

Thesis Title Determination of Estrogen Receptor
and Progesterone Receptor in Breast
Tumor and Uterine Tissue by Modified
Competitive Binding Assay

Author Mr. Sombat Matayabun

M.Sc. Biochemistry

Examining Committee: Assoc.Prof.Dr.Maitree Suttajit..Chairman
Assist.Prof.Dr.Vichai Wongchai..member
Assist.Prof.Dr.Nimit Martin.....member
Dr. Tharinee Sinchai.....member

ABSTRACT

Estrogen receptor (ER) function as mediator of estrogen action on target organs. Determination of ER in human mammary tumor is clinically valuable in the selection of suitable therapy. In this study, the modified dextran coated charcoal method (DCC) had been developed to determine ER and PgR more conveniently, accurately and precisely. The modification steps and their results are as the followings.

a) Addition of 10 % glycerol in the uterine cytosolic preparation increased ER content from 16 to 88

fmol/mg protein but reduced the specific binding to estradiol by increasing Kd values from 0.20 to 0.75 nM.

b) Sodium molybdate 20 mM added to the cytosol insignificantly affected the ER values as compared to the untreated one, 120.6 ± 49.21 and 95.66 ± 23.8 fmol/mg protein respectively.

c) Ammonium sulfate precipitation of ER from cytosol reduced ER content from 56.42 ± 10.44 to 25.13 ± 3.68 fmol/mg protein.

ER content of uterine cytosolic samples determined by a modified DCC method and polyethylene glycol method the modified DCC method gave the lowest % C.V. and less S.D. than the DCC method. The modified DCC was also reproducible and more precise than other methods, therefore it was chosen to determine ER content in breast cancer tissues of patients.

Estrogen receptor reference standard in porcine uterine cytosol preparation was purified by the two adsorption technics; heparin-Sepharose adsorption technic, the cytosol preparation was 8 fold-purified, with 23 % yield, while by DES-Sepharose adsorption, the preparation was 16 fold-purified and 16 % yield. Characterized by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, the ER preparation from heparin-Sepharose adsorption technic appeared as ten

stained bands including three major bands of Mr. 6.4, 8.3, 10.0 x 10⁴ daltons. But by DES-Sepharose technic, it appeared as only two small bands of Mr.9.5 and 10.0 x 10⁴ daltons which was suggested as subunits of the ER dimer. The modified DCC method was used to quantitatively determine ER and PgR contents in breast cancer specimens from patients (N=158). It was found that 34.2 % (54/158) of the total cases were ER+ and 13.3 % (21/158) were PgR+, while 6.9 % (11/158) were ER+, PgR+, 6.3 % (10/158) were ER-, PgR+, 27.2 % (43/158) were ER+, PgR- and 59 % (94/158) were ER-, PgR-. Percentage of ER+ samples was highest in Stage III of patients while PgR+ sample was highest in Stage IV of patients. According to menstruation period, the average values of ER+ and PgR+ samples seemed to be higher in postmenopausal women than those of premenopausal women.

In conclusion, the modified DCC method for ER and PgR determination has been developed by adding 10 % glycerol and molybdate for stabilization of receptor complex. The results analyzed by this method were closed to the original DCC method but more preceised. Therefore the modified DCC now has been routinely used for ER and PgR determination of the tumors of breast cancer patients in the hospital.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การตรวจวัดเอสโตรเจนรีเซพเตอร์และโปร-
เจสเทอโรนรีเซพเตอร์ในก้อนเนื้องอกเต้านม
และ เนื้อเยื่อมดลูก โดยวิธีคอมแพททิฟไบบ์ดิง
แอสเสย์ที่ดัดแปลง

ชื่อผู้เขียน

นาย สมบัติ มาตยาบุญ

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชา ชีวเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ :

รศ.ดร. ไมตรี สุธงจิตต์...ประธานกรรมการ

ผศ.ดร. วิชัย วงศ์ไชย.....กรรมการ

ผศ.พญ. นิมิต มาร์ติน.....กรรมการ

อจ.ดร. ธาริณี สิ้นชัย.....กรรมการ

บทคัดย่อ

เอสโตรเจนรีเซพเตอร์ ทำหน้าที่เป็นสารตัวกลางในการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจน ต่ออวัยวะเป้าหมาย การหาปริมาณเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ จึงมีความสำคัญในทางคลินิกเพื่อให้เลือกวิธีการรักษาให้เหมาะสม ในการศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาวิธี เด็กแตรนเคสลิบบนผงถ่าน(ดีซีซี) ให้สามารถวัดปริมาณเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ และ โปรเจสเทอโรนรีเซพเตอร์ได้สะดวก, ถูกต้อง, และ แม่นยำ มากยิ่งขึ้น.

ขั้นตอนในการดัดแปลงและผลลัพธ์ของวิธีมีดังนี้

ก) การเติม 10 % กลีเซอรอล ลงไปในไซโตซอลที่เตรียมจากมดลูก จะทำให้วัดปริมาณเอสโตรเจนรีเซพเตอร์เพิ่มขึ้นจาก 16 เป็น 88 เฟมโตโมล ต่อมิลลิกรัมโปรตีนแต่ลดความจำเพาะในการจับยึดกับเอสตราไดออล โดยการเพิ่มค่า สัมประสิทธิ์การแยกตัว จาก 0.20 เป็น 0.75 นาโนโมลาร์.

ข) โซเดียมโมลิบเดต ปริมาณ 20 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเติมลงไปในไซโตซอลไม่มีผลกระทบต่อปริมาณของเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ โดยเปรียบเทียบกับไซโตซอลที่ไม่เติมสารนี้ลงไปและได้เอสโตรเจนรีเซพเตอร์เป็น 120.6 ± 49.21

และ 95.66 ± 23.8 เฟมโตโมล ต่อ มิลลิกรัม โปรตีน ตามลำดับ.

ค) การตกตะกอนเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ ด้วยสารแอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้ปริมาณรีเซพเตอร์นี้สูญหายไป โดยพบว่าปริมาณรีเซพเตอร์จะลดลงจาก 56.42 ± 10.44 เป็น 25.13 ± 3.68 เฟมโตโมล ต่อ มิลลิกรัม โปรตีน

ในการหาปริมาณเอสโตรเจนรีเซพเตอร์จากสารละลายไซโทซอลของมดลูก โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงนี้ เปรียบเทียบกับวิธี ดีซีซีเดิม และ วิธีโพลีเอทิลีนไกลคอล พบว่าวิธีที่ดัดแปลงนี้ให้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนน้อยที่สุด และให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานน้อยกว่าวิธีเดิม วิธี ดีซีซีที่ดัดแปลง เป็นวิธีที่ทำซ้ำได้ และแม่นยำกว่าวิธีอื่นๆ จึงเลือกใช้เป็นวิธีที่จะวัดปริมาณเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ ในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมของผู้ป่วย.

เอสโตรเจนรีเซพเตอร์จากไซโทซอลของมดลูกหมูกัดให้บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิคการดูดซับ 2 ขั้นตอน โดยพบว่าเทคนิคการดูดซับด้วยเอพารินที่ติดบนเม็ดเซฟาโรส สามารถสกัดเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ได้บริสุทธิ์ดีกว่าเดิม 8 เท่า และได้ปริมาณ 23 เปอร์เซ็นต์ของสารตั้งต้น ในขณะที่เดียวกันเทคนิคการดูดซับด้วยไดเอทิลสตีลเบสตรอลที่ติดบนเม็ดเซฟาโรส สามารถสกัดเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ได้บริสุทธิ์ดีกว่าเดิม 16 เท่า และได้ปริมาณ 16 เปอร์เซ็นต์ ของสารตั้งต้น. จากการทดสอบคุณสมบัติการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าผ่านตัวกลางโพลีอะคริลลาไมด์ ที่มีสารโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ของสารสกัดบริสุทธิ์ โดยการดูดซับด้วยเอพารินเซฟาโรส จะปรากฏเป็นแถบสี 10 แถบรวมทั้งแถบสีขนาดใหญ่เด่นชัด 3 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 6.4 , 8.3 และ 10.0×10^4 คอลตัน แต่สารสกัดบริสุทธิ์โดยการดูดซับด้วยไดเอทิลสตีลเบสตรอลเซฟาโรส พบแถบสีเพียง 2 แถบที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 9.5 และ 10.0×10^4 คอลตัน ซึ่งควรจะเป็นหน่วยย่อย 2 หน่วยของเอสโตรเจนรีเซพเตอร์นี้ การตรวจวัดปริมาณ เอสโตรเจน และ โพรเจสเตอโรน รีเซพเตอร์ ในสารตัวอย่างของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจำนวน 158 ราย โดยวิธีดูดซับด้วยผงถ่านที่ดัดแปลงจะพบว่า เอสโตรเจนรีเซพเตอร์บวกอย่างเดียว (อีอาร์ บวก) 34.2 เปอร์เซ็นต์ ($54/158$), โพรเจสเตอโรนรีเซพเตอร์บวกอย่างเดียว (พีอาร์

บวก) 13.3 เปอร์เซ็นต์ (21/158) แต่จะพบ อีอาร์บวก กับ พีจีอาร์บวก 6.9 เปอร์เซ็นต์ (11/158), อีอาร์ลบ กับ พีจีอาร์บวก 6.3 เปอร์เซ็นต์ (10/158) อีอาร์บวก กับ พีจีอาร์ลบ 27.2 เปอร์เซ็นต์ (43/158) และ อีอาร์ลบ กับ พีจีอาร์ลบ 59 เปอร์เซ็นต์ (94/158). เมื่อแจกแจงผู้ป่วยตามลักษณะทางคลินิก จะพบว่าผู้ป่วยระยะที่ 3 จะมีเปอร์เซ็นต์เอสโตรเจนรีเซพเตอร์บวกมากที่สุด แต่ ผู้ป่วยระยะที่ 4 จะมีเปอร์เซ็นต์โปรเจสเทอโรนรีเซพเตอร์บวกมากที่สุด และจากการแจกแจงผู้ป่วยตามภาวะการมีประจำเดือน จะพบว่า ค่าเฉลี่ยของเอสโตรเจนรีเซพเตอร์บวก และ โปรเจสเทอโรนรีเซพเตอร์บวก ในผู้ป่วยวัยหมดประจำเดือน ไม่แตกต่างทางสถิติจากวัยมีประจำเดือน.

สรุปว่า วิธี ดีซีซีที่ดัดแปลงนี้ ได้รับการพัฒนาโดยการเติมกลีเซอรอล และ โมลิบเดนท ลงไปในเนื้อเยื่อตัวอย่างก่อนนำมาตรวจวัด เพื่อช่วยรักษาเสถียรภาพของสารประกอบเชิงซ้อน ระหว่าง รีเซพเตอร์ และ ฮอร์โมนทั้งสอง ผลลัพธ์จากการวิเคราะห์หาปริมาณรีเซพเตอร์ด้วยวิธีนี้ได้ค่าใกล้เคียงกับวิธี ดีซีซีเดิม แต่แม่นยำกว่า จึงน่าจะได้นำวิธีที่พัฒนานี้มาใช้เป็นงานบริการตรวจวัด ปริมาณเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ และ โปรเจสเทอโรนรีเซพเตอร์ ในก้อนเนื้ออกของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved