

자궁내막증 환자의 자궁내막내 성호르몬 수용체, Integrins, Cyclooxygenase의 발현과 변이 양상

아주대학교 의과대학 산부인과학교실¹, 분자과학기술과², 해부병리학교실³,
연세대학교 의과대학 산부인과학교실⁴

김미란¹ · 박동욱¹ · 권혁찬^{1,2} · 황경주¹ · 주희재³ · 조동제⁴ · 김세광⁴ · 오기석¹

Expression Pattern of Progesterone Receptor, Integrin, Cyclooxygenase (COX) in Human Endometrium of Patients with Endometriosis

Mi Ran Kim¹, Dong Wook Park¹, Hyuck Chan Kwon^{1,2}, Kyoung Joo Hwang¹,
Hee Jae Joo³, Dong Jae Cho⁴, Sei Kwang Kim⁴, Kie Suk Oh¹

*Department of Obstetrics and Gynecology¹, Department of Molecular Science
and Technology², Department of Pathology³, Ajou University School of
Medicine, Suwon, Department of Obstetrics and Gynecology,
Yonsei University College of Medicine⁴, Seoul, Korea*

Objectives: To develop a new immunohistochemical marker system for supplementation of the Noyes histological classification of the endometrium in women of child bearing age with regular menstrual cycles, and to employ this system to evaluate pathologic factors involved in endometriosis, and thus to ascertain if it is useful in diagnosis.

Materials and Methods: Endometrial biopsies were sampled from the posterior fundus of 41 (24 proliferative phases, 17 secretory phases) women with regular menstrual cycles (28-32 days), and each sample was immunohistochemically stained according to Noyes et al (1975) for determination of expression for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), integrin α_1 , α_4 , β_3 , COX-1 and COX-2. Then, the PR, integrin β_3 , and COX-2 which were clearly expressed in the luteal phase was with endometrial samples were obtained from 20 cases of normal patients (group 1) and 25 cases with endometriosis (group 2) after confirming the day of ovulation by sex steroid level measurements 7-8 days after ovulation

Results: In the regular menstruation group the expression of ER showed a tendency to be increased in the proliferative phase and decreased in the secretory phase, and was the highest in the proliferative phase. However, PR in the stromal cells showed no change in the entire menstrual cycle while in the epithelial cells, PR reached a peak in the late proliferative phase and was almost absent in the secretory phase. Integrin α_1 , α_4 , and β_3 expression in the epithelial cells was absent in the proliferative phase but α_1 was strongly expressed starting from the early secretory phase into the entire secretory phase. α_4 was expressed strongly in the early and mid secretory phases and disappeared in the late proliferative phase, while β_3 appeared after the mid secretory phase and continued to be expressed until the late secretory phase. Expression in the stromal cells

주관책임자: 권혁찬, 아주대학교 의과대학 산부인과학교실, 아주대학교 대학원 분자과학기술과
경기도 수원시 팔달구 원천동 산5번지 442-749

본 연구는 '97년도 보건과학기술 연구개발사업의 지원 (HMP-97-M-1-0006)에 의하여 이루어진 것임

was weak overall and did not show any cyclic pattern. COX-1 expression was shown as a cyclic pattern in the stromal and epithelial cells and was particularly strongly expressed in the mid secretory phase of epithelial cells, and in the mid secretory and menstruation phase of stromal cells. In the endometrial epithelial cells there was strong expression during the entire cycle with stronger expression in the secretory phase compared to the proliferative phase. COX-2 was clearly expressed in the late proliferative, early and mid secretory phases in the stromal cells. No expression was observed in the proliferative phase of the epithelial cells, but which began to appear in the early secretory phase reaching a significant pattern from the mid secretory phase onwards. There was almost no expression in the stromal cells.

In the cases with endometriosis showing normal endometrial maturation according to the Noyes classification, PR expression was increased while Integrin- β_3 의 expression was significantly decreased compared to the normal group. Also, COX-2 expression was slightly decreased in the stromal cells of patients with endometriosis while it was significantly increased in the stromal cells.

Conclusion: Immunohistochemical markers can supplement the original Noyes classification of histological endometrial dating and therefore ascertain existing pathologic conditions. Particularly for patients with endometriosis with normally mature endometrial cells, changes in COX-2 and integrin expression patterns may assist in elucidating pathophysiologic mechanisms and therefore aid in the diagnosis of abnormal implantation conditions, and consequently determine a treatment modality.

Key Words: Implantation, Endometriosis, Sex steroid receptor, Cyclooxygenase, Integrin

착상은 인간을 포함한 포유류의 특징으로서 모체와 태아의 첫 접촉을 의미하며 이의 성공적 과정을 통해서 미분화된 배아의 단계를 넘어 보다 복잡한 발달을 할 수 있는 배아 및 개체로 진입하는 계기를 제공한다. 인간 배아의 착상은 자궁내막과 배아 간의 전달 체계에 의해 조절되는 일련의 과정으로서¹ 배아와 자궁내막간의 성공적인 착상과 후속적인 탈락막 현상이 일어나기 위해서는 두 가지의 필수적인 과정이 필요하다.^{2,3} 첫 번째는 배아가 자궁내막에 접촉하려는 부위에서의 혈관 투과성의 증가이며, 두 번째는 배아가 자궁내막의 기저층에 접촉하여 뚫고 들어가는 과정으로 이것은 곧 자궁내막 기질세포가 탈락막 세포로 전환됨을 의미한다. 이러한 착상의 과정에는 growth factors,⁴ cytokines,⁵ homeotic factors,⁶ prostaglandins 등이^{7,8} 관여한다고 알려져 있으며, 이에 대한 증거들이 1980년 대 말 면역학 및 분자생물학이 발전되면서 활발히 밝혀지고 있는 추세이다.

자궁내막의 생리주기에 따른 조직학적 변화 양상은 1975년 Noyes 등에 의해 제시되었으며 현재까지 자궁내막 성숙도 측정 (endometrial dating)의 중요한 지표로 이용되고 있다.⁹ 그러나 최근 prostaglandins (PG),¹⁰ estrogen과 progesterone 수용체

(ER, PR),¹¹ α_1 , α_4 , α_v , β_3 integrins,¹² IGF-II, IGF-I/II Receptor mRNA, TGF β , IL-1, IL-1 Receptor type I, CSF-1, LIF 등의 peptide growth factors, cytokines과 그 수용체가 생리주기에 따른 주기적 변화 양상이 보고되어 있으며,¹³ Simon 등은 착상과정에 있어서 성호르몬에 의해 유도된 다양한 growth factors, cytokines 등이 autocrine 및 paracrine 작용을 통해 배아 착상에 적합한 내막 변성을 유발한다는 "cytokines adhesion molecules invasive proteinase hypothesis"를 제시한 바 있다.¹⁴ 이러한 연구결과는 성호르몬의 주기적 분비 양상에 의해 유도된 다양한 growth factors, cytokines 및 그 수용체의 발현이 autocrine/paracrine 작용에 의해 자궁내막의 조직변화를 조절한다는 것을 의미하며, 경구용 피임제 사용,¹⁵ 항 progesterone 사용,¹⁶ 황체기 결함,^{17,18} 자궁내막증 등에서 변형되는 것이 보고되고 있다.^{19,20} 따라서 이러한 발현 양상의 지표화는 기존의 조직병리학적 내막성숙도를 보완할 뿐 아니라 착상과 관련된 질환의 병리생리학적 원인 규명을 가능케 하며 진단 및 치료에 유용한 지침이 될 것으로 기대되고 있다.

이에 본 저자들은 정상적인 생리주기를 갖는 한국 여성의 자궁내막조직을 대상으로 estrogen 수용체 (ER), progesterone 수용체 (PR), integrin α_1 ,

α_4 , β_3 과 prostaglandin의 생성에 관여하는 COX-1과 COX-2의 주기적 발현 양상을 조직학적 성숙도와 비교 관찰을 통해 조직학적 분류를 보완할 수 있는 면역조직화학적 지표개발을 하고자 하였으며, 이를 기준으로 착상관련 질환인 자궁내막증을 가지고 있는 한국 여성의 자궁내막조직을 대상으로 착상기에 특징적으로 상대적 변화 양상이 뚜렷하여 지표화 될 수 있는 progesterone 수용체, integrin- β_3 , COX-2의 발현 양상을 각각의 조직학적 성숙도와 비교하여 착상관련 질환의 병인을 밝혀내고 나아가 그러한 질병들의 진단 및 치료에 유용한 지침이 되고자 하였다.

연구대상 및 방법

연구는 착상관련 질환이 없는 정상적인 생리주기를 갖고 있는 환자 (이하 정상 생리군)에서 생리주기에 따른 ER, PR, integrin α_4 , α_4 , β_3 와 COX-1과 COX-2의 주기적 발현 양상을 확인하여 새로운 지표의 개발을 하고, 착상과 관련된 것으로 추정되고 있는 자궁내막증이 있는 환자에서 착상기인 중기 분비기에 뚜렷한 특징을 갖는 생체지표의 변이 양상을 확인하고자 하였다.

1. 연구대상

1) 정상 생리군

아주대학교 병원 산부인과를 내원한 28~32일의 정상적인 생리주기 (31.2 ± 2.4)를 갖는 20~39세 (34.4 ± 5.7) 사이의 가임기 환자에서 자궁경부 병변 (CIN II, 28례; CIN III, 14례)으로 전자궁적출술을 시행한 41례 (증식기 24례, 분비기 17례)를 대상으로 자궁내막 후저부에서 자궁내막조직을 채취하였다. 채취 직후 PBS로 세척하여 적혈구를 제거한 후에 10% paraformaldehyde에 24시간 고정한 후 paraffin에 포매하여 4 μ m 두께로 박절하여 슬라이드로 만든 후 통상의 탈 paraffin 과정과 합수과정을 수행하였다. 각 조직은 통상적인 Hematoxylin-Eosin 염색법으로 염색하여 광학현미경으로 Noyes 등 (1950)의 조직화학적 기준에 따라 배란기를 기준으로 -4일까지의 조직을 후기 증식기 (6례: Group II)로 -5일에서 -10일까지의 조직을 전기 증식기 (19례: Group I)로 나누었으며, 배란 후 5일까지를 전기 분비기 (5례: Group III)로 6일에서 10일까지를 중기 분비기 (6례: Group IV)로 그 이상 14일까지의 조직을 후기 분비기 (6례: Group V)

로 나누어 분류한 후 estrogen 및 progesterone 수용체 (ER 및 PR), integrin α_4 , α_4 , β_3 , COX-1과 -2의 발현을 catalyzed signaling amplification (CSA) system (DAKO, Denmark)을 이용하여 염색하였다.

2) 자궁내막증 질환군

아주대학교 병원 산부인과 불임클리닉을 방문한 60명의 환자중 남성불임 및 난관인자 외에 다른 요인이 없었던 20명의 환자를 대조군 (A군)으로 설정하였고, 3기 이상의 자궁내막증 (endometriosis stage III, IV)을 가지고 있는 환자 25명을 실험군 (B군)으로 하였다. 내원한 모든 대상 환자에서 질식 초음파 및 소변의 황체화 호르몬 검출을 통해 배란을 확인하고 배란일로부터 7~8일 째 외경이 3.14 mm인 Pippelle (laboratoire CCD, Paris, France)과 관의 외경이 1.0 mm인 변형된 T.D.T. (laboratoire CCD, Paris, France)관을 사용하여 자궁내막세포를 채취하였다. 각 조직은 통상적인 Hematoxylin-Eosin 염색법으로 염색하여 광학현미경으로 Noyes 등 (1950)의 조직화학적 기준에 따라 분류하였으며 progesterone 수용체 (PR), integrin- β_3 , COX-2의 발현을 catalyzed signaling amplification (CSA) system (DAKO, Denmark)을 이용하여 염색하였다.

2. 연구 방법

1) 면역조직화학적 염색

ER과 PR의 면역조직화학적 염색은 표본을 4% H_2O_2 용액에 5분간 전처리하여 조직에 남아 있는 내재성 peroxidase를 제거한 후 1:200으로 희석한 일차항체 (mouse antihuman monoclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)로 상온에서 1시간 동안 항습 chamber에서 반응시킨 후 Tris-buffered saline (TBS)으로 세척하였으며, 이차항체를 15분간 처리한 후 TBS로 세척하였다. Streptavidin-biotin complex로 15분간 처리한 다음 TBS로 세척한 후 amplification reagent로 15분간 처리하였으며, 다시 TBS로 세척한 후 streptavidin-peroxidase로 15분간 처리하였다. Diaminobenzidine (DAB; DAKO, Denmark)을 이용하여 발색시켜 hematoxylin으로 대조 염색한 후 Canadian balsam으로 봉입하였다.

Integrin α_4 에 대해서는 rabbit anti-human integrin α_4 subunit polyclonal antibody를, α_4 는 mouse anti-human integrin α_4 monoclonal antibody를, β_3 는 mouse anti-human integrin β_3 monoclonal antibody

(Chemicon international INC., Temecula, CA., USA)를 이용하였으며, Horse Radish Peroxidase (HRP) conjugate secondary antibody를 포함한 면역조직화학염색 ABC kit로 Histostain-SP kit (primary antibody mouse and broad spectrum antibody, AEC chromogen, Zymed. Lab. Inc., South San Francisco, CA., USA)를 이용하였다. 면역조직화학염색은 avidin-biotin-peroxidase technique을 이용하여 시행하였다.²¹ 절편된 조직 슬라이드를 phosphate buffered saline (PBS)에 2분간 3회 씻은 후 serum blocking solution을 각 표본에 첨가한 후 10분간 방치하고 여분의 용액은 제거하였다. 1:400으로 희석된 일차항체를 각 표본에 첨가하고 항습 chamber에서 30~60분간 반응시켰다. 여기에 biotinylated 이차항체를 첨가하고 10분간 방치한 후 PBS에 세척하였다. 그런 다음 avidin이 conjugate된 enzyme를 각 표본에 첨가하고 10분간 반응시킨 후 PBS에 씻은 다음 substrate chromogen을 처리하여 발색시켰으며, hematoxylin으로 대조 염색을 한 후 Balsam을 사용하여 mounting하였다. 염색의 음성대조군으로 일차항체를 포함하지 않은 생쥐와 백서의 IgG로 처리한 슬라이드를 비교하였다.

COX-1과 -2에 대한 면역조직화학적 염색은 박절한 표본을 4% H₂O₂ 용액에 5분간 전 처리하여 조직에 남아 있는 내재성 peroxidase를 제거한 후 1:400으로 희석한 COX-1과 COX-2 일차항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc., California, USA)로 상온에서 1시간 동안 항습 chamber에서 반응시킨 후 LSAB- kit (DAKO A/S, Glostrup, Denmark)에 포함된 이차항체를 사용하여 15분간 처리하였다. 표본은 증류수로 세척한 후 diaminobenzidine (DAB; DAKO A/S, Denmark)을 이용하여 발색시켰으며, hematoxylin으로 10초간 대조 염색하여 canadian balsam으로 봉입하였다.

2) Western blotting analysis

(1) 단백질의 분리 (Purification of total protein)

Defreezer (-70℃)에 보관된 각 군의 내막조직을 먼저 PBS buffer (pH 7.4)로 세척하고 단백질 분해 효소 억제제인 aprotine과 PMSF (phenyl-methylsulphonyl fluoride)가 포함된 RIPA cell lysis solution (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 10 mM sodium deoxycholate)을 첨가하여 homogenizer로 잘게 부순 후 30분간 얼음 위에서 반응시킨 후 세포질 추출물을 4℃, 14800 rpm에서

15분간 원심분리하여 상층액만을 분리한 후 얻은 단백추출물을 Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량 분석하여 적당량으로 분주한 후 -70℃에 보관하여 실험에 사용하였다.

(2) 단백질의 전기영동 (Electrophoresis of protein)

추출된 단백질 20~30 µg 정도를 2x SDS sample buffer 용액 (50 mM Tris-HCl, 100 mM dithiothreitol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol)에 1:1로 희석하여 100℃에서 5분간 가열한 후 5% stacking gel과 10% acrylamide separating gel로 구성된 1 mm SDS polyacrylamide gel에 loading 후 1X 전기영동 완충용액 (25 mM Tris, 250 mM glycine pH 8.3, 0.1% SDS)으로 채운 후 100 volt에서 2분간 전기영동 하였다.

(3) Western blotting analysis

전기영동 후 단백질을 wet-electrotransfer (transfer buffer; 48 mM Tris, 39 mM glycine, 0.073% SDS, 20% methanol)를 통하여 4℃에서 120 mA 3 volt로 2시간 동안 Nitrocellulose (NC) filter로 전이시킨 후 전이된 NC filter washing buffer (TBS-T; 25 mM Tris-HCl pH 7.6, 500 mM NaCl, 0.05% v/v Tween-20)에 무지방유를 5%로 혼합하여 NC filter (10 ml)의 크기에 맞는 적당한 양으로 실온에서 1시간 동안 흔들어서 비특이성 항원의 결합을 차단하였다. Washing buffer로 20분씩 2회 이상 세척 후 5% 무지방유에 1차항체 (COX-1 Ab; rabbit polyclonal IgG; K-18, 1021; Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA)를 1:500으로 희석하여 만든 용액에 NC filter를 넣고 실온에서 2시간 이상 반응시킨 다음, 역시 Washing buffer로 20분씩 2회 이상 세척 후 5% 무지방유에 2차항체 (Rabbit Ig, HRP linked whole antibody; Amersham, Buckinghamshire, England)를 1:5000으로 희석하여 만든 용액에 실온에서 1시간 반응시킨 후, 다시 20분씩 2회 이상 세척하였다. 모든 과정을 거친 NC filter를 wrap위에 올려놓고 ECL western analysis system reagent kit의 1번 용액과 2번 용액을 동량을 잘 섞은 뒤 Hybond-N 위에 적시고 1분 정도 반응시킨 후 즉시 wrap으로 싸다음 감광판에 직접 넣고 암실에서 X-ray film에 노출시킨 후 현상하였다.

3) 통계학적 분석

면역조직화학적 염색된 슬라이드를 광학 현미경 (phase contrast inverted microscope; Diaphot

300, Nikon Co., Tokyo, Japan)으로 관찰하여 자궁 내막 상피세포와 기질세포에서 세포질 및 세포막에 대한 각 ER, PR, integrin, COX-1, COX-2 항체의 염색 상태 및 정도를 관찰하여 염색이 되지 않은 경우 0으로, 경도로 염색된 경우를 1, 중등도로 염색이 된 경우 2, 고등도로 염색된 경우를 3으로 표시하였다. 정량적 분석을 위해 mean HSCORE (HSCORE = $\sum P_i [i + 1]$, $i = 0, 1, 2, 3$, P_i 는 염색된 세포의 percentage) (1988, Lessey et al.²²)를 mean $\pm$ SEM로 표현하였다. 통계학적 분석방법으로는 SPSS for Windows release 7.0 프로그램의 Oneway Anova with Scheffe test를 이용하였고 p 값이 0.05 이하를 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

1. 정상 생리군

1) 성호르몬 수용체의 발현

자궁내막 상피세포에서의 ER의 면역조직화학적 염색의 HSCORE는 증식기 (Group I: 218.4 ± 12.7 , Group II: 263.3 ± 14.5)가 분비기 (Group III:

142.0 ± 13.5 , Group IV: 138.3 ± 18.1 , Group V: 103.3 ± 9.9)보다 유의하게 높았으며 후기 증식기 (Group II)에서 가장 높게 발현되었다 ($p < 0.05$). 기질세포의 ER은 후기 증식기를 정점으로 증가 후에 감소되는 경향을 보이며 증식기 (Group I: 217.4 ± 11.1 , Group II: 250.0 ± 11.5) 및 전기 분비기 (Group III: 210.0 ± 24.3)에 비해 중기 및 후기 분비기 (Group IV: 160.0 ± 11.3 , Group V: 96.5 ± 8.5)에 유의하게 감소되었다 ($p < 0.05$).

상피세포의 PR은 전기 증식기 (Group I: 185.8 ± 16.2)에 비해 후기 증식기 (Group II: 306.7 ± 43.3)에 유의한 상승을 보였으며, 분비기 (Group III: 66.0 ± 13.3 , Group IV: 53.3 ± 12.6 , Group V: 36.7 ± 6.7)에서는 현저한 감소를 보였다 ($p < 0.05$). 기질세포의 PR은 생리주기에 따라 유의한 변화 양상을 변화를 보이지 않았다 (Group I: 178.4 ± 14.3 , Group II: 236.7 ± 29.1 , Group III: 236.0 ± 14.4 , Group IV: 220.0 ± 11.5 , Group V: 196.7 ± 9.5 , $p > 0.05$) (Figure 1).

2) Integrin의 발현

상피세포에서의 integrin α_1 의 면역조직화학적 염색의 평균 HSCORE는 전기 증식기 (Group I: 24.2 ± 5.0)에는 거의 발현이 되지 않고 후기 증식

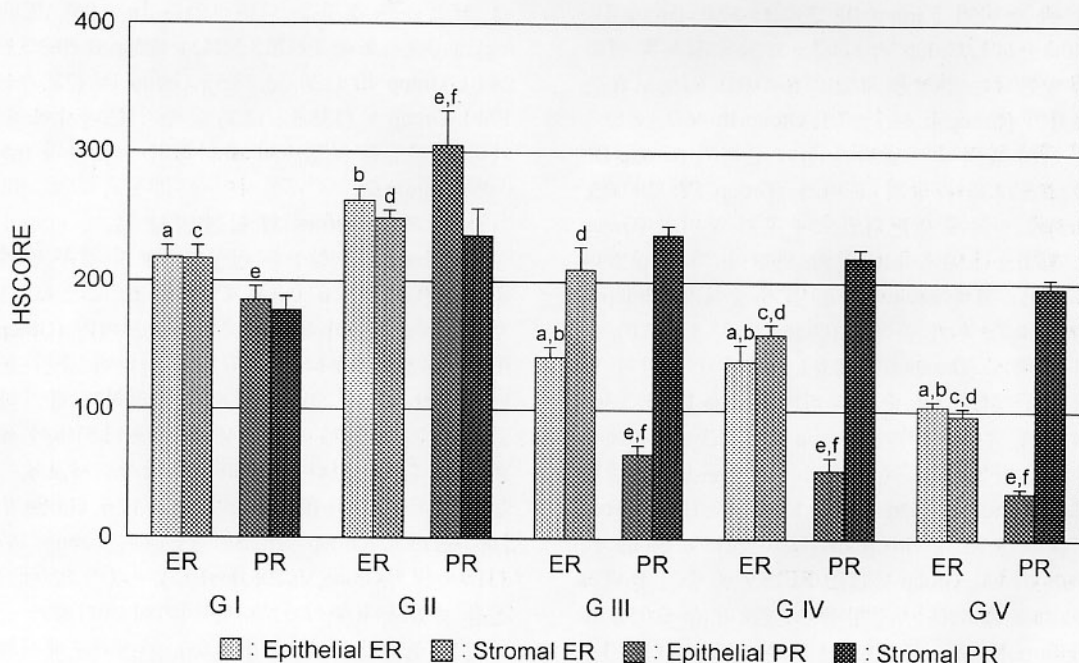


Figure 1. Mean HSCORE of estrogen receptors (ER) and progesterone receptors (PR) in endometrium (Mean $\pm$ SEM; a, b, c, d, e, f: $p < 0.05$).

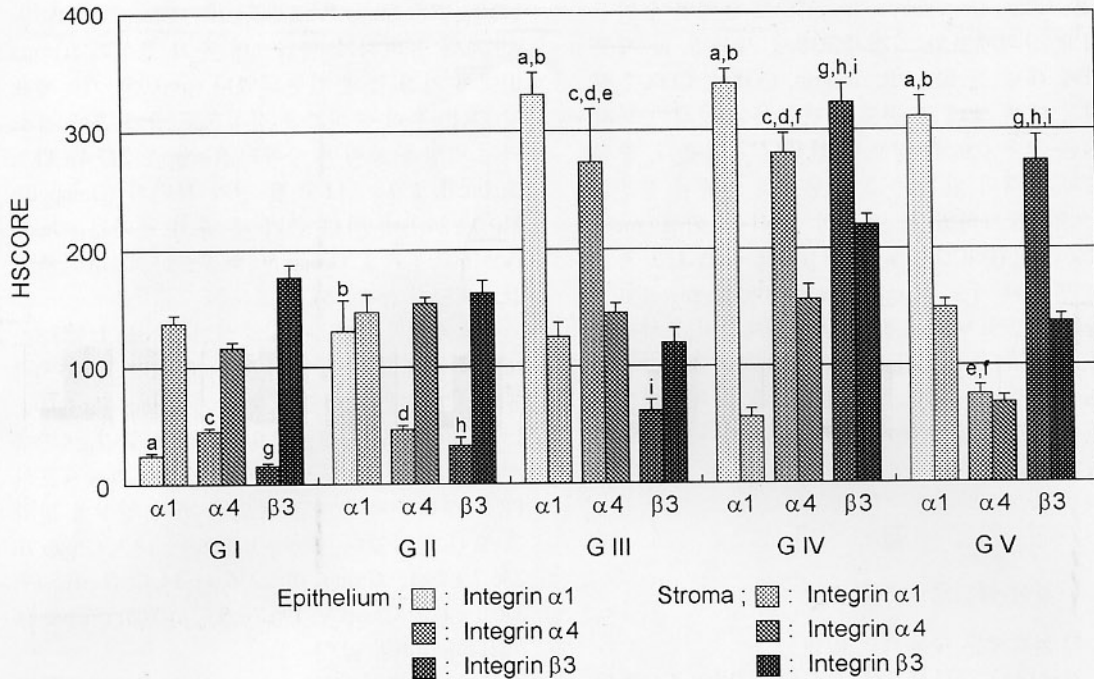


Figure 2. Mean HSCORE of integrin α_1 , α_4 , β_3 on endometrium (Mean $\pm$ SEM; a, b, c, d, e, f, g, h, i: $p < 0.05$).

기 (Group II: 130.0 ± 55.7)부터 발현되기 시작하여 전 분비기 (Group III: 330.0 ± 30.0 , Group IV: 340.0 ± 24.1 , Group V: 311.7 ± 35.3)에 걸쳐 뚜렷하게 발현되는 양상을 보였고 ($p < 0.05$), integrin α_4 는 증식기 (Group I: 44.7 ± 7.1 , Group II: 46.7 ± 8.8)에는 거의 발현되지 않다가 전기 분비기 (Group III: 272.0 ± 71.1)와 중기 분비기 (Group IV: 280.0 ± 31.3)에 강하게 발현되었으나 후기 분비기 (Group V: 75.0 ± 15.9)에서는 거의 발현이 되지 않았다 ($p < 0.05$). 또한 integrin β_3 는 전기 증식기 (Group I: 15.3 ± 4.7), 후기 증식기 (Group II: 33.3 ± 12.0), 전기 분비기 (Group III: 62.0 ± 17.7)에서는 거의 발현되지 않았으나, 중기 분비기 (Group IV: 323.3 ± 24.9) 및 후기 분비기 (Group V: 273.3 ± 34.6)에서 강하게 발현되었다 ($p < 0.05$). 기질세포에서의 발현 양상은 integrin α_1 이 Group I (138.4 ± 13.8), Group II (146.7 ± 35.3), Group III (126.0 ± 27.7), Group IV (56.7 ± 16.3), Group V (150.0 ± 16.9)로 중기 분비기에 다소 감소하는 경향을 보였으며 ($p < 0.05$), integrin α_4 는 Group I (115.8 ± 14.6), Group II (153.3 ± 14.5), Group III (146.0 ± 18.6), Group IV (156.7 ± 16.5), Group V (68.3 ± 10.8)으로 α_1 에 비해 전반

적으로 약한 발현 양상을 보였으며, 후기 분비기에 감소하는 경향을 나타내었다 ($p < 0.05$). 또한 integrin β_3 는 Group I (176.3 ± 24.3), Group II (163.3 ± 24.0), Group III (120.0 ± 23.5), Group IV (220.0 ± 17.9), Group V (138.3 ± 13.2)로 중기 분비기에 증가하는 양상을 보였으나 유의하지는 않았다 ($p > 0.05$) (Figure 2).

3) Cyclooxygenase의 발현 양상

COX-1의 발현 양상은 선상피세포의 경우 전기 증식기 (Group I: 67.0 ± 12.4 , Group II: 8.3 ± 4.0)까지는 발현이 거의 없었으나, 전기 분비기 (Group III: 123.4 ± 10.5)부터 발현되기 시작하여 중기 분비기 (Group IV: 221.0 ± 15.8)에 유의하게 증가하였고, 후기 분비기 (Group V: 143.3 ± 13.5)에서 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$). 내강상피세포에서는 전주기에 걸쳐 (Group I: 216.9 ± 17.6 , Group II: 240.0 ± 15.1 , Group III: 321.0 ± 14.4 , Group IV: 331.8 ± 12.7 , Group V: 306.0 ± 10.7) 뚜렷한 발현 양상을 보였으나 증식기보다 분비기에 유의하게 증가되는 경향을 보였다 ($p < 0.05$). 기질세포에서의 발현은 전기 증식기 (Group I: 250.8 ± 15.4)에 유의하게 강한 발현을 보인 후 후기 증식기 (Group II:

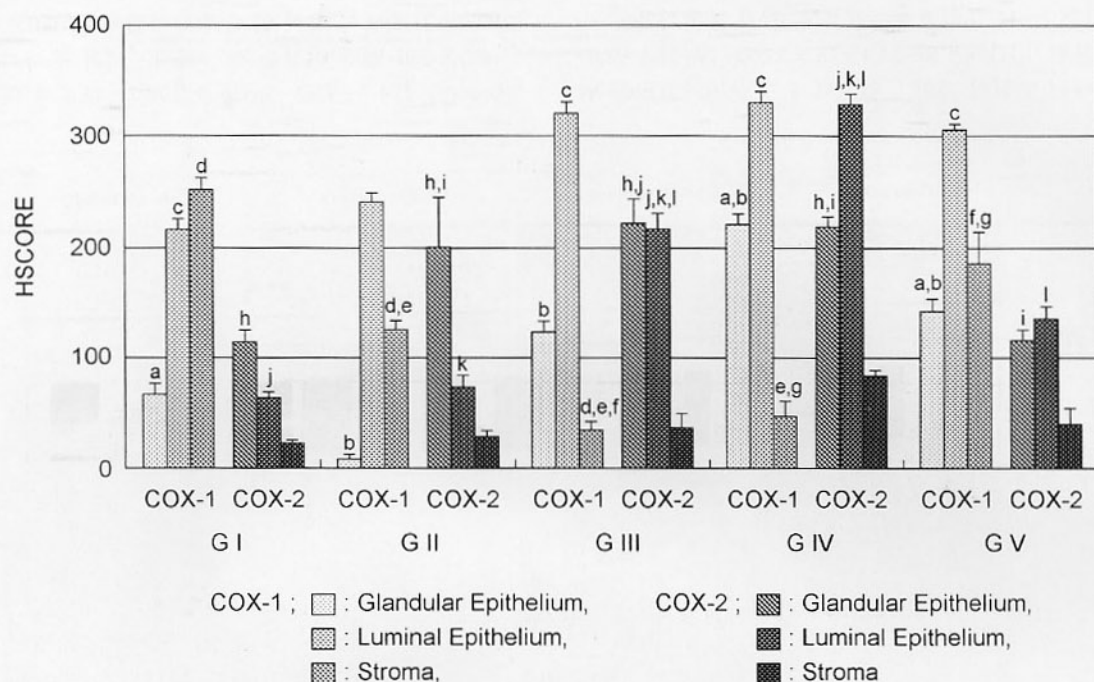


Figure 3. Mean HSCORE of COX-1, -2 on endometrium (Mean $\pm$ SEM; a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o: $p < 0.05$).

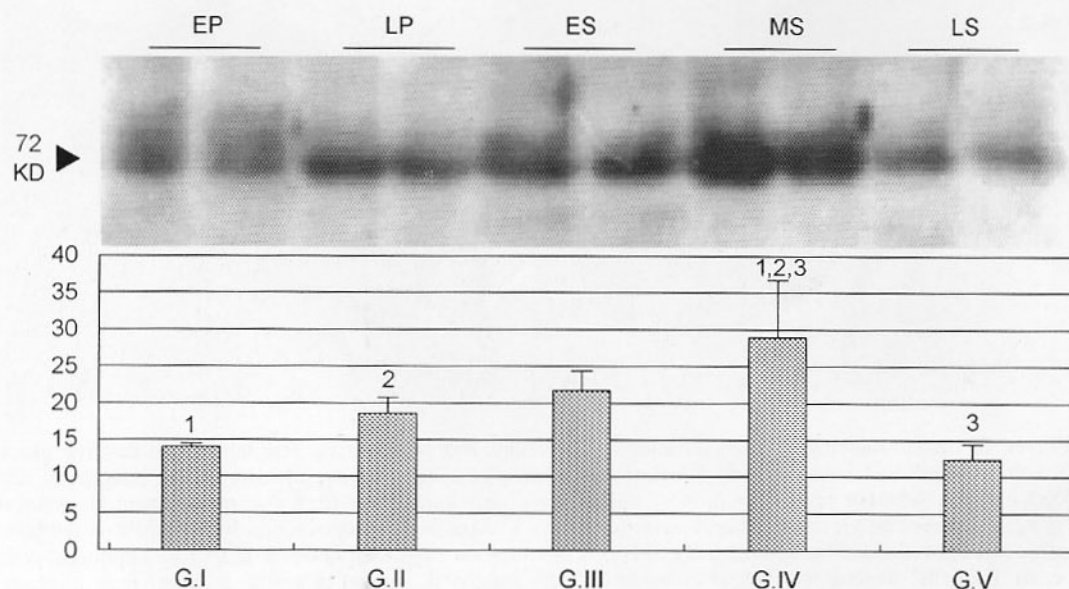


Figure 4. Western blotting using a monoclonal antibody against human COX-2 in lysate of human endometrium from each stage of the cycle. Top panel shows the specific bands in the lysate and the bottom panel shows the relative changes in the protein concentration of COX-2 enzymes in each groups, measured as densitometric units of specific bands on Western blots. Data are the mean $\pm$ SD, and bars with different letters at the top vary significantly by Scheffe test ($p < 0.05$).

125.7±11.7)에 감소하였으며, 전기 분비기와 중기 분비기 (Group III: 34.4±18.3, Group IV: 56.5±8.8)에는 발현이 거의 없었으나 후기 분비기 (Group V:

192.4±21.8)에서 의미 있게 증가하였다 ($p<0.05$).

COX-2의 발현 양상을 선상피세포에서 증식기 (Group I: 114.7±12.2, Group II: 198.7±45.7)에 비

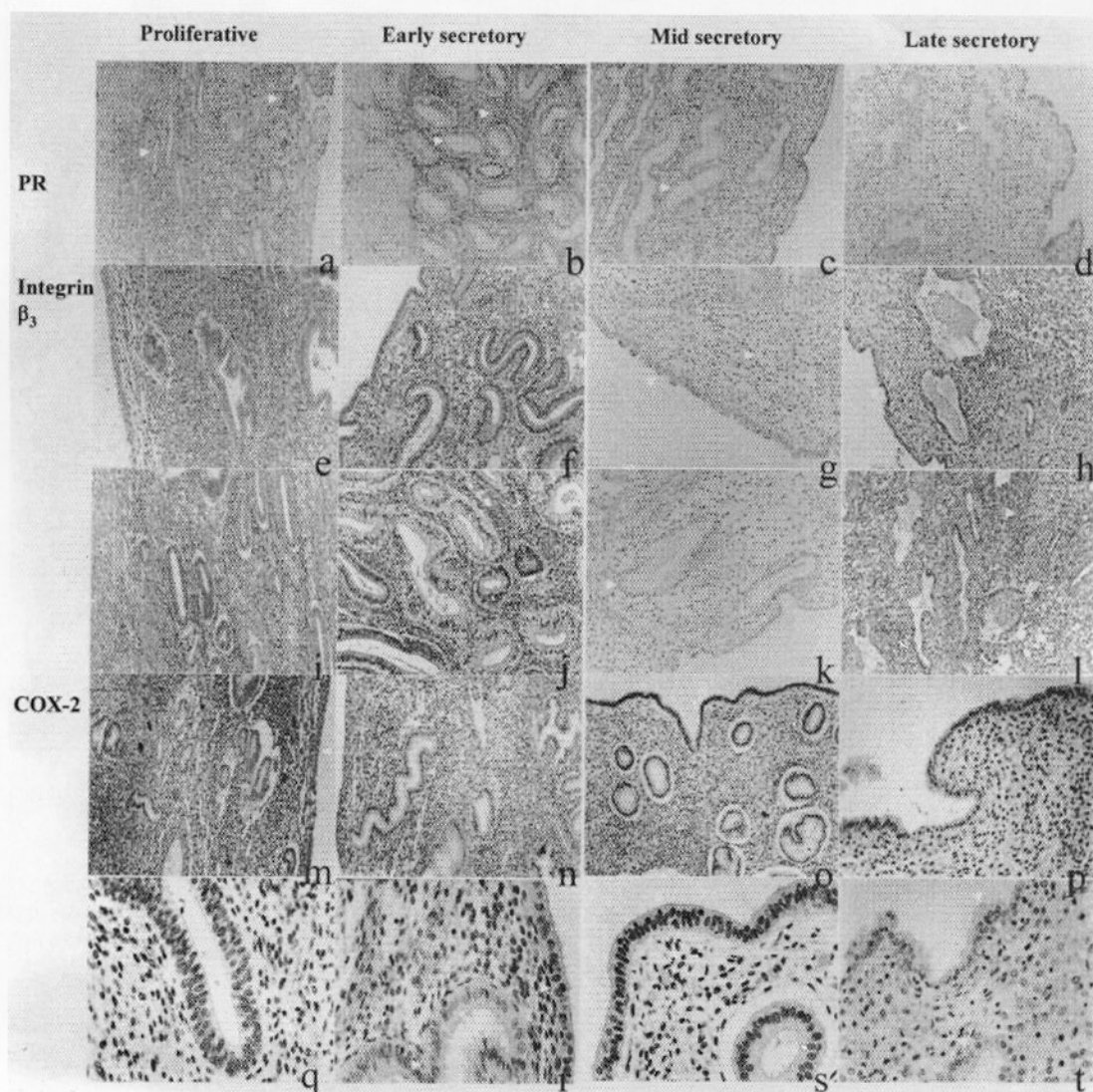


Figure 5. Immunostaining of COX-2, integrin β_3 subunit and progesterone receptor in proliferative phase versus early luteal, mid luteal and late luteal phase endometrium. The staining intensity of PR, integrin β_3 and COX-2 in the proliferative phase (a, e, i, m, q, respectively), early luteal phase (b, f, j, n, r, respectively), midluteal (c, g, k, o, s, respectively), and late luteal phase (d, h, l, p, t, respectively) endometrium. Increased PR in the proliferative endometrial epithelial and stromal cells (a) demonstrates a significant decrease in secretory epithelial cells (b, c, d). Epithelial staining was judged as nearly zero for integrin β_3 subunit in proliferative and early secretory epithelial cells (e, i, f, j). Immunostaining in the mid and late secretory phase for β_3 subunit demonstrates a significant increase in epithelial cells (g, k, h, l). COX-2 expression defined in the epithelial cells was present only in glandular epithelial cells during proliferative phase (m, q) but gradually expressed in luminal epithelial cells during luteal phase (n, r, o, s, p, t) from near the basalis layer upwards. Integrin with COX-2 were expressed on glandular epithelial cells of midsecretory phase (g, k, o, s) whereas PR expression was significantly decreased (c) (Magnification x100, 200, 400).

Table 1. The result of endometrial dating by Noyes classification

Groups	Patient no.	In phase no. (%)	Out po phase no. (%)
Group A	20	18 (90)	2 (10)
Group B	25	18 (72)	7 (28)
Total	60	45	15

p=NS

해 전기 및 중기 분비기 (Group III: 218.4 ± 18.8 , Group IV: 212.5 ± 15.1)에 유의하게 증가된 후, 후기 분비기 (Group V: 121.2 ± 14.4)로 다시 감소하였다 ($p < 0.05$). 내강상피세포에서의 발현 양상은 증식기 (Group I: 74.6 ± 7.9 , Group II: 84.7 ± 7.3)에는 미약하게 염색되었으나 전기 및 중기 분비기 (Group III: 212.8 ± 13.8 , Group IV: 321.0 ± 9.0)에 통계적으로 유의한 상승을 보인 후에 후기 분비기 (Group V: 134.2 ± 13.4)에 다시 발현이 약해지는 양상을 보였다 ($p < 0.05$) (Figure 4). 기질세포에서 COX-2의 발현 양상 (Group I: 24.8 ± 7.8 , Group II: 37.2 ± 4.4 , Group III: 36.0 ± 9.0 , Group IV: 88.8 ± 10.2 , Group V: 42.3 ± 12.2)은 생리주기와 상관없이 미약한 발현상태를 보였다 ($p < 0.05$) (Figure 3).

발현 양상이 주기적으로 뚜렷하지만 전반적으로 표현되는 COX-2에 대한 Western blotting의 상대적 농도는 전기 증식기 (Group I)에 14.3 ± 0.6 , 후기 증식기 (Group II)에 18.2 ± 2.4 , 전기 분비기 (Group III)에 22.4 ± 2.5 , 중기 분비기 (Group IV)에 28.8 ± 7.2 , 후기 분비기 (Group V)에 12.8 ± 2.0 으로써 전기 분비기에 뚜렷한 상승을 보인 후 중기 분비기에 특징적으로 높은 발현 양상을 보였고 다시 전반적으로 낮아지는 양상을 보였다 (Figure 4).

이러한 결과를 바탕으로 midluteal phase에 뚜렷한 양상을 보인 것은 PR, integrin β_3 , COX-2로서 이들의 자궁내막의 각 stage에 따른 면역조직화학적 염색의 결과는 Figure 5와 같았다.

2. 착상관련 질환군

1) Endometrial dating 결과

각 질환별 조직병리 소견을 Noyes의 조직화학적 분류에 따라 판독한 결과 정상 대조군 (A군)에서는 20명 중 정상소견 (in phase)이 18명 (90%), 황체기결함 (out of phase) 2명 (10%)으로 나타난데 반해, 자궁내막증 환자 (B군)에서는 25명 중 정상소견이 18명 (72%), 황체기결함 7명 (28%)으로 나

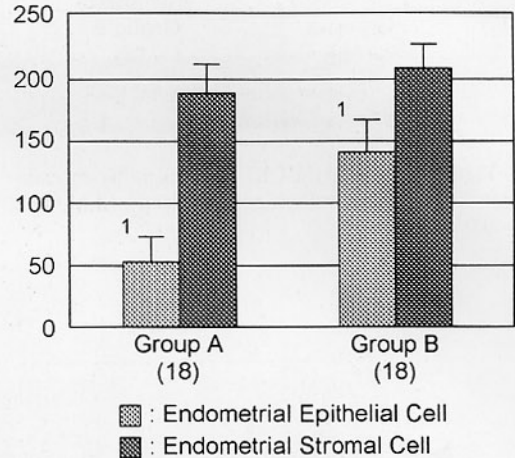


Figure 6. Mean HSCORE of progesterone receptor on endometrium in endometriosis group (Mean ± SEM, 1: $p < 0.05$).

타났다. 이로써 A군에 비해 B군에서 황체기결함이 다소 증가됨을 알 수 있었다 (Table 1).

2) 면역조직화학적 염색의 결과

면역조직화학적 염색의 검사소견상 PR, integrin β_3 , COX-2의 발현이 각 군에서 의미 있게 차이를 나타내었다.

(1) Progesterone 수용체 (PR)의 발현 양상

PR의 발현은 대조군인 A군 (선상피세포: 53.3 ± 12.6 , 기질세포: 190.0 ± 11.5)에 비해 B군 (선상피세포: 142.4 ± 32.4 , 기질세포: 210.4 ± 17.2)에서 선상피세포에서의 PR의 발현이 유의하게 증가되는 양상을 보였다 ($p < 0.05$) (Figure 6).

(2) Integrin β_3 의 발현 양상

Integrin β_3 의 발현은 자궁내막중군인 B군 (선상피세포: 123.2 ± 13.7 , 기질세포: 122.4 ± 15.2)이 선상피세포와 기질세포 모두에서 대조군인 A군 (선상피세포: 283.3 ± 24.9 , 기질세포: 220.0 ± 17.9)에 비해 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$) (Figure 7).

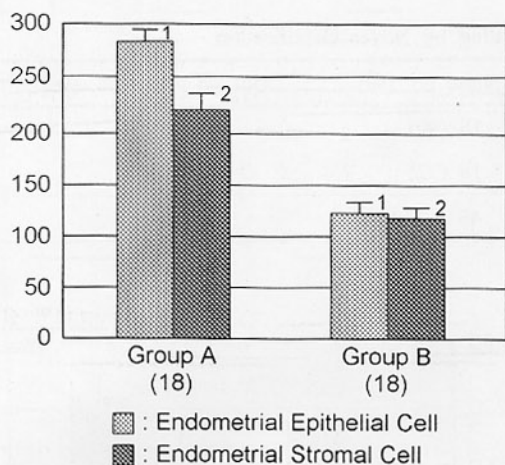


Figure 7. Mean HSCORE of integrin β_3 on endometrium in endometriosis group (Mean $\pm$ SEM, 1, 2: $p < 0.05$).

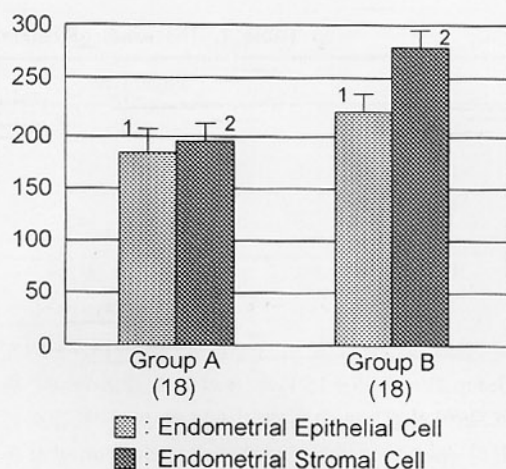


Figure 8. Mean HSCORE of COX-2 on endometrium in endometriosis group (Mean $\pm$ SEM, 1, 2, 3, 4: $p < 0.05$).

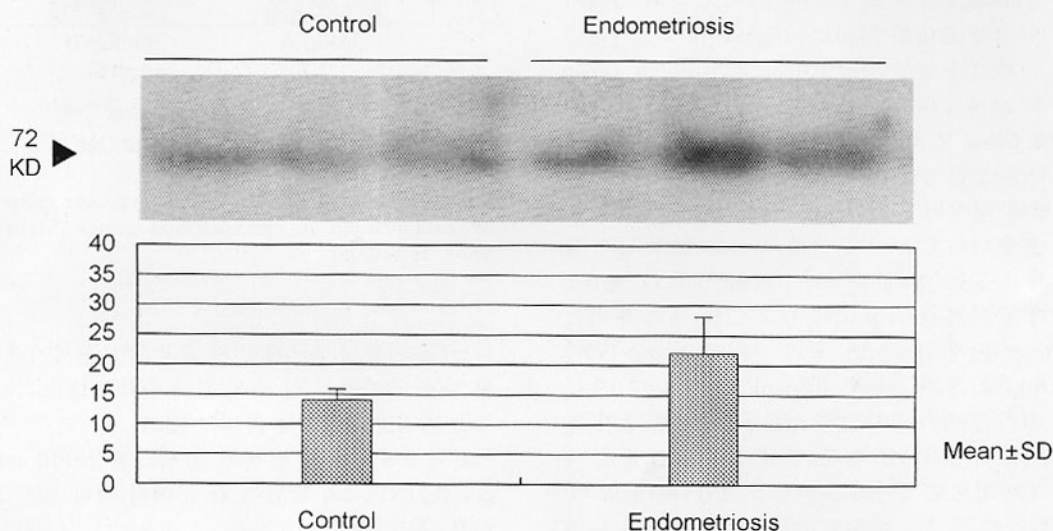


Figure 9. Western blotting using a monoclonal antibody against human COX-2 in lysate of human endometrium from control and endometriosis group. Top panel shows the specific bands in the lysate and the bottom panel shows the relative changes in the protein concentration of COX-2 enzymes, measured as densitometric units of specific bands on Western blots. Data are the mean $\pm$ SD, and bars with different letters at the top vary significantly by Scheffe test ($p < 0.05$).

(3) COX-2의 발현 양상

COX-2의 발현은 선상피세포와 기질세포 모두에서 A군 (선상피세포: 188.5 ± 15.1 , 기질세포: 192.5 ± 10.2)에 비해 B군 (선상피세포: 224.2 ± 24.2 , 기질세포: 280.4 ± 12.4)에서 선상피세포와 기질세포에서 모두 유의 있게 증가되는 양상을 보였다

($p < 0.05$) (Figure 8).

COX-2에 대한 Western blotting의 상대적 농도는 Group A (14.5 ± 2.5)보다 Group B (22.1 ± 6.7)에서 특징적으로 높은 발현 양상을 보였다 ($p < 0.05$) (Figure 9).

이상의 결과로써 자궁내막증군 (Group B)에서

대조군 (Group A)과는 다르게 PR, integrin β_3 , COX-2가 발현됨을 알 수 있었다.

고 찰

최근 인간의 자궁내막에서 growth factors, cytokines, adhesion molecules 등과 그 수용체의 발현 양상에 관한 연구가 활발히 진행되면서 이러한 물질들의 특이한 상호작용에 의해 자궁내막의 변성과 성숙이 유발된다는 것이 밝혀지고 있다.²³ 즉 생리주기에 따른 estrogen과 progesterone 등의 호르몬 분비, 그리고 생리주기에 따른 특징적인 양상을 보이는 물질, estrogen과 progesterone 수용체¹¹ α_1 , α_4 , β_3 integrins,¹² IGF-II, IGF-I/II Receptor, TGF β , IL-1, IL-1 Receptor type I, CSF-1, LIF 등은 자궁내막 조직세포간의 autocrine/ paracrine 작용을 통해 특이적 내막 변화를 유발하며 착상기전에 관여하는 것으로 알려지고 있다.^{13,14}

본 연구에서는 여러 가지 생체 물질 중에서 이미 인간의 생리주기에 따라 자궁내막에서 특징적으로 발현되는 것으로 알려진 ER, PR, α_1 , α_4 , β_3 integrins과 발현 양상이 확인되지 않은 COX-1과 COX-2의 주기적 발현을 관찰 분석하여 주기에 따른 변화 양상을 확인하고, 이를 통한 자궁내막 성숙지표를 확립하고자 하였다. 또한 이를 바탕으로 착상관련 질환인 자궁내막증을 가지고 있는 여성의 자궁내막조직을 대상으로 착상기에 특징적인 양상을 나타내는 생체지표인 progesterone 수용체, integrin β_3 , COX-2의 발현 양상을 각각의 조직학적 성숙도와 비교하여 착상관련 질환의 병리생리학적인 원인 규명을 가능케 하고자 하였다. 이러한 발현 양상의 지표화는 기존의 조직병리학적 내막성숙도를 보완할 뿐 아니라 나아가 그러한 질병들의 진단 및 치료에 유용한 지침이 될 것으로 사료된다.

정상 생리군에서 성호르몬 수용체는 estrogen 및 progesterone의 작용으로 인해 ER의 발현은 증식기에 높았고 분비기에 낮아지는 경향을 보였으며 후기 증식기에 가장 높은 양상을 보였다. 그러나 PR의 경우 기질세포에서는 전 주기에서 거의 변화가 없었던 반면 상피세포에서는 후기 증식기에 최고치에 도달한 후에 분비기에 거의 발현되지 않는 특징적인 양상을 보였다. 이는 Lessey (1988) 등의 관찰과 일치하며 이러한 변화는 estrogen의 수용체 유도과 progesterone의 항 estrogen 작용에

의한다고 설명될 수 있으며, 또한 세포분화가 증식기에서는 상피세포층에서 활발히 일어나고, 분비기에서는 기질세포층에서 활발하게 일어나는 현상과 일치한다고 볼 수 있다.¹⁰ 특히 중기 분비기에서 상피세포의 PR 발현이 현저하게 저하되는 양상은 내막의 성숙도와 일치한다는 보고가 있어 주목받고 있다.¹⁷

Integrin은 3개의 peptide 서열 (Arg-Gly-Asp, RGD)로 이루어진 결합부위를 통해 다양한 ligand와 결합을 하게 되는데, 배아 발생에서는 착상, 포배성장 (blastocyst outgrowth), 영양배세포 이동 (trophoblast cell migration) 등 다양한 세포간 작용에 관여하는 것으로 알려져 있다.²⁴ 그러나 그 작용 및 조절 기작에 관하여는 현재까지 거의 알려져 있지 않으며, 생쥐 초기 배아의 발생단계에 따라서 integrin의 mRNA의 발현과 단백질의 발현시기가 다양하게 조절된다고 보고되고 있다.²⁵ 생쥐의 후기포배 (late blastocyst)는 분화하여 내세포괴 (inner cell mass)와 영양외배엽 (trophoectoderm)으로 분화하며 이 부분은 투명대 (zona pellucida)로부터 부화 후 약 10~15시간이 되면 자궁내벽으로 침투할 수 있는 능력을 지니게 되는데, 이 시기에 세포 표면에는 α subunit과 β subunit로 구성되어 있는 integrin이 다양한 세포층 및 세포외 기질에 존재하는 분자들 (extracellular cellular matrix molecules; ECM molecules)과 상호작용을 하여 특정한 ligand를 중심으로 두 세포를 서로 결합시키는 역할을 하게 된다. 즉, integrin은 영양배엽세포와 ECM 단백질 사이 또는 자궁내막 상피세포와의 상호작용을 통하여 착상에 직접 관여하는 것으로 알려져 있다.²⁴ Integrin α_1 , α_4 , β_3 는 모두 증식기에서는 거의 발현되지 않았으나, 분비기에는 각기 특징적인 발현 양상을 나타냈다. 즉 α_1 은 전기 분비기부터 시작하여 모든 분비기동안 강한 염색을 나타냈고, α_4 는 전기와 중기 분비기에 강하게 염색된 후에 후기 분비기에 사라지는 양상을 보였고, β_3 는 중기 분비기 이후에 나타난 후에 후기 분비기까지 지속되었다. 그러나 기질세포에서의 발현 양상은 전반적으로 약했으며 주기적인 변화를 나타내지 않았다. 이러한 상피세포에서 세포외 기질 (extracellular matrix)의 수용체인 integrin의 주기적인 발현 양상은 최근의 여러 보고와 일치하며,^{14,26-28} α_1 , α_4 , β_3 integrin 모두 발현되는 시기는 착상기로써 trophoblast가 착상되는 과정에 배아와 자궁내막세포가 상호 인식하는 수용체로 작용하

는 것으로 알려지고 있다. 본 연구에서도 중기 분비기 즉, 착상기에서만 이들 integrin들이 모두 발현되는 것을 확인할 수 있어 착상기 내막의 지표로서 매우 유용하다고 평가되며 특히 상피세포의 integrin β_3 는 중기 분비기에 발현이 시작되는 특징적인 양상을 나타내어 내막성숙도의 측정에 있어서 좋은 지표로 활용 가능하다고 사료된다.

최근에는 착상기 즉, 중기 분비기의 자궁내막 변화에 관심이 집중되고 있으며, 이때 뚜렷한 변화는 prostaglandins (PGs)에 의해 유발된 탈락막 반응 (decidual reaction)의 시작이라고 할 수 있다.²⁹ COX는 이러한 PGs를 arachidonic acid로부터 합성하는데 관여하는 중요한 효소로 COX-1과 COX-2라는 두 가지 이성체를 가지고 있다.³⁰ COX-1은 생체내 많은 조직에 존재하는 내재성 효소인 반면, COX-2는 내분비적 자극에 의해 유도되는 유도성 효소의 특징을 가지고 있다. 동물의 발정주기에 따른 이들 효소의 자궁내 발현 양상은 다르게 보고되고 있다. 즉, 쥐와 양에서 COX-1은 발정주기에 따라 자궁내막에서 큰 차이 없이 발현되나, COX-2는 쥐의 경우 착상 이후, 양에 있어서는 배란 직전 및 배란기에 발현이 증가하는 것으로 보고되고 있으며 동물 종에 따라 차이는 있으나, COX-2가 착상 및 임신 유지에 중요한 역할을 하고 있다는 것이 보고되고 있다.³¹ 인간에 있어서도 Rees (1982) 등이 자궁내막의 선상피세포에서 COX-2의 발현을 확인한 이래 태반 및 자궁내막에서 COX-2의 발현을 확인하였으나 생리주기에 따른 자궁내막에서의 발현 양상은 아직 확립되어 있지 않다.^{29,32} Jones (1997) 등은 COX-2의 발현이 전 생리기간에 걸쳐 일어나며, 특히 후기 분비기와 생리기에 높게 나타난다고 보고하였다.³³ 그러나 본 연구결과에 따르면 정상 생리군에서는 COX-1의 발현 양상은 선상피세포에서는 중기 분비기에, 기질세포에서는 후기 분비기와 전기 증식기에 강하게 발현되었으나 내강상피세포에서는 전주기에 걸쳐 유의할 만한 변화를 보이지 않아 자궁내막세포에서 내재적인 특성과 동시에 착상과 생리에 부분적으로 관여하는 양상을 보였고, COX-2의 발현 양상은 선상피세포, 내강상피세포, 기질세포 모두에서 증식기에서 발현이 없다가 중기 분비기에서 뚜렷하게 발현된 후 감소하는 특징을 보였다. 이는 COX-2가 착상기에 특징적으로 발현됨을 의미한다. 이 결과는 현재까지의 보고와 다소 차이가 있으나, COX-2의 발현을 조절

하는 IL-1과 PGE₂ 및 그 수용체, 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase가 중기 분비기에 현저하게 높게 발현되며,^{10,34} PGE₂에 의한 기질세포의 predecidualization 현상이 중기 분비기에 시작되는 점을 고려할 때 본 연구전의 결과가 더욱 타당한 것으로 보인다.

이상의 결과를 요약하면 인간의 자궁내막에서의 착상기인 중기 분비기에는 PR, integrin β_3 , COX-2가 뚜렷하게 변화됨을 알 수 있었다. 이 결과를 Noyes 등의 분류에서 정상 성숙도를 보인 착상관련 질환에 적용한 결과, 내막상피세포에서의 PR은 대조군에 비해 자궁내막중군에서는 선상피세포에서 의미 있게 발현이 증가되어 있는 양상을 보였다. 이는 자궁내막중 환자들은 PR의 down regulation의 장애로 인하여 PR의 발현이 상피세포와 기질세포 모두에서 오히려 증가된 것으로 사료된다.^{35,36}

인간의 자궁내막은 생리주기에 따라 주기적인 integrin의 발현 양상을 보이는데, 특히 착상기에는 integrin α_1 , α_4 , β_3 등이 발현되며, 착상기 지표로서는 integrin β_3 가 가장 유용함이 보고되었다. Integrin β_3 는 자궁내막중군에서 대조군에 비해 의미 있게 감소하여 Lessey 등의 실험결과와 일치하였다.¹⁹ Lessey 등은 integrin β_3 의 발현이 되지 않는 양상에 따라 uterine receptivity 장애를 2가지로 분류하였다. 즉, 조직학적으로 자궁내막의 성장이 지연되거나, 또는 gland maturation이 되지 않은 경우와 (luteal phase defect, type I), 조직학적으로는 정상임에도 불구하고 integrin β_3 가 발현되지 않는 경우 (luteal phase defect, type II)로 나누어 분류하였고, 경증 자궁내막중,¹⁹ 원인불명의 불임, 난관수종이 있는 환자군에서 착상기의 자궁내막에서 integrin β_3 의 발현이 감소하는 경우가 많다고 보고하였다. 본 연구에서도 정상적인 내막성숙도를 보인 착상관련 질환을 가지고 있는 환자의 자궁내막조직에서 integrin β_3 의 발현이 정상그룹에 비하여 매우 감소되어 있고, 또한 황체가 결함도 상대적으로 많음을 알 수 있었는데, 이러한 현상들은 각 질환에 따라 잠재적인 uterine receptivity 장애와 관련이 있다고 추정된다.

COX-2의 발현은 정상군에 비해 자궁내막중군에서는 선상피세포에서의 발현이 다소 증가되고 기질세포에서는 뚜렷하게 증가되는 양상을 보였다. 자궁내막중 환자에 있어서 COX-2의 증가는 증가된 복강내 macrophages가 interleukin (IL), vas-

cular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrotic factor (TNF) 등을 포함한 여러 가지 cytokines의 증가, 특히 interleukin-1 (IL-1)³⁷과 vascular endothelial growth factor³⁸에 의해 endometrial stromal cell 및 epithelial cell에서 COX-1, 2를 증가시키고 있다고 추정된다. IL-1이 COX-2의 발현에 중요하다는 것은 COX-2의 발현 억제제가 IL-1 receptor antagonist (IL-1ra)에 의해 일어나는 것으로 증명되고 있다.³⁹ COX-2에 의하여 생성이 증가되는 prostaglandin E₂, F_{2α}는 통증을 유발할 뿐만 아니라 난관 및 자궁의 contractility에 영향을 미치고 난소의 황체에서 황체의 기능저하를 초래할 수 있다고 보고되고 있다.⁴⁰

이상의 결과로써 자궁내막증에서는 증가된 복강내 macrophages에서의 cytokines의 분비로 인해 직접적으로 자궁내막에서의 integrin β₃와 COX-2의 발현 이상을 초래하고 간접적으로 난소에서의 COX-2의 발현 증가에 의해 prostaglandins 합성이 촉진됨으로써 황체의 기능 변화에 기인한 progesterone의 분비 이상을 초래하여 자궁에서 PR과 integrin β₃의 발현 이상을 초래한 것으로 추정된다. 그러나, 이 결과에 대한 정확한 평가는 자궁내막과 난소에서의 호르몬, cytokine 및 prostaglandin의 변화 양상과, 역으로 체외착상 모델을 통해 증명되어야 병리생리학적인 설명이 가능하리라 사료된다.

본 연구에서는 정상 생리주기를 갖는 인간의 자궁내막조직에서 생리주기에 따른 ER, PR, integrins, COX의 발현 양상이 증식기보다 분비기에서, 특히 착상시기에 해당하는 중기 분비기에서 가장 특징적인 발현 양상을 나타냄을 밝혀내었다. 또한 착상관련 질환의 하나인 자궁내막증군에서 중기 분비기에 특징적인 양상을 보이는 PR, integrin-β₃, COX-2의 발현 양상이 대조군과는 다른 발현 양상을 보임을 증명하였다. 이러한 결과는 새로운 내막의 성숙도 지표로써 활용될 수 있으며, 또한 이러한 생체활성 물질의 생리주기에 따른 특이적 발현 양상과 질환에 따른 민감한 변형은 기존의 조직학적 기준 (Noyes et al., 1975)을 보완할 뿐 아니라 질환 진단의 예민도를 크게 상승시킴으로써 분자생물학적, 면역생리화학적, 병태생리학적 이해를 증진시킬 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Suzuki N, Zara J, Sato T, Ong E, Bakheit N, Oshima RG, et al. A cytoplasmic protein, bystin, interacts with trophinin, tasin, and cytokeratin and may be involved in trophinin-mediated cell adhesion between trophoblast and endometrial epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 28; 95(9): 5027-32.
2. Paria BC, Huet-Hudson YM, Dey SK. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 1; 90(21): 10159-62.
3. Huet YM, Dey SK. Role of early and late oestrogenic effects on implantation in the mouse. *J Reprod Fertil* 1987 Nov; 81(2): 453-8.
4. Das SK, Wang XN, Paria BC, Damm D, Abraham JA, Klagsbrun M, et al. Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development* 1994 May; 120(5): 1071-83.
5. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 1992 Sep 3; 359(6390): 76-9.
6. Benson GV, Lim H, Paria BC, Satokata I, Dey SK, Maas RL. Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development* 1996 Sep; 122(9): 2687-96.
7. Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ, Johnston JJ, Jaffee BD, Covington MB, et al. Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* 1995 Nov 23; 378(6555): 406-9.
8. Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, et al. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 1997 Oct 17; 91(2): 197-208.

9. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 1975 May; 122(2): 262-3.
10. Strauss JF III, Gurdip E. The endometrium: Regulation and dysfunction. In: Yen SSC, Jaffe RB, editors. *Reproductive endocrinology*. Philadelphia: WB Saunders; 1991. p.309-56.
11. Ilesanmi AO, Hawkins DA, Lessey BA. Immunohistochemical markers of uterine receptivity in the human endometrium. *Microsc Res Tech* 1993 Jun 15; 25(3): 208-22.
12. Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, Buck CA. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest* 1992 Jul; 90(1): 188-95.
13. Giudice LC. Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil Steril* 1994 Jan; 61(1): 1-17.
14. Simon C, Gimeno MJ, Mercader A, Frances A, Garcia Velasco J, Remohi J, et al. Cytokines-adhesion molecules-invasive proteinases. The missing paracrine/autocrine link in embryonic implantation? *Mol Hum Reprod* 1996 Jun; 2(6): 405-24.
15. Somkuti SG, Sun J, Yowell CW, Fritz MA, Lessey BA. The effect of oral contraceptive pills on markers of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 1996 Mar; 65(3): 484-8.
16. Cameron ST, Critchley HO, Thong KJ, Buckley CH, Williams AR, Baird DT. Effects of daily low dose mifepristone on endometrial maturation and proliferation. *Hum Reprod* 1996 Nov; 11(11): 2518-26.
17. Lessey BA, Yeh I, Castelbaum AJ, Ilesanmi AO, Korzeniowski P, Sun J, et al. Endometrial progesterone receptors and markers of uterine receptivity in the window of implantation. *Fertil Steril* 1996; 65: 477-83.
18. Bilalis DA, Klentzeris LD, Fleming S. Immunohistochemical localization of extracellular matrix proteins in luteal phase endometrium of fertile and infertile patients. *Hum Reprod* 1996; 11: 2713-8.
19. Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, Buck CA, Schinnar R, Bilker W, Strom BL, et al. Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 643-9.
20. Vinatier D, Dufour P, Oosterlynck D. Immunological aspects of endometriosis. *Hum Reprod Update* 1996; 2: 371-84.
21. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, et al. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984 Feb; 32(2): 219-29.
22. Lessey BA, Killam AP, Metzger DA, Haney AF, Greene GL, McCarty KS Jr. Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1988 Aug; 67(2): 334-40.
23. Edwards RG. Physiological and molecular aspects of human implantation. *Hum Reprod* 1995 Dec; 10 Suppl 2: 1-13.
24. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992 Apr 3; 69(1): 11-25.
25. Sutherland AE, Calarco PG, Damsky CH. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development*. 1993 Dec; 119(4): 1175-86.
26. Lessey BA, Castelbaum AJ, Buck CA, Lei Y, Yowell CW, Sun J. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil Steril* 1994 Sep; 62(3): 497-506.
27. Aplin JD, Spanswick C, Behzad F, Kimber SJ, Vicovac L. Integrins beta 5, beta 3 and alpha v are apically distributed in endometrial epithelium. *Mol Hum Reprod* 1996 Jul; 2(7): 527-34.
28. Bronson RA, Fusi FM. Integrins and human reproduction. *Mol Hum Reprod* 1996 Mar; 2(3): 153-68.
29. Rees MC, Parry DM, Anderson AB, Turnbull AC. Immunohistochemical localisation of cyclo-

- oxygenase in the human uterus. Prostaglandins 1982 Feb; 23(2): 207-14.
30. Fletcher BS, Kujubu DA, Perrin DM, Herchman HR. Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. J Biol Chem 1992 Mar 5; 267(7): 4338-44.
 31. Chakraborty I, Das SK, Wang J, Dey SK. Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroid. J Mol Endocrinol 1996 Apr; 16(2): 107-22.
 32. Han SW, Lei ZM, Rao CV. Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression by chorionic gonadotropin during the differentiation of human endometrial stromal cells into decidua. Endocrinology 1996 May; 137(5): 1791-7.
 33. Jones RL, Kelly RW, Critchley HO. Chemokine and cyclooxygenase-2 expression in human endometrium coincides with leukocyte accumulation. Hum Reprod 1997 Jun; 12(6): 1300-6.
 34. Ishihara O, Tsutsumi O, Mizuno M, Kinoshita K, Satoh K. Metabolism of Arachidonic acid and synthesis of prostanoids in human endometrium and decidua. Prostaglandins Leukot Med. 1986 Sep; 24(1): 93-102.
 35. Saracoglu OF, Aksel S, Yeoman RR, Wiebe RH. Endometrial estradiol and progesterone receptors in patients with luteal phase defects and endometriosis. Fertil Steril 1985 Jun; 43(6): 851-5.
 36. Lessey BA, Young SL. Integrins and Other Cell adhesion Molecules in Endometrium and Endometriosis. Semin Reprod Endocrinol 1997; 15(3): 291-9.
 37. Bany BM, Kennedy TG. Role of interleukin 1 in the regulation of cyclooxygenase gene expression in rat endometrial stromal cells. J Reprod Fertil 1999 Jan; 115(1): 125-31.
 38. Bany BM, Kennedy TG. Regulation of cyclooxygenase gene expression in rat endometrial stromal cells: the role of epidermal growth factor. Dev Genet 1997; 21(1): 109-15.
 39. Kniss DA, Zimmerman PD, Garver CL, Fertel RH. Interleukin-1 receptor antagonist blocks interleukin-1-induced expression of cyclooxygenase-2 in endometrium. Am J Obstet Gynecol 1997 Sep; 177(3): 559-67.
 40. Karck U, Reister F, Schafer W, Zahradnik HP, Breckwoldt M. PGE₂ and PGF₂ alpha release by human peritoneal macrophage in endometriosis. Prostaglandins 1996 Jan; 51(1): 49-60.