คุณสมบัติบางประการของโปรเจสเตอโรนและอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ในไซโตซอลเนื้องอกเต้านม

นางสาวอนงค์ เทพสุวรรณ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2525

ISBN 974 - 561 - 397 - 5

007607

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SOME PROPERTIES OF CYTOSOLIC PROGESTERONE AND ESTROGEN RECEPTORS IN HUMAN BREAST TUMOR

Miss Anong Tapsuwan

A Thesis Submitted in Partial fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1982

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	Some Properties of Cytosolic Progesterone and Estrogen Receptors in Human Breast Tumor
By	Miss Anong Tapsuwan
Department	Biochemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in partial fulfillment of the requirements for Master's degree.

S. Bunnag ..... Dean of Graduate School

(Associate Professor Supradit Bunnag, Ph.D.)

Thesis Committee

S. Subptosok ..... Chairman

(Assistant Professor Sansern Subptosok)

Jariya Boonjawat ..... Member

(Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.)

Peerada Sirijintakarn ..... Member

(Dr. Peerada Sirijintakarn)

Nikom Chaisiri ..... Member

(Dr. Nikom Chaisiri)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	คุณสมบัติบางประการของโปรเจสเตอโรนและอีสโตรเจนรีเซพ-เตอร์ในไซโตซอลเนื้องอกเต้านม
ชื่อนิสิต	นางสาวอนงค์ เทพสุวรรณ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.จริยา บุญญวัฒน์
ภาควิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2524

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ในการศึกษาโปรเจสเตอโรนรีเซพเตอร์ในตัวอย่างเนื้องอกเต้านม 120 ราย จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลและสถาบันมะเร็งรวม 7 แห่ง ในกรุงเทพ-มหานคร โดยวิธีการปั่นแยกด้วยผงถ่าน พบว่าตัวอย่างเนื้อเยื่อ 95 ราย (79%) มีโปรเจสเตอโรนรีเซพเตอร์โดยปริมาณเฉลี่ย 335.2 ± 32.0 เฟมโตโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน และค่าสัมประสิทธิ์ของการแยกตัว (Kd) 8.58 ±0.58 นาโนโมลต่อลิตร เมื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างการพบโปรเจสเตอโรนรีเซพเตอร์กับอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ในผู้ป่วยกลุ่มเดียวกันนี้พบว่า ผู้ป่วยที่มีอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ 80 ราย (66.1%) ของตัวอย่างทั้งหมด จะตรวจพบโปรเจสเตอโรนรีเซพเตอร์อยู่ด้วยถึง 64 ราย (80% ของผู้ป่วยที่มีอีสโตรเจนรีเซพเตอร์) ตัวอย่างที่ไม่พบรีเซพเตอร์ใดเลยมีเพียง 9 ราย (7.5%) สรุปได้ว่าเนื้องอกเต้านมในหญิงไทยมีโอกาสสูงที่จะเป็นชนิดที่ขึ้นกับอิทธิพลของสเตอรอยด์ฮอร์โมนประมาณ 50%

ในการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นเนื้องอกชนิดร้ายแรง 84 ราย ซึ่งพบ Infiltrating ductal carcinoma (IDC) มากที่สุด กับกลุ่มผู้ป่วยชนิดเนื้องอกธรรมดา 29 ราย พบว่าปริมาณอีสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนรีเซพเตอร์ใน

กลุ่มเนื้องอกธรรมดา และกลุ่มเนื้องอกชนิดร้ายแรงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่ค่าสัมประสิทธิ์ของการแตกตัวของโปรเจสเตอโรนรีเซพเตอร์ชนิดในกลุ่มเนื้องอกธรรมดาและกลุ่มเนื้องอกร้ายแรงมี affinity ต่ำกว่าอีสโตรเจนรีเซพเตอร์อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.005$) การกระจายของรีเซพเตอร์ทั้งสองชนิดในผู้ป่วยช่วงอายุต่าง ๆ มีลักษณะของการกระจายเหมือนกัน คือผู้ป่วยในช่วงอายุมากกว่า 50 ปีขึ้นไป จะมีแนวโน้มที่จะตรวจพบรีเซพเตอร์ได้มากกว่าพวกที่มีอายุต่ำกว่า 40 ปีลงมา

เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ สัมประสิทธิ์การตกตะกอนของรีเซพ-เตอร์ โดยการปั่นในซูโครสเกรเดียนท์เทียบกับโปรตีนมาตรฐานเพื่อหาขนาดโมเลกุล พบว่าอีสโตรเจนรีเซพเตอร์แสดงสัมประสิทธิ์การตกตะกอน 2 ขนาด คือ ประมาณ 8 – 9S และ 4S ส่วนโปรเจสเตอโรนรีเซพเตอร์แสดงสัมประสิทธิ์การตกตะกอนเพียงค่าเดียวคือประมาณ 4S และพบในปริมาณน้อยกว่าและมีความจำเพาะต่ำกว่าอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ตรวจพบปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์สูงจะแสดงความจำเพาะในการจับตัวของรีเซพเตอร์สูงด้วย

อีสโตรเจนรีเซพเตอร์แสดงความจำเพาะในการจับตัวกับอีสตราไดออลสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสเตอรอยด์ฮอร์โมนอื่น ๆ ได้แก่ เทสโทสเตอโรน, คอร์ติโคส-เตอโรน และโปรเจสเตอโรน ตรวจวัดโดยวิธีแย่งจับตัวกับอีสตราไดออลที่ติดฉลากรังสีสำหรับสารที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับอีสตราไดออล ได้แก่ ไดเอทิลสติลเบสตรอล (DES) และทามอกซิเฟน (TAM) ซึ่งใช้เป็นยารักษามะเร็งเต้านมอยู่ในปัจจุบัน เมื่อนำมาทดลองแย่งจับตัวกับอีสตราไดออลติดฉลากรังสีใน 4 ตัวอย่าง ปรากฏว่า DES มีความสามารถในการแย่งจับตัวกับอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ได้ใกล้เคียงกับอีสตราไดออล แต่ใน 4 ตัวอย่างที่ศึกษานี้ TAM ไม่สามารถแย่งจับตัวกับอีสโตรเจนรีเซพเตอร์อย่างมีนัยสำคัญ

การศึกษาความจำเพาะในการจับตัวของโปรเจสเตอโรนรีเซพเตอร์ในทำนองเดียวกัน พบว่าสเตอรอยด์ฮอร์โมนอื่น ๆ ได้แก่ อีสตราไดออล เทสโทสเตอโรน

คอร์ติโคสเตอโรน ตลอดจนสารต้านอีสโตรเจน คือ DES และ TAM ไม่สามารถแย่งจับตัวกับโปรเจสเตอโรนติดฉลากรังสีได้เว้นแต่ ORG 2058 ซึ่งเป็นสารโปรเจสเตอโรนสังเคราะห์เองที่แสดงความสามารถในการแย่งจับตัวกับโปรเจสเตอโรนรีเซพเตอร์ได้ดีกว่าโปรเจสเตอโรนไม่ติดฉลากอย่างเห็นได้ชัด

นอกจากนี้การศึกษาเปอร์เซนต์ความแปรปรวนของการวัดโปรเจสเตอโรนรีเซพเตอร์ในไซโตซอล ซึ่งเก็บไว้ที่ −70 °ซ. ตั้งแต่ 15 วัน ถึง 3 เดือน พบว่าไซโตซอลที่เก็บไว้นาน 2 เดือน จะมีเปอร์เซนต์ความแปรปรวนของการวัดค่า Kd ประมาณ 15% แต่ถ้าเก็บไว้นานถึง 3 เดือน การวัดค่า Kd จะมีความแปรปรวนมากขึ้น (17.6 − 32.9%) ดังนั้นผลการทดลองแสดงแนวโน้มว่าน่าจะเก็บไซโตซอลไว้ไม่เกิน 2 เดือน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	Some Properties of Cytosolic Progesterone and Estrogen Receptors in Human Breast Tumor
Name	Miss Anong Tapsuwan
Thesis Advisor	Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.
Department	Biochemistry
Academic Year	1981

ABSTRACT

The study on progesterone receptor (PgR) in 120 human breast tumor specimens from the patients subjected to mastectomy in 6 hospitals and the National Cancer Institute in Bangkok was performed by the dextran-coated charcoal method (DCC). It was found that 95 samples (79%) contatined progesterone receptor (PgR^+) at the average level of 335.2 $\pm$ 32.0 fmol/mg protein, and the dissociation constant (Kd) was 8.58 $\pm$ 0.58 nmol/l. The correlation of the distribution of progesterone and estrogen receptor in this group of patients was observed: within the 80 samples (66.7% of total) which were estrogen receptor positive (ER^+), there were 64 samples (80% of ER^+) that also contained progesterone receptor. There were only 9 samples (7.5% of total), in which neither estrogen receptor nor progesterone receptor was detected. It was concluded

that the probability of breast tumor in this group of Thai women to be classified as "hormone dependent" type was about 50% of the total incidences.

Comparative study for ER and PgR was done in 2 groups of patients; the malignant group (n = 84) in which infiltrating ductal carcinoma (IDC) was the highest incident, and benign group (n = 29). The content of the ER and PgR in the benign and the malignant groups were not significantly difference. The dissociation constant of PgR in the benign and malignant groups showed significant lower affinity than the ER ($P < 0.005$). The distribution of both receptors among various age group of patients were similar, i.e. the tendency to find receptor in eldery patients, age above 50 years was higher than the patients in the age group below 40 years.

The study on biochemical properties of the receptors, such as the sedimentation coefficient was performed by the sucrose gradient centrifugation (SGC), comparing with standard protein, to determine the molecular size of the receptors. ER exhibited the sedimentation coefficient approximately at 8 - 9S and 4S. PgR exhibited the sedimentation coefficient approximately at 4S only, and was found in smaller content and less specific comparing to ER. The specimens which had high level of estrogen receptor also showed high specificity for 17-β- estradiol binding.

The estrogen receptor showed high specific binding with 17 β-estradiol beyond other steroids such as, testosterone, corticosterone, as determined by competitive binding with tritiated estradiol. When diethylstilboestrol (DES) and tamoxifen (TAM), which have part of their structure similar to estradiol, and are currently used in human breast cancer treatment, were used to compete with tritiated estradiol in 4 cytosol specimens, it was found that DES could effectively compete for estradiol binding, whereas TAM could not.

The specificity of PgR was studied by the same method. The results showed that other steroid hormones, such as estradiol, testosterone, corticosterone, and antiestrogen substances (DES and TAM), could not compete for the binding of tritiated progesterone (^{3}H - Pg), except ORG 2058, the synthetic progesterone could compete more effectively than the unlabelled progesterone itself.

Besides, from the study of the per cent variation in the assay of PgR, when the cytosols were stored at -70 ^{o}C at various time intervals from 15 days to 3 months, it was found that storage of cytosols for as long as 2 months resulted in the per cent variation of Kd values approximately 15% but storage for 3 months resulted in increased percentage of variation to 17.6 - 32.9%. The results suggested that the cytosols should not be stored longer than 2 months.

ACKNOWLEDGEMENT

The author wishes to express her deepest gratitude to Dr. Jariya Boonjawat for her keen supervision and heartily guidance during the course of this investigation and particularly in the preparation of the thesis.

Her deep appreciation is also expressed to Assistant Professor Sansern Subptosok, Dr.Peerada Sirijintakarn and Dr. Nikom Chaisiri for serving as thesis committees.

The author wishes to acknowledge Miss Lalita Parinayakosol for her great help diring this study and thank to other members of the Department of Biochemistry for helpful at various times in the course of this research.

She is indebted to the Faculty of Science, the Graduate School, Chulalongkorn University for funding supports and to the Department of Biochemistry for providing of the facilities.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT iv

ENGLISH ABSTRACT vii

ACKNOWLEDGEMENT x

CONTENT xi

LIST OF TABLES xiii

LIST OF FIGURES viv

ABBREVIATIONS xv

CHAPTER

I INTRODUCTION 1

II MATERIALS AND METHODS 8

III RESULTS

1. PgR in Ruman breast tumors 15

2. The relationship between ER and PgR 15

2.1 Distribution of ER and PgR 15

2.2 ER and PgR in malignant breast tumor . 17

2.3 ER and PgR in benign breast tumor 17

2.4 Content and affinity of ER and PgR in different types of breast tumor 17

Page

2.5 Distribution of ER and PgR in patients of various age groups 20

3. Sedimentation analysis

3.1 ER analysis 23

3.2 PgR analysis 25

3.3 Effect of tamoxifen and progesterone on the $^{3}H - E_2$ binding profile 25

4. Competitive binding assay for ER and PgR by DCC method

4.1 Competitive binding assay for ER 28

4.2 Competitive binding assay for PgR 30

5. Stability of PgR 33

IV DISCUSSION 35

REFERENCES 43

APPENDIX 51

BIOGRAPHY 62

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Distribution of ER and PgR	16
2	ER and PgR in malignant breast tumor	18
3	ER and PgR in benign breast tumor	19
4	Contents and affinity of ER and PgR in human breast tumor	21
5	Change in Kd of cytosolic PgR at various time of assay.	34
6	The result of PgR assay in the cytosolic of 120 human breast tumor specimens	52

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Structure of steroid hormones and substances involved in this study	5
2	Distribution of ER and PgR in patrents of various age groups	22
3	Sedimentation analysis of ER	24
4	Sedimentation analysis of PgR	26
5	Effect of tamoxifen and progesterone on the $^{3}H - E_2$ binding	27
6	Competitive binding assay of ER	29
7	Effect of increasing concentration of competitors on the ability to compete for $^{3}H - E_2$ binding	31
8	Competitive binding assay for PgR	32
9	Standard curve of BSA	58
10	Standard curve of DNA	59
11	Scatchard analysis curve	60
12	The BSA profile from sedimentation analysis and the sucrose linear gradient	61

ABBREVIATIONS

DCC	=	Dextran - coated charcoal
DES	=	Diethylstilboestrol
$^{3}H - E_2$	=	Tritiated estradiol
ER	=	Estrogen receptor
ER^+	=	Estrogen receptor positive
ER^-	=	Estrogen receptor negative
IDC	=	Infiltrating ductal carcinoma
Kd	=	Dissociation constant
$^{3}H - Pg$	=	Tritiated - progesterone
PgR	=	Progesterone receptor
PgR^+	=	Progesterone receptor positive
PgR^-	=	Progesterone receptor negative
SGC	=	Suerose gradient centrifugation
TAM	=	Tamoxifen
TED	=	Tris - EDTA - Dithiothreitol

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย