

자궁내막증 환자와 대조군에서의 자궁내막 유전자 발현의 차이: Microarray를 이용한 연구

경북대학교 의과대학 산부인과학교실¹, 경북대학교 의과대학 면역학교실²

정민지¹ · 정은정² · 이신제² · 김문규² · 전상식¹ · 이택후¹

Comparison of Gene Expression Profile in Eutopic Endometria with or without Endometriosis: A Microarray Study

Minli Chung¹, Eun jung Chung², Shin Je Lee², Moon kyu Kim², Sang Sik Chun¹, Taek Hoo Lee¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Immunology, Kyungpook National University, School of Medicine, ²Department of Obstetrics and Gynecology, Kyungpook National University, School of Medicine

Objective: Pathogenesis of the endometriosis is very complex and the etiology is still unclear. Our hypothesis is that there may be some difference in gene expression patterns between eutopic endometria with or without endometriosis. In this study, we analyzed the difference of gene expression profile with cDNA microarray.

Methods: Endometrial tissues were gathered from patients with endometriosis or other benign gynecologic diseases. cDNA microarray technique was applied to screen the different gene expression profiles from early and late secretory phase endometria of those two groups. Each three mRNA samples isolated from early and late secretory phase of endometrial tissues of control were pooled and used as master controls and labeled with Cy3-dUTP. Then the differences of gene expression pattern were screened by comparing eutopic endometria with endometriosis, which were labeled with Cy5-dUTP. Fluorescent labeled probes were hybridized on a microarray of 4,800 human genes.

Results: Twelve genes were consistently overexpressed in the endometrium of endometriosis such as ATP synthase H transporting F1 (ATP5B), eukaryotic translation elongation factor 1, isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), mitochondrial ribosomal protein L3, ATP synthase H+ transporting (ATP5C1) and TNF alpha factor. Eleven genes were consistently down-regulated in the endometriosis samples. Many extracellular matrix protein genes (decorin, lumican, EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1, fibulin 5, and matrix Gla protein) and protease/protease inhibitors (serine proteinase inhibitor, matrix metalloproteinase 2, tissue inhibitor of metalloproteinase 1), and insulin like growth factor II associated protein were included. Expression patterns of selected eight genes from the cDNA microarray were confirmed by quantitative RT-PCR or real time RT-PCR.

Conclusion: The result of this analysis supports the hypothesis that the endometrium from patients with endometriosis has distinct gene expression profile from control endometrium without endometriosis.

Key Words: Endometriosis, Pathogenesis, DNA microarray, Gene expression profile

자궁내막증의 발생기전은 아직 명확하게 알려져 있지 않다. 여러 가설 중에서 가장 널리 받아들여지고 있는 것은 월경 중에 탈락된 자궁내막세포가

나팔관을 통하여 복강 내로 들어가는 역행성 월경 (retrograde menstruation)에 의한다는 것이다.¹ 그러나 90% 이상의 여성에서 월경혈의 역류 현상이 관찰

주관책임자: 이택후, 우) 700-721, 대구광역시 중구 삼덕2가 50번지, 경북대학교병원 산부인과학교실
Tel: (053) 420-5735, Fax: (053) 423-7905, e-mail: thlee@knu.ac.kr

되기는 하지만, 전체 여성 중 자궁내막증의 빈도는 1~7% 정도에서만 나타나며, 불임 여성에서는 20~40% 정도로 더욱 높게 동반되는 것으로 알려져 있다.²³ 이러한 점에서 볼 때 자궁내막증은 월경혈의 역류 현상이 있는 모든 여성에서 발생하는 것은 아니고, 월경혈의 역류와 함께 다른 요인이 함께 존재하여 자궁내막세포들이 자궁 외 환경인 복강에 착상이 되고 성장이 됨으로써 발생하는 것이라고 가정할 수 있다.⁴ 자궁내막증의 감수성을 증가시키는 원인으로 유전적인 성향, 역류되는 월경혈의 양적인 차이, 복강환경의 차이, 면역학적 감수성의 차이 등이 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.⁵⁻⁸

본 연구는 자궁내막증 환자의 자궁내막조직과 정상 대조군의 자궁내막조직의 유전자 발현을 비교하여 자궁내막증 환자에서는 똑같이 월경혈의 역류가 일어난 경우에 자궁내막증의 발생을 조장하는 유전자가 발현되어 있을 것이라는 가정 하에서 시행되었다. 과거에 시행된 유전자 발현에 관한 연구는 한번에 한 개의 유전자 이상의 연구는 불가능하여 연구에 많은 제약이 있었으나 DNA microarray 기술의 도입으로 한번에 수천 개의 유전자 발현을 조사할 수 있었다.

이에 2002년 1월부터 2002년 12월까지의 기간 동안 본원 산부인과에서 자궁내막증 환자와 자궁내막증 이외의 다른 부인과적 질환으로 수술을 시행한 환자들을 대상으로 채취한 자궁내막조직으로 KNU 4.8K cDNA chip을 이용하여 유전자 발현을 비교 연구하였다.

연구대상 및 방법

1. 자궁내막조직의 채취

1) 자궁내막증 환자의 자궁내막조직

난소종양, 불임, 골반통, 월경통 등의 원인으로 자궁내막증 추정하여 치료적 혹은 진단적 복강경을 시행한 환자에서 자궁내막 소파술을 통하여 자궁내막조직을 채취하였으며 후에 병변의 조직검사상 자궁내막증으로 진단된 경우만 포함하였다.

2) 대조군의 자궁내막조직

자궁내막증 이외의 부인과질환으로 치료적 혹은 진단적 복강경 또는 개복하에 부인과적 수술을 시

행한 환자에서 자궁내막 소파술을 통하여 자궁내막 조직을 채취하였으며, 후에 조직검사상 자궁내막증이 없다고 진단된 경우만 포함하였다.

3) 자궁내막조직의 시기 구분 (Endometrial dating)

각각의 군에서 채취된 조직은 H&E 염색을 통해 자궁내막조직의 시기를 구분하였으며, 조직의 일부는 액화질소로 급속 냉동하여 RNA를 추출하였다. 자궁내막의 시기 (phase)를 6개로 분류하였다. 자궁내막을 증식기 (proliferative phase)와 분비기 (secretory phase)로 분류한 뒤 각각의 기를 다시 초기, 중기, 후기로 나누었다.

2. RNA의 추출 및 증폭

1) 자궁내막조직으로부터 total RNA와 mRNA 추출

Trizol (Invitrogen, California, USA)을 이용하여 각 조직에서 total RNA를 분리하였다. 조직을 액체질소로 얼려주면서 막자사발에서 미세하게 간 후 Trizol을 1~2 ml 넣어 조직을 녹여낸 후, 1/5 vol의 1-bromo 3-chloropropan을 첨가하고 잘 섞은 뒤 원심 분리하여 상층액을 1.5 ml tube에 옮기고 동량의 isopropano를 넣어 total RNA를 침전시킨다. 침전된 RNA pellet을 RNase-free 증류수에 녹이고 정량한 후 agarose gel에서 전기영동하였다. 이렇게 분리한 total RNA로부터 mRNA를 추출하기 위해 Dynabeads mRNA Purification kit (DynaL A.S, Oslo, Norway)를 이용하였다. Oligo (dT)가 붙은 magnetic beads와 total RNA를 섞어 10분간 반응시켜 mRNA가 결합된 magnetic beads만 분리한 후 11 µl의 elution 용액을 넣고 65°C에서 2분간 방치하여 유리된 mRNA를 회수하였다.

2) Double stranded cDNA의 합성

Double stranded cDNA의 합성은 아래의 방법에 따라 시행되었다. 간략히 기술하면 mRNA 10 µl에 oligo-dT/DpnII/T7 primer (5'-AAA CGA CGG CCA GTG AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGCGATC T21-3') 1 µl, First strand buffer 4 µl, DTT 2 µl, 10 mM dNTP 1 µl, Superscript II (Invitrogen, California, USA)를 1 µl 첨가한 후 42°C에서 1시간 반응시켜 first strand cDNA를 합성하였다. 위 반응액에 second strand

buffer (200 mM Tris pH 6.9, 900 mM KCL, 46 mM MgCl₂, 1.5 mM Nicotine adenosine dinucleotide, 100 mM [(NH₄)SO₄] 30 µl, 10 mM dNTP 3 µl, E. coli DNA ligase 1 µl, E. coli DNA polymerase-I 4 µl, RNase-H 1 µl, DEPC treated water 91 µl를 첨가하여 16°C에서 1 시간 30분 처리한다. 합성된 double strand cDNA를 페놀로 추출한 후 7.5 M ammonium acetate와 ethanol (-20°C)을 첨가하여 침전시켰다. 침전물을 8 µl의 DEPC water로 용해하여 합성된 double stranded cDNA를 수확하였다.

3) T7 RNA polymerase를 이용한 RNA 증폭

T7 RNA polymerase를 이용한 RNA 증폭을 간략히 기술하면 Ampliscribe T7 transcription kit (Epicentre Technologies, Madison, USA)를 사용하여 RNA를 증폭하였다. 8 µl의 double-stranded cDNA에 Ampliscribe T7 buffer 2 µl, 100 mM의 ATP, UTP, GTP, CTP 각각 1.5 µl씩, DTT 2 µl, T7 RNA polymerase 2 µl를 첨가하여 42°C에서 2시간 반응시켰다. 위 반응액을 다시 Trizol에 녹여 RNA만 분리해냈다. 증폭된 RNA를 Microcon-30에 통과시켜 정제하고 농축하였다.

3. Microarray hybridization

경북대학교 기질세포 유전자은행에서 보유하고 있는 cDNA 중에 세포의 신호전달, 세포분열, apoptosis, 그리고 세포분화에 관여하는 유전자를 선별하여 제작한 KNU 4.8K cDNA chip을 사용하였다. 이 array에는 4,800여종의 인간유전자와 control 유전자가 포함되어 있다. 정상 자궁내막조직의 mRNA에는 녹색형광을 내는 Cy3-dUT를 그리고 자궁내막증 환자의 자궁내막조직의 mRNA에는 적색형광을 내는 Cy5-dUTP를 각각 부착하여 cDNA probe를 제작하였다. 증폭된 RNA를 reverse transcription하는 과정 중 각각 녹색과 적색형광물질이 끼어들게 된다. Cy3와 Cy5 반응물을 섞은 후 20X SSC 3µl, 5% SDS 0.4 µl, poly-dA 1.25 µl, yeast tRNA 2.5 µl를 첨가하고 99°C에서 5분 끓여 미리 제작된 array에 얹고 cover slide로 덮었다. Array를 hybridization cassette에 넣고 봉한 후 50°C에서 16~20시간 반응시켰다.

4. Confocal laser scanner를 이용한 형광의 측정과 데이터의 분석

Hybridization이 끝난 cDNA chip 슬라이드를 Scanarray 4000 confocal laser scanner (GSI Lumonics, USA)를 사용하여 Cy3와 Cy5가 내는 형광의 이미지를 스캔하여, Cy3와 Cy5의 경쟁적 결합에 의한 유전자의 상대적 발현을 Quantarray 이미지 분석 프로그램 (Quantarray software, version 2.0.1, GSI Lumonics, USA)을 이용하여 각 유전자의 형광이미지를 수치로 산출하였다. 각 유전자에 대하여 자궁내막증 환자와 대조군에서의 형광의 세기를 비로 나타내고 (각 유전자에 대한 Cy5/Cy3의 값), 일반적인 microarray 실험법과 같이 형광강도의 값이 2배 이상 증가하거나 감소하는 유전자를 특이적으로 발현되는 유전자로 판정하였다.⁹ 유전자가 포함되지 않은 점 (spot)에서 발현되는 형광강도의 3배 값까지를 background 값으로 정하고 전체 4,800개 유전자 중 그 값 이하로 발현되는 유전자는 그 실험 조직에서 발현되지 않는 것으로 판정하여 통계에서 제외시켰다.

Table 1. PCR primers for differentially expressed genes in endometrial tissues with or without endometriosis

Genes	PCR primers
Hypothetical protein BC011593	5'-tggcagactgtgtctttgct-3'
	5'-ggcagcatttgagttccat-3'
Hypothetical protein MGC4251	5'-gctccttggagagagtgtgg-3'
	5'-ccctgagaacctgtgact-3'
IGF-II associated protein	5'-gagatccaaaacgcttcgag-3'
	5'-gatggagagccacgactagg-3'
PAPSS1	5'-tcatccagaacagggagg-3'
	5'-gcagaccaaaactgatgcaa-3'
Non-metastatic cell 1	5'-agcgttttgagcagaaagga-3'
	5'-gaaggaggggaaatggatgt-3'
Leptin receptor-related protein	5'-gtgtggctgtgatcaaatgg-3'
	5'-cggtatctgcctctccaagc-3'
Thioredoxin interacting protein	5'-gcagtgagcatgtggaagaa-3'
	5'-agtgcacaaagggaaacac-3'
Calumenin	5'-tccttttgggtcccttctt-3'
	5'-aggctcttggccacacagt-3'

5. 유전자 발현 양상의 검증

cDNA chip 연구에서 특이적으로 발현된 유전자를 선별하여 RT-PCR (reverse transcription-PCR)과 정량적 RT-PCR (realtime RT-PCR)법을 통하여 그 상대적 발현을 검증하였다. RT-PCR은 각 시료의 total RNA 5 µg을 first-strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, California, USA)를 이용해 reverse transcription 시킨 다음 역전사 반응 생성물의 1/20을 이용해 다음의 primer로 PCR 하였다 (Table 1). Real time RT-PCR은 역전사 반응 생성물에 MgCl₂ 2.4 µl, 각 primer 0.5 µl씩, Master SYBR green 2 µl를 섞은 후 LightCycler (Roche, Switzerland)를 이용해 증폭시켰다. PCR은 95°C 10초, 59°C 5초, 72°C 10초를 45 cycle 반응하였다. 이 때 beta-actin을 단계적으로 희석한 것을 같이 반응시켜 standard curve를 만들고, 각각의 primer로 PCR 한 시료의 signal을 이 standard curve에 적용시켜, 상대적인 발현 양상을 정량화하였다.

결 과

1. 유전자칩 데이터 분석

본 실험에서는 자궁내막증과 관련한 유전자 발현 변화를 알아보기 위하여 4,800종의 인간유전자가 찍혀있는 9장의 유전자칩 (cDNA microarray)으로 실험하였다. 초기 분비기 (early secretory phase)와 후기 분비기 (late secretory phase)의 대조군은 3명의 자궁내막조직에서 분리한 RNA를 합하여 이용하였고, 자궁내막증 환자의 조직 내 유전자 발현을 대조군과 비교하였다.

초기 분비기 5개의 실험군 중 2개 이상의 조직에서 유효한 값으로 발현되는 유전자 1,133개를 클라 hierarchical clustering 방법으로 분석하였고 (Figure 1a), 후기 분비기 4개의 실험군 중 2개 이상의 조직에서 유효한 유전자 1,218개를 역시 같은 방법으로 분석하였다 (Figure 1b). 대조군에 비해 발현이 증가하는 유전자들은 붉은색으로, 대조군에 비해 발현이 감소하는 유전자들은 초록색으로 표시되며, 확대한 image는 각각의 cluster 결과에서 확연히 차이를 보이는 유전자 그룹을 나타낸 것이다.

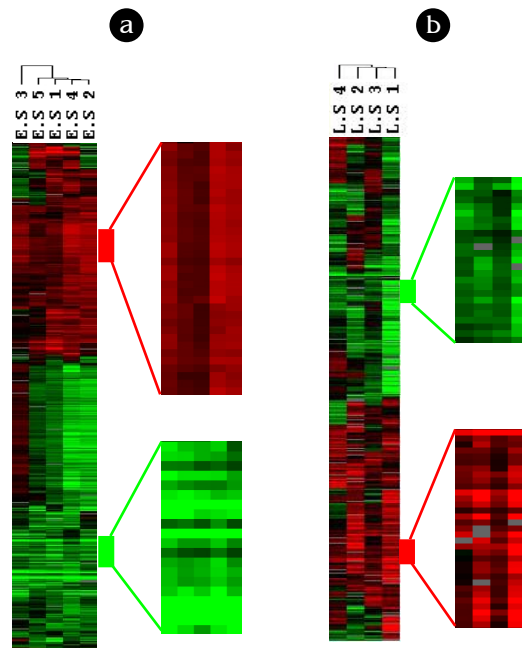


Figure 1. Gene expression patterns of secretory endometrium with endometriosis (n=9). The vertical axis corresponds to genes, and the horizontal axis to tissues. Red colors indicate relatively up-regulated genes compared to normal endometrium, green colors indicate relatively down-regulated genes compared to normal endometrium.

(a) The clustering result of early secretory phase chip in 5 cases

(b) The clustering result of late secretory phase chip in 4 cases

E.S: Early secretory, L.S: Late Secretory.

2. 자궁내막증 조직에서 발현의 증감을 보이는 유전자

분비기 전기간에 걸쳐 증가한 유전자의 선별은 전체 9개의 시료 중 대조군에 비하여 적어도 3개 이상에서 2배 이상 형광강도의 차이를 보이면서 전체평균이 1.7배 이상인 것으로 정하였으며 이에 해당하는 유전자는 12종이었다 (Table 2). 분비기 전기간에 감소한 유전자는 위와 같은 조건으로 감소한 유전자를 정하였으며 이에 해당하는 유전자는 11종이었다 (Table 2). 초기 분비기에서만 증가하거나 감소한 유전자는 초기 분비기 조직 5개 중 3개 이상에서 2배 이상의 형광강도 차이를 보이면서 평균이 2.0배 이상 증가 혹은 감소한 것으로 정하였다. 이에 해당하는 유전자는 증가하거나 감소한 것이 각

Table 2. Commonly up- or down-regulated genes in endometrium of endometriosis compared to control

Ref. Seq.	Gene Title (Gene symbol)	E.S Ave.	L.S Ave.	Total Ave.
Up-regulated genes				
NM_005627	serum/glucocorticoid regulated kinase (SGK)	3.2	1.8	2.5
NM_001769	CD9 antigen (CD9)	2.7	1.7	2.2
NM_138408	hypothetical protein BC011593	2.4	1.9	2.1
NM_004862	LPS-induced TNF-alpha factor (LITAF)	2.2	1.6	1.9
NM_001686	ATP synthase, H+ transporting, F1 (ATP5B)	2.0	1.7	1.8
NM_005742	protein disulfide isomerase-related protein (PDIA6)	1.9	1.8	1.8
NM_174921	hypothetical protein LOC201895 (LOC201895)	2.0	1.7	1.8
NM_005517	high-mobility group protein 17 (HMGN2)	2.1	1.6	1.8
NM_006817	chromosome 12 open reading frame 8 (C12orf8)	2.0	1.6	1.8
NM_007355	HSPCB 90kD protein 1 (HSPCB)	1.8	1.8	1.8
NM_001404	eukaryotic translation elongation factor 1 (EEF1G)	2.1	1.5	1.8
NM_007263	coatmer protein complex, epsilon (COPE)	1.7	1.8	1.7
Down-regulated genes				
NM_001007139	Insulin-like growth factor II associated protein	0.3	0.5	0.4
NM_004105	EGF-containing fibulin-like EMP1 (EFEMP1)	0.4	0.7	0.5
NM_000900	matrix Gla protein (MGP)	0.4	0.7	0.5
NM_000358	TGF, beta-induced (TGFB1)	0.5	0.6	0.5
NM_012223	Myosin IB (MYO1B)	0.4	0.7	0.6
NM_005928	milk fat globule-EGF factor 8 protein (MFGE8)	0.5	0.6	0.6
NM_001001392	CD44 (CD44)	0.5	0.6	0.6
NM_001839	calponin 3, acidic (CNN3)	0.6	0.6	0.6
NM_004612	TGF beta receptor 1 (activin A receptor type II-like kinase)	0.6	0.7	0.6
NM_003711	phosphatidic acid phosphatase type 2A (PPAP2A)	0.6	0.7	0.6
M0926-5	Unknown	0.4	0.7	0.5

각 25개씩 이었다 (Table 3, 4). 후기 분비기에서만 증가하거나 감소한 유전자는 후기 분비기 조직 4개 중 2개 이상에서 2배 이상의 형광강도 차이를 보이면서 평균이 1.9배 이상 증가 혹은 감소한 것으로 정하였다. 이에 해당하는 유전자는 증가한 유전자는 4개 있었으나 감소한 유전자는 1종 뿐이었다 (Table 5).

3. 유전자칩으로 검색된 유전자의 검증

유전자칩으로 자궁내막증 조직에서 발현의 증감

을 보였던 유전자 중에서 8종의 유전자를 대상으로 RT-PCR이나 real time RT-PCR 법을 통하여 그 발현 양상을 검증하였다 (Figure 2). 이 때 사용한 시료는 유전자칩 실험에서 사용한 시료와 동일하였다. 두 종의 hypothetical proteins BC011593과 MGC4251은 분비기 전기간에서 증가함을 보였다 (Figure 2a). 유전자칩 실험에서는 MGC4251 유전자는 초기 분비기에서만 증가하는 결과를 보였지만 RT-PCR 결과에서는 분비기 전기간에 걸쳐 증가하는 양상을 보였다. PAPSS1과 non-metastatic cells 1 유전자는 초기

Table 3. Genes specifically up-regulated in early secretory phase endometrium with endometriosis

Ref. Seq.	Gene Title	E.S Ave.	L.S Ave.
NM_005896	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+)	5.8	1.1
NM_138288	hypothetical protein MGC24447	4.4	1.3
NM_005443	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 1 (PAPSS1)	3.8	1.1
NM_032376	hypothetical protein MGC4251 (MGC4251)	3.4	1.2
NM_007208	mitochondrial ribosomal protein L3 (MRPL3)	2.9	1.1
NM_005340	histidine triad nucleotide binding protein 1 (HINT1)	2.5	1.1
NM_000671	alcohol dehydrogenase 5 (class III)	2.5	1.1
NM_002129	high-mobility group protein 2	2.5	1.3
NM_006082	tubulin, alpha, ubiquitous (K-ALPHA-1)	2.4	1.2
NM_004126	guanine nucleotide binding protein 11 (GNG11)	2.4	0.9
NM_001833	clathrin, light polypeptide (CLTA)	2.3	1.2
NM_001959	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2 (EEF1B2)	2.3	1.1
NM_004074	cytochrome c oxidase subunit VIII (COX8)	2.2	1.4
NM_005174	ATP synthase, H+ transporting (ATP5C1)	2.2	1.1
NM_001948	dUTP pyrophosphatase (DUT)	2.2	1.3
NM_001865	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 (COX7A2)	2.2	1.2
NM_005731	actin related protein 2/3 complex, subunit 2	2.1	1.3
NM_000454	superoxide dismutase 1, soluble	2.1	1.3
NM_002952	ribosomal protein S2	2.1	0.8
NM_001404	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	2.1	1.5
NM_004508	isopentenyl-diphosphate delta isomerase	2.1	1.2
NM_000269	non-metastatic cells 1, protein (NM23A)	2.0	0.9
NM_000026	adenylosuccinate lyase	2.0	0.9
NM_033022	ribosomal protein S24	2.0	0.8
NM_139207	nucleosome assembly protein 1-like 1	2.0	1.3

분비기에서 (Figure 2b), 그리고 leptin receptor gene-related protein, thioredoxin interacting protein, calumenin 은 후기 분비기에서 주로 증가하는 양상을 보였으며 (Figure 2c), 이는 유전자칩 실험 결과와 잘 일치하였다. 그림 3에서는 7종 유전자의 RT-PCR 결과에서 얻어진 밴드를 스캔하여 정량화 한 것과 IGF-II associated protein의 발현 양상을 real time RT-PCR로 검증한 결과를 그래프로 나타내었다. Figure 2에서와 같이 분비기 전기간에 발현이 증가한 유전자군 (Figure 3a), 전기 분비기 (Figure 3b) 혹은 후기 분비

기 (Figure 3c)에서 특이적으로 발현의 차이를 보이는 유전자군, 분비기 전기간에 발현이 감소한 유전자 (Figure 3d)를 표시하였다. RT-PCR과 real time RT-PCR에 의한 검증 결과는 유전자칩의 결과와 잘 일치하였다.

고 찰

자궁내막증은 자궁내부에 존재하여야 할 자궁내막조직이 자궁 외에 존재하면서 불임, 성교통, 골

Table 4. Genes specifically down-regulated in early secretory phase endometrium with endometriosis

Ref. Seq.	Gene Title	E.S Ave.	L.S Ave.
NM_033011	plasminogen activator (PLAT)	0.2	1.1
NM_001124	adrenomedullin (ADM)	0.2	2.4
NM_000598	insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)	0.2	2.0
NM_009964	crystallin, alpha B (Cryab)	0.2	1.9
NM_006329	fibulin 5 (FBLN5)	0.2	0.9
NM_006169	nicotinamide N-methyltransferase (NNMT)	0.2	1.1
NM_000362	tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP3)	0.2	1.2
NM_004530	matrix metalloproteinase 2 (MMP2)	0.2	0.7
NM_006224	phosphatidylinositol transfer protein, alpha (PITPNA)	0.3	1.2
NM_000062	Serpin proteinase inhibitor (SERPING1)	0.3	0.8
NM_004370	collagen, type XII, alpha 1 (COL12A1)	0.3	1.3
NM_002345	lumican (LUM)	0.3	0.9
NM_001919	dodecenoyl-Coenzyme A delta isomerase (DCI)	0.3	0.8
NM_003254	tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1)	0.3	0.9
NM_014172	Phosphohistidine phosphatase 1 (PHPT1)	0.4	1.5
NM_006432	Niemann-Pick disease, type C2 (NPC2)	0.4	0.9
AF200348	Peroxidasin homolog (PXDN)	0.4	0.9
NM_000165	gap junction protein, alpha 1 (connexin 43)	0.4	0.9
NM_006096	N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1)	0.4	1.2
NM_001920	decorin (DCN)	0.4	1.0
NM_001908	cathepsin B (CTSB)	0.5	1.2
NM_001731	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative (BTG1)	0.5	1.0
NM_133503	decorin, transcript variant A2	0.5	1.2
NM_004385	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	0.5	1.2
NM_004512	interleukin 11 receptor, alpha (IL11RA)	0.5	0.9

Table 5. Genes specifically up- or down-regulated in late secretory phase endometrium with endometriosis

Ref. Seq.	Gene Title	E.S Ave.	L.S Ave.
Up-regulated genes			
NM_017526	leptin receptor overlapping transcript (LEPROT)	1.0	2.8
NM_006472	thioredoxin interacting protein (TXNIP)	1.2	3.4
NM_001219	calumenin (CALU)	1.0	1.9
NM_022783	DEP domain containing 6 (DEPDC6)	0.7	1.9
Down-regulated genes			
NM_020315	pyridoxal (vitamin B6) phosphatase (PDXP)	1.0	0.5

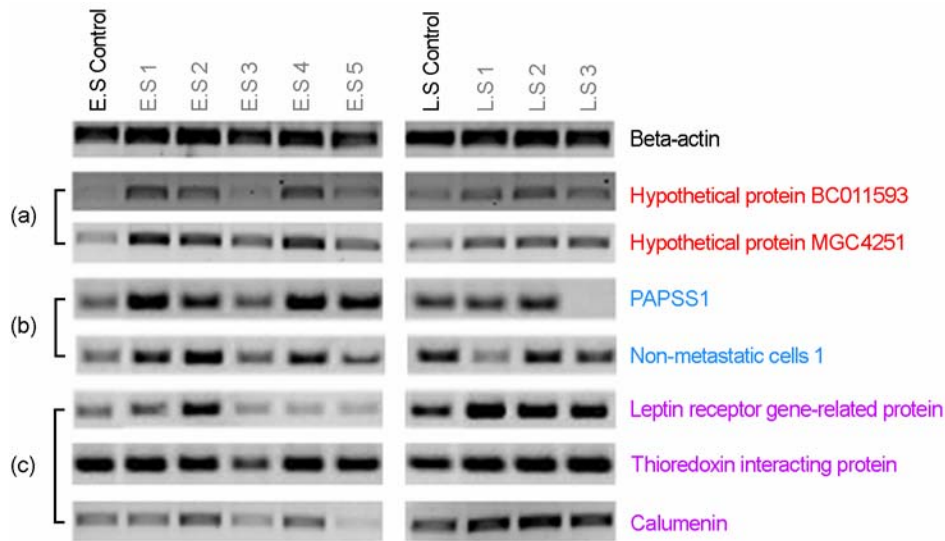


Figure 2. RT-PCR analysis of selected genes from cDNA array. The sample list are indicated at the top of each panel and the genes are shown on the right side of each lane.

- (a) Group of up-regulated genes during entire secretory phase: hypothetical protein BC011593 and MGC4251.
 (b) Group of up-regulated genes during early secretory phase: PAPSS1, Non-metastatic cell 1.
 (c) Group of up-regulated genes during late secretory phase: leptin receptor-related protein, thioredoxin interacting protein and calumenin.

E.S: Early Secretory, L.S: Late Secretory.

반통, 월경통 등을 초래하는 진행성 질환이다. 자궁내막증의 발생기전은 아직 명확하게 알려져 있지 않다. 1927년 Sampson은 월경혈의 역류에 의하여 자궁내막조직이 복강 내에 착상되어 발생할 것이라는 착상설을 제시하였고, 월경혈의 역류로 인하여 자궁내막조직이 복강액 내에 존재하는 것을 세포학적으로 증명되어 이 가설이 가장 널리 받아들여지고 있다.^{1,11,12} 이 외에도 체강상피 이상 분화설 (celomic metaplasia theory), 전이된 자궁내막조직이 자극을 주어 화생화반응 (metaplastic response)를 유발한다는 설, 자궁내막조직의 혈관, 임파관을 통한 전이설 등이 있다.¹³⁻¹⁵

실제로 월경을 하는 90% 이상의 여성에서 월경혈의 역류 현상이 일어나지만 월경혈의 역류 현상이 있는 여성 모두가 자궁내막증으로 진행되지 않는 점으로 미루어 보아 월경혈의 역류만이 아니라 다른 요인이 함께 존재하는 일부 여성에서 자궁내막세포들이 자궁 외 환경인 복강에서 착상이 되어 자궁내막증으로 이환된다고 가정할 수 있다. 자궁내막증이 발생하는 감수성을 증가시키는 부가적인 원

인으로 거론되고 있는 것이 유전적인 감수성의 차이, 역류되는 월경혈의 양적인 차이, 복강환경의 차이, 면역학적 감수성의 차이 등이며,⁵⁻⁸ 이처럼 자궁내막증은 여러 유전자 간의 상호작용에 의한 다유전적인 질환이자 환경적인 요인에 영향을 받는 다요인적인 질환으로 받아들여지고 있다.

자궁내막증이 유전적인 소인이 존재한다는 증거로서 Simpson 등은 자궁내막증의 유병률이 자궁내막증 환자의 직계 가족에서 대조군의 직계 가족과 비교하여 7배 정도 높다고 보고하였으며, Coxhead와 Thomas는 자궁내막증의 유병률이 환자의 직계 가족에서 6배 정도 높다고 하였다.^{16,17} 면역학적인 요인 또한 자궁내막증의 원인으로 여러 연구들 통해 제시되고 있다. 자궁내막증 환자의 복강액에서 대조군에 비하여 활성화된 대식세포의 증가가 관찰되는데, 이는 TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, VEGF, TGF- β 등의 높은 발현의 원인으로 설명하기도 한다.¹⁸ 또한 자궁내막증 환자의 복강액에서 NK 세포의 기능이 감소되어 있다는 보고도 있다.¹⁹

저자들은 자궁내막증 환자와 정상 대조군의 자궁

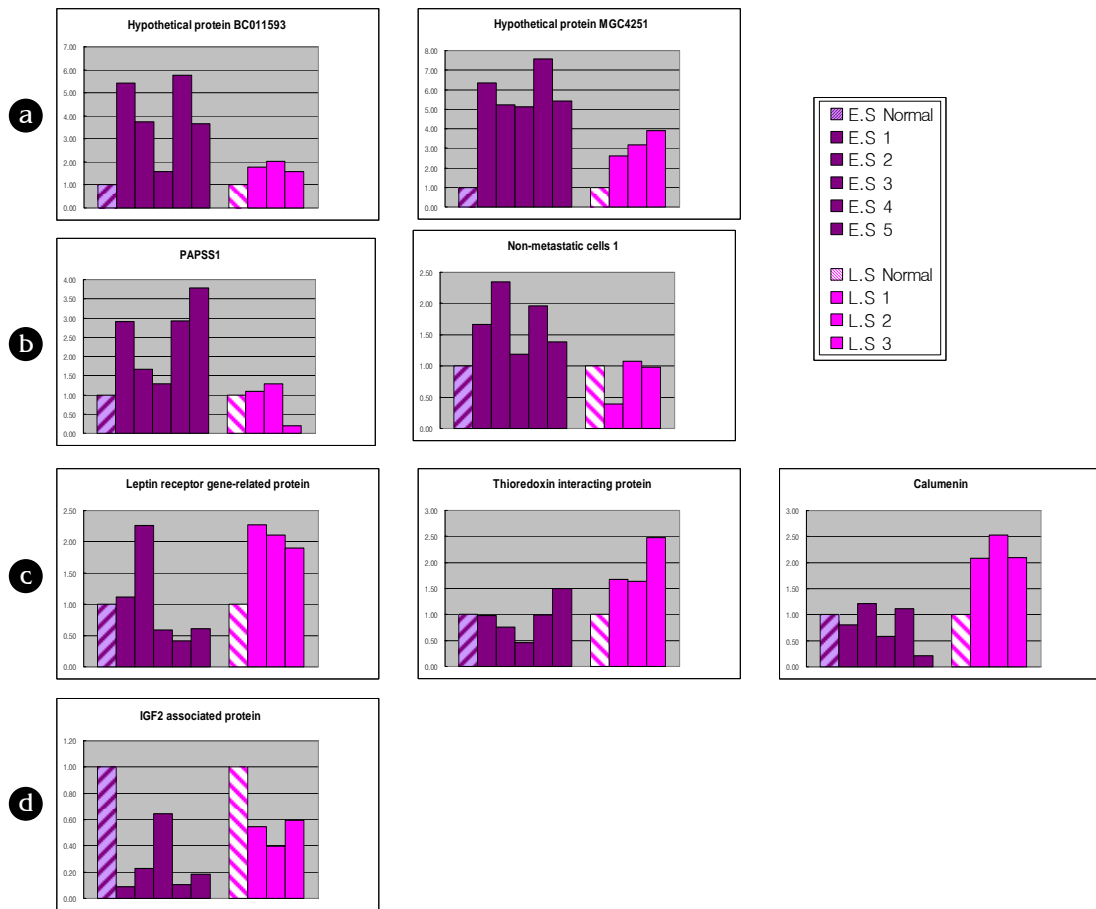


Figure 3. Quantitative analysis of gene expressions. Each band intensity of the RT-PCR product was measured using Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

- (a) Group of up-regulated genes during entire secretory phase: hypothetical protein BC011593 and MGC4251.
- (b) Group of up-regulated genes during early secretory phase: PAPSS1, Non-metastatic cell 1.
- (c) Group of up-regulated genes during late secretory phase: leptin receptor-related protein, thioredoxin interacting protein and calumenin.
- (d) The down-regulated gene during entire secretory phase: IGF-II associated protein.

E.S. Normal: Early secretory phase of normal endometrium, E.S: Early secretory phase with endometriosis, L.S. Normal: Late secretory phase of normal endometrium, L.S: Late secretory phase of endometriosis.

내막조직 간의 유전자 발현의 차이에 의해서 자궁 내막증 환자에서는 자궁내막증의 발생이 더욱 조장 되는 것이라는 가정 하에서 연구를 시행하였다. 또한 유전자 연구에 DNA microarray 기술을 도입함으로써, 한번에 한 개의 유전자 이상의 연구는 불가능했던 과거의 유전자 발현 연구의 제한점을 극복하였다. 또한, 유전자칩 실험에서 자궁내막증 환자의 자궁내막조직에서 공통적으로 증가하거나 감소된 유전자 및 분비기 초기에 특이적으로 증가하거나

나 감소된 유전자들을 대상으로 하여 그 기능에 따라 분류하였다.

자궁내막증에 이환된 여성의 자궁내막조직에서 대조군에 비하여 높게 발현되고 있는 것으로 나타난 유전자들은 ATP synthase H transporting F1 (ATP-5B), eukaryotic translation elongation factor 1, isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), mitochondrial ribosomal protein L3, ATP synthase H+ transporting (ATP5C1) 등으로 세포의 에너지 생성과 대사과정에 관여하는

유전자들이었다. 이들 유전자들은 역류성 월경으로 자궁내막조직이 복강내 환경에 노출되었을 때, 자궁내막조직 세포들의 생존을 유리하게 하는 작용을 하리라 생각된다.

Lipopolysaccharide (LPS) induced TNF- α factor 유전자도 자궁내막증 환자에서 높게 발현되었는데, 이 유전자는 염증반응 및 신호전달과 관련된 기능을 한다. LPS induced TNF- α factor는 TNF- α 가 작용하는 cascade 중 한 단계에 관여하리라 추측되지만, 정확한 기능과 작용기전에 대한 연구는 미진한 실정이다. Iwabe 등의 연구에 의하면 TNF- α 는 자궁내막 증 조직에서 interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) 등의 사이토카인 (cytokine)의 분비를 증가시키는 핵심 사이토카인이며, 이러한 TNF- α 에 의한 IL-8의 유도는 Nuclear factor (NF)- κ B의 활성화 과정을 통해 이루어 진다고 하였다.²⁰ 세균성 내독소인 LPS가 자궁내막증에서 사이토카인 분비를 유발하는 것으로 알려져 있는데, LPS는 TNF- α 의 유도를 통해서 endometrial stromal cells의 증식을 유도한다.²¹

또한 유전자칩 실험에서는 초기 분비기에서만 증가하는 결과를 보였지만 RT-PCR 결과에서는 분비기 전기간에 걸쳐 증가하는 양상을 보였던 Hypothetical protein MGC 4251 유전자는 NF- κ B와 MAP kinase 경로를 활성화하는 유전자로 최근에 알려지고 있는 유전자이다.²² NF- κ B는 평상시에는 세포질 (cytosol)에서 inhibitor κ B (I κ B)에 결합되어 있다.²³ 이러한 결합은 NF- κ B가 세포핵 안으로 이동하는 것을 방지한다. 여기에 염증을 유도하는 자극 (pro-inflammatory stimuli)이 I κ B의 인산화를 가져오며 이 결과 I κ B가 분해되어 결과적으로 NF- κ B가 떨어져 나와 핵안으로 들어가게 된다. 핵안으로 들어간 NF- κ B는 염증을 유도하는 사이토카인의 전사 (transcription)와 활성산소 (reactive oxygen) 생성에 관여하는 단백질과 효소의 합성을 조절한다.²⁴ 이번 연구에서 자궁내막증 환자의 자궁내막조직에서 LPS induced TNF- α factor 및 Hypothetical protein MGC 4251 등과 같이 TNF- α 및 NF- κ B 경로에 작용하는 것으로 여겨지는 유전자들이 공통적으로 발현이 증가된 점으로 미루어 보아 자궁내막증의 발병기전에 이들 경로가 관여할 수도 있을 것으로 생각된다.

한편 자궁내막증 환자의 자궁내막조직에서 대조

군에 비하여 낮게 발현된 IGF-II associated protein 은 세포의 성장에 관련된 IGF-II와 염기서열이 일치 하였다. 이외에도 EGF-containing fibulin-like EMP1, matrix G1a protein, TGF beta-induced, TGF beta receptor 1 (activin A receptor type II-like kinase), crystalline alpha B, fibulin 5, tissue inhibitor of metalloproteinase 3, collagen type XII, alpha 1, tissue inhibitor of metalloproteinase 1, decorin, 등의 유전자가 낮게 발현되어 있었다. 이런 유전자들은 세포의 기질을 구성하거나, 세포와 세포의 기질 (extracellular matrix) 간의 유착을 도와 주는 기능을 한다. 따라서 이런 유전자들의 발현이 자궁내막증 환자의 자궁내막에서 감소되어 있음으로서 월경시에 자궁내막의 역류의 양이 증가되어 자궁내막증의 발생을 더 용이하게 하는 것으로 생각 된다. EGF-containing fibulin-like EMP1는 세포가 세포의 기질에 유착되는 과정을 도와주며, matrix G1a protein, crystalline alpha B, fibulin 5, collagen type XII, alpha 1, lumican, decorin 등은 세포의 기질 및 결합 조직을 구성하는 중요 물질이다. Transforming growth factor-beta (TGF- β)는 섬유모세포의 증식 및 교원질 합성을 촉진하며, 동시에 fibronectin 분비와 integrin receptor 발현을 증가시켜 세포가 세포의 기질에 결합하는 것을 도와준다.²⁵ 즉 세포가 세포의 기질에 결합하는 것을 도와주거나 세포의 기질을 구성하는 물질을 합성하는 기능을 가지고 있는 유전자들이 낮게 발현됨으로서 정상인의 자궁내막조직보다 더 많은 양의 월경혈이 역류하도록 조장하여 자궁내막 증의 발병에 역할을 할 것으로 생각된다.

앞에서 언급한 바와 같이 본 연구에서는 자궁내막증 환자의 자궁내막에서 IGF-II associated protein의 유전자가 대조군에 비해 낮게 발현되었으며, 이는 real time RT-PCR을 통해서도 검증이 되었다. IGF는 single chain polypeptide로서 insulin과 구조 및 기능적으로 유사하며, 몸 전체에 분포하면서 특히 세포막수용체를 통하여 작용하는데, 성장호르몬에 반응하여 세포의 성장 및 분화에 관여한다. IGF는 in vitro에서 배양된 자궁내막 stromal cells의 강력한 mitogen으로서 보고된 바 있다.²⁶ 즉, 자궁내막조직의 증식 및 성장을 촉진하는 환경을 조성하는 것으로 생각해 볼 수 있다. Sbracia 등은 자궁내막증 환자와 대조군의 자궁내막 및 자궁내막증 조직에서

면역조직화학검사 (immunohistochemical study)를 통하여 IGF-I, IGF-II의 발현 차이에 대한 연구를 시행한 결과, IGF-II의 경우 자궁내막증 환자의 자궁내막조직에서는 대조군에 비해 발현이 감소되어 있었으며, 환자의 난소의 자궁내막증 조직과 복막의 섬유화 유착병변에서는 IGF-II의 발현이 전혀 관찰되지 않았다. 이는 본 연구 결과와도 유사한 것으로서 자궁내막증에서 세포의 성장과 분화를 조절하는 IGF 체계에 변화가 있음을 시사한다고 하겠다.²⁷

이상의 DNA microarray 및 RT-PCR을 통해 얻어진 결과에서 자궁내막증의 자궁내막조직에서 대조군에 비하여 유전자들의 발현에 차이가 있음을 확인하였다. 발현이 증가되거나 감소된 유전자 간의 상호작용의 가능성이나 이러한 유전자 발현의 차이가 자궁내막증의 원인인지 결과인지에 대한 의문이 여전히 남아 있는 상태이며, 본 연구에서 확인된 초기 분비기와 후기 분비기에서의 유전자 발현의 차이에 대한 고찰 또한 필요하리라 여겨진다. 또한 자궁내막조직의 면역조직화학적 염색 등을 통하여 발현 양상의 차이를 보이는 유전자의 기원을 밝혀내고, 아직 기능이 밝혀지지 않은 hypothetical protein에 대한 많은 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14: 422.
2. Berbieri RL. Etiology and epidemiology of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162: 565-7.
3. Mahmood TA, Templeton A. Folliculogenesis and ovulation in infertile women with mild endometriosis. *Hum Reprod* 1991; 6: 227-31.
4. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 151-4.
5. Lamb K, Hoffman RG, Nichols TR. Family trait analysis: A case-control study of 43 women with endometriosis and their best friends. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154: 596.
6. Cramer DW, Wilson E, Stillman RJ, Berger MJ, Belisle S, Schiff I, et al. The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking, and exercise. *JAMA* 1986; 255: 1904-8.
7. Ramey JW, Archer DF. Peritoneal fluid: its relevance to the development of endometriosis. *Fertil Steril* 1993; 60: 1.
8. Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 1991; 56: 45-51.
9. Claverie JM. Computational methods for the identification of differential and coordinated gene expression. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 182133.
10. Levenstien MA, Yang Y, Ott J. Statistical significance for hierarchical clustering in genetic association and microarray expression studies. *BMC Bioinformatics* 2003; 4: 62-70.
11. Badawy SZA, Cuenca V, Marshall L, et al. Cellular components in peritoneal fluid in infertile patterns with and without endometriosis. *Fertil Steril* 1984; 42: 704.
12. Bartosik D, Jacobs SL, Kelly LJ. Endometrial tissue in peritoneal fluid. *Fertil Steril* 1986; 46: 796.
13. Gompel C, Silverberg SG. The female peritoneum. *Pathology in gynecology and obstetrics*, 3rd edn., Philadelphia, U.S.A., JB Lippincott 1985; 411.
14. Steck WD, Helwing EB. Cutaneous endometriosis. *Clin Obstet Gynecol* 1966; 9: 373.
15. Halban J. Hysteroadenosis metastatica: die lymphogene genese der so. Adenofibromatosis heterotropica. *Wien Klin Wochenschr* 1924; 37: 1205.
16. Simpson JL, Elias S, Malinak LR, Buttram VCJ. Heritable aspects of endometriosis. I Genetic studies. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 137: 327-31.
17. Coxhead D, Thomas EJ. Familial inheritance of endometriosis in a British population. A case control study. *J Obstet Gynecol* 1993; 13: 42-4.
18. Witz CA. Interleukin-6: another piece of the endo-

- metriosis-cytokine puzzle. *Fertil Steril* 2000; 73: 212-4.
19. Koninckx PR, Barlow D, Kennedy S. Implantation versus infiltration: the Sampson versus the endometriotic disease theory. *Gynecol Obstet Invest* 1999; 47: 3-10.
 20. Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Tanikawa M, Oonahara Y, Terakawa N. Pathogenetic significance of increased levels of interleukin-8 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1998; 69: 924-30.
 21. Iba Y, Harada T, Horie S, Deura I, Iwabe T, Terakawa N. Lippopolysaccharide-promoted proliferation of endometriotic stromal cells via induction of tumor necrosis factor α and interleukin-8 expression. *Fertil Steril* 2004; 82: 1036-42.
 22. Matsuda A, Suzuki Y, Honda G, Muramatsu S, Matsuzaki O, Nagano Y, et al. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Oncogene* 2003 May 22; 22(21): 3307-18.
 23. Mckay LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses; interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endoc Rev* 1999; 20: 435-59.
 24. Yamauchi N, Harada T, Taniguchi F, Yoshida S, Iwabe T, Terakawa N. Tumor necrosis factor- α induced the release of interleukin-6 from endometriotic stromal cells by the nuclear factor- κ B and mitogen-activated protein kinase pathways. *Fertil Steril* 2004; 82: 1023-8.
 25. Goldman R. Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future. *Adv Skin Wound Car.* 2004; 17: 24.
 26. Irwin JC, De las Fuentes L, Dsupin BA, Giudice LC. Insulin-like growth factor regulation of human endometrial stromal cell function: coordinate effects on IGF binding protein-1, cellular proliferation, and prolactin secretion. *Regul Peptides* 1993; 48: 165-77.
 27. Sbracia M, Zupi E, Alo P, Manna C, Marconi D, Scarpellini F, et al. Differential expression of IGF-I and IGF-II in eutopic and ectopic endometria of women with endometriosis and in women without endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37(4): 326-9.

= 국문초록 =

목적: 자궁내막증은 자궁내부에 존재하여야 할 자궁내막조직이 자궁 외에 존재하는 질환으로 그 발생기전은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다. 이에 저자들은 자궁내막증 환자와 정상 대조군의 자궁내막조직 간의 유전자 발현의 차이가 자궁내막증의 발병과 관련이 있을 것이라는 가정 하에 DNA microarray 기술을 도입하여 연구를 시행하였다.

연구방법: 2002년 1월부터 2002년 12월까지의 기간 동안 본원 산부인과에서 자궁내막증 환자와 자궁내막증 이외의 다른 부인과적 질환으로 수술을 시행한 환자들을 대상으로 채취한 자궁내막조직으로 KNU 4.8K cDNA chip을 이용하여 유전자 발현을 비교 연구하였다. 유전자칩으로 자궁내막증 조직에서 발현의 증감을 보였던 유전자 중에서 8종의 유전자를 대상으로 RT-PCR이나 real time RT-PCR 법을 통하여 그 발현 양상을 검증하였다.

결과: 자궁내막증에 이환된 여성의 자궁내막조직에서 대조군에 비하여 높게 발현되고 있는 것으로 나타난 유전자들은 ATP synthase H transporting F1 (ATP5B), eukaryotic translation elongation factor 1, isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), mitochondrial ribosomal protein L3, ATP synthase H+ transporting (ATP5C1), LPS induced TNF- α factor 등으로 세포의 에너지 생성과 대사과정 및 신호전달에 관여하는 유전자들이었다. 한편 자궁내막증 환자의 자궁내막조직에서 대조군에 비하여 낮게 발현된 유전자들은 insulin like growth factor II associated protein, EGF-containing fibulin-like EMP1, matrix G1a protein, TGF beta-induced, TGF beta receptor 1 (activin A receptor type II-like kinase), crystalline alpha B, fibulin 5, tissue inhibitor of metalloproteinase 3, collagen type XII, alpha 1, tissue inhibitor of metalloproteinase 1, decorin 등으로 세포외기질의 구성 및 기능에 관련이 있었다.

결론: 이상의 DNA microarray 및 RT-PCR을 통해 얻어진 결과에서 자궁내막증의 자궁내막조직에서 대조군에 비하여 유전자들의 발현에 차이가 있음을 확인하였다.

중심단어: 자궁내막증, 병인론, DNA microarray, 유전자 발현