962.
- King, W.J. and Greene, G.L.: Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 307(23): 745-747, 1984.
- Lee, S.H.: Cytochemical study of estrogen receptor in human mammary cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 70: 197-203, 1978.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- Lubahn, D.B., McCarty, K.S. Jr. and McCarty, K. S. Sr.: Electrophoretic characterization of purified bovine, porcine, murine, rat, and human uterine estrogen receptors. *Endocrinology* 260(4): 2515-2526, 1985.
- McGuire, W.I.: Steroid hormone receptors in breast cancer treatment strategy. *Rec. Prog. Horm. Res.* 36: 135-156, 1980.
- Moudgil, V.K., ed.: *Recent Advances in Steroid Hormone Action.* de Gruyter, New York, pp. 522, 1987.
- Muller, R.E. and Wotiz, H.H.: Kinetics of estradiol entry into uterine cells. *Endocrinology* 105: 1107-1114, 1979.
- Nenci, I., Dandliker, W.B., Meyers, C.Y., Marchetti, E., Marzola, A. and Fabris, G.: Estrogen receptor cytochemistry by fluorescent estrogen. *J. Histochem. Cytochem.* 28: 1081-1094, 1980.
- Noteboom, W.D. and Gorski, J.: Stereospecific binding of estrogens in the rat uterus. *Arch. Biochem. Biophys.* 111: 559-568, 1965.
- O'Mally, B.W. and Means, A.R.: Female steroid hormones and target cell nuclei. *Science* 183(125): 610-620, 1974.
- Panko, W.B., Mattioli, C.A. and Wheeler, T.N.: Lack of Correlation of a histochemical method for estrogen receptor analysis with the biochemical assay results. *Cancer* 49: 2148-2152, 1982.
- Peck, E.J. Jr., Burgner, J. and Clark, J.H.: Estrophillic binding sites of the uterus; Relation to uptake and retention of estradiol in vitro. *Biochemistry* 12: 4596-4603, 1973.
- Penney, G.C. and Hawkins, R.A.: Histochemical detection of oestrogen receptors: A progress report. *Br. J. Cancer* 45: 237-246, 1982.
- Rories, C. and Spelsberg, T.C.: Ovarian Steroid Action on Gene Expression: Mechanisms and Models. *Ann. Rev. Physiol.*, 51: 653-681, 1989.
- Roy, A.K. and Clark, J.H.: *Gene Regulation by Steroid Hormones III.* Springer-Verlag, New York, pp. 302, 1987.
- Scatchard, G.: The attraction of protein for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51: 660-672, 1949.
- Sheridan, P., Blum, K. and Trachtenberg, M.C.: *Steroid Receptors and Disease; Cancer, Autoimmune and Circulatory Disorders,* Dekker, New York, pp. 228, 1988.
- Toft, D. and Gorski, J.: A receptor molecule for estrogens: Isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55: 1474-1481, 1966.
- Walker, R.A., Cove, D.H. and Howell, A.: Histological detection of oestrogen receptor in human breast carcinomas. *The Lancet*(i): 171-173, 1980.