

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

台灣地區早發性乳癌之類固醇調節功能之研究

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-002-160-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院外科

計畫主持人：張金堅

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 11 月 6 日

## 台灣地區早發性乳癌之類固醇調節功能之研究

### 摘要

乳癌是最普遍的惡性腫瘤之一，為台灣婦女的第二大致死癌症，且近十年來，死亡率逐年增加。有別於西方國家，台灣地區乳癌患者主要分佈在停經前婦女，而40歲以前的早發性乳癌病患發生率遠較歐美為高。雌性素、助孕素、雄性素與他們的受體，向來被認為與乳癌的發生與進展有密切的相關，尤其是在早發性與晚發性兩大族群間，不同雌性素、助孕素、雄性素與他們的受體的表現也有差別。本計畫目的為探討雌性素、助孕素、雄性素與他們的受體在台灣地區早發性乳癌的發生與進展上的功能角色，而且將追蹤在台灣地區早發性乳癌病患中雌性素、助孕素、雄性素的分泌特性、與他們的受體的表現特型，並測試他們作為後續治療策略的參考因子之適當性。本計畫目前以成功建立一本土性早發型乳癌細胞株 BC-1，此細胞株具有 ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、PR、AR 及 Her2/Neu，並成功建立一本土性正常乳腺細胞 81N，雌性素會抑制此細胞株之死亡。初步以 10nM 雌性素處理 BC-1，雌性素具有抑制 BC-1 細胞死亡之效，未來將利用此二細胞株進行研究，觀察雌性素、助孕素、雄性素對二者細胞之生長與死亡之調節，之影響基因表現有何不同。並以成功製備出 ER $\alpha$ 、PR 之重組蛋白預備進行免疫小鼠、兔子以生產大量抗體作為分析臨床上之早發性乳癌檢體之 ER $\alpha$ 、PR 表現。

### 緒言

乳癌是最普遍的惡性腫瘤之一，為台灣婦女的第二大致死癌症，且近十年來，死亡率逐年增加。年輕時發生的乳癌與年紀較長時發生的乳癌在病因學、臨床特徵、與診療結果有所不同，早發性乳癌被描述為較具侵略性、預後較不良、再發率較高、而存活率較低，且目前使用的標準病理檢測項目都不能有效地預測早發性乳癌的預後。有別於西方國家，台灣地區乳癌患者主要分佈在停經前婦女，而40歲以前的早發性乳癌病患發生率遠較歐美為高，暗示台灣地區乳癌的致癌機轉及癌症的遺傳機制有其特殊的一面，雌性素、助孕素、雄性素與他們的受體，向來被認為與乳癌的發生與進展有密切的相關，尤其是在早發性與晚發性兩大族群間，不同雌性素、助孕素、雄性素與他們的受體的表現也有差別。早發性乳癌這麼惡性的疾病在本國發生率特別高，實在值得我們努力研究此一疾病的病理，而傳統病理學檢測項目並不能有效評估該疾病之預後，是以尋找有意義的預後參考因子也是本計畫將要努力的目標。本計畫為探討雌性素、助孕素、雄性素與他們的受體在台灣地區早發性乳癌的發生與進展上的功能角色，而且將追蹤在台灣地區早發性乳癌病患中雌性素、助孕素、雄性素的分泌特性、與他們的受體的表現特型，並測試他們作為後續治療策略的參考因子之適當性；另外，也將尋找接受雌性素、助孕素、雄性素與他們的受體調控的乳癌高危險基因，並評估他們作為乳癌早期診斷、及預後預測之生物標幟的可行性。

## 材料與方法

### 西方墨點法 ( Western Blotting Assay ):

將均質化組織或細胞懸浮液(cell lysate)加入等體積 2x sample buffer(4% SDS, 125mM Tris-HCl pH6.8, 20% glycerol, 10% B-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue)混合均勻, 在 100°C 煮五分鐘後, 注入 10% SDS-PAGE 明膠, 以 60 伏特解析。取下明膠, 以電泳將膠上已解析的蛋白轉印至 NC 紙上。已染印蛋白之 NC 紙浸於含有 5% 脫脂奶粉的 PBST 溶液中填塞二小時, 之後以 PBST 清洗三次, 再與含專一性抗體之 PBST 液體中浸漬二小時, 再用 PBST 清洗三次, 以含有 <sup>35</sup>S 標幟的蛋白質 A 的 PBST 浸漬一小時, 最後用 PBST 清洗三次, 烘乾後再行自動放射顯像。

### RT-PCR

萃取組織或細胞之 RNA 作為 RT-PCR 反應之模板並加入專一性引子對放入反應混合液中(RNase free water, 5 $\lambda$  10x TaqMan Buffer, 5.5mM 25mM MgCl<sub>2</sub>, 300  $\mu$ M 10mMdNTP, 0.05U/ $\mu$ l AmpliTaq Gold DNA Polymerase, 0.25 U/ $\mu$ l MultiScribe Reverse Transcriptase, 0.4 U/ $\mu$ l RNase inhibitor), 放入 ABI PRISM 5700 Sequence Detection System (TaqMan) real-time quantitative PCR 機器中進行反應, 溫度為第一步 50°C, 2 分鐘活化 uracil N-glycosylase 將 carryover contamination 去除, 第二步 95°C, 10 分鐘將 uracil N-glycosylase 去活性並活化 DNA Polymerase, 第三步 95°C, 作用 15 秒使模版 DNA 變性, 及 60°C, 1 分鐘進行引子延展和黏合, 第三步共作四十個循環。5700 sequence detection system 將直接讀取各組 PCR 產物之產量, 即反應出各特異基因之 RNA 相對表現量。

### MTT 呈色反應:

將細胞分裝於 96 孔盤, 在 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培養箱內培養後, 吸除上清液, 添加含有 100 $\mu$ L MTT (1mg/mL) 的新鮮培養液, 培養四小時後, 除去所有培養液, 並於每孔加入 100  $\mu$ L DMSO 置放 30 分鐘, 並震盪培養盤使孔底藍色結晶充分溶解, 使用 ELISA reader 在 550 及 630 nm 雙波長下讀取每孔的吸光值。

### 存活率測定-Trypan blue stain:

將細胞分裝於培養皿中, 在 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培養箱內培養後, 離心吸除上清液, 加入新鮮培養液將細胞混合均勻, 吸取 50 $\mu$ L 的細胞液與 50 $\mu$ L 0.2% 的 trypan blue 溶液混合均勻後, 以血球技術盤隨機取 100 顆細胞, 計算存活的細胞數。

### 細胞培養:

- (1) 培養液: 500ml 之 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), 其內添加 100 ml 胎牛血清, 抗生素-Penicillin G (100 units/ml)、Streptomycin (100 ug/ml), 保存於 4 冰箱。
- (2) 初級細胞培養: 將外科手術中所割除的乳癌組織塊, 截取一約 20x20x20mm 大小之組織塊, 而後在無菌操作環境下, 以 PBS 清洗三次, 並將組織塊切割成數個大小為 1x1x1mm, 加入 5ml DMEM 並搖晃一分鐘後離心, 上清液置放於

另一離心管中，添加 5 ml 新鮮 DMEM 混合組織塊，再離心，收集上清液，重複三次，將收集的上清液離心，離心後抽除上清液，加入新鮮的 DMEM 培養液，混合細胞團塊後，將細胞液分裝至 25T 培養盤中，在 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培養箱內培養 3-4 天後，換置新的培養液，當細胞長到約七、八分滿時，以 trypsin 將之分散，並分裝至另一新培養皿中。

(3) Enrichment of epithelial cells：開始培養時，細胞種類有似上皮的細胞及約 10-20% 纖維母細胞，利用選擇性打散及再貼附的方式純化細胞，將上皮細胞數比例增多，以 trypsin 將細胞打散，而後在 37°C 作用 2.5、5 及 10 分鐘，在每一時間點取上清液並添加新鮮的 trypsin，收集的上清液分裝於新的 25T 培養盤中，培養於 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培養箱。

(4) Agar 選殖：選取較多上皮細胞的 25T 培養盤，以 trypsin 打散，並將細胞鋪於直徑 50mm 培養皿含有 2 公分厚、20%胎牛血清、0.375%洋菜膠之培養液上，此層培養液下還有一層 2 公分厚含有 5%洋菜膠之培養液作為基底層。細胞於 37°C 培養 7 天，收集細胞數達 10 個以上之群落。

(5) Dilution cloning：將細胞以 trypsin 打散，分裝至 96 孔盤，於 37°C 過夜培養，以光學顯微鏡確認每一孔內為單一細胞，當細胞群落長至七、八分滿時，將細胞打散，移至 48 孔盤、24 孔盤、12 孔盤、6 孔盤培養。

## 結果與討論

為探討雌性素、助孕素、雄性素與其受體對台灣地區早發性乳癌的發展之影響，本計畫自台大醫院、馬偕醫院等收集臨床之早發性乳癌檢體，將檢體進行細胞培養，預期得到一本土性早發性乳癌細胞株，以進一步研究雌性素、雄性素對本土性早發性乳癌細胞生長之影響。目前研究小組已由一 24 歲，invasive ductal carcinoma 患者檢體，成功建立本土性早發性乳癌細胞株，台灣地區早發性乳癌細胞株 BC-1。於相位差顯微鏡下觀察可發現 BC-1 貼附十分緊密，形狀為圓形至多角形屬上皮樣 (epithelial-like) 細胞。並以 cytokeratin19 抗體進行西方墨點法檢測其為上皮細胞。染色體觀察，BC-1 之 Karotype 顯示出其染色體數目異常，其染色體數目為 Polyploid 而非正常之 diploid，且出現許多染色體片段。進行 100 個 BC-1 細胞之 Karotyping，BC-1 細胞染色體數目多集中於 44-50 個。以 RT-PCR 檢測此細胞株中雌性素、雄性素、助孕素受體表現情形，此細胞株具有 ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、PR、AR 及 Her2/Neu。觀察雌性素、雄性素對於台灣地區早發性乳癌細胞株 BC-1 生長之影響，以未含血清之培養液培養 BC-1 細胞，促使細胞死亡，以 Trypan blue 染色方法計數細胞。若添加 10nM 雌性素 (E2)，與處理組相比，雌性素具有抑制細胞死亡之效，若加入雌性素拮抗劑 (OHT)，則細胞死亡的情形更嚴重，若 E2 與 OHT 共同處理則 E2 可以抑制 OHT 促使細胞死亡更加嚴重之情況發生。而添加雄性素 DHEA 無顯著抑制死亡之效。

另計畫亦建立一本土性正常乳腺細胞 81N，以雌性素刺激所建立之本土性正常乳腺細胞 81N 增生。以 5 種不同濃度之雌性素處理 81N 細胞株，與未以雌性素處

理組相比，0.1、1、10 nM 三種劑量都會刺激 81N 細胞株增生為未處理組之 1.4 倍，1nM 處理第三天達到最大刺激之效果，而 0.1 及 10nM 則在處理後第 4 天達到最大刺激量，刺激效果以 10nM 處理組最佳。若以高劑量雌性素處理如 100、1000nM 則細胞增生情形較不明顯。

為瞭解台灣地區早發性乳癌，其雌性素、助孕素、雄性素受體表現情形，需以特異性抗體對於臨床上所獲得的檢體進行免疫組織化學染色，因此，我們利用重組蛋白製備方式，並以重組蛋白免疫小鼠、兔子，期能獲得大量之抗雌性素受體、雄性素受體、助孕素受體之抗體。目前已獲得純化之 ER $\alpha$ 、PR 重組蛋白，並以用之免疫小鼠及兔子。

### 參考文獻

1. Cancer Registry Annual Report, Republic of China. Department of Health, the Executive Yuan. Taiwan, R.O.C. p48-49, 1998
2. Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program Public-Use CD-ROM (1973-1997). National Cancer Institute, DCCPS, Cancer Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch, released April 2000, based on the August 1999 submission.
3. Walker RA, Lees E, Webb MB, Dearing SJ. Breast carcinomas occurring in young women (<35 years) are different. Br J Cancer 74: 1796-1800, 1996
4. Adami HO, Malaker B, Holmberg L, et al. The relation between survival and age at diagnosis in breast cancer. N Engl J Med 315: 559-563, 1986
5. Chung M, Chang HR, Bland KI, Wanebo HJ. Younger women with breast carcinoma have poorer prognosis than older women. Cancer 77: 97-103, 1996
6. Winchester DP, Osteen RT, Menck HR. The National Cancer Data Base report on breast carcinoma characteristics and outcome in relation to age. Cancer 78: 1838-1843, 1996
7. Chan A, Pintilie M, Vallis K, Girourd C, Goss P. Breast cancer in women  $\leq$  35 years: review of 1002 cases from a single institution. Ann Oncol 11: 1255-1262, 2000

8. Olsen JH, Seersholm N, Boice JD Jr, Kruger KS, Fraumeni JF Jr. Cancer risk in close relatives of women with early-onset breast cancer: a population-based incidence study. *Br J Cancer* 79: 673-9, 1999
9. Holli K, Isola J. Effect of age on the survival of breast cancer patients. *Eur J Cancer* 33:425-428, 1997
10. Swanson GM, Lin CS. Survival patterns among younger women with breast cancer: the effects of age, race, stage and treatment. *J Natl Cancer Inst Monogr* 16: 69-77, 1994
11. Kroman N, Jensen MB, Wohlfahrt J, et al. Factors influencing the effect of age on prognosis in breast cancer: population based study. *BMJ* 320: 474-478, 2000
12. Albain KS, Allred DC, Clark GM. Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials? *J Natl Cancer Inst Monogr* 16: 35-42, 1994
13. Hulka BS, Moorman PC. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas* 38: 103-116, 2000
14. Cheng SH, Tsou MH, Liu MC, Jian JJ, Cheng JCH, Leu SY, Hsieh CY, Huang AT. Unique features of breast cancer in Taiwan. *Breast Cancer Res Treat* 213-223, 2000
15. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J, editors. *Cancer incidence in Five Continents*. Oxford: International Agency for Research on Cancer, Oxford University Press, 1997
16. Pisani P, Parkin DM, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985: Implications for prevention and projections of future burden. *Int J Cancer* 55: 891-903, 1993
17. Eley JW, Hill HA, Chen VW, Austin DF, Wesley MN, Muss HB, Greenberg RS, Coates RJ, Correa P, Redmond CK. Racial differences in survival from breast cancer. Results of the National Cancer Institute Black/White Cancer Survival

- Study. JAMA 272: 947-954, 1994
18. Natarajan N, Nemoto D, Nemoto T, Mettlin C. Breast cancer survival among orientals and whites living in the United States. J Surg Oncol 39: 206-209, 1988
  19. Hsu JL, Glaser SL, West DW. Racial/ethnic differences in breast cancer survival among San Francisco Bay Area women. J Natl Cancer Inst 89:1311-1312, 1997
  20. Elkhuizen PH, van de Vijver MJ, Hermans J, et al. Local recurrence after breast-conserving therapy for invasive breast cancer: high incidence in young patients and association with poor survival. Int J Radiat Oncol Biol Phys 40: 859-867, 1998
  21. Nemoto T, Vana J, Bedwani RN, et al. Management and survival of female breast cancer: results of a national survey by the American College of Surgeons. Cancer 45: 2917-2924, 1980
  22. Trichopoulos D, MacMahon B, Cole P. Menopause and breast cancer risk. J Natl Cancer Inst 48: 605-613, 1972
  23. Kuller L, Cauley J, Lucas L, Cummings S, Browner W. Sex steroid hormones, bones mineral density, and risk of breast cancer. Environ Health Perspect 105: 1-7, 1997
  24. Hulka BS, Stark A. Breast cancer: cause and prevention. Lancet 346: 883-887, 1995
  25. Collaborative Group on Hormonal factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. Lancet 347: 1713-1727, 1996
  26. Dao TL. The role of ovarian steroid hormones in mammary carcinogenesis. In: Pike MC, Siiteri PK, Welsch CW, ed., Hormones and Breast Cancer. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. p281-295, 1981

27. Henderson BE, Ross RK, Bernstein L. Estrogens as a cause of human cancer: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res* 48: 246, 1988
28. MacMahon B, Cole P, Brown JB. Urine oestrogen profiles of Asian and North American women. *Int J Cancer* 14: 161-167, 1974
29. Bernstein L, Yuan JM, Ross R, et al. Serum hormone levels in pre-menopausal Chinese women in Shanghai and white women in Los Angeles: results from two breast cancer case-control studies. *Cancer Causes Control* 1: 51-58, 1990
30. Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Pike MC, Henderson BE. Serum oestrogen levels in postmenopausal women: comparison of American whites and Japanese in Japan. *Br J Cancer* 62: 451-453, 1990
31. Seow A, Duffy SW, McGee MA, Lee J, Lee HP. Breast cancer in Singapore: trends in incidence 1968-1992. *Int J Epidemiol* 25: 40-45, 1996
32. Chow LW, Ting AC, Cheung KL, Au GK, Alagaratnam. Current status of breast cancer in Hong Kong. *Chinese Med J* 110: 474-478, 1997
33. Thomas HV, Reeves GK, Key TJA. Endogenous estrogen and postmenopausal breast cancer: a quantitative review. *Cancer causes Control* 8: 922-928, 1997
34. Dorgan J, Longcope C, Stephenson H, et al. Relation of prediagnostic serum estrogen and androgen levels to breast cancer risk, cancer epidemiology. *Biomark Prevent* 5: 533-539, 1996
35. Toniolo P, Levitz M, Zeleniuch-Jacquotte A, et al. A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 87:190-197, 1995
36. Hankinson S, Willett W, Manson J, et al. Plasma sex steroid hormone levels and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 90:1292-1299, 1998



37. Berrino F, Muti P, Micheli A, et al. Serum sex hormone levels after menopause and subsequent breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 88:291-296, 1996
38. Thomas HV Key TJ, Allen DS, Moore JW, Dowsett M, Fentiman IS, Wang DY. A prospective study of endogenous serum hormone concentrations and breast cancer risk in premenopausal women on the island of Guernsey. *Br J Cancer* 75: 1075-1079, 1997
39. Thomas HV Key TJ, Allen DS, Moore JW, Dowsett M, Fentiman IS, Wang DY. A prospective study of endogenous serum hormone concentrations and breast cancer risk in postmenopausal women on the island of Guernsey. *Br J Cancer* 76: 401-405, 1997
40. Lipworth L, Adami HO, Trichopoulos D, Carlstrom K, Mantzoros C. Serum steroid hormone levels, sex hormone-binding globulin and body mass index in the etiology of postmenopausal breast cancer. *Epidemiology* 7: 96-100, 1996
41. Bernstein L, Ross RK. Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 15: 48-65, 1993

Preliminary results of recombinant steroid receptor				
ER $\alpha$	ER $\beta$	PR <sub>A</sub>	PR <sub>B</sub>	AR
Recombinant protein	CDNA product	Recombinant protein	Expression plasmid	Expression plasmid

Table 1 性類固醇受體重組蛋白質之製備進度表

Table 2 性類固醇受體及生長因子受體 Her2/neu 於早發性乳癌細胞株 BC-1 表現之情形

	BC-1
ER $\alpha$	+
ER $\beta$	+
PR <sub>A</sub>	+
AR	+ *
Her2/neu	+

+ : 有表現且 RT-PCR 產物已經定序確認

\* : 未定序

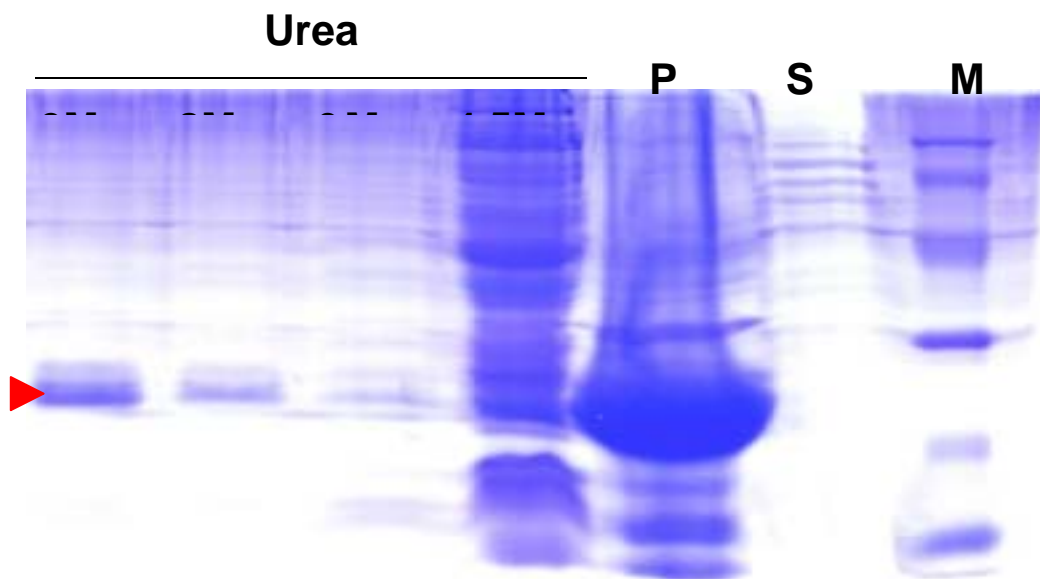


Fig.1 重組雌性素 $\alpha$ 受體(ER $\alpha$ )蛋白質之表現。將含有 ER $\alpha$ 基因片段之表現載體轉形至大腸桿菌，誘導 ER $\alpha$ 重組蛋白質之表現，以不同濃度梯度(4.5, 6, 8, 9M)之尿素打破細菌並包涵體，將重組蛋白溶解純化。▶: ER $\alpha$ 重組蛋白, P: 細菌團塊, S: 上清液, M: Protein Marker

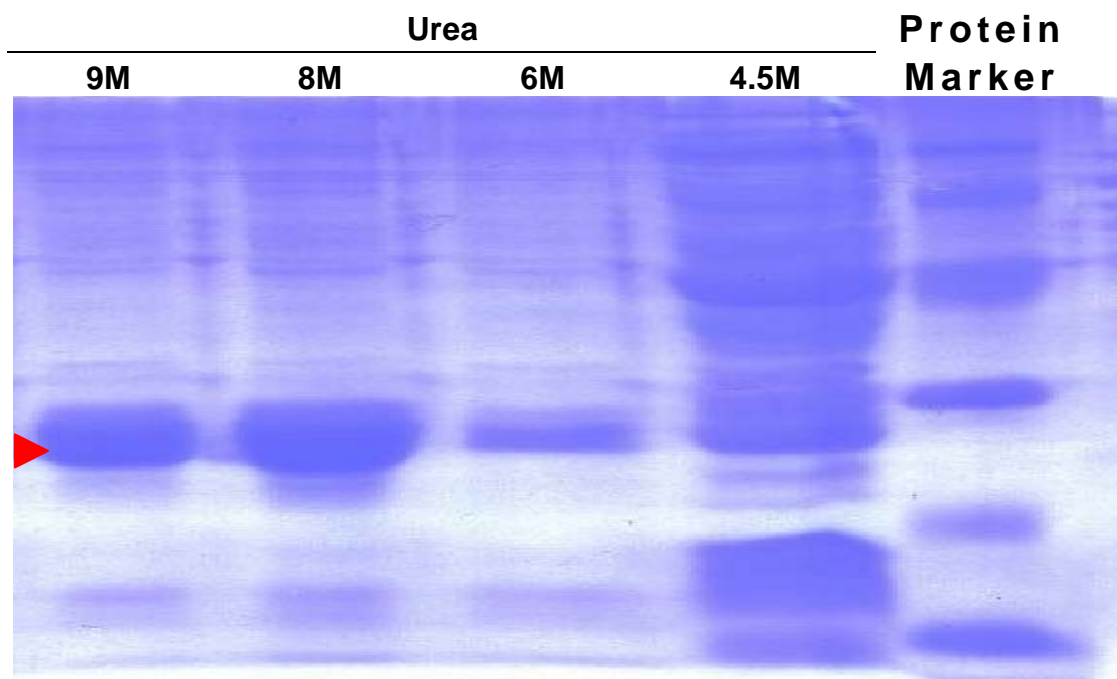


Fig.2 PR<sub>A</sub>重組蛋白質之表現。將含有 PR<sub>A</sub>基因片段之表現載體轉形至大腸桿菌，誘導 PR<sub>A</sub>重組蛋白質之表現，以不同濃度梯度(4.5, 6, 8, 9M)之尿素打破細菌並包涵體，將重組蛋白溶解純化。▶: PR<sub>A</sub>重組蛋白。

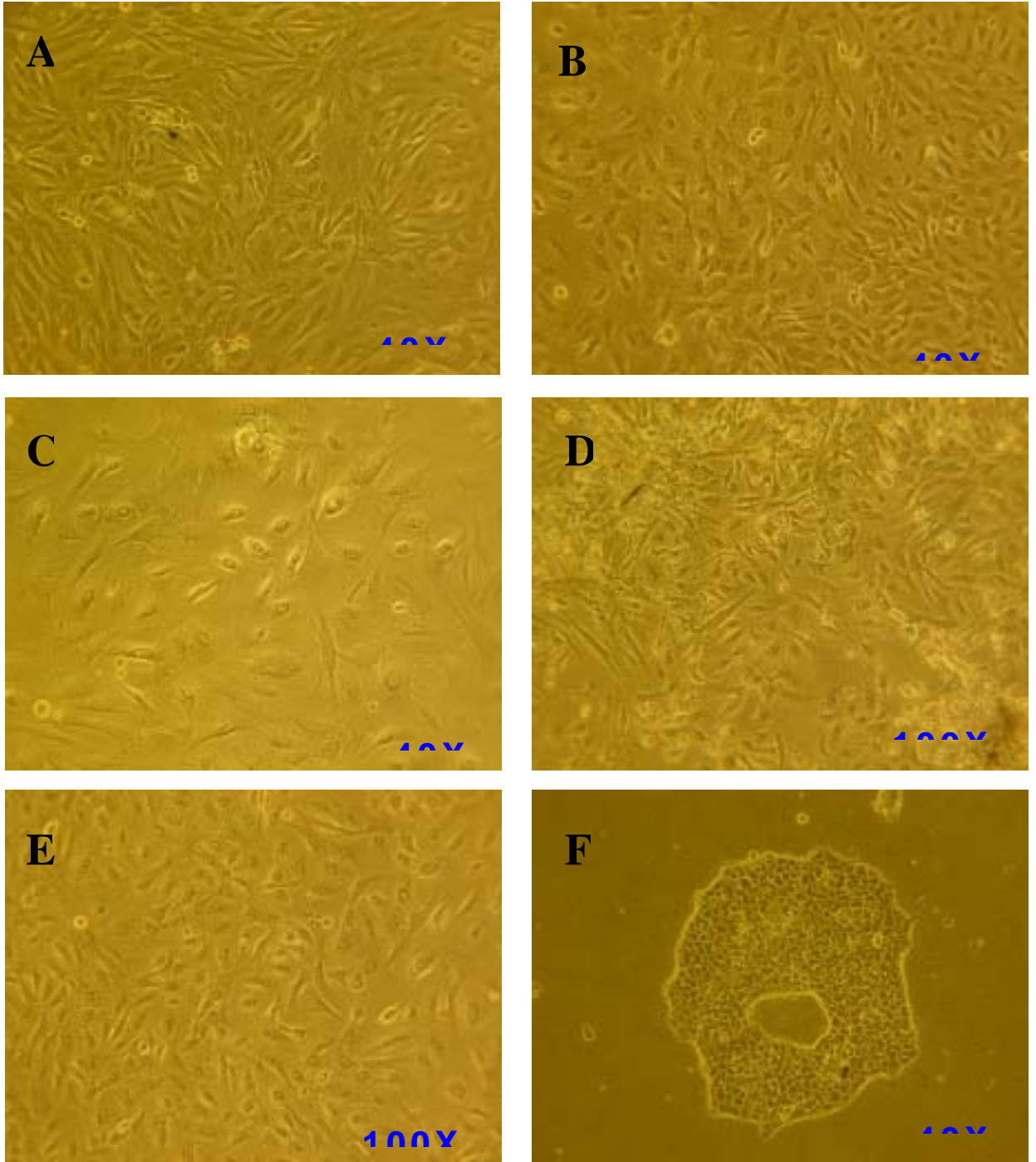


Fig. 3 乳癌腫瘤細胞及正常乳腺細胞之初代細胞培養。

A : B : C : D : E : F :

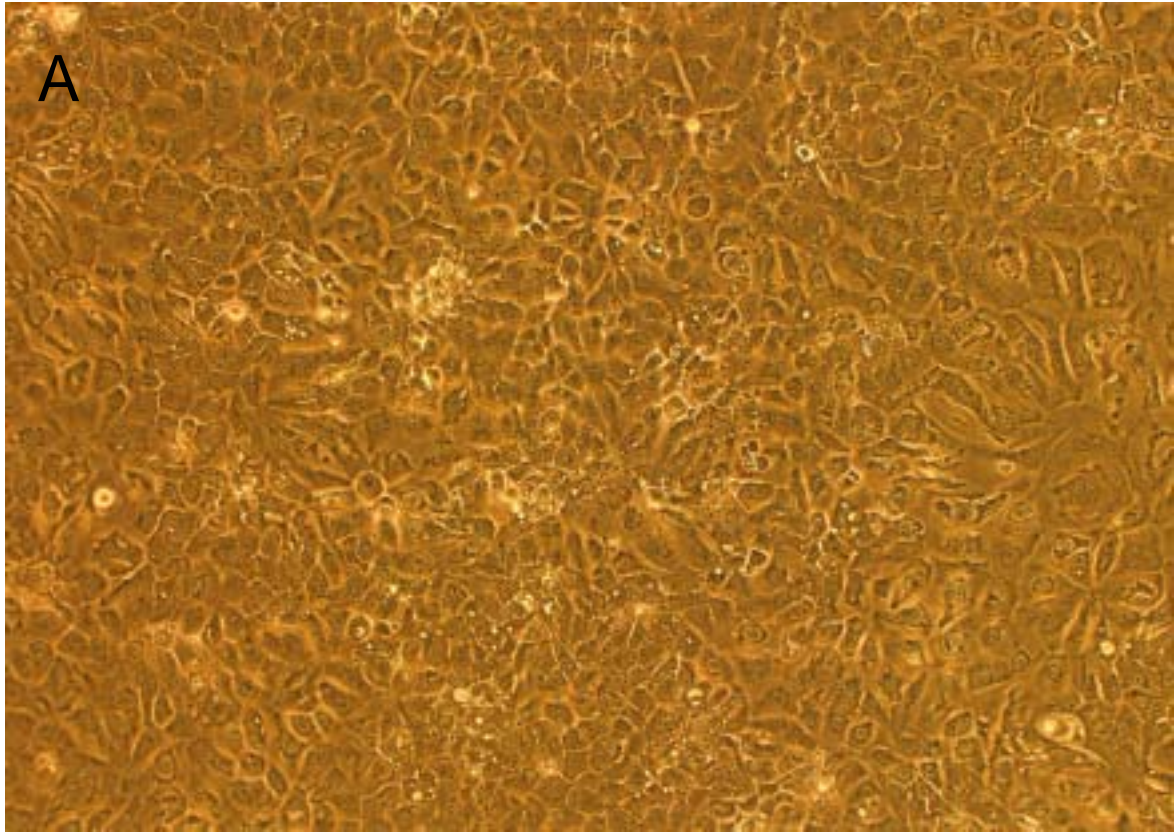


Fig. 4 台灣地區早發性乳癌細胞株 BC-1。A：於相位差顯微鏡下觀察可發現 BC-1 貼附十分緊密，形狀為圓形至多角形屬上皮樣（epithelial-like）細胞。B：以 cytokeratin 19 抗體進行西方墨點法，BC-1 有 cytokeratin 19，BC-1 係為上皮細胞。1：BC-1，2-4：以已確認之細胞株作為 Postive control 分別是 MCF-7、T47D、MDA-MB-435S。

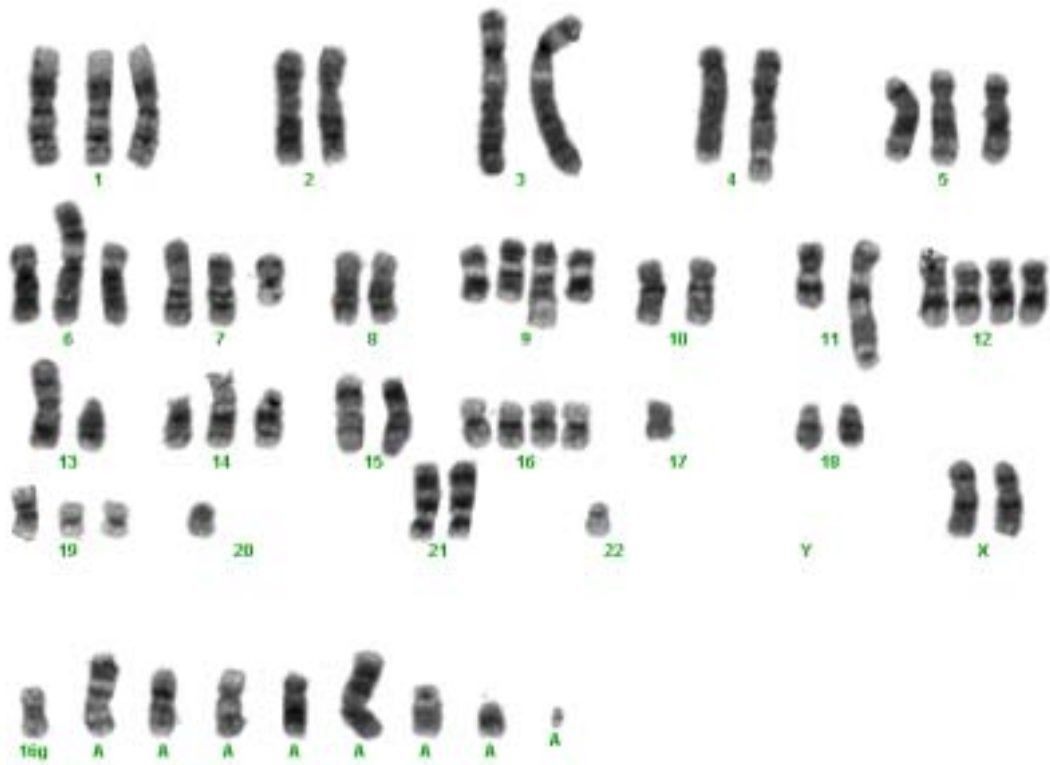
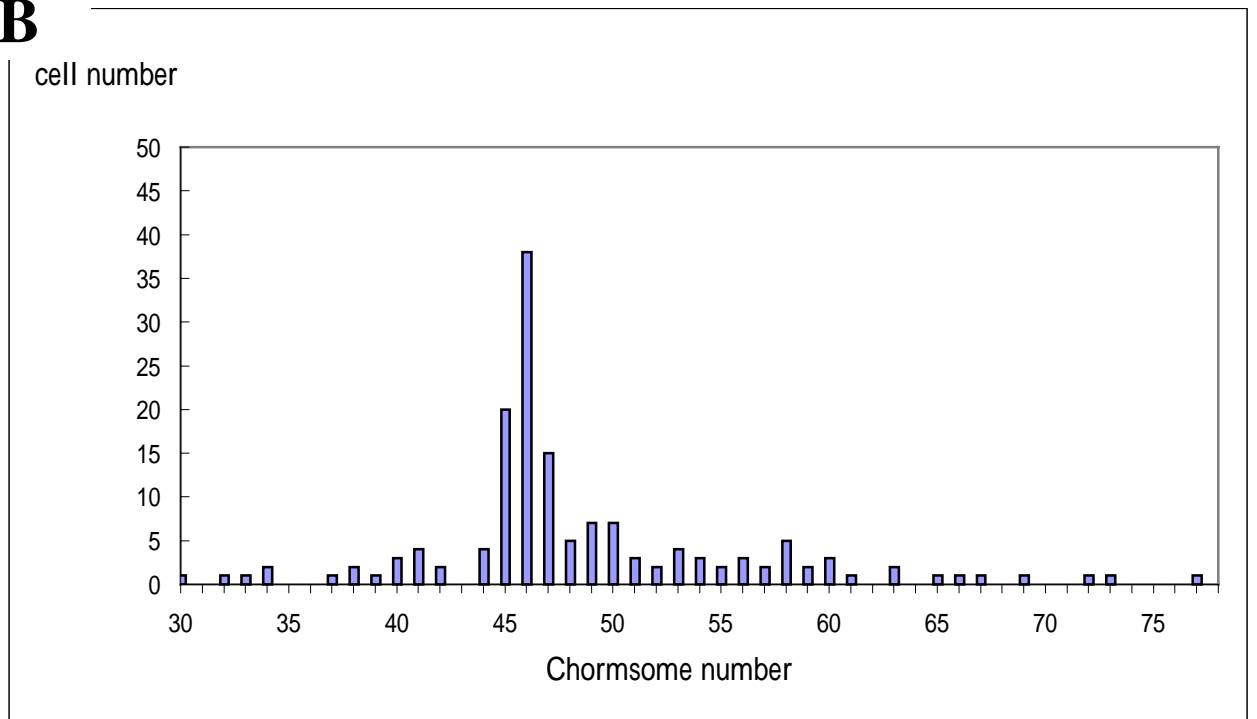
**A****B**

Fig.5 BC-1 細胞之染色體觀察。A：BC-1 之 Karotype，顯示出 BC-1 染色體數目異常，其染色體數目為 Polyploid 而非正常之 diploid，且出現許多染色體片段。B：進行 100 個 BC-1 細胞之 Karotyping，BC-1 細胞染色體數目多集中於 44-50 個。

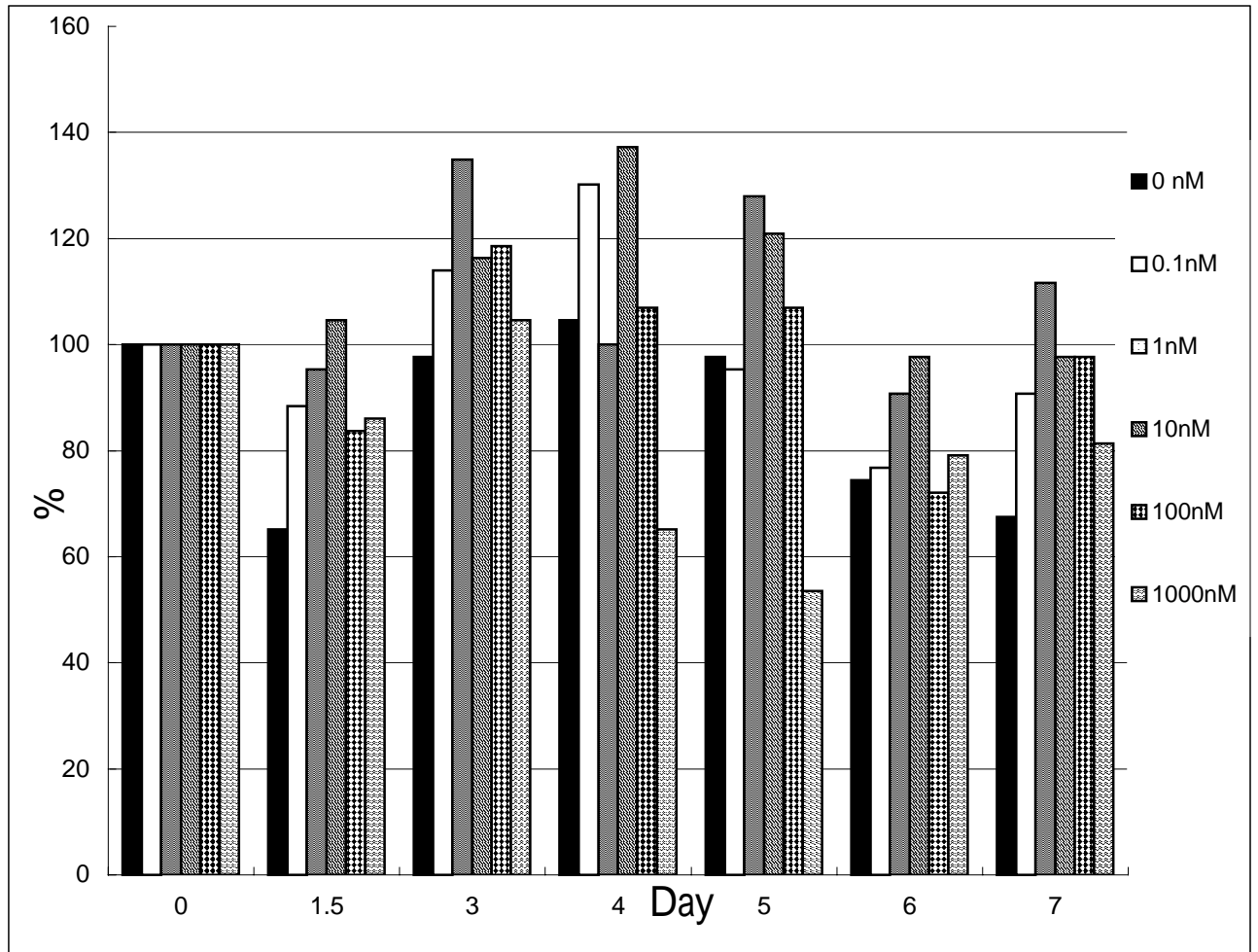


Fig. 6 雌性素刺激所建立之本土性正常乳腺細胞 81N 增生。以 5 種不同濃度之雌性素處理 81N 細胞株，與未以雌性素處理組相比，0.1、1、10 nM 三種劑量都會刺激 81N 細胞株增生為未處理組之 1.4 倍，1nM 處理第三天達到最大刺激之效果，而 0.1 及 10nM 則在處理後第 4 天達到最大刺激量，刺激效果以 10nM 處理組最佳。若以高劑量雌性素處理如 100、1000nM 則細胞增生情形較不明顯。

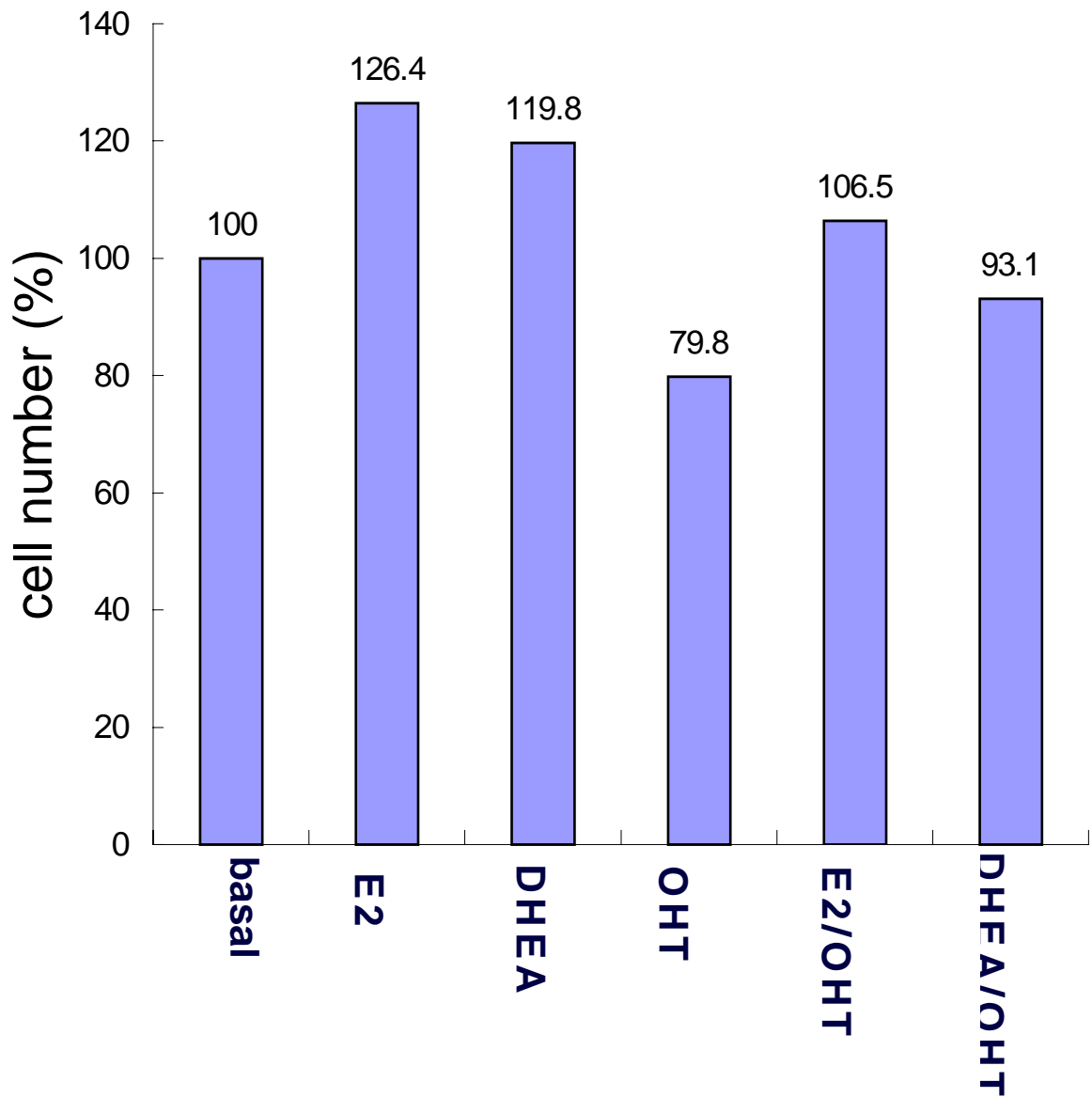


Fig. 7 雌性素 (E2) 抑制本土性早發性乳癌細胞株 BC-1 死亡。以未含血清之培養液培養 BC-1 細胞，促使細胞死亡，以 Trypan blue 染色方法計數細胞。若添加 10nM E2，與為處理組相比，雌性素具有抑制細胞死亡之效，若加入雌性素拮抗劑 OHT，則細胞死亡的情形更嚴重，若 E2 與 OHT 共同處理則 E2 可以抑制 OHT 促使細胞死亡更加嚴重之情況發生。而添加雄性素 DHEA 無顯著抑制死亡之效。

E2: Estrodiol 雌性素；DHEA: Dehydroxyepiandrosterone 雄性素；OHT: 4-OH-tamoxifen, 雌性素拮抗劑；